

「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

間野 博行

(自治医科大学医学部 教授)

「遺伝子発現調節機構の包括的解析による疾病の個性診断」

1. 研究実施の概要

有効なテラーメイド医療のためには、ゲノム情報を利用した形でのリアルタイムな患者個々の疾病の評価が不可欠である。その実現のためには疾患責任細胞・組織における遺伝子発現プロファイルおよびエピジェネティックな変化をゲノムワイドで評価し、それに基づいた新規疾患分類法、診断法、予後予測法及び治療法を開発することが必要である。この目的のために本研究計画においては、様々なヒト疾患の発症責任細胞を純化・保存する大規模バンク事業を実施し、これらを試料とした包括的ゲノミクス解析を自治医科大学ゲノム機能研究部にて行う。実際の解析手法としては DNA チップによる網羅的遺伝子発現解析を行うだけでなく、ゲノムワイドなエピジェネティック解析および染色体コピー数の解析を統合的に行い、疾患の病態を解明する。また実際の臨床検体収集事業も、血液悪性腫瘍、消化器腫瘍および心筋組織のバンク事業が順調に進行している。

2. 研究実施内容

(1) 血液疾患

急性骨髄性白血病(AML)およびその類縁疾患の鑑別診断はいまだなお形態学的特徴に依存するものが多く、各患者の予後予測には必ずしも有効ではない。我々は各種白血病類縁疾患患者より、疾患責任分画を純化保存する大規模事業を行い、得られた臨床検体に対してDNAチップによる網羅的遺伝子発現解析を行った。その結果例えばAMLについては標準的な化学療法に対する反応性を予測する遺伝子セットの抽出に成功した。同様に、成人T細胞白血病(ATL)に対してもCD4陽性白血病分画をDNAチップにより解析し、慢性期から急性期へ移行する悪性化機構に関与する遺伝子の同定に成功した。また悪性リンパ腫についてはSNPタイピングアレイを用いた染色体コピー数の網羅的定量を行い、T細胞性リンパ腫における予後関連部位を同定することに成功した。本部位は一部のT細胞性リンパ腫患者において遺伝子重複が生じており、そのような患者は化学療法に抵抗性で、生命予後が不良であることが明らかになった。このように各種造血器悪性腫瘍において予後にリンクする遺伝子発現変化・染色体コピー数変化を検出することに成功した。

(2) 消化器腫瘍

これまで大腸癌 249 例および膵臓癌 250 例を超える多くの消化器腫瘍臨床検体を収集することに成功し、網羅的遺伝子発現解析、染色体コピー数解析など多くのゲノミクス解析を行った。例えば大腸癌の発生に新たな癌抑制遺伝子が関与することを明らかにした。大腸癌の一部には、ゲノム中のマイクロサテライトの反復数が大きく変動する microsatellite instability (MSI)陽性が特徴的に認められる MSI 陽性大腸癌が存在する。我々は MSI 陽性大腸癌症例10例と、年齢を一致させた MSI 陰性大腸癌10例とを選び出し、DNA チップによる発現比較を行った。その結果 MSI 陽性大腸癌において AXIN2 遺伝子の発現量が特異的に低下していることを明らかにした。AXIN2 遺伝子の発現低下は同遺伝子プロモーター領域のメチル化によることが明らかになり、しかもこの遺伝子の発現低下は WNT シグナルの活性化を誘導して癌化に寄与することが確認された。したがって MSI 陽性大腸癌の発生には AXIN2 遺伝子のサイレンシングが重要な役割を担うことが示された。また膵臓癌についても正常膵管上皮と膵臓癌細胞との間で cDNA サブトラクションスクリーニングを行い、後者においてのみ特異的発現する膵臓癌マーカーのスクリーニングを行った。

(3) うっ血性心不全

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

3. 研究実施体制

DNA チップ解析グループ

- ①研究分担グループ長：間野 博行（自治医科大学、教授）
- ②研究項目：各種疾病における疾患責任細胞を純化保存するバンク事業を行い、これらを用いた DNA チップ解析を行う。

