

戦略的創造研究推進事業
チーム型研究(CREST)
追跡評価用資料

研究領域
「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」
(2002 年度～2009 年度)

研究総括: 笹月 健彦

2016 年 3 月

目次

要旨	1
第1章 追跡調査概要	2
1.1 研究領域概要	2
1.1.1 戦略目標	2
1.1.2 研究領域概要	2
1.1.3 研究総括	2
1.1.4 領域アドバイザー	2
1.1.5 研究課題および研究代表者	3
1.2 研究領域終了後の進展と波及効果	4
1.2.1 研究成果の発展状況や活用状況	4
1.2.2 研究成果から生み出された科学技術や社会・経済への波及効果	5
1.3 研究領域の展開状況(系譜図)	6
第2章 追跡調査(研究領域全体動向)	8
2.1 追跡調査について	8
2.1.1 調査の目的	8
2.1.2 調査の対象	8
2.1.3 調査方法	8
2.2 研究成果概要	9
2.2.1 研究助成金	9
2.2.2 論文	15
2.2.3 特許出願及び登録	16
2.3 科学技術や社会・経済への波及効果	17
2.3.1 科学技術への波及効果	17
2.3.2 社会・経済への波及効果	19
第3章 各研究課題の主な研究成果及び波及効果	21
3.1 2002年度採択課題	21
3.1.1 高精度ゲノムアレイの開発と疾患遺伝子の探索(稲澤譲治)	21
3.1.2 高血圧関連疾患に関する多面的なゲノム疫学研究(加藤規弘)	26
3.1.3 転写調節系の分子解剖による糖尿病要因の探索(武田純)	30
3.1.4 ゲノム解析によるパーキンソン病遺伝子同定と創薬(戸田達史)	34
3.1.5 遺伝子発現調節機構の包括的解析による疾病の個性判断(間野博行)	39
3.2 2003年度採択課題	45
3.2.1 大規模共同研究による統合失調症遺伝子の探索(有波忠雄)	45
3.2.2 sub-common diseaseの感受性遺伝子同定と個人型易罹患性診断への応用 (井ノ上逸朗)	49
3.2.3 生体分子の高次構造形成に基づく遺伝子診断法(寺前紀夫)	53
3.2.4 日仏共同体制による人種間ゲノム多型の比較解析(松田文彦)	57

3.3	2004 年度採択課題.....	63
3.3.1	染色体および RNA の機能変化からの疾患の系統的解析（油谷浩幸）.....	63
3.3.2	Whole Genome Association 解析による GVHD の原因遺伝子の探索（小川誠司）....	68
3.3.3	分子シャペロン工学に基づく遺伝子解析（丸山厚）.....	73
3.3.4	大腸癌の発生、進展および治療感受性に関わる因子の解析（森正樹）.....	78
第 4 章	科学技術イノベーションに資する研究成果の状況	83
4.1	高精度ゲノムアレイの開発と疾患遺伝子の探索（稲澤譲治）.....	83
4.1.1	研究の概要	83
4.1.2	研究成果の波及と展望	84
4.2	遺伝子発現調節機構の包括的解析による疾病の個性判断（間野博行）.....	89
4.2.1	研究の概要	89
4.2.2	研究成果の波及と展望	92
4.3	染色体および RNA の機能変化からの疾患の系統的解析（油谷浩幸）.....	97
4.3.1	研究の概要	97
4.3.2	研究成果の波及と展望	99
4.4	Whole Genome Association 解析による GVHD の原因遺伝子の探索（小川誠司）.....	103
4.4.1	研究の概要	103
4.4.2	研究成果の波及と展望	105

要旨

本資料は、戦略的創造研究推進事業のチーム型研究 CREST の研究領域「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」（2002-2009 年度）において、研究終了後一定期間を経過した後、副次的効果を含めて研究成果の発展状況や活用状況を明らかにし、独立行政法人科学技術振興機構(JST)事業及び事業運営の改善等に資するために、追跡調査を実施した結果をまとめたものである。

第 1 章は研究領域の追跡調査の概要について述べる。まず 1.1 項では本研究領域全体の戦略目標と研究の概要を示した。次いで研究の指導にあたる研究総括及び領域アドバイザーを示した。また、13 研究課題の各採択年度、研究課題名、代表研究者とその所属について記載した。1.2 項では各課題について、本研究終了後、研究代表者を中心にどのように研究が発展したか、調査した結果を示した。またこれらの研究からどのような新たな科学技術上の成果が生み出されたか、あるいは得られた成果が社会や経済に及ぼした影響についてまとめた。

第 2 章は各研究代表者についての研究期間中及び終了後の成果、成果物について調査の結果をまとめた。2.1 項では本調査の目的と方法について記載した。2.2 項ではそれぞれの研究代表者が本研究開始後に獲得した研究助成金の種類と金額、期間中及び終了後に発表した原著論文の数、出願あるいは登録した特許数を表にまとめた。2.3 項では科学技術への波及効果として各代表者の受賞、学会・研究会等への貢献、研究人材の広がり共同研究、その他の活動状況について、調査した結果を記載した。

第 3 章は本研究領域の各研究課題について、最初に、本研究期間中の研究成果と関連論文を簡単にまとめた。次に、研究終了後の発展状況を調査した結果をまとめた。研究終了後の調査については、研究代表者の研究の全体像をまとめた後に、科学技術の発展に寄与した代表的成果を取り上げまとめた。さらにより社会的、経済的な波及効果の展望についてまとめた。

第 4 章では本研究終了後、科学技術イノベーションの観点から進展のあった研究代表者のうち、4 名の研究者にインタビューを行いその成果をまとめた。ここでは特に本研究領域研究終了後、「テーラーメイド医療」という観点から、世界の科学技術がどのように発展し、その中で各研究課題あるいは研究代表者がどのような展開を図り、成果を上げたかについて聴取した。その後に、事前調査の結果と併せ、科学技術上の発展及び社会的波及効果の観点から調査結果をまとめた。

第1章 追跡調査概要

1.1 研究領域概要

1.1.1 戦略目標

個人の遺伝情報に基づく副作用のないテーラーメイド医療実現のためのゲノム情報活用基盤技術の確立

1.1.2 研究領域概要

本研究領域は、ゲノム情報を活用した創薬、個々人の体質に合った疾病の予防と治療－テーラーメイド医療－の実現に向けて、新たなゲノム情報解析システムの創製を目指した研究や多因子疾患の解明と創薬をはじめとした革新的な治療・予防法の基盤となる技術等を対象とする。

具体的には2010年代において、ゲノム情報を活用した合理的な手法による創薬や、薬剤をより効果的に適用するため、個人の遺伝情報に基づく、副作用のない効果的な医療(テーラーメイド医療)の実現等を目指し、そのために必要となる基盤技術を開発することとし、以下を達成目標とした。

- ・高速かつ安価に個人のゲノム情報(SNPs)を解析することが出来るシステムの実用化のための基盤技術の開発

例えば、現在100%外国技術を使用しているSNPsの解析技術(現在は、インベーター法(米国TWT社)、TaqMan法(ABI社)、MALDI-TOF法(米国数社)が使用されている)について、100%の解析精度を実現し、かつ解析速度を現在よりも1桁(現在、1億タイピング/年)上げ、コストを2桁(現在1SNPあたり、100-200円程度)程度下げるための我が国独自のSNPs解析技術の開発及びその高度化

- ・日本人固有の疾患遺伝子型の特定と創薬のための技術開発

例えば、日本人のゲノム配列と外国人のゲノム配列のわずかな差の比較による、薬剤感受性、感染症への抵抗性、生活習慣病の環境要因、がん・アルツハイマー病等に関する日本人固有の疾患遺伝子型の解明のために決定的な情報の迅速な取得、及び同情報を活用した効果的かつ効率的な創薬のための技術開発

1.1.3 研究総括

笹月 健彦

(就任時：国立国際医療センター研究所 所長、現：九州大学高等研究院 特別主幹教授)

1.1.4 領域アドバイザー

本研究領域はゲノム情報のテーラーメイド医療(診断と治療)への活用に着目し、ゲノム解析技術の開発及びそれを利用した疾患遺伝子の探索研究を進めた。この研究領域の概要に沿って研究を行うため、7人の領域アドバイザーを定め、研究代表者の指導にあたった。表1-1に領域アドバイザーを示す。

表 1-1 領域アドバイザー一覧

領域アドバイザー	所属	役職	任期
猪子 英俊	東海大学	医学部長・教授	2002 年 4 月～2008 年 12 月
鎌谷 直之	情報解析研究所 理化学研究所ゲノム医科学研究センター	所長 副センター長	2002 年 4 月～2010 年 3 月
古野 純典	九州大学	教授	2007 年 4 月～2010 年 3 月
徳永 勝士	東京大学	教授	2002 年 4 月～2010 年 3 月
富永 祐民	(財)愛知県健康づくり振興事業団健康科学総合センター	センター長	2002 年 4 月～2007 年 3 月
中村 祐輔	東京大学医科学研究所ヒトゲノム解析センター	センター長・教授	2002 年 4 月～2010 年 3 月
吉田 光昭	東京大学 (財)癌研究会 癌化学療法センター	客員教授 所長	2002 年 4 月～2010 年 3 月

(註)所属と役職は CREST/さきがけ終了時点を記載

1.1.5 研究課題および研究代表者

表 1-2 研究課題と研究者(第 1 期、第 2 期、第 3 期)

期 (採択年度)	研究課題	研究者	採択時の 所属・役職	終了時の 所属・役職	追跡調査時の 所属・役職
第 1 期 (2002)	高精度ゲノムアレイの開発と疾患遺伝子の探索	稲澤 譲治	東京医科歯科大学 難治疾患研究所 教授	東京医科歯科大学 難治疾患研究所 教授	東京医科歯科大学 難治疾患研究所 教授
	高血圧関連疾患に関する多面的なゲノム疫学研究	加藤 規弘	国立国際医療センター研究所 遺伝子診断治療開発研究部 部長	国立国際医療センター研究所 遺伝子診断治療開発研究部 部長	国立国際医療センター研究所 遺伝子診断治療開発研究部 部長
	転写調節系の分子解剖による糖尿病素因の探索	武田 純	群馬大学生体調節研究所 教授	岐阜大学大学院医学研究科 教授	岐阜大学大学院医学研究科 教授
	ゲノム解析によるパーキンソン病遺伝子同定と創薬	戸田 達史	大阪大学大学院医学系研究科 教授	大阪大学大学院医学系研究科教授	神戸大学大学院医学研究科 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	間野 博行	自治医科大学医学部 教授	自治医科大学医学部 教授	東京大学大学院医学系研究科 教授
第 2 期 (2003)	大規模共同研究による統合失調症遺伝子の探索	有波 忠雄	筑波大学基礎医学系 教授	筑波大学大学院人間総合科学研究科 教授	筑波大学 名誉教授 茨城福祉医療センター 医療部長
	Sub-common disease の感受性遺伝子同定と個人型易罹患性診断への応用	井ノ上 逸朗	東京大学医科学研究所 客員助教授	東海大学医学部 教授	国立遺伝学研究所 総合遺伝研究系 教授
	生体分子の高次構造形成に基づく遺伝子診断法	寺前 紀夫	東北大学大学院理学研究科 教授	東北大学大学院理学研究科 教授	日本分析化学会会長 東北大学 名誉教授

第2期 (2003)	日仏共同体制による 人種間ゲノム多型の 比較解析	松田 文彦	京都大学大学院医学 研究科 教授	京都大学大学院医学 研究科 教授	京都大学大学院医学 研究科 教授
第3期 (2004)	染色体および RNA の 機能変化からの疾患 の系統的解析	油谷 浩幸	東京大学 先端科学技術研究 センター 教授	東京大学 先端科学技術研究 センター 教授	東京大学 先端科学技術研究セ ンター 教授
	Whole Genome Association 解析に よる GVHD の原因遺 伝子の探索	小川 誠司	東京大学医学部附 属病院 客員助教授	東京大学医学部附 属病院 特任准教授	京都大学大学院医学 研究科 教授
	分子シャペロン工学 に基づく遺伝子解析	丸山 厚	九州大学 先端物質化学研究 所 教授	九州大学 先端物質化学研究 所 教授	東京工業大学大学院 生命理工学研究科 教授
	大腸癌の発生、進展お よび治療感受性に 関する因子の解析	森 正樹	九州大学生体防御 医学研究所 教授	大阪大学大学院医 学系研究科消化器 外科 教授	大阪大学大学院医学 系研究科消化器外科 教授

1.2 研究領域終了後の進展と波及効果

1.2.1 研究成果の発展状況や活用状況

本研究領域は、個々人の体質に合った疾病の予防と治療－テーラーメイド医療－を実現することを目標とし、新たなゲノム情報解析技術を開発し、がんや様々な多因子疾患とゲノム異常の関連を解明することを目指し展開された。

実際の達成目標として①個人のゲノム情報 (SNPs) を解析することが出来るシステムの実用化のための基盤技術の開発、②日本人固有の疾患遺伝子型の特定と創薬のための技術開発、が掲げられた。その結果、以下に示すような研究成果が得られ、それらは、その後も大きく発展している。

(1) 基盤技術の開発の展開

本研究領域で開発されたゲノムワイドの解析を可能にするアレイ技術の進展は目覚ましく、がん関連遺伝子の同定、独自のアレイ技術による DNA メチル化や miRNA などのエピゲノムにおける疾患遺伝子の同定やその後普及した次世代シーケンサーと併せた疾患関連遺伝子同定のための技術開発につながった。この中で、高精度 bacterial artificial chromosome (BAC) アレイは商品として実用化されている (稲澤)。また、BAC アレイに対して、合成オリゴマーを使用したヒトゲノムコピー数 (CNV) 解析のためのマイクロアレイ開発は世界的に注目され、ヒトゲノムにはコピー数多型が従来の予測以上に高頻度に存在することが明らかになった。その後、エピゲノムに着目し、後天的ゲノム修飾のメカニズムを活用した創薬基盤技術開発を展開している (油谷)。

(2) 創薬のための技術開発の展開

疾患に関しては、生活習慣病、がん、リウマチ等の数多くの疾患関連遺伝子の同定が進められた。日本人に多発する高血圧、糖尿病、冠動脈疾患の候補遺伝子解析および GWAS から、日本人で主要なリスク効果をもつ複数の感受性遺伝子座も同定された。また、東アジア人 (日本人、韓国人、

中国人を含む計 5 万人余)の大規模全ゲノム関連解析から、初めての高血圧関連遺伝子を同定された(加藤)。

さらに、GWAS によるパーキンソン病(PD)の感受性遺伝子の同定(戸田)、関節リウマチ(RA)疾患感受性遺伝子の同定(松田)や骨髄異形成症候群(MDS)及び白血病の原因に関わる複数の遺伝子の発見(小川)も進んでいる。

特に、新規肺がん遺伝子 EML4-ALK の発見は、肺がんの診断法の開発及び ALK 阻害剤による肺がんの治療に繋がった。米国の大手製薬企業は、この発見の 4 年後に、世界のがん治療薬開発史上最速のスピードで 2011 年には最初のがん治療薬を発売した。また、この治療薬に耐性のがん発生に対して耐性発生のメカニズムが解明され、速やかに第 2 世代の ALK 阻害剤の開発と実用化につながった(間野)。

1.2.2 研究成果から生み出された科学技術や社会・経済への波及効果

(1) 研究成果の科学技術の進歩への貢献

稲澤らの高精度 BAC アレイや DNA のメチル化を検出する BAMCA 法は、その後がん関連遺伝子の同定に大きく貢献した。BAMCA 法は DNA のメチル化と発がんとの関連研究に発展し、現在の中心的課題であるエピゲノム研究につながっている。油谷らは合成オリゴマーを使用したヒトゲノムコピー数(CNV)解析のためのマイクロアレイ開発のコンセプトを世界最初に打ち出した。その技術をもって HapMap プロジェクトに参画し、国際コンソーシアムの下で、ヒトゲノムのコピー数多様性のゲノムワイドなマップの作成に貢献した。

小川らは SNP アレイをゲノムワイドに定量できるプログラムを開発し、その後、各種がんの網羅的なアレル・ゲノムコピー数解析により骨髄系腫瘍など多数のがん関連遺伝子を同定するなど、Nature 誌等の一流誌で発表される数多くの成果につながった。また、ゲノム解析技術を利用して数多くのがん関連遺伝子が見出され、スプライシングやコヒーシンなど多様な発がんメカニズムが明らかになるなど、発がんメカニズムの理解が大幅に進んだ。

また、高血圧や糖尿病など生活習慣病やパーキンソン病については、本研究終了後の発展により、パーキンソン病では疾患感受性遺伝子、高血圧では東アジア人特有の疾患関連遺伝子が同定されるなどゲノム解析は病因解明に寄与しており、糖尿病など生活習慣病においてもその病態と遺伝子の詳細な関連研究が進められている。

本領域研究で開発された基礎技術はその後の多数の疾患関連遺伝子の同定につながり、さらに発がんやその他の疾患メカニズム解明研究に直接的に寄与してきた。

(2) 研究成果の応用に向けた発展状況

本研究領域では BAC アレイや肺がんの治療薬のように、いくつかの研究成果が実用化したもの、また実用化に向けて発展しているものがある。ゲノム解析技術自体が商品化される可能性があり、とりわけアレイ技術が研究試薬としてあるいは診断技術として商品化につながっている。実際、重要な疾患遺伝子の発見や機能解明の情報は企業による疾患の診断あるいは治療薬開発の創薬シーズとして世界で開発研究が進められている。ゲノム関連では NEDO プロジェクトとして、アレイや診断機器の開発につながっている。

具体的な技術開発の研究成果として、稲澤が開発した種々のアレイは、2005 年の NEDO プロジェクト「個別化医療の実現のための技術融合バイオ診断技術開発/染色体解析技術受託研究」に採択され実用化へ向けての展開が行われた。そこでは他の大学や公的機関、企業と診断用ゲノムアレイの開発及び診断用全自動染色体異常解析システムの開発が行われた。その結果、数種の診断用アレイが開発され、実際のゲノム異常の同定に利用され、がん関連遺伝子同定に寄与した。その 1 つ、先天異常症ゲノムコピー数異常診断システム (GD-700) は企業に移管され製品化につながった。また自動診断システムも完成した。この過程で見出された新規がん遺伝子に対する抗がん剤が海外で開発されている。

コピー数多型は染色体の幅広い領域で起こっており、油谷らが開発した CNV 解析用アレイは、コピー数多型の詳細な解析のために、次世代シーケンサーが発達した現在でも、それを補完する技術として利用されている。また、油谷がプロジェクトリーダーを務める NEDO プロジェクト「後天的ゲノム修飾のメカニズムを活用した創薬基盤技術開発」では、エピゲノム技術研究組合や産業技術総合研究所とともに、後天的ヒストン修飾(アセチル化、リン酸化、メチル化等)の高感度解析技術や生命情報データを統合し可視化するための新たな情報処理技術の実用化を目指した開発を行っている。

創薬に繋がる研究成果としては、間野博行による新規肺がん原因遺伝子 EML4-ALK を標的とした抗がん剤が挙げられる。同遺伝子発見の 4 年後の 2011 年に、米国ファイザー社が世界のがん治療薬開発史上最速のスピードで上市した。さらに間野らは、この治療薬に耐性のがん発生に対して耐性発生のメカニズムを解明し、これは第 2 世代の ALK 阻害剤の開発と実用化の達成につながった。

1.3 研究領域の展開状況(系譜図)

CREST プログラムでは、2002 年に本研究領域「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」が発足する前に、1998 年～2004 年にかけてゲノムに関するより基礎的な研究領域「ゲノムの構造と機能」が実施された。また、本研究領域の後半から注目を集め出したエピゲノムを中心とした 2011 年には、ERATO「斎藤全能性エピゲノムプロジェクト」が、2013 年には、CREST 領域研究「エピゲノム研究に基づく診断・治療へ向けた新技術の創出」が発足し、現在進行中である。

本研究領域の技術的發展の速度は極めて速く、研究課題の開始時と終了時では全く研究状況が変わった。特にゲノム解析技術は劇的な進展を遂げた。それは、これまで得られた様々な解析技術をベースに企業による大幅な技術開発により、高密度アレイや次世代シーケンサーが多くの研究者が使用できる機器・装置として商品化されたことによる。いずれも、本研究領域の研究期間中の 2005～2010 年頃に大きな進展が起り、本研究領域終了後それらの技術はさらに高度化している。その波及効果として、様々な医学分野で疾患と関連する遺伝子異常の解析が大幅に進み、その結果、多くの疾患関連遺伝子が同定され、また疾病要因の複雑さも明らかになってきた。

これに伴い、ゲノム情報のみでは解明できない研究分野が進展し、エピゲノムや miRNA などが注目されるようになり、本研究代表者の多くはこれらの研究を進めている。

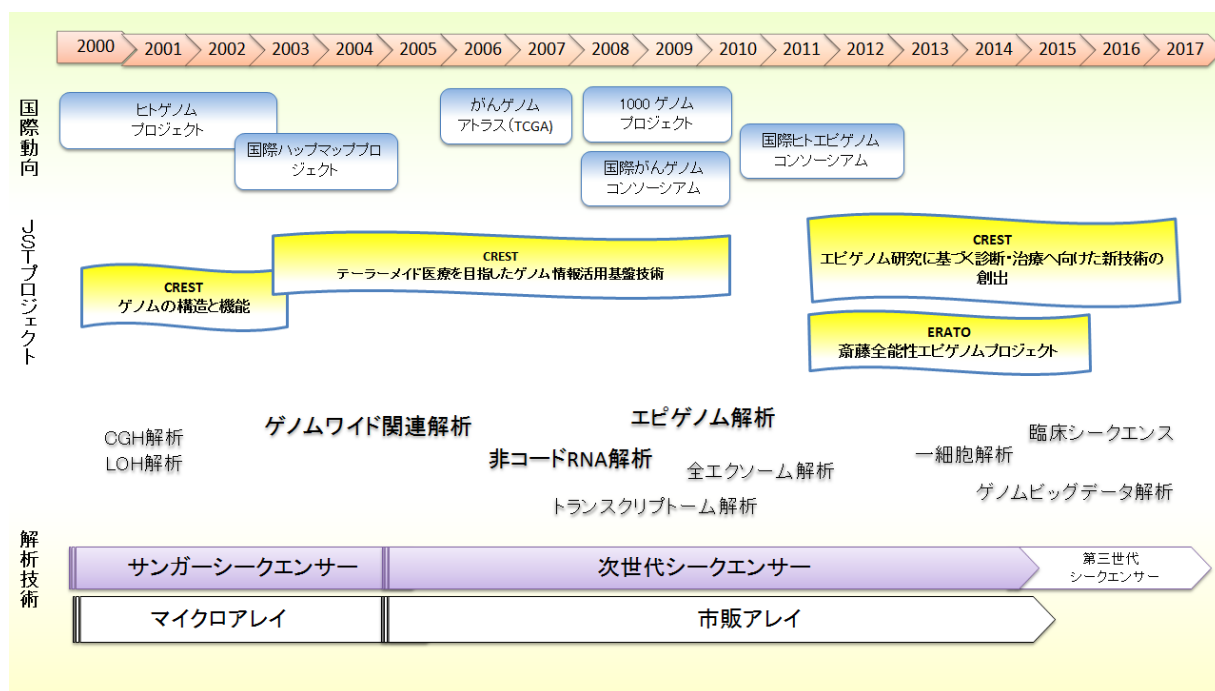


図 1-1 研究領域の展開状況

第2章 追跡調査(研究領域全体動向)

2.1 追跡調査について

2.1.1 調査の目的

追跡調査は研究終了後、一定期間を経過した後、副次的効果を含めて研究成果の発展状況や活用状況を明らかにし、JST(科学技術振興機構)の事業および事業運営の改善に資するために行うもので、研究領域終了後の研究者の研究課題の発展状況等を調査した。

2.1.2 調査の対象

本追跡調査は CREST 研究領域「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(2002-2009 年度)」の研究代表者全員を対象とする。表 2-1 に調査対象と調査対象期間を示す。

表 2-1 調査対象と調査対象期間

	CREST 期間	CREST 終了後調査対象期間	研究課題数
第1期	2002 年 11 月～2008 年 3 月	2008 年 4 月～2014 年 9 月	5
第2期	2003 年 10 月～2009 年 3 月	2009 年 4 月～2014 年 9 月	4
第3期	2004 年 10 月～2010 年 3 月	2010 年 4 月～2014 年 9 月	4

2.1.3 調査方法

(1) 研究助成金

本領域研究の研究代表者が研究代表者となっているプロジェクトを中心に調査した。その中から、助成金総額が1千万円／件以上のものを表 2-2 に示した。

研究助成金資金の獲得状況の調査については、下記の Web サイトを利用した。

- ・調査対象者の所属する研究室や本人の Web サイトの調査
- ・競争的研究資金の担当機関の Web サイト
- ・競争的研究資金の担当機関データベース検索

(科学研究費助成事業データベース及び厚生労働科学研究成果データベース)

(2) 論文

論文の抽出は研究代表者の著者名検索により論文リストを出力し、article と review に絞り込み、さらに本研究課題に関係しないと思われる論文を除いた。すなわち、「ゲノム」、「遺伝子」、「アレイ」など、共通するキーワード及び各課題独自のキーワードでヒットしなかった論文を個別に調べ、終了報告書の内容、あるいはテーラーメイド医療と無関係と思われるものを除いた。得られた論文の発行年で分類し、研究期間中及び研究領域終了後の論文の数を求めた。研究領域終了後については、責任著者(第一著者、最終著者、及び連絡責任著者)の論文数を求めた。

本領域研究期間中及び研究終了後の期間の定義は以下のとおりである。

採択年度	実際の研究期間	論文対象期間(発行日)	
		研究期間中	研究終了後
第1期	2002/11～2008/3	2002/1～2008/12	2009/1以降
第2期	2003/10～2009/3	2003/1～2009/12	2010/1以降
第3期	2004/10～2010/3	2004/1～2010/12	2011/1以降

・使用データベース：Scopus(エルゼビア社)

(3) 特許出願

特許出願及び登録状況は、研究代表者が発明者となっているもので、その発明の名称からそれぞれの研究課題と関連していないと思われるものを上記と同様にして除いた。

・使用データベース：Shareresearch(株式会社 日立製作所)

2.2 研究成果概要

2.2.1 研究助成金

本領域研究が開始して以降、各代表研究者が獲得した助成金のリストを表 2-2 に示した。ここでは助成金総額が 1000 万円／件以上のものを示しているが、各代表者ともさらに多くの課題での研究を行っている。

表 2-2 研究者の研究助成金獲得状況

研究者	研究期間(年度)	研究種目	研究課題	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	金額 百万円
稲澤 譲二	2002～2007	CREST	高精度ゲノムアレイの開発と疾患遺伝子の探索																519
	2003～2007	科研費基盤研究(B)	微細染色体構造異常の検出を可能とする CGH アレイの開発とその実用化																15.9
	2005～2006	科研費基盤研究(B)	微細染色体構造異常の検出を可能とする CGH アレイの開発とその実用化																14.6
	2005～2009	科研費特定領域研究	がんの統合的ゲノム解析と個性診断法の開発																117
	2006～2010	NEDO 受託研究費	個別化医療の実現のための技術融合バイオ診断技術開発/染色体解析技術																1,745
	2010～2012	科研費科研費基盤研究(A)	がんのゲノム・エピゲノム解析に基づく個性診断法の開発																50.2

稲澤 譲二	2010 ～ 2014	科研費新 学術領域 研究(研究 領域提案 型)	がんの統合的ゲ ノム・エピゲノ ム解析と治療標 的分子シーズの 探索															271
	2011 ～ 2015	文部科学 省 P-DIRECT	食道扁平上皮癌 の新規治療標的 分子と診断バイ オマーカーの同定															25～ 125
	2013 ～ 2015	科研費基 盤研究(A)	がんのゲノム・ エピゲノム情報 の包括的理解に 基づく個性診断 法の開発															34.5
加藤 規弘	2002 ～ 2007	CREST	高血圧関連疾患 に関する多面的 なゲノム疫学研 究															515
	2004 ～ 2006	科研費基 盤研究(B)	生活習慣病の成 因とゲノムネッ トワーク解明に 向けた病態モデ ルの開発															12.7
	2007 ～ 2010	科研費基 盤研究(B)	環境要因のコン パートメント化 を考慮した、ス リランカでの生 活習慣病の遺伝 疫学															16.9
	2009 ～ 2011	厚生労働 科学研究 費補助金	創薬および臨床 試験の効率化に 資するメタボリ ックシンドローム と心血管病の モデルラットの 開発研究															29.0
武田 純	2002 ～ 2007	戦略的創 造研究推 進事業	転写調節系の分 子解剖による糖 尿病素因の探索															499
	2007 ～ 2009	厚生労働 科学研究 費補助金	体脂肪減少因子 を用いた2型糖 尿病の治療															2009 年 26 2008 年 36.0
	2010	厚生労働 科学研究 費補助金	MODY1-6の病態 調査と識別的診 断基準の策定															31.0
	2010 ～ 2012	科研費基 盤研究(B)	体脂肪分解と肝 糖取り込みを促 進させる糖尿病 治療の開発															10.9
	2011 ～ 2012	厚生労働 科学研究 費補助金	循環器リスクと 耐糖能障害の効 率的な健診マー カーの探索															2010 年 10.9
戸田 達史	2003 ～ 2007	CREST	ゲノム解析によ るパーキンソン 病遺伝子同定と 創薬															500
	2005 ～ 2009	科研費特 定領域研 究	パーキンソン病 関連遺伝子探索 と機能解析															35.2

戸田 達史	2007 ～ 2010	科研費基盤研究(B)	認知機能関連遺伝子同定と機能解析															19.8
	2008 ～ 2010	厚生労働科学研究費補助金	福山型筋ジストロフィーおよび類縁疾患のユニークな治療法開発と病態解明															70.0
	2010 ～ 2012	厚生労働科学研究費補助金	孤発性パーキンソン病遺伝子同定と創薬・テララーメイド研究															90.0
	2010 ～ 2014	新学術領域研究(研究領域提案型)	パーキンソン病および認知機能関連分子とパーソナルゲノム解析															187
	2011 ～ 2013	科研費基盤研究(A)	ジストロフィーおよび類縁疾患の分子標的治療と病態解明															48
	2011 ～ 2013	厚生労働科学研究費補助金	次世代シーケンサーを用いた孤発性の神経難病の発症機構の解明に関する研究															226
	2012 ～ 2014	産学連携・技術移転事業	アンチセンス核酸による福山型筋ジストロフィー治療薬探索と非臨床試験															60
	2014 ～ 2016	科研費基盤研究(A)	福山型筋ジストロフィーおよびジストログリカノパチーの分子病態解明と治療薬開発															16
間野 博行	2002 ～ 2007	CREST	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															516
	2004 ～ 2006	厚生労働科学研究費補助金	高齢者特発性造血障害の大規模ゲノミクス解析による病態解明															127
	2005 ～ 2008	科研費特定領域研究	ゲノム情報を利用した造血器悪性腫瘍の新規治療戦略															33.4
	2007 ～ 2009	厚生労働科学研究費補助金	DNA チップによる急性白血病の新規分類法提案															48.9
	2008 ～ 2010	厚生労働科学研究費補助金	新規融合型がん遺伝子を標的とした肺がんの分子診断法および治療法の開発															151
	2009 ～ 2013	戦略的創造研究推進事業研究加速課題	新規がん遺伝子同定プロジェクト															記載なし

間野 博行	2010 ～ 2012	厚生労働 科学研究 費補助金	ゲノミクス解析 に基づく白血病 の新規分類法開 発															75.2
	2011 ～ 2015	厚生労働 科学研究 費補助金	肺がんの分子診 断法および分子 標的治療法の開 発															171
	2013	厚生労働 科学研究 費補助金	ゲノミクス解析 に基づく造血器 悪性腫瘍の分子 診断法開発															18.8
有波 忠雄	2003 ～ 2008	CREST	大規模共同研究 による統合失調 症遺伝子の探索															500
	2008 ～ 2010	科研費基 盤研究(B)	治療的介入法を 用いた統合失調 症の関連遺伝子 群のパスウェイ 解析															19.5
	2011 ～ 2012	新学術領 域研究(研 究領域提 案型)	日本人統合失調 症家系のゲノム 解析に基づく疾 患発症に関わる ゲノム多様性と 病態の解明															13.0
	2011 ～ 2013	科研費基 盤研究(B)	全ゲノムシーク エンス時代に向 けた統合失調症 の病態の類型化 と診断・治療戦 略の確立															19.2
井ノ上 逸朗	2003 ～ 2008	CREST	Sub-common disease の感受 性遺伝子同定と 個人型易罹患性 診断への応用															513
	2010 ～ 2012	科研費基 盤研究(A)	大規模 GWAS で 得られた脳動脈 瘤感受性遺伝子 の病態への関与															39.9
寺前 紀夫	2003 ～ 2008	CREST	生体分子の高次 構造形成に基づ く遺伝子診断法															492
	2010	科研費基 盤研究(A)	RNA 非翻訳領域 を標的とする核 酸検出リガンド の創製と機能性 RNA 研究への応 用															16.3
	2010 ～ 2013	科研費基 盤研究(S)	極微量小分子 RNA を網羅的に 解析する次世代 型核酸アレイチ ップの開発															216. 3
松田 文彦	2003 ～ 2008	CREST	日仏共同体制に よる人種間ゲノ ム多型の比較解 析															499
	2008 ～ 2009	科研費特 定領域研 究	ゲノムワイドア プローチを用い た日本人成人性 T細胞白血病の 感受性遺伝子・ 多型の探索															13.3

松田 文彦	2010 ～ 2011	科研費特 定領域研 究	大規模リウマチ 前向きコホートの ゲノム解析に よるリウマチの テイルーメイド 医療の試み														16.0
	2011 ～ 2013	厚生労働 科学研究 費補助金	網羅的統合オミ ックス解析を用 いた難病の原因 究明と新規診 断・治療法の確 立														461
	2012 ～ 2013	厚生労働 科学研究 費補助金	難病・がん等の 疾患分野の医療 の実用化研究事 業の成果を基に した原因遺伝子 変異データベー スの構築														208
油谷 浩幸	2004 ～ 2009	CREST	染色体および RNA の機能変化 からの疾患の系 統的解析														621
	2005 ～ 2009	科研費特 定領域研 究	発現情報に基づ くがん個性診断 法の開発														117
	2008 ～ 2012	科研費基 盤研究(S)	癌における転写 制御変異の統合 的解析														210
	2010 ～ 2014	NEDO ナシ ョナルプ ロジェク ト, 実用化 促進事業	後天的ゲノム修 飾のメカニズム を活用した創薬 基盤技術開発														480
	2010 ～ 2014	医薬基盤 研究 研究推進 業務	多層的疾患オミ ックス解析にお ける、エピゲノ ム情報に基づく 創薬標的の網羅 的探索を目指し た研究														150
	2011 ～ 2012	新学術領 域研究(研 究領域提 案型)	肝細胞分化にお けるエピゲノム 修飾制御に関す る研究														11.2
	2011 ～ 2013	新学術領 域研究(研 究領域提 案型)	心筋細胞分化に おける時期特異 的クロマチンリ モデリング制御 に関する研究														11.2
	2012 ～ 2016	科研費基 盤研究(S)	統合的ゲノム解 析によるがん細 胞集団進化の解 明														141
小川 誠司	2004 ～ 2009	CREST	Whole Genome Association 解 析による GVHD の原因遺伝子の 探索														652

小川 誠司	2005 ～ 2009	科研費特 定領域研 究	造血系の制御機 構の解析とゲノ ム異常の網羅的 探索による造血 器腫瘍発症機構 の解明															64.0
	2006 ～ 2007	科研費基 盤研究(B)	造血器腫瘍の遺 伝学的基盤等 に関する網羅的ゲ ノム研究															17.4
	2008 ～ 2011	科研費基 盤研究(B)	先端ゲノミクス による造血器腫 瘍の治療・診断 標的分子の同定															18.6
	2010 ～ 2012	厚生労働 科学研究 費補助金	不応性貧血の治 癒率向上を目指 した分子・免疫 病態研究															99.4
	2010 ～ 2014	新学術領 域研究(研 究領域提 案型)	大規模ゲノムシ ーケンスに基づく 癌の個性の理 解と分子標的の 探索															178
	2011 ～ 2013	科研費基 盤研究(A)	白血病幹細胞の 維持と再発・治 療抵抗性に関わ る遺伝学的基盤 の解明															48
	2011 ～ 2015	文部科学 省 P-DIRECT	骨髄異形成症候 群におけるエピ ゲノム関連マー カーの探索と実 用化															30
	2014 ～ 2016	科研費基 盤研究(A)	RNA スプライシ ング変異による MDS 発症の分子 メカニズムの解 明															27.6
丸山 厚	2014 ～ 2018	科研費基 盤研究(S)	骨髄異形成症候 群(MDS)の分子 基盤の解明															69.8
	2004 ～ 2009	CREST	分子シャペロン 工学に基づく遺 伝子解析															344
	2008 ～ 2010	科研費基 盤研究(A)	ガン治療を目指 した核酸ナノマ シンの創出															48.9
	2010 ～ 2012	産学連 携・技術移 転事業	高度遺伝子解析 のためのシャペ ロン材料の開発															60.0
	2011 ～ 2014	科研費基 盤研究(A)	生体高分子の高 次構造と機能制 御のための高分 子材料設計															50.0
森 正樹	2011 ～ 2015	新学術領 域研究(研 究領域提 案型)	細胞内核酸イメ ーシングによる 細胞機能発現の 解明と調節															85.5
	2004 ～ 2009	CREST	大腸癌の発生、 進展および治療 感受性に関わる 因子の解析															606

森 正樹	2005 ～ 2009	科研費基 盤研究(S)	食道癌の診療向 上のための分子 遺伝学および 分子疫学的研究														112
	2008 ～ 2009	科研費特 定領域研 究	大腸上皮幹細胞 の加齢による変 化と発癌への関 与														11.0
	2009 ～ 2013	科研費基 盤研究(S)	高精度の分子遺 伝学的評価によ る食道癌治療成 績向上のための 包括的研究														212
	2009 ～ 2013	厚生労働 科学研究 費補助金	固形がん幹細胞 を標的とした革 新的治療法の開 発に関する研究														300
	2010 ～ 2012	厚生労働 科学研究 費補助金	リプログラミング 技術による消化 器癌の新しい 診断・治療														2010 年 14.0 2011 年 14.0

科研費 NEDO 厚生省科研費 JST 医薬基盤研究所 文部科学省

本研究領域開始年以降に開始されたプロジェクトで助成金総額が1,000万円／件以上のもののみを抽出した。

2.2.2 論文

本領域研究の研究代表者が研究期間中及び研究終了後に発表した原著論文の数を表 2-3 にまとめた。また、その中で研究終了後については責任著者となった論文数の数も示している。ほとんどの研究者が本研究終了後も期間中と同等、あるいはそれ以上の多数の論文を発表している。多くは現在も本研究領域と関連した研究を行っているが、ゲノム解析法に関する研究を行った研究代表者は特に、そこから発展した研究を行っている。

表 2-3 研究者の論文(原著論文)数

期(採択年度)	研究課題	研究代表者	①研究期間 中の論文数	②研究終了 後の論文数	③研究終了 後の責任著 者論文数
第1期(2002)	高精度ゲノムアレイの開発 と疾患遺伝子の探索	稲澤 譲治	112	69	30
	高血圧関連疾患に関する多 面的なゲノム疫学研究	加藤 規弘	29	55	18
	転写調節系の分子解剖によ る糖尿病素因の探索	武田 純	39	26	15
	ゲノム解析によるパーキン ソン病遺伝子同定と創薬	戸田 達史	74	65	16

第 1 期 (2002)	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	間野 博行	71	55	25
第 2 期 (2003)	大規模共同研究による統合失調症遺伝子の探索	有波 忠雄	74	37	12
	Sub-common disease の感受性遺伝子同定と個人型易罹患性診断への応用	井ノ上 逸朗	67	39	12
	生体分子の高次構造形成に基づく遺伝子診断法	寺前 紀夫	75	23	18
	日仏共同体制による人種間ゲノム多型の比較解析	松田 文彦	56	73	16
第 3 期 (2004)	染色体および RNA の機能変化からの疾患の系統的解析	油谷 浩幸	165	111	15
	Whole Genome Association 解析による GVHD の原因遺伝子の探索	小川 誠司	88	98	29
	分子シャペロン工学に基づく遺伝子解析	丸山 厚	72	33	12
	大腸癌の発生、進展および治療感受性に関わる因子の解析	森 正樹	294	343	75

(2014 年 8 月現在)

2.2.3 特許出願及び登録

特許出願及び登録は、研究目的と段階によりその数は異なるが、当該研究が最終的に一定の成果を収め、実用化による社会貢献につながる段階に達したことを示す重要な指標でもある。

