

## 微量臨床検体発現プロファイルによるがんの個別化治療

◆辻本 豪三 ◆奥水 崇鏡 ◆奥野 恭史 ◆足達 達也

京都大学大学院薬学研究所

### <研究の目的と進め方>

ヒトゲノム計画の成果により、患者の病状に合わせた処方・治療計画を行う、いわゆるテーラーメイド医療が現実のものになろうとしている。ゲノム構造や機能の変化に由来する遺伝子発現変動情報を臨床に応用しテーラーメイド医療を実現するためには、ゲノム機能情報と臨床情報を統合して解析、評価することが必要である。すなわち、ゲノム情報や各種データベースを基に臨床情報とゲノム解析情報を包括的に統合したシステムとして扱う臨床研究の推進が求められる。

しかし病初期の患者から得られる検体は少量であることも多く、貴重な臨床検体から遺伝子発現情報を得ることは必ずしも容易でない。網羅的な遺伝子発現情報解析により次世代のテーラーメイド医療を実現するため、我々は高精度、高効率の SNP、発現プロファイル解析技術の開発が必須であると考えた。これまで辻本等は科学研究費特定領域研究（応用ゲノム）「臨床ゲノム研究のための高感度ゲノム機能解析システムの開発」で臨床ゲノム研究の推進エンジンとなるマイクロアレイ解析技術の開発を行い、高感度マイクロアレイの開発に成功している。この新型 DNA チップは、従来型と比して約 100 倍の高感度を達成した。本研究ではこの高感度チップをさらに改良、高密度化して臨床に応用し、低浸襲的操作により採取される各種難治性疾患の微量臨床検体について、ゲノム機能解析情報を加えることにより、病型診断、治療効果評価、予後予測の精度をこれまで以上に向上させることを目標とする。さらに、ゲノム情報と臨床情報の統合データベースを構築し、これに基づくテーラーメイド医療、ゲノム臨床薬理研究を推進するための先進的モデルを提示する。

### <2007 年度の研究の当初計画>

今年度は高感受性チップ使用時のデータ再現性を確認後、コンテンツを決定し癌判別アルゴリズムを改善する。患者生検食道がんに関して（1）患者手術検体 80 例に加えて、既に株化樹立されている培養食道がん細胞株約 50 種において、化学療法や放射線療法の感受性と発現プロファイルの関係を統合し、これら治療に対する感受性判定に重要な遺伝子群を絞り込む。次に（2）これらの遺伝子群によるマイクロアレイを作製し、これまでに開発した高感度マイクロアレイ DNA チップを用いて食道がん患者からの生検試料によるプロスペクティブ研究を進める。食道がん検体について京都大学腫瘍外科、その他の病院施設において倫理審査委員会の承認を得て、研究を実施できる体制を構築し、また上記各機関から実験実施箇所である京都大学薬学部までの検体収集搬送体制を確立し、品質良好な RNA を抽出可能な状態で検体を取集できることを確認する。

今後のゲノム臨床研究では、生検試料のような微量臨床検体によるゲノム機能解析が極めて重要となる。本研究では申請者が従来開発してきたコア技術を活用しこのような未来志向型の臨床応用ゲノム解析を現実のものとする。検体を採取する京都大学では匿名化システムを稼働させ、検体に関する臨床情報の管理と個人情報情報の匿名化を行う。その一方で、発現プロファイル解析システ

ムを申請者らによって稼働させ、統合インターフェイスで臨床情報および検体情報、プローブのカテゴリやアノテーション情報を発現実験結果と合わせて管理する。さらに臨床医との双方向フィードバックを可能とするインターフェイスを構築しより正確な、臨床情報が経時的に inputs 可能なシステムとする。

### <2007 年度の成果>

微量生検試料からの RNA 抽出に関し、動物移植がんなどを用いた予備実験から高感度チップ用 RNA として充分量を収集できる手技を確認した。実際の臨床検体を解析する場合には、検体の安定性が重要事項となる。食道がん生検検体の搬送・保存システムを構築するためプロトコルを作成し、実際に良質の RNA 検体を採取できることを 15 検体において確認した。

搬送、保存システムを確立した後、あらかじめ選定された検体と細胞株によって作成した癌判別アルゴリズムを用い、新たに収集した検体を判別するモデル実験を行った。食道がん生検検体計 54 組（生検判断によるガン・非ガン部分を比較）について、ガン組織の割合が 6 割以上の検体をガンと判別できることが確認された。食道がんの判別精度は 81% であった。判別できていない検体については、内視鏡検査時に目視で正常と判断されたが前ガン状態であった検体が混じっている可能性がある。上述のアルゴリズムでガンと判定された生検検体について、リンパ節転移を予測したところ、確率 73% で転移を判別することができた。よって高感度 DNA チップは臨床レベルの微量試料の解析においても定量性を保持して微量臨床試料レベルでも十分に計測可能であった。