バイオインフォマティクス解析グループ

- ①研究分担グループ長：大橋 順（東京大学、助手）
- ②研究項目：膨大な遺伝子発現プロファイルに対してバイオインフォマティクス処理を行い、新規分子診断マーカーの同定、遺伝子発現プロファイルに基づく疾患分類の試み、診断用 DNA チップにおける診断アルゴリズムの開発、などを行う。

4. 主な研究成果の発表（論文発表および特許出願）

(1) 論文（原著論文）発表

- Yamada T, Katagiri H, Ishigaki Y, Ogihara T, Imai J, Uno K, Hasegawa Y, Gao J, Ishihara H, Nijima A, Mano H, Aburatani H, Asano T & Oka Y "Signals from intra-abdominal fat modulate insulin and leptin sensitivity through different mechanisms: neuronal involvement in food-intake regulation" *Cell Metab*, **3**: 223-229, 2006.
- Takada S, Ota J, Kansaku N, Yamashita H, Izumi T, Ishikawa M, Wada T, Kaneda R, Choi YL, Koinuma K, Fujiwara S, Aoki H, Kisanuki H, Yamashita Y & Mano H "Nucleotide sequence and embryonic expression of quail and duck Sox9 genes" *Gen Comp Endocrinol*, **145**: 208-213, 2006.
- Taguchi J, Miyazaki Y, Tsutsumi C, Sawayama Y, Ando K, Tsushima H, Fukushima T, Hata T, Yoshida S, Kuriyama K, Honda S, Jinnai I, Mano H & Tomonaga M "Expression of the myeloperoxidase gene in AC133 positive leukemia cells relates to the prognosis of acute myeloid leukemia" *Leuk Res*, in press 2006.
- Shi L, Xu SB, Ohashi J, Sun H, Yu JK, Huang XQ, Tao YF, Yu L, Horai S, Chu JY & Tokunaga K "HLA-A, HLA-B, and HLA-DRB1 alleles and haplotypes in Naxi and Han populations in southwestern China (Yunnan province)" *Tissue Antigens*, **67**: 38-44, 2006.
- Ohashi J, Naka I, Tokunaga K, Inaoka T, Ataka Y, Nakazawa M, Matsumura Y & Ohtsuka R "Brief communication: Mitochondrial DNA variation suggests extensive gene flow from Polynesian ancestors to indigenous Melanesians in the northwestern Bismarck Archipelago" *Am J Phys Anthropol*, 2006.
- Ohashi J, Naka I, Kimura R, Tokunaga K, Yamauchi T, Natsuhara K, Furusawa T, Yamamoto R, Nakazawa M, Ishida T & Ohtsuka R "Polymorphisms in the ABO blood group gene in three populations in the New Georgia group of the Solomon Islands" *J Hum Genet*, 2006.
- Mano H "DNA microarray analysis of myelodysplastic syndrome" *Leuk Lymphoma*, **47**: 9-14, 2006.
- Koinuma K, Yamashita Y, Liu W, Hatanaka H, Kurashina K, Wada T, Takada S, Kaneda R, Choi YL, Fujiwara SI, Miyakura Y, Nagai H & Mano H "Epigenetic silencing of AXIN2 in colorectal carcinoma with microsatellite instability" *Oncogene*, **25**: 139-146, 2006.
- Horikoshi M, Hara K, Ohashi J, Miyake K, Tokunaga K, Ito C, Kasuga M, Nagai R & Kadowaki T "A Polymorphism in the AMPK{alpha}2 Subunit Gene Is Associated With Insulin Resistance and Type 2 Diabetes in the Japanese Population" *Diabetes*, **55**: 919-923, 2006.
- Hirayasu K, Ohashi J, Kashiwase K, Takanashi M, Satake M, Tokunaga K & Yabe T "Long-term persistence of both functional and non-functional alleles at the leukocyte

