

199800138A

蓄積遺伝子異常の網羅的把握による  
がんの特徴の解明と診療への応用

主任研究者  
関 谷 剛 男

## 厚生科学研究費補助金（がん克服戦略研究事業）

## 総括研究報告書

## 蓄積遺伝子異常の網羅的把握によるがんの特徴の解明と診療への応用

主任研究者 関谷剛男 国立がんセンター研究所腫瘍遺伝子研究部部長

研究要旨 個々の患者のがんに蓄積している複数個の遺伝子異常を網羅的に把握し、その組み合わせを知ることは、腫瘍の特徴を明らかにし、がんの形成機構の解明、的確で合目的な診断、治療にとって重要である。ジェネティック、エピジェネティックな異常を網羅的に同定する技術確立することを目的とする。ジェネティックなDNA異常の把握：

(1) 既知遺伝子を標的として、蛍光標識を使用したSSCP多型解析を行い、尿や唾液中のがん細胞DNAでの遺伝子欠失を感度よく検出し、遺伝子診断に応用可能であった。(2) 標的既知遺伝子の数を増やすため、染色体欠失解析では単離できないがん抑制遺伝子を、造腫瘍性の抑制活性を指標に追跡し、ヒト肺がんの11q23欠失領域に由来するYAC、PACクローン解析で、130キロ塩基対DNA断片に抑制能を検出し、全塩基配列を決定した。

(3) 遺伝子産物の機能と関連するタンパク質の解明は、標的遺伝子の拡大につながる。融合遺伝子AML1-MTG8、アポトーシスに関与するがん遺伝子、p53遺伝子の産物の機能の解析から、相互作用するタンパク質を明らかにした。(4) 標的を設定せずにDNA異常を把握する目的で、AP-PCRフィンガープリンティング解析の応用を試み、ヒトがんにおける10q領域の欠失、MDM2やサイクリンD3遺伝子の増幅を見いだした。また、G染色とSKY法を組み合わせ、異常染色体を構成する染色体起源、転座切断点の決定が可能であった。エピジェネティックな異常の把握：(1) 主要な異常であるCpGアイランドのメチル化の解析のために開発したCpGアイランド単離技術SPMで、ヒト染色体一領域に存在が想定されるCpGアイランドのほとんどが同定でき、遺伝子の単離法としても有用であった。(2) アフィニティーカラムクロマトグラフィーで、肺がんで高度にメチル化されたDNA断片を分画し、ライブラリーを作成した。(3) ライブラリーに含まれるクローンの解析から、肺がんでメチル化される900個のCpGアイランドのうち、100個ががん特異的にメチル化されることを明らかにした。(4) 肝臓がんモデルマウスに生じた腫瘍のDNAをRLGS法で解析し、がん特異的にメチル化されるDNA領域14箇所を同定した。

分担研究者	田矢洋一 国立がんセンター研究所 室長
阿部達生 京都府立医科大学 教授	林崎良英 理化学研究所ライフサイ 主任研究員
大木 操 国立がんセンター研究所 部長	エンス筑波研究センター
口野嘉幸 国立がんセンター研究所 部長	山田正夫 国立小児病院小児医療研 部長

## 究センター

菅野康吉 国立がんセンター中央病 院長  
院

### A. 研究目的

ヒトがんの形成には複数個のがん遺伝子、がん抑制遺伝子における変異の蓄積が必要である。個々の患者のがんに蓄積しているこれらの異常を網羅的に把握すること、この網羅的検出のための技術を開発すること、遺伝子異常のがんにおける役割を理解すること、得られた情報のがんの診療に最大限に利用することを目的とする。同種のがんでも、個々の患者のがんに蓄積している異常遺伝子の組み合わせは異なる。がんの種類に共通する異常は発がん機構の理解に役立つと考えられる。一方、個々のがんで特異的な異常は、そのがんの個性を作り出していると考えられる。これらの異常を網羅的に把握することは、患者それぞれのがんの実体の理解のためにはもちろんのこと、がんのよりきめ細かな診断、より適切で合理的な治療を行うために、是非とも必要な重要事項である。がん関連遺伝子の多くが、シグナル伝達、細胞周期などの細胞増殖制御機構に関与するタンパク質の遺伝子であることから、得られる情報はがんの生成機構の解明のみならず、細胞増殖機構の基礎的理解につながるものである。これらの情報を臨床面に応用することは、手術の施行、あるいは、化学療法実施の有無の決定などで、個々の患者に応じた有益な判断材料を提供すると考えられる。

### B. 研究方法

各患者の腫瘍それぞれに蓄積しているDNA異常を網羅的に把握すること、すなわち、個々のがん特徴を決めている異常遺伝子の組み合わせを知ることが重要である。DNA異常には、ジェネティックな異常と、エピジェネティックな異常があるが、

個々のがんに蓄積しているこれらの異常を持つ遺伝子の全てを迅速に同定するストラテジー、技術を確立することを最終目標とする。この目的の達成には、既知標的遺伝子における変異の迅速、効率的な同定、標的とすべき遺伝子としての新規がん関連遺伝子の発見、未解析DNA領域も含めて、標的遺伝子を設定せずにDNA異常を検出すること、塩基配列変化を伴わないエピジェネティックなDNA異常の把握等の基盤的研究が必要である。

ジェネティックなDNA異常の把握：(1) 既知標的遺伝子における変異を同定する目的で、われわれが開発した塩基配列変化の検出技術single-strand conformation polymorphism (SSCP) を、蛍光標識の導入などで臨床研究に応用する。

(2) 解析対象となる既知遺伝子の数を増やすことも重要であることから、新規がん関連遺伝子を明らかにする目的で、loss of heterozygosity (LOH) 解析だけでは単離に到達できないがん抑制遺伝子を、yeast artificial chromosomes (YAC) クローン等をヒトがん細胞へ導入し、その造腫瘍性の抑制活性を指標に追跡する。(3) 新規がん関連遺伝子の発見には、がんにおけるDNA異常を出発点にするほかに、既知遺伝子産物の機能から類推した別の遺伝子のがんにおける異常の検出も考えられる。この観点に沿い、染色体転座によって発現する融合遺伝子産物の機能、アポトーシスに関連したがん遺伝子の産物の機能、p53遺伝子産物のリン酸化による機能の制御、WT遺伝子異常と関連する他の遺伝子異常、などがん関連遺伝子産物の機能の解明を行う。(4) 未知領域におけるDNA異常の検出にもつながるが、特に望まれるのは、標的を設定することなく、既知遺伝子、未知遺伝子に関わりなくあらゆる異常を網羅的に把握できるストラテジー、技術の誕生である。標的遺伝子を設定せずに、DNA異常を検出する目的で、arbitrarily primed PCR (AP-PCR) フィンガーブ

リント法、spectral karyotyping (SKY) 法、comparative genomic hybridization (CGH)を検討する。

塩基配列変化を伴わないエピジェネティックなDNA異常の把握：(1) CpGアイランドに由来するDNA断片を簡便に単離するために開発した segregation of partly melted molecules (SPM)法の遺伝子探索技術としての有効性を検討する。

(2) アフィニティーカラムクロマトグラフィーによるメチル化DNA断片の網羅的な単離を検討する。

(3) これら二つの技術を組み合わせて、肺がんで特異的にメチル化されるCpGアイランドの網羅的単離を検討する。(4) Restriction landmark genomic scanning (RLGS) 法により、発がんモデルマウスに生じた肝臓がんにおける、がん特異的なDNAメチル化を検討する。

