

200/0665

厚生科学研究費補助金

高度先端医療研究事業

遺伝子診断法ならびに遺伝子診断システムの実用化研究

平成13年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 森谷 宜皓

平成14(2002)年4月

目次

I. 総括研究報告書

| | |
|---------------------------|---|
| 遺伝子診断法ならびに遺伝子診断システムの実用化研究 | 1 |
| 森谷宜皓 | |

II. 分担研究報告

| | |
|---------------------|----|
| 1. 大腸がんの遺伝子診断法の開発 | 7 |
| 森谷宜皓 | |
| 藤田 伸 | |
| 松村保宏 | |
| 佐々木博己 | |
| 2. 動脈硬化症の遺伝子診断法の開発 | 11 |
| 永井 良三 | |
| 森田 啓行 | |
| 3. 遺伝子診断システムの技術検討 | 14 |
| 神原 秀記 | |
| III. 研究成果の刊行に関する一覧表 | 15 |

遺伝子診断法ならびに遺伝子診断システムの実用化研究

主任研究者 森谷宜皓 国立がんセンター中央病院医長

研究要旨：本研究は、生活習慣病であるがんや心筋梗塞、脳卒中に関連する遺伝子多型、変異、発現をプローブによって検出する遺伝子診断法の開発・実用化を目的とし、がんの中でも遺伝子解析の進んでいる大腸がんと心筋梗塞と脳卒中の原因である動脈硬化症を研究対象疾患とした。また遺伝子診断システムの実用化は日立製作所との共同として進めている。

大腸がんに関しては、がんスクリーニングの自動化に向け、便中の生細胞 RNA の分離法の確立と CD44 遺伝子以外の検査対象遺伝子のスクリーニングを行った。検体からの RNA の分離に関しては、パーコール密度勾配遠心による細胞分画法と細菌・ヒト細胞の分別溶解法を検討した。検査対象遺伝子のスクリーニングとしては、マイクロアレイ解析を行い大腸がんで顕著に発現する 19 個の遺伝子を同定した。

動脈硬化症に関しては、心筋梗塞、高血圧の発症および病態に関連する遺伝子多型の診断法の開発・実用化を目的とし、東京大学において心臓カテーテルを施行した全症例を対象として臨床データを網羅的にデータベース化を行うと同時に既知の動脈硬化関連因子に着目して遺伝子解析を行った。マトリクスメタロプロテアーゼ多型が心筋梗塞発症に関連することを明らかにした。

分担研究者氏名・所属機関名および職名
森谷宜皓・国立がんセンター中央病院・医長
藤田 伸・国立がんセンター中央病院・医長
松村保宏・国立がんセンター中央病院・医長
佐々木博己・国立がんセンター研究所・室長
永井良三・東京大学大学院医学系研究科循環器内科・教授
森田啓行・東京大学大学院医学系研究科循環器内科・助手
神原 秀記・㈱日立製作所中央研究所・技師長

ムの構築を行う。

B. 研究方法

大腸がんのスクリーニング法は、便中からがん細胞を含む細胞群を効率良く分離することを基盤に置いた方法である。便の前処理システムの開発に向け、便中の生きた細胞から RNA を精製する方法の簡便化を行う。また検査システムの開発としては、検査対象遺伝子の決定とその mRNA の検出系の開発を行う。

動脈硬化症の遺伝子検査は、心臓カテーテルを施行した全症例を対象として臨床データを網羅的にデータベース化を行なう。動脈硬化症との関連性の示唆される遺伝子の SNP について解析を日立製作所開発の BAMPER 法に代表される新しい遺伝子解析システムを活用して解析し、臨床データベースと統合的に相関性を検討し、発症および予後、治療反応性を規定する遺伝子マーカーの同定を試みる。

（倫理面への配慮）

本研究は国立がんセンターと東京大学倫理審査委員会の承認を得ており、検体の提供者に研究の目的と解析対象に関する説明に基づきインフォームドコンセントを取り、検体はすべて匿名化を行っている。

C. 研究結果

A. 研究目的

本研究は、生活習慣病であるがんや心筋梗塞、脳卒中に関連する遺伝子多型、変異、発現をプローブによって検出する遺伝子診断法の開発・実用化を目的とし、がんの中でも遺伝子解析の進んでいる大腸がんと心筋梗塞と脳卒中の原因である動脈硬化症を研究対象疾患としている。

大腸がんに関しては比較的少量の便の生細胞 RNA を用いた大腸がんスクリーニング法の実用化を目的とした。

動脈硬化症に関しては、本疾患に関連する遺伝子多型、変異、発現をプローブによって検出する遺伝子診断法の開発・実用化を目的とした。

いずれの研究も日立製作所との共同で汎用的で実地臨床に還元される遺伝子診断システ

大腸がんのスクリーニング法

便の前処理システムの開発では、最初に 0.5 - 5 g の便を生理食塩水でけん濁後、ろ過によって未消化物を除き、次にパーコール密度勾配遠心によって、ヒト細胞を分離するか、またはヒトの細胞のみを選択的に溶解する方法で RNA を精製する方法の検討を行っている。蛍光標識したがん細胞と便を混ぜる実験で、24 時間室温で放置しても、生きたがん細胞がパーコール法で分離できることを確認した。一方、分別溶解法に関しては、デタージェントの濃度などの検討を行っている。検査対象遺伝子のスクリーニングとしては、大腸がん患者および健康人の便中の細胞、大腸がん組織および大腸正常粘膜から抽出した RNA を用いマイクロアレイ解析 (12600 遺伝子) を行い、大腸がんのスクリーニングのための新たな候補遺伝子の分離を開始した。現在、大腸がん細胞および炎症性リンパ球を含む間質を構成する細胞で、特異的かつ顕著に発現している約 20 種の遺伝子の同定に成功した。陽性率等の実用化評価を行うため、年間 100 症例のサンプルの精製、保存体制を構築した。

動脈硬化症

2002 年 3 月の段階で心臓カテーテル検査施行患者約 1400 症例をデータベース化し、遺伝子検体数は約 700 例に達し、この遺伝子検体を用いて動脈硬化の発症、進展に寄与する遺伝子マーカーの検出を進めた。既知の動脈硬化関連因子に着目し、その遺伝子に存在する遺伝子多型の解析を行い、すでに構築してある臨床データベースとの間で関連解析を行った。一例として動脈硬化の発症・進展に関与が示唆されるマトリクスメタロプロテナーゼ(MMP)の遺伝子多型に関して心筋梗塞発症との有意相関を見いだした。各々の転写活性に関与する MMP-1 プロモーター領域 -1607 1G/2G 多型、MMP-3 プロモーター領域 -1171 5A/6A 多型には互いに強い連鎖不平衡を認め、MMP3 の 5A アレルおよび MMP1 1G-MMP3 5A ハプロタイプを保有することは有意に心筋梗塞発症のリスク因子となることを明らかとした。現在、新しい遺伝子多型タイプングシステム (BAMPER 法 (日立製作所)) を利用しつつ数十の遺伝子の SNP について解析を行い、すでに半数程度の解析が終了しており、今後臨床事象との関連性の検討を行う予定である。

D. 考察

大腸がんのスクリーニング法

便の前処理システムの開発における、ヒト生細胞の分離の基礎的実験は終了したものと考える。一方ヒトの細胞のみを選択的に溶解する方法は次年度の前期に終了する予定である。国立がんセンターでは、既に患者から採取した約 5 g の便から CD44 遺伝子のスプライシングバリエーションを検出することによって、大腸がんの症例の 60%以上で検出できることを報告している。一方、大腸がん組織にはがん細胞の他、炎症性リンパ球などが含まれていることから、がん細胞で特異的かつ顕著に発現している遺伝子や間質を構成する細胞で発現する今回同定した遺伝子もまた大腸がんの検出に有用であると考えられる。

