

20020764

別添2 厚生労働科学研究費補助金研究報告書表紙

厚生労働科学研究費補助金

萌芽的先端医療技術推進研究事業

**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14年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 池田 康行

平成15(2003)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	7
2. 血液を用いたがんの遺伝子診断に関する研究 赤木 究	11
3. 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 竹永 啓三	15
4. 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	19
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	23

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・病因部室長

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：今回、心疾患関連遺伝子であるリポ蛋白リパーゼ（LPL）遺伝子の変異を高トリグリセリド血症患者から新に1種類、エキソン6に見出し、計22種類の変異集積が完了している。これらの内、3種類の変異（818A変異、916G-del変異、1065G変異）に関して、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）を用いる多電極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：本年度は、ECAチップを用いてがん細胞の転移能を予測可能にする候補遺伝子の特定を目的として、研究を行ってきた。大腸がんの肝臓への転移に関与する遺伝子として apolipoprotein A1 が選択された。肺がん転移能を予測する遺伝子として、nm23, PEDF, eIF4B, Col3A1, epithelin precursor が選択された。病理学的に乳がん転移の有無について診断されたケースについて、CK19, CEA, HER2, Muc1 および E-cadherin をがん転移予測マーカーとして解析した結果、CK19, CEA, Muc1 の3種類の内2種類が陽性の場合、がん細胞の転移が予測できることを示した。

分担研究者

赤木 究：埼玉県立がんセンター研究室
遺伝子診断室 専門研究員

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 部長

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

B. 研究方法

■心疾患関連遺伝子の LPL 変異検出方法

高トリグリセリド血症者を対象者とし、末梢血からゲノムを調整する。ゲノムをテンプレートとして、LPL のエキソン 1 から 9 を蛍光プライマーを用いて PCR 増幅を行う。PCR 増幅 DNA を SSCP (single strand conformational polymorphism) 法で分析し、異常の有無を解析する。異常と判定されたエキソンは、直接塩基配列法で、変異部位を特定する。

■ECA チップを用いての LPL 変異検出方法

(1) LPL 遺伝子の PCR 増幅: LPL 遺伝子エキソン 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) とエキソン 5 の 916G (正常型) の 1 塩基 G が欠失した変異 (916G-del-変異型)、エキソン 6 の 1065T (正常型) が 1065G (変異型) に 1 塩基置換した変異 (270 番目の Phe が Leu に置換) を対象とした。これら LPL 変異は、LPL 酵素機能を完全に失活させる。対象者から得た DNA を鋳型として、エキソン 5 および 6 をループを形成するプライマーを用いて PCR 増幅し、検体として使用した。

(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、916G-del-変異プローブ、1065T-正常プローブおよび 1065G-変異プローブをそれぞれ多電極 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多電極 ECA チップと LPL 遺伝子エキソン 5 および 6 の PCR 産物とハイブリさせ、ライゲーション後、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) 大腸がんの肝臓への転移に関する遺伝子の検索方法: 大腸がんの原発巣及び肝転移巣がペアでそろっている組織 100mg より、タンパク質を抽出し、タンパク質の等電点電気泳動後、12% アクリルアミドゲルで 2 次元泳動、SYPRORUBY で染色した。転移巣と原発巣のサンプルで明らかに発現の差の認められたスポットを切り出し、エドマン法、MS-TOF 法でアミノ酸配列を決定した。

(2) ルイス肺がん細胞株およびヒト乳がん細胞株を用いての転移能に関する遺伝子の検索方法: ルイス肺がん細胞の高転移性細胞株と低転移性細胞株を用いて、アポトーシス抵抗性遺伝子 (Mcl-1) の関与を検討した。ヒト乳癌由来の低浸潤性細胞株 (MCF7) および高浸潤性細胞株 (MDA-MB-231) を用いて、浸潤転移に関する遺伝子 (ST2) の発現量を RT-PCR 法およびマイクロアレイを用いて検討した。