### C. 研究結果

ジェネティックなDNA異常の把握：(1) 蛍光標識を使用した、ブラントエンドPCR-SSCPによる多型解析により、尿や腭液中のがん細胞DNAでの遺伝子欠失を感度よく検出し、遺伝子診断に応用可能であることを示した。(2) LOH解析で、ヒト肺非小細胞がんのがん抑制遺伝子の存在が示唆された染色体11q23領域に関し、該当領域を含む一連のYACクローンを、ヌードマウスに腫瘍を作るヒト肺がん細胞株へ導入し、1個のクローンがこのがん細胞の造腫瘍性を抑制する活性を示すことを明らかにした。さらに、このクローンの一部130キロ塩基対のDNA断片を含むP1-derived artificial chromosomes (PAC) クローンが抑制能を示し、がん抑制遺伝子を含んでいることが示唆され、全塩基配列を決定した。(3) 標的遺伝子の数の拡大のための、既知がん関連遺伝子産物の機能解析に関しては、以下の結果を得た。1) 急性骨髄性白血病におけるt(8;21)転座で形成されるAML1-MTG8

融合遺伝子をレトロウイルスベクターにつなぎ、G-CSF存在下好中球への分化が可能な、マウス骨髄性細胞株に導入した結果、G-CSFの存在下でも、分化せずに増殖を続けることを明らかにした。この結果から、AML1-MTG8は、AML1の機能を抑制することにより、G-CSFに依存した好中球への分化を阻害し、白血病発症に導くと考えられた。2) c-myc遺伝子と協調して細胞のがん化に関与するras遺伝子の発現が、c-myc依存性のアポトーシス誘導を抑制することを明らかにした。また、ras遺伝子の発現が、悪性脳腫瘍や胃がん細胞において、アポトーシスとは異なるプログラム細胞死を誘導することを見いだした。3) 細胞周期の制御に関与するp53の持つ様々な機能は、特定部位のリン酸化と密接な関係を持つが、推定される13箇所のリン酸化部位のそれぞれを特異的に認識する抗体を全て作成し、機能の解明に使用した。その結果、Ataxia telangiectasia原因遺伝子の産物であるATMタンパク質がタンパク質リン酸化酵素活性を持ち、p53の15位セリンを直接リン酸化することを明らかにした。DNAに障害が起こったときに、この位置も含めたp53 N-末端領域のリン酸化で、MDM2タンパク質が結合しなくなり、p53タンパク質は分解を免れて安定化し、細胞周期をG1期で停止させるか、アポトーシスに導くかの機能を果たすと考えられた。4) ウイルムス腫瘍の原因遺伝子WTの転写が、近接遺伝子であるPAX6遺伝子の発現で促進され、変異PAX6遺伝子では、その作用が消失する相互作用の存在を明らかにした。(4) 特定の標的遺伝子を設定せずに、AP-PCRフィンガープリンティング解析を行い、検出したがん特異的に異常を示すDNA断片の染色体位置を、ラジエーションハイブリッド解析で同定することにより、肺がんにおける10q24-q25領域の欠失、縦隔繊維肉腫におけるMDM2遺伝子の増幅、神経膠芽腫におけるサイクリンD3遺伝子の増幅を見いだした。

また、GバンドパターンとSKY法による解析像を同時に得る dual karyotype法を工夫し、骨髓異形成症候群（MDS）の染色体異常を解析した結果、G染色法だけでは同定困難であったマーカー染色体、由来不明の付加染色体片、ならびに、homogeneously staining region（HSR）の全ての染色体起源を同定でき、転座切断点の決定も可能であった。

エピジェネティックなDNA異常の把握：（1）主要なエピジェネティックなDNA異常としてCpGアイランドのメチル化がある。その解析には、CpGアイランドの単離が必須であることから、CpGアイランドに由来するDNA断片の特徴を巧みに利用した、ゲル電気泳動を原理とした簡便な単離技術、SPM法を開発した。この方法で、第11染色体長腕の400キロ塩基対領域を解析し、存在が想定されるCpGアイランドのほとんどに由来するDNA断片を単離し、それらが転写領域を含むことから、遺伝子単離法としても、極めて有効な技術であることを明らかにした。（2）メチル化DNA結合ドメイン（MBD）カラムクロマトグラフィーで、メチル化したDNA断片を分画できることを明らかにし、肺がん手術材料から得られた高度にメチル化されたDNA断片でラムダベクターを用いてライブラリーを作成した。（3）このライブラリーに含まれる $3 \times 10^5$ 個のクローンのうち $1 \times 10^3$ 個をSPM法で解析した段階で、9個のCpGアイランド断片を同定した。そのうちの8個は、正常細胞においてもメチル化されていて、インプリンティング遺伝子と考えられたが、1個のCpGアイランドは肺がんで特異的にメチル化されていることを明らかにした。この結果は、肺がんで特異的にメチル化されるCpGアイランドの数が、約100個であることを示唆した。（4）SV40T抗原遺伝子上流にマウス遺伝子の発現制御領域を結合した外来遺伝子を、B6マウス受精卵に導入し作成したトランスジェニックマウス

MT-D2と、野生マウスとの交配で得たF1雑種を肝臓がんモデルマウスとして使用し、生じた腫瘍のDNAをRLGS法で解析した。DNAメチル化のため制限酵素で切断されなくなった部位が、フィンガープリント上スポットとして検出されないことから、がん特異的にメチル化されるDNA領域を知ることができる。575個の染色体上の位置がわかっているスポットに関し、30試料のがんDNAを解析し、高頻度にメチル化の起こっている領域14箇所を同定した。14個のスポットに対応する遺伝子として、p53、a4-integrin、mac25遺伝子、ならびに、いくつかの未知遺伝子cDNAなどを明らかにした。

#### D. 考察

個々のがん蓄積している異常遺伝子の全てを、一つの方法で把握することは、現時点では不可能であり、いくつかの解析手段を組み合わせることが現実的である。

ジェネティックなDNA異常の把握： 既知塩基配列における異常の把握は、臨床研究に重要であるが、蛍光標識を使用したプラントエンドRCR-SSCP法によるLOH解析は、正常細胞の混在によるシグナルの影響をある程度克服でき、有効に答えを出せる簡便な遺伝子診断法になりうると考えられた。

染色体領域の欠失は、がん抑制遺伝子の存在を示唆するが、LOH解析だけで欠失領域を狭めて、該当遺伝子の単離にまで到達することは不可能である。この限界を乗り越える一手段として、がん抑制遺伝子産物が持つ、細胞のヌードマウスにおける造腫瘍性を抑制する生物活性を指標とすることが有効であった。

がんで異常を示す遺伝子の産物の機能解析は、様々なタンパク質との相互反応を明らかにする。p53遺伝子の特定位置のリン酸化と、がん関連遺伝子としてすでに知られているMDM2遺伝子産物と

の関連でも明らかのように、相互作用の相手のタンパク質の異常も、がんの発生に関与すると考えられることから、がんにおける遺伝子異常の網羅的把握における解析対象となるものとする。

AP-PCRフィンガープリント法で検出したゲノム上無作為位置のDNA断片における異常を手がかりに、ラジエーションハイブリッド解析を組み合わせることにより、異常染色体位置を知ることができ、標的となる遺伝子を設定することなしに、該当位置に存在する既知、あるいは、未知の遺伝子を特定できる可能性を示した。現時点では、ヒトゲノム上で明らかにされている遺伝子の数が少ないため、直ちに該当遺伝子にたどり着くことは難しいが、ゲノム上の遺伝子配列決定の進行に応じて、たちどころに異常遺伝子を言い当てることが可能であると考えられた。また、G染色法とSKY法を組み合わせたdual karyotypingは、複雑な染色体構造異常の把握に極めて有効な手段であった。

エピジェネティックなDNA異常の把握：

SPM法は、ゲノム上のCpGアイランドをもれなく単離しうることから、遺伝子単離法としても極めて有効であった。MBDカラムクロマトグラフィーで分画した高度にメチル化されたDNA断片を、このSPM解析することにより、メチル化CpGアイランドの網羅的単離が可能であると考えられた。肺がんがメチル化されているDNA断片で作成したライブラリーに含まれるクローン $3 \times 10^5$ 個のうちの $1 \times 10^3$ 個を解析した段階で、9個のメチル化CpGアイランドが同定され、うち1個ががん細胞特異的にメチル化されていた。このライブラリーには、3ゲノム相当のクローンが含まれていると計算されたことから、肺がん組織にはゲノムあたり900個のメチル化CpGが存在し、このうちの100個ががん細胞で特異的にメチル化されるCpGアイランドと算定された。これらのCpGアイランド断片の単離同定は、比較的短期間で達成できると考えられること

