

200/0664

別添2 厚生科学研究費補助金研究報告書表紙

厚生科学研究費補助金

高度先端医療研究事業

心疾患及びがん疾患遺伝子の SNPs 解析と ECA チップによる
遺伝子診断システムの確立

平成13年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 池田 康行

平成13 (2001) 年 3月

目次

I. 総括研究報告		
心疾患及びがん疾患遺伝子の SNPs 解析と ECA チップによる遺伝子診断システムの確立 主任研究者 池田 康行	-----	1
II. 分担研究報告		
1. リポ蛋白リパーゼ遺伝子の SNPs 集積とその診断法の確立 池田 康行	-----	6
2. がん細胞の転移能・予後を予測する臨床遺伝子 診断システム開発のための研究 竹永 啓三	-----	9
3. DNA チップを用いた迅速がん診断システム開発の研究 落合 淳志	-----	11
4. 血漿 DNA を用いた遺伝子診断に関する研究 赤木 究	-----	14

厚生科学研究費補助金（高度先端医療研究事業）

総括研究報告書

心疾患及びがん疾患遺伝子の SNPs 解析と ECA チップによる遺伝子診断システムの確立

主任研究者 池田 康行 国立循環器病センター研究所・病因部長

がんや心疾患は日本における死因の第一位、二位を占めており、その予防、診断・治療法の開発は、社会的重要な課題である。

■心疾患関連遺伝子の遺伝子診断用チップの開発：我々は、心疾患関連遺伝子であるリポ蛋白リパーゼ（LPL）遺伝子の変異を 15 種類集積し、これらの内、2 種類の変異（818A 変異と 916G-del 変異）を新しい電気化学的活性を持つ DNA 二本鎖特異的縫い込み型インターカレーター（Ferrocenyl Naphthalene Diimide; FND）を用いる単電極 ECA(Electrochemical Array)チップでの検出法を確立した。

■がん関連遺伝子の遺伝子診断用チップの開発：ECA チップを用いて遺伝子診断する候補遺伝子を明らかにすることを目的として、研究を行ってきた。ヒト乳がんの浸潤・転移の予測のマーカーとして、E-cadherin、S100A4、VEGF-A、VEGF-C、matrix metalloprotease-9、血中のがん細胞を検出するための候補遺伝子として、CK19、CEA、HER2、Muc1 を選択した。また、血漿中の遊離 DNA を用いた治療効果判定法の原理について実証を行った。

分担研究者

赤木 究：埼玉県立がんセンター研究所
遺伝子検査室 主任研究員
竹永啓三：千葉県がんセンター研究局化学
療法研究部 主席研究員
落合淳志：国立がんセンター研究所支所
臨床腫瘍病理部長

定し、ECA チップの実用化を目指すことである。心疾患関連遺伝子の場合、多種の LPL 遺伝子変異を同時に検出できる測定条件の決定を目的とする。がん関連の場合は、CEA、K-ras 等既知の遺伝子および新たに発見したがん関連遺伝子を用いて、がんの早期診断、転移の有無および治療効果の判定を可能にする ECA チップの開発を目指すものである。

A. 研究目的

本研究は、新しい電気化学的活性を持つ DNA 二本鎖特異的縫い込み型インターカレーター（Ferrocenyl Naphthalene Diimide; FND）を用いる ECA(Electrochemical Array)チップを完成させるのに必須のソフトウェア、つまり診断にどのような遺伝子を候補とするかを、心疾患およびがん関連遺伝子群から選択し、選択した遺伝子の変異の同定または遺伝子発現を定量できる条件を決

B. 研究方法

■心疾患関連遺伝子と解析方法■

（1）心疾患関連遺伝子：動脈硬化惹起性高トリグリセリド血症の病因遺伝子である LPL 遺伝子を対象とする。エキソン 5 の G188E 変異（188 番目の Gly が Glu に置

換、818G-正常アレル、818A-変異アレル)とエキソン5の916Gの1塩基Gが欠失した変異(916G-正常アレル、916G-del-変異アレル)を解析する。両変異共、LPL酵素機能を完全に失活させるLPL変異である。対象者から得たDNAを鋳型として、エキソン5をPCR増幅(増幅DNAサイズは350bp)し、検体として使用する。

(2) ハイブリダイゼーションと電流測定: 13から15塩基程度の818G-正常プローブ、818A-変異プローブ、916G-正常プローブおよび916G-del-変異プローブをそれぞれ単電極ECAチップに結合させる。適当な条件下で、プローブを結合した単電極ECAチップとLPL遺伝子エキソン5のPCR産物とハイブリ後、インターカレーター(FND)を含む緩衝液中で電流測定を行なう。

■がん関連遺伝子候補選定のための基礎実験■

(1) ヒト乳がん細胞株、MCF7、BT549、MDA-MB-231およびOWBMを用いて、がんの浸潤能を検討した。発現を検討する対象遺伝子としては、ER α 、EGFR、c-erbB-2、E-cadherin、S100A4、vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A)、VEGF-Cおよびmatrix metalloprotease-9 (MMP-9)を選択した。

(2) ヒト膵がん培養細胞株 Aspc-1, BxPC-3, Capan-1, Miapaca-2, PSN1, Suit-2の6種類ならびに21名(男性18名、女性3名)の健常人末梢血、さらに乳がん患者20例の手術時採取されたリンパ節31個の切片からRNAを抽出し、その発現レベルを調べた。