(3) ヒト乳がんセンチネルリンパ節を用いての転移能に関する遺伝子の検索方法: ヒト乳がんセンチネルリンパ節 29 症例を対象として、がん転移の有無を免疫染色法および CK19, CEA, E-cadherin (E-cad), HER2, Mucl, β actin の遺伝子発現量を LightCycler™ を用いた定量 PCR 法で解析し、転移陽性 10 症例と陰性 19 症例に分類し、遺伝子診断の開発用検体として用いた。
(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

■心疾患遺伝子の多電極 ECA チップによる遺伝子診断システムの確立（池田）

本年度、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 の変異を高トリグリセリド血症患者から新に 1 種類検出し、合計 22 種類の LPL 変異集積を完了している。これら 22 種類の内、G188E、916G の 1 塩基欠失の変異、F270L 変異を多電極 ECA チップを用いて検出する条件設定を試みた。

818G-正常型プローブ、818A-変異型プローブ、916G-正常型プローブ、916G-del-変異型プローブ、1065T-正常プローブおよび 1065G-変異型プローブを貼り付けた ECA チップに、ループ形成プライマーで PCR 増幅した LPL エキソン 5 および 6 の DNA を 0.25 x SSC 緩衝液中で 25 度、1 時間ハイブリ後、ライゲーション反応を行い、未反応の DNA を洗浄し、0.05mM の FND を含む 35 度に設定した酢酸緩衝液中で電流測定を行った。これらの最適条件下で、818G-正常/818G-正常型ホモ、818G-正常/818A-変異型ヘテロおよび 818A-変異/818A-変異型ホモ接合体、916G-正常/916G-正常

型ホモ、916F-正常/916G-del-変異型ヘテロおよび 916G-del-変異/916G-del-変異型ホモ接合体、1065T-正常/1065T-正常型ホモ、1065T-正常/1065G-変異型ヘテロおよび 1065G-変異/1065G-変異型のホモ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転移に關与する遺伝子の検索とがん転移能予測診断法の確立

(1) 大腸がんの肝臓への転移を予測可能にする遺伝子の検索（赤木）：大腸がんの原発巣及び肝転移巣がペアでそろっている組織 100mg より、タンパク質を抽出し、二次元電気泳動を用いて、両者を比較検討した結果、apolipoprotein A1 蛋白が、がんの転移巣のみならず、原発巣の深部先端のがん細胞で強く発現していた。

(2) ルイス肺がんおよびヒト乳がんにおける浸潤・転移の予測を可能にする遺伝子マーカーの探索（竹永）：ルイス肺がん細胞の高転移性細胞株と低転移性細胞株を用いて、アポトーシス抵抗性遺伝子 (Mcl-1) の関与を検討した結果、Mcl-1 遺伝子が高転移性細胞で、高発現していることが判明した。がんの浸潤・転移に關連する新たな遺伝子を検索し、低転移性細胞株で発現の高い遺伝子として nm23-M2、PEDF、ST2、eIF4B および Col3A1 を見出している。今回、機能が未知の ST2 遺伝子に関して、ヒト乳がん由来の低浸潤性細胞株 (MCF7) および高浸潤性細胞株 (MDA-MB-231) を用いて、比較検討した結果、ST2 は、MCF7 細胞で高発現していることが判明した。

(3) ヒト乳がんセンチネルリンパ節を用いてのがん転移能に關与する遺伝子の検索（落合）：ヒト乳がんセンチネルリンパ節

29 症例を転移陽性 10 症例と陰性 19 症例に分類し、両群のがん転移に関与する遺伝子 CEA, CK19, E-cad, HER2, Muc1 の 5 種について比較検討した結果、CEA, CK19 および Muc1 遺伝子発現は転移陽性群で有意に高値を示した。これら 3 種の遺伝子をマーカーとして、病理組織学的診断との比較により、2 種類以上の遺伝子発現が高値を示した症例においては組織学的にがん細胞を認めたことより、2 種類以上の組み合わせ陽性症例を遺伝子診断陽性症例と判断した場合、病理診断陽性 10 症例中、9 症例のがん転移を認識することが可能であった。

