

平成10年度厚生科学研究費補助金  
(ヒトゲノム・遺伝子治療研究事業)  
総括・分担研究報告書

ゲノム情報を基盤とした疾病関連遺伝子の解明  
(H10-ゲノム-020)

主任研究者  
国立がんセンター研究所  
関谷剛男

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・遺伝子治療研究事業）

総括研究報告書

ゲノム情報を基盤とした疾病関連遺伝子の解明

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 ヒトゲノム解析の進行に伴い、各染色体の物理的地図上に、疾病の原因遺伝子、関連遺伝子が次々と位置づけられている。しかし、これら既知遺伝子の数はまだまだ限られている。本研究は新規疾病関連遺伝子の同定を二つの方向から行い、ゲノム情報の充実を図ることにより、DNAの異常に起因する遺伝性疾患やがんの理解に役立てることを目的とした。第一は、ゲノム異常を検出した染色体領域について、物理的地図の情報を基盤に行う遺伝子の単離と疾病関連遺伝子の同定である。本研究組織の研究者の作成した第11染色体長腕のNotI制限酵素地図を基盤に、q23.1の10メガ塩基対領域に関し、クローンコンティグを含むさらに詳細な物理的地図を作製した。この物理的地図に基づき、肺がんにおける染色体欠失領域を限界まで狭めた後、がん細胞の造腫瘍性を抑える機能を指標にがん抑制遺伝子の追跡を行った。候補遺伝子の単離にまで至っている。第二は、疾患の原因となるDNAのメチル化の異常を示す遺伝子の同定である。CpGアイランドに由来するDNA断片を簡便に単離する技術として、本研究組織の研究者らが開発したSPM法が、染色体上の特定領域に存在するCpGアイランドのほとんど全てを単離できたことから、遺伝子単離法としても極めて有効であることを示した。一方、メチル化DNAアフィニティーカラムクロマトグラフィーでメチル化DNA断片を、網羅的に単離できることを明らかにした。これらの方法を組み合わせることにより、がんにおいて特異的にメチル化されるCpGアイランド断片、ならびに、インプリンティングに関与した多数のCpGアイランド断片を単離するに至っている。また、PCRを基盤とした技術で、メチル化DNA断片を得る工夫を行い、腸上皮化生の発生に伴い脱メチル化される領域などを明らかにした。

分担研究者

大木 操 国立がんセンター研究所部長  
横田 淳 国立がんセンター研究所部長  
牛島俊和 国立がんセンター研究所室長

A. 研究目的

遺伝子異常を原因とするヒト疾患の理解、その診断、治療、予防に資する情報を得ることは、現時点における健康科学の緊急かつ最

重要な課題である。ヒトゲノム解析の進行に伴い、各染色体の物理的地図上に、疾病の原因ならびに関連遺伝子が次々と位置づけられている。しかし、これら既知遺伝子の数はまだまだ限られ、種々の技術で検出されるゲノム上の異常部位に疾病原因遺伝子候補を見いだすことは、まだまだ難しい状況にあり、さらに多くの疾患関連遺伝子の同定、マッピングが必要である。本研究は新規疾病関連遺伝子の同定を二つの方向から行い、ゲノム情報の充実を図ることにより、DNAの異常に起因する遺伝性疾患やがんの理解に資することを目的とする。第一は、新規にゲノム異常を検出した染色体領域について、物理的地図の情報を基盤に、該当する疾病関連遺伝子の単離、同定を行い、遺伝子地図に加えることである。第二は、疾患の原因となるDNAのメチル化の異常を示す遺伝子の同定である。CpGアイランドのメチル化は、遺伝子の発現抑制につながる。がん等の疾病においてそのメチル化、脱メチル化によって発現異常がもたらされる遺伝子の同定、また、疾病関連遺伝子候補であるインプリンティング遺伝子の同定を行う。これらのDNA解析にあたっては、既存技術に加え、独自に開発したDNA解析技術等を駆使し、また、必要に応じて既存法の原理とは異なる発想による新技術の開発を行う。

## B. 研究方法

ゲノム異常検出技術で明らかにされた染色体領域における疾病関連遺伝子の同定、また、ゲノム上メチル化の異常が検出された領域に存在する遺伝子の単離、同定を行うことにより、疾病関連遺伝子に関するゲノム情報の充実を図る。下記の計画を分担、実施した。

(1) 第11染色体長腕のNotI制限酵素地図を基

盤に、11q23領域の疾病関連遺伝子の同定に焦点を合わせ、肺がん、乳がんにおける染色体欠失領域をLOH解析での限界まで狭めた。このLOH解析によるがん抑制遺伝子追跡の限界を克服するために、ヒト肺がん細胞株へ該当領域に由来する長大DNA断片を導入し、その細胞の持つ造腫瘍性を抑制する生物学的機能を指標として、染色体11q23領域に想定されヒト肺がんに関与するがん抑制遺伝子の同定を行う。

(2) 第11染色体q23領域における染色体転座関連遺伝子の単離、同定のため、YAC、P1、コスミドクローンの解析でより詳細な物理的地図を作成する。

(3) AP-PCR解析、LOH解析で検出している肺がんにおける第2、9、18、21染色体におけるヘテロ、ホモ欠失領域の遺伝子探索を行い、また、AP-PCRフィンガープリンティング解析で検出した種々のがんにおける異常DNA断片をプローブとして、ラジエーションハイブリッド解析を行うことにより、疾病関連遺伝子を同定するとともに、遺伝子地図の充実を図る。

(4) 胃粘膜細胞の分化異常と考えられる腸上皮化生におけるDNAメチル化異常をヒト胃手術材料に関し、MS-RDA法を用いて検索する。

(5) 高度にメチル化されたDNA断片をメチル化DNA結合MBDカラムクロマトグラフィーで分画して、ライブラリーを作成し、SPM法を用いてCpGアイランドに由来するDNA断片を含むクローンを検出することにより、インプリンティングによるメチル化遺伝子や、がん中で特異的にメチル化されている遺伝子を網羅的に単離する。

