

「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 16 年度採択研究代表者

油谷 浩幸

(東京大学 国際・産学共同研究センター 教授)

「染色体および RNA の機能変化からの疾患の系統的解析」

1. 研究実施の概要

本研究においては腫瘍および正常組織検体の染色体および RNA の機能変化に着目して疾患の解析を行う。アレル別の染色体変異解析、腫瘍特異的転写産物についての系統的解析を中心に進めると共に、アレル間の遺伝子発現量の多様性についての解析技術開発を進める。今年度までにゲノタイピングアレイデータを用いてアレル別にコピー数を推定するアルゴリズムの開発、さらに国際コンソーシウムに参画して HapMap プロジェクトの 270 名の検体を用いて健常人における染色体構造変異の分布及び頻度を解析中である。MALDI-TOF 質量分析装置を用いての複数 SNP の多検体同時測定系の立ち上げ、定量的ゲノムコピー数測定手法の樹立も行った。一方、薬物応答性などの多様性を検討するための 96 名の不死化細胞株パネルの構築も進めている。本研究成果により治療法開発のための新規バイオマーカー、新規治療標的分子の同定及び開発が進み、第 2 期のゲノム創薬として、オーダーメイド医療の実現化へ向けての加速化が期待される。

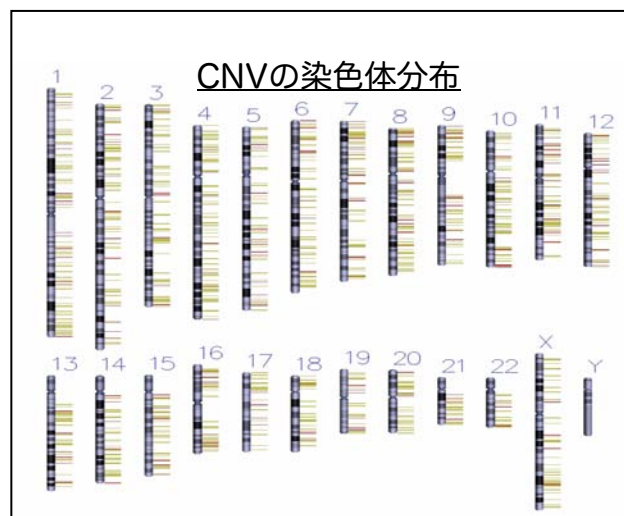
2. 研究実施内容

(1) 染色体変異の系統的解析技術開発

ヒトの疾患罹患性、薬剤応答性を規定する遺伝子多型としては SNP が最もよく知られているが、最近になってヒトには数百キロ bp に及ぶ領域のコピー数の多型 CNV (copy number variant)が従来の予想よりも高頻度に存在することが明らかになってきた。トロント大学、Sanger センター、Harvard 大学、Affymetrix 社と国際コンソーシウムを形成し、HapMap プロジェクトにおいて解析された 270 名の検体について CNV の頻度および分布に関する検討を進めた。Sanger センターが BAC アレイによる解析、我々は Affymetrix 社の Jones らと共に高密度タイピングアレイによる解析を担当した。CNV の検出には SNP 検出に開発された 500K アレイデータに基づいて、石川研究員らが独自に開発したアレル別コピー数解析プログラムである Genome Imbalance Map (GIM)を改良、応用した。17 年 7 月（トロント）および 11 月（ケンブリッジ）に合同検討会議を開催し、平成 17 年度末にデータフリーズを行い、データの統合および詳細解析を進めている。500K アレイデータ

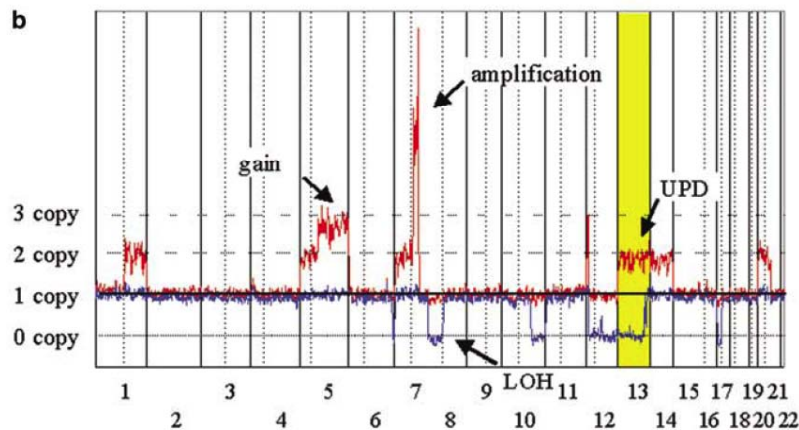
からの予備的検討では1MB以上のサイズにおよぶCNVが存在し、5%以上のゲノム領域、1000前後の遺伝子が含まれることが予想される。なお、不死化リンパ球株の中には染色体変化が高度な検体も認められ、培養中に生じたものと予想される。現在、再生医療への応用などが検討されているヒトES細胞の安定性をモニタリングする上でも考慮すべき点であると考えられる。

