

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月 7日現在

機関番号： 15501

研究種目： 挑戦的萌芽研究

研究期間： 2012～2012

課題番号： 24659278

研究課題名（和文） 血液検査で膵がんになりやすさを判定する方法

研究課題名（英文） Blood DNA test for breast cancer susceptibility

研究代表者

末広 寛 (SUEHIRO YUTAKA)

山口大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号： 40290978

研究成果の概要（和文）：コピー数多型（CNP）は遺伝子多型の一つであり、数千から数万塩基にわたる DNA 領域のコピー数に個人差があるというものである。この CNP は精神疾患を含めた様々な病気との関連が報告されている。これまでに膵がんとの関係についてはほとんど報告されていないため、この関係について検討した。Array comparative genomic hybridization を用いて膵がん感受性 CNP 候補領域を探索した。膵がん感受性 CNP は 10 カ所存在し、当該 CNP 出現頻度は膵がん患者で 55-70%であったのに対して、コントロール群では 0-7%であった。この CNP を調べることで、膵がんになりやすさを予測できる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Copy number polymorphisms (CNP) is one of genetic variations and involve gains or losses of several to hundreds of kilobases of genomic DNA among phenotypically normal individuals. Recent studies have described associations of CNPs with various common disorders as well as mental illness. Although CNPs are expected to affect pancreatic cancer, little is known about this association. These gap, in our knowledge, prompted us to study this relation. Array comparative genomic hybridization was performed to search for candidate CNPs related to pancreatic cancer susceptibility. We found 10 CNP markers associates with pancreatic cancer risk. The frequency of the CNPs were 55-70% in patients with pancreatic cancer and 0-7% in controls. These findings may lead a new means of risk assessment for pancreatic cancer.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目： 境界医学、病態検査学

キーワード：膵がん、コピー数多型

1. 研究開始当初の背景

がんの死亡率を低下させる基本は、がん罹患しないことである（予防に勝る治療法はない）。とはいえ、がんになりやすさ（がん感受性）の評価ができていない現状では、一次予防（発症予防）よりは二次予防（早期診断、早期治療）に重点をおかざるをえない。しかし、各人のがん感受性が予め評価可能と

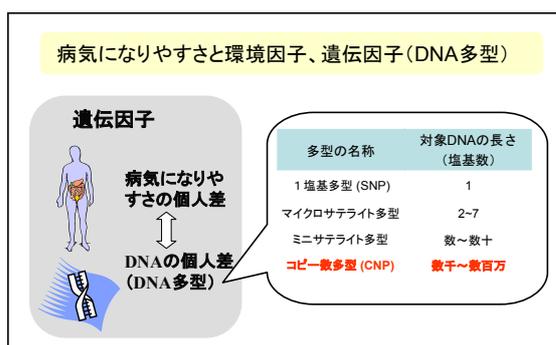
なれば、「生活習慣や生活環境」改善を含めた具体的な予防策を講ずることが可能となるばかりか、現行のがん検診も効率的かつ効果的に実施できる。

「予防に勝る治療法はない！」という言葉どおり、がんを予防する方法の確立が重要である。がんの予防において生活習慣の改善が有効である事は、様々な研究から明らかにな

っており、第3次対がん10か年総合戦略研究事業の生活習慣の改善によるがん予防法の開発に関する研究においてエビデンス評価が行なわれ、科学的根拠を持って確度別に改善すべき生活習慣が公表されている。しかしながら、多くの国民に浸透させるためには、ハイリスクグループを把握し、生活習慣改善の具体的な指導および動機付けを行うことが求められる。この指導および動機付けは、「革新的ながん予防法の開発に関する研究」においてもハイリスクグループを把握し、適切な生活指導を行なう事を強力に推進する必要があることが記載されていることから重要な事がわかる。我々は、がん予防を実現する為になんか感受性について評価する方法を新たに発見し、実用化に向け検討を重ねてきた。

2. 研究の目的

数千から数万塩基にわたるDNAコピー数に個人差がある「コピー数多型(CNP)」が2004年に発見され、それ以来、精神疾患や腎臓病など様々なCommon diseaseとCNPの関係が報告されている。本研究者は「がんなりやすさ(がん感受性)」に関連したDNAコピー数多型(copy number polymorphism, CNP)を特定している。これは採取が容易な血液を材料として「ある特定領域のDNAコピー数」を調べることで「がん感受性」の有無を判定する技術であり、本研究これまで乳がん、大腸がん及び子宮体がん感受性CNPを発見している。膵がんについては未解明であるため本研究では「膵がん感受性CNP領域」の特定を目的とした。本検査により膵がん感受性があらかじめ分かれば生活習慣の改善による発症予防や定期検診による早期発見・早期治療が期待できる。



