

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

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に関する研究

平成15年 総括研究報告書

主任研究者 森谷 宜皓

平成16（2004）年 4月

目次

I 総括研究報告書

遺伝子ならびに遺伝子診断システムの実用化研究	1
森谷亘皓	

II 分担研究報告

1 大腸がんの遺伝子診断法の開発	5
松村保広	
森谷亘皓	
斎藤典男	
佐々木博己	
藤田 伸	
2 動脈硬化症の遺伝子診断法の開発	7
永井良三	
今井 靖	
3 遺伝子診断システムの技術検討	10
永井啓一	
II 研究成果の刊行に関する一覧表	11

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 森谷亘皓 国立がんセンター中央病院部長

研究要旨 新規大腸がんスクリーニング法の開発研究において、便中剥離がん細胞を分離回収する方法を確立した。また分離細胞から DNA を抽出し、PCR-sequence 法にて k-ras、p53、APC などの遺伝子変異あるいは MSI の出現などにつき 70%以上の感度でがんを同定できた。また、大腸がん特異的に発現が認められる 5 遺伝子につき、便分離細胞において RT-PCR を行ったところ、正常便サンプルはすべて陰性で、大腸がん患者便において 60%が陽性であった。心臓 血管病への関与が期待される遺伝子群の多型性を検討し、それらを統合的に解析した。その結果、ABCA1、MMP1、MMP3、ADRB2、KLF5 などの遺伝子多型が循環器疾患の発症あるいはその背景因子と関連することが示された。KLF5 については遺伝子多型のみならずその遺伝子産物の cofactor の同定、またノックアウトマウスの解析により発生過程および心臓血管リモデリングに重要な因子であることが確認された。今後、このような臨床データベース集積と遺伝子解析の進行によりあらたな疾患感受性、治療反応性遺伝子群が多数同定され、それを応用した個別化医療の実践が将来的に可能になることが期待される。

分担研究者氏名・所属機関名および職名
松村保広 国立がんセンター研究所支所・部長

斎藤典男・国立がんセンター東病院・部長
藤田 伸・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
今井 靖・東京大学大学院医学系研究科
循環器内科 助手
永井啓一・(株)日立製作所中央研究所・
研究主幹

臨床に還元される遺伝子診断システムの構築を行う。

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ストマノカーや磁気ヒーズやフィルターなどを用いて効率良く分離することを基盤に置いた方法である。便の前処理の条件設定、便中の生きた細胞に対する細胞診、また DNA あるいは 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。

循環器疾患の遺伝子検査は、インフォームドコンセントの得られた約 1 300 症例について DNA を採取 保存した。その遺伝子検体を活用し心臓血管病への関与が期待される遺伝子群のプロモーター領域およびエクソン領域、イントロンの splicing 関連領域に焦点を絞って約 50 遺伝子の多型性につき、直接シーケンシング法および日立製作所が開発した BAMPER 法により遺伝子解析を実施した。

（倫理面への配慮）

本研究の開始にあたり患者サンプルの採取に関するインフォームドコンセントの内容や方法、ならびに本研究にかかる目的や方法などの研究内容は各施設に設置されたヒトゲノム遺伝子解析研究倫理審査委員会（「ヒトゲノム解析研究に関する共通指針」に準拠）において審査・承認されそれに基づいて実施した。

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を分離する方法を確立し、細胞診、DNA、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。

循環器領域の疾患では高血圧・心筋梗塞を含む虚血性心疾患・脳卒中に焦点を絞り、健康人および疾患患者の血液を用いて動脈硬化関連遺伝子の多型性・変異について検討し、そこから得られた知見を元に遺伝子リスク診断のシステム構築を行うこととした。いずれの研究も日立製作所との共同で汎用的に実地

C 研究結果

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、最初に約5gの便を生理食塩水でストマッカーを用いてけん濁後、フィルターを通過させることによって未消化物を除き、次に磁気ビーズで、ヒト細胞を分離した。蛍光標識したがん細胞と便を混ぜる実験で、便中に絶対数として1000個のがん細胞が存在すれば細胞診で確認できることが判明した。この方法を25例の大腸がん患者便に適用したところ25例中13例でがん細胞陽性であった。その中には3例の右側結腸がんも含まれていた。DukesAは6例でありそのうち5例が陽性であった。計25例のうち手術標本で19例において何らかの遺伝子異常があったが、その19例中18例において便細胞に組織で認められたのと同様の遺伝子異常が同定された。大腸内視鏡検査にて大腸病変がないことが確認されている健康人便7例すべてにおいて異形細胞は確認できなかった。正常の扁平上皮のみ存在していた。遺伝子異常もなかった。mRNA検出系に関しては7人の健康人と27人の大腸がん患者の便から分離した微量細胞のRT-PCRを行った。5種の遺伝子による結果として、7人の健康人便はすべて陰性であったのに対して、27人の大腸がん患者の便では、全体として60%、beta-Actin mRNAが検出された症例(良好なRNAが回収された症例)では、80%で少なくとも1つの遺伝子が陽性であった。以上により今回我々が開発した方法は早期の大腸がんでしかも全結腸をカバーしているといえる。

