

研究課題別事後評価結果

1. 研究課題名：高精度ゲノムアレイの開発と疾患遺伝子の探索

2. 研究代表者名及び主たる研究参加者名(研究機関名・職名は研究参加期間終了時点)

研究代表者

稲澤 謙治(東京医科歯科大学難治疾患研究所 教授)

主たる共同研究者

津田 均(防衛医科大学校 准教授)

細田 文恵(国立癌センター研究所 主任研究員)

金井 弥栄(国立癌センター研究所 部長)

今井 高志((財)放射線医学総合研究所フロンティア研究センター プロジェクトリーダー)

小川 誠司(東京大学医学部附属病院 准教授)(~平成16年9月)

嶋田 裕(兵庫医科大学 准教授)

杉本 徹(京都府立医科大学大学院 教授)

水谷 修紀(東京医科歯科大学大学院 教授)

山岸 久一(京都府立医科大学 学長)

坂本 優((財)佐々木研究所附属杏雲堂病院 部長)

松尾 雅文(神戸大学大学院医学系研究科 教授)

山川 和弘(理化学研究所脳科学総合研究所 チームリーダー)

有井 滋樹(東京医科歯科大学大学院 教授)

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)

正木 克典(日立ソフトウェアエンジニアリング(株)ライフサイエンス推進本部

バイオインフォマティクス開発部 部長)

3. 研究内容及び成果

癌をはじめとするヒトの疾患が様々な遺伝子異常により発症しあるいは進展していくことが知られている。中でも癌や染色体微細構造異常症などの遺伝疾患では、数10~数100キロ塩基対(bp)あるいはこれ以上の物理サイズの領域に欠失や増幅が生じることで、その領域に存在する遺伝子の発現が影響を受け疾患に様々な表現型を付与する。そのため、このような疾患特異的な微細ゲノム構造異常(コピー数異常)を迅速、簡便、かつ高精度に検出するゲノムアレイシステムならびにその応用法を確立し、これらツールを用いて癌や遺伝疾患において潜在的ゲノムコピー数異常を探索し、検出されてくる疾患特異的ゲノム構造異常を糸口に疾患原因遺伝子の同定を目指し、以下の成果を得た。

高精度ゲノムアレイとその応用法の開発

微細染色体コピー数異常を検出する総計8316個のBACクローンを搭載した6種類のin-house BACアレイを作製した。(Inazawa 他, Cancer Sci.2004, Review) その内訳は、4,523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(Whole Genome Array 4500, 分担研究者・細田文恵博士と共同)、染色体1p36の20Mbを間断なくカバーしたアレイ(1p36-contig Array)、癌関連遺伝子800種類の解析を可能とする「癌個性診断」用アレイ(Cancer Array-800)、X染色体の偽常染色体領域以外を1003個のBACで埋め尽くした高密度アレイ(X-tiling Array)、既知遺伝疾患、染色体異常症の診断アレイ(Genome Disorder Array)、ヒトゲノム中のCopy number variation (CNV)の667座位を検出するアレイ(CNV Array)。これら高密度BACアレイを用

いて1コピーレベルで数10kbのゲノムコピー数異常を高精度に検出するための解析ソフトウェアを開発した。さらに、BACアレイをプラットフォームにメチル化DNAの染色体ワイドスクリーニング法であるBAC array-based methylated CpG-island amplification (BAMCA)法や特定蛋白結合DNA領域の探索法であるChIP-on-BACアレイ法などの応用法を開発した。

癌CGHデータベースの構築

従来型の染色体CGH法により25癌種の総計約1000例以上においてゲノムコピー数異常を解析し、それら結果をデータベース化するとともにその一部を情報公開した。(2003年7月29日公開、CGH Data Base: <http://www.cghtmd.jp/cghdatabase/index.html>) 本データベースは米国NCIのSKY/CGHデータベースより“CGH database Japan”としてリンクされている。アクセス件数は22,900件(2008/03/17)に達し、国内外の研究者に利用されている。また、アレイCGH解析結果のデータベースを構築し、公開予定(2008年3月31日)である。

