

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 20 日現在

機関番号：82502

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22510215

研究課題名（和文） 放射線感受性相関ハプロタイプ多型マーカーの実験的解析

研究課題名（英分） Experimental determination of haplotypes in radiosensitivity-associated genes

研究代表者

道川 祐市 (MICHIKAWA YUICHI)

独立行政法人放射線医学総合研究所・緊急被ばく医療研究センター・主任研究員

研究者番号：20360688

研究成果の概要（和文）：本研究課題では、ヒト凍結保存血液を試料として実験的ハプロタイプ解析するための技術確立および実証実験を行った。放射線感受性との相関が報告されている CD44 遺伝子の SNP 4 個について、検体 50 名分の解析を遂行した。6 検体については再解析を繰り返しても良好な結果が得られず、検体の状態によっては解析が困難な場合もあることが明らかになった。今後機会があれば、技術的な改善を検討していきたく考えている。

研究成果の概要（英文）：In this study, experimental haplotype determination has been conducted using cryopreserved human blood samples. Improvement of technology to remove contaminating small DNA fragments generated by freeze and thaw process was carried out. Four SNPs of the CD44 gene were selected and analysis of 50 frozen human bloods was attempted by this experimental system. Failure of 6 samples indicated that some physical properties of DNA preparation might be affecting suitability for this experimental system. Further improvement should be necessary to overcome this.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ゲノム科学・ゲノム医科学

キーワード：ゲノム、放射線、遺伝子、核酸、1分子計測

1. 研究開始当初の背景

申請者は1塩基置換多型（SNP）を指標として、399名の乳癌患者における放射線誘発正常組織有害反応と相関する遺伝子領域の探索に携わった（文献1）。その結果、細胞分裂時の核染色体分配に関わる PTTG1 遺伝子や細胞間相互作用に関与する細胞膜表面糖タンパク質 CD44 遺伝子など6種類の遺伝子における SNP の組み合わせ（ハプロタイプ

多型）が有意な相関を示すことを明らかにした。ただし、この研究でのハプロタイプ多型は統計学的手法を用いて推測されたものであり、解析対象とした集団レベルでの頻度比較に用途が限定されていた。すなわち、統計学的手法では患者個人におけるハプロタイプ多型の同定が困難であり、将来的なオーダーメイド医療等への個人レベルでの臨床応用を検討することはできなかった。

これは申請者に限定した問題ではなく、ハプロタイプ多型を実験的に直接決定する技術が一般化されていないため限定的な利用に留まっているのが現状である（文献2）。そこで、申請者は独自に igMDA (in-gel Multiple Displacement Amplification) 法と命名した新規技術開発を行い、実験的なハプロタイプ多型直接決定を可能とした（文献3）。

ハプロタイプ多型は同一染色体上における多型の配列情報であるが、それを特定するためにはひと繋りの染色体分子を切れ目無く、かつ相同染色体が混在しないように1分子レベルで解析する必要がある。長さとしては通常数十 kb に及ぶ距離が対象になるが、それを1分子レベルで途切れないように扱うことは非常に困難である。

igMDA 法では、分子生物学実験で日常的に使用されているアガロースゲルで生細胞由来染色体分子を包み込むことにより問題の解決を行った。溶液状態のアガロース内部に生細胞（ヒト血液由来の EB ウィルス形質転換 B リンパ球細胞）を直接添加して希釈分散させてから、小容量ずつ分注して冷却ゲル化させることで1分子レベルの染色体 DNA が単離できる。この条件では希釈に伴う DNA 不安定化をアガロースの存在が緩和するので、細断片化や凝集化されることなくサイズの長い DNA を安定に分離することが可能である。

ゲル化したアガロースに外部から Phi29 DNA ポリメラーゼと6塩基ランダムオリゴヌクレオチドプライマーを添加すると、ゲル内部に両者が侵入し、埋め込まれている DNA を鋳型として10万倍程度まで鎖置換型増幅反応が行われる。この鎖置換型増幅反応は温度サイクルを必要とせず、30℃の一定温度で連続的に反応が遂行されるため、ゲル化状態が維持することで内包されている鋳型 DNA も安定に保持される。反応終了後アガロースゲルを加熱して融解させ、増幅 DNA を水溶液中へ回収する。このようにして回収された1分子由来の増幅 DNA は、特別な処理を施すことなくそのままハプロタイプ多型解析を含めた様々なゲノム研究に用いることができる。