動脈硬化症

国内外で遺伝子多型の検討が多く施行されているが、包括的な臨床情報と遺伝子情報を統合的に解析し、かつ臨床事象を前向きに観察してその予後、治療反応性、薬剤副作用などの関連性を検討を試みている研究は稀少であり、非常に有用である。本研究の問題点としては、健常対照群が必ずしも冠動脈疾患保有患者と年齢、性別などの点で合致しない点が挙げられるが、今後関連医療機関および健康診断などからの高齢男性健康者のサンプリングを検討する必要がある。

E. 結論

大腸がんのスクリーニング法では、便の前処理システムに関しては、今後、各ステップを自動化に向けて、簡便化する必要がある。またさらに陽性率を高めるため、新たな候補遺伝子の探索が必要である。

動脈硬化では、MMP1、MMP3 の遺伝子多型が心筋梗塞発症に関連する有用なマーカーであることが確認されたが、今後、さらに有用な疾患感受性、治療反応性を規定する遺伝子マーカーの同定が必要である。

以上、いずれの研究も実用化に関しては途上であり、今後さらに対象例を増やし、日立製作所が開発した BAMPER (バンパー) 法と対象遺伝子特異的プローブによる検査用マイクロアレイ解析の適用を検討し、実用的なシステムを開発していく予定である

F. 健康危機情報

特に認められない。

G. 研究発表

1. 論文発表

国立がんセンター

- 1) Shirakawa, K., Tsuda, H., Heike, Y., Kato, K., Inomata, M., Sasaki, H., Kasumi, F., Yoshimoto, M., Iwanaga, T., Konishi, F., Terada, M., and Wakasugi, H. Lack of endothelial cells, central necrosis, and fibrosis is associated with aggressive inflammatory breast cancer. *Cancer Res.*, 61: 445-451, 2001.
- 2) Kakazu, N., Ashihara, E., Hada, S., Ueda, T., Sasaki, H., Terada, M., and Abe, T. Development of spectral color banding in cytogenetic analysis. *Lancet*, 357: 529-530, 2001.
- 3) RIKEN Genome Exploration Research group Phase II team: Kawai, J., et al., FANTOM Consortium: Okazaki, Y., Sasaki, H., et al., and general organizer: Hayashizaki, Y. Functional annotation of a full-length mouse cDNAs collection. *Nature*, 409: 685-690, 2001.
- 4) Tanooka, H., Sasaki, H., Shiroishi, T., and Moriwaki, K. p53 pseudogene dating: Identification of the origin of laboratory mice. *Gene*, 270: 153-159, 2001.
- 5) Yamamoto, H., Ochiya, T., Takeshita, F., Toriyama-Baba, H., Hirai, K., Sasaki, H., Sasaki, H., Sakamoto, H., Yoshida, T., Saito, I., and Terada, M. Enhanced skin carcinogenesis in cyclin D1 conditional transgenic mice: cyclin D1 alters keratinocyte response to calcium-induced terminal differentiation. *Cancer Res* (in press)
- 6) Fujita, S., Kudo, N., Akasu, T., and Moriya, Y. Detection of cytokeratin 19 and 20 mRNA in peripheral and mesenteric blood from colorectal cancer patients and their prognosis. *Int J Colorectal Dis*, 16: 141-146, 2001
- 7) Matsuoka, N., Moriya, Y., Akasu, T., and Fujita, S. Long-term outcome of urinary function after extended lymphadenectomy in patients with distal rectal cancer. *Eur J Surg Oncol*, 27: 165-169, 2001

東京大学

- 1) Morita H, Kurihara H, Imai Y, Sugiyama T, Hamada C, Sakai E, Mori M, Nagai R. Lack of association between the platelet glycoprotein Ia C807T gene polymorphism and myocardial infarction in Japanese. An approach entailing melting curve analysis with specific fluorescent hybridization probes. *Thromb Haemost.* 2001;85:226-30.
- 2) Oh-hashii Y, Shindo T, Kurihara Y, Imai T, Wang Y, Morita H, Imai Y, Kayaba Y, Nishimatsu H, Suematsu Y, Hirata Y, Yazaki Y, Nagai R, Kuwaki T, Kurihara H. Elevated sympathetic nervous activity in mice deficient in alpha CGRP.

Circ Res. 2001;89:983-90.

- 3) Shindo T, Kurihara Y, Nishimatsu H, Moriyama N, Kakoki M, Wang Y, Imai Y, Ebihara A, Kuwaki T, Ju KH, Minamino N, Kangawa K, Ishikawa T, Fukuda M, Akimoto Y, Kawakami H, Imai T, Morita H, Yazaki Y, Nagai R, Hirata Y, Kurihara H. Vascular abnormalities and elevated blood pressure in mice lacking adrenomedullin gene. *Circulation.* 2001;104:1964-71.
- 4) Itoh T, Kikuchi K, Odagawa Y, Takata S, Yano K, Okada S, Haneda N, Ogawa S, Nakano O, Kawahara Y, Kasai H, Nakayama T, Fukutomi T, Sakurada H, Shimizu A, Yazaki Y, Nagai R, Nakamura Y, Tanaka T. Correlation of genetic etiology with response to b-adrenergic blockade among symptomatic patients with familial long-QT syndrome. *J Hum Genet* 2001; 46: 38-40
- 5) Iwasa H, Kurabayashi M, Nagai R, Nakamura Y, Tanaka T. Multiple single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in the Japanese population in six candidate genes for long QT syndrome. *J Hum Genet* 2001; 46: 158-162
- 6) Hiori Y, Kudoh S, Monzen K, Ikeda Y, Yazaki Y, Nagai R, Komuro I. Tbx5 associates with Nkx2-5 and synergistically promotes cardiomyocyte differentiation. *Nature Genetics* 2001; 28:276-280
- 7) Saiura A, Sata M, Hirata Y, Nagai R, Makuuchi M. Circulating smooth muscle progenitor cells contribute to atherosclerosis. *Nat Med* 2001; 7: 382-383
- 8) Yamagishi T, Saito Y, Nakamura T, Takeda S, Kanai H, Sumino H, Kuro-o M, Nabeshima Y, Kurabayashi M, Nagai R. Troglitazone Improves Endothelial Function and Augments Renal klotho mRNA Expression in Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) Rats with Multiple Atherogenic Risk Factors. *Hypertension Research* 2001; 24: 705-709
- 9) Tozawa R, Ishibashi S, Osuga J, Yamamoto K, Yagyu H, Ohashi K, Tamura Y, Yahagi N, Iizuka Y, Okazaki H, Harada K, Gotoda T, Shimano H, Kimura S, Nagai R, Yamada N. Asialoglycoprotein receptor deficiency in mice lacking the major receptor subunit: Its obligate requirement for the stable expression of oligomeric receptor. *J Biol Chem* 2001; 276: 12624-12628
- 10) Morita H, Saito Y, Kurabayashi M, Nagai R. Diet-induced mild hyperhomocysteinemia and increased salt intake diminish vascular endothelial function in a synergistic manner. *J Hypertens.* 2002;20:55-62.
- 11) Nagai R, Suzuki T, Aizawa K, Miyamoto S, Amaki T, Kawai-Kowase K, Sekiguchi KI, Kurabayashi M. Phenotypic modulation of

vascular smooth muscle cells: dissection of transcriptional regulatory mechanisms.