考察

(1) 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。多電極 ECA チップでの 3 種類の LPL 変異の検出条件を基にすることで、残り 19 種類の LPL 変異の検出条件の設定が容易になり、将来の 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。

(2) がん関連

(1) 大腸がんの肝臓への転移を予測可能にする遺伝子の検索 (赤木): 免疫組織染色にて、apolipoprotein A1 の発現を解析した結果、がんの転移巣のみならず、原発巣の深部先端のがん細胞でも発現を認めた。このことは悪性度を増した転移しやすい癌細胞において apolipoprotein A1 の発現が亢進しているものと思われ、転移を予測するのによいマーカー遺伝子の一つと考えられた。

(2) ルイス肺がんおよびヒト乳がんにおける浸潤・転移の予測を可能にする遺伝子マーカーの探索 (竹永): 複数の転移能が異なる細胞株においてアポトーシス抵抗性と転移能が正の相関を示したことから、転移能とアポトーシス抵抗性の間には密接な関連があると推察された。このアポトーシス抵抗性の差の原因として Mcl-1 遺伝子の発現量の差が関連している可能性が示唆された。ヒト乳がん由来の高浸潤性細胞株でも ST2 の発現が減少していることが判った。このことは、ST2 遺伝子の発現が種々の高転移性あるいは高浸潤性細胞で共通に減少していることを示し、ST2 が浸潤転移を抑制する機能を有している可能性を示唆している。

(3) ヒト乳がんセンチネルリンパ節を用いてのがん転移能に関与する遺伝子の検索 (落合): 本年度の研究成果より CK19, CEA, Muc1 は乳がんのセンチネルリンパ節転移の定量化に最適な分子マーカーであることが明かとなった。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。

D. 結論

■心疾患関連

多電極 ECA チップを用いて、3種類の LPL 遺伝子変異（818A-変異型、916G-del-変異型、1065G-変異型）の遺伝型、つまり変異 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 のホモ接合型の検出が可能となった。

■がん関連

（1）大腸がんの悪性度、転移能を知る上で、apolipoprotein A1 は有効なマーカーであることが示唆された。

（2）ルイス肺がんおよびヒト乳がん細胞株を用いての検討により、Mcl-1 と ST2 遺伝子のがん転移に深く関連している可能性が示唆された。

（3）CK19, CEA, Muc1,の遺伝子の発現を感度よく測定することによりヒト乳がん症例におけるセンチネルリンパ節へのがん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

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. *Bioconjugate Chem.* 13:1193-1199, 2002.

高木敦子、池田康行

高カイトミクロン血症患者からの新しいリ

ポ蛋白リパーゼ（LPL）遺伝子異常-複合型ヘテロ接合体の検出-

The Lipid 13:102-109, 2002.

池田康行、高木敦子

高トリグリセリド血症に対するテーラーメイド医療

医学のあゆみ 201 : 713-720, 2002.

Matsuyama S, Ohkura Y, Eguchi H, Kobayashi Y, Akagi K, Uchida K, Nakachi K, Gustafsson JA, Hayashi S.

Estrogen receptor beta is expressed in human stomach adenocarcinoma.

J Cancer Res Clin Oncol. 128:319-24, 2002.

Tada Y, O-Wang J, Takenaga K, Takiguchi Y, Tatsumi K, Kuriyama T, Tagawa, M. Expression of the TNF- α gene on mouse lung carcinoma cells suppresses spontaneous lung metastasis without affecting tumorigenicity. *Oncol Rep.* 9: 585-588, 2002.

Endo H, Takenaga K, Kanno T, Satoh H, Mori S. Methionine aminopeptidase 2 is a new target for the metastasis-associated protein, S100A4. *J Biol. Chem.* 19: 26396-26402, 2002.

