

整理番号	11大・11
------	--------

育成試験の名称	癌関連遺伝子の高感度検出法の開発 動物検体における H-ras 遺伝子変異率検出法の確立	
実施機関及び担当者	大阪市立大学 医学部 講師 矢野 善久	
育成試験の目的	<p>がんの本質は細胞の増殖に関わる複数の遺伝子の変異が蓄積され、次第に細胞増殖調節機構に破綻をきたしてくることにあり、発生の初発段階に認められる微量の変異を検出することは、がんの早期発見早期治療の観点から非常に有用であると考えられる。我々が新規に開発した Thermosequencase Cycle End Labeling (TCEL) 法は DNA 塩基配列決定法の一つであるジデオキシ法および耐熱性 DNA ポリメラーゼを用いた Cycle sequencing 法を応用したもので、従来法より高感度でかつ定量性および再現性に優れた遺伝子変異高感度検出法である。今回、さらに改良を加え、新規のがん診断法としての可能性を検討する。</p>	
試験方法		
試験項目	内 容	
電気泳動を用いない方法の開発	ビオチン・アビジン系を用いた固相法を検討した。	
ヒト遺伝子への適応	対象遺伝子をラットの H-ras からヒトのがん抑制遺伝子の 1 つ p53 に変更し、検出条件を検討した。	
予算額	300万円	
試験結果	<p>簡便性と大量処理のために電気泳動を用いない検出法としてビオチンプライマーとアビジンでコートした 96 穴プレートを組み合わせた固相法を開発した。すなわち、5'末端にビオチンを結合させた変異検出プライマーを用いて TCEL 反応を行い、変異率に応じて放射能ラベルされたプライマーをアビジンでコートした 96 穴マルチスクリンアッセイプレート上に捕捉した後、その放射活性を測定した。その結果、がん遺伝子の 1 つラットの H-ras 遺伝子のコドン 12 の変異を検出したところ、電気泳動法に比べ固相法はシグナルのバックグラウンドが高く定量性がやや劣るものの、検出限界はほぼ同等の 0.001%であった。また、簡便性においては固相法が優れていた。</p> <p>つぎに、ヒト p53 を標的遺伝子に用いてコドン 248 の変異の検出条件を検討した。その結果、変異率 1~0.01%の範囲で定量性は良好であったが、検出限界は 0.01%でラット H-ras 遺伝子の場合の約 1/10 であった。</p>	
現在の状況及び今後の展開方策	<p>育成試験の結果を踏まえて変異検出の対象となる遺伝子の数を増やして続行している。ヒト遺伝子に関しては、倫理的問題で自由には使用できないので、トランスジェニック動物を有する機関と共同研究を始めた。</p>	