

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・遺伝子治療研究事業）
総括研究報告書

病理組織に発現する疾病関連遺伝子の包括的解析
(H 10-ゲノム-013)

主任研究者 広橋 説雄 (国立がんセンター研究所 所長)

研究要旨：がん症例の凍結切片標本よりマイクロダイセクションシステムを用い、厳密に分離採取を行ったがん細胞から良好にRNAが抽出出来ることが示された。さらに、5000個程度の細胞から抽出したRNAからReal-time quantitative RT-PCRを行い、上皮や間質に特異的に発現する遺伝子のレベルを検出し、マイクロダイセクションのサンプルに混入がほとんどないことを確認した。細胞診材料からマイクロダイセクションにて採取した細胞から抽出したDNAについては、K-ras遺伝子やp53遺伝子の点突然変異を一個の腫瘍細胞を用いても検出可能であることが示された。悪性度を異にする複数の肺がん、肝がん症例のがん・正常組織ならびに転移性の異なる肝がん細胞株から抽出したRNAを対象にDifferential Display方により、発現の異なるバンド各約50~100本を同定し、各塩基配列の決定を行った。さらにRT-PCR法で多数例の臨床材料のRNAのパネルを用いて、同定された遺伝子の発現パターンを検討した。cDNAチップ技術を導入するにあたりその基礎的技術を確立するための研究を行った。第一に少量のRNAから合成したプローブでの検出感度を検討するため、がん組織で発現する約80の遺伝子をスライドガラス上に整列させたミニチップを作製した。第二に悪性度が高いスキルス胃がんで特異的に発現する遺伝子を同定するための実践的なチップの作製に向けてcDNAサブトラクションを行った。

分担研究者

1. 広橋 説雄 国立がんセンター研究所
所長
2. 野口 雅之 筑波大学基礎医学系
教授
3. 佐々木博己 国立がんセンター研究所
室長

A. 研究目的

疾病の例としてがんを見ると、たとえ同一臓器のがんであっても個々の症例により病態や予後が異なる。従って、疾病の診断と治療法の開発を目指した疾病関連遺伝子の研究を促進するには、染色体上の位置情報に基づくゲノム構造解析に加え、病変部位・病変細胞に発現する遺伝子の包括的解析の必要性は

極めて高い。本研究は、疾病の原因となる或いは病態や予後を決定する疾病関連遺伝子を見つけ、遺伝子レベルでの診断に基づく治療法の選択を可能にするために、疾病関連遺伝子発現データベースを蓄積することを目的とする。この目的を達成するために、組織切片上のマイクロダイセクション法と発現遺伝子の包括的解析法の両者を改良し効率化する。これにより、疾病関連遺伝子発現データベースの蓄積を加速させ疾病関連遺伝子を同定すると同時に、病理診断を客観化し医療の質の向上に役立てることを目指す。

B. 研究方法

1. マイクロダイセクション法による病変細胞の分離

肺腺がんの臨床材料の凍結切片を用いて HE 染色を施行し、Laser microscope systems(PALM UV-laser microbeam,Wolfratshausen,D-82515 Germany)でがん部とその間質部を分離採取し、RNA を抽出した。上皮系マーカー(Eカドヘリン)と間葉系マーカー(HGF)に特異的なプライマーとプローブをそれぞれ作成し、ABI PRISM™7700(Perkin-Elmer)を用いた real time quantitative RT-PCR を行い、mRNA の発現を定量的に評価し、マイクロダイセクション法による組織の分離並びに採取の正確性について検討した。16 例の肺がん切除後の再発胸水の細胞診材料からがん細胞を同定し、マイクロマニピュレーターを用いたマイクロダイセクションを行い、腫瘍細胞を 1 から 40 個採取し、DNA を抽出した後、K-ras 遺伝子、p53 遺伝子の異常を PCR-SSCP 法を用いて解析した。

2. 肝がんの転移性により発現が異なる遺伝子群の同定

転移モデルにて転移、浸潤能に差があることが示されている 2 つの cell line (PLC/PRF/5, KYN-2) を用い、Differential Display 法にて両者で発現に差のある遺伝子について検討した。Differential Display は Fluorescence Differential Display Kit(TaKaRa)を用いて、arbitrary primer 24 通り、anchor primer (Rhodamin 標識)9 通りの計 216 通りの組み合わせで RT-PCR(Perkin Elmer 9600)を施行した。得られた PCR products を変性アクリルアミドゲルで電気泳動し FM Bio100(HITACHI)で解析した。finger print 上、両 cell line 間で差の認められた band は、ゲルより DNA を抽出し、2nd PCR 後、H.A.Yellow (AT 含量の違いで DNA 断片を

分離する核酸電気泳動用高分離剤)添加アガロースで DNA を精製した。更に 3rd PCR 後、H.A.Red (GC 含量の違いで DNA 断片を分離する核酸電気泳動用高分離剤)添加アガロースで DNA を精製し、Direct Sequence を施行(Perkin Elmer 377)し塩基配列を決定した。臨床検体 HCC14 症例 18 病変 (中ないし高分化型 12 病変、低分化型 6 病変、転移性を示さない症例～高度に示す症例を含む) の腫瘍部と非腫瘍部より RNA を抽出し、oligo dT を primer として AMV reverse transcriptase で RT 反応を行い cDNA を作成した。Direct Sequence で得られた塩基配列をもとに各 clone 毎に specific primer を設定し、SYBR Green で蛍光標識して、real time quantitative PCR で検討した。定量数値の比較は、GAPDH で補正した値で行った。

3. 肺がん・肝がんの発生、進展過程で発現が異なる遺伝子群の同定

外科手術切除材料より、非がん部、がん部のそれぞれの組織切片を肉眼的に採取し total RNA を抽出した。肺がんに於いては正常 2 例、非浸潤がん 3 例、浸潤がん 2 例、肝がんにおいては異なる悪性度を示す 3 症例の各がん部及び非がん部を用いた。上述の Differential Display 法を行い差の認められるバンドを抽出し、塩基配列を決定した。

