

平成 21 年 6 月 16 日現在

研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19790929  
 研究課題名（和文） 自作 B A C マイクロアレイによる治療指針に役立つがんの DNA 診断法の確立  
 研究課題名（英文） Establishment of DNA diagnostics of cancer for medical guideline using custom made BAC 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：

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した研究を行った。特に、自作 BAC マイクロアレイ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に含まれる遺伝子（群）から癌の詳細を解析し、治療指針となり得る遺伝子を抽出・解析する事を目的とし、食道癌、胃癌、大腸癌、乳癌の臨床検体を用いて解析を行った。

## 交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,200,000	0	2,200,000
2008 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	330,000	3,630,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

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

(1)ゲノム DNA セグメントの増減を詳細に確認する Array-based CGH (aCGH) 法は、FISH 法に替わって先天性異常、癌研究の分野において急速に普及し始めている。しかしながら日本において aCGH 法はほとんど普及しておらず、使用するアレイも短いオリゴ配列がア

レイされた DNA チップしか手に入らない状況であった。

(2)BAC-DNA をスポットした BAC-DNA マイクロアレイは実験条件検討が容易であり感度が良いので、使用する DNA 量も約 10 分の 1 で済む。このため、微量の検体からでも検出できるので、DNA チップと比較して臨床検体

を多数処理することに向いている。

(3)我々は、BAC-DNA マイクロアレイを自作しているため、品質の高いアレイを使って安価に実験を行うことが出来る。

(4)使用している BAC クローンライブラリーは独自に構築したものであり、新規スライドガラスの開発、RLS(Resonance Light Scattering)法ラベリングシステムを用いた超高感度なシグナル検出系の確立にも成功している(日本特許 発明名称: 担持体、物質検出用器具とその製造方法、特許番号: 第 4066187 号、発明者: 清水信義、浅川修一、村山裕治)。

これらの実験材料を用いた精度の高い測定技術とマイクロアレイ作製技術、ヒトゲノムシーケンスプロジェクトで培ったゲノム解析技術を駆使して、がんの個性を体系的・科学的に解明する。

## 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、自作 BAC マイクロアレイ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に含まれる遺伝子(群)から、バイオインフォマティクスによる遺伝子構造/機能の推定、遺伝子発現解析を行い、癌のマーカーとなり得る遺伝子を抽出する。また、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、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。

## 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等の協力のもとに食道癌、胃癌、小・大腸癌、乳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。

(2)BAC Array7700 によるゲノム不安定性の検定:  
癌組織と正常組織からの DNA を Cy3/Cy5 で蛍

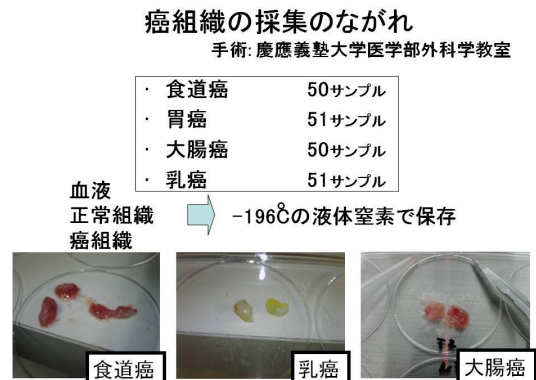
光標識後、自作の BAC マイクロアレイ(BAC Array7700)を用いて DNA セグメントの増減を検出する。次に、それらの DNA セグメント(個別の BAC クローン)に含まれる遺伝子(群)を専用データベースから探索、同定する。

(3)バイオインフォ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および、クロマチン DNA のメチレーションに関しても解析する。

## 4. 研究成果

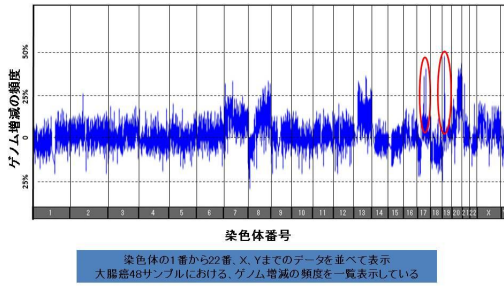
(1)癌組織バンクの構築:  
慶應義塾大学病院外科(北島政樹教授)等の協力のもとに食道癌、胃癌、小・大腸癌、乳癌から癌組織バンクを構築し、3分割した組織は、RNA、タンパク質、DNA 抽出用とした。(下図)



