

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21791309

研究課題名(和文)

自作ゲノムアレイによる癌関連遺伝子群の抽出と診断法の確立

研究課題名(英文)

Establishment of diagnostics of cancer using custom made genome microarray.

研究代表者

村山 裕治 (MURAYAMA YUJI)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：40327656

研究成果の概要(和文):

ゲノムマイクロアレイは次世代シーケンサーに比べて低コスト・簡便・迅速に検査を行うことができ、得られた結果から即座に FISH 解析へ移行する事も可能である。

高密度 BAC マイクロアレイを平成 16 年 12 月より自前で作製している。また、これまでの研究において検出感度の向上、実験の簡便化、専用スキャナーを使用することなく肉眼でシグナルを確認できる方法を独自に開発し、簡易検査装置の作製も行った。

研究成果の概要(英文):

Genomic micro array is possible to inspect low cost, handily, and promptly compared with the next generation sequencer, and immediately shifts from the result of obtaining to the FISH analysis.

High density BAC microarray has been made by us, since December, 2004. Moreover, the method by which the signal was able to be confirmed improving the detection sensitivity in a current research, and using without making of the experiment handy nor a special scanner with the unassisted eye was originally developed, and the simple inspection device was made.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：遺伝子・癌・ゲノム・マイクロアレイ・CGH・LOH・染色体・BAC

## 1. 研究開始当初の背景

癌細胞における染色体異常(転座と異数性変化)や特定遺伝子の変異(融合やコピー数の増減)は広く知られている。このような変化を検出するために用いられている方法として、FISH 法は簡便であるが特異的なプローブに制限がある、また染色体 CGH 法はゲノムワイドに異常を検出できるが解像度が低い。一方、Array based CGH (aCGH) 法は DNA セグ

メントの欠失や増幅をゲノムワイドに且つ微少な DNA 領域がヘテロで欠失していても検出できるほどの感度を有する。従って、癌のゲノム不安定性の研究において BAC マイクロアレイの有用性は計り知れない。しかし我が国では、短いオリゴヌクレオチドの DNA マイクロアレイしか入手できないため日本での aCGH 法の普及は遅れている。所属研究室では既に高品質な BAC マイクロアレイを自作する

ことに成功しており、癌のゲノム不安定性の研究を開始している。このBACマイクロアレイは現在7718個のBACクローンからなるが、使用するDNA量が市販のDNAチップと比較して約1/10で済むほど高感度であり、微量な臨床検体を迅速に処理して有用な情報を再現性良く取得する方法として最適である。

当教室では過去15年間にわたってヒトゲノム解析を推進し、独自に構築したヒトBACライブラリーを駆使してヒト22番、21番、8番染色体のゲノムシーケンシング(Nature, 402: 489-495, 1999, Nature, 405: 311-320, 2000, Nature, 439, 331-335, 2006)、ヒト全ゲノムシーケンスの解読(Nature, 409:860-921, 2001, Nature, 409:934-941, 2001, Nature, 431:931-945, 2004)に貢献した。このBACライブラリーを用いてBACマイクロアレイを作製することにより、ゲノムDNAセグメントの増減を高感度・詳細に解析出来る。すでに3万クローンのBAC末端シーケンスを解読し、ヒトゲノム上にマップして最小重なりとなるよう7,718個のBACクローンを選抜した。これをトリプレットにアレイした23,154スポットのBACマイクロアレイ(BAC Array7700)を作製、ゲノム研究に活用しており、ゲノムDNAセグメントの増減を詳細且つゲノムワイドに解析している。

例えば、食道癌検体の解析からEGFRやCCND1の増幅が検出され、それぞれ予後不良との関連が示唆されている。また14q21の増幅も検出され遠隔転移との関連が示唆されているが、マーカー遺伝子はいまだ同定されていない。また、脳腫瘍の一種であるオリゴデンドログリオーマ(OLG)では、1p、19qがヘテロで欠失していた。このような場合、PCV(carboplatin, ACNU, vincristine)併用化学療法が効果的であるとされているが、当該遺伝子の同定はなされていない。本研究では自作のBACマイクロアレイを駆使して各種の癌組織から新たな癌マーカーを探索するとともに治療の指針となる癌の種類に特化したDNA診断法を確立することを目指す。