から、対応する遺伝子の同定でDNAメチル化で不活性化するがん抑制遺伝子を網羅的に把握することが可能と考えられた。

また、制限酵素NotI切断位置を標識し、標識DNA断片をさらに別の制限酵素で切断して短くした後、電気泳動で二次元に展開するRLGS法は、NotI制限酵素の切断位置がDNAメチル化の標的であるCpGアイランドに多いこと、メチル化でその切断が阻害されることなどから、がんにおけるCpGアイランドのメチル化異常を網羅的に把握する極めて有用な技術である。したがって、上記のアプローチと同様に、DNAメチル化で不活性化するがん抑制遺伝子を網羅的に把握することが可能と考えられた。

## E. 結論

ジェネティックなDNA異常の把握において、既知遺伝子の異常の把握は、SSCP解析等ですでに十分可能である。したがって、既知遺伝子の数を増やすことが、一つの方策であるが、従来のLOH解析等によるがん抑制遺伝子の追求には限界がある。これを克服する手段として、該当遺伝子に想定される生物機能を指標とする解析が極めて有効であった。また、がん関連遺伝子の産物の機能と関連して、相互作用に関わる相手のタンパク質の遺伝子も網羅的な異常遺伝子の把握の標的になる。標的遺伝子を設定することなしに、異常を知ることが最も望ましいが、AP-PCRフィンガープリンティングが可能性を示した。しかし、異常の網羅的な把握には、ほど遠く何か奇抜なアイデアが必要である。その点、SKY法を基盤とした解析は、染色体レベルでの異常の把握に有効であった。

エピジェネティックなDNA異常は、CpGアイランドのメチル化、あるいは、脱メチル化による遺伝子発現の変化の寄与が大きいと考えられている。メチル化DNA断片を分画するMBDカラムクロマト

グラフィーと、CpGアイランドに由来するDNA断片を単離するSPM法を組み合わせたアプローチは、高度にメチル化されているCpGアイランドを網羅的に単離し、該当する遺伝子を明らかにすることが可能と考えられた。また、RLGS法は、発がんモデルマウスのがんにおけるメチル化異常を網羅的に把握でき、がんにおけるDNAメチル化異常の関与を理解する多くの情報を与えるものと期待される。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Kon H, Sonoda Y, Kumabe T, Yoshimoto T, Sekiya T and Murakami Y. Structural and functional evidence for the presence of tumor suppressor genes on the short arm of chromosome 10 in human gliomas. *Oncogene* 1998 16: 257-263.
2. Murakami Y and Sekiya T. Accumulation of genetic alterations and their significance in each primary human cancer and cell line. *Mut Res* 1998 400: 21-37.
3. Kijima G, Murakami Y, Ouchi N, Satomi S and Sekiya T. Nonsense mutation at codon 63 of the BRCA1 genen in Japanese breast cancer patients. *Jpn J Cancer Res* 1998 89: 837-841.
4. Malkhosyan S, Yasuda J, Soto JL, Sekiya T, Yokota J and Perucho M. Molecular karyotyping of metastatic colorectal cancer by unbiased DNA fingerprinting. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998 95: 10170-10175.
5. Maekawa M, Sugano K, Sano H, Miyazaki S, Ushiyama M, Fujita S, Gotoda T, Yokota T, Ohkura H, Kakizoe T and Sekiya T Increased expression of cyclooxygenase-2 to -1 in human colorectal cancers and adenomas, but not in hyperplastic polyps. *Jpn J Clin Oncol* 1998 28: 421-426.
6. Murakami Y, Nobukuni Y, Tamura K, Maruyama T, Sekiya T, Arai Y, Gomyou H, Tanigami A, Ohki M, Cabin D, Frischmeyer P, Hunt P and Reeves RH. Localization of tumor suppressor activity important in non-small cell lung carcinoma on chromosome 11q. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998 95: 8153-8158.
7. Kawakami K, Yasuda J, Shiraishi M, Kayama T, Doi K, Perucho M and Sekiya T. Detection of DNA abnormalities by arbitrarily primed PCR fingerprinting: Allelic losses in chromosome 10q in lung cancers. *Biochem Biophys Res Commun* 1998 251:153-157.
8. Shigyo M, Sugano K, Fukayama N, Taniguchi T, Tobisu K-I, Fujimoto H, Doi N, Niwakawa K, Shimamura K, Tsukamoto T, Sekiya T and Kakizoe T. Allelic loss on chromosome 9 in bladder cancer tissues and urine samples detected by blunt-end single-strand DNA conformation polymorphism. *Int J Cancer* 1998 78: 425-429.
9. Shiraishi M, Oates AJ, Li X, Hosoda F, Ohki M, Alitalo T, Lerman LS and Sekiya T. The isolation of CpG islands from human chromosomal regions 11q13 and Xp22 by segregation of partly melted molecules. *Nucl Acids Res* 1998 26: 5544-5550.
10. Kawakami K, Yasuda J, Kayama T, Doi K, and Sekiya T. Structures of primer-template hybrids in arbitrarily primed polymerase chain reaction. *Genet Anal Biomol Engineering* 1999 15: 5-8.
11. Shiraishi M, Sekiguchi A, Chuu YH and Sekiya T. Alteration of mosaic methylation of the repeat unit of the human ribosomal RNA genes in lung cancer. *Biol Chem* 1999 380: 81-84.
12. Shiraishi M, Chuu YH and Sekiya T. Isolation of DNA fragments associated with methylated CpG

- islands in human adenocarcinomas of the lung using a methylated DNA binding column and denaturing gradient gel electrophoresis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999 96: 2913-2918.
13. Kuchiki H, Yasuda J, Kayama T, Murakami Y, and Sekiya T. Detection of DNA abnormalities by arbitrarily primed PCR fingerprinting: Amplification of the MDM2 gene in a mediastinum fibrosarcoma. *Biochem Biophys Res Comm* 1999 in press.
  14. Sakakura C, Koide K, Ichikawa D, Shirasu M, Kimura A, Taniguchi H, Hagiwara A, Yamaguchi T, Inazawa J, Abe T, Takahashi T and Otsuji E. Analysis of histological therapeutic effect, apoptosis rate, and p53 status after combined treatment with radiation, hyperthermia, and 5-fluorouracil suppositories for advanced rectal cancers. *British J Cancer* 1998 77: 159-166.
  15. Kishi K, Toda K, Azegami T, Tsukada N, Uesugi Y, Masuko M, Niwano H, Hashimoto S, Sakaue M, Furukawa T, Koike T, Takahashi H, Maekawa T, Abe T and Aisawa Y. Hematopoietic cytokine-dependent differentiation to eosinophils and neutrophils in a newly established acute promyelocytic leukemia cell line with t(15;17). *Exp Hematol* 1998 26: 135-142.
  16. Ishino S, Hashimoto N, Fushiki S, Date K, Mori T, Fujimoto M, Nakagawa Y, Ueda S, Abe T, and Inazawa J. Loss of material from chromosome arm 1p during malignant progression of meningioma revealed by fluorescent in situ hybridization *Cancer* 1998 83: 360-366.
  17. Chikayama S, Kimura S, Kobayashi Y, Abe T, Maekawa T and Kondo M. Effects of daunorubicin on cell growth, cell cycle and induction of apoptosis in HL-60 cells. *Haematologia* 1998 29: 115-121.
  18. Ariyama Y, Fukuda Y, Okuno Y, Seto M, Date K, Abe T, Nakamura Y and Inazawa J. Amplification on double-minute chromosomes and partial-tandem duplication of the MLL gene in leukemic cells of a Patient with acute myelogenous leukemia. *Genes Chromosom Cancer* 1998 23: 267-272.
  19. Yashige H, Horiike S, Taniwaki M, Misawa S and Abe T. Micronuclei and nuclear abnormalities observed in erythroblasts in myelodysplastic syndromes and in de novo acute leukemia after treatment. *Acta Haematologica (Basel)* 1999 in press.
  20. Abe T. Infantile leukemia and soybeans - a hypothesis -. *Leukemia* 1999 in press.
  21. Sakakura C, Mori T, Sakabe T, Ariyama Y, Shinomiya T, Date K, Hagiwara A, Yamaguchi T, Takahashi T, Nakamura Y, Abe T, Inazawa J. Gains losses, and amplifications of genomic materials in primary cancers analyzed by comparative genomic hybridization. *Genes Chromosom Cancer* 1999 in press.
  22. Kakazu N, Taniwaki M, Horiike S, Nishida K, Hirakawa K, Goto S, Takahashi T, Uoshima N, Akaogi T, Inazawa J, Ohki M and Abe T. Spectral karyotyping (SKY) analysis of chromosome abnormalities in myelodysplastic syndromes (MDS) and overt leukemias developed from MDS. *Genes Chromosom Cancer* 1999 in press.
  23. Kitabayashi I, Ida K, Yokoyama A, Morohoshi F, Mitsuhashi N, Shimizu K, Hayashi Y and Ohki M. The AML1-MTG 8 leukemic fusion protein forms a complex with a novel member of the MTG8(ETO/CDR) family, MTGR 1. *Mol. Cell Biol* 1998 18: 846-858.
  24. Kitabayashi I, Yokoyama A, Shimizu K and Ohki