本領域研究の代表研究者による特許出願数及び登録数の結果を表 2-4 に示す。国内、国際特許を合計した出願数はプロジェクト期間中に 107 件、終了後に 38 件である。また、出願特許のうち現在登録となっているものは期間中に 36 件で、終了後に 3 件である。また、国際出願を行ったものは期間中に 57 件、終了後に 28 件であり、またその内登録されたものは期間中に 18 件、終了後に 2 件である。

この中で、ゲノム解析技術に関する研究を行った稲澤と油谷は、期間中には 30 件以上の特許を出願し、その半数近くが登録されている。終了後には、NEDO プロジェクトに参画し、そこで本領域研究の成果を直接実用化に活かす展開を行っているため、特許の出願も多くなっている。

表 2-4 研究領域機関中・終了後の特許の出願と成立状況

		研究領域期間中				研究領域終了以降			
		出願件数		登録件数		出願件数		登録件数	
採択 年度	研究 代表者	国内	海外 (国際)	国内	海外 (国際)	国内	海外 (国際)	国内	海外 (国際)
2002 年度	稲澤 譲治	38	18	13	6	9	5	2	2
	加藤 規弘	1	0	0	0	0	0	0	0
	武田 純	1	0	0	0	0	0	0	0
	戸田 達史	0	0	0	0	2	0	0	0
	間野 博行	6	4	3	2	2	2	0	0
2003 年度	有波 忠雄	2	0	1	0	3	3	3	0
	井ノ上 逸朗	3	1	0	0	1	1	0	0
	寺前 紀夫	5	2	4	1	0	0	0	0
	松田 文彦	0	0	0	0	1	1	0	0
2004 年度	油谷 浩幸	36	25	9	8	8	8	0	0
	小川 誠司	2	0	0	0	1	0	0	0
	丸山 厚	7	3	2	1	1	1	0	0
	森 正樹	6	4	1	0	8	7	0	0
	領域全体	107	57	33	18	36	28	5	2

(2014 年 8 月現在)

2.3 科学技術や社会・経済への波及効果

2.3.1 科学技術への波及効果

科学技術の進歩への貢献や研究成果に関する評価を示す指標の一つとして、受賞が挙げられる。表 2-5 に、本研究領域期間中及び終了後の研究代表者の受賞を示す。

本研究領域における研究代表者は、国内的にも国際的にも高く評価されていることが分かる。授賞理由としてはがん関連が多いが、その他の遺伝子疾患、筋ジストロフィー、パーキンソン病あるいは技術に関するものもある。

稲澤は 2008 年に「科学技術に関する研究開発、理解増進等において顕著な成果を収めた」として文部科学大臣表彰科学技術賞を受賞した。

戸田は 2008 年「福山型筋ジストロフィーの発見とその類縁疾患における病態の解明」に対して朝日賞を、また 2009 年「福山型筋ジストロフィーとその類縁疾患の解明に関する研究」に対し文部科学大臣表彰科学技術賞を受賞した。

間野は 2012 年、肺がんの原因遺伝子の発見に対し、紫綬褒章を受賞した。また、2011 年に「肺がんの新しい原因遺伝子の発見」に対し、文部科学大臣表彰 科学技術賞を受賞した。そのほか肺がん遺伝子を中心とした研究成果に対し 16 もの賞を受賞しており、その評価は極めて高い。この中には米国最大のがん患者支援団体である「The Bonnie J. Addario Lung Cancer Foundation」

による「The Asclepios Award」が含まれる。これは民間団体の医学賞としては最も権威があるものの一つであり、毎年1名選ばれ日本人では初めての受賞である。肺がん遺伝子の発見とその後の研究が海外でも非常に高く評価されていることを示している。

表 2-5 受賞リスト

No.	受賞者	賞名	授賞機関 (国名)	受賞年	受賞理由
1	稲澤 譲治	2008 年度科学技術分野 文部科学大臣表彰 科学 技術賞(研究部門)	文部科学省(日本)	2008 年	科学技術に関する研究開発、理解 増進 等において顕著な成果を収めた
2		第2回日本癌学会 JCA-Mauverny Award	日本癌学会とスイスの 製 薬 会 社 で ある Debiopharm 社(日本、 スイス)	2006 年	基礎および応用的がん研究の領域で、 優れた業績を収めた
3	加藤 規弘	Young Investigator' s Award 優 秀 賞	日 本 循 環 器 学 会	2002 年	Successful Isolation of a Chromosome 1 Region Affecting Blood Pressure, Stroke, and Glucose Tolerance in the Stroke-Prone Spontaneously Hypertensive Rat
4	戸田 達史	文部科学大臣表彰	文部科学省(日本)	2009 年	福山型筋ジストロフィーとその類縁疾 患の解明に関する研究
5		朝日賞	朝日新聞(日本)	2008 年	福山型筋ジストロフィーの発見とその 類縁疾患における病態の解明
6		第1回日本神経学会・学 会賞	日本神経学会(日本)	2002 年	パーキンソン病の分子病態機序のブレ ークスルー
7	間野 博行	日本癌学会 JCA-CHAAO 賞	日本癌学会(日本)	2013 年	新たな抗がん剤・治療法に関わる研 究・開発
8		細胞科学研究財団 塩 野賞	細胞科学研究財団(日 本)	2013 年	肺がん原因遺伝子 EML4-ALK の発見と 臨床への応用
9		紫綬褒章	日本国	2012 年	肺がんの原因遺伝子の発見
10		慶應医学賞	慶応大学(日本)	2012 年	肺がん原因遺伝子 EML4-ALK の発見と 分子標的治療への貢献
11		日本がん分子標的治療 学会 鶴尾隆賞	日本がん分子標的治療 学会(日本)	2011 年	肺がん原因遺伝子の発見と分子標的治 療への展開
12		第一三共生命科学研究 振興財団 高峰記念第 一三共賞	第一三共生命科学研究 振興財団(日本)	2011 年	肺がん原因遺伝子の発見と分子診断 法・分子標的療法の実現
13		安田記念医学財団 安 田医学賞	安田記念医学財団(日 本)	2011 年	肺がん原因遺伝子 EML4-ALK の 発見と分子標的治療法の実現
14		Bonnie J. Addario Lung Cancer Foundation “Asclepios Award”	The Bonnie J. Addario Lung Cancer Foundation (米国)	2011 年	肺がんの新しい原因遺伝子の発見
15		日本肺癌学会 篠井・河 合賞	日本肺癌学会(日本)	2011 年	肺がん原因遺伝子 EML4-ALK の発見と 臨床応用
16		文部科学大臣表彰 科 学技術賞	文部科学省(日本)	2011 年	科学技術に関する研究開発、理解増進 等において顕著な成果を収めた。 文部科学省科学技術政策研究所 科学 技術への顕著な貢献 2010
17		持田記念医学薬学振興 財団 持田記念学術賞	持田記念医学薬学振興 財団(日本)	2010 年	新規肺がん原因遺伝子の発見と分子標 的療法への展開
18		上原記念生命科学財団 上原賞	上原記念生命科学財団 (日本)	2010 年	肺がん原因遺伝子 EML4-ALK の発見と 臨床応用

19	間野 博行	武田科学振興財団 武田医学賞	武田科学振興財団(日本)	2010 年	肺がん原因遺伝子の発見と分子標的療法への展開
20		高松宮妃癌研究基金 学術賞	高松宮妃癌研究基金	2009 年	新規肺がん原因遺伝子 EML4-ALK の機能解析と臨床応用
21		佐川がん研究助成振興財団 佐川特別研究助成賞	佐川がん研究助成振興財団(日本)	2009 年	肺がんの新規原因遺伝子の発見と分子標的治療剤開発
22		東京テクノ・フォーラム 21 ゴールド・メダル賞	東京テクノ・フォーラム 21	2009 年	肺がんの原因遺伝子の発見とそれに基づく有効な治療薬剤の開発
23		日本癌学会 JCA-Mauvernay Award	日本癌学会(日本、スイス)	2008 年	Discovery of a novel fusion-type oncogene EML4-ALK in lung cancer
24		日本医師会 医学賞	日本医師会(日本)	2008 年	肺がんの引き金となる新しい原因遺伝子の発見
27	寺前 紀夫	日本分光学会賞(学会賞)	日本分光学会	2011 年	分光学を利用した分析化学の先駆的研究
28		平成 17 年度 日本化学会 学術賞	日本化学会	2005 年	光機能性分子認識試薬の開発と規制反応場特異的分子認識
29		平成 17 年度 日本分析化学会 学会賞	日本分析化学会	2005 年	表面界面分光計測法と化学センシングシステムの開発
30	小川 誠司	日本癌学会 Mauvernay 賞	日本癌学会	2010 年	Identification of molecular targets in cancers through comprehensive cancer genome analysis
31		第 2 回日本血液学会賞	日本血液学会	2013 年	骨髄異形成症候群における RNA スプライシングパスウェイ変異の発見
32		日本医師会医学賞	日本医師会	2013 年	骨髄異形成症候群における RNA スプライシング因子の変異の発見
33	丸山 厚	日本バイオマテリアル学会 学会賞(学術)	日本バイオマテリアル学会	2005 年	バイオコンジュゲート 核酸工学 生体機能性材料
34	森 正樹	佐川がん研究振興財団 第 11 回佐川特別賞	佐川がん研究振興財団	2014 年	がんの基礎研究及び臨床研究
35		高松宮妃癌研究基金 学術賞	高松宮妃癌研究基金	2012 年	消化器癌の癌幹細胞に関する研究
36		大阪大学功績賞	大阪大学	2011 年	大阪大学における、教育、研究、社会・国際貢献又は管理運営上の功績が特に顕著
37		医学賞	日本医師会	2010 年	消化器癌幹細胞の臨床的意義
38		九州大学研究・産学官連携活動 表彰	九州大学	2007 年	九州大学の研究の活性化と財務上の貢献が特に 顕著であり、他の職員の模範となり得る

(2014 年 8 月現在)

2.3.2 社会・経済への波及効果

(1) 新聞報道等

本研究領域期間中及び終了後の研究成果に関する報道について調査を行った。日本経済新聞、毎日新聞、朝日新聞、読売新聞など主要全国紙に報道された回数は間野 (62 件)、森 (31 件)、戸田 (21 件)、小川 (18 件) が突出していた。その内容は間野については肺がんを含むがん治療、あるいは分子標的薬に関する記事が主体である。また紫綬褒章、文部科学大臣賞などを含む多数の受賞に関する記事がかなりの数に上り、肺がん遺伝子の発見とその後の研究成果が極めて高く評価されていることを示している。森は大腸がんの研究を進めているが、幹細胞に関する研究が報道の中心であった。2013 年 9 月に NHK クローズアップ現代において「がん“根治”の時代は来る

か～“がん幹細胞”研究最前線～」に出演し、がん幹細胞をターゲットにした治療法の開発の重要性を強調した。戸田は福山型筋ジストロフィーの遺伝子及びその治療法の研究が成果を上げ、受賞を含め数多く報道されていた。また、パーキンソン病原因遺伝子の発見に関する記事が多数の新聞で報道された。小川は悪性リンパ腫など血液がんの原因遺伝子の発見で多くの成果を上げており、多数の報道があるが、最近では腎がんやクッシング症候群の原因遺伝子の発見などの成果が報道されている。その他、研究成果ではないが、糖尿病の関連遺伝子と病態の関連研究を進めている臨床医でもある武田は、糖尿病に関する活動について地方紙を中心に数多くの報道がなされている。

全体的にみると、報道の中心は間野による肺がん遺伝子の発見が直接治療薬の開発につながった例など、がんを中心とした疾患原因遺伝子の発見など病気の診断や治療に結びつきそうなものも多く取り上げられている。それらは Nature 誌など主要科学雑誌に発表された成果に関するものが多い。ゲノム科学の発展が革新的医療、テーラーメイド医療につながることに社会が大きな期待を持っていることを示している。

(2) その他の社会的貢献

稲澤はこれまでのがんゲノム研究に関する長年の知見を活かし、東京医科歯科大学のバイオバンク、「疾患バイオリソースセンター」のセンター長としてその設立から運営に大きく貢献している。

小川は科学技術・学術政策研究所により 2011 年度「ナイスステップな研究者」として選定された。これは同研究所の調査研究活動や専門家ネットワーク(1,740 人)への調査を通して明らかになった科学技術の振興・普及において顕著な貢献をした 10 組 14 名が選定されたもので、研究部門では小川を含めて 2 名が選定された。

武田は岐阜大附属病院の医療連携センター長として患者情報を医師間で伝える IC カードの試験運用などの活動も行っており、新聞等にも取り上げられている。

第3章 各研究課題の主な研究成果及び波及効果

3.1 2002 年度採択課題

3.1.1 高精度ゲノムアレイの開発と疾患遺伝子の探索（稲澤譲治）

(1) 研究のねらいと研究期間中の達成状況

①研究のねらい

がんをはじめとするヒトの疾患は、様々な遺伝子異常により発症し、進展していくことが知られている。中でもがんや染色体微細構造異常症などの遺伝疾患では、数十～数百キロ塩基対 (bp) あるいはこれ以上の大きさの領域に欠失や増幅が生じることで、その領域に存在する遺伝子の発現が影響を受け疾患に様々な表現型を付与する。疾患特異的な微細ゲノム構造異常 (コピー数異常) を迅速、簡便、かつ高精度に検出するために、ゲノムアレイシステム並びにその応用法を確立し、それにより検出される疾患特異的なゲノム構造異常を糸口に、疾患原因遺伝子の同定を目指した。これらの解析により、当該疾患の病態解明に資するとともにその悪性度判定のバイオマーカーや治療の標的分子の同定を目指した。

②期間中の研究成果

(i) 高精度ゲノムアレイの開発と応用法の開発

ヒトの 24 種類の染色体を 4,523 個の BAC クローンでカバーした高密度アレイ、Whole Genome Array-4500 (WGA-4500) を初めとする 6 種類の実用レベルのゲノムアレイを開発し、標準化した。これらのアレイは、数 10kb のヘミ欠失¹⁾を検出する精度を有しており、染色体異常、コピー数異常、がん個性診断用など、幅広い研究に貢献できる^[1]。さらに BAC アレイをプラットフォームに、メチル化 DNA の染色体ワイドスクリーニング法である BAC array-based methylated CpG-island amplification (BAMCA) 法や特定蛋白結合 DNA 領域の探索法である ChIP-on-BAC アレイ法などの応用法を開発した。

(ii) がん Comparative Genomic Hybridization (CGH) データベースの構築

従来型の染色体 CGH 法により 25 がん種の総計約 1000 例以上において、ゲノムコピー数異常を解析し、それら結果をデータベース化するとともに、その一部を情報公開した²⁾。データベースは米国 NCI の SKY/CGH データベースより “CGH database Japan” としてリンクしており、2003 年より国内外の研究者に利用されている。

¹⁾ 一方のアレルのみが欠失する遺伝子変異

²⁾ CGH Data Base: http://www.cghtml.jp/CGHDatabase/index_j.jsp

(iii) 各種がんの自作ゲノムアレイ解析と新規癌関連遺伝子の同定

国内の 400 例以上のがん症例および 150 例以上の先天異常症の症例に対して、ゲノムアレイ解析を行い、食道扁平上皮がん、肺がん^{[2], [3]}、胃がんを始めとする各種のがんにおいて、新規のがん関連遺伝子や遺伝疾患の原因遺伝子候補を同定した。

(iv) 先天異常症の潜在的微細染色体異常解析

開発した BAC アレイは BAC クローン内で生じた数 10kb の微細なヘミ欠失をも高精度に検出可能である。そこで、精神発達遅滞を伴う多発奇形症などの先天異常症や自閉症、てんかん、さらに X 染色体連鎖精神発達遅滞などの遺伝性疾患では、その病態形成に潜在的な微細染色体コピー数異常の関与が強く示唆されるため Genome Disorder Array (GD アレイ)、さらに高密度 WGA-4500 や X-タイリングアレイを用いたアレイ CGH 解析を精力的に進めた。さらに 2005 年より国内遺伝診療施設を備える 20 医療施設と連携し、「アレイ CGH 診断法実用化コンソーシアム」を形成し、GD アレイの遺伝診療検査としての実用化研究を実施している。

③研究成果に関連した主な成果論文リスト(3 報以内)

- [1] Misawa A., Inoue J., Sugino Y., Hosoi H., Sugimoto T., Hosoda F., Ohki M., Imoto I., Inazawa J., Methylation-associated silencing of the nuclear receptor 1I2 gene in advanced-type neuroblastomas, identified by bacterial artificial chromosome array-based methylated CpG island amplification (2005) Cancer Res., 65 (22), pp. 10233-10242.
- [2] Imoto I., Izumi H., Yokoi S., Hosoda H., Shibata T., Hosoda F., Ohki M., Hirohashi S., Inazawa J., Frequent silencing of the candidate tumor suppressor PCDH20 by epigenetic mechanism in non-small-cell lung cancers (2006) Cancer Res., 66 (9), pp. 4617-4626.
- [3] Izumi H., Inoue J., Yokoi S., Hosoda H., Shibata T., Sunamori M., Hirohashi S., Inazawa J., Imoto I., Frequent silencing of DBC1 is by genetic or epigenetic mechanisms in non-small cell lung cancers (2005) Hum. Mol. Genet., 14 (8), pp. 997-1007.

(2) 研究領域終了後の継続と発展状況

本研究終了後、科研費特定領域研究「がんの統合的ゲノム解析と個性診断法の開発」(2005～2009 年度)、科研費基盤研究(A)「がんのゲノム・エピゲノム解析に基づく個性診断法の開発」(2010～2012 年度)、科研費挑戦的萌芽研究「Chromothripsis、その新たなゲノム構造異常の生成機構の解明」(2013～2014 年度)、科研費新学術領域研究(研究領域提案型)「がんの統合的ゲノム・エピゲノム解析と治療標的分子シーズの探索」(2010～2014 年度)、科研費基盤研究(A)「がんのゲノム・エピゲノム情報の包括的理解に基づく個性診断法の開発」(2013～2015 年度)などで、研究を展開している。

また、新エネルギー・産業技術総合開発機構(NEDO)受託研究費「個別化医療の実現のための技術融合バイオ診断技術開発/染色体解析技術」(2006年3月～2011年11月)で応用への展開を計った。

稲澤は、2006年には日本癌学会学術賞 JCA-Mauvernay Award を、2008年には「2008年度科学技術分野 文部科学大臣表彰 科学技術賞(研究部門)」を受賞している。

①科学技術の進歩への貢献

本領域研究が終了して以降、次世代型高速シーケンサーの開発とその結果得られた大量ヒトゲノム情報を利用するための基盤整備が整い、網羅的分子情報の収集と多次元的解析が加速化されてきた。稲澤は本研究課題終了後も開発したアレイや構築した CHG データベースを基盤とし、さらにがんのゲノム・エピゲノムの解析を進めている。国内外より約 500 種類のがん細胞株を収集し、詳細なオミックスデータに加えて「代謝」、「低酸素」、「細胞死」、「オートファジー」、「ゲノム不安定性」、「薬剤耐性」などの状態を調べた結果、現在まで多数の新規がん遺伝子候補およびがん抑制遺伝子候補、さらに多くのがん抑制性 miRNA を同定した。また、個々の遺伝子の詳細な機能と病態関連解析を行い、治療標的としての意義や個性診断バイオマーカーとしての有用性を検証し報告している。

その中で最近では、miRNA に着目した研究が多く、個性診断法開発と個別化医療治療への応用を視野にがん抑制性 miRNA のハイスループットスクリーニング系を構築し、これらを用い、口腔がんでは miR-193a、miR-137^[1]、miR-218、miR-596 と標的遺伝子 LLGLS3BP、肝細胞がんでは miR-124、miR-203^[2]、子宮体がんでは miR-152 などの同定に成功した。また、がんの悪性特性の中でも難治がん特性となる浸潤・転移能と密接に関与する上皮間葉系細胞転換(EMT)関連分子を探索し、大腸がん EMT 制御転写因子 SIX1 を同定し、さらに、口腔扁平上皮がん(OSCC)細胞株の解析による Wnt シグナル関連遺伝子群の発現解析と DNA メチル化解析から、間葉系細胞株特異的 DNA 過剰メチル化により発現抑制される遺伝子 WNT7A と WNT10A を見出し、miR-200-ZEB1-WNT7A-CDH1 経路を明らかにした。また、WNT7A と WNT10A の DNA 過剰メチル化は OSCC 症例の悪性度と相関することを明らかにした^[3]。食道扁平上皮がん(ESCC)の発がんに関与する転写因子 NRF2 経路を調節する 4 種の miRNA(miR-507、-634、-450a、および-129-5p)を同定し、*in vivo* 実験で miR-507 は単独、あるいはシスプラチンとの併用で腫瘍増殖を阻害し新しいがん治療法に対するヒントを与えた^[4]。稲澤らは本領域研究で開発された CGH データベースやエピゲノム解析技術を基盤として、本研究期間中に得られた解析法を発展させがんに関わる miRNA の発見を通じて新たながんの治療に向けた研究を展開している。

精神遅滞 (intellectual disability; ID)や多発奇形 (multiple congenital anomalies; MCA)をともし先天性異常症(MCA/ID)は全出生の 1～3%に存在し、長期的な医療ケアを必要とするが、臨床症状や既存の染色体検査法によって診断が確定するものは全体の約 20%であり、実にその 80%は診断未確定の療育を受け生涯を過ごすことになる。疾患原因となるゲノム構造異常を特定しエビデンスに基づいた個別療育、治療法の糸口を見出すために、遺伝外来を開設する国内 23 の大学附属病院や国立成育医療センター、小児病院と連携し、通常の染色体検査を含むゲノム解析で異常が検出されない原因不明の MCA/ID 症例を収集し、アレイ CGH 法のゲノム診断法としての有用性と実用化検討の社会実験的取り組みと、MCA/ID の新規原因ゲノム異常の探索研究を実施した。

その結果、2014 年 12 月までに MCA/ID の 646 例を収集し自作高密度ゲノムアレイを含む種々のゲノム構造異常解析技術を駆使して、発端者（患児）とその両親のトリオを対象に疾患特異的ゲノムコピー数異常をスクリーニングした。その結果、MCA/ID コホートの 646 例中 158 例（24.5%）に疾患原因と判定できる copy number variation (CNV) を見出した。特筆すべきは新たに見いだされた 25 例において新規の疾患原因遺伝子候補を指摘することができた。中でも、MRI 画像で顕著な小脳脳幹部低形成を呈し小頭症（Microcephaly with pontine and cerebellar hypoplasia, MICPCH）と重度の ID の少女に CASK 欠失を見出し MICPCH 症候群の原因が CASK ハプロ不全であることを先駆けて報告した。さらに国内において MICPCH 症候群 41 例を収集しうち 31 例（75.6%）に CASK 異常を同定した。これらの結果より CASK 異常症家族の会が設立され CASK 異常症という稀少疾患児の成育・療育に関する情報交換の場が提供されるに至っている。CNV は健常者集団においても高い頻度で検出されることから、ゲノム解析で検出された CNV の病因性（疾患原因）の判定は極めて重要となる。このために、稲澤は早くから日本人健常者 CNV データベースに取り組んだ。日本人健常者親子（父母子のトリオ）のゲノムワイド CGH 解析データを MCG CNV database として世界に先駆けて公表した。

②社会・経済への波及効果

前述のように、発がんに関わるがん遺伝子候補、がん抑制遺伝子候補、がん抑制性 miRNA に関する知見は、がんの診断や抗がん剤の研究開発を目指したものである。本研究課題のさらなる展開目標として、「染色体の異常を高感度、高精度、かつ迅速、安価で非コード領域までを検出するゲノムアレイの解析基盤技術の開発」がある。稲澤らは、本研究課題で得られた BAC アレイ開発の成果をさらに実用化につなげるため、新エネルギー・産業技術総合開発機構 (NEDO) のプロジェクト「個別化医療の実現のための技術融合バイオ診断技術開発/染色体解析技術受託研究」³⁾ に参画し、企業と共同で「臨床診断用全自動染色体異常解析システムの開発」を行った。ここで、実用化へ向けて染色体異常解析アレイと自動化装置の開発を行った。その結果、BAC プローブを搭載した高精度ゲノムアレイの開発と CNV データベースの作成、がんの個性診断用アレイに成功し、これらの技術の一部は実際に企業へ技術移転し製品化された。同時に自動化装置もほぼ完成した。図 3-1 には、NEDO プロジェクトでの開発の概要を示した。また、同プロジェクトにおいて、これまで原因のわからなかった先天異常症の潜在的微細染色体異常を検出することに成功した。

³ 「個別化医療の実現のための技術融合バイオ診断技術開発/染色体解析技術開発」染色体解析技術開発」事後評価報告書(案)概要 <http://www.nedo.go.jp/content/100496177.pdf>

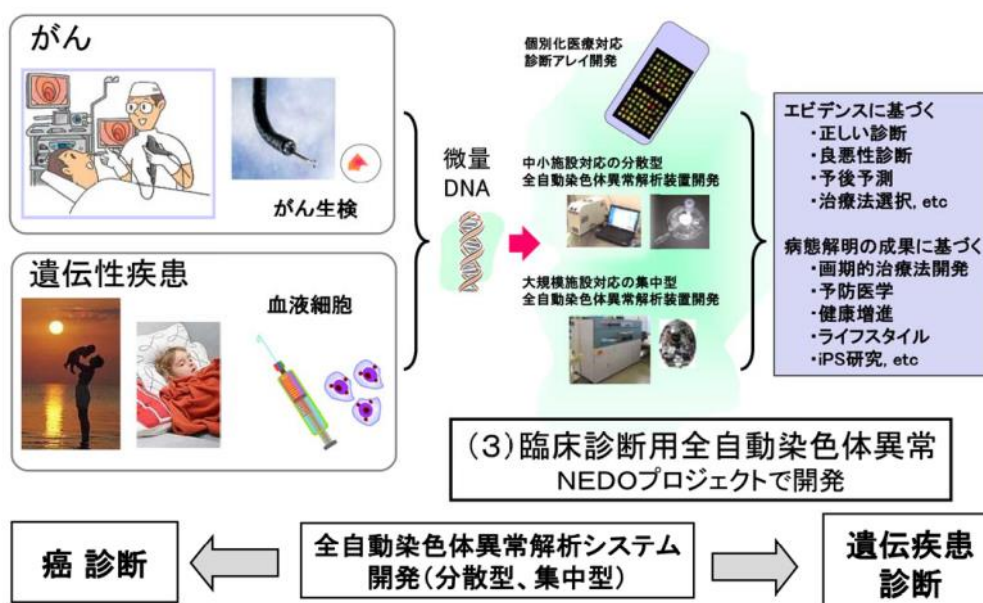


図 3-1 NEDO プロジェクト「個別化医療の実現のための
技術融合バイオ診断技術開発／染色体解析技術開発」の概要⁴⁾

③上記、継続と発展状況を示す研究成果に関連した主な成果論文リスト(4 報以内)

- [1] Kozaki K. -I., Imoto I., Mogi S., Omura K., Inazawa J., Exploration of tumor-suppressive microRNAs silenced by DNA hypermethylation in oral cancer (2008) *Cancer Res.*, 68 (7), pp. 2094-2105.
- [2] Furuta M., Kozaki K. -I., Tanaka S., Arii S., Imoto I., Inazawa J., miR-124 and miR-203 are epigenetically silenced tumor-suppressive microRNAs in hepatocellular carcinoma (2010) *Carcinogenesis*, 31 (5), pp. 766-776.
- [3] Ono H., Imoto I., Kozaki K., Tsuda H., Matsui T., Kurasawa Y., Muramatsu T., Sugihara K., Inazawa J., SIX1 promotes epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer through ZEB1 activation (2012) *Oncogene*, 31 (47), pp. 4923-4934.
- [4] Yamamoto S., Inoue J., Kawano T., Kozaki K. -I., Omura K., Inazawa J., The impact of miRNA-based molecular diagnostics and treatment of NRF2-stabilized tumors (2014) *Mol. Cancer Res.*, 12 (1), pp. 58-68.

⁴ <http://www.nedo.go.jp/content/100455442.pdf>

3.1.2 高血圧関連疾患に関する多面的なゲノム疫学研究（加藤規弘）

(1) 研究のねらいと研究期間中の達成状況

①研究のねらい

本研究では、高頻度な多因子疾患である高血圧とその関連疾患に関してヒトでの遺伝素因の探索とモデル動物を用いた基盤的知見の収集から得られた因子のヒトホモログでの検証を行い、これらの疾患のテーラーメイド医療の進展に寄与することを目的とした。

②研究期間中の成果⁵⁾

(i) ヒトでの高血圧遺伝素因の探究

ヒトでの遺伝素因の探索は、候補遺伝子アプローチとゲノムワイド関連解析から実施した。候補遺伝子アプローチにおいては、高血圧では尼崎研究⁶⁾の被験者から4箇所のSNPsにおいて、脳梗塞では島根研究⁴⁾の被験者から、6箇所のSNPsにおいて病態との有意な関連を認めた。また高血圧に関連した心血管病の危険因子として、生活習慣の1つである飲酒、及び血中脂質レベルに関するSNP解析を行った。アルコール反応性(飲酒行動と血圧への影響)に関して4つの候補遺伝子を選出し、その内の2つのSNPsが飲酒行動を協調的(synergistic)に規定しており、うち1つは収縮期血圧との有意な association の傾向を示した。また、脂質代謝に関しては、14の候補遺伝子を選出し、うち5遺伝子(6 SNPs)に関してQT解析を行ない、ApoEのisoformと総コレステロール値の間、コレステロールエステル転送タンパク質(CETP)Gly549AspとHDLコレステロール値の間で有意な association が認められた。一方ゲノムワイド関連解析においては高血圧において9 SNPsとの有意な association の傾向を認め、特に3つの遺伝子(ADD2、KIAA0789、M6PR)に関しては、re-sequencing後に25 tag SNPsを追加 typing し fine mapping した^[1]。

(ii) モデル動物を用いた検討

高血圧自然発症ラット(SHR)、脳卒中易発症 SHR から、各々6系統、8系統のコンソミックラット⁷⁾を作成し、うち4つの染色体領域に関してはコンジェニック⁸⁾化による Quantitative trait locus(QTL、量的形質座位)の絞込みと機能解析を実施した。ラットの1番染色体に関しては、3つの独立した血圧QTLの存在を確認し、それぞれの責任遺伝子候補を同定した。また、薬物負荷に対する遺伝子発現変動については、候補遺伝子を選定して機能的検証を行っている^{[2], [3]}。

本研究課題では、尼崎、島根の両コホートと、2005年に立ち上げた病院コホート(国立国際医療センター)を整備して活用している。

⁵⁾ 高血圧関連疾患に関する多面的なゲノム疫学研究事後評価報告書(案)概要 http://www.jst.go.jp/kisoken/cr_est/eval/jigo/20080611/8_tailor/tailor_02.pdf

⁶⁾ 本研究課題において、尼崎研究と島根研究及び国立国際医療センターの3つのコホートを立ち上げ重点的に整備し遺伝子解析研究の被験者として活用した。

⁷⁾ 2つの系統が1つの染色体の全領域について異なった由来をもち、他の染色体の遺伝的背景が共通である場合、これらの2つの系統は互いにコンソミックな状態にあり、これらの系統はコンソミック系統という。

⁸⁾ ドナーとなる系統の、ある遺伝子領域を残しながら、その他の遺伝情報をレシピエントとなる系統と同一に(あるいは同一にみなせるように)交配・選択して得られた系統をいう。

③研究研究成果に関連した主な成果論文リスト(3 報以内)

- [1] Kato N., Miyata T., Tabara Y., Katsuya T., Yanai K., Hanada H., Kamide K., Nakura J., Kohara K., Takeuchi F., Mano H., Yasunami M., Kimura A., Kita Y., Ueshima H., Nakayama T., Soma M., Hata A., Fujioka A., Kawano Y., Nakao K., Sekine A., Yoshida T., Nakamura Y., Saruta T., Ogihara T., Sugano S., Miki T., Tomoike H., High-density association study and nomination of susceptibility genes for hypertension in the Japanese National Project (2008) Hum. Mol. Genet., 17 (4), pp. 617-627.
- [2] Serizawa M., Nabika T., Ochiai Y., Takahashi K., Yamaguchi S., Makaya M., Kobayashi S., Kato N., Association between PRKCH gene polymorphisms and subcortical silent brain infarction (2008) Atherosclerosis, 199 (2), pp. 340-345.
- [3] Kato N., Nabika T., Liang Y.-Q., Mashimo T., Inomata H., Watanabe T., Yanai K., Yamori Y., Yazaki Y., Sasazuki T., Isolation of a Chromosome 1 Region Affecting Blood Pressure and Vascular Disease Traits in the Stroke-Prone Rat Model (2003) Hypertension, 42 (6), pp. 1191-1197.

(2) 研究領域終了後の継続と発展状況

本研究課題終了後、科研費基盤研究(B)「環境要因のコンパートメント化を考慮した、スリランカでの生活習慣病の遺伝疫学」(2007～2010 年度)、厚生労働科学研究費補助金「創薬および臨床試験の効率化に資するメタボリックシンドロームと心血管病のモデルラットの開発研究」(2009～2011 年度)などで、研究を展開している。

ゲノム情報解析支援方法に関する特許を期間中に 1 件出願している。

①科学技術の進歩への貢献

本研究領域終了後、ゲノム情報を取り入れた臨床ゲノム疫学を主たるアプローチとして、心血管病とそのリスクファクターに対する診断、治療法の開発・検証に関わる研究に取り組んでいる。高血圧、糖尿病、冠動脈疾患の候補遺伝子解析および GWAS を行い、日本人で主要なリスク効果をもつ複数の感受性遺伝子座を同定している。

(i) 東アジア人の高血圧関連遺伝子を同定^{[1], [2]}

東アジア人での大規模全ゲノム関連解析を行い、初めて東アジア人(日本人、韓国人、中国人を含む計 5 万人余)の高血圧関連遺伝子を同定した。この研究の主な成果を以下に示す。

- ・世界的にありふれた重要な生活習慣病指標である血圧に着目して、非欧州人の大規模全ゲノム関連解析を実施し、新規のもの 5 遺伝子座を含む、計 13 遺伝子座を同定した。
- ・欧州人と東アジア人の間で共通する部分は多いものの、人種特異的な血圧関連遺伝子座の存在が無視できず、そのうちの少なくとも一部は自然選択により生じた可能性が示唆された。
- ・遺伝-環境相互作用に関わる明確な事例が見出されて、個個人の生活習慣に影響されながら、心血管病の発症リスクは複合的に規定されていることが実証された。

東アジア人で統計学的有意性の確認されたものは 13 遺伝子座であり、なかでもアルコール代謝酵素 ALDH2 の遺伝子多型 (Glu504Lys) のアミノ酸置換が、東アジア人における今回の解析で最も強い遺伝的効果を示すことが判明した。図 3-2 に ALDH2 遺伝子多型と代謝形質との関連を示す。

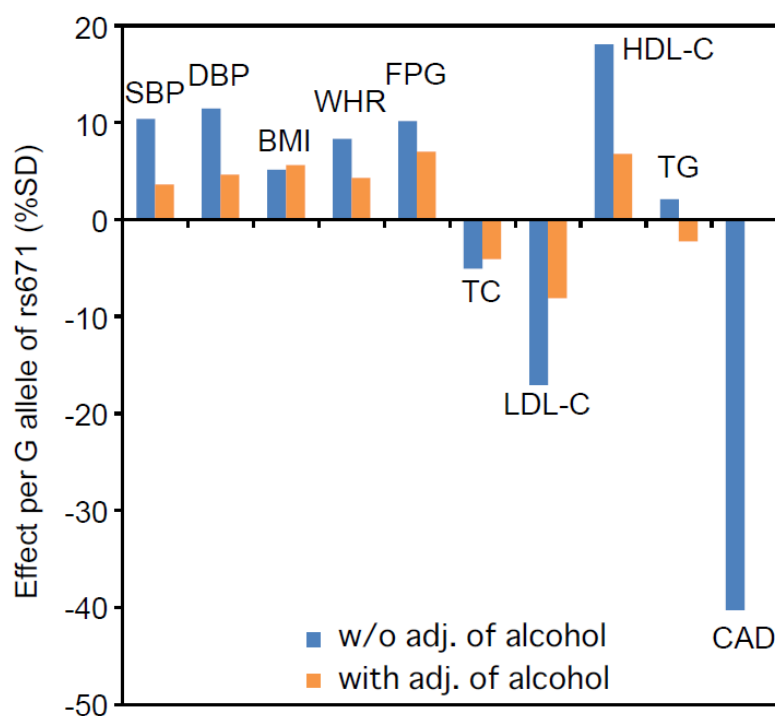


図 3-2 ALDH2 遺伝子多型と代謝形質との関連⁹⁾

図 3-2 において、G-allele が活性型対立遺伝子。不活性型に比べての遺伝的効果をバークグラフで示す。青色は飲酒の影響の補正無し、橙色は補正有りを示す。また略語は次の通りである。

BP 血圧、BMI 体格指数、FPG、空腹時血糖、TC 総コレステロール、TG 中性脂肪、CAD 冠動脈疾患。

活性型 (504Glu) は不活性型 (504Lys) に比べて、血圧上昇、血糖上昇、BMI 増加傾向〔いずれも動脈硬化促進〕を示す一方、LDL (悪玉) コレステロール低下、HDL (善玉) コレステロール上昇傾向〔動脈硬化抑制〕を示している。さらに冠動脈疾患 (及び心筋梗塞) の発症リスクは大きく低下するため、恐らく差し引きした結果として、後者の“動脈硬化抑制”の作用が優位になるのだと推測される。この研究における遺伝子多型の分子系統樹的解析及び自然選択の検討で、ALDH2 遺伝子多型はおそらく気候や食事などの何らかの選択圧により、東アジア人に特異的に定着したことが裏付けられた。欧州人で報告された遺伝子座の重なり具合も考慮すると、同じ高血圧でも人種特異的な要因の存在を十分考慮する必要があることが分った。

(ii) 生活習慣病のモデル動物を用いた検討

「創薬および臨床試験の効率化に資するメタボリックシンドロームと心血管病のモデルラットの開発研究」において、本態性高血圧をはじめとする生活習慣病のモデル動物として、高血圧自然発症ラット (SHR: Spontaneously hypertensive rat) およびその垂系である脳卒中易発症 SHR (SHRSP: Stroke-prone SHR) を用いた QTL マッピング、原因となるネットワークの探究、心血

⁹⁾ 国立国際医療研究センタープレスリリース http://www.ncgm.go.jp/topics/ncgm_press_release01.pdf

管病の新規モデルの開発などを進めている。

- ・ ヒト CETP-Tg ラットの作成・表現型解析: SHR に transgene を導入し、ヒトの動脈硬化型の脂質異常 (HDL コレステロールの低下と中性脂肪) や脂肪肝、血圧上昇を認めた。
- ・ “心血管病評価用ラットパネル” の整備: SHR 系統より一連のコンジェニック系統を作成し、ストレス感受性、心肥大、メタボリックシンドローム (代謝関連形質の集積)、脂質異常等の、元となる近交系ラットと比べて特徴的な心血管病関連表現型を示すモデルを開発した。
- ・ モデルラットでの心血管病の病態探究: 高血圧性腎硬化症に関して、血圧影響の無い培養細胞 (*in vitro*) 及び個体 (*in vivo*) の実験系において補体 C3 の病因/病態的関与の検討を進め、内因性異常として C3 の遺伝的過剰発現とそれに伴う細胞増殖が認められた。

②社会・経済への波及効果

高齢化が進む日本では、頻度の高い多因子疾患である高血圧およびその関連疾患の予防は医療経済学的にも極めて重要である。本研究課題の意義として、①探索的アプローチにより、多くが未知の遺伝子座と血圧との関連が見出されたことから、新たな治療法や予防法、診断法の開発につながると期待される点、さらに、将来のゲノム医療を考慮した場合、②東アジア人独自のゲノム解析結果が必要とされる点、及び③十分に大規模かつ精密な情報を備えた母集団で“遺伝子-環境-病気 (健康障害)” の因果関係を明らかにすることにより、個別化健康指導・療養指導への展望が示された点が挙げられる。

③上記、継続と発展状況を示す研究成果に関連した主な成果論文リスト (4 報以内)

- [1] Kato N., Takeuchi F., Tabara Y., Kelly T.N., Go M.J., Sim X., Tay W.T., Chen C.-H., Zhang Y., Yamamoto K., Katsuya T., Yokota M., Kim Y.J., Ong R.T.H., Nabika T., Gu D., Chang L.-C., Kokubo Y., Huang W., Ohnaka K., Yamori Y., Nakashima E., Jaquish C.E., Lee J.-Y., Seielstad M., Isono M., Hixson J.E., Chen Y.-T., Miki T., Zhou X., Sugiyama T., Jeon J.-P., Liu J.J., Takayanagi R., Kim S.S., Aung T., Sung Y.J., Zhang X., Wong T.Y., Han B.-G., Kobayashi S., Ogihara T., Zhu D., Iwai N., Wu J.-Y., Teo Y.Y., Tai E.S., Cho Y.S., He J., Meta-analysis of genome-wide association studies identifies common variants associated with blood pressure variation in east Asians (2011) Nat. Genet., 43 (6), pp. 531-538.
- [2] Takeuchi F., Isono M., Katsuya T., Yamamoto K., Yokota M., Sugiyama T., Nabika T., Fujioka A., Ohnaka K., Asano H., Yamori Y., Yamaguchi S., Kobayashi S., Takayanagi R., Ogihara T., Kato N., Blood Pressure and hypertension are associated with 7 loci in the Japanese population (2010) Circulation, 121 (21), pp. 2302-2309.

