

「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」
平成14年度採択研究代表者

稲澤 讓治

(東京医科歯科大学 難治疾患研究所 教授)

「高精度ゲノムアレイの開発と疾患遺伝子の探索」

1. 研究実施の概要

本研究の目的は、高精度ゲノムマイクロアレイシステムを開発し、これを用いて従来の技術では検出困難であった癌や遺伝疾患の潜在的な微細ゲノムコピー数異常を探索し、この情報を基に疾患関連遺伝子を同定することである。充実した情報とクローン資源を容易に入手できる現在のゲノム環境において、疾患遺伝子座の発見は疾患遺伝子の同定そのものであると言える。したがって、微細な増幅変化や欠失をゲノムワイドに網羅的に検出するシステムの開発は必須であり、本システムの開発は、癌治療の標的分子や癌個性診断のバイオマーカーを明らかにするだけでなく、本態不明とされている自閉症や精神発達遅滞をはじめとする潜在的染色体異常の存在が予測されている疾患群においても、原因遺伝子の究明において強力なツールとなる。

高精度・高密度のゲノムアレイの技術開発を行い、本技術を用いて各種の癌において新しい遺伝子増幅領域やホモ欠失領域を探索し、見出された異常領域を標的に癌遺伝子や癌抑制遺伝子の同定を行う。ゲノムDNAコピー数異常のhigh-throughput解析を可能にするCGHマイクロアレイの開発を推進している。

①全染色体スクリーニング用アレイ；第1～22番、X、Y染色体を1メガベース間隔以下にカバーするBACクローンを配置したアレイ（4523クローンを配置）、②種々の癌細胞においてアレル不均衡のホットスポットでの1p36-p35領域（約20メガベース）を212個のBACで間断なくカバーした1p36 コンティグアレイ、③800種類の癌関連遺伝子を配置した多項目遺伝情報に基づく「癌の個性診断」用のカスタムCGHアレイ、④X染色体連鎖精神発達遅滞（XLMR）をはじめとするX染色体微細ゲノム構造異常探索アレイ（project X）を作製した。これらCGHアレイは1コピーレベルのゲノム構造異常を検出できる高精度のものである。

これらの成果を基盤に以下の作業を実施する。

1. 高精度・高密度のゲノムアレイと応用技術を開発し、本技術を用いて各種癌において新しい遺伝子増幅領域やホモ欠失領域をゲノムワイドに探索する。
2. 見出された異常領域を標的に癌遺伝子や癌抑制遺伝子の同定を行う。
3. 各種の癌で検出するゲノムコピー数異常と種々の臨床病態との関連解析を行い、癌の

個性診断の基本データベースを作製する。

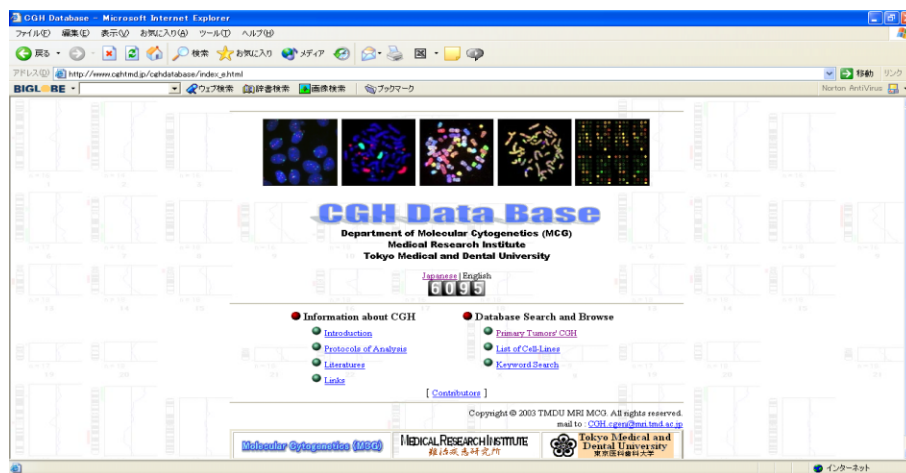
4. 潜在的な染色体微細異常が存在すると考えられているてんかんやX連鎖精神発達遅滞をモデルにゲノムアレイを用いて全染色体ワイドに潜在的ゲノムコピー数異常のスクリーニングを行い、疾患遺伝子座の特定に繋がる微細染色体異常を探索する。

