

イマチニブ耐性の原因 その4 2016.10.22 by Sunny NC

(GIST 診断時の二次変異はどうして PCR 検出ができないのか)

この課題を説明してくれるサイトは見つからないので、基本的な情報を集め、「GIST 診断時の二次変異はどうして PCR 検出できないのか」に答えます。間違いがあれば指摘して下さい。また質問・議論、多いに歓迎します。

GIST のゲノム変異は PCR (ポリメラーゼ連鎖反応) 法で検出されています。

「PCR 法」は多くのサイトで説明されています。その一つ：

PCR (ポリメラーゼ連鎖反応) 法 (日本語)

<http://www.aichi-c.ed.jp/contents/rika/koutou/seibutu/se18/PCR/PCR.htm>

でアニメ動画をクリックすると分かりやすく説明されています。

Wiki 日本語版の「ポリメラーゼ連鎖反応」の初部文章を編集しました：

「PCR 法を使い、非常に微量な検体から、その目的の特定 DNA 断片（数百から数千塩基対）を選択的に温度変化のステップを 30 回ほど繰り返すことで目的 DNA 断片を 10 億倍ほどに増幅ができる。増幅に要する時間は 2 時間程度と短く、プロセスが簡単で卓上用装置で自動的に増幅した結果の塩基配列の詳細が解析できる。」

PCR は正しく使えば非常に正確です。目的の Exon の解析にはその Exon の前後になる特徴的なプライマー 2 つ (塩基 20-30 個の配列) と他の二つの物質が必要です。GIST の場合、Exon9、11、13、14、17 などの変異を検出するにはそれらゲノム断片の前後に通常存在するゲノム塩基配列を複製してプライマーとして使われます。

耐性になる二次変異は主に、Exon13、14、16 そして 17 です⁽¹⁾。これらを検出する PCR の正確度はプライマーの質、検体の状態などにも影響されるようですが、非常に高いです。問題は PCR の検体にこれら二次変異を有する細胞が入っているか否かです。これは単純な物理的な問題で、これを数値的に追及します。単純な理由は：

1. 耐性シリーズ 3 で書いたように、初期に二次変異が起こるのは 1 億か 10 億個の GIST 細胞の中の 1 個か数個。すなわち極々少量です。

2. PCR 法でつかわれる検体の量は DNA100ng ほどをふくむ 1.2mm³ とごく微量です⁽²⁾。これは腫瘍径が 5cm だと全体の 37,000 分の 1 の量でしかありません。

ですから、初発 GIST 腫瘍の FFPE パラフィンブロックを削った検体に二次変異をおこした細胞が入っている可能性は何万分の 1 以下です。現実的に二次変異を見つけることが不可能に近いでしょう。非常に正確な PCR でも検出、解析はできないのが現実でしょう。

この件につき、GSI のサイトで質問があり、その一人の Christine さんの私からの質問に答えてくれたメール文章を下にコピーしました。

" Two years ago I asked Dr. Heinrich if the Gleevec resistant mutations are pre-existing, then why they are not detected in tumor samples. He said that the mutation could be 1 out of billions of cells, so a PCR machine may not be able to detect it."

「Dr. Heinrich にもシグリベック耐性変異が既存であれば、どうして腫瘍サンプルから検出されてないのですかと 2 年前に尋ねました。彼は、突然変異は 10 億の細胞うち 1 個の頻度だから、PCR がそれを検出することができないかもしれない。」

Dr. Heinrich は OHSU (Oregon Health Science University) の GIST 治療研究でアメリカ屈指の医師です。

彼の、「PCR がそれを検出することができないかもしれない」は非常に単純な物理的、確率的な課題だと私の結論です。この件につき、ご異論があれば是非ご議論ください。

(1) Secondary mutations in the kinase domain of the KIT gene are predominant in imatinib-resistant gastrointestinal stromal tumor

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1349-7006.2008.00727.x/full>

(2) ホルマリン固定・パラフィン包埋 (FFPE) 組織からの microRNA 発現プロファイルの作製

http://www.gene-lab.com/miRNA/CF_%E3%83%9B%E3%83%AB%E3%83%9E%E3%83%AA%E3%83%B3%E5%9B%BA%E5%AE%9A_microRNA%E7%99%BA%E7%8F%BE%E3%83%97%E3%83%AD%E3%83%95%E3%82%A1%E3%82%A4%E3%83%AB.pdf