

博士論文概要

論文題目

Simple and accurate methodology for quantification of genetic markers in acute leukemias and myeloproliferative neoplasms

急性白血病と骨髄増殖性腫瘍における遺伝子マーカーの
簡便・正確な定量手法

申請者

Soji	Morishita
森下	総司

生命医科学専攻 環境生命科学研究

2010年 12月

バイオマーカーは、生体の特定の疾病の存在や状態の指標となる物質を指し、核酸、ペプチド、タンパク質、脂質代謝物等、対象は多岐にわたる。なかでも核酸由来バイオマーカー（マーカー遺伝子）は遺伝子定量手法の発展・普及により比較的簡便に検出あるいは定量できるため、病態の診断、治療の予後予測、病態のモニタリングに利用されるなど、臨床の現場へ着実に応用されつつある。このような試みは、がん分野において積極的に行われているが、特に血液疾患における進歩はめざましく、他のがん分野を常に牽引してきた。例えば、慢性骨髄性白血病（chronic myeloid leukemia: CML）患者の90%以上に、CMLのマーカー遺伝子であるBCR/ABLキメラ遺伝子が存在することが知られている。BCR/ABLキメラ遺伝子はCML診断の極めて有効な指標であるばかりか、BCR/ABLキメラ遺伝子のABLキナーゼドメインにおける点突然変異の有無や種類が薬剤選択の指標となるため、治療の予後予測が立てやすい。さらには、BCR/ABLキメラ遺伝子量を定量することで、治療の経過を容易にモニタリングできる。

これまで述べてきたように、マーカー遺伝子は病態の診断・判定の指標としての利用に留まらず、治療の予後予測、病態のモニタリングなどにも利用されており、今後、新たなマーカー遺伝子の探索・同定、および同定されたマーカー遺伝子の検出・定量技術は重要な位置を占めると考えられる。事実、近年、網羅的な遺伝子解析、ゲノム解析を可能とする様々な手法が確立され、それらを用いた解析により、新たなマーカー遺伝子が次々と発見・報告されている。それに伴い、病態診断の拠り所として、また、治療の予後予測や病態モニタリングの手段として、マーカー遺伝子の定量の必要性が高まっている。そこで、本研究では造血器腫瘍関連、特に白血病と骨髄増殖性腫瘍のマーカー遺伝子を定量するための新規な遺伝子定量技術の確立を目的とした。

本論文は5章から構成されている。以下に各章の概要について述べる。

第1章では、造血器腫瘍のマーカー遺伝子と、その検出・定量技術に関する既往の知見および問題点を、最近の研究動向を踏まえつつ概説し、本研究の研究背景をまとめるとともに、本研究の意義および目的を明らかにした。

第2章では、白血病（特に急性白血病）の汎用マーカー遺伝子として臨床検査へ実用化されたWilms Tumor 1 mRNA (WT1 mRNA)の発現量を、既存手法と比較し、より迅速、簡便に定量するための新たな定量系を確立した。まず、reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP)法を用い、WT1 mRNAの迅速・簡便な定量系を構築した。RT-LAMP法はreverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)法のように温度変化を必要とせず、等温条件下で対象遺伝子を増幅可能な新規遺伝子増幅手法である。また、RT-PCR法ではRNAの逆転写反応とその後の増幅反応を別々に実施する必要があるのに対し、RT-LAMP法は等温反応であるため、逆転写反応と増幅反応が同時に起こり、比較的短時間で反応が終了するという利点を有する。さらに、遺伝

