

(別紙1)

総括研究報告書

)

課題番号：2019B-17

課題名：デジタルPCRと並列シグナルを使った新規融合遺伝子検出法の開発

主任研究者 (所属施設) 国立研究開発法人 国立成育医療研究センター
(所属・職名 氏名) 病理診断部・統括部長 義岡 孝子

(研究成果の要約) 融合遺伝子の存在を確認する方法として FISH 解析は有効であるが、蛍光標識の分離 (split signal) を目視で判断することはしばしば困難であるため、客観的数値を (遺伝子コピー数) を検出可能なデジタル PCR を用いた融合性遺伝子の検出を目的とした新規検出法の開発を試みる。横紋筋肉腫でしばしば認められる PAX3-FOXO1 キメラ遺伝子を target として、primer-probe デザインを行い、pilot case として検討した。対照として、PAX3-FOXO1 キメラ遺伝子を有さない神経芽腫細胞株の NBI 細胞株を培養し回収した細胞より DNA 抽出を行った。これらの DNA サンプルと primer-probe セットを用いての ddPCR を行うにあたり、温度条件とサンプル濃度の検討を行った。至適温度と至適サンプル濃度で ddPCR を行ったところ、target と control の両方あるいはいずれかが進行、もしくは両方ともに進行しない 4 種の droplet が明確に分離することができた。デジタル PCR での検討を進める上での基礎的な検討が完了した。

1. 研究目的

本研究の目的：融合相手が複数存在する融合遺伝子の存在を確認するには、split signal を用いた FISH 解析が有効である。しかし、2 種類の蛍光標識の分離を判断する split signal では、人為的エラーも含め目視による判断が非常に困難である。そこで、人為的エラーを少なくするため客観的数値 (遺伝子コピー数) を検出可能なデジタル PCR を用いた融合性遺伝子の検出を目的とした新規融合遺伝子検出法の開発を考案する。

2. 研究組織

(主任研究者)
義岡 孝子 国立成育医療研究センター病理診断部
(研究協力者)
大喜多 肇 国立成育医療研究センター病理診断部非常勤医師
加藤 元博 国立成育医療研究センター小児がんセンター
早田 正和 長崎大学病院 ゲノム診療センター がんゲノム診療部門
辰野 美知子 国立成育医療研究センター病理診断部

小野 ひろみ 国立成育医療研究センター病理診断部

3. 研究成果

2019 年度の研究計画では、「融合遺伝子特異的 primer-probe デザインの検討」を研究目的としていた。研究計画申請の段階では、肺がんの融合遺伝子を target モデルとしていたが、当センターにおける疾患モデルとしては不適であることから、軟部腫瘍の中でも発生頻度が高い rhabdomyosarcoma においてしばしば発見される PAX3-FOXO1 キメラ遺伝子を target として、primer-probe をデザインし pilot model ケースとして検討することとした。PAX3-FOXO1 キメラ遺伝子を有するヒト細胞株として数種が確立されているが、RH30 細胞株は、論文において breakpoint が明確に解析されており (PLOS GENETICS DOI:10.1371/journal.pgen.1004951)、PAX3 は NC_000002.12 の 3886、FOXO1 は NC_000013.11 の 58063 がそれぞれの breakpoint となり融合していることが報告されている。この情報をもとに chimera(+)

の合成遺伝子 DNA を作製し、正常遺伝子の DNA と比較検討することで、primer-probe デザインの場所を新規に確定することができ、デジタル PCR を実際に行い、その特異性や精度の検討を行うことが可能となった。

(1) RH30 細胞株と同じ breakpoint を有するキメラ遺伝子 DNA の合成：RH30 細胞株の PAX3-FOXO1 キメラ遺伝子と同じ breakpoint を有する 1280bp のキメラ遺伝子 DNA 断片を合成した。以後この DNA を RH30 (1280)DNA と表す。

(2) 対照となる PAX3-FOXO1 キメラ遺伝子を有さない DNA の調製：病理診断部において所有していた神経芽腫細胞株の NBI 細胞株を培養し回収した細胞より DNA 抽出を行った。NBI 細胞株は、牛胎児血清 FCS を 10% に含む RPMI1640 培養液を用いて 5%CO₂ インキュベーター内で培養し、DNA は QIAGEN 社の QIAamp DNA Mini Kit を用いて回収した。

(3) デジタル PCR (ddPCR) 解析を行うための primer-probe 設計：PAX3-FOXO1 キメラ遺伝子を構成するために発生するそれぞれの遺伝子の breakpoint は、個々の症例によって様々であることが、いくつかの PAX3-FOXO1 キメラ遺伝子細胞株を解析することで明らかになっている^{1),2)}。今回は、RH30 細胞株の breakpoint の部分を用いて、デジタル PCR 解析法を用いて PAX3-FOXO1 キメラ遺伝子の有無を判定するための pilot test として primer-probe 設計を検討した。

① chimera (-)DNA、chimera (+)DNA の PAX3 塩基配列で、どちらにも共通して PCR が進行する primer-probe 構成 (PAX3-control1)、② chimera (-)DNA の PAX3 塩基配列では PCR が進行するが chimera (+)DNA では PCR が進行しない primer-probe 構成 (PAX3-Target1) と、③ chimera (+)DNA では PCR が進行するが chimera (-)では PCR が進行しない primer-probe 構成 (Pax3-Target2) を作製し、RH30 (1280)DNA と NBI 細胞株より抽出した