3.1.3 転写調節系の分子解剖による糖尿病要因の探索（武田純）

(1) 研究のねらいと研究期間中の達成状況

①研究のねらい

日本人における糖尿病の原因である「非肥満(あるいは軽度肥満)インスリン分泌不全」と、欧米人の「肥満型インスリン抵抗」とは異なる特徴を持っている。本研究は、日本人に特有な糖尿病素因を同定することによって、罹患体質の解明とテーラーメイド医療の開発を目指した。すなわち、肝細胞核因子(HNF)転写ネットワークにおける新規転写因子とその標的分子を同定し、SNP多型解析により日本人固有の2型糖尿病素因と発症機序を解明し、罹患体質に基づいた医療へ展開することを目指した。

②期間中の研究成果

本研究では、 β 細胞の転写調節カスケードに焦点を絞って選別した遺伝子の多型(SNP)関連解析を行った。本遺伝子解析の基本シーズは独自収集した膵島の expressed sequence tag(EST)プールである。本研究課題では以下の戦略により2型糖尿病素因と発症機序の解明を目指した。

- ・一連の若年発症成人型糖尿病(MODY)転写因子の発現を変化させ、ESTマイクロアレイ解析により協調因子や下流の標的因子を網羅する。
- ・正常細胞とインスリン分泌能を欠失した膵 β 細胞株の mRNA 発現プロファイルを比較して異なる遺伝子を求める^[1]。
- ・膵島特異的な遺伝子は特異的転写因子によって制御されるので、膵組織切片と実験動物 EST プローブを用いた大規模 *in situ* hybridization(ISH)により、転写標的となる遺伝子を求める。
- ・候補遺伝子の欠失マウスを作成し、病態解析と新たな候補獲得に供する。続いて、関心遺伝子や標的エフェクター分子を欠失させたモデル動物を用いて発症機序と病態を解析する。その結果、以下の研究成果が得られた。

若年糖尿病の遺伝学的解析では、すでに見出されている原因候補遺伝子について若年糖尿病の DNA の全エクソン領域を直接スクリーニングを行い、rabphilin 3A-like (without C2 domains) (noc2 (RPH3AL)) おいてナンセンス変異を見出した。また MODY 遺伝子において2種類のアレル欠失を見出し、CNVに起因する若年糖尿病が存在することを明らかにした。

2型糖尿病に関する SNP 関連解析では2型糖尿病の候補遺伝子と動脈硬化の候補遺伝子をスクリーニングし、既知遺伝子 Hypoxia inducible factor 1- α (HIF-1 α)、Liver receptor homolog-1 (LRH-1)、Transcription factor 7-like 2 (TCF7L2)、Cdk5 regulator subunit associated protein 1-like 1(CDKAL1)、IGF binding protein-2 (IGFBP2)において、糖尿病発症と有意の関連を認めた^{[2], [3]}。この内、Small hetero-dimerization partner(SHP)の協調因子である LRH1 については、プロモーター多型によって生じるトランス因子のリクルート有無が疾患発症に関連すること、LRH1 は膵島形成の初期に機能する転写因子を制御すること、LRH1 欠失マウスの解析により胎生期の膵島形成不全が生じる可能性が示唆された(図 3-3)。

膵β細胞株からクローニングした転写因子 Orthodenticle homolog 3(Otx3)の欠失マウスを作製・解析した。その結果、Otx3 が、遺伝性肥満・糖尿病モデルマウスである Ay マウスの肥満・糖尿病の発症に不可欠であることを見いだした。

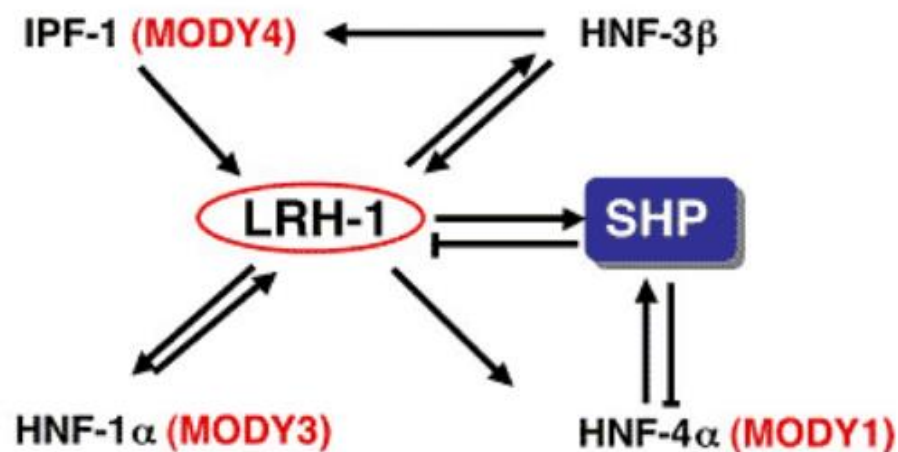


図 3-3 膵臓発生における LRH1-SHP ネットワーク¹⁰⁾

③研究成果に関連した主な成果論文リスト(3 報以内)

- [1] Wang H., Horikawa Y., Jin L., Narita T., Yamada S., Shihara N., Tatemoto K., Muramatsu M., Mune T., Takeda J., Gene expression profile in rat pancreatic islet and RINm5F cells (2005) J. Mol. Endocrinol., 35 (1), pp. 1-12.
- [2] Yamada N., Horikawa Y., Oda N., Iizuka K., Shihara N., Kishi S., Takeda J., Genetic variation in the hypoxia-inducible factor-1α gene is associated with type 2 diabetes in Japanese (2005) J. Clin. Endocrinol. Metab., 90 (10), pp. 5841-5847.
- [3] Miyake K., Horikawa Y., Hara K., Yasuda K., Osawa H., Furuta H., Hirota Y., Yamagata K., Hinokio Y., Oka Y., Iwasaki N., Iwamoto Y., Yamada Y., Seino Y., Maegawa H., Kashiwagi A., Yamamoto K., Tokunaga K., Takeda J., Makino H., Nanjo K., Kadowaki T., Kasuga M., Association of TCF7L2 polymorphisms with susceptibility to type 2 diabetes in 4,087 Japanese subjects (2008) J. Hum. Genet., 53 (2), pp. 174-180.

(2) 研究領域終了後の継続と発展状況

本研究領域の期間中に開始した研究としては厚生労働科学研究費補助金「体脂肪減少因子を用いた 2 型糖尿病の治療」(2007～2009 年度)がある。また終了後に科研費基盤研究(B)「体脂肪分解と肝糖取り込みを促進させる糖尿病治療の開発」(2010～2012 年度)、厚生労働科学研究費補助

¹⁰⁾ 岐阜大学大学院医学研究科分子・構造学講座 内分泌代謝病態学分野武田純研究室ホームページ
http://www.med.gifu-u.ac.jp/diabetes/2_class/index.html

金「MODY1-6 の病態調査と鑑別診断基準の策定」(2010 年度)、厚生労働科学研究費補助金「循環器リスクと耐糖能障害の効率的な健診マーカーの探索」(2011～2012 年度)があり、2 型糖尿病および肥満の発症原因解明と治療薬に関する研究が中心となって展開されている。

期間中に「2 型糖尿病および動脈硬化のマーカー、およびこれを検出するためのプローブ並びにプライマー」という標題で特許を 1 件出願している。

①科学技術の進歩への貢献

武田の主要研究テーマは、高血圧・糖尿病といった生活習慣病をはじめとする多因子疾患のゲノム解析である。発症予知、診断、予後の推定などに遺伝情報を活用すること、さらに成因に基づいた適切な治療法の選択・開発を行うことを目的として、ヒト罹患者およびモデル動物(遺伝的高血圧ラット)を対象とした多角的な研究アプローチを試みている。

(i) 若年糖尿病の遺伝学的解析と診断基準

本研究領域で行った若年糖尿病の遺伝子解析研究の展開として、実際の診断への適用の可能性について検討している^[1]。若年糖尿病の原因遺伝子として MODY1-6 があり、各病型は 0.1～5 万人と推定されるが、概数や家系内浸透率は不明である。この実態調査を行い、臨床所見の解析から病型の特徴的症候と鑑別基準を明確にすることを目的として研究をすすめた。その結果、以下のことが分かった。

- ・臨床所見等は MODY 型によって非常に多様であり、MODY 全体での DNA 検査推奨基準の設定は日本人では困難であることが示唆された。
- ・MODY2 では家系内に未発症例が多く、従来基準では見逃されてきたことが判明した。
- ・日本人 MODY5 に認められた CNV 変異では膵形成不全が合併した。
- ・未診断 MODY 遺伝子の解析を行うことにより新たな確定診断につながった。

また、配列決定により新たな MODY 遺伝子の変異遺伝子候補が見つかるなど、着実に若年性と糖尿病の病態と遺伝子変異に関する理解が深まっている。

(ii) この他にも科研費の助成金を得て「膵島機能に関連するマイクロ分子の同定と機能解析」というテーマにおいて、ヒト及びラット膵島の EST データベースと miRNA のデータベースの相同性検索を行い、見出された miRNA の発現を調べるなど新たな展開も行っている^[11]。

②社会・経済への波及効果

武田らの糖尿病に関する膵島転写因子研究により、これらの転写因子より発現するタンパク質のいくつかは「膵島、肝臓で共通発現し、生活習慣病の代謝病態に共通に関与するタンパク質である」ことが明らかとなった。共通の機能接点に関する転写下流のキー分子を見出せば、コモン代謝疾患の発症機序の解明が期待されるのみならず、臨床応用に直結するという利点がある。そのような観点からモデル動物を用いた分子の同定と機能解析を進め^[2]、体脂肪分解と肝糖取り込みを促進させる液性因子の同定を行い、機能解析を行っている。そこでは膵島トランスクリプト

¹¹ 科学研究費助成事業データベース <http://kaken.nii.ac.jp/d/p/20659145/2009/3/ja.ja.html>

ーム解析によるスクリーニングの結果、糖尿病の関連臓器である「膵島、肝」で共通発現している Hepatocyte nuclear factor (HNF) 標的の 32kDa 分泌蛋白質に着目し、実験動物の肝で過剰発現させたところ、体脂肪蓄積を減少させると共に血糖降下作用が認められモデル動物での過剰発現により、インスリン非依存性の体脂肪減少と血糖低下が認められ、その背景として肝での糖および脂質の取り込み促進が示唆された。ヒトにおける血中レベルは、肥満度と正相関したので、糖脂質代謝の臨床マーカーとなる可能性が考えられた。

遺伝子解析のみならず、「循環器リスクと耐糖能障害の効率的な健診マーカーの探索」という課題においては、糖尿病調査と種々の生化学検査を実施してフォローアップ解析を行なうと同時に、生活習慣が評価できるアンケート調査を行い、病態や検査所見との関連を解析している。それによって、健診感度を上昇させる効率的マーカーや病態に則した療養指導マーカーの開発を行い、糖尿病、肥満等の診断、治療を目的とした研究を行っている^[3]。

武田純らによる特許には、2004 年 10 月 14 日に公開された「2 型糖尿病および動脈硬化のマーカー、およびこれを検出するためのプローブ並びにプライマー」がある。これは、HNF-4 α 遺伝子のエクソン 4 における 31 位の塩基の C から T への変異の有無によって、2 型糖尿病および動脈硬化の発症の可能性を判断するものである。

③上記、継続と発展状況を示す研究成果に関連した主な成果論文リスト(4 報以内)

- [1] Horikawa Y., Enya M., Fushimi N., Fushimi Y., Takeda J., Screening of diabetes of youth for hepatocyte nuclear factor 1 mutations: Clinical phenotype of HNF1 β -related maturity-onset diabetes of the young and HNF1 α -related maturity-onset diabetes of the young in Japanese (2014) Diabet. Med., 31 (6), pp. 721-727.
- [2] Hattori T., Iizuka K., Horikawa Y., Takeda J., LRH-1 heterozygous knockout mice are prone to mild obesity (2014) Endocr. J., 61 (5), pp. 471-480.
- [3] Enya M., Horikawa Y., Iizuka K., Takeda J. Association of genetic variants of the incretin-related genes with quantitative traits and occurrence of type 2 diabetes in Japanese (2014) Mol. Genet. Metab. Rep., 1 (1), pp. 350-361.
- [4] Iizuka K., Wu W., Horikawa Y., Saito M., Takeda J., Feedback looping between ChREBP and PPAR α in the regulation of lipid metabolism in brown adipose tissues (2013) Endocr. J., 60 (10), pp. 1145-1153.

3.1.4 ゲノム解析によるパーキンソン病遺伝子同定と創薬（戸田達史）

(1) 研究のねらいと研究期間中の達成状況

①研究のねらい

パーキンソン病(PD)はドパミンニューロンの変性による運動障害を主症状とする神経変性疾患であり、家族性 PD に対する原因遺伝子としては α -synuclein(SNCA)等、数種が発見されている。しかし患者の大部分を占める孤発性 PD では疾患感受性遺伝子は同定されていない。その経過・中心となる症状・薬剤の効果は患者により異なり、テーラーメイド医療が可能となることが期待される。本研究課題では、1)ゲノムワイド関連解析等により疾患感受性遺伝子を同定する、2)SNP と各薬剤への反応性、副作用との関連を明らかにしテーラーメイド治療法を確立する、3)同定された疾患感受性遺伝子の機能解析、蛋白構造解析などに基づく網羅的薬剤候補探索により日本発のパーキンソン病創薬を行うことを目標とした。

②期間中の研究成果

- (i)パーキンソン病感受性遺伝子を同定するために 27,000 のマイクロサテライト DNA を用いて 3 段階関連解析を行い、さらに個別 DNA 検体を用いたタイピングを行った結果、7 箇所のマーカーを同定した。
- (ii)約 900 人の患者を対象とした候補遺伝子の SNP 解析によるスクリーニングの結果、確実なパーキンソン病疾患感受性遺伝子として SNCA 遺伝子を同定した^[1]。また、SNP の周辺で連鎖不平衡マッピング及び関連解析を行い、合計 6 個の SNPs が全て PD と強い関連を示した^[2]。これらの SNP の各遺伝子型ごとに SNCA 発現をみたところ、剖検脳にて PD 関連アレルの数に応じた SNCA 遺伝子発現増加がみられた。
- (iii)家族性パーキンソン病では、劣性遺伝性パーキンソン病の約 4 割が parkin(PARK)変異による parkin 陰性例が存在することから PARK6、PARK7 の遺伝子変異解析を行い、PARK6 の変異を 8 家系について認めた。さらなる解析で、7 種の新規遺伝子変異を見出した。
- (iv)優性遺伝性パーキンソン病では、SNCA の duplication 症例が 5 家系存在している事が分かり、1 症例については認知症が存在していた。
- (v)Parkin 機能関連では、ユビキチンリガーゼの負の調節因子である 14-3-3 η の同定に成功した。また parkin のノックダウンによりドパミンキノン体の増加が認められ、その増加は正常 SNCA で抑制された。
- (vi)抗てんかん薬 Zonisamide に抗パーキンソン作用のあることを発見し、大規模臨床試験の結果、抗パーキンソン効果を確認した^[3]。

③研究成果に関連した主な成果論文リスト(3 報以内)

- [1] Mizuta I., Satake W., Nakabayashi Y., Ito C., Suzuki S., Momose Y., Nagai Y., Oka A., Inoko H., Fukae J., Saito Y., Sawabe M., Murayama S., Yamamoto M., Hattori N., Murata M., Toda T., Multiple candidate gene analysis identifies α -synuclein as a susceptibility gene for sporadic Parkinson's disease (2006) Hum. Mol. Genet., 15 (7), pp. 1151-1158.
- [2] Hattori N, Mizuno Y. Pathogenetic mechanisms of parkin in Parkinson's disease. Lancet, (2004) 364 (9435), pp. 722-724.
- [3] Murata M, Hasegawa K, Kanazawa I, The Japan Zonisamide on PD Study Group. Zonisamide improves motor function in Parkinson disease: A randomized, double-blind study (2007) Neurology, 68, pp. 45-50.

(2) 研究領域終了後の継続と発展状況

本研究課題終了後、パーキンソン病と関連するテラーメイド医療と関連した研究として、科研費特定領域研究「パーキンソン病関連遺伝子探索と機能解析」(2005～2009 年度)、厚生労働科学研究費補助金「ゲノム解析によるパーキンソン病遺伝子同定と創薬・テラーメイド研究」(2007～2009 年度)、科研費基盤研究(B)「認知機能関連遺伝子同定と機能解析」(2008～2010 年度)、厚生労働科学研究費補助金「孤発性パーキンソン病遺伝子同定と創薬・テラーメイド研究」(2010～2012 年度)、科研費新学術領域研究(研究領域提案型)「パーキンソン病および認知機能関連分子とパーソナルゲノム解析」(2010 年 6 月～2015 年 3 月)、厚生労働科学研究費補助金「次世代シーケンサーを用いた孤発性の神経難病の発症機構の解明に関する研究」(2011～2013 年度)を得て、パーキンソン病及び神経難病の研究を行ってきた。また、戸田らのもう 1 つの中心的テーマである福山型筋ジストロフィーに関する研究でも多くの研究助成金を獲得している。

本研究終了後、特許を 2 件出願しているが、その 1 つは「パーキンソン病発症リスクマーカー」である。

期間中 1 件、終了後に 2 件の受賞があるが、期間中のものは第 1 回日本神経学会・学会賞「パーキンソン病の分子病態機序のブレークスルー(2002 年)」である。終了後には福山型筋ジストロフィーに関する研究に対し、朝日賞(2009 年)及び文部科学大臣表彰(2010 年)を受賞している。

①科学技術の進歩への貢献

(i) 孤発性パーキンソン病遺伝子同定と創薬・テラーメイド研究

戸田らは本研究課題で得られた結果を受け、さらに疾患感受性遺伝子の同定とメカニズムに関する研究を継続している。図 3-4 に示したように、1) 全ゲノムに対する関連解析を行い疾患感受性遺伝子を同定する、2) 日本で発見された抗 PD 薬、ゾニサミドを中心とした抗 PD 薬の反応性、副作用と SNP の関連を明らかにしテラーメイド治療法を確立する、3) 同定された疾患感受性遺

伝子の機能解析、蛋白構造解析などを行いスクリーニングによる日本発のパーキンソン病創薬がその目標である。

孤発性パーキンソン病(PD)の感受性遺伝子である、SNCA 3'-flanking SNP rs356219 において、*in vitro* でアレル特異的な現象を見出し、保護的アレルに結合する転写因子、SH-SY5Y を同定した^[1]。この転写因子を細胞に強制発現して SNCA および SNCA 下流に存在するアンチセンス noncoding RNA (ncRNA)の発現を RT-PCR で解析した。その結果、SNCA 発現レベルはほとんど変化しないが、ncRNA 発現レベルは数十倍に上昇していることが分かった。さらに剖検脳(前頭葉レビー小体群 21 例)における SNCA、ncRNA の発現レベルと rs356219 との関連を調べた。その結果、rs356219 の疾患アレルが増えるほど SNCA 発現レベルは上昇する傾向を示したが、ncRNA についてはアレルとの関連性は殆ど見られなかった。SNCA と ncRNA の共発現は、両者の間に機能的関連性があることが示唆された。

戸田らは現在も次世代シーケンサーなども使用したパーキンソン病に関する感受性遺伝子の同定を進めるなど、テーラーメイド医療へむけた研究を続けている。現在は「次世代シーケンサーを用いた孤発性の神経難病の発症機構の解明に関する研究」や「パーキンソン病および認知機能関連分子とパーソナルゲノム解析」等の研究を進めている。

(ii) 認知機能関連遺伝子同定と機能解析

戸田らは、筋ジストロフィー、パーキンソン等の神経変性疾患と並行して、同様なアプローチで認知機能のメカニズム研究とした遺伝子同定も進めている。

精神発達遅滞(MR)症患者 28 症例のコピー数異常領域検出を行った。28 症例中 3 症例は、既知の症候群であったが、6 症例 12 領域について未知のコピー数異常を見出した。知能指数 IQ の差が顕著な一卵性双生児を用いた遺伝子発現プロファイリング解析で、それぞれの双子の IQ が低い方の検体で、炎症性サイトカインの発現が上昇する傾向にあることが明らかになった^[2]。

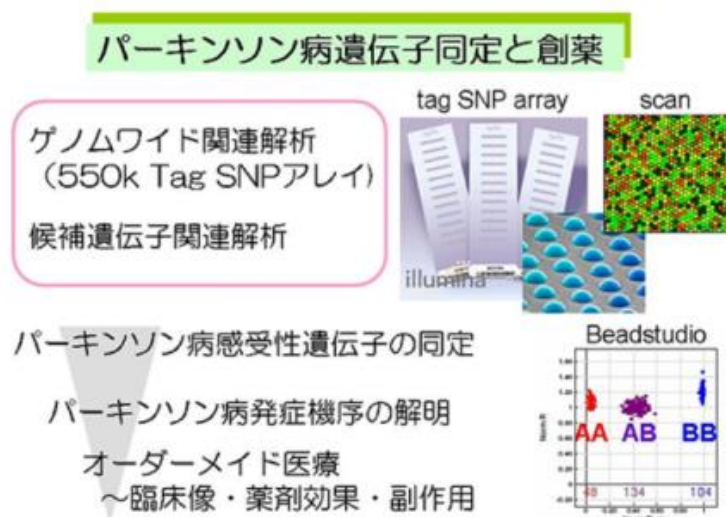


図 3-4 パーキンソン病遺伝子同定と創薬^[3]

¹² 科学研究費助成事業データベース <https://kaken.nii.ac.jp/d/p/20390099/2010/8/ja.ja.html>

¹³ 戸田研究室ホームページ <http://www.med.kobe-u.ac.jp/clgene/research/pd.html>

②社会・経済への波及効果

(i) ゲノム解析によるパーキンソン病遺伝子同定と創薬・テーラーメイド研究

本研究課題でのゲノムワイド解析結果を展開し、日本人の PD 2,011 検体、対照 18,381 検体を用いて、ゲノムワイド関連解析と 2 つの再現研究を行った。その結果、1q32 と、4p15 に、新しい PD 感受性遺伝子座が同定された。さらに、SNCA (4q22) と LRRK2 (12q12) の領域に疾患感受性を検出した。白人集団の関連解析の結果と比較することにより、人種間で共通した PD リスク遺伝子座として、PARK16、SNCA、LRRK2、人種差を示す遺伝子座として、BST1 と MAPT を見出した。原因遺伝子が未知の常染色体劣性晩発性 PD 家系において連鎖解析を行い遺伝子座を決定し、さらに変異を有する候補遺伝子候補を同定した^[2]。この研究では、Zonisamide (ZNS) を含む抗パーキンソン病薬の効果と遺伝的背景の関連を研究している。その中で、戸田らはパーキンソン病における Wearing off 現象改善薬の catechol-O-methyltransferase (COMT) 阻害薬の効果について、50 例の L-dopa test 施行例の検討から効果予測式を作成した。また、心エコーでは麦角系ドパミンアゴニストで用量依存的に心臓弁膜症の増加を確認した。

常染色体劣性遺伝性疾患であるゴーシェ病の原因遺伝子はグルコセレブロシダーゼ (GBA) 遺伝子であることが分かっている。その変異を 1 つだけ持つ人の一部でパーキンソン病を発症するという事例が以前から報告されており、パーキンソン病との関連が疑われていた。そこで、戸田らはアメリカ国立衛生研究所のエレン・シドランスキー博士ら計 16 施設(日本、アメリカ、ヨーロッパ、イスラエル、アジア)と協力し、大規模な多施設共同の国際研究を行い、約 3,500 人の患者の遺伝子を解析した結果、パーキンソン病を発症している人の約 7% が GBA 遺伝子変異のキャリアであることが判明し、キャリアでない人と比べると約 6.5 倍、パーキンソン病を発症しやすいことを明らかにした^{[3], [4]}。

(ii) 抗てんかん薬 Zonisamiden の抗パーキンソン薬としての適用

本研究課題の共同研究者の村田らは臨床的に抗パーキンソン作用を発見した抗てんかん薬 ZNS について、わが国で大規模な二重盲検試験を行い、50mg/日という少量(抗てんかん薬としての維持量-600mg)で明らかな抗パーキンソン効果を確認した。本研究課題終了時、薬事申請中であったこの薬剤は、抗パーキンソン薬として承認されて販売されている。戸田らは、その後、村田が代表するパーキンソン病における ZNS の臨床研究においてゲノムワイド関連解析を行うなど、創薬に関連した研究に関与している¹⁴⁾。さらに自らが代表するプロジェクトでも引き続き ZNS に関するゲノム解析を行っており、臨床と基礎をつなぐ展開となっている。

その他、戸田は福山型筋ジストロフィーの原因遺伝子の発見とその後の治療に向けた研究においてめざましい業績をあげ、文部科学大臣賞等を受賞している。

戸田らによる特許としては、2010 年 5 月 14 日に公開された「パーキンソン病発症リスクマーカー」がある。これは孤発性 PD の発症に関連する発症リスクマーカー、発症リスクの判定方法並

¹⁴⁾ 厚生科研費「新規抗パーキンソン病薬ゾニサミドの神経保護作用に関する臨床研究」(2006 年度 ~ 2008 年度)

びに判定試薬を提供するものであり、本領域研究におけるゲノムワイド解析の結果が具体的な成果につながっている。

③上記、継続と発展状況を示す研究成果に関連した主な成果論文リスト(4報以内)

- [1] Mizuta I., Takafuji K., Ando Y., Satake W., Kanagawa M., Kobayashi K., Nagamori S., Shinohara T., Ito C., Yamamoto M., Hattori N., Murata M., Kanai Y., Murayama S., Nakagawa M., Toda T., YY1 binds to α -synuclein 3' -flanking region SNP and stimulates antisense noncoding RNA expression (2013) J. Hum. Genet. 58 (11), pp. 711-719.

- [2] Satake W., Nakabayashi Y., Mizuta I., Hirota Y., Ito C., Kubo M., Kawaguchi T., Tsunoda T., Watanabe M., Takeda A., Tomiyama H., Nakashima K., Hasegawa K., Obata F., Yoshikawa T., Kawakami H., Sakoda S., Yamamoto M., Hattori N., Murata M., Nakamura Y., Toda T., Genome-wide association study identifies common variants at four loci as genetic risk factors for Parkinson's disease (2009) Nat. Genet. 41 (12), pp. 1303-1307.

- [3] Sidransky E., Nalls M. A., Aasly J. O., Aharon-Peretz J., Annesi G., Barbosa E. R., Bar-Shira A., Berg D., Bras J., Brice A., Chen C.-M., Clark L. N., Condroyer C., De Marco E. V., Durr A., Eblan M. J., Fahn S., Farrer M. J., Fung H.-C., Gan-Or Z., Gasser T., Gershoni-Baruch R., Giladi N., Griffith A., Gurevich T., Januario C., Kropp P., Lang A. E., Lee-Chen G.-J., Lesage S., Marder K., Mata I. F., Mirelman A., Mitsui J., Mizuta I., Nicoletti G., Oliveira C., Ottman R., Orr-Urtreger A., Pereira L. V., Quattrone A., Rogaeva E., Rolfs A., Rosenbaum H., Rozenberg R., Samii A., Samaddar T., Schulte C., Sharma M., Singleton A., Spitz M., Tan E.-K., Tayebi N., Toda T., Troiano A. R., Tsuji S., Wittstock M., Wolfsberg T. G., Wu Y.-R., Zabetian C. P., Zhao Y., Ziegler S. G., Multicenter analysis of glucocerebrosidase mutations in Parkinson's disease (2009) New Engl. J. Med., 361 (17), pp. 1651-1661.

- [4] Mitsui J., Mizuta I., Toyoda A., Ashida R., Takahashi Y., Goto J., Fukuda Y., Date H., Iwata A., Yamamoto M., Hattori N., Murata M., Toda T., Tsuji S., Mutations for Gaucher disease confer high susceptibility to Parkinson disease (2009) Arch. Neurol. 66 (5), pp. 571-576.

3.1.5 遺伝子発現調節機構の包括的解析による疾病の個性判断（間野博行）

(1) 研究のねらいと研究期間中の達成状況

①研究のねらい

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課題では計画においては、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を構築し、これらを試料とした包括的ゲノミクス解析を行う。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い、また新たに遺伝子変異の網羅的スクリーニングを大規模に行い、疾患の病態の理解を図ると共に、各種疾患遺伝子の同定、さらには遺伝子発現量に基づく精度の良い疾患の予後予測法を開発することを目指した。

②期間中の研究成果¹⁵⁾

本研究課題では、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を構築し、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、遺伝子解析を実施した。

(i) 急性骨髄性白血病 (AML)

造血幹細胞特異的細胞表面抗原の 1 つである CD133 陽性白血病幹細胞を純化保存する大規模細胞バンクを開設した。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 (HG133) 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 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) システムを開発した。

(ii) 大腸がん

microsatellite instability (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実施した結果、AXIN2 遺伝子が MSI 陽性大腸がん特異的に発現低下している事が明らかになった。大腸がんの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。

¹⁵⁾ 遺伝子発現調節機構の包括的解析による疾病の個性判断事後評価報告書(案)概要 http://www.jst.go.jp/kisoken/crest/eval/jigo/20080611/8_tailor/tailor_05.pdf

(iii) 新規肺癌原因遺伝子 EML4-ALK の同定

肺腺がん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がん化能を示す遺伝子を探索した。その結果、同定された遺伝子は図 3-5 に示したように、5' 側は微小管会合蛋白質の一種である EML4 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 の細胞内チロシンキナーゼドメインをコードした EML4-ALK 融合遺伝子であった。EML4-ALK はがん化能を有し、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、EML4-ALK は新規肺癌原因遺伝子と同定された^{[1], [2], [3]}。

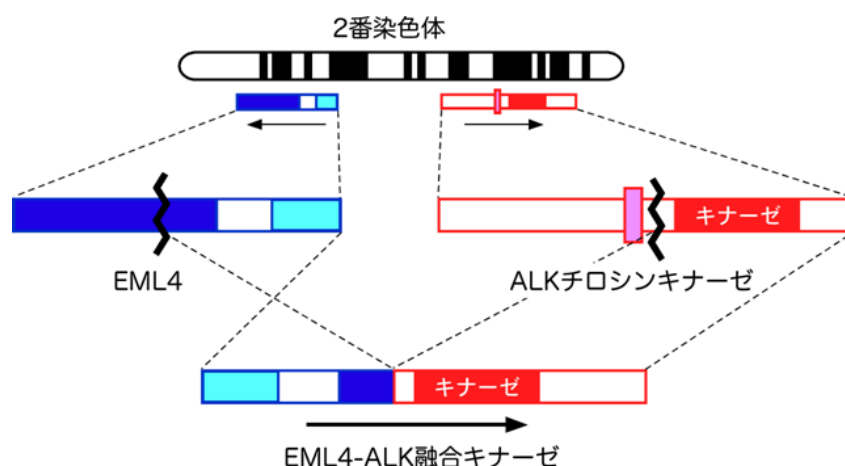


図 3-5 EML-AL 融合遺伝子¹⁶⁾

EML4 遺伝子と ALK 遺伝子は、正常細胞では、ヒト 2 番染色体上のごく近い位置に互いに反対向きに存在するが、がん化細胞では、両遺伝子を挟む領域が逆位となることで EML4-ALK 融合遺伝子が生じる。その結果、微小管会合蛋白質である EML4 のアミノ末端側約半分と受容体型チロシンキナーゼ ALK の細胞内キナーゼ領域とが融合した活性型融合キナーゼである EML4-ALK 融合キナーゼが肺癌の中で産生されることになる。

EML4-ALK 陽性肺癌においては同融合遺伝子こそが発がんの主たる原因であり、その機能を抑制する薬剤は肺癌の全く新しい分子標的治療法となることが生体において証明された^[3]。

特記すべきは、EML4-ALK の発見^[1]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かったとの従来の知見を覆す発見である。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¹⁷⁾。

③研究成果に関連した主な成果論文リスト (3 報以内)

- [1] Soda M., Choi Y.L., Enomoto M., Takada S., Yamashita Y., Ishikawa S., Fujiwara S.-I., Watanabe H., Kurashina K., Hatanaka H., Bando M., Ohno S., Ishikawa Y., Aburatani H., Niki T., Sohara Y., Sugiyama Y., Mano H., Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer (2007) Nature, 448 (7153), pp. 561-566.

¹⁶⁾ 間野研究室ホームページ <http://mano-lab.umin.jp/research.html>

¹⁷⁾ 独立行政法人科学技術振興機構法 (JST) ホームページ

http://www.jst.go.jp/kisoken/crest/eval/jigo/20080611/8_tailor/tailor_05.pdf

- [2] Chen Y., Takita J., Choi Y.L., Kato M., Ohira M., Sanada M., Wang L., Soda M., Kikuchi A., Igarashi T., Nakagawara A., Hayashi Y., Mano H., Ogawa S., Oncogenic mutations of ALK kinase in neuroblastoma (2008) Nature, 455 (7215), pp. 971-974.
- [3] Soda M., Takada S., Takeuchi K., Young L.C., Enomoto M., Ueno T., Haruta H., Hamada T., Yamashita Y., Ishikawa Y., Sugiyama Y., Mano H., A mouse model for EML4-ALK-positive lung cancer (2008) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 105 (50), pp. 19893-19897.

(2) 研究領域終了後の継続と発展状況

本研究終了後、科研費特定領域研究「ゲノム情報を利用した造血器悪性腫瘍の新規治療戦略」(2005～2008 年度)、厚生労働科学研究費補助金「ゲノミクス解析に基づく造血器悪性腫瘍の分子診断法開発」(2013 年度)、厚生労働科学研究費補助金「ゲノミクス解析に基づく白血病の新規分類法開発」(2010～2012 年度)、厚生労働科学研究費補助金「肺がんの分子診断法および分子標的治療法の開発」(2011～2015 年度)、厚生労働科学研究費補助金「新規融合型がん遺伝子を標的とした肺がんの分子診断法および治療法の開発」(2008～2010 年度)、厚生労働科学研究費補助金「DNA チップによる急性白血病の新規分類法提案」(2007～2009 年度)、戦略的創造研究推進事業研究加速課題「大規模共同研究による統合失調症遺伝子の探索」(2009～2013 年度)などで、研究を展開している。

研究期間中には 7 件の特許を出願し、終了後には 3 件の特許を出願しており、EML4-ALK 融合遺伝子関連の特許は 2 件は企業から出願され、いずれも登録されている。

間野は研究成果が高く評価され、2008 年には日本医師会 医学賞、日本癌学会 JCA-Mauverny Award を、2009 年には東京テクノ・フォーラム 21 ゴールド・メダル賞、佐川がん研究助成振興財団佐川特別研究助成賞、高松宮妃癌研究基金学術賞、武田科学振興財団武田医学賞、上原記念生命科学財団上原賞、持田記念医学薬学振興財団持田記念学術賞を、2011 年には文部科学大臣表彰科学技術賞、日本肺癌学会篠井・河合賞、Bonnie J. Addario Lung Cancer Foundation “Asclepios Award”、安田記念医学財団安田医学賞、第一三共生命科学振興財団高峰記念第一三共賞、日本がん分子標的治療学会鶴尾隆賞を、2012 年には慶應医学賞、紫綬褒章を、2013 年には細胞科学研究財団塩野賞、日本癌学会 JCA-CHAAO 賞、2014 年には、第 1 回イノベータ・オブ・ザ・イヤー賞を受賞している。

① 科学技術の進歩への貢献

本研究領域終了後、戦略的創造研究推進事業・研究加速課題「新規がん遺伝子同定プロジェクト」や「新規融合型がん遺伝子を標的とした肺がんの分子診断法および治療法の開発」(2008～2010 年度)において、EML4-ALK の発がんメカニズムの解析を行うと共に、その下流シグナル分子機構の同定、さらには EML4-ALK を標的とした分子診断法及び分子標的治療法の開発、さらには新規がん遺伝子の同定及び分子標的治療法の開発を目指した¹⁸⁾。

¹⁸⁾ 独立行政法人科学技術振興機構(JST)ホームページ <http://www.jst.go.jp/pr/announce/20120213/>

間野はがん発症の原因遺伝子のスクリーニングを DNA のシーケンスと機能のスクリーニングを組み合わせるにより効率的に実施し優れた成果を上げた。

(i) EML4-ALK 融合遺伝子

研究領域終了後、間野らは EML4-ALK キナーゼを肺特異的に産生する遺伝子改変マウスで肺がんの発生を確認し、ALK 阻害剤の投与により肺がんが消失することを報告した。¹⁹⁾

一方診断への応用という観点から RT-PCR 法、FISH 法、及び高感度免疫染色法を世界に先駆けて開発し、ALK 肺がんの診断法を確立した^[1]。

EML4-ALK の発見を受けて数多くの製薬会社が ALK 阻害剤の開発に乗り出したが、最初に第 I 相臨床試験に入ったのはクリゾチニブであった。その成果は、FISH を含む 2 種類の診断法で陽性になった症例において奏効率が 8 割を超え、完全寛解も生じるという目覚ましい治療効果が明らかになった。またクリゾチニブは第 I/II 相試験の結果のみで 2011 年 8 月 26 日に米国 FDA から薬剤として承認された。2007 年の間野研究室の EML4-ALK の発見からわずか 4 年での薬剤の承認・販売は、がんの治療薬開発史上最速のスピードと言える。

一方クリゾチニブは当初著効を発揮したが、約半年後薬剤耐性を発生した。次世代シーケンサーによる解析の結果 ALK 内のアミノ酸の変異によるものと判明し^[2]、第 2 世代の ALK 阻害剤の開発が進められ、現在 2 種類が認可され、6 種が治験段階にある。そのうちの 1 種「アレクチニブ」は奏効率 94% で、無増悪生存期間が 2 年を超える有効性を示した。

EML4、ALK 両遺伝子は共に正常細胞内に存在するが、両者が融合した EML4-ALK 遺伝子は肺がん細胞内でしか存在せず、しかも両遺伝子は本来染色体内で反対向きに存在しているため、EML4-ALK の融合点を挟む様に設置したプライマーによる RT-PCR 法は、同融合遺伝子が存在しない限り決して PCR 産物を生じない高精度かつ高感度な肺がん診断法になると期待される。実際 10 万個の正常細胞内に 1 個しか存在しない EML4-ALK 陽性細胞を検出可能なことが確認された^[1]。

(ii) 新規融合型がん遺伝子を標的とした肺がんの分子診断法及び治療法の開発

上記の「新規がん遺伝子同定プロジェクト」において EML4-ALK 融合遺伝子のような融合型チロシンキナーゼを新たに肺がんで探索するプロジェクトを開始した。以前に肺がんにおいて発見していた KIF5B-ALK 融合キナーゼを発見していたが KIF5B が別のチロシンキナーゼである RET 遺伝子と融合していることを発見し、RET 肺がんは肺腺がんの 1.2% であることが明らかにした。また肺腺がん (1,100 例) の解析結果を統計学的に検討して、RET、ROS1 または ALK いずれかの融合キナーゼを持つ肺がんは、若年者、非喫煙者または軽度喫煙者に多く、予後が比較的良いという特徴があることも明らかにした。また ROS1 と RET キナーゼが融合した ROS1 融合遺伝子と RET 融合遺伝子は融合によって強いがん化能を獲得することを確認した^[3]。

RET のキナーゼ活性阻害剤であるバンデタニブ (Vandetanib) を、EML4-ALK 導入マウス BA/F3 細胞に添加しても細胞増殖への影響はほとんど観察されないが、一方、KIF5B-RET 導入 BA/F3 細胞にバンデタニブを加えると、濃度依存性に速やかな細胞死が確認され、すなわち優れた RET 活性

¹⁹⁾ Soda M., Mano H. et al. A mouse model for EML4-ALK-positive lung cancer 2008 Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 105(50) 19893-19897

阻害剤を開発すれば、RET 肺がんに対して極めて有効な分子標的治療法が現実化すると予想される²⁰⁾。

(iii) ゲノミクス解析に基づく造血器悪性腫瘍の分子診断法開発

日本の白血病症例から CD133 陽性白血病芽球分画のみを純化保存するバンク事業を行い、既に 1,000 例に及ぶ芽球ストックを整備すると共に、エラー率の極めて低い次世代シーケンサー解析技術を新たに開発した。上記検体バンクを大規模にリシーケンスし、配列異常の面から造血器腫瘍の新たな分子診断マーカーおよび発症原因異常の探索を目指すとともに、白血病に存在する遺伝子異常がどのようなメカニズムで造腫瘍性を獲得するかを検討した。その結果 CML 細胞株から全く新しいがん遺伝子 RAC2(P29L)が発見され、さらに解析対象を広げることで、RAC ファミリー蛋白質は様々なヒト腫瘍の直接的な発症原因となることが明らかになり、変異 RAS より強力ながん遺伝子であることが確認できた^{21), [4]}。

②社会・経済への波及効果

ALK 阻害剤研究の成功は肺がんのみならず、他の固形腫瘍の治療にたいしても大きなインパクトをもたらした。

肺がんは日本など先進国でがんの死因の第 1 位を占める。肺がんに対して ALK 融合遺伝子による肺がんが ALK 阻害剤分子標的薬によって治療可能になったように RET 融合キナーゼ遺伝子及び ROS1 融合キナーゼ遺伝子についても、他の臓器で使用が認められている治療薬の適応拡大、あるいは、新たなキナーゼ阻害剤の開発により、治療可能な患者の増加が期待できる。例えば RET 融合キナーゼでは、マウスにおいて、米国で甲状腺髄様がん治療薬として承認されたバンデタニブ（一般名）を用いて、がん化能を抑えることに成功した。

また肺がん以外の固形がんにおいても ALK 融合キナーゼ遺伝子は見つかっており、同遺伝子を持つ患者は、がんの発生臓器によらず同じ分子標的治療薬で救われる可能性が高い。さらに間野の発見した RAC ファミリー遺伝子の変異が乳がんや悪性黒色種 5 種類のがんの発症の原因となることが分かった。これ等の遺伝子変異についても将来新しい分子標的薬の研究開発が望まれる。

世界で 5 万人から 7 万人位の人が EML4-ALK 陽性肺がん死亡している。10 年間で 50 万人から 70 万人になると推定される。EML4-ALK などの分子標的治療薬の市場規模は 3000 億円程度と想定されている²²⁾。

間野は EML4-ALK 遺伝子が肺がんの原因遺伝子であることを突き止め、EML4-ALK 遺伝子産物である ALK キナーゼの作用を特異的に阻害し、がんを消失させる治療薬「クリゾチニブ」の開発につながり、新規肺がん治療薬として実用化に成功した。また、肺がんの検体から同遺伝子を検出する診断方法も開発したため、個々人の疾患の原因を診断によって突き止め、その患者を個別的に治療するというテーラーメイド医療の実現に繋がった例であり、間野の研究は本研究領域の研究の中で最も成功した例であると言える。

²⁰ 独立行政法人科学技術振興機構法 (JST) ホームページ <http://www.jst.go.jp/pr/announce/20120213/>

²¹ <http://mhlw-grants.niph.go.jp/niph/search/NISR00.do>

²² https://sangakukan.jp/journal/journal_contents/2013/01/articles/1301-02-1/1301-02-1_article.html

③上記、継続と発展状況を示す研究成果に関連した主な成果論文リスト(4報以内)

- [1] Soda M., Isobe K., Inoue A., Maemondo M., Oizumi S., Fujita Y., Gemma A., Yamashita Y., Ueno T., Takeuchi K., Choi Y.L., Miyazawa H., Tanaka T., Hagiwara K., Mano H., A prospective PCR-based screening for the EML4-ALK oncogene in non-small cell lung cancer (2012) Clin. Cancer Res., 18 (20), pp. 5682-5689.

