

# プロテオミクスの現状と将来

—国立がんセンターにおける試み—

Strategy of the Cancer Proteomics Project in National Cancer Center

やま だ てっ し  
山 田 哲 司  
Tesshi YAMADA

# プロテオミクスの現状と将来

## —国立がんセンターにおける試み—

### Strategy of the Cancer Proteomics Project in National Cancer Center

やま だ てっ し  
山 田 哲 司  
Tesshi YAMADA

#### はじめに

ヒトゲノム解読の完了が宣言され、完全にポストゲノム時代となった。ヒトゲノムの全情報が自由に誰でも机上のパーソナルコンピューターから取り出せる時代である。がんは点突然変異、遺伝子増幅、欠失などの塩基配列の変化（ジェネティックな変化）あるいは塩基配列の変化を伴わないメチル化などのエピジェネティックな変化によるいくつかのがん遺伝子あるいはがん抑制遺伝子の機能異常が蓄積することによって起こる疾患であることは、今日ほぼ間違いないと考えられている。事実1980年代後半から1990年代にかけて、遺伝子解析技術の急速な進歩に伴い、実際のがんで蓄積している遺伝子変化が多数同定されてきた。しかしヒトゲノムプロジェクトの終了によって、自動的にがんの発生、浸潤・転移、治療抵抗性などのメカニズムが明らかになり、治療法が開発されることにはならない。ヒトが持つ遺伝子のほぼすべての塩基配列が同定されたといっても、これはすべての単語を網羅した辞典を手に入れたに過ぎない。分厚い英和辞典があればシェークスピアが解読できるとは誰も思わない。

約3万弱あると推定されているヒトの遺伝子から alternative splicing によっておそらく数十万種の mRNA が作られる。mRNA からペプチド鎖が形成された後も特定のプロテアーゼによる切断、リン酸化、糖鎖付加などの翻訳後修飾、ユビキチン化や SUMO 化に伴い生じる分解にて多種多様に変化したタンパク質が生じ、量が変化する（図1）。さら

にタンパク質が実際に機能するためには、細胞内の特定の部位に局在し、複数のタンパク質が複合体を形成する必要がある（図1）。例えばがん遺伝子のひとつである  $\beta$ -catenin タンパク質は細胞接着分子 cadherin と結合し、その裏打ちタンパク質として働く場合と、転写因子 T-cell factor/Lymphoid enhancer factor と結合し、核内で転写活性化因子として働く場合で機能が異なる<sup>1)</sup>。このように遺伝子の機能異常に伴いダイナミックに変化するさまざまなタンパク質の発現量、細胞内局在、翻訳後修飾、他のタンパク質との相互作用などが、がんの発生や浸潤・転移、治療抵抗性などの実際の病態を引き起こすものと考えられる。またこうしたタンパク質の特性が分子治療の標的となると考えられる。

プロテオーム (proteome) とはゲノム (genome) から派生した言葉であり<sup>2)</sup>、特定の細胞・組織・器官でゲノムに制御され、特定の条件下で発現されるタンパク質全体をさし、プロテオームを対象とする

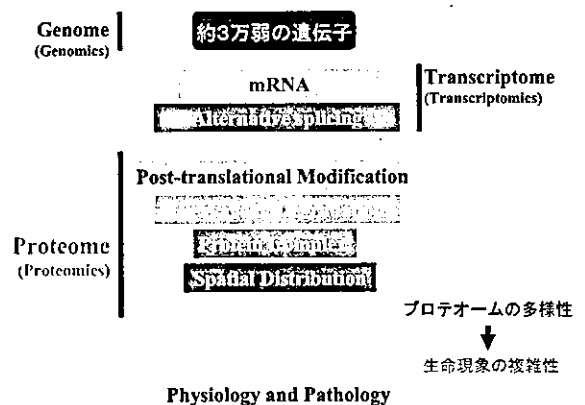


図1 プロテオームの複雑性

国立がんセンター研究所  
化学療法部・腫瘍プロテオミクスプロジェクト  
〒104-0045 東京都中央区築地 5-1-1

Chemotherapy Division and Cancer Proteomics Project,  
National Cancer Center Research Institute  
(5-1-1 Tsukiji, Chuo-ku, Tokyo)

学問がプロテオミクス (proteomics) である。特にタンパク質の機能や疾病との関わりを明らかにするプロテオーム研究が注目を集めている。本稿では国立がんセンター研究所において行われている臨床応用を目指したプロテオーム研究について中心に紹介する。

## I. 国立がんセンター研究所腫瘍プロテオミクスプロジェクトの開設

プロテオームを網羅的に解析する手段は cDNA マイクロアレイ技術にて画期的に進歩した遺伝子発現解析に比べれば、かなり不十分である。特に多数の遺伝子の変異が蓄積し、複雑なゲノム異常を来した進行がんのプロテオーム解析は非常に困難であることが予測される。そこで近年急速に進歩した質量分析などのプロテオーム解析技術を改良し、これまでがん克服新 10 年戦略などで蓄積されたがんのゲノムの異常に関する知見を分子創薬や診断法の開発に結びつけるため、国立がんセンター研究所では平成 13 年 4 月より厚生労働省が実施するメディカル・フロンティア戦略のうち、「タンパク質科学研究によるがん対策・創薬等推進事業」を担当し、医薬品副作用被害救済・研究振興調査機構 (現・独立行政法人医薬品医療機器総合機構) と共同研究を行うこととなった。腫瘍プロテオミクス・プロジェクト (Cancer Proteomics Project) はこの事業の中心

として、同研究所の地下 1 階のフロアーのほぼ全体を改修して、新たに設けられた部署である。研究所の化学療法部や病理部と密接に連携して、Amersham Biosciences 社の 2D-DIGE (two-dimensional difference gel electrophoresis) 法による定量性の高い 2 次元電気泳動 (図 2)、Ciphergen 社のプロテインチップシステムを用いた低分子タンパク質とペプチドのプロファイリング (図 3)、免疫沈降法やビアコアを用いたタンパク質複合体の解明、免疫組織染色によるスクリーニングをロボット化した独自のモノクローナル抗体作製システムなどを用いて、がんの発生、浸潤・転移などの病態の分子機構解明、治療標的分子の同定、がんの早期診断・病態診断に有用な腫瘍マーカーの開発などを目的に研究を行っている (<http://www.ncc.go.jp/jp/nccri/divisions/p03prms/p03prms.html>)。

## II. 2D-DIGE 法

検出波長の異なる蛍光色素 (Cy3 と Cy5) で標識した 2 種のタンパク質を混和し、2 次元ゲルで分離・定量するタンパク質発現解析法である。ダイナミックレンジが広く、高感度である蛍光色素の一般特性に加え、2D-DIGE 法では Cy3 で標識したタンパク質を内部コントロールに用いることで格段に 2 次元電気泳動の定量性と再現性が向上している。われわれはこの 2D-DIGE 法に改良を加え、統合的なプロ

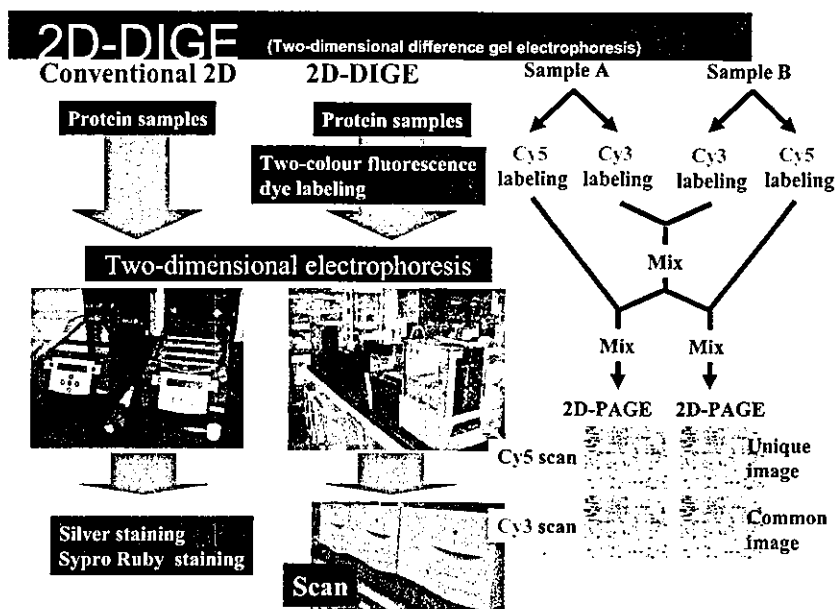


図 2 2D-DIGE 法による 2 次元電気泳動

テオーム発現解析システムを構築している。本システムの特徴は、1)上記の内部コントロールの使用により再現性と定量性に優れること、2)ゲル間の比較が半自動的に高速で行えること、3)1日24検体を処理でき、ハイスループット化に対応していることなどである。高感度な蛍光色素標識法を用いればレーザーマイクロダイセクションにて得られたような微量のタンパク質も2D-DIGEにて解析可能である<sup>3)</sup>。