しかしながら、この方法はヒト由来の生細胞試料として EB ウィルス形質転換 B リンパ球細胞を必要としたため、その利用にはやはり制約があった。現実的な臨床応用のためには血液等のヒト由来試料を直接解析試料として利用することが必要である。

文献1 : Suga T. et al. Haplotype-based analysis of genes associated with risk of

adverse skin reactions after radiotherapy in breast cancer patients. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2007;69:685-693.

文献2 : Kwok PY. et al. Single-molecule analysis for molecular haplotyping. *Hum Mutat.* 2004;23:442-446.

文献3 : Michikawa Y. et al. In-gel multiple displacement amplification of long DNA fragments diluted to the single molecule level. *Anal Biochem.* 2008;383:151-158.

2. 研究の目的

本研究計画は申請者が開発した igMDA 法を用いてハプロタイプ多型と放射線感受性の詳細な相関解析を行うことが目的である。まず臨床試料として入手し易い血液を解析試料として利用するための諸実験条件を確立する。その後、50名の放射線治療乳癌患者に由来する血液を用いて、6種類の遺伝子における既知の放射線感受性相関ハプロタイプ多型を実験的に直接決定する。このようにして決定されたハプロタイプ多型と報告済み統計学的推測ハプロタイプ多型との比較を行い、両手法の信頼性を検証する。さらに、同一遺伝子ハプロタイプ組み合わせ（ディプロタイプ）と放射線感受性との相関、及び複数遺伝子ハプロタイプ組み合わせと放射線感受性との相関をそれぞれ統計学的に評価する。

3. 研究の方法

本研究計画の実施期間は3年間を予定しており、各年度予定に対応する下記3段階の計画により遂行される。

第1段階：凍結保存ヒト血液を利用するための諸実験条件検討

第2段階：収集済み凍結保存血液（50名）を用いた実験的ハプロタイプ多型解析

第3段階：実験的ハプロタイプ多型データによる放射線感受性相関解析

4. 研究成果

(1) 研究計画の初年度（平成22年度）は、凍結保存血液をハプロタイプ解析試料として利用するための技術開発を予定通り行った。開発した技術は、①細胞のゲル内埋め込み、②ゲル内拡散、③サイズの小さな DNA 除去、の3点に関連する技術である。

①では、血中細胞に含まれる DNA を抽出せずかつ定量的にアガロースゲルへ埋め込むため、核 DNA を保有する血中細胞のみを簡便

に計数する方法を検討した。その結果、スライドガラス上に血中の全細胞を塗布乾燥してから蛍光色素で核 DNA を染色し、顕微鏡的な観察により正確な計数を行うことにした。

②では、鋳型 DNA が極力細断されない状態で 1 分子レベルの限界希釈するため、既存のゲル内埋め込み実験条件の改善を行った。その結果、80℃で保温状態のアガロースゲル溶液に血中細胞を直接添加し、そのまま振動を与えず保温しながらゲノム DNA を穏やかに自然拡散させる反応条件を確立した。

③では、拡散の過程で生じる細断化 DNA について、DNA が埋め込まれたゲルを電気泳動し、サイズの小さな分子を選択的に取り除くことで、ゲル内に残留する長鎖 DNA の頻度を高めることにした。5 名分の凍結保存血液試料を用いて試行を行ったところ、良好なハプロタイプ解析結果を得ることができた。次年度は解析検体数を 50 名に増やし、統計学的ハプロタイプ推定法と実験的決定法との詳細な比較を行う予定とした。

(2) 次年度 (平成 23 年度) はまず、ハプロタイプ解析技術のさらなる改善を行った。これまでの方法ではアガロースゲル内に埋め込まれた 1 分子レベル DNA の増幅産物を、加熱処理で液状化し回収していた。この溶液は常温に放置すると再固化して、繰り返しの回収効率を低下させていた。そこで、アガロース分解酵素 (ニッポンジーン社、アガラゼ) による液状化処理の導入検討を行った。

