

## 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、第三に応用として食道がんのリンパ節転移の診断用アレイの作製のためのマーカー遺伝子の分離を行った。

### A. 研究目的

過去10年間に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。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。マイクロアレイ技術は遺伝子発現の包括的解析、遺伝子のコピー数の変動に役立つことが示されてきた。しかしDNAの鎖長によって左右されない安定な固定化技術や微量のRNAからのプローブの作製法は開発途上にある。またがんの診断・治療に有用な研究成果は報告されていない。以上の理由からDNAチップによる発現解析技術の開発・応用を行う。

### B. 研究方法

1) 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、2) 短鎖DNAの固定化技術の開発を行う。3) 応用としては、食道がんのリンパ節転移の診断用アレイの作製をおこなう。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て行い、サブトラクション技術とマイクロアレイ技術の組み合わせとしては低分化型胃がん

に特異的な遺伝子の探索を兼ねて行う計画である。各技術や診断法の開発に関しては完成を目指し、ターゲットの遺伝子に関しては分離・同定を目指す。

（倫理面への配慮）

本研究では食道がん及び胃がんの手術材料ともに、従来の免疫染色法と同様に、遺伝子発現の解析を行ったのみであり、生殖細胞系列の遺伝子異常や多型を解析しておらず、倫理面での問題がないと判断した。

### C. 研究成果

1) 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）。

2) 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癌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、スキルス胃癌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。

3) 約50症例の食道がんからリンパ節転移が顕著な食道がんで見られないものを各々10数症例から抽出したRNAからプローブを作製し、TaKaRaのCancerチップとApoptosisチップによって解析し、36個のリンパ節転移のマーカー遺伝子候補の分離に成功した。

4) スキルス胃癌で特異的に発現する遺伝子を網羅すべく、スキルス胃癌培養細胞株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癌培養細胞株8株から合成したcDNAとのサブトラクションを行い、ポリカルボジイミド樹脂をコートしたガラスにcDNAクローンを固定化した。

#### D. 考察

1) 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oligo dT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。評価は市販のcDNAマイクロアレイまたcDNAチップで検討する。

2) 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。

3) 本年度の研究によって食道がんのリンパ節転移と関連するのマーカー遺伝子は実際に分離可能であることが示された、したがって多くの遺伝子を網羅的に分離するため、Affimetrix社の

高密度遺伝子チップを使用する方針が明確になった。

#### E. 結論

1) 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。

2) ポリカルボジイミド樹脂による短鎖DNAの固定化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須な条件を充たす。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。

3) 今後、食道がんのリンパ節転移と関連するのマーカー遺伝子をのせた診断用アレイを作製し、転移がみられない群の混合サンプルでの各遺伝子の発現量を対照として、各々の症例について比較後、リンパ節転移の数や再発の有無との相関を調べることによって、食道がん患者の中でリンパ節転移の再発を術前に診断するための方法が確立されることが期待される。

#### F. 研究発表

##### 論文発表

1. Takahashi, A., Sasaki, H., Kim, S.J., Kakizoe, T., Miyao, N., Tsukamoto, T., Sugimura, T., and Terada, M. Identification of receptor genes in renal cell carcinoma associated with angiogenesis by differential hybridization. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 257: 855-859, 1999.
2. Nezu, M., Sasaki, H., Kuwahara, Y., Ochiya, T., Yamada, Y., Sakamoto, H., Tashiro, H., Yamazaki, M., Ikeuchi, T., Saito, Y., and Terada, M. Identification of a novel promoter and exons of the c-*ERBB2* gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 258: 499-505, 1999.



