

## 検査偽陽性の評価方法

5-メチルシトシンの脱アミノ化に由来する偽陽性の評価方法

島津 光伸, 野上 祥平

### 1 はじめに

肺がんにおけるEpidermal Growth Factor Receptor (EGFR) T790M 変異は、チロシンキナーゼインヒビター (TKI) 治療により誘発される薬剤耐性変異である。本変異は、ACG から ATG へのミスセンス変異、CpG シトシンからチミンへの変異である。本変異を有する患者に有効な治療薬が開発され本変異の高感度検出が望まれているが、TKI 未投与の患者から採取した組織を凍結保存した場合と FFPE とした場合で T790M 変異の検出率が大きく異なる例も報告されており、FFPE 検体におけるアーチファクトの可能性が示唆されている<sup>1)2)</sup>。今回、CpG シトシンに由来するアーチファクトの量を推定する新たな方法を構築したので、EGFR T790M 変異検出例と共に本法を紹介する。

### 2 背景

近年、保険診療の一つとして肺がんや大腸癌における分子標的薬の効果予測する遺伝子変異検出検査が増加してきた。肺癌や大腸癌など固形がんの検査では病理検査が一般的である。固形がんの遺伝子検査では正常部位とがん部位を区別し特定することやがん細胞の存在率を確認する必要があることから、病理検査と共通するホルマリン固定パラフィン包埋切片 (FFPE) を検査材料とすることが多い。FFPE を検査材料とする PCR 法など核酸増幅法では、検査材料の量と質が大きな問題となる (図 1)。量の問題とは、検査材料に含まれる増幅可能な核酸の量である。遺伝子検査に適した FFPE を作製法については、日本病理学会よりガイドライン<sup>3)</sup>が示されており、ホルマリン固定法としては、10 % 中性緩衝ホルマリンで6時間から48時間が適切とされている。さらに、生検のような小さい材料はサイズに応じて短時間する必要がある。このホルマリン固定が過剰になると DNA の分解や塩基の化学修飾が進行することが示されている<sup>3)</sup>。DNA 分解が進行すると増幅可能な DNA 量が減少する。例えば、PCR 検査における検体量 (初発鑄型量) が 100 ケであれば、どんなに増幅しても調べている範囲は 100 ケであり、100 ケの中に目的とする変異

があるかを調べていることになる。初発鑄型量が 10000 ケの場合と比べると、1/100 の感度で調べたことになる。PCR 法の検査で検査陰性になった場合は、検査材料中に検出できる量の検査対象物がなかったと考えるべきである。したがって、適切な検体量を用いることは検査感度を維持する上で重要である。

検査材料の質の問題としては、塩基の化学修飾が挙げられる。核酸塩基の化学修飾は生体内で起こる現象であるが、遺伝子変異の火種であり、ホルマリン過固定や FFPE 作製後の保管期間、FFPE から DNA を抽出する際の脱アミノ化工程などで発生する可能性がある。核酸塩基配列中のシトシン塩基の 4 位アミノ基が加水分解的脱アミノ化を受けるとウラシルに変換される。また、生体内の CpG シトシン (5' 末端からシトシン、グアニンと並ぶ配列) は、ほとんどがメチル化され、5-メチルシトシンとなっており、これが脱アミノ化されるとチミンへと変換される<sup>4)~6)</sup>。さらに、この反応は Shen らの研究によって、シトシンより 5-メチルシトシンの方が 2~4 倍速いことが報告されている<sup>7)</sup>。この脱アミノ化を受けたシトシンを含む DNA を鑄型として PCR 等による核酸増幅を行った場合、元来シトシンであった塩基は最終的にチミンとなり検出される。あらかじめ、この化学修飾が強く疑われる検体であれば、PCR の前にウラシル DNA グリコシラーゼ (UDG) 処理を行い、ウラシルを含む鑄型 DNA を切断し、PCR 等で増幅がで

