

「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

東京大学先端科学技術研究センター・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

症例毎に最適な治療法(テーラーメイド医療)を提供するためには、個々の症例が有する遺伝子変異および SNP あるいは CNV(コピー数多型)などのゲノム多様性にもとづく疾患リスクとの関連を解明することが重要であることから、本研究においては腫瘍および正常組織検体に生じた染色体および RNA の機能変化に着目して疾患の解析を進めてきた。CNV を含むゲノム構造の多様性については CNV と SNP との関連を解析する一方で、ナノ流体回路を用いたコピー数測定および高速シーケンサーを用いたゲノム配列解析に着手した。肝細胞癌、脳腫瘍、大腸癌、子宮体癌、卵巣癌においてアレル別コピー数変異の解析を行い、肝細胞癌において 8 番染色体のホモ欠失領域に含まれ高頻度に発現低下が認められる遺伝子 *CSMD1* を癌抑制遺伝子候補として同定した。アレル別遺伝子発現に関しては大規模家系由来の不死化リンパ球を用いた解析からインプリントされた遺伝子の同定を進めている。アレル間の発現多様性をもたらす原因として転写因子結合部位に存在する SNP の同定をクロマチン免疫沈降と高速シーケンサー技術を組み合わせることによって進めている。全エクソンアレイを用いた解析については引き続き癌細胞における染色体転座の検出および検証を進めた。

### 2. 研究実施内容(文中にある参照番号は 4.(1)に対応する)

#### ①研究目的

症例毎に最適な治療法(テーラーメイド医療)を提供するためには、個々の症例が有する遺伝子変異および SNP あるいは CNV(コピー数多型)などのゲノム多様性にもとづく疾患リスクとの関連を解明することが重要である。本研究では、染色体構造多型、アレル別の染色体変異解析、アレル別遺伝子発現、転写産物の多様性について系統的に解析する技術を開発し、疾患との関連を解析することにより、ヒトゲノム情報の多様性を解明し、テーラーメイド医療の実現に貢献することを目指す。

#### ②研究成果

# 1. 染色体変異の系統的解析技術開発

## 1-1 ヒトゲノムコピー数解析(CNV)

ヒトゲノムコピー数多型マップ (Redon, Ishikawa, Nature 2006)を發表して以来、さらなる網羅的な検出法の開発が求められてきた。当初用いた SNP アレイには染色体重複領域のマーカーが除外されていたため、CNV の検出には不十分なものであった。昨年度から引き続き、非多型プローブのみからなる 130 万箇所のコピー数を測定可能なカスタムオリゴアレイを用いて CNV あるいはゲノム変異の検出をおこなっている。現在、CNV と近傍 SNP との連鎖関係に関して検討を進めている(論文投稿中)。

今後の CNV 解析に求められることはより網羅的かつ定量的に CNV を検出することである。数コピー以上の重複領域のゲノムコピー数を正確に判定することは現行のマイクロアレイでは困難である。質量分析やナノ流体回路アレイ(Fluidigm)を用いて2つのアレル間の比率を正確に算定することによりコピー数を推定することを進めており、図1に CYP2D6 遺伝子領域の CNV の判定例を示す。

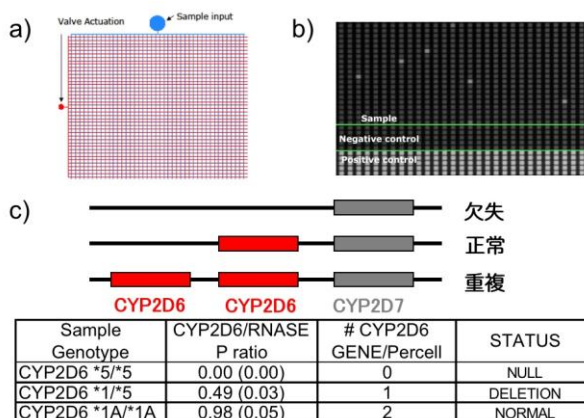


図1 ナノ流体アレイによるコピー数の検出  
a) 検体と試薬の自動分注 b) 6 ナノリットルごとの区画のうち、目的遺伝子が入った区画のみシグナルが検出される c) CYP2D6 遺伝子の重複。ヒトゲノム中に2コピー存在する RNaseP との存在比(表2列目)は 0.00,0.49,0.98(括弧内は SD)と理想値(表3列目)にきわめて近い値が得られている。