2. 研究実施内容

特に疾患特異的ゲノム構造異常を標的にした疾患遺伝子の同定アプローチを体系化し、新規の癌や遺伝疾患の関連遺伝子を発見してきている。これらは癌個性診断のバイオマーカーとして、あるいは創薬の標的分子候補として注目されている。さらに、独自に実用化したゲノムアレイは約0.7Mbの解像度とヒト全ゲノムの約1/3をカバーする世界的にも高精度のツールであり、現在、癌や遺伝疾患の病態解明の糸口となる潜在的ゲノム構造異常の検出に威力を発揮しており、多くの成果が得られてきている。

a. 各種がん細胞のゲノム構造異常の網羅的スクリーニング

全腫瘍の90%を締める胃癌や肺癌などの上皮系固形腫瘍において、疾患特異的ゲノム構造異常の探索を目的にCGH法による染色体ワイドのゲノムコピー数異常解析を行った。約5年間をかけ、25種類以上の癌の900サンプル以上を解析したが、本CREST事業の支援を受けてデータベースを構築し、これを2003年7月29日に公開した。(CGH Data Base: <http://www.cghtmd.jp/cghdatabase/index.html>)。本データベースは米国NCBIが収載するSKY/M-FISH and CGH Database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sky/skyweb.cgi>)の関連サイト[CGH database Japan]として紹介されている。



b. 高精度ゲノムアレイの開発

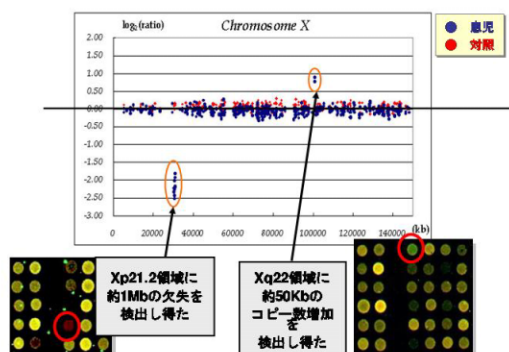
従来、100kbレベル～数Mbオーダーのゲノム構造異常を全染色体にわたり俯瞰的に検出する技術は存在しなかった。これを克服するものとしてCustom-made CGHアレイの実用化を目指してきた。

その結果、以下のゲノムアレイを作製し、標準化した。

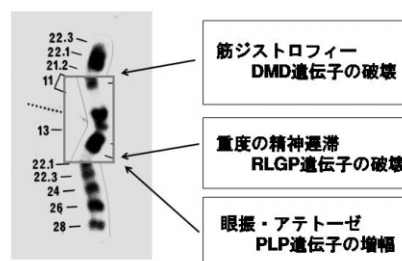
- ① MCG Whole Genome Array-4500 : 4523個のBACクローンを配置した全ゲノムをカバーする高密度ゲノムアレイ (国立がんセンター、細田・大木グループと共同研究)
- ② MCG 1p36 Contig Array : 染色体1p36の20Mbを間断なくカバーしたアレイ
- ③ MCG Cancer Array-800 : 癌関連遺伝子800種類の解析を可能とする「がん個性診断」用アレイ
- ④ MCG Genetic Disease array : 既知遺伝疾患、染色体異常症の診断アレイ (561個のBACを配置)
- ⑤ MCG chromosome X-tiling array : X染色体を1003個のBACで埋め尽くした高密度アレイ

これらのゲノムアレイは、わずか数10kbのヘミ欠失を検出する精度であり、癌に特異的な染色体コピー数異常だけでなく、本態不明の自閉症や精神発達遅滞、多発奇形症などにおいて疾患の原因と直結したゲノム一次構造を浮き彫りにする可能性がある。

Case 5. MCG genome arrayの結果



Case 5. 本症例における遺伝子異常



右の図は、重度の精神発達遅滞を合併し、inv(X) (p21.2;q22.1)の染色体異常を有するDuchenne型筋ジストロフィー(DMD)患者のアレイ解析結果である。Xq21でDMD遺伝子の欠失を、加えてXq22でPLP遺伝子の重複を検出した。すなわち、この患者さんはDuchenne型筋ジストロフィーにPerizaeus-Merzbacher病を併発していた。

以上に加えて、データ解析を高精度化するCGHアレイ解析専用ソフトの開発、②各種癌の基本ゲノム構造異常データベースの構築、③解析技術装置 (ハイブリダイゼーションチャンバ (特許出願中)、④ゲノムアレイによるDNAメチル化領域のスクリーニング法の開発 (BAMCA法と命名)、⑤ゲノムアレイのクロマチン免疫沈降法への応用 (ChIP on chip) などの開発も進めている。

3. 研究実施体制

高精度ゲノムアレイの開発と疾患遺伝子の探索研究グループ

- ① グループ長：稲澤譲治（東京医科歯科大学難治疾患研究所、教授）
- ② 研究実施項目：高精度ゲノムアレイの技術開発とテーラーメイド医療に向けた疾患遺伝子の探索ならびに同定と研究総括