4. cDNA チップ技術導入の基礎的検討

既知のがん遺伝子やがん抑制遺伝子を含むがん細胞において発現量の異なる 80 の遺伝子の cDNA をポリ陽イオンコートスライドガラスに静電結合で固定化したミニチップを作製した。スキルス胃がん培養細胞株 8 株から精製した RNA から cDNA を合成し、正常胃粘膜および非スキルス胃がん培養細胞株 8 株から合成した cDNA とのサブトラ

クションを行った。サブトラクションの効率はスキルス胃がんで特異的に発現される K-sam/FGFR2 の C-terminal splicing variants の配列の濃縮率で検定した。

がん組織からの生きたがん細胞の分離法並びに質の良い RNA の分離法を検討した。

C. 研究結果

1. マイクロダイセクション法による病変細胞の分離

マイクロダイセクション法で肺腺がんをがん部とその間質部に分離採取し、良好に RNA を抽出することが出来た。またその RNA を用いて、上皮系マーカーである E カドヘリン mRNA と間葉系マーカーである HGF mRNA の発現をがん部とその間質部で比較したところ、E カドヘリンはがん部に、HGF は間質部に選択的に発現が認められた。

PCR-SSCP 法を行うと 16 例中 6 例の症例の外科切除材料に K-ras あるいは p53 遺伝子の異常バンドが 7 本検出された。その内訳は K-ras exon 1 の異常が 1 例、p53 exon 4, 5, 7 の異常がそれぞれ 1, 1, 4 例である。このうち細胞診材料からマイクロダイセクションした 40 個の腫瘍細胞を用いて行った PCR-SSCP 法による解析で K-ras exon 1, p53 exon 5, 7 で見つかった異常バンドをそれぞれ 1, 1, 3 例 (5/7 バンド、71%) に検出できた。さらに細胞 1 個を用いた解析で、K-ras exon 1, p53 exon 7 の異常をそれぞれ 1 例ずつ検出することに成功した (2/7 バンド、29%)。

2. 肝がんの転移性により発現が異なる遺伝子群の同定

両 cell line 間で発現の異なる band のうち最終的に 84 clone (PLC/PRF/5 に優位に発現しているもの; 34 clone, KYN-2; 50 clone) について塩基配列を決定すると共に、

quantitative RT-PCR で検討した。臨床検体のパネルを用いた評価では、腫瘍部で発現が高い 5 clone、非腫瘍部で発現が高い 7 clone の計 12 clone で、腫瘍部、非腫瘍部で明瞭な違いが認められ、その内訳は、既知; 5 clone, EST; 7 clone であった。2 clone では腫瘍の転移性との対応も見られた。

3. 肺がん・肝がんの発生、進展過程で発現が異なる遺伝子群の同定

肺がんについては、発現の異なるバンドのうち最終的に 118 clone、肝がんについては 86 clone について塩基配列を決定した。既知の遺伝子は、肺がん 23 clone、肝がん 33 clone、未知ないし EST はそれぞれ 95 clone, 22 clone であった。

4. cDNA チップ技術導入の基礎的検討

ポリカルボジイミド樹脂をコートしたガラスへの、cDNA の固定化率は 90% 以上と高かった。高感度な検出が期待される。またこの方法はアルデヒド基導入スライドガラスへの固定化のように cDNA をアミノ化する必要がなく安価な検出法であるといえる。

スキルス胃がんで特異的に発現する遺伝子の存在を調べるためサブトラクションを終了した。

がん組織からの生きたがん細胞の分離法は和歌山県立医科大学外科との共同研究によって行い、RNA の抽出や FISH 解析にも使える分離法をうることができた。凍結がん組織からの良質の RNA の抽出としては液体チップで冷やしたスチール製の容器中で敏速に粉碎する方法がもっとも有効である結果を得た。

D. 考察

1. マイクロダイセクション法による病変細胞の分離

がん組織にて発現している遺伝子をより詳細にみる場合、より正確な組織の分離採取が必要である。今回 Laser microscope systems を用いることによりがん組織のがん部ならびに間質部から別々に mRNA を抽出することが出来た。また、上皮性ならびに間葉系のマーカーを調べることで、がん部と間質部が正確に分離採取されていることが確認された。

1 個の細胞を用いても 1 コピーの遺伝子の異常 (点突然変異) を解析できることが明らかとなった。特に細胞診材料は組織切片のように薄切されていない、つまり観察している細胞すべての核酸が採取できる点で優れた病理材料といえる。

2. 肝がんの転移性により発現が異なる遺伝子群の同定

SCID mouse を用いた in vivo の系で転移、浸潤能に明瞭な違いを示した二つの cell line を材料として、Differential Display 法を用いて両者で発現の異なる遺伝子を同定し、更に転移性、悪性度が異なる肝細胞がん症例の腫瘍、非腫瘍部 18 組の cDNA のパネルを用いて発現の傾向についても検討した。特に臨床検体でも一定の傾向が見られた 12 clone については、肝がんの発生ないし悪性度との関連が示唆され、さらに詳細に検討を行う。

3. 肺がん・肝がんの発生、進展過程で発現が異なる遺伝子群の同定

組織学的悪性度の異なる肺がん、肝がんを用いた Differential Display 法による検討にて、多数の既知ならびに未知の遺伝子が同定された。既知の分子の中で、既にかんにおい

て発現が亢進していると報告されている遺伝子、また細胞の分化の marker である遺伝子群をそれぞれ、がん部、及び非がん部において優位に上昇しているクローンとして同定しえた。例えば、非がん部において発現の保たれている分化 marker に関しては、肝細胞がんの悪性度が高くなるにしたがって、その発現が減弱していくことが、症例間の比較にて伺われ、組織学的所見とよく一致し、本法の妥当性も示された。

