

「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

間野 博行

(自治医科大学ゲノム機能研究部 教授)

「遺伝子発現調節機構の包括的解析による疾病の個性診断」

1. 研究実施の概要

有効なテーラーメイド医療のためには、ゲノム情報を利用した形でのリアルタイムな患者個々の疾病の評価が不可欠である。その実現のためには疾患責任細胞・組織における遺伝子発現プロファイルおよびエピジェネティックな変化をゲノムワイドで評価し、それに基づいた新規疾患分類法、診断法、予後予測法及び治療法を開発することが必要である。この目的のために本研究計画においては、自治医科大学主要臨床講座が様々なヒト疾患の発症責任細胞を純化・保存する大規模バンク事業を実施し、これらを試料とした包括的ゲノミクス解析を自治医科大学ゲノム機能研究部にて行う。これまで血液悪性腫瘍、膵臓癌および心筋組織のバンク事業が順調に進行しており、それらを用いた網羅的遺伝子発現解析の結果新たな疾患診断法、予後予測法の開発に成功している。今後はさらにDNAチップ解析を続行するとともに、実際の臨床応用を目指したカスタムDNAチップの開発を行う予定である。

2. 研究実施内容

(1) 血液疾患

- a) 現在なお正確な診断が困難であり、かつ有効な治療法の存在しない急性骨髄性白血病（AML）類縁疾患が数多くある。各患者の有効な治療法を選択する上でも正確な鑑別診断は必須であり、そのためには新たな分子診断マーカーの同定が最も重要であると考えられる。DNAチップは数千〜数万種類の遺伝子発現変化を簡便に解析可能にする最新の研究システムであり、上述の目的に適したスクリーニング法であると期待される。我々は白血病などの特発性血液疾患の多くが造血幹細胞（あるいはその近傍）の異常に起因することに着目し、これら疾患患者のフレッシュ検体より造血幹細胞相当分画のみを純化しストックするバンク事業「Blast Bank」をスタートした。本バンク細胞を用いてDNAチップ解析を行うことで、（1）白血病の鑑別診断に有効な遺伝子マーカーの同定、（2）白血病の薬剤感受性に関与する遺伝子マーカーの同定、（3）病期が進行する白血病類縁疾患の病期特異的分子マーカーの同定、等を本研究計画で目指した。具体的には、骨髄異形成症候群由来白血病計

22例およびde novo AML 28例のBlast Bankサンプルにおける網羅的遺伝子発現解析をDNAチップを用いて行い、各疾患内に発現プロファイルの面から新たなサブグループ群が定義可能なこと、またこれらの鑑別診断に用いる新しい分子マーカーを10種類以上同定した。またBlast Bankサンプルをプロテオミクス解析することにより白血病の染色体不安定性に関わる遺伝子産物の同定にも成功した。さらに全ヒト遺伝子が配置されたDNAチップを用いた解析をBlast Bank中のAML全症例について行う世界最大の白血病類縁疾患遺伝子発現データベースを構築した。これら膨大な遺伝子発現データおよび、各症例の臨床情報フォローアップデータより、初回寛解導入療法の成績にリンクする遺伝子など様々な臨床データに発現量が連関する遺伝子セットを抽出することに成功した。

b) 成人T細胞性白血病 (ATL) はHTLV-I感染によって引き起こされる極めて予後不良の成熟T細胞性腫瘍であり、本邦南西部に膨大なHTLV-Iキャリアーが存在することが知られる。ATLは臨床症状の乏しい慢性期を経た後治療抵抗性の急性期へと移行する。我々はATLの病期進展機構を解明する目的で、長崎大学原研内科との共同研究で慢性型及び急性型ATLの患者末梢血よりCD4陽性T細胞の純化保存事業を開始した。ATL患者末梢血中のCD4陽性T細胞分画はほぼ100%ATL細胞によって占められるため、同分画を純化して比較することで、ATL細胞のみを直接DNAチップによって解析することが可能になる。平成15年度末現在で計62例の保存に成功しており、そのうち純度が良好でアレイ解析に耐えるサンプル慢性型19例、急性型21例を用いた全ヒト遺伝子DNAチップによる大規模遺伝子発現解析が終了した。また健常人末梢血CD4陽性T細胞3例も純化し、PHA刺激の有無それぞれの場合で同様なDNAチップ解析を行った。これらの膨大な遺伝子発現データベースから、ATLの慢性期と急性期が遺伝子発現プロファイルの面から大きく異なることを明らかにし、しかも急性期のみが発現が認められる遺伝子を同定することにも成功した。しかも後者の遺伝子群の中には細胞増殖因子受容体が含まれており、そのリガンドも患者血中で高値となっていることを確認した。以上の結果はATLの病期進展機構に全く新しい知見をもたらす貴重なものと考えられる。

