

- Ochiai, A., Ohkohchi, N. The impact of liver metastasis on mortality in patients initially diagnosed with locally advanced or respectable pancreatic cancer. *Int. J. Gastroint. Cancer*, 33: 155-162, 2003.
- Hasebe, T., Sasaki, S., Imoto, S., Ochiai, A. Tumor cell in lymph vessels and lymph nodes closely associated with nodal metastasis by invasive ductal carcinoma of the breast. *Cancer Sci.*, 94: 508-514, 2003.
- Ishii, G., Sangai, T., Oda, T., Aoyagi, Y., Hasebe, T., Kanomata, N., Endoh, Y., Okumura, C., Okuhara, Y., Magae, J., Emura, M., Ochiya, T., Ochiai, A. Bone-marrow derived myofibroblasts contribute to the cancer-induced stromal reaction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 309: 232-240, 2003.
- Yoshikawa, T., Aoyagi, Y., Kodama, K., Kamijo, T., Yonou, H., Yokose, T., Ishii, G., Oda, T., Takamochi, K., Nishiwaki, Y., Shimizu, N., Ochiai, A. Topographical distribution of allelic loss in lung adenocarcinomas with lymph node metastases. *Mod. Pathol.*, 17: 204-213, 2004.
- Hironaka, S., Ohtsu, A., Boku, N., Muto, M., Nagashima, F., Saito, H., Yoshida, S., Nishimura, M., Haruno, M., Ishikura, S., Ogino, T., Yamamoto, S., Ochiai, A. Nonrandomized comparison between definitive chemoradiotherapy and radical surgery in patients with T₂₋₃N_{any}M₀ squamous cell carcinoma of the esophagus. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 57: 425-433, 2003.
- Yamada, Y., Itano, N., Narimatsu, H., Kudo, T., Hirohashi, S., Ochiai, A., Tohnai, I., Ueda, M., Kimata, K. CD44 variant exon 6 expressions in colon cancer assessed by quantitative analysis using real time reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Oncol. Rep.*, 10: 1919-1924, 2003.
- Miyamoto, S., Yano, K., Sugimoto, S., Ishii, G., Hasebe, T., Endoh, Y., Kodama, K., Goya, M., Chiba, T., Ochiai, A. Matrix metalloproteinase-7 facilitates insulin-like growth factor bioavailability through proteinase activity on insulin-like growth factor binding protein-3. *Cancer Res.*, 64: 665-671, 2004.
- Lim, S., Zhang, S., Ishii, G., Endoh, Y., Kodama, K., Miyamoto, S., Hayashi, R., Eboihara, S., Cho, J., Ochiai, A. Predictive markers late cervical metastasis in stage I and II invasive squamous cell carcinoma of the oral tongue. *Clin. Cancer Res.*, 1: 166-172, 2004.
- Hasebe, T., Sasaki, S., Imoto, S., Ochiai, A. Prognostic significance of the intra-vessel tumor characteristics of invasive ductal carcinoma of the breast: A prospective study. *Virchows Arch.*, 444: 20-27, 2004.
- Sano, Y., Kuga, R., Kuang I. Fu, Yoshino, T., Shigeaki, Y., Ochiai, A., Fujii, T. Superficially elevated colonic adenoma changed to undetectable configuration of ordinary endoscopy during treatment with preferential

cyclooxygenase-2 inhibitor. *J. Gastroenterol.*, 38: 909-914, 2003.

Yoh, K., Ishii, T., Yokose, T., Minegishi, Y., Tsuta, K., Goto, K., Nishiwaki, Y., Kodama, T., Suga, M., Ochiai, A. Breast cancer resistance protein impacts clinical outcome in platinum-based chemotherapy for advanced non-small cell lung cancer. *Clin. Cancer Res.*, 10:1691-7. 2004.

