

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
(H10-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：PALM (Position and Ablation with Laser-Microscopes) システムならびに Laser Capture Microdissection (LCM) システムの2つの方法でがん組織の凍結切片標本よりがん細胞を厳密に分離採取可能でRNAを抽出出来ることを確認してきたが、本年度は、調整RNA量が比較的多く操作性に富むLCMをより実用レベルに近づけるため、レーザー径をより小さいものに変更し採取条件の検討を行った。これにより、高転移性のがんによく認められる浸潤先深部で散在しているようながん細胞の分離採取が効率よく行えるようになった。採取された検体から遺伝子発現解析に利用可能なRNAの調整が可能であることも確認した。この過程で、肺がん間質の線維芽細胞にc-Metが発現していることを見出し、その意義につき検討した。悪性度を異にする複数の肺がん、肝がん症例のがん・非がん部からRNAを抽出し、Differential Display法によりがん・非がんで明瞭な差を示すバンド約100本を同定した。これらの塩基配列を解析して、発現遺伝子プールとしてのカタログ化を行うと共に、実際の臨床材料で定量的RT-PCRを行い、多数症例における発現パターンの検討を行った。転移性、分化度など病理学的指標との相関が示された幾つかの遺伝子に関しては遺伝子の構造と産物の機能等より詳細な解析を行った。*in situ* ハイブリダイゼーションでは非常に分解されやすいRNAを切除術後の病理標本をサンプルとして取り扱うため、この保存に適した標本作製のための固定、包埋法についての検討を行い、昨年度開発した多検体プローブ下での反応条件を検討した。cDNAチップ技術を導入するにあたりその基礎的技術を確認するための研究を行った。第一にPCRを介した微量RNAからの不死化プローブの作製、第二に短鎖DNAの固定化技術の開発を行った。

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

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

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

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. レーザー・キャプチャー・マイクロダイセクション法を用いた遺伝子解析

LCMは、凍結切片と密着したキャプチャーの膜にレーザー照射を行って、標的としている組織・細胞を転写し回収してくる手技である。このLCM法により薄膜状に分離採取してきた組織標本からRNAの調整を行い、様々な遺伝子発現解析への応用が可能か否かを各種腫瘍組織を用いて検討した。組織の分離採取に用いた検体はOCT compoundで包埋処理した外科切除材料の凍結切片である。高転移性大腸がんの浸潤先進部および表層部のがん細胞を選択的に採取し、そこから抽出したRNAを鋳型に逆転写を行ったのち、いくつかのarbitrary primerとanchor primerとを利用して増幅、電気泳動によって解析するdifferential display法を行うことでサンプルについての詳細な定性解析と再現性の検討を行うとともに、浸潤先進部において特異的に発現している遺伝子群を網羅的に単離できる可能性に対する検討を行った。大腸がんにおけるmethyltransferaseの発現を例にとってRT-PCR法にて検討した。RNAサンプルはDNAチップ技術の進化などを合わせて考えると今後の中心課題の一つになると考えられたため、現在一般的に行われているAGPC法(Acid Guanidine Phenol-Chloroform法)以外に古典的なproteinase K法ならびに吸着カラム

(RNeasy kit (Qiagen))での抽出・調整を行い、微量核酸の測定が可能なGenespec (HITACHI)を用いた定量的検討を行うと共に、変性アガロースゲルによる電気泳動法を行って、各手法の比較検討を行った。さらに技術的側面として、病理学的に意味の有るレベルでの組織・細胞の精密な分収を行えるようLCMのレーザー径を従来の30 μ mから7.5 μ mおよび15 μ mへと変更し、その条件下における最適標本回収条件の検討

も併せて行った。

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、浸潤能に差があると思われる肝細胞がん細胞株を用い、Differential Display法にて発現に差のある遺伝子について検討し、転移、浸潤に関与する未知及び既知の分子群を同定した。具体的には、SV Total RNA Isolation System(Promega)でsubconfluentの状態、各cell lineよりtotal RNAを抽出及びDNase処理を行い、OD260値でそれぞれのRNA量を揃えた後、Fluorescence Differential Display Kit(TaKaRa)を用いて、arbitrary primer 24通り、Rhodamin標識されたanchor primer 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、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領域(中分化型12領域、低分化型6領域)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(Perkin Elmer 7700)。臨床検体

での発現にある種の傾向が認められた clone については、cDNA library screening や、5'RACE 法でより長い塩基配列情報を得て、遺伝子学的解析を進めた。

3. 肺がん・肝がんの発生、進展過程で発現が変化する遺伝子群の同定

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、塩基配列を決定すると共に、臨床パネルを用い、遺伝子発現につき RT-PCR 法にてさらに検討した。

4. *in situ* ハイブリダイゼーションを用いた発現プロファイリング

実験動物を用いた実験系では多くの器官・組織で感度良く発現部位の詳細な解析が現在可能となっている *in situ* ハイブリダイゼーション (ISH) 法だが、切除術後の病理標本に代表されるヒト組織では組織内の不安定な mRNA の分解がしばしば見受けられ、発現解析感度の不足が指摘される。そこで不安定な RNA を内包しているヒト組織サンプルを利用した ISH において検出感度の検定を行うべく、発現頻度の異なる遺伝子で大規模 EST 発現解析 (SAGE 法) データを利用して選び出し、これらを感度検出プローブとして利用することにした。(例: 大腸組織における keratin-8 (発現頻度 1%) ・ Keratin-19 (0.3%) ・ claudin-3 (0.2%) ・ Carbonic Anhydrase-1 (CA-1/0.05%) など) これら発現頻度の異なる各種遺伝子の cDNA 断片を RT-PCR を利用して単離後、転写プロモーターを持ったベクターにクロ

ーニングし、*in vitro* transcription によってマーカーである Digoxigenin を取り込ませながら RNA プローブの作製を行った。その後、これらのプローブを用いて、各種固定 (ホルマリン・パラホルムアルデヒド・

DEPC・未固定など) ・各種包埋 (Wax・パラフィン・OCT compound など) 条件のヒト組織標本サンプルに対して ISH を施行することにより、最適条件の検討を行った。また、ゲノムスケールでの解析を可能とするために欠かせない多検体プローブの効率的作製のための基礎検討として、鋳型となるプラスミドライブラリーの作製法と、プローブの効率的な精製についての検討を行った。

5. cDNA チップ技術導入の基礎的検討

発現解析技術の開発としては PCR を介した微量 RNA からの不死化プローブの作製、短鎖 DNA の固定化技術の開発を行った。不死化プローブの検定と診断に必要な遺伝子の分離は市販のチップを用いた。

