

「テーラーメイド医療を目指したゲノム情報活用基盤技術」
平成14年度採択研究代表者

稲澤 譲治

(東京医科歯科大学・難治疾患研究所 教授)

「高精度ゲノムアレイの開発と疾患遺伝子の探索」

1. 研究実施の概要

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

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

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

これらの成果を基盤に以下の作業を実施する。

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

個性診断の基本データベースを作製する。

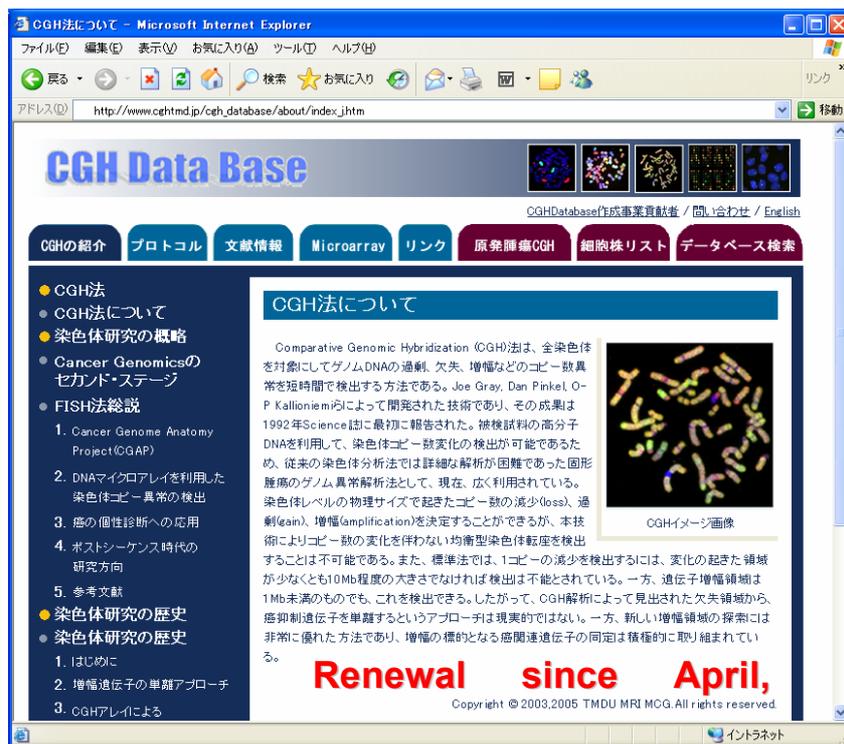
- 4) 潜在的な染色体微細異常が存在すると考えられているてんかんやX連鎖精神発達遅滞をモデルにゲノムアレイを用いて全染色体ワイドに潜在的ゲノムコピー数異常のスクリーニングを行い、疾患遺伝子座の特定に繋がる微細染色体異常を探索する。

2. 研究実施内容

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

a. 各種がん細胞のゲノム構造異常の網羅的スクリーニング

全腫瘍の90%を締める胃癌や肺癌などの上皮系固形腫瘍において、疾患特異的ゲノム構造異常の探索を目的にCGH法による染色体ワイドのゲノムコピー数異常解析を行った。約5年間をかけ、25種類以上の癌の1000サンプル以上を解析したが、本CREST事業の支援を受けてデータベースを構築し、これを2003年7月29日に公開した。(CGH Data Base: <http://www.cghtmd.jp/cghdatabase/about/index.html>)。本データベースは米国NCBIが収載するSKY/M-FISH and CGH Database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sky/skyweb.cgi>)の関連サイト[CGH database Japan]として紹介されている。このCGH Data Baseは2005年4月に更新し、英語紙面を充実させた。その結果、アクセス件数は10,000件を超えた。



