

「テ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。また、in-house ゲノムアレイ上で展開するメチル化 DNA や特定蛋白の DNA 配列領域のゲノムワイドスクリーニングの応用法を開発し、疾患のエピゲノム解析を行う。

従来、100 キロベース(kb)～数メガベース(Mb)レベル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以下の①～⑤の in-house CGH アレイを開発した。

具体的には、①4523 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アレイ(国立がんセンター、細田、大木博士と共同研究)、②染色体 1p36 の 20Mb を間断なくカバーしたアレイ、③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、④X 染色体を 1003 個の BAC で埋め尽くした高密度アレイ、⑤既知遺伝疾患、染色体異常症の診断アレイ。特に③Cancer Array-800 と⑤MCG GD(Genome Disorder)アレイは癌ゲノム診断ならびに遺伝診療の染色体検査の代替・補完検査技術としての実用化に積極的に取り組んでいる。これら実用レベルのアレイに加えて 2005 年度はヒトゲノム中に存在する数 10kb～Mb レベルの大きなゲノム DNA 挿入・欠失多型(Copy Number Polymorphism; CNP)のゲノムワイド検出を可能とする新規ゲノムアレイ(MCG CNP Array)の開発を進めている。本研究課題において構築したゲノムアレイは、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。また、ゲノムアレイによる診断システムの臨床応用を視野に、①アレイデータ解析の

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)等の開発も実施した。

2. 研究実施内容

(1) CGH データベースの構築

約5年間をかけ、25種類以上の癌の総計900例以上を標準CGH法で解析し、データベースを構築し公開した。(2003年7月29日に公開。CGH Data Base: <http://www.cghtmd.jp/cgh/database/index.html>) このデータベースは米国NCBI統合データベースにおいて“CGH data base Japan”として紹介され世界中の癌ゲノム研究者によって利用されている。2005年3月には、その内容を更新し、アクセス件数は14000件(2006/01/26現在)を超えた。さらに、CGHアレイによる癌の微細ゲノム構造異常の解析を進めており、各種細胞株を中心に既に700例の解析を終了した。これらデータも順次データベース化し公開の予定である。

(2) 癌のゲノム・エピゲノム解析

① 消化器癌の癌関連遺伝子の同定

大腸癌: 大腸癌(CRC)の肝転移は予後を左右する最大の因子といっても過言でない。CRC原発巣と同一患者の肝転移巣の間でのゲノム変化の差をサブトラクティブCGH法により比較し第6番染色体短腕6p過剰を見出した。次にCGHアレイによりCRC細胞株のゲノム構造異常をスクリーニングし2細胞株で6p21の高度増幅を検出し、同領域の標的遺伝子がサイクリンD3(CCND3)であることを明らかにした。CRC原発巣の120症例において、①辺縁隆起部、②粘膜下層浸潤先進部、③漿膜下層浸潤先進部、④腫瘤中心部の4箇所より癌組織を採取して組織マイクロアレイを作製してCCND3 蛋白発現を調べ、臨床病理学的諸因子との相関を解析した。その結果、辺縁隆起部でのCCND3 発現陽性例で血管浸潤性転移の頻度が有意に高いことが示された。本論文(Tanami et al., Lab Invest 2005)は雑誌Laboratory Investigation 掲載号の巻頭で紹介されるとともにNature Publishing グループHPのトップ画面でも紹介された。

胃癌: 胃癌は日本人での発生頻度の高い癌である。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。(Takada et al., Cancer Sci 2005)