小型の基板を用い開発した DNA チップの実験条件を検討し、ハイブリダイゼーションプロトコル、およびスキャナーによる検出画像読み取りの条件を確認した。今後本研究においては、より検出力が高いプロトコル、アルゴリズムを工夫することによって、確度高い予測を目指す。開発した特殊形状の DNA チップは、従来方式と比して約 100 倍の感度を有し、また実際の臨床試料の解析においても定量性を保持して微量臨床試料でも十分に計測可能であるが、その解析遺伝子数は当初 300 以下で、網羅的解析には向かなかった。したがって、まず培養食道がん細胞を用いる網羅的発現遺伝子解析は従来型の DNA チップにより行い、さらに、拡張性の高いアレイレイアウトを設計し、スポット濃度 40  $\mu$  M、スポット直径 180 ~ 200  $\mu$  m の条件でカスタムチップの作製を開始、絞り込みに必要なデータ収集の基礎構築を行った。現在、基盤の高密度化により搭載可能な遺伝子数は約 1000 遺伝子まで増加させることが可能となったため、判別アルゴリズムの精度を向上させる遺伝子コンテンツの追加を図る。

さらに患者登録に関し、臨床情報の電子化、匿名化システム、採取試料の保管、管理システムなど臨床ゲノム研究体制を京都大学大学院医学研究科と共同で整え検体の収集を開始している。食道がんの発現プロファイル研究を、腫瘍外科グループと共同研究を行うが、臨床研究に関する京都大学大学院医学研究科・医学部医の倫理委員会の承認は既に得ている。この倫理委員会では、「医

の倫理委員会」において①研究等の対象となる個人の権利擁護（プライバシーの保護等）、②研究等の対象となる個人に理解を求め同意を得る方法とその範囲（説明文と同意書等）、③研究等によって生じる個人への不利益ならびに危険性と医学上の貢献度の予測に関して説明し、委員会の承認を得た上で、サンプル収集を行っている。さらに、臨床情報管理システムの構築は京都大学大学院医学研究科、薬学研究科との連携で研究開発を推進している。

#### <国内外での成果の位置づけ>

大規模臨床ゲノム研究の為に大量かつ迅速な試料検出技術は主として米国ベンチャーを中心として各種開発されつつある。ゲノム発現解析に関しては Affymetrix 社のジーンチップが現在国際標準となりつつあるが、現時点ではその感度、コストに難がある。従って臨床応用に求められる理想のゲノム発現解析システムは、微量臨床試料で解析情報を高精度で収集でき、しかも低コストなものである。この要件を満たす高感度マイクロアレイ法による臨床診断に特化する DNA チップは未だ国内外で類を見ない。

既に我々は動物実験において疾患関連遺伝子の抽出が効率的に行えることをラット標準遺伝子 cDNA ライブラリーによるマイクロアレイ DNA チップを用いて糸球体腎炎モデルの腎臓組織における発現変動遺伝子を解析し、病態形成、病状の悪化や治療の標的に関連する可能性の極めて高い遺伝子群を見出すことに成功している。その他、腎疾患、肺疾患、肝疾患、アレルギー等多数の病態において DNA チップを用いた網羅的ゲノム解析から病態・治療関連候補遺伝子の抽出、更にその病態生理に於ける役割の解明、並びに各種治療薬の作用機構解析に関する研究実績を有し国内外のこの領域の研究をリードしている。

開発した特殊形状の DNA チップは、従来方式と比して約 100 倍の感度を有し、また実際の臨床試料の解析においても定量性を保持して微量臨床試料でも十分に計測可能である。絞り込まれた遺伝子、創薬ターゲットとして有用な遺伝子、および食道がんで特異的に発現変動する既知遺伝子について文献情報を含めて決定したところこれまで食道がんと関係が報告されていない新規遺伝子を同定した。今後のゲノム臨床研究では、生検試料のような微量臨床検体によるゲノム機能解析が極めて重要となる。申請者が従来開発してきたコア技術を活用しこのような未来志向型の臨床応用ゲノム解析を現実のものとする。