子増幅反応の副産物であるピロリン酸マグネシウムの生成量を濁度としてリアルタイムに測定することで、対象の遺伝子量を定量することも可能である。このような利点により、RT-LAMP法をWT1 mRNA定量へ応用できれば、迅速・簡便な白血病の病態モニタリングが可能になると期待される。WT1 mRNAを特異的に増幅させるような短鎖DNAオリゴ（プライマー）のセットを設計し、それらを用いてRT-LAMP法によるWT1 mRNAの増幅を試みたところ、10コピーのWT1 mRNAを30分程度で検出できた。さらに、HeLa株抽出RNAにWT1 mRNAを既知量混入させたものを測定用サンプルとして調整し、これらサンプル中のWT1 mRNA量をRT-LAMP法およびリアルタイムRT-PCR法でそれぞれ定量した。その結果、両手法とも真値に近い値を示すことが明らかとなった。これらの結果により、RT-LAMP法はリアルタイムRT-PCR法と同等の定量精度を持ちながらもより迅速・簡便に白血病の病態をモニタリングできる手法であることが示唆された。つづいて、より正確な病態モニタリング実現のため、遺伝子の増幅阻害物質混入下でも正確な遺伝子定量が可能な手法である Alternately Binding quenching probe Competitive(ABC)法をRT-PCR法と組み合わせ(ABC RT-PCR法)、WT1 mRNAの簡便・正確な定量手法の確立を試みた。ABC RT-PCR法では、対象となる遺伝子と等しい増幅効率で競合的に増幅される内部標準遺伝子を既知量、反応系に添加し、反応を行う。反応系にはグアニン塩基との電子移動により蛍光強度が著しく消光する性質を持った蛍光色素がラベルされたプローブが添加されており、増幅反応後の蛍光強度が対象遺伝子と内部標準遺伝子の割合を反映するため、対象遺伝子量を算出できる。本手法最大の特長は内部標準法であるために遺伝子の増幅阻害物質の影響を数学的に打ち消すことのできる点であり、既存手法と比較して、より正確な定量が可能となる。急性白血病患者2名より経時的に採取した骨髄サンプルよりトータルRNAを抽出し、これらのサンプル中のWT1 mRNA発現量をABC RT-PCR法にて定量したところ、各々の患者の病態に従ってWT1 mRNA発現量が増減する様子が確認され、ABC RT-PCR法により白血病の病態モニタリングが可能であることが示唆された。

第3章では、骨髄増殖性腫瘍(myeloproliferative neoplasm:MPN)において2005年に報告されたマーカー遺伝子であるJanus Kinase 2(JAK2)遺伝子の点突然変異(JAK2V617F)のアレルバーデン((変異JAK2遺伝子量/JAK2全遺伝子量)×100%)について、簡便・低コスト・正確な定量手法の構築を行った。第2章にて触れたABC法をPCR法と組み合わせ(ABC-PCR法)、JAK2アレルバーデン定量へ応用することにより、既存の手法と比較して、より簡便に低コストで、かつ、正確に対象のJAK2アレルバーデンを定量することが可能である。ABC-PCR法では、増幅反応後の蛍光値が対象のアレルバーデンに依って変化するため、PCR法により対象のDNAを増幅し、その後蛍光強度を測定するのみで対象のJAK2アレルバーデンを定量することが可能である。また、スループッ

トが既存手法であるリアルタイムアリル特異的 PCR (リアルタイム Allele Specific PCR : リアルタイム AS-PCR) 法の約 2 倍であるため, ランニングコストをおよそ半分に抑えることができる。ABC-PCR 法の定量精度確認のため, UT-7 株 (JAK2 野生型株) 抽出 DNA と HEL 株 (JAK2 変異型株) 抽出 DNA を任意のアレルバーデンとなるように混合し, 模擬定量サンプルを調整した。これらの JAK2 アレルバーデンを ABC-PCR 法とリアルタイム AS-PCR で定量し, その値を真値と比較した。その結果, ABC-PCR 法はアレルバーデン 10%~90%の範囲においてリアルタイム AS-PCR よりも真値をよく反映した値を示し, リアルタイム AS-PCR はある程度の真値からのずれを許容すればアレルバーデン下限値 1%まで定量可能であるという結果を得た。これにより, ABC-PCR 法は定量下限においては既存手法に劣るが, アレルバーデン 10%~90%までの範囲では, 既存手法よりも正確に対象のアレルバーデンを定量可能であることが示唆された。最後に, MPN 患者と健常者より採取した血液サンプルより DNA を抽出し, それらのサンプル中の JAK2 アレルバーデンを ABC 法, リアルタイム AS-PCR 法でそれぞれ定量し, その値を比較した。その結果, アレルバーデン下限値 10%までにおいて両者の定量結果には相関性があった。これにより, ABC-PCR 法は既存手法と比較し, アレルバーデン 10%~90%の範囲では, 簡便・低コスト・正確に対象の JAK2 アレルバーデンを定量できる手法であることが示された。