CGH法について

Comparative Genomic Hybridization (CGH)法は、全染色体を対照にしてゲノムDNAの過剰、欠失、増幅などのコピー数異常を短時間で検出する方法である。Joe Gray, Dan Pinkel, O-P Kallioniemiによって開発された技術であり、その成果は1992年Science誌に最初報告された。被検試料の高分子DNAを利用して、染色体コピー数変化の検出が可能であるため、従来の染色体分析法では詳細な解析が困難であった固形腫瘍のゲノム異常解析法として、現在、広く利用されている。染色体レベルの物理サイズで起きたコピー数の減少(loss)、過剰(gain)、増幅(amplification)を決定することができるが、本技術によりコピー数の変化を伴わない均衡型染色体転座を検出することは不可能である。また、標準法では、1コピーの減少を検出するには、変化の起きた領域が少なくとも10Mb程度の大きさでなければ検出は不能とされている。一方、遺伝子増幅領域は1Mb未満のものでも、これを検出できる。したがって、CGH解析によって見出された欠失領域から、癌抑制遺伝子を単離するというアプローチは現実的ではない。一方、新しい増幅領域の探索には非常に優れた方法であり、増幅の標的となる感関連遺伝子の同定は積極的に取り進められている。

Renewal since April,

Copyright © 2003,2005 TMDU MRI MCG. All rights reserved.

b. 高精度ゲノムアレイの開発

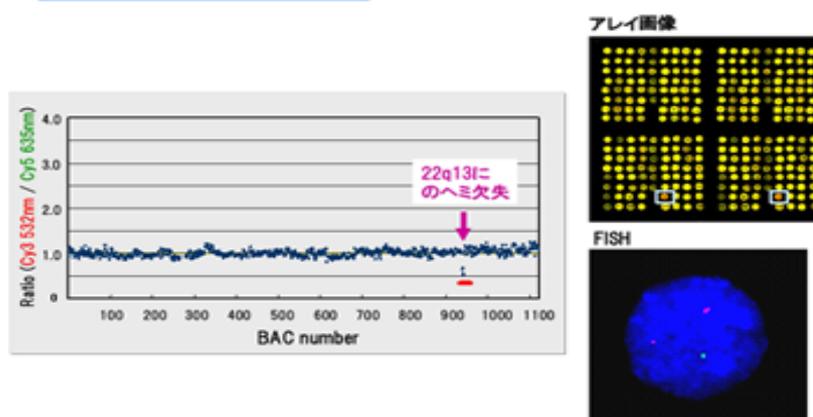
従来、100kbレベル～数Mbオーダーのゲノム構造異常を全染色体にわたり俯瞰的に検出する技術は存在しなかった。これを克服するものとしてCustom-made CGHアレイの実用化を目指してきた。

その結果、以下のゲノムアレイを作製し、標準化した。

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

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

検証3: 22q13欠失症候群



上の図は、重度精神発達遅滞を合併した患児のリンパ球DNAを試料に、今回の研究において開発したMCG Genome Disorder Arrayを用いて染色体微細欠失の有無を解析した。その結果、22q13サブテロメアに微細な欠失を検出した。この患者さんの22q13微細欠失は通常のゲノム解析法で明らかにできなかった異常であり、私たちが開発したCGHアレイが潜在的微細染色体異常の検出に威力を発揮することを示している。染色体コピー数異常の診断法としても古典的な染色体分析の補完法として実用化できるものである。

以上に加えて、①データ解析を高精度化するCGHアレイ解析専用ソフトの開発、②各種癌の基本ゲノム構造異常データベースの構築、③解析技術装置（ハイブリダイゼーションチャンバ（特許出願中）、④ゲノムアレイによるDNAメチル化領域のスクリーニング法の開発（BAMCA法と命名）、⑤ゲノムアレイのクロマチン免疫沈降法への応用（ChIP on chip）などの開発も進めている。

