〔シンポジウム：癌，肝炎および動脈硬化症における病態解析法の進歩〕

RDA 法，Differential display 法による遺伝子 異常検出法：消化器癌における応用

伊東 文生・日野田裕治

SUMMARY

Schirrous gastric cancer is one of the most mortal neoplasms and is characterized by histopathological features of poorly differentiated type and infiltrative growth. However, very little is known about the genetic mechanisms of this malignant tumor, which is difficult to analyze due to the proliferation of scirrhous stroma. The aim of this study was to apply an improved representational difference analysis (RDA) in order to identify the genetic alterations in schirrous gastric cancer. To monitor the efficiency of RDA, mouse DNA fragment was added to a tester prepared from the genomic DNA, at the rate of a single copy per haploid genome (Efficiency-monitored RDA (EM-RDA)). The difference products were analyzed by Southern blot with the mouse DNA as a probe. The real difference products, other than the mouse DNA, were subcloned. As a result, added control DNA fragments were sufficiently amplified through 3 rounds of subtraction and the high efficiency of the subtraction was confirmed. In summary, efficiency-monitored RDA was demonstrated to raise the reliability of RDA. Furthermore this method successfully contributed to the detection of fragment in the schirrous gastric cancer.

Key words: genome, subtraction, representational difference analysis (RDA), differential display.

はじめに

本邦において胃癌は主要な死因の一つであり，1993年の胃癌死亡は全悪性新生物死のうち男性で21.1% (2位)，女性で18.5% (1位) を占める¹⁾。このうち，びまん性浸潤を示す非充実型低分化腺癌は，間質に正常組織を豊富に含むため臨床材料の直接的な遺伝学的解析が困難な腫瘍の一つである。したがって，このような腫瘍の遺伝子異常を検出するためには新しい手法の開発が必要と考えられる。

近年報告された新しいゲノムのサブトラクション法である representational difference analysis (RDA)²⁾ は，2種のゲノム間の差を検出することが可能である。特に癌研究への応用では，癌での homozygous deletion, loss of heterozygosity (LOH) および amplification などが癌と正常組織のゲノムの差として RDA によって検出され，PTEN³⁾，DMBT 1⁴⁾ などの新しい癌抑制遺伝子の単離に成果をあげている。

RDA は，一方の DNA (以下，tester) からもう一

Detection of genetic alteration in human gastrointestinal cancer by RDA method.

Fumio Itoh, Yuji Hinoda; 札幌医科大学医学部第一内科

Correspondence address: Fumio Itoh, First Department of Internal Medicine, Sapporo Medical University, South 1, West 16, Chuo-ku, Sapporo 060-8543, Japan.

第48回日本電気泳動学会春季大会・シンポジウム

方の DNA (以下, driver) と共通する DNA を除去することによって, tester に特異的な DNA 断片 (以下, difference product) を得る方法であり, 2 つの異なるステージつまり representation と subtraction から構成される. 前半の representation では, 制限酵素処理と polymerase chain reaction (PCR) を用いて tester および driver それぞれのゲノムの複雑性を減らしたライブラリー (以下, amplicon) を作成する. 後半の subtraction では, 微量の tester amplicon に過剰量の driver amplicon を競合的にハイブリダイゼーションさせる. このようなシステムによって tester 特異的な DNA 配列のみが PCR で対数的に増幅される. RDA を用いることにより, 理論的には tester のハプロイドゲノムに特異的な 1 コピーの DNA 配列をも検出可能である. しかしその過程には多くの PCR, 制限酵素処理およびライゲーションを使用するため, 常にコンタミネーションの危険がつきまとう. また競合的ハイブリダイゼーションの段階では試料を厳密に高温に保ったままでの操作が要求され, これらの操作が正確になされなければサブトラクション効率は著しく低下し, 結果として false positive を多く含んだ difference product の解析に無駄な時間を費やすことになりうる. しかし, RDA のサブトラクション効率をモニターすること, すなわち高効率のサブトラクションが実現されていることを確認することによって, 得られた difference product を非常に効率的に解析することが可能になると考えられる. 本研究においては, RDA のサブトラクション効率をモニターし得る efficiency-monitored RDA (EM-RDA) を開発し, EM-RDA を胃癌の遺伝子異常の検索に実際に応用した.