各種癌のin-houseゲノムアレイ解析と新規癌関連遺伝子の同定

自作ゲノムアレイを用いて各種癌において見出した新規増幅あるいはホモ欠失をランドマークに多くの癌関連遺伝子を見出した。胃癌において7q21.2増幅の*CDK6*(Takada他, Cancer Sci. 2005, 共同研究者の津田均博士と共同研究)、2q33.3ホモ欠失の*ADAM23*(Takada他, Oncogene 2005)、9p24.2ホモ欠失の*VLDLR*(Takada他, Oncogene 2006)を標的癌関連遺伝子として同定した。食道扁平上皮癌では、共同研究者の嶋田裕博士により樹立された細胞株KYSEシリーズの31株でアレイCGH解析を行い、新規2q22.1ホモ欠失の標的癌抑制遺伝子*LRP1B*(Sonoda他, Cancer Res. 2004)を見出した。肺小細胞癌、非小細胞肺癌に5p13増幅を見出し、標的遺伝子*SKP2*を明らかにした(Yokoi他, Am J Pathol.2002,2004)。SKP2の機能抑制はアポトーシスを誘導することを明らかにした(Yokoi他, Cancer Sci.2003)。また、3q26増幅の標的として*TERC*を同定し(Yokoi他, Clinical Can Res.2003)、リンパ節転移性との関連を明らかにした(Yokoi他, Am J Pathol.2004)。つづき、非小細胞肺癌の9q33ホモ欠失の標的*DBC1*(Izumi他, Hum Mol Genet.2005)、13q21.2ホモ欠失の標的*PCDH20*を同定した(Imoto他, Cancer Res.2007)。また、14q11.2増幅標的の*BCL2L2*を同定した(Kawasaki他, Cancer Sci.2007)。口腔扁平上皮癌のアレイCGH解析で10p12ホモ欠失を見出し、標的抑制遺伝子候補*PRTFDC1*を同定した(Suzuki他, Oncogene 2007)。また、口腔扁平上皮癌の*PIK3CA*遺伝子変異とPI3K-AKTシグナル伝達系の異常を明らかにした(Kozaki他, Cancer Sci. 2006)。食道扁平上皮癌に続き口腔扁平上皮癌において癌抑制遺伝子候補*LRP1B*のホモ欠失あるいはDNAメチル化による遺伝子機能消失を明らかにした(Nakagawa他, Cancer Sci. 2006)。加えて、DNAメチル化により発現抑制をうける癌抑制候補マイクロRNAを同定した(Kozaki他, Cancer Res. 2008 in press)。これらは共同研究者の天笠光雄、小村健両博士との共同研究の成果である。その他、神経芽細胞腫(NB)と卵巣明細胞腺癌で17q23の高頻度増幅を見出し、その標的遺伝子*PPM1D*を同定した(Saito他, Cancer Res.2003、Hirasawa他, Clinical Cancer Res. 2004)。また、メラノーマにおける*BRAF*遺伝子の点突然変異と遺伝子増幅による活性化メカニズムを明らかにした(Tanami他, Oncogene 2004)。さらに、抗癌剤の標的遺伝子のコピー数異常と耐性能獲得機構や(Yasui K他, Cancer Res. 2004)、多発性骨髄腫の薬剤耐性獲得と*PDZK1*遺伝子増幅の関与を明らかにし(Inoue他, Am J Pathol. 2004)、さらに、多発性骨髄腫の11q23増幅から標的遺伝子*POU2AF1*を同定した(Zhao他, Oncogene 2007)。肺癌で見出された*SKP2*は胆管癌やグリオーマにおいても5p13増幅の標的となっていることを共同研究者の有井滋樹博士との共同研究で明らかにした(Sanada他, Cancer Sci.2004、Saigusa他, Cancer Sci.2005)。これらに加え、大腸癌肝転移のバイオマーカーとしてCyclin D3や(Tanami他, Lab. Invest. 2005)、小児急性白血病のt(1;19)転座の新規切断点融合遺伝子*MEF2D/DAZAP1*を同定した(Yuki他, Cancer Sci.2004)。また、膀胱癌の19q増幅遺伝子*KLK5*(Shinoda他, Cancer Sci.2007)や卵巣癌6q23.3の癌抑制遺伝子候補*CTGF*(Kikuchi他, Cancer Res. 2007)、グリオーマの癌抑制遺伝子候補*RGC32*(Saigusa他, Oncogene 2007)、予後不良の甲状腺未分化癌8p12増幅遺伝子の*DUSP26*なども明らかにした(Yu他, Oncogene 2007)。

高精度ゲノムアレイの応用法の開発

in-house BAC アレイをプラットフォームにメチル化 DNA の染色体ワイドスクリーニング法である BAMCA 法や ChIP-on-BAC アレイ法を開発し (Inazawa 他, Cancer Sci. 2004, Review)、DNA メチル化により機能消失する候補癌抑制遺伝子として、神経芽腫の *NR1H2*(Misawa-Furihata 他, Cancer Res. 2005)や *PGER2*, *PGDR*(Sugino 他, Oncogene 2007)、および食道扁平上皮癌の *CRABP1*(Tanaka 他, Oncogene 2007)を同定した。これらのうち神経芽腫の成果は共同研究者の杉本徹博士との共同研究による。