Enomoto N, Koshikawa N, Gassmann M, Hayashi J, Takenaga K. Hypoxic induction of hypoxia-inducible factor 1 α and oxygen-regulated gene expression in mitochondrial DNA-depleted HeLa cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 297: 346-352, 2002.

竹永啓三、越川信子. 低酸素とがん—低

酸素下のがん細胞を標的とした治療へのアプローチ（総説）。

放射線生物研究、37:376-392、2002.

2. 学会発表

「新しい電気化学的アレイ(ECA)チップによるリポ蛋白リパーゼ(LPL)遺伝子変異検出法の開発」

池田康行、高木敦子、山下健一、竹中繁織、高木 誠

第 34 回日本動脈硬化学会（神戸国際会議場）平成 14 年 7 月 18 日～19 日

「新しい電気化学的アレイ(ECA)チップの開発：リポ蛋白リパーゼ(LPL)遺伝

子変異検出をモデル系として」

池田 康行、高木 敦子、山下 健一、竹中 繁織、高木 誠

第 75 回日本生化学会大会（国立京都国際会館）平成 14 年 10 月 14 日～17 日

「大腸癌肝転移に対する外科治療における肝動注補助化学療法および血漿中 DNA 解析の意義」

網倉克己、坂本裕彦、吉成大介、小林照忠、尾形昌男、右田隆之、西村洋治、内田健二、田中洋一、赤木究、山口研成、中島哲夫

第 102 回 日本外科学会定期学術集会（国立京都国際会館）

平成 14 年 4 月 11 日～13 日

「大腸がん原発巣と転移巣の比較プロテオーム解析：アポリポタンパク A-1 の検出」

橘正芳、大倉康男、小林康人、渡辺潤子、坂本裕彦、田中洋一、赤木究

第 61 回 日本癌学会総会（東京国際フ

ォーラム）平成 14 年 10 月 1 日～3 日

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

厚生労働科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進研究事業）
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・病因部室長
研究協力者 高木 敦子 国立循環器病センター研究所・薬理部室長

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。現在、日本人において 21 種類の変異が集積されている。今回、LPL 遺伝子エクソン6 に新たな変異を見出したので、計 22 種類となった。この LPL 変異 22 種類の内、3 種類の変異（G188E, 916G-del, F270L 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 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 のホモ接合体、正常 LPL/変異 LPL のヘテロ接合体および変異 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、生活習慣病の予防を目指すものである。

B. 研究方法

LPL 変異の検出方法：高トリグリセリド血症者を対象者とし、末梢血からゲノムを調整する。ゲノムをテンプレートとして、LPL のエクソン1 から9 を蛍光プライマーを用いて PCR 増幅を行う。PCR 増幅 DNA を SSCP (single strand conformational polymorphism)法で分析し、異常の有無を解析する。異常と判定されたエクソンは、直接塩基配列法で、変異部位を特定する。

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)、エキソン6の1065T(正常型)が1065G(変異型)に1塩基置換した変異(270番目のPheがLeuに置換)を対象とした。これらLPL変異は、LPL酵素機能を完全に失活させる。対象者から得たDNAを鋳型として、エキソン5および6をループを形成するプライマーを用いてPCR増幅し、検体として使用した。

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、916G-del-変異型プローブ、1065T-正常プローブおよび1065G-変異型プローブをそれぞれ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ECAチップとLPL遺伝子エキソン5および6のPCR産物とハイブリさせ、ライゲーション後、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

高トリグリセリド血症者から新たなLPL変異の検出:対象者のDNAをテンプレート

として、蛍光プライマーを用いてLPL遺伝子エキソン1から9までをPCR増幅し、SSCP法で解析した結果、エキソン6に異常バンドを検出した。エキソン6を配列決定の為に、PCR増幅し、直接塩基配列決定法にて、変異部位を解析した結果、1塩基の置換を検出した。この変異は、欧米および日本人からも検出されていない、新たな変異であることが判明した。