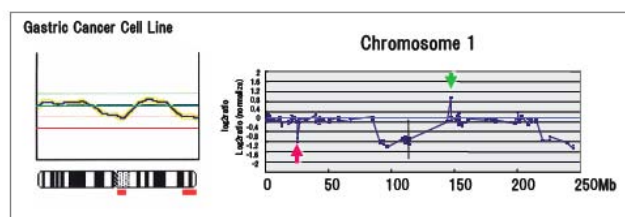
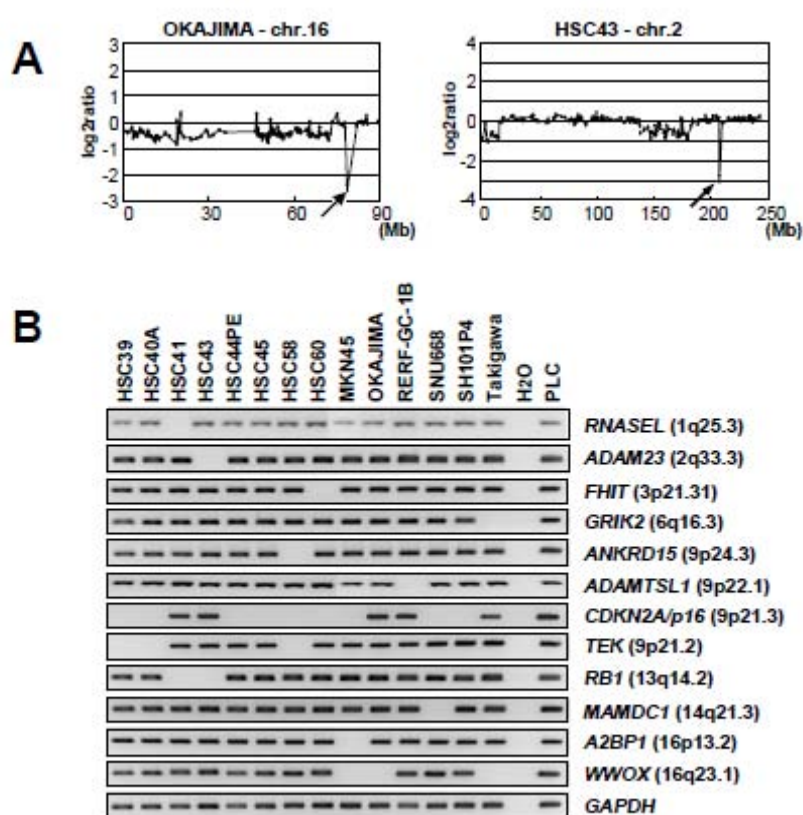


図1. Cancer Array-800で胃癌細胞株MKN45を解析した。通常のCGH法(左)では検出不能の微細1p36欠失(赤矢印)と1q21.3増幅(緑矢印)を検出する。

さらに、MCG Whole Genome Array-4500 により、新規の 2q33.3 ホモ欠失を見出し、標的遺伝子として ADAM23 を明らかにした。マイクロディセクションで採取した胃癌外科摘出サンプル 39 例の検討でもその 1 例で ADAM23 ホモ欠失を確認した。ADAM23 は正常胃上皮細胞で発現しているにもかかわらず、ホモ欠失(-)の胃癌細胞株において mRNA レベルにおいて発現はなかった。脱メチル化剤 5'-aza 2'-deoxycytidine の投与により、胃癌細胞株において ADAM23 発現の回復を認め、さらにプロモーター領域の CpG 島に高頻度の DNA メチル化を検出した。この ADAM23 プロモーターのメチル化は MSP 法により臨床検体でも確認できた。以上の結果から、2q33.3 に座位する ADAM23 がジェネティック／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., Oncogene 2005)



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を明らかにした。この DBC1 は喫煙者、高齢者の非腫瘍部肺上皮細胞でもメチル化を起こす傾向があることから、喫煙と肺非小細胞癌の発症機構を知る上でも興味深い。

③ 神経芽細胞腫の新たな癌抑制遺伝子の発見

神経芽細胞腫(NB)は小児固形腫瘍の中でも最も高頻度に発症し、臨床的にも病態解明は重要である。N-myc 遺伝子増幅を起こし1才以上の乳児に発症する予後不良群(StageⅢ,Ⅳ)と、1才未満の乳児に発症しその後神経分化を遂げながら自然退縮する予後良好群(StageⅠ,Ⅱ,Ⅳa)の2群に大別できるという特徴から、臨床面だけでなく生物学的にも注目されている腫瘍である。これらのことから我々は NB の分子病態解明をゲノム的アプローチで進めている。既に NB の高頻度 17q22-23 増幅の標的遺伝子の一つが PPM1D であることを報告した。(Saito-Ohara, Imoto et al., Cancer Res 2003)

