定量的 PCR による新しい遺伝子発現 プロファイルシステムの構築

— 臨床および創薬への応用 —

特集 テイラーメイドメディスンと DDS

川口辰哉^{*1)}, John C. Cheronis^{*2)}, 満屋裕明^{*1)}

A novel gene expression profiling system using quantitative PCR—For clinical research and drug development—

Innovation of gene technologies such as DNA microarray and real-time PCR has made it possible to quantitatively measure the expression of multiple genes. Such new technologies are expected to advance clinical medicine and pave new avenues for drug development. Source Precision Medicine™, a biotechnology company with which we have been working, has recently established a novel gene-expression profiling system using quantitative PCR in order to construct data bases of genetic profiles of individual patients upon therapy and disease progression. We here describe the system and recent data of the gene profiles associated with inflammatory processes, and discuss advantages of the use of the system for diagnosis/therapy and drug development.

Tatsuya Kawaguchi^{*1)}, John C. Cheronis^{*2)}, Hiroaki Mitsuya^{*1)}

*key words : gene expression profiling, quantitative PCR,
inflammatory gene response, drug development*

新世紀の幕開けとともにヒトゲノムドラフト配列が発表され¹⁾, 3~4 万個と推定される遺伝子(およびその産物)の機能を明らかにしようとする本格的なポストゲノム時代が到来した。生命現象はさまざまな遺伝子機能の集積と相互作用によって維持されており, 筆者らが遭遇する疾病の多くはその“歪み”によって引き起こされる。端的な例は 1 遺伝子の機能欠損によって起こる遺伝性疾患であるが, 多くの後天性疾患(たとえば糖尿病や癌)では複数の遺伝子が複雑に病態に関わるため, 依然として病因遺伝子や治療のターゲットとなるような遺伝子の同定は困難をきわめている。

ところが, このような状況を打破する有力なポストゲノム時代の解析手段として DNA マイクロアレイやリアルタイム PCR など新テクノロジーが出現し, 遺伝子発現を網羅的かつ定量的に測定すること

が可能となった。これらを臨床へ応用することにより, 疾患特異的な遺伝子の動きや薬剤の反応性をより詳細に把握でき, 病態解析や新薬開発に大きく寄与するものと期待されている²⁾。これは生命現象を時間的, あるいは空間的な“動き”として理解しようとするバイオインフォマティクスの流れとリンクしており, 正常および異常の遺伝子発現プロファイルのデータベース化によって, さらにその有用性が高まるものと思われる。

このような背景から, 米国コロラド州ボルダーに本拠地を置くベンチャー企業 Source Precision Medicine³⁾(以下 Source)は, 定量的 PCR 法を用いた炎症関連遺伝子の網羅的解析法を確立し, これを用いた正常および異常(疾患)における遺伝子発現プロファイルのデータベース化や薬剤反応性など臨床や創薬への応用を試みている。筆者らも, そのプロジェクトに参画していることから, この新システムの有用性について, 一部データを紹介しながら概説したい。

^{*1)} Department of Internal Medicine II, Kumamoto University School of Medicine 熊本大学医学部内科学第二講座

^{*2)} Source Precision Medicine, Boulder, CO USA ソース プレシジョン メディスン

図 1 DNA マイクロアレイと定量的 PCR の有用性の比較

DNA マイクロアレイと定量的 PCR

遺伝子発現解析には目的に応じてさまざまな方法が用いられているが、その基本原理は、① mRNA (もしくは mRNA を鋳型に逆転写酵素 reverse-transcriptase (RT) で変換した cDNA) に対して目的遺伝子プローブをハイブリダイズさせて検出する方法と、② 目的とする遺伝子に特異的なプライマーを用いて cDNA を増幅し検出する方法 (RT-PCR 法) の二つに大別される。前者に関しては、従来よりノーザンブロット法が代表的検出法であるが、十分なサンプル (RNA 量) が必要なことや定量性に乏しいこと、1 プローブ 1 ハイブリダイゼーションが原則であり、1 回のハイブリダイゼーションで多数の遺伝子発現を検出することが困難であることなどから、網羅的遺伝子発現解析には不向きである。この欠点を補う形で出現した革新的技術が DNA マイクロアレイで、ガラス基盤上に高密度に集積固定化された数千から数万のプローブ DNA に対し、蛍光などで標識したサンプル由来の cDNA を 1 回ハイブリダイゼーションさせることによって一気にゲノムスケールの遺伝子発現解析が可能となった。