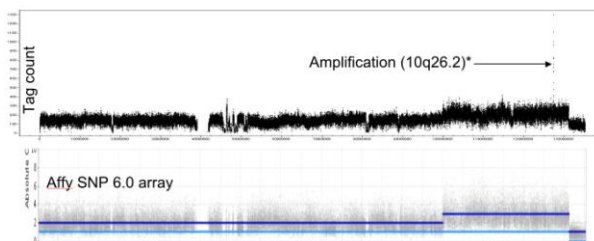


図2 高速シーケンサーによるコピー数解析  
大腸癌細胞 HCT116 を解析し、10 番染色体データを示した。上段は 138,326,810 個の 36 塩基タグの位置を 3kb 毎に集計した。下段は SNP6.0 アレイ(Affymetrix)によるコピー数データを Sanger センターのサイトより引用。両者のデータは相関が高い。

## 1-2 腫瘍組織における染色体変異

がんにおいて生じたゲノム変異を明らかにすることは、今後分子標的医薬品の開発が進むことにより、「がんのテーラーメイド医療」においてますます重要になると考えられる。国際的にも多数のがん検体のシーケンシング解析が進行中であり、本プロジェクトでも平成 19 年度末より高速シーケンサー装置(Illumina 社 Genome Analyzer)を導入し、ゲノム構造変異の検出を試みた。現時点ではヒト全ゲノム配列解析のためにはさらなる低コスト化が必要であり、さらにゲノム配列のみではなく遺伝子発現、コピー数やエピジェネティックな異常についても並行して解析を進める必要がある。

染色体欠失の検出には上述の SNP アレイを用いた検出法が有力である。癌細胞ゲノムでは LOH (Loss of Heterozygosity、ヘテロ接合性の喪失)領域中に生じたセカンドヒットにより両側アレルの遺伝子が失われたホモ欠失は癌抑制遺伝子の不活性化機構としてしられる。しかしながら、臨床材料を用いる解析の場合、正常組織の混入が不可避のため、ホモ欠失領域の検出は通常のアレイ CGH では困難であるが、SNP アレイを用いた解析ではアレル毎にコピー数を計測するこ

とにより1アレル分の変化に相当するシグナルを推定できるので、臨床検体の解析においても LOH のみならずホモ欠失の鋭敏な検出が可能となる。肝細胞癌、悪性膠芽細胞腫(グリオーマ)、大腸癌、子宮体癌においてホモ欠失領域が検出された。肝細胞癌において早期病変の解析では 1p および 17p の欠失が特徴的であり、さらに癌抑制遺伝子候補として 8 番染色体のホモ欠失領域に含まれ高頻度に発現低下が認められる遺伝子 *CSMD1* を同定した。同遺伝子は染色体欠失のない症例では高頻度に DNA メチル化を受けることにより不活化されていた (Midorikawa *Hepatology*, 2009)<sup>15</sup>)。グリオーマについてもホモ欠失領域にグリア細胞分化に重要と思われる遺伝子が同定された(論文投稿準備中)。

## 2. アレル間の遺伝子発現量の多様性解析法

SNPを利用して2つの染色体からの遺伝子発現量比較をゲノムワイドに行う方法を開発してきた。同一の転写制御下にありながら2つの染色体からの遺伝子発現量が異なる現象は、染色体の機能の違いを検出するために極めて有効である。インプリントされた遺伝子は由来する親により片側アレルのみから発現するが、CEPH家系検体の解析からヒトインプリント遺伝子の同定を行った(論文準備中)。一方、定常状態においてアレル間の発現量が異なる遺伝子もあれば、薬剤処理等の刺激により初めてアレル間の発現が異なる遺伝子も多く認められる。転写制御に関わる領域にアレル間の違いが存在して発現量に変化を生じるものと思われ、薬剤感受性における個人差の探索に有効な手法であると考えられる。本年度導入した Beadstation (Illumina) は 100 万箇所の SNP タイピングを可能とする解析プラットフォームであるので、より網羅的なアレル別解析への技術改良も進める予定である。

アレル選択的遺伝子発現をもたらす成因而として遺伝子プロモーター領域に存在する配列多型が挙げられる。転写因子や RNA ポリメラーゼを含むクロマチン免疫沈降産物をシーケンシングする ChIP-sequencing 法は転写制御およびエピゲノムの研究に広く用いられている。従来の ChIP-chip 法に較べて解像度が高く、配列情報も得られるので、結合領域及びその近傍の SNP を調べることにより、アレル間で転写量に違いがあるかを判定できる(図 3)。