2次元電気泳動では高分子・疎水性のタンパク質や発現量の低いタンパク質の発現解析は困難であるが(図4)、遺伝子発現解析では得られなかったような鳥瞰的な所見が得られることがあきらかになった<sup>4)</sup>。また高分子タンパク質の検出を向上させるために1次元目の泳動にアガロースゲルを使用した報告もある<sup>5)</sup>。2次元電気泳動で観察されるスポット



図3 CIPHERGEN社のプロテインチップシステムを用いた低分子タンパク質とペプチドのプロファイリング

に含まれるタンパク質の同定のためのゲルの切り出しはほぼ自動化している(図5)。ゲルからタンパク質そのままを抽出することは困難であるが、トリプシンなどの酵素を用いゲル内でタンパク質を断片化し、ペプチドとしてならゲルから容易に回収できる。得られた複数のペプチドの質量を主としてMALDI-TOF型の質量分析機(matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry)にて測定し(図6)、ゲノム情報などに基づいて作製されたタンパク質データベースと照合し、同定する方法をPMF(peptide mass fingerprinting)法と呼ぶ<sup>6)</sup>。

### Ⅲ. 液体クロマトグラフィーと質量分析(liquid chromatography-mass spectrometry(LC-MS))によるプロテオーム

図4にあるような2次元電気泳動法の問題点のうち、特に従来解析が困難であった細胞膜受容体などの疎水性部分を持つタンパク質、高分子タンパク質を解析でき、またタンパク質の同定までの全過程をほぼ自動化できる技術がLC-MSである。今後のプロテオーム解析の中心技術になっていくものと思われる。この方法ではトリプシンなどの消化酵素で粗精製のタンパク質混合物を断片化し、生じたペプチドフラグメントを通常複数種類のカラムを用いた多次元のクロマトグラフィーで分離し、直接ESI型の質量分析機(electrospray ionization mass spectrometry)にて解析する。酵素消化にてさまざまなタン

#### 2D-DIGEの問題点

##### 実験の面では

1. 2Dで解析できない(適さない)タンパク質
  1. 等電点が極端にアルカリ側(>10)または酸性側(<3)のタンパク質
  2. 疎水性のタンパク質(膜タンパク質)
  3. 高分子タンパク質(>100kD) APC、BRCA1/2はだめ。
  4. 微量なタンパク質(転写因子など)
2. 極端に特定のタンパク質に偏っている検体  
血清タンパク質(アルブミン)
3. スポットの同定  
微量なタンパク質の場合、ゲルからの抽出効率はかなり悪い。

##### 実用面では

1. 自動化ができない  
→多検体を泳動するためにはかなり時間がかかる  
専任オペレーターが必要
2. 解析ソフトの問題点  
ランドマークの設定、解析結果のチェックなどに膨大な時間がかかる
3. 高額なランニングコスト  
蛍光色素、人件費

図4 2D-DIGE法による2次元電気泳動の問題点

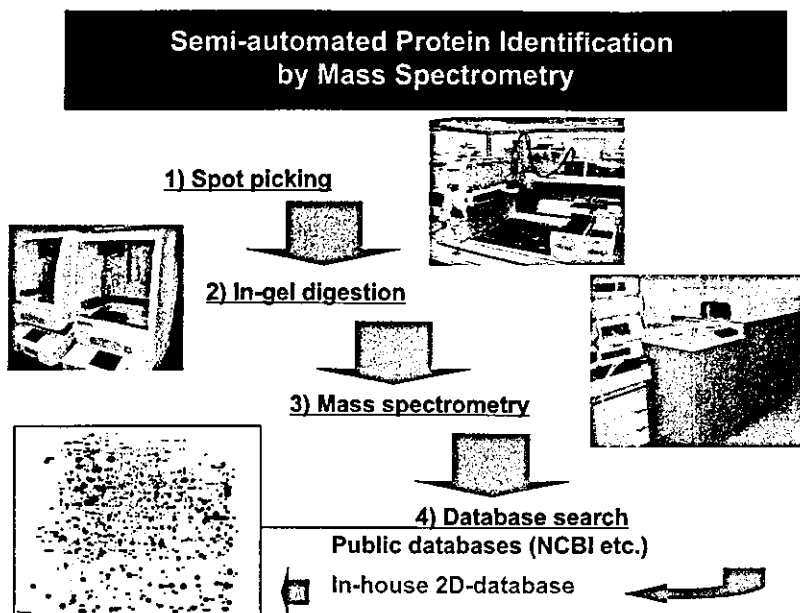


図5 ロボット化したゲル内消化システムとPMF法によるタンパク質同定

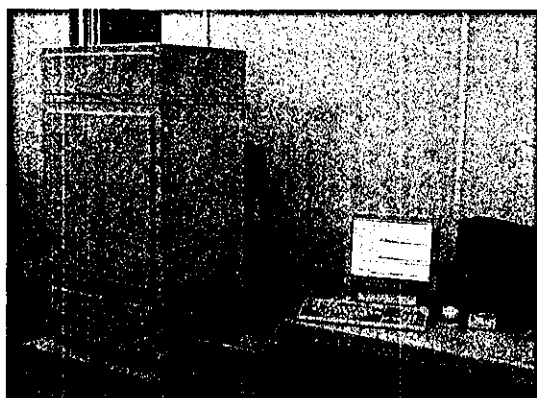


図6 MALDI-TOF型の質量分析機

パク質の物理化学的な性状をすべて均一にして網羅的に解析することから、ショットガン法とも呼ばれている。特に微小なカラムを用い、nl/minレベルの低流速で液体クロマトグラフィーから直接質量分析機に資料を導入することで、高感度が得られる<sup>7)</sup>。

従来 LC-MS 法は定量性に問題があったが、安定同位体による代謝標識<sup>8)</sup> や ICAT (isotope-coded affinity tag) 法による化学標識<sup>9)</sup> を行うことで、定量的な解析も可能となった。

#### IV. プロテインチップ法による腫瘍マーカー開発

進行がんの治療は現在利用可能な医療技術では困難な場合が多く、高感度な検出方法を用いて微少のがんを発見し、早期に治療を開始することが患者の

Quality of life や予後の改善に必須であることは論を待たない。そのため多数の被験者からがん罹患者を効率よくスクリーニングできるがん検診技術の開発と整備が国民から強く要望されている。国立がんセンターでは平成16年2月よりがん予防・検診研究センターを開設し、既存のがん検診方法の検証と新しいがん検診技術の開発を行っている。がん予防・検診研究センターでは従来の放射線やエコー、内視鏡などに加えて、PET (positron emission tomography) によるがん検診を行っている。しかし施設と機器に膨大な経費がかかるため、がん検診の目的でPETが全国的に普及するかどうかは現時点では不明である。一方、血液中の腫瘍マーカーは、どこの病院や診療所でも容易に検体が採取できることから、大多数の被験者のスクリーニングに有利である。自己採血などによるがん診断キットも市販されるようになってきたが、その有用性は不明である。

現在腫瘍プロテオミクスプロジェクトはがんの早期診断のための腫瘍マーカー開発に特に力を入れている。腫瘍マーカーといえば、CEA (carcinoembryonic antigen) や CA19-9 のように治療効果の判定や、再発の発見など限られた範囲で臨床に有用であるが、がんの早期発見には、前立腺がんにおける PSA (prostatic specific antigen)<sup>10)</sup> 以外に有用なマーカーはないというのが今までの常識であった。しかしこの医学常識が最近崩れつつある。米国の CIPHERgen 社のプロテインチップシステム (図3)

と Correlogic 社が開発したアルゴリズムを用いた多変量解析を用い、米国 NCI と FDA の共同で行われている Clinical Proteomics Project は治癒可能性の高い Stage I の早期症例を含め、100%に近い正診率で卵巣癌が診断できたと報告している<sup>11)</sup>。この成果は米国のマスコミに大きく取り上げられ(図7)、注目を浴びているが、チップの消耗品が高価であり、またピークの解析ソフトが市販されていないため、国内では少数例を用いた散発的な研究しか行われていなかった。われわれはピーク同定の独自のアルゴリズムを開発し、またロボットシステムによる分画法を改良し、わずか20 $\mu$ lほどの血漿(血清)から約1,000の低分子タンパク質とペプチドを検出することができるようになっている。

