

研究課題別事後評価結果

1. 研究課題名： 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

2. 研究代表者名及び主たる研究参加者名 (研究機関名・職名は研究参加期間終了時点)

研究代表者

間野 博行 (自治医科大学分子病態治療研究センター 教授)

主たる共同研究者

大橋 順 (東京大学大学院医学系研究科 助教)

3. 研究内容及び成果

全体の研究内容

本研究では白血病、固形腫瘍など様々な臨床検体の収集事業を行い、それらを用いた大規模ゲノミクス解析を行うことにより、疾患の病態・予後に基づいた新たな分類法の提案、さらに病因に基づいた分子診断法、治療法開発を目指した。具体的には白血病関連検体 850 例以上、成人 T 細胞白血病 72 例、肺癌 75 例、肺線維症 36 例、大腸癌 249 例、膵臓癌 266 例、胃癌 342 例、左室心筋 56 例などの連結可能匿名化条件での検体収集に成功した。これらをもちいて当初 DNA マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析を行い、各種疾患の病態関連遺伝子の同定、さらに遺伝子発現量に基づく予後予測法の開発を目指した。また疾患関連遺伝子を効率良くスクリーニングする目的で、レトロウィルスを用いた完全長 cDNA 発現ライブラリー構築システムを開発し、それを用いて非小細胞肺癌より新たな融合型チロシンキナーゼ型癌遺伝子 EML4-ALK を発見した。さらに白血病の発症原因を解明する目的で大規模遺伝子配列解析用 DNA マイクロアレイを開発し、白血病芽球 20 例における 5600 種類の癌関連遺伝子のタンパクコード領域の体細胞変異をスクリーニングした。その結果 11 種類の体細胞遺伝子異常を発見した。またこれらのプロジェクトを通して、DNA チップ解析グループがデータ作成を担当し、その解釈、統計学的有意性の検討についてバイオインフォマティクスグループがサポートした。具体的には DNA チップ解析グループから網羅的解析データを逐次入手し、臨床サイドからの要請に応じて「予後予測」など必要とされるパラメーターの計算アルゴリズムを開発した。作成されたアルゴリズムは DNA チップ解析グループのデータで検証され、また新たに得るデータを用いて前方向の検証も行われた。その結果を基にアルゴリズムは再び最適化される、というフィードバックを繰り返した。

網羅的遺伝子発現解析

急性骨髄性白血病 (AML) 患者の治療反応性・長期予後を予測する最も重要な因子は白血病細胞の核型 (karyotype) である。白血病細胞に t (8;21) のような予後良好染色体転座が認められれば「Favorable group」、monosomy 7 など予後不良染色体異常が認められれば「Adverse group」、それ以外が「Intermediate」群に分類される。Adverse group が極めて予後不良であることは多くの追試で確認されているが、Favorable および Intermediate 群のどちらも予後不良患者を含んでいる事が知られる。さらに全体の過半数を占める正常核型患者は Intermediate group に属し、これら患者の実際の長期予後を予測することは現在では不可能である。研究チームは AML 類縁疾患が造血幹細胞近傍の極めて未分化な分画から発生することに着目し、これら患者骨髓より造血幹細胞分画のみを純化保存するプロジェクトを設立した。純化細胞に対するゲノミクス解析により骨髓中の悪性細胞の割合やその分化傾向に影響されない精度の高いゲノミクス解析が可能になると期待される。そこで、造血幹細胞特異的細胞表面抗原の一つである CD133 に対するアフィニティカラムを開発し、簡便に CD133 陽性幹細胞分画を純化する手法を確立した。本邦全域に研究協力病院のネットワークを構築し、これら病院において CD133 陽性白血病幹細胞を純化保存する大規模細胞バンク事業「Blast Bank」を開設した。さらに登録 AML 症例のうち 99 例について Affymetrix 社の全ヒト遺伝子チップ (HGU133) による網羅的遺伝子発現

