

「染色体解析技術開発」
(事後評価)分科会資料
資料 5-1 (公開)

「個別化医療の実現のための技術融合 バイオ診断技術開発／染色体解析技術開発」

事業原簿【公開版】

担当部	独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構 バイオテクノロジー・医療技術部
-----	--

— 目次 —

概要	i-xvi
I. 事業の位置付け・必要性について	
1. NEDOの関与の必要性・制度への適合性	2
1.1 NEDOが関与することの意義	
1.2 実施の効果(費用対効果)	
2. 事業の背景・目的・位置づけ	4
2.1 事業の背景と目的	
2.2 政策上の位置づけ	
II. 研究開発マネジメントについて	
1. 事業の目標	7
1.1 事業の全体目標	
1.2 研究開発の目標	
2. 事業の計画内容	9
2.1 研究開発の内容	
2.2 研究開発の実施体制	
2.3 研究の運営管理	
3. 情勢変化への対応	20
4. 中間評価結果への対応	21
5. 評価に関する事項	26
III. 研究開発成果について	
III-1. 研究開発項目 1) 2)	
1. 事業全体の成果	29
2. 研究開発項目毎の成果	
III-2. 研究開発項目 3)	
1. 事業全体の成果	180
2. 研究開発項目毎の成果	
IV. 実用化、事業化の見通しについて	
IV-1. 研究開発項目 1) 2)	
1. 実用化等の見通しについて	266
IV-2. 研究開発項目 3)	
1. 実用化・事業化の見通しについて	269
(添付資料)	
■ 特許/論文/学会報告リスト(IV.項目末掲載: 開発項目 1)および 2) p.274-p.281, 開発項目 3) p.282-p.319 参照)	
■ 用語集(IV.項目末に掲載: 同上)	
■ 健康安心イノベーションプログラム基本計画/ナノテク・部材イノベーションプログラム基本計画	
■ 技術戦略マップ(分野別技術ロードマップ)	
■ 事前評価書	
■ 事前評価 NEDO ポスト2	
■ プロジェクト基本計画, 実施方針	

概要

< 概 要 >

		最終更新日	平成 23 年 11 月 25 日	
プログラム（又は施策）名	健康安心イノベーションプログラム ナノテク・部材イノベーションプログラム			
プロジェクト名	個別化医療の実現のための技術融合バイオ診断技術開発／染色体解析技術開発	プロジェクト番号	P06012	
担当推進部/ 担当官	バイオテクノロジー・医療技術部/ ○ 主査 下川 晃彦 (H22 年 04 月 ~ H23 年 11 月) ○ 主任 古川 善規 (H18 年 04 月 ~ H23 年 11 月) 主査 勢藤 陽子 (H21 年 11 月 ~ H22 年 03 月) 主査 澤田 育久 (H18 年 09 月 ~ H22 年 03 月) 主査 宮本 裕生 (H18 年 04 月 ~ H18 年 08 月)			
0. 事業概要	我が国が有する微細加工技術・表面処理といったナノテク技術の強みを活かし、染色体の異常を高感度、高精度、かつ迅速、安価で非コード領域までを検出するゲノムアレイの解析基盤技術の開発を行い、また実用化を目指した全自動解析システムの開発を実施する。さらに、臨床情報を付随する臨床サンプルの解析によって、本プロジェクト開発のゲノムアレイを用いた染色体異常解析技術の有用性の検証を行い、臨床の現場で使用されるバイオ診断機器の基盤技術開発を行う。			
I. 事業の位置付け・必要性について	本プロジェクトは、「健康安心イノベーションプログラム」および「ナノテク・部材イノベーションプログラム」の一環として実施されたものである。本プログラムは、「国民が健康で安心して暮らせる社会の実現」に向け、達成すべき重要な課題の一つとして、個々人の体質に合わせた効果的・効率的な医療の実現を目標とする。プロジェクトでは癌や遺伝疾患などに関係するゲノム染色体上の異常を高感度、高精度かつ簡便、迅速、安価に解析するための染色体異常解析技術を開発することにより、個別化医療の実現に寄与することを目的とするものである。また、「ナノテク・部材イノベーションプログラム」においては、ナノテクノロジーや高機能部材の革新を先導することで、これら部材を活用したライフサイエンスなどの幅広い産業における付加価値の増大を図ることを目指している。本事業は、これらのプログラム施策を背景として、ライフサイエンス・健康・医療領域との融合を推進するプログラムの一環として位置づけられ実施するものである。			
II. 研究開発マネジメントについて				
事業目標	次の 3 つの項目に関する研究開発を行う。 ● 研究開発項目 1) BAC を用いた高精度全ゲノムアレイの開発 BAC を用い、10 万塩基対以下の領域での非コード領域を含む全ゲノムの染色体異常(増幅、欠失等)を解析可能な高精度全ゲノムアレイ技術を開発する。 ● 研究開発項目 2) 染色体異常を解析する革新的要素技術の開発 染色体異常解析の診断利用に向け、染色体異常(増幅、欠失等)を微量サンプルで高感度、高精度かつ迅速、安価に定量性・再現性を確保した染色体異常解析を行うための DNA 標識物質の高輝度・低コスト化、DNA 標識技術、ハイブリゼーションの効率化、スキャニング技術についての要素技術を開発する。 ● 研究開発項目 3) 臨床診断用全自動染色体異常解析システムの開発 サンプル前処理の効率化・迅速化、検出感度の向上、測定時間の短縮、再現性の向上、低コスト化を図るため、診断用アレイモジュールを開発するとともに、機器性能を飛躍的に向上させ、個別化医療を行う臨床現場で活用できる全自動染色体異常解析システムのプロトタイプを作成し、臨床サンプルの活用によりその有用性を検証する。さらに 本システム開発の一環として、高密度ジェノタイプング情報を付加した日本人の良性および病因CNVデータベース構築情報から、次世代型ゲノムアレイコンテンツを開発する。 ○中間目標: DNA の標識化技術やハイブリダイゼーションの効率化、スキャニング技術の臨床応用に向けた要素技術を開発するとともに、バクテリア人工染色体(BAC) を用いた非コード領域を含むゲノム全領域を検出できる高精度ゲノムアレイの開発を行う。また個別化医療診断に活用できる全自動染色体異常解析システムのプロトタイプを開発し有用性を検証する。[ハイブリダイゼーション技術の目標: ハイブリ時間を 5 時間以内、スキャニング技術の目標: 3 ミクロン以下の解像度、高輝度DNA標識技術の目標: 現行の 10 倍以上の輝度(標識、洗浄、およびスキャニングを経て得られる数値ベース)] ○最終目標: BAC を用いて非コード領域を含むゲノム全領域を検出する高精度ゲノムアレイの開発と、臨床サンプルを用いた有用性の実証を行う。また臨床現場において、微量サンプル(数ナノグラム)から、12 時間			

事業の 計画内容	<p>以内に染色体異常(増幅、欠失、コピー数多型等)を、低コストかつ定量性・再現性を確保し検出可能な全自動染色体異常解析システムのプロトタイプを開発し、臨床サンプルを活用し有効性を実証する。さらに、本システム開発の一環として、高密度ジェノタイピング情報を付加した日本人の良性および病因CNVデータベース構築情報から、次世代型ゲノムアレイコンテンツを開発する。</p> <p>[定量的解析精度の目標:1 コピーの増減を 98%以上の感度と特異性(偽陽性率、偽陰性率がともに 2%以下)で検出、再現性の目標:CVが 5%以下]</p>								
	主な実施事項	H18fy	H19fy	H20fy	H21fy	H22fy	H23fy		
	研究開発項目 1) BAC を用いた高精度全ゲノムアレイの開発								
	①日本人 BAC ライブラリー構築の研究開発								
	②日本人 BAC を用いた高精度全ゲノムアレイの開発								
	研究開発項目 2) 染色体異常を解析する革新的要素技術の開発								
	①高精度表面加工修飾技術の研究開発								
	②新規ゲノムアレイ用蛍光標識化技術の研究開発								
	③疾患別アレイハイブリッドシステムの研究開発								
	研究開発項目 3) 臨床診断用全自動染色体異常解析システムの開発								
	①臨床診断用全自動染色体異常解析システムに対応したゲノムアレイの開発								
	②臨床診断用全自動染色体異常解析システムの開発								
	③癌の染色体構造異常の解析と診断のコンテンツ開発								
	開発予算 (会計・勘定別に事業費の実績額を記載)(単位:百万円)	会計・勘定	H18fy	H19fy	H20fy	H21fy	H22fy	H23fy	総額
		一般会計	298	366	323	323	216	0	1,526
	特別会計	0	0	0	0	0	0	0	
	加速予算 (成果普及費を含む)	25	50	0	0	80	64	219	
	総予算額	323	416	323	323	296	64	1,745	
契約種類: (委託○)助成 ()共同研究 負担率()	(委託)								
	(助成) :助成率△/□								
	(共同研究) :負担率△/□								
開発体制	経産省担当原課	経済産業省 製造産業局 生物化学産業課							

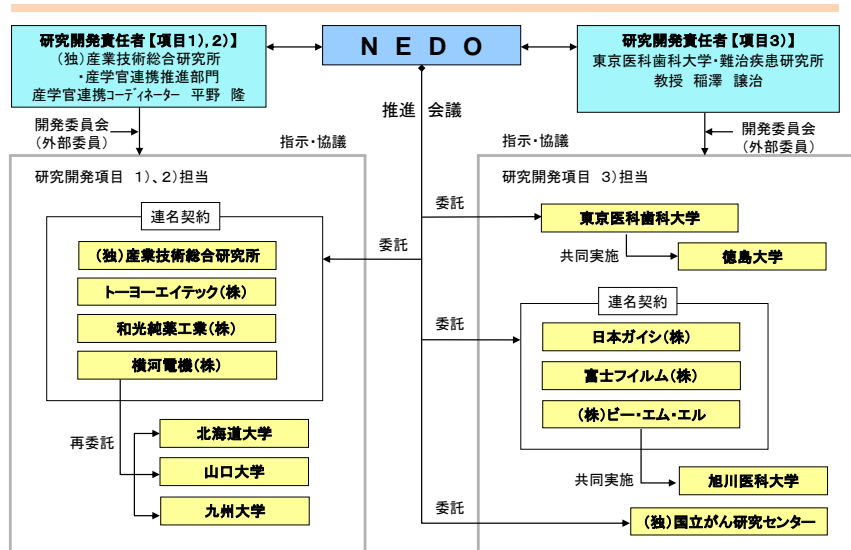
	プロジェクトリーダー	<p>研究開発項目 1) BAC を用いた高精度全ゲノムアレイの開発、および 研究開発項目 2) 染色体異常を解析する革新的要素技術の開発 担当PL: 独立行政法人産業技術総合研究所 産学官連携推進部門 産学官連携コーディネーター 兼 財団法人沖縄科学技術振興センター 理事 平野 隆氏</p> <p>研究開発項目 3) 臨床診断用全自動染色体異常解析システムの開発 担当PL: 国立大学法人東京医科歯科大学 難治疾患研究所 ゲノム応用医学研究部門 分子細胞遺伝分野 教授 稲澤 譲治氏</p>
--	------------	---

委託先

- 研究開発項目 1) BAC を用いた高精度全ゲノムアレイの開発
 - ① 日本人BACライブラリー構築の研究開発
 - ② 日本人BACを用いた高精度全ゲノムアレイの開発
 - ・独立行政法人産業技術総合研究所
- 研究開発項目 2) 染色体異常を解析する革新的要素技術の開発
 - ① 高精度表面加工修飾技術の研究開発
 - ・トーヨーエイトック株式会社
 - ② 新規ゲノムアレイ用蛍光標識化技術の研究開発
 - ・和光純薬工業株式会社
 - ③ 疾患別アレイハイブリシステムの研究開発
 - ・横河電機株式会社、
 - 共同研究先： 国立大学法人北海道大学、山口大学、九州大学
- 研究開発項目 3) 臨床診断用全自動染色体異常解析システムの開発
 - ① 臨床診断用全自動染色体異常解析システムに対応したゲノムアレイの開発
 - ・国立大学法人東京医科歯科大学、
 - 共同実施先： 国立大学法人徳島大学
 - ・独立行政法人国立がん研究センター
 - ・株式会社ビー・エム・エル
 - 共同実施先： 国立大学法人旭川医科大学
 - ・富士フイルム株式会社
 - ② 臨床診断用全自動染色体異常解析システムの開発
 - ・富士フイルム株式会社
 - ・日本ガイシ株式会社
 - ③ 癌の染色体構造異常の解析と診断のコンテンツ開発
 - ・国立大学法人東京医科歯科大学
 - 共同実施先： 国立大学法人徳島大学
 - ・独立行政法人国立がん研究センター

<実施体制図>

【染色体解析技術開発の実施体制】



<p>情勢変化への対応</p>	<p>研究開発項目 1) 日本人 BAC を用いた革新的染色体異常解析基盤技術の開発：平成 18 年度：「日本人 BAC を用いた革新的染色体異常解析基盤技術の開発」を加速、予算前倒し(25 百万円) 研究開発項目 3) 臨床診断用全自動染色体異常解析システムの開発：平成 19 年度：「先天性染色体異常、口腔癌の解析アレイの実用化に向けた開発」を加速(50 百万円)、共同研究先：旭川医科大学追加、平成 22 年度：臨床診断用全自動染色体異常解析システムに対応したゲノムアレイの開発のため加速(80 百万円)、共同実施先：徳島大学追加、平成 23 年度：「先天異常診断用・次世代型高精度アレイの開発に向けた“日本人”CNV データベースの構築と GD アレイ実用化普及促進」のため加速(64 百万円)</p>
<p>中間評価結果への対応</p>	<p>○ 中間評価(平成20年7月実施)時の総合評価コメントは次の通り：「本プロジェクトは、BAC(バクテリア人工染色体)アレイを用いて染色体異常を解析する技術を開発することにより、個別化医療の実現に寄与することを目的としており、公共性が高く、民間のみでの実施が困難な内容であることから、NEDOによる実施の意義は大きく評価できる。妥当な計画、体制が組織されており、情勢の変化へも機敏な対応が行われている。中間目標は達成され、着実に成果が上がりつつあり、高く評価できる。実用化の見通しも十分にある。一方で、個別化医療の実現を目指し、二つの独立した特徴あるアプローチによって、着実に研究開発が進められているが、出口の見えた所で、相互の成果を活用することにより、予算、資源等をより効率的に活用できる。両者の間の情報交換などの対策が必要と思われる。」</p> <p>○ 中間評価結果を受け、「問題点・改善すべき指摘点」に対して「対処方針」を策定し、平成 21 年度の実施方針に反映させプロジェクトの推進を図った。肯定的指摘点や問題点・改善すべき点については本文記載を参照。中間評価による対処方針について以下に記す(各番号【#】については本文記載参照)。</p> <p><今後に対する提言></p> <p>【1】両チームの研究開発も一応の目途がついてきたため、秘密保持下で、両チームのシナジー効果を発揮するため進捗等情報交換を実施する。</p> <p>【2】随時両チームのがん臨床研究に関する情報交換を行う。</p> <p><事業の位置付け・必要性></p> <p>【3】最終目標の全ゲノム領域をカバーするタイリングアレイを作成し、臨床サンプルのゲノム解析を行い、日本人のゲノムアレイとしての有用性を実証する計画である(研究開発項目 1))。</p> <p>日本人ゲノムコピー数多様性(CNV)を基に、先天性疾患、癌の診断の正診率を高める計画である(研究開発項目 3))。</p> <p>【4】日本人 BAC ライブラリーを整備し、公的ライブラリーとして公開、配布する計画である。</p> <p>特許出願により知財権を確保しつつ、データベースの国際公開を継続する(研究開発項目 3))。</p> <p><研究開発マネジメント></p> <p>【5】【1】の再掲。両チームの研究開発も一応の目途がついてきたため、秘密保持下で、両チームのシナジー効果を発揮するため進捗等情報交換を実施する。また随時両チームのがん臨床研究に関する情報交換を行う。</p> <p><研究開発成果></p> <p>【6】他の癌の診断技術が BAC アレイを用いた診断技術を補完する場合もあり、実用化段階で検討する計画である。</p> <p>【7】臨床データが不足する場合は、実用化研究で症例数の追加を行い、指摘の検証を行う計画である。</p> <p><実用化の見通し></p> <p>【8】【7】の再掲。臨床データが不足する場合は、実用化研究で症例数の追加を行い、指摘の検証を行う計画である。</p> <p>【9】【6】の再掲。コストダウンは BAC 数をミニマムにすることで対応する。今後オリゴアレイの進歩が確認された時には知財を確認し、置き換えを行う計画である。</p> <p><その他のコメント></p> <p>(BAC を用いた高精度全ゲノムアレイの開発)</p> <p>【10】日本人 BAC ライブラリーの公開・配布については【4】の再掲。別途 METI プロジェクトにて実施予定の日本人ゲノム解析プロジェクトとも情報交換を行う計画である。</p> <p>【11】【3】の再掲。日本人 BAC を用いたアレイを作製し、臨床上の有用性、優位性を確認する。</p> <p>【12】日本人 BAC ライブラリーについて各方面から日本人標準ゲノムとして遺伝子情報の解析を求める要請があるが、日本人 BAC ライブラリーの標準ゲノムについては本プロジェクトの範囲外であり、別途 METI プロジェクトにて対応する。</p>

中間評価結果への対応	<p>(染色体異常を解析する革新的要素技術の開発)</p> <p>【13】【6】の一部再掲。日本人 BAC ライブラリーの DNA をスポットした高品質のアレイ、高感度・高精度の発色検出システム、および「物理ハイブリユニット」、「深い焦点深度の読み取り装置」、「高精度チップ」等、一連の革新的装置により、数々の疾患の診断に応用し、優位性を検証する計画を進める。</p> <p>【14】現在も二色蛍光法の採用に向けて、特許面について知的財産権専門部門による精査を実施中であり、今後も問題無いように対応する。</p> <p>【15】診断で実用的なサイズを考慮し、かつ、高精度なデスクトップ PC サイズを想定して試作する計画を進めている。</p> <p>【16】実用化段階で、北海道大学、山口大学、および九州大学との連携をさらに強めることで、疾患診断コンテンツ開発の充実を図る計画である。</p> <p>【17】【9】【15】の再掲。</p> <p>(臨床診断用全自動染色体異常解析システムの開発)</p> <p>【18】Dual ハイブリ法では、特に感度の向上を目指し、その後、プロトコルの確立を行い、臨床検査レベルでの解析を実現する計画である。臨床検査のレベルでトレーサビリティの確保と確実性の向上を実現する計画である。また、診断コンテンツに応じ、臨床現場での利用形態を前提に基礎試験を行い、化医療を進めている。</p> <p>【19】【6】の再掲。</p> <p>【20】これまでと同様、RP-11から日本人BACへの置き換えは、配列情報が得られた段階で実施する。</p> <p>【21】診断コンテンツが開発され次第、自動機に実装できるよう改良を進めている。</p> <p>【22】がん診断、先天性疾患の診断について、コンソーシアム等を組織し、臨床医、大規模臨床検査センター(BML)を含む研究者等との連携により実用化を並行で進めている。</p> <p>国際貢献に関しては、【4】の再掲。日本人ゲノムコピー数多様性(CNV)データベースは構築中であり、癌CGH解析データベースは公開しており、これらを継続する。</p>	
評価に関する事項	事前評価	平成18年5月15日 事前評価実施(担当部:新エネルギー・産業技術総合開発機構 バイオテクノロジー・医療技術開発部)
	中間評価	平成20年7月31日 中間評価分科会実施(担当部:新エネルギー・産業技術総合開発機構 評価部)
	事後評価	平成23年12月5日 事後評価分科会実施(担当部:新エネルギー・産業技術総合開発機構 評価部)

<p>Ⅲ. 研究開発成果について</p>	<p>1. 事業全体の成果</p> <p>1-1. 研究成果の概要 <研究開発項目 1) および 2)></p> <p>1) BAC を用いた高精度全ゲノムアレイの開発</p> <p>① 日本人 BAC ライブラリーの構築</p> <p>欧米人と日本人の癌発症部位に差のあること、抗癌剤の感受性および副作用に差のあることから、ゲノムレベルで差があることは十分予想されるが、国際ヒトゲノム解析コンソーシアムからこれまでに至るまでゲノムの差異は定量的に研究されていない。この差異を明らかにするためには日本人のゲノムライブラリーを作製し、国際ヒトゲノムコンソーシアムで用いられた欧米系ヒトゲノムライブラリーとの比較を行わなければならない。今後ゲノム情報を基に診断、医療、創薬が進められるに際し、日本人のゲノムライブラリーはゲノム情報の標準として不可欠であり、国として整備すべき業務である。</p> <p>・日本人の選択</p> <p>欧米系ゲノムライブラリーの構築(RP-11)には NY 州バファロー市在住の白人の末梢血を EB ウイルスで不死化した細胞の DNA が用いられているが、遺伝学的に欧米人である証明はなされていない。また EB ウイルスは転座などの染色体異常を生じることから、培養により異なる染色体プロファイルを与える可能性がある。これらの事実を避けるため、遺伝学的に日本人であることを証明した個人を DNA 源とする、細胞は不死化せず、一回の採取ですべてのライブラリーを構築した。具体的には人種的な遺伝情報が蓄積されている HLA 領域から 4 つの遺伝子座を選んで、スクリーニングを行い、中国人でないこと、韓国人である可能性が極小であり、日本人である可能性が 97%以上である個人を 100 検体から選別した。また DNA 源として最も損傷の少ない臍帯血を用い、両親の血液もコントロールとして採取した。</p> <p>・BAC ライブラリーの構築</p> <p>BAC ライブラリーの構築はこの技術を世界的に確立した元理研の添田榮一博士に依頼した。RP-11 ライブラリーは添田博士に師事していた小副川一豊博士が作製したものである。常法により臍帯血細胞を寒天ゲルに包埋し、ゆるやかに制限酵素で DNA を切断し、大きな断片を得た。パルスフィールド電気泳動により 100kb 以上の大きさの断片を採取し、エレクトロポレーションにより大腸菌に挿入し、クローン化した。この結果 33 万クローンの日本人 BAC ライブラリーを得た。一回の DNA 採取で作られた BAC ライブラリーとしては世界最大規模である。サンプリングにより BAC の大きさは平均約 130kb であることから、33 万クローンのライブラリーはヒトゲノム 3G の約 14.3 倍の重複度を有している。この 33 万クローンから中間評価までに 11.5 万クローンの両末端塩基配列の解析を行い、NCBI ヒトゲノム領域の 84.9%をカバーする地図を得た。中間評価後さらに自主努力で 18.5 万クローンの解析を行い、現時点で 96.4%のカバー率に至った。</p> <p>・日本人であることの証明 HLA 領域の BAC クローン全塩基配列の解析(ハプロタイプ解析)</p> <p>前述の日本人の同定に用いた HLA 領域の 4 つの遺伝子座の内 2 つを含む 6 番染色体短腕の一つの BAC について全塩基配列決定を行った。従来のグリーディ法によるアセンブルでは 6 本のコンティグに止まったため、k-mer 法が採用された。断片長を 2kb に揃えた DNA を pUC ライブラリとしてサブクローン化してショットガン解析を行うことにより 1 本のコンティグが得られ 172kb の全塩基配列を決定した。この BAC DNA を含む HLA 領域は反復配列が多いため塩基配列の解析は困難とされているが、実際にこの BAC クローンは 53%が反復配列で、グリーディ法では塩基配列の決定が困難であった理由が明らかとなった。この BAC DNA 塩基配列を同じ領域の欧米系 NCBI ヒトゲノム情報との比較を行った。その結果 100 塩基以上の大規模な転座、欠損、挿入が 10 カ所見出され、全体として 4.7%の塩基が不一致であることが示された。この領域は HLA 領域で変異が多いとされているが、これほど高率の変異が存在することは知られていなかった。この塩基不一致は単塩基置換(SNP)の候補であるが、世界的な SNP のデータベースである dbSNP ではわずか 3.9%が相当し、残りの 96.1%はカバーされない。世界的に流通しているいわゆる SNP チップは dbSNP のデータを基に設計されていることから、少なくともこの BAC DNA の SNP はほとんど検出できないことを意味している。このように日本人 BAC ライブラリーを構築し、人種差を最も反映する HLA 領域の BAC DNA の全塩基配列を解析することにより、日本人のゲノムが欧米人のゲノムと 100 塩基以上の大規模な変異と SNP レベルでの多くの未知の差異があることが明らかとなった。</p> <p>② 日本人 BAC を用いた高精度全ゲノムアレイの開発</p> <p>日本人の疾患の診断、治療、さらにゲノム創薬のためには、日本人のゲノム情報に基づく解析が必要である。前述のように遺伝学的に確認された日本人からゲノムライブラリーを作製し、物理的地図の完成に至ったことから、全ゲノム領域をカバーする BAC ゲノムアレイの設計、作製、および評価を行った。作製コストを下げるため、最も少ない数で全ゲノム領域をカバーする設計を行い、この設計に基づき各 BAC クローンを大量増殖、DNA 分離精製を行った。大腸菌自身のゲノムに比べ BAC は 100 分の 1 程度であるため、独自の精製プロトコルを開発した。各クローンを不死化する手法も存在するが、PCR 増幅による偏りを避けることが出来ないこと、コスト的にも大腸菌 BAC 抽出と大差ないこと、大腸菌 BAC は元のヒトゲノム断片の塩基配列が保持されることが確立していることから、基準となる全ゲノムアレイは大腸菌 BAC 抽出法によって作製した。作製した日本人 BAC 全ゲノムアレイの性能評価は(1)基線の安定性、(2)DNA 量に対するシグナルの直線性について行った。</p>
----------------------	--

(1) 基線の安定性については正常人 XY ゲノム DNA に対し同じ正常人ゲノム DNA を競合的にハイブリダイズさせ、2 色の蛍光を計測し、両者の比を対数プロットすることにより、本来零であるべき信号にどの程度の分散性があるかを評価する。その結果分散値 $\alpha = 6.0\%$ となり、現在市販されている 4KBAC アレイの使用基準値である 5% に遜色なく、十分の評価安定性があることが示された。

(2) DNA 量に対するシグナルの直線性については、性染色体に 2X, 3X, 4X, 5X の異数性を有する細胞株由来の DNA に対し正常人 DNA をハイブリダイズさせ、X 染色体部分のシグナル強度を比較した。その結果異数性 X とシグナル強度の直線性 $R^2 = 0.99$ となった。この直線性により検定サンプルの増幅、欠損を定量的に判定することが出来る。

このようにして性能評価を行った日本人 BAC 全ゲノムアレイを用いて、胃がん培養細胞株および胃がん臨床検体由来 DNA の評価を行った。胃がん培養細胞株については、従来の市販 4KBAC アレイより高精度の増幅および欠損の検出が可能なが示された。培養がん細胞は培養すると染色体プロファイルが変化することを既に BAC アレイを用いた解析で見出していることから、ATCC あるいは細胞提供先から得た細胞を産業技術総合研究所で培養することなく DNA の抽出を行った。胃がん臨床検体に関しては、プロジェクト全体の目標達成のため、より少ない BAC 数で診断できるミニアレイの開発を目指した。再委託先の山口大学医学部との共同研究により、胃がんにおいて最も困難とされる転移を判定する特異的部位の情報により、相当する BAC を選定し、ミニアレイを作製した。最終評価について前記の胃がん培養細胞株および胃がん臨床検体由来 DNA について全ゲノムアレイおよびミニアレイの両者について CGH 解析を行った。この結果全ゲノムアレイで検出された変異部位の検出がミニアレイで可能であることが示された。

以上のように基本計画で目標とした、全ゲノム領域をカバーする日本人高精度 BAC アレイの開発および臨床検体による有用性の確認について達成した。

2) 染色体異常を解析する革新的要素技術の開発

i) 高精度表面加工修飾技術の開発

・現在主流のスタンフォード型 DNA チップはスポッターを用いて DNA を打ち付ける方法であるが、スポッターの精度が限界に来ており、今以上の高精度化、高密度化が望めない。従って、本研究開発では DNA のリンカーとして自己組織化単分子膜を用い、さらに自己組織化単分子膜の足場として高結晶配向性の Au 薄膜を応用することで特異的結合機能を持たせる。さらに Au 薄膜は半導体技術を応用することで高精度かつ安価にパターンニングすることで所定のアレイスポットに特異的結合させることが実現可能となる。また現在、アレイスポットパターンを有する DNA チップも市販されているが、本研究開発では、さらにアレイスポット以外に非特異吸着を抑止する表面処理を組み合わせることでバックグラウンドノイズをも低減可能とする。これらの技術について、得られた成果を以下に示す。

・自己組織化単分子膜の足場となる Au 薄膜形成について、独自のスパッタリング成膜技術を用いることで、プラズマ電力を最適化し、従来にない高度に(111)面に配向し、きわめて粗さの小さい緻密な表面を持つ Au 薄膜を開発することができた。

・さらに Au 薄膜はフォトリソエッチングを応用することで、直径及びピッチ精度について高い精度が得られる事を示した。尚、同技術は半導体分野ではパターンニングに広く応用されており、量産性が高く、安価に製造できる。

・DNA の特異結合機能は、自己組織化単分子膜の最適化を行い、アレイスポット以外の領域について、疎水性の非特異吸着処理技術を開発した。この結果、発色シグナル及び蛍光シグナルを用いてハイブリダイゼーションにより、スポット部への特異的結合を確認し、市販品よりも高い輝度精度を示した。

・熱転写成型により、成型品のパターン直径、高さ、ピッチ各項目について、高い精度で成型可能であることを示した。

・産業技術総合研究所の日本人 BAC を搭載し、横河電機株式会社の自動ハイブリシステムに合わせたデザインのミニ DNA アレイチップを試作し、山口大学の胃がん培養サンプルを用いて解析可能であることを示した。

ii) 新ゲノムアレイ用蛍光標識化技術の開発

現在、アレイ用蛍光標識試薬は、CyDye が市場のほとんどを占めている。CyDye は、特許のライセンスが難しいこと、蛍光色素の価格が高いという問題点があり、BAC アレイ CGH 法を国内で普及させるためには、国産の新規蛍光物質が望まれていた。そこで、国産の新規な蛍光標識試薬の開発すべく、研究を開始した。

新規な蛍光標識試薬を開発するに当たり、2つの点に注目し、研究開発を進めることにした。1 点目は、BAC アレイ CGH 法は、競合ハイブリダイゼーションをおこなうため、蛍光標識試薬を開発するに当たり、2 種類の蛍光色素の取り込み比率を最適化し、精度を向上させること、2 点目は、既存のレーザーキャナーの励起レーザーの波長に蛍光色素の励起波長を合わせることで、高輝度な新規蛍光標識試薬の開発することを目標とした。

・まず、市場で販売されている蛍光色素を用い WY547-dCTP,WY647-dCTP を合成した。WY547-dCTP,WY647-dCTP をもちいて取り込み条件について検討した。その結果 2 種類の蛍光色素の取り込み率を最適化することで CyDye より BAC アレイ CGH 法でばらつきが少なく、精度よく測定が可能な蛍光標識試薬を開発することができた。本結果をもとに特許出願(PCT JP2008/051215)を行った。さらに蛍光標識試薬(ゲノム DNA 標識キット)を発売し、事業化を行った。この結果から、CGH 解析は、蛍光色素の輝度が高いだけでなく、2 種類の蛍光色素の取り込み率を最適化が重要であることが推察された。

・蛍光標識試薬開発における知見をもとに、新規な蛍光標識試薬の開発を開始した。既存のレーザースキャナーの励起波長にあった新規な構造のインドレニン-ピラゾール誘導体である蛍光色素 WY535-S4(535nm 付近に極大励起波長をもつ)、WY635-S4(635nm 付近に極大励起波長をもつ)を合成後、ヌクレオチド化を行い蛍光標識ヌクレオチド WY535-S4-dCTP、WY635-S4-dCTP を合成した。さらに本蛍光標識ヌクレオチドを用いて酵素による取り込みの最適化を検討した。

・蛍光標識ヌクレオチドの取り込み率向上のため側鎖の改良し、2 種の蛍光標識ヌクレオチド WY535-S3-dCTP および WY635-S3-dCTP を合成した。本蛍光標識ヌクレオチドを用いて酵素による取り込みの最適化を検討した結果、取り込み率の上昇がみられた。

・更なる取り込み率の向上を目指し、さらに側鎖を改良した 2 種の蛍光標識ヌクレオチド WY535-S2-dCTP および WY635-S2-dCTP を合成した。

・これまでに合成した 6 種の蛍光標識ヌクレオチド(WY535-S2-dCTP、WY635-S2-dCTP、WY535-S3-dCTP、WY635-S3-dCTP、WY535-S4-dCTP、WY635-S4-dCTP)の取り込み率を比較したところ、WY535-S3-dCTP および WY635-S3-dCTP の取り込み率が最も高いことがわかった。

新規蛍光標識ヌクレオチド WY535-S3-dCTP および WY635-S3-dCTP を用いて、新規蛍光標識試薬の試作品を作製し、マクロジェン社製 BAC アレイで CGH 解析を行ったところ、1コピーの差を十分に検出できる結果を得た。さらに、本プロジェクトで作製したミニアレイで CGH 解析を行い、十分な輝度が得られることを確認した。また、トーヨーエテック社製基板に山口大学で見出され、産総研で作製された日本人 BAC をアレイ化した胃がんミニアレイと和光純薬において開発した新規蛍光標識をもちいて胃がん培養細胞より得たサンプルを標識し、横河電機社製ハイブリダイゼーション装置でハイブリダイゼーションを行い、横河電機社製スキャナーで検出し、CGH 解析を行ったところ、評価解析できることがわかった。

以上の結果から、初期の目標であるレーザースキャナーの励起波長にあった蛍光色素を合成し、2 種類の蛍光色素の取り込み率を最適化することで、精度の高い蛍光標識試薬を開発できた。

iii) 疾患別アレイハイブリシステムの開発

物理的ハイブリシステムの研究開発では、

・2次元および3次元の高速状態観察システムを構築し、微小空間での溶液の振る舞いを把握した。

従来の微小空間での層流状態で攪拌・混合が困難であることを再確認するとともに、3次元ランダム攪拌によって実際に2粒子が攪拌・混合できることを確認した。また、流速分布を評価し、最適条件を与えることによって、3次元ランダム攪拌では実際に乱流が発生していることを確認できた。

・3次元ランダム攪拌が可能な微小チャンパーを試作し、予備実験として、微小空間内で乱流化できていることを、溶液として水とオイルを用いた混合実験により確認できた。微小チャンパー内の層流の系では水とオイルは混ぜることはできなかったが、3次元ランダム攪拌を行うと、界面活性剤等を添加していないにもかかわらず、水とオイルはエマルジョンとなり混合できていることを確認できた。

・同様に予備実験として、2種類の蛍光粒子を用いて3次元ランダム攪拌による微小空間内での攪拌・混合の実験を行った。微小空間内に緑色蛍光粒子溶液を充填し、続いて赤色蛍光粒子溶液を導入する。このままでは境界面の薄層部分は拡散によってわずかに混合された状態であった。この状態から3次元ランダム攪拌を行うと、終了後には2種類の蛍光粒子は完全に混合された状態となった。3次元状態観察システムによって、2種類の粒子はZ軸方向にも混合されていることが確認できた。

・3次元ランダム攪拌の動作が可能なハイブリユニットと、それを駆動する処理装置を試作した。ハイブリユニットは弾性体で構成された微小な流路構造を持ち、外部から印加される力によって送液を行う。ハイブリユニットにはミニチップを搭載することができるので、各種 CGH マイクロアレイをこの大きさに切断して実装し、実際にハイブリを行って、3次元ランダム攪拌の効果を確認できた。

・弾性体で構成された微小な流路・チャンバー容器に、アクチュエータによって外部から力を印加すると、流路・チャンバーは変形して容器内の溶液を移動させることができる。この外力の印加は、溶液の移動だけではなく封止も可能である。すなわち、流路間に物理的にバルブを構成しなくとも、溶液の移動と停止を外力の動きだけで実現することができる。この機能を活用して、物理ハイブリ、洗浄、廃液機能をこの物理ハイブリユニットに一体化すると共に、処理により発生する洗浄後の廃液も外部へ出さない閉鎖された系を実現できた。

・この方式の送液では、弾性体の流路に急激に大きな変形を起こさせることが可能なため、実質的に「可変流路構造」が実現できる。これによって微小空間内に流れの方向も大きさも激しく変化する乱流を発生させる物理攪拌を実現できた。

・処理装置は、アクチュエータ、温度制御等を一体化し、ハイブリユニットと共に処理装置によるシステム化を実現できた。そしてこのシステムを市販のCGHチップへ適用することによりハイブリ光量として約2倍の効果を確認できた。光量の増加から S/N の改善となり、これによってハイブリ効率の向上が確認できた。

深い焦点深度の読取装置の研究開発では、

・深い焦点深度を実現する励起系および受光系の開発を行った。浅い焦点深度を持つ共焦点方式の設計ノウハウを活用して逆の光学設計を行い、光軸方向の位置が変化してもビーム径等の変化が少ない長深度広開口光学系を開発した。これによって、開発した読取装置では 250 μ m(\pm 125 μ m)の焦点深度を得ることができ、目標の \pm 100 μ m 以上を達成できた。

・干渉縞ノイズ低減のため、共焦点スキャナの技術を応用し、マルチビーム・ディスク光学系を開発し励起光のノイズ低減を行った。さらに、パターン配置を工夫することにより、光学系部品へのゴミの付着に対する影響を激減させることができた。

・励起系のビーム整形光学系を新規に開発し、従来方式に対し励起光量を約 2 倍に増加できた。結果として蛍光信号強度も増加させることができた。

・ハイブリ後にドライアップ無しで液中にてそのまま測定できる液中計測光学系を開発し、大気中での赤色蛍光色素の光量低下を抑制することができるようになった。これによって、Cy3,Cy5 のレシオがより安定化することができる。

iv) **ゲノム情報と臨床情報の統合化** (担当:九州大学医学部(再委託先))では、大腸癌原発巣から癌細胞のみをLMDで採取し、total RNA および genomic DNA を採取し、1) 発現アレイ、CGH アレイ解析を行った。また、2) 遺伝子多型 8q24 genotype と MYC 遺伝子発現、allelic imbalance、予後との関係 3) iPS 遺伝子群発現の意義、4) 上皮間葉移行を制御する遺伝子 pathway の解明について報告する。

がん組織バンクの構築と CGH 解析 (担当:北海道大学医学部(再委託先))では、北海道大学病院第一外科において、手術検体を種々の解析をおこなう目的で組織バンクを設立している。これまでに約 3600 余りの患者検体(血液、組織)を収集し、管理・保存している。患者の個人情報とは連結可能匿名化をおこない、各検体には、患者背景、臨床情報がリンクされている。これらの検体を用いて CGH アレイ解析や糖鎖解析などを行った。

疾患別 BAC アレイの設計 (担当:山口大学(再委託先))では、胃癌のリンパ節転移、肝転移等の生物学的特性を評価する BAC ミニアレイを開発した。決定木および他の統計学的手法を用いて 50 種類の BAC クローンを同定して、それらと対照の日本人 BAC クローンをスポットしたミニアレイを作成した。新規症例を用いた検討では、リンパ節転移、肝転移、腹膜播種、進達度の正診率はそれぞれ 66.7%、86.7%、86.7%、96.7%であった。

v) 研究開発の連携

・山口大学医学部の病態評価用癌特異ミニアレイのコンテンツを産業技術総合研究所の日本人 BAC クローンを用いて、横河電機株式会社のハイブリユニットに搭載可能なサイズで絞込みチップ(144 ミニアレイ)として製作した。この 144 ミニアレイをハイブリユニットに搭載し、実際に物理ハイブリを行い、試作した読取装置によって画像を取得することができた。

・また 144 ミニアレイをトーヨーエイトック株式会社の高配向性金基板を使用し、蛍光試薬として和光純薬株式会社が製品化した新規蛍光標識試薬を同時に連携させ、ハイブリユニットによりハイブリダイゼーションの自動処理から読取の画像取得まで一連の処理をシステムとして動作させることに成功した。

1-2. 研究成果の概要 <研究開発項目 3>

以下の成果を達成した。

3) 臨床診断用全自動染色体異常解析システムの開発

①臨床診断用全自動染色体異常解析システムに対応したゲノムアレイの開発

・BAC DNA の調製と無尽資源化の半自動化ラインを完成させた。

・GENESHOT[®]法を用いて MCG Cancer array-800/-1500、MCG Cancer Array-Mini、Whole Genome Array-4500、アレイモジュール用の微小アレイの製造を行った。BAC DNA は分子量が大きく粘性が高いことから取り扱いにくい性状を有している、スポット条件、新規スポットティングヘッドの検討を加えることで、より高精度、高密度のスポット条件を見出すことができた。

・2色法と同等性能をもつ、CGH 解析法である dual hybridization 法を確立した。

・MCG Cancer array-800/-1500 を開発した。これらのアレイは搭載したターゲット遺伝子のゲノムコピー数変化を1コピーレベルで正確に検出する実用化レベルのデバイスである。

・既知の先天異常疾患の診断型アレイとして Genome Disorder Array (GDA)を開発した。アレイ実用化コンソーシアムでの症例収集・解析と性能検証を行いながら、搭載する BAC クローンに改良を重ね、Ver. 2、Ver.3 を経て、GD-700 として商品化および検査受託開始にて実用化(平成21年)に至った。

・ヒト染色体タイリングアレイ(WGA15000)を開発した。

・臨床診断用癌ゲノムコピー数異常の検出を可能とする自動化アレイ CGH 解析装置に対応したツールとして、文献データならびに東京医科歯科大学・稲澤研で蓄積した癌特異的ゲノム異常データに基づき癌関連遺伝子領域を含む 108 種類の BAC クローンを搭載した「MCG Cancer Array-Mini」を作製した。MCG Cancer Array-Mini を用いた食道扁平上皮癌の術後の予後予測に有用なコンテンツが含まれていることを検証した。

・GDA と Whole Genome Array-4500 (WGA)を用いた、先天異常疾患の2段階スクリーニングを行った。臨床的に診断がつかず染色体核型正常の多発奇形を伴う発達遅滞 (MCA/MR) 646 症例を解析した。GDA を用いた1次スクリーニングにおいて 69 例 (10.7%)で疾患原因の pathogenic CNV (pCNV)を検出した。1次スクリーニング陰性例は WGA4500 を用いた 2次スクリーニングの対象として 515 症例を解析し、61 例 (11.8%)に pCNV を検出した。このスクリーニングを通じ、臨床診断や従来の染色体核型分析によって疾患原因を特定できなかった先天異常疾患について、GDA により迅速に既知疾患の診断が可能であることを検証するとともに、WGA を用いた 2次スクリーニングでより詳細な疾患原因の探求を行うことができた。

・WGA を用いた MCA/MR 症例解析の過程で、小頭症・小脳脳幹部低形成を伴う精神遅滞 (MR/MICPCH) 女児例に見出された Xp11.3-p11.4 ヘテロ欠失から、女性における CASK 遺伝子のハプロ不全が上記の病態に関与している可能性を指摘した。

・臨床症状として MR/MICPCH を呈する女児 10 例を収集して CASK 遺伝子異常の有無を解析し、CASK のハプロ不全が多様なゲノム構造異常により惹起され、MR/MICPCH を引き起こしていることを示した (Hayashi et al., 2011 Hum Genet)。

・角膜混濁・両側軸後性合多趾・重度精神遅滞を伴う女児の WGA 解析により 14q22.1-q22.3 のヘテロ欠失を検出した。本欠失範囲に含まれる BMP4 遺伝子のコンディショナル・ノックアウトマウスが多指症・眼球の形成異常を来することが報告されていることから、本症例は 14q22.1-q22.3 に座位する BMP4 遺伝子のハプロ不全により惹起される可能性を示した (Hayashi et al., 2008 Am J Med Genet)。

・全身性の多毛を伴う MR の男児 2 人のアレイ CGH 解析において、Xq24 領域に 371kb のヌル欠失を検出した。本欠失領域に含まれる UBE2A 遺伝子のナンセンス変異が本症例と表現型の類似する MR の原因となることが報告されていることから、本症例において UBE2A ヌル欠失が原因となっている可能性が考えられることを示した。

・文科省「テラーメイド医療を目指したゲノム情報活用基盤技術」からの成果も含めて、新たにがんのアレイ CGH-DB 構築、リリース開始(平成20年3月)。

・日本人 100 家系におけるトリオ解析を実施したところ、のべ 1353 箇所 CNV が検出された。そのうち 970 箇所は DGV に収載されておらず、固有性の高い CNV である可能性が考えられた。また、568 箇所の CNV は、子において新規に生じた *de novo* CNV であった。これらの成果に基づき日本人健常者の CNV データベースを構築し、MCG CNV database をインターネット公開(平成23年3月1日)。

②臨床診断用全自動染色体異常解析システムの開発

・集中型染色体異常解析システムとして、撮動型スキャナーを搭載した CGH ハイブリダイゼーション全自動機プロトタイプ機を作製し、性能評価を行い、集中型染色体異常解析システムのプロトタイプとして完成した。

・分散型全自動染色体異常解析装置の開発について、微小アレイを内蔵したサンプルの前処理とアレイ反応機能を付加したディスプレイのリアクター(アレイモジュール)、駆動装置(プロトタイプ機)を製作し、微量なサンプル量からでも同日内に染色体異常を検出できるシステムの開発に成功した。

・分散型全自動染色体異常解析装置は、ゲノムコピー数異常既知の食道扁平皮膚癌、乳癌、大腸癌、急性骨髄性白血病の各細胞株を用いた検討で MCG Cancer array-800/-1500、とほぼ同等に染色体コピー数異常検出できることが確認された。

③癌の染色体構造異常の解析と診断のコンテンツ開発

・異常メチル化断片を検出する応用法として独自に開発した BAC array-based methylated CpG island amplification (BAMCA)法を用いた食道扁平上皮癌細胞株のスクリーニングデータに基づき、新規の食道癌抑制遺伝子候補として CRABP1 を見出した。

・食道扁平上皮癌の 11q22 増幅領域の標的遺伝子 YAP1 とその新たなアイソフォームを同定した。YAP1 タンパクの核での発現亢進は予後不良と関連し、多変量解析でも独立した予後因子となることが示された。さらにその機能解析から YAP1 は食道扁平上皮癌の治療標的候補になりうることが示唆された。

・腎癌のゲノムコピー数に基づく unsupervised の階層的クラスタリング解析により通常型腎細胞癌は A, B の 2 群に分類され、B 群には組織学的異型度が高く、静脈侵襲、腎静脈本幹の腫瘍栓があり、病期 3, 4 の症例を含むことから、腎癌のゲノムコピー数に基づく予後予測の可能性を示した。

・口腔癌を CA-800 で解析した結果、口腔癌検体において癌進行度に特徴的なゲノム構造変化を見出すことができた。

・食道扁平上皮癌で検出した 13q21.2 ホモ欠失領域の標的癌抑制遺伝子候補 PCDH17(Protocadherin17)を同定した。臨床サンプルの検討から、PCDH17 は主に DNA メチル化により発現抑制を受ける癌抑制遺伝子候補であり、予後マーカーとして利用できる可能性が示唆された。

・食道扁平上皮癌で見出した 1q32-q41 増幅の標的遺伝子 SMYD2 を同定した。SMYD2 が新規の ESCC における癌遺伝子として、診断・治療の標的になり得ることが示された。

・BAC アレイを基盤に高度増幅領域の標的遺伝子 KLF12 遺伝子を同定した。KLF12 高発現群は腫瘍径が 7 cm 以上の大きい未分化癌を形成する傾向が強く($p=0.038$)、KLF12 遺伝子は未分化型胃癌の治療標的候補である。

・未分化型胃癌において遺伝子コピー数異常を起こしているチロシンキナーゼ遺伝子として、高度増幅を INSR, NTRK1, PTK7, EGFR, LMTK2, MET, BLK, PTK2, ABL1, FGFR2, FLT3, FLT1, FES, TNK1, AATK, AXL, SRC, PTK6, SRMS, BMX に、また、ホモ欠失を JAK2 で検出した。

・分化型胃癌の悪性化に関連し、胃癌の増殖に関与する癌遺伝子を染色体 6p21 領域内に複数個同定した。

・胃癌の Whole Genome Array-4500 を用いたアレイ CGH 解析により検出した約 3 Mb の 9p24.2-24.3 ホモ欠失の標的遺伝子として VLDLR を同定し、本遺伝子は胃癌抑制遺伝子候補であることを明らかにした。

	<p>・肺癌の高グレード内分腫瘍(HGNEC)の CA800 アレイ解析によるゲノムコピー数異常パターンからHGNEC は3群に分かれ、それら3群は予後良好群(BR2)と予後不良群(BR1, BR3)に2分されることが明らかになった。また、それらを区別するゲノム異常として、染色体 6p22.3 DEK 遺伝子領域のコピー数増加を同定した。</p> <p>・肺癌細胞株の Whole Genome Array-4500 を用いたアレイ CGH 解析により新規 13q21.2-q21.31 にホモ欠失を検出し、標的癌抑制遺伝子の PCDH20 を同定した。PCDH20 は肺癌臨床例においては高頻度に DNA メチル化により発現消失しており、PCDH20 メチル化陽性例は有意に予後不良であり、多変量解析の結果、他の臨床病理学的諸因子とは独立のバイオマーカーであることが示された。</p> <p>・肺非小細胞癌細胞株において MCG Cancer Array-800 ならびに Whole Genome Array-4500 を用いたアレイ CGH 解析により 14q11.2 増幅を明らかにし、同増幅標的遺伝子候補として BCL2L2 を同定した。その機能解析から分子標的治療の標的候補となりうることを示唆された。</p> <p>・多発性骨髄腫細胞株のアレイ CGH 解析により検出した 11q23.1 増幅領域から標的遺伝子候補 POU2AF1 を同定した。</p> <p>・卵巣癌細胞株の Whole Genome Array-4500 を用いたアレイ CGH 解析により新規 9q33.3 ホモ欠失を検出し、その標的遺伝子 ANGPTL2 を明らかにした。その機能解析から ANGPTL2 が卵巣癌抑制遺伝子である可能性が示唆された。</p> <p>・口腔扁平上皮癌(OSCC)細胞株のスクリーニングから LRP1B 1(2q22.1)のホモ欠失を検出し、さらに臨床検体において LRP1B プロモーター領域の高頻度 DNA メチル化を検出した。LRP1B はホモ欠失や DNA メチル化により発現抑制を受ける癌抑制遺伝子として働くことが示唆された。</p> <p>・MCG Cancer Array-800 ならびに Whole Genome Array-4500 を用いたアレイ CGH 解析により新規 10p12.1 ホモ欠失を見出し、その標的癌抑制遺伝子候補として PRTEDC1 を同定した。</p> <p>・口腔扁平上皮癌細胞株について MCG Cancer Array-800 ならびに Whole Genome Array-4500 を用いたアレイ CGH 解析により 4q35 領域に約 1Mb の新規ホモ欠失を見出し、同領域内の候補癌抑制遺伝子 MTNR1A を同定した MTNR1A は口腔癌の独立した予後因子になりうることを示唆され、さらにその機能解析から癌抑制遺伝子であると考えられた。</p> <p>・口腔癌の CG Cancer Array-800 ならびに Whole Genome Array-4500 を用いたアレイ CGH 解析で 19q13.12-q13.2 増幅を検出し、同領域内の 49 遺伝子ならびに 17 の未確認の転写物候補の中から標的遺伝子の PAK4 を同定した。PAK4 は Kinase 活性に依存性に口腔癌・頭頸部癌の進展に関わり、診断マーカーだけでなく治療標的となりうることを示唆された。</p> <p>・甲状腺未分化癌細胞株の Whole Genome Array-4500 を用いたアレイ CGH 解析により 20q11.22 に微細な新規高度増幅領域を見出し、標的候補遺伝子として ITCH(AIP4、atrophin 1-interacting protein 4)を同定した。</p> <p>・甲状腺未分化癌細胞株の MCG Cancer Array-800 を用いたアレイ CGH 解析により 8p12 増幅を検出し、標的遺伝子 DUSP26(dual-specificity phosphatase 26)を同定した。DUSP26 は p38MAPK を基質にして未分化甲状腺癌細胞の増殖を促進する新規癌遺伝子あることが示唆された。</p>
学術論文	開発項目 1) 2) 3) 総計: 「査読付き」 296 件(関連文献含む)、「その他」 21 件
特許	開発項目 1) 2) 3) 総計: 「出願済」 66 件(うち「国際出願」 30 件)
その他の外部発表プレス発表等	開発項目 1) 2) 3) 総計: 「学会等発表」 199 件、「新聞等」 3 件

IV. 実用化、事業化の見通しについて	<p>研究開発項目 1) BAC を用いた高精度全ゲノムアレイの開発</p> <p>研究開発項目 2) 染色体異常を解析する革新的要素技術の開発</p> <p>1. 実用化等について</p> <ul style="list-style-type: none"> ・日本人全ゲノムアレイの実用化 <p>中間評価において当該「日本人 BAC を用いた革新的染色体異常解析基盤技術の研究開発」について、産業技術総合研究所の BAC アレイの構築と参画企業の技術開発の一体性が見えないとの指摘を受けた。この指摘に対応するため、最終目標達成の過程において産業技術総合研究所は山口大学医学部との共同研究により臨床診断用の日本人 BAC クローンを用いたミニアレイの作製を行った。この日本人 BAC ミニアレイをトーヨーエイトック株式会社のスポッティング技術により作製し、和光純薬株式会社の新規開発蛍光試薬を用い、横河電機株式会社のハイブリダイズ装置および検出システムを用いて計測を行い、参画企業の革新的技術開発を幹事企業の横河電機株式会社が全体システムとして統一した。</p> <ul style="list-style-type: none"> ・BAC アレイの優位性 <p>発現解析で用いられていた SNP チップが製作企業であるアフィメトリクス社の意図に反して CGH 解析に用いられて以来、測定対象検体の DNA と対照 DNA をアレイ上で同時に競合的にハイブリダイズする CGH アレイ法は信頼性の高い手法として全ゲノム領域解析(WGA)に用いられている。しかし日本人の BAC クローンのショットガン解析に基づく欧米人ゲノムとの比較により、日本人の SNP は欧米人の SNP と大きく異なる可能性が示された。また技術的に SNP チップに用いられる合成 DNA 断片が BAC DNA に比べて短いことから、ハイブリダイズ効率が BAC アレイに比べ低い。したがって計測信号強度は圧倒的に BAC アレイが優れている。臨床診断は出来る限り信頼度の高い計測に基づくべきであり、ノイズの少ない BAC アレイの計測感度の優位性はゆるがない。</p>
	<p>研究開発項目 2) 染色体異常を解析する革新的要素技術の開発</p> <p>1. 実用化等について</p> <ul style="list-style-type: none"> ・高精度表面加工修飾技術の開発 <p>本研究開発において、横河電機株式会社のハイブリシステムに併せたデザインのミニ DNA アレイチップ試作品を製作し、産業技術総合研究所より提供を受けた BAC DNA を搭載した。さらに同ミニ DNA アレイチップを用い、山口大学医学部より提供を受けた胃がん培養細胞より得たサンプルについて、評価解析できることを検証した。今後、本研究グループの要素技術を組み合わせたがんの診断あるいは予防システムの事業化を主体に、DNA チップの実用化を目指す。</p> <ul style="list-style-type: none"> ・新ゲノムアレイ用蛍光標識化技術の開発 <p>ゲノム DNA 標識キットの販売;既存の蛍光物質を用いて蛍光標識試薬(ゲノム DNA 標識キット)を開発。特許(PCT JP2008/051215)を出願し、初期の目標を上回る蛍光標識試薬(ゲノム DNA 標識キット)の事業化を行った。</p> <p>初期の目標であるレーザースキャナーの励起波長にあった蛍光色素を合成し、2 種類の蛍光色素の取り込み率を最適化することで、精度の高い蛍光標識試薬が実現した。今後、保存安定性、データの再現性について検討し、新規蛍光物質での蛍光標識試薬の実用化を目指す。</p> <ul style="list-style-type: none"> ・疾患別アレイハイブリシステムの開発 <p>物理的ハイブリシステムの研究開発では、ハイブリユニットと処理装置によるシステム化を達成した。また物理攪拌によりハイブリ光量への約2倍の効果を確認した。さらに、深い焦点深度の読取装置の研究開発では、新パターンによるマルチビーム・ディスク方式により、深い焦点深度、高感度、高 S/N、を確認した。また 2 色の液中計測が可能な装置を実現した。これらの技術は、染色体異常の解析という当初の目的とともに、各種の医療分野および環境・生産・その他産業分野等への応用が見込まれる。特に読取装置については、平成23年度から実用化の検討を開始している。</p>
	<p>研究開発項目 3) 臨床診断用全自動染色体異常解析システムの開発</p> <p>1. 実用化について</p> <ul style="list-style-type: none"> ①GD アレイを用いた先天性異常症候群を含む染色体異常の診断 <ul style="list-style-type: none"> ・先天異常症、多発奇形症及び精神発達遅滞を合併する症例の診断、自然流産の原因の探索、不育症の原

	<p>因解明、出生前診断等、広範囲の領域で使用可能である。GD アレイの実用化はこれらの分野での臨床診断としてニーズが高く、医療分野での波及効果が期待される。GDアレイは、平成 21 年度に“GD-700”という商品名で市販され、同年にGD-700を用いた臨床検査が開始された。</p> <p>③ Cancer Array-800 を用いた癌検体の解析</p> <ul style="list-style-type: none"> ・Cancer Array-800 を用いて大腸癌、食道扁平上皮癌、肝癌のゲノム異常解析についてデータベースを構築し、受託解析を平成 24 年度以降に自由診療として実施する。 <p>④ 自動染色体異常解析システムを用いた癌の診断</p> <ul style="list-style-type: none"> ・Cancer Array-1500 を用いて固形癌の臨床病理とリンクした解析データを蓄積する。一方、CNV のデータベースを構築し、正診率の向上を図り、最終的に標的とする癌を診断する BACDNA コンテンツを絞り込む予定である。平成 22 年度までに癌の個別化医療に使用する診断用アレイの作製、分散型全自動染色体異常解析装置、集中型全自動染色体異常解析システムを完成させ、癌の診断が可能な環境を作る。その後、臨床評価、解析装置の改良等を行い、平成 24 年度末の稼動(実用化)を目指している。 <p>⑤ 自動染色体異常解析システムを用いた染色体異常症の診断</p> <ul style="list-style-type: none"> ・平成 22 年度末の全自動染色体異常解析装置の完成後、本装置に GD アレイが搭載できるように改良を加え、染色体異常の全自動解析を進める予定である。さらに、Whole Genome Array-4500、ヒトタイリングアレイ-15000 についても全自動染色体異常解析システムに搭載可能であり、データ解析と連動したシステムを構築し、研究用での解析に実用化を計画している。 <p>2. 事業化について</p> <ul style="list-style-type: none"> ・先天異常症を対象としたGDアレイの販売(富士フイルム株式会社)とその市販品を用いた臨床検査(自由診療)(株式会社ビー・エム・エル)は既に実施している(平成 21 年度)。現在のところコストの壁は厚いが、今後は自動解析装置の投入による検査工程の自動化や検査に使用する試薬、消耗品の低コスト化を進め普及を図りたい。不育症への展開は特にローコスト化が鍵になる。一方で、本格的な普及にはゲノム解析に理解のある遺伝カウンセラーの育成や染色体解析技術に精通した医師がいる複数の拠点病院を整備する必要がある。また、市場の動向を見ながらであるが、製造承認を得て保点収載へ進めれば採算ベースに乗せることも可能であろう。 ・がんを対象にしたアレイ CGH 解析の事業化までには、本プロジェクトで見出されたような多数の候補遺伝子領域、及びそれらを組み合わせた安価なミニアレイについて、臨床検体を用いた有用性の検討を重ねる必要がある。また、がん組織からがん細胞と正常細胞を区別して回収する効率的な方法の開発も平行して進める必要がある。がんの場合はゲノム異常の程度もさまざまであることから、BAC-DNA を用いたアレイ CGH 解析法だけでなく、オリゴ DNA アレイや次世代シーケンサーを用いた解析法など最新の技術との融合を図りながら費用対効果の高い診断システムを構築していくことが現実的と考えられる。先天異常症に比べがんの市場性ははるかに大きいことから、有用なコンテンツを見つけさえすれば広く普及し、事業として成り立つと考えられる。 	
V. 基本計画に関する事項	作成時期	平成18年3月 制定
	変更履歴	<p>平成20年3月 改訂: プロジェクトリーダー名の記載。</p> <p>平成20年7月 改訂: イノベーションプログラム基本計画の制定により、「(1)研究開発の目的」の記載を改訂。</p> <p>平成23年1月 改訂: 加速予算に伴う実施期間の変更改訂。</p>

I. 事業の位置付け・必要性について

I. 事業の位置づけ・必要性について

1. NEDO の関与の必要性・制度への適合性

1. 1 NEDO が関与することの意義

今後、世界に類を見ない少子高齢化が進展する我が国において、国民が健康で安心して暮らせる社会を実現することは喫緊の課題である。具体的には、個の医療を通じて健康寿命の延伸、QOL (Quality of Life: 生活の質) の向上を図ることが求められている。近年ゲノム解析技術の進展により、個人のゲノム解析も進み、個人間の予想以上の塩基配列の相違以上に、数十万から数百万塩基対に及ぶ非コード領域を含むゲノム染色体上の大規模な異常(増幅、欠失等)が存在し、癌や遺伝疾患などの疾患と密接に関係していることが解明され始め、診断分野への応用に対する期待が高まっている。染色体構造変化を高精度、迅速に解析する技術は、新たな個別化診断のための手法として早期に確立する必要がある。その実行には、研究のリソース整備や技術基盤の整備が必要であり、それらは、アカデミアや民間単独での実施が不可能である。また、それら基礎基盤技術を背景とする研究開発情報は、社会的有用性が高いことから公共性が高い技術開発であり、そのためNEDOが産官学からなる連携体制構築の下により本研究開発を推進する意義は非常に大きい。

また、NEDO事業としての背景については「政策上の位置づけ」のなかで後述するように、「健康安心イノベーションプログラム」、および「ナノテク・部材イノベーションプログラム」の一環として実施するものであり、健康安心イノベーションプログラムの目標として掲げている、“国民が健康で安心して暮らせる社会の実現”の達成に向け、個々人の体質に合わせた効果的・効率的な医療の実現を目標としている。すなわち、本プロジェクトでは癌や遺伝性疾患などに関係するゲノム染色体上の異常を高感度、高精度かつ簡便、迅速、安価に解析するための染色体異常解析技術を開発することにより、技術戦略ロードマップにおける創薬・診断分野のシナリオを具現化すべく、個別化医療の実現に寄与することを目的とし実施するものである(添付資料参照: 技術戦略マップ2010、創薬・診断分野の導入シナリオ)。

I. 事業の位置づけと必要性: NEDOの事業としての妥当性

NEDO関与の必要性

<経済産業省の施策(プログラム)目標>

- ◎個別化医療の実現(健康安心イノベーションプログラム)
- ◎ナノテク・部材技術の革新・付加価値増大(ナノテク・部材イノベーションプログラム)

上位プログラム目標の達成に

●本プロジェクトで開発する“ゲノム解析技術”は、個人・細胞種ごとのゲノム配列の相違を網羅的、かつ高効率・高精度に解析する手段として有効な方法であり、個人のゲノム情報から、がんをはじめとする様々な疾患の病態に応じた治療戦略の策定や、従来法では見出せなかった新規疾患関連遺伝子の同定からの個別化医療の実現に資する「診断と治療法の開発」に貢献することが期待され、それに対する国の支援は重要である。また本邦における医療技術の向上や新規医療事業の機会創出を国として推進することも重要となる。

●“個別化医療の実現”のため、その一端を担う“ゲノム解析”の“基盤技術”や“臨床診断技術”、研究リソースの整備は、公共性の観点も含め極めて重要であり、民間単独による実施は不可能であることから、NEDOによる産官学からなる連携体制構築のもと、本事業を推進する意義は非常に大きい。

1. 2 実施の効果(費用対効果)

個別化医療では、罹患、薬剤効果、副作用に関し個人毎にゲノムデータをもって治療・医療に反映する必要がある。個人のゲノム配列の相違を検出する方法としては、究極的にはシーケンスをすることで達成されるが、個人毎、疾患によっては細胞種毎に高効率に解析する方法として実用化されるには更なる技術開発が必要である。そこで、CGH(Comparative Genomic Hybridization: 比較ゲノムハイブリダイゼーション)法による解析は個人毎、細胞種毎のゲノム配列の相違を網羅的且つ高効率、高精度に解析する手段として最も有効な方法の一つである。疾患の病態に応じた治療戦略の策定、従来の解析では見出されなかった疾患関連遺伝子の同定、診断そしてその治療法の開発に大いに貢献することが期待されている。例えば、がんはゲノム病とも呼ばれ、個人の遺伝的な背景、環境から、後天的なゲノム変化、異常を伴い発生し、その悪性を診断する上でゲノム構造が重要な情報となる。従来、病理学的に目視にて判定されていたが、ゲノム解析の進展により確実な診断、治療が可能となる医療の革新が期待される。がん診断のみならず、従来のSNPs等解析では網羅、解析出来ない原因不明の疾患も染色体の異常が原因である事が見出され始めており、CGH解析の応用は世界で大いに進捗している。

本邦においても早期に診断技術として迅速、高精度な技術開発、診断コンテンツ開発、治療体系の早期確立が望まれ、医療の向上を行う必要がある。そして、新たな診断の事業化機会を逸することなく推進することは重要である。本邦での遺伝子診断関連の市場規模は約150億円(2008 日経バイオ年鑑)程度であるが、今後、個別化医療が進展し治療と診断が一体となり実施されることが期待され、更に着実に拡大することが見込まれる(下図参照)。本事業で開発する技術は個別化医療の一端を担う重要な技術であり、疾患の悪性度、予後予測等を可能することから医療の場で広く活用されるものと思われる。

また、本事業で開発される技術、リソース、基盤データは疾患の原因究明、個別化医療のための医療を可能とする研究開発の基盤を提供するものであり、遺伝子関連の研究用試薬、計測機器として事業化を目指し普及を図る。リソース、基盤データは公共に供しゲノムの基盤リソース、データとして広く活用される。

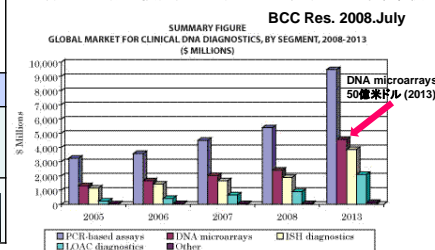
1. 事業の位置づけと必要性: NEDOの事業としての妥当性

費用対効果

疾患ゲノム構造の変化を高効率に解析する“ゲノム解析技術開発”は、がんや先天性疾患などの医療分野における診断システム・機器への応用、疾患の悪性度や予後予測、予防技術の開発や医薬品の開発など、幅広い分野での産業応用に大きく貢献することが期待できる。

本事業の総額	17.5 億円	
	▲	
国内外潜在需要規模		引用資料
例) 遺伝子診断関連市場	国内: 76億JPY (2009) 国外: 201億米ドル (2013) DNAマイクロアレイは50億米ドル(2013)	富士経済 bcc Research
例) DNAチップ世界市場	7億6000万米ドル (2010) ⇒14億2520万米ドル (2015)	MARKETS AND MARKETS

世界のDNA診断技術、2013年には201億米ドルの市場規模に



●個別化医療の一端を担う“ゲノム解析”は、治療と診断の一体的な医療が今後進んでいくなかで、遺伝子診断関連市場規模は更に拡大することが見込まれる。

2. 事業の背景・目的・位置づけ

2. 1 事業の背景と目的

2001年2月に国際ヒトゲノム計画の結果の草案(ドラフトシーケンス)が公開され、ヒトゲノムの塩基配列に基づいた診断・治療・創薬の研究開発がポストゲノム研究としてスタートした。シーケンス技術の進展も著しく、個人ハプロイドゲノムが解析されるにいたり、いよいよ個別化医療が個人のゲノム情報に基づき、個人に則した診断、治療が必然となっている。近年ゲノム解析技術の進展により、数十万から数百万塩基対に及ぶゲノム染色体上の大規模な異常(増幅、欠失等)が存在し、癌や遺伝疾患などの疾患と密接に関係していることが解明され始め、診断分野への応用に対する期待が高まっている。さらに、近年のポストゲノム研究の進展により、タンパク質をコードしない、いわゆる非コード領域を含むゲノム全領域にわたる数万から数十万塩基対の物理サイズにおける染色体異常と疾患の関係が明らかになりつつある。加えて、染色体コピー数多型と疾患の関係が今後のゲノム解析研究において重要となっている。しかし、このような染色体異常を高効率に解析し、診断応用に展開していくためには、性能、コスト等、飛躍的な向上のための技術開発が必要である。

染色体の異常を検出する手法として、最初に蛍光標識したDNAを癌由来の染色体にハイブリダイズさせるFISH(Fluorescence in situ Hybridization)法が開発され、既知DNAの検出法として現在も臨床診断に用いられている。これに対して未知の染色体異常を全ゲノム領域で検出する方法としてCGH法が1992年にKallioniemiらにより開発され、1997年ドイツ癌研究所のLichterら、そして翌年1998年米国カリフォルニア大学のGrey、Pinkel、Albertssonらも染色体メタフェーズの代わりにバクテリア人工染色体(BAC)クローンを用いるBACアレイCGH法の展開を開始した。BACアレイCGHにおいては各BACクローンの染色体上の位置が特定されているため、染色体CGHのような核型解析が不要になり、2004年Lamらが提唱した約3万個のBACクローンで全ゲノム領域をカバーするタイリングアレイにより、遺伝子レベル相当の解像度を達成することが可能となった。このようは背景を経てBACアレイCGHは染色体異常を全ゲノム領域に亘って解析できる汎用性の高い最有力の研究ツールとなった。

I. 事業の位置づけと必要性: 事業目的の妥当性

ゲノム解析技術開発研究の動向(国内外)

<ゲノム研究を支えるシーケンシング技術とマイクロアレイ技術> ～DNAマイクロアレイによる高次のゲノム解析技術開発の現況～

- ・DNAマイクロアレイ解析の一番の強みは「汎用性」にある。
- ・シーケンサー同様、高次ゲノム解析に近年用いられてきた。
- ・解析誤差に関する課題がある。
- ・再現性や感度向上に加え、DNAマイクロアレイの「用途の拡大」が急務。
- ・将来的には、次世代シーケンサーによるゲノム解明情報をもとに、マイクロアレイの利点を生かした活用が広がる可能性がある。
- ・DNAマイクロアレイは、基礎研究の進展とともに、応用研究や創薬における実証試験、臨床や診断などに使えるような技術開発がこれからも進むと考えられる。
- ・そのためのプラットフォーム開発、低コスト化が今後の重要課題である。

(参考文献: ゲノム解析技術の最前線と展望、Nature, Jun 2010)

●ゲノム解析技術は国内外において「安く、早く、高精度」を指向する研究開発が進んでいる。同時に、DNAマイクロアレイによる解析技術も進展しており、医療への応用が今後も国際競争の中で期待されている。本事業の成果は、医療産業応用への貢献が期待される。

本事業では、CGH 法を基に、ヒト染色体の欠失及び増幅を定量的に精度良く解析可能な全自動染色体異常解析装置を開発し、染色体異常の解析に基づいた癌及び遺伝性疾患の個別化医療を実現させるための基盤を構築する。我が国が有する微細加工技術・表面処理技術といったナノテク等の強みを活かし、こうした染色体異常を高感度、高精度かつ迅速、安価で非コード領域までを検出するゲノムアレイや解析基盤技術開発を行うとともに、全自動解析システムの開発を行うものである。

さらに、臨床情報を有する臨床サンプルを解析することにより、ゲノムアレイを用いた染色体異常解析技術の有用性の検証を行い、臨床現場で活用できるバイオ診断機器の基盤技術の開発を目的とするものである。

2. 2 政策上の位置づけ

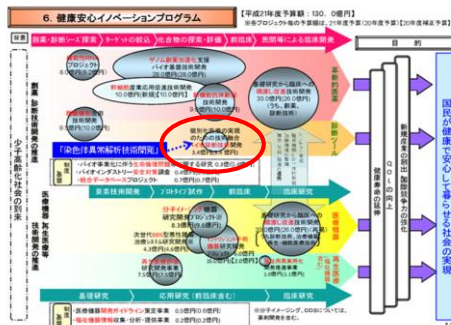
冒頭で述べたように、本プロジェクトは、「健康安心イノベーションプログラム」、および「ナノテク・部材イノベーションプログラム」の一環として実施されるものである。健康安心イノベーションプログラムの目標である“国民が健康で安心して暮らせる社会の実現”に向け、達成すべき重要な課題の一つとして、個々人の体質に合わせた効果的・効率的な医療の実現が掲げられている。本プロジェクトでは癌や遺伝性疾患などに関係するゲノム染色体上の異常を高感度、高精度かつ簡便、迅速、安価に解析するための染色体異常解析技術を開発することにより、技術戦略ロードマップにおける戦略的方向性としての個別化医療の実現に寄与することを目的とし実施するものである(下図、および添付資料参照)。

I. 事業の位置づけと必要性: NEDOの事業としての妥当性

事業の位置づけ

「健康安心イノベーションプログラム」
“国民が健康で安心して暮らせる社会の実現”に向け、達成すべき重要な課題の一つとして、“**個々人の体質に合わせた効果的・効率的な医療(個別化医療)の実現**”が目標として掲げられている。

「ナノテク・部材イノベーションプログラム」
“ナノテクノロジーや高機能部材の革新を先導することにより、それら部材の活用による**情報通信、ライフサイエンス、環境、エネルギー**などの幅広い産業の**付加価値増大を図る**ことを目指している。



本プロジェクトは、「健康安心イノベーションプログラム」、および「ナノテク・部材イノベーションプログラム」の一環として実施されたものである。

また、「ナノテク・部材イノベーションプログラム」では、“ナノテクノロジーや高機能部材の革新を先導することで、これら部材を活用した情報通信、ライフサイエンス、環境、エネルギーなどの幅広い産業の付加価値の増大を図る”ことが目指されている。本事業では、ライフサイエンス・健康・医療領域との融合を推進するプログラムの一環として、我が国が有する微細加工技術・表面処理技術といったナノテクノロジーの強みを活かした開発内容となっている(添付資料参照: イノベーションプログラム基本計画等)。

Ⅱ．研究開発マネジメントについて

II. 研究開発マネジメントについて

1. 事業の目標

1.1 事業の全体目標

本プロジェクトは、「健康安心プログラム」の一環として実施されるものである。健康安心プログラムの目標である「国民が健康で安心して暮らせる社会の実現」に向け、達成すべき重要な課題の一つとして、個々人の体質に合わせた医療による「効果的・効率的な医療の実現」が掲げられている。本プロジェクトでは癌や遺伝疾患などに関係するゲノム染色体上の異常を高感度、高精度かつ簡便、迅速、安価に解析するための染色体異常解析技術を開発することにより、個別化医療の実現に寄与することを目的とする。近年ゲノム解析技術の進展により、数十万から数百万塩基対に及ぶゲノム染色体上の大規模な異常(増幅、欠失等)が存在し、癌や遺伝疾患などの疾患と密接に関係していることが解明され始め、診断分野への応用に対する期待が高まっている。さらに、近年のポストゲノム研究の進展により、タンパク質をコードしない、いわゆる非コード領域を含むゲノム全領域にわたる数万から数十万塩基対の物理サイズにおける染色体異常と疾患の関係が明らかになりつつある。加えて、染色体コピー数多型と疾患の関係が今後のゲノム解析研究において重要となっている。しかし、このような染色体異常を高効率に解析し、診断応用に展開していくためには、性能、コスト等、飛躍的な向上のための技術開発が必要となっている。本プロジェクトでは、我が国が有する微細加工技術・表面処理技術といったナノテク等の強みを活かし、こうした染色体異常を高感度、高精度かつ迅速、安価で非コード領域までを検出するゲノムアレイや解析基盤技術開発を行うとともに、全自動解析システムの開発を行う。さらに、臨床情報を有する臨床サンプルを解析することにより、ゲノムアレイを用いた染色体異常解析技術の有用性の検証を行い、臨床現場で活用できるバイオ診断機器の基盤を開発することを目的とする。

II. 研究開発マネジメント: 研究開発目標の妥当性

事業の目標

全体の目標 (基本計画より抜粋)

近年ゲノム解析技術の進展により、非コード領域も含め、**染色体・ゲノムの微細構造異常(増幅、欠失等)**の存在と、**癌や遺伝性疾患などとの密接な関係性**が示唆されており、これら異常を高精度に検出する技術の確立と診断への応用に対する期待が国内外で高まっている。今後の個別化医療の実現には、こうした**染色体異常を高感度、高精度かつ高効率に解析するバイオ診断機器の開発と実用化**が急務の課題である。そのためには、**十万塩基対以下の精度で全ゲノム領域をカバーする高精度ゲノムアレイの開発や、高輝度DNA標識技術の開発等による高感度化といった基盤技術課題の克服が必要**であり、研究用途のみならず臨床応用へと展開するには、再現性の確保や解析システムの簡便化、時間短縮や低コスト化の実現のための**要素技術の開発が必要**である。

本プロジェクトでは、**個別化医療に供する、疾患と染色体異常の検証、および診断機器開発を行うため**、現状の染色体検査との整合性が高く、また、高感度化や低コスト化への期待が高いバクテリア人工染色体(BAC)を用いたゲノムアレイに着目し、診断応用に必要とされる**高感度、高精度かつ迅速、安価**といった要求を満たす**革新的要素技術開発**を行い、**臨床診断用全自動染色体異常解析システムの開発**を目標とする。なお、これらの技術開発を行うにあたり、診断利用の有効性を検証するため、疾患と染色体異常の関係について臨床サンプルを用いた検証を行いながら、研究開発を推進する。

1. 2 研究開発の目標

①最終目標(平成22年度末)

バクテリア人工染色体(BAC)を用いた非コード領域を含むゲノム全領域を検出できる高精度ゲノムアレイを開発し、臨床サンプルを用いて、その有用性を実証する。さらに、臨床現場において、微量サンプル(数ナノグラム)から、12時間以内に染色体異常(増幅、欠失、コピー数多型等)を、低コストかつ定量性・再現性を確保して検出ができる全自動染色体異常解析システムのプロトタイプを開発し、その有効性について臨床サンプルを活用して実証する。[定量的解析精度の目標:1コピーの増減を98%以上の感度と特異性(偽陽性率、偽陰性率がともに2%以下)で検出、再現性の目標:CVが5%以下]

②中間目標(平成20年度末)

DNA標識技術の開発やハイブリダイゼーションの効率化、スキャニング技術の臨床応用に向けた要素技術を開発するとともに、BACを用いた非コード領域を含むゲノム全領域を検出できる高精度ゲノムアレイの開発に目途をつける。さらに、個別化医療診断に活用できる全自動染色体異常解析システムのプロトタイプを開発し、その有用性を確認する。[ハイブリダイゼーション技術の目標:ハイブリ時間が5時間以内、スキャニング技術の目標:3ミクロン以下の解像度、高輝度DNA標識技術の目標:現行の10倍以上の輝度(標識、洗浄及びスキャニングを経て得られる数値ベース)]

II. 研究開発マネジメント: 研究開発目標の妥当性

目標達成に向けた具体的研究開発項目

研究開発項目	詳細記述	技術開発
1) BACを用いた高精度全ゲノムアレイの開発	BACを用い、十万塩基対以下の領域での非コード領域を含む全ゲノムの染色体異常(増幅、欠失等)を解析可能な高精度全ゲノムアレイ技術を開発する。(日本人BACライブラリ、3万アレイ)	基礎・基盤技術開発 <i>研究リソースの整備、革新的要素技術開発</i>
2) 染色体異常を解析する革新的要素技術の開発	染色体異常解析の診断利用に向け、染色体異常(増幅、欠失等)を微量サンプルで高感度、高精度かつ迅速、安価に定量性・再現性を確保した染色体異常解析を行うためのDNA標識物質の高輝度・低コスト化、DNA標識技術、ハイブリダイゼーションの効率化、スキャニング技術についての要素技術を開発する。(アレイ基盤、蛍光標識化技術、ハイブリシステム、計測技術)	
3) 臨床診断用全自動染色体異常解析システムの開発	サンプル前処理の効率化・迅速化、検出感度の向上、測定時間の短縮、再現性の向上、低コスト化を図るため、診断用アレイモジュールを開発するとともに、機器性能を飛躍的に向上させ、個別化医療を行う臨床現場で活用できる全自動染色体異常解析システムのプロトタイプを作成し、臨床サンプルを活用して、その有用性を検証する。(ゲノムアレイ、全自動染色体異常解析装置、診断のコンテンツ)	実用化研究開発 <i>診断技術の実用化、臨床診断コンテンツ開発と有効性判定</i>

●事業目標を達成するため3つの研究開発項目を設定。「**基礎・基盤技術開発**」と「**実用化研究開発**」の2つの軸に対する考え方を体制に反映させ、本事業の開発マネジメントを実施。

II. 研究開発マネジメント: 研究開発目標の妥当性

研究開発項目の定量的設定目標と根拠

研究開発項目	中間目標 (H20年度末)	最終目標 (H22年度末)
1) BACを用いた高精度全ゲノムアレイの開発	<ul style="list-style-type: none"> ・DNA標識技術の開発 ・ハイブリダイゼーションの効率化 ・スキャンニングの要素技術開発 	<ul style="list-style-type: none"> ・バクテリア人工染色体(BAC)を用いた非コード領域を含むゲノム全領域を検出できる高精度ゲノムアレイを開発し、臨床サンプルを用いて、その有用性を実証する。
2) 染色体異常を解析する革新的要素技術の開発	<ul style="list-style-type: none"> ・BACを用いた非コード領域を含むゲノム全領域検出可能な高精度ゲノムアレイの開発 	
3) 臨床診断用全自動染色体異常解析システムの開発	<ul style="list-style-type: none"> ・ハイブリダイゼーション要素技術開発 ハイブリ時間:5時間以内 スキャンニング技術:3ミクロン以下の解像度 ・高輝度DNA標識技術:現行の10倍以上の輝度 ・全自動染色体異常解析システムプロトタイプの開発 ・有用性の検証 	<ul style="list-style-type: none"> ・[定量的解析精度の目標:1コピーの増減を98%以上の感度と特異性(偽陽性率、偽陰性率がとも2%以下)で検出、再現性の目標:CVが5%以下] ・臨床現場において、微量サンプル(数ナノグラム)から、12時間以内に染色体異常(増幅、欠失、コピー数多型等)を、低コストかつ定量性・再現性を確保して検出ができる全自動染色体異常解析システムのプロトタイプを開発し、その有効性について臨床サンプルを活用して実証する。

●3つの研究開発項目それぞれについて、実施者による技術開発の強みを生かした役割分担のもと、具体的かつ明確な開発の数値目標を設定。可能な限り定量的指標を目標に本プロジェクトを推進。

2. 事業の計画内容

2.1 研究開発の内容

<研究開発の必要性>

近年ゲノム解析技術の進展により、非コード領域も含め、数十万から数百万塩基対に及ぶ染色体・ゲノムの微細構造異常(増幅、欠失等)が存在し、癌や遺伝疾患などの疾患と密接に関係していることが示

研究開発概要

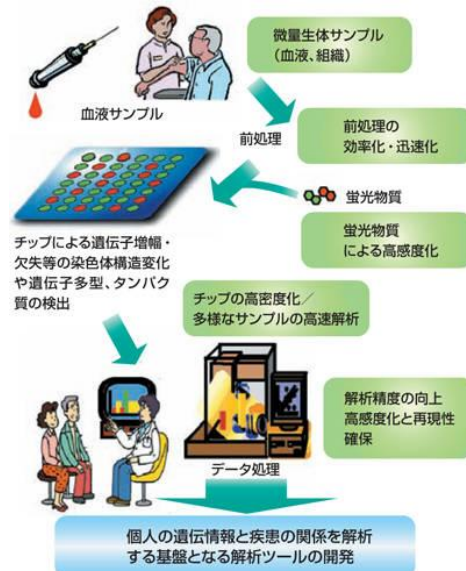
事業・プロジェクト概要

事業期間:平成18年度～平成22年度、平成22年度
 予算:2.25億円

PL:平野 隆(独立行政法人 産業技術総合研究所 産学官連携業務推進部門 産学官連携コーディネーター) : 稲澤 譲治(東京医科歯科大学 難治疾患研究所 教授)

近年のゲノム解析技術の進展により、数十万から数百万塩基対に及ぶゲノム染色体上の大規模な異常(増幅、欠失等)が存在し、がんや遺伝性疾患と密接に関係していることが解明され始め、診断分野のみならず治療への応用に対する期待が高まっています。

本プロジェクトでは、こうした染色体異常を高感度、高精度かつ迅速、安価でゲノム全領域にわたり検出するゲノムアレイや解析基盤技術および全自動解析システムの開発を行います。さらに、臨床情報を有する臨床サンプルを解析することにより、ゲノムアレイを用いた染色体異常解析技術の有用性の検証を行い、臨床現場で活用できるバイオ診断機器およびその基盤を開発することを目的としています。



唆されており、これらの異常を高精度に検出する技術の確立と診断分野への応用に対する期待が高まっている。個別化医療の実現に供するためには、こうした染色体異常を高感度、高精度かつ高効率に解析するバイオ診断機器の開発と実用化が急務の課題となっている。そのためには、十万塩基対以下の精度で全ゲノム領域をカバーする高精度ゲノムアレイの開発や、高輝度DNA標識技術の開発等による高感度化といった基盤技術課題の克服が必要である。また、研究用途のみならず臨床応用へと展開するためには、再現性の確保や解析システムの簡便化、時間短縮や低コスト化の実現のための技術開発が必要である。

<研究開発の具体的内容>

個別化医療に供する、疾患と染色体異常の検証、診断機器開発を行うため、現状の染色体検査との整合性が高く、また、高感度化や低コスト化への期待が高いバクテリア人工染色体(BAC)を用いたゲノムアレイに着目し、診断応用に必要とされる高感度、高精度かつ迅速、安価といった要求を満たす革新的要素技術の開発を行い、臨床診断用全自動染色体異常解析システムを開発することを目標とする。なお、これらの技術開発を行うにあたり、診断利用の有効性を検証するため、疾患と染色体異常の関係について臨床サンプルを用いた検証を行いながら、研究開発を推進する。この目標を達成するための研究開発項目は次の通りとする。

研究開発項目 1): BACを用いた高精度全ゲノムアレイの開発

BACを用い、十万塩基対以下の領域での非コード領域を含む全ゲノムの染色体異常(増幅、欠失等)を解析可能な高精度全ゲノムアレイ技術を開発する。

研究開発概要:

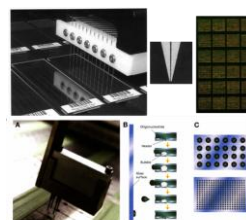
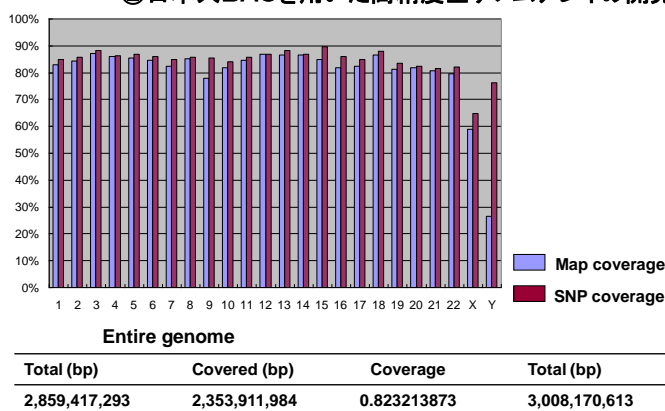
- 1) BACを用いた高精度全ゲノムアレイの開発
- 2) 染色体異常を解析する革新的要素技術の開発



研究開発概要:

1) BACを用いた高精度全ゲノムアレイの開発

- ①日本人BACライブラリー構築の研究開発
- ②日本人BACを用いた高精度全ゲノムアレイの開発



3万タイリングアレイ開発



日本人BACライブラリー (Yamato2) のゲノムカバー率

研究開発項目 2): 染色体異常を解析する革新的要素技術の開発

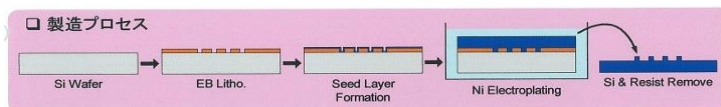
染色体異常解析の診断利用に向け、染色体異常(増幅、欠失等)を微量サンプルで高感度、高精度かつ迅速、安価に定量性・再現性を確保した染色体異常解析を行うためのDNA標識物質の高輝度・低コスト化、DNA標識技術、ハイブリゼーションの効率化、スキャニング技術についての要素技術を開発する。

研究開発概要:

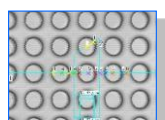
2) 染色体異常を解析する革新的要素技術の開発

①高精度表面加工修飾技術の研究開発

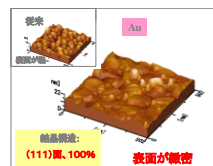
・Ni電鍍モールドの作製方法



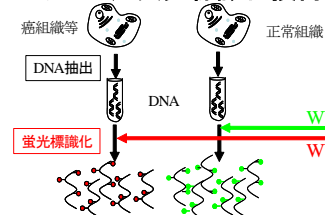
・転写成型結果 (PMMA基板)



PMMA基板の加工精度
 スポット径: $\Phi 30 \pm 1 \mu\text{m}$
 高さ: $10 \pm 1 \mu\text{m}$ **高精度**
 $\sigma: 0.38 \mu\text{m}$



②新規ゲノムアレイ用蛍光標識化技術の研究開発

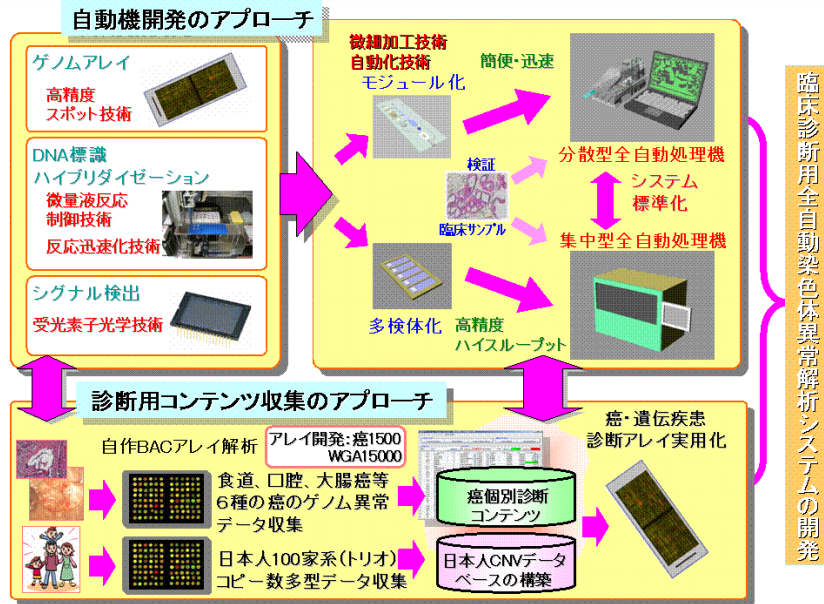


Genomic DNA Labeling Kit 2007年2月発売

研究開発項目 3): 臨床診断用全自動染色体異常解析システムの開発
 サンプル前処理の効率化・迅速化、検出感度の向上、測定時間の短縮、再現性の向上、低コスト化を
 図るため、診断用アレイモジュールを開発するとともに、機器性能を飛躍的に向上させ、個別化医療を
 行う臨床現場で活用できる全自動染色体異常解析システムのプロトタイプを作成し、臨床サンプルを
 活用して、その有用性を検証する。

研究開発概要:

3) 臨床診断用全自動染色体異常解析システムの開発

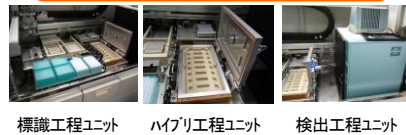


研究開発概要:

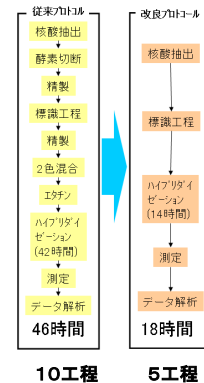
3) 臨床診断用全自動染色体異常解析システムの開発

② 臨床診断用全自動染色体異常解析システムの開発

分散型全自動染色体異常解析装置(病院の検査室に適した装置)の開発



集中型全自動染色体異常解析装置(多検体型で検査センターに適した装置)の開発



<研究開発項目毎の研究内容詳細>

○ 以下、各開発内容について詳述する。

研究開発項目 1): BACを用いた高精度全ゲノムアレイの開発

個別化医療を実現するため我が国が世界をリードするナノテク製造技術と先端バイオ・ゲノム研究および医療研究を統合し、がん等の疾患を対象とした臨床診断技術および装置システムの開発を行う。研究開発の根拠となるリソースとして公的日本人ゲノムライブラリーを構築し、公開する。このライブラリーを用い全ゲノム領域をカバーするタイリングアレイを作製するとともに臨床検体解析を可能とする革新的アレイ要素技術を開発する。

本事業ではまずリソースとして産総研が主体となって日本人BACライブラリーを構築する。このライブラリーのDNAとして最も損傷の少ない臍帯血由来のDNAを用いる。産総研が2005年から2006年に確立した日本男児由来BACライブラリー約40万クローンから、全ゲノム30億塩基対を理論的に少なくとも90%以上カバーする10万クロンの両末端の塩基配列の解析を行う。引き続きこの日本人BACライブラリーに基づいて全ゲノム領域をカバーする高精度タイリングアレイを作製する。該当するBACライブラリーのBACクロンの平均鎖長が140Kbであることから、約3万クローンを一枚のガラススライド上にスポットしたアレイを作製する。大学医学部と連携の下に、胃癌・肝癌・肺癌・乳癌等の我が国に多発する臨床癌検体の解析を行う。この研究開発は産業技術総合研究所/研筑波センターで実施する。

研究開発項目 2): 染色体異常を解析する革新的要素技術の開発

参画企業ではこのリソースを用いた診断技術をツールとして実用化するに当り解決すべき課題について革新的技術開発を行う。すなわち研究室レベルでの解析から検査室レベルでの解析を可能とするためボトルネックとなっている、(1)ガラス基板表面修飾の高度化(トーヨーエイテック株式会社, 広島市)について研究開発を行う。(2)蛍光標識プロセスの最適化、(和光純薬工業株式会社, 尼崎市)(3)DNAハイブリダイゼーションの高効率化・高速化、および読取装置の高度化(横河電機株式会社, 武蔵野市)、九州大学医学部(九州大学生体防御医学研究所、別府市)(北海道大学医学部第一外科, 札幌市)(山口大学大学院分子病理学, 宇部市)では産総研と連解してアレイCGHによる臨床癌検体解析を行う。我々はこれまでの染色体CGHおよびアレイCGHの解析で正確な解析のためにはマイクロダイセクションが不可欠であることを示してきた。

特に固形癌検体では癌組織と正常組織が混在していることから、病理医による癌の診断を経て、マイクロダイセクションによる癌組織部分の切除およびDNA抽出手法を確立する。また本事業で目標とする癌診断システムでは、アレイCGHによる染色体異常部位の解析情報と、予後・癌ステージ・薬剤治療効果・再発・転位・浸潤等の医療情報のリンクが必須であることから、これらの情報統合手法についての研究開発を行う。

研究開発項目 3): 臨床診断用全自動染色体異常解析システムの開発

癌及び遺伝性疾患の個別化医療を実現するために、診断用ゲノムアレイの開発とそれを解析する臨床診断用全自動染色体異常解析システムを開発する。まず、Genome Disorder Arrayに関して、日本人ゲノム多型を考慮し且つ日本人のニーズに適合した先天性異常症候群の診断を実現させ、PerkinElmer社、Signature Genomics Laboratories社、ペイラー医科大学が作製した米国製アレイを凌駕する最適な診断法を確立する。

さらに、Cancer Array-800を用いてこれまで東京医科歯科大学で得られた成果に加えて、口腔癌での臨床評価を行い研究検査としての実用化を実現させる。一方では、ヒト全ゲノムに起きた数万~数百万塩基対レベルの染色体コピー数異常の高精度定量的解析を可能とするヒト染色体タイリングアレイを開発する。Whole Genome Array-4500及び新たに本事業で開発する15,000種のBACクローンを搭載し

ヒト染色体タイリングアレイのWhole Genome Array-15000 を用いて日本人100 家系(両親と子の3人)の染色体コピー数多型のデータを収集して、「日本人染色体コピー数多型情報データベース」を構築する。本データベースは染色体構造異常を解析する診断に必須である。

癌の分野ではCancer Array-1500 を作製し、腎癌、大腸癌、食道扁平上皮癌、口腔癌、骨軟部腫瘍、肝胆膵癌において各50 症例の臨床検体を解析し、臨床病理学的情報との関連解析を行う。その結果、特定の抗癌剤や放射線治療に対する反応性や転移・浸潤性の予測、予後推定など、癌の個性診断に有用な染色体領域・遺伝子(群)をコンテンツとして選択し、これに相当するBAC クローンを搭載したアレイを作製することにより癌の個別化診断の実用化を行う。

遺伝性疾患の分野ではWhole Genome Array-4500 及びヒト染色体タイリングアレイのWhole Genome Array-15000 を用いて原因不明の遺伝性疾患を解析し、その原因と考えられる染色体の重複/欠失を同定する。これにより、既知疾患の原因となる染色体異常を診断するBAC クローンに加えて新規の診断用BAC クローンの追加により、従来法では不可能であった微細染色体コピー数異常の検出を可能とする高精度の遺伝性疾患診断用アレイを作製し、本疾患領域における個別化医療に資するものとする。この結果、Genome Disorder Array の診断コンテンツを増やし、本Array の有用性を高める。癌及び遺伝性疾患の正診率を向上させるために、本事業で明らかになる日本人染色体コピー数多型のデータを取り入れ、搭載するBAC クローンのコンテンツを選別する。一方、ゲノムアレイを用いた癌並びに遺伝性疾患のゲノムコピー数異常の検出と診断法の実用化において、病院等の検体数が限られた測定ニーズ環境に対応する分散型全自動染色体異常解析装置を開発するとともに、さらに、多検体の同時測定を可能にする集中型全自動染色体異常解析装置の開発を行う。前者では検体DNA の精製、標識、短時間でのハイブリダイゼーション、及びシグナルの検出について自動化を検討する。その第一段階として、個別機による要素技術の開発、その結果を踏まえた前記4工程に分割した半自動機の開発を行う。後者では、要素技術開発の一環として、反応の迅速化/微量化の為にサンプルの増幅/標識技術及びDNA精製/濃縮技術、コストダウン技術、形状精度の向上を実現する為の微小流体送液技術について検討する。5年目には集中型及び分散型染色体異常解析装置を作製し、癌及び遺伝性疾患のゲノムアレイを用いて解析するシステムを確立する。

東京医科歯科大学では、Whole Genome Array-4500、新規に開発するCancer Array-1500 など各種高精度BAC アレイを作製し、癌や先天性異常疾患のゲノムコピー数異常を解析して個別化診断を実現するゲノムアレイコンテンツを抽出する。さらに、より詳細な解析用にWhole Genome Array-15000 を作製するために、BAC DNA の調製とPCR を用いた増幅をセミオートメーションで行い、トレーサビリティを担保したシステムを確立し、BAC DNA 断片の調製を進める。また大きなサイズの日本人ゲノム多型のデータ収集とその情報データベースを構築のために、Whole Genome Array-4500 による親子解析を行い、アレイ染色体異常診断法実用化の基盤情報を整備する。さらに、収集したデータに関しオンラインで公開するシステムの構築を行う。

株式会社ビー・エム・エルでは、ヒト染色体タイリングアレイに搭載するためのBAC プローブの調製をセミオートメーションのシステムで行うために、その前半部分ではBAC クローンからBAC DNA の調製を半自動で行うためのロボットシステムを構築する。後半部分では、BAC DNA を制限酵素消化、アダプターライゲーション、DNA 精製、PCR による増幅、増幅産物の精製、濃度調整の一連の操作を行うロボットシステムを確立する。これらのシステムにはバーコードに基づくトレーサビリティを担保する仕組みを導入する。さらに、ヒトゲノムの全染色体を網羅的にカバーする15,000 個のBAC クローンを搭載したWhole Genome Array-15000 を作製するために、本セミオートメーションシステムを用いて、BAC プローブの調製を進める。一方、Cancer Array-1500 の作製を同時に進める。これらの研究課題を東京医科歯科大学と共同で行う。さらに、加速予算を用いてGenome Disorder Array を改良し、広範囲の先天性異常症候群の診断に関する臨床評価を行い、診断の実用化を進める。

日本ガイシ株式会社では、反応の迅速化を実現する為に、効率的な前処理プロトコールの設計・開発を

行う。DNAの酵素増幅及び精製/濃縮技術を組み合わせて、微量サンプルからでも高濃度な標識液を調製可能な技術を開発する。さらに、微小流体送液技術を駆使した、インライン前処理モジュールを開発する。

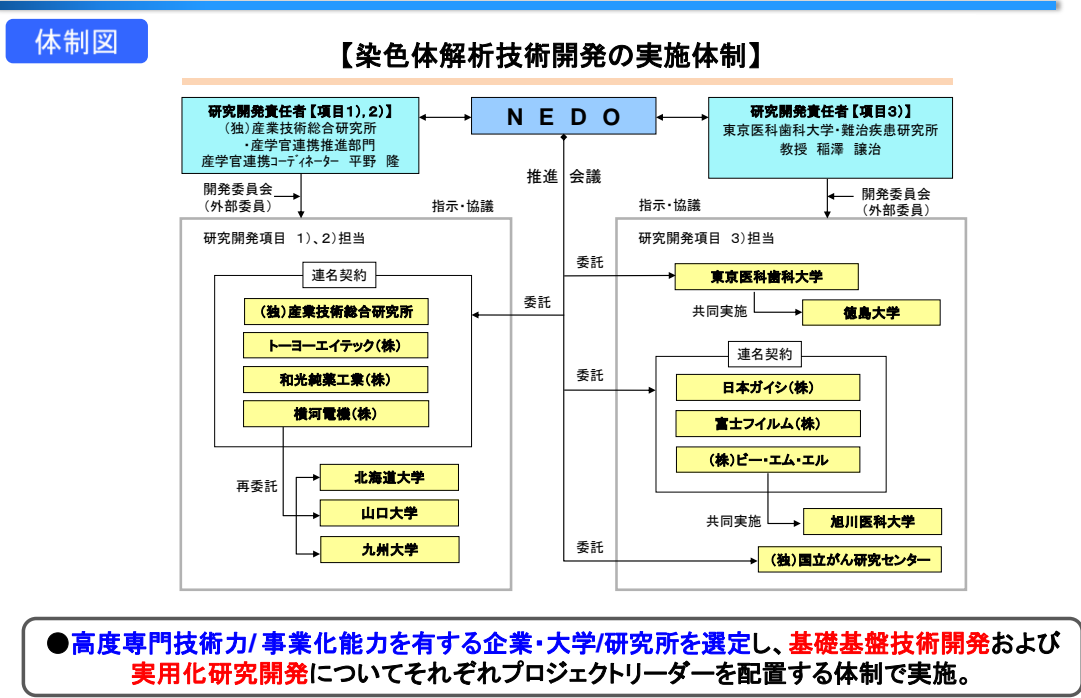
富士フィルム株式会社では、基幹要素技術としての、DNA抽出の簡便化・迅速化・微小化、蛍光標識ならびに標識体の精製の簡便化、ハイブリダイゼーション時間の短縮、ゲノムアレイ法により至適化された蛍光検出法およびデータ解析法の確立に向け、個別機による要素技術の開発、その結果を踏まえた全自動機の開発を行う。さらに、加速予算を用いてCancer Array-800 を用いた口腔癌の染色体異常の解析データを集積し、その結果、口腔癌の診断について実用化を目指す。

2. 2 研究開発の実施体制

<事業体制について>

本研究開発は、単独ないし複数の企業、研究組合、公益法人、独立行政法人、大学等の研究機関の中から、研究開発実施者を選定の上、委託により実施した。委託先は、独立行政法人産業技術総合研究所、トーヨーエテック株式会社、横河電機株式会社、国立大学法人東京医科歯科大学、国立がん研究センター、日本ガイシ株式会社、株式会社ビー・エム・エル、富士フィルム株式会社からなる。

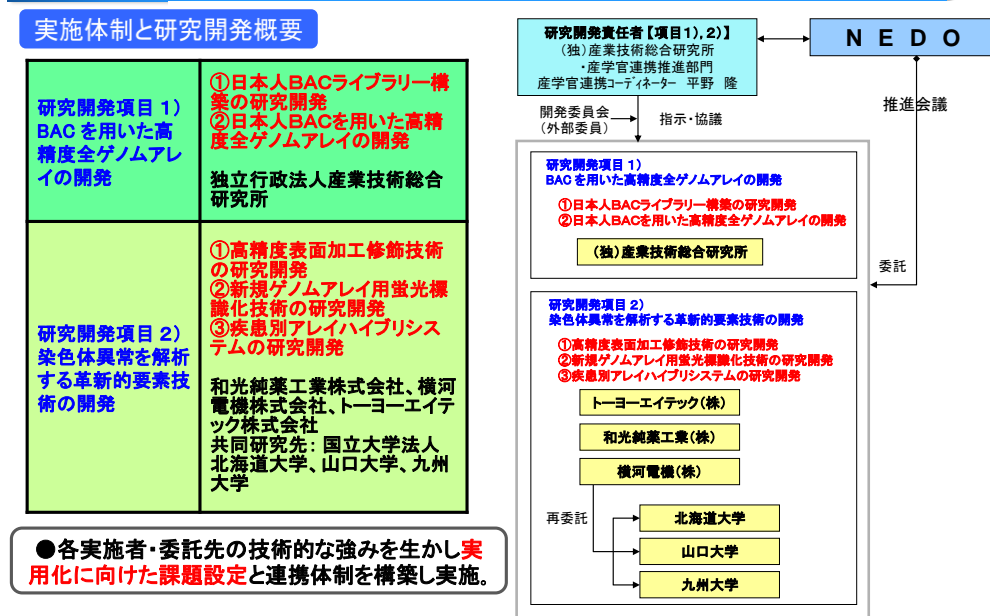
II. 研究開発マネジメント: 研究開発実施の事業体制の妥当性



< 「染色体解析技術開発」 実施体制 >

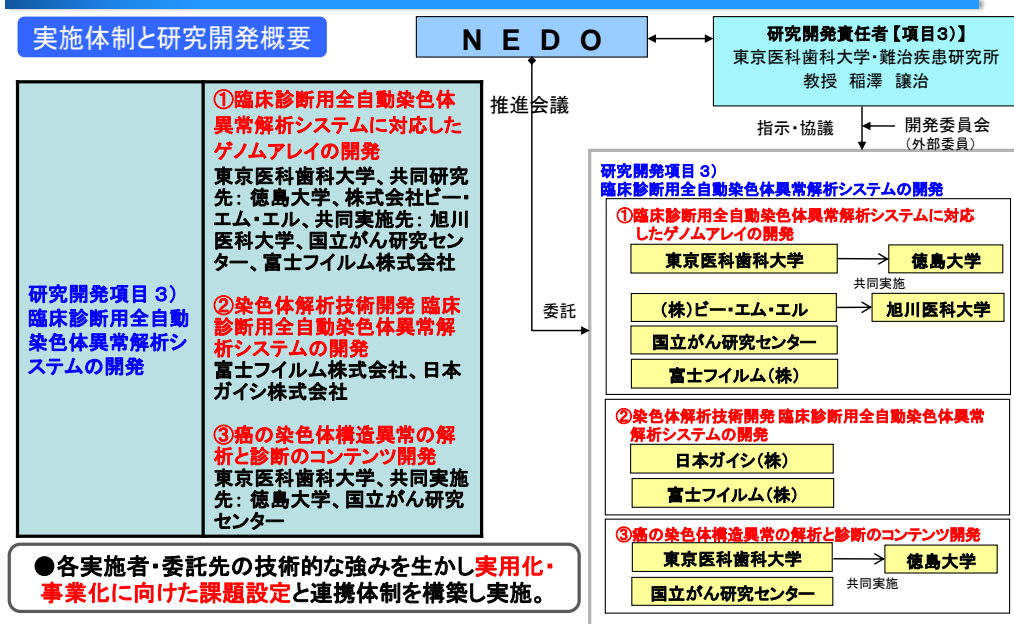
【研究開発項目 1)、2)の実施体制（平野PLグループ）】

II. 研究開発マネジメント:
研究開発成果の実用化に向けたマネジメントの妥当性



【研究開発項目 3)の実施体制（稲澤PLグループ）】

II. 研究開発マネジメント:
研究開発成果の実用化・事業化に向けたマネジメントの妥当性



平成18年3月24日から平成18年度4月24日の間、標記事業への参加を希望する研究機関等を公募した結果、3件の応募があり、外部有識者からなる採択審査委員会(委員名簿 参照)及びNEDO 技術開発機構の厳正な審査を経て、委託先を独立行政法人産業技術総合研究所、トーヨーエイトック株式会社、横河電機株式会社、国立大学法人東京医科歯科大学、国立がんセンター(現、国立がん研究センター)、日本ガイシ株式会社、株式会社ビー・エム・エル、富士フイルム株式会社と決定した。委託を受けたものは必要に応じて、独立行政法人又は大学等の研究機関と共同研究契約等を締結し、研究開発を実施している。(上記体制図参照)

実施にあたっては、独立行政法人産業技術総合研究所 産学官連携推進部門 産学官連携コーディネーター 平野 隆氏(兼任、財団法人沖縄科学技術振興センター 理事)、および国立大学法人東京医科歯科大学 難治疾患研究所 教授 稲澤 譲治氏をプロジェクトリーダーとして、平成18年6月より研究開発を開始した。

平成19年度、株式会社ビー・エム・エルの共同実施先として、国立大学法人旭川医科大学を追加。平成22年度、国立大学法人東京医科歯科大学の共同実施先として国立大学法人徳島大学を追加。また、平成23年3月度より、国立大学法人東京医科歯科大学(実施期間:H23. 3~H23.11)、および株式会社ビー・エム・エル(実施期間:H23. 8~H24.3)との委託事業、継続研究を実施。富士フイルム株式会社および日本ガイシ株式会社は協力企業として参画。加速による研究開発項目3)の研究開発を推進した(継続研究実施体制図、下記参照。継続研究期間:平成23年3月1日から平成23年11月30日)。また研究開発項目3)においては、下図に示すとおり、各委託先が有するノウハウや技術的な強みを生かした個別テーマ(個別テーマ名:A~F)を設定し取り組むこととした。

II. 研究開発マネジメント: 研究開発成果の実用化・事業化に向けたマネジメントの妥当性

実施体制と研究開発概要

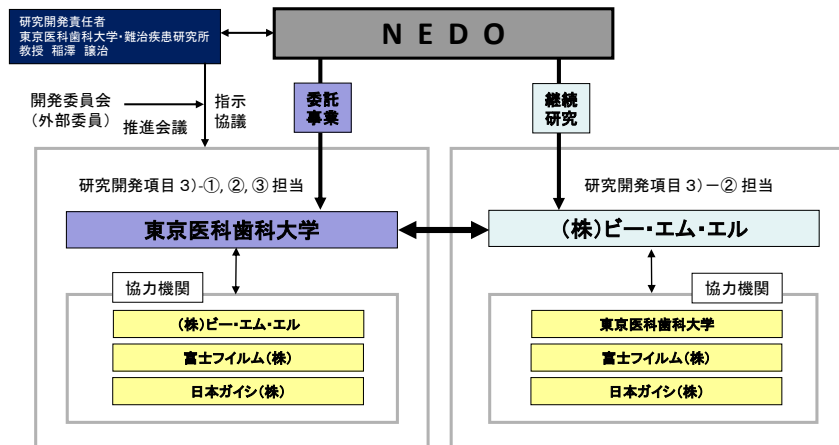
研究開発項目 3)臨床診断用全自動染色体異常解析システムの開発
~ 研究開発実施項目内の個別テーマ名と担当施設について ~

	実施項目	個別テーマ名	委託先(担当施設)	
研究開発項目3)	① 臨床診断用全自動染色体異常解析システムに対応したゲノムアレイの開発	A	BAC DNAの調製と無尽資源化の半自動化	(株)ビー・エム・エル
		B	ヒト染色体タイピングアレイ(WG15000)の作製	(株)ビー・エム・エル, 東京医科歯科大学, 国立がん研究センター
		C	日本人ゲノム多様性データベースの構築	東京医科歯科大学
		D	Genome Disorder ArrayとCancer Array-800の実用化	東京医科歯科大学, (株)ビー・エム・エル, 富士フイルム(株), 旭川医科大学
		E	Cancer Array-1500(CA-1500)の作製と評価	東京医科歯科大学, 国立がん研究センター, (株)ビー・エム・エル
	② 臨床診断用全自動染色体異常解析システムの開発	G	高密度アレイの試作	日本ガイシ(株)
		H	分散型全自動染色体異常解析装置の開発	日本ガイシ(株)
		I	集中型染色体異常解析システムの開発	富士フイルム(株)
	③ 癌の染色体構造異常の解析と診断のコンテンツ開発	F	がんの染色体異常解析とコンテンツ開発	東京医科歯科大学, 国立がん研究センター

●研究開発項目3)の実施項目①②③について、それぞれ「個別テーマ」に分け、委託先のノウハウ・技術的強みを生かした研究体制を構築し、技術開発への取り組みを行った。

II. 研究開発マネジメント: 研究開発実施の事業体制の妥当性

体制図 継続研究実施体制(H23.3.1-H23.11.30)



なお、当初、本事業の立ち上げに向けた公募プロセスについては、下記の表に示す。
平成17年12月度にワークショップを開催し、翌年3月度に公募を開始した。同年5月度に表に示す採択審査委員による採択委員会を開催し、前述の実施体制を構築した。

(公募プロセス)
下記の表に示す。

#	プロセス	内容	実施日・開催日	
①	ワークショップ開催	発明会館ホールにおいて開催	平成17年12月26日	
②	公募開始	NEDO ホームページによる公募	平成18年3月24日	
③	公募説明会	9 企業・団体が参加(14 名)	平成18年4月5日	
④	公募〆切	提案件数:3件	平成18年度4月24日	
⑤	採択審査委員会	書面審査	書面による技術審査の実施	平成18年4月25日～5月10日
		ヒアリング審査	書面審査の結果を踏まえ、3件の提案を対象にヒアリングを行った後審査を行い、委託予定先の選考案を決定。	平成18年5月15日
⑥	契約・助成審査委員会	採択審査委員会の選考結果を踏まえ、採択(1件)・不採択(2件)を決定。	平成18年6月6日	

(採択審査委員)

委員長	猪子 英俊	学校法人東海大学 医学部基礎医学系 医学部長、教授
委員	井上 潔	株式会社トランスサイエンス代表取締役CEO
	古川 洋一	東京大学医科学研究所 ヒトゲノム解析センター 特任教授
	末永 智一	東北大学 大学院環境科学研究科 教授
	松本 直通	横浜市立大学 大学院医学研究科 教授

(平成18年5月現在)

本研究開発の各年度毎における予算推移を下表に示す。情勢変化への対応の項目にて詳述するように、研究開発項目1)の研究の進展により平成18年度に加速予算を配分し加速、また研究開発項目3)の研究の進展により、さらなる加速予算処置を平成19年度および平成22年度に実施した。

II. 研究開発マネジメント: 研究開発計画の妥当性

研究開発予算とその推移

		(百万円)						
研究開発項目	実施項目	H18	H19	H20	H21	H22	H23	合計
1) BACを用いた高精度全ゲノムアレイの開発	①日本人BACライブラリー構築の研究開発 ②日本人BACを用いた高精度全ゲノムアレイの開発	121	108	80	70	33	-	412
2) 染色体異常を解析する革新的要素技術の開発	①高精度表面加工修飾技術の研究開発 ②新規ゲノムアレイ用蛍光標識化技術の研究開発 ③疾患別アレイハイブリッドシステムの研究開発	52	62	62	72	55	-	303
3) 臨床診断用全自動染色体異常解析システムの開発	①臨床診断用全自動染色体異常解析システムに対応したゲノムアレイの開発 ②臨床診断用全自動染色体異常解析システムの開発 ③癌の染色体構造異常の解析と診断のコンテンツ開発	150	246	181	181	208	64	1,030
合計		323	416	323	323	296	64	1,745

●研究開発項目1)、2)、3)に関して、平成18年度から最終年度に亘って順次計画的に開発推進に関わるマネジメントを実施。

2.3 研究の運営管理

<プロジェクトリーダーについて>

本プロジェクトに参加する各研究開発チームの有する研究開発ポテンシャルを最大限に活用することにより、効率的な研究開発の推進を図るとの観点から、研究開発項目に応じて研究開発責任者(プロジェクトリーダー)を設け、産業技術総合研究所 産学官連携推進部門 産学官連携コーディネーター 平野隆氏(研究開発項目 1)、2)、および東京医科歯科大学 難治疾患研究所 教授 稲澤譲治氏(研究開発項目 3))により研究開発を推進する。

<委員会について>

研究開発会議はそれぞれのテーマについて年に2回開催し、委員のほか、チームリーダー、登録研究員の出席の下、研究開発項目毎に研究計画および研究進捗状況の報告を行い、問題点等について討議を行い、効率的な研究開発の推進を図った。研究推進委員会の登録委員を次に示す。また、随時研究進捗報告会などを開催し、詳細な研究内容の検討と課題に対する解決を図り、研究推進を行った。

(研究推進委員会登録委員一覧表)

プロジェクト	登録委員名	所属・役職
研究開発項目 1)、2)	草野 満夫	昭和大学医学部 教授
	三輪 正直	長浜バイオ大学バイオサイエンス学部 教授
	松村 保広	国立がんセンター研究所支所がん治療開発部 部長
	水澤 博	独立行政法人医薬基盤研究所生物資源研究部 部長
	高橋 規郎	財団法人放射能影響研究所遺伝学部 室長
研究開発項目 3)	杉本 芳一	共立薬科大学 化学療法学講座 教授
	大木 操	国立がんセンター客員 研究員
	油谷 浩幸	東京大学先端科学技術研究センター 教授
	馬場 嘉信	名古屋大学大学院 工学研究科 教授

(平成19年4月現在)

II. 研究開発マネジメント: 情勢変化への対応等

研究開発運営管理への反映

	会議等運営管理	開催日
研究開発項目1), 2) <平野PL-グループ>	「キックオフ会議(初年度開催)」	H18年7月
	「開発委員会」	H18年12月, H19年10月, H20年11月, H21年10月
	「進捗報告会」	H20年5月, H21年6月, H22年4月
	「サイトミクス研究会」	H18年11月, H19年11月
	「開発推進会議(全体会議)」	H19年12月, H20年10月, H21年12月, H23年1月
研究開発項目3) <稲澤PL-グループ>	「キックオフ会議(初年度開催)」	H18年10月
	「プロジェクト開発委員会」	H18年10月, H20年2月, H21年2月, H22年5月
	「プロジェクト推進会議」	H20年1月, H21年2月
	「プロジェクト進捗報告会」年1回開催	H19年8月, H20年7月, H21年9月
	「アレイCHG実用化コンソ会議」	H18年7月, H18年10月, H20年1月, H20年9月, H21年1月, H21年3月, H23年1月

- 本研究開発の全体管理と執行に責任を有するNEDO技術開発機構は、経済産業省およびプロジェクトリーダーとの密接な関係を維持しながら本プログラムの開発目的・目標に照らした適切な運営管理を実施した。
- 開発委員会等における外部有識者の意見を運営管理へ反映させた。
- 半期に一度程度プロジェクトリーダー等を通じて研究開発の進捗報告を受けるなど対応した。

3. 情勢変化への対応

3.1 プロジェクトの経緯

本プロジェクトは、平成17年度「健康安心プログラム」、および「ナノテクノロジープログラム」の一環として開始され、19年度のプログラムの改訂、統合を経て、「健康安心イノベーションプログラム」、および「ナノテク・部材イノベーションプログラム」の一環として実施されたものである。健康安心イノベーションプログラムの目標である“国民が健康で安心して暮らせる社会の実現”に向け達成すべき重要な課題の一つとして、個々人の体質に合わせた効果的・効率的な医療の実現が掲げられ、また、「ナノテク・部材イノベーションプログラム」では、“ナノテクノロジーや高機能部材の革新を先導することで、これら部材を活用した情報通信、ライフサイエンス、環境、エネルギーなどの幅広い産業の付加価値の増大を図る”ことが謳われている。

3.2 研究テーマの強化

平成17年度に日本人BACの解析のため、予算の前倒し(2,500万円)を行い、日本人BACリソースの早期整備を行った。また、加速という観点では、19年度に、先天性染色体異常、口腔癌の解析アレイの実用化に向けた開発のため加速予算による追加(5,000万円)を行い、実用化のフィジビリティを開始した。平成22年度には、臨床診断用全自動染色体異常解析システムに対応したゲノムアレイの開発のための加速を実施し(8,000万円)、共同実施先として徳島大学の追加により、研究開発項目3)の体制を整えた。また平成23年度は、先天異常診断用・次世代型高精度アレイの開発に向けた日本人のCNVデータベースの構築とGDアレイ実用化普及促進のために加速を行った(6,400万円)。

II. 研究開発マネジメント: 情勢変化への対応等

加速財源投入による対応と体制整備

研究開発	実施年度	予算対応 (百万円)	実施内容
研究開発項目3) 臨床診断用全自動染色 体異常解析システ ムの開発	平成19年度	50	小児発達障害と先天性染色体異常に関する解析、および口腔癌の解析アレイの実用化に向けたフィジビリティ検証のため、加速財源を投入し実施した。
		-	臨床サンプル解析によるアレイ検証を進めるため、共同研究先として「旭川医科大学」を追加し体制を強化整備した。
	平成22年度	80	臨床診断用全自動染色体異常解析システムに対応したゲノムアレイの開発のため加速財源を投入し実施した。
		-	研究開発体制の維持・開発推進のため、共同実施先として徳島大学を追加した。
		64	先天異常診断用・次世代型高精度アレイの開発に向けた“日本人”CNVデータベースの構築とGDアレイ実用化普及促進を図った ^{補足} 。

補足) “日本人”の先天異常疾患の診断精度をさらに高め、診断法の実用化普及を促進させることを目的として“日本人の良性および病因CNVデータベース”を構築。そして得られる網羅的CNV情報を基に、臨床診断に役立つ“検索ツール(ホームページ)の公開”を施行した(H23.4)。これにより、ゲノム異常による疾患の次世代型高精度診断アレイの開発に繋げるべく、連携企業との一体的な取り組みを開始した。(加速による具体的な研究開発内容：日本人家系の先天異常患者とその健康親子のトリオ300例から調製した末梢血リンパ由来ゲノムDNAのCNVを解析し、①日本人の網羅的CNVデータベースを構築するとともにそのデータベース情報を利用して、国際1000人ゲノムPJ情報との比較による種差特有のCNVを明らかにし、②病気との関連が最も強い病因CNV群を厳選する。また③診断項目数の追加により、GDアレイによる従来よりも高い診断精度の向上を図り、その診断法の普及・実用化を加速させる。(株)ピー・エム・エル、富士フイルム株式会社(アレイCGH診断法実用化コンソーシアム)により“次世代GDアレイの開発”に取り組んでいく。

4. 中間評価結果への対応

中間評価により得られた提言を下記に記述する。総合評価に加えて各論も含め、「問題点・改善すべき指摘点」については、「対処方針」を策定し、平成21年度の実施方針にも反映し推進した。総論と「問題点・改善すべき指摘点」に対する「対処方針」、並びにその実行状況について整理した。

<1. 総論>

1-1) 総合評価

本プロジェクトは、BAC(バクテリア人工染色体)アレイを用いて染色体異常を解析する技術を開発することにより、個別化医療の実現に寄与することを目的としており、公共性が高く、民間のみでの実施が困難な内容であることから、NEDOによる実施の意義は大きく評価できる。妥当な計画、体制が組織されており、情勢の変化へも機敏な対応が行われている。中間目標は達成され、着実に成果が上がりつつあり、高く評価できる。実用化の見通しも十分にある。一方で、個別化医療の実現を目指し、二つの独立した特徴あるアプローチによって、着実に研究開発が進められているが、出口の見えた所で、相互の成果を活用することにより、予算、資源等をより効率的に活用できる。両者の間の情報交換などの対策が必要と思われる【a】。

<対処方針> 下記【1】【2】に記述。

1-2) 今後に対する提言

BAC アレイだけでは診断できない疾患、病態が存在するので、BAC アレイ技術と他のゲノム解析技術を組み合わせることにより、さらに詳細な遺伝子解析システムを開発することの検討が必要となるであろう。また、二つの研究グループ間の連携については、ある程度研究開発のめど及び知財の整理がついた時点で相互交流を図り、更に優れたシステム開発を検討すべきである【1】。そして、がんにおける予後予測のデータの信頼性を高めるため症例を増やすことが重要であり、がんの診断のための臨床データ検討などにおいても、両グループの協力体制の構築が望まれる【2】。

<対処方針> 【1】両チームの研究開発も一応の目途がついてきたため、秘密保持下で、両チームのシナジー効果を発揮するため進捗等情報交換を実施する。【2】随時両チームのがん臨床研究に関する情報交換を行う。

<2. 各論>

2-1) 事業の位置付け、必要性について

個別化医療を念頭に置いた本プロジェクトは、健康安心イノベーションプログラムの一つとして妥当であり、また、微細加工等の技術力が活用され、ナノテク・部材イノベーションプログラムとしてふさわしい。本プロジェクト遂行には、民間のみでは達成できない複数の技術的な融合が必要であり、NEDO の関与が必要とされる事業である。本分野における内外での動向から考えて、事業目的は妥当であり、本プロジェクトで得られた成果、例えば日本人BAC ライブラリーや、日本人CNVデータベースは公共性も高く、広く医学研究にも利用されることが望まれ、NEDOが本プロジェクトを推進する意義は高いと考えられる。一方で、日本人の特徴に合った診断技術【3】を開発し、成果を国際貢献に生かす方向性を検討することが望ましい【4】。

<対処方針>【3】最終目標の全ゲノム領域をカバーするタイリングアレイを作成し、臨床サンプルのゲノム解析を行い、日本人のゲノムアレイとしての有用性を実証する計画である(研究開発項目1))。日本人ゲノム多型データベースを基に、先天性疾患、癌の診断の正診率を高める計画である(研究開発項目3))。【4】日本人BACライブラリは整備し公的ライブラリとして公開、配布する計画である。特許出願により知財権を確保しつつ、データベースの国際公開を継続する(研究開発項目3))。

2-2) 研究開発マネジメントについて

研究開発に関する目標設定、計画は、妥当であり、SNP に依る疾病診断からコピー数変動に依る疾病診断に目を向けているのは時宜を得ている。開発体制はよく練られており、それぞれのプロジェクトリーダーのもと、実施企業、臨床関係者が一丸となって、目標達成に向けて努力している。日本人BAC の解析の加速のためや、先天性染色体異常、口腔がんアレイの実用化のための予算前倒しなど状況に応じた機敏な対応をおこなっている。一方で、コピー数変動と疾病の関係研究は急進展しており、国際競争力を保つ上で、例えばがんの臨床データの解析にあたり、両方のグループで試料やデータを提供しあうなど、両グループの有機的な連携によるスピードアップ望まれる【5】。

<対処方針>【5】【1】の再掲。両チームの研究開発も一応の目途がついてきたため、秘密保持下で、両チームのシナジー効果を発揮するため進捗等情報交換を実施する。また随時両チームのがん臨床研究に関する情報交換を行う。

2-3) 研究開発成果について

3つの研究開発項目のそれぞれについて目標は達成されつつあり、一部に目標を超える成果もみられる。日本人の特徴をとらえた診断技術に結実する可能性が高い。新規の先天性染色体異常や、がんの予後予測に関する世界初の発見も次々とおこなわれており、診断用CGH アレイのコンテンツの充実をはかり、市場の創造につながることを期待できる。特許申請数、ならびに発表された論文の質と数から考慮しても、十分に成果を挙げつつある。一方で、当該プロジェクトで知財の実践的利用のためには、他の国内知財や開発技術との連携を可能とする方針作りも必要【6】と考える。また、がんにおける解析は全体的に症例数が少なく、症例数の充実が望まれる【7】。

<対処方針>【6】他の癌の診断技術が BAC アレイを用いた診断技術を補完する場合もあり、実用化段階で検討する計画である。【7】臨床データが不足する場合は、実用化研究で症例数の追加を行い、指摘の検証を行う計画である。

2-4) 実用化等の見通しについて

全般的に、実用化への見通しは十分にあると判断できる。研究開発項目3)については、先天性染色体異常のスクリーニングという明確な用途があり、低コスト化も考慮されており、分散型と集中型の2種類の用途に合わせた装置開発の進展により、すぐにも実用化・事業化に進むと期待できる。研究開発項目1)、2)については、日本人BAC をアレイ化し、要素技術と組み合わせでシステム化するという実用化イメージができています。これらの開発の成果は、がんに対する創薬や予防、染色体の微細な変化をもつ先天異常症の診断、他の検査機器開発などにも応用できる可能性がある。一方で、今後、がんにおける予後予測のデータの信頼性を高めるため症例を増やし、精度、再現性に対する、さらなる検証が必要であ

る【8】。また、最終的な診断法に関しては、さらなるコストダウンをはかるとともに、承認申請や普及という段階を考えると、用いるBAC の選択や他の手法との得失を十分に検討することが望まれる【9】。

＜対処方針＞【8】【7】の再掲。臨床データが不足する場合は、実用化研究で症例数の追加を行い、指摘の検証を行う計画である。【9】【6】の再掲。コストダウンは BAC 数をミニマムにすることで対応する。今後オリゴアレイの進歩が確認された時には知財を確認し、置き換えを行う計画である。

＜3. 個別テーマに関する評価＞

研究開発項目1) BAC を用いた高精度全ゲノムアレイの開発

3-1) 研究開発成果について

日本人BAC ライブラリーの構築という国としても重要な課題に取り組み、クオリティーも高く、全ゲノムのうちかなりの部分をカバーしたことは評価できる。スピードをあげて進めるべきである。成果物を公開するという姿勢も評価できる。日本人のゲノム構造を解析し利用していく上で、貴重な研究資源となる。一方で、日本人BAC のリソースとしての価値を高めるには、遺伝子や塩基配列の情報も必要であり、一グループによる取り組みを超えた研究体制も必要である【10】。

＜対処方針＞【10】日本人BACライブラリーの公開・配布については【4】の再掲。別途METIプロジェクトにて実施予定の日本人ゲノム解析プロジェクトとも情報交換を行う計画である。

3-2) 実用化の見通しについて

実用化のモデルとして、がんにおけるゲノム構造異常の解析と、BAC を用いたがんの治療方針決定や予後診断というイメージははっきりしており、実用化の見通しを認める。診断のみならず、がんに対する創薬や予防に役立つ可能性があり、また、染色体の微細な変化をもつ先天異常症の診断にも応用可能である。一方で、がんの診断に適用するBAC 選定の妥当性を保証するには、今後さらなる臨床例の蓄積が必要であり、より妥当性と精度の高い臨床検体解析を行う必要性がある。また、新規なアレイの実用化推進には、同一検体による既存アレイとの比較評価が必要である。この日本人BAC ライブラリーを使った個別化医療に対応する実用化には障害が多く、もう少し実用化可能な精度のデータを集めるための技術開発戦略の練り直しも含む検討が必要である【11】。

＜対処方針＞【11】【3】の再掲。日本人BACを用いたアレイを作製し、臨床上的有用性、優位性を確認する。

3-3) 今後に対する提言

コーカシアン系BAC ライブラリーが席卷している状況の中、日本人BAC ライブラリーを確立する意義は大きく、本研究開発で得られたBAC クローンを研究資源として、日本人標準ゲノムデータベースの作成のためのプロジェクトを、NEDO 支援とは限らず、新たに立ち上げることを期待する【12】。

＜対処方針＞【12】日本人BACライブラリについて各方面から日本人標準ゲノムとして遺伝子情報の解析を求める要請があるが、日本人BACライブラリの標準ゲノムについては本プロジェクトの範囲外であり、別途METIプロジェクトにて対応する。

研究開発項目2) 染色体異常を解析する革新的要素技術の開発

3-1) 研究開発成果について

3社は各々固有の経験と技術に基づいて研究開発を進めており、着実に成果を上げており、十分な進展がみられる。クオリティーの高いアレイ作製と感度・精度の高い発色検出システムの開発など、地味ではあるが重要な要素技術の開発が行われている。色素開発では、すでに蛍光試薬は市販されるなど、十分な成果を上げている。乱流発生や特殊な検出法なども評価できるものであり、感度・精度の高い発色検出システムを実現している。一方で、短期間のうちに日本人BAC ライブラリーを実装した診断チップに近づくには課題もある。同一検体による従来法との比較データが必要である【13】。

＜対処方針＞【13】【6】の一部再掲。日本人BACライブラリのDNAをスポットした高品質のアレイ、高感

度・高精度の発色検出システム、および「物理ハイブリユニット」、「深い焦点深度の読み取り装置」、「高精度チップ」等、一連の革新的装置により、数々の疾患の診断に応用し、優位性を検証する計画を進める。

3-2) 実用化の見通しについて

開発された蛍光色素は、既に商品化されている他、各要素技術を組み合わせた装置の開発めどは立っているとのことであり、十分に実用化が見込める。CGH以外のマイクロアレイにも応用できる技術であり波及効果も期待される。一方で、各要素の仕様のマッチングが必要であり、全体を一体化させる方向性が必要である。新開発のアレイ、本装置を早期に完成させ、データを蓄積する必要があり、疾病コンテンツのさらなる充実が期待される。また、ハイブリ技術の開発では、試作機を作成しその性能テストを行うことが必要であり、二色蛍光法など既存技術の採用にあたっては、特許面の留意も必要【14】である。

<対処方針>【14】現在も二色蛍光法の採用に向けて、特許面について知的財産権専門部門による精査を実施中であり、今後も問題無いように対応する。

3-3) 今後に対する提言

全体のシステムコーディネートが必要であり、ユニークな技術を、小型化、スピード、価格、正確さ等で国際的競争に耐える形で市場投入する【15】ことを、常に意識していくことが重要である。その際に、疾病コンテンツの充実が臨床用診断ビジネスへの参入の糸口であり、臨床研究者とのいっそうの連携【16】が望まれる。また、コストダウンへの努力【17】も引き続き必要である。

<対処方針>【15】診断で実用的なサイズを考慮し、かつ、高精度なデスクトップ PC サイズを想定して試作する計画で進めている。【16】実用化段階で、北海道大学、山口大学、および九州大学との連携をさらに強めることで、疾患診断コンテンツ開発の充実を図る計画である。【17】【9】【15】の再掲。

研究開発項目3) 臨床診断用全自動染色体異常解析システムの開発

3-1) 研究開発成果について

大学の基礎技術に加えて、メーカー各社の技術が集結され、無尽化装置によるBAC アレイの安定供給、臨床診断のスクリーニングに利用可能なアレイの開発、既存の特許をクリアできるDual ハイブリ法の開発、国際競争力を有する数多くのコンテンツなど、順調に基盤的な成果を上げている。CGH データベースは公開され、成果の普及もなされている。臨床現場、大規模臨床検査センターの両方の需要に応えうる、分散型と集中型の全自動解析システムのプロトタイプ開発も進んでおり、20年度末までに有用性確認という目標も達成できると見込める。一方で、Dual ハイブリ法の解析感度、特異性、再現性の検討などを行う必要があり、また、臨床診断に最も重要なトレーサビリティの確保や確実性の向上に努力が必要である。さらに、小型と大型の2タイプの装置開発で、早急に、コンテンツに対応した製品を実装し、実績を上げること【18】が望まれる。

<対処方針>【18】Dual ハイブリ法では、特に感度の向上を目指し、その後、プロトコルの確立を行い、臨床検査レベルでの解析を実現する計画である。臨床検査のレベルでトレーサビリティの確保と確実性の向上を実現する計画である。また、診断コンテンツに応じ、臨床現場での利用形態を前提に基礎試験を行い、化医療を進めている。

3-2) 実用化、事業化の見通しについて

コンテンツ開発は順調であり、また、実用化に必要な検査機器開発や検査会社との連携が行われており、課題解決の方針も立てられている。アレイについても、海外で市販されているものに比較して安価な製品を提供できる見通しが立っており、十分に評価できる。アレイ及び解析装置とも実用化及び事業化が期待できる。Dual ハイブリ法は、CGH 以外のマイクロアレイ技術にも用いることができ波及効果がある。また、開発される解析装置は、他の検査機器開発にも役立つ可能性がある。一方で、がん診断に展開するには、BAC の選択、遺伝子解析など他の手法との得失に十分配慮すべきであり、分散型装置については、微量化することのシステム構築上の負担、実用性を十分検討【19】するべきである。また、海外機関が使用権を有するBAC に変えて、研究開発項目(1)の日本人BAC を使用する可能性も検討【20】

してはどうか。

<対処方針>【19】【6】の再掲。【20】これまでと同様、RP-11から日本人BACへの置き換えは、配列情報が得られた段階で実施する。

3-3) 今後に対する提言

疾患の解析についてさらなるコンテンツ開発が期待され、装置開発において上記コンテンツ実装による成果を早急に挙げることを期待する。また、日本人BACライブラリーの開発とも連携し、日本人のために役立つリソースの実現【21】をめざすと共に、臨床検査医、大規模臨床検査センターなどを含む幅広い研究者等との連携による、予防医療、個別化医療に向けた総合的診断システムの開発も視野に入れた検討を行い、広く国際的にも貢献【22】することを目指して欲しい。

<対処方針>【21】診断コンテンツが開発され次第、自動機に実装できるよう改良を進めている。【22】がん診断、先天性疾患の診断について、コンソーシアム等を組織し、臨床医、大規模臨床検査センター(BML)を含む研究者等との連携により実用化を並行で進めている。国際貢献に関しては、【4】の再掲。日本人ゲノム多型データベースは構築中であり、癌CGH解析データベースは公開しており、これらを継続する。

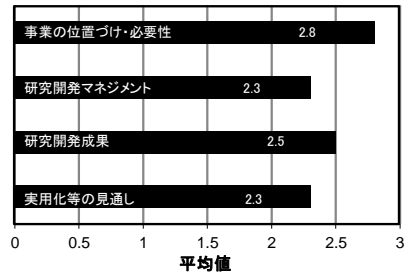
II. 研究開発マネジメント: 情勢変化への対応等

中間評価結果への対応

【中間評価実施_H20.7.31】_評点結果(プロジェクト全体)

【総合評価結果】 本プロジェクトは、BAC(バクテリア人工染色体)アレイを用いて染色体異常を解析する技術を開発することにより、個別化医療の実現に寄与することを目的としており、公共性が高く、民間のみでの実施が困難な内容であることから、NEDOによる実施の意義は大きく評価できる。妥当な計画、体制が組織されており、情勢の変化へも機敏な対応が行われている。中間目標は達成され、着実に成果が上がりつつあり高く評価できる。実用化の見通しも十分にある。

一方で、個別化医療の実現を目指し、二つの独立した特徴あるアプローチによって、着実に研究開発が進められているが、出口の見えた所で、相互の成果を活用することにより、予算、資源等をより効率的に活用できる。両者の間の情報交換などの対策が必要と思われる。



指摘事項	対応
1 日本人の特徴に合った診断技術を開発し、成果を国際貢献に活かす方向性を検討することが望ましい。	日本人ゲノムの解析による明確化、日本人ゲノム情報の高質化を図った(H22・H23年度までに完了)。
2 コピー数変動と疾病の関係研究は急展開しており、国際競争力を保つ上で、たとえば癌の臨床データを提供しあうなど、両グループの有機的な連携によるスピードアップが望まれる。当該プロジェクトで知財の実践的利用のためには、他の国内知財や開発技術との連携を可能とする方針作りも必要と考える。	プロジェクト期間中は、有機的連携のタイミングを図りつつ、それぞれの課題解決に向けた技術開発を実施。H23年現在、本プロジェクト終了による達成技術をもって連携の機が熟し、今後技術融合による相乗効果が期待される。
3 今後、がんにおける予後予測のデータの信頼性を高めるため症例を増やし、精度・再現性に対する更なる検証が必要である。	実用化研究において症例数の追加による指摘点の検証を実施した。
4 最終的な診断法に関しては、さらなるコストダウンを図るとともに、承認申請や普及という段階を考えると、用いるBACの選択や他の手法との特質を十分に検討することが望まれる。	コストダウンは搭載BACクローン数をミニマムにするなどの対応を図り、また検出試薬レベルやスポッティング技術の改善なども図った。

5. 評価に関する事項

中間評価を平成20年度に実施し、また事後評価については平成23年度に事後評価を外部評価により、NEDO研究評価部により実施された。いずれの評価に関しても、NEDOが策定した「評価項目／評価基準」に従って行われた。

1. 中間評価実施について

① 評価の実施時期

平成20年7月31日 第1回分科会開催

平成20年10月29日 第19回研究評価委員会開催

<審議経過>

● 第1回 分科会(平成20年7月31日)

(公開セッション)

1. 開会、分科会の設置、資料の確認
2. 分科会の公開について
3. 評価の実施方法及び評価報告書の構成について
4. プロジェクトの概要説明
(非公開セッション)
5. プロジェクトの詳細説明
(公開セッション)
6. 纏め、講評
7. 今後の予定、その他、閉会

● 第19回 研究評価委員会(平成20年10月29日)

② 評価手法

独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構において、被評価プロジェクトに対する当該技術の外部専門家、有識者等によって構成される研究評価分科会を、研究評価委員会によって設置し、同分科会にて被評価対象プロジェクトの研究評価を行い、評価報告書案を策定の上、研究評価委員会において確定した。

③ 評価事務局

独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構 評価部

「染色体解析技術開発」の中間評価について、第13回研究評価委員会において設置された「染色体解析技術開発」(中間評価)研究評価分科会において評価報告書案を策定し、第19回研究評価委員会(平成20年10月29日)に諮り、確定された。

④ 評価項目・基準(「標準的評価項目・基準」)

<プロジェクト全体>

評価項目

1. 事業の位置付け、必要性について
2. 研究開発マネジメントについて
3. 研究開発成果について
4. 実用化等の見通しについて

<個別テーマ> 研究開発項目1)、2)、3)のそれぞれについて算定

1. 研究開発成果について
2. 事業化の見通しについて

⑤ 評価委員リスト

「染色体解析技術開発」
中間評価分科会委員名簿

(平成20年7月現在)

職位	氏名	所属、肩書き
分科会長	まつばら けんいち 松原 謙一	大阪大学名誉教授 株式会社DNAチップ研究所 代表取締役社長
分科会長 代理	たかはし たかし 高橋 隆	名古屋大学 大学院医学系研究科 神経疾患・腫瘍 分子医学研究センター 教授
委員	あおやま せいこ 青山 聖子	サイエンスライター 早稲田大学 政治経済学術院 客員教授
	たじま ひでじ 田島 秀二	プレジジョン・システム・サイエンス株式会社 代表取締役社長
	はただ いずほ 畑田 出穂	群馬大学 生体調節研究所 生体情報ゲノムリソースセンター 准教授
	ふるかわ よういち 古川 洋一	東京大学 医科学研究所 先端医療研究センター 教授

敬称略、五十音順

「染色体解析技術開発」
研究評価委員会委員名簿(敬称略、五十音順)

職位	氏名	所属、肩書き
委員長	西村 吉雄	国立大学法人東京工業大学 監事
委員	伊東 弘一	早稲田大学 理工学術院総合研究所 客員教授(専任)
委員	稲葉 陽二	日本大学 法学部 教授
委員	大西 優	株式会社カネカ 顧問
委員	尾形 仁士	三菱電機エンジニアリング株式会社 取締役社長
委員	小林 直人	独立行政法人産業技術総合研究所 理事
委員	小柳 光正	国立大学法人東北大学大学院 工学研究科バイオロボティクス専攻 教授
委員	佐久間一郎	国立大学法人東京大学大学院 工学系研究科精密機械工学 精密 機械工学専攻 教授
委員	菅野 純夫	国立大学法人東京大学大学院 新領域創成科学研究科 メディカル ゲノム専攻 教授
委員	富田 房男	放送大学 北海道学習センター 所長
委員	架谷 昌信	愛知工業大学 工学部機械学科 教授・総合技術研究所所長
委員	平澤 冷	東京大学名誉教授
委員	吉原 一紘	アルバック・ファイ株式会社 技術開発部 理事

Ⅲ. 研究開発成果について

Ⅲ-1. 研究開発成果について

研究開発項目1)BAC を用いた高精度全ゲノムアレイの開発

研究開発項目2)染色体異常を解析する革新的要素技術の開発

1. 事業全体の成果

1)BACを用いた高精度全ゲノムアレイの開発 (担当:独立行政法人産業技術総合研究所)

遺伝学的に日本人と確定されたゲノムを断片化し、大腸菌に挿入しクローン化することにより33万クローンの独自日本人ゲノムライブラリーを作成した。このライブラリーの約2/3のクローンの両末端の塩基配列を解析し、全ヒトゲノムの96%をカバーする日本人ゲノム物理地図を確定した。このライブラリーから人種的特徴を保存するHLA領域のクローンの全塩基配列を決定し、同じ領域の欧米系ヒトゲノム配列と比較し、構造上及び一塩基多型の両方で大きく異なる事を明らかにした。物理的地図から全ゲノム領域をカバーする高精度アレイを設計し、市販4Kアレイと同等の精度の17K アレイを試作した。この高精度全ゲノムアレイにより胃癌培養細胞及び臨床患者由来のDNAを解析し、有用性を確認した。

2)染色体異常を解析する革新的要素技術の開発

高精度表面加工修飾技術の研究開発 (担当:トーヨーエテック株式会社)では、SAM (Self assembled Monolayer)や高精度アレイによるDNAアレイチップの開発を行った。熱転写によるアレイ成型基板は高いピッチ精度を示した。独自のスパッタによる金の成膜では、(111)面に優先配向した表面構造が示された。金膜とSAMの至適化によりアレイ上のDNAの特異的結合が示された。さらに試作アレイチップは胃癌DNAサンプルを用いて解析が可能である事が示された。

新規ゲノムアレイ用蛍光標識化技術の研究開発 (担当:和光純薬工業株式会社)では、本プロジェクトにおいて、蛍光物質WY547およびWY647を使った新しい蛍光標識試薬を発売した。次に、新規な構造の蛍光物質WY535の誘導体とWY635の誘導体を合成した。これらの蛍光標識ヌクレオチドを本プロジェクトで作製したミニアレイを用いて評価し、十分な輝度が得られることを確認した。

疾患別アレイハイブリシステムの研究開発 (担当:横河電機株式会社)では、物理的ハイブリシステムの開発により物理ハイブリの有効性を確認し、ミニアレイを組み込み開発したハイブリユニットと処理装置のシステムによりハイブリを確認した。読取装置開発では、新マルチビーム・ディスク方式により、深い焦点深度、高感度、高S/N、を確認し2色で液中計測が可能な読取装置を実現した。さらに各成果である日本人BAC、がんのコンテンツ、基板、蛍光標識と同時に連携させ一連の処理をシステムとして動作させ有用性を確認した。

ゲノム情報と臨床情報の統合化 (担当:九州大学(再委託先))では、大腸癌原発巣から癌細胞のみをLMDで採取し、total RNAおよびgenomic DNAを採取し、1)発現アレイ、CGHアレイ解析を行った。また、2)遺伝子多型8q24 genotypeとMYC遺伝子発現、allelic imbalance、予後との関係 3)iPS遺伝子群発現の意義、4)上皮間葉移行を制御する遺伝子pathwayの解明について報告する。

がん組織バンクの構築とCGH解析 (担当:北海道大学(再委託先))では、北海道大第一外科において、手術検体を種々の解析をおこなう目的で組織バンクを設立している。これまでに約3600余りの患者検体(血液、組織)を収集し、管理・保存している。患者の個人情報(連結可能匿名化)をおこない、各検体には、患者背景、臨床情報がリンクされている。これらの検体を用いてCGHアレイ解析や糖鎖解析などを行っている。

疾患別BACアレイの設計 (担当:山口大学(再委託先))では、胃癌のリンパ節転移、肝転移等の生物学的特性を評価するBACミニアレイを開発した。決定木と他の統計学的手法を用いて50種類のBACク

ローンを同定して、それらと対照のBACクローンをスポットしたミニアレイを作成した。新規症例を用いた検討では、リンパ節転移、肝転移、腹膜播種、進達度の正診率はそれぞれ66.7%, 86.7%, 86.7%, 96.7%であった。

2. 研究開発項目毎の成果

2.1 BACを用いた高精度全ゲノムアレイの開発（担当：独立行政法人産業技術総合研究所）

(1) 研究開発の目的

本プロジェクトは、「健康安心イノベーションプログラム」の一環として実施された。健康安心プログラムの目標である「国民が健康で安心して暮らせる社会の実現」に向け、達成すべき重要な課題の一つとして、個々人の体質に合わせた医療による効果的・効率的な医療の実現が掲げられている。この背景として2000年に国際ヒトゲノムコンソーシアムにより30億ヒトゲノムの塩基配列情報が公開され、個々人の遺伝情報に基づいた診断、治療、創薬が可能となるとの期待があった。

当該研究開発においては下記に示す研究開発体制により、産総研が研究開発リソース(知的資源)を提供し、ナノテック製造技術を有する企業が手法の開発を行い、大学医学部において臨床での有効性を検証することを目指した。研究開発課題にある健康安心イノベーションの推進においては、世界的レベルの我が国の製造業をバイオテクノロジー分野に関与させ、大学医学部との連携を促進する体制を作ることが実用化、産業化にとって重要である。

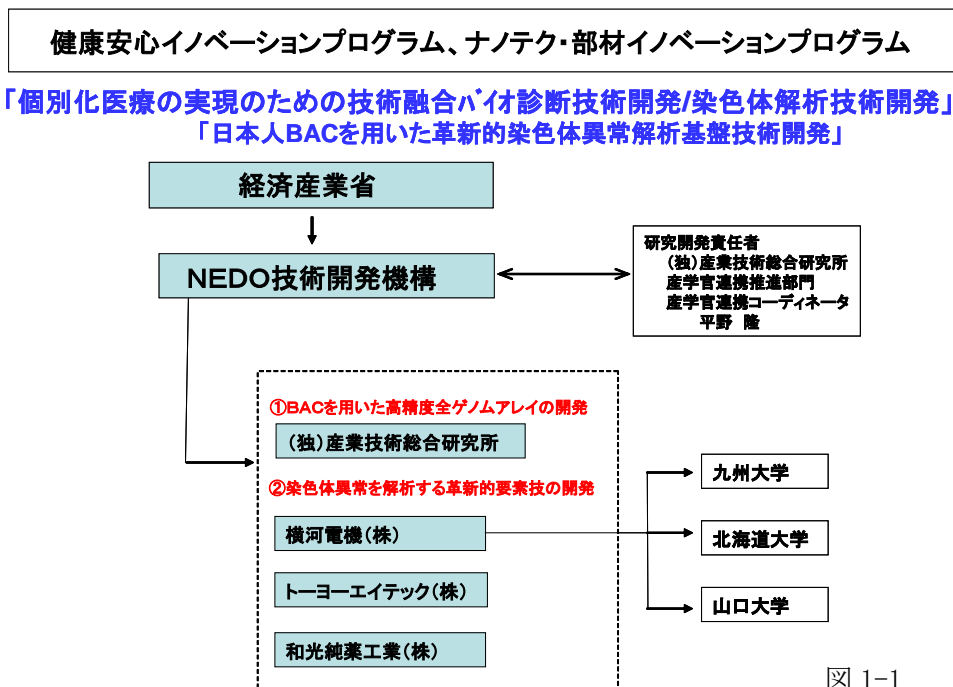


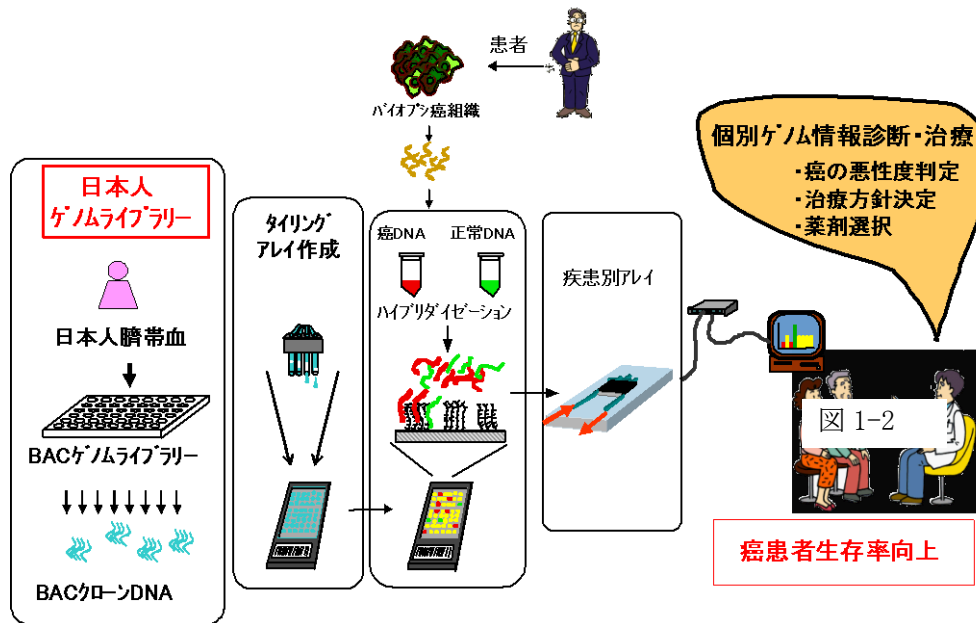
図 1-1

急速な超高齢化社会が予想されるわが国において医療に係わる費用の削減は大きな政策目標である。特に若年性癌の発症による社会的負担は大きい。3 大成人性疾患とされる癌、糖尿病、循環器病のうち、染色体レベルの大きな異常が癌、特に胃癌・肺癌・大腸癌・乳癌等の予後の悪い固形癌に多発する。したがって先端技術開発による癌の診断および治療は大きな意義がある。本プロジェクトでは癌や遺伝疾患などに関係するゲノム染色体上の異常を高感度、高精度かつ簡便、迅速、安価に解析するための染色体異常解析技術を開発することにより、個別化医療の実現に寄与することを目的とする。近年ゲノム解析技術の進展により、数十万から数百万塩基対に及ぶゲノム染色体上の大規模な異常(増幅、欠失等)が存在し、癌や遺伝疾患などの疾患と密接に関係していることが解明され始め、診断分野への応用に対する期待が高まっている。さらに、近年のポストゲノム研究の進展により、

タンパク質をコードしない、いわゆる非コード領域を含むゲノム全領域にわたる数万から数十万塩基対の物理サイズにおける染色体異常と疾患の関係が明らかになりつつある。加えて、染色体コピー数多型と疾患の関係が今後のゲノム解析研究において重要となっている。しかし、このような染色体異常を高効率に解析し、診断応用に展開していくためには、性能、コスト等、飛躍的な向上のための技術開発が必要となる。

そのためのリソースとしてまず産総研が独自の日本人ゲノムライブラリを構築した。このライブラリを用いてヒト全ゲノム領域を隙間なくカバーする全ゲノムアレイを作成するとともに企業と連携し臨床検体解析を可能とする革新的アレイ要素技術を開発、評価する。これらの技術は医師・看護師等、医療従事者の負担軽減(操作性向上等)、ひいては患者の負担軽減(QOL 向上、健康寿命の延伸、低侵襲化、及び治療期間の短縮等)に資することが期待される。

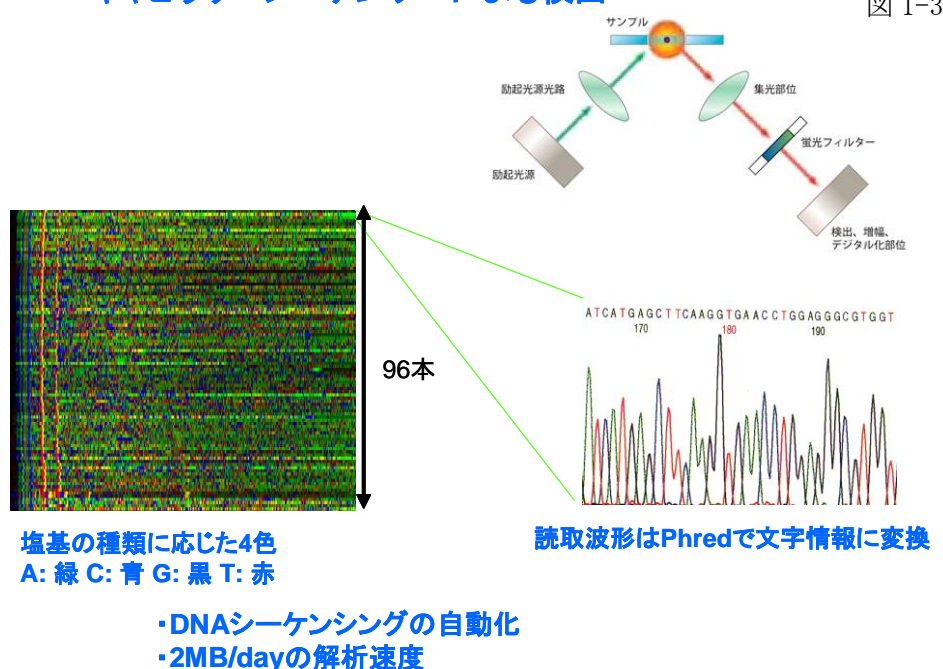
日本人BACゲノムライブラリに基づく癌の個別化診断・医療



(2) 研究背景

ヒトゲノムの全貌を明らかにするために米国のエネルギー省と厚生省によって 30 億ドルの予算が組まれて発足したヒトゲノム計画は、1990 年に開始、15 年間での完了が計画されていた。当時、この計画は「100 年計画」とも呼ばれ、困難視する向きも多かった。しかし技術の進歩とともに研究が加速した。2000 年には国際ヒトゲノムコンソーシアムの成果として米国クリントン大統領および英国ブレア首相がヒトゲノムのドラフト 30 億塩基対の解析が完了したとの発表を行った。この背景としては、シーケンシングの手法そのもの(Sanger 法: F. Sanger ら 1980 年ノーベル化学賞)はもちろんのこと、さらに自動でシーケンシングを行うシーケンサーの開発改良、およびそれに伴う酵素や光源、検出器、アSEMBル(再構築)プログラムなどのコンピューター情報処理周辺技術の向上によるところが大きい。特に 1993 年に登場したキャピラリーアレイシーケンサーは当時としては画期的な解読速度を持ち、ヒトゲノム計画の加速化に大きく貢献した。また、最大 1,000 塩基程度と次世代シーケンサー(50-400 塩基程度)と比較しても長い解析長を持つのが特長で、現在ではこの分野の大学、研究機関でデファクトとして普及している。本プロジェクトで導入された ABI 3730xl キャピラリーシーケンサーは 96 サンプルを同時に解析可能であり、その解析能力は約 200 万塩基/日であった。

キャピラリーシーケンサーによる検出

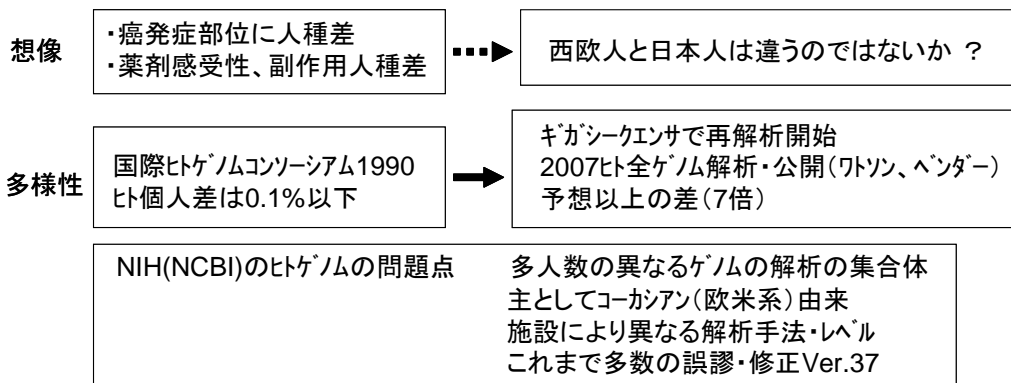


ヒトゲノム計画で解析された塩基配列情報は翌年に公開され、2003 年には当初の予定より 2 年早く 30 億塩基対からなるヒトゲノムの 99%を明らかにした塩基配列(RefSeq)の公開に至った。この配列は 99.99%以上の正確性を持つとされる。この配列は現在も改定が続けられており、まとめたものを NCBI Build としてアップデートしている。2011 年 3 月現在のバージョンは 37 である。公開された塩基配列情報は、国際塩基配列データベース(INSDB)からインターネット経由で誰でも入手可能である。INSDB は米国国立生物工学情報センター(NCBI)、日本 DNA データバンク(DDBJ)、欧州分子生物学研究所(EMBL)の 3 つの機関より構成され、相互に情報の共有が行われている。各研究所が解析した塩基配列情報は 3 つの機関のいずれかに登録すると、同時に他の期間にも同じ ID で登録される。これを元にポストゲノム研究開発が大きく進展した。特に個人のゲノム情報に基づいた個別化医療については、国民の半数が罹患する癌の診断・治療・副作用軽減が期待された。しかし国際ヒトゲノムコンソーシアムで解析されたヒトゲノムは欧米系コーカシアン系のものであり、日本人の属するモンゴロイド系ではなかった。国際ヒトゲノム計画の発足当初各個人のゲノムの相違は 0.1%以下との仮定で進められたが、実際にはこの数字は根拠のあるものではなかった。一方我が国の医療関係者では癌発症の部位、抗癌剤の薬効および副作用

について人種差のあることが知られており、ゲノム上でも違いが当然あるはずとの認識があった。肺がん治療薬イレッサ[®]がアジア系女性腺癌に有効なことが知られ、副作用に關与する SNP の分布が人種により大きく異なる例はよく知られている。したがって欧米系の国際ヒトゲノムの塩基配列情報では、モンゴロイド系日本人の個別化医療を推進するには不十分であり、日本人のゲノムの物差しとなる「日本人の標準ゲノム」が必要である。この他にも国際ヒトゲノムの結果は多くの施設の異なる手法による情報の集合体であり、解析精度の検証がなされていないという大きな問題がある。

欧米人と日本人のゲノムは同じか

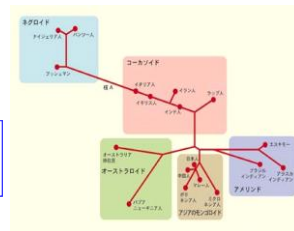
図 1-4



日本人のゲノム解析の基準が必要
尺度(物差し)

日本人の標準ゲノム

日本人ゲノムライブラリ



ゲノム研究開発の進展とともにゲノム構造における人種差、および個人差についても徐々に明らかになってきた。2002 年に開始された HapMap プロジェクトからは一塩基多型(SNP: Single Nucleotide Polymorphism)の分布が、2005 年に開始された CNV プロジェクトからはコピー数多型(CNV: Copy Number Variation)の分布が人種により大きく異なることが明らかとなった。SNP や CNV による遺伝子構造の違いは疾患のリスク、薬剤代謝などに大きく関与することが多くの研究より明らかにされている。2007 年にはジェームズ・ワトソン博士、グレイグ・ベンター博士が相次いで自らのゲノム配列を公表し、同じコーカシアン同士であってもゲノム構造の個人差が 0.7%におよぶことが明らかになった。これは事前に予想されていた値の 7 倍である。2011 年 1 月現在では SNP のデータベースである dbSNP(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>)の登録数は 1 千万以上に達している。日本人に見られる SNP についても JSNP(<http://snp.ims.u-tokyo.ac.jp/>)に登録され、その数は 20 万に達する。また、CNV が存在する領域は全ゲノムの 12%におよぶことが明らかとなっている。これらのことから、ゲノム構造の多様性はこれまで想定されてきた以上であることは明らかである。癌に限らずゲノム情報に基づく個別化医療およびゲノム創薬を進めるには人種差や個人差を考慮することが重要であり、そのためには標準となる「日本人のゲノム情報」の確立が必須であると考えられた。

人種の違いに関連するゲノム研究

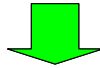
図 1-5

国内

- ・非小細胞肺癌治療薬イレッサ[®]の副作用に関与する一塩基多型を特定 (東大: 2004)
- ・(アジア諸国に多い)川崎病の発病と重症化に関与する遺伝子を発見 (理化学研究所: 2007)
- ・(日本人に多い)脳梗塞発症に関与する一塩基多型を発見 (九大ほか: 2007)
- ・(アジア、南米に多い)未分化型胃腸がんのリスク遺伝子を特定 (国立がんセンターほか: 2008)
- ・東アジア人の睡眠障害と関連する一塩基多型を発見 (東大、米スタンフォード大ほか: 2008)
- ・東アジア人の変形性関節症の疾患感受性遺伝子を発見 (理化学研究所: 2008)

海外

- ・(欧米先進国に多い)小児性クローン病のリスクを高める遺伝子変異を同定 (米Children's Hospital of Philadelphiaほか: 2007)
- ・コーカシアンの基底細胞癌(BCC)に関与する一塩基多型を2種発見 (アイスランドdeCODE Genetics社: 2008)
- ・欧米人の肥満に関係する新たな多型を発見 (英Cambridge大ほか: 2008)
- ・(黒人に多い)食道がんリスクに影響を与えるmiRNA遺伝子変異を発見 (米Texas大: 2008)
- ・6万人の遺伝情報をもとに疾患や薬剤反応に関与する遺伝子異常を同定 (英Wellcome財団: 2010)



日本人と欧米人は異なる可能性あり

1) 日本人BACライブラリ構築の研究開発

産総研ではプロジェクトの発足前から「日本人のゲノム情報」の確立のため、まずゲノム解析に不可欠な「日本人のゲノムライブラリ」の構築を行った。日本人 BAC ライブラリとしては 1997 年に慶応大のグループにより作成されたものが存在するが、(1)遺伝学的な裏付けがなされていない、(2)EB ウィルスにより組み換えられたライブラリ(FLEB-14)を使用している、という大きな問題が存在する。日本に住んでいるから日本人とは限らず、どのように日本人であることを定義するかということは重要である。このためゲノム資源として入手した一定数の中からライブラリにふさわしいサンプルの選択を行うため、(1)アメロジェニン遺伝子検査(2)STR 検査(3)ミトコンドリア DNA 検査(4)HLA 遺伝子検査の 4 種の DNA 検査を行った。(1)は性別の判定に用いられる。歯の発生において生成されるエナメル質の構成蛋白であるアメロジェニンは X 染色体上にそのコード遺伝子 AMELX が存在するが、Y 染色体上に相同な遺伝子 AMELY が存在する。しかし、AMELY にはイントロン領域に 177 塩基の欠損が含まれる。そこで、このイントロン領域を挟むように設計されたプライマーで PCR 増幅を行い、産物を電気泳動すると女性の DNA からは AMELX 由来の 1 本のバンド、男性の DNA からは AMELX および AMELY 由来の 2 本のバンドが検出される。(2)は個人識別や集団の判定に用いられる。DNA の特定の領域に数〜数十塩基の単位配列の繰り返し(STR: Short Tandem Repeat)が挿入、欠失することで生じる多型で、偶然一致する可能性はきわめて低く、個人識別に使用される。また、この多型性は集団により特徴があり、これを利用して集団判別も可能である。(3)は母系の判定に用いられる。通常、DNA は父から 1 対、母から 1 対が遺伝するが、全長 17kb のミトコンドリア DNA は母の 1 対のみが遺伝する。特に D-Loop 領域と呼ばれる約 1kb の領域は進化速度が速く、一般の領域の 10 倍ともいわれる。これを利用して母系の集団判別が可能である。(4)は移植適合性の判定に用いられるが、人種判定にも用いられる。白血球抗原をコードする 6 番染色体 HLA(Human Leukocyte Antigen)領域はクラス I とクラス II に大別され、その大きさは 3.6MB におよぶ。HLA 領域は特に遺伝子密度が高く、多様性に富む。遺伝子の多型は*0101 などの表記で示される。また、この領域は連鎖不平衡が強く成り立っていることが知られており、遺伝子ごとの多型の組み合わせは人種や民族ごとに特徴的である。これを利用して集団判別に用いられる。以上の検査の結果、最も日本人らしい(96%以上)と判定された男性ゲノムがライブラリ構築に採用された。

採用されたサンプル(Yamato-2)の DNA 検査結果はそれぞれ以下の通りであった。

(1)アメロジェニン遺伝子検査: PCR 増幅の後の電気泳動により 2 本のバンドが検出されたため男性と判定された。Y 染色体も含めたゲノムライブラリを構築するためには男性の DNA サンプルが必要である。

(2)STR 検査: NIST STR Database (<http://www.cstl.nist.gov/div831/strbase>)と照合を行った結果、97 の集団のいずれかに分類されるが、「日本人または韓国人」と判定された。

(3)ミトコンドリア DNA 検査: MITOMAP (<http://www.mitomap.org/MITOMAP>)との照合の結果「ハプログループ B」と判断された。これは 4 万年前に中国から日本に渡来したとされるグループである。日本人の 18%、韓国人の 8%がこのハプログループに属する。コーカシアンにはこのハプログループは見られない。また、これまでゲノム配列が公開されたサンプルのいくつかについてハプログループの情報が公開されている。ジェームズ・ワトソンは H、ヨルバ族(ナイジェリア)が L1、中国人が M、韓国人が D である。ゲノム解析された韓国人は BAC ライブラリ AK1 と同一のゲノムリソースである。同じくゲノム配列が公開されたグレイグ・ベンターについてはハプログループが公表されていない。人類の母系をさかのぼると「イブの 7 人の娘」と呼ばれる L0 から L6 までの 7 つのハプログループに辿り着く。この事実は人類の祖先がアフリカに由来するという有力な根拠となっている。ヨルバ族のハプログループ L1 はこのうちの 1 つである。ハプログループ L3 から分化して東アジア系のハプログループ M および西ユーラシアおよび中央アジアに見られるハプログループ N となった。韓国人のハプログループ D はハプログループ M から分化している。ハプログループ B はハプログループ N よりハプログループ R を経て分化したとされる。ジェームズ・ワトソンのハプログループ H はハプログループ N よりハプログループ R1 を経て分化している。このことから Yamato はこれまでゲノム解析された DNA リソースのいずれともハプログループが異なり、これまでに解析されたことのない母系をもつゲノムリソースであることが明らかとなった。

(4)HLA 遺伝子検査: JSHI Database (<http://square.umin.ac.jp/JSHI/databank/index.html>)との照合の結果、HLA-A*2402、HLA-B*0702、HLA-B*5201、HLA-C*0702、HLA-C*1202、HLA-DRB1*0101、HLA-DRB1*1502 が検出された。いずれも日本人によく見られ、コーカシアンには見られない組み合わせである。これらの結果を既存の日本人 HLA データベースと照合し、日本人・韓国人。中国人(漢人)を除く白人・黒人等 94 人種である可能性は 0.01%以下であり、中国人(漢人)である可能性 0.1%以下、韓国人である可能性 3%、日本人の可能性 97%であることが示された。このような人種の解析はランダムであれば正規分布を示すはずであり、97%日本人との結果は遺伝学的に日本人であると総合的に判定できる。この結果は HLA 領域での人種鑑定に実績のある東海大学医学部猪子先生の研究室と共同で行った。

AIST YAMATO-2の人種的検討

図 1-6

解析内容	方法・結果	評価
1. アメロジェニン遺伝子検査	PCR増幅 電気泳動で2本のバンド	男性
2. マイクロサテライト15座検査	ABI STR同定PCRキット97人種 NIST Short Tandem Repeat DNA Database http://www.cstl.nist.gov/div831/strbase	日本人または韓国人
3. ミトコンドリアDループ検査	ハプログループB	日本人 18%, 韓国人 8% (コーカシアンでない)
4. HLA遺伝子4座検査 *HLA-A,B,CおよびHLA-DRB1 人種により最もハプロタイプが保存	HLA-A 2402 HLA-B 0702, 5201 HLA-C 0702, 1202 HLA-DRB1 0101, 1502	HLA-B*0702-DRB1*0101 HLA-B*5201-DRB1*1502 いずれも日本人によく見られ (コーカシアンには見られない)

(コーカシアンの例: HLA-B*0801-DRB1*0301) (参考: 移植・輸血検査学)

総合評価

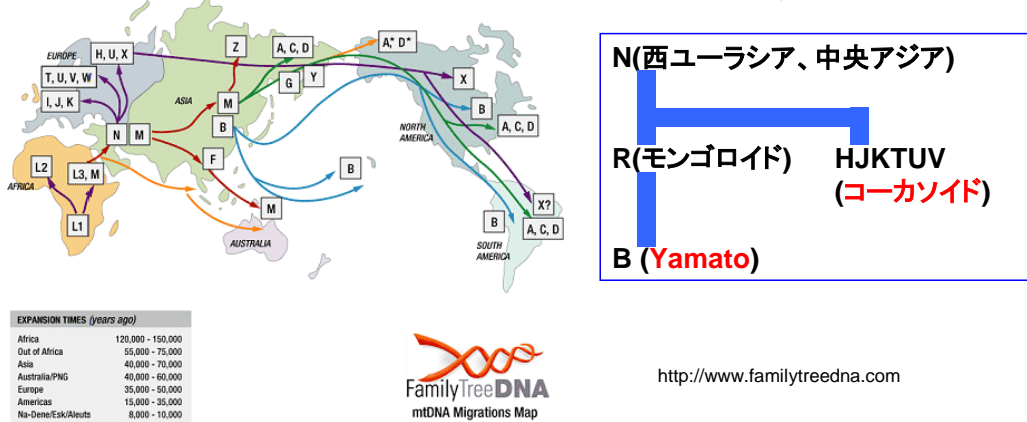
1. 日本人・韓国人・中国人(漢人)を除く白人・黒人等の94種の可能性 0.01%以下
2. 中国人の確率 0.1%以下、韓国人の可能性 3%、日本人の可能性97%

東海大学医学部猪子先生との共同研究

Yamatoが日本人か否かの判定

ミトコンドリアDループ解析

(参考：日本人になった祖先たち)



HLA解析

(参考：移植・輸血検査学)

	HLA-A	HLA-B	HLA-C	HLA-DRB1	
Yamato2	2402	5201	1202	1502	本土日本人に最も多い
		0702	0702	0101	韓国人、日本人、満族に見られる
Caucasian	0201	0801	0701	0301	コーカシアン の典型的なハプロタイプ

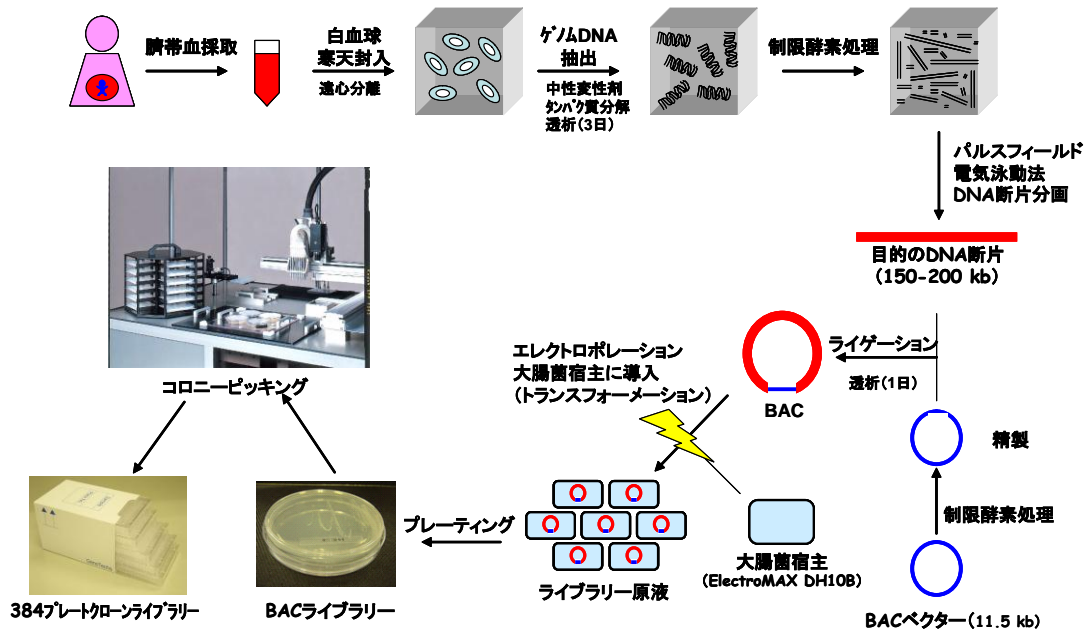
日本人ゲノムライブラリーを作成するためのゲノム DNA は男児臍帯血から採取された。臍帯血は DNA の損傷が最も少ないと考えられており、再生医療におけるリソースの一つとしてバンク化も行われている。我が国の臍帯血バンクは無菌性を重要視したため、帝王切開等で得た臍帯血を用いている。しかし分娩の各段階は生物学的に安全性のチェックを行っていると考えられており、ゲノム全体の健全性を考えると正常分娩の臍帯血がリソースとして最適である。また、前述のような理由で EB(Epstein Barr)ウイルスによる細胞の不活化は行わなかった。大量の DNA を安定な状態で採取することが技術的に困難であり、ライブラリー化の技術が確立していなかったため、EB ウィルスによる不活化は必須の手順であった。しかし、EB ウィルスは癌ウイルスでありリンパ腫や咽頭癌を引き起こす原因となることが知られており、遺伝子変異を引き起こす可能性が指摘されていた。実際、慶応大学で作成されたライブラリーにおいては 6 番染色体と 14 番染色体の間で大規模な転座が生じていることが報告されている。また、EB ウィルスを使用しなくても DNA を十分量採取することが技術的に可能になったことから、JY2 構築に当たっては EB ウィルスによる不活化は不要であった。

ゲノムライブラリーはゲノム DNA を断片化した状態で大腸菌ベクターに挿入し、クローニングするものである。巨大なゲノム DNA を取り扱いやすい大きさに保持可能、同じ断片を増幅可能といった利点が存在する。これらはシーケンシングをはじめとした遺伝子研究に際して欠かせない機能である。ゲノムライブラリーの種類としてはプラスミド、コスミド、BAC (Bacterial Artificial Chromosome)、YAC (Yeast Artificial Chromosome)などが挙げられる。プラスミドやコスミドは数千から数万塩基程度の大きさの断片を扱うのに適しているが、ヒトゲノム全体のライブラリーを構築するには膨大な数が必要となるため、コスト的に非現実的である。また、ヒトゲノムに多く含まれる反復配列を考慮すると、YAC は数百万塩基までの大きさの断片を扱うことが可能であるが、増幅を繰り返しているうちに塩基配列に変異が生じる例が報告されている。これは標準ライブラリーとしては致命的な欠陥である。BAC は断片の大きさこそ最大三十万塩基と YAC より小さいものの、数百世代にわたって増幅を繰り返しても塩基配列が安定して保持されることが確認されている。これらの理由からライブラリー構築には BAC が採用された。断片化に関しては超音波等による物理的な方法、制限酵素等による化学的な方法が考えられるが、今回は後者が選択された。断片化された DNA はパルスフィールド電気泳動法で分離した後、100-200kb の

DNA断片を回収し、ライブラリ構築に供した。宿主の大腸菌は DH-10B、ベクターとしては pBACe3.6 が採用された。これらについては他の BAC ライブラリ構築において確立した手法として選択した。

日本人臍帯血BACゲノムライブラリー(33万クローン)作成

図 1-8



このようにして全くオリジナルの産総研ゲノムライブラリ 33 万クローン(JY2: Japanese Yamato-2)を作成した。日本国内外ですでにいくつかのヒトゲノムライブラリが存在する。ヒトゲノム計画に使用されたライブラリとしては 1996 年に California Institute of Technology によって構築された Caltech ライブラリや、2001 年に Rosewell Park Cancer Institute によって構築された RPCI ライブラリが存在する。Caltech ライブラリは精子を DNA のリソースとしている。RPCI ライブラリはサンプリングを複数回行うことにより 50 万という膨大な数のライブラリが構築されていること、サイズセレクションにより平均 178kb と非常に大きな DNA 断片で構成されていることが特徴である。1997 年に慶応大によって構築されたライブラリは FLEB-14 培養株より構築されている。そのほかモンゴロイド系の BAC ライブラリとしては 2001 年にソウル大によって構築された AK1 ライブラリ、2004 年に全北大によって構築された KBAC ライブラリなどが存在する。

JY2 は(1)遺伝学的に日本人との人種を特定した、(2)染色体組み替えを回避するため、EB ウイルスによる細胞不死化を行っていない、(3)一回のサンプリングで作成しているのでリソースのばらつきがない、(4)平均断片サイズが 130kb(13 万塩基)と大きいことが大きな特徴である。このライブラリを日本人標準のゲノムリソースとして活用することにより、日本人のゲノム構造についての詳細な知見が得られることは勿論、日本人に特化した医療および創薬の基本情報となる。

世界のヒトBACライブラリ

名称	施設	報告	由来	出自	総数	平均長
A/B	California Institute of Technology	1996	987SK(ATCC)	不明	9.6万	140kb
C-D2			ヒト精子			
KEIO	慶応大	1997	FLEB14-14培養株 (EBウイルス形質転換)	日本人	9.6万	110kb
RPCI-11	Rosewell Park Cancer Institute	2001	ヒト末梢血 (EBウイルス形質転換)	非公開 (欧米系コーカシアン)	50万	178kb
AK1	ソウル大	2001	ヒト末梢血 (EBウイルス形質転換)	韓国人	10万	103kb
KBAC	全北大	2006	韓国人リンパ球	韓国人	10万	86kb
Yamato-2	産総研	2005	日本人臍帯血	日本人	33万	140kb

*FL (Follicular Lymphoma : 濾胞性リンパ腫)においてEBウイルス(Epstein-Barr Virus)によるbcl-2やc-mycのtranslocationをFISHやSKY-analysisで確認

*Mol Cell Biol. 1987 Feb;7(2):708-17

「EBV組み換えなし」「日本人」 の2つを満たすライブラリを構築

産総研日本人ゲノムライブラリを資源として使えるようにするためには、それぞれのゲノムクローン断片がヒトゲノム上のどの位置にあるかを決定する膨大な作業が必要である。このため、それぞれの断片を大腸菌クローンから増幅・精製し、断片の両末端の塩基配列をキャピラリーシーケンサーで解析した。プロジェクトのほとんどの資金的、人的リソースはこの作業のために投入された。解析に使用した ABI3730 キャピラリー型シーケンサーは最大 1,000 塩基まで解析可能であるが、解析塩基情報の最初と最後はデータの品質が低下することが知られている。この信頼性は QV という数字で表される。QV はリードエラーの含まれる割合を経験的に数値で表したもので、QV10 なら 10 塩基に 1 つ、QV20 なら 100 塩基に 1 つのリードエラーが含まれるとされる。信頼できるデータのみを使用するために今回の解析では QV15 でトリミングを行っている。この値は NCBI 等の国際データベースに登録するにあたってクリアされているべき標準的な数字とされ、97%以上正確であることを意味する。トリミングの結果、使用可能なデータの長さは平均 490 塩基であった。この長さはヒトゲノム特有の繰り返し単位の約 300 塩基を上回っており、全ヒトゲノム上の位置を決定する物理地図作成に十分な長さであった。

最終的に全 33 万クロンの半数強の 18 万クロンについて、DNA 断片の両末端にそれぞれ SP6、T7 プライマーを接続して解析を行った。続いて、この塩基配列結果を米国ヒトゲノム研究所(NCBI)が公開しているヒトゲノム塩基配列(RefSeq)と対照することにより、日本人BACの全ヒトゲノム配列上の物理的地図を作成した。この作業には NCBI より提供されているプログラムの1つである BLAST(Basic Local Alignment Search Tool)が使用された。これは局所的に相同な塩基配列またはアミノ酸配列を高速に検索するためのプログラムである。

シーケンス情報のマッピング方法

BLAST(Basic Local Alignment Search Tool)

シーケンスデータベースサーチの最も一般的なツール

塩基やアミノ酸配列のホモロジー検索、コドン表を介して塩基配列とアミノ酸配列の双方の検索および塩基配列からの遺伝子領域の推定等を行うプログラム

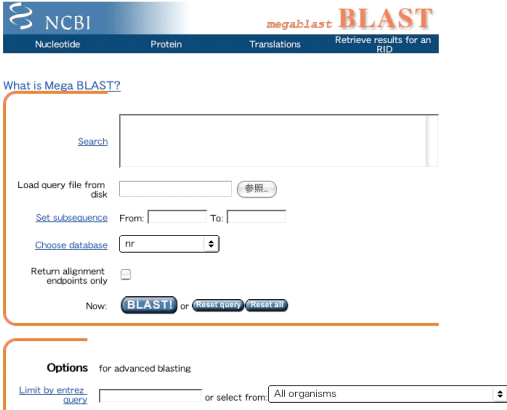
米国バイオテクノロジー情報センター(NCBI:National Center for Biotechnology Information)

```

XXXXXXXXXXATCGACTCCTATAGGGAGGANNCTTAATGAGATTTCTATGTTACACTTCNNNTCTGGTTC
TCGGCTAGAAAAATAGGTTTATTTCTCNGAACTTTGTTCTCACTATGACTGGGCTTCACCTCTCTGGGATCACCTC
AGGACTAAGCAACAGATAAAAAAGCATAAAAAATTAATAAAGACTTCCTCGACATTTAAACCACAGTCTCTCTTTTC
CTATCTCTCTCACAGAAAAATAATGTCCTGTCAGGCACTCTTCAMTGCATCTGTGCACACAGTCTATATCCAA
GGCTGCCCAAGTGGAAAAATGGGAAAAATGGGATTTCTCAAACTCTGGGTTTATTTTGTGGATACTCTACT
AAGATTTTACAAATGGTAAATTTCAAAAACAGATATTTGCTTTGTAATTTCTTAATAATTTCTTCAAAGTG
TTCTGTTCTTATTTGTTATAGCATAAAAGTCTTTAAGCACTCAAAAATTTGATATGATGATTTTATATGATTC
ACTTCAAATATTTTAAATTTCTTTATAATTTTCTTGACTACATGTTATCTAGTGATGATGATTAATTTCT
TATTTGGAAATATCTCAATATAATTTGCTTTTAAAAATTAATTTTATCTATAGGCAATATGTCATCTTGCAT
TTTATGTTACATTTTCTAATGTTCTTAAAAATAATGGTTTATAAAGAACTGATATATTTAAGGTTGACATG
TGATGATTTGATATGATACATATATAATGATTAGCAGTAAATTAACACACATCTATCACTACCATGGTGAAN
TANATCCCAANNNTTTNNNNNNNACTGAAAN
    
```

シーケンス解析塩基結果入力

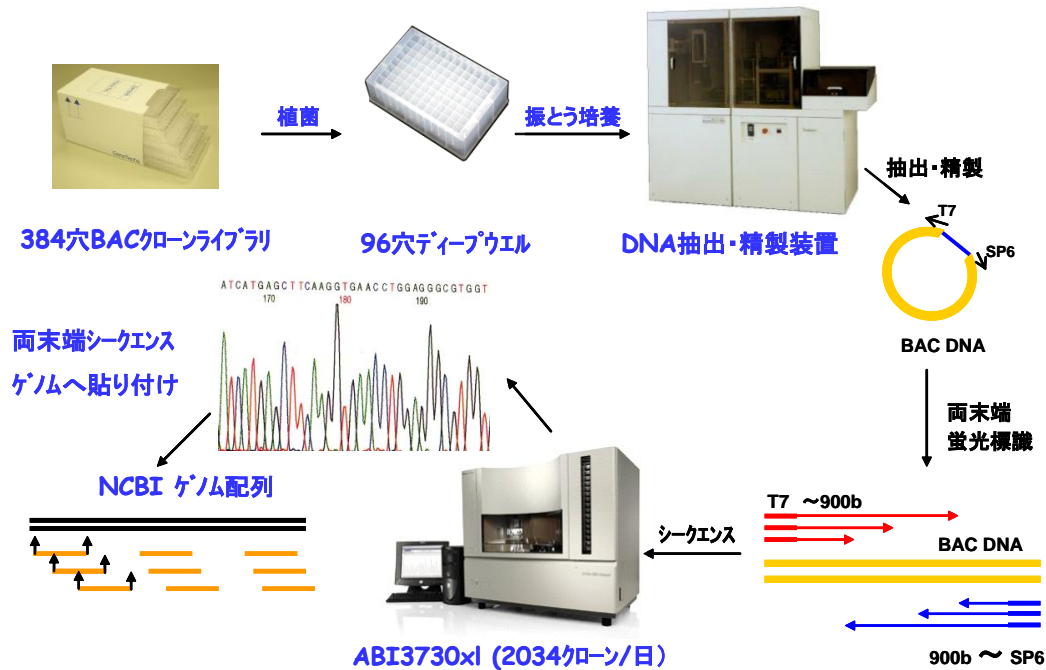
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>



BLAST のプログラムは NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) のホームページ上でも実行可能であるが、今回は解析対象が数量ともに膨大であるため、CentOS 5.2 をインストールした専用のワークステーションを別途用意した。BLAST 2.2.18 のソースコードをダウンロード、コンパイルしたものをインストールして使用した。このプログラムではまず 6 塩基が完全一致する部分配列を検索する。一致部分の両端を延長し、塩基が一致した場合は加点、変異や挿入あるいは欠失の場合は減点しながらスコアが最大となる組み合わせ(HSP: high-scoring segment pairs)を模索する。結果には E-value と呼ばれる値がしばしば使用される。これは検索に使用された塩基配列と同程度の相同性(スコア)を、ランダムな塩基配列が持つ確率を計算したものである。今回は E-value が $1e-50$ (10 のマイナス 50 乗)を閾値として使用した。相同性を判定する目的のみであれば $1e-5$ などの緩い値が採用されることが多い。今回はヒトゲノム同士での判定であること、ヒトゲノムにおいては反復配列が多く含まれることを鑑み、厳しい閾値を採用した。それぞれの塩基配列(約 36 万個)を RefSeq と対照した結果(1)一意に配置(2)両末端が対面する方向に配置(3)両末端間の距離が 100-200kb の 3 つの条件を全て満たす DNA 断片のみが地図作成に使用された。この結果、約 10 万の DNA 断片がマップされた。マップされなかった断片の多くは位置が一意に決定できなかったもので、末端配列がヒトゲノムの 5 割以上を占めるとされる反復配列中に含まれる場合がこれに相当すると考えた。

BAC両末端塩基配列解析によるマッピング

図 1-11



BLAST の結果によって得られた RefSeq 上の座標を元に「日本人ゲノム物理地図」を完成した。この物理地図により、全長 2.8GB(28 億塩基)の全ヒトゲノム染色体領域について 2 万個の既知遺伝子、1000 万個の SNP について偏りなくカバーするようにライブラリが分布していることが明らかとなった。プロジェクトの中間評価では全ゲノム領域のカバー率は 84%であったが、最終的に 96%を越え、冗長度においても 4 を越えた。カバー率を上げるには 90%を越える段階からマップ率が大きく低下する事が知られており、実際に 84%から 96%には倍の数のクローンの解析が必要であった。

日本人ゲノムライブラリーの断片平均断片長は 130kb(13 万塩基)で、これは標的となる遺伝子 1-4 個の領域を非コード領域も含めて十分カバーする長さである。このライブラリーを評価すすため、遺伝子、dbSNP に登録されている SNP、Affymetrix 社の SNP チップに採用されている SNP についてもそれぞれ集計したところ、いずれも 96%を上回っていた。このデータは日本人の遺伝子領域のほとんどについて JY2 ライブラリがゲノムリソースとして適用可能であることを意味する。性染色体、特に Y 染色体のカバー率は 60%と低いが、その理由として常染色体は 2 本ずつ得られるが性染色体は X と Y の各 1 本ずつしか得られないこと、反復配列が特に多く含まれるため一意にマッピングされにくかったことが考えられる。9 番染色体のセントロメア付近がカバーされていないが、この領域については正常な日本人で欠損している例が報告されている。また、カバーされていない領域は CNV 領域に多く見られた。これらの結果から、JY2BAC ライブラリでカバーされていない領域には「日本人にはそもそも存在しない」領域が多く含まれていると考えられた。これは NCBI の塩基配列が不完全であったため真摯に検討されていなかったが、ライブラリーを構築することにより初めて明らかとなった。

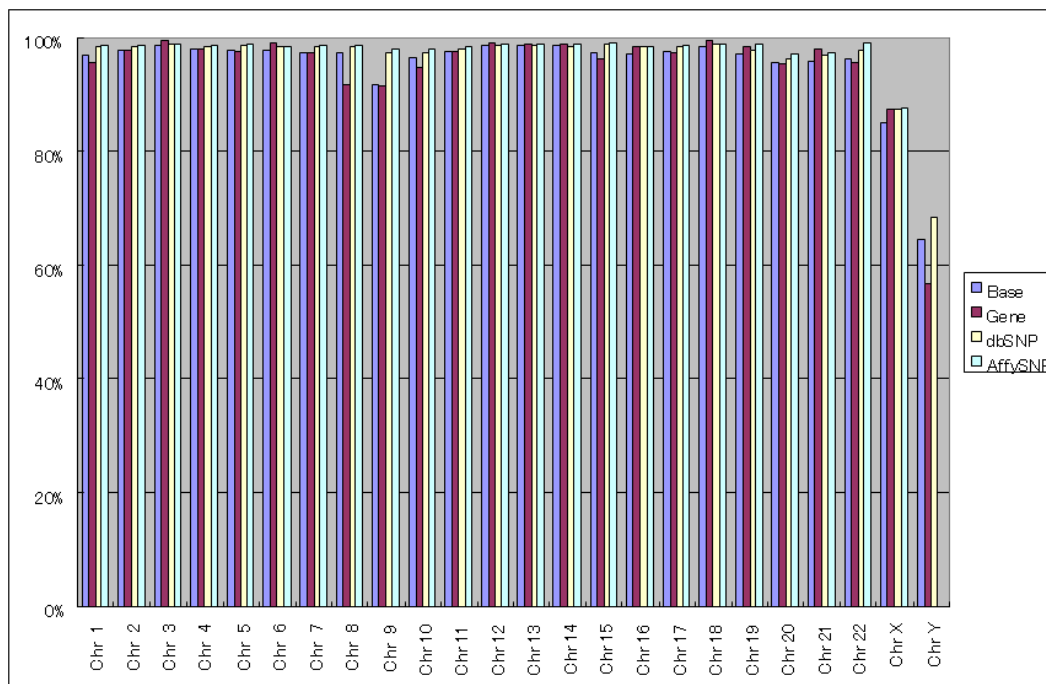


図 1-12

日本人ゲノム物理地図構築の結果、ターゲットとする遺伝子あるいは領域について 100-200kb 程度の大きさの「日本人男性由来の DNA 断片」が容易に取得可能となった。また現在、次世代型シーケンサーと呼ばれる塩基配列解析装置が国内でも稼働しつつある。これらのシーケンサーは正確な参照配列(リファレンス)を使用することで最大の機能を発揮するとされているが、ターゲットとなる領域の正確な参照配列情報を取得するためのツールとしても大変有用である。このライブラリをゲノムリソースとして活用することにより「日本人のゲノム」に関する研究が大きく前進することが期待される。

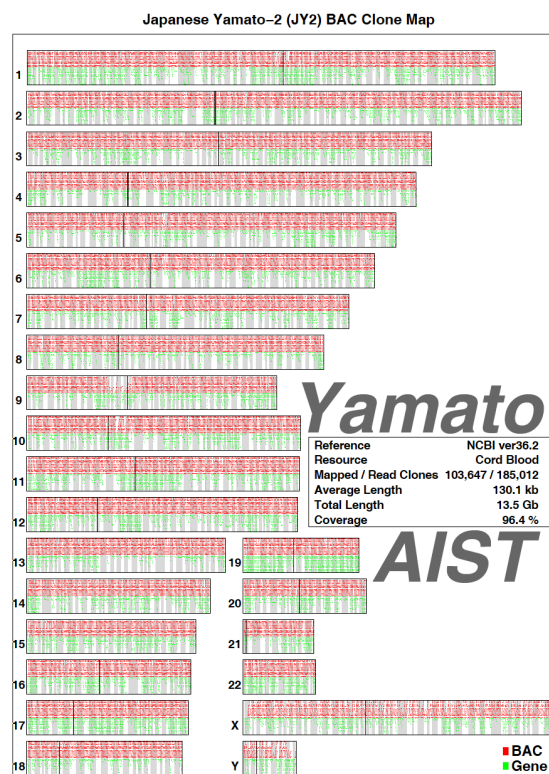
図 1-13

産総研オリジナル 日本人BACライブラリ (JY2 : 33万クローン)

由来 遺伝学的確定日本人臍帯血
 解析総数 185,012クローン
 マップ数 103,647クローン
 マップ率 56.0%
 BAC平均長 130.1kb
 BAC総延長 13.5Gb
 カバー率 96.4%

NCBIヒト染色体(v36.2)
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/RefSeq/>
 BLASTによる日本人BACクローン配置地図

日本人標準ゲノム決定
 強力なツール



本プロジェクトで構築された日本人ゲノム物理地図により、ターゲットとなる領域に存在する DNA 断片を迅速に選択可能となった。DNA 断片の塩基配列の決定(コンセンサス構築)の高速化はターゲット領域の塩基配列の迅速な取得に直結する。そこで、各方面からの「本当に日本人と言えるのか」との指摘に答えるため、このライブラリの日本人との判定に用いた 4 個の HLA(ヒト白血球抗原: human leukocyte antigen)遺伝子座の内 1 個を包含する DNA 断片のうち1つについてキャピラリーシークエンサーを用いたショットガンシークエンスにより全塩基配列解析を行った。HLA は移植適合性の判定にも用いられ、主要組織適合抗原遺伝子複合体(MHC: Major Histocompatibility Complex)とも呼ばれる。抗原をコードする領域は 6 番染色体短腕上 3.6Mb にわたって存在し、HLA 領域と呼ばれクラス I と II に大別される。HLA 領域に存在する遺伝子は人種や民族により強く保存された特徴的な組み合わせをもち、これらは連鎖不平衡と呼ばれる。ゲノムライブラリーによりクローン化された DNA を用いることにより、これまで計算上でのみ議論されてきた連鎖不平衡が塩基配列として明示される。さらにヒトには母方と父方から 2 本の染色体を受け継いでいる。したがってヒトゲノム配列は対として明示されるべきであるが、国際ヒトゲノムコンソーシアムの結果は 1 本に過ぎない。ライブラリーによりこの問題が解決できる。

日本人BACの塩基配列決定

ヒト6番染色体短腕HLA領域 (6p21.31)

人種により高度に保存された領域

クラス I HLA-A

クラス II HLA-C

HLA-B

HLA-DRB1

HLA-DQB1

HLA-DPB

HLA ヒト白血球抗原 (human leukocyte antigen)
ヒト白血球の細胞表面に存在する抗原
ヒト6番染色体短腕上に密に連鎖して存在する遺伝子産物
クラス I と II に大別、人種や民族に特徴的な配列
移植適合性の判定にも用いられ主要組織適合抗原とも呼ばれる

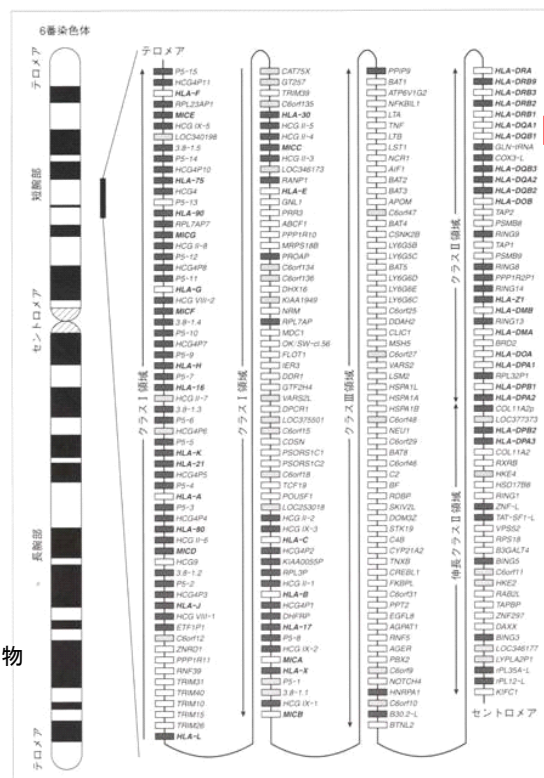


図 1 HLA 領域の遺伝子構造

□ は発見遺伝子、■ は偽遺伝子、□ は発見可能遺伝子をそれぞれ示す。また、太文字は HLA 遺伝子を示している。

図 1-14

キャピラリーシークエンサーで一度に読取可能な長さは最大でも 1,000 塩基程度である。このため、より長い塩基配列を決定するためには、選択した約 170K の DNA をさらに細かく断片化し、再び大腸菌に挿入し、クローン化する必要がある。このクローンを増幅し、両末端の塩基配列をそれぞれ解析し、断片塩基配列情報を重ね合わせゲノム配列をアセンブル(再構築)する必要がある。今回は再断片化したゲノム DNA の両末端にそれぞれ SP6、T7 プライマーを接続し、その塩基配列をキャピラリーシークエンサー 3730xl (Life Technology 社) で解析した。

アセンブル作業をまずは従来法において一般的なアセンブルソフトである Sequencher (Soft Genetics 社) を使用して行ったところ、6 本のコンティグ(連結断片)が構築された。10 倍以上の冗長度であるにもかかわらず配列が 1 本につながらないのは、Greedy 法を使用しているため、反復配列部分でコンティグが切断されることが主な理由である。これらのコンティグ同士をさらに結合するためにはギャップクローニングと呼ばれる作業が必要になる。ギャップクローニングは全てのコンティグの組み

合わせに対してプライマーを設計し、増幅したものをシーケンスし、コンティグ同士が結合するまで末端を延長していく手法である。プライマーの数はコンティグ数に応じ、増加する。6本のコンティグであれば初手で $(6 \times 5) \div 2 = 15$ 組のプライマーを設計する必要がある。塩基配列決定作業においてはギャップクローリングに要する時間が最も大きい。反復配列が含まれる割合は、微生物のような構造の単純なゲノムにおいては1%未満であり、解析に際して大きな障害にはならない。また、Greedy法は計算量が少なく済むこともあり、DNA断片の塩基配列を決定するためにしばしば用いられる。しかし、ヒトゲノムにおいて反復配列は50%以上を占め、特にAluと呼ばれる約300塩基の長さをもつ特徴的な配列がヒトゲノム中には100万個以上含まれているとされる。

ヒトゲノム解析はなぜ難しい 反復配列

図 1-15

全体の**52%以上** (1.56 Gbp / 3 Gbp)

数塩基 (約 3%)	500 bp以下 縦列型反復配列: STR (short tandem repeat) マイクロサテライト等	AAAA CA CA CA CAG CAG (トリプレットリピート)
数10塩基 (約 15%)	500 bp以上 STR, 可変反復配列: VNTR (variable number tandem repeat) ミニサテライト、テロメア配列等	TTAGGG CAGTCGTAA ACAGGGTGTGGGG.....
数100塩基 (約 13%)	短鎖散在反復配列: SINE (short interspersed nuclear element) アルフォイド構造(セントロメア)	Alu配列 (100万個)
数1,000塩基 (約 21%)	長鎖散在反復配列: LINE (long interspersed nuclear element)	レトロボゾン型、非レトロボゾン型等

反復配列はかつて「がらくた(ジャンク遺伝子)」とされてきた

反復配列はかつて、ジャンク(がらくた)遺伝子とされてきた。このため、反復配列領域の正確な配列を得ることは重要視されてこなかった。しかし、ヒトゲノム計画以降、ポストゲノム解析の発展とともに徐々にその機能が明らかになりつつある。Alu配列は遺伝子発現の調節に関与することが明らかになった。3塩基の反復配列の異常伸長がトリプレットリピート病と呼ばれる遺伝子疾患の原因となることもわかってきた。現在では、反復配列領域にも重要な機能が存在するという見解が一般的である。このことから、配列決定に際しては、反復配列も含めた新しいアセンブル手法の確立が必須であると考えられた。

塩基配列解析手法については2006年以降1000ドルゲノムプロジェクトにより劇的進化が見られた。2000年のキャピラリーシーケンサーの開発は技術的進歩であったが、2006年これを遙かに上回る技術革新がスタートした。この革新は「次世代シーケンサー」と呼ばれるが、従来のキャピラリーシーケンサーの1000倍の解析能力を有する装置システムの出現である。一回の解析で出てくるデータ量はTeraに達し、現行の情報処理技術を一変させた。この技術革新がアセンブルソフトにも変革をもたらされた。

反復配列が関与する疾患

図 1-16

・ACE遺伝子(17q23.3)第16エクソンへのAluの挿入、欠失が**心筋梗塞**や**虚血性心疾患**の危険因子

Nature. 1992 Oct 15;359(6396):641-4.

・**統合失調症**発症の危険度を、Fyn遺伝子(6q21)のイントロン中に存在する反復配列の欠失により判定

特開2007-236300(P2007-236300A)

・トリプレットリピートの異常伸長が関与する疾患(下記)は**トリプレットリピート病**に分類される

脊髄小脳変性症(1型、2型、6型、7型)

マチャド・ジョゼフ病 (脊髄小脳変性症3型: **日本人に多い**)

ビタミンE単独欠乏性失調症

ハンチントン病(**欧米人に多い**)

歯状核赤核・淡蒼球ルイ体萎縮症

筋強直性ジストロフィー

球脊髄性筋萎縮症

フリードライヒ失調症

脆弱X症候群

ATXN1(6p23) etc.

ATXN3(14q24.3-q32.2)

TTPA(8q13.1-q13.3)

HTT(4p16.3)

DRPLA(12p13.31)

DMPK(19q13.2-q13.3)

SMN(5q13)

FXN(9q13-q21.1)

FMR1(Xq27.3)

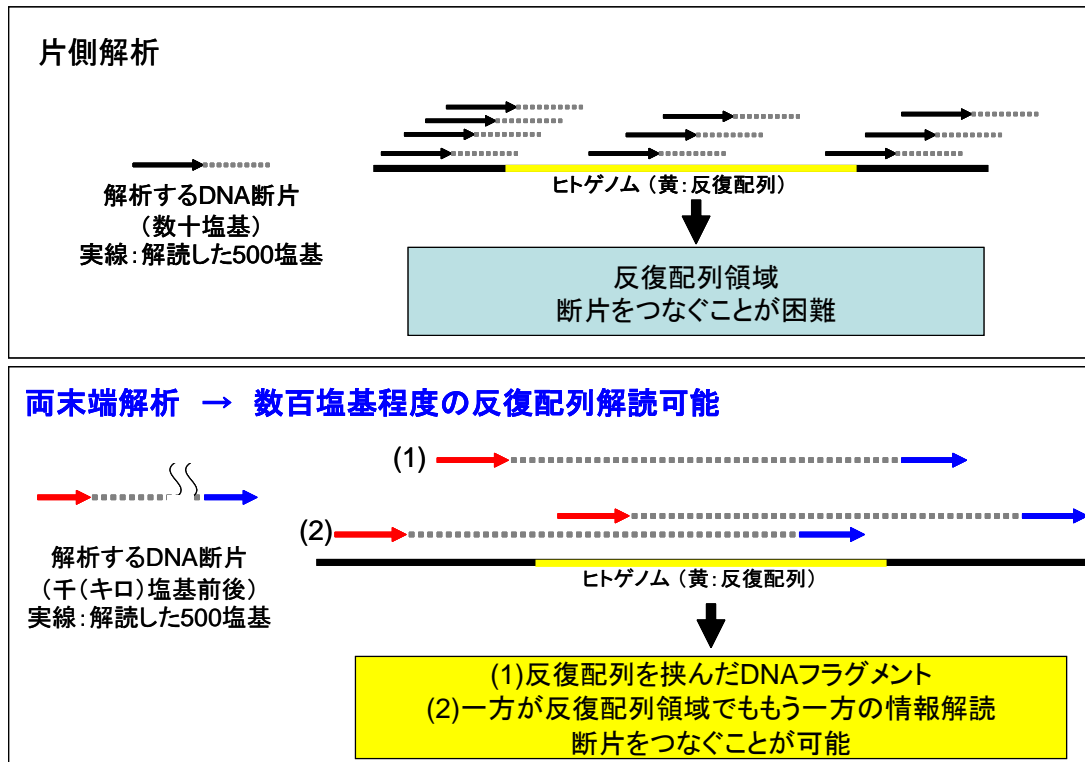
疾患原因遺伝子の研究には反復配列の解析が欠かせない

反復配列を含む領域をアセンブルするためには反復配列領域をまたぐような断片の情報を利用してリード長を補うのが基本であり、このためには両末端解析が重要である。しかし Greedy 法でアセンブルする場合、アセンブルソフト上では両末端間の距離は考慮されない。このため、アセンブル結果の配列に対してサブクローンごとに両末端間の距離を検証し、誤りがある場合は手作業で直すのが一般的である。この作業にしばしば使用される Consed や Sequencher 等のソフトは、この作業を行いやすいよう、グラフィック機能やエディット機能などが使いやすくなっている。それでもこの作業に要する時間は膨大になりがちであり、特に反復配列の多い領域については顕著である。

反復配列の領域の解析法について考え方を整理すると、反復配列のランクが問題となる。前掲のごとく反復配列には数塩基、数十塩基、数百塩基、数千塩基があるが、これまで解析の目的とされたのが数百塩基であり、キャピラリー型シーケンサーの 1000 塩基はこれを越えたことに意義があった。仮に代表的な約 300 塩基の反復配列が続いたとして、その領域より長い断片があれば、片側が反復配列にとらわれたとしても、反対側が反復配列の外にあれば、長さが一定であるという前提が達成されれば、アセンブルを完成させることが可能となる。

両末端解析の重要性: ヒゲノム反復配列周辺の解析

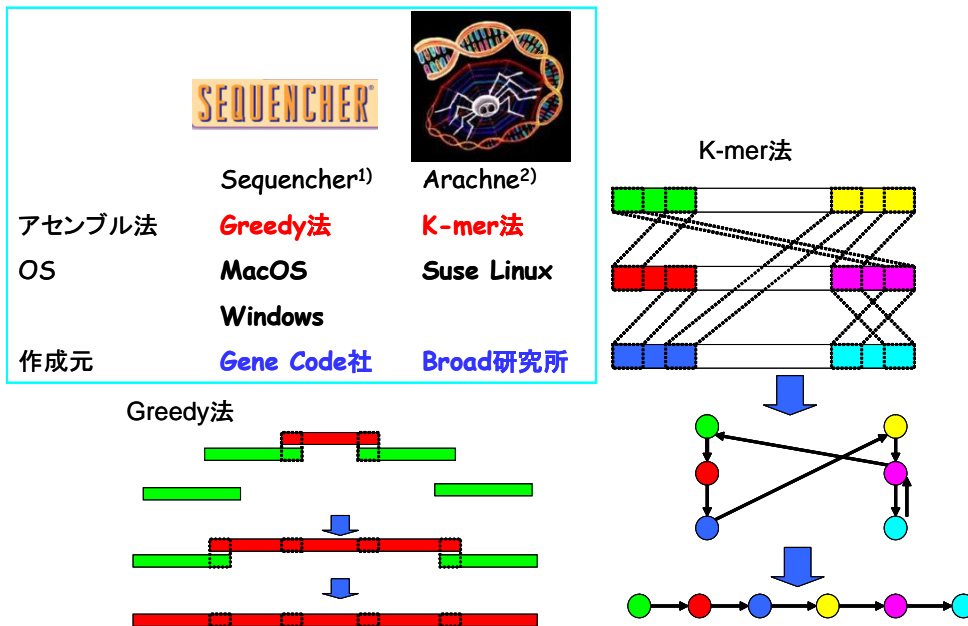
図 1-17



次世代シーケンサーのアセンブルソフトの代表として反復配列を含む配列の効率的なアセンブルを可能にする手法 K-mer 法を採用した。K-mer 法はグラフ理論を使用することにより、ショットガン両末端の間の距離を考慮したアセンブルが可能という点が Greedy 法と大きく異なる。K-mer 法の前提として断片化した DNA の長さの分布 (SD 値) が 5% 以下であることが要求される。この達成には新しい非酵素的ランダム断片化手法および高度精製法の開発が必要となる。K-mer 法の採用により、ギャップクローニングの量を大幅に軽減することが可能になった。また、総当たり解析を行った場合と同じ結果をより少ない計算量で求められるという点から、次世代シーケンサー用のアセンブルソフトの多くにおいても K-mer 法が採用されている。K-mer 法を使用したアセンブルソフトを比較検討した結果、QV(シーケンスデータの品質)を考慮したアセンブルが可能という理由から Arachne(Broad 研究所)を採用した。Arachne は Unix 系ワークステーションでの使用を前提としてプログラムされており、Windows や Macintosh の一般的な PC へのインストールは想定されていない。今回は、Broad 研究所のホームページ(<http://www.broadinstitute.org/>)より Arachne3.1.0 のソースコードをダウンロードし、コンパイルしたものを openSUSE 11.1 をインストールした専用のワークステーションで使用した。この程度の作業であれば大型のスーパーコンピュータの必要はない。

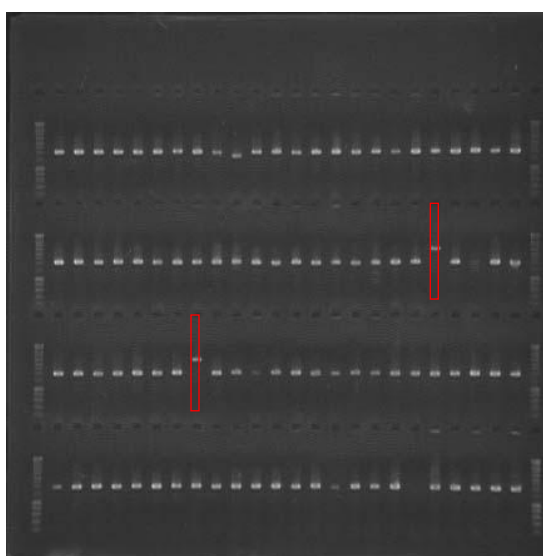
アセンブルソフトの比較

1) <http://www.genecodes.com/>
 2) <http://www.broadinstitute.org/science/programs/genome-biology/crd/>



K-mer 法を使用したアセンブルを行うためには(1)大きさの揃ったクローンからなるショットガンライブラリの構築(2)キメラクローンの除去(3)品質(QV:Quality Value)の高いリード、といった要素が重要である。(1)は DNA 断片の大きさの SD(標準偏差)が 10%以下であることが求められる。従来のサイズセレクションでは SD25%前後である。しかしハイドロシェアを使用したシェアリングの後、電気泳動とアガロースゲル切り出しを 2 度繰り返すことで 2kb±80bp のライブラリ(SD4%)を得ることを可能にした。(2)についてはキメラクローンの混入率が 5%以内であることが求められる。これについては泳動により大きさの明らかに異なるクローンを選別することでほぼ完全な除去が確認された。

アガロースゲル電気泳動によるキメラクローン検出



キメラクローン
 DNA断片化後に再結合
 倍数の大きさの断片発生

Arachneアセンブルではクローン
 長の均一性が重要
 キメラ混入はアセンブルミスにつ
 ながる *Nature (2000), Venter

2K切断
 pUCライブラリクローン長が揃って
 いる(1850±80bp)
 キメラクローンを電気泳動で確認
 →シーケンスによりキメラを確認

(3)はベースコールソフトウェア Phred を使用し、QV30 でのトリミングを行うことでそれぞれ達成した。今回使用した QV30 を使用したトリミングによりリードエラーが 1000 塩基に1つ(0.1%)未満に抑えられる。また、トリミング後のリード長が 508 塩基と Alu の一般的な長さ(300 塩基)より十分長く、アセンブルに必要な長さを満たしていると考えられた。

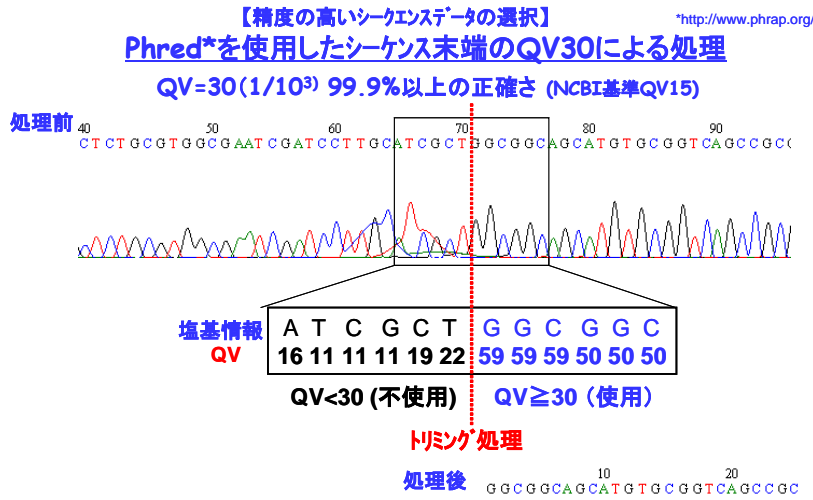


図 1-20

- ・QV30以下トリミング処理 →信頼に値する部分のみアセンブルに使用
- ・トリミング処理後の有効塩基数 平均508bp
- ・代表的な反復配列単位であるAlu(300bp)を大きく上回る

(1)(2)(3)を満たしたリードのみを使用し、Arachne を使用したアセンブルを行うことにより、およそ 17 万塩基からなる 1 本の完成配列を得た。この長さから計算されるシーケンスの冗長度はおよそ 16 倍であり、Arachne を使用したアセンブルによる適切なコンセンサスを得るために必要な冗長度(10 倍以上)を満たしていた。また、リファレンス配列(173,532 塩基)から想定される大きさと矛盾しないことなどからこのコンセンサスは正しいものと判断した。

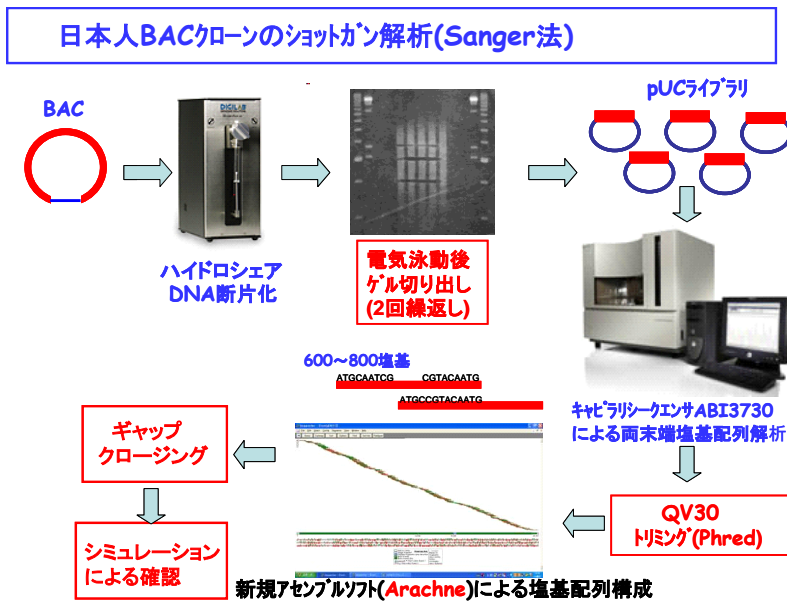
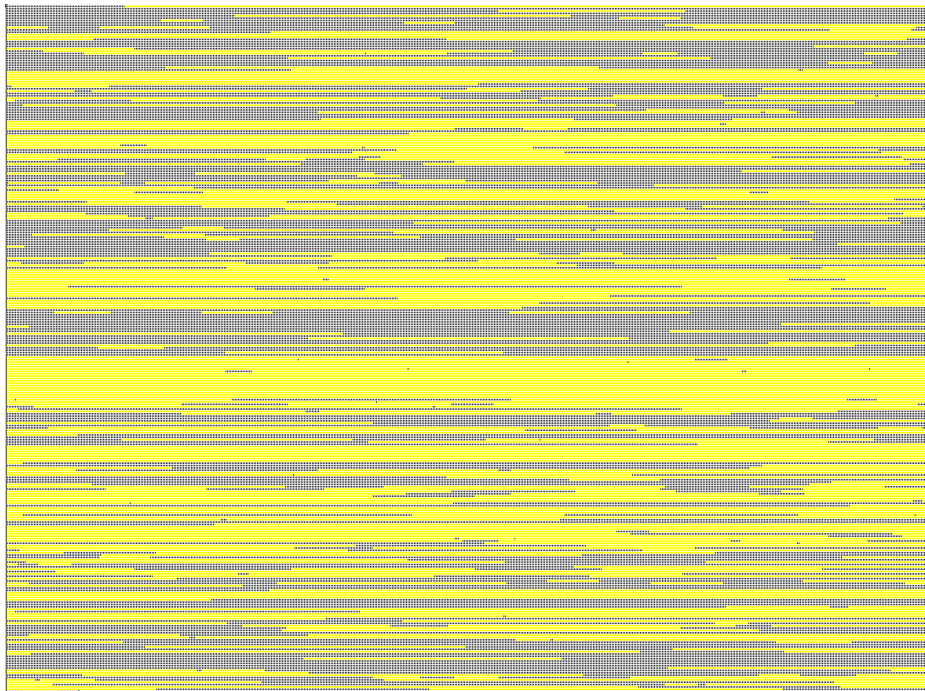


図 1-21

日本人BAC(6番染色体短腕HLA領域)全体図

黄色 : 反復配列

図 1-22

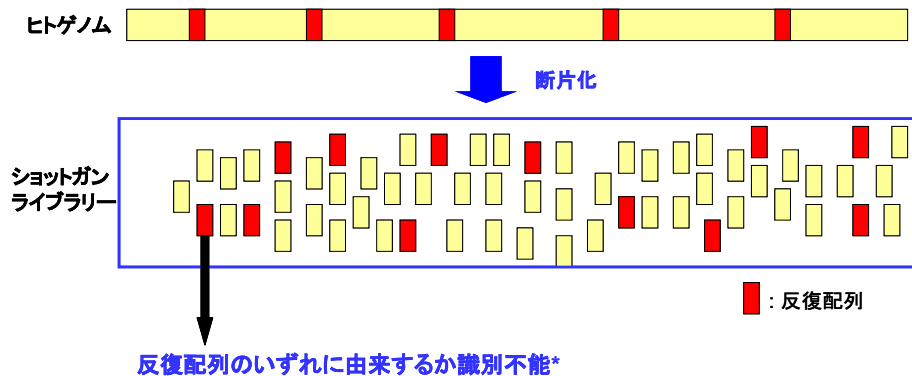


反復配列**52.9%**(90,816/171,735)、ホールゲノム解析では決定不能

この領域には 53%もの反復配列が含まれていることが明らかになった。これだけの反復配列を含む領域の塩基配列を完全決定できた背景には JY2 が単に日本人のゲノムリソースであるというだけでなく、クローンライブラリであるということが大きい。

ホールゲノムショットガン法(WGS)

図 1-23



反復配列のいずれに由来するか識別不能*

*Michael Sipser, *Introduction to the Theory of Computation*, PWS Publishing Company, 1997.

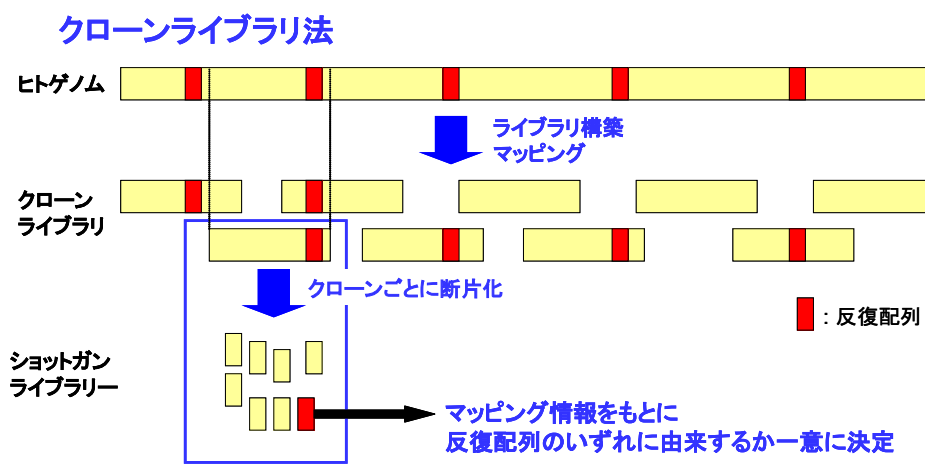
長所 : ライブラリ構築の必要が無い

→ゲノム構造が単純な生物のゲノムを**高速、低コスト**に決定
(ex: 微生物の反復配列は1%未満)

短所 : 反復配列のアセンブルができない

→(反復配列が58%を占める)ヒトゲノムの配列完全決定は**困難**

微生物ゲノム高速解析におけるスタンダード



長所：反復配列のアセンブルも可能
 →(反復配列が58%を占める)ヒトゲノムの配列も決定

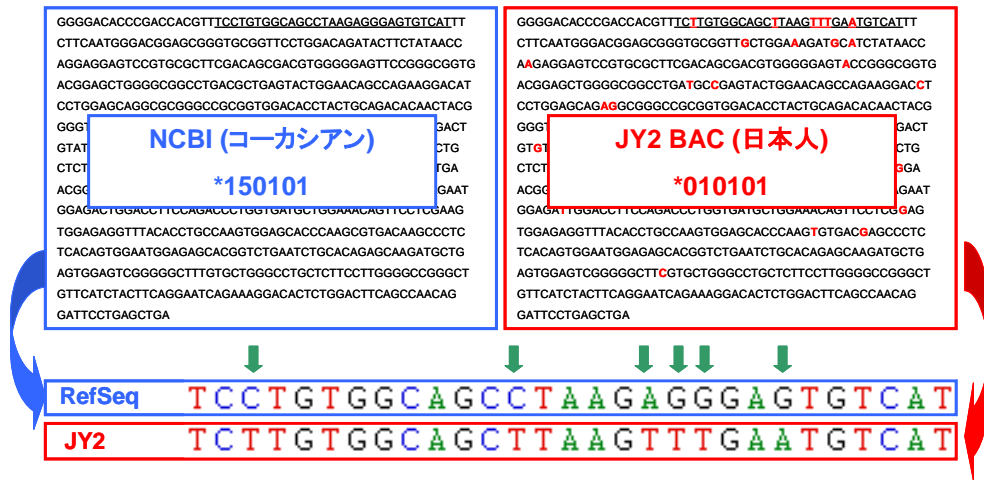
短所：**ライブラリ構築、マッピングが必要**
 →(ゲノム構造が単純な)下等生物の配列決定においては**高コスト**

ヒトゲノムをde novoで完全決定できる唯一の方法

ゲノム塩基配列を決定するためには大きく分けてホールゲノム法とクローンライブラリ法の2つが存在する。ホールゲノム法はライブラリ構築が一度で済むことから、高速かつ低コストの解析が可能である。この手法によりゲノム解析の速度は飛躍的にアップし、現在では微生物のゲノム塩基配列決定のスタンダードとなっている。しかし、この手法には反復配列領域の決定が困難という問題が存在する。クローンライブラリ法は BAC などのライブラリを一度構築、マッピングする必要があるが、日本人 BAC ライブラリの構築、さらには日本人ゲノム物理地図の完成により、これが可能になった。今回配列決定した DNA 断片と同じ領域を仮にホールゲノム法で解析したとすると、50%以上を占める反復配列の部分についても解析不能である。このことから、この領域を決定するにはクローンライブラリ法が必須であることは明らかである。

この配列を同じ領域の国際ヒトゲノム塩基配列(RefSeq)と比較し、100 塩基以上の大きな欠損、挿入、転位を 10 箇所見出した。また RefSeq と異なる塩基部位は一塩基多型(SNP)に相当するが、国際 SNP コンソーシアムデータベース(DBSNP)にはそのうち 4%しか登録されていないことが明らかとなった。このことは DBSNP をベースとして設計されているアフィメトリックス社等の SNP アレイがこの領域については日本人に対して有効でないことを意味している。また日本人の SNP データベースである JSNP における登録割合も半分以下であった。以上の結果から「日本人」は国際ヒトゲノムコンソーシアムで解析されたコーカシアン系ゲノムと大きく違うことを明らかにした。また、日本人特有の未知の多型が多く存在することを明らかにした。RefSeq との比較では 4%の違いが存在することが明らかになった。この結果は JY2 が日本人ゲノムリソースとしての有用であることを示した。

HLA – DRB1発現遺伝子の多型解析



発現遺伝子のコード領域において
日本人BACとコーカシアンで
28 / 798塩基(3.5%)の差

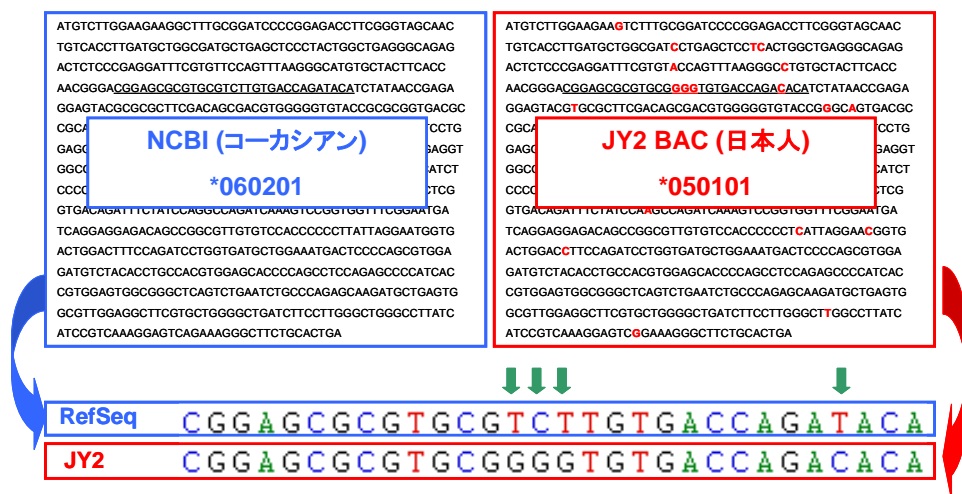
HLA-DRB1
*0101は自閉症のリスクが6倍以上
*1502は潰瘍性大腸炎のリスクが4倍

J Neuroimmunol 67:97-102, 1996.

遺伝子タイプの違いが疾患リスクの大きな差に

遺伝子領域についても塩基配列の検証を行った。JY2 ライブラリ構築に際しては4つの HLA 遺伝子について検査が行われた。今回塩基配列が決定された DNA 断片にはそのうちの1つ、HLA-DRB1 が含まれることが日本人ゲノム地図より明らかになっている。HLA 遺伝子は多くの疾患に関与することがこれまでの研究より知られているが、HLA-DRB1 も自閉症、潰瘍性大腸炎などの疾患のリスクに関与することが知られている。HLA 遺伝子検査から JY2 の HLA-DRB1 多型は HLA-DRB1*0101 または HLA-DRB1*1502 のいずれかであることが明らかになっているが、今回解析した DNA 断片は HLA-DRB1*0101 を含むという結論を得た。この多型は自閉症のリスクが他の多型と比較して 6 倍以上であることが医学的な研究より明らかになっている。また、RefSeq に登録されているコーカシアンの多型である HLA-DRB1*1501 は過睡眠症(ナルコレプシー)のリスクが他の多型と比較して 1000 倍以上であることがやはり医学的な研究より明らかになっている。

HLA – DQB1発現遺伝子の多型解析



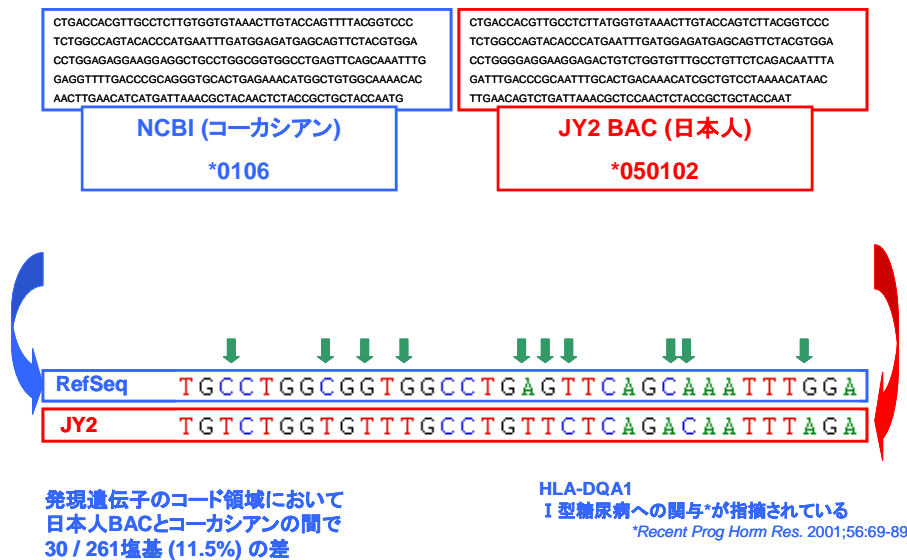
発現遺伝子のコード領域において
日本人BACとコーカシアンの間で
28 / 783塩基 (3.6%) の差

HLA-DQB1
HLA class II complexを構成する遺伝子の1つ
関節リウマチへの関与が指摘されている
**Recent Prog Horm Res. 2001;56:69-89.*

HLA 領域は連鎖不平衡が強く見られ、その組み合わせは人種、民族により強く保存されていることが知られている。解析した DNA 断片には HLA-DRB1、HLA-DQB1、HLA-DRA1、HLA-DQA1 の 4 つの遺伝子が含まれる。このうち、HLA-DRB1 と HLA-DQB1 および HLA-DQA1 について日本人における連鎖不平衡の組み合わせが知られている。解析結果をもとに各遺伝子の多型を調べたところ、HLA-DQB1*0501-HLA-DQA1*0501 と日本人に一般的な組み合わせの一つであることが確認された。これらはそれぞれ関節リウマチ、I 型糖尿病など疾患リスクへの関与が指摘される遺伝子である。今回、これらの遺伝子について正確に多型が判定できたことの意義は大きい。

HLA - DQA1 発現遺伝子の多型解析

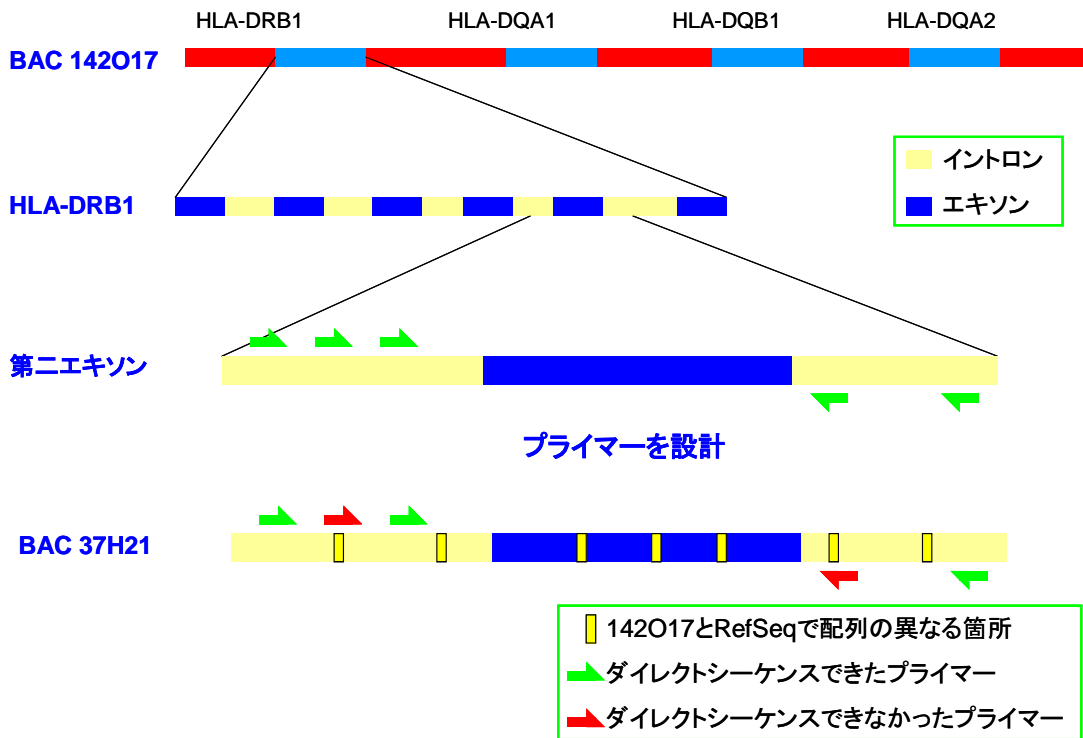
図 1-27



さらにこの完全塩基配列した断片ゲノム情報から同一領域のハプロタイプを検出し、2 つめのゲノム断片の完全塩基配列解析を行った。ハプロタイプとは母方と父方からの一対の染色体を意味している。遺伝子 HLA-DRB1 は 6 つのエキソンから構成され、850 種類以上の多型が存在することが知られているが、その多型の多くが第 2 エキシソンの配列により識別可能である。今回解析した DNA 断片の完全長塩基配列の情報をもとに、第 2 エキシソンを挟むようにプライマーを設計した。このプライマーを使用して同領域にマップされた DNA 断片 5 つについてそれぞれを鋳型として増幅を行った。すると、そのうちの 1 つについて増幅されないプライマーが存在した。プライマーで増幅した配列を解析したところ、HLA-DRB1*1502 の配列の一部と一致した。また、増幅した配列と先に決定した DNA 断片配列とを比較したところ、増幅されなかったプライマー配列部分には断片配列と異なる部分が含まれていることが明らかになった。PCR で増幅されない可能性としては条件(温度、サイクル数など)が適切でないケース等も存在するが、この DNA 断片については多型の違いに因るものと考えられた。この断片を前述の 17K で確立した手法によりキャピラリーシーケンサーを用いて完全長塩基配列に供した。

HLA領域の日本人BACのタイピング

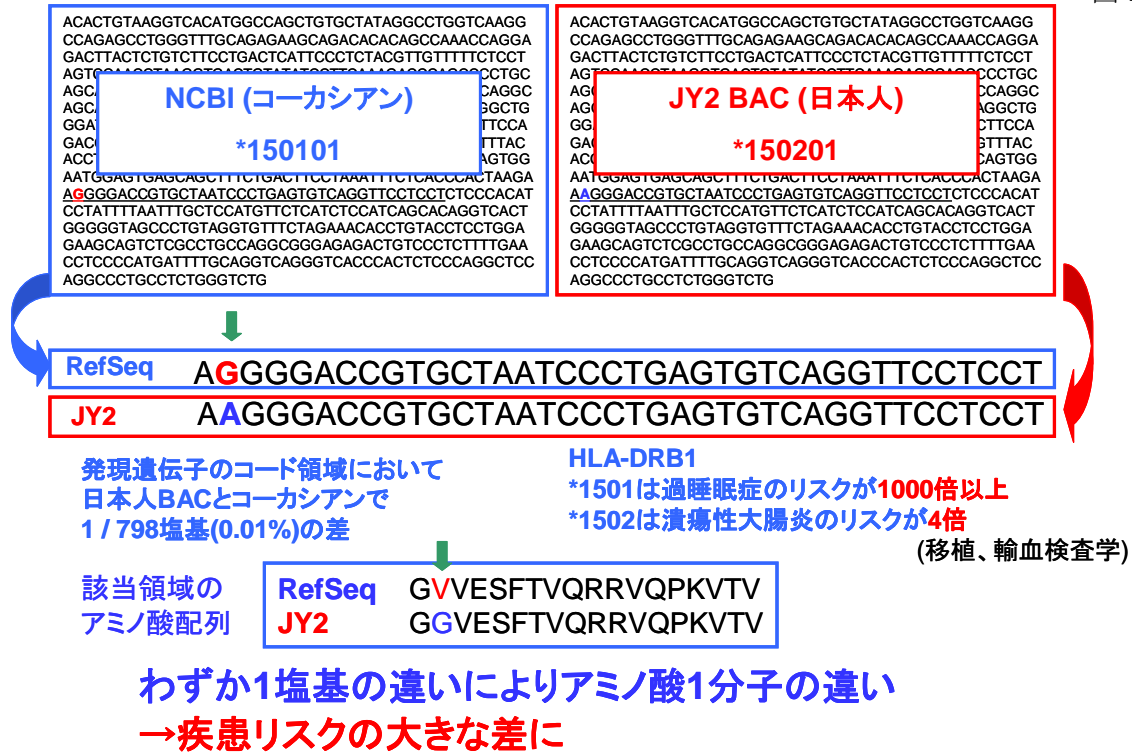
図 1-28



今回は 17K 断片の解析プロセスにさらに改良を加え、より効率的な塩基配列の構築を目指した。K-mer 法を使用したアセンブルソフトには、複数の大きさのライブラリを併用してアセンブルすることが可能なものが存在する。Arachne もその機能を有しており、複数の大きさのライブラリを併用してアセンブルすることでより正確なコンセンサスがより少ない解析量で得られる。今回は 1.5kb と 4kb の 2 種類のライブラリを構築し、アセンブルに供した。その結果、約 12 万塩基の全長にわたって塩基配列を決定した。塩基配列決定までに要した解析量は最初の断片の 1/3 であった。これにより、断片の塩基配列決定に要する時間を大幅に短縮することが可能になった。解析の結果、この DNA 断片には HLA-DRB1*1502 が含まれることが明らかになった。この多型は潰瘍性大腸炎のリスクが他の多型の 4 倍におよぶことが医学的研究より明らかになっている。HLA 遺伝子検査の結果からは HLA-DRB1*0101 および HLA-DRB1*1502 が報告されている。完全長塩基配列が行われた 2 つの DNA 断片の解析結果はこの結果と一致する。同じ領域について母親と父親由来の異なるハプロタイプの完全塩基対配列の解析は世界初の成果である。これらのハプロタイプはいずれも日本人において一般的によく見られ、コーカシアンには見られないものであった。

HLA – DRB1発現遺伝子の多型解析

図 1-29



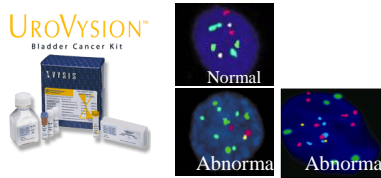
2) 日本人BAC DNAを用いた高精度全ゲノムアレイの開発

1992年に報告されたCGH(Comparative Genome Hybridization)解析は2つのサンプルに由来するDNAを異なる種類の傾向で標識し、競合的にハイブリダイズさせる手法である。癌はゲノムレベルでの変異を生じることが知られており、DNAマイクロアレイを検出に使用したアレイCGH法を使用することで、ゲノム全域にわたって変異の有無を簡便に高感度で検出することが可能となる。既に乳癌などでは診断用アレイチップが市販されている。しかし、これらはコーカシアンのゲノム情報を元に設計されており、日本人の診断においては擬陽性の問題が指摘されている。また、日本人特有の遺伝子領域については情報がないためそもそも診断不能である。2001年に発売された膀胱癌検出キットは国内申請が行われたが、人種差を理由に認可されていない。コーカシアンのゲノム情報をもとにコーカシアンに多く見られる乳癌の診断チップを作成しているのが成功の要因であると考えられる。日本人に特化した診断を行うためには、日本人のDNAをスポットしたアレイチップの開発が必須である。日本人BACライブラリはこのためのDNAリソースとして適切であると考えられた。

世界の癌診断用チップの実用化例

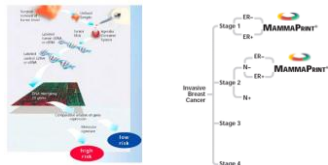
図 1-30

(1)2001年膀胱癌検出キット Uro Vysion



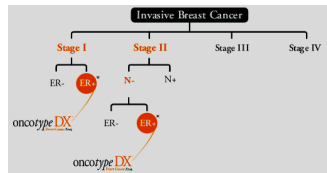
- ・尿中細胞を4個のFISH Probeで検査
- ・日本国内で申請されたが認可に至らず (人種差)

(2)2007年乳癌転移・予後予測キット MammaPrint



- ・オランダ発売 3,500USD

(3)2007年乳癌再発予測・化学療法効果予測 oncotypeDX



- ・イスラエル受託解析 1検体45万円

遺伝子チップとしてはオリゴアレイ、SNP チップ、BAC アレイなどの種類が存在する。オリゴアレイはドラフトゲノム配列が決定されている生物種についてレイアウトが容易である点が特長である。ヒトゲノムについても RefSeq の情報をもとに遺伝子のエクソンまたはプロモーター領域に特化して設計されたものが市販されている。しかし、数十塩基という短いオリゴ DNA をスポットするという性質から、位置特異性に欠けるのが欠点である。診断に応用する場合、その擬陽性が問題になることが想定される。SNP チップは SNP の変異を高感度で検出可能という特長から HapMap プロジェクトにおいて強力なツールとなった。人種によるゲノム構造の差を SNP の分布という形で示され、公開されている。しかし、SNP チップの設計にあたっては SNP に関する情報が必要である。現状、日本人の SNP に関する情報はまだまだ少ない。現に本プロジェクトで行われた DNA 断片解析より多数の未知の SNP の存在が明らかになっている。BAC アレイは少ないスポット数で広い領域の変異を検出可能であることが大きな長所である。前提条件として、BAC アレイの設計にあたっては BAC ライブラリの構築が必要である。本プロジェクトでは日本人 BAC ライブラリ JY2 を使用することで日本人に特化した BAC アレイの設計が可能になると考えられた。また、日本人ゲノム物理地図の情報を活用することで効率的にクローンを選択することが可能になると考えられた。

遺伝子チップの比較

図 1-31

オリゴアレイ (Agilent, Nimblegen)

長所：レイアウトが容易(ゲノム配列のみ)

短所：スポットの位置特異性に欠ける

→ヒトゲノムには反復配列が多い

SNPチップ (Affymetrix)

長所：SNPの変異を高感度で検出

短所：SNPに関する情報が必要

→日本人のSNPの情報は少ない

(dbSNP: 2,000万 JSNP: 50万)

BACアレイ (Macrogen, AIST)

長所：少ないスポット数で広い領域の変異を検出可能

短所：BACライブラリの構築が必要

→産総研日本人BACライブラリ(JY2)

全ゲノム領域をカバーするアレイの作成準備のため、市販の標準的アレイに採用されている領域にマップされた日本人 BAC ライブラリクローンを 4 千個選択した。この市販のアレイに使用されている BAC クローンには癌との関連が知られているものが 365 個含まれている。これらを大量培養増幅し、DNA 精製を行った。チップの作成方法はピンスポット法と

バブルジェットスポット法に大別される。今回は経済的な理由により、ピン法を使用して一枚のガラス上に 2 重にスポットしたアレイを試作した。

DNAチップ作成法 (スポットティング方式)

Pin Spot

TeleChem Stealth

d=250um 1.6万

70um 13万

BAC Spot Worldwide

Low Cost

Bubble-Jet Spot

d=25um

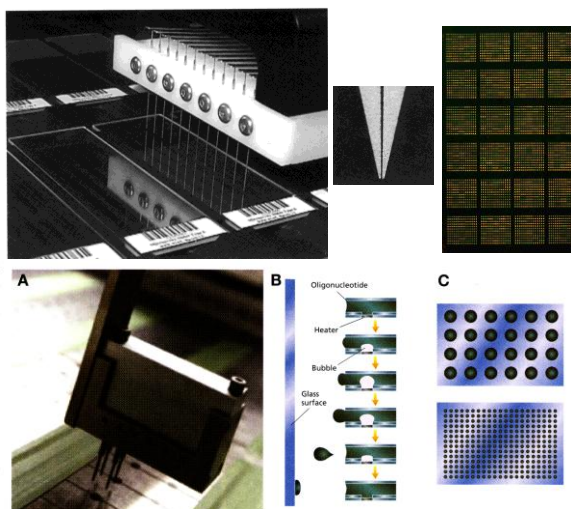


図 1-32

Figure 1. Spot the difference. (A) A pen tip assembly for cDNA spotting. (B) Non-contact printing using the Bubble Jet type print head. (C) Comparison of current quill pen tip cDNA microarray spot density (top) to projected Bubble-Jet spot density (bottom).

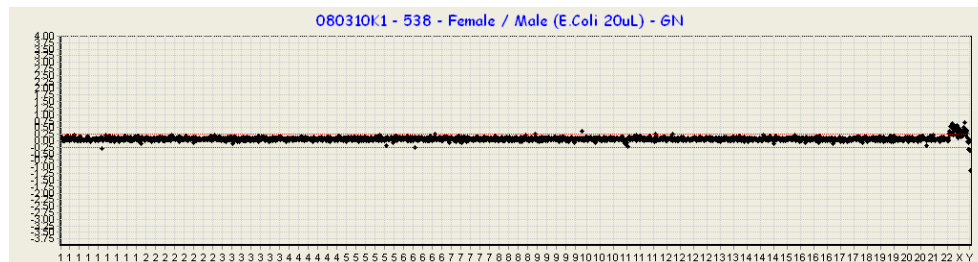
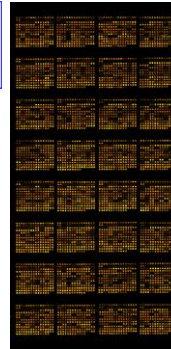
このアレイ上に異なる蛍光で標識した正常男性 DNA と正常女性 DNA を競合的にハイブリダイズさせ、このアレイの性能を評価した。この結果 1 番染色体から 22 番染色体の 2 色の蛍光強度の標準偏差 (SD) が 4% であった。これまで癌ゲノムの染色体解析に用いた標準的 BAC アレイの標準偏差が 5% であることから、試作した 4 千個を 2 重に搭載したアレイは市販の標準的アレイを上回る精度を持つことが示された。

【産総研】

日本人BAC4Kアレイ作成

図 1-33

- ・Y2ライブラリから4,096クローン増幅
- ・DNA精製
- ・ガラス基板上二重ピンスポット



Chr. 1-22: 0.029774 ± 0.046512
Average \pm SD(Log2ratio)

「日本人ゲノムライブラリ」の物理的地図が完成したことから、全ゲノム領域をカバーするアレイの設計を行った。全ゲノム領域をカバーするようなクローンの選択方法としては地図上での重なりを最小にする方法(MTP: minimal tiling path)、あるいは数を最少にする方法(MNP: minimal number path)の2つが有力である。前者は DNA の全長が最短となるため、ゲノムの塩基配列を決定するに際して解析すべきクローンを選択法として適している。今回はアレイにスポットする BAC の選択が目的であることから、経済的理由によりスポット数が最少となる後者を基本に 17280 クローンを選択した。

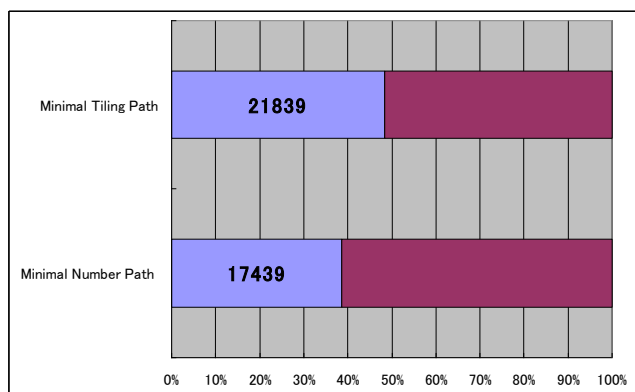
図 1-34

タイリングアレイの設計 -スポット用日本人BACクローンの選択-

- ・BACでReferenceの配列を最大限カバーする方法
 - (1) BACのoverlapを最小にする (minimal tiling path)
 - (2) BACの数を最小にする (minimal number path)

・少ないスポット数でカバーされる(2)を採用

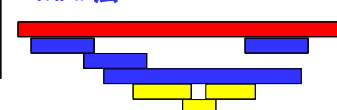
少ないSpot数で
最大のカバー率



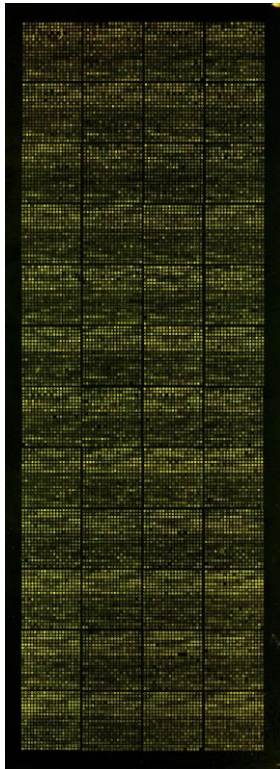
MTP法 *Numerische Mathematik (1959), 269-271*



MNP法 *The Art Of Computer Programming Vol 1.*

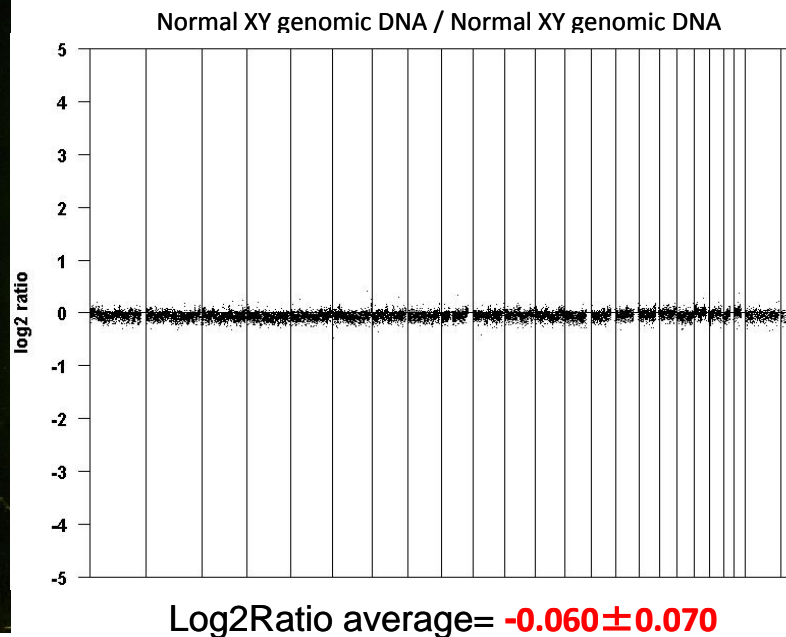


解像度は 0.16Mb となり、市販の標準的アレイの 4 倍となる。市販されているアレイスキャナで解析可能であることを前提にするため、ガラスの大きさは縦 $75 \pm 0.5\text{mm}$ 、横 $25 \pm 0.5\text{mm}$ 、厚さ $1 \pm 0.1\text{mm}$ に設計された。選択したクローンを直径 140–180nm、中心間隔 $230\mu\text{m}$ 、19 行 \times 19 列を 1 ブロックとして 4×12 ブロックにスポットしたアレイを作成した。このレイアウトは解像度が $0.5\mu\text{m}$ とされる市販の一般的なアレイスキャナを使用した解析に対応可能である。 $18 \times 54\text{mm}$ 、総スポット数は 17,328 となる。物理地図の情報を元に MNP 法で 17280 クロンを選択、全ゲノムアレイ用クローンプレートを作成し、各クローンを大量増幅、DNA を精製し、ピン法で 1 枚のガラス基板上にスポットした。



日本人BAC全ゲノムアレイ (17Kタイリングアレイ) 図 1-35

・Minimal Number Path (MNP)を基本に17,280クローンを選択



全ゲノムアレイの性能試験として、(1)正常男性同士のハイブリによる基線の分散値(SD)および(2)性染色体倍数体(X,XX,XXX,XXXX)の測定値の直線性を検討した。Axon 社製アレイスキャナを使用して $0.5\mu\text{m}$ の解像度でスキャンを行い、lowess 法を使用した平滑化を行った。(1)については -0.06 ± 0.07 という安定した基線が得られた。(2)においては米コリエル研究所(<http://ccr.coriell.org/>)より正常男性由来、正常女性由来、異数性染色体患者(3 種)由来の計 5 サンプルを正常男性由来の DNA とハイブリさせて直線性を検討した。直線性は正常男性を基準とし、X 染色体上のスポットの平均値を対数プロットした結果、 $R^2=0.99$ という高い精度の定量性が得られた。いずれにおいても市販の標準アレイに相当する性能であることが示された。この全ゲノムアレイを用いて胃癌培養細胞および癌臨床患者由来の DNA の解析を行い、増幅欠損部位および強度について有効性を検証した。

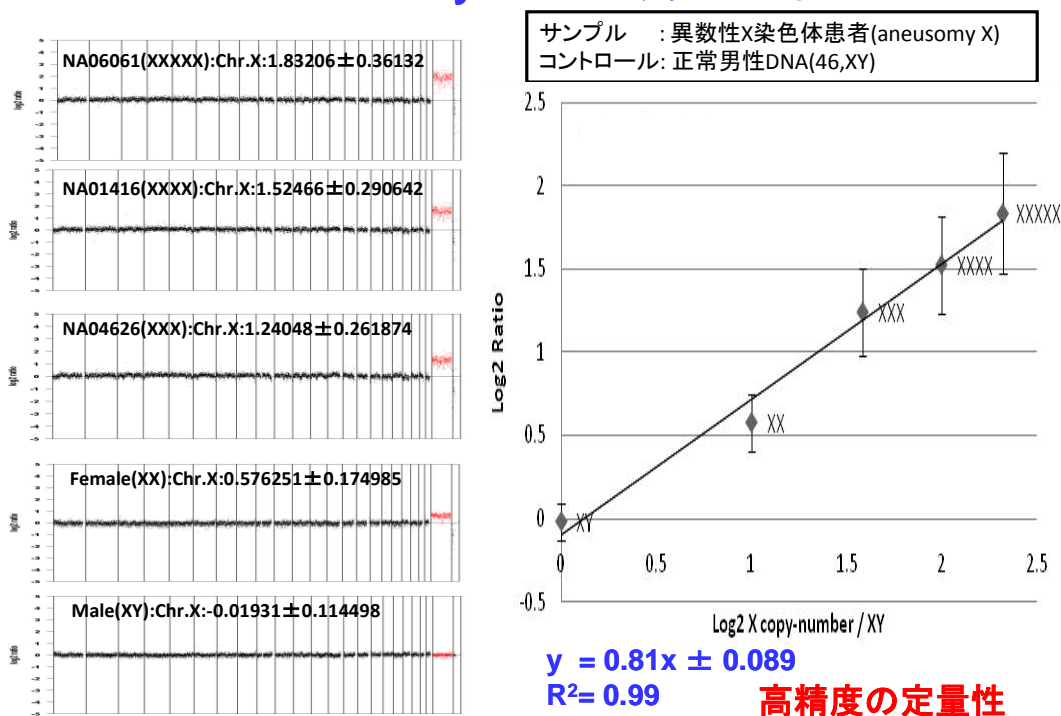
コピー数変化の検出性能評価に使用したDNA

入手元: 米コリエル医学研究所 <http://ccr.coriell.org/>

Name	Cell Type	Sex	Age	Chromosome	
NA15510	B-Lymphocyte	Female	不明	46,XX	正常ヒト女性由来 <i>therapeutics</i> 306:1210-8 2003
NA10851	B-Lymphocyte	Male	52	46,XY	正常ヒト男性由来 <i>J Biol Chem</i> 272:13974-9 1997
NA04626	Fibroblast	Female	21	47,XXX	異数性染色体患者由来 <i>EMBO J</i> 9:2923-9 1990
NA01416	B-Lymphocyte	Female	27	48,XXXX	異数性染色体患者由来 <i>Nature</i> 293:374-6 1981
NA06061	B-Lymphocyte	Female	2	49,XXXXX	異数性染色体患者由来 <i>Somat Cell Mol Genet</i> 14:371-9 1988

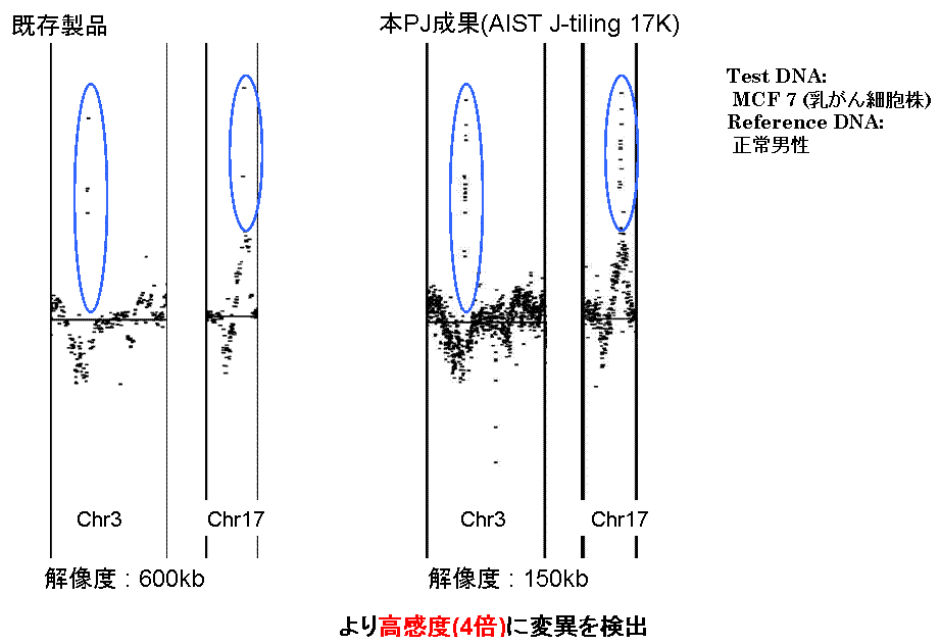
異数体(性染色体の本数が異なる)を
評価サンプルに使用

17K 日本人BAC Arrayのコピー数変化の検出能評価



既存製品と本PJ成果による解析結果の比較

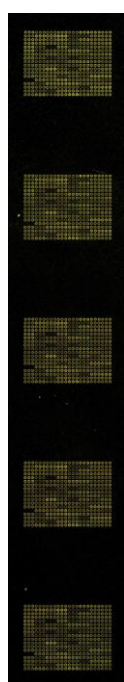
図 1-38



さらに「日本人ゲノムライブラリ」を用いて実際の癌の臨床診断に供する、絞った数のクローンからなるミニアレイの作成を試みた。胃癌の病態診断に有効なクローンを 84 個と基線維持に必要なクローンを 60 個選択し、ミニアレイ用クローンプレートを作成した。1つのクローンを 3点ずつ、24列(8クローン)×18行を 5.6mm×4.2mm の領域にスポットした。設計されたスライド 1枚で 5検体を診断可能である。全ゲノムアレイと同様に SD を測定したところ -0.021 ± 0.051 となり、市販の標準アレイと同等の性能であることが示された。

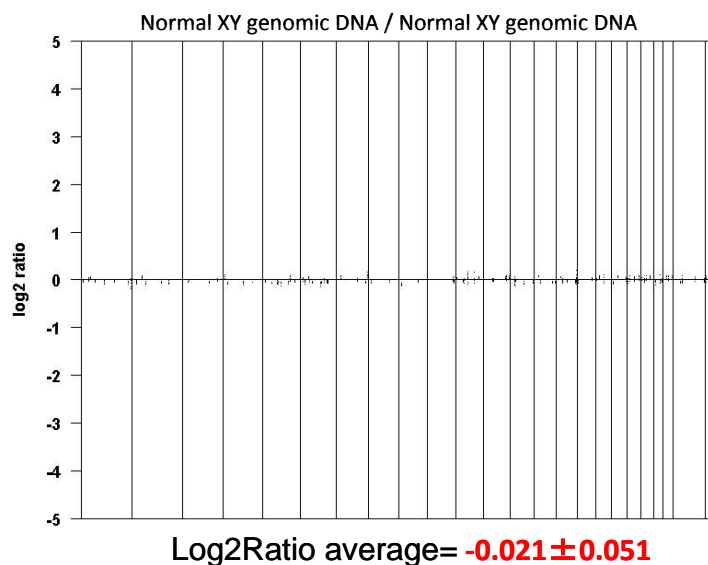
日本人BACを用いた胃癌病態診断用ミニアレイ

図 1-39



*胃癌病態診断用BAC 84個 (日本人BAC)
コントロール 60個 (日本人BAC)

*山口大



このミニアレイを用いて全ゲノムアレイと全く同じように胃癌培養細胞および癌臨床患者由来の DNA の解析を行い、増幅欠損部位および強度について有効性を検証した。培養株 8 株(男 5, 女 3)、臨床サンプル 15 検体(男 13、女 2)について検証を行ったところ、男性サンプル、女性サンプルいずれにおいても市販の標準的アレイと同等の結果が得られた。このことより日本人 BAC DNA をスポットしたアレイは診断用ツールとして有効であることが示された。また、診断の迅速化、コストダウンには絞られたスポット数でアレイを作成することが望ましいが、これにはクローンの選択が適切であることが重要である。日本人ゲノム物理地図はこの選択のためのツールとして非常に重要である。今後、医療の分野から得られた知見をもとにクローンを選択し、他の癌をはじめとする遺伝子疾患の診断にも応用が期待される。

CGH解析を行った胃癌細胞株

細胞株購入元: JCRB(独立行政法人医薬基盤研究所・生物資源研究部)
DNA精製: SepaGene(三光純薬株式会社) 図 1-40

Name	Sex	Age	
MKN45	Female	62	Poorly differentiated adenocarcinoma <i>Jpn. J. Cancer Res.</i> , 77: 849-853, 1986.
MKN74	Male	37	Tissue prepare : Liver metastasis <i>Jpn. J. Cancer Res.</i> , 77: 849-853, 1986.
KATOIII	Male	55	Signet ring cell carcinoma <i>Jpn. J. Exp. Med.</i> , 48: 61-68, 1978.
FU97	Female	66	Poorly differentiated adenocarcinoma <i>In Vitro Cell Dev. Biol. -Animal</i> , 35: 555-557, 1999.
NUGC-3	Male	72	<i>Jpn. J. Cancer Res.</i> , 81: 967-970, 1990.
NUGC-4	Female	35	Tissue prepared : Gastric Lymph node <i>Jpn. J. Cancer Res.</i> , 81: 967-970, 1990.
IM95	Male	63	Moderately differentiated Adenocarcinoma <i>Anticancer Res.</i> 20; 1263-1267; 2000.
SCH	Male	46	Choriocarcinoma <i>Nippon Byouri Gakkai Zasshi</i> , 61: 146-147, 1972.

これまで述べたように「BAC を用いた高精度ゲノムアレイの開発」では産総研独自の 33 万クローンの日本人ゲノムライブラリーを構築し全体の 2/3 のクローン断片の両末端塩基配列を解析し、全ヒトゲノムの 96%以上をカバーする物理的地図を作成した。この日本人ゲノムライブラリーのクローン DNA の完全塩基配列解析を行い、日本人のゲノムが構造及び一塩基多型(SNP)レベルで欧米系国際ヒトゲノム配列と大きく異なることを明らかにした。さらに日本人ゲノムライブラリーの物理的地図に基づき全ヒトゲノム領域をカバーする 17K 高精度ゲノムアレイを設計・試作し、市販4K 低解像度アレイに匹敵する定量性を確保した。この高精度ゲノムアレイにより臨床胃癌患者由来 DNA の解析し有用性を確認し、当初目標を達成した。

2. 2 染色体異常を解析する革新的要素技術の開発

2. 2. 1 高精度表面加工修飾技術の研究開発（担当：トーヨーエイトック株式会社）

① 高配向性薄膜形成技術の開発

1) 背景及び目的

金属に吸着しやすい官能基を末端に持つ有機分子の溶液中に金属を浸漬すると、有機分子が金属表面に吸着する。吸着は有機分子の相互作用によって安定するまで継続し、金属表面に単分子層が一様に形成されたのちに吸着は完了する。こうして得られるナノレベルの単分子層を自己組織化単分子膜(SAM:Self assembled Monolayer)と呼び、SAM 表面に DNA と結合可能な官能基を構成する事で基板への DNA 固定化が可能となる。

金属に吸着しやすい官能基としてチオール基が知られており、アルカンチオールは金の表面に極めて均一な SAM が形成される。チオール基の吸着位置は金表面の原子配列と深く関係があり、金の原子配列に対して最適な配置で吸着される。従って、金-チオール反応の基材として、均一かつ緻密に SAM を形成するために高い結晶配向性が重要である。このため SAM の研究の多くは(111)面に配向した単結晶の金が基材に用いられている。しかしながら、高価な金を医療現場、あるいは工業的に広く扱う為には、効率的面で配慮が必要である。効率化の手段として薄膜化が挙げられるが、結晶配向性の高い金薄膜を得るのは容易ではない。様々な薄膜形成法においてプラズマプロセスはエネルギー粒子の基板照射の効果により、基板表面拡散による膜質の高密度化、膜表面の平坦化、基板と膜の付着力強化などの制御が可能となる。そこで本研究開発ではプラズマを応用した独自のスパッタリング技術により、金の結晶配向性の制御を検討する。

2) 実験及び結果

プラズマ電力を0～60Wの条件で金薄膜を形成し、原子間力顕微鏡(AFM)により、解析を行った。得られた原子間力顕微鏡像を図2.1-①-1示す。金をガラス上に成膜する上でスペーサ金属薄膜をコートする。このスペーサコート後の基板表面粗さがRa=0.44nmであった。さらにスペーサの上に金をコートした場合の表面粗さは0W:Ra=0.91nm、10W:Ra=1.06nm、60W:0.74nmであり、60Wが最も表面粗さが低い結果であった。

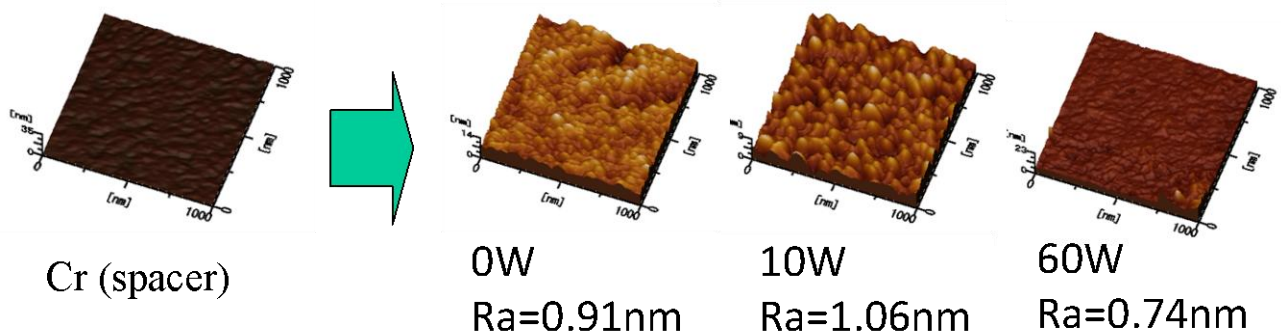


図2.1-①-1 金薄膜の各プラズマ電力出力におけるAFM観察結果

次に得られた金薄膜の表面構造についてX線回折により結晶配向性を解析した結果を図2.1-①-2に示す。いずれも最も高いピークを示す(111)面、及び(200)面、(220)面の結晶方位が確認される。プラズマの出力を0Wから上げていく事で(200)面の結晶方位が減少し、60Wでは確認できないレベルまで減少し、(111)面に優先配向された金薄膜が形成可能である事が分かった。

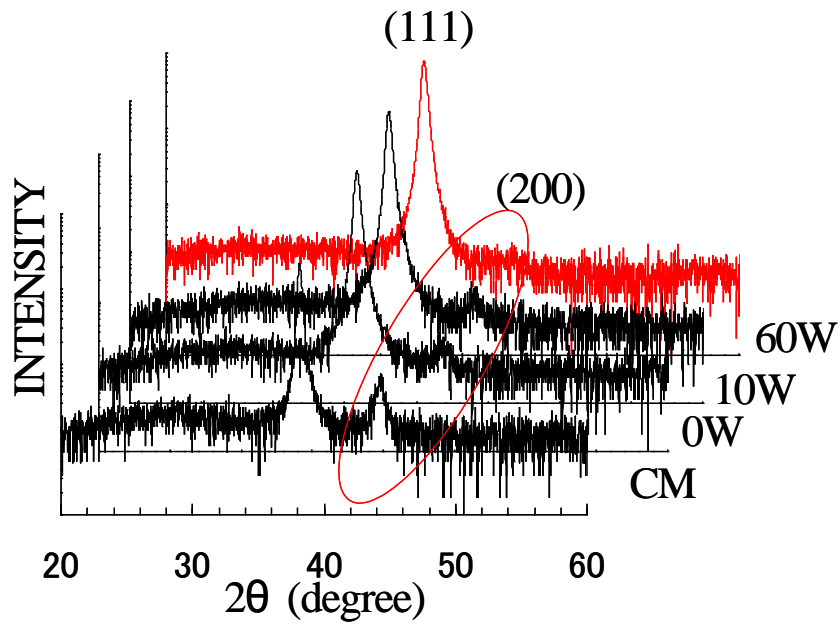


図2.1-①-2 金薄膜の各プラズマ電力出力におけるXRD回折パターン

3) 結論

従来のスパッタ技術では結晶配向性が(111)面および(200)面に配向された構造しか得られなかったが、独自のスパッタリング技術においてプラズマ電力を調製する事で金薄膜を検討したところ、きわめて粗さの小さい緻密な表面が確認され、優先配向した金薄膜が得られる事が分かった。以上の結果より、SAMの下地として最適な結晶配向性の高い金薄膜を形成する事が出来た。

② 高精度表面加工修飾技術の研究開発

1) 背景及び目的

DNAをチップ上に固定化するため、基板表面に様々な表面処理が検討されているが、いずれも基板の全面に表面処理されている。この方法では非特異吸着によるバックグラウンドノイズの増大、あるいは不要な官能基をブロッキングする工程により全体の感度が低下するなど、DNAを特異的に固定化させたいスポット部位と、非特異な吸着を抑制させたいスポット領域外で相反する特性が必要とされる。また、DNAを網羅的に解析するためには、基板上へ数十万種のDNAを高密度に固定化する必要があり、高い精度が求められる。さらに今後は特定の疾患の診断への応用が進むと予測されるが、この場合も解析検体数の増加や、それに伴う試薬の増加を考えるとDNAチップは小型/高密度化しなければならない。従って本研究開発ではこれらの課題を解決する目的で高精度にパターニングされた表面加工修飾技術を検討する。本技術の特徴は金薄膜による「高密度/高精度なパターニング」、自己組織化単分子膜(SAM: Self assembled Monolayer)をリンカーに用いた「DNAの特異結合機能」、これら技術の概念図を図2.1-②-1に示す。さらにはこれら技術を網羅したミニDNAアレイを試作、検討する。

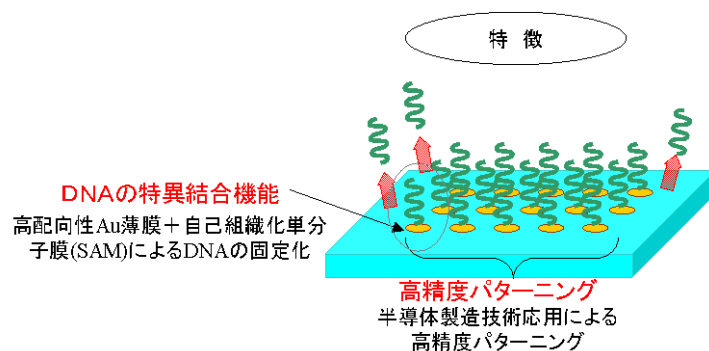


図2.1-②-1 高精度表面加工修飾技術の研究開発 技術概念図

2) 実験及び結果

2-1) 高密度/高精度パターニング

ミニDNAアレイを想定したデザインの試作基板について、パターニング精度の評価を行った。具体的には5.6mm×4.2mmの領域にφ 140μ mのスポットが230μ mのピッチで18行×24列=432スポットが整列し、一枚の基板に5領域を設けたデザインとした(図2.1-②-2)。評価は光学顕微鏡を用いて、画像解析により、スポット径精度及びピッチ精度を測定した。

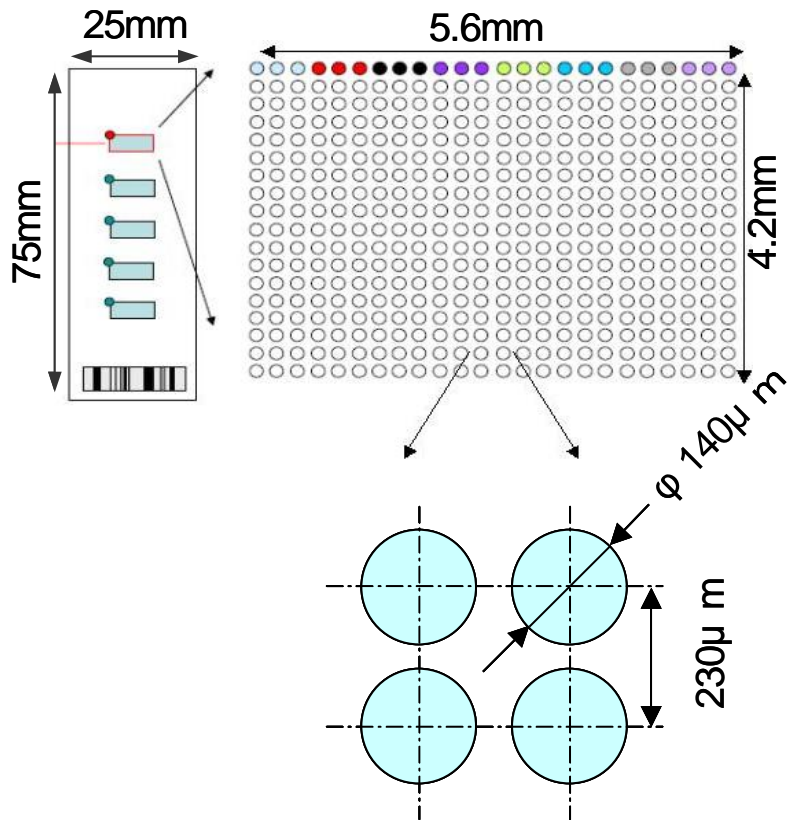


図2.1-②-2 パターニング評価基板のデザイン

20箇所のスポットを測定した結果を表2.1-②-1に示す。直径及びピッチ精度について最大、最小値の差がそれぞれ $0.9\mu\text{m}$ 、 $1.1\mu\text{m}$ 、標準偏差がそれぞれ $0.23\mu\text{m}$ 、 $0.28\mu\text{m}$ と高い精度が確認された。基板観察結果の一例を図2.1-②-3に示す。

	スポット径(μm)	ピッチ(μm)
設計値	140.0	230.0
最大値	139.9	232.0
最小値	139.0	230.9
標準偏差	0.23	0.28

n=20

表2.1-②-1 パターン精度測定結果

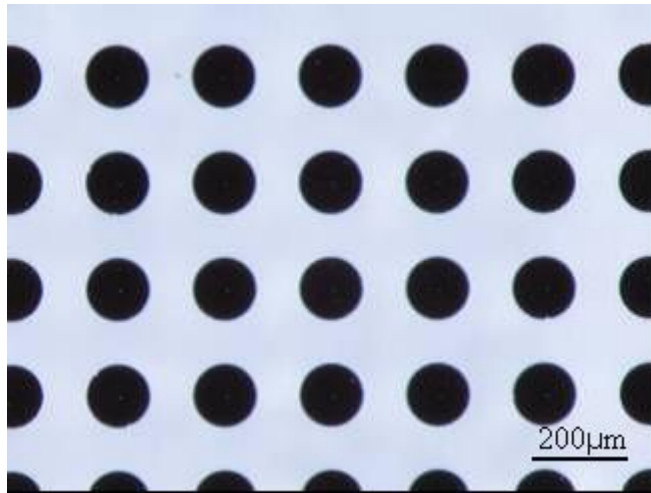


図2.1-②-3 パターン領域部の光学顕微鏡観察結果

2-2) DNAの特異結合機能

(1) 発色シグナルを用いたDNAの特異結合性の基礎評価結果

金薄膜の上にチオール官能基を持つSAMが固定されたプロトタイプDNAチップを作製し、DIG (digoxigenin)を用いた発色シグナルでDNAを標識し、ハイブリダイゼーションにより検討した。プローブは相補的な配列を持つPositive と非相補的な配列を持つNegativeを調製した。ハイブリダイゼーション後、Positive側はシグナルが見られ、Negative側はシグナルが見られなかったことから、DNAが特異的に吸着し、ハイブリダイゼーションにより機能を示すことが確認された。結果を図2.1-②-4に示す。

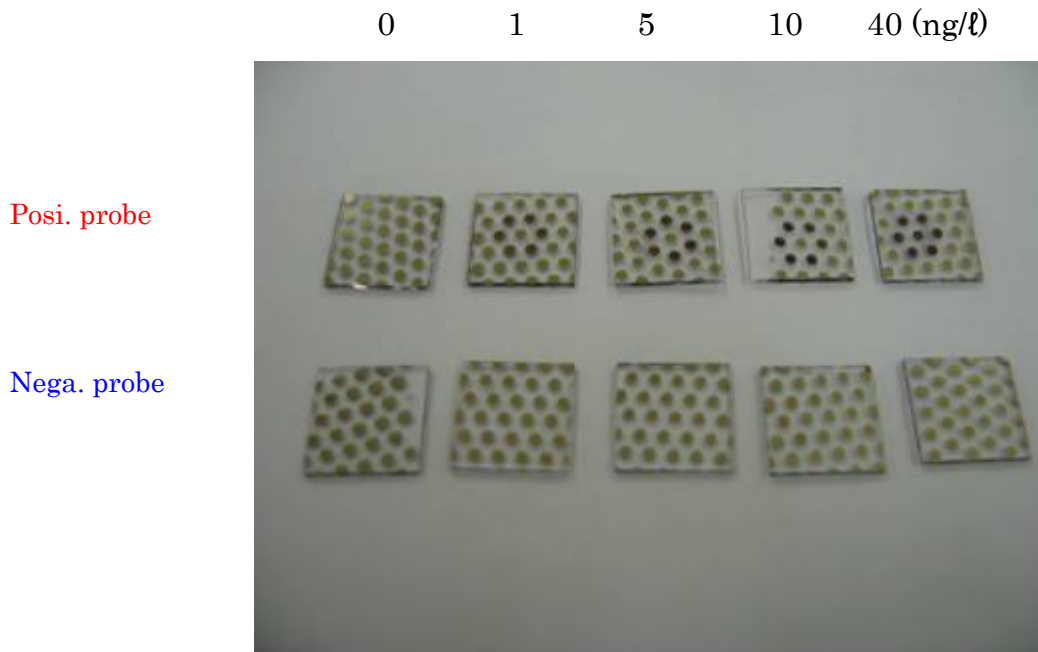


図2.1-②-4 ハイブリダイゼーション結果
上:Positive 下:Negative

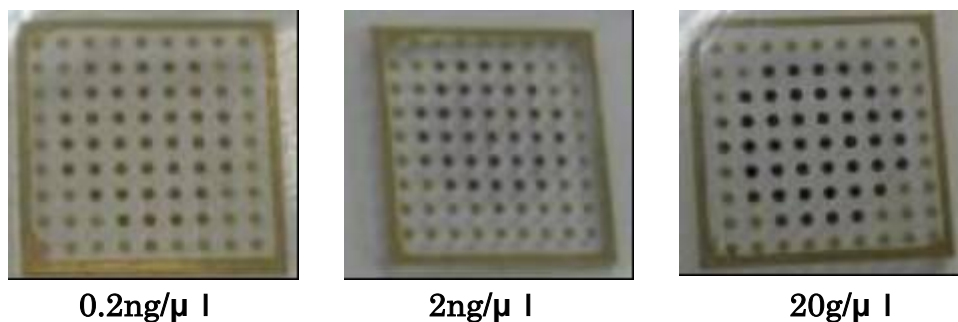


図2.1-②-5 ターゲットDNA濃度の違いによるシグナル強度

(2) 蛍光シグナルを用いたDNAの特異結合性の評価結果

スポット部位の特異的吸着特性を蛍光試薬(cy3)を用い、ハイブリダイゼーションで確認した。DNAは、pUC19をEcoRIで切断することにより直鎖状DNAとして、実験に供した。スポット径φ 100μ mのシグナルを検出し、得られた画像から輝度を定量化した。この結果、スポット輪郭部の輝度変化についてシャープに立ち上がる高い形状精度、スポット内の輝度分布が80%以上であり、均一な輝度、バックグラウンドノイズ10%以下の高精度な解析結果を確認した。結果を図2.1-②-6に示す。

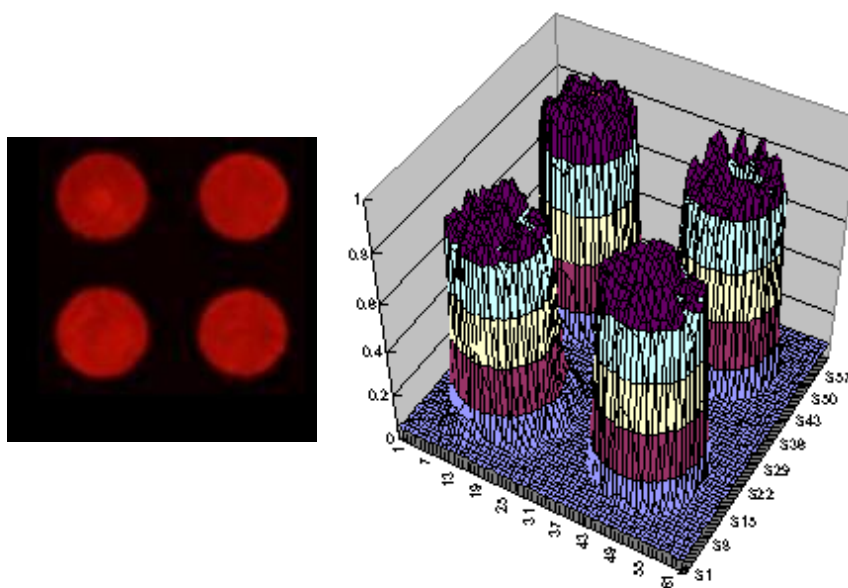


図2.1-②-6 左:蛍光顕微鏡観察結果 右:蛍光輝度の定量化結果

2-3) BAC-DNAを用いたミニDNAアレイ試作及び評価

本研究開発で検討した基板を用い、ミニDNAアレイの試作検討を行った。横河電機様の開発したスキャナの仕様に併せた基板デザインを採用し、山口大学様によるがん発症と相関性を検討されている部位のDNAを産業技術総合研究所様のBAC-DNAより選定し、スポット上に搭載した。基板のデザインは図2.1-②-9とした。

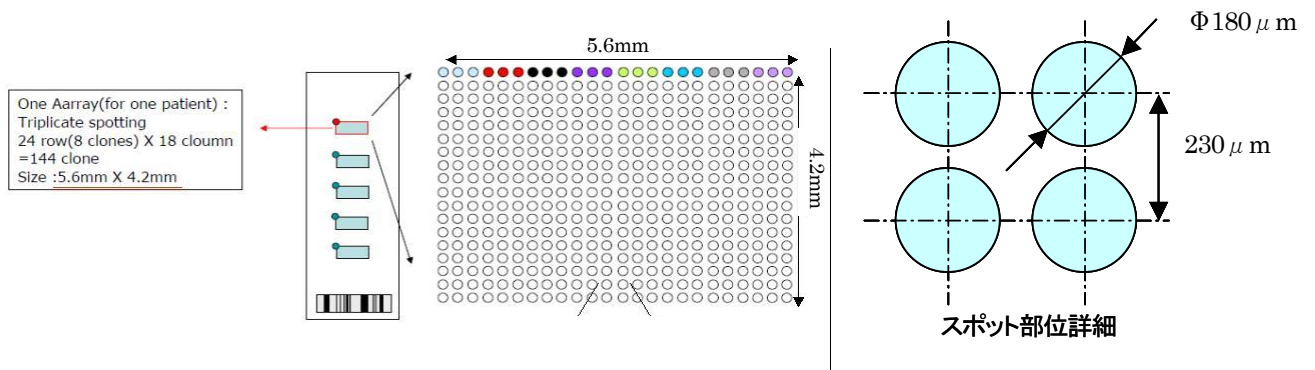


図2.1-②-9 基板のデザイン

ハイブリ終了後の基板を専用のスキャナで読み取り、蛍光を確認した。その結果を図2.1-②-10に示す。また、解析した結果を図2.1-②-11に示す。この結果より、DNAチップとして評価できることが確認できた。

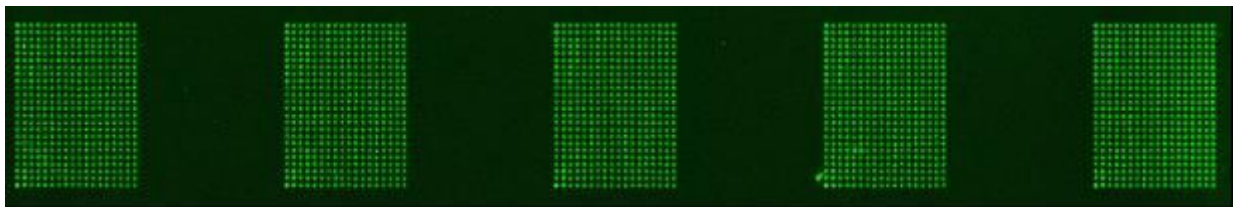


図2.1-②-10 スキャナによるハイブリの確認結果

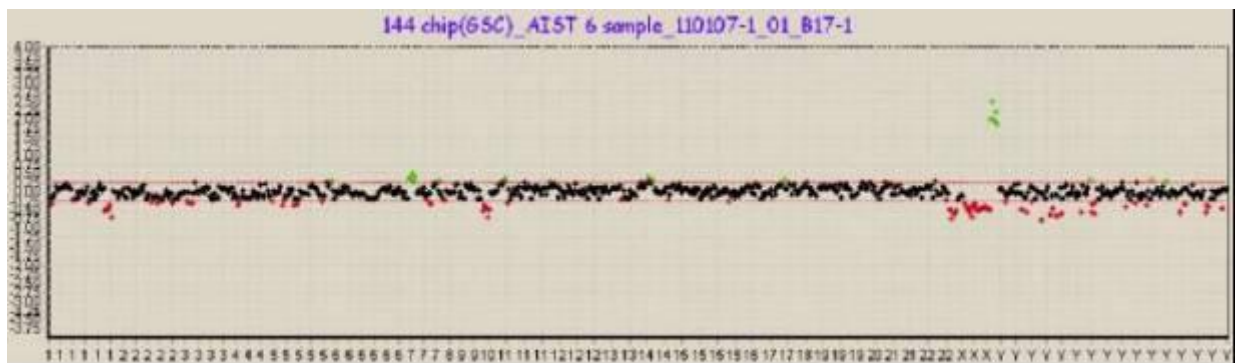


図2.1-②-11 サンプル解析結果

3) 結論

本研究開発では「金薄膜による高密度/高精度なパターンニング」、「DNAの特異結合機能」、を検討した。「高精度パターンニング」では直径及びピッチ精度について標準偏差がそれぞれ $0.23\mu\text{m}$ 、 $0.28\mu\text{m}$ と高い精度が得られている事が確認された。スポッターはハイエンドの製品でも $1\mu\text{m}$ の位置決め精度であることから極めて高い精度が実現できている。「DNAの特異結合機能」については、SAMの至適化を行い、発色シグナル及び蛍光シグナルを用いてハイブリダーゼーションにより、スポット部への特異的結合を確認した。①項で開発した高配向性金薄膜とこれらの技術を組み込んだミニDNAアレイ基板を試作し、ハイブリダーゼーションを行い、DNAチップとして評価できることを確認した。尚、このミニDNAアレイは横河電機様開発のスキャナの仕様に合わせたデザインとし、山口大学様で検討されているBAC-DNAを産業技術総合研究所様にて搭載し、解析まで行った。

③ 高精度ガラス基板の開発

1) 背景及び目的

DNAチップの基板となる素材は成型段階で板厚誤差や反りなどが発生する。遺伝子解析でDNAチップの読取に使用されるスキャナは焦点深度が浅く、DNAチップ基板の精度が解析精度に大きな影響を及ぼす。そこで基板精度の改善のために、例えばガラス基板であれば、表面を研磨する事によって精度を高める事が可能であるが、研磨にコストが掛り、研磨ガラスは10倍以上の価格となることから、DNAチップの価格が引き下がらない一因となっている。そこで高精度金型を用いた転写成型を行う事により高精度かつ安定した品質の基板製造技術を検討する。具体的には光学レンズ金型の製造実績をもとに、熱転写法による基材の加工技術の検討を行った。具体的にはまずシリコンウエハへ電子線リソグラフィーによるレジストマスタを作製し、電鍍法によりパターンが転写されたNi製の高精度電鍍金型を作製する。次に金型を加熱し、軟化した材料を熱転写インプリントによって金型のパターンを転写することで、高精度の基板を得る。尚、本研究開発では基板製造プロセスの検証に注力し、成型及び評価はPMMA(Poly methyl methacrylate)を用いた。本開発で検討したパターン形状・設計寸法及び精度目標は次の通りである。概略図を図2.1-③-1に示す。

- (1) パターン領域 : 10mm□内にピッチ 50μ m × 外径φ 30μ m × 高さ 10μ m
- (2) パターン高さ : 目標値 10μ m ± 1μ m
- (3) パターン径(スポット径) : 目標値φ 30μ m ± 1.5μ m
- (4) パターンピッチ : 目標値 50μ m ± 0.5μ m
- (5) パターン面粗さ : 目標値 Ra0.05μ m 以下

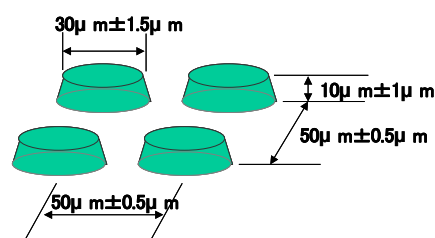


図2.1-③-1. パターン形状概略図

2) 実験方法

レジストマスタは基板材料に円形シリコンウエハを用いた。外形寸法は直径200mm ± 0.5mm 基板厚さ725μ m ± 25μ mとした。シリコン基板の左右上下4箇所、指定のパターンを形成した。金型のパターン形成領域を図2.1-③-2に示す。

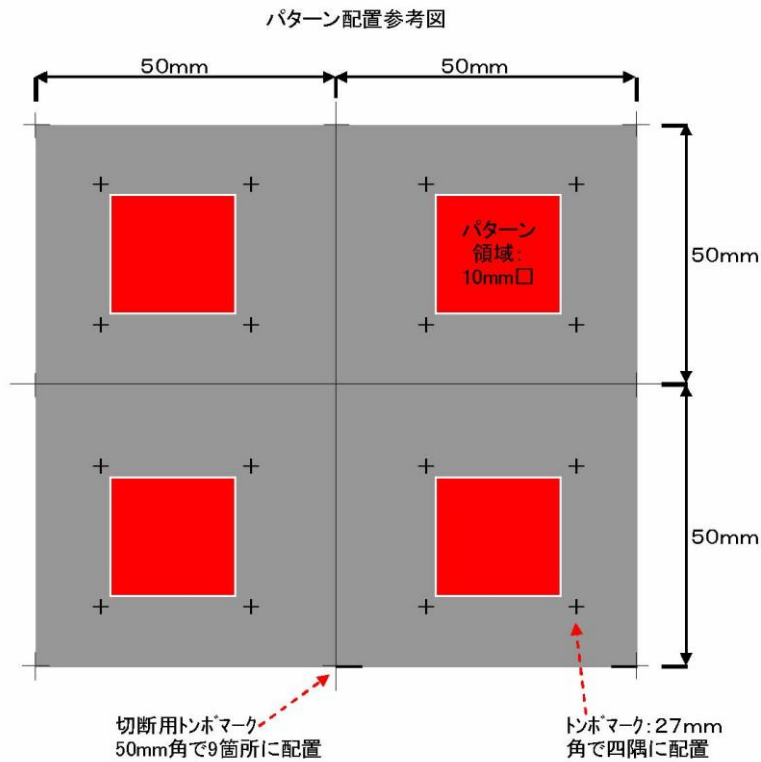


図 2.1-③-2. 金型のパターン形成領域

電鍍金型は外形サイズ: 100mm × 100mm ± 0.1mm、金型厚み: 290μ m ± 10μ m とした。
 熱転写インプリントは転写基材: PMMA・厚み 1mm とした・サイズ約 25mm□
 試作した Ni 電鍍金型ならびに熱転写インプリントした基板を図 2.1-③-3 に示す。

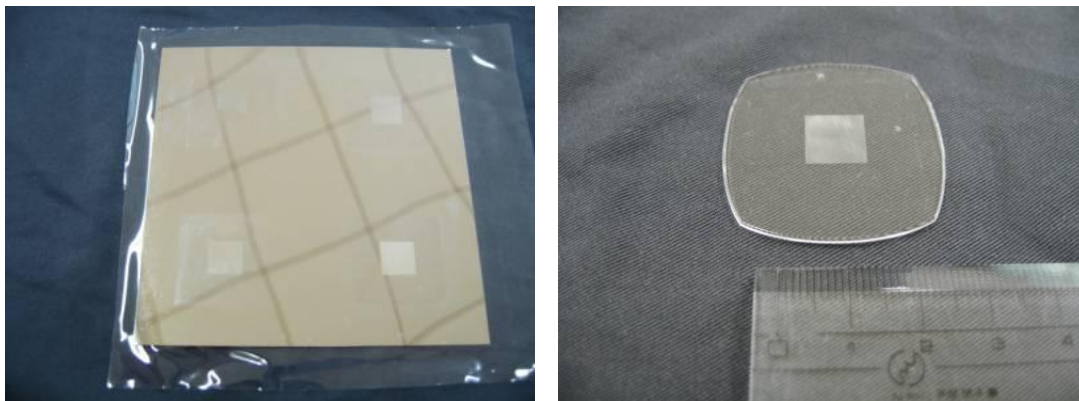


図 2.1-③-3 左: Ni 電鍍金型 右: 熱転写インプリントした基材

金型および転写インプリントした基材について、レーザー顕微鏡を用い、非接触でピッチ、高さ、スポット径、粗さを評価測定した。

金型寸法はレジストマスタを測定した各寸法の測定箇所は位置記号 RU、C、LB の3箇所を各エリアで測定した。ピッチは位置記号 LX、LY を測定し、個数(199 個)で除した数値とした。粗さは電鍍金型のスポット径内を測定した。寸法測定位置概略図を図 2.1-③-4 に示す。

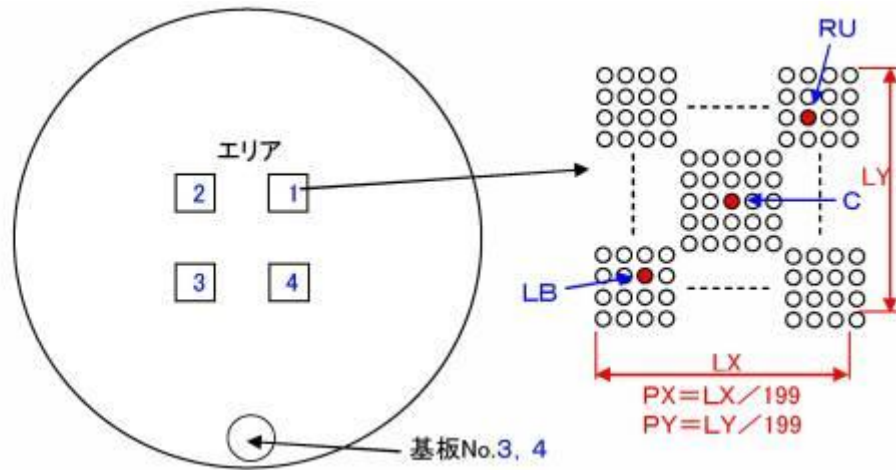


図 2.1-③-4 寸法測定位置概略図

金型エリア 1~4 で成型した転写インプリント基材それぞれについて、測定した。図③-4で示した位置記号 C 近傍についてパターン径(スポット径)及び高さについては左右3パターンを測定し、平均値を求めた。ピッチは左右併せて5パターンのピッチを測定し、5で除した数を値とした。表面粗さは C 点スポット内の2箇所を測定し、平均値を求めた。

3) 評価結果

3-1) 金型測定結果

各寸法測定結果を Table 2.1-③-1 に示す。測定項目についてパターン高さを H、パターン径(スポット径)を T、パターンピッチを PX, PY で示す。いずれも目標精度(H:10μ m±1μ m、T:φ 30μ m±1.5μ m、PX, PY:50μ m±0.5μ m)をクリアしている。

測定結果

基板No.	エリア/項目	RU	C	LB	PX	PY
3	1/T	30.7	30.8	30.7	50.012	50.010
	1/B	31.4	31.9	31.5		
	1/H	9.8	9.8	9.8		
	2/T	30.9	30.9	30.8	50.001	50.004
	2/B	31.7	31.6	31.2		
	2/H	9.8	9.8	9.8		
	3/T	30.7	30.7	30.3	50.004	50.010
	3/B	31.4	31.6	31.7		
	3/H	9.9	9.9	9.9		
	4/T	30.6	30.8	30.7	50.008	50.010
	4/B	31.6	31.8	31.8		
	4/H	9.8	9.8	9.8		

Table 2.1-③-1 金型の各寸法測定結果

次に表面粗さの測定結果についても目標精度 Ra0.05μ m 以下をクリアしている。測定結果の一例を図 2.1-③-5 に示す。

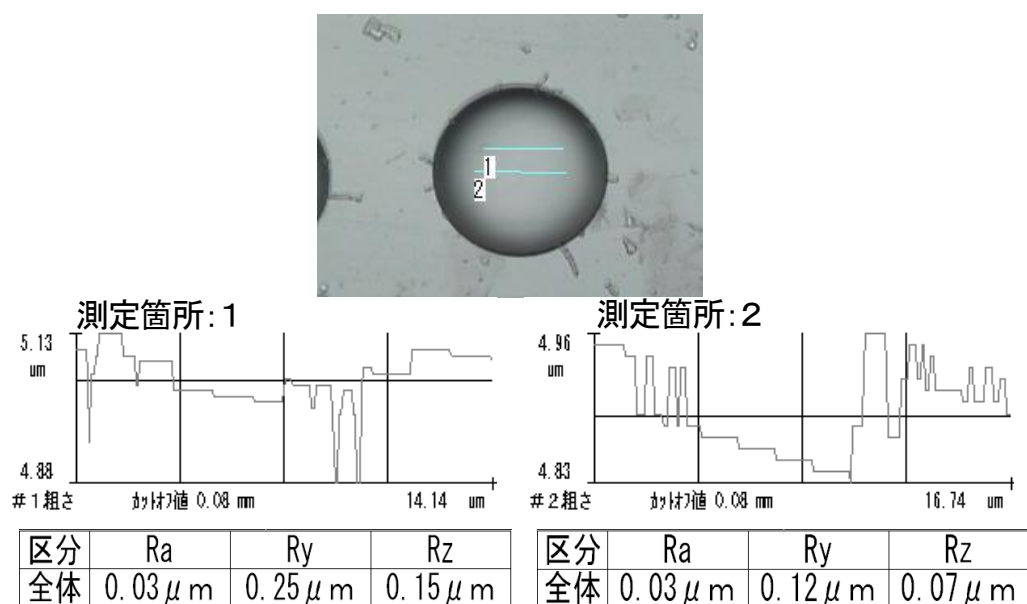


図2.1-③-5 金型のスポット径内の表面粗さ測定結果(エリア3 C位置)

3-2) 転写インプリント基材評価結果

各寸法測定結果をTable 2.1-③-2に示す。測定項目についてパターン径(スポット径)、高さ、ピッチ、表面粗さはいずれも目標精度(パターン径: $T:\phi 30\mu\text{m} \pm 1.5\mu\text{m}$ 、高さ: $10\mu\text{m} \pm 1\mu\text{m}$ 、ピッチ: $50\mu\text{m} \pm 0.5\mu\text{m}$ 、表面粗さ: $Ra=0.05\mu\text{m}$ 以下)をクリアしている。転写インプリント基材の寸法測定結果の一例を図2.1-③-6に示す。また表面粗さ測定結果の一例を図2.1-③-7に示す。

インプリント回数	エリア	平均寸法(μm)			平均表面粗さ Ra(μm)
		径 n=3	高さ n=3	ピッチ	
3回目	1	30.42	9.98	49.89	0.03
	2	29.15	10.08	49.94	0.03
	3	29.45	9.10	49.89	0.03
	4	30.35	10.25	49.94	0.03
4回目	4	30.20	9.95	49.78	0.03
誤差(上限)		0.42	0.25	-0.06	-
誤差(下限)		-0.85	-0.90	-0.22	-
標準偏差		0.51	0.40	0.06	0.00
目標精度		達成	達成	達成	達成

Table 2.1-③-2 . 転写インプリント基材の各寸法測定結果

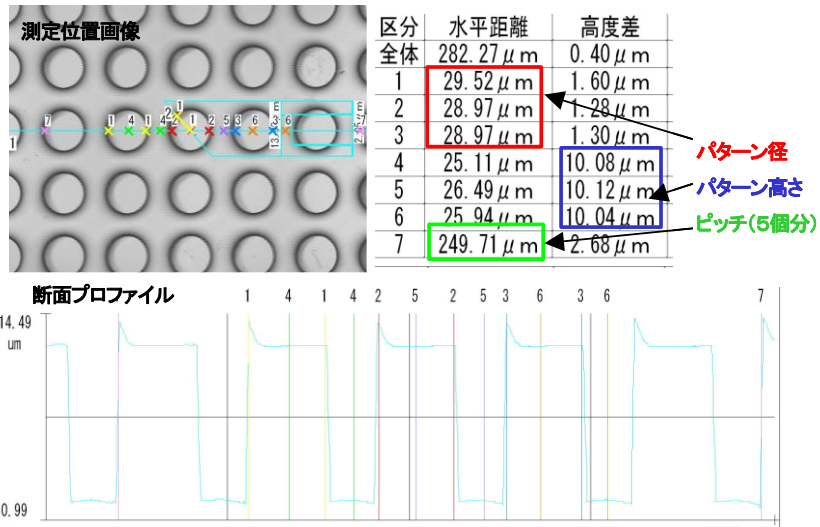


図2.1-③-6 転写インプリント基材の寸法測定結果(インプリント2回目 エリア3)

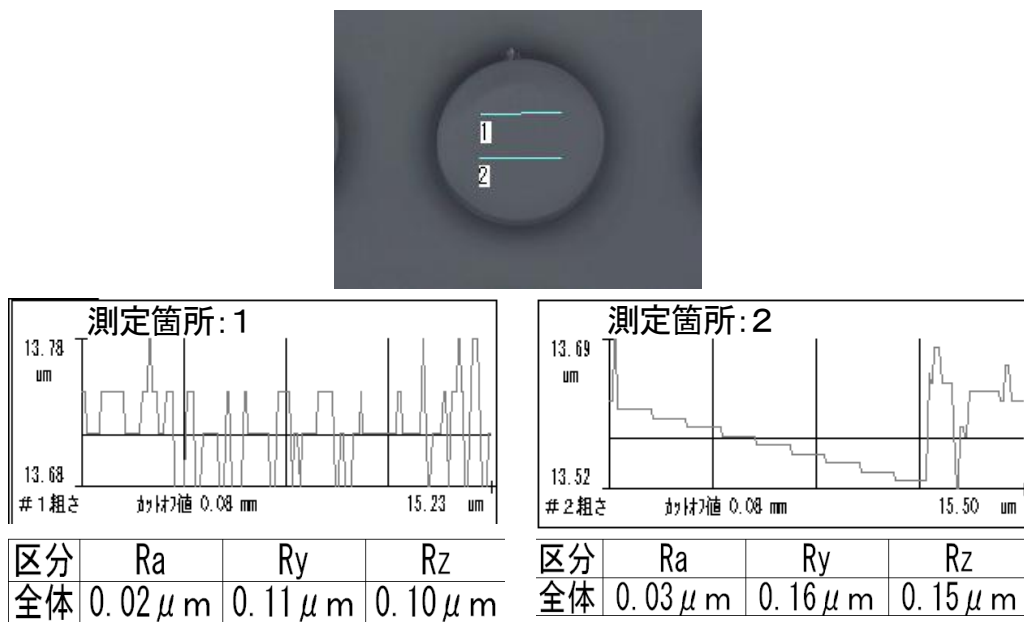


図2.1-③-7 転写インプリント基材の表面粗さ測定結果(エリア3 C位置)

4) 結論

微細かつ高精度なパターンを持つDNAチップ基材の加工について検討した。加工方法は熱転写成型法で行った。まず電鍍法で成型用金型を試作し、目標精度を満足したものが得られた。そこで次にPMMAを材料に用いて熱転写成型を行い、成型品の精度を評価した。その結果、成型品は各項目の目標精度を達成し、精度バラツキについてパターンピッチ直径:0.51 μ m、高さ:0.40 μ m、ピッチ:0.06 μ mと高い精度であることが確認された。以上の結果から、熱転写成型法により、微細なかつ高精度なパターンを有するDNAチップ基材の加工が可能である事が確認された。ガラス基材についても同様に熱転写成型法で成型が可能であるが、樹脂より成型温度が高く、金型材料に用いた材料は熱的影響による早期消耗などの検証が必要であり、量産性については課題が残される。これに対しては既に光学レンズ成型金型の応用実績もある高硬度かつ600 $^{\circ}$ C以上の耐熱性を有する独自のコーティング技術(特許公開2007-308753)が応用可能であり、ガラス転写成型の量産性については今後の課題とする。また、②項で報告したとおり、Au薄膜によるパターンニングを応用することで、高精度ガラス基板が実現可能である。

2. 2. 2 新規ゲノムアレイ用蛍光標識化技術の研究開発（担当：和光純薬工業株式会社）

① 新規蛍光物質の合成に関する研究開発

背景及び目的

現在、蛍光物質は、基本骨格からローダミン系、フルオロセイン系、シアニン系、フェニルボロン酸系、タンパク系、クマリン系、クロメン系、ピレン系、希土類遷移金属錯体系、金属ナノパーティクル系などがあるが、ライフサイエンス分野における DNA の標識においては、その蛍光強度、分子量、標識の行いやすさ等からローダミン系、フルオロセイン系、シアニン系、フェニルボロン酸系が主に使用されている。

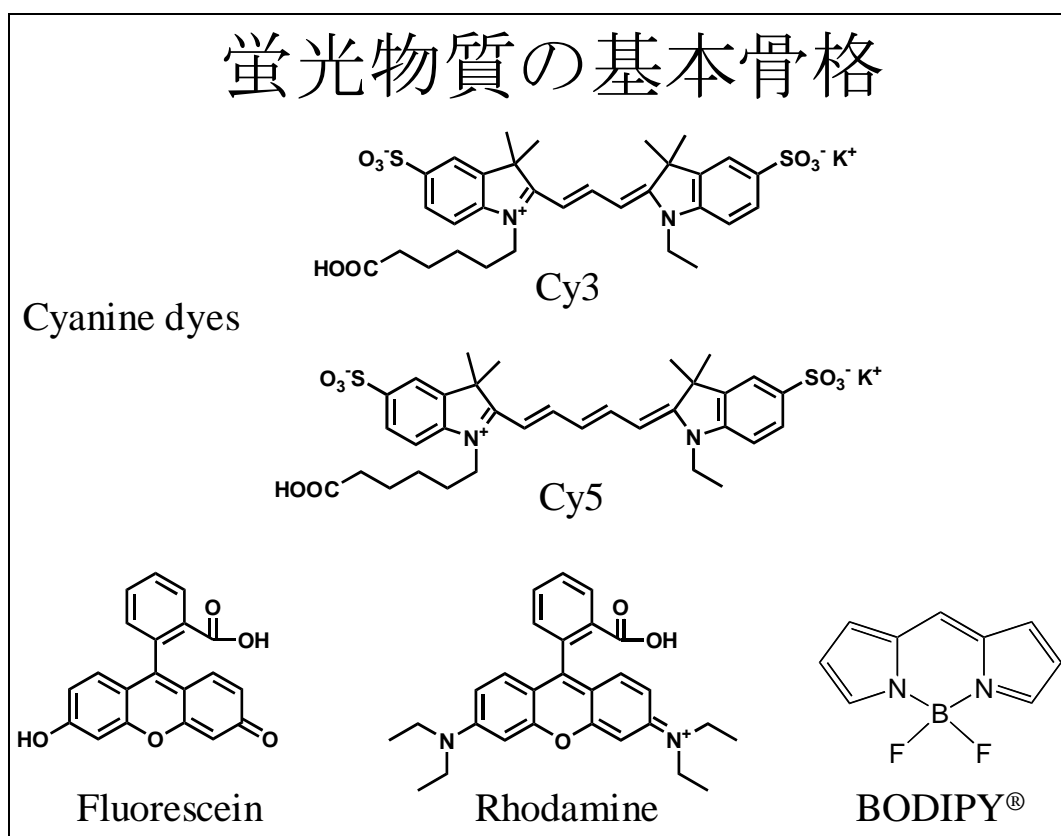


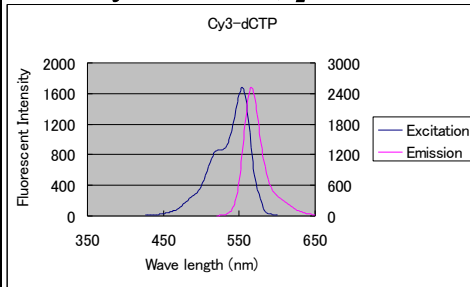
図 2.2-①-1

ローダミン系、フルオロセイン系の蛍光色素は、構造的に安定であり化学合成が比較的容易であることから、励起波長、蛍光波長の異なる多くの誘導体が合成されてきた。さらに、励起波長が極大励起波長より短波長側の比較的広範囲で励起可能であるため、同一レーザーで多種の蛍光色素を励起可能という特徴を持つ。そのため、4種類の蛍光色素が必要な DNA シークエンスでは、機械側の搭載レーザーを少なくできることから Dye Terminator 法のシークエンス試薬として多く用いられている。しかしながら、励起光により消光（フォトブリーチング）しやすく、クロストークするという問題点から、定量が重要なマイクロアレイでは、ほとんど使用されていない。

今回の研究課題であるマイクロアレイ法で用いる蛍光色素は、異なる励起波長と蛍光波長をもつ2種の色素を用いる。一方をサンプル、もう一方を対照として DNA を標識し、それぞれのスポット毎に蛍光強度を比較し、サンプル中の測定物を対照との相対値で測定を行う。そのため、2種の蛍光物質間でのクロストークが少なく、再現良く測定できる事が求められ、励起光に比較的安定でクロストークが比較的少ないシアニン系の色素が用いられてきた。

蛍光物質の特性

Cy3-dCTP /pH 7



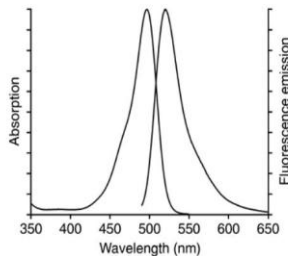
定量性が高い



- 光に安定
- クロストークが少ない

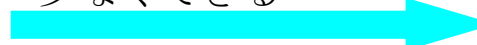
アレイ用
試薬で使用

Rhodamine 110/pH 7



励起光源のレーザーを

少なくできる



- 構造的に安定
- クロストークあり

シーケンス用
試薬で使用

図 2.2-①-2

シアニン系の蛍光色素は種々の化合物が合成され、特許も多数出願されている。CyDye は、カーネギーメロン大学が特許をもつシアニン系の色素で、550nm 付近で励起し 570nm 付近に蛍光を発する Cy3 と 650nm 付近で励起し 670nm 付近に蛍光を発する Cy5 が市場のほとんどを占めている。

しかしながら、CyDye は、価格が高く、特許のライセンスの問題が存在する為に、マイクロアレイに関する事業を展開するうえでの大きな障害になっている。カーネギーメロン大学が保有する CyDye に関する日本における特許 3497704 は、2009 年に特許権が消失するが、アメリカにおける基本特許 US5,268,486 は 2012 年、その応用特許である US5,569,587 は、2015 年まで存続する。

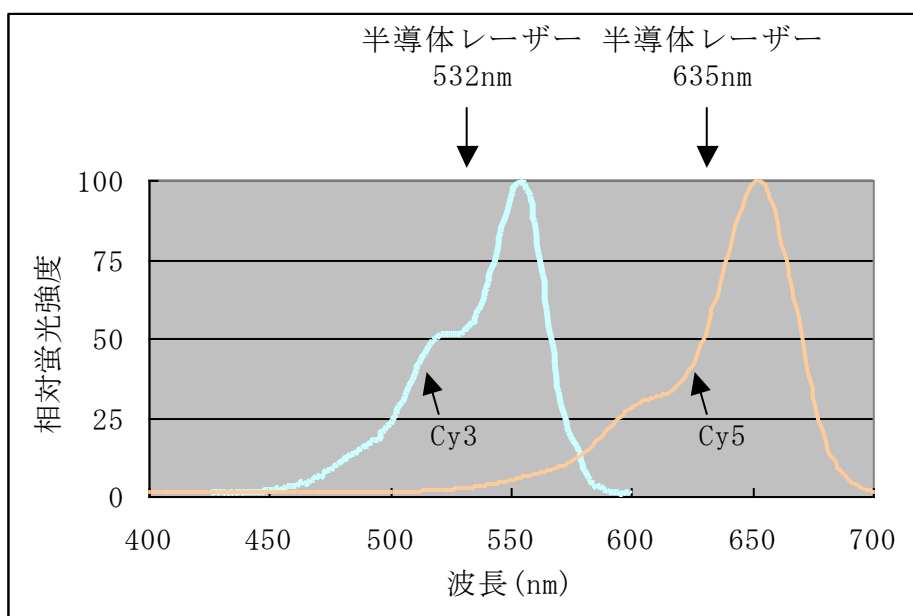
本プロジェクトにおいて作製した蛍光物質は、アメリカにおいても普及を目指すために、本特許が輸出における障害となる。このことから、ゲノムアレイの広範な実用化を計る為には、従来の高コストの蛍光物質に代わる新規な蛍光物質を本プロジェクトにおいて開発することを目標とした。

各種蛍光物質及び関連特許

Cy5 (Cy3) Amersham Biosciences Perkin Elmer	Ex: 650 Em: 668	→	カーネギーメロン大学 特許3497704 US5, 486, 616 US5, 268, 486 優先権主張日 1988/9/2
Oyster 647 (Oyster547) Denovo Biolabels	Ex: 656 Em: 674	→	特許不明
DyLight647 (DyLight547) PIERCE社	Ex: 652 Em: 673	→	特許不明
Alexa 647 (Alexa546) Invitrogen社	Ex: 650 Em: 668	→	特許不明 モレキュラープロブ社関連特許 US6, 974, 873B2 優先権主張日 2001/10/1
HiLyte 647 (HiLyte555) Anaspec社	Ex: 650 Em: 670	→	ANASPEC INC. WO 2006/047452 優先権主張日 2004/10/25

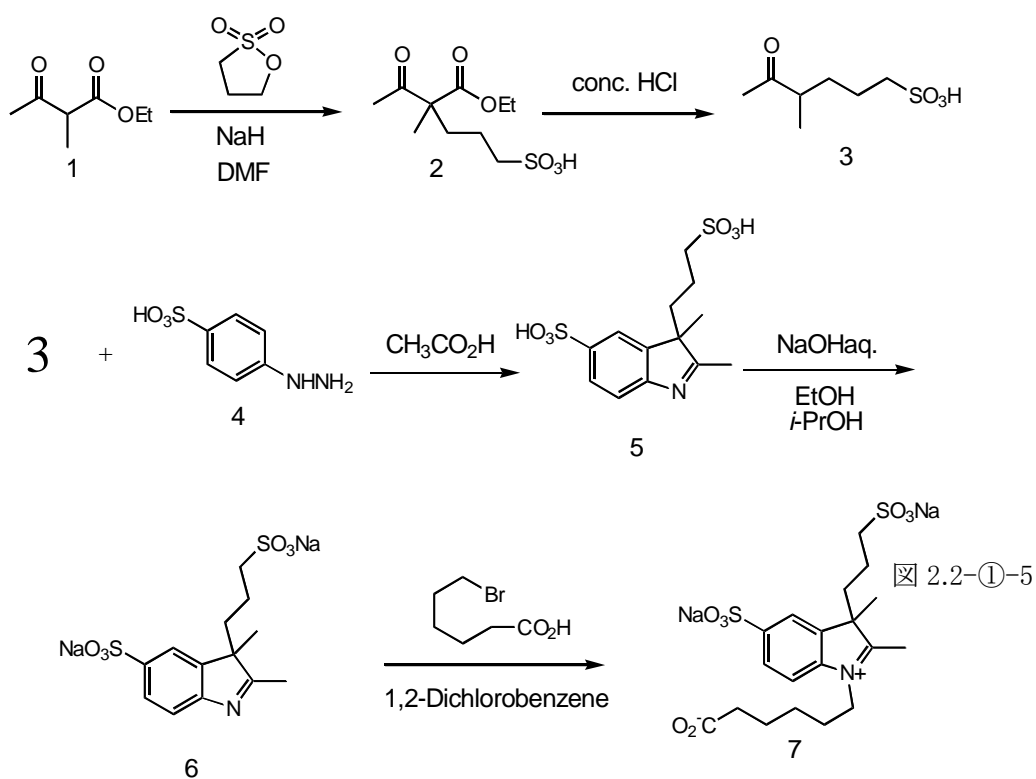
図 2.2-①-3

近年、一部のアレイで、対照を使用せず、1種類の蛍光物質で定量する方法も行われているが、BACアレイCGH法においては、2色の蛍光色素を用い、きちんと対照を使用し、バラツキが少なく、高感度に再現性が高いデータを得る必要がある。そのため、本プロジェクトにおいては異なる励起波長を有する2種の新規な蛍光色素を合成し、マイクロアレイ法において高感度で、再現性が高いデータを得ることが可能な2種の蛍光色素を合成することを目標とした。本目標を達成する為にまず、Cy3, Cy5の蛍光特性について検討を行った。その結果、CyDyeの極大励起波長と既存の蛍光スキャナーに搭載されているレーザー波長とずれが生じており、最適な励起が出来ていないことが判明した。そのため、既存の蛍光スキャナーに搭載されているレーザー波長と極大励起波長が一致し、最適な励起が出来る構造の新規蛍光物質の合成を行うことにした。



方法及び結果

既存の蛍光スキャナーに搭載されているレーザー波長は、Cy3,Cy5 の極大励起波長より短波長側であることから、Cy3,Cy5 より短波長側で励起可能な構造の蛍光物質の合成を計画した。既存のデータベースから構造検索を行い構造的に新規な化合物で、かつ構造から推測してCy3,Cy5 より短波長で励起可能な構造の蛍光物質として、インドレニン化合物と、ピラゾール化合物が共鳴系を介して結合したインドレニン-ピラゾール型蛍光色素の合成を行った。



インドレニン化合物の合成

エチル-2-メチルアセトアセテート、1,3-プロパンスルトン を DMF に溶解後水素化ナトリウムを添加し、化合物(2)を合成した。

化合物(2)を濃塩酸中で反応させ化合物(3)を合成した。

化合物(3)と1-ヒドラジド 4-スルホニルベンゼンを 120°Cで 4 時間、酢酸中で反応させ化合物(5)を得た。

化合物(5)に水酸化ナトリウムを加え化合物(6)を合成した。

化合物(6)と 6-ブロモヘキサン酸を 1,2-ジクロロベンゼンに溶解し、120°Cで終夜反応を行い、インドレニン化合物(7)を合成した。

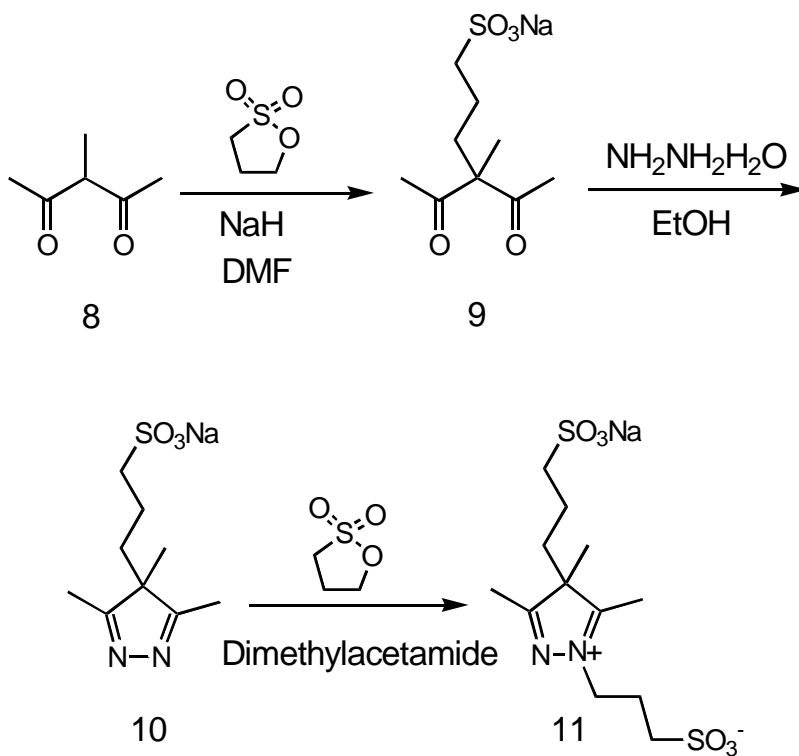


図 2.2-①-6

3-メチル-2,4-ペンタンジオンと 1,3-プロパンスルトン、水素化ナトリウムを DMF 中で反応を行い、化合物(9)を得た。

化合物(9)とヒドラジン1水和物をエタノールに溶解し、80°Cで 3 時間攪拌反応を行い、化合物(10)を得た。

化合物(10)と 1,3-プロパンスルトン をジメチルアセトアミドに溶解し 140°Cで 4 時間反応させピラゾール化合物(11)を得た。

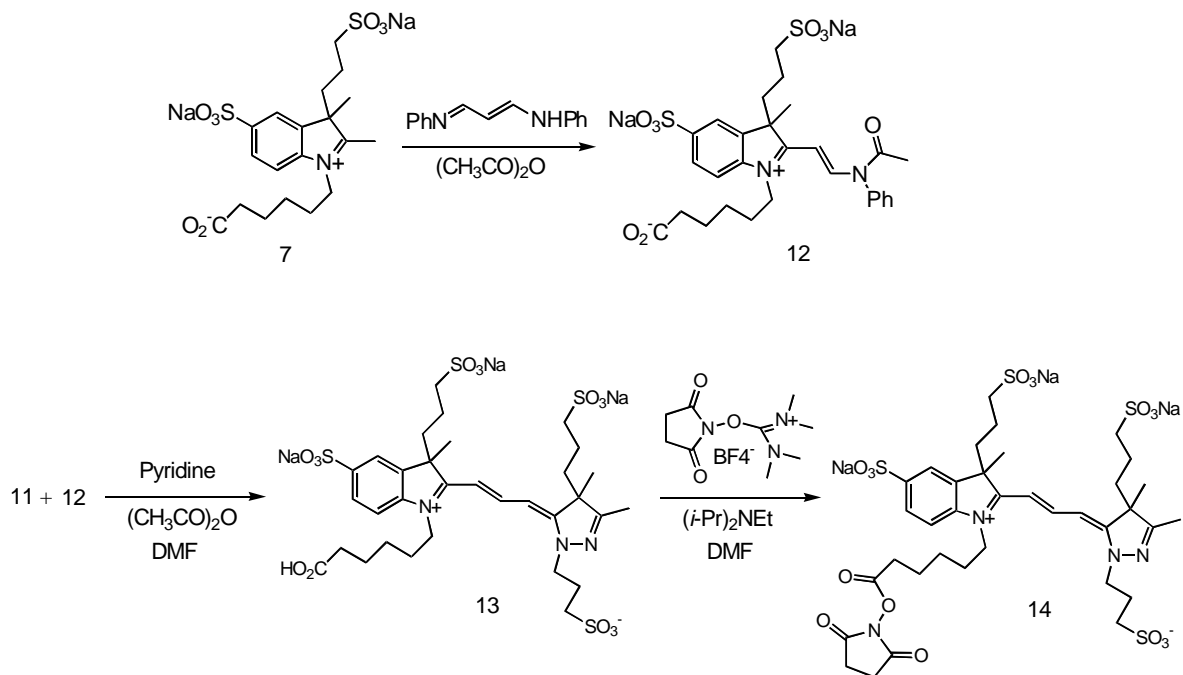


図 2.2-①-7

インドレニン化合物(7)と *N,N'*-ジフェニルホルムアミジンを無水酢酸中に溶解し、120°Cで 1 時間反応させ、化合物(12)を得た。

ピラゾール化合物(11)とインドレニン化合物誘導体(12)を DMF 中に溶解し、ピリジンと無水酢酸を加え 80°Cで 1 時間反応を行い、化合物(13)WY535-S4を得た。

得られた WY535-S4 を DMF に溶解し、2-スクシンイミド-1,1,3,3-テトラメチルウロニウムテトラフルオロボレート及び *N*-エチルジイソプロピルアミンを加え、室温で 3 時間反応させ、化合物 14 の WY535-S4-NHS 誘導体を合成した。

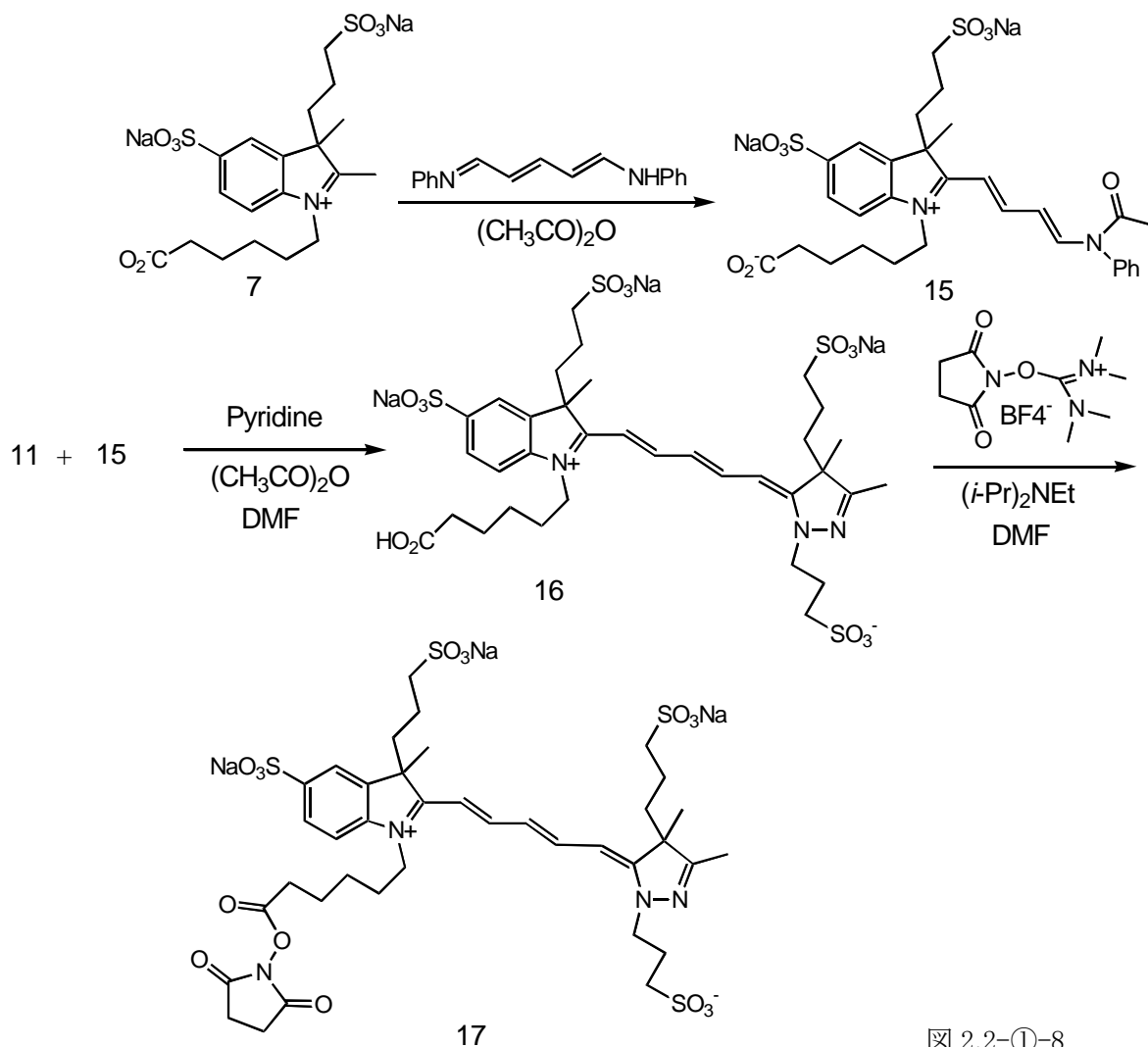
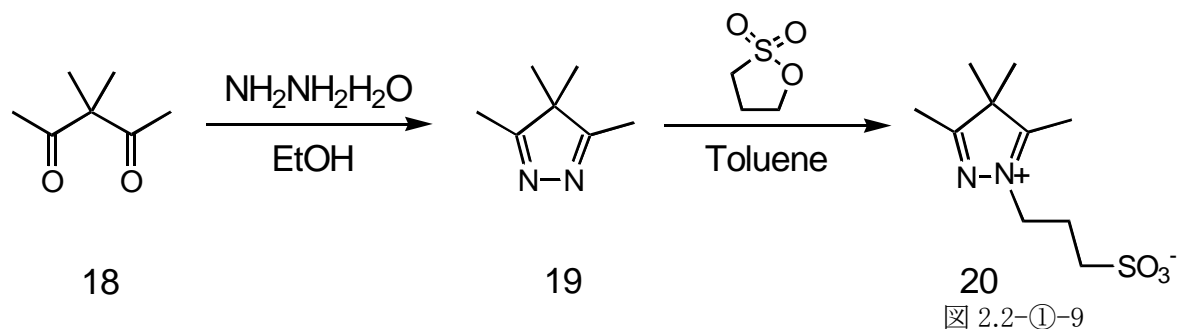


図 2.2-①-8

インドレニン化合物(7)とマロンアルデヒドジアニリド塩酸塩を無水酢酸中に溶解し、120°Cで1時間反応させ、化合物(15)を得た。

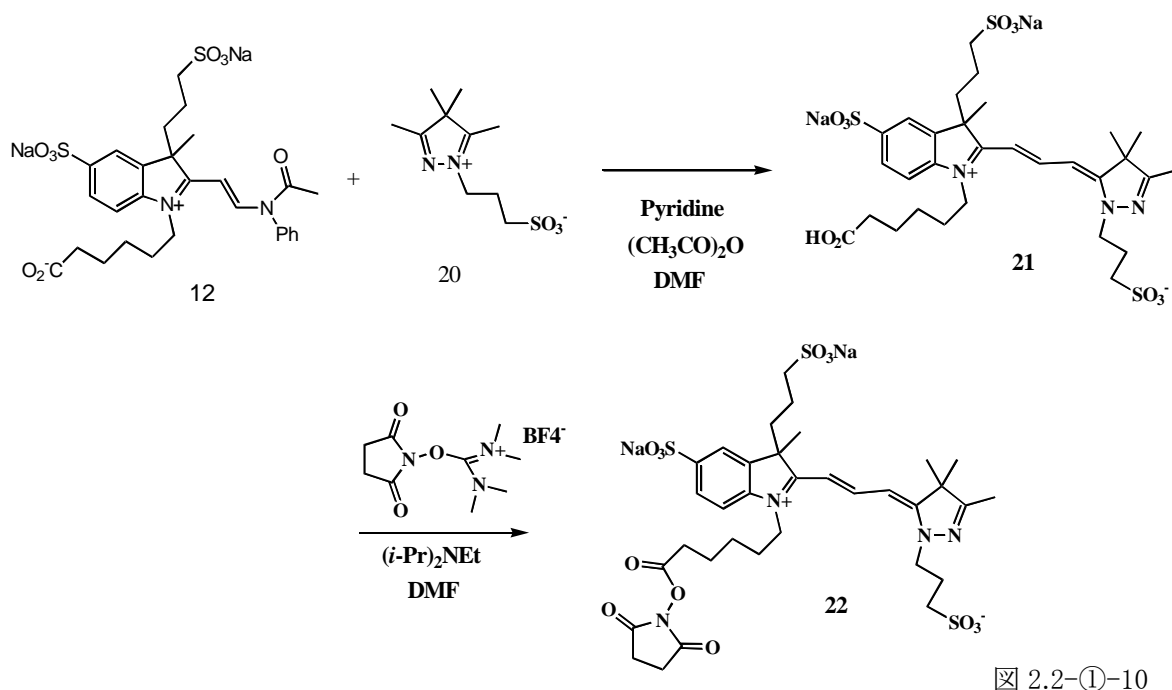
ピラゾール化合物(11)とインドレニン化合物誘導体(15)をDMF中に溶解し、ピリジンと無水酢酸を加え80°Cで1時間反応を行い、化合物(16)WY635-S4を得た。

得られたWY635-S4をDMFに溶解し、2-スクシンイミド-1,1,3,3-テトラメチルウロニウムテトラフルオロボレート及びN-エチルジイソプロピルアミンを加え、室温で3時間反応させ、化合物17のWY635-S4-NHS誘導体を合成した。



3-メチル-2,4-ペンタンジオン(化合物 18)とヒドラジン1水和物をエタノール中で 80°Cで 3 時間攪拌反応を行い、化合物(19)を得た。

化合物(9)と 1,3-プロパンスルтонをトルエンに溶解し 120°Cで 5 時間反応させピラゾール化合物(20)を得た。



ピラゾール化合物(20)とインドレニン化合物誘導体(12)を DMF 中に溶解し、ピリジンと無水酢酸を加え 80°Cで 1 時間反応を行い、化合物(21)WY535-S3を得た。

得られた WY535-S3 を DMF に溶解し、2-スクシンイミド-1,1,3,3-テトラメチルウロニウムテトラフルオロボレート及び N-エチルジイソプロピルアミンを加え、室温で 3 時間反応させ、化合物 22 の WY535-S3-NHS 誘導体を合成した。

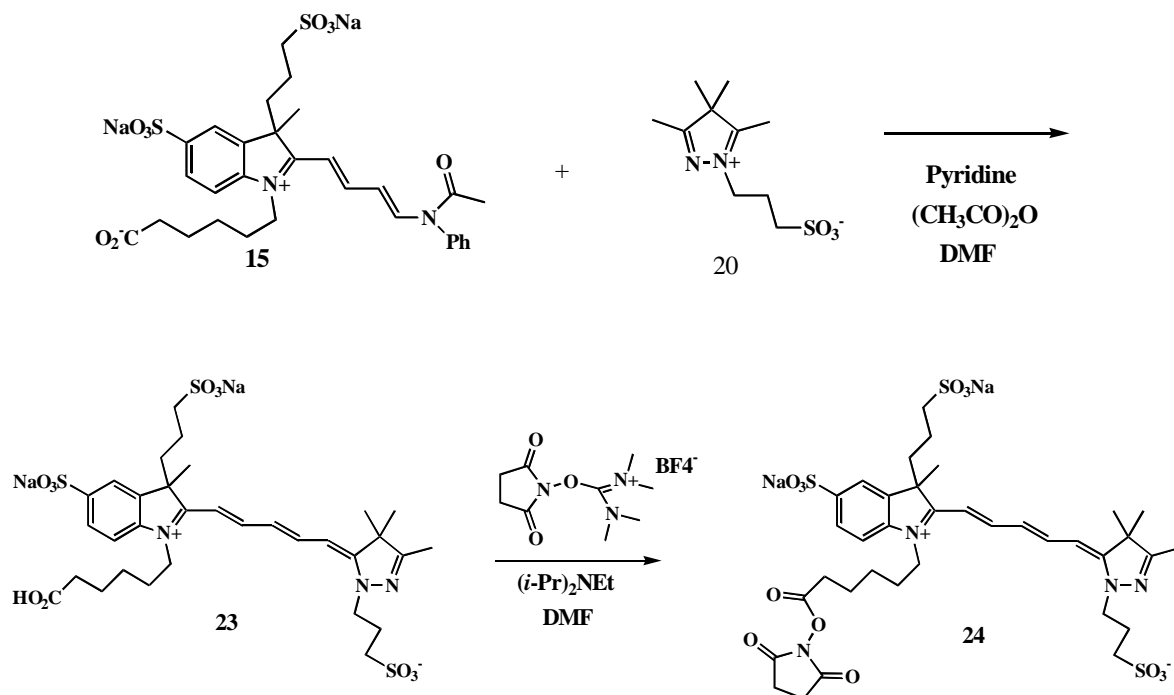


図 2.2-①-11

ピラゾール化合物(20)とインドレニン化合物誘導体(15)を DMF 中に溶解し、ピリジンと無水酢酸を加え 80°C で 1 時間反応を行い、化合物(23)WY635-S3 を得た。

得られた WY635-S3 を DMF に溶解し、2-スクシンイミド-1,1,3,3-テトラメチルウロニウムテトラフルオロボレート及び N-エチルジイソプロピルアミンを加え、室温で 3 時間反応させ、化合物(24)の WY635-S3-NHS 誘導体を合成した。

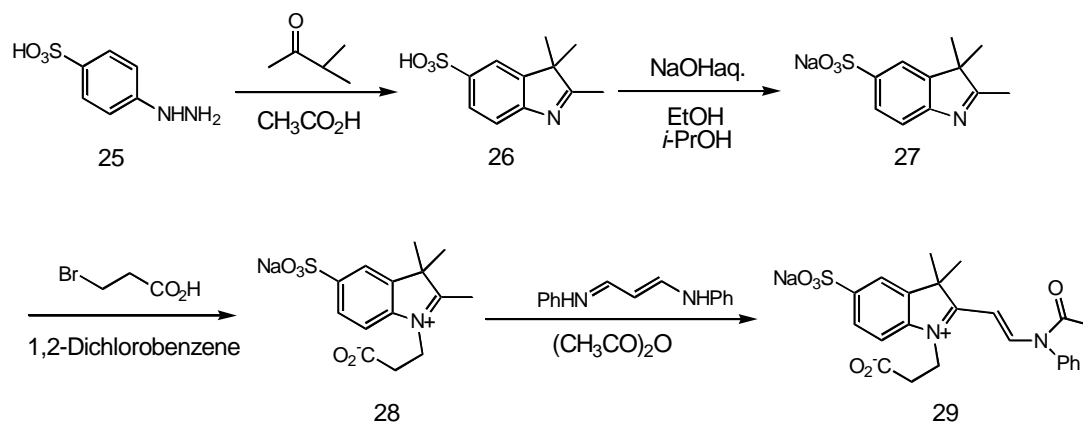


図 2.2-①-12

4-ヒドラジノベンゼンスルホン酸 0.5 水和物(25)及び 3-メチル-2-ブタノンを、酢酸中、120°C で3時間攪拌を行った。反応終了後、溶媒を冷却し、ジエチルエーテルを加え2回洗浄することにより、化合物(2)を得た。

化合物(26)及び水酸化ナトリウムをエタノール/2-プロパノール4:1混合溶媒中、室温下で 4 時間攪拌を行った。反応終了後、溶媒を減圧留去し、2-プロパノールを加え2回洗浄することで化合物(27)を得た。

化合物(27)、3-ブロモプロピオン酸をトルエン中、110°Cで終夜加熱還流を行った。反応終了

後、酢酸エチル(100ml)を加え3回洗浄し、化合物(28)を得た。

化合物(28)及び N,N-ジフェニルホルムアミジンを無水酢酸に溶解し、120°Cで 1 時間攪拌を行った。反応終了後、酢酸エチルを加え 2 回洗浄し、インドレニン化合物(29)を得た。

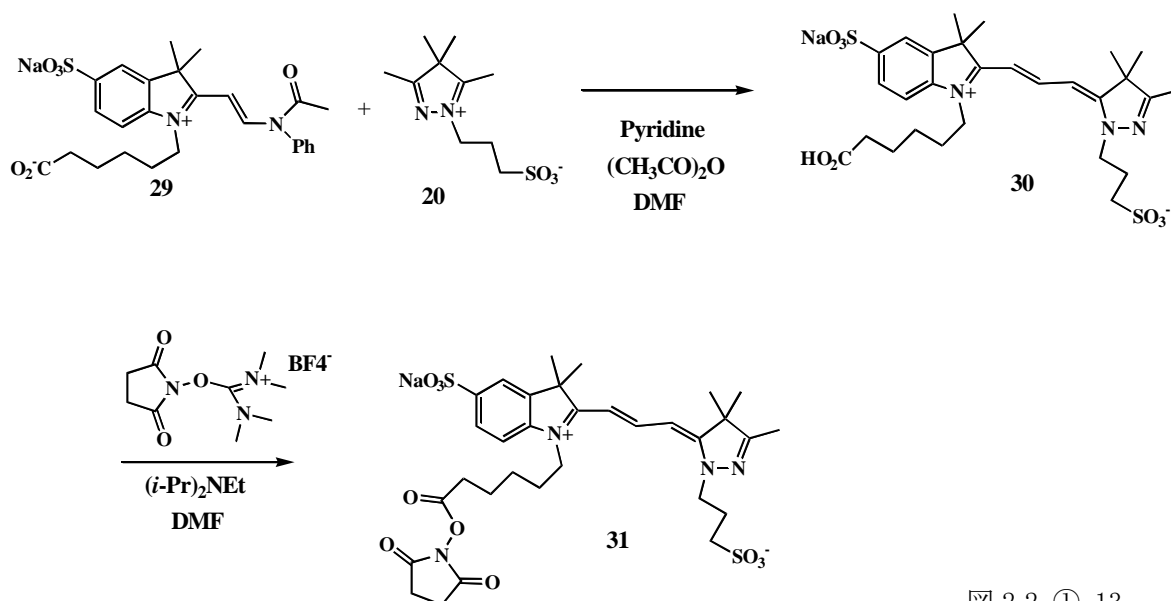


図 2.2-①-13

化合物(29)と化合物(20)を DMF 溶媒中、無水酢酸・ピリジンを縮合触媒として、80°Cで反応を行った。反応終了後、精製を行い、化合物(30)WY535-S2 を得た。

化合物(30)と TSTU を反応させ活性エステル化を行った。反応終了後、後処理を行い、酢酸エチルを用いて結晶化を行い WY535-S2-NHS 誘導体(31)を得た。

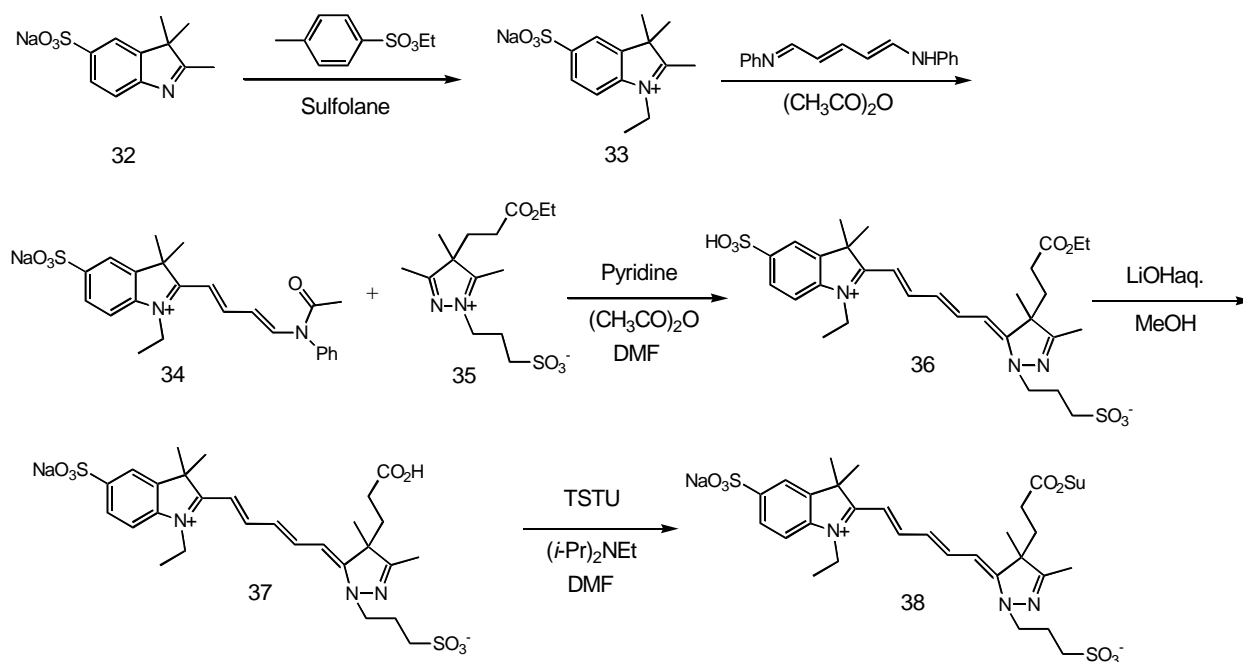


図 2.2-①-14

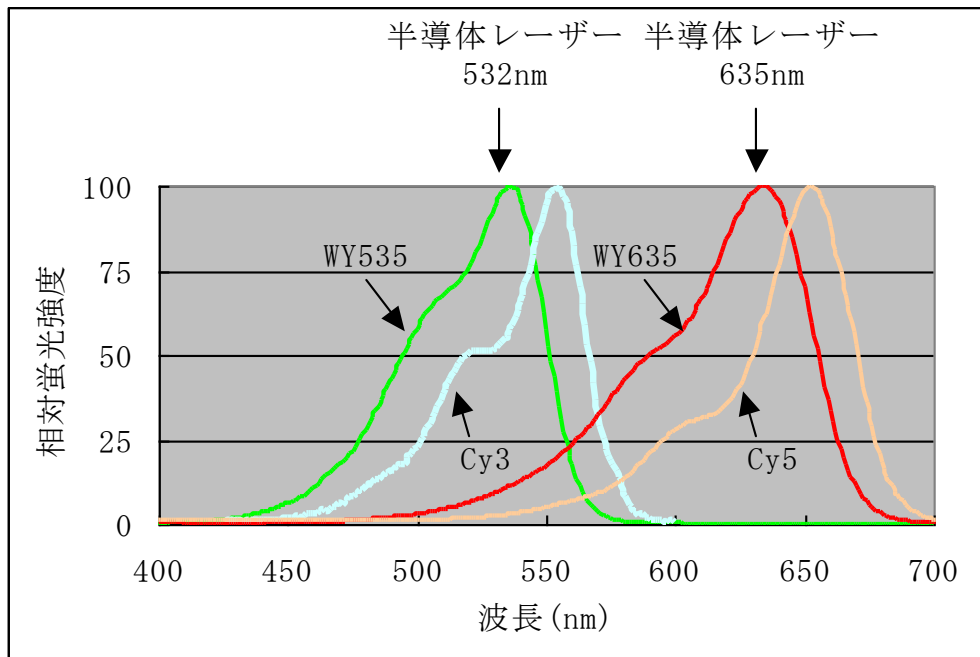
化合物 32 とエチルトルエンスルホン酸をスルホラン中、140°Cの条件で N-アルキル化反応を行った。反応終了後、後処理を行い、酢酸エチルを用いて結晶化及び洗浄を行うことで化合物 33 を得た。

化合物 33 とマロンアルデヒドジアニリド塩酸塩を無水酢酸中、120°Cの条件でアニル化反応を行った。反応終了後、酢酸エチルを用いて結晶化及び洗浄することでアニル体 34 を得た。

化合物 34 と化合物 35 を DMF 溶媒中、無水酢酸・ピリジンを縮合触媒として、80°Cで反応を行い、化合物 36 を得た。

化合物 36 と5%水酸化リチウムを MeOH 溶媒中、室温下の条件で反応を行った。反応終了後、精製を行い化合物(37)WY635-S2 を得た。

化合物 37 と TSTU を反応させ、活性エステル化を行った。反応終了後、酢酸エチルを用いて結晶化及び遠心分離を行うことで WY635-S2-NHS 誘導体(38)を得ることができた。



新規蛍光物質の物性

表 2.2-①-1

	分子量	MASSデータ (m/z)	極大吸収波長 (λ max)	極大励起波長 (Ex max)	極大蛍光波長 (Em max)
WY-535	825	824(nega)	536nm	536nm	557nm
Cy3			550nm	550nm	570nm
WY-635	851	850(nega)	634nm	635nm	655nm
Cy5			649nm	649nm	670nm

既存のレーザースキャナーの励起レーザー波長にあった新規な蛍光物質が合成できた。特許出願については、本プロジェクト開始前に国内に物質特許として出願している。また、国外についてもPCT出願を終えている。

② 新規リンカーの合成に関する研究開発
背景及び目的

蛍光物質とヌクレオチドを結合させるためにリンカーが必要である。リンカーの構造によって、酵素による蛍光標識ヌクレオチドの取込み効率が変化することが知られている。現在、CyDye には、Enzo 社が特許を保有するリンカーがもちいられており、本特許に抵触せず、酵素による取込みが高い蛍光標識ヌクレオチドを合成する必要がある。

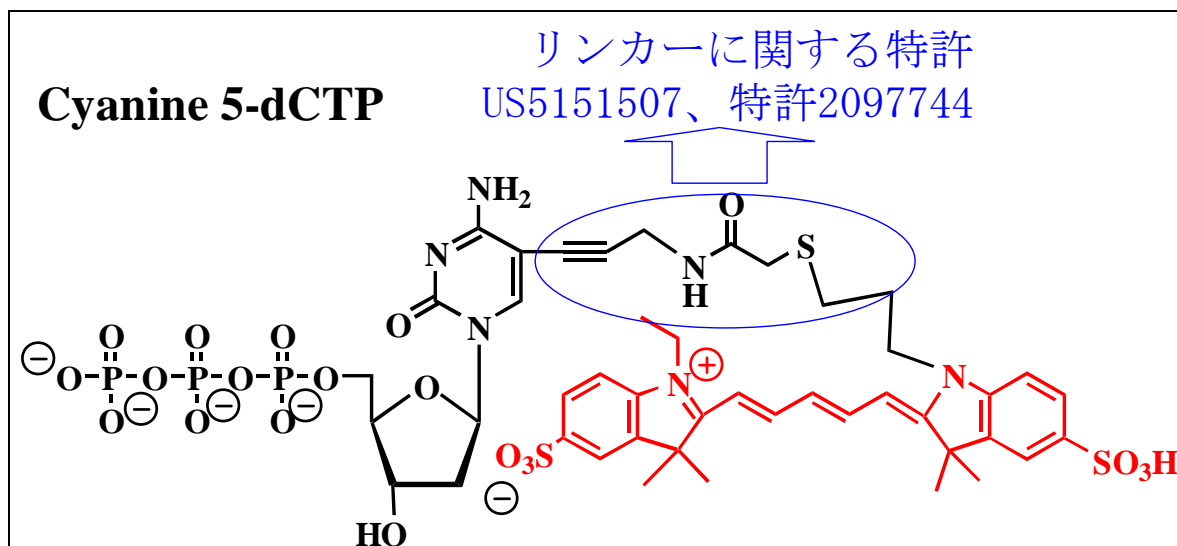


図 2.2-②-1

そのため、和光純薬では、転写シーケンスにおいて作製実績のあるリンカーを基本に、新規蛍光物質とヌクレオチドを、結合させ、酵素による取込み効率が高くなるような蛍光標識ヌクレオチドの作製を目的とした。

方法及び結果

蛍光物質の DNA 鎖への取り込み効率の向上のためには酵素反応で取り込まれやすい新規リンカーの導入が不可欠であるため、リンカーの合成を行った。

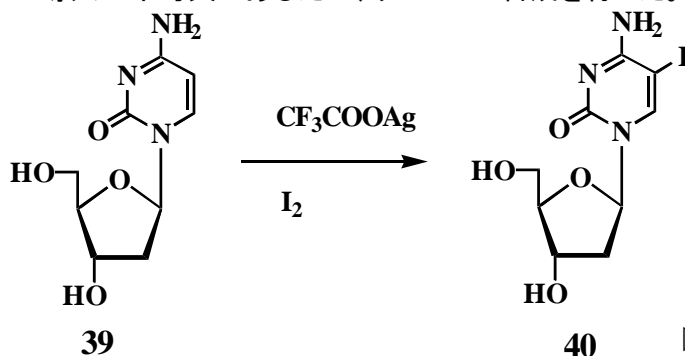


図 2.2-②-2

2'-デオキシシチジン(39)を 10%-エタノール/ジオキサン溶液に懸濁し、トリフルオロ酢酸銀、よう素を添加した。反応終了後、精製を行い、エタノールより再結晶化することで、5-ヨード-2'-デオキシシチジン(40)を得た。

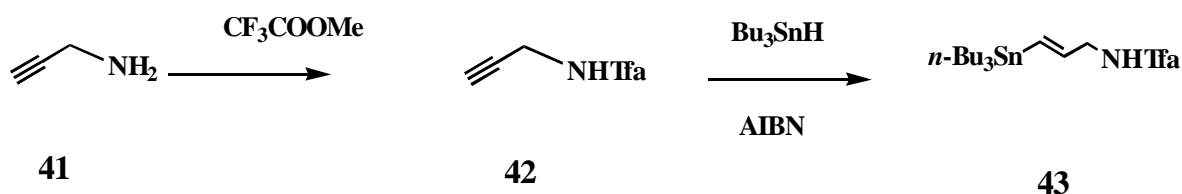


図 2.2-②-3

Propargylamine(41)に、氷冷下でトリフルオロ酢酸メチルを滴下し反応させ、減圧蒸留で精製を行い、化合物(42)を得た。

化合物(42)に Bu₃SnH, AIBN を添加した後、還流下反応させた。精製を行い、化合物(43)を得た。

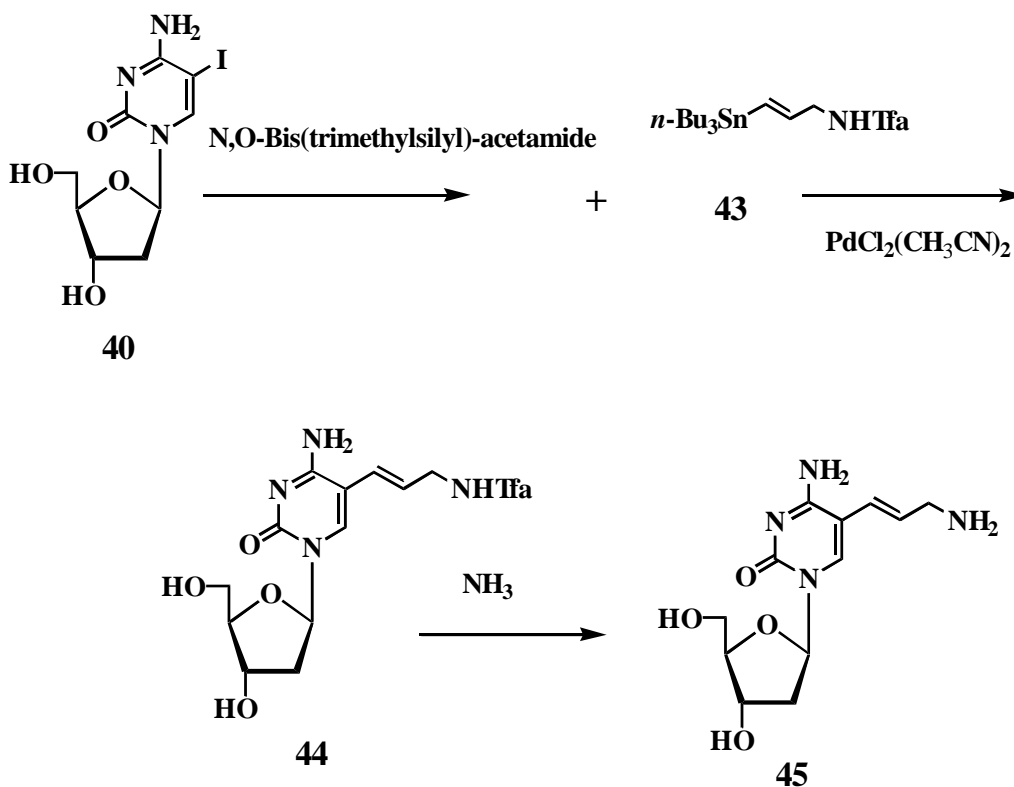


図 2.2-②-4

化合物(40)をアセトニトリルに懸濁し、Ar ガス置換下で *N,O*-Bis(trimethylsilyl)- acetamide を添加した後、還流下反応させた。反応液を室温に冷却した後、リンカー(43)、及び PdCl₂(CH₃CN)₂ を添加し、更に 50~60°Cで反応させ、反応終了後精製を行った。ジエチルエーテルより結晶化を行い、2'-デオキシシチジン誘導体(44)を得た。

化合物(44)をメタノールに溶解し、25%-アンモニア水を添加した後、低温で攪拌した。反応終了後、精製を行い、化合物(45)を得た。

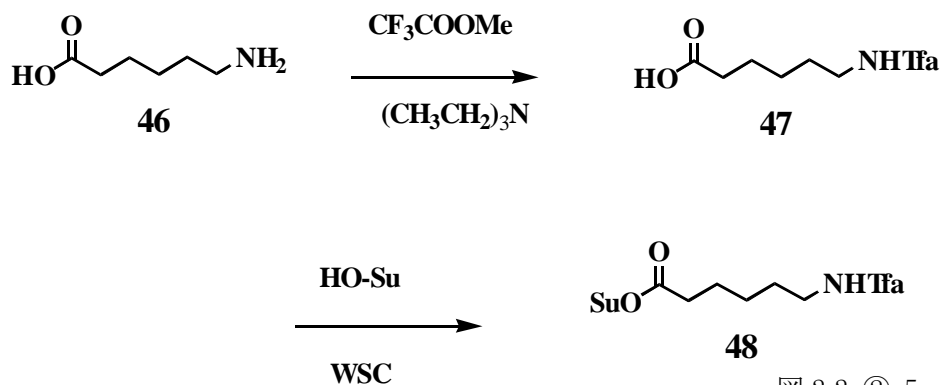


図 2.2-②-5

6-Aminohexanoic acid(46)にトリフルオロ酢酸メチル，トリエチルアミンを添加し反応を行った。反応終了後、結晶化を行うことで、化合物(47)を得た。

化合物(47)に HO-Su, WSC を添加し反応を行った。反応終了後、分液洗浄により化合物(48)を得た。

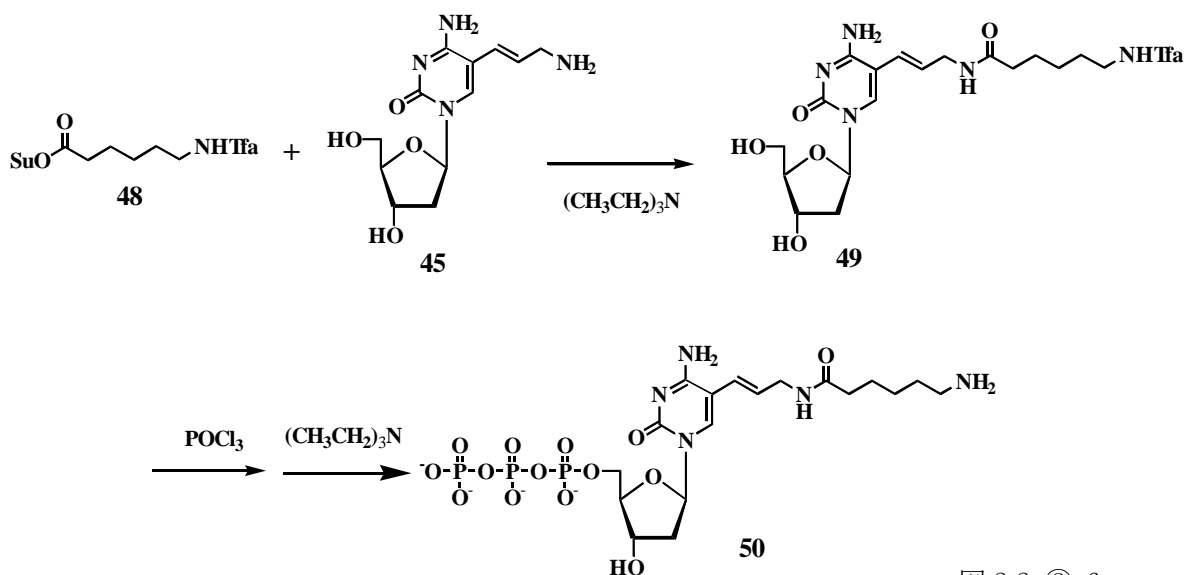


図 2.2-②-6

デオキシウリジン誘導体(45) とリンカー活性エステル体(48)にトリエチルアミンを添加した後、反応を行った。反応終了後、精製を行い、化合物(49)を得た。

デオキシウリジン誘導体(49)にオキシ塩化リンを添加しモノリン酸体を得た。次いで、反応液を 0.5M-tris(TBAPP)/DMF 溶液に投入し、攪拌後、トリエチルアミンで中和した。カラムによる精製を行い、化合物(50)を得た。

本リンカー結合核酸誘導体と市販の蛍光物質 WY547 と WY647 を反応させ、WY547-dCTP と WY647-dCTP を合成した。

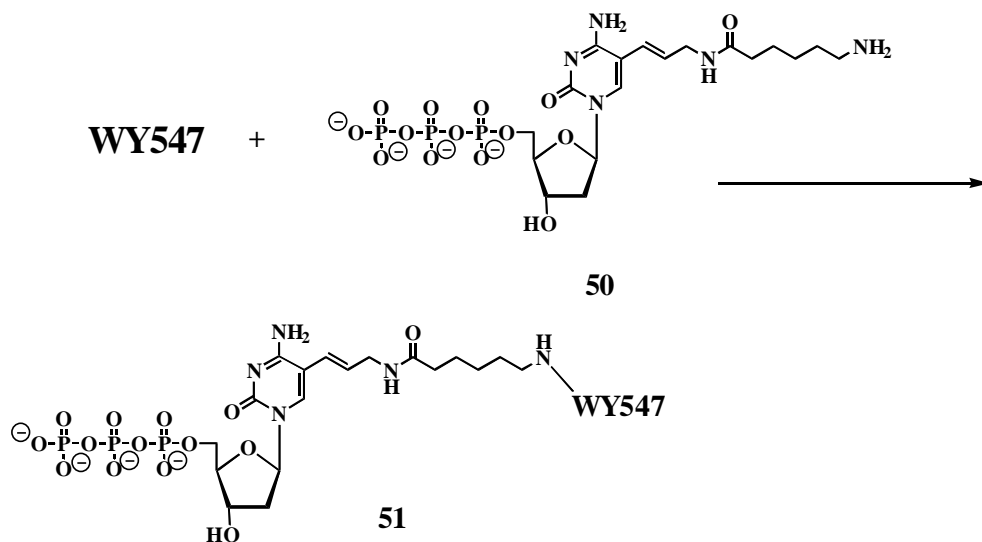


図 2.2-②-7

2'-dCTP 誘導体(50)を IEW に溶解し、WY547 の DMF 溶液を添加した後、室温で終夜攪拌した。反応終了後、カラムにより精製し、残渣を凍結乾燥することで WY547 標識 2'-dCTP 誘導体(51)(WY547-dCTP)を得た。

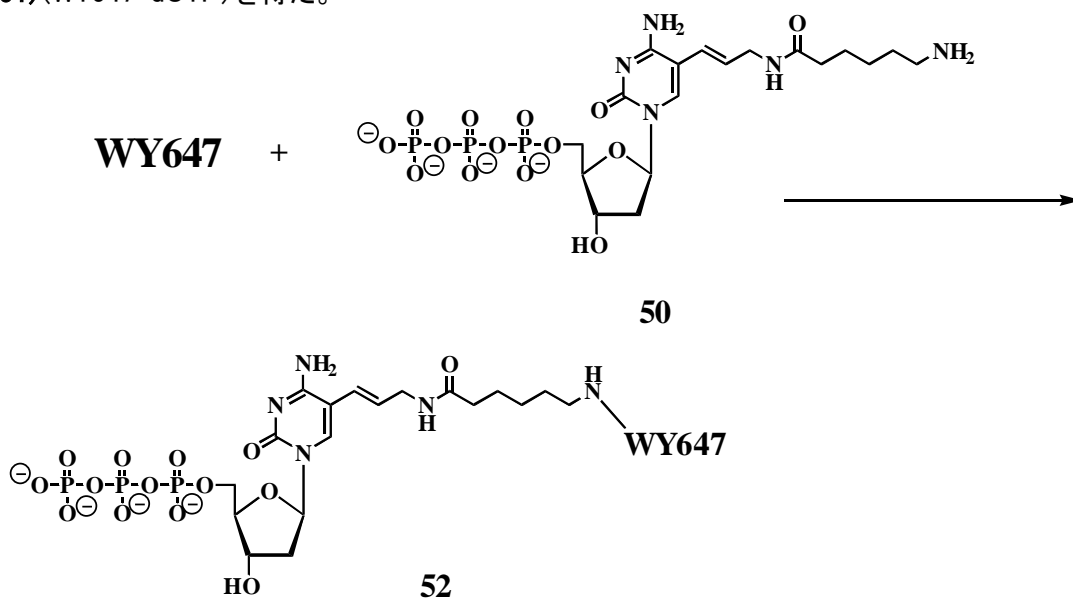


図 2.2-②-8

2'-dCTP 誘導体(50)を IEW に溶解し、WY647 の DMF 溶液を添加した後、室温で終夜攪拌した。反応終了後、カラムにより精製し、残渣を凍結乾燥することで WY647 標識 2'-dCTP 誘導体(52)(WY647-dCTP)を得た。

更に上述した新規な蛍光物質 WY535-S4 と WY635-S4 と反応させ、WY535-S4-dCTP と WY635-S4-dCTP をそれぞれ合成した。

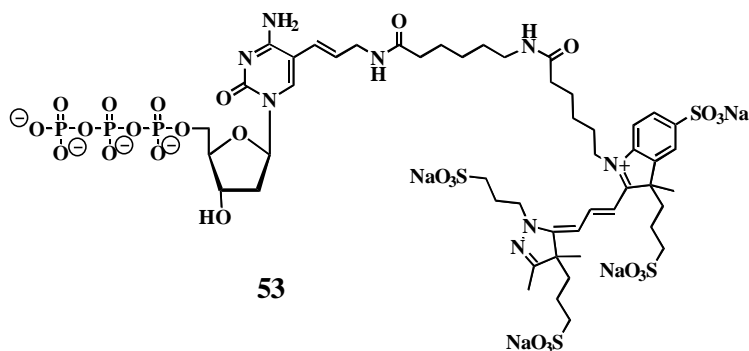
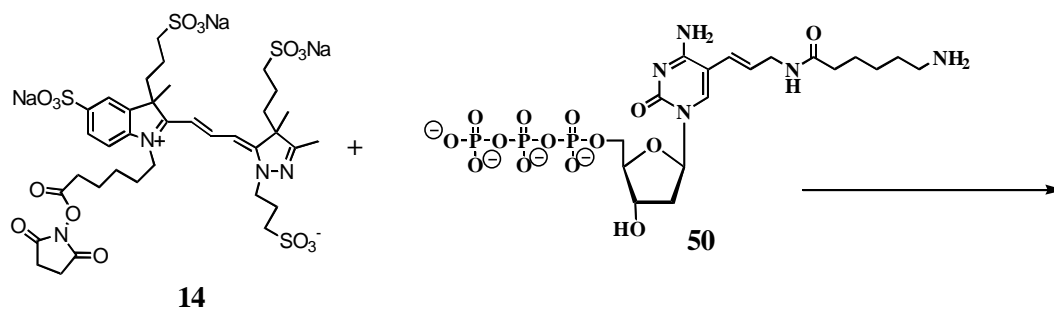


図 2.2-②-9

2'-dCTP 誘導体(50)を IEW に溶解し、化合物 14(WY535-S4)の DMF 溶液を添加した後、室温で終夜攪拌した。反応終了後、カラムにより精製し、残渣を凍結乾燥することで WY535-S4 標識 2'-dCTP 誘導体(53)(WY535-S4-dCTP)を得た。

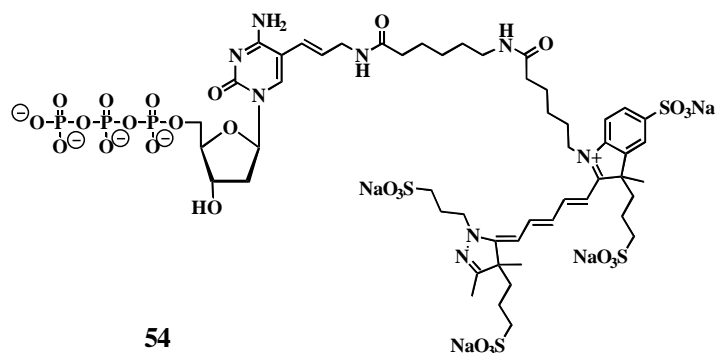
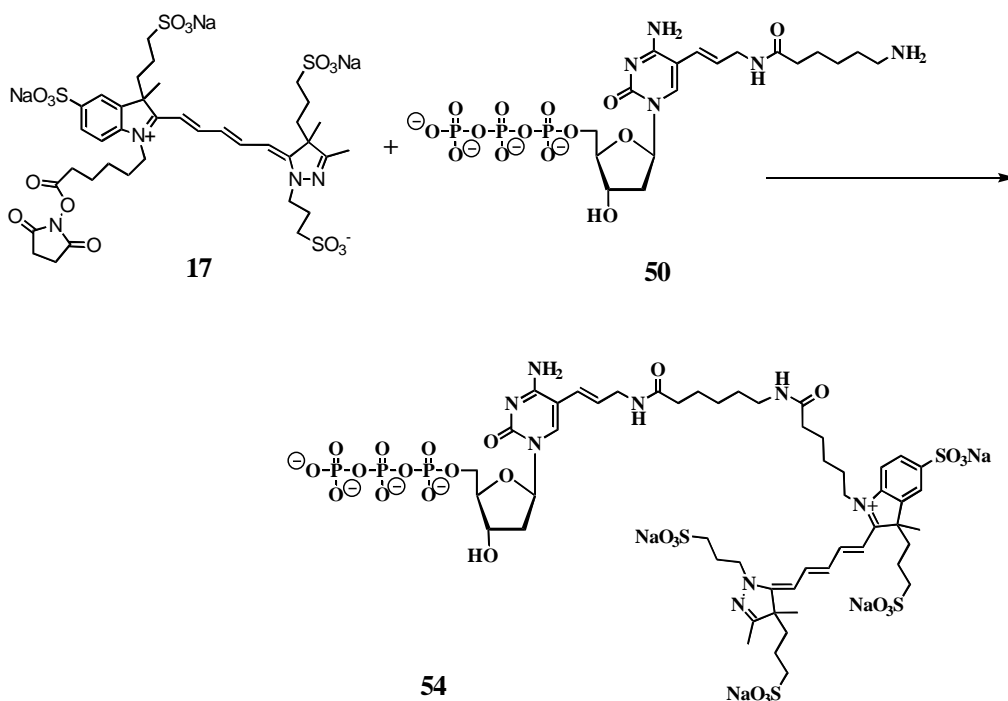


図 2.2-②-10

2'-dCTP 誘導体(50)を IEW に溶解し、化合物 17(WY635-S4)の DMF 溶液を添加した後、室温で終夜攪拌した。反応終了後、カラムにより精製し、残渣を凍結乾燥することで WY635-S4 標識 2'-dCTP 誘導体(54)(WY635-S4-dCTP)を得た。

更に上述した新規な蛍光物質 WY535-S3 と WY635-S3 と反応させ、WY535-S3-dCTP と WY635-S3-dCTP をそれぞれ合成した。

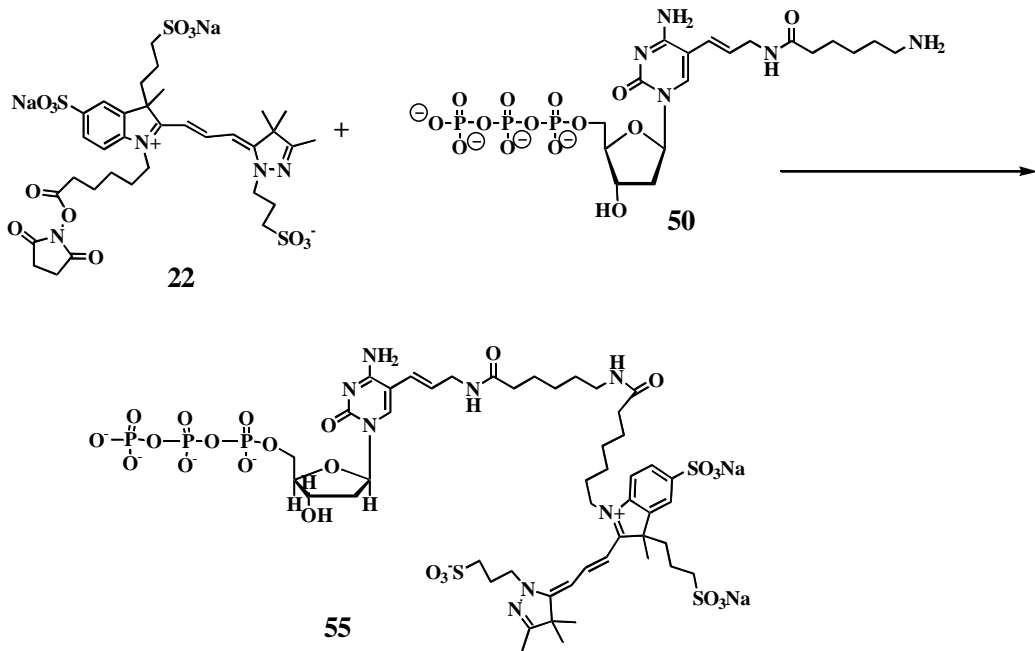


図 2.2-②-11

2'-dCTP 誘導体(50)を IEW に溶解し、化合物 22 (WY535-S3) の DMF 溶液を添加した後、室温で終夜攪拌した。反応終了後、カラムにより精製し、残渣を凍結乾燥することで WY535-S3 標識 2'-dCTP 誘導体(55) (WY535-S3-dCTP) を得た。

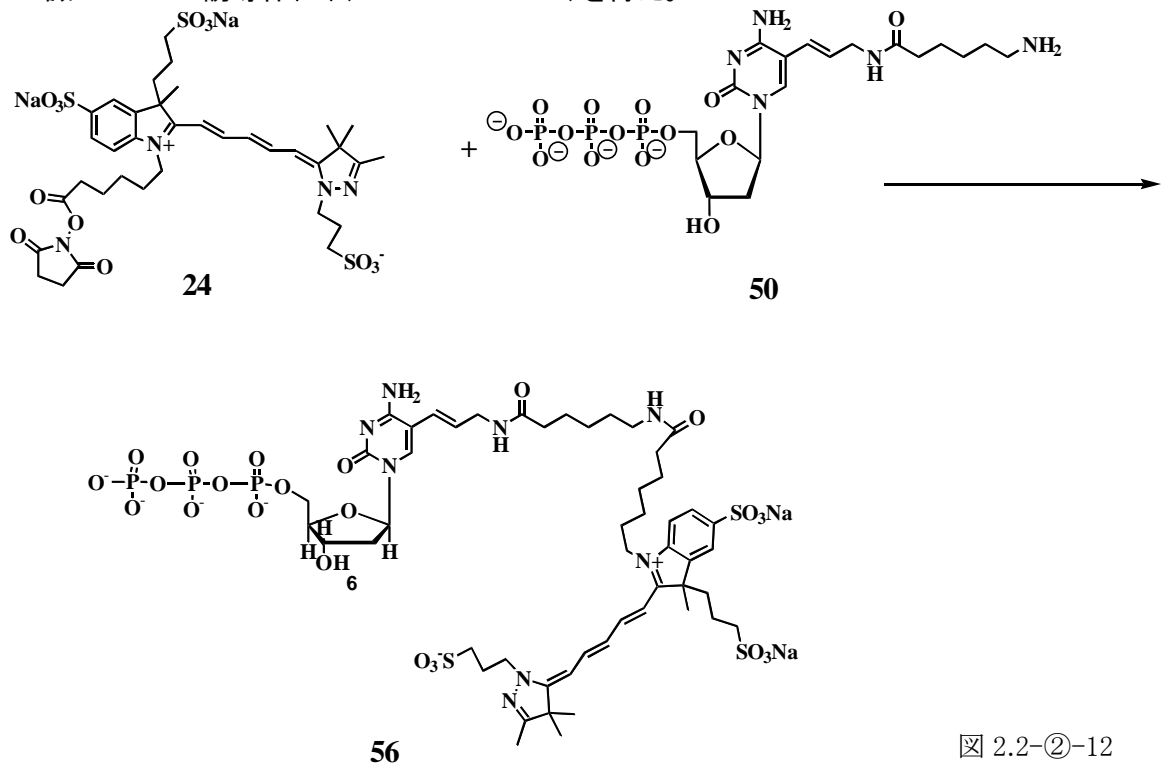


図 2.2-②-12

2'-dCTP 誘導体(50)を IEW に溶解し、化合物 24 (WY635-S3) の DMF 溶液を添加した後、室温で終夜攪拌した。反応終了後、カラムにより精製し、残渣を凍結乾燥することで WY635-S3 標識 2'-dCTP 誘導体(56) (WY635-S3-dCTP) を得た。

更に上述した新規な蛍光物質 WY535-S2 と WY635-S2 と反応させ、WY535-S2-dCTPWY635-S2-dCTP をそれぞれ合成した。

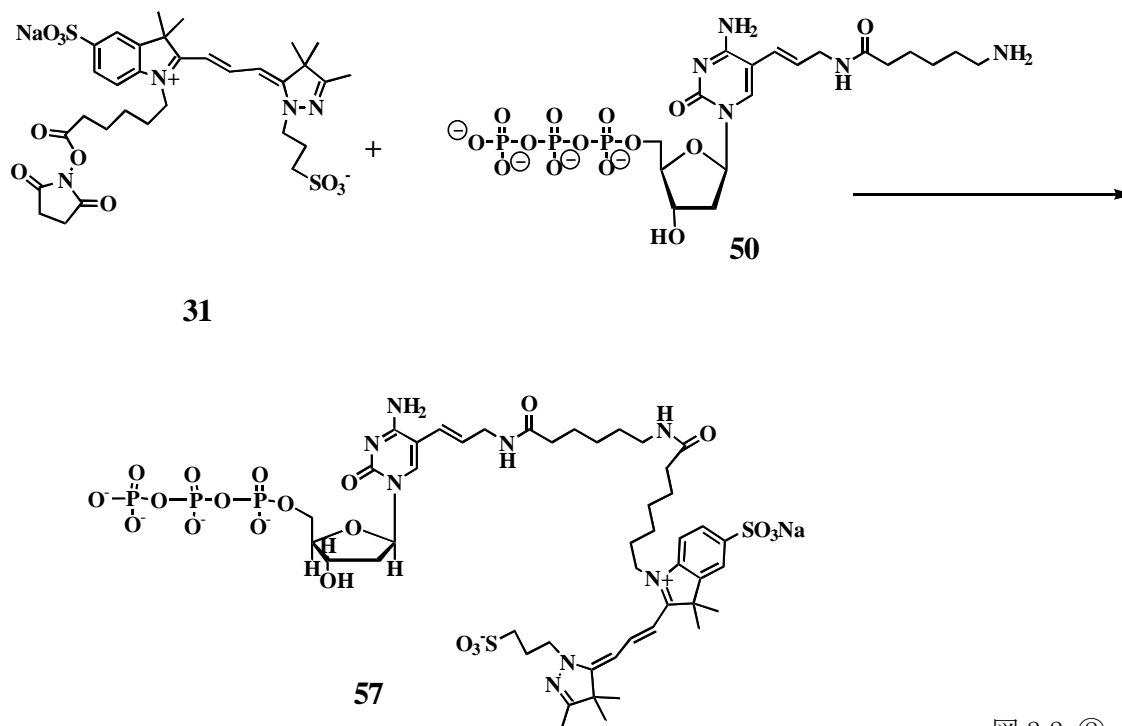


図 2.2-②-13

2'-dCTP 誘導体(50)を IEW に溶解し、化合物 31 (WY535-S2) の DMF 溶液を添加した後、室温で終夜攪拌した。反応終了後、カラムにより精製し、残渣を凍結乾燥することで WY535-S2 標識 2'-dCTP 誘導体(57) (WY535-S2-dCTP) を得た。

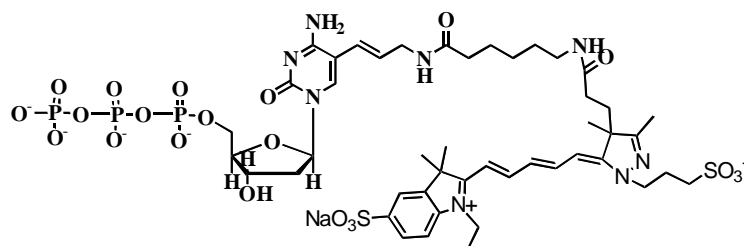
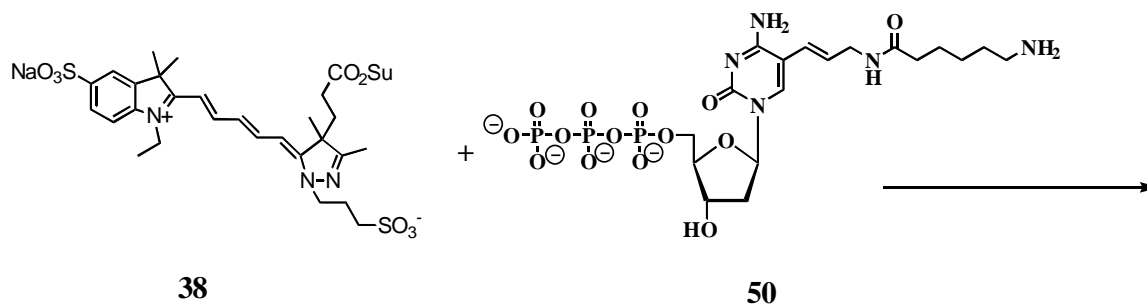


図 2.2-②-14

2'-dCTP 誘導体(50)を IEW に溶解し、化合物 38(WY635-S2)の DMF 溶液を添加した後、室温で終夜攪拌した。反応終了後、カラムにより精製し、残渣を凍結乾燥することで WY635-S2 標識 2'-dCTP 誘導体(58)(WY635-S2-dCTP)を得た。

新規な構造の蛍光物 WY535-S4, WY635-S4, WY535-S3, WY635-S3, WY535-S2, WY635-S2 を合成し、新規リンカーを用いてヌクレオチド化を行い、蛍光標識ヌクレオチド WY535-S4-dCTP, WY635-S4-dCTP, WY535-S3-dCTP, WY635-S3-dCTP, WY535-S2-dCTP, WY635-S2-dCTP を合成した。

③ 酵素による蛍光標識ヌクレオチドの取り込みに関する研究開発
背景及び目的

本プロジェクトにおいてBACアレイCGH法に最適な蛍光標識DNAを作成するために上述の新規蛍光標識ヌクレオチド取込み条件の最適化について検討を行うことにした。

この BAC アレイ CGH 法では、染色体の増幅、欠損を競合ハイブリダイゼーション後の Log2 比で測定することから、それぞれの蛍光標識ヌクレオチドの取込み効率を 2 種の蛍光色素において最適にする必要がある。2 種の蛍光色素において、取込み効率のバランスに差があると、測定サンプルと対象の Log2 比のバラツキが発生し、再現の良いデータが取得できない。バラツキが大きいとカットオフの値が高くなり、染色体の微小な増幅及び欠損の判別が難しくなる。このように、高性能の蛍光色素の開発だけでは BAC アレイデータのクオリティに直結している高品質の標識 DNA の作成には対応できない。そこで、ランダムプライマー、酵素、反応緩衝液、ヌクレオチド、蛍光標識ヌクレオチドをもちい BAC アレイ CGH 法に最適化された標識核酸を作製できるシステム構築を目的とした。

新規蛍光物質を合成し、キット化するまでには、時間がかかるため、すでに市販されている蛍光物質を用いて、キットの作製のノウハウを蓄積し、新規蛍光物質の合成が完了した段階で、そのノウハウを用いて新規蛍光物質のキット化を進める計画を立てた。

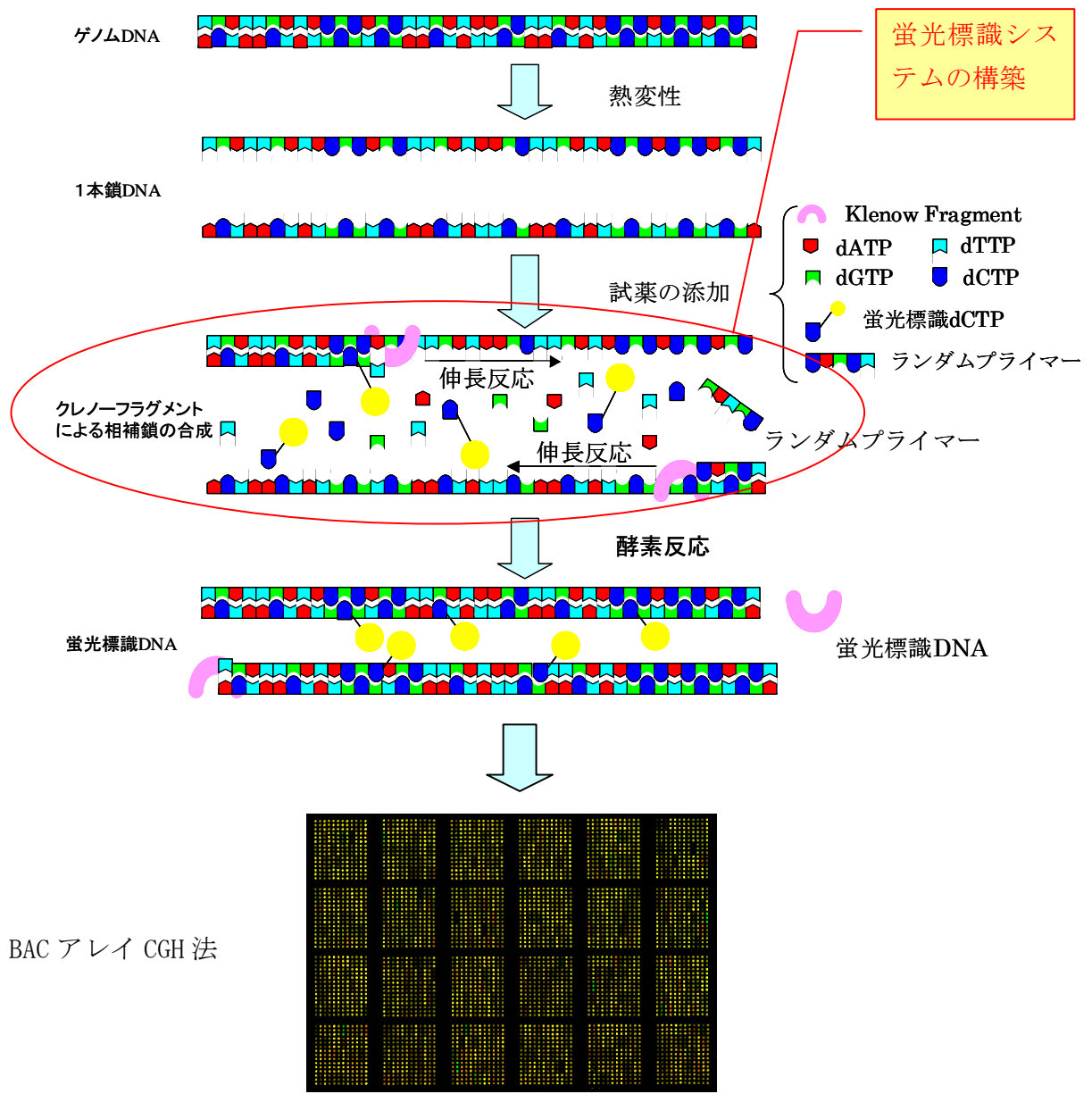


図 2.2-③-1

方法および結果

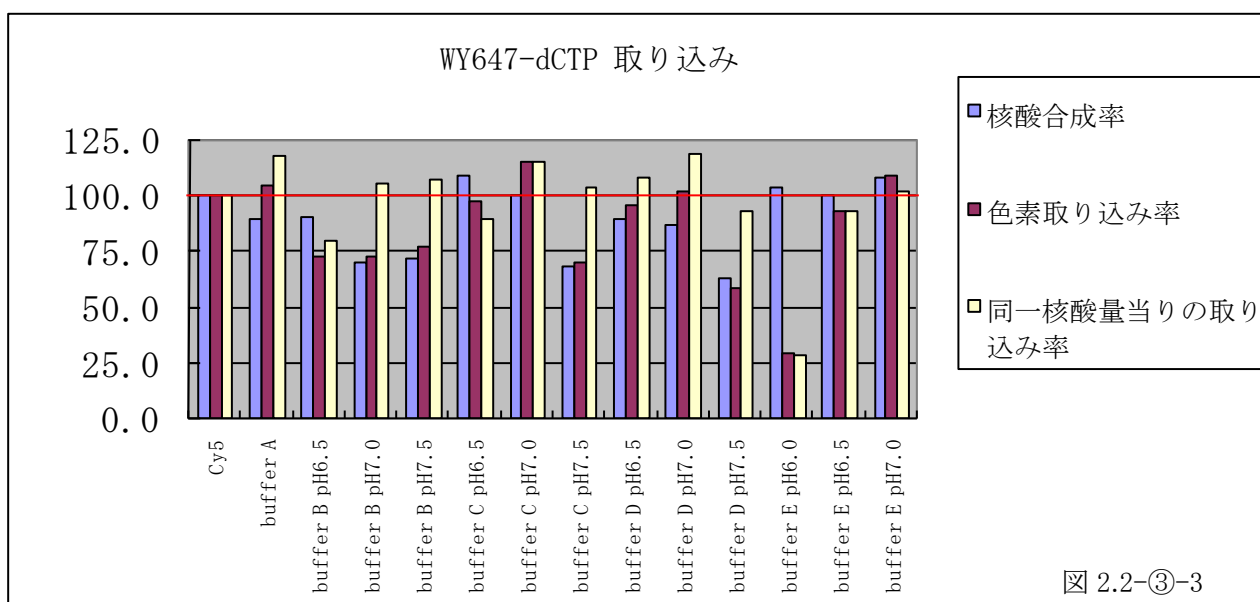
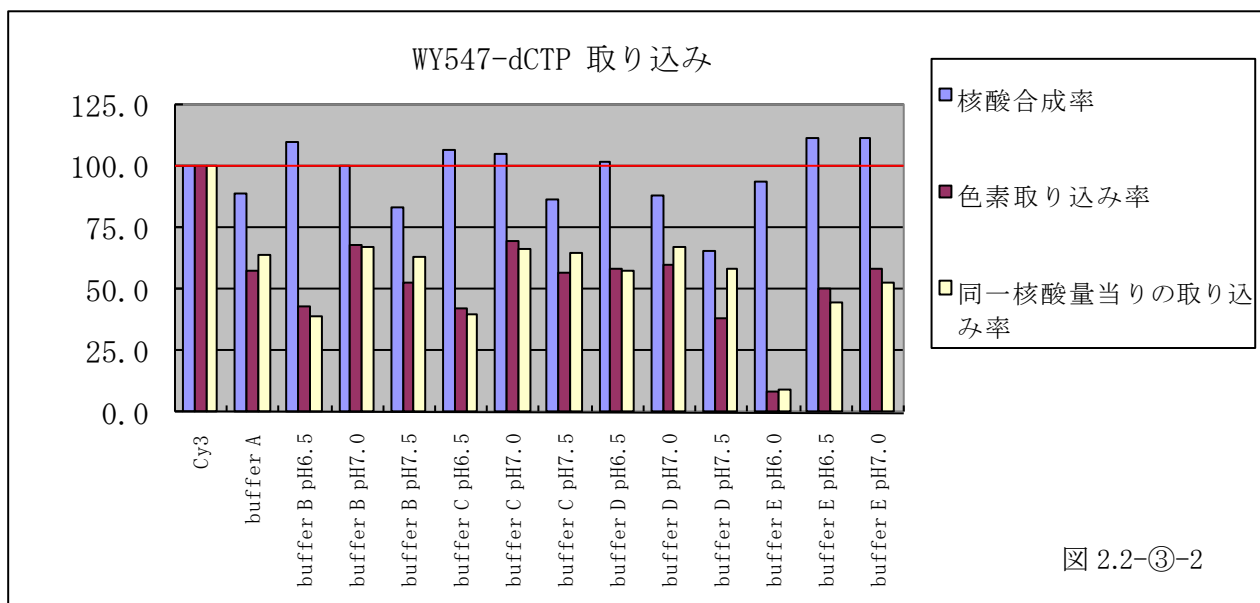
まず、すでに市販されている、蛍光物質をヌクレオチド化した化合物 51(WY547-dCTP)と化合物 52(WY647-dCTP)を用いて蛍光標識キットの作製をめざし、取り込み条件の最適化を行った。まず、種々の緩衝液について検討を行った。

<DNA 鎖への取込み>

- (1) 男性または、女性 DNA を 500ng 分相当の液量を分取した。
- (2) Random Primer solution を 20 μ L ずつ添加した。
- (3) 滅菌水を加えて全量を 39 μ L に調整した。
- (4) 100°C で 10 分加熱した。
- (5) 氷上で 5 分冷却した。
- (6) 室温に 5 分温置した。
- (7) dNTP を 5 μ L 添加した。
- (8) 各種蛍光標識ヌクレオチドを 3 μ L 添加した。
- (9) 遠心分離機によりスピンドウン(6,000r.p.m., 30 秒)した。
- (10) KlenowFragment を 3 μ L 添加した。
- (11) マイクロピペッターでピペッティングにより泡を作らないように混合した。
- (12) 37°C で 16 時間反応した。
- (13) 0.5M EDTA 5 μ L 添加し、反応を停止した。

<キアゲンスピンカラムを用いた蛍光標識 DNA の精製及び分光光度計による測定>

- (1) 反応停止後の液に Binding Buffer を 275 μ L 加えた。
- (2) ピペッティングにより混合した。
- (3) スピンカラムに 1.5mL のマイクロチューブをセットした。
- (4) 混合液全量をスピнкаラムにアプライした。
- (5) 6,000r.p.m.(3,500 \times g) で 2 分遠心分離した。
- (6) Wash Buffer 750 μ L を添加した。
- (7) 6000r.p.m.(3,500 \times g) で 2 分遠心分離した。
- (8) 12,000r.p.m.(14,000 \times g) で 3 分遠心分離した。
- (9) カラムの中心に Elution Buffer を 50 μ L 添加した。
- (10) アルミホイルで遮光し、5 分室温に放置した。
- (11) 12,000r.p.m.(14,000 \times g) で 3 分遠心分離した。
- (12) カラムの中心に Elution Buffer を 30 μ L 添加した。
- (13) アルミホイルで遮光し、5 分室温に放置した。
- (14) 12,000r.p.m.(14,000 \times g) で 3 分遠心分離した。
- (15) 溶出液を分光光度計で測定し、DNA 合成量、蛍光色素取り込み量を計算した。



青色のバーは、核酸の合成量について CyDye を 100%とした場合の合成率を示している。
 えんじ色のバーは、蛍光物質の取り込み量について CyDye を 100%とした場合の蛍光物質取り込み率を示している。
 肌色のバーは、核酸 1 μ g 当たりに含まれる蛍光物質質量について CyDye を 100%とした場合の蛍光物質取り込み率を示している。
 各条件について比較を行ったところ、緩衝液 C pH7.0 の条件において WY547-dCTP、WY647-dCTP ともに高い取り込み率を示した。このことから、緩衝液は、C の pH7.0 を用いることにした。
 WY547-dCTP については、Cy3 に比べ取り込み率が 70%程度であり、さらに取り込み率を向上させるために、添加物の検討を行った。

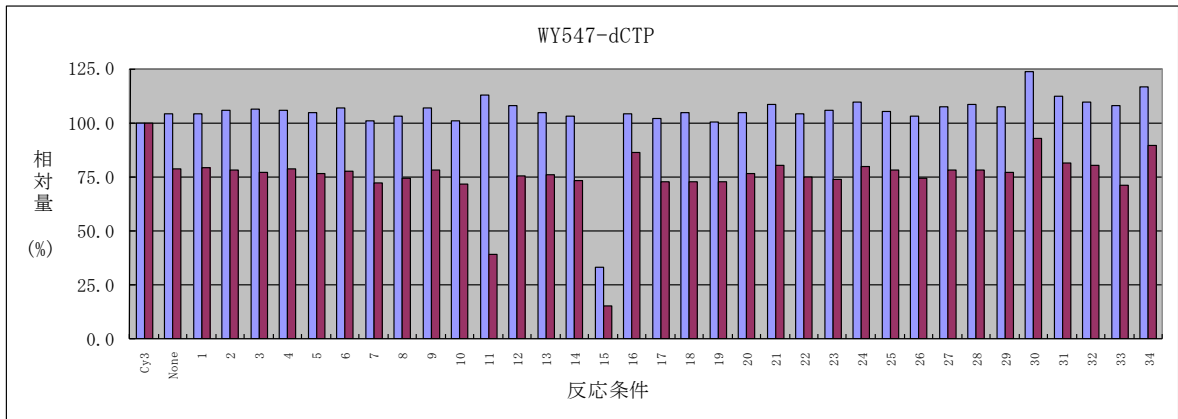


図 2.2-③-4

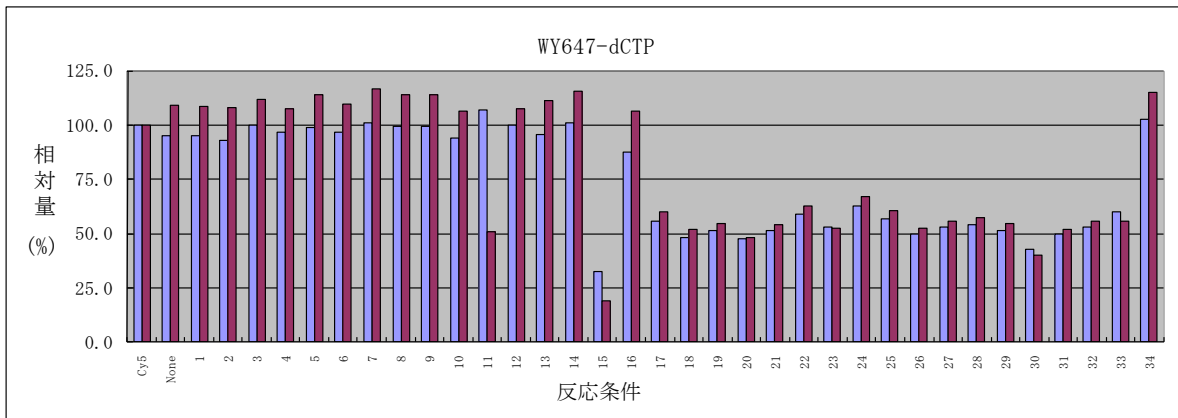


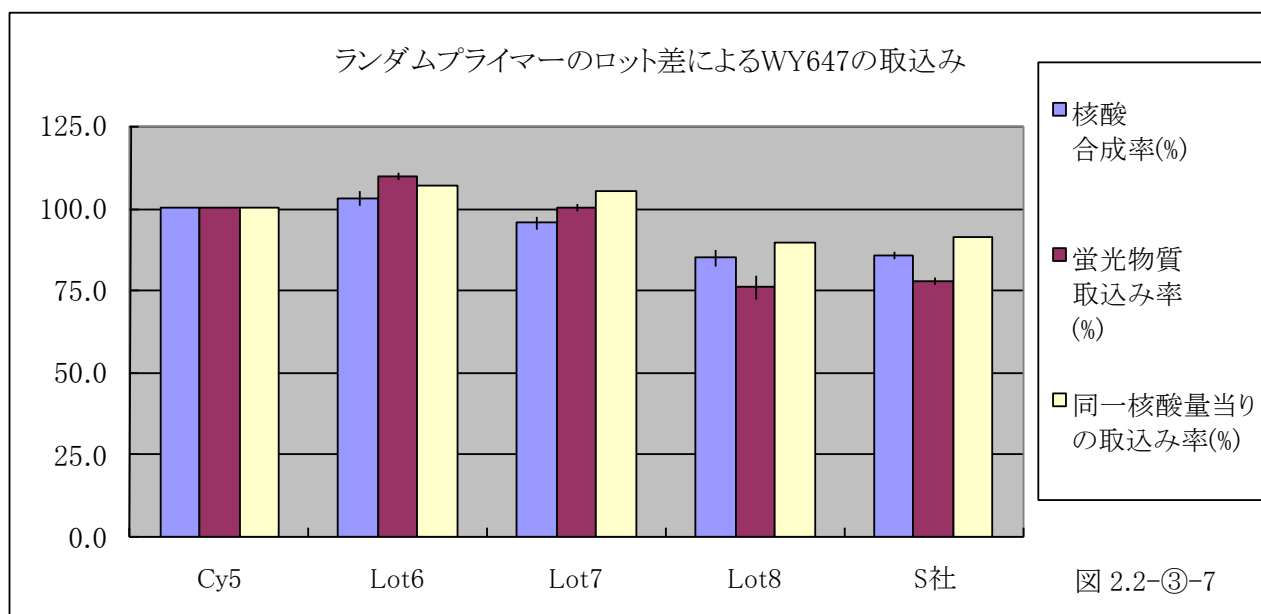
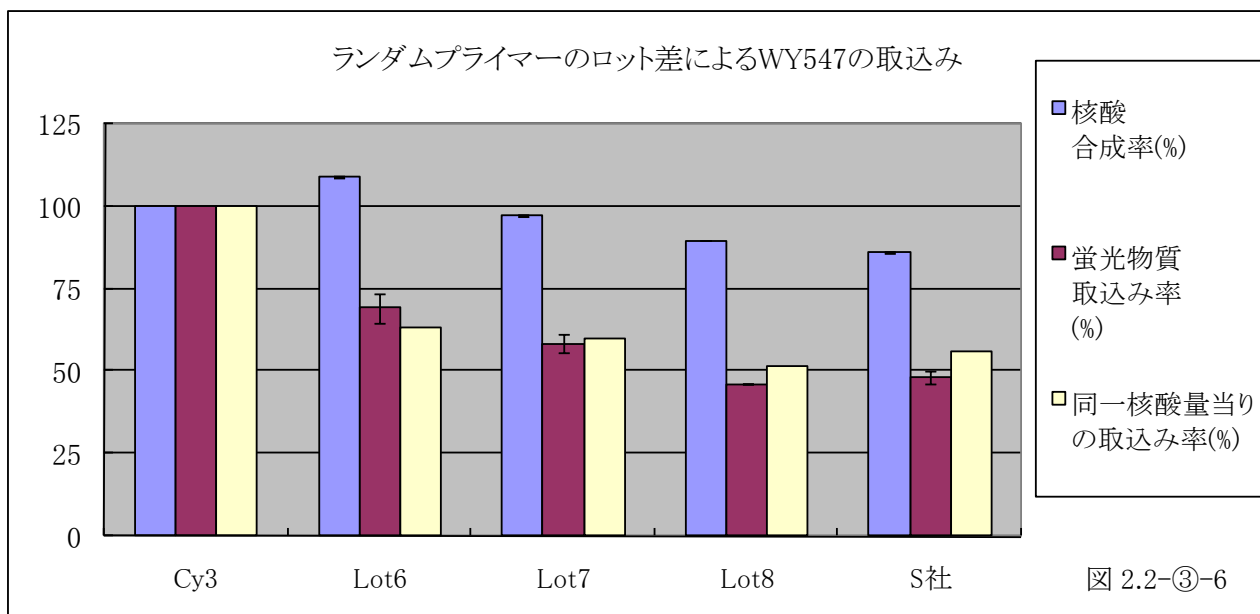
図 2.2-③-5

ブルーのバーは、核酸の合成量について CyDye を 100%とした場合の合成率を示している。
 臙脂のバーは、蛍光物質の取り込み量について CyDye を 100%とした場合の蛍光物質取り込み率を示している。

その結果、WY547-dCTP の取り込みでは、条件 16,30,34 において取り込み率が高く、WY647-dCTP においては、条件 7,14 において取り込み量が多かった。

ただ、キット化を行う上で、WY547,WY647 が異なる組成であると、緩衝液が 2 種類となり、混乱を招くため、本添加剤の使用については、BAC アレイのデータを見て判断することにした。

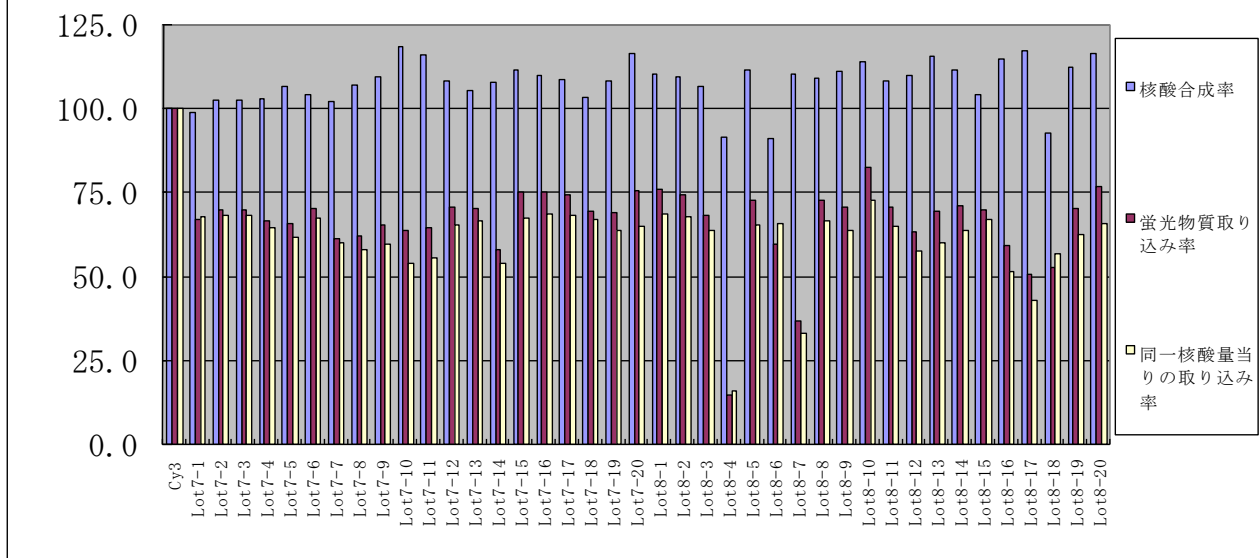
次に、使用するランダムプライマーについて検討を行った。



使用するランダムプライマーは、その作製ロットにより蛍光物質取り込み率に大きな差があることが明らかとなった。1 ロットは、複数本の合成ランダムプライマーを混ぜて作製しているため、このロット間差が何に由来するのか調べるために、合成したランダムプライマー1本ずつ蛍光物質の取り込み率を測定することにした。

ランダムプライマーのバッチ差

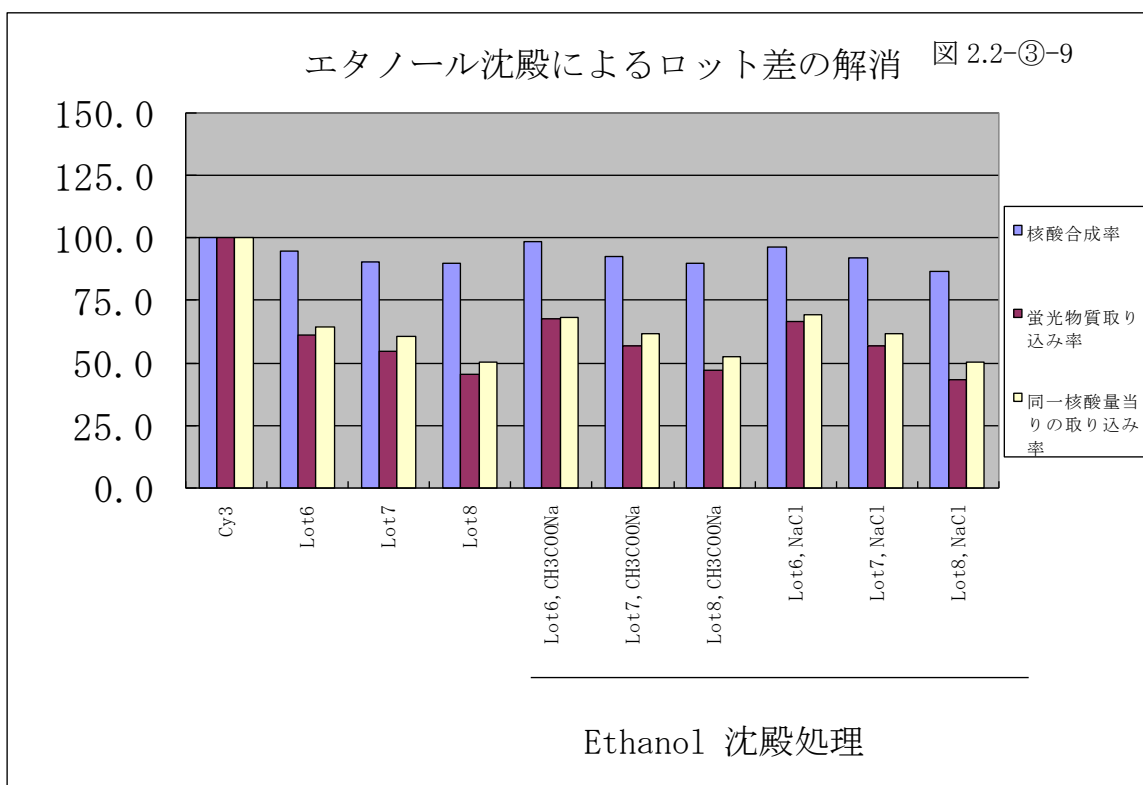
図 2.2-③-8



ロット間差で取り込み率が低かった Lot7 と Lot8 について合成したすべてのランダムプライマーについて取り込み率を測定した。その結果、合成したランダムプライマーには、取り込み率がかなり異なることが明らかとなった。また、この 2 ロットで取り込み率が低下した原因は、取り込み率が低いランダムプライマーが混ざることによって全体の取り込み率が低下することに起因することがわかった。

つぎに、取り込み率が低いこの 2 ロットについて、エタノール沈殿による精製について検討を行った。

エタノール沈殿によるロット差の解消 図 2.2-③-9



Ethanol 沈殿処理

その結果、エタノール沈殿による効果はみられなかった。

そのため、合成したすべてのランダムプライマーについて取り込み率を測定し、取り込み率の低いランダムプライマーを除くことで、取り込み率の低下を防ぐことにした。

上述した WY547-dGTP と WY647-dGTP を用いて、様々な条件下で蛍光色素の取り込み率を測定し、核酸への取込みの最適条件について検討を行った。その結果、感度がより求められる Cy5 に相当する WY-647 において Cy5 より取り込み率を向上させる事に成功した。

酵素取り込み条件で良好な結果の得られた条件で標識を行い、実際に BAC アレイ上で正常ヒト女性試料と男性試料を各蛍光標識ヌクレオチドで標識し、BAC アレイ CGH 解析を行い性能について評価を行った。

<ハイブリダイゼーション溶液の調製>

(1) 以下の各試薬を混合した。

蛍光標識 DNA(対照)	80μ l
蛍光標識 DNA(対象)	80μ l
Solution B	100μ l
3M 酢酸ナトリウム	25μ l
100% エタノール	700μ l

(2) -20°Cに 60 分置いた。

(3) 14,500r.p.m. (20,200 × g) 20 分遠心分離した。

(4) 上清を除去した。

(5) 氷冷した 70%エタノールを加えた。

(6) 14,500r.p.m. (20,200 × g) 5 分遠心分離した。

(7) 上清を除去した。

(8) 遮光下 10 分乾燥した。

(9) Solution D を4μ l 添加し、ペレットを溶解させた。

(10) Solution C を 160μ l 添加し混合した。

(11) 30°Cで 30 分遮光下静置した。

(12) 70°Cで 15 分加熱変性を行った。

(13) 37°Cで 60 分プレアニーリングした。

<プレハイブリダイゼーション>

(1) 以下の各試薬を混合し、プレハイブリ液を調製した。

Solution C	30μ l
Solution E	10μ l

(2) 70°Cで 10 分加熱変性した。

(3) 37°Cに冷却

(4) BAC アレイにプレハイブリ液をアプライした。

(5) 22 × 55mm のカバーガラスをかぶせた。

(6) 湿箱中 37°Cで 1 時間静置した。

(7) カバーガラスをはずし、蒸留水中で洗浄を 2 回行った。

(8) イソプロパノールに浸漬した。

(9) 2000 r.p.m. (780 × g) 2 分遠心し、乾燥させた。

(10) ハイブリダイゼーション装置にセットした。

<ハイブリダイゼーション、洗浄、測定および解析>

(1) ハイブリダイゼーション溶液を BAC アレイにアプライした。

(2) 下記条件でハイブリ

温度	37°C
攪拌	high
時間	67 時間

(3) 46°C、50%Formamide/2×SSC で洗浄し 5 分静置した(計 3 回)。

(4) 46°C、0.1%SDS/2×SSC で洗浄し 10 分静置した(計 3 回)。

(5) 46°C、PN Buffer で洗浄し 10 分静置した(計 3 回)。

(6) 46°C、2×SSC で洗浄し 2 分静置した(計 3 回)。

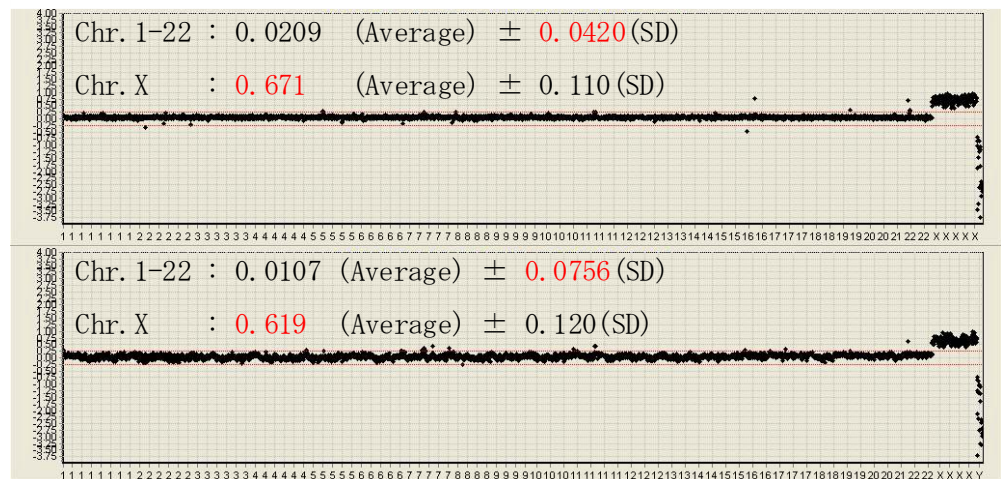
(7) 室温、コップリンジャー中 2×SSC で洗浄した。

(8) 2000 r.p.m.(780×g)2 分遠心し、乾燥させた。

(9) GenePix 4000B で測定した。

(10) MAC Viewer で解析した。

WY-Dye



従来色素

図 2.2-③-10

常染色体 1-22 番染色体では、男性、女性各 2 本ずつ染色体をもっているため、理論上、各蛍光色素の Log2 比を取ると 0 となる。一方、X 染色体は、女性 2 本、男性 1 本であり、理論上蛍光量が 2 倍、Log2 比で 1 となる。Y 染色体は、男性しかないので、-無限大を示す。蛍光色素の評価としては、常染色体での Log2 比の S.D.値が小さくほど増減の評価であるカットオフ値を下げることができ、正確かつ高感度に検出が可能で、X 染色体で 1 に近い値を示すほうが、増減判別可能であり良好な結果がえられる。

今回、検討した和光で合成した蛍光標識ヌクレオチド(WYDye)では、常染色体の S.D.は、0.042 と従来の蛍光色素の 0.0756 と比べても、S.D.値が小さくバラツキが少ないという結果であった。また、X 染色体の Log2 比が 0.671 と従来の蛍光色素の 0.619 と比べても大きく、良好であった。これらの結果から、WY-Dye を使用することで、常染色体の S.D.値を抑える事ができ、正確かつ高感度に染色体異常を捕らえる事が可能な事がわかった。

また、本結果から、WY547 と WY647 において、添加剤を使用しなくても十分な性能を保持できることがわかった。また、添加剤を加えた場合、WY547 と WY647 で緩衝液組成が異なることになり、キット化した場合に不便になるため、使用しないことに決定した。

本成果を基に特許を出願し、商品化を行った。

図 2.2-③-11



Genomic DNA Labeling Kit 2007年2月発売

国内特許出願

和光純薬工業株式会社:出願済み特許 1 件

発明の名称:「ゲノム DNA 断片の増幅または欠失の検出方法」

出願人:和光純薬工業株式会社

出願番号:特願 2007-020701

出願日:平成 19 年 1 月 31 日

PCT 出願

和光純薬工業株式会社:出願済み特許 1 件

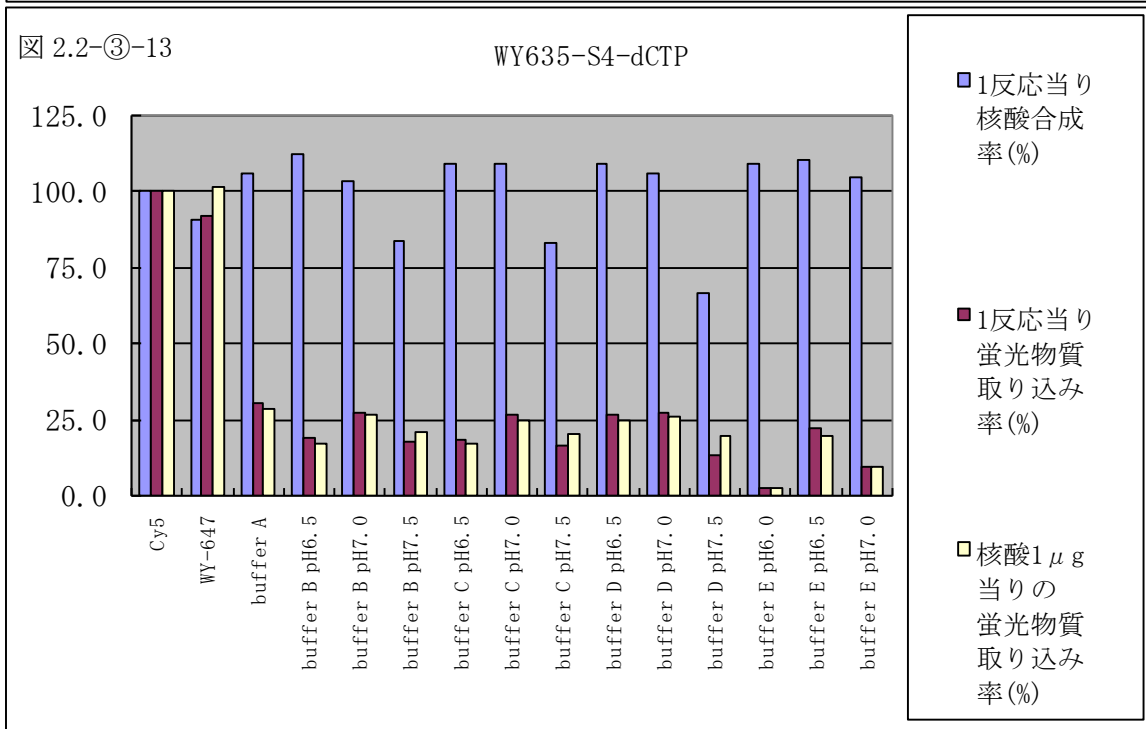
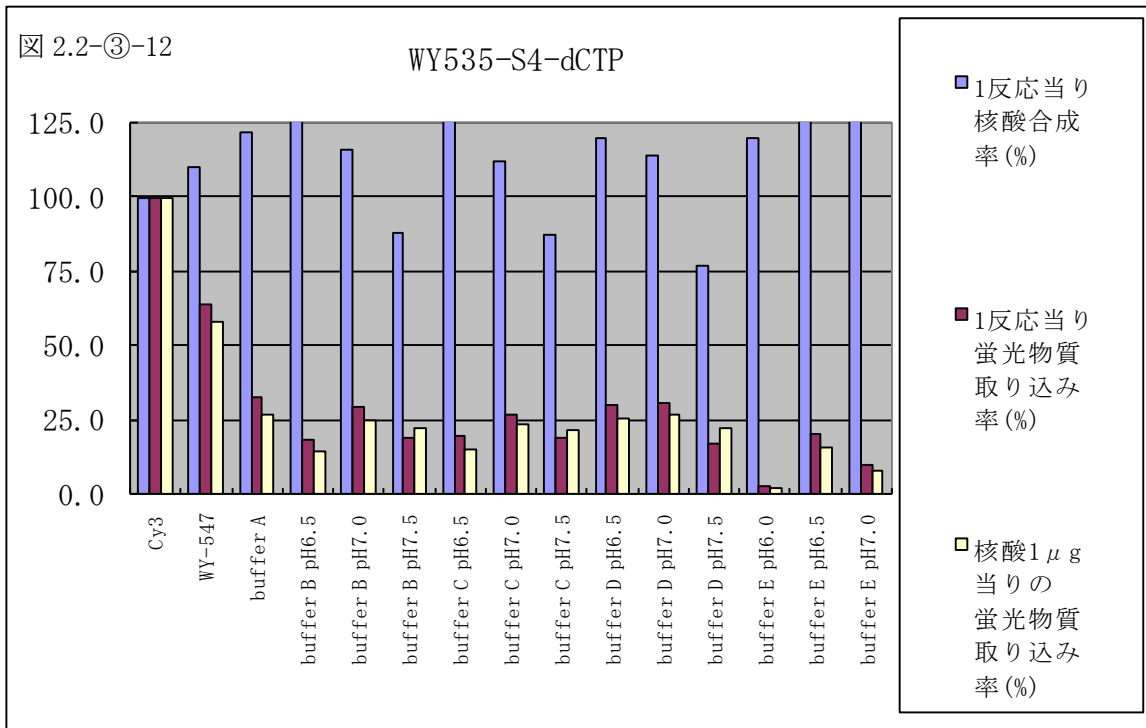
発明の名称:「ゲノム DNA 断片の増幅または欠失の検出方法」

出願人:和光純薬工業株式会社

出願番号:PCT JP2008/051215

出願日:平成 20 年 1 月 28 日

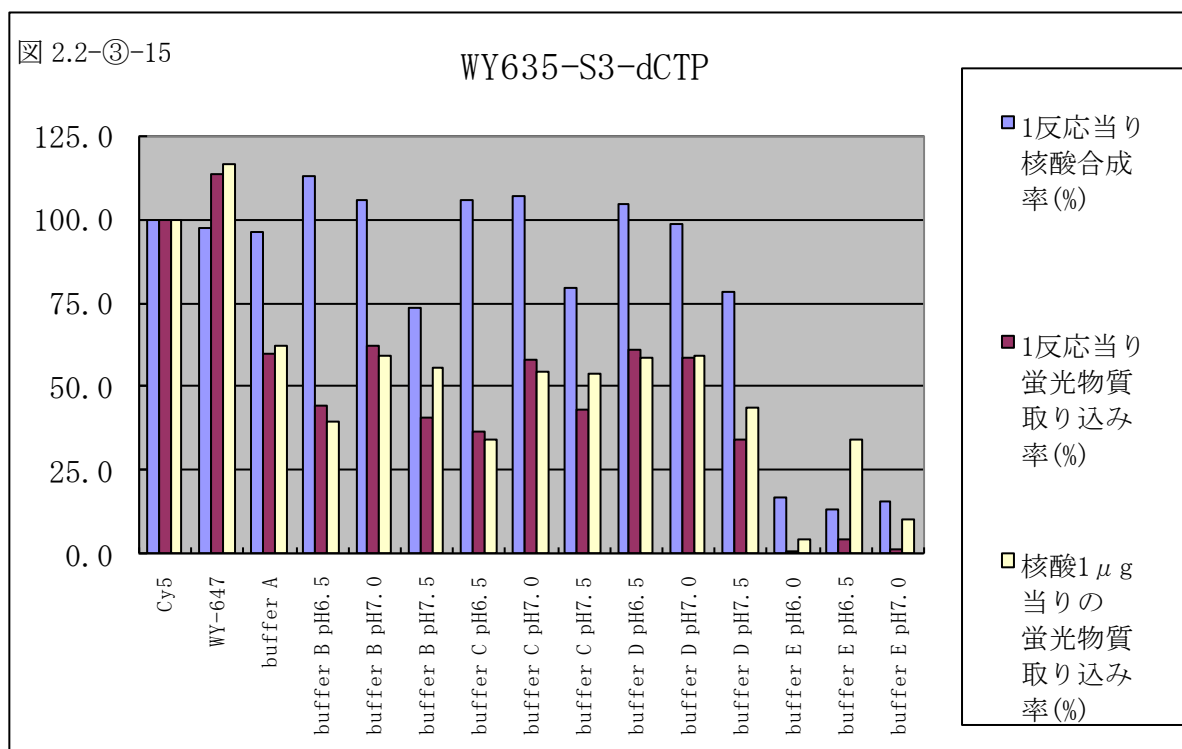
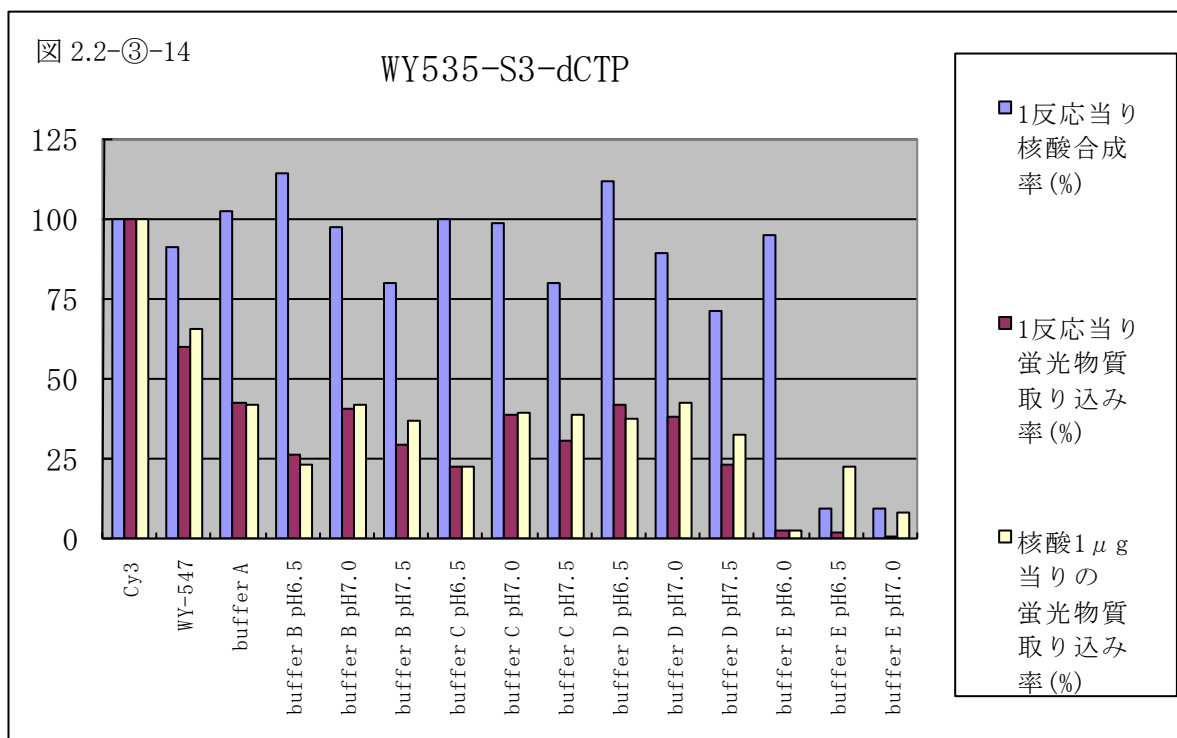
WY547-dCTPとWY647-dCTPでの知見をもとに、新規な蛍光物質であるWY535-S4-dCTPとWY635-S4-dCTPの取り込み条件の最適化を行った。種々の条件検討において、効果の高かった反応時の緩衝液組成の検討を行った。



その結果、すでに発売しているWY547とWY647でのDNA標識に比べ、WY535-S4とWY635-S4の取り込み率は25%程度であった。核酸の合成量がCyDyeと変わらないことから、蛍光標識ヌクレオチド取り込みによるDNA合成の阻害があるわけではないことがわかった。しかしながら、あまりに取り込み率が悪いため、蛍光標識ヌクレオチドの構造を変える必要があると判断した。

蛍光標識ヌクレオチドの構造を変え、取り込み率の向上を目指した。ただ、基本骨格を変更は、

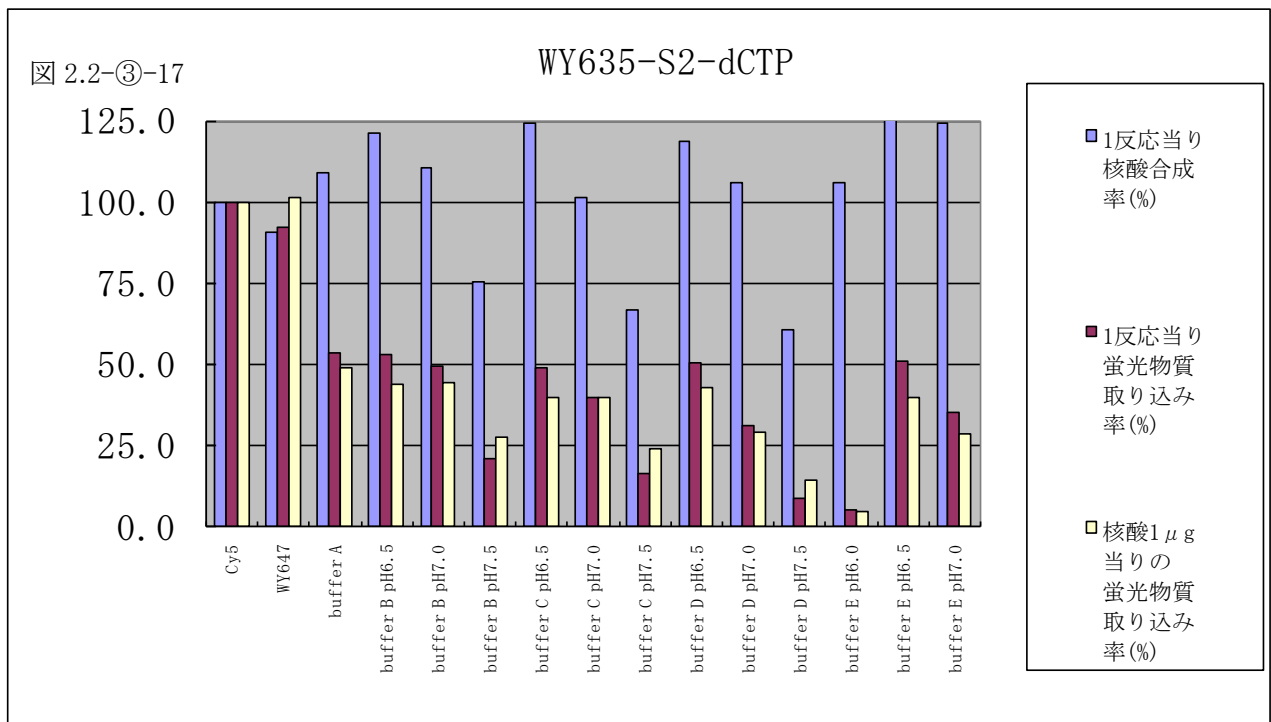
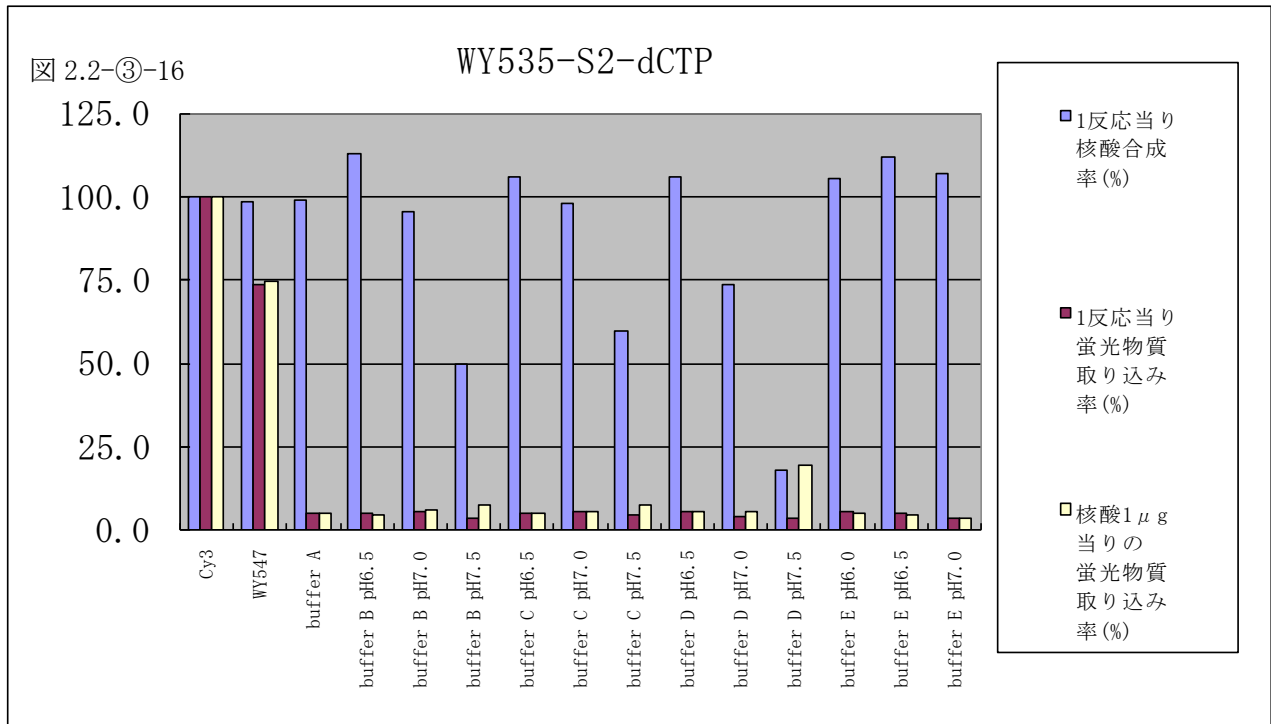
当初の目的である、既存のレーザーキャナーの励起レーザー波長にあった新規な蛍光物質ではなくするため、側鎖の変更を行っていくことにした。蛍光物質の硫酸基の数に着目し、硫酸基の数を減らした蛍光物質の合成を試みた。硫酸基の数を3つに減らしたWY535-S3-dCTPおよびWY635-S3-dCTPの2種類の合成を行い、取り込み率について検討を行った。



硫酸基が3つとなったWY535-S3-dCTPおよびWY635-S3-dCTP について取り込み率を測定したところ、WY535-S4-dCTPおよびWY635-S4-dCTPに比べ取り込み率が向上していることがわ

かった。

更なる取り込み率向上のために、硫酸基を2つにしたWY535-S2-dCTPおよびWY635-S2-dCTPの合成を行った。



硫酸基が2つとなったWY535-S2-dCTPおよびWY635-S2-dCTP について取り込み率を測定したところ、WY535-S2-dCTPは、ほとんど取り込まれず、硫酸基が4つのWY535-S4-dCTPおよび硫酸基が3つのWY635-S3-dCTPより取り込み率が悪くなっていた。WY635-S2-dCTPは、WY635-S4-dCTPに比べ取り込み率が向上していたが、WY635-S3-dCTPに比べ取り込み率が低下していた。硫酸基は、インドレニン環、ピラゾール環の両方に存在する必要がある、これ以上

硫酸基を減らすことはできないと判断し、取り込み率が最も高かったWY535-S3-dCTPおよびWY635-S3-dCTPを用いてCGH解析を行った。

female-WY635-S3/male-WY535-S3

図 2.2-③-18

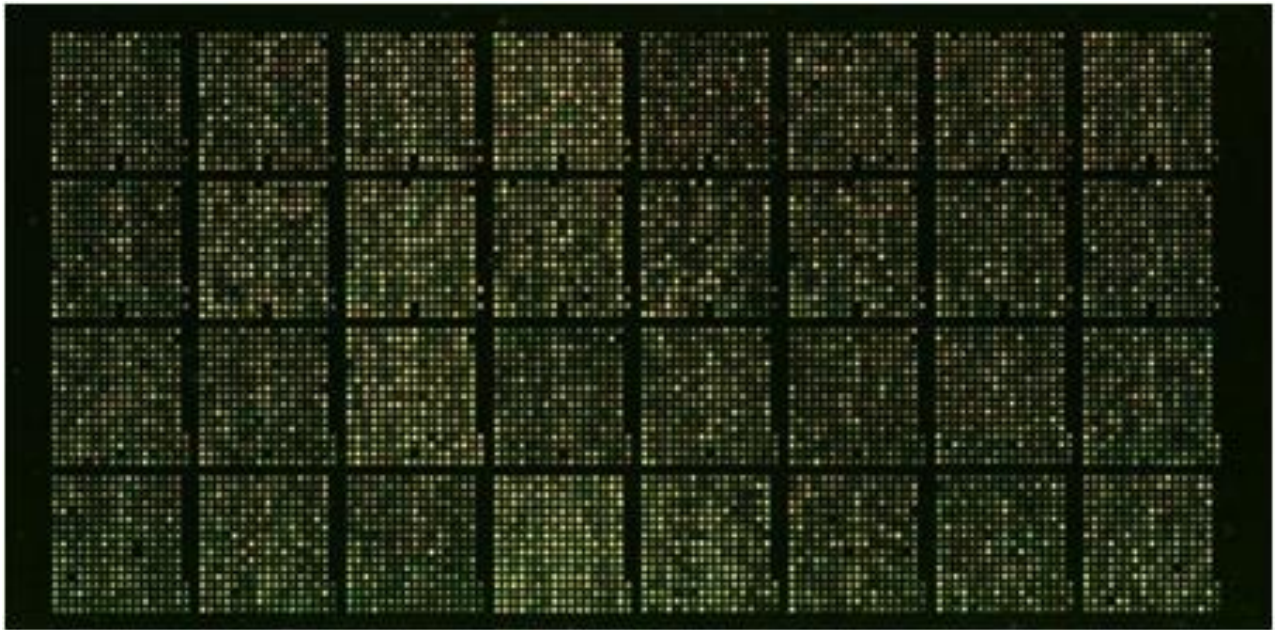
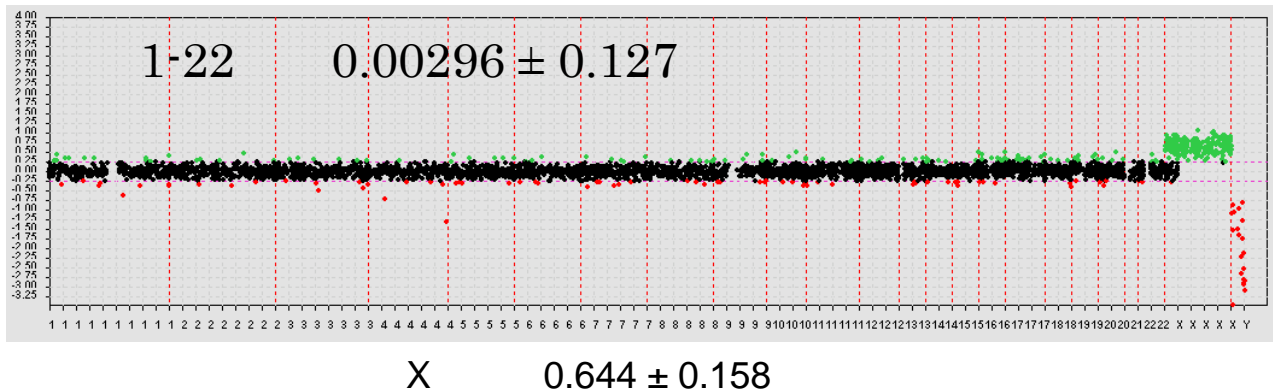


図 2.2-③-19



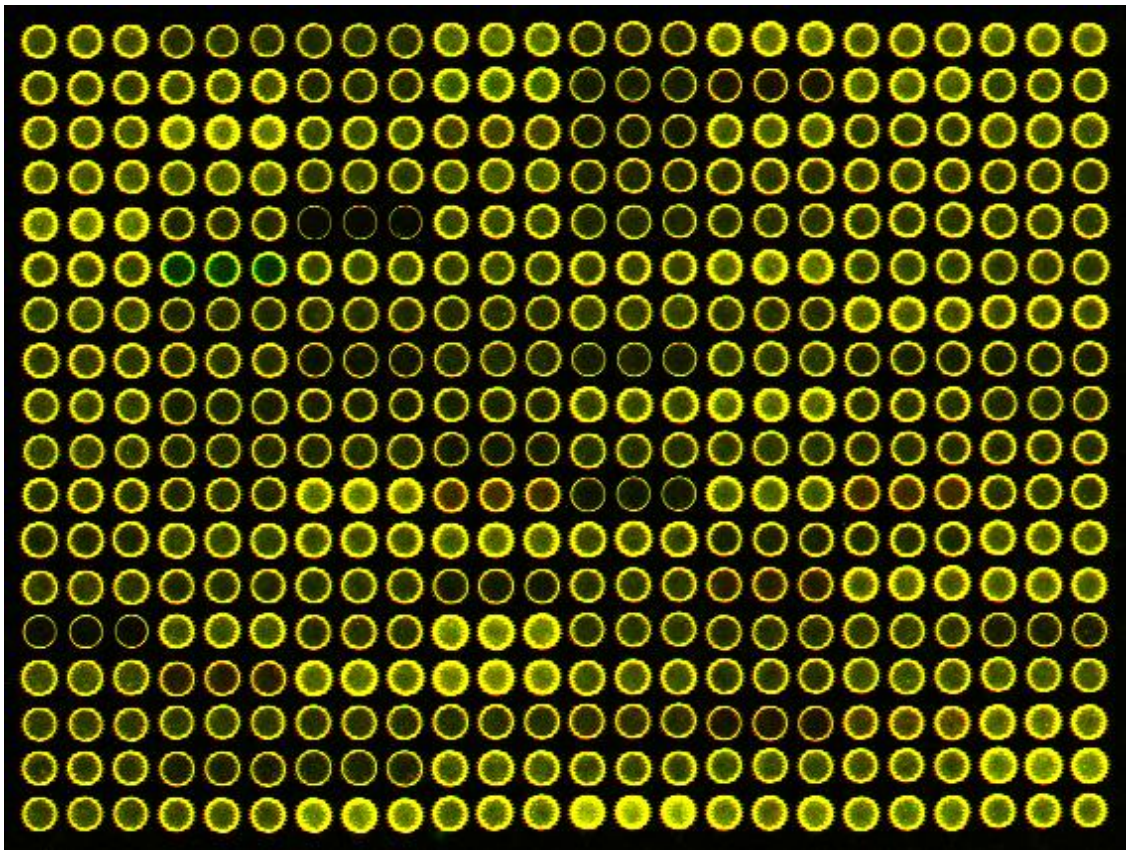
WY635-S3-dCTPを用いて女性 DNAを標識、WY535-S3-dCTPを用いて男性 DNAを標識を行い、Macrogen社のBACアレイC-chipを用いてCGH解析を行った。

現在のMacrogen社のC-chipの性能が悪く、厳密な比較が困難であるが、1-22番染色体のS.D.が0.127、X染色体の平均が0.644とコピー数変化の解析が可能であり、十分な性能を有している事がわかった。

このことから、WY635-S3-dCTPとWY535-S3-dCTPの取り込み率はCyDyeに比べ低いが、励起波長がレーザーとあっていることから十分に解析可能であったと考えている。

山口大学において胃がん患者のがん部位のゲノムに増減が確認された領域について、産業技術総合研究所で作製された日本人BACに相当するBACクローンを選定し、作製されたミニアレイを用いてハイブリダイゼーション実験を行った。

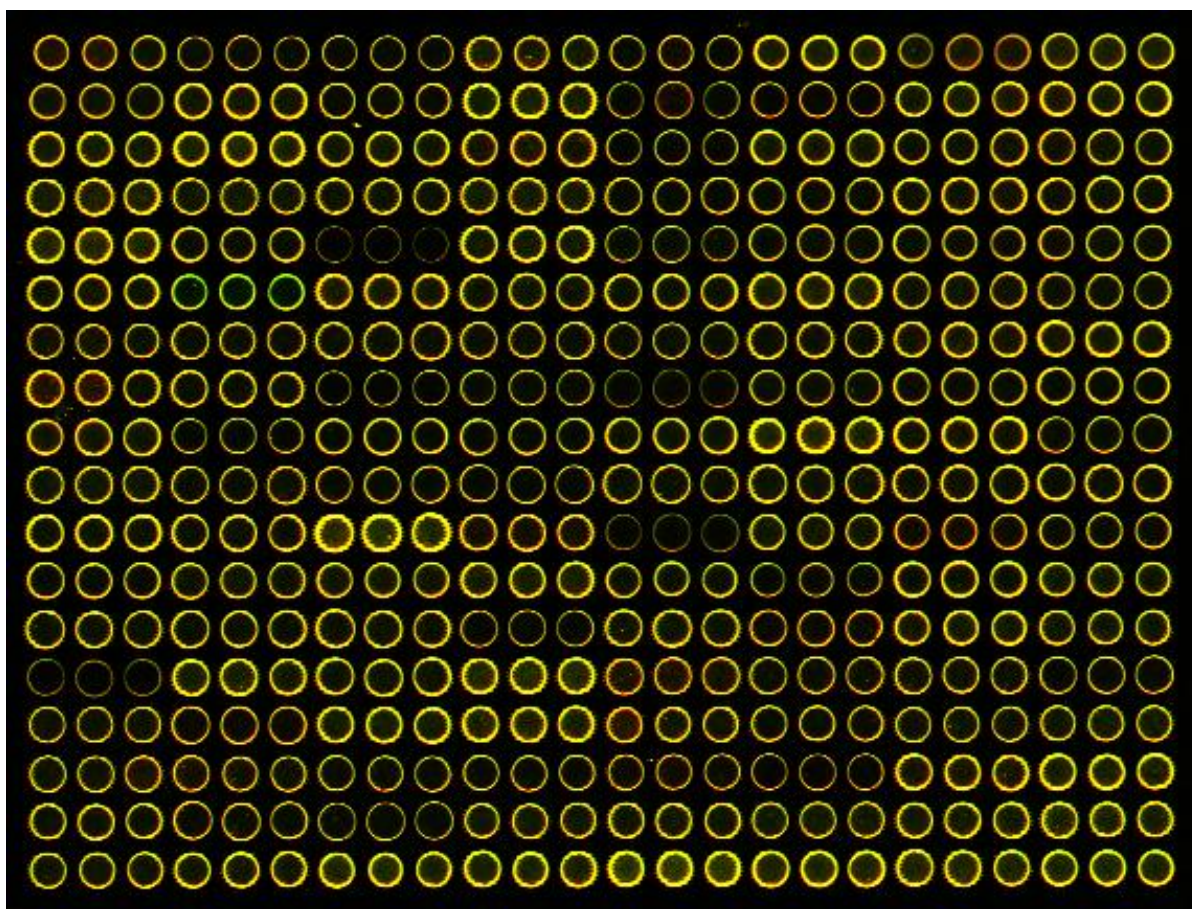
ヒト女性正常プールDNA (female) をWY647で標識し、ヒト男性正常プールDNA (male) をWY547で標識し、胃がんミニアレイを用いてハイブリダイゼーション実験を行った。



ハイブリダイゼーションの結果、上図のように解析に十分な輝度が得られ、ハイブリダイゼーションがうまく行えている事がわかった。

得られた蛍光画像のスポットがリング状に見える現象は、ハイブリダイゼーション時に起こったのではなく、DNAをスポットするときの条件が悪いため起こったと考えている。今回の実験に用いた基板は、Macrogen社で使用している基板で、スポットティングについてもMacrogen社で行っている。今後、ミニアレイの作製を行う場合は、ミニアレイのスポットティング条件についても検討の必要があると推察された。

ヒト女性正常プールDNA (female) をWY635-S3で標識し、ヒト男性正常プールDNA (male) をWY535-S3で標識し、胃癌ミニアレイを用いてハイブリダイゼーション実験を行った。



その結果、上図のように解析に十分な輝度が得られた。

得られた蛍光画像のスポットがリング状になっているのは、スポット時の問題で、ハイブリダイゼーション時の問題ではない。今回の実験に用いた基板は、Macrogen社で使用している基板で、スポットティングについてもMacrogen社で行っている。今後、ミニアレイの作製を行う場合は、ミニアレイのスポットティング条件についても検討の必要があると推察された。現在、和光純薬が保有しているスキャナーに搭載されているフィルターが本蛍光物質に最適ではないため、本蛍光物質に最適化したフィルターを搭載することによって、さらに感度が向上し、CyDyeを超える性能を示すと考えている。

本蛍光標識試薬は、山口大学が見出した胃がんの増減部位について、産業技術総合研究所が作製したBACクローンをトーヨーエイトック株式会社が作製した基板にスポットティングしたミニアレイを用い、横河電機株式会社が開発したハイブリダイゼーション装置をもちいてハイブリダイゼーションを行い、横河電機株式会社が開発したスキャナーで評価を行って頂いた。

本結果については、横河電機株式会社の成果部分に記載されている。

まとめ

現在、マイクロアレイに用いられている蛍光物質は、CyDye がその市場のほとんどを占めている。本プロジェクトでは、BAC アレイに最適な、既存のスキャナーのレーザー波長にあった異なる2種類の蛍光標識ヌクレオチドを含む新規蛍光標識試薬の開発を目的とした。

すでに市販されている蛍光物質 WY547 と WY647 を使用し、WY547-dCTP と WY647-dCTP を合成し、CyDye に代わる蛍光標識試薬を発売した。

既存のレーザースキャナーの励起レーザー波長にあった新規な構造の蛍光物質 WY535-S4, WY635-S4, WY535-S3, WY635-S3, WY535-S2, WY635-S2 を合成し、新規リンカーを用いてヌクレオチド化を行い、蛍光標識ヌクレオチド WY535-S4-dCTP, WY635-S4-dCTP, WY535-S3-dCTP, WY635-S3-dCTP, WY535-S2-dCTP, WY635-S2-dCTP を合成した。合成した6種の蛍光標識ヌクレオチドの取り込み率を比較したところ、WY535-S3-dCTP および WY635-S3-dCTP の取り込み率が最も高かった。これらの蛍光標識ヌクレオチドを用いて MacroGen 社製 BAC アレイで CGH 解析を行い、1コピーの差を十分に検出できる結果を得た。さらに、本プロジェクトで作製したミニアレイで CGH 解析を行い、十分な輝度が得られることを確認した。以上の結果から、所期の目的にかなう蛍光標識試薬を開発できた。

2. 2. 3 疾患別アレイハイブリシステムの研究開発(担当:横河電機株式会社)

日本人 BAC を用いた高精度ゲノムアレイによる CGH スクリーニング解析の成果を、実際の臨床検体で検証するための解析検証システムを開発する。そのために、「物理的ハイブリシステムの研究開発」および「深い焦点深度の読取装置研究の開発」を行った。「物理的ハイブリシステム」は新しく考案した微小空間における物理的な強制攪拌機構を有したハイブリユニットとそれを駆動する処理装置から成り、実用的なサイズのシステムを実現した。これを用いて遺伝子を絞り込んだミニアレイのハイブリを確認できた。「深い焦点深度の読取装置研究の開発」は、深い焦点深度と S/N 比の高い高感度な蛍光読取りと、小型・安価で高信頼性の機構を同時に実現するマルチビーム・ディスク方式を用い、2色液中観察光学系機能を実装した読取り装置を実現した。これらを連携させて、「物理的ハイブリシステム」によってハイブリしたミニアレイの測定を「深い焦点深度の読取装置」によって液中で行い、評価を通してシステムの有効性を検証した(図 2.3-1)。

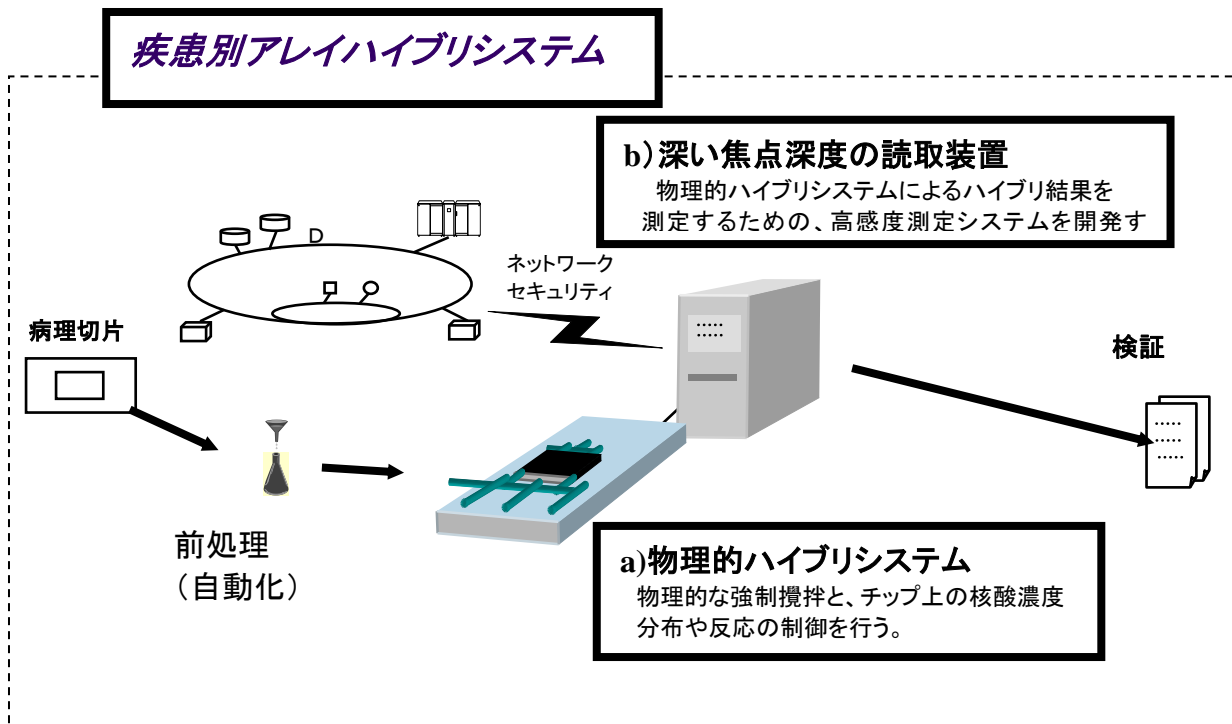


図 2.3-1 疾患別アレイハイブリシステムの研究開発

① 物理的ハイブリシステムの研究開発

本研究開発では、横河電機の独自技術により、物理的な強制攪拌による微小空間での物理的ハイブリ機構の要素技術開発を行った。現状でのハイブリの課題を整理し、ターゲットとプローブの会合確率を向上させるための3次元ランダム攪拌方式を考案した。

はじめに、微小空間での溶液の振る舞いを観察する測定系として、2次元および3次元の状態観察システムを構築し、層流・乱流の物理法則に則した攪拌の基礎技術開発を行った。次に微小空間内での流速分布を解析し送液条件を検討することによって、3次元ランダム攪拌方式の最適条件を検討した。そして、この3次元ランダム攪拌方式を実現した物理的ハイブリユニットを試作して、CGHチップのハイブリを行い、S/N比の向上や信号の安定性を確認できた。また、疾患別アレイはスポット数が少なくてもよいのでチップの小型化を図り、遺伝子を絞り込まれた小型化されたミニアレイをハイブリユニットに実装してシステム全体の評価・改良を進めた。この小型化したミニアレイを組み込んだハイブリユニットと処理装置を実用的なサイズにシステム化し(図 2.3-①-1)、物理的ハイブリシステムによるハイブリを確認できた。

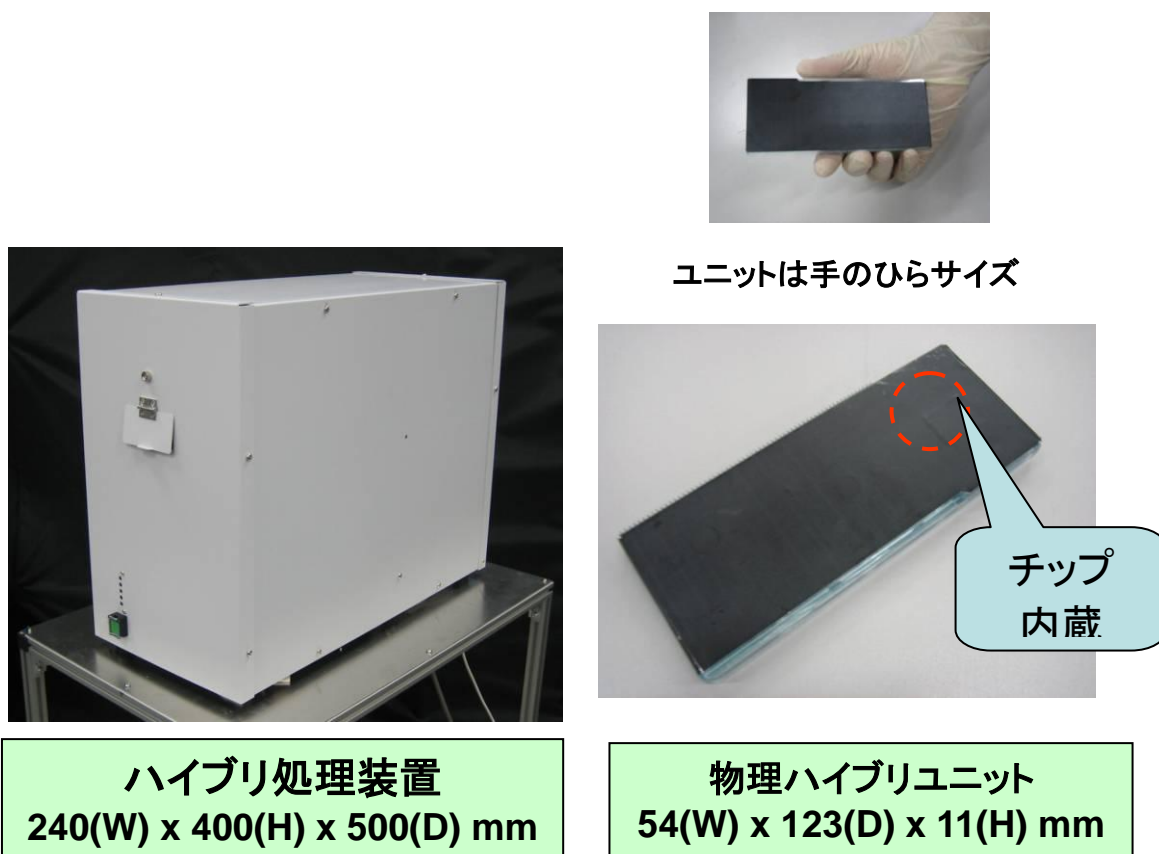


図2.3-①-1 物理的ハイブリシステム

(1.1) 現在のハイブリの課題

物理的ハイブリシステムの開発に当たっては、従来のハイブリの課題を明確にし、従来法に対してハイブリの効率化を目指すものとして検討を進めた。

DNAのハイブリダイゼーションは、基板上に固定化されたDNA(プローブDNA)とハイブリ溶液中のDNA(ターゲットDNA)との会合によって起こり、そのときの反応速度は下のよう示される(3)。

$$-d[\text{DNA}_T]/dt = k_1 [\text{DNA}_p] [\text{DNA}_T] + k_2 [\text{DNA}_T]^2$$

DNA_T : ターゲット DNA

DNA_p : プローブ DNA

k_1, k_2 : 定数

3. DNA-DNA Hybridization on Nitrocellulose Filters. Richard A. et al.
Eur. J. Biochem. 47,535-543 (1974)

基板上に固定化されているプローブ DNA 量を一定と見なすと、上記の式からハイブリ速度は、ハイブリするターゲット濃度に依存することになる。しかしこれは、ハイブリ開始直後、もしくはプローブ DNA 近傍における瞬間的なターゲット DNA 濃度に対してのみ成立する。実際は、ハイブリが進むにつれプローブ DNA 近傍のターゲット DNA が消費され、部分的にターゲット DNA 濃度が低下する部分が生じるようになる。

一般的なハイブリの系では、ハイブリ溶液は静止状態におかれているが、この場合には、ターゲット DNA は拡散でしか移動することができない。このような状態での分子拡散による物質移動を考察してみると、溶液中の拡散係数をたとえば $1 \times 10^{-5} \text{cm}^2/\text{s}$ と仮定した場合には、5mm 距離が離れたところのターゲット DNA がプローブ DNA に会合するために要する時間は約7時間、25mm 離れた場所からの移動には約174時間となる(図 2.3-①-2)。したがって、このターゲット DNA 溶液中に生じた濃度勾配は、溶液内分子の拡散によってある程度は打ち消されるが、部分的にハイブリ速度が遅くなる状態が発生するものと推測される。

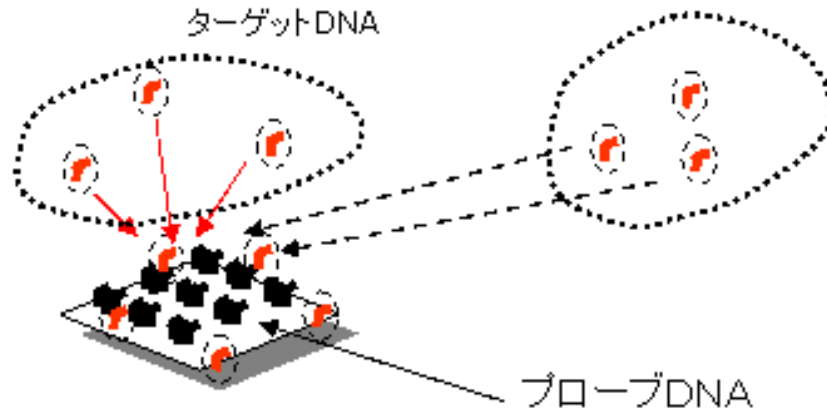
このため、ハイブリの効率を向上させるためには、ハイブリ時間を長くするか、ハイブリのプローブ DNA 濃度を上げて、プローブ近傍のターゲット DNA の数を増加させる方法が有効である。しかし、前者は迅速な分析に反し、後者はサンプルが大量に必要なので望ましい方法とは言えない。そこで、ハイブリ溶液中の濃度分布を均質化し、ターゲット DNA を効率的にハイブリに関与させるために、ハイブリ溶液を何かしらの方法で動かすことが必要となる。

<近い>

ハイブリに関与

<遠い>

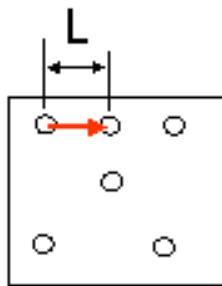
プローブから遠いターゲットは
ハイブリに関与できない



<文献例>

拡散係数:

$D = 1 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$ の時
(水中の低分子)



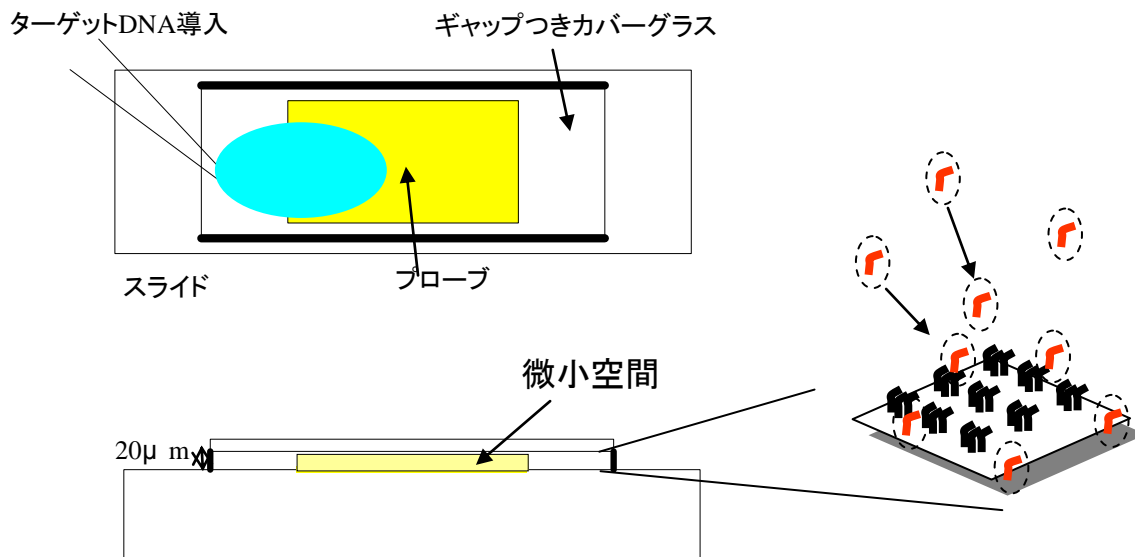
<試算> $t \propto L^2 / D$

L: 5mm 7H

25mm 174H

図 2.3-①-2 ハイブリにおける分子のふるまい

一般的なハイブリの系では、ギャップ付きカバーガラス等を利用して、プローブ DNA 上の数十 μm 程度の厚さにハイブリ溶液を限定するような微小空間におかれている(図 2.3-①-3)。このような微小空間では、溶液を移動させても溶液は層流の流れとなる。層流では、壁面付近の流速はゼロとなり、壁面近傍にあるチップ表面のハイブリ溶液は効果的に移動・置換させることはできない。つまり、ハイブリ溶液を単純に移動させても、微小空間内では、チップ表面から溶液の厚さ方向に距離の離れた位置にいるターゲット DNA をハイブリに関与させることはできない。一方、乱流では壁面近傍でも速度分布を持ち、溶液を移動・置換することができる。つまりハイブリ溶液の流れを乱流化することができれば、溶液中のターゲット DNA を管壁近傍にあるチップに接近させ、有効にハイブリに関与させることができるので、ハイブリの効率を向上することが期待できる(図 2.3-①-4)。



ハイブリは数十 μ mの微小空間で行われている。
その微小空間における分子の運動は、通常の空間での運動とは異なる

図 2.3-①-3 一般的なハイブリの系

ハイブリ溶液を移動させたいが、微小空間では層流になる

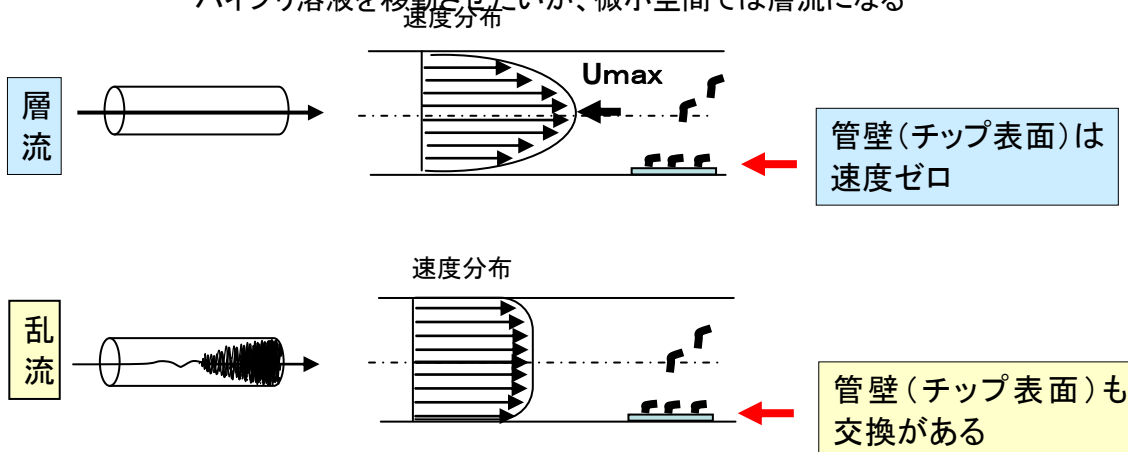


図 2.3-①-4. 微小空間での流体

(1.2) 開発のポイント

物理的ハイブリシステムの開発のポイントは、強制攪拌によって乱流を生成し、プローブ DNA とターゲット DNA の会合確率を向上させること、さらに小型チップを採用することでサンプルの量を減らすとともに、温度の不均一性を減少することでハイブリの再現性・安定性を向上させ、ハイブリの局所ムラや洗浄時のムラを低減させることである。この物理的ハイブリシステムを開発するに当たっては、要素技術として、横河電機の保有する MEMS 技術や、共焦点顕微鏡による高速3次元画像計測技術を活用した。

(1.3) 物理的ハイブリシステム(3次元ランダム攪拌方式)

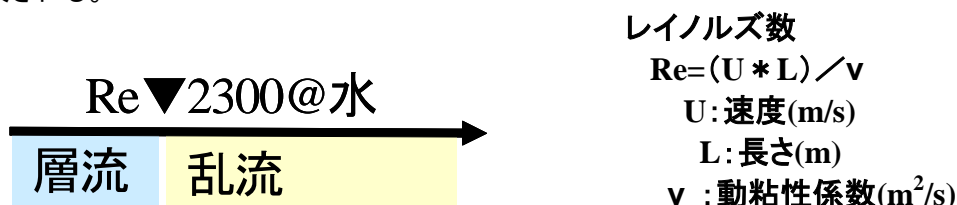
流路チャンバー中の微小空間での層流状態では、溶液を循環させるだけではプローブ DNA とターゲット DNA の会合効率は小さく、効果的なハイブリは期待できない。微小空間でのハイ

ブリの効率を向上させるためには、チップ上の異なる位置から相補的 DNA の会合を行うこと、しかもその会合を規則的なものではなくランダム化することによって大きな効果が期待できる。横河電機では3次元ランダム攪拌方式という新規な攪拌方式を考案し、これにより微小空間においても乱流を生成し DNA の会合確率を向上させる物理的ハイブリシステムの開発を行った(図 2.3-①-5)。

微小空間で溶液を移動させる場合、流体の流れの状態を表す無次元数であるレイノルズ数の値は小さくなり、いわゆる低レイノルズ数流れとなる。レイノルズ数: Re は液体の動粘性係数: ν [m²/s], 流速: U [m/s], 微小空間の代表長さ: L [m]として、

$$Re = UL/\nu$$

で表される。



流体が水の場合、レイノルズ数が 2300 以下であると層流になる。乱流にするためには、レイノルズ数を大きくする、すなわち、速度と長さを大きくする必要があるが、速度の上限には限度があり、微小空間では長さも限定されてしまうため、乱流を実現するのは大変困難であった。

これに対して、横河電機の3次元ランダム攪拌方式では次の2点の工夫を行った。(1)速度 U を急激に加速・減速する。(2)長さ L も上記速度変動に同期させて急激に変動させる。これは、「可変流路構造」と呼ぶこともできる新規の構造であり、距離の2次微分は力 F を外部から加えることを意味する。従来の流路チャンバーは流体自身の内部エネルギーしか利用できなかったが、この方式では、投入できるエネルギー量を非常に大きくできる。さらに、前記の流速の加速・減速と組み合わせることで、高次の流体振動の誘導も行っている。この方式により、微小空間にもかかわらず乱流化に成功した。

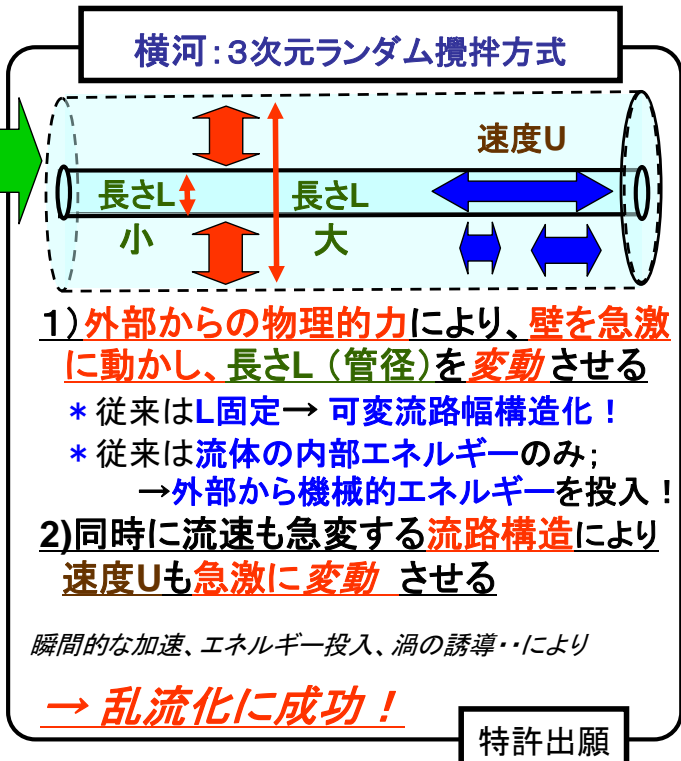
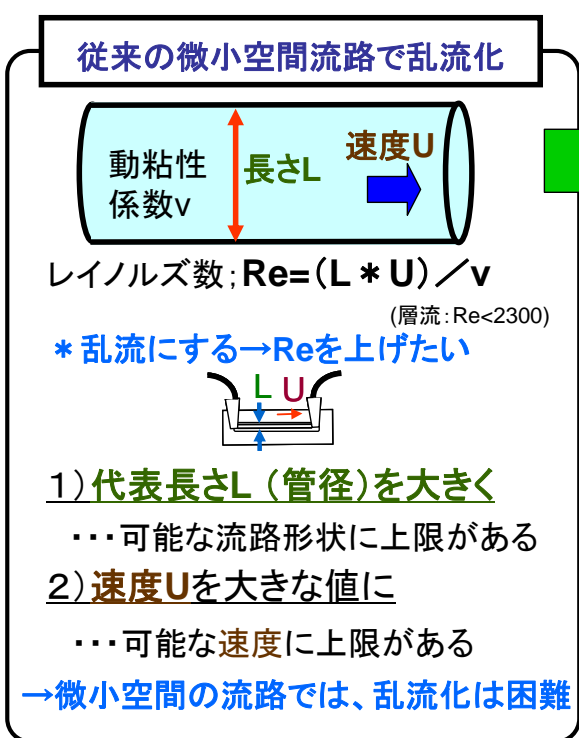
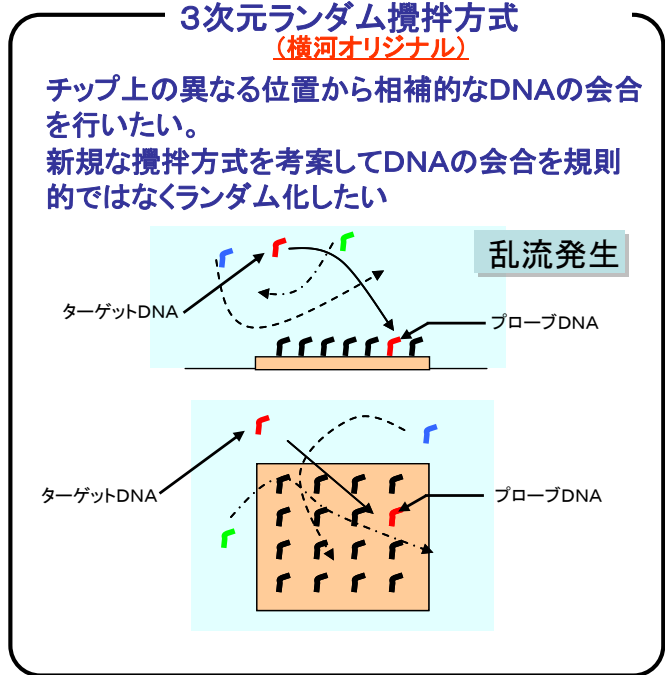
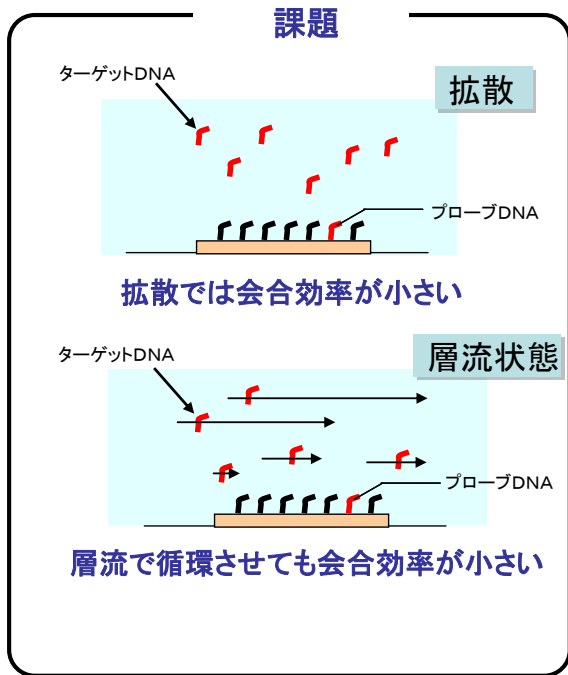


図 2.3-①-5 物理的ハイブリシステム(3次元ランダム攪拌方式)

(2) 要素技術開発のための測定系の構築(状態観察システム)

微小空間での溶液の振る舞いを把握するために、顕微鏡下での溶液中の蛍光粒子観察システムを構築した。

(2.1) 2次元状態観察システム

倒立顕微鏡IX71(オリンパス)および共焦点スキャナ CSU-X1(横河電機(株))を基本観察系とし、励起光源として空冷 ArKr レーザー(波長488nm, 568nm)を用いた。画像データは高感度高速ビデオカメラ SV-2000i(西華産業(株))によりパーソナルコンピュータに取り込まれ、PIV システムソフトウェア Koncert/Win(西華産業(株))を用いて蛍光粒子の流速の評価を行った(図 2.3-①-6)。これにより、微小空間での溶液の状態を把握し、層流状態で攪拌・混合が困難であることを再確認するとともに、3次元ランダム攪拌によって実際に2粒子が攪拌・混合できることを確認した。溶液における2粒子の同時測定には、2色分光装置 DualView(西華産業(株))を介することによって、1粒子ずつの画像にして解析することもできるし、低流速の場合や操作の前後の静止状態の分布の測定にはビデオレートのカラーCCD カメラを用いて2色同時に測定することもできる。

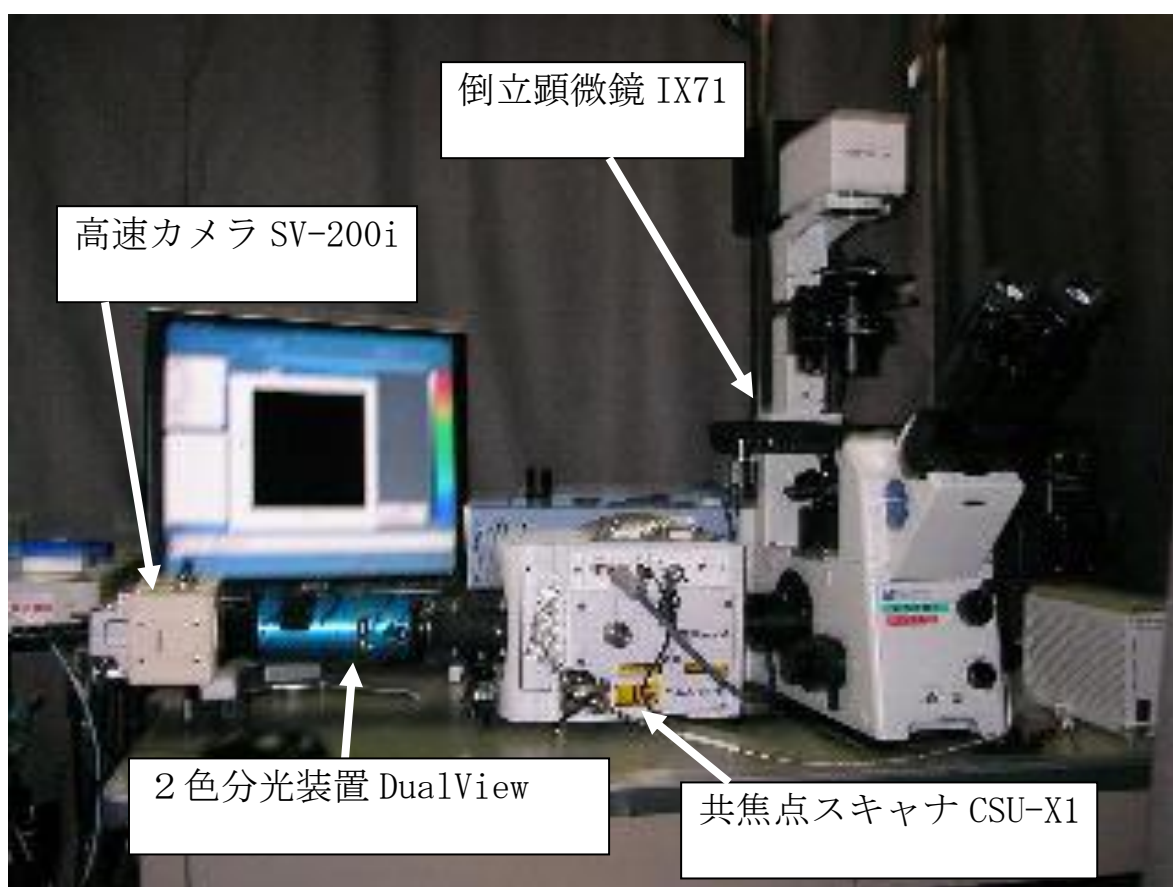


図 2.3-①-6 2次元状態観察システム

(2.2) 3次元状態観察システム

前述の2次元状態観察システムに、対物レンズ駆動用ピエゾアクチュエータと、そのコントローラである高速3次元スキャン装置 PX100L(西華産業(株))を付加することによって、3次元の状態観察システムに拡張した(図 2.3-①-7)。このシステムにより、微小空間におけるZ軸方向の状態を3次元スライス画像として評価することができるので、3次元ランダム攪拌方式による攪拌の状態を3次元的に評価することができた。

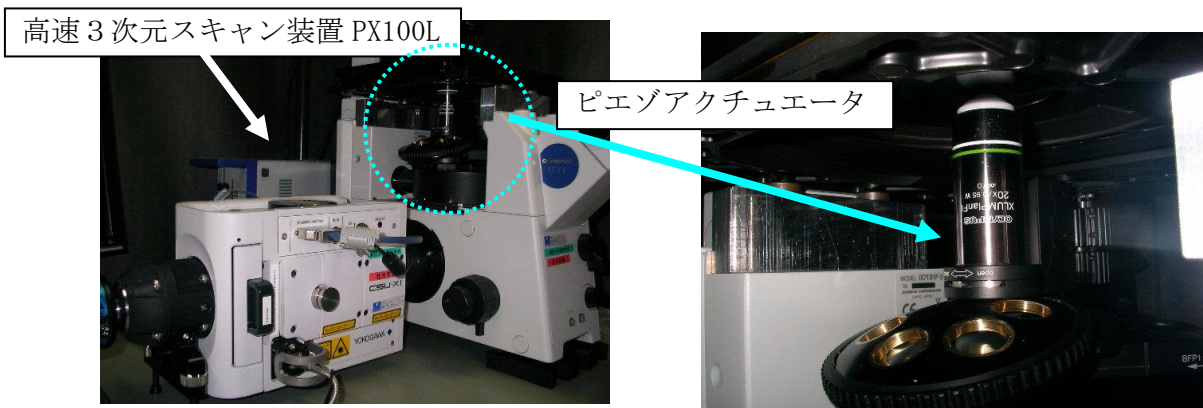


図 2.3-①-7 3次元状態観察システム

(3)状態観察システムによる微小空間内の溶液状態の把握

2次元および3次元の状態観察システムを用いて、微小空間での溶液の振る舞いを把握した。従来の微小空間での層流状態で攪拌・混合が困難であることを再確認するとともに、3次元ランダム攪拌によって実際に2粒子が攪拌・混合できることを確認した。流速分布を評価し、最適条件を与えることによって、3次元ランダム攪拌では実際に乱流が発生していることを確認できた。

(3.1) 従来の微小流路での層流

PDMS に深さ: $50\mu\text{m}$ 、幅: 数百 μm の流路を構成して、一般的に用いられている微小流路を試作した。これに蛍光粒子を添加した溶液を流すことによって、層流状態での攪拌・混合が可能であるか検討した。試作した流路チャンバーと送液するためのシリンジポンプを図 2.3-①-8 に示す。

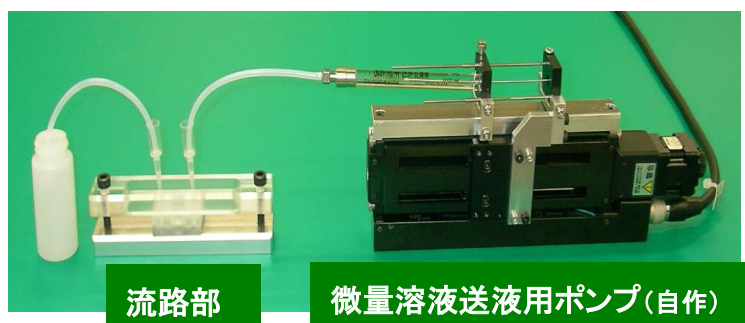
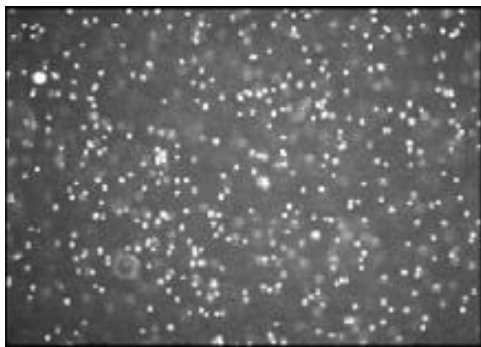


図 2.3-①-8 層流系の流路チャンバー

この流路チャンバーを状態観察システム上で動作させ、蛍光粒子の運動を測定した。流速ゼロではブラウン運動による粒子の揺動運動が観測でき、流速 $20[\text{mm/s}]$ 程度で送液すると流路壁面近傍では蛍光粒子が流れない、層流の流れが観測された(図 2.3-①-9)。



流速ゼロ：ブラウン運動



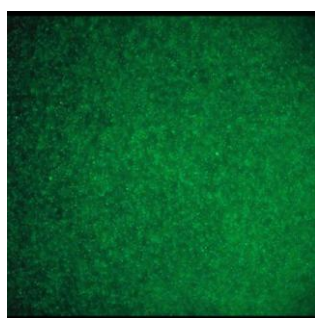
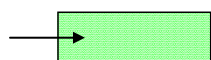
流速 20mm/s：層流の流れ

図 2.3-①-9 流路中の蛍光粒子の運動

次に、微小空間内での攪拌・混合の実験を行った。小型化された DNA チップに適用されることを想定して、実際にミニアレイにアプライされる $20\mu\text{L}$ の容積の微小空間をつくり、そこに2種類の蛍光粒子溶液を順次導入して、流路内で反復送液動作をさせてみた。図 2.3-①-10 のように、はじめにこの微小空間内に緑色蛍光粒子溶液を充填し、続いて赤色蛍光粒子溶液を導入する。このとき境界面の薄層部分は拡散によってわずかに混合された状態となる。この状態のまま、流路中の溶液を左右に反復送液して、攪拌・混合を試みても2粒子を含んだ溶液は混合されることはなかった。層流状態になっている微小空間中では、いかに攪拌・混合をさせることが困難であるかがわかる。

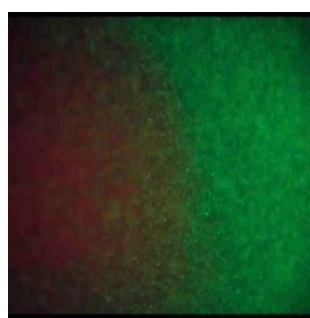
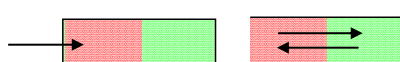
実際のDNAチップ面と同等の溶液量である $20\mu\text{L}$ の微小空間に2色のビーズ(直径 $1\mu\text{m}$)を導入し反復動作による混合状況を観測する。

①微小空間へ緑色ビーズ溶液導入



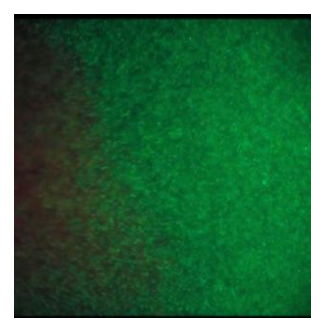
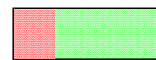
←→
 $500\mu\text{m}$

②微小空間へ赤色ビーズ溶液導入
③微小空間内で反復動作



(動画)

④反復動作終了後



2色ビーズの境界領域を境にして混合されずに存在する

図 2.3-①-10 微小空間での攪拌・混合実験1:層流

(3.2) 3次元ランダム攪拌方式による乱流

3次元ランダム攪拌が可能な微小チャンバーを試作し、その中での溶液の振る舞いを状態観察システムによって観測した。3次元ランダム攪拌方式では、外部から加えた物理的な力によって微小空間の壁面を急激に変化させ、実質的に可変流路幅構造を実現させている。あわせて、溶液の流速を急激に加速・減速させ大きな変動を与える。この動作にランダム化を加えることによって、微小空間においても乱流を発生させることに成功した。(図 2.3-①-11、図 2.3-①-12)

はじめに予備実験として、微小空間内で乱流化できていることを、溶液として水とオイルを用いた混合実験により確認した。図 2.3-①-10 の実験同様に、微小空間内に水とオイルを導入し、攪拌・混合動作を行うと、層流の系では図 2.3-①-13 (a)のように、水とオイルは混ぜることはできない。しかし、3次元ランダム攪拌を行うと図 2.3-①-13 (b)のように、界面活性剤等を添加していないにもかかわらず、水とオイルはエマルジョンとなり混合できていることを確認できた。このように、微小空間にもかかわらず乱流をつくり出すことに成功した。

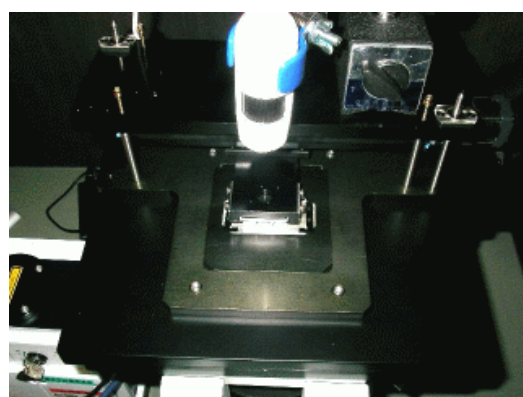
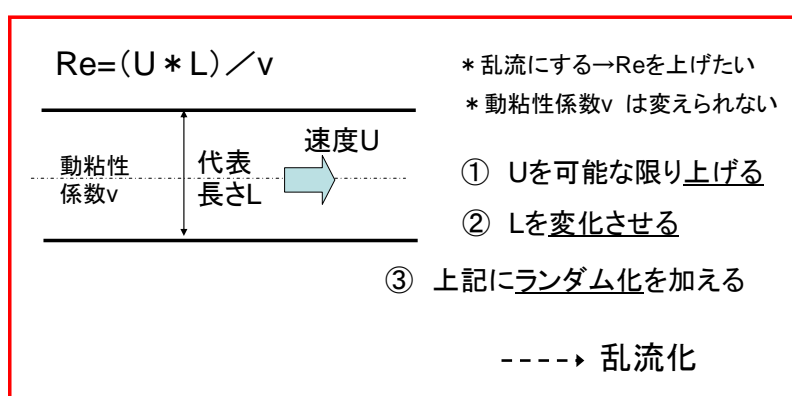


図 2.3-①-12 3次元ランダム攪拌方式による乱流化

図2.3-①-12 3次元ランダム攪拌を行う微小チャンバー

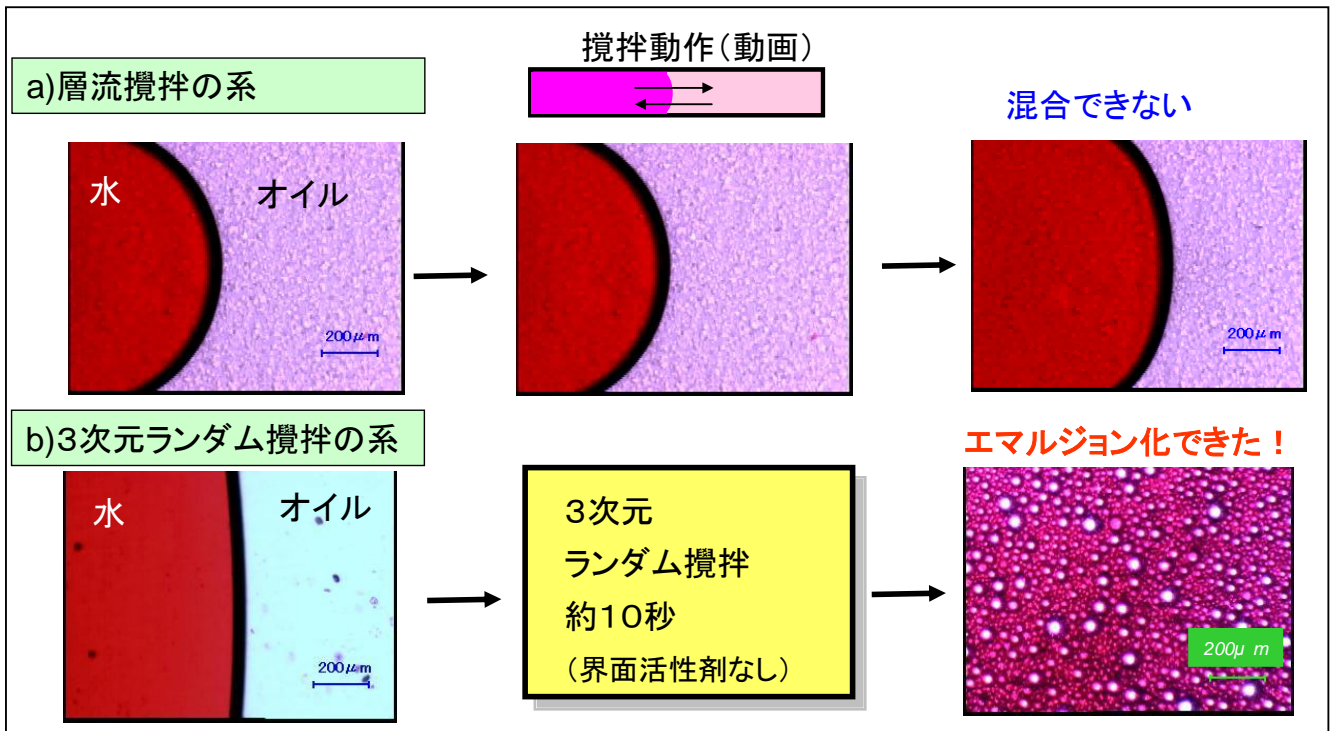


図 2.3-①-13 水とオイル混合による3次元ランダム攪拌方式の動作確認方式による乱流化

次に、2種類の蛍光粒子を用いて3次元ランダム攪拌による微小空間内での攪拌・混合の実験を行った。実験では、図 2.3-①-10 と同じ条件で蛍光粒子を導入した。すなわち、はじめに緑色蛍光粒子溶液を充填し、続いて赤色蛍光粒子溶液を導入する。このとき境界面の薄層部分は拡散によってわずかに混合された状態となった。この状態から3次元ランダム攪拌を行うと、緑色蛍光粒子と赤色蛍光粒子は混ざり合い、混合終了後には2種類の蛍光粒子は完全に混合された状態となった(図 2.3-①-14)。このとき、3次元状態観察システムによって、3次元的なスライス画像を取得しても、2種類の粒子は Z 軸方向にも混合されていることが確認できた(図 2.3-①-15)。

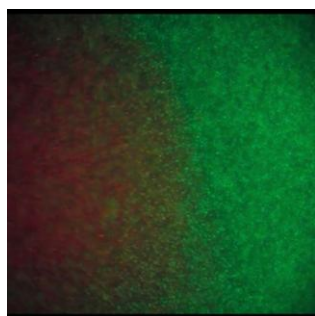
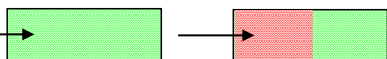
実際のDNAチップ面と同等の溶液量である20 μ Lの微小空間に2色のビーズ(直径1 μ m)を注入し3次元ランダム攪拌(乱流方式)を行う。

①微小空間へ緑色ビーズ溶液導入

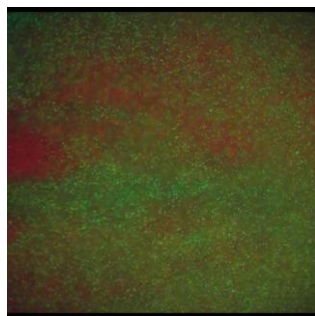
②微小空間へ赤色ビーズ溶液導入

③微小空間内で3次元ランダム攪拌

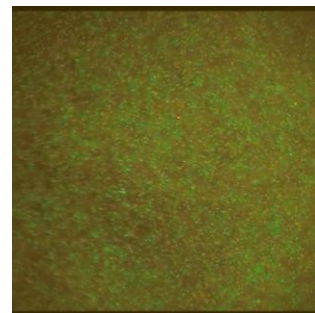
④攪拌動作終了後



500 μ m



(動画)



2色のビーズは混合できた

3次元ランダム攪拌(乱流方式)後の結果

図 2.3-①-14 微小空間での攪拌・混合実験2: 3次元ランダム攪拌

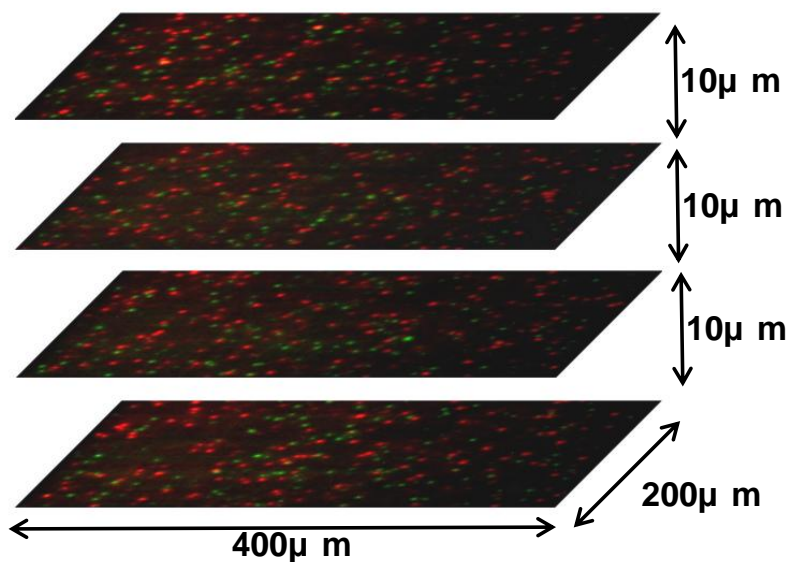


図 2.3-①-15 3次元状態観察システムによるスライス画像

(3.3) 微小空間内の流速分布の解析

粒子画像流速測定法(PIV; Particle Image Velocimetry)は、溶液中の粒子が流れに追従することを前提に、時間的に連続撮影された画像から微小時間における粒子の変位ベクトルを求めて速度ベクトルを推定する技術である。この手法を用いて、蛍光粒子の送液画像から層流状態および、3次元ランダム攪拌による乱流状態の溶液の流速分布の解析を行った。

1mm×1mm程度の広い視野で33msのサンプリング速度によって取得した画像からPIV解析した流速分布を図2.3-①-16に示す。層流状態では、流路の中央部分はやや速度が速いが、ほぼ一様流速分布となっていることがわかる。図2.3-①-17は同じ条件で取得した3次元ランダム攪拌の画像からPIV解析した結果である。流路内に渦が発生しており、流速分布が広範囲にわたっていることがわかる。

3次元ランダム攪拌方式による乱流の状態を、1msのサンプリングで取得した画像からPIV解析した結果を図2.3-①-18に示す。送液の条件を最適化することによって、1msの時間間隔でも速度ベクトルの向きは正負に変化し、その大きさも激しく変わっていることが確認できた。この状態は、流れの向きも大きさも激しく変化する乱流になっていることを示している。

このように、状態観測システムを用いてPIV解析を行うことによって、3次元ランダム攪拌では、実際に微小空間内に乱流を発生させることができることを確認できた。

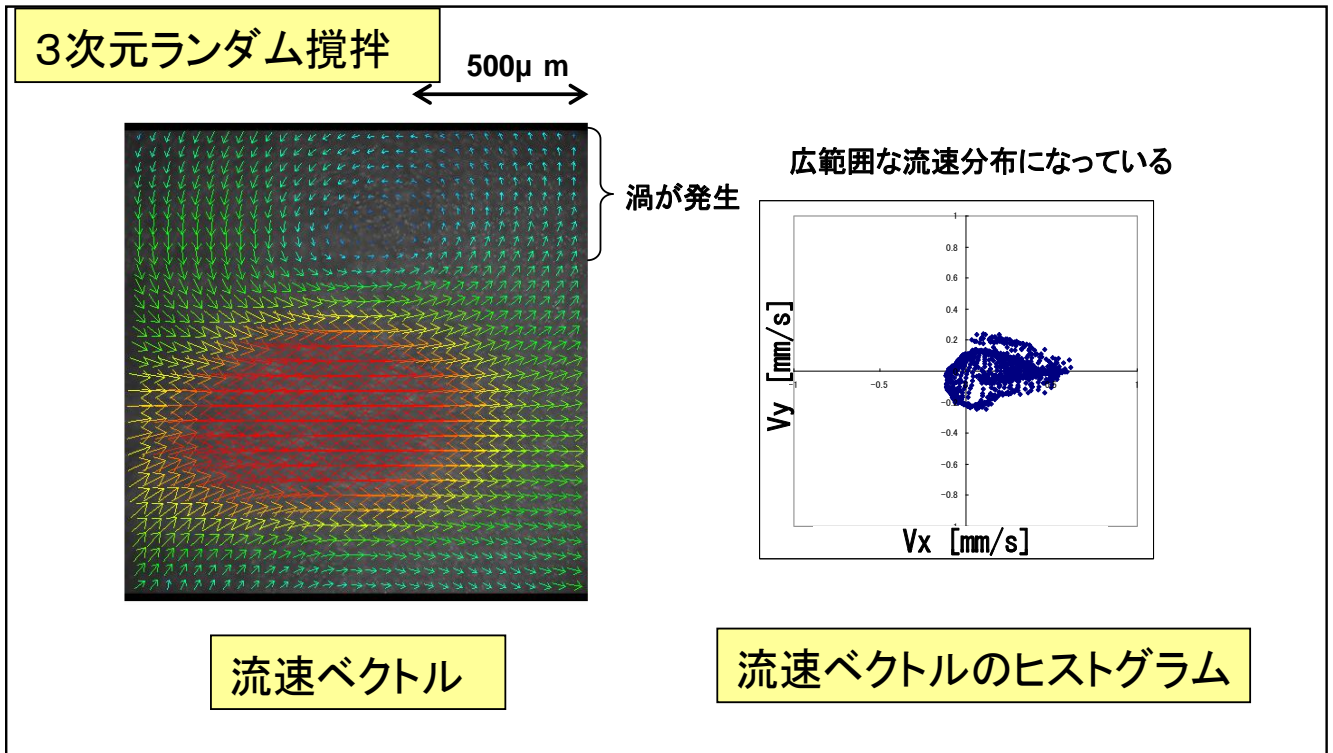


図 2.3-①-16 層流の流速分布

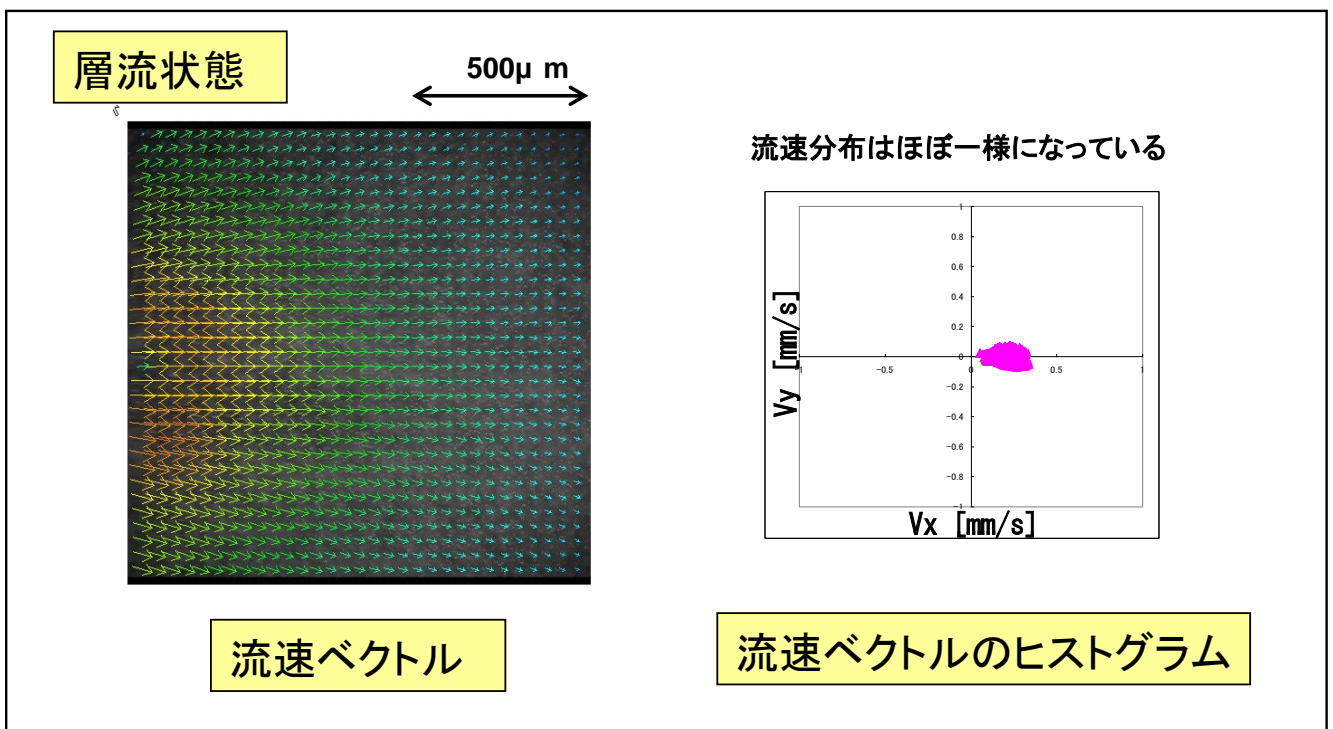


図 2.3-①-17 3次元ランダム攪拌による乱流の流速分布

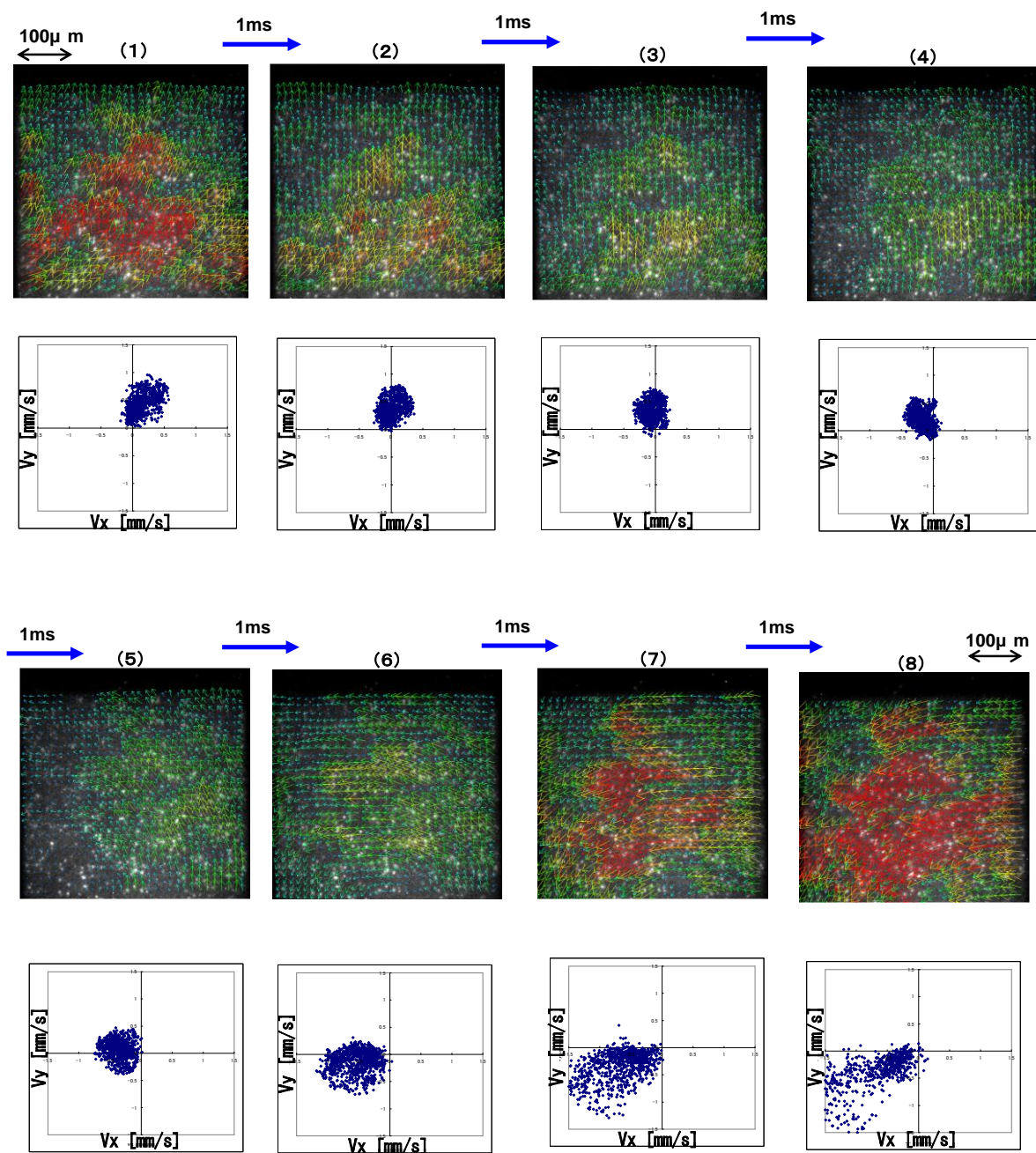


図 2.3-①-18 3次元ランダム攪拌による乱流の発生

(4) 物理的ハイブリシステムによるハイブリユニット

3次元ランダム攪拌の動作が可能なハイブリユニットと、それを駆動する処理装置を試作した。ハイブリユニットは弾性体で構成された微小な流路構造を持ち、外部から印加される力によって送液を行う。ハイブリユニットには $7\text{mm} \times 12\text{mm}$ の大きさのチップを搭載することができるので、各種 CGH マイクロアレイをこの大きさに切断して実装し、実際にハイブリを行って、3次元ランダム攪拌の効果を確認した。

(4.1) メカニカルドライブ(メカニカルローラー)方式による送液・封止・混合

弾性体で構成された微小な流路・チャンバー容器に、ローラーのようなアクチュエータによって

外部から押しつける力を印加すると、流路・チャンバーは変形して容器内の溶液を移動させることができる(図 2.3-①-19)。ローラーによる外力の印加は、溶液の移動だけではなく封止も可能である。すなわち、流路間に物理的にバルブを構成しなくとも、溶液の移動と停止をローラーの動きだけで実現することができる。したがってメカニカルドライブ(メカニカルローラー)方式は、シンプルな原理・構造でありながら流路やチャンバーの構造、および配置を工夫することによって、溶液の混合や流路切り替え、分注、攪拌などが、外部ポンプやバルブを用いることなく実現できるものである(図 2.3-①-20)。

このメカニカルドライブ方式による送液では、弾性体の流路は急激に大きな変形を起こすので、実質的には「可変流路構造」が実現できることになる。この動作にあたっては、ローラーの送り速度を調整することによって、流路の変形量および溶液の流速が制御できるので、流路内の溶液を乱流的な流れにすることが可能となる。

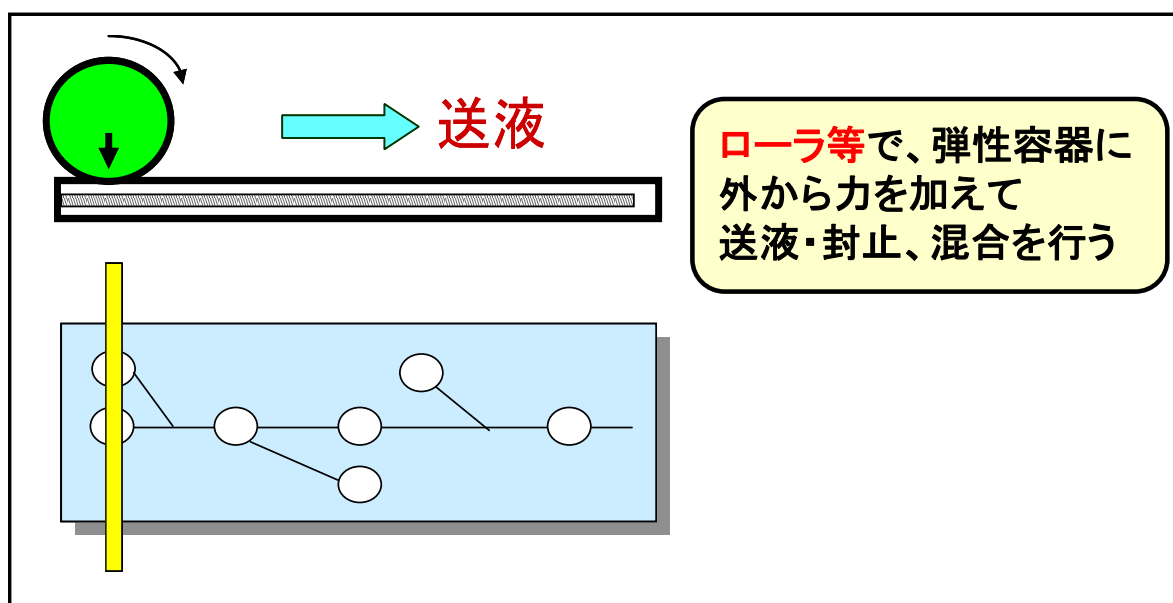


図 2.3-①-19 メカニカルローラー方式

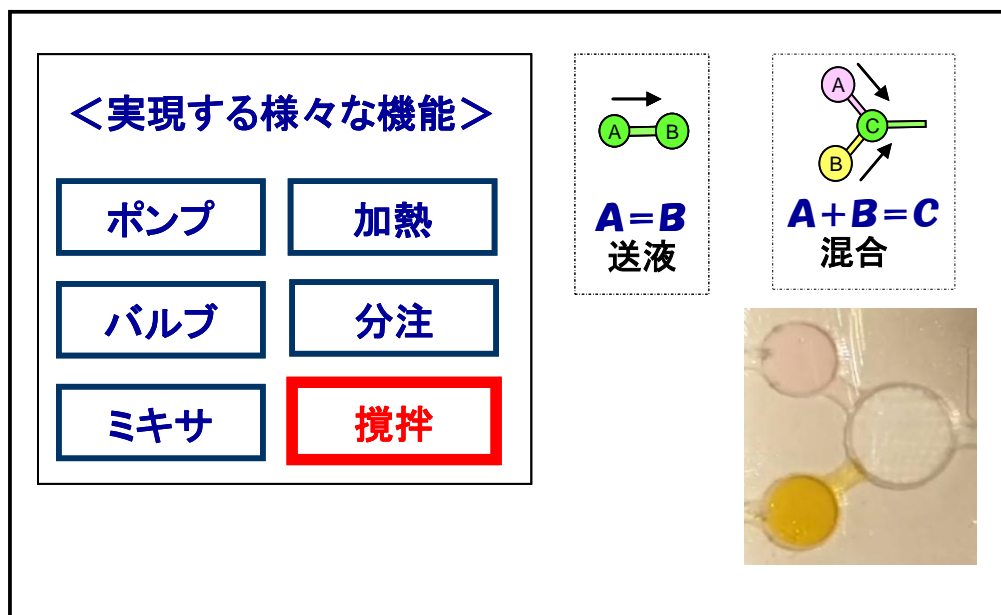


図 2.3-①-20 メカニカルローラー方式の動作

(4.2) ハイブリユニット

試作したハイブリユニットを図 2.3-①-21 に示す。全体の大きさは 54(W)×123(D)×11(H)mm のハンディーサイズとなっている。内部には送液を行う流路構造があり、ハイブリ部には7×12mm のチップが装着できる構造となっている。ハイブリユニットには、あらかじめユニット内の試薬リザーバ部分にハイブリ溶液や洗浄液を封入しておく。処理により発生する洗浄後の廃液もユニット内の廃液溜めにストアされたままの状態なので、ハイブリユニットは単独で駆動・処理することができ、廃液も外部へ出さない閉鎖された系となっている。

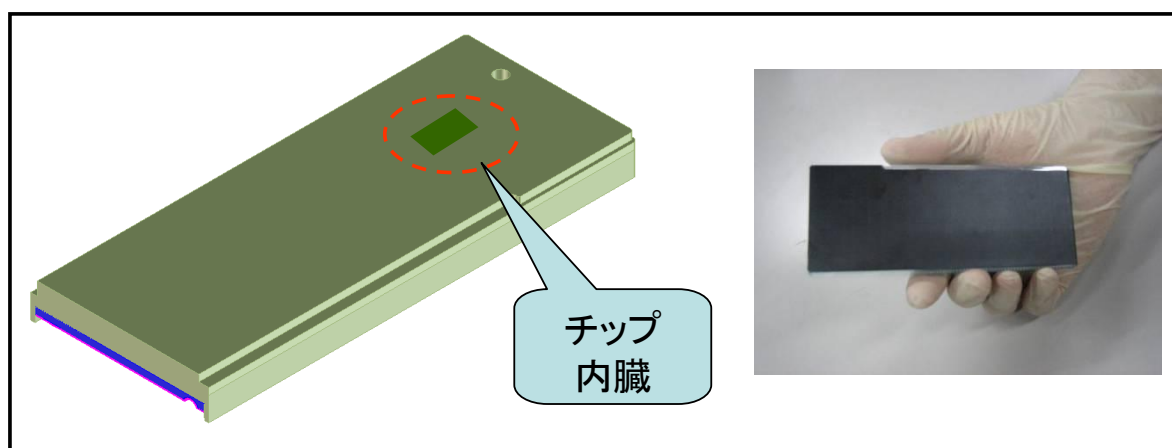


図 2.3-①-21 ハイブリユニット

(4.3) ハイブリユニット処理装置

ハイブリユニットは処理装置の中で、送液やハイブリ時の加熱を自動で行われる。処理装置には送液を行うためのローラー駆動部や加熱用ペルチェ素子コントローラなどが搭載されており、シーケンスプログラムによって全自動でハイブリと洗浄を行う(図 2.3-①-22)。

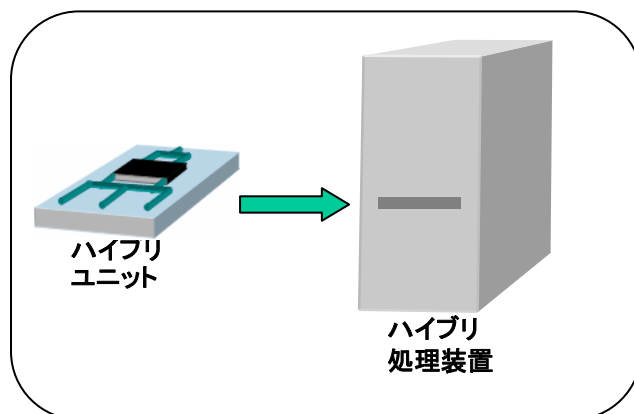


図 2.3-①-22 物理的ハイブリシステム

ハイブリユニットを用いて、ユニット内でのハイブリを自動で行うための処理装置の仕様を表 2.3-①-1 に示す。

表 2.3-①-1 処理装置の仕様

試作仕様	
項目	仕様
水平軸駆動方式	ステッピングモーター・ボールネジ方式 電力：10W/軸
クランプ部	空圧シリンダ駆動
ハイブリ加熱	空圧シリンダ駆動 加熱素子：ペルチェモジュール PID制御
ハイブリユニットローディング機構	DCモーター駆動
制御方法	USB経由でのPCからの逐次指令方式
寸法	240W×400H×500D (突起物を除く)
重量	約25kg
用力	AC100V 200W (最大) 圧縮空気

試作した処理装置の外観および内部の制御系の配置図を図 2.3-①-23 に示す。

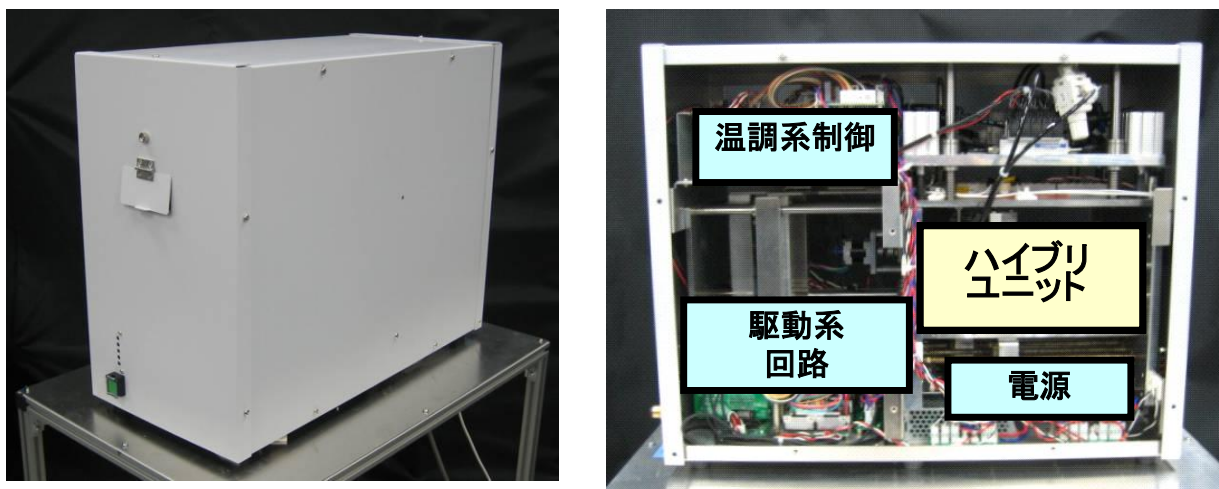


図 2.3-①-23 処理装置

反応は、ハイブリ溶液と洗浄試薬を注入したハイブリユニットを処理装置本体へローディングさせることにより開始される。

反応開始後にハイブリ溶液は、ハイブリチャンバー内に送り込まれる。ハイブリヒーターはペルチェモジュールを加熱素子としたヒーターにより予め暖められており、適切なハイブリ温度に PID 方式の制御要素を用いて温度調整がされている。ハイブリ中はハイブリ溶液の物理攪拌を行い、均一なハイブリを行っている。

ハイブリ加熱と洗浄の終了後に、装置正面左下に位置するエジェクトボタンを押すことによりハイブリユニットは処理装置より排出される。

(5)ハイブリプロトコルの検討

CGH 法は Comparative Genomic Hybridization と呼ばれ、染色体のコピー数異常や欠失を調べる方法である。1992 年にこの方法が報告された当初は、スライドガラス上に固定された分裂中期細胞の染色体標本へ DNA をハイブリさせ、顕微鏡下で染色体異常を解析するというものであった(染色体 CGH)(1)。一方、90 年代には DNA アレイの技術が向上し、スライドガラスサイズの基板の上に数千から数万種類の DNA 断片を配列することが出来るようになった。90 年代後半にこの DNA マイクロアレイの技術と CGH 法を組み合わせ、ゲノム DNA をパッケージングした BAC クローン DNA などを基板上にスポットしたアレイ CGH が開発された。この方法が開発されたことで、コピー数や染色体欠失部位などに関して従来よりも格段に詳細な結果が得られるようになった(2)。

1. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors.
Kallioniemi A. et al. Science. 1992 Oct 30;258(5083):818-21.
2. High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays.
Pinkel D. et al. Nature Genetics. 1998 Oct;20(2):207-11.

(5.1) ハイブリ条件の設定

アレイ CGH のハイブリ条件とハイブリ溶液の組成を比較すると、染色体 CGH 法と大きな違い

はないことがわかる。市販のアレイ CGH 用のハイブリ溶液についても、基本的には同様の組成、温度、時間でのハイブリが推奨されている。これらをふまえ、アレイ CGH の物理攪拌システムを構築するにあたり、表 2.3-①-2 にあるような標準的なハイブリ条件を確定した。以後の実験で、物理攪拌システムでのハイブリ条件検討など手作業によるハイブリを行う際には、この条件を適用した。

表 2.3-①-2 染色体 CGH とアレイ CGH のハイブリ条件

	染色体 CGH	アレイ CGH	標準ハイブリ
前処理	Cot-1 DNA	混合 DNA	混合 DNA
ハイブリ液	50% formamide 10% dextran 2x SSC	50% formamide 10% dextran 2x SSC tRNA 添加	50% formamide 10% dextran 2x SSC tRNA 添加
ハイブリ時間	12-96時間	16-72時間	72時間
ハイブリ温度	37°C	37°C	37°C

(5.2) ハイブリ効率化のためのアプローチ

(5.2.1) 光量増強についての検討

CGH の解析指標の一つに、 $SD\log_2(A/B)$ が採用されている (図 2.3-①-24)。ここでの A/B は、図 2.3-①-25 の結果例に示されるように、サンプル A (Cy5: 赤色)、サンプル B (Cy3: 緑色) とした場合に、ハイブリ後のアレイにおける常染色体由来のスポットについて、Cy3 (B) に対する Cy5 (A) の光量比を取ったものとなる。理想的条件下においては、A と B が同一サンプルであれば A/B は 1 になり、 $SD\log_2(A/B)$ も限りなく小さくなる。よってこの指標が小さいほど、比較する 2 つのサンプル間でのハイブリ時のアーティファクトや測定におけるノイズの影響が少ないと考えられることから、CGH としてのハイブリが良好であるとされている。

そこで CGH のハイブリに際し、解析指標の向上に必要な条件について検討を行った。まず、CGH 用のハイブリチップ (C-Chip, Macrogen) を使い、Cy5 (female) についてハイブリターゲット量とハイブリ光量の関係を確認したところ、ハイブリターゲット量とハイブリ光量の間には高い正の相関が確認された。また、シグナル (S) を各アレイのスポット内部の光量平均、背景光 (N) をスポット外周部 (Local Ring) における光量平均として、S/N 比を算出したところ、光量と S/N についても同様に高い相関関係が認められた (図 2.3-①-26)。次に、前述の解析指標を各ハイブリチップについて算出・適用したところ、S/N の値と解析指標には負の相関が認められた。さらに、Cy3 (male) のハイブリからも同様傾向を示す結果が得られた。このことから、S/N の向上は良好な解析指標を得るために必要な一要素であると考えられた。

※ CGH の解析指標について

$SD\log_2(A/B)$ が採用されている
(算出法)

①各 Spot のシグナルについて、サンプル A (赤), B (緑) の比をとる
②常染色体のスポットについて、 $\log_2(A/B)$ の SD を算出

図 2.3-①-24 CGH の解析指標

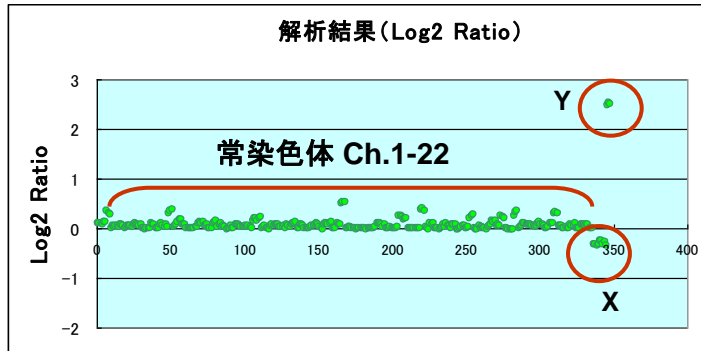


図 2.3-①-25 CGH の解析結果 (C-Chip, MacroGen)

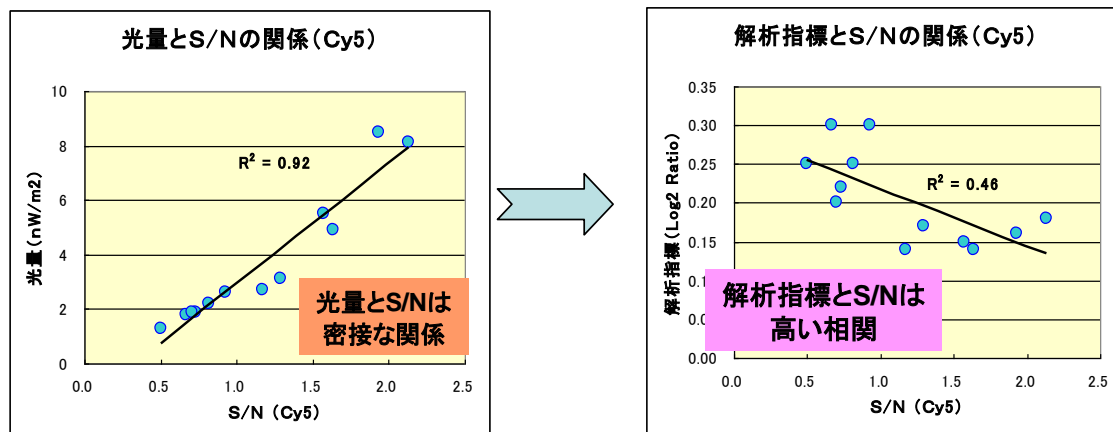


図 2.3-①-26 光量と S/N, および解析指標と S/N との関係

(6) ハイブリユニット用ハイブリサンプルの調製

ハイブリ実験には、条件検討用として健常人男性、女性由来のゲノム DNA をサンプルとした。このゲノム DNA は Promega 社より、Human Genomic DNA, Male (G1471) および Human Genomic DNA, Female (G1521) を購入し使用した。

ハイブリ用ターゲット DNA の調製は以下の手順で進めた。1. ゲノム DNA ヘランダムプライマーの結合、2. DNA ポリメラーゼによる DNA 相補鎖合成反応で Cy3-UTP または Cy5-UTP の取り込み(ラベリング)、3. DNA の精製、4. DNA 量の測定 (UV 吸光) 5. Cot-1 DNA を含むハイブリ溶液への DNA 溶解。このようにして作成したターゲット DNA は、プローブ DNA への非特異的なハイブリを抑えるため、70°C で 10 分間加熱後、37°C で 1 時間保持の処理を加え、サンプル DNA に含まれる繰り返し配列をマスクしてからハイブリ試験に使用した。

(7) 物理的ハイブリシステムによるハイブリ実験

試作した物理的ハイブリシステムを用いて、実際の CGH チップのハイブリを行った。

はじめに、7×12mm に切断したチップを搭載したハイブリユニットを用いて、動作の処理シーケンスの開発を行い、実際に CGH チップをハイブリできることを確認した。

続いて、動作検証中に明らかになった問題点を改善するために試作品の改良を行い、ハイブ

りにおける3次元ランダム攪拌の動作や、効果的な洗浄の動作を開発した。この改良したハイブリュユニットを用いて、3次元ランダム攪拌によってハイブリ効率が増加することを、攪拌無しのハイブリと比較してスポットの光量が増加していることで確認できた。

そして、各研究機関との連携として、産総研で開発された日本人 BAC を山口大学で絞り込んだ、144 ミニアレイを搭載して動作させて良好な結果が得られた。さらに、和光純薬工業で開発された蛍光標識試薬で調製したサンプルを用いて、トーヨーエイテックで開発された高配向性金基板にスポットされた 144 ミニアレイをハイブリすることができた。

(7.1) 試作ハイブリュユニットによる CGH チップのハイブリ

CGH チップとして、Macrogen 社の C-Chip を用いた。スライドガラスにスポットされているものを 7×12mm のサイズに切り出してハイブリュユニットに搭載する。ハイブリュユニットにはハイブリ溶液と洗浄液を充填しておき、処理装置にかけてハイブリ・洗浄を自動で行う。

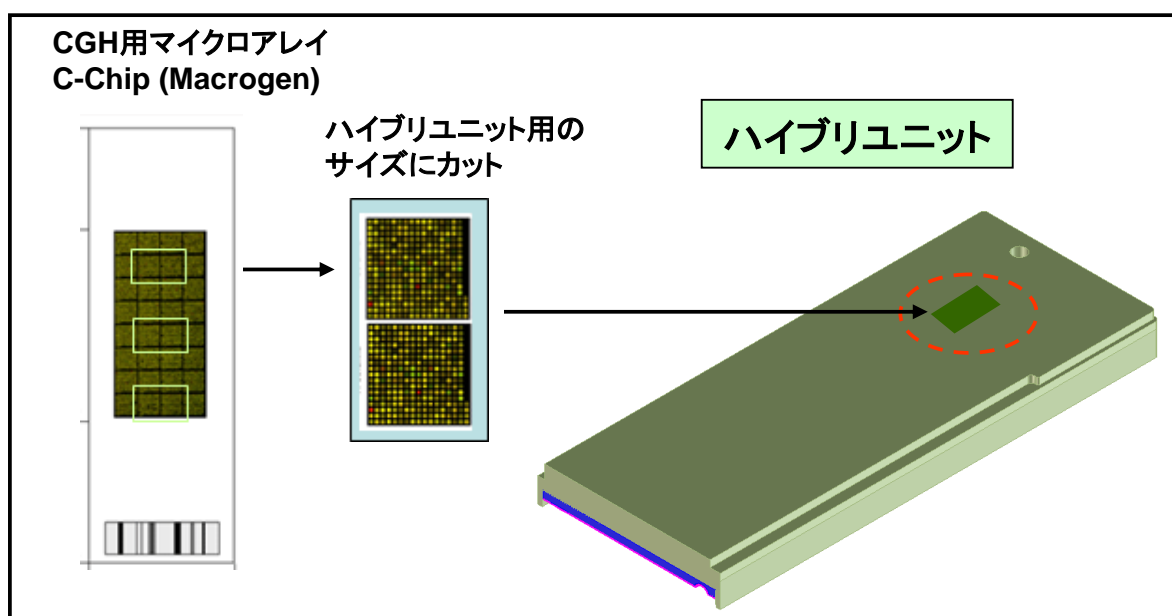


図 2.3-①-27 試作ハイブリュユニットへのチップ搭載

サンプルとして、Cy3 標識した Male DNA と Cy5 標識した Female DNA を混合したものを用いて、18 時間のハイブリを行った。CGH チップは、Macrogen 社の C-Chip を用いている。スライドガラスにスポットされているものを 7×12mm のサイズに切り出してハイブリュユニットに搭載した(図 2.3-①-27)。ハイブリュユニットにはハイブリ溶液と洗浄液を充填しておき、処理装置にかけてハイブリ・洗浄を自動で行う。

(7.2) 試作ハイブリュユニットによる3次元ランダム攪拌の効果の確認

試作したハイブリュユニットを用いて、ハイブリ条件の最適化、3次元ランダム攪拌動作および洗浄条件・動作の最適化を行った後に、3次元ランダム攪拌によってハイブリ効率が向上することを確認する実験を行った。攪拌動作をしない静置状態でのハイブリと、3次元ランダム攪拌動作でのハイブリの、スポットの平均シグナル光量を比較した。CGH チップとしては Macrogen 社の C-Chip を用い、ターゲットは Male、Female の混合サンプル、ハイブリ時間は 18 時間で実験を行った。結果を図 2.3-①-28 に示す。攪拌動作を行った方が、明らかに静置よりも明るいシ

ゲナルが得られている。複数回の実験の結果、静置のときのシグナル光量 3.1[nW/m²]に対して、3次元ランダム攪拌では 5.9[nw/m²]となり、約2倍のシグナル光量の増加が確認できた。(図 2.3-①-29)

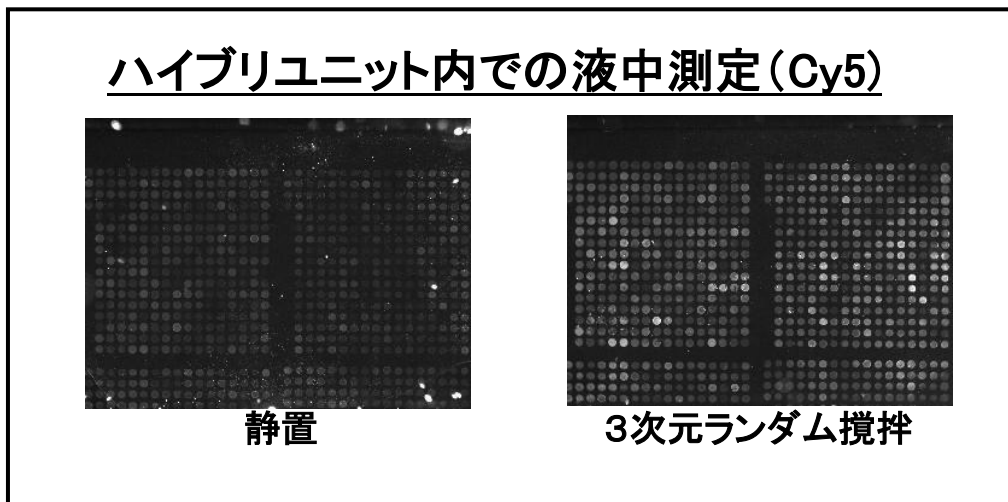


図 2.3-①-28 3次元ランダム攪拌によるシグナル光量の増加

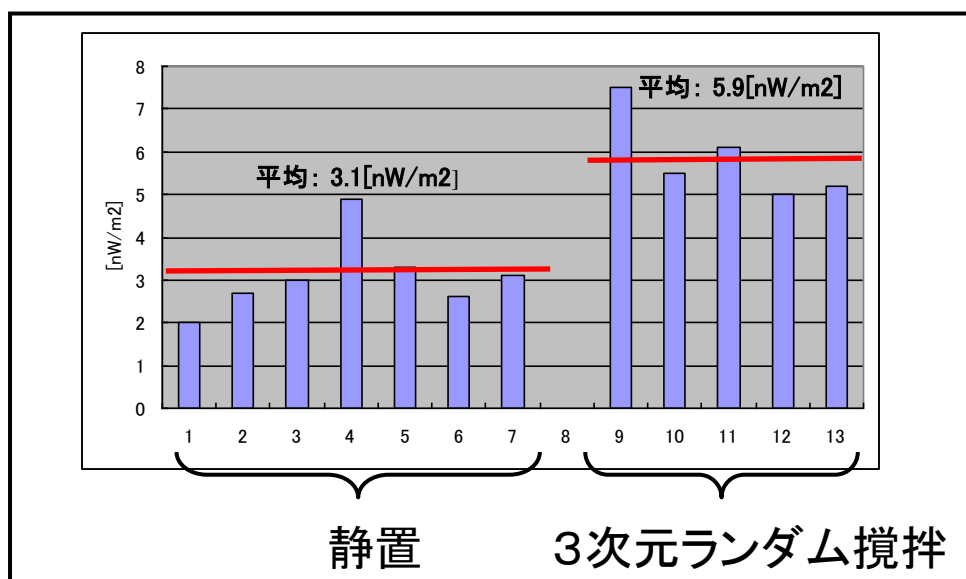


図 2.3-①-29 シグナル光量の比較

(8) 開発成果のまとめ

物理的ハイブリシステムの研究開発として、現在のハイブリの課題を整理するとともに、微小空間におけるプローブとターゲットの会合効率を向上させる、3次元ランダム攪拌方式を考案した。要素技術開発のために、2次元および3次元の状態観察システムを構築し、微小空間における溶液の流れの状態を測定した。従来、微小空間では層流状態になる溶液の流れも、3次元ランダム攪拌によって乱流状態になることを確認し、PIVによる流速分布の解析も行った。

そして、3次元ランダム攪拌を実現するハイブリユニットとその処理装置の試作を行った。ハイブリユニットはメカニカル・ドライブ(メカニカル・ローラー)方式で駆動されることによってポンプやバルブの機能を持ち、送液や混合、分注、攪拌を行うことができる。処理装置内では送液や部分的な加熱を行い、ハイブリ・洗浄動作を全自動で実行することができた。ハイブリユニットと処理装置は2度の試作を行って改良を進め、物理的ハイブリシステムとしての完成度と性能を向上した。

3次元ランダム攪拌の効果としては、同一条件での静置状態よりもハイブリシグナル光量が2倍程度増加することを確認できた。

② 深い焦点深度の読取装置の研究開発

上記のハイブリ結果を測定するには、小型化したチップの高感度測定システムが必要となる。このため、横河電機の高感度蛍光測定技術、背景光・迷光除去技術を活かして新たに2色マルチビーム・ディスク型読取装置を開発する。具体的には、基準との差動により高精度な読取を可能にする2色読取方式、深い焦点深度とS/N比の高い高感度蛍光読取方式、小型・安価で高信頼性の機構を同時に実現するマルチビーム・ディスク方式の開発を行う。試料をアレイ状に配置したバイオチップに複数の光束の光を同時に照射し、受光器により前述複数の試料に応じた画像情報を読取る方式である。さらに不均一な蛍光退色を防止する液中計測光学系を組み合わせることにより、稼働部が少なく、且つ1ビーム当たりの励起パワーが少ないので、蛍光色素の退色も少なく、相対的に微弱光の測定も可能なバイオチップ読取装置が実現できる。

a)開発のポイント

横河電機の共焦点光学系設計技術、レーザ光学技術を活用し、前記の機能を実現させるために以下の開発を行なった。

- 1.深い焦点深度の実現により、チップに歪みや傾きがあっても全光量を高感度に測定できる長深度広開口光学系
- 2.ノイズを低減させることにより S/N 比を改善させるマルチビーム・ディスク光学系
- 3.シグナルを上げることにより S/N 比を改善させるビーム整形光学系
- 4.緑色／赤色励起に対して不均一な蛍光退色を防止する液中計測光学系
- 5.要素技術を集大成した試作機の開発
- 6.評価用基準チップの作成と、基準チップによる評価
各開発項目についての詳細を以下に記す。

b)深い焦点深度の実現(長深度広開口光学系の開発)

DNA チップにはチップ自身の歪や寸法公差があり、また読取装置に取り付ける際にも各種の誤差要因が存在する。チップ自身の厚さ公差(撓み、平面度も含む)だけでも高精度グレードで±50μ m、一般グレードでは±100μ mある。これらを考慮するとフォーカス調整をその都度行わないのであれば、読取装置は±100μ m以上の焦点深度を持つ必要がある(図 2.3-②-1)。

焦点深度と受光光量の関係については、図2.3-②-2の通り、ピントがずれた場合は急激に受光量が減少する。焦点深度を測定したところA社製の読取装置では18μ m、B社製では10μ mであった。

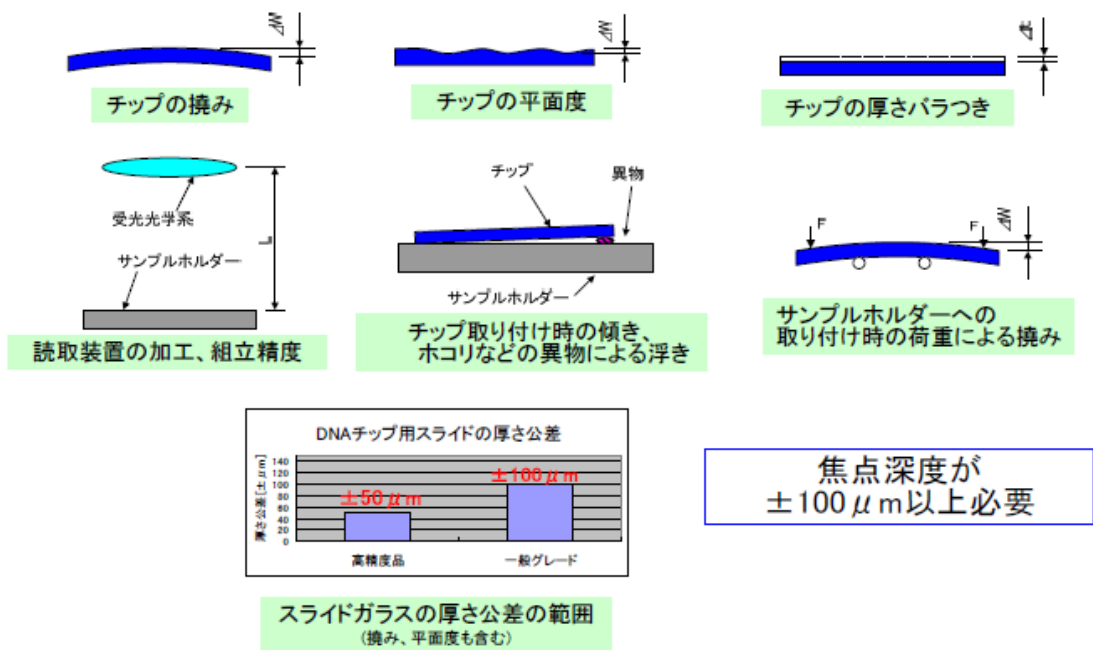


図 2.3-②-1 チップ自身の各種公差、サンプルホルダーへの取付における各種誤差と必要な焦点深度

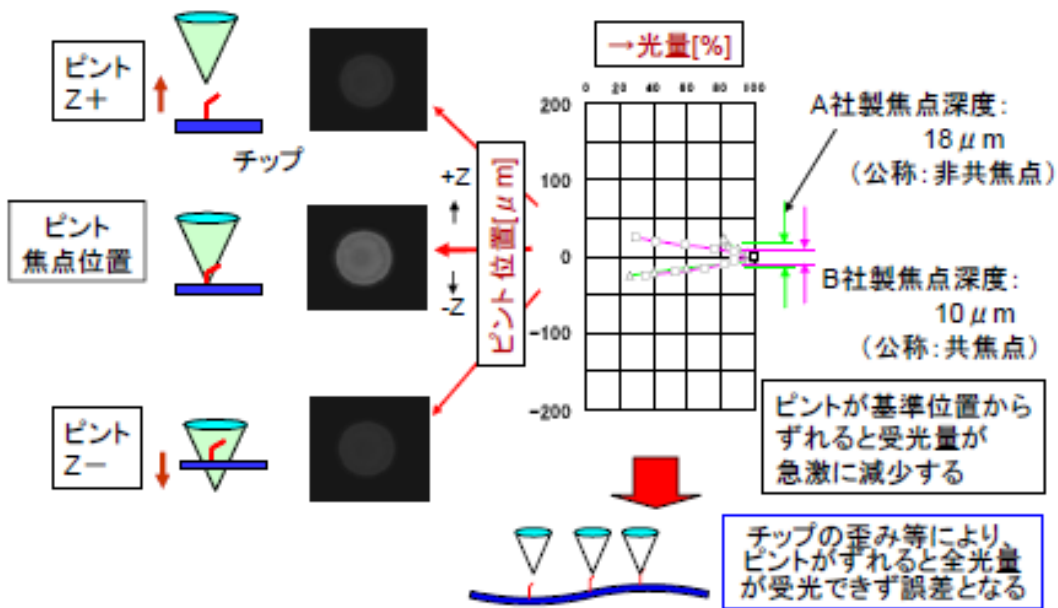


図 2.3-②-2 市販読取装置における焦点深度と受光量の関係

このため、横河の長深度広開口光学系では深い焦点深度を実現する励起系および受光系の開発を行った。その結果、開発した読取装置では $250\mu\text{m}(\pm 125\mu\text{m})$ の焦点深度を得ることができ、目標の $\pm 100\mu\text{m}$ 以上を達成した(図 2.3-②-3)。

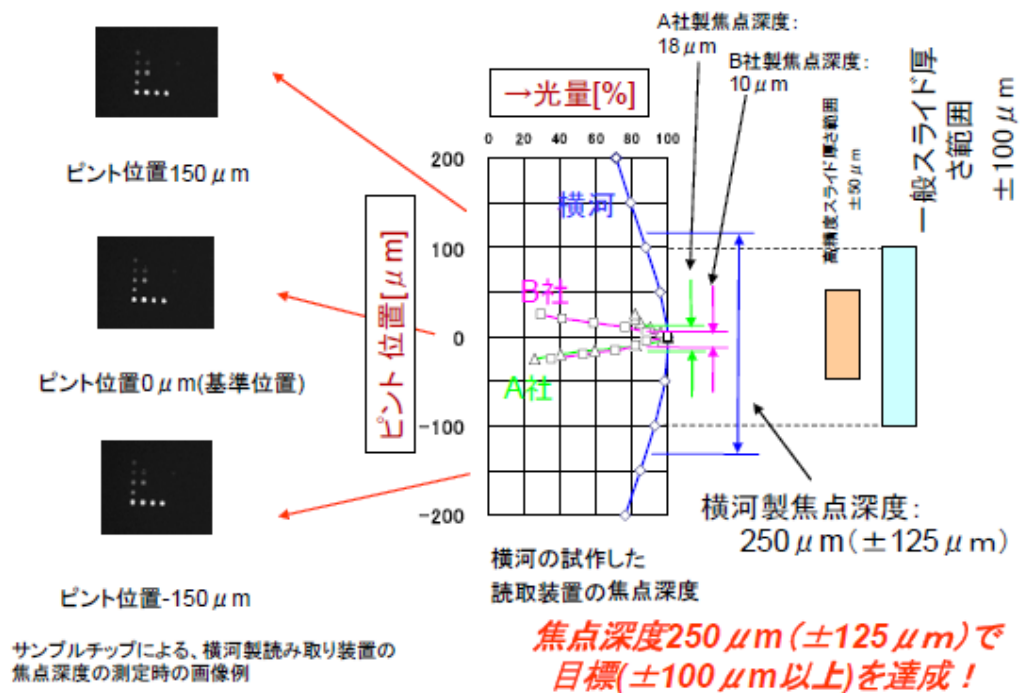


図 2.3-②-3 試作した読取装置で実現した深い焦点深度

c)ノイズ低減によるS/Nの改善

蛍光の測定に白色光をもちいると、励起光量が不足すると共に、励起波長が蛍光波長に回り込みノイズとなってしまふ。一方、レーザ励起の場合、レーザ励起固有の干渉縞(スペックル)が発生し、干渉縞は励起光のノイズとなるため低減させる必要がある。また、機器外部から進入したゴミが光学部品に付着した場合、ゴミにより励起光が妨げられ、励起光のノイズとなるため、このノイズについても低減させる必要がある(図 2.3-②-4)。

干渉縞ノイズ低減のため、図 2.3-②-5 に示す横河電機の持つ共焦点スキヤナの技術を応用し、マルチビーム・ディスク光学系を開発し励起光のノイズ低減を図った。さらに、パターン配置を工夫することにより、光学系部品へのゴミの付着に対する影響を激減させることができた。また、マルチビーム方式では励起光が分散効果されるため、シングルビーム方式よりも、蛍光退色を低減することができる(図 2.3-②-6)。

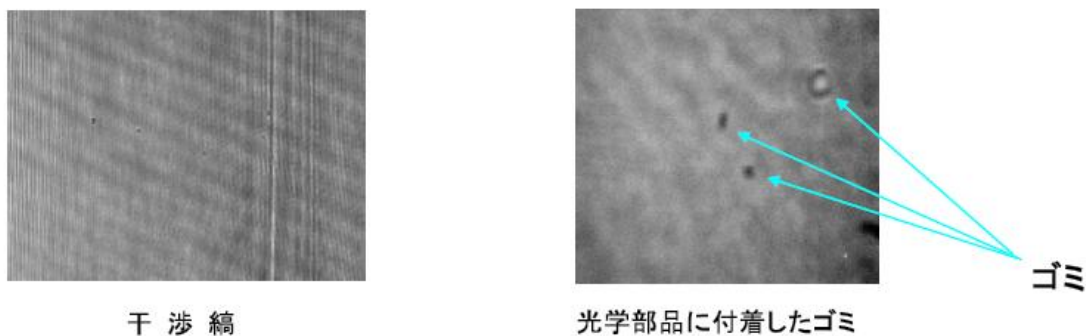


図 2.3-②-4 光学的なノイズ

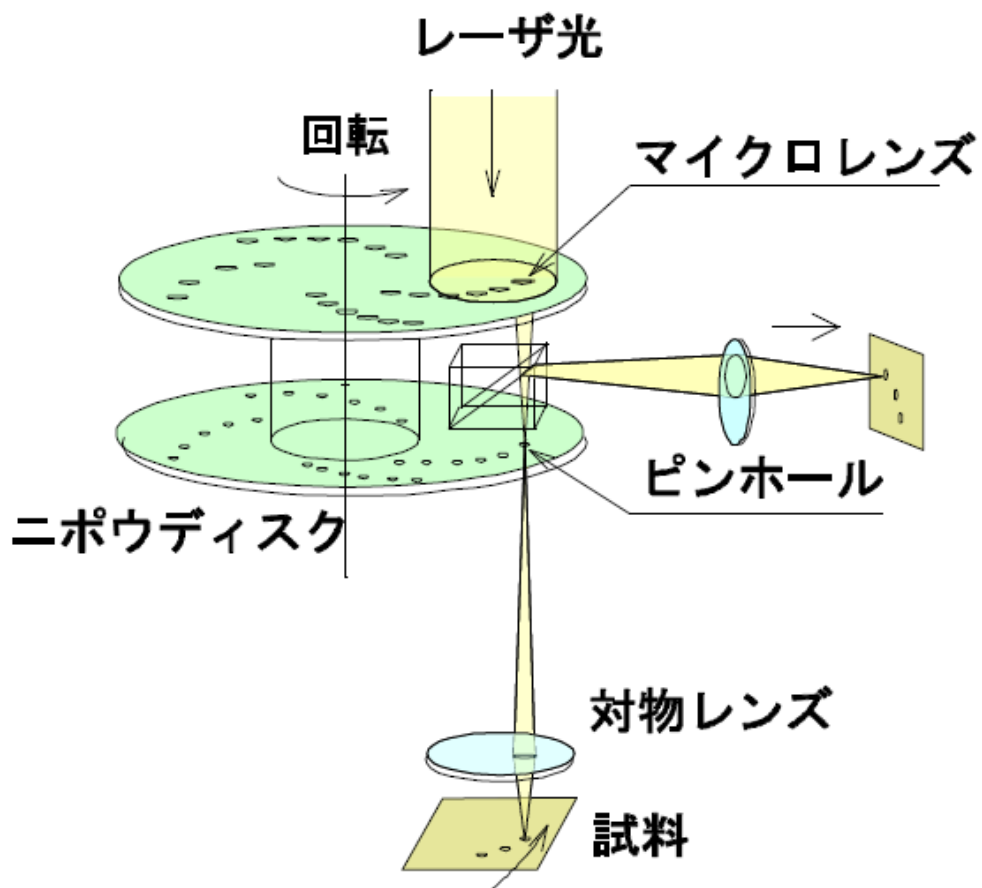
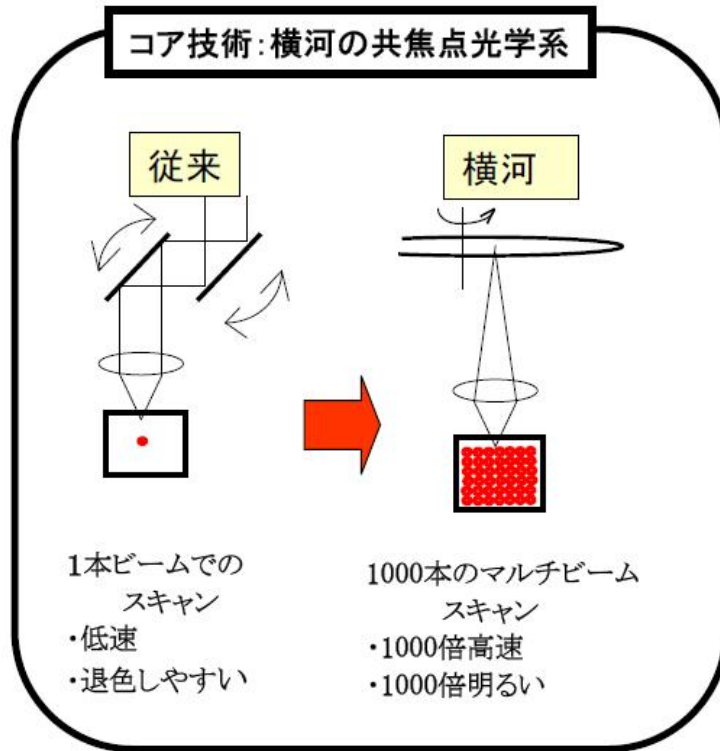


図 2.3-②-5 横河電機の共焦点スキャナの光学系



干渉縞ノイズ低減のため、共焦点スキャナの技術に応用し、マルチビームディスク光学系を開発。さらにパターン配置を工夫することにより、光学系部品へのゴミ付着に対する影響を激減。

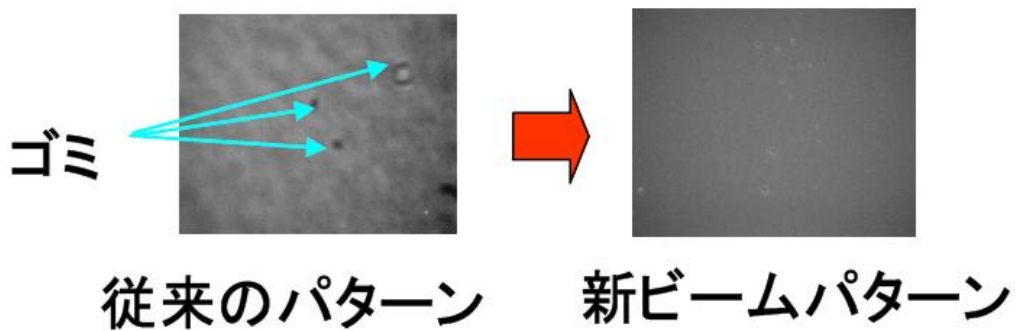


図2.3-②-6 マルチビーム・ディスク光学系とパターン配置の工夫によるノイズの低減

従来型

(1) 単ビーム型

XY ステージ走査が必要

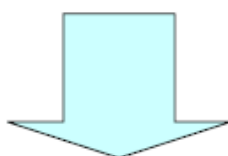
→ 大型・低信頼性

フォトマル受光 → 狭いダイナミックレンジ

強い励起光 → 蛍光物質の退色

(2) 白色光源型

光量不足 → S/N が良くない



横河読取装置【特許】

(1) マルチビーム型 (Nipkow 共焦点装置開発)

マイクロレンズを介してレーザー光を同時照射/読取

ステージ稼動部がない → 小型・高信頼性

ダイナミックレンジが広い

1ビーム当たりの光量が少ない → 退色が少ない

(2) 深い焦点深度

表面の凹凸等の影響が少ない

図2.3-②-7 従来型光学系と比較した、新規開発光学系の優位性

d)シグナル向上によるS/N比の改善(ビーム整形光学系)

レーザ光により励起を行う場合、レーザから出力される細いビームをチップサイズに拡大する必要がある。レーザ光の光軸周りの強度分布はガウス分布状のパターンであるために、単純にビームを拡大しても光源出力の数割程度しか利用できない。

新規に開発した方式では、従来方式に対し励起光量を2倍に増加でき、結果として蛍光強度も増加させることができた(図 2.3-②-8)。

従来型光学系と比較した、新規開発光学系の優位性のまとめを図 2.3-②-7 に示す。

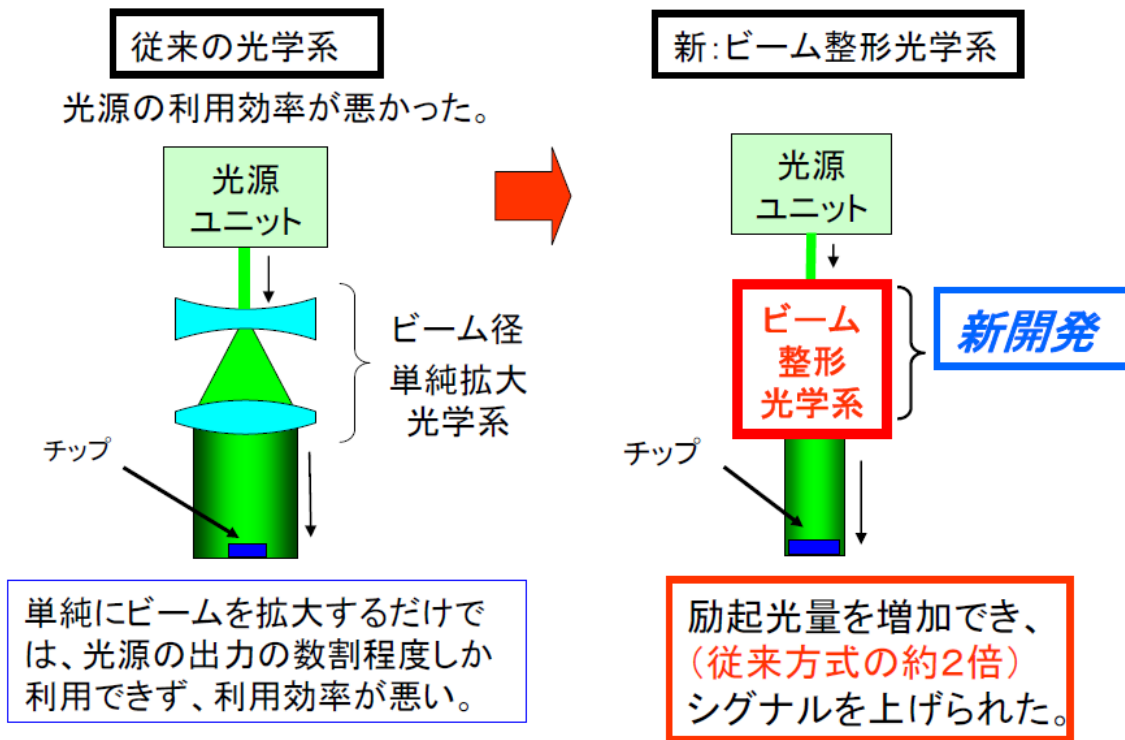


図2.3-②-8 ビーム整形光学系による励起光量の増加

e)不均一な蛍光退色を防止する液中計測光学系の開発

ハイブリ後にドライアップの処理を行うと、赤色蛍光色素の光量は急激に低下するため、Cy3, Cy5 のレシオが不安定となり、計測結果に影響を与える。

そのため、ハイブリ後にドライアップ無しで液中にてそのまま測定できる液中計測光学系を開発した。液中では赤色蛍光色素の光量低下が抑制されるため、Cy3, Cy5 のレシオが安定に得られると考えられる(図 2.3-②-9)。

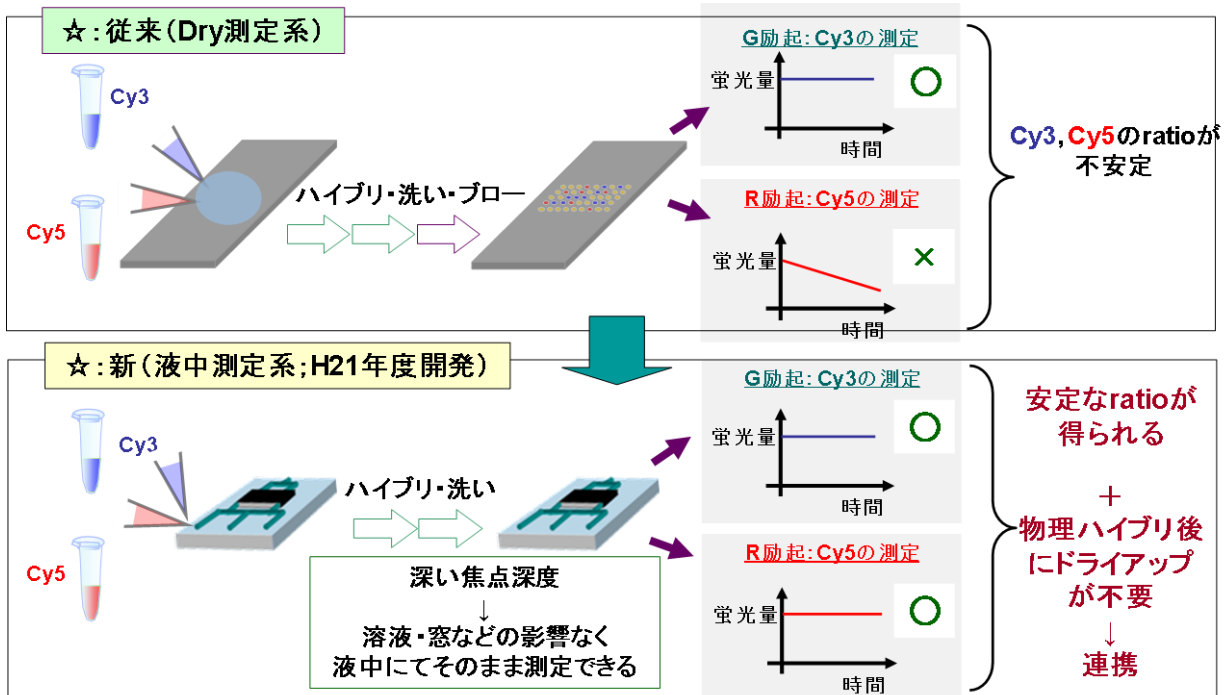


図 2.3-②-9 液中計測光学系による赤色蛍光色素の光量低下の抑制

ドライ・液中での光量安定性を評価するため、Cy3, Cy5 それぞれの光量基準チップを作成した。光量基準チップを用いて、ハイブリから洗いの処理中に液中でのウェット状態を保ちながら 5 分間隔での測定を 70 分継続し、ドライアップの処理後から 5 分間隔での測定を 20 分継続した。その結果、液中でのウェット状態では Cy3, Cy5 とともに一定の光量を維持していたが、ドライ状態では Cy5 における急激な光量低下が確認され、液中計測光学系の有効性を確認することができた(図 2.3-②-10)。

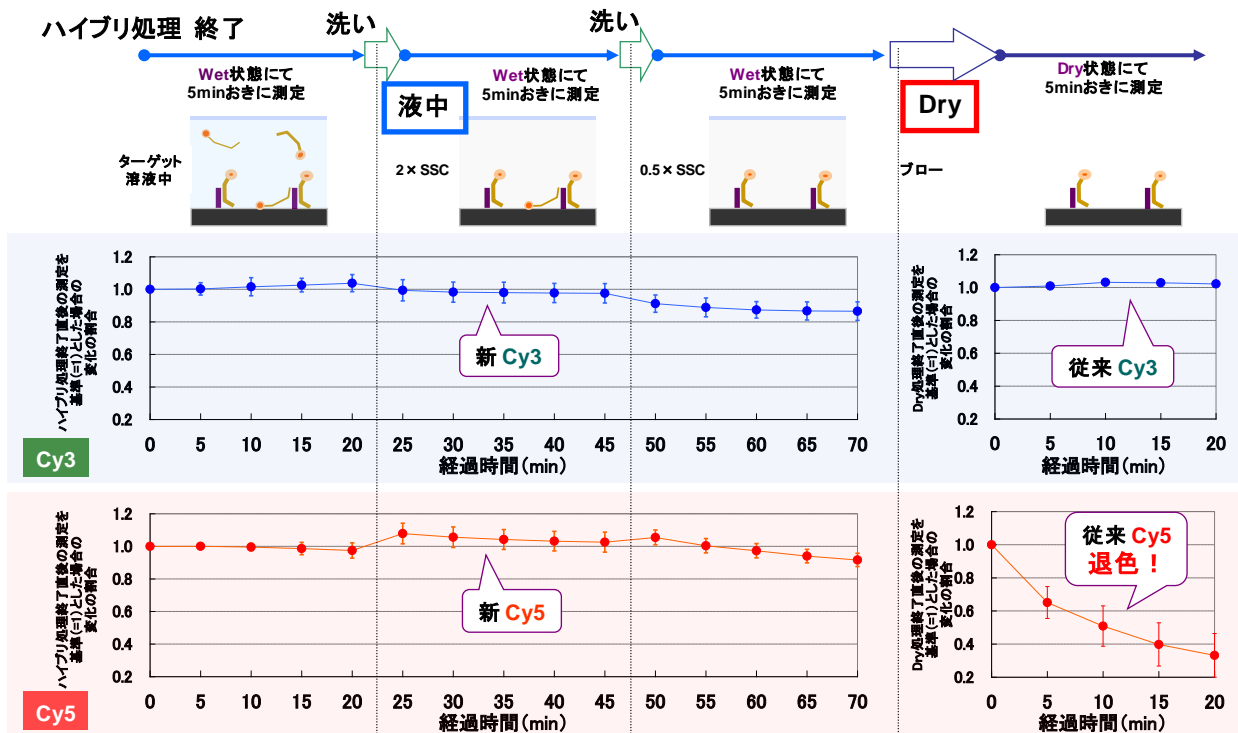


図 2.3-②-10 液中光学系による赤色蛍光色素の光量低下の抑制

f) 評価用基準チップによるリニアリティの評価

試作した読取装置の基本性能を確認するために、3倍希釈系列の濃度に調整した Cy3, Cy5 混合溶液をスポットし、グラデーションレイアウトの評価用基準チップを作成した(図 2.3-②-11)。基準チップを液中観察した結果、Cy3, Cy5 とともに、スポット濃度に対する光量測定値のリニアリティが得られた(図 2.3-②-12)。この測定レンジは、144mini アレイで要求される測定レンジに対応しており、試作した読取装置は物理的ハイブリシステムでハイブリしたチップを測定するための基本性能を有していると確認できた。

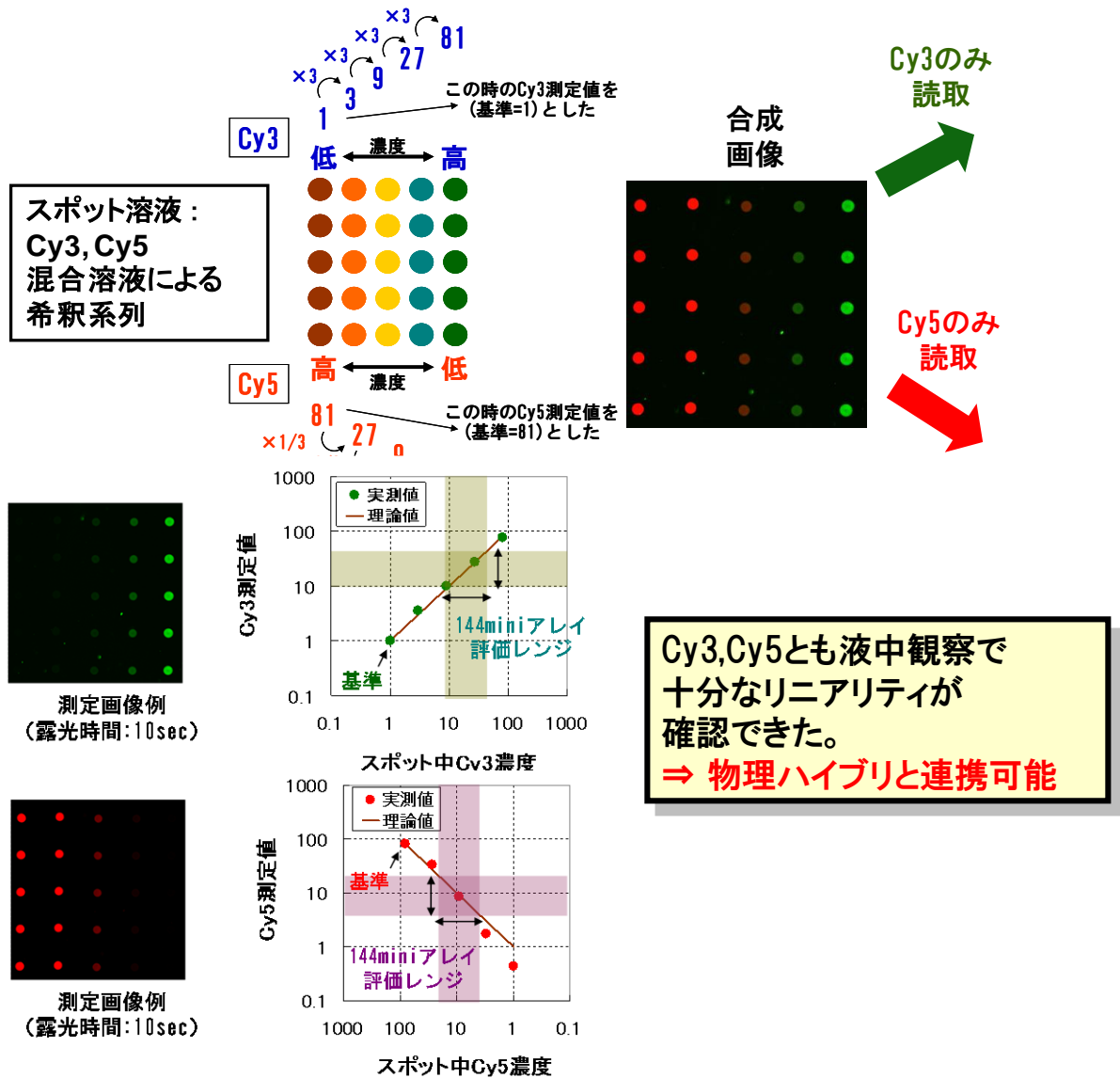
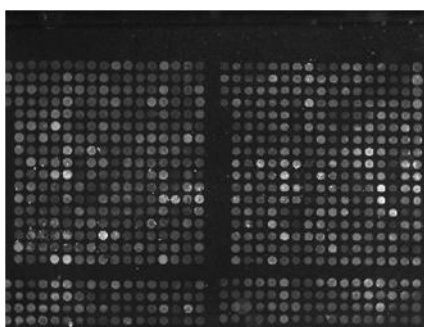
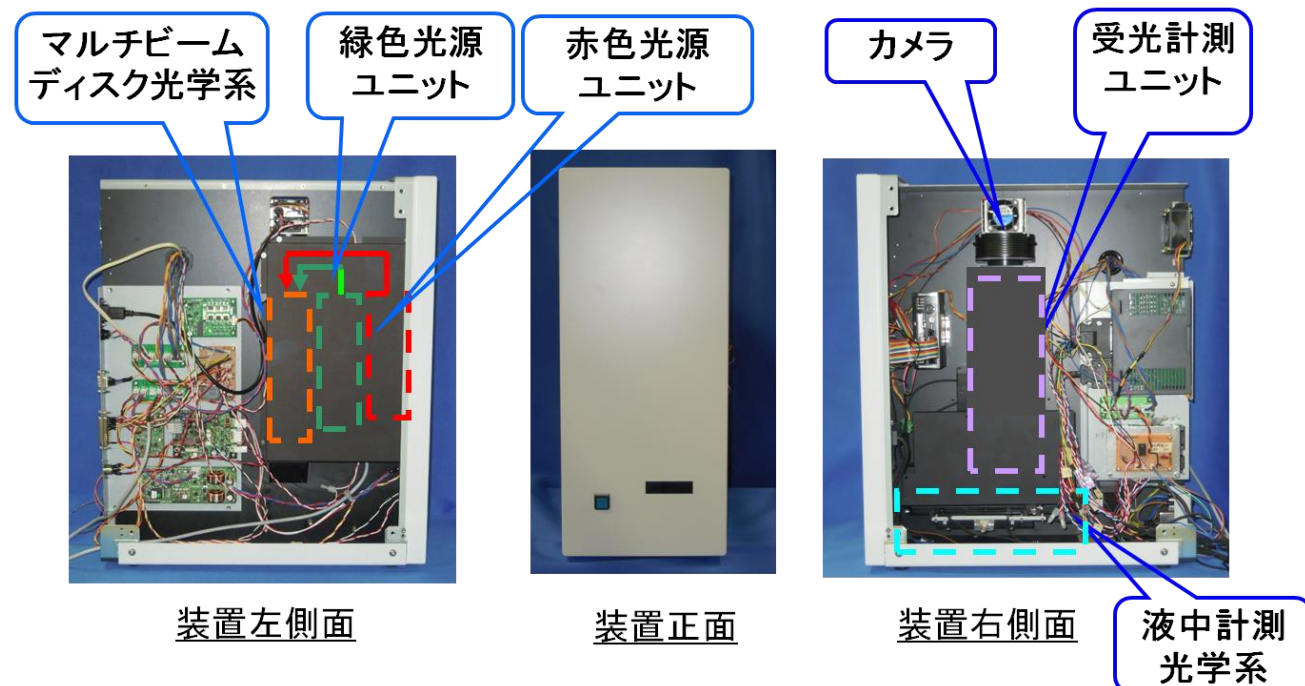


図2.3-②-12 液中観察により確認したスポット濃度に対する光量測定値のリニアリティ

g) 要素技術を集大成した試作機の開発

長深度広開口光学系、マルチビーム・ディスク光学系、ビーム整形光学系を搭載し、液中計測に対応したサンプルローダーと受光光学系を備えた読取装置の開発を行ない、今までに開発した要素技術を集大成した読取装置の試作機を製作した。

試作した読取装置により、物理的ハイブリシステムでハイブリしたチップを液中測定し、高 S/N 比かつ高感度で測定できることを確認した。読取装置の外形寸法は 210(W)×500(H)×420(D) mm である(図 2.3-②-13)。



物理攪拌ハイブリ画像 (液中Cy5)

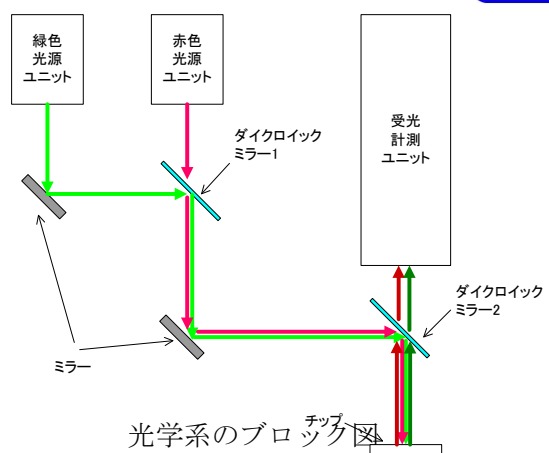


図2.3-②-13 開発した読取装置の構造と光学系の構成と液中での測定画像例

h)開発成果まとめ

- 1.長深度広開口光学系により、深い焦点深度を実現し、焦点深度の目標 $\pm 100\mu\text{ m}$ に対し、 $\pm 125\mu\text{ m}$ を達成できた。
- 2.配置パターンを改良した、マルチビーム・ディスク光学系により、ゴミや干渉縞によるノイズを激減させることができた。
- 3.ビーム整形光学系により、励起光量を従来比2倍に増加させることができ、シグナルを増加することができた。
- 4.液中でのウェット状態では Cy3, Cy5 とともにほぼ一定の光量を維持できることを確認し、液中計測光学系の有効性を確認することができた。
5. Cy3, Cy5 の混合溶液による希釈系列をスポットした評価用基準チップを作成し、144mini アレイで要求される 2 色同時の測定レンジに必要なスポット濃度に対する光量測定値のリニアリティが得られていることを確認することができた。
- 6.要素技術を集大成した試作機の開発を行ない、液中での物理攪拌ハイブリ画像を得ることができた。

③ 研究開発の連携

(1) 144 ミニアレイを用いた実験

各研究機関との連携として、産総研で開発された日本人 BAC を山口大学で絞り込んだ、144 ミニアレイを搭載した2次試ハイブリユニットを作製し、物理的ハイブリシステムの実験を行った(図 2.3-③-1)。144 ミニアレイのスポットは C-Chip と同様にスライドガラスに Macrogen 社によってスポットされたものを、ハイブリユニットに搭載できるよう切断したものをを用いている。ハイブリ結果を図 2.3-③-2 に示す。

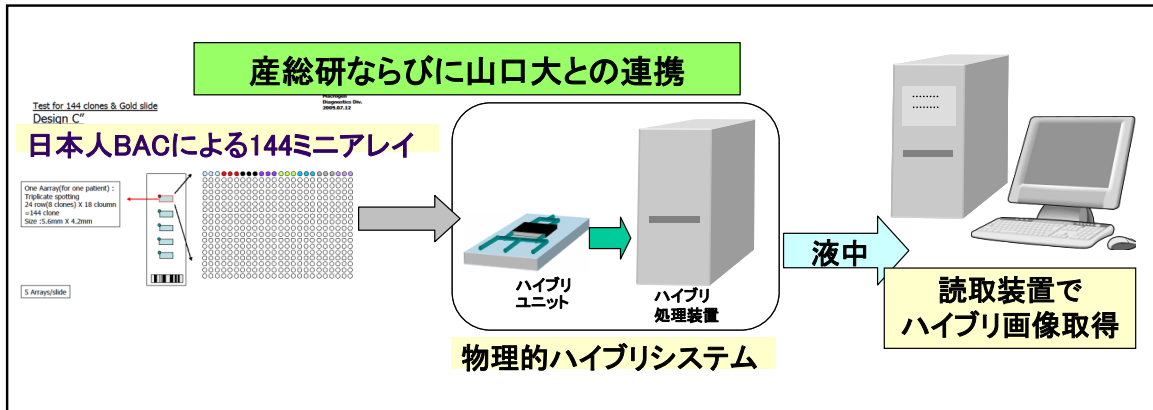


図 2.3-③-1 144 ミニアレイの実験

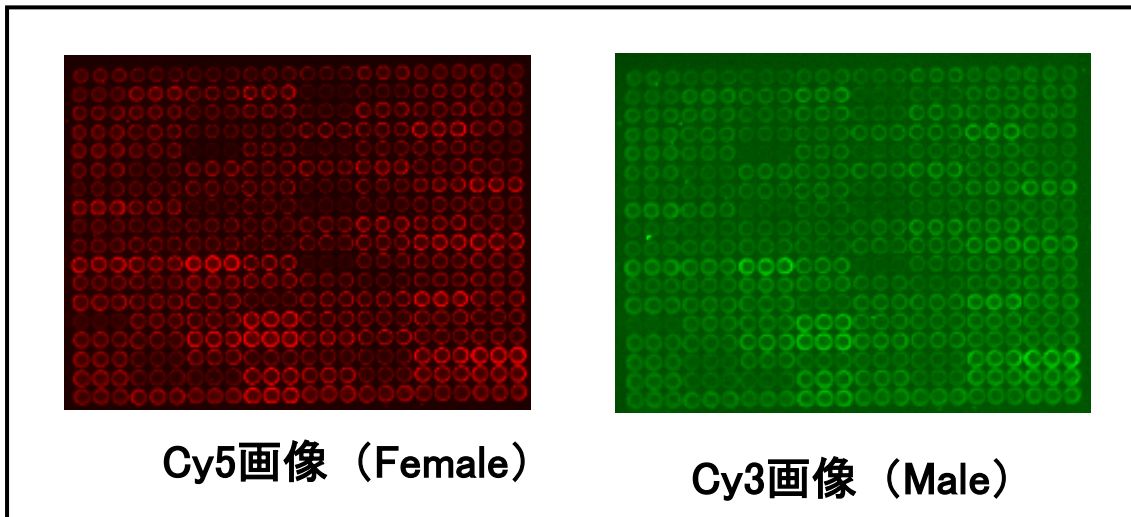


図 2.3-③-2 144 ミニアレイのハイブリ結果

(2) 和光純薬工業の試薬を用いた実験

和光純薬工業の成果との連携として、和光純薬が開発した新規の蛍光標識試薬 WY-535 および WY-635 を用いてサンプルを標識して、144 ミニアレイの搭載した2次試ハイブリユニットでハイブリを行った(図 2.3-③-3)。WY-535 および WY-635 は励起波長を横河電機で開発した読み取り装置で用いている波長に、より近づけた蛍光色素であり、144 ミニアレイのスポットは C-Chip と同様にスライドガラスに Macrogen 社によってスポットされたものをハイブリユニットに搭載できるよう切断したものをを用いている。ハイブリ結果を図 2.3-③-4 に示す。

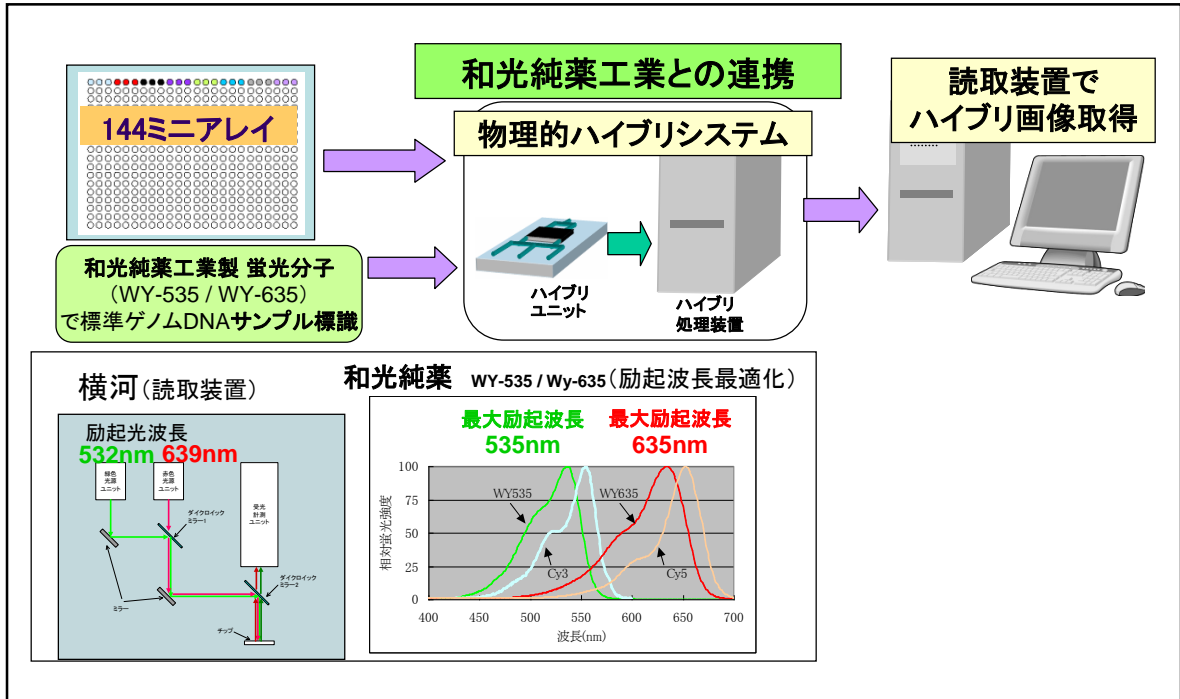


図 2.3-③-3 和光純薬工業の試薬を用いた実験

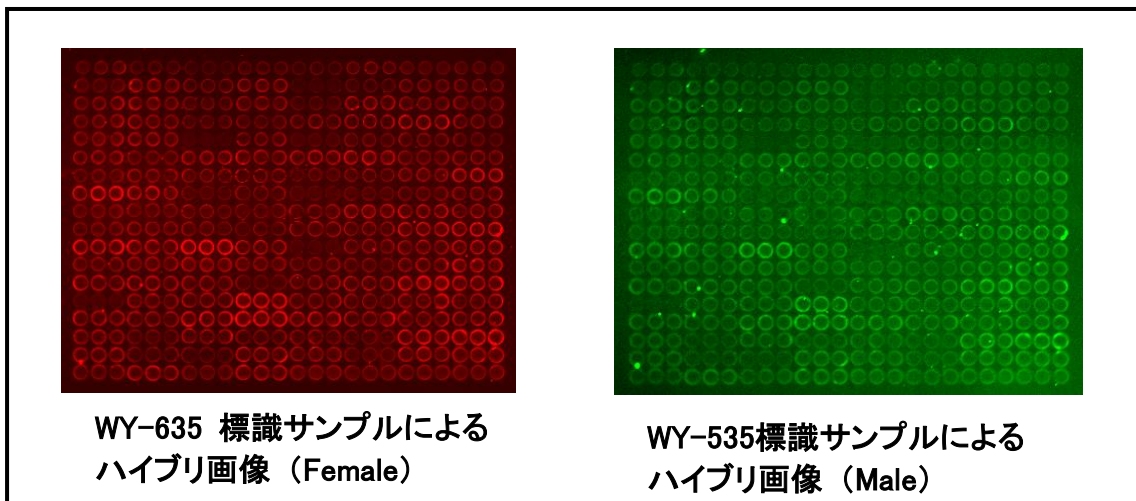


図 2.3-③-4 ハイブリ結果

(3) 和光純薬工業の試薬、トーヨーエイトックの基板を用いた実験

各研究機関の成果との連携として、トーヨーエイトックで開発された高配向性金基板に 144 ミニアレイをスポットしたものを2次試ハイブリユニットに搭載し、和光純薬工業の蛍光標識試薬で標識したサンプルをハイブリした(図 2.3-③-5)。ハイブリ結果を図 2.3-③-6 に示す。各組織の研究成果を連携させて、疾患別アレイシステムとして画像が取得できた。

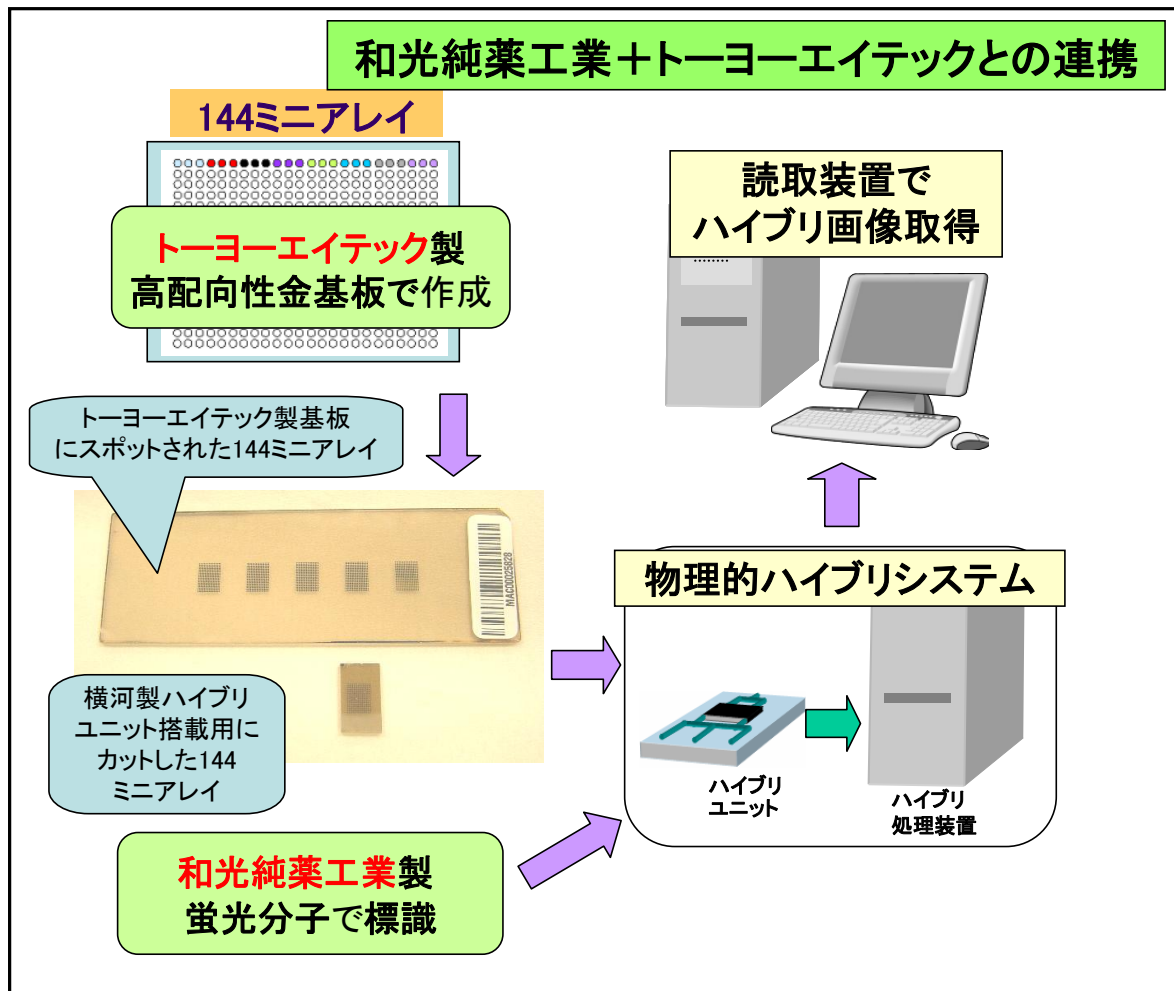


図 2.3-③-5 和光純薬工業、トーヨーエイトックとの連携

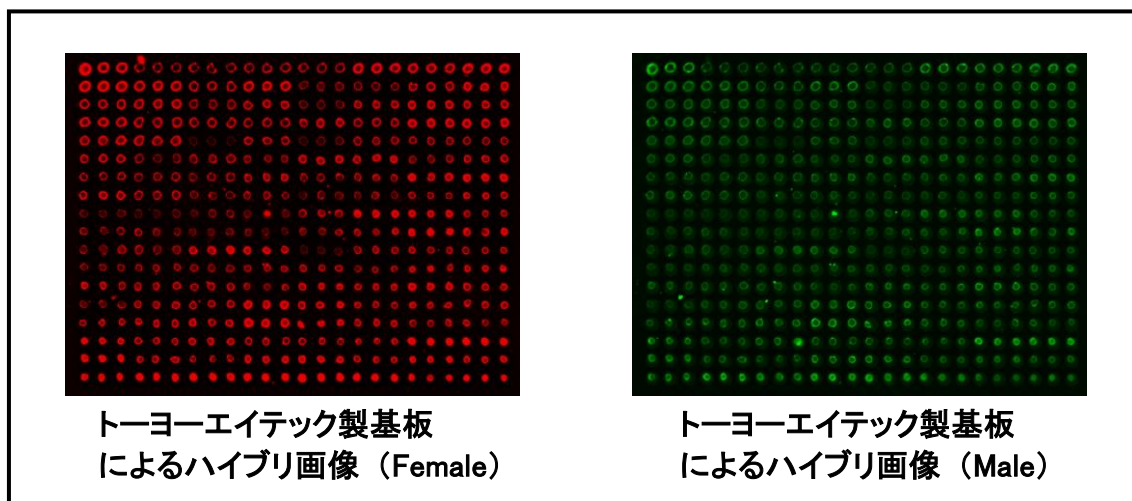


図 2.3-③-6 ハイブリ結果

(4) 開発成果のまとめ

各研究機関との連携では、産総研の日本人BAC、山口大のがんのコンテンツ、和光純薬の蛍光標識試薬、トヨエイトテックの高配向性金基板を同時に用いてハイブリユニットを構成し、物理的ハイブリシステムとしてハイブリの自動処理から結果の画像取得まで一連の処理をシステムとして動作させることができた。

2. 2. 4 ゲノム情報と臨床情報の統合化(担当:九州大学(再委託先))

はじめに わが国における大腸癌罹患率は増加する傾向にあり、そのゲノムレベルあるいは発現遺伝子レベルでの変異機構を明らかにする必要がある。われわれは大腸癌原発巣より Laser microdissection で採取した癌細胞より、genomic DNA および total RNA を抽出し CGH アレイおよび発現遺伝子アレイを実施した。その発現遺伝子 profile あるいはゲノム CGH profile から大腸癌あるいは進展に寄与するゲノム機構領域を同定する。

大腸癌関連遺伝子多型については、今日まで様々な報告が成されている。たとえば 2007 年 Tomlinson らは 930 人の家族性大腸癌症例を対象に 55 万 SNPs (一塩基多型) アレイを用いて 8 番染色体(8q24.21)が最も強く大腸癌の発生に関連すると報告し、大腸癌患者 7334 人でこの結果を確認した ($P=1.27 \times 10^{-14}$) (Nat Genet 2007;39:984-8)。Zanke らは 8 番染色体(8q24:OR 1.18 $P=1.41 \times 10^{-8}$)と 9 番染色体(9p24:OR 1.14 $P=1.32 \times 10^{-5}$)に強い多型部位を報告した(Nat Genet 2007;39:989-94)。彼らは異なる人種で結果を再確認した。Broderick らは大腸癌 7473 例を対象に SMAD7 遺伝子の内部に存在する 18 番染色体の多型 (18q21: $P=1.0 \times 10^{-12}$)を報告した(Nat Genet 2007;39:1315-7)。さらに Tomlinson らは 10 番 (10p14:rs10795668 $P=2.5 \times 10^{-13}$)と 8 番(8q23.3:rs16892766 $P=3.3 \times 10^{-18}$)に新たな多型を同定した(Nat Genet 2008;40:623-30)。Tenesa らは総計 14500 例の大腸癌を対象に 11 番染色体(11q23:rs3802842 OR=1.1, $P=5.8 \times 10^{-10}$)、18 番染色体(18q21:rs4939827 $P=5.8 \times 10^{-10}$)、8 番染色体(8q24:rs7014346 OR=1.19, $P=8.6 \times 10^{-26}$)の多型を報告した (Nat Genet 2008;40:631-7)。Pittman らも 11 番染色体(11q23: rs3802842 OR = 1.17, $P = 1.08 \times 10^{-12}$)に多型を報告している(Human Mol Genet 2008;17:3720-7)。Houlston らは 19q13.1 等において報告した(rs10411210; $P = 4.6 \times 10^{-9}$)(Nat Genet 2008;40:1426-35)。以上の報告を統合すると、人種や検索手段を問わず大腸癌で見出される多型にはある程度の再現性があることが了解され、すべての多型を持つと大腸癌発症の危険率は 2.6 になると報告されている。以上のことから多型のうち、最も知られる多型のひとつ 8q24 について発癌関連機構解明のために、CGH アレイおよび発現遺伝子アレイとの関係を調べ、EEM 解析を行った。

CGH アレイ解析症例数は平成 20 年度に解析症例数 159 例に到達し、クラスター解析を行った。その結果、全領域の大規模なゲノム変異を伴う症例群 119 例とほとんどゲノム変異のみられない症例群 40 例の大きく2つのクラスターに別れることが明らかになった。前者は後者にくらべて左側結腸に多く ($q < 0.05$)、進行癌に多い($q < 0.05$)。また、前者においてのみ、臨床病理学的因子との有意な相関が認められる($q < 0.05$)。特に前者の 119 例についてのみ解析を行ったところ肉眼型、脈管侵襲、リンパ節転移とそれぞれ強い相関を示す領域が存在した。さらに発癌関連遺伝子多型 8q24 rs6983267 の genotype と CGH および発現アレイの結果との関連について調べた。

1) 大腸癌の遺伝子発現解析とゲノム変異解析

大腸癌の発生、進展および治療感受性に関わる因子の詳細を明らかにするために、大腸癌の組織をサンプルとしたマイクロアレイデータを利用して次の解析を行った。

第1の解析では、発現マイクロアレイより得られたデータを利用して、臨床病理学的因子と関連する遺伝子について調査した。解析で用いた大腸癌臨床検体146例の全ては、14種類の臨床病理学的因子情報(性別、年齢、腫瘍占拠部位、腫瘍最大径、肉眼型、組織型、壁深達度、リンパ管侵襲、静脈侵襲、腹膜転移、肝転移、肝以外の遠隔転移、リンパ節転移、Dukes stage)が収集されている。それぞれの因子の違いにより発現量に差がある遺伝子を調べた結果、6種類の因子で統計的に有意な発現差を示す遺伝子が見つかった。

第2の解析では、CGH(Comparative Genomic Hybridization)用マイクロアレイを用いて、大腸癌症例に関連したゲノム領域の部分的な増幅や欠失(染色体異常)を調査した。まず、ゲノムの欠失または増幅領域のパターンが類似する症例があるかどうかを確認するために、常染色体のゲノム領域の DNA コピー数に基づいて、クラスター分析により各症例を分類した。大腸癌臨床検体157例を用いてクラスタリ

ングした結果、DNA コピー数変化が激しいグループ(127症例)と穏やかなグループ(30症例)の2種類に分類されることがわかった。さらにコピー数変化が穏やかなグループでは、2種類の臨床病理学的因子と密接に関連していた。次に、ゲノム領域の欠失や増加のパターンと臨床病理学的因子との間に関連があるかどうかを調査した。CGH マイクロアレイの解析で用いた臨床検体についても、14種類の臨床病理学的因子情報が収集されているので、染色体異常と関連がある因子を調査した。結果として、4種類の因子についてゲノムの欠失、増幅パターンが関連する領域を特定することができた。

(1) 2分割したクラスター別にみた大腸癌症例の特徴

臨床病理因子		Cl 1	Cl 2	student-t ANOVA (p value)	Fisher's exact test (p value)	chi-square test (p value)
年齢	平均	64.8 (35-86)	65.5 (32-96)	ns		
性	男性	18	70	ns		
	女性	12	57			
局在	直腸	3	58	<0.0001		
	近位結腸	17	27			
	遠位結腸	10	42			
	遠位 vs 直腸	遠位	直腸	0.00003	0.00007	
	近位 vs 直腸	近位	直腸	0.04	0.04	
腫瘍型	type 0	4	5	ns		
	type 1	4	8			
	type 2	21	105			
	type 3	1	9			
	type 4	0	0			
腫瘍径	平均 (range)	5.41 (2.30-11.0)	4.61 (1.5-11.0)	0.0397		
分化度	well	15	73	ns		
	moderate	13	53			
	poor	2	1			
深達度	粘膜下層まで	4	6	ns		
	筋層まで	3	19			
	漿膜下層まで)	15	79			
	pT	8	23			
リンパ管浸潤	陰性	16	56	ns		
	陽性	14	71			
静脈浸潤	陰性	19	39	0.0012		

	陽性	11	87	
	陽性 vs. 陰性	なし		0.001 0.002
リンパ節転移	陰性	18	67	ns
	陽性	12	60	
腹膜播種	negative	30	124	ns
	positive	0	3	
肝転移	negative	28	112	ns
	positive	2	15	
Dukes 分類	A	7	19	ns
	B	10	44	
	C	11	46	
	D	2	18	

(2) マイクロサテライト不安定性

クラスター間における microsatellite instability についても解析を行った。用いた loci は国際基準で認められたもの (BAT25, BAT26, D5S346, D2S123, D17S250) を用い、一つでも陽性であれば MSI(+) とした。マイクロサテライト陽性症例 7 例はすべて Cluster 1 に属し、Vogelstein、Christophe らが提唱した大腸癌の 2 つの分類 microsatellite instability 群 (MIN 群) と Chromosomal Instability 群 (CIN 群) に大別された。

(3) 発現アレイと CGH アレイの関係について

発現アレイと CGH アレイの両方のマイクロアレイデータが得られている臨床検体 132 例を用いて解析を行った。癌細胞において、染色体異常が原因で発現量に差が生じたと思われる遺伝子は、発現データと CGH データを統合することにより見つけ出すことができる。本解析では、各遺伝子に対して発現データと CGH データの相関係数を求めることにより、発現量の増減パターンとゲノムの欠失増幅パターンが同期している、すなわち染色体異常で発現量が制御されていると期待される遺伝子群を調査した。結果として、相関係数 0.7 以上 (p -value $< 1.0 \times 10^{-20}$) を示す 301 個の遺伝子を見つけることができた。

特にリンパ節転移に注目し、リンパ節転移の有無で発現量と DNA コピー数に差が認められた遺伝子の数を確認した。まず、リンパ節転移の有無と発現レベルとが有意に相関した遺伝子群は ($q < 0.05$) 54 個。CGH アレイ解析の結果、Allelic imbalance とリンパ節転移の有無とが有意 ($q < 0.05$) に相関した領域は 240 個。さらに発現アレイと aCGH とが有意 ($p > 0.7$) に相関している遺伝子領域は 501 個。以上の 3 つの条件をすべて満たす領域は全部で 11 個認められた。この 11 遺伝子すべてが 8p21~23 の領域内に存在し、このうち 3 個は 8p22 に於いてクラスターを形成する遺伝子であることを明らかにした。この 3 個の遺伝子では、それらの発現低下によりリンパ節転移陽性頻度が高いことを明らかにした。機能解析等現在進めている。

(4) 大腸癌細胞における染色体間の相関関係

CGH アレイの解析の結果、統計学的に有意に相関しうる、二つの独立した異なる染色体に位置する probe が存在することを明らかにした。また、極めて興味深いことにリンパ節転移陽性群と陰性群間で染色体間の相関の程度は大きく異なることが明らかとなった。今後、この現象の機序を解明したい。

2) 大腸発癌関連遺伝子多型 8q24 genotype と MYC 遺伝子発現、allelic imbalance、予後との関係

157 例の大腸癌症例の癌細胞採取による genomic DNA のうち、rs6983267 (8q24 多型) genotype の判明しているについて解析した。rs6983267 の non-risk allele TT 48 例、ヘテロ 40 例 または risk allele GG は 18 例であった。このうち risk allele は 17 例(94.4%)が cluster 2 に属し、88 例中 70 例(79.5%)が cluster 1 に属することを明らかにした。以上のことから、発癌関連多型の rs6983267 は、ゲノムレベルのコピー数変異と相関することを明らかにした。さらに、リスクアリル症例は、非リスクアリル症例群に比べて有意に Dukes C,D に分類され、予後増悪であることも明らかとなった。以上のことから、同多型が癌進展機構においても何らかの役割を示すことを示した。

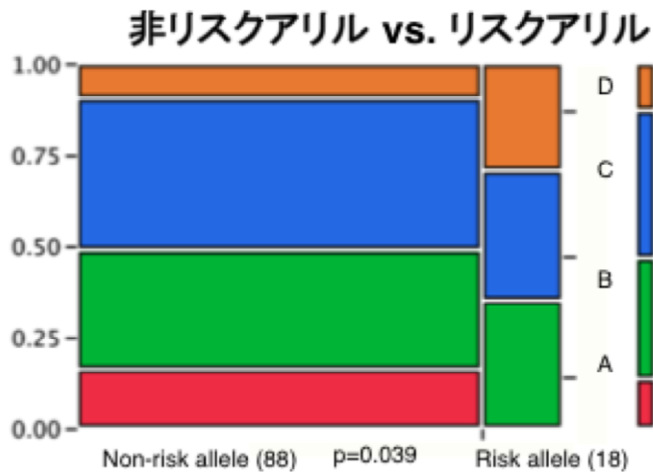


図 2.4-1

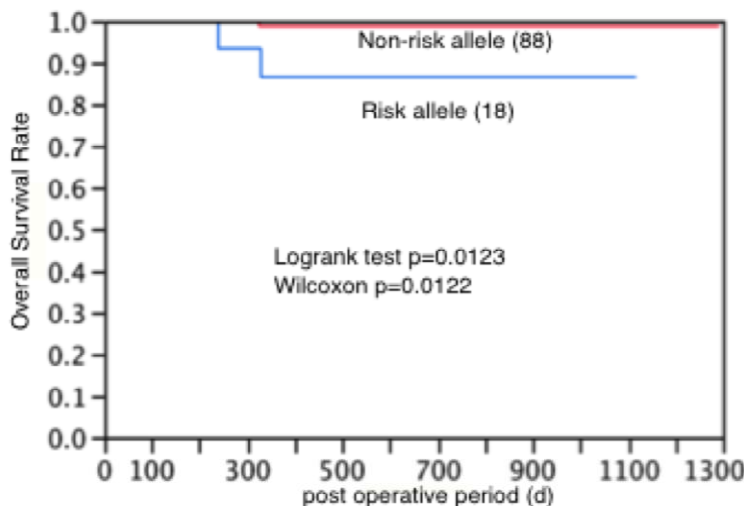


図 2.4-2

ごく最近 Tuupanen らは大腸がん症例 1042 人と対照 1,012 人により、局所における 8q24.21(rs6983267)と microsatellite instability とが相関することを明らかにした。すなわち 466 人の germ line におけるヘテロアリルを有する患者が大腸癌の rs6983267 においてアリルの不均衡を生じていることを述べ、germline における 8q24.21 の変異は大腸癌進展過程におけるひとつの標的であることを述べた。多型と疾患との関連機構については最も有名な 8q24 の多型を含め明らかではない。その理由はこれらの多型には翻訳領域が存在しないことに起因する。Ghoussaini らが“遺伝子の砂漠”と称した様に 8q24 には翻訳領域および転写産物がない。したがって、全く新しい大腸発癌機構を明らかにする端緒となる可能性を秘めているともいえる。ごく最近 Tuupanen らは 8q24 多型と大腸発癌とを結びつけ

るセンサーショナルな報告をした。すなわち、8q24 の rs6983267 が Wnt シグナルをエンハンスすることにより大腸発癌に寄与するという報告である(Nat Genet. 2009 Aug;41(8):885-90)。8q24 (rs6983267)におけるホモの G アリルは 1.5 倍大腸発癌危険率を高めることが知られる。エンハンサー部位局在特定法 (EEL)を用いて rs6983267 におけるエンハンサー配列を同定し、rs6983267 SNP の塩基配列は Wnt により制御をうける TCF4 の結合能に影響を及ぼすことに着目した。すなわち、TCF4 は rs6983267 がリスクアリル G を有する配列のみ in vitro, in vivo で強い結合能を示す。したがって、rs6983267 のリスクアリルに TFC4/LEF1 が結合した上で、さらにゲノム上で loop を形成し 400kb も下流の MYC 遺伝子を活性化することを明らかにした。この報告については、その後もいくつか報告が散見され、Tuupanen らの報告を支持している(Mol Cell Biol. 30: 1411-1420, 2010)。しかし、Tuupanen らの臨床検体では rs6883267 配列と MYC 発現とは相関がなかったことから、Wnt に制御されるエンハンサー領域の標的遺伝子として MYC 以外すべてをスクリーニングする必要がある。

そこでわれわれは、大腸癌細胞に於ける発現遺伝子 profile について、包括的にスーパーコンピュータを用いた解析を行い、rs6983267 多型 genotype と相関する遺伝子群について Extraction Expression Module Analysis にて解析を行った。すなわち、IPA 遺伝子ライブラリー (function, Ingenuity® Systems, www.ingenuity.com) 59 遺伝子セットのなかから有意差を示した 3 つの遺伝子セットを同定。cell cycle, DNA replication recombination, gastrointestinal disease, である。たとえば DNA replication recombination モジュールでは、ホモの G アリル症例群において有意に発現が相関していた($p=1 \times 10^{-16}$)。また、Pathway signature 遺伝子セットからは 8 つの遺伝子セットが有意差をもち選ばれてきた。すなわち Myc_UP, Beta_Catenin_UP, EGFR_DN, p63_UP, HER2_DN, Ras_UP, PI3_kinase_UP, p53_DN である。このうち、特に MYC pathway および beta -catenin がもっとも高い有意差をもち、rs6983267 の 3 つの genotype と相関していた(それぞれ $p=1 \times 10^{-34}$, $p=1 \times 10^{-22}$)。

またわれわれは特に MYC の発現変異との相関に注目しているが、qRT-PCR 法を用いて、MYC mRNA 発現と 3 つの genotype との相関について調べたところ、ANNOVA test にて有意差をもち、相関していた。

IPA database と Literature-based Gene セットによる EEM 解析に於いて、MYC 遺伝子のモジュールが有意に rs6983267 genotype と相関していることを明らかにした。MYC モジュールとの有意差は有意であり、rs6983267 genotype と大腸癌進展機構との関係を臨床検体においてはじめて明らかにした。

3) 大腸癌症例における iPS 遺伝子群発現の臨床的意義について

概要:我々は以前、化学療法剤に対して癌幹細胞は大腸癌細胞の感受性に影響する可能性があると考えた。高橋と Park は、通常の幹細胞維持のための人工多能性幹細胞(iPS)遺伝子を同定しましたが、大腸癌における iPS 遺伝子発現の正確な役割ははっきりしていない。本研究の目的は、大腸癌における幹細胞調整遺伝子発現の臨床的意義を明らかにすることである。laser microdissection(LMD)によって大腸癌 79 症例の組織から癌細胞切除し、定量的 RT-PCR にて iPS 遺伝子である c-MYC、SOX2,OCT3/4,LIN28、KLF4、NANOG の発現レベルを評価した。そして、それらの発現と大腸癌の臨床病理学的因子との関連を検討した。LIN28 発現は、リンパ節転移($p=0.018$)と Dukes ステージ($p=0.0319$)と有意に相関していた。SOX2 発現は、リンパ節転移と相関していた。さらにまた、Dukes D ステージの 10 症例は、その他の 69 症例と比較し有意に高い SOX2 レベルを示した($p=0.0136$)。対照的に、KLF4 発現は、Dukes ステージと逆相関傾向を示した。c-MYC、OCT3/4、NANOG は、大腸癌症例において臨床所見との関連は認めなかった。今回の分析で、いくつかの iPS 遺伝子発現が大腸癌病因の役割を担っていることが強く示唆された。

定量的 RT-PCR 分析では、LIN28 発現がリンパ節転移と Dukes 病期に相関を示した。さらにまた、リンパ節転移のある 34 症例の平均 LIN28 発現レベルは 1.02 ± 0.11 に対して、リンパ節転移のない 45 症例では 0.66 ± 0.10 。Dukes' stage に関して、Dukes C の 28 症例の平均 LIN28 発現レベルは、Dukes A、B、D 症例より非常に高い発現を示した。これらのデータは、LIN28 発現が大腸癌患者でリンパ節転移有無程度と強く相関していることを示唆する。高い SOX2 発現レベルは、リンパ節転移程度と相関していた。正常組織 5 例での SOX2 発現レベルを標準の 1.00 とし、SOX2 表現は、大腸癌取扱規約の n(0)41 症例 で 0.95、n(1+)23 症例で 6.81、n(2+)8 症例で 16.60 であった。

これらの関連は、ANOVA 分析によって有意な相関を示した ($p < 0.05$)。加えて、SOX2 は Dukes D の 10 症例で、他のいかなる Dukes ステージの 69 例よりかなり高いレベルで発現していた ($p = 0.0136$)。この事は、SOX2 の高発現が血行性および／またはリンパ行性の大腸癌転移と本質的に関係していることを示した。予想外に、KLF4 表現レベルは、Dukes 分類の進行度と逆相関の傾向を認めた。全体として、脈管侵襲陽性の 52 症例は、脈管侵襲陰性 26 症例よりかなり低い KLF4 は低発現を示した ($p = 0.043$)。c-MYC、OCT3/4 または NANOG 遺伝子発現と大腸癌は関係が認められなかった。

		<i>LIN28</i>			<i>c-MYC</i>		
		症例	平均値±標準偏差	p	平均値±標準偏差	p	
腫瘍組織/正常組織			0.78±0.65		1.33±1.71		
組織型	tub1	40	0.83±0.62		1.06±1.16		
	tub2	38	0.81±0.73	np	1.64±2.15	np	
	por	1	0.16		0.58		
深達度	T1,2	20	0.65±0.45		1.36±0.39		
	T3,4	59	0.86±0.72	np	1.31±0.23	np	
リンパ管侵襲	(-)	19	0.98±0.61		1.21±0.39		
	(+)	60	0.76±0.68	np	1.37±0.23	np	
静脈侵襲	(-)	26	0.87±0.60		1.58±0.34		
	(+)	52	0.78±0.71	np	1.17±0.24	np	
リンパ節転移	(-)	45	0.66±0.10		1.44±0.26		
	(+)	34	1.01±0.11	0.02	1.18±0.30	np	
肝転移	(-)	70	0.81±0.08		1.23±0.20		
	(+)	6	0.63±0.27	np	2.47±0.69	np	
Dukes分類	A	12	0.65±0.18		1.56±0.48		
	B	27	0.69±0.12		1.10±0.34		
	C	28	1.12±0.12	0.03	1.26±0.34		
	D	10	0.47±0.20		1.80±0.55	np	

図 2.4-3

		<i>SOX2</i>			<i>OCT3/4</i>		
		症例	平均値±標準偏差	p	平均値±標準偏差	p	
腫瘍組織/正常組織			8.10±29.32		1.17±0.78		
組織型	tub1	40	10.5±36.3		1.19±0.76		
	tub2	38	2.43±5.71	np	1.19±0.76	np	
	por	1	113		0.08		
深達度	T1,2	20	3.27±6.74		1.34±0.18		
	T3,4	59	9.74±3.93	np	1.12±0.10	np	
リンパ管侵襲	(-)	19	2.96±6.74		1.42±0.18		
	(+)	60	9.85±3.92	np	1.09±0.10	np	
静脈侵襲	(-)	26	2.11±3.43		1.37±0.16		
	(+)	52	7.01±2.45	np	1.08±0.11	np	
リンパ節転移	(-)	45	2.47±4.49		1.14±0.12		
	(+)	34	15.7±5.08	0.053	1.23±0.14	np	
肝転移	(-)	70	7.27±3.49		1.17±0.09		
	(+)	6	16.5±11.9	np	1.23±0.32	np	
Dukes分類	A	12	3.34±8.09		1.37±0.22		
	B	27	2.33±5.72		1.04±0.15		
	C	28	3.02±3.17	0.01	1.21±0.15		
	D	10	21.4±5.12		1.19±0.25	np	

図 2.4-4

		SOX2			OCT3/4		
		症例	平均値±標準偏差	p	平均値±標準偏差	p	
腫瘍組織/正常組織			8.10±29.32		1.17±0.78		
組織型	tub1	40	10.5±36.3		1.19±0.76		
	tub2	38	2.43±5.71	np	1.19±0.76	np	
	por	1	113		0.08		
深達度	T1,2	20	3.27±6.74		1.34±0.18		
	T3,4	59	9.74±3.93	np	1.12±0.10	np	
リンパ管侵襲	(-)	19	2.96±6.74		1.42±0.18		
	(+)	60	9.85±3.92	np	1.09±0.10	np	
静脈侵襲	(-)	26	2.11±3.43		1.37±0.16		
	(+)	52	7.01±2.45	np	1.08±0.11	np	
リンパ節転移	(-)	45	2.47±4.49		1.14±0.12		
	(+)	34	15.7±5.08	0.053	1.23±0.14	np	
肝転移	(-)	70	7.27±3.49		1.17±0.09		
	(+)	6	16.5±11.9	np	1.23±0.32	np	
Dukes分類	A	12	3.34±8.09		1.37±0.22		
	B	27	2.33±5.72		1.04±0.15		
	C	28	3.02±3.17	0.01	1.21±0.15	np	
	D	10	21.4±5.12		1.19±0.25		

図 2.4-5

本項では、興味ある所見を3点認めた。第一は、LIN28の過剰発現は、大腸癌で臨床病理学的に重要性を持つと考えられる。近年では、Viswanathanらは、LIN28が胚細胞でpre-let-7micro RNA (miRNAs)の処理をブロックすると報告した。Yuらによってlet-7は人間の体細胞を多能性幹細胞に再プログラムする因子であることが確認された。Dangi-GarimellaらはLIN28がプロ侵入性遺伝子とプロ転移性遺伝子を賦活化する染色質改造タンパク質であるHMGA2を抑制するlet-7処理を阻害するために、上方制御されたLIN28が乳癌において転移を加速したという所見を検証した。let-7が癌遺伝子活性を抑制することにより肺癌と乳癌において腫瘍抑制の役割を果たすことが知られているが、ViswanathanらとBussingらはLIN28発現が癌の進行と密接に関連があるだろうと推測している。今回のデータは、LIN28mRNAが進行した大腸癌患者においてより高発現していた。さらに、本研究は大量のLIN28発現がリンパ節転移と有意に関連していることを示した。

LIN28が大腸癌細胞の転移に影響する機構がわかっていないが、我々はLin28の過剰発現が幹細胞静止状態を維持するlet-7の能力を抑制する可能性があるかと仮定した。なぜLIN28は特にリンパ節転移と関連があるのか説明することは困難であり、今日まで、in vivoとin vitroで明らかにそれを示す直接証拠はなかった。しかしながら、我々はLIN28により大腸癌幹細胞が細胞周期に再び入り、それによってリンパ経路を経て増殖、運動性と侵襲性と転移を促進すると考えた。加えて、comparative genomic hybridization (CGH) array分析では、本研究で評価した大腸癌79症例で大腸癌進行に関係するLIN28反応する遺伝子座の増幅を明らかにできなかった。LIN28がどのように人間の癌組織で賦活化するかについてさらなる研究が必要である。

また第2の主要知見は、SOX2発現増加が大腸癌リンパ節転移と相関していた点であるTavazoieらは、miRNAのmiR-335が、前駆細胞転写制御因子であるSOX遺伝子ファミリーのメンバーのSOX4を標的として作用することにより癌細胞転移と遊走を抑制すると報告した。再発乳癌患者の原発性巣の大半でmiR-335発現がなくなっており、そして、SOX4に作用するmiRNAの発現がみられないと、無遠隔転移生存率は不良である。本研究において、我々はSOXファミリーの他のメンバーであるSOX2がおそらく大腸癌転移の原因となる役割を果たす可能性が期待された。

実際、SOX2は転移のない大腸癌症例と比較して遠隔転移大腸癌(Dukes D)症例で、有意にかなり高い

発現レベルを示した。このように、SOX2 は大腸癌細胞の転移性に寄与していると思われる。

本研究からの第 3 の興味ある結果は、KLF4 発現が大腸癌進行度と逆相関していた。この知見は KLF4 単独の減少がマウスの胃上皮の劇的な変化に至ると報告して、KLF4 は正常な胃上皮ホメオスターシスに重大な意味を持つと結論した Katz らの結果で裏づけられる。さらにまた、Wel らは KLF4 が胃癌と大腸癌で癌抑制遺伝子として機能すると報告し、Choi らは KLF4 発現の減少が大腸癌において腫瘍進行の早期のイベントである可能性があることを発見した。対照的に、Pandya らは、明らかに逆の所見を報告した。彼らは、KLF4 が早期乳癌において病原性と関係していることを報告した。Rowland らが述べるように、大腸癌と他の癌で KLF4 の正確な役割を決定するさらなる研究が必要である。大腸癌での他の iPS 遺伝子の潜在的役割に関して、はっきりとした所見は認めなかった。

c-MYC の発癌活性と悪性の可能性は、我々のグループの以前の研究で確立されている。c-MYC の大量発現が本研究では大腸癌症例で観察されたが、その臨床的な関連ははっきりしなかった。類似の結果を Smith らは報告している。大腸での腫瘍の c-MYC 過剰発現とほかの同時性腺腫有無において有意な相関が観察されたにもかかわらず、c-MYC の有無や過剰発現の程度も病期と相関していなかったと報告した。最後に、iPS 遺伝子 OCT3/4(POU5F1) が線維芽細胞成長因子-4(FGF-4) のアクチベーターとして知られているが、固形腫瘍の病因において OCT3/4 の役割は同定されていない。我々が iPS 遺伝子が組織で最初に幹細胞を形成すると予想した時から、どの細胞が iPS 遺伝子の転写活性を上方制御するのか、非常に興味ある事項であった。しかしながら、我々は現在の技術によってマイクロダイセクションした癌細胞群からそれらを同定することはできなかった。Barker らにより Lgr5 が腸上皮細胞の幹細胞マーカーの 1 つとして報告したが、しかしながら、大腸癌の幹細胞マーカーは今日まで同定されていない。従って、現在、レーザーマイクロダイセクションによって癌細胞を組織から特異的に切除することは大腸癌細胞の iPS 遺伝子の重要性を明らかにするために最良な方法である。

結論として、LMD 分析による大腸癌 79 症例の悪性細胞の広範な分析結果は、通常の大腸幹細胞の iPS 遺伝子発現の上方制御が、大腸癌発生機序の基礎をなしている腫瘍形成機構の 1 つである可能性があることを示唆する。例えば LIN28 と SOX2 の過剰発現と KLF4 の発現減少といった iPS 遺伝子の変化した発現は、大腸癌の発癌と進行において密接に関与していると考えられた。

4) 消化器癌転移に於いて重要な機構-上皮間葉移行-を制御する因子の同定と発現プロファイルによる同遺伝子の pathway の解明

目的: 大腸癌の予後は術後補助化学療法あるいは転移・再発症例の化学療法の進歩により向上しているが、さらなる改善のためには新たな転移再発機構の解明と真の診断・治療標的分子の同定が求められている。大腸癌の転移、再発の制御メカニズムとして上皮間葉移行(EMT)が注目されている。EMT は細胞骨格の再構築により細胞に①線維芽細胞様の形態変化、②遊走能、浸潤能の亢進、③上皮マーカー発現低下、間葉系マーカー発現亢進を誘導する。今回われわれはアクチン結合タンパクである IEMT に着目し、その EMT 誘導能、大腸癌臨床検体における発現意義について検討した。

対象と方法:(1)IEMT 導入株あるいは siRNA による抑制大腸癌株化細胞を作成し、EMT 誘導能、TGF- β との関係性を調べた。(2)IEMT 導入株の形態変化、浸潤能を調べた。(3)大腸癌原発巣および血液中循環腫瘍細胞 circulating tumor cells (CTC)における IEMT 発現の臨床的意義を明らかにした。

結果:(1)IEMT 導入した大腸癌細胞株における VIM、FN1、N-cad、TWIST、SNAIL、SLUG、SMAD4 発現と E-Cad 発現減少による EMT を確認し、逆に TGF- β によって EMT を誘導したに IEMT siRNA を投与すると間葉上皮移行(MET)を確認した。(2)IEMT 導入株で紡錘状の形態変化と高い浸潤能と遊走能獲得を確認した(3)大腸癌原発巣 110 症例における IEMT の発現意義を調べたところ IEMT は非癌部と比較して癌部で高発現していた。特に癌側から正常側に浸潤している小細胞集団(budding cancer cells)において強発現していることが免疫組織染色にて確認された。癌部における IEMT 高発現は臨床病理学的因子の進行と有意に相関し独立予後因子であった。IEMT 発現分布は循環血液系細胞にはないことが知られることから、大腸癌臨床検体 177 症例の術前末梢血、術中門脈血を採取し IEMT 発現量を検索した。その結果、血液中の IEMT 高発現も原発巣同様に臨床病期の進行と関連し独立予後因子となった。また IEMT 発現由来細胞が循環血液中癌細胞であることをサイトケラチンと IEMT の 2 重蛍光免疫染色にて確認した。

結語: 癌細胞が原発巣から遊離・浸潤し、循環血液中 anoikis condition を乗り越えて生存し、転移巣にいたるの転移カスケードにおいて IEMT は重要な役割を担うが、転移巣において EMT が誘導された癌細胞は造腫瘍能および細胞増殖能には関与しない可能性が示された。臨床的には原発巣、血液中 IEMT 発現は予後予測マーカーとして期待されるが、治療標的分子としては MET 誘導が造腫瘍能と細胞増殖能を高め転移成立を幫助する可能性があることから慎重な検討が必要である。

研究成果の今後期待される効果

第1の発現アレイの結果、様々な臨床病理学的因子を規定する遺伝子群を同定したが、これらの遺伝子は診断マーカーとして臨床応用されるのみならず、治療分子標的としても期待される。

第2のゲノム変異に関しては、発現遺伝子のみならず、遺伝子をコードしないゲノム領域をふくめて、各種臨床病理学的因子と関連する領域を明らかにした。これにより、安定した genomic DNA を用いることが可能になり、より現実的な臨床応用(たとえば生検サンプルなどからの DNA 抽出)が可能と期待される。

統合したデータにおいては、翻訳されるゲノム領域に限り、臨床病理学的因子あるいは予後再発との関係を明らかにしうることから、ゲノム変異を主機構とする大腸発癌・癌進展機構の解明や、正確な治療標的を明らかにすることが可能になると考えている。

2. 2. 5 がん組織バンクの構築とCGH解析(担当:北海道大学(再委託先))

北海道大学第一外科では、各種癌患者に対して施行した手術により摘出した検体から核酸・タンパク質・糖鎖などを抽出し、それらを用いた分子生物学的解析を含めた種々の解析をおこない、各患者の臨床データと対比・解析することで診断や治療に有用な情報を得ることを目的として 2000 年に北海道組織バンク(Tissue bank)を設立した。本バンクはさまざまな解析に対応できるように、個々の研究プロジェクトとは独立した検体収集・管理プロジェクトとして北海道大学医の倫理委員会からの承認を受けており、個々の共同研究プロジェクトが開始される際に、北海道大学第一外科および共同研究機関が、Tissue Bank を含めた共同研究として倫理委員会へ申請し、承認が得られた後に「組織サンプルの解析」を開始する仕組みとなっている。

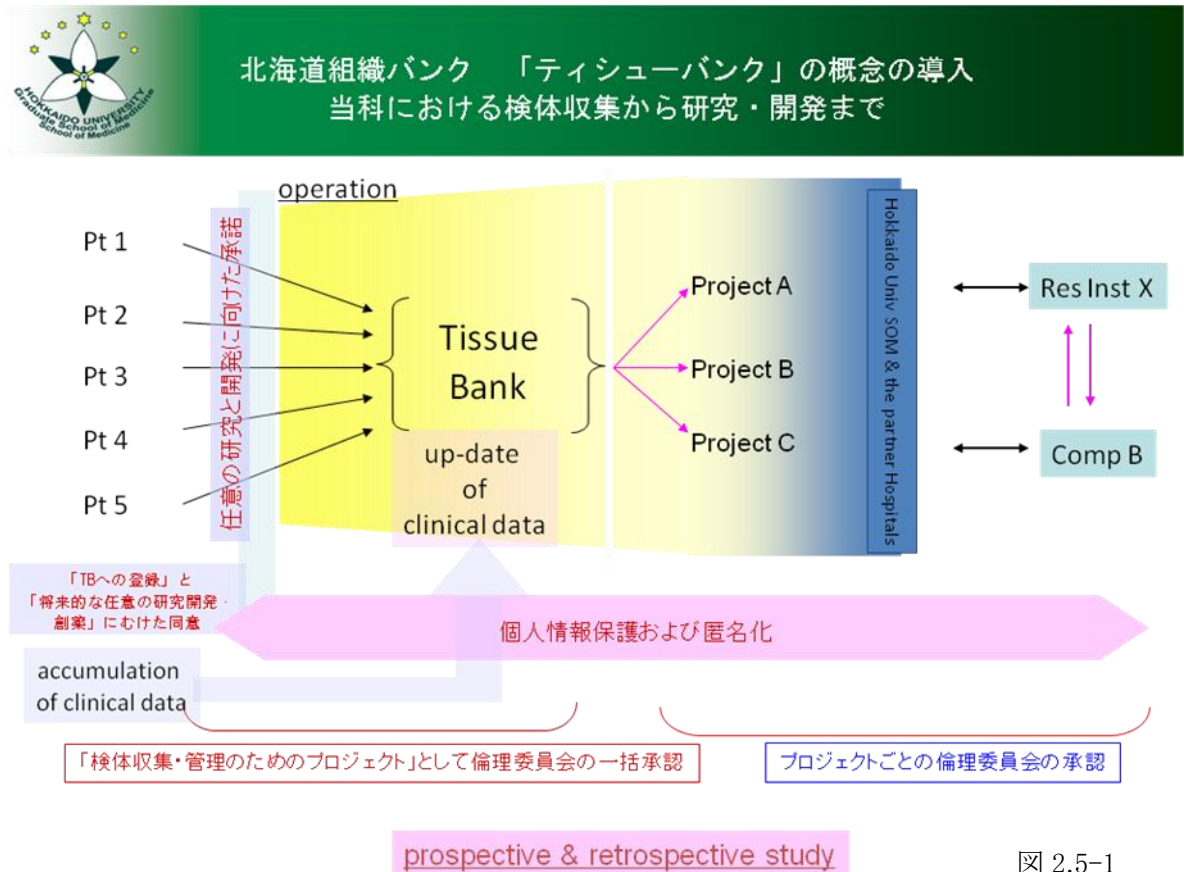


図 2.5-1

参加施設は、北海道大学病院(第一外科)および北海道大学第一外科関連17施設にわたり、これまでに 3600 超の患者検体(血液、組織)を収集し、管理・保存している。これらの施設では、診療は共通の診断・治療アルゴリズムを用いて行われており、そのため診断・治療は統一が図られているため、各施設間での診療結果の均一化、臨床データの解析の信憑性が担保されている。

各患者検体は、 -80°C にて保存された腫瘍部及び正常組織片各 4 個と境界領域を含む組織片、術前後に採取された血液からなる。境界領域を含む組織片は、OCT コンパウンドとホルマリン固定の各 1 個ずつを保存、管理している。また、血液検体は、DNA/RNA 抽出後保存・管理を行っている。患者検体の質的狀態を把握する目的で、定期的に検体をランダムに選択し、遺伝子抽出して、そのクオリティーをチェックしている。

一方、各検体の臨床データは疾患名および臨床病期、病理結果、手術日、再発の有無、再発日、腫瘍死の有無等、臨床生化学データなどがリンクされており、様々な解析結果を再発、予後、あるいは病理組織学的因子との関係で解析できる体制を整えている。

個人情報の管理に関しては、患者名に関して連結可能匿名化システムを導入し、臨床データの管理は「匿名化 ID」にて管理され、解析に供している。また臨床データでは再発や予後、術後治療

内容などの経時的な変更を要する項目を中心に定期的に update している。

匿名化の流れ

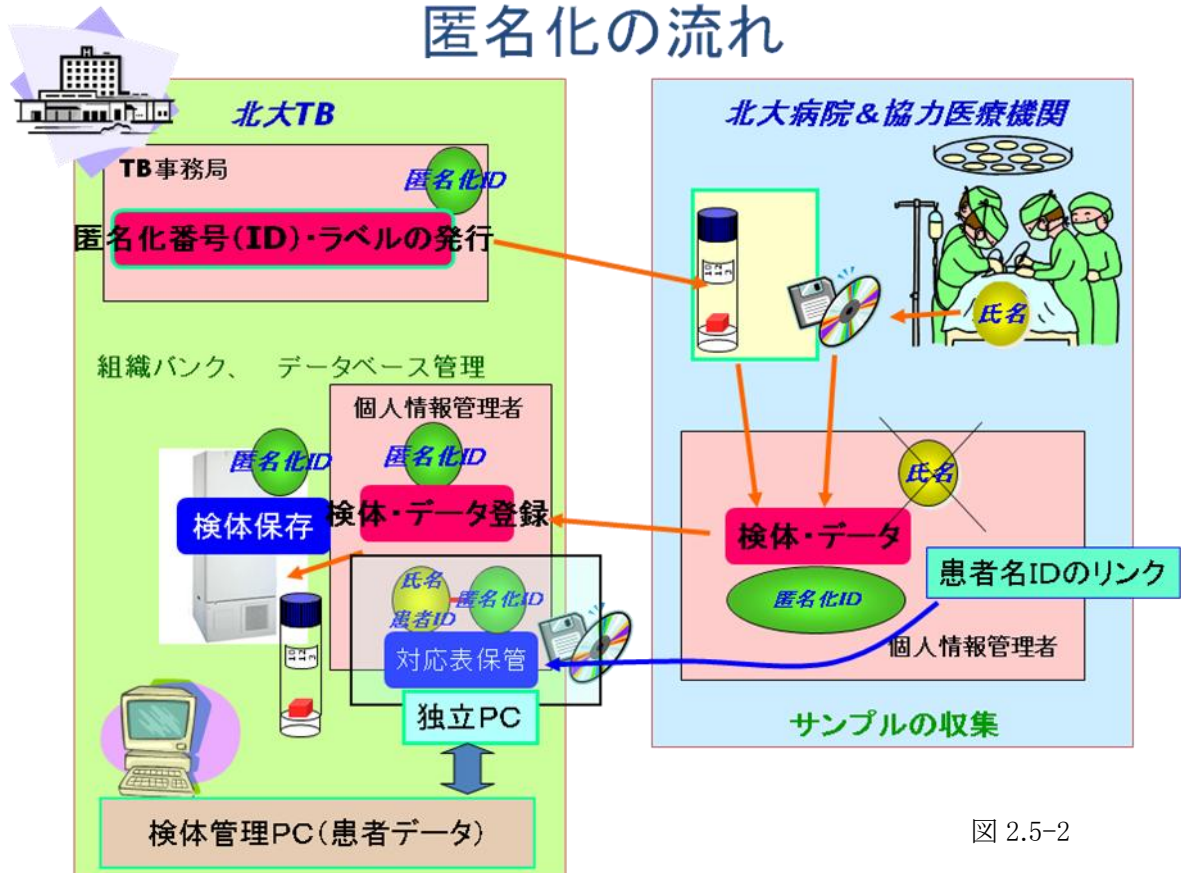


図 2.5-2

2001 年から 2010 年までの検体の合計は 3600 症例超であり、それらの主要疾患の内訳は、乳癌 582 例、胃癌 560 例、大腸癌 1374 例、肝細胞癌 639 例となっている。

Tissue Bank総計(2001 - 2010)

図 2.5-3

施設名	甲状腺癌	乳癌	食道癌	胃癌	大腸癌	HCC	CCC	胆嚢癌	胆管癌	膵臓癌	その他	症例数
北大	84	366	9	138	308	575	38	19	49	48	182	1816
A	0	0	0	12	23	0	0	0	0	0	0	35
B	0	0	6	16	22	0	0	0	0	1	4	49
C	0	6	0	15	45	5	0	0	0	0	1	72
D	0	10	2	19	30	1	0	0	0	0	0	62
E	0	6	0	27	71	2	1	0	0	0	2	109
F	0	10	0	25	86	4	0	0	0	0	2	127
G	0	51	4	83	170	1	0	0	1	0	3	313
H	0	5	0	19	86	25	1	0	0	0	5	141
I	2	42	0	40	86	2	0	0	0	0	1	173
J	0	9	0	15	20	2	0	0	0	0	4	50
K	0	7	0	10	41	0	0	0	0	0	0	58
L	2	31	0	44	100	13	0	0	0	2	8	200
M	0	10	0	13	28	0	0	0	0	0	1	52
N	0	10	0	30	63	7	3	0	0	2	4	119
O	2	9	1	49	165	1	0	0	0	0	2	229
P	0	10	1	5	6	1	0	0	0	0	1	24
Q	0	0	0	0	24	0	0	0	0	0	1	25
計	90	582	23	560	1374	639	43	19	50	53	221	3654

保存検体の信頼性の確認および予後との相関解析のため、これらの検体を用いて CGH アレイ解析や糖鎖解析などを行っている。そのうち、産総研平野グループにより開発された高解像度 BAC アレイを用い、各種消化器癌のゲノム異常解析を行っている。

原発性胃癌手術症例 56 例の解析では臨床病理学的因子の内訳は、Intestinal type が 20 例、Diffuse type が 36 例、組織学的ステージ IV は 38 例 68%、肝転移症例 6 例 11%、腹膜転移症例 14 例 25%、根治度 C の症例を 23 例 41%含む、高度進行癌症例を主体とするサンプルセットとなっており、予後と関連するゲノム異常領域を解析のメインとしたデザインとなっている。

予後に関わるゲノム異常領域の検討では、その信頼性を一層高めるため、対象症例 56 例中、特に腫瘍細胞を優位に多数含む 31 例を用い、log rank test で最も小さい p -value を示す、統計学的に最も有意な差をもって分けられた予後良好群と不良群の 2 群を設定した。この 2 群間の比較において、有意差をもって認められるゲノム異常領域を、予後に関連するゲノム領域とし、以下の解析を進めている。

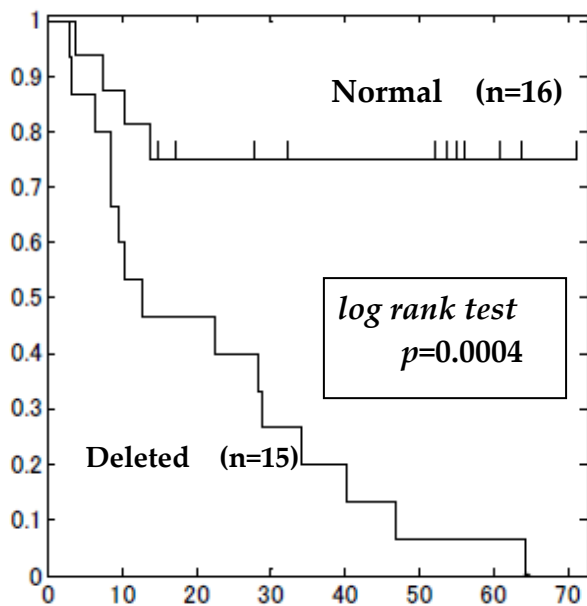


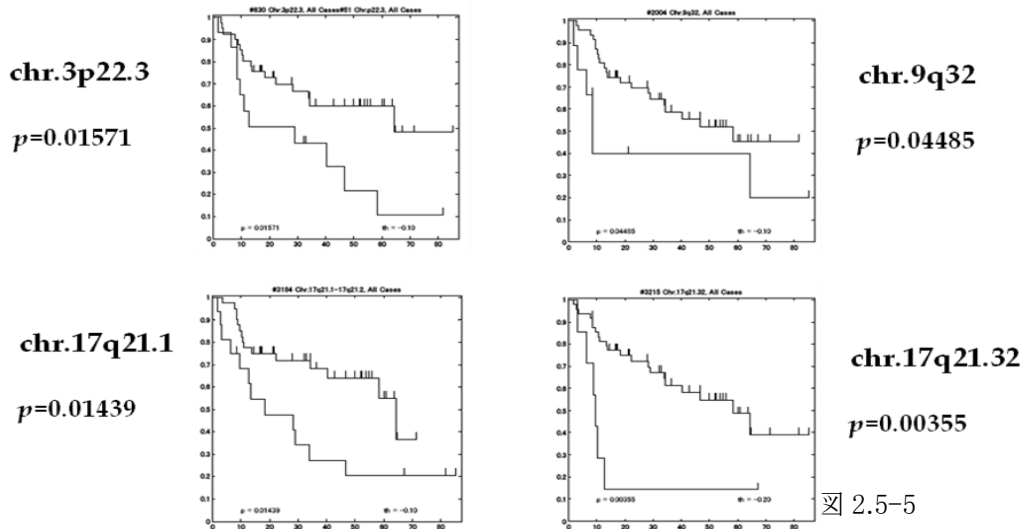
図 2.5-4

0.0004 をもって予後良好群と不良群に分けられていることが分かった。

予後不良群で有意に増加していた領域は、1,2,5,10,11,12,14,15,18 番染色体のそれぞれの領域であり、(1q21、2p25、5p15、5q22、10q11、10q26、11q13、12p11、14q32、15q21-22、15q25、18q21)、有意に欠失していた領域は、3,6,9,11,17 番染色体のそれぞれの領域であった(3p22-21、3p14、6q21、9q32、11p15、17q21)。それらのうち、予後との関連性の強い上位4領域のいずれかで欠失を認める群と、いずれにも欠失を認められなかった群の 2 群に分けて生存曲線を解析したところ、 p -value

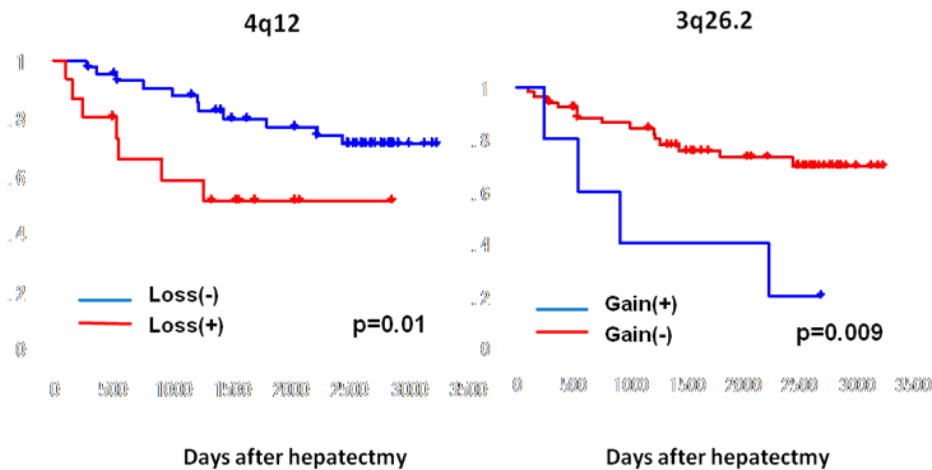
よって、これを予後予測マーカーとし、胃癌全症例 56 例にも適応したところ、 p -value=0.00245 をもって 予後良好な 31 例と予後不良な 25 例とに分けられることが確認できた。

All Over Survival Rate After surgery for 56 gastric cancers



肝細胞癌 58 例よる解析の結果では、内訳は、男性 48 名、女性 10 名、平均年齢 59.9 歳であり、HBV 陽性 28 例、HCV 陽性 22 例であった。平均観察期間 1808 日、stage 1、2、3、4A=3、28、17、10 例であった。58 例の 5 年累積生存率は 70%、5 年無再発生存率は 42.7%であり、予後と有意な相関をもつ BAC が 4q12 や 3q26.2 など 9 クロームが認められた。また既存の予後因子である門脈侵襲陽性と有意に相関する BAC も複数認められ、上記の予後と相関する BAC との検討から、臨床病理学的因子に関与しない予後不良な症例を抽出する際の有用な分子マーカーの検出に期待できる。

Post-operative survival For 92 HCC patients (Kaplan-meier 法)



BACs and clinico-pathological factors correlated with poor prognosis in HCC

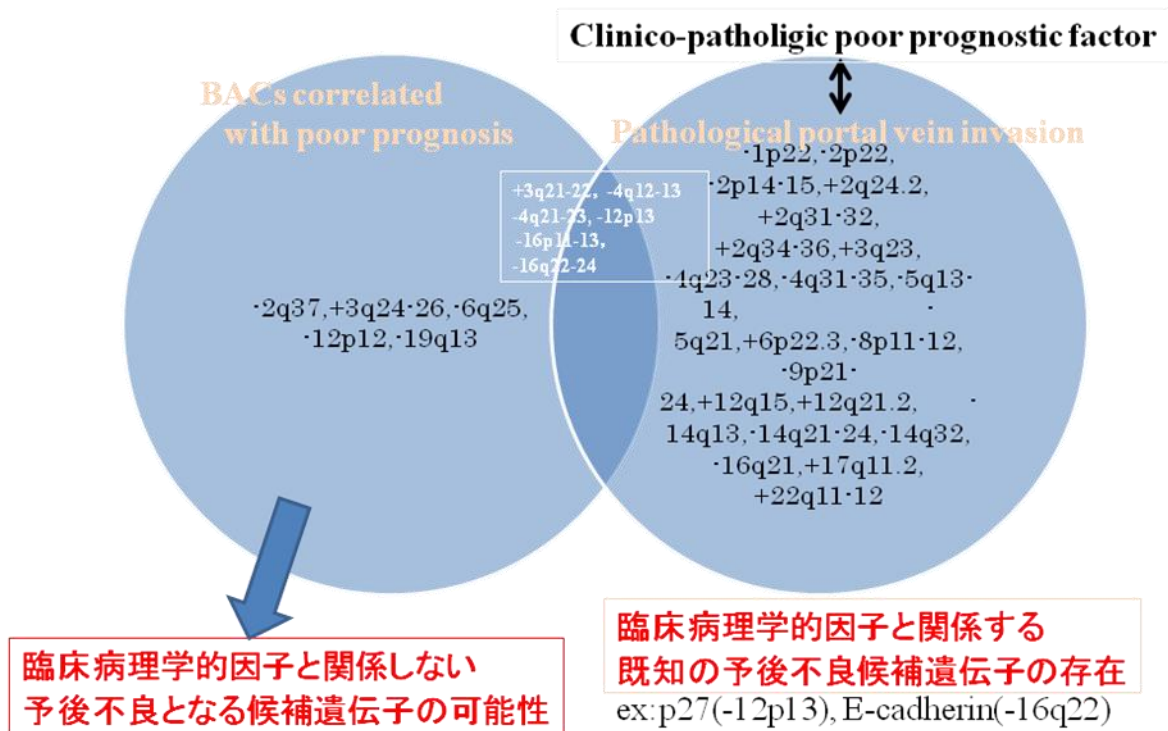


図 2.5-7

また当 bank の検体は、腫瘍組織検体の蛋白解析や血清糖鎖解析、さらには免疫学的解析に寄与している。

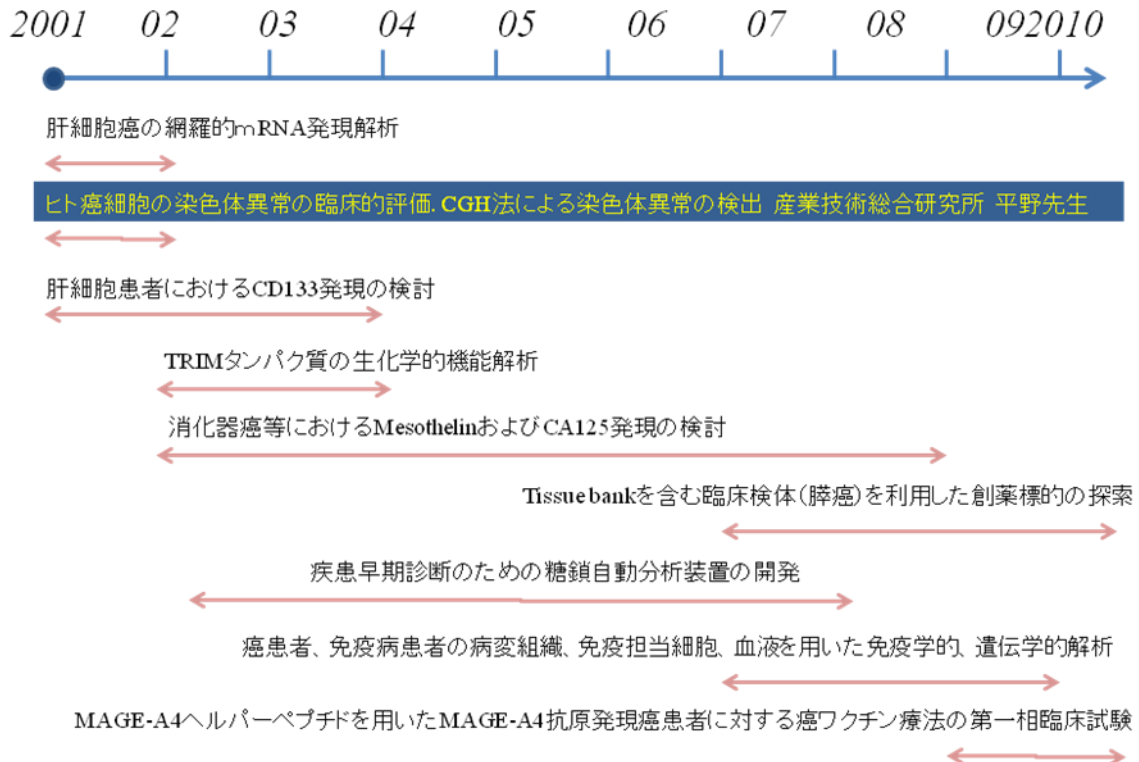


図 2.5-8

2. 2. 6 疾患別 BAC アレイの設計(担当:山口大学(再委託先))

癌は男性の半数に、女性の1/3が罹患する最も日常的な疾患となっており、克服されるべき疾患の代表格である。癌は患者各々それぞれにおいて異なっていることは周知の事実である。それには、一つひとつの癌の病態を正確に知ることがまず必要なことである。胃等の消化管では、内視鏡検査がルーチンの検査とされ、早期診断にも大きく貢献していることは衆知の事実である。胃癌に代表される消化管癌の治療は切除が基本であるが、その症例の病態によって大きく異なる。すなわち、癌の進達度、腹膜播種、リンパ節転移の有無等の情報が、効果的で高いQOLをもたらす治療には必要であり、個別化(personalized treatment)の基礎となる情報である。例えば、粘膜に限局した癌であり、リンパ節転移がなければ、内視鏡による癌切除が通常の治療法であり、高いQOLが期待されるし、医療費も開腹による癌切除に比べて大きく節減もできる。内視鏡的に早期癌と考えられても、リンパ節転移があれば、通常的外科的切除術の適応となる。腹膜播種が示唆されれば、切除とともに術後補助療法が考慮される。すなわち、癌各々に対して最大のQOLをもたらす最適な治療法の選択を可能とする病態評価のための検査法が求められている。

癌には「個性」があり、各々の症例の病態、特性は症例毎に大きく異なっていることは広く認識されている。一般的には、細胞の生物学的特性はその細胞の背景にあるゲノム異常を反映するとされている。従って、細胞の生物学的特性を評価するには、その細胞が有しているゲノム異常を網羅的に測定し、臨床病理学的データと対比すること(genome-wide association study)により、各臨床病理学的指標と密接に関連したゲノムマーカーを同定することが可能となる。その結果、各ゲノムマーカーを測定することにより、その癌症例の病態を明らかにすることができる。そのひとつの方法として、ゲノム解析が提案されている。検査効率や検査費用を考慮すれば、従来の多数のプローブがスポットされいわゆるスクリーニング用アレイを利用することは、実際的ではない。個別化治療という観点からは、各々の目的に特化したアレイを用いるのが、臨床現場では実際的である。

ゲノムの網羅的解析には、microarray技術はその目的に適した方法であり、現時点ではarray-based comparative genomic hybridization (array CGH)が最も適している方法である。本研究においても、網羅的ゲノム異常の解析には、この方法を採用した。

病態、生物学的特性おののに関連したゲノム異常(状態)を解析することにより、その癌の性質を的確に判断できる。すなわち、病態、生物学的特性と関連するゲノムのみを解析することにより、効果的、効率的に当該患者の癌病態を評価可能となる。すなわち、これの少数のゲノムの解析を可能とするミニアレイの開発が望まれる。限定された領域のみの解析ですむので、検査コストも大幅に節減できる。

いままでの研究は癌の種類によってゲノム異常は大きく異なっていることを明らかにしており、それぞれの臓器に適したアレイを作成することが肝要である。本研究開発プロジェクトは個別化癌治療に貢献することのできる一例として、胃癌の病態診断のために、リンパ節転移の有無、腹膜播種の有無、癌の進達度、肝臓転移の有無と推定することを可能とする胃癌専用ミニアレイを作成するとともに、大腸癌についてのデータも合わせて報告する。

手順の概要

本邦では発生頻度の高い胃癌に対して、特異ミニアレイを作成した。その概要は以下のとおりである。まず胃癌症例のアレイCGH解析を行い、臨床病理学的データ(リンパ節転移の有無、腹膜播種の有無、癌の進達度、肝臓転移の有無)と対比することにより、それぞれの項目と密接に関連したゲノム異常を同定する。解析方法は1種類とせず、2種類の方法を用いて、精度を高める。これらの解析から抽出されたゲノム変化に対応するBAC (bacterial artificial chromosome)クローンを選択し、ミニアレイを作成した。なお、本研究は山口大学医学部倫理委員会によって承認されており、利用した組織については、患者からの同意を得ている。

材料

外科手術によって切除された胃癌83例(進行癌73例、早期癌10例、男女比は62/21、年齢は44歳から89歳、平均70歳)から癌組織を採取し、最初のスクリーニングに供した (Table 2.6-1)。

Table 2.6-1. Clinicopathological summary of 83 gastric adenocarcinomas

For Screening			
The number of gastric cancers examined:	83		
Average age of patients (range):	70 years old (44 – 89 years)		
Histological type of gastric cancers			
Intestinal-type:			41
Diffuse-type:			42
	Intestinal-type		Diffuse-type
Average age (years)	72		68
Sex (F/M)		9/32	12/30
Node metastasis		26	34
Liver metastasis	3		3
Peritoneal dissemination		7	12
Early /advanced cancers*		6/35	4/38

なお、組織型は Lauren の分類に従って2型に分け、intestinal type 41 例、diffuse type 42 例であった。リンパ節転移を60例に、肝臓転移を6例に、腹膜播種を19例に認めた。

DNA 抽出

癌組織のように雑多な細胞からなる癌組織では、解析の目的とする癌細胞のみを選択的に採取することがなければ正確で精度の高い解析はできないことは以前に報告したとおりである。従って、Tissue microdissection (TMD) を全症例に適用し、できるだけ癌細胞の純度を高めた材料から良質の高分子DNAを抽出した。すなわち、凍結組織切片作製し、実体顕微鏡下でマニュアルにより、癌細胞を選択的に採取した。癌細胞(組織)からのDNA抽出には以前報告したと同様にDNA抽出キット(SepaGene, 三光純薬)を手順書に従って用いた。アレイCGH解析で対照とする対照DNAは、Promega社から提供されているプールDNAを用いた。

アレイCGH (Array-based comparative genomic hybridization)

ゲノムにおけるDNAコピー数の異常のスクリーニングにアレイCGHを利用したが、それにはMacArray Karyo 1400 (Macrogen 社、韓国)アレイの詳細情報は以下にて見ることができる、http://www.macrogen.com/eng/biochip/karyo_summary.jspを用いて実施した。BACクローン間の平均距離は2.3Mbである。アレイCGHの原理を下図に提示する。

アレイCGH (comparative genomic hybridization)

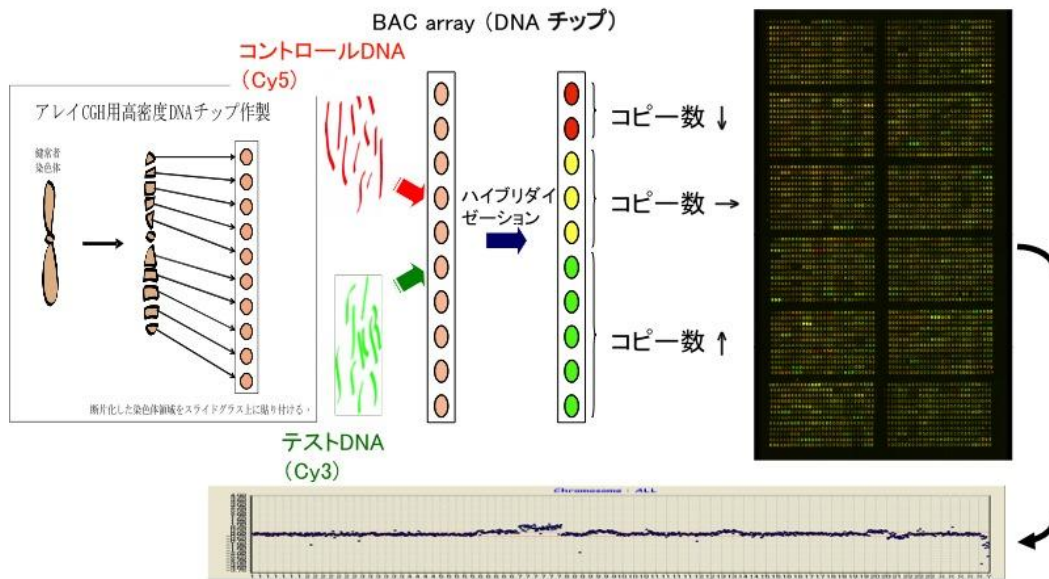


図 2.6-1

試料の性と一致した対照DNAを用いるが、試料DNA 500ngと対照DNAとをrandom priming法によってそれぞれ蛍光色素Cy 3とCy 5で標識した。これらをCot-1 DNA (50 μ g, Gibco社製)と混合し、上記のアレイに滴下した。ハイブリダイゼーションは37°Cで2日間、湿箱内で行った。その後、アレイを洗浄緩衝液にて洗浄し、乾燥後、Gene-Pix 4000Aスキャナー(Axon Instruments社)にて各スポットの蛍光シグナル像を得た。この蛍光画像をMAC Viewerソフト(Macrogen)を用いて解析を行った。Cy 3とCy 5との蛍光強度比を各スポットについて底を2としたlog表示として表した。蛍光強度比は上記図のように染色体に対応させて表示した。なお、 \log_2 0.25を越えた場合には、コピー数増加とし、 $-\log_2$ 0.25以下の場合にはコピー数減少とした。 \log_2 1.0を越えるスポットに対しては、増幅とした。なお、コントロールとした男女DNAを用いた実験では、性染色体を除けば、原則として $\pm \log_2$ 0.25の範囲に入っていた。

アレイCGHデータ解析

83例の胃癌に対して行ったアレイCGHでは、染色体領域20q12-q13と8q24でのコピー数増加が43%の症例で認められた。一方、4q35.2, 1p36, 4q34, 4q12, 14q32におけるコピー数減少が33 - 37%の症例で検出された。DNAの増幅は、17q21.1 (癌遺伝子HER2を含む領域)、11q13.3 (癌遺伝子CCND1を含む領域)、11q13 (癌遺伝子FGF4を含む領域)見られ、それぞれが4例、3例、3例で検出された。これらが、特定の臨床病理学的所見と関連することはなかった。

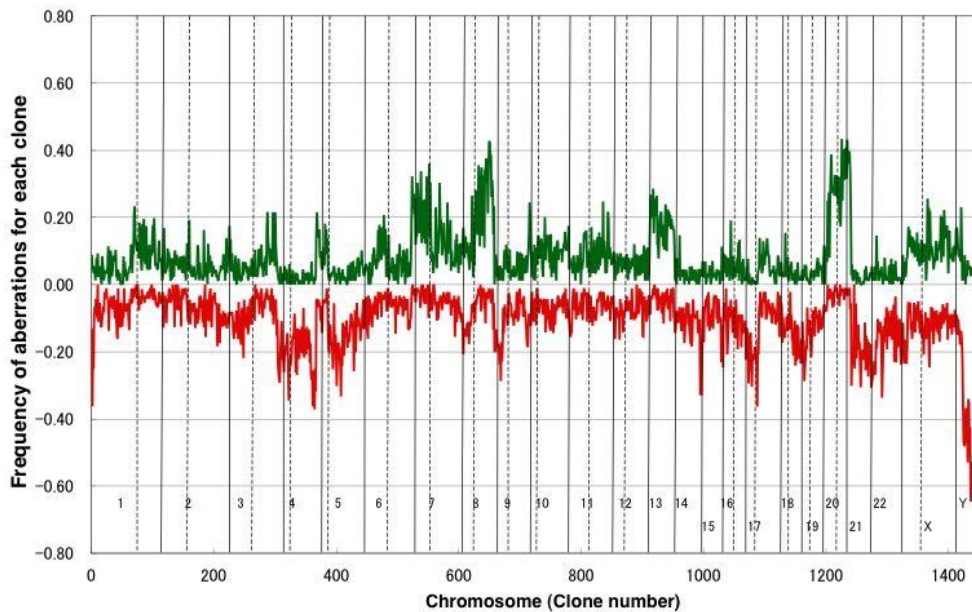


図 2.6-2

Overall frequency of DCNAs for each BAC clones in 83 sporadic gastric adenocarcinomas. A DNA copy number gain is frequent for clones/genes from chromosomal regions 7p12-14, 8q21-q24, and 20q13, and a DNA copy number loss is frequent for clones/genes from 1p36, 4q34-q35, 5q, 14q32, 21 q22, 22q11, and the Y chromosome. A green line plot indicates the frequency of clones with relative increase in DNA copy number gains and a red line plot indicates the frequency of clones with relative decrease in DNA copy number. Numbers on the horizontal axis denote chromosome number (clone number). Numbers on the vertical line denote the frequency of DCNA for each clone; DNA copy number gain for the upper part of the figure, and DNA cop number loss for the lower part of the figure.

アレイCGHで得られたデータを2種類の方法で解析を行った。すなわち、リンパ節転移の有無、肝転移の有無、腹膜播種の有無、癌進達度、組織型に対応するゲノム変化を知る一つの方法(method 1)として WEKA decision-tree model classifier, 148 (<http://www.cs.waikato.ac.nz/ml/weka/>)を用いて、BACクローンを同定した(いわゆる決定木法)。もう一つの方法(method 2)として、クローン毎に、上記の臨床病理事項に対する異常頻度について χ^2 検体を行って、関連あるBACクローンを同定した。原則としてp値ができるだけ小さいものをミニアレイには使用するようにした。選択されたBAC クローンの重複はリンパ節転移と肝転移との間では一部で重複がみられたものの、それを除けば、臨床病理学的パラメータと重複して関連するBACクローンはなかった。

Table BAC clones relevant to characteristics of gastric cancer (by method 1)

Clone ID	Chromosomal region	Candidate gene
Nodal metastasis		
1309	5q13.2	FCHO2
1153	13q31.1	BAAT
1196	1p22.3	COL24A1
113	14q32.2	TIE1, MPL, CDC20, ELOVL1, MED8
490	3q13.12-13	SETD3, CCNK
1187	1p34.2	CD47
Liver metastasis		
303	1q44-qter	-

1309	5q13.2	FCHO2
727	7q31.1	DLD, LAMB1, LAMB4
320	6q22	MYB
Peritoneal dissemination		
1	4q11	AFP
588	4q42.2	FSTLS
1374	13q24.33	-
875	12q24.23	-
Depth of tumor invasion		
902	1q43	FH, KMO, OPN3
19	21q22.2	HLCS, DSCR6, PIGP
1529	16q22.1	NFATS, NQO1
1133	6p21.1	TRERF1
Histological types		
923	8p23.3	-
1393	5q33.3	TIMD4
380	2p16.3	MSH6, FBXO11
983	16p13,13	-
489	7p13	NUDCD3
267	1p31..3	ROR1
408	2p11.2	-

いわゆる決定木法 (method 1) では、100% の分類が可能であるが、リンパ節転移の有無に関しては6種類のBACクローンが選択され、下図のごとくに判別パターンが決められた。肝転移では4種類のBACクローンを、腹膜播種に関しては4種類のBACクローンを、癌浸潤進達度 (早期癌 / 進行癌) については、4種類のBACクローンが決定された。それぞれのクローンには表のとおり遺伝子が存在するものも多い。

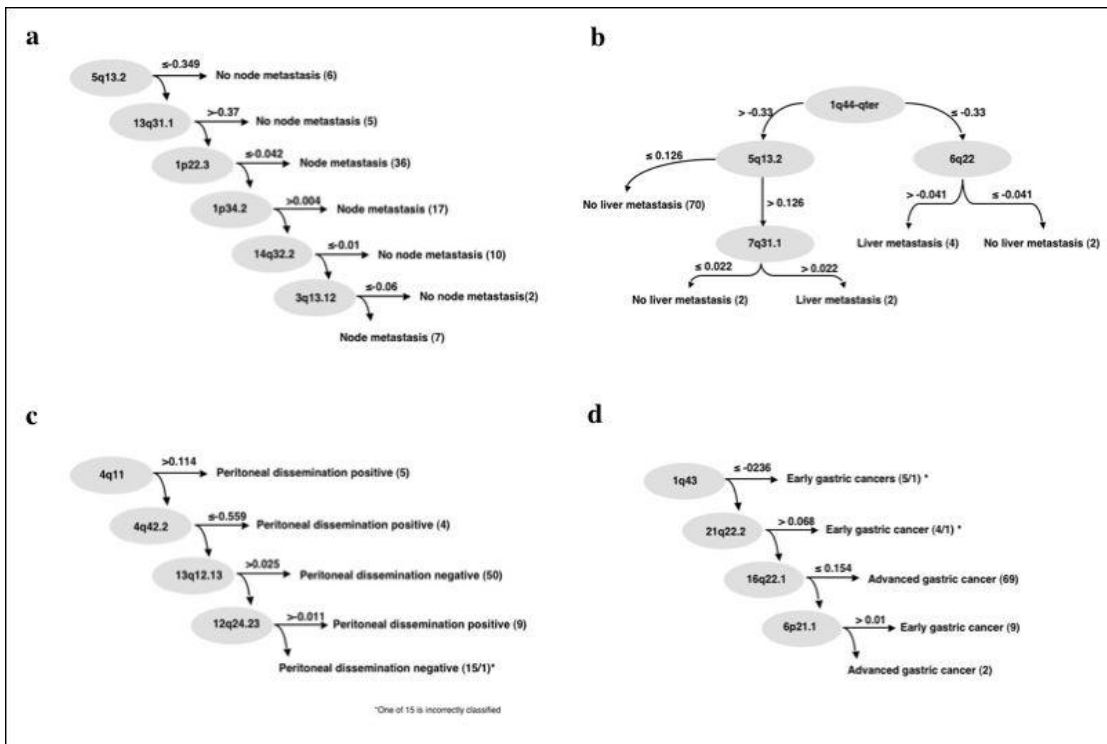


图 2.6-3

Fig. Identification of BAC clones by a decision-tree algorithm to classify gastric cancers into two groups with different characters. (a) Differentiation between gastric cancers with and without node metastasis. These two groups can be clearly differentiated by examining the degree of copy number changes of six BAC clones mapped to 5q13.2, 13q31.1, 1p22.3, 1p34.2, 14q32.2, and 3q13.12 in descending order. A tumor of which the copy number at 5q13.2 is ≤ -0.346 (\log_2) shows no node metastasis. When the DNA copy number of the tumor was not the case at the first clone, the second criterion (> -0.37 at 13q31.1) is checked. Five tumors are separated from the remaining 77 tumors at this point. When the DNA copy number of the clone at 13q31.1 is ≤ -0.37 in the tumor, the third clone located on 1p22.3 is examined. If the DNA copy number of the tumor meets the criterion of the third clone, ≤ -0.042 , nodal metastasis is positive in this tumor. Thirty-six cancers are classified into this category at this point. In this way, the DNA copy number of the tumor was in turn examined from the first to the sixth clone. Following each step successively sorts a cluster of either group. Eventually, all gastric cancers were classified into either of two groups, cancers with and without node metastasis. Figures in parentheses indicate the number of tumors fitting the requirements. The correctly classified instances are 83 (100%), and the incorrectly classified instances are 0 (0%). In this classifier, the number of leaves is seven, and the size of the tree is 13. In the same way as the case of node metastasis, BAC clones and their copy numbers are determined for liver metastasis (b), peritoneal dissemination (c), and depth of tumor invasion (early or advanced cancer)(d).

Table. BAC clones with a significant difference in the frequency of DCNAs between two groups of tumors with opposite characteristics (by method 2)

BAC ID	Chrom. region	Candidate Gene	Frequency of DCNAs(%)	of Frequency of DCNAs(%)	P-value*
<u>Gain</u>					
Node metastasis			Positive (n=60)	Negative (n=23)	
225	2q24.32	TMEM132D	3	26	0.0005
1308	5q13.2	FCHO2, MGC13034	7	43	0.0005
491	16p13.11	PKD1P3	5	35	0.0006
884	19q13.32	N.i.	5	30	0.0006
Liver metastasis			Positive (n=6)	Negative (n=77)	
1322	1p13.2	CHIA, C1orf88, OVGP1	43	3	<0.0001
1271	8p22	N.i.	67	13	0.0016
92	11p15	ST5	43	6	0.0006
Peritoneal dissemination			Positive (n=19)	Negative (n=64)	
948	15q22.1	MYO1E, LDHAL6B	22	0	0.0002
155	Xp21.2	XK	35	5	0.0009
Histologic type			Diffuse (n=42)	Intestinal (n=41)	
563	10p15.3	DIP2C	7	38	0.0011
911	10q24.2	SPFH1, CHUK, CWF19L1	0	23	0.0013
<u>Loss</u>					
Node metastasis			Positive (n=60)	Negative (n=23)	
936	8p21.2	DOCK5, GNRH1, KCTD9, CDCA2	3	23	0.0023
1158	8p21.1	EXTL3	3	21	0.0023
878	13q31.2	SLITRK5	13	47	0.0007
Liver metastasis			Positive (n=6)	Negative (n=77)	
877	1p32.3	LRP8,	50	5	0.0006
1386	7q35	CNTNAP2,	43	4	0.0001
309	21q22.3	HSF2BP, KIAA0179,	29	1	0.0002
Peritoneal dissemination			Positive (n=19)	Negative (n=64)	
1407	3p26.3	CNTN6	33	6	0.0009
503	3p24.3	UBE2E1	32	6	0.0009
229	4q31.1	MAML3	44	5	<0.0001
Histologic type			Diffuse (n=42)	Intestinal (n=41)	
1292	4q34.1	N.i.	17	53	0.0004
1393	5q33.2	TIMD4	15	48	0.0007
91	8p21.3	INTS10	0	24	0.0006
227	14q32.33	IGHV3-22	16	54	0.0001
1122	15q15.3	GANC, CAPN3	2	27	0.0003
1210	17q13.2	ATP2A3, ZZEF1	5	41	0.0001

ミニアレイの作成

ミニアレイ作成には83例の胃癌に対して上記で選択した50のBACクローンを用いた。治療法選択に重要と考えられるリンパ節転移の有無、肝転移の有無、腹膜播種の有無、癌進達度、組織型を評価の対象とした。それに加えてreferenceとして62のBACクローンをスポットした。これらを3重としてスポットしたアレイを下图のようなレイアウトで作成し、1枚のライドガラスの2カ所にスポットすることにより、1枚で2症例の解析ができるようにした。これらは20mm以上離れているので、2症例の試料が混合することはない。

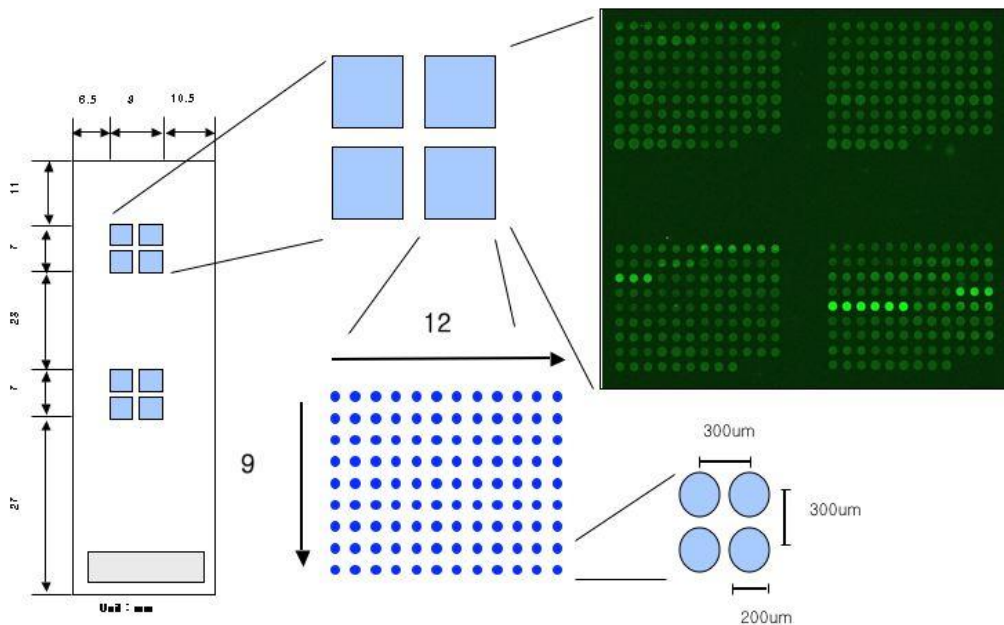


図 2.6-4

A design of a mini-array. The mini-array spotted with 50 BAC clones chosen in two analytical methods of aCGH data from 83 gastric cancers to estimate node and liver metastases, peritoneal dissemination, depth of tumor invasion, and histological type, 26 clones with frequent or infrequent DCNAs, and 62 reference clones. A total of 138 BAC clones was spotted in triplicate on two discrete parts of a glass slide, and thus, each slide was used for two specimens. The diameter of a spot is approximately 200 μ m.

スクリーニング用アレイを用いたCGH解析と開発したミニアレイによるCGHとのデータを比較すると、ミニアレイで得られたゲノム変化はスクリーニング用アレイで得られたデータと差異はなかった(下图)。

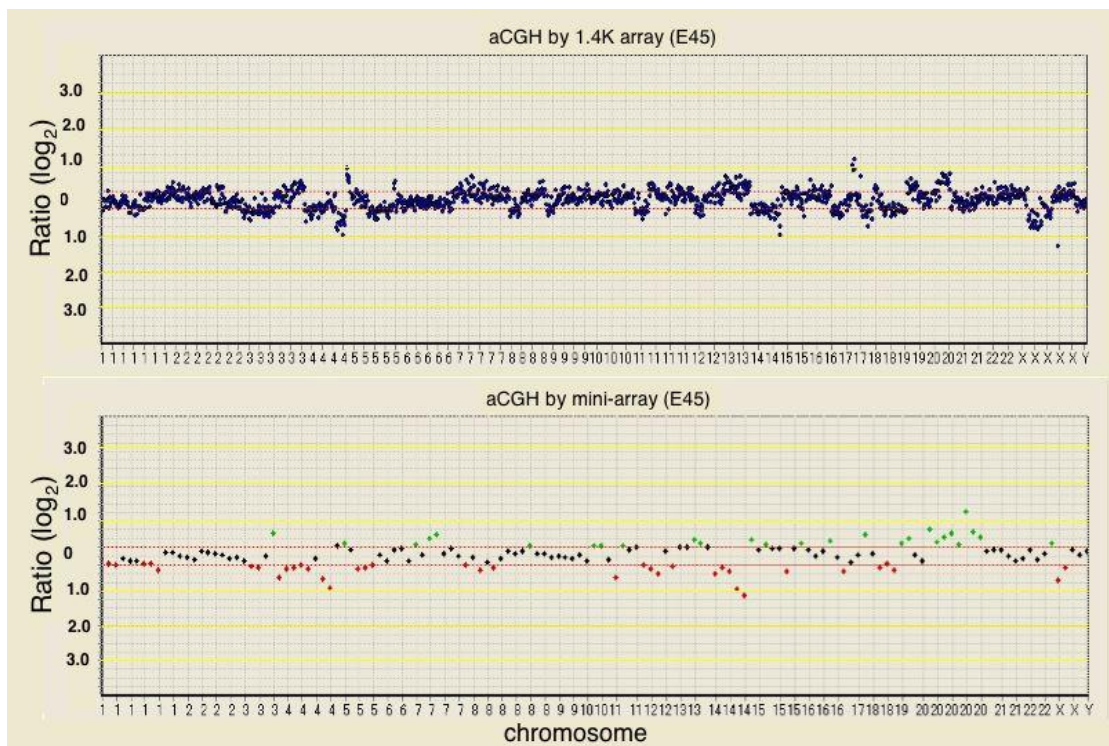


図 2.6-5

Comparison of aCGH profile by the mini-array with that by the screening array. Upper; aCGH data by 1.4 screening chip, and lower; aCGH data by the mini-array specific for gastric cancer. Note DCNAs in many BAC clones in both aCGH profiles. Although the density of dots is less in the mini-array than in the screening 1.4K arrays, data by the mini-array analysis are equivalent to those by the screening array. An example of aCGH by the screening 1.4 K array and by the mini-array that is applied to intestinal typed, advanced gastric adenocarcinoma (E45) with node metastasis, liver metastasis, and peritoneal dissemination in a 72-year-old male.

ミニアレイの評価

作成したミニアレイの機能と精度の評価をミニアレイ作成に供した83例とは別の新たな30例の胃癌を用いて行った(表)。評価において2種類の方法で結果が異なった場合には、臨床応用を考慮して、より進行した方を採用することにした。

A clinicopathological summary of an independent series of 30 gastric adenocarcinomas for evaluation of diagnostic ability of the mini-array

Total number of gastric cancers examined:	30
Average age of patients (range):	69.3 years old (44 - 88 years)
Sex (F/M)	11/19
Histological type of gastric cancers	
Intestinal/diffuse	13/17
Node metastasis	9
Liver metastasis	3
Peritoneal dissemination	5
Early /advanced cancers*	3

判定方法の差異が結果に大きく影響することはなかった。下の表に示すように、リンパ節転移の有無

に対する正診率(病理診断と比較して)は、method 1では63.3% (19/30)であり、method 2では66.7% (20/30)であった。Overallでの正診率は66.7% (20/30, 感度0.95, 特異度0.0)であった。肝転移、腹膜播種、進達度(早期癌か進行癌)についての正診率はどちらの方法でも80%を越えており、overallの正診率はそれぞれ86.7% (26/30, 感度0.67, 特異度0.89), 86.7% (26/30, 感度0.20, 特異度1.0), 96.7% (29/30, 感度1.0, 特異度0.67)であった(下表)。誤診例では、偽陰性は極めて少なく、偽陽性となることが殆どであった。

Table Diagnostic accuracy of the mini-array for an independent series of 30 gastric cancers

Method	Node Metastasis	Liver Metastasis	Peritoneal Dissemination	Early or advanced	Histological type
1	19/30 (63.3%)	27/30 (90.0%)	25/30 (83.3%)	29/30 (96.6%)	18/29 (62.1%)
2	20/30 (66.7%)	26/30 (86.7%)	26/30 (86.7%)		21/29 (72.4%)
Overall Accuracy	20/30 (66.7%)	26/30 (86.7%)	26/30 (86.7%)	29/30 (96.7%)	
False positive	9/9 (1.0)	3/27 (0.11)	0/24 (0.0)	1 (over-diagnosis)	
False negative	1/21 (0.05)	1/3 (0.33)	4/5 (0.80)	0 (under-diagnosis)	

腫瘍内heterogeneityのミニアレイ評価への影響

腫瘍におけるheterogeneityの問題は広く認識されており、診断精度にも大きく影響することが考えられている。ここで作成したミニアレイの診断精度への影響も検討されなければならない。腫瘍内heterogeneityのミニアレイの診断精度への影響を、一つの腫瘍から場所を変えて複数場所(4カ所)から採取して検討を5胃癌症例について行った。その結果を下の表に提示する。

評価する方法によって、僅かな差異は存在するものの、腫瘍内heterogeneityは本ミニアレイの精度には大きくは影響しないといえる。すなわち、腫瘍の何処から試料を採取しても、ミニアレイを用いた病態評価には大きな影響はないことを意味している。

Intratumoral genomic heterogeneity and diagnostic performance of the mini-array

Case	S39	B17	C22	I87	S50
Method 1					
Node metastasis	-	+(1)	-	-	+(2)
Liver metastasis	-	-	-	-	-
Peritoneal dissemination	-	-	-	-	-
Early or advanced	+(1)	-	-	+(1)	-
Histologic type*	+(1)	-	-	-	+(2)
Method 2					
Node metastasis	-	-	-	+(1)	-
Liver metastasis	-	-	-	-	-
Peritoneal dissemination	-	-	-	-	-
Histologic type*	-	-	-	+(1)	-

The difference in diagnosis was rare between four samples from the same tumor. In particular, there were no BAC clones affecting the estimation of liver metastasis and peritoneal dissemination in all of samples.

-; Absence of intratumoral genomic heterogeneity affecting diagnosis

++; Presence of intratumoral genomic heterogeneity affecting diagnosis (the number of clones different from others)

* Intestinal or diffuse type

結論

胃癌の治療法選択に寄与することができるゲノム異常を測定し、自動的に病態の評価をできるミニアレイを作成した。このミニアレイは、かなり高い精度(リンパ節転移に関しては66.7%、肝転移に関しては86.7%、腹膜播種に関しては86.7%、進達度に関しては96.7%)で胃癌の病態の推定を可能にした。

実際の臨床現場では、他の検査所見を合わせることにより、治療前の診断時に生検組織を利用することにより、病態をより正確に推定可能にする。

<追加データ>

大腸・直腸癌とリンパ節転移並びに病期の推定のためのアレイCGH

外科的に切除された大腸・直腸癌77例のアレイCGH (comparative genomic hybridization)解析を行った。症例の内訳は男性41例、情勢36例であり、大部分の症例は組織学的に中分化腺癌であった。39例にはリンパ節転移を認めた。アレイCGHには4030種類のヒトBACクローンがスポットされたアレイ(MacroGen, Korea)を用いた。20q、特に20q11.21におけるDNAコピー数の増加は症例の70%に見られた。一方、DNAコピー数の減少は18q23で症例の68%に認められた。その他では、7p、8q、13染色体でコピー数増加が、8p、17pでコピー数減少が目立っていた。決定木解析では、リンパ節転移とは染色体領域11q13.3, Xp, 15q26.2 - q26.3, 2q37.1, Xq23, 8q24.3, 8p23.3におけるDNAコピー数が関係していた。4030 の各BACクローンをリンパ節転移と比較すると、8q24.3におけるDNAコピー数増加が最も関係していた ($p=3.52319E-05$)。この領域には遺伝子ZNF16が局在していた。DNAコピー数減少としては、染色体領域9q33.1が有意で合った ($p=0.00099$)。この部での遺伝子の存在は明らかではなかった。

Ⅲ-2. 研究開発成果について

研究開発項目3)臨床診断用全自動染色体異常解析システムの開発

1)事業全体の成果

癌及び遺伝性疾患の個別化医療を実現するために、染色体微細構造異常に焦点をあてそれを解析するための診断用ゲノムアレイの開発と診断用全自動染色体異常解析システムの開発を目的とした。

1)-1 診断用ゲノムアレイの開発

先天性疾患を診断するための GD アレイの開発

新規開発の Dual ハイブリ法を用いた GD アレイ(GD-700)による先天異常症ゲノムコピー数異常診断システムを確立し、GD-700 の製造(富士フイルム株式会社)及び臨床検査受託(株式会社ビー・エム・エル)を開始した。また、GD-700 の検査用途を不育症分野にも広げた。

WG15000 アレイの作製と CNV データベースの構築

ヒト全染色体を網羅する 15,000 種類の BAC プローブを搭載した高精度ゲノムアレイ WG15000 解析システムを開発した。貼付する BAC クローンの約 10%(1500 クローン)は FISH 法で染色体マッピングした。

癌の染色体異常の解析と個別化医療での診断コンテンツの開発

癌の個性診断用にミニアレイ(MCG Cancer Array-Mini)を開発した。本プロジェクトで開発する集中型および分散型自動解析装置に対応するものである。

癌個性診断用 MCG Cancer Array-Mini(33 クローンセットおよび 108 クローンセット)を用いて各種癌でパフォーマンスを検証し、高精度検出能の確認および実用化の可能性を示した。

通常型腎細胞癌のゲノムコピー数異常解析から予後と相関するゲノム異常を抽出した。大腸癌のゲノムコピー数異常解析から増幅遺伝子候補とホモ欠失遺伝子候補を抽出した。低分化型腎癌に特徴的な 13q22 ゲノム増幅から胃癌のびまん性増殖に関連する KLF12 遺伝子を同定した。低分化型胃癌におけるチロシンキナーゼ遺伝子のコピー数異常解析とキナーゼドメインの網羅的シーケンス解析を実施し、胃癌に関与するチロシンキナーゼ遺伝子を同定した。また 6p21 ゲノム増幅から胃癌増殖に関与する複数の癌遺伝子を同定した。肺神経内分泌腫瘍の染色体 6p22.3 増幅と予後不良に相関する標的遺伝子 DEK 癌遺伝子を同定した。

1)-2 診断用全自動染色体異常解析システムの開発

アレイ CGH 分散型全自動染色体異常解析装置の開発

微小アレイ(ミニ DNA アレイ)を内蔵したサンプルの前処理とアレイ反応機能を付加したディスプレイのリアクター(アレイモジュール)、駆動装置(プロトタイプ機)を製作し、微量なサンプル量からでも同日内に染色体異常を検出できるシステムの開発に成功した。CNV 既知の癌細胞株 DNA を用いて全自動化システムの評価を行い、CNV 検出が可能であることを確認した。定量的解析精度、再現性に課題はまだ残るものの全自動化への目処を立てることができた。

集中型全自動染色体異常解析装置の開発

標識・抽出・解析の三工程を並行して開発し、標識工程と抽出工程については平成 21 年度までに完成した。平成 22 年度は解析工程のスキャナーを改良した。全自動化システムを、既知染色体異常細胞のゲノム DNA を試料に評価を行い CNV 検出が可能であることを確認した。今回開発の集中型全自動機がアレイ CGH を評価できるレベルにあることを確認し、開発を完了した。

2) 研究開発項目毎の成果

研究開発項目の目標を達成するために、以下に示す実施項目①、②、③および達成目標を明確にした個別テーマを設定し、プロジェクト参加施設の得意分野を分担して研究開発を進めた。

- ① 臨床診断用全自動染色体異常解析システムに対応したゲノムアレイの開発
- ② 臨床診断用全自動染色体異常解析システムの開発
- ③ 癌の染色体構造異常の解析と診断のコンテンツ開発

実施項目と個別テーマ名および担当施設の関係を以下の表に示す。テーマEおよびテーマFに関する記載では東京医科歯科大学には共同研究先の徳島大学も含まれる。

	実施項目	個別テーマ名 (担当施設)
①	臨床診断用全自動染色体異常解析システムに対応したゲノムアレイの開発	A: BAC DNAの調製と無尽資源化の半自動化 (株式会社ビー・エム・エル) B: ヒト染色体タイリングアレイ(WG15000)の作製 (株式会社ビー・エム・エル、東京医科歯科大学、国立がん研究センター) C: 日本人ゲノム多様性データベースの構築 (東京医科歯科大学) D: Genome Disorder ArrayとCancer Array-800の実用化 (東京医科歯科大学、株式会社ビー・エム・エル、富士フイルム株式会社、旭川医科大学) E: Cancer Array-1500 (CA-1500)の作製と評価 (東京医科歯科大学、国立がん研究センター、株式会社ビー・エム・エル)
②	臨床診断用全自動染色体異常解析システムの開発	G: 高密度アレイの試作 (日本ガイシ株式会社) H: 分散型全自動染色体異常解析装置の開発 (日本ガイシ株式会社) I: 集中型染色体異常解析システムの開発 (富士フイルム株式会社)
③	癌の染色体構造異常の解析と診断のコンテンツ開発	F: がんの染色体異常解析とコンテンツ開発 (東京医科歯科大学、国立がん研究センター)

以下、個別テーマ毎に成果を記載する。

【テーマA】 BAC DNAの調製と無尽資源化の半自動化（株式会社ビー・エム・エル）

本プロジェクトでは日本人を対象としてヒト染色体のコピー数多様性(CNV)データベースを構築するために、そのツールとしてヒト染色体を網羅する染色体タイリングアレイ作製を計画した。そのためにまずヒト染色体を網羅する 15,000 種類の BAC DNA の抽出と無尽資源化を行う必要がある。東京医科歯科大学では用手法で BAC DNA を調製し、均質に PCR 増幅を行う無尽資源化系を確立し、精度の高いアレイ(Whole Genome Array-4500、Cancer Array-800、1p36-Contig Array、X-Tiling Array、Genome Disorder Array、及び Genome Variation Array)を自作し、これまで多くの臨床検体を解析し、その成果を発表して来た。

15,000 種類の BAC DNA を調製するために用手法を用いる事は時間と労力がかかり、トレーサビリティが担保されないため、用手法をほぼ正確に反映するセミオートメーション装置を開発し、BAC DNA の調製を行う事を計画した。セミオートメーション装置は前段の BAC DNA 調製工程と後段の BAC DNA 無尽資源化工程に分けて設計し、作製した。

東京医科歯科大学・稲澤研究室で確立した用手法のプロトコルをセミオートメーション装置で再現する設計を行い、トレーサビリティの担保はバーコードシステムを採用していった。以下、工程に沿って開発内容を説明する。

BAC DNA 調製工程

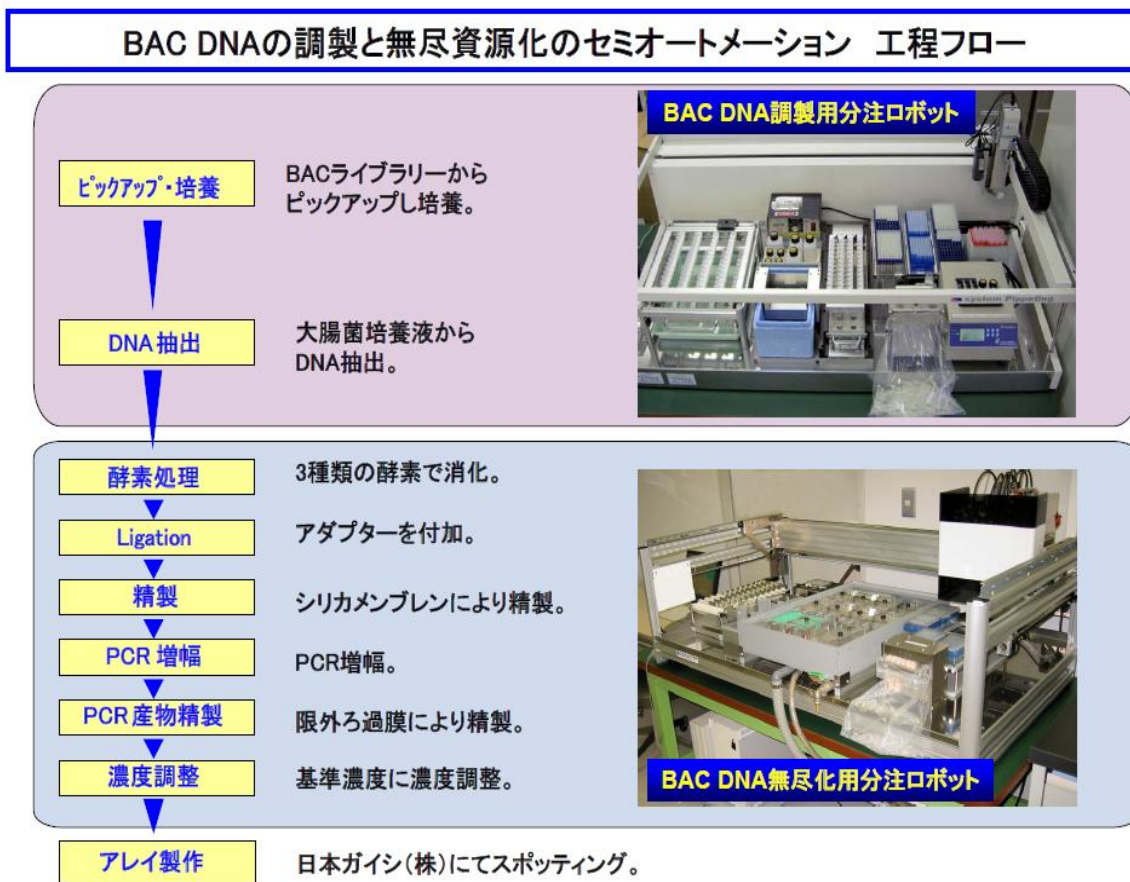
- i) RP-11BAC ライブラリーの 384 プレートからプレート位置情報に基づいて目的とする BAC クローンをピックアップし、LB 10ml 入りの 50ml チューブに接種する。
 - ii) 37°Cでの振とう培養を一晩行い、遠心分離により集菌する。(セミオートメーション装置から取り出して行う。)
 - iii) NaOH-SDS 法により大腸菌の溶菌と BAC DNA の抽出を行う。
 - iv) NucleoBond[®] PC20 カラムシステムを用いて抽出した BAC DNA の精製を行う。最後に 20×1 の TE バッファーに溶解する。
- 上記 i)、iii)、及び iv)の工程について分注ロボットを使用したオートメーションで行う。

BAC プローブ調製工程(BAC DNA 無尽資源化工程とも言う)

- i) BAC DNA 調製工程で得られた BAC DNA を 3 分割し、各々に制限酵素 *RsaI*、*DpnI*、*HaeIII* を加え消化を行う。
 - ii) アダプターDNA とのライゲーションを 16°Cで一晩行い、65°C 10min の加熱で酵素を失活させる。
 - iii) NucleoBond[®]を用いてアダプター結合 DNA を精製する。
 - iv) PCR(Ligation-mediated PCR 法)により DNA の増幅を行う。(セミオートメーション装置から取り出して PCR 装置を用いて行う。)
 - v) 限外濾過膜を用いて増幅した無尽資源化 DNA の精製と濃度調整及び濃度測定を行う。
- 上記 i)~iii)、及び v)の工程について分注ロボットを使用したオートメーションで行う。

上記 BAC DNA 調製工程(図A-1上:BAC DNA 調製用ロボット)と BAC プローブ調製工程(図A-1下:BAC DNA 無尽資源化用ロボット)は分注ヘッドが作動し、試料及び試薬のピックアップ、インキュベーション、ゲル濾過等の操作が極めて精確に行われる。

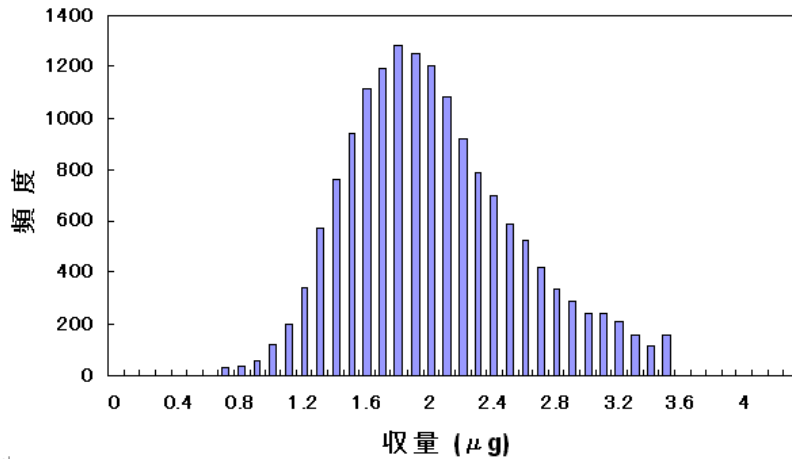
図A-1. BAC-DNA の調製と無尽資源化の半自動化工程フロー



384 プレートから目的の試料をピックアップするオートメーション装置は市販されているが、BAC DNA 調製工程及び BAC プローブ調製工程のように非常に煩雑で多数のステップを操作する装置は実在せず、本装置は日本初の製品であり期待通り実稼動した。

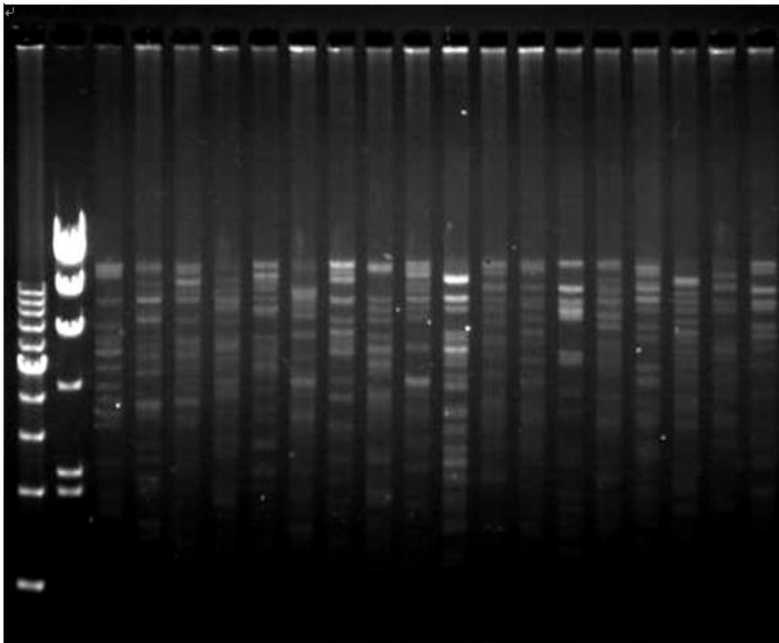
前段の BAC DNA 調製工程では 1 日に 96 検体から BAC DNA の調製が可能であり、BAC クローン当たりの収量は1~2.2 マイクログラム(図A-2)であり、次のステップの無尽資源化工程に進むために十分な量が担保されていた。また、得られた BAC DNA の純度を検定するために *EcoRI* 切断した時の 0.8%アガロースゲル電気泳動のプロファイルを図A-3に示した。UV 吸収曲線の結果と合わせて高純度の BAC DNA 標品が抽出・収穫されていることが確認された。後段の BAC DNA 無尽資源化工程は 1 日に 96 検体の無尽資源化が可能であった。さらに、両工程を用いて調製した DNA を搭載したアレイを試作し、これを用いてアレイ CGH 法によりゲノムコピー数異常解析を実施した結果、用手法で調整した BAC DNA と同様に高精度にシグナル検出できることが確認された。

図A-2. BAC-DNA 抽出収量



図A-3. EcoR1 切断 BAC DNA のアガロース電気泳動像

M1 M2 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18



【テーマB】 ヒト染色体タイリングアレイ(WG15000)の作製

(株式会社ビー・エム・エル、東京医科歯科大学、国立がん研究センター)

本染色体解析技術開発プロジェクト、研究開発項目1)BAC を用いた高精度全ゲノムアレイの開発では日本人ゲノムに由来する 3 万個の BAC DNA を搭載したアレイを作製する計画(独立行政法人産業技術総合研究所)であったが、本アレイのバリデーションを行い供給可能になるためには相当の時間がかかる。そのため、日本人 CNV データベースをより早く構築するためにヒトゲノムシーケンスプロジェクトの共通材料として世界のゲノムセンターで使用された実績を有する RPM11 BAC ライブラリークローンを試料に Whole Genome Array-15000 (WG15000)の作製を進めた。

1. ヒト全染色体を網羅する 15,000 個の BAC クローンの選別

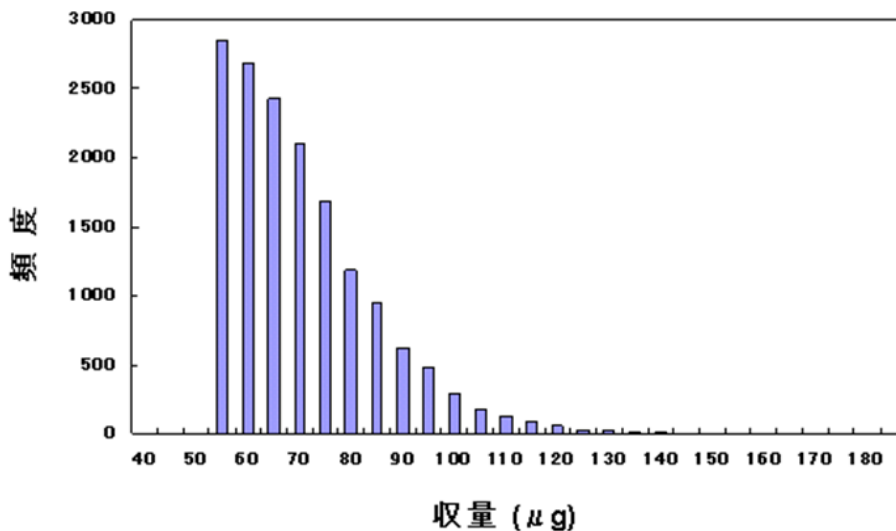
ヒト染色体タイリングアレイにはヒト全染色体を網羅する 15,000 個の BAC クローンの搭載を計画した。そ

のために、Whole Genome Array-4500(WG4500)に搭載されている 4,523 個の BAC/PAC DNA に加えて、ヒト染色体を網羅する 10,500 個のクローンを RP-11BAC ライブラリーから選別した。The National Center for Biotechnology Institute (NCBI)及び University of California, Santa Cruz(UCSC)のゲノムデータベースウェブサイトを使用し、ヒト染色体タイリングアレイを作製するための最適なクローンを選択した。BAC DNA の平均鎖長は 150Kb であり、選択した 15,000 個の BAC クローンはヘテロクロマチン領域(高頻度から中頻度の繰り返し配列が含まれ、テロメアやセントロメア領域に存在し、遺伝子が低密度の領域)を除くヒト全染色体をカバーしている。

2. ヒト染色体タイリングアレイに搭載する DNA の調製

まず、15,000 個の BAC クローンより、“テーマA”で作製した BAC DNA 調製半自動化装置を用いて BAC DNA の調製を行った。得られた BAC DNA の品質は用手法で調製した BAC DNA の品質と同等であった。得られた BAC DNA については“テーマA”で作製した BAC プローブ調製工程半自動化装置を用いて BAC DNA の無尽資源化を行った。BAC プローブの収量は最低でも 50 マイクログラム以上であり 500 枚以上のアレイスライド作製に十分な量であった(図B-1)。

図B-1. BAC プローブの収量



作製された 15,000 個の BAC プローブは日本ガイシ株式会社へ送られ、日本ガイシ株式会社にて WG15000 スライドが作製された。作製された WG15000 は東京医科歯科大学でのテストハイブリダイゼーションにより解析に十分な感度と特異性を持ちうるパフォーマンスを示し、現在、日本人 100 家系 Trio(父・母・子)解析に使用されている。

3. 搭載 DNA の性能評価

WG15000 の作製に使用した BAC クローンの性能を評価するため、全体の約 1 割にあたる 1573 種の BAC クローンについて FISH 法により染色体マッピングを実施し、データベース情報通りの正しい染色体領域とハイブリダイズするかを検証した。FISH 解析に使用した BAC クローンはデータベース情報に基づき染色体ごとに、ほぼ等間隔(約 2 Mbp)に座位すると予測されるものを選択した。FISH 解析の結果、WG15000 の作製に使用した約 83%の BAC クローンが正常に目的の染色体領域にマッピングされた。一方、残りの 14%は本来の領域に加えてそれ以外の染色体領域にとの交叉雑種が観察され、さらに 2%はゲノムデータベースに報告されているとは全く別の領域に雑種シグナルを検出した(図B-2)。これらの結果は RP-11BAC ライブラリーに関する従来からの知見と同程度の誤配置であり、WG15000 により検出される CNV の評価に重要な情報となる。図B-2に、FISH 解析結果の分類と BAC クローンの割合を示した。

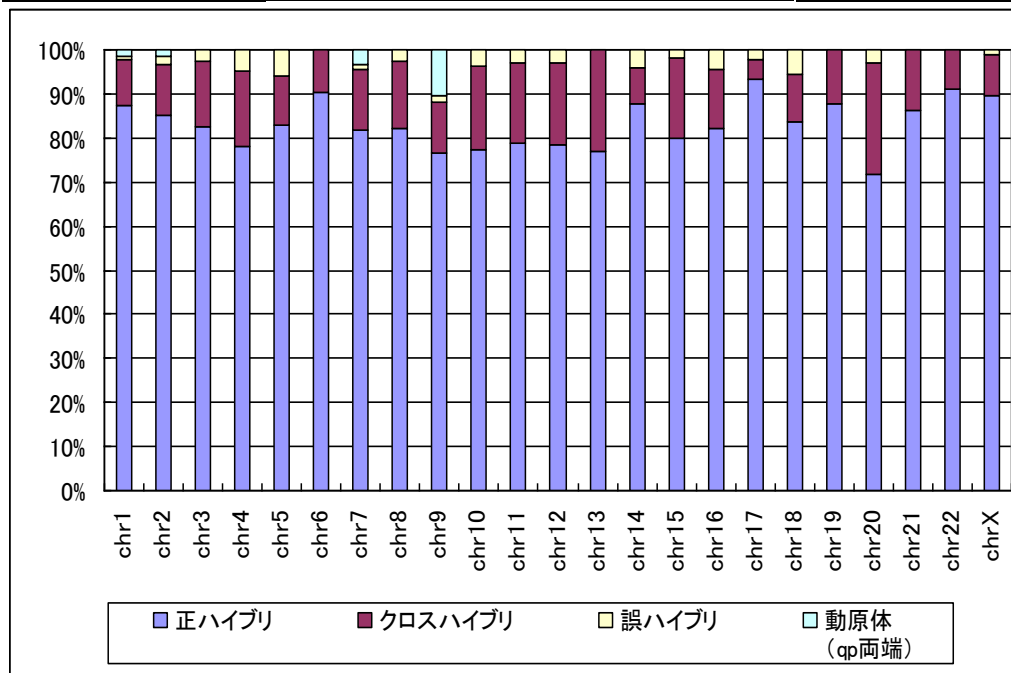
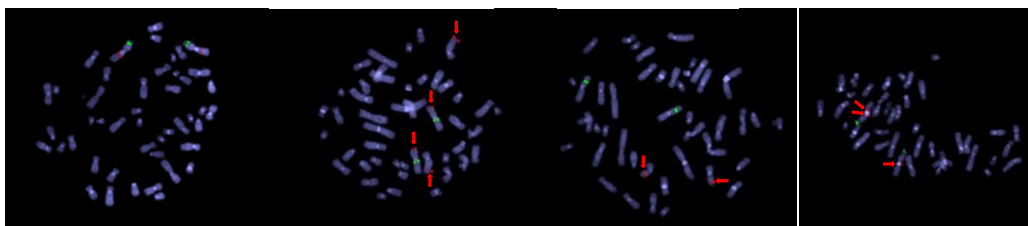
図B-2. WG15000に搭載したBACクローンのFISH解析

正確な染色体領域
にハイブリする例
全体の 83%

クロスハイブリの例
全体の 14%

誤ハイブリの例
全体の 2%

動原体付近の両端
にハイブリする例
全体の 1%



クロスハイブリ：該プローブが目的以外の染色体座位にもハイブリする。

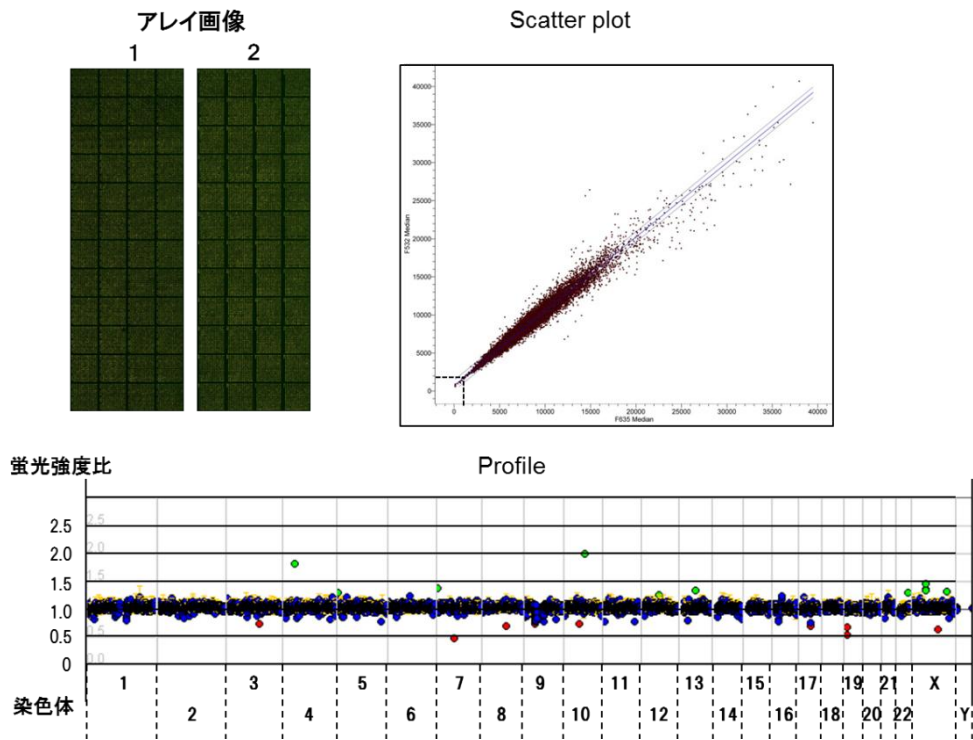
誤ハイブリ：該プローブが目的の染色体座位にハイブリせず、別の染色体座位にハイブリする。

4. MCG Whole Genome Array-15000 のパフォーマンスの検証

作製した MCG WGA-15000 のパフォーマンスを検証する目的で、コントロール用男性 DNA と男性(コントロールとは異なる)または女性テスト DNA をハイブリダイゼーションした時の、実際のアレイ画像(アレイ1および2、各 7500 プローブを 2 箇所ずつスポット)、Scatter plot 図、並びに Profile 図を示す(図B-3、B-4)。Scatter plot 上、ほとんどのスポットから十分な蛍光強度が得られており(点線より右上)、その結果 Profile 上のほとんどのスポットでの標準化後の蛍光強度比は、正常範囲内(0.75-1.32)に分布している。女性では、男性に対して X 染色体数は 2 倍であるため、Scatter plot 上別れた分布を示す plot 集団が認められ、これらは Profile でも高い蛍光強度比を示す。

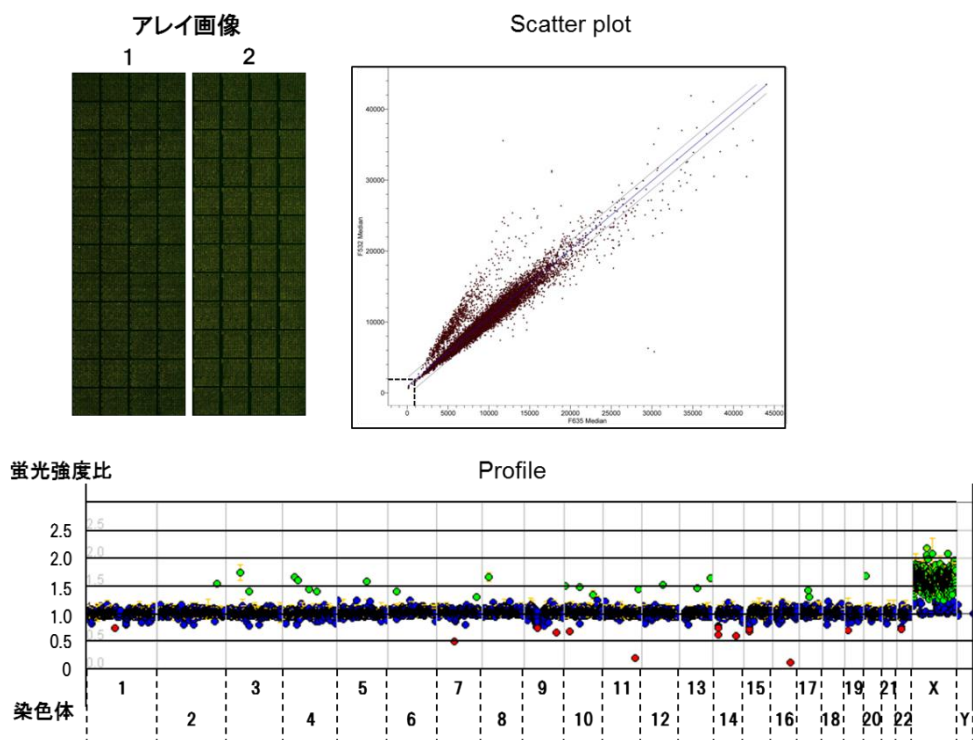
図B-3.

男性(テストサンプル)/男性(コントロール)での検討



図B-4.

女性(テストサンプル)/男性(コントロール)での検討



【テーマC】日本人ゲノム多様性データベースの構築（東京医科歯科大学）

ヒトゲノム解析の進展により、1塩基多型 (single nucleotide polymorphism; SNP) はヒトゲノム中に約 1,000 万箇所存在すると推定され、これが個別化医療を行う上での重要な根拠となっている。さらに、民族によってもその存在頻度に大きな差があり、それを考慮した医療が必要となる。一方では、CNV データベースが公表 (Nature Nov.22, 2006) され、その存在頻度はヒト全ゲノムの 12% (約 360Mb) と極めて高いことが判明した。従って、*de novo* 発生 CNV の座位、頻度、特徴などの詳細な情報を格納した日本人 CNV データベースの構築は極めて重要であり、日本で個別化医療を進める上で必須となる。

本プロジェクトでは、NEDO が実施する「染色体解析技術開発」プロジェクト (2006 年度～2011 年度事業) の支援を受け、健常日本人集団における CNV の位置や出現頻度情報を収載した CNV データベース「MCG CNV Database」を構築し、広く公開することで、研究レベルでのゲノム解析に大きく貢献すると同時に「診断の正診率」の向上のための基盤データとして先天性疾患及び癌の診断に活用されることを期した。

本データベースを構築するにあたり、日本人 100 家系における父・母・子のトリオの延べ 300 人を対象とし、リンパ球から抽出した DNA を用いてアレイ CGH 解析を行った。解析に用いたのは、東京医科歯科大学難治疾患研究所 (稲澤謙治研究室) で開発された高密度 BAC アレイである WGA-4500、WGA-15000 の 2 種類の BAC アレイである。健常コントロールとして、特定の日本人男性 1 名のリンパ球由来 DNA を用いた。この解析によって検出された CNV のコピー数増加・減少、染色体上の位置、サイズ、頻度などを集積した。さらに、両親と子の CNV を比較し、子において生じた CNV が両親のいずれかに由来する inherited CNV であるか、あるいは新規に生じた *de novo* CNV であるかの情報を集積した。今回の 300 人の解析において、のべ 1353 箇所に CNV が検出された。そのうち 970 箇所は DGV に収載されておらず、固有性の高い CNV である可能性が考えられた。また、568 箇所の CNV は、子において新規に生じた *de novo* CNV であった (図 C-1)。これらの成果に基づき日本人健常者の CNV データベースを構築し、MCG CNV database を 2011 年 3 月 1 日よりインターネット上に公開した [<http://www.cghtmd.jp/CNVdatabase>] (図 C-2、C-3)。このデータベースからは、BAC アレイレベルで検出する日本人健常者の全ゲノムレベルの CNV 情報を得ることが出来るだけでなく、現在広く世界的に用いられているゲノム多様性データベースである Database of Genomic Variant (DGV)、遺伝性疾患・遺伝子のデータベースである OMIM、ゲノムブラウザである UCSC ゲノムブラウザとのリンクから、国際的に進展するゲノム解析の進捗に合わせた情報比較や CNV の病因性を考慮した質的検討におけるの利便性を向上させている。

本データベースの提供する健常日本人 CNV の頻度情報をリファレンスとすることで、種々のゲノム解析によって得られたゲノム構造変化が、遺伝性疾患やがんなどの疾患の病態形成と関連するものであるか否かをより早く正確に評価することが期待できる。また、健常者に検出される CNV は SNP と同様に疾患の感受性を規定するファクターとなることが知られているため、本データベースが提供する日本人における CNV の頻度は、希少な遺伝疾患だけではなく、生活習慣病やアレルギーなどの一般的な疾患を理解する上でも重要な基盤情報となることが期待される。現在、ゲノム情報に基づいた新たな医薬品開発や医療機器開発を促進する「医療イノベーション推進」が構想されており、本データベースはバイオリソースの価値を高める情報資源として、「生体試料」のバイオバンクと「ゲノム情報・臨床情報」のデータベースの統合によって成立する“バイオリソースセンター”の重要な基盤にもなると考えられる。

図C-1. MCG CNV Database に収載されている CNV 数と染色体上の位置
 左の表は WGA-15000、右の表は WGA-4500 により検出された CNV を示す。

Summary Statics			
MCG Whole Genome Array 15000 (WGA-15000)			
Chromosome	Total CNV	CNV not found in DGV	de novo
1	76	50	34
2	76	52	30
3	49	45	26
4	79	64	34
5	63	48	27
6	42	37	16
7	25	14	11
8	28	14	9
9	65	22	46
10	50	39	20
11	56	46	21
12	34	24	11
13	37	31	14
14	33	18	19
15	42	15	25
16	47	18	25
17	29	18	16
18	29	26	13
19	26	17	16
20	10	7	4
21	28	26	14
22	27	11	13
X	86	63	-
Y	10	8	-
MCG Whole Genome Array 4500 (WGA-4500)			
Chromosome	Total CNV	CNV not found in DGV	de novo
1	19	14	10
2	6	5	3
3	11	11	3
4	13	13	7
5	12	10	8
6	10	9	7
7	10	8	4
8	9	5	2
9	16	11	8
10	17	13	9
11	23	23	11
12	15	13	5
13	18	17	10
14	9	8	6
15	17	11	7
16	4	2	2
17	6	2	4
18	2	2	2
19	24	20	12
20	4	4	0
21	15	15	2
22	4	3	2
X	28	24	-
Y	14	14	-

図C-2. MCG CNV Database のトップページ

MCG CNV Database

Overview Content ArrayDesign CNV Map

日本語 | English

本データベースの概要

February 2011

本データベースは、日本人の健常者集団を対象として独自開発したBACアレイ〈MCGアレイ〉¹⁾を用いた解析を行い、検出された **CNV** を収載したものです。このことにより、日本人におけるCNVの出現頻度を示し、ゲノム解析において検出されるCNVが病態と関連するかどうかを判断する基盤となることを期しています。

Reference

1) Inazawa J, Inoue J, Imoto I. Comparative genomic hybridization (CGH)-arrays pave the way for identification of novel cancer-related genes. 2004. Cancer Sci 95: 559-563.

共同研究者

- 浜島信之教授: 名古屋大学・院医・予防医学
- Dr. Sueli Miekko Oba-Shinjo
Laboratory of Molecular Biology, Department of Neurology, School of Medicine, São Paulo University, São Paulo, Brazil
- Dr. Lucy Sayuri Ito
Japanese Brazilian Health Professional Volunteer Group, São Paulo, Brazil

本データベース作成の貢献者

- 稲澤謙治
- 井本遼勢
- 林 深
- 高橋綾子
- 森 留美

なお、本データベースの構築には、新エネルギー開発機構 (NEDO) の支援を受けています。

お問い合わせ Link Site CGH Data Base

Copyright © 2011 TMDU MRI MCG | All Rights Reserved

図C-3. MCG CNV Database の画面

Clone ID	Start	End	Gene Symbol	CNV in DOV	Pathogenic region	Duplication %	Deletion %	de novo %	Lineage Map
13129	3476231	3656125	ITGAE		OMIM	4	0	1	
13133	4178539	4358570	SPNS3		OMIM	1	0	0	
13200	16045010	16219231	PIGL		OMIM	1	0	0	
13216	18863813	19021902	LOC400561	77544	OMIM	10	0	8	
13230	21261074	21470226	C17orf51	48634	OMIM	1	0	0	
13232	21803590	21919086	FLJ39000	29670	OMIM	0	1	1	
13234	22038117	22170480		29670		0	1	1	
13242	23428643	23573738	NLK		OMIM	1	0	1	
13267	32241487	32419534	DNM3L3		OMIM	1	0	0	

染色体ごとに CNV の位置が示され、10 倍までズームが可能である。各 CNV の一覧表も合わせて表示され、UCSC や DGV などの各種データベース、各家系の解析情報などへリンクする。

【テーマD】 Genome Disorder Array と Cancer Array-800 の実用化

(東京医科歯科大学、株式会社ビー・エム・エル、富士フイルム株式会社、旭川医科大学)

1. GD アレイ実用化の戦略立案と方針決定 (旭川医科大学、東京医科歯科大学)

従来、先天性異常疾患の臨床では、小児科領域の臨床遺伝専門医が患児の臨床症状と染色体検査の結果に基づいてその診断がなされてきた。しかし、従来の核型分析による染色体検査の検出精度は約 5~10メガ塩基対 (Mb) という数百万塩基対レベルであり、それ以下の微細なゲノムサイズの異常を検出することは困難であり、原因異常が見出せない症例も稀ではなかった。また、染色体検査は、(1) 患者生体試料の採取 (2) 試料リンパ球培養 (3) 染色体標本の作製 (4) 標本の顕微鏡観察と異常の有無の同定、といった工程を経る必要があり極めて low-throughput な解析技法である。現在、染色体検査は保険適用の臨床検査の中では最も自動化が図りにくい技術とされている。さらに、顕微鏡を通してヒト 24 種類の染色体の個々を識別して染色体異常を同定する技能を備えた検査技師の養成には、年単位の時間を要する。

本テーマで開発を行った Genome Disorder Array (GD アレイ, GDA) は、既知疾患の責任領域と核染色体のサブテロメア・ペリセントロメア領域にターゲットを絞ったプローブを搭載した診断型アレイであり、核型分析による通常の染色体検査では検出が困難であるサブテロメア異常や環状染色体異常などの微細染色体コピー数異常を検出することが可能である。これらのゲノム異常に起因する症候群を、簡便かつ迅速に診断できるメリットは極めて大きい。GD アレイを用いた 1 次スクリーニングによりゲノム異常が見出された場合には、原因を特定し、そのエビデンスに基づいた臨床症状の把握や予測、ならびに患児の療育やケアマネージメントが可能になる。このことは、患児とその両親ならびに主治医にとって大きな利益となるばかりではなく、疾患原因追及のために過剰な検査等の反復を避け、医療費の抑制効果も期待できる。一方、1 次スクリーニングの結果において陰性の結果であった場合には、より高度の小児科医療機関で他の遺伝学的検査を含めてその後の対応を検討する必要がある。

GD アレイを先天性疾患の 1 次スクリーニングに使用することを目的に東京医科歯科大学、株式会社ビー・エム・エル、及び先天性疾患の診断について実績を有する 23 の医療施設から成る「CGH アレイ診断法実用化コンソーシアム」を組織した(参加施設と担当の臨床遺伝専門医を添付資料に示す)。

本目的を効率良く達成するために、対象とする先天異常疾患症例の登録と臨床情報のデータベース化を行った上で、株式会社ビー・エム・エルにおいて GD アレイを用いた 1 次スクリーニングを行った。検出されたゲノムコピー数多様性(Copy number variant, CNV)はすべて複数の公共ゲノムデータベースの最新情報と対照させるとともに、FISH 法による両親解析を実施して患者(proband)に検出した CNV が健常な両親の一方より伝達された良性 CNV (benign CNV, bCNV) であるか、あるいは病理性 CNV (pathogenic CNV, pCNV) であるかを判定した。さらに、CNV 領域内に疾患原因遺伝子が存在するか文献的に検索した。これらの診断結果は全症例において定型化された「アレイ CGH 検査報告書」(図D-1)をもってビー・エム・エル社より主治医およびクライアントにフィードバックされ、プロジェクト期間中に診療貢献を果たした。

図D-1. アレイ CGH 検査報告書の例 (ビー・エム・エル社)

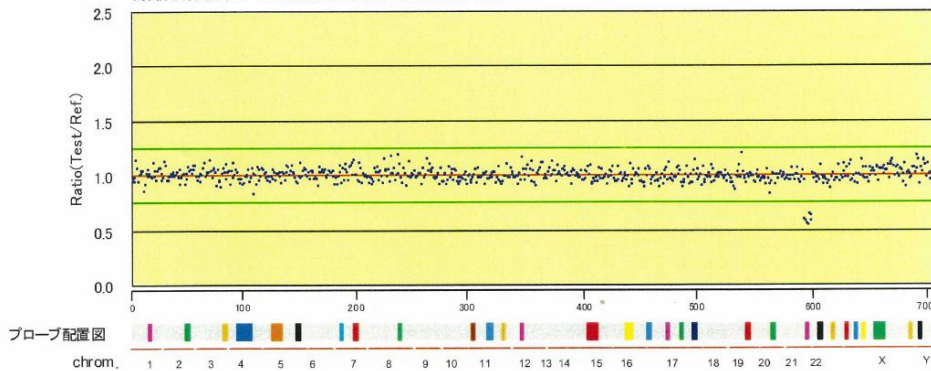
アレイCGHによる先天異常症解析

施設名: [REDACTED]
 氏名: [REDACTED] 年齢: 性別: M
 診療科: [REDACTED] 採取日: 2009/08/21
 病棟: [REDACTED] 受付日: 2009/08/21
 担当医: [REDACTED] 受付NO: 087-1408

結果 21q22.3領域において、ゲノムDNAの欠失を示すシグナルの変化が認められました。

【判定法】 検体と対照の比が、0.75以下の領域は欠失、1.25以上の領域は過剰として判定します。

【ご注意】 染色体の微細欠失や過剰などで引き起こされる多くの隣接遺伝子症候群、奇形症候群などは、その特異的な診断所見から染色体異常部位が推定できます。それに呼応した微細領域のコピー数異常が本検査にて検出されましたら判定は確定ですが、非典型症例では本検査の配置プローブでもコピー数異常を捉えきれないことがあります。(解析限界領域サイズはおおよそ0.1から0.3 Mbまで)。



主な疾患に対応したスポットの位置

- | | | |
|-----------------------------------|---|--|
| ■ : van der Woude (1q32-q41) | ■ : WAGR (11p13) | ■ : Alagille (20p12.2) |
| ■ : Mowat-Wilson (2q22.3) | ■ : Potocki-Shaffer (11p11.2) | ■ : Down (21q22.1) |
| ■ : BPES (3q22.3) | ■ : Pallister-Killian (12p13.3) | ■ : Cat eye (22q11.1) |
| ■ : Wolf-Hirschhorn (4p16.3) | ■ : Prader-Willi / Angelman (15q11-q13) | ■ : DiGeorge (22q11.2) |
| ■ : 5p- (5p15.3-p15.2) | ■ : Rubinstein-Taybi (16p13.3) | ■ : Leri-Weill Dyschondrosteosis (Xp22.3/Yp11.3) |
| ■ : Sotos (5q35.3) | ■ : Miller-Dieker (17p13.3) | ■ : Steroid sulfatase Deficiency (Xp22.31) |
| ■ : Saethre-Chotzen (7p21.1) | ■ : Charcot-Marie-Tooth 1A (17p12) | ■ : Kallman type 1 (Xp22.31) |
| ■ : Williams (7q11.2) | ■ : Smith-Magenis (17p11.2) | ■ : DMD (Xp21.2) |
| ■ : Langer-Gledion (8q23.3-q24.1) | ■ : Neurofibromatosis 1 (17q11.2) | ■ : PMD (Xq22.2) |
| ■ : Beckwith-Wiedemann (11p15.5) | ■ : Diamond-Blackfan (19q13.2) | ■ : Testis-determining Factor (Yp11.3) |

コメント

GDアレイには既知染色体異常症の関連領域ならびに各染色体サブテロメア領域を含む712個(第1-22番染色体=627個、X=60個、Y=25個)のBAOクローンが配置されています。今回の解析では21q22.3領域に座する7個のBAOクローンの1コピー欠失を検出しました。対照には正常男性ゲノムDNAを用いました。ISCN2009に準じたゲノムアレイ解析結果は次の通りです。

arr 21q22.3(44 958 870-46 920 384)x1

異常シグナルと被検者の表現型との繋がりを確認するためにも、可能でありましたら被検者のご両親にFISH解析を適用していただきたく、よろしくご説明のうえ、ご了解を得て下さいますようお願い申し上げます。

注) 解析結果の表記法は、2009年8月21日よりISCN2005表記からISCN2009表記に変更しております。

報告書作成日 2009/09/18

検査責任者 [REDACTED]



BML総合研究所

〒350-1101 埼玉県川越市市場1361-1 Tel. 049-232-3131

GDアレイでの解析結果がネガティブであった症例に関しては、コンソーシアム内の熟練遺伝専門医の合議により個々の症例の供覧と討議を行い、「染色体異常が病態形成に関与する可能性の強さ」の順位付けを行った。その高位の症例から順に、2次スクリーニングとして東京医科歯科大学難治疾患研究所において全ゲノム型アレイである Whole Genome Array-4500 (WGA)を用いたより詳細な解析を実施した。Probandならびに両親の解析結果は、東京医科歯科大学難治疾患研究所(稲澤研究室)で定型化した「アレイ CGH 解析結果報告書」(図D-2)をもって主治医およびクライアントにフィードバックした。これらの経緯を、次項以降詳述する。

図D-2 東京医科歯科大アレイ CGH 解析結果報告書の例

先生

いつもお世話になっております。過日お預かりしました、アレイコンソーシアム検体の検索結果についてご報告いたします。

【プロフィール】

ID :
 性別 :
 臨床症状 : MCA/MR
 核型 : 未詳

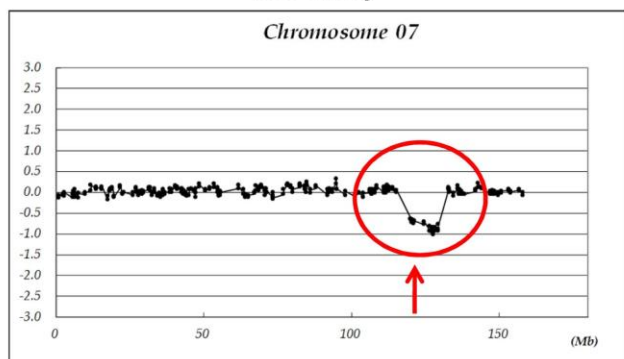
【MCG Whole Genome Array-4500による解析結果】

7q31.31-q32.2にヘテロ欠失を認めました。
 ISCN2005に準じた記載: arr cgh 7q31.31q32.2(RP11-68E12->RP11-38P11)x1

【FISHによる解析結果】

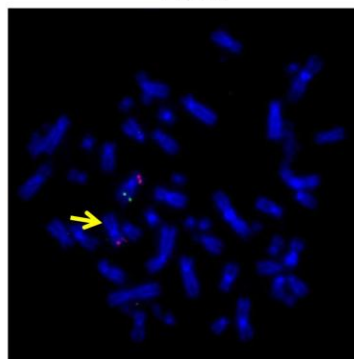
当該部位のBACを用いて欠失を確認しました。
 ISCN2005に準じた記載: ish del(7)(q31.31q31.32)(RP11-3L10-)

WG array



矢印は7q31.31-q32.2におけるヘテロ欠失を示します。

FISH



矢印はシグナルの欠失を示します。
 Green: RP11-3L10 (7q31.31q31.32)
 Red: RP11-51L23 (7p21.1, control)

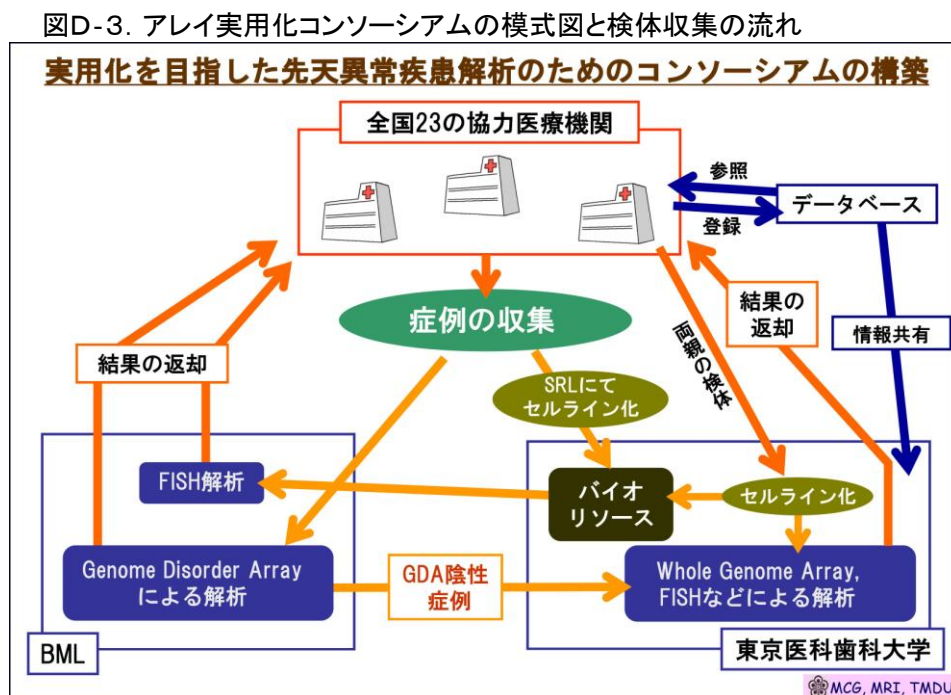
【コメント】

MCG Whole Genome Array-4500 (WG array)には、全染色体を約0.7Mbおきにカバーする約4500種類のBACクローンが配置されています。今回のゲノムアレイの解析では7q31.31-q32.2におけるヘテロ欠失を検出いたしました。この結果はFISHにより確認され、サイズは最小で約9.3Mbと判断致しました。本領域の欠失は少数ながら先行報告があり、Paskulinらの報告は本症例の欠失とオーバーラップしていると考えられます [Eur J Med Gene. 2011]。臨床症状の異同等につきご検討ください。

以上、ご報告申し上げます。

2011年7月4日
 東京医科歯科大学 難治疾患研究所 分子細胞遺伝学教室
 林 深(筆) 稲澤 譲治

コンソーシアム GD アレイ実用化のための臨床検体の取り扱いフローを図D-3に示した。



2. GD アレイ及び WG4500 アレイを用いた先天性疾患の解析(東京医科歯科大学、株式会社ビー・エム・エル、旭川医科大学)

Genome Disorder Array (GDA)は、上述のコンソーシアムでの性能検証を行いながら、搭載する BAC クローンに改良を重ね、Ver. 2、Ver.3 を経て、GD-700 として商品化(富士フイルム株式会社にて実用化、平成21年)に至った。以下、時系列的に開発・検討の経過を説明する。

本プロジェクトでは、既知の先天性異常症候群及びサブテロメア領域の異常を伴う未知疾患を診断するためにまず GDA (Ver.2)を作製した。本アレイを用いて診断できる先天性疾患名とその原因となる染色体領域を表D-1に示した(特許出願)。

表D-1. GDA (Ver.2)を用いて診断できる先天性異常疾患

① 既知染色体異常症 (31 種類)

疾患名	原因領域
1. 1p36	1p36
2. Van der Woude	1q32-q41
3. ZFHX 1B deletion	2q22
4. BPES	3q23
5. Wolf-Hirschhorn 症候群	4p16
6. Cri-du-Chat (5p 症候群)	5p15
7. Sotos 症候群	5q35
8. Craniosynostosis	7p21.1
9. Silver-Russell 症候群	7p11.2
10. Williams 症候群	7q11.23
11. Kallmann II 症候群	8p11.2-p11.1
12. TRPS I	8q24.12
13. TRPSII (Langer-Giedion)	8q24.11-24.13
14. WAGR	11p13
15. Pallister-Killian 症候群	12p テトラソミー

16. Prader-Willi 症候群	15q11-q13
17. Angelman 症候群	15q11-q13
18. Rubinstein-Taybi 症候群	16p13.3
19. Miller-Dieker 症候群	17p13.3
20. Smith-Magenis 症候群	17p11.2
21. Neurofibromatosis	17q11.2
22. Diamond-Blackfan	19q13.2
23. Alagille	20p12
24. Down 症候群	21 トリソミー
25. Cat eye 症候群	22q11
26. DiGeorge 症候群	22q11.2
27. Kallmann 1 症候群	Xp22.3
28. DMD	Xp21.2
29. Pelizaeus-Merzbacher 病	Xp21.33-q22
30. AHC	Xp21.3-p21.2
31. Steroid sulfatase deficiency	Xp22.32

② サブテロメア領域の異常に起因する疾患

各染色体のテロメア近傍 40 種類 (13, 14, 15, 21, 22, Y の各短腕は除く) を搭載する。

GDA (Ver.2)を用いて、上記1に記載したコンソーシアムを通じて収集した先天異常症例を解析した。対象としたのは、臨床的に診断がつかないか非定型的な臨床症状を呈し、染色体 G 分染法で正常核型であった多発奇形を伴う発達遅滞 (MCA/MR)症例である。169 例の検体を GDA (Ver.2)を用いて解析し、既知の先天異常疾患 11 例と小奇形を伴う原因不明の精神発達遅滞の症例 17 例について、疾患に関連すると考えられる pCNV を検出した。この検出頻度は 16.5%であった。プロジェクト以前の解析(文科省科研費、科技構 CREST の支援)を加えて集計すると GDA (ver.2)を用いて 396 症例を解析し、うち 41 症例 (10.4%)に pCNV を検出した。

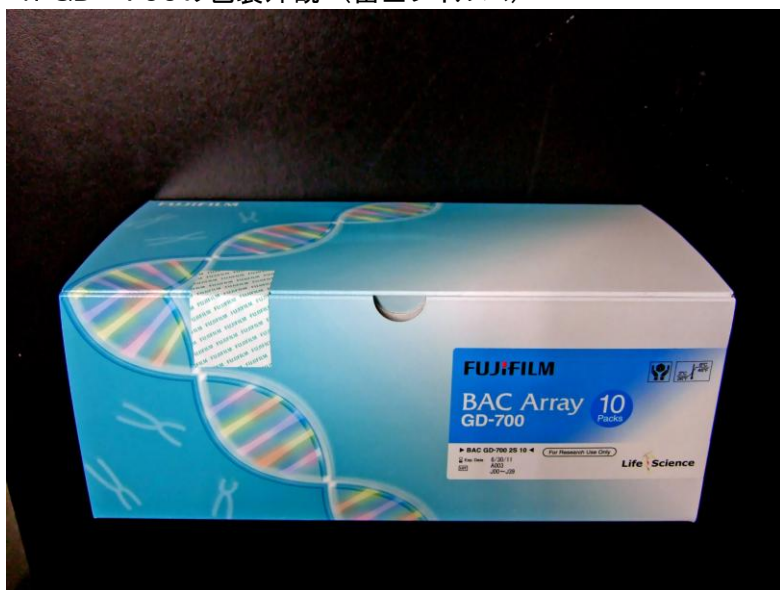
次に、これらの知見に基づき搭載する BAC DNA の内容を拡充した GDA (Ver.3)を作製した。Ver.2 に下記の 31 項目を追加し、Pallister-Killian 症候群を除いた。Ver.2 では 550 種類の BAC DNA を triplicate でスポットしたが、Ver.3 では 660 種類の BAC DNA を triplicate でスポットして作製した。

- Ver.3で追加した項目: Beckwith-Wiedemann症候群、Potocki-Shaffer症候群、Retinoblastoma、Charcot-Marie-Tooth disease type 1A、Leri-Weill dyschondrosteosis、Leri-Weill dyschondrosteosis、Testis-determining factor on Y、FMR1、FMR2、MECP2、STS、PQBP、3q29 deletion、10q24 deletion、16p11.2-p12.2 deletion、17q21.31 deletion、9q22.3 deletion、12q14 deletion、8p23 duplication、15q24 deletion、2p15-16.1 deletion、TAR症候群(1q21 del)、1q21del/dup症候群、APP、2q32.2 deletion症候群、SHOX(XとY)、Xp11.3 deletion症候群、DMDの遠位側の領域補強、AZFb + AZFc、AZFc、サブテロメア領域のXp他数箇所プローブを補強、ペリセントロメア領域42箇所のプローブを補強。

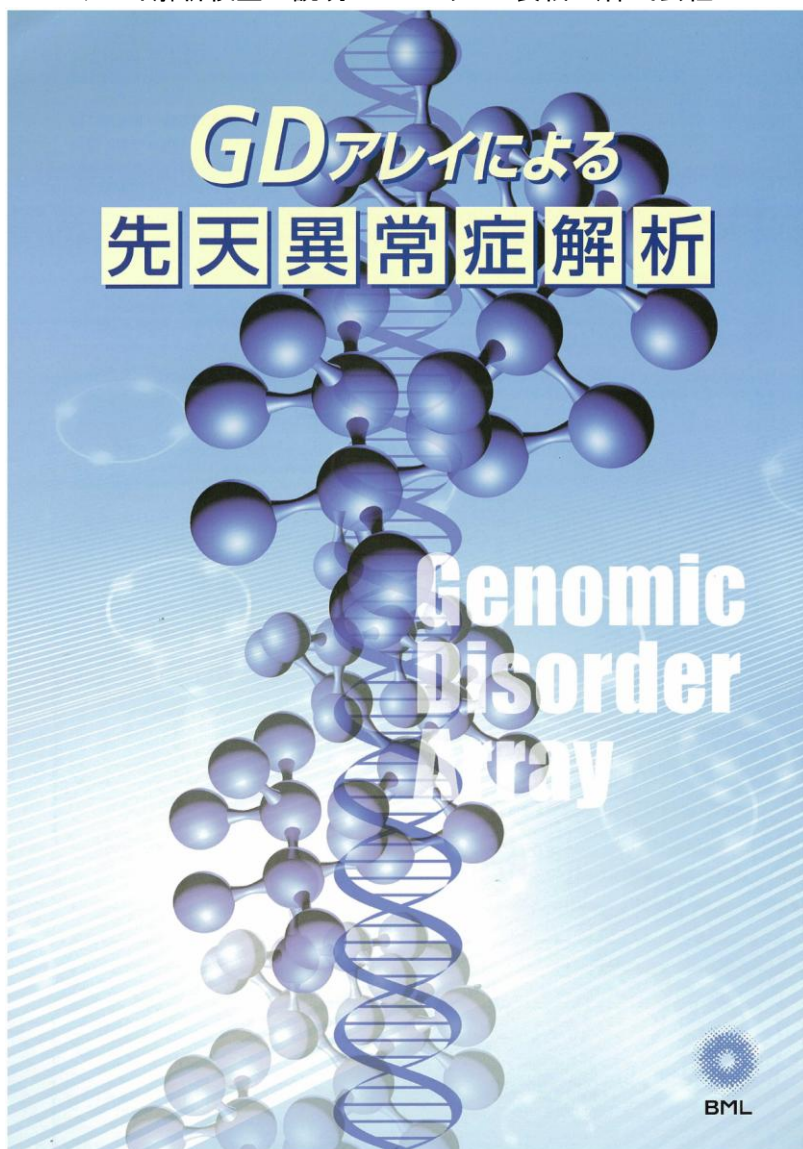
GDA (Ver.3)の使用は 2008 年 7 月より開始し、2009 年 3 月までにコンソーシアム検体 137 症例の解析を実施した。その結果、14 症例について pCNV を検出した。その検出頻度は 10.2%であった。

上述の先天性疾患解析の取り組みから、GDAによる解析を染色体G分染法やFISH法と組み合わせて実施することにより、従来の細胞遺伝学的検査を補完・一部代替する重要な役割を果たし、かつ先天異常症の診断における実用化ポテンシャルも高いことが判明した。この成果を受け、GDA (Ver.3)にさらに改良を加えた Ver.4が「GD-700」という商品名で富士フイルム株式会社から販売され(図D-4)、株式会社ビー・エム・エルにてGD-700を用いた有償受託が開始された(2009年)(図D-5)。これらの成果は第54回日本人類遺伝学会総会のランチョンセミナーで報告した(2009年)(図D-6)。

図D-4. GD-700の包装外観（富士フィルム）



図D-5. GDアレイ解析検査の説明パンフレットの表紙（株式会社ビー・エム・エル）



図D-6. GDアレイ解析検査に関するランチョンセミナー(3社共催)のパンフレット表紙

日本人類遺伝学会第54回大会

ランチョンセミナー10

演題

**先天異常症候群診断用
BACアレイスライド(GD-700)の
実用化**

日時 平成21年9月26日(土) 12:00~12:50 (50分)

場所 グランドプリンスホテル高輪 第4会場(桜花)

演者 **林 深** 先生
東京医科歯科大学 難治疾患研究所 分子細胞遺伝分野

岡本 伸彦 先生
大阪府立母子保健総合医療センター 遺伝診療科

黒澤 健司 先生
神奈川県立こども医療センター 遺伝科

水野 誠司 先生
愛知県心身障害者コロニー中央病院 小児科

座長 **蒔田 芳男** 先生
旭川医科大学 教育センター 教授

共催 日本人類遺伝学会第54回大会
株式会社ビー・エム・エル
日本ガイシ株式会社
富士フイルム株式会社

株式会社ビー・エム・エルにおける GD-700の使用は2009年8月より開始し、2011年2月までにコンソーシアム検体110症例(2009年度:73症例, 2010年度:37症例)の解析を実施した。その結果、14症例(12.7%)にpCNVを検出した。

本プロジェクト以前の解析(文科省科研費、科技構 CREST の支援), GDA Ver.2, Ver.3, 及び GD-700によりこれまで実施した全解析症例を集計すると、646 症例において GDA 解析を施行し、うち 69 症例(10.7%の頻度)に pCNV を検出した。特に、このうち 49 症例は1箇所または2箇所のサブテロメアの異常であり、通常の染色体 G 分染法では見逃されやすいゲノム異常を効率よく検出することができた。この結果を図D-7に示す。

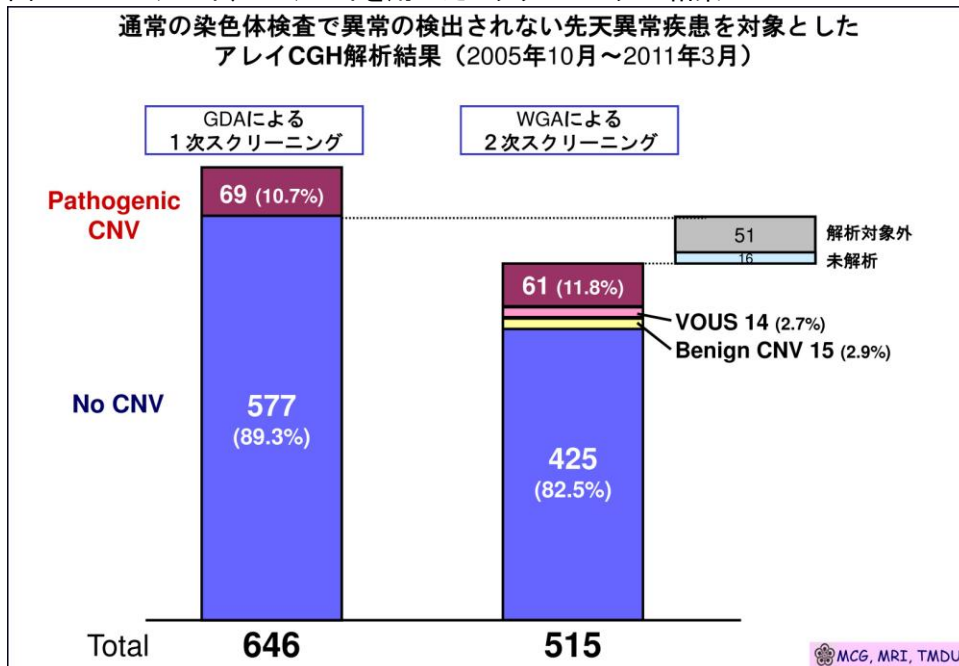
また、これらの GDA によるスクリーニングで微細異常を検出できなかった 577 症例については、稲澤研究室において漸次 Whole Genome Array-4500 (WGA)による解析を進めた。他の手法で診断がつかないなどして解析対象外となった症例を除外した 515 例を解析し、90 例に CNV を検出した。CNV を検出した症例においては

全例において FISH を施行して CNV を確認するとともに、必要に応じて定量 PCR やオリゴアレイなどのゲノム解析技法を併用し、それぞれの CNV をより詳細に検討した。

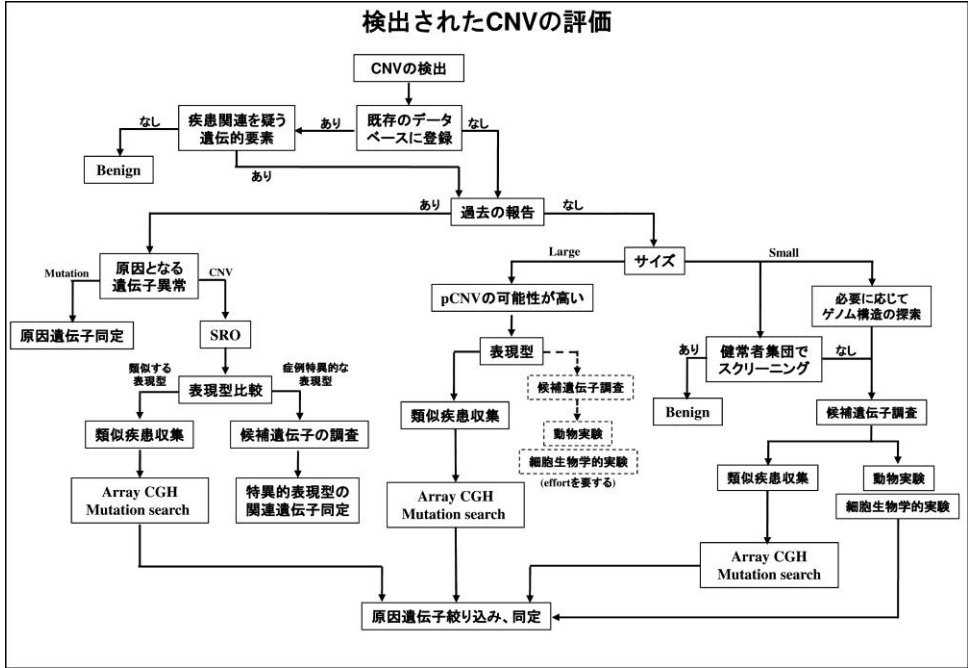
診断目的に特化したプローブを搭載した GDA と異なり、WGA は検出された CNV が疾患に関連するかどうかを評価する必要がある。そのため、従来の報告を参考に独自に CNV 評価のフローチャートを作成し、検出された各々の CNV を評価した(図D-8)。その結果、90 例の CNV のうち 61 例 (11.8%)は疾患に関連すると考えられる pathogenic CNV であった。一方 15 例 (2.9%)は疾患に関連する可能性の低い、一般健常者にも存在し得る benign CNV であり、14 例 (2.7%)は臨床的意義が現時点では不明と判定せざるを得ない variants of uncertain clinical significance (VOUS)であった(図D-7、図D-9)。

これらの結果を総合すると、臨床診断や従来の染色体核型分析によって疾患原因を特定できなかった先天性疾患について、GDA により迅速に既知疾患を診断するとともに、WGA を用いた 2 次スクリーニングにおいてより詳細な疾患原因の探求を行うことが可能であった。このことが臨床、研究の両面にもたらすメリットは極めて大きいものと考えられる。

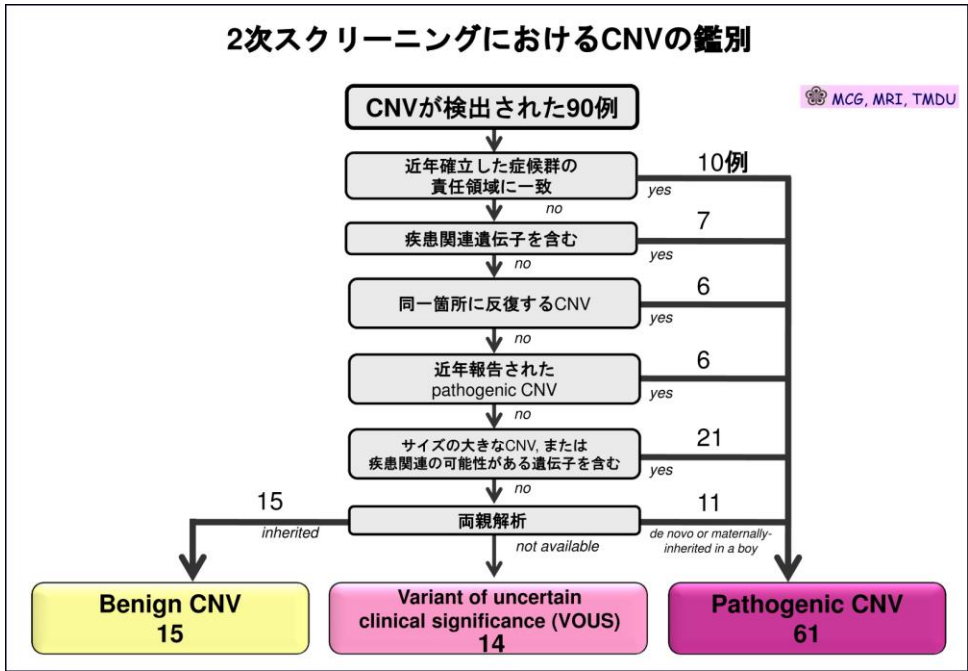
図D-7. GD アレイ、WG アレイを用いたスクリーニングの結果



図D-8. CNV と疾患原因の関連を評価するフローチャート



図D-9. WG アレイを用いた2次スクリーニングで検出された CNV 鑑別



WGA を用いた2次スクリーニングにおいて pathogenic CNV を有すると判断された症例の一覧を表D-2に示す。Pathogenic であると判断された原因ごとに分類し、それぞれに関連する遺伝子・症候群を併記した。公的データベースなどを用いて最新の知見と照応することで、診断の確定や、疾患関連遺伝子を指摘することのできた症例も多数存在している。このような基盤情報は、今後の解析で類似する臨床症状やゲノム異常を呈する症例が検出された際に、新規症候群の定義や遺伝子機能の解明に寄与することが期待される。

表D-2. 2次スクリーニングで検出された CNV と関連する症候群・候補疾患遺伝子の一覧

No.	CNV			CNV assessment	Corresponding gene/syndrome	OMIM	Corresponding disorder/phenotype
	CNV	position	start end				
1	del	1p36.2322	8,585,127 11,143,717	recently established syndrome	1p36 deletion syndrome	#607872	
2	del	1q41q42.11	215,986,492 222,467,931	recently established syndrome	1q41q42 microdeletion syndrome	#612530	
3	del	1q44	241,996,973 244,141,010	recently established syndrome	1q43-q44 deletion syndrome	#612337	
4	del	2q23.1	147,651,472 149,879,891	recently established syndrome	2q23.1 microdeletion syndrome		
5	del	14q12-q13.2	28,768,137 35,489,337	recently established syndrome	14q12 microdeletion syndrome		
6	del	15q26.2	93,199,415 96,942,334	recently established syndrome	15q26-qter deletion syndrome	#612626	
7	del	16p11.2	28,873,841 34,476,095	recently established syndrome	16p11.2-p12.2 microdeletion syndrome	#611913	
8	del	16p11.2	27,184,508 31,443,492	recently established syndrome	16p11.2-p12.2 microdeletion syndrome	#611913	
9	del	16p12.1p11.2	25,795,340 31,443,492	recently established syndrome	16p11.2-p12.2 microdeletion syndrome	#611913	
10	dup	17q22q24.2	52,363,266 62,285,481	recently established syndrome	17q23.1-q23.2 duplication syndrome	#613618	
11	del	7p14.2p13	35,621,006 45,508,196	pathogenic gene	<i>GLI3</i>	*165240	Greig cephalopolysyndactyly syndrome
12	del	7q22.1q22.2	97,314,215 106,451,506	pathogenic gene	<i>RELN</i>	*600514	lissencephaly
13	del	14q13.3	35,858,865 36,949,213	pathogenic gene	<i>PAX9</i>	*167416	Hypodontia
14	del	14q22.1q22.3	51,964,774 55,054,754	pathogenic gene	<i>BMP4</i>	*112262	polydactyly and corneal opacity
15	del	17q13.3	1,008,128 2,026,967	pathogenic gene	<i>YWHAE</i>	*605066	lissencephaly
16	del	18q21.2	48,218,621 51,861,143	pathogenic gene	<i>TCF4</i>	*602272	Rtt-Hopkins syndrome
17	del	Xp11.4p11.3	41,392,291 45,495,709	pathogenic gene	<i>CASK</i>	*300172	MR with MICPCH
18	del	6q14.1	75,484,004 79,851,528	recurrent CNVs	del(6)(q12q14.1) in 2 cases		
19	del	6q12q14.1	69,029,871 85,101,718	recurrent CNVs	del(6)(q12q14.1) in 2 cases		
20	del	10p12.1p11.23	28,121,596 30,577,807	recurrent CNVs	del(10)(p12.1p11.23) in 2 cases		
21	del	10p12.1p11.23	27,045,285 29,088,950	recurrent CNVs	del(10)(p12.1p11.23) in 2 cases		
22	del	10q24.31q25.1	103,917,900 106,011,522	recurrent CNVs	del(10)(q24.31q25.1) in 2 cases		
23	del	10q24.31q25.1	102,560,783 105,929,608	recurrent CNVs	del(10)(q24.31q25.1) in 2 cases		
24	del	3p21.3	46,150,261 52,571,544	pathogenic CNV in previous studies			
25	del	4q13q21.2	69,746,610 86,527,316	pathogenic CNV in previous studies			
26	del	7p22.1	3,185,609 6,409,277	pathogenic CNV in previous studies			
27	del	15q14q15.1	34,271,599 38,766,145	pathogenic CNV in previous studies			
28	del	17q24.1q24.2	60,576,365 64,587,782	pathogenic CNV in previous studies			
29	del	19p13.2	9,248,377 12,553,279	pathogenic CNV in previous studies			
30	del	2q24.2	160,407,234 166,923,475	morbid OMIM gene	<i>TBR1</i>	*604616	coactivator of CASK
31	del	5p15.2	10,771,782 13,700,249	morbid OMIM gene	<i>CTNND2</i>	*604275	candidate causative of Cri-du chat
32	del	6p22.3	17,056,373 18,145,656	morbid OMIM gene	<i>CAP2</i>	*602069	Highly-expressed in CNS
33	del	7q21.11	83,597,839 84,788,160	morbid OMIM gene	<i>SEMA3A</i>	*603961	inhibiting axonal growth
34	del	10p11.22p11.21	30,957,006 35,440,145	morbid OMIM gene	<i>NRP1</i>	*602069	<i>SEMA3A</i> receptor, axon guidance
35	dup	14q32.2	99,330,486 99,845,472	morbid OMIM gene	<i>YY1</i>	*600013	embryogenesis
36	dup	16p13.3	4,851,459 6,165,923	morbid OMIM gene	<i>A2BP1</i>	*605104	corresponding to autism
37	dup	16q24.1	82,699,729 84,123,857	morbid OMIM gene	<i>KCNQ4</i>	*607603	encoding a Na ⁺ channel
38	dup	Xp22.2p22.13	16,952,121 17,638,351	morbid OMIM gene	<i>IL1RAPL1</i>	*300206	X-linked MR
39	dup	2q11.2q13	88,273,220 112,714,666	large/gene-rich CNV			
40	del	3q27.1q27.3	184,235,871 188,589,798	large/gene-rich CNV			
41	dup	4p16.1	8,202,790 10,638,054	large/gene-rich CNV			
42	del	6q21-q22.33	108,616,467 128,778,095	large/gene-rich CNV			
43	del	7q31.31q32	115,790,622 133,043,504	large/gene-rich CNV			
44	del	9q31.2q32	107,489,653 114,647,547	large/gene-rich CNV			
45	del	9q33q34.11	128,953,314 131,302,268	large/gene-rich CNV			
46	del	11q14.1q21	80,132,679 97,393,199	large/gene-rich CNV			
47	del	12q12q13.11	42,739,501 47,234,286	large/gene-rich CNV			
48	del	12q13.13	50,987,232 52,180,088	large/gene-rich CNV			
49	dup	16q22.3	70,355,260 73,785,124	large/gene-rich CNV			
50	del	Xq23		large/gene-rich CNV			
51	del	2p24.1p23.3	20,037,821 28,414,457	de novo			
52	del	3p22.1p21.31	41,365,663 49,198,542	de novo			
53	del	3p26.1p25.3	8,190,557 10,026,217	de novo			
54	del	3q26.31q26.33	175,650,310 181,653,281	de novo			
55	del	8q21.11q21.13	75,722,961 81,493,446	de novo			
56	del	13q13.2q13.3	33,451,136 34,909,905	de novo			
57	dup	19p13.3	1,095,485 3,499,581	de novo			
58	del	19p13.3	6,043,505 6,859,584	de novo			
59	del	1p34.3	37,830,131 39,583,645	de novo			
60	dup	1q25.2	177,088,480 177,859,828	de novo			
61	del	Xp11.3	44,403,077 46,795,588	de novo			

次に、これらのアレイ CGH を用いた先天異常疾患の解析により得られた臨床遺伝学的に有意義な事例を述べる。

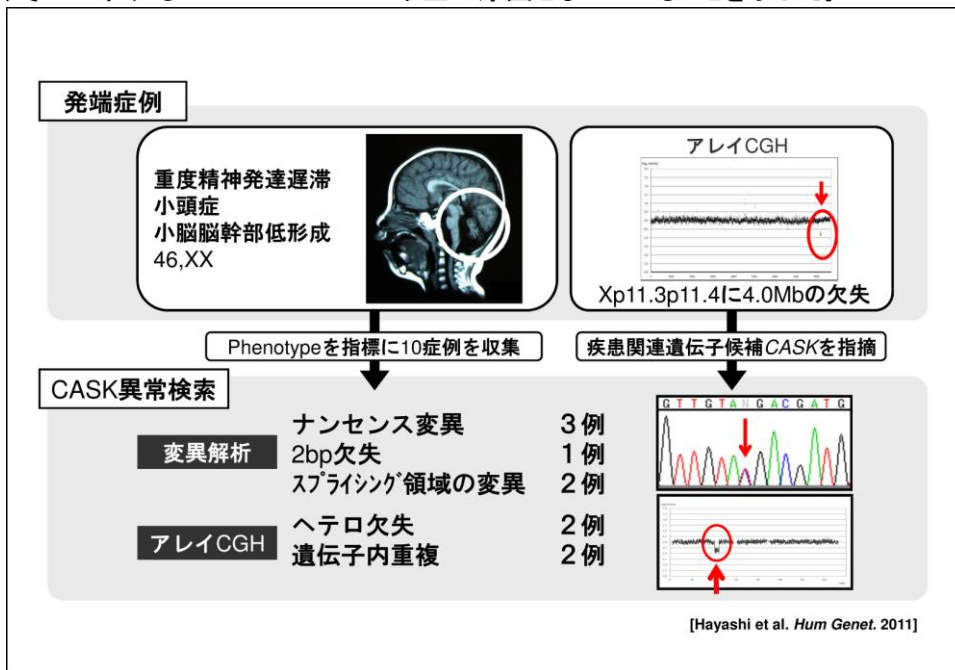
・小頭症・小脳脳幹部低形成を伴う精神遅滞の原因となる CASK 遺伝子の指摘と解析

WGA を用いた MCA/MR 症例解析の過程で、小頭症・小脳脳幹部低形成を伴う精神遅滞 (MR/MICPCH) 女兒に見出した Xp11.3-p11.4 のヘテロ欠失から、女性における CASK 遺伝子のハプロ不全が上記の病態に関与している可能性を指摘した [Hayashi *et al.* 2008]。そののち、図D-3に示したコンソーシアムの協力を得て、臨床症状として MR/MICPCH を呈する女兒 10 例を収集して CASK を解析し、全例において多様なゲノム構造異常が CASK のハプロ不全の原因となり、MR/MICPCH を引き起こしていることを示し、報告した [Hayashi *et al.* 2011] (図D-10)。

これらの成果は、genotype-phenotype の関連を明らかにしてゆくことで先天異常疾患の病態を解明し、新規の症候群を定義し得る可能性を示している。

図D-10. Genotype-Phenotype の関連に基づいた CASK 遺伝子解析

アレイ CGH 解析により疾患関連遺伝子候補として CASK を指摘し、phenotype を手がかりに新たに 10 例を収集、CASK 解析を行った。全例において、変位・欠失・遺伝しない重複を含む多様なゲノム構造異常を検出し、そのいずれもが CASK のハプロ不全の原因となっていることを示した。

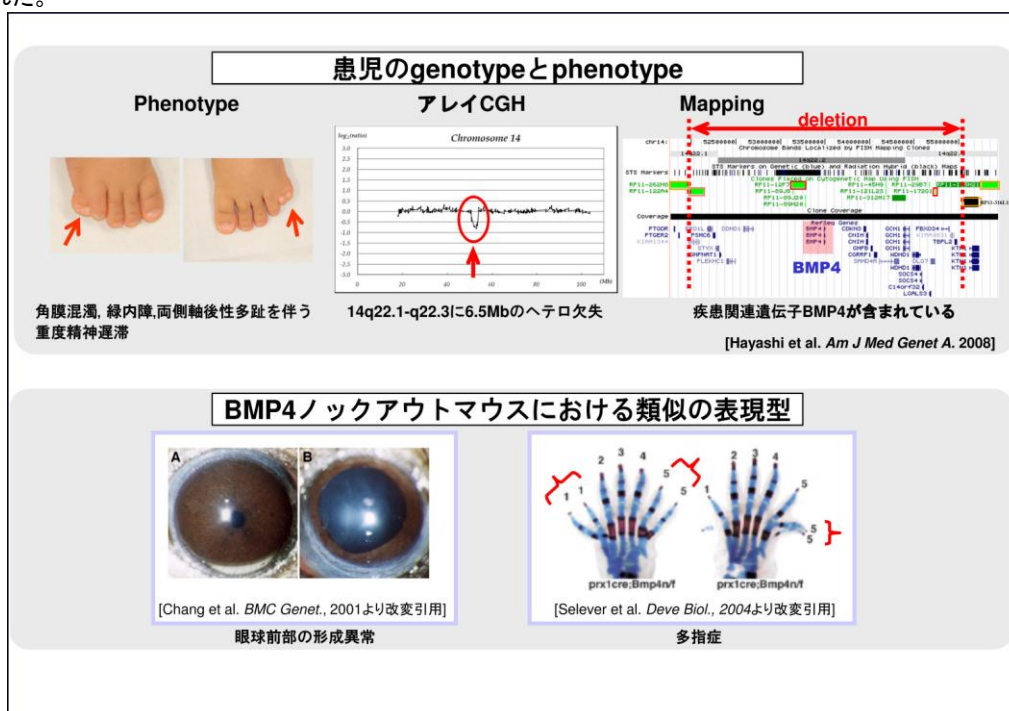


・先天性白内障・合多趾症を伴う発達遅滞の原因遺伝子 BMP4 欠失例

角膜混濁・両側軸後性合多趾・重度精神遅滞を伴う女児を、WGA を用いて解析し、14q22.1-q22.3 に約 2.7Mb のヘテロ欠失を検出した。本欠失範囲に含まれている BMP4 遺伝子 (bone morphologic protein 4)は、コンディショナル・ノックアウトマウスの表現型から多指症・眼球の形成異常を来すことが報告されている。このことから、本症例は BMP4 遺伝子のハプロ不全が表現系の原因となることをヒトにおいて示したと考え、報告した(図D-11)[Hayashi *et al.* 2008]。

図D-11. Genotype 異常を手がかりとした疾患関連遺伝子の指摘

14q22.1-q22.3 のヘテロ欠失に含まれていた BMP4 遺伝子は、モデル動物の表現型より疾患関連遺伝子の可能性が高いと考えられた。

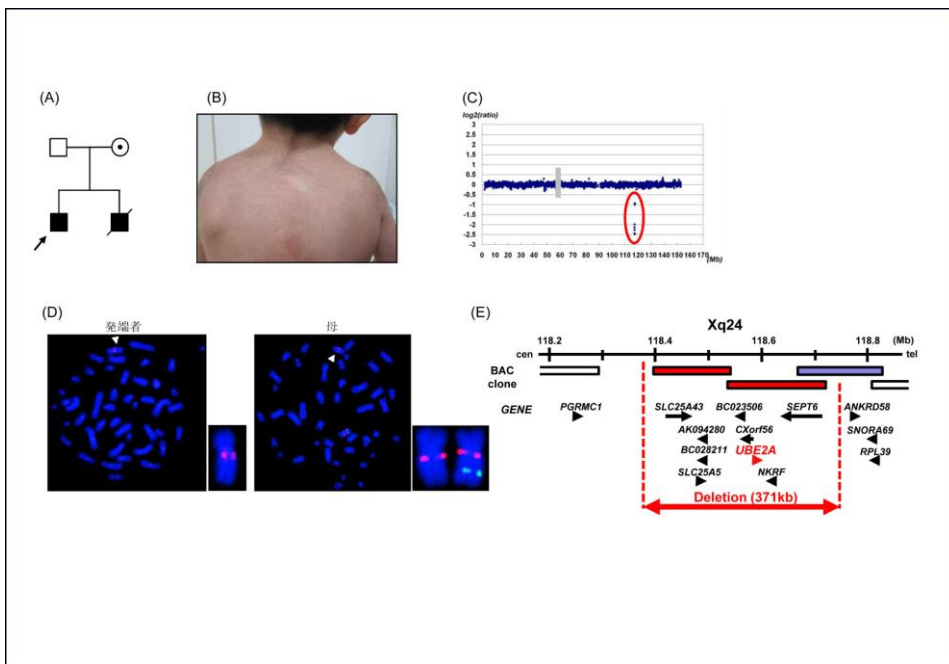


・多毛を伴う発達遅滞の原因遺伝子 UBE2A 欠失例

全身性の多毛を伴う MR の男児 2 人と健常な両親から構成される家系のアレイ CGH 解析において、Xq24 領域に 371kb の欠失を検出した。本欠失領域にはユビキチン結合酵素(E2)をコードする UBE2A 遺伝子が座位している。UBE2A のナンセンス変異が多毛を伴う MR の原因となることが報告されており [Nascimento *et al.* 2006]、本症例と表現型が類似していることから、本症例における UBE2A 欠失がこれらの症状の原因として強く示唆された。本欠失は母親に由来することが確認され、母親は欠失アリルが偏って不活化されていたことから、本欠失は患児では MR の原因として働く一方で、母親は X 不活化の偏りによって MR 症状の発現を免れ保因者となっている可能性が考えられるとして当教室より論文報告した(図D-12)[Honda *et al.* 2010]。

図D-12. UBE2A 欠失を伴う家系例解析

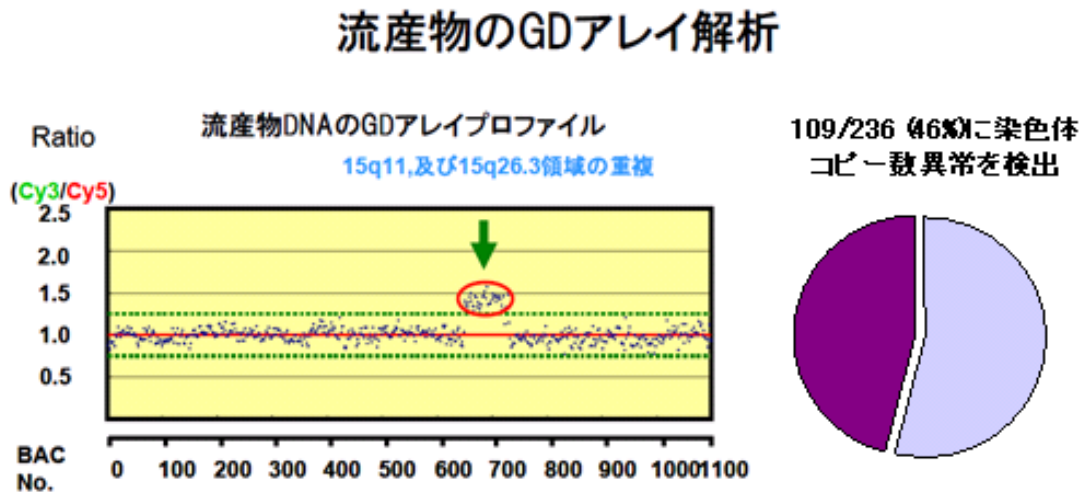
(A) 家系図、矢印は発端者を示す。欠失は母親に由来していた。(B) 発端者の背部写真。多毛を認める。(C) X-tiling array により Xq24 における欠失を認めた。(D) FISH により発端者における Xq24 欠失を確認し(左)、子の欠失が母親に由来していることを示した(右)。(E) 欠失領域のマッピング。疾患関連遺伝子 UBE2A を含む。



3. GD アレイを用いた不育症の診断(東京医科歯科大学、株式会社ビー・エム・エル)

現在、年間出生数は約 110 万人であり、その中で流産件数は 20 万~30 万件で、その多くは自然流産である。その原因を調べ、それが児側にある偶発的なものか染色体異常が原因なのかを特定することにより次の出産に安心と希望を与えることも可能となり、その結果、少子化社会の改善が可能になる。分裂中期細胞を観察する従来の染色体分析法は生きた細胞(living cell)を検体試料とするために、本邦において流産の遺伝学的要因の検索は主に「人工流産物」をサンプルとしたものであるが、不育症における遺伝学的要因の寄与度を正確に知るには自然流産物をサンプルとした解析が必須である。GD アレイ等を用いた自然流産物の潜在的染色体異常の検出が可能であれば、不育症における遺伝学的要因の中でも *de novo* 染色体コピー数異常、あるいは両親の潜在的染色体均衡転座等の関与を知る上で極めて有用である。これまで、国立成育医療研究センター周産期診療部(小澤伸晃博士)より提供された流産産物より DNA を抽出して、GD アレイを用いた解析を 236 例について行った結果、109 例(46.2%)にゲノム異常が検出された(図D-13)。内訳は染色体トリソミーと考えられる症例が 87 例、染色体モノソミーと考えられる症例が 1 例、性染色体数異常と考えられる症例が 7 例、微細異常が 14 例であった。

図D-13. 流産物のGDアレイ解析



4. 二色蛍光法に代わる Dual ハイブリ法の開発(富士フィルム株式会社)

アレイ CGH 法で一般に評価に用いているプロトコルはアボット社が知財権を取得している二色法である。富士フィルムではこの知財権を回避した独自の Dual hybridization 法を開発した。Dual hybridization 法とは正常 2 倍体細胞由来のゲノム、及び被検組織由来のゲノムを同じ蛍光標識で標識し、それぞれ別々のアレイに対しハイブリダイゼーションを行い、両者の蛍光強度を比較することによりゲノムの異常を判別する方法である。高い比較精度を得るために、別の蛍光標識をした補正核酸を同時に添加し補正を行う。この方法で少スポットのミニアレイを用いて測定したところ、ハイブリダイゼーションの時間(以降、ハイブリ時間という)としては 5 時間で結果を出すことが可能となった(プロジェクト中間目標達成)。

次に、実用化形態である GD アレイを用いて評価した結果、ハイブリ時間はミニアレイでの結果より長くなり最低限 16 時間が必要であった。

この 16 時間での評価の成功率は 2 色法と比べ劣っていた。Dual hybridization 法で成功率が落ちる原因は、ハイブリダイゼーション後の蛍光が位置特異的に薄くなるというムラに起因していることがわかった。ハイブリしている蛍光標識 DNA の量が少なくなっていることが考えられたため、つまり、スポットに対して、十分な量の DNA がハイブリダイゼーションしていないことが考えられたため、ハイブリ時間を 40 時間に延ばしたところ、S/N 比が高くなりムラは改善された。

それまで、短時間化を目標に掲げていたが、実用化を重視した開発とするため、GD700 の商品化に伴い、検査用プロトコルとして耐える安定性の方を重要視して、ハイブリ時間は安定性の目標を満たす 40 時間とすることにした。

加えて、洗浄条件を最適化することで、ムラの発生をほぼ無くし、100%に近い成功率で判定できるプロトコルを確立した。

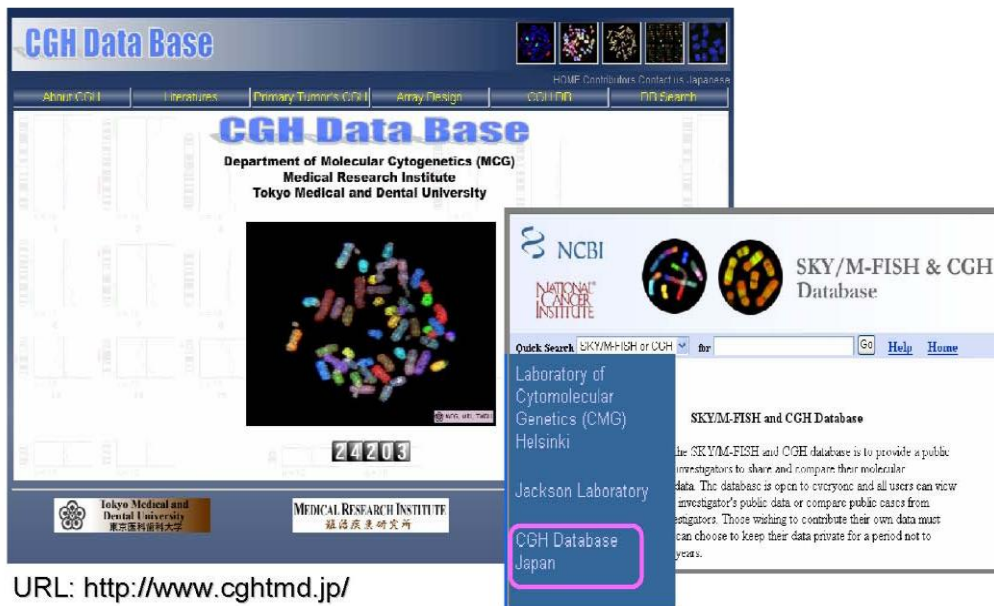
5. Cancer Array-800 (CA800)の実用化(富士フィルム株式会社、東京医科歯科大学)

CA800 は癌遺伝子、癌抑制遺伝子、細胞周期関連遺伝子、転写因子をコードする遺伝子等の領域を含む 800 種類の BAC DNA プローブを搭載したアレイである。これまで、東京医科歯科大学では肺癌、胃癌、膵癌、大腸癌等の固形癌のゲノム異常を解析し、増幅領域には癌遺伝子、細胞周期関連遺伝子、転写因子遺伝子等が含まれ、ホモ並びにヘミ欠失領域には癌抑制遺伝子が含まれる事を証明した(特許出願)。加えて、薬剤トランスポーター遺伝子及びアポトーシス抑制遺伝子等を含むゲノム領域の増幅が薬剤耐性の獲得により見出される事についても証明した(特許出願)。CA800 を用いて、これまで 18 種類の癌種の総計 355 例に関する染色体 CGH 解析結果のデータベースを構築し、2004 年 7 月 29 日に CGH データベースとして公開した(図D-14)。本データベースは「CGH database Japan」として米国 NCBI データベースからリンクが張られ国際的にも利用されている。今回、NEDO 加速予算の支援により、12 癌種の総計 369 例における CA800 および WG4500 によるアレイ CGH 解析結果のデータを追加してインターネットを通じて一般に公開した(2008 年 3

月)。本データベースは遺伝医学教科書「Color Atlas of Genetics 第3版」(Eberhard Passarge 博士著、Thieme 出版)で紹介され、また、国際的にも多くの研究者によって閲覧され、遺伝学教育の面においても貢献している。

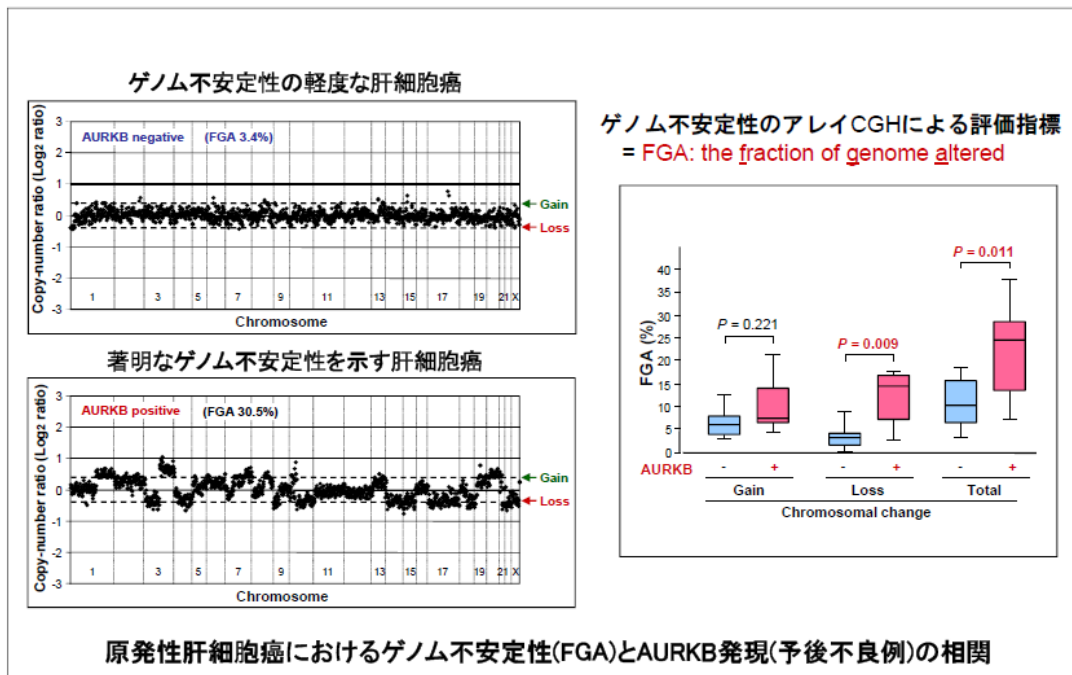
図D-14. 東京医科歯科大学で公開している CGH データベース

アレイCGHデータを充実させたCGH Data Baseは、米国NCBI databaseにおいて「CGH database Japan」として紹介され国内外の研究者に利用されている



MCG Cancer Array-800 を用いたゲノム不安定性の評価系として、コピー数異常を検出したプローブ間の距離から the fraction of genome altered (FGA)の算出を行った(図D-15)。肝臓癌の発現アレイ解析から予後不良例で発現亢進する AURKB を同定したが、AURKB は細胞分裂関連遺伝子であり、その発現異常がゲノム不安定性に関わることが予測された。このため 19 例の肝細胞癌を対象に MCG Cancer Array-800 (CA800)解析を行い、FGA を算出することで、AURKB 高発現例でのゲノム不安定性の増加を確認した (Tanaka S et al., Br J Surg 2008)

図D-15



これらの成果に基づいて、富士フイルム株式会社は CA800 の実用化を計画し、RPCI から購入した RP-11 BAC ライブラリーより 800 種類の BAC DNA を調製し無尽資源化を行い、CA800 を調製した。800 種類の BAC DNA については FISH 法及びシーケンスによる染色体座位の確認を行った。このようにして作製した CA800 を用いて、口腔癌の癌進行(ステージ、T 分類)と相関のある遺伝子群の探索をおこなうことで、口腔癌の予後予測診断を可能とするゲノム構造変化を見出すことを目的に検討した。

使用検体としては、一般的に予後が良好な進行度が低い(ステージ I・II 及び T1・T2)口腔癌 27 検体、予後が悪性で進行度が高い(ステージ III・IV 及び T3・T4)口腔癌 13 検体を用い、アレイ CGH 解析を行い得られたデータから有意差解析を実施し、癌の進行度と相関の見られるゲノム構造変化を探索した。その結果を表D-3に示す。

表D-3. ステージ I・II 及びステージ III・IV、T1・T2 及び T3・T4 の遺伝子領域での 2 群解析

Stage	z-value	p-value	FWER	FDR	cT	z-value	p-value	FWER	FDR
ABR	3.760314347	0.0001697	1.33E-01	8.19E-02	TP53	4.170775892	3.03564E-05	0.02386	0.02386
TP53	3.708678157	0.000208344	1.64E-01	8.19E-02	BIRC4BP	3.669665158	0.000242868	0.190895	0.095447
CRK	3.124358234	0.001781934	1.00E+00	4.67E-01	ABR	3.471519668	0.000517521	0.406772	0.135591
YWHAE	2.816546462	0.004854302	1.00E+00	5.11E-01	ALOX12	3.361252008	0.0007759	0.609857	0.143754
PTPN1	2.754472653	0.00587868	1.00E+00	5.11E-01	RH68621	3.278176234	0.001044801	0.821214	0.143754
BUB1	-2.721494251	0.006498752	1.00E+00	5.11E-01	FLII	3.26429734	0.001097359	0.862525	0.143754
BIRC4BP	2.714845933	0.006630661	1.00E+00	5.11E-01	ZNF287	3.106789059	0.001891313	1	0.212367
GLI2	-2.70554531	0.006819234	1.00E+00	5.11E-01	PLUNC	3.011216504	0.002602033	1	0.25565
BCL2L1	2.691063455	0.007122465	1.00E+00	5.11E-01	HIC1	2.951862178	0.003158639	1	0.275855
SS18	-2.662726258	0.007751044	1.00E+00	5.11E-01	CRK	2.777360012	0.005480244	1	0.420199
RH68621	2.657732195	0.007866838	1.00E+00	5.11E-01	RCV1	2.754363362	0.005880644	1	0.420199
ALOX12	2.655620872	0.007916256	1.00E+00	5.11E-01	RALB	-2.631590551	0.008498622	1	0.55666
FLII	2.633694967	0.008446133	1.00E+00	5.11E-01	PTPN1	2.517776432	0.011809826	1	0.677566
FAT	2.58650415	0.0096955	1.00E+00	5.44E-01	YWHAE	2.510132101	0.012068601	1	0.677566
FANCA	2.511295823	0.012028885	1.00E+00	6.30E-01	MET	-2.455654919	0.014062812	1	0.70245
GAS6	2.45727654	0.013999488	1.00E+00	6.88E-01	D17S1280	2.432820209	0.014981738	1	0.70245
HIC1	2.410996067	0.01590902	1.00E+00	7.09E-01	EPHB6	-2.427746906	0.015192941	1	0.70245
TRAF4	2.403662234	0.016231763	1.00E+00	7.09E-01	BUB1	-2.376682027	0.01746914	1	0.752328
SRI	-2.360602593	0.018245271	1.00E+00	7.54E-01	E2F1	2.30627104	0.021095492	1	0.752328
TNFAIP1	2.321743796	0.020246735	1.00E+00	7.54E-01	SERPINE5	-2.304969334	0.021168291	1	0.752328
CYP17A1	2.320902383	0.020292113	1.00E+00	7.54E-01	FANCA	2.295262364	0.021718093	1	0.752328
RALB	-2.3007018	0.021408492	1.00E+00	7.54E-01	GRP	-2.291817266	0.02191619	1	0.752328
D17S1280	2.26236236	0.023675024	1.00E+00	7.54E-01	SNRPN	-2.29011431	0.022014691	1	0.752328
THRAP1	2.251759379	0.024337482	1.00E+00	7.54E-01	SMAD2	-2.217481111	0.026590232	1	0.869715
ZMYM2	-2.245440638	0.024739859	1.00E+00	7.54E-01	SS18	-2.200434824	0.027776059	1	0.869715
TAF15	2.204264974	0.027505715	1.00E+00	7.54E-01	TFDP1	2.186634838	0.028769192	1	0.869715
ZNF287	2.204051091	0.027520751	1.00E+00	7.54E-01	APC	2.135245886	0.032740931	1	0.949771
MUC4	-2.183478644	0.02900058	1.00E+00	7.54E-01	FOLR1	-2.095556266	0.036121572	1	0.949771
SNRPN	-2.178365356	0.029378847	1.00E+00	7.54E-01	CYP17A1	2.095092332	0.036162785	1	0.949771
BIRC7	2.171281196	0.029909923	1.00E+00	7.54E-01	TEP1	2.088099539	0.036788857	1	0.949771
PLUNC	2.168475119	0.030122556	1.00E+00	7.54E-01	BCL2L1	2.080724216	0.037459156	1	0.949771
APC	2.146054983	0.031868592	1.00E+00	7.54E-01	SLC40A1	-2.034765889	0.041874435	1	0.961263
SMAD2	-2.142535232	0.032150437	1.00E+00	7.54E-01	EPHA1	-2.024368261	0.042932275	1	0.961263
TBX4	2.136825929	0.032612152	1.00E+00	7.54E-01	GAS6	2.002931594	0.045184631	1	0.961263
CYR61	-2.105637007	0.035235895	1.00E+00	7.91E-01	FAT	1.993514854	0.046205099	1	0.961263
PRIM1	2.079168761	0.037601842	1.00E+00	8.21E-01	IGF1	-1.993092461	0.046251323	1	0.961263
BRC42	2.052702913	0.040101399	1.00E+00	8.52E-01	ARID4A	1.990534993	0.046532033	1	0.961263
DNAJA3	2.037567776	0.041593177	1.00E+00	8.53E-01	EGR1	1.9890088	0.046700232	1	0.961263
AATF	2.030122316	0.042344108	1.00E+00	8.53E-01	CTGF	-1.979522843	0.04775717	1	0.961263
CD79B	2.018684458	0.043520026	1.00E+00	8.55E-01	XRCC4	1.941931829	0.052145354	1	0.961263
EGR1	1.999630727	0.045540153	1.00E+00	8.73E-01	CDKN3	1.935854729	0.052885496	1	0.961263
DMTF1	-1.945957578	0.051659836	1.00E+00	9.20E-01	PMP22	1.927752524	0.053885915	1	0.961263

表は左から、遺伝子名、Z 値、P 値、FWER、FDR。Z 値は大きいほど 2 群の差が大きく、符号が正の場合はステージ I・II / T1・T2 の群のゲノムコピー数が増幅、負の場合はゲノムコピー数欠失を意味する。

2 群解析の結果から、ステージの検討で *ABR*、*TP53* 遺伝子、T 分類の検討では *TP53*、*BIRC4BP* が FDR (False Discovery Rate) 10%以下で検出された。いずれも進行癌で有意にゲノム構造が欠失する傾向が見られた。さらに個々の遺伝子領域ではなく染色体領域としての有意差検討では、いずれも 17p13.1、17p13.3、17p11.2 領域が有意であった(表D-4)。

表D-4. ステージ I・II 及びステージ III・IV、T1・T2 及び T3・T4 の染色体領域での 2 群解析

Stage	P-values	Bonferroni	BH		cT	P-values	Bonferroni	BH
17p13.3	6.4693E-08	2.88533E-05	2.89E-05		17p13.1	1.8467E-10	8.23607E-08	8.24E-08
17p13.1	1.1277E-06	0.000502954	0.000251		17p11.2	9.9683E-08	4.44588E-05	2.22E-05
17p11.2	6.0638E-05	0.02704464	0.009015		17p13.3	2.4881E-07	0.000110968	3.7E-05
17q11.2	0.0005853	0.2610447	0.065261		2q14.2	0.00532644	1	0.593898
2q14.2	0.00143537	0.640173	0.128035		20q11.21	0.00678682	1	0.605384
20q13.13	0.00545709	1	0.364308		13q34	0.00993851	1	0.615582
7q21.12	0.00571784	1	0.364308		20q13.13	0.01040128	1	0.615582
13q34	0.00792081	1	0.412042		2q13	0.01104183	1	0.615582
17q23.3	0.00831476	1	0.412042		7q34	0.01378026	1	0.627201
4q35.2	0.0096955	1	0.432419		7q31.2	0.01406281	1	0.627201
2q13	0.01580094	1	0.559809		20q11.22	0.02109549	1	0.748757
16q24.3	0.01712251	1	0.559809		18q21.32	0.02191619	1	0.748757
20q13.33	0.01723192	1	0.559809		15q11.2	0.02201469	1	0.748757
20q11.21	0.01757249	1	0.559809		16q24.3	0.02376423	1	0.748757
16p13.3	0.0213321	1	0.609817		12q15	0.02518242	1	0.748757
10q24.32	0.0263357	1	0.609817		5q22.22	0.03274093	1	0.862635
12q13.3	0.0273368	1	0.609817		11q13.4	0.03612157	1	0.862635
13q12.11	0.02801705	1	0.609817		18q11.2	0.0365874	1	0.862635
3q29	0.02900058	1	0.609817		18q21.33	0.03674902	1	0.862635
18q11.2	0.02931342	1	0.609817		16p13.3	0.04376169	1	0.961325
15q11.2	0.02937885	1	0.609817		4q35.2	0.0462051	1	0.961325
1p22.3	0.03008064	1	0.609817		6q23.2	0.04775717	1	0.961325
5q22.22	0.03186859	1	0.617974		5q14.2	0.05214535	1	0.961325
13q13.1	0.0401014	1	0.745218		14q22.2	0.0528855	1	0.961325
4q34.3	0.05310956	1	0.922354		17p12	0.05388592	1	0.961325
4q35.1	0.05446978	1	0.922354		16q23.3	0.06081108	1	0.976484

これらの結果から、口腔癌検体において癌進行度に特徴的なゲノム構造変化を見出すことができた。今回得られた遺伝子群、*ABR*、*TP53*、*BIRC4BP* 遺伝子のゲノム構造変化を口腔癌検体で検出、指標に用いることで、将来的には口腔癌の癌進行度に伴う予後予測を診断できる可能性があると考えられる。しかしながら、癌細胞に生じるゲノム構造は多様な変化(例えば、DNA メチル化、変異等)を含んでいることが近年明らかとなっているため、さらに可能な限りのゲノム構造変化の知見を集約し複合的に解析して、予後予測診断方法を確立していく必要があると考えている。

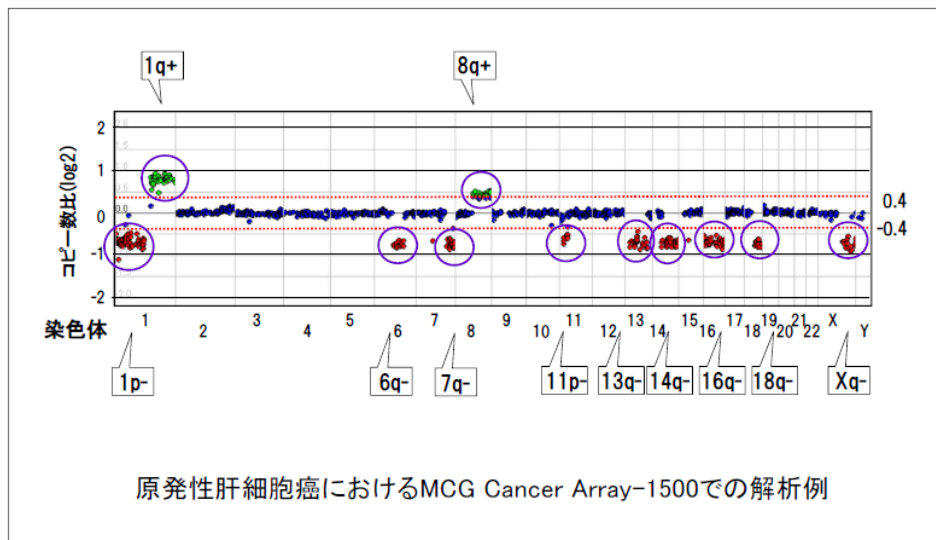
【テーマE】 Cancer Array-1500(CA1500)の作製と評価 (東京医科歯科大学、国立がん研究センター、株式会社ビー・エム・エル)

1. CA1500 の作製と評価

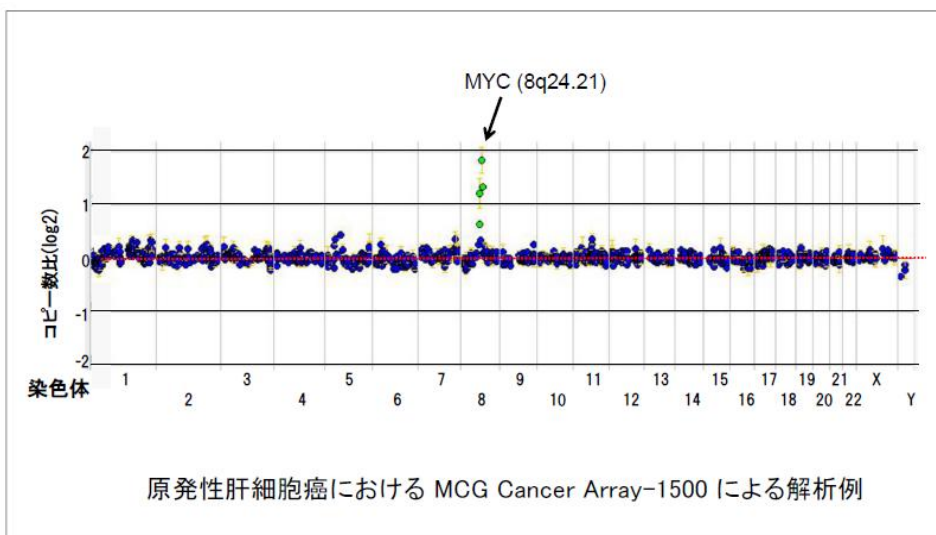
MCG Cancer Array-800 は、設計当時のヒトゲノム情報が概要版であり、染色体によって BAC クローンが配置されず、また PAC や RP11 シリーズ以外の BAC を使用するなどの欠点があったことから、その後継として、ゲノム全体をより均一にカバーする RP11 シリーズの BAC プローブで設計を行った MCG Cancer Array-1500 を開発した。

MCG Cancer Array-1500 を用いて臨床例として肝臓癌 58 例、食道扁平上皮癌 53 例、口腔扁平上皮癌 53 例、肉腫 14 例(以上、東京医科歯科大学)、腎癌 47 例、大腸癌 52 例(以上、国立がん研究センター)を解析した。肉腫に関しては、希少性疾患のため症例数の十分な収集が困難であった。肝臓の解析では、ゲノム全体に 1 コピーレベルの増幅、欠失を検出できることを確認する一方、著明な増幅は 8q13.2(*SULF1*)8q24(*MYC*)に検出できた。(図E-1、E-2、E-3)

図E-1



図E-2



食道癌では、著明な増幅は 1p34.3(MACF1、MYCL1 など)7p11.2(EGFR)、7q21.12(SRI)、8q24(MYC)、11p13(CD44、TRAF6 など)、11q13(CCND1、FGF3、FGF4 など)、11q22(YAP/BIRC2 など)、12p12.1(KRAS、SOX5)17q21.2(TBX4 など)、18p11.3(DLGAP、TGIF など)などに認めた(図E-4)。

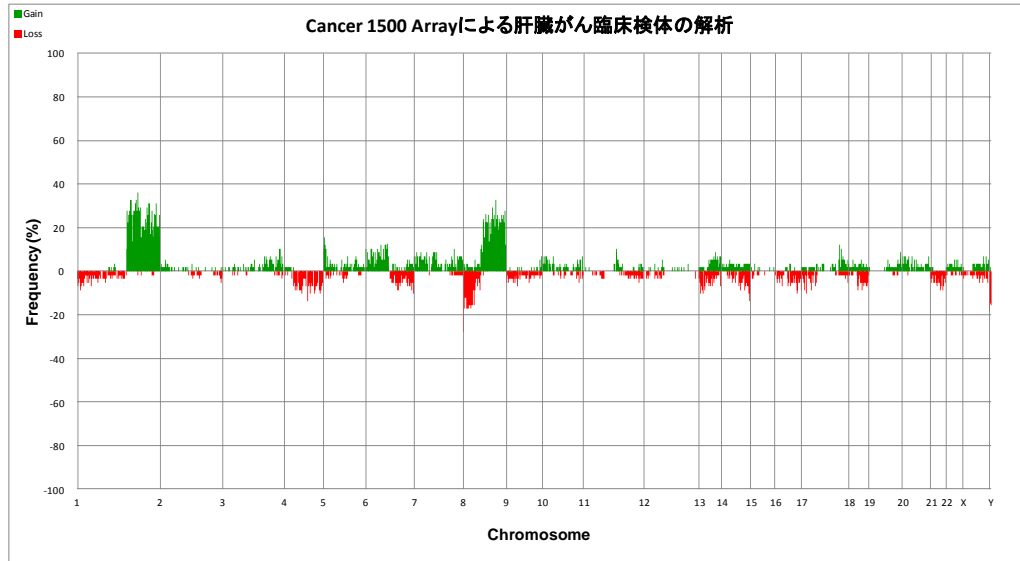
口腔癌では、著明な増幅を 11q13(CCND1、FGF3、FGF4 など)、7p11.2(EGFR)、12q15(YEATS4)などに認めた。

骨肉腫では、著明な増幅は 11p13(CD44、TRAF6 など)、11q22(YAP/BIRC2 など)、12q14.1(CDK4)、12q15(MDM2)、12q23(ELK3)など、著明な欠失は 9p21.3(CDKN2A)などに認めた(図E-5)。

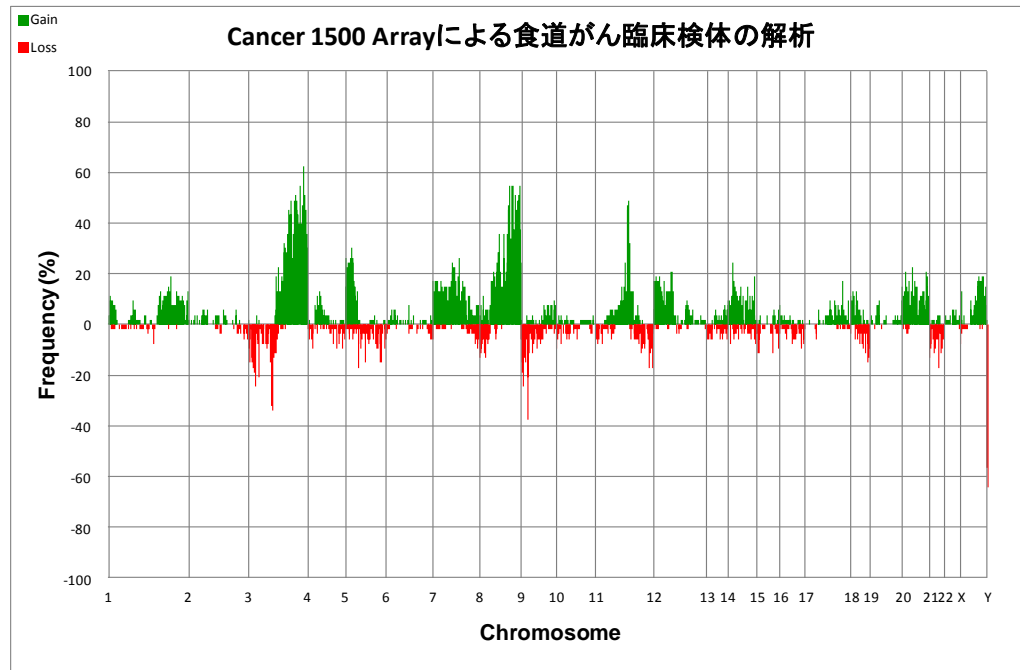
腎癌では、著名な増幅を 5p15.3(TPPP、NKD2、TERT)、7q36(CDK5)、20q13.3(NTSR1、BIRC7)などに認めた(図E-6)。

大腸癌では、著名な増幅を 3q26.2(TERC、PHC3、PKCI、SNO)、8p12(FGFR1)、8q24(MYC、PVT1 など)、17q12(ERBB2)などに認め、著名な欠失を 4q22(GRID2)、8p23(DLGAP2)などに認めた(図E-7)。

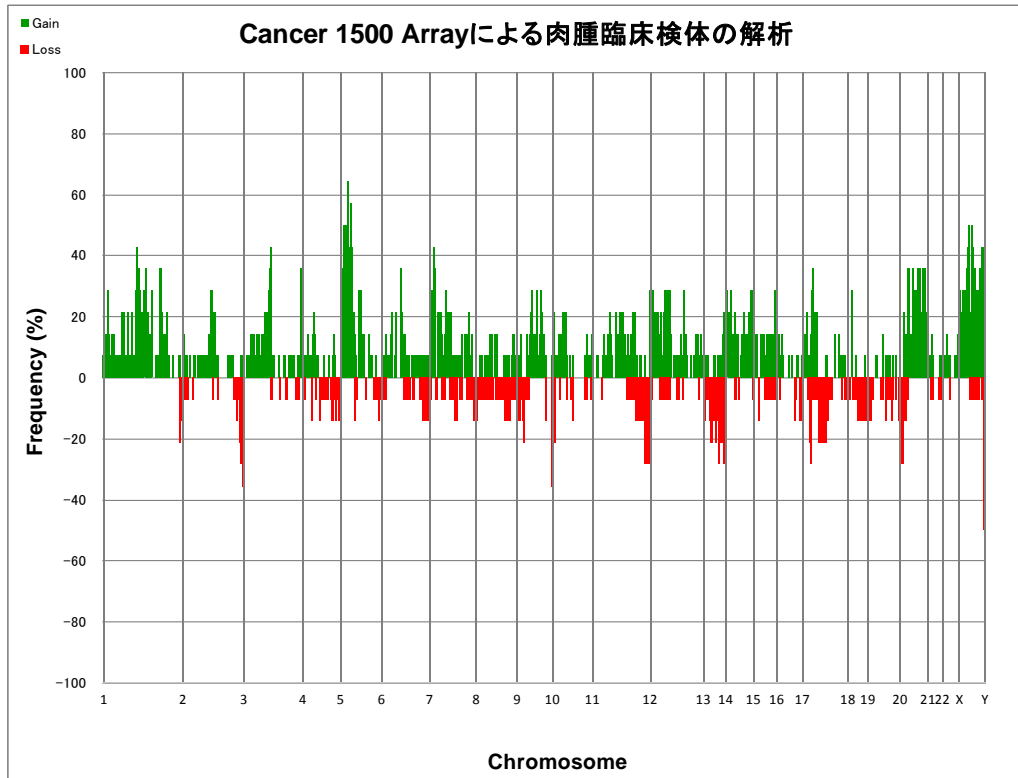
図E-3



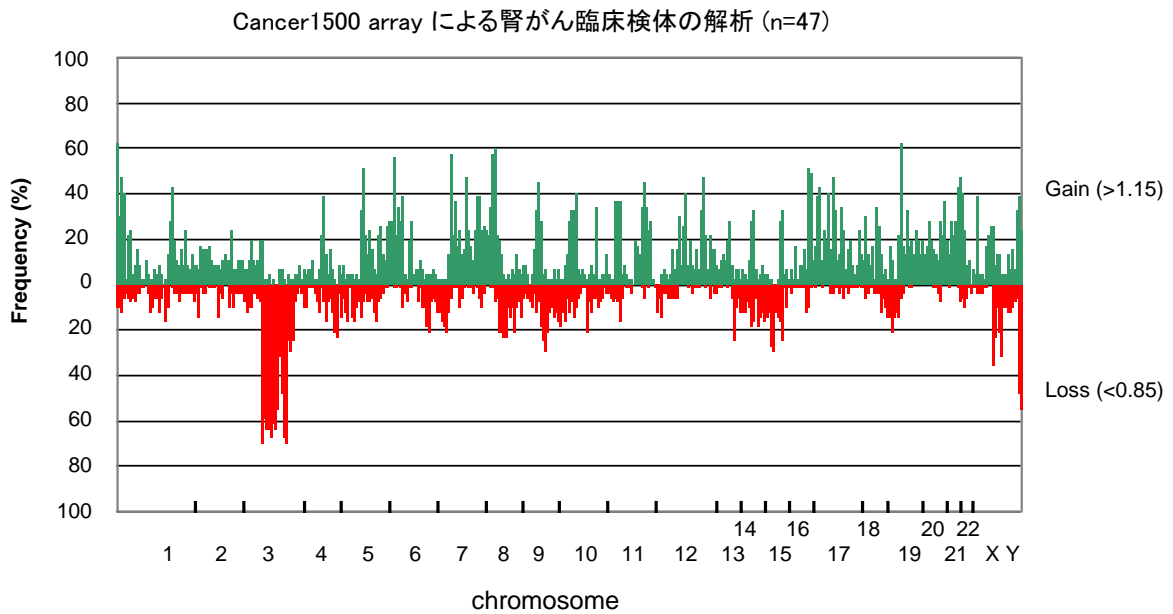
図E-4



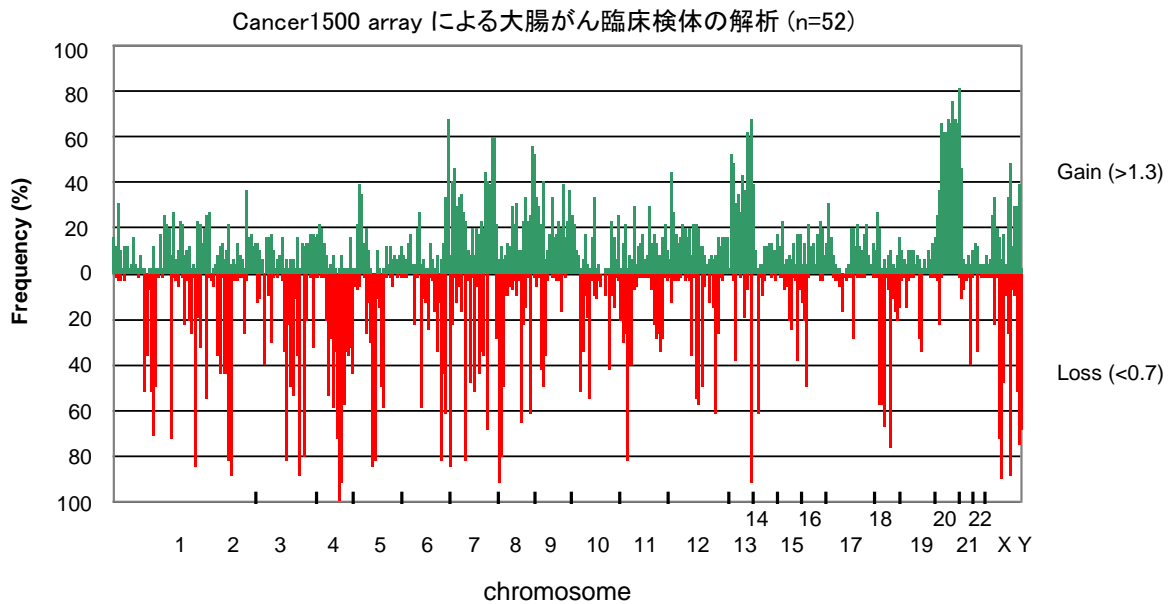
図E-5



図E-6



図E-7



2. MCG Cancer Array-Mini の作製と評価

自動化アレイCGH解析装置に対応したツールとして、より少数のコンテンツで臨床的に有用なゲノムコピー数異常情報を探索するアレイMCG Cancer Array-Mini作製とその評価を行った。

コンテンツとしてコピー数の異常(増幅ならびに欠失)を伴いエビデンスのある癌関連遺伝子を含むプローブを、Sanger Center, Cancer Gene Census (<http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/Census/amplification.shtml>)、最近の総説 (Santarius T, et al. A census of amplified and overexpressed human cancer genes. *Nat Rev Cancer* 10:59-64, 2010)と論文 (Beroukhim R et al. The landscape of somatic copy-number alteration across human cancers. *Nature* 463:899-905, 2011)、及びこれまでの稲澤研究室からの論文報告での情報をもとに、各染色体(短腕・長腕)にできるだけ均等にパターンとして全体を俯瞰できるように選択した。この作業により、搭載予定数の108種類のクローンを選択した(表E-1)。

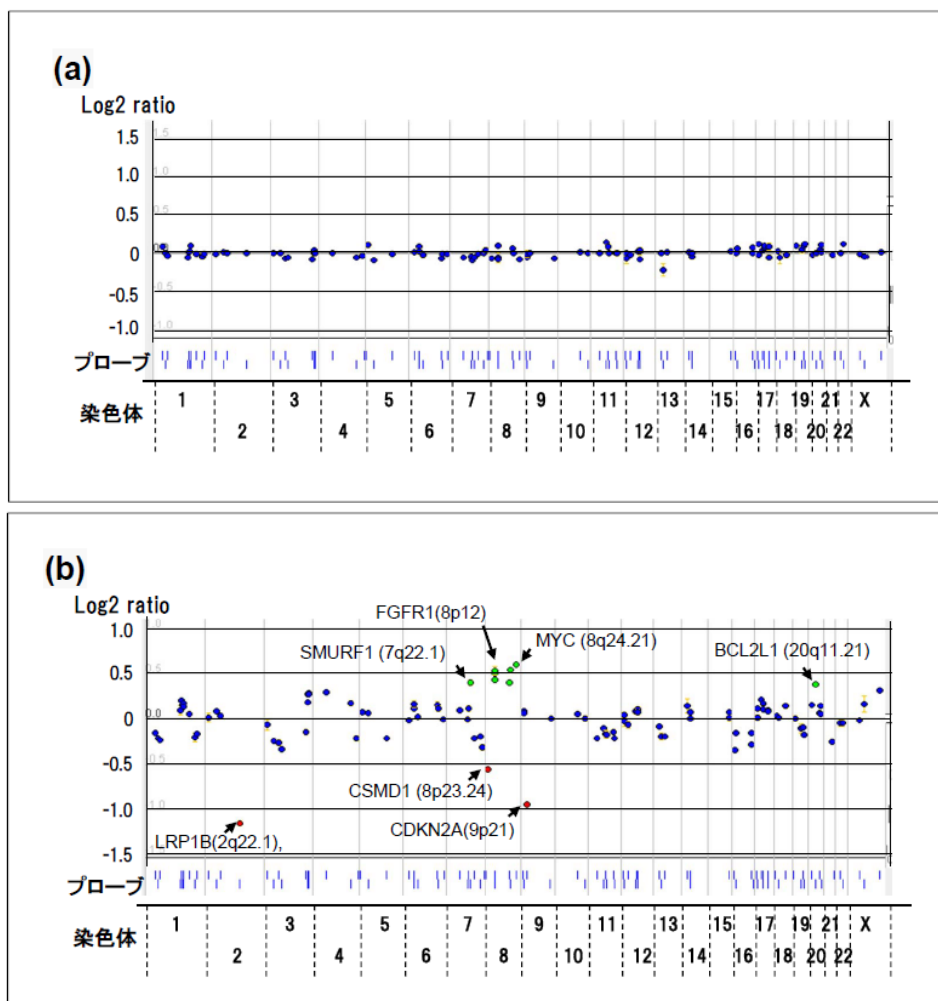
表E-1

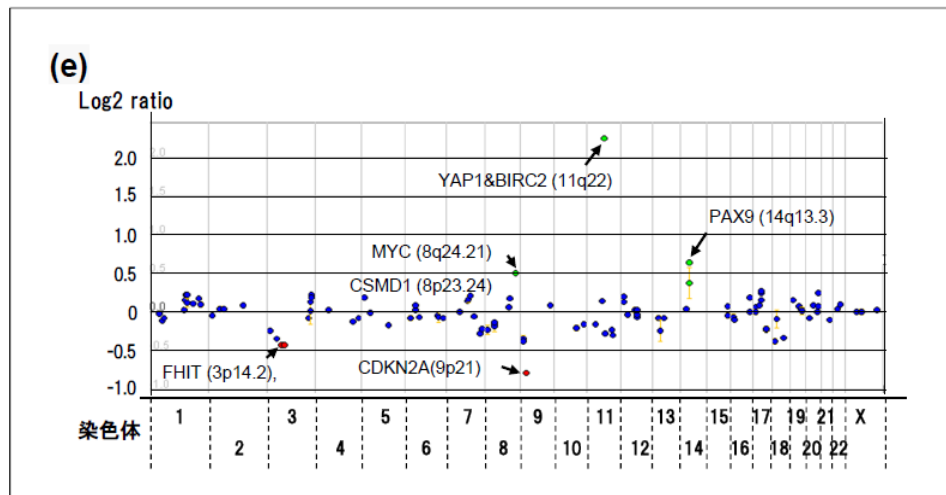
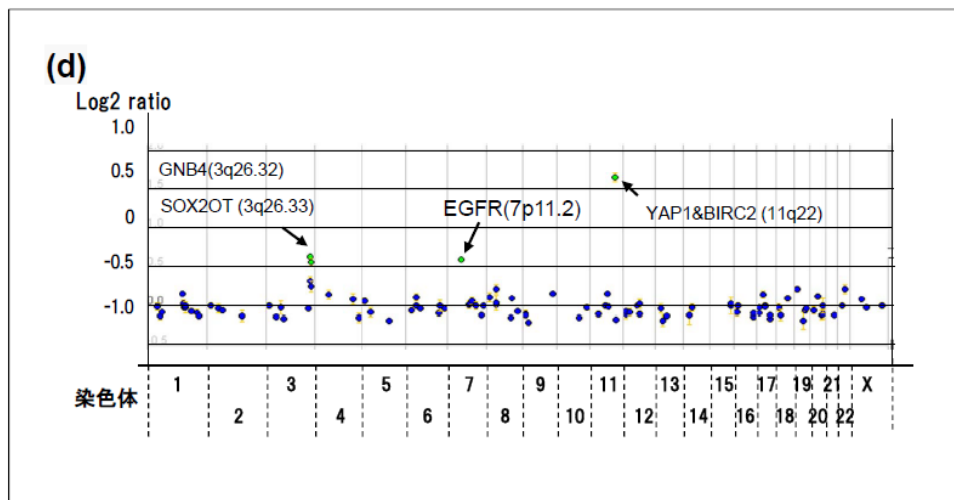
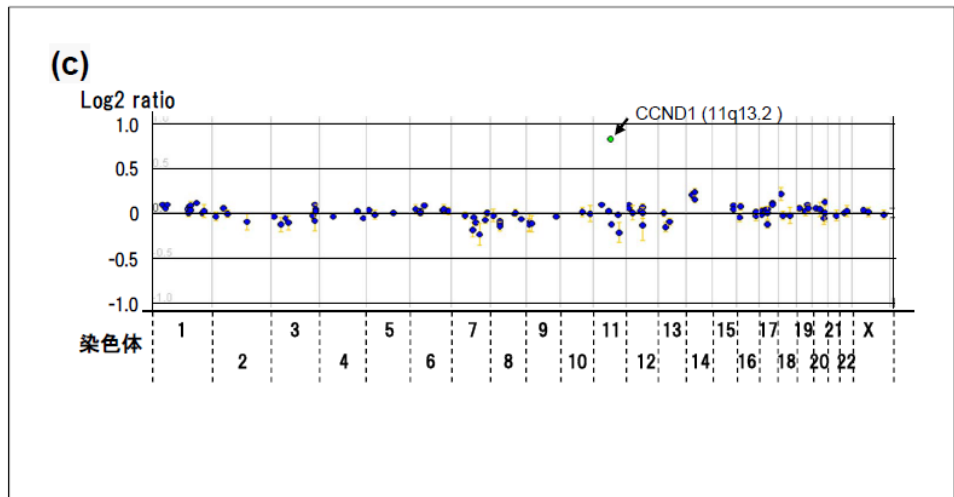
MCG Cancer Array-Mini用プローブ					
期待される異常	遺伝子	ゲノム上の座位	BAC	アレイでの番号	自験例で異常が検出された癌種
Amplification	EGFR	7p11.2	339F13	1	
Amplification	ERBB2	17q12	62N23	2	
Amplification	AR	Xq12	383C12	3	
Amplification	MYC	8q24.21	440N18	4	
Amplification	SKP2	5p13.2	36A10	5	肺小細胞癌(2/25)、肺非小細胞癌(5/25)、胆道癌(5/7)、グリオーマ(4/22)
Amplification	TERT	5p15.33	117B23	6	
Amplification	MDM2	12q15	450G15	7	
Amplification	MDM4	1q32.1	433N15	8	
Amplification	CDK4	12q14.1	571M06	9	
Amplification	CDK6	7q21.2	316P4	10	胃癌(1/31)
Amplification	CCND1	11q13.2	300I6	11	
Amplification	BIRC2	11q22.2	864G5	12	食道癌(2/43)、子宮頸癌(1/9)
Amplification	AURKA	20q13.2-13.31	158O17	13	
Amplification	NMYC	2p24.3	355H10	14	
Amplification	MYCL1	1p34.2	22I9	15	
Amplification	MET	7q31.2	95I20	16	
Amplification	EV11	3q26.2	82C9	17	食道癌(5/31)
Amplification	CACNA1E	1q25.3	209A18	18	
Deletion	ATM	11q23.3	241D13	19	
Amplification	MITF	3p14.1	215K24	20	
Amplification	E2F3	6p22.3	2F19	21	
Amplification	KRAS	12p12.1	295I5	22	
Amplification	KIT	4q12	74L18	23	
Amplification	PIK3CA	3q26.32	613F6	24	
Amplification	FGFR1	8p12	100B16	25	
Deletion	BRCA2	13q13.1	37E23	26	
Amplification	CCND2	12p13.32	74J21	27	
Amplification	PPM1D	17q23.2	105G8	28	神経芽細胞腫(23/25)、卵巣癌(Primary, gain: 8/20)
Amplification	CCNE1	19q12	345J21	29	
Amplification	WHSO1L1	8p12	265K5	30	
Amplification	BCL2L2	14q11.2	81F9	31	肺非小細胞癌(1/27)
Amplification	GATA6	18q11.2	18K7	32	
Amplification	GRB7	17q12	94L15	33	
Amplification	YWHAZ	8q22.3	343F19	34	
Amplification	PAX9	14q13.3	74D5	35	
Amplification	NKX2-1	14q13.3	76M21	36	
Amplification	REL	2p16.1	373L24	37	
Amplification	CDC6	17q21.2	46G16	38	
Amplification	NCOA3	20q13.12	456N23	39	
Amplification	EEF1A2	20q13.33	95N13	40	
Amplification	CKS1B	1q21.3	168O3	41	
Amplification	SMYD2	1q41	74E6	42	食道癌(1/43)
Amplification	DCUN1D1	3q26.33	110I20	43	
Deletion	MEN1	11q13.1	38B20	44	
Amplification	LSM1	8p12	90P5	45	
Amplification	MTDH	8q22.1	662P7	46	
Amplification	EMSY	11q13.5	269F1	47	
Amplification	JUN	1p32.1	20N11	48	
Amplification	SMURF1	7q22.1	312K17	49	膀胱癌(1/24)
Amplification	MAP3K5	6q23.3	81C4	50	
Amplification	MCL1	1q21.2	54A4	51	
Amplification	CRKL	22q11.21	505B16	52	
Amplification	HMG2	12q14.3	366L20	53	
Amplification	VEGFA	6p21.1	21M9	54	
Amplification	BCL2L1	20q11.21	409	55	
Deletion	TNFAIP3	6q23.3	10J5	56	
Amplification	CCND3	6p21.1	720D9	57	大腸癌(2/11)
Amplification	PAK4	19q13.2	16G4	58	口腔癌(1/18)
Amplification	GASCI(JMJD2C)	9p24.1	148B14	59	食道癌(5/29)
Amplification	CD44	11p13	30D23	60	胃癌(4/25)
Amplification	IQGAP1	15q26.1	154B12	61	胃癌(2/25)
Amplification	IGF1R	15q26.3	14G11	62	胃癌(2/25)
Amplification	TYMS	18p11.32	145B19	63	食道癌(4/29)
Amplification	SOX2	3q26.2	43F17	64	
Amplification	FGFR2	10q26.13	62L18	65	
Amplification	MUC1	1q22	145H4	66	グリオーマ(1/22)
Amplification	ABCB1	7q21.12	212B1	67	薬剤耐性
Amplification	BRAF	7q34	25N5	68	メラノーマ(gain: 21/40)
Amplification	ABCC1	16p13.11	8H13	69	薬剤耐性
Deletion	APC	5q22.2	3B10	70	
Deletion	CDKN2C	1p33	116M11	71	
Deletion	CDKN2A	9p21.3	145E5	72	
Deletion	FBXW7	4q31.3	300I24	73	
Deletion	KDM6A	Xp11.3	52K7	74	
Deletion	CSMD1	8p23.2	45M12	75	
Deletion	VHL	3p25.3	572M14	76	
Deletion	SMAD4	18q21.2	729G3	77	
Deletion	FHIT	3p14.2	152A9	78	
Deletion	NF1	17q11.2	142O6	79	
Deletion	NF2	22q12.2	55L12	80	
Deletion	RB1	13q14.2	136N2	81	
Deletion	GPC3	Xq26.2	177A8	82	
Deletion	MLH1	3p22.2	155E4	83	
Deletion	MSH2	2p21	436K12	84	
Deletion	STK11	19p13.3	50C6	85	
Deletion	PTEN	10q23.31	380G05	86	
Deletion	MAP2K4	17p12	170H18	87	
Deletion	FANCA	16q24	79A1	88	
Deletion	FAT1	4q35.2	182A9	89	
Deletion	PARK2	6q26	148P13	90	
Deletion	PTPRD	9p24.1-23	134K1	91	
Deletion	ETV6	12p13.2	44P20	92	
Deletion	A2BP1	16p13.3-13.2	358L10	93	
Deletion	MACROD2	20p12.1	116H23	94	
Deletion	LRP1B	2q22	45N24	95	食道癌(6/43)、口腔癌(1/18)
Deletion	WWOX	16q23.1	116D9	96	
Deletion	LATS2	13q12.11	23H13	97	
Deletion	TP53	17p13.1	89D11	98	
Deletion	DSCAM	21q22.2	183I2	99	
Deletion	DBC1	9q33.1	28O4	100	肺癌(1/27)
Amplification	AKT2	19q13.2	36B2	101	
Amplification	RPS6KB1	17q23.1	76K15	102	
Amplification	CHD1L	1q21.1	24O19	103	
Amplification	RAB23	6p12.1	14D8	104	
Amplification	YEATS4	12q15	72G19	105	
Amplification	ZNF639	3q26.32	97J8	106	
Amplification	SHH	7q36.3	69O3	107	
Amplification	RAB25	1q22	35P22	108	

株式会社ビーエムエルの作製した自動化装置によるBACクローンからのDNA抽出の後、FISHにより予測される領域に単独でハイブリダイズされることを確認した。株式会社日本ガイシにおいて、BACより抽出したDNAをガラスアレイ上にスポットすることで、108種類のクローンを搭載したMCG Cancer Array-Miniを作製した。既にMCG Cancer Array-800やMCG Whole Genome Array-4500による解析によりゲノムコピー数プロファイルを取得済みの細胞株を用いたValidationの後、食道扁平上皮癌、肝癌、口腔扁平上皮癌の臨床検体を用いた検証実験を行った。

食道扁平上皮癌臨床検体での解析例を図に示す。症例の中にはほとんど異常を検出しない例があるものの(図E-8(a))、多くの症例では増幅、欠失が検出された。特に、食道扁平上皮癌において比較的高頻度の異常が報告されるCCND1、MYC、BIRC2(cIAP1)/YAPなどの増幅やCKKN1A、FHIT、LRP1Bなどの欠失が明瞭かつ高頻度に検出され、コピー数異常の検出ツールとして有用であることが示唆された(図E-8(b)-(e))。また、プローブ数は少ないながらも、ゲノム全体に比較的均一に配置したことにより、特に内部コントロールプローブを置くことなしにコピー数異常のない領域を用いたノーマライズ(log₂ ratioで0となる基準線の決定)が容易であることも明らかになった(図E-8(a)-(e))。

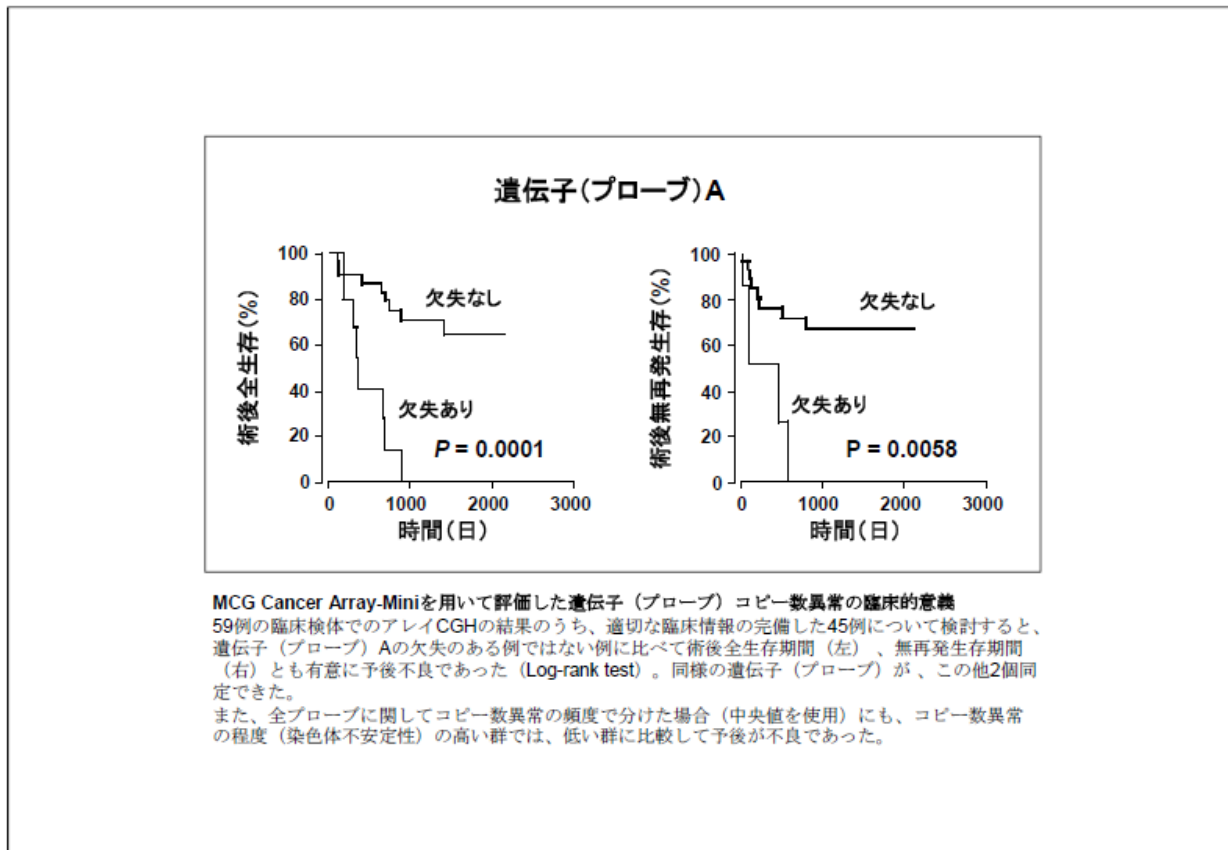
図E-8





さらに、アレイCGH解析を行った59例のうち、予後を含めた臨床情報の完備した45例の結果を用いて、各遺伝子(プローブ)それぞれならびに全プローブでのコピー数異常の有無と、食道癌の術後全生存、無再発生存期間の相関を調べると、3つの遺伝子(プローブ)のコピー数異常(図E-9)ならびに全遺伝子(プローブ)を用いた染色体不安定性の程度が予後と有意な相関を示す事が明らかになった。これら個々のプローブならびにプローブ全体で評価する染色体不安定性は、MCG Cancer Array-Miniを用いた食道扁平上皮癌の術後の予後予測に有用なコンテンツである可能性がある。

図E-9



【テーマF】 がんの染色体異常とコンテンツ開発 (東京医科歯科大学、国立がん研究センター)

※東京医科歯科大学が担当する食道扁平上皮癌、口腔扁平上皮癌、肝細胞癌、骨軟部腫瘍における癌の染色体異常とコンテンツ開発の詳細な成果は 2011 年末に公開される東京医科歯科大学の成果報告書において明らかにされる予定である。

1. 固形癌から DNA の調製とアレイ CGH 解析

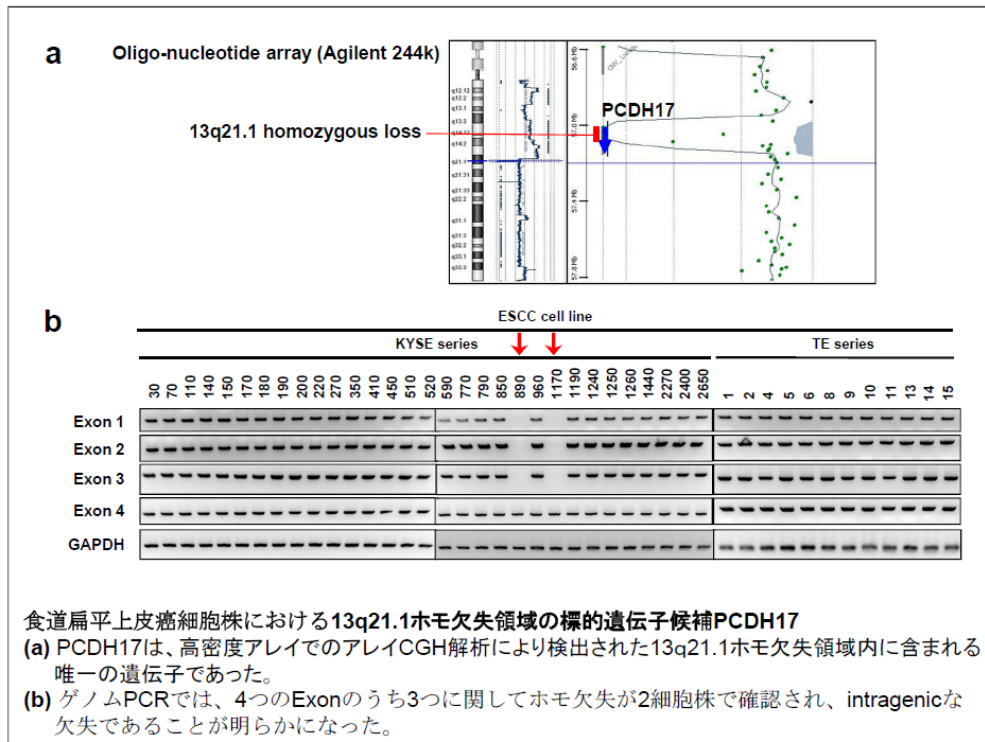
食道扁平上皮癌、腎癌、骨軟部腫瘍、大腸癌の臨床検体(各 50 例)を新たに収集し、ゲノム DNA の調製を行った。胃癌 163 例は別途収集済みのサンプルを使用した。腎癌以外は正常部位の混入を避けるために Laser Captured Microdissection (LCM)を用いて癌細胞を選択的に分離した。調製した DNA 試料を用いて WG4500 及び CA1500 アレイを用いたアレイ CGH 解析を進めた。診断マーカーとなる BAC DNA コンテンツまたは遺伝子の絞込みを行うために癌の臨床病理学的情報を収集し、臨床病理データベースの構築を進めた。

2. 食道扁平上皮癌のゲノム異常解析と診断マーカーの開発 (東京医科歯科大学)

(1) PCDH17(Protocadherin17)

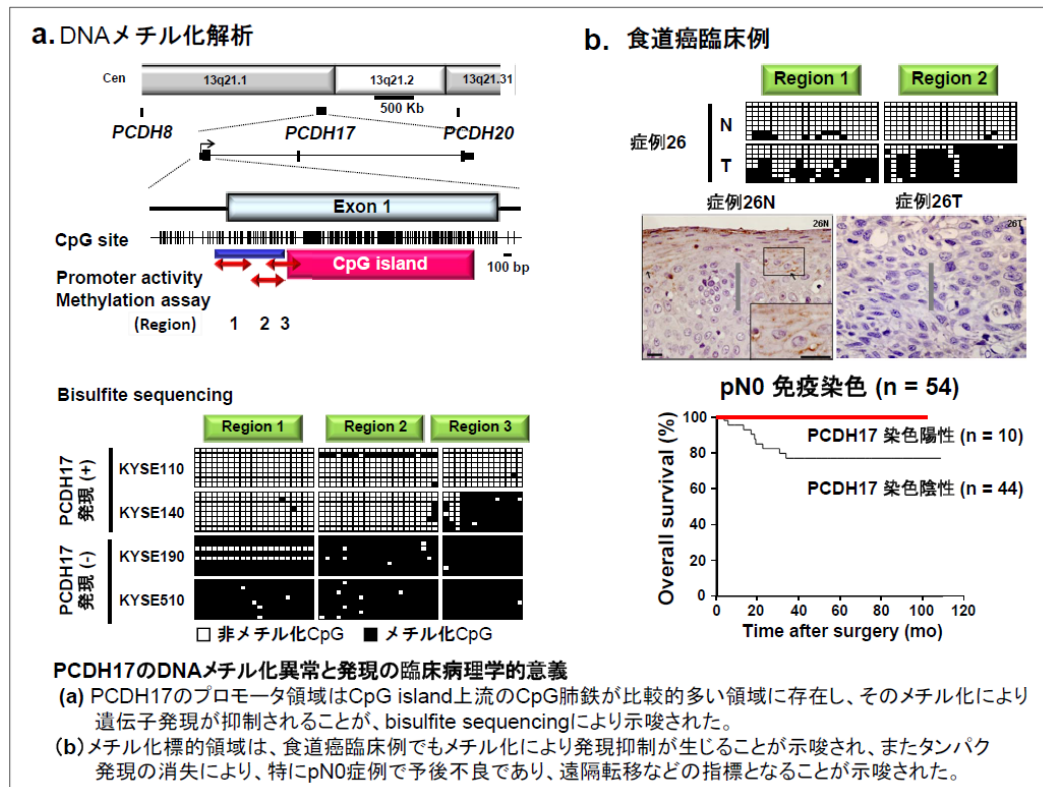
BAC アレイ(MCG Cancer Array-800、1500、ならびに Whole Genome Array-4500)を補完してより小さなゲノム構造異常検出を目的に、高密度 oligo-nucleotide アレイ(Agilent 244K)を用いたアレイ CGH により 43 種類の食道扁平上皮癌細胞株の詳細なゲノムコピー数解析を行った。その結果、2 細胞株から検出した 13q21.2 ホモ欠失領域に座位する PCDH17 が同定された(図F-1)。PCDH17 のホモ欠失は遺伝子内に局在し、本領域には PCDH17 以外の遺伝子が含まれていなかったことから、本遺伝子を標的候補として検討を行った。

図F-1



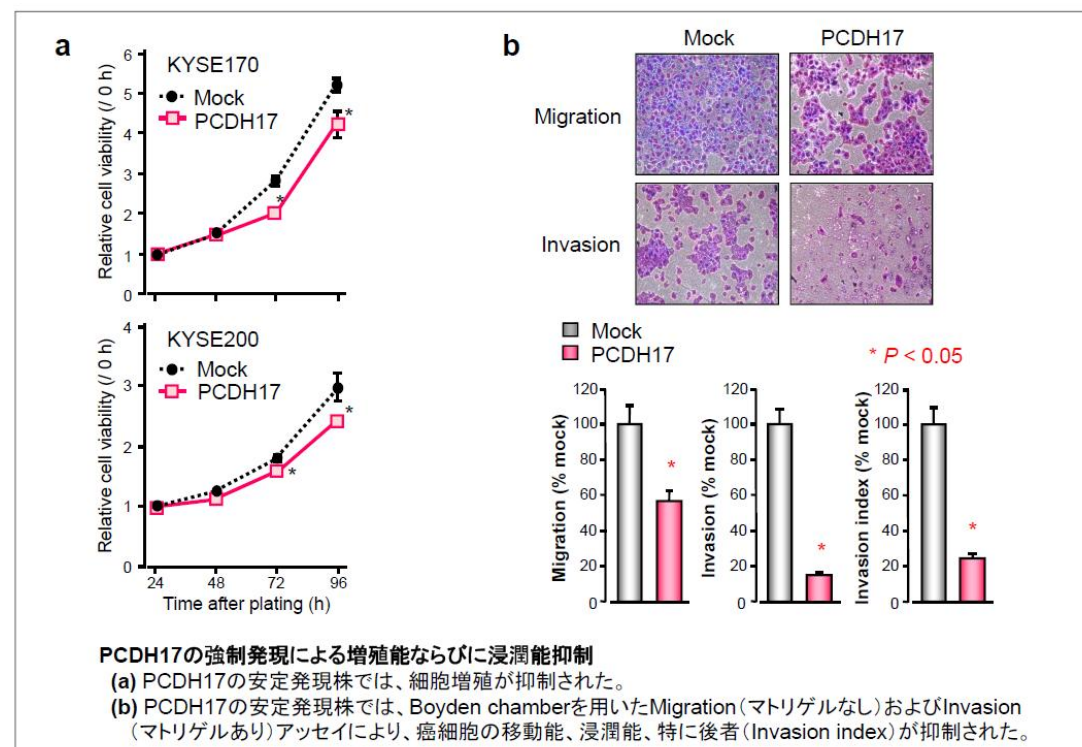
PCDH17 遺伝子発現は、ホモ欠失の有無に関わらずほとんどの細胞株で消失しており、5-aza-deoxycytidine (5-aza-dCyd)処理で回復することから DNA メチル化による遺伝子発現抑制がより高頻度に起こっていることが考えられた。実際に PCDH17 の CpG island 上流にあるプロモーター領域周囲の比較的 CpG の豊富な領域は、発現の消失していた細胞株でのメチル化されていることが確かめられ、臨床検体でも高頻度に同領域がメチル化していた(図F-2)。また、メチル化と発現は逆相関し、PCDH17 は主に DNA メチル化により発現抑制を受ける癌抑制遺伝子として働くことが示唆された。PCDH17 タンパク発現を臨床検体で検討すると、全症例での生存率は PCDH17 陰性例では陽性例に比べて不良の傾向はあるものの有意差を認めなかったが、pN0 症例に限ると PCDH17 陰性例でのみ死亡例が認められたことから潜在的リンパ節転移に関連している可能性があり、このような非進行例における予後予測のマーカーになることが示唆された。

図F-2



さらに、強制発現により食道扁平上皮癌細胞株の増殖能を抑制するのみでなく、浸潤能を抑制すること(図F-3)から、機能的にもPCDH17が新規の食道扁平上皮癌抑制遺伝子であることが明らかになった(Haruki et al., Carcinogenesis 2010)。

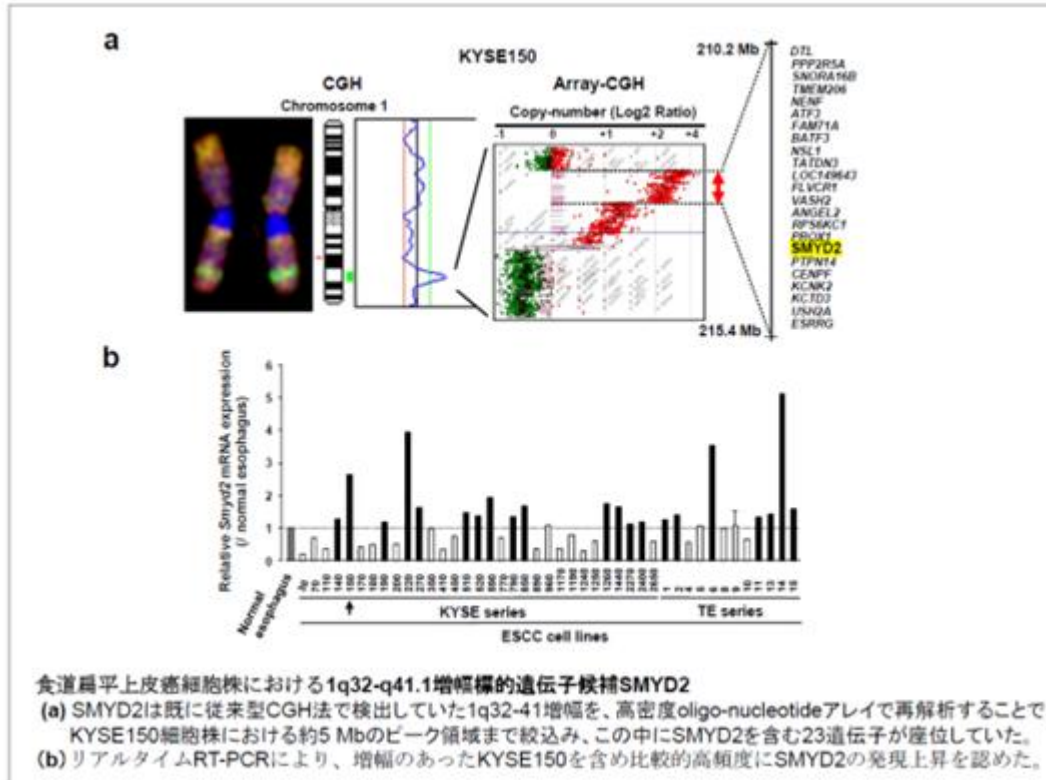
図F-3



(2) SMYD2 (SET and MYND domain-containing protein 2)

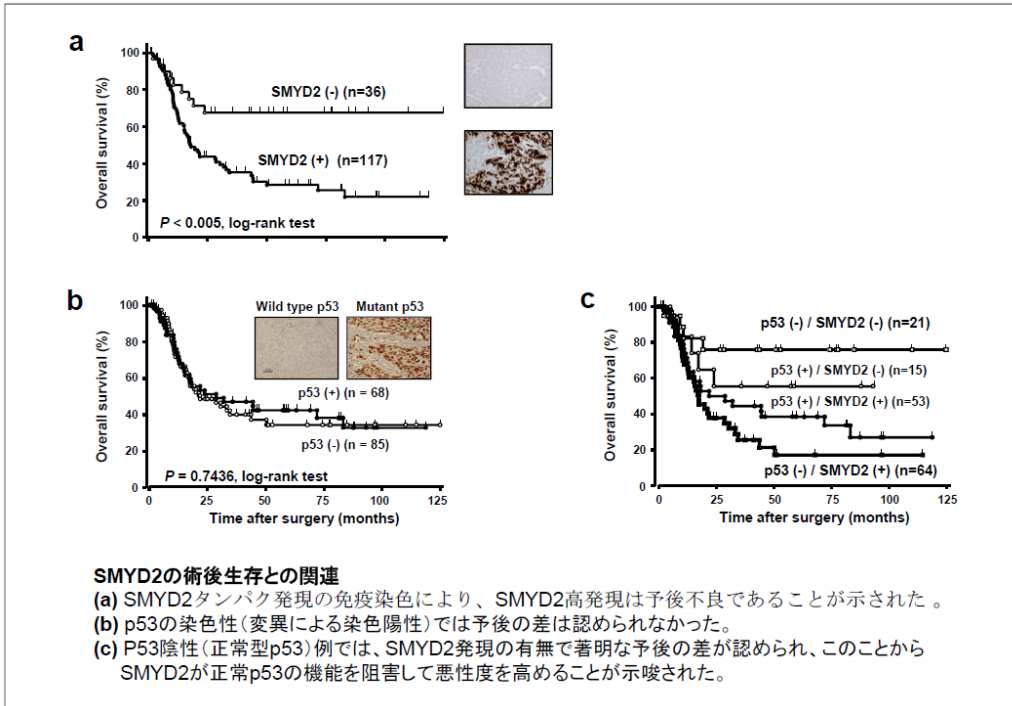
既に食道扁平上皮癌細胞株に従来型 CGH 法で検出していた 1q32-q41 増幅 (Pimkhaokham et al. Jpn. J. Cancer Res 2000) 領域の新規増幅標的遺伝子候補として、高密度 oligo-nucleotide アレイ (Agilent 244K) を用いたアレイ CGH により増幅のピーク領域を絞込み、その中で Histone H3K36 や p53K370 をメチル化し、それぞれ転写活性調節や p53 の不活性化作用を持つことが報告される SMYD2 を同定した (図F-4)。

図F-4

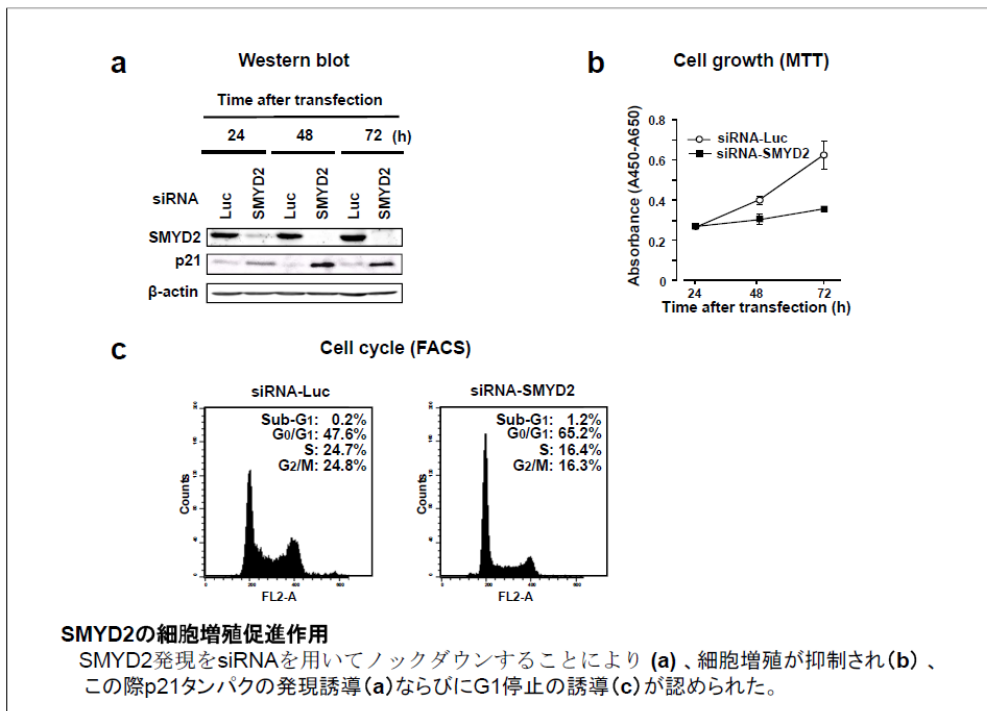


SMYD2 は、ESCC の細胞株や臨床検体で高頻度に発現亢進しており、発現亢進する症例では有意に予後不良であること、特に p53 が正常の例で予後の増悪に関与することが明らかになるとともに (図F-5)、SMYD2 発現亢進による癌細胞増殖促進活性を強制発現ならびに siRNA を用いたノックダウンの系で証明した (図F-6)。

図F-5



図F-6



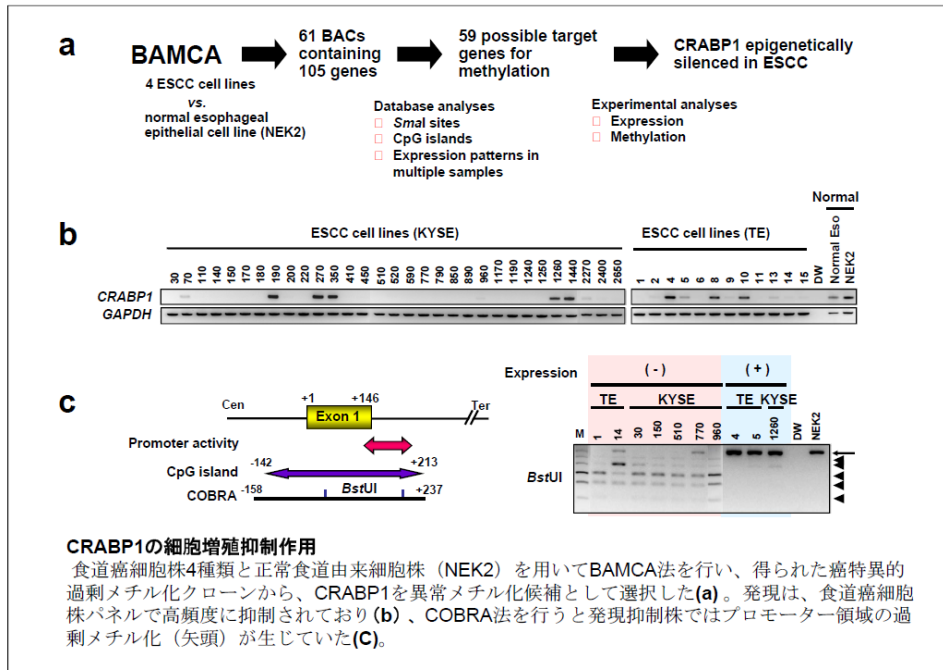
これらの結果から、SMYD2 が新規の ESCC における癌遺伝子として、診断・治療の標的になり得ることが示された(Komatsu et al., Carcinogenesis 2009)。

(3) CRABP1 (cellular retinoic acid binding protein 1)

BAC アレイを基盤に異常メチル化断片を検出する応用法として独自に開発した **BAC array-based methylated CpG island amplification (BAMCA)**法を用いて、食道扁平上皮癌細胞株 4 種類と正常食道上皮由来細胞株 (NEK2) の間でメチル化の程度の異なる DNA 断片を選択した。4 種類の細胞株全てに共通して検出されたプローブに含まれる遺伝子から、CpG island の有無、発現解析、メチル化解析などに関して検討

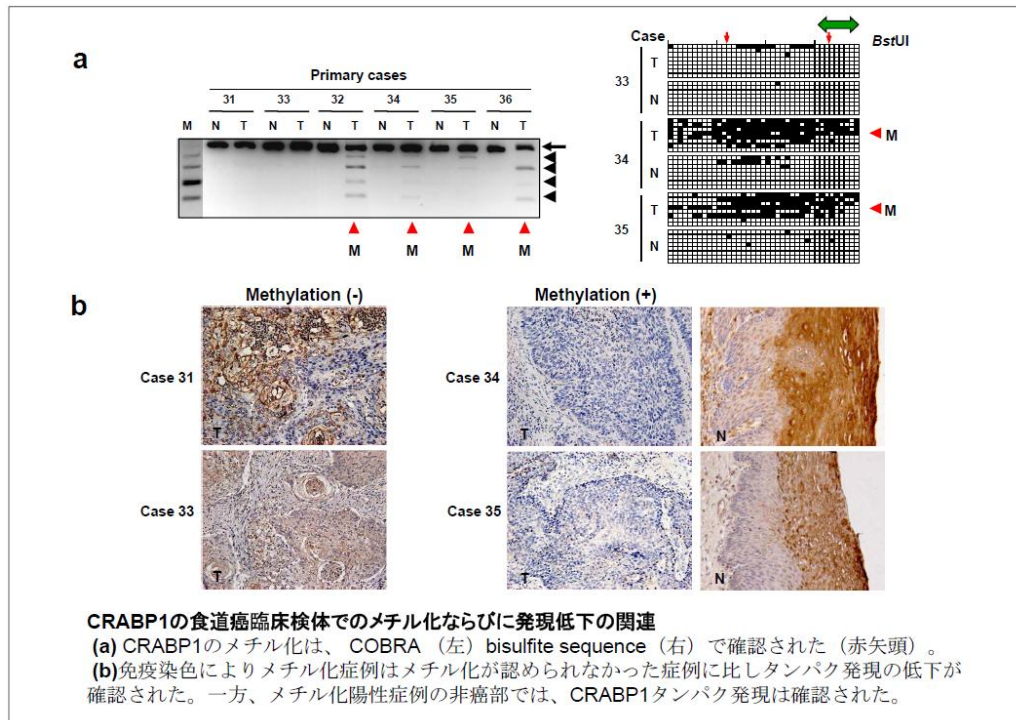
することにより、CRABP1 遺伝子を異常 DNA メチル化の標的遺伝子候補として同定した(図F-7)。

図F-7



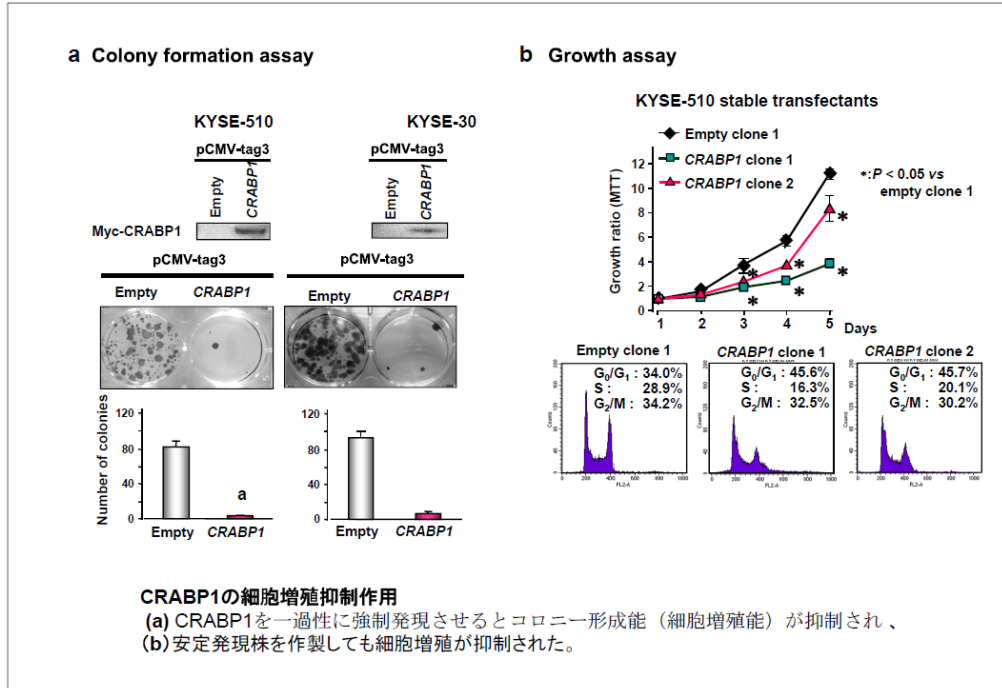
CRABP1 のプロモーター領域のメチル化は臨床検体でも認められ、高メチル化の検出された症例ではタンパク発現低下が免疫組織学的に認められた。さらに、CRABP1 発現低下は、分化度の低い症例や遠隔リンパ節転移症例に高頻度に認められ、これらのマーカーとなる可能性がある(図F-8)。

図F-8



CRABP1 を発現消失細胞株に強制発現することで、細胞増殖抑制作用が認められることから(図F-9)、CRABP1 は新規の食道癌抑制遺伝子候補と考えられた。(Tanaka et al., Oncogene 2007)

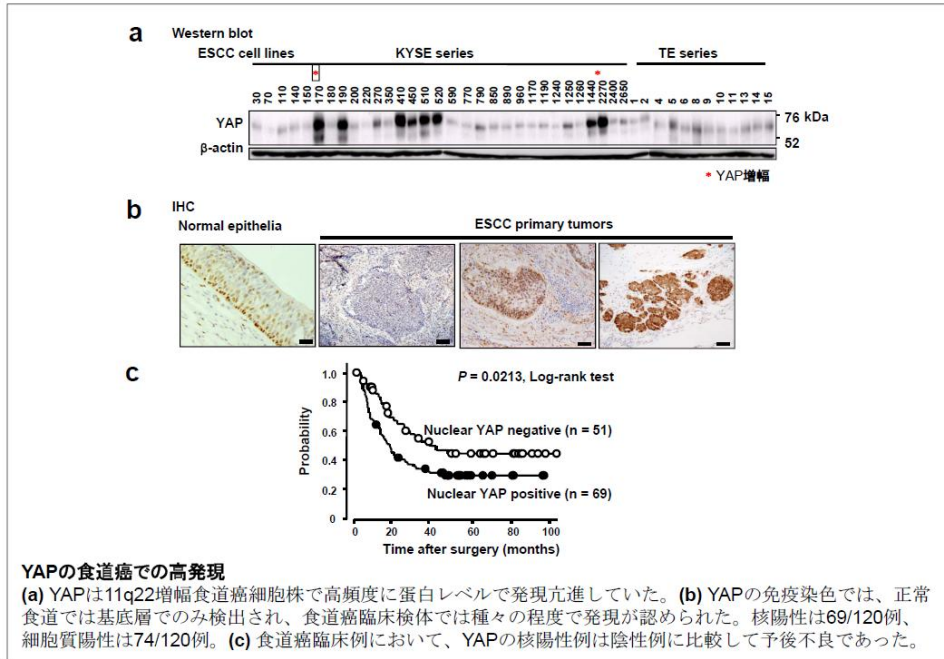
図F-9



(4) YAP1 (yes-associated protein)

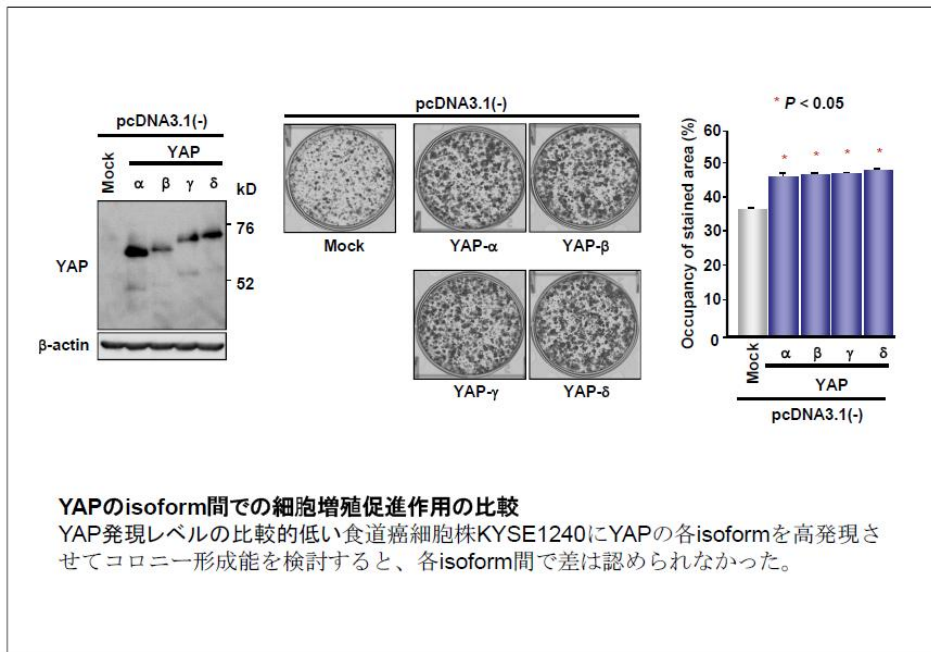
既に食道扁平上皮癌細胞株に従来型 CGH 法で検出していた 11q22 増幅 (Imoto et al., Cancer Res 2001) 領域の増幅標的遺伝子候補として BIRC2 (cIAP1) を報告していたが、近年本領域に座位する YAP1 が Hippo 経路の最下流に位置する転写共役因子であり肝癌や乳癌で癌遺伝子として働くことが報告されたことから、食道癌における癌遺伝子の可能性について検討した。YAP1 は、43 種類の食道癌細胞株のうち 2 株で増幅していたが、その他の株でもタンパクレベルでの発現亢進が確認された。タンパク発現の亢進は、食道癌臨床例においても確認され、核ならびに細胞質での発現亢進は 120 例中それぞれ、69 例 (58%)、74 例 (62%) であった。予後との関連を検討すると、核での発現亢進例で予後不良であり、多変量解析でも独立した予後因子となることが示された (図F-10)。

図F-10



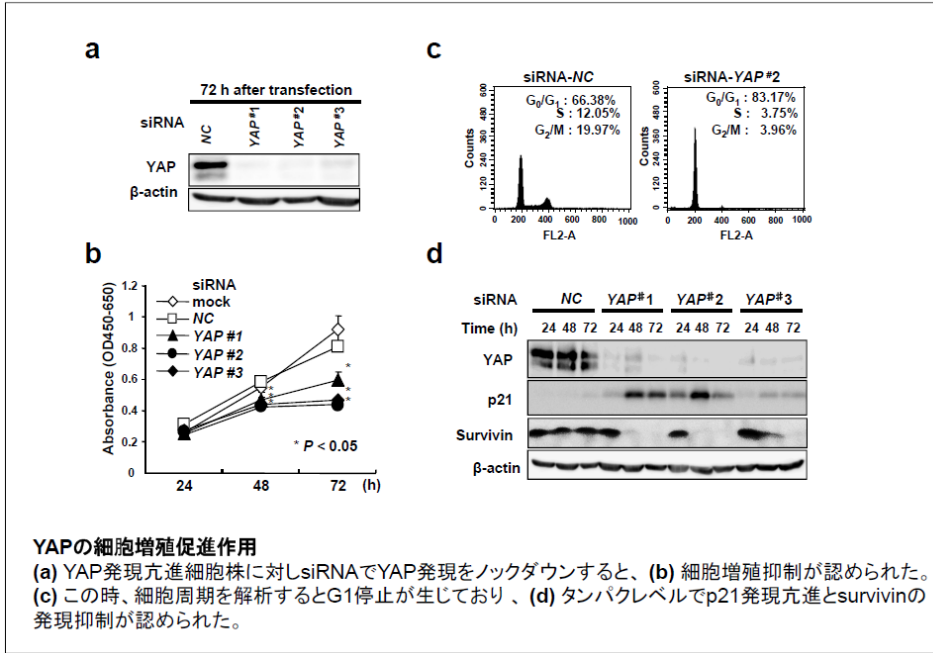
YAP1には既に2つの isoform が報告されていたが、これ以外にさらに2つの isoform を同定した。各 isoform を高発現させて検討すると、細胞増殖亢進作用は isoform 間で差は無かった(図F-11)。

図F-11

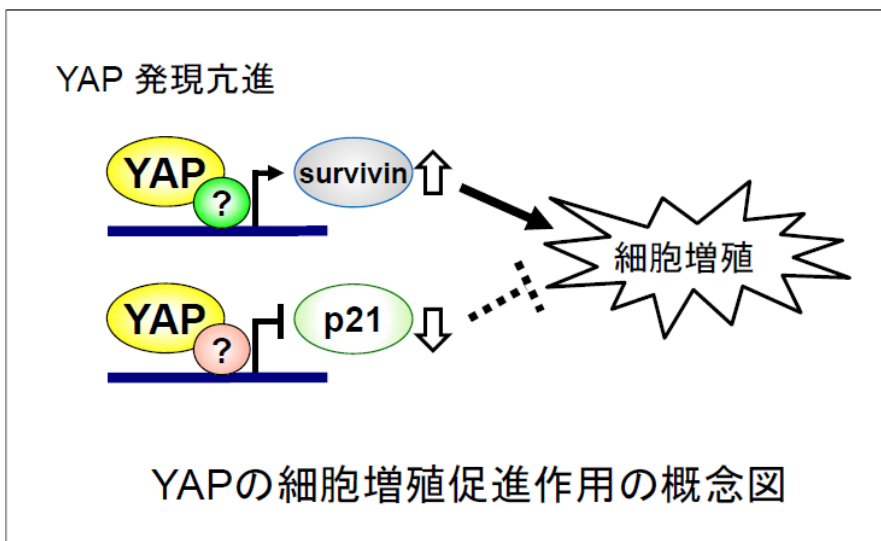


また、発現亢進株においてはYAP1の発現量に依存した細胞増殖が認められた。この際、YAP1の発現によりp21の発現低下とsurvivinの発現上昇を認めた(図F-12)ことから、転写因子に共役してこれらの遺伝子の発現を調節し、癌化に関わることが考えられた(図F-13)。これらの結果から、YAP1は食道扁平上皮癌の癌悪性化に関わる遺伝子であり、治療標的になりうることが示唆された。

図F-12

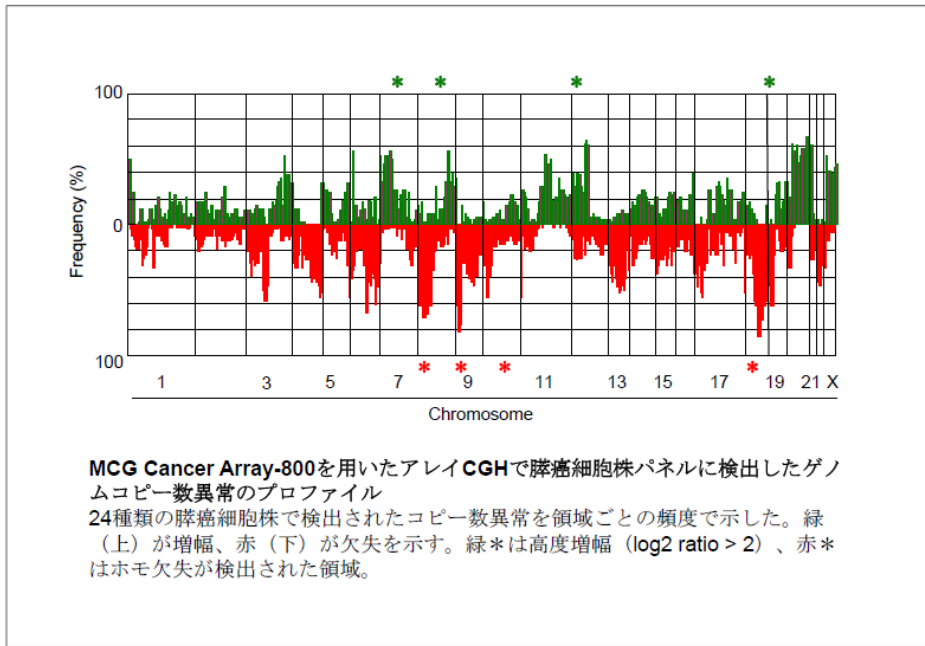


図F-13



3. 肝・胆・膵癌のゲノム異常解析と診断マーカーの開発 (東京医科歯科大学)
 膵臓癌細胞株 24 種類に関して MCG Cancer Array-800 を用いたアレイ CGH 解析によるゲノムコピー数異常解析を行った。

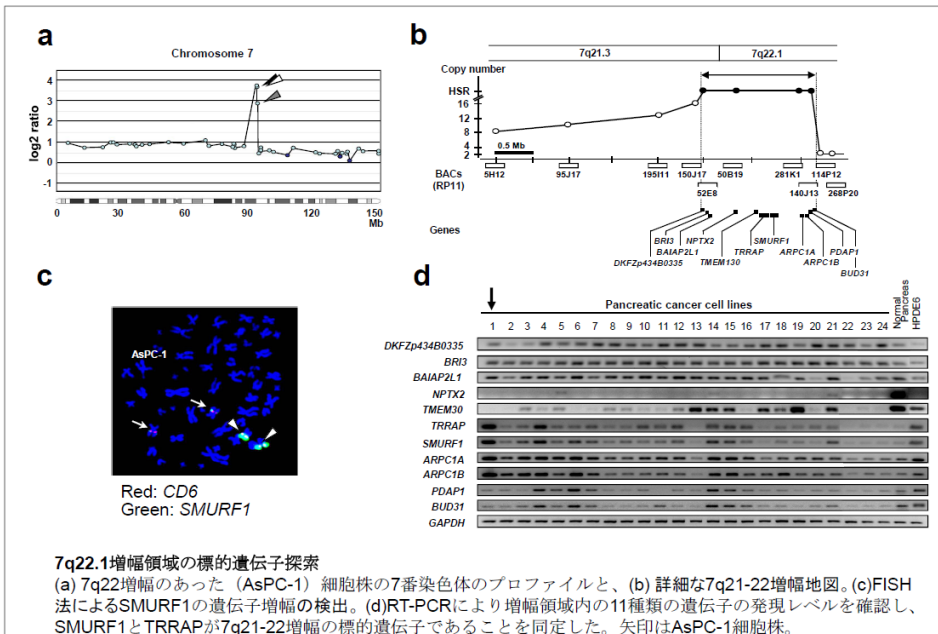
図F-14



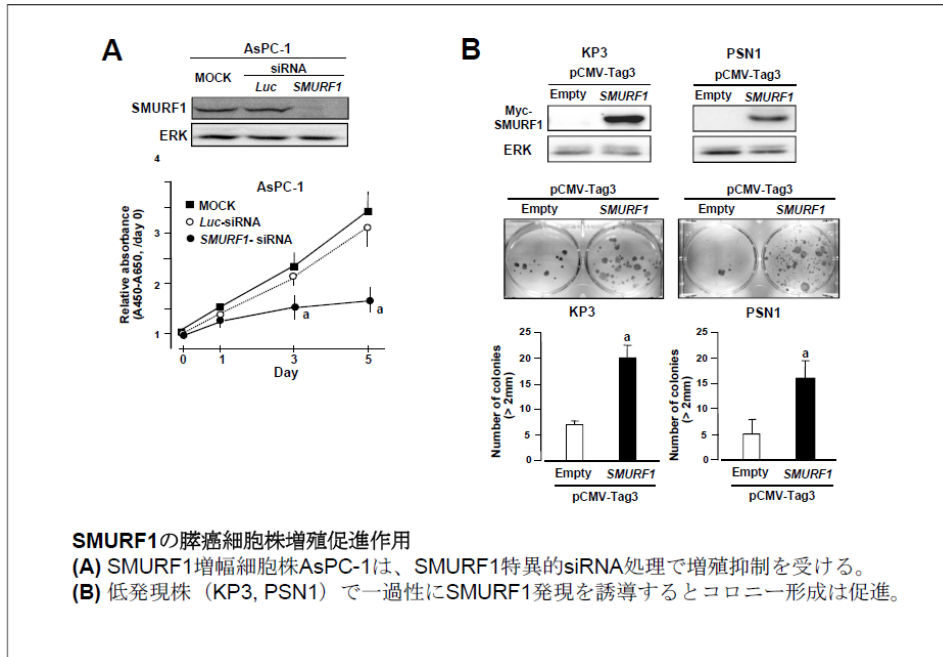
コピー数増加と欠失を各領域に認めた(図F-14)が、特に著明な増幅($\log_2 \text{ratio} > 2.0$)を4箇所(7q22.1、8q24.21、12p12.1、19q13.2)にホモ欠失を5箇所(8p22、9p21.3、9q33.1、10q22.1、18q21.2)に認めた。この中で、多くの領域について、増幅では MYC (8q24.21) KRAS (12p12.1)、AKT2 (19q13.2) が、ホモ欠失では TUSC3 (8p22) CDKN2A (9p21.3)、DEK (9q33.1)、SMAD4 (18q21.2) など既知の癌遺伝子、癌抑制遺伝子が座位していた。このため、新規増幅領域 7q22.1 に注目し、その標的として SMURF1、TRRAP を同定した(Suzuki et al., Cancer Sci 2008) (図F-15)。

SMURF1、TRRAP は、siRNA を用いてノックダウンを行うと発現量の高い増幅株や高発現株では増殖が抑制され(図F-16)、低発現株では影響を受けない発現量依存的増殖促進効果が認められた(Oncogene addiction)。発現プラスミドの作製できた SMURF1 については、低発現株を用いて遺伝子導入により一過性に発現させると、コロニー形成(細胞増殖)が促進されたことから、SMURF1 を最も確からしい増幅標的遺伝子とした。臨床検体においても SMURF1 発現が強陽性となる症例が認められたものの、予後は膵癌全体が不良で、陽性、陰性例間でその差を認めなかったが、治療標的になりうることを示唆された。

図F-15



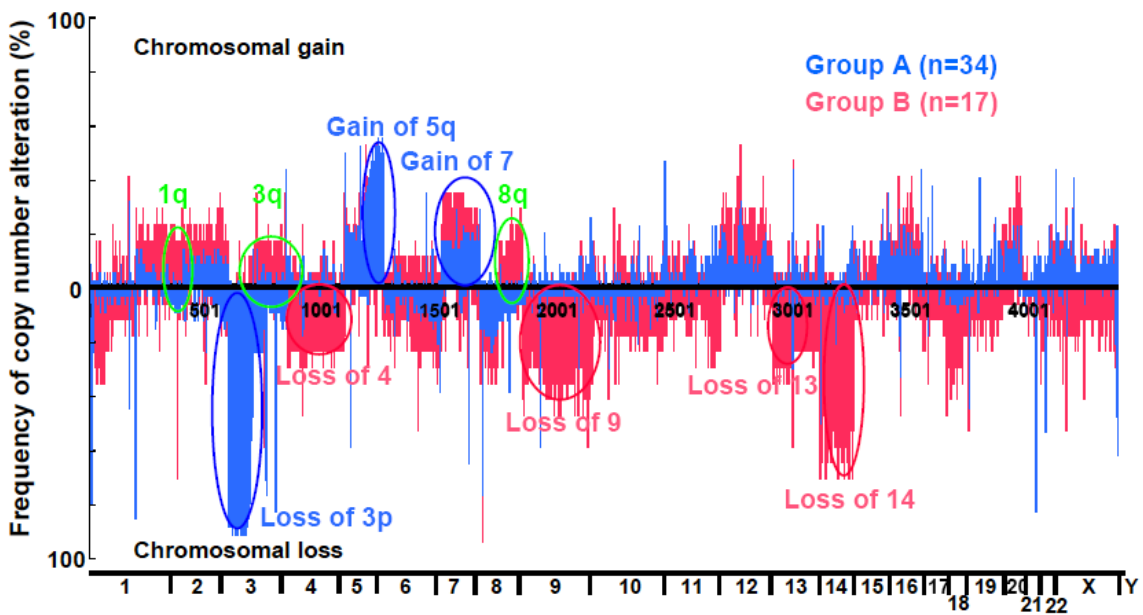
図F-16



4. 腎癌のゲノム異常解析と診断マーカーの開発 (国立がん研究センター)

通常型腎細胞癌(淡明細胞癌)は腎細胞癌の 8 割を占める主要な病型である。腫瘍結節内には間質が入り込まない髄様な癌であり腫瘍含量が高いことが期待できるため、マイクロダイセクションを行わず直接新鮮凍結標本から DNA を抽出し、PCR 増幅を行うことなくアレイ CGH 解析に使用した。WG4500 を用いた 51 症例の解析により 3p 欠失、5 番、7 番の増加、4 番、9 番、13 番、14 番欠失等の特徴的なパターンが得られた(図 F-17)。

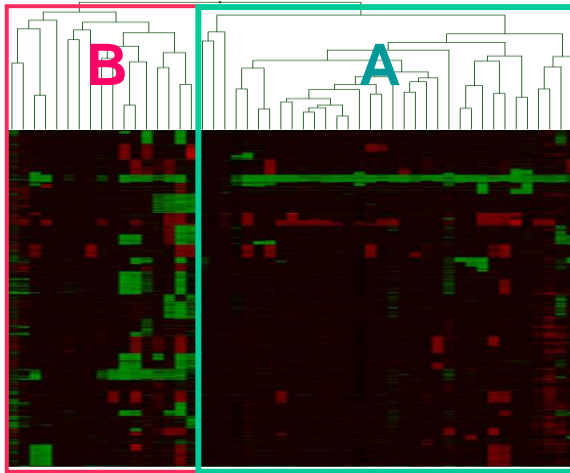
図F-17 腎癌の予後不良B群に特徴的なゲノム構造異常領域



ゲノムコピー数に基づく unsupervised の階層的クラスタリング解析により通常型腎細胞癌は A, B の 2 群に分類された(図F-18)。臨床病理学的諸因子との相関解析から、A 群には組織学的異型度が低く、静脈侵襲がなく、腎静脈本幹の腫瘍栓がなく、病期(stage) 1, 2 の症例が多く含まれるのに対し、B 群には組織学的

異型度が高く、静脈侵襲があり、腎静脈本幹の腫瘍栓があり、病期 3, 4 の症例が多かった(表F-1)。

図F-18. unsupervised 階層的クラスタリング解析による腎癌の分類

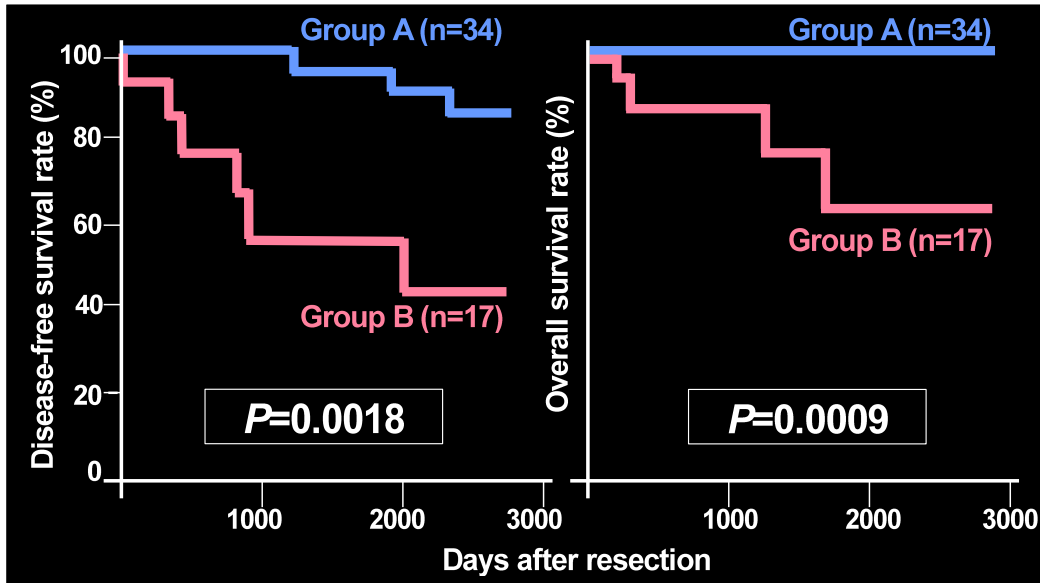


表F-1. 臨床病理学的諸因子の相関解析に基づく腎癌の分類

Clinicopathological parameters of conventional renal cell carcinomas		Hierarchical clustering based on copy number alteration		<i>P</i>
		Group A (n=34)	Group B (n=17)	
Histological grade	Grade 1	25	8	} 0.0063
	Grade 2	8	3	
	Grade 3	1	6	
Vascular invasion	Negative	30	8	0.0045
	Positive	4	9	
Renal vein thrombus	Negative	32	10	0.0064
	Positive	2	7	
Pathological stage	Stage 1 or 2	25	5	0.0066
	Stage 3 or 4	9	12	

ゲノム構造異常の蓄積している B 群はより悪性度の高い癌であり、再発率、死亡率ともに高く、明らかに予後不良であった(図F-19)。従って、通常型腎細胞癌においてはゲノム構造異常の蓄積が予後不良因子になると考えられた。

図F-19. 腎癌のゲノム異常と予後との関係



A 群におけるコピー数異常の頻度と、B 群におけるコピー数異常の頻度を比較した。3p の欠失・5q と 7 番のコピー数増加は A 群・B 群問わず通常型腎細胞癌に共通の異常である。この段階で止まると予後良好な A 群となるが、さらに 4 番・9 番・13 番・14 番などのゲノム欠失が蓄積すると予後不良な B 群になるという経路の存在が推測された。

腎癌においては組織学的な観察だけでは予後予測が難しい症例もあるため、ゲノム構造異常を指標とする判定法が有用となる可能性が高い。A、B 群間で有意にゲノム異常の出現頻度に差が出る BAC クローンを抽出した。これら BAC クローンは腎癌予後予測診断用ミニチップの候補分子として使える可能性が高い(表F-2)。

表F-2. 腎癌の予後不良B群に特徴的なゲノム構造異常領域の抽出

RP11-BAC clone	Location	Chromosomal gain			Chromosomal loss		
		Cluster A	Cluster B	P value	Cluster A	Cluster B	P value
4	1p	0 (0%)	0 (0%)		0 (0%)	5 (29%)	0.0047
135	1q	0 (0%)	4 (24%)	0.0167	2 (6%)	0 (0%)	0.7987
38	4p	0 (0%)	0 (0%)		0 (0%)	5 (29%)	0.0047
11	4q	0 (0%)	0 (0%)		0 (0%)	5 (29%)	0.0047
90	8q	0 (0%)	5 (29%)	0.0047	2 (6%)	0 (0%)	0.7987
327	9p	0 (0%)	0 (0%)		0 (0%)	7 (41%)	0.0003
65	9q	1 (3%)	0 (0%)	0.7210	0 (0%)	8 (47%)	<0.0001
158	11q	2 (6%)	0 (0%)	0.7987	0 (0%)	5 (29%)	0.0047
8	13q	0 (0%)	0 (0%)		0 (0%)	6 (35%)	0.0013
140	14q	0 (0%)	0 (0%)		0 (0%)	12 (71%)	<0.0001
89	17p	2 (6%)	0 (0%)	0.7987	0 (0%)	4 (24%)	0.0167
106	18p	1 (3%)	0 (0%)	0.7210	1 (3%)	8 (47%)	0.0005
12	18q	1 (3%)	0 (0%)	0.7210	3 (9%)	7 (41%)	0.0178
133	19q	0 (0%)	0 (0%)		0 (0%)	4 (24%)	0.0167
499	Xq	3 (9%)	1 (6%)	0.8539	0 (0%)	4 (24%)	0.0167

P value: Chi-square test

(注)BAC クローン名と Location(座位)の詳細は省略した。

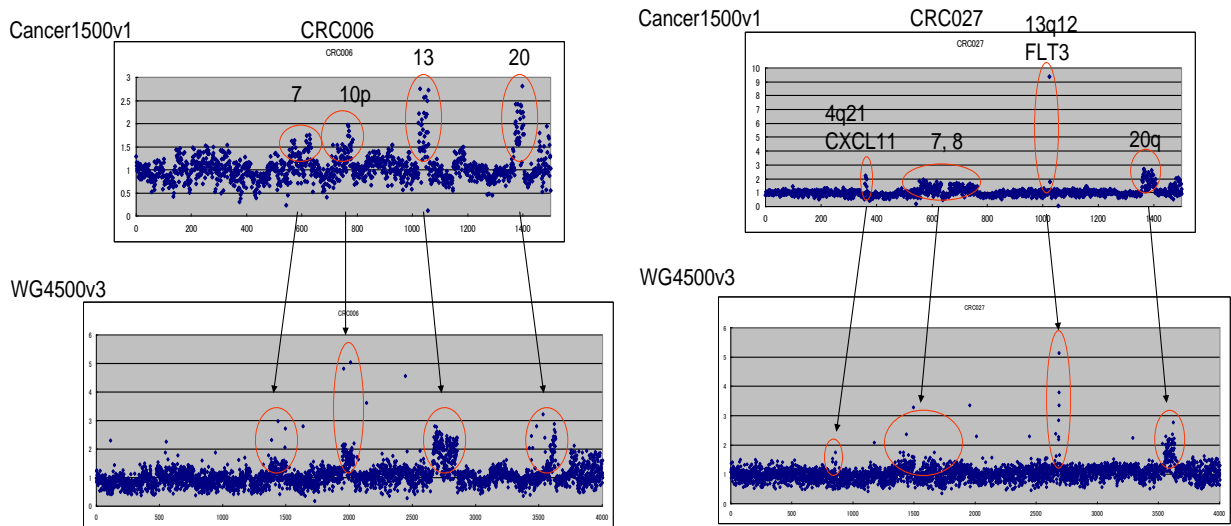
腎癌については、CA1500 を用いたアレイ CGH 解析も実施しており、全生存率、再発率と相関するゲノム異常を検出する BAC クローンや高頻度異常を検出する BAC クローンとして上記の表以外に 90BAC を選出した。

5. 大腸癌のゲノム異常解析と診断マーカーの開発（国立がん研究センター）

大腸癌 52 症例の WG4500 及び CA1500 アレイを用いたアレイ CGH 解析を行った。大腸癌は強い染色体不安定性形質を有しており、ゲノム全域に渡って高頻度のコピー数異常を示した。特に 4q・6q・18q・X の広範囲欠失が 50%以上の症例で見られた。7番・8q・9q・13q・20q の増加が 30%以上の症例で見られた。

2つのアレイデータを比較することにより確実性の高いゲノム異常を特定し(図F-20)、大腸癌における高度増幅遺伝子、ホモ欠失遺伝子候補を CA1500 アレイより抽出した。

図F-20. CA1500 アレイと WG4500 アレイによる大腸癌 52 症例のゲノム異常の解析

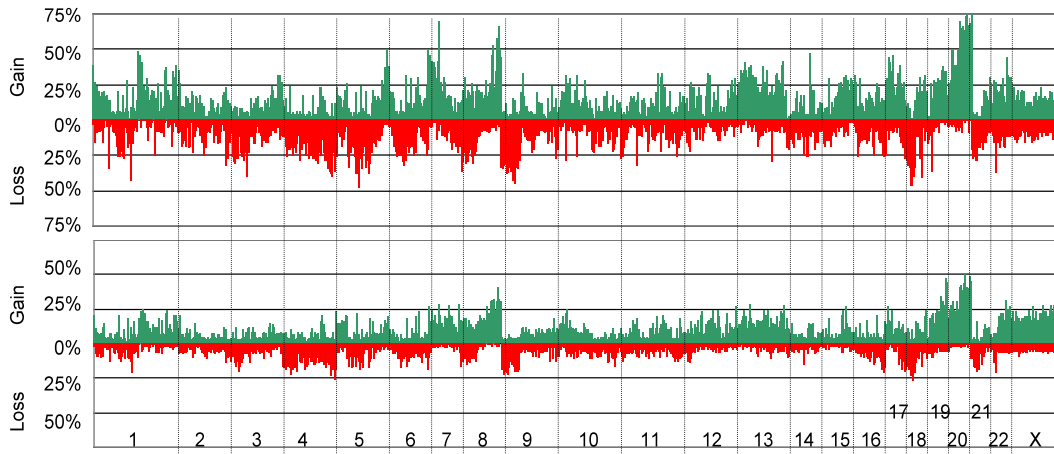


6. 胃癌のゲノム異常解析と診断マーカーの開発（国立がん研究センター、東京医科歯科大学）

分化型胃癌 79 症例、未分化型胃癌 84 症例について WG4500 を用いたアレイ CGH 解析を行った。1q・7p・8q・13q・17q・20q 増加、3p・4q・5q・9p・18q 欠失などの異常が見られ、分化型(図F-21上段)の方が未分化型(図F-21下段)よりも高頻度にコピー数異常を示した。しかしながら全体的に見れば異常を起こしているゲノム領域に大きな違いは見られなかった。

CA800 アレイ CGH データを用いてゲノムコピー数に基づく unsupervised の階層的クラスタリング解析を行ったところ、コピー数異常の少ない A 群とコピー数異常の多い B 群に分類された。コピー数異常の少ない A 群には未分化型胃癌が多く含まれ、コピー数異常の多い B 群には分化型胃癌が多く含まれた。

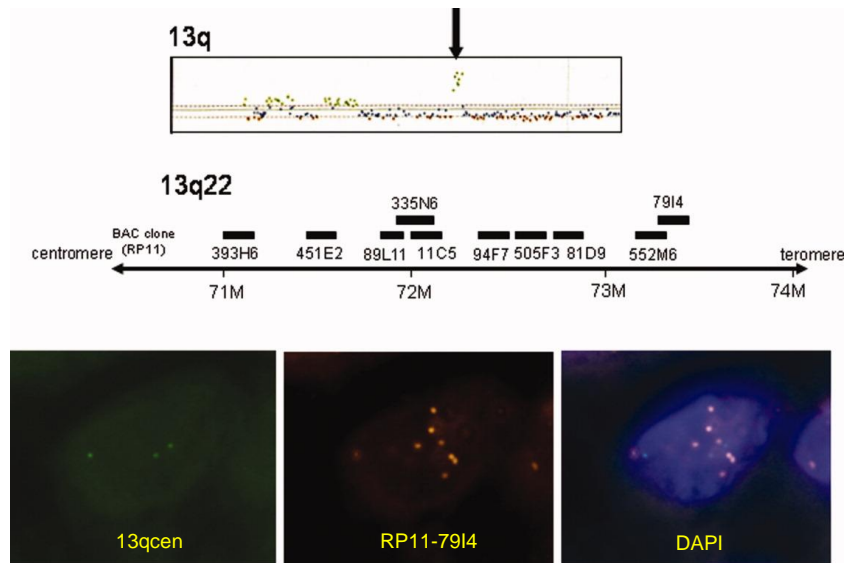
図F-21. WG4500 アレイによる胃癌 163 症例のゲノム異常の解析(上段:分化型、下段:未分化型)



(1) 未分化型胃癌の癌遺伝子 KLF12 (国立がん研究センター)

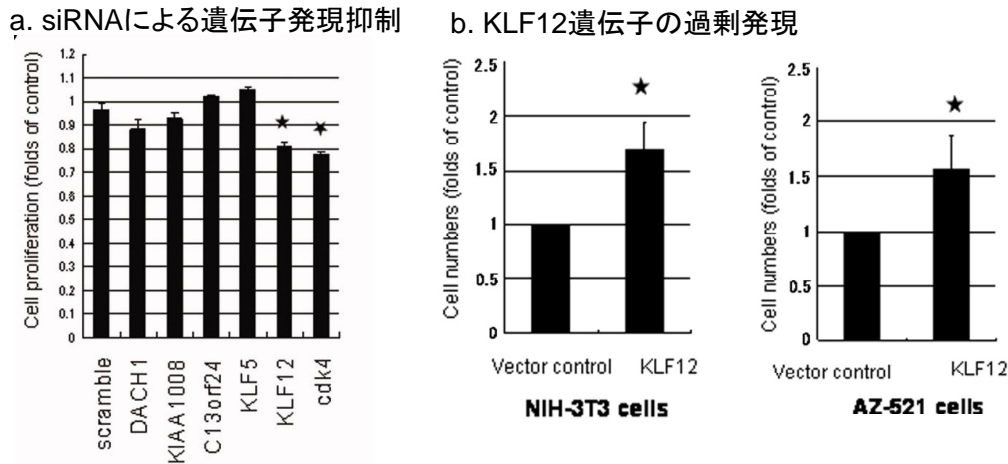
未分化型胃癌は、悪性度が高い予後不良群を含んでいる。特に予後不良であるびまん性に増殖する未分化癌に特徴的な新規ゲノム異常として、1p13・1q31・1q43・13q22・13q33・15q21・16q21・18p11・19p13・Xp11の高等度増幅を検出した(図F-22)。

図F-22. 未分化型胃癌において recurrent に検出された 13q22 染色体増幅



その中で 2 症例の高等度増幅を確認した 13q22 内の 5 遺伝子の中から、siRNA を用いた遺伝子ノックダウンにより胃癌細胞の増殖を抑制する KLF12 遺伝子を同定した。KLF12 は転写因子であり、細胞増殖や発生に関わる遺伝子の発現調節に関与していることがわかった。また、KLF12 遺伝子の発現が低い胃癌細胞または NIH3T3 細胞に KLF12 を過剰発現すると、細胞の浸潤能が活性化されることがわかった(図F-23)。さらに胃癌臨床検体においては、KLF12 高発現群は腫瘍径が 7 cm 以上の大きい未分化癌を形成する傾向が強いことがわかった($p=0.038$)。KLF12 遺伝子は未分化型胃癌の治療標的候補になると考えられる。

図F-23. KLF12 遺伝子の発現抑制は細胞増殖を抑え、過剰発現は細胞浸潤能を活性化する



(2) 未分化型胃癌におけるチロシンキナーゼ遺伝子異常 (国立がん研究センター)

重要な発癌経路と密接に関係し、治療標的としても実績のあるチロシンキナーゼ遺伝子に絞り、未分化型胃癌におけるチロシンキナーゼ遺伝子異常の探索を行った。

90 個のチロシンキナーゼ遺伝子領域のコピー数異常とキナーゼドメインのシーケンス異常を調査した。アミノ酸置換を伴う体細胞遺伝子変異を検出したチロシンキナーゼ遺伝子と、その遺伝子コピー数異常の頻度を下記の表F-3に示した。

表F-3. 未分化型胃癌におけるチロシンキナーゼ遺伝子のアミノ酸置換を伴う体細胞遺伝子変異異常とコピー数異常

TK gene	Cytogenic band	BAC clone	Amplification (%)	Gain (%)	Loss (%)	HD (%)	Sample name with amplification/HD	Sample name with nonsynonymous mutation
EPHA2	1p36	RP11-430L17	0	4.8	4.8	0		GC060
TIE1	1p34-p33	RP11-319C21	1.6	1.6	4.8	0	GC129 (amp)	GC027
ROR1	9q22	RP11-246N19	0	9.5	1.6	0		GC123
JAK1	1p32.3-p31.3	RP11-86K19	0	3.2	6.3	0		HSC39
MERTK	2q14.1	RP11-218F21	0	4.8	1.6	0		HSC58
EPHA3	3p11.2	RP11-91A15	0	3.2	11.1	0		NUGC3
EPHA6	3q11.2	RP11-449F7	0	6.3	4.8	0		HGC43
KDR	4q11-q12	RP11-89B18	0	0	14.3	0		GC047
PDGFRB	5q31-q32	RP11-128C13	0	7.9	6.3	0		GC123
EPHA7	6q16.1	RP11-346N8	0	4.8	9.5	0		GC120
EPHB6	7q33-q35	RP11-269N18	0	12.7	1.6	0		TMK-1
EPHA1	7q34	RP11-79M8	0	19.0	1.6	0		GC181
TEK	9p21	RP11-57P14	1.6	6.3	17.5	1.6	GC021 (amp); HSC58 (HD)	HSC44, HSC45
ROR2	9q22	RP11-44O3	0	9.5	3.2	0		GC060, NUGC4
LTK	15q15.1-q21.1	RP11-328J12	0	7.9	0	0		MKN45, NUGC3

CSK	15q23-q25	RP11-46C10	0	11.1	1.6	0		GC181, GC217
NTRK3	15q25	RP11-91E10	0	9.5	3.2	0		GC001, OKAJIMA
IGF1R	15q26.3	RP11-80F4	0	7.9	4.8	0		GC041
ERBB2	17q11.2-q12	RP11-87N6	1.6	36.5	3.2	0	GC120 (amp)	GC035
INSR	19p13.3-p13.2	RP11-1137G4	0	15.9	1.6	0		GC035
HCK	20q11-q12	RP11-134I8	3.2	50.8	0	0	NUGC3 (amp), GC120 (amp)	NUGC3
BTK	Xq21.33-q22	RP11-89G18	1.6	17.5	3.2	0	HSC59 (amp)	GC027

他にアミノ酸置換を伴う体細胞遺伝子変異は検出されなかったが、遺伝子コピー数異常を起こしているチロシンキナーゼ遺伝子は、高等度増幅/増加: INSR, NTRK1, PTK7, EGFR, LMTK2, MET, BLK, PTK2, ABL1, FGFR2, FLT3, FLT1, FES, TNK1, AATK, AXL, SRC, PTK6, SRMS, BMX、ホモ欠失: JAK2 であった。

NTRK3, LTK, CSK, ROR2 は recurrent 遺伝子変異を示し、また、HCK, TIE1, TEK, ERBB2, BTK は遺伝子変異と遺伝子コピー数増加を示すことから、未分化型胃癌において重要な働きを担うチロシンキナーゼであり、治療標的候補として有望であると考えられる。

(3) 分化型胃癌の癌抑制遺伝子 (国立がん研究センター)

分化型胃癌においてその遺伝子異常が予後不良と相関する遺伝子を複数個同定した。

染色体 4q13 の癌抑制遺伝子は胃癌細胞株 1 例の微小ホモ欠失領域から見出したもので、別の胃癌細胞株ではフレームシフト変異が起きていた。胃癌臨床検体においては 40%以上でヘミ欠失している。本遺伝子発現が胃癌において DNA メチル化によっても発現抑制を受けていること、また NIH3T3 細胞に本遺伝子を強制発現させると細胞増殖が抑制されることを観察した。本遺伝子の低発現は予後不良と有意に相関した ($p=0.046$)。

さらに、同じく分化型胃癌においてコピー数減少頻度が高い染色体 5q21 領域 (40%以上でヘミ欠失) から癌抑制遺伝子を同定した。これは胃癌細胞株 2 例の共通ホモ欠失領域から見出した遺伝子であり、胃癌臨床検体 2 例においてナンセンス変異とミスセンス変異を同定した。本遺伝子の発現量はゲノムコピー数とよく相関した。野生型遺伝子、C 末欠損型遺伝子 (ナンセンス変異体に相当)、ミスセンス変異型遺伝子を HEK293 細胞に過剰発現すると、野生型で最も強く細胞の増殖能が低下した。

(4) 分化型胃癌の癌遺伝子 (国立がん研究センター)

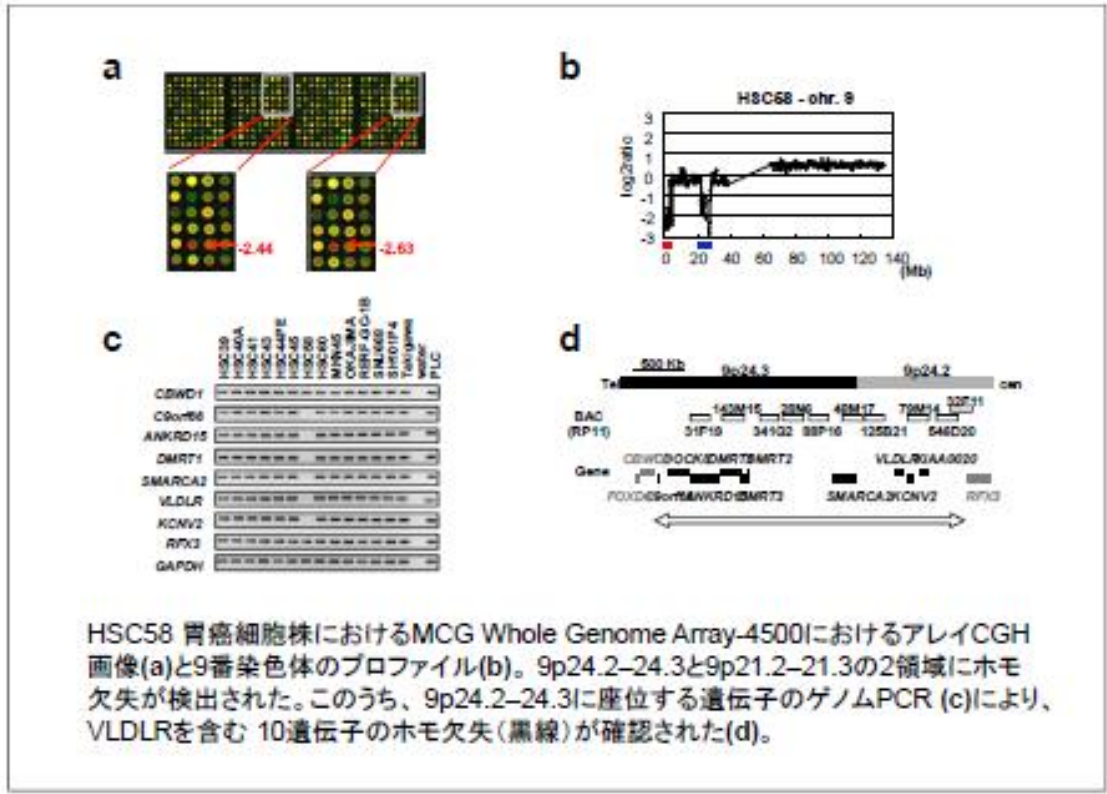
WG4500 アレイ CGH 解析によって多数の recurrent なコピー数増幅部位が検出された。ゲノム解析を行った分化型胃癌のうちの 58 症例について網羅的発現解析を実施し、遺伝子の高発現とゲノムコピー数増加がよく相関するゲノム領域を 23 ヶ所同定した。その中で、染色体 6p21 は ERBB2 遺伝子領域に次いでコピー数増幅頻度が高かった。また、6p21 領域内の4つの BAC クローンにより検出されるコピー数増加は胃癌の予後不良 (全生存率、再発率) とよく相関することがわかった。

分化型胃癌において 6p21.2-p21.1 の 8 Mb 領域にマップされる 120 遺伝子の半数が遺伝子量効果によって過剰発現していた。そのうちの 36 遺伝子が胃癌細胞株 2 株の増殖に関与していることを siRNA を用いた検定法により同定した。さらに HEK293 細胞または NIH3T3 細胞における遺伝子強制発現により 2 倍以上の細胞増殖促進能を持つ遺伝子を 6 遺伝子見出した。これら複数遺伝子が協調して細胞増殖に寄与する可能性も示唆された。またこれらをヌードマウス皮下に移植すると腫瘍を形成した。以上、主に分化型胃癌の悪性化に関連し、胃癌の増殖に関与する癌遺伝子を染色体 6p21 領域内に複数個同定した。

(5) 胃癌のバイオマーカー-VLDLR (very-low-density lipoprotein receptor) (東京医科歯科大学)

胃癌細胞株のゲノム異常を指標としてバイオマーカー探索を行った。32 種類の胃癌細胞株の Whole Genome Array-4500 を用いたアレイ CGH 解析で検出していたホモ欠失領域のうち、新規に見出した 3 Mb の 9p24.2-24.3 ホモ欠失の標的遺伝子が VLDLR であることを明らかにした (図F-24)。

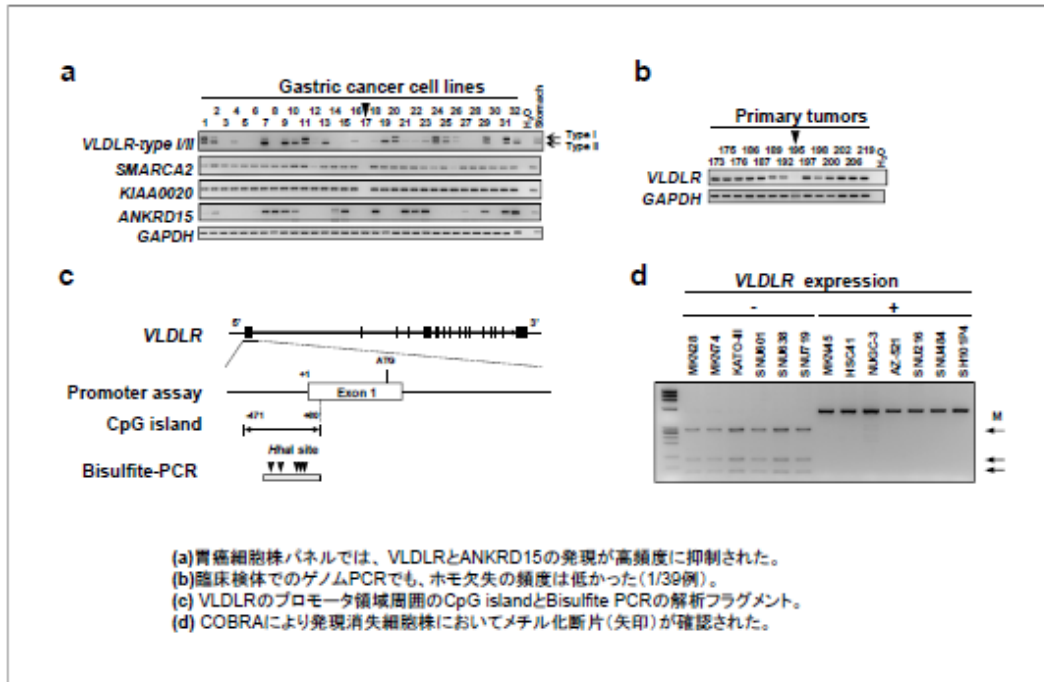
図F-24



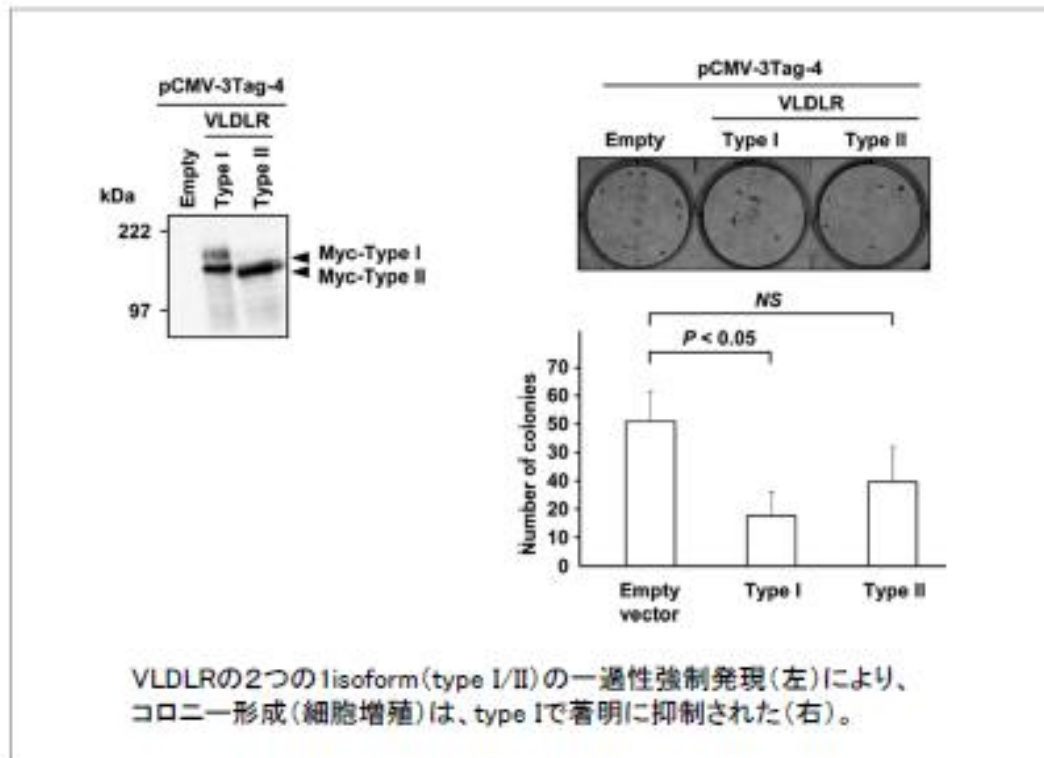
本領域内の 10 遺伝子で VLDLR と ANKRD15 が高頻度に発現が消失しており、このうち VLDLR は癌との関係が報告されていなかった。ホモ欠失は胃癌細胞株 (1/32 株)、臨床検体 (1/39 例)とも低頻度であり、DNA メチル化に注目すると、VLDLR プロモーター周囲の CpG island はメチル化が生じ、発現が高頻度に不活化されていた(図F-25)。

臨床検体においても高頻度にメチル化を検出し、また VLDLR type I を胃癌細胞株に強制発現すると増殖抑制効果を示した(図F-26)ことから、本遺伝子は胃癌抑制遺伝子候補と考えられた (Takada et al., Oncogene 2006)。

図F-25



図F-26

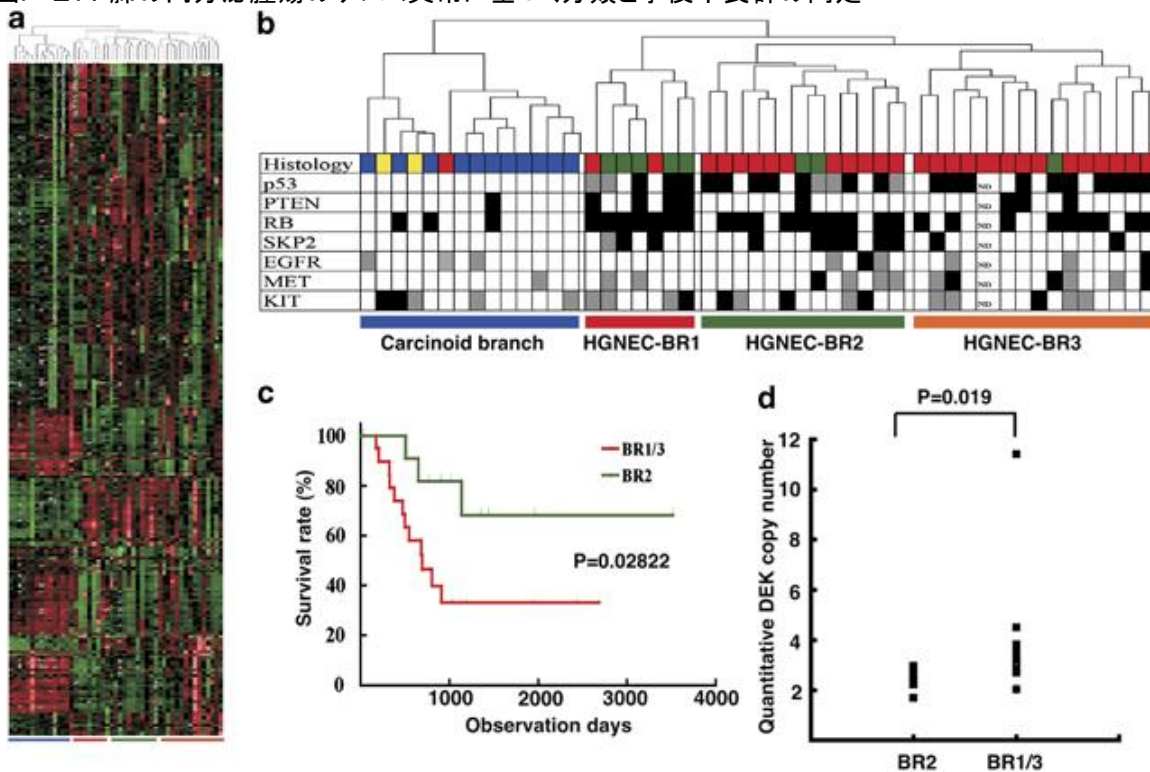


7. 肺癌のゲノム異常解析と診断マーカーの開発 (国立がん研究センター、東京医科歯科大学)

(1) 肺の神経内分泌腫瘍の予後予測マーカー-DEK 癌遺伝子 (国立がん研究センター)

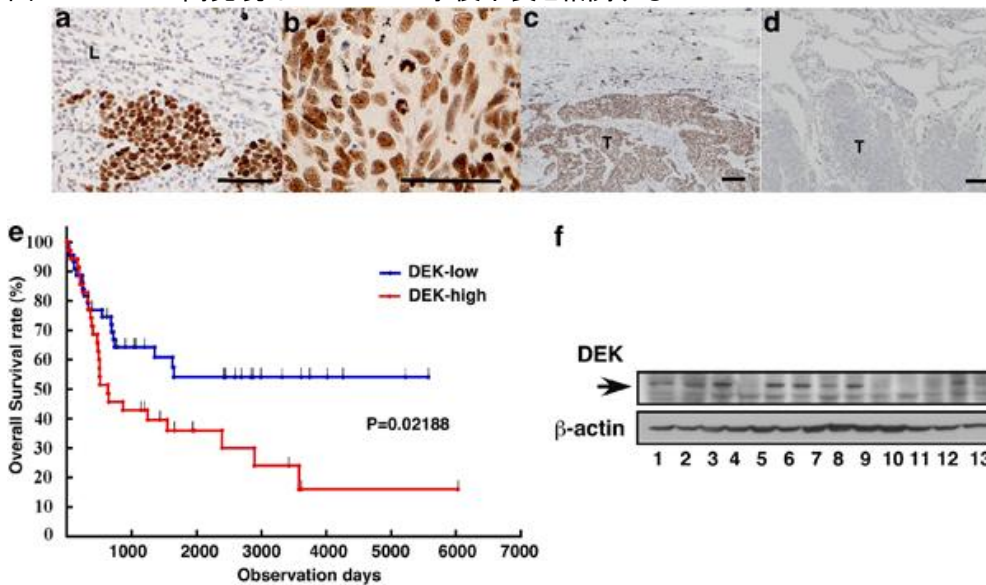
肺癌の組織学的サブタイプ分類において、大細胞神経内分泌腫瘍(LCNEC)と小細胞癌(SCLC)はよく似た組織学的特徴と臨床的挙動を示すことから高グレード内分泌腫瘍(HGNEC)として同一分類化される。CA800 アレイを用いた肺の内分泌腫瘍のゲノム解析から HGNEC は3つの群に分かれるが、それらは予後良好群(BR2)と予後不良群(BR1, BR3)に分かれることが明らかになった。また、それらを区別するゲノム異常として、染色体 6p22.3 DEK 遺伝子領域のコピー数増加を同定した(図F-27)。

図F-27. 肺の内分泌腫瘍のゲノム異常に基づく分類と予後不良群の同定



HGNEC における DEK 癌遺伝子の過剰発現を免疫組織染色法により分類し、DEK 高発現 HGNEC が予後不良であることを確認した(図F-28)。

図F-28. DEK 高発現は HGNEC の予後不良と相関する



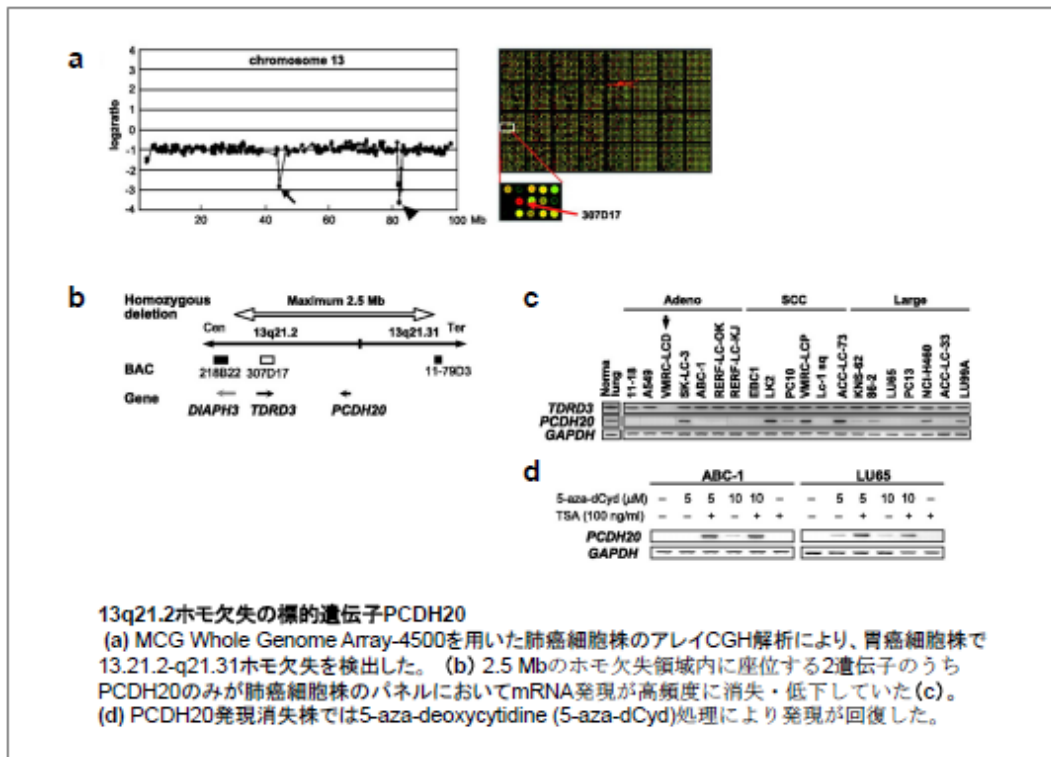
DEK 癌遺伝子の機能解析として、siRNA を用いた DEK ノックダウンにより肺小細胞癌細胞株の *in vitro* コロニー形成能、*in vivo* 腫瘍形成能、化学療法剤抵抗性がそれぞれ抑制されることを証明した。また DEK により多くの転写調節因子の発現、特に癌幹細胞としての性質を維持するために働くことが知られる遺伝子群の発現が制御されていることを明らかにした。

(2) 肺癌の予後予測バイオマーカー PCDH20 (東京医科歯科大学)

肺癌細胞株のゲノム異常を指標としてバイオマーカー探索を行った。WG4500 を用いて NSCLC の 20 細胞

株のゲノム異常スクリーニングを行い、1 細胞株で新規 13q21.2-q21.31 にホモ欠失を検出した。本領域に含まれる 2 つの遺伝子のうち、肺癌細胞株で高頻度に発現抑制を受ける PCDH20 を標的遺伝子候補とした (図F-29)。

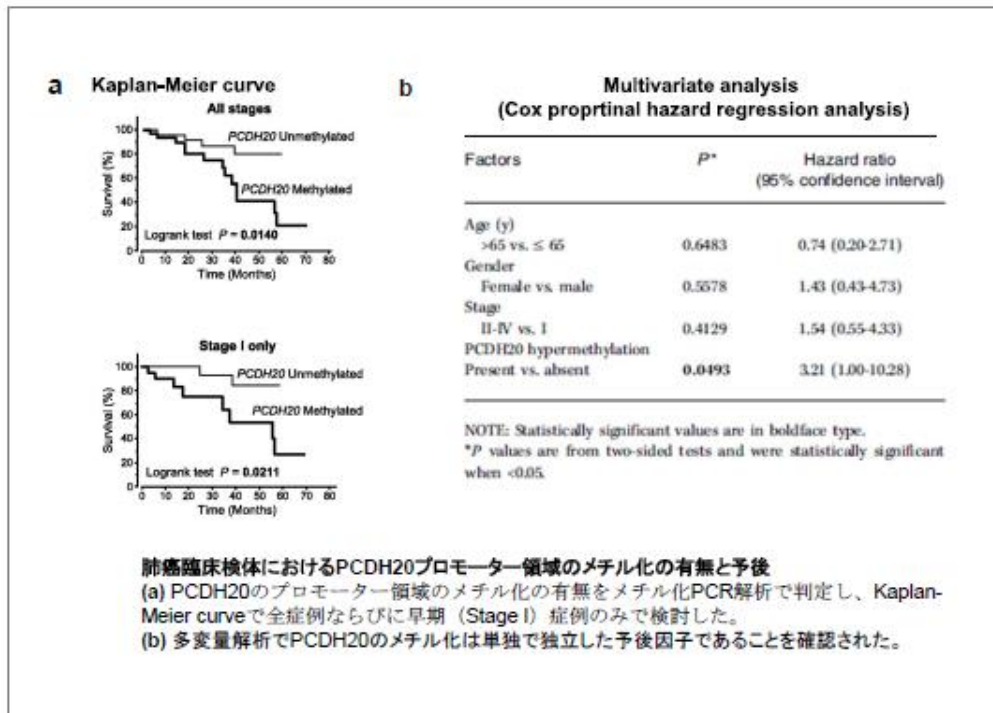
図F-29



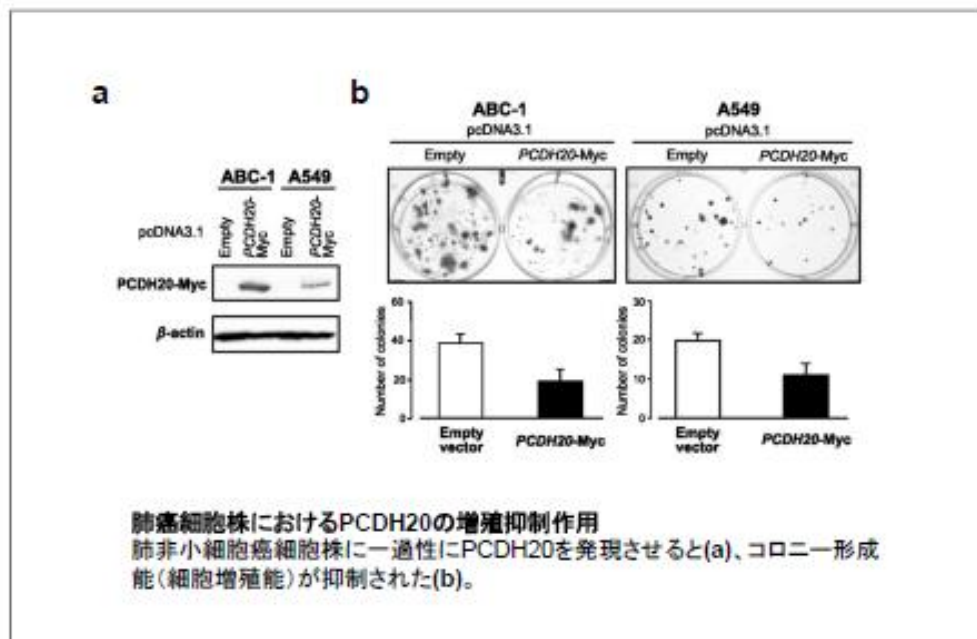
PCDH20 の mRNA レベルでの発現は細胞株の 52.6% (10/19)で消失し、これが PCDH20 遺伝子プロモーターのメチル化に起因していた。さらに NSCLC 臨床検体 59 例の解析で、その 54.2% (32/59)にメチル化を検出し、PCDH20 メチル化陽性例は有意に予後不良であり、多変量解析の結果、他の臨床病理学的諸因子とは独立のバイオマーカーであることを示した(図F-30)。

また、肺癌細胞株に対し PCDH20 を一過性に高発現させると、細胞増殖抑制作用を示した(図F-31)ことから、PCDH20 は新規の肺癌抑制遺伝子であることが示唆された(Imoto et al., Cancer Res 2006)。

図F-30



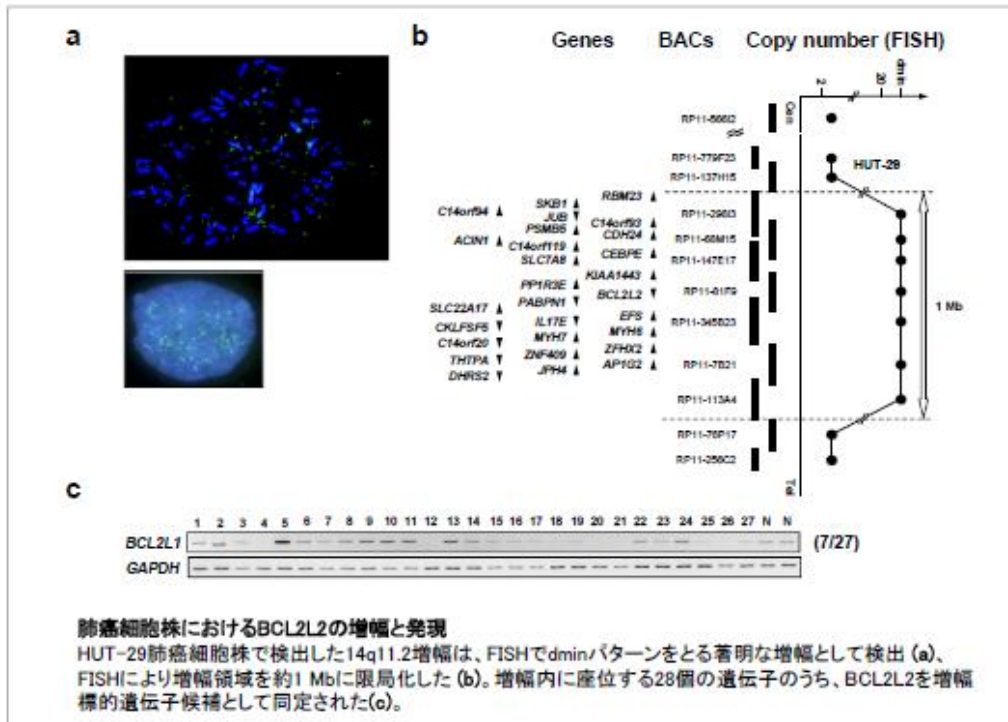
図F-31



(3) 肺癌の予後予測バイオマーカー BCL2L2 (東京医科歯科大学)

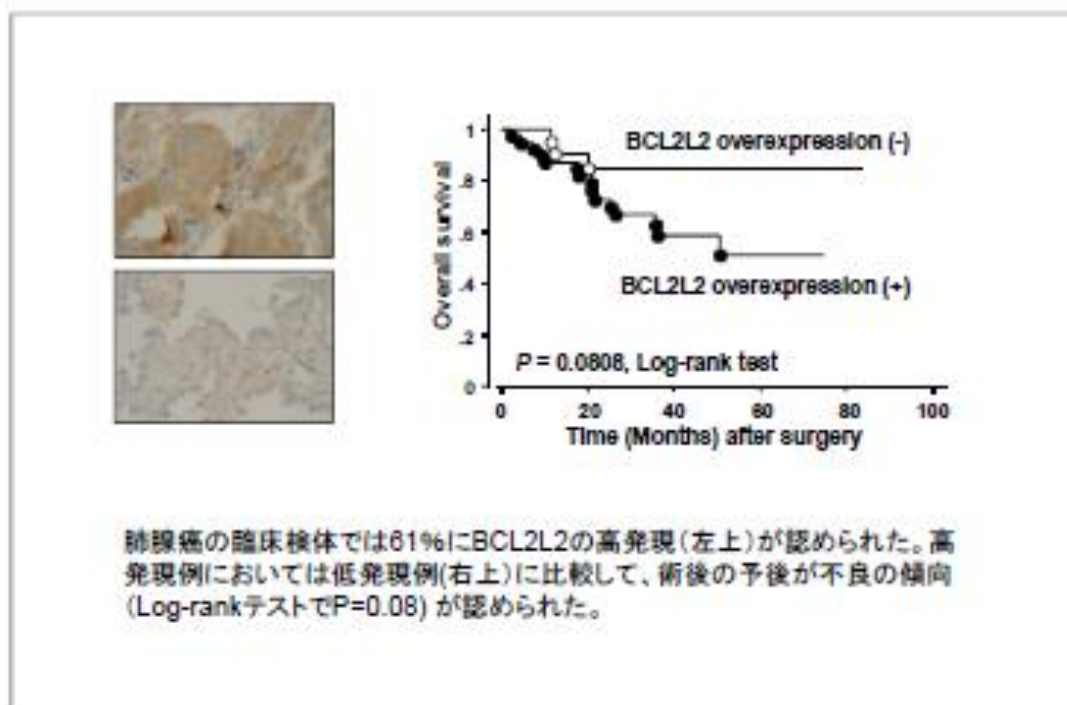
27種類の肺非小細胞癌細胞株のMCG CA800ならびにWG4500を用いたアレイCGH解析で検出していた著明な増幅のうち、肺腺癌細胞株HUT29で見出していた14q11.2増幅領域1 Mb内に座位する28遺伝子について詳細な発現解析を行い、BCL2遺伝子ファミリーに属するBCL2L2を同増幅標的遺伝子候補として同定した(図F-32)。

図F-32



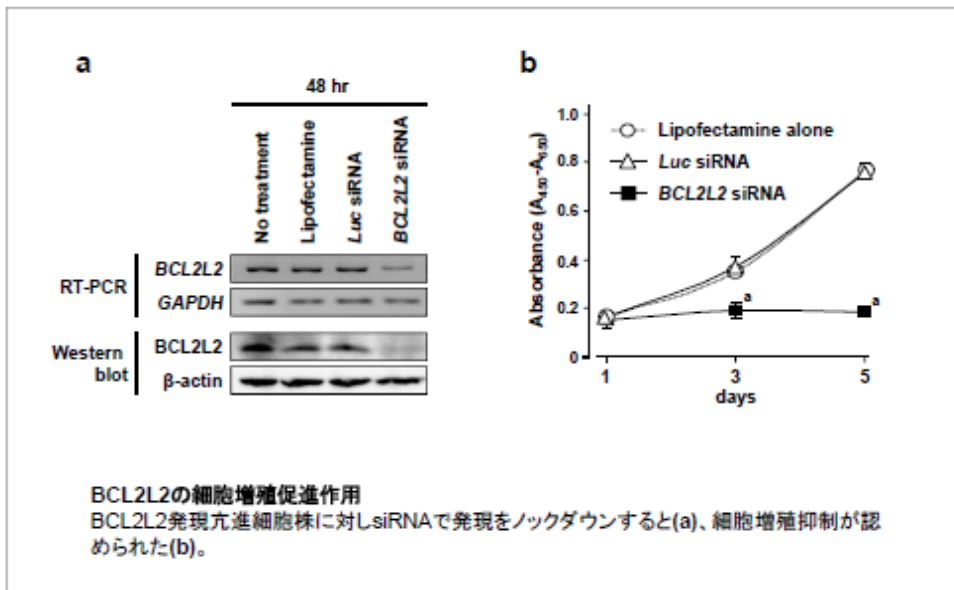
61例の肺腺癌組織を用いた免疫組織学的解析では、66%の症例で高発現を認め、BCL2L2発現と病期あるいは分化度についての有意な相関を認め、統計学的に有意ではなかったが予後との相関性が示唆された (図F-33)。

図F-33



さらに、siRNA による BCL2L2 発現のノックダウンにより、HUT29 の増殖能が抑制された(図F-34)ことから、分子標的治療の標的候補となりうることが示唆された。

図F-34

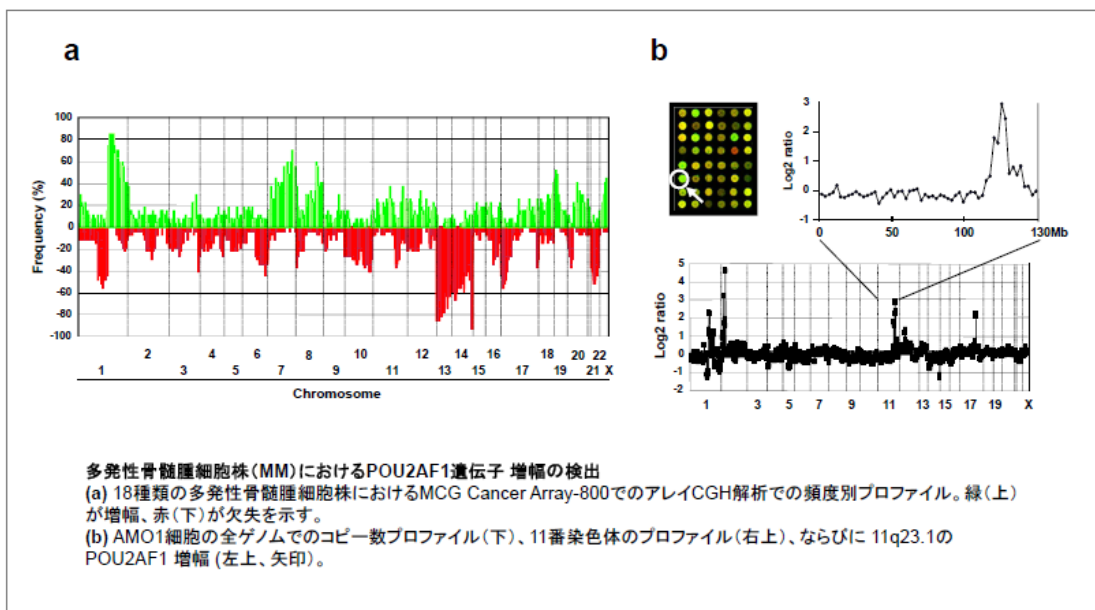


8. その他の癌のアレイ CGH 解析とバイオマーカーの同定

(1) 多発性骨髄腫の候補バイオマーカー POU2AF1 (東京医科歯科大学)

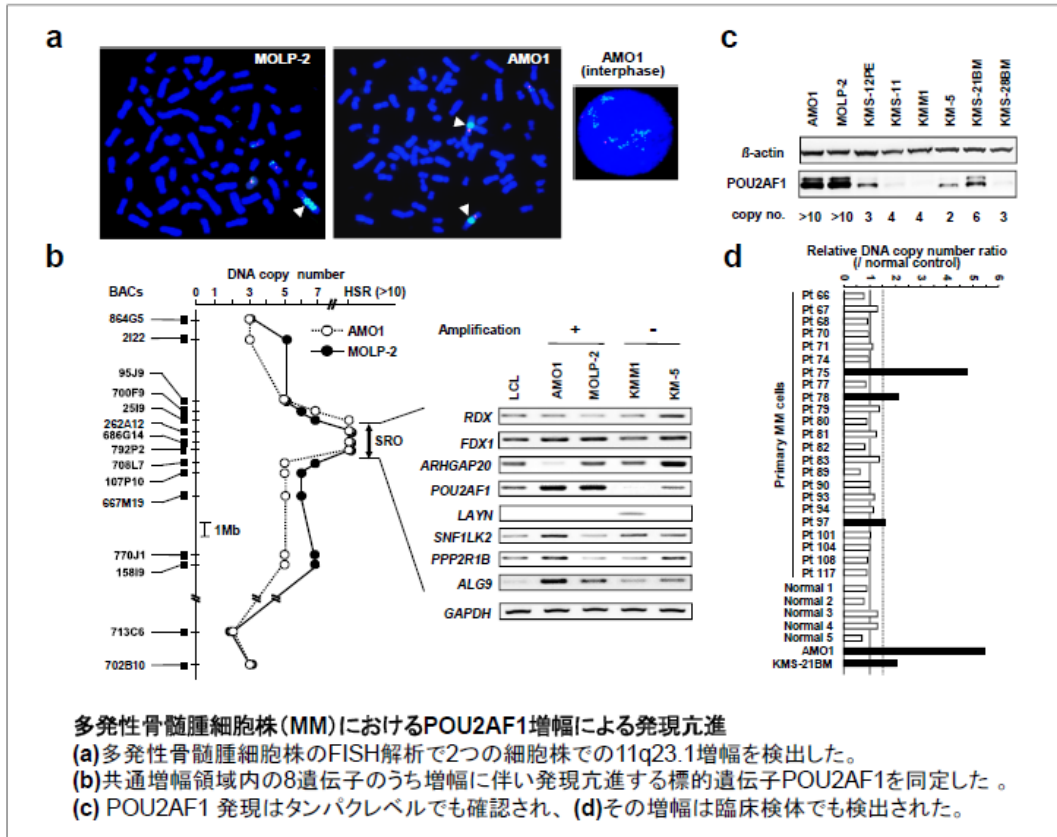
多発性骨髄腫細胞株のアレイ CGH 解析で検出した 11q23.1 増幅領域から増幅に伴い発現し、臨床検体でも増幅が検出される標的遺伝子候補 POU2AF1 を同定した(図F-35)。

図F-35



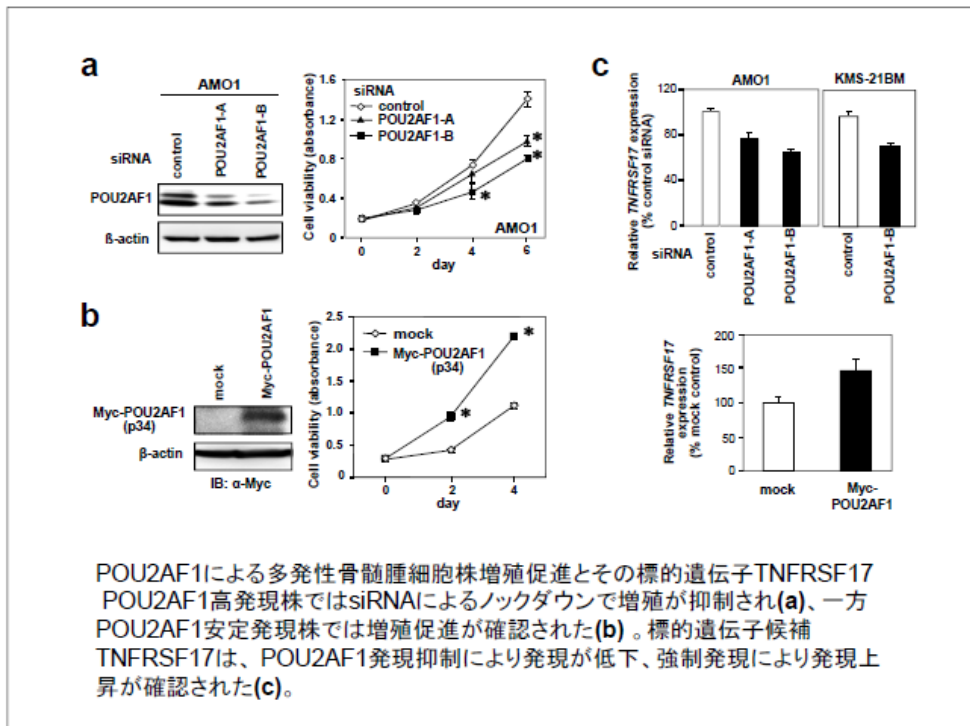
POU2AF1 のノックダウンは多発性骨髄腫細胞株の増殖を抑制し、強制発現は増殖を亢進した(図F-36)。

図F-36



POU2AF1 の転写標的候補 TNFRSF17 は、POU2AF1 発現量に相関して発現量が変化し(図F-37)、プロモーターアッセイ、ChIP アッセイにより直接的な標的であることが確認された。また、TNFRSF17 も細胞増殖促進に働き、POU2AF1 の下流で働きうることを示した。これらの結果から、POU2AF1 が多発性骨髄腫において発現亢進し TNFRSF17 の転写誘導を介して腫瘍化に関与する、新規多発性骨髄腫関連遺伝子であることが示唆された。(Zao et al., Oncogene 2008)

図F-37

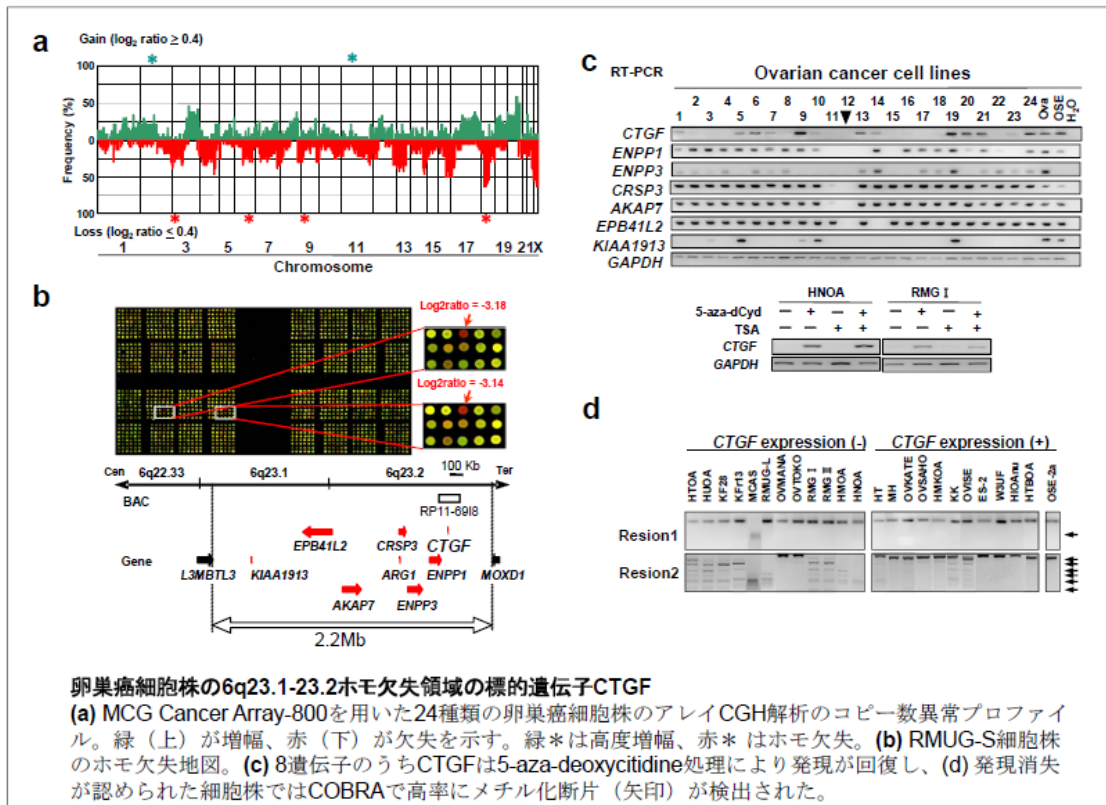


(2) 卵巣癌の候補バイオマーカー CTGF (東京医科歯科大学)

24種類の卵巣癌細胞株におけるMCG CA800を用いたアレイCGH解析で、既知の9p21.2 (CDKN2A)、3p24.1 (TGFB2)、18q21.1 (SMAD4)以外に、新規に検出した6q23.2ホモ欠失(2.2 Mb)内の標的遺伝子として、高頻度に発現抑制されるCTGFを同定した(図F-38)。

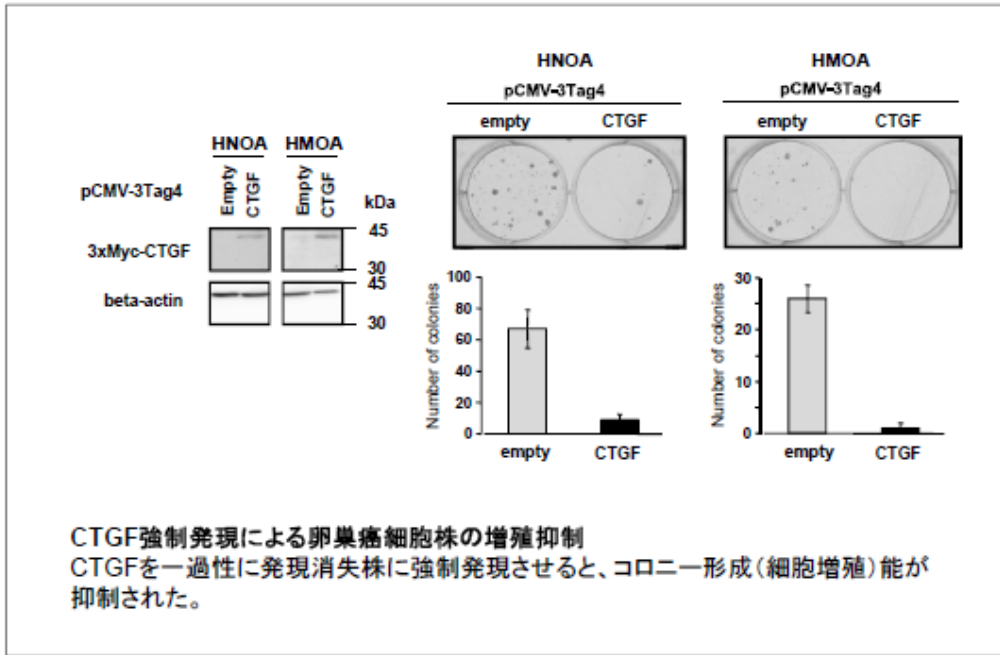
CTGFはホモ欠失のない卵巣癌でも発現が低下しており、DNA脱メチル化処理で発現の回復を高頻度で卵巣癌細胞株(23株中12株)に認めた。プロモーター活性を示すCTGFのCpGアイランド領域のメチル化は、細胞株、臨床検体ともに発現と逆相関が認められた。

図F-38



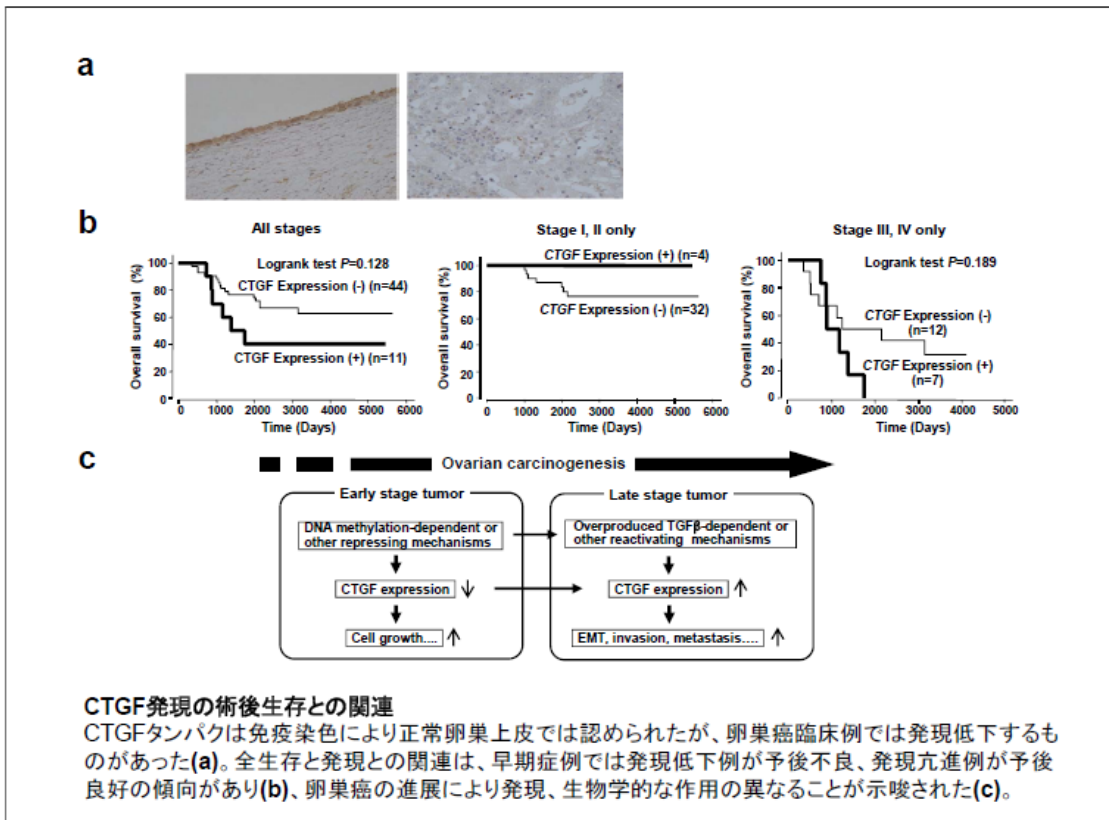
CTGFを発現消失株で強制発現させると増殖抑制が認められ(図F-39)、発現株でノックダウンすると増殖の促進を認めた。

図F-39



さらに、臨床検体では早期の癌より発現が低下し、組織型でも発現の頻度に違いが認められた(図F-40)ことから、CTGFはDNAメチル化で卵巣癌の病期・組織型依存的に発現抑制を受ける癌抑制遺伝子であることが示唆された(Kikuchi et al., Cancer Res 2007)。

図F-40

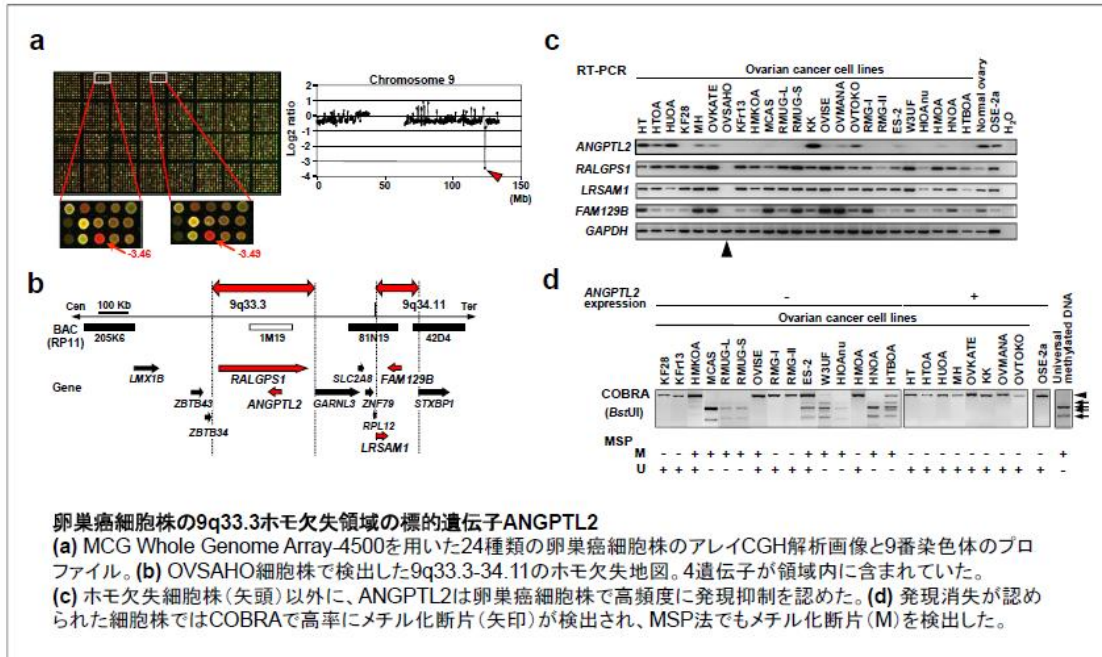


(3) 卵巣癌の候補バイオマーカー ANGPTL2 (東京医科歯科大学)

卵巣癌細胞株のWG4500を用いたアレイCGH解析で新規に検出した4q、6q、8q、9p、9q領域のホモ欠失の中で、9q33.3ホモ欠失の標的遺伝子がANGPTL2であることを明らかにした。ANGPTL2は正常卵巣上皮

細胞で発現しているにもかかわらず、ホモ欠失のない卵巣癌でも高頻度に発現が低下を認め(23 株中 18 株, 78.3%)、その発現消失は ANGPTL2 プロモーター領域の DNA メチル化で生じていた(図F-41)。

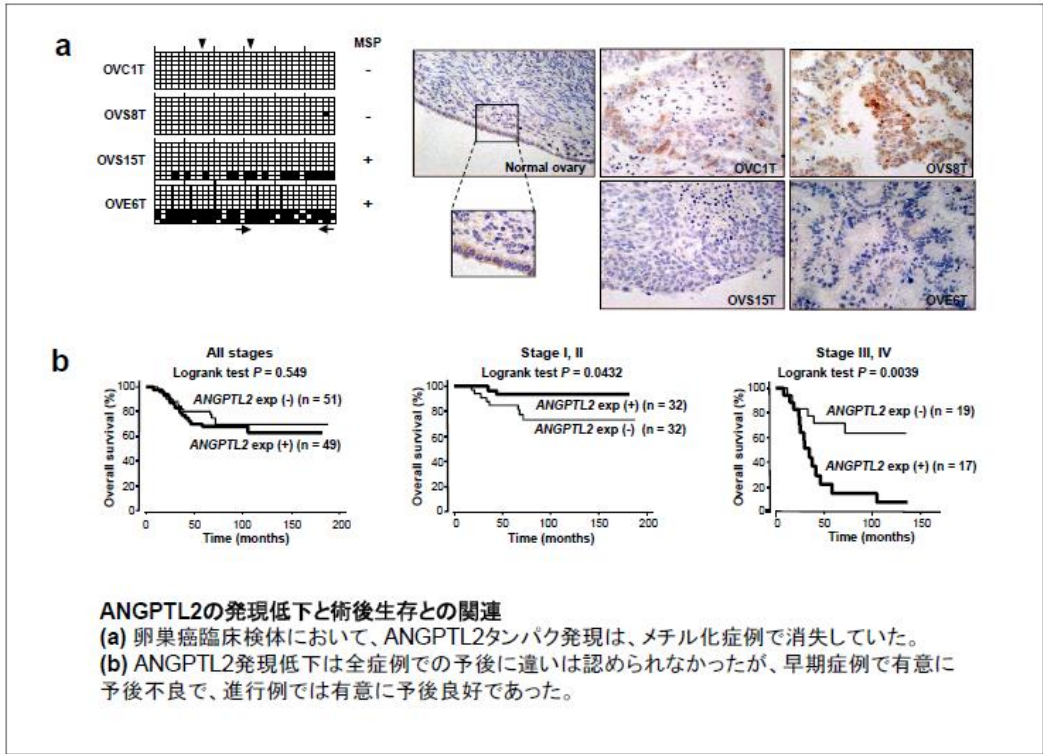
図F-41



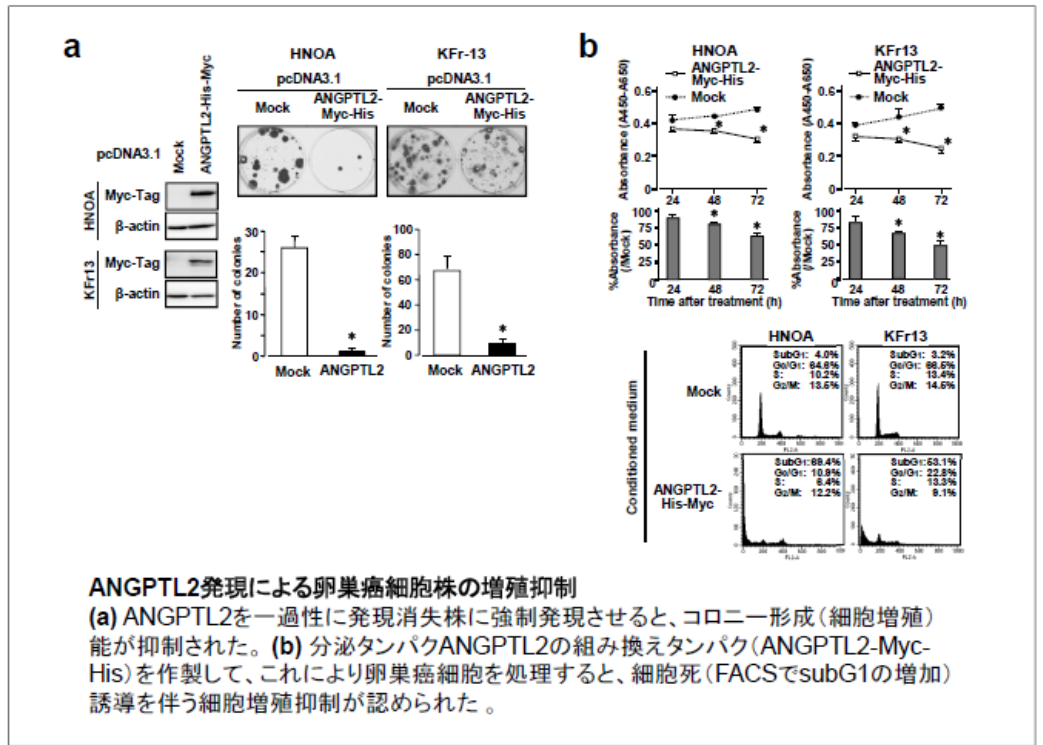
抗 ANGPTL2 抗体による卵巣がん臨床サンプルでの蛋白レベルの発現を確認したところ 100 例中 53 例で ANGPTL2 蛋白発現が低下し、DNA メチル化と関連していた。Stage-1,-2 の早期卵巣がんにおいて ANGPTL2 の発現低下は予後不良と有意に関連していたが、Stage-3,-4 例では発現低下例は予後良好であった(図F-42)。

また、ANGPTL2 発現消失している卵巣がん細胞株に外来性に ANGPTL2 を発現させた場合、また ANGPTL2 コンディショニングメEDIUMにより細胞の増殖抑制が確認された(図F-43)。また発現株において siRNA による ANGPTL2 ノックダウンにより細胞増殖抑制が確認された。以上より ANGPTL2 が卵巣がん抑制遺伝子である可能性が示唆された。(Kikuchi et al., Cancer Res 2008)

図F-42



図F-43

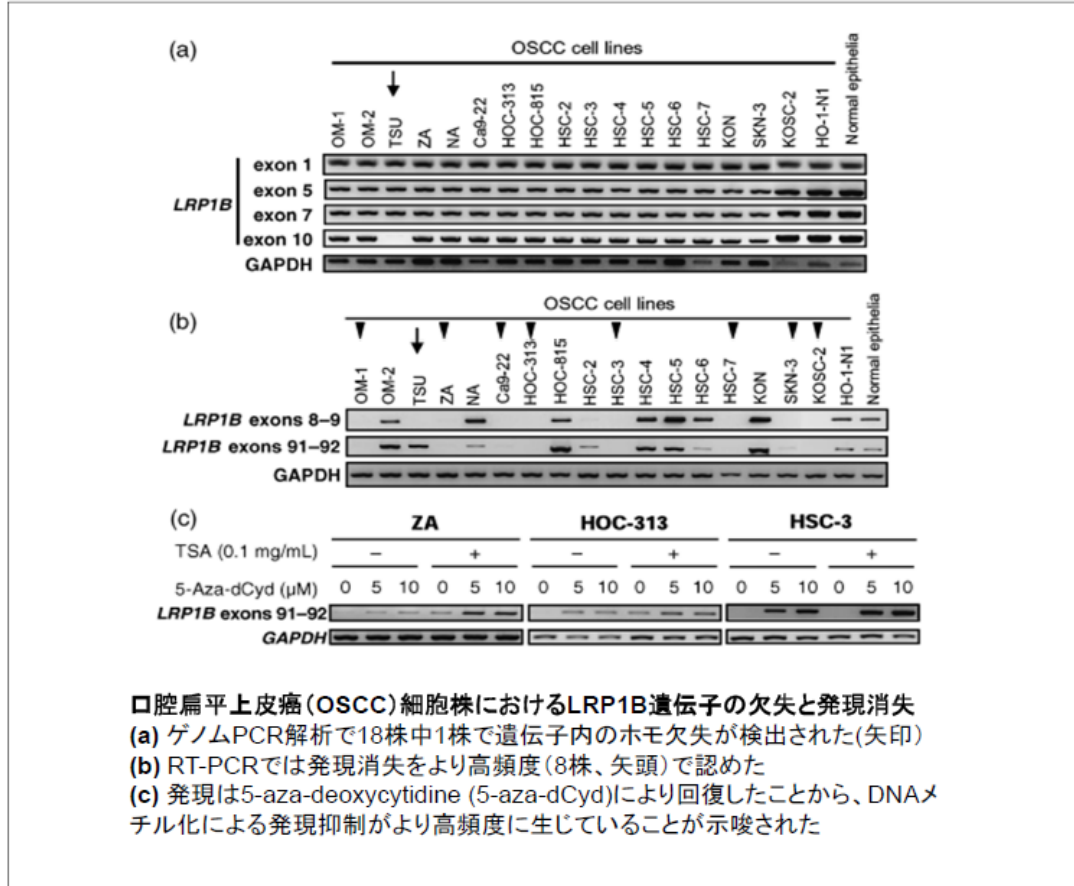


(4) 口腔癌の新規バイオリソース候補 LRP1B (東京医科歯科大学)

食道扁平上皮癌(ESCC)においてホモ欠失あるいは DNA メチル化により発現が抑制される癌抑制遺伝子候補 LRP1B(low-density lipoprotein receptor-related protein 1B)遺伝子(2q22.1)を既に報告していたが(Sonoda et al., Cancer Res 2004)、同じ扁平上皮である口腔扁平上皮癌(OSCC)での検討を行った。18種類の OSCC 細胞株パネルでは、1株のみで遺伝子内にホモ欠失が検出された。一方で、発現は8株で消失しており、遺伝子発現は5-aza-deoxycytidine (5-aza-dCyd)で回復することから DNA メチル化による遺伝子発

現抑制がより高頻度に行っていることが考えられた(図F-44)。実際に LRP1B のプロモーター領域のメチル化は、発現の消失していた細胞株で生じていることが確かめられ、臨床検体でも高頻度に同領域がメチル化していた。これらの結果から、LRP1B は OSCC でもホモ欠失や DNA メチル化により発現抑制を受ける癌抑制遺伝子として働くことが示唆された(Nakagawa et al., Cancer Sci 2006)。

図F-44

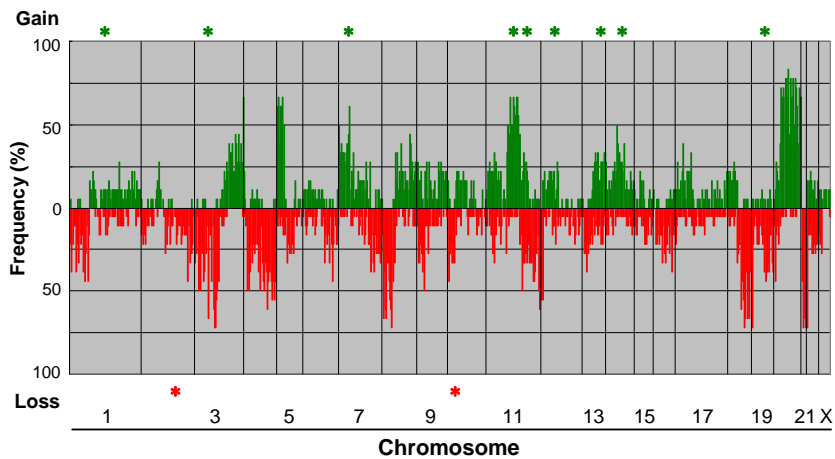


(5) 口腔癌の新規バイオマーカー候補 PRTEDC1 (東京医科歯科大学)

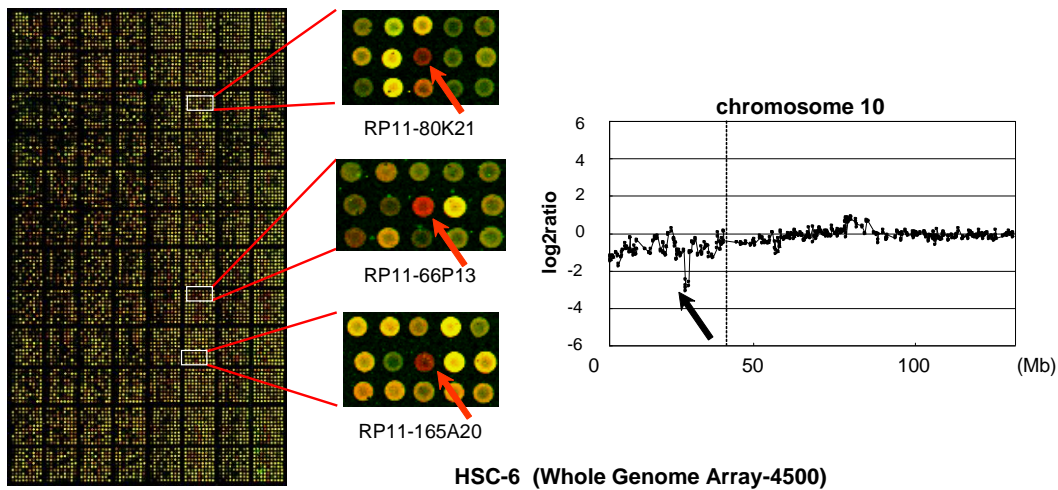
MCG CA800ならびにWG4500を用いたアレイ CGH 解析を行った。7p11.2(EGFR)、11q13.3(CCND1)、11q22(BIRC2、YAP1)など既知の癌遺伝子を含む多くの高度増幅領域が検出されたのに対し、ホモ欠失は2q24.1-q24.2と10p12.1のみであった(図F-45)。このうち、10p12.1領域に新規に見出した約3Mbの新規ホモ欠失領域内に座位する7遺伝子の発現解析によって高頻度に発現抑制されるPRTEDC1を同定した(図F-46)。

図F-45

a



b

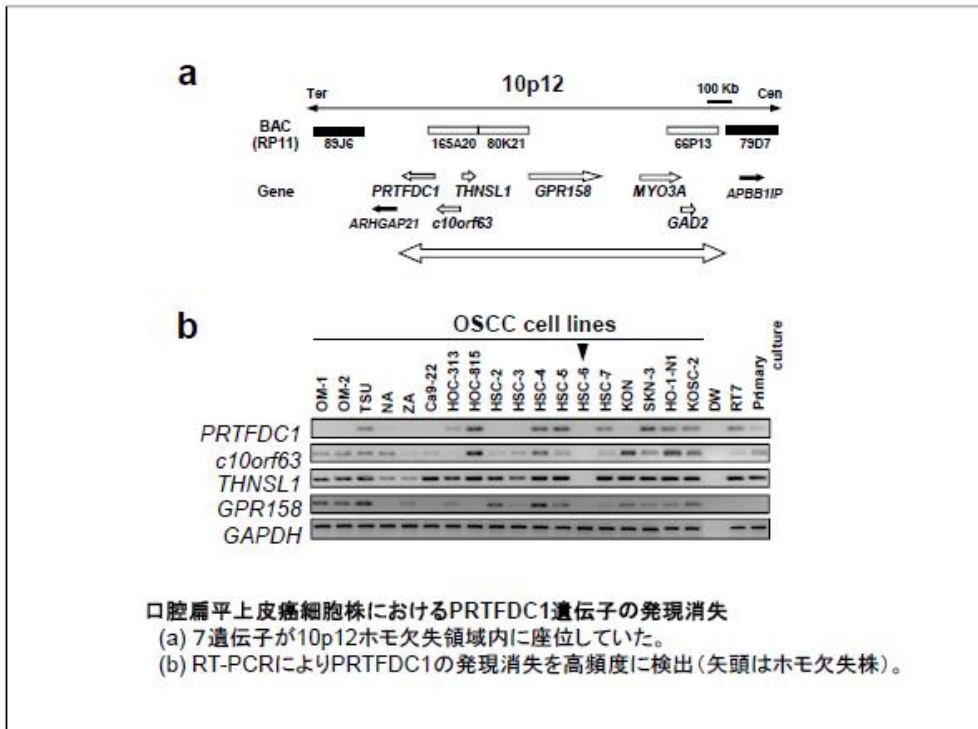


口腔扁平上皮癌細胞株における10 p 12ホモ欠失の検出

(a) 18種類の口腔癌細胞株におけるMCG Cancer Array-800でのアレイCGH解析で検出されたコピー数異常の頻度別まとめ。緑（上）が増幅、赤（下）が欠失を示す。緑*は高度増幅（ $\log_2 \text{ratio} > 2$ ）、赤*はホモ欠失が検出された領域。

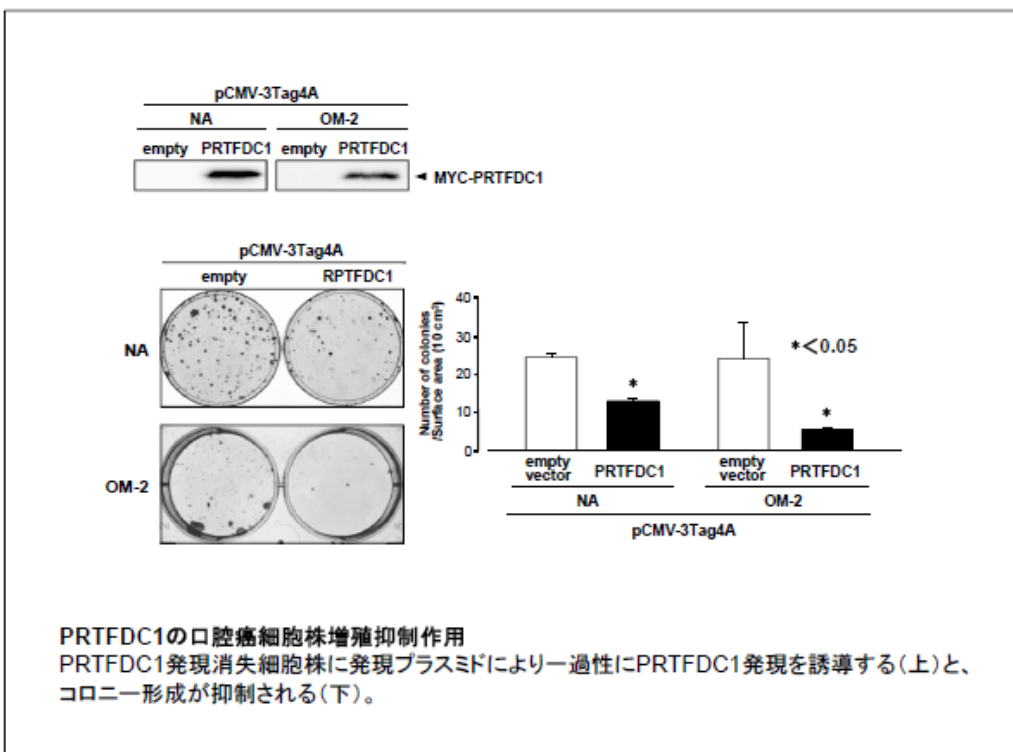
(b) HSC-6細胞におけるMCG Whole Genome Array-4500のアレイCGH画像（左）、ならびに10番染色体のプロファイル（右）。10p12ホモ欠失が検出された(矢印)。

図F-46



口腔扁平上皮癌の細胞株および臨床検体において PRTFDC1 のプロモーター領域を含む CpG island に過剰メチル化が高頻度に検出され、メチル化と遺伝子発現が逆相関し、5-aza-deoxycytidine (5-aza-dCyd) 処理によりメチル化が外れることで遺伝子発現が回復することから、多くは DNA 過剰メチル化により発現抑制を受けていると考えられた。また、PRTFDC1 は phosphoribosyl transferase ドメインを持つ以外にその生理作用は不明であるが、過剰発現により細胞増殖が抑制され、逆に同遺伝子の発現抑制では細胞増殖が亢進する(図F-47)ことから、PRTFDC1 は新規癌抑制遺伝子であると考えられた(Suzuki et al., Oncogene 2007)。

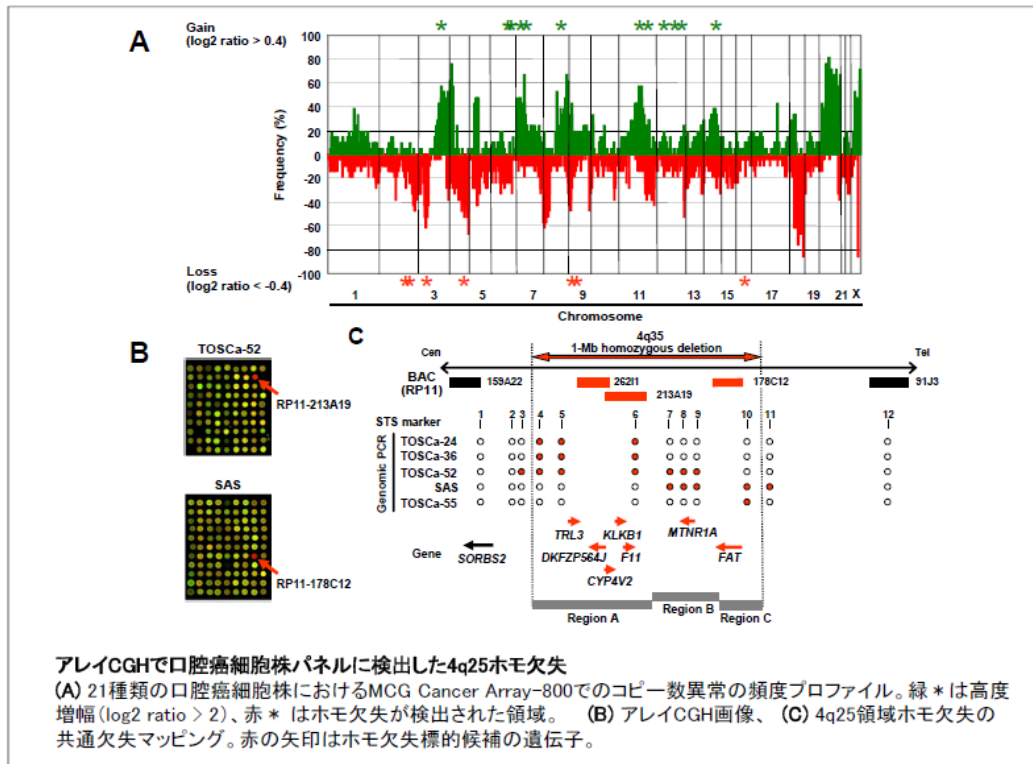
図F-47



(6) 口腔癌の新規バイオマーカー候補の MTNR1A (melatonin receptor 1 A) (東京医科歯科大学)

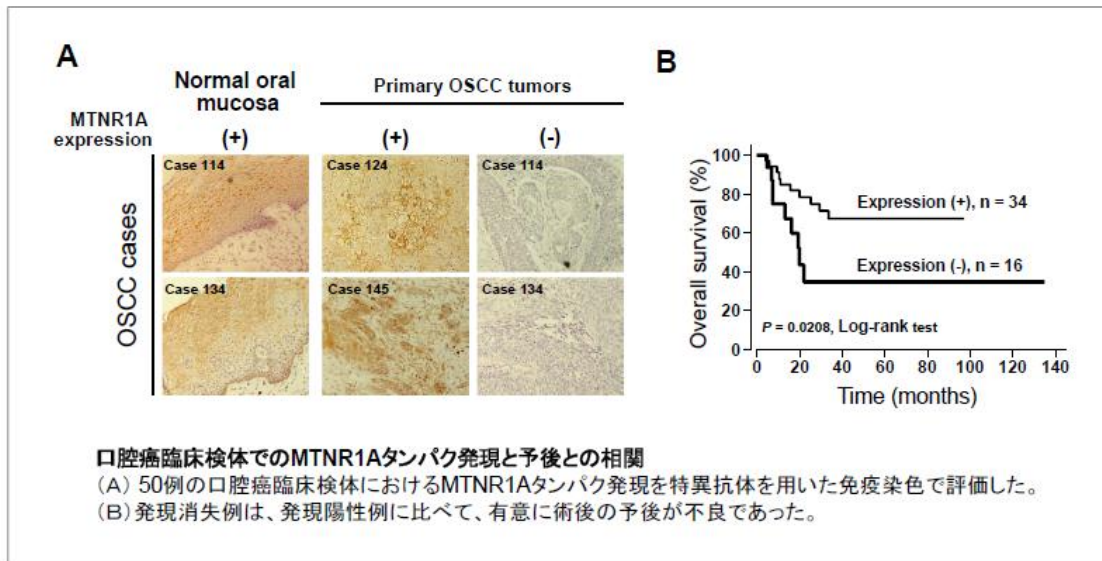
21 株の口腔扁平上皮癌細胞株について MCG CA800 ならびに WG4500 を用いたアレイ CGH 解析を行い、4q35 領域に約 1Mb の新規ホモ欠失を見出した(図F-48)。

図F-48



同領域内に座位する7遺伝子の発現解析をRT-PCRによって行い、高頻度に発現抑制されるMTNR1Aを同定した。MTNR1A発現は5-aza-deoxyshytidineにより回復し、また口腔扁平上皮癌の細胞株および臨床検体においてMTNR1Aの過剰メチル化が高頻度に検出されたことから、ホモ欠失以外にDNAメチル化による発現抑制を受けることが明らかになった(図F-49)。臨床検体50例を対象にMTNR1Aタンパク発現の免疫組織学的解析を行うと、MTNR1A発現と予後の間に有意な相関が認められた(図F-50)。MTNR1A発現は、既知の予後因子などとともに多変量解析を行っても有意に予後と相関することから、独立した予後因子になりうることを示唆された。さらに、MTNR1A過剰発現により細胞増殖が抑制されることから、MTNR1Aは新規癌抑制遺伝子であると考えられた(Nakamura et al., 2008 Cancer Sci)。

図F-49



図F-50

**Cox proportional hazard regression解析による
MTNR1Aタンパク発現と予後との相関**

口腔癌臨床検体（50例）におけるMTNR1Aタンパク発現を含む各因子の予後との相関解析（単変量、多変量）

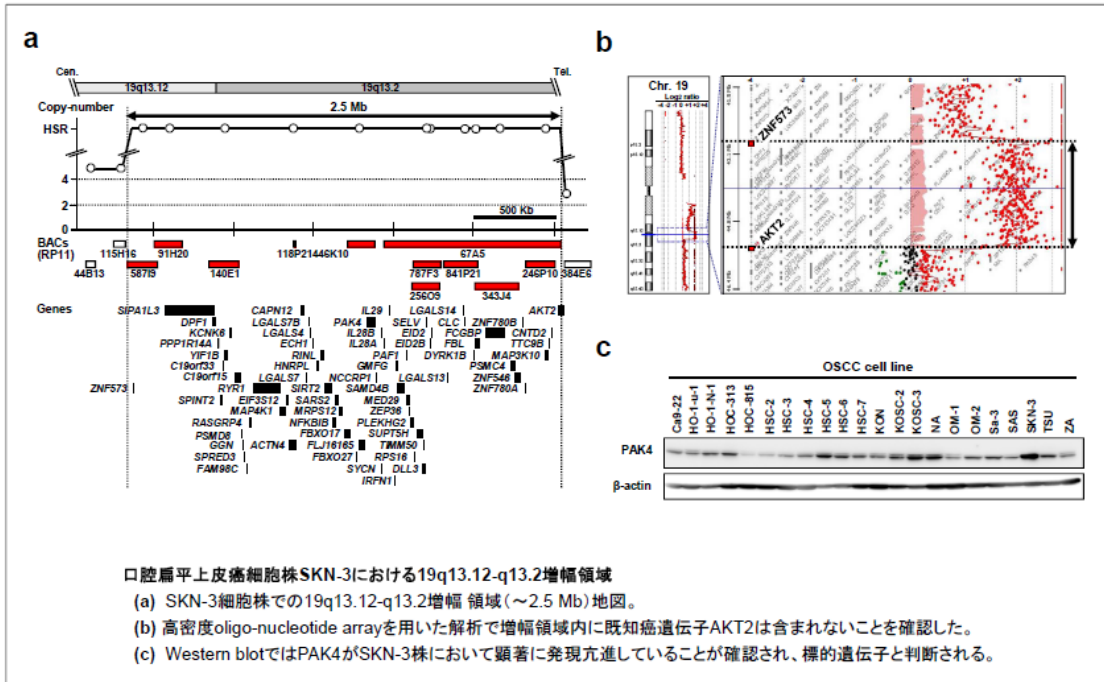
Factor	Univariate		Multivariate ^a
	Hazard ratio (95% confidence interval)	P-value ^b	P-value ^b
Age (years)			
≥ 60 vs. < 60	1.060 (0.430-2.612)	0.899	-
Gender			
Male vs. Female	1.080 (0.410-2.843)	0.877	-
Differentiation			
Poor-Moderate vs. We	2.899 (1.041-8.065)	0.042	-
Stage			
III+IV vs. I+II	4.184 (1.493-11.765)	0.007	0.0099
TNM classification			
T catogo			
T3+T4 vs. T1+T2	3.509 (1.416-8.696)	0.007	-
N catogo			
N1-3 vs. N0	2.193 (0.890-5.405)	0.088	-
MTNR1A expression ^c			
Negative vs. Positive	2.816 (1.128-7.029)	0.027	0.0498

NOTE: Statistically significant values are in boldface type.
^aForward- and backward-stepwise analyses were used for multivariate analysis.
^bP-values are from two-sided tests and were statistically significant when <0.05.
^cMTNR1A expression was evaluated by immunohistochemical analysis as described in Materials and Methods.

(7) 口腔癌の新規バイオマーカー候補のPAK4（東京医科歯科大学）

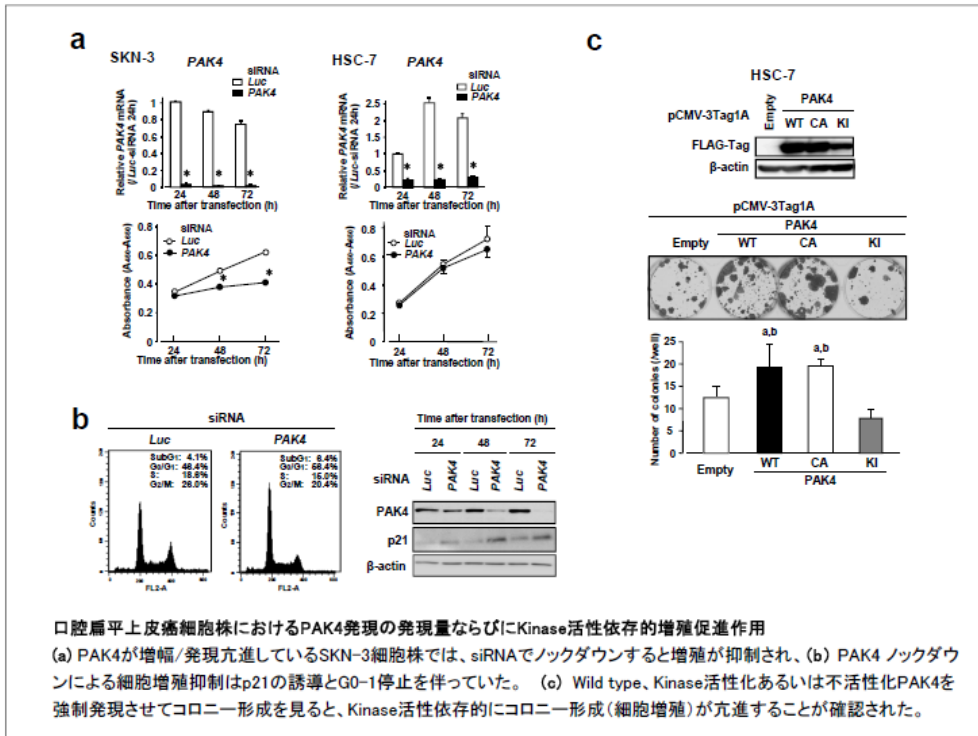
既に行っていた口腔癌のMCG CA800ならびにWG4500を用いたアレイCGH解析(Suzuki et al., Oncogene 2007)で検出していた19q13.12-q13.2領域の2.5 Mbの増幅(SKN-3細胞株)は、増幅領域地図をFISHならびに高密度 oligo-nucleotide arrayを用いて詳細に作成してみると、本領域における代表的な癌遺伝子候補AKT2が含まれていないことが明らかになり、本領域に新たな癌遺伝子候補が含まれていることを示唆した(図F-51)。

図F-51



このことから、2.5 Mb に含まれる 49 遺伝子ならびに 17 の未確認の転写物候補を対象に発現解析、データベース参照、ノックダウン後の細胞増殖の変化を系統的に検討した。正常組織では発現が低いのに対し、増幅に伴い発現亢進し、siRNA を用いたノックダウンにより高発現株では増殖が抑制されるが低発現株では影響の認められない癌遺伝子中毒(Oncogene addiction)の状態にある増幅遺伝子候補を探索した結果、PAK4 を同定した(図F-52)。

図F-52

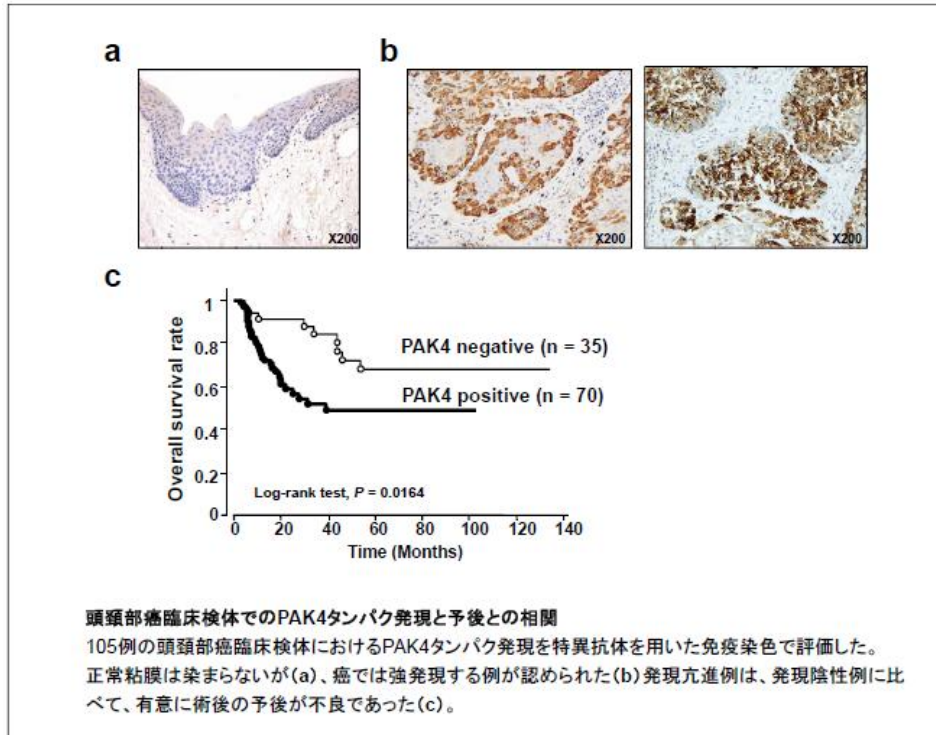


PAK4 は臨床検体でも正常粘膜で発現が認められないのに対し、口腔癌を含む頭頸部癌で 1/3 の症例で発現亢進が認められた。頭頸部癌での PAK4 発現亢進症例は発現陰性症例に比較して予後不良であり、多変量解析による補正後も PAK4 発現亢進は有意な独立した予後因子であった(図F-53、図F-54)。

これらの結果から PAK4 は、発現亢進により Kinase 活性に依存して口腔癌を含む頭頸部癌の進展に関わ

り、診断マーカーだけでなく治療標的となりうる遺伝子であることが示唆された (Begum et al., Cancer Sci 2009)。

図F-53



図F-54

Cox proportional hazard regression解析を用いたPAK4タンパク発現と予後との相関

105例の口腔癌を含む頭頸部癌臨床検体におけるPAK4タンパク発現を含む各因子の予後との相関を単変量 (Univariate)、多変量 (Multivariate) で解析した。

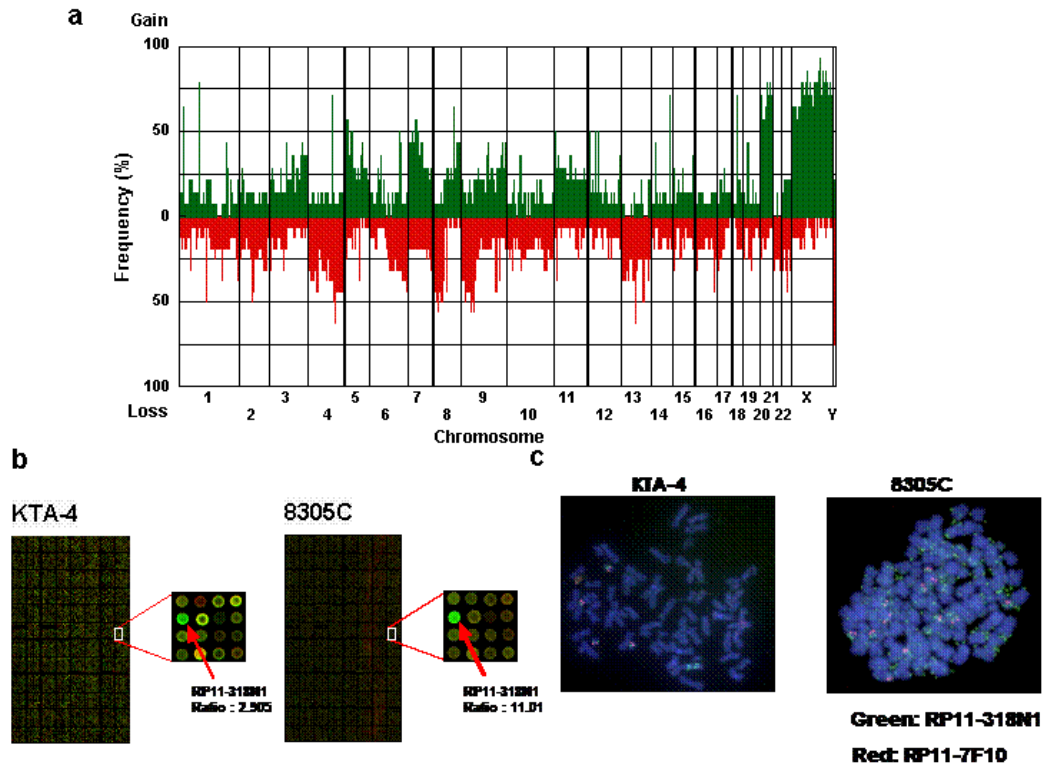
Factor	Univariate		Multivariate [†]
	Hazard ratio (95% confidence interval)	P-values*	P-values*
Age (years)			
>60 versus ≤60	1.341 (0.715–2.514)	0.835	X
Differentiation			
Poor-moderate versus well	2.111 (0.998–4.465)	0.051	X
Stage			
III+IV versus I+II	3.413 (1.504–7.752)	0.003	0.006
PAK4 expression [‡]			
Positive versus negative	2.451 (1.151–5.208)	0.02	0.024

Note: Statistically significant values are in boldface type.
^{*}P-values are from two-sided tests and were statistically significant when <0.05.
[†]Forward- and backward-stepwise analyses were used for multivariate analysis.
[‡]PAK4 expression was evaluated by immunohistochemical analysis as described in 'Materials and Methods'.

(8) 未分化甲状腺癌の新規バイマーカー候補のITCH (東京医科歯科大学)

甲状腺癌は、①乳頭腺癌、②濾胞癌、③髄様癌、④未分化癌の4種類に大別される。その中で甲状腺未分化癌は、全癌の中でも最も予後不良とされその病態解明と指摘治療法の開発は喫緊の課題である。14種類の甲状腺未分化癌細胞株のWG4500を用いたアレイCGH解析で20q11.22に微細な新規高度増幅領域を見出し、増幅に伴い発現亢進する標的候補遺伝子としてITCH(AIP4, atrophin 1-interacting protein 4)を同定した(図F-55)。

図F-55



未分化甲状腺癌で検出した20q11.22増幅の標的候補ITCH (AIP4)

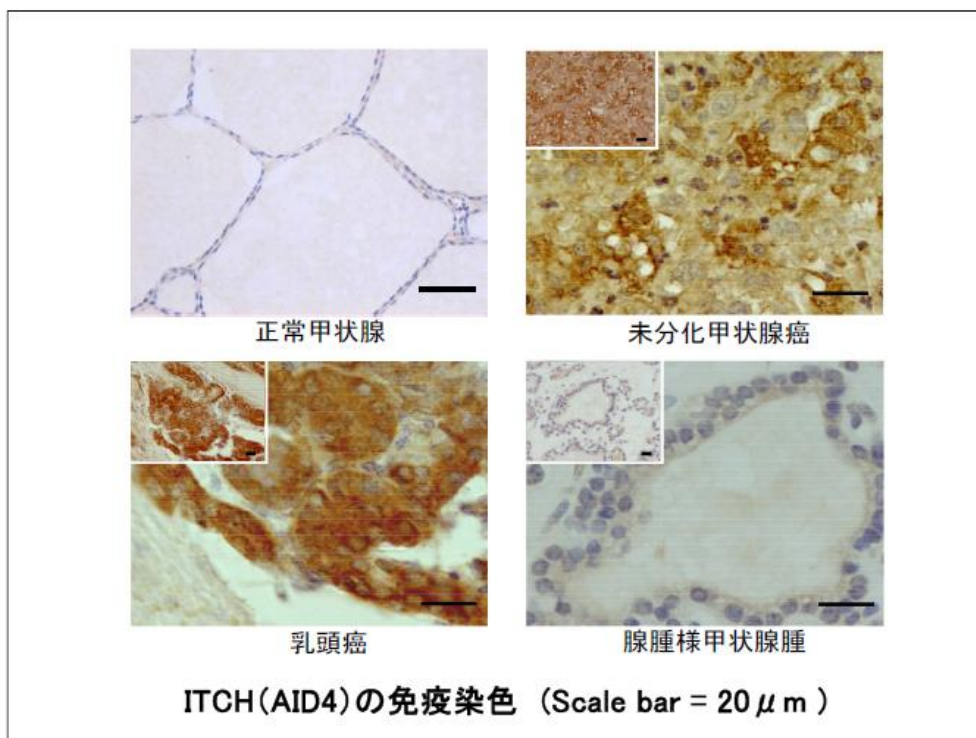
(a) 14種類の未分化甲状腺癌細胞株のMCG Whole Genome Array-4500でのアレイCGH解析結果のコピー数プロファイル。

(b) 20q11.22増幅領域の検出の実際のアレイCGH画像。KTA-4と8305C株で検出された。

(c) KTA-4と8305C株でのFISHによる増幅の確認。

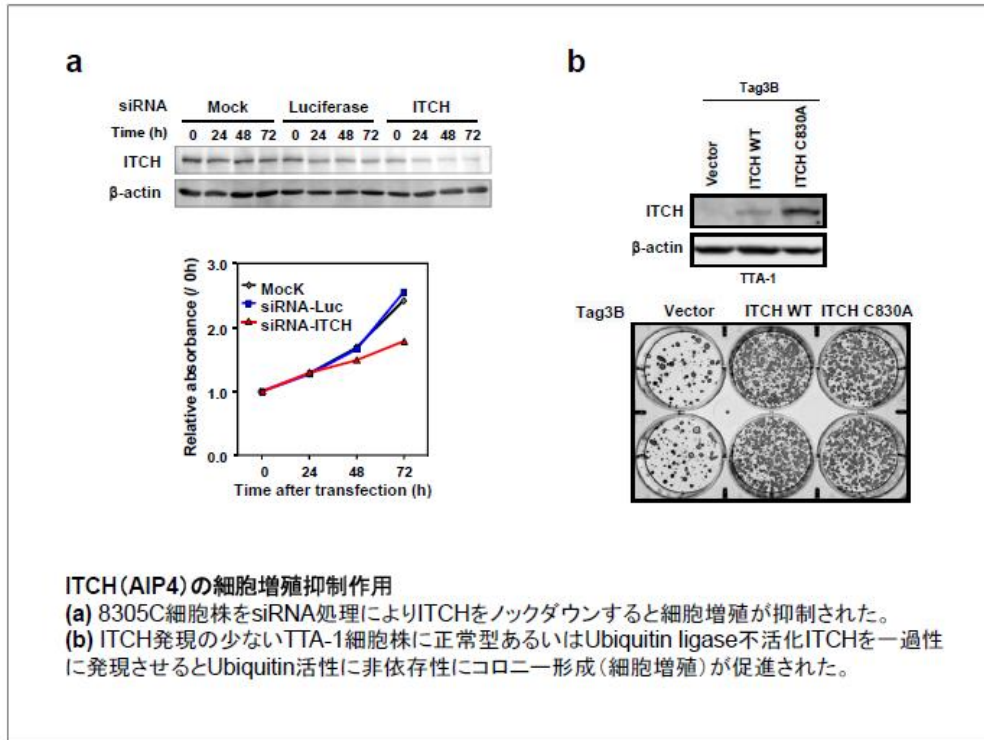
免疫染色によりITCHは甲状腺未分化癌だけでなく甲状腺乳頭腺癌や微小乳頭癌などの他の甲状腺腫瘍においても高い頻度で発現亢進を検出し、病態の連続性が示唆された(図F-56)。

図F-56



さらに、ITCH 増幅株における特異的 siRNA によるノックダウンにより有意な増殖抑制効果と G1 期での細胞周期停止が認められた。一方、低発現株での過剰発現では、ユビキチンリガーゼ活性非依存的にコロニー形成が亢進した(図F-57)。以上の結果から、ITCH は、その発現亢進により甲状腺癌の発癌・進展に寄与し、治療標的となりうる甲状腺癌関連遺伝子であることが示唆された(Ishihara et al., Cancer Sci 2008)。

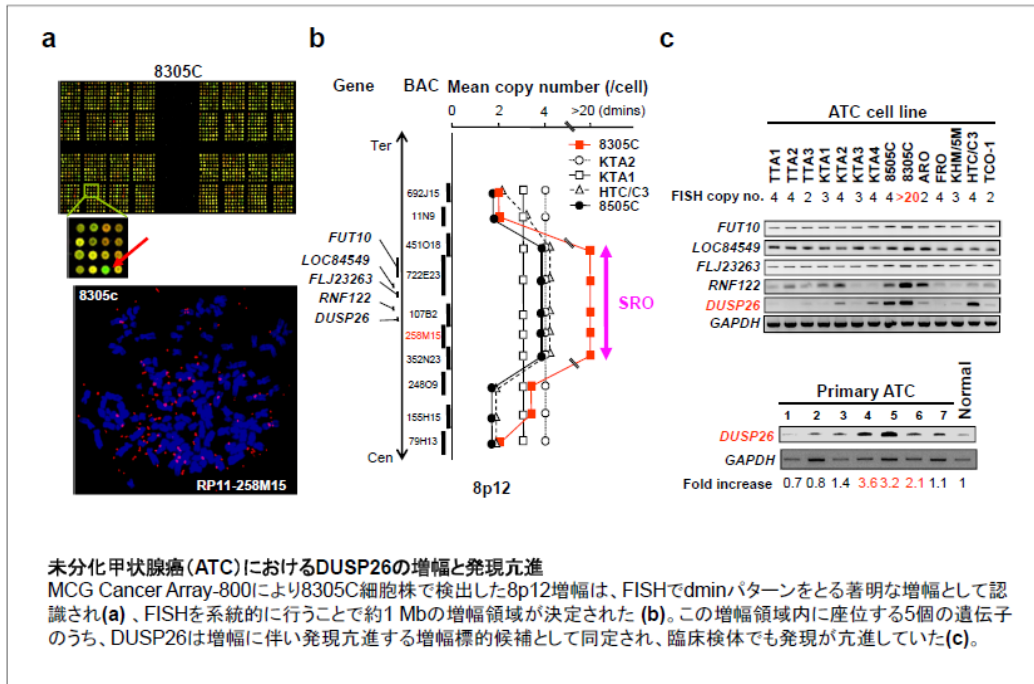
図F-57



(9) 未分化甲状腺癌の新規バイオマーカー候補の DUSP26 (東京医科歯科大学)

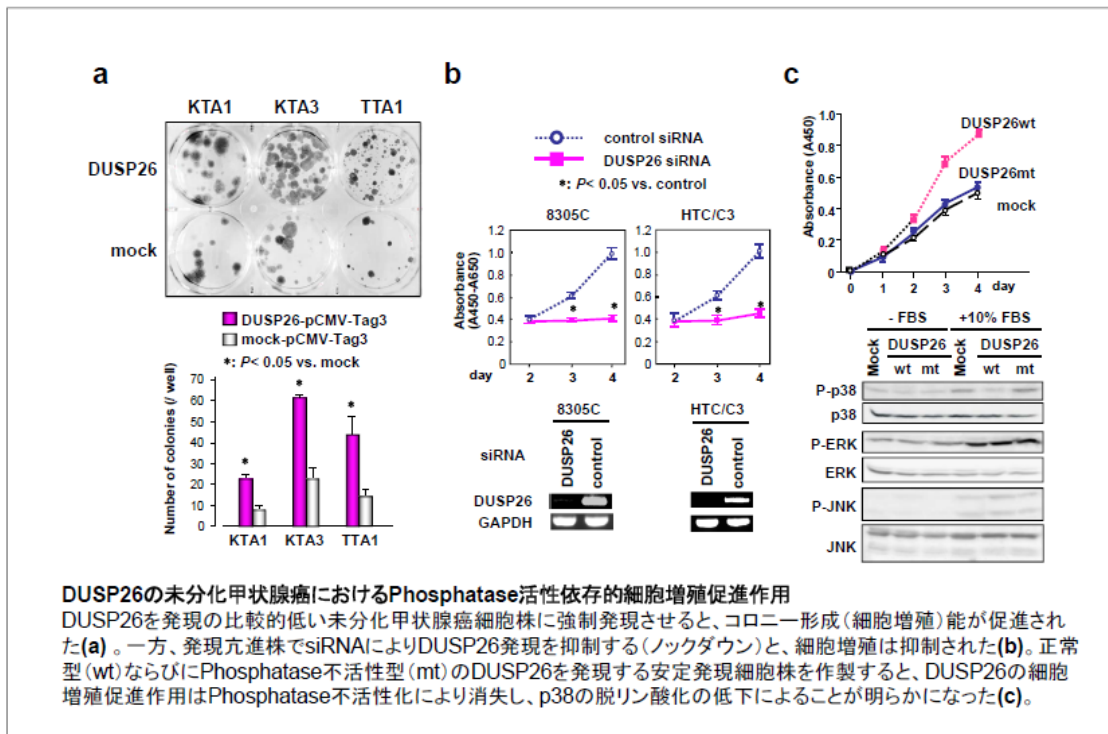
予後不良の未分化甲状腺癌の 14 種類の細胞株において MCG CA800 を用いたアレイ CGH 解析で検出した 8p12 増幅は、最小共通増幅領域が 1 Mb で、その中に含まれる 5 遺伝子から、増幅に伴い発現亢進し臨床検体でも発現亢進例の認められる DUSP26 遺伝子(dual-specificity phosphatase 26)を同定した(図F-58)。

図F-58



DUSP26は、低発現株に一過性に発現させると細胞増殖促進を、発現亢進株でノックダウンをすると細胞増殖抑制を引き起こした(図F-59)。またDUSP26はPhosphatase活性を持つことから、正常型とPhosphatase不活性変異型のDUSP26を発現する安定発現株を作製すると、細胞増殖促進作用は抑制された。この時、DUSP26の基質候補であるMAP kinaseのうちp38MAPKのリン酸化状態が細胞増殖に相関していた(図F-59)ことから、DUSP26はp38MAPKを基質にして未分化甲状腺癌細胞の増殖を促進する新規癌遺伝子あることが示唆された(Yu et al., Oncogene 2006)

図F-59

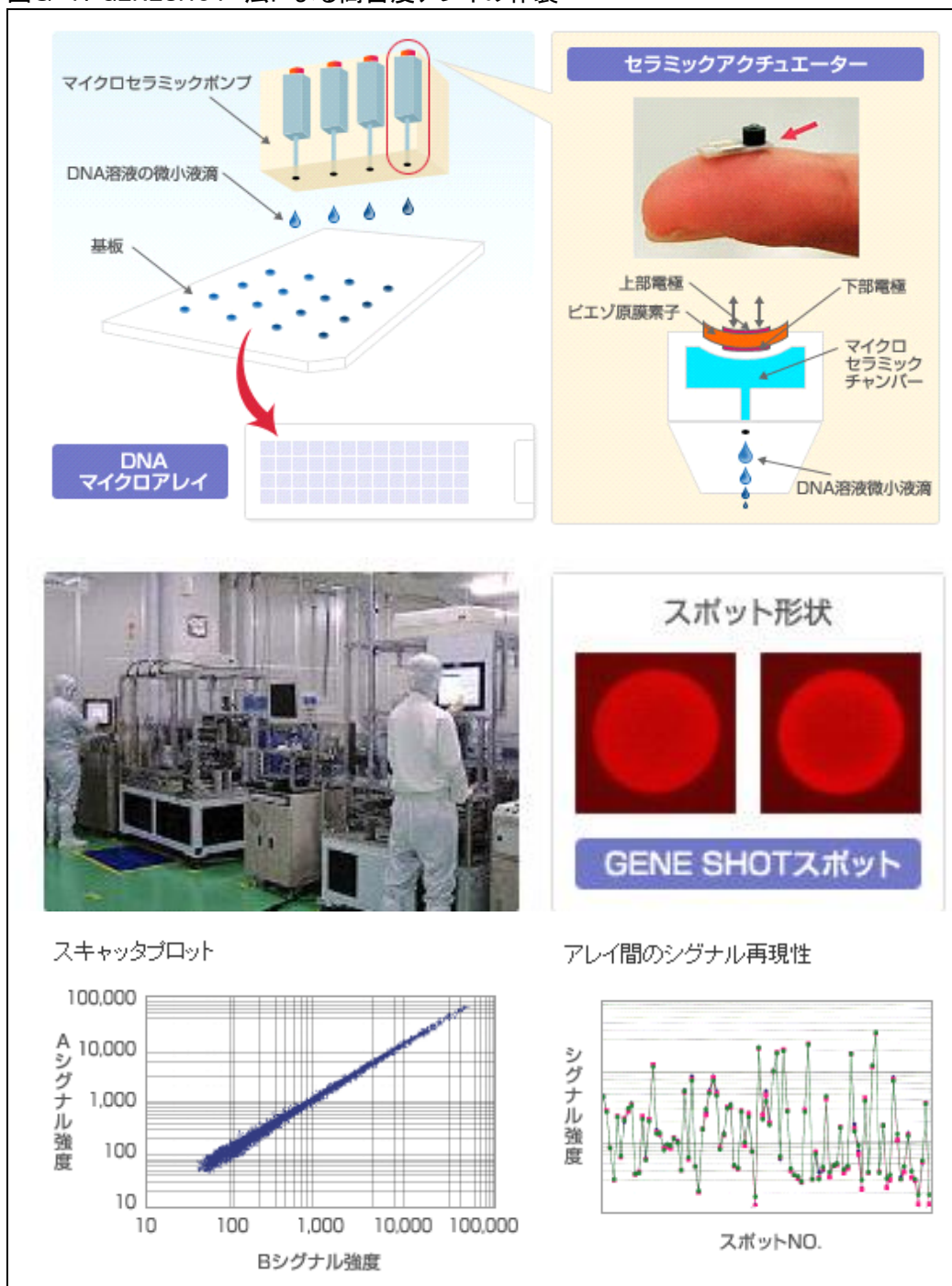


【テーマG】 高密度アレイの試作(日本ガイシ株式会社)

日本ガイシ株式会社では GENESHOT[®]法を用いたアレイの製造を事業化している。BAC DNA のスライドガラス上へのスポットティングも外注を受けており経験しているが、BAC DNA は分子量が大きく粘性が高いため、取り扱いにくい性状を有している。無尽資源化 BAC DNA を用いてスポットの条件、新規スポットティングヘッドの検討を加え、より高精度、高密度のスポット条件を見出すことができた。その成果に基づいて Whole Genome Array-4500、Cancer Array-1500、Cancer Array-800、Cancer Array-Mini、Tiling Array-15000、アレイモジュール用の微小アレイ(ミニ DNA アレイ)を製作した。

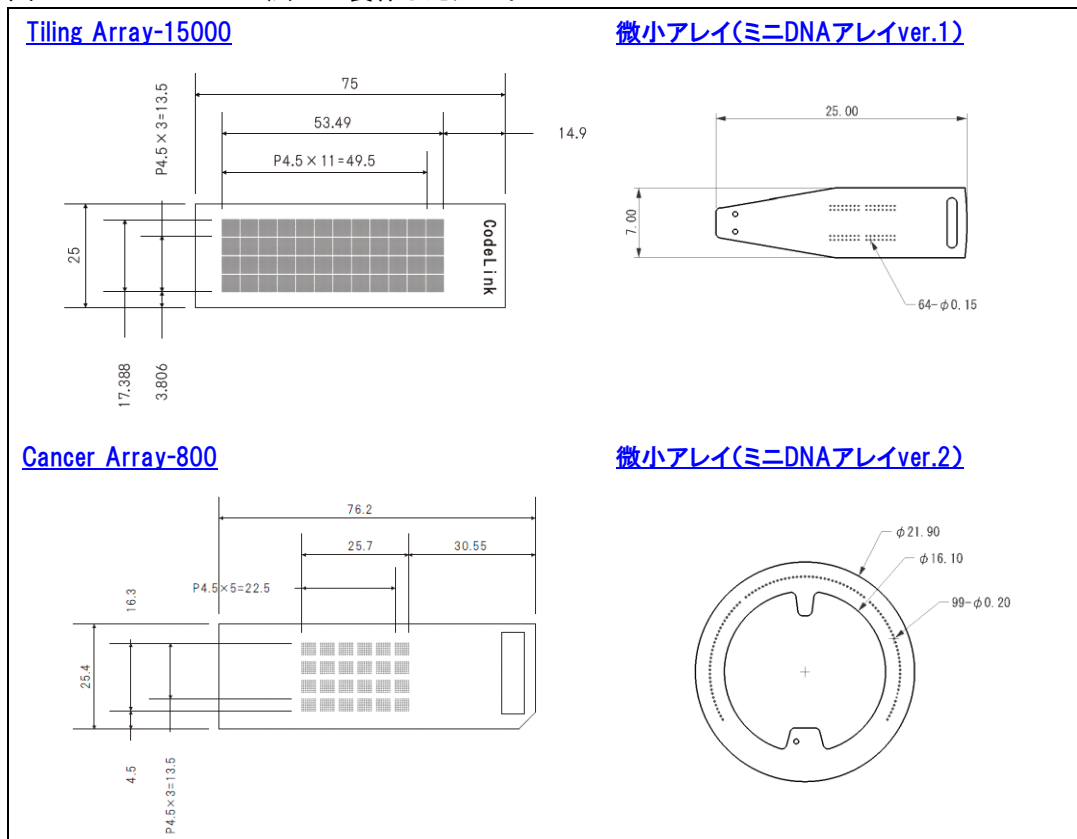
図G-1は、マイクロセラミックポンプを用いて基板の上に、DNA 溶液(BAC DNA)をスポットし、アレイを作製する様子を図で示した。GENESHOT[®]法で得られたスポット形状は均質であり、蛍光シグナル強度に関しても高い再現性を有する事が証明された。

図G-1. GENESHOT[®]法による高密度アレイの作製



図G-2は、GENESHOT[®]法にて製作したアレイのスポット図を示した。Tiling Array-15000、Cancer Array-800、アレイモジュール用の微小アレイ(ミニ DNA アレイ ver.1、ver.2)

図G-2. GENESHOT[®]法にて製作したアレイ



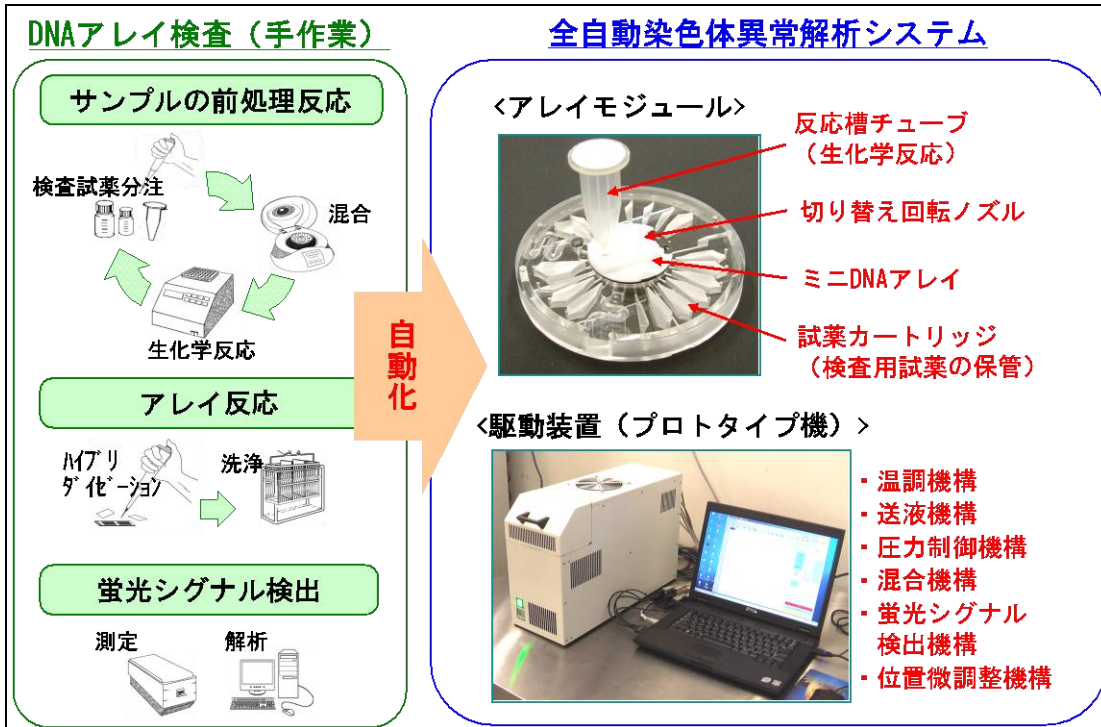
【テーマH】 分散型全自動染色体異常解析装置の開発 (日本ガイシ株式会社)

開発目標は、サンプルの前処理反応、アレイ反応、蛍光シグナル検出の各工程において、効率化、迅速化、低コスト化を図り、診断用アレイモジュールを開発するとともに、機器性能を向上させ、個別化医療を行う臨床現場で活用できる全自動染色体異常解析システムのプロトタイプ機を完成させる。具体的には、微量サンプル(数 ng)から、12 時間以内に染色体異常(増幅、欠失)を、低コストかつ定量性、再現性を確保して検出ができる全自動染色体異常解析システムのプロトタイプを開発する。下記、5 項目の仕様を満たす全自動染色体異常解析システムの開発をする。

- (1) サンプルの微量化: 数 ng (従来; 数 μ g)
- (2) 検査時間の短縮化: 12 時間以内 (従来; 72 時間以上)
- (3) 低コスト化: 数百万円以下 (従来; 市販機器の組み合わせで、約 2000 万円)
- (4) 定量的解析精度: 98% 以上の感度と特異性 (= 正解率 98% 以上)
- (5) 再現性: CV 値 5% 以下

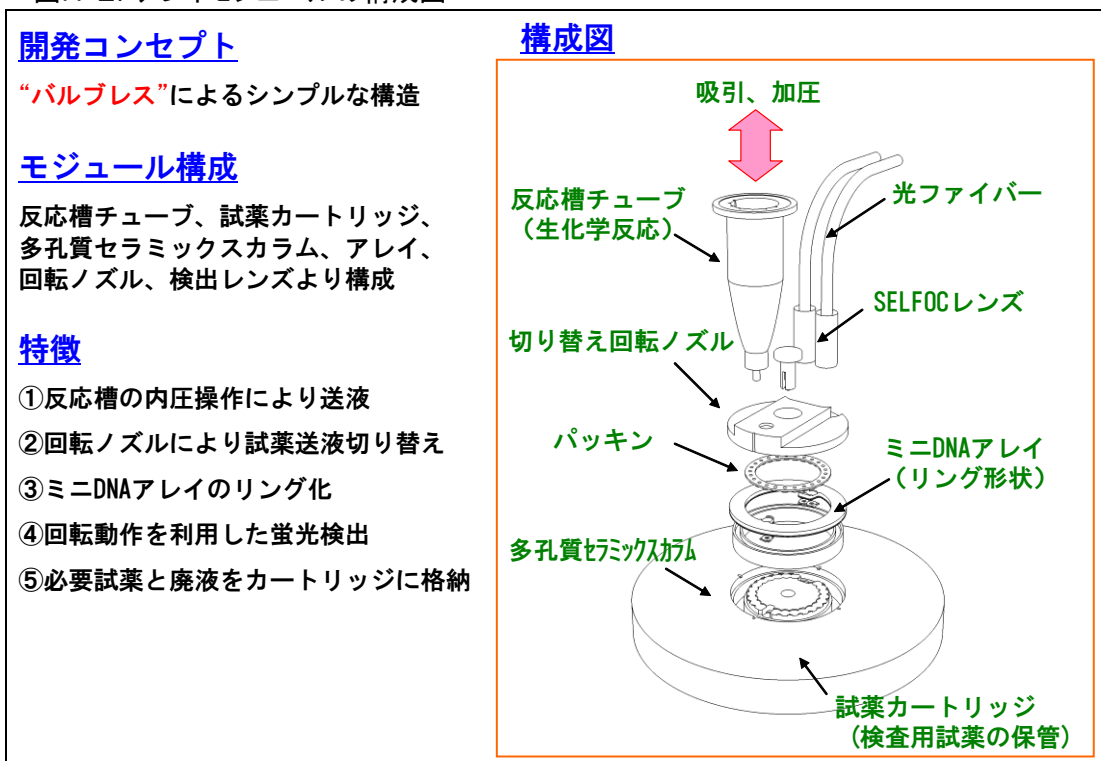
全自動染色体異常解析システムの開発については、微小アレイ(ミニ DNA アレイ)を内蔵した、サンプルの前処理とアレイ反応機能を付加したディスポーザブルのリアクター(アレイモジュール)と駆動装置(プロトタイプ機)を製作し、小型で簡便性を備え、12 時間以内に染色体異常を検出できるシステムの開発に成功した。図H-1左に、従来手作業で実施している DNA アレイを用いた遺伝子検査、図H-1右に、開発したアレイモジュールと駆動装置を図で示した。

図H-1. アレイモジュールと駆動装置(プロトタイプ機)



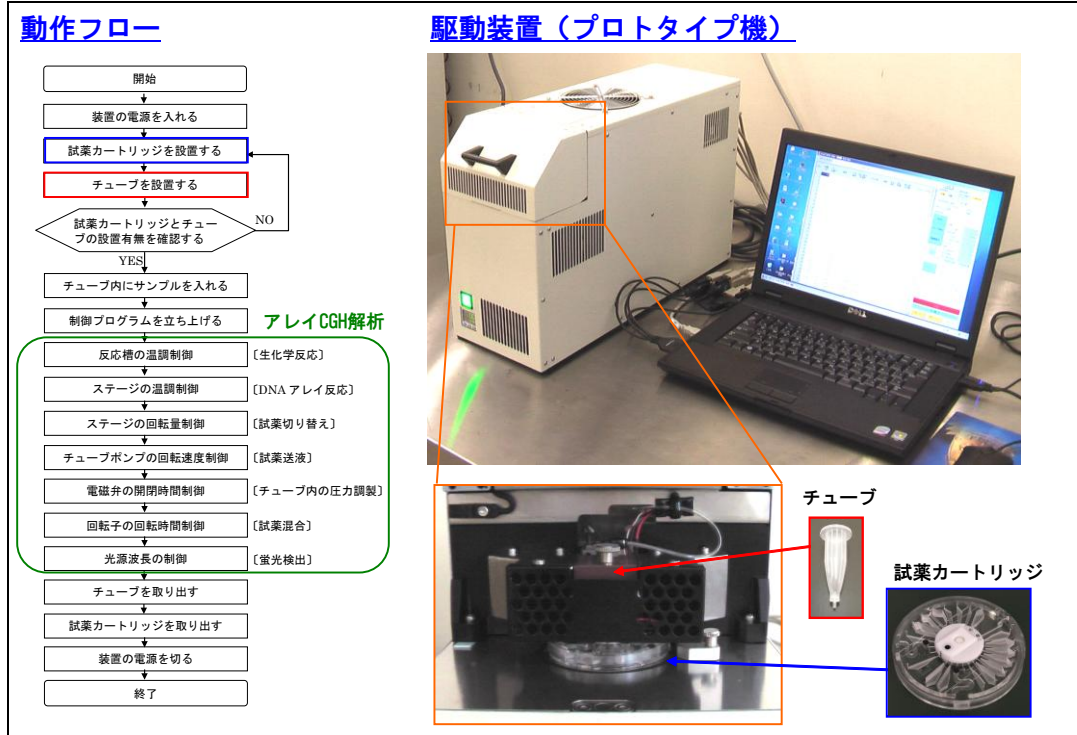
次に、最重要の要素技術である微量流体送液技術を検討した結果、回転部にバルブ機能を持たせ、液の位置制御が容易なバルブレスをコンセプトとした日本ガイシ独自の新しい技術を開発した。さらに、この技術の特徴である回転機構を利用した蛍光シグナル検出技術を開発し、特許出願を行った。蛍光シグナルの検出感度は、ミニ DNA アレイ ver.2(リング形状)へのスポット条件(配置、径)の改良、測定励起波長及び測定条件の最適化を行った結果、低蛍光シグナル(濃度 10nM まで)の検出に成功し、市販器より低コストでほぼ同等な検出感度を得ることができた。アレイモジュールの特徴を図H-2に示した。

図H-2. アレイモジュールの構成図



図H-3に、全自動染色体異常解析システムの動作フローを示した。操作手順は、手作業にて試薬カートリッジとチューブを装置内に設置後、検査サンプルをチューブ内に分注し、パソコン上で任意のプログラムを起動する。

図H-3. 動作フロー図



図H-4. バイोजパン 2009(横浜パシフィコ)の展示パネル



染色体解析技術
開発プロジェクト

DNAアレイ検査 の自動化

日本ガイシ株式会社

アレイ検査を臨床現場へ バルブレスのシンプルな構造で 全自動遺伝子検査を実現

DNAアレイの普及には、煩雑なアレイ検査操作の自動化が必須です。日本ガイシでは、検体の前処理反応から蛍光検出までを自動化し、誰でも使えるアレイ検査機を実現しました。



DNAアレイ



制御温度:
4~98°C

LED励起光:
波長①532nm
波長②635nm

検出:
フォトダイオード



- ・DNA増幅・標識・アレイ反応・蛍光検出迄の全工程の自動検査装置(卓上型)
- ・使い捨ての試薬カートリッジ

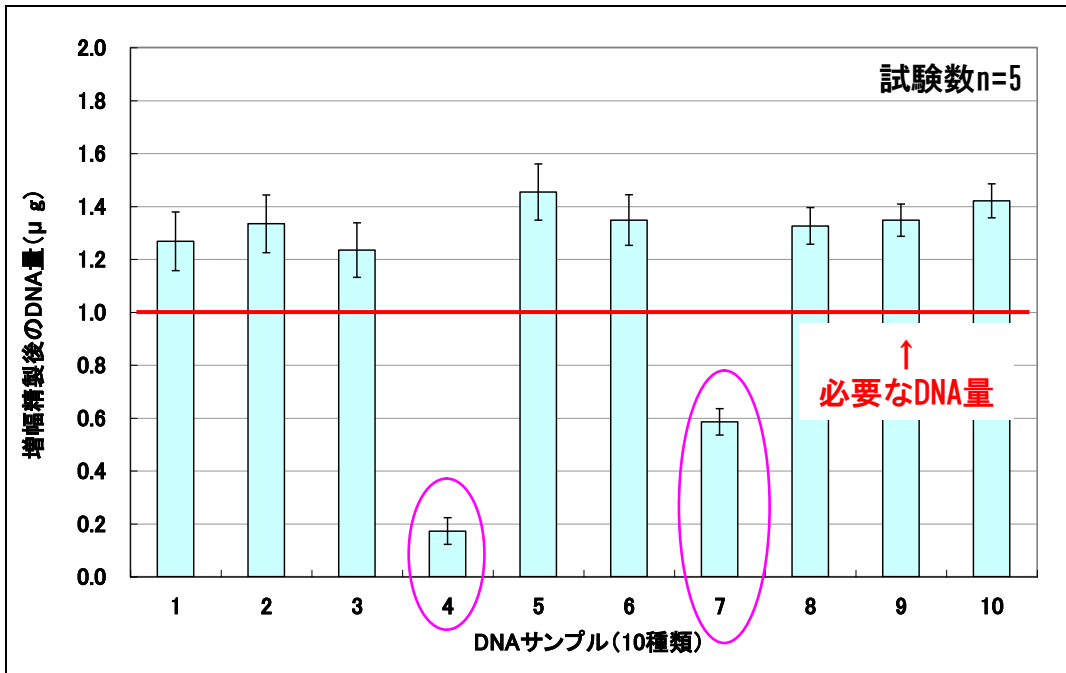
(1) サンプルの微量化

DNA 増幅技術に、微量流体送液技術、カラム濃縮技術(多孔質セラミックスカラム)、微小アレイ技術(ミニDNAアレイ)を組み合わせ、数種類のDNAサンプルを除いて、2.5ng(癌細胞株から抽出したDNAサンプル)のサンプル量から、同日内に染色体異常を検出することに成功した。サンプル量を2.5ngと微量化することで、正確な染色体異常を検出できないDNAサンプルがあり、サンプルの微量化に課題が残った。

図H-5に、癌の細胞株から抽出した10種類のDNAサンプルを用いたDNA増幅試験の結果を示した。10種類中2種類(No.4と7)のDNAサンプルにおいて、必要なDNA量まで増幅させることができなかった。試験に使用したDNAサンプルの吸光度等が正常値であることから、増幅試薬、反応条件に問題があると考えら

れる。増幅試薬を再選定し、その酵素にあった反応条件を再検討することで、サンプルの微量化を目指す。

図H-5. DNA サンプルの増幅結果



(2) 検査時間の短縮化

微量流体送液技術、カラム濃縮技術(多孔質セラミックスカラム)、微小アレイ技術(ミニ DNA アレイ)を組み合わせ、ハイブリ反応液を高濃度化し、ハイブリダイゼーションさせることで、反応時間を 72 時間から約 6 時間まで短縮することに成功した。検査時間を約 12 時間まで短縮することができた。

図H-6. アレイ CGH 解析プロトコル

工程名	作業内容	(詳細条件)	所要時間
1. サンプルの前処理	1-1. 増幅	増幅試薬(REPLI-g)を用いての反応処理 条件[25°C×3min. → 30°C×75min.]	80min.
	1-2. 精製	多孔質セラミックスカラムを用いての精製処理	15min.
	1-3. 断片化	制限酵素(Dpn II)を用いての反応処理 条件[37°C×20min.]	25min.
	1-4. 標識	標識試薬(BioPrime)を用いての反応処理 条件[95°C×5min. → 15°C×3min. → 37°C×60min.]	75min.
	1-5. 精製	多孔質セラミックスカラムを用いての精製処理	15min.
	1-6. ハイブリ反応液作成	コントロール/バッファーを用いての反応処理 条件[95°C×45min. → 42°C×1min → 75°C×8min → 42°C×10min.]	70min.
2. アレイ反応	2-1. ハイブリダイゼーション	パッケージ済みミニDNAアレイへハイブリ反応液を送液し、反応処理 条件[42°C×360min. → 50°C×1min.]	365min.
	2-2. アレイ洗浄	3種類の洗浄液を用いての送液洗浄 条件[50°C×5min. → 42°C×5min. → 27°C×5min.]	20min.
	2-3. 乾燥	エア-送液による乾燥 条件[27°C×20min.]	20min.
3. 蛍光シグナル検出	3-1. スキャニング	2波長測定(励起635: サンプル、532nm: リファレンス)	30min.
計			715min. (約11.9hr.)

(3) 低コスト化

全自動染色体異常解析システムの開発により、病院内検査に適した小型で安価なプロトタイプ機を製作することができた。

量産時(300 台/年)、約 200 万円で製作することが可能なため、市販機器(分注機、ハイブリ装置、検出

器)を組み合わせて製作する場合と比べて、約 1/10 のコストダウンに成功した。

(4) 定量的解析精度

既に東京医科歯科大学稲澤研究室におけるアレイ CGH 解析の結果、詳細なゲノムコピー数異常が明らかにされている、食道扁平上皮癌(KYSE450 と KYSE520)、乳癌(MCF7)、大腸癌(COLO205)、急性骨髄性白血病(HL60)の細胞株から抽出した DNA サンプルを用いて、全自動評価を実施した。その結果、東京医科歯科大学稲澤研究室におけるアレイ CGH 解析結果とほぼ同等な染色体異常を検出することができた。

図H-7に、食道扁平上皮癌(KYSE450 と KYSE520)の細胞株から抽出した DNA サンプルを用いた全自動検査結果を示した。東京医科歯科大学稲澤研究室におけるアレイ CGH 解析結果(Cancer array 800 data or Sanger center data)を用いて、正解不正解を判定し、正解の場合は○、不正解の場合は×と、判定結果の列に表記した。その結果、正解率は、それぞれ“78.8%”、“75.8%”であった。目標値の 98%以上を達成することができず課題が残った。

アレイ反応工程の反応条件(ハイブリダイゼーション、洗浄)を再検討することで、目標値の達成を目指す。

図H-7. 全自動検査結果

ID	KYSE450			KYSE520		
	Cancer array 800 date or Sanger center data	全自動検査結果	判定結果	Cancer array 800 date or Sanger center data	全自動検査結果	判定結果
1	Gain	Gain	○	HG	HG	○
2	Gain	Gain	○	Normal	Normal	○
3	Gain	Gain	○	Normal	Normal	○
4	HG	HG	○	Gain	Normal	×
5	Gain	Normal	×	Normal	Normal	○
6	Gain	Normal	×	Gain	Normal	×
7	Gain	Gain	○	Normal	Normal	○
8	Normal	Normal	○	Normal	Normal	○
9	Normal	Normal	○	Gain	Gain	○
10	Gain	Gain	○	Normal	Normal	○
11	Normal	Normal	○	Normal	Normal	○
12	Loss	Normal	×	Loss	Normal	×
13	Gain	Normal	×	Gain	Gain	○
14	Normal	Normal	○	Normal	Normal	○
15	Normal	Loss	×	Gain	Loss	×
16	Normal	Normal	○	Loss	Normal	×
17	Normal	Loss	×	Normal	Normal	○
18	Normal	Normal	○	Gain	Loss	×
19	Normal	Normal	○	Normal	Normal	○
20	Normal	Normal	○	Normal	Normal	○
21	Normal	Normal	○	Normal	Normal	○
22	Normal	Normal	○	Normal	Gain	×
23	Normal	Normal	○	Normal	Normal	○
24	Gain	Gain	○	Normal	Gain	×
25	Normal	Normal	○	Normal	Normal	○
26	Normal	Normal	○	Loss	Loss	○
27	HD	Loss	×	Normal	Normal	○
28	Loss	Loss	○	Loss	Loss	○
29	Loss	Loss	○	Loss	Loss	○
30	Normal	Normal	○	Normal	Normal	○
31	Loss	Loss	○	Loss	Loss	○
32	Normal	Normal	○	Normal	Normal	○
33	Gain	Gain	○	Gain	Gain	○

Cancer array 800 date

- HG : 高度な増幅 (High level gain)
- Gain : 増加 (Gain)
- Normal : 正常 (Copy number neutral: Normal)
- Loss : 減少 (Loss)
- HD : ホモ欠失 (Homo deletion)

Sanger center data

- HG : 高度な増幅 (High level gain)
- Normal : 正常 (Copy number neutral: Normal)
- HD : ホモ欠失 (Homo deletion)

全自動検査結果

- HG : Log₂比 +2.00以上
- Gain : Log₂比 +0.30以上
- Normal : Log₂比 ±0.30以内
- Loss : Log₂比 -0.30以下
- HD : Log₂比 -2.00以下

※Log₂比は、ミニDNAアレイ内同一スポットの平均値を使用
 ※赤字部は、“Cancer array 800 date or Sanger center data”と異なる箇所

(5) 再現性

定量的解析精度の評価同様に、癌の細胞株から抽出した DNA サンプルを用いて、試験間再現性の確認試験を実施した。その結果、CV 値 8.7~10%であった。目標値の CV 値 5%以下を達成することができず課題が残った。

(4)の定量的解析精度と同様に、アレイ反応工程の反応条件(ハイブリダイゼーション、洗浄)を再検討することで、目標値の達成を目指す。

以上の結果から、サンプルの微量化(数 ng)、定量的解析精度(98%以上の感度と特異性)、再現性(CV 値 5%以下)に課題は残るものの、同日内に染色体異常を検出することができ、全自動化への目処を立てることができた。

【テーマI】 集中型染色体異常解析システムの開発(富士フイルム株式会社)

集中染色体異常解析システムの開発は、抽出した DNA を用いて全自動で多検体の染色体の異常を集中解析できるシステムを構築することであって、当初はハイブリ時間の短縮と低価格化を目標に研究開発を進めていた。ハイブリ時間短縮プロトコル検討の結果、ミニアレイでは 5 時間で結果を出すことができていたが、診断としてニーズがある GD-700 にあわせた形(GD アレイ)で全自動機を開発した方が実用的な価値は高いと判断し、プロトタイプの全自動機を開発するという目標に軌道修正した。よって Dual hybridization 法の開発と同様に、ハイブリ時間短縮に加えて安定化を重点化課題として、検討することにした。

標識工程、ハイブリ工程、解析工程を別々に開発し、最終的にそれぞれを接続することで、全自動化を成し遂げ、安定して集中自動処理でアレイ CGH 解析が行えるプロトタイプを完成させた。

1) プロトコルの安定化

Dual hybridization 法の開発でも触れたが、安定化のために、時間を延長し、洗浄の最適化を実施した。これにより安定して結果の出せるプロトコルを確立し、これを自動機に応用した。

2) 標識工程の自動化

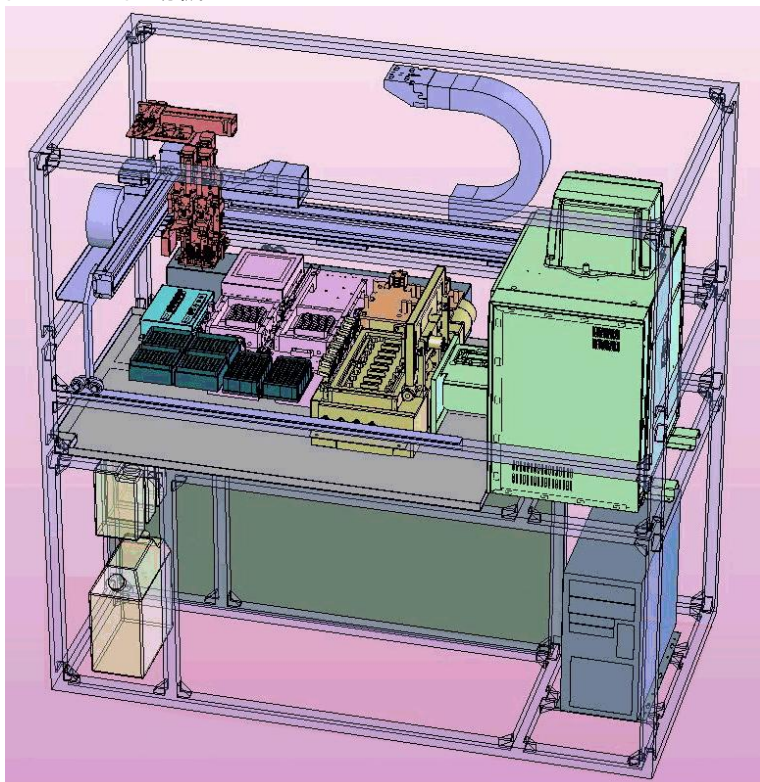
標識工程の要素機を作製し、市販のアレイ CGH キットに付属する試薬の分注方法を検討し、粘性が高い試薬についても微量で分注できる方法を確立した。加えて、標識キットの推奨プロトコルである 100°Cからの冷却行程も時間をかけて冷却することで、良好な結果が得られることを見出した。

次に要素機の結果を全自動機に反映させ、全自動機上で分注ができるように最適化した。

反応槽については蒸発を抑制する方法を採用し、標識プログラムについては、dual hybridization 法だけに特化するのではなく、どんな分注方法・反応条件にも対応できるようなプログラムとし、後の改良に備えた汎用性を付与した。これらを用いて反応検討を行い、最適化することで、標識反応が自動で確実にできるようになった。

遠心機を全自動工程に組み入れることが困難であったため、エタノール沈殿を用いてハイブリ液を交換する工程についてだけは、人が介在する。しかし、エタノール沈殿時に使用する試薬についても、反応後自動で分注することにより、人が介在する部分は、遠心機で遠心し上清を取り除くという簡便な操作のみになった(図I-1)。

図I-1. 全自動機イメージ



3) ハイブリ工程の自動化

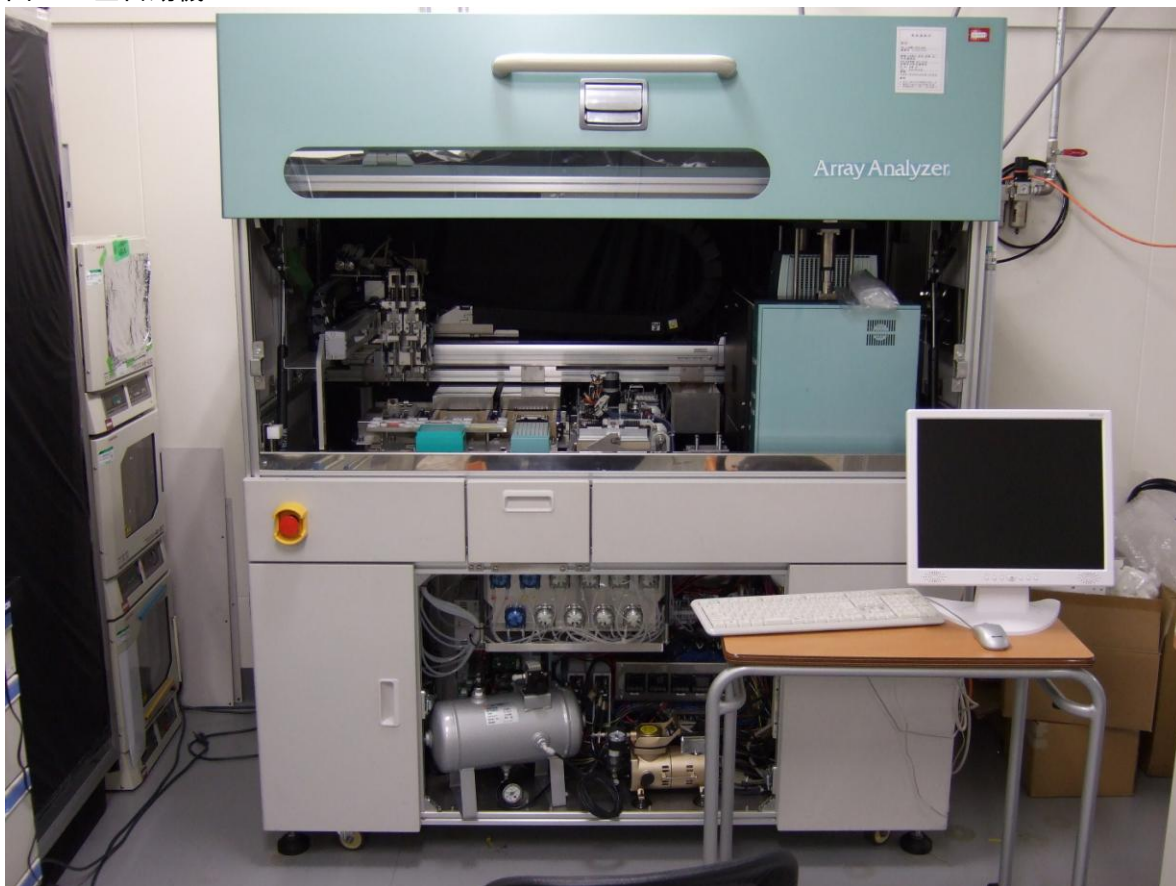
ハイブリダイゼーション工程についても要素機を作製し、短時間化に向けた検討を行った。当初回転方式を採用し、検討を行い、15 スポットのミニアレイであれば、5 時間で結果を出せることを確認した。しかしながら、多スポットのアレイの場合、ムラが発生し、良好な結果を得ることができなかった。次に超音波でハイブリ液を攪拌する方法を検討したが、数時間超音波を印加するだけでも高温となってしまう、ハイブリ温度を一定に保つことが難しく、この検討も失敗に終わった。

ハイブリをムラ無く実施する方法としては、全てのスポットに対して、ハイブリ液が厳密に均等に接する条件でなければいけないことが分かった。また短時間化には、標識 DNA とスポットの DNA との衝突頻度を向上させる必要があることが分かった。そこで、既存の機器から出発して改良を加えてハイブリの安定性を付与することにした。

既存の機器においては、洗浄液の排出時に攪拌部位が小刻みに可動するため、ムラの原因となっていた。そこで、本全自動機のハイブリについては、洗浄液の排出時にハイブリ槽全体を傾けることで、攪拌部位の可動無しに、排液を実現し、ムラ発生を除外する画期的な方法:「ティップタンク法」を開発することで、この困難な課題のブレークスルーを達成した。

以上の検討の結果、ハイブリダイゼーション工程を完成することができた。ハイブリ治具をハイブリ槽の蓋に取り付けることで、コンパクト化を実現した(図I-2)。

図I-2. 全自動機



4) 高感度 CCD モジュールを活用した簡便な撮像型蛍光検出システムの開発及び、解析工程の自動化

安価なスキャナーを開発する目的で、撮像型スキャナーの開発を行った。従来のスキャナーは走査型であって、小さな領域をレーザーとフォトマルが動くことでスキャンしている。走査型はレーザービームやフォトマルを走査し、迷光を除去するための光学系・機構部品が必要となるため、高価になる。一方で、撮像型スキャナーは CCD を用いることでいわゆるカメラのように画像を撮影することで原理的に安価にすることが出来る。

今回は富士フィルムの冷却ハニカム CCD を用いた検出ユニットと、顕微鏡光学系を組み合わせることによ

り、アレイ画像の安定的な取得を目指した。Dual hybridization 法と GD-700 に適合させるために、2 色のレーザーを搭載した。

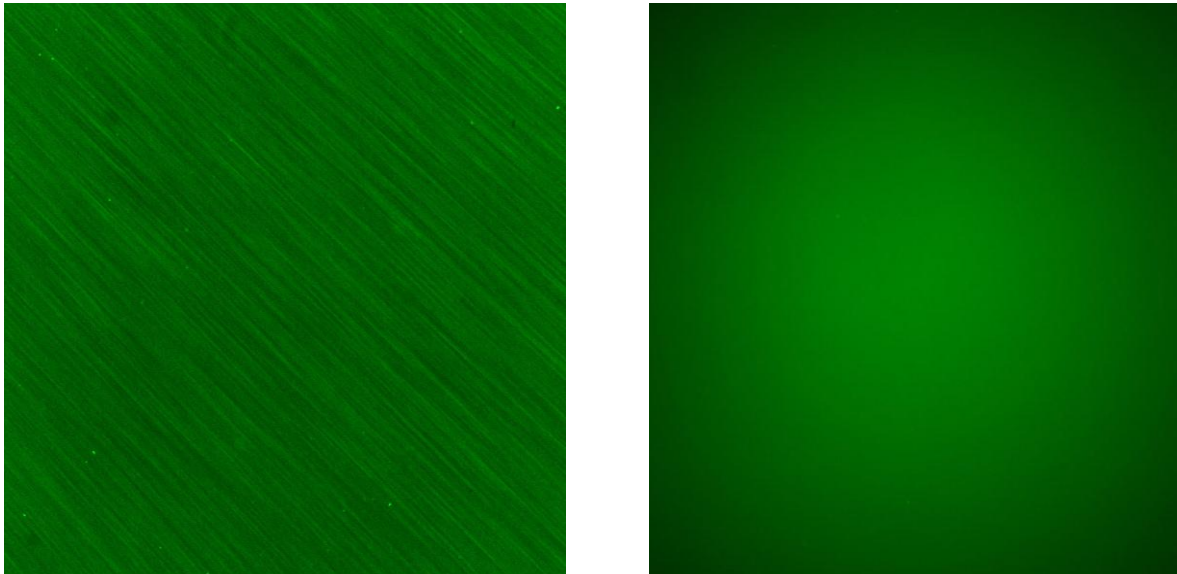
撮像型の場合、アレイ上の全てのスポットに対し、均等に光を当てなければいけないが、レーザー光自体は、光が集中しており、そのままではアレイの一部しか光を当てることができない。そこで、ディフューザーを用いてレーザー光を広げることで、アレイに全体に均等に光を当てることが目指した。

レーザー光は、広げてしまうとムラが目立ってくる。単に拡散しただけであるとレーザームラが結果に影響を与え、良好な結果を得ることができなかった。ディフューザーを検討することで、光を均一化し、加えて、スライドガラスの下部空間の工夫、検出側のフィルター配置の工夫などにより、S/N 比を上げ、より安定的な結果を得ることができるようになった。

このようにして得た画像をデータ化するために、富士フイルムが独自開発していたアレイゲージのアルゴリズムを応用し、作業者の手を煩わせることなく画像の数値化を可能にした。画像の数値化と共に、解析ソフトにエントリーできるようにした。

解析ソフトについては、結果を算出するための演算を行い、Dual hybridization 法の特徴を最大限生かせるように、エントリーした標準・検体同士をどんなパターンでも比較できるようなソフトを作成した。臨床検査会社である株式会社ビー・エム・エルとも協働して実情にあったソフトを開発した(図I-3)。

図I-3. スキャナ画像、改良前(左)改良後(右)



5) 自動化

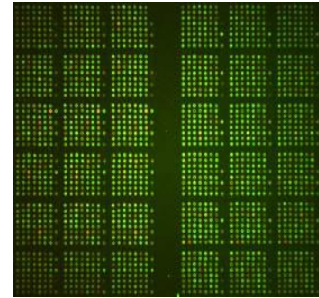
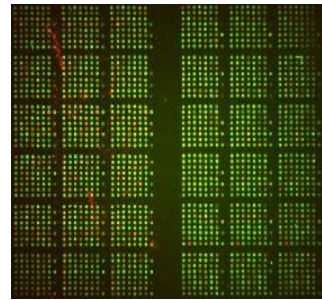
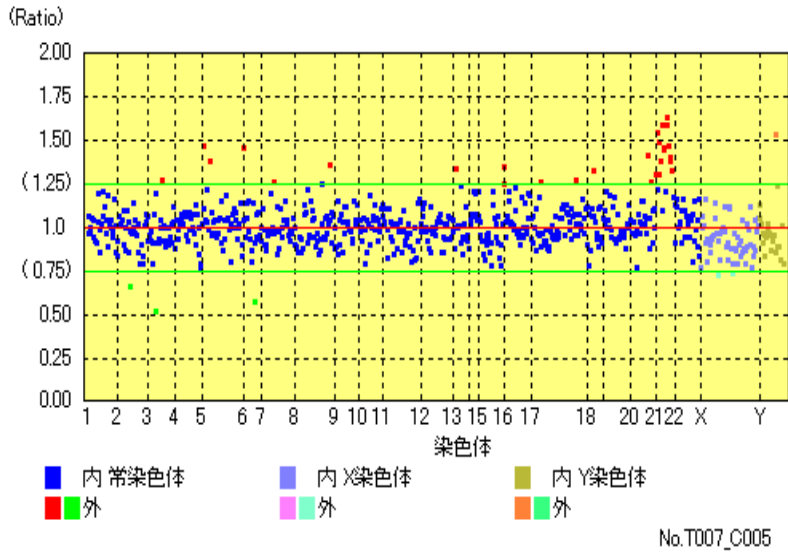
以上、標識・ハイブリ・解析工程を個別に開発してきた。各工程を接続し、を自動化するには次のような課題があった。ハイブリ工程から解析工程に移る際、解析工程ではスライドガラスを 1 枚ずつ撮影するため、2 枚以上解析するには、撮影前のスライドガラスは、他のスライドガラスを撮影している間、ハイブリ槽内に留めておかなければならず、ハイブリ槽の蓋の開閉で、スライドガラスに液滴が付着するため、スライドガラス上で液滴が乾燥し塩が析出し、これがノイズの原因となっていた。

この問題を解決するため、塩をなるべく用いないプロトコルに変更し、スキャンしている間は、撮影前のスライドガラスをハイブリ槽の外に置く設計に変更した。

これにより、自動化を成し遂げプロトタイプ機を完成させた。

コリエル医療研究所から入手した細胞からゲノムを抽出し、GD-700 を用いて全自動機による CGH 解析を行ったところ、トリソミー21 のダウン症例由来細胞 DNA (ATCC で販売供給)などの既知コピー数異常を有する細胞 DNA を試料にした検討において良好な結果を得ることができた(図I-4)。

図I-4. ダウン症解析結果



ダウン症解析結果

IV. 実用化、事業化の見通しについて

IV-1. 実用化等の見直しについて

研究開発項目 1) BAC を用いた高精度全ゲノムアレイの開発

・日本人全ゲノムアレイの実用化

中間評価において当該「日本人BACを用いた革新的染色体異常解析基盤技術の研究開発」について、産業技術総合研究所のBACアレイの構築と参画企業の技術開発の一体性が見えないとの指摘を受けた。この指摘に対応するため、最終目標達成の過程において産業技術総合研究所は山口大学医学部との共同研究により臨床診断用の日本人BACクローンを用いたミニアレイの作製を行った。この日本人BACミニアレイをトーヨーエイトック株式会社のスポッティング技術により作製し、和光純薬株式会社の新規開発蛍光試薬を用い、横河電機株式会社のハイブリダイズ装置および検出システムを用いて計測を行い、参画企業の革新的技術開発を幹事企業の横河電機株式会社が全体システムとして統一した。

・BACアレイの優位性について

発現解析で用いられていたSNPチップが製作企業であるアフィメトリクス社の意図に反してCGH解析に用いられて以来、測定対象検体のDNAと対照DNAをアレイ上で同時に競合的にハイブリダイズするCGHアレイ法は信頼性の高い手法として全ゲノム領域解析(WGA)に用いられている。しかし日本人のBACクローンのショットガン解析に基づく欧米人ゲノムとの比較により、日本人のSNPは欧米人のSNPと大きく異なる可能性が示された。また技術的にSNPチップに用いられる合成DNA断片がBAC DNAに比べて短いことから、ハイブリダイズ効率がBACアレイに比べ低い。したがって計測信号強度は圧倒的にBACアレイが優れている。臨床診断は出来る限り信頼度の高い計測に基づくべきであり、ノイズの少ないBACアレイの計測感度の優位性はゆるがない。

研究開発項目2) 染色体異常を解析する革新的要素技術の開発

2)-1 高精度表面加工修飾技術の研究開発

本研究開発において、横河電機株式会社様のハイブリシステムに併せたデザインのミニDNAアレイチップを試作し、産業技術総合研究所様より提供を受けたBAC-DNAを搭載した。さらに同ミニDNAアレイチップを用い、山口大学様より提供を受けた胃癌培養細胞より得たサンプルについて、評価解析できることを示した。今後は本研究Grの要素技術を組み合わせたがんの診断あるいは予防システム等の実用化を主体に、DNAチップの実用化を目指す。

2)-2 新規ゲノムアレイ用蛍光標識化技術の研究開発

既存の蛍光物質を用いて蛍光標識試薬(ゲノムDNA標識キット)を開発。特許(PCT JP2008/051215)を出願し、初期の目標を上回る蛍光標識試薬(ゲノムDNA標識キット)の事業化を行った。

新規蛍光標識ヌクレオチドWY535-S3-dCTPおよびWY635-S3-dCTPを用いて、新規蛍光標識試薬の試作品を作製し、マクロジェン社製BACアレイでCGH解析を行ったところ、1コピーの差を十分に検出できる結果を得た。さらに、本プロジェクトで作製したミニアレイでCGH解析を行い、十分な輝度が得られることを確認した。また、トーヨーエイトック社製基板に山口大学で見出され、産総研で作製された日本人BACをアレイ化した胃癌ミニアレイと和光純薬において開発した新規蛍光標識をもちいて胃癌培養細胞より得たサンプルを標識し、横河電機社製ハイブリダイゼーション装置でハイブリダイゼーションを行い、横河電機社製スキャナーで検出し、CGH解析を行ったところ、評価解析できることがわかった。以上の結果から、初期の目的であるレーザースキャナーの励起波長にあった蛍光色素を合成し、2種類の蛍光色素の取り込み率を最適化することで、精度の高い蛍光標識試薬を開発できた。以上の結果から初期の目標であるレーザースキャナーの励起波長にあった蛍光色素を合成し、2種類の蛍光色素の取り込み率を最適化することで、精度の高い蛍光標識試薬を開発できた。

今後、保存安定性、データの再現性について検討し、新規蛍光物質での蛍光標識試薬の実用化を目指す。

2)-3疾患別アレイハイブリシステムの研究開発

本人BACを用いたCGHスクリーニング解析の成果を、実際の臨床検体で検証するための要素技術開発を進めてきたが、今後は個々の要素技術の完成度を高め、実証結果等を反映することによって、実用化への展開・応用・連携を進めることが重要である。

物理的ハイブリシステムの研究開発では、ハイブリユニットと処理装置によるシステム化を実現できた。また物理攪拌によりハイブリ光量への約2倍の効果を確認できた。

さらに、深い焦点深度の読取装置の研究開発では、新パターンによるマルチビーム・ディスク方式により、深い焦点深度、高感度、高S/N、を確認できた。また2色の液中計測が可能な装置を実現できた。

実用化に向けた技術的な課題としては、以下のようなものが想定される。

・ハイブリユニットの小型化・簡易化。これは、すでにハンディタイプではあるが、これをさらにコンパクトで使いやすくすると共により安価にしていくことで実用化を進める。このためには内部の構造の工夫と最適化が重要であるが、同時に、材料や温度特性の性能を限界まで引き出す処理プロトコルの工夫も大切である。

・読取装置の低廉化： 今回の読取装置は、深い焦点深度や液中観察といった、ハイブリユニットで重要とされる新機能を実現している。同時にレーザにより高感度で読み取る方式は、他の分野への広い波及の可能性を持っている。このため、この読取装置はハイブリシステムとしてのブラッシュアップを行うと同時に、他の分野への展開も積極的に進めることが期待される。この場合、性能や機能は保持したまま、低廉化が期待される可能性が高い。このため、量産向け再設計等の検討を開始することが実用化のためには重要であると考えられる。特にこの読取装置については、横河電機では平成23年度から実用化の検討を開始している。

・データ処理/操作を含めた容易化： 今回のシステム連携評価は、研究開発者が自ら実施したため、特に訓練等は不要であった。しかし、実際にシステムを実用化へ進めるためには、フィールドテストを実施し、多数の研究者の意見や実験結果等を得て、それを反映していく必要がある。特に、ハードウェアだけでなく、データ処理方法や、PCだけではなく装置全般のヒューマン・マシン操作系は、開発者には使い勝手がわからないことが多い。これらを随時システムに反映していくことが重要である。

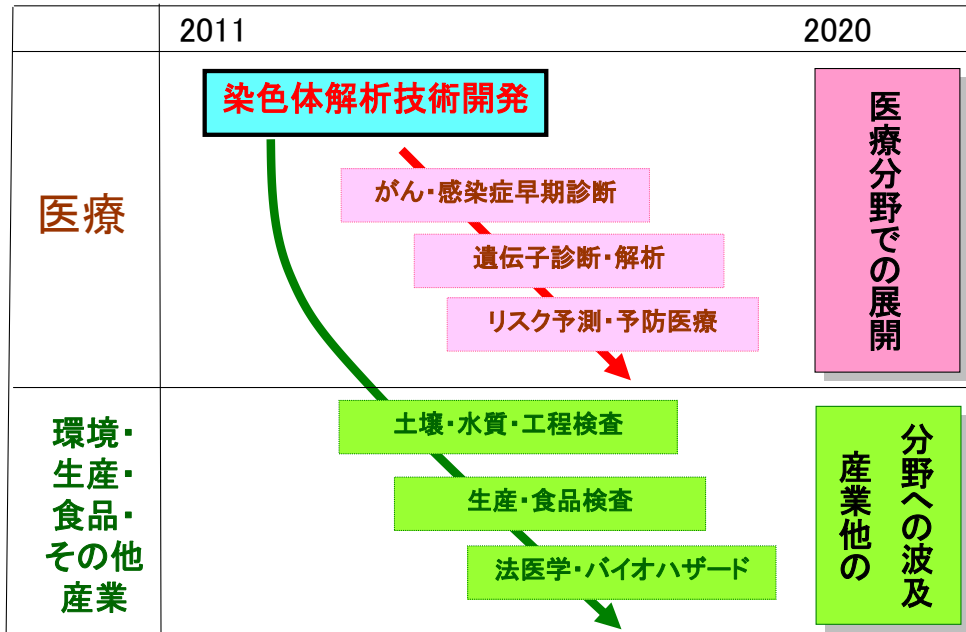
波及効果について

本開発では、染色体異常を解析するための3次元ランダム攪拌による物理ハイブリの動作が可能なハイブリユニットと、深い焦点深度で高性能の読取装置を開発してきた。このシステムの技術は、染色体異常の解析という目的を超えて各種の分野に応用・展開が可能であり、波及効果が期待できる。

医療分野では、染色体異常によりがんの診断を目的としたコンテンツを重点的に開発を進めてきた。この技術は、同じように核酸を用いる多くの分野に展開できる。すなわち、遺伝子診断や感染症、遺伝子による各種リスクの予測、そしてこれからの医療費の増大を抑制するために重要な予防医療などである。これらの医療分野で使用するには、コンテンツと呼ばれる個々の遺伝子情報が重要であり、そのためには医療機関や大学・研究機関、そしてNEDOなどの実用化・事業化サポートも重要となる。

また、医療分野以外でも、多くの遺伝子の計測が期待されている。特に、近年は、安全・安心・持続可能社会が社会要請として求められている。このためには環境・生活・生産・食品・その他産業などの分野で正確で迅速な計測が必要である。すなわち、土壌や水質、大気中などの微生物などの検査、食品や薬品など生産や工程内の各種製品や雑菌などの検査などである。さらに、安全・安心の面と、国際化の面から法医学やテロ・バイオハザードでも遺伝子の計測の比重が高まっている。

これらに対して、本開発の成果は、検出手段であるハイブリの効率化や自動化、そして読取装置の高性能化を順次提供し、計測作業の効率化と高精度化に貢献していくことが可能である。



IV-2. 実用化、事業化の見通し

研究開発項目3)臨床診断用全自動染色体異常解析システムの開発

【テーマA】 BAC DNA の調製と無尽資源化の半自動化 (株式会社ビー・エム・エル)

本テーマで作製した半自動化装置は後述する“テーマB”の WG15000 の作製に使用され期待した性能を発揮した。一方、本プロジェクトで実用化を検討した Genome Disorder Array (GD アレイ)は平成 21 年に富士フイルム株式会社により商品化された(商品名「GD-700」)が、GD-700 の商品化前段階の試作品作製過程に本自動化装置が有効に活用された。本テーマで得られた BAC DNA の調製と無尽資源化の半自動化のノウハウは、今後の BAC DNA アレイ製品の実用化において、スライド製造における省力化、ローコスト化に寄与することが期待される。

【テーマB】 ヒト染色体タイリングアレイ(WG15000)の作製 (株式会社ビー・エム・エル、

東京医科歯科大学、国立がん研究センター)

ヒト染色体タイリングアレイは本プロジェクトにおいて東京医科歯科大学稲澤研究室で構築された日本人健常者 CNV データベースの CNV 情報収集のために実用された。一方、ヒト染色体の全ゲノムを対象とした異常を解析できるアレイとして研究用途での実用化も可能である。富士フイルム株式会社は米 RPCI と RP-11 BAC ライブラリーの商用利用の契約を締結している。研究用ゲノム解析の需要が見込める可能性が高く、研究用途としてヒト染色体タイリングアレイを製造、販売することが可能である。BAC DNA を使用したヒト染色体タイリングアレイはオリゴヌクレオチドを搭載したタイリングアレイと質的に異なっており、ゲノムのコピー数変化(増幅及び欠失などの CNV)を解析する手法として精度及び特異性において優れている。本ヒト染色体タイリングアレイは高精度のゲノムアレイであり、癌および遺伝性疾患の患者を対象として疾患ゲノム解析の進展に貢献することが期待される。

【テーマC】 日本人ゲノム多様性データベースの構築 (東京医科歯科大学)

ヒトゲノム解析の進展により、1塩基多型(single nucleotide polymorphism; SNP)はヒトゲノム中に約 1,000 万箇所存在すると推定され、これが個別化医療を行う上での重要な根拠となっている。さらに、民族によってもその存在頻度に大きな差があり、それを考慮した医療が必要となる。一方では、CNV データベースが公表(Nature Nov.22, 2006)され、その存在頻度はヒト全ゲノムの 12%(約 360Mb)と極めて高いことが判明した。従って、de novo 発生 CNV の座位、頻度、特徴などの詳細な情報を格納した日本人 CNV データベースの構築は極めて重要であり、日本で個別化医療を進める上で必須となる。

本プロジェクトで得られる日本人 CNV データベースについて公表する予定であり、研究レベルでのゲノム解析に大きく貢献すると同時に「診断の正診率」の向上のための基盤データとして使用する予定であり、先天性疾患及び癌の診断に重要な役割を担う。

【テーマD】 Genome Disorder Array と Cancer Array-800 の実用化 (東京医科歯科大学、

株式会社ビー・エム・エル、富士フイルム株式会社、旭川医科大学)

1. GD アレイの実用化

これまでの成果として先天性異常症候群及び精神遅滞を伴う多発性奇形症候群の診断に GD アレイが使用可能であることを証明した。この成果を受け、平成 21 年に富士フイルムより GD アレイ(商品名「GD-700」)が発売され、既に株式会社ビー・エム・エルにて有償受託が実施されている。東京医科歯科大学では平成 22 年度中には日本人 CNV データベースを完成させ、平成 23 年度に公開の予定であるため、その内容を取り入れ、正診率を向上させた GD アレイ解析受託を行う予定である。米国では Signature Genomics Laboratories 社、Baylor 医科大学がアレイ CGH 法に基づく先天性疾患の診断を実施している。米国では二色蛍光法を用いているため、その知財を有するアボット社(オリジナリティは UCSF)に特許実施料を支払う必要があるが、我々は独自の Dual ハイブリ法(特許出願)を使用するため、特許に抵触せずに検査の実施が可能であり、十分な競争力があると考えている。また、アレイに搭載するコンテンツについても日本人患者の実績に基づいて日本人に適しており、この点でも有利である。さらに、GD アレイでの検査がネガティブの場合に、必要に応じて WG4500、或いは WG15000 等を用いて全ゲノム上での異常を隅々まで網羅的に調べる事が可能である。この結果、これまで原因不明と診断されてきた先天性疾患の比較的多くの症例で原因が特定できる可能性が高くなると考えている。現在でも

疾患の診断が明確になれば、患児の成長に伴う病態の予測が可能になり、対症療法により QOL を改善できる可能性がある。さらに、将来、疾患の原因が特定されることにより遺伝子治療、或いは、原因遺伝子産物の阻害剤の開発に基づく治療の可能性もあり、最先端のアレイ技術を開発して先天性疾患の精度の高い診断を行うニーズは高い。

GD アレイを用いて診断する疾患は先天性異常症候群に加えて、流産産物の解析を含む不育症の領域に拡大する事が期待される。さらに、その次には羊水細胞や絨毛細胞を対象にした出生前の診断も視野に入れている。社会的に出生前診断が生命倫理的に認められるために時間がかかると思われるがそれ迄に実現できるように準備を進めていきたい。出生前診断については産み分けの倫理的問題がクローズアップされてしまいがちであるが、出産に安心と希望をもてるメリットがありカウンセリングを併用して対応できる社会的状況の確立がまず必要である。

2. CA800 の実用化

癌は日本で死亡率第一位(約 30 万人)の疾患である。癌の個別化医療は癌患者の QOL の向上、抗癌剤による副作用の低減、医療費削減のために必須の課題である。

既に、東京医科歯科大学では 700 例超の固形癌データベースが構築されており(CGH データベースとして公開)、これに、平成 20~21 年度は大腸癌、食道扁平上皮癌、肝癌の解析データを追加し、実用化を検討した。

3. 事業化のシナリオ

事業化まで次のステップを順次進める。i)~iv)は GD アレイに関しては既に実施済み。

- i) 販売用アレイに搭載する RP-11 BAC ライブラリーを商用使用するために、RPCI と契約を締結する。
- ii) GENESHOT[®]法を用いてスポットティングを行い GD アレイ及び CA800 を製造する(日本ガイシ株式会社)
- iii)アレイの販売は Dual ハイブリ法のプロトコルを使用するため、二色蛍光法の特許に抵触することなくスムーズな販売ができる。
- iv) 株式会社ビー・エム・エルが GD アレイを用いて先天性疾患及び不育症の診断について臨床検査を受託する。株式会社ビー・エム・エルにおいては、平成 21 年 10 月より GD-700 を用いた先天性疾患解析の一般受託検査を開始、平成 23 年 8 月までに依頼を受けた 30 検体に対し検査を実施し、4 検体で染色体微細異常を検出している。さらに、CA800 を用いた大腸癌、食道扁平上皮癌、肝癌のゲノム異常解析について受託する。両検査受託は製造承認申請前であるため、自由診療として実施する。
- v) 上記両受託を他臨床検査センターに波及させる。
- vi)癌の診断の状況を判断し、富士フィルム株式会社が平成 24 年度以降に製造承認申請の準備を進める。癌診断の市場規模は大きく、個別化医療への貢献度も高い。
- vii) 海外展開も視野に入れている。Dual ハイブリ法を使用するためにコスト競争力があり、欧米のアレイ CGH と競合できると考えている。富士フィルム株式会社は欧米に拠点を有するため、海外展開が可能である。

【テーマE】 Cancer Array-1500(CA1500)の作製と評価 (東京医科歯科大学、国立がん研究センター、株式会社ビー・エム・エル)

次のテーマFの項目で述べる。

【テーマF】 がんの染色体異常とコンテンツ開発 (東京医科歯科大学、国立がん研究センター)

1. 固形癌を診断するための BAC DNA コンテンツの絞込み

癌ゲノム異常の解析に用いた CA800、CA1500 及び WG4500 アレイに搭載された BAC クローンの中から、術後生存率(予後)、再発率、その他の臨床病理像と相関するコピー数異常を検出した BAC DNA コンテンツの抽出を行った。国立がん研究センターでは、過去に CA800 を用いて解析した肝癌、膵癌、肺癌を含めて、癌の個別化医療を行うための診断用 BAC DNA コンテンツとして使用可能な BAC クローンを選出した(表 7)。肝癌 23 クローン、膵癌 75 クローン、肺腺癌 45 クローン、肺内分分泌腫瘍 36 クローン、

胃癌 32 クローン、腎癌 100 クローンとしているが、各癌腫において抽出したこれらのコンテンツには重複が含まれるため、すべてのリストを精査し、癌の個別化医療に最適な診断用コンテンツの絞り込みを行う必要がある。表には個別研究により、ゲノムコピー数異常領域内から同定した診断・治療標的候補分子のリストも含めた。

表 7 各癌腫において臨床病理学的因子と相関する BAC クローンの抽出

	ゲノムコピー数異常を検出するBAC クローン(遺伝子)		発現解析・機能解析・その他 診断・治療標的候補分子	文献
	高頻度/高等 度異常	臨床病理学的因子相関 (生命予後・再発・転移・分 化度等)		
肝癌	23	23	PEDF, MOS, RPS6KB1	1, 2
膵癌	38	75	Smurf1, TRRAP, BCAS1, VCL	3
肺癌(腺癌)	53	45	EGFR mutation, MET	4
肺癌(内分泌 腫瘍)	59	36	DEK	5, 6
胃癌	140	32	KLF12, ERBB2, HCK, TIE1, TEK, BTK, CSK, NTRK3, LTK, ROR2、他	7, 8
大腸癌	150	nd	-	-
腎癌	58	100	VHL mutation	9

1. Katoh et al, J. Hepatol., 2005
2. Katoh et al, Gastroenterology, 2007
3. Loukopoulos et al, Cancer Sci., 2007
4. Shibata et al, Clin. Cancer Res., 2005
5. Peng et al, Cancer Sci., 2005
6. Shibata et al, Oncogene, 2010
7. Nakamura et al, Int. J. Cancer, 2009
8. Kubo et al, Carcinogenesis, 2009
9. Arai et al, Clin. Cancer Res., 2008

東京医科歯科大学がこれまで進めてきた食道扁平上皮癌、その他の 700 例超の固形癌ゲノム異常の解析データについても有効活用し、平成 22 年度には癌診断用のミニアレイ(CA-Mini)に搭載する BAC DNA を確定した。

2. 事業化のシナリオ

事業化のシナリオはテーマD「Genome Disorder Array と Cancer Array-800 の実用化」とほぼ同じである。即ち、富士フイルム株式会社が RPCI と契約を締結して RP-11 BAC ライブラリーの商用使用権を得て、癌診断用ミニアレイに搭載する BAC DNA 及び BAC プローブを製造する。アレイの作製は日本ガイシ株式会社にアウトソースする。この時点で集中型と分散型の染色体異常解析装置を完成する予定であり、本装置にミニアレイを搭載して全自動で癌の染色体異常を解析できる状況となる。ミニアレイの形状は集中型と分散型の解析装置で違いがあり、癌種によりアレイに搭載するコンテンツが異なる。診断する固形癌は食道扁平上皮癌、腎癌、大腸癌、口腔癌、肝胆膵癌、骨軟部腫瘍である。日本人ゲノム CNV データベースは平成 22 年度に構築し、平成 23 年 4 月に公開予定である。その内容を反映することにより正診率の高いアレイを作製する。測定方法は Dual ハイブリ法(特許出願)を用いるため二色蛍光法の知財には抵触せず、臨床検査センター或いは医療機関に納得のいく価格帯でのミニアレイの販売が可能であると考えている。

臨床検査に関しては、平成 24 年度以降に株式会社ビー・エム・エルが集中型染色体異常解析装置にミニアレイを搭載し解析を行う事により上記固形癌の臨床診断を自由診療として受託する。集中型染色体異常解析装置に至る前処理(DNA抽出)工程については、改装によりDNA抽出機能を実装した BAC DNA 無尽資源化用ロボットを用い、臨床検体からDNA抽出溶液までの品質とトレーサビリティを担保する。その後、他臨床検査センターに波及することになる。一方、癌専門病院の検査室では小型の分散型染色体異常解析装置を設置して、上記固形癌の検査を実施する。

富士フイルム株式会社は平成 24 年度以降に状況が整った所で、製造承認申請を行う予定である。その後、海外の状況を判断し、タイミング良く海外進出を図る。

ミニアレイを用いた癌の診断は予後予測、癌の悪性度、リンパ節転移の可能性、抗癌剤感受性等について結果が得られるので、癌の個別化医療に必須の遺伝子診断項目になると考えられる。癌診断の市場規模は極めて大きく、遺伝子検査の価格も遺伝子発現を解析する検査、例えば、乳癌の悪性度(再発の有無)を調べる Oncotype-DX (米 GHI 社)では 1 検査約 40 万円強と高額である。本ミニアレイを用いた検査ではその 1/5~1/10 程度の価格設定は可能であり、ユーザーフレンドリーな品質・精度・価格でこの分野の先陣を切って事業化を進めていきたい。

【テーマG】高密度アレイの試作 (日本ガイシ株式会社)

日本ガイシ株式会社は GENESHOT[®]法を用いた BAC DNA のスポットティングによるアレイの製造を事業として行っている。今後もさらに、アレイの製造に改良を加え、より優れた製品の供給を行っていく所存である。

【テーマH】分散型全自動染色体異常解析装置の開発 (日本ガイシ株式会社)

全自動染色体異常解析システムの開発について、病院内検査に適した小型で安価なプロトタイプ機の製作に成功し、癌の細胞株から抽出した DNA サンプルを用いて全自動で試験評価を実施することができた。開発目標をすべてクリアすることはできなかったが、全自動化へ繋がる一定の成果を上げることができた。今後は、アレイ CGH 診断市場の動向をフォロー調査しつつ、時期を見て、今回開発したプロトタイプ機をベースにした全自動機の投入に繋げていきたい。また、弊社のプロトタイプ機の原理、コンセプトは、アレイ CGH 専用ではなく、汎用性にも優れていると自負しており、将来的には、その他 DNA 分野 (SNP、発現)、抗原/抗体分野等にも展開を図っていきたい。

【テーマI】集中型染色体異常解析システムの開発 (富士フイルム株式会社)

集中染色体異常解析システムの開発として、今回、プロトタイプ全自動機を用いて評価ができるようになった。即ち、将来全自動機として用いるための要素技術を確立でき、一定の知見を得ることができた。本来ならすぐにもでも商用に試作機等を作製したいところであるが、GD-700 をはじめとしてアレイ CGH 診断の市場が広がりを見せておらず、検査数が少なく、未だ集中染色体異常解析システムが必要とされている状況に無い。集中染色体異常解析システムを市場投入するためには、市場に一定の広がりが出た段階で、最適な時期を選んで投入していく必要がある。今回は、一定の成果を上げることができたので、市場が広がりさえすれば、この成果を生かして全自動機の投入につなげたい。

富士フイルムとして近々は、アレイ CGH の市場を拡大させることに注力していきたい。具体的には GD アレイのコストダウンである。コストダウンすることで、安価に CGH アレイの診断が出来るようにして、検査数を増やすことができれば、集中処理のニーズが生まれ、そこに今回開発した集中染色体異常解析システムを投入していくことができると考えられる。

添付資料

【研究開発項目毎 成果一覧表】

	特許出願 () 外国出願	論文発表		学会等発表	新聞等
		学会誌等 査読有り () 投稿中	総説、解説		
研究開発項目1) BACを用いた高精度全ゲノム アレイの開発	0	6	0	11	1
研究開発項目2) 染色体異常を解析する革新的 要素技術の開発	10 (1)	204	0	29	0
研究開発項目3) 臨床診断用全自動染色体異 常解析システムの開発	65 (35)	87	32(11)	238	7
集計	75 (36)	297	32(11)	278	8

【研究開発項目毎成果詳細】

研究開発項目1)BAC を用いた高精度全ゲノムアレイの開発

研究開発項目2)染色体異常を解析する革新的要素技術の開発

1. 研究発表・講演(口頭発表も含む)

発表年月日	発表媒体	発表タイトル	発表者
平成19年4月	第107回日本外科学会定期学術集会	高解像度アレイCGHによる胃癌の生物学的特性に関連するゲノム異常解析	富岡伸元、森田桂子、多田光宏、野村 克、高橋典彦、近藤正男、片岡昭彦、中西一彰、高橋将人、尾崎倫孝、藤堂 省、平野 隆
平成19年10月	第66回日本癌学会学術総会	高解像度array CGH による胃癌の生物学的特性および予後に関するゲノム異常解析	富岡伸元、齋藤総一郎、多田光宏、高橋典彦、片岡昭彦、小林 希、中西一彰、高橋将人、尾崎倫孝、平野 隆、藤堂 省
平成19年11月	第18回日本消化器癌発生学会総会	BAC array CGH による胃癌の生物学的特性・予後に関するゲノム異常解析	富岡伸元、齋藤総一郎、高橋典彦、片岡昭彦、小林 希、中西一彰、高橋将人、多田光宏、尾崎倫孝、藤堂省、平野 隆
平成21年4月2日-4日	第109回日本外科学会	高感度アレイCGHを用いた肝細胞癌の生物学的悪性度および予後に関するゲノム異常領域の検討	中西一彰1、森田桂子2、多田光宏3、富岡伸元1、神山俊哉1、 横尾英樹1、高橋将人1、尾崎倫孝1、松下通明1、藤堂 省1、平野 隆2
March 12-15, 2009 Miami	2009 The American Hepato-Pancreato-Biliary Association annual meeting	Analysis of genomic abnormal area concerning biological malignant potential and prognosis of hepatocellular carcinoma by high sensitive array CGH	Kazuaki Nakanishi, Keiko Morita, Mituhiro Tada, Nobumoto Tomioka, Toshiya Kamiyama, Hideki Yokoo , Masato Takahashi, Michitaka Ozaki, Michiaki Matushita , Satoru Todo and Takashi Hirano
2009年10月1日-3日	第68回日本癌学会総会	Analysis of genomic abnormality concerning with prognosis of hepatocellular carcinoma by array CGH	Kazuaki Nakanishi, Keiko Morita, Nobumoto Tomioka Toshiya Kamiyama,Hideki Yokoo , Masato Takahashi, Michitaka Ozaki , Takashi Hirano and Satoru Todo
平成18年5月24日	XXIII International Society For Analytical Cytology	Genetic aberrations detected by array CGH depends on DNA ploidy.	佐々木 功典
平成18年6月15日	The 32 nd Annual Meeting of Korean Cancer Association	Symposium Comparative genomic hybridization (CGH) analysis of solid tumors.	佐々木 功典
平成19年7月5日	第17回日本サイトメトリー学会	教育講演「サイトメトリーと細胞周期:温故知新」	佐々木 功典
平成20年10月30日	第48回日本臨床細胞学会秋期大会	教育講演:ゲノム異常からみたがん細胞	佐々木 功典
平成20年6月20日	第19回日本サイトメトリー学会	ワークショップ DNA ploidy と染色体不安定性(CIN)、ゲノムコピー数異	佐々木 功典
平成21年6月26日	第20回日本サイトメトリー学会学術集会	特別講演 癌とゲノム	佐々木 功典
平成21年7月14日	第65回日本消化器外科学会	教育講演 ゲノム解析のがん診療への応用	佐々木 功典
平成21年2月21日	第10回九州大学病院別府先進医療センター市民公開講座	男と女:それぞれのなりやすい癌の傾向と対策 こんなサインに要注意	田中文明
平成21年3月5日	62th Surgical Society of Oncology ,Phoenix, AZ.	Comprehensive Analysis of the Clinical Significance of Inducing Pluripotent Stemness-Related Gene Expression in Colorectal Cancer Cells.	Mimori K, Saiki Y, Ishimaru K,Akiyoshi S, Nagahara M,Yamada K, Mori M.
平成21年3月6日	62th Surgical Society of Oncology, Phoenix, AZ.	Comprehensive Analysis to Identify the CD133 Expression Committed Genes in Colorectal Cancer.	Akiyoshi S, Mimori K, Haraguchi N,Tanaka F, Ishikawa K, Ishii H and Mori M
平成21年4月2日	第109回日本外科学会定期学術集会, 福岡	大腸癌において特異的に変化するmicroRNAとその意義	石丸神矢、杉原健一、三森功士、高角康志、永原 誠、佐藤哲也、藤 博幸、田中文明、井上 裕、森 正樹
平成21年4月2日	サージカルフォーラム 第109回日本外科学会定期学術集会.	大腸癌における間質細胞の重要性: microRNA array解析を用いた検討	永原 誠、高角康志、井上 裕、杉原健一、森 正樹
平成21年4月2日	サージカルフォーラム 第109回日本外科学会定期学術集会.	大腸癌症例におけるiPS遺伝子群発現の臨床的意義について	佐伯泰慎、石丸神矢、永原 誠、高角康志、三森功士、山田一隆、森 正樹
平成21年4月3日	サージカルフォーラム 第109回日本外科学会定期学術集会.	乳癌患者の末梢血中におけるPLS3遺伝子発現の意義	横堀武彦、三森功士、井上 裕、桑野博行、森 正樹
平成21年4月4日	サージカルフォーラム 第109回日本外科学会定期学術集会.	大腸癌組織におけるMMP familyの包括的発現および血清MMP-1の予後因子としての意義	田原光一郎、飯沼久恵、三森功士、田中文明、石川健二、井上 裕、北野正剛、森 正樹

平成21年4月4日	サージカルフォーラム第109回日本外科学会定期学術集会	高解像度アレイCGH解析による大腸癌亜分類の試み	高角康志、佐藤哲也、永原 誠、三森功士、田中文明、井上 裕、藤 博幸、杉原健一、森 正樹
平成21年7月16日	企画関連講演 第64回日本消化器外科学会総会、大阪	腸癌患者におけるKIF18A遺伝子発現の臨床病理学的意義	永原 誠、石丸神矢、石川健二、主藤朝也、三森功士、田中文明、石川浩一、杉原健一、森 正樹
平成21年7月16日	ポスター 第64回日本消化器外科学会総会、大阪	大腸癌における細胞周期調節因子FBXW7の臨床病理学的意義	石川浩一、岩槻政晃、三森功士、横堀武彦、石川健二、主藤朝也、田中文明、森 正樹
平成21年7月16日	ワークショップ第64回日本消化器外科学会総会、大阪	大腸癌CGHアレイを用いたmicroRNA局在部位の変異を有する高危険症例群の検出	石丸神矢、三森功士、永原 誠、石川健二、主藤朝也、田中文明、石川浩一、佐藤哲也、杉原健一、森 正樹
平成21年7月23日	シンポジウム第18回日本がん転移学会学術集会総会、旭川	大腸癌におけるEMTを制御し造腫瘍能と多分化能を有する遺伝子の臨床的意義と機能解析	三森功士、横堀武彦、岩槻政晃、石丸神矢、秋吉清百合、永原 誠、石井秀始、森 正樹
平成21年8月8日	oral presentation 生医研リトリート 阿蘇	EMT Induced Epithelial-Mesenchymal Transition in Circulating Tumor Cells in Colon Cancer Cases with Poor Prognosis	横堀武彦、三森功士、石井秀治、岩槻政晃、桑野博行、森 正樹
平成21年10月1日	口演 第68回日本癌学会学術総会、横浜	胃癌におけるMAL遺伝子発現の抑制による臨床病理学的因子の関連	石丸神矢、三森功士、森 正樹、杉原健一
平成21年10月1日	口演第68回日本癌学会学術総会、横浜	大腸癌におけるCD133発現と関連する遺伝子の解析:新規腫瘍幹細胞マーカーの可能性	秋吉清百合、三森功士、原口直紹、石井秀始、森 正樹
平成21年10月2日	口演第68回日本癌学会学術総会、横浜	新規EMT誘導遺伝子Xの大腸癌臨床的意義とX導入CD133発現大腸癌細胞における造腫瘍形成能	16. 三森功士、横堀武彦、石井秀始、森 正樹
平成21年10月2日	ポスター第68回日本癌学会学術総会、横浜	食道癌において化学療法がEMTを誘導する	17. 主藤朝也、三森功士、横堀武彦、岩槻政晃、石丸神矢、田中文明、藤田博正、白水雄、森 正樹
平成21年11月26日	ワークショップ第20回日本消化器癌発生学会、広島	食道癌におけるEMT制御遺伝子FOXC2発現の臨床病理学的意義	18. 西田尚弘、三森功士、横堀武彦、古後龍之介、秋吉清百合、石丸神矢、岩槻政晃、石川健二、主藤朝也、田中文明、柴田
平成21年11月26日	ワークショップ第20回日本消化器癌発生学会、広島	食道癌におけるFBXO31発現の臨床的意義について	19. 古後龍之介、横堀武彦、三森功士、田中文明、小宗静男、森 正樹
平成21年11月27日	ミニシンポジウム第20回日本消化器癌発生学会、広島	大腸癌ゲノムにおけるmicroRNAcluster領域の変動とその臨床病理学的意義	20. 石丸神矢、三森功士、森 正樹
平成22年3月6日	parallel session 63th The Society of Surgical Oncology, St.Louis,MO	Identification of the Target Gene Enhanced by Wnt/TCF Binding to the Common Predisposition SNP Rs6983267 at Chromosome 8q24 in Colorectal Cancer Cases	21. K.Mimori, K.Yamamoto, T.Sato,K.Yamada, M.Watanabe, M.Kusunoki,Y.Moriya, S.Kudo, H.Mochizuki, K.Sugihara, M.Mori
平成22年3月6日	poster 63th The Society of Surgical Oncology	Clinical significance of miR-125 expression in colorectal cancer patients	22. T.Yokobori, K.Mimori, F.Tanaka, K.Shibata, T.Sudo, S.Ishimaru,S.Akiyoshi, N.Nishida, R.Kogo,H.Kuwano, M.Mori
平成22年3月6日	poster 63th The Society of SurgicalOncology St.Louis,MO	The Clinicopathological Significance of Genomic Aberrations of MicroRNA Locus in Colorectal Cancer Patients	23. S.Ishimaru, K.Mimori, K.Shibata,T.Sudo, T.Yokobori, N.Nishida,S.Akiyoshi, R.Kogo, T.Sato, H.Toh,K.Sugihara, M.Mori
平成22年3月7日	parallel session 63th The Society of SurgicalOncology, St.Louis,MO	FN1 is an Independent Prognostic Marker and a Susceptible Indicator of Chemotherapy in Esophageal Cancer	24. T.Sudo, K.Mimori, T.Yokobori,M.Iwatsuki, F.Tanaka, M.Mori
平成22年4月8日	ワークショップ第110回日本外科学会定期学術集会、名古屋	大腸癌細胞のゲノムCGHクラスター解析および発現アレイpathway解析による5FU適応症例の決定	25. 三森功士、高角康志、井上 裕、佐藤哲也、藤 博幸、島田安博、森谷宜皓、杉原健一、森 正樹
平成22年4月8日	一般口演 第110回日本外科学会定期学術集会、名古屋	大腸癌細胞特異的なゲノムコピー数変異と遺伝子発現の相関の検討	26. 岩槻政晃、高角康志、三森功士、主藤朝也、田中文明、柴田浩平、馬場秀夫、森 正樹
平成22年4月9日	一般口演第110回日本外科学会定期学術集会、名古屋	大腸癌細胞における全てのmicroRNAゲノム クラスターの臨床的意義と予後予測因子としての意義	27. 石丸神矢、三森功士、石川健二、主藤朝也、柴田浩平、田中文明、佐藤哲也、藤博幸、杉原健一、森 正樹

2. 特許出願

出願日	受付番号	出願に係る特許等の標題	出願人
平成19年1月31日	特願2007-020701	「ゲノムDNA断片の増幅または欠失の検出方法」	和光純薬工業株式会社
平成20年1月28日	PCT JP2008/051215	「ゲノムDNA断片の増幅または欠失の検出方法」	和光純薬工業株式会社
平成20年7月25日	出願: 2008-191811	バイオチップ読取装置(ビーム整形光学系)	横河電機株式会社
平成20年7月30日	出願: 2008-195585	バイオチップ読取装置(深い焦点深度)	横河電機株式会社
平成20年7月30日	出願: 2008-195584	化学反应用カートリッジ(物理攪拌ハイブリ)	横河電機株式会社
平成22年2月18日		マイクロRNA単独による新しいRP技術	森 正樹
平成22年2月26日		癌幹細胞の機能的標識	森 正樹
平成21年5月11日		未分化細胞の識別方法	森 正樹
平成20年9月30日		癌幹細胞の製造方法	森 正樹
平成20年4月23日		某遺伝子を用いた大腸癌再発診断	森 正樹

3. その他の特記事項(新聞報道、雑誌等への投稿など)

・平成21年6月19日 日経産業新聞「日本人ゲノムデータ整備 塩基配列10ヶ所変異」
--

【用語集】

研究開発項目 1) BAC を用いた高精度全ゲノムアレイの開発
 研究開発項目 2) 染色体異常を解析する革新的要素技術の開発

(アルファベット、あいうえお順に記載)

用語	説明
A	
B	
BAC	Bacterial Artificial Chromosome の略。大腸菌にヒトゲノム等、数千から数十万塩基の分子量の大きなDNA 断片が挿入されたもの。
Bioanalyzer	アジレント社製の核酸品質を正確に定性する技術、あるいは機器。アレイ研究には、通常分子生物学レベルをはるかに越えた核酸品質精度
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool の略。塩基配列解析で最も一般的に用いられるツールであり、塩基配列のホモロジー検索を行うプログラム。
C	
CGH	Comparative Genomic Hybridization の略。ゲノム全体にわたるDNA の増幅や欠失を1 度の処理で解析できる分子生物学的手法のこと。
D	
dbSNP	Single Nucleotide Polymorphism database のこと。NCBI が提供するSNP のデータベース。
DyeTerminater 法	DNA シークエンスで用いられる蛍光物質を結合したジデオキシヌクレオチド。通常のDNA は、デオキシヌクレオチドであるが、ジデオキシヌクレオチドを使用することでDNA の伸長反応が止まる。止まった場所に蛍光物質が結合しているため、電気泳動を行い、蛍光を測定する事でDNA の塩基配列を知る事が出来る。
E	
EB virus	Epstein-Barr ウイルス。このウイルスに感染したB 細胞は不死化する。これを用いることで正常細胞の培養が容易となり、大量培養によるヒトゲノムライブラリー作製に貢献した。
EMBL	European Molecular Biology Laboratory の略。ドイツのハイデルベルグに本部を構える非営利団体で、公的研究資金を受けた多種多様な分子生物学における基礎研究機関。DNA やRNA の配列情報を提供している。
F	
FISH	Fluorescent in situ Hybridization の略。特定の遺伝子配列やDNA 配列の一部をプローブとして、染色体上における該当領域の位置や、増幅や欠失などの変化を検出する手法。
G	
H	
HLA	Human Leukocyte Antigen の略。組織適合性抗原として重要な意味を持つ。ヒト6 番染色体短腕領域に座位。それぞれの個体は、同領域に座位する遺伝子群の多用な組み合わせから固有の組み合わせを持ち、その解析によって民族の起源が推察可能である。
I	
IC	Informed consent 医療行為(投薬・手術・検査など)や治験などの対象者(患者や被験者)が、治療や臨床試験/治験の内容についてよく説明を受け理解した上で(informed)、方針に合意する (consent) 事である。
J	
K	
L	
LMD	レーザーマイクロ・ダイセクション 病理凍結標本を顕微鏡下に観察し、腫瘍組織・細胞のみをレーザー光線で焼き取り去る技術。腫瘍特異的な蛋白・RNA・DNA を抽出するための技術
Log rank test	2 群の生存曲線などの因子間に有意差があるかどうか検定する手法のひとつ
M	
MEMS	Micro Electro Mechanical System の略称で、半導体の微細加工技術などを利用して作製された微小な部品から構成される電気機械システム。マイクロマシンまたはMST (Microsystem technology)とも呼ばれている。
MNP	Minimal Number Path の略。タイリングアレイ作製法における設計方法のひとつ。選択されたBAC の数が最小となるように設計すること。アレイ設計に際して、BAC のスポット数は最小となるが、選択されたBAC の合計長は必ずしも最小にはならない。

MTP	Minimal Tiling Path の略。タイリングアレイ作製法における設計方法のひとつ。選択されたBACの領域の重複が最小となるように設計すること。アレイ設計に際して、BACの合計長は最小となるが、選択されたBACの数は必ずしも最小にはならない。
N	
Nanodrop 法	核酸濃度を正確に定量する技術、あるいは機器。アレイ研究には、通常分子生物学レベル以上の定量技術が要求される
NCBI	National Center for Biotechnology Information の略。米国 National Institutes of Health(NIH)が提供するデータベース。
NHS エステル	N-ヒドロキシスクシンイミジルエステルの略である。このエステルは、ヒドロキシコハク酸イミドが非常に良い脱離基であるため、アミンにより容易に求核攻撃され、アミド結合を形成する事が出来る。
O	
OTC コンパウンド	凍結切片作成のための組織包埋用コンパウンド
P	
PCR	Polymerase Chain Reaction の略。特定のDNA 配列を指数関数的に増幅させる手法。
Q	
R	
RPCI	Roswell Park Cancer Institute の略。米国ニューヨーク州バッファローを拠点とするNational Cancer Institute (NCI)の研究施設。ヒトゲノム計画で用いられたRPCI-11 は、この施設が管理している。
S	
SNP	Single Nucleotide Polymorphism の略。1塩基多型。DNA 配列中に見られる多型のひとつ。現在までに十数万以上のSNP が報告されている。この多型と薬剤感受性や遺伝子発現などに相関が見られることから、SNP 解析の結果を基に個々に適した治療法を選択する、という個別化医療が注目されている。
SN 比	シグナルとノイズの比率 この SN 比が大きい方が測定値の信頼性が高い
SP6	シーケンス反応に用いられるプライマー領域のひとつ。
T	
T7	シーケンス反応に用いられるプライマー領域のひとつ。
U	
V	
W	
X	
Y	
Yamato-2	独立行政法人産業技術総合研究所が構築した日本人BAC ライブラリーの名称。成人に比べDNA 損傷の少ない臍帯血由来の細胞を用い、培養することなくDNA を抽出し、ライブラリー化に成功した。
あ行	
アジレント社	米国カリフォルニア州サンタクララを拠点とする。合成オリゴDNA244 K フォーマットのDNA マイクロアレイ等を販売している。
アフィニックス社	米国カリフォルニア州サンタクララを拠点とする。アレイ製造・販売の先駆的な会社であり、合成オリゴDNA500 k フォーマットのDNA マイクロアレイ等を販売している。
インクジェット法	アレイ作製時におけるスポッティングの手法のひとつ。各スポットを定量的にスポット(吹き付け)可能であるが、スポット溶液が大量に必要であり、またその装置作製のために大規模な設備投資が必要。
か行	
カットオフ値	各検査項目の特性を考慮したうえで正常とみなす範囲を決め、正常範囲と異常範囲を区切る値
肝細胞癌	肝臓には大きくは胆管の癌と肝細胞の癌が発生するが、ここでは後者を対象とする。肝炎患者、肝硬変患者に発生する癌は肝細胞癌である。
間質	腫瘍を構成する細胞群には大きく分けて2 つある。腫瘍細胞群とそれを支える(酸素や栄養を補給する)細胞群であり、後者を腫瘍間質細胞という。間質細胞は通常宿主側(癌細胞由来ではないということ)から供給されるというのが定説であったが、近年一部癌細胞が分化した細胞も混入しているという報告もあり、現在癌研究における最も関心が高い領域のひとつとなっている。
共焦点顕微鏡	通常の光学顕微鏡は、面光源と面受光のため、コントラストや分解能に限界がある。共焦点顕微鏡はピンホールを使い、点光源と点受光を採用することで、試料の断面像を得ることが可能になり、立体的な映像をハイコントラスト、高分解能で観察できる。
キャピラリーシーケンサー	従来のゲル電気泳動法から、特殊なゲルで充填されたキャピラリー内にてDNA を泳動させ、

	シーケンス解析を行うDNA 配列読取装置。1000 塩基以上を1 時間程度で解読できる高速シーケンサー。
クスター解析	アレイ解析の手段のひとつ。五年生存率や転移などの臨床情報を全く無視して、純粋にゲノムの変異パターンのみで解析症例を分類化する解析法。予断無く解析した結果が、臨床情報に相関していることがわかった場合、そのゲノム変異が患者予後や転移と関連していることになる。
クローフラグメント	大腸菌DNA ポリメラーゼI のラージフラグメントの事。DNA 依存性DNA ポリメラーゼであり、5'→3'ポリメラーゼ、3'→5'エキソヌクレアーゼ活性を持つが、天然酵素と異なり5'→3'エキソヌクレアーゼ活性は欠いている。
クrostーク	励起波長、蛍光波長の重複の事。励起波長に重複が見られる場合に意図しない蛍光物質が蛍光発し、ノイズになる。
蛍光測定	特殊な化学物質(蛍光物質)に、ある波長の光(励起光)を照射すると、それより長い波長の光(蛍光)を発する。これが蛍光である。検出したい物質に、あらかじめ蛍光物質を結合させておけば、励起光を照射することにより、物質の有無や、物質の動きが分かる。
ゲノム	遺伝子領域や非遺伝子領域を含めたDNA 配列のすべて。
ゲノムアレイ	今日において、ヒトの遺伝子領域だけでなく、非遺伝子領域にも重要な意味があることが示唆されている。これまでの遺伝子領域のみのアレイ解析では不完全と考えられ、特定の遺伝子領域、発現解析では不可能であった全ゲノムを対象としたアレイのこと。
個別化医療	個々で異なる多型を含めた遺伝情報、その個人における疾患の特徴や薬剤の応答性に関する分子情報などによって、患者個人に最適化された医療のこと。
根治度	手術の根治性の度合い(A からC に従って根治性が低下する。)
さ行	
疾患別アレイハイブリシステム	日本人BACを用いた高精度ゲノムアレイによるCGHスクリーニング解析の成果を、実際の臨床検体で検証するための解析検証システム
染色体部位 20q11.21	染色体の部位を表す。すなわち、20 番染色体の長腕(q)の11.21 の部位の意味
組織学的ステージ	手術標本の病理学的解析による病期・進行度(I からIV に従って進行する。
大腸癌	一般的には大腸と直腸とを含めた臓器に発生した悪性腫瘍の総称として使われることが多いが、ここでは、大腸と直腸に発生した腺癌(最も一般的な癌)を対象としている
タイリング	隙間なく並べることから転じ、ゲノム全体を隙間なく網羅(カバー)すること。
転写シーケンス法	通常、DNA のシーケンスを行う場合、DNA ポリメラーゼを用いた方法を用いるが、RNA ポリメラーゼを用いシーケンスを行う方法。DNA ポリメラーゼを用いた方法では解読が困難なヘアピン構造を形成する塩基配列や、GC 含量の高い塩基配列の解読が可能な方法。
な行	
ニンプルジェン社	米国ウィスコンシン州を拠点とする独自開発の高密度DNA マイクロアレイ(385 K フォーマット)等を作製・販売している。2007 年にロシュ社の傘下となり、現在はロシュ・ニンプルジェン社となっている。
は行	
発現プロファイリング	RNA レベルでのアレイ解析結果のこと。ある個人の癌で発現している遺伝子の発現量を包括的に調べた結果(多くは20000 種類以上の遺伝子について同時に検索する)を示す。100 人の大腸癌では100 通りのプロファイリングが得られるが、それらの遺伝子の中には共通して発現が増減する遺伝子群が見出されてくる。これを大腸癌に特徴的な発現プロファイリングという。
パブルジェット法	アレイ作製時におけるスポットティングの手法のひとつ。各スポットを定量的にスポット(吹き付け)可能であるが、スポット溶液が大量に必要であり、またその装置作製のために大規模な設備投資が必要。
病期	原発癌の種類ごとに分類基準が異なる。普通は、0 或いはI~IV のローマ数字で表され、数が大きいほど進行癌である。ローマ数字に英小文字を付け("IVa", "IVb"等)亜分類される。
ピン法	アレイ作製時におけるスポットティングの手法のひとつ。スポット溶液をピン先に浸け、そのピンをアレイ基盤に接触させることによってスポットする。パブルジェット法やインクジェット法に比べ定量的に欠けるが、スポット溶液は少量で済み、簡便である。
深い焦点深度	ピントの合った状態からピントをずらした際、受光量が急激に減少する。受光量が90%以内の範囲を焦点深度としている。チップの歪み等により、ピントがずれると誤差が拡大するが、焦点深度が深いと、チップの歪み等の影響を受けにくくなる。
物理的ハイブリシステム	強制攪拌により乱流を生成し、DNAの会合確率を向上させたハイブリシステム
ホットスポット	ゲノムや遺伝子配列のなかで、特に病気の原因の関連が深いことがわかっている場所のこと。通常複数あり、その場所は近接していることが多いため、特にホットスポットと呼ばれる。蛋白構造上、その機能の中心にあたる場所であることが多い。
ホルマリン固定	パラフィン切片作成のための組織固定液
ら行	
ライブラリー	全ゲノムの塩基配列を図書館のように整理して保管・利用できるようにすること。

リンパ節転移	腫瘍細胞がリンパ節に到達し、そこで再び増殖し、同一種類の腫瘍を二次的に生じること。転移は悪性腫瘍の特徴である。
連結可能匿名化	必要な場合に人を識別できるよう、その人と新たに付された符号又は番号の対応表を残す方法による匿名化

研究開発項目毎成果一覧

研究開発項目3)臨床診断用全自動染色体異常解析システムの開発

【成果まとめ表】

	特許出願 () 外国出願	論文発表		学会等発表	新聞等
		学会誌等 査読有り () 投稿中	総説、解説		
研究開発項目1) BACを用いた高精度全ゲノム アレイの開発	0	6	0	11	1
研究開発項目2) 染色体異常を解析する革新的 要素技術の開発	10 (1)	204	0	29	0
研究開発項目3) 臨床診断用全自動染色体異 常解析システムの開発	65 (35)	87	32(11)	238	7
集計	75 (36)	297	32(11)	278	8

1. 研究発表・講演(口頭発表も含む)

【英文原著論文】

発表年月日	発表媒体	発表タイトル	発表者
2011年	J Biol Chem. 2011 [Epub ahead of print]	The HECT-type ubiquitin ligase ITCH targets lysosomal-associated protein multispinning transmembrane 5 (LAPTM5) and prevents LAPTM5-mediated cell death.	Ishihara T, Inoue J, Kozaki K, Imoto I, Inazawa J, T
2011年	Oncogene. 2011(in press)	Stabilization of phenotypic plasticity through mesenchymal-specific DNA hypermethylation in cancer cells.	Kurasawa Y, Kozaki K, Pimkhaokham A, Muramatsu T, Ono H, Ishihara T, Uzawa N, Imoto I, Amagasa T, Inazawa J
2011年	J Hum Genet. 2011(in press)	HRAS mutants identified in Costello syndrome patients can induce cellular senescence: possible implications for the pathogenesis of Costello syndrome.	Niihori T, Aoki Y, Okamoto N, Kurosawa K, Ohashi H, Mizuno S, Kawame H, Inazawa J, Ohura T, Arai H, Nabatame S, Kikuchi K, Kuroki Y, Miura M, Tanaka T, Ohtake A, Omori I, Ihara K, Mabe H, Watanabe K, Nijima S, Okano E, Numabe H, Matsubara Y
2011年	Cancer Res. 2011 [Epub	The tumor suppressive	Uesugi A, Kozaki K, Tsuruta

	ahead of print]	microRNA miR-218 targets the mTOR component Rictor and inhibits AKT phosphorylation in oral cancer.	T, Furuta M, Morita K, Imoto I, Omura K, Inazawa J
2011 年	Hum Genet. 2011[Epub ahead of print]	Novel intragenic duplications and mutations of CASK in patients with mental retardation and microcephaly with pontine and cerebellar hypoplasia (MICPCH).	Hayashi S, Okamoto N, Chinen Y, Takanashi J, Makita Y, Hata A, Imoto I, Inazawa J
2011 年	EMBO Mol Med. 3:320-33. 2011	SASPase regulates stratum corneum hydration through profilaggrin-to-filaggrin processing.	Matsui T, Miyamoto K, Kubo A, Kawasaki H, Ebihara T, Hata K, Tanahashi S, Ichinose S, Imoto I, Inazawa J, Kudoh J, Amagai M
2011 年	Pathobiology. 78:1-9.2011	Genome-wide DNA methylation profiles in renal tumors of various histological subtypes and non-tumorous renal tissues.	Arai E, Wakai-Ushijima S, Fujimoto H, Hosoda F, Shibata T, Kondo T, Yokoi S, Imoto I, Inazawa J, Hirohashi S, Kanai Y
2011 年	J Biomed Biotechnol. 2011:780836. 2011	Diagnosis and prognostication of ductal adenocarcinomas of the pancreas based on genome-wide DNA methylation profiling by bacterial artificial chromosome array-based methylated CpG island amplification.	Gotoh M, Arai E, Wakai-Ushijima S, Hiraoka N, Kosuge T, Hosoda F, Shibata T, Kondo T, Yokoi S, Imoto I, Inazawa J, Kanai Y
2011 年	Carcinogenesis. 32:462-9.2011	Copy number alterations in urothelial carcinomas: Their clinicopathological significance and correlation with DNA methylation alterations.	Nishiyama N, Arai E, Nagashio R, Fujimoto H, Hosoda F, Shibata T, Tsukamoto T, Yokoi S, Imoto I, Inazawa J, Kanai Y
2011 年	Carcinogenesis. 32:389-98. 2011	YAP is a candidate oncogene for esophageal squamous-cell carcinoma.	Muramatsu T, Imoto I, Matsui T, Kozaki K, Haruki S, Sudol M, Shimada Y, Tsuda H, Kawano T, Inazawa J
2011 年	J Hum Genet. 56:110-24. 2011	Clinical application of array-based comparative genomic hybridization by two-stage screening for 536 patients with mental retardation and multiple congenital anomalies.	Hayashi S, Imoto I, Aizu Y, Okamoto No, Mizuno S, Kurosawa K, Okamoto Na, Honda S, Araki S, Mizutani S, Numabe H, Saitoh S, Kosho T, Fukushima Y, Mitsubuchi H, Endo F, Chinen Y, Kosaki R, Okuyama T, Ohki H, Yoshihashi H, Ono M, Takada F, Ono H, Yagi M, Matsumoto H, Makita Y, Hata A, Inazawa J
2010 年	J Neurosci Res. 88:3598-609. 2010	Transplantation of neuronal cells induced from human mesenchymal stem cells improves neurological functions after stroke without cell fusion.	Xu H, Miki K, Ishibashi S, Inoue J, Sun L, Endo S, Sekiya I, Muneta T, Inazawa J, Dezawa M, Mizusawa H.
2010 年	Nat Genet. 42:893-6. 2010	Variation in TP63 is associated with lung	Miki D, Kubo M, Takahashi A, Yoon KA, Kim J, Lee GK, Zo

		adenocarcinoma susceptibility in Japanese and Korean populations.	Ji, Lee JS, Hosono N, Morizono T, Tsunoda T, Kamatani N, Chayama K, Takahashi T, Inazawa J, Nakamura Y, Daigo Y
2010 年	Nat Genet. 42:751-4. 2010	Genome-wide association study identifies five new susceptibility loci for prostate cancer in the Japanese population.	Takata R, Akamatsu S, Kubo M, Takahashi A, Hosono N, Kawaguchi T, Tsunoda T, Inazawa J, Kamatani N, Ogawa O, Fujioka T, Nakamura Y, Nakagawa H
2010 年	J Gastroenterol. 45:1201-11. 2010	Dermokine as a novel biomarker for early-stage colorectal cancer.	Tagi T, Matsui T, Kikuchi S, Hoshi S, Ochiai T, Kokuba Y, Kinoshita-Ida Y, Kisumi-Hayashi F, Morimoto K, Imai T, Imoto I, Inazawa J, Otsuji E
2010 年	J Hum Genet. 55:590-9.2010	Copy-number variations on the X chromosome in Japanese patients with mental retardation detected by array-based comparative genomic hybridization analysis.	Honda S, Hayashi S, Imoto I, Toyama J, Okazawa H, Nakagawa E, Goto YI, Inazawa J
2010 年	AJNR Am J Neuroradiol. 31:1619-22. 2010	Neuroradiologic Features of CASK Mutations.	Takanashi J, Arai H, Nabatame S, Hirai S, Hayashi S, Inazawa J, Okamoto N, Barkovich AJ
2010 年	Oncogene. 29:4671-81. 2010	DEK oncoprotein regulates transcriptional modifiers and sustains tumor initiation activity in high-grade neuroendocrine carcinoma of the lung.	Shibata T, Kokubu A, Miyamoto M, Hosoda F, Gotoh M, Tsuta K, Asamura H, Matsuno Y, Kondo T, Imoto I, Inazawa J, Hirohashi S
2010 年	J Hum Genet. 55:244-7. 2010	Novel deletion at Xq24 including the UBE2A gene in a patient with X-linked mental retardation.	Honda S, Orii K, Kobayashi J, Hayashi S, Imamura A, Imoto I, Nakagawa E, Goto Y, Inazawa J
2010 年	Lung Cancer. 70:263-70. 2010	Overexpression of NF-kappaB inducing kinase underlies constitutive NF-kappaB activation in lung cancer cells.	Saitoh Y, Martínez Bruyn VJ, Uota S, Hasegawa A, Yamamoto N, Imoto I, Inazawa J, Yamaoka S
2010 年	Carcinogenesis. 31:1027-36. 2010	Frequent silencing of protocadherin 17, a candidate tumour suppressor for esophageal squamous-cell carcinoma.	Haruki S, Imoto I, Kozaki K, Matsui T, Kawachi H, Komatsu S, Muramatsu T, Shimada Y, Kawano T, Inazawa J
2010 年	J Oral Pathol Med. 39:525-32. 2010	DNA amplification and expression of FADD in oral squamous cell carcinoma.	Prapinjumrune C, Morita KI, Kuribayashi Y, Hanabata Y, Shi Q, Nakajima Y, Inazawa J, Omura K
2010 年	Surgery. 147:405-14. 2010	Gene-expression phenotypes for vascular invasiveness of hepatocellular carcinomas.	Tanaka S, Mogushi K, Yasen M, Noguchi N, Kudo A, Nakamura N, Ito K, Miki Y, Inazawa J, Tanaka H, Arii S
2010 年	Carcinogenesis. 31:766-76. 2010	miR-124 and miR-203 are epigenetically silenced tumor-suppressive microRNAs in hepatocellular	Furuta M, Kozaki K, Tanaka S, Arii S, Imoto I, Inazawa J

		carcinoma.	
2010 年	PLoS One. 4:e7099. 2010	Lysosomal-associated protein multispinning transmembrane 5 gene (LAPTM5) is associated with spontaneous regression of neuroblastomas.	Inoue J, Misawa A, Tanaka Y, Ichinose S, Sugino Y, Hosoi H, Sugimoto T, Imoto I, Inazawa J
2010 年	Cancer Sci. 101:231-40. 2010	Genome-wide DNA methylation profiles in urothelial carcinomas and urothelia at the precancerous stage.	Nishiyama N, Arai E, Chihara Y, Fujimoto H, Hosoda F, Shibata T, Kondo T, Tsukamoto T, Yokoi S, Imoto I, Inazawa J, Hirohashi S, Kanai Y
2009 年	Carcinogenesis. 30:1857-64. 2009	Resequencing and copy number analysis of the human tyrosine kinase gene family in poorly differentiated gastric cancer.	Kubo T, Kuroda Y, Shimizu H, Kokubo A, Okada N, Hosoda F, Arai Y, Nakamura Y, Taniguchi H, Yanagihara K, Imoto I, Inazawa J, Hirohashi S, Shibata T
2009 年	Cancer Sci. 100:1908-16. 2009	Identification of PAK4 as a putative target gene for amplification within 19q13.12-q13.2 in oral squamous-cell carcinoma.	Begum A, Imoto I, Kozaki K, Tsuda H, Suzuki E, Amagasa T, Inazawa J
2009 年	Int J Cancer. 125:1859-67. 2009	Krüppel-like factor 12 plays a significant role in poorly differentiated gastric cancer progression.	Nakamura Y, Migita T, Hosoda F, Okada N, Gotoh M, Arai Y, Fukushima M, Ohki M, Miyata S, Takeuchi K, Imoto I, Katai H, Yamaguchi T, Inazawa J, Hirohashi S, Ishikawa Y, Shibata T
2009 年	Int J Cancer. 125:2854-62. 2009	Genome-wide DNA methylation profiles in liver tissue at the precancerous stage and in hepatocellular carcinoma.	Arai E, Ushijima S, Gotoh M, Ojima H, Kosuge T, Hosoda F, Shibata T, Kondo T, Yokoi S, Imoto I, Inazawa J, Hirohashi S, Kanai Y
2009 年	Carcinogenesis. 30:1139-46. 2009	Overexpression of SMYD2 relates to tumor cell proliferation and malignant outcome of esophageal squamous-cell carcinoma.	Komatsu S, Imoto I, Tsuda H, Kozaki K, Muramatsu T, Shimada Y, Aiko S, Yoshizumi Y, Ichikawa D, Otsuji E, Inazawa J
2009 年	J Hum Genet. 54:355-9. 2009	Molecular cloning of t(2;7)(p24.3;p14.2), a novel chromosomal translocation in myelodysplastic syndrome-derived acute myeloid leukemia.	Fujita K, Sanada M, Harada H, Mori H, Niihara H, Omine M, Inazawa J, Imoto I
2009 年	J Am Coll Surg. 208:368-74. 2009	Surgical contribution to recurrence-free survival in patients with macrovascular-invasion-negative hepatocellular carcinoma.	Tanaka S, Mogushi K, Yasen M, Noguchi N, Kudo A, Kurokawa T, Nakamura N, Inazawa J, Tanaka H, Arii S
2009 年	EMBO J. 28:843-53, 2009	ASK1 and ASK2 differentially regulate the counteracting roles of apoptosis and inflammation in tumorigenesis.	Iriyama T, Takeda K, Nakamura H, Motimoto Y, Kuroiwa T, Mizukami J, Umeda T, Noguchi T, Naguro I, Nishitoh H, Saegusa K, Tobiume K, Homma T, Shimada Y, Tsuda H, Aiko S, Imoto I, Inazawa J, Chiba K,

			Kamei Y, Kozuma S, Taketani Y, Matsuzawa A, Ichijo H
2009 年	Cell. 36:535-50, 2009	PH domain-only protein PHLDA3 is a p53-regulated repressor of Akt.	Kawase T, Ohki R, Shibata T, Tsutsumi S, Kamimura N, Inazawa J, Ohta T, Ichikawa H, Aburatani H, Tashiro F, Taya Y
2009 年	Mod Pathol. 22:499-507, 2009	Actinin-4 gene amplification in ovarian cancer: a candidate oncogene associated with poor patient prognosis and tumor chemoresistance.	Yamamoto S, Tsuda H, Honda K, Onozato K, Takano M, Tamai S, Imoto I, Inazawa J, Yamada T, Matsubara O
2009 年	J Biol Chem. 284:3334-44, 2009	SKI and MEL1 cooperate to inhibit transforming growth factor-beta signal in gastric cancer cells.	Takahata M, Inoue Y, Tsuda H, Imoto I, Koinuma D, Hayashi M, Ichikura T, Yamori T, Nagasaki K, Yoshida M, Matsuoka M, Morishita K, Yuki K, Hanyu A, Miyazawa K, Inazawa J, Miyazono K, Imamura T
2009 年	Carcinogenesis. 30:214-21, 2009	Genome-wide DNA methylation profiles in both precancerous conditions and clear cell renal cell carcinomas are correlated with malignant potential and patient outcome.	Arai E, Ushijima S, Fujimoto H, Hosoda F, Shibata T, Kondo T, Yokoi S, Imoto I, Inazawa J, Hirohashi S, Kanai Y
2008 年	Cancer Sci.99:1940-49, 2008	ITCH is a putative target for a novel 20q11.22 amplification detected in anaplastic thyroid carcinoma cells by array-based comparative genomic hybridization.	Ishihara T, Tsuda H, Hotta A, Kozaki K, Yoshida A, Jaeduk Yoshimura Noh, Ito K, Imoto I, Inazawa J
2008 年	Am J Med Genet A.146A:2905-10, 2008	Heterozygous Deletion at 14q22.1-q22.3 including the BMP4 gene in a patient with psychomotor retardation, congenital corneal opacity and feet polysyndactyly.	Hayashi S, Okamoto N, Makita Y, Hata A, Imoto I, Inazawa J
2008 年	Clin Cancer Res.14:5531-9, 2008	Genetic clustering of clear cell renal cell carcinoma based on array-comparative genomic hybridization: its association with DNA methylation alteration and patient outcome.	Arai E, Ushijima S, Tsuda H, Fujimoto H, Hosoda F, Shibata T, Kondo T, Imoto I, Inazawa J, Hirohashi S, Kanai Y
2008 年	Clin Cancer Res.14:5348-56, 2008	Expression and gene amplification of actinin-4 in invasive ductal carcinoma of the pancreas.	Kikuchi S, Honda K, Tsuda H, Hiraoka N, Imoto I, Kosuge T, Umaki T, Onozato K, Shitashige M, Yamaguchi U, Ono M, Tsuchida A, Aoki T, Inazawa J, Hirohashi S, Yamada T
2008 年	Cancer Sci.99:1539-45, 2008	Caffeine yields aneuploidy through asymmetrical cell division caused by misalignment of chromosomes.	Katsuki Y, Nakada S, Yokoyama T, Imoto I, Inazawa J, Nagasawa M, Mizutani S

2008 年	Am J Med Genet A.146A:2145-51, 2008	The CASK gene harbored in a deletion detected by Array-CGH as a potential candidate for a gene causative of X-linked dominant mental retardation.	Hayashi S, Mizuno S, Migita O, Okuyama T, Makita Y, Hata A, Imoto I, Inazawa J
2008 年	Hepato Res.38:886-95, 2008	Activation of B-Myb by E2F1 in hepatocellular carcinoma.	Nakajima T, Yasui K, Zen K, Inagaki Y, Fujii H, Minami M, Tanaka S, Taniwaki M, Itoh Y, Arai S, Inazawa J, Okanoue T
2008 年	Int J Oral Maxillofac Surg.37:1047-53, 2008	Expression of cIAP-1 correlates with nodal metastasis in squamous cell carcinoma of the tongue.	Qi S, Mogi S, Tsuda H, Tanaka Y, Kozaki K, Imoto I, Inazawa J, Hasegawa S, Omura K
2008 年	Cancer Res.68:5067-75, 2008	Frequent inactivation of a putative conditional tumor-suppressor gene, angiopoietin-like protein 2, in ovarian cancer.	Kikuchi R, Tsuda H, Kozaki K, Kanai Y, Kasamatsu T, Sengoku K, Hirohashi S, Inazawa J, Imoto I
2008 年	Cancer Sci.99:1390-400, 2008	Frequent silencing of a putative tumor suppressor gene melatonin receptor 1A (MTNR1A) in oral squamous-cell carcinoma.	Nakamura E, Kozaki K, Tsuda H, Suzuki, E, Pimkhaokham A, Yamamoto G, Irie T, Tachikawa T, Amagasa T, Inazawa J, Imoto I
2008 年	Cancer Res. 68:2094-2105, 2008	Exploration of tumor-suppressive microRNAs silenced by DNA hypermethylation in oral cancer.	Kozaki K, Imoto I, Mogi S, Omura K, Inazawa J
2008 年	Cancer Sci.99:986-94, 2008	Identification of SMURF1 as a possible target for 7q21.3-22.1 amplification detected in a pancreatic cancer cell line by in-house array-based comparative genomic hybridization.	Suzuki A, Shibata T, Murakami Y, Horii A, Shiratori K, Hirohashi S, Inazawa J, Imoto I:
2008 年	Br J Surg.95:611-619, 2008	Aurora kinase B is a predictive factor for the aggressive recurrence of hepatocellular carcinoma after curative hepatectomy.	Tanaka S, Arai S, Yasen M, Moqushi K, Su NT, Zhao C, Imoto I, Eishi Y, Inazawa J, Miki Y, Tanaka H
2008 年	Blood.111:5118-29, 2008	Overexpressed NF- κ B inducing kinase contributes to the tumorigenesis of adult T-cell leukemia and Hodgkin Reed-Sternberg cells.	Saitoh Y, Yamamoto N, Dewan MZ, Sugimoto H, Martinez BVJ, Iwasaki Y, Matsubara K, Qi X, Saitoh T, Imoto I, Inazawa J, Utsunomiya A, Watanabe T, Masuda T, Yamamoto N, Yamaoka S
2008 年	Oncogene.27:63-75, 2008	POU2AF1, an amplification target at 11q23, promotes growth of multiple myeloma cells by directly regulating expression of a B-cell maturation factor, TNFRSF17.	Zhao C, Inoue J, Imoto I, Otsuki T, Iida S, Ueda R, Inazawa J
2007 年	Int J Hematol.86:233-7, 2007	Successful imatinib treatment of cardiac involvement of FIP1L1-	Arai A, Yan W, Wakabayashi S, Hayashi S, Inazawa J, Miura O

		PDGFRA-Positive chronic eosinophilic leukemia followed by severe hepatotoxicity.	
2007 年	Gastroenterology.133:1475-86, 2007	Genetically distinct and clinically relevant classification of hepatocellular carcinoma: putative therapeutic targets.	Katoh H, Ojima H, Kokubu A, Saito S, Kondo T, Kosuge T, Hosoda F, Imoto I, Inazawa J, Hirohashi S, Shibata T
2007 年	Am J Med Genet A.143:2804-9, 2007	22q13 microduplication in two patients with common clinical manifestations: A recognizable syndrome?	Okamoto N, Kubota T, Nakamura Y, Murakami R, Nishikubo T, Tanaka I, Takahashi Y, Hayashi S, Imoto I, Inazawa J, Hosokai N, Kohsaka S, Uchino S
2007 年	Genet Test.11:241-8, 2007	Multiplex PCR/Liquid chromatography assay for screening of subtelomeric rearrangements.	Udaka T, Imoto I, Aizu Y, Torii C, Izumi K, Kosaki R, Takahashi T, Hayashi S, Inazawa J, Kosaki K
2007 年	Mod Pathol.20:1278-85, 2007	Actinin-4 expression in ovarian cancer: a novel prognostic indicator independent of clinical stage and histological type.	Yamamoto S, Tsuda H, Honda K, Kita T, Takano M, Tamai S, Inazawa J, Yamada T, Matsubara O
2007 年	Mod Pathol.20:622-631, 2007	Non-incident coamplification of Myc and ERBB2, and Myc and EGFR, in gastric adenocarcinomas.	Mitsui F, Dobashi Y, Imoto I, Inazawa J, Kono K, Fujii H, Ooi A
2007 年	Clin Gastroenterol Hepatol.5:1046-1052, 2007	Analysis of sentinel node involvement in gastric cancer.	Morita D, Tsuda H, Ichikura T, Kimura M, Aida S, Kosuda S, Inazawa J, Mochizuki H, Matsubara O
2007 年	J Hum Genet.52:643-9, 2007	Redefining the disease locus of 16q22.1-linked autosomal dominant cerebellar ataxia.	Amino T, Ishikawa K, Toru S, Ishiguro T, Sato N, Tsunemi T, Murata M, Kobayashi K, Inazawa J, Toda T, Mizusawa H
2007 年	Virchows Arch.451:27-35, 2007	Clinicopathological significance of WT1 expression in ovarian cancer: a possible accelerator of tumor progression in serous adenocarcinoma.	Yamamoto S, Tsuda H, Kita T, Maekawa K, Fujii K, Kudoh K, Furuya K, Tamai S, Inazawa J, Matsubara O
2007 年	Br J Cancer.97:260-6, 2007	Genetic analysis of multifocal superficial urothelial cancers by array-based comparative genomic hybridisation.	Kawanishi H, Takahashi T, Ito M, Matsui Y, Watanabe J, Ito N, Kamoto T, Kadowaki T, Tsujimoto G, Imoto I, Inazawa J, Nishiyama H, Ogawa O
2007 年	Am J Med Genet A. 143:1448-5, 2007	Partial tandem duplication of GRIA3 in a male with mental retardation.	Chiyonobu T, Hayashi S, Kobayashi K, Morimoto M, Miyanomae Y, Nishimura A, Nishimoto A, Ito C, Imoto I, Sugimoto T, Jia Z, Inazawa J, Toda T
2007 年	Cancer Res. 67:7095-7105, 2007	Promoter hypermethylation contributes to frequent inactivation of a putative conditional tumor suppressor gene connective tissue growth factor in	Kikuchi R, Tsuda H, Kanai Y, Kasamatsu T, Sengoku K, Hirohashi S, Inazawa J, Imoto I

		ovarian cancer.	
2007 年	Oncogene.26:7921-32, 2007	PRTFDC1, a possible tumor-suppressor gene, is frequently silenced in oral squamous-cell carcinomas by aberrant promoter hypermethylation.	Suzuki E, Imoto I, Pimkhaokham A, Nakagawa T, Kamata N, Kozaki K, Amagasa T, Inazawa J
2007 年	Oncogene.26:7401-13, 2007	Epigenetic silencing of prostaglandin E receptor 2 (PTGER2) is associated with progression of neuroblastomas.	Sugino Y, Misawa A, Inoue J, Kitagawa M, Hosoi H, Sugimoto T, Imoto I, Inazawa J
2007 年	Oncogene.26:6456-68, 2007	Frequent methylation-associated silencing of a candidate tumor-suppressor, CRABP1, in esophageal squamous-cell carcinoma.	Tanaka K, Imoto I, Inoue J, Kozaki K, Tsuda H, Shimada Y, Aiko S, Yoshizumi Y, Iwai T, Kawano T, Inazawa J
2007 年	Cancer Sci.98:1078-1086, 2007	Association of KLK5-overexpression with invasiveness of urinary bladder carcinoma cells.	Shinoda Y, Kozaki K, Imoto I, Obara W, Tsuda H, Mizutani Y, Shuin T, Fujioka T, Miki T, Inazawa J
2007 年	Cancer Sci.98:1070-7, 2007	BCL2L2 is a probable target for novel 14q11.2 amplification detected in a non-small cell lung cancer cell line.	Kawasaki T, Yokoi S, Tsuda H, Izumi H, Kozaki k, Aida S, Ozeki Y, Yoshizawa Y, Imoto I, Inazawa J
2007 年	Am J Med Genet A.143:1191-7, 2007	Fortuitous detection of a submicroscopic deletion at 1q25 in a girl with cornelia-de lange syndrome carrying t(5;13)(p13.1;q12.1) by array-based comparative genomic hybridization.	Hayashi S, Ono M, Makita Y, Imoto I, Mizutani S, Inazawa J
2007 年	J Hum Genet. 52:397-405, 2007	Construction of a high-density and high-resolution human chromosome x array for comparative genomic hybridization analysis.	Hayashi S, Honda S, Minaguchi M, Makita Y, Okamoto N, Kosaki R, Okuyama T, Imoto I, Mizutani S, Inazawa J
2007 年	Am J Med Genet A.143:1334-7,2007	Dup(8p)/del(8q) recombinant chromosome in a girl with hepatic focal nodular hyperplasia.	Tokutomi T, Hayashi S, Imai K, Chida A, Ishiwata T, Asano Y, Inazawa J, Nonoyama S
2007 年	Am J Med Genet.143:687-93, 2007	Clinical and molecular cytogenetic characterization of two patients with non-mutational aberrations of the FMR2 gene.	Honda S, Hayashi S, Kato M, Niida Y, Hayasaka K, Okuyama T, Imoto I, Mizutani S, Inazawa J
2007 年	Clin Cancer Res.13:1331-40, 2007	The suppression of aurora-A/STK15/BTAK expression enhances chemosensitivity to docetaxel in human esophageal squamous cell carcinoma.	Tanaka E, Hashimoto Y, Ito T, Kondo K, Higashiyama M, Tsunoda S, Ortiz C, Sakai Y, Inazawa J, Shimada Y
2007 年	Cancer Sci. 98:392-400, 2007	Genome-wide array-based comparative genomic hybridization analysis of pancreatic adenocarcinoma: identification of genetic indicators that predict patient outcome.	Loukopoulos P, Shibata T, Katoh H, Kokubu A, Sakamoto M, Yamazaki K, Kosuge T, Kanai Y, Hosoda F, Imoto I, Ohki M, Inazawa J, Hirohashi S

2007 年	Mol Cell Biol.27:1730-44, 2007	Reduced levels of ATF-2 predispose mice to mammary tumors.	Maekawa T, Shinagawa T, Sano Y, Sakuma T, Nomura S, Nagasaki K, Miki Y, Saito-Ohara F, Inazawa J, Kohno T, Yokota J, Ishii S
2007 年	Oncogene.26:1110-21, 2007	RGC32, a novel p53-inducible gene, is located on centrosomes during mitosis and results in G2/M arrest.	Saigusa K, Imoto I, Tanikawa C, Aoyagi M, Ohno K, Nakamura Y, Inazawa J
2006 年	Oncogene.26:1178-87, 2006	A novel amplification target, DUSP26, promotes anaplastic thyroid cancer cell growth by inhibiting p38 MAPK activity.	Yu W, Imoto I, Inoue J, Onda M, Emi M, Inazawa J
2006 年	Cancer Sci.97:1351-8, 2006	PIK3CA mutation is an oncogenic aberration at advanced stages of oral squamous cell carcinoma.	Kozaki K, Imoto I, Pimkhaokham A, Hasegawa S, Tsuda H, Omura K, Inazawa J
2006 年	Oncogene.25:6554-62, 2006	Genomic loss and epigenetic silencing of very low density lipoprotein receptor involved in gastric carcinogenesis.	Takada H, Imoto I, Tsuda H, Nakanishi Y, Sakakura C, Mitsufuji S, Hirohashi S, Inazawa J
2006 年	Neurosci Lett.405:126-31, 2006	Mutation analyses of genes on 6p12-p11 in patients with juvenile myoclonic epilepsy.	Suzuki T, Delgado-Escueta AV, Alonso ME, Morita R, Okamura N, Sugimoto Y, Bai D, Medina MT, Bailey JN, Rasmussen A, Ramos Peek J, Cordova S, Rubio-Donnadieu F, Ochoa A, Jara-Prado A, Inazawa J, Yamakawa K
2006 年	Cancer Sci.97:1070-4, 2006	Genetic or epigenetic silencing of low density lipoprotein receptor-related protein 1B expression in oral squamous cell carcinoma.	Nakagawa T, Pimkhaokham A, Suzuki E, Omura K, Inazawa J, Imoto I
2006 年	Cancer Res.66:4617-26,2006	Frequent silencing of the candidate tumor suppressor PCDH20 by epigenetic mechanism in non-small-cell lung cancers.	Imoto I, Izumi H, Yokoi S, Hosoda H, Shibata T, Hosoda F, Ohki M, Hirohashi S, Inazawa J
2006 年	J Cell Biol.172:835-46, 2006	The selective continued linkage of centromeres from mitosis to interphase in the absence of mammalian separase.	Kumada K, Yao R, Kawaguchi T, Karasawa M, Hoshikawa Y, Ichikawa K, Sugitani Y, Imoto I, Inazawa J, Sugawara M, Yanagida M, Noda T
2006 年	Ann Neurol.59:298-309, 2006	Clinical heterogeneity of alpha-synuclein gene duplication in Parkinson's disease.	Nishioka K, Hayashi S, Farrer MJ, Singleton AB, Yoshino H, Imai H, Kitami T, Sato K, Kuroda R, Tomiyama H, Mizoguchi K, Murata M, Toda T, Imoto I, Inazawa J, Mizuno Y, Hattori N
2006 年	J Clin Invest.116:80-9, 2006	Early G2/M checkpoint failure as a molecular mechanism underlying etoposide-induced chromosomal aberrations.	Nakada S, Katsuki Y, Imoto I, Yokoyama T, Nagasawa M, Inazawa J, Mizutani S

【国際学会 講演】

発表年月日	発表媒体	発表タイトル	発表者
2011年10月21日	The 8th Nikko International Symposium 2011. Jichi Medical University. Tochigi. Japan.	Function-based screening of tumor-suppressor microRNAs silenced by DNA hypermethylation in cancer	Inazawa J
2011年3月13日	Taiwan Association of Obstetrics and Gynecology. 台湾産婦人科学会学会第50回大会. The Grand Hi Lai Hotel (Taipei, Taiwan)	Copy-number variation (CNV) in Japanese patients with multiple congenital anomalies and mental retardation (MCA/MR) by array-based comparative genomic hybridization analysis.	Inazawa J:
2010年11月6日	Linking systems-biology to cancer research. Seoul national university dental hospital. Seoul, Korea.	Integrative genomics and epigenomics for identification of cancer-related genes.	Inazawa J
2010年8月10日	Chilean-Japanese joint meeting for screening of digestive tumors and International symposium of advances in medical and surgical treatment of colorectal disorders. Clinica Las Condes, Chile.	Molecular pathogenesis of esophageal squamous cell carcinoma.	Inazawa J
2010年8月10日	Chilean-Japanese joint meeting for screening of digestive tumors and International symposium of advances in medical and surgical treatment of colorectal disorders. Clinica Las Condes, Chile.	Cancer genomics and epigenomics.	Inazawa J
2009年11月19日	The 9th East Asian Union of Human genetics Society. Yonsei 大学医療院, Seoul, Korea.	Integrative genomics and epigenomics in cancer.	Imoto I
2009年11月13日	Medical Genetics Symposium Commemorating the 10th anniversary of inauguration of Medical Genetics Clinic & Laboratory. Asan Medical Center, Seoul, Korea.	Integrative genomic and epigenomic analyses in cancer and genomic disorders.	Inazawa J
2009年3月19-20日	Bulgarian-Japanese Symposium "Genomics and Proteomics in Personalized Medicine". Tokuda Hospital, Sofia, Bulgaria. 19-20/March/2009	Genomic and epigenomic analyses in cancer and genomic disorders.	Inazawa J
2008年11月20日	Seoul University, Korea.	Exploring gynecologic cancer-related genes by molecular cytogenetic approach.	Inazawa J
2008年11月22日	2008 Samsung Comprehensive Cancer Center International Gynecologic Cancer Symposium. Samsung Comprehensive Cancer	Exploring gynecologic cancer-related genes by molecular cytogenetic approach.	Inazawa J

	Center, Korea.		
2008年7月19日	The 2008 EAUHGS Symposium & the 8th EAUHGS Annual Meeting. 北海道医療大学札幌サテライトキャンパス・定山溪ビューホテル. 北海道.	Exploring cancer-related genes by molecular cytogenetic approach.	Inazawa J
2008年6月12-13日	The 17th CRI Cancer Symposium "Molecular Target-Based Therapy and Prevention of Cancer" Seoul National University KwanaK Campus, Korea.	Exploring cancer-related genes by molecular cytogenetic approach.	Inazawa J
2008年3月15-16日	The Westin Hotel Tokyo, Tokyo-Japan.	The 4th Asia Pacific Medical Education Initiative on Molecular Targeted Therapy of Cancer(MTTC).	Inazawa J
2007年11月30日	Oral Cancer Symposium 120th Anniversary between Japan-Thailand Diplomatic Relations. Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand.	Identification of tumor suppressor microRNA silenced by DNA methylation in oral squamous cell carcinoma.	Kozaki K, Imoto I, Mogi S, Omura K, Inazawa J
2007年11月30日	Oral Cancer Symposium 120th Anniversary between Japan-Thailand Diplomatic Relations.Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand.	Expression of cIAP-1 Correlates with Nodal Metastasis in Squamous Cell Carcinoma of the Tongue.	Mogi S, Qi S, Tsuda H, Kozaki K, Imoto I, Inazawa J, Omura K
2007年4月16日	98th annual meeting of American Association for Cancer Research 2007(LosAngeles, USA)	RGC32, a novel p53-inducible tumor-suppressor gene, is located on centrosomes during mitosis and results in G2/M arrest.	Imoto I, Saigusa K, Tanikawa C, Aoyagi M, Ohno K, Nakamura Y, Inazawa J
2007年1月22日	7th AACR/JCA Joint International Conference (Hawaii, USA)	Cancer genomic and epigenomic analyses on a BAC-array platform.	Inazawa J
2006年12月15日	International Symposium on Applied Genomics 2006 グラウンドアーク半蔵門. 東京.	Detecting copy-number variation in the human genome using BAC-array based comparative genomic hybridization.	Imoto I, Hayashi S, Honda S, Inazawa J
2006年9月15日	The 8th International Meeting on Human Genome Variation and Complex Genome Analysis(Hong Kong, China)	Array-CGH detecting Human Genome Variation in Japan.	Imoto I, Hayashi S, Honda S, Inazawa J

【国内学会 講演、特別講演、シンポジウム、モーニングレクチャー】

発表年月日	発表媒体	発表タイトル	発表者
2011年7月28日	2011年度東京医科歯科大学オープンキャンパス. 東京	パーソナルゲノム医療の時代は既に始まっている	稲澤讓治
2011年1月31日	国立大学法人東京医科歯科大学第四回硬組織疾患ゲノムセンター・シンポジウム. 東京医科歯科大学講堂. 東	先天異常疾患の原因となるゲノム異常の網羅的探索	林深、稲澤讓治

	京.		
2010年10月29日	日本人類遺伝学会第55回大会. 大宮ソニックシティ. 埼玉.	アレイ CGH の臨床応用と CNV データベースの構築	林深、稲澤譲治
2010年10月29日	日本人類遺伝学会第55回大会. 大宮ソニックシティ. 埼玉.	食道扁平上皮癌において高頻度に発現抑制を受ける新規癌抑制遺伝子候補 Protocadherin 17(PCDH17).	井本逸勢、春木茂男、小崎健一、松井毅、河内洋、小松周平、村松智輝、嶋田裕、河野辰幸、稲澤譲治
2010年10月29日	日本人類遺伝学会第55回大会. 大宮ソニックシティ. 埼玉.	BAC-based X-tiling array を用いた X 連鎖性精神発達遅滞(XLMR)の原因遺伝子探索.	本田尚三、林深、小林淳也、井本逸勢、中川栄二、後藤雄一、稲澤譲治
2010年10月28日	日本人類遺伝学会第55回大会. 大宮ソニックシティ. 埼玉.	Xp11.2 微細重複症候群の1例.	岡本伸彦、林深、稲澤譲治、蒔田芳男、羽田明
2010年10月28日	日本人類遺伝学会第55回大会. 大宮ソニックシティ. 埼玉.	UBE2A を含む Xq24 のゲノム欠失により特徴的な臨床症状を示した男児例.	小林淳也、本田尚三、林深、井本逸勢、折居恒治、今村淳、中川栄二、後藤雄一、稲澤譲治
2010年10月28日	日本人類遺伝学会第55回大会. 大宮ソニックシティ. 埼玉.	複数のゲノムアレイによる先天異常疾患におけるゲノム評価.	林深、岡本奈那、本田尚三、井本逸勢、蒔田芳男、羽田明、稲澤譲治
2010年9月30日	イルミナ主催セミナー～次世代遺伝子解析ツールの医療分野への展開～. 東京ステーションコンファレンス. 東京.	先天異常/精神発達遅滞症の潜在的ゲノムコピー数異常解析	稲澤譲治
2010年9月24日	第69回日本癌学会学術総会. 大阪国際会議場・リーガロイヤルホテル. 大阪	肝細胞癌の肉眼形態が示す特異的遺伝子発現パターンと分子標的 EpCAM の意義	田中真二、茂櫛薫、藍原有弘、松村聡、ヤセン・マハムット、稲澤譲治、田中博、有井滋樹
2010年9月24日	第69回日本癌学会学術総会. 大阪国際会議場・リーガロイヤルホテル. 大阪.	癌細胞において DNA メチル化異常により発現抑制される EMT 関連分子の探索.	倉沢泰浩、小崎健一、小野宏晃、井本逸勢、天笠光雄、稲澤譲治
2010年9月24日	第69回日本癌学会学術総会. 大阪国際会議場・リーガロイヤルホテル. 大阪.	子宮体癌細胞株の機能的スクリーニングを用いたエピゲノム異常により発現抑制される癌抑制遺伝子型 microRNA の同定.	鶴田智彦、小崎健一、平沢晃、阪埜浩司、進伸幸、井本逸勢、青木大輔、稲澤譲治
2010年9月24日	第69回日本癌学会学術総会. 大阪国際会議場・リーガロイヤルホテル. 大阪.	口腔癌細胞株の機能的スクリーニングを用いた DNA メチル化異常により発現抑制される癌抑制遺伝子型 microRNA の探索	上杉篤史、小崎健一、鶴田智彦、古田繭子、井本逸勢、小村健、稲澤譲治
2010年9月24日	第69回日本癌学会学術総会. 大阪国際会議場・リーガロイヤルホテル. 大阪.	Functional スクリーニングを用いた肝細胞癌抑制性 microRNA の同定.	古田繭子、小崎健一、田中真二、有井滋樹、井本逸勢、稲澤譲治
2010年9月24日	第69回日本癌学会学術総会. 大阪国際会議場・リーガロイヤルホテル. 大阪.	腫瘍特異的 DNA 過剰メチル化によって発現抑制される口腔扁平上皮癌関連癌抑制遺伝子型 microRNA の探索.	遠藤寛則、小崎健一、古田繭子、井本逸勢、天笠光雄、稲澤譲治
2010年9月23日	第69回日本癌学会学術総会. 大阪国際会議場・リーガロイヤルホテル. 大阪.	がんの統合的ゲノム・エピゲノム解析とがん関連遺伝子の探索	稲澤譲治
2010年9月23日	第69回日本癌学会学術総会. 大阪国際会議場・リーガロイヤルホテル. 大阪.	癌細胞におけるオートファジー経路の障害	井上純、稲澤譲治
2010年9月23日	第69回日本癌学会学術総会. 大阪国際会議場・リーガロイヤルホテル. 大阪.	発現アレイを用いた大腸癌における EMT 関連遺伝子の探索	小野宏晃、井本逸勢、小崎健一、杉原健一、稲澤譲治

2010年9月23日	第69回日本癌学会学術総会. 大阪国際会議場・リーガロイヤルホテル. 大阪.	肝細胞癌における CpG アイランドの過剰メチル化により発現制御される新規がん抑制遺伝子の同定	松村聡、井本逸勢、小崎健一、田中真二、有井滋樹、稲澤讓治
2010年9月23日	第69回日本癌学会学術総会. 大阪国際会議場・リーガロイヤルホテル. 大阪.	食道扁平上皮癌で高頻度に発現消失する新規癌抑制遺伝子候補 protocadherin17	井本逸勢、春木茂男、小崎健一、松井毅、河内洋、小松周平、村松智輝、嶋田裕、河野辰幸、稲澤讓治
2010年9月23日	第69回日本癌学会学術総会. 大阪国際会議場・リーガロイヤルホテル. 大阪.	食道扁平上皮がんにおける Yes-associated protein(YAP) のがん遺伝子としての可能性.	村松智輝、井本逸勢、松井毅、小崎健一、嶋田裕、津田均、稲澤讓治
2010年9月22日	第69回日本癌学会学術総会. 大阪国際会議場・リーガロイヤルホテル. 大阪.	がん細胞において DNA 過剰メチル化により発現抑制される癌抑制遺伝子型 microRNA	小崎健一、稲澤讓治
2010年9月22日	第69回日本癌学会学術総会. 大阪国際会議場・リーガロイヤルホテル. 大阪.	ヒト癌における LC3A variant-1 の発現低下の意義.	白樺、井上純、井本逸勢、稲澤讓治
2010年9月22日	第69回日本癌学会学術総会. 大阪国際会議場・リーガロイヤルホテル. 大阪.	卵巣癌細胞における NF-κB inducing kinase による恒常的 NF-κB 活性化調節	宇野雅哉、斉藤愛記、井本逸勢、稲澤讓治、山岡昇司
2010年9月22日	第69回日本癌学会学術総会. 大阪国際会議場・リーガロイヤルホテル. 大阪.	DNA メチル化プロファイルに基づいた膵がんの存在診断・病態診断指標の確率	後藤政広、新井恵吏、若井一牛島抄織、平岡伸介、小菅智男、細田文恵、柴田龍弘、近藤格、横井左奈、井本逸勢、稲澤讓治、金井弥栄
2010年9月2日	平成22年度文部科学省科学研究費補助金・新学術領域研究「がん研究分野の特性等を踏まえた支援活動」. がん若手研究者ワークショップ. アートランドホテル蓼科. 長野.	Exploration of potential EMT-related genes in colorectal cancer by gene expression array analysis.	小野宏晃、井本逸勢、小崎健一、稲澤讓治
2010年9月2日	平成22年度文部科学省科学研究費補助金・新学術領域研究「がん研究分野の特性等を踏まえた支援活動」. がん若手研究者ワークショップ. アートランドホテル蓼科. 長野.	Frequently silenced putative tumor suppressors identified homozygously deleted region in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) cell lines.	小西博貴、井本逸勢、春木茂男、小松周平、市川大輔、大辻英吾、稲澤讓治
2010年7月31日	第19回日本 Cell Death 学会学術集会. 愛知県産業労働センター. 愛知.	神経芽腫自然退縮における Impaired autophagy を伴う LPTM5 依存性細胞死	稲澤讓治
2010年7月18日	北陸がんプロフェッショナル養成プログラム. 金沢大学. 金沢.	腫瘍病理学特論(がんのゲノム・エピゲノム)	稲澤讓治
2010年2月16日	第3回硬組織疾患ゲノムセンター・シンポジウム. 東京医科歯科大学講堂. 東京.	口腔癌と先天異常症のゲノム・エピゲノム解析	稲澤讓治
2010年1月14日	がん特定研究5領域合同シンポジウム. 学術総合センター・一橋記念講堂. 東京.	LPTM5 蓄積で誘導されるリソゾーム細胞死と神経芽腫の自然退縮機構	稲澤讓治
2010年1月8日	札幌開成高等学校ブレ先端科学特論プログラム. 北海道医療大学. 北海道.	がんと遺伝疾患のゲノム解析: その分子診断から標的治療へ	稲澤讓治
2009年10月3日	第68回日本癌学会学術総会. パシフィコ横浜. 神奈川.	LPTM5 の蓄積により誘導されるオートファジー障害を伴う細胞死; その神経芽腫の自然退縮への関与	稲澤讓治、井上純

2009年10月3日	第68回日本癌学会学術総会. パシフィコ横浜. 神奈川	p53 標的遺伝子 PHLDA3 は Akt 抑制因子として機能する PH domain-only protein をコードする	大木理恵子、川瀬竜也、柴田龍弘、堤修一、太田力、市川仁、稲澤譲治、油谷浩幸、田代文夫、田矢洋一
2009年10月3日	第68回日本癌学会学術総会. パシフィコ横浜. 神奈川	口腔扁平上皮癌における 19q13.12-q13.2 増幅の新規標的遺伝子 PAK4	ベガム アスマ、井本逸勢、小崎健一、津田均、鈴木江美奈、天笠光雄、稲澤譲治
2009年10月3日	第68回日本癌学会学術総会. パシフィコ横浜. 神奈川.	食道扁平上皮癌における YAP1 とその isoform の癌遺伝子としての機能	村松智輝、井本逸勢、松井毅、小崎健一、津田均、嶋田裕、稲澤譲治
2009年10月2日	第68回日本癌学会学術総会. パシフィコ横浜. 神奈川.	DNA 過剰メチル化により発現抑制される癌抑制遺伝子型 microRNA	小崎健一、稲澤譲治
2009年10月2日	第68回日本癌学会学術総会. パシフィコ横浜. 神奈川.	肝細胞癌においてエピゲノムで制御されるがん抑制遺伝子の統合的アレイ解析	松村聡、井本逸勢、小崎健一、有井滋樹、稲澤譲治
2009年10月2日	第68回日本癌学会学術総会. パシフィコ横浜. 神奈川.	子宮体癌細胞株の機能的スクリーニングを用いたエピゲノム異常により発現抑制される癌抑制遺伝子型 microRNA の探索	鶴田智彦、小崎健一、平沢晃、阪空浩司、進伸幸、井本逸勢、青木大輔、稲澤譲治
2009年10月2日	第68回日本癌学会学術総会. パシフィコ横浜. 神奈川	低分化胃がん進展における KLF12 転写因子の役割	中村裕、右田敏郎、細田文恵、後藤政広、新井康仁、宮田敏、竹内賢吾、片井均、山口俊晴、稲澤譲治、廣橋説雄、石川雄一、柴田龍弘
2009年10月2日	第68回日本癌学会学術総会. パシフィコ横浜. 神奈川.	乳癌における 1p13 増幅領域の標的遺伝子 tripartite motif 33(TRIM33)の解析.	横井左奈、津田均、稲澤譲治
2009年10月2日	第68回日本癌学会学術総会. パシフィコ横浜. 神奈川.	食道扁平上皮癌における新規診断・治療標的遺伝子 SMYD2 の同定	小松周平、井本逸勢、津田均、小崎健一、嶋田裕、市川大輔、大辻英吾、稲澤譲治
2009年10月2日	第68回日本癌学会学術総会. パシフィコ横浜. 神奈川.	肝細胞癌において腫瘍特異的 DNA 過剰メチル化により発現抑制される癌抑制 microRNA	古田繭子、小崎健一、田中真二、有井滋樹、井本逸勢、稲澤譲治
2009年10月2日	第68回日本癌学会学術総会. パシフィコ横浜. 神奈川	尿路上皮がんならびに前がん段階にある尿路上皮における DNA メチル化プロファイル-発がんリスク評価と予後予測	西山直隆、新井恵史、藤元博行、細田文恵、柴田龍弘、近藤格、塚本泰司、横井左奈、井本逸勢、稲澤譲治、廣橋説雄、金井弥栄
2009年10月2日	第68回日本癌学会学術総会. パシフィコ横浜. 神奈川	肝細胞がんとその前がん状態である慢性肝炎・肝硬変症におけるゲノム網羅的 DNA メチル化プロファイル	新井恵史、牛島抄織、後藤政広、尾島英知、小菅智男、細田文恵、柴田龍弘、近藤格、横井左奈、井本逸勢、稲澤譲治、廣橋説雄、金井弥栄
2009年10月1日	第68回日本癌学会学術総会. パシフィコ横浜. 神奈川	肝癌再発ネットワーク解析に基づく Aurora kinase B 分子標的治療の開発	田中真二、藍原有弘、茂榎薫、ヤーセン マームット、野口典男、入江工、工藤篤、中村典明、井本逸勢、三木義男、稲澤譲治、田中博、有井滋樹
2009年10月1日	第68回日本癌学会学術総会. パシフィコ横浜. 神奈川.	がんの統合的ゲノム・エピゲノム解析	井本逸勢、稲澤譲治
2009年9月26日	日本人類遺伝学会第54回大会. グランドプリンスホテル高輪. 東京	ゲノムワイドな統合的DNAメチル化異常解析による肝癌抑制遺伝子候補探索	井本逸勢、松村聡、小崎健一、有井滋樹、稲澤譲治
2009年9月26日	日本人類遺伝学会第54回大会. グランドプリンスホテル	自閉症スペクトラム障害を併存する精神遅滞の遺伝学的	中川栄二、和田敬仁、久保田健夫、加藤光広、難波栄

	高輪. 東京	解析	二、斉藤伸治、黒澤健司、戸田達史、岡澤均、松本直道、本田尚三、稲澤譲治、神田将和、岡崎康司、後藤雄一
2009年9月26日	日本人類遺伝学会第54回大会. グランドプリンスホテル高輪. 東京	アレイCGH法による流産絨毛染色体分析	小澤伸晃、佐々木愛子、須郷慶信、江川真希子、青木宏明、高橋宏典、三井真理、渡邊典芳、林聡、左合治彦、会津善紀、山口敏和、井本逸勢、稲澤譲治
2009年9月24日	日本人類遺伝学会第54回大会. グランドプリンスホテル高輪. 東京.	アレイCGH法と新しい細胞遺伝学	稲澤譲治
2009年9月24日	日本人類遺伝学会第54回大会. グランドプリンスホテル高輪. 東京.	GDA700による染色体微細異常解析受託システムの構築	会津善紀、井本逸勢、林深、小澤伸晃、左合治彦、山口敏和、永田欽也、宮本力、蒔田芳男、羽田明、稲澤譲治
2009年9月24日	日本人類遺伝学会第54回大会. グランドプリンスホテル高輪. 東京.	小頭症と小脳脳幹部低形成を伴う発達遅滞12例におけるCASK遺伝子の解析.	林深、岡本伸彦、水野誠司、小野正恵、小崎里華、奥山虎之、知念安紹、蒔田芳男、羽田明、井本逸勢、稲澤譲治
2009年9月24日	日本人類遺伝学会第54回大会. グランドプリンスホテル高輪. 東京.	アレイCGHを用いた多発奇形を伴う精神遅滞症例解析の4年間の実績	林深、岡本奈那、本田尚三、蒔田芳男、羽田明、井本逸勢、稲澤譲治
2009年9月24日	日本人類遺伝学会第54回大会. グランドプリンスホテル高輪. 東京.	BAC-based X-tiling arrayを用いたX連鎖性精神発達遅滞(XLMR)の原因遺伝子探索.	本田尚三、林深、井本逸勢、當山潤、岡本伸彦、黒澤健司、中川栄二、後藤雄一、稲澤譲治
2009年8月3日	テーラーメイド医療を目指したゲノム情報活用基盤技術第5回公開シンポジウム. 東京.	高精度ゲノムアレイの開発と疾患遺伝子の探索	稲澤譲治
2009年7月13日	広島がんセミナー学術講演会. 広島大学. 広島.	ゲノム・エピゲノム解析によるがん関連遺伝子の探索	稲澤譲治
2009年7月9日	琉球大学大学院セミナー. 琉球大学医学部機器センターセミナー室. 沖縄	がんと遺伝疾患の統合的ゲノム・エピゲノム解析	稲澤譲治
2009年3月25日	京都府立医科大学医学部がんプロフェッショナル養成プラン特別講義. 臨床講義棟北臨床講義室. 京都.	がんと遺伝子疾患の病態形成とゲノム多様性	稲澤譲治
2009年3月14日	昭和大学歯学部口腔癌包括的研究センター 平成20年度公開シンポジウム. 昭和大学歯科病院. 東京.	癌と遺伝疾患のゲノム・エピゲノム解析	稲澤譲治
2008年12月11日	第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生科学会大会合同大会. 神戸ポートアイランド. 兵庫.	ゲノムアレイプラットフォームで展開するがんのゲノム・エピゲノム解析	稲澤譲治
2008年12月11日	第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生科学会大会合同大会. 神戸ポートアイランド. 兵庫.	ヒト癌におけるゲノム一次構造異常領域から同定された増幅標的癌遺伝子候補としての dual specificity phosphatase	井本逸勢、稲澤譲治
2008年12月11日	第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生科学会大会合同大会. 神戸ポートアイランド. 兵庫.	自作 BAC アレイを用いた未分化甲状腺癌細胞株のコピー数異常解析により検出された新規増幅領域 20q11.22 の標的遺伝子候補 ITC.	石原孝也、津田均、堀田晶子、小崎健一、吉田明、吉村弘、伊藤公一、井本逸勢、稲澤譲治

2008年11月27日	第3回四大学連合文化講演会. 一橋記念講堂. 東京.	ゲノムの変化から知るがんの個性と治療法	稲澤譲治
2008年11月25日	第2回硬組織疾患ゲノムセンター・シンポジウム. 東京医科歯科大学歯学部特別講堂. 東京.	顎顔面の多発奇形を伴う先天異常症の統合的ゲノム解析	稲澤譲治
2008年11月8日	日本消化器病学会四国支部第90回例会. 松山市総合コミュニティセンター. 愛媛.	消化器疾患におけるゲノム異常と臨床への展開	稲澤譲治
2008年10月30日	第67回日本癌学会学術総会. 名古屋国際会議場. 愛知.	日本癌学会(JCA)における『がん臨床研究の利益相反に関する指針』と細則案について	稲澤譲治
2008年10月29日	第67回日本癌学会学術総会. 名古屋国際会議場. 愛知.	エピゲノム異常で発現抑制を受ける新規口腔、食道扁平上皮癌抑制遺伝子候補の同定.	井本逸勢、井上純、稲澤譲治
2008年10月29日	第67回日本癌学会学術総会. 名古屋国際会議場. 愛知.	口腔癌において腫瘍特異的DNA過剰メチル化により発現抑制される癌抑制microRNA:miR-137とmiR-193a	小崎健一、井本逸勢、茂木世紀、小村健、稲澤譲治
2008年10月29日	第67回日本癌学会学術総会. 名古屋国際会議場. 愛知.	肝癌に対する選択的Aurora kinase B阻害剤の前臨床研究	藍原有弘、田中真二、Mahmut Yasen、茂櫛薫、野口典夫、工藤篤、中村典明、伊東浩次、井本逸勢、稲澤譲治、三木義男、田中博、有井滋樹
2008年10月29日	第67回日本癌学会学術総会. 名古屋国際会議場. 愛知.	高密度オリゴアレイCGHを用いた新規食道扁平上皮癌関連癌抑制遺伝子の探索	春木茂男、小松周平、井本逸勢、小崎健一、嶋田裕、河野辰幸、稲澤譲治
2008年10月29日	第67回日本癌学会学術総会. 名古屋国際会議場. 愛知.	浸潤生腺管がんにおけるアクチニン-4の遺伝子増幅とたんぱく質発現増加	本田一文、菊池哲、津田均、平岡伸介、稲澤譲治、井本逸勢、廣橋説雄、山田哲司
2008年10月28日	第67回日本癌学会学術総会. 名古屋国際会議場. 愛知.	統合的ゲノム・エピゲノム解析から見出された癌のバイオマーカーと治療標的分子.	稲澤譲治
2008年10月28日	第67回日本癌学会学術総会. 名古屋国際会議場. 愛知.	エピジェネティック異常により発現抑制される子宮体がん関連癌抑制遺伝子のMPA療法における役割.	鶴田智彦、井本逸勢、平沢晃、小崎健一、阪埜浩司、進伸幸、青木大輔、稲澤譲治
2008年10月28日	第67回日本癌学会学術総会. 名古屋国際会議場. 愛知.	肝癌血管侵襲の遺伝子プロファイルに基づく新規分子標的治療への展開	田中真二、茂櫛薫、藍原有弘、ヤセンマハムレット、水島洋、三木義男、稲澤譲治、田中博、有井滋樹
2008年10月28日	第67回日本癌学会学術総会. 名古屋国際会議場. 愛知.	肺小細胞癌における1p13増幅領域の標的候補遺伝子tripartite motif33(TRIM33)の解析.	横井左奈、井本逸勢、柴田龍弘、北川昌伸、廣橋説雄、稲澤譲治
2008年10月28日	第67回日本癌学会学術総会. 名古屋国際会議場. 愛知.	食道扁平上皮癌における新規診断治療標的遺伝子OES1の同定	小松周平、井本逸勢、津田均、小崎健一、松井毅、嶋田裕、市川大輔、大辻英吾、稲澤譲治
2008年10月17日	東京医科歯科大学大学院分子生物学特論. 東京医科歯科大学大学院講義室. 東京.	ゲノムアレイプラットフォームで展開する癌と遺伝疾患のゲノム・エピゲノム解析	稲澤譲治
2008年10月11日	第70回日本血液学会総会. 国立京都国際会館. 京都.	Global assessment of chromosomal changes in cancer.	稲澤譲治
2008年9月30日	日本人類遺伝学会第53回	ゲノムアレイプラットフォーム	井本逸勢、林深、本田尚三、

	大会. パシフィック横浜. 神奈川県.	を用いた遺伝疾患研究の進展と臨床応用.	稲澤譲治
2008年9月30日	日本人類遺伝学会第53回大会. パシフィック横浜. 神奈川県.	X-tiling array を用いた X 連鎖性精神発達遅滞(XLMR)の原因遺伝子探索.	本田尚三、林深、井本逸勢、井ノ上逸朗、屋部登志男、徳永勝士、中川栄二、後藤雄一、稲澤譲治
2008年9月30日	日本人類遺伝学会第53回大会. パシフィック横浜. 神奈川県.	ゲノムアレイを用いた先天異常症の効率的診断法の確立と疾患特異的構造異常の探索	蒔田芳男、斎藤伸治、羽田明、石井拓磨、吉橋博史、黒澤健司、小崎里華、小野正恵、沼部博直、水野誠司、古庄知己、福嶋義光、岡本伸彦、三淵浩、知念安紹、林深、井本逸勢、稲澤譲治
2008年9月30日	日本人類遺伝学会第53回大会. パシフィック横浜. 神奈川県.	アレイ CGH を用いた多発奇形を伴う精神遅滞症例の解析と診断	林深、本田尚三、井本逸勢、稲澤譲治
2008年9月30日	日本人類遺伝学会第53回大会. パシフィック横浜	精神発達遅滞児(者)における500K SNP チップを用いたコピー数変化領域のスクリーニングと原因遺伝子の同定	牟禮岳男、小林千浩、金城薫、千代延友裕、西村陽、平井清、森本昌史、松尾雅文、稲澤譲治、戸田達史
2008年9月29日	日本人類遺伝学会第53回大会. パシフィック横浜	アレイ CGH 法による肺小細胞癌の潜在的ゲノムコピー数解析と癌関連遺伝子の同定	横井左奈、井本逸勢、柴田龍弘、北川昌伸、廣橋説雄、稲澤譲治
2008年9月28日	日本人類遺伝学会第53回大会. パシフィック横浜. 神奈川県.	がん抑制 microRNA と腫瘍特異的 DNA メチル化異常.	小崎健一、稲澤譲治
2008年9月28日	日本人類遺伝学会第53回大会. パシフィック横浜. 神奈川県.	アレイ CGH 法を用いた流産原因の遺伝学的解析.	小澤伸晃、左合治彦、高橋宏典、林聡、右田王介、小崎里華、柿島裕樹、奥山虎之、北川道弘、会津善紀、山口敏和、井本逸勢、稲澤譲治
2008年9月10日	第153回環境研セミナー.(財)環境科学技術研究センター. 青森.	ゲノムアレイプラットフォームで展開する癌と遺伝疾患のゲノム・エピゲノム解析	稲澤譲治
2008年8月4日	第9回文部科学省特定領域研究「がん」5領域・若手研究者ワークショップ. アートランドホテル蓼科. 長野.	Identification of a novel oncogene, OES1, as a target for amplification in esophageal squamous cell carcinomas.	小松周平、井本逸勢、津田均、小崎健一、阪倉長平、嶋田裕、稲澤譲治
2008年8月2日	第17回日本アポトーシス研究会学術集会-細胞死研究の楽しさを考える-. メルパルク京都. 京都.	ゲノム構造解析による食道扁平上皮癌の標的遺伝子探索.	井本逸勢、稲澤譲治
2008年7月5-6日	第7回 Cell Biology Summer Meeting. 鴨川グランドホテル. 千葉.	がんと遺伝疾患のゲノム・エピゲノム解析: その分子診断から標的治療へ	稲澤譲治
2008年6月28日	第18回日本サイトメトリー学会学術集会.(招請講演). 東京慈恵会医科大学1号館3階講堂. 東京.	がんのゲノム・エピゲノム解析から分子診断・標的治療へ	稲澤譲治
2008年5月31日	日本環境変異原学会公開シンポジウム「遺伝子傷害のマーカ探索をめざして」. 青山学院大学ガウチャーホール. 東京.	アレイ CGH 法による癌と遺伝疾患のゲノム・エピゲノム解析研究.	稲澤譲治
2008年5月29日	第50回日本小児神経学会総会・第50回総会記念国際小児神経シンポジウム. ホテル日航東京. 東京.	先天異常疾患における潜在的染色体異常を探索・診断するツールとしてのアレイCGHの有用性.	林深、本田尚三、井本逸勢、稲澤譲治

2008年5月29日	第50回日本小児神経学会総会・第50回総会記念国際小児神経シンポジウム。ホテル日航東京。東京。	X-tiling array を用いたX連鎖生精神発達遅滞(XLMR)の原因遺伝子探索。	本田尚三、林深、井本逸勢、中川栄二、後藤雄一、稲澤譲治
2008年5月29日	第50回日本小児神経学会総会・第50回総会記念国際小児神経シンポジウム。ホテル日航東京。東京。	レット症候群の責任蛋白質MeCP2の標的遺伝子探索-自閉症のマーカー遺伝子の同定にむけて-	久保田健夫、五月女雅樹、伊藤雅之、後藤雄一、稲澤譲治
2008年5月17日	第6回幹細胞シンポジウム。学術総合センター。東京。	アレイプラットフォームで展開する癌と遺伝疾患のゲノム・エピゲノム解析	稲澤譲治
2008年2月19日	京都府立医科大学研究開発センター第4回学術講演会(がんプロフェッショナル養成プラン第1回学術講演会)。京都府立医科大学第2講義室。京都。	がんのゲノム・エピゲノム異常解析と治療標的分子の探索	稲澤譲治
2008年2月13日	ゲノムアレイとバイオマーカー。ナノメディシン・シンポジウム。アルカディア市ヶ谷私学会館。東京。	バイオチップ技術とバイオ情報学・通信技術との融合で拓くユビキタス未来診断医療。	稲澤譲治
2008年2月8日	発生工学・疾患モデル研究会第67回定例会。東京ガーデンバレス。東京。	ゲノムアレイプラットフォームで展開する癌と遺伝疾患のゲノム・エピゲノム解析	稲澤譲治
2008年1月19日	第3回近畿血液疾患治療研究会。京都東急ホテル。京都。	ゲノムの多様性からみる病気と日常	稲澤譲治
2007年11月20日	乳癌研究会「Kyoto Report to Update Conference」。ウエスティン都ホテル京都。京都。	ゲノムアレイプラットフォームで展開するがんと遺伝疾患のゲノム・エピゲノム解析	稲澤譲治
2007年11月9日	第58回日本電気泳動学会教育講演。宇部全日空ホテル。	ゲノムアレイプラットフォームで展開する癌と遺伝疾患のゲノム・エピゲノム解析	稲澤譲治
2007年10月25日	第45回日本癌治療学会総会。国立京都国際会館。京都。	がんのトランスレショナルゲノミクス—Copy number variation(CNV)と疾患—。	稲澤譲治
2007年10月5日	第66回日本癌学会学術総会。パシフィコ横浜。神奈川県	Cancer genomic and epigenomic analyses on BAC-array platform.	井本逸勢、小崎健一、稲澤譲治
2007年10月5日	第66回日本癌学会学術総会。パシフィコ横浜。神奈川県	Identification of tumor suppressor microRNA silenced by DNA methylation in oral squamous cell carcinoma	小崎健一、井本逸勢、茂木世紀、小村健、稲澤譲治
2007年10月5日	第66回日本癌学会学術総会。パシフィコ横浜。神奈川県	Epigenetic silencing of prostaglandin E receptor 2 is associated with progression of neuroblastomas	杉野由里子、三沢あき子、井上純、北川正信、細井創、井本逸勢、杉本徹、稲澤譲治
2007年10月5日	第66回日本癌学会学術総会。パシフィコ横浜。神奈川県	CTGF is a tumor-suppressor gene frequently inactivated by promoter hypermethylation in ovarian cancer	菊池良子、井本逸勢、津田均、金井弥栄、笠松高弘、千石一雄、広橋説雄、稲澤譲治
2007年10月4日	第66回日本癌学会学術総会。パシフィコ横浜。神奈川県	Long-range chromosomal interactions regulate the expression of novel E2F1 target gene	横井左奈、井上純、井本逸勢、稲澤譲治
2007年10月4日	第66回日本癌学会学術総会。パシフィコ横浜。神奈川県	BCL2L2 is a probable target for novel 14q11.2 amplification detected in a	河崎勉、横井左奈、和泉宏幸、井本逸勢、吉澤靖之、稲澤譲治

		non-small cell lung cancer cell line.	
2007年10月4日	第66回日本癌学会学術総会. パシフィコ横浜. 神奈川県	In-house BAC array-based copy-number analysis revealed novel cancer-related genes in Anaplastic thyroid cancer.	石原孝也、于衛、井上純、音田正光、江見充、井本逸勢、稲澤譲治
2007年10月4日	第66回日本癌学会学術総会. パシフィコ横浜. 神奈川県	Identification of novel amplification-target genes in oral squamous cell carcinoma using array-CGH-assisted strategy.	Begum Asma、鈴木江美奈、中村恵理奈、井本逸勢、小崎健一、津田均、天笠光雄、稲澤譲治
2007年10月3日	第66回日本癌学会学術総会. パシフィコ横浜. 神奈川県	Association of KLK5-overexpression with invasiveness of urinary bladder carcinoma cells	篠田康夫、小崎健一、井本逸勢、執印太郎、藤岡知昭、三木恒治、稲澤譲治
2007年10月3日	第66回日本癌学会学術総会. パシフィコ横浜. 神奈川県	Epigenetic silencing of TSOC25 by hypermethylation of the CpG island in oral cancer.	中村恵理奈、鈴木江美奈、中川貴之、津田均、山本剛、入江太朗、小崎健一、井本逸勢、立川哲彦、天笠光雄、稲澤譲治
2007年9月15日	日本人類遺伝学会第52回大会. 京王プラザホテル. 東京	口腔扁平上皮癌においてDNAメチル化により発現抑制される癌抑制microRNAの単離	小崎健一、井本逸勢、茂木世紀、小村健、稲澤譲治
2007年9月15日	日本人類遺伝学会第52回大会. 京王プラザホテル. 東京	BAMCA(BAC-array based MCA)法による多発性骨髄腫DNAメチル化領域の網羅的探索.	中村紋子、横井左奈、井上純、井本逸勢、稲澤譲治
2007年9月15日	日本人類遺伝学会第52回大会. 京王プラザホテル. 東京	ChIP on BAC-arrayにより見出したE2F1標的遺伝子のクロマチン構造による転写制御.	横井左奈、井上純、井本逸勢、稲澤譲治
2007年9月15日	日本人類遺伝学会第52回大会. 京王プラザホテル. 東京	X-tilling arrayを用いたX連鎖性精神発達遅滞(XLMR)の原因遺伝子探索.	本田尚三、林深、井本逸勢、中川栄二、後藤雄一、稲澤譲治
2007年9月14日	日本人類遺伝学会第52回大会. 京王プラザホテル. 東京	アレイCGHによる先天異常症の潜在的染色体異常診断とその解析	林深、本田尚三、井本逸勢、稲澤譲治
2007年9月14日	日本人類遺伝学会第52回大会. 京王プラザホテル. 東京	アレイCGH法による微細染色体異常症解析の評価.	会津善紀、井本逸勢、林深、山口敏和、宮本力、稲澤譲治
2007年9月3日	福知山市民病院セミナー. 市立福知山市民病院. 京都府.	ゲノムの成果がもたらす癌と遺伝疾患の診断と治療	稲澤譲治
2007年8月30-31日	北海道医療大学新川教授着任記念特別講演会. 北海道医療大学. 北海道.	ゲノムの変化から知るがんの個性」「オンコジーンアディクションとがんの分子標的治療薬	稲澤譲治
2007年8月7日	第32回組織細胞化学講習会. 京都芸術劇場春秋座. 京都	FISH法の基礎と応用	稲澤譲治
2007年7月6日	大阪国際会議場. 大阪.	原因不明の多発奇形精神遅滞患児の診断におけるGenome Disorder Arrayの有用性.	蒔田芳男、藤枝憲二、斉藤伸治、黒澤健司、水野誠司、福島義光、岡本伸彦、沼部博直、林深、井本逸勢、稲澤譲治
2007年7月6日	大阪国際会議場. 大阪.	難治性てんかん、重度精神遅滞をきたす1q44欠失症候群の責任領域.	黒澤健司、小坂仁、井合瑞江、蒔田芳男、林深、井本逸勢、稲澤譲治、山下純正

2007年6月25日	アレイプラットフォームで展開する癌のゲノム・エピゲノム解析.	Genetics and Epigenetics Seminar in Sendai. ホテルモントレ仙台. 仙台.	稲澤譲治
2007年6月22日	Genetics and Epigenetics Seminar in Akita. 秋田大学医学部医学系総合研究棟総1講. 秋田.	アレイプラットフォームで展開する癌のゲノム・エピゲノム解析.	稲澤譲治
2007年4月19日	第30回日本小児遺伝学会学術集会. 京大会館. 京都.	高密度かつ高精度なヒトX染色体ゲノムアレイの構築	林深、本田尚三、水口真紀、蒔田芳男、岡本伸彦、小崎里華、奥山虎之、井本逸勢、水谷修紀、稲澤譲治
2007年3月17日	Tsukuba Oncology Symposium 万有製薬(株)つくば研究所. 茨城.	ゲノムアレイプラットフォームで展開するがんのゲノム・エピゲノム解析.	稲澤譲治
2007年2月20日	JCA-Mauvernay Award 受賞記念講演. 東京医科歯科大学. 東京.	分子細胞遺伝学的アプローチによる癌関連遺伝子の同定.	稲澤譲治
2007年2月13日	第11回横浜市立大学「癌の分子細胞生物学懇話会」. 横浜市立大学附属病院. 横浜.	ゲノムアレイプラットフォームで展開する癌のゲノム・エピゲノム解析.	稲澤譲治
2007年2月1日	The Cancer Edition of H-Invitational meeting. 産業技術総合研究所. 東京.	Cancer genomic and epigenomic analyses on a BAC-array platform.	井本逸勢、稲澤譲治
2006年12月15日	International Symposium on Applied Genomics 2006. グランドアーク半蔵門. 東京.	Detecting copy-number variation in the human genome using BAC-array based comparative genomic hybridization.	井本逸勢、林深、本田尚三、稲澤譲治
2006年12月4日	第4回 COE 国際ワークショップ 遺伝子・染色体病の診断治療の最前線. ウェスティンナゴヤキャッスル. 名古屋.	染色体異常症の最新の知見.	稲澤譲治
2006年11月25日	インフォマティクス研究者と医学研究者の交流会. 東京大学柏キャンパス. 千葉	ゲノムアレイ解析から得られるゲノム構造変化の意義	井本逸勢
2006年10月31日	The strategic Meeting for Frontier Project 日本大学医学部. 東京.	Exploration of molecular targets based on genomic copy-number aberrations in human cancers.	井本逸勢、稲澤譲治
2006年10月20日	日本人類遺伝学会第51回大会. 米子コンベンションホール. 鳥取.	In-house BAC アレイを用いたゲノム一次構造解析によるがんと遺伝疾患の個別医療実現へのアプローチ.	井本逸勢
2006年10月20日	日本人類遺伝学会第51回大会. 米子コンベンションホール. 鳥取.	BAC array を用いたエピゲノム解析	井上純、三沢あき子、横井左奈、中川貴之、杉野由里子、細井創、杉本徹、井本逸勢、稲澤譲治
2006年10月19日	第44回日本癌治療学会総会. 京王プラザホテル. 東京.	ゲノムアレイプラットフォームで展開する癌のゲノム・エピゲノム解析	稲澤譲治
2006年10月19日	第44回日本癌治療学会総会. 京王プラザホテル. 東京.	高密度ゲノムアレイを用いた先天異常疾患の解析とゲノム多型の検出.	林深、本田尚三、井本逸勢、水谷修紀、稲澤譲治
2006年10月19日	第44回日本癌治療学会総会. 京王プラザホテル. 東京.	X-tiling array を用いた X 連鎖性精神発達遅滞(XLMR)の原因遺伝子探索.	本田尚三、林深、井本逸勢、中川栄二、後藤雄一、水谷修紀、稲澤譲治
2006年10月18日	第44回日本癌治療学会総会. 京王プラザホテル. 東	Freeman Sheldon 症候群における MYH3 遺伝子の変異	井上奈都子、林深、井本逸勢、岡本伸彦、水野誠司、大

	京.	解析	山紀美栄、稲澤譲治
2006年10月16日	The Strategic Meeting of the Cancer Edition of H-Invitational 産業技術総合研究所. 東京.	Exploration of molecular targets based on the genomic and epigenomic characterization of human cancers using in-house BAC array system	井本逸勢、稲澤譲治
2006年10月6日	第39回遺伝医学研究会. 東京女子医科大学. 東京.	In house BAC アレイを用いた癌のゲノム構造・機能異常解析からの分子標的探索	井本逸勢、稲澤譲治
2006年9月30日	第65回日本癌学会学術総会. パシフィコ横浜. 横浜	ゲノムアレイプラットフォームで展開するがんのゲノム、エピゲノム解析	稲澤譲治
2006年9月30日	第65回日本癌学会学術総会. パシフィコ横浜. 横浜. 神奈川	In-house BAC アレイを用いた癌のゲノム構造・機能異常解析からの分子標的探索	井本逸勢、稲澤譲治
2006年9月30日	第65回日本癌学会学術総会. パシフィコ横浜. 横浜. 神奈川	口腔扁平上皮癌における PIK3CA 遺伝子変異.	小崎健一、長谷川正午、津田均、Atiphan Pimkhaokham、井本逸勢、小村健、稲澤譲治
2006年9月30日	第65回日本癌学会学術総会. パシフィコ横浜. 横浜. 神奈川	DNA メチル化により発現制御をうける新規口腔癌関連遺伝子候補 TSOC10 の解析.	鈴木江美奈、井本逸勢、井上純、中川貴之、Atiphan Pimkhaokham、細田文恵、大木操、天笠光雄、稲澤譲治
2006年9月30日	第65回日本癌学会学術総会. パシフィコ横浜. 横浜. 神奈川	口腔癌のアレイ CGH 解析により検出した新規ホモ欠失領域の標的癌関連遺伝子候補の解析.	中村恵理奈、鈴木江美奈、中川貴之、山本剛、入江太郎、小崎健一、井本逸勢、立川哲彦、天笠光雄、稲澤譲治
2006年9月30日	第65回日本癌学会学術総会. パシフィコ横浜. 横浜. 神奈川	胃癌に認められる超低密度リポタンパク質受容体 VLDLR 発現抑制機序と意義.	高田久、井本逸勢、津田均、中西幸浩、阪倉長平、光藤章二、岡上武、広橋説雄、稲澤譲治
2006年9月30日	第65回日本癌学会学術総会. パシフィコ横浜. 横浜. 神奈川	アレイ CGH 法による卵巣癌の潜在的ゲノムコピー数異常解析と癌関連遺伝子の同定.	菊池良子、井本逸勢、津田均、千石一雄、石川睦男、金井弥栄、広橋説雄、稲澤譲治
2006年9月30日	第65回日本癌学会学術総会. パシフィコ横浜. 横浜. 神奈川	多発性骨髄腫細胞株で検出された 11q23 増幅の標的遺伝子候補 POU2AF1 の TNFRSF17 転写制御を介する腫瘍細胞増殖促進作用	趙晨、井上純、大槻剛巳、井本逸勢、稲澤譲治
2006年9月30日	第65回日本癌学会学術総会. パシフィコ横浜. 横浜. 神奈川	BAMCA (BAC array-based MCA)法による神経芽細胞腫抑制遺伝子 PTGDR および PTGER2 の同定.	杉野由里子、井上純、降旗あき子、北川昌伸、細井創、井本逸勢、杉本徹、稲澤譲治
2006年9月29日	JCA-Mauvernay Award 受賞講演(Clinical). 第65回日本癌学会学術総会. パシフィコ横浜. 横浜. 神奈川	分子細胞遺伝学的アプローチによるがん関連遺伝子の探索.	稲澤譲治
2006年9月29日	第65回日本癌学会学術総会. パシフィコ横浜. 横浜. 神奈川	口腔癌における BAC-array を用いた DNA メチル化領域の網羅的探索.	中川貴之、横井左奈、井上純、鈴木江美奈、Atiphan Pimkhaokham、鎌田伸之、小村健、井本逸勢、稲澤譲治
2006年9月29日	第65回日本癌学会学術総会. パシフィコ横浜. 横浜. 神奈川	X-tiling アレイを用いた X 染色体上の癌関連遺伝子群の探索.	坂本宙子、横井左奈、井本逸勢、稲澤譲治
2006年9月29日	第65回日本癌学会学術総会. パシフィコ横浜. 横浜. 神奈川	高密度ゲノムアレイにより発見された肺癌関連遺伝子候補の解析.	河崎勉、横井左奈、和泉宏幸、井本逸勢、吉澤靖之、稲澤譲治

2006年9月28日	第65回日本癌学会学術総会. パシフィコ横浜. 横浜. 神奈川	BAMCA(BAC array-based methylated CpG island amplification)法による食道扁平上皮癌新規癌抑制遺伝子候補 TSEC1 の同定	田中浩司、井本逸勢、井上純、津田均、嶋田裕、河野辰幸、岩井武尚、稲澤譲治
2006年9月28日	第65回日本癌学会学術総会. パシフィコ横浜. 横浜. 神奈川	高密度・高精度ゲノムアレイにより発見された新規膀胱癌関連遺伝子の解析	篠田康夫、小崎健一、井本逸勢、藤岡知昭、執印太郎、三木 恒治、稲澤譲治

【海外ポスター発表】

発表年月日	発表媒体	発表タイトル	発表者
10/October/2006 (9-13/October/2006)	56th Annual Meeting of the American Society of Human Genetics (New Orleans, Louisiana)	Exploring cryptic genomic aberrations responsible for multiple congenital anomaly with mental retardation using in-house CGH-arrays.	Hayashi S, Honda S, Imoto I, Inazawa J
12/October/2006 (9-13/October/2006)	56th Annual Meeting of the American Society of Human Genetics (New Orleans, Louisiana)	Partial tandem duplication of GRIA3 in a male with mental retardation.	Chiyonobu T, Hayashi S, Morimoto M, Miyanome Y, Nishimura A, Nishimoto A, Ito C, Imoto I, Sugimoto T, Jia Z, Inazawa J, Toda T
15/April/2007 (14-18/April/2007)	98th annual meeting of American Association for Cancer Research 2007. (Los Angeles, USA)	TSOV2 is a putative conditional tumor-suppressor gene frequently inactivated by promoter hypermethylation in ovarian cancer.	Kikuchi R, Tsuda H, Kanai Y, Kasamatsu T, Sengoku K, Hirohashi S, Inazawa J, Imoto I
16/April/2007 (14-18/April/2007)	98th annual meeting of American Association for Cancer Research 2007 (Los Angeles, USA)	Epigenetic silencing of TSOC25 by hypermethylation of the CpG island in oral cancer.	Nakamura E, Suzuki E, Nakagawa T, Tsuda H, Yamamoto G, Kozaki K, Irie T, Tachikawa T, Amagasa T, Imoto I, Inazawa J
17/ April/ 2007 (14-18/April/2007)	98th annual meeting of American Association for Cancer Research 2007(Los Angeles, USA)	MicrorRNA expression profiles in oral squamous cell carcinoma cell lines.	Kozaki K, Imoto I, Inazawa J
18/April/2007(14-18/April2007)	98th annual meeting of American Association for Cancer Research 2007 (Los Angeles, USA)	A novel amplification target, DUSP26, promotes anaplastic thyroid cancer cell growth by inhibiting p38 MAPK activity.	Ishihara T, Yu W, Inoue J, Onda M, Emi M, Imoto I, Inazawa J
24/October/2007 (23-27/October/ 2007)	The American Society of Human Genetics 57th annual meeting (San Diego, CA)	Exploration of genes related to X-linked mental retardation (XLMR) by MCGX-tiling array.	Honda S, Hayashi S, Imoto I, Nakagawa E, Goto Y, Inazawa J
25/October /2007 (23-27/October/2007)	The American Society of Human Genetics 57th annual meeting (San Diego, CA)	Exploring cryptic genomic aberrations related to multiple congenital anomaly with mental retardation using in-house CGH-arrays.	Hayashi S, Honda S, Imoto I, Inazawa J
8/December/2007 (7-9/December/2007)	The 2007 EAUHGS Symposium & the 7th EAUHGS Annual Meeting (Changsha Hunan China)	A case of 12q interstitial partial trisomy diagnosed by MCG whole genome array.	Numabe H, Ochiai Y, Hayashi S, Imoto I, Inazawa J, Kosugi S
12-16/April/2008 (12-16/April/2008)	99th annual meeting of American Association for Cancer Research 2008 (San	PRTFDC1, a possible tumor-suppressor gene, is frequently silenced in oral	Suzuki E, Pimkhaokham A, Nakagawa T, Kamata N, Kozaki K, Amagasa T,

	Diego, California USA)	squamous-cell carcinomas by aberrant promoter hypermethylation.	Inazawa J
12-16/ April/ 2008 (12-16/April/2008)	99th annual meeting of American Association for Cancer Research 2008(San Diego, California USA)	Frequent inactivation of a putative conditional tumor-suppressor gene TSOVC1 in ovarian cancer.	Kikuchi R, Imoto I, Tsuda H, Kanai Y, Kasamatsu T, Sengoku K, Hirohashi S, Inazawa J
12-16/ April/2008 (12-16/April/2008)	99th annual meeting of American Association for Cancer Research 2008 (San Diego, California USA)	Silencing of tumor-suppressive microRNAs by DNA hypermethylation in oral squamous cell carcinoma.	Kozaki K, Imoto I, Mogi S, Omura K, Inazawa J
12-16/ April/ 2008 (12-16/April/2008)	99th annual meeting of American Association for Cancer Research 2008(San Diego, California USA)	Identification of a novel amplification-target gene in oral squamous cell carcinoma(OSCC) using array-CGH-assisted strategy.	Begum A, Suzuki E, Nakamura E, Imoto I, Kozaki K, Tsuda H, Amagasa T, Inazawa J
11-15/November/2008	58th Annual Meeting of the American Society of Human Genetics 2008 (Philadelphia, Pennsylvania USA)	Application of in-house array-CGH for investigation and diagnosis of congenital genome disorders.	Hayashi S, Honda S, Imoto I, Inazawa J
11-15/November/2008	58th Annual Meeting of the American Society of Human Genetics 2008 (Philadelphia, Pennsylvania USA)	Exploration of genes related to X-linked mental retardation(XLMR) by in-house X-tiling array.	Honda S, Inazawa J
21/October/2009	59th Annual Meeting of the American Society of Human Genetics 2009 (Honolulu, Hawaii USA)	Exploration of genes related to X-linked mental retardation (XLMR) by BAC-based X-tiling array.	Honda S, Hayashi S, Imoto I, Toyama J, Okamoto N, Kurosawa K, Nakagawa E, Goto Y, Inazawa J
21/October/2009	59th Annual Meeting of the American Society of Human Genetics 2009 (Honolulu, Hawaii USA)	Analyses of 499 cases of multiple congenital anomalies with mental retardation using array-CGH for investigation and diagnosis.	Hayashi S, Honda S, Mizuno S, Okamoto N, Makita Y, Hata A, Imoto I, Inazawa J
5-9/ February/ 2010	8th Joint Conference of the American Association for Cancer Research and Japanese Cancer Association (Waikoloa, Hawaii, USA)	Lysosomal-associated protein multispinning transmembrane 5 gene (LAPTM5) is associated with spontaneous regression of neuroblastomas.	Inoue J, Misawa A, Tanaka Y, Ichinose S, Hosoi H, Sugimoto T, Imoto I, Inazawa J
5-9/ February/ 2010	8th Joint Conference of the American Association for Cancer Research and Japanese Cancer Association (Waikoloa, Hawaii, USA)	Functional screening of tumor-suppressive microRNAs silenced by DNA hypermethylation in endometrial cancer.	Tsuruta T, Kozaki K, Akira H, Banno, K, Susumu N, Imoto I, Aoki D, Inazawa J
5-9/ February/ 2010	8th Joint Conference of the American Association for Cancer Research and Japanese Cancer Association (Waikoloa, Hawaii, USA)	Exploration of tumor-suppressive microRNAs silenced by DNA hypermethylation in oral cancer.	Kozaki K, Imoto I, Mogi S, Omura K, Inazawa J
5-9/ February/ 2010	8th Joint Conference of the American Association for Cancer Research and Japanese Cancer Association (Waikoloa, Hawaii, USA)	Frequent silencing of protocadherin 17, a candidate tumor suppressor for esophageal squamous cell carcinoma.	Imoto I, Haruki S, Kozaki K, Matsui T, Kawachi H, Komatsu S, Muramatsu T, Shimada Y, Kawano T, Inazawa J
17-21/ April/ 2010	101th annual meeting of American Association for	Frequent silencing of protocadherin 17, a	Imoto I, Haruki S, Kozaki K, Matsui T, Kawachi H,

	Cancer Research 2010 (Washington,DC, USA)	candidate tumour suppressor for esophageal squamous-cell carcinoma.	Komatsu S, Muramatsu T, Shimada Y, Kawano T, Inazawa J
17-21/ April/ 2010	101th annual meeting of American Association for Cancer Research 2010 (Washington,DC, USA)	Functional screening of tumor-suppressive microRNAs silenced by DNA hypermethylation in oral squamous cell carcinoma.	Kozaki K, Uesugi A, Furuta M, Imoto I, Inazawa J
17-21/ April/ 2010	101th annual meeting of American Association for Cancer Research 2010 (Washington,DC, USA)	Functional significance of potential oncogene YAP and its isoforms in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC).	Muramatsu T, Imoto I, Matsui T, Kozaki K, Tsuda H, Shimada Y, Inazawa J
17-21/ April/ 2010	101th annual meeting of American Association for Cancer Research 2010 (Washington,DC, USA)	Gene expression signature of the non-cancerous liver tissue associated with the early recurrence of hepatocellular carcinoma.	Tanaka S, Mogushi K, Yasen M, Noguchi N, Irie T, Kubo A, Nakamura N, Inazawa J, Tanaka H, Arii S
17-21/April/ 2010	101th annual meeting of American Association for Cancer Research 2010 (Washington,DC, USA)	ITCH is a putative target for a novel 20q11.22 amplification detected in anaplastic thyroid carcinoma cells by array-based comparative genomic hybridization.	Ishihara T, Tsuda H, Hotta A, Kozaki K, Yoshida A, Yoshimura H, Ito K, Imoto I, Inazawa J
17-21/April/ 2010	101th annual meeting of American Association for Cancer Research 2010 (Washington,DC, USA)	Lysosomal-associated protein multispanspanning transmembrane 5 gene (LAPTM5) is associated with spontaneous regression of neuroblastomas.	Inoue J, Misawa A, Tanaka Y, Ichinose S, Sugino Y, Hosoi H, Sugimoto T, Imoto I, Inazawa J
17-21/ April/2010	101th annual meeting of American Association for Cancer Research 2010 (Washington,DC, USA)	miR-124 and miR-203 are epigenetically silenced tumor-suppressive microRNAs in hepatocellular carcinoma.	Furuta M, Kozaki K, Tanaka S, Arii S, Imoto I, Inazawa J
November 2-6, 2010	The American Society of Human Genetics 60th annual meeting, Washington DC	The CASK gene mutation in ten Japanese cases with severe mental retardation, microcephaly, and disproportionate pontine and cerebellar hypoplasia.	Hayashi S, Okamoto N, Mizuno S, Chinen Y, Takahashi J, Makita Y, Hata A, Imoto I, Inazawa J.
November 2-6, 2010	The American Society of Human Genetics 60th annual meeting, Washington DC	Exploration of genes related to X-linked mental retardation by BAC-based X-tiling array.	Honda S, Hayashi S, Kobayashi J, Imoto I, Nakagawa E, Goto Y, Inazawa J

【国内 ポスター発表】

発表年月日	発表媒体	発表タイトル	発表者
2006年9月28日	第65回日本癌学会学術総会. パシフィコ横浜	ChIP on BAC array 法を用いた新規 E2F1 標的遺伝子の解析	横井左奈、井上純、井本逸勢、稲澤謙治
2006年9月28日	第65回日本癌学会学術総会. パシフィコ横浜	胃癌における c-myc の c-erbB-2あるいは EGFR との同時遺伝子増幅について	大井章史、土橋洋、三井文彦、井本逸勢、稲澤謙治、河野浩二、藤井秀樹
2006年9月29日	第65回日本癌学会学術総会. パシフィコ横浜	高精度ゲノムアレイを用いた甲状腺未分化癌関連遺伝子の解析	石原孝也、于衛、井本逸勢、音田正光、江見充、稲澤謙治
2006年9月29日	第65回日本癌学会学術総会. パシフィコ横浜	神経芽腫の自然退縮における LAPTM5 遺伝子活性化の	井上純、三沢あき子、杉野由里子、細井創、杉本徹、井本

		意義	逸勢、稲澤譲治
2007年8月2日	科学技術振興機構、戦略的創造研究推進事業第3回公開シンポジウム「テーラーメイド医療を目指したゲノム情報活用基盤技術」。東京コンファレンスセンター。品川	Connective Tissue Growth Factor is a putative conditional tumor-suppressor gene frequently inactivated by promoter hypermethylation in ovarian cancer.	菊池良子、井本逸勢、津田均、金井弥栄、笠松高弘、千石一雄、広橋説雄、稲澤譲治
2007年8月2日	科学技術振興機構、戦略的創造研究推進事業第3回公開シンポジウム「テーラーメイド医療を目指したゲノム情報活用基盤技術」。東京コンファレンスセンター。品川	MCG X-tiling array を用いた X 連鎖性精神発達遅滞 (XLMR) の原因遺伝子探索	本田尚三、林深、井本逸勢、中川栄二、後藤雄一、稲澤譲治
2007年8月2日	科学技術振興機構、戦略的創造研究推進事業第3回公開シンポジウム「テーラーメイド医療を目指したゲノム情報活用基盤技術」。東京コンファレンスセンター。品川	Construction of a High-density and High-resolution Human Chromosome X Array for Comparative Genomic Hybridization Analysis	林深、本田尚三、水口真希、蒔田芳男、岡本伸彦、小崎里華、奥山虎之、井本逸勢、水谷修紀、稲澤譲治
2007年8月2日	科学技術振興機構、戦略的創造研究推進事業第3回公開シンポジウム「テーラーメイド医療を目指したゲノム情報活用基盤技術」。東京コンファレンスセンター。品川	神経芽腫の自然退縮における LPTM5 遺伝子の活性化	井上純、井本逸勢、稲澤譲治
2007年8月2日	科学技術振興機構、戦略的創造研究推進事業第3回公開シンポジウム「テーラーメイド医療を目指したゲノム情報活用基盤技術」。東京コンファレンスセンター。品川	ChIP on BAC-array により見出した E2F1 標的遺伝子のクロマチン構造による転写制御	横井左奈、井上純、井本逸勢、稲澤譲治
2007年8月2日	科学技術振興機構、戦略的創造研究推進事業第3回公開シンポジウム「テーラーメイド医療を目指したゲノム情報活用基盤技術」。東京コンファレンスセンター。品川	口腔扁平上皮癌において DNA メチル化により発現抑制される癌抑制 microRNA の単離	小崎健一、井本逸勢、茂木世紀、小村健、稲澤譲治
2007年8月2日	科学技術振興機構、戦略的創造研究推進事業第3回公開シンポジウム「テーラーメイド医療を目指したゲノム情報活用基盤技術」。東京コンファレンスセンター。品川	新規 p53 誘導遺伝子 RGC32 の分裂期での中心体への局在と G2/M 期停止への関与	井本逸勢、三枝邦康、谷川千津、青柳傑、大野喜久郎、中村祐輔、稲澤譲治
2007年10月4日	第66回日本癌学会学術総会。パシフィコ横浜	Exploration of cancer-related genes on X chromosome using X-tiling array-based copy-number analysis in human cancer	坂本宙子、横井左奈、井本逸勢、稲澤譲治
2007年10月4日	第66回日本癌学会学術総会。パシフィコ横浜	Identification of candidate target genes at genomic loci with high copy number increase in gastric cancer	細田文恵、新井康仁、安田純、中西幸浩、稲澤譲治、廣橋説雄、大木操、柴田龍弘
2007年10月5日	第66回日本癌学会学術総会。パシフィコ横浜	Frequent methylation-associated silencing of candidate tumor-suppressor, CRABP1 in esophageal squamous-cell carcinoma	田中浩司、井本逸勢、井上純、小崎健一、津田均、嶋田裕、河野辰幸、岩井武尚、稲澤譲治
2007年10月5日	第66回日本癌学会学術総会。パシフィコ横浜	Detection of aberrantly methylated genes in	趙晨、井本逸勢、井上純、田中信治、有井滋樹、田中博、

		hepatocellular carcinoma by BAC-array based MCA(BAMCA)strategy.	稲澤譲治
2007年10月5日	第66回日本癌学会学術総会. パシフィコ横浜	Inactivation of LC3A gene in human cancers	井上純、井本逸勢、稲澤譲治
2008年8月1日	テーラーメイド医療を目指したゲノム情報活用基盤技術第4回公開シンポジウム. 日本科学未来館みらいCANホール. 東京	PRTFDC1, a possible tumor-suppressor gene, is frequently silenced in oral squamous-cell carcinomas by aberrant promoter hypermethylation	井本逸勢、稲澤譲治
2008年8月1日	テーラーメイド医療を目指したゲノム情報活用基盤技術第4回公開シンポジウム. 日本科学未来館みらいCANホール. 東京	Silencing of tumor-suppressive microRNAs by DNA hypermethylation in oral squamous cell carcinoma.	小崎健一、稲澤譲治
2008年8月1日	テーラーメイド医療を目指したゲノム情報活用基盤技術第4回公開シンポジウム. 日本科学未来館みらいCANホール. 東京	<i>ITCH</i> is a putative target for a novel 20q11.22 amplification detected in anaplastic thyroid carcinoma cells by array-based comparative genomic hybridization.	石原孝也、稲澤譲治
2008年8月1日	テーラーメイド医療を目指したゲノム情報活用基盤技術第4回公開シンポジウム. 日本科学未来館みらいCANホール. 東京	Identification of a novel amplification-target gene in oral squamous cell carcinoma(OSCC)using array CGH-assisted strategy.	Begum Asma、稲澤譲治
2008年9月4日	第9回文部科学省特定領域研究「がん」5領域・若手研究者ワークショップ. アートランドホテル蓼科. 長野	Screening of tumor suppressive microRNAs silenced by tumor-specific DNA hypermethylation in hepatocellular carcinoma.	古田蘭子、小崎健一、田中真二、有井滋樹、井本逸勢、稲澤譲治
2008年9月28日	日本人類遺伝学会第53回大会. パシフィコ横浜	商用 FISH プローブにてモザイクが検出された Miller-Dieker 症例群の1例	蒔田芳男、長屋建、高橋悟、藤枝憲二、林深、井本逸勢、稲澤譲治
2008年9月28日	日本人類遺伝学会第53回大会. パシフィコ横浜	46, XY,der(9)t(6;9)(p24.1;p23)の兄弟例	小野正恵、林深、北爪勉、入江学、鈴木淳子、稲澤譲治
2008年9月28日	日本人類遺伝学会第53回大会. パシフィコ横浜	先天異常症診断用アレイ、Genome Disorder Array を用いた MCA/MR のアレイ CGH 解析	会津善紀、井本逸勢、林深、山口敏和、永田欽也、宮本力、稲澤譲治
2008年10月28日	第67回日本癌学会学術総会. 名古屋国際会議場. 愛知	Inactivation of LC3A gene in human cancers.	白樺、井上純、井本逸勢、稲澤譲治
2008年10月28日	第67回日本癌学会学術総会. 名古屋国際会議場. 愛知	食道癌発生における Yes-associated protein 1(YAP1) 増幅の意義	村松智輝、井本逸勢、津田均、嶋田裕、小崎健一、稲澤譲治
2008年10月28日	第67回日本癌学会学術総会. 名古屋国際会議場. 愛知	X-tiling アレイを用いた X 染色体上の癌関連遺伝子群の探索	坂本宙子、横井左奈、井本逸勢、稲澤譲治
2008年10月28日	第67回日本癌学会学術総会. 名古屋国際会議場. 愛知	Identification of a novel amplification-target gene in oral squamous cell carcinoma (OSCC) using array-CGH strategy.	Asma Begum、鈴木江美奈、中村恵理奈、井本逸勢、小崎健一、津田均、天笠光雄、稲澤譲治
2008年10月28日	第67回日本癌学会学術総会. 名古屋国際会議場. 愛知	アレイ CGH を用いた甲状腺未分化癌のゲノム構造解析による新規増幅領域 20q11.22 の標的候補遺伝子 <i>ITCH</i>	石原孝也、津田均、小崎健一、吉田明、伊藤公一、井本逸勢、稲澤譲治

		の同定	
2008年10月28日	第67回日本癌学会学術総会. 名古屋国際会議場. 愛知	胃がんの6p21ゲノム増幅領域からの新規標的遺伝子の同定	細田文恵、新井康仁、安田純、中西幸浩、井本逸勢、稲澤譲治、柳原五吉、廣橋説雄、大木操、柴田龍弘
2008年10月28日	第67回日本癌学会学術総会. 名古屋国際会議場. 愛知	ヒト卵巣癌におけるActinin-4遺伝子のoncogenicな性質	山本宗平、津田均、本田一文、高野政志、山田哲司、井本逸勢、稲澤譲治、松原修
2008年10月29日	第67回日本癌学会学術総会. 名古屋国際会議場. 愛知	神経芽腫細胞でのLAPTM5遺伝子強制発現により誘導される細胞死の特性	井上純、井本逸勢、稲澤譲治
2008年10月29日	第67回日本癌学会学術総会. 名古屋国際会議場. 愛知	肝細胞癌において腫瘍特異的DNA過剰メチル化により発現抑制される癌抑制microRNA	古田繭子、小崎健一、田中真二、有井滋樹、井本逸勢、稲澤譲治
2008年12月10日	第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会・合同大会. 神戸ポートアイランド. 兵庫	肝細胞癌において腫瘍特異的DNA過剰メチル化により発現抑制される癌抑制microRNA	古田繭子、小崎健一、田中真二、有井滋樹、井本逸勢、稲澤譲治
2008年12月11日	第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会・合同大会. 神戸ポートアイランド. 兵庫	精神発達遅滞における500K SNPチップを用いたコピー数変化領域のスクリーニングと原因遺伝子の同定	小林千浩、牟禮岳男、金城薫、千代延友裕、西村陽、平井清、森本昌史、松尾雅文、稲澤譲治、戸田達史
2009年9月24日	日本人類遺伝学会第54回大会. グランドプリンスホテル高輪. 東京	新規症候群の可能性のある10q24微細欠失を伴う2症例の報告	岡本奈那、林深、黒澤健司、水野誠司、蒔田芳男、羽田明、井本逸勢、森山啓司、稲澤譲治
2009年9月24日	日本人類遺伝学会第54回大会. グランドプリンスホテル高輪. 東京	アレイCGHで診断された1p34.3微細欠失例	岡本伸彦、林深、井本逸勢、稲澤譲治、蒔田芳男、羽田明
2009年9月25日	日本人類遺伝学会第54回大会. グランドプリンスホテル高輪. 東京	1p13増幅領域の標的遺伝子 tripartite motif 33(TRIM33)は乳癌の予後不良因子である	横井左奈、津田均、井本逸勢、稲澤譲治
2009年10月1日	第68回日本癌学会学術総会. パシフィック横浜. 神奈川	胃がんにおける6p21ゲノム増幅と複数のがん関連遺伝子の協調的活性化	細田文恵、新井康仁、宮本正之、安田純、中西幸浩、井本逸勢、稲澤譲治、柳原五吉、廣橋説雄、大木操、柴田龍弘
2009年10月1日	第68回日本癌学会学術総会. パシフィック横浜. 神奈川	食道扁平上皮癌において高頻度に発現抑制される癌関連抑制遺伝子DESC1の同定	春木茂男、井本逸勢、小松周平、村松智輝、松井毅、小崎健一、河内洋、嶋田裕、河野辰幸、稲澤譲治
2009年10月1日	第68回日本癌学会学術総会. パシフィック横浜. 神奈川	ヒト癌におけるLC3A variant 1の発現低下の意義	白樺、井上純、井本逸勢、稲澤譲治
2010年9月23日	第69回日本癌学会学術総会. 大阪国際会議場・リーガロイヤルホテル. 大阪	LAPTM5はHECT型ユビキチンリガーゼITCHの基質である	石原孝也、井上純、井本逸勢、小崎健一、稲澤譲治
2010年9月23日	第69回日本癌学会学術総会. 大阪国際会議場・リーガロイヤルホテル. 大阪	食道扁平上皮癌において高頻度に発現抑制される癌関連抑制遺伝子PCDH-X,Yの同定	宮脇豊、井本逸勢、春木茂男、村松智輝、松井毅、小崎健一、河内洋、嶋田裕、河野辰幸、稲澤譲治
2010年9月23日	第69回日本癌学会学術総会. 大阪国際会議場・リーガロイヤルホテル. 大阪	食道癌(ESCC)細胞株におけるhomo欠失領域から同定された癌抑制遺伝子候補の検討	小西博貴、井本逸勢、春木茂男、小松周平、河野辰幸、市川大輔、大辻英吾、稲澤譲治
2010年10月28日	日本人類遺伝学会第55回大会. 大宮ソニックシティ. 埼玉	新規症候群の可能性のある10p12.1-p11.23欠失の2症例	岡本奈那、林深、本田尚三、小栗泉、長谷川知子、小崎里華、井本逸勢、蒔田芳男、羽田明、森山啓司、稲澤譲

			治
--	--	--	---

【邦文総説】

発表年月日	発表媒体	発表タイトル	発表者
2006年11月10日	共立出版株式会社. 蛋白質核酸酵素. 51(14):2256-2262	癌化 ジェネティックな異常とエピジェネティックな修飾異常	井上純、稲澤譲治
2006年12月1日	(株)メディカルレビュー社. Surgery Frontier.13(4):405-409	DNA メチル化の網羅的解析と新規癌関連遺伝子の同定	中川貴之、稲澤譲治
2006年	ライフサイエンスレポート. (7):500-507	ゲノムアレイの作製と応用	井本逸勢、稲澤譲治
2007年8月5日	(株)医薬ジャーナル社. Cancer Frontier. 2007 Vol.9 43-49, 2007	ヒトゲノムのコピー数変化 (Copy number variation:CNV) と疾患	稲澤譲治
2007年8月5日	(株)医薬ジャーナル社. Cancer Frontier.2007 Vol.9 195-197, 2007	ミーティングレポート AACR(2007年米国癌学会年次総会)	井本逸勢
2007年8月22日	株式会社秀潤社. 細胞工学. 26(9):1014-1019, 2007	癌のゲノム一次構造異常解析とトランスレショナルゲノミクス	井本逸勢、稲澤譲治
2007年9月25日	(株)最新医学社. 最新医学. 62巻増刊号. 臨床遺伝学. 07 82-92, 2007	がん全ゲノム解析のインパクト	井本逸勢、稲澤譲治
2007年	メディカルレビュー社. Sugery Frontier.Vol.14 No.4:417-423	転移とゲノム構造変化	小松周平、田波秀朗、井本逸勢、稲澤譲治
2008年	医歯薬出版(株). 別冊医学のあゆみ. Vol.225 No.9:845-849	アレイ CGH による先天異常症の潜在的染色体異常診断と解析	林深、井本逸勢、稲澤譲治
2008年8月28日	(株)日本臨牀社. 日本臨牀 66巻増刊号 6:45-49, 2008	遺伝子異常の全ゲノム探索	横井左奈、稲澤譲治
2008年10月4日	医歯薬出版株式会社. 医学のあゆみ. Vol.227 No.1:62-66,2008	癌幹細胞と microRNA	小崎健一、稲澤譲治
2009年1月1日	(株)診断と治療社. 小児科診療. 第 72 巻第 1 号:31-37, 2009	ゲノム微細構造異常と先天異常疾患	林深、井本逸勢、稲澤譲治
2009年1月28日	(株)日本臨牀社. 日本臨牀. がん薬物療法学. 67巻増刊号1(通巻 950 号):167-171, 2009	癌のゲノム構造異常とその意義	稲澤譲治
2009年	医歯薬出版(株). 別冊医学のあゆみ. Vol.229 No.10:941-948	がんのゲノミクス・エピゲノミクス	春木茂男、井本逸勢、稲澤譲治
2009年9月30日	金原出版株式会社. 小児科. 第 50 巻第 7 号:847-853, 2009	アレイCGHによる先天異常の解析	林深、稲澤譲治
2009年9月25日	最新医学社. 最新医学. 64巻 9 月増刊号(通巻 810 号):36-45, 2009	染色体構造異常とがん	稲澤譲治
2010年5月20日	医歯薬出版(株). 別冊医学のあゆみ. がんの分子病理診断の新展開:5-12, 2010	がんのゲノミクス・エピゲノミクス	春木茂男、井本逸勢、稲澤譲治
2010年6月1日	日本医師会. 日本医師会雑誌. 第 139 巻第 3 号:562-566, 2010	染色体異常—検査の進歩、結果の解釈	稲澤譲治
2010年6月20日	ニューサイエンス社. 細胞. 42巻6号:232-235, 2010	癌細胞における DNA メチル化異常と microRNA 発現制	小崎健一、稲澤譲治

		御	
2010年9月20日	メディカルレビュー社. 大腸癌 FRONTIER. 26-31, 2010	遺伝子・ゲノム変異と大腸癌発癌～全ゲノムを研究対象としてみえてきたこと～	小野宏晃、井本逸勢、稲澤譲治
2011年4月20日	(株)日本臨牀社. 日本臨牀増刊号. 大腸癌. 69 巻増刊号3(通巻 997 号):77-83, 2011	DNA ミスマッチ修復遺伝子	小野宏晃、稲澤譲治

【邦文著書】

発表年月日	発表媒体	発表タイトル	発表者
2006年10月20日	株式会社南江堂	染色体・ゲノム異常. 新臨床腫瘍学.	(分担)稲澤譲治
2007年	日本組織細胞化学会	FISH 法、SKY 法、CGH 法. 組織細胞化学 2007(第 32 回組織細胞化学講習会)	(分担)稲澤譲治
2008年2月15日	医薬ジャーナル社	アレイ CGH 診断活用ガイドブック-知っておきたい染色体微細構造異常症-	(分担)稲澤譲治
2008年9月15日	株式会社南山堂(東京)	がんの分子標的治療(鶴尾隆編)	(分担)稲澤譲治
2009年2月10日	株式会社メジカルビュー社	講義録 腫瘍学	(分担)稲澤譲治
2009年4月20日	日本医事新報社	造血器腫瘍アトラス-形態、免疫、染色体と遺伝子-改訂第4版	(分担)阿部達生、稲澤譲治、井本逸勢、井上純
2009年10月1日	篠原出版新社	入門腫瘍内科学	(分担)稲澤譲治
2009年10月30日	中外医学社	がん化学療法・分子標的治療 update	(分担)井本逸勢、稲澤譲治
2009年11月5日	株式会社南江堂(東京)	新臨床腫瘍学(改訂第2版)-がん薬物療法専門医のために-	(分担)稲澤譲治
2010年7月10日	株式会社羊土社(東京)	がん生物学イラストレイテッド.	(分担)稲澤譲治
2011年3月15日	独立行政法人科学技術振興機構中国総合研究センター(東京).	中国・日本科学最前線-研究の現場から- 2011年版.	(分担)稲澤譲治

2. 特許出願

【特許出願】

(国外・US)			
2006年10月24日	2005-309921	癌抑制剤	東京医科歯科大学/富士フィルム株式会社
2007年3月21日	2006-078786	癌抑制剤	東京医科歯科大学/富士フィルム株式会社
2007年3月21日	2006-078787	癌の検出方法および抑制方法	東京医科歯科大学/富士フィルム株式会社
2007年4月11日	2006-109312	癌関連欠失遺伝子マーカーを用いた癌の診断方法	東京医科歯科大学/富士フィルム株式会社
2007年7月25日	2006-204601	癌抑制剤	東京医科歯科大学/富士フィルム株式会社
2008年5月23日	2007-169875	神経芽腫の悪性度を含めた検出方法、及び抑制方法	東京医科歯科大学/富士フィルム株式会社

2008年5月28日	2007-143110	口腔扁平上皮癌の検出方法、及び抑制方法	東京医科歯科大学/富士フィルム株式会社
2008年5月28日	2007-143111	卵巣癌の検出方法、及び抑制方法	東京医科歯科大学/富士フィルム株式会社
2008年7月23日	2005-309921	癌抑制剤	東京医科歯科大学/富士フィルム株式会社
2008年12月12日	12/747,597	流体収容カートリッジ及びその利用」	日本ガイシ株式会社
2009年1月22日	2008-012256	癌の検出方法および癌抑制剤	東京医科歯科大学/富士フィルム株式会社
2009年7月15日	2008-184982	甲状腺癌の検出方法	東京医科歯科大学/富士フィルム株式会社
2009年9月28日	2008-275176	神経芽腫の検出方法	東京医科歯科大学/富士フィルム株式会社
2009年11月19日	12/621,771	DNAアレイ内蔵カートリッジ、分析装置及びDNAアレイ内蔵カートリッジの使用方法	日本ガイシ株式会社
2010年3月24日	2009-073998	食道癌の検出方法及び抑制剤	東京医科歯科大学/富士フィルム株式会社
2010年5月26日	2009-128162	核酸マイクロアレイの異常スポットを検出する方法	東京医科歯科大学/富士フィルム株式会社
(国外・EP)			
2006年10月25日	2005-309921	癌抑制剤	東京医科歯科大学/富士フィルム株式会社
2007年4月19日	2006-118030	VLDLR遺伝子の検出による胃癌の検出方法	東京医科歯科大学/富士フィルム株式会社
2007年7月26日	2006-204601	癌抑制剤	東京医科歯科大学/富士フィルム株式会社
2007年9月21日	2006-255155	多発性骨髄腫の検出方法および抑制方法	東京医科歯科大学/富士フィルム株式会社
2008年5月30日	2007-143110	口腔扁平上皮癌の検出方法、及び抑制方法	東京医科歯科大学/富士フィルム株式会社
2008年5月30日	2007-143111	卵巣癌の検出方法、及び抑制方法	東京医科歯科大学/富士フィルム株式会社
2008年12月12日	08862757.5	流体収容カートリッジ及びその利用	日本ガイシ株式会社
2009年1月23日	2008-012256	癌の検出方法および癌抑制剤	東京医科歯科大学/富士フィルム株式会社
2009年11月20日	09252659.9	DNAアレイ内蔵カートリッジ、分析装置及びDNAアレイ内蔵カートリッジの使用方法	日本ガイシ株式会社
2010年5月27日	2009-128162	核酸マイクロアレイの異常スポットを検出する方法	東京医科歯科大学/富士フィルム株式会社
(国外・CN)			
2007年4月12日	2006-109312	癌関連欠失遺伝子マーカーを用いた癌の診断方法	東京医科歯科大学/富士フィルム株式会社
2007年4月23日	2006-118030	VLDLR遺伝子の検出による胃癌の検出方法	東京医科歯科大学/富士フィルム株式会社
2007年7月27日	2006-204601	癌抑制剤	東京医科歯科大学/富士フィルム株式会社
2007年9月21日	2006-255155	多発性骨髄腫の検出方法および抑制方法	東京医科歯科大学/富士フィルム株式会社
2008年5月30日	2007-143110	口腔扁平上皮癌の検出方法、及び抑制方法	東京医科歯科大学/富士フィルム株式会社
2008年5月30日	2007-143111	卵巣癌の検出方法、及び抑制方法	東京医科歯科大学/富士フィルム株式会社
2008年12月12日	200880120804.8	流体収容カートリッジ及びその利用	日本ガイシ株式会社
2009年12月8日	200910253516.6	DNAアレイ内蔵カートリッジ、分析装置及びDNAアレイ内蔵カートリッジの使用方法	日本ガイシ株式会社
2010年5月27日	2009-128162	核酸マイクロアレイの異常スポットを検出する方法	東京医科歯科大学/富士フィルム株式会社
(国内)			
2006年9月21日	2006-255155	多発性骨髄腫の検出方法および制御方法	東京医科歯科大学/富士フィルム株式会社

			ム株式会社
2006年11月8日	2006-303331	食道癌の検出方法	東京医科歯科大学/株式会社 ビー・エム・エル
2006年12月20日	2006-342462	癌の診断マーカーならびに治療の標的分子 OSLC1	東京医科歯科大学/第一製薬株 式会社
2007年4月19日	2007-111033	食道癌の判別方法	東京医科歯科大学/株式会社 ビー・エム・エル
2007年5月10日	2007-125838	膀胱癌の検出方法	東京医科歯科大学/株式会社 ビー・エム・エル
2007年5月30日	2007-143110	口腔扁平上皮癌の検出方法、及び抑制方法	東京医科歯科大学/富士フィル ム株式会社
2007年5月30日	2007-143111	卵巣癌の検出方法、及び抑制方法	東京医科歯科大学/富士フィル ム株式会社
2007年6月28日	2007-269875	神経芽腫の悪性度を含めた検出方法、及び 抑制方法	東京医科歯科大学/富士フィル ム株式会社
2008年1月23日	2008-012256	癌の検出方法および癌抑制剤	東京医科歯科大学/富士フィル ム株式会社
2008年5月27日	2008-138530	核酸アレイを用いた検出方法	東京医科歯科大学/富士フィル ム株式会社
2008年5月28日	2008-139638	核酸マイクロアレイを用いた核酸計量方法	東京医科歯科大学/富士フィル ム株式会社
2008年7月1日	特願2008-172659	流体収容カートリッジ及びその利用	日本ガイシ株式会社
2008年7月16日	2008-184982	甲状腺癌の検出方法	東京医科歯科大学/富士フィル ム株式会社
2008年8月1日	2008-199541	先天性異常症の染色体欠失の検出方法	東京医科歯科大学/株式会社 ビー・エム・エル/富士フィル ム株式会社
2008年8月8日	2008-205138	口腔扁平上皮癌の検出方法	東京医科歯科大学/富士フィル ム株式会社
2008年9月11日	2008-233491	BACクローンを用いる腎細胞癌の予後予測方 法	東京医科歯科大学/財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団
2008年10月27日	2008-275176	神経芽腫の検出方法	東京医科歯科大学/富士フィル ム株式会社
2008年12月25日	2008-329872	BACクローンを用いる肝細胞癌の発生リスク 評価方法及び予後予測方法	東京医科歯科大学/財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団
2009年2月2日	2009-022048	医薬組織物、および腫瘍の治療用薬剤	東京医科歯科大学/東京理科大 学
2009年2月26日	特願2010-518944	DNAアレイ	日本ガイシ株式会社
2009年3月3日	2009-049864	精神遅滞を伴う多発性奇形症候群の判別方 法	東京医科歯科大学/株式会社 ビー・エム・エル/富士フィル ム株式会社
2009年3月11日	2009-058156	BACクローンを用いる尿路上皮癌の発生リス ク評価方法及び予後予測方法	東京医科歯科大学/財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団
2009年3月25日	2009-073998	食道癌の検出方法及び抑制剤	東京医科歯科大学/富士フィル ム株式会社
2009年5月1日	2009-111725	薬剤耐性マーカーおよびその利用	稲澤譲治/富士フィルム株式会 社
2009年5月26日	2009-126894	核酸アレイ及び核酸アレイの識別方法	東京医科歯科大学/富士フィル ム株式会社
2009年5月26日	2009-126780	核酸マイクロアレイを用いた解析方法	東京医科歯科大学/富士フィル ム株式会社
2009年5月27日	2009-128162	核酸マイクロアレイの異常スポットを検出する 方法	東京医科歯科大学/富士フィル ム株式会社
2009年9月18日	特願2009-218029	DNAアレイ内蔵カートリッジ、分析装置及び DNAアレイ内蔵カートリッジの使用方法	日本ガイシ株式会社
2010年2月26日	2010-041825	食道癌の検出又は予後の予測のための方法 及び食道癌抑制剤	東京医科歯科大学/富士フィル ム株式会社
2010年3月3日	2010-046564	癌の検出方法および抑制方法	東京医科歯科大学/富士フィル ム株式会社

3. 受賞実績他

2006年

1. 稲澤譲治がブルガリア国立アカデミー外国人会員に選出された。
2. 稲澤譲治が第2回日本癌学会 JCA-Mauvernay Award を受賞した。
3. 井本逸勢が平成 18 年度臓器病研究財団研究奨励賞を受賞した。
4. 和泉宏幸が第 7 回田中道子がん研究奨励賞を受賞した。

2007年

1. 田中浩司が平成 19 年度東京医科歯科大学医科同窓会研究奨励賞を受賞した。
2. 横井左奈が平成 19 年度第 15 回黒住医学研究振興財団研究助成を受賞した。

2008年

1. 稲澤譲治が平成 20 年度科学技術分野 文部科学大臣表彰 科学技術賞(研究部門)を受賞した。
2. 本田尚三が平成 20 年度日本学術振興会特別研究員-DC1 に採用された。
3. 井本逸勢が平成 19 年度(第 2 回)有限責任中間法人小林がん学術振興会奨学助成を受賞した。
4. 菊池良子の論文が掲載誌 Cancer Res の表紙で紹介された。
5. 石原孝也の論文が掲載誌 Cancer Sci の表紙で紹介された。
6. 古田繭子が平成 20 年度「難治疾患研究」を重点課題とする研究助成に採択された。

2009年

1. 横井左奈助教が平成 21 年 6 月 1 日付で千葉県がんセンター研究局・がんゲノムセンター部長に就任した。
2. 井上純特任助教が平成 21 年 9 月 1 日付で助教に就任した。
3. 井上純特任助教古田繭子が平成 20 年度大学院生・若手研究者研究発表会で大学院生部門2位を受賞した。
4. 小松周平が平成 20 年度大学院生・若手研究者研究発表会で大学院生部門3位を受賞した。
5. 本田尚三が平成 20 年度大学院生・若手研究者研究発表会で難治疾患研究賞を受賞した。

2010年

1. 井本逸勢准教授が平成22年5月1日付で徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部人類遺伝学分野教授に就任した。
2. 小崎健一硬組織疾患ゲノムセンター特任准教授が平成22年6月1日付で准教授に就任した。
3. 林深特任助教が平成22年8月1日付で 硬組織疾患ゲノムセンター特任講師に就任した。
4. 井上純が平成21年度大学院生・若手研究者研究発表会で若手研究者部門3位を受賞した。
5. 鶴田智彦が平成21年度大学院生・若手研究者研究発表会で難治疾患研究賞を受賞した。
6. 本田尚三が平成22年度難治疾患研究所国際研究者海外派遣プログラムにて米国派遣された。
7. 本田尚三の論文が掲載誌Journal of Human Genetics の表紙で紹介された。

2011年

1. 春木茂男(大学院医歯学総合研究科博士課程平成21年度卒業)が第12回田中道子がん研究奨励賞を受賞した。
2. 村松智輝が平成22年度「難治疾患の研究」を重点課題とする研究助成に採択された。
3. 小野宏晃が平成22年度大学院生・若手研究者研究発表会で大学院生部門1位(ベストプレゼンテーション)

- ン賞)を受賞した。
4. 本田尚三が平成22年度大学院生・若手研究者研究発表会で大学院生部門2位を受賞した。
 5. 村松智輝が平成22年度大学院生・若手研究者研究発表会で難治疾患研究賞を受賞した。
 6. 古田繭子が平成22年度大学院生・若手研究者研究発表会で萌芽賞を受賞した。
 7. 古田繭子が東京医科歯科大学グローバルCOE (GCOE) スーパースチューデント(SS)研究発表で優秀賞「Excellent Award」を受賞した。
 8. 林深の論文が掲載誌Journal of Human Genetics の表紙で紹介された。
 9. 井上純が川野小児医学奨学財団の研究助成に採択された。

4. その他の特記事項(新聞報道、雑誌等への投稿など)

【著書出版】

2008 年2月

アレイCGH 診断活用ガイドブック ―知っておきたい染色体微細構造異常症―
稲澤譲治、蒔田芳男、羽田明 編 出版社:医薬ジャーナル社

【DB 公開】

2008 年3 月

CGH Database(ver.3)

http://www.cghtmd.jp/CGHDatabase/index_jjsp

2011年4月6日

日本人健常者集団を対象としたヒトゲノム多様性データベース「MCG CNV Database」公開

<http://www.cghtmd.jp/CNVdatabase>

【雑誌の表紙に掲載】

2006 年12 月

Cancer Science Vol.97, No.12 の表紙に口腔扁平上皮癌の3q23 増幅遺伝子のゲノム解析論文

*がハイライト論文として紹介される。

*Kozaki K, Imoto I, Pimkhaokham A, Hasegawa S, Tsuda H, Omura K, Inazawa J: PIK3CA

mutation is an oncogenic aberration at advanced stages of oral squamous cell carcinoma, Cancer Sci.,97 (12), 1351-1358, 2006

2007 年7 月

Cancer Science Vol.98, No.7 の表紙に東京医科歯科大学稲澤研究室自作CGH アレイによる膀胱癌の解析と新規19q番染色体増幅の標的遺伝子KLK5、-6、-8、-9 の発見に関する論文*の図の一つが掲載される。

*Shinoda Y, Kozaki K, Imoto I, Obara W, Tsuda H, Mizutani Y, Shuin T, Fujioka T, Miki T,

Inazawa J: Association of KLK5-overexpression with invasiveness of urinary bladder carcinoma cells, Cancer Sci., 98 (7), 1078-1086, 2007

2008 年7 月

米国癌学会雑誌Cancer Research Vol.68, No.13 の表紙に卵巣がんの癌抑制遺伝子候補の同定に関する論文がハイライト論文*として紹介される。

*Kikuchi R, Tsuda H, Kozaki K, Kanai Y, Kasamatsu T, Sengoku K, Hirohashi S, Inazawa J:

Frequent inactivation of a putative conditional tumor-suppressor gene, angiotensin-like protein 2, in ovarian cancer, Cancer Res., 68 (13), 5067-5075, 2008

【新聞報道】

2006年10月

東京医科歯科大学稲澤研究室自作のBAC アレイを用いて同定した肺がん抑制遺伝子PCDH20 の悪性度バイオマーカーとしての有用性が日経新聞(平成18年10月16日朝刊)で紹介された。

2006年11月

東京医科歯科大学稲澤研究室自作のBAC アレイ(Genome Disorder Array)を用いて染色体微細異常を診断できることが日経新聞(平成18年11月6日朝刊)で紹介された。

2008年12月

「ゲノムの変化から知る癌の個性と治療法・高精度ゲノムアレイの実用化・先天性異常症の診断にも貢献」日経新聞(2008年12月21日朝刊)

2009年9月

「染色体の微細異常検出 富士フィルム DNAアレイ発売」日刊工業新聞(2009年9月30日)

2009年9月

「染色体DNAアレイ 臨床応用向け開発 富士フィルム 先天異常症の解析用」化学工業日報(2009年9月29日)

2009年10月

「先天性障害 48時間以内に検出 富士フィルムDNAチップ」日経新聞(2009年10月2日)

2009年10月

「BML、BAC アレイを用いた先天異常の染色体診断サービスを開始」日経 Biotechnology Japan on line (<http://biotech.nikkeibp.co.jp/bionewsn/detail.jsp?id=20065714>)に掲載(2009年10月1日)

【ニュースリリース】

2009年9月

富士フィルム株式会社が「染色体検査用DNAアレイの臨床応用に世界で初めて成功！～先天異常症候群解析用DNAアレイ「GD-700」～染色体の微細な違いを高精度かつ簡便に検出～新発売(富士フィルム株式会社・ホームページ・ニュースリリース、2009年9月28日)

2009年9月

NEDO日比谷オフィス広報センターで「先天異常症候群を解析する装置を世界に先駆け実用化 受託解析事業も開始」についてプレスリリース実施(NEDO主催)(2009年9月26日)

【雑誌掲載】

2011年7月

産学連携レポート「NEDOとの共同研究『ヒトゲノム多様性データベース』東京医科歯科大学広報誌 Bloom!医科歯科No.12号

【展示】

2008年7月

日本ガイシ株式会社

第7回国際バイオEXPOに NEDO 成果展示(2008年7月2日～4日)

2009年10月

日本ガイシ株式会社、富士フイルム株式会社、株式会社ビー・エム・エル
バイोजパン 2009(横浜パシフィコ)の NEDO ブースで「分散型全自動染色体異常解析装置、GD アレイ
(GD-700)、GD-700 を用いた先天異常症解析受託」を展示(2009年10月7~9日)

【ランチョンセミナー】

2006年10月

日本人類遺伝学会第 51 回大会(米子コンベンションセンター)でランチョンセミナー「臨床奇形学領域におけるアレイ CGH 実用化の取り組み」を開催(2006年10月18日)

2008年9月

日本人類遺伝学会第 53 回大会(パシフィコ横浜)でランチョンセミナー「染色体分析を代替・補完するBACアレイCGH法の臨床診断への活用」を開催(2008年9月28日)

2009年9月

日本人類遺伝学会第 54 回大会(グランドプリンスホテル高輪)でランチョンセミナー「先天異常症候群診断用BACアレイスライド(GD-700)の実用化」を開催(2009年9月26日)

5. 会議の記録

【NEDOプロジェクトキックオフ会議】

2006. 10. 3

【NEDOプロジェクト開発委員会】

2006. 10. 23

2008. 2. 5

2009. 2. 24

2010. 5. 25

【NEDOプロジェクト推進会議】

2008. 1. 11

2009. 2. 16

【NEDOプロジェクト進捗報告会】

2007. 8. 29

2008. 7. 10

2009. 9. 10

【アレイCGH実用化コンソシウム会議】

2006. 7. 1

2006. 10. 20

2008. 1. 26

2008. 9. 23

2009. 1. 17

2009. 3. 7

2011. 1. 21

6. CGHアレイ診断法実用化コンソーシアム参加施設一覧

CGHアレイ診断法実用化コンソーシアム参加施設の一覧

No.	施設名	担当医師氏名
1	旭川医科大学医学部小児科	蒔田芳男
2	神奈川県立こども医療センター遺伝科	黒澤健司
3	千葉県こども病院 遺伝科	羽田 明, 石井拓磨
4	大阪府立母子保健総合医療センター企画調査部	岡本伸彦
5	愛知県心身障害者コロニー中央病院小児内科	水野誠司
6	東京医科歯科大学医学部附属病院小児科	荒木聡(水谷修紀)
7	東京医科大学病院 遺伝子診療室	沼部博直
8	京都大学医学部附属病院 遺伝子診療部	沼部博直
9	北海道大学病院 小児科	斉藤伸治
10	信州大学医学部附属病院 遺伝子診療部	福嶋義光
11	千葉大学医学部附属病院 遺伝カウンセリング室	羽田 明
12	熊本大学医学部附属病院 小児科	三淵浩(遠藤文夫)
13	琉球大学医学部附属病院 小児科	知念安紹
14	慶応義塾大学病院 小児科	小崎健次郎
15	国立成育医療センター 遺伝診療科	小崎里華
16	東京都立清瀬小児病院 遺伝科	大木寛生
17	東京逡信病院	小野正恵
18	北里大学病院 臨床遺伝学	高田史男
19	広島県立広島病院 小児科	小野浩明
20	神戸大学医学部小児科	八木真理子
21	防衛医大小児科	松本浩
22	群馬県立小児医療センター	吉橋博史
23	東京都立北療育センター	沼部博直

8. 用語集

(アルファベット、あいうえお順に記載)

染色体異常	性細胞の減数分裂時の異常により、受精後、体細胞の染色体数の異常が起こることがある。性染色体(X,Y)、および常染色体のそれぞれに、数の増加、減少の起こる場合が知られている。常染色体の場合、トリソミー(3本に増加)が多い。染色体全体ではなく、その一部のみの変化の起こる場合もあり、この場合には、モノソミー(1本に減少)も多く起こる。染色体検査では3百万塩基対以上の異常を検出することができる。
染色体異常症候群	染色体異常により誘起される精神発達遅滞、多発奇形、成長障害、神経症状等を伴う疾患。
BAC DNA	BAC DNAとはBacterial Artificial Chromosome DNAの略で、ゲノムDNAの断片を大腸菌内で自立複製するベクターDNAと繋ぎ、大腸菌に入れる事により、大腸菌を培養することにより増幅できるDNAである。BAC DNAは5千塩基～数万塩基のサイズのゲノムを有しており、プラスミドと比較すると非常に大きいサイズのDNAを大腸菌内で自立・複製できる事が特徴で、それが染色体の解析に使用される大きい理由である。
癌遺伝子	高発現または遺伝子変異により活性化することにより癌を誘起する一因となる遺伝子である。
癌抑制遺伝子	普通のレベルで発現する事により癌化を抑制している遺伝子である。
セルサイクル関連遺伝子	細胞の分裂はG1期→S期→G2期→M期のサイクルを経て2倍に増えていく。このサイクルをセルサイクルと言い、その各プロセスに関与する遺伝子をセルサイクル関連遺伝子と呼ぶ。
ハイブリダイゼーション	DNAは2重らせんからできており、相補的な2本のDNAが対になっている。それは塩基のシトシンとグアニン、アデニンとチミンが水素結合により対を作るためであり、DNA同士が相補的な配列を有する事により対を作る事をハイブリッドを形成すると言う。この現象をハイブリダイゼーション(略してハイブリ或いはハイブリダイズとも言う)と呼ぶ。
二色蛍光法	2重らせんから成る対のDNAの一方を基板に固定し、もう一方のDNAを健常者と患者より調製し、異なった蛍光試薬で標識する。この2色の蛍光色素で標識したDNAはお互いに競合して基板のDNAと結合する。患者由来のDNAがある領域で欠失していると健常者の標識DNAが優先して基板のDNAと結合する。一方、患者由来のDNAがある領域で増幅している場合は患者の標識DNAが優先して基板のDNAと結合する。2種類の蛍光標識したDNAの蛍光強度を測定して、ゲノムの欠失及び増幅を判断するが、その方法を二色蛍光法と言う。
Dual ハイブリ技術	本提案で初めて使用する用語である。二色蛍光法と対比して使用している。同一蛍光色素で健常者と患者より調製したDNAを標識する。別々のアレイ基板上で健常者由来の標識DNA及び患者由来の標識DNAをハイブリして各々のDNAが結合する比率を算出する。両標識DNAが基板のDNAに結合する強度の比はバラつきが大きいので他の蛍光色素で標識したCot-1 DNA(内部標準)を用いて補正する事により正しい比を算出可能である。その結果、両者での結合強度の違いによりゲノムの欠失及び増幅の程度を定量的に解析する。
Comparative Genomic Hybridization(CGH)	邦語で比較ゲノムハイブリダイゼーション法という。二色蛍光法を用いてハイブリダイゼーションによりゲノムの異常を解析する手法である。即ち、癌細胞や染色体異常を疑う患者の体細胞由来DNAと正常2倍体細胞DNAをそれぞれ異なる蛍光色素で標識し、基板上に固定したDNAとハイブリダイゼーションを行う。その結果、2種類の蛍光標識DNAは競合的に基板のDNAとハイブリッドを形成するので、患者ゲノムの欠失或いは増幅などのコピー数変化を正常2倍体DNAと比較して測定することができる。
集中型染色体異常解析システム	本NEDOプロジェクトで使用する用語である。二色蛍光法或いはDualハイブリ法を用いて全自動で染色体異常を解析するシステム(装置)で、8検体以上を同時に解析可能で主に臨床検査センターに適した装置である。本システムは検体よりDNAの抽出→蛍光標識→ハイブリダイゼーション→スキャンニング(測定)→データ解析を自動的に行うプロセスから成る。
分散型染色体異常解析装置	集中型染色体異常解析システムと対比して本NEDOプロジェクトで使用する用語である。病院等の検体数が限られた測定(分散測定)ニーズに対して有効な装置である。その特徴として、小型の装置で、検体より抽出した微量DNAを用いて当日内に解析可能な装置で、解析する検体数は限定されている。使用するアレイは集中型染色体異常解析システムとは異なった形状となる。
Copy Number Variation (CNV)	全ゲノムにおいて数千塩基対～数メガ塩基対の比較的大きなサイズのゲノム断片が欠失或いは過剰となっているコピー数変化を一般の健添-34常者集団に検出することがあり、これをCopy Number Variation (CNV)という。一般集団での出現頻度が1%以下であることから多型(polymorphism)の用語でなく多様性(variation)という用語が適応されが、Copy Number Polymorphism (CNP)ともよばれることもある。民族間でもCNVの質的、量的な差がある。また、疾患罹病性との関連が注目されてきている。2006年にCNVはヒト全ゲノムの12%(約360Mb、1,447カ所)を占め、極めて高頻度に存在する事が報告された。
FISH法	Fluorescence in situ hybridizationを略してFISHと言う。FISH法とは蛍光標識したDNAをプローブとして染色体標本に直接ハイブリダイズさせ、プローブと同じ配列を有するゲノム領域を、

	染色体あるいは間期核で蛍光シグナルとして検出する方法である。通常、プローブの蛍光シグナルは蛍光顕微鏡で観察する。
無尽資源化	大腸菌からBAC DNA を調製する場合に収量は数マイクログラム/10ml 培養液と少ない。従って、数百枚レベルのアレイにスポットする場合、得られたBAC DNAを増幅する必要がある。東京医科歯科大学・稲澤研究室ではPCR を用いて均一にBACDNA を増幅する手法を確立した。これをBAC DNA の無尽資源化と呼び、無尽資源化により得られたDNA をBAC プローブ(基板にスポットしてゲノム異常を解析するプローブの意味)と言う。
GENESHOT®法	アレイ基板にDNA をスポットする方法で日本ガイシ株式会社が確立した方法でアレイの製造に使用している。特徴として、溶液を球状に吐出するので、真円に近い形状でスポットでき、非接触方式のため打ちはじめと打ち終わりのばらつきや基板の損傷がない。
トリオ解析	両親の子供は、父、母よりそれぞれ常染色体を1 セットずつ受け継ぐ。また、男児は父のY 染色体と母のX 染色体を、女児は父のX 染色体と母の2 本のX 染色体のいずれか一方を受け継ぐ。このために、両親と子供のトリオのゲノム解析を行うことで、児に検出したゲノコピー数変化が両親から伝達されたものか、あるいは児で初めて出現したde novo 変化であるかを判別することができる。

健康安心イノベーションプログラム基本計画

健康安心イノベーションプログラム基本計画

平成22年4月1日
産業技術環境局
製造産業局

1. 目的

今後、世界に類を見ない少子高齢化が進展する我が国において、国民が健康で安心して暮らせる社会を実現することは喫緊の課題である。具体的には、個の医療を通じて健康寿命の延伸、QOL（Quality of Life：生活の質）の向上を図ることが求められている。

この目的を達成するため、創薬に資する基盤技術の開発、再生医療の確立、医療機器・福祉機器の開発等の手段を適切に組み合わせることによって、健康維持増進、疾患の早期診断、及び適切な治療法の提供を実現するほか、関連産業の競争力強化・ベンチャー企業の創出を図る。

2. 政策的位置付け

○新成長戦略（基本方針）（2009年12月30日）

強みを活かす成長分野として「グリーン・イノベーション」分野と「ライフ・イノベーション」分野を策定、人材育成や技術開発を後押しするほか、需要を創造すると同時に利用者の立場に立った社会ルールの変更に取り組む。また、政府は新たな分野に挑戦する人々を支援するとしている。

○革新的医薬品・医療機器創出のための5か年戦略（2009年2月12日改訂）

内閣府、文部科学省、厚生労働省及び経済産業省の間において革新的な医薬品・医療機器の創出に向け、研究資金の集中投入、ベンチャー企業の育成、臨床研究・治験環境の整備、アジアとの連携、薬事法における審査の迅速化・質の向上、イノベーションの適切な評価、官民対話等、研究から上市に至る過程の一貫かつ集中的な支援を実施することとしている。

○「ドリームBTジャパン」（2008年12月11日BT戦略推進官民会議）

2002年に策定した「バイオテクノロジー戦略大綱」以降、バイオテクノロジーをめぐる状況が変化してきたことを背景に、新産業の育成・創出、食糧問題解決、バイオマス利活用等の課題に対処すべく、イノベーション強化11項目や官民が協働で取り組むべき最重点課題を策定した。

○新経済成長戦略のフォローアップと改訂（2008年9月19日閣議決定）

2006年6月に経済産業省がとりまとめた「新経済成長戦略」を、資源価格の高騰等の構造変化を踏まえフォローアップと改訂を行った。「資源生産性競争」時代における経済産業構造の構築、世界市場獲得と持続的発展のためのグローバル戦略の再構築、地域・中小企業・農林水産業・サービスの未来志向の活性化を3つの柱として、「新経済成長戦略」を強化した。

○「iPS細胞研究の推進について（第一次とりまとめ）」（2008年7月3日総合科学技術会議 iPS細胞研究WG）

iPS細胞研究の成果がもたらす医療への波及効果や新しいバイオインダストリーの進展等について検討を行い、iPS細胞研究を推進するための研究推進体制、国の支援の在り方、知的財産戦略、国際化協力の在り方等をとりとまとめた。

○「イノベーション25」（2007年6月閣議決定）

生涯健康な社会形成に向けて中長期的に取り組むべき課題として、治療重点の医療から予防・健康増進を重視する保健医療体系の転換、生命倫理・安全性と医療技術促進政策の調和などをとりあげ、再生医療及び在宅医療・介護に係る社会還元加速プロジェクトを実施するとともに、臨床研究・臨床への橋渡し研究をはじめとする研究開発ロードマップの提示により所要の措置を講じていくこととしている。

○がん対策推進基本計画（2007年6月閣議決定）

がん対策基本法に基づき、国、地方公共団体及び関係者等が、がん対策を総合的かつ計画的に推進するために策定された基本方針であり、取り組むべき施策の一つとして「がん研究」が取り上げられている。具体的には、現状、診断薬・診断機器の開発、治療薬・治療機器の開発等が推進されているが、さらに、有用な早期診断技術についての研究開発の推進等に取り組むことが提示されている。

○新健康フロンティア戦略（2007年4月新健康フロンティア戦略賢人会議）、同アクションプラン（2007年12月）

健康寿命の延伸や生活の質の向上を図ることを目的として策定された新健康フロンティア戦略及び新健康フロンティア戦略アクションプランの中で、「人間の活動領域の拡張に向けた取組」及び「医療・福祉技術のイノベーション」において、「先進的予防・診断・治療技術の開発」や「医薬等ベンチャー・基盤産業支援対策」等の施策が提示されている。

3. 達成目標

- ①医薬品開発の成功確率の向上に資する技術開発や、基礎研究から臨床への橋渡し研究等を通じた、医薬品の上市期間の短縮や開発コストの低減を図る。
- ②再生医療の早期実現を目標とし、産業化を促進する。
- ③医療機器¹など先進的な技術開発等の推進による国際競争力の強化、厚生労働省との連携事業（医療機器開発ガイドラインの策定など）による開発から製品に至るまでの期間の短縮等を達成する。
- ④高齢者・障害者の自立促進や介護者の負担軽減等のため、優れた技術や創意工夫のある福祉機器の実用化支援を行う。

¹ 医療機器は、画像診断システムなどの「診断機器」、内視鏡下手術支援システムなどの「治療機器」、その他家庭用医療機器、歯科材料、眼科用品を含む。

4. 研究開発内容

I. 創薬・診断

I-1. 革新的医薬品の創出

(1) 糖鎖機能活用技術開発（運営費交付金）

①概要

我が国が強みを持つ糖鎖工学分野において、これまでに取得・開発した「糖鎖遺伝子ライブラリー」「糖鎖構造解析技術」「糖鎖合成技術」を活用し、癌や感染症など様々な疾病に関与する糖鎖の機能を解析する基盤技術を確立し、我が国の優位性を維持するとともに、創薬・診断等の分野における糖鎖機能の産業利用の促進を図る。

②技術目標及び達成時期

2010年度までに、糖鎖や糖タンパク質などの機能を分子レベルで効率的に解明するための基盤技術、糖鎖の機能解析・検証技術、及び、有用性が認められた糖鎖機能を産業利用するための基盤技術を開発する。

③研究開発期間

2006年度～2010年度

(2) ゲノム創薬加速化支援バイオ基盤技術開発（化合物等を活用した生物システム制御基盤技術開発）（運営費交付金）

①概要

我が国が強みとする完全長cDNAライブラリーやタンパク質相互作用解析技術等を最大限に活用し、重要なタンパク質ネットワーク解析等により創薬の対象となるタンパク質の効率的な絞り込みを行うとともに、疾患等の生物現象を制御する化合物の探索まで、一貫した技術開発を行う。

②技術目標及び達成時期

2010年度までに、超高速・高感度にタンパク質の相互作用を解析する技術や疾患を制御する化合物の探索・評価技術を開発する。

③研究開発期間

2006年度～2010年度

(3) ゲノム創薬加速化支援バイオ基盤技術開発（創薬加速に向けたタンパク質構造解析基盤技術開発）

①概要

創薬上重要な膜タンパク質は複合体を形成していることも多く、その構造解析及び相互作用の情報を取得することは創薬研究において重要であるが、その解析は非常に困難である。そこで、膜タンパク質やその複合体の構造情報を取得する新たな技術等の開発に向けて、タンパク質の立体構造及びその構造変化や膜タンパク質複合体の構造情報等の解析及び構造情報を基にした高精度なシミュレーション技術を開発する。

②技術目標及び達成時期

2011年度までに生体内に近い状態での膜タンパク質及びその複合体の構造解析手法、リガンド分子との相互作用解析手法を確立するとともに、当該技術から得られた情報に基づく in silico スクリーニング手法を確立する。

③研究開発期間

2007年度～2011年度

(4) 新機能抗体創製技術開発 (運営費交付金)

①概要

ポストゲノム研究や診断・創薬等において重要となっている機能を有する抗体を創製するため、創薬標的として産業利用上重要だが、解析が困難な膜タンパク質やタンパク質複合体を特異的に認識できる抗体を系統的に作成する技術や抗体の分離・精製を高効率に行うための技術の開発を行う。

②技術目標及び達成時期

2010年度までに、産業上有用と考えられるタンパク質やその複合体を特異的に認識する抗体を創製するための基盤技術、及び、製造コスト低減に向けた抗体の分離・精製等を高効率に行う技術を開発する。

③研究開発期間

2006年度～2010年度

(5) 基礎研究から臨床研究への橋渡し促進技術開発 (運営費交付金)

①概要

がん対策等の国民医療高度化を目指し、急速に発展している多様なバイオ技術の融合と医療現場への円滑な橋渡しによるイノベーションの創出・加速のため、総合科学技術会議のもと文部科学省及び厚生労働省と連携し、橋渡し研究の強化に一体的に取り組む。具体的には、民間企業と臨床研究機関(文部科学省や厚生労働省が整備する橋渡し研究拠点等)が一体となって行う、医薬品、医療機器、診断ツール等の開発を推進する。

②技術目標及び達成時期

2011年度までに医療現場及び臨床研究からのフィードバックに基づく研究開発により、医薬品、医療機器、診断ツール等の研究開発成果を円滑に実用化につなげる仕組みを確立する。

③研究開発期間

2007年度～2012年度

(6) 幹細胞産業応用促進基盤技術開発 (運営費交付金)

①概要

創薬プロセス効率化や再生医療への応用が期待される iPS 細胞等幹細胞について、産業応用に不可欠な基盤技術の開発や、iPS 細胞に関連した産業応用例創出の促進を行う。

②技術目標及び達成時期

2013年度までに、安全で効率的なiPS細胞の作製技術を開発するとともに、産業応用に繋げるために必要となるiPS等幹細胞の選別・評価・製造技術を開発し、産業上利用可能な創薬スクリーニングシステムを確立する。

③研究開発期間

2009年度～2013年度

(7) 後天的ゲノム修飾のメカニズムを活用した創薬基盤技術開発

①概要

がんや生活習慣病などの後天的疾患の原因として重要な因子である「後天的な遺伝子の変化（後天的ゲノム修飾）」を解析する技術や疾患との関連づけにより診断の指標を特定する手法の開発等を実施する。

②技術目標及び到達時期

2014年度までに、後天的ゲノム修飾解析技術開発として、極微量サンプルに対応した解析技術の高精度・高感度化、システム化を行うとともに、開発した技術やモデル動物等を活用し、後天的ゲノム修飾と疾患との関連づけを行う。また、探索的実証研究として、制御因子の探索・同定、制御に関する検証を行う。

③研究開発期間

2010年度～2014年度

I-2. 診断ツールの開発

(1) 個別化医療実現のための技術融合バイオ診断技術開発（運営費交付金）

①概要

我が国が有する微細加工技術・表面処理技術といったナノテク等の強みを活かし、染色体異常を高感度、高精度かつ迅速、安価で非コード領域までを検出するゲノムアレイや解析基盤技術開発を行うとともに、診断への応用を可能とする全自動解析システムの開発を行う。

②技術目標及び達成時期

2010年度までに、BACを用いた非コード領域を含むゲノム全領域を検出できる高精度ゲノムアレイを開発する。さらに、臨床現場において、微量サンプル（数ナノグラム）から、12時間以内に染色体異常（増幅、欠失、コピー数多型等）を、低コストかつ定量性・再現性を確保して検出ができる自動染色体異常解析システムのプロトタイプを開発する。

③研究開発期間

2006年度～2010年度

(2) 糖鎖機能活用技術開発（運営費交付金）【再掲】

(3) 基礎研究から臨床研究への橋渡し促進技術開発（運営費交付金）【再掲】

I-3. 創薬・診断に係る基盤整備

(1) 統合データベースプロジェクト

①概要

ライフサイエンス分野では、自身の研究成果と既存の研究成果と対比することにより、自身の研究成果の仮説を考案する手がかりが得られたり、新しい実用化の発想が得られたりする可能性があるため、国家プロジェクト等により産生された研究データを一括して活用できるデータベースが、産業界や社会から要望されている。

このため、政府全体の“生命科学データベース統合化の取組”の一環として、経済産業省関連の公的資金研究から産出される研究データを、産業上の有用性を評価のうえ、統合化し、産業界等に提供する。

②技術目標及び達成時期

2010年までに経済産業省関連機関により実施されたライフサイエンス分野の研究開発プロジェクトの成果に関する情報提供サイトを構築・運用する。また、ヒト遺伝子に関連した各種研究成果に関しては、平成17～19年度に実施したゲノム情報統合プロジェクトにおいて構築した「ヒト全遺伝子のアノテーション統合データベース (H-Invitational)」を基礎として、経済産業省関連の研究成果を連携して利用できるシステムを構築する。

③研究開発期間

2008年度～2010年度Ⅱ. 再生医療

II. 再生医療

II-1. 再生医療の実用化

(1) 次世代機能代替技術研究開発事業（うち、次世代再生医療技術研究開発）（運営費交付金）

①概要

生体内で自己組織の再生を促すセルフフリー型再生デバイスや、少量の細胞により生体内で自律的に成熟する自律成熟型再生デバイスの実用化を促進するとともに、これら再生デバイスにおける有効性・安全性の評価技術等を確立する。

②技術目標及び達成時期

2014年度までに、生体内で自己組織の再生を促進するための細胞外マトリクス、幹細胞誘導・分化促進因子等の再生医療技術を確立し、工学的技術との組み合わせにより、セルフフリー型再生デバイス及び自律成熟型再生デバイスを作製する。また、それらを用いて再生した組織等の有効性・安全性に関して、低侵襲で高精度な評価技術の標準化に取り組む。さらに、開発する再生デバイスを低侵襲に植込む技術を確立する。

③研究開発期間

2010年度～2014年度

(2) 基礎研究から臨床研究への橋渡し促進技術開発（運営費交付金）【再掲】

II-2. 再生医療に係る基盤整備

(1) 医療機器開発ガイドライン策定事業

①概要

医療機器産業への投資、新規企業参入、医療機器研究開発の促進及び薬事法審査の円滑化・迅速化にも資する「医療機器開発ガイドライン」を厚生労働省との連携の下、産学の協力を得て、個別の機器ごとに策定し、国内での機器開発促進の環境整備を図るとともに、医療機器産業に製品として、または部品・部材の供給として参入しやすい環境を整備するための方策を検討し、医療機器分野の活性化・国際競争力の強化を図る。

②技術目標及び達成時期

2010年度までに、今後実用化が期待される先進的な医療機器について、工学的安定性や生物学的安定性等に関する詳細な評価基準を策定し、開発ガイドラインとして取りまとめる。また、平成21年度事業において検討・整理された医療機器産業への参入を促す方策や部材供給の活性化方策の具体化を図るため、様々なマッチング機会をコーディネートする人材育成や事業者の海外展開支援策並びに部材供給取引契約にかかるガイドラインの作成及びPL保険のあり方や普及方法等についてさらに検討を加え、医療機器産業の活性化に資するものとする。

③研究開発期間

2008年度～2010年度

III. 医療機器

III-1. 医療機器の開発

(1) がん超早期診断・治療機器総合研究開発プロジェクト（運営費交付金）

① 概要

がんの診断・治療の革新を一体の課題として捉え、多様な治療法選択が可能なより早期のステージのがんに対して、治療方針を決定するために必要ながん性状、並びに位置に関する正確な情報を確実に取得し、得られた診断情報に基づく侵襲性の低い治療を可能とすることで、患者のQOLを向上させる。

② 技術目標及び到達時期

診断機器システムとしては、分子プローブ等の薬剤並びにそれらの薬剤を用いる高感度・高解像度な画像診断システム、病理診断の効率・信頼性を向上させる病理画像等診断支援システム、遺伝子診断の信頼性を向上させる検体前処理技術を備えた血中がん分子・遺伝子診断システム等を開発する。

治療機器システムとしては、より侵襲性の低い外科的治療を実現する内視鏡下手術支援システム並びに高精度で容易なオペレーションを可能とするX線治療機器を開発する。

③ 研究開発期間

2010年度～2014年度

(うち、内視鏡下手術支援システムは 2007年度～2011年度)

(2) 基礎研究から臨床研究への橋渡し促進技術開発（運営費交付金）【再掲】

(3) 次世代機能代替技術研究開発事業（うち次世代心機能代替治療技術研究開発）（運営交付金）

①概要

小柄な体格にも適用可能な小型の製品で、血栓形成や感染を防ぎ、長期在宅使用が可能な植込み型補助人工心臓を開発する。

②技術目標及び達成時期

2014年度までに、小児を含めた小柄な患者への適用を可能とする、長期使用可能な小型の植込み型補助人工心臓を作製するとともに、有効性及び機械的・電氣的・生物学的な安全性の評価を行う。

③研究開発期間

2010年度～2014年度

Ⅲ－2. 医療機器の開発に係る基盤整備

(1) 医療機器開発ガイドライン策定事業【再掲】

①概要

医療機器産業への投資、新規企業参入、医療機器研究開発の促進及び薬事法審査の円滑化・迅速化にも資する「医療機器開発ガイドライン」を厚生労働省との連携の下、産学の協力を得て、個別の医療機器ごとに策定し、国内での機器開発促進の環境整備を図るとともに、医療機器産業に製品として、または部品・部材の供給として参入しやすい環境を整備するための方策を検討し、医療機器分野の活性化・国際競争力の強化を図る。

②技術目標及び達成時期

2010年度までに、今後実用化が期待される先進的な医療機器について、工学的安定性や生物学的安定性等に関する詳細な評価基準を策定し、開発ガイドラインとして取りまとめる。また、平成21年度事業において検討・整理された医療機器産業への参入を促す方策や部材供給の活性化方策の具体化を図るため、様々なマッチング機会をコーディネートする人材育成や事業者の海外展開支援策並びに部材供給取引契約にかかるガイドラインの作成及びPL保険のあり方や普及方法等についてさらに検討を加え、医療機器産業の活性化に資するものとする。

③研究開発期間

2008年度～2010年度

Ⅳ. 福祉機器

Ⅳ－1. 福祉機器の開発

(1) 福祉用具実用化開発推進事業（運営費交付金）

①概要

「福祉用具の研究開発及び普及の促進に関する法律」（福祉用具法）に基づき、高齢者・障害者及び介護者の生活の質の向上を目的として、生活支援分野、社会活動支援分野を中心とした福祉用具の実用化開発を行う民間企業等に対し、研究開発費

用の2/3以内を補助することで、多様な福祉ニーズに対応するとともに、当該分野における新産業の創出、成長の促進に資する。

②技術目標及び達成時期

高齢者、障害者の生活支援、社会参加支援に資する福祉用具の実用化開発を促進することにより、高齢者等の生活における負担の軽減を図り、安全で安心のできる生活を実現する。より具体的な目標として、各々の補助対象事業終了後3年経過した時点で50パーセント以上を製品化する。

③研究開発期間

1993年度～

IV-2. 福祉機器の開発に係る基盤整備

(1) 福祉機器情報収集・分析・提供事業

①概要

福祉用具法に基づき、民間による福祉機器の実用化のための研究開発を促進するため、福祉機器に関する産業技術に係る情報の収集・分析・提供事業を実施することで、当該分野における福祉機器の普及や新規産業の創出・成長の促進を図る。

②技術目標及び達成時期

各年において福祉機器に係るニーズ等の調査の実施及び福祉用具実用化推進事業で開発された福祉機器の各種展示会等への出展による情報収集・分析・情報の提供を実施する。

③研究開発期間

1993年度～

5. 政策目標の実現に向けた環境整備（成果の実用化、導入普及に向けた取組）

[標準化]

- ・各プロジェクトで得られた成果のうち、標準化すべきものについては、適切な標準化活動（国際規格（ISO/IEC）、日本工業規格（JIS）、その他国際的に認知された標準の提案等）を実施する。具体的には、統合データベースの情報やインターネットに公開されている情報資源等を相互運用するために、必要なデータ形式、フォーマット等の標準化を推進する。
- ・高齢者等支援機器については、関係省庁との緊密な連携の下、標準化等の手法による実用化及び普及の方策を検討する。

[導入普及促進]

- ・ゲノム研究の進展は、個人遺伝情報を用い、情報技術を駆使した幅広い医療・健康サービスによる人々の健康や福祉の向上、さらには新しい医療・健康サービス産業の育成に重要な役割を果たそうとしているが、その際、人権を尊重し、社会の理解と協力を得て、個人遺伝情報の厳格な管理の下で適正に事業を実施することが不可欠である。そのため、個

人遺伝情報を安全に保護するために作成した事業者が遵守すべきルール「経済産業分野のうち個人遺伝情報を用いた事業分野における個人情報保護ガイドライン（2004年12月17日告示）」（個人遺伝情報保護ガイドラインという）を適切に運用する。

[産業間連携]

- ・バイオベンチャーは商品を市場に送り出すまでに長期間を要する、研究開発のために多額の資金調達を必要とする、事業を行うために様々な規制・審査を経る必要がある等、他業種のベンチャー企業と比較して困難な問題を抱えていることが多い。そのため、バイオベンチャーの様々な問題に対して施策への反映を検討し、補助金等の施策の紹介を通じてバイオベンチャー振興を図る。
- ・「産業クラスター計画」に基づき、全国のバイオクラスターにおいて、企業間のネットワーク形成の支援、産学連携による研究開発プロジェクトの支援、地域系ベンチャーファンドによる資金調達支援等を実施していく。
- ・医療の進歩・国民の健康に貢献する医療機器・用具の産業技術力向上及び国際競争力強化を目指し、研究開発から市場化までのすべてのプロセスにおけるマクロな戦略の検討と、医療機器の重要性について社会的認知の向上を実現するための仕組み及び個別プロジェクトの形成をはかることを使命とした「医療技術産業戦略コンソーシアム（METIS）」が平成13年に設立され、平成21年10月より第4期に入っている。

[プロジェクト等間の連携について]

- ・ゲノム創薬加速化支援バイオ基盤技術開発（化合物等を活用した生物システム制御基盤技術開発）については、タンパク質機能解析・活用プロジェクトの成果を活用することで、超高速・高感度にタンパク質の相互作用を解析する技術を開発する。
- ・ゲノム創薬加速化支援バイオ基盤技術開発（創薬加速に向けたタンパク質構造解析基盤技術開発）については、「生体高分子立体構造情報解析」の成果を活用することで、膜タンパク質やその複合体の構造情報を取得する新たな技術等の開発に向けて、タンパク質の立体構造及びその構造変化や膜タンパク質複合体の構造情報等の解析及び構造情報を基にした高精度なシミュレーション技術を開発する。
- ・糖鎖機能活用技術開発については、糖鎖合成関連遺伝子ライブラリー構築、糖鎖エンジニアリングプロジェクトの成果を活用することで、糖鎖の機能を効率的に解析するための基盤技術を開発する。
- ・ゲノム創薬加速化支援バイオ基盤技術開発の「化合物等を活用した生物システム制御基盤技術開発」、「創薬加速に向けたタンパク質構造解析基盤技術開発」については、必要に応じ、各々の成果を活用し、効率的、効果的な研究開発を図る。

[関係機関との連携]

- ・総合科学技術会議が推進する基本政策推進専門調査会 分野別推進総合PT ライフサイエンスPT及び科学技術連携施策（「生命科学の基礎・基盤」、「臨床研究・臨床への橋渡し研究」）の下、各プロジェクトについて、関係府省との適切な連携を図る。

[その他]

・一段と激化する特許戦争の中、成果実用化・効率的な研究開発を推進するため、プロジェクト企画段階から、研究テーマ周辺の論文及び特許状況のサーベイ実施やプロジェクト実施段階における特許出願後の事業化構想等、特許に関する戦略的取組（プロパテントアプローチの導入）を実施する。

・医療機器の審査体制の強化による薬事法審査の迅速化の観点から、2004年より独立行政法人産業技術総合研究所の工学系研究者を独立行政法人医薬品医療機器総合機構へ派遣しているところである。

・福祉機器においても、中小企業等産業側の観点を福祉政策に活かすため2008年より独立行政法人産業技術総合研究所の職員を厚生労働省に派遣中である。

6. 研究開発の実施に当たっての留意事項

事業の全部又は一部について独立行政法人の運営費交付金により実施されるもの（事業名に（運営費交付金）と記載したものは、中期目標、中期計画等に基づき、運営費交付金の総額の範囲内で、当該独立行政法人の裁量によって実施されるものである。

なお、適切な時期に、実用化・市場化状況等について検証する。

7. 改訂履歴

- (1) 平成12年12月28日付けがん・心疾患等対応高度医療機器プログラム制定。
- (2) 平成14年2月26日付け健康維持・増進のためのバイオテクノロジー基盤研究プログラム基本計画制定。
- (3) 平成14年2月28日付け健康寿命延伸のための医療福祉機器高度化プログラム基本計画制定。がん・心疾患等対応高度医療機器プログラム（平成12・12・27工総第13号）は、廃止。
- (4) 平成15年1月27日付け健康維持・増進のためのバイオテクノロジー基盤研究プログラム基本計画制定。健康維持・増進のためのバイオテクノロジー基盤研究プログラム基本計画（平成14・02・25産局第4号）は、廃止。
- (5) 平成15年3月10日付け健康寿命延伸のための医療福祉機器高度化プログラム基本計画制定。健康寿命延伸のための医療福祉機器高度化プログラム基本計画（平成14・02・05産局第2号）は、廃止。
- (6) 平成16年2月3日付け制定。健康維持・増進のためのバイオテクノロジー基盤研究プログラム基本計画（平成15・01・23産局第4号）及び健康寿命延伸のための医療福祉機器高度化プログラム基本計画（平成15・03・07産局第17号）は、本プログラム基本計画に統合することとし、廃止。
- (7) 平成17年3月31日付け制定。健康安心プログラム基本計画（平成16・02・03産局第12号）は、廃止。
- (8) 平成18年3月31日付け制定。健康安心プログラム基本計画（平成17・03・25産局第1号）は、廃止。
- (9) 平成19年4月2日付け制定。健康安心プログラム基本計画（平成18・03・31産局第2号）は、廃止。
- (10) 平成20年4月1日付け制定。健康安心プログラム基本計画（平成19・03・20産局第5号）は、廃止。

- (11) 平成21年4月1日付け制定。健康安心プログラム基本計画（平成20・03・25産局第6号）は廃止。
- (12) 平成22年4月1日付け制定。健康安心プログラム基本計画（平成21・03・26産局第3号）は廃止。

ナノテク・部材イノベーションプログラム基本計画

ナノテク・部材イノベーションプログラム基本計画

1. 目的

このプログラムは、情報通信、ライフサイエンス、環境、エネルギーなど、あらゆる分野に対して高度化あるいは不連続な革新（ジャンプアップ）をもたらすナノテクノロジー及び革新的部材技術を確立するとともに、その実用化や市場化を促進することで、我が国産業の国際競争力の維持・強化や解決困難な社会的課題の克服等を可能とすることを目的とする。

2. 政策的位置付け

第 3 期科学技術基本計画（2006 年 3 月閣議決定）

- ・ 「ナノテクノロジー・材料分野」は、特に重点的に研究開発を推進すべき分野（重点推進 4 分野）の一つに指定されていて、優先的に資源配分することとされている。
- ・ 我が国の材料技術は、基礎研究から応用研究、素材、部材の実用化に至るまでの全ての段階において世界のトップレベルを堅持しており、我が国製造業の国際競争力の源泉となっている。

「イノベーション 25」（2007 年 6 月閣議決定）

- ・ 「ナノテクノロジー・材料分野」は、中長期的に取り組むべき課題として、「1. 生涯健康な社会形成」、「2. 安全・安心な社会形成」、「4. 世界的課題解決に貢献する社会形成」、及び「5. 世界に開かれた社会形成」の分野に位置付けられている。
- ・ 所要の措置を講じていくことが必要である事項として以下の点が指摘されている。
 - ・ 学際領域・融合領域における教育等人材育成、拠点形成
 - ・ 社会受容を促すための積極的な取り組み
 - ・ 知的財産確保のための戦略的な取り組み

「経済成長戦略大綱」（2006 年 7 月財政・経済一体改革会議）

- ・ 「我が国の国際競争力の強化」の取り組みとして、高度な部品・材料産業やモノ作り中小企業の強化が掲げられている。
- ・ 「技術戦略マップ」の活用等により、ユーザー企業との垂直連携による研究開発を推進することを通して、我が国経済発展の基盤である高品質、高性能な部品・材料産業の強化を図ることが今後の取組として記載されている。

「新産業創造戦略 2005」（2005 年 6 月経済産業省）

- ・ 部材分野は、新産業群の創出を支える共通基盤技術として位置づけられている。
- ・ 「高度部材・基盤産業」の集積を形成していることが、「ものづくり」に不可欠な基盤技術のネットワーク化を通じた現場レベルでの迅速かつ高度な摺り合わせを可能としており、我が国「ものづくり」の強みの源泉となっていると記載されている。

3. 達成目標

- ・世界に先駆けて、ナノテクノロジーを活用した非連続な技術革新を実現する。
- ・我が国部材産業の強みを更に強化することで、他国の追随を許さない競争優位を確保するとともに部材産業の付加価値の増大を図る。
- ・ナノテクノロジーや高機能部材の革新を先導することで、これら部材を活用した情報通信、ライフサイエンス、環境、エネルギーなどの幅広い産業の付加価値の増大を図る。
- ・希少金属などの資源制約の打破、圧倒的な省エネルギー社会の実現など、解決困難な社会的課題の克服を目指す。

4. 研究開発内容

[プロジェクト]

・ナノテクノロジーの加速化領域

ナノテクノロジーを活用した不連続な技術革新を加速・促進する。

(1) 異分野異業種融合ナノテクチャレンジ(運営費交付金)

概要

革新的なナノテクノロジーを活用し、川上と川下の連携、異業種異分野の連携で行う部材開発に対して支援を行い、燃料電池、ロボット、情報家電、健康・福祉・機器・サービス、環境・エネルギー・機器・サービスの5分野に資するキーデバイスの実現を目指す。

技術目標及び達成時期

マテリアル・プロセス研究、加工・計測技術研究、昨今の環境意識向上に対応した研究、社会課題を解決するための基盤技術研究に加え、異分野等の融合研究を推進することにより、2011年度までにナノテクノロジーの産業化のための基盤的技術を確立し、実用化を図る。

研究開発期間

2007年度～2011年度

(2) ナノテク・先端部材実用化研究開発(運営費交付金)

概要

新産業創造戦略の趣旨に則り、革新的なナノテクノロジーを活用し、川上と川下の連携、異業種・異分野の連携で行うデバイス化開発の支援を行うため、

ナノテクノロジー活用による材料・部材の高度化を図る先導的研究開発(ステージ)

ナノテクノロジー研究成果の部材等への課題設定型実用化により目指した開発支援(ステージ)

について提案公募を実施する。

技術目標及び達成時期

2010年頃に想定される半導体微細加工の限界を克服するため、分子・原子を1つずつ制御し部品部材に組み上げる「ボトムアップ型」のナノテクノロジーなど革新的なナノテクノロジー等の活用により、情報家電・ロボット、燃料電池等新規産業5分野等において、従来の性能・効率を大幅に改善するナノテク・先端部材技術を開発し、我が

国が優位にあるナノテクノロジーを基盤とした国際的な産業競争力を強化することを目標とする。

研究開発期間

2005年度～2011年度

・情報通信領域

ナノテクノロジーや革新的部材開発技術を駆使して既存技術の微細化の壁を突破し、電子デバイス・光デバイスで世界をリードするとともに、高度化された製造技術の開発を行う。

(1) ナノエレクトロニクス半導体新材料・新構造技術開発 - うち新材料・新構造ナノ電子デバイス

概要

ナノエレクトロニクスは、ナノテクノロジーの最大の応用領域の一つであり、デジタル・デバイスのCMOS構造というアーキテクチャは、優れた工学概念である。また、これまでの半導体技術の微細化に基づく高集積化・高速化・低消費電力化の追求は、シリコン材料をベースとするプレーナ構造を基本とした微細加工プロセスの高度化にあった。

しかし、さらなる微細化によるデバイスのパフォーマンス向上は物理的限界に直面しつつあり、問題は、FETを、シリコン材料をベースとして作製することにより現出していると考えられる。

そのため、次世代の電子デバイスのために「シリコンで培った微細化技術やデバイス原理をこれまで同様に活用しながら、シリコンという材料の物理的限界を突破するための“新材料”や“新(デバイス)構造”を実現すること」、すなわち、「New Nano Materials/Structure on Silicon for “More Moore”」の半導体技術を、ナノテクノロジーを最大限に活用することによって研究開発を行い、将来の産業応用への目を見出していく取りかかりとする。

技術目標及び達成時期

2011年度までに、産業界が10年後を見据えた将来の電子デバイスを開発する際に、産業技術として活用できるかどうかの実現可能性を見極め、また技術シーズを確立する。

研究開発期間

2007年度～2011年度

(2) ナノエレクトロニクス半導体新材料・新構造技術開発 - うち窒化物系化合物半導体基板・エピタキシャル成長技術の開発(運営費交付金)(再掲)

概要

窒化物系化合物半導体は日本が強みを有し、パワーデバイス、高周波デバイス、発光デバイス等、今後のIT社会を支えとなることを期待されている分野である。しかし、既存のバルク単結晶基板成長技術やエピタキシャル成長技術では、従来の半導体では実現できない領域で動作可能なハイパワー、超高効率デバイス性能を十分に引き出すには至っていない。

これを突破するため、大学あるいは研究所を拠点に材料メーカー、デバイスメーカー、装置メーカー等が相互連携して、窒化物半導体の結晶欠陥低減技術やナノ構造作製技術等の革新を図り、これらデバイスの飛躍的な性能向上と消費電力削減の実現を図る。

技術目標及び達成時期

2011年度までに、次世代窒化物系半導体デバイスを実現する以下結晶作製技術を開発する。

1) 基板技術 (GaN、AlNバルク結晶作製技術)

・口径2～4インチで高品質エピ成膜を可能とする低コストの単結晶基板作製技術の確立。

2) エピ技術 (エピタキシャル成膜及び計測評価技術)

- ・低欠陥高品質エピ層を実現する成膜技術及び膜成長過程を計測評価する技術の確立。
- ・高出力かつ高安定動作可能なエピ層の実現
- ・高耐圧超高速な新しいデバイス構造の開発

研究開発期間

2007年度～2011年度

(3) スピントロニクス不揮発性機能技術プロジェクト (運営費交付金)

概要

将来のエレクトロニクスにおいて中核的な基盤技術となり得るスピントロニクス技術 (電子の電荷ではなく、電子の自転 = 「スピン」を利用する全く新しいエレクトロニクス技術) を確立するため、強磁性体ナノ構造体におけるスピンの制御・利用基盤技術を開発し、我が国が世界に誇るシーズ技術を核として、産学官の共同研究体制を構築し、将来の中核的エレクトロニクス技術における我が国の優位性の確保を図る。

技術目標及び達成時期

2010年度までに、超高集積で高速な不揮発性メモリとして期待されるスピンメモリのための基盤技術を確立する。また、新ストレージ・メモリデバイス、不揮発性スピン光機能素子、スピン能動素子等の新しい動作原理によるスピン新機能素子の実現のための基盤技術を確立する。

研究開発期間

2006年度～2010年度

(4) 三次元光デバイス高効率製造技術 (運営費交付金)

概要

波面制御素子による空間光変調技術を確立し、ガラス中に三次元造形を高精度に一括形成できるプロセス技術を開発する。この技術を用いて、具体的な光デバイスを作製し、当該技術の有効性の確認と市場への早期参入のための基盤技術を確立する。

技術目標及び達成時期

2010年度までに波面制御素子による空間光変調技術を用いたフェムト秒レーザー照射技術等を確立し、高精度の光デバイスを高速に作製できるプロセス技術を開発する。

研究開発期間

2006年度～2010年度

(5) 次世代高度部材開発評価基盤の開発* (運営費交付金) (再掲)

概要

エネルギー需給構造の高度化を図る観点から行うものである。半導体産業分野で、集積回路の消費電力低減に必要な配線形成用各種材料等の開発のネックとなっているナノレベルでの材料間の相互影響を評価可能な統合部材開発支援ツールを開発する。これにより、集積回路の種類やデザインルールに応じて、配線形成用各種材料とプロセスの最適な組み合わせの提案技術(統合的材料ソリューション提案技術)を確立する。

技術的目標及び達成時期

2008年度までに、半導体材料開発に貢献する材料評価基盤を構築するとともに、上記の統合的材料ソリューション提案技術を確立する。また、本プロジェクトを通して得られた基礎データ等については、プロジェクト実施期間中にデータを体系的に整理し、幅広く社会に提供を図る。

研究開発期間

2006年度～2008年度

(6) 超フレキシブルディスプレイ部材技術開発* (運営費交付金) (再掲)

概要

エネルギー需給構造の高度化を図る観点から、製造工程等の省エネルギー化を実現するために行う。従来、表示デバイスの製造には、真空蒸着と高温下での焼成と、それに伴う排ガス排水処理が必須であった。これを、ロールtoロール方式に代替することで常圧、常温下での製造を実現し、フレキシブルな薄型ディスプレイを効率よく製造する。そのために、有機TFT材料およびコンタクトプリント技術等を開発する。

技術的目標及び達成時期

2009年度までに、実用化に向けた実証のための巻き取り方式ディスプレイのプロトタイプを試作する。またフレキシブルデバイス材料開発に貢献する部材ならびに薄膜複合化技術を開発し、これらをパネル化するための実用化技術を確立する。

研究開発期間

2006年度～2009年度

(7) 低損失オプティカル新機能部材技術開発* (運営費交付金) (再掲)

概要

エネルギー需給構造の高度化を図る観点から行うものであり、近接場光の原理・効果を活用した低損失オプティカル新機能部材技術を開発し、実用化の目処を得ることを目的とする。動作原理に近接場光を用いるオプティカル新機能部材は、従来の材料特性のみに依存した光学部品では不可能な機能・性能を発揮し、液晶プロジェクター・液晶ディスプレイなど情報家電の省エネルギー、高性能・高信頼化を図る上でのキーデバイスとなることが期待できる。

技術目標及び達成時期

2010年度までに、共通基盤技術として、ナノ構造部材の設計・作製・評価技術を開発するとともに、ナノ構造部材に発現する近接場光の機能を動作原理とする低損失オプティカル新機能部材を検討し機能を確認する。

研究開発期間

2006年度～2010年度

・ライフサイエンス・健康・医療領域

ナノテクノロジーを駆使して初めて可能となる診断・治療により革新的な医療を実現する。

(1) 次世代DDS型悪性腫瘍治療システムの研究開発事業(運営費交付金)(再掲)

(深部治療に対応した次世代DDS型治療システムの研究開発事業)

概要

DDSのさらなる裾野の拡大、及び早期実用化を目指し、様々な外部エネルギー(機器技術)と薬剤技術を組み合わせることにより、比較的人体の深部にある臓器(肺、消化器)等のがんを対象としたDDS型治療システムの開発を行う。

技術目標及び達成時期

光線力学治療システムの前臨床試験の開始及び治療効果・安全性の検証と、超音波診断・治療システムの前臨床試験を可能とする薬剤及び装置の完成に関する開発を難治性がんの治療に向けて行う。

研究開発期間

2006年度～2009年度

(2) 個別化医療実現のための技術融合バイオ診断技術開発(運営費交付金)(再掲)

概要

我が国が有する微細加工技術・表面処理技術といったナノテク等の強みを活かし、染色体異常を高感度、高精度かつ迅速、安価で非コード領域までを検出するゲノムアレイや解析基盤技術開発を行うとともに、全自動解析システムの開発を行う。

技術目標及び達成時期

2010年度までに、BAC(染色体の断片)を用いた非コード領域を含むゲノム全領域を検出できる高精度ゲノムアレイを開発する。さらに、臨床現場において、微量サンプル(数ナノグラム)から、12時間以内に染色体異常(増幅、欠失、コピー数多型等)を、低コストかつ定量性・再現性を確保して検出ができる自動染色体異常解析システムのプロトタイプを開発する。

研究開発期間

2006年度～2010年度

(3) 分子イメージング機器研究開発プロジェクト(運営費交付金)(再掲)

(3-1) 生活習慣病超早期診断眼底イメージング機器研究開発プロジェクト

概要

細小血管の分子レベルでの代謝機能を非侵襲で可視化する細胞代謝イメージングを実現し、代謝異常を細胞レベルで観察することにより、循環器系疾患等の早期の診断・治

療を図る。

技術目標及び達成時期

2009年度までに、ナノテクノロジーを活用した光学基盤技術等を確立することにより、細胞やタンパク質レベルの組織診断を可能とする機器を開発する。

研究開発期間

2005年度～2009年度

(3-2) 悪性腫瘍等治療支援分子イメージング機器研究開発プロジェクト

概要

良性・悪性の区別も含めた腫瘍の超早期診断を実現するため、悪性腫瘍に特異的に反応する標的物質を利用することにより生体細胞の分子レベルの機能変化を抽出・検出できる機器の開発を行う。

技術目標及び達成時期

2009年度までに、全身で3mm、局所で1mmの分解能を有する分子イメージング機器を開発する。

研究開発期間

2005年度～2009年度

．エネルギー・資源・環境領域

ナノテクノロジーや革新的部材開発技術を駆使して、エネルギー・資源・環境等の社会的制約を克服すると同時に我が国の強みであるナノテック関連産業・部材産業の競争力を強化する。

() エネルギー制約の克服

(1) サステナブルハイパーコンポジット技術の開発(運営費交付金)(再掲)

概要

炭素繊維複合材料は、軽量、高強度等の優れた特性を有している。従来の熱硬化性樹脂を用いた炭素繊維複合材料では成形性・加工性に乏しくリサイクルが困難であったため、熱可塑性樹脂を用いた炭素繊維複合材料(CFRP)の開発を行う。

技術目標及び達成時期

2012年度までに、炭素繊維と熱可塑性樹脂との中間基材を開発し、熱可塑性CFRP加工技術を開発する。

研究開発期間

2008年度～2012年度

(2) 革新的ガラス溶融プロセス技術開発(運営費交付金)(再掲)

概要

プラズマ等による高温を利用し瞬時にガラス原料をガラス化することにより、極めて効率的にガラスを気中で溶融(インフライトメルティング法)し省エネに資する革新的ガラス溶融プロセス技術を開発する。

技術目標及び達成時期

2012年度までに、インフライトメルティング法により原料を溶解する技術、カレットをガラス原料として利用するため高効率で加熱する技術、カレット融液とインフライトメルティング法による原料融液とを高速で混合する技術を開発する。

研究開発期間

2008年度～2012年度

(3) 高温超電導電力ケーブル実証プロジェクト(運営費交付金)(再掲)

概要

革新的な超電導送電技術を確立するため、工業生産プロセスで実用化レベルに達している高温超電導線材を活用し、実用化のための実証試験及び評価を行う。

技術目標及び達成時期

2011年度までに、200MVA級の中間接続部を有した三心一括型高温超電導ケーブルを、冷却装置や保護装置などの付帯設備とともに66KV実系統に接続して、12ヶ月以上の長期連系試験を行うことによって総合的な安全性や信頼性を実証する。

研究開発期間

2007年度～2011年度

(4) マルチセラミックス膜新断熱材料の開発(運営費交付金)(再掲)

概要

住宅やビルなどの冷暖房における大幅な省エネを実現する画期的な断熱性能を示す壁および窓材料を、セラミックスのナノ多孔体構造やナノ羽毛状構造およびセラミックス・ポリマー複合化構造などからなるマルチセラミックス膜アセンブリ技術によって開発する。

技術目標及び達成時期

2011年度までに、熱貫流率(熱の伝わりやすさ)が $0.3\text{W}/\text{m}^2\text{K}$ 以下、壁厚さ10mm程度の超断熱壁材料および熱貫流率が $0.4\text{W}/\text{m}^2\text{K}$ 以下、光(可視光)透過率が65%以上(Low-Eガラス使用)、ヘイズ率が1%以下の超断熱窓材料を実現する。

研究開発期間

2007年度～2011年度

(5) カーボンナノチューブキャパシタ開発プロジェクト(運営費交付金)(再掲)

概要

従来の活性炭電極では不可能な高出力かつ高エネルギー密度の電気二重層キャパシタを実現するため、高度に配向した長尺の単層カーボンナノチューブの大量合成技術を開発するとともに、これを用いたキャパシタ電極の開発を行う。

技術目標及び達成時期

2010年度までに、単層カーボンナノチューブの高度配向技術及び大量生産技術を確立するとともに、キャパシタ製造技術を確立することで、 $20\text{Wh}/\text{Kg}$ の高エネルギー密度と耐久性を有する電気二重層キャパシタを開発する。

研究開発期間

2006年度～2010年度

(6) 発電プラント用超高純度金属材料の開発(運営費交付金)(再掲)

概要

従来の金属材料と比べ耐食性、耐久性、加工性などの飛躍的な向上が期待できる超高純度金属材料の発電プラント部材としての実用化を目指し、低コスト・量産化製造プロセス、及び加工・溶接技術等の開発を行い、部材としての実用特性の評価・検証を行う。また、実用化に向けたフィージビリティ調査を行い経済性の評価等を実施するとともに、材料特性に関するデータベースの整備及びそれに必要な試験研究を行う。

技術目標及び達成時期

2009年までに、不純物総量100ppm未満、溶解量数100kg以上の低コスト・量産化技術製造技術を開発するとともに、製造された超高純度材料が発電プラントの各種機器に適用でき、本材料の持つ優れた特性を長期に亘って発揮できることを確認する。

研究開発期間

2005年度～2009年度

(7) セラミックリアクター開発(運営費交付金)(再掲)

概要

電気化学的に物質やエネルギーを高効率で変換する次世代型セラミックリアクターの実現のため、低温作動と急速作動停止を可能とする材料の開発とマイクロセルの集積構造化技術等の開発を行う。

技術目標及び達成時期

2009年度までに、新電解質材料の適用や電極反応の高効率化等による、低温作動時(650以下)での出力性能を向上させる材料技術と共に、マイクロセルの集積構造化や精緻なインターフェース構築のための製造プロセス技術を開発。そして、これらの技術を統合することにより、次世代型セラミックリアクターとしてのプロトタイプモジュール実証(出力性能2kW/L等)を行う。

研究開発期間

2005年度～2009年度

(8) 高機能チタン合金創製プロセス技術開発プロジェクト(再掲)

概要

大量の電力を必要とする従来のバッチ処理方式のチタン製錬法(クロール法)を、エネルギー効率の高い連続処理方式へ転換する抜本的なプロセス改善のための技術を開発する。また、併せて、成形性の高いチタン合金設計技術及び成形プロセス技術を開発する。

技術目標及び達成時期

2008年度までに省エネ型チタン新製錬プロセスの基盤技術を開発し、2010年

までに実用化を目指す。また、本製錬技術により得られるチタンをベースとして、加工性、強度等をさらに向上させた合金設計・成形プロセス技術を確立する。

研究開発期間

2005年度～2008年度

() 資源制約の克服

(1) 希少金属代替材料開発プロジェクト(運営費交付金)

概要

希少金属は、特殊用途において希少な機能を発揮する一方で、その希少性・偏在性・代替困難性から、市場メカニズムが必ずしもうまく機能せず、その供給停止は川下の経済成長の制約要因となり得るリスクを伴っている。近年、「コンピュータによる材料設計」、「ナノテクによる微細構造制御」等が飛躍的に向上した結果、従来出来なかった、「コンピュータによる最適制御設計による候補元素系の探索」、「結晶粒界、界面の制御等マイクロ構造の制御」等が可能となりつつあることから、こうした最先端技術を用いることで、希少金属の新たな代替/使用量低減技術を開発する。

技術目標及び達成時期

2011年度までに、以下希少金属元素の使用原単位について現状と比較して以下の低減ができる製造技術を開発し、ユーザー企業、大学等の外部機関に対して機能評価のためにラボレベルで提供できる(試料提供)水準に至るまでの技術を確立することを目標とする。また、製品の機能や製造コストは現状と同等を少なくとも維持することを前提とする。

〔対象元素〕	〔使用原単位の低減目標値〕
・透明電極向けインジウム(In)	: 現状から50%以上低減
・希土類磁石向けディスプロシウム(Dy)	: 現状から30%以上低減
・超硬工具向けタンゲステン(W)	: 現状から30%以上低減

研究開発期間

2007年度～2011年度

() 環境制約の克服

(1) グリーン・サステイナブルケミカルプロセス基盤技術開発

概要

化学品等の製造プロセスにおけるシンプル化、クリーン化、原材料・資源の多様化、更に、廃棄物の減容化、容易なりサイクル等を実現し、産業競争力強化、国際規制の先取りを図って、将来にわたっても持続的に化学品等を製造するための必要な新規なGSC(グリーン・サステイナブルケミストリー)プロセスを開発する。

技術的目標及び達成時期

2015年度までに、有害な化学物質を大幅に削減、使わない革新的なプロセス及び化学品の開発や廃棄物、副生成物の大幅に削減できる革新的なプロセス及び化学品の開発を行う。

研究開発期間

2008年度～2015年度

(2) 次世代高信頼性ガスセンサ技術開発(運営費交付金)(再掲)

概要

一酸化炭素中毒やガス漏れなどのガス事故を限りなくゼロに近づけるため、センサー素子のナノレベルでのメカニズム解析及び開発設計を行い、コードレスで高信頼性を有する次世代高信頼性ガスセンサー(COセンサー・メタンセンサー)を開発する。

技術目標及び達成時期

2011年度までに、最先端のナノテクノロジー及びMEMS技術を導入し、電池駆動で5年以上の長寿命、高信頼性(数百ppm以下の故障率)、低コストなCOとメタンのセンサーを開発する。

研究開発期間

2008年度～2011年度

(3) 革新的膜分離技術の開発(再掲)

概要

河川水等の浄水工程における、微量の有害物質、微生物等の除去に係る水処理技術のうち、分離膜方式による高効率(省エネ)な分離技術を開発する。

技術目標及び達成時期

2012年度までに、ナノテクノロジー等新技术を用いて新素材を開発し、高度な水質制御と高速処理を兼ねた膜ろ過システムを開発する。

研究開発期間

2008年度～2012年度

(4) 循環社会構築型光触媒産業創成プロジェクト(運営費交付金)

概要

我が国で発見された光触媒技術の新産業分野開拓を目指し、サイエンスにさかのぼることにより、紫外光のみならず、可視光レベルでの性能・機能の飛躍的な向上のための技術基盤を構築する。これにより、従来では困難とされてきた医療関連分野や土壌処理、PFC処理/フッ素回収などの環境関連分野等に光触媒技術を導入し、光触媒の最大のメリットである自然エネルギーを利用した安心・安全な環境を提供できる技術を開発する。

技術目標及び達成時期

2011年度までに、材料レベルで紫外光応答型2倍、可視光応答型10倍の感度向上を達成し、その高感度光触媒を適用した薄膜プロセス技術の基盤技術を確立する。

研究開発期間

2007年度～2011年度

(5) 革新的マイクロ反応場利用部材技術開発*(運営費交付金)(再掲)

概要

エネルギー需給構造の高度化を図る観点から行うものであり、マイクロリアクター、ナノ空孔などの精密反応場を利用し、反応分子の自由な運動を活性種レベルで制御した革新的な化学反応プロセスと新機能材料創成技術の確立を目指す。さらに、マイクロリアクターとナノ空孔反応場の組み合わせ、各反応場とマイクロ波等のエネルギー供給手段との組み合わせにより協奏的反応場を構成し、さらなる高効率生産等を可能にする基盤技術を開発する。これらの技術の確立により、反応システムの小型化、多段プロセスの簡略化等を通じた化学産業の製造工程等の省エネルギー化を図る。

技術的目標及び達成時期

2010年度までに、マイクロリアクター技術、ナノ空孔技術を軸とし、これらに更にマイクロ波、超臨界流体等のエネルギー供給手段を組み合わせた協奏的反応場を構成することにより、これまでにない革新的な化学反応プロセスを確立し、新機能材料創成技術を実現する。さらに、これらの技術を用いて高性能・高機能電子材料、医薬中間体などの部材を開発する。

研究開発期間

2006年度～2010年度

(6) 高感度環境センサ部材開発*

概要

ダイオキシンをはじめとする微量有害有機物質を高感度・高選択・安価・迅速に計測するため、分子認識部位として生体分子を用い、有害有機物質の結合の有無・量を直接電気信号に変換するセラミックスセンシング材料(電極材料)を用いたセンサ部材を開発する。

技術目標及び達成時期

2010年度までに、ダイオキシン類、エストラジオール及びビスフェノールAについて、 $0.001 \text{ ng} \cdot \text{ml}$ の濃度において有意な電気信号として検出し得る小型・携帯型計測器に挿入可能な寸法のセンサ部材の開発を目標とする。

研究開発期間

2006年度～2010年度

・材料・部材領域

極めて広範囲な産業領域に波及する材料・部材領域について、ユーザー製造業等との連携(川上・川下連携)を促進し、高度な部材産業群の「すり合わせ力」を一層強化する。

(1) 高機能複合化金属ガラスを用いた革新的部材技術開発(運営費交付金)

概要

複合化金属ガラス(金属ガラスマトリックス中に第二相として微結晶や微粒子または微小空隙等を分散させたもの)を創製して、次世代高密度記録媒体、超微小モータ用部材および高強度・高導電性電気接点部材を開発する。

技術目標及び達成時期

2011年度までに、複合化金属ガラス合金を創製し、従来の金属ガラス単層合金の持つ優れた特徴に加えて、塑性加工性、硬磁気特性、高電気伝導性等を付与する。この

複合化金属ガラスの新規特性を用いて、従来の金属ガラス単層合金では為しえなかった革新的部材の開発を行い、さらに多様な工業製品に応用することで、我が国産業の優位性を確保する。

研究開発期間

2007年度～2011年度

(2) 超ハイブリッド部材技術開発 (運営費交付金)

概要

従来実現が不可能と考えられていた相反する複数機能(トレードオフ機能)を両立できる材料を、異種素材の組合せ(ハイブリッド化)により実現するための技術を開発する。要素技術として、異種材料間の界面挙動をシミュレーション技術等により解明し、ナノレベルよりもさらに微小な原子・分子レベルでのハイブリッド化構造・配列制御のための合成技術を開発する。従来の単一材料では実現困難であったトレードオフの性能を引き出すことで、自動車用構造材料、パワーデバイス用材料、光学材料等を出口イメージとした、高機能革新部材製造に必要な技術基盤を開発する。

技術目標及び達成時期

2011年度までに、電気・電子材料、光学材料、その他工業材料について従来材料では実現できなかった相反機能を解消するとともに、市場評価が可能な成果物を供試し、市場(ユーザー)から、客観的な実用化研究開発課題を抽出する。また、単なる相反機能の解消ではなく、相反機能を制御・実現する技術を開発する。

研究開発期間

2007年度～2011年度

(3) 鉄鋼材料の革新的高強度・高機能化基盤研究開発 (運営費交付金) (再掲)

概要

プラント、構造物や自動車等の革新的な高効率化、省エネルギー化、長寿命化、安全・安心化を図るため、最新の科学的知見を導入し、鉄鋼材料及び鋼構造体を超高機能化する基盤的研究開発を行う。具体的には、高強度鋼、高機能鋼の実用化拡大の基盤となる(1)高級鋼厚板(高強度鋼、極低温用鋼、耐熱鋼)溶接部の信頼性・寿命を大幅に向上する溶接施工技術(高密度・清浄熱源溶接技術)、及び金属組織制御技術を基本とする材料技術(クリープ破壊及び水素破壊の機構解明等を踏まえた)の開発、(2)部材の軽量化を図るために強度、加工性等の最適機能傾斜を付与する機械部品鍛造技術(駆動部材の信頼性確保のための耐疲労破壊特性の向上を踏まえた)の開発を行う。

技術目標及び達成時期

2011年度までに、高級鋼厚板(高強度鋼・極低温用鋼・耐熱鋼)の溶接を予熱・後熱なしに可能とする溶接技術と材料技術を開発するとともに、傾斜機能部材の鍛造技術を開発する。

研究開発期間

2007年度～2011年度

(4) マグネシウム鍛造部材技術開発プロジェクト* (運営費交付金)

概要

マグネシウム合金部材について、製品歩留まりが高く、高耐疲労性を付与する鍛造技術の開発を行う。また、循環型素材としてのマグネシウム合金部材の特性を活かし、リサイクル材の鍛造用ピレット化に係る課題抽出を行う。当該技術開発により、マグネシウム鍛造部材製造技術の基盤を構築し、我が国の家電、自動車等の川下産業の競争力の強化に不可欠な高度部材を供給する。

技術目標及び達成時期

2010年度までに高強度・高耐疲労・加工性に優れたマグネシウム鍛造技術を確立する。

研究開発期間

2006年度～2010年度

(5) 先端機能発現型新構造繊維部材基盤技術の開発* (運営費交付金)

概要

電界紡糸や溶融紡糸等により創製される極微細な繊維状材料に対してナノオーダーの成形加工や微細な界面加工ならびに複合化することで材料を高機能化した革新的部材を創出する。高機能新材料を求めるユーザーの要望を満たす繊維の極微細加工と高次複合化を解決する基盤技術開発を行う。

技術的目標及び達成時期

2010年度までに、電界紡糸法による繊維高機能化、大型装置化技術およびナノ溶融分散紡糸法による超極細炭素繊維製造技術を開発し、これら基盤技術を活用して、高性能・高機能電池用部材、高性能・高機能フィルター用部材、高性能・高機能医療衛生用・産業用部材を開発する。

研究開発期間

2006年度～2010年度

(6) 次世代光波制御材料・素子化技術* (運営費交付金) (再掲)

概要

エネルギー需給構造の高度化を図る観点から行うものであり、ガラス材料に関する精密モールド技術を確立し、機能性の高い光波制御素子を低コストで生産できるプロセス技術を開発することで部材の小型化・高機能化を図りつつ、省エネを実現する。

技術目標及び達成時期

2010年度までにサブ波長レベルの微細構造をガラス表面にモールド成形する技術を実現し、実装可能な具体的なデバイスを作製する。

研究開発期間

2006年度～2010年度

・ナノテクノロジー・部材分野推進共通基盤領域

ナノテクノロジー、部材分野の研究開発に必要な加工・計測・解析技術等の共通基盤の確

立とともに、信頼性、普遍性、安全性等のリスク不安に対処したリスク管理手法を開発し、社会に貢献する産業化の支援を相互的に推進する。

(1) ナノ粒子の特性評価手法開発 (運営費交付金)

概要

ナノ粒子のキャラクタリゼーション、計測技術の確立とともに、生体影響等評価手法、暴露評価手法及びナノテクノロジーによるリスク不安に対処したリスク管理手法を開発する。

技術目標及び達成時期

2008年度までに、ナノ粒子のキャラクタリゼーション及び計測技術を確立するとともに、2010年までに、生体影響等評価手法、暴露評価手法及びリスク評価手法を開発し、ナノ材料のリスク評価指針及びナノ粒子の管理指針の提言を行う。

研究開発期間

2006年度～2010年度

(2) 高度分析機器開発実用化プロジェクト* (再掲)

概要

燃料電池・情報家電・ナノテクといった先端新産業において、材料解析・性能評価・品質管理等で必要とされる超微量・超低濃度試料の分析技術の開発を行う。これら産業化の各フェーズに適した分析技術を開発することにより、先端新産業の事業化や製品の高付加価値化を図る。

技術目標及び達成時期

2008年度までに希ガスイオン源を搭載した集束イオンビームの開発、低加速・高分解能・高感度の元素分析用顕微鏡の開発、超微量試料用分離・分析技術の開発を行う。

研究開発期間

2006年度～2008年度

注：*印のある研究開発プロジェクトは2006年度より開始された新産業創造高度部材基盤技術開発の一環として実施しているもの。

5．政策目標の実現に向けた環境整備（関連施策）

ナノテクノロジーは、情報通信、環境、エネルギーなどの分野における科学技術の進歩や課題解決に貢献する重要な技術シーズである。そのため、ナノテクノロジーの研究開発と一体となった関連施策を実施することで、その成果を市場に出していくことが重要である。主な関連施策を、以下に示す。

〔技術戦略マップ〕

- ・NEDO及び経済産業省では、技術戦略マップを策定、毎年改訂し、ナノテク・部材分野の将来の方向性を見定めながら、合理的かつ効果的な研究開発プロジェクトを推進しているところ。また、技術戦略マップを活用して、多様な連携（川上川下の垂直連携、異業種間の水平連携など）による研究開発を促進、支援し、当該分野の技術革新を促進する。

〔サンプル提供・実用化促進〕

- ・NEDOでは、実施するナノテクノロジー関連の研究開発プロジェクト成果のサンプルを対象として、それらを活用した用途の開発、実用化ないし製品化提案を有する企業とのマッチングを図ることで、プロジェクトの事業化を促進する取組みを実施しているところ。

〔基準・標準化〕

- ・ナノテクノロジーの標準化については、研究開発プロジェクトを推進する上で、適切な活動（国際規格ISO/IEC、日本工業規格JIS、その他）を実施し、我が国のナノテクノロジー分野の研究開発、産業活動の効率向上を図り、研究開発の成果が社会で普及する環境を整備する意味でも重要である。これまでの主な取組みについては、下記のとおり。
- ・2005年5月にナノテクノロジーの標準化に向けてISO/TC229の設立がされ、「用語と命名法」、「計測とキャラクタリゼーション」、「健康・安全・環境」の3つのWGにおいて、国際標準化の策定に向けて議論が開始された。
- ・また、2007年6月にシンガポールで開催された第5回総会以降、「材料規格」の分科会の設立に向けて対応しているところ。
- ・さらに、2006年9月にはナノテクノロジーに関する電気電子技術の標準化に向けてIEC/TC113が設立され、「用語と命名法」、「計測とキャラクタリゼーション」、「性能評価」の3つのWGにおいて、国際標準化の策定に向けて議論が開始されている。（なお、はISO/TC229とのジョイントWGとなっている。）

〔広報〕

- ・ナノテクノロジーに関する先端技術及び製品等の世界最大の展示会である「nano tech」が毎年日本で開催されている。2002年に開催された第1回以降、出展者来場者ともに増加傾向にあり、近年は海外、とくにヨーロッパ・アジア等の出展が目立つようになってきている。

〔社会受容〕

- ・ナノテクノロジーの社会受容に対する取組みは、ナノテクノロジーの産業化を推進するため、例えば工業ナノ粒子のキャラクタリゼーション技術や人の健康や環境に及ぼす影響など、潜在的な課題に関する知見を蓄積する取組みが重要である。

- ・経済産業省では、2006年度から「ナノ粒子特性評価手法の研究開発」を開始し、工業ナノ粒子の有害性評価手法、また、そのリスク評価手法の確立を目標としたプロジェクトを開始しているところ。

〔人材育成〕

- ・経済産業省では、「製造中核人材育成事業」を実施しており、産学連携による波及効果の高い人材育成プログラムを開発、実践している。ナノテクノロジー関連の人材育成プログラムも複数実施しているところ。

（例）ナノテク製造中核人材の養成プログラム

概要：情報家電、燃料電池、ロボット、医療機器、バイオ等の応用分野において、その産業の基盤と創出を支える中堅企業を対象として、「基礎加工技能・技術、特殊な要素技能・技術に習熟し、製造技術の高度化を図る人材」及び「豊富なナノ加工プロセスの知識や先端機器を使いこなすノウハウ等を習熟し、製造現場の技能・技術を統括できず人材」を育成するもの。

- ・NEDOでは、我が国の産業技術の発展のため、先端分野や融合分野の技術を支える人材の育成と、人的交流の面から産学連携を促進するための「場」の形成を促進する取り組みを実施している（NEDO特別講座）。具体的には、優れた成果を生み出しつつあり、大学が技術の中核となっている研究開発プロジェクトをコアプロジェクトとし、そのプロジェクトリーダーの所属大学に拠点を設置し、関連技術の人材育成、人的交流の拡大、周辺研究の実施を行うもの。ナノテクノロジー関連の研究開発プロジェクトも複数実施しているところ。

〔他省庁との連携〕

- ・総合科学技術会議／連携施策群において、「ナノバイオテクノロジー」「ナノテク研究推進と社会受容」が設置され、関係省庁と連携して実施しているところ。
- ・経済産業省が実施する研究開発プロジェクトにおいては、文部科学省など他省庁との連携の可能性について検討を行い、研究開発プロジェクトの立案、推進しているところ。

（例）ナノエレクトロニクス半導体新材料・新構造技術開発 - うち新材料・新構造ナノ電子デバイスプロジェクト、希少金属代替材料開発プロジェクト など

6．研究開発の実施に当たっての留意事項

事業の全部又は一部について独立行政法人の運営費交付金により実施されるもの（事業に（運営費交付金）と記載したもの）は、中期目標、中期計画等に基づき、運営費交付金の総額の範囲内で、当該独立行政法人の裁量によって実施されるものである。

7．改訂履歴

- (1) 平成12年12月28日付け制定。
- (2) 平成14年2月28日付け制定。材料ナノテクノロジープログラム基本計画（平成12・12・27工総第16号）は、廃止。
- (3) 平成15年3月10日付け制定。ナノテクノロジープログラム基本計画（平成14・02・25産局第8号）は、廃止。
- (4) 平成16年2月3日付け制定。ナノテクノロジープログラム基本計画（平成15・03・07産局第1号）は、廃止。
- (5) 平成17年3月31日付け制定。ナノテクノロジープログラム基本計画（平成16・02・03産局第7号）は、廃止。
- (6) 平成18年3月31日付け制定。ナノテクノロジープログラム基本計画（平成17・03・25産局第4号）は、廃止。
- (7) 平成19年4月2日付け制定。ナノテクノロジープログラム基本計画（平成18・03・31産局第13号）は、廃止。
- (8) 平成14年2月28日付け制定。
- (9) 平成15年3月10日付け制定。革新的部材産業創出プログラム基本計画（平成14・02・25産局第9号）は、廃止。
- (10) 平成16年3月7日付け制定。革新的部材産業創出プログラム基本計画（平成15・03・07産局第5号）は、廃止。
- (11) 平成17年3月31日付け制定。革新的部材産業創出プログラム基本計画（平成16・03・07産局第5号）は、廃止。
- (12) 平成18年3月31日付け制定。革新的部材産業創出プログラム基本計画（平成17・03・25産局第3号）は、廃止。
- (13) 平成19年4月2日付け制定。革新的部材産業創出プログラム基本計画（平成18・03・31産局第14号）は、廃止。
- (14) 平成20年4月1日付け、ナノテク・部材イノベーションプログラム基本計画制定。ナノテクノロジープログラム基本計画（平成19・03・20産局第1号）および革新的部材プログラム基本計画（平成19・03・19産局第4号）は、本イノベーションプログラム基本計画に統合することとし、廃止。

技術戦略マップ

創薬・診断分野

健康寿命の延伸、QOL（Quality of Life：生活の質）の向上は世界全体の願いであり、特に、今後、少子高齢化が他国に先駆けて進行する日本にとっては、喫緊の課題である。このために創薬・診断分野では、2005年の技術戦略マップ策定当初から①「疾患の早期診断」、「適切な治療法の提供」によって、より良い医療サービスを提供していくとともに、②「予防医療による健康維持増進」によって、治療から予防へと転換し、より個人に適切に対応する「個の医療」を実現することを目標とし、技術動向や社会情勢の変化を踏まえて毎年度改訂を行ってきた。これにより、本分野における技術の俯瞰や将来への道筋の提示については一定の役割を果たしてきたものと考えられる。

しかし、前述した目標を達成するためには、技術の延長にとどまらず、国民に深刻な影響を与えている疾患の克服への技術の貢献可能性を改めて検討することが必要なことから、技術戦略マップ2010においては、患者数・治療満足度の低さ等から「アルツハイマー」、「糖尿病」、「がん」を選定し、各疾患の治療のあるべき将来像から導き出される必要な技術開発と、共通基盤技術の抽出を行った。

網羅性は技術戦略マップ2009に委ねつつ、課題解決に向けて特に必要となるであろう技術の抽出に注力した。本マップについては、関係者の意見を踏まえつつ、今後とも不断の見直しを行っていく予定である。

創薬・診断分野の技術戦略マップ

I. 導入シナリオ

(1) 創薬・診断分野の目標と将来実現する社会像

今後、世界に類を見ない少子高齢化社会を迎える我が国において、国民が健康で安心して暮らせる社会を実現することは、喫緊の課題である。そのために創薬・診断分野が果たす役割は大きい。

2009年12月30日には新成長戦略（基本方針）が閣議決定され、その中で「ライフ・イノベーションによる健康大国戦略」として、医療・介護・健康関連産業の成長産業化、日本発の革新的な医薬品、医療・介護技術の研究開発等を通じて、2020年までに「医療・介護・健康関連サービスの需要に見合った産業育成と雇用の創出、新規市場約45兆円、新規雇用約280万人」とする目標が示されたところである。

技術戦略マップは、本目標の達成にも資する具体的な方策について、主に技術開発を視点に据えつつ記載したものであるが、導入シナリオにおいては、特に開発した技術を社会へ繋げていくために必要となるレギュレーション対応や社会基盤整備等を示した。

現在行われている疾患の予防や診断では、家族の病歴・自らの健診から得られる基礎的なデータや、集団健診から得られる平均値等の統計データが主として用いられている。また、各疾患と遺伝子発現等の関連を知る上で欠かせない臨床サンプルの数的不足や散逸もあって、現状では非臨床試験や少数のサンプルから得られたバイオマーカーを、画一的に利用している。さらには、発症メカニズムが不明な数多くの疾患については、正確な予防法は依然として確立していない。画像診断や病理組織診断についても、近年の多様化、小型化等により、疾患の早期診断に重要な役割を果たしつつあるが、まだ用途は限定的で、今後とも更なる技術開発の必要がある。

一方で、基礎研究の進展によって、ゲノム、エピゲノム、RNA、タンパク質、糖鎖、脂質等の様々な切り口や統合的なアプローチによって、生命現象や疾患メカニズムに関する研究が急激に進展しており、基礎的な研究成果が臨床の現場へと一刻も早く応用されるよう、切れ目のない研究開発体制の構築が求められている。

また近年、国民の健康に対する関心も高まり、今後、日常生活における生体情報の取得や自主的な健康管理が一層普及すると予想され、前述した技術の進展、臨床サンプルの収集やバンキングともあいまって、革新的な診断薬・治療薬の創出や個人に最適な医療の提供・普及が期待される。

こうした現状を踏まえ、今回の導入シナリオの策定にあたっては2009年までの改訂作業を継承し、我が国が取るべき具体的方策の一つとして重要な考え方として、「安全性が高く優れた日本発の革新的な医薬品を創出しつつ、健康寿命の延伸、最適な医療の実現、医療産業力の強化を図る」という考えをベースに、20年後のあるべき姿を見

据え、「より予防的な治療」の実現へと向かうことが重要であると分析した。

次いで、「より予防的な治療」を具体化し、将来実現すべき社会像として以下の方向性を提示した。

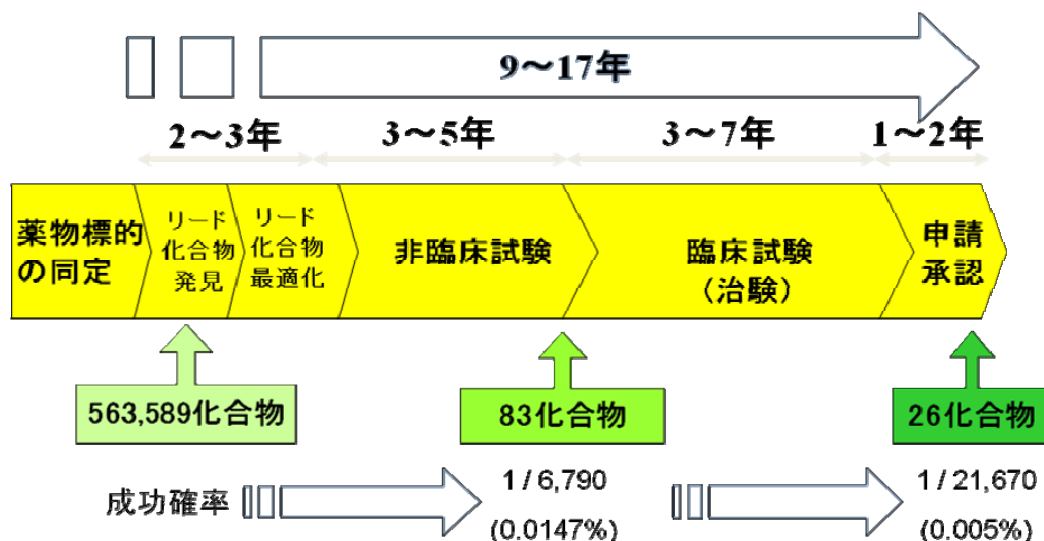
- ① 有効な予防が開発され、疾患発症年数を遅らせ、重症化を防ぐ
- ② エビデンスに基づく最適な診断治療が、より正確・安全に受けられる
- ③ 患者のQOLが向上し、高齢化社会を健康に過ごすことができる
- ④ 医療関連産業分野の技術革新により、安全性が高く優れた日本発の革新的な医薬品や医療サービスを創出し、世界への貢献を図りつつ国際競争力を強化する

さらに、創薬や診断技術の開発といった開発プロセスの改善という視点から、国民に深刻な影響を与えている疾患の克服への技術の貢献可能性を検討するため、患者数・治療満足度の低さ等から「アルツハイマー」、「糖尿病」、「がん」を検討対象の疾患とし、課題解決のために必要な技術を抽出して、それぞれに導入シナリオを検討した。加えて、疾患ごとの検討結果を俯瞰し、あるべき将来像への変革に共通して必要となる産業波及性の高い重要技術課題を抽出して、共通の導入シナリオを作成した。共通する重要技術課題としてまとめた項目は、①ヒト臨床情報・サンプルのバンキング、②ヒト生体機能のモニタリング、③エビデンスに基づく創薬診断である。

(2) 研究開発の取組

現在の創薬プロセスにおいては、1つの医薬品が製品化されるまでに、9~17年程度の期間及び500億円を超える開発費が必要であるといわれている。研究開発費のうちの7割強は、臨床試験までに投入されている。

図1 新薬開発の特質 (03年~07年の例)



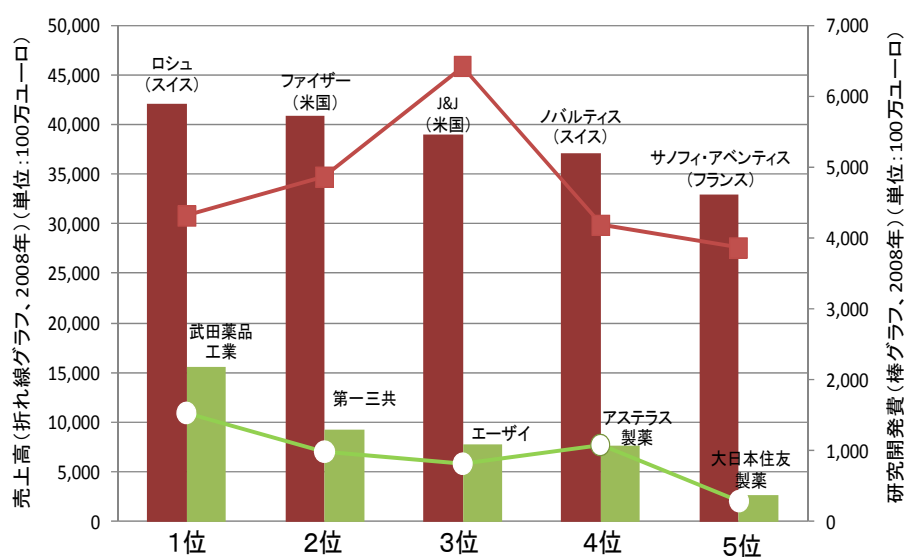
出典：てきすとぶつく 製薬産業 2009

また、研究開発領域の拡大とともに臨床試験開始後の成功確率が減少傾向にあるこ

とから、製薬企業における研究開発費の総額は増大し、創薬における研究開発リスクはますます高まる傾向にある。

我が国の企業の研究開発投資は、欧米と比べると規模で劣る。例えば全世界・日本の製薬企業の研究開発投資トップ5社を比べると、研究開発費・売上高ともに、規模の格差が顕著である。また、政府の研究開発規模も10倍近くの差がある。一方で、このような状況下、売上高は必ずしも大きくないが、医薬品の世界売り上げランキング50位以内に日本オリジンの医薬品が10品目入っており、限定的な領域での強みが伺われる。

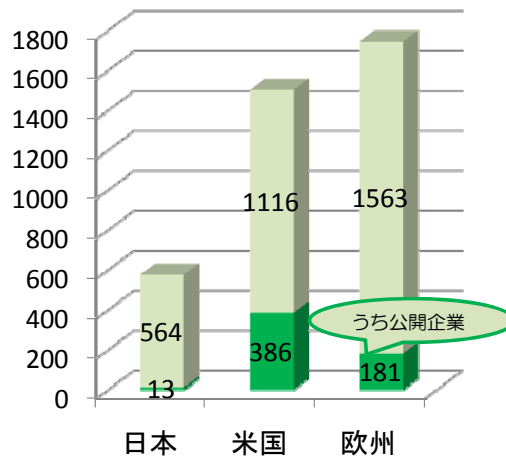
図2 全世界・日本の製薬企業トップ5社の比較



(出典)European Commission The 2009 EU Industrial R&D Investment Scoreboard より経済産業省作成

また、バイオベンチャーは、他分野ベンチャー企業以上に重要な役割を担うところであるが、企業数、ベンチャーキャピタルからの投資額、開発起源企業別にみたバイオ医薬品数において、我が国のバイオベンチャーは、欧米との比較において、質・量ともに不十分と言わざるを得ない。

図 3 バイオベンチャーの企業数海外比較



出典：E&Y「Global Biotechnology Report 2008」バイオインダストリー協会「2007年バイオベンチャー統計調査」

このため、我が国が少ない研究開発費で効率的な創薬を達成し、国際競争力を高めていくためには、基礎研究の成果を迅速に臨床に橋渡ししていくことを含め、産業界のニーズや我が国の強みを踏まえつつ、創薬の成功確率を向上し新薬を効率的に生み出す創薬力強化のための産業基盤の整備、診断と治療が一体化した新しい医療を実現する技術開発に加え、オープンイノベーション環境の整備などに政府予算を投入していくことが重要である。

このような状況の中、経済産業省においては、生体分子の機能・構造・ネットワーク解析や、それら研究を強力に推進するためのバイオツールやバイオインフォマティクスの開発、成果を高度に活用するためのデータベース整備等を行うことにより、個人に適切に対応した医療、予防医療の実現や画期的な新薬の開発、健康維持・増進につながる新しい産業の創出に向けた取組を行ってきた。今後とも、各省庁連携のもと、ゲノム、エピゲノム、RNA、タンパク質、糖鎖、脂質等、様々な切り口や統合的なアプローチによって、生命現象や疾患メカニズムに関する研究を進展させていくとともに、基礎研究の成果に基づく波及効果の高い革新的な診断・治療技術をいち早く産業応用へと繋げ、ライフ・イノベーションによる国際競争力の強化によって、日本の成長を牽引する産業セクターとすべく研究開発を行っていく。

(3) 関連施策の取組

創薬・診断分野における将来像を実現するためには、研究開発のみならず、開発の迅速化や成果普及につながる制度整備、将来の国際展開を見据えた標準化の取組等の関連施策を研究開発政策と一体的に推進する必要がある。このため、政府関係機関に

において以下の取組がなされている。

〔起業・事業支援〕

- ・ 「産業クラスター計画」に基づき、全国のバイオクラスターにおいて、企業間のネットワーク形成の支援、産学連携による研究開発プロジェクトの支援、地域系ベンチャーファンドによる資金調達支援等の実施。

〔導入補助・支援〕

- ・ 個人遺伝情報保護ガイドラインの適切な運用
- ・ バイオインダストリー安全対策調査の実施
- ・ バイオ事業化に伴う生命倫理問題等に関する研究の実施

〔ガイドライン整備〕

- ・ テーラーメイド医療用診断機器 (DNA チップ) 開発ガイドライン 2007—遺伝子型 (ジェノタイピング) 検定用 DNA チップに関して—」を 2007 年 5 月に公表。翌 2008 年 4 月に、厚生労働省より「DNA チップを用いた遺伝子型判定用診断薬に関する評価指標」が公表。
- ・ 発現解析 DNA チップガイドラインについて医療機器ガイドライン策定事業の中で継続審議中。

〔規制・制度改革、他省庁との連携〕

- ・ バイオ・イノベーション研究会の下での医薬品産業を発展拡大させるための方策の検討。
- ・ 内閣府、文部科学省、厚生労働省及び経済産業省の間で2009年2月に改訂した「革新的医薬品・医療機器創出のための5か年戦略」に基づき、研究資金の集中投入、ベンチャー企業の育成、臨床研究・治験環境の整備、アジアとの連携、薬事法における審査の迅速化・質の向上、イノベーションの適切な評価等、本分野における研究から上市に至る過程の一貫かつ集中的な支援の実施。
- ・ 2008年7月22日に設置された「健康研究推進会議」による、先端医療開発特区（スーパー特区）」制度の推進と各省が実施している臨床研究や橋渡し研究を一体的に運用していくための司令塔機能の発揮。

〔基準・標準化〕

- ・ バイオチップのデータ信頼性・互換性向上のための基準・標準化活動の推進を目的として、2007年10月、特定非営利活動法人バイオチップコンソーシアムが設立（参加企業68社）。

〔知的基盤整備〕

- ・ 研究開発の企画段階から、研究テーマ周辺の論文及び特許状況のサーベイ実施や研究開発の実施段階における特許出願後の事業化構想等、特許に関する戦略的取組の実施をサポート。

〔特許化〕

- ・特許庁は、2008年10月より、現行の早期審査よりも更に早期に審査を行う「スーパー早期審査制度」を創設、早期の事業化を目指す発明やライフサイクルが短い発明への早期審査のニーズを充足させるべく、制度を構築。

(4) 海外での取組

米国では、NIHにおける約3兆円の研究開発予算のうち、約90%が大学や病院といった外部へのグラントに充当され、10%がNIH クリニカルセンター等の内部研究に充てられている。2009年度においては、ARRA (American Recovery and Reinvestment Act; 米国再生・再投資法)により、NIH 予算は約1兆円上積みされ、生物医療学研究等の研究開発の加速が予想される。NIH では、NIH に属する27 研究所全体として取り組むべき研究分野を見極めることを目的に、NIH ロードマップを2003年9月に作成し、以下の主要テーマについて取組が行われている。

①New Pathways to Discovery :

生体メカニズムの理解を主眼とした、細胞や組織を構成する生体分子のネットワーク、分子イメージング、構造生物学、バイオインフォマティクス、ナノ医療等に係る研究開発。

②Research Team of the Future

専門分野を越えた学際的研究を行うチーム、新しい組織モデルの検討。特にハイリスク研究分野では、43の橋渡し研究、81の新規事業、115のニューイノベーター研究に資金が配分されている。

③Re-Engineering the Clinical Research Enterprise

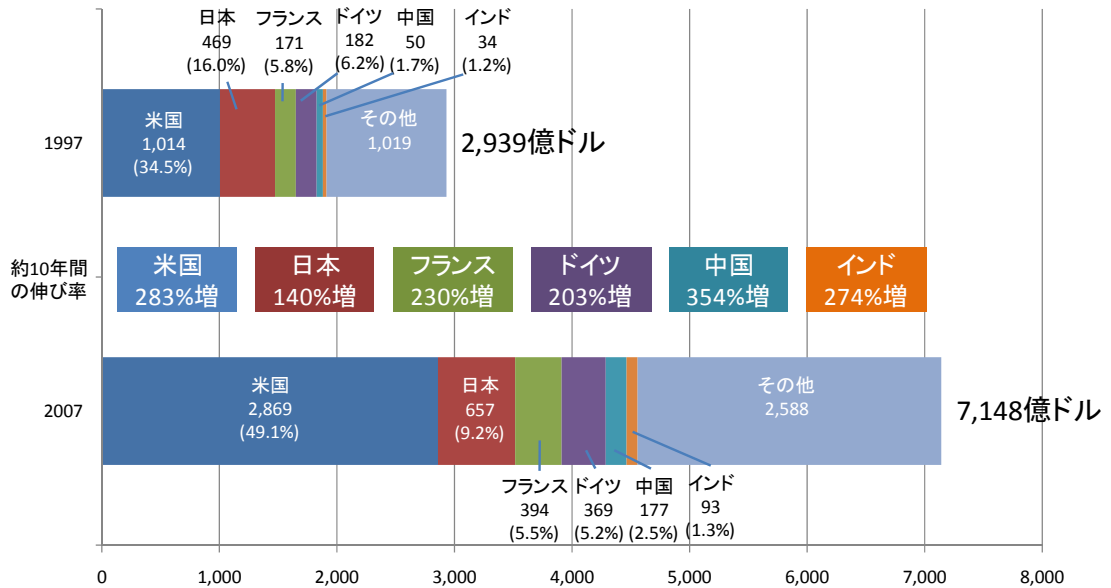
研究上の発見や諸成果を、迅速に臨床現場に展開するためのシステム構築。

欧州では、科学技術に関する総合的なプログラム (Framework Programme) を3~4年単位で実施している。2006年12月には、2007年~2013年の取組を示したFP7が策定・開始されている。FP7においては、欧州レベルでの官民パートナーシップを実現化する新たな手法として共同研究イニシアチブが取り組まれており、6領域のイニシアチブの1つとして、「革新的医薬品イニシアチブ」が展開されている。当該イニシアチブでは、十分な医療が提供されていない領域に、研究成果の迅速な橋渡しを促進する仕組みを構築することを狙いとしている。

(5) 民間での取組

過去10年で、世界の医薬品市場はおよそ2倍近く拡大しているが、日本市場の伸びは2割程度にとどまり、結果として日本が占める割合は半減している。

図 4 世界の医薬品市場の推移



出典：「第1回バイオ・イノベーション研究会」資料

こうした中、経営基盤の強化を図るため、企業間の再編や外部リソースの活用が進んでいる。

表 1：近年の再編動向（国内）

統合年	主たる企業名
2005年	・アステラス製薬（山之内製薬、藤沢薬品工業） ・大日本住友製薬（大日本製薬、住友製薬）
2007年	・第一三共（三共、第一製薬） ・田辺三菱製薬（田辺製薬、三菱ウェルファーマ）
2008年	・協和発酵キリン（協和発酵、キリンファーマ）

外部リソースの活用は、経営基盤の強化を図ることにとどまらず、企業にとってこれまで研究が立ち後れていた有用技術の早期導入に役立っているケースもあり、技術が国境を越える一つの契機にもなっている。

また、主要薬が相次いで特許切れになる「2010年問題」を見据え、米国企業を中心とした大規模な買収・合併の動きが加速していることも、今後の企業における研究開発に影響を与えることが予想される。

表 2：国境を越えた組織再編・技術提携

公表時期	内容
2008年5月	武田薬品工業がミレニアム・ファーマシューティカルズ社（米）を88億ドルで買収

2008年9月	ベーリンガーインゲルハイム(独)と北海道大学発ベンチャー、イーベックが5,500万ユーロで抗体作成技術のライセンス契約を締結
2009年1月	ファイザー(米)がワイス(米)を680億ドルで買収
2009年3月	メルク(米)がシェリング・プラウ(米)を411億ドルで買収
2009年3月	ロシュ(スイス)がジェネンティック(米)を468億ドルで買収

(6) 改訂のポイント

- 新たな創薬・診断分野の技術戦略マップを作成するに当たり、患者数・治療満足度の低さ等から「アルツハイマー」、「糖尿病」、「がん」を選定、それぞれに導入シナリオを検討した後、そこから導かれる以下のあるべき姿・将来像と必要な技術開発を示した共通の導入シナリオを作成した。
- (1) 創薬・診断分野の目標と将来実現する社会像において、新成長戦略(基本方針)に関する記載を追加した。
- [ガイドライン整備]の欄にDNAチップガイドラインに関する記載を追加した。
- [規制・制度改革、他省庁との連携]の欄に経済産業省において開催した「バイオ・イノベーション研究会」に関する記載を追加した。
- [基準・標準化]の欄に特定非営利活動法人バイオチップコンソーシアムに関する記載を追加した。
- (4) 海外での取組において、米国NIHの研究開発予算に関する記載を追加した。

II. 技術マップ

(1) 技術マップ

国民にとって最大の関心事項である健康とは、「病気になった場合に早期に健康状態に戻れること」、そして、「そもそも病気にならず健康であり続けること」に、大きく二分される。この2つのニーズに対応するためには、将来の疾患リスクを事前に把握した上で、予防的医療も視野に入れ、各人において日々の健康管理を可能とすること、また、より早期に適切な診断によって病気の兆候を捕まえるとともに、診断に基づき個々人に応じた副作用の少ない最適な医療を提供することが重要である。

このため、技術戦略マップ策定当初から、①「より良い医薬品の開発・提供」及び②「健康産業の創造(治療から予防への転換)」を2つの戦略として位置づけ、ニーズに従って必要な技術を技術マップ上に俯瞰してきた。しかし、前述したように、創薬や診断技術の開発といった開発プロセスの改善という視点から、国民に深刻な影響を与えている疾患の克服への技術の貢献可能性を検討することの重要性にかんがみ、患者数・治療満足度の低さ等から「アルツハイマー」、「糖尿病」、「がん」を検討対象の疾患とし、「健常一発症一治療」というフェーズごとに、課題解決のために必要な技術を抽出した。さらに疾患ごとの検討結果を俯瞰し、あるべき将来像への変革に共通し

て必要となる産業波及性の高い重要技術課題を抽出した、「共通技術マップ」を作成した。

2009 年度まで改訂を重ねてきた技術戦略マップを下敷きとしつつ、「より予防的な医療へと変革を推し進めること」が重要であるとの考えに基づき、「現状」を「あるべき姿」へと変革を促していくうえでキーとなる産業波及性の高い重要技術を抽出した。具体的には、「共通技術マップ」としてまとめた項目は、①ヒト臨床情報・サンプルのバンキング、②ヒト生体機能のモニタリング、③エビデンスに基づく創薬診断である。より詳細に例示すると、臨床サンプルバンクの整備や疾患と生活習慣に関するコホート研究、バイオインフォマティクス・シミュレーションツールの開発等の *in silico* 解析の進展、エピゲノム情報等の解析、サロゲートマーカーの開発、イメージング技術の開発等、いずれも、健常なうちに疾患の兆候をいち早く予測するための技術が挙げられた。

(2) 重要技術の考え方

網羅的な技術の俯瞰と重要技術の抽出については、技術戦略マップ 2009 における作業結果を引き続き踏襲するものとし、技術戦略マップ 2010 については、前述したように 3 疾患に係る問題の解決に資する技術について記載した。

(3) 改訂のポイント

- 国民の生活の質に大きな影響を及ぼしている「アルツハイマー」、「糖尿病」、「がん」と、そこから導き出される共通の技術マップを作成した。

Ⅲ. 技術ロードマップ

(1) 技術ロードマップ

導入シナリオ及び技術マップと同様に、「アルツハイマー」、「糖尿病」、「がん」の 3 疾患の技術ロードマップに加え、各疾患の治療等のあるべき将来像から導き出される必要な技術を俯瞰する、共通の技術ロードマップも作成した。

「①ヒト臨床情報・サンプルのバンキング」について、アルツハイマー病等精神性疾患はヒトで特に発達した高次機能の障害であることから、イメージング技術等の基礎科学の発展を踏まえつつ、ヒトを対象として疾患メカニズムを探索することが極めて重要であるとした。加えて、がん等の領域においても、ヒト個体やヒト臨床サンプルを対象とした研究アプローチの重要性が示唆された。2030 年を目処に、ヒト臨床サンプルバンキングシステムが構築され、ヒトを対象とした解析から示唆された疾患メカニズムを、ヒトの病態を忠実に再現したモデル動物等を用いた創薬・診断技術開発に応用する等、大きな変革と進展が期待される。

また、「②ヒト生体機能のモニタリング」については、疾患の予防的な観点から重要な課題として取り上げた。将来、病気になるかどうかは遺伝子情報のみでは決まらず、その脆弱性や環境因子の影響によって左右される。環境因子等の影響を最初に受ける

のはゲノムのエピジェネティクス的な変化と考えられることから、パーソナルゲノムやエピゲノムに関する解析を一層進展させることが重要であると分析した。これにより、正確なリスク診断の実用化や、解析によって得られた情報を自己管理するシステムの構築が期待される。サロゲートマーカーや薬効評価のイメージングツールの開発を通じて、一層早期かつ適切な診断・治療の実現が望まれる。

「③エビデンスに基づく創薬診断」については、ファーマコゲノミクス解析による薬剤の応答性や有害事象高リスク群に対する治療が実施されることにより、新薬開発成功率が向上することが期待される。また、高性能な診断技術をベースに、診断と治療に対する一体的な研究開発に取り組むことが重要と分析した。

これらの技術開発の実現を通じて、現在の治療を中心とした医療から、予防を重視した医療へと変遷し、また、病気になった場合であっても、現在、治療困難な疾患も含め、患者の体質・遺伝情報や病態に応じた個別療法の提供が可能になる等、個別化医療が進展することが期待される。

(2) 改訂のポイント

- 国民の生活の質に大きな影響を及ぼしている「アルツハイマー」、「糖尿病」、「がん」と、そこから導き出される共通の技術ロードマップを作成した。

IV. その他の改訂のポイント

○ 国際競争ポジション（ベンチマーキング）

- 図 3 に「バイオベンチャーの企業数海外比較」、図 4 に「世界の医薬品市場の推移」を追加した。

20年後の予防、診断、治療の姿（創薬診断技術）

あるべき
姿

- ◆ 有効な予防法が開発され、疾患発症年齢を遅らせ、重症化を防ぐ
- ◆ エビデンスに基づく最適な診断治療が、より正確・安全に受けられる
- ◆ 患者のQOLが向上し、高齢化社会を健康に過ごすことができる
- ◆ 医療関連産業分野の技術革新により、国際競争力が強化される

健康寿命延伸
最適な医療の実現
医療産業力の強化

現 状

技術開発

将 来 像

予
防

- 食事・運動・禁煙等、生活習慣の改善により予防する
- 家族の病歴や健診等の結果で、発病リスク・可能性を判断する
- 発病メカニズムが不明な疾患では、明確な予防法が存在しない

診
断

- 画一的な項目を対象とした集団健診で、平均値を指標に健康度を判断する
- 少数のバイオマーカーを、個別検診で利用する
- 画像や病理組織による診断は、限定的である

治
療

- 医薬品は対症療法が中心で、個々の患者に最適な効果を持つとは限らない
- 外科手術、薬物療法（分子標的薬・バイオ医薬）、放射線療法等、複数の治療法を組み合わせる

①ヒト臨床情報・サンプルのバンキング

- ◆ 健常人を含めたヒト臨床サンプルの効率的収集と、バンキングシステム
- ◆ 前向きコホート研究・大規模臨床データベースと、インテリジェントな情報処理基盤技術

②ヒト生体機能のモニタリング

- ◆ ゲノム、エピゲノム情報等の統合的解析
- ◆ 実用的バイオマーカー、サロゲートマーカー
- ◆ イメージング技術（画像診断技術）の向上と、多様な生体機能のモニタリング技術

③エビデンスに基づく創薬診断

- ◆ エビデンスに基づく予防・診断・治療の新たな方法と医薬の開発による選択肢の拡大

予
防

- ゲノム・エピゲノム情報解析等により、各個人の疾患発症リスクが的確に判断できる
- リアルタイム生活習慣計測や発症リスクバイオマーカー測定により、健康管理・食品・薬剤等、各自に最適な疾患の予防手段を選択し、発症を予防できる
- バイオマーカー・遺伝子検査、画像診断等を用い、複数の治療薬や治療法から各自に最適な薬や治療法が選択でき、治療効果の判定や再発等も、モニターできる
- 核酸医薬、次世代抗体医薬等、画期的な医薬品が実現する
- 部分的には、失われた臓器の機能再建等、再生医療による治療が受けられる
- 最適な治療により、社会復帰までの時間が短縮する
- 疾患と共存し、QOLを維持できる健康管理法が確立する

診
断・
治
療

20年後のアルツハイマー病(AD)の予防、診断、治療の姿

あるべき姿

- ◆ アルツハイマー病(AD)による神経変性メカニズムが解明され、制御可能な疾患となる
- ◆ 予防的治療法の確立により、発症年齢を5年遅らせる
- ◆ 高齢者が健康に過ごすことにより、本人・家族のQOLの向上、社会活力の維持につながる
- ◆ AD患者が大半を占める認知症の介護費(2000年度推計で約2.3兆円)を大幅に削減できる

現状

基礎・臨床研究

- 疾患メカニズムが解明されず、明確な予防法が存在しない
- 日本はADの疫学研究が不十分

診断

- 自覚(他覚)症状に伴う臨床心理学的検査が中心である
- 早期発見が困難で、加齢等による認知機能低下との区別が難しい

治療

- 医薬品による対症療法が中心
- 一度失われた認知機能の回復は困難である
- アミロイド仮説に基づいた医薬品等、根本治療を目指した薬が開発されている

社会環境

- 在宅介護や施設介護など、高齢者の介護様式は多様化している
- 認知症による社会的負担は深刻である

技術開発

①メカニズム解明に向けた基礎研究

- ◆ 病態解明のためのツール開発、及びヒトの病態を忠実に再現できる動物モデルの開発
- ◆ 大規模臨床データベースの構築・解析と、疫学をベースとした前向きコホート研究

②早期診断による早期治療への展開

- ◆ 血液などを用いたAD特異的バイオマーカーの開発
- ◆ 微量のアミロイド、神経回路異常を高感度に検出する機能画像検査法の開発

③認知機能維持・回復のための治療

- ◆ 新規作用機序を持つ医薬品の開発
- ◆ エビデンスに基づいた統合的医療と評価法の開発

社会環境の整備は診断・治療技術開発のドライバーとなる

将来像

予防

- AD発症リスクのメカニズムが解明され、発症年齢を遅らせる
- 画像診断等を用いた早期診断と予防的治療により、症状発現を未然に防ぐ
- 軽度認知機能障害を正確に診断し、進行防止治療を開始できる
- 体液バイオマーカー・遺伝子検査、画像診断等を活用し、複数の薬から最適な治療薬が選択できる
- 適切な治療とリハビリにより、一定レベルの認知機能を回復できる

診断・治療

社会環境

- 地域コミュニティがネットワーク化され、ADの早期発見・治療が実現するとともに、患者の認知機能の維持により、介護者等の負担も軽減される
- 治験拠点と支援体制の整備等により、診断・治療技術開発が効率化される
- 世界に先立って超高齢化社会となる日本の経験・技術を、海外に広める

20年後の糖尿病の予防、診断、治療の姿

あるべき姿

- ◆ 糖尿病の平均発症年齢を10年遅らせる
- ◆ 患者自身が合併症発症抑制の管理ができる
- ◆ 合併症発症まで至る人は現在の十分の一になる

現状

予防

- 食事・運動・禁煙等、生活習慣改善による予防が中心

診断

- <発症診断>
- 重症化するまで自覚症状がない
- 血糖値による診断に加え、新診断基準でヘモグロビンA1cも追加へ
- <合併症リスク診断>
- 合併症の遺伝子多型検査を一部開始

治療

- <糖尿病治療>
- 病態進展に伴い、食事・運動療法、治療薬、インスリン投与等を組み合わせる
- 治療途中のドロップアウトが多い
- 低血糖を起こさない血糖制御薬が上市された
- <合併症治療>
- 網膜症・脳血管障害・心血管障害は、動脈硬化前段階の制御により改善できる
- 腎症は治療継続しても進行例がある

社会環境

- 特定健診・保健指導は低受診率が課題
- 健康日本21
- 一部地域での地域医療連携

技術開発

①健康管理与予備軍の発症予防

- ◆ リアルタイム生体情報モニタリングと、遺伝・環境要因等多数の情報を扱うデータマイニングに基づく健康管理法
- ◆ ゲノム、エピゲノム情報等を統合したインテリジェント創薬等による予防薬
- ◆ 実用的サロゲートマーカー測定機器

②合併症リスクの発見

- ◆ 合併症リスク診断の有効なバイオマーカーの開発
- ◆ 動脈硬化等合併症リスクの簡便な診断技術

③合併症の予防と治療

- ◆ インテリジェント創薬等による糖尿病及び合併症治療薬の開発

将来像

<予防>

- リアルタイムな生活習慣計測と発症リスクのバイオマーカーの測定等により、食事をはじめ、各個人に最適な生活習慣と予防手段を選択できる
- カロリー制限模倣薬、体重減少模倣薬、運動模倣薬等が開発され、予備軍の糖尿病発症が抑制できる

<合併症診断と予防>

- リアルタイムな生活習慣計測と発症リスクバイオマーカーの測定等により、糖尿病合併症リスク診断・予防ができる

<診断と治療>

- 血糖値を最適にコントロールし、糖尿病と共存できる
- 各個人の遺伝的背景と環境要因に適応した、糖尿病治療薬及び、一定の機能回復効果のある合併症治療薬を選択できる
- 再生医療による糖尿病治療が開始される

予防

診断・治療

20年後のがんの予防、診断、治療の姿

あるべき姿

- ◆ がん死亡率を40 %減(平成16年比、75歳以下年齢調整死亡率)
- ◆ 有効な予防法を50種類以上開発
- ◆ 生存率に加え、QOLを重視した治療の日常化

現状

予防

- 家族の病歴や健診等の結果で、発病リスクを推定する
- 禁煙・運動等、効果のある予防法は限定的である

診断

- 画一的な項目を対象とした集団健診で、平均値を指標に健康度を判断する
- 少数のバイオマーカーを、個別検診で利用する
- 病理組織による診断が主流である

治療

- 細胞毒性のある薬剤が中心である
- 外科手術、薬物療法(分子標的薬・バイオ医薬)、放射線療法等、複数の治療法を組み合わせる
- 医薬品の臨床開発に課題が多い

社会環境

- 第3次対がん10か年総合戦略(研究事業)
- がん対策基本法
- がん対策推進基本計画
- がん情報サービス
- 健康増進法

技術開発

① サロゲートマーカーの開発

- ◆ 正常組織も対象とした、多型解析を含むゲノム・エピゲノム解析
- ◆ ゲノム・エピゲノム情報等に基づくサロゲートマーカーの開発

② 早期がん病変の性質解明と検出

- ◆ 早期がん病変及び、がん細胞の特異的性質(転移、浸潤、がん幹細胞、細胞形質転換等)の生物学的機構の解明
- ◆ がん細胞及び免疫状態のモニタリング・イメージング技術の開発

③ 豊富かつ適切な治療法の選択

- ◆ がんの特異的性質を標的とした画期的医薬品及び治療法(がんワクチン、核酸医薬、予防薬、遺伝子・細胞治療、再生医療等)の開発
- ◆ ファーマコゲノミクスのマーカー開発

- ◆ 社会・政策的対応・支援の強化
- ◆ 新薬開発のスピードアップ

将来像

<エビデンスに基づく予防>

- ゲノム・エピゲノム情報等を統合し、リアルタイムに発病危険性を判定できる
- 危険性に応じた健康管理(生活習慣・食品・薬剤等)により、発症が予防できる

<超早期診断>

- 血液等のサロゲートマーカーが充実し、簡単に診断できる
- イメージング技術等により、超早期から病変が確認され、組織観察に依存せず治療の判断ができる

<個別化医療>

- 早期発見と治療法の充実により、完治するがんが大幅に増加する
- がんの病態や体質に加えて、QOLや経済性も考慮し、各個人に最適な治療が受けられる
- 治療に伴う苦痛が軽減され、社会復帰までの時間が短縮する
- 失われた臓器の機能回復など、一部のがんで再生医療が始まる

予防

診断・治療

創薬・診断分野の技術マップ(1/4)

	健 常	発 症	治 療
①ヒト臨床情報・サンプルのバンキング			
健常人を含めたヒト臨床サンプルの効率的収集と、バンキングシステム	臨床サンプルバンクの整備、高精度なサンプルの解析法		
	ヒト細胞製造・培養技術	iPS細胞研究	
	ヒト病態を忠実に再現できる動物モデル、病態プロセスモデルの開発		
前向きコホート研究・大規模臨床データベースと、インテリジェントな情報処理基盤技術	疾患と生活習慣に関するコホート研究		
	バイオインフォマティクス(統計・疫学的解析手法等)とデータマイニング技術		
	臨床研究データに基づくシミュレーションツールの開発		
	疾患の特異的性質の解明		
②ヒト生体機能のモニタリング			
ゲノム、エピゲノム情報等の統合的解析	ゲノムワイド解析などを用いた網羅的遺伝子解析		
	エピゲノム情報等の変化の網羅的解析		
	バイオインフォマティクス・データマイニング技術による統合的解析手法		
実用的バイオマーカー、サロゲートマーカー	生活習慣(食事・運動量)バイオマーカー開発		
	簡便でリアルタイム計測可能なバイオマーカー測定機器開発		
	超早期診断のためのバイオマーカー・測定機器開発		
	発症リスクバイオマーカー開発		
	合併症発症リスクバイオマーカー開発		
イメージング技術(画像診断技術)の向上と、多様な生体機能のモニタリング技術	時系列 in vivo 1細胞計測技術		
	体液バイオマーカーの検査技術		
	異常などを早期から評価できるイメージング技術		
	高感度機能画像検査法		
	小型・簡易なゲノム・エピゲノム測定装置		
	ヒトを対象とした病態解明、薬効評価のためのツール開発		
③エビデンスに基づく創薬診断			
エビデンスに基づく予防・診断・治療の新たな方法と医薬の開発による選択肢の拡大	リアルタイムなリスク診断に基づく予防薬・予防法		
	薬物動態、薬力学、ファーマコゲノミクス解析技術		
	再生医療による治療法		
	エビデンスに基づく分子標的薬(抗体医薬)		
	核酸医薬		
	免疫療法		
	遺伝子治療・細胞治療法		
	疼痛緩和薬		

創薬・診断分野の技術マップ(2/4)

アルツハイマー病技術マップ

	健 常	発 症	治 療
①メカニズム解明に向けた基礎研究			
病態解明のためのツール開発、及びヒトの病態を忠実に再現できる動物モデルの開発		ヒトを対象とした病態解明、薬効評価のためのツール開発 動物モデル・病態プロセスモデルの開発	
大規模臨床データベースの構築・解析と、疫学をベースとした前向きコホート研究	コンピュータを利用した臨床心理学的試験法	ヒト脳バンクの整備と、剖検脳試料の高精度解析法 AD初期病変に対応した臨床心理検査の開発	
②早期診断による早期治療への展開			
血液などを用いたAD特異的バイオマーカーの開発		髄液中のアミロイドβ, tauなどADバイオマーカーの開発 尿・血液等由来のADバイオマーカーの開発 AD特異的体液バイオマーカーの測定装置・イメージング技術 ゲノムワイド解析などを用いた網羅的遺伝子解析	
微量のアミロイド、神経回路異常を高感度に検出する機能画像検査法の開発	神経回路異常等を早期から検出するイメージング技術	微量アミロイドを高感度に検出するイメージング技術 脳血流、脳萎縮のイメージング技術	
③認知機能維持・回復のための治療			
新規作用機序を持つ医薬品の開発	糖尿病などADリスク疾患の治療法	AchE阻害剤など対症療法 セクレターゼ阻害剤やアミロイドβ・tau免疫療法など根本治療薬 脳特異的な薬物送達(DDS)技術 幹細胞を利用した神経細胞再生医療	
エビデンスに基づいた統合的医療と評価法の開発	遺伝子検査等によるAD発症リスク評価	臨床研究データに基づくシミュレーションツールの開発 認知機能を維持・回復させるコンピュータ支援プログラムの開発 ITを活用した生涯健康管理データの蓄積と活用	

創薬・診断分野の技術マップ(3/4)

糖尿病 技術マップ

	健 常	発 症	治 療
①健康管理と予備軍の発症予防			
リアルタイム生体情報モニタリングと、遺伝・環境要因等多数の情報を扱うデータマイニングに基づく健康管理法	発症リスクバイオマーカーの開発 生活習慣計測マーカーの開発 糖尿病と生活習慣に関するコホート研究 バイオインフォマティクス・データマイニング技術		
ゲノム・エピゲノム情報等を統合したインテリジェント創薬による予防薬	アディポネクチン上昇薬（体重減少模倣薬） 基礎代謝上昇薬（運動模倣薬） カロリー制限模倣薬	血管病に向かうプロセス制御薬	
実用的サロゲートマーカー測定機器	各種パラメータ計測法(ゲノムワイド、パーソナルゲノム解析、生活習慣等) 次世代臨床検査機器、個別診断機器 時系列 in vivo 1細胞計測技術		
②合併症リスクの発見			
合併症リスク診断の有効なバイオマーカーの開発	簡便でリアルタイムに計測可能な生活習慣(食事・運動量)バイオマーカー・測定機器	合併症発症リスクバイオマーカーの開発	
動脈硬化等合併症リスクの簡便な診断技術	リアルタイム・非侵襲計測技術 パーソナルゲノム等を活用した診断機器 頸動脈エコーの自動測定		
③合併症の予防と治療			
インテリジェント創薬等による糖尿病及び合併症治療薬の開発	インテリジェント創薬(多数のパラメーターを統合) DDS技術	再生医療・遺伝子治療 β 細胞移植 腎再生誘導・線維化抑制技術 脂肪細胞の形質転換制御 AGE(終末糖化産物)除去技術	

創薬・診断分野の技術マップ(4/4)

がん 技術マップ

	健 常	発 症	治 療
① サロゲートマーカーの開発			
正常組織も対象とした、多型解析を含むゲノム・エピゲノム解析	バイオインフォマティクス、システム生物学		
	多型解析を中心としたゲノム解析		
ゲノム・エピゲノム情報等に基づくサロゲートマーカーの開発	超早期診断も可能なサロゲートマーカーの開発		
	個人に最適ながんスクリーニングマーカーの開発		
② 早期がん病変の性質解明と検出法			
早期がん病変及び、がん細胞の特異的性質(転移、浸潤、がん幹細胞、細胞形質転換等)の生物学的機構の解明	頻度の高いがんのリスク解析		
	遺伝性腫瘍の遺伝子診断		
	がん細胞の特異的性質解明(転移、浸潤、がん幹細胞など)		
がん細胞および免疫状態のモニタリング・イメージング技術の開発	リアルタイムの発がんリスク診断装置		
	個人に最適ながんリスク自己診断システム		
	がん細胞および免疫機能のモニタリング・イメージング技術		
③ 豊富かつ適切な治療法の選択			
がんの特異的性質を標的とした画期的医薬品及び治療法(がんワクチン、核酸医薬、予防薬、遺伝子・細胞治療、再生医療等)の開発	発症リスクに合わせた予防薬・機能性食品		
	がん本態解明に基づく分子標的薬		
	浸潤転移等を抑制する免疫療法(ペプチド療法等)		
	核酸医薬		
	遺伝子治療・細胞治療		
	DDS		
	がん幹細胞を標的とした創薬・iPS細胞研究		
	再生医療		
			がん疼痛緩和薬
ファーマコゲノミクスのマーカー開発	ファーマコゲノミクスのマーカー		
	ファーマコゲノミクスによる治療法の有効性、安全性評価法		
	がん細胞の特性に基づいたがんの個別化医療		

事前評価書

事前評価書

	<table border="1" style="margin: auto;"> <tr> <td style="padding: 2px;">作成日</td> <td style="padding: 2px;">平成 17 年 10 月 6 日</td> </tr> </table>	作成日	平成 17 年 10 月 6 日
作成日	平成 17 年 10 月 6 日		
1. 事業名称 (コード番号)	個別化医療の実現のための技術融合バイオ診断技術開発(染色体解析技術開発)		
2. 推進部署名	バイオテクノロジー・医療技術開発部		
3. 事業概要	<p>(1)概要：近年ゲノム解析技術の進展により、数十万から数百万塩基対に及ぶゲノム染色体上の構造異常(増幅、欠失、転座等)が存在し、癌や遺伝疾患などの疾患と密接に関係していることが示唆され、診断法や治療薬開発への期待が高まっている。</p> <p>本プロジェクトではこうした染色体構造変化を高感度、高精度かつ迅速、安価に検出するアレイ技術および解析機器の基盤技術開発を行うとともに、疾患と染色体構造変化の相関などの臨床情報に基づいた解析技術の有用性の実証を行い、これらの基盤技術に基づいた個別化医療に適用する診断用機器の開発に取り組む。</p> <p>(2)事業規模：平成 18 年度事業費 9.0 億円</p> <p>(3)事業期間：平成 18 年度～22 年度(5 年間)</p>		
4. 評価の検討状況			
<p>(1)事業の位置付け・必要性</p> <p style="margin-left: 20px;">事業の位置付け</p> <p>本プロジェクトは、健康・安心プログラムの一環として実施されるものである。プログラムの目標である「国民が健康で安心して暮らせる社会の実現」に向け、達成すべき重要な課題の1つとして、個々人の体質に合わせた個別化医療による効果的・効率的な医療の実現が掲げられている。個別化医療を実現する上で不可欠となる技術開発を、我が国が強みとする微細加工技術等との融合により推進し、癌や遺伝疾患などに関係するゲノム染色体上の構造異常を高感度、高精度かつ簡便、迅速、安価に解析することが可能となり、個別化医療の実現に寄与する。</p> <p>ゲノム染色体構造と疾患の関係を解明する研究は近年始まったばかりの研究分野である。そのため解析装置や要素技術の開発についても未だ発展途上の段階であり、その開発はリスクが高いため、国が主導して研究開発を実施する。また、企業が本研究開発の成果を活用して実用化する際は自己負担等により実用化研究を実施する。</p> <p>また、本プロジェクトは、技術戦略マップ(平成 17 年 3 月経済産業省策定)のライフサイエンス分野「創薬・診断分野」における、個別化医療の実現に向けた技術のうち、波及効果が高く、QOL(生活の質)の向上に資する技術、及び日本の強みが活かせる技術であり、画期的な医薬品・診断技術の開発に資する技術に位置付けられる。</p>			

事業の必要性

近年ゲノム解析技術の進展により、数十万から数百万塩基対に及ぶゲノム染色体上の構造異常（遺伝子増幅、欠失、転座等）が存在し、癌や遺伝疾患などの疾患と密接に関係していることが示唆され、診断法や治療薬開発への期待が高まっている。こうした染色体構造変化を高感度、高精度かつ高効率に解析する機器開発が必要であるが、そのためには数万～十数万塩基対の精度で全ゲノム領域をカバーする高密度アレイの開発や、アレイ解析プロセスに最適な高輝度物質の開発等による高感度化といった基盤技術課題の克服が必要である。また、研究用途から癌の悪性度診断などの臨床応用への展開が期待されているものの、再現性の確保や解析システムの簡便化、時間短縮や低コスト化のための技術開発が必要である。

(2)研究開発目標の妥当性

<目標>

- ①ヒト全染色体を数万～十数万塩基対の精度で解析可能な高精度アレイおよび解析機器を開発する。
- ②臨床サンプルの解析により染色体構造解析技術の診断応用の有用性の実証を行いながら、実用化レベルの診断機器を開発する。具体的には、微量DNAサンプルで24時間以内に染色体異常の検出を可能にする全自動解析システムを開発する。

<妥当性>

NEDO POST2 やワークショップ等で意見聴取し、妥当性について更なる検討を行う。

(3)研究開発マネジメント

公募を行い最適な研究開発体制を構築する。プロジェクトリーダーを選定し、プロジェクトリーダーと協議して研究管理を行う。また、研究開発委員会を年2～3回開催し、研究テーマ間の連携強化、進捗状況を踏まえた予算配分・事業計画の策定を行う。プロジェクト開始後3年目に中間評価を行い、その評価結果を踏まえ事業全体を見直す。

(4)研究開発成果

- ①ヒト全染色体を対象とした高精度ゲノムアレイおよび解析機器・システムの実現
疾患と染色体構造変化の相関を高感度、高精度に解析することが可能な基盤ツールが開発される。
- ②ゲノム染色体解析法による新たな診断機器の実現
染色体構造変化を解析する診断機器の開発により、個別化医療の実現に供する。

(5)実用化・事業化の見通し

基盤技術として開発するゲノム染色体上の構造異常を高感度、高精度かつ迅速、安価に解析できるアレイ技術を活用し、癌の個性診断や遺伝疾患の診断等に関する個別化医療実現に向けた機器の実用化を図る。

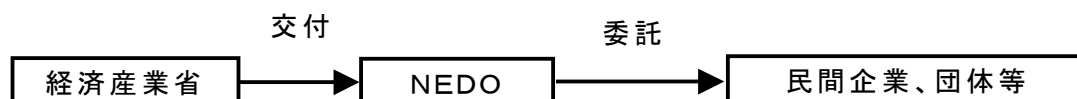
(6)その他特記事項

5. 総合評価

本プロジェクトは個別化医療を実現する上で不可欠となる技術開発を我が国が強みとする微細加工技術等との融合により推進する事業である。本プロジェクトの成果により、癌の悪性度診断や予後診断、遺伝疾患の診断など個別化医療の実現に大きく寄与することが期待できる。

基盤技術として開発する高精度ゲノムアレイは国際的な産業競争力を有する技術として有効性が高いと考えられる。

事業のスキーム図



事前評価 NEDOPOST2



個別化医療の実現のための技術融合バイオ診断技術開発(染色体解析技術開発)

研究目的

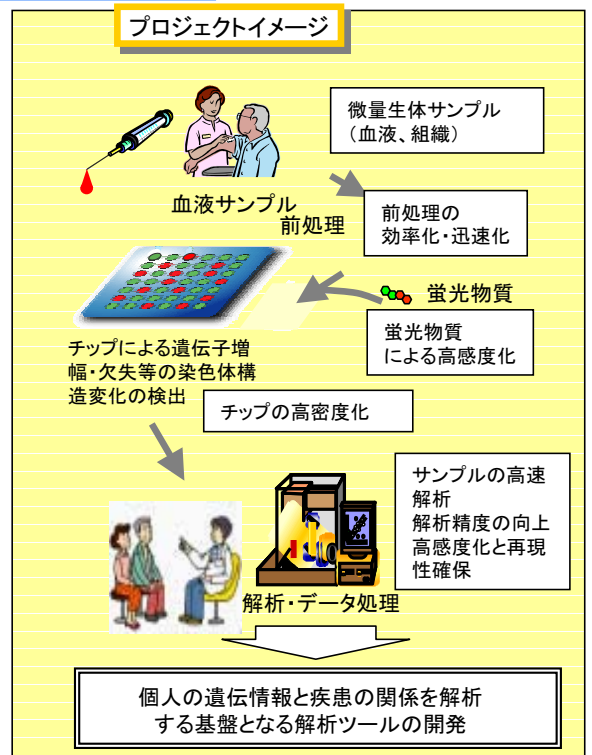
背景、目的、必要性(政策的位置付け、市場ニーズ、技術ニーズ)

- ①背景：急速な少子高齢化が到来し、個別化医療の実現が求められている。他方、近年ゲノム解析技術の進展により、数十万から数百万塩基対に及ぶゲノム染色体上の構造変化(遺伝子増幅、欠失、転座等)が存在し、癌や遺伝疾患と密接に関係していることが解りつつあり、診断法や治療薬開発への期待が高まっている。
- ②市場ニーズ(目的)：個別化医療の実現に向け、個人の遺伝情報等の診断の重要性の増大と診断市場の拡大が予想されている。
- ③技術ニーズ：診断分野等への展開を図るための染色体構造変化(増幅、欠失、転座等)を解析する解析機器の性能の飛躍的な向上、疾患と染色体構造変化との関係に関する知見の一層の充実、我が国が強みとするナノテク技術とバイオテクノロジーとの融合

技術戦略マップ上の位置付け

「創薬・診断分野」の個別化医療の実現に向けた技術のうち、波及効果が高く、QOL(生活の質)の向上に資する技術、及び日本の強みが活かせる技術であり、画期的な医薬品・診断技術の開発に資する技術に位置付けられる。

その他関連図表



研究内容

- 研究開発課題(目的達成のための技術課題)
 - ・染色体構造変化を高感度、高精度かつ迅速、安価に検出するアレイ技術および解析機器の開発。
 - ・具体的課題としてはチップの高密度化、サンプルの前処理の効率化・迅速化、検出感度の向上、低コスト化、再現性の確保。
 - ・個別化医療に適用する診断用機器の実用化に向けた解析システム開発及び臨床サンプルを用いた解析技術の有効性の実証。
- キーテクノロジー、ブレイクスルーのポイント、オリジナリティ(課題を解決するためのポイントおよびその現状)
 - ①ナノテク技術とバイオテクノロジーとの融合によるヒト全染色体を数万～十数万塩基対の精度で解析可能な高精度アレイ技術。
 - ②疾患と染色体構造異常の関係に関する臨床データに基づき、解析技術の有効性を実証。
- 目標値(技術水準)とその条件および設定理由(根拠)
 - ・ヒト全染色体を数万～十数万塩基対の精度で解析可能な高精度アレイ及び解析機器の開発。
 - ⇒ゲノム染色体構造と疾患との関係を解明する研究として国際競争力を獲得できる技術レベルであること。
 - ・微量DNAサンプルで24時間以内に染色体異常の検出を可能にする全自動解析システムの開発。
 - ⇒臨床現場のニーズに合致し、医療経済の側面から実用化に適合すること。

プロジェクトの規模

○事業費と研究開発期間(目安として)

18年度事業費 9.0億円, 研究開発期間5年

＜個別化医療の実現のための技術融合バイオ診断技術開発 (染色体解析技術開発)＞

投稿No.28

2005/11/15 (火) 23:44

現在遺伝子診断が具体化している分野に染色体異常による白血病の判定がある。しかし、これは現状では女工哀史のように、多くの女性専門職が毎日常時顕微鏡をのぞいて判断している現状がある。一方、今後のがん診断では、ますます染色体異常による判別の領域が広がりを見せるものと思われるが、検査ツールが顕微鏡では自ずと出口の隘路により、その普及が制限を受ける状態にある。このような状態においてCGHの登場は、顕微鏡をのぞいて判定するという労働集約的な、且つ属人的なスキルから診断工程を開放するものである。

一方、CGHの普及という面では、臨床現場でも検査が可能となれば更に普及に加速がつくと思われるが、その場合にはサンプル調整から検出まで全自動化システムが必須である。即ち、プラットフォームが全自動化されることにより、今までの労働集約的且つ属人的スキルから開放された染色体検査が臨床現場で可能となる。

他方、CGHにて診断できるコンテンツは現在さほど多くはなく、染色体で判定できるプリミティブ且つロバスタな系が多くの疾病コンテンツを対象に可能となるならば、今後の遺伝子診断に大きな可能性をもたらすものとなる。

具体的には、多くのがんが染色体異常を来していることは周知の事実であり、それを日本人のBACライブラリーを構築することにより日本人特有の染色体異常によるCGHチップが出来れば、上述の全自動CGH検査システムとバンドル化することにより、がんの臨床現場での簡便、廉価確定診断システムが実現でき、医療のEBMに大いに貢献すると思われる。

投稿No.27

2005/11/15 (火) 23:42

「個別化医療の実現のための技術融合バイオ診断技術開発(染色体解析技術開発)」について私どもで考えていることを書かせていただきます。

私どもの研究室では約8年前から癌と染色体異常の関連について当初画像解析の立場からCGHに関する研究を開始しました。CGHは1992年にKallioniemiが米国カリフォルニア大学サンフランシスコ校UCSFの研究グループと開発した手法で、従来解析できなかった固形癌の染色体異常を全染色体領域にわたって解析することができる優れた方法であった。この方法は現在染色体CGHと呼ばれているが、染色体番号の同定(核型分析 karyotype analysis)が難しいこと、数十Mbの大きな異常しか検出できないことから、広く使われるには至らなかった。

その後1997年にドイツ癌研のLichter、1998年に米国UCSFのGreyらが分裂中期染色体の代わりにヒトゲノムプロジェクトで用いられたバクテリア人工染色体BACを使ってCGHを行うことを提唱した。この方法はアレイCGHと呼ばれているが、染色体CGHに比べて染色体番号を読む必要がないこと、BACを高密度にスポットすることにより高解像度の解析ができることから、大きな期待が寄せられた。またこの手法は別途DNAチップとして発達した手法が援用できることも大きなメリットであった。

アレイCGHは解析対象が安定なDNAであることからmRNAを逆転写したcDNAを解析する発現解析より安定な結果を得ることができる。特に染色体異常に起因する疾患であることが確立している癌の

染色体解析に大きく寄与することが期待される。

アレイ CGH は研究として進展し、有用性が認められる段階に来ているし、診断・治療・創薬への期待も大きい。しかし現時点で誰もが使える技術ではないことから、実用化のためには技術として確立することが最重要課題であろう。また根幹となる BAC についても、全世界的に民族による疾患の罹患率の違い、薬剤感受性・副作用、治療法の違い等が問題になってきていることから、民族差を捉えられるものである必要がある。このためには公的な日本人 BAC ライブラリーを作成し、誰もが使えるように整備すべきである。見方によっては公的日本人 BAC ライブラリーは国として守るべきゲノム資産であり、安全保障に匹敵するものと考えられる。

アレイ CGH は優れた方法ではあるが、万能ではないことは事実である。染色体の増幅および欠損には極めて有効であるが、転座などは検出できない。また極めて小さい異常を検出することはできない。したがって診断等に有用な技術とするためには、BAC アレイ CGH で全染色体領域を出来る限りの精度で解析し、見出された異常部位をたとえばオリゴアレイで詳細に解析するような双方の長所を生かした技術開発が望ましい。癌のような大規模な染色体異常が集積する疾患には BAC ゲノム CGH は極めて有用であろう。テクノロジーとして実用化できる技術開発を目指して頂きたいと思います。

投稿No.26

2005/11/15 (火) 23:31

本プロジェクトは、急速に進む少子高齢化に対応した個別化医療の実現のために、ゲノム情報や遺伝子情報を基盤とした疾患の新しい診断や治療法の開発を目標としており、臨床現場での早期実現化が求められている領域と考えられます。

そのためには、ナノテクノロジーとバイオテクノロジーを融合した革新CGHアレイ技術やラボオンチップなどの新規検出技術とインフォマティクスとの融合による情報処理技術の開発と同時に、医療機関からの質の高い臨床検体および患者情報を融合させることが重要と考えます。

特にCGHアレイによる疾患特異的なゲノム構造変化の探索から生物学的に意義のある分子マーカーや臨床応用により近い分子マーカーの同定、さらには臨床現場での実用化のためには、臨床現場との強い連携体制の構築、ならびに疾患トランスクリプトーム／プロテオームDBを保有する研究機関によるゲノム／RNA／タンパク質からの多面的な統合解析が必要と考えています。

他方、数万レベルから十数万塩基対の精度でゲノム構造変化を全染色体にわたり網羅的に検出するためには、高精度、高感度化が重要となります。特に医療現場において疾患の早期かつ確実な診断がQOL向上に繋がることから、本プロジェクトにおいても対象とする疾患(ニーズ)の選定、およびわが国発の高感度、かつ高精度な検出ツール・システムの確立と同時に、検査診断に有効なアレイタイプやラボオンチップタイプに代表されるツール・システムの実用化が重要と考えます。

投稿No.25

2005/11/15 (火) 23:33

本プロジェクトが染色体を対象とするならば、エピジェネティクスもそのスコープに入れて頂きたいと思えます。

がんの発生に関しては、メチル化異常が原因のひとつであることが解明されつつあり、今後のがんの確定診断や予後診断においては避けて通ることの出来ない分野であることは周知の通りです。

しかしながら、メチル化異常の検出に関しては、研究用のキットが出ているものの、臨床用に適用する



には余りにもプロトコールが煩雑で、到底使用できるものではありません。

つきましては、メチル化異常を臨床現場で簡易に廉価に、しかも精度よく分析できるシステムを開発することは、今後のがんの遺伝子診断を実現化していく上で非常に重要なテーマであると思われますので、是非この染色体を対象とするプロジェクトスコープに、染色体異常のCGHのみならず、染色体のメチル化異常であるエピジェネティクスも含めて頂きたく、お願い致します。

投稿No.24

2005/11/15 (火) 21:51

1塩基対レベルのSNPからはじまって、数万から数百万塩基レベルのCNP、遺伝子増幅、欠失、転座や、さらには塩基やヒストンなどへの修飾によるエピジェネティックなものまで、様々な階層での染色体における構造変化が癌や遺伝性疾患などと深い関わりを持つことが知られるようになっていきます。個別化医療の実現を視野に入れて、これらの疾患に対する診断法・治療薬の開発が緊急の課題になっており、まさにタイムリーなプロジェクトと思われます。

本プロジェクトでは、人種差を考慮した我が国独自のBACライブラリーを作成構築し、高密度化したチップの作成、高感度な検出系の確立、ならびにサンプル調製から検出・解析までの自動化をめざしていると思われます。

すでにいくつかの投稿で指摘されていますように、日本人固有の遺伝情報を標準化することは、今後の我が国における医療高度化のためには不可欠と思われます。他省庁とも連携も含めて、NEDOプロジェクトとして挙国体制で進めていくべき課題だと思われます。

しかし一方で研究開発目標としてあげられている、高精度アレイや解析機器の開発ならびに全自動解析システムの開発については、すでに実験ツールレベルでは実現しており、これらの臨床応用を目指した再現性の確保・自動化・低コスト化などの課題は、国が主導するよりも、民間企業で実用化研究開発を進めた方がより効率的にすすめられると思われます。

問題はこれらの実験ツールのほとんどが日本オリジナルのものでない、または日本オリジナルのものは国際競争力がない、ということではないでしょうか？

我が国の強みであるべき、ナノテク技術とバイオテクノロジーとを融合させて、日本発の国際競争力のある解析技術・機器の開発研究をすすめることも、本プロジェクトの一部に加えるべきであると思います。

また、臨床現場の参画等により実際の病理検体を使用した研究開発を進めるなど、プロジェクト終了後の実用化がスムーズにすすむような研究体制・制度の確立も考慮していただきたいと思います。

投稿No.23

2005/11/15 (火) 17:06

医療業界に従事している立場から、また医療を受ける立場から意見させて戴きます。ポストゲノムシーケンス研究が叫ばれてから数年が経過していますが、実際に現場の医療にダイナミックに反映される研究成果がなかなか創出されていないのが現状の様です。フェノタイプに直結するはずのタンパク質の機能だけでは解明できない新たなパスウェイの存在が大きく影響しているのが原因のようです。個別化医療にはSNPsに代表されるように従来のゲノム研究をベースとした成果を医療に結びつける作業を促進する必要性を感じます。DNAのメチル化やアセチル化などのエピゲノム研究が今後のキーを握っていると推測します。しかしこれまでエピジェネティクスに関連する大きなプロジェクトが稀有であり、



この研究を促進する意味でもこのプロジェクトの果たす意義は大きいのではないのでしょうか。個別化に関しては広くは人種差の問題が挙げられていますが、内在する問題は広範であると考えます。プライベートな話で恐縮ですが、双子を持つ親の立場から見ますと、これ程までに相同性のある個体でありながら明らかに病気や薬に対する挙動が異なっているようです。この差異解析にターゲットिंगすることが個別化医療への近道であると感じます。このプロジェクトはゲノムワイズな研究の再定義付けとして、また、疾病の根本要因の個別化を探索する研究として非常に着目しております。

投稿No.22

2005/11/15 (火) 16:32

本プロジェクト概要を読ませて頂きましたが、染色体解析技術そのものはすでに過去のものであると強く感じます。高密度 DNA マイクロアレイや大規模大量シーケンスが可能なパイロシーケンス技術がすでに世の中に出ていることを考えると、本プロジェクトのフォーカスすべき点は、必ずしも正確でない遺伝子配列で構成された BAC クローンを用いる染色体解析技術ではなくて、例えばポストゲノムプロジェクトの中でも非常に重要な DNA メチル化機構の解析、及びその新規解析法の開発ではないかと思えます。本プロジェクトの成果が臨床現場で応用される場合であっても、患者が診断結果を待てるのは 2 時間以内と考えますので現在のプロジェクト構想では個別化医療実現化には程遠い内容と思われる。本プロジェクトの重要性は大変よく理解できますが、NEDO プロジェクトのような大型国家プロジェクトとして推進し成果を海外にも発信するためには、過去の技術の組合せが中心となるのではなくて新規 DNA メチル化解析法等も含めた新しい技術開発内容を取り込む必要があると思えます。

投稿No.21

2005/11/15 (火) 13:49

これまで造血器悪性腫瘍の染色体分析により、疾患特異的な染色体転座が知られており、その切断点から癌化に関与する遺伝子が同定されてきた。しかし、固形悪性腫瘍の染色体分析は困難を極めていたことから、CGH法、あるいは現在ではアレイCGH法というモダリティーが開発され、特定のゲノム領域の増加、減少、増幅やホモ欠失等の様々なゲノム異常が同定され、その領域内に存在する、癌化や悪性度の獲得に関与する遺伝子が同定されるようになってきている。現在はそのアレイの解像度が高密度化し、遂に全ゲノムを隙間無くカバーするBACコンティグをアレイ化したものが実用可能な状況となった。このような高解像度アレイを用いることにより、同一疾患内でのゲノム異常パターンに基づくサブセットの設定が、より信憑性のあるものとなることが期待される。また、サブセットそれぞれに対し、トランスクリプトーム、プロテオーム解析を統合することで、各サブセットが示す臨床生物学的特性への理解が深まるとともに、ひいては、それぞれのサブセットに対し、分子生物学的に合理的な治療法や治療薬の開発がなされることが期待される。つまり、疾患の個別化医療がより現実的なものとなるものと期待される。この統合解析が極めて重要となってきており、生物情報医学統計学の専門家との共同研究により、合理的解析システムの開発と確立が、非常に重要であると考え。そういった意味でも、まず、より再現性の高い、より高解像度なアレイの実用化が求められる。一方で、人種特有のゲノム多型の存在が知られている。人種固有のBACライブラリーから作製された日本人用CGHアレイが開発されると、ゲノム多型をゲノム異常として誤って認識されることが避けられるため、それ以降の各種データ解析が、より信憑性の高いものとなることが期待される。以上より、再現性の高いクローンのコンティグを搭載することが技術的に可能となった現在、さらに高品位なCGHアレイを得るためには、日本



人種特異的なBACライブラリーを確立することが、極めて重要であると考えます。さらに、医学、工学、産業各分野が統括され、より信憑性のある解析が押し進められる体制が少しでも早く確立されることに大きな期待感をもっている。

投稿No.20

2005/11/15 (火) 11:59

本プロジェクトは「染色体解析技術開発」の中でも遺伝子欠失と増幅を調べるための「診断用装置」の開発とあります。遺伝子欠失と増幅はがんでは最も重要な遺伝子変化ですので、その遺伝子変化がどのように進行度・予後に効いているかを調べるのが研究者にとって大きな課題です。本プロジェクトでは機器開発が目標とありますが、むしろ基礎研究としてがんの遺伝子欠失と増幅を調べるのが重要ではないでしょうか。その結果、臨床現場では、必ずしもアレイCGHを使って診断する必要性はなくなり、タンパク質の発現を組織免疫染色と in situ hybridization ISHで検査することになります。実際ハーセプチン療法では、HER2 タンパク質をターゲットにしているので HER2 タンパク質の発現を調べます。現在体外診断用医薬品として実績があり、検査ができるまでの時間も組織免疫染色は3時間と短いので第一の選択肢となります。偽陽性を考えるとISHで確認する方がいいと思われれます。いずれにしてもコスト、時間を考えて将来技術的な革新があったとしても(同じターゲットで数が増えたとしても再現性など考慮して)アレイCGHを検査で使用する可能性は低いのではないのでしょうか。アレイCGHを診断・創薬ターゲットとしての対象遺伝子の重要性がしめされることで大きなインパクトが期待されると思います。その場合はすでに複数のメーカーから実用化されているアレイがそろってきたので役立つと思います。現在2社のゲノムアレイを使用していますがデータ解析でツールがないことが課題になってます。タイリングアレイなどと比較してBACアレイの長所についてはよくわかりませんので何かしらの説明が必要ではないでしょうか。

投稿No.19

2005/11/15 (火) 11:14

この分野においては、日本が欧米諸国のみならず近隣アジア新興国に比べても非常に遅れを取っており、これからの需要が大幅に増加する見込みがあることを考えると、このような技術の開発は非常に重要である。特に、現在限られた施設のみで施行されている染色体構造解析を一般化するのに大いに役立つものであると期待される。

しかしプロジェクトの概要書を見る限り、いくつかの疑問を感じる。このような全ゲノムの構造解析は未だ探索の域を出ておらず、データを蓄積していかななくてはならない段階である。現在の標準的手法では2~3日に結果を出すことが出来るが、このような検査の性質を考えると24時間以内に結果を出すために努力をする必要は無いのではないかと。ベッドサイドでこのような検査が必要な例は未だ無い。ゲノムサイエンスの進歩の早さを考えると、近い将来このような必要性が出てくるという考えもあろうが、将来に通用する技術を考えるのであれば数万~数十万塩基対の精度は低すぎるのではないかと。これは既にBACアレイとして諸外国で一般的に市販されており、研究レベルでは一般的に使用されている。単なる追従に終わる可能性がある。ベッドサイドでの応用は全probeではなく病気に応じたsubsetを搭載したシステムが適しているであろう。発現アレイであるがイレッサの効果判定システムなどは良い例である。

それよりも、新たなシステムが国外の技術に対して優位に立つためには、BACアレイよりも解像度の高



いシステムであることは前提として、特色のある解析が可能である事が必要であると思われる。すなわち、コピー数解析のみならず、LOH解析や、ゲノムのメチル化解析、ヒストンのメチル化やアセチル化の解析、なども行うシステムを目指すべきである。これらは、1遺伝子のプロモータ領域を検出する解像度が必要であり、目標としている解像度をあげても良いと思われる。これらの解析はoligonucleotideアレイで可能であることが示され始めているため、新たなシステムがこれに対応できなければ諸外国に後塵を拝する状況は変わらないのではないかと。全く新たな技術を開発するか、むしろ既に存在しているplatformに対して、新たな解析を可能とするプロトコルの作成、プローブの設計、管理システムの開発などの点で知的財産権を確立していく方が有用であると思われる。

投稿No.18

2005/11/15 (火) 7:53

癌をはじめとする多因子疾患の原因究明は医学研究の急務である。ゲノムプロジェクトが終了したことで、ヒトの蛋白発現遺伝子が約23000個同定され、cDNAマイクロアレイ解析により、多くの疾患特異的発現プロファイルが明らかにされ診断・治療に莫大な知見をもたらしてきている。一方DNAゲノム変異も従来より多因子疾患の原因として重要であることが明らかにされており、染色体数の変異、遺伝子・染色体の欠失、増幅、少数の塩基単位の欠失・挿入、単一塩基変異、あるいは遺伝子多型が研究のターゲットとなる。

近年、単一塩基変異、あるいは遺伝子多型については高速・大量処理のシーケンス技術、あるいはゲノムDNAアレイの開発により、ヒト疾患における変異が次第に明らかにされ始めている。特に治療薬剤感受性についてはEGFR(上皮性増殖因子)のキナーゼドメイン突然変異が治療薬グリベックの効果に劇的な変化をもたらすことがわかり、特に肺癌治療への個別化医療に大きく役立っている。すなわち、治療効果がないことが予想される患者への無用のグリベック投与を防ぐことが可能となり(1)効果のない患者への副作用(重篤な肺合併症)を防ぐこと、(2)国民総医療費の軽減(グリベックを初めとする分子標的薬剤は高価である)が可能となるためであり極めて重要である。

一方癌における遺伝子・染色体レベルの欠失、増幅は従来より知られてはいたが、適当な解析手段がなかったため、体系的・包括的研究は漸く開始されはじめたにすぎない。癌におけるこのレベルの遺伝子欠失、増幅(数10Kb～数100Kb)は予想以上に多彩、複雑であることが明らかにされ始めている。臨床切除腫瘍においてもその変化は著しく、しかも臓器に応じた個性が明らかにされ始めている。数10Kb～数100Kb単位の遺伝子欠失、増幅を体系的・包括的に探索する手段として最も優れているのはBACアレイを用いた全ゲノムスキャンである。最近ゲノム構成には人種・民族による多型が存在することが次第に明らかになっているが、日本人の癌を検索する場合、日本人由来の染色体・ゲノムを用いたBACアレイの整備は必須であろうと考えられる。

我々の研究室では従来からインフォームドコンセントを得たのち外科的に切除された腫瘍由来のDNA・RNAサンプル各臓器数百検体保管して解析を進めてきた。更に癌に対する個別化医療を実現するためにRNA・蛋白解析とともに、DNAゲノム解析も同時に進め、多層的な解析を進めたいと常々考えてきた。しかしながら日本人由来の染色体・ゲノムを用いたBACアレイは一研究室レベルで作成できるものではなく、国家的プロジェクトのもとに、質の高い製品を供給されることが望ましい。特にアレイの品質管理と供給のためには多施設研究をまとめた上位機関の存在が必須である。



個別化医療を実現するために、是非とも公的機関による日本人BAC ライブラリーの整備を希望したいと考えるものである。

投稿No.17

2005/11/14 (月) 23:13

今回の NEDO のプロジェクトは、ゲノム科学の臨床応用を目指した大型の開発研究という点で、投稿ログも併せ、大変興味を持って読ませていただきました。近年のアレイ解析技術の進歩を背景として、悪性腫瘍や先天性異常症におけるゲノムの異常を分析する次世代のシステムを開発すること、そのための政府の施策は大変に重要です。しかし、残念ながら、計画案に示されている現時点の構想については、展望と将来性を欠いたものであると感じております。また、BAC アレイを用いた CGH が議論されていますが、これについては、世界的な見地からすれば、すでに時代の要請ではありません。近年汎用されつつあるオリゴヌクレオチドプローブを用いたアレイ解析システムの優越性は以下の多くの点でゆるがぬところであると認識すべきです。

- 1) オリゴヌクレオチドを合成の集積技術の向上は著しく、次年度には 1 千万プローブ/アレイを越えようとしている。
- 2) SNP タイピング用に開発されたアレイを用いて既に、計画の目的以上の解析性能が達成・凌駕されている。
- 3) 2)のシステムは極めて単純なシステムとして既に薬剤代謝に関わる SNP のタイピングを標的として Roch により欧米での臨床使用への認可が得られており、今後大量生産により非常なコスト低下が実現される。
- 4) オリゴアレイでは、癌の 80%を占めるコピー数変化を伴わない LOH やアレルの不均衡までも詳細に検出可能。
- 5) オリゴアレイに限らず、BAC アレイによるゲノム解析自体も、基本的なアレイ解析部分の特許の多くは Affymetrix 社に押さえられている。

このような状況で、性能・コストの点でおとる BAC アレイのシステムが、先行した Affymetrix/Roch のシステムを凌駕して、標準のシステムとして受け入れられるということは大変難しいであろうと思われます。加えて申し上げますと、この開発の目的として重要なのは、日本人の BAC ライブラリーの作成、24 時間以内に解析できること、染色体分析のアレイ版ではなく、まして「臨床現場で解析できる」ことでは決してありません。

本プロジェクトで取り組むべき課題は、実用化を視野にいれた、(1)新たなアレイ集積技術の開発、および(2)より多様なゲノムの異常を検出することが可能なアレイ解析システムの開発、および(3)独創的な塩基配再決定技術の開発です。国際戦略上最も重要なのは(3)ですが、もっとも現実的なのは(2)でしょうか。プローブ設計(プロセッサでいえば”論理回路”)とこれを用いた解析技術(“software”)に関わる知的所有権も重要な標的ですが。また、これらの一連のアレイの開発で、コピー数の解析以上に重点を置く必要があるのは、染色体転座の解析および点突然変異の解析であります。これらの異常こそ、病型を決定し、分子標的療法開発の標的となることが多数の例で示されているにもかかわらず、現時点では網羅的な解析の手段の及ばない課題であるからです。これらは、高密度オリゴプローブを用いたアレイにより理論的に可能ですが、BAC アレイでは現実的には解析不可能な技術です。DNA やクロ

マチンの修飾に関わる異常の解析技術も重要ですが、これらは、より空間分解能に優れるオリゴヌクレオチドプローブの使用が必然の選択です。

まことに僭越ではありますが、我が国が今後数十億円の税金を投入するプロジェクトとて世界の趨勢を踏まえ、5年、さらに10年先を見通した開発計画が立案・遂行されることを切に願う次第です。

投稿No.16

2005/11/14 (月) 22:59

私は、以下の理由により、今後のわが国ががんの分野で貢献できることの一つとして、Array CGH のわが国での利用に向けての取り組みをお願いしたいと思います。

現在私は、胆道がんの基礎研究を海外の研究者との共同で行っております。

予後の極めて不良な胆道(胆嚢・胆管)がんの発生頻度は高齢化社会を迎えた我が国をはじめ、アジア諸国でも発生率が高いことが知られてきました。わが国での2015年における胆道がんの発生は、臓器別では男性では8位、女性では6位と予測されています。

一方、胆道がんの早期発見は困難で、医療技術の進歩した我が国でも大多数は進行がんの状態で見られることが多い現状です。このため、切除困難症例が多い上に、胆道がんは間質成分が多くがん細胞成分が少ないため培養株樹立が困難であり、良好な条件下で調整された十分量のDNAや良質のRNAを必要とする遺伝子生物学的研究の対象とされ難かった経緯があります。また、胆道がんは西欧社会での発生頻度が低く、遺伝子生物学的解明の進んだ大腸がんや膵がんなどとは異なり、遺伝子生物学をリードした西欧諸国でもこの方面の研究は少ない。このため、胆道がんの遺伝子生物学的研究は立ち遅れが顕著であり、アジアを代表する我が国の研究者がアジアの研究者とともにこの課題に取り組む意義は大きいと考えます。

胆道がんにおいても他の部位のがんのように多くの染色体変化がおきることはよく知られていますが、染色体のどの部位の変化がどのような臨床データと関連するかはいまだはっきりしません。従来は、ゲノムの構造変化(DNAコピー数の変化)をComparative Genomic Hybridization(CG H)法により調べ(CG HではDNAコピー数の増加は、遺伝子の増幅を示し、CG HではDNAコピー数の減少は、遺伝子の欠失を示す)てきました。いくつかの知見を得ていますが、臨床症状との関連を突き詰めるためには、より詳細な染色体上のDNAの構造変化を調べる必要があります。その方法は、最近開発されつつあるarray CGH(アレー・ゲノム比較ハイブリダイゼーション)法であり、DNAコピー数の変化を染色体の細部にわたって調べるものであり、どのような遺伝子の増幅または、欠失が、がんの成因にかかわっているかを明らかにできる可能性が出てきたといえます。原因遺伝子にたどり着く目安が出来たとはいえる画期的な技術だと思われま す。この技術を是非公開して多くの基礎及び臨床研究者が使うことが出来るようになることが期待されます。特に、公的ライブラリーとして整備し、公開するなど、このようなゲノム資産は国として確立すべきと考えます。癌の研究においても民族間の違いが課題となると思いま す。

投稿No.15

2005/11/14 (月) 22:22

個別化医療の実現をめざした本プロジェクトには、現在の医療現場でその必要が叫ばれていることもあり、非常に関心を寄せています。

DNAチップをベースにした遺伝子診断システムの開発は、個別化医療の実現に大きく貢献するものと



考えます。

しかし、そのベースとなるBACライブラリーは日本人由来のものである必要があるのではないのでしょうか。というのも疾患感受性には個人差だけでなく、人種差があることが指摘されているからです。日本における医療レベルの向上を考慮したとき、人種差を無視した個別化医療にどれだけ意味があるのでしょうか。

欧米のデータを参考にすることはあっても、やはり最終的には日本人のライブラリー、データで日本人のための個別化医療をめざす、そういうプロジェクトであって欲しいと考えます。この点を考慮し、プロジェクトを遂行されることを望んでおります。

投稿No.14

2005/11/14 (月) 14:56

18年度新規研究開発プロジェクト案概要を興味深く拝見しました。疾病の診断学を、「従来の疾病かどうか、良性か悪性かを知る診断」から「治療法決定の診断」へと、根本的に転換することを視野に入れた高い目標を掲げた意欲的なプロジェクトと感じました。近年の癌の分子標的薬剤で重要なものの多くはゲノムレベルでの変化に起因した分子変化を標的としています。例えばc-erbB-2(HER-2)増幅乳癌に対するハーセプチン、EGFR点突然変異やコピー数増多を有する非喫煙者の分化形肺腺癌に対するイレッサ、染色体相転座t(9;22)を持つ慢性骨髄性白血病に対するグリベックなどです。実際に癌は、様々な臓器で様々な種類の細胞から生じ、その性質や悪性度に応じて様々なゲノムの変化を持ち合わせています。したがって、癌の分子標的治療、治療個別化を進めていくには、わが国で開発された現有のアレイCGH技術をさらに飛躍的に発展させ、実用化に持っていくと共に、多くの癌や遺伝疾患においてゲノム構造解析を展開し様々なゲノム変化の知見を充実させ、整理統合していくことが欠かせません。具体的には、国際標準BACライブラリーを用いたより密度の高いチップの開発、より高速、精密度で再現性の高いアレイCGHスクリーニング技術と解析法の改良、アレイCGHで同定したゲノム構造変化の迅速な解析法の工夫などがあり、一方で、更に多くの遺伝性疾患や癌の種類を網羅して様々なゲノム変化を見いだして解析し、ゲノム構造変化の知見のデータベース化、体系化を行うことが必須と思われます。これらの研究の展開によって、個々の疾患や癌に特異的なゲノム変化に対応する分子治療標的の発見が飛躍的に促進され、ナノテクノロジーとの合体によって分子標的薬の創薬につながり、我が国の当該分野での国際的競争力が高められるものと期待されます。

遺伝病の病型や癌細胞の構造とゲノム構造はよく対応し、病理形態診断学とゲノム診断学はよく対応することが明らかになってきました。後者の利点はいうまでもなく具体的な治療方針決定に役立ち、更に治療開発研究にも直接つながることです。一方で、現時点でのゲノム診断学は、体系化が十分とはいえ、病理形態診断学に比べるとまだまだ知見の集積、整理が不十分と思われます。これまでの研究成果に加えて、一層速度、精度を高めたCGHアレイ技術を基にしてより幅広い疾患を対象にゲノム構造変化に関するデータが体系化されれば、新しい診断学を形作るためのプラットフォームを形成できると考えます。近い将来に病理診断学に匹敵する、治療に直結したゲノム診断学が実用化され、オーダーメイド医療が飛躍的に促進されることを望みます。

投稿No.13

2005/11/14 (月) 10:20

染色体解析技術は古くは、光学顕微鏡下での染色体バンド解析から綿々と続く基礎的な技術であり、



ゲノムとは異なる背景を持つ。

近年の分子生物・遺伝子工学技術はヒトゲノムプロジェクトの急速な展開により計り知れない情報が得られるようになった。染色体解析技術は伝統的な染色体解析の手法にゲノム技術を導入したことにより、現在まさに急展開を見せている。

産業界から見ても、染色体に起因する疾患の定量的解析、確定診断および個別化医療に極めて有用と考えられることから、期待が高い。しかしこれまでのゲノム技術が十分な技術的課題を解決しないまま、医学主導で進められ、混乱を引き起こしている。産業としてこの染色体解析技術に関する施策を行うのであれば、技術的に確立した上で進めることを期待する。また産業化の観点から知財にも十分な配慮をはらうべきである。これらを配慮して次の点が重要と考える。

1. 日本人のBACライブラリーとそれを搭載した診断用チップ

現在市販され広く利用できるBACライブラリーとBACチップは「米国で作られたもの（人種特定不能）」と韓国で作られたのもである。

しかし、個別医療を考えた時「SNPs」が問題になる。

はたして、「アメリカで作られたもの」「韓国で作られたもの」で日本人特有のSNPsを反映しているのか？という疑問がわいてくる。

実際に、肺がんのイレッサの効き目に「民族間の違い」が発見され、欧米人と東洋人に民族的違いがあることが明らかとなってきている。

ということは、「日本人に特有な変異」を発見する為には「日本人のBACライブラリー」が不可欠という結論に達する。

当然、そのライブラリーを利用した「BACチップ」で染色体の異常を測定すべきである。

2. BACライブラリーの所属

これは、「国の財産・日本民族の財産」として扱うべき性格のものであり、国として責任をもって整備し、一般意公開すべきと考える。例えば、細胞バンク、遺伝子バンク、組織バンクと同列の国としての位置づけがされるべきである。

保存の為の経費は、国が負担し、利用するには「倫理規定等」十分に審査をした後、出荷すべき性質のものとする。

3. 技術的確立

特に米国のチップは異変を定量的に検出できる水準にないことが、染色体解析技術の進展を止めている。アレイCGHはDNAレベルの解析のため、mRNAレベルの解析を行うcDNA発現解析よりはるかに再現性のある結果が得られることが期待される。Affymetrix社の言いなりで技術的検証をしないままに発現解析を行った徹を踏むことのように、技術的確立を行うことが産業界からの期待である。

以上、3点を踏まえてプロジェクトを推進する事が重要と考える。

投稿No.12

2005/11/11 (金) 8:04

ヒトゲノムの解析が非常に進んでいるにも関わらず、医療現場で実用化されているヒト遺伝子検査は検査全体から見ると限られています。技術的には遺伝子発現解析、SNP(一塩基多型)解析、シーケンス解析が先行していますが、単一遺伝子疾患の検査を除きますとそれらの解析は汎用的な遺伝子

検査に実用化する上でハードルが高いと言えます。

一方、ゲノム構造異常の解析は現状では染色体検査として臨床検査の分野で定着していますが、これらの手法を用いた微細構造異常の検出は困難です。近年の CGH (comparative genomic hybridization) アレイ技術の進展はゲノム微細構造異常の解析を実現し、さらには個別化医療のための診断技術となる可能性を秘めています。CGH アレイを用いた染色体異常症候群の検査は実用化の段階に至っていますが、米国に先駆けてより優れた診断システムを提供するためには日本でチームを結成し民間企業、大学、研究所、医療機関が連携して取り組む事が必須であると考えます。

さらに、癌の分野では個別化医療実現のために癌組織のゲノム微細構造変化の解析は必須であり、抗癌剤耐性、癌の悪性度、予後、転移可能性等多くの情報を提供できる事は疑う余地がありません。各項目に関する研究論文が発表されており、それを検査に実用化するためには CGH アレイを用いた臨床データの蓄積、臨床データのスコアリング化、判定基準作製、精度管理等を実現させる必要があります。これも個々の企業の取り組みでは膨大な内容であり実現は困難です。本プロジェクトは研究成果の出ている本技術を実用化へ持っていくために最適な内容と言えます。

今後、高齢化社会を迎え医療費が増大する状況を考えますと、本プロジェクトで提案されている染色体微細構造変化の解析技術を進展させ臨床検査に実用化する事は個別化医療を実現させる事に繋がり、その結果、患者の QOL の向上、治療率の向上をもたらし、その経済効果は極めて大きいと予想されます。

投稿No.11

2005/11/10 (木) 21:48

現在、ゲノム解析技術の進展により、数十万から数百万塩基対に及ぶゲノム上の構造異常が存在し、癌や遺伝疾患などの疾患発生に関与していることが示唆され、これらの疾患の診断法や治療薬開発への期待が高まっています。さらに、近年進められているゲノム構造異常解析の過程で、数万から数百万塩基対レベルでのコピー数多型(CNP)をはじめとするゲノム構造多型があることも明らかにされ、その意義、特に疾患との関連の解明が待たれるところです。

このため、本プロジェクトに掲げられる染色体解析技術の開発は、現在すぐにでもはじめられるべき非常に重要な課題であると思われれます。

このようなゲノム構造異常の解析は、未だ、技術的にも、コストの面でも、high-throughput 化が困難な状態にあります。近年の SNP 解析技術の進歩による疾患関連多型の解明とその結果を基盤とした予防を含めた個別化医療の推進の流れを考えると、染色体構造変化あるいは異常のもつ「意味」を明らかにしようとする場合、現在研究レベルで行われている解析技術ではとうてい不可能です。解析の自動化と高速化は、コスト削減にもつながり、短時間で大量のサンプルを処理することにより大量のデータを得ることが可能な環境を作らなくてはならないでしょう。わが国の得意とするロボット技術、ナノテクノロジーをはじめとする様々な技術を集約することで現在よりはるかに低いコストと短い時間での解析を達成出来る可能性があり、またしなくてはなりません。もちろん、より小さな変化を捉える技術(数100-数1000塩基)やゲノムアレイを用いた応用解析法(タンパク非コード領域の機能の探索など)といったものを同時に考えていくことで付加価値を高めていくことも、重要な要素になる可能性があります。いずれにしても、新しい染色体解析システム開発は、研究的な側面のみならず臨床応用に直結する側



面をもっており、しかもその達成は短時間で必ずやり遂げられるべきことですから、今回のようなプロジェクトで取り上げられるにふさわしいものです。

ゲノムアレイ開発に用いられる BAC クローンのライブラリーについては、RP11 を用いることには商業的な問題が生じる可能性があります。しかし、一方で様々なデータの比較などの局面を考えると、シーケンスに耐える品質であったことが証明されており、公共のデータベースとの対比が保証されている世界標準である点で、このライブラリーの使用こそが望ましいとも考えられます。もちろん、日本人特有の CNP の検出の可否は、ライブラリーが日本人由来であるかどうかには依存するのではなく、たとえば日本人特有に高頻度に存在する多型などは日本人特有の BAC の使用によって逆に検出できなくなる可能性もあります。このため、RP11 の使用の可否が十分調査された上で、どのライブラリーを使うことが現段階で最もいいのかは慎重に決められるべきと考えます。

投稿No.10

2005/11/10 (木) 19:05

平成18年度新規プロジェクト(案)を拝見いたしました。私は大学病院の呼吸器外科医として肺癌の治療と研究にたずさわる者ですが、これまでの肺癌に対する外科治療の臨床経験から強く感じていたことに、肺癌の個性ということがあります。貴プロジェクトの中で、特に研究課題(個別化医療の実現のための技術融合バイオ診断技術開発(染色体解析技術開発))が、この問題の解決に有力な手がかりを与えてくれるのではないかと期待しているところであります。ご存知の通り、現在では肺癌も他臓器の癌と同様に、TNM因子で分類され、病期が決められています。しかしながら、この分類では早期癌であっても、手術を受けたのに肺癌死する患者は決して稀ではありません。

また、抗癌剤治療でも放射線治療でもその感受性には個体差が大きいことを臨床医は気付いております。腫瘍細胞そのものviability、あるいは生体側の腫瘍の発生に寛容な環境、などなど、さまざまな個体の因子が大きな役割を握っていることが想定されています。この観点から、肺癌治療も個別戦略が不可欠ですが、現在過渡期にある分子標的治療から、本当のテーラーメイド医療に引き上げるために、是非とも日本人の遺伝子ライブラリーの整備が必要と考えております。これまで医学情報のほとんどは輸入でありました。しかし、今話題のイレッサと肺癌についても実は大きな人種差があることが解ってきています。しかしながら、こうした研究はいくら背伸びしても一大学では推進させることができません。是非ともNEDOのプロジェクトとして実現し、日本人を癌から守るための基盤をつくっていただきたいと心から願っております。

投稿No.9

2005/11/10 (木) 16:31

平成18年度新規プロジェクト(案)を一通り拝見しましたが、特に本研究課題(個別化医療の実現のための技術融合バイオ診断技術開発(染色体解析技術開発))に強い興味を引かれました。私は病理医として癌の病理診断や基礎研究に主に携わっています。近年の科学技術の進歩により、様々な予後因子や治療標的マーカーが欧米一流誌に掲載されるようになりましたが、我々の検体で追試してみても同様の結果が得られないことはめずらしくはありません。種々の疾患において人種差があることはよく知られているわけですから、日本における医療水準の向上を考えた場合、欧米の臨床(あるいは研究)データをうのみにするばかりではなく、国家戦略として医学的知見を日本人の遺伝子情報と照らし合わせて再検討できる基盤を作ることが極めて重要であると常々思っていました。そのためには、網羅的



で信頼性の高い”公的日本人遺伝子ライブラリー”を是非とも整備し、一般研究者にも広く使えるようにして欲しいと思います。また同時に解析技術や解析機器をもっと向上させ、簡便で信頼性の高い評価法確立して欲しいと思います。この両者が日本全国の研究者や医療現場に行き渡れば、膨大な量の“日本人に即した医療(医学)情報”が集積可能となり、個別化医療を含め日本における医療水準の大幅な引き上げにつながることは明白です。これはとても一研究所や一大学でできるような話ではなく、医学、工学、企業を統合するような規模の大きなものですが、だからこそ本研究はNEDOのプロジェクトとしてふさわしいと思います。是非とも本研究が実現して欲しいと願う次第です。

投稿No.8

2005/11/10(木) 14:06

本事業は実用化レベルの染色体診断装置の創出を視野に入れた重要なプロジェクトである。バイオテクノロジー、IT技術、光学技術、ナノテクノロジーなど、世界的にみても先端的な知識と技術のある我が国において、民間企業、大学、研究所、医療機関の研究者が磐石の体制で取り組むことによって、個別化医療に資する診断用機器開発の成果が期待できるタイムリーな企画と思われる。

この数年間、ゲノム構造変化を検出するアレイやチップ技術の開発は急速に進んでいます。研究レベルで見ると、これら手法によって癌や遺伝疾患で新しい重要な疾患関連遺伝子が同定されてきています。また、高密度アレイによって、従来法で均衡型染色体転座と判定されていた症例でも転座切断点の微細欠失や重複が見つかり、その頻度も稀でないことも指摘されてきています。癌では高密度アレイを用いた不均衡型転座の切断点の検出が実証されています。このことは、胃癌や肺癌などの複雑な染色体異常の固形癌においても高密度ゲノムアレイ解析によって特徴的な染色体転座が見つかる可能性を示唆するものといえます。

ヒトのゲノム配列も明らかになり、タンパクをコードしないRNAの重要性が問われてきています。この非コードRNAの数はタンパクコード遺伝子のそれよりも遙かに多いことも指摘されています。このような非コード領域のゲノム機能やDNAメチル化、あるいはタンパク質/DNAの相互作用を全染色体レベルで検索する場合においてもゲノムアレイ技術の重要性は益々大きくなります。今後、エピゲノム分野においても汎用ツールとなることが予測されます。

臨床検査として利用されている現在の染色体検査やFISH法の代替・補完検査としてBACアレイが定着するでしょう。精神発達遅滞や自閉症などでも微細ゲノム構造異常が明らかになってきており診断法としてのニーズは非常に大きくなることが予測されます。特にBACクローンはFISH法のプローブとして利用されており、今後、癌や遺伝疾患の診断用にカスタマイズされたBACアレイが近未来医療の標準的診断ツールとして利用されるものと考えられます。アレイ構築用のBACクローンは、現在、ゲノム情報が明らかにされているRPCI-BACが世界標準として利用されています。しかし、RPCI-BACの我が国での商業利用が可能か否か、その条件や制限は不明確です。プロジェクトの企画にあたり、本件に関しては事前の情報収集は必須です。

ヒトゲノムDNAの中に数10キロベースからメガベースレベルの大きなコピー数多型(CNP)の存在がわかってきました。これらとCNPと罹病性の関係は未だ不明であり、SNPs解析に続くテーマと考えられています。今後、高精度ゲノム解析システムを診断レベルにまで実用化するには、日本人のCNPの詳細なデータの収集もシステム開発と両輪で推進すべき重要な課題です。



投稿No.7

2005/11/10 (木) 12:55

現状、DNAチップは、生体サンプルに含まれる数千から数万種にもおよぶ多数の遺伝子を一度に網羅的にしかも比較的簡単に再現性よく測定することができる。その為、ゲノムシーケンス解読後の遺伝子の機能解析、疾患関連遺伝子の同定、創薬ターゲット分子の同定と機能解析、医薬品や化合物の安全性予測研究等に不可欠の技術として遺伝子研究分野で広く使われるようになってきた。また、今後は、遺伝子の違いを事前に調べて、治療効果や副作用の有無を知った上で、個人の詳細な遺伝子情報に合わせた治療を実施する、いわゆる「個別化医療」の実現に大きく貢献するものと期待されている。従って、このプロジェクトで提案されている、再現性の高いDNAチップをベースにした遺伝子診断ツール／システムの開発は、市場ニーズと技術ニーズがうまくマッチした、まさに、個別化医療の実現に向けた最適な提案の一つと言えるだろう。

しかしながら、このDNAチップをはじめ現在検討されている多くの遺伝子診断システムは、サンプルの前処理、ハイブリダイゼーション等反応、反応後の処理の各工程が独立している。その為、現状品は到底臨床現場で使えるレベルではない。さらに、人件費のかかるマニュアル工程が大半で、自動化されていない為、臨床現場での使用時に、ヒューマンエラー、コンタミネーション、あるいは、検体由来するウイルス、細菌等の検査従事者への感染等の危険は避けられない。また、サンプルを採取してから検出までに約60時間要しており、非常に煩雑で臨床現場での使用に課題がある。

このような観点から、今後、研究者だけでなく必ずしも専門技術を要していない臨床現場の担当者が簡便な操作で、短時間でサンプル採取からゲノム染色体の構造変化を検出できるツール／システムの開発が重要になると思われる。さらに、ヒューマンエラーの低減により、データの信頼性も向上するだろう。

また、採取できるサンプル量には限界がある為、微量サンプルで検出できるツール／システムの開発も必要になると思われる。これにより、サンプルを患者等への負担の軽減にもつながると考えられる。

このような背景から、本プロジェクトで提案されている、ヒト全染色体を対象とした高精度DNAチップ及び解析機器、微量サンプルを短時間に染色体異常の検出を可能にする全自動システムを開発することは、今後の個別化医療の実現に向けて非常に有用な技術となるであろう。

投稿No.6

2005/11/10 (木) 11:11

個別化医療の実現に向けて染色体技術を大きく動かさなくてはならない時期に来ている。個別化のステージになれば日本人固有の遺伝子や染色体を対象とせざるをえず、米国の医療戦略から離脱した独自の方針を中心にした研究開発がすすめられるべきである。これまで個別化医療はSNP解析が注目されてきたが、最近このような小規模の変異のみならず、CGH等の大規模変異と疾病の関係が注目されだしている。個々の遺伝子変異では一つの疾病に幾つもの遺伝子変異が関係しておりそれらすべてを見出すのに時間が掛かるといふ点に関して、CGHは遺伝子全体にわたる大規模の変異を見るため疾病との関連が見出しやすいという期待があり、日本としてはSNPのみならずCGHを中心とする解析データの蓄積及びそのための日本人のBACライブラリーの確立が緊急の課題であるとかんがえる。是非この方面も漏れないように開発体制を整えてほしい。



投稿No.5

2005/11/10 (木) 10:41

研究開発課題について

ポストゲノムの有望課題である生活習慣病、癌等の遺伝子診断がようやく実証段階に入った。最終的には個体識別から個体変異検出へと精度化すると予想される。しかし、現在の基盤材料・技術・情報は欧米製であり、日本人にどこまで適用できるか、あるいはその延長でいいのか疑問である。したがって、本課題では、「日本人の個別化医療」に視点を置いた基盤整備・技術開発と臨床情報に基づく有用性の評価が含まれるべきである。

開発目標と水準

本課題は、ヒト全染色体を数万～十数万塩基対の精度で解析できる高密度アレイ、およびその解析機器の開発を目標にしている。ゲノム全体から染色体の部分的増減や転移が検出できるツールの開発は、生活習慣病、癌等、遺伝子疾患の予防診断上の重要であり、その緊急度は高い。

実現可能な技術は、大腸菌人工染色体(BAC)アレイを用いたゲノム比較ハイブリダイゼーション法(CGH)であるが、このためには染色体全域をカバーできる高密度BACアレイの品質と価額が開発、普及の鍵を握る。ただし、現在、日本人の基盤材料・情報がなく、詳細研究や商品化への障害となっている。

先行する米国では、国際ヒトゲノム計画でマップしたRP11・BACライブラリーを用いている。RP11は、米国NIHの依頼で匿名の男性末梢血から作製され、ヒトゲノム全塩基配列決定の時に国際間で供用したライブラリーであるが、米国以外での商業的利用や、民族差、家系識別などへの高度化利用に問題がある。この状況を見越した英国、ドイツ、韓国は、ゲノム計画終了後、自国のBAC作製、マップし、ポストゲノムに備えた。

いずれ必要となるが、この機会に日本人家系で損傷が少ない臍帯血でBACライブラリーを作製、マップし、日本人の知的資源とすべきである。そして、これからの個別化医療のための公的な研究基盤と医療産業の発展へ備えるべきである。日本人は世界にまれな均一民族であり、家系解析や個体識別に成果が得やすい利点もある。

運営体制

BACアレイによるCGHIは、発癌機構解明の集大成と目され、癌の予防診断に期待されている。このために、多くの基礎、臨床研究者が高密度BACアレイの使用を希望しているが、高価であるために断念している。早急に供給体制をつくり、臨床情報に基づいた解析データを集積、評価せねばならない。緊急課題であり、かつ広範、公平に対応するためにも公的な中核管理機構が必要である。

投稿No.4

2005/11/06 (日) 8:54

2003年のヒトゲノムシーケンス完了宣言により、ヒトゲノムを包括的に把握・検査する時代が到来した。ヒトゲノムプロジェクトによってもたらされたゲノムクローン、cDNAクローンを用いることで、より効率的・迅速な研究・診断が可能となってきた。近年、発現解析を出発点とするマイクロアレー研究が、ゲノムDNA解析に応用され、特に最近では、ゲノム解析用マイクロアレー研究が、疾患ゲノム解析の主役の一つとなり、幅広い研究者・臨床医がその有効性を認識し始めている。しかし一方で、依然研究レベル(一部商業化されているが)で用いられているのが現状で、高価な解析機器・開発費を伴い、有用性は

一目瞭然であるにもかかわらず、一般の臨床的な解析に用いられている状況とはほど遠い。本邦でも我々を含む数グループが実働しているにすぎない。現在の研究で示された有用性を鑑みるに、広く用いられるためには商業化・低コスト化が必須であると考えられるが、ヒトゲノム解析でのシーケンスプラットフォームに用いられ研究者間で普及しているRPCI-11 BACライブラリーは、商業ベースでの使用が制限され低コスト化に大きな障害となる。提案されているプロジェクトはこのような背景を踏まえ、実にタイムリーで、将来の個別化医療の実現に必要な不可欠な提案といえる。特に本研究で達成されるであろう、安価で入手可能なゲノム解析用マイクロアレー・解析法が実現されれば、臨床・研究分野での波及効果は計り知れない。現在、多くの人手を有するルーチンの染色体検査を補完・代替する技術として多くの研究所・商業ラボで使用されることは疑いがない。さらに研究での使用も容易になることで、個人レベルで使用が可能になるような、診断・研究用ツールが開発され、個別医療の達成に向けた大きな推進力となるであろう。本研究のターゲットは、ゲノム変化によって惹起される疾患(体細胞性変化による腫瘍性疾患、生殖細胞系列の変化による種々の遺伝性疾患)のみならず、メチル化や機能蛋白付着を伴う変化も対象となり、ゲノムのみならず近年発展のめざましいエピゲノム研究への応用も可能であり、包括的な疾患ゲノム・エピゲノム研究への大きな推進力となるであろう。一方で技術・基盤開発に多大な開発予算がかかるであろうことは容易に想像できるため、事業規模と事業機関も妥当な設定と思われる。

投稿No.3

2005/11/03 (木) 4:06

染色体の構造異常を解析する技術は現在注目されている領域であり、疾患との関連においても重要であります。個人のコピー数多型(CNPと呼びます)は様々なサイズのものがあり、任意の2人を比較した場合に一万塩基から百万塩基のサイズの多型は100箇所以上検出されますし、人種差が存在しますので、将来の個別化医療へ向けて必要な情報であることは間違いありません。

しかるに本プロジェクト(案)が開発する技術の達成目標として挙げられている「数万～数十万塩基対」の解像度のゲノム構造変異の解析ツールはすでに達成されており、研究用としては市場に存在しています。1枚のチップに数十万から数百万種類のDNA(25～85塩基)を合成することにより、染色体コピー数を1本レベルの検出感度において測定することが行われています。さらに一塩基多型(SNP)情報を活用することにより2本の染色体を識別して解析することさえも可能です。これらは臨床へ応用していくことも十分に可能な技術です。現行のシステムの延長として検出感度を含めた反応系については改良の余地は大いにありますが、より革新的な手法の開発が望まれるところです。

現在、求められているのはマイクロサテライトより大きく数千塩基対までの間の構造異常を網羅的に探索する技術です。最近開発された米国ベンチャー企業のシークエンサー技術ではシークエンス解析のコストが2桁下がりました。ショットガンシークエンス法のコストの低下が将来的に実現できれば、百塩基対程度まではチップベースの技術より遙かに正確な情報をもたらすことが期待されます。シークエンス技術の弱点はやや大きな構造的変異の検出です。そこで「百塩基から数千塩基対まで」の構造変異を検出する技術開発こそが期待されることです。

最後に「24時間以内に染色体異常を検出するシステム」という目標については、臨床の現場においてどれだけの必要性が存在するのかがどうか疑問符がつきます。発現情報のような動的に変動する情報



ではありませんので、目標とする24時間以内の解析と現行システムでも実現可能な48時間との間に大きな実用性の相違はないと思われます。現行プロトコールの改良で達成できるのではないかと思います。

投稿No.2

2005/11/02 (水) 10:43

ゲノムの解析が人類にとって重要な課題であることには、誰も異論のないところであろう。ゲノムの高次構造が染色体であり、その異常が、結果か原因かはともかくとして、各種疾患と密接に関係していることも明らかである。疾患とゲノム異常との関係を明らかにすることは、その疾患の発生機序の解明、診断には当然必要なことであり、治療薬の開発にも有用な情報となるであろう。

市場ニーズ(目的)の項に「個人の遺伝情報等の診断の重要性・・・」とあるが、個の医療を課題に掲げている以上は当然のことであろう。この場合に気をつけておかねばならないことは、疾患感受性には個人差があるように人種差も指摘されていることである。人種差がありその人種内で個人差があるということである。人種差を明らかにしない個人差に意味は少ないであろう。今までの日本の研究が欧米追従であったことは、誰にも否定することはできないであろう。日本人のゲノムを解析し、日本人の疾患との関係をこのプロジェクトで如何に実施するのかが、全く言及されていないが、欧米(人)の情報に基づいて日本人の疾患を解析するという愚は犯してはならない。人種差を考慮した研究にしなければ、得られた情報の信頼性を大きく失することになる。

研究内容に、「転座といった染色体構造変化を DNA チップで解析」とあるが、本当に DNA チップでそれが可能なのか、大きな驚きであるとともに大きな疑問が生じる。チップテクノロジーである array-based comparative genomic hybridization (a-CGH)が DNA コピー数異常の検索に利用されているが、転座といった染色体構造異常を解析したという報告は、私の知る限りでは無いし、不可能であろう。今回のプロジェクトにおいて、DNA チップを利用して染色体構造異常を解析するためにどのような技術的ブレイクスルーを用いるのか全く判らない。本当に可能なのであろうか。

投稿No.1

2005/10/29 (土) 8:35

個別化医療の実現のための技術融合バイオ診断技術開発(染色体解析技術開発)についてですが中味は単に「ゲノム解析技術」にすぎず、「染色体解析」というからには、形態的な「染色体」そのものの解析を扱っていないのは片手落ちだと思います。

どちらかと言えば、細胞内構造の可視化技術も格段に進み、後者の重要性の方が高まっているのではないのでしょうか？

「染色体そのものの形態的構造変化」の解析も加えるべきかと思います。

プロジェクト基本計画、実施方針

（健康安心イノベーションプログラム、ナノテク・部材イノベーションプログラム）
「個別化医療の実現のための技術融合バイオ診断技術開発／染色体解析技術開発」
基本計画

バイオテクノロジー・医療技術開発部

1. 研究開発の目的・目標・内容

(1) 研究開発の目的

本研究開発は、創薬に資する基盤技術の開発、再生医療の確立、医療機器・福祉機器の開発等の手段を適切に組み合わせることによって、健康維持増進、疾患の早期診断、及び適切な治療法の提供を実現し、個の医療を通じた健康寿命の延伸、生活の質の向上を図り、今後、成果に類を見ない少子高齢化が進展する我が国において、国民が健康で安心して暮らせる社会の実現をめざすことを目的とする「健康安心イノベーションプログラム」の一環として行う。また、情報通信、ライフサイエンス、環境、エネルギーなど、あらゆる分野に対して高度化あるいは不連続な革新（ジャンプアップ）をもたらすナノテクノロジー及び革新的部材技術を確立するとともに、その実用化や市場化を促進することで、我が国産業の国際競争力の維持・強化や解決困難な社会的課題の克服等を可能とすることを目的とする「ナノテク・部材イノベーションプログラム」の一環として行う。本プロジェクトでは癌や遺伝疾患などに関係するゲノム染色体上の異常を高感度、高精度かつ簡便、迅速、安価に解析するための染色体異常解析技術を開発することにより、個別化医療の実現に寄与することを目的とする。

近年ゲノム解析技術の進展により、数十万から数百万塩基対に及ぶゲノム染色体上の大規模な異常（増幅、欠失等）が存在し、癌や遺伝疾患などの疾患と密接に関係していることが解明され始め、診断分野への応用に対する期待が高まっている。さらに、近年のポストゲノム研究の進展により、タンパク質をコードしない、いわゆる非コード領域を含むゲノム全領域にわたる数万から数十万塩基対の物理サイズにおける染色体異常と疾患の関係が明らかになりつつある。加えて、染色体コピー数多型と疾患の関係が今後のゲノム解析研究において重要となっている。しかし、このような染色体異常を高効率に解析し、診断応用に展開していくためには、性能、コスト等、飛躍的な向上のための技術開発が必要となっている。

本プロジェクトでは、我が国が有する微細加工技術・表面処理技術といったナノテク等の強みを活かし、こうした染色体異常を高感度、高精度かつ迅速、安価で非コード領域までを検出するゲノムアレイや解析基盤技術開発を行うとともに、全自動解析システムの開発を行う。さらに、臨床情報を有する臨床サンプルを解析することにより、ゲノムアレイを用いた染色体異常解析技術の有用性の検証を行い、臨床現場で活用できるバイオ診断機器の基盤を開発することを目的とする。

(2) 研究開発の目標

①最終目標（平成22年度末）

バクテリア人工染色体（BAC）を用いた非コード領域を含むゲノム全領域を検出できる高精度ゲノムアレイを開発し、臨床サンプルを用いて、その有用性を実証する。さらに、臨床現場において、微量サンプル（数ナノグラム）から、12時間以内に染色体異常（増幅、欠失、コピー数多型等）を、低コストかつ定量性・再現性を確保して検出ができる全自動染色体異常解析システムのプロトタイプを開発し、その有効性について臨床サンプルを活用して実証する。[定量的解析精度の目標：1コピーの増減を98%以上の感度と特異性（偽陽性率、偽陰性率がともに2%以下）で検出、再現性の目標：CVが5%以下]

②中間目標（平成20年度末）

DNA標識技術の開発やハイブリダイゼーションの効率化、スキャニング技術の臨床応用に向けた要素技術を開発するとともに、BACを用いた非コード領域を含むゲノム全領域を検出できる高精度ゲノムアレイの開発に目途をつける。さらに、個別化医療診断に活用できる全自動染色体異常解析システムのプロトタイプを開発し、その有用性を確認する。[ハイブリダイゼーション技術の目標：ハイブリ時間が5時間以内、スキャニング技術の目標：3ミクロン以下の解像度、高輝度DNA標識技術の目標：現行の10倍以上の輝度（標識、洗浄及びスキャニ

ングを経て得られる数値ベース]

(3) 研究開発の内容

上記目標を達成するために、以下の研究開発項目について、別紙の研究開発計画に基づき研究開発を実施する。

①染色体異常解析技術開発

2. 研究開発の実施方式

(1) 研究開発の実施体制

① 本研究開発は、独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構（以下、「NEDO技術開発機構」という。）が、単独ないし複数の原則、本邦の企業、研究組合、公益法人等の研究機関（原則、国内に研究開発拠点を有していること。ただし、国外企業の特別な研究開発能力、研究施設等の活用あるいは国際標準獲得の観点からの国外企業との連携が必要な場合はこの限りではない。）から公募によって研究開発実施者を選定後、共同研究契約等を締結する研究体を構築し、委託して実施する。

② 共同研究に参加する各研究開発グループの有する研究ポテンシャルの最大限の活用により効率的な研究開発の推進を図る観点から、独立行政法人産業技術総合研究所セルエンジニアリング研究部門 平野隆主幹研究員、及び東京医科歯科大学・難治疾患研究所 稲澤謙治教授を研究開発責任者（プロジェクトリーダー）とし、その下に研究者を可能な限り結集して効果的な研究開発を実施する。

(2) 研究開発の運営管理

研究開発全体の管理・執行に責任を有する NEDO 技術開発機構は、経済産業省及びプロジェクトリーダーと密接な関係を維持しつつ、プログラムの目的及び目標、並びに本研究開発の目的及び目標に照らして適切な運営管理を実施する。具体的には、必要に応じて設置される技術検討委員会等における外部有識者の意見を運営管理に反映させるほか、四半期に一回程度プロジェクトリーダー等を通じて研究開発の進捗について報告を受けること等を行う。

3. 研究開発の実施期間

本研究開発の実施期間は、平成18年度（2006年度）から平成22年度（2010年度）までの5年間とする。

4. 評価に関する事項

NEDO 技術開発機構は、技術的及び政策的観点から、研究開発の意義、目標達成度、成果の技術的意義並びに将来の産業への波及効果等について、外部有識者による研究開発の中間評価を平成20年度、事後評価を平成23年度に実施する。また、中間評価結果を踏まえ必要に応じプロジェクトの加速・縮小・中止等の見直しを迅速に行う。なお、評価の時期については、当該研究開発に係る技術動向、政策動向や当該研究開発の進捗状況等に応じて、前倒しする等、適宜見直すものとする。

5. その他の重要事項

(1) 研究開発成果の取り扱い

①共通基盤技術の形成に資する成果の普及

得られた研究開発成果のうち、下記共通基盤技術に係る研究開発成果については、NEDO 技術開発機構、実施者とも普及に努めるものとする。

- a)染色体異常データベース等、本研究開発を通じて得られる共通基盤情報
- b)DNA標識技術、高効率ハイブリダイゼーション等の基盤技術

②知的基盤整備事業又は標準化等との連携

得られた研究開発の成果については、知的基盤整備または標準化等との連携を図るため、データベースへのデータ提供、標準情報（TR）制度への提案等を積極的に行う。

③知的財産権の帰属

委託研究開発の成果に関わる知的財産権については「独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構新エネルギー・産業技術業務方法書」第25条の規定等に基づき、原則として、すべて受託先に帰属させることとする。

④成果の産業化

- a) 受託者は、本研究開発から得られる研究開発成果の産業面での着実な活用を図るため、本研究開発の終

了後に実施すべき取り組みのあり方や研究開発成果の産業面での活用のビジネスモデルを立案するとともに、立案した取り組みのあり方とビジネスモデルについて、研究開発の進捗等を考慮して、本研究開発期間中に必要な見直しを行う。

b) 受託者は、上記a)で立案した取り組みとビジネスモデルを本研究開発終了後、実行に移し、成果の産業面での活用に努めるものとする。

(2) 基本計画の変更

NEDO 技術開発機構は、研究開発内容の妥当性を確保するため、社会・経済状況、国内外の研究開発動向、政策動向、プログラム基本計画の変更、第三者の視点からの評価結果、研究開発費の確保状況、当該研究開発の進捗状況等を総合的に勘案し、達成目標、実施期間、研究開発体制等、基本計画の見直しを弾力的に行うものとする。

(3) 根拠法

本研究開発は、独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構法第15条第1項第2号に基づき実施する。

(4) 関連指針の厳守

当該プロジェクトの実施にあたっては、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」(平成13年度文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第1号)等、研究開発関連の指針を厳守しなければならない。また、本研究開発成果の事業化においては、「経済産業分野のうち個人情報を用いた事業分野における個人情報保護ガイドライン」(平成16・12・24 製局第1号)を厳守しなければならない。

6. 基本計画の改訂履歴

(1) 平成18年3月制定。

(2) 平成20年3月改訂。プロジェクトリーダー名の記載。

(3) 平成20年7月改訂。イノベーションプログラム基本計画の制定により、「(1)研究開発の目的」の記載を改訂。

(別紙)研究開発計画

研究開発項目「染色体異常解析技術開発」

1. 研究開発の必要性

近年ゲノム解析技術の進展により、非コード領域も含め、数十万から数百万塩基対に及ぶ染色体・ゲノムの微細構造異常(増幅、欠失等)が存在し、癌や遺伝疾患などの疾患と密接に関係していることが示唆されており、これらの異常を高精度に検出する技術の確立と診断分野への応用に対する期待が高まっている。個別化医療の実現に供するためには、こうした染色体異常を高感度、高精度かつ高効率に解析するバイオ診断機器の開発と実用化が急務の課題となっている。そのためには、十万塩基対以下の精度で全ゲノム領域をカバーする高精度ゲノムアレイの開発や、高輝度DNA標識技術の開発等による高感度化といった基盤技術課題の克服が必要である。また、研究用途のみならず臨床応用へと展開するためには、再現性の確保や解析システムの簡便化、時間短縮や低コスト化の実現のための技術開発が必要である。

2. 研究開発の具体的内容

個別化医療に供する、疾患と染色体異常の検証、診断機器開発を行うため、現状の染色体検査との整合性が高く、また、高感度化や低コスト化への期待が高いバクテリア人工染色体(BAC)を用いたゲノムアレイに着目し、診断応用に必要とされる高感度、高精度かつ迅速、安価といった要求を満たす革新的要素技術の開発を行い、臨床診断用全自動染色体異常解析システムを開発することを目標とする。なお、これらの技術開発を行うにあたり、診断利用の有効性を検証するため、疾患と染色体異常の関係について臨床サンプルを用いた検証を行いながら、研究開発を推進する。

この目標を達成するための研究開発項目は次の通りとする。

(1) BACを用いた高精度全ゲノムアレイの開発

BACを用い、十万塩基対以下の領域での非コード領域を含む全ゲノムの染色体異常(増幅、欠失等)を解析可能な高精度全ゲノムアレイ技術を開発する。

(2) 染色体異常を解析する革新的要素技術の開発

染色体異常解析の診断利用に向け、染色体異常(増幅、欠失等)を微量サンプルで高感度、高精度かつ迅速、安価に定量性・再現性を確保した染色体異常解析を行うためのDNA標識物質の高輝度・低コスト化、DNA標識技術、ハイブリゼーションの効率化、スキャニング技術についての要素技術を開発する。

(3) 臨床診断用全自動染色体異常解析システムの開発

サンプル前処理の効率化・迅速化、検出感度の向上、測定時間の短縮、再現性の向上、低コスト化を図るため、診断用アレイモジュールを開発するとともに、機器性能を飛躍的に向上させ、個別化医療を行う臨床現場で活用できる全自動染色体異常解析システムのプロトタイプを作成し、臨床サンプルを活用して、その有用性を検証する。

3. 達成目標

(1) 最終目標(平成22年度末)

バクテリア人工染色体(BAC)を用いた非コード領域を含むゲノム全領域を検出できる高精度ゲノムアレイを開発し、臨床サンプルを用いて、その有用性を実証する。臨床現場において、微量サンプル(数ナノグラム)から、12時間以内に染色体異常(増幅、欠失、コピー数多型等)を、低コストかつ定量性・再現性を確保して検出ができる全自動染色体異常解析システムのプロトタイプを開発し、その有効性について臨床サンプルを活用して実証する。[定量的解析精度の目標:1コピーの増減を98%以上の感度と特異性(偽陽性率、偽陰性率がともに2%以下)で検出、再現性の目標:CVが5%以下]

(2) 中間目標(平成20年度末)

DNAの標識化技術やハイブリダイゼーションの効率化、スキャニング技術の臨床応用に向けた要素技術を開発するとともに、BACを用いた非コード領域を含むゲノム全領域を検出できる高精度ゲノムアレイの開発に目途をつける。さらに、個別化医療診断に活用できる全自動染色体異常解析システムのプロトタイプを開発し、その有用性を確認する。[ハイブリダイゼーション技術の目標:ハイブリ時間が5時間以内、スキャニング技術の目標:3ミクロン以下の解像度、高輝度DNA標識技術の目標:現行の10倍以上の輝度(標識、洗浄及びスキャニングを経て得られる数値ベース)]

以上

（健康安心イノベーションプログラム、ナノテク・部材イノベーションプログラム）
「個別化医療の実現のための技術融合バイオ診断技術開発／染色体解析技術開発」
基本計画

バイオテクノロジー・医療技術部

1. 研究開発の目的・目標・内容

(1) 研究開発の目的

本研究開発は、創薬に資する基盤技術の開発、再生医療の確立、医療機器・福祉機器の開発等の手段を適切に組み合わせることによって、健康維持増進、疾患の早期診断、及び適切な治療法の提供を実現し、個の医療を通じた健康寿命の延伸、生活の質の向上を図り、今後、成果に類を見ない少子高齢化が進展する我が国において、国民が健康で安心して暮らせる社会の実現をめざすことを目的とする「健康安心イノベーションプログラム」の一環として行う。また、情報通信、ライフサイエンス、環境、エネルギーなど、あらゆる分野に対して高度化あるいは不連続な革新（ジャンプアップ）をもたらすナノテクノロジー及び革新的部材技術を確立するとともに、その実用化や市場化を促進することで、我が国産業の国際競争力の維持・強化や解決困難な社会的課題の克服等を可能とすることを目的とする「ナノテク・部材イノベーションプログラム」の一環として行う。本プロジェクトでは癌や遺伝疾患などに関係するゲノム染色体上の異常を高感度、高精度かつ簡便、迅速、安価に解析するための染色体異常解析技術を開発することにより、個別化医療の実現に寄与することを目的とする。

近年ゲノム解析技術の進展により、数十万から数百万塩基対に及ぶゲノム染色体上の大規模な異常（増幅、欠失等）が存在し、癌や遺伝疾患などの疾患と密接に関係していることが解明され始め、診断分野への応用に対する期待が高まっている。さらに、近年のポストゲノム研究の進展により、タンパク質をコードしない、いわゆる非コード領域を含むゲノム全領域にわたる数万から数十万塩基対の物理サイズにおける染色体異常と疾患の関係が明らかになりつつある。加えて、染色体コピー数多型と疾患の関係が今後のゲノム解析研究において重要となっている。しかし、このような染色体異常を高効率に解析し、診断応用に展開していくためには、性能、コスト等、飛躍的な向上のための技術開発が必要となっている。

本プロジェクトでは、我が国が有する微細加工技術・表面処理技術といったナノテク等の強みを活かし、こうした染色体異常を高感度、高精度かつ迅速、安価で非コード領域までを検出するゲノムアレイや解析基盤技術開発を行うとともに、全自動解析システムの開発を行う。さらに、臨床情報を有する臨床サンプルを解析することにより、ゲノムアレイを用いた染色体異常解析技術の有用性の検証を行い、臨床現場で活用できるバイオ診断機器の基盤を開発することを目的とする。

(2) 研究開発の目標

① 最終目標（平成23年11月末）

バクテリア人工染色体（BAC）を用いた非コード領域を含むゲノム全領域を検出できる高精度ゲノムアレイを開発し、臨床サンプルを用いて、その有用性を実証する。さらに、臨床現場において、微量サンプル（数ナノグラム）から、12時間以内に染色体異常（増幅、欠失、コピー数多型等）を、低コストかつ定量性・再現性を確保して検出ができる全自動染色体異常解析システムのプロトタイプを開発し、その有効性について臨床サンプルを活用して実証する。また、高密度ジェノタイプング情報を付加した日本人の良性および病因CNVデータベースを構築し、次世代型ゲノムアレイコンテンツを開発する。[定量的解析精度の目標：1コピーの増減を98%以上の感度と特異性（偽陽性率、偽陰性率がともに2%以下）で検出、再現性の目標：CVが5%以下]

② 中間目標（平成20年度末）

DNA標識技術の開発やハイブリダイゼーションの効率化、スキャニング技術の臨床応用に向けた要素技術を開発するとともに、BACを用いた非コード領域を含むゲノム全領域を検出できる高精度ゲノムアレイの開発に目途をつける。さらに、個別化医療診断に活用できる全自動染色体異常解析システムのプロトタイプを開発し、その有用性を確認する。[ハイブリダイゼーション技術の目標：ハイブリ時間が5時間以内、スキャニング技術の目標：3ミクロン以下の解像度、高輝度DNA標識技術の目標：現行の10倍以上の輝度（標識、洗浄及びスキャニ

ングを経て得られる数値ベース]

(3) 研究開発の内容

上記目標を達成するために、以下の研究開発項目について、別紙の研究開発計画に基づき研究開発を実施する。

① 染色体異常解析技術開発

2. 研究開発の実施方式

(1) 研究開発の実施体制

- ① 本研究開発は、独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構(以下、「NEDO」という。)が、単独ないし複数の原則、本邦の企業、研究組合、公益法人等の研究機関(原則、国内に研究開発拠点を有していること。ただし、国外企業の特別な研究開発能力、研究施設等の活用あるいは国際標準獲得の観点からの国外企業との連携が必要な場合はこの限りではない。)から公募によって研究開発実施者を選定後、共同研究契約等を締結する研究体を構築し、委託して実施する。
- ② 共同研究に参加する各研究開発グループの有する研究ポテンシャルの最大限の活用により効率的な研究開発の推進を図る観点から、独立行政法人産業技術総合研究所セルエンジニアリング研究部門 平野隆主幹研究員、及び東京医科歯科大学・難治疾患研究所 稲澤譲治教授を研究開発責任者(プロジェクトリーダー)とし、その下に研究者を可能な限り結集して効果的な研究開発を実施する。

(2) 研究開発の運営管理

研究開発全体の管理・執行に責任を有する NEDOは、経済産業省及びプロジェクトリーダーと密接な関係を維持しつつ、プログラムの目的及び目標、並びに本研究開発の目的及び目標に照らして適切な運営管理を実施する。具体的には、必要に応じて設置される技術検討委員会等における外部有識者の意見を運営管理に反映させるほか、四半期に一回程度プロジェクトリーダー等を通じて研究開発の進捗について報告を受けること等を行う。

3. 研究開発の実施期間

本研究開発の実施期間は、平成18年度(2006年度)から平成23年11月末までとする。

4. 評価に関する事項

NEDOは、技術的及び政策的観点から、研究開発の意義、目標達成度、成果の技術的意義並びに将来の産業への波及効果等について、外部有識者による研究開発の中間評価を平成20年度、事後評価をプロジェクト終了後に実施する。また、中間評価結果を踏まえ必要に応じプロジェクトの加速・縮小・中止等の見直しを迅速に行う。なお、評価の時期については、当該研究開発に係る技術動向、政策動向や当該研究開発の進捗状況等に応じて、前倒しする等、適宜見直すものとする。

5. その他の重要事項

(1) 研究開発成果の取り扱い

① 共通基盤技術の形成に資する成果の普及

得られた研究開発成果のうち、下記共通基盤技術に係る研究開発成果については、NEDO、実施者とも普及に努めるものとする。

- a) 染色体異常データベース等、本研究開発を通じて得られる共通基盤情報
- b) DNA標識技術、高効率ハイブリダイゼーション等の基盤技術

② 知的基盤整備事業又は標準化等との連携

得られた研究開発の成果については、知的基盤整備または標準化等との連携を図るため、データベースへのデータ提供、標準情報(TR)制度への提案等を積極的に行う。

③ 知的財産権の帰属

委託研究開発の成果に関わる知的財産権については「独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構新エネルギー・産業技術業務方法書」第25条の規定等に基づき、原則として、すべて受託先に帰属させることとする。

④ 成果の産業化

- a) 受託者は、本研究開発から得られる研究開発成果の産業面での着実な活用を図るため、本研究開発の終

了後に実施すべき取り組みのあり方や研究開発成果の産業面での活用のビジネスモデルを立案するとともに、立案した取り組みのあり方とビジネスモデルについて、研究開発の進捗等を考慮して、本研究開発期間中に必要な見直しを行う。

b) 受託者は、上記a)で立案した取り組みとビジネスモデルを本研究開発終了後、実行に移し、成果の産業面での活用に努めるものとする。

(2) 基本計画の変更

NEDOは、研究開発内容の妥当性を確保するため、社会・経済状況、国内外の研究開発動向、政策動向、プログラム基本計画の変更、第三者の視点からの評価結果、研究開発費の確保状況、当該研究開発の進捗状況等を総合的に勘案し、達成目標、実施期間、研究開発体制等、基本計画の見直しを弾力的に行うものとする。

(3) 根拠法

本研究開発は、独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構法第15条第1項第2号に基づき実施する。

(4) 関連指針の厳守

当該プロジェクトの実施にあたっては、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」(平成13年度文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第1号)等、研究開発関連の指針を厳守しなければならない。また、本研究開発成果の事業化においては、「経済産業分野のうち個人情報を用いた事業分野における個人情報保護ガイドライン」(平成16・12・24 製局第1号)を厳守しなければならない。

6. 基本計画の改訂履歴

(1) 平成18年3月制定。

(2) 平成20年3月改訂。プロジェクトリーダー名の記載。

(3) 平成20年7月改訂。イノベーションプログラム基本計画の制定により、「(1)研究開発の目的」の記載を改訂。

(4) 平成23年1月改訂。加速予算に伴う実施期間変更及び最終目標の更なる普及に向けた高質化。

(別紙) 研究開発計画

研究開発項目「染色体異常解析技術開発」

1. 研究開発の必要性

近年ゲノム解析技術の進展により、非コード領域も含め、数十万から数百万塩基対に及ぶ染色体・ゲノムの微細構造異常(増幅、欠失等)が存在し、癌や遺伝疾患などの疾患と密接に関係していることが示唆されており、これらの異常を高精度に検出する技術の確立と診断分野への応用に対する期待が高まっている。個別化医療の実現に供するためには、こうした染色体異常を高感度、高精度かつ高効率に解析するバイオ診断機器の開発と実用化が急務の課題となっている。そのためには、十万塩基対以下の精度で全ゲノム領域をカバーする高精度ゲノムアレイの開発や、高輝度DNA標識技術の開発等による高感度化といった基盤技術課題の克服が必要である。また、研究用途のみならず臨床応用へと展開するためには、再現性の確保や解析システムの簡便化、時間短縮や低コスト化の実現のための技術開発が必要である。

2. 研究開発の具体的内容

個別化医療に供する、疾患と染色体異常の検証、診断機器開発を行うため、現状の染色体検査との整合性が高く、また、高感度化や低コスト化への期待が高いバクテリア人工染色体(BAC)を用いたゲノムアレイに着目し、診断応用に必要とされる高感度、高精度かつ迅速、安価といった要求を満たす革新的要素技術の開発を行い、臨床診断用全自動染色体異常解析システムを開発することを目標とする。なお、これらの技術開発を行うにあたり、診断利用の有効性を検証するため、疾患と染色体異常の関係について臨床サンプルを用いた検証を行いながら、研究開発を推進する。

この目標を達成するための研究開発項目は次の通りとする。

(1) BACを用いた高精度全ゲノムアレイの開発

BACを用い、十万塩基対以下の領域での非コード領域を含む全ゲノムの染色体異常(増幅、欠失等)を解析可能な高精度全ゲノムアレイ技術を開発する。

(2) 染色体異常を解析する革新的要素技術の開発

染色体異常解析の診断利用に向け、染色体異常(増幅、欠失等)を微量サンプルで高感度、高精度かつ迅速、安価に定量性・再現性を確保した染色体異常解析を行うためのDNA標識物質の高輝度・低コスト化、DNA標識技術、ハイブリゼーションの効率化、スキャニング技術についての要素技術を開発する。

(3) 臨床診断用全自動染色体異常解析システムの開発

サンプル前処理の効率化・迅速化、検出感度の向上、測定時間の短縮、再現性の向上、低コスト化を図るため、診断用アレイモジュールを開発するとともに、機器性能を飛躍的に向上させ、個別化医療を行う臨床現場で活用できる全自動染色体異常解析システムのプロトタイプを作成し、臨床サンプルを活用して、その有用性を検証する。さらに、本システム開発の一環として、高密度ジェノタイプング情報を付加した日本人の良性および病因CNVデータベース構築情報から、次世代型ゲノムアレイコンテンツを開発する。

3. 達成目標

(1) 最終目標(平成23年11月末)

バクテリア人工染色体(BAC)を用いた非コード領域を含むゲノム全領域を検出できる高精度ゲノムアレイを開発し、臨床サンプルを用いて、その有用性を実証する。臨床現場において、微量サンプル(数ナノグラム)から、12時間以内に染色体異常(増幅、欠失、コピー数多型等)を、低コストかつ定量性・再現性を確保して検出ができる全自動染色体異常解析システムのプロトタイプを開発し、その有効性について臨床サンプルを活用して実証する。また、日本人の良性および病因CNVデータベースを構築し、次世代型ゲノムアレイコンテンツを開発する。[定量的解析精度の目標: 1コピーの増減を98%以上の感度と特異性(偽陽性率、偽陰性率がともに2%以下)で検出、再現性の目標: CVが5%以下]

(2) 中間目標(平成20年度末)

DNAの標識化技術やハイブリダイゼーションの効率化、スキャン技術の臨床応用に向けた要素技術を開発するとともに、BACを用いた非コード領域を含むゲノム全領域を検出できる高精度ゲノムアレイの開発に目途をつける。さらに、個別化医療診断に活用できる全自動染色体異常解析システムのプロトタイプを開発し、その有用性を確認する。[ハイブリダイゼーション技術の目標:ハイブリ時間が5時間以内、スキャン技術の目標:3ミクロン以下の解像度、高輝度DNA標識技術の目標:現行の10倍以上の輝度(標識、洗浄及びスキャンを経て得られる数値ベース)]

以上

平成18年度実施方針

1. 件名：プログラム名 健康安心プログラム
（大項目）個別化医療の実現のための技術融合バイオ診断技術開発
（中項目）染色体解析技術開発

2. 根拠法

独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構法第15条第1項第2号

3. 背景及び目的・目標

(1)背景及び目的

近年ゲノム解析技術の進展により、数十万から数百万塩基対に及ぶゲノム染色体上の大規模な異常（増幅、欠失等）が存在し、癌や遺伝疾患などの疾患と密接に関係していることが解明され始め、診断分野への応用に対する期待が高まっている。さらに、近年のポストゲノム研究の進展により、タンパク質をコードしない、いわゆる非コード領域を含むゲノム全領域にわたる数万から数十万塩基対の物理サイズにおける染色体異常と疾患の関係が明らかになりつつある。加えて、染色体コピー数多型と疾患の関係が今後のゲノム解析研究において重要となっている。しかし、このような染色体異常を高効率に解析し、診断応用に展開していくためには、性能、コスト等、飛躍的な向上のための技術開発が必要となっている。

本プロジェクトでは、我が国が有する微細加工技術・表面処理技術といったナノテク等の強みを活かし、こうした染色体異常を高感度、高精度かつ迅速、安価で非コード領域までを検出するゲノムアレイや解析基盤技術開発を行うとともに、全自動解析システムの開発を行う。さらに、臨床情報を有する臨床サンプルを解析することにより、ゲノムアレイを用いた染色体異常解析技術の有用性の検証を行い、臨床現場で活用できるバイオ診断機器の基盤を開発する。本プロジェクトはこれらの研究開発により個別化医療、すなわち個々人の体質に合わせた医療による効果的・効率的な医療の実現に寄与することを目的とする。

(2)研究開発の目標

①最終目標（平成22年度末）

バクテリア人工染色体(BAC)を用いた非コード領域を含むゲノム全領域を検出できる高精度ゲノムアレイを開発し、臨床サンプルを用いて、その有用性を実証する。さらに、臨床現場において、微量サンプル(数ナノグラム)から、12時間以内に染色体異常(増幅、欠失、コピー数多型等)を、低コストかつ定量性・再現性を確保して検出ができる全自動染色体異常解析システムのプロトタイプを開発し、その有効性について臨床サンプルを活用して実証する。[定量的解析精度の目標：1コピーの増減を98%以上の感度と特異性(偽陽性率、偽陰性率がともに2%以下)で検出、再現性の目標：CVが5%以下]

②中間目標（平成20年度末）

DNA標識技術の開発やハイブリダイゼーションの効率化、スキャニング技術の臨床応用に向けた要素技術を開発するとともに、BACを用いた非コード領域を含むゲノム全領域を検出できる高精度ゲノムアレイの開発に目途をつける。さらに、個別化医療診断に活用できる全自動染色体異常解析システムのプロトタイプを開発し、その有用性を確認する。[ハイブリダイゼーション技術の目標：ハイブリ時間が5時間以内、スキャニング技術の目標：3ミクロン以下の解像度、高輝度DNA標識技術の目標：現行の10倍以上の輝度(標識、洗浄及びスキャニングを経て得られる数値ベース)]

4. 事業内容

(1)平成18年度事業内容

個別化医療に供する、疾患と染色体異常の検証、診断機器開発を行うため、現状の染色体検査との整合性が高く、また、高感度化や低コスト化への期待が高いバクテリア人工染色体(BAC)を用いたゲノムアレイに着目し、診断応用に必要とされる高感度、高精度かつ迅速、安価といった要求を満たす革新的要素技術の開発を行い、臨床診断用全自動染色体異常解析システムを開発することを目標とする。なお、これらの研究開発を行うにあたり、診断利用の有効性を検証するため、疾患と染色体異常の関係について臨床サンプルを用いた検証を行いながら、研究開発を推進する。

この目標を達成するため、以下の研究開発を行う。

①BACを用いた高精度全ゲノムアレイの開発

BACを用い、十万塩基対以下の領域での非コード領域を含む全ゲノムの染色体異常(増幅、欠失等)を解析可能な高精度全ゲノムアレイ技術の開発に着手する。商用利用に供するために必要な条件を明確にし、それに対応できていることとする。

②染色体異常を解析する革新的要素技術の開発

染色体異常解析の診断利用に向け、染色体異常(増幅、欠失等)を微量サンプルで高感度、高精度かつ迅速、安価に定量性・再現性を確保した染色体異常解析を行うためのDNA標識物質の高輝度・低コスト化、DNA標識技術、ハイブリゼーションの効率化、スキャニング技術についての要素技術開発に着手する。

③臨床診断用全自動染色体異常解析システムの開発

サンプル前処理の効率化・迅速化、検出感度の向上、測定時間の短縮、再現性の向上、低コスト化を図るため、診断用アレイモジュールの開発に着手する。機器性能を飛躍的に向上させ、個別化医療を行う臨床現場で活用できる全自動染色体異常解析システムのプロトタイプの様態を決定する。また、臨床サンプルを活用して、その有用性を検証するための体制を整備する。

(2)平成18年度事業規模

一般会計 300百万円(新規)

5. その他重要事項

(1)運営・管理

当該プロジェクトの実施に当たっては、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」(平成13年度文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第1号)等、研究開発関連の指針を厳守しなければならない。また、本研究開発成果の事業化においては、「経済産業分野のうち個人情報を用いた事業分野における個人情報保護ガイドライン」(平成16・12・24製局第1号)を厳守しなければならない。

(2)複数年度契約の実施

平成18～19年度の複数年度契約を行う。

(3)年間スケジュール

平成18年2月下旬・・・部長会

2月下旬・・・運営会議

3月下旬・・・公募開始

4月下旬・・・公募〆切

5月下旬・・・契約・助成審査委員会、採択決定

応募総数が多い場合等、特段の事情がある場合を除き、公募締切から原則45日以内での採択決定を行う。

(注)事業規模については、変動があり得る。

平成19年度実施方針

バイオテクノロジー・医療技術開発部

1. 件名:プログラム名 健康安心プログラム
(大項目) 個別化医療の実現のための技術融合バイオ診断技術開発
(中項目) 染色体解析技術開発

2. 根拠法

独立御製法人新エネルギー・産業技術総合開発機構法第15条第1項第2号

3. 背景及び目的・目標

(1)背景及び目的

近年ゲノム解析技術の進展により、数十万から数百万塩基対に及ぶゲノム染色体上の大規模な異常(増幅、欠失等)が存在し、癌や遺伝疾患などの疾患と密接に関係していることが解明され始め、診断分野への応用に対する期待が高まっている。さらに、近年のポストゲノム研究の進展により、タンパク質をコードしない、いわゆる非コード領域を含むゲノム全領域にわたる数万から数十万塩基対の物理サイズにおける染色体異常と疾患の関係が明らかになりつつある。加えて、染色体コピー数多型と疾患の関係が今後のゲノム解析研究において重要となっている。しかし、このような染色体異常を高効率に解析し、診断応用に展開していくためには、性能、コスト等、飛躍的な向上のための技術開発が必要となっている。

本プロジェクトでは、我が国が有する微細加工技術・表面処理技術といったナノテク等の強みを活かし、こうした染色体異常を高感度、高精度かつ迅速、安価で非コード領域までを検出するゲノムアレイや解析基盤技術開発を行うとともに、全自動解析システムの開発を行う。さらに、臨床情報を有する臨床サンプルを解析することにより、ゲノムアレイを用いた染色体異常解析技術の有用性の検証を行い、臨床現場で活用できるバイオ診断機器の基盤を開発する。本プロジェクトはこれらの研究開発により個別化医療、すなわち個々人の体質に合わせた医療による効果的・効率的な医療の実現に寄与することを目的とする。

(2)研究開発の目標

①最終目標(平成22年度末)

バクテリア人工染色体(BAC)を用いた非コード領域を含むゲノム全領域を検出できる高精度ゲノムアレイを開発し、臨床サンプルを用いて、その有用性を実証する。さらに、臨床現場において、微量サンプル(数ナノグラム)から、12時間以内に染色体異常(増幅、欠失、コピー数多型等)を、低コストかつ定量性・再現性を確保して検出ができる全自動染色体異常解析システムのプロトタイプを開発し、その有効性について臨床サンプルを活用して実証する。[定量的解析精度の目標:1コピーの増減を98%以上の感度と特異性(偽陽性率、偽陰性率がともに2%以下)で検出、再現性の目標:CVが5%以下]

②中間目標(平成20年度末)

DNA 標識技術の開発やハイブリダイゼーションの効率化、スキャニング技術の臨床応用に向けた要素技術を開発するとともに、BACを用いた非コード領域を含むゲノム全領域を検出できる高精度ゲノムアレイの開発に目途をつける。さらに、個別化医療診断に活用できる全自動染色体異常解析システムのプロトタイプを開発し、その有用性を確認する。[ハイブリダイゼーション技術の目標:ハイブリ時間が5時間以内、スキャニング技術の目標:3ミクロン以下の解像度、高輝度DNA標識技術の目標:現行の10倍以上の輝度(標識、洗浄及びスキャニングを経て得られる数値ベース)]

4. 実施内容及び進捗状況

(独)産業技術総合研究所・セルエンジニアリング研究部門・主幹研究員、平野隆をプロジェクトリーダーとして、以下の研究開発項目(1)(2)の研究開発を実施し、東京医科歯科大学・難治疾患研究所教授、稲澤穰治をプロジェクトリーダーとして、以下の研究開発項目(3)の研究開発を実施した。これらにより平成18年度の目標を達成する(一部では超える)成果を得た。

(1)BACを用いた高精度全ゲノムアレイの開発

初年度の平成 18 年度には日本人 BAC ライブラリーの両末端塩基配列解析およびアレイ作製の条件検討を行った。塩基配列解析においては日本人であることがゲノム的に確定した男児臍帯血から作製した平均鎖長 140KB の 33 万クローンの内 10 万クローンについて ABI3730 型キャピラリーシーケンサを用いて今年度および来年度で末端塩基配列解析を行う。オリジナルライブラリーから複製ライブラリーを作製し、振とう培養法により大腸菌クローンの高密度培養を行い、自動核酸抽出装置により人工染色体 DNA の抽出および高度精製を行った。高コストの原因となる DNA 精製用カラムを用いることなく精製が可能となった。DNA の純度の検定を電気泳動により行い、大腸菌由来 DNA 及び RNA の不純物がほとんど含まれていないことを確認した。使用したシーケンサをフル稼働させるため、当初 96 穴プレートにより解析を開始したが、開始後 2 週間で 384 穴プレートによる解析に切り替えた。この切り替えにより一日当たり 2,304 検体の解析が可能となった。

末端解析と同時併行でゲノム物理地図作成を開始するため、T7 片側を優先して解析し、続いて反対側の SP6 側を解析することにした。T7 側の塩基配列を米国 NCBI の公開ヒトゲノム塩基配列データベースに参照することにより、地図の第一次ドラフトを作成することが可能となる。T7 側を優先して解析する前に一部分の DNA について T7 と SP6 両側の解析を行い、両者の結果が同じヒト染色体上に位置することを確認した。DNA が全く存在しないクローン、伸張反応に用いたプロモーター由来 DNA 等の割合は 10% 以下であった。T7 側の 3730 シーケンサによる解析は極めて効率が良く、塩基と判定された解析鎖長はこの装置の限界とされる 900 塩基に達するクローンもあった。平均的な解析鎖長 700 塩基として、前述の一日の処理スケジュールから約 1.6M 塩基の処理が一台のシーケンサで可能であった。

ヒトゲノム地図作成のための解析用のシステムとしてリナックス仕様のワークステーションの立ち上げを行った。この WS には大容量記録装置を並列で併設し、データ及び解析結果の安全な保存を確保した。基本的なデータベースとして NCBI の公開ヒトゲノム塩基配列をダウンロードし、NCBI 及び UCSC の検索ソフトにより T7 地図のドラフト作成に着手した。

BAC アレイ作製の条件検討については、現行のアレイが $2 \times 4,000$ 計 8,000 個を搭載していることから、目標とする 3 万クローンの搭載条件の検討を第一に行った。スポット面積を同じにしてクローン数を約 4 倍にするためには、スポット直径およびスポット間隔を半分以下にすることが必要である。現行 8,000 アレイのスポット直径が約 250 ミクロンであることから、直径 100 ミクロン以下への検討を行った。このプロジェクトの開発目標である CGH 法は各スポットに内部標準があるのでスポット量の厳密さが不要であること、インクジェットあるいはバブルジェット法では一枚数万円とスポットコストが高く、大量の DNA を必要とするこの 2 つの理由から、ピン法によるスポットを採用した。スポット用基板ガラスなどの条件を変えることなく、ピンの選択と DNA の調整を行うことにより、100 ミクロン以下のスポット直径を達成することができた。

(実施体制: (独)産業技術総合研究所)

(2)染色体異常を解析する革新的要素技術の開発

①高精度表面加工修飾技術の研究開発

高配向性薄膜形成技術の開発; ガラス基板上に高配向性の金属膜を成膜し、その上に高分子を介して DNA を結合することにより、配向性を有した安定なアレイを作成することが可能となる。平成 18 年度においては金の高配向性膜の形成のため保有技術の ICP 支援型多重磁極マグネトロンスパッタ技術の改造及び調整を行った。技術優位性の確保のため市販 DNA アレイの基板について調査を行った。

(実施体制: トーヨーエイテック株式会社)

②新規ゲノムアレイ用蛍光標識化技術の研究開発

a) 新規蛍光物質の合成に関する研究開発

平成 18 年度中に 1 種類の新規蛍光物質の合成を行った。

b) 新規リンカーの合成に関する研究開発

標識効率の向上のためには酵素反応で取り込まれ易い新規リンカーの導入が不可欠であることから、今年度プロパギルアミンおよび 6-アミノヘキサン酸を原料としたリンカーを用いて、核酸誘導体 WY-Dye-dCTP を合成した。

c) 酵素による蛍光標識ヌクレオチドの取込みに関する研究開発

WY-Dye-dCTP を様々な反応条件で反応させ、最適条件を検討し、感度がより求められる Cy5 に相当する WY-647 において、Cy5 より取込み率を向上させることに成功した。本蛍光物質について既存の BAC アレイで評価を行い、Cy 系の蛍光標識試薬と比較して正確かつ高感度に染色体異常を検出することが示された。

本成果を基に商品化を行う予定。
(実施体制:和光純薬工業株式会社)

③疾患別アレイハイブリシシステムの研究開発

a)物理的ハイブリシシステムの研究開発

産総研のハイブリ・プロトコルに基づいて開発目的とするアレイに適合するプロトコルの検討を行った。
また要素技術として層流・乱流の物理法則に則した攪拌の基礎技術開発を開始した。

b)深い焦点深度の読取装置開発

臨床診断用に絞り込んだアレイを高感度かつ深い焦点深度で測定する独自の 2 色マルチビーム・ディスク型読取装置の仕様の調査及び検討を行った。要素技術の検討のため 1 色の評価用読取装置の試作を開始した。

(実施体制:横河電機株式会社)

④ゲノム情報と臨床情報の統合化

癌細胞におけるゲノム DNA 変化を解析し、ゲノム変化を明らかにする。研究開発を行い食道がんにおいて、がん特異的に欠失・増幅するゲノム領域を明らかにした。

(実施体制:横河電機株式会社一再委託九州大学)

⑤がん組織バンクの構築と CGH 解析

プロトコルに従い標準化されたヒト検体の保存と処理および組織バンク検体数の拡充を図るため、CGH アレイ解析用細胞検体のバンク登録数拡充を行った。

(実施体制:横河電機株式会社一再委託北海道大学)

⑥疾患別 BAC アレイの設計

DNA コピー数異常について解析し、癌の悪性度、進行度にかかわる変化を抽出するため、消化器がんを中心にアレイ CGH 解析を行い、悪性度、進行度の関連を検討した。

(実施体制:横河電機株式会社一再委託山口大学)

(3)臨床診断用全自動染色体異常解析システムの開発

分散型染色体異常解析装置の開発に着手しサンプル前処理の微量化と迅速化を検討した。その結果、1ng の DNA を用いて 2 時間以内に恒温下で 240 倍に増幅できる事を確認した。さらに、ポリカーボネート製増幅モジュール(日本ガイシ社のパッケージアレイ)を作成し、本反応を検討すると約 30 分で上記の結果を得る事ができた。

一方、集中型染色体異常解析システムの開発のために、DNA の標識・精製に必要な基本仕様を決定し、設計を行い、今年度中に基礎実験用個別テスト機の製作に至る予定である。精製プロセスについては簡略化基本プロトコルを確立した。さらに、ハイブリダイゼーションに関して、その仕様を決定し、機器の設計を行った。今年度中に要素検討用実験機を製作する予定である。

臨床サンプルの解析を目的に Whole Genome Array-4500 と Cancer Array-1500 の作製を進めた。Whole Genome Array-4500 のスポッティングに必要な DNA は予定より早く増幅・作製を終了し平成 18 年度作製分の 600 枚は年度内に完成が見込まれる。Cancer Array-1500 については癌関連遺伝子座の 800 クローンの DNA 作製を終了しており、新規に追加予定の 700 クローンのうち 500 クローンの BAC 精製を終了し、残り 300 クローンにおいても FISH 法による品質確認を終了した。いずれも平成 18 年度内に予定の計画は達成された。一方、これらのアレイを用いて解析するサンプルの臨床検体(腎癌、食道扁平上皮癌)の調製を行った。腎癌について手術後の新鮮凍結標本から直接高品質の DNA を抽出した。食道扁平上皮癌についてはメタノール固定パラフィン包埋標本から薄切、HE染色標本を作製し、顕微鏡下にてレーザー光線による癌細胞のみの分離を行い、微量の DNA 抽出と増幅を行っている。今年度中に各々予定の 50 症例についての DNA 調製を終了する予定である。

ヒト染色体タイリングアレイに搭載する 15,000 種類の BAC DNA を作製するために、東京医科歯科大学で確立された BAC DNA 調製法をトレースし、その操作工程を半自動化するために必要な作業手順を決定した。その作業フローチャートを基にして仕様書を作成し、外注により BAC DNA セミオート調製システムを完成した。本機を用いて BAC DNA の調製を開始する。一方、ヒト染色体タイリングアレイに搭載する 15,000 種類の BAC の構成を決定するために今年度はゲノムデータベースを用いて情報の収集を行なった。本情報を基に、今年度中に BAC の選択を決定する予定である。

(実施体制:東京医科歯科大学、株式会社ビー・エム・エル、株式会社富士フイルム、株式会社日本ガイシ、国立がんセンター)

4. 2 実績推移

	18年度	19年度	20年度	21年度	22年度
実績額推移 一般会計(百万円)	323	416			
特許出願件数(件)	1	2			
論文発表数(報)	1	30			
フォーラム等(件)	1	63			

5. 事業内容

(独)産業技術総合研究所・セルエンジニアリング研究部門・主幹研究員、平野隆をプロジェクトリーダーとして、以下の研究開発項目(1)(2)の研究開発を実施し、東京医科歯科大学・難治疾患研究所教授、稲澤穰治をプロジェクトリーダーとして、以下の研究開発項目(3)の研究開発を実施する。実施体制については別紙参照のこと。

5. 1 平成19年度事業内容

個別化医療に供する、疾患と染色体異常の検証、診断機器開発を行うため、現状の染色体検査との整合性が高く、また、高感度化や低コスト化への期待が高いバクテリア人工染色体(BAC)を用いたゲノムアレイに着目し、診断応用に必要とされる高感度、高精度かつ迅速、安価といった要求を満たす革新的要素技術の開発を行い、臨床診断用全自動染色体異常解析システムを開発することを目標とする。なお、これらの研究開発を行うにあたり、診断利用の有効性を検証するため、疾患と染色体異常の関係について臨床サンプルを用いた検証を行いながら、研究開発を推進する。この目標を達成するための研究開発項目は次の通りとする。

(1) BACを用いた高精度全ゲノムアレイの開発

日本人 BAC ライブラリーの中から 10 万クローンの DNA を増幅精製し、キャピラリーシーケンサにより両末端塩基配列の解析を終了する。この塩基配列解析結果を基にヒトゲノム上の BAC 配列地図の第一次ドラフト作成を行う。また全ゲノムアレイの作製のため DNA の調整および高密度スポットティング法の検討を行う。

(実施体制:(独)産業技術総合研究所)

(2) 染色体異常を解析する革新的要素技術の開発

① 高精度表面加工修飾技術の研究開発

高精度のガラス基板の開発; 現行のガラス基板がミクロンレベルの粗さがあるが、当社固有の技術である高精度金型を用いた転写成型によりナノレベルの粗さの基板作成を目指す。このために工作機械製造技術で培った高精度加工技術を発展させ、ナノレベルの位置決め精度を付加し、金型材料にナノ微細形状加工を行う。

(実施体制:トヨーエイテック株式会社)

② 新規ゲノムアレイ用蛍光標識化技術の研究開発

(a)新規蛍光物質の合成に関する研究開発

平成 18 年度に合成した蛍光物質と対をなすもう一種類の新規蛍光物質の合成を行う。

(b)新規リンカーの合成に関する研究開発

2 種類の新規蛍光物質を用いて蛍光標識ヌクレオチドを作成する。

(c)酵素による蛍光標識ヌクレオチドの取込みに関する研究開発

酵素による取り込み向上は 18 年度ですでに前倒しで達成したが、既存の蛍光物質について更に最適な条件について検討を行う。また、今年度末に予定している新規蛍光標識ヌクレオチドの合成が前倒しできれば、新規蛍光標識ヌクレオチドを用いた取り込み条件の検討を行う。

(実施体制:和光純薬工業株式会社)

③ 疾患別アレイハイブリシステムの研究開発

(a)物理的ハイブリシステムの研究開発

物理的ハイブリシステム化に適した CGH チップ用ハイブリ・プロトコルを検討し、プロトコル開発を開始する。また物理的ハイブリシステム化に必要な要素技術の従来技術との比較検討や改善検討を進める。

(b)深い焦点深度の読取装置開発

差動により高精度な読取を可能にする 2 色読取方式と、深い焦点深度と S/N 比の高い高感度な蛍光読取、小型・安価で高信頼性の機構を同時に実現するマルチビーム・ディスク方式の要素技術開発とサブシステム開発を行う。

(実施体制: 横河電機株式会社)

④ ゲノム情報と臨床情報の統合化

食道癌、胃癌、大腸癌、各 10 例における癌細胞におけるゲノム DNA 変化と包括的遺伝子発現プロファイルを比較し、臨床病理学的諸事項に及ぼす遺伝子発現・ゲノム変化を統合的に明らかにし、日本人アレイ開発のためのゲノム遺伝子情報の抽出を行う。

(実施体制: 横河電機株式会社—再委託九州大学)

⑤ がん組織バンクの構築と CGH 解析

今年度下記(a)から(d)について、引き続き研究・検討する。

(a)プロトコルに従い標準化されたヒト検体の保存と処理

(b)胃癌、大腸癌、乳癌を中心とした組織バンク検体数の拡充

(c)登録された検体のクオリティー管理(検体、検体情報、患者情報)

(d)標準化された治療法の実践と確実な患者フォローアップによる正確な病理・病態・予後の解析

(実施体制: 横河電機株式会社—再委託北海道大学)

⑥ 疾患別 BAC アレイの設計

(a)倫理委員会承認の下、山口大学関連施設にて採取された胃癌、大腸癌等の消化器癌を中心として、引続き解析を継続して行う。2年間で各50例程度を目標とする。

(b)さらに、臨床病理学的データとの対比により、癌の生物学的特性(悪性度)と直接に関係する変化、さらには発癌・進展の過程を明らかにすることのできる変化を抽出する。

(c)同時に産総研で本プロジェクトにより作成された BAC アレイの評価も上記の研究開発の中で順次実施する。

(実施体制: 横河電機株式会社—再委託山口大学)

(3) 臨床診断用全自動色体異常解析システムの開発

分散型染色体異常解析装置を作成するために、前処理工程で DNA 精製と濃縮が可能な微小カラムを開発する。その結果、酵素使用量の低減、反応時間の短縮、さらに後段のハイブリダイゼーション工程の迅速化が可能となる。この成果に基づいて微小流体送液制御可能な前処理モジュールを設計/試作する。

集中型染色体異常解析システムを開発するために、検体 DNA 標識工程自動機及びハイブリダイゼーション工程自動機のプロトタイプ製作を開始する。さらに、データ解析自動機の開発を開始し、全自動化に向け、システム全体での最適設計を目指す。

ヒト染色体タイリングアレイに搭載する BAC DNA を調製するために、BAC DNA セミオート調製システムを安定稼働させ、19 年度末までに 18,000 クローンより DNA 抽出を完了させる。また、前年度より引き続き、BAC プローブセミオート無尽資源化システムにおける BAC DNA の制限酵素処理、アダプター・ライゲーション反応、PCR、増幅産物精製、および最終製品の濃度調整に至る一連の工程の条件最適化検討を終え、6 月末までにシステムを構築する。その後、本システムを用いて順次 BAC DNA の無尽資源化を進める。

さらに、アレイ上に無尽資源化 BAC DNA をスポットする条件を検討する。新規スポットングヘッド及びバッファーを検討し、BAC DNA の粘度等個別状態の影響を受けないスポットング条件を開発し高密度アレイを試作する。Whole Genome Array-4500 の 19 年度作製分(400 枚)は年度前半で、Cancer Array-1500 については 7 月末までに作製し、解析に供する予定である。骨軟部腫瘍、大腸癌各々 50 症例を目標として

検体 DNA の調製を行う。Cancer Array-1500 アレイ及び Whole Genome Array-4500 を用いて、これら臨床検体(腎癌、食道扁平上皮癌、骨軟部腫瘍および大腸癌 DNA)のアレイ CGH 解析を行う。また、正常日本人の DNA 親子(トリオ)検体を用いて、ゲノムコピー数多型(CNV)の解析を行う。

(実施体制:東京医科歯科大学、株式会社ビー・エム・エル、株式会社富士フイルム、株式会社日本ガイシ、国立がんセンター)

5. 2 平成19年度事業規模

一般会計 366百万円(継続)

注) 事業規模については、多少の変動があり得る。

6. その他重要事項

(1)運営・管理

当該プロジェクトの実施にあたっては、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」(平成 13 年度文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第 1 号)を厳守しなければならない。また、本研究開発成果の事業化においては、「経済産業分野のうち個人情報を用いた事業分野における個人情報保護ガイドライン」(平成 16・12・24 製局第 1 号)を厳守しなければならない。

7. スケジュール

(1)本年度のスケジュール

平成 19 年 4 月	稲澤グループ第二回研究開発推進会議開催
平成 19 年 6 月頃	産総研グループ第二回研究開発推進会議開催
平成 19 年 12 月	稲澤グループ第三回研究開発推進会議開催

平成20年度実施方針

バイオテクノロジー・医療技術開発部

1. 件名：プログラム名 健康安心イノベーションプログラム
 ナノテク・部材イノベーションプログラム
 (大項目) 個別化医療の実現のための技術融合バイオ診断技術開発
 (中項目) 染色体解析技術開発

2. 根拠法

独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構法第15条第1項第2号

3. 背景及び目的・目標

(1)背景及び目的

近年ゲノム解析技術の進展により、数十万から数百万塩基対に及ぶゲノム染色体上の大規模な異常(増幅、欠失等)が存在し、癌や遺伝疾患などの疾患と密接に関係していることが解明され始め、診断分野への応用に対する期待が高まっている。さらに、近年のポストゲノム研究の進展により、タンパク質をコードしない、いわゆる非コード領域を含むゲノム全領域にわたる数万から数十万塩基対の物理サイズにおける染色体異常と疾患の関係が明らかになりつつある。加えて、染色体コピー数多型と疾患の関係が今後のゲノム解析研究において重要となっている。しかし、このような染色体異常を高効率に解析し、診断応用に展開していくためには、性能、コスト等、飛躍的な向上のための技術開発が必要となっている。

本プロジェクトでは、我が国が有する微細加工技術・表面処理技術といったナノテク等の強みを活かし、こうした染色体異常を高感度、高精度かつ迅速、安価で非コード領域までを検出するゲノムアレイや解析基盤技術開発を行うとともに、全自動解析システムの開発を行う。さらに、臨床情報を有する臨床サンプルを解析することにより、ゲノムアレイを用いた染色体異常解析技術の有用性の検証を行い、臨床現場で活用できるバイオ診断機器の基盤を開発する。本プロジェクトはこれらの研究開発により個別化医療、すなわち個々人の体質に合わせた医療による効果的・効率的な医療の実現に寄与することを目的とする。

(2)研究開発の目標

①最終目標(平成22年度末)

バクテリア人工染色体(BAC)を用いた非コード領域を含むゲノム全領域を検出できる高精度ゲノムアレイを開発し、臨床サンプルを用いて、その有用性を実証する。さらに、臨床現場において、微量サンプル(数ナノグラム)から、12時間以内に染色体異常(増幅、欠失、コピー数多型等)を、低コストかつ定量性・再現性を確保して検出ができる全自動染色体異常解析システムのプロトタイプを開発し、その有効性について臨床サンプルを活用して実証する。定量的解析精度の目標:1コピーの増減を98%以上の感度と特異性(偽陽性率、偽陰性率がともに2%以下)で検出、再現性の目標:CV が5%以下]②中間目標(平成20年度末)

DNA 標識技術の開発やハイブリダイゼーションの効率化、スキャニング技術の臨床応用に向けた要素技術を開発するとともに、BAC を用いた非コード領域を含むゲノム全領域を検出できる高精度ゲノムアレイの開発に目途をつける。さらに、個別化医療診断に活用できる全自動染色体異常解析システムのプロトタイプを開発し、その有用性を確認する。[ハイブリダイゼーション技術の目標:ハイブリ時間が5時間以内、スキャニング技術の目標:3ミクロン以下の解像度、高輝度DNA 標識技術の目標:現行の10倍以上の輝度(標識、洗浄及びスキャニングを経て得られる数値ベース)]

4. 実施内容及び進捗状況

4.1 平成19年度(委託)事業内容

(独)産業技術総合研究所・セルエンジニアリング研究部門・主幹研究員、平野隆氏をプロジェクトリーダーとして、以下の研究開発項目(1)(2)の研究開発を実施し、東京医科歯科大学・難治疾患研究所教授、稲澤譲治氏をプロジェクトリーダーとして、以下の研究開発項目(3)の研究開発を実施した。これらにより平成19年度の目標を

達成する(一部では超える)成果を得た。

(1)BAC を用いた高精度全ゲノムアレイの開発

平成18 年度に引き続き、平成19 年度においても日本人BAC ライブラリー全体33 万クローンの内11 万クローンについて解析を行った。ゲノム断片を含む大腸菌を高速かつ高濃度増殖させ、ヒトBAC の抽出および精製を大規模に行った。各BAC のT7 およびSP6 両末端を蛍光標識化し、ABI 社製3730 キャピラリー型シーケンサにより塩基配列の解析を行った。条件検討の結果最短の1 時間以内で1 サイクルの解析が可能であることが明らかとなったことから、一回に96 個のBAC の塩基配列を一時間で解析し、自動装置により24 時間連続運転を行った。DNA の品質が高いことから、T7 側では約800 塩基、SP6 側では約700 塩基の解析に達した。従来のBAC 末端解析では300 塩基程度であったことから、今回の解析は従来の倍の長さの塩基配列を位置同定に用いることが可能となった。当該年度内に予定通り11 万クローンの両末端塩基配列解析を終了した。この塩基配列結果を米国ヒトゲノム研究所の既知ヒト塩基配列に対照することにより、各BAC クローンDNA の染色体上の位置決定を行っている。ヒトゲノム30 億塩基の内約80%以上がカバーされる見込みであることが示された。また、平成19 年度においては日本人BAC の精製からスタートしてアレイ作成に至るプロセスの検証のため約4,000 個の日本人BAC クローンDNA を大量精製し、一枚のガラス基板上にピン法でクローン毎2ヶ所スポットし、作成をチェックした。この検証によりDNA の精製度、断片化度、スポット用溶液の調整について最適化を図ることができた。またモデルDNA を用いてピン法で一枚のガラス基板上に3 万クローンのDNA をスポットする試作を行い、3 万クローンのスポットが可能であることを示した。(実施体制:(独)産業技術総合研究所)

(2)染色体異常を解析する革新的要素技術の開発

①高精度表面加工修飾技術の研究開発

高配向性薄膜形成技術の開発:ガラス基板上に高配向性の金属膜を成膜し、その上に高分子を介してDNA を結合することにより、配向性を有した安定なアレイを作成することが可能となる。平成19 年度においては金の高配向性膜の形成のため保有技術のICP 支援型多重磁極マグネトロンスパッタ技術を用いて銅ターゲットによる基礎実験において結晶配向性を確認した。また樹脂を用いた転写成型によるパターンニング基板の試作を実施した。(実施体制:トーヨーエイトック株式会社)

②新規ゲノムアレイ用蛍光標識化技術の研究開発

a) 新規蛍光物質の合成に関する研究開発

昨年度合成した蛍光物質のペアとなるもう1 種類の新規蛍光物質の合成を行った。

b) 新規リンカーの合成に関する研究開発

2 種類の新規な蛍光標識物質と合成したリンカーをもちいて核酸誘導体WY535-dCTP とWY635-dCTP を合成した。本蛍光物質の励起長波は、汎用スキャナーに搭載されているレーザー光に対応した波長であった。

c) 酵素による蛍光標識ヌクレオチドの取込みに関する研究開発

平成19 年度に商品化を行ったGenomic DNA Labeling kit の更なる性能向上のため、種々の反応条件の最適化について検討を行った。(実施体制:和光純薬工業株式会社)

③疾患別アレイハイブリシステムの研究開発

a) 物理的ハイブリシステムの研究開発

産総研のハイブリ・プロトコルに基づいて開発目的とするアレイに適合するプロトコルの検討を行った。また要素技術として層流・乱流の物理法則に則した攪拌の基礎技術開発を開始し、3次元空間用の画像による状態解析システムを試作した。

b) 深い焦点深度の読取装置開発

臨床診断用に絞り込んだアレイを高感度かつ深い焦点深度で測定する独自の2 色マルチビーム・ディスク型読取装置の仕様の調査及び検討を行った。要素技術の検討のため1 色の評価用読取装置の試作を行った。また2色の光源ユニットと高感度受光ユニット等についての要素技術開発とサブシステムの開発を行った。(実施体制:横河電機株式会社)

④ゲノム情報と臨床情報の統合化

癌細胞におけるゲノムDNA変化を解析し、ゲノム変化を明らかにする。研究開発を行い食道がんにおいて、がん特異的に欠失・増幅するゲノム領域を明らかにした。更に食道癌、大腸癌、各10例における癌細胞におけるゲノム

DNA変化と包括的遺伝子発現プロファイルを比較した。(実施体制:横河電機株式会社一再委託九州大学)

⑤がん組織バンクの構築とCGH 解析

プロトコルに従い標準化されたヒト検体の保存と処理および組織バンク検体数の拡充を図るため、CGH アレイ解析用細胞検体のバンク登録数拡充を行った。また、患者情報の匿名化を含めて検体を確実に管理するためのシステムを導入した。(実施体制:横河電機株式会社一再委託北海道大学)

⑥疾患別BAC アレイの設計

DNA コピー数異常について解析し、癌の悪性度、進行度にかかわる変化を抽出するため、消化器がんを中心にアレイCGH 解析を行い、生物学的特性と悪性度、進行度の関連を検討した。(実施体制:横河電機株式会社一再委託山口大学)

(3)臨床診断用全自動染色体異常解析システムの開発

①診断用全自動染色体異常解析装置の開発

病院内検査に適している分散型染色体異常解析装置の開発では、反応の迅速化と前処理工程のモジュール化と並行して微量検体DNA の増幅、DNA 精製、及び濃縮法の開発を行った。平成19 年度末までに、目的とする機能を完備した前処理モジュールを試作した。一方、臨床検査センターに適している集中型染色体異常解析システムの開発では、検体からのDNA 抽出、標識、ハイブリダイゼーション、スキャンニング、データ解析から成る工程について、自動化特性を付与した簡便かつ短時間の基本プロトコルを完成した。標識工程とハイブリダイゼーション工程に関して全自動プロトタイプ機(I 型)の詳細仕様設計が完成した。平成19 年度末までに、本機の制作を完了させ、稼動を開始した。

②診断用ゲノムアレイの開発

新規スポットティングヘッド及びバッファー等を検討し、BAC DNA の粘度等の個別的状態の影響を受けないスポットティングの条件を開発し高密度アレイの試作を進めた。一方、Genome Disorder Array(GD Array)、CancerArray-800、Cancer Array-1500 及びWhole Genome Array-4500 を作製し、臨床検体の解析に供した。GD Array (Version 2)を用いた先天性異常症候群を含む染色体異常の解析について、これまで実検体での臨床評価を進めた。その結果、既知の先天性異常症候群に加えてサブテロメア領域の異常に由来する精神発達遅滞の疾患を検出できる事が判明した。一方、Cancer Array-800 については口腔癌検体での臨床評価を進めている。GD Array とCancer Array-800 は平成22 年度の実用化を目指している。Whole Genome Array-4500 のスポットティングに必要なDNA は予定より早く増幅・作製を終了し平成19 年度作製分の400 枚を含めて作製予定の1,000 枚の作製を既に完了した。Cancer Array-1500 についても癌関連遺伝子座の全BAC クローンのBAC 精製を終了し、FISH 法による品質確認・スポット用DNA への加工を終了した後、平成19 年度作製分はスポットまで終了した完成品を得て、性能確認を終え、運用を開始している。CancerArray-1500 解析支援のためのデータ格納システムならびに解析ソフト(Viewer)を開発した。また、Whole Genome Array-4500 に対応した、日本人ゲノムコピー数変化(多型、CNV)を解析するためのデータ格納システムならびに解析ソフト(Viewer)の開発を進めα バージョンの使用を開始しており、平成20 年度内に修正を終えて正規版の本格運用を開始する。ヒト全染色体を網羅するTiling Array-15000 を作製するために、BACDNA を簡便且つ効率良く調製するための半自動化ラインを完成させた。前半工程(BAC DNA 調製ライン)を用いて平成19 年度末までに18,000 種類のBAC DNA を調製し、後半工程(無尽化工程ライン)は最終調整を進め、平成20 年度末までに15,000 種類のBAC プローブを調製する。日本人ゲノム多型データベース構築を目的として、MCG Whole GenomeArray-4500(WG4500)を用いて日本人100 家系の親子(父、母、子のTrio)解析を進めている。最終的にはこれらのデータと共に、Tiling Array-15000のデータも加えて、Copy Number variation(CNV)情報を収集し、その頻度、欠失/重複の定量的解析を行い、データベースを構築する。癌の診断コンテンツの開発を目的として、固形腫瘍の臨床検体の解析を進めている。癌種は腎癌、大腸癌、食道扁平上皮癌、口腔癌、骨軟部腫瘍、及び肝胆膵癌である。癌の解析を目的に作製したCancer Array-1500 はパフォーマンスに極めて優れている事が判明し、解析データの集積を進めている。種々の癌細胞株のアレイCGH 解析データベースを構築しWeb での公開を実施した。(実施体制:東京医科歯科大学、株式会社ビー・エム・エルー共同実施旭川医科大学、富士フイルム株式会社、日本ガイシ株式会社、国立がんセンター)

4. 2 実績推移

	18年度	19年度	20年度	21年度	22年度
実績推移 一般会計(百万円)	323	416			
特許出願件数(件)	1	2			
論文発表数(報)	1	30			
フォーラム等(件)	1	63			

5. 事業内容

(独)産業技術総合研究所・セルエンジニアリング研究部門・主幹研究員 平野隆氏をプロジェクトリーダーとして、以下の研究開発項目(1)(2)の研究開発を実施し、東京医科歯科大学・難治疾患研究所教授 稲澤謙治氏をプロジェクトリーダーとして、以下の研究開発項目(3)の研究開発を実施する。実施体制については別紙参照のこと。

5. 1 平成20年度(委託)事業内容

個別化医療に供する、疾患と染色体異常の検証、診断機器開発を行うため、現状の染色体検査との整合性が高く、また、高感度化や低コスト化への期待が高いバクテリア人工染色体(BAC)を用いたゲノムアレイに着目し、診断応用に必要とされる高感度、高精度かつ迅速、安価といった要求を満たす革新的要素技術の開発を行い、臨床診断用全自動染色体異常解析システムを開発することを目標とする。なお、これらの研究開発を行うにあたり、診断利用の有効性を検証するため、疾患と染色体異常の関係について臨床サンプルを用いた検証を行いながら、研究開発を推進する。この目標を達成するための研究開発項目は次の通りとする。

(1) BAC を用いた高精度全ゲノムアレイの開発

日本人BAC ライブラリー全体33 万クローンの内11 万クローンのT7 及びSP6両末端のキャピラリーシークエンサ塩基配列解析結果から、ヒトゲノム上のBAC配列地図の第二次ドラフト作成を行う。引き続き全ゲノム領域をカバーする3のBAC クローンDNA を各マイクログラムレベルで調整し、スポットティングを開始する。(実施体制:(独)産業技術総合研究所)

(2) 染色体異常を解析する革新的要素技術の開発

① 高精度表面加工修飾技術の研究開発

銅ターゲットで得られた成果を元に金ターゲットを用いて金の結晶配向性並びに金スポットの性能確認を行う。また、転写成型金型については樹脂材料への転写成型結果を元に用いてガラス基板への転写成型を実施し精度を確認する。(実施体制:トーヨーエイトック株式会社)

② 新規ゲノムアレイ用蛍光標識化技術の研究開発

19 年度に合成した当社固有の新規蛍光標識ヌクレオチドを用いた取り込み条件の検討を行い、高い取込みを示す条件について検討を行う。新規蛍光標識ヌクレオチドで標識されたDNA を用いて、BAC アレイ上での評価を行い、BAC アレイCGH 法で解析を行う上で、最適な蛍光標識試薬組成の検討を行う。(実施体制:和光純薬工業株式会社)

③ 疾患別アレイハイブリシステムの研究開発

(a)物理的ハイブリシステムの研究開発

横河の独自技術による物理的な強制攪拌による微小空間でのCGH チップ用物理的ハイブリ機構について前年度までの成果を元に第一次の試作を開始し、流速条件・流速分布などの評価と改善を行う。

(b)深い焦点深度の読取装置開発

昨年度まで進めてきた差動により高精度な読取を可能にする2 色読取方式と、深い焦点深度とS/N 比の高い高感度な蛍光読取、小型・安価で高信頼性の機構を同時に実現するマルチビーム・ディスク方式の要素技術開発を用いて第一次の試作を開始する。(実施体制:横河電機株式会社)

④ ゲノム情報と臨床情報の統合化

平成19年度の研究を更に進め、食道癌30例、大腸癌80例における癌細胞におけるゲノムDNA変化と包括的遺伝子発現プロファイルを比較し、臨床病理学的諸事項に及ぼす遺伝子発現・ゲノム変化を統合的に明らかにし、日本人アレイ開発のためのゲノム遺伝子情報の抽出を行う。(実施体制:横河電機株式会社一再委託九州大学)

⑤ がん組織バンクの構築とCGH解析

今年度下記(a)から(d)について、引き続き研究・検討する。(a)プロトコルに従い標準化されたヒト検体の保存と処理 (b)胃癌、大腸癌、乳癌を中心とした組織バンク検体数の拡充(c)登録された検体のクオリティー管理(検体、検体情報、患者情報)(d)標準化された治療法の実践と確実な患者フォローアップによる正確な病理・病態・予後の解析(実施体制:横河電機株式会社一再委託北海道大学)

⑥ 疾患別BACアレイの設計

(a)倫理委員会承認の下、山口大学関連施設にて採取された胃癌、大腸癌等の消化器癌を中心として、引き続き解析を継続して行う。2年間で各50例程度を目標とする。

(b)さらに、臨床病理学的データとの対比により、癌の生物学的特性(悪性度、リンパ節転移の有無等)と直接に関係する変化、さらには発癌・進展の過程を明らかにすることのできる変化を抽出する。

(c)同時に産総研で本プロジェクトにより作成されたBACアレイの評価も上記の研究開発の中で順次実施する。(実施体制:横河電機株式会社一再委託山口大学)

(3) 臨床診断用全自動染色体異常解析システムの開発

①臨床診断用全自動染色体異常解析装置の開発

分散型全自動染色体解析装置を開発するために、これまでに蓄積した微量流体の送液等のマイクロリアクター技術を活用し、システム後段のDNAアレイ反応モジュールを試作する。その後、平成19年度に作製した前処理反応モジュールとの連結、自動化を図る。さらに、検出部を加えたプロトタイプ機を試作し、モジュールとの動作整合性を確認する。集中型全自動染色体異常解析装置については、平成19年度末に製作した全自動プロトタイプ機(I型)に対する、詳細評価を行い、システムとしての精度、信頼性、操作性に関わる問題点(要改良点)を洗い出す。並行して改良、変更を検討し、平成20年度前半に対策を盛り込んだ全自動プロトタイプ機II型(改良型)を製作する。平成20年度後半には、全自動プロトタイプ機II型を用いた実使用条件に即した本稼働テストを開始し、実用化可能な全自動機を完成させる。

②診断用ゲノムアレイの開発

ヒト染色体を網羅的に搭載するTiling Arrayを作製するために、セミオートメーションのラインを用いて15,000種類のBACプローブを調製する。平成21年度初めにTiling Array-15000を作製する。平成20年度はWhole Genome Array-4500を用いて正常日本人のDNA親子(検体)を用いてゲノムコピー多型(CNV)の解析を継続し、平成21~22年度にTiling Array-15000を用いて検証する。得られたゲノム多型データの結果は診断用ゲノムアレイを用いた診断での正診率を上げるために使用する。

がんの染色体異常の解析と個別化医療での診断コンテンツの開発について、Cancer Array-1500及びWhole Genome Array-4500を用いたデータ収集と解析を継続する。大腸癌と腎癌についてCancer Array-1500及びWhole Genome Array-4500を用いたアレイCGH解析データと臨床病理学的諸因子との相関解析を行い、転移・浸潤性の予測、予後推定など、癌の個別診断に有用なゲノム情報の選択(診断のコンテンツ)を開始する。食道扁平上皮癌、口腔癌、骨軟部腫瘍、肝胆膵癌についても染色体異常の解析を進め、診断のためのコンテンツの開発を行なう。また、診断のコンテンツを評価するための癌臨床検体の試料調製等を進める。既に完成した2種のアレイ(先天性異常疾患解析用のGenome Disorder Array(Version 3)、Cancer Array-800)に関しては臨床病情報リンクしたデータ収集を進め、平成22年度の実用化を目標として開発を進める。(実施体制:東京医科歯科大学、株式会社ビー・エム・エル共同実施旭川医科大学、富士フィルム株式会社、日本ガイシ株式会社、国立がんセンター)

5.2 平成20年度事業規模

一般会計 340百万円(継続・委託事業)

注) 事業規模については、多少の変動があり得る。

6. その他重要事項

(1) 評価

NEDO技術開発機構は、技術的及び政策的観点から、研究開発の意義、目標達成度、成果の技術的意義並びに将来の産業への波及効果等について、外部有識者による研究開発の中間評価を平成20年7月に実施する。

(2) 運営・管理

当該プロジェクトの実施にあたっては、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」(平成13年度文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第1号)を厳守し研究開発を推進する。また、本研究開発成果の事業化においては、「経済産業分野のうち個人情報を用いた事業分野における個人情報保護ガイドライン」(平成16・12・24製局第1号)を厳守する。

7. スケジュール

(1) 本年度のスケジュール

平成20年5月 産総研グループ第三回研究開発推進会議開催

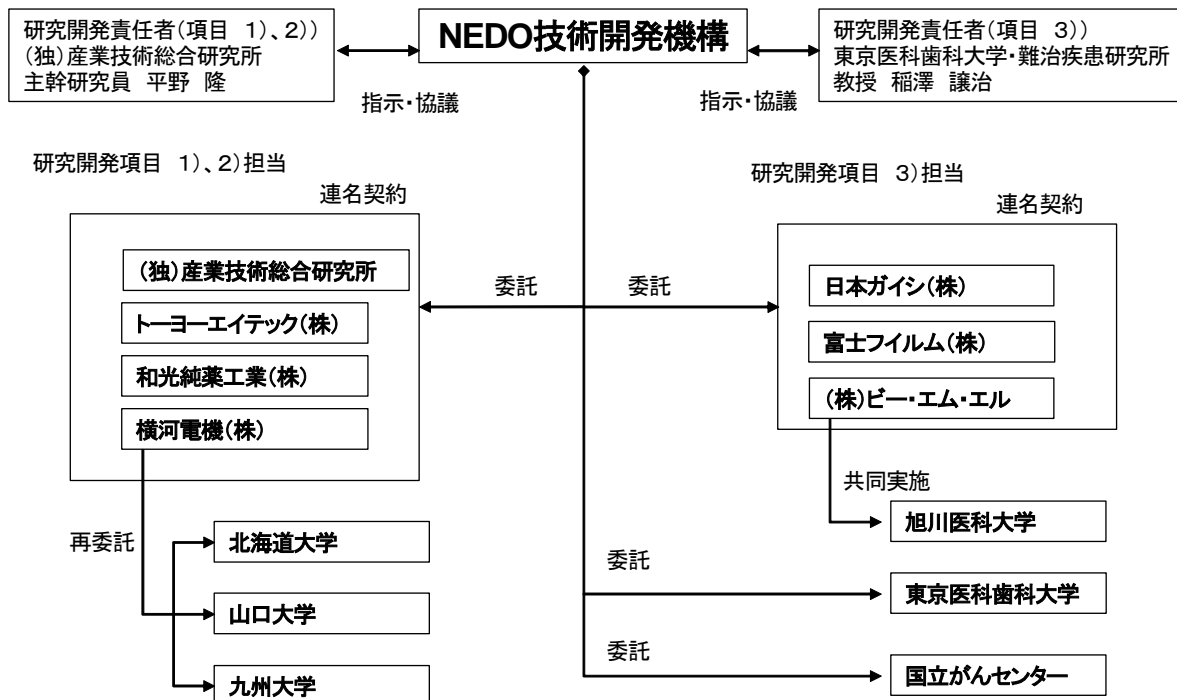
平成20年6月 稲澤グループ第三回研究開発推進会議開催

平成20年7月 中間評価

平成20年12月 稲澤グループ第四回研究開発推進会議開催

平成21年1月 推進会議開催

(別紙) 実施体制図



1. 件名：プログラム名 健康安心イノベーションプログラム
ナノテク・部材イノベーションプログラム
(大項目) 個別化医療の実現のための技術融合バイオ診断技術開発
(中項目) 染色体解析技術開発

2. 根拠法

独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構法第15条第1項第2号

3. 背景及び目的・目標

(1)背景及び目的

近年ゲノム解析技術の進展により、数十万から数百万塩基対に及ぶゲノム染色体上の大規模な異常(増幅、欠失等)が存在し、癌や遺伝疾患などの疾患と密接に関係していることが解明され始め、診断分野への応用に対する期待が高まっている。さらに、近年のポストゲノム研究の進展により、タンパク質をコードしない、いわゆる非コード領域を含むゲノム全領域にわたる数万から数十万塩基対の物理サイズにおける染色体異常と疾患の関係が明らかになりつつある。加えて、染色体コピー数多型と疾患の関係が今後のゲノム解析研究において重要となっている。しかし、このような染色体異常を高効率に解析し、診断応用に展開していくためには、性能、コスト等、飛躍的な向上のための技術開発が必要となっている。

本プロジェクトでは、我が国が有する微細加工技術・表面処理技術といったナノテク等の強みを活かし、こうした染色体異常を高感度、高精度かつ迅速、安価で非コード領域までを検出するゲノムアレイや解析基盤技術開発を行うとともに、全自動解析システムの開発を行う。さらに、臨床情報を有する臨床サンプルを解析することにより、ゲノムアレイを用いた染色体異常解析技術の有用性の検証を行い、臨床現場で活用できるバイオ診断機器の基盤を開発する。本プロジェクトはこれらの研究開発により個別化医療、すなわち個々人の体質に合わせた医療による効果的・効率的な医療の実現に寄与することを目的とする。

(2)研究開発の目標

①最終目標(平成22年度末)

バクテリア人工染色体(BAC)を用いた非コード領域を含むゲノム全領域を検出できる高精度ゲノムアレイを開発し、臨床サンプルを用いて、その有用性を実証する。さらに、臨床現場において、微量サンプル(数ナノグラム)から、12時間以内に染色体異常(増幅、欠失、コピー数多型等)を、低コストかつ定量性・再現性を確保して検出ができる全自動染色体異常解析システムのプロトタイプを開発し、その有効性について臨床サンプルを活用して実証する。[定量的解析精度の目標:1コピーの増減を98%以上の感度と特異性(偽陽性率、偽陰性率がともに2%以下)で検出、再現性の目標:CVが5%以下]

②中間目標(平成20年度末)

DNA標識技術の開発やハイブリダイゼーションの効率化、スキャニング技術の臨床応用に向けた要素技術を開発するとともに、BACを用いた非コード領域を含むゲノム全領域を検出できる高精度ゲノムアレイの開発に目途をつける。さらに、個別化医療診断に活用できる全自動染色体異常解析システムのプロトタイプを開発し、その有用性を確認する。[ハイブリダイゼーション技術の目標:ハイブリ時間が5時間以内、スキャニング技術の目標:3ミクロン以下の解像度、高輝度DNA標識技術の目標:現行の10倍以上の輝度(標識、洗浄及びスキャニングを経て得られる数値ベース)]

4. 実施内容及び進捗状況

4.1 平成20年度(委託)事業内容

(独)産業技術総合研究所・セルエンジニアリング研究部門・主幹研究員、平野隆氏をプロジェクトリーダーとして、以下の研究開発項目(1)(2)の研究開発を実施し、東京医科歯科大学・難治疾患研究所教授、稲澤譲治氏をプロジェクトリーダーとして、以下の研究開発項目(3)の研究開発を実施した。これらにより平成20年度の目標を達成する(一部では超える)成果を得た。

(1)BAC を用いた高精度全ゲノムアレイの開発

平成 20 年度においては産総研の遺伝学的に日本人であることが確立した BAC ライブラリー 33 万クローンの内 11 万クローンについて両末端の塩基配列を決定し、BLAST(Basic Local Alignment Tool; ヒトゲノム塩基配列情報にデータベース検索ソフト)を用いて物理的地図の作成を行った。その結果全ゲノムの 84.5% をカバーし、1 番から 22 番の染色体および X,Y 染色体に偏りなく BAC が配列されており、登録された遺伝子データベース、40%以上の頻度の SNP の各要素についても 85%以上の高カバー率であることが示された。

この物理的地図から人種差を最も保存している HLA 領域の BAC について塩基配列の解析を行った結果、これまでに国際データベース上に登録された SNP とはかなり異なることが示され、日本人の SNP データベースとも異なる事が示された。したがって SNP レベルで日本人 BAC は相当するコーカシアン系 NCBI 塩基配列と異なることが明らかとなった。

日本人 BAC によるタイリングアレイは最も BAC 数が少なくなる方式で設計し、17,000 個の BAC クローンを選択し、BAC クローン DNA の大量調製、精製を行った。これら BAC クローン DNA を一枚のガラススライド上にピン法によりタイリングアレイの試作を行った。

(実施体制: (独)産業技術総合研究所)

(2)染色体異常を解析する革新的要素技術の開発

①高精度表面加工修飾技術の研究開発

高配向性薄膜形成技術の開発: ガラス基板上に高配向性の金属膜を成膜し、その上に高分子を介して DNA を結合することにより、配向性を有した安定なアレイを作成することが可能となる。平成 20 年度においてはこれまで得られた技術を基にアレイ基板を作成し市販プラスミドから切り出した DNA を用いて評価を行なった。50~500 μ m のスポットを作成した結果、スポットサイズを問わず DNA の基盤への結合と配列特異的なハイブリダイゼーションが確認できた。(実施体制: トーヨーエイテック株式会社)

② 規ゲノムアレイ用蛍光標識化技術の研究開発

19 年度に合成した当社固有の新規蛍光標識ヌクレオチドで標識化した DNA を用い、BAC アレイ上で評価した。更なる性能の向上を目指し、取り込み反応条件と構造改変について検討を進めた。(実施体制: 和光純薬工業株式会社)

③ 疾患別アレイハイブリシステムの研究開発

a) 物理的ハイブリシステムの研究開発

横河の独自技術による物理的な強制攪拌による微小空間での CGH アレイ用物理的ハイブリ機構について前年度までの成果を元に第一次の試作を開始し、流速条件・流速分布などの評価と改善を行った。

b) 深い焦点深度の読取装置開発

昨年度まで進めてきた差動により高精度な読取を可能にする 2 色読取方式と、深い焦点深度と S/N 比の高い高感度な蛍光読取、小型・安価で高信頼性の機構を同時に実現するマルチビーム・ディスク方式の要素技術開発を用いて第一次の試作を行った。(実施体制: 横河電機株式会社)

④ ゲノム情報と臨床情報の統合化

大腸癌細胞における CGH アレイの結果と臨床的に重要な原発巣からのリンパ節転移予測因子、脈管侵襲と有意に関連した領域を特定した。また、クラスター解析により、大規模変異をきたす症例群とほとんどゲノム変異を認めない症例群とに二分された。特に前者においては高度に臨床病理学的因子との相関を認め、ゲノム変異自体が大腸癌進展に直接関与している可能性が考えられる。再発・予後との関係が待たれるが、日本人タイリングアレイ解析について大腸癌症例においては特定の症例において極めて有用になる可能性が考えられる。また、食道癌においては 50 症例以上のサンプルと臨床情報とを集積した。(実施体制: 横河電機株式会社一再委託九州大学)

⑤ がん組織バンクの構築と CGH 解析

プロトコルに従い標準化されたヒト検体の保存と処理および組織バンク検体数の拡充を図るため、CGH アレイ解析用細胞検体のバンク登録数拡充を行った。また、北海道大学病院を中心とした登録患者情報の匿名化を含めて検体を確実に管理するためのシステムを導入し、臨床データ管理に関するシステムを構築した。(実施体制: 横河電機株式会社一再委託北海道大学)

⑥ 疾患別 BAC アレイの設計

DNA コピー数異常について解析し、癌の悪性度、進行度にかかわる変化を抽出するため、消化器がんを中心にアレイ CGH 解析を行い、生物学的特性と悪性度、進行度の関連を、2 年間で各 50 例程度をもとに検討した。(実施体制: 横河電機株式会社—再委託山口大学)

(3)臨床診断用全自動染色体異常解析システムの開発

①臨床診断用全自動染色体異常解析装置の開発

病院内検査に適している分散型全自動染色体解析装置を開発するために、これまでに蓄積した微量流体の送液等のマイクロリアクター技術を活用し、システム後段の DNA アレイ反応モジュールを作製した。本モジュールを平成 19 年度に作製した前処理モジュールと連結し、一連のアレイ CGH 反応を自動で行う分散型測定ニーズ向けのプロトタイプを試作し、原理検証を進めている。プロセス全体として大幅な微量化と迅速化(数 ng の DNA を用いて12時間)が可能となることを確認した。さらに、試作した小型蛍光検出器のスキニングについて開発を進めた。

一方、臨床検査センターに適している集中型全自動染色体異常解析装置については、標識工程とハイブリダイゼーション工程を自動化する全自動プロトタイプ機 I 型機の性能評価を実施することにより基本性能、安定性および操作性等に分けて問題点を抽出した。操作性等の軽微な課題は I 型機を改良した II.1 型機として対策を施した。基本性能に関して、i)ハイブリ工程において均一にハイブリダイゼーションが行われずむらが生じ、ii)スキャナーの精度(S/N 比)が悪く測定時間を要する事が判明したので、各要素に戻って検討を行っている。さらに、プロトタイプ I 型機を制御するソフトウェアと得られた解析結果の解析ソフトを設計し、I 型機に実装させた。標識工程についてはほぼ完成した。

②診断用ゲノムアレイの開発

a)先天性疾患を診断するための GD アレイの開発

GD アレイを用いてこれまで 450 例以上の先天性疾患について臨床病理情報をリンクしたデータ収集を行った。精神遅滞を伴う多発性奇形症候群の診断並びに不育症の分野での診断に有効であることが判明した。前者と従来の先天性疾患の診断について H21 年度に有償での受託を開始する予定である。本解析には Dual ハイブリ法を使用するため、二色法の特許(アボット社)を回避することができる。

b)WG4500 アレイを用いた先天性疾患の解析

GD アレイで陰性となる疾患の約25%について WG4500 を用いることにより微細ゲノム異常を検出することができた。その中で新規疾患(2種類)を診断するゲノム異常を見だし、1件について特許(特願 2008-199541)を出願した。

c)WG15000 アレイの作製と CNV データベースの構築

ヒト全染色体を網羅する 15,000 種類近くの BAC プローブをセミオートメーション装置を用いて調製した。一方、WG4500 アレイを用いて日本人 100 家系 Trio 解析を進めている。CNV 情報を収集するソフト(CNV-Viewer/Analyzer)を作成し、データベース化と情報の評価を進めている。

d)がんの染色体異常の解析と個別化医療での診断コンテンツの開発

腎癌、食道癌、肝胆膵癌、骨軟部腫瘍、大腸癌、口腔癌から DNA を調製し、CA1500/WG4500 アレイを用いた解析を進めている。その結果、大腸癌では特徴的なコピー数異常を解析し、腎細胞癌では予後不良に特徴的なゲノム異常領域を抽出した。さらに、肝細胞癌、癌化していない肝組織、正常肝組織についてメチル化 CpG アイランド増幅(BAMCA)法を用いてゲノムワイドに DNA メチル化異常を解析した。肝多段階発癌過程における DNA メチル化異常の蓄積を明らかにし、前癌状態の診断および肝細胞癌の予後予測に有用なクローンを同定した(特願 2008-331274)。

一方、CA800 を用いて口腔癌 50 例の解析を終了した(本アレイは癌の解析ツールとして国内販売にむけ準備中)。(実施体制: 東京医科歯科大学、株式会社ビー・エム・エルー共同実施旭川医科大学、富士フイルム株式会社、日本ガイシ株式会社、国立がんセンター)

4. 2 実績推移

	18年度	19年度	20年度
実績額推移			
一般勘定(百万円)	323	416	323
特許出願件数(件)	1	2	19
論文発表数(報)	1	30	36
フォーラム等(件)	1	63	65

5. 事業内容

(独)産業技術総合研究所・セルエンジニアリング研究部門・主幹研究員 平野隆氏をプロジェクトリーダーとして、以下の研究開発項目(1)(2)の研究開発を実施し、東京医科歯科大学・難治疾患研究所教授 稲澤譲治氏をプロジェクトリーダーとして、以下の研究開発項目(3)の研究開発を実施する。実施体制については別紙参照のこと。

5. 1 平成21年度(委託)事業内容

個別化医療に供する、疾患と染色体異常の検証、診断機器開発を行うため、現状の染色体検査との整合性が高く、また、高感度化や低コスト化への期待が高いバクテリア人工染色体(BAC)を用いたゲノムアレイに着目し、診断応用に必要とされる高感度、高精度かつ迅速、安価といった要求を満たす革新的要素技術の開発を行い、臨床診断用全自動染色体異常解析システムを開発することを目標とする。なお、これらの研究開発を行うにあたり、診断利用の有効性を検証するため、疾患と染色体異常の関係について臨床サンプルを用いた検証を行いながら、研究開発を推進する。この目標を達成するための研究開発項目は次の通りとする。

(1) BACを用いた高精度全ゲノムアレイの開発

平成20年度に試作した全ゲノムアレイの評価を、臨床癌検体DNAを用いて行い、全ゲノムアレイのバージョンアップを行う。胃癌について限られた数の日本人BACによるミニアレイを試作し、臨床癌検体DNAによる有効性評価を行い、性能向上のためバージョンアップを行う。(実施体制:(独)産業技術総合研究所)

(2) 染色体異常を解析する革新的要素技術の開発

① 高精度表面加工修飾技術の研究開発

開発したDNAチップについて、20年度に引続き市販DNAを用い、最適なDNA濃度の確認、スポットへの固定化均一性等の基礎性能評価を行ない、さらにはBACの固定化を検討する。(実施体制:トーヨーエテック株式会社)

② 新規ゲノムアレイ用蛍光標識化技術の研究開発

20年度に検討した新規蛍光物質は、酵素による取り込みが悪い事が明らかとなった。そこで、酵素による取り込みを向上させるために側鎖を改良した蛍光物質を新規に2種合成する。(実施体制:和光純薬工業株式会社)

③ 疾患別アレイハイブリシステムの研究開発

a)物理的ハイブリシステムの研究開発

物理的ハイブリ機構の試作の評価・改良を進め、適切な温度や流速条件・流速分布を解析、最適条件を与えることで、チップ上の核酸濃度分布や反応を制御し、ターゲットとプローブの会合促進による信号の安定化・ノイズ低減、ハイブリの高感度化、再現性・信頼性などを実現する。

b)深い焦点深度の読取装置開発

読取装置の改良を進め、特に深い焦点深度を生かした2色の液中計測光学系などの研究開発により第二次の試作を行う。この第二次試作を用いて基準チップおよびゲノム・アレイ・チップの測定・評価を行う。(実施体制:横河電機株式会社)

④ ゲノム情報と臨床情報の統合化

平成20年度の研究を更に進め、食道癌、大腸癌についてCGHアレイの結果、臨床病理学的意義、包括的遺伝子発現プロファイル、臨床病理学的諸事項あるいは転移・再発に及ぼす遺伝子発現・ゲノム変化を統合的に明らかに日本人アレイ開発のためのゲノム遺伝子情報を総括する。(実施体制:横河電機株式会社一再委託九州大学)

⑤ がん組織バンクの構築と CGH 解析

がん組織バンクの構築と参加する全施設における組織バンクへの登録患者情報の匿名化および臨床データ管理体制を確立する。(実施体制: 横河電機株式会社一再委託北海道大学)

⑥ 疾患別 BAC アレイの設計

胃癌、大腸癌等の消化器癌を中心として、引続き解析を継続して行い、臨床病理学的データとの対比により、癌の生物学的特性(悪性度、リンパ節転移の有無等)、発癌・進展の過程を明らかにすることのできる変化を抽出する。同時に産総研で本プロジェクトにより作成された BAC アレイの評価も実施する。(実施体制: 横河電機株式会社一再委託山口大学)

(3)臨床診断用全自動染色体異常解析システムの開発

① 臨床診断用全自動染色体異常解析装置の開発

分散型全自動染色体異常解析装置についてプロトコールを含めたトータルシステムを構築するために、課題を抽出し、改良を行い、アレイ CGH 法の再現性、定量性、操作性の向上を図る。その結果、前処理モジュール、DNA アレイ反応モジュール、検出器を一体化した分散型全自動染色体異常解析装置を完成させる。

集中型全自動染色体異常解析装置について、基本性能に関わる課題(ハイブリ工程、検出部の精度、測定時間の短縮)の検討、Dual ハイブリダイゼーションに必要なコントロール DNA を調製する工程の自動化、ユーザビリティの優れた装置への改良を行い、全自動プロトタイプ機(ver.III)を完成させる。

② 診断用ゲノムアレイの開発

a) Dual ハイブリ法による GD アレイを用いた先天性疾患の診断、そして不育症分野での流産産物の解析について、受託解析を実施のための研究開発を進める。

b) GD アレイで陰性の疾患について WG4500 を用いた解析を進め、新規疾患の原因となるゲノム異常を見いだす。発見した新規コンテンツについては、GD アレイに搭載して改良を図る。

c) ヒト染色体を網羅する 15,000 種類の BAC プローブを搭載した高精度ゲノムアレイ(Tiling Array15000)を作製し、日本人 100 家系 Trio 解析を行い、WG4500 を用いた結果と比較し、より精度の高いデータベースを構築する。

d) がんの染色体異常の解析と個別化医療での診断コンテンツの開発

大腸癌についてアレイ CGH 解析データと臨床病理学的諸因子との相関解析を実施する。さらに、腎細胞癌の予後不良群に特徴的なゲノム異常領域より標的を絞り、腎細胞癌悪性化遺伝子の同定に向けて解析を行う。

(実施体制: 東京医科歯科大学、株式会社ビー・エム・エルー共同実施旭川医科大学、富士フイルム株式会社、日本ガイシ株式会社、国立がんセンター)

5. 2 平成21年度事業規模

	委託事業
一般勘定	323百万円(継続)

注) 事業規模については、多少の変動があり得る。

6. その他重要事項

(1)運営・管理

当該プロジェクトの実施にあたっては、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」(平成 13 年度文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第 1 号)を厳守し研究開発を推進する。また、本研究開発成果の事業化においては、「経済産業分野のうち個人情報を用いた事業分野における個人情報保護ガイドライン」(平成 16・12・24 製局第 1 号)を厳守する。

(2)複数年度契約の実施

平成21~22年度の複数年度契約を行う。

7. スケジュール

(1) 本年度のスケジュール

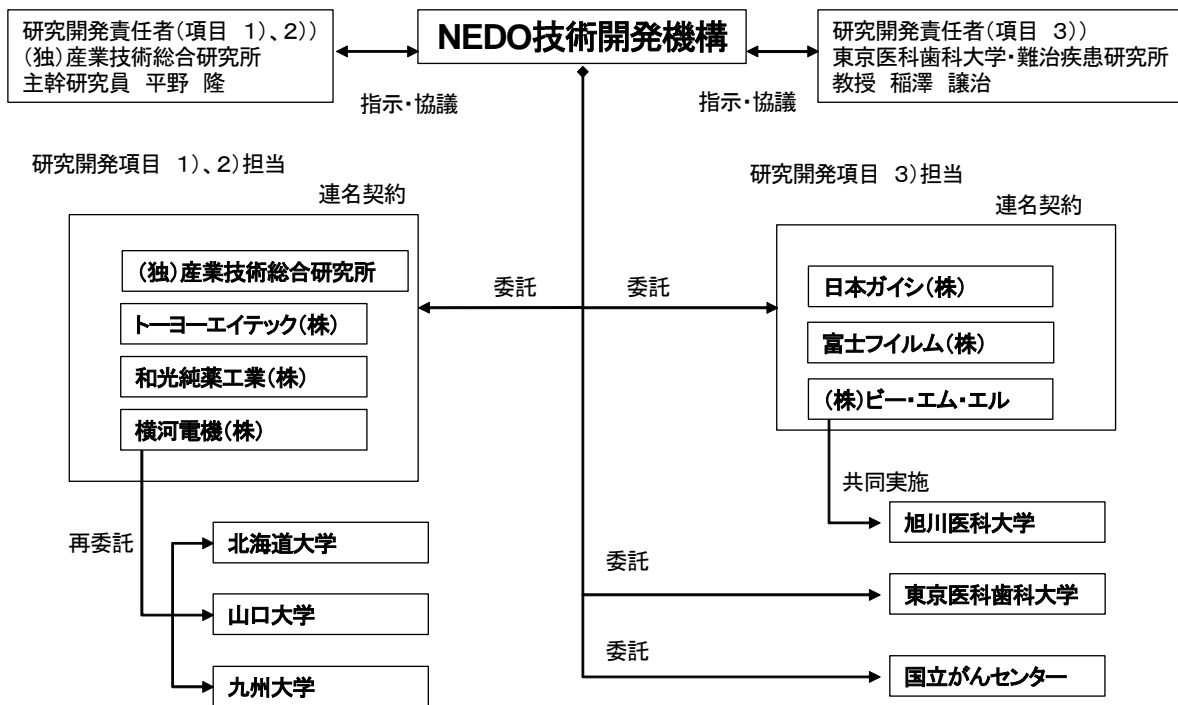
平成 21 年 6 月
平成 21 年 7 月
平成 21 年 12 月
平成 22 年 1 月

稲澤グループ第五回研究開発推進会議開催
産総研グループ第五回研究開発推進会議開催
稲澤グループ第六回研究開発推進会議開催
推進会議開催

8. 実施方針の改定履歴

(1) 3月5日、制定。

(別紙) 実施体制図



平成22年度実施方針

バイオテクノロジー・医療技術開発部

1. 件名: プログラム名 健康安心イノベーションプログラム
 ナノテク・部材イノベーションプログラム
 (大項目) 個別化医療の実現のための技術融合バイオ診断技術開発
 (中項目) 染色体解析技術開発

2. 根拠法

独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構法第15条第1項第2号

3. 背景及び目的・目標

(1) 背景及び目的

近年ゲノム解析技術の進展により、数十万から数百万塩基対に及ぶゲノム染色体上の大規模な異常(増幅、欠失等)が存在し、癌や遺伝疾患などの疾患と密接に関係していることが解明され始め、診断分野への応用に対する期待が高まっている。さらに、近年のポストゲノム研究の進展により、タンパク質をコードしない、いわゆる非コード領域を含むゲノム全領域にわたる数万から数十万塩基対の物理サイズにおける染色体異常と疾患の関係が明らかになりつつある。加えて、染色体コピー数多型と疾患の関係が今後のゲノム解析研究において重要となっている。しかし、このような染色体異常を高効率に解析し、診断応用に展開していくためには、性能、コスト等、飛躍的な向上のための技術開発が必要となっている。

本プロジェクトでは、我が国が有する微細加工技術・表面処理技術といったナノテク等の強みを活かし、こうした染色体異常を高感度、高精度かつ迅速、安価で非コード領域までを検出するゲノムアレイや解析基盤技術開発を行うとともに、全自動解析システムの開発を行う。さらに、臨床情報を有する臨床サンプルを解析することにより、ゲノムアレイを用いた染色体異常解析技術の有用性の検証を行い、臨床現場で活用できるバイオ診断機器の基盤を開発する。本プロジェクトはこれらの研究開発により個別化医療、すなわち個々人の体質に合わせた医療による効果的・効率的な医療の実現に寄与することを目的とする。

(2) 研究開発の目標

最終目標(平成22年度末)

バクテリア人工染色体(BAC)を用いた非コード領域を含むゲノム全領域を検出できる高精度ゲノムアレイを開発し、臨床サンプルを用いて、その有用性を実証する。さらに、臨床現場において、微量サンプル(数ナノグラム)から、12時間以内に染色体異常(増幅、欠失、コピー数多型等)を、低コストかつ定量性・再現性を確保して検出ができる全自動染色体異常解析システムのプロトタイプを開発し、その有効性について臨床サンプルを活用して実証する。[定量的解析精度の目標: 1コピーの増減を98%以上の感度と特異性(偽陽性率、偽陰性率がともに2%以下)で検出、再現性の目標: CVが5%以下]

中間目標(平成20年度末)

DNA 標識技術の開発やハイブリダイゼーションの効率化、スキャニング技術の臨床応用に向けた要素技術を開発するとともに、BACを用いた非コード領域を含むゲノム全領域を検出できる高精度ゲノムアレイの開発に目途をつける。さらに、個別化医療診断に活用できる全自動染色体異常解析システムのプロトタイプを開発し、その有用性を確認する。[ハイブリダイゼーション技術の目標: ハイブリ時間が5時間以内、スキャニング技術の目標: 3ミクロン以下の解像度、高輝度 DNA 標識技術の目標: 現行の10倍以上の輝度(標識、洗浄及びスキャニングを経て得られる数値ベース)]

4. 実施内容及び進捗状況

4.1 平成21年度委託事業内容

(独)産業技術総合研究所・産学官連携推進部門・産学官連携コーディネータ 平野隆氏をプロジェクトリーダーとして、以下の研究開発項目(1)(2)の研究開発を実施し、東京医科歯科大学・難治疾患研究所教授、稲澤讓治氏をプロジェクトリーダーとして、以下の研究開発項目(3)の研究開発を実施した。これらにより平成

21年度の目標を達成する(一部では超える)成果を得た。

(1)BACを用いた高精度全ゲノムアレイの開発

平成20年度に作成した物理的地図から人種差を最も保存している6番染色体上のHLA領域のBACについてショットガン法により塩基配列の解析を行い、シーケンチャーにより171,735塩基のアセンブルを行った。このBACは日本人に特有のハプロタイプを有しており、コーカシアン系欧米人には存在しないことが知られている。このBACの全塩基配列決定の結果、これまでに国際データベース上に登録された同じ位置の塩基配列とは異なる大規模な欠損、挿入、転位などの構造的異変が見出された。さらにこの解析で見出された新規SNPに関して、Affymetrix社等のSNPチップの基となる国際SNPデータベースでは数%以下のカバー率にしか至らず、日本人の特徴SNPは国際ヒトゲノム由来SNPでは判定できないことが明らかとなった。重複とはかなり異なることが示され、日本人のSNPデータベースとも異なる事が示された。

このような物理的地図の確定した日本人BACによる全ヒトゲノム領域をカバーするタイリングアレイの作製は最もBAC数が少なくなる方式で設計し、17000個のBACクローンを選択した。PCR増幅による特定領域の増幅の偏りを避けるため、17000のBACクローンDNAの大量増殖、調製、精製を行った。これら17000BACクローンDNAを一枚のガラススライド上にピン法によりスポットし、タイリングアレイの試作・改変を行った。

(実施体制: (独)産業技術総合研究所)

(2)染色体異常を解析する革新的要素技術の開発

①高精度表面加工修飾技術の研究開発

平成21年度においてはこれまで得られた技術を基にアレイ基板を作成し、特異的結合によるスポット内輝度の安定化及び非特異結合排除によるバックグラウンドの安定を確認した。またBACを精製しBAC搭載基板試作の準備を行った。

(実施体制: トーヨーエイテック株式会社)

②新規ゲノムアレイ用蛍光標識化技術の研究開発

平成20年度までに合成した当社固有の新規蛍光標識ヌクレオチドは、蛍光標識ヌクレオチドの取り込み率が悪かったため、取り込み率向上のために蛍光物質の基本骨格は変更せずに、側鎖の改良を行った。その結果、従来の蛍光物質の取り込み率には到達できなかったが、平成20年度までに合成した蛍光標識ヌクレオチドに比べ約2倍蛍光物質をDNA鎖中に取り込ませることに成功し、側鎖の改良の効果が見られた。

(実施体制: 和光純薬工業株式会社)

③疾患別アレイハイブリシステムの研究開発

a) 物理的ハイブリシステムの研究開発

物理的な強制攪拌による微小空間でのCGHチップ用物理的ハイブリ機構について試作の評価・改良を進め、ターゲットとプローブの会合促進による信号の安定化・ノイズ低減、ハイブリの高感度化、再現性・信頼性などを確認するための評価を実施した。また小型化した実CGHアレイを組み込んだ「物理的ハイブリシステム」を構築し、それによるハイブリを確認した。

b) 深い焦点深度の読取装置開発

差動により高精度な読取を可能にする2色読取方式と、深い焦点深度とS/N比の高い高感度な蛍光読取、小型・安価で高信頼性の機構を同時に実現するマルチビーム・ディスク方式の読取装置の改良を進め、第二次の試作を行った。特に深い焦点深度を生かした2色の液中測定の有効性を確認するとともに、基準サンプルによる測定・評価を行った。

(実施体制: 横河電機株式会社)

④ゲノム情報と臨床情報の統合化

大腸癌細胞におけるCGHアレイの結果と臨床的に重要な原発巣からのリンパ節転移予測因子、脈管侵襲と有意に関連した領域を特定した。また、クラスター解析により、ダイナミックなゲノム変異をきたす症例群とほとんどゲノム変異を認めない症例群とに二分された。特に前者においては高度に臨床病理学的因子との相関を認め、ゲノム変異自体が大腸癌進展に直接関与している可能性が考えられる。一方、解析した157例のうちmicrosatellite instability(MSI)陽性9例はすべて後者に属した。したがって今回の解析により大腸発癌の2大成因として知られる(chromosomal instability; CIN群とmicrosatellite instability; MIN群)をCGHアレイのクラ

スター解析により、初めて明確に示すことに成功した。さらに、発現アレイデータとの関係を明らかにしたところ、化学療法感受性・耐性機構についてもゲノムレベルで推察できる可能性を示した。したがって、再発・予後との関係あるいは抗腫瘍効果のデータが待たれるが、日本人タイリングアレイ解析を用いることにより大腸癌症例においては臨床的に極めて有用な予後再発予測マーカーあるいは治療感受性マーカーになる可能性が期待される。また、食道癌においては 50 症例以上のサンプルと臨床情報とを鋭意集積中である。

(実施体制: 横河電機株式会社—再委託九州大学)

⑤がん組織バンクの構築と CGH 解析

プロトコルに従い標準化されたヒト検体の保存と処理および組織バンク検体数の拡充を図るため、CGH アレイ解析用細胞検体のバンク登録数拡充を行っている。このうち平成21年度は、約 250 検体を新たに登録した。プロジェクト開始以来、現時点で約 3800 検体を収集し、管理・保存している。

また、北海道大学病院を中心とした登録患者情報の匿名化を含めて検体を確実に管理するためのシステムを導入しているが、平成21年度には臨床データ管理に関するシステムを構築するとともに実際に臨床データの解析を行った。また検体保存の信頼性の確認および予後との相関解析のために、肝細胞癌症例を用いてアレイ CGH 解析を行った。

(実施体制: 横河電機株式会社—再委託北海道大学)

⑥疾患別 BAC アレイの設計

50 例以上の大腸がんにおける DNA コピー数異常についてアレイ CGH 解析を実施し、癌の悪性度、進行度等に関連する変化を抽出し、病態評価用ミニアレイ作成のための基本的デザインを行った。

(実施体制: 横河電機株式会社—再委託山口大学)

(3)臨床診断用全自動染色体異常解析システムの開発

①臨床診断用全自動染色体異常解析装置の開発

病院内検査に適している分散型全自動染色体解析装置については、プロトコルを含め、検体の前処理反応モジュール、ゲノムアレイ反応モジュール、蛍光シグナル検出器を一体化した装置を試作し、動作検証を行った。その結果、検出シグナルの強度、再現性等課題は残るものの、ゲノムアレイ検査に必要な一連の煩雑な操作を自動化させることができた。

一方、臨床検査センターに適している集中型全自動染色体異常解析装置については、前年度の懸案事項であった下記の問題に対処した。

- i) ハイブリダイゼーション工程におけるムラ・均一性を改善する為のハイブリ動作機構と洗浄動作機構の改良
- ii) スキャナーの S/N 比及び精度を改善する為の補正演算の組み込みと、検出時間の短縮を図る為のレーザ照射方法の改良
- iii) Dual ハイブリダイゼーションに必要なコントロール DNA を調製する為の自動化ソフト・ハードの開発
- iv) ユーザビリティの優れた装置にする為のソフトウェアの改良

以上の施策を施し、最終年度での評価フェーズに供する全自動プロトタイプ機(ver.III)の目処を立てた。

②診断用ゲノムアレイの開発

a)先天性疾患を診断するための GD(Genome Disorder)アレイの開発

新規に開発した Dual ハイブリ法を用いて GD700 アレイによる先天性疾患の診断系を確立し、GD700 の製造及び臨床検査受託を開始した。

GD700 アレイ検査の用途を広げるために患者数が多く且つ検査についてニーズのある不育症分野に注目し、流産産物の解析を行い受託検査実施に向けてデータ収集を行った。

b)WG(Whole Genome)4500 アレイを用いた先天性疾患の解析

GD アレイで陰性の疾患について WG4500 を用いた解析を継続した。これまでと同様、約 20%の頻度で微細ゲノム異常を検出した。新規疾患を診断できるゲノム異常を見だし、これまで2件の特許を出願した。

c)WG15000 アレイの作製と CNV データベースの構築

ヒト全染色体を網羅する 15,000 種類の BAC プローブを搭載した高精度ゲノムアレイ(WG15000)を作製した。

WG15000 アレイは、テストハイブリダイゼーションにより解析に十分な感度と特異性を持ちうるパフォーマンスを確認した。一方、WG15000 対応の CNV 解析ソフトを開発し、データ収集の基本フォーマットの構成ならびに WG4500 より大量のデータを効率よく解析できるシステムに改良した。

これらの結果を受け、WG15000 を用いて日本人 100 家系 Trio 解析を進めており、WG4500 を用いた結果と比較しより精度の高いデータベースを構築中である。

d)がんの染色体異常の解析と個別化医療での診断コンテンツの開発

BAC アレイ(CA(Cancer Array)800/CA1500/WG4500)を用いて実施した CGH 解析およびメチル化 CpG アイランド増幅 (BAMCA) 法による DNA メチル化異常解析の結果を、癌個性診断コンテンツとしてまとめた。腎癌、大腸癌、肝癌、膵癌、肺癌、胃癌、尿路上皮癌の 7 種類の癌について、各癌に特徴的な高頻度/高等度コピー数異常を検出する BAC プローブ、臨床病理学的因子と相関するコピー数異常を検出する BAC プローブ、発癌リスクや予後と相関するメチル化異常を検出する BAC プローブをリストアップした。

低分化型胃癌に特徴的な 13q22 ゲノム増幅異常について詳細に解析し、KLF12 遺伝子の発現上昇が低分化型胃癌のびまん性増殖に関与していることを見出した。また低分化型胃癌におけるチロシンキナーゼ遺伝子異常をキナーゼドメインの網羅的シーケンス解析により実施し、アミノ酸置換を伴う遺伝子変異を同定した。複数症例で変異が検出された4遺伝子と、ゲノム増幅を伴う5遺伝子は低分化型胃癌の治療標的となる可能性がある。

大腸癌、口腔癌、肝細胞癌各 50 例の CA1500 によるアレイ CGH 解析から得られたデータをノーマライズの上、これまでに得られている各症例の臨床病理学的データとの比較検討により、より詳細な診断マーカー・治療標的の抽出を行った。さらに、口腔癌については、増幅標的遺伝子候補 PAK4 ならびに FADD について詳細な検討を行い、診断・治療標的になりうることを確認した。また、肝細胞癌については、メチル化、発現解析との総合により、新規肝細胞癌抑制マイクロ RNA 候補 miR-124 と miR-203 を同定するとともに、肝癌の血行性転移の予測マーカーになりうる遺伝子セットを同定した。

(実施体制:東京医科歯科大学、株式会社ビー・エム・エルー共同実施旭川医科大学、富士フィルム株式会社、日本ガイシ株式会社、国立がんセンター)

4. 2 実績推移

	18 年度	19 年度	20 年度	21 年度
実績額推移 一般勘定(百万円)	323	416	323	323
特許出願件数(件)	1	2	19	9
論文発表数(報)	1	30	36	51
フォーラム等(件)	1	63	65	75

5. 事業内容

(独)産業技術総合研究所・産学官連携推進部門・産学官連携コーディネータ 平野隆氏をプロジェクトリーダーとして、以下の研究開発項目(1)(2)の研究開発を実施し、東京医科歯科大学・難治疾患研究所教授 稲澤譲治氏をプロジェクトリーダーとして、以下の研究開発項目(3)の研究開発を実施する。実施体制については別紙参照のこと。

5. 1 平成22年度委託事業内容

個別化医療に供する、疾患と染色体異常の検証、診断機器開発を行うため、現状の染色体検査との整合性が高く、また、高感度化や低コスト化への期待が高いバクテリア人工染色体(BAC)を用いたゲノムアレイに着目し、診断応用に必要とされる高感度、高精度かつ迅速、安価といった要求を満たす革新的要素技術の開発を行い、臨床診断用全自動染色体異常解析システムを開発することを目標とする。なお、これらの研究開発を行うにあたり、診断利用の有効性を検証するため、疾患と染色体異常の関係について臨床サンプルを用いた検証を行いながら、研究開発を推進する。この目標を達成するための研究開発項目は次の通りとする。

(1) BAC を用いた高精度全ゲノムアレイの開発

日本人 BAC ライブラリーの両末端塩基配列により全ヒトゲノム領域を 90%カバーすることが明らかとなったヒトゲノム物理地図に基づき平成21年度に試作した17000バージョンアップ全ゲノムアレイについて、臨床癌検

体由来 DNA を用いて有効性の検証を行なう。胃癌について限られた数の日本人 BAC によるミニアレイを試作・改良し、臨床癌検体 DNA による有効性評価を行う。

(実施体制: (独)産業技術総合研究所)

(2) 染色体異常を解析する革新的要素技術の開発

① 高精度表面加工修飾技術の研究開発

開発した DNA チップについて、平成21年度に引き続き、BAC を用いたスポットへの固定化均一性等の性能評価を行い、BAC を搭載したミニチップ基板を試作する。

(実施体制: トーヨーエテック株式会社)

② 新規ゲノムアレイ用蛍光標識化技術の研究開発

平成21年度に検討した側鎖を変更した新規蛍光物質は、酵素による取り込みに改善が見られたものの、まだ十分な取り込みが見られない事が明らかとなった。そこで、更に酵素による取り込みを向上させるために更なる側鎖の改良を行い、蛍光物質を新規に 2 種合成し、取り込み率向上について検討し、最終的な目標である新規な蛍光標識ヌクレオチドを用いた蛍光標識試薬を組み上げる。

(実施体制: 和光純薬工業株式会社)

③ 疾患別アレイハイブリシシステムの研究開発

a) 物理的ハイブリシステムの研究開発

物理的な強制攪拌による微小空間での CGH チップ用物理的ハイブリ機構の試作の評価・改良を進めると共に、同時に開発を行っている深い焦点深度の読取装置と連携させ、全体のシステムとして実用的なサイズにまとめる。

b) 深い焦点深度の読取装置開発

読取方式と、深い焦点深度と S/N 比の高い高感度な蛍光読取、小型・安価で高信頼性の機構を同時に実現するマルチビーム・ディスク方式と 2 色液中観察光学系機能を実装した読取装置を実現し、同時に開発を行っている物理的ハイブリシステムと連携させ、物理的ハイブリシステムによりハイブリされた小型チップの測定を全て液中で行い、評価を通してシステムの有効性について検証を行う。

(実施体制: 横河電機株式会社)

④ ゲノム情報と臨床情報の統合化

平成21年度の研究を更に進め、食道癌、大腸癌について CGH アレイおよび包括的遺伝子発現プロファイルの結果、各種臨床病理学的因子、転移・再発との関係あるいは抗癌剤感受性に及ぼす影響について、遺伝子発現・ゲノム変化について統合的に解析を進めている。日本人アレイ開発のためのゲノム遺伝子情報を総括する。

(実施体制: 横河電機株式会社—再委託九州大学)

⑤ がん組織バンクの構築と CGH 解析

がん組織バンクの構築と参加する全施設における組織バンクへの登録患者情報の匿名化および臨床データ管理体制を確立し、登録件数の更なる増加や臨床データとのリンクを行なう。また、このシステムを用いて、臨床検体の実際のアレイ解析を進め、その有用性を確認するとともに、医学的解析を行なう。同時に、検体の保存状況の確認などにより、様々な解析に耐えうるがん組織バンクの運営を行う。

(実施体制: 横河電機株式会社—再委託北海道大学)

⑥ 疾患別 BAC アレイの設計

胃癌、大腸癌を中心として、引き続きアレイ CGH 解析を継続して行い、臨床病理学的データとの対比により、癌の病態評価(病期、リンパ節転移の有無等)を可能とするゲノムコピー数異常を抽出する。同時に産総研で本プロジェクトにより作成された BAC アレイの評価も実施する。

(実施体制: 横河電機株式会社—再委託山口大学)

(3) 臨床診断用全自動染色体異常解析システムの開発

① 臨床診断用全自動染色体異常解析装置の開発

分散型全自動染色体異常解析装置については、平成21年度に試作した自動解析装置を改良し、臨床検体の解析で有効性を実証、さらに、低コストかつ定量性、再現性を担保して検出できるシステムを完成する。

集中型全自動染色体異常解析装置について、評価フェーズである最終年度において、全自動プロトタイプ機(ver.III)を用いての安全性評価、操作性評価、及び実技試料評価を遂行する。評価フェーズで出てくる問題は小さいものと予想しており、それらに逐次対処することでバージョンアップを行い、集中型全自動染色体異常解析装置を完成させる。

② 診断用ゲノムアレイの開発

a)ゲノム微細異常を診断するための GD アレイの開発

GD700 を用いた臨床検査受託として先天性疾患に加えて、市場の大きい不育症分野での流産産物の解析受託を開始する。

b)高精度ゲノムアレイ(WG15000)の作製と CNV データベースの構築

WG15000 の評価を行うために、搭載した BAC DNA の 1 割について FISH 法での確認試験を行う。

WG15000 を用いて日本人 100 家系の Trio 解析を完了し、精度の高い CNV データベースを構築し、随時公開する。

c)がんの染色体異常の解析と個別化医療での診断コンテンツの開発

これまで CA1500 及び WG4500 を用いて腎癌、大腸癌、食道扁平上皮癌、骨軟部腫瘍、肝胆膵癌、口腔癌、胃癌の悪性度及び予後予測に有用な BAC DNA を絞りこんできた。それらを搭載したフォーカスタレイを作製し、上記固形癌の診断について有用性を検討する。さらに、各固形癌で網羅的に抽出した BAC DNA コンテンツの中から新規の診断及び治療標的分子を同定する。

また、得られた各診断・治療標的候補遺伝子(マイクロ RNA を含む)について、生物学的・臨床病理学的意義の解明と in vivo での治療標的としての妥当性とその方法について確認するため、in vivo、in vitro での機能解明と発現調節による治療効果の検証、ならびに各種癌における発現、ゲノム・エピゲノム異常パターンとその臨床病理学的データとの比較検討を、大規模コホートを用いて行い、実用化に目処をつける。

(実施体制:東京医科歯科大学、株式会社ビー・エム・エルー共同実施旭川医科大学、富士フィルム株式会社、日本ガイシ株式会社、国立がんセンター)

5. 2 平成22年度事業規模

委託事業

一般勘定 214百万円(継続)

注) 事業規模については、多少の変動があり得る。

6. その他重要事項

(1)評価の方法

独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構(以下、「NEDO」という。)は、技術的および政策的観点から、研究開発の意義、目標達成度、成果の技術的意義並びに将来への波及効果等について、外部有識者による研究開発の事後評価を平成23年度に実施する。

(2)運営・管理

当該プロジェクトの実施にあたっては、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」(平成 13 年度文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第 1 号)を厳守し研究開発を推進する。また、本研究開発成果の事業化においては、「経済産業分野のうち個人情報を用いた事業分野における個人情報保護ガイドライン」(平成 16・12・24 製局第 1 号)を厳守する。

7. 本年度のスケジュール

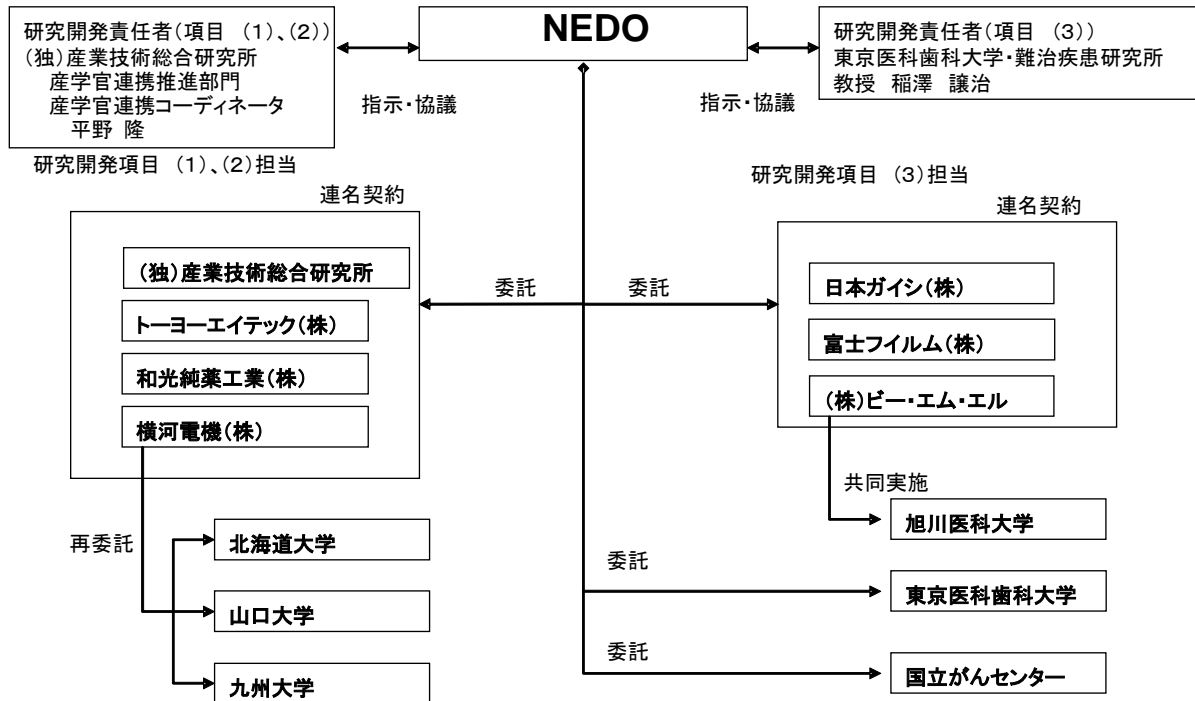
平成 22 年 6 月	稲澤グループ第七回研究開発推進会議開催
平成 22 年 7 月	産総研グループ第六回研究開発推進会議開催
平成 22 年 12 月	稲澤グループ第八回研究開発推進会議開催
平成 23 年 1 月	推進会議開催

8. 実施方針の改定履歴

(1)平成22年3月9日、制定。

(別紙)

実施体制図



平成23年度実施方針

バイオテクノロジー・医療技術部

1. 件名:プログラム名 健康安心イノベーションプログラム
ナノテク・部材イノベーションプログラム
(大項目) 個別化医療の実現のための技術融合バイオ診断技術開発
(中項目) 染色体解析技術開発

2. 根拠法

独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構法第15条第1項第2号

3. 背景及び目的・目標

(1)背景及び目的

近年ゲノム解析技術の進展により、数十万から数百万塩基対に及ぶゲノム染色体上の大規模な異常(増幅、欠失等)が存在し、癌や遺伝疾患などの疾患と密接に関係していることが解明され始め、診断分野への応用に対する期待が高まっている。さらに、近年のポストゲノム研究の進展により、タンパク質をコードしない、いわゆる非コード領域を含むゲノム全領域にわたる数万から数十万塩基対の物理サイズにおける染色体異常と疾患の関係が明らかになりつつある。加えて、染色体コピー数多型と疾患の関係が今後のゲノム解析研究において重要となっている。しかし、このような染色体異常を高効率に解析し、診断応用に展開していくためには、性能、コスト等、飛躍的な向上のための技術開発が必要となっている。

本プロジェクトでは、我が国が有する微細加工技術・表面処理技術といったナノテク等の強みを活かし、こうした染色体異常を高感度、高精度かつ迅速、安価で非コード領域までを検出するゲノムアレイや解析基盤技術開発を行うとともに、全自動解析システムの開発を行う。さらに、臨床情報を有する臨床サンプルを解析することにより、ゲノムアレイを用いた染色体異常解析技術の有用性の検証を行い、臨床現場で活用できるバイオ診断機器の基盤を開発する。本プロジェクトはこれらの研究開発により個別化医療、すなわち個々人の体質に合わせた医療による効果的・効率的な医療の実現に寄与することを目的とする。

(2)研究開発の目標

最終目標(平成23年11月末)

バクテリア人工染色体(BAC)を用いた非コード領域を含むゲノム全領域を検出できる高精度ゲノムアレイを開発し、臨床サンプルを用いて、その有用性を実証する。さらに、臨床現場において、微量サンプル(数ナノグラム)から、12時間以内に染色体異常(増幅、欠失、コピー数多型等)を、低コストかつ定量性・再現性を確保して検出ができる全自動染色体異常解析システムのプロトタイプを開発し、その有効性について臨床サンプルを活用して実証する。また、高密度ジェノタイピング情報を付加した日本人の良性及び病因CNVデータベースを構築し、次世代型ゲノムアレイコンテンツを開発する。[定量的解析精度の目標:1コピーの増減を98%以上の感度と特異性(偽陽性率、偽陰性率がともに2%以下)で検出、再現性の目標:CVが5%以下]

中間目標(平成20年度末)

DNA 標識技術の開発やハイブリダイゼーションの効率化、スキャニング技術の臨床応用に向けた要素技術を開発するとともに、BACを用いた非コード領域を含むゲノム全領域を検出できる高精度ゲノムアレイの開発に目途をつける。さらに、個別化医療診断に活用できる全自動染色体異常解析システムのプロトタイプを開発し、その有用性を確認する。[ハイブリダイゼーション技術の目標:ハイブリ時間が5時間以内、スキャニング技術の目標:3ミクロン以下の解像度、高輝度 DNA 標識技術の目標:現行の10倍以上の輝度(標識、洗浄及びスキャニングを経て得られる数値ベース)]

4. 実施内容及び進捗状況

4.1 平成22年度委託事業内容

(独)産業技術総合研究所・イノベーション推進本部・イノベーションコーディネータ 平野 隆氏をプロジェクトリーダーとして、以下の研究開発項目(1)(2)の研究開発を実施し、東京医科歯科大学・難治疾患研究所教授 稲澤 譲治氏をプロジェクトリーダーとして、以下の研究開発項目(3)の研究開発を実施した。これらにより平成22年度の目標を達成する(一部では大幅に超える)成果を得た。なお、実施体制については別紙参照のこと。

(1)BAC を用いた高精度全ゲノムアレイの開発

遺伝学的に日本人と確定したオリジナル「日本人ゲノムライブラリー」の物理的地図についてゲノム断片の両末端解析を 18 万クローンに展開し、ヒトゲノム全領域のカバー率を 96%に高めた。また日本人のゲノムの特徴を明らかにするため日本人の同定に用いた 6 番染色体 HLA 領域の断片についてキャピラリーシーケンサーを用い、コンティグ作成、ギャップシーリングを経て約 17 万塩基の完全解析を完了した。この結果日本人のゲノムは国際ヒトゲノムコンソーシアムの結果得られたコーカシアン系塩基配列と構造上及び一塩基多型上大きく異なることが明確となった。さらにこの解析済み断片と対をなすハプロタイプ断片についても完全塩基配列の解析を完了した。ヒトゲノム上で両ハプロタイプの完全塩基配列を確定したのは世界初であった。

この「日本人ゲノムライブラリー」の物理的地図に基づき、全ゲノム領域をカバーする高精度ゲノムアレイの設計を行い、全ゲノムアレイプレートの作成を行った。全ゲノムアレイプレートの約 1.7 万個クローンのゲノム断片の大量増幅、精製を行い、1 枚のガラスプレート上に全ゲノムアレイの作成を行った。この全ゲノムアレイの定量性評価のため、正常人ゲノム及び染色体多重ゲノムのハイブリを行い、基線分散値 7%、直線性 99%であることを確認した。この分析値は市販の 4K ゲノムアレイに匹敵する定量性を有することを示した。この全ゲノムアレイを用いて胃癌の培養株及び患者由来の DNA の解析を行い、増幅及び欠損を検出し、全ゲノムアレイの有用性を検証した(最終目標達成)。さらに大学・企業との連携のため「日本人ゲノムライブラリー」を用いて胃癌の病態診断のためのミニアレイを作製し、全ゲノムアレイと同様に胃癌の培養株及び患者由来の DNA の解析を行い、有用性を確認し目標を達成した。

(実施体制:(独)産業技術総合研究所)

(2)染色体異常を解析する革新的要素技術の開発

①高精度表面加工修飾技術の研究開発

平成21年度に実施したスポットの表面処理方法では DNA 溶液の親和性が不十分であることが分かったため、平成22年度は DNA 溶液の親和性と DNA の結合性を両立できる表面組成の最適化を行った。これまでに開発した技術と併せた基板はシャープな境界、スポット内輝度の安定化、バックグラウンドが安定した基板が得られた。さらに、BAC を搭載した胃癌評価用ミニアレイを試作した。

(実施体制:トーヨーエイテック株式会社)

②新規ゲノムアレイ用蛍光標識化技術の研究開発

平成22年度においては、側鎖を改良した 2 種の蛍光物質(WY-535-S2、WY-635-S2)を合成し、ヌクレオチド化を行った。これまでに合成した 4 種の蛍光物質(WY-535-S4、WY-635-S4、WY-535-S3、WY-635-S3)とともに、蛍光標識ヌクレオチドの取り込み率を比較したところ、昨年度合成した蛍光物質(WY-535-S3、WY-635-S3)が最も取り込み率が高かった。これらの最も取り込み率の高かった WY-535-S3、WY-635-S3 を用いてマクロジェン社製 BAC アレイで CGH 解析を行ったところ、1コピーの差を十分に検出できる結果が得られた。さらに、本プロジェクトで作製したミニアレイで CGH 解析を行ったところ、十分な輝度が得られることが確認でき、当初の目標を達成できた。

(実施体制:和光純薬工業株式会社)

③疾患別アレイハイブリシステムの研究開発

a)物理的ハイブリシステムの研究開発

物理的な強制攪拌による微小空間での CGH チップ用物理的ハイブリ機構について試作の評価・改良を進め、ハイブリ条件、物理攪拌条件、洗浄条件を最適化することで物理ハイブリは静置に対して約 2 倍の信号光量の増加を確認した。また小型化したミニアレイを組み込んだハイブリユニットと処理装置による実用的なサイズのシステム化を実現し、それによるハイブリダイゼーションを確認できた。

b)深い焦点深度の読取装置開発

新パターンによるマルチビーム・ディスク方式により、深い焦点深度、高感度、高 S/N、を確認し、要素技術を結合して 2 色で液中計測が可能な読取装置を実現した。また同時に開発を行っている物理的ハイブリ

システムと連携させ、物理的ハイブリシステムによりハイブリ化されたミニアレイの測定を全て液中で行いハイブリダイゼーションを確認できた。

c) 研究開発の連携

研究開発項目の(1)の日本人 BAC、(2)–⑤のがんのコンテンツ、(2)–①の基板、(2)–②の蛍光標識試薬を同時に連携させ、ハイブリユニットによりハイブリ自動処理から読取の画像取得まで一連の処理をシステムとして動作確認できた。

(実施体制:横河電機株式会社)

④ゲノム情報と臨床情報の統合化

大腸・直腸がんに関して収集した全 4,902 例(症例群 1,917 例、対照群 2,985 例;平成21年度時点の実数)を用いて、30 万 SNPs において抽出された多型から上位 10%の頻度の高いものから着手し研究を進展させてきた。平成22年度は、アレイによる多型データの収集、アレイによる遺伝子発現データ、さらに疫学関連データの収集を精力的に実施してきた。

その結果、第 8 番、第 10 番、第 11 番、第 14 番、第 15 番、第 16 番、第 18 番、第 19 番、第 20 番染色体を含む複数の領域から同定した SNPs の機能解析を実施し、確認、生活習慣等の他の総合パラメーターとの関連解析を統合して進めた。特に、生活習慣では、糖尿病、肉食習慣、肥満が危険因子、ツナ食、ビタミン摂取が防御因子であることを明らかにした。さらに多型との交互作用関係で注目されたのは染色体 8 番長腕と糖尿病、あるいは 10 番短腕と肉食または糖尿病とが交互作用を認めた。この関係については、東京大学医科学研究所宮野悟教授との共同研究によりスーパーコンピューターを用いた Meta GP 解析を行った結果、3 つの遺伝子モジュール(Transcription factor、Pathway、Ontology)それぞれより代表的な遺伝子(各々、Collagen family、Insulin-Akt、PPARG)が同定された。

また、全染色体レベルで高密度のマッピング解析を実施し、ゲノムコピー数変異とリクスアレル・臨床病期を 2 次元に展開する解析を行った。われわれは 8q24 が大腸発癌及びゲノムコピー数変異へ影響し予後とも相関する多型であることを明らかにしたが、8q24 多型をアレル別にみた発現モジュール(extraction expression module; EEM)解析の結果、8q24 は MYC 経路の活性化を介してゲノムコピー数変異及び予後への影響を及ぼすことを明らかにした。

(実施体制:横河電機株式会社一再委託:九州大学)

⑤がん組織バンクの構築と CGH 解析

プロトコルに従い標準化されたヒト検体の保存と処理及び組織バンク検体数の拡充を図るため、CGH アレイ解析用のみならず、様々な解析に耐えうるがん組織バンク登録数拡充を行っている。このうち平成22年度は、約 200 検体を新たに登録した。プロジェクト開始以来、現時点で約 4,000 検体を収集し、管理・保存している。

また、北海道大学病院を中心とした登録患者情報の匿名化を含めて検体を確実に管理するためのシステムを導入しているが、平成22年度には臨床データ管理に関するシステムを構築するとともに予後を含めた臨床データを更新した。また検体保存の信頼性の確認及び予後との相関解析のために、肝細胞癌や胃癌・膵癌などの症例を用いてアレイ CGH や糖鎖解析を含む各種の医学的解析を行った。

(実施体制:横河電機株式会社一再委託:北海道大学)

⑥疾患別 BAC アレイの設計

50 例以上の胃癌における DNA コピー数異常についてアレイ CGH 解析を実施し、癌の悪性度、進行度等に関連する変化を抽出し、病態評価用ミニアレイ作成のための基本的デザインを行った。

(実施体制:横河電機株式会社一再委託:山口大学)

(3)臨床診断用全自動染色体異常解析システムの開発

①臨床診断用全自動染色体異常解析装置の開発

病院内検査に適している分散型全自動染色体解析装置については、プロトコルを含め、検体の前処理反応モジュール、ゲノムアレイ反応モジュール、蛍光シグナル検出器を一体化した装置を試作し、動作検証を行った。その結果、検出シグナルの強度、再現性等課題は残るものの、ゲノムアレイ検査に必要な一連の煩雑な操作を自動化させることができた。

一方、臨床検査センターに適している集中型全自動染色体異常解析装置については、前年度の懸案事項であった下記の問題に対処した。

- ii) ハイブリダイゼーション工程におけるムラ・均一性を改善するためのハイブリ動作機構と洗浄動作機構の改良
 - ii) スキャナーの S/N 比及び精度を改善するための補正演算の組み込みと、検出時間の短縮を図るためのレーザ照射方法の改良
 - iii) Dual ハイブリダイゼーションに必要なコントロール DNA を調製するための自動化ソフト・ハードの開発
 - iv) ユーザビリティの優れた装置にするためのソフトウェアの改良
- 以上の施策を施し、最終年度での評価フェーズに供する全自動プロトタイプ機(ver.III)の目処を立てた。

②診断用ゲノムアレイの開発

a)先天性疾患を診断するための GD(Genome Disorder)アレイの開発

新規に開発した Dual ハイブリ法を用いて GD700 アレイによる先天性疾患の診断系を確立し、GD700 の製造及び臨床検査受託を開始した。

GD700 アレイ検査の用途を広げるために患者数が多く且つ検査についてニーズのある不育症分野に注目し、流産産物の解析を行い受託検査実施に向けてデータ収集を行った。

GD アレイ開発当初に搭載した既知染色体微細欠失症候群 30 種類と全染色体サブテロメア(第 13, 14, 15, 21, 22 番染色体短腕を除く)領域をカバーする BAC クローンに加えて、傍セントロメア(pericentromeric)領域の BAC クローンを搭載することで環状染色体異常や弧発染色体数滴的異常症の検出パワーを担保した。

臨床で実施されている染色体検査で以上を検出できなかった先天異常症の 536 例を対象に GD アレイの第 1 次スクリーニングで 54 例(10.1%)に病因性 CNV を検出した。このことから保険適応の染色体検査の代替・補完検査で実用レベルであることが検証された。

b)WG(Whole Genome)4500 アレイを用いた先天性疾患の解析

GD アレイで陰性の疾患について WG4500 を用いた解析を継続した。これまでと同様、約 20%の頻度で微細ゲノム異常を検出した。新規疾患を診断できるゲノム異常を見だし、これまで 2 件の特許を出願した。

上記 a)の GD アレイ陰性症例の 482 例のうち、無作為の 349 症例を対象に WG4500 を用いた第 2 次スクリーニングを行い 48 例(113.8%)に病因性 CNV を検出した。

c)WG15000 アレイの作製と CNV データベースの構築

ヒト全染色体を網羅する 15,000 種類の BAC プローブを搭載した高精度ゲノムアレイ(WG15000)を作製した。

WG15000 アレイは、テストハイブリダイゼーションにより解析に十分な感度と特異性を持ちうるパフォーマンスを確認した。一方、WG15000 対応の CNV 解析ソフトを開発し、データ収集の基本フォーマットの構成ならびに WG4500 より大量のデータを効率よく解析できるシステムに改良した。

これらの結果を受け、WG15000 を用いて日本人 100 家系 Trio 解析を行った。また、WG4500 を用いた結果と比較しより精度の高いデータベースを構築した。

d)がんの染色体異常の解析と個別化医療での診断コンテンツの開発

BAC アレイ(CA(Cancer Array)800/CA1500/WG4500)を用いて実施した CGH 解析及びメチル化 CpG アイランド増幅(BAMCA)法による DNA メチル化異常解析の結果を、癌個性診断コンテンツとしてまとめた。腎癌、大腸癌、肝癌、膵癌、肺癌、胃癌、尿路上皮癌の 7 種類の癌について、各癌に特徴的な高頻度/高等度コピー数異常を検出する BAC プローブ、臨床病理学的因子と相関するコピー数異常を検出する BAC プローブ、発癌リスクや予後と相関するメチル化異常を検出する BAC プローブをリストアップした。

低分化型胃癌に特徴的な 13q22 ゲノム増幅異常について詳細に解析し、KLF12 遺伝子の発現上昇が低分化型胃癌のびまん性増殖に関与していることを見出した。また低分化型胃癌におけるチロシンキナーゼ遺伝子異常をキナーゼドメインの網羅的シークエンス解析により実施し、アミノ酸置換を伴う遺伝子変異を同定した。複数症例で変異が検出された 4 遺伝子と、ゲノム増幅を伴う 5 遺伝子は低分化型胃癌の治療標的となる可能性がある。

大腸癌、口腔癌、肝細胞癌各 50 例の CA1500 によるアレイ CGH 解析から得られたデータをノーマライズの上、これまでに得られている各症例の臨床病理学的データとの比較検討により、より詳細な診断マ

カー・治療標的の抽出を行った。さらに、口腔癌については、増幅標的遺伝子候補 PAK4 ならびに FADD について詳細な検討を行い、診断・治療標的になりうることを確認した。また、肝細胞癌については、メチル化、発現解析との総合により、新規肝細胞癌抑制マイクロ RNA 候補 miR-124 と miR-203 を同定するとともに、肝癌の血行性転移の予測マーカーになりうる遺伝子セットを同定した。

上記の成果に基づき、癌 CNV 検出ミニアレイを作製し、肝臓癌、食道癌でのパフォーマンスを確認した。
(実施体制:東京医科歯科大学、株式会社ビー・エム・エルー共同実施)

(旭川医科大学、富士フィルム株式会社、日本ガイシ株式会社、国立がん研究センター)

4. 2 実績推移

	18年度	19年度	20年度	21年度	22年度
実績額推移					
一般勘定(百万円)	323	416	323	323	359
特許出願件数(件)	1	2	19	9	10
論文発表数(報)	1	30	36	51	91
フォーラム等(件)	1	63	65	75	100

5. 事業内容

東京医科歯科大学・難治疾患研究所教授 稲澤譲治氏をプロジェクトリーダーとして、以下の内容で研究開発項目の 3)-③を実施する。実施体制については別紙参照のこと。

5. 1 平成23年度委託事業内容

個別化医療に供する疾患と染色体異常の関連検証や、診断機器開発を行うため、現状の染色体検査との整合性が高く、また、高感度化や低コスト化への期待が高いバクテリア人工染色体(BAC)を用いたゲノムアレイに着目し、診断応用に必要とされる高感度、高精度かつ迅速、安価といった要求を満たす革新的要素技術の開発を行い、臨床診断用全自動染色体異常解析システムを開発することを目標とする。なお、これらの研究開発を行うにあたり、診断利用の有効性を検証するため、疾患と染色体異常の関係について臨床サンプルを用いた検証を行いながら、研究開発を推進する。この目標を達成するための研究開発項目は次の通りとする。

(1) BAC を用いた高精度全ゲノムアレイの開発(平成22年2月終了)

(2) 染色体異常を解析する革新的要素技術の開発(平成22年2月終了)

- ① 高精度表面加工修飾技術の研究開発
- ② 新規ゲノムアレイ用蛍光標識化技術の研究開発
- ③ 疾患別アレイハイブリシステムの研究開発
- ④ ゲノム情報と臨床情報の統合化
- ⑤ がん組織バンクの構築と CGH 解析
- ⑥ 疾患別 BAC アレイの設計

(3)臨床診断用全自動染色体異常解析システムの開発

① 臨床診断用全自動染色体異常解析装置の開発(平成22年2月終了)

② 診断用ゲノムアレイの開発(平成22年2月終了)

③ 高密度ジェノタイプング情報を付加した日本人の良性及び病因 CNV データベースの構築と次世代ゲノムアレイコンテンツを開発する。また、本事業により開発し実用化された先天異常症診断用ゲノムアレイ(Genome Disorder array、通称 GD アレイ)の日本人病因 CNV を判定するためのリファレンス情報を取得し、当該研究開発事業で開発した GD アレイを含む高精度ゲノムアレイ(WG15000)ならびにがん診断用ゲノムアレイの診断精度の向上化を図る。

(実施体制:東京医科歯科大学、協力企業:株式会社ビー・エム・エル、富士フィルム株式会社、日本ガイシ株式会社)

5. 2 平成23年度事業規模

委託事業

一般勘定 65.5百万円(継続)

注) 事業規模については変動があり得る。

6. その他重要事項

(1) 評価の方法

独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構(以下、「NEDO」という。)は、技術的及び政策的観点から、研究開発の意義、目標達成度、成果の技術的意義並びに将来への波及効果等について、外部有識者による研究開発の事後評価を平成23年度に実施する。

(2) 運営・管理

当該プロジェクトの実施にあたっては、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」(平成13年度文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第1号)を厳守し研究開発を推進する。また、本研究開発成果の事業化においては、「経済産業分野のうち個人遺伝情報を用いた事業分野における個人情報保護ガイドライン」(平成16・12・24 製局第1号)を厳守する。なお、関連指針等が改正されたときは、改正後の指針を適用するものとする。

7. 本年度のスケジュール

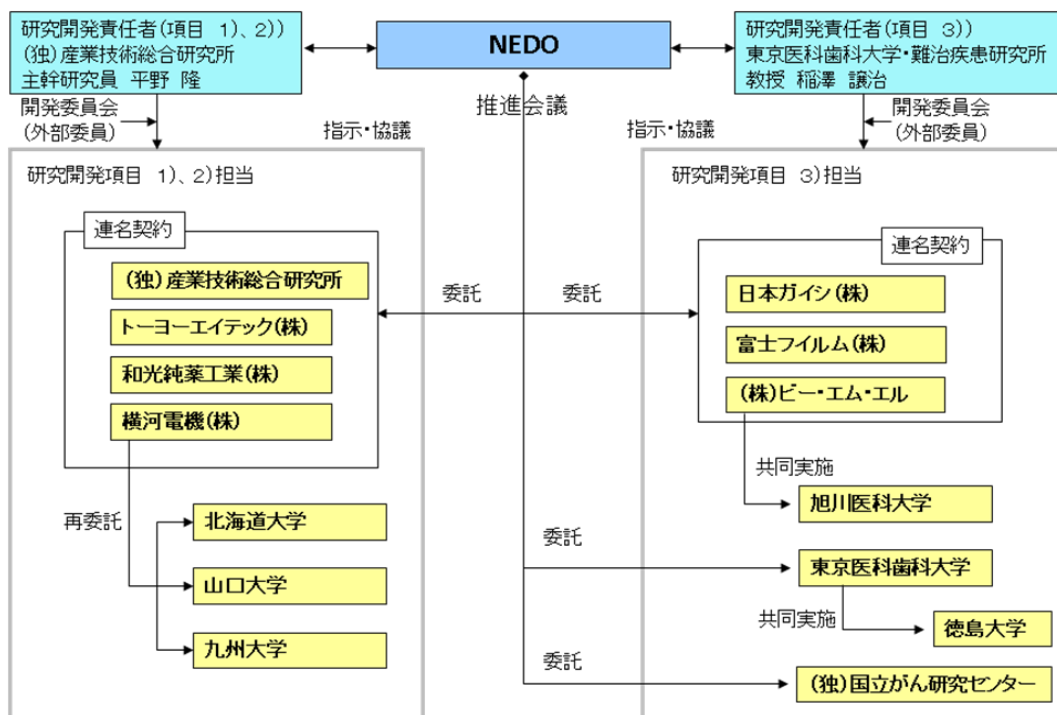
平成23年度委託期間中に推進会議を開催

8. 実施方針の改定履歴

(1) 平成23年3月10日 制定

(別紙)

(1) 実施体制図(平成18年3月～平成23年2月)



(2) 実施体制図(平成23年3月～平成23年11月)