V. ロボット化したモノクローナル抗体作製システムとタンパク質アレイ

96穴マイクロタイタープレート内でアレイ化した小さな組織切片に対し、免疫染色を迅速に行えるロボットシステムを独自に開発した。がんの浸潤部や患者血清と反応する多数の抗体を分離し、病態の診断やスクリーニングへの応用を検討している。わ

れわれは膀胱がん細胞株を免疫源として、本システムを用いた大規模なスクリーニングで、膀胱がん患者血清と高率に反応する新しい8種の新規モノクローナル抗体を選択した。これらの抗体パネルを用いた血漿のタンパク質アレイで膀胱がん患者の98例中73例(74.4%)が陽性を示したが、健常人においても9.7%が陽性を示した(第62回日本癌学会総会記事)。膀胱がんは進行して発見された場合著しく予後が不良であり、早期発見の効果的な戦略が重要である。治癒率を向上させるためには、現時点ではある程度の偽陽性があっても検出率を向上させる必要がある。本方法は偽陽性が高く、現状ではそのままではがん検診には使えないが、膀胱がん患者の高い検出率を示し、今後重要な診断法の1つになる可能性がある。

VI. その他のプロテオーム解析技術

組織の凍結切片に直接レーザーをあて、レーザーが照射された局所にあるタンパク質の質量をMALDI-TOF MSで測定する方法が行われている。プロテオームの結果で肺癌の組織型や予後を判定できたと報告されている<sup>12)</sup>。



図7 プロテインチップに関する米国マスコミの報道

## おわりに

バイオテクノロジーの基礎研究の領域では近年急速な技術革新が行われ、cDNA マイクロアレイ法などのトランスクリプトーム技術や本稿で述べたプロテインチップ法、質量分析法、抗体・タンパク質マイクロアレイ法などのプロテオーム技術の臨床応用が期待されている。またバイオインフォマティクスの技術が進歩し、一見特異性のないように思われる数値データからも、診断に有用な情報が引き出せる可能性がでてきている。われわれはこれらの新技術を単なる基礎研究に終わらせないことが責務であると感じている。邦人がノーベル賞をとったことを機会に、日本独自の画期的なプロテオーム解析によるがん診断法を開発したいと思う。モダンメディア読者であられる全国の病院臨床検査部の皆様からの協力で、この目標を達成できればと願う。

## 文 献

- 1) Hirohashi S., and Kanai Y.: Cell adhesion system and human cancer morphogenesis. *Cancer Sci.* 94(7): 575-581. 2003 Jul.
- 2) Wasinger V.C., et al.: Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. *Electrophoresis.* 16(7): 1090-1094. 1995 Jul.
- 3) Kondo T., et al.: Application of sensitive fluorescent dyes in linkage of laser microdissection and two-dimensional gel electrophoresis as a cancer proteomic study tool. *Proteomics.* 3(9): 1758-1766. 2003 Sep.
- 4) Seike M., et al.: Proteomic analysis of intestinal epithelial cells expressing stabilized  $\beta$ -catenin. *Cancer Res.* 63(15): 4641-4647. 2003 Sep.
- 5) Oh-Ishi M., et al.: Preparative two-dimensional gel electrophoresis with agarose gels in the first dimension for high molecular mass proteins. *Electrophoresis.* 21(9): 1653-1669. 2000 May.
- 6) Henzel W.J., et al.: Protein identification: the origins of peptide mass fingerprinting. *J Am Soc Mass Spectrom.* 14(9): 931-942. 2003 Sep.
- 7) Kaji H., et al.: Lectin affinity capture, isotope-coded tagging and mass spectrometry to identify N-linked glycoproteins. *Nat Biotechnol.* 2003 Jun; 21(6): 667-672. Epub 2003 May 18.
- 8) Oda Y., et al.: Accurate quantitation of protein expression and site-specific phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96(12): 6591-6596. 1999 Jun 8.
- 9) Gygi S.P., et al.: Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. *Nat Biotechnol.* 17(10): 994-999. 1999 Oct.
- 10) Soderdahl D.W., and Hernandez J.: Prostate cancer screening at an equal access tertiary care center: its impact 10 years after the introduction of PSA. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 5(1): 32-35. 2002 Mar.
- 11) Petricoin E.F., et al.: Use of proteomic patterns in serum to identify ovarian cancer. *Lancet.* 359(9306): 572-577. 2002 Feb 16.
- 12) Yanagisawa K., et al.: Proteomic patterns of tumour subsets in non-small-cell lung cancer. *Lancet.* 362(9382): 433-439. 2003 Aug 9.

# 分子消化器病

別刷



## MDR1 は $\beta$ -カテニンと TCF 4 転写 複合体の標的遺伝子である

山田哲司\* 広橋説雄\*

### KEY WORDS

APC,  $\beta$ -カテニン, TCF 4, MDR1, NSAID

### SUMMARY

*adenomatous polyposis coli (APC)* 癌抑制遺伝子の変異は大腸癌において最も頻度が高く、かつ最も早期にみられ、前癌病変である腺腫形成の原因と考えられる。APC の遺伝子変異によって、 $\beta$ -カテニン蛋白が細胞内に異常蓄積する。細胞内に蓄積した  $\beta$ -カテニンによって T-cell factor (TCF)/lymphoid enhancer factor (LEF) ファミリーの転写因子のさまざまな標的遺伝子の発現を誘導することが、腺腫形成の原因であると考えられている。 $\beta$ -カテニンと TCF 4 が転写活性化する Multidrug resistance gene-1 (MDR1) の阻害薬は大腸癌予防に応用できるかもしれない。

### はじめに

家族性大腸腺腫症 (familial adenomatous polyposis : FAP, 以下 FAP) は癌抑制遺伝子 APC の変異による遺伝疾患であり、20代から30代にかけて腺腫性ポリープが無数に大腸に生じる。これらの腺腫性ポリープは病理学的には浸潤性病変ではなく、良性であるが、前癌病変であり、放置すると必ず癌化するため、広範な全結腸切除が FAP 患者では今日においてもやむを得ないものとされている。非ステロイド性消炎鎮痛剤 (non-steroidal anti-inflammatory drug : NSAID) に腺腫性ポリープの形成抑制効果および縮小効果があり、FAP 症例で予防的および治療的に使用されているが、その効果は不完全であり、また消化性潰瘍などの重篤な副作用のため長期の使用が困難である。さらに重要なことは APC の不活化による発癌過程はそのまま通常の大腸癌にもあてはまることである。欧米では腺腫性ポリープの発生頻度は一般のポピュレーションでも高く、人口の約半数に腺腫性ポリープが生じるとの見方もある。わが国でも食生活の欧米化に伴い大腸癌が急増しており、効

\* YAMADA Tesshi, HIROHASHI Setsuo / 国立がんセンター研究所化学療法部・腫瘍プロテオミクスプロジェクト

果的な大腸癌予防法の確立が公衆衛生上重要性を増していると考えられる。

## APC 癌抑制遺伝子の失活が大腸発癌の原因である

FAP の原因遺伝子としてポジショナルクローニングにて同定されたのが *adenomatous polyposis coli* (APC) 癌抑制遺伝子<sup>1)</sup>である。APC の変異は FAP 症例の腫瘍のみならず、通常の大腸癌においても、80~90%の頻度で見られ、また数ミリ大の小ポリープにおいても変異が見られることから初期大腸発癌の原因と考えられる<sup>2)</sup>。APC は典型的な癌抑制遺伝子であり、Knudson らの<sup>3)</sup> two-mutation hypothesis に合致した不活化により、機能不全が生じる。APC の失活にて腸上皮細胞に何らかの細胞生物学的な変化が生じ、初期の大腸腺腫を形成し、さらに *k-ras*, *p53* などのほかの癌遺伝子、癌抑制遺伝子の二次的な多段階の変異を経て癌化に至るものと考えられる。Vogelstein らのグループ<sup>4)</sup>は種々の段階の腫瘍を多数の症例で検討し、有名な adenoma-carcinoma sequence のモデルを提唱した。このモデルは単純化され過ぎた感があるが、APC の変異が多段階発癌の最初に起こるという点では今日でもかわりがない。ほとんどの大腸癌が APC の変異を基点にはじまるため、Vogelstein のグループは APC を gatekeeper (門番) とよんでいる。門番が不審者を素通りさせなければ、事件 (大腸癌) は発生しないという意味である。さらにここで指摘しておきたいポイントは APC の変異で生じるのは初期の腺腫の形成までであり、ほかの遺伝子の変化をきたさなければ、浸潤性の癌にはならないことである。