(倫理面への配慮)

手術標本からの組織の採取にあたっては、患者の治療方針決定のための病理学的検索を切除後迅速かつ優先して行い、その残った組織を研究に用いることにより患者への不利益はないように行った。組織サンプルの由来する患者の臨床的情報のうち本研究に必要なものは、あらかじめカルテより調査しておく、研究の過程ではサンプルは無記名で番号でだけで扱い、患者の個人を特定していない。又、本研究の結果を組織を入手した患者の臨床に直接戻って解析することは行わないことにより、患者のプライバシーは厳守されている。さらに手術にて摘出した標本を、診断のために検索した後に、残りの試料を医学の進歩を目的とした種々の研究に使わせていただくことに関しては、平成 11 年より、患者に説明の上、同意を得て実施している。

C. 研究結果

1. レーザー・キャプチャー・マイクロダイセクション法を用いた遺伝子解析

LCMによって標的とする細胞を選択的に採取し、調整したRNAサンプルは遺伝子発現解析にたえうるレベルにあることが示された。一方RNAの定性的解析では解析可能なレベルの結果が得られはするものの、一部再現性に問題が有ることが明らかになった。問題がどのステップで起っているのかを調べるため、調整法以外にも包埋未処理標本やLCM未施行標本からのサンプル調整・解析に用いるサンプルの量・酵素の種類や反応条件などについて細かく比較検討した結果、最大の問題点は術後病理標本自体の質と、OCT compoundへの包埋作業に有ることが確認された。

LCMのレーザー径の変更に関する条件最適化を行った結果では、分離した組織への非分離組織の混入(例：がん細胞分取時の非がん細胞の混入)が明らかに少なくなり、散在しているがん細胞など従来のレーザー径では難しかった組織の分離選択も効率よく行えるようになった。

腫瘍組織および正常組織からLCMを用いてそれぞれ細胞群を約100個程度採取し methyltransferase の発現をRT-PCR法にて検討したところ腫瘍組織のcDNA推定量は正常組織のその約4倍程度に増加していることが分かった。

LCM法により、がん細胞と間質細胞を分離し、それぞれの分画に特異的に発現している遺伝子の同定を試みる過程において、偶然、従来がん細胞に主として発現していると考えられてきた oncogene の c-met が、間質の筋線維芽細胞に発現していることを見いだした。筋線維芽細胞における c-met の発現は培養細胞においても認められた。興味深いことに、HGF添加により培養筋線維芽細胞の増殖亢進、HGF中和抗体の添加により

筋線維芽細胞の増殖抑制が認められ、HGF/c-met が autocrine loop を形成しているものと考えられた。筋線維芽細胞の c-met 発現は、ヒト肺腺がんの臨床検体を用いた検討においても確認され、さらに筋線維芽細胞に c-met の発現した肺腺がんは予後不良であることも明らかとなった。

2. 肝がんの転移性により発現が異なる遺伝子群の同定

cell line 間で発現の異なる band のうち、最終的に 84 clone について塩基配列を決定すると共に、定量的 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。腫瘍部で高発現を示す clone141(EST)と非腫瘍部で高発現を示す clone21(EST)について、library screening を施行し、それぞれ 2324bp、2394bp の clone を得た。homology search の結果、clone141 は、orphan G protein-coupled receptor の一種であることが判明した。clone21 は、更に 5'RACE を施行し、ORF を含む全長と推測される clone を得たが、novel gene であった。臨床検体 HCC35 症例で定量的 RT-PCR を施行し、臨床病理学的に検討したところ、clone141 は、約半数の症例で腫瘍部で高発現を示し、特に女性でその傾向が強かった。clone21 は、門脈浸潤陽性症例、肝内転移陽性症例、低分化症例で腫瘍部の発現が有意に低下する傾向を示した。

3. 肺がん・肝がんの発生、進展過程で発現が変化する遺伝子群の同定

肝がんについては、がん部、非がん部にて発現の異なる band のうち、最終的に

50 clone について、塩基配列を決定した後、その内、40 clone に関して肝細胞がん 30 症例における発現を定量的な real time PCR にて検索し得た。既知の遺伝子として、albumin、heparin cofactor、plasminogen 等をはじめとした 18 clone を、未知の遺伝子としては、EST を含む 22 clone を得た。特に上述の遺伝子群に関しては、がん部において有意に発現の低下を示した。同じく既知の遺伝子として 4 回膜貫通型の蛋白 tetraspan が、肉眼型が多結節癒合型を示す腫瘍にて発現上昇を示すことを見出し、現在抗体を用いて、それらの症例における蛋白レベルでの発現の再確認とともに、細胞生物学的な意義の検討を行っている。

肺がんについては、上記三者間で発現の差を示す 116 clone を得た。うち 23 clone は既知の遺伝子、93 clone は EST ないし未知の遺伝子であった。既知遺伝子の中では、ERM ファミリーの radixin が肺腺がんでは低下すること、 $\alpha_v \beta_3$ integrin の ligand である osteopontin が逆に肺腺がんにおいて発現亢進すること等を明らかにした。これら 2 物質に関してはさらに免疫染色を行い、蛋白レベルでの発現の差を確認した。

4. *in situ* ハイブリダイゼーションを用いた発現プロファイリング

発現感度の点では、組織を未固定で凍結し、クリオスタットを用いて切片を作製したサンプルのものが最も良く、この系では発現頻度が 0.05% 程度の遺伝子 (CA-1 など) も十分検出できた。鋳型となるプラスミドライブラリーとしてはプローブとして適当なサイズ分布をもち、遺伝子上の部位として偏りのないライブラリーの作製が可能なが示された。さらにプローブ精製において従来行われていた沈殿法でなく、プレートフィルターを利用したカラム精製が応用可能なこ

とを示すことが出来た。

5. cDNA チップ技術導入の基礎的検討

本年は微量 RNA (100ng) の 3' mRNA 断片に T7RNA ポリメラーゼのプロモーター配列を付加し、PCR で増幅する方法を開発した。この PCR 産物を鋳型とすれば T7RNA ポリメラーゼによって随時 cRNA を合成することが可能である (RNA プローブの不死化)。各遺伝子のもともとの発現量を保って合成されているか、実際に約 500 の遺伝子を含む cDNA チップで検討した結果、約 7 割以上の遺伝子が保持されかつ全体的に高感度になっていることを確認した (特許申請中)。

昨年度はポリカルボジイミド樹脂をコートしたガラスへの、短鎖 cDNA (100-300bp) の固定化率は 90% 以上と高く、高感度なチップの作製が期待されることを示した。本年度はスキルス胃がん細胞から合成した約 200 個の cDNA (100-500bp) をこの方法でスライドガラスに固定化し、スキルス胃がん細胞から調製したプローブを反応させ、実際に短鎖 DNA から得られるシグナルが十分に高いことを確認した。