- M. Interaction and functional cooperation of the leukemia-associated factors AML1 and p300 in myeloid cell differentiation. *EMBO J* 1998 17: 2994-3004.
25. Gamou T, Kitamura E, Hosoda F, Shimizu K, Shinohara K, Hayashi Y, Nagase T, Yokoyama Y and Ohki M. The partner gene of AML1 in t(16;21) myeloid malignancies is a novel member of the *MTG8 (ETO)* family. *Blood* 1998 91: 4028-4037.
  26. Ikegawa S, Ohashi H, Hosoda F, Fukushima Y, Ohki M and Nakamura Y. Pseudoachondroplasia with de novo deletion [del(11)(q21q22.2)]. *Am J Med Genet* 1998 77: 356-359.
  27. Morohoshi F, Ootsuka Y, Arai K, Ichikawa H, Mitani S, Munakata N, Ohki M. Genomic structure of the human RBP56/HTAFII68 and FUS/TLS gene. *Gene* 1999 in press.
  28. Eguchi-Ishimae M, Eguchi M, Tanaka K, Hamamoto K, Ohki M. Ueda K and Kamada N. Fluorescence *in situ* hybridization analysis of 12;21 translocation in Japanese childhood acute lymphoblastic leukemia. *Jpn J Cancer Res* 1998 89: 783-788.
  29. Hanaki K, Odawara T, Nakajima N, Shimizu YK, Nozaki C, Mizuno K, Muramatsu T, Kuchino Y and Yoshikura H. Two different reactions involved in the primer/template-independent polymerization of dATP and dTTP by Taq DNA polymerase. *Biochem Biophys Res Commun* 1998 244: 210-219.
  30. Mishima K, Higashiyama S, Asai A, Yamaoka K, Nagashima Y, Taniguchi N, Kitanaka C, Kirino T and Kuchino Y. Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor stimulates mitogenic signaling and is highly expressed in human malignant gliomas. *Acta Neuropathologica* 1998 96: 322-328.
  31. Chi S, Kitanaka C, Noguchi K, Mochizuki T, Nagashima Y, Shirouzu M, Fujita H, Yoshida M, Chen W, Asai A, Himeno M, Yokoyama S and Kuchino Y. Oncogenic Ras triggers cell suicide through the activation of a caspase-independent cell death program in human cancer cell. *Oncogene* 1999 in press.
  32. Sugiyama A, Noguchi K, Kitanaka C, Katou M, Tashiro G, Ono T, Yoshida MC and Kuchino Y. Molecular cloning and chromosomal mapping of mouse intronless *myc* gene acting as potent apoptosis inducer. *Gene* 1999 226: 273-283.
  33. Kitanaka C and Kuchino Y. Caspase-independent cell death with necrotic morphology. *Cell Death Different* 1999 in press.
  34. Banin S, Moyal L, Shieh SY, Taya Y, Anderson CW, Chessa L, Snorodinsky NI, Prives C, Reiss Y, Shiloh Y and Ziv Y. Enhanced phosphorylation of p53 by ATM in response to DNA damage. *Science* 1998 281: 1674-1677.
  35. Canman CE, Lim DS, Cimoprach KA, Taya Y, Tamai K, Sakaguchi K, Appella E, Kastan M B, Siliciano JS. Activation of the ATM kinase by ionizing radiation and phosphorylation of p53. *Science* 1998 281: 1677-1679.
  36. Khanna KK, Keating KE, Kozlov S, Scott S, Gatei M, Hobson K, Taya Y, Gabrielli B, Chan D, Lees-Meller SP and Lavin M. ATM associates with and phosphorylates p53: mapping the region of interaction. *Nature Genet* 1998 20: 398-400.
  37. Lu H, Taya Y, Ikeda M and Levine AJ. Ultraviolet radiation, but not gamma radiation or etoposide-induced DNA damage, results in the phosphorylation of the murine p53 protein at serine-389.

- Proc Natl Acad Sci USA 1998 95: 6399-6402.
38. Tibbetts RS, Williams JM, Taya Y, Shieh SY, Prives C and Abraham RT. ATR is a DNA damage-responsive protein kinase that phosphorylates the p53 tumor suppressor protein. *Genes Dev* 1999 in press.
  39. Cuddihy AR, Li S, Tam NWN, Wong AHT, Taya Y, Abraham N, Bell JC and Koromilas AE. The interferon-inducible protein kinase PKR mediates the transcriptional activation of the tumor suppressor p53. *Mol Cell Biol* 1999 in press.
  40. Adams PD, Li X, Sellers WR, Baker KB, Leng X, Harper JW, Taya Y and Kaelin WG. The retinoblastoma protein contains a C-terminal motif that targets it for phosphorylation cyclin/cdk2 complexes. *Mol Cell Biol* 1999 in press.
  41. Nakagawa K, Taya Y, Tamai K and Yamaizumi M. Requirement of ATM in the phosphorylation of the human p53 protein at serine 15. *Mol Cell Biol* 1999 19: 2828-2834.
  42. Brugarolas J, Moberg K, Boyd SD, Taya Y, Jacks T and Lees JA. Inhibition of CDK2 by p21 is necessary for pRB-mediated G1 arrest following  $\gamma$ -irradiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999 96: 1002-1007.
  43. Sheih S-Y, Taya Y and Prives C. DNA damage-inducible phosphorylation at N-terminal sites including a novel site, serine 20, requires oligomerization of p53. *EMBO J* 1999 in press.
  44. Nagata Y, Anan T, Yoshida T, Mizukami T, Taya Y, Fujiwara T, Kato H, Saya H and Nakao M. The stabilization mechanism of mutant-type p53 by impaired ubiquitination: the loss of wild-type p53 function and the hsp90 association. *Oncogene* 1999 in press.
  45. Sasaki N, Izawa M, Watahiki M, Ozawa K, Tanaka T, Yoneda Y, Matsuura S, Carninci P, Muramatsu M, Okazaki Y and Hayashizaki Y. Transcriptional sequencing: A method for DNA sequencing using RNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998 95: 3455-3460.
  46. Sasaki N, Nagaoka S, Itoh M, Izawa M, Konno H, Carninci P, Yoshiki A, Kusakabe M, Moriuchi T, Muramatsu M, Okazaki Y and Hayashizaki Y. Characterization of gene expression in mouse blastocyst using single-pass sequencing of 3995 clones. *Genomics* 1998 49: 167-179.
  47. Carninci P, Nishiyama Y, Westover A, Itoh M, Nagaoka S, Sasaki N, Okazaki Y, Muramatsu M and Hayashizaki Y. Thermostabilization and thermoactivation of thermolabile enzymes by trehalose and its application for the synthesis of full length cDNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998 95: 520-524.
  48. Kato MV, Ikawa Y, Hayashizaki Y and Shibata H. Paternal imprinting of mouse serotonin receptor 2A gene Htr2 in embryonic eye; A conserved imprinting regulation on the RB/Rb locus. *Genomics* 1998 47: 146-148.
  49. Naas TP, DeBerardinis RJ, Moran JV, Ostertag EM, Kingsmore SF, Seldin MF, Hayashizaki Y, Martin SL and Kazazian Jr. HH. An actively retrotransposing, novel subfamily of mouse L1 elements. *EMBO J* 1998 17: 590-597.
  50. Shibata H, Yoda Y, Kato R, Ueda T, Kamiya M, Haraiwa N, Yoshiki A, Plass C, Pearsall RS, Held WA, Muramatsu M, Sasaki H, Kusakabe M and Hayashizaki Y. A methylation imprint mark in the mouse imprinted gene Grf1/Cdc25 Mm locus shares a common feature with the U2afbp-rs gene; An association with a short tandem repeat and a hypermethylated region. *Genomics* 1998 49: 30-