循環器疾患

(1) HDL コレステロールの生成に関わるABCA1(ATP-binding cassette transporter A1)遺伝子のMet823Ile多型が日本人においてHDL濃度を有意に規定する遺伝的要因であることが判明した。

(2) MMP1およびMMP3の遺伝子多型は、近接して存在することから互いに連鎖し、その組み合わせからなるハプロタイプが心筋梗塞発症に強く関連することが示された。

(3) $\beta 2$ アドレナリン受容体多型およびそのハプロタイプが冠動脈硬化、特に心筋梗塞発症に強く関連することが示された。

(4) MMP3 MMP9 p21 phoxの遺伝子多型が標的病変の性状で補正した再狭窄発症に有意に関連することが認められた。

(5) 心臓血管のリモデリングの制御に関与

する転写因子KLF5についての生体内における機能を解明するためにノックアウトマウスを作成したところ、ホモは胎性初期に致死であったが、ヘテロは正常に発育したが心臓血管リモデリングが抑制されることが示された。また転写因子として蛋白-蛋白相互作用における転写調節機構としてSETという制御因子と結合し、それがKLF5の転写抑制に関与すること、血管などの炎症の際に重要な役割を果たす転写因子NFkBと結合し協調的にPDGF遺伝子転写を活性化することも併せて証明した。

(6) 複数の遺伝子多型を組み合わせることにより、よりハイリスク症例の峻別が可能になることが示された

D 考察

大腸がん

1) 達成度について

便に含まれる大腸がん細胞の分離方法の技術は固定することができた。ただし最終的に診断に使うサンプルはDNAかRNAあるいは蛋白かは未定である。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

細胞診に適応できるくらい完全な形で便中がん細胞を分離する方法を見出した意義は大きい。世界中で大腸がんの遺伝子診断の開発は行なわれているがそれは便から直接DNAを抽出する方法なので感度が低すぎる。我々の方法はその感度の高さにおいて臨床の現場に導入可能で現在増加している大腸がんの死亡率を減少させようとする。

3) 今後の展望について

便処理の方法から診断までオートメーション化を試みている。がん患者100例正常人100例での解析を行ない臨床導入への道筋をつける。

循環器疾患

1) 達成度について

膨大な症例の臨床データベース構築と心臓血管関連の候補遺伝子の遺伝子多型解析によりいくつかの候補遺伝子の選出が出来た。

しかしながら疾患の有無などといった断面的研究が中心であり、治療反応性あるいは予後といった前向きな検討については追跡期間が高々3年という時間的制約のため、検体収集が不十分であり有用な遺伝的因子の同定に至らなかった。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

ケースコントロール研究主体の遺伝子多型研究では時として見落とされる可能性のある、遺伝的な臨床事象規定要因の検出に優れていると考えられる。また将来的には有用な遺伝的規定因子を一般的な臨床情報に加味してリスク予測などを行うといった個別化医療の実践を行う基盤がすでに構築されつつある。従って本研究の社会的インパクトは大きく、また国際的にみた場合も先行する欧米人での遺伝子研究がかならずしもモンゴロイドにそのまま外挿できない事実があり、日本人を対象とした本研究の成果はアジア人における臨床においては有益な情報を提供すると考えられる。

3) 今後の展望について

疾患の発症のみならず治療・環境要因感受性予後を規定する遺伝的素因を多数同定し、個々人の遺伝的素因と環境要因に適した個別化医療の実践に結びつけていきたい。

E 結論

大腸がんスクリーニングについては右側結腸がんを含む全結腸の早期がんを効率よく発見できる方法を開発した。循環器に関しては包括的臨床情報収集とゲノム解析との統合により、複数の冠動脈疾患発症を規定する遺伝的因子およびその組み合わせを検出した。またその際には日立製作所との共同研究による新しい遺伝子多型解析系である BAMPER 法の有用性も確認された。