D. 考察

1. レーザー・キャプチャー・マイクロダイセクション法を用いた遺伝子解析
今後の最大の課題は、現時点でも十分な解析レベルにある DNA・蛋白質と比較して、質的に再現性の問題が多い RNA サンプルにおいて、いかにして再現性を有した質の高いサンプル調整を行っていかにかかっている。ヒト術後標本を用いている点から、ある程度出発点の標本の質に対しては妥協せざるを得ないため、マイクロダイセクションを行った後に RNA 抽出が再現良く実施可能な固定・包埋法の開発と、薄膜標本からのより安定な RNA 抽出手法の開発が求められる。

また得られる生体高分子サンプルはかなり微量であるため、発現に関しての定量的な解析を行った際の信頼性については十分注意を払う必要が有ると考えられる。

肺がん間質の線維芽細胞に c-Met が発現されていることを見出し、その意義につき検討したが、得られた知見は、間質の筋線維芽細胞の活性化が、がんの浸潤転移に関わっていることを示唆しており興味深い。

2. 肝がんの転移性により発現が異なる遺伝子群の同定

肝細胞がんは、その多中心性発生と高頻度に肝内転移が起こるといふ生物学的特性から、いまだに予後不良ながんのひとつである。しかし、肝内転移、浸潤の分子機構については、未だ不明な点が多い。今回、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 HCC cell line を材料として、Differential Display 法を用いて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 35 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、主に解析を進めている 2 clone(clone141,21)に関しては、パネル上肝がんの発生ないし悪性度との関連が示唆され、生物学的な意義を含め更なる詳細な検討を行う予定である。

3. 肺がん・肝がんの発生、進展過程で発現が変化する遺伝子群の同定

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、既知及び未知遺伝子の、肺がん・肝細胞がんにおける詳細な発現プロファイルを得た。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。また、いくつかの clone に関しては、門脈浸潤など悪性度との関連が示唆されるものもあり、更に詳細な検討を進めることで肺がん・肝細胞がんの発がん、進展に関わる既知遺伝子、未知遺伝子の同定が可能になるものと考ええる。

4. *in situ* ハイブリダイゼーションを用いた発現プロファイリング

現在の凍結切片を用いた方法は解析感度の点では十分な物であるが、今後予定している多検体を想定した解析には効率の点で問題が有ると考えられる。酵素化学的な増幅手法などを適宜利用することで、発現感度を高め、感度の点では劣るものの多検体サンプルの効率的な作製の点で大きな利点があるような固定法や包埋法などを更に検討することが必要である。

また、部域特異的に発現の変化する遺伝子をより効率良く解析するために、サブトラクションなどを行った遺伝子ライブラリーをプローブ作製の鋳型として用いることを試み、解析効率の向上を検討していく予定である。

5. cDNA チップ技術導入の基礎的検討

不死化プローブの作製法に関しては 1-10ng (100-1000 cells から回収される) 程度の微量 RNA からの作製法をさらに開発する。具体的には微量 RNA から一旦 T7RNA ポリメラーゼの配列を付加した oligodT プライマーで cDNA を合成し、T7RNA ポリメラーゼによって cRNA を増幅後、PCR を用いて 3'mRNA 断片を増幅し、さらに T7RNA

ポリメラーゼによってcRNAを増幅する2段階法でプローブを作製する計画である。微量RNAからの不死化プローブの作製技術は微量の病理組織とくにマイクロダイセクションのサンプルを用いたDNAチップでの発現解析に有効である。

ポリカルボジイミド樹脂による短鎖DNAの固定化技術はほぼ完成したものと考えられる。この技術は特殊な化学反応を基盤にしたもので、cDNAやオリゴマーの末端を修飾する必要がなく、安価な臨床診断の開発に必要な条件を充たす。また特定のがん細胞（たとえば浸潤部のがん細胞）からPCRによって作製したcDNAライブラリー、Differential Display法やサブトラクション法で濃縮した短いcDNA断片をチップへ固定化する上で有用である。

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、レーザー・キャプチャー・マイクロダイセクション法を用いた遺伝子発現解析、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、進展過程で発現が変化する遺伝子群の同定、*in situ* ハイブリダイゼーションを用いた発現プロファイリング解析のための検討、cDNAチップ技術導入の基礎的検討を行った。今後は、マイクロダイセクションされた微量RNAを対象に、サブトラクションなどを行った遺伝子ライブラリーを作製し、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. Kondo, Y., Hirohashi, S., et al., β -catenin accumulation and mutation of exon 3 of the β -catenin gene in hepatocellular carcinoma. *Jpn. J. Cancer Res.*, 90(12): 1301-1309, 1999.
2. Saito, A., Hirohashi, S., et al. Disruption of E-cadherin-mediated cell adhesion systems in gastric cancers in young patients. *Jpn. J. Cancer Res.*, 90(9): 993-999, 1999.
3. Tomizawa, Y., Noguchi, M., Hirohashi, S., et al. Correlation between the status of the *p53* gene and survival in patients with stage I non-small cell lung carcinoma. *Oncogene*, 18: 1007-1014, 1999.
4. 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 (Pred. Oncol.)*, 84: 381-387, 1999.
5. Kondo, Y., Hirohashi, S., et al. Microsatellite instability associated with hepatocarcinogenesis. *J. Hepatology*, 31: 529-536, 1999.
6. Fujii, G., Hirohashi, S., et al. Analysis of nuclear localization signals using a green fluorescent protein-fusion protein library. *Exp. Cell Res.* 251: 299-306, 1999.
7. Ono, Y., Hirohashi, S., et al. Clinicopathological significance of laminin-5 γ 2 chain expression in squamous cell carcinoma of the tongue: immunohistochemical analysis of 67

