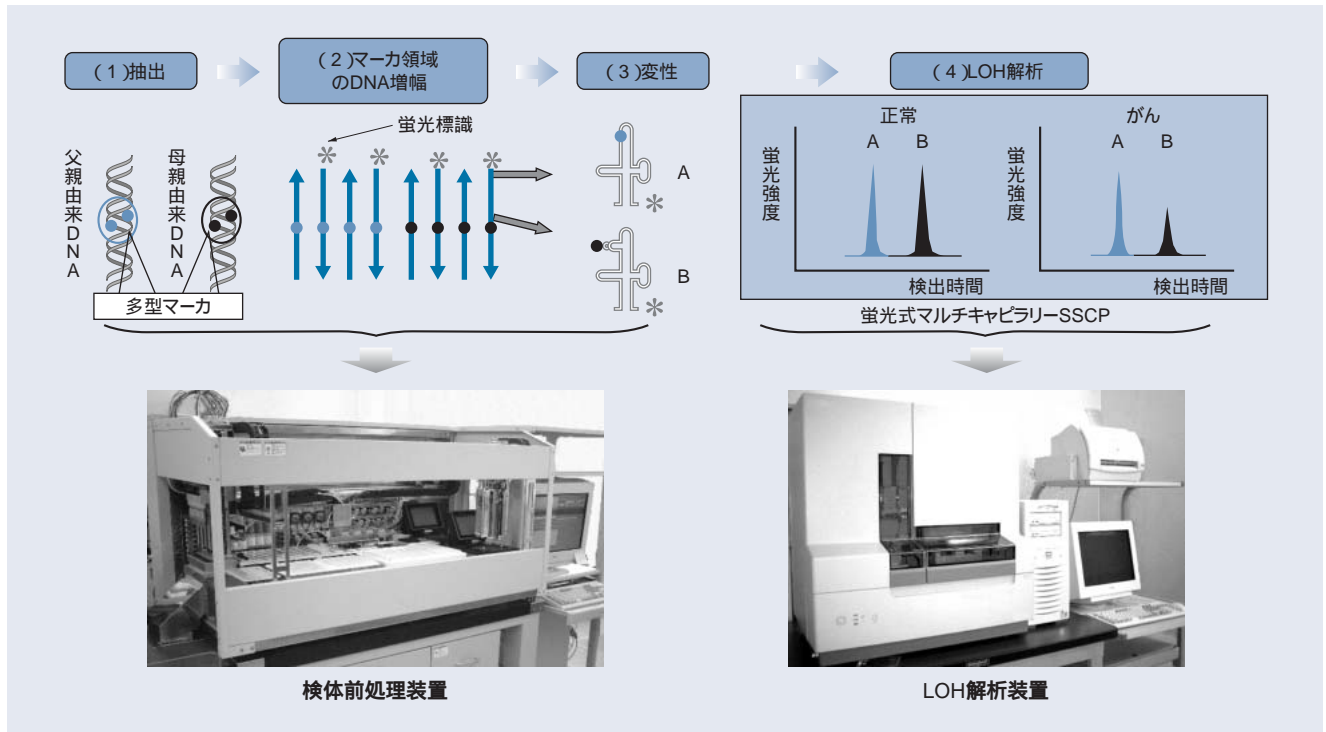


がんの再発リスクを予測する 遺伝子検査システムの開発

Genetic Diagnosis of Bladder Cancer Using Multiple-Capillary Electrophoresis

菅野 康吉 *Kōkichi Sugano* 神田 隆之 *Takayuki Kanda* 小沢 理 *Satoshi Ozawa*
市川 明 *Akira Ichikawa* 前田 耕史 *Kōshi Maeda* 福蘭 真一 *Shin'ichi Fukuzono*



注：略語説明 DNA(Deoxyribonucleic Acid), LOH(Loss of Heterozygosity), SSCP(Single Strand Conformation Polymorphism)

膀胱(ぼうこう)がん遺伝子検査法の概要とプロトタイプ装置の外観

腫瘍(しゅよう)組織や尿中のがん細胞の染色体の欠失を、蛍光式マルチキャピラリー-SSCP法を用いたLOH解析によって調べる。AとBのピークの高さが異なる場合、がん細胞の中で染色体の欠失が生じていると判定する。

がんは世界的にも死因の上位を占め、今後も増加していくと予想されることから、社会的にも大きな問題となっている。一方、ヒトゲノムの配列解析がほぼ終了し、ゲノム情報を利用したヒト遺伝子検査、特に個人の遺伝子の多様性(遺伝子多型)を対象とした検査が、個人の特徴に合わせた最適な医療(オーダーメイド医療)を提供し、医療の質を向上する検査として期待されている。