- [2] Choi Y.L., Soda M., Yamashita Y., Ueno T., Takashima J., Nakajima T., Yatabe Y., Takeuchi K., Hamada T., Haruta H., Ishikawa Y., Kimura H., Mitsudomi T., Tanio Y., Mano H., EML4-ALK mutations in lung cancer that confer resistance to ALK inhibitors (2010) New Engl. J. Med., 363 (18), pp. 1734-1739.

- [3] Takeuchi K., Soda M., Togashi Y., Suzuki R., Sakata S., Hatano S., Asaka R., Hamanaka W., Ninomiya H., Uehara H., Lim Choi Y., Satoh Y., Okumura S., Nakagawa K., Mano H., Ishikawa Y., RET, ROS1 and ALK fusions in lung cancer (2012) Nat. Med., 18 (3), pp. 378-381

- [4] Kawazu M., Ueno T., Kontani K., Ogita Y., Ando M., Fukumura K., Yamato A., Soda M., Takeuchi K., Miki Y., Yamaguchi H., Yasuda T., Naoe T., Yamashita Y., Katada T., Choi Y.L., Mano H., Transforming mutations of RAC guanosine triphosphatases in human cancers (2013) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 110 (8), pp. 3029-3034.

3.2 2003 年度採択課題

3.2.1 大規模共同研究による統合失調症遺伝子の探索（有波忠雄）

(1) 研究のねらいと研究期間中の達成状況

①研究のねらい

本研究課題では、オールジャパン体制で統合失調症の罹患同胞対家系及び患者・対照解析用サンプルを収集し、大規模な連鎖不平衡/関連解析を行うとともに、死後脳や髄液での遺伝子発現、遺伝子産物を解析し、統合失調症の関連遺伝子を同定して、その病態を解明することを目的とした。

②期間中の研究成果

研究内容は主に以下の 8 つに分かれる。(1) オールジャパン体制で収集された 236 家系の統合失調症の罹患同胞対法によるスクリーニング^[1]、及び、(2) マイクロサテライトマーカーと (3) 1 塩基多型 (SNP) を用いたゲノムワイド関連解析によるスクリーニングから関連遺伝子候補を検出し、症例・対照各々 2,500 人以上のサンプルで関連を確認した関連遺伝子の同定、(4) 患者死後脳の遺伝子発現変化をスクリーニング、及び、(5) 候補遺伝子のリシーケンスによる強い影響力を持つ稀な変異のスクリーニングから関連遺伝子の同定、また、(6) 統合失調症の大きな 1 家系の連鎖領域の解明、(7) 抗精神病薬リスペリドンに対する反応性、(8) 抗精神病薬の重篤な副作用である遅発性ジスキネジアについてのゲノムワイド関連解析により関連遺伝子を同定^[2]。これらの関連遺伝子と関連変異に関わる遺伝子発現や関連代謝産物の変化を患者群及び対照群の死後脳や血液の試料で確認した。さらに、遺伝子改変マウス、実験的モデルマウス、マウスに対する抗精神病薬の投与などの実験により、統合失調症や副作用の病態におけるこれらの関連遺伝子の役割を明らかにした。また、一部の関連遺伝子は臨床治験へと研究が発展した。

収集したサンプル数は世界最大規模(症例・対照各々 2,500 人以上)であり、これらを用いて種々の手法による解析が行われた。関連遺伝子の同定を目的として検討された、罹患同胞対法による連鎖解析、マイクロサテライトマーカーあるいは SNPs を用いた GWAS、死後脳における全ゲノム発現解析、及び候補遺伝子のリシーケンスからは、それぞれ統合失調症の候補遺伝子(計 10 個)が同定された。また、抗精神病薬に対する反応性、及び副作用の解明を目的とした GWAS から、候補遺伝子(計 11 個)が得られている。これら同定された候補遺伝子のうち、SNPs を用いた GWAS から得られた SMARCA2 は KO マウス、死後脳での検討から、多数の統合失調症関連遺伝子に影響を及ぼしていることが明らかにされた。また、抗精神病薬の副作用(遅発性ジスキネジア)解明を目的とする GWAS で得られた HSPG2 遺伝子は、KO マウスなどでの実験により副作用との関連が明らかになった^[3]。さらには、候補遺伝子のリシーケンスから同定された遺伝子異常では、これをターゲットとする創薬の検討も始まっている^{[2], 23)}。

²³ 大規模共同研究による統合失調症遺伝子の探索事後評価報告書(案)概要 http://www.jst.go.jp/kisoken/cres t/report/heisei18/pdf/pdf15/15_1/006.pdf

③研究成果に関連した主な成果論文リスト(3報以内)

- [1] Arinami T., Ohtsuki T., Ishiguro H., Ujike H., Tanaka Y., Morita Y., Mineta M., Takeichi M., Yamada S., Imamura A., Ohara K., Shibuya H., Ohara K., Suzuki Y., Muratake T., Kaneko N., Someya T., Inada T., Yoshikawa T., Toyota T., Yamada K., Kojima T., Takahashi S., Osamu O., Shinkai T., Nakamura M., Fukuzako H., Hashiguchi T., Niwa S.-I., Ueno T., Tachikawa H., Hori T., Asada T., Nanko S., Kunugi H., Hashimoto R., Ozaki N., Iwata N., Harano M., Arai H., Ohnuma T., Kusumi I., Koyama T., Yoneda H., Fukumaki Y., Shibata H., Kaneko S., Higuchi H., Yasui-Furukori N., Numachi Y., Itokawa M., Okazaki Y., Genomewide high-density SNP linkage analysis of 236 Japanese families supports the existence of schizophrenia susceptibility loci on chromosomes 1p, 14q, and 20p (2005) *Am. J. Hum. Genet.*, 77 (6), pp. 937-944.

- [2] Inada T., Koga M., Ishiguro H., Horiuchi Y., Syu A., Yoshio T., Takahashi N., Ozaki N., Arinami T., Pathway-based association analysis of genome-wide screening data suggest that genes associated with the γ -aminobutyric acid receptor signaling pathway are involved in neuroleptic-induced, treatment-resistant tardive dyskinesia (2008) *Pharmacogenet. Genomics*, 18 (4), pp. 317-323.

- [3] Koga M., Ishiguro H., Yazaki S., Horiuchi Y., Arai M., Niizato K., Iritani S., Itokawa M., Inada T., Iwata N., Ozaki N., Ujike H., Kunugi H., Sasaki T., Takahashi M., Watanabe Y., Someya T., Kakita A., Takahashi H., Nawa H., Muchardt C., Yaniv M., Arinami T., Involvement of SMARCA2/BRM in the SWI/SNF chromatin-remodeling complex in schizophrenia (2009) *Hum. Mol. Genet.*, 18 (13), pp. 2483-2494.

(2) 研究領域終了後の継続と発展状況

本研究課題終了後も、統合失調症の関連遺伝子の同定を目的としてゲノムワイド関連解析を実施し、科研費新学術領域研究(研究領域提案型)「日本人統合失調症家系のゲノム解析に基づく疾患発症に関わるゲノム多様性と病態の解明」(2011~2012 年度)、科研費基盤研究(B)「全ゲノムシーケンス時代に向けた統合失調症の病態の類型化と診断・治療戦略の確立」(2011~2013 年度)、科研費基盤研究(B)「治療的介入法を用いた統合失調症の関連遺伝子群のパスウェイ解析」(2008~2010 年度)などで、研究を展開している。

期間中は2件、終了後は7件の特許を出願している。毛髪形状感受性遺伝子に関する特許は企業より6件出願している。

①科学技術の進歩への貢献

科研費新学術領域「パーソナルゲノム情報に基づく脳疾患の発症機構の解明」においては「日本人統合失調症家系のゲノム解析に基づく疾患発症に関わるゲノム多様性と病態の解明」の研究

代表を務め、日本人で家系的な罹患に関連するリスク遺伝子(変異)を同定し、統合失調症の病態の解明に役立つゲノム情報の構築を目指している²⁴⁾。

図 3-6 は日本人(中国・九州地方)の統合失調症家族での 3 か所の連鎖領域における染色体変異を示している。

科研費基盤研究(B)「全ゲノムシーケンス時代に向けた統合失調症の病態の類型化と診断・治療戦略の確立」においては、頻度の低い、日本人あるいは東アジア人特有の変異を持つ可能性のある候補遺伝子の解析と次世代シーケンサーを利用して統合失調症に関連するゲノム変異の特徴を明らかにし有効に診断・治療に利用する方法を開発することを目的とし、統合失調症の病態に関わっているグルタミン酸シグナル伝達に影響を与える変異を中心に解析を行ない、solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 1 (SLC1A1) 遺伝子多型が統合失調症の疾患感受性に関与する可能性を示唆した^{[1], [2]}。

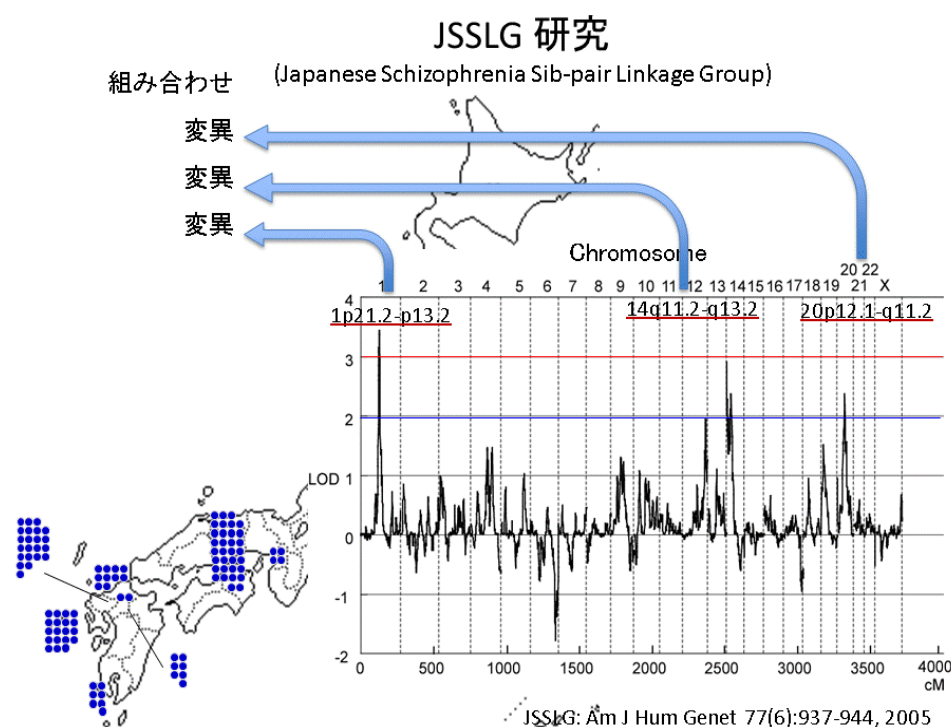


図 3-6 統合失調症家族での 3 か所の連鎖領域における染色体変異²⁵⁾

また、科研費基盤研究(B)「治療的介入法を用いた統合失調症の関連遺伝子群のパスウェイ解析」^{[3], [4]}においては、統合失調症の発症には多くの遺伝子が関与しており、それらの遺伝子を同定するのに有用なゲノムワイド関連解析を実施し、検出された関連遺伝子の中から特に治療面において重要な遺伝子を同定することを目的として、ヒトの脳、遺伝子改変マウス、細胞実験、パスウェイ解析を行った。その結果、SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator

²⁴ <http://www.personal-genome.jp/grantsinaid/schizophrenia-in-japanese/>

²⁵ 文部科学省科学研究補助金新学術領域ホームページ <http://www.personal-genome.jp/grantsinaid/schizophrenia-in-japanese/>

of chromatin, subfamily a, member 2 (SMARCA2) 遺伝子が統合失調症に関与し、かつ、多くの遺伝子に影響を与え、統合失調症の発症に関わっていることが証明された。その中でも Homer protein homolog 1 (HOMER1) 遺伝子は部分的な SMARCA2 遺伝子の発現低下でも選択的スプライシングが変化してグルタミン酸神経伝達体の機能不全に関わることが示され、SMARCA2 遺伝子型が個別化医療に有用な情報であることが示唆された。

②社会・経済への波及効果

統合失調症は、民族に関わらず人の罹患率が約1%の代表的な精神疾患であり、本人だけでなく、家族、社会に多大な負担を強いる疾患である。発症には遺伝要因が大きく関与していることは明らかにされているが、疾患特異的な生化学的、病理学的所見がなく、個々の遺伝子多型の影響力も小さいことが予想されるため、ゲノム研究では確実な成果が得にくいことが知られている。このため、本研究課題では、サンプルサイズを大きくし、かつ民族差を考慮せずに済むよう、オールジャパン体制を構築して日本人サンプルの収集を行った。期間中及び終了後もこれらのサンプルを用いた連鎖解析、GWAS などの種々の解析により、多数の関連遺伝子候補を同定した。これ等の研究成果は、将来的にはその病態機序の解明や有効な治療薬開発へとつながる。

③上記、継続と発展状況を示す研究成果に関連した主な成果論文リスト(4 報以内)

- [1] Horiuchi Y., Iida S., Koga M., Ishiguro H., Iijima Y., Inada T., Watanabe Y., Someya T., Ujike H., Iwata N., Ozaki N., Kunugi H., Tochigi M., Itokawa M., Arai M., Niizato K., Iritani S., Kakita A., Takahashi H., Nawa H., Arinami T., Association of SNPs linked to increased expression of SLC1A1 with schizophrenia (2012) *Am. J. Med. Genet. Part B Neuropsychiatr. Genet.*, 159 B (1), pp. 30-37.
- [2] Tanaka S., Syu A., Ishiguro H., Inada T., Horiuchi Y., Ishikawa M., Koga M., Noguchi E., Ozaki N., Someya T., Kakita A., Takahashi H., Nawa H., Arinami T., DPP6 as a candidate gene for neuroleptic-induced tardive dyskinesia (2013) *Pharmacogenomics J.*, 13 (1), pp. 27-34.
- [3] Syu A., Ishiguro H., Inada T., Horiuchi Y., Tanaka S., Ishikawa M., Arai M., Itokawa M., Niizato K., Iritani S., Ozaki N., Takahashi M., Kakita A., Takahashi H., Nawa H., Keino-Masu K., Arikawa-Hirasawa E., Arinami T., Association of the HSPG2 gene with neuroleptic-induced tardive dyskinesia (2010) *Neuropsychopharmacology*, 35 (5), pp. 1155-1164.
- [4] Koga M., Ishiguro H., Horiuchi Y., Inada T., Ujike H., Itokawa M., Otowa T., Watanabe Y., Someya T., Arinami T., Replication study of association between ADCYAP1 gene polymorphisms and schizophrenia (2010) *Psychiatr. Genet.*, 20 (3), pp. 123-125.

3.2.2 sub-common disease の感受性遺伝子同定と個人型易罹患性診断への応用（井ノ上逸朗）

(1) 研究のねらいと研究期間中の達成状況

①研究のねらい

本研究課題はありふれた疾患ではあるものの比較的遺伝背景の強い sub-common disease (脳動脈瘤、男性不妊症、家族性甲状腺がん) の感受性遺伝子を同定し、個人型易罹患性モデルを構築して個人の発症予防に資することを目指した。また、個々人の罹患予測や健康保持のための、遺伝要因と生活習慣、環境要因を組み合わせた予測プログラム作成も目指した。

②期間中の研究成果

本研究課題の対象疾患は脳動脈瘤、男性不妊症、家族性甲状腺がんであり、それぞれに疾患の特徴や研究環境状況を考慮しつつ、疾患遺伝子多型同定を行った。また、個々人の罹患予測や健康保持のための、遺伝要因と生活習慣を組み合わせた予測プログラム作成も試みた。

(i) 脳動脈瘤感受性遺伝子同定

同胞対連鎖解析による遺伝子座の特定と遺伝子座におけるポジショナル・クローニングにより脳動脈瘤の感受性遺伝子として elastin (ELN)、Lim kinase-1 (LIMK1) を同定し、これらの発現量の低下が発症に関与するという新しいメカニズムを提唱した^[1]。

また、日本人脳動脈瘤患者 300 例、対照 200 例の GWAS で日本人で有意となる SNP を同定した。さらに Yale 大学 Gunel 教授との共同研究で、フィンランド、オランダ検体 (患者 2,200 例、対照 8,000 例)、アソシエーション・スタディにより、3 カ所 (2、6、9 番染色体) の SNP において $P < 10^{-9}$ で、脳動脈瘤感受性遺伝子領域を特定した。有意差を認めた SNP 近傍に存在する遺伝子は SOX17 転写因子及び cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (CDKN2A) であった^[2]。

(ii) 男性不妊症 (非閉塞性無精子症) のゲノム解析

非閉塞性無精子症のほとんどは特発性であり原因不明である。非閉塞性無精子症の臨床型は単一でなく、精子形成の段階ごとに異常が知られている。本研究課題では精巣組織の遺伝発現プロファイルから非閉塞性無精子症の分子解剖的分類を試み、2 つに分類された。そのサブグループは血中 Follicle Stimulating Hormone (FSH) と、Luteinizing hormone (LH) レベルに差があった。これら分類を特徴づける遺伝子候補の関連解析を行ったところ、ADP-ribosyltransferase C2 and C3 toxin-like 3 (ART3) 遺伝子 SNP において有意な関連を認めた^[3]。

(iii) 家族性甲状腺がんの解析

家族性甲状腺乳頭がんのゲノム全域罹患同胞対連鎖解析により、8 番染色体に連鎖領域を認めた。この領域については、今後、次世代シーケンサーを用いたターゲット領域リシーケンスにより効率的なスクリーニングを目指す予定である。また、候補遺伝子変異スクリーニング解析により、甲状腺がん患者でミスセンス変異が集積する Map kinase (MAPK) パスウェイ上の遺伝子を同定した。

③研究成果に関連した主な成果論文リスト(3 報以内)

- [1] Akagawa H., Tajima A., Sakamoto Y., Krischek B., Yoneyama T., Kasuya H., Onda H., Hori T., Kubota M., Machida T., Saeki N., Hata A., Hashiguchi K., Kimura E., Kim C.-J., Yang T.-K., Lee J.-Y., Kimm K., Inoue I., A haplotype spanning two genes, ELN and LIMK1, decreases their transcripts and confers susceptibility to intracranial aneurysms (2006) Hum. Mol. Genet. 15 (10), pp. 1722-1734.
- [2] Bilguvar K., Yasuno K., Niemela M., Ruigrok Y.M., Von Und Zu Fraunberg M., Van Duijn C.M., Van Den Berg L.H., Mane S., Mason C.E., Choi M., Gaal E., Bayri Y., Kolb L., Arlier Z., Ravuri S., Ronkainen A., Tajima A., Laakso A., Hata A., Kasuya H., Koivisto T., Rinne J., Ohman J., Breteler M.M.B., Wijmenga C., State M.W., Rinkel G.J.E., Hernesniemi J., Jaaskelainen J.E., Palotie A., Inoue I., Lifton R.P., Gunel M., Susceptibility loci for intracranial aneurysm in European and Japanese populations (2008) Nat. Genet. 40 (12), pp. 1472-1477.
- [3] Okada H., Tajima A., Shichiri K., Tanaka A., Tanaka K., Inoue I., Genome-wide expression of azoospermia testes demonstrates a specific profile and implicates ART3 in genetic susceptibility (2008) PLoS Genet. 4e26.

(2) 研究領域終了後の継続と発展状況

本研究課題終了後、科研費基盤研究(A)「大規模 GWAS で得られた脳動脈瘤感受性遺伝子の病態への関与」(2010～2012 年度)を得ている。科研費新学術領域研究(研究領域提案型)「高深度シーケンシングによる百十歳以上長寿者のミトコンドリア DNA 体細胞変異率決定」(2014～2015 年度)、科研費挑戦的萌芽研究「HLA アレルと強く関連する薬剤副作用の惹起分子同定と作用機序」(2011～2012 年度)を獲得している。

研究期間中に 3 件、終了後に 1 件の特許が出願されており、易罹患性解析方法とそのソフトウェア、発がんの検出法、DNA タイピング方法などの診断に関するもので、企業が出願者となっている。

井ノ上グループ²⁶⁾では、次世代シーケンサーで得られる膨大な塩基配列情報を医学研究に活用し、ヒト疾患の理解、治療法の開発に寄与することを目指している。疾患ゲノム研究は原因となっている遺伝子変異、多型を検出することを当初の目標としているが、病変組織における遺伝子発現プロファイル、ネットワーク解析を組み合わせることにより、疾患メカニズムの理解につなげる研究も推進する。また多因子疾患における疾患感受性遺伝子は進化的な意義を有することが多く、集団遺伝学的な検討も試みている。以下に主な研究テーマを示す。

- ・全エクソンシーケンスによる希少遺伝性疾患遺伝子同定
- ・脳動脈瘤感受性遺伝子同定と疾患メカニズム解明
- ・Human leukocyte antigen(HLA) 遺伝子のハプロイドゲノム配列決定^[1]

²⁶⁾ 井ノ上研究室ホームページ <http://www.nig.ac.jp/section/inoue/inoue-j.html>

- ・統計数理モデルによる高次表現型と遺伝型との関連

疾患の機構解明への視点を図 3-7 に示すように、疾患メカニズムの解明にはゲノム配列だけでなく、遺伝子を含む全ての転写産物とそれらを制御する領域および因子を合わせて理解する必要がある。井ノ上研究室では、次世代シーケンサーを使ったこれらの解析により、疾患メカニズムを明らかにすることを目指して研究を展開している。

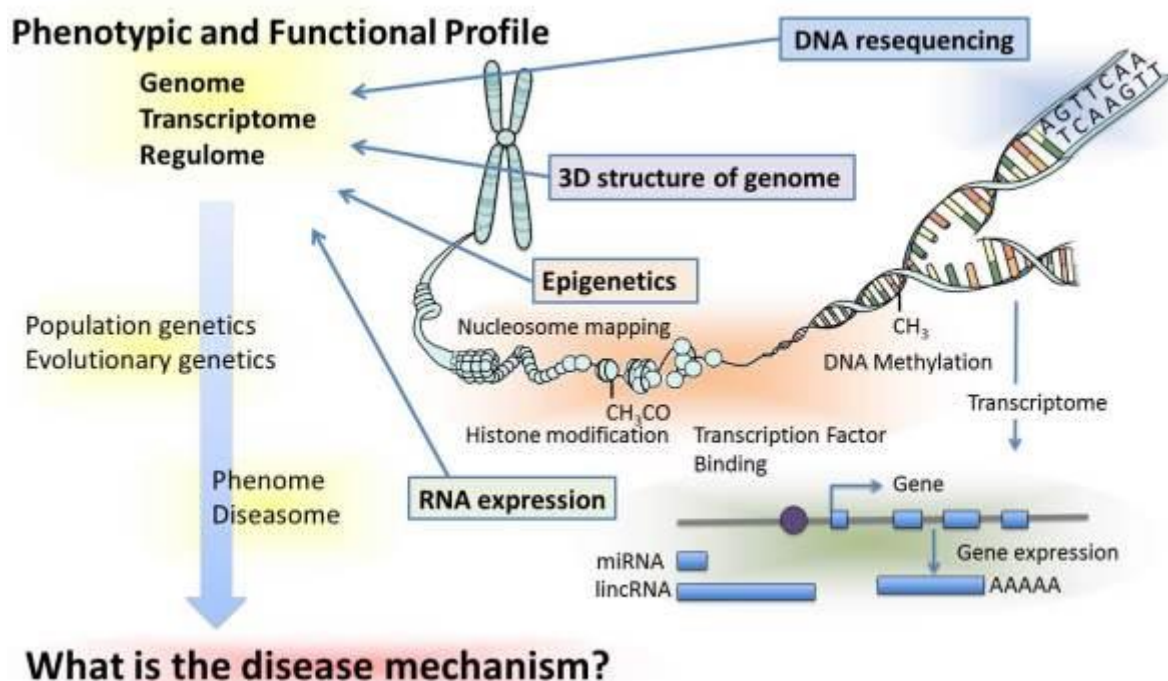


図 3-7 疾患メカニズムの解析へアプローチ ²⁶⁾

①科学技術の進歩への貢献

HLA アレルと強く関連する薬剤副作用の惹起分子同定と作用機序²⁷⁾の解明では、特異的な HLA アレル発現細胞を作製し(HLA-A*33:03)、塩酸クロピジン投与後、HLA アレルに結合しているペプチド分子(薬剤もしくは薬剤代謝物との複合体)の同定、及びそれを用いた免疫応答機能解析を試みた。同時にコンピュータモデリングを行い、HLA-A*33:01 のペプチド結合領域に相同性を有する薬剤代謝産物の同定を行っている。

②社会・経済への波及効果

大規模 GWAS で得られた脳動脈瘤感受性遺伝子の病態への関与では²⁸⁾、GWAS による頻度の高い SNP 解析に加え、次世代シーケンサーを用いて希少変異のスクリーニングを行い、より詳細な脳動脈瘤原因変異を検索している^[2]。

特定の脳動脈瘤表現型の感受性に関与する遺伝子を同定することで、発症メカニズムの理解が進むと考えられるため、脳動脈瘤感受性遺伝子座として同定した 9p21 領域の SNP(rs1333040)が、

²⁷⁾ 科学研究費助成事業データベース <http://kaken.nii.ac.jp/d/p/23133507/2011/3/ja.ja.html>

²⁸⁾ 科学研究費助成事業データベース <https://kaken.nii.ac.jp/d/p/22241049.en.html>

特定の表現型 (subphenotype) に特異的な効果を示す可能性について評価した。脳動脈瘤の subphenotype として、くも膜下出血既往歴、多発性脳動脈瘤および脳動脈瘤の病変部位に着目した^[3]。subphenotype に基づく患者サブグループと対照との間で SNP アレル頻度を比較する、多値ロジスティック回帰分析を行い、サブグループ特異的遺伝的効果(オッズ比)を推定した。次いで、遺伝的効果がサブグループ間で有意に異なることを実証するために、2 値ロジスティック回帰分析で患者サブグループ間の SNP アレル頻度を比較した。その結果、後方循環と関連した特異的な表現型と rs1333040 が関連することが明らかになった。さらに次世代シーケンサーを用いた変異検索を行い、脳動脈瘤に関連する希少変異の検索を試みた。その結果、脳動脈瘤に関連する希少変異を同定した^[4]。

井ノ上らの発明による、研究終了後の特許出願として、「HLA 遺伝子の DNA タイピング方法及びキット」(2013 年 10 月 25 日)がある。これは、フェーズ・アンビギュイティに由来する曖昧さを排除した高精度の DNA タイピング方法及びキットを提供するもので、診断に有用と考えられる。

③上記、継続と発展状況を示す研究成果に関連した主な成果論文リスト(4 報以内)

- [1] Hosomichi K., Jinam T.A., Mitsunaga S., Nakaoka H., Inoue I., Phase-defined complete sequencing of the HLA genes by next-generation sequencing (2013) BMC Genomics, 14 (1), 355.
- [2] Akiyama K., Narita A., Nakaoka H., Cui T., Takahashi T., Yasuno K., Tajima A., Krischek B., Yamamoto K., Kasuya H., Hata A., Inoue I., Genome-wide association study to identify genetic variants present in Japanese patients harboring intracranial aneurysms (2010) J. Hum. Genet., 55 (10), pp. 656-661.
- [3] Nakaoka H., Takahashi T., Akiyama K., Cui T., Tajima A., Krischek B., Kasuya H., Hata A., Inoue I., Differential effects of chromosome 9p21 variation on subphenotypes of intracranial aneurysm: Site distribution (2010) Stroke, 41 (8), pp. 1593-1598.
- [4] Yasuno K., Bilguvar K., Bijlenga P., Low S.-K., Krischek B., Auburger G., Simon M., Krex D., Arlier Z., Nayak N., Ruigrok Y.M., Niemela M., Tajima A., Von Und Zu Fraunberg M., Doczi T., Wirjatijasa F., Hata A., Blasco J., Oszvald A., Kasuya H., Zilani G., Schoch B., Singh P., Stuer C., Risselada R., Beck J., Sola T., Ricciardi F., Aromaa A., Illig T., Schreiber S., Van Duijn C.M., Van Den Berg L.H., Perret C., Proust C., Roder C., Ozturk A.K., Gaal E., Berg D., Geisen C., Friedrich C.M., Summers P., Frangi A.F., State M.W., Wichmann H.E., Breteler M.M.B., Wijmenga C., Mane S., Peltonen L., Elio V., Sturkenboom M.C.J.M., Lawford P., Byrne J., MacHo J., Sandalcioğlu E.I., Meyer B., Raabe A., Steinmetz H., Rufenacht D., Jaaskelainen J.E., Hernesniemi J., Rinkel G.J.E., Zembutsu H., Inoue I., Palotie A., Cambien F., Nakamura Y., Lifton R.P., Gunel M., Genome-wide association study of intracranial aneurysm identifies three new risk loci (2010) Nat. Genet., 42 (5), pp. 420-425.

3.2.3 生体分子の高次構造形成に基づく遺伝子診断法（寺前紀夫）

(1) 研究のねらいと研究期間中の達成状況

①研究のねらい

本研究課題では、ゲノム情報、特に SNPs に基づく薬剤感受性の個人差を迅速かつ確実に分析する技術や高効率ゲノム情報解析技術を実現するため、DNA の高次構造形成と DNA に結合する有機小分子リガンドを併用する全く独自の SNPs 蛍光検出法の開発を目的とした。具体的には、脱塩基部位(abasic site: AP site)を含むプローブ DNA を検体 DNA とハイブリダイゼーションさせることで標的塩基の向側に疎水的な微小空間を構築し、同空間中における有機小分子リガンド／核酸塩基間の相互作用の有無をモニターすることにより遺伝子中の一塩基の違いを検出する。この方法により特殊な酵素の利用や精密な温度制御等を必要とせず、極めて簡便に一塩基多型の検出が可能になる。

②期間中の研究成果

本研究課題を通じて、AP site を含むプローブ及び蛍光性低分子リガンドを併用する、1SNPs 検出法を世界に先駆けて提案した^[1]。さらに、4 種の塩基について個々に詳細に検討し、4 種類の核酸塩基を高選択的に検出することのできる一連の蛍光性リガンド群の開発を達成した。

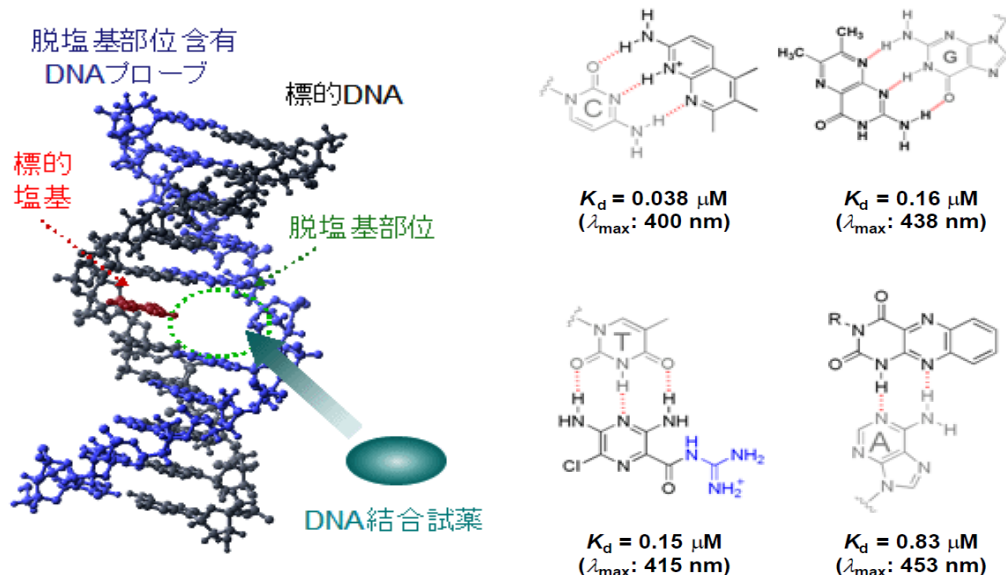


図 3-8 二重鎖中における標的塩基検出と開発した蛍光性リガンド群²⁹⁾

まず、シトシン塩基選択性のあるナフチリジンにメチル基の 3 個導入により結合親和力を 20 倍増強させ、また蛍光特性も改良した 2-amino-5,6,7-trimethyl-1.8-naphthyridine (ATMND) を見出した ($K_d = 53 \text{ nM}$ at 20°C , pH 7.0) [2]。また、グアニン検出リガンドとしてはジメチルプテリジ

²⁹⁾ 本研究領域終了報告書

ン($K_d=0.16\ \mu\text{M}$)でプテリンの 500 倍の親和性増強を達成した。同様に、チミンについてはアミロライド($K_d=0.16\ \mu\text{M}$)等[3]、アデニンについてはアロキサジン($K_d=0.83\ \mu\text{M}$)を見出した。これら蛍光性リガンドはいずれも、標的塩基に対して解離定数 μM 以下の強力な親和性を有し、実試料に準じた PCR 産物の迅速かつ簡便な解析に適用することが可能である。

本検出原理を応用することで、表面プラズモン共鳴(Surface Plasmon Resonance : SPR)検出や電気化学検出システムの開発を進めた。

③研究成果に関連した主な成果論文リスト(3 報以内)

- [1] Yoshimoto K., Nishizawa S., Minagawa M., Teramae N., Use of abasic site-containing DNA strands for nucleobase recognition in water (2003) J. Am. Chem. Soc. 125 (30), pp. 8982-8983.
- [2] Sato Y., Nishizawa S., Yoshimoto K., Seino T., Ichihashi T., Morita K., Teramae N., Influence of substituent modifications on the binding of 2-amino-1,8-naphthyridines to cytosine opposite an AP site in DNA duplexes: Thermodynamic characterization (2009) Nucleic Acids Res. 37 (5), pp. 1411-1422.
- [3] Zhao C., Dai Q., Seino T., Cui Y.-Y., Nishizawa S., Teramae N., Strong and selective binding of amiloride to thymine base opposite AP sites in DNA duplexes: Simultaneous binding to DNA phosphate backbone (2006) Chem. Commun. (11), pp. 1185-1187.