アガラゼ処理では液状化した状態が長期間維持され、繰り返し使用の際の回収効率に大きな改善が認められた。その後、ハプロタイプ解析対象として CD44 遺伝子の SNP を 4 個選出し、予定していた検体 50 名分について一通りの解析を遂行した。50 検体中 38 検体については、4SNP を全て含む増幅産物が 96 ウェルの反応セット中で 20 個以内に収まり、かつジェノタイピングの結果全てホモアレルと判定できたものが複数個同定できた。

ホモアレル同士を組み合わせたジェノタイプは元のジェノタイプと矛盾なく、ハプロタイプとして結論づけた。残りの 12 検体については、一度の解析で十分な数の全長ホモアレル産物を得ることができず、再度の解析を最終年度に行う予定とした。全検体のハプロタイプを決定した上で、統計学的なハプロタイプ推定法との比較を行い、論文をまとめる予定とした。

(3) 研究計画最終年度にあたる平成 24

年度は、予定していたヒト 50 検体ハプロタイプ解析を完遂するため、残っていた 12 検体の再解析を行った。38 検体については昨年度までに解析終了しており、対象遺伝子は CD44 で SNP 4 個を選択している。上記 12 検体についても一度解析を試みていたが、良好な結果を得ることができなかった。

再解析の結果、6 検体については SNP を全て含む増幅産物が 96 ウェルの反応セット中で 20 個以内に収まり、かつジェノタイピングの結果全てホモアレルと判定できたものが複数個同定できた。ホモアレル同士を組み合わせたジェノタイプは元のジェノタイプと矛盾なく、ハプロタイプとして結論づけることができた。

しかしながら、再度残った 6 検体については全てを含む増幅産物を得ることができず、検体の DNA が小さく断片化されていることが推測された。そこで、良好な解析が得られた 6 検体と上記 6 検体の断片化状況をアガロースゲル電気泳動法で比較してみたが、特に違いは認められなかった。一分子レベル希釈時に不安定化する可能性を考慮してサイズの長い DNA を濃縮しておくため、アガロースゲル電気泳動法やショ糖密度勾配遠心分離法などで粗分画を行って再解析を行ってみたが、改善は得られなかった。

今回用いた検体は抽出済みヒトゲノム DNA であり、検体ごとの抽出条件もしくは物理的安定性の違いが影響しているものと考えられる。もともとの方法は血液検体中の白血球をそのままアガロースゲル内に埋め込むことで、断片化を防ぎながら穏やかに一分子レベルの希釈を行っていた。本研究課題を遂行することで、抽出済み DNA を出発材料とすると解析が困難な場合もあることが明らかになった。抽出済み DNA でも解析できるようになれば、汎用性が高まる。今後機会があれば、技術的な改善を検討していきたいと考えている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

① K. Sugahara, Y. Michikawa, et al. Combination effects of distinct cores in 11q13 amplification region on cervical lymph node metastasis of oral squamous cell carcinoma. International Journal of Oncology, 2011, 39, 761-769, 査読あり DOI: 10.3892/ijo.2011.1094

② A. Ishikawa, Y. Michikawa et al. Genetic Variants of NPAT-ATM and AURKA are Associated with an Early Adverse Reaction in the Gastrointestinal Tract of Patients with Cervical Cancer Treated with Pelvic Radiation Therapy. International Journal of Radiation Oncology Biology Physics, 2011, 81, 1144-1152, 査読あり
DOI: 10.1016/j.ijrobp.2010.09.012

③ R. Okazaki, Y. Michikawa et al. Dynamics of Delayed p53 Mutations in Mice Given Whole-Body Irradiation at Eight Weeks, International Journal of Radiation Oncology Biology Physics, 2011, 79, 247-254, 査読あり

6. 研究組織

(1) 研究代表者

道川 祐市 (MICHIKAWA YUICHI)

独立行政法人放射線医学総合研究所・緊急

被ばく医療研究センター・主任研究員

研究者番号：20360688