株式会社日立ハイテクノロジーズは、国立がんセン

ターで開発された「膀胱がんの再発リスクを予測する遺伝子検査法」を導入し、この検査法の臨床統計学的有用性を実証し、薬事法の認可と保険収載を目的として多施設共同臨床試験を推進中である。また、これまでの検査法は煩雑な操作と熟練を要していたことから、この検査の自動化を目的として、日立グループ独自のDNA抽出技術とマルチキャピラリー電気泳動装置を用いた高精度一本鎖DNA高次構造多型解析法を開発し、自動化プロトタイプ装置を試作した。

1 はじめに

わが国では、がんは死因の第1位であり、今後も増加すると予想されることから、厚生労働省を中心に国家的な取り組

みが行われている。がんは、本来ヒトが持っている正常な遺伝子が変化(変異)することの積み重ねにより、発生すると考えられている。したがって、遺伝子の変異を直接検査することが可能な遺伝子検査は、有効な検査法として期待されている。

株式会社日立ハイテクノロジーズは、国立がんセンターで開発された「膀胱がんの再発リスクを予測する遺伝子検査法」の臨床試験を行うとともに、この検査法の自動化を目的とした「がん遺伝子検査システム」を開発した。

ここでは、この検査システムについて述べる。

2 がん遺伝子検査法の二一ス

国立がんセンターの臨床基礎研究により、膀胱がんを対象に「染色体の消失」と「がん再発」の間に相関関係が見出された¹⁾。膀胱がんは、病期によって施行される標準的な治療法が異なる(図1参照)。膀胱鏡による治療が可能な膀胱粘膜の表面に発生した膀胱がん(表在性膀胱がん、図1のTa,T1)を対象として、腫瘍組織と尿検体中の9番染色体の欠失を検査すると、欠失していた症例では80%が2年以内に再発したのに対し、欠失していなかった症例で再発したのは、10%であった²⁾³⁾。また、がんの浸潤が筋層まで達しているような進行したがん(図1のT2以上)では、90%の症例に17番染色体短腕の欠失が認められた²⁾³⁾。このように、膀胱がん腫瘍組織と尿を対象とした遺伝子検査は、表在性膀胱がんの再発と浸潤性膀胱がんへの進展の予測に有用であると考えられる。

さらに、膀胱がんで見られる染色体の欠失は、染色体の種類に違いはあるものの、肺がんや大腸がんなどのさまざまながんに見られる現象であり、今後の研究によって同様な原理に基づく検査法が広く普及することが期待されている。

3 がん遺伝子検査システム

膀胱がん遺伝子検査に用いる検体は、膀胱鏡手術によって切除した腫瘍組織、膀胱内壁から脱落したがん細胞を含む尿、および染色体の欠失がない正常コントロールとして使用する血液の3種類である。

この検査は、DNA(デオキシリボ核酸)抽出、マーカDNA増幅、変性、およびLOH(Loss of Heterozygosity: 異型接合性の消失)解析の4工程から構成し(71ページの図参照)以下の順で行う。

- (1) 検体からDNAを抽出する。
- (2) ヒトは父親と母親それぞれから染色体を受け継ぐことから、同じDNAを2種類持っている。このDNAの中で、父親と母親とではDNA配列が異なる多型マーカを含む領域をPCR(Polymerase Chain Reaction)法を用いてDNA増幅する。
- (3) 増幅されたDNAを熱変性し、2本鎖DNAを1本鎖DNAにする。
- (4) 1本鎖DNAを、マルチキャピラリー電気泳動装置を用い

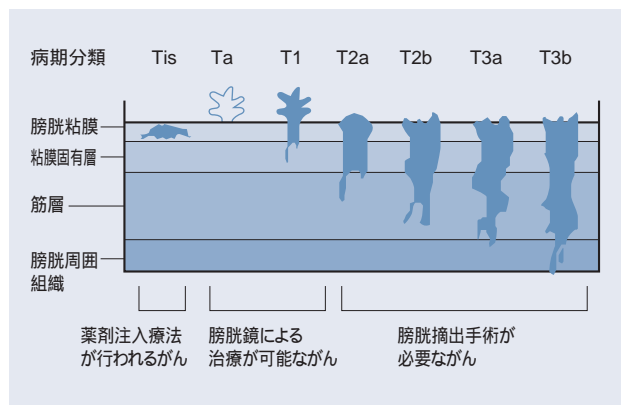


図1 膀胱がんのタイプと治療法

がんの進行度(病期)の分類は、治療方針の決定に重要である。がんが筋層に浸潤すると、膀胱摘出など身体に対して負荷の大きな治療となり、生活の質が低下する。

たSSCP(Single Strand Conformation Polymorphism: 1本鎖DNA高次構造多型)解析によって分離し、父親または母親由来の電気泳動ピークの増減から、LOHを判定する。この結果に基づき、LOHが陽性ならば染色体が欠失しており、陰性ならば欠失していないと診断する。