4. cDNA チップ技術導入の基礎的検討

ポリカルボジイミド樹脂をコートしたガラスおよびアルデヒド基導入スライドガラスへ固定化したミニ cDNA チップを用い検出法の改良を行う必要がある。均一微量がん組織から抽出される RNA の量は数 μ g と少量であることが多い。今後、作製したチップと反応させるためには遺伝子の発現量比を保持し、さらに特定の配列を欠落させずに、PCR で増幅する方法を開発することが必要である。そのため cDNA の 2 次構造に左右されにくいプライマー配列と PCR の反応条件を決定することが重要である。

スキルス胃がんについてのサブトラクションは終了した。今後は正常胃粘膜で発現しないスキルス特異的遺伝子を複数分離し、部分的な塩基配列を決定後、データベースを検索するプロセスへ移行する予定である。さらにチップを作製し、実際の手術材料で個々の遺伝子発現を検討する。その際、スキルス胃がんへの応用やマイクロダイセクションの導入を含めがん組織からの RNA サンプルの調製を検討するべきである。またリンパ節転移が多くみられる食道がんで特徴的に発現する遺伝子を把握するため、70 症例の RNA を抽出する計画を加える予定である。

E. 結論

本研究は、疾病の原因となる或いは病態や予後を決定する疾病遺伝子を捉え、遺伝子レベルでの診断に基づく治療法の選択を可能にするために、疾病遺伝子発現データベースを蓄積することを目的とする。本年度は、マイクロダイセクション法による病変細胞の分離、肝がんの転移性により発現が異なる遺伝子群の同定、肺がん・肝がんの発生、進展過程で発現が異なる遺伝子群の同定、cDNAチップ技術導入の基礎的検討などを行った。今後は、マイクロダイセクションされた微量RNAを対象に Differential Display 法を行い、発現に差のある遺伝子についてさらに in situ ハイブリダイゼーションによる情報も加え、各症例の病理所見、臨床経過と対応させた疾病遺伝子発現データベースを作成する。またチップとのハイブリダイゼーションの条件と感度の検討などを行い、微量なRNAを用いたcDNAチップの技術を確立する。

F. 研究発表

論文発表

- 1) Kanai, Y., Hirohashi, S., et al., DNA hypermethylation at the D17S5 is associated with gastric carcinogenesis. *Cancer Lett.*, 122:135-141, 1998.
- 2) Komiya, T., Hirohashi, S., et al., Cloning of the novel gene intelectin, which is expressed in intestinal paneth cells in mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 251(3):759-762, 1998.
- 3) Hui, A-M., Hirohashi, S., et al., Reduced p27^{Kip1} expression in hepatocellular carcinomas. *Cancer Lett.*, 132:67-73, 1998.
- 4) Tsuda, H., Hirohashi, S., et al., der(16)t(1;16)/der(1;16) in breast cancer detected by fluorescence in situ hybridization is an indicator of better patient prognosis. *Genes, Chromosomes & Cancer*, 24:72-77, 1999.
- 5) Komiya, T., Hirohashi, S., et al., Cloning and identification of the gene gob-5, which is expressed in intestinal goblet cells in mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 255(2):347-351, 1999.
- 6) Kanai, Y., Hirohashi, S., et al., DNA hypermethylation at the D17S5 locus and reduced HIC-1 mRNA expression are associated with hepatocarcinogenesis. *Hepatology*, in press.
- 7) Tsuda, H., Hirohashi, S., et al., Correlation of the numerical and structural status of chromosome 16 with the histological type and grade of non-invasive and invasive breast carcinomas. *Int. J. Cancer*, in press.
- 8) Yoshioka, H., Hirohashi, S., Noguchi, M., et al., Analysis of loss of heterozygosity in small adenocarcinomas of the lung. *Jpn. J. Clin. Oncol.*, 28(4):240-244, 1998.
- 9) Anami, Y., Hirohashi, S., Noguchi, M., et al., Case Report: A case of double primary adenocarcinoma of the lung with multiple atypical adenomatous hyperplasia. *Path. Int.*, 48(8):634-640, 1998.
- 10) Takei, K., Noguchi, M., Hirohashi, S., et al., A novel tumor suppressor locus on chromosome 18q involved in the development of human lung cancer. *Cancer Res.*, 58(16):3700-3705, 1998.
- 11) Sakao, Y., Hirohashi, S., Noguchi, M., et al., Microsatellite instability and frameshift mutations in the *Bax* gene in hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma. *Jpn. J. Cancer Res.*, 89(10):1020-1027, 1998.

12) Fiddes, RJ, Sasaki, H., et al., Analysis of Grb7 recruitment by heregulin-activated erbB receptors reveals a novel target selectivity for erbB3. J.Biol.Chem., 273(13):7717-7724, 1998.

13) Takahama, Y., Sasaki, H., et al., Molecular cloning and functional analysis of cDNA encoding a rat leukemia inhibitory factor: towards generation of pluripotent rat embryonic stem cells. Oncogene, 16:3189-3196, 1998.

14) Sasaki, H., et al., Presence of *streptococcus anginosus* DNA in

esophageal cancer, dysplasia of esophagus, and gastric cancer. Cancer Res., 58:2991-1995, 1998.

15) Tanooka, H., Sasaki, H., et al., Homologous recombination between *p53* and pseudogene in a radiation-induced mouse tumor. Cancer Res., 58:5649-5651, 1998.