(3) 消化器の進行がん患者の血漿中に存在する癌由来変異K-ras遺伝子のDNA量をPCR-SSCP法で解析し、その推移と治療

の効果について検討し、一定の因果関係を見いだした。

(倫理面への配慮)

LPL遺伝子解析およびがん関連の研究は各センターの倫理審査委員会にてすでに承認を受けている。また、研究に使用する検体は、十分な説明を受けた提供者の自由意思により「高脂血症の成因解明の研究およびがん研究のための同意書」に同意の表明をいただいているものを使用している。この研究に伴う人権の保護(研究協力の任意性、同意の撤回、個人情報の保護、研究による利益不利益など)は同意書の中に盛り込まれている。患者検体は解析前に暗号化を行うことにより、個人情報の保護を行っている。

C. 研究結果

■心疾患遺伝子の単電極ECAチップによる遺伝子診断システムの確立(池田)■

動脈硬化惹起性高トリグリセリド血症の病因遺伝子であるLPLの変異を15種類集積している。

本年度は、15種類の内、G188Eと916Gの1塩基欠失の変異を単電極ECAチップを用いて検出する条件設定を試みた。

単電極ECAチップによるLPL遺伝子818G-正常ホモ、818G-正常/818A-変異ヘテロおよび818A-変異ホモ接合体の検出における最適条件の決定: LPLエキソン5のPCR産物の818G-正常アレルおよび818A-変異アレルを、それぞれに対応するプローブを単電極に結合させたチップを用いての検出条件は、0.25 x SSC緩衝液中で25度、1時間ハイブリ後、0.05mMのFNDを含む35度に設定した酢酸緩衝液中が最適であ

った。これらの最適条件下で、818G-正常ホモ、818G-正常/818A-変異ヘテロおよび818A-変異ホモ接合体の区別が可能であった。

単電極 ECA チップによる LPL 遺伝子 916G-正常ホモ、916G-正常/916G-del-変異ヘテロおよび 916G-del-変異ホモ接合体の検出

における最適条件の決定：LPL エキソン 5 の PCR 産物の 916G-正常アレルおよび 916G-del-変異アレルを、それぞれに対応するプローブを単電極に結合させたチップを用いての検出条件は、0.25 x SSC 緩衝液中で 25 度、1 時間ハイブリ後、0.05mM の FND を含む 40 度に設定した酢酸緩衝液中が最適であった。これらの最適条件下で、916G-正常ホモ、916F-正常/916G-del-変異ヘテロおよび 916G-del-変異ホモ接合体の区別が可能であった。

■ECA チップによる遺伝子診断システムの確立に必要ながん疾患遺伝子の選択■

ヒト乳がんにおける浸潤・転移の予測を可能にするマーカー (竹永)：MCF7、BT549

および MDA-MB-231 の各がん細胞株を用いて、浸潤能を検討したところ、MCF7、BT549、MDA-MB-231 の順に浸潤能が高いことが判った。そこで、これらの細胞における転移関連遺伝子 E-cadherin、S100A4、VEGF-A、VEGF-C および MMP-9 の発現を検討したところ、浸潤能の亢進に伴って E-cadherin の発現低下と他の遺伝子の発現亢進を認めた。

リンパ節ならびに血中および胸腹水中のがん細胞を感度よく検出するための ECA チップに乗せる候補遺伝子の検索 (落合)：

ヒト膵がん培養細胞株 Aspc-1, BxPC-3, Capan-1, Miapaca-2, PSN1, Suit-2 の 6 種類の

培養細胞あたりにおける候補遺伝子の発現コピー数の検出と実際のヒト組織ならびに血液内における候補遺伝子の発現コピー数を定量 PCR 法を用いて検討した。がん遺伝子として CK 19、CEA、HER2、Muc1 等が比較的高率にがん細胞においてコピー数が多く認められたので ECA チップ作成における候補遺伝子として選択した。

血漿中に存在するがん細胞由来の DNA を測定し、これをバイオマーカーとした新しい診断法の開発 (赤木)：

K-ras の遺伝子変異のほとんどはコドン 12 であり、この部位を含む領域を蛍光プライマーを用いて PCR で増幅し、SSCP で変異を分離する条件を検討した。その結果、25 度でコドン 12 のすべての変異を分離することができた。また、この解析では、野生型と変異型の比率を求めるが、既知の変異 k-ras 遺伝子を含むプラスミドを用いて、様々な DNA 濃度で測定を行い、検量線を引いて検討した。その結果、この測定系がある程度直線性を持ち、1対20のレベルまではその比をほぼ正確に測定できることがわかった。

D. 考察

■心疾患関連■

LPL 遺伝子ヘテロ接合体検出に関して、プローブ DNA がサンプルと 2 本鎖を形成するかどうかは、パーフェクトマッチなら 2 本鎖を維持できるものの、ミスマッチを含んでいれば 2 本鎖を維持できないという条件を選ぶことで対応した。つまり、正常型プローブから応答があればそのサンプルは正常配列を含んでいて、変異型プローブから応答があれば変異配列を含んでいるという結論に到達する。もちろん両方のプロ

ブから電氣的応答が得られれば、そのサンプルはヘテロ型となる。ヘテロ型を鑑別診断できる技術は本研究の特徴のひとつと言える。単電極 ECA チップでの 2 種類の LPL 変異の検出条件を基にすることで、残り 1 3 種類の LPL 変異の検出条件の設定が容易になり、将来の多電極 (25 ピン) ECA チップによる LPL 変異診断システムの確立を可能にするものと思われる。