(2) 研究領域終了後の継続と発展状況

本研究課題終了後、科研費基盤研究(A)「RNA 非翻訳領域を標的とする核酸検出リガンドの創製と機能性 RNA 研究への応用」(2010 年 5 月～2011 年 3 月)、科研費基盤研究(S)「極微量小分子 RNA を網羅的に解析する次世代型核酸アレイチップの開発」(2010～2013 年度)を得て、研究を展開した。

研究期間中、特許 9 件出願し、そのうち、5 件は登録されている。

分光学を利用した分子認識の成果を認められ、2005 年に「平成 17 年度日本化学会学術賞」、及び「平成 17 年度 日本分析化学会学会賞」、また 2011 年には「日本分光学会賞(学会賞)」を受賞している。

①科学技術の進歩への貢献

(i) RNA 非翻訳領域を標的とする核酸検出リガンドの創製と機能性 RNA 研究への応用³⁰⁾

最近、ncRNA が注目されているが、その 1 つであるリボスイッチは、低分子化合物との特異的結合によって遺伝子発現調節を行うユニークな ncRNA であり、抗生物質の標的である可能性や遺伝子発現を制御し得る技術開発につながる研究対象としても注目されている。

³⁰⁾ 科学研究費助成事業データベース <http://kaken.nii.ac.jp/d/p/22245010.ja.html>

寺前らは、本研究課題で得られた蛍光小分子と脱塩基 DNA 二重鎖との相互作用の知見をベースとして新たな研究分野における分析ツールの開発を目指し、リボスイッチを標的とする蛍光性の小分子(リガンド)ならびにこれらの化合物に基づく RNA 解析法、及び薬剤のハイスループットスクリーニング法を開発している。また、リボスイッチのほか、「ヒト免疫不全ウイルス(HIV)の Trans-activation responsive region(TAR RNA)や 16S リボソーム RNA サイト」といった遺伝子発現調節に関わる RNA の非翻訳領域を標的とする蛍光性リガンドの開発も併せて試みている。その結果、ピラジン誘導体(蛍光極大波長:~400nm)が抗生物質とほぼ同等の結合親和力で TAR RNA と結合しうることを見出すとともに(Kd=770nM)、蛍光性ナフチリジン誘導体(蛍光極大波長:~400nm)がアミノグリコシド類に匹敵する結合力で A サイトに結合することを見出している(Kd=530nM)。さらに詳細な相互作用解析を行い、結合機能及び蛍光応答特性の改良をさらに行うことで、ncRNA の新しい分析ツールの開発を目指している。

(ii) 極微量小分子 RNA を網羅的に解析する次世代型核酸アレイチップの開発³¹⁾

本領域研究では脱塩基 DNA 二重鎖と蛍光小分子リガンドとの相互作用により SNPs の検出システムの開発を行ってきたが、さらに最近注目されている小分子 RNA、特に miRNA 検出用蛍光性リガンドの開発に展開している^{[1],[2]}。その結果、脱塩基部位結合リガンドであるナフチリジン誘導体と核酸結合性蛍光色素であるシアニン誘導体とを連結したコンジュゲートを開発した。得られた一連のコンジュゲート群の RNA 検出能を評価したところ、DNA プローブを用いた場合、脱塩基部位結合に基づく塩基識別能とシアニン部位に基づく明瞭な発蛍光応答を発現することを見出し、実用的検出に向けた蛍光応答の改良に成功した。加えて、本分子設計では各部位の合理的機能集積が可能で、網羅的 RNA 検出に適用しうる有用な方法論である。

一方、ローダミン色素をプローブとした時間分解蛍光法によってアミノプロピルトリエトキシシラン(APTES)を修飾した直径 3-60nm のナノ細孔内部における過冷却現象を検討したところ、およそマイナス 50℃まで細孔壁近傍に過冷却水が安定に存在しうることを見出し、ナノ細孔内部で過冷却水を利用した miRNA 検出系が構築可能であることが分かった。さらに、ナノ細孔内部での DNA 二重鎖形成について検討したところ、通常バルク溶液系では熱力学的に起こりえない極短 DNA 二重鎖形成反応が過冷却条件下で起こることを見出した^[3]。これらの結果は、過冷却状態を利用した高感度小分子 RNA 検出の可能性を示唆するものである。

②社会・経済への波及効果

本研究課題の実用化へ向けての研究として、図 3-9 に示すように、SNP 検出のために、脱塩基部位の DNA と結合する表面プラズモン共鳴(SPR)用の小リガンドバイオセンサーの開発を行っている。現在、SPR は医薬ハイスループットスクリーニングなどに使われており、簡便で汎用的な方法になり得る。ここではチミン塩基に対して完全に相補的な水素結合が可能な 3,5 - ジアミノピラジン誘導体をセンサー表面上の認識部位とし、標的一本鎖 DNA 配列を配置するために、脱塩基部位を含む DNA プローブとハイブリダイズされる DNA の検出が可能になった。このシステムでは明確な選択性を有する二重鎖中の孤立した核酸塩基を検出することができる。現在さらに SPR

³¹⁾ 科学研究費助成事業データベース <http://kaken.nii.ac.jp/d/p/22225003.ja.html>

に適したリガンドセットの改良を継続している^[4]。

なお、寺前らによる本研課題の直接的成果である登録特許として「一塩基置換検出方法及び一塩基置換検出用キット」(2009年6月5日)(工程数を極力減らし、簡便且つ迅速に遺伝子の一塩基置換を検出するキット)がある。また出願中のものとして「核酸の蛍光標識法」がある。

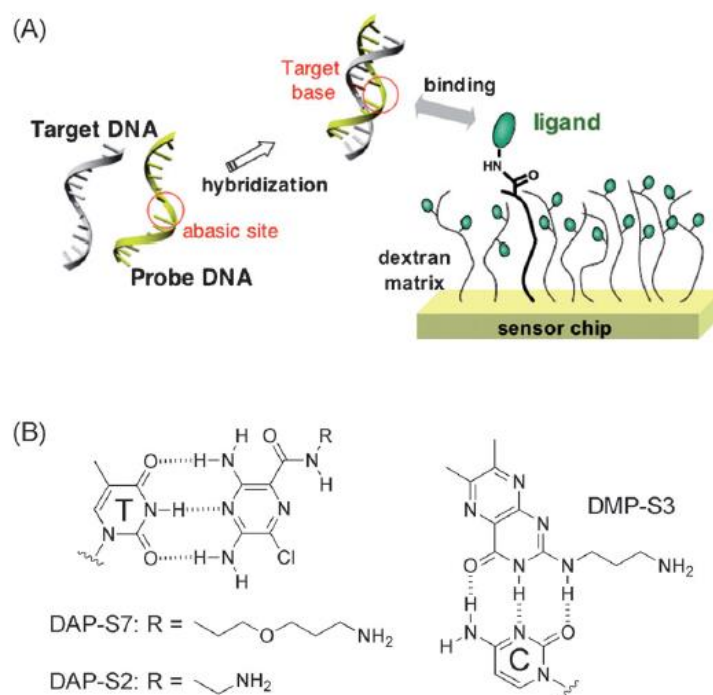


図 3-9 脱塩基部位の相互作用を利用した表面プラズモンバイオセンサー^[4]

③上記、継続と発展状況を示す研究成果に関連した主な成果論文リスト(4報以内)

- [1] Sato Y., Toriyabe Y., Nishizawa S., Teramae N., 2,4-Diamino-6,7-dimethylpteridine as a fluorescent ligand for binding and sensing an orphan cytosine in RNA duplexes (2013) Chem. Commun. 49 (85), pp. 9983-9985.
- [2] Sato Y., Nishizawa S., Teramae N., Label-free molecular beacon system based on DNAs containing abasic sites and fluorescent ligands that bind abasic sites (2011) Chem. Eur. J. 17(41), pp. 11650-11656.
- [3] Arafune H., Yamaguchi A., Namekawa M., Sato, Y., Itoh T., Yoshida, R., Teramae N., Trinucleotide duplex formation inside a confined nanospace under supercooled conditions (2014) Nature Commun. 5, 5151.
- [4] Miura S., Nishizawa S., Suzuki A., Fujimoto Y., Ono K., Gao Q., Teramae N., DNA-binding small-ligand-immobilized surface plasmon resonance biosensor for detecting thymine-related single-nucleotide polymorphisms (2011) Chem. Eur. J. 17 (50), pp. 14104-14110.

3.2.4 日仏共同体制による人種間ゲノム多型の比較解析（松田文彦）

(1) 研究のねらいと研究期間中の達成状況

①研究のねらい

人種を超えて病気と関連する遺伝子・多型を同定し、疾患の原因遺伝子または疾患マーカーとなる SNP の組み合わせを発見することにより、人種的偏差を加味した疾患別 SNP データベースを構築することを目的とした。さらに SNP と臨床情報を統合したデータベースの統計解析を行い、SNP に基づく遺伝学が治療に直結した次世代の臨床遺伝学として有効であることを実証し、疾患の分子レベルでの予知、診断および、将来的には個人に合った治療や予後の予測（テーラーメイド医療）のための情報の基盤を確立することを目的とした。

②期間中の研究成果³²⁾

対象を免疫系疾患及び一部のがんに限定した候補遺伝子アプローチで、免疫関連遺伝子と DNA 修復関連遺伝子の SNP 同定から患者検体を用いた遺伝解析までを一貫して行ない、解析結果、検体の臨床情報とともに構築したリレーショナル・データベースシステム Multiple Ethnic SNP Database for Human Multigenetic Disorders (MESHMD) に格納した。MESHMD のシステムを図に示す。その特徴は、下記のとおりである。

- ・複数のプロジェクトを管理する、ユーザー認証を導入したセキュリティーシステム
- ・異なる方法で得られるタイピング結果を、それぞれの解析結果ファイルからに人手による加工なしに直接取り込むプログラム
- ・公共データベースから得られる情報と実験結果の標準化を融合
- ・得られた実験結果を用いた統計遺伝学的解析(有意差の検定など)プログラムの組み込み
- ・患者の臨床情報、人種などを指標とした基礎的な統計解析(アレル頻度計算他)の自動化
- ・各種情報の確認と検索のための Web インターフェースによる検索ページの構築

本研究に関連するジェノタイピング結果 20 億データポイント以上が蓄積されている。一部のデータは既に一般公開されている。格納されたデータは異なる疾患で GWAS を試みる研究者にとって有用なデータとなると思われる。

³²⁾ 日仏共同体制による人種間ゲノム多型の比較解析事後評価報告書(案)概要 http://www.jst.go.jp/kisoken/carest/eval/jigo/200905/4_tailor/tailor_04.pdf

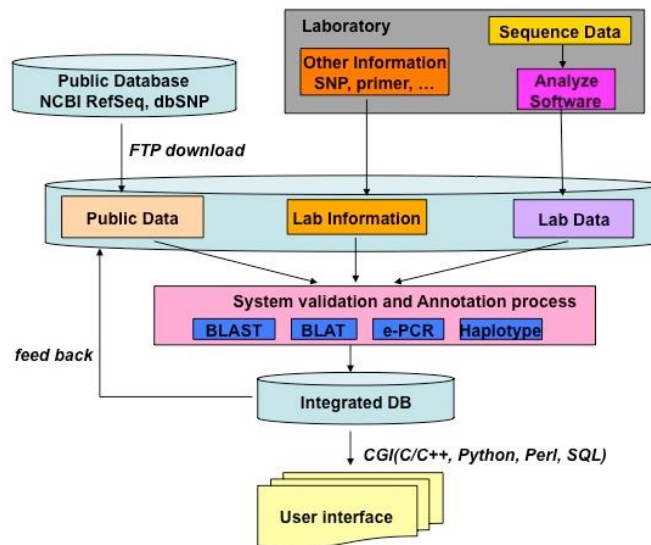


図 3-10 MESHMD データベースのスキーム³³⁾

全ゲノムスキャニングを取り入れ、関節リウマチ(RA)と肺がんについて白人、日本人間で疾患感受性遺伝子を同定した。RA の候補遺伝子解析では、免疫関連の 169 遺伝子で同定した SNP のうち、1,536 個の SNP でマーカーパネルを構築し、日本人、ドイツ人の RA 患者、健常者検体をタイピングしたところ、FCGR2A、DPYD、SPTB 遺伝子で人種間において有意な関連が得られた。また、日本人、ドイツ人検体を用いた GWAS では、ミエリン塩基性蛋白遺伝子領域に、強い関連のある SNP を日本人で見出すとともに、両人種に共通して RA に関連する複数の多型を見出した。

肺がんで行った GWAS では、白人の解析において、15 番染色体のアセチルコリン受容体遺伝子群を含む領域に、極めて強い関連を見出した^[1]。また、5 番染色体では、白人、日本人で共通して肺がんに関連する領域を同定した^[2]。

③研究成果に関連した主な成果論文リスト(3 報以内)

- [1] Hung R. J., McKay J. D., Gaborieau V., Boffetta P., Hashibe M., Zaridze D., Mukeria A., Szeszenia-Dabrowska N., Lissowska J., Rudnai P., Fabianova E., Mates D., Bencko V., Foretova L., Janout V., Chen C., Goodman G., Field J. K., Liloglou T., Xinarianos G., Cassidy A., McLaughlin J., Liu G., Narod S., Krokan H. E., Skorpén F., Elvestad M. B., Hveem K., Vatten L., Linseisen J., Clavel-Chapelon F., Vineis P., Bueno-De-Mesquita H. B., Lund E., Martinez C., Bingham S., Rasmuson T., Hainaut P., Riboli E., Ahrens W., Benhamou S., Lagiou P., Trichopoulos D., Holcatova I., Merletti F., Kjaerheim K., Agudo A., MacFarlane G., Talamini R., Simonato L., Lowry R., Conway D. I., Znaor A., Healy C., Zelenika D., Boland A., Delepine M., Foglio M., Lechner D., Matsuda F., Blanche H., Gut I., Heath S., Lathrop M., Brennan P., A susceptibility locus for lung cancer maps to nicotinic acetylcholine receptor subunit genes on 15q25 (2008) Nature, 452 (7187), pp. 633-637.

³³⁾ 研究終了報告書 「日仏共同体制による人種間ゲノム多型の比較解析」

- [2] McKay J.D., Hung R.J., Gaborieau V., Boffetta P., Chabrier A., Byrnes G., Zaridze D., Mukeria A., Szeszenia-Dabrowska N., Lissowska J., Rudnai P., Fabianova E., Mates D., Bencko V., Foretova L., Janout V., McLaughlin J., Shepherd F., Montpetit A., Narod S., Krokan H.E., Skorpén F., Elvestad M.B., Vatten L., Njolstad I., Axelsson T., Chen C., Goodman G., Barnett M., Loomis M.M., Lubinski J., Matyjasik J., Lener M., Oszutowska D., Field J., Liloglou T., Xinarianos G., Cassidy A., Zelenika D., Boland A., Delepine M., Foglio M., Lechner D., Matsuda F., Blanche H., Gut I., Heath S., Lathrop M., Brennan P., Vineis P., Clavel-Chapelon F., Palli D., Tumino R., Krogh V., Panico S., Gonzalez C.A., Ramon Quiros J., Martinez C., Navarro C., Ardanaz E., Larraaga N., Kham K.T., Key T., Bueno-De-Mesquita H.B., Peeters P.H.M., Trichopoulou A., Linseisen J., Boeing H., Hallmans G., Overvad K., Tjonneland A., Kumle M., Riboli E., Lung cancer susceptibility locus at 5p15.33 (2008) *Nat. Genet.*, 40 (12), pp. 1404-1406.
- [3] Thein S.L., Menzel S., Peng X., Best S., Jiang J., Close J., Silver N., Gerovasilli A., Ping C., Yamaguchi M., Wahlberg K., Ulug P., Spector T.D., Garner C., Matsuda F., Farrall M., Lathrop M., Intergenic variants of HBS1L-MYB are responsible for a major quantitative trait locus on chromosome 6q23 influencing fetal hemoglobin levels in adults (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 104 (27), pp. 11346-11351.

(2) 研究領域終了後の継続と発展状況

本研究課題終了後、科研費特定領域研究「大規模リウマチ前向きコホートのゲノム解析によるリウマチのテーラーメイド医療の試み」(2010～2011 年度)、科研費特定領域研究「ゲノムワイドアプローチを用いた日本人成人性 T 細胞白血病の感受性遺伝子・多型の探索」(2008～2009 年度)、厚生労働科学研究費補助金「難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業の成果を基にした原因遺伝子変異データベースの構築」(2012～2013 年度)、厚生労働科学研究費補助金「網羅的統合オミックス解析を用いた難病の原因究明と新規診断・治療法の確立」(2011～2013 年度)などで研究を展開している。

研究終了後「関節リウマチの新規遺伝因子としてのミエリン塩基性蛋白の利用」に関する特許を 2 件出願している。

① 科学技術の進歩への貢献

(i) リウマチのゲノム解析によるリウマチのテーラーメイド医療へのアプローチ

RA のゲノム解析コンソーシアムを設立し、10,000 人以上の日本人 RA 患者の DNA を集積し、全ゲノム関連解析を実施した。そして、ミエリン塩基性蛋白(MBP)遺伝子を含む 12 個の新たな RA 疾患感受性遺伝子を同定した。さらに、MBP 蛋白に対する自己抗体が RA 患者血中で上昇していることを示し、マウスモデルを用いて自己抗体の機能的解析を進めた。HLA 領域と RA 自己抗体との関

係性を明らかにした。IL-6 受容体を標的にした抗体医薬トシリズマブ投与患者を 299 例集積し、120 例につきゲノムスキャンを完了し、反応性と関連する候補領域を同定した³⁴⁾、[1]、[2]、[3]。

(ii) ゲノムワイドアプローチを用いた日本人成人性 T 細胞白血病の感受性遺伝子・多型の探索

ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型 (HTLV-1) 感染により惹起される成人 T 細胞白血病 (ATL)、HTLV-1 関連脊髄症 (HAM) の感受性遺伝子多型を解析し発症危険群の同定を目的として、SNP を用いた GWAS による疾患関連 SNP の同定を試みた³⁵⁾。

(iii) 網羅的統合オミックス解析を用いた難病の原因究明と新規診断・治療法の確立

2011 年に、次世代遺伝子解析装置を用いて集中的に希少難治性疾患の遺伝子解析を行い、早期に原因究明、遺伝的診断手法の確立、治療法の開発に取り組んでいくことを目標に設立された。対象とする疾患は IgG4 関連全身硬化性疾患や HTLV-1 関連疾患等日本で概念が確立された疾患で、外国とは疾患概念の認識に差がある疾患である。いずれも根本的治療法のない難病で、大規模なゲノム解析がなされておらず強い遺伝因子が同定されていない。我が国から提唱された疾患を世界に先駆けて解明する。難治性疾患の予防・治療薬のニーズは世界で高まっており、我が国から創薬での大きな貢献が可能となる³⁶⁾。

②社会・経済への波及効果

松田は本研究領域終了後、上記「難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業の成果を基にした原因遺伝子変異データベースの構築」および「網羅的統合オミックス解析を用いた難病の原因究明と新規診断・治療法の確立」の代表研究者を務め、臨床情報を伴う多数検体を用いたゲノムワイド関連解析により日本特有の難病を対象とする網羅的探索やその原因究明と新規診断・治療法の確立を目指した研究を推進している。

遺伝子変異のデータベースの構築では、希少難治性疾患研究拠点が連携し、疾患と関連する遺伝子変異情報を集約・共有するためのデータベースを構築した。

日本人遺伝子リファレンス情報・希少難治性疾患の遺伝子変異情報を蓄積し、情報を広く公開することで科学的価値の高い成果を創造し、精度の高い診断、迅速な治療方針の決定による質の高い「個の医療」の実現を目指した。2013 年 11 月 12 日には、遺伝子リファレンスライブラリデータベースを公開し、公開から 3 ヶ月で 717,654 回のアクセスを得ており、疾患ゲノム解析への関心の高さ、含まれるゲノム情報の有用性が証明された。

日本人健常者集団のゲノム変異情報の集積は、3,248 人の健常者の一塩基多型頻度情報に加え、1,208 検体のエクソーム解析による各種ゲノム変異の頻度情報を蓄積し、ゲノム上の遺伝子をコードする領域に存在する、日本人の標準的な遺伝子情報とその正常なバリエーションを明らかにした^[4]。このデータベースを研究者が活用することによって、日本人での遺伝病の原因遺伝子の発見や、見出された変異が疾患発症に関わる可能性の評価・解釈、種々の病気になりやすい遺伝

³⁴⁾ 科学研究費助成事業データベース <https://kaken.nii.ac.jp/d/p/22021023.en.html>

³⁵⁾ 科学研究費助成事業データベース <https://kaken.nii.ac.jp/d/p/20014009.ja.html>

³⁶⁾ http://www.nanbyou.or.jp/upload_files/23_life_03.pdf

的体質の解明が大きく進展するものと期待される。本データベースの活用により、疾患の原因変異究明のプロセスが飛躍的に向上することが期待できる³⁷⁾。

③上記、継続と発展状況を示す研究成果に関連した主な成果論文リスト(4報以内)

- [1] Okada Y., Wu D., Trynka G., Raj T., Terao C., Ikari K., Kochi Y., Ohmura K., Suzuki A., Yoshida S., Graham R. R., Manoharan A., Ortmann W., Bhangale T., Denny J. C., Carroll R. J., Eyler A. E., Greenberg J. D., Kremer J. M., Pappas D. A., Jiang L., Yin J., Ye L., Su D.-F., Yang J., Xie G., Keystone E., Westra H.-J., Esko T., Metspalu A., Zhou X., Gupta N., Mirel D., Stahl E. A., Diogo D., Cui J., Liao K., Guo M. H., Myouzen K., Kawaguchi T., Coenen M. J. H., Van Riel P. L. C. M., Van De Laar M. A. F. J., Guchelaar H. J., Huizinga T. W. J., Dieude P., Mariette X., Bridges Jr. S. L., Zhernakova A., Toes R. E. M., Tak P. P., Miceli-Richard C., Bang S.-Y., Lee H.-S., Martin J., Gonzalez-Gay M. A., Rodriguez-Rodriguez L., Rantapaa-Dahlqvist S., Arlestig L., Choi H. K., Kamatani Y., Galan P., Lathrop M., Eyre S., Bowes J., Barton A., De Vries N., Moreland L. W., Criswell L. A., Karlson E. W., Taniguchi A., Yamada R., Kubo M., Liu J. S., Bae S.-C., Worthington J., Padyukov L., Klareskog L., Gregersen P. K., Raychaudhuri S., Stranger B. E., De Jager P. L., Franke L., Visscher P. M., Brown M. A., Yamanaka H., Mimori T., Takahashi A., Xu H., Behrens T. W., Siminovitch K. A., Momohara S., Matsuda F., Yamamoto K., Plenge R. M., Genetics of rheumatoid arthritis contributes to biology and drug discovery (2014) *Nature*, 506 (7488), pp. 376-381.
- [2] Kochi Y., Okada Y., Suzuki A., Ikari K., Terao C., Takahashi A., Yamazaki K., Hosono N., Myouzen K., Tsunoda T., Kamatani N., Furuichi T., Ikegawa S., Ohmura K., Mimori T., Matsuda F., Iwamoto T., Momohara S., Yamanaka H., Yamada R., Kubo M., Nakamura Y., Yamamoto K., A regulatory variant in CCR6 is associated with rheumatoid arthritis susceptibility (2010) *Nat. Genet.*, 42 (6), pp. 515-519.
- [3] Okada Y., Terao C., Ikari K., Kochi Y., Ohmura K., Suzuki A., Kawaguchi T., Stahl E. A., Kurreeman F. A. S., Nishida N., Ohmiya H., Myouzen K., Takahashi M., Sawada T., Nishioka Y., Yukioka M., Matsubara T., Wakitani S., Teshima R., Tohma S., Takasugi K., Shimada K., Murasawa A., Honjo S., Matsuo K., Tanaka H., Tajima K., Suzuki T., Iwamoto T., Kawamura Y., Tanii H., Okazaki Y., Sasaki T., Gregersen P. K., Padyukov L., Worthington J., Siminovitch K. A., Lathrop M., Taniguchi A., Takahashi A., Tokunaga K., Kubo M., Nakamura Y., Kamatani N., Mimori T., Plenge R. M., Yamanaka H., Momohara S., Yamada R., Matsuda F., Yamamoto K., Meta-analysis identifies nine new loci associated with rheumatoid arthritis in the Japanese population (2012) *Nat. Genet.*, 44 (5), pp. 511-516.

³⁷⁾ <http://research-er.jp/projects/view/156009>

- [4] Oishi M., Yamashiro K., Miyake M., Akagi-Kurashige Y., Kumagai K., Nakata I., Nakanishi H., Yoshikawa M., Oishi A., Gotoh N., Tsujikawa A., Yamada R., Matsuda F., Yoshimura N., Association between ZIC2, RASGRF1, and SHISA6 genes and high myopia in Japanese subjects (2013) *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 54 (12), pp. 7492-7497.

3.3 2004 年度採択課題

3.3.1 染色体および RNA の機能変化からの疾患の系統的解析（油谷浩幸）

(1) 研究のねらいと研究期間中の達成状況

①研究のねらい

テーラーメイド医療の実現には症例の層別化が必要であり、個人のゲノムの違いに関するマーカーが必要となる。このため、個人のゲノムがどの程度異なるのかを明らかにすべく染色体および RNA 変異の系統的解析技術開発、アレル間の遺伝子発現量の多様性という 3 つの研究項目を掲げ、最終的にそれらの多様性と疾患との関連づけを目指すことを目的とした。

②期間中の研究成果

本研究課題では、一貫してヒトゲノムに SNP 以外にどのような多様性があるのかを明らかにすることに取り組み、copy number variation (CNV)、遺伝子発現のアレル間多様性、及び RNA 変異のゲノムワイドの高感度な解析技術を開発した。これらの技術開発から疾患との関連づけを含め多くの成果が得られているが、中でも世界に先駆けて行われたゲノムワイドの CNV マップの作成は特筆すべき成果であった。また、遺伝子発現のアレル間多様性の解析技術が実用化に結びつきつつある。

(i) 染色体変異の系統的解析技術開発

・ヒトゲノムコピー数解析

ヒトゲノム構造多様性解析コンソーシアム³⁸⁾を結成し、HapMap プロジェクト³⁹⁾に用いられた白人、アジア人、アフリカ人合計 270 検体について本研究チームは専らオリゴヌクレオチドによる SNP アレイを用いた解析を担当した。新たにコピー数推定アルゴリズム Genotyping Microarray based CNV Analysis (GEMCA)を開発した^[1]。BAC アレイ解析結果と統合した結果、ヒトゲノム中に少なくとも 1447 箇所の CNV が存在し、CNV 領域は合計すると 360Mb (ヒトゲノムの 12%) におよび、3000 近い遺伝子が含まれるなど、ヒトゲノムにはコピー数多型が従来の予測以上に高頻度に存在し、その頻度は人種により異なることを明らかにした^[2]。

本研究期間中に開発されたオリゴヌクレオチド SNP アレイは次世代シーケンサーによる解析が主流となった期間終了後も、シーケンサーを補完する技術として広く利用されている。

・腫瘍組織における染色体変異への展開

同 SNP アレイを用いるがん細胞ゲノムにおける染色体変異について各種のがんのアレル別

³⁸⁾ ヒトゲノム構造多様性解析コンソーシアム：ヒトの CNV を系統的に解析する目的で結成された 2005 年に世界の 5 つの研究機関、企業からなる国際コンソーシアム

³⁹⁾ HapMap プロジェクト：国際 HapMap 計画は、ヒトにおける遺伝的多型パターンを明らかにし、病気や薬に対する反応性に関わる遺伝子を発見するための基盤を整備するプロジェクトである。この計画は、カナダ、中国、日本、ナイジェリア、英国、米国の科学者と各国政府、財団などの協力により行われている。

コピー数解析を行った。解析は、腫瘍組織における染色体変異、先天的ゲノム異常の検出にも用いられ、その有用性が明らかにされた^[3]。

(ii) アレル間の遺伝子発現量の多様性解析

同一の転写制御下にある 2 つの染色体からの遺伝子発現量の違いを SNP を利用して、ゲノムワイドに遺伝子発現量比較する方法 Express genotyping 法 (EG 法)[™]を開発した。不死化リンパ球を用いたスクリーニングでは、測定した遺伝子の 1%程度で 3 倍以上発現量の異なるアレルが存在することを確認した。薬剤刺激を行うことによって初めて検出されるアレル間の発現多様性が数多く存在する。薬剤応答性のみならず、増殖刺激やストレス応答における個人差のスクリーニングにも有用な解析技術になるものと期待される。

(iii) RNA 変異の系統的解析技術開発

140 万種類以上のエクソン候補配列に対して 4 種類のオリゴプローブからなるプローブセットを持ち、全転写産物の全体的発現量を測定することが可能な Exon1.0ST アレイ (Affimetrix) を用いて転写産物の多様性の解析を行った。正常組織 88 検体に加えてがん細胞株 139、臨床腫瘍組織 151 からの RNA 検体についてのエクソンアレイ情報をデータベース化した⁴⁰⁾。

③研究成果に関連した主な成果論文リスト (3 報以内)

- [1] Redon R., Ishikawa S., Fitch K.R., Feuk L., Perry G.H., Andrews T.D., Fiegler H., Shapero M.H., Carson A.R., Chen W., Cho E.K., Dallaire S., Freeman J.L., Gonzalez J.R., Gratacos M., Huang J., Kalaitzopoulos D., Komura D., MacDonald J.R., Marshall C.R., Mei R., Montgomery L., Nishimura K., Okamura K., Shen F., Somerville M.J., Tchinda J., Valsesia A., Woodwark C., Yang F., Zhang J., Zerjal T., Zhang J., Armengol L., Conrad D.F., Estivill X., Tyler-Smith C., Carter N.P., Aburatani H., Lee C., Jones K.W., Scherer S.W., Hurles M.E., Global variation in copy number in the human genome (2006) *Nature*, 444 (7118), pp. 444-454.
- [2] Komura D., Shen F., Ishikawa S., Fitch K.R., Chen W., Zhang J., Liu G., Ihara S., Nakamura H., Hurles M.E., Lee C., Scherer S.W., Jones K.W., Shapero M.H., Huang J., Aburatani H., Genome-wide detection of human copy number variations using high-density DNA oligonucleotide arrays (2006) *Genome Res.*, 16 (12), pp. 1575-1584.
- [3] Midorikawa Y., Yamamoto S., Ishikawa S., Kamimura N., Igarashi H., Sugimura H., Makuuchi M., Aburatani H., Molecular karyotyping of human hepatocellular carcinoma using single-nucleotide polymorphism arrays (2006) *Oncogene*, 25 (40), pp. 5581-5590.

⁴⁰⁾ 染色体および RNA の機能変化からの疾患の系統的解析事後評価報告書 (案) 概要
<http://www.jst.go.jp/kisoken/crest/eval/jigo/201005/j16-07/j16-01.pdf>

(2) 研究領域終了後の継続と発展状況

本研究課題終了後、油谷はエピゲノムの研究へと展開を図った。科研費基盤研究(S)「がんにおける転写制御変異の統合的解析」(2008～2012 年度)、新学術領域研究(研究領域提案型)「肝細胞分化におけるエピゲノム修飾制御に関する研究」(2011～2012 年度)、科研費基盤研究(S)「統合的ゲノム解析によるがん細胞集団進化の解明」(2012～2016 年度)、科研費新学術領域研究(研究領域提案型)「心筋細胞分化における時期特異的クロマチンリモデリング制御に関する研究」(2011～2013 年度)、医薬基盤研究所の保健医療分野における基礎研究推進事業「多層的疾患オミックス解析における、エピゲノム情報に基づく創薬標的の網羅的探索を目指した研究」(2010～2014 年度)などで研究を展開している。また NEDO プロジェクト「後天的ゲノム修飾のメカニズムを活用した創薬基盤技術開発」(2010～2014 年度)で応用への展開を図っている。

研究期間中には 54 件特許を出願しており、そのうち 9 件が登録されている。終了後には、10 件の特許を出願している。また企業との共同出願が 56 件である。

①科学技術の進歩への貢献

(i) 心筋細胞分化及び幹細胞分化におけるエピゲノム修飾制御

多能性細胞から心筋細胞への分化系をモデルとして、DNA メチル化やヒストン修飾等のエピゲノム標識に加えて、クロマチン状態の変動とその制御因子を明らかにする。分化制御因子が結合するオープンクロマチン領域の同定、さらには従来心筋分化の制御因子として知られる β -catenin、Nkx2.5 などの転写因子結合部位を同定し、細胞運命決定に伴う時期特異的なエピゲノム制御機構の解明を目指す^[1]。心筋細胞分化を制御する転写因子 X を同定した^[41]。

(ii) がんにおける転写制御変異の統合的解析

網羅的なゲノム・エピゲノム解析技術を確立するとともに、がん細胞における転写制御の異常に関する統合的解析を行った。増殖、分化に関わる転写因子の標的分子の同定に加えて、ヒストン修飾、DNA メチル化、クロマチンアクセスなどエピゲノム修飾が分化や細胞老化プロセス、ウイルス感染においてダイナミックに変動することが明らかとなった。一方、肝細胞がん^[2]、膵がん^[3]をはじめとするがん細胞ゲノムに生じた体細胞変異を同定した^[42]。本邦初のがんゲノムの全配列解読を国立がん研究センターと共同で行い、63 のアミノ酸変化を伴う遺伝子変異を同定した。

(iii) 統合的ゲノム解析によるがん細胞集団進化の解明

「がん細胞集団の進化(evolution)」にかかわるゲノム・エピゲノム変異を同定するために、がん細胞集団のゲノム不均一性の解析については、エクソーム解析および DNA メチル化解析を実施した。グリオーマ、膵がん、低分化型胃癌を検証をおこなった。また、がん細胞のクロマチン動態の解析については、ヒト肝細胞がん腫瘍組織においてのヒストン修飾および転写因子の標的部位を特定すべく ChIP-seq 解析を行い、 β -catenin の標的部位を腫瘍組織と正常組織で比較した。

⁴¹ 科学研究費助成事業データベース <https://kaken.nii.ac.jp/d/p/23118508/2011/3/ja.en.html>

⁴² http://www.jsps.go.jp/j-grantsinaid/12_kiban/hyouka23/shinchoku_gaiyo/01/summary_19_aburatani.pdf

さらに、がん幹細胞をはじめとした腫瘍内の質的な不均一性を明らかにすべく、単一細胞のトランスクリプトーム解析法の確立をすすめた⁴³⁾。図 3-11 に油谷の研究室で行われている Chip-seq 解析の概略を示した。

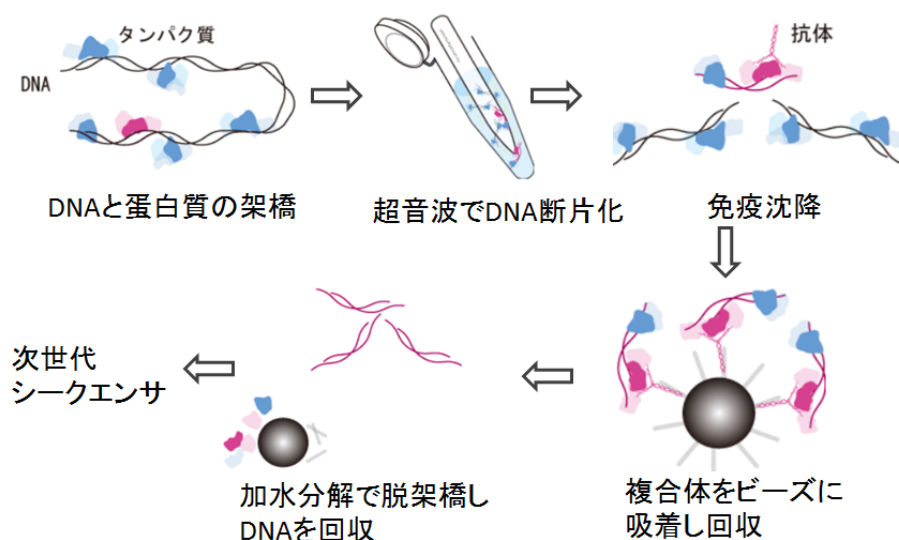


図 3-11 クロマチン免疫沈降シーケンシング (ChIP-seq) 解析の概要⁴⁴⁾

(iv) 創薬のためのエピゲノム情報の網羅的解析とエピゲノム解析技術開発

DNA 脱メチル化中間体である 5-ヒドロキシメチルシトシン検出法等の解析技術開発を行い、エピゲノム解析技術開発として、Tet-associated bisulfite (TAB)-seq 法と TAB-chip 法を実用化した。「疾患オミックス統合データベース」のゲノムビューワー・パスウェイビューワーの構築を進め、先行疾患である腎がん等の Infinium 解析⁴⁵⁾データをデータベースに格納した⁴⁶⁾。

②社会・経済への波及効果

NEDO プロジェクト「後天的ゲノム修飾のメカニズムを活用した創薬基盤技術開発」では、後天的ゲノム修飾を効率的に解析する手法を開発し、高感度で検出するシステムの構築を行っている。さらに、複数種類のがんとの関連づけを行うための基盤技術を世界に先駆けて開発している。疾患特異的な後天的ゲノム修飾を引き起こす因子(酵素等の蛋白質)を同定し、治療標的としての妥当性を検証する。これらの成果は、将来的には、効率的な医薬品・診断薬の開発、さらには個別化医療、予防医療の実現に貢献すると考えられる。新規メカニズムに基づく画期的な医薬品ターゲットや診断マーカーの探索技術を提供することにより、企業による医薬品開発が加速され、例えばグリベックやタルセバのような 1 製品あたり売上高が 1,000 億を超える医薬品の創出も期待

⁴³⁾ 科学研究費助成事業データベース <https://kaken.nii.ac.jp/d/p/24221011.ja.html>

⁴⁴⁾ 東京大学 先端科学技術研究センター ゲノムサイエンス分野 ホームページ(http://www.genome.rcast.u-tokyo.ac.jp/research/chip_seq)より改変

⁴⁵⁾ Infinium 解析：全ゲノム増幅を用い、ビーズチップ (BeadChip) 上でゲノム断片と試薬を反応させて行う SNP 型の判定(ジェノタイピング)法で、イルミナ社により開発された。ゲノム全体の SNP を一度に数万～ 100 万ヶ所検出可能である。

⁴⁶⁾ http://www.nibio.go.jp/shinko/kenkyuu/h25kenkyuyouko/h25_10_42.html

される。さらに将来、個人の後天的ゲノム情報に基づいて、疾患の個体差や進行度に応じた標的治療薬による、質と費用対効果の高い治療の実現も期待できる⁴⁷⁾。

③上記、継続と発展状況を示す研究成果に関連した主な成果論文リスト(4報以内)

- [1] Nagae G., Isagawa T., Shiraki N., Fujita T., Yamamoto S., Tsutsumi S., Nonaka A., Yoshiba S., Matsusaka K., Midorikawa Y., Ishikawa S., Soejima H., Fukayama M., Suemori H., Nakatsuji N., Kume S., Aburatani H., Tissue-specific demethylation in CpG-poor promoters during cellular differentiation (2011) *Hum. Mol. Genet.*, 20 (14), pp. 2710-2721.

- [2] Totoki Y., Tatsuno K., Yamamoto S., Arai Y., Hosoda F., Ishikawa S., Tsutsumi S., Sonoda K., Totsuka H., Shirakihara T., Sakamoto H., Wang L., Ojima H., Shimada K., Kosuge T., Okusaka T., Kato K., Kusuda J., Yoshida T., Aburatani H., Shibata T., High-resolution characterization of a hepatocellular carcinoma genome (2011) *Nat. Genet.*, 43 (5), pp. 464-471.

- [3] Wang L., Tsutsumi S., Kawaguchi T., Nagasaki K., Tatsuno K., Yamamoto S., Sang F., Sonoda K., Sugawara M., Saiura A., Hirono S., Yamaue H., Miki Y., Isomura M., Totoki Y., Nagae G., Isagawa T., Ueda H., Murayama-Hosokawa S., Shibata T., Sakamoto H., Kanai Y., Kaneda A., Noda T., Aburatani H. Whole-exome sequencing of human pancreatic cancers and characterization of genomic instability caused by MLH1 haploinsufficiency and complete deficiency, (2012) *Genome Research*, 22(2), pp. 208-219.

⁴⁷ NEDO プロジェクト「後天的ゲノム修飾のメカニズムを活用した創薬基盤技術開発」
http://www.nedo.go.jp/introducing/iinkai/kenkyuu_bunkakai_24h_cyuukan_3_1.htm

3.3.2 Whole Genome Association 解析による GvHD の原因遺伝子の探索 (小川誠司)

(1) 研究のねらいと研究期間中の達成状況

①研究のねらい

骨髄移植は、難治性造血器腫瘍に対する最強の治療手段であるが、同時に大きな副作用の危険を伴う治療法でもある。本研究課題では、患者とドナーの遺伝学的背景の違いによって引き起こされる 移植片対宿主病 (GvHD) の原因となる遺伝的相違を解明し、移植成績の向上に資することを目的とした。また、基盤技術として開発されたゲノムコピー数解析技術を用いて、がんの標的分子の同定を行なう。

②期間中の研究成果

(i) 全ゲノム関連解析に基づく GvHD 関連遺伝子多型の同定

日本骨髄バンクを通じて行われた非血縁者間骨髄移植のうち、HLA-A、B、C、DRB1、DQB1 が DNA レベルで一致し、急性 GvHD (aGvHD) に関する情報の得られる 1600 移植検体について、約 50 万 SNP のタイピングを行い、6SNP 座を aGvHD の標的遺伝子座として世界に先駆けて同定した。また、レシピエントの SNP において aGvHD と関連する 2 つの候補を同定し、慢性 GvHD や再発と関連する 4SNP を同定した。

(ii) 全ゲノム関連解析の手法に基づく 移植片対白血病 (GVL) 関連マイナー抗原の同定

細胞傷害性 T 細胞 (CTL) HapMap 細胞パネルの細胞傷害性アッセイと HapMap Phase II データに基づいて高感度かつ効率的に当該 CTL の標的マイナー抗原遺伝子座を同定する HapMap 法を開発し、これを用いて複数の新規マイナー抗原の同定を行った。HapMap 法とこれに基づくマイナー抗原は、腫瘍特異的なアロ免疫療法の開発に有用であると考えられ大きな成果である。

(iii) 高密度 SNP アレイ解析による高精度ゲノムコピー数定量プログラムの開発と発がん関連遺伝子変異の同定

SNP アレイによる解析の研究過程で、巨大な情報を処理するために、ゲノムワイドにアレルを定量できるプログラム (CNAG/AsCNAR) を開発した^[1]。SNP アレイを用いて行った各種のがんの網羅的なアレル・ゲノムコピー数の解析から、神経芽腫における ALK キナーゼ変異^[2]、悪性リンパ腫における A20 遺伝子の不活化変異^[48]、骨髄系腫瘍における CBL の変異^[3]が、がんの原因となる遺伝子変異であることを明らかにした。これらも特記されるべき成果である^[49]。

⁴⁸ Kato M., Ogawa S. et al. Frequent inactivation of A20 in B-cell lymphomas (2009) Nature 459 (7247), pp. 712-716

⁴⁹ Whole Genome Association 解析による GVHD の原因遺伝子の探索事後評価報告書(案)概要
<http://www.jst.go.jp/kisoken/crest/eval/jigo/201005/j16-07/j16-02.pdf>

③研究研究成果に関連した主な成果論文リスト(3 報以内)

- [1] Nannya Y., Sanada M., Nakazaki K., Hosoya N., Wang L., Hangaishi A., Kurokawa M., Chiba S., Bailey D.K., Kennedy G.C., Ogawa S., A robust algorithm for copy number detection using high-density oligonucleotide single nucleotide polymorphism genotyping arrays (2005) *Cancer Res.*, 65 (14), pp. 6071-6079.
- [2] Chen Y., Takita J., Choi Y.L., Kato M., Ohira M., Sanada M., Wang L., Soda M., Kikuchi A., Igarashi T., Nakagawara A., Hayashi Y., Mano H., Ogawa S., Oncogenic mutations of ALK kinase in neuroblastoma (2008) *Nature*, 455 (7215), pp. 971-974.
- [3] Sanada M., Suzuki T., Shih L.-Y., Otsu M., Kato M., Yamazaki S., Tamura A., Honda H., Sakata-Yanagimoto M., Kumano K., Oda H., Yamagata T., Takita J., Gotoh N., Nakazaki K., Kawamata N., Onodera M., Nobuyoshi M., Hayashi Y., Harada H., Kurokawa M., Chiba S., Mori H., Ozawa K., Omine M., Hirai H., Nakauchi H., Koeffler H.P., Ogawa S., Gain-of-function of mutated C-CBL tumour suppressor in myeloid neoplasms (2009) *Nature*, 460 (7257), pp. 904-908.