ECAチップによるLPL遺伝子変異の検出:

818G-正常型プローブ、818A-変異型プローブ、916G-正常型プローブ、916G-del-変異型プローブ、1065T-正常プローブおよび1065G-変異型プローブを貼り付けたECAチップに、ループ形成プライマーでPCR増幅したLPLエキソン5および6のDNAを0.25xSSC緩衝液中で25度、1時間ハイブリ後、ライゲーション反応を行い、未反応のDNAを洗浄し、0.05mMのFNDを含む35度に設定した酢酸緩衝液中で電流測定を行った。これらの最適条件下で、818G-正常/818G-正常型ホモ、818G-正常/818A-変異型ヘテロおよび818A-変異/818A-変異型ホモ接合体、916G-正常/916G-正常型ホモ、916F-正常/916G-del-変異型ヘテロおよび916G-del-変異/916G-del-変異型ホモ接合体、1065T-正常/1065T-正常型ホモ、1065T-正常/1065G-変異型ヘテロおよび1065G-変異/1065G-変異型のホモの区別が可能であった。

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気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。

本研究で、日本人において検出された LPL 変異、22 種の内、3 種類を多電極 ECA チップで検出する基本条件を確立することが出来た。この条件を基にすることにより、残り 19 種類の LPL 変異の検出条件の設定が容易になるので、ECA チップによる LPL 変異診断システムの確立が可能になると思われる。

E. 結論

多電極 ECA チップを用いて、3 種類の LPL 遺伝子変異 (818A-変異型、916G-del-変異型、1065G-変異型) の遺伝型、つまり変異 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. *Bioconjugate Chem.*, 13 : 1193-1199 (2002) .

2. 学会発表

「新しい電気化学的アレイ (ECA) チップによるリポ蛋白リパーゼ (LPL) 遺伝子変異検出法の開発」

池田康行、高木敦子、山下健一、竹中繁織、高木 誠

第 34 回日本動脈硬化学会 (神戸国際会議場) 平成 14 年 7 月 18 日～19 日

「新しい電気化学的アレイ (ECA) チップの開発：リポ蛋白リパーゼ (LPL) 遺伝子変異検出をモデル系として」

池田康行、高木敦子、山下健一、竹中繁織、高木 誠

第 75 回日本生化学会大会 (国立京都国際会館) 平成 14 年 10 月 14 日～17 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（萌芽的先端医療技術推進研究事業）

分担研究報告書

血液を用いたがんの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 研究室 専門研究員

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。特に、がんの予後を左右する転移の有無は、がん征圧の大きな鍵である。しかし、実際にこのことを判定する有用なマーカーは少なく、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。我々は、血液中に遊離している癌細胞の存在、さらにはその癌細胞が転移能を有するのかどうかを判定するために、転移に関わる分子の同定を試みた。大腸がんの原発巣及び転移巣より発現に差を認める分子を differential proteomics 法を用いて同定した。そのうちの1つが apolipoprotein A1 であり、免疫染色や RT-PCR より転移巣で発現が亢進をしていることを確認した。同様の手法で転移に関係する分子の同定を現在行っており、これらの遺伝子を用いた転移能を判定するための診断チップの作成を試みている。

A. 研究目的

プロテオーム解析や遺伝子多型解析を行い、大腸がんの易罹患性診断や転移能を予測するためのがん診断用チップに用いる候補遺伝子を探索する。

B. 研究方法

大腸がん患者のがん組織及び正常組織 179 検体、健常人末梢血サンプル 224 検体を用いて、Ku70 遺伝子の変異及び多型を検討した。大腸がん組織の DNA を用い、各エクソンごとに PCR-SSCP を行い、変異解析を行った。また、正常組織を用いて、多型解析も同様に行った。SSCP により認められたシフトバンドは、ゲルより切り出し、ダイレクトシーケンス、及び TA クローニングベクターに入れてシーケンスを行った。