方 法

1. DNA およびモニタリング用標的 DNA の調製

胃癌および正常胃組織の凍結手術材料より genomic DNA を抽出した. また, severe combined immunodeficiency (SCID) マウス (CLEA Japan, Osaka) の genomic DNA の BamHI (Toyobo, Osaka) 制限酵素断片から, サザンブロット法にてヒト genomic DNA とクロスハイブリダイゼーションしない DNA 断片 1 種 (450 bp) を選択し, モニタリング用標的 DNA として用いた.

2. Efficiency-monitored representational difference analysis

1. で得られた癌部および非癌部の genomic DNA

は, BamHI で制限酵素処理し, フェノール抽出後エタノール沈殿し TE に溶解した. BamHI 処理後の癌部 DNA を tester として用い, ヒトのハプロイドゲノム (3×10^9 bp) に対し 1 コピー (450 bp) となる比率で tester にのみモニタリング用標的 DNA 1 種を混入した. BamHI 処理後の正常胃組織 DNA は driver として用いた. Amplicon の作製およびサブトラクションは原法の RDA プロトコールに一部変更を加えて行った.

RDA のサブトラクション効率はサザンブロット法により評価した. 3 ラウンドのサブトラクション後, tester amplicon, driver amplicon および第 1, 第 2, 第 3 ラウンドで生成された difference product (以下, 1st, 2nd, 3rd product) それぞれ $1 \mu\text{g}$ を 1.5% Nusieve アガロースゲル上で電気泳動し, ナイロン膜 (Hybond-N⁺: Amersham, Cleaveland, OH) にブロットした. プローブとしてモニタリング用標的 DNA をランダム DNA ラベリング (Random DNA labeling kit: Takara, Tokyo) により [α -³²P] でラベルしたものを用いた. プレハイブリダイゼーションおよびハイブリダイゼーションは既述の方法に従い行った.

3. 3rd product の解析

EM-RDA により生成された 3rd product の解析を行うため, 3rd product 全体を BamHI で制限酵素処理し pBluescript II (Stratagene, La Jolla, CA) にライゲーションした. T3/T7 プライマー (Stratagene) を用いた PCR でインサートが確認されたリコンビナントクローンを単離し, ナイロン膜 (Hybond-N⁺) に 96 穴吸引マニフォールドを用いて既述の方法に従ってブロットした. モニタリング用標的 DNA, および他のクローンをプローブとしてドットブロットを行うことにより, 重複するクローンを除外した. 重複せずに選択したクローンはそれぞれをプローブとして, tester および driver の amplicon および genomic DNA に対してサザンブロット法を行った.

結 果

胃癌の遺伝子異常を同定することを目的として, 胃癌 DNA を tester, 同一症例の正常胃組織を driver として RDA を施行し, 同時に RDA のサブトラクション効率の確認を行った (EM-RDA, Fig. 1). Driver およびモニタリング用標的 DNA を混入した tester に, それぞれ Rbam adapter をライゲーションした後 PCR を施行し amplicon を作製した. Tester およ

図1. Efficiency-monitored RDA (EM-RDA) 法の概略。

び driver amplicon は電気泳動にてそれぞれ 0.7 kbp から 3 kbp の範囲でスメアを呈した (Fig. 2 A). 3 ラウンドのサブトラクションから得られた各ラウンドの difference product を電気泳動した結果, 1 st product はスメアを, 2 nd product は不鮮明なバンドを, 3 rd product は 0.5 kbp と 1 kbp にバンドを呈した (図 2 A).

