

「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。現在までに、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、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 X-tiling アレイ、⑤既知遺伝疾患、染色体異常症の診断アレイ (Genome Disorder(GD)アレイ)、⑥ヒトゲノム中の Copy number variation (CNV) の 667 座位を検出するアレイの 6 種類、総数 8677 個の BAC クローンを配置した高精度の CGH アレイを完成させた。これら独自に開発した in-house BAC アレイを用いて各種癌の 700 例以上を解析し、新しい遺伝子増幅やホモ欠失を見出し、これを指標に新規の癌遺伝子あるいは抑制遺伝子候補を同定した。加えて、BAC アレイをプラットフォームに DNA メチル化領域のスクリーニングを行う BAC array-based methylated CpG-island amplification (BAMCA)法を独自に開発した。本 BAMCA 法を用いて DNA メチル化によって不活性化される癌抑制遺伝子候補を見出した。

GD アレイを従来の染色体検査を代替・補完するゲノム解析ツールとして実用化レベルとするため大学付属病院や小児医療センターの 17 の医療機関と連携し、GD アレイ診断法実用化の feasibility study を実施した。現在までに 236 例の未知先天異常症の解析を行い 36 例(15.3%)に潜在的染色体異常を検出した。また、国立精神神経センター・後藤雄一博士を主任研究者として収集されている精神発達遅滞バイオリソースの 58 家系 84 例の X-tiling アレイ CGH 解析を終え 4 家系に病態との関連が疑われるゲノムコピー数異常を検出した。

2. 研究実施内容

1. 癌のゲノム構造異常の網羅的スクリーニング

1) CGH データベースの構築

25 種類以上の癌の総計 1000 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/cghdatabase/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 database Japan”として紹介されている。2005 年 3 月には、その内容を更新し、アクセス件数は 18300 件(2007/04/06)を超えた。さらに、アレイ CGH による癌細胞株 700 例の解析を終了し、これらも順次データベース化の予定である。

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

胃癌: アレイ CGH 解析より 2q33.3 ホモ欠失を見出し、ADAM23 が genetic/epigenetic 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) 引き続き、9p24.2 ホモ欠失を見出し、これを糸口に標的遺伝子 VLDLR がホモ欠失のみでなく DNA メチル化により高頻度に不活化される胃癌抑制遺伝子候補であることを明らかにした。(Takada et al., Oncogene 2006)

食道癌: BAMCA 法により食道扁平上皮癌(ESC)細胞株における DNA メチル化領域のゲノムワイドスクリーニングを行い、異常 DNA メチル化の標的遺伝子候補として CRABP1 を同定した。CRABP1 のプロモーター領域のメチル化は臨床サンプルでも認められ、発現低下は遠隔リンパ節転移と関連していた。さらに CRABP1 強制発現による細胞増殖抑制作用があり、ESC の癌抑制遺伝子である可能性を示した。(Tanaka et al., Oncogene 2007)

2) 口腔癌の癌関連遺伝子解析

本研究プロジェクトにおいて食道扁平上皮癌(ESC)の癌抑制遺伝子候補として LRP1B を同定したが(Sonoda et al., Cancer Res 2004)、本 LRP1B は口腔癌においても細胞株、臨床検体においても高頻度にメチル化による不活化を受けており、口腔癌発生に関与する可能性が示唆された。(Nakagawa et al., Cancer Sci. 2006)

口腔扁平上皮癌(OSCC)で *PIK3CA* 遺伝子変異ならびに PI3K-AKT シグナル伝達系の活性化の状態を調べ、約 10%に、遺伝子変異を見出した。さらに、*PIK3CA* を癌治療の分子標的とするには *PIK3CA* 変異特異的な阻害剤の開発が必須であることを示した。(Kozaki et al., Cancer Sci. 2006)

3) 肺癌の新規癌関連遺伝子の同定

肺非小細胞癌(NSCLC)細胞株のアレイ CGH 解析の結果、新規 13q21.2 ホモ欠失を 1 細胞株に検出し Protocadherin 20 (PCDH20) が標的遺伝子であることを明らかにした。PCDH20 の mRNA レ