■がん関連■

(1) 乳がん細胞株として MCF7、BT549 および MDA-MB-231 は、浸潤能に伴って異なるレベルで本研究で選択したがん遺伝子を発現していることから、遺伝子発現解析のときの標準細胞株として用いることが可能と思われた。

(2) 乳がんの微小リンパ節転移を予測するために、がんマーカーならびに上皮細胞マーカーをの選択を行った結果、CK19、CEA、Muc1 そして HER2 はがんの微小リンパ節転移の定量化に向いている分子マーカーであることが明かとなった。

(3) 血漿 DNA をアクリルアミドゲルで泳動すると、約 180bp、340~60bp 近傍に DNA 断片が主に存在し、このことから血漿 DNA はヌクレオソーム単位で存在することが示唆された。このために、血漿 DNA は血中ですぐに分解されず、循環するものと思われた。血漿 DNA 量は、がん細胞の増殖と縮小に相関して変動する傾向を認め、新しいマーカーとして利用できる可能性が見出された。

E. 結論

■心疾患関連■

単電極 ECA チップを用いて、2 種類の

LPL 遺伝子変異 (G188E と 916G の 1 塩基欠失) の変異 LPL/変異 LPL のホモ接合型、正常 LPL/変異 LPL のヘテロ接合型および正常 LPL/正常 LPL のホモ接合体の検出が可能となった。

■がん関連■

(1) 乳がん細胞株として MCF7、BT549 および MDA-MB-231 を用いることにより、乳がんの転移、予後や効果予測に關与する解析が可能となり、ECA チップでの遺伝子発現定量を行う際の標準として用いることができると思われた。

(2) CK19、CEA、Muc1、HER2 などの遺伝子の発現を感度よく測定することによりリンパ節の転移の有無を測定することが可能になると考えられた。

(3) がん患者における血漿 DNA は、がんの治療効果や再発を知るのに、有効なマーカーであることが示唆された。

F. 健康危険情報 特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Yamashita K., Takagi A., Takagi M., Kondo H., Ikeda Y. and Takenaka S. Electrochemical hybridization assay of a heterozygous deficiency of lipoprotein lipase gene with ferrocenylnaphthalene diimide. Nature Biotechnology, 2002 (submitted).

2. 学会発表

「血漿 DNA によるがん診断の基礎検討と化学療法における血漿 DNA の推移」

山口研成、新井吉子、石窪力、多田正弘、西村仁志、神田祐三、菅野康吉、赤木究
第 60 回日本癌学会総会 (パシフィコ横

浜) 平成13年9月26日～28日

「ユニバーサル腫瘍マーカーとしてのがん細胞由来血漿 DNA の応用」

赤木究、山口研成、新井吉子、田中洋一、
神田祐三、神津知子、西村仁志

第60回日本癌学会総会（パシフィコ横浜）
平成13年9月26日～28日

「microsatellite instability 陽性大腸直腸癌と k-ras、p53 の変異との関係」

石窪力、山口研成、新井吉子、大倉康男、
小林照忠、西村洋治、田中洋一、多田正弘、
赤木究

第60回日本癌学会総会（パシフィコ横浜）
平成13年9月26日～28日

「消化器がんのプロテオーム解析：転移巣と原発巣の比較」

橘正芳、西村洋治、赤木究

第60回日本癌学会総会（パシフィコ横浜）
平成13年9月26日～28日

「癌細胞由来の血漿中 DNA を用いた腫瘍進展の解析」

網倉克己、山口研成、坂本裕彦、小林照忠、
右田隆之、西村洋治、内田健二、田中洋一、
赤木究

第60回日本癌学会総会（パシフィコ横浜）
平成13年9月26日～28日

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

厚生科学研究費補助金（高度先端医療研究事業）
分担研究報告書

リポ蛋白リパーゼ遺伝子の SNPs 集積とその診断法の確立

主任研究者 池田 康行 国立循環器病センター研究所・病因部長

研究協力者 高木 敦子 国立循環器病センター研究所・薬理部長

リポ蛋白リパーゼ (LPL) 遺伝子変異の診断法の確立は、動脈硬化惹起性 IV 型高トリグリセリド(TG)血症の診断、治療および予防に重要である。日本人の IV 型高 TG 血症者から集積された LPL 変異 15 種類の内、2 種類の変異 (818A 変異と 916G-del 変異) を新しい電気化学的活性を持つ DNA 二本鎖特異的縫い込み型インターカレーター (Ferrocenyl Naphthalene Diimide; FND) を用いる単電極 ECA(Electrochemical Array) チップでの検出法を確立した。本方法は、正常 LPL/正常 LPL のホモ、正常 LPL/変異 LPL のヘテロおよび変異 LPL/変異 LPL のホモ接合体の遺伝子型の鑑別診断を可能にした。

A. 研究目的

リポ蛋白リパーゼ (LPL) 遺伝子異常ヘテロ接合体者は、粗悪な生活習慣 (運動不足、アルコールの多飲癖等) の負荷により動脈硬化惹起性 IV 型高トリグリセリド (TG) 血症を発症する。LPL 遺伝子異常ヘテロ接合体者の IV 型高 TG 血症は、生活習慣の改善によって正脂血への改善が可能である。このことは、LPL 遺伝子異常ヘテロ接合体を早期確定診断できれば、ヘテロ接合体者が健全な生活習慣を守ることで、将来の動脈硬化惹起性 IV 型高 TG 血症の発症を予防できることを意味している。本研究は、新しい電気化学的活性を持つ DNA 二本鎖特異的縫い込み型インターカレーター (Ferrocenyl Naphthalene Diimide; FND) を用いる ECA(Electrochemical Array) チップで、心疾患関連遺伝子である LPL 遺伝子の種々の変異を同一条件下で同時に検出できる遺伝子診断システムを確立し、生活

慣病の予防を目指すものである。

B. 研究方法

LPL 遺伝子変異と PCR 増幅: LPL 遺伝子エクソン 5 の 818G(正常型)が 818A(変異型)に 1 塩基置換した変異 (188 番目の Gly が Glu に置換) とエクソン 5 の 916G (正常型) の 1 塩基 G が欠失した変異 (916G-del-変異型) を対象とした。両変異共、LPL 酵素機能を完全に失活させる LPL 変異である。対象者から得た DNA を鋳型として、エクソン 5 を PCR 増幅 (増幅 DNA サイズは 350bp) し、検体として使用。

ハイブリダイゼーションと電流測定: 818G-正常型プローブ、818A-変異型プローブ、916G-正常型プローブおよび 916G-del-変異型プローブをそれぞれ単電極 ECA チップに結合させる。適当な条件下で、プローブを結合した単電極 ECA チップと LPL 遺伝子エクソン 5 の PCR 産物とハイブリ後、

インターカレーター(FND)を含む緩衝液中で電流測定を行なう。

(倫理面への配慮)

LPL 遺伝子解析は当センターの倫理審査委員会にてすでに承認を受けている。また、研究に使用する検体は、十分な説明を受けた提供者の自由意思により「高脂血症の成因解明の研究のための同意書」に同意の表明をいただいているものを使用している。この研究に伴う人権の保護（研究協力の任意性、同意の撤回、個人情報保護、研究による利益不利益など）は同意書の中に盛り込まれている。患者検体は解析前に暗号化を行うことにより、個人情報保護を行っている。

C. 研究結果

単電極 ECA チップによる LPL 遺伝子 818G-正常型ホモ、818G-正常/818A-変異型ヘテロおよび 818A-変異型ホモ接合体の検出における最適条件の決定：LPL エキソン5の PCR 産物の 818G-正常型アレルを、単電極に結合させた 818G-正常型プローブを用いて検出する場合、0.25 x SSC 緩衝液中で 25 度、1 時間ハイブリ後、0.05mM の FND を含む 35 度に設定した酢酸緩衝液中での測定が最適であった。一方、LPL エキソン5の PCR 産物の 818A-変異型アレルを、単電極に結合させた 818A-変異型プローブを用いて検出する場合、0 x SSC 緩衝液中で 25 度、1 時間ハイブリ後、0.05mM の FND を含む 35 度に設定した酢酸緩衝液中での測定が最適であった。これらの最適条件下で、818G-正常型ホモ、818G-正常/818A-変異型ヘテロおよび 818A-変

異型ホモ接合体の区別が可能であった。

単電極 ECA チップによる LPL 遺伝子 916G-正常型ホモ、916G-正常/916G-del-変異型ヘテロおよび 916G-del-変異型ホモ接合体の検出における最適条件の決定：LPL エキソン5の PCR 産物の 916G-正常型アレルを、単電極に結合させた 916G-正常型プローブを用いて検出する場合、0.25 x SSC 緩衝液中で 25 度、1 時間ハイブリ後、0.05mM の FND を含む 40 度に設定した酢酸緩衝液中での測定が最適であった。一方、LPL エキソン5の PCR 産物の 916G-del-変異型アレルを、単電極に結合させた 916G-del-変異型プローブを用いて検出する場合、0 x SSC 緩衝液中で 25 度、1 時間ハイブリ後、0.05mM の FND を含む 40 度に設定した酢酸緩衝液中での測定が最適であった。これらの最適条件下で、916G-正常型ホモ、916G-正常/916G-del-変異型ヘテロおよび 916G-del-変異型ホモ接合体の区別が可能であった。

単電極 ECA チップによる正常型ホモ、正常/変異型ヘテロおよび変異型ホモ検出のブライントテストによる評価：LPL 遺伝子 818G-正常型ホモ、818G-正常/818A-変異型ヘテロおよび 818A-変異型ホモ接合体を含む患者 10 例を対象者として、LPL 遺伝子エキソン5を増幅し、最適条件下で単電極に結合させた 818G-正常型プローブおよび単電極に結合させた 818A-変異型プローブとハイブリ後、遺伝子型を決定した。対象者 10 例の本測定方法で決定した遺伝子型は、すべて予想どおりであった。また、916G-正常型ホモ、916G-正常/916G-del-変異型ヘテロおよび 916G-del-変異型ホモ接合体検出の評価も同様に 10 例の対象者

で行なった結果、すべて予想どおりの結果であった。

D. 考察

本研究は、2本鎖 DNA に選択的に結合するインターカレーター (FND) を使用し、サンプルとプローブ DNA とが電極上において示す挙動を2本鎖形成情報として取り出すことにより、注目した遺伝子の変異の有無を電気信号に置き換えて検出したものである。また、プローブ DNA がサンプルと2本鎖を形成するかどうかは、パーフェクトマッチなら2本鎖を維持できるものの、ミスマッチを含んでいれば2本鎖を維持できないという条件を選ぶことで対応した。つまり、正常型プローブから応答があればそのサンプルは正常配列を含んでいて、変異型プローブから応答があれば変異配列を含んでいるという結論に到達する。もちろん両方のプローブから電氣的応答が得られれば、そのサンプルはヘテロ型となる。ヘテロ型を鑑別診断できる技術は本研究の特徴のひとつと言える。

単電極 ECA チップでの2種類の LPL 変異の検出条件を基にすることで、残り13種類の LPL 変異の検出条件の設定が容易になり、将来の多電極 (25ピン) ECA チップによる LPL 変異診断システムの確立を可能にするものと思われる。

E. 結論

単電極 ECA チップを用いて、2種類の LPL 遺伝子変異 (818A-変異型と 916G-del-変異型) の変異 LPL/変異 LPL のホモ接合型、正常 LPL/変異 LPL のヘテロ接合型および正常 LPL/正常 LPL のホモ接合体の

検出が可能となった。

F. 健康危険情報 特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Yamashita K., Takagi A., Takagi M., Kondo H., Ikeda Y. and Takenaka S. Electrochemical hybridization assay of a heterozygous deficiency of lipoprotein lipase gene with ferrocenylnaphthalene diimide. Nature Biotechnology, 2002 (submitted).

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

厚生科学研究費補助金（高度先端医療研究事業）
分担研究報告書

がん細胞の転移能を予測する臨床遺伝子診断システム開発のための研究

分担研究者 竹永啓三 千葉県がんセンター研究局化学療法研究部 主席研究員

がんの悪性度特に転移する可能性のあるがんであるかどうかや治療効果、術後予後を早期に予測することは、治療方針を決めるためや治療成績を向上させるためにも重要である。本年度は、ヒト乳癌における浸潤・転移の予測を行うためのマーカーとして、E-cadherin、S100A4、VEGF-A、VEGF-C、matrix metalloprotease-9 を選択し、浸潤能の異なるヒト乳癌培養細胞株における発現を調べた。その結果、浸潤能とこれらの遺伝子の発現とが良く相関することが判った。また、それぞれの細胞株で予後および効果予測に使用できると考えられる遺伝子、ER α 、EGFR および c-erbB-2、の発現を検討し、臨床材料での発現量を ECA チップで検討する際の標準細胞株として使用できることが判った。

A. 研究目的

がんの悪性度特に転移する可能性のあるがんであるかどうかや術後予後を早期に予測すること、および治療効果の予測を行うことは、治療方針を決めるためや治療成績を向上させるためにも重要なことである。近年の DNA チップやその関連機器の技術開発は細胞のがん化ばかりでなくがん細胞の生物学的性状に関与する分子に基づいた早期の遺伝子診断を可能にし、DNA チップの臨床診断への応用が期待されている。そこで本研究では、がんの悪性度特に浸潤転移に関連する遺伝子（我々独自で見い出した遺伝子および既知の遺伝子）や予後因子遺伝子を集積した DNA チップ（ECA チップ）を作製することにより転移能、術後予後や治療効果を予測する臨床遺伝子診断システムを確立することを目的とする。乳癌治療においてホルモン療法の果たす役割は重要であり、その効果予知は臨床的意

義が高いと考えられる。従来、原発腫瘍での estrogen receptor (ER) や progesterone receptor (PgR) の発現がホルモン療法効果の確立された指標として広く用いられている。しかし、ER 陽性であっても epidermal growth factor receptor (EGFR) や c-erbB-2 (HER-2) が陽性であると効果不良・予後不良であり、ER、PgR と EGFR あるいは c-erbB-2 の組み合わせが効果予測・予後予測に有用であると考えられる。また、aromatase 阻害剤を用いた治療や抗 HER-2 モノクローナル抗体である Herceptine による治療の効果予測には aromatase や c-erbB-2 の発現がそれぞれ重要な指標となる。一方、転移関連遺伝子の発現も予後予測のために重要な指標になると考えられる。そこで、ECA チップを用いた乳癌の治療効果及び転移・予後を予測するシステムを確立するための予備的な実験を行った。

B. 研究方法

4種類のヒト乳癌細胞株、MCF7、BT549、MDA-MB-231 および OWBM を用いた。浸潤能の測定は、マトリゲル (30 μ g) をコートしたヌクレオポアフィルター (穴径、8 μ m) を装着したボイデンチャンバーを用いて行った。ケモアトラクタントとして、NIH3T3 細胞の培養上清を用い、8 時間のインキュベーションの後、フィルター下面に移動した細胞数を計測した。発現を検討する対象遺伝子としては、ER α 、EGFR、c-erbB-2、E-cadherin、S100A4、vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A)、VEGF-C および matrix metalloprotease-9 (MMP-9) を選択した。それぞれの遺伝子の発現は、細胞から抽出した全 RNA から逆転写酵素を用いて作製した cDNA と、それぞれの遺伝子に特異的なプライマーペアを用いて PCR を行い測定した。