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし

疾病遺伝子発現データベースの作製、疾病遺伝子の構造・機能研究

分担研究者 広橋 説雄 (国立がんセンター研究所 所長)

研究要旨：がん症例の凍結切片標本よりマイクロダイセクションシステムを用い、厳密に分離採取を行ったがん細胞から良好に RNA が抽出出来ることが示された。さらに、5000 個程度の細胞から抽出した RNA から Real-time quantitative RT-PCR を行い、上皮や間質に特異的に発現する遺伝子のレベルを検出し、マイクロダイセクションのサンプルに混入がほとんどないことを確認した。悪性度を異にする複数の肺がん、肝がん症例のがん・正常組織ならびに転移性の異なる肝がん細胞株から抽出した RNA を対象に Differential Display 方により、発現の異なるバンド各約 50～100 本を同定し、各塩基配列の決定を行った。さらに RT-PCR 法で多数例の臨床材料の RNA のパネルを用いて、同定された遺伝子の発現パターンを検討した。

A. 研究目的

疾病の例としてがんを見ると、たとえ同一臓器のがんであっても個々の症例により病態や予後が異なる。従って、疾病の診断と治療法の開発を目指した疾病遺伝子の研究を促進するには、染色体上の位置情報に基づくゲノム構造解析に加え、病変部位・病変細胞に発現する遺伝子の包括的解析の必要性は極めて高い。本研究は、疾病の原因となる或いは病態や予後を決定する疾病遺伝子を捉え、遺伝子レベルでの診断に基づく治療法の選択を可能にするために、疾病遺伝子発現データベースを蓄積することを目的とする。この目的を達成するために、組織切片上のマイクロダイセクション法と発現遺伝子の包括的解析法の両者を改良し効率化する。これにより、疾病遺伝子発現データベースの蓄積を加速させ疾病遺伝子を同定すると同時に、病理診断を客観化し医療の質の向上に役立てることを目指す。

B. 研究方法

1. マイクロダイセクション法による病変細胞の分離

肺腺がんの臨床材料の凍結切片を用いて

HE 染色を施行し、Laser microscope systems(PALM UV-laser microbeam, Wolfratshausen, D-82515 Germany)でがん部とその間質部を分離採取し、RNA を抽出した。上皮系マーカー(Eカドヘリン)と間葉系マーカー(HGF)に特異的なプライマーとプローブをそれぞれ作成し、ABI PRISM™7700(Perkin-Elmer)を用いた real time quantitative RT-PCR を行い、mRNA の発現を定量的に評価し、マイクロダイセクション法による組織の分離並びに採取の正確性について検討した。

2. 肝がんの転移性により発現が異なる遺伝子群の同定

転移モデルにて転移、浸潤能に差がある事が示されている 2 つの cell line (PLC/PRF/5, KYN-2) を用い、Differential Display 法にて両者で発現に差のある遺伝子について検討した。Differential Display は Fluorescence Differential Display Kit(TaKaRa)を用いて、arbitrary primer 24 通り、anchor primer (Rhodamin 標識)9 通りの計 216 通りの組み合わせで RT-PCR(Perkin Elmer 9600)を施

行した。得られた PCR products を変性アクリルアミドゲルで電気泳動し FM Bio100(HITACHI)で解析した。finger print 上、両 cell line 間で差の認められた band は、ゲルより DNA を抽出し、2nd PCR 後、H.A.Yellow (AT 含量の違いで DNA 断片を分離する核酸電気泳動用高分離剤) 添加アガロースで DNA を精製した。更に 3rd PCR 後、H.A.Red (GC 含量の違いで DNA 断片を分離する核酸電気泳動用高分離剤) 添加アガロースで DNA を精製し、Direct Sequence を施行(Perkin Elmer 377)し塩基配列を決定した。臨床検体 HCC14 症例 18 病変 (中ないし高分化型 12 病変、低分化型 6 病変、転移性を示さない症例～高度に示す症例を含む) の腫瘍部と非腫瘍部より RNA を抽出し、oligo dT を primer として AMV reverse transcriptase で RT 反応を行い cDNA を作成した。Direct Sequence で得られた塩基配列をもとに各 clone 毎に specific primer を設定し、SYBR Green で蛍光標識して、real time quantitative PCR で検討した。定量数値の比較は、GAPDH で補正した値で行った。

3. 肺がん・肝がんの発生、進展過程で発現が異なる遺伝子群の同定

外科手術切除材料より、非がん部、がん部のそれぞれの組織切片を肉眼的に採取し total RNA を抽出した。肺がんには正常 2 例、非浸潤がん 3 例、浸潤がん 2 例、肝がんには異なる悪性度を示す 3 症例の各がん部及び非がん部を用いた。上述の Differential Display 法を行い差の認められるバンドを抽出し、塩基配列を決定した。

C. 研究結果

1. マイクロダイセクション法による病変細胞の分離

マイクロダイセクション法で肺腺がんをがん部とその間質部に分離採取し、良好に RNA を抽出することが出来た。またその RNA を用いて、上皮系マーカーである E カドヘリン mRNA と間葉系マーカーである HGF mRNA の発現をがん部とその間質部で比較したところ、E カドヘリンはがん部に、HGF は間質部に選択的に発現が認められた。

2. 肝がんの転移性により発現が異なる遺伝子群の同定

両 cell line 間で発現の異なる band のうち最終的に 84 clone(PLC/PRF/5 に優位に発現しているもの;34 clone, KYN-2;50 clone)について塩基配列を決定すると共に、quantitative RT-PCR で検討した。臨床検体のパネルを用いた評価では、腫瘍部で発現が高い 5 clone、非腫瘍部で発現が高い 7 clone の計 12 clone で、腫瘍部、非腫瘍部で明瞭な違いが認められその内訳は、既知; 5 clone, EST; 7 clone であった。2 clone では腫瘍の転移性との対応も見られた。

3. 肺がん・肝がんの発生、進展過程で発現が異なる遺伝子群の同定

肺がんには、発現の異なるバンドのうち最終的に 118 clone、肝がんには 86 clone について塩基配列を決定した。既知の遺伝子は、肺がん 23 clone、肝がん 33 clone、未知ないし EST はそれぞれ 95 clone, 22 clone であった。