ベルでの発現は細胞株の 52.6% (10/19)で消失し、これが PCDH20 遺伝子プロモーターのメチル化に起因することを明らかにした。さらに NSCLC 臨床検体 59 例の解析で、その 54.2% (32/59)にメチル化を検出し、PCDH20 メチル化陽性例は有意に予後不良であり、多変量解析の結果、他の臨床病理学的諸因子とは独立のバイオマーカーであることを示した。(Imoto et al., Cancer Res 2006)

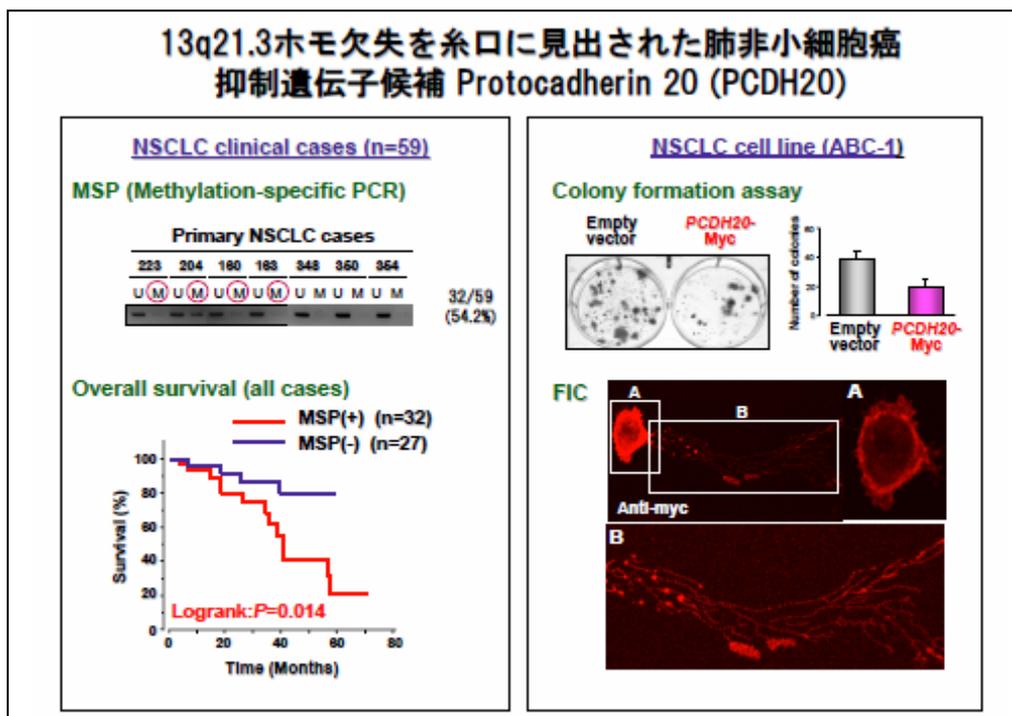


図1 肺癌抑制遺伝子候補 PCDH20 はホモ欠失のない症例では高頻度にプロモーター領域メチル化を受けており、メチル化陽性例は陰性例に比し予後不良である。コロニー形成試験により増殖抑制効果が確認され、また、強制発現により神経突起様の形態を呈し、PCDH20 蛋白は先端部に濃縮して局在する傾向にある。

4) 甲状腺未分化癌の新規癌関連遺伝子の同定

甲状腺未分化癌(Anaplastic thyroid carcinoma, ATC) は全癌の中で最も予後不良であり、発症の分子機構の詳細は不明である。有効な治療法も確立されていない。ATC 細胞株のアレイ CGH 解析を行い新規 8p12 増幅を検出し、その共通増幅領域から標的癌遺伝子候補の DUSP26 を同定した。この脱リン酸化酵素 DUSP26 を DUSP26 発現の低い ATC 細胞株に強制発現させると細胞増殖能は亢進し、一方、発現細胞株で DUSP26 をノックダウンすると細胞増殖抑制効果が認められた。この効果は p38MAPK を基質としたアポトーシス抑制作用に起因する可能性が示唆され、その阻害剤は ATC の分子標的治療の候補となる。(Yu et al., Oncogene 2007)

