

「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、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。実際の解析手法としてはDNAチップによる網羅的遺伝子発現解析を行うだけでなく、ヒストン蛋白のアセチル化レベルをゲノムワイドに比較する新たな解析法を開発し、これを用いた臨床検体におけるエピジェネティックな変化の検討も行う。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、特に急性骨髄性白血病については新たな予後予測法の開発に成功した。

2. 研究実施内容

(1) 血液疾患

a) 急性骨髄性白血病 (AML) およびその類縁疾患の治療反応性を予測することは現在でも困難であり、今日において最も有効な予後予測因子は悪性細胞の核型である。この分類は患者を予後の異なる3群に分類するものであるが、患者の過半数を占める中程度悪性群は、化学療法によって治癒する症例と治療不応性の予後不良群の両者を含んでいる。我々はDNAチップによる大規模発現解析でこれらAML類縁疾患の新しい予後予測法の開発を目指した。我々はこれまで、各種血液疾患の患者骨髄よりCD133陽性造血幹細胞分画を純化保存するバンク事業を行ってきたが、本バンクに属するAML類縁疾患約100例のサンプルについて全ヒト遺伝子が配置されたDNAチップによる大規模遺伝子発現データベースを構築した。得られた発現データと各患者の治療反応性とを比較することで、これら膨大な遺伝子発現データの中から生命予後にリンクする遺伝子発現プロファイルを同定することに成功した。またこれら発現プロファイルの数種類を組み合わせることで、患者の化学療法に対する長期予後を予測するアルゴリズムの開発にも成功した。

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。我々は慢性型ATL 19例、急性型ATL 22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を行い、純化ATL細胞の大規模遺伝子発現データベースを構築した。これらの解析により、急性型ATL特異的に発現する遺伝子セットの抽出に成功した。その中には受容体型チロシンキナーゼをコードする遺伝子Aが含まれていたが、興味深いことにこの受容体のリガンドの血中濃度はATL患者血中で上昇していることが明らかになった。しかも遺伝子A発現ATL細胞はそのリガンド依存性に増殖することも示された。以上の結果はATLの病期進行に関する新たな分子メカニズムを示しており興味深い。

(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な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。我々は逆行性膵胆管造影検査 (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。本バンクに属する検体のうち、健常者25例および膵臓がん患者24例を用いて全ヒト遺伝子DNAチップによる大規模遺伝子発現データベースを構築した。得られた発現データより膵臓癌を診断するアルゴリズムを開発し高い正確性を持って膵液による膵臓がん診断が可能であることを示した。

(3) うっ血性心不全

うっ血性心不全のような慢性変性疾患の進行にはエピジェネティックな変化が重要な役割を果たしていると予想される。心筋細胞は増殖をしないため、心不全の進展にはエピジェネティック変化の中でもヒストン蛋白のアセチル化異常が病態に関連している可能性が高い。今日において任意の細胞・組織間でヒストンアセチル化が変化する遺伝子をゲノムワイドにスクリーニングする手法は殆ど存在しない。そこで我々はクロマチン免疫沈降とゲノムDNAサブトラクションとを組み合わせた新しいスクリーニング法であるDifferential Chromatin Scanning (DCS) 法を開発した。DCS法を応用することで心筋内におけるヒストンアセチル化の標的遺伝子を網羅的にスクリーニングすることが出来た。来年度は実際の臨床検体を用いたDCS解析を行う予定である。

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

- Numata, A., Shimoda, K., Kamezaki, K., Haro, T., Kakumitsu, H., Shide, K., Kato, K., Miyamoto, T., Yamashita, Y., Oshima, Y., Nakajima, H., Iwama, A., Aoki, K., Takase, K., Gondo, H., Mano, H. & Harada, M. Signal transducers and activators of transcription 3 augments the transcriptional activity of CCAAT/enhancer-binding protein alpha in granulocyte colony-stimulating factor signaling pathway. *J. Biol. Chem.* **280**: 12621-12629, 2005.
- Tsutsumi, C., Ueda, M., Miyazaki, Y., Yamashita, Y., Choi, Y.L., Ota, J., Kaneda, R., Koinuma, K., Fujiwara, S., Kisanuki, H., Ishikawa, M., Ozawa, K., Tomonaga, M. & Mano, H. DNA microarray analysis of dysplastic morphology associated with acute myeloid leukemia. *Exp. Hematol.* **32**: 828-835, 2004.
- Ohki-Kaneda, R., Ohashi, J., Yamamoto, K., Ueno, S., Ota, J., Choi, Y.L., Koinuma, K., Yamashita, Y., Misawa, Y., Fuse, K., Ikeda, U., Shimada, K. & Mano, H. Cardiac function-related gene expression profiles in human atrial myocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **320**: 1328-1336, 2004.
- Ohki, R., Yamamoto, K., Ueno, S., Mano, H., Misawa, Y., Fuse, K., Ikeda, U. & Shimada, K. Transcriptional profile of genes induced in human atrial myocardium with pressure overload. *Int. J. Cardiol.* **96**: 381-387, 2004.
- Mano, H. Stratification of acute myeloid leukemia based on gene expression profiles. *Int. J. Hematol.* **80**: 389-394, 2004.
- Kano, Y., Akutsu, M., Tsunoda, S., Izumi, T., Mori, K., Fujii, H., Yazawa, Y., Mano, H. & Furukawa, Y. Schedule-dependent synergism and antagonism between pemetrexed and paclitaxel in human carcinoma cell lines in vitro.