今回、我々が開発した BAMCA 法(図3)を用いて予後良好例の NB 原発腫瘍(StageⅠ,Ⅱ)と進行例(StageⅢ,Ⅳ)から樹立された NB 細胞株との間での DNA メチル化の差を検索し、予後不良群において特異的にメチル化を受ける癌抑制遺伝子候補のスクリーニングを行った。その結果、3q21 に座位する BAC クローン(RP11-169N13)を陽性シグナルとして検出し、これに含まれる核内受容体型転写因子 *NR1I2*(別名 *PXR*)を標的遺伝子として同定した。*NR1I2* のプロモーター解析より CpG を含む intron 2-exon3 の領域にプロモーター活性を検出した。また StageⅢ,Ⅳの進行 NB では同領域の高度 DNA メチル化により *NR1I2* 発現が消失しており、この傾向は N-myc 増幅症例で有意に強く、またその傾向は予後不良例に認められた。この *NR1I2* の強制発現によりコントロールに比し明らかに腫瘍細胞の増殖が抑制されることから、進行 NB の癌抑制遺伝子候補と結論した。*NR1I2* は NB 悪性度を知るバイオマーカーのみならず分化誘導療法薬剤のスクリーニングを知る上でも非常に良い生体指標となる。(Misawa, Inoue et al., Cancer Res 2005)

(3) ゲノムアレイの応用技術開発

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 領域の解析法 BAMCA の開発(図3)

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、口腔・食道扁平上皮癌をはじめとする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行い、幾つかの癌抑制遺伝子候補を同定している。

2. 蛋白結合 DNA 領域の染色体ワイド検出法 ChIP on BAC-array の開発

全ゲノムにおける蛋白コード領域はわずか2%以下である。約98%の蛋白非コード領域には、プ

ロモーターやエンハンサー、さらに種を超えて保存されている CNE (Conserved Noncoding Element)などの時空間的転写調節ドメイン、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 BAC アレイとクロマチン免疫沈降法 (ChIP) を組み合わせた“ChIP on BAC-array”法を確立し、癌や発生に関与する転写因子結合領域の染色体ワイド解析を進めている。

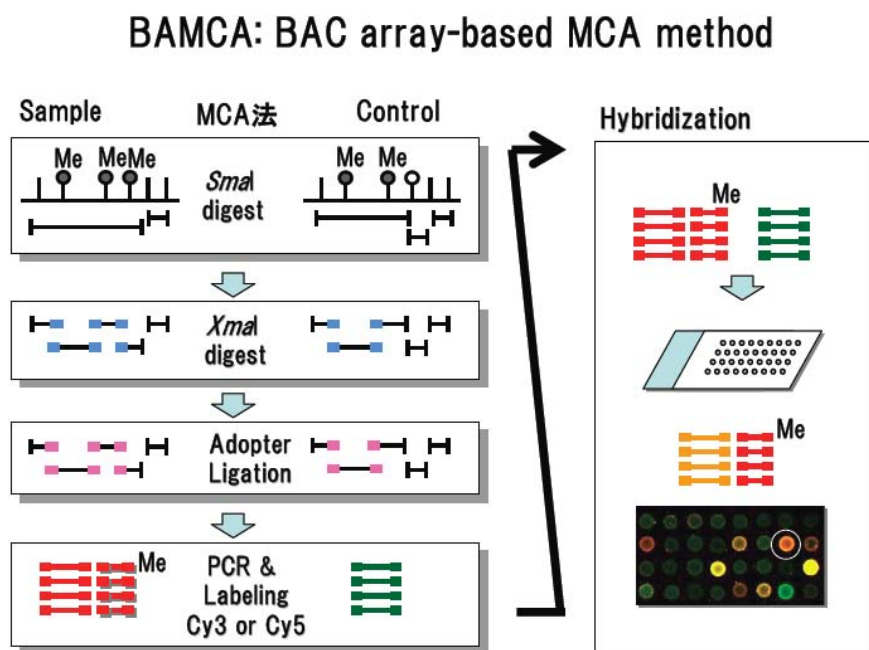


図3. BAC array-based MCA 法の概略を図で示した

(4) 遺伝性疾患のゲノム解析

我々の手によって標準化したゲノムアレイは、「遺伝疾患、染色体異常症の診断」、「癌の個性診断」の臨床応用技術としても多大な期待が寄せられている。また、既に幾つかの本態不明の遺伝疾患において疾患特異的なゲノム異常領域候補が明らかになってきており、原因遺伝子の探索の糸口となるものと期待している。現在、疾患遺伝子座の候補領域内ゲノムの機能解析を進めている。