3. 研究の方法

(1) 血液採取およびDNA抽出

健常者80名、膵がん患者20名の末梢血を採取し、DNAを抽出した(テストDNA)。また、30名の健常者末梢血より抽出したDNAを1本のチューブにまとめたプールDNAをリファレ

ンスDNAとした。抽出したDNAを分光光度計260nmおよび280nmの吸光度からA260/A280の吸光度比を求めたところいずれも1.8以上であり高純度のDNAを抽出できたことが分かった。

(2) マイクロアレイ解析

Human CGH 2.1 M whole-genome tiling array (Roche NimbleGen)を用いて健常者群および膵癌患者群のCNPを網羅的に解析した。具体的には以下の通り行った。

(A) DNAの蛍光標識 (Nimblegen Dual-Color DNA Labeling Kit (Roche社)を製品プルトコルに準拠し使用)

あらかじめ、Cy3-Random Nonamer および Cy5-Random Nonamer 中に、Random Primer Buffer 998.25 μ l および β メルカプトエタノール 1.75 μ l を入れて希釈した。

(B) テストDNAの標識

- ①2本の0.5mlチューブを用意し、各チューブ内に以下を入れた。
テストDNA 1 μ g (乳がん患者あるいは健常女性末梢血由来DNA)
希釈済みCy-3-Random Nonamers 40 μ l
Nuclease-free水を加えて全量80 μ lとした。
- ②98°C10分インキュベーション後、氷上で2分インキュベーションした。
- ③各チューブに以下の試薬類を加えた。
10 mM dNTP Mix 10 μ l
Nuclease-free水 8 μ l
50U/ μ l Klenow Fragment 2 μ l
- ④37°Cで一晩インキュベーション。
- ⑤各チューブにStop Solution (0.5 M EDTA) 10 μ lを加えた。
- ⑥各チューブに5M NaCl 11.5 μ lを加えた。
- ⑦各チューブにイソプロパノール 110 μ lを加えた。
- ⑧2本のチューブ内容物を1本の1.5mlチューブ内にまとめた。
- ⑨よく混ぜた後、室温で10分間インキュベーション。
- ⑩12,000gで10分間遠心後、上澄みをピペットで吸って除去した。
- ⑪各チューブに冷やした80%エタノール500 μ lを加えて、12,000gで2分間遠心後、上澄みをピペットで吸って除去した。
- ⑫遮光下で自然乾燥させDNAをペレット化した。
- ⑬-20°Cで保存。

(C) リファレンスDNAの標識

- ①2本の0.5mlチューブを用意し、各チューブ内に以下を入れた。
リファレンスDNA 1 μ g (30名の健常女性末梢血由来プールDNA)
希釈済みCy-5-Random Nonamers 40 μ l

- Nuclease-free 水を加えて全量 80 μ l とした。
②98°C10 分インキュベーション後、氷上で 2 分インキュベーション。
③各チューブに以下の試薬を加えた。
10 mM dNTP Mix 10 μ l
Nuclease-free 水 8 μ l
50U/ μ l Klenow Fragment 50U/ μ l 2 μ l
④37°Cで一晩インキュベーション。
⑤各チューブに Stop Solution (0.5 M EDTA) 10 μ l を加えた
⑥各チューブに 5M NaCl 11.5 μ l を加えた。
⑦各チューブにイソプロパノール 110 μ l を加えた。
⑧2 本のチューブ内容物を 1 本の 1.5 ml チューブ内にまとめた。
⑨よく混ぜた後、室温で 10 分間インキュベーション。
⑩12,000g で 10 分間遠心後、上澄みをピペットで吸って除去した。
⑪各チューブに冷やした 80%エタノール 500 μ l を加えて、12,000g で 2 分間遠心後、上澄みをピペットで吸って除去した。
⑫遮光下で自然乾燥させ DNA をペレット化した。
⑬-20°Cで保存。

