

別紙3 (補足資料)

<p>サブテーマ名： DNA・抗体マイクロアレイの作製技術開発及びその作製・評価 小テーマ名：がん治療標的遺伝子の解析</p>
<p>サブテマリーダー（所属、役職、氏名）千葉県産業振興センター（研究員）今井一英 小テマリーダー（所属、役職、氏名）（主任研究員）古閑比佐志 研究従事者（所属、役職、氏名）千葉県産業振興センター（主任研究員）古閑比佐志、（研究員）小野さやか、（非常勤研究補助員）末永雄介（研究開発指導者 研究局長 中川原 章）</p>
<p>研究の概要、新規性及び目標</p> <p>①研究の概要 かずさDNA研究所の所有するヒト長鎖cDNAクローンの中で、がんの治療や診断に貢献する可能性を持つ遺伝子を検索することを目的に、かずさヒトcDNAマイクロアレイを利用した発現解析によって、(1)神経芽腫細胞株における新規N-myc標的遺伝子群の探索および、(2)脳腫瘍検体を用いた悪性神経膠腫における新規予後予測マーカーの検索の2つのテーマで研究を実施した。</p> <p>②研究の独自性・新規性 (1) 神経芽腫においてN-myc遺伝子の増幅はその悪性度と強く相関し、予後予測の強力な指標となっている。しかし、その標的遺伝子については未だ不明な点が多い。 (2) 悪性神経膠腫は、原発性脳腫瘍で最も高頻度かつ予後不良な腫瘍であるが、長期生存例も稀に存在するが、その予後診断法は確立されていない。予後の指標となる分子マーカーの特定と正確な予後診断の確立は治療適応決定のために重要である。 KIAA遺伝子を対象にしたこれらの2つの研究テーマは、新規癌関連遺伝子の同定に有効であると考えられる。</p> <p>③研究の目標（フェーズ毎に数値目標等をあげ、具体的に） <u>フェーズⅠ（H14-H15）：該当しない</u> フェーズⅡ（H16-H18）：これまでに、かずさヒトcDNAマイクロアレイを用いた発現解析の結果より得られたがん関連候補遺伝子群を絞り込み、その機能や診断マーカーとしての有用性について検証実験を実施する。 フェーズⅢ（H18. 11.25事業完了日以降）：(1) 候補遺伝子が機能的にがんの悪性度にどのように関与するのかを検討する。(2) マーカー候補遺伝子の臨床での応用を目指し、臨床検体での発現量の定量的な検出方法および判定基準の確立を検討する。</p>
<p>研究の進め方及び進捗状況（目標と対比して）</p> <p>(1) かずさヒトcDNAマイクロアレイを用い、テトラサイクリン添加によりN-mycの発現を誘導できる神経芽腫細胞株において、N-mycの発現に伴い発現の変動するKIAA遺伝子の検索を行った。N-myc誘導後に発現の上昇する遺伝子を抽出し、そのプロモーター領域を組み込んだレポーターベクターを構築してルシフェラーゼアッセイを実施した。 (2) 悪性神経膠腫31例を対象に、かずさヒトcDNAマイクロアレイを用いた網羅的遺伝子解析を実施し、各遺伝子の発現量と予後との相関を検証して予後を規定する遺伝子候補を抽出した。この候補遺伝子を用いた予後予測法の臨床応用を検討するために、抗体を用いた発現量解析が可能か否かを抗体の反応性試験を含めウェスタンブロット法、および細胞あるいは組織での免疫染色を実施した。</p>
<p>主な成果</p> <p>具体的な成果内容： (1) マイクロアレイを用いた発現解析の結果、N-myc誘導前に比べ誘導24時間後で10種のKIAA遺伝子の発現上昇が認められた。その中で、最も著明な発現変動を示したKIAA遺伝子の5'上流領域には、N-myc結合配列であるE-boxが存在していた。KIAA遺伝子のプロモーター領域についてルシフェラーゼレポーターアッセイを行ったところ、N-myc容量依存的にレポーター活性が上昇した。従って、KIAA遺伝子がN-mycの標的遺伝子の一つである可能性が強く示唆された。 (2) 悪性神経膠腫検体を用いたマイクロアレイによる発現解析の結果、14遺伝子で予後との高い相関が認められた。そのうち6種の遺伝子を予後予測分子マーカーと仮定し、この発現と生存日数を比較し、症例を「高危険群」と「低危険群」の2つに分類したところ、各群の予後の差は相対危険率12.2倍と高い</p>

有意差を持って分類された。これらの6遺伝子の中で1つのKIAA遺伝子について、千葉県地域結集プロジェクトより供与された抗hKIAA抗体を用いた解析を試みた。はじめに、抗体の反応性を確認する目的で、hKIAA導入細胞を用いたウェスタンブロットおよび細胞免疫染色の結果、特異的な反応が確認された。続いてパラフィン包埋された検体での染色性を試験するために、同様に遺伝子導入した細胞から作製されたパラフィン切片を用いて免疫染色を実施した。その結果、遺伝子の導入された細胞では核が濃染され、非導入細胞と区別することが可能であった。次にヒト脳腫瘍検体について、マイクロアレイでKIAA遺伝子の発現量が既知である症例を対象として免疫染色を実施した。高発現症例では核が濃く染まった症例が多く観察され、低発現症例では非特異的に血管内皮が濃く染まる像が観察された。特異的と考えられる核の染色性に注目すると、この抗体による免疫染色は発現量を反映しうると考えられる。

特許件数：0 論文数：0 口頭発表件数：0

研究成果に関する評価

1 国内外における水準との対比

- (1) これまでにN-mycの標的遺伝子に関する報告は少なく、1つのKIAA遺伝子が新たなN-myc標的遺伝子である可能性が示唆された。
- (2) 今回同定された遺伝子の発現量と悪性神経膠腫の予後との関係はこれまでに報告されておらず、これらの遺伝子が神経膠腫の悪性化に関与する可能性が考えられる。

2 実用化に向けた波及効果

- (2) 新たな予後予測分子マーカーの発現量を免疫染色やin situ hybridizationにより判定が可能になれば、臨床での予後診断への応用が期待される。

残された課題と対応方針について

- (1) N-mycを介したKIAA遺伝子の発現増加が腫瘍の悪性度にどのように関与しているのかを、安定発現株を樹立し薬剤感受性などを指標として検討する。
- (2) 実際に臨床検体の予後判定に用いるためには、脳腫瘍組織は症例により形態が多様であることから染色での判定が困難であり、明確に陽性部位を判断できる基準や定量性についてさらに検討が必要である。今後、臨床材料を用いた方法でmRNAレベルとタンパク質レベルの発現量の整合性を検討し、判定基準を設定する。

代表的な設備名と仕様 [既存 (事業開始前) の設備含む]

J S T負担による設備：なし

地域負担による設備：DNAマイクロアレイ解析装置、蛍光顕微鏡、動物細胞培養装置、蛋白質解析装置など