## 2. 研究の目的

自作のBACマイクロアレイを駆使して各種の癌組織から新たな癌マーカーを探索するとともに、治療の指針となる癌の種類に特化したDNA診断法を確立することを目指す。特に、BACマイクロアレイ(BAC Array7700/BAC Array15000)を用いて検出されたDNAセグメントの増減に該当する領域(個別のBACクローン)に含まれる遺伝子(群)から、癌のマーカーとなり得る遺伝子(オンコジーンやサプレッサージーンなど)を同定する。そのために、バイオインフォーマティクスに

よる遺伝子構造/機能の推定、遺伝子発現解析、DNA・クロマチンのメチレーション部位検出、遺伝子DNAの導入による細胞のトランスフォーメーションやアポトーシスなどの解析を行う。さらに、悪性度や転移などの臨床データとの関連性などを照合して癌の種類に共通あるいは特徴的な新規遺伝子マーカーを同定し、最終的には既知のマーカーと組み合わせることで簡便かつ迅速正確に行える癌のDNA診断チップを確立する。自作のBAC Array7700/BAC Array15000から得られる知見は計り知れず、遺伝子異常に基づく癌の臨床診断(個別の治療方針決定や予後予測)、発症前診断による個別化予防への応用が期待される。本研究のために必要な癌組織は共同研究者から提供され癌組織バンク(食道、胃、腸、肝、胆嚢、膵臓など)が構築されている。

## 3. 研究の方法

### (1)癌組織バンクの構築:

慶應義塾大学病院外科(北島政樹教授)等の協力のもとに食道癌、胃癌、小・大腸癌、肺癌などを収集し癌組織バンクを既に構築したが、さらに検体数と癌の種類(肝癌、胆嚢癌、膵癌など)を充実させる。検体は可能な限り術前血液、癌組織、正常組織の採取を協力臨床医に依頼する。また、申請者が手術室隣室で待機し、組織を3分割した後、直ちに液体窒素で凍結し保存する。3分割した組織は、RNA、タンパク質、DNA抽出用とし、必要な場合は連続切片を作製する。以下、自作のBACマイクロアレイを駆使して各種の癌組織から新たな癌マーカーを探索するとともに、治療の指針となる癌の種類に特化したDNA診断法を確立することを目指す。

### (2)BAC Array7700/BAC Array15000によるゲノム不安定性の検定(注1):

癌組織と正常組織からのDNAをCy3/Cy5で蛍光標識後、自作のBACマイクロアレイ(BAC Array7700/BAC Array15000)を用いて、確立したプロトコールに従ってハイブリダイゼーション、スキャンニング、イメージ解析を行いDNAセグメントの増減を検出する。次に、それらのDNAセグメント(個別のBACクローン)に含まれる遺伝子(群)を専用データベースから探索、同定する。

(注1) BACマイクロアレイを作製する際のスライドガラスは、現在、米国アマーシャム社製CodeLinkを用いているが、本研究期間内に、ニトロセルロースで被膜されたスライドガラスを使用することによって、充填DNAの増量を計りさらに高感度なマイクロアレイに改良する。

(3)バイオインフォーマティクスによる遺伝子構造 / 機能の推定 :

同定した遺伝子 (群) のゲノム構造、産生されるタンパク質のモチーフやドメイン、機能などをバイオインフォーマティクスの手法で推定し、癌のマーカーとなる可能性の高い遺伝子 (オンコジーンやサプレッサージーンなど) を選抜、特定する。

(4)遺伝子発現およびクロマチン DNA メチレーション :

当該遺伝子の発現の変動は検体から調製した RNA 標品を用いて、RT-PCR およびノーザンプロット法で解析する。クロマチンあるいは DNA メチレーションについても所属研究室で日常的に行われている手法を用いて検討する。