(2) 研究領域終了後の継続と発展状況

本研究課題終了後、科研費基盤研究(B)「先端ゲノミクスによる造血器腫瘍の治療・診断標的分子の同定」(2008～2011 年度)、科研費新学術領域研究(研究領域提案型)「大規模ゲノムシーケンスに基づくがんの個性の理解と分子標的の探索」(2010～2014 年度)、科研費基盤研究(A)「白血病幹細胞の維持と再発・治療抵抗性に関わる遺伝学的基盤の解明」(2011～2013)、科研費基盤研究(A)「RNA スプライシング変異による MDS 発症の分子メカニズムの解明」(2014～2016)、科研費基盤研究(S)「骨髄異形成症候群(MDS)の分子基盤の解明」(2014～2018 年度)、厚生労働科学研究費補助金「不応性貧血の治療率向上を目指した分子・免疫病態研究」(2010～2012 年度)などで研究を展開している。

研究期間中は2件の特許を、終了後は1件の特許を出願している。「骨髄異形成症候群または骨髄性腫瘍素因の評価方法、そのポリペプチド及び抗体、並びにその治療薬若しくは予防薬の候補物スクリーニング方法」は、PCT 出願として、海外展開を図っている。スプライシングの異常に関する特許は、現在、出願中であり、既にキアゲン社の全欧、全米における独占的ライセンス供与が発表されている。

小川はこれらの研究成果が認められ、2010 年日本癌学会 Mauverny 賞、2013 年日本血液学会第2回日本血液学会賞、2013 年日本医師会医学賞を受けている。

①科学技術の進歩への貢献

研究領域終了後、これまで骨髄異形成症候群(MDS)及び白血病の原因に関わる複数の遺伝子を新たに発見した。MDS ではこれまで DNA 修飾やクロマチン修飾に関わる遺伝子の異常がその原因とされてきたが、RNA のスプライシングの異常及びコヒーシンの異常がその原因であることを発見した。

研究領域期間中の GvHD 関連遺伝子多型の同定での成果は多数の研究者によって引用され日本の移植の研究基盤としてリスク研究に不可欠なリソースとなっている。GVL 関連マイナー抗原の同定の研究は、マイナー抗原を捕まえる方法として広く使われるとともに養子免疫療法を行うための研究の基盤になっている。また高密度 SNP アレイ解析による高精度ゲノムコピー数定量プログラムの開発と発がん関連遺伝子変異の同定の研究は、遺伝性疾患における原因解析、がんの責任遺伝子の同定、iPS 細胞の品質評価に汎用されている。

(i) RNA のスプライシングの異常による骨髄異形成症候群の発症

大量並列ゲノムシーケンス技術を用い、29 例の MDS 症例のゲノムを詳細に解読することによって「RNA スプライシング」に関わる遺伝子群が 45~85%という高い頻度で変異を生じていることをつきとめた。MDS において同定された RNA スプライシング装置に関わる新規 pathway 変異の発見は^[1]、RNA スプライシングに関わる遺伝子の後天的な変異が発がんに関わることを明らかにした画期的な発見として世界的に高い評価を受けている。その後スプライシングの異常は腎がん、クッシング症候群の発症の原因遺伝子になっていることを解明した。

(ii) MDS の白血病化の原因遺伝子異常を発見

700 例以上の MDS や白血病の症例を対象として高速ゲノムシーケンス技術を用いたゲノム解析を行い、SETBP1 遺伝子の変異が MDS から白血病への進行に関わっているということをつきとめた。ゲノム解析には、次世代シーケンサーによる塩基配列情報の収集と、スーパーコンピュータによる高速度のデータ解析を行った^{[2], 50)}。

(iii) 白血病・骨髄異形成症候群(血液がんの一種)の原因遺伝子異常を発見

細胞分裂や遺伝子の転写調節において重要な働きを持つことが知られている蛋白質複合体「コヒーシン」を構成する遺伝子の変異が、MDS、慢性骨髄単球性白血病(CMML)、急性骨髄性白血病(AML)、慢性骨髄性白血病(CML)などの「骨髄系腫瘍」に分類される血液がんを高頻度に認められることを 600 症例から解明した。MDS の全エクソンシーケンスにより、コヒーシン複合体を構成する 4 遺伝子の変異が重要な遺伝子変異であることが明らかになった。コヒーシン遺伝子の変異した白血病の患者由来の細胞株では、コヒーシン複合体の染色体への結合が減少していることが示された^[3]。その後、膀胱がんでは頻度が最も高く、横紋筋肉腫や脳腫瘍でも見つかった。

コヒーシン遺伝子変異による白血病化のメカニズムの模式図を図 3-12 に示した。

コヒーシン複合体は 4 つの蛋白質がリング状の複合体を形成することにより染色体を取り囲んでいる。コヒーシン遺伝子に変異が生じると、正常なリング状の複合体の形成ができなくなり、コヒーシンの染色体への正常な結合が阻害されると考えられる。その結果、造血細胞の遺伝子の転写調節や細胞分裂においてコヒーシンの正常な機能が失われ、細胞分裂が異常となり、白血病化につながると考えられる。

⁵⁰ ライフサイエンス新着論文レビュー <http://first.lifesciencedb.jp/archives/7681>

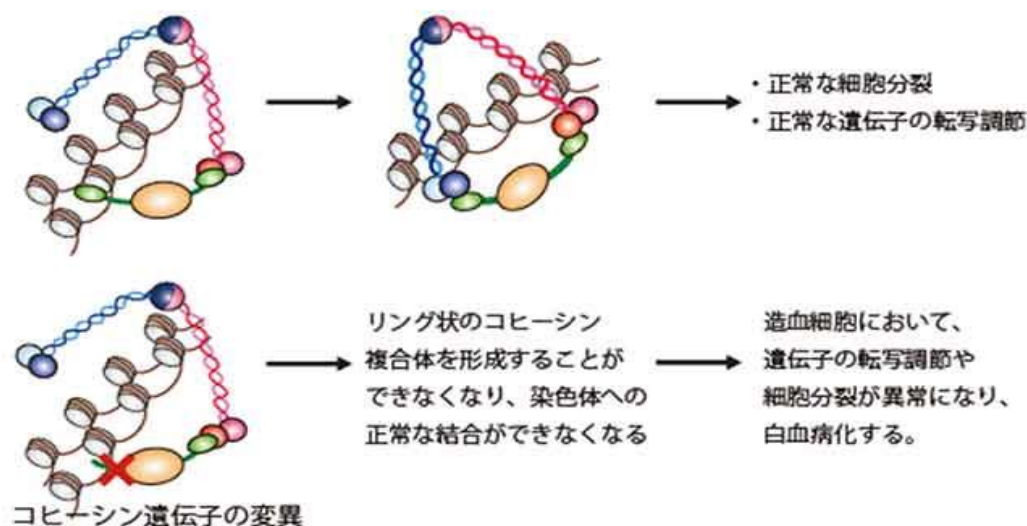


図 3-12 コヒーシン遺伝子変異による白血病化のメカニズム⁵¹⁾

②社会・経済への波及効果

MDS や白血病は代表的な「血液がん」で日本でも推定で数万人の患者がおり、特に年間 5,000 人以上が新たに発症しており、高齢者の増加により患者数が年々増加している。MDS は、血液細胞のがん化にともなって正常な血液細胞を作ることができなくなる結果、感染症、貧血、出血といった症状を生じる極めて難治性の血液がんの 1 つである。また、多くの症例で、急速に病気が進行する急性骨髄性白血病へ移行し、致死的な転帰をたどるが、白血病への進行を予測する有効な指標は知られておらず、現在は骨髄移植を除いて根治的な治療手段はないが、これ等の原因遺伝子に関する研究成果は新しい診断や治療法の開発に繋がる可能性を示している。

SETBP1 遺伝子の変異により、MDS から白血病へ進行することから、この変異をマーカーとして、従来より早期に MDS から白血病へ進行するハイリスクの患者を予測できるようになることが期待できる。また、SETBP1 遺伝子変異は過剰発現によって白血病化をきたしている可能性が高いことから、SETBP1 を治療標的とした新たな創薬の可能性も考えられる⁵²⁾。

さらに、コヒーシン遺伝子の変異が MDS、CMML、AML、CML などの「骨髄系腫瘍」に高頻度に見られる重要な遺伝子変異であることが判明し、今後、骨髄系腫瘍の診療において、コヒーシン遺伝子の変異をマーカーとして予後予測を行い、最適な治療法を選択することに役立てられることが期待できる。また、コヒーシンの遺伝子変異はこれまで骨髄系腫瘍で知られてきた遺伝子変異とは異なる新たなグループに属する遺伝子変異であることから、コヒーシン遺伝子の変異を治療標的とした新たな創薬に期待がもたれる⁵³⁾。

③上記、継続と発展状況を示す研究成果に関連した主な成果論文リスト(4 報以内)

- [1] Yoshida K., Sanada M., Shiraishi Y., Nowak D., Nagata Y., Yamamoto R., Sato Y., Sato-Otsubo A., Kon A., Nagasaki M., Chalkidis G., Suzuki Y., Shiosaka M., Kawahata

⁵¹⁾ 京都大学ホームページ http://www.kyoto-u.ac.jp/static/ja/news_data/h/h1/news6/2013/130819_1.htm

⁵²⁾ 京都大医学ホームページ http://www.kyoto-u.ac.jp/static/ja/news_data/h/h1/news6/2013/130708_3.htm

⁵³⁾ ライフサイエンス 新着論文レビュー <http://first.lifesciencedb.jp/archives/7681>

- R., Yamaguchi T., Otsu M., Obara N., Sakata-Yanagimoto M., Ishiyama K., Mori H., Nolte F., Hofmann W.-K., Miyawaki S., Sugano S., Haferlach C., Koeffler H.P., Shih L.-Y., Haferlach T., Chiba S., Nakauchi H., Miyano S., Ogawa S., Frequent pathway mutations of splicing machinery in myelodysplasia (2011) *Nature*, 478 (7367), pp. 64–69.
- [2] Makishima H., Yoshida K., Nguyen N., Przychodzen B., Sanada M., Okuno Y., Ng K.P., Gudmundsson K.O., Vishwakarma B.A., Jerez A., Segui I.G., Takahashi M., Shiraishi Y., Nagata Y., Guinta K., Mori H., Sekeres M.A., Chiba K., Tanaka H., Muramatsu H., Sakaguchi H., Paquette R.L., McDevitt M.A., Kojima S., Sauntharajah Y., Miyano S., Shih L.-Y., Du Y., Ogawa S., Maciejewski J.P., Somatic SETBP1 mutations in myeloid malignancies (2013) *Nat. Genet.*, 45 (8), pp. 942–946.
- [3] Kon A., Shih L.-Y., Minamino M., Sanada M., Shiraishi Y., Nagata Y., Yoshida K., Okuno Y., Bando M., Nakato R., Ishikawa S., Sato-Otsubo A., Nagae G., Nishimoto A., Haferlach C., Nowak D., Sato Y., Alpermann T., Nagasaki M., Shimamura T., Tanaka H., Chiba K., Yamamoto R., Yamaguchi T., Otsu M., Obara N., Sakata-Yanagimoto M., Nakamaki T., Ishiyama K., Nolte F., Hofmann W.-K., Miyawaki S., Chiba S., Mori H., Nakauchi H., Koeffler H.P., Aburatani H., Haferlach T., Shirahige K., Miyano S., Ogawa S., Recurrent mutations in multiple components of the cohesin complex in myeloid neoplasms (2013) *Nat. Genet.*, 45 (10), pp. 1232–1237.

3.3.3 分子シャペロン工学に基づく遺伝子解析（丸山厚）

(1) 研究のねらいと研究期間中の達成状況

①研究のねらい

本研究課題では、核酸の正確なハイブリダイゼーションを促す蛋白質である核酸シャペロンの機能に着目し、合成高分子材料でその機能を再現し核酸解析に応用することを目的とし、より簡便で迅速かつ安価な遺伝子診断法の開発を目指した。そのために、図 3-13 に示したように、核酸構造を高精度に認識する新たなプローブとして、核酸との迅速、正確な相互作用を支援する分子シャペロン機能を有する材料を設計した。

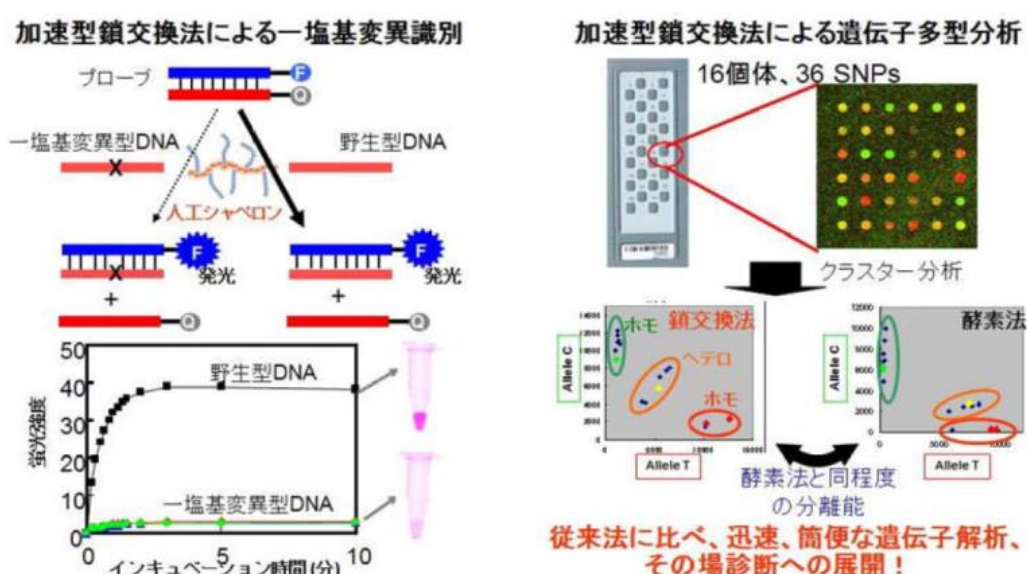


図 3-13 迅速・簡便な遺伝子診断法への高分子材料への展開⁵⁴⁾

②期間中の研究成果

カチオン性くし型共重合体、PLL-g-Dex は、核酸ハイブリッドを安定化するのみならず、その形成速度を 2～3 桁高める。さらに 1 級アミノ基をグアニジノ基に変換することによりシャペロン活性を数十倍高めることができた^[1]。また、シャペロン活性の向上は、単鎖核酸に対する親和性が向上したためであることを明らかにした。

核酸 3 重鎖の形成は遺伝子解析はじめ様々な応用が期待され得るものの、3 重鎖核酸の不安定性がその応用を制限している。カチオン性くし型共重合体と非天然型核酸(BNA)との併用による 3 重鎖核酸の安定化を検討した。その結果、それぞれ単独では 100 倍程度の安定化効果を示すのに対し、併用した場合には 10,000 倍近く安定性が向上し、それぞれの効果が相乗的に発現されることを見いだした^[2]。3 重鎖核酸のバイオテクノロジーへの応用に有用な成果である。

側鎖カチオン型高分子においてもシャペロン活性を確認した。核酸シャペロン活性を利用した遺伝子解析法として、二重鎖核酸をプローブとする鎖交換法を検討し、新たに部分二重鎖(PDS)

⁵⁴⁾ 丸山厚研究室ホームページ <http://mlab.bio.titech.ac.jp/research.html>

プローブおよび末端変異二重鎖(TMD)プローブを設計した。いずれのプローブも高い一塩基変異識別能を発現したがTMDプローブはハイブリダイゼーション法での識別が困難であるT→G変異も高い識別能で検出できることがわかった。

ポリカチオン加速型核酸鎖交換法をより簡便に解析する方法として、蛍光色素の1つであるピレンのエキサイマー形成に着目し、エキサイマー形成型のプローブを設計した。これによりプローブの2重ラベルを不要とし単一ラベルで一塩基変異等を高識別能で検出できるようになった^[3]。

鎖交換法のSNPs解析法への実際的な展開を図るために、DNA タグアレイ法と融合した結果、多検体の解析においても、鎖交換法は高い識別能を保持していた。

③研究成果に関連した主な成果論文リスト(3報以内)

- [1] Choi S.W., Kano A., Maruyama A., Activation of DNA strand exchange by cationic comb-type copolymers: Effect of cationic moieties of the copolymers (2008) *Nucleic Acids Res.*, 36 (1), pp. 342-351.
- [2] Torigoe H., Maruyama A., Obika S., Imanishi T., Katayama T., Synergistic stabilization of nucleic acid assembly by 2'-O,4'-C-methylene- bridged nucleic acid modification and additions of comb-type cationic copolymers (2009) *Biochemistry*, 48 (15), pp. 3545-3553.
- [3] Yamana K., Fukunaga Y., Ohtani Y., Sato S., Nakamura M., Kim W.J., Akaike T., Maruyama A., DNA mismatch detection using a pyrene-excimer-forming probe (2005) *Chem. Commun.*, (19), pp. 2509-2511.

(2) 研究領域終了後の継続と発展状況

本研究課題の終了後に、JST 産学連携・技術移転事業「高度遺伝子解析のためのシャペロン材料の開発」(2010～2012 年度)、科研費基盤研究(A)「生体高分子の高次構造と機能制御のための高分子材料設計」(2011～2014 年度)、科研費新学術領域研究(研究領域提案型)「細胞内核酸イメージングによる細胞機能発現の解明と調節」(2011 年 7 月～2016 年 3 月)により、研究を展開している。

期間中には、8 件の特許を出願し、そのうち登録したものは 4 件であった。終了後には、2 件の本研究関連特許を出願している。

2005 年に日本バイオマテリアル学会学会賞(バイオコンジュゲート 核酸工学 生体機能性材料)を受賞している。

丸山ら⁵⁵⁾では、生体と高分子の相互作用を基礎的に解明し、診断、治療を含め QOL を高める材料の開発研究を行っている。本研究課題で行ったゲノム解析手法の開発は、カチオン性くし型共重合体、PLL-g-Dex が核酸ハイブリッドを安定化し、その交換を促進する機能を発見し、それを

⁵⁵⁾ 丸山研究室ホームページ <http://mlab.bio.titech.ac.jp/professor.html>

遺伝子の変異の解析に利用するものであるが、本研究課題終了後、研究の継続と並行して、このユニークな現象に関する基礎研究とそれを利用した応用、開発研究を展開している。

①科学技術の進歩への貢献

(i)細胞内核酸イメージングによる細胞機能発現の解明と調節

近年、miRNA など短い核酸断片の細胞内での機能が注目されており、細胞内で空間的および時間的に高い分解能でこれら核酸をイメージングする手法が求められている。そのためには、1)核酸プローブの塩基配列選択性の向上、2)核酸検出感度の向上、3)プローブ核酸を細胞内に効率よく送達する手法の3条件が求められる。丸山らは、これまでハイブリッド形成を格段に迅速・安定化する核酸シャペロン機能を持った高分子材料の構築と核酸プローブの開発を行ってきた。また、細胞内送達には細胞膜破壊/融合活性を持つペプチドが有用であるが、シャペロン高分子材料によりその効率を効果的に向上できることを見出してきた。丸山らはこれらの知見を元に生体に優しくかつ高い時空間分解能で細胞内イメージングを可能とする核酸ナノセンシング法とそれによる細胞機能調節法の基盤を構築することを目的とした研究を進めている^[1]。細胞内デリバリーを念頭に、エンドソーム内のpH変化(pH7.4→5.0)に応答する塩基性基を有するポリカチオンの設計を行った。特に、アミノ酸の α -アミノ基が低いpKaを有することに着目し、新しいエンドソームpH応答性高分子の合成とその細胞内送達キャリアとしての評価を行った。その結果、 α -アミノ酸の α -アミノ基が細胞内への導入に適したpH応答性を有することが示唆された。 α -アミノ酸をビルディングブロックとして利用した生体適合性の高いキャリア設計によるエンドソーム内のpH変化をモニターできるプローブ開発が期待される⁵⁶⁾。

(ii)生体高分子の高次構造と機能制御

共重合体と核酸との相互作用および形成される複合体の性状を1分子蛍光観察法により解析し、その相互作用メカニズムの解明を行っている^[2]。通常、ポリリジンのようなポリカチオンは、核酸をコイル状態からコンパクトなグロビュール状態に凝縮させ、その後二次凝集を誘起し、結果的に複合体は沈殿する。一方で、くし型共重合体は、グラフト率に依存して異なる可溶性複合体を形成することを既に溶液中の一分子計測により明らかにしている。さらに、核酸と共重合体を二重ラベルした液中1分子計測およびフローストレッチング法を取り入れた1分子観察法により、共重合体が核酸構造に与える効果を高い時空間分解能で解析した。具体的には、 λ ファージDNAなどの長鎖核酸をフローセルのガラス表面に固定し、核酸鎖を伸張させ、さらに種々の共重合体と交換反応を行い核酸の構造変化をリアルタイム共焦点顕微鏡(CLM)で観察することで、共重合体との相互作用を評価した。その結果、共重合体はDNA長を20%程度収縮させるものの、グロビュール化を誘起しないことが分かった。また、DNAの収縮は、DNAの可視化に用いている蛍光性インターカレーターのDNAへの結合を共重合体が競合的に抑制する結果であり、共重合体自体は、DNA鎖長に影響しないことが分かった。

⁵⁶⁾ 科学研究費助成事業データベース <http://kaken.nii.ac.jp/d/p/23107007.ja.html>

②社会・経済への波及効果

(i)がん治療を目指した核酸ナノマシンの創出

この研究は遺伝子解析に直接的に関連するものではないが、丸山らが行っている核酸塩基の相補的結合の交換を促進するという分子シャペロン機能のがん組織で治療効果を発現する治療用核酸ナノマシンシステムへの利用について評価したものである^[3]。ここで丸山らは、親水性側鎖をグラフトしたカチオン性くし型共重合体のがん集積性を担がんマウスで評価し、高密度にグラフト鎖を有する共重合体が経時的にがんを集積することを見出した。さらに核酸の構造転移に与える共重合体の効果を評価したところ共重合体が、ステムループ・二重鎖の転移や四重鎖核酸の形成速度を顕著に高め、機能性核酸の機能を制御し得ることが示唆された。これらは医療分野への展開例といえる。

(ii)遺伝子解析のためのシャペロン材料の開発

この研究の目的は SNP 解析や病原菌、ウイルス感染の検出を迅速かつ簡便に行うことができる方法の開発である。これまでシャペロン活性を持つカチオン性主鎖と親水性側鎖を有する共重合体を使用していたが、それに加え、水素結合性基を有する高分子プローブを合成し評価した。このプローブを用いて遺伝子識別を行ったところ、識別時間 30 分を達成した。これは目標(2 時間)を大幅に上回るものであった。しかし、多サンプル同時解析では、タイピング不良の SNP サイトが存在し、PCR 増幅不良が原因であり、識別段階は良好であることがわかった。PCR 条件に課題が残った。一方、簡便化という観点では、ステップ数は 5 ステップ、試薬数も削減し 11 試薬とおおむね目標を達成できた。また K-Ras 遺伝子をターゲットとした蛍光・消光機能をもつプローブを用いた変異型遺伝子の識別能を実証することができた。これは科学技術振興機構 (JST) 産学連携・技術移転事業として行われたものであり、本領域研究を引き継いだものといって良いが、「当初の開発目標を達成し、それを上回る特筆すべき成果をあげた」と評価されており、実用化へ向けての研究が進められている。

丸山らは期間中に申請した特許のうち 4 特許を研究終了後に登録している：「ヌクレオチド鎖交換反応促進物」(登録日 2012 年 7 月 27 日)(従来のコポリマーに比べて、数十倍～数百倍の交換反応促進活性を有する物質の提供)、「核酸結合性物質の評価法」(同 2013 年 1 月 18 日)(高感度・高精度・短期間に、核酸結合性物質と核酸との結合性を評価する方法の提供)、「部分二重鎖型核酸分子」(同 2013 年 5 月 10 日)(塩基配列の微細な違いを簡便に識別できる方法の提供)、「金微粒子とその製造方法」(同 2013 年 12 月 6 日)(PLL-g-PEG を吸着させることによって血液中での分散安定性を高めた、生体に対して安全な金ナノロッドとその用途の提供)。また、終了後も、上で述べた二本鎖 DNA の交換反応を利用した遺伝子解析技術の改良に関する特許を出願するなど、実用化へ向けた研究成果を示している。

③上記、継続と発展状況を示す研究成果に関連した主な成果論文リスト(4 報以内)

- [1] Wada T., Kano A., Shimada N., Maruyama A., α -amino acid pendant polymers as endosomal pH-responsive gene carriers (2012) *Macromol. Res.* 20 (3), pp. 302-308.

- [2] Maruyama A., Sonda N., Yamasaki K., Hirano M., Kidoaki S., Shimada N., Maeshiro M., Miyazaki M., Cationic comb-type copolymer excludes intercalating dye from DNA without inducing DNA condensation (2014) *Current Nanoscience*, 10, 185–188.

- [3] Ohya Y., Takeda S., Shibata Y., Ouchi T., Kano A., Iwata T., Mochizuki S., Taniwaki Y., Maruyama A., Evaluation of polyanion-coated biodegradable polymeric micelles as drug delivery vehicles (2011) *J. Control. Release* 155 (1), pp. 104–110.

3.3.4 大腸癌の発生、進展および治療感受性に関わる因子の解析（森正樹）

(1) 研究のねらいと研究期間中の達成状況

①研究のねらい

日本人において発生頻度が急増している大腸がんの発生・進展・治療感受性に関わる因子解析を行い、得られる遺伝子情報、疫学情報により大腸がんのテーラーメイド医療を具現化し、予後改善に寄与すること目的とした。

②期間中の研究成果

多施設共同研究により大腸がん群 1,957 例、コントロール群 2,615 例の生活習慣と DNA 資料を収集した我が国初の大規模な研究となった。大腸発がんあるいはがん進展を規定する因子として腫瘍側因子、宿主側因子、環境側因子の 3 つを考え、各々について多数例を用いて精密な解析を行った。1) 腫瘍側因子にはレーザーマイクロダイセクション (LMD) とマイクロアレイを用いたがん細胞特異的遺伝子発現解析とゲノム遺伝子変異解析 (CGH アレイ解析) を、2) 宿主側因子には遺伝子多型解析を、3) 環境側因子には生活習慣のアンケートによる疫学的解析を実施した。

目標症例数を収集し、全ゲノム相関解析を行って大腸発がんに関連する SNP を 10p14 に 5 箇所同定した。また、欧米で報告された 8q24 の遺伝子多型と大腸がんリスクとの関係を日本人の症例で明らかにした。

大腸がん罹患しやすい危険因子を遺伝学的、疫学的および両者の交互作用の面から明らかにする解析では、12 の大項目で疫学的因子を解析し、有意差の認められた疫学因子群と遺伝的因子 (10p14、8q24) 間で遺伝子-環境交互作用を調べた。その結果、日本人ではリスクとなる遺伝子多型を有すること自体が大腸発がんを規定しうること、非リスクアリルの場合は、糖尿病や肉食頻度という疫学因子が重要な因子となることを明らかにした。以上の結果は、これらの SNP や関連遺伝子の機能解明への手がかりを提供する極めて重要な成果である。また、大腸がん症例ががん細胞から抽出した全ゲノムの CGH 解析から、これらの症例が大規模なゲノム変異を伴う群と殆どゲノム変異のみられない群の 2 つのクラスターに分かれることを明らかにした。前者の群では、肉眼型、脈管侵襲、リンパ節転移と強い相関を示す領域が明らかになった。大腸発がん・がん進展機構の解明につながる成果である⁵⁷⁾。

③研究成果に関連した主な成果論文リスト (3 報以内)

- [1] Calin G. A., Trapasso F., Shimizu M., Dumitru C. D., Yendamuri S., Godwin A. K., Ferracin M., Bernardi G., Chatterjee D., Baldassarre G., Rattan S., Alder H., Mabuchi H., Shiraishi T., Hansen L. L., Overgaard J., Herlea V., Mauro F. R., Dighiero G., Movsas B., Rassenti L., Kipps T., Baffa R., Fusco A., Mori M., Russo G., Liu C.-G., Neuberg D., Bullrich F., Negrini M., Croce C. M., Familial cancer associated with a polymorphism

⁵⁷⁾ 大腸癌の発生、進展および治療感受性に関わる因子の解析事後評価報告書(案)概要 <http://www.jst.go.jp/kisoken/crest/eval/jigo/201005/j16-07/j16-04.pdf>

in ARLTS1 (2005) New Engl. J. Med., 352 (16), pp. 1667-1676.

- [2] Yokoe T., Tanaka F., Mimori K., Inoue H., Ohmachi T., Kusunoki M., Mori M., Efficient identification of a novel cancer/testis antigen for immunotherapy using three-step microarray analysis (2008) Cancer Res., 68 (4), pp. 1074-1082.
- [3] Ohmachi T., Inoue H., Mimori K., Tanaka F., Sasaki A., Kanda T., Fujii H., Yanaga K., Mori M., Fatty acid binding protein 6 is overexpressed in colorectal cancer (2006) Clin. Cancer Res., 12 (17), pp. 5090-5095.

(2) 研究領域終了後の継続と発展状況

本研究課題終了後、科研費基盤研究(S)「高精度の分子遺伝学的評価による食道がん治療成績向上のための包括的研究」(2009～2013 年度)、厚生労働科学研究費「固形がん幹細胞を標的とした革新的治療法の開発に関する研究」(2009～2013 年度)、厚生労働科学研究費「リプログラミング技術による消化器がんの新しい診断・治療」(2010～2012 年度)などで研究を続けている。

がんマーカーやがん幹細胞の検出法などに関する特許を中心に、研究期間中には 6 件、終了後には 13 件の特許を出願している。

森はこれらの研究成果が認められ、2007 年九州大学九州大学研究・産学官連携活動表彰、2010 年日本医師会医学賞、2011 年大阪大学大阪大学功績賞、2012 年高松宮妃癌研究基金学術賞、2014 年佐川がん研究振興財団第 11 回佐川特別賞を受けている。

① 科学技術の進歩への貢献

森は本研究課題と並行して消化器がんのがん幹細胞の解明にも取り組んでいる。がんの再発や根治に至らない患者の存在及び白血病で幹細胞の存在が確認されたことを受けて、がんの中で最も多い消化器がんにおいて存在が明らかではなかったがん幹細胞の探索・同定及び治療法開発を目指した研究で、次のような科学技術の進歩に貢献している。

(i) 消化器のがん幹細胞の関与

ヒト大腸がん、肝臓がん自己複製能と多分化能を有するがん幹細胞が存在することを初めて示した。大腸がんでは CD133(+)CD44(+), 肝臓がんでは CD13(+) で現される細胞が腫瘍形成能、多分化能、抗がん剤耐性を示し、がん幹細胞であることを明らかにした^{[1], [2]}。また、大腸がん幹細胞に特徴的に発現する遺伝子を同定した。そのうちの 1 つは T-plastin(PLS3)で、これは細胞の上皮・間葉移行を誘発し、転移・浸潤能を増すことから、がん幹細胞の転移機構に重要である^[3]。もう 1 つは新規分子 PICT1 であり、これは p53 を制御すること、固形がんのがん幹細胞で発現亢進し、予後へ強い影響を与えることを明らかにした^[4]。

さらに、がん幹細胞を治療標的とする方法を探索し、マウスに移植したヒト肝がんは抗がん剤単独より、抗がん剤に CD13 阻害剤を併用することで格段に高い治療効果を示した。これにより CD13(+) がん幹細胞を標的とした新たな治療法確立への道筋を示した^[1]。

さらに、がん幹細胞に iPS 遺伝子を導入するとがん細胞の類正常化が起こることより、がんの新規治療法の 1 つになる可能性を示し、これをがん治療に臨床応用するための iPS 作成技術として miRNA のみによる新規方法を確立した。新しい RNA 医薬品によるがん幹細胞のリプログラミング技術の確立と、そのがん幹細胞の分子制御への応用はがんの冬眠療法にもつながる新規治療法として期待されている⁵⁸⁾。

図 3-14 にがんにおける階層構造を示した。がん幹細胞は自己複製機能と多分化能を持ち、少数の細胞からでも高率に強い造腫瘍性を持つ細胞である。がん組織においても細胞学的・組織学的構築は正常細胞と同様に幹細胞を基盤とした階層構造によって成り立っていると考えられる。がん幹細胞は層構造の基盤になっており、自己複製する一方で、非対称性分裂を行い分化したがん細胞を生み出す。

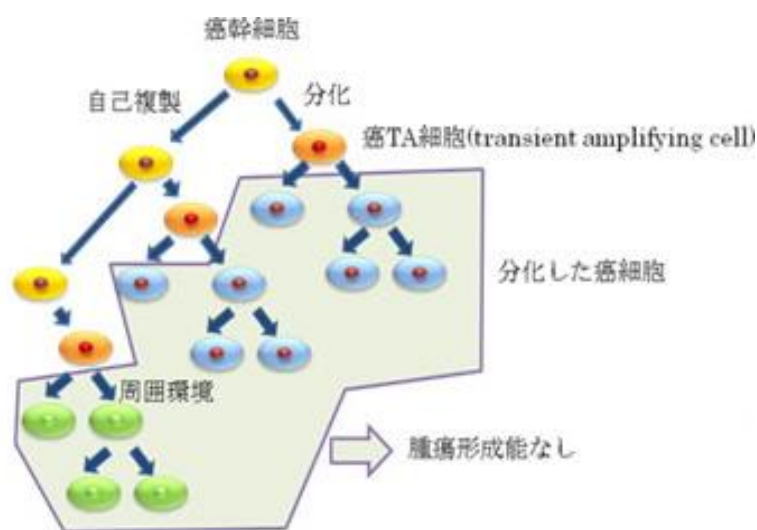


図 3-14 がんにおける階層構造⁵⁹⁾

(ii) 食道がん

難治性で知られる食道がんの治療成績向上のため食道がんの発生、進展および治療感受性に関わる因子を明らかにすべく、科学研究費基盤研究(S)「高精度の分子遺伝学的評価による食道がん治療成績向上のための包括的研究」(2009～2013 年度)を展開している。

食道がんに関連する 3 つの因子(多型(P)、腫瘍発現解析(T)、環境側因子(E))を総合的かつ俯瞰的に明らかにすることを目的として研究を進め、現在、食道がん 70 例のがん部・非がん部を用いて、エキソームシーケンス、発現アレイ、CGH、SNP アレイを実施している⁶⁰⁾。

⁵⁸⁾ Miyoshi N., Ishii H., Nagai K.-I., Hoshino H., Mimori K., Tanaka F., Nagano H., Sekimoto M., Doki Y., Mori M., Defined factors induce reprogramming of gastrointestinal cancer cells, (2010) Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 107(1) pp40-45

⁵⁹⁾ 森正樹研究室ホームページ <http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/gesurg/study/index.html> の図の一部を改変

⁶⁰⁾ 科学研究費助成事業データベース <http://kaken.nii.ac.jp/d/p/21229015.ja.html>

②社会・経済への波及効果

日本の最新がん統計によれば 2012 年 1 位肺がん 5.1 万、2 位胃がん 3.2 万、3 位大腸がん、4 位肝臓がん、5 位すい臓となっている⁶¹⁾。消化器がんにおけるがん幹細胞の存在の確認やそのマーカーの同定、またそれらを利用した治療法の開発は社会や国家経済にとって極めて重要である。

森は本研究課題では大腸がんの発生、進展および治療感受性に関わる因子の解析という極めて基礎的・探索的な研究を行ったが、並行的に進めた「消化器がんのがん幹細胞の解明」においては、がん幹細胞のマーカーの同定やがん幹細胞を治療標的とする方法の探索を行い、抗がん剤として標的細胞に発現している CD13 の阻害剤を併用することで格段に高い治療効果を示した等の成果が得られており、これにより CD13(+)がん幹細胞を標的とした新たなテーラーメイド医療における治療法確立への道筋を示した意義は大きい。

さらに森は 2013 年 9 月 19 日(木)NHK クローズアップ現代において「がん“根治”の時代は来るか～“がん幹細胞”研究最前線～」に出演し、がん幹細胞について解説し、がんの転移や再発にがん幹細胞が強くかかわっており、がん幹細胞をターゲットにした方法を開発する重要性を強調した⁶²⁾。

③上記、継続と発展状況を示す研究成果に関連した主な成果論文リスト(4 報以内)

- [1] Yoshioka, Y., Kosaka, N., Konishi, Y., Ohta, H., Okamoto, H., Sonoda, H., Nonaka, R., Yamamoto, H., Ishii, H., Mori, M., Furuta, K., Nakajima, T., Hayashi, H., Sugisaki, H., Higashimoto, H., Kato, T., Takeshita, F., Ochiya, T., Ultra-sensitive liquid biopsy of circulating extracellular vesicles using ExoScreen (2014) Nat. Commun., 7 (5), pp. 3591.
- [2] Hamabe, A., Konno, M., Tanuma, N., Shima, H., Tsunekuni, K., Kawamoto, K., Nishida, N., Koseki, J., Mimori, K., Gotho, N., Yamamoto, H., Doki, Y., Mori, M., Ishii, H., Role of pyruvate kinase M2 in transcriptional regulation leading to epithelial-mesenchymal transition (2014) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 111 (43), pp. 15526-15531.
- [3] Miyoshi N., Ishii H., Nagano H., Haraguchi N., Dewi D.L., Kano Y., Nishikawa S., Tanemura M., Mimori K., Tanaka F., Saito T., Nishimura J., Takemasa I., Mizushima T., Ikeda M., Yamamoto H., Sekimoto M., Doki Y., Mori M., Reprogramming of mouse and human cells to pluripotency using mature microRNAs (2011) Cell Stem Cell, 8 (6), pp. 633-638.
- [4] Miyoshi N., Ishii H., Nagai K.-I., Hoshino H., Mimori K., Tanaka F., Nagano H., Sekimoto M., Doki Y., Mori M., Defined factors induce reprogramming of gastrointestinal cancer

⁶¹⁾ がん情報サービスホームページ <http://ganjoho.jp/public/statistics/pub/statistics01.html>

⁶²⁾ NHK「クローズアップ現代」ホームページ http://www.nhk.or.jp/gendai/kiroku/detail02_3404_all.html

cells (2010) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 107 (1), pp. 40–45.

- [5] Haraguchi N., Ishii H., Mimori K., Tanaka F., Ohkuma M., Kim H.M., Akita H., Takiuchi D., Hatano H., Nagano H., Barnard G.F., Doki Y., Mori M., CD13 is a therapeutic target in human liver cancer stem cells (2010) *J. Clin. Invest.*, 120 (9), pp. 3326–3339.