図1 ヒトCNVの分布



一方、がん細胞における染色体変異について、肝細胞癌、子宮体癌、グリオーマ、肺癌などの解析を進め、肝細胞癌の分化度の低下につれて染色体変異が増加し、コピー数が2本以上でも LOH を示す Uniparental disomy も頻繁に認められた。染色体コピー数と遺伝子発現量には正の相関が認められ、発現プロファイルの解釈にはコピー数の影響が反映されることが示された。オリゴデンドログリオーマでは従来認められている 1p 及び 19q の LOH が確認された一方、1p/19qLOH がない症例では他の染色体異常が高頻度に認められた。それぞれの腫瘍で染色体ホモ欠失領域が同定され、細胞増殖および悪性化への関与についての検討に着手した。

図2 肝細胞癌のアレル別コピー数解析



(2) アレル間の遺伝子発現量の多様性解析法

ヒト不死化リンパ球においてのアレル間の遺伝子発現多様性を検討した。ゲノムワイドな検出により、X 染色体の片側アレルの不活化やインプリンティング遺伝子が確認されたほか、多くの遺伝子においてアレル間の発現レベルは異なっていることが明らかにされた。今後これらのアレル間発現多様性の遺伝性を CEPH 家系検体で検証するとともに、制御 SNP の同定、さらには疾病との関連解析を進める予定である。MALDI-TOF 質量分析計によるゲノタイピングは正確、迅速であり、蛍光色素による標識も不要であることからタイピングの低コスト化を実現できると考えられ、測定装置の導入、複数 SNP の多検体同時測定系の立ち上げを行った。また、上述の CNV の定量的な検証にも本装置を使用した。

(3) RNA 変異の系統的解析技術開発

エクソンアレイによる転写産物の多様性の解析に着手した。トータル RNA からランダムプライム法により cDNA 合成後、IVT 法による増幅をおこない、全長を標識した。スプライシング変異についての検出アルゴリズムの開発に着手した。

3. 研究実施体制

「油谷」グループ

①研究分担グループ長：油谷 浩幸（東京大学、教授）

②研究項目：

- 1) 染色体変異の系統的解析技術開発
- 2) アレル間の遺伝子発現量の多様性解析法
- 3) RNA 変異の系統的解析技術開発

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

○ Huang J, Wei W, Chen J, Zhang J, Liu G, Di X, Mei R, Ishikawa S, Aburatani H,

- Jones KW, Shapero MH. CARAT: A novel method for allelic detection of DNA copy number changes using high density oligonucleotide arrays. **BMC Bioinformatics**. 2006 Feb 21;7(1):83
- Yamamoto Y, Uehara A, Watanabe A, Aburatani H, Komiyama M., Chemical-Reaction-Based Site-Selective DNA Cutter for PCR-Free Gene Manipulation. **Chembiochem**. 7(4):673-677. 2006
 - Yamashita K, Igarashi H, Kitayama Y, Ozawa T, Kiyose S, Konno H, Kazui T, Ishikawa S, Aburatani H, Tanioka F, Suzuki M, Sugimura H. Chromosomal Numerical Abnormality Profiles of Gastrointestinal Stromal Tumors. **Jpn J Clin Oncol**. 36(2):85-92, 2006
 - Tanaka T, Jiang S, Hotta H, Takano K, Iwanari H, Sumi K, Daigo K, Ohashi R, Sugai M, Ikegame C, Umezu H, Hirayama Y, Midorikawa Y, Hippo Y, Watanabe A, Uchiyama Y, Hasegawa G, Reid P, Aburatani H, Hamakubo T, Sakai J, Naito M, Kodama T. Dysregulated expression of P1 and P2 promoter-driven hepatocyte nuclear factor-4alpha in the pathogenesis of human cancer. **J Pathol**. 208(5): 662-672. 2006.
 - Chen Y, Guo Y, Ge X, Itoh H, Watanabe A, Fujiwara T, Kodama T, Aburatani H. Elevated expression and potential roles of human Sp5, a member of Sp transcription factor family, in human cancers. **Biochem Biophys Res Commun**. 340(3):758-66, 2006
 - Aggarwal A, Li Guo D, Hoshida Y, Tsan Yuen S, Chu KM, So S, Boussioutas A, Chen X, Bowtell D, Aburatani H, Leung SY, Tan P. Topological and functional discovery in a gene coexpression meta-network of gastric cancer. **Cancer Res**. 66(1):232-41. 2006
 - Nakajima H, Shibata F, Fukuchi Y, Goto-Koshino Y, Ito M, Urano A, Nakahata T, Aburatani H, Kitamura T. Immune suppressor factor confers stromal cell line with enhanced supporting activity for hematopoietic stem cells. **Biochem Biophys Res Commun**. 340(1):35-42. 2006
 - Sasayama T, Kato M, Aburatani H, Kuzuya A, Komiyama M. Simultaneous Genotyping of Indels and SNPs by Mass Spectroscopy. **J Am Soc Mass Spectrom**. 17(1):3-8. 2006
 - Yamazaki S, Miki K, Takayama T, Hasegawa K, Sata M, Midorikawa Y, Aburatani H, Makuuchi M. Hepatic gene induction in murine bone marrow after hepatectomy. **J Hepatol**. 44(2):325-333. 2006
 - Matsubara D, Niki T, Ishikawa S, Goto A, Ohara E, Yokomizo T, Heizmann CW, Aburatani H, Moriyama S, Moriyama H, Nishimura Y, Funata N, Fukayama M.