5) グリオーマの新規癌抑制遺伝子の発見

アレイ CGH と網羅的発現の統合解析より、グリオーマにおいて高頻度に見られる 13q 欠失の標的遺伝子候補として RGC32 を同定した。RGC32 は臨床検体でも進行例かつ p53 点突然変異例で発現が低下していた。RGC32 は転写因子 p53 の直接標的であることを明らかにした。細胞分裂期に中心体に局在し、Plk1 と結合して細胞周期進行を抑制することで細胞増殖の抑制作用を持つ癌抑制遺伝子の可能性が示唆された。本研究成果は掲載紙 *Oncogene* のハイライトで紹介された。(Saigusa et al., *Oncogene* 2007)

2. ゲノムアレイの応用技術開発

1) メチル化 DNA 領域の解析法 BAMCA の開発

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) 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、神経芽腫の癌抑制遺伝子候補である NR1H2 (Misawa A & Inoue J et al., *Cancer Res* 2005)や PGDFR2 (Sugino Y et al., *Oncogene* 2007)、さらに食道扁平上皮癌の CRABP1(Tanaka K et al., *Oncogene* 2007)を同定した。

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

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。

3. 遺伝性疾患のゲノム解析

1) 遺伝医療におけるゲノムアレイ診断法実用化

従来の染色体検査を代替・補完するゲノム解析ツールとして作製した GD アレイの実用化レベルであることの検証を 17 の小児疾患医療施設や大学付属病院 (小児科) とコンソーシアムを形成し、feasibility study をおこなっている。既に 236 例の未知先天異常症の解析を行い、うち 36 例 (15.3%) で潜在的染色体異常を検出し、実用レベルの段階であることが検証されてきている。また、これら全症例でリンパ球 LCL 化を実施しておりバイオリソースとしての保存体制も整備している。