この検査法は、従来ほとんどすべての工程を人手に頼って実施してきた。しかし、将来、病院の検査室などで実施することを想定すると、不慣れた遺伝子取り扱い技術や、工程ごとに煩雑な操作が必要な点が課題であった。そのため、この検査法の自動化を目的にDNA抽出やマルチキャピラリー電気泳動技術を開発し、プロトタイプ装置を試作した。

3.1 検体前処理装置

自動装置として(1)DNA抽出、(2)マーカ領域のDNA増幅、および(3)変性の工程を1台の装置上で自動化する検体前処理装置を試作した。

この装置は、8連分注機構、試薬ディスペンサ、 μ Lレベルの微量分注機構、およびPCRサーマルサイクラ2台で構成している。3種類の検体は、それぞれ、血液は採血管を開封した状態、尿中は離細胞は尿沈渣(さ)を懸濁した状態、腫瘍組織はホモジナイズした状態で最大8検体を同時にセットできる。

DNA抽出では、シリカ担体を内蔵した分離チップを用いる日立グループ独自の吸引吐出方式を採用した。この方式はグアニジン塩存在下でDNAがシリカに吸着する性質を利用したもので、吸引と吐出を繰り返し、サンプルをシリカに複数回接触させることで、高い吸着性能と再現性を実現している。試薬ディスペンサで抽出試薬を各容器に分注し、分離チップを装着した8連分注機構により、8検体同時に吸引吐出を繰り返し、全自動でDNAを抽出できる。

LOH解析のための多型マーカは、9番染色体上に1塩基多型など、合計7か所、17番染色体上に6か所を設定した。すべての人が同じ種類の多型マーカを持つわけではないの

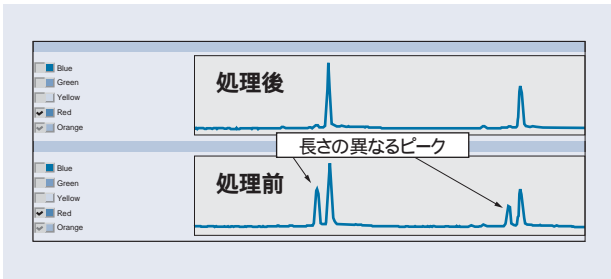


図2 プラントエンド処理の効果

プラントエンド(平滑末端)処理によって長さの異なるサブピークが消失し、定量的精度が向上する。

で、一つの染色体に対して複数の多型マーカを使用することで、検査漏れを防いでいる。マーカ領域のDNAは、蛍光色素で標識したプライマーを用いるPCR法で増幅した。サーマルサイクラ上に設置した96ウェルPCRプレートに、PCR試薬と抽出されたDNA試料を微量分注機構によって分注し、PCRを開始する。PCR後、増幅されたDNA試料にKlenow酵素を添加し、プラントエンド(平滑末端)処理する。この処理は、PCR時のアデニン付加が原因で発生する、長さの異なる増幅DNAを同じ長さに変換するものである(図2参照)。

このプラントエンド処理した増幅DNAを別に設置してあるサーマルサイクラ上の96ウェルPCRプレートに分注し、変性試薬を添加後、92℃で2分間熱処理を行う。

以上の三つの工程は、連続して自動で行うことが可能である。試料は最終的に96ウェルPCRプレートに入っており、このプレートをもつLOH解析装置にセットすることができる。

3.2 LOH解析装置

従来、SSCP法にはスラブゲル電気泳動が使用されていた。この方法は、1 mm以下の間隔で向かい合わせた数十センチメートル角のガラス板の間に分離用ゲルを流し込み、固形化させ、このゲルの間隙(げき)に試料を分注し、電気泳動する。この操作はすべて人手で行われ、ゲル作成と電気泳動に1日以上を費やしていた。近年、急速に普及してきたマルチキャピラリーDNAシーケンサでは、マルチキャピラリー電気泳動装置に専用のDNA配列解析アプリケーションを適用し、自動化を実現している。そのため、このマルチキャピラリー電気泳動装置にSSCPアプリケーションを適用することにより、LOH解析工程の自動化とスピードアップを検討した。