Zhang, S., Miyamoto, S., Kamijo, T., Hayashi, R., Hasebe, T., Ishii, G., Fukayama, M., Ochiai, A. Intratumor microvessel density in biopsy specimens predicts local response of hypopharyngeal cancer to radiotherapy. *Jpn. J. Cancer Oncol.*, 33: 613-619, 2003

Tahara, M., Ochiai, A., Fujimoto, J., Boku, N., Yasui, W., Ohtsu, A., Tahara, E., Yoshida, S. Expression of thymidyl synthase, thymidine phosphorylase, dihydropyrimidine dehydrogenase, E2F-1, Bak, Bcl-X, and Bcl-2, and clinical outcomes for gastric cancer patients treated with bolus 5-fluorouracil. *Oncol. Rep.*, 11: 9-15, 2004.

Tsuta, K., Ishii, G., Nitadori, J., Shiono, S., Nishiwaki, Y., Ochiai, A. Primary lung carcinoma with signet ring cell carcinoma components: clinicopathological analysis. *Am. J. Surg. Pathol.*, 2004, in press.

Yamada, Y., Itano, N., Narimatsu, H., Kudo, T., Morozumi, K., Hirohashi, S., Ochiai, A., Ueda, M., Kimata, K. Elevated transcript level of

hyaluronan synthase gene correlates with poor prognosis of human colon cancer. *Clin. Exp. Metastasis*. 2004 in press.

Yonou, H., Yokose, T., Yoshikawa, T., Kanomata, N., Kamijo, T., Hasebe, T., Nagai, K., Ito, H., Yamasaki, A., Hatano, T., Ogawa, Y., Emura, M., Ochiai, A. Engraftment of adult human lung tissue in non-obese diabetic/severe combined immunodeficient mice: a novel lung epithelial regeneration model. *Pathobiol.*, 71: 93-102, 2004.

Yonou, H., Ochiai, A., Goya, M., Kanomata, N.; Hokama, S., Morozumi, M., Sugaya, K., Hatano, T., Ogawa, Y. Intraosseous growth of human prostate cancer in implanted adult human bone: Relationship of prostate cancer cells to osteoclasts in osteoblastic metastatic lesions. *Prostate*, 58: 406-13, 2004.

Kusakai G, Suzuki A, Ogura T, Miyamoto S, Ochiai A, Kaminishi M, Esumi H. ARK5 expression in colorectal cancer and its implications for tumor progression. *Am J Pathol.* 164(3):987-95, 2004

Hasebe T, Sasaki S, Imoto S, Ochiai A. Histological characteristics of tumor in vessels and lymph nodes are significant predictors of progression of invasive ductal carcinoma of the breast: A prospective study. *Hum Pathol.* 35, 298-308, 2004..

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

リポ蛋白質リパーゼ遺伝子の 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

リポ蛋白質リパーゼ (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、治療および予防に関して重要である。現在、日本人において LPL 機能をゼロにする変異として、我々によって集積された 17 種類の変異を含み計 22 種類の変異が同定されている。この LPL 変異 22 種類の内、7 種類の変異 (Y61X, V200A, A221-del, R243C, A261T, A334T, W382X 変異) をモデル系として、多種塩基変異同時検出法 (SMMD: simultaneous multiple mutation detection) 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 (FND: ferrocenyl naphthalene diimide) を用いる ECA (electrochemical array) チップにて確立した。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。確立した SMMD 法を用いて、臨床検体 50 例に 2 例の LPL 変異ホモ (A221-del, R243C) と 6 例の LPL 変異ヘテロ (Y61X, V200A, A221del, A261T, A334T, W382X) を含め、ブラインド試験による LPL 変異検出を行った。期待通り、全て 8 例の変異を検出することができた。これらの結果から SMMD 法 ECA チップは臨床検査に使用できる可能性が示された。

A. 研究目的

リポ蛋白質リパーゼ (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。現在、LPL 機能をゼロにする LPL 遺伝子変異は、