- 37.
51. Izawa M, Sasaki N, Watahiki M, Ohara E, Yoneda Y, Muramatsu M, Okazaki Y and Hayashizaki Y. Recognition sites of 3'-OH group by T7 RNA polymerase and its application to transcriptional sequencing. *J Biol Chem* 1998 273: 14242-14246.
  52. Sugahara Y, Akiyoshi S, Okazaki Y, Hayashizaki Y and Tanihata I. An automatic image analysis system for RLGS films. *Mammal. Genome* 1998 9: 643-651.
  53. Seki M, Carninci P, Nishiyama Y, Hayashizaki Y and Shinozaki K. High-efficiency cloning of Arabidopsis full-length cDNA by biotinylated CAP trapper. *Plant J* 1998 15: 707-720.
  54. Mori M, Akiyoshi S, Mizuno Y, Okuizumi H, Okazaki Y, Hayashizaki Y and Nishimura M. Genetic profile of the SMXA recombinant inbred mouse strains revealed with restriction landmark genomic scanning. *Mammal. Genome* 1998 9: 695-709.
  55. Pearsall RS, Imai K, Shibata H, Hayashizaki Y, Chapman V M, Held WA and Plass C. The Rasgrf1-repeat sequence (D9Ncvs53) maps between Mod1 and Rbp1 on mouse chromosome 9 and may define a putative imprinted region. *Mammal. Genome* 1998 9: 261-262.
  56. Hayward B, Kamiya M, Strain L, Moran V, Campbell R, Hayashizaki Y and Bonthron DT. The human GNAS1 gene is imprinted, and encodes distinct paternally and biallelically expressed G proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998 95: 10038-10043.
  57. Sasaki N, Izawa M, Sugahara Y, Tanaka T, Ozawa K, Matsuura S, Muramatsu M, Okazaki Y and Hayashizaki Y. Identification of unusually stable RNA hairpins causing band compression in transcriptional sequencing and their elimination by use of inosine triphosphate. *Gene* 1998 222: 17-23.
  58. Okazaki, Y and Hayashizaki Y. Genome scanning using restriction landmark techniques. "Methods", Academic Press, London, in press.
  59. Mizuno Y, Carninci P, Okazaki Y, Tateno M, Kawai J, Amanuma H, Muramatsu M and Hayashizaki Y. Increased specificity of reverse transcription priming by trehalose and oligo-blockers allows high-efficiency window separation of mRNA display. *Nucl Acids Res* 1999 27: 1345-1349.
  60. Sugahara Y, Akiyoshi S, Okazaki Y, Tanihata I and Hayashizaki Y. Application of RLGS image analysis tool (RAT) to the construction of a genetic linkage map of recombinant inbred strain SMXA. *Mammal Genome* 1998 in press.
  61. Itoh M, Kitsunai T, Akiyama J, Shibata K, Izawa M, Kawai J, Tomaru Y, Carninci P, Shibata YI, Ozawa Y, Muramatsu M, Okazaki Y and Hayashizaki Y. Automated high throughput plasmid preparation system with microtiter well-plates by filtration method. 1999 in press.
  62. Pearsall RS, Plass C, Romano MA, Garriks MD, Shibata H, Hayashizaki Y and Held WA. A direct repeat sequence at the Rasgrf1 locus and imprinted expression. *Genomics* 1999 55, 194-201.
  63. Okuyama T, Li XK, Funeshima N, Fujino M, Sasaki K, Kita Y, Kosuga M, Takahashi M, Saito H, Suzuki S and Yamada M. Fas-mediated apoptosis is involved in the elimination of gene-transduced hepatocytes with E1/E3-deleted adenoviral vectors. *J Gastroenterol* 1998 13: S113-118.
  64. Azuma N, Hotta Y, Tanaka H and Yamada M. Missense mutations in the PAX6 gene in aniridia.

- Invest Ophthalmol Vis Sci 1998 39: 2524-2528.
65. Azuma N and Yamada M. Missense mutation at the C-terminal of the PAX6 gene in ocular anterior segment anomalies. Invest Ophthalmol Vis Sci 1998 39: 828-830.
  66. Miyashita T, Nagao K, Ohmi K, Yanagisawa H, Okamura-Oho Y and Yamada M. Intracellular aggregate formation of dentatorubral-pallidoluyisian atrophy (DRPLA) protein with the extended polyglutamine. Biochem Biophys Res Comm 1998 249: 96-102.
  67. Takayama S, Krajewski S, Krajewska M, Kitada S, Zapata JM, Kochel K, Knee D, Scudiero D, Tudor U, Miller GJ, Miyashita T, Yamada M and Reed C. Expression and location of Hsp70/Hsc-binding anti-apoptotic protein BAG-1 and its variants in normal tissues and tumor cell lines. Cancer Res 1998 58: 3116-3131.
  68. Yuan ZR, Kohsaka T, Ikegaya T, Suzuki T, Okano S, Abe J, Kobayashi N. and Yamada M. Mutational analysis of the Jagged 1 gene in Alagille syndrome families. Hum Mol Genet 1998 7: 1363-1369.
  69. Okuyama T, Fujino M, Li XK, Funeshima N, Kosuga M, Saito I, Suzuki S and Yamada M. Efficient Fas-ligand gene expression in rodent liver after intravenous injection of a recombinant adenovirus by the use of a Cre-mediated switching system. Gene Therapy 1998 5: 1047-1053.
  70. Sakai K, Yamada M, Horiba N, Wakui M, Demura H and Suda T. The genomic organization of the human corticotropin-releasing factor type-1 receptor. Gene 1998 219: 25-130.
  71. Miyashita T, Nagao K, Krajewski S, Salvesen GS, Reed JC, Inoue T and Yamada M. Investigation of glucocorticoid-induced apoptotic pathway: Processing of caspase-6 but not caspase-3. Cell Death Differ 1998 5: 1034-1041.
  72. Okuyama T, Kosuga M, Takahashi S, Sasaki K and Yamada M. Hepatocyte specific gene expression by a recombinant adeno-associated virus vector carrying apolipoprotein E enhancer and  $\alpha$ 1-antitrypsin promoter. Gene Therapy Mol Genet 1998 3: 67-74.
  73. Li XK, Okuyama T, Tamura A, Enosawa S. Kaneda Y, Takahara S, Funashima N, Yamada M, Amemiya H and Suzuki S. Prolonged survival of rat liver allografts transfected with Fas-ligand expressing plasmid. Transplantation 1999 in press.
  74. Narimatsu N, Iwasaki H, Nakayama F, Ikehara Y, Kudo T, Nishihara S, Sugano, K, Okura H, Fujita S and Hirohashi S. *Lewis* and *Secretor* gene dosages affect CA19-9 and DU-PAN-2 serum levels in normal individuals and colorectal cancer patients. Cancer Res 1998 58: 512-518.
  75. Imoto S, Ohkura H, Sugano K, Sasaki Y, Ito K, Igarashi T, Ohtsu T, Fujii H, Minami H, Hasebe T and Mukai M. Determination of cytosol c-erbB-2 protein in breast cancer by sandwich enzyme immunoassay. Jpn J Clin Oncol 1998 28: 92-96.
  76. Sugano K. A primer for genetic counseling of hereditary cancer - visits to the cancer hospitals in the United States. Jpn J Clin Oncol 1998 28: 454.
  77. Maekawa M and Sugano K. Quantification of relative expression of genes with homologous sequences using fluorescence-based single-strand conformation polymorphism analysis-application to lactate dehydrogenase and cyclooxygenase isozymes. Clin Chem Lab Med 1998 36: 577-582.
  78. Maekawa M, Sugano K et al. Point mutations of ornithine decarboxylase gene are an infrequent event in colorectal cancer but a missense mutation

was found in a replication error positive patient with hNSH2 germline mutation. *Jpn J Clin Oncol* 1998 28: 383-387.