c. 高精度ゲノムアレイによる癌のゲノム異常と関連遺伝子の同定

(1) 食道扁平上皮癌の新規癌関連遺伝子の同定

食道扁平上皮癌（ESC）細胞株43株を対象にMCG Cancer Array-800を用いたアレイCGH解析で、LRP1B遺伝子（2q22.1）のホモ欠失を検出した。Genomic PCRによりESC細胞株（6/43, 14.0%）と臨床検体（30/70, 42.9%）の両方で高頻度なLRP1Bのintragenicなホモ欠失を確認した。LRP1Bの発現はホモ欠失のない細胞株でも高率（14/37, 37.8%）に消失し、これらはプロモーター活性を持つCpG island内のメチル化によるLRP1B発現消失と考えられた。LRP1B発現の消失したESC細胞株に強制発現させるとcolony formation assayで明らかなcolony数の減少を観察し、ESCの癌抑制遺伝子候補であることを確認した。（Sonoda et al., Cancer Re. 2004）

(2) 肺癌の新規癌関連遺伝子の同定

肺小細胞癌（SCLC）の高頻度5p13増幅の標的がSKP2であることを明らかにし（Yokoi et al., Am J Pathol 2002）、続きSKP2発現抑制はDNA合成のみならずアポトーシスを進行させることから、癌の分子標的治療の格好のターゲットであることを明らかにした（Yokoi S et al., Cancer Science 2003）。これらの成果に続き、SKP2が肺非小細胞癌（NSCLC）の5p13増幅の標的であり、その発現抑制は、NSCLC細胞の遊走能、浸潤能を抑制することを明らかにした（Yokoi S et al., Am J Pathol, 2004）。

また、肺非小細胞癌細胞株のCGHアレイ解析で検出した9q33の新規ホモ欠失領域から、ホモ欠失あるいはプロモーターCpGアイランド領域のメチル化により高頻度に発現消失を認める遺伝子DBC1を同定した。（Izumi et al., 2005）DBC1のメチル化と発現消失は臨床例でも認められ、発現消失株に強制発現させることにより細胞増殖抑制が起こることから、新規肺非小細胞癌抑制遺伝子候補であることあることを明らかにした。また、SCLCならびにNSCLCのゲノムアレイ解析により、複数の新規領域にホモ欠失領域および増幅領域を検出し、新規癌関連遺伝子の特定を進めている。

(3) 胃癌の新規癌関連遺伝子の同定

MCG Whole Genome Array-4500/Cancer Array-800を用いて胃癌細胞株32例のCGHアレイ解析を行った。新規増幅をCDK6（7q21.2）に検出した。CDK6は胃癌臨床検体の組織マイクロアレイを用いて293例で免疫染色による発現解析を行ったところ、細胞質強陽性を28例（9.6%）に、核強陽性を44例（15%）に検出した。（Takada et al., Cancer Sci. 2005）一方、新規ホモ欠失領域を検出し、標的癌抑制遺伝子候補として細胞間シグナルの授受に関わる因子（MCG22、lab. name）を同定した。本遺伝子はホモ欠失のない株においても、発現低下（9/32株, 28.1%）あるいは完全消失（12/32株, 37.5%）をしていた。遺伝子上流のプロモ

ーター領域において高度のメチル化を認め、ジェネティック・エピジェネティックな機構により機能消失する胃癌抑制遺伝子の候補であることを明らかにした。(Takada et al., submitted)