D. 考察

1. マイクロダイセクション法による病変細胞の分離

がん組織にて発現している遺伝子をより詳細にみる場合、より正確な組織の分離採取法が必要である。今回 Laser microscope

systems を用いる事によりがん組織のがん部ならびに間質部から別々に mRNA を抽出することが出来た。また、上皮性ならびに間葉系のマーカーを調べることで、がん部と間質部が正確に分離採取されていることが確認された。

2. 肝がんの転移性により発現が異なる遺伝子群の同定

SCID mouse を用いた in vivo の系で転移、浸潤能に明瞭な違いを示した二つの cell line を材料として、Differential Display 法を用いて両者で発現の異なる遺伝子を同定し、更に転移性、悪性度が異なる肝細胞がん症例の腫瘍、非腫瘍部 18 組の cDNA のパネルを用いて発現の傾向についても検討した。特に臨床検体でも一定の傾向が見られた 12 clone については、肝がんの発生ないし悪性度との関連が示唆され、さらに詳細に検討を行う。

3. 肺がん・肝がんの発生、進展過程で発現が異なる遺伝子群の同定

組織学的悪性度の異なる肺がん、肝がんを用いた Differential Display 法による検討にて、多数の既知ならびに未知の遺伝子が同定された。既知の分子の中で、既にがんにおいて発現が亢進していると報告されている遺伝子、また細胞の分化の marker である遺伝子群をそれぞれ、がん部、及び非がん部において優位に上昇しているクローンとして同定しえた。例えば、非がん部において発現の保たれている分化 marker に関しては、肝細胞がんの悪性度が高くなるにしたがって、その発現が減弱していくことが、症例間の比較にて伺われ、組織学的所見とよく一致し、本法の妥当性も示された。

E. 結論

本研究は、疾病の原因となる或いは病態や予後を決定する疾病遺伝子を捉え、遺伝子レベルでの診断に基づく治療法の選択を可能にするために、疾病遺伝子発現データベースを蓄積することを目的とする。本年度は、マイクロダイセクション法による病変細胞の分離、肝がんの転移性により発現が異なる遺伝子群の同定、肺がん・肝がんの発生、進展過程で発現が異なる遺伝子群の同定などの検討を行った。今後は、マイクロダイセクションされた微量 RNA を対象に Differential Display 法を行い、発現に差のある遺伝子についてさらに in situ ハイブリダイゼーションによる情報も加え、各症例の病理所見、臨床経過と対応させた疾病遺伝子発現データベースを作成する。

F. 研究発表

論文発表

1. Kanai, Y., Hirohashi, S., et al., DNA hypermethylation at the D17S5 is associated with gastric carcinogenesis. *Cancer Lett.*, 122:135-141, 1998.
2. Komiya, T., Hirohashi, S., et al., Cloning of the novel gene intelectin, which is expressed in intestinal paneth cells in mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 251(3):759-762, 1998.
3. Hui, A-M., Hirohashi, S., et al., Reduced p27^{Kip1} expression in hepatocellular carcinomas. *Cancer Lett.*, 132:67-73, 1998.
4. Yoshioka, H., Hirohashi, S., et al., Analysis of loss of heterozygosity in small adenocarcinomas of the lung. *Jpn. J. Clin. Oncol.*, 28(4):240-244, 1998.
5. Anami, Y., Hirohashi, S., et al., Case Report: A case of double primary adenocarcinoma of the lung with

multiple atypical adenomatous hyperplasia. *Path.Int.*, 48(8):634-640,1998.

6. Takei,K.,Hirohashi,S.,et al., A novel tumor suppressor locus on chromosome 18q involved in the development of human lung cancer. *Cancer Res.*, 58(16):3700-3705,1998.

7. Sakao,Y.,Hirohashi,S.,et al., Microsatellite instability and frameshift mutations in the *Bax* gene in hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma. *Jpn.J.Cancer Res.*, 89(10):1020-1027,1998.

8. Tsuda,H.,Hirohashi,S.,et al., der(16)t(1;16)/der(1;16) in breast cancer detected by fluorescence in situ hybridization is an indicator of better patient prognosis. *Genes, Chromosomes & Cancer*, 24:72-77,1999.

9. Komiya,T.,Hirohashi,S.,et al., Cloning and identification of the gene *gob-5*, which is expressed in intestinal goblet cells in mice.

Biochem.Biophys.Res.Commun., 255(2):347-351,1999.

10.Kanai,Y.,Hirohashi,S.,et al., DNA hypermethylation at the D17S5 locus and reduced HIC-1 mRNA expression are associated with hepatocarcinogenesis. *Hepatology*, in press.

11.Tsuda,H.,Hirohashi,S.,et al., Correlation of the numerical and structural status of chromosome 16 with the histological type and grade of non-invasive and invasive breast carcinomas. *Int.J.Cancer*, in press.

マイクロダイセクションによるRNA抽出の精度向上

(分担) 研究者 野口雅之 筑波大学基礎医学系病理学教授

研究要旨：マイクロマニピュレーター、またレーザー光によるマイクロダイセクション法を用いて採取した少数の細胞から抽出した微量の核酸をpolymerase chain reaction (PCR)法を利用して解析するための方法論の検討を行った。まず1コピーの核酸解析が可能かどうかの検討を細胞診材料から抽出したDNAを用いて行った。その結果、K-ras 遺伝子やp53遺伝子の点突然変異は一個の腫瘍細胞を用いても検出可能であることがわかった。次にβ-actin 遺伝子とmethyltransferase (MTase) 遺伝子について、大腸癌細胞株HT29から抽出したRNAを用いてRT-PCR法によって増幅可能な最小量の細胞数を検討した。MTaseなど発現の限られた遺伝子発現に関しては、数回のPCR法を行うためには、現状では500個の細胞が必要である。今後検体採取法やRNA抽出法のさらなる改良によってより少ない量の細胞からより高品質のRNAを抽出できるようになることが必要である。