C. 研究結果

MCF7、BT549 および MDA-MB-231 の浸潤能を検討したところ、MCF7、BT549、MDA-MB-231 の順に浸潤能が高いことが判った。そこで、これらの細胞における転移関連遺伝子 E-cadherin、S100A4、VEGF-A、VEGF-C および MMP-9 の発現を検討したところ、浸潤能の亢進に伴って E-cadherin の発現低下と他の遺伝子の発現亢進を認めた。一方、ER α 、EGFR および c-erbB-2 の発現を検討したところ、MCF7 細胞では ER α は高発現しているが EGFR 及び c-erbB-2 は発現が極めて低いこと、他の細胞株では ER α 及び c-erbB-2 は発現が極めて低いが EGFR は高発現していることが判った。また、OWBA 細胞では、c-erbB-2

が高発現していることが判った。

D. 考察

乳癌組織で転移・予後に関する遺伝子の発現量を ECA チップで測定する際には標準となる細胞株が重要になると考えられる。今回用いた乳がん細胞株は、浸潤能に伴って異なるレベルでこれらの遺伝子を発現していることから、遺伝子発現解析のときの標準細胞株として用いることが可能と思われる。今後、定量 PCR を用いた定量と、ECA チップでの定量との間の相関性を検討する必要があると思われる。

E. 結論

今回用いた細胞株を用いることにより、乳癌の転移、予後や効果予測に関与する各種遺伝子の発現の差が判り、ECA チップでの遺伝子発現定量を行う際の標準として用いることができるとと思われる。

F. 健康危険情報 特に無し。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Tada Y, O-Wang J, Takenaga K, Takiguchi Y, Tatsumi K, Kuriyama T, Tagawa M. Expression of the NF- α gene on mouse lung carcinoma cells suppresses spontaneous lung metastasis without affecting tumorigenicity. *Oncol Rep.* in press.
2. Kawamura K, Bahar R, Namba H, Seimiya M, Takenaga K, Hamada H, Sakiyama S, Tagawa M. Bystander effect in uracil phosphoribosyl transferase/5-fluorouracil-mediated suicide gene therapy is correlated with the level of intercellular communication. *Int J Oncol.* 18:117-20, 2001.

厚生科学研究費補助金（高度先端医療研究事業）
分担研究報告書

DNA チップを用いた迅速がん診断システム開発

主任研究者 落合 淳志 国立がんセンター研究所支所・臨床腫瘍病理部長

がん細胞を手術中に短時間で検出することは、外科的がん治療にとりその治療法選択のために必須である。本年度は、リンパ節ならびに血中および胸腹水中のがん細胞を感度よく検出するための遺伝子チップに乗せる候補遺伝子を検索する目的で、各種がん培養細胞あたりにおける候補遺伝子の発現コピー数の検出と実際のヒト組織ならびに血液内における候補遺伝子の発現コピー数を定量 PCR 法を用いて検討した。これら候補遺伝子群の中で（CK19、CEA、HER2、Muc1）等が比較的高率にがん細胞においてコピー数が多く認められた。

A. 研究目的

リンパ節に転移したがん細胞や胸・腹水中のがん細胞を検出することはがん患者治療のためには重要と考えられ、一般には迅速診断として標本を凍結し組織を作製し比較的短い時間で病理組織学的に検出されている。しかし、これら病理標本での検索は一般の病理標本に比べ質が下がり診断が困難であること、また診断する病理医が各病院に常駐する必要がある、必ずしも迅速診断システムがすべての手術に使われていないのが実情である。また、摘出されたリンパ節におけるがん細胞の有無を病理組織学的に検索することにより、がんの進行度（stage）を決め、患者の予後を推定できるが、多数のリンパ節に存在するがん細胞を短時間で定量化できれば患者予後をより客観的に知ることができると思われる。

本研究は、新しい電気化学的活性を持つ DNA 二本鎖特異的縫い込み型インターカレーター（Ferrocenyl Naphthalene Diimide;

FND）を用いる ECA(Electrochemical Array) チップで、種々のがんマーカーおよび上皮細胞マーカーを同一条件下で同時に検出できる遺伝子診断システムを確立し、がんの遺伝子診断ならびに迅速診断をできるようにするものである。

B. 研究方法

LightCycler™ を用いた定量 PCR 法の確立：LightCycler™ を用いた定量 PCR 法の確定のため、標的として分子（CK19, CEA, E-cadherin (E-cad), HER2, Muc1, β actin, GAP-DH) に対して特異的な primer を設定し、各 primer 毎に PCR 条件を検討した。次いで各 primer 毎に検量線を作成し、コントロールサンプルを用いて各分子コピー数の計算を行った。

材料と方法：本年度 mRNA を抽出し定量 PCR を行った症例および材料は、以下の毎くである。ヒト膵がん培養細胞株 Aspc-1, BxPC-3, Capan-1, Miapaca-2, PSN1, Suit-2 の 6 種類ならびに 21 名（男性 18 名、女性 3

名)の健常人末梢血、さらに乳がん患者20例の手術時採取されたリンパ節31個の切片からRNAを抽出し、その発現レベルを調べた。検討に用いたリンパ節31個は病理診断においてがん転移陽性9個、陰性22個であった。各リンパ節における分子の発現コピー数を調べ Receiver operating characteristic curve (ROC) カーブを作成し各分子発現における適切な cut off 値を設定した。