(2) 膵臓癌

膵臓がんは極めて予後不良な悪性腫瘍であり、特徴的臨床所見に乏しく、診断が確定した時点では既にごんが進行し根治手術が困難な例がほとんどを占める。しかも診断目的で施行する膵液細胞診による膵臓がんの診断率も依然高くなく新たな診断マーカーの同定が世界的な急務といえる。DNAチップは数千〜数万種類の遺伝子の発現変化を数回の実験で解析可能にする最新の研究機器であり、本システムを用いることで膵臓がんの新たな分子診断マーカーが同定されることが期待される。我々は本研究計画において既に、健常人及び膵臓がん患者より膵胆管造影検査 (ERCP) の際に得られる膵液より膵管上皮細胞を純化保存する大規模バンク事業「Pancreas Bank」を開始した。具体的には上皮細胞特異的表面蛋白MUC1に対する抗体を用いたマグネティック

ビーズカラムによるMUC1陽性細胞の簡便な純化装置を開発した。また本邦に広く分布する研究協力施設において、周辺病院より採取した膵液から膵管上皮細胞を効率よく純化保存する事業を開始した。既に自治医科大学消化器内科だけでなく、福島県会津中央病院消化器病センターを含む、全国レベルでの新たな膵液検体収集システム「Pancreas Bank」を構築している。これによって我々は膵管上皮細胞を膵臓がん32例、良性膵腫瘍35例、慢性膵炎15例および正常130例について収集することに成功した。Pancreas Bankの健常人25例および膵臓がん24例より純化した膵管上皮サンプルよりmRNA分画を調整し、全ヒト遺伝子DNAチップによる大規模遺伝子発現プロファイルを終了した。一方、同サンプルを用いたcDNAサブトラクションクローニング法も行い、膵臓癌特異的cDNA断片のスクリーニングも行った。

(3) うっ血性心不全

本態性高血圧症は遺伝的素因の関与が示唆される代表的な生活習慣病であるが、本疾患が具体的にどの様な遺伝子異常を背景としているかは今なお殆ど不明なままである。また本態性高血圧などによる、長期にわたる圧負荷はやがて心筋の収縮力低下および細胞死を導き、うっ血性心不全に至る。いったん低下した心筋能を回復することは極めて困難であり、重症心不全は現在なお予後不良の疾患である。我々は本研究計画において本態性高血圧症および心不全の発症・進展機構を明らかにする目的で、以下のような多面的なアプローチを取った。(a) 遺伝性食塩感受性動物であるDahlラットは、食塩の過剰摂取に伴い速やかに高血圧・心肥大を発症し、まもなくうっ血性心不全となって死へ至る。これら様々な病期におけるDahlラットの心筋より抽出したRNAによるDNAマイクロアレイ解析を行い、高血圧発症及び心不全への移行にともない、病期依存性に発現量が変化する遺伝子を同定した。(b) 弁置換術の際に患者より得る心筋組織を用いてDNAマイクロアレイ解析を行い、左室駆出率あるいは心内圧と相関して発現する遺伝子群を同定した、(c) 全国より自治医科大学の卒業生ネットワークを介してゲノムDNAを収集する大規模ゲノムバンク事業を立ち上げた。

3. 研究実施体制

DNAチップ解析グループ

- ① 研究分担グループ長：間野 博行（自治医科大学医学部、教授）
- ② 研究項目：：各種疾病における疾患責任細胞を純化保存するバンク事業を行い、これらを用いたDNAチップ解析を行う。