79. Miyauchi A, Futami H, Hai N, Yokozawa T, Kuma K, Aoki N, Kosugi S, Sugano K and Yamaguchi K. Two germline missense mutations at codon 804 and 806 of the RET protooncogene in the same allele in a patient with multiple endocrine neoplasia type 2B without codon 918 mutation. *Jpn J Cancer Res* 1999 90 1-5.

厚生科学研究費補助金（がん克服戦略研究事業）

分担研究報告書

蓄積遺伝子異常の網羅的把握によるがんの特徴の解明と診療への応用

主任研究者 関谷剛男 国立がんセンター研究所腫瘍遺伝子研究部部长

研究要旨 個々のがん蓄積している、ジェネティックなDNA異常と、エピジェネティックなDNA異常の全てを迅速に同定する戦略、技術確立することを最終目標とする。ジェネティックなDNA異常の把握：（1）既知標的遺伝子における変異を同定する目的で、われわれが開発した塩基配列変化の検出技術SSCPを、蛍光標識の導入などで臨床研究に応用し、尿や膀胱液中のがん細胞DNAでの異常の検出を可能にした。（2）解析対象となる既知遺伝子の数を増やす目的で、YACクローン等をヒトがん細胞へ導入し、LOH解析で示唆されたがん抑制遺伝子による細胞の造腫瘍能の抑制を指標に追跡し、肺がんに関与する遺伝子候補として、活性を示すDNA断片を単離し、その塩基配列を決定した。3）標的遺伝子を設定せずにDNA異常を検出する目的で、AP-PCR法の導入を試み、異常遺伝子の検出が可能であることを明らかにした。エピジェネティックなDNA異常の把握：（1）CpGアイランドの簡便な単離技術として、CpGアイランドに由来するDNA断片の特徴を巧みに利用したゲル電気泳動を原理としたSPM法を開発し、遺伝子単離法としても優れた技術であることを示した。（2）がんでメチル化されているDNA断片を、アフィニティーカラムクロマトグラフィーで網羅的に回収できることを明らかにし、ライブラリーを作成した。得られたクローンをSPM解析することにより、がんで特異的にメチル化されるCpGアイランドを同定し、肺がんにおいてはその数が約100個であると算定した。

A. 研究目的

がんの形成機構の解明、よりの確な診断、より合目的的な治療には、各患者の腫瘍それぞれに蓄積しているDNA異常を網羅的に把握すること、すなわち、個々のがん特徴を決めている異常遺伝子の組み合わせを知ることが必要である。DNA異常には、ジェネティックな異常と、エピジェネティックな異常があるが、個々のがん蓄積しているこれらの異常を持つ遺伝子の全てを迅速に同定する

戦略、技術確立することを最終目標とする。

B. 研究方法

ジェネティックなDNA異常の把握：（1）既知標的遺伝子における変異の同定する目的で、われわれが開発した塩基配列変化の検出技術SSCPを、蛍光標識の導入などで臨床研究に応用する。（2）解析対象となる既知遺伝子の数を増やすことも重要

析対象となる既知遺伝子の数を増やすことも重要であることから、新規がん関連遺伝子を明らかにする目的で、LOH解析だけでは単離に到達できないがん抑制遺伝子を、YACクローン等をヒトがん細胞へ導入し、その造腫瘍性の抑制活性を指標に追跡する。(3) 標的遺伝子を設定せずに、DNA異常を検出する目的で、AP-PCRフィンガープリント法を検討する。塩基配列変化を伴わないエピジェネティックな異常の把握：(1) CpGアイランドに由来するDNA断片を簡便に単離するために開発したSPM法の遺伝子探索技術としての有効性を検討する。(2) アフィニティーカラムクロマトグラフィーによるメチル化DNA断片の網羅的な単離を検討する。(3) これら二つの技術を組み合わせて、肺がんで特異的にメチル化されるCpGアイランドの網羅的単離を検討する。

### C. 研究結果

ジェネティックなDNA異常の把握：(1) 蛍光標識を使用した、プラントエンドPCR-SSCPによる多型解析により、尿や膀胱液中のがん細胞DNAでの遺伝子欠失を感度よく検出し、遺伝子診断に応用可能であることを示した。(2) ヒト肺非小細胞がんのがん抑制遺伝子の存在が考えられる染色体11q23領域に関し、該当領域を含む一連のYACクローンを、ヌードマウスに腫瘍を作るヒト肺がん細胞株へ導入し、1個のクローンがこのがん細胞の造腫瘍性を抑制する活性を示すことを明らかにした。さらに、このクローンの一部130キロ塩基対のDNA断片を含むPACクローンが抑制能を示し、がん抑制遺伝子を含んでいることが示唆され、全塩基配列を決定した。(3) AP-PCRフィンガープリンティング解析で検出したがん特異的に異常を示すDNA断片の染色体位置を、ラジエーションハイブリッド解析で決定することにより、肺がんにおける10q24-q25領域の欠失、縦隔繊維肉腫にお

けるMDM2遺伝子の増幅、神経膠芽腫におけるサイクリンD3遺伝子の増幅を見いだした。

エピジェネティックなDNA異常の把握：(1) 主要な異常としてCpGアイランドのメチル化がある。その解析には、CpGアイランドの単離が必須であることから、CpGアイランドに由来するDNA断片の特徴を巧みに利用したゲル電気泳動を原理とした簡便な単離技術、SPM法を開発した。この方法で、第11染色体長腕の400キロ塩基対領域を解析し、存在が想定されるCpGアイランドのほとんどに由来するDNA断片を単離し、それらが転写領域を含むことから、遺伝子単離法としても、極めて有効な技術であることを明らかにした。(2) メチル化DNA結合ドメイン(MBD)カラムクロマトグラフィーで、メチル化したDNA断片を分画できることを明らかにし、肺がん手術材料から得られた高度にメチル化されたDNA断片で、ラムダベクターを用いてライブラリーを作成した。(3) このライブラリーに含まれる $3 \times 10^5$ 個のクローンのうち $1 \times 10^3$ 個をSPM法で解析した段階で、9個のCpGアイランド断片を同定した。そのうちの8個は、正常細胞においてもメチル化されていて、インプリンティング遺伝子と考えられたが、1個のCpGアイランドは肺がんで特異的にメチル化されていることを明らかにした。この結果は、肺がんで特異的にメチル化されるCpGアイランドの数が、約100個であることを示唆した。