C. 研究結果

検出に用いた遺伝子は CEA, CK19, E-cad, HER2, Muc1 の5つであり、コントロールとして β -アクチンと GAP-DH を用いた。これら分子はいずれも各種がん細胞において高発現することが報告されている。まず、膵がん培養細胞株6種におけるこれら5つ遺伝子の発現を検討してみた。膵がん培養細胞株6から採取された100ng mRNA あたりもっとも発現が高かったものは CK19 遺伝子であり、ついで CEA, Muc1, HER2, そして E-cad の順であった。CK19 は100ng あたり発現コピー数は、 10^6 程度存在し CEA, Her2, Muc1 はそれぞれ 10^4 そして E-cad は 10^3 コピーが認められた。健常人末梢血中における mRNA 中には少量の分子発現を認めることはあったが、一般にその発現コピー数は低かった。リンパ節31個の中でこれら5つの分子の発現を定量化し、その発現量と組織学的リンパ節転移の有無を比較することにより ROC カーブを作成し適正な cut off 値を個々の分子について決定した。100ng cDNA あたり CEA は 1×10^3 コピー, CK19 は 5×10^3 コピー, E-cad は 5×10^2 コピー, HER2 は 1×10^4 コピーそして

Muc1 は 1×10^3 コピーとした。これらの cut off 値を用いて再び組織学的にがんを検出したリンパ節9個を検討したところ8個のリンパ節において3個以上の発現が陽性として認められたが一方、がんの転移を認めなかったリンパ節22個においては2症例においてのみ3個以上の陽性所見を示した。これらの結果は、本遺伝子の組み合わせにより特異度・感度を上げてがん細胞を検出することが可能であることが示された。

D. 考察

本研究は、新しい電気科学的活性をもつ DNA 2本鎖特異的縫込型インターカレーター (FND) を用いる ECA チップで各種がんマーカーならびに上皮マーカーを検出する系を確立するものであるが、本年度は特にこのチップにのせる遺伝子マーカー(がんマーカーならびに上皮細胞マーカー)を決定することを行った。本年度の研究結果より CK19, CEA, Muc1 そして HER2 は比較的乳がんの微小リンパ節転移の定量化には向いている分子マーカーであることが明らかとなった。今回は、各遺伝子の cut off 値を組織学的ながん細胞の有無の確認と比較検討することにより cut off 値の設定を行った。現在これら cut off 値の個数により陽性および陰性の判定をしているが、今後はこれら分子の重み付けを考えより感度・特異度とも高くなるような cut off 値の設定が必要と考えられる。また、本研究の目的である縫込型インターカレーター FND を用いる ECA (エレクトロケミカルアレイ) におけるこれら分子の発現を見るためには、今後適切なプローブ領域の検索も必要と考えられる。PCR 法を用いずこの ECA チッ

プにより検出が可能となれば短時間でがんの転移の有無の補助診断が可能になり今後、術中迅速だけでなく、がんのステージを決定するリンパ節病理診断において ECA チップを用いた遺伝子検索法の適応が拡大されると考えられる。

E. 結論

CK19, CEA, Muc1, HER2 などの遺伝子の発現を感度よく測定することによりリンパ節の転移の有無を測定することが可能になると考えられた。

F. 健康危険情報 特になし。

G. 研究発表

特になし。

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

厚生科学研究費補助金（高度先端医療研究事業）

分担研究報告書

血漿 DNA を用いた遺伝子診断に関する研究

分担研究者名 赤木 究 埼玉県立がんセンター研究所 遺伝子検査室 主任研究員

がんの発見、治療効果判定やがんの進展を知る上で腫瘍マーカーは大きな役割を果たしている。しかし、実際に有用なマーカーは少なく、また利用できるのは一部のがんに限られており、新たなマーカーを見つけることはがんを克服する上で重要である。

私たちは、これまでに血漿中に存在するがん細胞由来の DNA を測定し、これをバイオマーカーとした新しい診断法の開発を試みている。これまでに 5 症例に関して、長期的にがん細胞由来血漿 DNA の動態を解析してきたが、その動きが腫瘍マーカーと平行に推移する症例があり、腫瘍の進展状態を反映している可能性を見いだした。今後、症例を増やすとともに、ごく微量しか存在しない血漿 DNA の解析法など方法論を確立させ、生体内における核酸の動態を明らかにし、すべてのがんに対して応用可能な治療効果に関わる診断法としての実用化を目指している。

A. 研究目的

血漿中に存在するがん細胞由来の DNA を測定し、これをバイオマーカーとした新しい診断法の開発を試みる。個々の症例を検討し、この方法論を確立させながら、生体内における核酸の動態を明らかにし、すべてのがんに対して応用可能な治療効果に関わる診断法の開発を目指す。

B. 研究方法

血漿 DNA は微量であるため、これを測定するためには純度が高く、回収率の高い精製法が必要であり、そのための DNA 抽出法の検討を行った。まず、採血管としてプレーン、EDTA2Na、EDTA2K、ヘパリン、クエン酸ナトリウムによる採血を行った。また、採血直後、採血 6 時間後に血漿分離を行い、その影響を検討した。次に、血漿 DNA を効率よく回収するため

に、複数の方法を検討した。キアーゲンカラム法、NaI 法、proteinase K 法、Get pure DNA Kit blood (Dojin) を用いて検討した。また、血漿 DNA 中に含まれる変異 k-ras 遺伝子の割合を求めるため、PCR-SSCP 法の条件を検討した。K-ras のコドン 12、13 を含むように蛍光プライマーを設計し、変異型 DNA と野生型 DNA を分離する条件を決定した。これをオートシーケンサーで行い、分離した変異型 DNA と野生型 DNA のシグナルをフラグメント解析ソフト（アレルリンク）を用いて解析を行った。そして、腫瘍組織に k-ras 遺伝子の変異を認められた症例より経時的に採血を行い、解析を行った。