組織アレイ開発グループ

- ① グループ長：津田 均（防衛医科大学校、助教授）
- ② 研究実施項目：組織アレイ技術によるhigh-throughput発現解析技術の開発

メンブレンアレイ開発グループ

- ① グループ長：細田文恵（国立がんセンター研究所分子腫瘍部、主任研究員）
- ② 研究実施項目：メンブレンを用いたCGHアレイ技術の開発

癌多段階病変解析グループ

- ① グループ長：金井弥栄（国立がんセンター研究所病理部、主任研究員）
- ② 研究実施項目：マイクロダイセクション組織による癌多段階病変ゲノム異常解析

発現解析グループ（1）

- ① グループ長：今井高志（放射線医学総合研究所・フロンティア研究センター）
- ② 研究実施項目：cDNAマイクロアレイによる発現解析

発現解析グループ（2）

- ① グループ長：江見 充（日本医科大学老人病研究所、教授）
- ② 研究実施項目：cDNAマイクロアレイによる発現解析

造血器腫瘍解析グループ

- ① グループ長：小川誠司（東京大学大学院造血再生医療寄付講座、助教授）
- ② 研究実施項目：造血器腫瘍のゲノムアレイ解析

食道癌解析グループ

- ① グループ長：嶋田 裕（京都大学医学研究科腫瘍外科学、講師）
- ② 研究実施項目：食道癌のゲノム異常解析

小児癌解析グループ

- ① グループ長：杉本 徹（京都府立医科大学大学院、教授）
- ② 研究実施項目：小児腫瘍のゲノム異常解析

胃癌解析グループ

- ① グループ長：山岸久一（京都府立医科大学大学院、教授）
- ② 研究実施項目：胃癌のゲノム異常解析

婦人科腫瘍解析グループ

- ① グループ長：坂本 優（佐々木研究所附属杏雲堂病院、副部長）
- ② 研究実施項目：婦人科腫瘍のゲノム異常解析

XLMR解析グループ

- ① グループ長：松尾雅文（神戸大学大学院医学系研究科、教授）
- ② 研究実施項目：X染色体異常症のアレイ解析

てんかんゲノム解析グループ

- ① グループ長：山川和弘（理化学研究所脳科学総合研究センター・チームリーダー）
- ② 研究実施項目：てんかんの微細染色体異常解析

肝胆膵腫瘍解析グループ

- ① グループ長：有井滋樹（東京医科歯科大学大学院、教授）
- ② 研究実施項目：肝胆膵腫瘍のゲノム異常解析

口腔頸部癌解析グループ

- ① グループ長：天笠光雄（東京医科歯科大学大学院、教授）
- ② 研究実施項目：口腔頸部領域腫瘍のゲノム異常解析

アレイスキャナ解析ソフト開発グループ

- ① グループ長：岡山利次（日立ソフトエンジニアリング、バイオインフォマクス開発部）
- ② 研究実施項目：ゲノムアレイスキャナおよび解析ソフトウェアの開発

4. 主な研究成果の発表（論文発表および特許出願）

(1) 論文発表

- Yuki Y, Imoto I, Imaizumi M, Hibi S, Kaneko Y, Amagasa T, Inazawa J: Identification of a novel fusion gene in a pre-B acute lymphoblastic leukemia with t(1;19)(q23;p13). *Cancer Sci.* **95**: 503-7, 2004
- Sonoda I, Imoto I, Inoue J, Shibata T, Shimada Y, Chin K, Imamura M, Amagasa T, Gray JW, Hirohashi S, Inazawa J: Frequent silencing of low density lipoprotein receptor-related protein 1B (*LRP1B*) expression by

genetic and epigenetic mechanisms in esophageal squamous-cell carcinoma. *Cancer Res.* **64:3741-7, 2004**