### D. 考察

個々のがん蓄積している異常遺伝子の全てを、一つの方法で把握することは、現時点では不可能であり、いくつかの解析手段を組み合わせることが現実的である。

ジェネティックなDNA異常の把握：

既知塩基配列における異常の把握は、臨床研究に重要であるが、蛍光標識を使用したプラントエ

ンドRCR-SSCP法によるヘテロ接合性消失の解析は、混在する正常細胞からのシグナルによる障害を考慮に入れながら、有効に答えを出せる簡便な遺伝子診断法になりうると考えられた。染色体領域の欠失は、がん抑制遺伝子の存在を示唆するが、LOH解析だけで欠失領域を狭めて、該当遺伝子の単離にまで到達することは不可能である。この限界を乗り越える一手段として、がん抑制遺伝子の細胞のヌードマウスにおける造腫瘍性を抑制する生物活性を指標とすることが有効であった。AP-PCRフィンガープリント法で検出したゲノム上無作為位置のDNA断片における異常を手がかりに、ラジエーションハイブリッド解析を組み合わせることにより、異常染色体位置を知ることができ、標的となる遺伝子を設定することなしに、該当位置に存在する既知、あるいは、未知の遺伝子を特定できる可能性を示した。現時点では、ヒトゲノム上で明らかにされている遺伝子の数が少ないため、直ちに該当遺伝子にたどり着くことは難しいが、ゲノム上の遺伝子配列決定の進行に応じて、たちどころに異常遺伝子を言い当てることが可能であると考えられた。

#### エピジェネティックなDNA異常の把握：

SPM法は、ゲノム上のCpGアイランドをもれなく単離しうることから、遺伝子単離法としても極めて有効であった。MBDカラムクロマトグラフィーで分画した高度にメチル化されたDNA断片を、このSPM解析することにより、メチル化CpGアイランドの網羅的単離が可能であると考えられた。肺がんではメチル化されているDNA断片で作成したライブラリーに含まれるクローン $3 \times 10^5$ 個のうちの $1 \times 10^3$ 個を解析した段階で、9個のメチル化CpGアイランドが同定され、うち1個ががん細胞特異的にメチル化されていた。このライブラリーには、3ゲノム相当のクローンが含まれていると計算されたことから、肺がん組織にはゲノムあたり900個のメ

チル化CpGが存在し、このうちの100個ががん細胞で特異的にメチル化されるCpGアイランドと算定された。これらのCpGアイランド断片の単離同定は、比較的短期間で達成できると考えられることから、対応する遺伝子の同定でDNAメチル化で不活性化するがん抑制遺伝子を網羅的に把握することが可能と考えられた。

#### E. 結論

ジェネティックなDNA異常の把握：既知遺伝子の異常の把握は、SSCP解析等ですでに十分可能である。したがって、既知遺伝子の数を増やすことが、一つの方策であるが、従来のLOH解析等によるがん抑制遺伝子の追求には限界がある。これを克服する手段として、該当遺伝子に想定される生物機能を指標とする解析が極めて有効であった。標的遺伝子を設定することなしに、異常を知ることが最も望ましいが、AP-PCRフィンガープリンティングが可能性を示した。しかし、異常の網羅的な把握には、ほど遠く何か奇抜なアイデアが必要である。

エピジェネティックなDNA異常の把握：この異常には、CpGアイランドのメチル化、あるいは、脱メチル化による遺伝子発現の変化の寄与が大きいと考えられている。メチル化DNA断片を分画するMBDカラムクロマトグラフィーとCpGアイランドに由来するDNA断片を単離するSPM法を組み合わせたアプローチは、高度にメチル化されているCpGアイランドを網羅的に単離し、該当する遺伝子を明らかにすることが可能と考えられた。がんにおけるDNAメチル化異常の関与を理解する多くの情報が得られると期待される。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Kon H, Sonoda Y, Kumabe T, Yoshimoto T,



- Sekiya T and Murakami Y. Structural and functional evidence for the presence of tumor suppressor genes on the short arm of chromosome 10 in human gliomas. *Oncogene* 1998 16: 257-263.
2. Murakami Y and Sekiya T. Accumulation of genetic alterations and their significance in each primary human cancer and cell line. *Mut Res* 1998 400: 21-37.
  3. Kijima G, Murakami Y, Ouchi N, Satomi S and Sekiya T. Nonsense mutation at codon 63 of the BRCA1 gene in Japanese breast cancer patients. *Jpn J Cancer Res* 1998 89: 837-841.
  4. Malkhosyan S, Yasuda J, Soto JL, Sekiya T, Yokota J and Perucho M. Molecular karyotyping of metastatic colorectal cancer by unbiased DNA fingerprinting. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998 95: 10170-10175.
  5. Maekawa M, Sugano K, Sano H, Miyazaki S, Ushiyama M, Fujita S, Gotoda T, Yokota T, Ohkura H, Kakizoe T and Sekiya T. Increased expression of cyclooxygenase-2 to -1 in human colorectal cancers and adenomas, but not in hyperplastic polyps. *Jpn J Clin Oncol* 1998 28: 421-426.
  6. Murakami Y, Nobukuni Y, Tamura K, Maruyama T, Sekiya T, Arai Y, Gomyou H, Tanigami A, Ohki M, Cabin D, Frischmeyer P, Hunt P, and Reeves RH. Localization of tumor suppressor activity important in non-small cell lung carcinoma on chromosome 11q. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998 95: 8153-8158.
  7. Kawakami K, Yasuda J, Shirishi M, Kayama T, Doi K, Perucho M and Sekiya T. Detection of DNA abnormalities by arbitrarily primed PCR fingerprinting: Allelic losses in chromosome 10q in lung cancers. *Biochem Biophys Res Commun* 1998 251:153-157.
  8. Shigyo M, Sugano K, Fukayama N, Taniguchi T, Tobisu K-I, Fujimoto H, Doi N, Niwakawa K, Shimamura K, Tsukamoto T, Sekiya T and Kakizoe T. Allelic loss on chromosome 9 in bladder cancer tissues and urine samples detected by blunt-end single-strand DNA conformation polymorphism. *Int J Cancer* 1998 78: 425-429.
  9. Shiraishi M, Oates AJ, Li X, Hosoda F, Ohki M, Alitalo T, Lerman LS and Sekiya T. The isolation of CpG islands from human chromosomal regions 11q13 and Xp22 by segregation of partly melted molecules. *Nucl Acids Res* 1998 26: 5544-5550.
  10. Kawakami K, Yasuda J, Kayama T, Doi K, and Sekiya T. Structures of primer-template hybrids in arbitrarily primed polymerase chain reaction. *Genet Anal Biomol Engineering* 1999, 15: 5-8.
  11. Shiraishi M, Sekiguchi A, Chuu YH and Sekiya T. Alteration of mosaic methylation of the repeat unit of the human ribosomal RNA genes in lung cancer. *Biol Chem* 1999 380: 81-84.
  12. Shiraishi M, Chuu YH and Sekiya T. Isolation of DNA fragments associated with methylated CpG islands in human adenocarcinomas of the lung using a methylated DNA binding column and denaturing gradient gel electrophoresis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999 96: 2913-2918.
  13. Kuchiki H, Yasuda J, Kayama T, Murakami Y, and Sekiya T. Detection of DNA abnormalities by arbitrarily primed PCR fingerprinting: Amplification of the MDM2 gene in a mediastinum fibrosarcoma. *Biochem Biophys Res Comm* 1999 in press.
2. 学会発表

