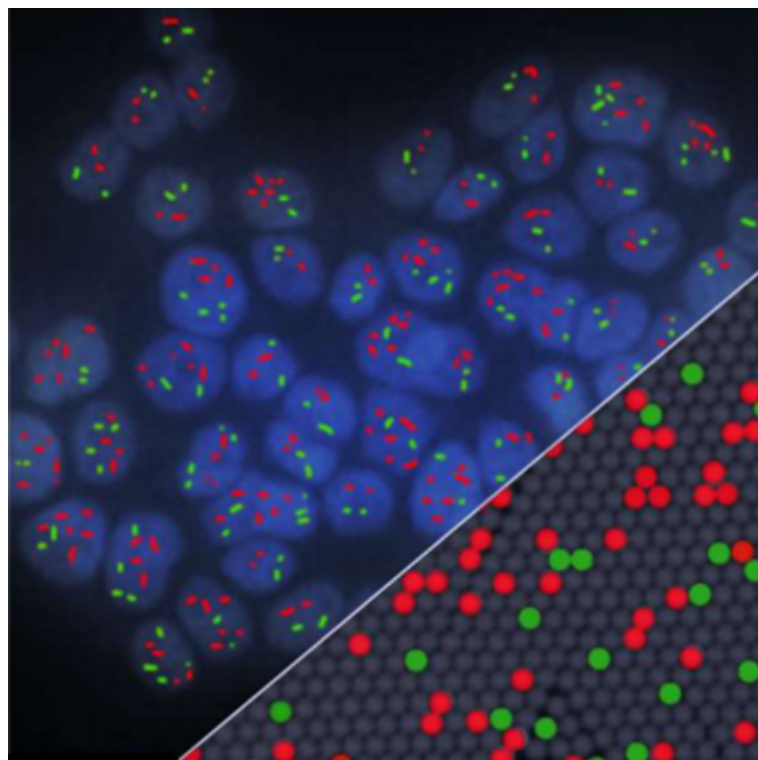




Crystal Digital PCRによる *HER2* コピー数多型の検出



富士フイルム 和光純薬株式会社

HER2 コピー数増幅用の Triplex Crystal Digital™ PCR

乳がんでは、HER2 増幅状態の調査は、抗HER2 標的療法の適応を決定するために重要です。HER2 コピー数の変動を評価する際、特に腫瘍DNAが正常細胞のDNAで希釈されている場合に困難です。ここでは、Crystal Digital PCRが腫瘍DNA率の低いサンプルでHER2 増幅を確実に識別できる方法を示します。

17番染色体のHER2 (ERBB2)とMRM1、および2番染色体のTSN (参照遺伝子)の検出アッセイ [1] をCrystal Digital PCR用に最適化しました。このアッセイは、HER2 コピー数の定量化、およびHER2 ステータスの誤解につながる可能性のあるHER2 増幅と17番染色体ポリソミーの区別を可能にします。

HER2 増幅検出の感度評価

SKBR3細胞株(HER2 /TSN 比10:1)から抽出されたゲノムDNAを、0~12% の変異割合を含むように、HER2 非増幅ゲノムDNAに添加し、HER2 /TSN 比の理論的範囲を1~2.08 にモデル化しました。

TSN およびHER2 の絶対濃度はポアソン分布を使用して計算され、Z検定はHER2 /TSN の対数比(正規分布で近似)に適用し、 $\alpha = \beta = 5\%$ の統計的有意性をもって変異DNAの存在を調べました [2]。この方法を使用して、変異体DNAの存在を、HER2 /TSN 理論比1.2に相当する、変異割合2% まで有意に検出することができました。

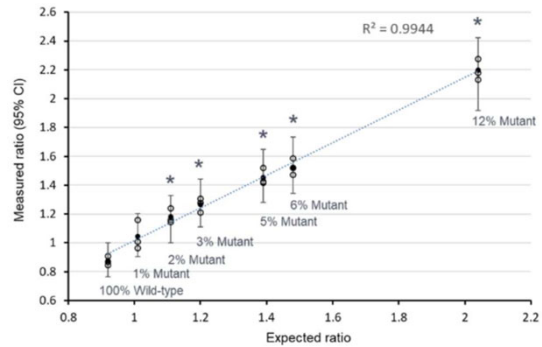


図1. 再現実験におけるさまざまなHER2 /TSN 比の測定(*は、検出が $\alpha = \beta = 5\%$ で統計的に有意であることを示します)。総DNA濃度は、2.5 ng /反応(760 cp /反応)に設定しました。制限酵素を使用してサンプルを断片化し、Crystal Digital PCRで3回の実験をしました。

