

最近のトピックス

DNAマイクロアレイを用いた口腔腫瘍の診断

Diagnosis of the Oral Tumor Using DNA Microarray

新潟大学大学院医歯学総合研究科 顎顔面口腔外科学分野

永田昌毅, 高木律男, 星名秀行, 藤田 一

Division of Oral and Maxillofacial Surgery, Niigata Graduate School of Medical and Dental Sciences
Masaki Nagata, Ritsuo Takagi,
Hideyuki Hoshina, Hajime Fujita

最近“ゲノム..”ということばがよく聞かれます。研究者がゲノムを正面切って扱うようになり“何がかわったか?”という問いには、いろいろ答えがあると思いますが、最も基本的なことは情報量の爆発的増加と言えるのではないのでしょうか。その変化に対応し、最近では遺伝子解析技術の高速、高効率化が様々な方面で進行しています。既に高速のシーケンサー、DNAチップ-マイクロアレイといった技術が実用域にありますし、さらに進化した小さな基盤上に血液などからの遺伝子抽出、増幅、シーケンシング、電気泳動、遺伝子多形や蛋白の検出など、多機能を集積した臨床検査技術の開発がはじめられています。話が遠くに行き過ぎましたが、本稿では、今後様々な分野で一般化し活用されていくであろうマイクロアレイ技術の紹介とともに、当科で現在進行中の遺伝子発現解析に基づいた口腔癌診断の試みについて話します。

DNAチップ-マイクロアレイとは?

名前のとおりガラスなどの基盤上にDNAプローブ(配列のわかったDNA鎖)が数十ミクロンのスポットとして基盤の目状に配置されていて、これに検出したいDNAを蛍光物質でラベルしてハイブリダイゼーション(相補的に結合)させます。基盤上で各スポットのプローブに結合した検体DNAをレーザー光で励起し、光の強度として遺伝子の存在を検出します¹⁾。ノーザンブロットやサザンブロットといった従来の検出法では、分析したい遺伝子をメンブレン上に固定し、それに一種類のラベルした遺伝子プローブをハイブリダイズして遺伝子の存在を検出しました。それに対し数千におよぶ多数のDNAプローブが微細な基盤の目状に並ぶマイクロア

レイ法では、高感度で多量の遺伝子のデータを数値として得ることができます。

DNAチップ-マイクロアレイの用途

1. 遺伝子発現解析

前述のごとく、マイクロアレイを用いると、一回の分析で数千の遺伝子発現を調べることが出来ますので、いわばグローバルな遺伝子発現解析を可能にします。たとえば最近、ヒトの全ゲノム配列がほぼ決定し、今後はゲノムから作り出される全ての蛋白質を調べあげることが、次の段階でのプロジェクトとして世界的に進められていくこととなります。マイクロアレイはゲノムの中からエクソンの探索や転写産物の多様性解明にも用いられていくでしょう²⁾。その他、薬物などの刺激に対する細胞の遺伝子発現変化の分析、トランスジェニックマウスやノックアウトマウスの遺伝子発現を調べることで、ある遺伝子の変化に連動して動く遺伝子群の探索、病巣の遺伝子発現のプロファイルから診断や治療法、病因解明の糸口を探す、などの目的に多くの可能性をもっています。

2. 遺伝子の多型解析による原因遺伝子の検索

人の遺伝子には、蛋白の構造に直接影響を与える領域と、その蛋白の遺伝子の転写に影響を与える領域、無機能または機能が不明な領域が存在します。そのゲノムのすべての範囲で140万ヶ所のsingle nucleotide polymorphism (SNP: 単一塩基の違いによる多様性を示す個所)が存在し、うち6万程度がエクソンの中に、全エクソンの85%は近傍の5kb以内にSNPを有するといわれます³⁾。SNPには遺伝子の機能に直接影響しないものも多いはずですが、それによって近傍の遺伝子領域を型別に分類することができます。もちろんSNPの中には、機能的あるいは構造的に遺伝子産物の機能に関与している場合も考えられます。具体的にいえば、ある病気である酵素の遺伝子領域近傍のSNPが病気に耐性をもつ人ではA型、かかりやすい人ではT型といった傾向として現れるとします。この傾向を調べ上げることによってその酵素が病気の原因遺伝子、あるいは関連する因子であることを絞り込んでいくことができます。ヒトのゲノムは、全ての遺伝子領域における多型(遺伝子部品タイプのバリエーション)の組み合わせによって組み立てられているといえます。となりのK君と僕はMSX1遺伝子のタイプは共通で、そのまたとなりのSさんとはFGFR2遺伝子のタイプが同じだ、というようなことが起こっています。

すなわち、その遺伝子領域に限って、お互い共通の先祖を持っているということですが、それらは人の発生から成長、老化、罹患の過程で何かしらの影響を及ぼしているはずで、それが顔や背だけの違いや、かかってしまった病気の違いに反映してきます。となりのK君と僕は親戚でもないのになぜか鼻の形が似ている。Sさんとは子供の頃喘息だったことが共通だ。というような形で反映しているかもしれません。

従来はこの遺伝子多型を制限酵素断片長 (RFLP) や繰り返し配列の長さ (ミニサテライト, マイクロサテライト) の違い, DNA鎖がつくる高次構造の違い (SSCP) で検出してきましたが, 分析は多大な労力を要していました。もし前述のSNPをDNAチップで検出することが一般化すれば, ある患者の全ゲノム的SNP情報を一晩で得ることが可能で, しかも一気に数千塩基の範囲まで, 何かの形質に関連する遺伝子領域を絞り込むことも可能になるかもしれません。その効率の差は徒歩とロケットほどの差に匹敵します。もちろん, 実現までには今後も多大な時間と努力が必要になるはずですが, その対象となり得る疾患は, う蝕や歯周炎, 口腔癌のリスクファクター, 抗生剤や抗癌剤の代謝能, 患者の顔の形や成長パターンの傾向など, 私たちが臨床で直面するあらゆる疑問と関係しています。

3. 私たちが行っている口腔癌組織での遺伝子発現解析

身近な例として私達が実際に始めている研究を紹介します。

背景と目的: 癌の治療では, 初期の診断で腫瘍の増殖性や発育の傾向, 転移性, 抗癌剤や放射線治療に対する感受性などの判定が, できるだけ正確に行われることがQOLの向上と良い予後を得るために重要です。しかし, 現時点では同じ癌であっても, 悪性度の判定や治療に対する感受性についての完璧な予測は困難です。私たちは, 臨床の場でそういった疑問に, 常に直面しなければなりません。腫瘍発生や病期の進行は, 種々の癌抑制遺伝子の不活性化, 癌遺伝子の活性化の結果であると言われていいます。しかもそれぞれの変化は, 一つ一つの癌で個別な様相を呈しているはずで、私たちはそれら癌関連遺伝子の発現プロファイルの変化を実際の腫瘍組織で解析し, 全ての癌にみられる共通の変化, あるいは特定の臨床経過や組織所見と関係した遺伝子の動きをとらえることによって, 口腔腫瘍の分子レベルでの診断技術を開発し, 将来臨床の場で活用することをめざしています。

研究の対象と方法: 口腔腫瘍の治療を受けた患者さんを対象とし, 生検試料, 手術時摘出物の一部を検体として採取します。腫瘍組織から抽出したmRNAを逆転写反応によって蛍光標識し, 合成された標識cDNAを癌関連遺伝子約500種類をスポットしたマイクロアレイ上に

(コントロールの正常粘膜標識cDNAとともに) ハイブリダイズし, 遺伝子発現解析を行います。結果的に, 図1のような蛍光の強弱としての画像データが得られます。蛍光の強さは遺伝子の発現量に対応し, 赤い色は癌組織で発現が高い遺伝子, 緑色は正常組織で高いものを表しています。黄色い発色は二つの組織が同じように発現している場合です。このシグナルの強弱はコンピュータ解析ソフトで数値化され, 両者の遺伝子発現比のデータが算出されます。図2は発現比 (Cy3 = 癌組織 / Cy5 = 正常粘膜組織) の分布を示すヒストグラムです。対数表示でshadowingした右が増加, 左が減少したグループを示し, これら発現比が2倍以上, あるいは2分の1以下に変化した遺伝子を有意として選定します。図3は腫瘍組織と正常粘膜の遺伝子発現比の分布を示すプロットです。中央のラインは1:1をあらわし, β -actinの発現量が一定と仮定して標準化に用いました。これらのDataを臨床診断や経過, 病理組織所見と照らし合わせることによって, 一定の傾向を抽出していきます。結果: 様々の遺伝子が, 口腔扁平上皮癌症例の間で共通に増加, あるいは減少していることが見出されました。その中で悪性腫瘍の予後に重要な意味をもつ転移に関連して, 従来盛んに研究されてきているmatrix metalloproteinase (MMP) について, 転移や再発の有無との関係を検討してみましたので, 一例として紹介します。結果を付表に示します。表中の数値は正常粘膜に対する癌組織での遺伝子発現の倍率です。ここで示す8症例は歯肉癌, 舌癌, 口底癌, 頬粘膜癌を含み, 病期も10mm以下の小さなものから進展癌を含む雑多なものです。左のグループはリンパ節転移あるいは局所再発が見られた症例, 右のグループは転移や再発のなかった症例です。差は一目瞭然で転移・再発群のMMP1とMMP3に数十倍の発現の亢進があります。これらの遺伝子の発現量は, 病期の進展との間に明らかな相関は無さそうなので, 腫瘍の進展に伴う間質誘導など組織構築の変化や, 新たな遺伝子変異の付加などには関係しておらず, むしろ腫瘍そのものの固有の性質といえるかもしれません。対照的に, 従来リンパ節転移や腫瘍血管新生に関与するとされているMMP2の発現量と転移の関連は見られず, 腫瘍組織での増加傾向もあきらかではありません。また, 膜結合型のMMPsや, MMPを抑制しその機能と密接に関わるとされるTIMPsも癌組織での量的変化は見られませんでした。

培養系などの実験と比較して, 臨床癌を扱った研究の難しい点は, 対象としてみているのが腫瘍細胞だけでなく, それを取り巻く雑多な間質細胞を含んでいる点です。しかし, マイクロアレイによる発現解析の利点は, 従来の分析の方法とは比べ物にならない多数の遺伝子発現情報が得られることですので, 今後それらの酵素の基質特

異性や発現部位，あるいは作用部位などを考慮しつつ，癌組織をじっくり検討することが必要です。それによって，実際の臨床癌からしか得られない新しい所見を示すことができると考えています。加えて，今後より多くの症例の解析をすることによって，臨床検査としての有用性についても検討を進めていきます。

文 献

- 1) David J. Duggan, et al. Expression profiling using cDNA microarrays. Nature genetics supplement 21, 10-14, 1999
- 2) D.D. Shoemaker et al. Experimental annotation of the human genome using microarray technology. Nature 409 922-927 2001
- 3) The international SNP map working group, A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. nature 409 928-933 2001

図 1

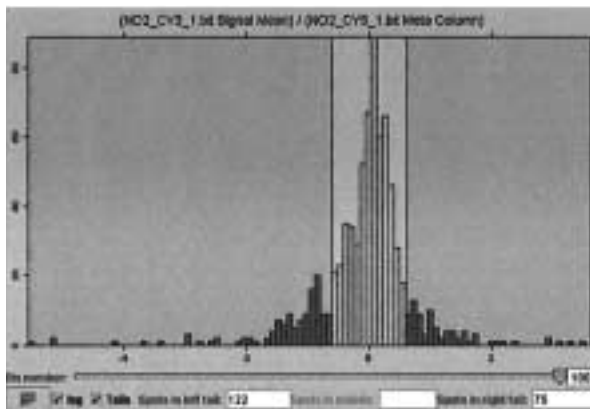


付 表

再発・転移症例

	T2N1M0	T3N1M0	T1N0M0	T1N0M0
MMP 1	47.0	49.4	52.5	35.2
MMP 3	21.3	22.1	17.9	14.3
MMP 2	1.6	0.4	1.1	1.0
MMP15	1.3	0.5	1.0	0.7

図 2



再発・転移しなかった症例

	T4N0M0	T2N0M0	T1N0M0	T1N0M0
MMP 1	10.9	5.9	7.2	13.7
MMP 3	6.2	6.3	5.2	12.0
MMP 2	2.2	0.4	0.5	1.2
MMP15	0.8	1.6	0.7	0.8

図 3