Difference product 中においてモニタリング用標的 DNA が増幅されていることを確認するため, tester および driver amplicon, および各ラウンドの difference product に対してモニタリング用標的 DNA をプローブとしてサザンブロットを行った (図 2 B). その結果, 2 時間の expose で 1 st, 2 nd および 3 rd product それぞれのレーンに 450 bp を中心と

図2. 胃癌材料を用いた EM-RDA 法の結果。

(A) lane TA はテスター amplicon を, lane DA はドライバー amplicon を示す。(B) target fragment をプローブとして用いたサザンブロット。RDA のラウンドが進むにつれてバンド強度が増加している。

した強いシグナルが検出された。またこれら difference product のレーンにおいては, 1st, 2nd, 3rd とラウンドが進むにつれてバンドのシグナル強度が強くなるのが確認された。

以上の結果から, tester のハプロイドゲノム中に混入した 1 コピーのモニタリング用標的 DNA が RDA により検出され, かつ 3 ラウンドのサブトラクションにより効率的に増幅されていることが確認できた。3 rd product の解析を行うため, 3 rd product 全体をサブクローニングし無作為にリコンビナントクローンを選択した。このうち T 3/T 7 PCR にてインサートが確認された 110 クローンに対しモニタリング用標的 DNA をプローブとしてドットブロットを行った。

その結果 110 クローン中 34 クローン (30.9%) がモニタリング用標的 DNA と同一であると判断され, RDA のサブトラクションが効率よく稼働していることが確認された。残りの 76 クローンに対して, それ

図3. RDA法で得られたDNA断片をプローブとして行ったサザンブロット。

腫瘍DNAでのみバンドが認められる。

それをプローブとしてドットブロットを行った結果、たとえばクローン2A8をプローブとした時は76クローン中25クローン(22.7%)に、クローン1D1をプローブとした時は76クローン中11クローン(10.0%)にハイブリダイゼーションすることが確認された。このようにクロスハイブリダイゼーションするクローンは重複して存在する同一クローンであると判断し、最終的に13クローンを重複しないクローンとして選択した。Tester, driverそれぞれのampliconおよびgenomic DNAに対して、これら13クローンをプローブとしてサザンブロットを行った。その結果、13クローン中2クローンがtesterに特異的なバンドを呈した。クローン2A8をプローブとした時は約0.5 kbpに、クローン1D1をプローブとした時は約1 kbpにtester側のレーンでのみバンドを認めた(図3)。

考 察

スキルス胃癌の遺伝子異常についてはk-sam⁵⁾, c-met⁶⁾の遺伝子増幅が認められるとの報告があるが頻度は30~40%であるため、これら以外にも臨床的および病理組織学的特徴の形成に関連する未知の遺伝子異常が存在すると推測される。しかしスキルス胃癌では間質に線維芽細胞などの正常細胞を多量に含むため、臨床材料を用いた癌の遺伝子異常の検索には困難が伴う。スキルス胃癌の分子生物学的病態を解析する

ためには、既知の遺伝情報によらず疾患関連異常遺伝子を検出できる新しい手法が求められる。

RDAは2種のゲノム間の“差”を検出できる優れた手法であり、癌と正常のゲノムを比較することによって未知の癌関連遺伝子の単離に応用することが可能である。しかし、その高度な感受性とPCRを多用する複雑な手技のため、試料のコンタミネーションの危険性が常にある。また、サブトラクションが効率よく行われなければ、difference product中に非特異的繰り返し配列がfalse positiveとして多く含まれることになり、RDAの利便性を減ずる原因となる。また癌組織中での多量の正常細胞の存在はdifference productの収量を減らす原因となる。癌組織から正常細胞を除去する試みとして、腫瘍をマウスに移植し増殖させた移植片を用いる方法⁷⁾、もしくはploidy patternを基にflowcytometryで腫瘍細胞のみを回収する方法⁸⁾なども報告されているが、必ずしも純粋な腫瘍細胞のみを回収できるわけではない。以上のようにRDAのサブトラクション効率を低下させる要素は多数存在するが、サブトラクション効率のモニターを行うことによって高効率のサブトラクションの実現が可能になると考えられる。さらに高効率のサブトラクションが実現されたRDAは、スキルス胃癌のように多量の正常細胞を含んだ癌組織の直接的な解析に大に効力を発揮すると考えられる。今回我々はRDAのサブトラクション効率をモニターできる系、すなわちEM-RDAを開発し、定量的な方法でモニタリング用標的DNAがdifference product中に増幅されているのを確認した。