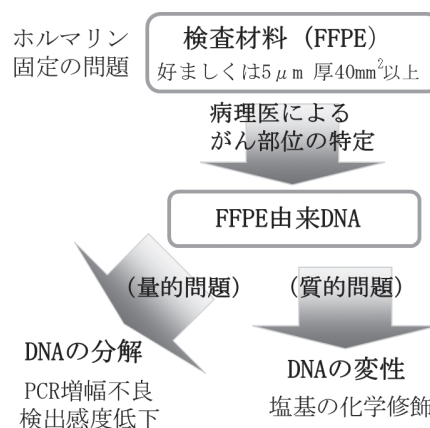


図 1 検査材料の問題 (量と質)

表 1 プライマー・プローブ配列

| プライマー及びプローブ                   | 塩基配列                                  |
|-------------------------------|---------------------------------------|
| EGFR T790M F-Primer           | 5'-GCCTCACCTCCACCGTGC-3'              |
| EGFR T790M R-Primer           | 5'-TGTTCCCGGACATAGTCCAG-3'            |
| EGFR T790M ddPCR Wild Probe   | 5'-HEX/AG+C TG+C G+TG A+TG/BHQ1-3'    |
| EGFR T790M ddPCR Mutant Probe | 5'-FAM/AG+C TG+C +A+TG ATG AG/BHQ1-3' |
| EGFR F795F ddPCR Wild Probe   | 5'-HEX/AGG CAG C+CG AAG GG/BHQ1-3'    |
| EGFR F795F ddPCR Mutant Probe | 5'-FAM/AGG CAG C+C+A AAG GG/BHQ1-3'   |

LNAの位置は+で表記した

きないようにして防ぐことができる<sup>6)</sup>。しかしながら、T790M 変異点のような CpG の配列を有するシトシンは、DNA メチルトランスフェラーゼによるメチル化修飾を受け、5-メチルシトシンとなっている。5-メチルシトシンは、通常のシトシンと同様に脱アミノ化を受けるが、ウラシルではなくチミンに変換されるため、UDG 処理の効果が得られない。したがって、患者組織中に本来あった遺伝子変異であるのか、検体採取から測定までの間に生じたアーチファクトかを区別できなかった。

筆者らは、様々な組織 DNA を用い EGFR T790M 近傍の CpG シトシンのメチル化を調べ、ほぼすべてがメチル化されていることを確認した。5-メチルシトシンに由来するアーチファクトは、がん細胞における遺伝子変異と異なり、広範に誘発されると考えられることから、目的とする遺伝子変異点（例えば T790M）と異なる部位の CpG シトシンであり、これまでに変異、多型の報告のないメチル化シトシンからチミンへの変化（例えば F795F）を定量的に測定し、両者の変異割合を比較することで、アーチファクトの存在量を推定する新たな方法を開発した<sup>8)</sup>。

### 3 材料調製と方法

#### 3.1 加熱処理による加水分解的脱アミノ反応によるアーチファクトの導入

健康人末梢血ゲノム DNA を 10 ng/μL に調整後 50 μL を分取し、ライトミネラルオイルを重層して、PCR 機を利用し 70 °C で、1 日、4 日、7 日加温した。加温後は測定まで -20 °C で保管した。

#### 3.2 ドロプレットデジタル PCR (ddPCR) 法による測定

加熱処理前のゲノム DNA (10 ng/μL 冷蔵 4 °C 保管) と上記加熱処理した DNA 及び検査残検体 DNA を鋳型に、表 1 に示す EGFR T790M プライマー、プローブを使用し、EGFR exon20 T790M (c. 2369 C>T) 変異および EGFR exon20 F795F (c. 2385 C>T) 変異検出用の反応液をそれぞれ調製した。各反応液を分注した 96 穴プレートをパイオラッド社製 Automated Droplet Generator (AutoDG<sup>TM</sup>) によりドロプレットを作製し、

C1000 Touch<sup>TM</sup> サーマルサイクラー (パイオラッド社) を用いて核酸増幅反応を行った。その後、QX200<sup>TM</sup> Droplet Reader (パイオラッド社) を用いて測定し、QuantaSoft<sup>TM</sup> Software による解析を行った。解析時の Threshold については T790M FAM (変異型検出プローブ) を 4000, HEX (野生型検出プローブ) を 3500 とし、F795F の場合は FAM を 3000, HEX を 3000 に設定した。変異型+野生型- (Ch1+, Ch2-) のドロプレットが 2 ケ以上の場合に変異陽性とし、変異割合は変異陽性の場合のみ算出した。