Ann N Y Acad Sci. 2001 Dec;947:56-66; discussion 66-7.

12) Oyama Y, Akuzawa N, Nagai R, Kurabayashi M. PPARgamma ligand inhibits osteopontin gene expression through interference with binding of nuclear factors to A/T-rich sequence in THP-1 cells. *Circ Res*. 2002;90:348-55.

13) Sata M, Sugiura S, Yoshizumi M, Ouchi Y, Hirata Y, Nagai R. Acute and chronic smooth muscle cell apoptosis after mechanical vascular injury can occur independently of the Fas-death pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001 ;21:1733-7.

2. 学会発表

国立がんセンター

1) 上田哲也、佐々木博己他、複数マーカー遺伝子を用いた胃がんの腹膜再発予測と新たなマーカー遺伝子の探索、第 73 回日本胃癌学会総会、2001 年

2) 成清道博、佐々木博己他、食道がん Streptococcus 感染、第 101 回日本外科学会総会、2001 年

3) 上田哲也、佐々木博己他、複数マーカー遺伝子による胃癌の腹膜再発予測のための新たなマーカー遺伝子の探索、第 101 回日本外科学会総会、2001 年

4) 成清道博、佐々木博己他、アンギノサス菌の食道がん発生における役割、第 12 回日本消化器癌発生学会総会、2001 年

5) Ueda, T., Sasaki, H., Kaminishi, M., Terada, M. et al., Identification of deletion of the carboxyl-terminal exons of the *K-sam*/FGFR2 gene in the scirrhous gastric cancer and novel transcripts. 4th IGCC, New York, 2001.

6) Ueda, T., Sasaki, H., Kaminishi, M., Terada, M. et al., Prediction of the peritoneal recurrence using multiple marker genes in the gastric cancers and searching for new marker genes. 39th WCS, Brussels, 2001.

7) Tsubosa, Y., Sasaki, H., et al., Evaluating risk of lymph node metastasis of esophageal cancer by complementary DNA chip. 39th WCS, Brussels,

2001.

8) 佐々木博己、坂本裕美、吉田輝彦、寺田雅昭、不安定なゲノム構造の特徴：がんにおける増幅ユニットの構造解析、シンポジウム 第 60 回日本癌学会総会、2001 年

9) 青柳一彦、佐々木博己他、DNAchip 解析による上部消化器がんの悪性度評価に向けた戦略不安定なゲノム構造の特徴、シンポジウム 第 60 回日本癌学会総会、2001 年

10) 齊藤大三、佐々木博己他、細菌と上部消化器がん、シンポジウム 第 60 回日本癌学会総会、2001 年

11) 田邊智佳子、佐々木博己他、末梢血およびパラフィン包埋切片 DNA の新しい増幅方法の開発、第 60 回日本癌学会総会、2001 年

12) Kim Hark-Kyun, Sasaki Hiroki, et al., Cisplatin-inducible genes identified by the DNA microarray analysis in esophageal cancer cell lines. 第 60 回日本癌学会総会、2001 年

13) 芦田明雄、佐々木博己他、マイクロアレイによる食道がんの治療法の選択に有用な遺伝子の探索、第 60 回日本癌学会総会、2001 年

14) 西垣美智子、佐々木博己他、スキルス胃癌細胞株におけるメチル化遺伝子とメチル化センターの探索、第 60 回日本癌学会総会、2001 年

15) 成清道博、佐々木博己他、アンギノサス菌の食道がん発生における役割、第 60 回日本癌学会総会、2001 年

16) 上田哲也、佐々木博己他、複数マーカー遺伝子を用いた低分化胃がんの腹膜再発予測、第 60 回日本癌学会総会、2001 年

17) 金達浩、佐々木博己他、増幅に伴う高頻度欠失領域にはがん抑制遺伝子が存在する、第 60 回日本癌学会総会、2001 年

18) 山本華子、佐々木博己他、マウス表皮におけるサイクリン D1 の過剰発現による DMBA 発がんの促進、第 60 回日本癌学会総会、2001 年

19) 村松知成、佐々木博己他、ヒト GALGT2 の cDNA および遺伝子の構造、第 74 回日本生化学会大会、2001 年

20) Hiroki Sasaki, et al., Prediction of Survival of Patients with Esophageal Squamous Cell Carcinoma Using Expression Profiling and Artificial Neural Networks

The 6th Japan-Korea Cancer Research Workshop, 2001.

21) 田邊智佳子、佐々木博己他、末梢血およ

びパラフィン包埋切片 DNA の新しい増幅技術 (SATAN 法)、第 24 回日本分子生物学会年会、2001 年

22) 村松知成、佐々木博己他、ヒト GALGT2 遺伝子とその発現、第 24 回日本分子生物学会年会、2001 年

23) 谷口繁生、佐々木博己他、テトラサイクリン依存的に MTA1 アンチセンス RNA を発現する乳がん細胞の性質、第 24 回日本分子生物学会年会、2001 年

24) 西垣美智子、佐々木博己他、スキルス胃がん細胞株を用いたメチル化遺伝子とメチル化センターの探索、第 24 回日本分子生物学会年会、2001 年

25) 佐々木博己、食道がんのマイクロアレイ解析、第 2 回 SRL 遺伝子診断フォーラム、2001 年

26) 佐藤弘、佐々木博己他、マイクロアレイによる遺伝子発現プロファイルに基づき食道がんリンパ節転移のリスク診断、食道疾患研究会、2002 年

東京大学

【第 65 回日本循環器学会総会学術集会】

1) 森田啓行、永井良三

The Human Genome Project in Cardiovascular Diseases Genetic Polymorphism in Homocysteine Metabolism

2) 野尻剛史、森田啓行、林同文、藤田英雄、今井靖、吹野恵子、山崎憲、深山源太、碓井伸一、原田智浩、池田祐一、山崎力、杉山卓郎、鈴木亨、小室一成、中村文隆、杉浦清了、大野実、平田恭信、永井良三

Reduced susceptibility to Coronary Heart Disease by Matrix Metalloproteinase-1 promoter 1G allele homogeneity

3) 吹野恵子、森田啓行、今井靖、野尻剛史、中村文隆、大野実、杉浦清了、平田恭信、武藤真祐、浅川雅子、飯田陽子、永井良三、林同文、山崎力、深山源太、藤田英雄、小室一成、杉山卓郎

ACE and AT1R polymorphism are genetic risk factors for coronary artery disease

4) 森田啓行、栗原裕基、吉田成孝、矢崎義雄、永井良三

Homocysteine-lowering with folate supplementation ameliorates the detrimental effect of hyperhomocysteinemia; An experiment in rat balloon injury model

5) 林同文、森田啓行、藤田英雄、中村文隆、

今井靖、吹野恵子、浅川雅子、池田祐一、野尻剛史、武藤真祐、山崎憲、深山源太、小室一成、杉浦清了、大野実、平田恭信、山崎力、永井良三

The levels of ANP and BNP are positively correlated with the severity of CHD irrespective of left ventricular function

6) 林同文、森田啓行、鈴木亨、藤田英雄、中村文隆、今井靖、吹野恵子、天木幹博、野尻剛史、山崎憲、水野由子、深山源太、小室一成、杉浦清了、大野実、平田恭信、山崎力、永井良三

Elevated levels of malondialdehyde modified (MDA)-LDL levels in patients with coronary artery disease