文 献

- 1) 部位別がん死亡率の推移. がんの統計編集委員会編. がんの統計1995. 東京: がん研究振興財団, 1995, 11.
- 2) Lisitsyn NA, Lisitsyn NM, Wigler M. Cloning the differences between two complex genomes. Science 1993; 259: 946-51.
- 3) Li J, Yen C, Liaw D, Podsypanina K, Bose S, Wang SI, Puc J, Miliarensis C, Rodgers L, McCombie R, Bigner SH, Giovanella BC, Ittmann M, Tycko B, Hibshoosh H, Wigler MH, Parsons R. PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. Science 1997; 275: 1943-7.
- 4) Mollenhauer J, Wiemann S, Scheurlen W, Korn B, Hayashi Y, Wilgenbus KK, Deimling A, Poustka A. DMBT1, a new member of the

要 旨

近年、遺伝子の解析技術は日進月歩であり、遺伝子の一次構造の解析に始まり、分子の機能の解析への応用、さらには遺伝子異常検出の臨床医学への応用も進められている。本稿では、PCR 法を基礎とした遺伝子解析技術の応用について概説した。癌はすでに遺伝子異常の蓄積によるいわゆる多段階発癌の機構で発症するものと考えられている。すでに、多種類の癌疾患において異常を呈する遺伝子が同定されており、一部はその癌化における役割も明らかになっている。しかし、これまでの報告を総合しても、癌をおこしうる遺伝子のうちごく一部が解明されているにすぎないのが現状と思われる。今後、新たな遺伝子の異常を知るためには、癌において特異的に異常を呈する遺伝子の同定法の開発が必要になる。そこで、近年発達した PCR 法を基礎に用いる 2 つの遺伝子解析法（ゲノム遺伝子の異常の検出法として RDA 法、mRNA の差の検出法として Differential display 法）について、実際にこれらの方法を胃癌に応用した例について RDA 法を中心としてその知見を述べ、新たな遺伝子異常検出法としての可能性を示す。

- SRCR superfamily, on chromosome 10 q 25.3-26.1 is detected in malignant brain tumours. *Nat Genet* 1997; 17: 32-9.
- 5) Hattori Y, Odagiri H, Nakatani H, Miyagawa K, Naito K, Sakamoto H, Katoh O, Yoshida T, Sugimura T, Terada M. K-sam, an amplified gene in stomach cancer, is a member of the heparin-binding growth factor receptor genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 5983-7.
- 6) Kuniyasu H, Yasui W, Kitadai Y, Yokozaki H, Ito H, Tahara E. Frequent amplification of the c-met gene in scirrhou type stomach cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 189: 227-32.
- 7) Hahn SA, Seymour AB, Shamsul Hoque ATM, Schutte M, da Costa LT, Redston MS, Caldas C, Weinstein CL, Fischer A, Yeo CJ, Hruban RH, Kern SE. Allelotype of pancreatic adenocarcinoma using xenograft enrichment. *Cancer Res* 1995; 55: 4670-5.
- 8) Maesawa C, Tamura G, Suzuki Y, Ishida K, Saito K, Sotodate R. Sensitive detection of p 53 gene mutations in esophageal endoscopic biopsy specimens by cell sorting combined with polymerase chain reaction single-strand conformation polymorphism analysis. *Jpn J Cancer Res* 1992; 83: 1253-6.