一方、プロテオーム解析にあたっては、

大腸がんの原発巣及び肝転移巣がペアでそろっている組織 100mg より、タンパク質を抽出し、タンパク質の等電点電気泳動後、12% アクリルアミドゲルで2次元泳動、SYPRORUBY で染色した。転移巣と原発巣のサンプルで明らかに発現の差の認められたスポットを切り出し、エドマン法、MS-TOF 法でアミノ酸配列を決定した。また、転移巣及び原発巣での RNA レベルの発現比較を行うため、RT-PCR を行った。apolipoprotein A1 の発現に対し、GAPDH, transferrin をコントロールにして比較検討した。

また、apolipoprotein A1 の転移巣における発現亢進を確認するために、16例の肝転移を有する大腸がん患者の原発巣及び肝転移巣を apolipoprotein A1 に対する抗体を用いて免疫染色を行った。

(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、連結不可能匿名化、または遺伝子解析研究を行うこと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。

C. 研究結果

まず、Ku70 遺伝子に体細胞変異がないか大腸がんサンプル 50 例を用いて各エクソンごとに PCR-SSCP にて解析したが、体細胞変異を見いだすことはできなかった。しかし、この遺伝子のエクソン 13 の 3' 非翻訳領域に AT の 2 塩基を欠失する、これまでに報告のない新たな多型を見いだした。そこでこの多型と大腸がんの易罹患性の関係について解析を行った。大腸がん患者 179、健常人サンプル 224 を解析し、そのアリル頻度を調べた。大腸がん患者及び健常人におけるこの多型のアリル頻度は各々 2.64%、2.68% となり、大腸がんと健常人との間に有意なアリル頻度の差を認めなかった。しかしながら、この新しい多型はアリルを識別するのに大変いいマーカーであることを見いだした。

また、タンパク質 2 次元電気泳動を用いたプロテオーム解析では、転移巣で発現が亢進しているスポットを複数見いだした。そのうちの 4 種類はエドマン法で分子同定を行った。その結果、そのうちの一つは apolipoprotein A1 であることがわかり、RT-PCR にて発現の確認をした。調べた 8 症例

ではすべて原発巣ではほとんど発現していないが、転移巣では強く発現していることを確認した。さらに、免疫組織染色にて、apolipoprotein A1 の発現を解析した結果、がんの転移巣のみならず、原発巣の深部先端のがん細胞でもその発現を認めた。apolipoprotein A1 以外にも 3 つのタンパク質を同定しており、同様な手法を用いることにより転移巣で発現が亢進または消失しているスポットの分子を同定、がん組織における発現の変化を解析中である。

D. 考察

免疫組織染色にて、apolipoprotein A1 の発現を解析した結果、がんの転移巣のみならず、原発巣の深部先端のがん細胞でも発現を認めた。このことは悪性度を増した転移しやすい癌細胞において apolipoprotein A1 の発現が亢進しているものと思われ、転移を予測するのによいマーカー遺伝子の一つと考えられた。また、同様な手法を用いて転移に関わる分子の同定を行っており、血液中に存在する遊離癌細胞を用いて、こうした遺伝子群の発現を調べることにより転移するかどうかの予測が可能になると思われる。

E. 結論

大腸がんの悪性度、転移能を知る上で、apolipoprotein A1 は有効なマーカーであることが示唆された。また、このプロテオーム手法を用いることにより、転移に関わる分子を網羅的に同定することが可能である。

F. 健康危険情報 特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Matsuyama S, Ohkura Y, Eguchi H, Kobayashi Y, Akagi K, Uchida K, Nakachi K, Gustafsson JA, Hayashi S.

Estrogen receptor beta is expressed in human stomach adenocarcinoma.

J Cancer Res Clin Oncol. 128:319-24, 2002.