乳がん患者におけるHER2 増幅と17番染色体ポリソミーの状態

腫瘍サンプルのHER2 増幅を評価する現在の方法は、免疫組織化学(IHC)でのHER2 過剰発現の評価です。IHC でHER2 equivocal (境界域、IHC2+)の場合、蛍光 in-situ ハイブリダイゼーション(FISH)によってHER2 遺伝子増幅を再検査します。

これらの手法は人手を要し、分析には高度な専門知識が必要です。分子生物学的手法は、より簡単で、速く、偏りのない代替手段を提供するかもしれません。

本研究はGustave Roussy 研究所(フランス) § によって提供された乳がん患者7名の腫瘍から抽出したDNAを使用して行われ、Crystal Digital PCRで得られた結果と標準の診断手順で得られた結果を比較しました。

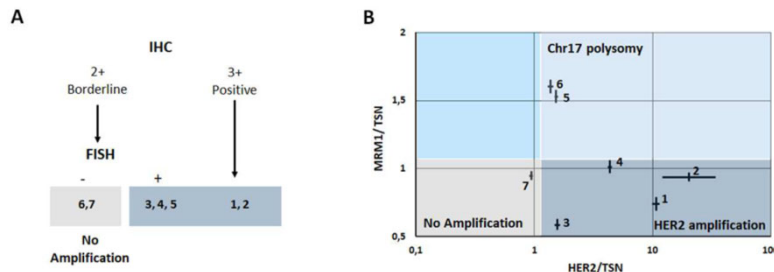


図2. 現在の診断手順(IHCおよびFISH)を使用したHER2 増幅に関する患者1~7の分類(A)、Crystal Digital PCRでの分類(B)。

IHC /FISHとCrystal Digital PCRで得られた結果は、両方の方法でHER2 増幅が陽性であると見なされた患者1~4のサンプルと、HER2 増幅が陰性であると識別された患者6および7のサンプルで一致しました。更に、Crystal Digital PCRでは患者6の17番染色体ポリソミーを識別しました。ただし、患者5のサンプルにおいて、標準の診断手順ではHER2 増幅が識別されたのに対し、Crystal Digital PCRでは、HER2 シグナルの上昇は17番染色体ポリソミーに起因すると識別されました。

[1] Jacquemier et al. "SISH/CISH or qPCR as alternative techniques to FISH for determination of HER2 amplification status on breast tumors core needle biopsies: a multicenter experience based on 840 cases". BMC Cancer. 2013 ; 13:351. PMID: 23875536

[2] Whale et al. "Comparison of microfluidic digital PCR and conventional quantitative PCR for measuring copy number variation". Nucleic Acids Res. 2012 ;40:11. PMID: 22373922

§ Courtesy of Dr Cécile Jovelet, Translational Research Laboratory, Institut Gustave Roussy, France

富士フイルム 和光純薬株式会社

本社 〒540-8605 大阪市中央区道修町三丁目1番2号
TEL: 06-6203-2759 (機器システム部)
東京本店 〒103-0023 東京都中央区日本橋本町二丁目4番1号
TEL: 03-3270-8124 (機器システム部)

- 九州営業所 TEL: 092-622-1005 (代)
- 中国営業所 TEL: 082-569-8095 (代)
- 東海営業所 TEL: 052-772-0788 (代)
- 筑波営業所 TEL: 029-858-2278 (代)
- 東北営業所 TEL: 022-222-3072 (代)
- 北海道営業所 TEL: 011-271-0285 (代)
- 横浜営業所 TEL: 045-225-8041 (代)

URL : <http://www.wako-chem.co.jp/siyaku/kiki/index.htm>