Cancer Chemother. Pharmacol. **54**: 505-513, 2004.

- Kaneda, R., Toyota, M., Yamashita, Y., Koinuma, K., Choi, Y.L., Ota, J., Kisanuki, H., Ishikawa, M., Takada, S., Shimada, K. & Mano, H. High-throughput screening of genome fragments bound to differentially acetylated histones. *Genes Cells* **9**: 1167-1174, 2004.
 - Bai, J., Sata, N., Nagai, H., Wada, T., Yoshida, K., Mano, H., Sata, F. & Kishi, R. Genistein-Induced Changes in Gene Expression in Panc 1 Cells at Physiological Concentrations of Genistein. *Pancreas* **29**: 93-98, 2004.
 - Araki, H., Katayama, N., Yamashita, Y., Mano, H., Fujieda, A., Usui, E., Mitani, H., Ohishi, K., Nishii, K., Masuya, M., Minami, N., Nobori, T. & Shiku, H. Reprogramming of human postmitotic neutrophils into macrophages by growth factors. *Blood* **103**: 2973-2980, 2004.
 - Aoki, N., Ueno, S.-i., Mano, H., Yamasaki, S., Shiota, M., Miyazaki, H., Yamaguchi-Aoki, Y., Matsuda, T. & 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グループ
- Tanaka, G., Matsushita, I., Ohashi, J., Tsuchiya, N., Ikushima, S., Oritsu, M., Hijikata, M., Nagata, T., Yamamoto, K., Tokunaga, K. & Keicho, N. Evaluation of microsatellite markers in association studies: a search for an immune-related susceptibility gene in sarcoidosis. *Immunogenetics* **56**: 861-870, 2005.
 - Ohashi, J., Naka, I., Patarapotikul, J., Hananantachai, H., Brittenham, G., Looareesuwan, S., Clark, A.G. & Tokunaga, K. Strong linkage disequilibrium of a HbE variant with the (AT)₉(T)₅ repeat in the BP1 binding site upstream of the beta-globin gene in the Thai population. *J Hum Genet* **50**: 7-11, 2005.
 - Hananantachai, H., Patarapotikul, J., Ohashi, J., Naka, I., Looareesuwan, S. & Tokunaga, K. Polymorphisms of the HLA-B and HLA-DRB1 Genes in Thai Malaria Patients. *Jpn J Infect Dis* **58**: 25-28, 2005.
 - Xu, S.B., Tao, Y.F., Huang, X.Q., Chu, Z.T., Ban, G.H., Qian, Y.P., Ohashi, J., Tokunaga, K. & Chu, J.Y. Polymorphism of HLA-DRB1 in Han population in Yunnan and comparison with 9 Han populations. *Yi Chuan* **26**: 787-792, 2004.
 - Tochigi, M., Zhang, X., Umekage, T., Ohashi, J., Kato, C., Marui, T., Otowa, T., Hibino, H., Otani, T., Kohda, K., Liu, S., Kato, N., Tokunaga, K. & Sasaki, T. Association of six polymorphisms of the NOTCH4 gene with

schizophrenia in the Japanese population. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* **128**: 37-40, 2004.

- Sato-Takeda, M., Ihn, H., Ohashi, J., Tsuchiya, N., Satake, M., Arita, H., Tamaki, K., Hanaoka, K., Tokunaga, K. & Yabe, T. The human histocompatibility leukocyte antigen (HLA) haplotype is associated with the onset of postherpetic neuralgia after herpes zoster. *Pain* **110**: 329-336, 2004.
- Kamio, K., Matsushita, I., Tanaka, G., Ohashi, J., Hijikata, M., Nakata, K., Tokunaga, K., Azuma, A., Kudoh, S. & Keicho, N. Direct determination of MUC5B promoter haplotypes based on the method of single-strand conformation polymorphism and their statistical estimation. *Genomics* **84**: 613-622, 2004.
- Hitomi, Y., Tsuchiya, N., Kawasaki, A., Ohashi, J., Suzuki, T., Kyogoku, C., Fukazawa, T., Bejrachandra, S., Siriboonrit, U., Chandanayingyong, D., Suthipinittharm, P., Tsao, B.P., Hashimoto, H., Honda, Z. & Tokunaga, K. CD72 polymorphisms associated with alternative splicing modify susceptibility to human systemic lupus erythematosus through epistatic interaction with FCGR2B. *Hum Mol Genet* **13**: 2907-2917, 2004.
- Akesaka, T., Lee, S.G., Ohashi, J., Bannai, M., Tsuchiya, N., Yoon, Y., Tokunaga, K. & Song, K. Comparative study of the haplotype structure and linkage disequilibrium of chromosome 1p36.2 region in the Korean and Japanese populations. *J Hum Genet* **49**: 603-609, 2004.

(2) 特許出願

H16年度特許出願件数：0件（CREST研究期間累積件数：2件）