- Differential expression of S100A2 and S100A4 in lung adenocarcinomas: Clinicopathological significance, relationship to p53 and identification of their target genes. **Cancer Sci.** 96(12):844-57. 2005
- Tauchi M, Hida A, Negishi T, Katsuoka F, Noda S, Mimura J, Hosoya T, Yanaka A, Aburatani H, Fujii-Kuriyama Y, Motohashi H, Yamamoto M. Constitutive expression of aryl hydrocarbon receptor in keratinocytes causes inflammatory skin lesions. **Mol Cell Biol.** 25(21):9360-8. 2005
 - Mashima R, Saeki K, Aki D, Minoda Y, Takaki H, Sanada T, Kobayashi T, Aburatani H, Yamanashi Y, Yoshimura A. FLN29, a novel interferon- and LPS-inducible gene acting as a negative regulator of toll-like receptor signaling. **J Biol Chem.** 280(50):41289-97. 2005
 - Katsuoka F, Motohashi H, Ishii T, Aburatani H, Engel JD, Yamamoto M. Genetic Evidence that Small Maf Proteins Are Essential for the Activation of Antioxidant Response Element-Dependent Genes. **Mol Cell Biol.** 25(18):8044-51. 2005
 - Inamura K, Fujiwara T, Hoshida Y, Isagawa T, Jones MH, Virtanen C, Shimane M, Satoh Y, Okumura S, Nakagawa K, Tsuchiya E, Ishikawa S, Aburatani H, Nomura H, Ishikawa Y. Two subclasses of lung squamous cell carcinoma with different gene expression profiles and prognosis identified by hierarchical clustering and non-negative matrix factorization. **Oncogene.** 24(47):7105-13. 2005
 - Yamashita S, Tanaka Y, Tsutsumi S, Aburatani H, Minato N, Ihara S. Analysis of mechanism for human gammadelta T cell recognition of nonpeptide antigens. **Biochem Biophys Res Commun.** 334(2):349-360. 2005
 - Ishikawa S, Komura D, Tsuji S, Nishimura K, Yamamoto S, Panda B, Huang J, Fukayama M, Jones KW, Aburatani H. Allelic dosage analysis with genotyping microarrays. **Biochem Biophys Res Commun.** 333(4):1309-1314, 2005
 - Tsuji AB, Sugyo A, Ogiu T, Sagara M, Kimura T, Ishikawa A, Sudo H, Ohtsuki M, Aburatani H, Imai T, Harada YN. Fine mapping of radiation susceptibility and gene expression analysis of LEC congenic rat lines. **Genomics.** 86(3):271-9 2005
 - Ge X, Yamamoto S, Tsutsumi S, Midorikawa Y, Ihara S, Wang SM, Aburatani H., Interpreting expression profiles of cancers by genome-wide survey of breadth-of-expression in normal tissues. **Genomics** 86(2):127-141, 2005
 - Kano M, Tsutsumi S, Kawahara N, Wang Y, Mukasa A, Kirino T, Aburatani H. A meta-clustering analysis indicates distinct pattern alteration between two

series of Gene Expression profiles for induced ischemic tolerance in rats.
Physiological Genomics. 21(2):274-83. 2005

- 西村邦裕、石川俊平、広田光一、油谷浩幸、廣瀬通孝 ゲノムコピー数異常検出のための可視化手法 日本データベース学会 Letters 4(3)：1-4、2005

(2) 特許出願

H17 年度出願件数： 0 件 (CREST 研究期間累積件数： 2 件)