この装置は、16本キャピラリーアレイを用い、分離用ポリマーを自動充填(てんじ)し、オートサンプラ上に設置した96ウェルプレートから試料をキャピラリーに自動的に導入し、電気泳動を実施する。

SSCP用の電気泳動バッファにはトリス-グリシン系バッファを使用することにより、発熱を抑制し、キャピラリー間の分離能のばらつきを抑制している。また、通常市販されているポリ

マー濃度(3~6%)の2倍以上にあたる12~15%の高濃度のポリマーを採用することで、スラブゲルと同等以上の分離性能を達成するとともに、全SSCP解析時間を1時間に短縮している。

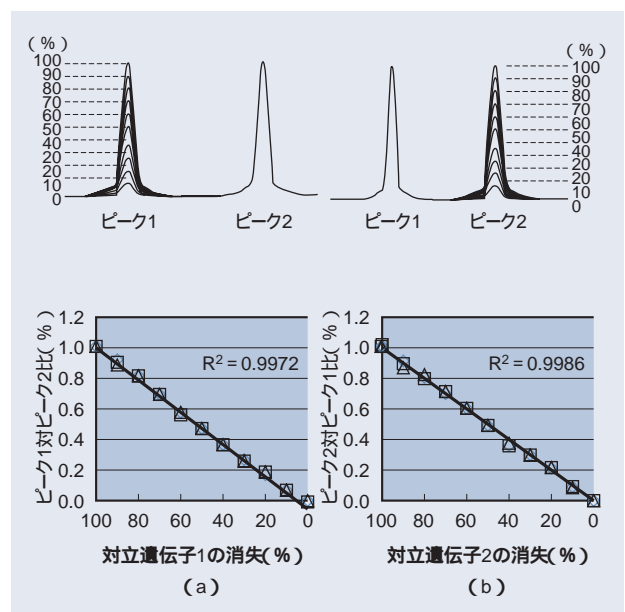
さらに、LOH解析には、ピーク比の定量性が重要である。多型マーカの存在比率をそれぞれ10%ずつ変化させたときの、検出されたピーク比との相関関係を調べた結果、高い定量性を確認できた(図3参照)。

また、マルチキャピラリー電気泳動固有の問題であるキャピラリー間の再現性を検討した結果、キャピラリー間再現性は変動係数CV1.4%以下と良好な再現性を示した。また、SSCPの繰り返し再現性はCV1.6%以下であり、スラブゲルと同等以上の再現性であった。

4 多施設共同臨床試験

現時点では、この遺伝子検査法は健康保険の適用を受けていないため、検査費用の全額が自己負担となり、広く利用することが難しい。また、これまでの基礎的研究の結果では症例数が少ないことから、薬事法認可や保険収載に必要な臨床的有用性を実証するには至っていない。そのため、この検査法の臨床的有用性を統計学的に確認し、薬事法の認可を得ることを目的として、症例数を大規模に収集するための多施設共同臨床試験を開始した。

この試験は全国13か所の医療機関で、倫理審査委員会や治験審査委員会の承認を得て実施し、膀胱がんの患者の同意に基づいて、匿名化された検体と診療情報の提供を



注：略語説明 R²(相関係数)