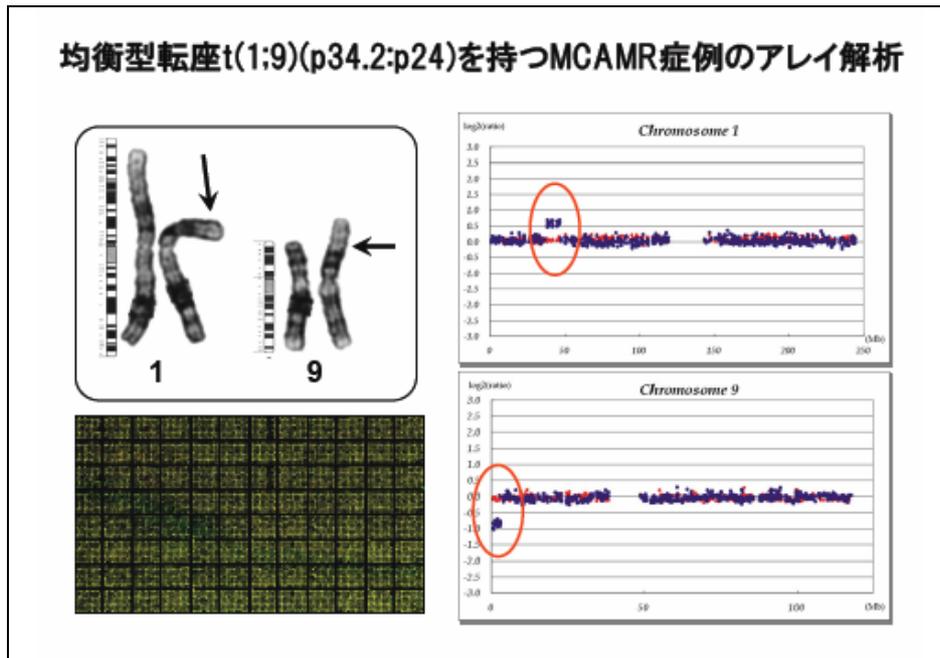


図2 自作のゲノムアレイは従来法では不明であった疾患に関連する潜在的ゲノム異常を明らかにする。

2) X染色体連鎖精神発達遅滞のゲノム解析

精神発達遅滞(MR)の10~20%はX染色体に座位する遺伝子が原因とされ、これらはX連鎖性精神発達遅滞(X-linked Mental Retardation, XLMR)として他のMRとは独立した概念でとらえられている。現在までにXLMRの原因遺伝子は少なくとも58遺伝子が同定されているが、実際にはXLMRの原因遺伝子は少なくとも140種類以上存在すると推定されている。このことから、X-tilingアレイを用いたMR関連遺伝子座の探索とMR関連遺伝子の同定を積極的に進めた。原因不明とされているSchinzel-Giedion症候群(SGS)の患児でXq22.3に1.1メガベースの重複を検出し、同領域内に座位する*ILIRAPL2*が本疾患の原因遺伝子である可能性を示した。(Hayashi et al., J Hum Genet 2007)さらに、46,XX,t(X;15)(q28;p11.2)の均衡型転座を持つMR女児と、核型正常で早期発症MRなどを伴う非典型的ハンター症候群と診断された男児の2症例について分子遺伝学的解析を行い、FMR2の欠失変化を微細構造異常として検出し、これがMRの症状発現の原因になっている可能性を示した。(Honda et al., AM J Med Genet 2007)また、現在、国立精神神経センター・後藤雄一博士を主任研究者としてXLMR家系も収集が進んでいる。現在までに58家系84例の解析を終え4家系にその病態形成との関連が示唆される微細ゲノム構造異常を見出した。

3. 研究実施体制

(1) 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 研究者名

稲澤 讓治(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

(2)組織アレイ開発グループ

①研究者名

津田 均(防衛医科大学校(病態病理) 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

(3)メンブレンアレイ開発グループ

①研究者名

細田 文恵(国立がんセ研究所(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

(4)癌多段階病変解析グループ

①研究者名

金井 弥栄(国立がんセ研究所(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

(5)発現解析グループ(1)

①研究者名

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

(6)発現解析グループ(2)

①研究者名

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

(7) 造血器腫瘍解析グループ

①研究者名

小川 誠司(東京大学大学院増結再生医療寄付講座 助教授)

②研究項目

造血器腫瘍のゲノムアレイ解析

(8) 食道癌解析グループ

①研究者名

嶋田 裕(兵庫医科大学第一外科 助教授)

②研究項目

食道癌のゲノム異常解析

(9) 小児癌解析グループ

①研究者名

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

(10) 胃癌解析グループ

①研究者名

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

(11) 婦人科腫瘍解析グループ

①研究者名

坂本 優(佐々木研究所附属杏雲堂病院 部長)

②研究項目

婦人科腫瘍のゲノム異常解析

(12) XLMR解析グループ

①研究者名

松尾 雅文(神戸大学大学院医学系研究科 副部長)

②研究項目

X染色体異常症のアレイ解析

(13) てんかんゲノム解析グループ

①研究者名

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

(14) 肝胆膵腫瘍解析グループ

①研究者名

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

(15) 口腔頸部癌解析グループ

①研究者名

天笠 光雄(東京医科歯科大学大学院 教授)

小村 健 (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

(16) アレイスキャナ解析ソフト開発グループ

①研究者名

正木 克典(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. 研究成果の発表等

(1) 論文発表(原著論文)

- Sugino Y, Misawa A, Inoue J, Kitagawa M, Hosoi H, Sugimoto T, Imoto I, Inazawa J. Epigenetic silencing of *prostaglandin E receptor 2 (PTGER2)* is associated with progression of neuroblastomas. *Oncogene* (in press)
- Tanaka K, Imoto I, Inoue J, Kozaki K, Tsuda H, Shimada Y, Aiko S, Yoshizumi Y, Iwai T, Kawano T, Inazawa J. Frequent methylation-associated silencing of a candidate tumor-suppressor, *CRABPI*, in esophageal squamous-cell carcinoma. *Oncogene* (in press)
- Shinoda Y, Kozaki K, Imoto I, Obara W, Tsuda H, Mizutani Y, Shuin T, Fujioka T, Miki T, Inazawa J. Association of *KLK5*-overexpression with invasiveness of urinary bladder carcinoma cells. *Cancer Sci.* (in press)