- lesions. *Cancer*, 85: 2315–2321, 1999.
8. Tomizawa, Y., Noguchi, M., Hirohashi, S., et al. Prognostic significance of allelic imbalances on chromosome 9p in stage I non-small cell lung carcinoma. *Clin. Cancer Res.*, 5: 1139–1146, 1999.
 9. Ochiai, A., Hirohashi, S., et al. Multiple mechanisms for inactivation of E-cadherin cell adhesion system in cancer. In: *Epithelial Morphogenesis in Development and Disease*, eds. by W. Birchmeier & C. Birchmeier, pp.427–444, Harwood Academic Publishers gmbh, Amsterdam, 1999.
 10. Komiya, T., Hirohashi, S., et al. Cloning of the gene *gob-4*, which is expressed in intestinal goblet cells in mice. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1444: 434–438, 1999.
 11. Kanai, Y., Hirohashi, S., et al., DNA hypermethylation at the D17S5 locus and reduced HIC-1 mRNA expression are associated with hepatocarcinogenesis. *Hepatology*, 29(3): 703–709, 1999.
 12. 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.
 13. Osada, T., Hirohashi, S., et al. Acquisition of glutamine synthetase expression in human hepatocarcinogenesis: relation to disease recurrence and possible regulation by ubiquitin-dependent proteolysis. *Cancer*, 85(4): 819–831, 1999.
 14. Harabayashi, T., Hirohashi, S., et al. Reduction of integrin $\alpha 6 \beta 4$ and enhanced migration on laminin in association with intraepithelial spreading of urinary bladder carcinomas. *J. Urology*, 161(4): 1364–1371, 1999.
 15. 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.
 16. Kanai, Y., Hirohashi, S., et al. Aberrant DNA methylation precedes loss of heterozygosity on chromosome 16 in chronic hepatitis and liver cirrhosis. *Cancer Lett.*, 148(1): 73–80, 2000.
 17. Ishii, Y., Hirohashi, S., et al. Integrin $\alpha 6 \beta 4$ as a suppressor and a predictive marker for peritoneal dissemination in human gastric cancer. *Gastroenterology*, 118(3): 497–506, 2000.
 18. Tokiwa, T., Noguchi, M., et al., SV40 large T antigen immortalization of rat hepatic stellate-like cells. *In Vitro Cell Dev. Biol.*, 35: 246–247, 1999.
 19. Hou, M., Noguchi, M., et al., DNA methylation and expression of *p16^{INK4A}* gene in pulmonary adenocarcinoma and anthracosis in background lung. *Int. J. Cancer (Pred. Oncol.)*, 84: 609–613, 1999.
 20. Anami, Y., Noguchi, M., Hirohashi, S., et al., Amplotyping of microdissected, methanol-fixed lung carcinoma by arbitrarily primed polymerase chain reaction. *Int. J. Cancer (Pred. Oncol.)*, 89: 19–25, 2000.

21. Iijima, T., Noguchi, M., et al., Clonal proliferation of B lymphocytes in the germinal center of human reactive lymph nodes: Possibility of overdiagnosis of B-cell clonal proliferation. *Diag. Mol. Pathol.*, in press.
22. Dai, Y., Noguchi, M., et al., Application of the p53 gene and k-ras gene mutation patterns for cytological diagnosis of recurrent lung carcinoma. Combined analysis with microdissection and PCR-SSCP. *Cancer Cytopathol.*, in press.
23. Takahashi, A., Sasaki, H., et al., Identification of receptor genes in renal cell carcinoma associated with angiogenesis by differential hybridization. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 257: 855-859, 1999.
24. Nezu, M., Sasaki, H., et al., Identification of a novel promoter and exons of the *c-ERBB2* gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 258: 499-505, 1999.
25. Ueda, T., Sasaki, H., et al., Novel exons on more than 200 kb downstream of the previously described 3' exon of the *K-sam* gene for generating active forms of KGF receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 265: 739-745, 1999.
26. Ueda, T., Sasaki, H., et al., Deletion of the carboxyl-terminal exons of *K-sam/FGFR2* by short homology mediated recombination, generating preferential expression of specific mRNAs. *Cancer Res*, 59: 6080-6086, 1999.
27. Jones, N., Sasaki, H., et al., Identification of Tek/Tie2 binding partners. *J. Biol. Chem.*, 274(43): 30896-30905, 1999.
28. Li, X-J, Sasaki, H., et al., Mxi mutation in human neurofibrosarcomas. *Jpn. J. Cancer Res.*, 90: 740-746, 1999.
29. Suzuki, T., Sasaki, H., et al., Detailed structural analysis on both human *MRP5* and mouse *mrp5* transcripts. *Gene*, 242: 167-173, 2000.

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

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：PALM (Position and Ablation with Laser-Microscopes)システムならびに Laser Capture Microdissection (LCM)システムの2つの方法でがん組織の凍結切片標本よりがん細胞を厳密に分離採取可能でRNAを抽出出来ることを確認してきたが、本年度は、調整RNA量が比較的多く操作性に富む LCM をより実用レベルに近づけるため、レーザー径をより小さいものに変更し採取条件の検討を行った。これにより、高転移性のがんによく認められる浸潤先深部で散在しているようながん細胞の分離採取が効率よく行えるようになった。採取された検体から遺伝子発現解析に利用可能なRNAの調整が可能であることも確認した。この過程で、肺がん間質の線維芽細胞に c-Met が発現していることを見出し、その意義につき検討した。悪性度を異にする複数の肺がん、肝がん症例のがん・非がん部からRNAを抽出し、Differential Display 法によりがん・非がんで明瞭な差を示すバンド約 100 本を同定した。これらの塩基配列を解析して、発現遺伝子プールとしてのカタログ化を行うと共に、実際の臨床材料で定量的 RT-PCR を行い、多数症例における発現パターンの検討を行った。転移性、分化度など病理学的指標との相関が示された幾つかの遺伝子に関しては遺伝子の構造と産物の機能等より詳細な解析を行った。*in situ* ハイブリダイゼーションでは非常に分解されやすい RNA を切除術後の病理標本をサンプルとして取り扱うため、この保存に適した標本作製のための固定、包埋法についての検討を行い、昨年度開発した多検体プローブ下での反応条件を検討した。

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. レーザー・キャプチャー・マイクロダイセクション法を用いた遺伝子解析
LCMは、凍結切片と密着したキャプチャーの膜にレーザー照射を行って、標的としていた組織・細胞を転写し回収してくる手技である。この LCM 法により薄膜状に分離採取してきた組織標本から RNA の調整を行い、様々な遺伝子発現解析への応用が可能か否かを各種腫瘍組織を用いて検討した。組織の分離採取に用いた検体は OCT compound で包埋処理した外科切除材料の凍結切片である。高転移性大腸がんの浸潤先進部および表層部のがん細胞を選択的に採取し、そこから抽出した RNA を鋳型に逆転写を行ったの