## C. 研究結果

(1) 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、この領域を含む一連の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、このがん細胞株の造腫瘍性を抑制する活性を1個のクローンが持つことを明らかにした。Alu配列を利用した相同組み換えを酵母細胞内で行い、DNAを断片化する工夫で、該当遺伝子の存在領域を700キロ塩基対に絞り込んだ。さらに、このDNA断片の一部130キロ塩基対を含む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。

(2) 第11染色体q23.1の10メガ塩基対領域について、YAC、P1、PACクローンコンティグを単離し、より詳細な物理的地図を作製した。

(3) AP-PCRフィンガープリント法で検出した異常DNA断片をプローブとした、ラジエーションハイブリッド解析により、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、さらには、神経膠芽腫において今までに報告のないサイクリンD3遺伝子の増幅を見いだした。また、肺がんにおける第2、9、18、21染色体上のホモ欠失領域を明らかにし、2q33、21q11領域からがん抑制遺伝子候補を単離した。

(4) 胃がんと関連が考えられる腸上皮化生において、低メチル化状態にあるDNAクローン1個の単離に成功した。

(5) CpGアイランドに由来するDNA断片は、GCに富む塩基配列を持つことから、変性剤濃度勾配ポリアクリルアミドゲル電気泳動において、部分変性した分子を与える。この分子は極端に小さい移動度を示し、長時間泳動した後、ゲル中に残存する。この性質を利用したCpGアイランド単離法SPMを開発している。

一方、高度にメチル化されたDNA断片をメチル化DNA結合ドメイン (MBD) カラムクロマトグラフィーで分画する技術を新たに確立した。肺がん手術材料から得られたDNA断片をMBDカラムクロマトグラフィーで分画し、得られた高度にメチル化されたDNA断片をラムダベクターにつないでライブラリーを作成し、SPM法を用いてCpGアイランドに由来するDNA断片を持つクローンを選択した。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 $1 \times 10^3$ 個のクローンを解析した段階で、9個のCpGアイランドを同定した。そのうちの8個は、正常細胞においてもメチル化され、インプリンティング遺伝子の可能性が考えられた。残る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た。

#### D. 考察

LOH解析で染色体領域の欠失を知ることにより、がん抑制遺伝子の存在を示唆することができるが、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、がん抑制遺伝子に期待されるがん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ることが示めされたと考える。

AP-PCRフィンガープリント法で、ゲノム上の無作為位置から増幅したDNA断片における異常の検出は、ラジエーションハイブリッド解析と組み合わせることにより、標的となる遺伝子を設定することなしに、既知あるいは未知遺伝子における異常を簡便に明らかにすることができる。また、AP-PCR法でホモ欠失を検出し、得られる極めて狭い染色体領域の情報からの遺伝子検索も有効であった。

しかし、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まだまだ少ないため、異常DNA断片の染色体上の存在位置を同定しても、直ちに該当遺伝子にたどり着くことは難しい。ゲノム上の遺伝子配列決定の進行に応じて、また、将来、全配列が決定された場合には、たちどころに異常遺伝子を言い当てることが可能なアプローチと考える。

MBDカラムクロマトグラフィーにより分画した高度にメチル化されたDNA断片で作成したライブラリーには、3ゲノム相当のクローンが含まれていると計算された。したがって、ライブラリーに含まれるクローン $3 \times 10^5$ 個の1/300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アイランドと算定できる。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ている。対応する遺伝子の同定で、インプリント遺伝子や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る。

#### E. 結論

AP-PCR法やLOH解析によって検出された染色体上の異常箇所、特に欠失領域における該当遺伝子の追求には、異常領域をできるだけ狭めることが必要である。しかし、これらの解析だけでは、この領域を遺伝子単離にまで狭めることは不可能である。このゲノム解析における限界を克服する手段として、該当遺伝子に期待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。既存技術の解析限

界を乗り越える工夫による、新たな遺伝子の単離は、遺伝子地図における情報の充実につながるものである。ヒト疾病におけるエピジェネティックなDNA異常の実体は、まだ明らかではない。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異常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を可能にする。DNAメチル化異常の疾病への関与の理解に役立つと考えられた。

#### 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. 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.
3. 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.
4. 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.
  5. 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.
  6. 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.
  7. 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.
  8. 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.
  9. 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.
  10. Ikegawa H, Ohashi 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.
  11. Kitabayashi I, Ida K, Yokoyama A, Morohoshi F, Mitsushashi 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, MTGR1. *Mol Cell Biol* 1998 18: 846-858.
  12. Gamou T, Kitamura E, Hosoda F, Shimizu K, shinohara K. Hayashi Y, Bagase T, Yokoyama Y and Ohki M. The partner gene of AML1 in t(16;21) myeloid malignancies in a novel member of the MTG8 (ETO) family. *Blood* 1998 91: 4028.
  13. Takei K, Kohno T, Hamada K, Takita J, Noguchi M, Matsuno Y, Hirohashi S, Uezato H, Yokota J. A novel tumor suppressor locus on chromosome 18q involved in the development of human lung cancer. *Cancer Res* 1998 58: 3700-3705.
  14. Kohno T, Kawanishi M, Matsuda S, Ichikawa H, Takeda M, Ohki M, Yamamoto T and Yokota J. Homozygous deletion and frequent allelic loss of the 21q11.1-q21.1 region including the ANA gene in human lung carcinoma. *Genes Chromosom Cancer* 1998 21: 236-243.
  15. Kohno T, Kawanishi M, Inazawa J and Yokota J. Identification of CpG islands hypermethylated in human lung cancer by the arbitrarily primed-PCR method. *Human Genet* 1998 102: 258-264.