【第 98 回日本内科学会】

7) 林同文、深山源太、山崎力、藤田英雄、森田啓行、今井靖、吹野恵子、野尻剛史、山崎憲、永井良三

臨床医学研究における新しいデータ管理・解析システムの構築とゲノム研究による分子疫学への展開

8) 林同文、深山源太、山崎力、藤田英雄、森田啓行、今井靖、吹野恵子、野尻剛史、山崎憲、永井良三

血中 ANP および BNP 濃度は冠動脈疾患の重症度と相関する

【5th International Conference on Preventive Cardiology】

9) 森田啓行、永井良三

Practical implication of "new" risk factors for prevention in the genetic polymorphism Homocysteine and cardiovascular disease

【第 8 回日本遺伝子診療学会大会】

・森田啓行、永井良三

シンポジウム 新しいゲノム技術とその臨床応用

ホモシステイン代謝関連酵素遺伝子多型と動脈硬化

・今井靖、前村浩二、鈴木亨、石井雅巳、林同文、森田啓行、山崎力、油谷浩幸、永井良三

心臓リモデリングの際、心臓線維芽細胞において発現する遺伝子プロファイルの DNA chip による解析

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得

1) DNA の増幅方法、平成 13 年 5 月 8 日

特許願第 2001-137858 号

発明者：佐々木博己、田邊智佳子、寺田雅昭、峰野純一、浅田起代蔵、加藤郁之進

出願人：国立がんセンター、医薬品機構、宝酒造株式会社

2) 癌の検出方法、平成 13 年 8 月 18 日

国際特許願 PCT/JP01/06201 号

発明者：佐々木博己、坪佐恭宏、青柳一彦、寺田雅昭、峰野純一、

浅田起代蔵、加藤郁之進

出願人：宝酒造株式会社

3) DNA の増幅方法、平成 13 年 10 月

国際特許願中(米国)

発明者：佐々木博己、田邊智佳子、寺田雅昭、峰野純一、浅田起代蔵、

加藤郁之進

出願人：国立がんセンター、医薬品機構、宝酒造株式会社

4) リアルタイム臨床データナビゲーションシステム

特許出願申請予定

2. 実用新案登録

特になし

3. そのほか

特になし

遺伝子診断法ならびに遺伝子診断システムの実用化研究

分担研究者 森谷宜皓 国立がんセンター中央病院医長
藤田 伸 国立がんセンター中央病院医長
松村保宏 国立がんセンター中央病院医長
佐々木博己 国立がんセンター研究所室長

研究要旨：大腸がんスクリーニングの自動化に向け、便中の生細胞 RNA の分離法の確立と CD44 遺伝子以外の検査対象遺伝子のスクリーニングを行った。検体からの RNA の分離に関しては、パーコール密度勾配遠心による細胞分画法と細菌・ヒト細胞の分別溶解法を検討した。検査対象遺伝子のスクリーニングとしては、マイクロアレイ解析を行い大腸がんで顕著に発現する 19 個の遺伝子を同定した。

A. 研究目的

比較的少量の便 (0.5 - 5 g) の生細胞 RNA を用いた大腸がんスクリーニング法の実用化を目的とする。検査の第一目標は偽陽性率を下げ、現行の便潜血検査での陽性率 (5%) を 50% 以上に高めること、第二の目標は小さな腫瘍も検出することとした。実際、CD44 を使った大腸がんのスクリーニングの結果では、全体の陽性率は 60 % であり、また陽性を示した症例中、3 cm 以下の小さな腫瘍も約 40 % は発見可能であった。第三に安価であることの 3 点に置いた。

B. 研究方法

本プロジェクトで開発する大腸がんのスクリーニング法は、便中からがん細胞を含む細胞群を効率良く分離することを基盤に置いた方法である。便の前処理システムの開発に向け、便中の生きた細胞から RNA を精製する方法の簡便化を行う。また検査システムの開発としては、検査対象遺伝子の決定とその mRNA の検出系の開発を行う。

(倫理面への配慮)

本研究は国立がんセンターの倫理審査委員会の承認を得ており、検体の提供者に研究の目的と解析対象 (生殖細胞系列の遺伝子異常や多型ではなく、がん細胞における遺伝子発現) に関する説明に基づきインフォームドコンセントを取り、検体はすべて匿名化を行っている。したがって倫理面での問題はないと判断する。

C. 研究結果

便の前処理システムの開発では、最初に 0.5 - 5 g の便を生理食塩水でけん濁後、ろ過に

よって未消化物を除き、次にパーコール密度勾配遠心によって、ヒト細胞を分離するか、またはヒトの細胞のみを選択的に溶解する方法で RNA を精製する方法の検討を行っている。蛍光標識したがん細胞と便を混ぜる実験で、24 時間室温で放置しても、生きたがん細胞がパーコール法で分離できることを確認した。一方、分別溶解法に関しては、デタージェントの濃度などの検討を行っている。検査対象遺伝子のスクリーニングとしては、大腸がん患者および健常人の便中の細胞、大腸がん組織および大腸正常粘膜から抽出した RNA を用いマイクロアレイ解析 (12600 遺伝子) を行い、大腸がんのスクリーニングのための新たな候補遺伝子の分離を開始した。現在、大腸がん細胞および炎症性リンパ球を含む間質を構成する細胞で、特異的かつ顕著に発現している約 20 種の遺伝子の同定に成功した。陽性率等の実用化評価を行うため、年間 100 症例のサンプルの精製、保存体制を構築した。

D. 考察

便の前処理システムの開発における、パーコール密度勾配遠心法によるヒト生細胞の分離の基礎的実験は終了したものと考える。一方ヒトの細胞のみを選択的に溶解する方法は次年度の前期に終了する予定である。国立がんセンターでは、既に患者から採取した約 5 g の便から抽出した RNA を鋳型に CD44 遺伝子のサブライシングバリエーション (CD44v6.10) を検出することによって、60% を超える大腸がん患者を検出できることを報告している。一方、大腸がん組織にはがん細胞の他、炎症性リンパ球などが含まれて

いることから、CD44v6,10 のみならずがん細胞で特異的かつ顕著に発現している遺伝子や間質を構成する細胞で発現する今回同定した遺伝子もまた大腸がんの検出に有用であると考えられる。

E. 結論

便の前処理システムに関しては、今後、各ステップを自動化に向けて、簡便化する必要がある。CD44 は有力な検査対象遺伝子であるが、さらに陽性率を高めるため、新たな候補遺伝子の探索が必要である。次年度は正常大腸粘膜での発現が殆どなく、大腸がん組織で顕著に発現する遺伝子の他、特異性の高いスプライシングバリエーションを同定するため 33000 遺伝子と 6000 種のスプライシングバリエーションの発現を一度に定量できる Affymetrix (アフィメトリックス) 社の最新のマイクロアレイを使って探索を進める必要がある。方法は健常人と大腸がん患者の便中の細胞の発現プロファイルおよび癌部、非癌部のプロファイルを比較することによって絞り込むものである。便中の微量 RNA による発現解析には、我々が開発した増幅法 (TALPAT) を適用する。検出系としては日立が開発した BAMPER (バンパー) 法と対象遺伝子特異的プローブによる検査用マイクロアレイ解析の適用を検討する必要がある。検査用マイクロアレイに関しては、既に試作品が作られており、今年中に実用評価する予定である。

F. 健康危機情報

特に認められない。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Shirakawa, K., Tsuda, H., Heike, Y., Kato, K., Inomata, M., Sasaki, H., Kasumi, F., Yoshimoto, M., Iwanaga, T., Konishi, F., Terada, M., and Wakasugi, H. Lack of endothelial cells, central necrosis, and fibrosis is associated with aggressive inflammatory breast cancer. *Cancer Res.*, 61: 445-451, 2001.
- 2) Kakazu, N., Ashihara, E., Hada, S., Ueda, T., Sasaki, H., Terada, M., and Abe, T. Development of spectral color banding in cytogenetic analysis. *Lancet*, 357: 529-530, 2001.
- 3) RIKEN Genome Exploration Research group Phase II team: Kawai, J., et al., FANTOM Consortium: Okazaki, Y., Sasaki, H., et al., and

general organizer: Hayashizaki, Y. Functional annotation of a full-length mouse cDNAs collection. *Nature*, 409: 685-690, 2001.