バイオインフォマティクス解析グループ

- ① 研究分担グループ長：大橋 順（東京大学医学部、助手）
- ② 研究項目：膨大な遺伝子発現プロファイルに対してバイオインフォマティクス処理を行い、新規分子診断マーカーの同定、遺伝子発現プロファイルに基づく疾患分類の試み、診断用DNAチップにおける診断アルゴリズムの開発、などを行う。

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

① DNAチップ解析グループ

- Koinuma, K., Shitoh, K., Miyakura, Y., Furukawa, T., Yamashita, Y., Ota, J., Ohki, R., Choi, Y.L., Wada, T., Konishi, F., Nagai, H., and Mano, H.: Mutations of BRAF are associated with extensive hMLH1 promoter methylation in sporadic colorectal carcinomas. *Int. J. Cancer* 108: 237-242, 2004.
- He, H., Hirokawa, Y., Gazit, A., Yamashita, Y., Mano, H., Kawakami, Y., Kawakami, Hsieh, C.Y., Kung, H.J., Lessene, G., Baell, J., Levitzki, A., and Maruta, H.: The Tyr-Kinase Inhibitor AG879, That Blocks the ETK-PAK1 Interaction, Suppresses the RAS-Induced PAK1 Activation and Malignant Transformation. *Cancer Biol. Ther.* 3: 96-101, 2004.
- Choi, Y.L., Makishima, H., Ohashi, J., Yamashita, Y., Ohki, R., Koinuma, K., Ota, J., Isobe, Y., Ishida, F., Oshimi, K., and Mano, H.: DNA microarray analysis of natural killer cell-type lymphoproliferative disease of granular lymphocytes with purified CD3(-)CD56(+) fractions. *Leukemia* 18: 556-565, 2004.
- Horwood, N.J., Mahon, T., McDaid, J.P., Campbell, J., Mano, H., Brennan, F.M., Webster, D., and Foxwell, B.M.: Bruton's tyrosine kinase is required for lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor alpha production. *J. Exp. Med.* 197: 1603-1611, 2003.
- Ogata, Y., Takahashi, M., Ueno, S., Takeuchi, K., Okada, T., Mano, H., Ookawara, S., Ozawa, K., Berk, B.C., Ikeda, U., Shimada, K., and Kobayashi, E.: Antiapoptotic Effect of Endothelin-1 in Rat Cardiomyocytes In Vitro. *Hypertension* 41: 1156-1163, 2003.
- Ohki, R., Yamamoto, K., Ueno, S., Mano, H., Ikeda, U., and Shimada, K.: Effects of Olmesartan, an Angiotensin II Receptor Blocker, on Mechanically-Modulated Genes in Cardiac Myocytes. *Cardiovasc Drugs Ther* 17: 231-236, 2003.
- Ota, J., Yamashita, Y., Okawa, K., Kisanuki, H., Fujiwara, S., Ishikawa, M., Lim Choi, Y., Ueno, S., Ohki, R., Koinuma, K., Wada, T., Compton, D., Kadoya, T., and Mano, H.: Proteomic analysis of hematopoietic stem cell-like fractions in leukemic disorders. *Oncogene* 22: 5720-5728, 2003.
- Oshima, Y., Ueda, M., Yamashita, Y., Choi, Y.L., Ota, J., Ueno, S., Ohki, R., Koinuma, K., Wada, T., Ozawa, K., Fujimura, A., and Mano, H.: DNA microarray analysis of hematopoietic stem cell-like fractions from individuals with the M2 subtype of acute myeloid leukemia. *Leukemia* 17:

1990-1997, 2003.