## $\beta$ -カテニンの細胞内蓄積が大腸発癌に重要である

近年 APC 遺伝子産物は Axin, Axil (Axin-2) などの蛋白質と複合体を形成し、カドヘリンの細胞内ドメインと結合する分子として同定された  $\beta$ -カテニンの、グリコゲンシンターゼキナーゼ 3- $\beta$  (GSK 3 $\beta$ ) によるリン酸化とそれによって引き続き起こされるユビキチン化による分解を制御していることがわかった<sup>5)</sup>。APC の遺伝子変異によって、この複合体の形成が失われると、 $\beta$ -カテ

ニン蛋白が細胞内に異常蓄積し、Wnt シグナル伝達系の活性化を模倣する。APC 遺伝子に変異のない大腸癌において  $\beta$ -カテニン遺伝子のリン酸化部位に突然変異が認められること<sup>6)</sup>や、小型の大腸腺腫においても  $\beta$ -カテニンの細胞内蓄積が見出されること<sup>7)</sup>、さらに遺伝子改変技術でエクソン 3 を欠損させ安定化させた変異  $\beta$ -カテニンを腸上皮で発現するマウスで腺腫が多発して見られること<sup>8)</sup>から、 $\beta$ -カテニン蛋白の細胞内蓄積の大腸発癌への関与は決定的となった。

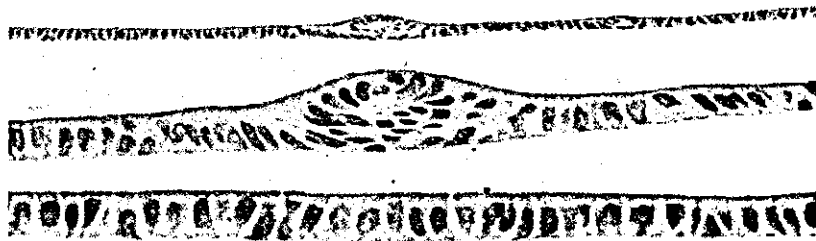
## 蓄積した $\beta$ -カテニンは転写因子 TCF 4 の標的遺伝子の転写活性化をもたらす

細胞内に蓄積した  $\beta$ -カテニンは T-cell factor (TCF)/lymphoid enhancer factor (LEF) ファミリーの転写因子と結合し<sup>9)</sup>、核に移行し、その標的遺伝子の転写活性を誘導することが発癌の直接の原因の有力候補であると考えられているが、現時点で得られている証拠は TCF/LEF の転写活性をネガティブフィードバックで抑制する TCF 1 欠損マウスを FAP の動物モデルである Multiple intestinal neoplasia (Min) マウスに交配すると、腫瘍の発生が増加するという、やや間接的なものである<sup>10)</sup>。TCF/LEF ファミリーは high mobility group (HMG) box とよばれる DNA 結合ドメインをもつ転写因子であるが、そのメンバーの 1 つである TCF 4 (TCF 7L2) のみが、大腸癌細胞に共通に発現しているため、大腸発癌にかかわっていると考えられている。TCF 4 のノックアウトマウスは小腸の絨毛 (villi) のあいだの陰窩 (crypt) の未分化増殖細胞が失われると報告されており、 $\beta$ -カテニンと TCF 4 の転写複合体の機能は未分化腸上皮細胞の維持にかかわっている標的遺伝子の発現を持続させるものと考えられ、 $\beta$ -カテニンの蓄積にて生理的な分化誘導が腸上皮に生じないことが腫瘍の形成につながるものと考えられている<sup>11)</sup>。最近 Wnt シグナルが幹細胞の維持に重要なはたらきをしていることが報告されている<sup>12)</sup>。TCF 4 の標的遺伝子の探索は数多くのラボで試みられ、多数の遺伝子が報告されている<sup>13)</sup>。しかし、これらのうち、どの遺伝子が発癌に決定的にかかわっているのかも現在まで明らかとなっていない。たとえば有力であると考えられていた *Cyclin D1* 遺伝子のノックアウト

Without induction of TCF4B ΔN30



With induction of TCF4B ΔN30



図① ドミナントネガティブ TCF 4 (TCF 4 BΔN 30) の誘導による大腸癌由来 DLD-1 細胞の多層化と、極性の回復  
(Naishiro Y *et al.*, 2001<sup>16)</sup>より許可を得て改変引用)

トマウスと Min マウスをかけあわせ、*Apc* (*Min/+*) *Ccnd1* (-/-) を作製しても、ポリープの発生は失われなかったと報告されている<sup>14)</sup>。おそらく複数の TCF 4 の標的遺伝子が単独ではなく、共同してはたらき、腫瘍化が起こるのであろう。

### MDR1 は β-カテニンと TCF 4 転写複合体の標的遺伝子である

われわれは β-カテニンと TCF 4 転写複合体形成により発現される標的遺伝子群を同定し、大腸発癌の分子生物学的な機構を解明するために、テトラサイクリン調節性プロモーターによる発現誘導システムを用い、β-カテニンとの結合部位を欠きドミナントネガティブに TCF 4 の転写活性を抑制する TCF 4 BΔN 30 を発現誘導できる大腸癌細胞 DLD-1 Tet-ON TCF 4 BΔN 30 を樹立した<sup>15)</sup>。その後オランダの Clevers ら<sup>11)</sup>も別のスプライスバリエントの TCF 4 E を用いて同様な細胞株を樹立している。β-カテニンによる異常な TCF 4 の転写活性化が細胞にどのような生物学的な影響を及しているのかを明らかにするため、走査型電子顕微鏡、位相差顕微鏡、細胞断面薄切標本作製、tight junction protein、

ZO 1 の免疫蛍光染色、軟寒天内コロニー形成試験などにて TCF 4 BΔN 30 を誘導した大腸癌細胞 DLD-1 細胞の形態の変化を観察した<sup>16)</sup>。β-カテニンによる転写活性の抑制の結果、多層化して増殖する DLD-1 細胞が細胞極性を回復し、正常の腸粘膜の単層円柱上皮を模倣するような形態変化を示すことが明らかになった(図①)。発癌過程を経過した大腸癌細胞においても、β-カテニンによる異常な転写亢進を制御することにより、ある程度の可逆性があることを示唆した。また non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID) であるスリダグに加え、*MDR1* 遺伝子の産物である P-糖蛋白質の阻害薬により DLD-1 細胞の多層化とポリープ状の増殖を抑制することを見出した(図②)<sup>16)</sup>。

このようなポリープ状の増殖はラットの小腸上皮由来の不死化細胞 IEC 6 に N 末の GSK 3 β リン酸化部位を欠き安定化させた β-カテニンの発現<sup>17)</sup>にても誘導されることから(図③)、β-カテニン/TCF 4 の転写活性化による細胞生物学的変化の指標に適しているものと考えられた。

われわれは当時出はじめであった 2 色蛍光プローブによる cDNA microarray を用いて約 7 千遺伝子について

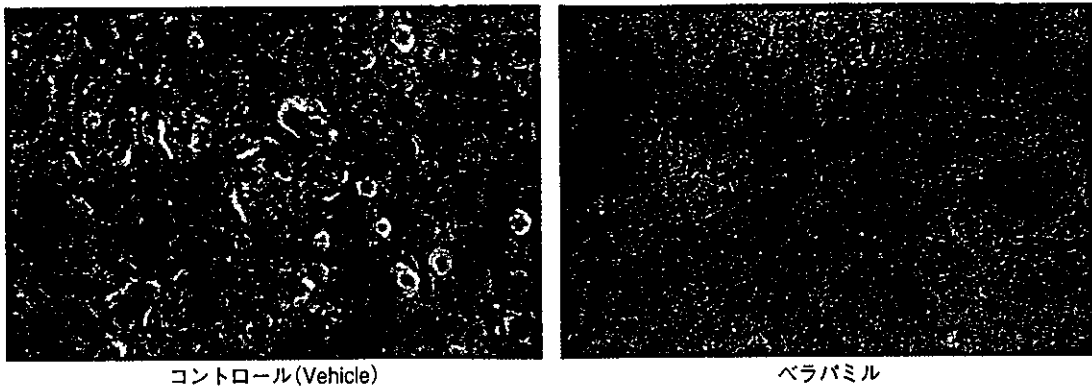


図2 P-糖蛋白質の阻害薬ベラバミルによるDLD-1細胞のポリープ状の増殖の抑制  
(Naishiro Y *et al*, 2001<sup>16)</sup>より許可を得て改変引用)