## 4 検討結果

### 4.1 アーチファクトを用いた検討

加熱した健康人末梢血ゲノム DNA の ddPCR で測定した結果を図 2 に示した。未処理のゲノム DNA サンプルからは、T790M 変異および F795F 変異は検出されなかったが、70 °C で加熱したサンプルからは両方の変異が検出され、変異の割合は加熱時間と共に上昇し、変異割合も略同じであることが判明した。人為的に誘発させた脱アミノ化は、ゲノム DNA において広範囲に一定の割合で誘発されていることが推定された。目的とする 5-メチルシトシンの変異である EGFR T790M (c. 2369C>T) 変異と変異や多型の報告が無い他の 5-メチルシトシンである EGFR F795F (c. 2385C>T) 変異の割合を比較することで、がん細胞中で誘発された変異 (真の変異) と検体採取後に誘発されたアーチファク

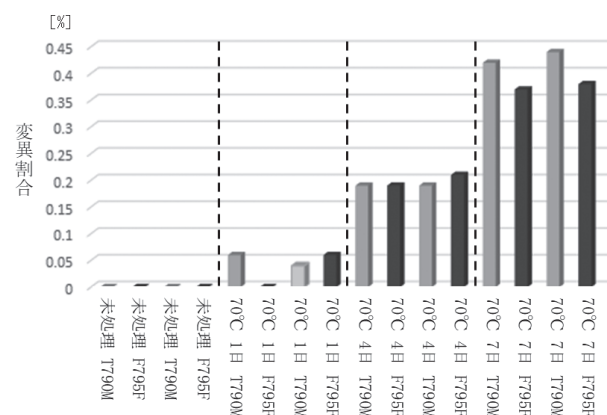


図 2 アーチファクト量の評価

トを区別でき、高精度且つ高感度に検出できる可能性を示すことができた。

#### 4.2 FFPE 由来 DNA を用いた検討

臨床検査で T790M 陰性となった 9 検体、T790M 陽性となった 2 検体について、同様の方法で T790M と F795F の変異割合を調べた。T790M 陽性の判定は臨床データ等に基づいて決定すべきであるが、便宜的に T790M と F795F の変異割合が 2 倍以上の場合にアーチファクトを上回る量の変異が存在すると仮定し、陽性判定基準を設定した。本法を用いる判定では、陽性の 2 検体の判定は一致したが、陰性 9 検体の内、6 検体が陽

性判定となった（表 2）。判定が乖離した 6 検体は何れもコバス® EGFR 変異検査キット v2.0 (Cobas) で検査したものであった。本キットの T790M 最小検出感度は 2~3 % とされていることから乖離の原因は感度不足によるものと考えられた。

検体 7 はオンコマイン Dx Target マルチ CDx システム (Oncomine) で検査した結果である。Oncomine は次世代シーケンサーを用いる診断薬である。シーケンサーデータの判定法と T790M の最小検出感度は、明確な記載は無く不明であるが検出例から推察すると 2~3 % と思われる。このことから、検体 7 の Oncomine での判定は感度以下による陰性、本法ではアーチファクト

表 2 ddPCR 反応条件

| 反応液組成   |        | 反応条件  |       |       |
|---|--------|-------|-------|-------|
| 試薬名   | 液量     | 温度    | 時間    | サイクル数 |
| Biorad 2X Supermix for Probe (No dUTP)                              | 11 μL  | 95 °C | 10 分間 | 1 回   |
| 50 μmol/L EGFR T790M F-Primer                                       | 0.5 μL | 94 °C | 30 秒間 | 40 回  |
| 50 μmol/L EGFR T790M R-Primer                                       | 0.5 μL | 60 °C | 1 分間  |       |
| 10 μmol/L T790M ddPCR Wild Probe<br>もしくは F795F ddPCR Wild Probe     | 0.7 μL | 98 °C | 10 分間 | 1 回   |
|   |        | 4 °C  | 30 分間 | 1 回   |
| 10 μmol/L T790M ddPCR Mutant Probe<br>もしくは F795F ddPCR Mutant Probe | 0.7 μL |       |       |       |
| Nuclease Free Water   | 3.6 μL |       |       |       |
| Sample DNA  | 5 μL   |       |       |       |

