

研究課題名 ゲノムワイド DNA アレイによる癌診断技術
所属研究機関名 独立行政法人産業技術総合研究所
研究者氏名 角田 慎一

・研究計画の概要

研究の趣旨・目的

社会の高齢化が着実に進行しつつある現在、相変わらず死亡原因第 1 位である癌の医療においては、優れた医療技術の開発と的確な診断技術の開発が急務となっている。特に癌細胞特異的な治療薬が開発されていない今、癌の悪性度の的確な診断と、それに応じた治療の最適化(テーラーメイド医療)の実現が最重要課題である。例えば、悪性度の高い癌であることが判明すれば手術後に十分な抗癌剤を用いた補助療法を実施し、逆に悪性度が低ければ副作用を最小限に抑えた治療を選択できるようになることが理想である。しかし、現在の癌の臨床診断を担っている組織形態学的病理検査では、予後や転移性、抗癌剤抵抗性など、癌の悪性度診断に重要な情報をほとんど提供することができない。従って、癌の生物学的悪性度を的確に把握するためには、新たな観点に基づいた検査・診断技術の開発が必要である。近年の医学・生物学研究の進歩は、癌の発生・進展のメカニズムを分子レベルで解明しつつある。それに伴って、癌は様々な要因によって DNA レベル、あるいは染色体レベルで異常を生じ、その異常が複数積み重なって悪性形質を発現していることが明らかとなってきた。このことは、個々の癌で生じている染色体異常を全染色体にわたって効率良く解析することが可能となれば、癌の多様な個性・悪性度を客観的に把握し、的確に評価するための指標を得ることを期待させるものである。そこで本研究では、癌の染色体異常を簡便かつ効率よく解析することにより、染色体異常情報に基づいた癌の悪性度診断を可能とし、また、癌の形成・進展の分子メカニズム解明に有用となる基盤技術の開発を行うことを目的とする。

研究計画の概要

癌細胞で生じている染色体異常の効率よい解析技術が開発できれば、臨床診断や遺伝子探索等に極めて有用な手段となる。しかし癌細胞では複雑で多様な染色体異常が生じているため、これらの異常を全染色体にわたって迅速かつ詳細にスクリーニングすることは従来の技術では困難であった。その中で、メタフェーズ染色体標本をテンプレートとして用いる comparative genomic hybridization 法 (CGH 法、chromosomal CGH 法) は、一度のハイブリダイゼーション操作で全染色体領域のコピー数異常を解析しうる技術として近年広く利用されるようになってきた。しかし、CGH 法は検出感度、異常領域のマッピング解像度、解析に要する時間、熟練技能の必用性、等に関して制限を有している。そこで本研究では国際ヒトゲノムプロジェクトの結果構築されたゲノム断片のクローン (BAC クローン) を活用し、全染色体にわたってピックアップしたマッピング済み BAC をマイクロアレイ化することを考案した。すなわちメタフェーズ染色体の代わりに、この BAC アレイを用いて CGH 解析を行うことで、従来の CGH 法の問題点をすべて改善しうる技術になるものと考えられる。本ゲノムワイドアレイ CGH 法により、癌のゲノムコピー数異常を全染色体領域にわたって詳細かつ簡便にスクリーニング可能となり、癌の診断や癌関連遺伝子の探索に有用な情報を得ることが期待される。そこで本研究では、約 1000 個のマッピング済みゲノム DNA フラグメント (BAC クローン) により構築された DNA マイクロアレイを構築し、本アレイに対して癌細胞 DNA の CGH 解析を行うことで、全染色体にわたって DNA コピー数異常領域を簡便に、かつ従来の CGH 法よりも高精度にスクリーニングしうる技術を確立する。さらに本解析技術を用いて肝細胞癌を中心とした臨床摘出組織由来の DNA を解析し、さらに得られた情報をデータベース化することにより、癌の進展や悪性化に重要な染色体異常領域の探索を行う。これにより、染色体異常に基づいた癌の新たな悪性度診断技術を達成しうる診断マーカーの探索を行う。さらに、ゲノムワイドアレイだけでなく、注目すべき染色体領域のみについて BAC を高解像度でピックアップした領域特異的アレイの作製を行い、臨床診断用途を想定した低コストのアレイ解析技術の確立を目指す。以上の研究により、癌の的確な診断や癌進展メカニズムの解明に寄与する基盤技術が確立できるものと期待される。