1. 学会発表

「大腸癌肝転移に対する外科治療における肝動注補助化学療法および血漿中 DNA 解析の意義」

網倉克己、坂本裕彦、吉成大介、小林照忠、尾形昌男、右田隆之、西村洋治、内田健二、田中洋一、赤木究、山口研成、中島哲夫

第 102 回 日本外科学会定期学術集会
(国立京都国際会館)

平成 14 年 4 月 11 日～13 日

「大腸がん原発巣と転移巣の比較プロテオーム解析：アポリポタンパク A-1 の検出」

橘正芳、大倉康男、小林康人、渡辺潤子、坂本裕彦、田中洋一、赤木究

第 61 回 日本癌学会総会 (東京国際フォーラム) 平成 14 年 10 月 1 日～3 日

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

厚生労働科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進研究事業）
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

ルイス肺癌より樹立されている数種類の細胞株間で、その転移能とアポトーシス抵抗性が正の相関を示すことを見出した。そこで、このアポトーシス抵抗性に関与する遺伝子を同定するために、DNA マイクロアレイを用いて、アポトーシス関連遺伝子の発現を低転移性と高転移性細胞との間で比較した。その結果、アンチアポトーティック遺伝子である Mcl-1 の発現量がアポトーシス抵抗性と正の相関を示し、高転移性細胞で高いことが判明した。一方、がんの浸潤・転移に関連する新たな遺伝子を探索し、低転移性細胞株で発現の高い遺伝子として nm23-M2、PEDF、ST2、eIF4B および Col3A1 を、高転移性細胞株で高い発現を示す遺伝子として epithelin precursor を見出している。これらの遺伝子のうちで機能が未知の ST2 についてその発現をヒト乳癌細胞株で検討したところ、低浸潤性の細胞株 (MCF7) で発現が高いのに対して高浸潤性の細胞株 (MDA-MB-231) では発現がほとんどないことが判った。これらの結果より、Mcl-1 および ST2 遺伝子のがんの転移を予測するために使用できる可能性が示唆された。

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。我々は日本独自の技術で近年開発された DNA チップ (ECA チップ) を用い、これにがんの悪性度特に浸潤転移に関連する遺伝子や予後因子遺伝子を集積したものを作製し、転移能や予後の予測に役立てることを目指している。しかし、そのためには多くの浸潤・転移に関連する遺伝子を明らかにしておく必要がある。

今回は、ルイス肺癌より樹立されている複数の低転移性と高転移性細胞株において、

その転移能とアポトーシス感受性との相関を検討するとともに、アポトーシス抵抗性にどのような遺伝子に関与しているのかを検討することを目的とした。また我々は、低転移性と高転移性細胞株において差次的発現を示す遺伝子の探索を行い、低転移性細胞株で発現の高い遺伝子として nm23-M2 (NDP kinase B)、pigment epithelium-derived factor (PEDF)、ST2、eukaryotic initiation factor 4B (eIF4B) 及び type III collagen α -1 (Col3A1) を、高転移性細胞株で高い発現を示す遺伝子として epithelin precursor 遺伝子を見出している。今回は、これらの遺伝子のうちで機能が未知の ST2 の発現を浸潤性の異なるヒト乳癌細胞株で比較した。

B. 研究方法

ルイス肺癌由来の低転移性細胞株 (P29, P34)、中転移性細胞株 (C2, D6) および高転移性細胞株 (A11)、およびヒト乳癌由来の低浸潤性細胞株 (MCF7) および高浸潤性細胞株 (MDA-MB-231) を用いた。アポトーシスは細胞を 0.5% 牛血清を含む培地中あるいは低酸素下 (0.1% O₂ 濃度) で培養することにより誘導した。アポトーシスの測定は、Annexin V 染色性、TUNEL 陽性細胞数、細胞核の断裂を指標に行った。アポトーシス関連遺伝子の発現は、96 種類のアポトーシス関連遺伝子を集積したマイクロアレイ (Apoptosis GEArray Q、SuperArray 社) を用いて調べた。ウェスタンブロットおよび半定量 RT-PCR は通常の方法で行った。