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研究分担グループ長：稲澤 譲治（東京医科歯科大学、教授）
- ②研究項目：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研究分担グループ長：津田 均（防衛医科大学校（病理2）、助教授）
- ②研究項目：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研究分担グループ長：細田 文恵（国立がんセンター研究所（分子腫瘍）、主任研究官）
- ②研究項目：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研究分担グループ長：金井 弥栄（国立がんセンター研究所（病理部）、部長）
- ②研究項目：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研究分担グループ長：今井 高志（（財）放医研・フロンティア研究センター、プロジェクトリーダー）
- ②研究項目：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研究分担グループ長：江見 充（日本医科大学老人病研究所、教授）
- ②研究項目：cDNA マイクロアレイによる発現解析

造血器腫瘍解析グループ

- ①研究分担グループ長：小川 誠司（東京大学大学院造血再生医療寄付講座、助教授）
- ②研究項目：造血器腫瘍のゲノムアレイ解析

食道癌解析グループ

- ①研究分担グループ長：嶋田 裕（京都大学大学院医学研究科・腫瘍外科、講師）
- ②研究項目：食道癌のゲノム異常解析

小児癌解析グループ

- ①研究分担グループ長：杉本 徹（京都府立医科大学小児科、教授）
水谷 修紀（東京医科歯科大学大学院、教授）
- ②研究項目：小児腫瘍のゲノム異常解析

胃癌解析グループ

- ①研究分担グループ長：山岸 久一（京都府立医科大学消化器外科学、教授）

②研究項目：胃癌のゲノム異常解析

婦人科腫瘍解析グループ

①研究分担グループ長：坂本 優（佐々木研究所附属杏雲堂病院、部長）

②研究項目：研究項目:婦人科腫瘍のゲノム異常解析

XLMR 解析グループ

①研究分担グループ長：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研究分担グループ長：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研究分担グループ長：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研究分担グループ長：天竺 光雄（東京医科歯科大学大学院、教授）

②研究項目：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研究分担グループ長：正木 克典（日立ソフトウェアエンジニアリング（株）ライフサイエンス本部バイオインフォマティクス開発部、部長）

②研究項目：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（原著論文）発表

- Nishioka K, Hayashi S, Farrer MJ, Singleton AB, Yoshino H, Imai H, Kitami T, Sato K, Kuroda R, Tomiyama H, Mizoguchi K, Murata M, Toda T, Imoto I, Inazawa J, Mizuno Y, Hattori N: Clinical heterogeneity of alpha-synuclein gene duplication in Parkinson's disease. Ann Neurol. 59:298-309, 2006