定量を行い、得られた発現プロファイルの中から、長期生命予後にリンクする遺伝子 4 種類を抽出した。これらわずか 4 種類の遺伝子データと核型とを組み合わせた新たな予後予測法 Gene Expression-based Stratification (GES) システムをバイオインフォマティクスグループが提案した。GES システムを用いることで training set でも、また test set においても長期生存可能な患者を明瞭に選び出すことが出来た。以上より純化分画を解析することでごくわずかの遺伝子データにより精度良く患者予後を予測可能なことが明らかになった。

消化器悪性腫瘍についても血液疾患の解析と同じく、多くの臨床検体を集めてそのゲノミクス解析により疾患の発症メカニズム解明・新規分子診断マーカーの同定を目指した。大腸癌の一部には、正常核型ながらゲノム上のマイクロサテライトリピート数に異常が認められる microsatellite instability (MSI) 陽性症例が存在し、一般の核型異常を認める大腸癌とは異なった発癌経路をたどると考えられている。研究チームは MSI 陽性症例と陰性症例とで DNA チップ解析を行い、MSI 特異的遺伝子発現プロファイルの同定を目指した。その結果、WNT シグナル伝達分子である AXIN2 遺伝子が MSI 陽性大腸癌特異的に発現低下している事が明らかになった。また AXIN2 遺伝子の発現減少は、同遺伝子のプロモーター領域に存在する CpG island のメチル化と相関することが判った。そこで MSI 陽性で AXIN2 が減少している大腸癌細胞株に 5'-azacytidine 投与、あるいは AXIN2 cDNA を導入したところ、細胞のアポトーシスが速やかに誘導された。以上より大腸癌の新たな発癌メカニズムの候補として AXIN2 遺伝子の発現低下が同定された。

新規肺癌原因遺伝子 EML4-ALK の同定

研究チームは、喫煙歴を持つ肺腺癌患者由来の外科切除標本から mRNA を抽出し、cDNA 発現レトロウィルスライブラリーを構築し、マウス 3T3 細胞を用いたフォーカスフォーメーションアッセイによって癌化能を示す遺伝子を探索した。その結果、同定された cDNA の 5' 側と 3' 側は違う遺伝子由来であった。5' 側は微小管会合タンパクの一種である EML4 (echinoderm microtubule-associated protein-like 4) のアミノ末端側約半分をコードし、3' 側は受容体型チロシンキナーゼ ALK (anaplastic lymphoma kinase) の細胞内チロシンキナーゼドメインをコードしていた。EML4-ALK が融合型チロシンキナーゼとして癌化能を有しているのかを検討する目的で EML4-ALK を 3T3 繊維芽細胞に導入すると多数の形質転換フォーカスが生じた。しかもこの細胞をヌードマウスの皮下に接種すると巨大な腫瘍を形成した。一方 EML4 と ALK 遺伝子は本来互いに反対向きにマップされる遺伝子であるから、両遺伝子を挟むように設置した PCR では正常細胞において決して特異的産物が得られない。したがって EML4-ALK 融合 cDNA を検出する PCR は極めて鋭敏かつ精度の高い肺癌の分子診断法となると期待される。実際研究チームが試したところ、喀痰 1 ml 中わずか 10 細胞しか EML4-ALK 陽性細胞がない状態でも明瞭に検出が可能であった。従って喀痰を用いた肺癌の高感度診断すなわち早期診断が現実のものになると期待される。

大規模リ・シーケンシング

さらに研究チームは遺伝子発現データのみでなく他の情報も統合して白血病の予後解析を目指す目的で、白血病症例の遺伝子変異スクリーニングに着手した。具体的には塩基配列解析用の世界最大の DNA マイクロアレイを米国 Perlegen Sciences, Inc. と共同で開発することに成功した。これは約 9 Mbp の塩基配列を決定するものであり、旧来に無い規模で体細胞変異を検出することが出来る。また本アレイで解析する遺伝子として、既に癌細胞において変異が報告されている遺伝子のみならず、発癌に関与する可能性が考えられる DNA 修復遺伝子、染色体構造調節遺伝子、酸化還元関連遺伝子、エピジェネティクス調節遺伝子、プロテインキナーゼ、転写因子、細胞周期関連遺伝子、細胞死関連遺伝子等、計 5,600 種類の遺伝子を選出した。これらの遺伝子のアミノ酸置換を誘導可能なエクソン配列に対してその塩基を決定すると共に、エクソン-イントロン境界についても塩基解析を行い、スプライシング異常も併せスクリーニングした。その結果、新たな体細胞変異として活性型チロシンキナーゼをコードする新規配列異常を発見した。本活性型チロシンキナーゼは血液細胞をトランスフォームすることが確認され、新たな AML の発症関連異常と考えられる。