4) Tanooka, H., Sasaki, H., Shiroishi, T., and Moriwaki, K. p53 pseudogene dating: Identification of the origin of laboratory mice. *Gene*, 270: 153-159, 2001.

5) Yamamoto, H., Ochiya, T., Takeshita, F., Toriyama-Baba, H., Hirai, K., Sasaki, H., Sasaki, H., Sakamoto, H., Yoshida, T., Saito, I., and Terada, M. Enhanced skin carcinogenesis in cyclin D1-conditional transgenic mice: cyclin D1 alters keratinocyte response to calcium-induced terminal differentiation. *Cancer Res* (in press)

6) Fujita, S., Kudo, N., Akasu, T., and Moriya, Y. Detection of cytokeratin 19 and 20 mRNA in peripheral and mesenteric blood from colorectal cancer patients and their prognosis. *Int J Colorectal Dis*, 16: 141-146, 2001

7) Matsuoka, N., Moriya, Y., Akasu, T., and Fujita, S. Long-term outcome of urinary function after extended lymphadenectomy in patients with distal rectal cancer. *Eur J Surg Oncol*, 27: 165-169, 2001

2. 学会発表

- 1) 上田哲也、佐々木博己他、複数マーカー遺伝子を用いた胃がんの腹膜再発予測と新たなマーカー遺伝子の探索、第 73 回日本胃癌学会総会、2001 年
- 2) 成清道博、佐々木博己他、食道がん Streptococcus 感染、第 101 回日本外科学会総会、2001 年
- 3) 上田哲也、佐々木博己他、複数マーカー遺伝子による胃がんの腹膜再発予測のための新たなマーカー遺伝子の探索、第 101 回日本外科学会総会、2001 年
- 4) 成清道博、佐々木博己他、アンギノサス菌の食道がん発生における役割、第 12 回日本消化器癌発生学会総会、2001 年
- 5) Ueda, T., Sasaki, H., Kaminishi, M., Terada, M. et al., Identification of deletion of the carboxyl-terminal exons of the K-sam/FGFR2 gene in the scirrhous gastric cancer and novel transcripts. 4th IGCC, New York, 2001.
- 6) Ueda, T., Sasaki, H., Kaminishi, M., Terada, M. et al., Prediction of the peritoneal recurrence

using multiple marker genes in the gastric cancers and searching for new marker genes. 39th WCS, Brussels, 2001.

7) Tsubosa, Y., Sasaki, H., et al., Evaluating risk of lymph node metastasis of esophageal cancer by complementary DNA chip. 39th WCS, Brussels, 2001.

8) 佐々木博己、坂本裕美、吉田輝彦、寺田雅昭、不安定なゲノム構造の特徴：がんにおける増幅ユニットの構造解析、シンポジウム第60回日本癌学会総会、2001年

9) 青柳一彦、佐々木博己他、DNAchip 解析による上部消化器がんの悪性度評価に向けた戦略不安定なゲノム構造の特徴、シンポジウム第60回日本癌学会総会、2001年

10) 齊藤大三、佐々木博己他、細菌と上部消化器がん、シンポジウム第60回日本癌学会総会、2001年

11) 田邊智佳子、佐々木博己他、末梢血およびパラフィン包埋切片 DNA の新しい増幅方法の開発、第60回日本癌学会総会、2001年

12) Kim Hark-Kyun, Sasaki Hiroki, et al., Cisplatin-inducible genes identified by the DNA microarray analysis in esophageal cancer cell lines. 第60回日本癌学会総会、2001年

13) 芦田明雄、佐々木博己他、マイクロアレイによる食道がんの治療法の選択に有用な遺伝子の探索、第60回日本癌学会総会、2001年

14) 西垣美智子、佐々木博己他、スキルス胃がん細胞株におけるメチル化遺伝子とメチル化センターの探索、第60回日本癌学会総会、2001年

15) 成清道博、佐々木博己他、アンギノサス菌の食道がん発生における役割、第60回日本癌学会総会、2001年

16) 上田哲也、佐々木博己他、複数マーカー遺伝子を用いた低分化胃がんの腹膜再発予測、第60回日本癌学会総会、2001年

17) 金達浩、佐々木博己他、増幅に伴う高頻度欠失領域にはがん抑制遺伝子が存在する、第60回日本癌学会総会、2001年

18) 山本華子、佐々木博己他、マウス表皮におけるサイクリン D1 の過剰発現によるDMBA 発がんの促進、第60回日本癌学会総会、2001年

19) 村松知成、佐々木博己他、ヒト GALGT2 の cDNA および遺伝子の構造、第74回日本生化学会大会、2001年

20) Hiroki Sasaki, et al., Prediction of Survival of Patients with Esophageal Squamous Cell Carcinoma Using Expression Profiling and Artificial Neural Networks

The 6th Japan-Korea Cancer Research Workshop, 2001.

21) 田邊智佳子、佐々木博己他、末梢血およびパラフィン包埋切片 DNA の新しい増幅技術 (SATAN 法)、第24回日本分子生物学会年会、2001年

22) 村松知成、佐々木博己他、ヒト GALGT2 遺伝子とその発現、第24回日本分子生物学会年会、2001年

23) 谷口繁生、佐々木博己他、テトラサイクリン依存的に MTA1 アンチセンス RNA を発現する乳がん細胞の性質、第24回日本分子生物学会年会、2001年

24) 西垣美智子、佐々木博己他、スキルス胃がん細胞株を用いたメチル化遺伝子とメチル化センターの探索、第24回日本分子生物学会年会、2001年

25) 佐々木博己、食道がんのマイクロアレイ解析、第2回 SRL 遺伝子診断フォーラム、2001年

26) 佐藤弘、佐々木博己他、マイクロアレイによる遺伝子発現プロファイルに基づき食道がんリンパ節転移のリスク診断、食道疾患研究会、2002年

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得

1) DNA の増幅方法、平成13年5月8日
特許願第2001-137858号

発明者：佐々木博己、田邊智佳子、寺田雅昭、峰野純一、浅田起代蔵、
加藤郁之進

出願人：国立がんセンター、医薬品機構、
宝酒造株式会社

2) 癌の検出方法、平成13年8月18日
国際特許願 PCT/JP01/06201号

発明者：佐々木博己、坪佐恭宏、青柳一彦、
寺田雅昭、峰野純一、
浅田起代蔵、加藤郁之進

出願人：宝酒造株式会社

3) DNA の増幅方法、平成13年10月
国際特許願中(米国)

発明者：佐々木博己、田邊智佳子、寺田雅昭、
峰野純一、浅田起代蔵、
加藤郁之進

出願人：国立がんセンター、医薬品機構、
宝酒造株式会社

2. 実用新案登録
0件

遺伝子診断法ならびに遺伝子診断システムの実用化研究

分担研究者 永井良三 東京大学大学院医学系研究科循環器内科
森田啓行 東京大学大学院医学系研究科循環器内科

研究要旨：心筋梗塞、高血圧の発症および病態に関連する遺伝子多型の診断法の開発・実用化を目的とし、東京大学循環器内科において心臓カテーテルを施行した全症例を対象として臨床データを網羅的にデータベース化を行うと同時に既知の動脈硬化関連因子に着目して遺伝子解析を行い、マトリクスメタロプロテナーゼ多型が心筋梗塞発症に関連することが判明し、また数十の SNP の解析が目下進行中であり、疾患に関連するより有用な遺伝子マーカーの同定が可能になると考えられる。