日本人において我々によって集積された 17 種類を含め計 22 種類検出されている。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 (FND: ferrocenyl naphthalene diimide) 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 (多種変異同時検出: SMMD, simultaneous multiple mutation detection system) 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 遺伝子変異と PCR 増幅:

(1) LPL 遺伝子変異: モデル系として用いた LPL 遺伝子変異は、1塩基置換の LPL 遺伝子変異 6 種類と 1塩基欠失の 1種類、計 7 種類である。それらは、エキソン 3 の Y61X (438 の T→A)、エキソン 5 の V200A (854 の T→C)、エキソン 6 の R243C (982 の C→T)、A261T (1036 の G→A)、エキソン 7 の A334T (1255 の G→A)、エキソン 8 の W382X (1401 の G→A) の 1塩基置換とエキソン 5 の A221-del (916 の G が欠失) の 1塩基欠失である。これらの LPL 変異は、LPL 酵素機能を完全に失活させる。

(2) 第 1 PCR のプライマーと条件: 7 種類の LPL 変異を検出するために、エキソン 3, 5, 6, 7, 8 を以下に示すプライマー (F と R の組) を用いて第 1 PCR 増幅を行う。条件は、95°C 5 分後、95°C 0.5 分、60°C 1.5 分、72°C 0.2 分を 40 回、72°C 10 分、反応終了後 4°C に保存する。

LPL-Ex3F: CTGTGCCAATGGGTTTCCA

LPL-Ex3R:

CACTGTTTTGGACACATAAGTCTC

LPL-Ex5F:

GAAATTTACA AATCTGTGTTCCCTGCT

LPL-Ex5R:

CATTGGGTCAATAAGGGTTAAGGA

LPL-Ex6F:

AGACATGCCAAATGAAACACTCT

LPL-Ex6R:

ACTCCTTGGTTTCCTTATTTACAACA

LPL-Ex7F:

TTCATAAAGATTGATCAACATGTTCGA

LPL-Ex7R: ACTGGTGCCATGATGACCG

LPL-Ex8F:

GAGAGCTGATCTCTATAACTAACCA

LPL-Ex8R: CTCTGATCTTCTGAATGGCGA

第 1 PCR 増幅後のエキソン 3, 5, 6, 7, 8 の DNA サイズは、それぞれ 340, 337, 353, 202, 205pb である。

(3) 第 2 PCR プライマーと条件:

第 1 PCR 増幅後のエキソン 3, 5, 6, 7, 8 の DNA をテンプレートとして 7 種類の LPL 変異を検出するための第 2 A-PCR (アシンメトリック-PCR) を以下のプライマーを用いて行う。CP プライマーは、各エキソン内の配列と同じプライマー、SP プライマーは自己ループ形成に必要な人工配列 (アンダーライン) を 5' 末端に含むプライマーである。第 2 A-PCR 条件は、95°C 5 分後、95°C 0.5 分、65°C 1.5 分、72°C 0.2 分を 40 回、72°C 10 分、反応終了後 4°C に保存する。

Y61X-CP:

TAGGTGGGTATTTTAAGAAAGCTTGT

Y61X-SP:

GAGAGTTGGGTGCCTCTCTCTTGTACAG

GGCGGCCACAAG

V200A-CP:

GTAGACGTCTTACACACATTCACCAGAG

GG

V200A-SP:

TGGGCATGTTGACATCCTGGCTGAAAAG

TACCTCCATTCGGG

A221-del-CP:

CAGTTGGGCATGTTGACATTTACCCG

A221-del-SP:

CTATCCCGCTGATTCTTCTAAATAATAT

TTACCTCCAAGTCCTCTCTCTGC

R243C-CP:

GCACCTGTAGGCCTTACTTGGATTTTCT

R243C-SP:

CTCGTGGGAGCACACCCAGATGTGGAC
CAGCTAGTGAA

A261T-CP:

CCCACGAGCGCTCCATTCATCTCT

A261T-SP:

CCTACAGGTGCAGTAGAGCCCTTTCTCA
AAGGCTTCCTTGG

A334T-CP:

CCTCCCCAACAGTCTTCCATTACCAAGT
AAAG

A334T-SP:

CCTTTGAGATTTCTCTGGGATGTTCTCA
CTCTCGGCCACGGTGCCAT

W382X-CP:

AGACCTACTCCTTCCTAATTTACACAGA
GGTAG

W382X-SP:

AAGAGTGATTTCATACTTTCTGCTCCACC
AGTCTGACCAGC

A-PCR 後の Y61X、V200A、A221-del、R243C、
A261T、A334T、W382X のサイズは、それ
ぞれ 113bp、125 bp、131 bp、133 bp、119 bp、
140 bp、127 bp である。

ハイブリダイゼーション、ライゲーション

と電流測定：7 種類の LPL 変異を検出する
ために以下に示す正常型プローブ (Wp)、
と変異型プローブ (Mp) を使用した。プロ
ーブ設計の際、正常の塩基と変異の塩基を、
それぞれ 3' 側末端に配置 (太字で示して
いる) するようにした。

Y61X-Wp:

AAAGCTTGTGTCATCATCTTCAGGTAAC
AGGAATGTAT

Y61X-Mp:

AAAGCTTGTGTCATCATCTTCAGGTAAC

AGGAATGTAA

V200A-Wp:

GGGTCCCCTGGTCGAAGCATTGGAATCC
AGAAACCAGT

V200A-Mp:

GGGTCCCCTGGTCGAAGCATTGGAATCC
AGAAACCAGC

A221-del-Wp:

TGGAGGTACTTTTCAGCCAGGATGTAAC
ATTGGAGAAG

A221-del-Mp:

ATGGAGGTACTTTTCAGCCAGGATGTAA
CATTGGAGAA

R243C-Wp:

TCATTCAACAGAGAGTCGATGAAGAGA
TGAATGGAGCG

R243C-Mp:

TCATTCAACAGAGAGTCGATGAAGAGA
TGAATGGAGCA

A261T-Wp:

CATCGACTCTCTGTTGAATGAAGAAAAT
CCAAGTAAGG

A261T-Mp:

CATCGACTCTCTGTTGAATGAAGAAAAT
CCAAGTAAGA

A334T-Wp:

TTTTTCTGGGACTGAGAGTGAAACCCAT
ACCAATCAGG

A334T-Mp:

TTTTTCTGGGACTGAGAGTGAAACCCAT
ACCAATCAGA

W382X-Wp:

TAGATATTGGAGA^{ACT}ACTCATGTTGAA
GCTCAAATGG

W382X-Mp:

TAGATATTGGAGA^{ACT}ACTCATGTTGAA

GCTCAAATGA

正常型プローブおよび変異型プローブをそれぞれ電極表面に固定化し、ECA チップを作成する。A-PCR 産物 (40 μL) を 10xSSC 緩衝液 (10 μL) と混合し、それぞれの正常型プローブと変異型プローブ結合アレイピン上にセットしたファイバーシートの中央に全量滴下し、37℃にて 30 分間ハイブリを行う。ハイブリ後、新たなファイバーシートをピン上に置き、ライゲーション液 (1 μL T4 ライゲース/5 μL の 10x ライゲーション緩衝液+40 μL 蒸留水) をシートの中央に全量滴下し、室温にて 10 分間反応する。洗浄後、インターカレーター (FND) を含む 2 ml の電解液中にて電流応答を測定する。

(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

ECA-SMMD 法による 7 種類の LPL 遺伝子変異の検出系の確立: 第 1 PCR および第 2 A-PCR にて調製した 7 種類の LPL 変異の PCR 産物を ECA-SMMD 法にて解析し、ホモ、ヘテロ、正常の 3 群を判別できる判定