F 健康危惧情報

特に認められない。

G 研究発表

論文発表

国立がんセンター

1 Aoyagi K, Tatsuta T, Nishigaki M, Akimoto S, Tanabe C, Omoto Y, Hayashi S, Sakamoto H, Sakamoto M, Teruhiko Y, Terada M and Sasaki H. A faithful method for PCR-mediated global mRNA amplification and its integration into microarray analysis on laser-captured cells. *Biochem Biophys Res Commun* 300 915-920 2003

2 Mori K, Aoyagi K, Ueda, T, Danjoh I, Tsubosa Y, Yanagihara K, Matsuno, Y, Sasako M, Sakamoto H, Mafune, K, Kaminishi M, Yoshida T, Terada, M and Sasaki H. Highly specific marker genes for detecting minimal gastric cancer cells in cytology negative peritoneal washings. *Biochem Biophys Res Commun* 313 931-937 2004

3 松下尚之, 松村保広
便からの癌細胞分離に基づくあらたな大腸癌スクリーニング法. *医学のあゆみ* 2004 208 169-170

東京大学

1 Shindo T, Imai Y, Nagai R et al. Kruppel-like zinc-finger transcription factor KLF5/BTFB2 is a target for angiotensin II signaling and an essential regulator of cardiovascular remodeling. *Nature Medicine* 2002,8 856-863

2 Harada T, Imai Y, Nagai R. A common Ile 823 Met variant of ATP-binding cassette transporter A1 gene (ABCA1) alters high density lipoprotein cholesterol level in Japanese population. *Atherosclerosis* 2003,169 105-12

3 Nojiri T, Imai Y, Nagai R. Genetic variations of matrix metalloproteinase-1 and -3 promoter regions and their associations with susceptibility to myocardial infarction in Japanese. *Int J Cardiol* 2003,92 181-186

4 Aizawa K, Suzuki T, Kada N, Ishihara A, Kawai-kowase Matsumura T, Sasaki K, Munemasa Y, Manabe I, Kurabayashi M, Collins T, Nagai R. Regulation of platelet-derived growth factor-A chain by kruppel like factor 5. *J Biol Chem* 2004 279 70-76

5 Miyamoto S, Suzuki T, Muto S, Aizawa K, Kimura A, Mizuno Y, Nagino T, Imai Y, Adachi N, Horikoshi M, Nagai R. Positive and negative regulation of the cardiovascular transcription factor KLF5 by p300 and the oncogenic regulator SET through interaction and

- acetylation on the DNA binding domain
Mol Cell Biol 2003 23 8528-8541
- 6 永井良三、新藤隆行、真鍋一郎 心血管
リモデリングに関わる転写因子 KLF5 と
抑制薬の開発 心臓 2003, 35 74-77

発明人 松村保広 松下尚之
出願人 国立がんセンター 日立製作所
1) ~ 4) 特許出願中

学会発表

2003 第 62 回日本癌学会

自然排出便のかん細胞を同定する新たな大腸がんスクリーニング法の開発 松下尚之、松村保広

便中RNAによる大腸がんスクリーニングへ向けた網羅的マーカー遺伝子の探索 名島 聡、松下尚之、松村保広、佐々木博己ら

2003 10 15 第 76 回日本生化学会

シンポジウム 生活習慣病と転写調節因子
—モデル動物から創薬への模索—

「Role of kruppel-like factor 5 (KLF5) in the cardiovascular system From pathophysiological mechanisms to therapeutic target」 永井 良三

2003 10 1 第 13 回国際動脈硬化学会

「Role of KLF5/BTEB2 a Kruppel-like zinc-finger type transcription factor, in vascular remodeling」 永井 良三

2003 11 9

74th American Heart Association Cardiovascular Seminars

「Kruppel-like zinc-fingers in cardiovascular development and remodeling」

永井 良三

H 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

（予定を含む）

- 1) 自然排出便中の剥離がん細胞分離同定および分子生物学的手法による大腸がんスクリーニング法の開発

発明者 松村保広 松下尚之

出願人 国立がんセンター 日立製作所

- 2) 糞便回収容器、細胞回収装置、糞便保存キット及び細胞回収方法

発明人 松村保広 松下尚之

出願人 国立がんセンター 日立製作所

- 3) 糞便ろ過装置および糞便ろ過方法

発明人 松村保広 松下尚之

- 4) 糞便回収器

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

松村保広 国立がんセンター研究所支所部長
藤田 伸 国立がんセンター中央病院医長
森谷宜皓 国立がんセンター中央病院部長
斎藤典男 国立がんセンター東病院部長
佐々木博己 国立がんセンター中央病院室長