- immunoglobulin-like receptor A3 (LILRA3) locus suggests balancing selection" *Hum Genet*, 2006.
- Zhang X, Tochigi M, Ohashi J, Maeda K, Kato T, Okazaki Y, Kato N, Tokunaga K, Sawa A & Sasaki T "Association study of the DISC1/TRAX locus with schizophrenia in a Japanese population" *Schizophr Res*, **79**: 175–180, 2005.
 - Takada S, Mano H & Koopman P "Regulation of Amh during sex determination in chickens: Sox gene expression in male and female gonads" *Cell Mol Life Sci*, **62**: 2140–2146, 2005.
 - Ohki R, Yamamoto K, Ueno S, Mano H, Misawa Y, Fuse K, Ikeda U & Shimada K "Gene expression profiling of human atrial myocardium with atrial fibrillation by DNA microarray analysis" *Int J Cardiol*, **102**: 233–238, 2005.
 - Ohashi J, Naka I, Doi A, Patarapotikul J, Hananantachai H, Tangpukdee N, Looareesuwan S & Tokunaga K "A functional polymorphism in the IL1B gene promoter, IL1B -31C>T, is not associated with cerebral malaria in Thailand" *Malar J*, **4**: 38, 2005.
 - Nam MH, Hijikata M, Tuan le A, Lien LT, Shojima J, Horie T, Nakata K, Matsushita I, Ohashi J, Tokunaga K & Keicho N "Variations of the CFTR gene in the Hanoi-Vietnamese" *Am J Med Genet A*, **136**: 249–253, 2005.
 - Koinuma K, Kaneda R, Toyota M, Yamashita Y, Takada S, Choi YL, Wada T, Okada M, Konishi F, Nagai H & Mano H "Screening for genomic fragments that are methylated specifically in colorectal carcinoma with a methylated MLH1 promoter" *Carcinogenesis*, **26**: 2078–2085, 2005.
 - Kisanuki H, Choi YL, Wada T, Moriuchi R, Fujiwara SI, Kaneda R, Koinuma K, Ishikawa M, Takada S, Yamashita Y & Mano H "Retroviral expression screening of oncogenes in pancreatic ductal carcinoma" *Eur J Cancer*, **41**: 2170–2175, 2005.
 - Kaneda R, Ueno S, Yamashita Y, Choi YL, Koinuma K, Takada S, Wada T, Shimada K & Mano H "Genome-wide screening for target regions of histone deacetylases in cardiomyocytes" *Circ Res*, **97**: 210–218, 2005.
 - Ishikawa M, Yoshida K, Yamashita Y, Ota J, Takada S, Kisanuki H, Koinuma K, Choi YL, Kaneda R, Iwao T, Tamada K, Sugano K & Mano H "Experimental trial for diagnosis of pancreatic ductal carcinoma based on gene expression profiles of pancreatic ductal cells" *Cancer Sci*, **96**: 387–393, 2005.
 - Hara K, Horikoshi M, Kitazato H, Yamauchi T, Ito C, Noda M, Ohashi J, Froguel P, Tokunaga K, Nagai R & Kadowaki T "Absence of an association between the polymorphisms in the genes encoding adiponectin receptors and type 2 diabetes" *Diabetologia*, **48**: 1307–1314, 2005.

- Fujiwara S, Yamashita Y, Choi YL, Wada T, Kaneda R, Takada S, Maruyama Y, Ozawa K & Mano H "Transforming activity of the lymphotoxin-beta receptor revealed by expression screening" *Biochem Biophys Res Commun*, **338**: 1256-1262, 2005.
- Choi YL, Moriuchi R, Osawa M, Iwama A, Makishima H, Wada T, Kisanuki H, Kaneda R, Ota J, Koinuma K, Ishikawa M, Takada S, Yamashita Y, Oshimi K & Mano H "Retroviral expression screening of oncogenes in natural killer cell leukemia" *Leuk Res*, **29**: 943-949, 2005.

(2) 特許出願

H17 年度出願件数： 1 件 (CREST 研究期間累積件数： 3 件)