A. 研究目的

本研究において一つの大きな目標としている部位特異的な遺伝子発現データベース（個々の病変、病態に特異的な遺伝子発現データベース）の作成には、組織、細胞マイクロダイセクション法を用いて顕微鏡下に組織学的、細胞学的特徴を踏まえた材料の採取が不可欠であり、かつ採取されたとく微量なRNAから自由な遺伝子操作ができることが必要である。そこで組織、細胞マイクロダイセクション法の改良と、得られた微量組織、細胞から高品質のRNAを得るための方法論の開発を目的にした研究を行った。

B. 研究方法

(1) 微量な核酸からの遺伝子解析の可能性を明らかにするために実際の細胞診材料からDNAを採取し、K-ras 遺伝子、p53遺伝子の異常をpolymerase chain reaction - single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP) 法を用いて解析した。16例の肺癌切除後の再発胸水から癌細胞を同定し、マイクロマニピュレーターを用いたマイクロダイセクションを行い、腫瘍細胞を1から40個採取し、DNAを抽出した後、上記遺伝子異常を解析した。

(2) 実際にレーザー光を用いたマイクロダイセクション法にて材料を採取すると数十個程度の細胞でreversetranscriptase(RT) - PCR法が行えることが以前よりわかっていたが、組織の保存の程度や組織の種類によって結果が一定しない。そこで本年度は培養細胞という最も状態の良い材料を用い

て解析できる細胞数の限界値を知るとともにRNA抽出の最適法を検討した。用いた細胞株は大腸癌細胞株HT29でこれから抽出した80 ng相当のtotal RNAをもとにRT法にてcDNAを作成し、その4倍希釈系列を9本(最終 4^8 倍)作り、β-actinとmethyltransferase (MTase) についてPCR法を用いてその発現を解析した。また細胞数1万個から25個までの希釈系列をつくってこれからtotal RNA、あるいはmRNAを直接抽出し、上記遺伝子の発現をPCR法によって解析した。

C. 研究結果

(1) PCR-SSCP 法を行うと16例中6例の症例の外科切除材料にK-rasあるいはp53遺伝子の異常バンドが7本検出された。その内訳はK-ras exon 1の異常が1例、p53 exon 4, 5, 7の異常がそれぞれ1, 1, 4例である。このうち細胞診材料からマイクロダイセクションした40個の腫瘍細胞を用いて行ったPCR-SSCP法による解析でK-ras exon 1, p53 exon 5, 7で見つかった異常バンドをそれぞれ1, 1, 3例(5/7バンド、71.4%)に検出できた。さらに細胞1個を用いた解析で、K-ras exon 1, p53 exon 7の異常をそれぞれ1例ずつ検出することに成功した(2/7バンド、28.6%)。

(2) 大腸癌細胞株HT29からtotal RNAを抽出し、80 ng相当のtotal RNAからcDNAを作成し、4倍希釈系列を9本(最終 4^8 倍)を作り、β-actinとMTase 遺伝子についてRT-

PCRを行った。β-actin遺伝子発現は4⁸倍希釈したcDNAからでも検出可能であったが、MTaseの検出には4⁶倍以上の希釈cDNAからでは検出不可能であった。

次にHT29を用いて細胞数1万個から25個までの希釈系列を作り、これからtrizol (Gibco BRL)を用いてtotal RNAを抽出した。また同様な条件で調整した細胞からmRNAキャプチャーキット(Roche Diagnostic Inc.)を用いて直接mRNAを抽出した。2種類の方法で抽出したRNAを用いて上記の2種類の遺伝子をRT-PCR法にて増幅するとβ-actin遺伝子は25個の細胞で十分増幅可能であった。しかしMTase遺伝子増幅は1万個の細胞からでも安定して増幅することはできなかった。そこで解析するプライマーセットの設定(3'端から4297 bp)をより3'端(ポリA)に近い位置(3'端から1146 bp)に変更するとMTaseであっても500個の細胞があれば安定した増幅が可能であることがわかった。

D. 考察

RNAは標本の保存、あるいは抽出過程で簡単にその品質が劣化するので、はじめに1コピーの核酸からの遺伝子解析の可能性をDNAを用いて解析した。この結果、全ての症例で可能というわけではないが、1個の細胞を用いても1コピーの遺伝子の異常(点突然変異)を解析できることが明らかとなった。特に細胞診材料は組織切片のように薄切されていない、つまり観察している細胞すべての核酸が採取できる点で優れた病理材料といえる。

マイクロダイセクション法を用いた部位特異的RNA抽出の前段階としての培養細胞を用いた基礎的検討によって、発現の少ない遺伝子と多い遺伝子があった場合、増幅される限界の細胞数は遺伝子ごとに異なり、少数の細胞から遺伝子ライブラリーを作成する場合、微量な発現しかない遺伝子は無視される可能性があり、かたよったライブラリーになる恐れが高いことが分かった。またRT-PCR法による遺伝子発現の検出感度をあげるためにはプライマーセットの設定をできるだけ3'端(ポリA)に近い位置にすることが重要であることが分かつ

た。いずれにしても今回の検討ではβ-actinなどその発現が非常に多い遺伝子については25個以下の細胞数でも十分増幅可能であることが判明したが、MTaseなど発現が限られた遺伝子についてはかなりの数の細胞を用いないと現状では増幅不可能である。今後多種のレーザー光によるマイクロダイセクション法を比較検討して、さらに簡便に、また迅速に目的の細胞を採取する技術を改良するとともに採取した細胞からより簡単に高品質のRNAをできるだけ多く抽出できる技術の確立が必要である。

E. 結論

本年度の検討によって以下の3点が明らかになった。(1)1コピーのDNAからでもPCR法を用いた遺伝子増幅は可能である。(2)発現の多い遺伝子については細胞数25個以下でも遺伝子増幅可能であるがこの数値は遺伝子の発現レベルによってかなりの差がある。(3)検出感度を上げるためにはプライマーセットの設定をより3'端(ポリA)に近い領域にする必要がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

(1) Takei, K., Noguchi, M., et al., A novel tumor suppressor locus on chromosome 18q involved in the development of human lung cancer. *Cancer Res*, 58:3700-3705, 1998.