A. 研究目的

本研究は、生活習慣病のひとつである心筋梗塞、高血圧などに関連する遺伝子多型、変異、発現をプローブによって検出する遺伝子診断法の開発・実用化を目的とする。研究対象を心筋梗塞に代表される動脈硬化に絞る、発症や再発のリスク診断を行うため、健常人と高血圧症、心筋梗塞患者の血液を用いて動脈硬化に関連が示唆される遺伝子の多型性を検討し、汎用的で実地臨床に還元される遺伝子診断システムの構築を行うことを目指す。本研究を進めることにより、現在のエビデンスに基づいた画一化された医療行為から発展して患者の個性に合わせた個別化医療の実践が可能となるであろう。

B. 研究方法

東京大学循環器内科において心臓カテーテルを施行した全症例を対象として臨床データを網羅的にデータベース化を行った。遺伝子解析に関しては、東京大学医学部倫理委員会において申請、承認を受けたのち、倫理委員会にて承認された承諾書を使用して書面にて患者よりインフォームドコンセントを得て DNA 抽出を行い、冠動脈硬化・高血圧との関連性の示唆される遺伝子の SNP について解析を日立製作所開発の BAMPER 法に代表される新しい遺伝子解析システムを活用しつつ解析した。それを臨床データベースと統合的に相関性を検討し、冠動脈疾患発症および予後、治療反応性を規定する遺伝子マーカーの同定を試みる。

C. 研究結果

2002 年 3 月の段階で心臓カテーテル検査施行患者約 1400 症例をデータベース化し、遺伝子検体数は約 700 例に達し、この遺伝

子検体を用いて動脈硬化の発症、進展に寄与する遺伝子マーカーの検出を進めた。我々は既知の動脈硬化関連因子に着目し、その遺伝子に存在する遺伝子多型の解析を行い、すでに構築してある臨床データベースとの間で相関解析を行った。一例として動脈硬化の発症・進展に関与が示唆されるマトリクスメタロプロテナーゼ(MMP)の遺伝子多型に関して心筋梗塞発症との有意相関を見いだした。各々の転写活性に関与する MMP-1 プロモーター領域-1607 1G/2G 多型、MMP-3 プロモーター領域-1171 5A/6A 多型には互いに強い連鎖不平衡を認め、MMP3 の 5A アレルおよび MMP1 1G-MMP3 5A ハプロタイプを保有することは有意に心筋梗塞発症のリスク因子となることを明らかとした。現在、新しい遺伝子多型-タイピングシステム (BAMPER 法 (日立製作所)) を利用しつつ数十の遺伝子の SNP について解析を行い、すでに半数程度の解析が終了しており、今後臨床事象との関連性の検討を行う予定である。

D. 考察

国内外で遺伝子多型の検討が多く施行されているが、包括的な臨床情報と遺伝子情報を統合的に解析し、かつ臨床事象を前向きに観察してその予後、治療反応性、薬剤副作用などの関連性を検討を試みている研究は稀少であり、非常に有用である。本研究の問題点としては、健常対照群が必ずしも冠動脈疾患保有患者と年齢、性別などの点で合致しない点が挙げられるが、今後関連医療機関および健康診断などからの高齢男性健常者のサンプリングを検討する必要がある。

E. 結論

我々がやっている臨床事象とゲノム情報の

統合的解析により、すでに MMP1、MMP3 の遺伝子多型が心筋梗塞発症に関連する有用なマーカーであることが確認された。今後、この研究を推進することによりさらに有用な疾患感受性、治療反応性を規定する遺伝子マーカーの同定が可能となると考えられる。

F. 健康危険情報 特に認められない。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Morita H, Kurihara H, Imai Y, Sugiyama T, Hamada C, Sakai E, Mori M, Nagai R. Lack of association between the platelet glycoprotein Ia C807T gene polymorphism and myocardial infarction in Japanese. An approach entailing melting curve analysis with specific fluorescent hybridization probes. *Thromb Haemost.* 2001;85:226-30.
- 2) Oh-hashii Y, Shindo T, Kurihara Y, Imai T, Wang Y, Morita H, Imai Y, Kayaba Y, Nishimatsu H, Suematsu Y, Hirata Y, Yazaki Y, Nagai R, Kuwaki T, Kurihara H. Elevated sympathetic nervous activity in mice deficient in alpha CGRP. *Circ Res.* 2001;89:983-90.
- 3) Shindo T, Kurihara Y, Nishimatsu H, Moriyama N, Kakoki M, Wang Y, Imai Y, Ebihara A, Kuwaki T, Ju KH, Minamino N, Kangawa K, Ishikawa T, Fukuda M, Akimoto Y, Kawakami H, Imai T, Morita H, Yazaki Y, Nagai R, Hirata Y, Kurihara H. Vascular abnormalities and elevated blood pressure in mice lacking adrenomedullin gene. *Circulation.* 2001;104:1964-71.
- 4) Itoh T, Kikuchi K, Odagawa Y, Takata S, Yano K, Okada S, Haneda N, Ogawa S, Nakano O, Kawahara Y, Kasai H, Nakayama T, Fukutomi T, Sakurada H, Shimizu A, Yazaki Y, Nagai R, Nakamura Y, Tanaka T. Correlation of genetic etiology with response to b-adrenergic blockade among symptomatic patients with familial long-QT syndrome. *J Hum Genet* 2001; 46: 38-40
- 5) Iwasa H, Kurabayashi M, Nagai R, Nakamura Y, Tanaka T. Multiple single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in the Japanese population in six candidate genes for long QT syndrome. *J Hum Genet* 2001; 46: 158-162
- 6) Hiori Y, Kudoh S, Monzen K, Ikeda Y, Yazaki Y, Nagai R, Komuro I. Tbx5 associates with Nkx2-5 and synergistically promotes cardiomyocyte differentiation. *Nature Genetics* 2001; 28:276-280
- 7) Saiura A, Sata M, Hirata Y, Nagai R, Makuuchi M. Circulating smooth muscle progenitor cells

contribute to atherosclerosis. *Nat Med* 2001; 7: 382-383

8) Yamagishi T, Saito Y, Nakamura T, Takeda S, Kanai H, Sumino H, Kuro-o M, Nabeshima Y, Kurabayashi M, Nagai R. Troglitazone Improves Endothelial Function and Augments Renal klotho mRNA Expression in Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) Rats with Multiple Atherogenic Risk Factors. *Hypertension Research* 2001; 24: 705-709

9) Tozawa R, Ishibashi S, Osuga J, Yamamoto K, Yagyu H, Ohashi K, Tamura Y, Yahagi N, Iizuka Y, Okazaki H, Harada K, Gotoda T, Shimano H, Kimura S, Nagai R, Yamada N. Asialoglycoprotein receptor deficiency in mice lacking the major receptor subunit: Its obligate requirement for the stable expression of oligomeric receptor. *J Biol Chem* 2001; 276: 12624-12628

10) Morita H, Saito Y, Kurabayashi M, Nagai R. Diet-induced mild hyperhomocysteinemia and increased salt intake diminish vascular endothelial function in a synergistic manner. *J Hypertens.* 2002;20:55-62.

11) Nagai R, Suzuki T, Aizawa K, Miyamoto S, Amaki T, Kawai-Kowase K, Sekiguchi KI, Kurabayashi M. Phenotypic modulation of vascular smooth muscle cells: dissection of transcriptional regulatory mechanisms. *Ann N Y Acad Sci.* 2001 Dec;947:56-66; discussion 66-7.