先天異常症の潜在的微細染色体異常解析

今回研究で開発した in-house BAC アレイは BAC クローン内で生じた数 10kb の微細なヘミ欠失であってもこれを高精度に検出することができる (Inazawa 他, Cancer Sci.2004, review; Hayashi 他, Am J Med Genet.2005)。精神発達遅滞(mental retardation, MR)を伴う多発奇形症(multiple congenital anomalies, MCA) (MCA/MR と略)などの先天異常症や自閉症、てんかん、さらに X 染色体連鎖精神発達遅滞(XLMR)などの遺伝性疾患では、その病態形成に潜在的な微細染色体コピー数異常の関与が強く示唆される。このことから、MCA/MR ならびに XLMR の症例に関して Genome Disorder Array(GD アレイ)、さらに高密度 Whole Genome Array-4500 (WGA)や X-tiling Array を用いてアレイ CGH 解析を精力的に進めた (Hayashi 他, Am J Med Genet.2007;Hayashi 他, J Hum Genet.2007; Honda 他, Am J Med Genet.2007)。MCA/MR 症例の収集の効率化と、GD アレイの診断への実用化検討を考慮して、平成 15 年より臨床遺伝専門医が在籍する国内 20 医療機関(平成 20 年 1 月 31 日現在)とコンソーシアムを形成し、「アレイ CGH 診断実用化プロジェクト」を開始した。その結果、染色体微細構造異常症の診断ツールとして実用化レベルにあることが確認され、その技術とプラットフォームを民間検査会社に移行した。

尚、これらの研究のすべては、「ヒトゲノム研究に関する基本原則」(科学技術会議生命倫理委員会)ならびに「遺伝子解析研究に付随する倫理問題等に対応するための指針」(厚生科学審議会先端医療技術評価部会)を遵守して遂行すると共に、東京医科歯科大学をはじめ各研究機関に設置された倫理委員会の承認を得て実施した。

4. 事後評価結果

4 - 1. 外部発表(論文、口頭発表等)、特許、研究を通じての新たな知見の取得等の研究成果の状況

本研究では、疾患特異的な微細ゲノム構造異常(コピー数異常)を迅速、簡便、かつ高精度に検出するゲノムアレイシステムを開発し、これらを用いて癌や遺伝疾患における潜在的ゲノムコピー数異常を探索して疾患原因遺伝子を同定することを目標とした。

当初の研究計画に従い、1)100kb レベルの微細染色体コピー数異常を検出する総計 8,316 個の BAC クローンを搭載した 6 種類の BAC アレイを作製し、同時に数十 kb の 1 コピーレベルのゲノムコピー数異常を検出するための解析ソフトウェアを開発した。開発したシステムは、2)多くの研究者との共同研究体制の下に実施された、極めて多数のがん遺伝子、がん抑制遺伝子、および神経疾患遺伝子の同定に用いられた。また、3)BAC アレイをプラットフォームにメチル化 DNA の染色体ワイドスクリーニング法を開発し、がん抑制遺伝子の同定に用いている。これらの質、量ともに優れた研究成果は、95 編の原著論文(及び 223 件の口頭、ポスター発表)として発表されており、併せて 19 件の特許が国内出願されている。また、アレイ CGH の解析結果は、既に公開されている染色体 CGH 法のデータベースと併せて、早期に公開される予定である。

本研究で開発されたゲノムアレイ群は、この分野に先鞭をつけたものであり、高く評価できる。また、自主開発した技術を用いて、精力的に各種のがん、遺伝性疾患の原因遺伝子解明に取り組み、多数の候補遺伝子を同定したことは特筆に値する。

4 - 2. 成果の戦略目標・科学技術への貢献

本研究で世界に先駆けて開発された各種のゲノムアレイとそれらの系統的な解析方法は実用面でも注目さ

れる。中でも遺伝性神経疾患の解析用に開発された Genome Disorder Array は、国内 20 医療機関との共同研究を経て染色体微細構造異常の診断ツールとして実用化レベルにあることが確認され、その技術は既に民間企業に移転された。また、開発されたゲノムアレイは従来法では検出困難であったがんや遺伝性疾患の微細コピー数異常の検出を可能とし、これによって多数のがん遺伝子、がん抑制遺伝子および神経疾患遺伝子等が同定されたことは、疾患の理解や診断、治療、予防への道を開く、領域の目的に沿った成果として高く評価できる。さらに、これら遺伝子構造異常のデータベースの公開は今後さらに多くの疾患遺伝子の同定につながるとともに、多くの関連遺伝子の同定、解析により、新しい疾患概念が確立されるものと期待している。

4 - 3 . その他の特記事項(受賞歴など)

本研究は、研究チームのテラーメイド医療実現への強い意志とたゆまぬ努力によって推進された。純粋な基礎研究とは異なる思考の重要性を示した例として特記したい。

稲澤譲治 : JCA-Mauvernay Award 2006 年

井本逸勢 : 平成 18 年度臓器病研究財団研究奨励賞

和泉宏幸 : 田中道子賞 2006 年

井上 純 : AACR Scholar-in-Training Award 2003

田中浩司 : 平成 19 年度東京医科歯科大学医科同窓会研究奨励賞

稲澤譲治 : 平成20年度科学技術分野の文部科学大臣表彰科学技術賞研究部門