4. 事後評価結果

4-1. 外部発表(論文、口頭発表等)、特許、研究を通じての新たな知見の取得等の研究成果の状況

本研究では、様々な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、これらを用いた包括的なゲノミクス解析を行って、疾患責任細胞における遺伝子発現プロファイル、エピジェネティックな変化を評価し、診断法、予後予測法、及び治療法を開発することを目的とした。

連結可能匿名化条件で収集した約 2,000 の臨床検体を用いて、1) 網羅的発現解析を行い、急性骨髄性白血病 (AML) では、長期生命予後にリンクする 4 種類の遺伝子を用いた予後予測法を開発し、大腸がんにおいては新たな発がんメカニズムの候補として AXIN2 遺伝子の発現低下を同定した。また、2) レトロウィルスを用いた完全長 cDNA 発現ライブラリー構築システムを開発し、これを用いた肺腺がんの検討では、新たな融合型チロシンキナーゼ型癌遺伝子 EML4-ALK を発見した。さらに、3) 白血病の発症原因を解明する目的で開発した大規模遺伝子配列解析用 DNA マイクロアレイを用い、白血病芽球における 5600 種類の癌関連遺伝子をスクリーニングし、11 種類の体細胞遺伝子異常を発見したが、この中には新たな AML の発症関連異常と考えられる新規配列異常が含まれていた。これらの研究成果は、着実に論文 (原著論文 64 編及び口頭、ポスター発表 56 件) として発表されており、重要な発見は特許化されている。特記すべきは、EML4-ALK の発見 (Nature, 2007) である。固形腫瘍では染色体転座によるがん遺伝子の活性化は行われないと従来知見を覆す発見であり、同一の手法による他の固形腫瘍での重要な遺伝子の発見が期待される。

4-2. 成果の戦略目標・科学技術への貢献

EML4-ALK の発見は世界的な発見であると同時に、当研究領域の最終目標である、「テーラーメイド医療の実現」に大きく貢献する成果と言える。海外においても追試が始まっているが、特にアジア人に多い肺がんの原因遺伝子であることが明らかになりつつある。国内では全肺がんの 5~7% が本遺伝子で説明できる。その、診断、治療への波及効果は大であろう。実際、喀痰 1 ml 中わずか 10 細胞しか EML4-ALK 陽性細胞がない状態でも明瞭に検出が可能であり、喀痰を用いた肺癌の高感度な早期診断が現実のものになると期待されるとともに、EML4-ALK 依存性に増殖しているがんは ALK 阻害剤が有効であることも判明している。また、EGFR 遺伝子の変異を伴う肺がんとは排他的であることも明らかにされており、今後の治療選択の面からも注目される。上述のように、本研究で用いられた手法は他の腫瘍の原因遺伝子探索にも用いることが可能であり、既に新たな原因遺伝子の発見に向けた検討が始まっている。また、急性骨髄性白血病の予後予測法の実用化に向けた検討が今後重要となろうが、白血病症例の遺伝子変異スクリーニングで発見された活性型チロシンキナーゼをコードする配列異常は、白血病の新しい治療剤開発に結びつく知見であり、今後の研究の進展が待たれるところである。

4-3. その他の特記事項 (受賞歴など)

EML4-ALK については、既に診断法の実用化検討と、阻害剤の開発が始まっている。日本発の抗がん剤が早期に開発されることを期待している。