C. 研究結果

腫瘍組織内で生ずる低血清あるいは低酸素によるアポトーシス誘導に対する P29、P34、C2、D6 および A11 細胞の感受性を調べたところ、転移能とアポトーシス抵抗性がほぼ相関することが判明した。このアポトーシス抵抗性の差がどのような遺伝子の発現の差によるものかを調べるために、これらの細胞におけるアポトーシス関連遺伝子の発現をマイクロアレイを用いて検討した。その結果、Bcl-2 ファミリーに属するアンチアポトーティック遺伝子である Mcl-1 の発現が最も良くそれぞれの細胞のアポトーシス抵抗性と相関することが判った。この発現量の差は半定量 RT-PCR によっても確認された。Bcl-2、Bcl-X_L、Bax、p53 を含めた他のアポトーシス関連遺伝子の発現との間には蛋白質レベルでの発現を

含めて相関が認められなかった。

一方、MCF7 および MDA-MB-231 細胞における ST2 の発現を半定量 RT-PCR で調べた。昨年度に、MCF7 細胞は低浸潤性であり、MDA-MB-231 細胞は高浸潤性であることを確認してある。その結果、MCF7 細胞では ST2 が多量に発現されているのに対して、MDA-MB-231 細胞ではほとんど発現されていないことが判明した。

D. 考察

複数の転移能が異なる細胞株においてアポトーシス抵抗性と転移能が正の相関を示したことから、転移能とアポトーシス抵抗性の間には密接な関連があると推察された。また、このアポトーシス抵抗性の差の原因として Mcl-1 遺伝子の発現量の差が関連している可能性が示唆された。今後、低転移性細胞で Mcl-1 を強制発現させた際に転移能が増加するか否か、ヒトがん由来の転移能の異なる細胞で発現に差が認められるかを検討して行く予定である。

一方、ST2 の発現が D6 や A11 細胞で減少しており、さらに大腸癌や悪性黒色腫由来の高転移性細胞株においても、それぞれの低転移性細胞株と比較して、減少していることを以前に見出している。今回、ヒト乳癌由来の高浸潤性細胞株でも ST2 の発現が減少していることが判った。このことは、ST2 遺伝子の発現が種々の高転移性あるいは高浸潤性細胞で共通に減少していることを示し、ST2 が浸潤転移を抑制する機能を有している可能性を示唆している。今後この点について検討を加える予定である。

E. 結論

本年度の検討により、Mcl-1 と ST2 遺伝子が転移に深く関連している可能性が示唆された。将来、これらの遺伝子をのせた ECA チップを作製し、臨床材料におけるこれらの遺伝子の発現定量を行う予定である。

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 TNF- α gene on mouse lung carcinoma cells suppresses spontaneous lung metastasis without affecting tumorigenicity. *Oncol Rep.* 9: 585-588, 2002.
 2. Endo H, Takenaga K, Kanno T, Satoh H, Mori S. Methionine aminopeptidase 2 is a new target for the metastasis-associated protein, S100A4. *J Biol. Chem.* 19: 26396-26402, 2002.
 3. Enomoto N, Koshikawa N, Gassmann M, Hayashi J, Takenaga K. Hypoxic induction of hypoxia-inducible factor 1 α and oxygen-regulated gene expression in mitochondrial DNA-depleted HeLa cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 297: 346-352, 2002.
 4. Duarte WR, Shibata T, Takenaga K, Takahashi E, Kubota K, Ohya k, Ishikawa I, Yamauchi M, Kasugai S. S100A4: A novel regulator of mineralization and osteoblast differentiation. *J Bone Mineral Res*, in press.
- 竹永啓三、越川信子. 低酸素とがん—低酸素下のがん細胞を標的とした治療へのアプローチ（総説）. 放射線生