(5)癌マーカーとしての有効性の検定実験 :

当該遺伝子の全長 cDNA をクローニングし発現ベクターに組み込んだ後に、マウス 3T3 細胞にリポフェクチン法で導入して細胞のトランスフォーメーションやアポトーシスを惹起するか否かを観察することによってオンコジーンかサプレッサージーンかなどを検定する。必要に応じて、当該遺伝子を含む BAC-DNA をマウス受精卵に注入して胚発生の過程を追跡し、癌化を観察する。

(6)癌に共通あるいは癌の種類に特徴的な新規遺伝子マーカーの同定 :

有効性が示唆された新規癌マーカー (遺伝子) に関して、悪性度や転移などの臨床データとの関連性を照合する。この際、臨床病理データ (転移や再発、予後、有効な治療方法など) と実験データ (DNA セグメント変動領域のサイズ、増減の度合など) の詳細な比較検討を行うことによって、癌の DNA 診断が有効な治療の指針となるように、新たなチェックポイントを見いだすことに専念する。

(7)癌の種類に特化した小型 DNA 診断チップの作製 (注 2) :

最終的には既知の癌マーカーと組み合わせる簡便かつ迅速正確に行える癌の種類毎の小型 DNA 診断チップを作製する。この場合、コントロールも含めて 10-400 個の厳選されたマーカーがスポットされた DNA チップを目指す。例えば、オリゴデンドログリオーマがその例である。このように、自作の BAC Array7700/BAC Array15000 から得られる知見は計り知れず、遺伝子異常に基づく癌の臨床診断 (個別の治療方針決定や予後予測) 発症前診断による個別化予防への応用が期待される。

(注 2) 現在、合成樹脂スライドを用いた BAC マイクロアレイの開発を住友ベークライトと共同で進めている。この場合、いかなる形にもデザインできるため汎用性が飛躍的に増すと期待している。さらに、厳選されたプロンプ (10-400 スポット) のマイクロアレイを使用し、後述の RLS ラベリング法による高感度検出系を用いれば、高価なイメージスキャナーを使用することなく、臨床家が診察室で目視で結果を判定できるようにすることも目指している。そのプロトタイプは成功している。

#### 4. 研究成果

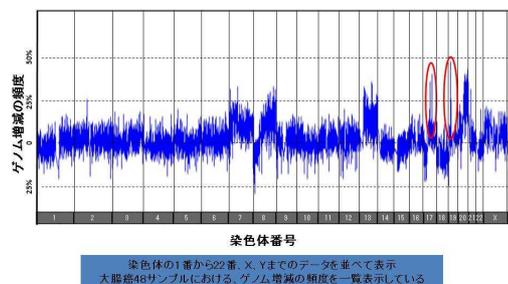
(1) 癌組織バンクの構築 :

慶應義塾大学病院外科 (北島政樹教授) 等の協力のもとに食道癌、胃癌、小・大腸癌、乳癌から約 50 サンプルを採集して癌組織バンクを構築し、3 分割した組織は、RNA、タンパク質、DNA 抽出用とした。

(2) BAC Array7700 によるゲノム不安定性の検定、ゲノム解析 :

BAC Array7700 を用いて食道癌 44 例、胃癌 48 例、大腸癌 48 例、乳癌 48 例のゲノム不安定性解析を行った。大腸癌において既報のゲノム増減頻度とほぼ同じデータを示したが、新たに 2ヶ所のゲノム増幅領域を確認した。その領域は他臓器において、癌リスクとの関連性がゲノムワイドアソシエーション解析によって指摘された領域であり、大腸癌においても関連性を進めている。(下図)

大腸癌のゲノム増減頻度

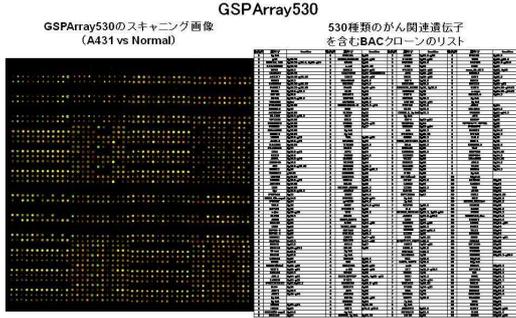


(3) 癌の種類に特化した小型 DNA 診断チップの作製 :