表 3 FFPE 由来検査残 DNA を用いた検証

| サンプル | 変異部位  | 変異割合 (%) | 臨床検査結果                         | 本法による判定結果                 | サンプル | 変異部位  | 変異割合 (%) | 臨床検査結果   | 本法による判定結果                 |
|------|-------|----------|--------------------------------|---------------------------|------|-------|----------|--|---------------------------|
| 1    | T790M | 0.69     | Cobas<br>ドライバー変異陰性<br>T790M 陰性 | T790M 陽性<br>790 > 2 × 795 | 7    | T790M | 0.27     | Oncomine<br>ドライバー変異陽性<br>L858R<br>T790M 陰性       | T790M 陰性<br>790 < 2 × 795 |
|      | F795F | 0.24     |                                |                           |      | F795F | 0.37     |  |                           |
| 2    | T790M | 0.55     | Cobas<br>ドライバー変異陰性<br>T790M 陰性 | T790M 陽性<br>790 > 2 × 795 | 8    | T790M | 30.30    | PNA-LNA Clamp<br>ドライバー変異陽性<br>19del.<br>T790M 陽性 | T790M 陽性                  |
|      | F795F | 0.05     |                                |                           |      | F795F | 検出せず     |  |                           |
| 3    | T790M | 0.36     | Cobas<br>ドライバー変異陰性<br>T790M 陰性 | T790M 陽性<br>790 > 2 × 795 | 9    | T790M | 0.58     | PNA-LNA Clamp<br>ドライバー変異陽性<br>19del.<br>T790M 陽性 | T790M 陽性                  |
|      | F795F | 0.08     |                                |                           |      | F795F | 検出せず     |  |                           |
| 4    | T790M | 0.54     | Cobas<br>ドライバー変異陰性<br>T790M 陰性 | T790M 陽性<br>790 > 2 × 795 | 10   | T790M | 0.10     | NA-LNA Clamp<br>ドライバー変異陽性<br>L858R<br>T790M 陰性   | T790M 陰性<br>790 < 2 × 795 |
|      | F795F | 0.09     |                                |                           |      | F795F | 0.06     |  |                           |
| 5    | T790M | 0.63     | Cobas<br>ドライバー変異陰性<br>T790M 陰性 | T790M 陽性<br>790 > 2 × 795 | 11   | T790M | 0.11     | PNA-LNA Clamp<br>ドライバー変異陰性<br>T790M 陰性           | T790M 陰性<br>790 < 2 × 795 |
|      | F795F | 0.02     |                                |                           |      | F795F | 0.08     |  |                           |
| 6    | T790M | 0.22     | Cobas<br>ドライバー変異陰性<br>T790M 陰性 | T790M 陽性<br>790 > 2 × 795 |      |       |          |  |                           |
|      | F795F | 0.06     |                                |                           |      |       |          |  |                           |

判定により陰性となったことで判定が一致したと考えられる。

PNA-LNA Clamp PCR (Peptide Nucleic Acid-Locked Nucleic Acid Clamp PCR) 検査は、PNA で野生型の増幅を抑制し、LNA で変異型を高感度に検出する方法である<sup>9)</sup>。本法で 0.1 % 程度の T790M 変異が検出された 2 検体は F795F 変異も同程度検出され、上記判定基準では T790M 陰性判定となり、判定が一致した。本法の最小検出感度は 0.5 % に設定されていることから、判定の乖離が無かったものと考えられる。

今回検討した 11 検体におけるアーチファクトの最大推定量は 0.37 % であり、70 °C 7 日間加熱し、アーチファクトを誘発した場合のアーチファクト量は 0.5 % 未満であった。したがって、0.5 % より低い量の変異を検出する場合にはアーチファクトの存在を考慮する必要があり、本法は低頻度の変異を精度良く、高感度に検出する際に有用と考えられる。