研究計画の詳細報告

(単位：百万円)

| 研究項目 | 所要経費 | | | | | |
|---------------------------|------|------|------|------|------|------|
| | 13年度 | 14年度 | 15年度 | 16年度 | 17年度 | 合計 |
| 1. ゲノムワイドアレイ CGH 法の基礎技術確立 | 19.5 | | | | | 19.5 |
| (1) テスト BAC アレイの試作 | ↔ | | | | | |
| (2) アレイ CGH 実験条件設定 | 16.0 | | | | | 16.0 |
| | ↔ | | | | | |
| | 3.5 | | | | | 3.5 |
| 2. ゲノムワイド DNA アレイの作製 | | 6.2 | 6.2 | | | 12.4 |
| (1) ゲノムワイド DNA アレイの構築 | | ↔ | ↔ | ↔ | ↔ | 12.4 |
| | | 6.2 | 6.2 | | | 3.0 |
| | | 3.0 | | | | 3.0 |
| 3. 臨床検体を用いた性能評価 | | ↔ | | | | 3.0 |
| (1) 染色体コピー数異常検出性能の検討 | | 3.0 | | | | 3.0 |
| | | | 0.6 | | | 0.6 |
| 4. データベースソフトウェアの開発 | | | ↔ | ↔ | ↔ | 0.6 |
| (1) データベース構築 | | | ↔ | | | 0.6 |
| | | | 0.6 | | | 0 |
| (2) 解析結果のデータベース登録 | | | 0 | | | 0 |
| | | | 5.0 | | | 5.0 |
| 5. 癌臨床検体のアレイ CGH 解析 | | | ↔ | ↔ | ↔ | 5.0 |
| (1) 肝細胞癌のアレイ CGH 解析 | | | 5.0 | ↔ | | 5.0 |
| (2) 微量 DNA の増幅技術開発 | | | | ↔ | ↔ | |
| | | | | | ↔ | |
| 6. 領域特異的 CGH アレイの構築 | | | | | | |
| (1) 領域特異的 CGH アレイの作製技術検討 | | | | | | |
| (2) 有用性検証 | | | | | | |
| 所要経費(合計) (間接経費を含む) | 19.5 | 9.2 | 11.8 | | | 40.5 |

研究成果の概要

研究成果の概要

平成 13 年度および 14 年度において、BAC マイクロアレイを用いた CGH 解析の基礎技術の確立と、染色体異常の検出性能の評価を実施した。まず全ゲノム上からピックアップした 1400 個のマッピング済み BAC クローンからなる DNA マイクロアレイを構築した。本 DNA アレイを用いることにより、従来の CGH 法の異常マッピング解像度の制限から脱却することが可能となり、従来の chromosomal CGH 法による解析解像度が 10Mb 以上であるのに対し、本ゲノムワイド DNA アレイを用いることにより、平均解像度 2.1Mb という高解像度で染色体コピー数異常領域を検出・マッピングすることが可能となった。また、各種既知の染色体コピー数異常を有する DNA サンプルを用いてアレイ CGH 解析を行った結果、本システムにより、1 コピーの染色体増加および欠失異常を明確に検出する性能を有することが判明した。さらに、定量的検出能(ダイナミックレンジ)について検討した結果、染色体コピー数が 3 コピー相当までの増加はもとより、約 30 コピーの増加まで半定量的に検出する優れた検出感度を有することが明らかとなった。以上のように、ゲノムワイドアレイ CGH 解析技術の確立ができたことから、今後は癌臨床サンプルの体系的な染色体異常解析を実施し、病期・悪性度診断マーカーとなりうる染色体異常の探索を行う予定である。それにより、癌の進展メカニズムの解明に寄与するのみならず、新たな癌診断技術の確立に発展することが期待される。

