

Title	Construction of Preferential cDNA Microarray Specialized for Human Colorectal Carcinoma : Molecular Sketch of Colorectal Cancer
Author(s)	竹政, 伊知朗
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	<a href="http://hdl.handle.net/11094/43758">http://hdl.handle.net/11094/43758</a>
DOI	
rights	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/repo/ouka/all/>

氏名	たけ まさ い ち ろう 竹 政 伊 知 朗
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学位記番号	第 1 6 8 9 2 号
学位授与年月日	平成14年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科外科系専攻
学位論文名	Construction of Preferential cDNA Microarray Specialized for Human colorectal Carcinoma: Molecular Sketch of Colorectal Cancer (ヒト大腸癌解析用 cDNA マイクロアレイの開発・作製: 大腸癌の分子生物学的スケッチ)
論文審査委員	(主査) 教授 門田 守人  (副査) 教授 青笹 克之 教授 野口眞三郎

### 論文内容の要旨

#### 【目的】

ヒトゲノムのドラフト配列、遺伝子の概数が発表され、ポストゲノム時代における癌研究も新たな局面を迎え、これまでの臨床病理学的エビデンスを基に、分子生物学的な解析を加えた癌個別化診断の重要性が認識されるようになった。大腸癌は世界的に発生率が高く、本邦でも年々増加の一途を辿っている。また多段階発癌のモデルとして分子生物学的に最も良く研究されている癌の一つで、これまでに APC、K-ras、p53などの遺伝子が重要な役割を担うと報告されてきた。しかし個々の癌の特性は多数の遺伝子異常が複雑に影響を及ぼしあって規定されると考えられるため、癌の個性の解明のためには、これまでのように単一因子の追求だけではなく、癌の発生・進展に関わる多数の遺伝子の同時解析が必須で、そのツールとして cDNA マイクロアレイが注目されている。われわれは大腸癌解析用の独自の cDNA マイクロアレイを開発・作成し、大腸癌の遺伝子発現プロファイル解析を行なった。

#### 【方法】

1) マイクロアレイに載せる遺伝子情報を取得するために、大腸癌部、正常粘膜、肝転移巣、各々6症例の mRNA mixture 由来の cDNA library (各10000 clone) の作成、および過去10年の文献上の大腸癌関連遺伝子の整理をした。

2) 大腸癌原発巣12例、正常粘膜12例から抽出した mRNA を cy3/cy5で蛍光標識したターゲットを作成した cDNA マイクロアレイに hybridization させて各遺伝子の発現レベルを調べ、two way clustering 法など生命情報工学的な解析を用いてその発現プロファイルを検討した。

#### 【成績】

1) 解析対象遺伝子情報を濃密化するために、cDNA clone 計約30000個についてシーケンシング及び核酸配列データベースに対するホモロジーサーチを行って対応する遺伝子を同定し、発現頻度情報をもとに non-redundant な4430 clone (既知2930個、未知1500個) を選出した。さらに cDNA library には含まれないが、文献上大腸癌の発生・進展に関与すると考えられる癌関連遺伝子約170個を PCR クローニングすることにより追加し、計約4600個の大腸癌解析用の独自の cDNA マイクロアレイを作成した。

2) まず解析データの quality を一定のレベルに保つためのデータプロセッシング処理を行なった後、癌部と正常粘膜で異なる発現プロファイルを示した遺伝子群939個を選出した。これらのうち正常に比べ癌部で2倍以上の発現上昇している遺伝子23個と、1/2倍以下に発現低下している遺伝子36個、計59個を大腸癌関連候補遺伝子として同定した。これらのうち15遺伝子はこれまでに文献で報告されているものであった。また14遺伝子については semiquantitative RT-PCR、12遺伝子については National Center for Biotechnology Information の SAGE (serial analysis of gene expression) データベースで発現比の確認をとったが、マイクロアレイのデータと相同性はそれぞれ93%、83%と非常に高かった。

#### 【総括】

大腸癌の遺伝子発現解析に有用な cDNA マイクロアレイを開発・作製した。これを用いた網羅的な遺伝子発現のプロファイル解析により、大腸癌部で発現上昇または低下している遺伝子の同定が可能であった。今回開発した cDNA マイクロアレイは、臨床病理学的事項を裏付ける遺伝子発現パターンの同定や、癌の発育・進展の解明に役立つものと考えられる。さらに、今後、癌の個性化診断の向上や、個々の症例に応じた癌治療（オーダーメイド医療）による治療成績の向上に繋がることが期待される。

#### 論文審査の結果の要旨

本研究はポストゲノム時代における網羅的遺伝子発現解析ツールとして注目を集めている cDNA マイクロアレイを独白に開発・作製し、臨床検体を用いて遺伝子発現プロファイル解析について検討したものである。

本研究では、大腸癌に特徴的な遺伝子解析のための遺伝子を選択すること、豊富かつ十分な情報量を有し、さらに結果の正確性に優れたマイクロアレイ作製することを目的とした。まず、大腸組織での遺伝子情報を濃密化するために、大腸癌部、正常粘膜、肝転移巣由来の cDNA library 30000クローン及び文献上の大腸癌関連遺伝子約170個より発現頻度情報をもとに重複のない約4600個を選択した。マイクロスポット上での高精度の hybridization 条件を達成した後、実際の臨床大腸癌サンプルを用いて発現プロファイルを検討した。その結果、正常に比べ癌部で2倍以上の発現上昇している遺伝子23個と、1/2倍以下に発現低下している遺伝子36個、計59個を大腸癌関連候補遺伝子として同定した。これらのうち15遺伝子はこれまでに文献で報告されているものであり、14遺伝子については semiquantitative RT-PCR、12遺伝子については SAGE データベースで発現比の確認をとったが、マイクロアレイのデータと相同性はそれぞれ93%、83%といずれも非常に高かった。以上よりこのマイクロアレイは、情報量に富みかつ正確性を有するものと考えられた。今回開発した cDNA マイクロアレイは、臨床病理学的事項を裏付ける遺伝子発現パターンの同定や、癌の発育・進展の解明に役立つものと考えられる。さらに、今後、癌の個性化診断の向上や、個々の症例に応じた癌治療（オーダーメイド医療）による治療成績の向上に繋がることを期待され、本研究は学位の授与に値すると思われる。