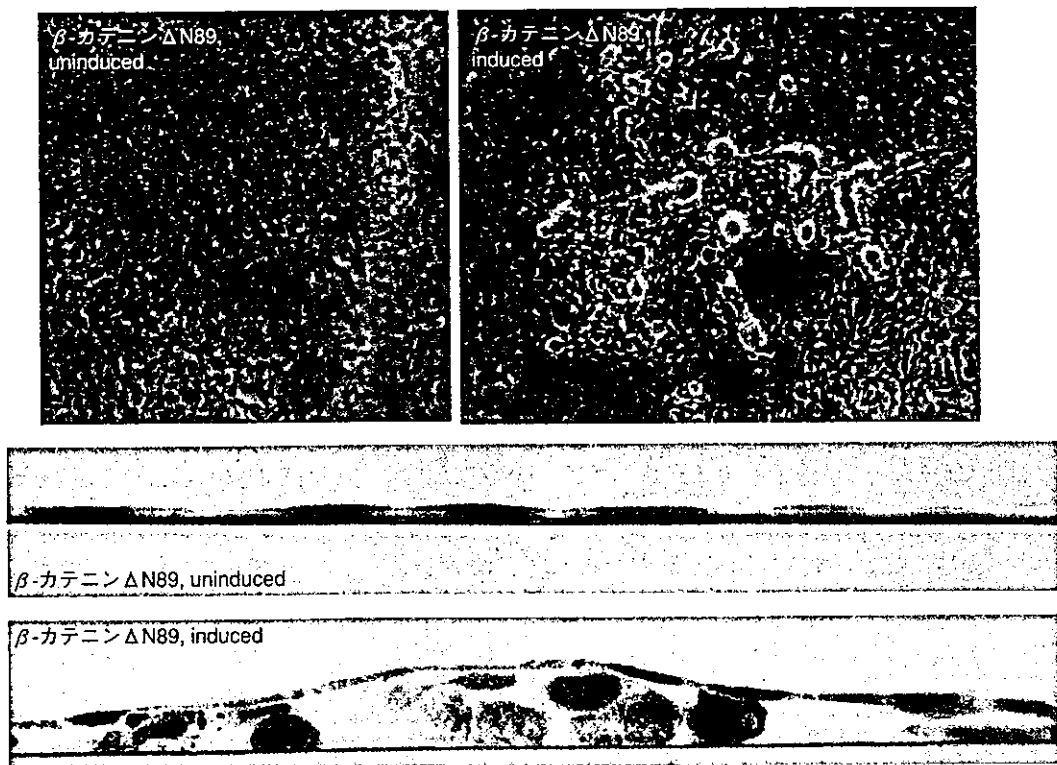


図3 安定化β-カテニン(β-カテニンΔN89)の誘導によるラット非腫瘍性腸上皮細胞IEC6のポリープ状の増殖  
(Yamada T *et al*, 2003<sup>18)</sup>より許可を得て改変引用)

テトラサイクリン誘導前後での発現変化を解析した。その結果、ドミナントネガティブTCF4の誘導にて発現抑制される遺伝子として *multidrug resistance gene-1* (*MDR1*)を同定した。*MDR1* 遺伝子のプロモーター領域には複数のβ-カテニン/TCF4応答部位があり、実際に家族性大腸腺腫症患者の腺腫組織でβ-カテニンの細胞

内蓄積と相応した*MDR1* 遺伝子産物p-糖蛋白質の発現亢進を証明した(図4)。*MDR1* 遺伝子は大腸上皮細胞においてβ-カテニンとTCF4の転写複合体の直接の標的遺伝子の1つであると結論した<sup>15)</sup>。

さらに*MDR1* 遺伝子の大腸発癌における機能的な関与を明らかにするために、*Mdr1* と *Apc* (*Min/+*) の複

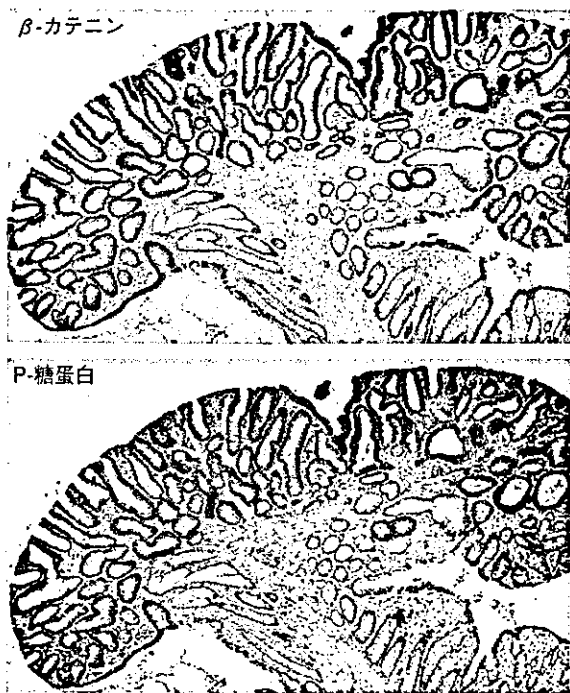


図4 FAP症例の腺腫組織におけるβ-カテニンとP-糖蛋白質の発現  
(Yamada T *et al*, 2000<sup>18)</sup>より許可を得て改変引用)

合遺伝子変異マウスを作成した。Apc (Min/+) Mdr1a/b (-/-) の個体は Apc (Min/+) mdr1a/b (+/+) の個体に比較して、腸管におけるポリープが半減することを見出した(図5)<sup>18)</sup>。大腸発癌の分子機構の理解に大きく貢献するとともに、大腸の発癌予防薬の開発にもつながる可能性がある重要な知見であると考えられた。事実、われわれの動物実験と同様の結果を後に九州大学の和田守正助教授らのグループ<sup>19)</sup>も報告し、またカナダの Victor Ling 教授らのグループ<sup>20)</sup>は P-糖蛋白質の阻害薬 PSC-833 を用いて、β-カテニンあるいは Wnt シグナル伝達系の異常が発癌に関与していると考えられている肝癌や、乳癌の発生をラットを用いた動物実験で抑制したと報告している。また東京大学の鶴尾隆教授らのグループ<sup>21)</sup>は P-糖蛋白質の阻害薬 MS-209 を開発し、すでに臨床試験が開始されている。これらの薬剤は抗癌剤耐性克服を目的として開発されたものだが、β-カテニンの細胞内蓄積による発癌予防にも有用であるかもしれない。

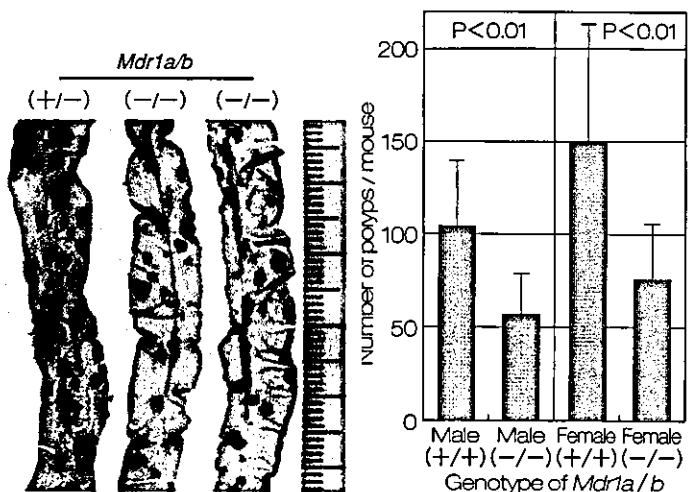


図5 Apc (Min/+) Mdr1a/b (-/-) マウスにおける腸ポリープ形成の抑制  
コントロールの Mdr1a/b (+/+) マウスと比較してポリープ数が半減している。左は肉眼像。  
(Yamada T *et al*, 2003<sup>18)</sup>より許可を得て改変引用)

## おわりに

われわれは現在までに、MDR1 遺伝子がβ-カテニンによる大腸発癌に機能的にかかわっていることを見出した<sup>19)</sup>。われわれは MDR1 の機能阻害薬の使用により、NSAID の効果を増強し、FAP 患者の大腸ポリポージスを抑制する治療法を確立することを最終的な目標としている。その前段階として FAP 患者の動物モデルである Min マウスを用い、MDR1 阻害薬単独あるいは NSAID との併用にてポリポージス抑制効果があるのかどうかを明らかにすることを目的とした研究を計画中である。最近β-カテニンと TCF4 の結合を阻害する低分子化合物が発見されてきた<sup>22)</sup>。広範な全結腸切除が必要とされる FAP 患者や大腸ポリープの切除を受けた患者での薬物による予防的治療が可能になれば、その社会的な恩恵は計り知れないものと考えられる。



## 文献

- 1) Nakamura Y, Nishisho I, Kinzler KW *et al*: Mutations of the adenomatous polyposis coli gene in familial polyposis coli patients and sporadic colorectal tumors. *Princess Takamatsu Symp* 22: 285-292, 1991

