

「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

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

有効なテー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、新たに遺伝子変異の網羅的スクリーニングを大規模に行い、疾患の病態の理解を図ると共に、これらゲノミクス情報を用いた精度の良い疾患の予後予測法を開発する。

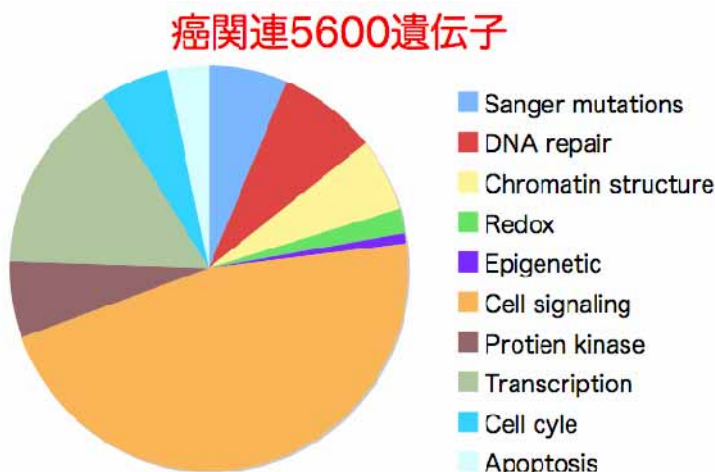
## 2. 研究実施内容

### 血液疾患の解析

各種血液疾患の効率良いゲノミクス解析を目指して、患者骨髄より造血幹細胞分画のみを純化保存する大規模検体収集事業 Blast Bank を行い、現在まで800例を超える検体収集に成功した。これら検体に対して様々なアプローチを試みているが、その一つは遺伝子発現の網羅的解析である。急性骨髄性白血病症例99例の骨髄より得た Blast Bank 検体について全ヒト遺伝子発現解析アレイにより遺伝子発現量の定量を行い、これら発現量を基に各患者の長期予後にリンクする遺伝子のスクリーニングを試みた。まず全体を2/3と1/3に分け、前者において Cox 比例ハザード解析を遺伝子発現量に対して行った。その結果4種類の予後関連遺伝子を同定することに成功した。さらにこれら遺伝子の発現量から各患者の長期予後を予測する Gene Expression-based Stratification (GES) システムを開発した。本アルゴリズムによって標準的化学療法に反応し長期生存する患者を正確に選び出すことが可能になった。さらに本アルゴリズムを、解析に用いなかった残り1/3の症例に対して当てはめたとこやはり精度良く予後良好患者を選別することが出来た。これらのデータは、疾患責任細胞のみを純化し遺伝子発現プロファイルを得ることで、一般の骨髄全体を比較する手法よりはるかに精度良く患者予後を予測可能なことを示している。

また我々は成人 T 細胞白血病 (ATL) の本態が成熟ヘルパー T 細胞の癌化であることに着目し、同分画のみを ATL 患者末梢血より純化保存するバンク事業も展開した。得られたヘルパー T 細胞に対してマイクロアレイによる遺伝子発現プロファイリングを行い、慢性型 ATL に比べて急性型 ATL においてのみ高発現する遺伝子として肝細胞成長因子 (HGF) の受容体である MET チロシンキナーゼを同定することに成功した。さらに ATL 患者末梢血中の HGF 濃度が極めて高いことも明らかになり、急性型 ATL の一部の患者においては HGF-MET 系の活性化が生じていることが明らかになった。これは同シグナル伝達機構を阻害することによる ATL の全く新しい治療法の可能性を示唆しており、実際 MET 発現 ATL 細胞に抗 HGF 抗体を添加したところその増殖は著明に阻害された。