- Nakada S, Katsuki Y, Imoto I, Yokoyama T, Nagasawa M, Inazawa J, Mizutani S: Early G2/M checkpoint failure as a molecular mechanism underlying etoposide-induced chromosomal aberrations. *J Clin Invest.* 116:80-89,2006
- Takada H, Imoto I, Tsuda H, Nakanishi Y, Ichikura T, Mochizuki H, Mitsufuji S, Hosoda F, Hirohashi S, Ohki M, Inazawa J: ADAM23, a possible tumor suppressor gene, is frequently silenced in gastric cancers by homozygous deletion or aberrant promoter hypermethylation. *Oncogene* 24:8051-8060,2005
- 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 112 gene in advanced-type neuroblastomas, identified by bacterial artificial chromosome array-based methylated CpG island amplification. *Cancer Res.* 65:10233-10242, 2005
- Hayashi S, Kurosawa K, Imoto I, Mizutani S, Inazawa J. Detection of Cryptic Chromosome Aberrations in a Patient with a balanced t(1;9)(p34.2;p24) by Array-based Comparative Genomic Hybridization. *Am J Med Genet A.* 139:32-6,2005
- Saigusa K, Hashimoto N, Tsuda H, Yokoi S, Maruno M, Yoshimine T, Aoyagi M, Ohno K, Imoto I, Inazawa J. Over-expressed Skp2 within 5p amplification detected by array-based comparative genomic hybridization is associated with poor prognosis of glioblastomas. *Cancer Sci.* 96:676-83, 2005.
- Peng WX, Shibata T, Katoh H, Kokubu A, Matsuno Y, Asamura H, Tsuchiya R, Kanai Y, Hosoda F, Sakiyama T, Ohki M, Imoto I, Inazawa J, Hirohashi S: Array-Based Comparative Genomic Hybridization Analysis of High-Grade Neuroendocrine Tumors of the Lung. *Cancer Sci.* 96.661-7,2005.
- Katoh H, Shibata T, Kokubu A, Ojima H, Loukopoulos P, Kanai Y, Kosuge T, Fukayama M, Kondo T, Sakamoto M, Hosoda F, Ohki M, Imoto I, Inazawa J, Hirohashi S. Genetic profile of hepatocellular carcinoma revealed by array-based comparative genomic hybridization: Identification of genetic indicators to predict patient outcome. *J Hepatol.* 43:862-74,2005
- Takada H, Imoto I, Tsuda H, Nakanishi Y, Ichikura T, Mochizuki H, Mitsufuji S, Hosoda F, Hirohashi S, Ohki M, Inazawa J: ADAM23, a Possible Tumor Suppressor Gene, is Frequently Silenced in Gastric Cancers by Homozygous Deletion or Aberrant Promoter Hypermethylation. *Oncogene* 24:8051-60,2005
- Tanami H, Tsuda H, Okabe S, Iwai T, Sugihara K, Imoto I, Inazawa J: Involvement of Cyclin D3 in Liver Metastasis of Colorectal Cancer, Revealed by Genome-wide Copy-number Analysis. *Laboratory Invest.* 85:1118-1129, 2005.
- Shibata T, Uryu S, Kokubu A, Hosoda F, Ohki M, Sakiyama T, Matsuno Y, Tsuchiya R, Kanai Y, Kondo T, Imoto I, Inazawa J, Hirohashi S. Genetic classification of lung

- adenocarcinoma based on array-based comparative genomic hybridization analysis: its association with clinicopathologic features. Clin Cancer Res. 11:6177-85, 2005.
- Matsumoto T, Okamoto R, Yajima T, Mori T, Okamoto S, Ikeda Y, Mukai M, Yamazaki M, Oshima S, Tsuchiya K, Nakamura T, Kanai T, Okano H, Inazawa J, Hibi T, Watanabe M: Increase of bone marrow-derived secretory lineage epithelial cells during regeneration in the human intestine. Gastroenterology 128:1851-67,2005
 - Ban S, Michikawa Y, Ishikawa K, Sagara M, Watanabe K, Shimada Y, Inazawa J, Imai T. Radiation sensitivities of 31 human oesophageal squamous cell carcinoma cell lines. Int J Exp Pathol. 86:231-40,2005.
 - Tanimoto T, Tsuda H, Imazeki N, Ohno Y, Imoto I, Inazawa J, Matsubara O: Nuclear expression of cIAP-1, an apoptosis inhibiting protein, predicts lymph node metastasis and poor patient prognosis in head and neck squamous cell carcinomas. Cancer Lett 224:141-51, 2005
 - Ban S, Ishikawa K, Kawai S, Koyama-Saegusa K, Ishikawa A, Shimada Y, Inazawa J, Imai T: Potential in a single cancer cell to produce heterogeneous morphology, radiosensitivity and gene expression. J Radiat Res (Tokyo). 46:43-50, 2005
 - Kuroda H, Moritake H, Sawada K, Kuwahara Y, Imoto I, Inazawa J, Sugimoto T: Establishment of a cell line from a malignant rhabdoid tumor of the liver lacking the function of two tumor suppressor genes, hSNF5/INI1 and p16. Cancer Genet Cytogenet 158:172-9, 2005
 - Tanaka E, Hashimoto Y, Ito T, Okumura T, Kan T, Watanabe G, Imamura M, Inazawa J, Shimada Y: The clinical significance of Aurora-A/STK15/BTAK expression in human esophageal squamous cell carcinoma. Clin Cancer Res 11:1827-34, 2005
 - Izumi H, Inoue J, Yokoi S, Hosoda H, Shibata T, Sunamori M, Hirohashi S, Inazawa J, Imoto I: Frequent silencing of *DBP1* is by genetic or epigenetic mechanisms in non-small cell lung cancers. Hum Molec Genet 14:997-1007, 2005

(2) 特許出願

H17 年度出願件数： 1 件 (CREST 研究期間累積件数： 4 件)