一方、後者の RT-PCR に関しては、きわめて微量なメッセージでも解析可能なことから感度にすぐれる反面、PCR 反応が一定回数を超すと増幅産物がプラトーになるため定量性を失うことや (プラトー効果)、電気泳動を行う手間がかかることなどから、や

はり多数サンプルの定量的解析に適しているとは言いがたい。このような RT-PCR の定量性や煩雑さの問題を克服するために考案されたのが PE Biosystem 社の TaqMan ケミストリを用いた定量的 PCR であり、これを用いるとサーマルサイクラーの各ウェルの増幅産物をサイクルごとにリアルタイムにモニターすることで電気泳動を行うことなく鋳型 DNA の初期量を定量できる。

このように、従来の遺伝子発現解析法の欠点を克服しつつ発展してきた DNA マイクロアレイと定量的 PCR であるが、それぞれの特徴を生かした臨床医学への応用が考えられている。図 1 に両者の有用性を比較した。マイクロアレイは、プローブ DNA を数千から数万と高密度に集積できることから、標的遺伝子を絞り込むのに非常に有用であるが、検体数が増えるとその分ハイブリダイゼーションやデータ処理の手間がかかりコストも高くなるという難点がある。

一方、定量的 PCR は 1 度に高々 96 ウェル分のサンプルしか処理できないことや、標的遺伝子ごとにプライマーを設計したり反応条件を検討する必要があることから、多くの遺伝子のなかから特定の標的遺伝子を絞り込むという目的には適さない。しかし、いったん標的遺伝子が絞り込まれば、感度や定量性そして再現性にすぐれており、1 標的遺伝子に対して多数の検体処理が同時に可能であることから、測定系を確立しさえすれば臨床検査レベルの手軽さ

採血日：○ 0週 ◐ 1週 ● 2週 ● 3週
 C_T value: PCR増幅産物が閾値に到達するサイクル数
 図2 健康人単一ドナーにおける遺伝子発現の再現性

で応用が可能である。

筆者らの目的は、既知情報をもとに特定カテゴリーの標的遺伝子パネル(たとえば炎症関連遺伝子)を設定し、これに対する遺伝子発現プロファイル解析システムを構築し、これを用いてさまざまな疾患や薬剤投与の影響などを調べデータベース化し、臨床病態解析や創薬へ応用することである。この目的の実現のためにはマイクロアレイより定量的PCR法のほうがより合理的・現実的であると考えられる。

遺伝子発現プロファイルシステムの概要

定量的PCRを用いた遺伝子発現プロファイルのデータベース化を進めようとするれば、まず解析対象遺伝子をどのように絞り込むかという点が問題となる。当然のことながら解析対象となる臓器(細胞)や対象疾患によって解析対象遺伝子は異なってくるし、また研究者の興味によっても違ってくる。Source社では、まず解析対象となる遺伝子を機能別に、① サイトカイン、ケモカイン類、② シグナル伝達関連分子、③ 細胞表面マーカー、④ 接着因子、⑤ 酵素類や阻害物質、⑥ その他、などのカテゴリーに分類し、それぞれ代表的な(もしくは重要な)遺伝子を選定した。その数は100種類以上にものぼる。

それぞれの遺伝子について、PCR反応条件をできる限り一定となるようプライマーを設計し反応条件を整えた。これら遺伝子はさまざまな組み合わせで選択可能であり、目的に応じた標的遺伝子パネルが作成できる。Source社では、まず手はじめに24種類の炎症関連遺伝子を標的としたパネルを用いて臨床サンプルの解析を開始している。

つぎに、検体採取から解析までの流れを簡単に紹介したい。まず検体は末梢静脈血とし、RNA安定化剤入りの真空採血管(PAXgene blood RNA tube™, QIAGEN)へ直接採血する方式を採用した。この利点は、操作によるアーチファクトを最小限に抑え、かつ再現性が高いこと、生体反応を全白血球の遺伝子発現の総和として表現できること、採血法が簡便で同一患者から繰り返し採取可能なこと、患者への侵襲が少なく同意が得やすいこと、などである。いったん採血したチューブは室温で5日間、凍結させればさらに数週間はRNAが安定したまま保存可能であり、サンプルを移送する際には大いに役立つ。