16. Hamada K, Kohno T, Kawanishi M, Ohwada S and Yokota J. Association of CDKN2A (p16)/CDKN2B(p15) alterations and homozygous chromosome arm 9p deletions in human lung carcinoma. *Genes Chromosom. Cancer* 1998 22: 232-240.
17. Kohno T and Yokota J. PCR fingerprinting for detection of deleted or amplified sequences in human cancer. In: *Methods in Molecular Biology* 1998 92: PCR in Bioanalysis. Edited by Meltzer, Humana Press inc., Totowa, pp267-272.
18. Tanaka H, Shimizu M, Horikawa I, Kugoh H, Yokota J, Barrett JC and Oshimura M. Evidence for a putative telomerase repressor gene on the 3p14.2-p21.1 region. *Gene Chromosom Cancer* 1998 23: 123-133.
19. Hirayama Y, Wakazono K, Yamamoto M, Kitano M, Tatematsu M, Nagao M, Sugimura T and Ushijima T. Rare mutations of p53, K-ras and  $\beta$ -catenin genes and absence of K-sam and c-erbB-2 amplifications in N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine-induced rat stomach cancers. *Mol Carcinog* impress.
20. Ushijima T, Nomoto T, Sugimura T, Housman D E and Nagao M. Isolation of 48 genetic markers appropriate for high throughput genotyping of inbred rat strains by B1 repetitive sequence-representational difference analysis. *Mamm Genome* 1998 9: 1008-1012.
21. Yoshida Y, Ushijima T, Yamashita S, Imai K, Sugimura T and Nagao M. Development of arbitrarily primed-representational difference analysis (AP-RDA) method and chromosomal mapping of the isolated high throughput rat genetic markers. *Proc Natl Acad Sci USA* in press.
22. Toyota M, Ushijima T, Suzui M, Murakumo Y, Imai K, Sugimura T and Matsuyama M. Generation of of polymorphic markers tightly linked to the thymus enlargement loci by phenotype-directed representational difference analysis. *Mamm Genome* 1998 9: 735-739.
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.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. 細田文恵、蒲生俊恵、北村栄子、麻生範雄、近藤健介、横山安伸、服部正平、大木操、t(16;21)(q24;q22)型二次性白血病より単離した新規融合遺伝子AML1-MTG16の転座点領域のゲノム解析、第57回日本癌学会総会、横浜、1998.
  7. 武居公子、河野隆志、浜田邦弘、滝田順子、横田淳、ヒト肺がんにおける第18染色体長腕欠失領域の解析、第57回日本癌学会総会、横浜、1998.
  8. 浜田邦弘、河野隆志、大和田進、森下靖雄、横田淳、ヒト肺がんにおける第9染色体短腕のホモ欠失地図の作製、第57回日本癌学会総会、横浜、1998.
  9. 滝田順子、林泰秀、武居公子、中島孝、花田良二、山本圭子、横田淳、9番と18番染色体上に想定される神経芽腫の発生・進展に関与するがん抑制遺伝子の解析、第57回日本癌学会総会、横浜、1998.
  10. 清水誠一、鈴川和己、矢ヶ崎史治、田中秀夫、藤沢信、長澤俊郎、横田淳、森下和廣、t(1;3)(q21;p36)を有する造血器腫瘍の分子生物学的解析、第57回日本癌学会総会、横浜、1998.
  11. 浅田潔、杉村隆、牛島俊和、Methylation-sensitive-representational difference analysis (MS-RDA)法によるメチル化の状態が異なるCpG island及びcDNAの同定、第21回日本分子生物学会年会、横浜、1998.

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・遺伝子治療研究事業）  
分担研究報告書

遺伝子機能、CpGアイランドならびにそのメチル  
化を指標とした疾患関連遺伝子の検索

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 (1) 染色体欠失領域に由来する長大DNAをヒトがん細胞株へ導入し、ヌードマウスにおけるこの細胞の造腫瘍性の抑制活性を指標に、がん抑制遺伝子の存在を追求することができることを明らかにし、遺伝子単離に到達できないLOH解析等の限界克服手段の一つであることを示した。肺非小細胞がんから抑制活性を示す11q23領域に由来する130キロ塩基対のDNA断片を得、その塩基配列を決定した。(2) AP-PCRフィンガープリント解析で検出した異常DNA断片をプローブとして、ラジエーションハイブリッドパネル解析を行うことにより、いくつかのヒトがんにおける染色体領域の欠失、がん関連遺伝子の増幅などを明らかにし、標的遺伝子を設定しないで既知、未知を問わずに異常遺伝子を検出する有効な手段であることを示した。(3) 高度にメチル化されたDNA断片をMBDカラムクロマトグラフィーで網羅的に集めることができることを明らかにし、ライブラリーを作成した。含まれるクローンの一部を、CpGアイランドに由来する断片を単離するために開発したSPM法で解析した結果から、肺がん組織ではメチル化CpGアイランドが900個存在し、その内の100個ががん細胞特異的にメチル化されていると算定した。これらに対応する遺伝子の網羅的単離が可能と考えられた。

A. 研究目的

遺伝子異常を原因とするヒト疾患の理解、その診断、治療、予防に有用な情報を得ることは、現時点における健康科学の、緊急かつ最重要の課題である。ヒトゲノム解析の進行に伴い、各染色体の物理的地図上に、疾病の原因遺伝子、あるいは、関連遺伝子が次々と位置づけられている。しかし、これら既知遺伝子の数はまだまだ限られ、種々の技術で検出されるゲノム上の異常部位に疾病原因遺伝

子候補を見いだすことは、まだまだ難しい状況にある。さらに多くの疾患関連遺伝子の同定、マッピングが必要である。本研究は新規疾病関連遺伝子の同定を二つの方向から行い、ゲノム情報の充実を図ることにより、DNAの異常に起因する遺伝性疾患やがんの理解に役立てることを目的とする。第一は、新規にゲノム異常を検出した染色体領域について、物理的地図の情報を基盤に、該当する疾病関連遺伝子の単離、同定を行い、遺伝子地図に加

えることである。第二は、疾患のエピジェネティックな原因として、CpGアイランドのメチル化の異常を示す遺伝子の同定である。CpGアイランドのメチル化、脱メチル化の変化は、遺伝子発現の異常をもたらす。インプリンティング遺伝子も疾病関連遺伝子候補である。

## B. 研究方法

ゲノム異常検出技術で明らかにされた染色体領域における疾病関連遺伝子の同定、また、ゲノム上メチル化の異常が検出された領域に存在する遺伝子の単離、同定を行うが、これらのDNA解析にあたっては、既存技術に加え、独自に開発したDNA解析技術等を駆使し、また、必要に応じて既存法の原理とは異なる発想による新技術の開発を行う。