基準を作成した。判定値は、 $2(\Delta i-Wt - \Delta i-Mt) / (\Delta i-Wt + \Delta i-Mt)$, $\Delta i = (i1-i0) / i0 \times 100$ (%) の式にて計算した。得られた値を基に、3 群 (ホモ、ヘテロ、正常) の判定を以下の判定値にて行うことで、7 種類の変異を確実に、ホモ、ヘテロ、正常の 3 群に判別することができた。

表-1 判定基準値

正常	$2.0 \geq x \geq 1.0$
正常/変異のヘテロ	$0.5 \geq x \geq -0.5$
変異/変異のホモ	$-1.0 \geq x \geq -2.0$

ブラインドテストによる ECA-SMMD 法の

評価: 臨床検体 50 例に塩基配列決定法により確認された LPL 遺伝子変異、2 例のホモ (A221-del, R243C) と 6 例の LPL 変異ヘテロ (Y61X, V200A, A221del, A261T, A334T, W382X) の計 8 例を含め、ブラインド試験による LPL 変異検出を行った。確立した判定基準値 (表-1) を用いて、50 例の検体からホモ、ヘテロ、正常の 3 群を判別した場合、2 例のホモと 6 例のヘテロが同定された。これらの変異は、期待通り、A221-del と R243C のホモ、Y61X, V200A, A221del, A261T, A334T, W382X の変異のそれぞれヘテロ接合体であった。

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。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

ッチならライゲーションされ、安定した 2 本鎖を維持できるものの、ミスマッチを含んでいればライゲーションされないので、2 本鎖を維持できないという方法を用いた。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。

本研究で、日本人において検出された LPL 変異、22 種の内、7 種類のホモ、ヘテロ、正常の 3 群を判別できる判定基準値を設定することができた。これら確立した判定基準値を用いて、LPL 検出のブラインド試験を行った結果、期待通り、すべての変異を検出することが可能であった。これらの結果から、ECA-SMMD 法は、日常臨床検査への応用が可能と思われた。

E. 結論

LPL 遺伝子診断システムの確立を目的とし、モデル系として、7 種類の LPL 遺伝子変異(Y61X, V200A, A221del, R243C, A261T, A334T, W382X) を用いて、これら遺伝子のホモ、ヘテロ、正常の 3 群を判別することが可能な ECA-SMMD 法の確立に成功した。確立した ECA-SMMD 法の評価は、ブラインド試験にて臨床検体 50 例から目的の LPL 変異が検出されるか否かにて行われた。期待通り、全て目的の LPL 変異が検出されることにより、ECA-SMMD 法の精度が 100%であることが証明された。

F. 健康危険情報 特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Nojima, T., Yamashita, K., Takagi, A., Takagi, M., Ikeda, Y., Kondo, H., and Takenaka, S.

Direct detection of single nucleotide polymorphism (SNP) with genomic DNA by the ferrocenylnaphthalene diimide-based electrochemical hybridization assay (FND-EHA). *Anal. Sci.* 19:79-83, 2003.

Harada-Shiba, M., Takagi, A., Miyamoto, Y., Tsushima, M., Ikeda, Y., Yokoyama, S., and Yamamoto, A.

Clinical features and genetic analysis of autosomal recessive hypercholesterolemia. *J. clin. Endocrinol. Metab.* 88:2541-2547, 2003.

池田康行, 高木敦子

HTGL「高脂血症ナビゲーター」山田信博
他篇 p.120-121, 2003.