(2)BAC Array7700 によるゲノム不安定性の検定、ゲノム解析:

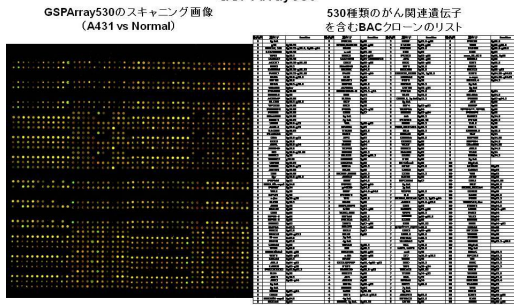
BAC Array7700 を用いて食道癌 44 例、胃癌 48 例、大腸癌 48 例、乳癌 28 例のゲノム不安定性解析を行った。大腸癌において既報のゲノム増減頻度とほぼ同じデータを示したが、新たに 2ヶ所のゲノム増幅領域を確認した。その領域は他臓器において、癌リスクとの関連性がゲノムワイドアソシエーション解析によって指摘された領域であり、大腸癌においても関連性を進めている。(下図)

### 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て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)

### がん研究特化型小規模アレイ GSPArray530



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)

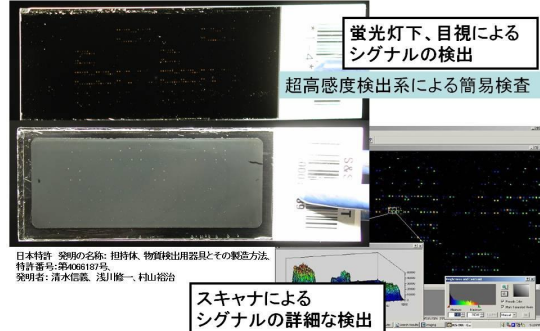
### BACマイクロアレイの作製

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。



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。

### 簡便なシグナル検出法の開発



### 5. 主な発表論文等

[学会発表](計 6 件)

発表者名: 村山裕治

発表表題: Analysis of Genomic Instabilities in Cancer using Custom-made High Density BAC microarray  
自作 BAC マイクロアレイを用いた消化器癌のゲノム不安定性解析

学会等名: 第 67 回日本癌学会学術総会

発表年月日: 平成 20 年 10 月 29 日

発表場所: 名古屋

発表者名: 村山裕治

発表表題: BAC マイクロアレイを用いた消化器がんのゲノム不安定性解析

学会等名: 第 15 回日本遺伝子診療学会

発表年月日: 平成 20 年 8 月 2 日

発表場所: 仙台

発表者名: 村山裕治

発表表題: 慶應 BAC マイクロアレイを用いた各種がん臨床検体のアレイ CGH 解析

学会等名: 第 30 回日本分子生物学会年会

発表年月日: 平成 19 年 12 月 14 日

発表場所: 横浜

発表者名: 村山裕治

発表表題: High-resolution analysis of Segmental DNA Changes in various cancer tissues

学会等名: 第 57 回 ASHG

発表年月日: 平成 19 年 10 月 25 日

発表場所: サンディエゴ(米国)

発表者名：村山裕治  
発表表題：Analysis of Segmental DNA Changes in Cancer using KEIO BAC microarray  
慶應 BAC マイクロアレイを用いた各種がん臨床検体のアレイ CGH 解析  
学会等名：第 66 回日本癌学会学術総会  
発表年月日：平成 19 年 10 月 4 日  
発表場所：横浜

発表者名：村山裕治  
発表表題：慶應 BAC マイクロアレイを用いた各種がん臨床検体のアレイ CGH 解析  
学会等名：第 14 回日本遺伝子診療学会  
発表年月日：平成 19 年 7 月 28 日  
発表場所：愛媛

〔産業財産権〕

取得状況（計 1 件）

産業財産権名称：担持体、物質検出用器具とその製造方法、及び検出方法

発明者：清水信義、浅川修一、村山裕治

権利者：学校法人慶應義塾

産業財産権の種類：特許

番号：第4066187号

取得年月日：平成20年1月18日

国内外の別：国内

〔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