研究要旨 新規大腸がんスクリーニング法の開発研究において、便中剥離がん細胞を分離する方法を確立した。また分離細胞から DNA を抽出し、PCR-sequence 法にて k-ras、p53、APC などの遺伝子変異あるいは MSI の出現などにつき 70%以上の感度でがんを同定できた。また、大腸がん特異的に発現が認められる 5 遺伝子につき、便分離細胞において RT-PCR を行なったところ、正常便サンプルはすべて陰性で、大腸がん患者便において 60%が陽性であった。

A. 研究目的

本研究においては、大腸がん患者便中の生細胞を分離する方法を確立し、細胞診、DNA 異常あるいは RNA レベルでの発現亢進を調べることによる大腸がんスクリーニング法の実用化を目的とした。

B 研究方法

便中からがん細胞を含む細胞群をストマノカーや磁気ビーズやフィルターなどを用いて効率良く分離することを基盤に置いた方法である。便の前処理の条件設定、便中の生きた細胞に対する細胞診、また DNA あるいは 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。実際 DNA レベルでは K-ras、APC、p53 の遺伝子変異あるいは MSI の出現について調べた。発現解析においては大腸がん特有の 5 つの遺伝子に絞り込み、がんと正常サンプルについて比較検討した。

（倫理面への配慮）

本研究の開始にあたり患者サンプルの採取に関するインフォームドコンセントの内容や方法、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に設置されたヒトゲノム遺伝子解析研究倫理審査委員会（「ヒトゲノム解析研究に関する共通指針」に準拠）において審査・承認されそれに基づいて実施した。

C 研究結果

便の前処理システムの開発では、最初に約 5 g の便を生理食塩水でストマノカーを用いてけん濁後、フィルターを使いろ過によって未消化物を除き、次に磁気ヒースで、ヒト細

胞を分離した。蛍光標識したがん細胞と便を混ぜる実験で、便中に絶対数として 1000 個のがん細胞が存在してれば細胞診で確認できることが判明した。この方法を 25 例の大腸がん患者便に適用したところ 25 例中 13 例でがん細胞陽性であった。その中には 3 例の右側結腸がんも含まれていた。DukesA は 6 例でありそのうち 5 例が陽性であった。計 25 例のうち手術標本で 19 例において何らかの遺伝子異常があったが、その 19 例中 18 例において便細胞に組織で認められたのと同じの遺伝子異常が同定できた。大腸内視鏡検査にて大腸病変がないことが確認されている健常人便 7 例すべてにおいて異形細胞は確認できなかった。正常の扁平上皮のみ存在していた。遺伝子異常もなかった。mRNA 検出系に関しては 7 人の健常人と 27 人の大腸がん患者の便から分離した微量細胞について RT-PCR を行った。5 種の遺伝子による結果として、7 人の健常人便はすべて陰性であったのに対して、27 人の大腸がん患者の便では、全体として 60%、beta-Actin mRNA が検出された症例（良好な RNA が回収された症例）では、80%で少なくとも 1 つの遺伝子が陽性であった。以上により今回我々が開発した方法は感度および特異度で従来の早期の報告よりすぐれており、大腸がんてしかも全結腸をカバーしているといえる。

D 考察

便に含まれる大腸がん細胞の分離方法の技術は固定することができた。ただし最終的に診断に使うサンプルは DNA か RNA あるいは蛋白かは未定である。

細胞診に適応できるくらい完全な形で便中がん細胞を分離する方法を見出した意義は大きい。世界中で大腸がんの遺伝子診断の開発は

行なわれているがそれらは便から直接DNAを抽出する方法なので感度が低すぎる。我々の方法はその感度の高さにおいて臨床の現場に導入可能で現在増加している大腸がんの死亡率を減少させようとする。

E 結論

右側結腸がんを含む全結腸の早期がんを効率よく発見できる方法を開発した。今後便処理の方法から診断までオートメーション化を試みる予定である。またがん患者100例正常人100例での解析を行ない臨床導入への道筋をつける。