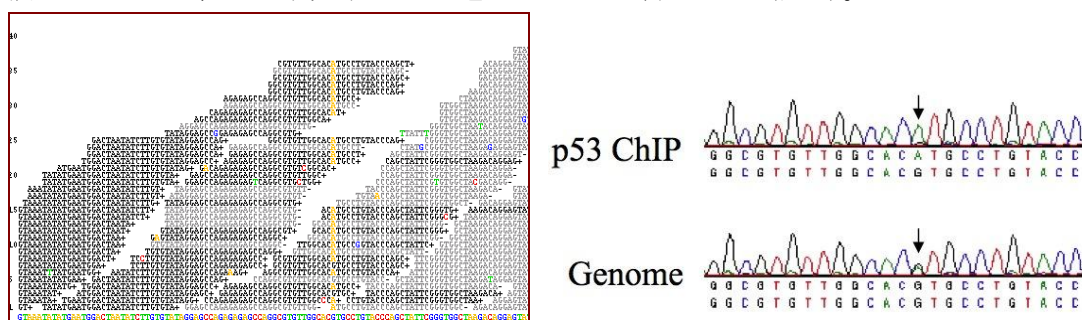


図3 p53のアレル選択的結合 左側は p53 の ChIP-seq により得られた結合部位にマップされた DNA 配列を示しており、A/G のヘテロ配列にもかかわらず G アレルは殆ど検出されない。右図は従来のキャピラリーシーケンサーで配列を確認した結果。ゲノム配列は A/G のヘテロであるが、ChIP した DNA では A が優位である。

## 3. RNA 変異の系統的解析技術開発

140 万種類以上のエクソンに対してプローブセットがデザインされた Exon 1.0 ST アレイ

(Affymetrix)を用いて、正常組織 88 検体に加えて癌細胞株 139、臨床腫瘍組織 151 からの RNA 検体について転写産物の多様性の解析を進めた(図4)。高速シーケンサーによる全トランスクリプトーム解析データと比較検討しながら、エクソンアレイデータを検証する予定である。

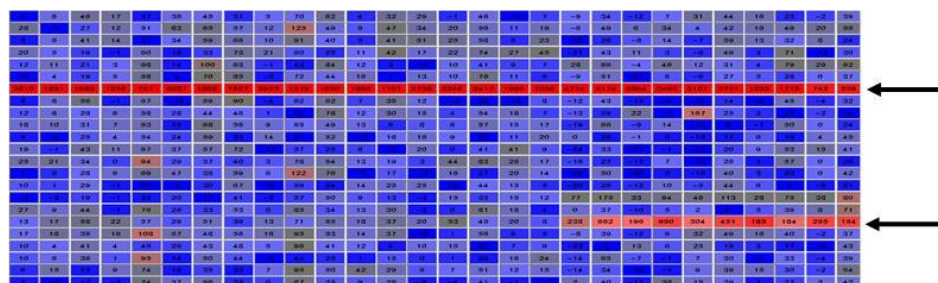


図4 エクソンアレイによる癌の異常転写産物の同定

23 種類の癌細胞株(縦軸)におけるある遺伝子のエクソン毎(横軸)の発現量を示した。ある細胞株(上矢印)は全エクソン領域で発現が高くなっているのに対し、別の細胞株(下矢印)では片側のエクソンのみよりなる異常転写産物が発現していることがわかる。

### 3. 研究実施体制

#### (1)「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. 研究成果の発表等

#### (1) 論文発表 (原著論文)

- 1 Maeda D, Ota S, Takazawa Y, Aburatani H, Nakagawa S, Yano T, Taketani Y, Kodama T, Fukayama M. Glypican-3 expression in clear cell adenocarcinoma of the ovary. **Mod Pathol.** 2009 Mar 27. [Epub ahead of print]
- 2 Mishiro T, Ishihara K, Hino S, Tsutsumi S, Aburatani H, Shirahige K, Kinoshita Y, Nakao M. Architectural roles of multiple chromatin insulators at the human apolipoprotein gene cluster. **EMBO J.** 2009 Mar 26. [Epub ahead of print]
- 3 Okamura M, Kudo H, Wakabayashi KI, Tanaka T, Nonaka A, Uchida A, Tsutsumi S, Sakakibara I, Naito M, Osborne TF, Hamakubo T, Ito S, Aburatani H, Yanagisawa M, Kodama T, Sakai J. COUP-TFII acts downstream of Wnt/ $\beta$ -catenin signal to silence PPAR $\gamma$  gene expression and repress adipogenesis. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 2009 Mar 23. [Epub ahead of print]
- 4 Matsumoto K, Isagawa T, Nishimura T, Ogaeri T, Eto K, et al. Stepwise Development of