第 4 章では, 第 3 章にて確立した ABC-PCR 法による JAK2 アレルバーデン定量のための標準サンプルの作製・評価手法を提案した。近年, 標準曲線を用いた相対的な定量 (相対定量) ではなく, 直接的な定量 (絶対定量) によって対象の遺伝子数を測定する新たな手法 (デジタル PCR 法) が確立された。本手法により, 対象の遺伝子数やアレルバーデンを直接定量することが可能であるが, ランニングコストの高さとスループット性の低さから, 定量系としての実用化は難しい。そこで, デジタル PCR 法をアレルバーデンの値を保証された標準サンプル作製のために運用することを考えた。これによって, コストを最小限に抑えつつ, 定量の正確性を担保できると期待される。まず, AS-PCR を基盤としてデジタル PCR 法により JAK2 アレルバーデンを定量できるような反応条件を検討した。つづいて, これを用いて野生型 JAK2 遺伝子量と変異型 JAK2 遺伝子量をデジタル PCR 法で定量し, その定量値をもとに ABC-PCR のための標準サンプルを作製した。最後に, 作製した標準サンプルを用いて ABC-PCR 法を実施し, アレルバーデンの真値を忠実に反映した定量結果を得られることを確認した。

第 5 章では本論文を総括した。

以上, 本論文では造血器腫瘍, 特に白血病と骨髄増殖性腫瘍のマーカー遺伝子を簡便・低コスト・正確に検出・定量できる手法の確立を行った。本成果は今後さらに発見がなされてゆくものと予想される種々のマーカー遺伝子の検出・定量へも応用可能であり, 臨床検査医学の分野に大きく寄与できるものと期待される。

早稲田大学 博士（工学） 学位申請 研究業績書

氏名 森下 総司 印

(2010年11月 現在)

種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む）
論文 ○	<p>(1) (報文) <u>Soji Morishita</u>, Aya H. Koda, Keita Kirito, Norio Komatsu, Yuji Sekiguchi, Satoshi Tsuneda, and Naohiro Noda, A simple, cost-effective, and accurate quantification method for JAK2V617F allele burden in myeloproliferative neoplasms by fluorescence quenching probe, <i>Haematologica</i> (submitted).</p> <p>(2) (報文) Hidenori Tani, Ryo Miyata, Kouhei Ichikawa, <u>Soji Morishita</u>, Shinya Kurata, Kazunori Nakamura, Satoshi Tsuneda, Yuji Sekiguchi, and Naohiro Noda, Universal quenching probe system: flexible, specific, and cost-effective real-time PCR method, <i>Analytical Chemistry</i> 2009; 81: 5678-5685.</p> <p>○ (3) (報文) <u>Soji Morishita</u>, Hidenori Tani, Shinya Kurata, Kazunori Nakamura, Yuji Sekiguchi, Satoshi Tsuneda, and Naohiro Noda, Real-time reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for rapid and simple quantification of WT1 mRNA, <i>Clinical Biochemistry</i> 2009; 42: 515-520.</p>
講演 (国際)	<p>(1) <u>Soji Morishita</u>, Naohiro Noda, Yuji Sekiguchi, Aya H. Koda, Yuriko Yahata, Keita Kirito, Satoshi Tsuneda, and Norio Komatsu, Alternately Binding Quenching Probe Competitive PCR: Simple, Sensitive, and Cost-Effective JAK2 Allele Burden Quantification Method, The 52nd ASH annual meeting, Orlando, FL, USA, December 2010 (accepted).</p>
講演 (国内)	<p>(1) <u>森下 総司</u>, 谷 英典, 蔵田 信也, 中村 和憲, 常田 聡, 関口 勇地, 野田 尚宏, RT-LAMP 法を用いた白血病マーカーWT1 mRNA の迅速・簡便定量技術の開発, 化学工学会第74年会, 横浜, 2009年3月</p> <p>(2) <u>森下 総司</u>, 谷 英典, 蔵田 信也, 中村 和憲, 常田 聡, 関口 勇地, 野田 尚宏, Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP)法を用いた白血病マーカーWT1 mRNA の迅速・簡便定量技術の開発, 第60回生物工学会大会, 仙台, 2008年8月</p> <p>(3) <u>森下 総司</u>, 谷 英典, 寺村 達也, 足立 賢, 常田 聡, 蔵田 信也, 中村 和憲, 金川 貴博, 関口 勇地, 野田 尚宏, 新規遺伝子定量手法 ABC-LAMP 法の開発, 化学工学会関東・東北・北海道合同支部大会, 東京, 2007年11月</p>

早稲田大学 博士（工学） 学位申請 研究業績書

種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む）
その他	<p>(1) (特許) 野田 尚宏, 関口 勇地, <u>森下 総司</u>, 常田 聡, 小松 則夫, 蓮沼 彩, 桐戸 敬太, JAK2遺伝子の変異解析方法, 特願2010-174571</p> <p>(2) (新聞掲載) 白血病, 30分で症状把握, 日経産業新聞, 2008年8月</p> <p>(3) (受賞) 平成19年度化学工学会学生賞, 2007年11月</p>