ち、いくつかの arbitrary primer と anchor primer とを利用して増幅、電気泳動によって解析する differential display 法を行うことでサンプルについての詳細な定性解析と再現性の検討を行うとともに、浸潤先進部において特異的に発現している遺伝子群を網羅的に単離できる可能性に対する検討を行った。RNA サンプルは DNA チップ技術の進化などを合わせて考えると今後の中心課題の一つになると考えられたため、現在一般的に行われている AGPC 法 (Acid Guanidine Phenol-Chloroform 法) 以外に古典的な proteinase K 法ならびに吸着カラム (RNeasy kit (Qiagen)) での抽出・調整を行い、微量核酸の測定が可能な Genespec (HITACHI) を用いた定量的検討を行うと共に、変性アガロースゲルによる電気泳動法を行って、各手法の比較検討を行った。さらに技術的側面として、病理学的に意味の有るレベルでの組織・細胞の精密な分取を行えるよう LCM のレーザー径を従来の $30 \mu\text{m}$ から $7.5 \mu\text{m}$ および $15 \mu\text{m}$ へと変更し、その条件下における最適標本回収条件の検討も併せて行った。

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、浸潤能に差があると思われる肝細胞がん細胞株を用い、Differential Display 法にて発現に差のある遺伝子について検討し、転移、浸潤に関与する未知及び既知の分子群を同定した。具体的には、SV Total RNA Isolation System (Promega) で subconfluent の状態で、各 cell line より total RNA を抽出及び DNase 処理を行い、OD260 値でそれぞれの RNA 量を揃えた後、Fluorescence Differential Display Kit (TaKaRa) を用いて、arbitrary primer 24 通り、Rhodamin 標識された anchor primer 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、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 領域 (中分化型 12 領域、低分化型 6 領域) 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 (Perkin Elmer 7700)。臨床検体での発現にある種の傾向が認められた clone については、cDNA library screening や、5'RACE 法でより長い塩基配列情報を得て、遺伝子学的解析を進めた。

3. 肺がん・肝がんの発生、進展過程で発現が変化する遺伝子群の同定

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。肺がんについては正常 2 例、非浸潤がん 3 例、浸潤がん 2 例、肝がんにつ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、塩基配列を決定すると共に、臨床パネルを用い、遺伝子発現につき RT-PCR 法にてさらに検討した。

4. *in situ* ハイブリダイゼーションを用いた発現プロファイリング

実験動物を用いた実験系では多くの器官・組織で感度良く発現部位の詳細な解析が現在可能となっている *in situ* ハイブリダイゼーション (ISH) 法だが、切除術後の病理標本に代表されるヒト組織では組織内の不安定な mRNA の分解がしばしば見受けられ、発現解析感度の不足が指摘される。そこで不安定な RNA を内包しているヒト組織サンプルを利用した ISH において検出感度の検定を行うべく、発現頻度の異なる遺伝子を大規模 EST 発現解析 (SAGE 法) データを利用して選び出し、これらを感度検出プローブとして利用することにした。(例: 大腸組織における keratin-8 (発現頻度 1%) ・ Keratin-19 (0.3%) ・ claudin-3 (0.2%) ・ Carbonic Anhydrase-1(CA-1/0.05%) など) これら発現頻度の異なる各種遺伝子の cDNA 断片を RT-PCR を利用して単離後、転写プロモーターを持ったベクターにクローニングし、*in vitro* transcription によってマーカーである Digoxigenin を取り込ませながら RNA プローブの作製を行った。その後、これらのプローブを用いて、各種固定(フォルマリン・パラホルムアルデヒド・DEPC・未固定など)・各種包埋 (Wax・パラフィン・OCT compound など) 条件のヒト組織標本サンプルに対して ISH を施行することにより、最適条件の検討を行った。また、ゲノムスケールでの解析を可能とするために欠かせない多検体プローブの効率的作製のための基礎検討として、鋳型となるプラスミドライブラリーの作製法と、プローブの効率的な精製についての検討を行った。

(倫理面への配慮)

手術標本からの組織の採取にあたっては、患者の治療方針決定のための病理学的検索を切除後迅速かつ優先して行い、その残った組

織を研究に用いることにより患者への不利益はないように行った。組織サンプルの由来する患者の臨床的情報のうち本研究に必要なものは、あらかじめカルテより調査しておく、研究の過程ではサンプルは無記名で番号でだけで扱い、患者の個人を特定していない。又、本研究の結果を組織を入手した患者の臨床に直接戻って解析することは行わないことにより、患者のプライバシーは厳守されている。さらに手術にて摘出した標本を、診断のために検索した後に、残りの試料を医学の進歩を目的とした種々の研究に使わせていただくことに関しては、平成 11 年より、患者に説明の上、同意を得て実施している。

C. 研究結果

1. レーザー・キャプチャー・マイクロダイセクション法を用いた遺伝子解析

LCM によって標的とする細胞を選択的に採取し、調整した RNA サンプルは遺伝子発現解析にたえうるレベルにあることが示された。一方 RNA の定性的解析では解析可能なレベルの結果が得られはするものの、一部再現性に問題が有ることが明らかになった。問題がどのステップで起っているのかを調べるため、調整法以外にも包埋未処理標本や LCM 未施行標本からのサンプル調整・解析に用いるサンプルの量・酵素の種類や反応条件などについて細かく比較検討した結果、最大の問題点は術後病理標本自体の質と、OCT compound への包埋作業に有ることが確認された。

LCM のレーザー径の変更に関する条件最適化を行った結果では、分離した組織への非分離組織の混入(例: がん細胞分取時の非がん細胞の混入)が明らかに少なくなり、散在しているがん細胞など従来のレーザー径では難しかった組織の分離選択も効率よく行えるようになった。

LCM 法により、がん細胞と間質細胞を分

離し、それぞれの分画に特異的に発現している遺伝子の同定を試みる過程において、偶然、従来がん細胞に主として発現していると考えられてきた oncogene の c-met が、間質の筋線維芽細胞に発現していることを見いだした。筋線維芽細胞における c-met の発現は培養細胞においても認められた。興味深いことに、HGF 添加により培養筋線維芽細胞の増殖亢進、HGF 中和抗体の添加により筋線維芽細胞の増殖抑制が認められ、HGF/c-met が autocrine loop を形成しているものと考えられた。筋線維芽細胞の c-met 発現は、ヒト肺腺がんの臨床検体を用いた検討においても確認され、さらに筋線維芽細胞に c-met の発現した肺腺がんは予後不良であることも明らかとなった。

2. 肝がんの転移性により発現が異なる遺伝子群の同定

cell line 間で発現の異なる band のうち、最終的に 84 clone について塩基配列を決定すると共に、定量的 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。腫瘍部で高発現を示す clone141(EST)と非腫瘍部で高発現を示す clone21(EST)について、library screening を施行し、それぞれ 2324bp、2394bp の clone を得た。homology search の結果、clone141 は、orphan G protein-coupled receptor の一種であることが判明した。clone21 は、更に 5'RACE を施行し、ORF を含む全長と推測される clone を得たが、novel gene であった。臨床検体 HCC35 症例で定量的 RT-PCR を施行し、臨床病理学的に検討したところ、clone141 は、約半数の症例で腫瘍部で高発