(4) その他の癌における新規癌関連遺伝子の同定

神経芽細胞腫 (NB) に続き (Saito-Ohara F, Imoto I et al., Cancer Res 2003) 卵巣明細胞腺癌の17q増幅の標的遺伝子がPPM1Dであることを明らかにした。(Hirasawa et al., Clinical Cancer Res, 2004) 悪性黒色腫において高頻度に変異をきたすBRAFが、変異がない場合においても遺伝子増幅により活性化を受けることを明らかにした。(Tanami et al., Oncogene 2004) 多発性骨髄腫の1q21増幅の標的PDZK1と薬剤耐性獲得を明らかにした。(Inoue J et al, Am J Pathol, 2004)、各種抗癌剤の薬剤耐性獲得メカニズムと特定ゲノム構造異常の関連を明らかにした。(Yasui K et al., Cancer Res 2004) 肺癌のみでなくSKPの高発現は胆管癌においても予後不良因子となることを明らかにした。(Sanada et al., Cancer Sci. 2004) 小児急性リンパ性白血病のt(1;19)転座より新規の切断点融合遺伝子MEF2D/DAZAP1を明らかにした。(Yuki et al., Cancer Sci. 2004)

d. ゲノムアレイの応用技術開発

さらに、ポストシーケンス以降のゲノム研究であるENCODE (Encyclopedia of DNA functional element) プロジェクトを視野に、現在、ゲノムアレイを解析のプラットフォームにした応用技術開発を進めている。

(1) メチル化DNA領域の網羅的解析

DNAメチル化領域のゲノムワイドスクリーニング法として、BACアレイ上でMCA (methylated CpG island amplification) 法を展開するBAC array-based MCA method (BAMCA法) を確立した。(Inazawa et al., Cancer Sci, 2004, review) . 現在、このBAMCA法により、各種の病型で癌特異的メチル化DNA領域のゲノムワイドスクリーニングを実施し、幾つかの癌抑制遺伝子候補を同定している。

(2) 転写因子結合領域の網羅的解析

全ゲノムにおける蛋白コード領域はわずか2%である。98%を占める蛋白非コード領域には近年、プロモーター、エンハンサー、サイレンサー、などの転写調節領域、あるいは100kb~Mbレベルの挿入/欠失多型 (insertion/deletion polymorphism) の存在が明らかにされてきている。当研究室において開発したゲノムDNAチップとクロマチン免疫沈降法 (Chromatin Immunoprecipitation, ChIP) を組み合わせた“ChIP-on-chip”法を確立し、転写因子結合領域の網羅的解析方法の開発をすすめている。

3. 研究実施体制

高精度ゲノムアレイの開発と疾患遺伝子の探索研究グループ

①グループ長：稲澤譲治 (東京医科歯科大学難治疾患研究所、教授)