2. 学会発表

「リポ蛋白リパーゼ分子異常の早期診断システムの開発とその高トリグリセリド血症に対するテーラーメイド予防への応用」

池田康行, 高木敦子, 大軽靖彦、長野 誠
第 10 回日本遺伝子診療学会 (大阪)

平成 15 年 7 月 24 日～25 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 研究室 専門研究員

薬物に対する感受性には、個人差があり、遺伝的要因の関与が明らかになりつつある。特に、抗がん剤では致死的な副作用を起こすケースがあり、薬物を代謝する酵素の遺伝子多型との関係の解明も進んできている。その一例として、抗がん剤メルカプトプリン(MP)の代謝酵素である Thiopurine S-Methyltransferase (TPMT) では、ある遺伝子多型において酵素活性が低く、薬が体内に長く貯留するため骨髄抑制など致命的な副作用を呈する。これまでに、主な多型が3つわかっているが、日本人ではそのうちの3Cという型が1%程度の頻度で認められる。今回、この多型についてダイレクトシーケンス及びRFLPにて確認された132検体を用い、ECAチップでの測定精度を調べるブラインドテストを行った。その結果、ECAチップによる測定はすべて正しい判定を示し、100%の精度であることが確認された。

A. 研究目的

薬物代謝酵素であるチオプリンメチル転移酵素 (TPMT) は遺伝子多型により、抗がん剤6-メルカプトプリン (6MP) や免疫抑制剤アザチオプリンの重篤な副作用を引き起こすことがある。従って、遺伝子多型を予め調べることにより薬剤の副作用を回避することができる。日本人に認められるTPMTの遺伝子多型3CについてECAチップでその遺伝子型を解析し、その精度を検証する。

B. 研究方法

連結不可能匿名化した132名の正常組織のゲノムDNAを用いて、TPMT 3Cを含む領域をPCRで増幅し (Primer 1 : GGCTTTAGCATAATTTTCAATTCCTCAAAAACATGTCA GTGT Primer 2 : GAACGACATAAAAAGTTGGGG (Product : 132 bp))、

ダイレクトシーケンスすると同時に、制限酵素 ACCI による PCR-RFLP にて遺伝子多型の有無を解析した。また、その PCR 産物をテンプレートとして、自己ループ形成に必須の人工配列を含むプライマーで A-PCR を行った (プライマー : TCTACTTA CAGAAAGTAAATggcttttagcataatTTTcaattcctc aaaaacatgtcagtgatTTTatTTTatctatgtctc、PCR 反応 95°C 5分後、95°C 30秒 68°C 30秒 を30サイクル)。

この PCR 産物を TPMT3C 及び野生型に対応するプローブを電極上に持った ECA チップ上でハイブリダイズさせ、T4 ligase で反応させて、インターカレーターを反応させ洗浄後、測定装置にて、チップ上の電流値を計測した。判定値の算出は $(\Delta iWt - \Delta iMt) / 15$ とした。0.8以上を Wt Homo、0.6以下を Mt Homo、その間を Hetero とした。

(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

TPMT 3 C 含む領域を PCR にて増幅し、制限酵素 ACCI で切断した。ACCI で切断されれば不活性型の TPMT 3 C と判定される。その結果、132 検体のうち、3 C 型はヘテロで 3 名、ホモは 0 名であり、アリル頻度は 0.013 であった。

また、この結果はダイレクトシーケンスでも確認された。

これらの検体を用いて、ECA チップで TPMT 3 C 測定のブラインドテストを行った。原理は、SMMD 法を用いて測定した。A-PCR の後、チップ上でハイブリダイゼーションし、洗浄後 T4 リガーゼでライゲーション反応を行った。縫い込み型インターカレーターで反応させた後、測定機で各電極の電流値を測定した。その結果、判定値が 0.8 以上を示したものが、127 例、0.8 と -0.6 の間の値を示したものが 5 例、-0.6 以下のものは認めなかった。0.8 と -0.6 の間の値を示した 5 例のうち、2 例は電流値が異常に低いため、何らかの原因による測定ミスと判定し、判定から除外した。その結果、130 検体中 127 例の wt ホモ、3 例がヘテロとの測定結果になり、すべてシ