現を示し、特に女性でその傾向が強かった。clone21 は、門脈浸潤陽性症例、肝内転移陽性症例、低分化症例で腫瘍部の発現が有意に低下する傾向を示した。

3. 肺がん・肝がんの発生、進展過程で発現が変化する遺伝子群の同定

肝がんについては、がん部、非がん部にて発現の異なる band のうち、最終的に 50 clone について、塩基配列を決定した後、その内、40 clone に関して肝細胞がん 30 症例における発現を定量的な real time PCR にて検索し得た。既知の遺伝子として、albumin、heparin cofactor、plasminogen 等をはじめとした 18 clone を、未知の遺伝子としては、EST を含む 22 clone を得た。特に上述の遺伝子群に関しては、がん部において有意に発現の低下を示した。同じく既知の遺伝子として 4 回膜貫通型の蛋白 tetraspan が、肉眼型が多結節癒合型を示す腫瘍にて発現上昇を示すことを見出し、現在抗体を用いて、それらの症例における蛋白レベルでの発現の再確認とともに、細胞生物学的な意義の検討を行っている。

肺がんについては、上記三者間で発現の差を示す 116 clone を得た。うち 23 clone は既知の遺伝子、93 clone は EST ないし未知の遺伝子であった。既知遺伝子の中では、ERM ファミリーの radixin が肺腺がん低発現を示すこと、 $\alpha_v\beta_3$ integrin の ligand である osteopontin が逆に肺腺がんにおいて発現亢進すること等を明らかにした。これら 2 物質に関してはさらに免疫染色を行い、蛋白レベルでの発現の差を確認した。

4. *in situ* ハイブリダイゼーションを用いた発現プロファイリング

発現感度の点では、組織を未固定で凍結し、クリオスタットを用いて切片を作製したサ

ンプルのものが最も良く、この系では発現頻度が0.05%程度の遺伝子 (CA-1 など) も十分検出できた。鋳型となるプラスミドライブラリーとしてはプローブとして適当なサイズ分布をもち、遺伝子上の部位として偏りのないライブラリーの作製が可能なが示された。さらにプローブ精製において従来行われていた沈殿法でなく、プレートフィルターを利用したカラム精製が応用可能なことを示すことが出来た。

D. 考察

1. レーザー・キャプチャー・マイクロダイセクション法を用いた遺伝子解析

今後の最大の課題は、現時点でも十分な解析レベルにある DNA・蛋白質と比較して、質的に再現性の問題が多い RNA サンプルにおいて、いかにして再現性を有した質の高いサンプル調整を行っていけるかにかかっている。ヒト術後標本を用いている点から、ある程度出発点の標本の質に対しては妥協せざるを得ないため、マイクロダイセクションを行った後に RNA 抽出が再現良く実施可能な固定・包埋法の開発と、薄膜標本からのより安定な RNA 抽出手法の開発が求められる。また得られる生体高分子サンプルはかなり微量であるため、発現に関しての定量的な解析を行った際の信頼性については十分注意を払う必要が有ると考えられる。

肺がん間質の線維芽細胞に c-Met が発現されていることを見出し、その意義につき検討したが、得られた知見は、間質の筋線維芽細胞の活性化が、がんの浸潤転移に関わっていることを示唆しており興味深い。

2. 肝がんの転移性により発現が異なる遺伝子群の同定

肝細胞がんは、その多中心性発生と高頻度に肝内転移が起こるといった生物学的特性から、いまだに予後不良ながんのひとつである。しかし、肝内転移、浸潤の分子機構について

は、未だ不明な点が多い。今回、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 HCC cell line を材料として、Differential Display 法を用いて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 35 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、主に解析を進めている 2 clone(clone141,21) に関しては、パネル上肝がんの発生ないし悪性度との関連が示唆され、生物学的な意義を含め更なる詳細な検討を行う予定である。

3. 肺がん・肝がんの発生、進展過程で発現が変化する遺伝子群の同定

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、既知及び未知遺伝子の、肺がん・肝細胞がんにおける詳細な発現プロファイルを得た。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。また、いくつかの clone に関しては、門脈浸潤など悪性度との関連が示唆されるものもあり、更に詳細な検討を進めることで肺がん・肝細胞がんの発がん、進展に関わる既知遺伝子、未知遺伝子の同定が可能になるものと考えられる。

4. *in situ* ハイブリダイゼーションを用いた発現プロファイリング

現在の凍結切片を用いた方法は解析感度の点では十分な物であるが、今後予定している多検体を想定した解析には効率の点で問題が有ると考えられる。酵素化学的な増幅手法などを適宜利用することで、発現感度を高め、感度の点では劣るものの多検体サンプルの効率的な作製の点で大きな利点があるような固定法や包埋法などを更に検討することが必要である。

また、部域特異的に発現の変化する遺伝子をより効率良く解析するために、サブトラクションなどを行った遺伝子ライブラリーをプローブ作製の鋳型として用いることを試み、解析効率の向上を検討していく予定である。

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、レーザー・キャプチャー・マイクロダイセクション法を用いた遺伝子発現解析、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、進展過程で発現が変化する遺伝子群の同定、*in situ* ハイブリダイゼーションを用いた発現プロファイリング解析のための検討を行った。今後は、マイクロダイセクションされた微量RNAを対象に、サブトラクションなどを行った遺伝子ライブラリーを作製し、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. Kondo, Y., Hirohashi, S., et al., β -catenin accumulation and mutation of exon 3 of the β -catenin gene in hepatocellular carcinoma. *Jpn. J. Cancer Res.*, 90(12): 1301-1309, 1999.
2. Saito, A., Hirohashi, S., et al. Disruption of E-cadherin-mediated cell adhesion systems in gastric cancers in young patients. *Jpn. J. Cancer Res.*, 90(9): 993-999, 1999.
3. Tomizawa, Y., Noguchi, M., Hirohashi, S., et al. Correlation between the status of the *p53* gene and survival in patients with stage I non-small cell lung carcinoma. *Oncogene*, 18: 1007-1014, 1999.
4. 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 (Pred. Oncol.)*, 84: 381-387, 1999.
5. Kondo, Y., Hirohashi, S., et al. Microsatellite instability associated with hepatocarcinogenesis. *J. Hepatology*, 31: 529-536, 1999.
6. Fujii, G., Hirohashi, S., et al. Analysis of nuclear localization signals using a green fluorescent protein-fusion protein library. *Exp. Cell Res.* 251: 299-306, 1999.
7. Ono, Y., Hirohashi, S., et al. Clinicopathological significance of laminin-5 γ 2 chain expression in squamous cell carcinoma of the tongue: immunohistochemical analysis of 67