RNAは専用のシリカゲル膜を用いたスピンカラムで単離し、逆転写酵素によりcDNAへ変換し、TaqManケミストリによるリアルタイムPCR(ABI PRISM 7700 Sequence Detection System™,

図3 ステロイド投与による遺伝子発現変化

PE Biosystem)を用いリボゾーム RNA を内部標準として発現量の解析を行う。このような遺伝子発現プロファイルシステムはすでに完成し、Source 社内に設置された解析センターにおいて共同研究施設から送られてきたサンプルが日々解析されており、目的に応じたデータベースが完成するのも間近いと期待されている。

遺伝子発現プロファイルシステムの有用性

ここで実際の解析データを示しながら、Source 社の遺伝子発現プロファイルシステムの有用性について解説したい。まず本システムで重要な点は、PCR が高感度であるがゆえに同一条件下で測定結果の再現性が担保されるかどうかという点である。測定結果に影響を与える要因は、生体側の要因(健康状態や服薬の有無など)および、採血法、サンプルの保存状況や処理方法、測定機器の精度などのシステム運用に必要な技術的要因である。そこで生体側要因が一定と考えられる健康な 1 人のドナーに対して毎週 1 回の採血を 4 週連続で計 4 回行い、技術的要因に起因する測定値のばらつきの有無を検討した。

その結果を図 2 に示す。横軸に今回対象とした 24 種類の炎症関連遺伝子パネル、縦軸には、サンプル間で内部標準の測定値に差を認めないことから、PCR 増幅産物が閾値に到達するサイクル数(C_T value)の実測値をそのまま示した。結果は、24 種類

の遺伝子発現パターンが事実上完全に一致していた。これは、本システムが技術的要因による誤差はきわめて少なく、ドナーが臨床的に安定した状態であれば非常に再現性のよい測定法であることを示している。

それでは、逆に個体がなんらかの刺激を受けた場合に遺伝子発現パターンはどのような変化をみせるのであろうか。Source 社は、1 例として代表的抗炎症剤であるグルココルチコイド(プレドニゾロン) 100 mg を健康人に連日 3 日間内服してもらい、その前後での遺伝子発現パターンの変化を検討した。プレドニゾロン内服前の遺伝子発現をキャリブレーターとし(発現量をベースライン値「1」で表現)、内服後の遺伝子発現量が何倍変化したかを相対値で表現した。相対値が 1 以上は up regulation, 1 以下は down regulation と判断される。結果は図 3 に示すように、炎症性サイトカインである IL-1, IL-8, TNF- α などの発現が抑制されており、この点では従来から知られているグルココルチコイドの抗炎症作用が再現されていた⁴⁾。

ところが、IL-2 や IL-12 など代表的 T 細胞関連のサイトカインの遺伝子発現はむしろ増強しており、従来の報告とは異なる結果であった⁴⁾。その違いの理由の一つとして、従来の報告が主に分離後のリンパ球を用いた *in vitro* の実験結果であるのに対し、今回は *in vivo* 実験であることから、複雑な血球間の相互作用が結果に反映されたのかもしれない。

□ *in vitro* 反応 (健康人由来の全血に、メチルプレドニゾロン添加し、6時間インキュベート)
 ■ *in vivo* 反応 (健康人にプレドニゾロン 100 mg/日を3日間投与)

図 4 グルココルチコイド刺激に対する遺伝子応答：*in vitro* および *in vivo* の比較

図 5 エンドトキシン(LPS)刺激による白血球遺伝子発現プロファイル

事実、健康人から採血した血液を血球分離することなく全血のまま *in vitro* でグルココルチコイド処理した場合は、*in vivo* における遺伝子発現パターンとほぼ一致していた(図 4)。

このように全血を用いた場合、*in vitro* と *in vivo* で近似した結果が得られることから、*in vitro* 実験

が薬剤や外来性物質の刺激に対する生体の応答反応を知る代用手段になりうる可能性を示している。特に人体投与が困難な毒素の人体への影響を知りたい場合には有用性を発揮する。