さらに我々は遺伝子発現データのみでなく他の情報も総合して白血病の予後解析を目指す目的で、白血病症例の遺伝子変異スクリーニングに着手した。具体的には塩基配列解析用の世界最大の DNA マイクロアレイを米国ベンチャー企業と共同で開発することに成功した。これは約 9 Mbp の塩基配列を決定するものであり、旧来に無い規模で体細胞変異を検出することが出来る。また本アレイで解析する遺伝子として、既に癌細胞において変異が報告されている遺伝子のみならず、発癌に関与する可能性が考えられる DNA 修復遺伝子、染



色体構造調節遺伝子、酸化還元関連遺伝子、エピジェネティクス調節遺伝子、プロテインキナーゼ、転写因子、細胞周期関連遺伝子、細胞死関連遺伝子等、計5600種類の遺伝子を選出した(上図)。これらの遺伝子のアミノ酸置換を誘導可能なエクソン配列に対してその塩基を決定すると共に、エクソン-イントロン境界についても塩基解析を行い、スプライシング異常も併せスクリーニングした。既に白血病検体20例における第一次スクリーニングが終了し、多くの体細胞変異候補遺伝子群を同定することに成功した。

### 固形腫瘍の解析

本プロジェクトにおいて様々なアプローチにより同定される癌関連遺伝子の機能をアッセイする目的で、我々は簡便なレトロウィルス発現システムを構築した。またさらに本システムにより固形腫瘍の cDNA 発現ライブラリーを構築して各種固形腫瘍の癌遺伝子スクリーニングも行っている。実際、ある肺癌症例検体より調整した cDNA 発現ライブラリーによる癌遺伝子スクリーニングを行った

ところ、非小細胞肺癌の約1割において発現している活性型チロシンキナーゼ遺伝子を同定することに成功した。これは、本遺伝子陽性肺癌に対する全く新しい治療法の可能性を明瞭に示す者であり、肺癌の予後改善に重要な知見となると期待される。

### 3. 研究実施体制

#### (1) DNA チップ解析グループ

##### ①研究者名

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。

#### (2) バイオインフォマティクス解析グループ

##### ①研究者名

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. 研究成果の発表等

#### (1) 論文発表(原著論文)

- Yamashita Y, Minoura K, Taya T, Fujiwara SI, Kurashina K, Watanabe H, Choi YL, Soda M, Hatanaka H, Enomoto M, Takada S & Mano H: Analysis of chromosome copy number in leukemic cells by different microarray platforms. *Leukemia*, Epub ahead of print, Mar 15, 2007.
- Naka I, Ohashi J, Patarapotikul J, Hananantachai H, Wilairatana P, Looareesuwan S & Tokunaga K: The genotypes of GYPA and GYPB carrying the MNSs antigens are not associated with cerebral malaria. *J Hum Genet*, Epub ahead of print, Mar 20, 2007.
- Kawasaki A, Tsuchiya N, Ohashi J, Murakami Y, Fukazawa T, Kusaoi M, Morimoto S, Matsuta K, Hashimoto H, Takasaki Y & Tokunaga K: Role of APRIL (TNFSF13) polymorphisms in the susceptibility to systemic lupus erythematosus in Japanese. *Rheumatology (Oxford)*, Epub ahead of print, Feb 16, 2007.
- Furukawa Y, Vu HA, Akutsu M, Odgerel T, Izumi T, Tsunoda S, Matsuo Y, Kirito K, Sato Y, Mano H & Kano Y: Divergent cytotoxic effects of PKC412 in combination with conventional

antileukemic agents in FLT3 mutation-positive versus -negative leukemia cell lines. *Leukemia*, Epub ahead of print, Mar 1, 2007.