12) Oyama Y, Akuzawa N, Nagai R, Kurabayashi M. PPARgamma ligand inhibits osteopontin gene expression through interference with binding of nuclear factors to A/T-rich sequence in THP-1 cells. *Circ Res.* 2002;90:348-55.

13) Sata M, Sugiura S, Yoshizumi M, Ouchi Y, Hirata Y, Nagai R. Acute and chronic smooth muscle cell apoptosis after mechanical vascular injury can occur independently of the Fas-death pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001 ;21:1733-7.

2. 学会発表

【第 65 回日本循環器学会総会学術集会】

- 1) 森田啓行, 永井良三
The Human Genome Project in Cardiovascular Diseases Genetic Polymorphism in Homocysteine Metabolism
- 2) 野尻剛史, 森田啓行, 林同文, 藤田英雄, 今井靖, 吹野恵子, 山崎憲, 深山源太, 碓井伸一, 原田智浩, 池田祐一, 山崎力, 杉山卓郎, 鈴木亨, 小室一成, 中村文隆, 杉浦清了, 大野実, 平田恭信, 永井良三
Reduced susceptibility to Coronary Heart

Disease by Matrix Metalloproteinase-1 promoter 1G allele homogeneity

3) 吹野恵子, 森田啓行, 今井靖, 野尻剛史, 中村文隆, 大野実, 杉浦清了, 平田恭信, 武藤真祐, 浅川雅子, 飯田陽子, 永井良三, 林同文, 山崎力, 深山源太, 藤田英雄, 小室一成, 杉山卓郎

ACE and AT1R polymorphism are genetic risk factors for coronary artery disease

4) 森田啓行, 栗原裕基, 吉田成孝, 矢崎義雄, 永井良三

Homocysteine-lowering with folate supplementation ameliorates the detrimental effect of hyperhomocysteinemia; An experiment in rat balloon injury model

5) 林同文, 森田啓行, 藤田英雄, 中村文隆, 今井靖, 吹野恵子, 浅川雅子, 池田祐一, 野尻剛史, 武藤真祐, 山崎憲, 深山源太, 小室一成, 杉浦清了, 大野実, 平田恭信, 山崎力, 永井良三

The levels of ANP and BNP are positively correlated with the severity of CHD irrespective of left ventricular function

6) 林同文, 森田啓行, 鈴木亨, 藤田英雄, 中村文隆, 今井靖, 吹野恵子, 天木幹博, 野尻剛史, 山崎憲, 水野由子, 深山源太, 小室一成, 杉浦清了, 大野実, 平田恭信, 山崎力, 永井良三

Elevated levels of malondialdehyde modified (MDA) -LDL levels in patients with coronary artery disease

【第98回日本内科学会】

7) 林同文, 深山源太, 山崎力, 藤田英雄, 森田啓行, 今井靖, 吹野恵子, 野尻剛史, 山崎憲, 永井良三

臨床医学研究における新しいデータ管理・解析システムの構築とゲノム研究による分子疫学への展開

8) 林同文, 深山源太, 山崎力, 藤田英雄, 森田啓行, 今井靖, 吹野恵子, 野尻剛史, 山崎憲, 永井良三

血中 ANP および BNP 濃度は冠動脈疾患の重症度と相関する

【5th International Conference on Preventive Cardiology】

9) 森田啓行, 永井良三

Practical implication of "new" risk factors for prevention in the genetic polymorphism Homocysteine and cardiovascular disease

【第8回日本遺伝子診療学会大会】

・森田啓行, 永井良三

シンポジウム 新しいゲノム技術とその臨床応用

ホモシステイン代謝関連酵素遺伝子多型と動脈硬化

・今井 靖, 前村浩二, 鈴木亨, 石井雅巳, 林同文, 森田啓行, 山崎力, 油谷浩幸, 永井良三

心臓リモデリングの際、心臓線維芽細胞において発現する遺伝子プロファイルのDNA chipによる解析

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得

リアルタイム臨床データナビゲーションシステム（我々独自に開発した臨床データ管理・解析システム）

特許出願申請予定

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

遺伝子診断システムの技術検討

分担研究者 神原 秀記 株式会社日立製作所 中央研究所 技師長

研究要旨

大腸がんならびに循環器疾患を対象とした遺伝子診断法の普及に必要な遺伝子診断システム機器を開発する。低コスト、高感度、簡便操作のシステム実現が目標である。

A. 研究目的

疾患に関連する遺伝子多型、変異、発現量を測定した結果に基づく遺伝子診断は、個人の体質に的確な診療を可能にし、患者の経済的・身体的負担を軽減する。本研究は、生活習慣病であるがんや心筋梗塞・脳卒中を対象にした遺伝子検査技術の開発とその技術に基づく臨床用遺伝子診断システムの確立を目的とする。

B. 研究方法

大腸がんスクリーニングについて、糞便中に微量に存在する大腸がん細胞を検出するため、遺伝子測定技術の高感度化を行う。測定ノイズの低減化を行い、存在比が0.1%のがん細胞を検出し得るシステムの実現を目指す。一方、複数のSNPsに基づいた循環器疾患の再発や副作用のリスクに関する遺伝子診断について、安価な検査システム実現のため、SNPsを含む複数のDNAを同時に増幅し、測定する検査技術の開発を進める。30種同時を目標とする。（倫理面への配慮）

大腸がん患者からのがん細胞ならびに糞便や血液の採取に関するインフォームド・コンセント内容や方法、ならびに本研究にかかる目的や方法などの研究内容は、国立がんセンターと株式会社日立製作所のそれぞれが定めた倫理指針に基づき双方の倫理審査委員会において審査を受け承認を得ている。一方、循環器疾患患者の血液採取に関するインフォームド・コンセント内容や方法、ならびに本研究にかかる目的や方法などの研究内容は、東京大学と株式会社日立製作所のそれぞれが定めた倫理指針に基づき設置された倫理審査委員会において審査を受け承認を得ている。

C. 研究結果

化学発光を用いた安価で高感度な遺伝子変異測定方法を開発した。この技術の条件などを最適化し、微量存在成分の検出を可能とした。現在、存在比1%の成分を検出可能なことを確認した。また、安価な検査方法を実現するため複数SNPsの同時測定を試み、5種DNAを同時に増幅し、検出できることを確認した。

D. 考察

微量成分検出では背景光の揺らぎを低減することで更に微量成分の検出が期待できる。試薬類の成分の再吟味、及び条件の最適化により向上を図る。独自に開発したBAMPER法を種々SNPsタイピングに適用し、概ね良好な結果を得たが測定できないターゲットも有った。これらの多くはPCR増幅に問題があることが分かり、プライマーの設計を再度検討する。一方、複数SNPs同時増幅は実用上重要で今後技術の確立を図る。

E. 結論

BAMPER法が微量存在比の成分の分析やSNPsの分析に使用できることが分かったので、技術の高度化と検査デバイスの開発を、NEDOから受託した事業「臨床用遺伝子診断システム機器の開発」を活用して行い、安価で簡便な遺伝子検査システムとしてまとめる見通しを得た。今後、糞便からのがん細胞抽出技術の確立と複数SNPsの同時増幅及び検出技術の確立などを行っていく。