## 5 ま と め

現在遺伝子検査で使用される体外診断薬の変異検出感度は、およそ 2~5 % である。この感度で十分であるかの判断は非常に難しい。検査材料におけるがん細胞の量が十分であれば、2~5 % の検出感度で満足できるが、手術や生検が困難な患者さんに対して行われるリキッドバイオプシー（血漿中遊離核酸）検体では不足感がある。また、常に適切な検査材料が採取できるかの問題もあり、変異検出の高感度化が望まれている。しかしながら、高感度変異検出法は、本来患者検体に存在しない変異をアーチファクトとして検出する危険性も有している。

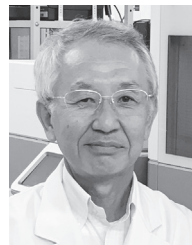
今回新たに構築した方法は、5-メチルシトシン由来するアーチファクトを定量的に推定できる。現在筆者らは、臨床検査で T790M 陰性となった検査残 DNA を用いて解析を継続している。解析中ではあるが、ほとんどの検体で 0.1 % 程度の T790M 変異と F795F 変異が共に検出され、本法の有用性を確認している。また、次世代シーケンサーを用いる検査では、多くの変異点を解読していることから、ゲノム DNA に散在している CpG 配列を調べることができる。OncoPrint 検査で得られたデータを用いて独自に再解析すると散在する CpG シトシンの変異が同程度検出された（データ未掲載）。本法を次世代シーケンスの解析アルゴリズムに利用す

れば、アーチファクトの存在を推定できると考えられる。本法は、精度を維持しつつ、感度を一段階向上させることができることから、高感度が要求される遺伝子変異検出に有用な方法と思われる。

本稿で使用した健康人末梢血 DNA はインフォームドコンセントが得られたボランティアの血液より抽出した。臨床検査結果及び臨床検査終了後の残検体 DNA については、社内倫理審査委員会の審査を経て使用した。

## 文 献

- 1) X. Ye, Z.Z. Zhu, L. Zhong, Y. Lu, Y. Sun, X. Yin, Z. Yang, G.Zhu, Q.Ji : *J Thorac Oncol*, **8**, 1118 (2013).
- 2) X. Wang, X. Li, H. Guo, L. Zhu, Z. Peng, J. Wang, F. Yang, Y. Guo : *Onco Targets and Therapy*, **13**, 10621 (2020).
- 3) ゲノム診療用病理組織検体取扱い規程: 日本病理学会 (2018 年).
- 4) N. Quach, M.F. Goodman, D. Shibata : *BMC clinical pathology*, **4**, 1 (2004).
- 5) Ruiz MI, Gallegos, K. Floor, F. Rijmen, K. Grunberg, JA. Rodriguez, G. Giaccone : *Cellular oncology*, **29**, 257 (2007).
- 6) H. Do, A. Dobrovic : *Oncotarget*, **3**, 546 (2012).
- 7) J.C. Shen, W.M. Rideout 3rd, P.A. Jones : *Nucleic Acids Res.*, **22**, 972 (1994).
- 8) 野上祥平, 吉岡 進, 細川由貴, 望月美希, 若松宏武, 寺崎浩司, 島津光伸 : 分析化学 (*BUNSEKI KAGAKU*), **71**, 59 (2022).
- 9) Y. Nagai, H. Miyazawa, H. Tanaka, K. Udagawa, M. Kato, S. Fukuyama, A. Yokote, K. Kobayashi, M. Kanazawa, K. Hagiwara : *Cancer Res.*, **65**, 7276 (2005).



島津光伸 (Mitsunobu SHIMADZU)  
株式会社 LSI メディエンスメディカルソ  
リユーション本部 技術顧問 (〒174-8555  
東京都板橋区志村三丁目 30 番 1 号). 東  
京理科大学応用生物科学科. 医学博士.



野上祥平 (Shohei NOGAMI)  
株式会社 LSI メディエンスメディカルソ  
リユーション本部 遺伝子解析研究部  
(〒174-8555 東京都板橋区志村三丁目  
30 番 1 号). 東京医科歯科大学大学院医  
歯学総合研究科医歯理工学専攻. 修士 (医  
科学), 臨床検査技師. <現在の研究テー  
マ>がん遺伝子の高感度検出, リキッド  
バイオプシー. <趣味>Sports.  
E-mail : nogami.shouhei@ma.medience.co.jp

会社ホームページ URL :

<https://www.medience.co.jp>