- Ohmine, K., Nagai, T., Tarumoto, T., Miyoshi, T., Muroi, K., Mano, H., Komatsu, N., Takaku, F., and Ozawa, K.: Analysis of Gene Expression Profiles in an Imatinib-Resistant Cell Line, KCL22/SR. *Stem Cells* 21: 315-321, 2003.
- Suzuki, N., Nakamura, S., Mano, H., and Kozasa, T.: Galpha 12 activates Rho GTPase through tyrosine-phosphorylated leukemia-associated RhoGEF. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 733-738, 2003.
- Ueda, M., Ota, J., Yamashita, Y., Choi, Y.L., Ohki, R., Wada, T., Koinuma, K., Kano, Y., Ozawa, K., and Mano, H.: DNA microarray analysis of stage progression mechanism in myelodysplastic syndrome. *Br. J. Haematol.* 123: 288-296, 2003.
- Ueno, S., Ohki, R., Hashimoto, T., Takizawa, T., Takeuchi, K., Yamashita, Y., Ota, J., Choi, Y.L., Wada, T., Koinuma, K., Yamamoto, K., Ikeda, U., Shimada, K., and Mano, H.: DNA microarray analysis of in vivo progression mechanism of heart failure. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 307: 771-777, 2003.
- Yoshida, K., Ueno, S., Iwao, T., Yamasaki, S., Tsuchida, A., Ohmine, K., Ohki, R., Choi, Y.L., Koinuma, K., Wada, T., Ota, J., Yamashita, Y., Chayama, K., Sato, K., and Mano, H.: Screening of genes specifically activated in the pancreatic juice ductal cells from the patients with pancreatic ductal carcinoma. *Cancer Sci.* 94: 263-270, 2003.
- Aoki, N., Ueno, S.-i., Mano, H., Yamasaki, S., Shiota, M., Miyazaki, H., Yamaguchi-Aoki, Y., Matsuda, T., and Ullrich, A.: Mutual regulation of protein-tyrosine phosphatase 20 and protein-tyrosine kinase Tec activities by tyrosine phosphorylation and dephosphorylation. *J. Biol. Chem.* 279: 10765-10775, 2004.
- ② バイオインフォマティクス解析¹グループ
 - Ohashi, J., Naka, I., Ohtsuka, R., Inaoka, T., Ataka, Y., Nakazawa, M., Tokunaga, K., and Matsumura, Y.: Molecular polymorphism of ABO blood group gene in Austronesian and non-Austronesian populations in Oceania. *Tissue Antigens* 63: 355-361, 2004.
 - Ohashi, J., Naka, I., Patarapotikul, J., Hananantachai, H., Brittenham, G., Looreesuan, S., Clark, A.G., and Tokunaga, K.: Extended linkage disequilibrium surrounding the hemoglobin e variant due to malarial selection. *Am J Hum Genet* 74: 1198-1208, 2004.
 - Chu, Z.T., Tsuchiya, N., Kyogoku, C., Ohashi, J., Qian, Y.P., Xu, S.B.,

Mao, C.Z., Chu, J.Y., and Tokunaga, K.: Association of Fcγ receptor IIb polymorphism with susceptibility to systemic lupus erythematosus in Chinese: a common susceptibility gene in the Asian populations. *Tissue Antigens* 63: 21-27, 2004.

- Omi, K., Ohashi, J., Patarapotikul, J., Hananantachai, H., Naka, I., Looareesuwan, S., and Tokunaga, K.: CD36 polymorphism is associated with protection from cerebral malaria. *Am J Hum Genet* 72: 364-374, 2003.
- Ohashi, J., and Tokunaga, K.: Power of genome-wide linkage disequilibrium testing by using microsatellite markers. *J Hum Genet* 48: 487-491, 2003.
- Ohashi, J., Maruya, E., Tokunaga, K., and Saji, H.: Power of association test for detecting minor histocompatibility gene causing graft-versus-host disease following bone marrow transplantation. *J Hum Genet* 48: 502-507, 2003.
- Ohashi, J., Naka, I., Patarapotikul, J., Hananantachai, H., Looareesuwan, S., and Tokunaga, K.: A single-nucleotide substitution from C to T at position -1055 in the IL-13 promoter is associated with protection from severe malaria in Thailand. *Genes Immun* 4: 528-531, 2003.
- Hohjoh, H., Ohashi, J., Takasu, M., Nishioka, T., Ishida, T., and Tokunaga, K.: Recent divergence of the HLA-DRB1*04 allelic lineage from the DRB1*0701 lineage after the separation of the human and chimpanzee species. *Immunogenetics* 54: 856-861, 2003.

(2) 特許出願

H15年度特許出願件数：2件（CREST研究期間累積件数：2件）