(1) LOH解析によるがん抑制遺伝子追跡の限界を克服するために、ヒト肺がん細胞株へ該当領域に由来する長大DNA断片を導入し、その細胞の持つ造腫瘍性を抑制する生物学的機能を指標として、染色体11q23領域に想定されヒト肺がんに関与するがん抑制遺伝子の同定を行う。

(2) AP-PCRフィンガープリンティング解析で検出した種々のがんにおける異常DNA断片をプローブとして、ラジエーションハイブリッド解析を行うことにより、疾病関連遺伝子を同定するとともに、遺伝子地図の充実を図る。

(3) 高度にメチル化されたDNA断片をメチル化DNA結合MBDカラムクロマトグラフィーで分画して、ライブラリーを作成し、SPM法を用いてCpGアイランドに由来するDNA断片を含むクローンを検出することにより、インプリンティングによるメチル化遺伝子や、がんで特異的にメチル化されている遺伝子を網羅

的に単離する。

## C. 研究結果

(1) 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、この領域を含む一連の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、このがん細胞株の造腫瘍性を抑制する活性を1個のクローンが持つことを明らかにした。さらに、このクローンのDNA断片の一部130キロ塩基対を含む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。

(2) AP-PCRフィンガープリント法で検出した異常DNA断片をプローブとした、ラジエーションハイブリッド解析により、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。

(3) CpGアイランドに由来するDNA断片がGCに富む塩基配列を持つことから、変性剤濃度勾配ポリアクリルアミドゲル電気泳動において、部分変成した分子となり極端に移動度が小さくなる。この部分変成分子が、長時間泳動した後、ゲル中に残存することを利用したCpGアイランド単離法SPMを開発している。一方、高度にメチル化したDNA断片をメチル化DNA結合ドメイン (MBD) カラムクロマトグラフィーで分画する技術を新たに確立した。肺がん手術材料から得られたDNA断片をMBDカラムクロマトグラフィーで分画し、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、SPM法を用いてCpGアイランドに由来するDNA断片を持つクローンを選択した。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<sup>3</sup>個のクローンを解析した段階で、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。

#### D. 考察

(1) LOH解析で染色体領域の欠失を知ることにより、がん抑制遺伝子の存在を示唆することができるが、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、がん抑制遺伝子の機能としての、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。

(2) AP-PCRフィンガープリント法で、ゲノム上の無作為位置から増幅したDNA断片における異常の検出は、ラジエーションハイブリッド解析と組み合わせることにより、異常DNA断片の染色体位置を簡便に同定でき、標的となる遺伝子を設定することなしに、既知あるいは未知の異常遺伝子を特定できる。しかし、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まだまだ少ないため、直ちに該当遺伝子にたどり着くことは難しい。ゲノム上の遺伝子配列決定の進行に応じて、また、将来、全配列が決定された場合には、たちどころに異常遺伝子を言い当てるのが可能なアプローチと考える。

(3) MBDカラムクロマトグラフィーにより分画した高度にメチル化されたDNA断片で作成したライブラリーには、3ゲノム相当のクローンが含まれていると計算された。したがって、ライブラリーに含まれるクローン3 × 10<sup>5</sup>個の1/300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とは、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アイランドと算定できる。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ている。対応する遺伝子の同定で、インプリント遺伝子や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る。

#### E. 結論

AP-PCR法やLOH解析によって検出された染色体上の異常箇所、特に欠失領域における該当遺伝子の追求には、異常領域をできるだけ狭めることが必要である。しかし、これらの解析だけでは、この領域を遺伝子単離にまで狭めることは、不可能である。このゲノム解析における限界を克服する手段として、該当遺伝子に期待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。既存技術の解析限界を乗り越える工夫による、新たな遺伝子の単離は、遺伝子地図における情報の充実につながるものである。ヒト疾病におけるエピジェネティックなDNA異常の実体は、まだ明らかではない。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異常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を可能にする。DNAメチル化異常の疾病への関与を理解する

一助になると考えられた。

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. 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.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. 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 Commun* 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.

3. 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.
4. 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.
5. 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.

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・遺伝子治療研究事業）  
分担研究報告書

ヒト11番染色体q23.1領域のフィジカルマッピングと二次性白血病関連染色体転座の解析

分担研究者 大木操 国立がんセンター研究所 放射線研究部

研究要旨 種々のがんで高頻度に染色体部分欠失が見られる11番染色体長腕部q23.1の10 Mb領域についてクローンコンテイングを含む詳細なフィジカルマップを作製し、現在約50%の領域をカバーした。また、がんの化学療法に伴って発症する二次性白血病t(16;21)(q24;q22)転座に関するAML1, MTG16遺伝子について転座点の塩基配列解析を行い、切断、再会合部位にトポイソメラーゼII認識配列を見出した。

A. 研究目的

q23.1領域はataxia telangiectasiaのATM遺伝子領域のほかに、遺伝性パラガングリオーマの候補領域や、肺がん、乳がん、卵巣がん、子宮がん、マントル細胞リンパ腫、慢性リンパ性白血病などの共通欠失領域が含まれる。q23.1領域は約10 Mbの大きさと推定され、この範囲に存在すると考えられる遺伝性パラガングリオーマ原因遺伝子及びがん抑制遺伝子を単離する目的で、詳細なフィジカルマップを作製する。

がんの化学療法に伴って発症する二次性白血病はがん治療における大きな問題となっており、抗がん剤として使用されているトポイソメラーゼII阻害剤等との関連が議論されている。頻度は低いながら二次性白血病症例の報告があるt(16;21)(q24;q22)転座について、化学療法剤の中でも染色体に損傷や異常を引き起こしやすいと考えられるトポイソメラーゼII阻害剤と、染色体転座発生との関連を調べることを目的とする。