F 健康危惧情報

特に認められない。

G 研究発表

1 論文発表

そのうち主なもの

1 論文発表

- 1 Aoyagi, K, Tatsuta T, Nishigaki, M, Akimoto S, Tanabe C, Omoto, Y, Hayashi, S, Sakamoto H, Sakamoto, M, Teruhiko Y, Terada M and Sasaki, H. A faithful method for PCR-mediated global mRNA amplification and its integration into microarray analysis on laser-captured cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 300 915-920 2003
- 2 Mori, K, Aoyagi K, Ueda T, Danjoh I, Tsubosa, Y, Yanagihara K, Matsuno, Y, Sasako M, Sakamoto H, Mafune K, Kaminishi M, Yoshida, T, Terada M, and Sasaki, H. Highly specific marker genes for detecting minimal gastric cancer cells in cytology negative peritoneal washings. *Biochem Biophys Res Commun* 313 931-937 2004

2 学会発表

2003 第62回日本癌学会

自然排出便のがん細胞を同定する新たな大腸がんスクリーニング法の開発 松下尚之、松村保広

便中RNAによる大腸がんスクリーニングへ向けた網羅的マーカー遺伝子の探索 名島 聡、松下尚之、松村保広、佐々木博己ら 2003 10 15

3 松下尚之、松村保広

便からの癌細胞分離に基づく新たな大腸癌スクリーニング法 医学のあゆみ 2004, 208 169-170

7 知的所有権の出願・取得状況

(予定を含む)

1) 自然排出便中の剥離がん細胞分離同定および分子生物学的手法による大腸がんスクリーニング法の開発

発明者 松村保広 松下尚之

出願人 国立がんセンター 日立製作所

2) 糞便回収容器、細胞回収装置、糞便保存キット及び細胞回収方法

発明人 松村保広 松下尚之

出願人 国立がんセンター 日立製作所

3) 糞便ろ過装置および糞便ろ過方法

発明人 松村保広 松下尚之

4) 糞便回収器

発明人 松村保広 松下尚之

出願人 国立がんセンター 日立製作所

1) ~ 4) 特許出願中

動脈硬化症の遺伝子診断法の開発

分担研究者

東京大学大学院医学系研究科 永井 良三
東京大学大学院医学系研究科 今井 靖

研究要旨 日本人における循環器疾患の遺伝的素因を明らかにするため、当院循環器内科入院症例の臨床情報を網羅的にデータベース化する一方、心臓・血管病への関与が期待される遺伝子群の多型性を検討し、それらを統合的に解析した。

その結果、ABCA1, MMP1, MMP3, ADRB2, KLF5 などの遺伝子多型が循環器疾患の発症あるいはその背景因子と関連することが示された。KLF5 については遺伝子多型のみならずその遺伝子産物の cofactor の同定、またノックアウトマウスの解析により発生過程および心臓血管リモデリングに重要な因子であることが確認された。今後、このような臨床データベース集積と遺伝子解析の進行によりあらたな疾患感受性、治療反応性遺伝子群が多数同定され、それを応用した個別化医療の実践が将来的に可能になることが期待される。

A 研究目的

日本人の死亡原因の上位を占める心臓脳血管疾患は生活習慣病と呼ばれ、生活習慣環境要因と遺伝的素因を背景に発症すると考えられる。従ってその遺伝的素因を明らかにすることは遺伝子情報に基づく個別化医療の実践に最終的につながる可能性が大きい。本研究では生活習慣病である心筋梗塞・脳卒中に関連する遺伝子多型・変異をプローブにより検出する新しい遺伝子診断法の開発・実用化が目的である。我々は循環器領域の疾患のなかで高血圧・心筋梗塞を含む虚血性心疾患・脳卒中に焦点を絞り、健常人および疾患患者の血液を用いて動脈硬化関連遺伝子の多型性・変異について検討し、そこから診療に有用な遺伝子マーカーを得て、その知見を元に遺伝子リスク診断のシステム構築を行うこととした。

B 研究方法

臨床における遺伝子研究においては遺伝子解析対象となる症例の充実したデータベースの存在が必須であり、我々は東京大学医学部附属病院循環器内科に入院した症例約 3000 症例につきデータベース化を行い、インフォームドコンセントの得られた約 1,300 症例については DNA を採取・保存した。その遺伝子検体を活用し心臓血管病への関与が期待される遺伝子群のプロモーター領域およびエクソン領域、イントロンの splicing 関連領域に焦点を絞って約 50 遺伝子の多型性につき、直接シーケンス法および日立製作所が開発した BAMPER (bioluminometric assay with coupled modified probe extension reactions) 法により遺伝子解析を実施し以下

の結果を得た。

(倫理面への配慮)