1. 村上喜則、関谷剛男他、遺伝的相補実験に基づく肺非小細胞がん抑制遺伝子の単離の試み、第57回日本癌学会総会、横浜、1998.
2. 関谷剛男、がん研究に役立つDNA解析技術、第57回日本癌学会総会、横浜、1998.
3. 朽木秀雄、関谷剛男他、Arbitrarily primed PCR (AP-PCR)法で検出したヒト神経膠芽腫培養細胞の増幅DNA断片の解析、第57回日本癌学会総会、横浜、1998.
4. 白石昌彦、関谷剛男他、ヒト肺がんにおいて高度にメチル化されたCpGアイランドの網羅的単離、第57回日本癌学会総会、横浜、1998.
5. 津田洋幸、関谷剛男他、ヒト正常型c-Ha-rasトランスジェニックラットの発がん感受性の解析、第57回日本癌学会総会、横浜、1998.
6. 菅野康吉、関谷剛男他、大腸腫瘍におけるp53遺伝子不活化の機序、第57回日本癌学会総会、横浜、1998.
7. ヒト膀胱がんにおける遺伝子異常の網羅的解析、井上雅之、関谷剛男他、第57回日本癌学会総会、横浜、1998.
8. 田村研治、関谷剛男他、ヒト肺小細胞がんにおける第5染色体長腕のホモ欠失領域の解析、第57回日本癌学会総会、横浜、1998.
9. 政本聰史、関谷剛男他、ヒト膀胱がん細胞におけるアポトーシス耐性の機構、第57回日本癌学会総会、横浜、1998.
10. 松原央、関谷剛男他、臨床検体を用いた膀胱腫瘍における遺伝子欠失の解析、第57回日本癌学会総会、横浜、1998.
11. 執行雅紀、関谷剛男他、膀胱がんにおける腫瘍と尿からの第9染色体および第17染色体短腕の欠失の解析、第57回日本癌学会総会、横浜、1998.
12. 信国宇洋、関谷剛男他、肺非小細胞がんの腫瘍原性抑制活性を担う第11染色体長腕領域の解析、第21回日本分子生物学会年会、横浜、1998.
13. 白石昌彦、関谷剛男他、メチル化DNA結合蛋白質を用いたヒト肺がん高度にメチル化されているCpGアイランドの単離、第21回日本分子生物学会年会、横浜、1998.

平成10年度がん克服戦略研究事業  
分担研究報告書

Spectral karyotyping (SKY) 法を用いた骨髄異形成症候群(MDS)における染色体異常の解析, および, comparative genomic hybridization (CGH) 法による消化器領域癌における増幅遺伝子領域の検索

分担研究者 阿部達生 京都府立医科大学衛生学教室  
(研究協力者 嘉数直樹, 阪倉長平)

### 研究要旨

Spectral karyotyping (SKY)法を導入して, 複雑型異常を中心にMDSの染色体異常を解析し, G染色法では同定困難であった異常を明らかにする. またMDSの染色体異常に関する新たな知見を得ることも目的として研究をおこなった. その結果, G染色法では解析困難であったマーカー染色体, 由来不明の付加染色体片, およびhomogeneously staining region (HSR)のすべての染色体起源を同定ないしは確定できた. さらに, FISH法を行うことにより, HSR内でMLL遺伝子, ring染色体内でAML1遺伝子がそれぞれ増幅している症例を見出すことができた. また, 4例においてG染色法で正常と判定された染色体において, その潜在型転座(cryptic translocation)を見出した. さらに複雑型異常を有する症例においては, G染色法で単純な欠失と思われていたものの約半数が, 実際にはその欠失領域と考えられる部分が G染色法では同定困難であった染色体や一見正常と思われた染色体に転座していることを明らかにした. また, CGH法を用いた胃癌症例の研究で先にMET (7q31), MYC (8q23-24), hst1/int2 (11q13) 遺伝子の増幅を報告したが, 今回これら遺伝子と別に, 標的候補遺伝子が明らかでない高頻度に観察される染色体領域が複数箇所と同定された. このうち, 8q23.1より新規増幅遺伝子を単離した. また, 20q13からAIB1やBTAKが既に報告されているが, 胃癌や大腸癌でも同じ20q13の増幅を認め, 候補遺伝子であるAIB1が胃癌で増幅, 高発現し, 転移に関係しているのを確認した.

#### A. 研究目的

骨髄異形成症候群(MDS)では, 急性骨髄性白血病とは異なり病型特異的な染色体相互転座はきわめて稀である. 逆に3種類以上の染色体で異常が認められる複雑型異常が多く, primary MDSで30%前後, 二次性MDSでは50%にもものぼる. この複雑型異常は, 5q-, 7q-を中心とした種々の欠失型異常が主であり, また, G染色法では同定困難なマーカー染色体(mar)や由来不明の付加染色体片(add)も数多く認められる. この複雑型異常を認めるMDSは白血病化

しやすく, MDSの進展・悪性化に関わる複数の遺伝子変異が多段階に蓄積していることが示唆される. このように, MDSにおける複雑型異常は, 高頻度で重要な所見であるにもかかわらず Gバンドでは完全な解析が困難であった. そこでspectral karyotyping (SKY)法を導入して, この複雑型異常を中心にMDSの染色体異常を解析し, G染色法では同定困難であった異常を明らかにし新たな知見を得る. また, この研究を通してSKY法をさらに進展・応用

させた高精度の染色体解析システムの確立をめざす。

一方、胃癌や大腸癌をはじめとする固形腫瘍の大多数症例では少なくとも現時点において完全な核型の作成は困難である。CGH法はその隘路を開く方法として登場したが、ゲノム構成が欠失と増幅で特徴づけられる固形腫瘍の解析に適している。従来の研究で染色体の欠失と増幅によってもたらされる複雑な異数性が癌の増殖増悪に関与するのが知られている。したがって、異数性やクローン進化を特徴づける特定遺伝子の増幅や欠失を消化器領域の癌で明らかにするのを目的とする。

## B. 研究方法

既にG染色法で染色体分析されたMDS 19症例 (CMML 2例, RA 3例, RARS 1例, RAEB 3例, RAEB-T 4例, 二次性MDS 3例, overt leukemia 3例)と1例のMDS細胞株(OHN-GM)を対象とした。複雑型異常が16例で、正常核型が2例(2例とも約90%と高頻度で染色体異常が認められる二次性MDSにもかかわらず正常核型であったため、crypticな異常を疑い今回の解析対象に加えた)であった。残りの2例は単独の染色体異常[いずれもadd(17)(p10)]であった。また、3症例でhomogeneously staining region (HSR)を認めた。

5種類の蛍光色素による24通りの組合わせで各染色体特異的DNAを標識し染色体ペインティングプローブとして用いた。トリプルバンドパスフィルターを通して染色体サンプルより発する蛍光を取り込み、各染色体に固有の蛍光スペクトルに変換した後、スペクトル同定アルゴリズムによりピクセル単位でどの染色体由来かを識別し、それぞれの由来染色体ごとに特定の疑似カラー(24色)で表示した。また、このSKY解析に引き続いてDAPI専用フィル

ターに切り替えて同一核板でDAPI対比染色像もデジタル信号化して取り込んで画像処理(band-enhancement)し、G染色像に匹敵するバンドパターンを得た。さらに、同一核板でSKY解析像とGバンドパターン像をmatchingさせ両者を同時にkaryotypingし、各染色体ごとに並列させて2つのkaryotype (dual karyotype)として表示した。

CGH法では、食道扁平上皮癌や胃癌、大腸癌等を対象として、腫瘍DNAと正常2倍体DNAをcot-1 DNA存在下でハイブリダイズし、それぞれの蛍光シグナルを異なった蛍光色素で検出、蛍光強度比から各染色体領域のコピー数の減少(loss)、増加(gain)、および、増幅(amplification)を判定した。つまり、染色体コピー数の異常を多数症例で解析した。

## C. 研究結果

### 1. 由来不明の染色体異常の同定。

G染色法で解析困難だった26個のadd, 9個のmarおよび1個のring染色体のすべての染色体起源を同定ないしは確定できた。HSRは、特定の癌遺伝子の増幅を示す染色体所見として知られているが、今回3症例で認められた計5個のHSRの由来染色体がすべて同定できた。1例(RAEB-t→M5a)において、11番染色体由来とわかった2個のHSRにおいて、FISH法によりMLL遺伝子を含む11q23領域の増幅(20~30コピー)を確認した。また、もう1例(RAEB-t→M4)において、SKY法とFISH法でring染色体におけるAML1遺伝子を含む21q22領域の増幅(6~10数コピー)を明らかにした。

### 2. Dual karyotypeによる切断点の同定。

SKY法の新たな応用法としてdual karyotypeを開発した。この方法により、一回の解析で同一核板におけるすべての染色体のSKY解析像とGバンドパターン像を同時に得ることができ、由来不明の転座