第4章 科学技術イノベーションに資する研究成果の状況

4.1 高精度ゲノムアレイの開発と疾患遺伝子の探索（稲澤譲治）

4.1.1 研究の概要

(1) 研究テーマの状況(国内)

本研究領域の開始時の2002年には、今日のように簡単に入手できるゲノムワイドの解析をするためのアレイは市販されておらず、独自の高密度、高精度のアレイの開発はゲノム解析を行うために非常に重要な課題であった。BACアレイは当時、簡単に作成できない状況であったが稲澤らはWGA4500のようなゲノムアレイを開発し、4500クローンの数百kbのDNA自体をPCRにより、無尽蔵に増幅させる独自の方法を確立した。当時は、画期的な方法として注目されていたが、その後、合成オリゴマーが市販されゲノムワイドの遺伝子解析が可能となった。稲澤らのBACアレイはゲノム全体をカバーしているため、遺伝子をコードしてない反復配列なども含めて増幅している点で優れていた。

当時、このBACアレイは密度と精度という意味において国内でトップを走っており、これらの技術を駆使してがん特異的ゲノムを見つけることができるようになった。多数のがん細胞のゲノム解析を行い、50種類近い新規のがん関連遺伝子を見出した。最近では、出生前診断の有力な方法として、特に海外で再び注目されている。本研究課題とそれに続くNEDOプロジェクトで開発されたGDアレイは株式会社ビー・エム・エル社に技術移転され、現在でも使用されている^[1]。

また上記BACアレイに加えて、その応用であるDNAメチル化を検出できるBAMCA法を早期に確立したことは、その後の疾患関連遺伝子同定の成功の基礎となっている。

独自に開発したBAMCA法によりDNAのメチル化異常をゲノムワイドに見つけることができようになり、がん特異的なメチル化を起こしている領域を見つけ、メチル化によりサイレンシングを受けているがん抑制遺伝子の探索などエピゲノム解析に展開した。

BACアレイを用いて多くのCNVの異常を見出したように、DNAメチル化の異常をゲノムワイドに調べると予想以上のメチル化異常が発見された。さらにコードされた部分だけでなくノンコーディング領域へ展開し、miRNAの検討に移った。口腔扁平上皮がんのDNAメチル化により機能を失うmiRNAのスクリーニングを行い、メチル化異常によるサイレンシングを介したがんの増殖を見出した^[2]。その後、肝臓がん^[3]、膵臓がん、食道扁平上皮がんでも異常メチル化によるmiRNAのサイレンシングとがん細胞増殖の関連を見出した^[4]。

さらに、がん細胞における上皮-間葉系移行に着目し、すい臓がん由来の安定株を用いたスクリーニング系を構築し、合成DNAを用いて調べた結果、浸潤性の高い間葉系細胞を抑制するmiR-655を見出し、将来の治療薬開発を示唆する結果を得た。

(2) 海外での共同研究の状況

本年、JSTの戦略的国際科学技術協力推進事業「日本-フィンランド研究交流」の2014年度の研究課題として、稲澤の「ゲノミクス・バイオインフォマティクスを活用した難治性卵巣癌細胞システムの理解と治療候補薬の探索」が採択された。日本は卵巣明細胞腺がんの頻度が高く、フ

インランドとの共同研究により、両者の比較を通して、難治性卵巣がん治療効果の向上とがん個別化治療の確立を目指すものである^[5]。

4.1.2 研究成果の波及と展望

(1) 科学技術への波及と展望

本研究領域で開発された BAC アレイは国内の多くの共同研究を通じたゲノム構造異常の解析に利用され、多数のがん関連遺伝子、および神経疾患関連遺伝子の同定につながった。これらの結果はさらに本研究課題終了後も NEDO プロジェクト等に引き継がれ、国内の多数の研究機関とコンソーシアムをつくり、さらに多くのがん遺伝子の同定が進められた。

一方、BAMCA 法の開発は、当時注目され始めたエピゲノムの分野の新たな展開につながった。すなわち、エピゲノムの重要な課題である DNA のメチル化異常のゲノムワイドな探索に利用され、その結果、健常者を含め、多くの DNA のメチル化異常が存在することを明らかにした。実際、BAC アレイ及び BAMCA 法はその後国立がんセンターの金井らにより使用され、あるいは発展し、肝がん、腎がん等の診断法の開発研究^[63]につながった。

また、これらの研究はオートファジーとがんと関連という新たな展開につながった。BAMCA 法を用いて神経芽細胞 (NB) 特異的な DNA メチル化をスクリーニングし、メチル化により機能を消失する Lysosomal-associated multitransmembrane protein 5a (LAPTM5) を見出した。LAPTM5 の機能活性化による NB 細胞のリソゾーム膜不安定化、すなわちオートファジー機能の損傷を伴う細胞死を引き起こし NB 自然退縮を誘導することを示した。これまで謎とされてきた NB 自然退縮のメカニズムの本態解明に迫る成果といえる^[6]。

また、DNA のメチル化異常と miRNA のがん化との関連を検討し、世界に先駆けてがんにおける過剰メチル化ががんを抑制する miRNA のサイレンシングを引き起こし、がん化を促進している事実を明らかにした。その後、いくつかのがんで同様な作用を示す miRNA を見出した。これらの報告は多数の論文で引用されている。

稲澤はエピゲノムの研究を通じ、がん化は細胞の種類や時期的な違いなどにより遺伝子や miRNA、蛋白質の機能が変化するというこれまでの知見に基づき、がん研究では「細胞文脈 (cellular context)」という新たな仮説を提唱している。すなわち、がんの進展にはドライバー遺伝子のみならず、様々な環境要因が影響しており、個々の患者の状態に応じた治療が必要となる。そのためにはゲノム情報のみならず様々な環境要因を含めた情報を集め、解析していく必要があるとし、新たながん化のメカニズム研究の展開が始められている^[7]。

稲澤は本研究課題終了後も一貫してがん関連遺伝子の研究を発展させ、69 報 (責任論文 30 報) の論文を発表している。

その他、本研究課題で構築した CGH データベースは英語版で公開され、米国 NCI の SKY/CGH データベースより “CGH database Japan” としてリンクし、毎年数千のアクセスがあり、教科書にも記載されている。

⁶³ 国立がんセンターホームページ <http://www.ncc.go.jp/jp/nccri/divisions/01path/01path01.html>

(2) 社会・経済への波及と展望

(i) 創薬への展開

稲澤は、開発した BAC アレイを用いたがん細胞のゲノム構造異常の解析により多くのがん遺伝子の同定に成功した。その後、製薬企業はこれらの遺伝子をターゲットとして抗がん剤のスクリーニングを実施している。その中には第 1 相あるいは第 2 相臨床試験に進んでいるものもあり、その例として、神経芽細胞腫や卵巣明細胞腺がんのがん遺伝子 PPM1D(ホスファターゼ)^[8]や GASC1(ヒストンアセチル化酵素)^[9]などの阻害剤の開発や診断のマーカー開発が挙げられる。

(ii) 全自動染色体異常解析システムの開発

本研究の初期に開発した数種のアレイはさらに実用化を目指した 2006 年度に開始された NEDO プロジェクト「個別化医療の実現のための技術融合バイオ診断技術開発/染色体解析技術受託研究」につながっている。ここでは他の大学や公的機関、企業と組み、3 つの開発項目のひとつである「臨床診断用全自動染色体異常解析システムの開発」を分担した^[1]。ここでは①診断用ゲノムアレイの開発、②診断用全自動染色体異常解析システムの開発という項目で、アレイと装置の開発が行われた。①の診断用ゲノムアレイの開発では GD アレイ (GD-700) による先天異常症ゲノムコピー数異常診断システムを確立し、共同研究先企業で GD-700 の製造及び臨床検査受託に至った。この GD アレイは株式会社ビー・エム・エル社に技術移転された。このアレイは現在も同社でサービスが行われている。

またヒト全ゲノムを網羅する 15,000 種類の BAC プローブを搭載した高精度ゲノムアレイ WG15000 及び自動解析システムを用いたがんの個性診断用にミニアレイ (MCG Cancer Array-Mini) を開発した。

これらのアレイを用いた自動解析装置としては 1) 全国からサンプルを集め、そこで多検体を一挙に解析をする集中型と、2) ディスポーザブルな装置の中ですべての反応を行い、10~20 検体といったターゲットを絞った、分散型自動解析装置の 2 種類の開発を行った。集中型についてはプロトタイプが完成した。また、分散型についても微量検体から同日内に染色体異常を検出できるシステムの開発に成功した。

本研究領域で作成された多数のアレイのさらなる実用化へ向けた研究開発がなされると同時に、それと並行してさらなるゲノム異常やがん遺伝子の同定が行われた。先天異常のある患者は全体の 1-2% であるが染色体異常症など原因が分かっているものはわずかで多くは原因不明である。図 4-1 に示すよう、染色体検査で異常なしの症例の CGH 解析で約 30% に pathogenic CNV が検出された。

ここで開発されたアレイを用いた解析によりかなりの微細染色体異常が検出され、その実用性が示された。図 4-1 に示したように先天異常症の診断により現時点では異常が明確となっていない約 90% は原因不明先天異常患者である。このうちの 30% はこれらアレイ解析により原因が明らかになり、今後先天異常症の対処法への理解が進むと考えられる。

稲澤は本研究期間中に 39 件の特許を出願し、終了後においても 12 件の特許を出願した。多くはがんゲノム等の遺伝子異常とその抑制に関するものであるが、上記 NEDO プロジェクトに関する特許も多い。このことは、研究のさらなる実用化を意識していることの現れといえる。

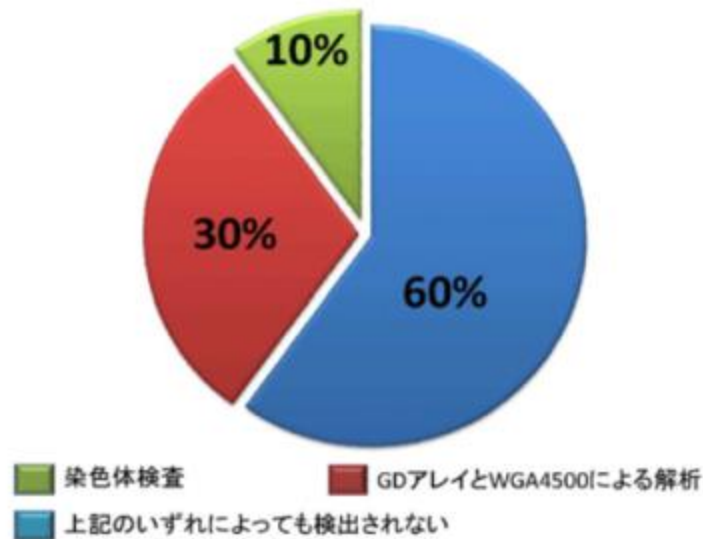


図 4-1 先天異常症の潜在的微細染色体異常解析^[10]

(iii) 疾患バイオリソースセンターの設立

稲澤は、コンソーシアムを組むなど多数の共同研究先から検体を集め、がんゲノム解析を行ってきたが、検体の入手と管理の経験から新たなバイオバンクの必要性を感じ、2012年の文部科学省産学官イノベーション推進研究拠点の形成事業による東京医科歯科大の「疾患バイオリソースセンター」^[11]の設立に尽力した。この施設は大規模なバイオバンク(311 平米)であり、稲澤は現在そのセンター長を務めている。

同バンクでは癌を含む生活習慣病及び難治性疾患に対する画期的診断・治療・予防法の開発と安心・安全な個別化医療の実現を目指して、臨床サンプルとそれに付随する臨床情報及びゲノム情報を一元管理するバイオバンク事業を展開している^[12]。バイオリソースを活用することで基礎生命科学からトランスレーショナル研究、さらに実用化までを視野に入れた一貫性のある産学連携研究を推進すると共に、ゲノム情報に基づく個別化医療に対応する医療人の育成に寄与する基盤施設としての役割を果たすことを目的としている。ここでは図 4-2 に示したとおり、医・歯学部と連携し、血液及び手術患者から同意のもとに集められた検体を保管し、ゲノム情報を利用した個別化医療に向けた研究に利用している。この疾患バイオリソースセンターのシステムは日本医療研究開発機構(AMED)のバイオバンクジャパンの中で展開されるがん病理組織のバンキングのプロトタイプにもなっているとのことである。

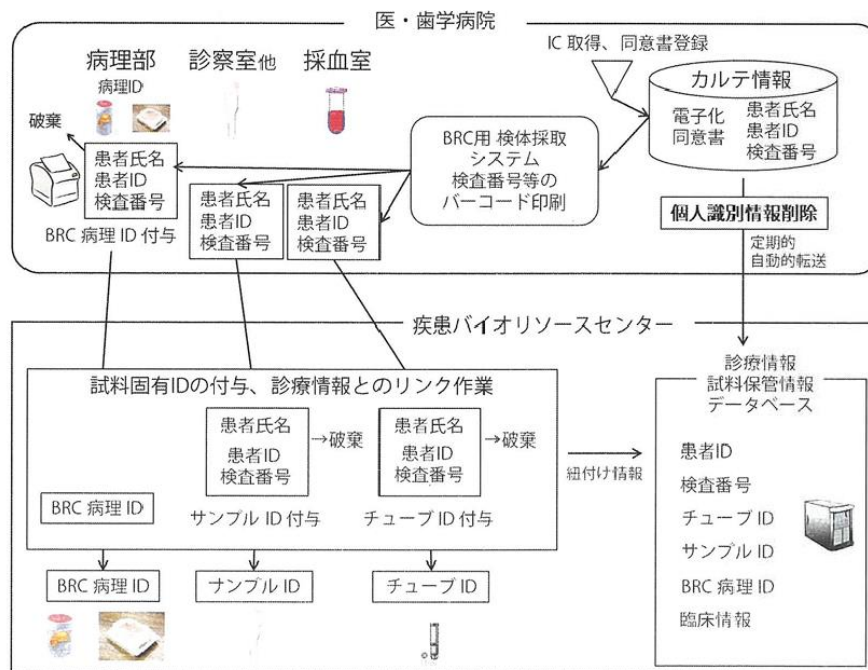


図 4-2 東京医科歯科大「疾患バイオリソースセンター」の臨床資料・診療情報の流れ^[12]

(iv) 人材の育成

稲澤研究室ではこの 10 年間のゲノム解析の過程で、国立大学医学部教授 2 名（徳島大学、岡山大学）、千葉県立がんセンター研究所部長 1 名、また、米国でラボを構えた研究者など多数の人材を輩出しており、人材の育成という点でも科学や社会に対し大きく貢献している。

引用文献

- [1] NEDO平成 19 年度－平成 23 年度成果報告書 「染色体解析技術開発 臨床診断用全自動染色体異常解析システムに対応したゲノムアレイの開発」（国立大学法人東京医科歯科大学）
http://www.nedo.go.jp/library/seika/shosai_201408/20120000000671.html
- [2] Kozaki K. -I., Imoto I., Mogi S., Omura K., Inazawa J., Exploration of tumor-suppressive microRNAs silenced by DNA hypermethylation in oral cancer (2008), Cancer Res. 68(7), pp. 2094-2105.
- [3] Furuta M., Kozaki K. -I., Tanaka S., Ariei S., Imoto I., Inazawa J., miR-124 and miR-203 are epigenetically silenced tumor-suppressive microRNAs in hepatocellular carcinoma (2010), Carcinogenesis 31(5), pp. 766-776.
- [4] Harazono Y., Muramatsu T., Endo H., Uzawa N., Kawano T., Harada K., Inazawa J., Kozaki K. -I., miR-655 Is an EMT-Suppressive MicroRNA Targeting ZEB1 and TGFBR2 (2013), PLoS ONE 8(5), e62757

- [5] 科学技術振興機構報 第 1019 号 戦略的国際科学技術協力推進事業「日本－フィンランド
研究交流」における平成 26 年度新規課題の決定について <http://www.jst.go.jp/pr/info/info1019/>

- [6] Inoue J., Misawa A., Tanaka Y., Ichinose S., Sugino Y., Hosoi H., Sugimoto T., Imoto
I., Inazawa J., Lysosomal-associated protein multispinning transmembrane 5 gene
(LAPTM5) is associated with spontaneous regression of neuroblastomas (2009) PLoS ONE,
4 (9), pp. e7099.

- [7] 日経バイオテク 10 月 27 日号「キーパーソンインタビュー」
<https://bio.nikkeibp.co.jp/article/news/20141030/179906/>

- [8] Loukopoulos P., Shibata T., Katoh H., Kokubu A., Sakamoto M., Yamazaki K., Kosuge T.,
Kanai Y., Hosoda F., Imoto I., Ohki M., Inazawa J., Hirohashi S., Genome-wide
array-based comparative genomic hybridization analysis of pancreatic adenocarcinoma:
Identification of genetic indicators that predict patient outcome (2007) Cancer Sci.,
98 (3), pp. 392-400.

- [9] Yang Z.-Q., Imoto I., Fukuda Y., Pimkhaokham A., Shimada Y., Imamura M., Sugano S.,
Nakamura Y., Inazawa J., Identification of a novel gene, GASC1, within an amplicon
at 9p23-24 frequently detected in esophageal cancer cell lines (2000) Cancer Res.,
60 (17), pp. 4735-4739.

- [10] Holowatyj A., Yang Z.-Q., The role of histone demethylase GASC1 in cancer and its
therapeutic potential (2013) Scopus, 9 (1), pp. 78-85.

- [11] Science Portal China ホームページ [http://www.spc.jst.go.jp/hottopics/1006genome
e_biofunctional_analysis/r1006_inazawa.html](http://www.spc.jst.go.jp/hottopics/1006genome_biofunctional_analysis/r1006_inazawa.html)

- [12] 「東京医科歯科大 疾患バイオリソースセンター」紹介パンフレット及びホームページ
<http://www.tmd.ac.jp/brc/index.html>

4.2 遺伝子発現調節機構の包括的解析による疾病の個性判断（間野博行）

4.2.1 研究の概要

(1) 研究テーマの状況(国内)

本研究領域において間野らは「レトロウイルスを用いたがん遺伝子スクリーニング法」を開発し、微量の細胞から再現性良く数百万種類の完全長 cDNA を得て機能スクリーニングを行うことを可能にした。この技術を用いて 2007 年には肺がんの新規原因遺伝子 EML4-ALK が発見され、さらに肺がんの一部で 2 番染色体内の微小な転座が生じた結果、EML4-ALK 融合遺伝子が生じることを発見した^[1]。図 4-3 に示したように、ヒト 2 番染色体上には EML4 遺伝子(緑色矢印)と ALK 遺伝子(赤色矢印)が互いに反対向きに存在している。両遺伝子を含む領域が肺がんの一部の症例において逆位を形成することにより EML4-ALK 融合遺伝子が産生される。ALK は受容体型チロシンキナーゼであるが、その酵素領域が EML4 と融合することで酵素活性が上昇し、強力ながん化能を獲得した EML4-ALK キナーゼになる(a)。さらにヒト EML4-ALK キナーゼを肺特異的に産生する遺伝子改変マウスを作製し、このマウスは肺腺がんを多発すること、またそのようなマウスに ALK 阻害剤を投与すると肺がんが消失する(b)ことも報告した^[2]。

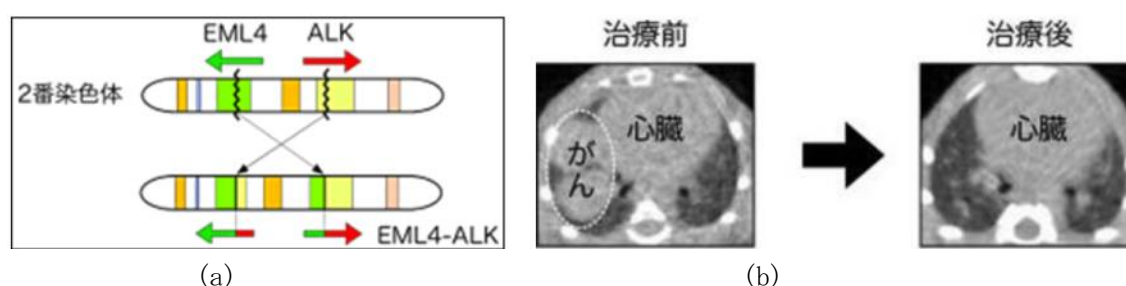


図 4-3 EML4-ALK 誘導遺伝子マウスの ALK 阻害剤による肺がん治療^[3]

また、間野らは PCR 法による ALK 肺がんの診断法を世界に先駆けて開発し、ALK 肺がんの臨床的特徴を明らかにした^[4]。他の肺がん症例で同様な EML4-ALK 遺伝子が存在するか否かを PCR で調べたところ、75 例中 5 例(6.7%)で EML4-ALK 遺伝子が確認された。EML4 と ALK 遺伝子は正常染色体上では逆向きに存在するため、両遺伝子上に置いたプライマーによる PCR では、本来は全くバンドが増幅されない。このことより、EML4-ALK を標的として PCR を利用した肺がんの高感度診断が可能であると考え、EML4-ALK 発現細胞を喀痰に様々な濃度で混和し、PCR 反応により EML4-ALK 遺伝子を検出するためのモデル実験を行った。1mL 中わずか 10 個の陽性細胞が存在する状態でも検出可能なことが分かった。2008 年にマルチプレックス RT-PCR 法、FISH 法を、2009 年に高感度免疫染色法 iAEP 法を世界に先駆けて開発し、ALK 肺がんの診断法として確立するとともに、腎がんなど肺がん以外の様々ながんにも ALK 融合キナーゼを持つ一群があることを証明し、ALK 阻害剤が、それらのがんに対して有効な治療薬となる可能性を示した。

さらに、ALK 肺がんの薬剤治療において平均で 10 か月から 11 か月で耐性細胞が生じたが、その耐性機構が ALK のアミノ酸変異であることを速やかに解明し^[5]、第 2 世代の ALK 阻害剤の開発への道を開いた。

戦略的創造研究推進事業 研究加速課題「新規がん遺伝子同定プロジェクト」(2009年1月～2014年3月)において、間野は病理形態学的手法が他の新しい融合遺伝子の探索に対しても有効と考え、EML4-ALK のような融合型チロシンキナーゼを新たに肺がんで探索するプロジェクトを開始した。2012年 EML4-ALK 遺伝子の研究過程で得たノウハウを生かした病理形態学を応用したユニークな方法で、ALK 融合キナーゼとは別の2種類のRET 融合キナーゼ遺伝子、4種類のROS1 融合キナーゼ遺伝子を、肺がんにおいて世界で初めて発見した^[6]。

具体的には、1,500例のホルマリン固定・パラフィン包埋の肺がん検体を使い、さまざまなキナーゼ遺伝子の再構成の有無をスプリット FISH 法という手法で大規模にスクリーニングした。その結果13例のROS1 融合キナーゼ陽性例を認め、しかも、その中から新たに4つのROS1 融合遺伝子を発見することに成功した。また間野が以前に発見していた KIF5B-ALK 融合キナーゼについて ALK 以外のキナーゼとも融合している可能性を探索して、KIF5B が別のチロシンキナーゼであるRET 遺伝子と融合していることを発見した。

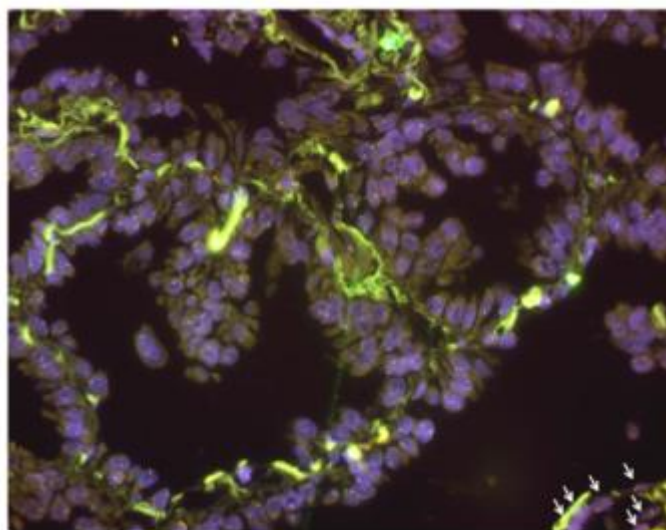


図 4-4 RET 肺がんにおける RET スプリット FISH 法⁶⁴⁾

図 4-4 に示したように RET 遺伝子の上流と下流を赤と緑で染色し、4 μ m に薄切した病理組織切片上で可視化している。細胞の核は青で染色されている。右下に見える正常の肺の細胞(矢印)においては赤と緑が重なり黄色に見える。これは RET 遺伝子が分断していない(転座していない)ことを示している。一方、がん細胞では黄色のシグナルのほかに赤と緑のシグナルが見られ、RET 遺伝子が分断している(転座している)ことが明らかである。同手法による肺腺がん(1100 例)の解析結果を統計学的に検討した結果、RET、ROS1 または ALK いずれかの融合キナーゼを持つ肺がんは、若年者、非喫煙者または軽度喫煙者に多く、予後が比較的良いという特徴があることも明らかになっている。

間野らはマウスの細胞を用い、これら全ての融合キナーゼのがん化性を証明した。また発見された KIF5B-RET 融合キナーゼのがん化能を、米国で甲状腺髄様がん治療薬として承認された RET

⁶⁴⁾ 独立行政法人科学技術振興機構法 (JST) ホームページ
<http://www.jst.go.jp/pr/announce/20120213/index.html>

阻害剤バンデタニブ(vendetanib、一般名)を用いて、抑えることに成功した^{[6], [7]}。

図 4-5 に示したように EML4-ALK および KIF5B-RET をマウス BA/F3 細胞に導入し増殖させる実験で、RET 阻害剤であるバンデタニブを添加しても EML4-ALK は増殖するが、KIF5B-RET は添加量に依存し速やかな細胞死が誘導された。

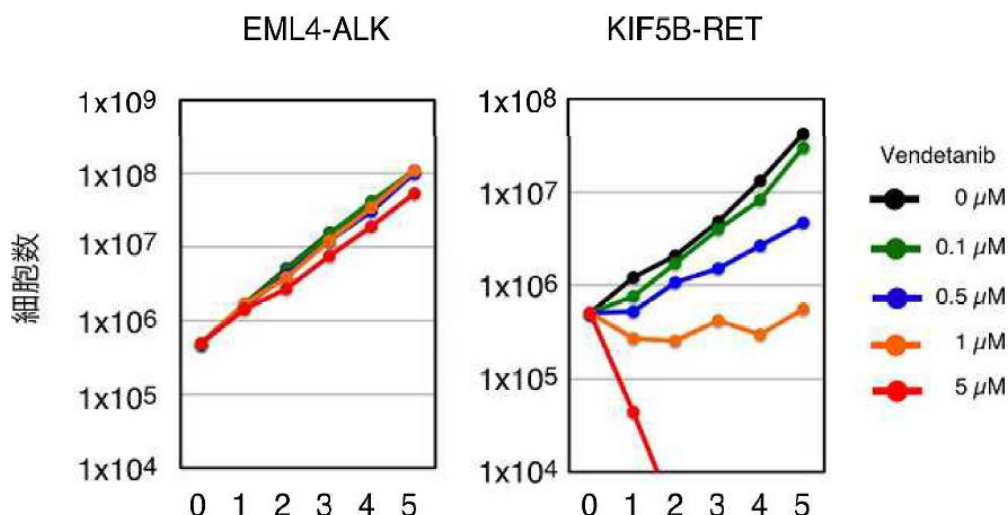


図 4-5 KIF5B-RET 陽性細胞に対する治療実験の成功^[7]

この他、肺がん以外の固形腫瘍においても、ALK 融合キナーゼ遺伝子が見つかり、同遺伝子を持つ患者は、がんの発生臓器によらず、同じ分子標的治療薬で救われる可能性が高い^[3]。同様に、RET、ROS1 融合キナーゼ遺伝子についても、他の臓器で使用が認められている治療薬の適応拡大、あるいは新たなキナーゼ阻害剤の開発により、治療可能な患者の増加が期待できる^[6]。

RET 融合キナーゼでは、マウスにおいて、米国で甲状腺髄様がん治療薬として承認されたバンデタニブ(一般名)を用いて、がん化能を抑えることに成功した^{[6], [7]}。

同研究加速プロジェクトにおいて、間野は発がん能力を持つ遺伝子を同定する機能評価法と高精度次世代 DNA シーケンサーを用いた遺伝子変異スクリーニング法を開発し、それらの組み合わせから、ヒトのがん細胞の中で「発がん機能」と「塩基配列異常」を持つ遺伝子があるか否かを解析した。その結果、ヒト線維肉腫細胞株から低分子量 G たんぱく質の 1 つである、RAC1 を発現する RAC1 遺伝子の突然変異を発見した。

具体的には、RAC1 たんぱく質の 92 番目のアミノ酸であるアスパラギンがイソロイシンに置換される変異である。この RAC1 遺伝子の抑制により、ヒト線維肉腫細胞が細胞死を起こすことから、RAC1 遺伝子変異の有無がヒト線維肉腫細胞株の本質的な発がん原因であることが分かった。また、他のヒトがんにおいても、RAC 遺伝子ファミリーの変異の有無を調べ、乳がんや悪性黒色腫など 5 種類のがんで変異があることも明らかにした。RAC1 ががん化能を持つことが明らかにしたのは世界で最初である^[12]。

(2) 海外での共同研究の状況

主な海外研究機関の研究者との共著論文は、期間中に 2 報、研究終了後には 2 報あった。

期間中の論文は University Medical Center Utrecht とのマイクロ RNA 関係^[8]及びメリーランド

大学との T 細胞白血病のゲノム解析の論文^[9]、研究終了後は Duke-National University of Singapore とのチロシンキナーゼ阻害剤関係^[10]、及び Vrije Universiteit Brussel との Tec キナーゼ関係の論文^[11]である。

共同研究ではないがファイザー製薬がこの発見を元に抗がん剤「クリゾチニブ」を開発し、22 ヶ国で臨床試験が行われた。国内では 2012 年 3 月申請から 1 年という異例の速さで国から製造・販売が承認された。間野らの論文において、クリゾチニブが ALK にも強い阻害活性を持っていることからファイザー社は 2008 年に新たな臨床試験を開始した。その後 2011 年の米国上市に至った。2012 年の米国臨床腫瘍学会 (ASCO) 総会において第 I / II 相試験結果はプレナリー発表として、完全寛解を含む奏効率 87%という目覚ましいものであったと報告された。なお、このクリゾチニブの対象である「EML4- ALK 融合遺伝子」陽性の進行性非小細胞肺がんの患者の選択に用いる診断薬キットは 2012 年にアボットジャパンが承認を取得し販売している。

4.2.2 研究成果の波及と展望

(1) 科学技術への波及と展望

病気にかかわる遺伝子の発見にはゲノム全域の遺伝情報を比較・分析する手法が主流となりつつある。しかし間野は、がん細胞の遺伝子をスクリーニングするという効率的な手法を 3 年間かけて開発した。この手法により新しい肺がん遺伝子 EML4-ALK を見出し、その発生機構は染色体の転座によるものであることを示した。これまで染色体の転座によるがんは血液細胞でのみ見つけていたが、肺がんという固形がんでも同じ機構でがん遺伝子 EML4-ALK が発生することを世界で初めて明らかにした。さらに、モデルマウスの実験によって EML4-ALK 遺伝子が肺がんの原因遺伝子であること、また酵素 ALK 阻害剤の投与によりがん細胞を死滅させることができることを明らかにした。

一方、診断への応用という観点から RT-PCR 法、FISH 法、及び高感度免疫染色法を世界に先駆けて開発し、ALK 肺がんの診断法を確立した。また、ALK 阻害剤クリゾチニブに対する耐性が発生するに及んで、速やかにその耐性が AKL 内のアミノ酸変異に基づくことを解明し、第 2 世代の ALK 阻害剤開発が進められ、既に 2 剤が認可されている。

2012 年研究加速プロジェクトにおいて、EML4-ALK 遺伝子の研究過程で得たノウハウを生かした病理形態学を応用したユニークな方法で、ALK 融合キナーゼとは別の 2 種類の RET 融合キナーゼ遺伝子、4 種類の ROS1 融合キナーゼ遺伝子を肺がんにおいて世界で初めて発見した^[6]。

さらに間野は機能スクリーニング法に次世代 DNA シーケンサーを使った高精度な遺伝子配列の変異解析を組み合わせた手法を開発した。1 つのがん検体を遺伝子配列の変異解析と機能スクリーニング法の 2 つの手法で解析することで、がんを起こす能力がある遺伝子を読み取り、エラーを少なくしより効率よく選び出すことができるようになった。そして 2013 年 2 月にはこの方法から新しい“横綱がん遺伝子” RAC を発見した。RAC 遺伝子は変異を起こすことによって、乳がんや悪性黒色腫、慢性骨髄性白血病などの強力な原因遺伝子となっている可能性が示された^{[12], [13]} (図 4-6 及び図 4-7)。

図4-6では(A)次世代DNAシーケンサーを用いた遺伝子変異スクリーニングと機能アッセイの両者を行い、どちらも陽性遺伝子として NRAS (Q61K) 変異と RAC1 (N92I) 変異を発見した。

(B) 正常マウス 3T3 線維芽細胞株(コントロール)あるいは野生型 RAC1 導入 3T3 を寒天中で培養しても足場非依存性増殖は認められないが、NRAS (Q61K) 導入細胞および RAC1 (N92I) 導入細胞はいずれも明瞭に足場非依存性増殖が確認される。また遺伝子発現ウィルスが同時に GFP たんぱく質を発現するため、蛍光顕微鏡を用いて遺伝子導入細胞を確認することができる。

図4-7では、(A) 遺伝子特異的な siRNA を導入すると、特定の遺伝子の発現を抑制できる。ヒト線維肉腫細胞株 HT1080 に対してコントロール siRNA を導入しても細胞増殖は抑制されないが、RAC1 に対する siRNA 導入によって細胞死が誘導された。NRAS に対する siRNA 導入は軽微な影響しかなく、RAC1 と NRAS 両者に対する siRNA 導入によっても RAC1 に対する siRNA 単独導入時と差は認められない。

(B) HT1080 細胞に RAC1 に対する siRNA を導入すると細胞死が誘導され、そこにさらに野生型 RAC1 を発現させても細胞増殖は抑制されたままだが、RAC1 (N92I) を発現させると細胞増殖が回復する。

(C) HT1080 細胞培養液に RAC1 活性阻害薬を添加すると、濃度依存的に細胞死が誘導された。

このように、現在、肺がんでは、がんの種類に合った適切な阻害剤が有効である EGFR 肺がんや ALK 肺がんなどが見つかってきている。また ALK 耐性肺がんの出現に対しては、薬が承認される前に耐性原因を明らかにできたため、製薬企業は世界中で耐性を克服できる薬の開発を行ったため極めて迅速に耐性がんにも効く薬剤を開発できた。第2世代の阻害剤は、奏効率は94%と顕著で、使用後27か月観察しても耐性は発生していない。第2世代の阻害剤は現在2種類が認可され、6種類が治験の段階にある。ALK 融合キナーゼに続いて発見された2種類の RET 融合キナーゼ遺伝子、4種類の ROS1 融合キナーゼ遺伝子についてもこれらのがん遺伝子陽性細胞がキナーゼ阻害剤によって死に至ることを確認している。ALK 肺がんの場合と同様に、これら遺伝子を持つ肺がん患者に全く新しい、しかも極めて有効な分子標的療法が速やかにもたらされると期待される。

現在、米国を中心とするがんのゲノム解析による遺伝子探索では、多数の臨床検体を使い多数の次世代シーケンサーを駆使した物量作戦で解析を行い、関連遺伝子をスクリーニングする方

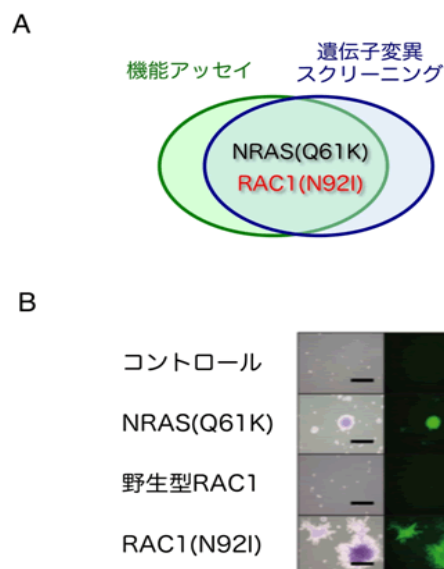


図4-6 RAC1 がん遺伝子の発見 [12]

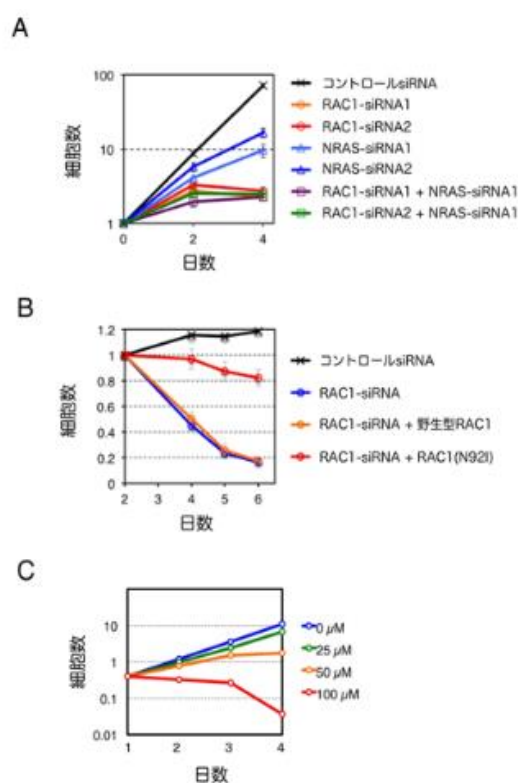


図4-7 RAC1 がん遺伝子は新しい治療標的 [12]

向で進んでいる。一方、間野はがん遺伝子の探索に当たって、次世代シーケンサーによるシーケンス情報とがん遺伝子の機能スクリーニングを組み合わせることで効率的なスクリーニングを行ない、新規な遺伝子を次々と発見している。間野は投入できる資源に限りがある日本においては、このようにスクリーニングに当たって新しい手法や考え方が勝利の鍵になると考えている。

(2) 社会・経済への波及と展望

EML4-ALK 遺伝子の発見と ALK 阻害剤の抗がん効果及び ALK 肺がんの診断法の開発の成果を受けて、実際の肺がん患者に投与する ALK 阻害剤の開発が多くの製薬会社で行われ、そのうちの1つ(クリゾチニブ)はすでに ALK 肺がんに対する目覚ましい治療効果が報告され、2011 年 8 月に米国で承認されて米国大手製薬企業ファイザーより肺がん治療薬クリゾチニブ(商品名「ザーコリ」)として販売が開始された。本薬剤は肺がん全体の治験ではなく、EML4-ALK 系遺伝子を持っている患者だけをエンタリーすることで少数の人数で有効性が早く明らかになった。また有効性が顕著に現れたので、通常行われる第3相臨床試験を行わずに承認された。2007 年の本研究チームの遺伝子発見からわずか4年で治療薬として販売されたことは、世界のがん治療薬開発史上最速のスピードと言える。

現在8種類の第2世代の EML4-ALK 阻害剤が臨床試験に入り、2剤は承認販売されている。中外製薬の「アレクチニブ」は日本で、ノバルティスの「セリチニブ」は米国で承認販売されている。「アレクチニブ」の奏効率は94%で、世界で最もよく効く抗がん剤である。

EML4-ALK 肺がんの診断方法の開発は共同研究者であるがん研究所の竹内賢悟が免疫染色法で診断キットに取り組み、一方、間野のグループでは PCR 法で EML4-ALK の診断システムを開発し、ともに実用化されている。免疫染色の高感度 ALK IHC (Immunohistochemistry) キットは株式会社ニチレイから販売され、検査サービスは株式会社エスアールエルや株式会社 LSI メディエンスとアボットジャパン株式会社が行っている。PCR 法も上記3社が扱っている。

EML4-ALK 遺伝子の発見と ALK 阻害剤の開発の成功は、科学技術イノベーションの創出に繋がった研究成果として大きなインパクトをもたらした。なぜならば、肺がんは、日本やアメリカなどの先進国におけるがん死因の第1位を占める疾患であり、がんの部位別に見た死亡数の推移を見ても、ほかの部位に比べて急速な伸びを示している。

肺がんの約8割が非小細胞肺がんが発症数は年間約37万件。その内、間野が発見した肺がん遺伝子による死亡者数は全世界で5~7万人/年と推定される⁶⁵⁾。

本肺がん遺伝子 EML4-ALK を原因遺伝子とするものは、肺がんの中では約5%で、若い世代に多く、肺がんのなかでも特に進行が早く、短期間で死に至るとされている⁶⁶⁾。クリゾチニブ(商品名「ザーコリ」)は非小細胞肺がんの EML4-ALK という遺伝子の機能を抑え、がんの増殖を抑える経口薬で、各国で上市され日本でも2012年3月に承認されており、患者の命を救う画期的な薬剤であると言える。

⁶⁵⁾ 産学連携ジャーナル 2013 年 1 月号

https://sangakukan.jp/journal/journal_contents/2013/01/articles/1301-02-1/1301-02-1_article.html

⁶⁶⁾ JST ホームページ <http://www.jst.go.jp/pr/jst-news/2008/2009-02/page06.html>

因みに、ザーコリの2013年の売上げ\$282million (WW) (Pfizer_Financial Report 2013 より)。
また国内の2012年における抗がん剤市場は7700億円であった。(富士経済プレスリリース)

引用文献

- [1] Soda M., Choi Y.L., Enomoto M., Takada S., Yamashita Y., Ishikawa S., Fujiwara S.-I., Watanabe H., Kurashina K., Hatanaka H., Bando M., Ohno S., Ishikawa Y., Aburatani H., Niki T., Sohara Y., Sugiyama Y., Mano H., Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer (2007) *Nature*, 448 (7153), pp. 561-566.
- [2] Soda M., Takada S., Takeuchi K., Young L.C., Enomoto M., Ueno T., Haruta H., Hamada T., Yamashita Y., Ishikawa Y., Sugiyama Y., Mano H., A mouse model for EML4-ALK-positive lung cancer (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 105 (50), pp. 19893-19897.
- [3] 国立研究開発法人科学技術振興機構法(JST)ホームページ <http://www.jst.go.jp/seika/01/seika18.html>
- [4] Soda M., Isobe K., Inoue A., Maemondo M., Oizumi S., Fujita Y., Gemma A., Yamashita Y., Ueno T., Takeuchi K., Choi Y.L., Miyazawa H., Tanaka T., Hagiwara K., Mano H., A prospective PCR-based screening for the EML4-ALK oncogene in non-small cell lung cancer (2012) *Clin. Cancer Res.*, 18 (20), pp. 5682-5689.
- [5] Choi Y.L., Soda M., Yamashita Y., Ueno T., Takashima J., Nakajima T., Yatabe Y., Takeuchi K., Hamada T., Haruta H., Ishikawa Y., Kimura H., Mitsudomi T., Tanio Y., Mano H., EML4-ALK mutations in lung cancer that confer resistance to ALK inhibitors (2010) *New Engl. J. Med.*, 363 (18), pp. 1734-1739.
- [6] Takeuchi K., Soda M., Togashi Y., Suzuki R., Sakata S., Hatano S., Asaka R., Hamanaka W., Ninomiya H., Uehara H., Lim Choi Y., Satoh Y., Okumura S., Nakagawa K., Mano H., Ishikawa Y., RET, ROS1 and ALK fusions in lung cancer (2012) *Nat. Med.*, 18 (3), pp. 378-381.
- [7] 公益財団法人がん研究所ホームページ http://www.jfcr.or.jp/up_pdf/20120213172126_1.pdf
- [8] Berezikov E., Mano H., et al., Many novel mammalian microRNA candidates identified by extensive cloning and RAKE analysis, *Genome Research* (2006) 16(10) pp1289-1298.