本研究の開始にあたり患者サンプルの採取に関するインフォームドコンセントの内容や方法、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医学部内に設置されたヒトゲノム遺伝子解析研究倫理審査委員会（「ヒトゲノム解析研究に関する共通指針」に準拠）において審査・承認されそれに基づいて実施した。

C 研究結果

(1) 脂質代謝において抗動脈硬化作用を有する高比重リポ蛋白コレステロール (HDL コレステロール) に関する遺伝子多型について HDL コレステロールの生成に関わる ABCA1 (ATP-binding cassette transporter A 1) 遺伝子の Met823Ile 多型が日本人において HDL 濃度を有意に規定する遺伝的要因であることか判明した。

(2) 血管リモデリングに関与する matrix metalloproteinase (MMP) の MMP1 および MMP3 の遺伝子多型は、近接して存在することから互いに連鎖し、その組み合わせからなるハプロタイプが心筋梗塞発症に強く関連することか示された。

(3) $\beta 2$ アドレナリン受容体多型およびそのハプロタイプが冠動脈硬化、特に心筋梗塞発症に強く関連することが示された。

(4) 冠動脈形成術後 (PCI) の再狭窄は本治療法の最大の障壁となっているが、MMP3, MMP9, p21 phox の遺伝子多型が標的病変の性状で補正した再狭窄発症に有意に関連することが認められた。

(5) KLF5 が血管平滑筋の形質転換、活性化に寄与する転写因子であることかすでに知ら

シンポジウム 生活習慣病と転写調節因子
—モデル動物から創薬への模索—

「Role of kruppel-like factor 5 (KLF5) in
the cardiovascular system From
pathophysiological mechanisms to
therapeutic target」 永井 良三

2) 海外

口頭発表 3

原著論文による発表 14

それ以外 (レビューなど) の発表 3

そのうち主なもの

論文発表

Shindo T, Manabe I, Fukushima Y, Tobe K,
Aizawa K, Miyamoto S, Kawai-Kowase K,
Moriyama N, Imai Y, Kawakami H, Nishimatsu
H, Ishikawa T, Suzuki T, Morita H, Maemura
K, Sata M, Hirata Y, Komukai M, Kagechika
H, Kadowaki T, Kurabayashi M, Nagai R.
Kruppel-like zinc-finger transcription
factor KLF5/BTFB2 is a target for
angiotensin II signaling and an essential
regulator of cardiovascular remodeling.
Nature Medicine 2002,8 856-863

Harada T, Imai Y, Nojiri T, Morita H,
Hayashi D, Maemura K, Fukino K, Kawanami D,
Nishimura G, Tsushima K, Monzen K, Yamazaki
T, Mitsuyama S, Shintani T, Watanabe N,
Seto K, Sugiyama T, Nakamura F, Ohno M,
Hirata Y, Yamazaki T, Nagai R.
A common Ile 823 Met variant of ATP-binding
cassette transporter A1 gene (ABCA1)
alters high density lipoprotein
cholesterol level in Japanese population.
Atherosclerosis 2003 169 105-12

Nojiri T, Morita H, Imai Y, Maemura K, Ohno
M, Ogasawara K, Aizawa T, Saito A, Hayashi
D, Hirata Y, Sugiyama T, Yamazaki T, Nagai
R. Genetic variations of matrix
metalloproteinase-1 and -3 promoter
regions and their associations with
susceptibility to myocardial infarction in
Japanese. Int J Cardiol 2003,92 181-186

Hayashi D, Imai Y, Hiroyuki M, Fujita H,
Monzen K, Yamazaki T, Yamazaki T, Nagai R.
Development of the pioneering clinical

support system utilizing information
technology -clinical informatics and
genome analysis - Jpn Heart J (in
press)

Aizawa K, Suzuki T, Kada N, Ishihara A, K
Kawai-Kowase, Matsumura T, Sasaki K,
Munemasa Y, Manabe I, Kurabayashi M,
Collins T, Nagai R. Regulation of
platelet-derived growth factor -A chain by
kruppel like factor 5. J Biol Chem
2004,279 70-76

Miyamoto S, Suzuki T, Muto S, Aizawa K,
Kimura A, Mizuno Y, Nagino T, Imai Y, Adachi
N, Horikoshi M, Nagai R. Positive and
negative regulation of the cardiovascular
transcription factor KLF5 by p300 and the
oncogenic regulator SET through
interaction and acetylation on the DNA
binding domain. Mol Cell Biol
2003 23 8528-8541