ゲノムマイクロアレイで検出可能な既知の癌マーカーと組み合わせる簡便かつ迅速正確に行える癌の小型 DNA 診断チップを設計・作製した。(下図)

BAC マイクロアレイは次世代シーケンサーに比べて低コスト・簡便・迅速に検査を行うことができ、市販のオリゴアレイと比べて安定したデータを得られることができる。独自に構築した慶應 BAC ライブラリーは日本人由来であり、過去にヒトゲノムシーケンスプロ

## がん研究特化型小規模アレイ



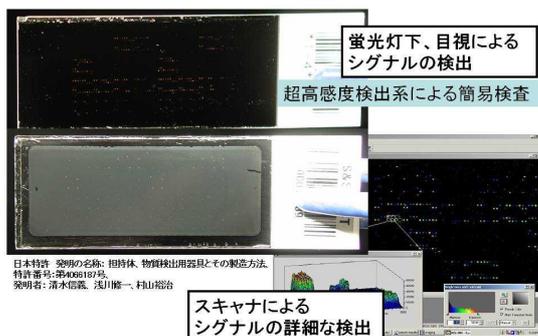
プロジェクトにも使用された実績がある。これを用いて慶應独自のBACマイクロアレイを作製した。当研究室ではマイクロアレイ作製のすべての工程を自前で行っている。選抜した7,718個のBACクローンを、信頼性向上のため同じスポットを3カ所に配置(合計23,154スポット)した高密度BACマイクロアレイを平成16年12月より作製している。(下図)

### BACマイクロアレイの作製

第一世代慶應 BACライブラリー: 平均110kb、10万クローン  
 第二世代慶應 BACライブラリー: 平均160kb、10万クローン  
 これらのライブラリーを自ら構築し、ゲノム解析に活用してきた。



### 簡便なシグナル検出法の開発



また、これまでの研究において検出感度の向上、実験の簡便化、専用スキャナーを使用することなく、蛍光灯下肉眼でシグナルを確認できる方法を独自に開発してきており(下図) 個別化診療を目指した簡易検査装置の作製において、世界的に見て優位に立っている。

## 5. 主な発表論文等

[学会発表](計 5件)

発表者名: 村山裕治

発表表題: Genomic Instability Analysis of Four Tumor Types Using In-house Printed BAC Microarray

学会等名: 第33回日本分子生物学会年会

発表年月日: 平成22年12月9日

発表場所: 神戸

発表者名: 村山裕治

発表表題: Genomic Instability Analysis of Four Tumor Types using Home-made BAC Microarray

自作BACマイクロアレイを用いた胃癌・食道癌・大腸癌・乳癌のゲノム不安定性解析

学会等名: 第69回日本癌学会学術総会

発表年月日: 平成22年9月23日

発表場所: 大阪

発表者名: 村山裕治

発表表題: 自作BACマイクロアレイを用いた胃癌・食道癌・大腸癌・乳癌のゲノム不安定性解析

学会等名: 第17回日本遺伝子診療学会

発表年月日: 平成22年8月7日

発表場所: 津

発表者名: 村山裕治

発表表題: 自作高密度BACマイクロアレイを用いた大腸癌のゲノム不安定性解析

学会等名: 第32回日本分子生物学会年会

発表年月日: 平成21年12月10日

発表場所: 横浜

発表者名: 高柳淳

発表表題: 自作BACマイクロアレイを用いた大腸癌48例のゲノム不安定性解析

学会等名: 第16回日本遺伝子診療学会

発表年月日: 平成21年7月31日

発表場所: 札幌

[その他]

なし

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

村山 裕治 (MURAYAMA YUJI)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号: 40327656

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし