

スフィンゴ糖脂質関連遺伝子検出システムの作成と病態診断への応用

井ノ口 仁一 [北海道大学大学院薬学研究科/助教授]
五十嵐 靖之 [北海道大学大学院薬学研究科/教授]
樺山 一哉 [北海道大学大学院薬学研究科/博士研究員]
市川 由加里 [(株)ラボ 研究受託センター/研究員]
白田 勝利 [(株)ジェネティックラボ/主任研究員]

背景・目的

スフィンゴ糖脂質 (GSL) の研究分野は、従来より日本人研究者が世界の牽引力となって、多種多様なGSLs構造決定に端を発し、1990年代後半には研究代表者である井ノ口も参画したGSL合成酵素遺伝子群のクローニングにおいてもリーダーシップを発揮し、数多くの論文が日本の研究機関から報告されている。しかしながら、その後のノックアウトマウスなどを用いたGSL機能解析は米、独そして日本の間で非常に競合しているのが現状である。従って、これらGSL合成酵素遺伝子を有効に駆使し、GSLの根本的意義の解明にせまる画期的な研究成果が日本から多く発信し、国際的な学術的リーダーシップを発揮していくことがGSL合成酵素遺伝子群の知的財産を発展的に保護する上で重要である。

発生・分化の過程や癌や炎症などの様々な疾患の細胞のGSLsの組成は、正常細胞に比較して著しく変化することが知られている。これらの過程においては様々な遺伝子発現の変化が起こるので、サイトカインなどの発現の変化がシグナルとして核に伝わり、GSL合成酵素遺伝子の発現が制御された結果、GSL組成の変化に繋がるとするのが従来の概念であった。しかしながら近年、GSLs、スフィンゴミエリン、コレステロールが凝集し、さらに種々の受容体タンパクをはじめとして種々のシグナル伝達分子が集積して形成される細胞膜のマイクロドメインの存在が明らかにされ、マイクロドメインは細胞外からのサイトカインなどのシグナルを仲介する中心的役割を担っていることが判明してきている。すなわち、GSLはマイクロドメインの性質を変化させ、マイクロドメインを介したシグナル伝達については特徴的な遺伝子発現の変化につながる可能性がある。

最近我々は、抗がん剤感受性とスフィンゴ糖脂質合成酵素遺伝子発現量の相関性を見出したことから、スフィンゴ糖脂質関連遺伝子によるDNAチップ(GSLアレイ)を用いた抗がん剤感受性予測装置の開発を提案する。スフィンゴ糖脂質合成酵素は触媒としての役割ゆえに総じて生体組織内の蛋白発現量が少なく、遺伝子発現量も一般的な遺伝子の発現量と比較してごく微量であることが、これまでの研究により確認されている。それ故現行のDNAアレイに追加すると他の高発現遺伝子の陰に隠れてしまい、解析が難しい。従って、スフィンゴ糖脂質関連遺伝子群を集約したGSLアレイは抗がん剤感受性予測において最大限の効果を発揮し、がん組織培養による抗がん剤感受性試験法の煩雑さを解消できるだけでなく、従来の幅広いがん腫においてコンセンサスの取れた信頼性の高い予測を可能にすることが期待される。本研究開発ではスフィンゴ糖脂質関連遺伝子からプローブを作製し、製品としての大量生産を志向したGSLアレイの作製を目的とする。

内容・方法

- ①スフィンゴ糖脂質関連遺伝子のクローニングとDNAプローブ作製
スフィンゴ糖脂質関連遺伝子約100種のプライマーを作製し(シグマジェノシス(株)において委託製造)、各遺伝子の優性発現細胞株より抽出したRNAを鋳型として、プローブとなるcDNAを合成した。合成したcDNAは発現ベクターに挿入し、大腸菌を利用して大量合成を行った。
- ②スフィンゴ糖脂質関連遺伝子DNAチップ(GSLアレイ)の作製
DNAのプローブとして使用する断片を制限酵素により切断、抽出した。チップに乗せる全てのDNAプローブを等濃度になるように調製し、Hydra-96HT(Robbins社製)を用いて微量なDNAプローブ溶液を分注し、10×15cmのナイロン膜にスポットした。

結果・成果

本研究開発において、GSL関連遺伝子群のライブラリー(合成酵素、代謝酵素、疾患関連シグナル伝達分子など)につき、マウス39種、ヒト31種の遺伝子のクローニングを行い、プローブの作製を行った。また、GSLアレイの試作段階においてプローブに不備が生じた場合のためにクローニングに用いる遺伝子の優勢発現株から抽出したRNAの品質管理にも注意を払い、迅速に修正できる体勢を確立し、GSLアレイの早期開発に努めた。

本研究開発ではRobbins社製のHydra-HTSを使用し、精度および再現性の高いDNAチップの作製を行った。Hydra-HTSは微量のDNAプローブを正確に分注し、チップ上にスポットする機材であり、共同研究開発機関であるジェネティックラボにおいて汎用されている。本研究においてGSLアレイの試作品を作製して、遺伝子発現解析に必要なプローブの至適量を検討し、ほぼ全ての遺伝子の至適感度に対応することを確認した。またGSLアレイの中から無作為に選択した遺伝子に対し、Northern blot法とReal time PCR法を用いた検討結果をGSLアレイの結果と適合させて、精度の評価も行った。

成果としては、次の点が挙げられる。

- 1) GSLアレイに用いる主要なGSL関連遺伝子群(マウス39種、ヒト31種、コントロールとしてのハウスキープ遺伝子も含む)総てのクローニングおよびプローブの作成に成功した。
- 2) マウスのGSLアレイにおいては、培養細胞株をもちいたプローブ感度の検討を行い、プローブに用いるDNAが25ugが至適濃度の限界であることを確認した。これをふまえて、網羅的な発現量変化をより正確に行えるDNAチップにするために25ugおよび50ugのプローブをそれぞれ2スポットおこない(1遺伝子あたり4スポット)、より精度の高い製品の作製を目指した。

今後の展望

本研究開発では基盤となる糖脂質関連遺伝子のプローブ作製およびチップ(膜)への導入に成功した。今後はGSLアレイの品質向上および大量生産系の開発を行う。この遺伝子チップが実用化されれば、副作用を最小限に抑え、最大の治療効果が期待される抗がん剤の投与量および種類を、他の診断技術とは異なるデータベースより選択できるシステムの構築が可能になる。このシステムの活用により、個々のがん患者のテーラーメイドがん治療戦略として、ポスト・ポストゲノム時代を先取した独創性ある医療への貢献が期待される。また、従来の抗がん剤感受性診断が可能な場所は、実際にがんを摘出する病院に検査システム(この場合は培養機器および検査を熟知したスタッフ)が併設されているような、一部の医療機関や大学病院などに限られていたが、本診断システムが検査キットとして全国の検査センターなどに常備されることにより、手術の担当医師は組織を凍結させ、検査センターへ搬送するだけで良く、簡便な抗がん剤感受性診断システムとしての波及効果を期待している。