- 2) Powell SM, Zilz N, Beazer-Barclay Y *et al* : APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis. *Nature* **359** : 235-237, 1992
- 3) Knudson AG Jr, Hethcote HW, Brown BW : Mutation and childhood cancer : a probabilistic model for the incidence of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA* **72** : 5116-5120, 1975
- 4) Kinzler KW, Vogelstein B : Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* **87** : 159-170, 1996
- 5) Kikuchi A : Tumor formation by genetic mutations in the components of the Wnt signaling pathway. *Cancer Sci* **94** : 225-229, 2003
- 6) Sparks AB, Morin PJ, Vogelstein B *et al* : Mutational analysis of the APC/ $\beta$ -catenin/Tcf pathway in colorectal cancer. *Cancer Res* **58** : 1130-1134, 1998
- 7) Inomata M, Ochiai A, Akimoto S *et al* : Alteration of beta-catenin expression in colonic epithelial cells of familial adenomatous polyposis patients. *Cancer Res* **56** : 2213-2217, 1996
- 8) Harada N, Tamai Y, Ishikawa T *et al* : Intestinal polyposis in mice with a dominant stable mutation of the  $\beta$ -catenin gene. *EMBO J* **18** : 5931-5942, 1999
- 9) Behrens J, von Kries JP, Kuhl M *et al* : Functional interaction of  $\beta$ -catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature* **382** : 638-642, 1996
- 10) Roose J, Huls G, van Beest M *et al* : Synergy between tumor suppressor APC and the  $\beta$ -catenin-Tcf4 target Tcf1. *Science* **285** : 1923-1926, 1999
- 11) van de Wetering M, Sancho E, Verweij C *et al* : The  $\beta$ -catenin/TCF-4 complex imposes a crypt progenitor phenotype on colorectal cancer cells. *Cell* **111** : 241-250, 2002
- 12) Rattis FM, Voermans C, Reya T : Wnt signaling in the stem cell niche. *Curr Opin Hematol* **11** : 88-94, 2004
- 13) Wong NA, Pignatelli M :  $\beta$ -catenin-a linchpin in colorectal carcinogenesis? *Am J Pathol* **160** : 389-401, 2002
- 14) Wilding J, Straub J, Bee J *et al* : Cyclin D1 Is Not an Essential Target of  $\beta$ -Catenin Signaling During Intestinal Tumorigenesis, but It May Act as a Modifier of Disease Severity in Multiple Intestinal Neoplasia (Min) Mice. *Cancer Res* **62** : 4562-4565, 2002
- 15) Yamada T, Takaoka AS, Naishiro Y *et al* : Transactivation of the multidrug resistance 1 gene by T-cell factor 4/ $\beta$ -catenin complex in early colorectal carcinogenesis. *Cancer Res* **60** : 4761-4766, 2000
- 16) Naishiro Y, Yamada T, Takaoka AS *et al* : Restoration of epithelial cell polarity in a colorectal cancer cell line by suppression of  $\beta$ -catenin/T-cell factor 4-mediated gene transactivation. *Cancer Res* **61** : 2751-2758, 2001
- 17) Seike M, Kondo T, Mori Y *et al* : Proteomic analysis of intestinal epithelial cells expressing stabilized  $\beta$ -catenin. *Cancer Res* **63** : 4641-4647, 2003
- 18) Yamada T, Mori Y, Hayashi R *et al* : Suppression of intestinal polyposis in Mdr1-deficient Apc<sup>Min/+</sup> mice. *Cancer Res* **63** : 895-901, 2003
- 19) Mochida Y, Taguchi K, Taniguchi S *et al* : The role of P-glycoprotein in intestinal tumorigenesis : disruption of mdr1a suppresses polyp formation in Apc<sup>Min/+</sup> mice. *Carcinogenesis* **24** : 1219-1224, 2003
- 20) Kankesan J, Vanama R, Yusuf A *et al* : Effect of PSC 833, an inhibitor of P-glycoprotein on N-methyl-N-nitrosourea induced mammary carcinogenesis in rats. *Carcinogenesis* **25** : 425-430, 2004
- 21) Naito M, Tsuruo T : New multidrug-resistance-reversing drugs, MS-209 and SDZ PSC 833. *Cancer Chemother Pharmacol* **40** : S20-S24, 1997
- 22) Lepourcelet M, Chen YN, France DS *et al* : Small-molecule antagonists of the oncogenic Tcf/ $\beta$ -catenin protein complex. *Cancer Cell* **5** : 91-102, 2004

やまだ・てっし

---

山田哲司 国立がんセンター研究所化学療法部・腫瘍プロテオミクスプロジェクト部長

広島県生まれ。

専門は、腫瘍病理学。研究テーマは、プロテオミクス、アクチン細胞骨格と癌の浸潤と転移の分子機構、大腸発癌。趣味は、音楽・ミュージカル鑑賞。

---

トピックス

難治がんの早期診断マーカーの探索

本 田 一 文   山 田 哲 司

検 査 と 技 術

第 33 卷 第 2 号 別刷

2005 年 2 月 1 日 発行

医学書院

TNF- $\alpha$ )である。TNF- $\alpha$ は脂肪細胞でも高発現すること<sup>9)</sup>、TNF- $\alpha$ 遺伝子や受容体の欠損マウスを肥満状態にしてもインスリン抵抗性が惹起されないこと、すなわちTNF- $\alpha$ はその受容体を介してインスリン抵抗性を惹起することが明らかにされている<sup>10)</sup>。

## ■症例

図に筆者らが経験した、歯周炎を合併した2型糖尿病患者に対する歯周病治療に伴う上記検査値の変動を示す。本患者は50歳代の男性で糖尿病歴は10年である。体格指数(body mass index, BMI)は26.4(kg/m<sup>2</sup>)と軽度肥満であり、内因性のインスリン分泌能は保たれているのみでなくむしろ亢進していた。歯科治療開始前3か月間のヘモグロビンA<sub>1c</sub>は7%前後であり、重度の歯周炎を併発していた。患者の歯周ポケット内細菌を局所抗生剤で徹底的に駆逐するとともに、歯表面の汚れを機械的に除去した。治療開始3か月後、ヘモグロビンA<sub>1c</sub>は5.8%に低下し、上記3種類の検査項目(歯周病菌に対する血清IgG抗体価、高感度CRP、TNF- $\alpha$ )はいずれも検査値が低下した。内因性のインスリン分泌が著明に低下したこと、ヘモグロビンA<sub>1c</sub>の低下はインスリン抵抗性の改善を介してもたらされたものと考えられた。

## おわりに

一般にインスリン感受性を低下させる軽微な慢性炎症の代表格は、肥満症であると考えられている。実際、肥満患者の内臓脂肪組織はTNF- $\alpha$ に代表されるインスリン抵抗性惹起分子を複数、高発現すること、また肥満患者では高感度CRP値が上昇しており体重減少とともに低下することが知られている。しかしながら、わが国においても糖尿病患者数が激増しているとはいえ、実際に欧米人にみられるような著明な肥満症を基盤として発症する糖尿病は、むしろ稀である。歯周炎は糖尿病患者で高頻度に発症・重症化しやすいことから、今後肥満のみでなく口腔内の炎症にも十分配慮する必要がある。

## 文 献

- 1) L e H : Periodontal disease. The sixth complication of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 16 : 329-334, 1993
- 2) Iwamoto Y, Nishimura F, Nakagawa M, et al : The effect of antimicrobial periodontal treatment on circulating tumor necrosis factor-alpha and glycated hemoglobin level in patients with type 2 diabetes. *J Periodontol* 72 : 774-778, 2001
- 3) Murayama Y, Nagai A, Okamura K, et al : Serum immunoglobulin G antibody to periodontal bacteria. *Adv Dent Res* 2 : 339-345,

1988

- 4) Ridker PM, Cushman M, Stampfer MJ, et al : Inflammation, aspirin, and the risk of cardiovascular disease in apparently healthy men. *N Engl J Med* 336 : 973-979, 1997
- 5) Rattazzi M, Puato M, Faggin E, et al : C-reactive protein and interleukin-6 in vascular disease : culprits or passive bystanders? *J Hypertens* 21 : 1787-1803, 2003
- 6) Nishimura F, Taniguchi A, Iwamoto Y, et al : *Porphyromonas gingivalis* infection is associated with elevated C-reactive protein in nonobese Japanese type 2 diabetic subjects. *Diabetes Care* 25 : 1888, 2002
- 7) Iwamoto Y, Nishimura F, Soga Y, et al : Antimicrobial periodontal treatment decreases serum C-reactive protein, tumor necrosis factor-alpha, but not adiponectin levels in patients with chronic periodontitis. *J Periodontol* 74 : 1231-1236, 2003
- 8) Taniguchi A, Nagasaka S, Fukushima M, et al : C-reactive protein and insulin resistance in non-obese Japanese type 2 diabetic patients. *Metabolism* 51 : 1578-1581, 2002
- 9) Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. : Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 259 : 87-91, 1993
- 10) Uysal KT, Wiesbrock SM, Marino MW, et al : Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF-alpha function. *Nature* 389 : 610-614, 1997