F. 健康危険情報

無し

G. 研究発表

1. 論文発表

無し

2. 学会発表

無し

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得

無し

2. 実用新案登録

無し

3. その他

無し

研究成果の刊行に関する一覧表

| 発表者氏名 | 論文タイトル名 | 発表誌名 | 巻名 | ページ | 出版年 |
|---|---|-------------------------------------|---------------|---------|------|
| Shirakawa, K., Tsuda, H., Heike, Y., Kato, K., Inomata, M., <u>Sasaki, H.</u> , Kasumi, F., Yoshimoto, M., Iwanaga, T., Konishi, F., Terada, M., and Wakasugi, H. | Lack of endothelial cells, central necrosis, and fibrosis is associated with aggressive inflammatory breast cancer. | <i>Cancer Res.</i> , | 61 | 445-451 | 2001 |
| Kakazu, N., Ashihara, E., Hada, S., Ueda, T., <u>Sasaki,</u> <u>H.</u> , Terada, M., and Abe, T. | Development of spectral color banding in cytogenetic analysis. | <i>Lancet</i> | 357 | 529-530 | 2001 |
| RIKEN Genome Exploration Research group Phase II team: Kawai, J., et al., FANTOM Consortium: Okazaki, Y., <u>Sasaki,</u> <u>H.</u> , et al., and general organizer: Hayashizaki, Y. | Functional annotation of a full-length mouse cDNAs collection. | <i>Nature</i> | 409 | 685-690 | 2001 |
| Tanooka, H., <u>Sasaki,</u> <u>H.</u> , Shiroishi, T., and Moriwaki, K. | p53 pseudogene dating: Identification of the origin of laboratory mice. | <i>Gene</i> | 270 | 153-159 | 2001 |
| Yamamoto, H., Ochiya, T., takeshita, F., Toriyama-Baba, H., Hirai, K., Sasaki, H., <u>Sasaki, H.</u> , Sakamoto, H., Yoshida, T., Saito, I., and Terada, M. | Enhanced skin carcinogenesis in cyclin D1-conditional transgenic mice: cyclin D1 alters keratinocyte response to calcium-induced terminal differentiation. | <i>Cancer Res</i> | (in press) | | |
| <u>Fujita, S.</u> , Kudo, N., Akasu, T., and <u>Moriya, Y.</u> | Detection of cytokeratin 19 and 20 mRNA in peripheral and mesenteric blood from colorectal cancer patients and their prognosis | <i>Int J Colorectal Dis</i> | 16 | 141-146 | 2001 |
| Matsuoka, N., <u>Moriya, Y.</u> , Akasu, T., and <u>Fujita, S.</u> | Long-term outcome of urinary function after extended lymphadenectomy in patients with distal rectal cancer. | <i>Eur J Surg Oncol</i> | 27 | 165-169 | 2001 |

| 発表者氏名 | 論文タイトル名 | 発表誌名 | 巻名 | ページ | 出版年 |
|--|--|-----------------------|-----|---------|------|
| Morita H, Kurihara H, Imai Y, Sugiyama T, Hamada C, Sakai E, Mori M, Nagai R. | Lack of association between the platelet glycoprotein Ia C807T gene polymorphism and myocardial infarction in Japanese. An approach entailing melting curve analysis with specific fluorescent hybridization probes. | <i>Thromb Haemost</i> | 85 | 226-30 | 2001 |
| Oh-hashii Y, Shindo T, Kurihara Y, Imai T, Wang Y, Morita H, Imai Y, Kayaba Y, Nishimatsu H, Suematsu Y, Hirata Y, Yazaki Y, Nagai R, Kuwaki T, Kurihara H. | Elevated sympathetic nervous activity in mice deficient in alpha CGRP. | <i>Circ Res</i> | 89 | 983-90 | 2001 |
| Shindo T, Kurihara Y, Nishimatsu H, Moriyama N, Kakoki M, Wang Y, Imai Y, Ebihara A, Kuwaki T, Ju KH, Minamino N, Kangawa K, Ishikawa T, Fukuda M, Akimoto Y, Kawakami H, Imai T, Morita H, Yazaki Y, Nagai R, Hirata Y, Kurihara H. | Vascular abnormalities and elevated blood pressure in mice lacking adrenomedullin gene. | <i>Circulation</i> | 104 | 1964-71 | 2001 |
| Itoh T, Kikuchi K, Odagawa Y, Takata S, Yano K, Okada S, Haneda N, Ogawa S, Nakano O, Kawahara Y, Kasai H, Nakayama T, Fukutomi T, Sakurada H, Shimizu A, Yazaki Y, Nagai R, Nakamura Y, Tanaka T. | Correlation of genetic etiology with response to b-adrenergic blockade among symptomatic patients with familial long-QT syndrome. | <i>J Hum Genet</i> | 46 | 38-40 | 2001 |
| Iwasa H, Kurabayashi M, Nagai R, Nakamura Y, Tanaka T. | Multiple single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in the Japanese population in six candidate genes for long QT syndrome. | <i>J Hum Genet</i> | 46 | 158-162 | 2001 |

| 発表者氏名 | 論文タイトル名 | 発表誌名 | 巻名 | ページ | 出版年 |
|---|--|---------------------------------------|-----|-------------|------|
| Hiori Y, Kudoh S, Monzen K, Ikeda Y, Yazaki Y, Nagai R, Komuro I. | Tbx5 associates with Nkx2-5 and synergistically promotes cardiomyocyte differentiation. | <i>Nature Genetics</i> | 28 | 276-280 | 2001 |
| Saiura A, Sata M, Hirata Y, Nagai R, Makuuchi M. | Circulating smooth muscle progenitor cells contribute to atherosclerosis. | <i>Nat Med</i> | 7 | 382-383 | 2001 |
| Yamagishi T, Saito Y, Nakamura T, Takeda S, Kanaï H, Sumino H, Kuro-o M, Nabeshima Y, Kurabayashi M, Nagai R. | Troglitazone Improves Endothelial Function and Augments Renal klotho mRNA Expression in Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) Rats with Multiple Atherogenic Risk Factors. | <i>Hypertension Research</i> | 24 | 705-709 | 2001 |
| Tozawa R, Ishibashi S, Osuga J, Yamamoto K, Yagyu H, Ohashi K, Tamura Y, Yahagi N, Iizuka Y, Okazaki H, Harada K, Gotoda T, Shimano H, Kimura S, Nagai R, Yamada N. | Asialoglycoprotein receptor deficiency in mice lacking the major receptor subunit: Its obligate requirement for the stable expression of oligomeric receptor. | <i>J Biol Chem</i> | 276 | 12624-12628 | 2001 |
| Morita H, Saito Y, Kurabayashi M, Nagai R. | Diet-induced mild hyperhomocysteinemia and increased salt intake diminish vascular endothelial function in a synergistic manner. | <i>J Hypertens</i> | 20 | 55-62 | 2001 |
| Nagai R, Suzuki T, Aizawa K, Miyamoto S, Amaki T, Kawai-Kowase K, Sekiguchi KI, Kurabayashi M. | Phenotypic modulation of vascular smooth muscle cells: dissection of transcriptional regulatory mechanisms. | <i>Ann N Y Acad Sci.</i> | 947 | 56-66 | 2001 |
| Oyama Y, Akuzawa N, Nagai R, Kurabayashi M. | PPARgamma ligand inhibits osteopontin gene expression through interference with binding of nuclear factors to A/T-rich sequence in THP-1 cells. | <i>Circ Res</i> | 90 | 348-55 | 2001 |
| Sata M, Sugiura S, Yoshizumi M, Ouchi Y, Hirata Y, Nagai R | Acute and chronic smooth muscle cell apoptosis after mechanical vascular injury can occur independently of the Fas-death pathway. | <i>Arterioscler Thromb Vasc Biol.</i> | 21 | 1733-7 | 2001 |