学会発表

2003 10 1

第 13 回国際動脈硬化学会 XIIIth
International Symposium on
Atherosclerosis

シンポジウム Proliferation and
differentiation of smooth muscle cells

「Role of KLF5/BTEB2 a Kruppel-like
zinc-finger type transcription factor, in
vascular remodeling」 永井 良三

2003 11 9

74th American Heart Association
Cardiovascular Seminars

「Kruppel-like zinc-fingers in
cardiovascular development and
remodeling」

永井 良三

7 知的所有権の出願・取得状況

(予定を含む)

なし

れているか、この KLF5 遺伝子の遺伝子全長のシーケンスを行い、新規 10SNPs を含む 13SNPs について解析を行ったところ、KLF5 遺伝子多型が冠動脈硬化・冠動脈形成術後再狭窄に関連することが確認された。また KLF5 についての生体内における機能を解明するためにノックアウトマウスを作成したところ、ホモは胎性初期に致死であったが、ヘテロは正常に発育したが心臓血管リモデリングが抑制されることが示された。また転写因子として蛋白-蛋白相互作用における転写調節機構として SET という抑制因子と結合し、それが KLF5 の転写抑制に関与すること、また血管などの炎症の際に重要な役割を果たす転写因子 NFkB と結合し協調的に platelet derived growth factor (PDGF) 遺伝子転写を活性化することも証明した。

(6) 複数の遺伝子多型を組み合わせることにより、よりハイリスク症例の峻別が可能になることが示された(一例として、lymphotoxin alpha と MCP-1 は単独では心筋梗塞発症には 1.5 倍程度のオッズ比であるか、これを組み合わせることによりオッズ比は 4 倍となる)。

D 考察

1) 達成度について

膨大な症例の臨床データベース構築と心臓血管関連の候補遺伝子の遺伝子多型解析によりいくつかの候補遺伝子の選出が出来た。また日立製作所と開発した BAMPER 法は遺伝子変異多型検査法としての有用性が確認された。

しかしながら疾患の有無などといった断面的研究が中心であり、治療反応性あるいは予後といった前向きな検討については追跡期間が高々 3 年という時間的制約のため、検体収集が不十分であり有用な遺伝的因子の同定に至らなかった。今後本研究を継続することにより、治療反応群・不応群、また予後情報の集積からそれら因子の探索が要求される。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

網羅的臨床情報と遺伝子情報とを統合的に解析する研究デザインであるため、他の施設にて施行されるケースコントロール研究主体の遺伝子多型研究では時として見落とされる可能性のある、遺伝的な臨床事象規定要因の検出に優れていると考えられる。また将来的に

は有用な遺伝的規定因子を一般的な臨床情報に加味してリスク予測などを行うといった個別化医療の実践を行う基盤がすでに構築されつつある。従って本研究の社会的インパクトは大きく、また国際的にみた場合も先行する欧米人での遺伝子研究がかならずしもモンゴロイドにそのまま外挿できない事実があり、日本人を対象とした本研究の成果はアジア人における臨床においては有益な情報を提供すると考えられる。

3) 今後の展望について

本研究の継続により疾患の発症のみならず治療・環境要因感受性、予後を規定する遺伝的素因を多数同定し、すでに構築した網羅的臨床情報とを最終的に統合し遺伝子情報を含めた有益な情報のデータマイニングにより、個々人の遺伝的素因と環境要因に適した個別化医療の実践に結びつけていきたい。

E 結論

包括的臨床情報収集とゲノム解析との統合により、複数の冠動脈疾患発症を規定する遺伝的因子およびその組み合わせを検出した。またその際には日立製作所との共同研究による新しい遺伝子多型解析系である BAMPER 法が簡便で、直接シーケンス法など他のアッセイ系に遜色ないことが確認された。今後さらなるデータ集積により治療・予後を規定する遺伝的因子の新規同定が期待される。

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) 国内

口頭発表 6

原著論文による発表 8

それ以外(レビューなど)の発表 4

そのうち主なもの

論文発表

永井良三、新藤隆行、真鍋一郎 心血管リモデリングに関わる転写因子 KLF5 と抑制薬の開発 心臓 2003 35 74-77

学会発表

2003 10 15

第 76 回日本生化学学会

遺伝子診断システムの技術検討

分担研究者 永井 啓一 株式会社日立製作所 基礎研究所 研究主幹

大腸がんならひ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

便中に微量に存在する大腸がん細胞を検出することによる大腸がんスクリーニング法を実用化するため、国立がんセンター開発の便処理の基本プロトコルに基づいて、便採取の際の受診者の作業負担と便処理に係る医師や検査技師の作業負担を軽減するため、便採取から便懸濁、便ろ過までの作業工程を簡便化する専用器具の開発を行う。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、独自開発の SNPs 検査法である BAMPER 法に基づいた SNPs 検査システムの開発を行う。試作器具、試作システムは臨床サンプルによる実用性評価を行う。