( \* 岡山大学大学院医歯学総合研究科病態機構学講座 )  
 歯周病態学分野・助教授  
 ☎700-8525 岡山市鹿田町2-5-1

## 難治がんの早期診断マーカーの探索

ほんだかずみ やまだてつし  
 本田一文\*・山田哲司\*

### はじめに

進行がんの治療は現在利用可能な医療技術をもってしても治癒困難な場合は少なくない。高感度で高特異度を有する検出方法を用いて微小がんを発見し、早期に治療を開始する以外には、予後の改善に大きな期待が持てないのが現状である。そのためには、多数の被検者を効率よく非侵襲的にスクリーニングできる診断マーカーの開発が急務である。近年、バイオテクノロジーの基礎研究領域において急速な技術革新がなされ、蛋白質を全体としてとらえて研究するプロテオミ



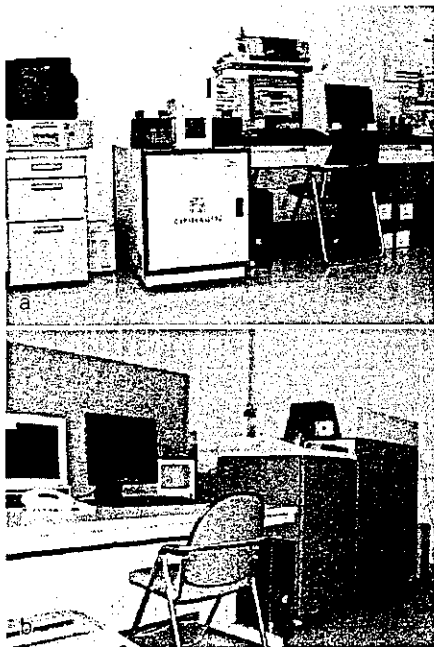


図1 プロテインチップ測定用質量分析装置  
a: 飛行時間型質量分析装置, b: 四重極飛行時間型質量分析装置。

クス技術が診断マーカーの探索法として注目を集めるようになってきた。プロテインチップと質量分析装置を組み合わせた SELDI-TOF-MS (surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, 表面エンハンス型レーザー脱イオン化質量分析法) で得られた質量データを、機械学習アルゴリズムを用いて解析することにより、一見特異性がないように思われる血漿・血清中に含まれる蛋白質・ペプチドの数値データからも早期がんが高い判別率で診断できるという報告がなされている<sup>1)</sup>。

本稿では SELDI-TOF-MS の原理, MS データからのマーカー探索法, 臨床検査への応用について述べる。

#### ■ SELDI-TOF-MS の原理

SELDI-TOF-MS は金属板表面に蛋白質を分離・捕捉するための性質を付加してあるプロテインチップと飛行時間型質量分析装置を組み合わせた解析法である(図1)。血液サンプルを解析する場合, 化学修飾チップがよく利用される。化学修飾チップには逆相, 陽イオン交換, 陰イオン交換, IMAC(金属イオン固定化  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Ga}^{3+}$  など), 順相などのチップがある。血液サンプルをあらかじめ変性, イオン交換などを用いて分画し複雑度を低下させる。この分画液をプロテインチップ上に微量(20  $\mu\text{l}$  程度)添加し, チップ上でアフィニティークロマトグラフィーを行う。チップに捕捉された蛋白質・ペプチドは, 特化された

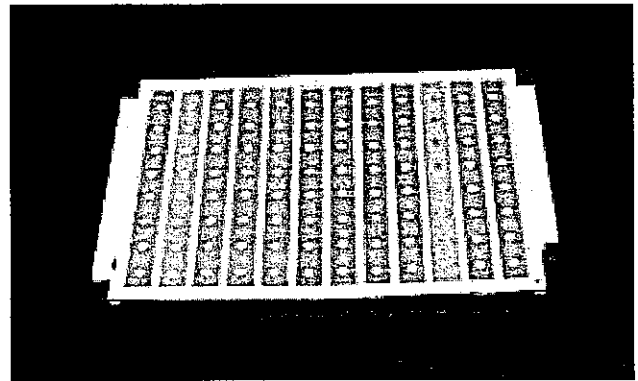


図2 プロテインチップ

直径 2 mm の金属板の表面に蛋白質に親和性を持つ各種官能基が修飾されている。チップ上でアフィニティークロマトグラフィーが可能でチップに親和性を持つ, 蛋白質・ペプチドを選択的に捕捉できる。

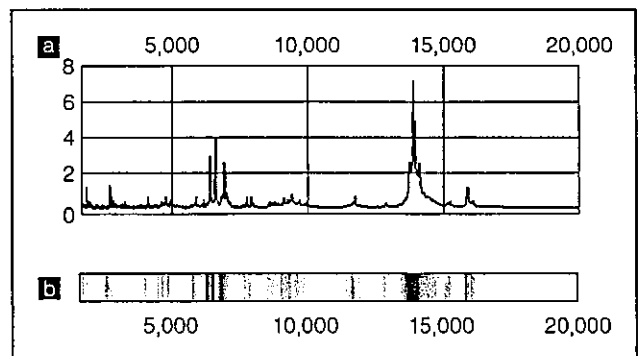


図3 SELDI-TOF-MS で測定されたピークイメージ

a: ヒト血漿サンプルから得られたピークプロファイル。  
b: ピークプロファイルをゲルイメージで観察したもの。

質量分析装置を用いて定量的に質量分析される(図2)。

#### ■ マーカー探索

イオン化された蛋白質・ペプチドの質量情報は図3が示すような波形として定量的に可視化される。これらピークの中からがん特異的な蛋白質を探索する。実際には単一のピークだけでがんとがん以外の疾患を区別することは困難なことが多い。そこで, 単一の生物学マーカーから診断するという従来の考えかたではなく, 人工知能などに応用される機械学習アルゴリズム(サポートベクターマシーン, ニューラルネットワーク, ファジーニューラルネットワーク)を利用する。年齢, 性別, 採血時期, 採血方法, 保存方法などを合致させた疾患群と対象群を学習セットとして用意する。この学習セットを用いてコンピューターにがん患者群と対象群のピークパターンを学習させる。さらに学習セットから得られたがんとそれ以外を区別するパターンに寄与するデータセットを抽出する。データセットが厳密に定義されれば, その後に臨床情報が付

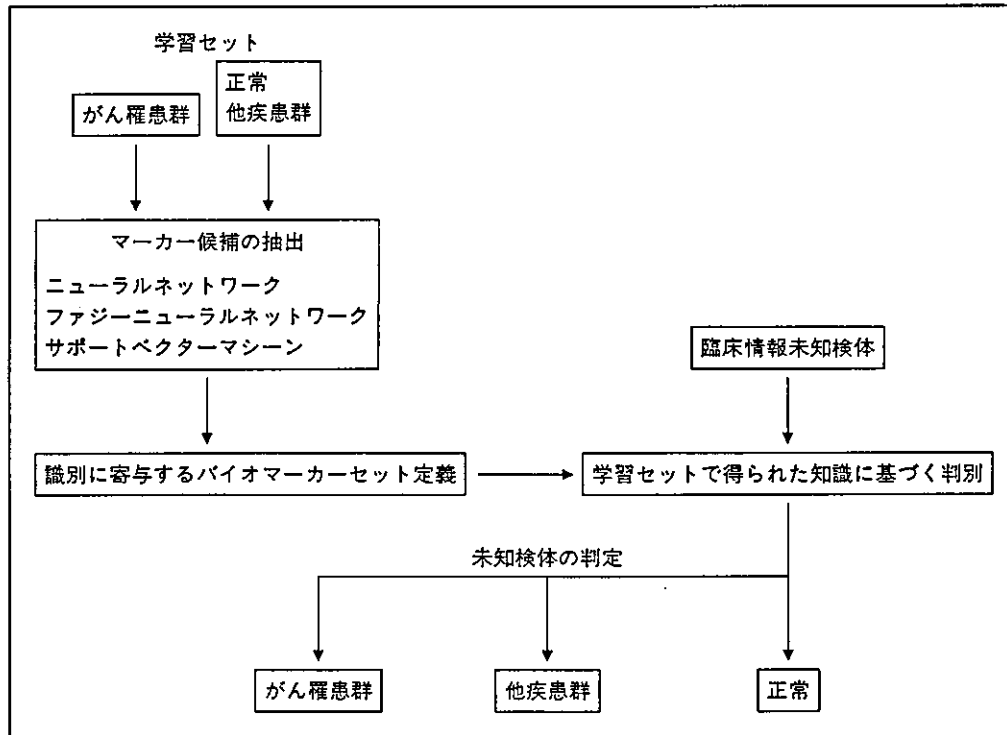


図4 マーカー探索の流れ

帯していないサンプルが持ち込まれたとしても高い判別率でがんか否かを判定することが可能である(図4)<sup>2)</sup>。

#### ■ 臨床検査への応用

SELDI-TOF-MSによるデータに高い再現性が得られれば、ピークパターンを用いた臨床検査法の開発が期待される。機械学習法で抽出されたピークは、より精密な質量分析法を用いることにより、そのアミノ酸構造を決定することが可能である。決定されたアミノ酸構造から特異抗体を作製すれば、酵素免疫測定法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)などによる生化学検査を用いることにより、質量分析装置を有しない一般施設などでもスクリーニング検査が可能になると考えられる。