たとえば、グラム陰性桿菌の菌体成分であるリポポリサッカライド(LPS)はエンドトキシンとして

図 6 疾患特異的遺伝子発現プロファイル

知られ、グラム陰性桿菌感染症による敗血症性ショックの原因となる。この LPS が人体にどのような影響を与えるかを詳細に知ることは早期診断や治療に大いに役立つが、実際に人体投与実験は倫理上許されない。そこで、健康人由来の全血に対し、10 ng/ml LPS を添加後 37°C で 6 時間インキュベートし、LPS 無添加サンプルをキャリブレーターとして炎症関連遺伝子発現の変化を解析した。結果は図 5 に示すとおり、種々の遺伝子発現変化が、 10^{-2} から 10^4 とかなり広いダイナミックレンジで測定可能であった。変化率の大きい遺伝子に着目すれば、病態解釈の一助となることや、早期診断や治療効果判定のマーカー、さらには治療のターゲットとしての意義を見いだすことができるかもしれない。

このように、人体に投与できない有害物質や、人体への影響が不確かな開発中の新薬などの *in vivo* 効果を知りたい場合は本法がきわめて有用な手段の一つとなる可能性のあることがうかがい知れる。

臨床と創薬への応用

今回は標的遺伝子を炎症関連遺伝子に限って話を進めてきたが、これら遺伝子発現は健康な状態の個体では生理的変動が少ないことは上述のとおりである。一方、個体間の発現差に関しても、年齢や性を

一致させた場合はほとんどばらつきがないことが確認されている(データ未公開)。したがって、健康人コントロールの遺伝子発現プロファイルが完成すれば、これを用いて病的状態(疾患)における遺伝子発現変化の特徴を捉えることが可能である。

たとえば、慢性喫煙が原因で引き起こされる代表的疾患として慢性閉塞性肺疾患(慢性気管支炎/肺気腫, chronic obstructive pulmonary disease: COPD)という一群の難治性肺疾患が知られている。COPD は欧米では死亡原因の上位を占め、高齢化、大気汚染、喫煙者増加などによって患者数も増加しており、社会的または経済的にも国家的対策が必要とされている。喫煙は確かに COPD の危険因子であるが、発症するのは喫煙者の高々 10~20% であることが疫学的に知られており、発症までには多因子の関与が指摘されている²⁾。

特に、喫煙が気道や肺胞に慢性炎症を惹起し、組織破壊と修復機転が持続することによって病気が進展することを考慮すれば、発症者と非発症者とは喫煙刺激に対する感受性の差(炎症の程度や内容が異なる)が予想される。そのような感受性の差が、末梢白血球における炎症関連遺伝子発現パターンの違いとして捉えられれば、発症する可能性のある喫煙者を早期に発見でき、根拠を持って病勢進行の予防に努めることができ、ひいては医療費削減といった

図 7 遺伝子発現プロファイルによる抗炎症薬効果の識別

社会的要請に応えることにつながる。

そこで、Source社は喫煙歴を含め背景のよく似た2名のCOPD患者および2名の非肺疾患ドナー(コントロール)の遺伝子発現プロファイルと比較している。キャリブレーターには複数の非喫煙健康人の平均値を用いた。その結果、図6に示すようにCOPD患者では複数の遺伝子で数倍から数十倍のup regulationが認められたが、コントロールではまったくup regulationが認められなかった。

これは複数の炎症関連遺伝子のup regulationがCOPDの進展に関与することを示唆しており、今後多症例での確認が待たれるところである。今回はモデルとしてCOPDを取り上げたが、慢性炎症が病態に深く関与する疾患は数多く、たとえば慢性関節リウマチ、慢性肝炎、アレルギー疾患(気管支喘息、花粉症、皮膚炎など)などは罹患率も高く格好の解析対象になるものと考えられる。

つぎに、本システムの大きな狙いの一つである新薬開発への応用について考えてみたい。まず図7に示したのは、健康人2名に対して2種類の抗炎症剤(プレドニゾン100 mg/日およびイブプロフェン800 mg/日)をそれぞれ十分な間隔をおいて3日間で内服してもらい、内服前後における遺伝子発現(6種類のサイトカイン遺伝子に限定)の変化を比較することで薬効評価を行ったものである。プレドニゾン効果は、遺伝子1~5のdown regulationと遺伝子6のup regulationに反映されているが、これに