- lesions. *Cancer*, 85: 2315–2321, 1999.
8. Tomizawa, Y., Noguchi, M., Hirohashi, S., et al. Prognostic significance of allelic imbalances on chromosome 9p in stage I non-small cell lung carcinoma. *Clin. Cancer Res.*, 5: 1139–1146, 1999.
9. Ochiai, A., Hirohashi, S., et al. Multiple mechanisms for inactivation of E-cadherin cell adhesion system in cancer. In: *Epithelial Morphogenesis in Development and Disease*, eds. by W. Birchmeier & C. Birchmeier, pp.427–444, Harwood Academic Publishers gmbh, Amsterdam, 1999.
10. Komiya, T., Hirohashi, S., et al. Cloning of the gene *gob-4*, which is expressed in intestinal goblet cells in mice. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1444: 434–438, 1999.
11. Kanai, Y., Hirohashi, S., et al., DNA hypermethylation at the D17S5 locus and reduced HIC-1 mRNA expression are associated with hepatocarcinogenesis. *Hepatology*, 29(3): 703–709, 1999.
12. 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.
13. Osada, T., Hirohashi, S., et al. Acquisition of glutamine synthetase expression in human hepatocarcinogenesis: relation to disease recurrence and possible regulation by ubiquitin-dependent proteolysis. *Cancer*, 85(4): 819–831, 1999.
14. Harabayashi, T., Hirohashi, S., et al. Reduction of integrin $\beta 4$ and enhanced migration on laminin in association with intraepithelial spreading of urinary bladder carcinomas. *J. Urology*, 161(4): 1364–1371, 1999.
15. 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.
16. Kanai, Y., Hirohashi, S., et al. Aberrant DNA methylation precedes loss of heterozygosity on chromosome 16 in chronic hepatitis and liver cirrhosis. *Cancer Lett.*, 148(1): 73–80, 2000.
17. Ishii, Y., Hirohashi, S., et al. Integrin $\alpha 6 \beta 4$ as a suppressor and a predictive marker for peritoneal dissemination in human gastric cancer. *Gastroenterology*, 118(3): 497–506, 2000.

厚生科学研究補助金（ヒトゲノム・遺伝子治療研究事業）
（分担）研究報告書

マイクロダイセクション法による 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：2種類のレーザー光を用いたマイクロダイセクション法によって採取した少数の固定細胞から抽出した微量の RNA を reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR)法を利用して解析するための方法論の検討を去年度に引き続き行った。まず採取方法として炭酸ガスレーザー光と窒素ガスレーザー光を比較検討し、さらに RNA 抽出のための最適プロトコールを作成した。このプロトコールによりそれぞれ約 100 個の大腸癌細胞と正常大腸上皮細胞との methyltransferase(MTase)発現を手術材料を用いて定量的に解析すると癌細胞は正常大腸上皮細胞より MTase の発現が数倍程度亢進していることがわかった。以上よりマイクロダイセクション法にて採取したごく微量の組織細胞を用いた RT-PCR が可能であり、定量的 RT-PCR 法を用いた微小材料からの Mtase mRNA 発現解析ができることが示された。

A. 研究目的

本研究において一つの大きな目標に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、まず組織マイクロダイセクションを用いて顕微鏡下で形態学的特徴を踏まえた材料の採取を可能にすることが必要である。また採取されたごく微量な材料から高品質な RNA を抽出し、自由な遺伝子操作ができなければならない。そこで組織マイクロダイセクション法の改良と得られた微量組織から高品質な RNA を抽出するための方法論の開発を目的にした研究を去年度に引き続き行った。

B. 研究方法

(1) 2種類のレーザー光を利用したマイクロダイセクションシステム [laser-captured microdissection

system (LCM)、position and ablation with laser-microdissection system (PALM)] を比較検討し、本研究に適したシステムを選び改良を加える。

(2) 昨年の検討を継続し、大腸癌における methyltransferase (MTase) の発現を例にとって種々の固定法にて固定した材料（細胞株として HT29 を用い、またヒト大腸癌切除材料を用いた）を用いて微小採取材料を用いた reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR)法の確立について検討し、この実験系を用いて competitive RT-PCR による遺伝子発現の定量的解析法について検討した。

C. 研究結果

(1) LCM と PALM を比較検討すると、以下の点が重要であることが分かった。第一に LCM が比較的波長の長い炭酸ガスパルスレーザー(10000 nm)

であるのに対し、PALM はこれより波長の短い窒素ガスパルスレーザー (337 nm) である。従って組織切削の方法も異なり、LCM は局所的な加熱による融解転写であるのに対し、PALM は高密度光子による非加熱破壊である。つまり試料自体にレーザー光をあてることなく、試料をなるべく保存的に処理するには PALM の方が適していると言える。一方操作の扱い易さを見てみると、LCM はスティックとレーザー照射装置のみで操作するので操作自体は比較的簡単であるが、PALM ではパソコンの画面上の切片をマウスを操作しながら動かすので慣れが必要である。またレーザー光の照射はフットスイッチを用いるので扱いにくいという欠点もある。さらに切り取った細胞の採取についても LCM ではレーザービーム照射した部分が転写フィルムに接着して切り出されてくるので比較的確実に再現よく採取できるが、PALM では切り取った細胞をメカニカルに PCR チューブのキャップ内に飛ばすので成功率が低くて再現性に乏しいことが分かった。しかしレーザー光の照射自体を考えると単発照射をくり返す LCM よりは連続照射の可能な PALM の方が効率がいい。一方試料の用意について考えると LCM が通常のスライドガラスに薄切した材料でもマイクロダイセクションが行えるのに対して、PALM では特殊なメンブレン上に薄切された切片をのせこの状態で染色し、さらに切り取り時にはこれを反転する操作が加わるので手間がかかる。このように 2 つのシステムは同じレーザー光を用いた

