

一般演題抄録

I-1 ORNi-PCRによる固定組織の塩基配列差異の高感度検出法の開発

○堀野 友里 清水 武史 藤田 敏次 藤井 穂高
(弘前大学大学院医学研究科 ゲノム生化学講座)

Oligoribonucleotide (ORN) interference-PCR (ORNi-PCR) は、PCR 増幅領域の塩基配列に相補的な 17~29 塩基の ORN (短鎖 RNA) を増幅領域にハイブリダイズさせ、プライマー伸長反応を阻害することで塩基配列特異的に増幅を抑制する技術である。ORN 結合部位に変異がある場合、ORN はハイブリダイズせず PCR 増幅される。ORNi-PCR 法は安価かつ簡便に実施可能であり、演者らはこれまでに (1) がん細胞やゲノム編集済み細胞の遺伝子における一塩基変異の検出、(2) 同一遺伝子内の複数箇所に生じる一塩基変異の同時検出、(3) 固定組織から精製した DNA や未精製の血液を鋳型とした塩基配列差異の検出、(4) ゲノム中の DNA メチル化の検出が可能であることを示した。本技術は臨床診断や検査での利用が期待されるが、そのためには検体中の多数の正常細胞に混在する極僅かな変異細胞の遺伝子を高感度に検出する必要がある。そこで、本研究はラットおよびヒトの固定組織をサンプルとして ORNi-PCR による塩基配列差異の検出感度を検討した。

ラット *glutathione S-transferase mu 1 (GST-M1)* 遺伝子における二塩基多型 (GA 塩基型と TT 塩基型) を塩基配列差異のモデルとして、GA 型塩基配列に相補的な ORN を作製した。GA 型および TT 型ラットの肝固定組織より DNA を抽出し、両 DNA を混合して ORNi-PCR による TT 型の検出感度を解析した。実験の結果、GA 型 DNA に TT 型 DNA を 0.5%含む鋳型において、GA 型 *GST-M1* 遺伝子は ORN によって増幅が抑制され、TT 型 *GST-M1* 遺伝子は増幅した。

次に、ヒト非小細胞肺がんのドライバー遺伝子である上皮細胞増殖因子受容体 (*epidermal growth factor receptor, EGFR*) 遺伝子の野生型塩基配列に相補的な ORN を作製した。野生型および L858R 一塩基変異型の固定組織より DNA を抽出し、両 DNA を混合して ORNi-PCR による L858R 変異型の検出感度を解析した。実験の結果、野生型 DNA に変異型 DNA を 5%含む鋳型において、野生型 *EGFR* 遺伝子は ORN によって増幅が抑制され、変異型 *EGFR* 遺伝子は増幅し L858R 変異が検出された。

いずれの解析においても、検体中の多数の野生型配列の増幅を ORN によって抑制し、混在する極僅かな塩基配列差異を検出できたことから、ORNi-PCR は高い検出感度を有することが示された。本研究の成果は、臨床検体を用いた遺伝子疾患やがんの早期診断など、医療分野における塩基配列差異の高感度検出法の確立に寄与すると考える。