B. 研究方法

11q22-23領域をカバーするYACコンテイングを用いて、この上にESTをマップする。遺伝性パラガングリオーマ原因遺伝子及びがん抑制遺伝子の領域内にマッピングされたESTを用いてPI、PACクローンを単離し、D11S1343-D11S1885間約10 Mbのクローンコンテイングを作製する。

t(16;21)(q24;q22)転座を持つ二次性急性骨髄性白血病3症例について、AML1遺伝子とMTG16遺伝

子の転座融合部位のゲノムシーケンスを解析し、周辺領域におけるトポイソメラーゼII結合部位や反復配列等、転座を誘発する可能性のある特殊なシーケンスとの関連を検討する。

C. 結果

ヒト11番染色体q23.1領域のフィジカルマッピング：Radiation hybrid マッピング法によりD11S1343-D11S1347間、及びD11S1347-D11S938間にマップされているEST 80個を13クローンから成るYACコンテイング上にマップした。14個のESTはYACコンテイング上にのらなかった。領域内にマッピングされたESTからPIまたはPACクローンのスクリーニングを併せて行い、現在までに70クローンを単離した。

二次性白血病3症例の白血病細胞DNAを用いたゲノミックサザンハイブリダイゼーションにより、転座部位がMTG16遺伝子のエキソン3の下流にあたるEcoRI断片内にあることがわかった。AML1-MTG16及びMTG16-AML1キメラ遺伝子転座部位を含むEcoRI断片をそれぞれクローン化し、塩基配列を決定した。その結果、患者1及び5の転座切断部位にはAML1側、MTG16側ともにputativeなトポイソメラーゼII認識配列が存在していた。また、各派生染色体上の転座融合部位には短い配列(1-4塩基)の挿入、重複、欠失が見られた。患者6ではAML1側、MTG16側ともに派生染色体上で五十数ベースの欠失が起こっており、その欠失領域内にputativeなトポイソメラーゼII

認識配列が存在していた。欠失領域の末端にそれぞれ4塩基と3塩基の短いdirect repeatが見られ、der(21)染色体の結合部位に1塩基挿入があった。二次性白血病においてMTG16遺伝子側転座部位はエクソン3-4の間のイントロン領域5.8 kb内に集中していたが、AML1遺伝子側転座部位は、エクソン5-6間の約30 kbのイントロン内に分散しており、特にホットスポットは見られなかった。

#### D. 考察

11q23.1にマッピングされたESTには領域による偏りが見られた。全域の完全なクローンコンテイング化のためには、別の方法でマーカーを探す必要がある。またがん抑制遺伝子領域については患者試料を用いた定量PCR法により共通欠失領域を狭めていくことが必要である。肺がんと大腸がんにおいては本領域内に存在するprotein phosphatase 2 (PP2R1B)遺伝子の変異が見つかり、T細胞性前リンパ球性白血病においてはATM遺伝子の変異が見つまっている。しかしながら、乳がん、卵巣がんなど他のがんではこれらの遺伝子に変異が検出されないことから、未知のがん抑制遺伝子が存在するものと考え、今後、領域内の遺伝子を網羅していく。

抗がん剤として用いられるトポイソメラーゼII阻害剤と二次性白血病発症の関連については、転座症例数の多いMLL遺伝子についてよく解析が行われており、ゲノムシークエンス構造からその関連性が指摘されている。t(16;21)転座の頻度は低いながら二次性白血病に多い(現在までの報告例7例中、二次性が5例、de novoが1例、不明1例)ことから、その原因をAML1遺伝子、MTG16遺伝子それぞれについて調べた結果、t(16;21)転座の場合もトポイソメラーゼIIが関与していることを分子レベルで推定できたと考える。今後はトポイソメラーゼII阻害剤による白血病発症機構を解明していくとともに、二次性白血病の診断や治療方針の検討のための基盤を作る。

#### E. 結論

種々のがんの進展に関与していると考えられるがん抑制遺伝子を含む11q23.1領域、約10 Mb内に80個のESTをマップし、それらからP1, PACクローンを70クローンを単離した。全体の50%領域をカバーした段階にある。

二次性白血病に見られるt(16;21)(q24;q22)転座の転座切断点、再会合部位に3例中、3例ともにトポイソメラーゼII認識配列が存在していた。このことは染色体転座が抗がん剤として使用されたトポイソメラーゼII阻害剤の作用により誘発された可能性が高いことを示唆する。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

Murakami, Y., Nobukuni, T., Tamura, K., Maruyama, T., Sekiya, T., Arai, Y., Gomyou, H., Tanigami, A., Ohki, M., Cabin, D., Frischmyer, P., Hunt, P., and Reeves, R. G. Localization of tumor suppressor activity important in non small cell lung carcinoma on chromosome 11q. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95, 8153-8158, 1998

Kitabayashi, I., Ida, K., Morohoshi, F., Yokoyama, A., Mitsuhashi, N., Shimizu, K., Nomura, N., Hayashi, Y., Ohki, M. The AML1-MTG8 leukemic fusion protein forms a complex with a novel member of the MTG (ETO/CDR) family, MTGR1. Mol. Cell Biol., 18 : 846, 1998.

Gamou, T., Kitamura, E., Hosoda, F., Shimizu, K., Shinohara, K., Hayashi, Y., Nagase, T., Yokoyama, Y., Ohki, M. The partner gene of AML1 in t(16;21) myeloid malignances is a novel member of the MTG8(ETO) family. Blood, 91 : 4028, 1998.

Ikegawa, S., Ohashi, H., Hosoda, F., Fukushima, Y., Ohki, M., Nakamura, Y. Pseudoachondroplasia with de novo deletion [del(11)(q24;q22.2)]. Am. J. Med. Genet., 77, 356-359, 1998.