組織マイクロダイセクション法ではあるが、一長一短があることがわかった。

(2) 昨年の結果より大腸癌細胞株 HT29 を用いて 500 個程度の細胞数で MTase の検出が RT-PCR 法にて可能であることがわかっているため、今年度は逆転写反応や遺伝子増幅に用いる酵素の選択や固定方法の違い (スミア標本、セルブロック標本、凍結組織標本) による影響をまず検討した。逆転写酵素としては THERMOSCRIPT reverse transcriptase (Life Tech) が、また遺伝子増幅酵素としては Ampli Taq Gold (Perkin Elmer) が最も適していることが分かった。また上記固定法の違いは 10 個程度の細胞数で MTase を検出する上で、大きな影響を及ぼさないことも明らかになった。以上の結果をもとに、competitive RT-PCR 法による MTase の定量的解析を実際に行った。適切な増幅用 primer set や competitor を選択作成するために既報の 2 つの primer set (M-1, M-2) の他我々が設定した primer set (M-3) を作成して HT29 細胞株 10000 個から 10 個の間で抽出した total RNA を用いて PCR 反応を行ったところ M-3 primer set についてどの希釈系列でも安定して増幅が可能であった。以上の結果より以後は M-3 primer を用いて実験を進めた。さらに competitor についても 3 つの heteroduplex を形成しない、かつ異なる塩基配列 (GAPDH, β -actin など) の competitor を作成して標的となる MTase 配列との間の増

幅効率を調べた。Molecular analyst (Bio-Rad, Laboratories) で泳動した PCR 産物の各バンド強度を調べると β -actin の塩基配列を利用した competitor が最も増幅効率が高かった。MTase 配列のそれと近似していたのでこの competitor を以後使用することにした。実際に HT29 細胞株の lysate の希釈系列を作成して RT-PCR を行うと、細胞数の増大 (10 個から 10000 個) に合わせて cDNA の推定量も増大し、両対数グラフは直線性を示し定量的解析が可能であることが分かった。そこで大腸癌凍結組織および正常組織を 10 μ m の厚さで薄切し、数秒アルコールで脱脂した後ヘマトキシリン・エオジンで染色をした。腫瘍組織および正常組織から LCM を用いてそれぞれ細胞群を約 100 個程度採取し上記と同様の competitive RT-PCR を行うと腫瘍組織の cDNA 推定量は正常組織のその約 4 倍程度に増加していることが分かった。

D. 考察

(1) 採取したい目的の細胞群が比較的まとまっているか、あるいは一つ一つの細胞が大きい場合は LCM を用いた方がより簡単に短時間で細胞を採取できるので RNA の変性もより少ないと考えられる。一方採取したい細胞群がばらばらで近くに排除したい細胞が多い、あるいは採取したい細胞数が 1 から数個のレベルのときは PALM を用いた方が確実に細胞を採取できるばかりでなく、レーザー光による障害も防げる。またこの場合、切り取った細胞の採取には試料をメ

カニカルに飛ばして採取する方法は極めて効率が悪いので、採取したい細胞の周辺をレーザーで焼き切って最終的には LCM の転写フィルムに転写して採取する方法をとるのが最も適切であることが分かった。

(2) HT29 細胞株をもとに MTase に対する competitive RT-PCR 法を確立した。固定法による RNA 保存の状況はスミア、セルブロック、凍結標本の順に検討したが、数百塩基対の RT-PCR はどの方法でも可能であることがわかった。つまり凍結材料があれば顕微鏡下で目的とする細胞を採取して mRNA の発現解析が可能である。微小材料から抽出した RNA から competitive RT-PCR を行うためには適切な primer set と competitor を作成し、適切な酵素類を用いる必要がある。しかしこの適正な条件さえ整えられれば、実際にヒト大腸癌組織から癌細胞と正常細胞を分取して約 100 個程度の細胞から抽出した RNA を用いても competitive RT-PCR 法にて解析すると数倍の発現差が十分解析可能であることがわかった。

E. 結論

本年度の検討によって以下の点が明らかになった。(1)レーザー光を用いた組織マイクロダイセクション法はレーザー光の種類とそのシステムの違いによって一長一短があるが遺伝子解析の目的によって使い分ける必要がある。すなわちより少数の細胞でより詳細な解析を必要とする場合、窒素ガスレーザー光を用いて RNA を保護するとともに不必要な細胞破片の混入を防ぐ必要がある。しかし

ずれの場合も得られた細胞の採取には LCM の転写システムが有効である。(2)組織マイクロダイセクション法によって採取された微小组織を用いた RT-PCR 法について、THERMOSCRIPT reverse transcriptase (Life Tech)と Ampli Taq Gold (Perkin Elmer)を用いた最適プロトコールが確立された。(3)上記の方法を利用して発現量が数倍程度の差を検出する定量的解析の可能な MTase に関する competitive RT-PCR 系を開発した。

F. 研究発表

1、論文発表

- (1) Tokiwa, T., Noguchi, M., et al., SV40 large T antigen immortalization of rat hepatic stellate-like cells. In Vitro Cell Dev. Biol. 35:246-247, 1999.
- (2) Tomizawa, Y., Noguchi, M., et al., Prognostic significance of allelic imbalances on chromosome 9p in stage I non-small cell lung carcinoma. Clin Cancer Res 5:1139-1146, 1999.
- (3) Tomizawa, Y., Noguchi, M., et al., Correlation between the status of the p53 gene and survival in patients with stage I non-small cell lung carcinoma. Oncogene 18:1007-1014, 1999.
- (4) Hou, M., Noguchi, M., et al., DNA methylation and expression of p16^{INK4A} gene in pulmonary adenocarcinoma and anthracosis in background lung. Int J Cancer (Pred Oncol) 84:609-613, 1999.

(5) Anami, Y., Noguchi, M., Amplotyping of microdissected, methanol-fixed lung carcinoma by arbitrarily primed polymerase chain reaction. Int J Cancer (Pred Oncol) 89:19-25, 2000.

(6) Iijima, T., Noguchi, M., et al., Clonal proliferation of B lymphocytes in the germinal center of human reactive lymph nodes: Possibility of overdiagnosis of B-cell clonal proliferation. Diag Mol Pathol (in press).

(7) Dai, Y., Noguchi, M., et al., Application of the p53 gene and k-ras gene mutation patterns for cytological diagnosis of recurrent lung carcinoma. Combined analysis with microdissection and PCR-SSCP. Cancer Cytopathol (in press).

2、学会発表

- (1) 野口雅之、肺腺癌の組織診と細胞診、第 40 回日本臨床細胞学会総会(要望講演)、1999 年 3 月
- (2) 野口雅之、他、肺腺癌における p16 遺伝子のメチル化と背景肺の炭粉沈着との関係、第 58 回日本癌学会総会、1999 年 9 月
- (3) Noguchi, M. CT-detected stage I lung cancer - Criteria for pathologic diagnosis, and frequency of questionable cases. International conference on screening for lung cancer, October 1-3, 1999.

G. 知的所有権の取得状況、なし