- Oh I, Ozaki M, Miyazato A, Sato K, Meguro A, Muroi K, Nagai T, Mano H & Ozawa K: Screening of genes responsible for differentiation of mouse mesenchymal stromal cells by DNA micro-array analysis of C3H10T1/2 and C3H10T1/2-derived cell lines. *Cytotherapy*, **9**: 80–90, 2007.
- Kimura R, Fujimoto A, Tokunaga K & Ohashi J: A practical genome scan for population-specific strong selective sweeps that have reached fixation. *PLoS ONE*, **2**: e286, 2007.
- Kano Y, Akutsu M, Tsunoda S, Izumi T, Kobayashi H, Mano H & Furukawa Y: Cytotoxic effects of histone deacetylase inhibitor FK228 (depsipeptide, formally named FR901228) in combination with conventional anti-leukemia/lymphoma agents against human leukemia/lymphoma cell lines. *Invest New Drugs*, **25**: 31–40, 2007.
- Choi YL, Tsukasaki K, O'Neill M C, Yamada Y, Onimaru Y, Matsumoto K, Ohashi J, Yamashita Y, Tsutsumi S, Kaneda R, Takada S, Aburatani H, Kamihira S, Nakamura T, Tomonaga M & Mano H: A genomic analysis of adult T-cell leukemia. *Oncogene*, **26**: 1245–1255, 2007.
- Choi YL, Kaneda R, Wada T, Fujiwara S, Soda M, Watanabe H, Kurashina K, Hatanaka H, Enomoto M, Takada S, Yamashita Y & Mano H: Identification of a constitutively active mutant of JAK3 by retroviral expression screening. *Leuk Res*, **31**: 203–209, 2007.
- Yamashita Y, Ohashi J, Hirai Y, Choi YL, Kaneda R, Fujiwara S-i, Arai Y, Akutsu M, Tsutsumi C, Miyazaki Y, Usuki K, Teramura M, Mitani K, Kano Y, O'Neill MC, Urabe A, Tomonaga M, Ozawa K & Mano H: Gene expression profiles of CD133-positive fractions predict the survival of individuals with acute myeloid leukemia. *Cancer Genomics & Proteomics*, **3**: 169–182, 2006.
- Takada S, Wada T, Kaneda R, Choi YL, Yamashita Y & Mano H: Evidence for activation of Amh gene expression by steroidogenic factor 1. *Mech Dev*, **123**: 472–480, 2006.
- Takada S, Berezikov E, Yamashita Y, Lagos-Quintana M, Kloosterman WP, Enomoto M, Hatanaka H, Fujiwara S, Watanabe H, Soda M, Choi YL, Plasterk RH, Cuppen E & Mano H: Mouse microRNA profiles determined with a new and sensitive cloning method. *Nucleic Acids Res*, **34**: e115, 2006.
- 14) Omi T, Kumada M, Kamesaki T, Okuda H, Munkhtulga L, Yanagisawa Y, Utsumi N, Gotoh T, Hata A, Soma M, Umemura S, Ogihara T, Takahashi N, Tabara Y, Shimada K, Mano H, Kajii E, Miki T & Iwamoto S: An intronic variable number of tandem repeat polymorphisms of the cold-induced autoinflammatory syndrome 1 (CIAS1) gene modifies gene expression and is associated with essential hypertension. *Eur J Hum Genet*, **14**: 1295–1305, 2006.

- Ohashi J, Naka I, Toyoda A, Takasu M, Tokunaga K, Ishida T, Sakaki Y & Hohjoh H: Estimation of the species-specific mutation rates at the DRB1 locus in humans and chimpanzee. *Tissue Antigens*, **68**: 427-431, 2006.
- 17) Kano Y, Akutsu M, Tsunoda S, Izumi T, Kobayashi H, Inoue K, Mori K, Fujii H, Mano H, Odgerel T & Furukawa Y: Schedule-dependent interactions between pemetrexed and cisplatin in human carcinoma cell lines in vitro. *Oncol Res*, **16**: 85-95, 2006.
- Berezikov E, van Tetering G, Verheul M, van de Belt J, van Laake L, Vos J, Verloop R, van de Wetering M, Guryev V, Takada S, van Zonneveld AJ, Mano H, Plasterk R & Cuppen E: Many novel mammalian microRNA candidates identified by extensive cloning and RAKE analysis. *Genome Res*, **16**: 1289-1298, 2006.

**(2) 特許出願**

平成 18年度特許出願:1 件 (CREST 研究期間累積件数:4 件)