#### おわりに

筆者らは現在、上記の方法を用いて臨床的に早期発

見が難しいとされる膵臓がんの診断マーカーの開発を行っている。たしかに罹患者と非罹患者を区別することができるピークプロファイルは存在するようである。臨床検査として本法を成功に導くには、ピークプロファイルを厳密に判別するための多数の学習セットサンプルが必要である。さらに症例数を拡大させ、より正確なピークプロファイルを抽出したいと考えている。

#### 文献

- 1) Petricoin EF, Ardekani AM, Hitt BA, et al: Use of proteomic patterns in serum to identify ovarian cancer. *Lancet* 359: 572-577, 2002
- 2) 青島健: プロテオミクス総論. *Cognition and Dementia* 3: 217-231, 2004

( \* 国立がんセンター研究所化学療法部・  
腫瘍プロテオミクスプロジェクト  
〒104-0045 東京都中央区築地5-1-1 )



ELSEVIER

Clinica Chimica Acta xx (2005) xxx–xxx



www.elsevier.com/locate/clinchim

## Pilot study of arbitrarily primed PCR-single stranded DNA conformation polymorphism analysis for screening genetic polymorphisms related to specific phenotypes

Masato Maekawa<sup>a,\*</sup>, Terumi Taniguchi<sup>a</sup>, Takeshi Uramoto<sup>a</sup>, Hitomi Higashi<sup>a</sup>, Toshinobu Horii<sup>a</sup>, Akihiro Takeshita<sup>a</sup>, Haruhiko Sugimura<sup>b</sup>, Masao Kanamori<sup>c</sup>

<sup>a</sup>Department of Laboratory Medicine, Hamamatsu University School of Medicine, 1-20-1 Handayama, Hamamatsu 431-3192, Japan

<sup>b</sup>First Department of Pathology, Hamamatsu University School of Medicine, Hamamatsu, Japan

<sup>c</sup>Department of Life Sport, Biwako Seikei Sport College, Shiga, Japan

Received 16 November 2004; received in revised form 27 December 2004; accepted 27 December 2004

### Abstract

**Background:** To investigate relationships between phenotypes and genotypes is not simple. We propose a phenotype-to-genotype screening strategy and pooled DNA system. As a pilot study of this strategy, we used arbitrarily primed polymerase chain reaction (AP-PCR) in combination with single-stranded DNA conformation polymorphism (SSCP) to screen for genetic polymorphisms associated with longevity.

**Methods:** Study subjects were separated into 3 age groups, individuals aged >100 years, 90–99 years and 60–69 years. Genomic DNAs were prepared from each individual, pooled to represent the 5 study groups, and then the pooled genomic DNAs were subjected to AP-PCR-SSCP analysis.

**Results:** We found 1 SNP more frequently in senior citizens with longevity. The genotype frequency of the 82133G>A polymorphism of human chromosome 3 clone RP11-61K12 (AC011199) differed significantly ( $P=0.0189$ , Fisher's exact test) between older subjects (>90 years) and younger subjects (<70 years). It is noteworthy that the strategy we describe herein was useful for identifying an SNP that showed statistically significant differences in its distribution across the subject groups.

**Conclusions:** The pooled DNA strategy and quantitative genotype discrimination can also be applied to screening for the relationship between phenotype and genotype more effectively.

© 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Arbitrarily primed PCR; Genetic polymorphism; Phenotype; Single stranded DNA conformation polymorphism

\* Corresponding author. Tel.: +81 53 435 2721; fax: +81 53 435 2794.

E-mail address: mmaekawa@hama-med.ac.jp (M. Maekawa).

## 1. Introduction

Associations between phenotypes and single nucleotide polymorphisms (SNPs) or other polymorphisms, including insertions and deletions, have been shown by exhaustive screening of polymorphisms by sequencing and by etiological studies of genotype–phenotype correlations. This genotype-to-phenotype approach is useful; however, exhaustive screening is expensive and labor intensive. Relationships between phenotypes and genotypes have also been investigated by use of candidate genes for the phenotype. However, much effort cannot always lead to a good result [1]. Here we propose the reverse process, a phenotype-to-genotype screening strategy and pooled DNA system. In essence, we screened for common genotypes in pooled DNAs of individuals with a common phenotype. As a pilot study of this strategy, we used arbitrarily primed polymerase chain reaction (AP-PCR) [2] in combination with single-stranded DNA conformation polymorphism (SSCP). This technique takes advantage of the random nature of AP-PCR and the quantitative and resolution abilities of SSCP [3,4]. We used this method to screen for genetic polymorphisms associated with longevity.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Subjects

Study subjects were separated into 3 groups, individuals aged >100 years ( $n=9$ ), 90–99 years (3 sub-groups,  $n=8$  each group), and 60–69 years ( $n=9$ ). As a control group, we included 27 volunteers <30 years recruited from among medical students.

### 2.2. AP-PCR-SSCP

Genomic DNAs were prepared from each individual and then pooled to represent the 3 age groups described above. The pooled genomic DNAs were subjected to AP-PCR-SSCP analysis. Sequences of the primers used are shown in Table 1. Amplification conditions for AP-PCR were 94 °C for 3 min followed by 5 cycles of 94 °C for 1 min, 42 °C for 1 min, and 72 °C for 2 min, 35 cycles at 94 °C

Table 1  
Primer sequences for the present study

Primer name	Primer sequence (5' to 3')
LDAcDF1	ACCGCCCGACGTGCATTCCC
LDAcDF2	CGCCCGACGTGCATTCCCGA
LDHA-m3	GTAATTATCATGGCTGGGACAT
Ae6F	TGAGGTGATCAAACCTCAAAGGC
Ae6R	CTTAATCATGGTGAAACTGGG
BAT26F	TGACTACTTTTGACTTCAGCC
BAT26R	AACCATTCAACATTTTAAACC
MS3(A)F2	CCAGCTATCTTCTGTGCATC
UF1KABI	CGAATCGCATGGCCTTG
EU1KABI	TTCTCAGGCTCCCTCTCC
p16RNA1	CCCGTTTCGTAGTTTTCAT
p16RNA2	TTATTTGAGCTTTGGTTCTG
D16S521L	GGAGCGAGACTCCGTCTAAA
D9S287L	GAGGATGCTCCTCACGC
NCC-COMM	AGGAATTCTTTTCTTNCAG

for 0.5 min, 55 °C for 0.5 min, and 72 °C for 1 min, and a final cycle of 72 °C for 7 min. The amplified products were analyzed by SSCP with 6–10% polyacrylamide gel electrophoresis and silver staining detection (Daiichi Pure Chemicals, Tokyo, Japan) [4]. SSCP bands with different visual densities or mobilities were excised from the gel and cloned into pGEM-T (Qiagen, Tokyo, Japan) for sequencing (PE Applied Biosystems, Tokyo, Japan). Nucleotide sequences were searched with BLAST [5]. Gene-specific primers were synthesized and used for genotyping of individual genomic DNAs in 3 age groups and a control group of volunteers by PCR-SSCP and/or DNA sequencing.

### 2.3. Statistical analysis

Pearson's  $\chi^2$  test and Fisher's exact test were used to compare allele and genotype frequencies between study groups. To analyze allele frequencies between the four age categories, the Kruskal–Wallis non-parametric test was used. Statistical significance was accepted at  $P<0.05$ .

## 3. Results and discussion

From a polyacrylamide gel of AP-PCR-SSCP (Fig. 1), we found 1 suspected band with different densities. By nucleotide sequence, it was originated from the 82133G>A polymorphism of human