ークエンス及び PCR-RFLP で得た結果と一致した。2 例のエラーケースでは、PCR 反応がうまくいっていないために、低電流値となりエラーを生じたことが、電気泳動にて確認された。

D. 考察

人為的なミスで 2 例にエラーを生じたが、それ以外の 130 例ではすべて結果の一致を認め、今回のチップが精度良く測定できることが検証された。前回の LPL 遺伝子の測定に比して、プローブの設計、測定技術はさらに向上しているものと考えられた。今後は、人為的なミスのはいる余地がないように作業工程の簡素化、全自動化が重要と考えられた。

E. 結論

SMMD 法を用いた ECA チップによる測定は遺伝子多型を正確に判定することができた。

F. 健康危険情報 特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Tachibana, M., Ohkura, Y., Kobayashi, Y., Sakamoto, H., Tanaka, Y., Watanabe, J., Amikura, K., Nishimura, Y. and Akagi, K. Expression of Apolipoprotein A1 in Colonic Adenocarcinoma. Anticancer Research 23: 4161-4168 (2003)

2. 学会発表

「性差による MSI 陽性大腸がんの臨床病理学的特徴」

赤木究、石窪力、小林照忠、新井吉子、山口研成、西村洋治、田中洋一

第9回 家族性腫瘍研究会学術集会
(国立成育医療センター1階講堂)

平成15年6月13日(金)～14日(土)

「膵臓癌患者の臨床経過に伴う癌由来変異血漿DNAの推移」

山口研成、新井吉子、石窪力、多田正弘、神田裕三、赤木究、

第62回 日本癌学会総会 (名古屋国際会議場)

平成15年9月25日(木)～27日(土)

「大腸がん進行に伴うアポリポタンパクA-1の発現増強；その機序について」

渡辺潤子、大倉康男、小林康人、坂本裕彦、田中洋一、西村洋治、網倉克己、赤木究、黒住昌史、橘正芳

第62回 日本癌学会総会 (名古屋国際会議場)

平成15年9月25日(木)～27日(土)

「siRNAによる白血病融合遺伝子AML1-MTG8の特異的ノックダウン」

神津知子、赤木究

第62回 日本癌学会総会 (名古屋国際会議場)

平成15年9月25日(木)～27日(土)

「大腸癌におけるゲノムの不安定性とKRAS, BRAF 遺伝子変異の検討」

赤木究、石窪力、小林照忠、新井吉子、山口研成、西村洋治、田中洋一

第62回 日本癌学会総会 (名古屋国際会議場)

平成15年9月25日(木)～27日(土)

「日本人における microsatellite instability (MSI) 陽性大腸直腸癌の頻度とその臨床像の男女差」

石窪力、新井吉子、山口研成、西村洋治、小林照忠、神田裕三、田中洋一、赤木究

第62回 日本癌学会総会 (名古屋国際会議場)

平成15年9月25日(木)～27日(土)

「大腸がんにおける K-ras 遺伝子変異の解析：新規変異の同定及び機能解析」

竹内朋代、赤木 究

第26回日本分子生物学会年会
(神戸ポートアイランド)

平成15年12月10日～13日

H. 知的財産権の出願・登録状況
特になし

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Nojima, T., Yamashita, K., Takagi, A., Takagi, M., Ikeda, Y., Kondo, H., Takenaka, S.	Direct detection of single nucleotide polymorphism (SNP) with genomic DNA by the ferrocenylnaphthalene diimide-based electrochemical hybridization assay (FND-EHA).	Anal. Sci.	19	79-83	2003
Koshikawa, N., Iyozumi, A., Gassmann, M., Takenaga, K.	Constitutive upregulation of hypoxia-inducible factor-1 α mRNA occurring in highly metastatic lung carcinoma cells leads to vascular endothelial growth factor overexpression upon hypoxic exposure.	Oncogene	22	6717-6724	2003

20030622

以降は雑誌/図書等に掲載された論文となりますので、
「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。