図3 多型マーカのピーク比率の定量性

相関係数はそれぞれ0.999および0.997と高い相関を示し、ピーク比率の高精度な定量分析が可能である。

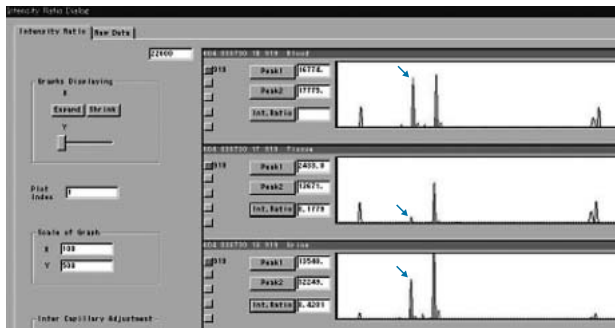


図4 膀胱がん検体の解析例

腫瘍組織と尿検体にLOH(異型接合性の消失)が認められ、17番染色体が欠失していると考えられる。

受けたうえで、「遺伝子検査による染色体の欠失」で再発や浸潤がんへの進展」との相関関係を最長3年間にわたって調べている。

実際に登録された症例の遺伝子検査結果を図4に示す。検体は同図の上方から、血液、腫瘍組織、および尿であり、多型マーカには17番染色体上のマーカを使用した。上段の正常コントロールである血液由来のピークに対して、中段の腫瘍組織と下段の尿由来の左側のピーク(矢印)が、右側のピークと比べて明らかに減少している。この結果から、LOH陽性と判定される。実際には、このほかに12か所の多型マーカに対して同様のLOH解析を行い、これらの結果から、9番染色体と17番染色体の欠失を総合的に判定している。今後、これらの遺伝子検査結果と提供された診療情報を基に、膀胱がんの再発と浸潤性膀胱がんへの進展の予測に関し、この検査法の臨床的有用性を統計学的に検証する考えである。

5 おわりに

ここでは、蛍光式マルチキャピラリー-SSCP法と、その自動前処理装置、および解析装置を組み合わせた「がん遺伝子検査システム」について述べた。

この遺伝子検査法については、臨床的有用性を実証するために、臨床試験を実施中である。再発や浸潤進展リスクに関する検査はこれまでにない新しい概念の臨床検査であり、オーダーメイド医療を支える検査法になるものと期待される。臨床試験の結果を踏まえて、がん遺伝子検査システムの薬事承認と保険収載を目指して、事業化を推進していく予定である。

なお、多施設臨床試験には、秋田大学医学部附属病院、大阪府立成人病センター、財団法人癌研究会附属病院、京都大学医学部附属病院、国立がんセンター中央病院、札幌医科大学医学部附属病院、静岡県立静岡がんセンター、筑波大学附属病院、栃木県立がんセンター病院、奈良県立医科大学附属病院、新潟県立がんセンター新潟病院、浜松医

科大学附属病院、NPO法人日本臨床研究支援ユニット、日立製作所日立総合病院に協力をいただいている。ここで、関係各位に厚く御礼申し上げる次第である。

参考文献

- 1) K. Sugano, et al.: Diagnosis of Bladder Cancer by Analysis of the Allelic Loss of the p53 Gene in Urine Samples Using Blunt-End Single-Strand Conformation Polymorphism, *Int. J. Cancer*, 74 : 403(1997)
- 2) M. Shigyo, et al.: Molecular Followup of Newly Diagnosed Bladder Cancer Using Urine Samples, *J. Urol*, 166 : 128(2001)
- 3) M. Shigyo, et al.: Allelic Loss of Chromosome 9 in Bladder Cancer Tissue and Urine Samples Detected by Blunt-End Single-Strand DNA Conformation Polymorphism, *Int. J. Cancer*, 78 : 425(1998)

執筆者紹介



菅野 康吉

栃木県立がんセンター 研究所 がん遺伝子・がん予防研究室
がん遺伝子診断の臨床研究および遺伝相談外来に従事
医学博士
日本癌学会評議員
E-mail : ksugano @ tcc. pref. tochigi. jp



市川 明

栃木県立がんセンター 研究所 がん遺伝子・がん予防研究室
多施設臨床研究における膀胱がんの遺伝子検査に従事
E-mail : aichikawa @ tcc. pref. tochigi. jp



神田 隆之

2000年日立製作所入社、株式会社日立ハイテクノロジーズ
ナノテクノロジー製品事業部 研究開発本部 バイオメディカルセンタ 所属
現在、がん遺伝子検査システムの開発に従事
工学博士
日本分子生物学会会員
E-mail : kanda-takayuki @ naka. hitachi-hitec. com



前田 耕史

2001年日立製作所入社、株式会社日立ハイテクノロジーズ
ナノテクノロジー製品事業部 研究開発本部 バイオメディカルセンタ 所属
現在、がん遺伝子検査システムの開発に従事
E-mail : maeda-koushi @ naka. hitachi-hitec. com



小沢 理

1984年日立製作所入社、中央研究所 ライフサイエンスセンタ 所属
現在、再生医療における品質管理法の研究に従事
理学博士
日本分析化学会会員
E-mail : ozawa @ crl. hitachi. co. jp



福園 真一

1984年日立製作所入社、株式会社日立ハイテクノロジーズ
ナノテクノロジー製品事業部 研究開発本部 バイオメディカルセンタ 所属
現在、遺伝子解析装置の開発に従事
工学博士
日本癌学会会員
E-mail : fukuzono-shinichi @ naka. hitachi-hitec. com