（倫理面への配慮）

この研究は当センターの倫理審査委員会にてすでに承認を受けている。また、研究に

使用する検体は、十分な説明を受けた提供者の自由意思により「がん研究のための同意書」に同意の表明をいただいているものを使用している。この研究に伴う人権の保護（研究協力の任意性、同意の撤回、個人情報保護、研究による利益不利益など）は同意書の中に盛り込まれている。

本研究は、体細胞レベルでの遺伝子変異の解析を行うものであるが、患者検体は解析前に暗号化を行うことにより、個人情報の保護を行っている。

C. 研究結果

血漿 DNA を精製するための採血法としては、EDTA2Na または EDTA2K が長時間放置しても一定の血漿 DNA が回収されることが分かった。

また、血漿より微量の DNA を効率よく回収する方法としては、NaI 法、Get pure DNA Kit blood (Dojin)を用いて精製するものが最も高い回収率を認めた。

K-ras の遺伝子変異のほとんどはコドン 12 であり、この部位を含む領域を蛍光プライマーを用いて PCR で増幅し、SSCP で変異を分離する条件を検討した。その結果、25 度でコドン 12 のすべての変異を分離することができた。また、この解析には、野生型と変異型の比率を求めるが、既知の k-ras 遺伝子を含むプラスミドを用いて、様々の濃度における定量性を検量線を用いて検討した。その結果、この測定系がある程度直線性を持ち、1 対 20 のレベルまではその比をほぼ正確に測定できることがわかった。

この方法を用いて、患者血漿より抽出した DNA を用いて、PCR-SSCP を行い、癌細

胞由来 DNA の相対的量を数値化し、患者の臨床経過との相関を検討したところ、5 例中 3 例で腫瘍マーカーと同様な動きを示すことが分かった。

D. 考察

抽出された血漿 DNA をアクリルアミドゲルで泳動すると、約 180bp, 340~60bp 近傍に DNA 断片が主に存在し、このことから血漿 DNA はヌクレオソーム単位で存在することが示唆された。このために、血漿 DNA は血中ですぐに分解されず、循環するものと思われた。

また、がんが化学療法に反応し縮小すると、腫瘍マーカーが減少するのと同様に、癌細胞由来血漿 DNA の相対的量も減少する傾向を示し、新しいマーカーとして利用できる可能性が見い出された。ただし、5 例中 2 例では必ずしも腫瘍マーカーの動きと同様な推移は見せなかったが、患者の全身状態や感染症などの影響を受けたためと考えられ、こうした変化をさらに客観的に評価できる方法の開発の必要性が示唆された。

E. 結論

がん患者における血漿 DNA は、がんの治療効果や再発を知るのに、有効なマーカーであることが示唆された。

F. 健康危険情報 特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Fukuyama,T.,Sueoka,E., Sugio,Y., Otsuka,T., Niho,Y., **Akagi,K.** and Kozu,T.

MTG8 proto-oncoprotein interacts with the regulatory subunit of type II cyclic AMP-

dependent protein kinase in lymphocytes
Oncogene, 20, 6225-6232, 2001

Yamaguchi, K., Arai, Y., Kanda, Y. and **Akagi, K.**

Germline Mutation of Dihydropyrimidine Dehydrogenase Gene among a Japanese Population in Relation to Toxicity to 5-Fluorouracil

Jpn. J. Cancer Res., 92: 337-342, 2001

Akagi, K., Kanai, M., Saya, H., Kozu, T. and Berns, A.

A novel tetracycline-dependent transactivator with E2F4 transcriptional activation domain
Nucleic Acids Res., 29: e23 (2001)

1. 学会発表

「hMLH1 遺伝子に構造異常を認めた HNPCC の一例」

山口研成、赤木究、新井吉子、西村洋治、大倉康男、深山紀子、菅野康吉

第7回家族性腫瘍研究会学術集会 平成13年6月14日～15日

「血漿 DNA によるがん診断の基礎検討と化学療法における血漿 DNA の推移」

山口研成、新井吉子、石窪力、多田正弘、西村仁志、神田祐三、菅野康吉、赤木究

第60回日本癌学会総会（パシフィコ横浜）平成13年9月26日～28日

「ユニバーサル腫瘍マーカーとしてのがん細胞由来血漿 DNA の応用」

赤木究、山口研成、新井吉子、田中洋一、神田祐三、神津知子、西村仁志

第60回日本癌学会総会（パシフィコ横浜）平成13年9月26日～28日

「microsatellite instability 陽性大腸直腸癌と k-ras、p53 の変異との関係」

石窪力、山口研成、新井吉子、大倉康男、小林照忠、西村洋治、田中洋一、多田正弘、赤木究

第60回日本癌学会総会（パシフィコ横浜）平成13年9月26日～28日

「消化器がんのプロテオーム解析：転移巣と原発巣の比較」

橘正芳、西村洋治、赤木究

第60回日本癌学会総会（パシフィコ横浜）平成13年9月26日～28日

「癌細胞由来の血漿中 DNA を用いた腫瘍進展の解析」

網倉克己、山口研成、坂本裕彦、小林照忠、右田隆之、西村洋治、内田健二、田中洋一、赤木究

第60回日本癌学会総会（パシフィコ横浜）平成13年9月26日～28日

H. 知的財産権の出願・登録状況
特になし