##### 2. 学会発表

細田文恵、蒲生俊恵、北村栄子、麻生範雄、近藤健介、横山安伸、服部正平、大木 操: t(16;21)(q24;q22)型二次性白血病より単離した新規融合遺伝子AML1-MTG16の転座点領域のゲノム解析、第57回日本癌学会総会、1998年

#### G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得 無
2. 実用新案登録 無
3. その他 無

## 染色体上の欠失・転座・メチル化部位の遺伝子地図作製と疾患関連遺伝子の単離

横田 淳 (国立がんセンター研究所生物学部部長)

がん細胞で欠失・転座・メチル化している様々な染色体領域を同定し、遺伝子地図を作製した。肺がんにおける共通ヘミ欠失領域として第18染色体q21領域(約1 Mb)を同定し、同領域内にホモ欠失のある症例を見出した。また、第9染色体短腕(9p)ではp16遺伝子と異なる領域にホモ欠失を二カ所同定した。t(1;3)を有する白血病における3q21及び1p36領域の転座集中領域を同定した。AP-PCR法を改良して複数のDNAサンプルで共通してメチル化されている断片を同定する方法を開発した。

キーワード：がん抑制遺伝子、欠失、メチル化、転座、肺がん、白血病

### A. 研究目的

染色体の欠失、転座、メチル化は様々な疾患発症の原因となる重要な染色体変化である。そこで、このような染色体部位の遺伝子地図を作製し、その領域のDNA配列あるいは遺伝子にどのような変化が起こっているかを明らかにすることは、様々な疾病発症の原因を明らかにする上で必要不可欠な情報である。本研究の目的は、がんを含む各種疾患に付随する染色体欠失、転座、メチル化を生じるゲノム変化領域を同定し、その領域の遺伝子地図を作製して異常を起こしている遺伝子群を同定し、疾患とゲノム異常の関わりを明らかにすることである。

### B. 研究方法

肺がん、白血病など多種のがん細胞において、欠失、転座、メチル化などのゲノム異常をおこしている領域を探索し、それらの領域の物理的地図を作製し、存在する遺伝子の同定を行う。欠失領域の解析は多型CAリピートマーカを用いたPCR-LOH解析による共通欠失領域の同定、AP-PCR法など様々な手法を用いたホモ欠失領域の探索、その領域に存在するESTの同定、全長cDNAの単離を行った。転座部位の解析はFISH及びPFGE電気泳動法を用いて

転座領域を同定し、BAC, P1, YACを用いてコンテイングを作製して転座点を決定した。メチル化DNAの検索はメチル化感受性制限酵素、非感受性制限酵素によってゲノムDNAを切断し、AP-PCR法にて展開し、メチル化部位を検索した。メチル化の確認は同定したDNA断片をプローブとして、感受性制限酵素、非感受性制限酵素によるゲノムDNAの切断後、サザンブロット解析により行った。

### C. 研究結果

#### 1) 欠失

a) ヒト肺がん手術検体62例、細胞株54例における第18染色体長腕(18q)の欠失領域地図を作製した。手術検体における18qのヘミ欠失領域は11個のマイクロサテライトマーカを用いたLOH解析によって同定した。細胞株については、18q上に存在する各マイクロサテライト座位におけるホモ接合性・ヘテロ接合性を決定し、統計学的に有意にホモ接合性の連続した領域をヘミ欠失領域とした。その結果、共通欠失領域は18q21内の約1Mbの領域にあることが明らかになった。さらに2例の肺がんにおいて同領域内にホモ欠失を検出した。遺伝子地図を作製した結果、共通ホモ欠失領域には既知の候補がん抑

制遺伝子、Smad4, Smad2, DCCは含まれていなかった。

b) 48例のヒト肺癌細胞株を用いてホモ欠失領域の遺伝子地図を作製し、第9染色体短腕(9p)にはp16がん抑制遺伝子領域とは異なるホモ欠失領域が2ヶ所あることを明らかにした。この結果は、9p上に未知のがん抑制遺伝子が存在することを示している。そこで、ホモ欠失領域の一つをカバーするBACコンティグを作製し、さらに新しいDNAマーカーを単離して、肺癌におけるこの領域の詳細なホモ欠失地図を作製した。その結果、この領域は複数個の肺癌細胞株において共通にホモ欠失していることがわかった。

## 2) 転座

t(1;3)を有するMDS発症急性単球性白血病4例の転座点の解析を行った。PFGEサザン解析により3q21領域における転座点は、これまでに同定している3q21q26症候群の転座点の近傍数十kb内に集中していることがわかった。そこで、この転座点を含むゲノム領域を単離し、1p36領域のゲノム断片をプローブとしてBAC、P1クローンを単離し、1p36領域のコンティグを作製した。その結果、これらの症例において1p36領域の転座点も数十kb内に集中していることがわかった。

## 3) メチル化

ゲノムフィンガープリンティング法の一つであるarbitrarily-primed PCR(AP-PCR)法にメチル化感受性酵素、非感受性酵素を用いたDNA切断の差違を利用して、メチル化されたCpGアイランドを同定する方法を開発した。この方法を用いて、肺癌細胞で特異的にメチル化されている3つのCpGアイランド(4q34、10q26、17p13.1-p13.2)を単離した。これらの領域はいくつかの肺癌手術検体に

においても共通してメチル化されており、この方法の有効性が確認された。

## D. 考察

### 1) 欠失

ヒト肺癌細胞株において、第9染色体短腕、第18染色体長腕の共通欠失領域を同定し、その領域の物理的地図を作製した。これらの結果から、この領域には未知のがん抑制遺伝子が存在すると考えられたので、現在共通欠失領域をカバーするBACコンティグ地図の作製と領域内に存在する遺伝子の探索を行っている。また、第9染色体短腕の共通ホモ欠失領域の一つは数十Kbと推定され、現在この領域に存在する遺伝子を同定するため、共通ホモ欠失領域を含むBACクローンを塩基配列の決定している。

### 2) 転座

白血病は各種病型特異的な染色体転座が知られているので、その成因を同定するためには各々の染色体転座点を解析し、原因遺伝子を同定する必要がある。今年度はt(1;3)の転座点が第1、第3染色体上で数十kbの領域に集中していることを示すことが出来た。今後は転座点近傍に存在する遺伝子を探索し、転座によって構造異常あるいは発現異常を起こしている遺伝子の同定を目指す予定である。

### 3) メチル化

AP-PCRを改良してCpGアイランドを同定する簡便な手法を開発し、この手法を用いて肺癌細胞で特異的にメチル化されているCpGアイランド領域を同定した。本法は複数のDNAを同時に解析することが出来るため、複数のグループ間で共通してメチル化に差違があるようなDNA断片を単離するのに極めて有用である。今後はプライマーの配列をか