DNA (以下 reference DNA と記す) を template として解析を行い、結果を比較検討する。

(4) reference DNA の制限酵素処理：培養細胞より抽出した reference DNA は長鎖で、1280 bp の RH30 (1280) と同重量で比較すると断片数で大きな差が発生してしまうため、上記で設計した primer-probe 構成部分に影響しない部位に切断配列を持つ制限酵素で reference DNA を処理する。制限酵素 CviQI は DNA の GTAC 配列部を切断する酵素で、上記の配列の PAX3-control1 と PAX3-Target1 との間を切断するが PCR には影響がないので、reference DNA は CviQI で処理したものをを用いる。以後この DNA を chimera (-)DNA と表す。

(5) ddPCR の基礎検討

これらの DNA サンプルと primer-probe セットを用いての ddPCR を行うにあたり、BIO-Rad 社製 QX200 AutoDG Droplet Digital PCR システムを用いて ddPCR サンプルとなるドロップレットを作製し、同じく BIO-RAD 社の C1000 Touch サーマルサイクラーで PCR を行い、Proplet Reader (BIO-RAD) を用いて測定、QuantaSoft で解析を行った。これらの primer-probe を用いての ddPCR を行うにあたり、optimal な反応条件を決定するために基礎検討を行った。

① 温度条件の検討

chimera (-)DNA と RH30 (1280)DNA を用いて、ddPCR のアニーリング温度を 50°C から 63°C までの 8 段階に設定し PCR を行った。PCR 条件は、denature (95°C : 10 分)、cycle (94°C : 30 秒 + 50-63 °C : 1 分、40 cycle)、Final heating (98°C : 10 分) で行った。その結果、50°C で行うのが最も PCR 反応がよいことが判明したので、アニーリング温度は 50°C で行うことに決定した。

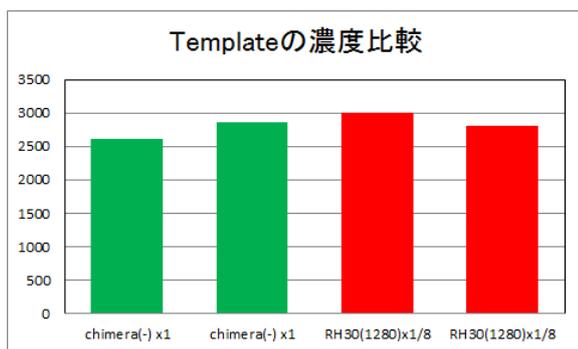
② サンプル濃度の検討

chimera (-)DNA と RH30 (1280)DNA とでの PAX3 control-1 を用いた ddPCR において

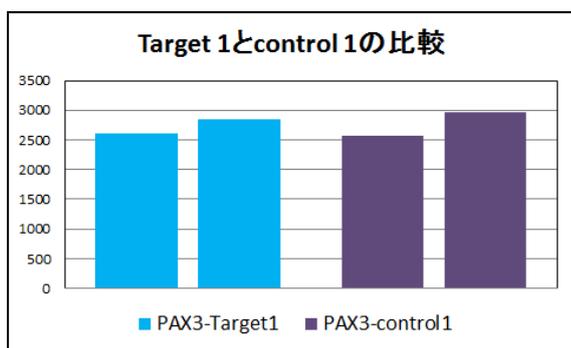
droplet 量が均衡する DNA 濃度を検索するために、chimera(-)DNA は 20ng/μL を基準に 2 倍希釈系列を 8 段階で作製、RH30(1280)DNA は 1.6×10^4 copy/μL を基準に 2 倍希釈系列を作製し、各々 PCR の well に 1μL 添加し ddPCR を行った。PCR 条件は先の PCR 条件をもとに、アニーリング温度を 50 °C とし、アニーリング反応時間を 2 分に設定し、40 cycle で行った。

その結果、chimera(-)DNA の基準液 (x1) と RH30(1280)DNA の 1/8 希釈液で相対する droplet が得られることがわかった。これは copy 数に換算すると、約 300 copy/μL (PCR 反応液 1 μL 中) となった。

また、この条件で PAX3-Target1 と PAX3-control1 の event 数を比較すると、ほぼ 1 : 1 となり、良好な結果が得られた。



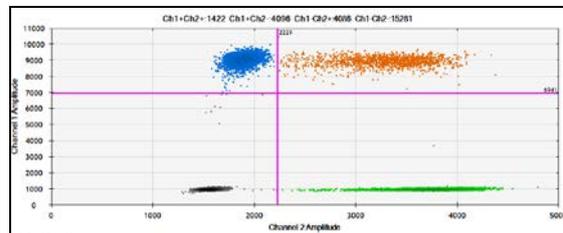
Template の濃度を比較した結果を示す。



PAX3-Target1 と PAX3-control1 の event 数がほぼ均衡していることを示す。

上記(5)の検討を PAX3-Target2 も含め行った結果を総合し条件を整えることによって、下図のように Target と control

の両方の PCR が進行する droplet (オレンジの dot)、Target または control のどちらかの PCR のみが進行する droplet (青または緑の dot)、どちらの PCR も進行しない droplet (黒の dot) の 4 種が明確に分離し観察できることが示された。



これらの検討結果を踏まえ、今後は種々の PAX3-FOXO1 キメラを有する細胞株や腫瘍組織について解析を進める。さらに別の種のキメラ遺伝子についても解析を進めていく予定である。

4. 研究内容の倫理面への配慮

培養細胞は、ISO9001 承認済の理研バイオリソースセンターより購入する。

ヒトの検体での FFPE の使用は余剰標本から使用する。使用にあたっては、倫理審査申請受理後に使用する

(参考文献)

1) Vicenta-Garcia C. et al. Genome Biology (2017)

18:106. regulatory landscape fusion in rhabdomyosarcoma through interactions between the *PAX3* promoter and *FOXO1* regulatory elements

2) Chalk J. et al. Oncogene (1997) 15, 1199-1205.

Translin recognition site sequences flank chromosome translocation breakpoints in alveolar rhabdomyosarcoma cell lines。