

## 総括研究報告書

1. 研究開発課題名：「早期診断マルチバイオマーカー開発」（がん診断のための血中メチル化 DNA の簡易検出法の開発）

2. 研究開発代表者： 岡本晃充（国立大学法人東京大学 先端科学技術研究センター）

3. 研究開発の成果

①モデル実験系による試験実験と条件最適化

ICON プローブによるメチル化 DNA 捕捉反応の基本的な反応条件として、熱変性 DNA サンプル 1~10 ng を、ICON プローブ、およびオスミウム酸カリウムなどを含む緩衝液中で、4℃、1 時間反応させた。ICON プローブの 5' 末端には、反応点と反応効率を明らかにするために蛍光色素をあらかじめ装着しておいた。フィルター濾過等で回収後、ゲル電子泳動で定量した。実証実験可能なメチル化 cfDNA 解析に特化した反応条件への最適化を進めた結果、高感度シグナル、つまり数コピーレベルでの検出が理論上で可能であることを確認した。

1) cfDNA の定量性…サンプル量を変えて実験を行い反応の定量性を確認した。

2) 感度、特異度…高感度シグナル、つまり数コピーレベルでの検出が理論上で可能であることを確認した。

3) 複数プローブの組み合わせによる定量性、感度、特異度…プローブを組み合わせても定量性、感度、特異度に悪影響はないことを確認した。

②エピゲノムシーケンシングデータからメチル化配列のピックアップ

エピゲノムシーケンシングデータから標的メチル化配列が選別された。臨床検体から収集したエピゲノムシーケンシングデータをもとに、CpG ショア領域を中心に 30 プローブ配列まで絞り込んだ。選抜においては、ICON プローブの作成に支障がないか、類似の配列が他に存在しないかについても十分に加味された。条件検討をした結果、現在少なくとも 1 プローブ配列については、メチル化 DNA を検出できるデータを獲得した。

③検体からの cfDNA の精製

肝細胞癌患者の術前血液を遠心分離して得られた血漿より QIAmp circulating Nucleic Acid (Qiagen) を用いて cfDNA を精製した。1mL の血漿より精製した cfDNA を Qubit dsDNA HS kit で定量したところ、155 症例での平均収量は、61.8 ng であり、腫瘍の分化度によらず 90%以上の症例で 10 ng 以上を得た。Agilent TapeStation により cell-free DNA の断片長は 180~200bp であることを確認した。

④検体サンプルを用いた実験系の確立

cfDNA モデルを用いて、反応条件の確認を行い、液相条件での最適な反応条件を導き出した。続いて、微量サンプルからの cfDNA 検出に向けて、ICON プローブをガラス基板に固定化した。ここでは、2 種類の ICON プローブ配列について検討した。ICON プローブアレイは、横 5 スポット、縦 4 スポットを 2 ブロックで計 40 スポットを 1.3mm×3.0mm のエリアの中に作成された。ここへ、蛍光標識した cfDNA モデルを流し込み、その蛍光量を測定した。その結果、標的配列特異的、標的濃度特異的な蛍光が各スポットから観察された。しかし、まだバックグラウンド蛍光が強く、定量性が低い。洗浄方法を含めた DNA アレイを用いることによるさらなる条件検討が必要である。

⑤肝がんに関連する血液の収集、および血漿もしくは精製 cfDNA としての蓄積

肝がんに関連する血液を収集し、血漿もしくは精製 cfDNA として蓄積した。合計 104 人の肝細胞がん患者より術前血液 12mL を採取し、EDTA 処理および遠心分離によって約 6ml の血漿を得た。得られた血漿 1mL から cfDNA を精製した（cfDNA 精製法については前項に述べたとおり）。