対しイブプロフェンの場合は遺伝子5のdown regulationを認めず、遺伝子6はむしろdown regulationされている。この発現パターンの特徴は2名に共通して認められることから多数の健康人でも同様の結果が期待され、薬剤特有の遺伝子発現プロファイルを得ることが可能である。

つまり、抗炎症作用という共通の薬効を有する多くの薬剤が、通常は化学構造に基づき分類されているが、遺伝子発現プロファイルというパラメーターを加えることにより、新たな機能分類が可能であることを示している。しかもこのようなデータベースを用いることで、新規薬剤のスクリーニングが容易になることが予想される。たとえば、抗炎症作用を有する物質をさまざまな植物抽出物のなかから発見することを想定した場合、健康人から採血した血液に抽出物を加え、*in vitro*で炎症関連遺伝子発現パターンの変化を調べるだけで、“プレドニゾンタイプの薬効を示す物質”とか、“イブプロフェンタイプの薬効を示す物質”などという具合に、容易に目的とする物質を含む試料をスクリーニングできであろう。新薬開発には、要する時間も費用も甚大である。いかに短時間に低コストで有用な薬剤を開発するかは、いわば製薬企業の至上命題と言える。本システムを新薬開発にうまく組み込むことによって、この至上命題に少なからず貢献できるのではないかと考えている。

そのほかにも、本システムを臨床治験に応用すれ

ば, *in vivo* での遺伝子発現プロファイルによる薬効評価や, 予期しない有害事象を臨床症状が出現する前に, 遺伝子発現レベルで早期に発見することも可能かも知れない。また, 中毒患者の未知薬剤の特定や, 薬物・毒物犯罪の捜査における物質の同定など, 人体側の遺伝子反応を一つのパラメーターとした原因物質同定にも威力を発揮するものと期待される。

文 献

- 1) International Human Genome Sequencing Consortium : Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409 : 860-921, 2001.
- 2) Alizadeh A, Eisen M, Davis R, Ma C, Lossos I et al. : Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* 403 : 503-511, 2000.
- 3) <http://www.sourcemedicine.com/>
- 4) Almawi W, Beyhum H, Rahme A, Rieder M : Regulation of cytokine and cytokine receptor expression by glucocorticoids. *J Leukoc Biol* 60 : 563-572, 1996.
- 5) 長井苑子 : 喫煙と呼吸器疾患—発生機序から予防まで, 呼吸器疾患 最新内科学体系, 中山書店, 1997, p 2-13.

“DDS” 用語解説 No. 26

ゲル

ゲルの語源はラテン語の *gelare* (凍らせる) にあり, コロイド溶液の “sol” が冷却されて固形物になったものを意味する。また, 【新版 高分子辞典】では, あらゆる溶媒に不溶の三次元網目構造を持った高分子およびその膨潤体と定義されている。しかし, 近年では低分子が自己組織化能により集合化し, 見掛け上巨大分子量を持った低分子集合体もゲルを形成する。したがって広義では, ゲルとはゾルを構成している高分子もしくは分子集合体が無限大の三次元網目構造を形成し, 構成溶媒, 溶質などと相互作用しうる状態を持った固形物である, と理解できる。その際その網目構造の結合様式やゲルの形態は任意である。

代表的なゲルとして, 生体組織の多くを構成しているゲル, ゼラチンや寒天に代表される天然物ゲル, 合成高分子ゲルの三種類がある。これらの各ゲルは, 従来の確率論的な扱いではなく, フラクタルや de Gennes らのスケーリング則を適用することで物性の理解が目覚ましく発展した。これらの異なった物性を利用し, 最近では天然高分子と合成高分子のハイブリット化や, DDS において 0 次放出実現のための研究が精力的に行われている。

もともと, DDS は高分子マトリックスを利用して薬物を長時間徐放させる研究からスタートした。その流れのなかで本格的な成功を収めたのは経皮吸収製剤用ゲルで, DDS の領域では発展途上にある。今日の再生医学・生命科学研究が注目されるなかで, たとえば組織工学における細胞外マトリックスとしてのゲル利用および発展が大いに期待される。

(聖マリアンナ医科大学難病治療研究センター 山口菓子)

ゾル ゲル
ゾルおよびゲル状態の模式図