- Kawasaki T, Yokoi S, Tsuda H, Izumi H, Kozaki k, Aida S, Ozeki Y, Yoshizawa Y, Imoto I, Inazawa J: *BCL2L2* is a probable target for novel 14q11.2 amplification detected in a non-small cell lung cancer cell line. *Cancer Sci.* (in press)
- Hayashi S, Ono M, Makita Y, Imoto I, Mizutani S, Inazawa J. Fortuitous Detection of a Submicroscopic Deletion at 1q25 in a Girl With Cornelia-de Lange Syndrome Carrying t(5;13)(p13.1;q12.1) by Array-based Comparative Genomic Hybridization. *Am J Med Genet* (in press)
- Hayashi S, Honda S, Minaguchi M, Makita Y, Okamoto N, Kosaki R, Okuyama T, Imoto I, Mizutani S, Inazawa J. Construction of a High-density and High-resolution Human Chromosome X Array for Comparative Genomic Hybridization Analysis. *J Hum Genet* (in press)
- Tokutomi T, Hayashi S, Imai K, Chida A, Ishiwata T, Asano Y, Inazawa J, Nonoyama S. Dup(8p)/del(8q) Recombinant Chromosome in a Girl With Hepatic Focal Nodular Hyperplasia. *Am J Med Genet* (in press)
- Honda S, Hayashi S, Kato M, Niida Y, Hayasaka K, Okuyama T, Imoto I, Mizutani S, Inazawa J. Clinical and molecular cytogenetic characterization of two patients with non-mutational aberrations of the FMR2 gene. *Am J Med Genet* (in press)
- Saigusa K, Imoto I, Tanikawa C, Aoyagi M, Ohno K, Nakamura Y, Inazawa J. RGC32, a Novel p53-inducible Gene, is Located on Centrosomes during Mitosis and Results in G2/M Arrest. *Oncogene* 26:1110-21,2007
- Kozaki K, Imoto I, Pimkhaokham A, Hasegawa S, Tsuda H, Omura K, Inazawa J: PIK3CA mutation is an oncogenic aberration at advanced stages of oral squamous cell carcinoma. *Cancer Sci.* 97:1351-8,2006
- Yu W, Imoto I, Inoue J, Onda M, Emi M, Inazawa J: A novel amplification target, DUSP26, promotes anaplastic thyroid cancer cell growth by inhibiting p38 MAPK activity. *Oncogene* 26:1178-87,2007
- Takada H, Imoto I, Tsuda H, Nakanishi Y, Sakakura C, Mitsufuji S, Hirohashi S, Inazawa J: Genomic loss and epigenetic silencing of very low density lipoprotein receptor involved in gastric carcinogenesis. *Oncogene* 25:6554-62,2006
- Suzuki T, Delgado-Escueta AV, Alonso ME, Morita R, Okamura N, Sugimoto Y, Bai D, Medina MT, Bailey JN, Rasmussen A, Ramos Peek J, Cordova S, Rubio-Donnadieu F, Ochoa A, Jara-Prado A, Inazawa J, Yamakawa K: Mutation analyses of genes on 6p12-p11 in patients with juvenile myoclonic epilepsy. *Neurosci Lett.* 405:126-31, 2006
- Nakagawa T, Pimkhaokham, A, Suzuki E, Omura K, Inazawa J, Imoto I: Genetic or epigenetic silencing of low density lipoprotein receptor-related protein 1B expression in oral squamous cell carcinoma. *Cancer Sci.* 97:1070-4, 2006

- 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. *Cancer Res.* 66:4617-26, 2006
- Kumada K, Yao R, Kawaguchi T, Karasawa M, Hoshikawa Y, Ichikawa K, Sugitani Y, Imoto I, Inazawa J, Sugawara M, Yanagida M, Noda T: The selective continued linkage of centromeres from mitosis to interphase in the absence of mammalian separase. *J Cell Biol.* 172:835-46, 2006

(2) 特許出願

平成 18年度特許出願:8 件(CREST 研究期間累積件数:12 件)