3. Li, X-J., Wang, D-Y., Zhu, Y., Guo, R-J., Wang, X-D., Lubomir, K., Mukai, K., Naito, Y., Sasaki, H., Yoshida, H., Oka, T., Machinami, R., Shinmura, K., Tanaka, M., and Sugimura, H. Mxi mutation in human neurofibrosarcomas. *Jpn. J. Cancer Res.*, 90: 740-746, 1999.
4. Jones, N., Master, Z., Jones, J., Bouchard, D., Sasaki, H., Daly, R., Alitalo, K., and Dumont, D. J. Identification of Tek/Tie2 binding partners. *J. Biol. Chem.*, 274: 30896-30905, 1999.
5. Ueda, T., Sasaki, H., Kuwahara, Y., Nezu, M., Shibuya, T., Sakamoto, H., Ishii, H., Yanagihara, K., Mafune, K., Makuuchi, M., and Terada, M. 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.
6. Ueda, T., Sasaki, H., Aoyagi, K., Narikiyo, M., Tsubosa, Y., Kuwahara, Y., Sakamoto, H., Mafune, K., Teruhiko, Y., Makuuchi, M., and Terada, M. 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.
7. Suzuki, T., Sasaki, H., Kuh, H-J., Agui, M., Tanabe, S., Terada, M., Saijo, N., and Nishio, K. A detailed structural analysis on both human MRP5 and mouse mrp5 transcripts. *Gene*, 242: 167-173, 2000.
1. Sasaki, H., et al., Frequent presence of Streptococcus DNA in esophageal cancer, dysplasia of esophagus and gastric cancer. 90th AACR Annual Meeting. April 10-14, 1999.
2. Kuwahara, Y., Sasaki, H., et al., Identification of a core amplified region and a recombination hot spot on the 17q12 amplicon. 90th AACR Annual Meeting. April 10-14, 1999.
3. Suzuki, T., Sasaki, H., et al., Molecular cloning of human MRP5 and mouse mrp5. 90th AACR Annual Meeting. April 10-14, 1999.
4. Tanooka, H., Ootsuyama, A., and Sasaki, H., Homologous recombination between p53 and pseudo-p53 in a mouse tumor produced with supra-threshold dose by repeated beta-irradiation. 91th ICRR. July 18-23, 1999.
5. Noda, N., Tokunaga, M., Sasaki, H., and Wakasugi, H., Gene amplification and expression of c-erbB-2 and cyclin E in Epstein-Barr virus-related gastric cancer. 3rd International Gastric Cancer Congress, Seoul, Korea, April 27-30, 1999.
6. 上田哲也、佐々木博己、柳原五吉、真船健一、幕内雅敏、寺田雅昭  
胃がんにおける遺伝子変化—現状と展望、第71回日本胃癌学会総会、シンポジウム、6/24—25、1999年
7. 佐々木博己、上田哲也、桑原勝孝、根津雅彦、坂本裕美、寺田雅昭  
HST1, CyclinD1遺伝子を含む11q13増幅ユニットの塩基配列の特徴、第58回日本癌学会総会、9/29—10/1、1999年
8. 上田哲也、佐々木博己、柳原五吉、桑原勝孝、根津雅彦、坂本裕美、真船健一、幕内雅敏、寺田雅昭、スキルス胃がんに頻繁にみられる異常をおこしたK-sam 遺伝子のC末端エクソンの同定と生物学的意義、第58回日本癌学会総会、9/29—10/1、1999年
9. 根津雅彦、佐々木博己、桑原勝孝、坂本裕美、齋藤康、寺田雅昭、染色体17q12アンプリコン上のCAB遺伝子の単離・同定ならびに転写物の機能解析、第58回日本癌学会総会、9/29—10

／1、1999年

10. 桑原勝孝、佐々木博己、根津雅彦、上田哲也、坂本裕美、名出頼男、寺田雅昭、c-ERBB-2を含む遺伝子増幅領域内に同定された組み換え活性部位、第58回日本癌学会総会、9／29－10／1、1999年

11. 大波澄子、佐々木博己、吉田輝彦、寺田雅昭、AP-PCR法で同定された胃がんの増幅遺伝子の解析、第58回日本癌学会総会、9／29－10／1、1999年

12. 鈴木俊宏、佐々木博己、安居院美香、中村貴、巽康彰、西条長宏、西尾和人、田辺信三、ヒトMRP5及びマウスmrp5の構造と発現解析、第58回日本癌学会総会、9／29－10／1、1999年

13. 巽康彰、鈴木俊宏、佐々木博己、岩橋誠、角田卓也、山上裕機、洪泰浩、中村貴、宮本謙一、西条長宏、西尾和人、MRP5およびそのsplicing variantの正常およびがん組織における発現、第58回日本癌学会総会、9／29－10／1、1999年

14. Sasaki, H., Narikiyo, M., and Terada, M., Frequent presence of Streptococcus DNA in esophageal cancer, dysplasia of esophagus and gastric cancer. U.S.-Japan cooperative cancer research seminar, Nara, December 6-9, 1999.

15. 青柳一彦、佐々木博己、市川竜生、西垣美智子、坪佐恭宏、上田哲也、桑原勝孝、鈴木収、寺田雅昭、cDNAチップ用プローブの不死化、第22回日本分子生物学会年会、12／7－10、1999年

16. 上田哲也、佐々木博己、桑原勝孝、青柳一彦、成清道博、坪佐恭宏、田邊智佳子、吉田輝彦、幕内雅敏、寺田雅昭、スキルス胃がんにおけるK-sam/FGFR2 遺伝子のC末端エクソンの欠失と新たなエクソンの同定、第22回日本分子生物学会年会、12／7－10、1999年

17. 田邊智佳子、佐々木博己、坂本裕美、坪佐恭宏、青柳一彦、成清道博、上田哲也、吉田輝彦、

寺田雅昭、HST1遺伝子を含む11q13増幅ユニットの構造解析、第22回日本分子生物学会年会、12／7－10、1999年

18. 桑原勝孝、佐々木博己、上田哲也、田邊智佳子、西垣美智子、坂本裕美、吉田輝彦、名出頼男、寺田雅昭、がんにおける遺伝子増幅、欠失、転座の組み換え活性部位の同定、第22回日本分子生物学会年会、12／7－10、1999年

19. 西垣美智子、佐々木博己、根津雅彦、桑原勝孝、坂本裕美、寺田雅昭

染色体17q12アンプリコン上のCAB遺伝子の単離・同定ならびに転写物の機能解析、第22回日本分子生物学会年会、12／7－10、1999年

20. 清水邦彦、佐々木博己他、マウス中軸骨格異常を示すTail-short (Ts)遺伝子のpositional cloning、第22回日本分子生物学会年会、12／7－10、1999年

21. 佐々木博己、Streptococcus anginosusと上部消化器がん、日本癌学会シンポジウム「感染症と発がん」、12／16－17、1999年

## 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