- [9] Choi Y.L., Tsukasaki K., O'Neill M.C., et al., A genomic analysis of adult T-cell leukemia, *Oncogene* (2007) 26(8) pp1245-1255.
- [10] Ng K.P., Mano H., et al., A common BIM deletion polymorphism mediates intrinsic resistance and inferior responses to tyrosine kinase inhibitors in cancer, *Nature Medicine*(2012)18(4)pp 521-528.
- [11] Himpe E., Mano H., et al., Tec kinase stimulates cell survival in transfected Hek293T cells and is regulated by the anti-apoptotic growth factor IGF-I in human neutrophils, *Cellular Signalling* (2013) 25(3) pp 666-673.
- [12] 国立研究開発法人科学技術振興機構法(JST)ホームページ
<http://www.jst.go.jp/pr/info/info933/index.html>
- [13] Kawazu M., Ueno T., Kontani K., Ogita Y., Ando M., Fukumura K., Yamato A., Soda M., Takeuchi K., Miki Y., Yamaguchi H., Yasuda T., Naoe T., Yamashita Y., Katada T., Choi Y.L., Mano H., Transforming mutations of RAC guanosine triphosphatases in human cancers (2013) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110 (8) pp.3029-3034

4.3 染色体および RNA の機能変化からの疾患の系統的解析（油谷浩幸）

4.3.1 研究の概要

(1) 研究テーマの状況(国内)

本研究課題期間中には、1) 染色体変異の解析技術開発(ヒトゲノムコピー数解析及び、腫瘍組織における染色体変異)、2) アレル間遺伝子発現量の多様性解析、3) RNA 変異の系統的解析技術開発の研究課題を掲げて研究を実施した。この中で特に注目すべき研究成果はヒトゲノムコピー数(CNV)解析についてであり、合成オリゴヌクレオチドを使ったマイクロアレイの開発をコンセプトとして世界で最初に打ち出した。それまではBACアレイがCGH法では使われており、合成オリゴヌクレオチドでは難しいと思われていたが、当時の国際ゲノムプロジェクトであるHapMapプロジェクトにおいてはSNP解析に際し、その簡便性が評価され、BACアレイと並行して用いられ、Sangerセンター、Toronto 子供病院、Harvard 大学、Affymetrix 社らとの国際コンソーシアムの下で、ヒトゲノム CNV のゲノムワイドなマップを作成した^[1]。

本研究領域終了後は、1) 肝細胞分化におけるエピゲノム修飾制御に関する研究、2) がんにおける転写制御変異の統合的解析、3) 統合的ゲノム解析によるがん細胞集団進化の解明、4) 創薬のためのエピゲノム情報の網羅的解析とエピゲノム解析技術開発、5) NEDO プロジェクト「後天的ゲノム修飾のメカニズムを活用した創薬基盤技術開発」^[2]等の研究課題を推進しているが、その中心はがんゲノムの解析、エピゲノム関連の解析技術の開発とその創薬への利用である。

油谷がエピゲノム関連研究を始めた理由は、①本研究課題である染色体の多様性や RNA の多様性の解決のため、②国際がんゲノムコンソーシアムでの肝臓がん全ゲノム解読解析の研究で明らかになったがんのゲノムの遺伝子変異のパターンを明らかにする必要があること、③本研究領域と同時並行で走っていた「ゲノムネットワークプロジェクト」(2004 年開始)における「Chip on Chip」の研究が進展したことなどである。

本研究課題で購入した次世代シーケンサーを活用して、上記研究課題を中心として、がんゲノムの解析及びエピゲノムの研究へと展開することとなった。NEDO プロジェクト「後天的ゲノム修飾のメカニズムを活用した創薬基盤技術開発」においては、そのプロジェクトリーダーとして、後天的ゲノム修飾を網羅的かつ高精度に解析する基盤技術を確立するとともに、疾患特異的な後天的ゲノム修飾を引き起こす因子(酵素等の蛋白質)を同定し、治療標的としての妥当性を検証する。

上記研究課題とは別に油谷は共同研究として以下のような研究課題に取り組んでいる。

- ・研究課題「がんにおけるエピゲノム修飾制御に関する研究」では「C 型肝炎ウイルス陽性肝臓がん症例の全ゲノム解読」を独立行政法人医薬基盤研究所「保健医療分野における基礎研究推進事業」の支援のもとに国立がん研究センターと共同で、最新型高速シーケンサーを用いて行い、その研究成果に関する論文が英国科学誌『Nature Genetics』に掲載された。これは肝臓がんの全ゲノム解析としては世界で初めてのものであり、国際がんゲノムコンソーシアムの中では英国の乳がんの解析に次ぐ 2 番目の報告である^[3]。
- ・第 3 次対がん総合戦略研究推進事業「国際協調に基づく日本人難治がんゲノムデータベースの構築」(国際がんゲノムコンソーシアム)において国立がん研究センター研究所と共同で「日

本人症例を中心とした大規模な肝細胞がんゲノムの解読」を行い、約 70%症例でみられる高頻度の遺伝子異常を発見、日本人に特徴的な発がん要因の存在も初めて確認した^[4]。この研究は、これまでで最大の肝細胞がんゲノム解析であり、重要なゲノム異常を最も高精度に同定したもので、今後、日本人における肝細胞がんの治療開発推進に重要な貢献をするものと考えられる。

- ・科研費 新学術領域研究「システムの統合理解に基づくがんの先端的診断、治療、予防法の開発」、文部科学省の産学官連携プログラムである先端融合領域イノベーション創出拠点の形成プログラム「システム疾患生命科学による先端医療技術開発」等の支援のもとで、難治性がんであるスキルス胃がん(びまん性胃がん)のゲノムシーケンシングを行い新規創薬の標的候補となる RHOA 遺伝子の活性化変異を同定した^{[5], [6]}。びまん性胃がん(Diffuse-type Gastric Carcinoma)は胃がんの主要なサブタイプの 1 つであり、低分化胃がん、スキルス胃がんとも呼ばれることがある極めて悪性度の高い難治がんである。日本人のびまん性胃がん症例のエクソーム解析によって高頻度な RHOA 遺伝子変異を同定した。RHOA 遺伝子は細胞運動・増殖制御に関わる遺伝子で、ここで見つかった RHOA 変異は、解析の結果、がん化のドライバーとなる活性化変異であることが分かった。

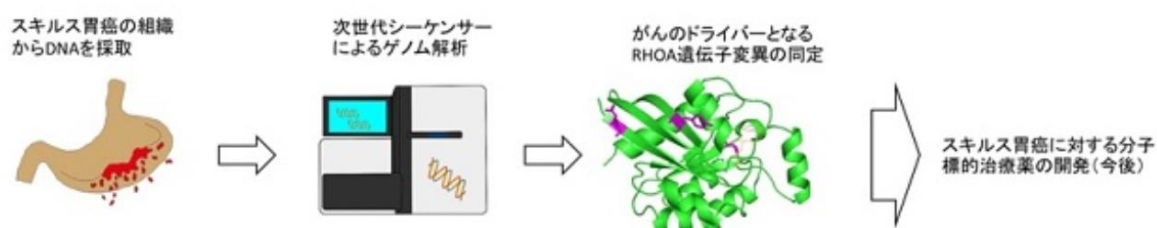


図 4-8 スキルス胃がんのゲノムシーケンシングによる治療標的候補の同定^[6]

スキルス胃がん組織からゲノム DNA を取り出し、次世代シーケンサーを用いてゲノム中の全エクソーム解析を行った結果、スキルス胃がん症例の約 1/4 (87 症例中 22 症例 : 25.3%) に RHOA 遺伝子の体細胞変異が存在することがわかった。スキルス胃がん症例で見つかった体細胞変異は RHOA 分子の特定の部位に集中している (図 タンパク構造の紫色のアミノ酸)。

この変異した RHOA 遺伝子の機能を阻害することによりがん細胞の増殖が大きく低下することも確認された。

(2) 海外での共同研究の状況

国際 HapMap プロジェクトは、人類における遺伝的多型パターンを明らかにするために多国間の国際協力として計画されたものである。この成果は世界中の多くの研究者に利用され、我々の健康維持や病気、あるいは、薬剤に対する効果や副作用に関係する遺伝子やそれらに影響を及ぼす環境要因の解明などに寄与すると考えられている。油谷らの合成オリゴヌクレオチドマイクロアレイによるヒトゲノムの SNP (CNV) 解析法は、国際 HapMap プロジェクトにおいて CGH を BAC アレイで調べようとしていたイギリス・サンガーセンターのメンバーの注目するところとなり、プロジェクトでは両者を比較しつつ解析を進め、最終的には、両者の連名で成果が Nature 誌に掲載された^[1]。

また国立がん研究センターと東京大学油谷らの研究グループは、米国ペイラー医科大学と共同で日本人を中心とする肝細胞がん症例 608 例のゲノム解読を行い、2014 年には新たな治療標的遺伝子候補の同定、また日本人に特徴的な発がん要因の存在の推定に成功した^[4]。

4.3.2 研究成果の波及と展望

(1) 科学技術への波及と展望

- (i) 本研究領域課題中に開発された CNV 解析用の合成オリゴヌクレオチドアレイは、次世代シーケンサーが汎用される時代になっても、それを長い塩基配列を読む技術として短い配列を読む次世代シーケンサーを補完する技術として世界中で利用されている。
- (ii) 「C 型肝炎ウイルス陽性肝臓がん症例の全ゲノム解読」の研究では、肝臓がんにおける遺伝子変異のパターン・新しいがん遺伝子・融合遺伝子の同定・腫瘍内におけるゲノムの複雑性、を初めて明らかにし、肝臓がんの発生や進展の分子機構の解明から、新たな予防・診断・治療法の開発を推進するために有益な情報をもたらした点に加え、世界レベルでのがんゲノム解読研究基盤の確立と実力を実証することができた。
- (iii) 「日本人症例を中心とした大規模な肝細胞がんゲノムの解読」では、約 70%の症例で見られる高頻度の遺伝子異常を発見、日本人に特徴的な発がん要因の存在も初めて確認した。この研究は、これまでで最大の肝細胞がんゲノム解析であり、重要なゲノム異常を最も高精度に同定したもので、今後、日本人における肝細胞がんの治療開発推進に重要な貢献をするものと考えられる。本研究では最新の解析技術を駆使することで、同じ肝細胞がんであってもそれぞれの人種背景によってその原因となる因子の組み合わせが異なること、さらに日本人において特徴的で、これまで重要な発がん危険因子として知られている肝炎ウイルス感染とは異なる、未知の肝細胞がんの発がん要因が存在する可能性を世界でも初めて明らかにした。また、がんゲノム解読データを元に演繹的に既知の発がん因子との関連や新たな原因を探索する研究は極めて新しい研究分野であり、近年、日本においても漸増している非肝炎ウイルス性肝細胞がんの治療・予防への貢献も強く期待される。
- (iv) びまん性胃がん RHOA 活性化遺伝子変異の同定においては、日本人のびまん性胃がん症例で高頻度に存在する RHOA 遺伝子変異はがん化のドライバーとなる活性化変異であることが分かった。びまん性胃がんは現在有効な分子標的治療薬が存在せず、今回見つかった RHOA の活性化遺伝子変異はびまん性胃がんに対する新規の治療標的となる可能性がある。

(2) 社会・経済への波及と展望

NEDO プロジェクト「後天的ゲノム修飾のメカニズムを活用した創薬基盤技術開発」(2010~2014 年)において後天的ゲノム修飾解析技術開発、後天的ゲノム修飾と疾患とを関連付ける基盤技術開

発(エピゲノムを制御する創薬標的分子の同定)及び探索的実証研究(創薬標的分子としての妥当性の実証)の3課題に取り組んでいる^{[2], [7]}(図4-9)。

2003年のヒト全ゲノム解読完了により疾患と遺伝子の関係が解明されることが期待されたが、ゲノム配列の異常のみで説明がつく疾患はごくわずかであった。エピゲノム異常が疾患の原因となることが明らかになってきたが、数年前まではエピゲノムを網羅的に解析することは困難であった。次世代シーケンサーの性能向上に伴いエピゲノム解析が飛躍的に加速し始め、エピゲノム研究の国際競争が熾烈になってきている。

日本はエピゲノムの基礎研究では世界の上位に位置しているが日本発のエピゲノム創薬に展開する事業基盤が確立されていない。日本の大手企業は欧米のベンチャー企業と提携してエピゲノム医薬品の開発に着手しているのが現状である。

エピゲノムの分野では最も研究の進んでいるDNAメチル化酵素及びヒストン脱アセチル化酵素の阻害剤がようやく上市にこぎつけた段階で、このプロジェクトが注力するエピゲノムを制御するヒストンメチル化酵素をはじめとするエピゲノムを制御する薬剤は存在せず、これらを標的とすることでより特異性の高い画期的ながん治療薬開発が期待できる。

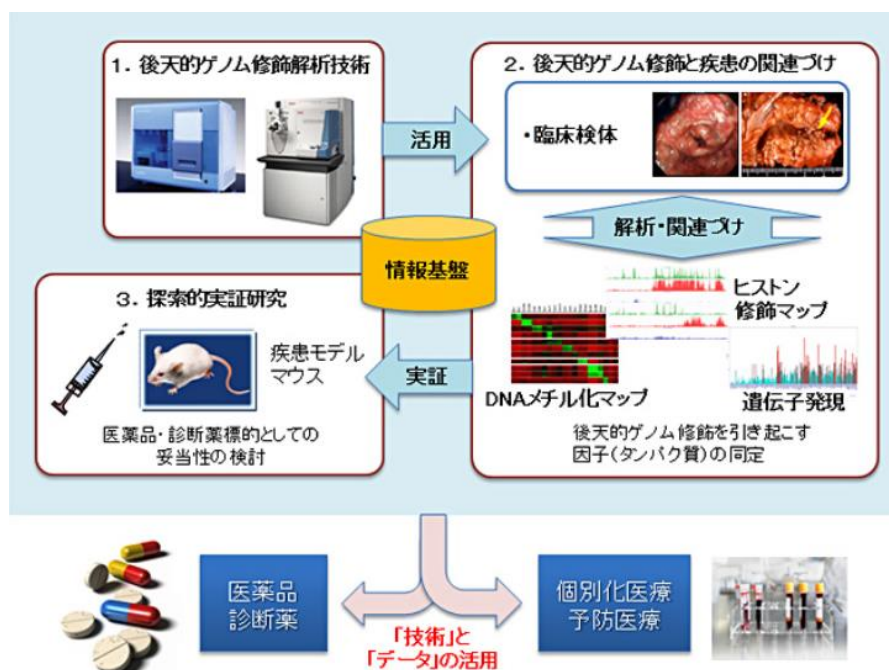


図4-9「後天的ゲノム修飾のメカニズムを活用した創薬基盤技術開発」プロジェクト概念図^[2]

図4-9における3課題のうち、

- (a) 後天的ゲノム修飾解析技術(エピゲノムを制御する創薬標的分子の同定)では、後天的ゲノム制御にかかわるヒストン修飾等について高感度かつ網羅的な解析(例えばDNAメチル化)技術を開発及びエピゲノム情報解析基盤技術の開発(データベース構築、新規ncRNAの同定)を行うことを目指し、エピゲノム修飾、特にDNAメチル化の異常パターンが前がん病変である腺腫の段階で既に形成されていることを明らかにした。また、数十万に及ぶCpGサイトを半定量的に測定可能なマイクロアレイの開発を支援し、スクリーニングマーカーとしてのDNAメチル化マーカー開発を様々ながん種において進めた。

(b) 後天的ゲノム修飾と疾患とを関連付ける基盤技術開発では臨床検体を用いた遺伝子発現情報や遺伝子変異情報を用いて診断用バイオマーカーや標的候補分子を定めることを目指し、数十に及ぶヒストン修飾につき、個別のヒストン分子でどのような修飾が組み合わされているかについて高感度 LC/MS/MS を用いて数十種類の組み合わせパターンを細胞周期を通じてダイナミックに変動することを見出した。

(c) 探索的実証研究では、標的候補分子や診断用バイオマーカーを用いて *in vitro* の低分子化合物のスクリーニングや結合ペプチドスクリーニング、*in silico* 阻害物質スクリーニングを行い、標的タンパク質 5 分子についてアッセイ系を確立した。

最終目標は同定したエピゲノム創薬・診断標的候補の 15 分子に対し、アッセイ法を構築し、5 分子については創薬・診断の標的としての妥当性を実証すること、臨床検体のエピゲノム解析技術の開発改良により、現行の 100 倍以上の感度を目指している。

引用文献

- [1] Redon R., Ishikawa S., Fitch K.R., Feuk L., Perry G.H., Andrews T.D., Fiegler H., Shaperro M.H., Carson A.R., Chen W., Cho E.K., Dallaire S., Freeman J.L., Gonzalez J.R., Gratacos M., Huang J., Kalaitzopoulos D., Komura D., MacDonald J.R., Marshall C.R., Mei R., Montgomery L., Nishimura K., Okamura K., Shen F., Somerville M.J., Tchinda J., Valsesia A., Woodwark C., Yang F., Zhang J., Zerjal T., Zhang J., Armengol L., Conrad D.F., Estivill X., Tyler-Smith C., Carter N.P., Aburatani H., Lee C., Jones K.W., Scherer S.W., Hurles M.E., Global variation in copy number in the human genome (2006) *Nature*, 444 (7118), pp. 444-454.
(Ishikawa*は Sanger センターの Redon と equal contribution である)
- [2] 国立研究開発法人 新エネルギー・産業技術総合開発機構 (NEDO) ホームページ
http://www.nedo.go.jp/activities/EK_00149.html
- [3] Totoki Y., Tatsuno K., Yamamoto S., Arai Y., Hosoda F., Ishikawa S., Tsutsumi S., Sonoda K., Totsuka H., Shirakihara T., Sakamoto H., Wang L., Ojima H., Shimada K., Kosuge T., Okusaka T., Kato K., Kusuda J., Yoshida T., Aburatani H., Shibata T., High-resolution characterization of a hepatocellular carcinoma genome (2011) *Nat. Genet.*, 43 (5), pp. 464-471.
- [4] 国立がん研究センターホームページ
http://www.ncc.go.jp/jp/information/press_release_20141103.html 「Nature Genetics」2014 年 11 月 2 日付 (日本時間 11 月 3 日) オンライン版で発表。
Yasushi Totoki, Kenji Tatsuno, Kyle R. Covington, Hiroki Ueda, Chad J. Creighton, Mamoru Kato, Shingo Tsuji, Lawrence A. Donehower, Betty L. Slagle, Hiromi Nakamura, Shogo Yamamoto, Eve Shinbrot, Natsuko Hama, Megan Lehmkuhl, Fumie Hosoda, Yasu

hito Arai, Kim Walker, Mahmoud Dahdouli, Kengo Gotoh, Genta Nagae, Marie-Claude G ingras, Donna M. Muzny, Hidenori Ojima, Kazuaki Shimada, Yutaka Midorikawa, John A. Goss, Ronald Cotton, Akimasa Hayashi, Junji Shibahara, Shumpei Ishikawa, Jacf ranz Guiteau, Mariko Tanaka, Tomoko Urushidate, Shoko Ohashi, Naoko Okada, Harsha Doddapaneni, Min Wang, Yiming Zhu, Huyen Dinh, Takuji Okusaka, Norihiro Kokudo, Tomoo Kosuge, Tadatoshi Takayama, Masashi Fukayama, Richard A. Gibbs, David A. Wheeler*, Hiroyuki Aburatani*, Tatsuhiko Shibata Trans-ancestry mutational landscape of hepatocellular carcinoma genomes Nature Genetics(in Press)

- [5] Kakiuchi M., Nishizawa T., Ueda H., Gotoh K., Tanaka A., Hayashi A., Yamamoto S., Tatsuno K., Katoh H., Watanabe Y., Ichimura T., Ushiku T., Funahashi S., Tateishi K., Wada I., Shimizu N., Nomura S., Koike K., Seto Y., Fukayama M., Aburatani H., Ishikawa S., Recurrent gain-of-function mutations of RHOA in diffuse-type gastric carcinoma (2014) Scopus, 46 (6), pp. 583-587.
- [6] 東京大学記者発表 難治性スキルス胃がんの治療標的候補となる活性化遺伝子変異を同定—がんのゲノムシーケンシングの成果— http://www.u-tokyo.ac.jp/public/public01_260512_j.html
- [7] 国立研究開発法人 新エネルギー・産業技術総合開発機構(NEDO)ホームページ <http://www.nedo.go.jp/content/100506449.pdf>

4.4 Whole Genome Association 解析による GvHD の原因遺伝子の探索 (小川誠司)

4.4.1 研究の概要

小川誠司は研究期間中、移植成績の向上に資することを目的として GvHD の原因となる遺伝的相違を解明した。その中で、全ゲノム関連解析に基づく GvHD 関連遺伝子多型の同定では 6SNP 座を aGvHD の標的遺伝子座として世界に先駆けて同定し、レシピエントの SNP において aGvHD と関連する 2 つの候補、慢性 GvHD や再発と関連する 4 種の SNP を同定した。また GVL 関連マイナー抗原の同定も行った。また、本研究課題で開発されたゲノムコピー数解析技術を用いて、がんの標的分子の同定を行うために、用いた SNP アレイをゲノムワイドにアレルを定量できるプログラム (CNAG/AsCNAR)を開発し^{[1],[2]}、各種のがんの網羅的なアレル・ゲノムコピー数の解析から、神経芽腫における ALK キナーゼ変異^[3]、悪性リンパ腫における A20 遺伝子の不活化変異^[4]、骨髄系腫瘍にける CBL の変異^[5]が、がんの原因となる遺伝子変異であることを明らかにした。

終了後の継続研究において高速ゲノムシーケンス技術を用い、これまでに MDS 及び白血病の原因に関わる複数の遺伝子を新たに発見した。MDS ではこれまで DNA 修飾やクロマチン修飾に関わる遺伝子の異常がその原因とされてきたが、RNA のスプライシングの異常及びコヒーシンの異常がその原因であることを発見した。

(1) 研究テーマの状況 (国内)

(i) RNA のスプライシングの異常による MDS の発症とその白血病化の原因遺伝子異常を発見

大量並列ゲノムシーケンス技術を用い、MDS 症例のゲノムを詳細に解読し「RNA スプライシング」に関わる遺伝子群が高い頻度で変異を生じていることをつきとめた。MDS において同定された RNA スプライシング装置に関わる新規 pathway 変異の発見は、それら遺伝子の後天的な変異が発がんに関わることを明らかにした画期的な発見として世界的に高い評価を受けている^{[6],[7]}。図 4-10 に RNA スプライシング装置と MDS における遺伝子変異について示した。

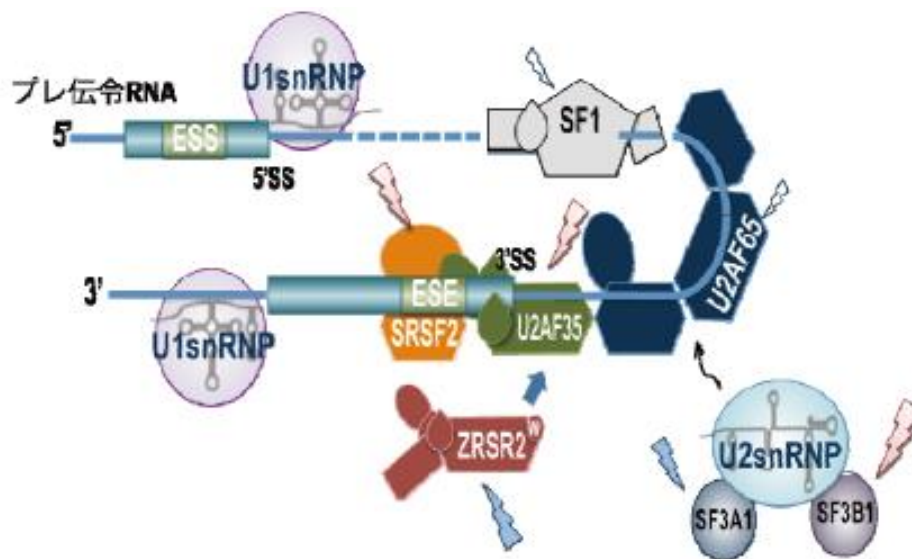


図 4-10 RNA スプライシング装置と MDS における遺伝子変異^[7]

RNA のスプライシングはゲノム DNA から「転写」されたプレ伝令 RNA に多数のスプライシング因子と呼ばれるタンパク質が作用することによっておこなわれる。このスプライシングは多数の過程を経て行われることが知られているが、その第一段階では、スプライス(除去)されるイントロンとエクソンの境界が、スプライシング因子によって認識されることで開始される。MDS の 45～85%の症例で、3'境界のスプライス部位の認識に関わる主要な因子である、U2AF35、SRSF2、ZRSR2、及び SF3B1 をはじめとする様々なスプライシング因子(矢印)が遺伝子変異によって異常をきたしていることが明らかになった。

さらに MDS や白血病の症例を対象として高速ゲノムシーケンス技術を用いたゲノム解析を行い、SETBP1 遺伝子の変異が MDS から白血病への進行に関わっているということをつきとめた。

(ii) コヒーシン遺伝子の異常による血液がんの発症

MDS や AML の症例を対象としたゲノム解析から、細胞分裂や遺伝子の転写調節において重要な働きを持つことが知られている蛋白質複合体「コヒーシン」を構成する遺伝子の変異が、MDS、慢性骨髄単球性白血病(CMML)、AML、慢性骨髄性白血病(CML)などの「骨髄系腫瘍」に分類される血液がんを高頻度に認められることを解明した^[8]。

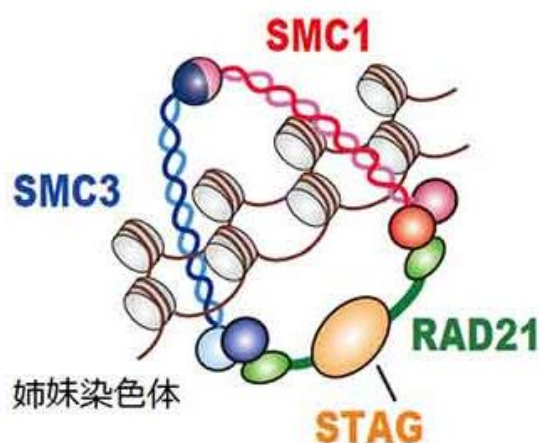


図 4-11 コヒーシン複合体の模式図^[8]

コヒーシンは、図 4-11 のように STAG2、RAD21、SMC1A、SMC3 という四つのタンパク質からなる複合体であり、細胞が分裂するときに、リング状の構造をとって染色体を束ね、姉妹染色体が二つの娘細胞に正確に分配されるために重要な役割を果たしている。コヒーシン複合体が正常に機能なくなると、細胞分裂後に染色体の数の異常がおこることが知られている。また、コヒーシンは遺伝子の転写調節において重要な役割を果たすことが知られている。

コヒーシン遺伝子の MDS や AML などの血液がんでの頻度変異を調べるため、さまざまな病型の血液がんを含む 610 例の患者由来の DNA 試料について、高速シーケンサーを用いた解析を行った。その結果、さまざまな病型の血液がんに変異がみられ(図 4-12)、MDS の 8%、MDS の病型の一つである慢性骨髄単球性白血病(CMML)の 10%、AML の 12%、慢性骨髄性白血病(CML)の 6%に遺伝子変異が生じていることが確認された。

さらに、コヒーシンの四つの遺伝子にみつかった変異の大部分は、互いに重複なく「排他的に」生じていた。このことは、コヒーシンを構成する四つの遺伝子のどの遺伝子に変異が生じても、共通の機序を通じて白血病化を招くことを示唆していると考えられる。

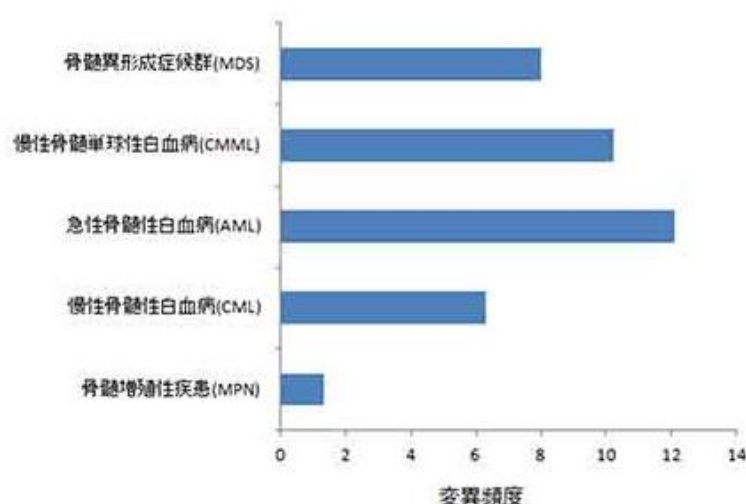


図 4-12 さまざまな病型の血液がんでみつかったコヒーシン遺伝子変異の頻度^[8]

(2) 海外での共同研究の状況

MSD の白血病化の原因遺伝子異常に関しては米国クリーブランド・クリニック Jaroslaw Maciejewski 教授、東京大学・宮野悟教授、名古屋大学・小島勢二教授を中心とする国際共同チームを組んで研究を行い、700 例以上の MDS や白血病の症例を対象として高速ゲノムシーケンス技術を用いたゲノム解析を行い、SETBP1 という遺伝子の変異が MDS から白血病への進行に関わっているということをつきとめた^{[8], [9], [10]}。

4.4.2 研究成果の波及と展望

(1) 科学技術への波及と展望

(i) 高密度 SNP アレイ解析によるゲノムコピー数定量プログラム (CNAG/AsCNAR)^[2]

本研究期間中に開発されたゲノムコピー数定量プログラムは SNP 解析のノイズ除去のアルゴリズムが非常に優れており、アレル組成が異なる場合も適用できる。この技術はその後の小川グループにおける成果に大きく貢献し、ALK、A20 変異、CBL 変異などがん遺伝子の同定に利用された。またこのプログラムはアカデミアには無料で公開され現在もこのアルゴリズムは汎用的に利用されているとのことである。その利用の目的には 1) 遺伝性疾患における原因解析と同定、2) がんの責任遺伝子の同定、3) iPS 細胞の品質評価、がある。

(ii) RNA のスプライシングの異常による MDS の発症

- ・世界で初めて MSD の原因遺伝子がスプライシング関連遺伝子であることを発見し RNA のスプ

ライシング異常ががんの発生に関わっていることを示した。

- ・これらは、大規模シーケンスによるがんゲノムの徹底的な解読研究から得られた結果であり、がんの病態解明上有効であることを示した。

その後の研究により、スプライシングの異常はダウン症候群、腎臓がん、クッシング症候群発症^[11]の原因になっていることが解明されている。今後、異常な「RNA スプライシング」の因子を阻害する薬剤などの新たな治療法の開発が期待される。

(iii) 若年性骨髄単球性白血病 (JMML) の原因遺伝子を発見

国際共同研究により JMML の新たな原因遺伝子として STEPBP1 と JAK3 を見出した(図 4-13)。STEPBP1 と JAK3 の 2 つの遺伝子に変異がある患者群では、これらの遺伝子に変異がない患者群に比べて生存率が低い傾向があった。SETBP1 遺伝子の変異が MDS から白血病への進行に関わる重要な遺伝子変異であることがわかったことから、この変異をマーカーとしてこれまでより早期に MDS から白血病へ進行するハイリスクの患者を予測できるようになることが期待される。また、SETBP1 遺伝子変異は過剰発現によって白血病化をきたしている可能性が高いことから、SETBP1 を治療標的とした新たな創薬に期待がもたれる^{[9], [10]}。

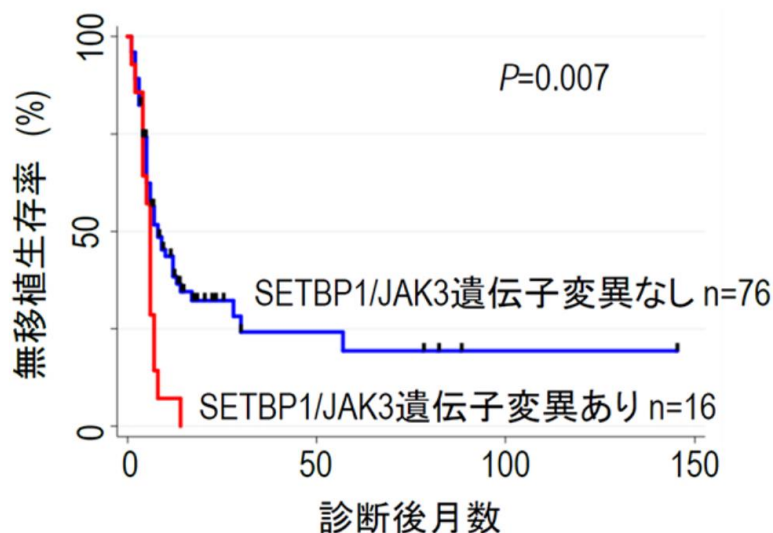


図 4-13 若年性骨髄単球性白血病 (JMML) の二次性変異が無移植生存率に及ぼす影響^[8]

(iv) 白血病・MDS の原因遺伝子異常を発見

MDS の全エクソンシーケンスにより、コヒーシン複合体を構成する 4 つの遺伝子の変異が重要な遺伝子変異であることが明らかになった。コヒーシン遺伝子の変異した白血病の患者由来の細胞株では、コヒーシン複合体の染色体への結合が減少していることが示された^[12]。

コヒーシン遺伝子の変異が MDS、CMML、AML、CML などの「骨髄系腫瘍」に高頻度にみられる重要な遺伝子変異であることがわかり、今後、骨髄系腫瘍の診療において、コヒーシン遺伝子の変異をマーカーとして予後予測を行い、最適な治療法を選択することに役立つことが期待される。また、コヒーシンの遺伝子変異はこれまで骨髄系腫瘍で知られてきた遺伝子変異とは異なる新たなグループに属する遺伝子変異であることから、コヒーシン遺伝子の変異を治療標的とした新たな創薬に期待がもたれる。

さらに最近の研究でコヒーシンの変異で一番発症頻度が高いのは膀胱がんで ras の次に発症頻度が高いこと、また横紋筋肉腫や脳腫瘍などいろいろな組織でコヒーシンの変異が見つかっている。

(2) 社会・経済への波及と展望

MDS や白血病は代表的な「血液がん」で日本でも推定で数万人の患者がいるが、特に年間 5,000 人以上が新たに発症しており、高齢者の増加により患者数が年々増加している。MDS は、血液細胞のがん化にともなって正常な血液細胞を作ることができなくなる結果、感染症、貧血、出血といった症状を生じる極めて難治性の血液がんの 1 つである。また、多くの症例がより急速に病気が進行する急性骨髄性白血病へ移行し、致死的な転帰をたどるが、白血病への進行を予測する有効な指標は知られておらず、現在は骨髄移植を除いて根治的な治療手段はないが、これ等の原因遺伝子に関する研究の成果からこれ等の疾患の新しい診断や治療法の開発が期待される。

引用文献

- [1] Nannya Y., Sanada M., Nakazaki K., Hosoya N., Wang L., Hangaishi A., Kurokawa M., Chiba S., Bailey D.K., Kennedy G.C., Ogawa S., A robust algorithm for copy number detection using high-density oligonucleotide single nucleotide polymorphism genotyping arrays (2005) *Cancer Res.*, 65 (14), pp. 6071-6079.
- [2] Yamamoto G., Nannya Y., Kato M., Sanada M., Levine R.L., Kawamata N., Hangaishi A., Kurokawa M., Chiba S., Gilliland D.G., Koeffler H.P., Ogawa S., Highly sensitive method for genomewide detection of allelic composition in nonpaired, primary tumor specimens by use of affymetrix single-nucleotide- polymorphism genotyping microarrays (2007) *Am. J. Hum. Genet.*, 81 (1), pp. 114-126.
- [3] Chen Y., Takita J., Choi Y.L., Kato M., Ohira M., Sanada M., Wang L., Soda M., Kikuchi A., Igarashi T., Nakagawara A., Hayashi Y., Mano H., Ogawa S., Oncogenic mutations of ALK kinase in neuroblastoma (2008) *Nature*, 455 (7215), pp. 971-974.
- [4] Kato M., Ogawa S. et al. Frequent inactivation of A20 in B-cell lymphomas (2009) *Nature*, 459 (7247), pp. 712-716.
- [5] Sanada M., Suzuki T., Shih L.-Y., Otsu M., Kato M., Yamazaki S., Tamura A., Honda H., Sakata-Yanagimoto M., Kumano K., Oda H., Yamagata T., Takita J., Gotoh N., Nakazaki K., Kawamata N., Onodera M., Nobuyoshi M., Hayashi Y., Harada H., Kurokawa M., Chiba S., Mori H., Ozawa K., Omine M., Hirai H., Nakauchi H., Koeffler H.P., Ogawa S., Gain-of-function of mutated C-CBL tumour suppressor in myeloid neoplasms (2009) *Nature*, 460 (7257), pp. 904-908.

- [6] Yoshida K., Sanada M., Shiraishi Y., Nowak D., Nagata Y., Yamamoto R., Sato Y., Sato-Otsubo A., Kon A., Nagasaki M., Chalkidis G., Suzuki Y., Shiosaka M., Kawahata R., Yamaguchi T., Otsu M., Obara N., Sakata-Yanagimoto M., Ishiyama K., Mori H., Nolte F., Hofmann W.-K., Miyawaki S., Sugano S., Haferlach C., Koeffler H.P., Shih L.-Y., Haferlach T., Chiba S., Nakauchi H., Miyano S., Ogawa S., Frequent pathway mutations of splicing machinery in myelodysplasia (2011) *Nature*, 478 (7367), pp. 64–69.
- [7] 東京大学プレスリリース http://www.h.u-tokyo.ac.jp/vcms_lf/release_20110912.pdf
- [8] 京都大学プレスリリース http://www.kyoto-u.ac.jp/static/ja/news_data/h/h1/news6/2013/130708_2.htm
- [9] Sakaguchi H., Okuno Y., Muramatsu H., Yoshida K., Shiraishi Y., Takahashi M., Kon A., Sanada M., Chiba K., Tanaka H., Makishima H., Wang X., Xu Y., Doisaki S., Hama A., Nakanishi K., Takahashi Y., Yoshida N., Maciejewski J.P., Miyano S., Ogawa S., Kojima S., Exome sequencing identifies secondary mutations of SETBP1 and JAK3 in juvenile myelomonocytic leukemia (2013) *Nat. Genet.*, 45 (8), pp. 937–941.
- [10] Makishima H., Yoshida K., Nguyen N., Przychodzen B., Sanada M., Okuno Y., Ng K.P., Gudmundsson K.O., Vishwakarma B.A., Jerez A., Segui I.G., Takahashi M., Shiraishi Y., Nagata Y., Guinta K., Mori H., Sekeres M.A., Chiba K., Tanaka H., Muramatsu H., Sakaguchi H., Paquette R.L., McDevitt M.A., Kojima S., Saunthararajah Y., Miyano S., Shih L.-Y., Du Y., Ogawa S., Maciejewski J.P., Somatic SETBP1 mutations in myeloid malignancies (2013) *Nat. Genet.*, 45 (8), pp. 942–946.
- [11] Sato Y., Maekawa S., Ishii R., Sanada M., Morikawa T., Shiraishi Y., Yoshida K., Nagata Y., Sato-Otsubo A., Yoshizato T., Suzuki H., Shiozawa Y., Kataoka K., Kon A., Aoki K., Chiba K., Tanaka H., Kume H., Miyano S., Fukayama M., Nureki O., Homma Y., Ogawa S. Recurrent somatic mutations underlie corticotropin-independent Cushing's syndrome (2014) *Science* 344 (6186) pp. 917– 920
- [12] Kon A., Shih L.-Y., Minamino M., Sanada M., Shiraishi Y., Nagata Y., Yoshida K., Okuno Y., Bando M., Nakato R., Ishikawa S., Sato-Otsubo A., Nagae G., Nishimoto A., Haferlach C., Nowak D., Sato Y., Alpermann T., Nagasaki M., Shimamura T., Tanaka H., Chiba K., Yamamoto R., Yamaguchi T., Otsu M., Obara N., Sakata-Yanagimoto M., Nakamaki T., Ishiyama K., Nolte F., Hofmann W.-K., Miyawaki S., Chiba S., Mori H., Nakauchi H., Koeffler H.P., Aburatani H., Haferlach T., Shirahige K., Miyano S., Ogawa S., Recurrent mutations in multiple components of the cohesin complex in myeloid neoplasms (2013) *Nat. Genet.*, 45 (10), pp. 1232–1237.