えることによって、種々の肺がん細胞で共通にメチル化されている断片を網羅的に単離する予定である。

#### E. 結論

ヒトがんで、欠失、転座、メチル化している遺伝子の染色体部位を各種の方法を用いて多数同定し、その領域の物理地図を完成させつつある。このような染色体部位の遺伝子地図は、その領域に存在する遺伝子を単離する上で必要不可欠であり、疾病発症の原因を明らかにする上で重要な手がかりとなる。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Takei K, Kohno T, Hamada K, Takita J, Noguchi M, Matsuno Y, Hirohashi S, Uezato H, Yokota J. A novel tumor suppressor locus on chromosome 18q involved in the development of human lung cancer. *Cancer Res*, 58:3700-3705, 1998.
- 2) Hamada K, Kohno T, Kawanishi M, Ohwada S, Yokota J. Association of CDKN2A(p16)/CDKN2B(p15) alterations and homozygous chromosome arm 9p deletions in human lung carcinoma. *Genes Chromosom Cancer*, 22:232-240, 1998.
- 3) Kohno T, Kawanishi M, Matsuda S, Ichikawa H, Takeda M, Ohki M, Yamamoto T, Yokota J. Homozygous deletion and frequent allelic loss of the 21q11.1-q21.1 region including the ANA gene in human lung carcinoma. *Genes Chromosom Cancer*, 21:236-243, 1998.
- 4) Kohno T, Kawanishi M, Inazawa J, Yokota J. Identification of CpG islands hypermethylated in human lung cancer by the arbitrarily primed-PCR method. *Human Genet*, 102:258-264, 1998.
- 5) Kohno T, Yokota J. PCR fingerprinting for detection of deleted or amplified sequences in human cancer. In: *Methods in Molecular Biology*, Vol. 92: PCR in Bioanalysis. Edited by S. J. Meltzer, Humana Press Inc., Totowa, pp.267-272, 1998.

6) Malkhosyan S, Yasuda J, Sato JL, Sekiya T, Yokota J, Perucho M. Molecular karyotyping (amplotype) of metastatic colorectal cancer by unbiased arbitrarily primed PCR DNA fingerprinting. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95:10170-10175, 1998.

7) Tanaka H, Shimizu M, Horikawa I, Kugoh H, Yokota J, Barrett JC, Oshimura M. Evidence for a putative telomerase repressor gene on the 3p14.2-p21.1 region. *Genes Chromosom Cancer*, 23, 123-133, 1998.

##### 2. 学会発表

- 1) 武居公子、河野隆志、浜田邦弘、滝田順子、横田淳、ヒト肺がんにおける第18染色体長腕欠失領域の解析、第57回日本癌学会総会、1998.
- 2) 浜田邦弘、河野隆志、大和田進、森下靖雄、横田淳、ヒト肺がんにおける第9染色体短腕のホモ欠失地図の作製、第57回日本癌学会総会、1998.
- 3) 滝田順子、林泰秀、武居公子、中島孝、花田良二、山本圭子、横田淳、9番と18番染色体上に想定される神経芽腫の発生・進展に関与するがん抑制遺伝子の解析、第57回日本癌学会総会、1998.
- 4) 清水誠一、鈴川和己、矢ヶ崎史治、田中秀夫、藤沢信、長澤俊郎、横田淳、森下和廣、t(1;3)(q21;p36)を有する造血期腫瘍の分子生物学的解析、第57回日本癌学会総会、1998.

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・遺伝子治療研究事業）  
分担研究報告書

疾患特異的に異常なメチル化を示すゲノム内領域の MS-RDA 法による検索

分担研究者 牛島 俊和

国立がんセンター研究所 室長

**研究要旨** 幽門部胃粘膜をテスターに、胃底腺粘膜をドライバーに、MS-RDA 法を行い、幽門部胃粘膜で特異的に脱メチル化されている DNA 断片を 17 個、幽門部胃粘膜での腸上皮化生の発生に伴い脱メチル化される DNA 断片を 1 個、同定した。これら 18 個の DNA 断片のうち、既知の遺伝子もしくは EST に一致するものが 7 個、既知のゲノムクローンと一致するものが 7 個、データベースでホモロジーがないものが 4 個であった。既知のゲノムクローンに一致した 7 個のうち 2 個で、MS-RDA で得られた DNA 断片は CpG island に一致または近接しており、そのうち 1 個で近傍の遺伝子が知られていた。その遺伝子について RT-PCR 法により発現を検討したところ、胃底腺粘膜で特異的な発現が認められた。MS-RDA 法により同定された DNA 断片は、その遺伝子のイントロンの CpG island に位置しており、イントロンのメチル化が転写促進的に働いていると考えられた。

A. 研究目的

胃の腸上皮化生は、胃癌の発生に密接に関連するが、その発生の分子機構はよく解明されていない。腸上皮化生が多くの腺管で多発的に発生してくることなどから、遺伝子発現の調節異常が原因である可能性が高い。そこで、我々が開発した、ゲノム全体についてメチル化の変化をスキャンする方法である methylation-sensitive-representational difference analysis (MS-RDA)法を用いて、腸上皮化生の発生に伴うゲノムの異常なメチル化を検索、発現の変化が腸上皮化生の発生やその表現形質に重要である遺伝子を同定することを目的とする。

腸上皮化生の様な多クローン性の病態での遺伝子のメチル化の異常の意義が解明されれば、様々な前癌病変、分化異常、変性疾患など、非常に多くの疾患の病態解明に役立つことが期待される。

B. 研究方法

a) 材料

ヒト胃の手術材料から、幽門部と胃体部をそれぞれ切除、EDTA 含有 buffer 中で振盪することにより、上皮のみを分離・収集した。また、腸上皮化生のある腺管とない腺管とを区別するため、エタノール固定後、アルカリホスファターゼ染色を行った。

b) MS-RDA 法

ゲノム DNA をメチル化感受性の制限酵素 *HpaII* で消化し、アダプターを接着後、PCR を行

うことで、“*HpaII* amplicon”を作成した。テスター DNA 由来の amplicon と、ドライバー由来の amplicon を用いて、常法に従い、2 サイクルの competitive hybridization と selective amplification を行った。