（倫理面への配慮）

大腸がん患者からのがん細胞ならひに便や血液の採取に関するインフォームト コンセント内容や方法、ならひ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ト コンセント内容や方法、ならひ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

便処理専用器具を試作し、臨床サンプルによる基本性能評価を行った結果、顕微鏡下で大腸がん細胞の回収を確認した。一方 SNPs 検査システムについて、PCR 増幅後から SNPs 検出までの分注作業工程を自動化する装置を開発した。また 臨床サンプル 288 検体を用いて循環器疾患関連の 3SNPs の解析

結果を既存法のものと比較し、BAMPER 法の信頼性を確認した。さらに試薬量の最適化によって試薬コストを 1/10 まで低減した。

D 考察

便処理器具の試作について、基本性能を得られたものの、実用化に向けて更に設計改善を行うとともに操作性向上を図る必要がある。また、回収された細胞が基本プロトコルよりもダメージを受けている様子が見られたことから便懸濁工程における実験条件の最適化が必須である。一方、SNPs 検査システムについて、SNPs 誤判定は臨床上許されないため、判定精度の技術的評価は慎重を要する。

E 結論

大腸がんスクリーニング法の対象は、一般の人間トックや検診受診者であり、便処理システムの高スループット化を今後も引き続き検討していく。一方、SNPs 検査システムは、適用範囲の拡大を目指して臨床上有用な SNPs に対する実験条件設定を進めていく。なお、本研究は、NEDO から受託した事業「臨床用遺伝子診断システム機器」を活用して行った。

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

著者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Aoyagi K, Tatsuta T, Nishigaki M, Akimoto S, Tanabe C, Omoto Y, Hayashi S, Sakamoto H, Sakamoto M, Teruhiko Y, Terada M and Sasaki H	A faithful method for PCR-mediated global mRNA amplification and its integration into microarray analysis on laser-captured cells	Biochem Biophys Res Commun	300	915-920	2003
Mori K, Aoyagi K, Ueda T, Danjoh I, Tsubosa Y, Yanagihara K, Matsuno Y, Sasako M, Sakamoto H, Mafune K, Kaminishi M, Yoshida T, Terada M and Sasaki H	Highly specific marker genes for detecting minimal gastric cancer cells in cytology negative peritoneal washings	Biochem Biophys Res Commun	313	931-937	2004
松下尚之 松村保広	便からの癌細胞分離に基づくあらたな大腸癌スクリーニング法	医学のあゆみ	208	169-170	2004
Shindo T, Imai Y, Nagai R et al	Kruppel-like zinc-finger transcription factor KLF5/BTFB2 is a target for angiotensin II signaling and an essential regulator of cardiovascular	Nature Medicine	8	856-863	2002
Harada T, Imai Y, Nagai R	A common Ile 823 Met variant of ATP-binding cassette transporter A1 gene (ABCA1) alters high density lipoprotein cholesterol level in Japanese population	Atherosclerosis	169	105-112	2003
Nojiri T, Imai Y, Nagai R	Genetic variations of matrix metalloproteinase-1 and -3 promoter regions and their associations with susceptibility to myocardial infarction in Japanese	Int J Cardiol	92	181-186	2003
Aizawa K, Suzuki T, Kada N, Ishihara A, Kawakowase M, Matsumura T, Sasaki K, Munemasa Y, Manabe I, Kurabayashi M, Collins T, Nagai R	Regulation of platelet-derived growth factor-A chain by Kruppel-like factor 5	J Biol Chem	279	70-76	2004
Miyamoto S, Suzuki T, Muto S, Aizawa K, Kimura A, Mizuno Y, Nagino T, Imai Y, Adachi N, Horikoshi M, Nagai R	Positive and negative regulation of the cardiovascular transcription factor KLF5 by p300 and the oncogenic regulator SET through interaction and acetylation on the DNA binding domain	Mol Cell Biol	23	8528-8541	2003
Hayashi D, Imai Y, Hiroyuki M, Fujita H, Monzen K, Yamazaki T, Yamazaki T, Nagai R	Development of the pioneering clinical support system utilizing information technology - clinical informatics and genome analysis -	Jpn Heart J		(in press)	

20030626

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。