- Tsutsumi S, Kamata N, Vokes TJ, Maruoka Y, Nakakuki K, Enomoto S, Omura K, Amagasa T, Nagayama M, Saito-Ohara F, Inazawa J, Moritani M, Yamaoka T, Inoue H, Itakura M: The Novel Gene Encoding a Putative Transmembrane Protein Is Mutated in Gnathodiaphyseal Dysplasia (GDD). *Am J Hum Genet.* **74:1255-61, 2004**
- Sato H, Saito-Ohara F, Inazawa J, Kudo A: Pax-5 is essential for kappa sterile transcription during Ig kappa chain gene rearrangement. *J Immunol.* **172:4858-65, 2004**
- Yasui K, Mihara S, Zhao C, Okamoto H, Saito-Ohara F, Tomida A, Funato T, Yokomizo A, Naito S, Imoto I, Tsuruo T, Inazawa J: Alteration in copy numbers of genes as a mechanism for acquired drug resistance. *Cancer Res.* **64:1403-10, 2004**
- Fujita Y, Sakakura C, Shimomura K, Nakanishi M, Yasuoka R, Aragane H, Hagiwara A, Abe T, Inazawa J, Yamagishi H: Chromosome arm 20q gains and other genomic alterations in esophageal squamous cell carcinoma, as analyzed by comparative genomic hybridization and fluorescence in situ hybridization. *Hepatogastroenterology* **50:1857-63, 2003**
- Hirasawa A, Aoki D, Inoue J, Imoto I, Susumu N, Sugano K, Nozawa S, Inazawa J: Unfavorable prognostic factors associated with high frequency of microsatellite instability and comparative genomic hybridization analysis in endometrial cancer. *Clin Cancer Res.* **15:5675-82, 2003**
- Yasui K, okamoto H, Arii S, Inazawa J: Association of over-expressed TFDP1 with progression of hepatocellular carcinomas. *J Hum Genet.* **48:609-13, 2003**
- Yokoi S, Yasui K, Iizasa T, Imoto I, Fujisawa T, Inazawa J: TERC identified as a probable target within the 3q26 amplicon that is detected frequently in non-small cell lung cancers. *Clin Cancer Res.* **15:4705-13, 2003**
- Okamoto H, Yasui K, Zhao C, AriiS, Inazawa J:PTK2 and EIF3S3 genes may be amplification targets at 8q23-q24 and are associated with large hepatocellular carcinomas. *Hepatology* **38: 1242-9, 2003**
- Imoto I, Yuki Y, Sonoda I, Ito T, Shimada Y, Imamura M, Inazawa J: Identification of ZASC1 encoding a Kruppel-like zinc finger protein as a novel target for 3q26 amplification in esophageal squamous cell carcinomas. *Cancer Res.* **63:5691-6, 2003**
- Zhao C, Yasui K, Lee CJ, Kurioka H, Hosokawa Y, Oka T, Inazawa J: Elevated expression levels of NCOA3, TOP1, and TFAP2C in breast tumors as

predictors of poor prognosis. *Cancer* 98: 18-23, 2003

- Yokoi S, Yasui K, Iizasa T, Takahashi T, Fujisawa T, Inazawa J: Down-regulation of SKP2 induces apoptosis in lung-cancer cells. *Cancer Sci.* 94:344-9, 2003
- Hirasawa A, Saito-Ohara F, Inoue J, Aoki D, Susumu N, Yokoyama T, Nozawa S, Inazawa J, Imoto I: Association of 17q21-q24 Gain in Ovarian Clear Cell Adenocarcinomas with Poor Prognosis and Identification of PPM1D and APPBP2 as Likely Amplification Targets. *Clin Cancer Res* 9:1995-2004, 2003
- Yu W, Inoue J, Imoto I, Matsuo Y, Karpas A, Inazawa J: GPC5 is a possible target for the 13q31-q32 amplification detected in lymphoma cell lines. *J Hum Genet* 48:331-5, 2003
- Hashimoto N, Murakami M, Takahashi Y, Fujimoto M, Inazawa J, Mineura K: Correlation between genetic alteration and long-term clinical outcome of patients with oligodendroglial tumors, with identification of a consistent region of deletion on chromosome arm 1p. *Cancer* 97:2254-61, 2003
- Saito-Ohara F, Imoto I, Inoue J, Hosoi H, Nakagawara A, Sugimoto T, Inazawa J: PPM1D is a potential target for 17q gain in neuroblastoma. *Cancer Res* 63:1876-83, 2003
- Murakami M, Hashimoto N, Takahashi Y, Hosokawa Y, Inazawa J, Mineura K: A consistent region of deletion on 1p36 in meningiomas: identification and relation to malignant progression. *Cancer Genet Cytogenet* 140:99-106, 2003
- Li M, Ishikawa K, Toru S, Tomimitsu H, Takashima M, Goto J, Takiyama Y, Sasaki H, Imoto I, Imazawa J, Toda T, Kanazawa I, Mizusawa H: Physical map and haplotype analysis of 16q-linked autosomal dominant cerebellar ataxia (ADCA) type III in Japan. *J Hum Genet* 48:111-8, 2003
- Shimada Y, Maeda M, Watanabe G, Yamasaki S, Komoto I, Kagonoi J, Kan T, Hashimoto Y, Imoto I, Inazawa J: Cell culture in esophageal squamous cell carcinoma and the association with molecular markers. *Clin Cancer Res* 9:243-9, 2003

(2) 特許出願

H15年度特許件数 : 5件