(D) ハイブリダイゼーション

- ①各ペレットに 20 μ l の精製水を加えて 20 分間静置後、ボルテックスをかけた。
②DNA 濃度を測定した。
③以下を 0.5 ml チューブ内に入れた。
蛍光標識されたテスト DNA 34 μ g
蛍光標識されたリファレンス DNA 34 μ g
精製水を加えて全量を 12.3 μ l とした。
④NimbleGen Hybridization Kit (Roche 社) の以下の試薬を 0.5 ml チューブ内に入れた。
2X Hybridization Buffer 29.5 μ l
Hybridization Component A 11.8 μ l
Alignment Oligo 1.2 μ l
⑤ ③の溶液中に、④の溶液 31.7 μ l を加えた。
⑥95°C5 分インキュベーションの後、42°Cで 5 分以上インキュベーションした。
⑦2.1 M array (Roche 社) に Nimblegen HX1 Mixer (Roche 社) をセットし、42°Cのヒートブロック上に静置。
⑧ ⑤の溶液 41 μ l を 2.1 M array に注入した。
⑨Nimblegen hybridization system (Roche 社) に 2.1 M array スライドをセットし、72 時間ハイブリダイゼーションを行った。

(E) 洗浄 (NimbleGen Wash Buffer Kit および NimbleGen Array Processing Accessories (Roche 社) を使用)。

- ①洗浄液 1, 2, 3 を作製する。
洗浄液 1 (2 セット)

水 (VWR 社) 225 ml
10X Wash Buffer I 25 ml
1M DTT 25 μ l

洗浄液 2 (1 セット)
水 (VWR 社) 225 ml
10X Wash Buffer II 25 ml
1M DTT 25 μ l

洗浄液 3 (1 セット)
水 (VWR 社) 225 ml
10X Wash Buffer III 25 ml
1M DTT 25 μ l

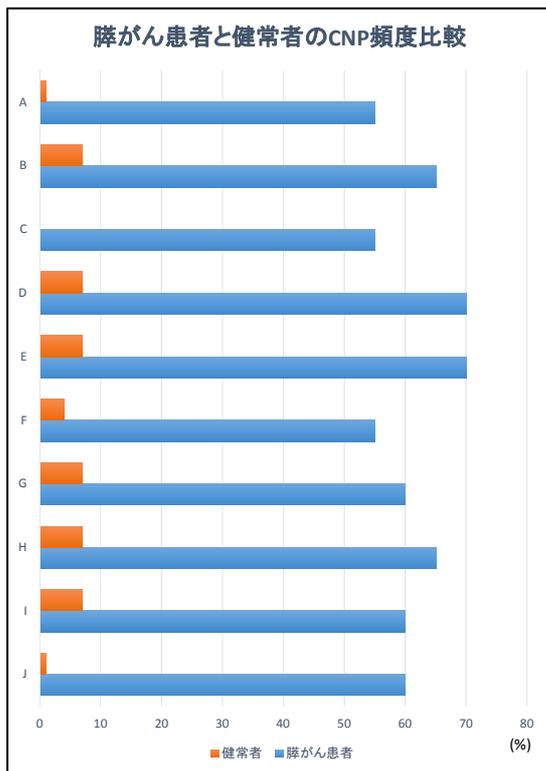
- ②40°Cに暖めた洗浄液 1 に 2.1 M アレイを浸し、Nimblegen HX1 Mixer を取り除いた。
③2.1 M アレイを洗浄液 1 中で 10-15 秒間揺らして、hybridization buffer を除去した。
④2.1 M アレイを洗浄液 1 (室温) 中で 2 分間しっかり揺らして洗浄した。
⑤2.1 M アレイを洗浄液 2 (室温) 中で 1 分間しっかり揺らして洗浄した。
⑥2.1 M アレイを洗浄液 3 (室温) 中で 15 秒間しっかり揺らして洗浄した。
⑦遠心器にてスライドを乾燥させた。

(F) アレイスライドのスキャンングおよびデータ解析

- ①マイクロアレイスキャナ GenePix 4000B (Axon instruments 社) に 2.1 M アレイをセットしアレイの蛍光スキャンングを行った。
②取得された蛍光画像ファイルを NimbleScan v2.5 ソフトウェア (Roche 社) にて解析を行い、2.1 M アレイにおける各プローブ毎の蛍光強度情報を得た。
③Nexus copy number ソフトウェア (BioDiscovery 社) にて健常者および乳がん患者におけるコピー数多型領域を比較し、乳がん発症に関わる CNP 領域を同定した。

4. 研究成果

膵がん患者と健常者の CNP を比較したところ、膵がん患者においてあるゲノム領域のコピー数が増加あるいは減少していることが分かった。すなわち、膵がん特異的な CNP が存在することが明らかとなった。この膵がん特異的な CNP は 10 カ所存在し、当該 CNP の出現頻度は膵がん患者での 55-70%であったのに対して、コントロール群では 0-7%であった。すなわち、この 10 カ所の CNP を調べることで、膵がんになりやすさを予測できる可能性が示唆された。



5. 研究組織

(1) 研究代表者

末広 寛 (SUEHIRO YUTAKA)

山口大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：40290978