2 サイクル目の PCR 産物全体をプラスミドにクローニングし、各クローンの独立性を検討した。独立な各クローンについて、amplicon の dot blot hybridization により、テスターとドライバーとの違いを検出するか否かをスクリーニングした後、*HpaII* 消化したゲノム DNA の Southern blot 解析により確認した。

違いが認められたクローンに関しては、他の症例の幽門腺と胃底腺の DNA を *HpaII* 消化したものをを用いて、Southern blot 解析を行った。

c) 塩基配列の決定とデータベースの解析

テスターとドライバーのメチル化の違いを検出するクローンに関しては、塩基配列を決定した。得られた配列について、G:C content, CpG score の計算、GenBank の検索を行った。

d) RT-PCR

メチル化の違いが認められる DNA 断片の近傍に遺伝子が存在し、イントロンを挟むプライマーが設計できる場合、RT-PCR 法により、その遺伝子の発現量の変化を検討した。

C. 研究結果

幽門部粘膜で 50-60%程度の腺管に腸上皮化生が認められる症例 1 例で、幽門部粘膜をテスターに、胃底腺粘膜（化生なし）をドライバーに用

いて、MS-RDA を行った。

185 個のクローンのうち、112 個の独立なクローンが存在した。Amplicon の dot blot hybridization でテスターとドライバーとの差異を検出していると思われた 52 クローン中、25 クローンについて、ゲノム DNA での確認が終了した。その結果、18 個のクローン (DNA 断片) が、テスター (幽門部粘膜) ではメチル化されず、ドライバー (胃底腺粘膜) ではメチル化されていることが確認された。

これら 18 個の DNA 断片をプローブに、幽門部の腸上皮化生した腺管の割合が、0%の症例 1 例、30-40%の症例 1 例、50-60%の症例 2 例、80%の症例 1 例を用いて、*HpaII* 消化したゲノム DNA を用いて、Southern blot 解析を行った。腸上皮化生の量と、幽門部粘膜での脱メチル化の程度が相関する DNA 断片 1 個と、腸上皮化生の量に関係なく幽門部粘膜では脱メチル化されている DNA 断片 17 個が得られた。

塩基配列決定の結果、これら 18 個の DNA 断片のうち、7 個が既知の遺伝子または EST と同一もしくは高度のホモロジーを持ち、7 個が既知のゲノムクローンと一致し、残り 4 個はホモロジーが認められなかった。ゲノムクローンと一致した 7 個のうち 2 個は CpG island に一致または隣接し、うち 1 個については近接する遺伝子が知られていた。MS-RDA 法で同定された DNA 断片は、その遺伝子のイントロンの CpG island に位置していた。

その遺伝子について、幽門部粘膜と胃底腺粘膜とでの発現量の違いを RT-PCR 法により検討した。CpG island は、幽門部粘膜で脱メチル化され、胃底腺粘膜でメチル化されているのに対し、発現量は、胃底腺粘膜で明らかに多かった。プロモーター領域のメチル化の状態は、現在検討中である。

#### D. 考察

1 症例の MS-RDA で得られた、幽門部粘膜と胃底腺粘膜とでメチル化の状態が異なると思われるクローンの解析が半分程度終了した。18 個のメチル化の状態が異なる DNA 断片のうち、7 個がゲノム由来が決定され、2 個が CpG island に隣接し、1 個の遺伝子の発現が異なっていた。未解析のクローンがほぼ同数あること、ゲノムの由来が決定できないクローンが半分以上あることから、今後、4-5 個の遺伝子について発現が異なることが同定されると考えられる。

今回、胃底腺で強く発現することが確認され

た遺伝子は、イントロンの CpG island が胃底腺でのみメチル化されていた (プロモーター領域の CpG island のメチル化の状態は検討中)。イントロンの CpG island がメチル化されると遺伝子発現量が上昇することは、IGF2R 等で知られている。また、この遺伝子は、腸上皮化生の量にかかわらず幽門部で脱メチル化されていることから、幽門腺と胃底腺の違いに関与している遺伝子であると考えられる。現在、小腸や大腸など他の消化管組織での発現の有無を検討している。

腸上皮化生の量と脱メチル化の程度が相関したクローン 1 個は、ゲノム由来が決定できなかった。従って、CpG island や遺伝子が近傍に存在するか否かは、現時点では不明である。今後、周辺のゲノムクローンを分離、そのクローンをプローブに cDNA ライブラリーをスクリーニングすることにより、遺伝子を同定していく予定である。

#### E. 結論

MS-RDA 法により、幽門腺と胃底腺とで発現が異なる遺伝子 1 個を同定した。組織特異的な遺伝子発現に、CpG island のメチル化が重要であることが確認された。また、腸上皮化生の発生に伴い、異常な脱メチル化が誘発される DNA 断片 1 個が同定された。

#### F. 発表業績

##### a) 論文発表

Hirayama, Y., Wakazono, K., Yamamoto, M., Kitano, M., Tatematsu, M., Nagao, M., Sugimura, T. and Ushijima, T. Rare mutations of *p53*, *K-ras* and  $\beta$ -catenin genes and absence of *K-sam* and *c-erbB-2* amplifications in *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine-induced rat stomach cancers. *Mol. Carcinog.*, in press

Toyota, M., Ushijima, T., Suzui, M., Murakumo, Y., Imai, K., Sugimura, T. and Matsuyama, M.

Generation of polymorphic markers tightly linked to the thymus enlargement loci by phenotype-directed representational difference analysis. *Mamm. Genome*, 9, 735-739 (1998).

Ushijima, T., Nomoto, T., Sugimura, T., Housman, D. E. and Nagao, M. Isolation of 48 genetic markers appropriate for high throughput genotyping of inbred rat strains by B1 repetitive sequence-representational difference analysis. *Mamm. Genome*, 9, 1008-1012 (1998).

Yoshida, Y., Ushijima, T., Yamashita, S., Imai, K.,