- Hematopoietic Stem Cells from Embryonic Stem Cells. **PLoS ONE** 4(3): e4820. 2009
- 5 Ishii KA, Fumoto T, Iwai K, Takeshita S, Ito M, Shimohata N, Aburatani H, Taketani S, Lelliott CJ, Vidal-Puig A, Ikeda K. Coordination of PGC-1beta and iron uptake in mitochondrial biogenesis and osteoclast activation. **Nat Med.** 15(3):259-266, 2009
  - 6 Shiraki N, Higuchi Y, Harada S, Umeda K, Isagawa T, Aburatani H, Kume K, Kume S. Differentiation and characterization of embryonic stem cells into three germ layers. **Biochem Biophys Res Commun.** 381(4):694-9. 2009
  - 7 Niida A, Smith AD, Imoto S, Aburatani H, Zhang MQ, Akiyama T. Gene set-based module discovery in the breast cancer transcriptome. **BMC Bioinformatics.** 10(1):71. 2009
  - 8 Ushiku T, Uozaki H, Shinozaki A, Ota S, Matsuzaka K, Nomura S, Kaminishi M, Aburatani H, Kodama T, Fukayama M. Glypican 3-expressing gastric carcinoma: Distinct subgroup unifying hepatoid, clear-cell, and alpha-fetoprotein-producing gastric carcinomas. **Cancer Sci.** 2009 Feb 18. [Epub ahead of print]
  - 9 Kawase T, Ohki R, Shibata T, Tsutsumi S, Kamimura N, Inazawa J, Ohta T, Ichikawa H, Aburatani H, Tashiro F, Taya Y. PH domain-only protein PHLDA3 is a p53-regulated repressor of Akt. **Cell.** 136(3):535-50. 2009.
  - 10 Kaneko K, Furuyama K, Aburatani H, Shibahara S. Hypoxia induces erythroid-specific 5-aminolevulinic acid synthase expression in human erythroid cells through transforming growth factor-beta signaling. **FEBS J.** 276(5):1370-82. 2009
  - 11 Sugita S, Usui Y, Horie S, Futagami Y, Aburatani H, Okazaki T, Honjo T, Takeuchi M, Mochizuki M. T cell suppression by programmed cell death 1 ligand 1 on retinal pigment epithelium during inflammatory conditions. **Invest Ophthalmol Vis Sci.** 2009 Jan 31. [Epub ahead of print]
  - 12 Chauhan SC, Vannatta K, Ebeling MC, Vinayek N, Watanabe A, Pandey KK, Bell MC, Koch MD, Aburatani H, Lio Y, Jaggi M. Expression and functions of transmembrane mucin MUC13 in ovarian cancer. **Cancer Res.** 69(3):765-74. 2009.
  - 13 Kojima I, Tanaka T, Inagi R, Nishi H, Aburatani H, Kato H, Miyata T, Fujita T, Nangaku M. Metallothionein is upregulated by hypoxia and stabilizes hypoxia-inducible factor in the kidney. **Kidney Int.** 75(3):268-77. 2009
  - 14 Takayama K, Tsutsumi S, Suzuki T, Horie-Inoue K, Ikeda K, Kaneshiro K, Fujimura T, Kumagai J, Urano T, Sakaki Y, Shirahige K, Sasano H, Takahashi S, Kitamura T, Ouchi Y, Aburatani H, Inoue S. Amyloid precursor protein is a primary androgen target gene that promotes prostate cancer growth. **Cancer Res.** 69(1):137-42. 2009.
  - 15 Midorikawa Y, Yamamoto S, Tsuji S, Kamimura N, Ishikawa S, Igarashi H, Makuuchi M, Kokudo N, Sugimura H, Aburatani H. Allelic imbalances and homozygous deletion on 8p23.2 for stepwise progression of hepatocarcinogenesis. **Hepatology.** 49(2):513-22. 2009.
  - 16 Ishiguro T, Sugimoto M, Kinoshita Y, Miyazaki Y, Nakano K, Tsunoda H, Sugo I, Ohizumi I, Aburatani H, Hamakubo T, Kodama T, Tsuchiya M, Yamada-Okabe H. Anti-glypican 3 antibody as a potential antitumor agent for human liver cancer. **Cancer Res.** 68(23):9832-8.

