

Suppression subtraction法による消化器疾患の分子病態の解明

●榎本信幸¹⁾ ◆黒崎雅之²⁾ ◆渡辺 守²⁾

1) 東京医科歯科大学医学部消化器内科 (現山梨大学医学部第1内科)

2) 東京医科歯科大学医学部消化器内科

〈研究の目的と進め方〉

Subtraction法により、病変特異的に発現する遺伝子群を同定し、原因不明の消化器疾患の分子病態の解明を目指す。mRNAを特異的に増幅するSMART-PCRにより極少量の臨床検体より解析に必要な量のcDNAを増幅、suppressive subtractionにより病変部と正常部の遺伝子発現の差異を迅速・高効率に検出する。

〈研究開始時の研究計画〉

(1) SMART PCR法およびsuppressive subtraction法を導入し、微量な生検・手術材料での遺伝子発現変化を網羅的に解析する困難を克服する。本研究ではこの方法を悪性腫瘍、肝硬変、自己免疫性肝疾患、炎症性腸疾患などの難治性消化器疾患に適用し、これらの疾患で発現が変化する遺伝子の同定を目指す。

(2) 本法により、大腸癌ではWnt inhibitor homologueである $dkk4$ 、肝癌ではTGF- β inhibitorであるdecorin、自己免疫性肝炎ではNK細胞に対するchemokineであるIP-10、原発性胆汁性肝硬変ではミトコンドリア遺伝子群など病態に密接に関連することが予想される遺伝子群を検出した。これらの遺伝子については、*in vitro*での機能解析、疾患臓器特異的に当該遺伝子を発現するtransgenic mouseの作出し、これを推進し、分子病態解明および診断・治療への応用をめざす。

〈研究期間の成果〉

(1) 生検材料から得られる微量のtotal RNAよりmRNAを特異的にlong distance PCRにより増幅するSMART PCR法を導入し、1 μ gのtotal RNAから数十microgramのmRNA由来のcDNAを得ることが可能となった。さらに、suppressive subtraction法による高効率のsubtraction cloningを行い、疾患特異的発現をする遺伝子のPCR産物を得ることができた。

(2) 肝癌cDNAと周囲非癌部cDNAをsubtractionすることにより、FAK, GS, DCC, Gia, PGC, decorinなどの遺伝子の肝癌における特異的な発現変化を見いだした(論文1)。

(3) 大腸癌から周辺正常大腸粘膜のsubtractionでは、同様にCEA, NCA, Bub1, Maspin, TOG, GABA-R, $dkk4$ などの遺伝子の発現を確認した (*in submission*)。

(4) 慢性C型肝炎および自己免疫性肝炎ではchemokineであるIP-10が特異的に発現していた(論文2)。

(5) 胃腺腫、早期胃癌で特異的に発現する遺伝子群を同定した(論文3)。

(6) 原発性胆汁性肝硬変では種々のミトコンドリア由来遺伝子が発現していることを見いだした(論文4)。

〈国内外での成果の位置づけ〉

最近、消化器疾患においても遺伝子発現変化の解析にmicroarrayが導入されているが、個々の解析結果は多様であり、これらの疾患の病態の全体像を解明しうる普遍的な結果は未だ得られていないと思われる。本研究で同定された遺伝子変化もこれらのmicroarrayでの結果とは

異なるものもあり、当面、これらの解析手法は相互に補完的な情報をもたらすと考えられる。一方、本研究で慢性肝炎で発現が上昇していることが明らかとIP-10は急性C型肝炎動物モデルのmicroarray解析でも最も発現変化の大きな遺伝子の一つであり、病態の解明に重要な分子と考えられる。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

癌組織においては、monoclonalな細胞増殖であるため、発現差のある遺伝子を同定することは比較的容易であるが、炎症性疾患など多様な細胞集団での、少数の疾患責任細胞における遺伝子発現の差を検討することは、大多数の細胞の遺伝子発現変化にマスクされやすく困難であった。

〈今後の課題〉

1) 獲得目標

組織内のheterogeneousな細胞集団での遺伝子変化を解析するため、laser capture microdissectionにより特定の細胞集団からのRNAを回収し、これを用いたSSH解析を導入する。また、これまでSSHにて同定された消化器疾患関連遺伝子について、それぞれの疾患での役割を明らかとする。

2) 研究計画

(1) Laser capture microdissectionを用いて、顕微鏡下に癌細胞、実質細胞のみ、または炎症性細胞などを分離し、RNAを抽出、SMART-PCRによりcDNAを増幅してsubtractionおよびmicroarray解析を行う。

(2) 各疾患よりsubtractionで得られた遺伝子の発現変化を多数の臨床検体を用いて調べ、各消化器疾患の病態との特異的な関連を示す遺伝子を同定する。IP-10については、albumin promoter下に特異的に発現するtransgenic mouseを作成し、肝炎を惹起しうるかどうかが検討する。大腸癌より新たに得られた $dkk4$ についてはWnt signal系のinhibitorである可能性を*in vitro*で検証する。

3) 特に力を注ぐべき点、困難が予想される点。

今後は、microdissectionとSMART-PCRを組み合わせることで、これまで不可能であった臨床検体での細胞レベルでの遺伝子発現変化の解析の達成に力点をおく。さらに少量の組織からのRNAを用いてcDNA増幅を行う必要があるが、すでに成功例の報告もあり達成可能と予想される。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

1: Miyasaka Y, Enomoto N, Nagayama K, Izumi N, Marumo F, Watanabe M, Sato C.

Analysis of differentially expressed genes in human hepatocellular carcinoma using suppression subtractive hybridization.

Br J Cancer. 2001 Jul 20;85(2):228-34.

PMID: 11461082 [PubMed - indexed for MEDLINE]

2: Nagayama K, Enomoto N, Miyasaka Y, Kurosaki M, Chen CH, Sakamoto N, Nakagawa M, Sato C, Tazawa J, Ikeda T, Izumi N, Watanabe M.

Overexpression of interferon gamma-inducible protein 10 in the liver of patients with type I autoimmune hepatitis identified by suppression subtractive hybridization.

Am J Gastroenterol. 2001 Jul;96(7):2211-7.

PMID: 11467655 [PubMed - indexed for MEDLINE]

3: Takenawa H, Kurosaki M, Enomoto N, Miyasaka Y, Kanazawa N, Sakamoto N, Ikeda T, Izumi N, Sato C, Watanabe M.

Differential gene-expression profiles associated with gastric adenoma.

Br J Cancer. 2004 Jan 12;90(1):216-23.

PMID: 14710232 [PubMed - indexed for MEDLINE]

4: Chen CH, Nagayama K, Enomoto N, Miyasaka Y, Kurosaki M, Sakamoto N, Maekawa S, Kakinuma S, Ikeda T, Izumi N, Sato C, Watanabe M.

Enhancement of mitochondrial gene expression in the liver of primary biliary cirrhosis.

Hepatol Res. 2005 Jan;31(1):24-30. Epub 2005 Jan 6.

PMID: 15652467 [PubMed - as supplied by publisher]