波及効果、発展方向、改善点等

現在の癌医療においては、組織形態学に基づく病理検査が診断の基本手段となっている。しかし、現在の病理診断では癌の確定が可能であっても、多様な個性を有する癌について、個々の症例ごとに予後や薬剤抵抗性などの悪性度を的確に判断することは困難であるため、新たな診断技術の開発が求められている。このような観点から近年、癌の悪性度診断を遺伝子レベルの情報に基づいて行おうとする研究が盛んに試みられている。cDNA マイクロアレイを用いた遺伝子発現レベルの解析はその代表であろう。しかし、mRNA は非常に安定性に乏しいために取り扱いが難しく、臨床の現場への応用は困難であるといえる。また、遺伝子発現は細胞・組織・臓器によってそのパターンや発現レベルが大きく異なるため、癌特異的な発現変化を見出すことは難しい。それに対して本研究で解析を行う染色体の量的変化は、正常細胞であればどの組織・臓器でも同一であって、癌のみで変化している最も根本的な変化である。そのため癌特異的な異常の解析が容易であるうえ、サンプルとして用いる DNA は安定性の点で非常に優れているため、臨床応用にも非常に適した技術であると考えられる。

これまでの研究成果により、ゲノムワイド DNA アレイ技術によって、染色体コピー数異常を高精度に解析しうることが明らかとなった。また、これまでの研究代表者らの研究により、特定の染色体増幅の有無により肝細胞癌の予後の良し悪しを予測しうることが明らかとなっている。従って、本研究で開発する高精度な染色体異常スクリーニング技術により、これまで見逃されていた微細ながら重要な意味をもつ癌染色体異常領域が見出されることが強く示唆される。今後の研究で、癌の診断マーカーとなる染色体異常の同定につながれば、癌の新たな悪性度診断技術として医療現場で大きく貢献するものと期待できる。また、DNA マイクロアレイ技術は解析の自動化が容易であると考えられるため、コストを抑えた診断用 BAC アレイの作製により、癌の的確な悪性度診断が開発され、質の高い医療の提供に大きく貢献するものと期待される。

. 研究成果発表等の状況

(1) 研究発表件数

| | 原著論文による発表 | 左記以外の誌上発表 | 口頭発表 | 合計 |
|----|-----------|-----------|------|-----|
| 国内 | 0件 | 4件 | 4件 | 8件 |
| 国際 | 2件 | 0件 | 1件 | 3件 |
| 合計 | 2件 | 4件 | 5件 | 11件 |

(2) 特許等出願件数

合計 1件 (うち国内1件、国外0件)

(3) 受賞等

合計 1件 (うち国内1件、国外0件)

1. 平成15年度日本サイトメトリー学会学術奨励賞

(4) 主な原著論文による発表の内訳

国外誌

1. Takeo S., Arai H., Kusano N., Harada T., Furuya T., Kawauchi S., Oga A., Hirano T., Yoshida T., Okita K., Sasaki K.: 「Examination of oncogene amplification by genomic DNA microarray in hepatocellular carcinomas: Comparison with comparative genomic hybridization analysis」, Cancer Genetics and Cytogenetics, 130,127-132, (2001)
2. Furuya T., Takita M., Tsunoda S., Kawauchi S., Hirano T., Oga A., Sasaki K.: 「Cell array coupled with laser scanning cytometry allows easy analysis of changes in cyclin expression during the cell cycle: An application of cell array system」, Methods in Cell Science,24,41-47, (2002)

(5) 主要雑誌への研究成果発表

| Journal | Impact Factor |
|----------------------------------|---------------|
| Cancer Genetics and Cytogenetics | 1.7 |
| Methods in Cell Science | - |

ゲノムワイドDNAアレイによる癌診断技術