②研究実施項目：高精度ゲノムアレイの技術開発とテーラーメイド医療に向けた疾患遺伝子の探索ならびに同定と研究総括

組織アレイ開発グループ

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

メンブレンアレイ開発グループ

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

癌多段階病変解析グループ

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

発現解析グループ（1）

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

発現解析グループ（2）

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

食道癌解析グループ

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

小児癌解析グループ

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

胃癌解析グループ

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

婦人科腫瘍解析グループ

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

X LMR 解析グループ

①グループ長：松尾雅文（神戸大学大学院医学系研究科、教授）

②研究実施項目：X染色体異常症のアレイ解析

てんかんゲノム解析グループ

①グループ長：山川和弘（理化学研究所脳科学総合研究センター・チームリーダー）

②研究実施項目：てんかんの微細染色体異常解析

肝胆膵腫瘍解析グループ

①グループ長：有井滋樹（東京医科歯科大学大学院、教授）

②研究実施項目：肝胆膵腫瘍のゲノム異常解析

口腔頸部癌解析グループ

①グループ長：天笠光雄（東京医科歯科大学大学院、教授）

②研究実施項目：口腔頸部領域腫瘍のゲノム異常解析

アレイスキャナ解析ソフト開発グループ

①グループ長：正木克典（日立ソフトエンジニアリング、ハイパフォーマンス開発部）

②研究実施項目：ゲノムアレイスキャナおよび解析ソフトウェアの開発

4. 主な研究成果の発表（論文発表および特許出願）

(1) 論文発表

- Susumu N, Aoki D, Noda T, Nagashima Y, Hirao T, Tamada Y, Banno K, Suzuki A, Tsuda H, Inazawa J, Nozawa S: Diagnostic clinical application of two-color fluorescence in situ hybridization that detects chromosome 1 and 17 alterations to direct touch smear and liquid-based thin-layer cytologic preparations of endometrial cancers. *Int J Gynecol Cancer* 15:70-80, 2005
- Tsuda H, Morita D, Kimura M, Shinto E, Ohtsuka Y, Matsubara O, Inazawa J, Takami K, Mochizuki H, Tamai S, Hiraide H: Correlation of KIT and EGFR overexpression with invasive ductal breast carcinoma of the solid-tubular subtype, nuclear grade 3, and mesenchymal or myoepithelial differentiation. *Cancer Sci* 96:48-53, 2005
- Takada H, Imoto I, Tsuda H, Sonoda I, Ichikura T, Mochizuki H, Okanoue T, Inazawa J: Screening of DNA copy-number aberrations in gastric cancer cell lines by array-based comparative genomic hybridization. *Cancer Sci* 96:100-10, 2005
- Shinto E, Tsuda H, Ueno H, Hashiguchi Y, Hase K, Tamai S, Mochizuki H, Inazawa J, Matsubara O. Prognostic implication of laminin-5 gamma 2 chain

expression in the invasive front of colorectal cancers, disclosed by area-specific four-point tissue microarrays. *Laboratory Invest* **85:257-66, 2005**

- Sanada T, Yokoi S, Arii S, Yasui K, Imoto I, Inazawa J. Skp2 Overexpression is a p27Kip1-independent poor prognosticator in patients with biliary tract cancers. *Cancer Sci.* **95:969-76, 2004**
- Tanami H, Imoto I, Hirasawa A, Yuki Y, Sonoda I, Inoue J, Yasui K, Misawa-Furihata A, Kawakami Y, Inazawa J. Involvement of overexpressed wild-type BRAF in the growth of malignant melanoma cell lines. *Oncogene* **23:8796-8804, 2004**
- Misawa A, Hosoi H, Imoto I, Iehara T, Sugimoto T, Inazawa J. Translocation (1;22)(p36;q11.2) with concurrent del(22)(q11.2) resulted in homozygous deletion of *SNF5/INI1* in a newly established cell line derived from extrarenal rhabdoid tumor. *J Hum Genet* **49:586-9, 2004**
- Inazawa J, Inoue J, Imoto I. Comparative genomic hybridization (CGH) arrays pave the way for identification of novel cancer-related genes. *Cancer Sci.* **95:559-63, 2004**
- Suzuki T, Delgado-Escueta AV, Aguan K, Alonso ME, Shi J, Hara Y, Nishida M, Numata T, Medina MT, Takeuchi T, Morita R, Bai D, Ganesh S, Sugimoto Y, Inazawa J, Bailey JN, Ochoa A, Jara-Prado A, Rasmussen A, Ramos-Peek J, Cordova S, Rubio-Donnadieu F, Inoue Y, Osawa M, Kaneko S, Oguni H, Mori Y, Yamakawa K: Mutations in *EFHC1* cause juvenile myoclonic epilepsy. *Nat Genet* **36:842-9, 2004**
- Yokoi S, Yasui K, Mori M, Iizasa T, Fujisawa T, Inazawa J: Amplification and Overexpression of SKP2 Are Associated with Metastasis of Non-Small-Cell Lung Cancers to Lymph Nodes. *Am J Pathol.* **165:175-80, 2004**
- Inoue J, Otsuki T, Hirasawa A, Imoto I, Matsuo Y, Shimizu S, Taniwaki M, Inazawa J: Overexpression of PDZK1 within the 1q12-q22 Amplicon Is Likely To Be Associated with Drug-Resistance Phenotype in Multiple Myeloma. *Am J Pathol.* **165:71-81, 2004**

(2) 特許出願

H16年度特許出願件数：0件（CREST研究期間累積件数：5件）