#### <達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

患者登録数の確保は各施設の協力体制により着実に進んでいるが一定の期間が必要である。DNA チップ作成時の問題としては、シグナルの不均一性、スポット形状の異常とスポットの同心円化現象の問題が挙げられた。スポット形状の異常とは、コンベンショナル DNA チップの場合、スポット形状が真円でない、スポットの直径が一様でない、スポットがにじむ、シグナルに同心円化などがあげられる。同心円化は一般に基板上的プローブ液の蒸発速度がスポットの辺縁と中心において不均一であることが原因とされ、プローブ溶液の蒸散速度をコントロールすることが必要で、これにはガラス基板表面の濡れ性とオリゴ DNA プローブ液の粘性の最適化が必要である。我々は以前より cDNA プローブを用いたカスタムチップを作成している。近年、cDNA プローブからオリゴ DNA プローブを用いた DNA チップに注目が集まるようになり、同時に DNA チップ作成を目的としたオリゴ DNA 価格が低下したことを受けて、cDNA をプローブとしたコンベンショナル DNA チップで得た技術をオリゴ DNA プローブによる DNA チップにも応用することが可能である。よってこれまでのノウハウを駆使することにより、スポットの不均一性に関わる問題も解決に近い段階まで改善されている。

#### <今後の課題>

食道がん細胞株を用い、化学療法や放射線療法の感受性から絞り込まれた遺伝子群を搭載する高感度 DNA チップを用いて食道がん患者からの生検試料について遺伝子発現解析を行なうプロスペクティブ研究を開始している。この研究では発現解析の食道がん治療方針決定における有用性を検証する。患者登録の段階は最も時間を必要とし、各参加施設の協力体制を仰ぎつつ推進する。この一連の研究から微量臨床検体発現解析による食道がんの個別化医療を目指す。

検体を採取する京都大学で匿名化システムを最大限活用し、検体に関する臨床情報の管理と個人情報の匿名化を行う。施設の倫理委員会に承認を受けたプロトコルに従い、発現プロファイル解析システムを稼働させ、統合インターフェイスで京都大学にて匿名化された臨床情報および検体情報を統合データベースシステムに取り込み、発現実験に関する様々な情報管理、プローブのカテゴリーやアノテーション情報の管理、実験データの管理と発現プロファイル解析を行う。予後予測のための診断用アルゴリズムを、サーバー・クライアントシステム上で、臨床に携わる医師が簡単な操作により操作しデータ参照、追加できるシステムの構築を行う。

今後は本研究方法を発展させ、食道がんの他、腎疾患、肺疾患、肝疾患、アレルギー等の病態において DNA チップを用いた網羅的発現解析から病態・治療関連候補遺伝子の抽出、更にその病態生理に於ける役割の解明、並びに各種治療薬の作用機構解析に関する臨床ゲノム研究を展開する。

#### <成果公表リスト>

##### 1) 論文/プロシーディング

1. 0801282248  
Myoumoto, A., Nakatani, K., Koshimizu, T.A., Matsubara, H., Adachi, S., and Tsujimoto, G. 2007. Glucocorticoid-induced granzyme A expression can be used as a marker of glucocorticoid sensitivity for acute lymphoblastic leukemia therapy. *J Hum Genet* 52:328-333.
2. 0801282303  
Kawanishi, H., Takahashi, T., Ito, M., Matsui, Y., Watanabe, J., Ito, N., Kamoto, T., Kadowaki, T., Tsujimoto, G., Imoto, I., et al. 2007. Genetic analysis of multifocal superficial urothelial cancers by array-based comparative genomic hybridisation. *Br J Cancer* 97:260-266.
3. 0801282312  
Ruike, Y., Katsuma, S., Hirasawa, A., and Tsujimoto, G. 2007. Glucocorticoid-induced alternative promoter usage for a novel 5' variant of granzyme A. *J Hum Genet* 52:172-178.
4. 0801282323  
Matsunaga, T., Yasuda, K., Adachi, T., Gu, N., Yamamura, T., Moritani, T., Tsujimoto, G., and Tsuda, K. 2007. Alpha-adrenoceptor gene variants and autonomic nervous system function in a young healthy Japanese population. *J Hum Genet* 52:28-37.
5. 0801282333  
Matsunaga, T., Yasuda, K., Adachi, T., Gu, N., Yamamura, T., Moritani, T., Tsujimoto, G., and Tsuda, K. 2007. Association of beta-adrenoceptor polymorphisms with cardiac autonomic modulation in Japanese males. *Am Heart J* 154:759-766

##### 2) データベース/ソフトウェア

無し