(2) Tokiwa, T., Noguchi, M., et al., SV40 large T antigen immortalization of rat hepatic stellate like cells. *In Vitro Cell Dev. Biol.* (in press)

2. 学会発表

(1) 野口雅之、肺野小型腺癌の病理とその問題点、第21回日本気管支学会総会(Work Shop)、1998年5月、

(2) Noguchi M. Synopsis of precursors of adenocarcinoma of the lung. XXII International Congress of the International Academy of Pathology, October 18-23, 1998.

G. 知的所有権の取得状況、なし

cDNAライブラリーの作製と遺伝子解析法の改良に関する研究

分担研究者 佐々木博己（国立がんセンター研究所分子腫瘍学部室長）

がん組織で発現する遺伝子の包括的な解析を行うため、cDNAチップ技術を導入する。本年度はその基礎的技術を確認するための研究を行った。第一に少量のRNAから合成したプローブでの検出感度を検討するため、がん組織で発現する約80の遺伝子をスライドガラス上に整列させたミニチップを作製した。第二に悪性度が高いスキルス胃がんで特異的に発現する遺伝子を同定するための実践的なチップの作製に向けてcDNAサブトラクションを行った。

A. 研究目的

過去10年間にがんの本態に迫る遺伝子レベルの解析が飛躍的に進んだ。その結果、発がん過程においては複数のがん遺伝子やがん抑制遺伝子が特異的に構造・発現異常を起こし、しかもその異常は多段階過程の中で集積する、という基本的理論がほぼ確立されたと言える。またヒトゲノム計画の進展によって全ての遺伝子構造が解明されようとしている。今後、がん研究が包括的な遺伝子発現の把握や遺伝子多型の大規模な解析が進めば、より個人の体質にあった良質で効率の良い医療が可能になることが期待される。そのための革新的な方法としてDNAチップ技術が注目を浴びており、本邦における本技術の開発・改良および敏速な導入が期待されている。しかし、実際ははじめられたばかりであるのが現状である。本年度は基礎的な研究として、スキルス胃がんで特異的に発現する遺伝子の分離・同定をモデル実験とし、少量のRNAからPCRによって増幅したcDNAを使ってチップの検出感度の検討を行うこととした。

B. 研究方法

1) 既知のがん遺伝子やがん抑制遺伝子を含むがん細胞において発現量の異なる80の遺伝子のcDNAをポリ陽イオンコートスライドガラスに静電結合で固定化したミニチップを作製した。この方法による固定化の効率は10%ほどと高くはないのでポリカルボジイミド樹脂をコートしたスライドガラスに共有結合する方法も検討した。

2) がんのタイプや転移能や抗癌剤抵抗性の相違を遺伝子の発現パターンで分類するために5万程の既知の遺伝子（公的データベースで検索できる遺伝子）で十分であるとゆう考えもある(closed system)。しかし発生の初期過程で発現され、成体では抑制される遺伝子がしばしばがんで再発現するという我々の研究結果（参考文献1）はがんはがんから分離した遺伝子で調べること(open system)によって本質的な遺伝子の分離につながる可能性を示唆する。そこでスキルス胃がんで特異的に発現するfetal oncogeneの存在（参考文献3）を調べるためサブトラ

クション（参考文献1,2）を行うことにした。

3) がん組織からの生きたがん細胞の分離法並びに質の良いRNAの分離法も検討する。

C. 研究成果

1) ポリカルボジイミド樹脂をコートしたガラスへの、cDNAの固定化率は90%以上と高かった。高感度な検出が期待される。またこの方法はアルデヒド基導入スライドガラスへの固定化のようにcDNAをアミノ化する必要がなく安価な検出法であるといえる。

2) スキルス胃がんで特異的に発現する遺伝子を網羅すべく、スキルス胃がん培養細胞株8株(KATOIII, HSC39, 40, 43, 44, 58, 59, 60)から精製したRNAからcDNAを合成し、正常胃粘膜および非スキルス胃がん培養細胞株8株から合成したcDNAとのサブトラクションを行った。サブトラクションの効率はスキルス胃がんで特異的に発現されるK-sam/FGFR2のC-terminal splicing variantsの配列の濃縮率で検定した。

3) がん組織からの生きたがん細胞の分離法は和歌山県立医科大学外科との共同研究によって行い、RNAの抽出やFISH解析にも使える分離法をうることができた。凍結がん組織からの良質のRNAの抽出としては液体チップで冷やしたスチール製の容器中で敏速に粉碎する方法がもっとも有効である結果を得た。

D. 考察

1) ポリカルボジイミド樹脂をコートしたガラスおよびアルデヒド基導入スライ

ドガラスへ固定化したミニcDNAチップを用い検出法の改良を行う必要がある。均一微量がん組織から抽出されるRNAの量は数 μ gと少量であることが多い。今後、作製したチップと反応させるためには遺伝子の発現量を保持し、さらに特定の配列を欠落させずに、PCRで増幅する方法を開発することが必要である。そのためcDNAの2次構造に左右されにくいプライマー配列とPCRの反応条件を決定することが重要である。現在、ほぼできつつある。