- 2008.
- 17 Nakano K, Orita T, Nezu J, Yoshino T, Ohizumi I, Sugimoto M, Furugaki K, Kinoshita Y, Ishiguro T, Hamakubo T, Kodama T, Aburatani H, Yamada-Okabe H, Tsuchiya M. Anti-glypican 3 antibodies cause ADCC against human hepatocellular carcinoma cells. **Biochem Biophys Res Commun.** 378(2):279-84. 2009
  - 18 Sugita S, Horie S, Nakamura O, Futagami Y, Takase H, Keino H, Aburatani H, Katunuma N, Ishidoh K, Yamamoto Y, Mochizuki M. Retinal Pigment Epithelium-Derived CTLA-2{alpha} Induces TGF{beta}-Producing T Regulatory Cells. **J Immunol.** 181(11):7525-7536. 2008
  - 19 Yoneda M, Uchiyama T, Kato S, Endo H, Fujita K, Yoneda K, Mawatari H, Iida H, Takahashi H, Kirikoshi H, Inamori M, Nozaki Y, Kobayashi N, Kubota K, Saito S, Maeyama S, Sagara M, Aburatani H, Kodama T, Nakajima A. Plasma Pentraxin3 is a Novel Marker for Nonalcoholic Steatohepatitis (NASH). **BMC Gastroenterol.** 8(1):53. 2008
  - 20 Koinuma D, Tsutsumi S, Kamimura N, Taniguchi H, Miyazawa K, Sunamura M, Imamura T, Miyazono K, Aburatani H. ChIP-chip analysis of Smad2/3 binding sites reveals roles of ETS1 and TFAP2A in TGF- $\beta$  signaling. **Mol Cell Biol.** 29(1):172-86. 2009
  - 21 Takanaga H, Tsuchida-Straeten N, Nishide K, Watanabe A, Aburatani H, Kondo T. Gli2 Is A Novel Regulator of Sox2 Expression In Telencephalic Neuroepithelial Cells. **Stem Cells.** 2008 Oct 16. [Epub ahead of print]
  - 22 Shimizu T, Kagawa T, Inoue T, Nonaka A, Takada S, Aburatani H, Taga T. Stabilized  $\beta$ -catenin functions through TCF/LEF proteins and the Notch/RBP-J $\kappa$  complex to promote proliferation and suppress differentiation of neural precursor cells. **Mol Cell Biol.** 28(24):7427-41. 2008
  - 23 Ohtsuji M, Katsuoka F, Kobayashi A, Aburatani H, Hayes JD, Yamamoto M. NRF1 and NRF2 play distinct roles in activation of antioxidant response element-dependent genes. **J Biol Chem.** 283(48):33554-62. 2008
  - 24 Niida A, Smith AD, Imoto S, Tsutsumi S, Aburatani H, Zhang MQ, Akiyama T. Integrative bioinformatics analysis of transcriptional regulatory programs in breast cancer cells. **BMC Bioinformatics.** 9(1):404. 2008.
  - 25 Hiratsuka S, Watanabe A, Sakurai Y, Akashi-Takamura S, Ishibashi S, Miyake K, Shibuya M, Akira S, Aburatani H, Maru Y. The S100A8-serum amyloid A3-TLR4 paracrine cascade establishes a pre-metastatic phase. **Nat Cell Biol.** 10(11):1349-55. 2008
  - 26 Matsubara T, Kida K, Yamaguchi A, Hata K, Ichida F, Meguro H, Aburatani H, Nishimura R, Yoneda T. BMP2 regulates osterix through Msx2 and Runx2 during osteoblast differentiation. **J Biol Chem.** 283(43):29119-25. 2008
  - 27 Yoneda M, Endo H, Mawatari H, Nozaki Y, Fujita K, Akiyama T, Higurashi T, Uchiyama T, Yoneda K, Takahashi H, Kirikoshi H, Inamori M, Abe Y, Kubota K, Saito S, Kobayashi N, Yamaguchi N, Maeyama S, Yamamoto S, Tsutsumi S, Aburatani H, Wada K, Hotta K, Nakajima A. Gene expression profiling of non-alcoholic steatohepatitis using gene set

enrichment analysis. **Hepatol Res.** 38(12):1204-12. 2008

- 28 Torisu Y, Watanabe A, Nonaka A, Midorikawa Y, Makuuchi M, Shimamura T, Sugimura H, Niida A, Akiyama T, Iwanari H, Kodama T, Zeniya M, Aburatani H. Human homolog of NOTUM, overexpressed in hepatocellular carcinoma, is regulated transcriptionally by beta-catenin/TCF. **Cancer Sci.** 99(6):1139-46. 2008

(2) 特許出願

平成 20 年度 国内特許出願件数 : 0 件 (CREST 研究期間累積件数 : 2 件)