2) スキルス胃がんについてのサブトラクションは終了した。今後は正常胃粘膜で発現しないスキルス特異的遺伝子を複数分離し、部分的な塩基配列を決定後、データベースを検索するプロセスへ移行する予定である。さらにチップを作製し、実際の手術材料で個々の遺伝子発現を検討する。その際、3)の方法のスキルス胃がんへの応用やマイクロダイセクションの導入を含めがん組織からのRNAサンプルの調製を検討すべきである。またリンパ節転移が多くみられる食道がんで特徴的に発現する遺伝子を把握するため、70症例のRNAを抽出する計画を加える予定である。

E. 結論

スライドガラスへの固定化法とプローブの作製法の検討は完了した。今後、チップとのハイブリダイゼーションの条件と感度の検討を行う。同時にサブトラクション後のcDNAの特徴を解析し、チップを作製する。均一微量組織からのRNAの調製法の検討は継続して行う。

参考文献

1. Tanaka, M., Sasaki, H., et al.,
Genes preferentially expressed in
embryo stomach are predominantly
expressed in gastric cancer.
Cancer Res., 52:3372-3377, 1992.
2. Sasaki, H., et al.,
Highly efficient method for obtaining
a subtracted genomic DNA library
by the modified in-gel competitive
reassociation method.
Cancer Res., 54:5821-5823, 1994.
3. Itoh, H., Sasaki, H., et al.,
Preferential alternative splicing in
cancer generates a K-SAM messenger
RNA with higher transforming activity.
Cancer Res., 54:3237-3241, 1994.

F. 研究発表

論文発表

1. Fiddes, R. J., Sasaki, H., et al.,
Analysis of Grb7 recruitment by
heregulin-activated erbB receptors
reveals a novel target selectivity for
erbB3.
J. Biol. Chem., 273:7717-7724, 1998.
2. Sasaki, H., et al.,
Presence of *Streptococcus anginosus*
DNA in esophageal cancer, dysplasia of
esophagus, and gastric cancer.
Cancer Res., 58:2991-2995, 1998.
3. Takahama, Y., Sasaki, H., et al.,
Molecular cloning and expression of
cDNA encoding a rat leukemia
inhibitory factor.
Oncogene, 16:3189-3196, 1998.
4. Tanooka, H., Sasaki, H., et al.,
Homologous recombination between
p53 and its pseudogene in a radiation-

induced mouse tumor.

Cancer Res., 58:5649-5651, 1998.

学会発表

1. Sasaki, H., et al.
Structural analysis of 10q26, 11q13 and
17q12 amplicons including genes, core
regions and joint DNAs in human cancer.
The first international workshop on
Advanced Genomics., Tokyo, 1998.
2. 佐々木博己、上部消化器がんに感染す
る特異的細菌、第21回消化器内視鏡
若手の会、特別講演、1998.
3. 上田哲也、佐々木博己 他、*c-erbB2*
と*K-sam*は胃癌で単独で増幅する
か?、第70回胃癌学会総会、1998.
4. 佐々木博己他、上部消化器がん
Streptococcus anginosus、第57回日本
癌学会総会、ワークショップ、1998.
5. 上田哲也、佐々木博己他、スキルス胃
がんにおける*K-SAM*遺伝子を含む染
色体10q26増幅ユニットのコア領域の
同定、第57回日本癌学会総会、1998.
6. 根津雅彦、佐々木博己他、染色体
17q12 アンプリコン上の*C51*遺伝子の
単離並びに*c-ERBB2*遺伝子との融合転
写産物の解析、第57回日本癌学会総
会、1998.
7. 桑原勝孝、佐々木博己他、17q12 アン
プリコン間の連結部DNAの同定、
第57回日本癌学会総会、1998.
8. 田ノ岡宏、佐々木博己他、放射線誘発
マウス皮膚がんに見出されp53と
その疑似遺伝子の相同組み替え、
第57回日本癌学会総会、1998.
9. 鈴木俊宏、佐々木博己他、マウス
*SMRP/MRP5*のcDNAクローニング、
第57回日本癌学会総会、1998.

10. 柳原五吉、佐々木博己他、新たなスキルス胃癌細胞株の樹立と遺伝子増幅、第57回日本癌学会総会、1998.
11. 高浜靖、佐々木博己他、ラットLIF cDNAのクローニングによるラットES細胞の未分化能の維持、第57回日本癌学会総会、1998.
12. 池内達郎、佐々木博己他、ヒト食道がんTE6細胞株における遺伝子共増幅領域のFISH法による解析、第57回日本癌学会総会、1998.
13. 大浪澄子、佐々木博己他、AP-PCR法で同定された胃癌の増幅遺伝子の解析、第57回日本癌学会総会、1998.
14. 佐々木博己他、上部消化器がんと *Streptococcus*、国際歯科学会日本部会ミニシンポジウム、1998.
15. 佐々木博己他、食道がんに高頻度に見出される *Streptococcus* DNA、第21回日本分子生物学会1998.
16. 上田哲也、佐々木博己他、染色体10q26領域の増幅に伴うK-SAM/*FGFR2* 遺伝子の高頻度な欠失領域の同定、第21回日本分子生物学会、1998.
17. 根津雅彦、佐々木博己他、染色体17q12領域のコア増幅領域の塩基配列の決定と転写地図の作製、第21回日本分子生物学会、1998.
18. 桑原勝孝、佐々木博己他、がんにおける遺伝子増幅に伴う染色体17q12領域の組換えホットスポットの同定、第21回日本分子生物学会、1998.
19. 田ノ岡宏、佐々木博己他、ベータ線反復照射によるマウス発がん：p53/ Ψ p53キメラを生じた腫瘍の細胞起源の考察、第41回日本放射線影響学会、1998.

刊行図書

1. 佐々木博己、分子生物学実験講座、Surgery Frontier: 139-141 (1998)
2. 渡辺寛、加藤包一、日月裕司、佐々木博己、「癌転移-転移の分子メカニズムと臨床展望」渡辺寛、清木元治編、白峰社: 189-202 (1998)

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし