

19990347

平成11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
H10-ゲノム-020

ゲノムの構造ならびにメチル化領域の
解明による疾病関連遺伝子の同定

総括・分担研究報告書

主任研究者
関谷 剛男 (国立がんセンター研究所)

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

ゲノムの構造ならびにメチル化領域の解明による疾病関連遺伝子の同定

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 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、DNA異常に起因する遺伝性疾患やがんを理解することを目的とした。第一は、異常染色体領域について、物理的地図の情報を基盤に行う疾病関連遺伝子の同定である。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。(1) 染色体欠失領域に対応するDNAを含むクローンをヒトがん細胞株へ導入し、ヌードマウスで腫瘍作れなくなることを指標にがん抑制遺伝子を追求し、肺非小細胞がんにおける候補遺伝子を単離した。(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、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できることを示した。(3) de novo t(9;11)(q21;q23)転座を持つ精神発達遅滞患者から樹立した培養細胞株において、9q21転座部位周辺で欠失している1.5メガ塩基対の領域が、ショウジョウバエの神経発生、体節形成期に細胞の分化決定を制御する転写抑制因子遺伝子に対応する遺伝子を含むことを明らかにした。(4) 腸上皮化生を伴う幽門腺胃粘膜で脱メチル化され、化生を伴わない胃底腺胃粘膜でメチル化されているDNA断片をMS-RDA法で分離し、異常を示すDNA断片18個のなかにintegrin遺伝子の一つが含まれることを明らかにした。また、bHLH型の転写因子の遺伝子は胃底腺粘膜で特異的に発現し、イントロンに存在するCpGアイランドのメチル化が転写促進的に作用していることを見いだした。(5) 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てライブラリーを作成し、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法で解析することにより、肺組織でメチル化されているCpGアイランドが800個、細胞がん化に伴い特異的にメチル化されるCpGアイランドが100個存在することを明らかにし、その多くを単離した。

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部長

A. 研究目的

遺伝子異常を原因とするヒト疾患の理解、また、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

別添2

体の塩基配列が明らかにされつつあるが、既知の疾病原因遺伝子、あるいは、疾病関連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該当する候補遺伝子を見いだすことは、依然として難しい状況にある。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、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、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、同定を行うことである。第二は、疾患のエピジェネティックな原因として、塩基配列変化ではなくゲノム上の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、脱メチル化のは、遺伝子発現の異常をもたらし、疾病関連遺伝子を作り出す。

B. 研究方法

既存技術に加え、独自に開発したDNA解析技術を駆使し、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ことにより、以下の解析を分担、実施した。

(1) 肺非小細胞がんDNAの染色体欠失領域解析で、11q23にその存在が示唆されたがん抑制遺伝子を、該当領域を含むYACクローン等の導入によるヒトがん細胞組織培養株のヌードマウスでの造腫瘍能の抑制を指標に突き止める。(2) AP-PCRフィンガープリンティングで種々のヒトがんDNAを解析し、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解析を行うことにより、疾病関連遺伝子を同定する。また、DNAマーカーのPCR解析や、FISH法およびパルスフィールド電気泳動法による染色体解析で異常検出する。(3) 染色体異常としてde novo t(9;11)(q21;q23)の相互転座を持つ精神発達遅滞症の患者

から樹立された培養細胞株JHGP56を対象に、転座部位周辺のゲノム解析により原因候補遺伝子の探索を行う。(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結合カラムクロマトグラフィーで分画し、クローン化したのち、CpGアイランド由来のDNA断片を同定するために開発した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し、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。

(倫理面への配慮)

手術検体は、臨床検査時、治療方針決定のための病理学的検索時に採取された組織の残りを使用する。検体はコード化され、DNA解析の結果が患者に不利益とならないように配慮する。新たに検体の採取が必要な場合には被験者に説明し、その同意を得る。胚細胞突然変異の解析が必要な症例に関しては、施設倫理委員会で研究計画の承認を受け、被験者に対する説明を行い、その同意を得る。

C. 研究結果

(1) ヒト肺非小細胞がんにおける染色体11q23欠失領域に関し、1個のYACクローンDNAの導入で、ヒト肺がん細胞の造腫瘍能が抑制されることから、がん抑制遺伝子の存在を明らかにした。さらに、詳細な物理的地図の情報を基盤に、酵母細胞内での相同組み換えで断片化したYACクローンDNAの抑制活性を指標に、候補遺伝子IGSF4/ TSLC1遺伝子を同定し、そのcDNAクローンが造腫瘍能抑制活性を示すことを明らかにした。(2) AP-PCRフィンガープリント法で検出した異常DNA断片を

別添2

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。マーカーDNAのPCR解析で、肺がん細胞株における染色体9p21領域の両相同染色体完全欠失部位として、p16がん抑制遺伝子を含む部位のほかに、3メガ塩基対近位側に別のがん抑制遺伝子の存在を明らかにした。また、FISH法およびバルスフィールド電気泳動法による染色体解析で、急性骨髄性白血病細胞株Kausmi-3で染色体7q35に位置するT cell receptor-beta遺伝子のV-beta領域が3q26部位のEvi1遺伝子の上流に融合し、この遺伝子の活性化していることを明らかにした。(3) 精神発達遅滞患者培養細胞株JHGP56におけるt(9;11)(q21;q23)に転座部位は、11q23.3に位置するMLL遺伝子の遠位にあたるが、近辺1メガ塩基対の領域には転座点をまたぐ遺伝子は見いだされず、染色体9q21側に1.5メガ塩基対の欠失が起こっていることを明らかにした。この領域には、ショウジョウバエの神経発達、体節形成期に機能する転写因子の遺伝子に対応するヒト遺伝子が存在することを突き止めた。(4) MS-RDA法による胃腺管DNAの解析で、正常胃底腺ではメチル化され、正常幽門腺では脱メチル化されているが、胃底腺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7個、腸上皮化生の発生には影響されないDNA断片を6個、正常の胃底腺ならびに幽門腺ではメチル化されているが、腸上皮化生の発生で脱メチル化されるDNA断片を4個、無作為にメチル化されるもの1個の合計18個のDNA断片を得た。胃底腺での腸上皮化生の発生に伴い、脱メチル化されるDNA断片の1個は、interrin遺伝子の一つのイントロン1に由来し、腸上皮化生の発生に伴い遺伝子の異常発現が起こることを明らかにした。

また、bHLH型転写因子のイントロン2に由来するDNA断片は、正常胃底腺でメチル化され、正常幽門腺で脱メチル化され、腸上皮化生の発生に伴い、メチル化されるとともに発現が上昇することを見いだした。(5) 肺非小細胞がんで高度にメチル化されているDNA断片をメチル化DNA結合カラムクロマトグラフィーで分画し、DNAライブラリー作成した。含まれるクローンをSPM解析し、種々のがん関連遺伝子、インプリンティング遺伝子のCpGアイランドに由来するDNA断片を多数単離した。その結果、作成したライブラリーにはメチル化CpGアイランドに由来するDNA断片が900個存在し、そのうちの100個ががん特異的にメチル化されるCpGアイランドに由来することを明らかにした。

D. 考察

ヘテロ接合性消失の解析ではがん抑制遺伝子の存在領域を示唆できるものの、遺伝子単離を可能にするまでに絞り込むことができない。該当する候補遺伝子を、異常領域に対応するDNA断片の持つ生物学的活性を指標に単離できたことは、数多く知られている染色体上の欠失領域におけるがん抑制遺伝子の単離を可能とすると考える。

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、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。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のが可能になるアプローチと考える。

染色体転座によって起こる遺伝子異常は、融合遺伝子の形成で、発現の量的、質的変化をもたらすことが多いが、本研究で対象とした精神発達遅

別添 2

すことが多いが、本研究で対象とした精神発達遅滞症では、転座に付随した染色体領域の欠失が発症に関係していると考えられ、有力な候補遺伝子として、中枢神経系発生期の細胞の分化を決定づけるDNA非結合性転写因子の遺伝子がこの領域に含まれることは示唆に富んでいる。

腸上非化生に伴い、細胞間あるいは細胞外基質からの情報伝達に関与するintegrin遺伝子の一つで異常なDNA脱メチル化による発現上昇がみられたこと、また、bHLH型の転写因子遺伝子のイントロンのCpGアイランドにおけるメチル化が発現促進的に作用することを見いだしたことは、複数の遺伝子異常の集積で起こると考えられる腸上非化生においてもDNAのメチル化の異常による遺伝子異常が関与することを明らかにした。

アフィニティークロマトグラフィーと新たに開発したCpGアイランド単離技術の組み合わせで、がんにおいてメチル化されているCpGアイランドの網羅的な単離が可能となったことは、塩基配列変化を伴わない遺伝子異常の解明につながる。この高度にメチル化されたCpGアイランドを持つ遺伝子の網羅的な単離は、本プロジェクト独自の成果であり、これら遺伝子の全てを単離、同定することは日本の成果となると考えられ、国際的な貢献が極めて大きいと考える。

E. 結論

染色体欠失領域に対応するDNAを含むクローンをヒトがん細胞株へ導入し、ヌードマウスで腫瘍作れなくなることを指標にがん抑制遺伝子を単離できることを示した。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、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できることを示した。

de novo t(9;11)(q21;q23)転座を持つ精神発達遅滞患者の細胞において、神経発生、体節形成期に細胞の分化決定を制御する転写抑制因子をコードすると考えられる遺伝子を含む9q21転座部位周辺の1.5メガ塩基対領域の欠失を明らかにした。胃粘膜における腸上皮化生に、DNAメチル化の変化によるintegrin遺伝子の一つ、また、bHLH型の転写因子遺伝子の発現変化が関連することを明らかにした。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てライブラリーを作成し、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法で解析することにより、肺組織でメチル化されているCpGアイランドが800個、細胞がん化に伴い特異的にメチル化されるCpGアイランドが100個存在することを明らかにし、その多くを単離した。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. 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.
2. 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* 15, 5-8, 1999
3. 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* 96, 2913-2918, 1999

別添 2

4. 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* 258, 271-277, 1999
5. Shiraishi M, Sekiguchi A, Chuu YH and Sekiya T. Tight interactions between densely methylated DNA fragments and the methyl-CpG binding domain of the rat protein MeCP2 attached to a solid support. *Biol Chem*, 380, 1127-1131, 1999
6. Kuchiki H, Saino M, Nobukuni T, Yasuda J, Maruyama T, Kayama T, Murakami Y and Sekiya T. Detection of amplification of a chromosomal fragment at 6p21 including the cyclin D3 gene in a glioblastoma cell line by arbitrarily primed polymerase chain reaction. *Int J Cancer*, 85, 113-116, 1999
7. Kanamori M, Kon, Nobukuni T, Nomura S, Sugano K, Mashiyama S, Kumabe T, Yoshimoto T, Meuth M, Sekiya T and Murakami Y. Microsatellite instability and the *PTEN1* gene mutation in a subset of early onset gliomas carrying germline mutation or promoter methylation of the *hMLH1* gene. *Oncogene* 19, 1564-1571, 2000
8. Nakata M, Shimizu K, Hayashi K, Taki T, Taniwaki M, Hosoda F, Nakamura H, Sadamori N, Ohnishi H, Bessho F, Yanagisawa M and Ohki M. Consistent detection of CALM-AF10 chimaeric transcripts in haematological malignancies with t(10;11)(p13;p14) and identification of novel transcripts. *Brit J Haematol* 105, 928-937, 1999
9. Nishiyama M, Arai Y, Tsunematsu Y, Kobayashi H, Asami K, Yabe M, Kato S, Oda M, Eguchi H, Ohki M and Kaneko Y. 11p15 translocations involving the NUP98 gene in childhood therapy-related acute myeloid leukemia/ Myelodysplastic syndrome. *Genes Chrom Cancer* 26, 215-220, 1999
10. Gaudray P, Carle GF, Gerhard DS, Gessler M, Mannens MM, Athanasiou M, Bliet J, Calender A, Debelenco LV, Devignes M-D, Evans GA, Favier R, Forbes S, Gaudray G, Gawin B, Gordon M, Grimmond S, Grossfeld P, Harris J, Hattori M, Hosoda F, Hummerich H, James M, Kalla J, Kasanis N, Little P, Mattina T, Negrini M, Ohki M, Osbone Lawrence S, Parente F, Quincey D, Radnaud S, Reid L, Rethy L. A., Schuurung E, Sellar G, Stilgenbauer S, Talbot C, Tauschner P, Thangarajah T, Tunnacliffe A, Turc-Carel C, Heyningen V Van, Weber G, Zabel B. Report of the sixth international workshop on human chromosome 11 mapping 1998. *Cytogenetics and Cell Genetics* 86, 167-186, 1999
11. Gomyo H, Arai Y, Tanigami A, Murakami Y, Hattori M, Hosoda F, Arai K, Aikawa Y, Tsuda H, Hirohashi S, Asakawa S, Shimizu N, Soeda E, Sakaki Y and Ohki M. A 2.Mb sequence-ready contig map and a novel immunoglobulin superfamily gene IGSF4 in the LOH region of chromosome 11q23.2. *Genomics* 62, 139-146, 1999
12. Hamada K, Kohno T, Takahashi M, Yamazaki M, Tashiro H, Sugawara C, Ohwada S, Sekido Y, Minna J and Yokota J. Two regions of

- homozygous deletion clusters at chromosome band 9p21 in human lung cancer. *Genes Chromosomes Cancer*, 27:308-318, 2000
13. Kohno T, and Yokota J. How many tumor suppressor genes are involved in human carcinogenesis? *Carcinogenesis*, 20:1403-1410, 1999
 14. Yamada T, Kohno T, Navarro JM, Ohwada S, Perucho M, and Yokota J. Frequent chromosome 8q gains in human small cell lung carcinoma detected by arbitrarily primed-PCR genomic fingerprinting. *Cancer Genet. Cytogenet.*, 2000, in press
 15. Shimizu S, Suzukawa K, Koder T, Nagasawa T, Abe T, Taniwaki M, Yagasaki F, Tanaka H, Fujisawa S, Johansson B, Ahlgren T, Yokota J and Morishita K. Identification of breakpoint cluster regions at 1p36.3 and 3q21 in hematologic malignancies with t(1;3)(p36;q21). *Genes Chromosomes Cancer*, 27:229-238, 2000
 16. Suzukawa K, Koder T, Shimizu S, Nagasawa T, Asou H, Kamada N, Taniwaki M, Yokota J and Morishita K. Activation of EVI1 transcripts with chromosomal translocation joining the TCRVbeta locus and the EVI1 gene in human acute undifferentiated leukemia cell line (Kasumi-3) with a complex translocation of der(3)t(3;7;8). *Leukemia*, 13:1359-1366, 1999
 17. Sugimura T and Ushijima T. Genetic and epigenetic alterations in carcinogenesis. *Mutat Res*, in press
1. 斎野真、朽木秀雄、安田純、丸山智子、嘉山孝正、村上善則、関谷剛男、Arbitrarily primed PCR (AP-PCR) 法を用いたヒト神経膠芽腫培養細胞における増幅DNA断片の解析、日本癌学会第56回総会、広島、1999
 2. 関谷剛男、関口あづみ、Chuu Yin、白石昌彦、ヒト肺がんにおけるリボソーム遺伝子繰り返し単位メチル化のモザイクパターンの変化、日本癌学会第56回総会、広島、1999
 3. 倉持雅巳、信國宇洋、福原浩、丸山智子、関谷剛男、村上善則、第11染色体q23領域におけるヒト肺非小細胞がん抑制遺伝子の探索 (I)、日本癌学会第56回総会、広島、1999
 4. 信國宇洋、福原浩、倉持雅巳、丸山智子、関谷剛男、村上善則、第11染色体q23領域におけるヒト肺非小細胞がん抑制遺伝子の探索 (II)、日本癌学会第56回総会、広島、1999
 5. 信國宇洋、福原浩、倉持雅巳、丸山智子、磯村実、小野塚祐二、大木操、Roger Reeves、関谷剛男、村上善則、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22回日本分子生物学会年会、福岡、1999.
 6. 白石昌彦、関口あづみ、Adam J. Oates、関谷剛男、メチル化DNA結合カラムクロマトグラフィーとSPM法によるヒト肺がんにおけるメチル化CpGアイランドの網羅的単離、第22回日本分子生物学会年会、福岡、1999.
 7. 白石昌彦、関口あづみ、Yin H. Chuu、関谷剛男、高密度メチル化DNA断片とラッ

- ト核蛋白質MeCP2のDNA結合部位の間の強い相互作用、第22回日本分子生物学会年会、福岡、1999
8. がん細胞株におけるCDH1遺伝子CpGアイランドのメチル化の解析、第22回日本分子生物学会年会、福岡、1999
 9. 関谷剛男、DNA解析による遺伝子情報の解明とがんにおける遺伝子異常の把握、日本薬学会第120年会、岐阜、2000
 10. Arai Y, Gomyo H, Tanigami A, Murakami Y, Hosoda F, Arai K, Aikawa Y, Tsuda H, Hirohashi S, Asakawa S, Shimizu N, Hattori M, Sakaki Y, Soeda E and Ohki M. A2Mb sequence-ready contig map and a novel candidate tumor suppressor gene IGSF4 in the LOH region of chromosome 11q23.2. The 19th international symposium on cancer, 1999
 11. Kobayashi Y, Nakata M, Takahashi M, Takenaka T, Tobinari K, Hosoda F and Ohki M. Detection of t(11;18)MALT lymphoma with double color FISH and/or RT-PCR. The American Society of Hematology, 1999
 12. 小林幸夫、高橋路子、中田匡信、竹中武昭、飛内賢正、細田文恵、大木 操 t(11;18)転座型 MALT リンパ腫の2色 FISH 法での診断、第41回日本臨床血液学会総会、1999
 13. 細田文恵、赤羽 努、福島美智代、新井享子、添田栄一、新井康仁、大木 操 ヒト11番染色体 q23.1のがん抑制遺伝子領域コンティグ作成と遺伝子検索、第22回日本分子生物学会年会、1999
 14. 新井康仁、金子安比古、小林幸夫、池田字次、池田和真、新井享子、細田文恵、大木 操、白血病におけるNUP98遺伝子の転座点の解析、第22回日本分子生物学会年会、1999
 15. 河野隆志、浜田邦弘、高橋身奈、山崎正明、田代弘行、菅原智代、大和田進、関戸好孝、横田淳、ヒト肺がんにおける9p21ホモ欠失は2つの領域に集中する、第22回日本分子生物学会年会、1999
 16. 森下和広、望月菜緒美、清水誠一、長澤俊郎、横田淳、t(1;3)を有するMDS/AMLにおいて転座集中領域近傍に存在する遺伝子の単離、第22回日本分子生物学会年会、1999
 17. 清水誠一、鈴川和己、望月菜緒美、長澤俊郎、横田淳、森下和広、t(1;3)(p36;q21)を有する造血器悪性腫瘍の分子生物学的解析、第58回日本癌学会総会、1999
 18. 牛島俊和、浅田潔、高井大哉、吉田幸成、黒須由紀子、福富隆志、杉村隆 ヒトがんでは異常なメチル化を受ける遺伝子群のMS-RDA法による同定 第58回日本癌学会総会、シンポジウム、1999
 19. 吉田幸成、稲田健一、今井浩三、立松正衛、杉村隆、牛島俊和 胃の腸上皮化生においてメチル化の状態及び発現が変化する遺伝子の同定、第58回日本癌学会総会、1999
 20. Yoshida, Y., Inada, K., Imai, K., Tatematsu, M., Sugimura, T., Ushijima, T. Isolation of differentially methylated DNA fragments in intestinal metaplasia and normal gastric epithelium. ISOBM Kyoto, Japan, 1999
 21. Asada K, Miyamoto K, Fukutomi T, Sugimura T, Ushijima T. Identification of

別添 2

hypermethylated and transcriptionally repressed
genes in human breast cancers. AACR annual
meeting, San Francisco, 2000

G. 知的所有権の取得状況

なし

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长

研究要旨 (1) 染色体欠失領域に存在するがん抑制遺伝子を単離する手段として、該当領域を含むDNAクローンをヒトがん細胞株へ導入し、ヌードマウスでのこの細胞の造腫瘍性の抑制活性を指標に追求することができることを明らかにし、肺非小細胞がんにおける候補遺伝子を単離した。(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アプローチが、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てライブラリーを作成し、含まれるクローンを、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、肺組織でメチル化されているCpGアイランドが800個、細胞がん化に伴い特異的にメチル化されるCpGアイランドが100個存在し、これら遺伝子の網羅的単離が可能であることを明らかにするとともに、その多くを単離した。

A. 研究目的

遺伝子異常を原因とするヒト疾患の理解、また、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、各染色体の塩基配列が明らかにされつつあるが、既知の疾病原因遺伝子、あるいは、疾患関連遺伝子の数は限られ、種々の技術で検出されるゲノム上の異常部位に該当する候補遺伝子を見いだすことは、まだまだ難しい状況にある。本研究は新規疾患関連遺伝子の同定を二つの方向から行い、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、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、該当する疾患関連遺伝子の単離、同定を行うことである。第二は、疾患のエピジェネティックな原因として、塩基配列変化ではなくゲノム上の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し、疾患関連遺伝子を作り出す。

B. 研究方法

既存技術に加え、独自に開発したDNA解析技術を駆使し、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ことにより、

別添3

以下の解析を行う。

(1) 肺非小細胞がんDNAの染色体欠失領域解析で、11q23にその存在が示唆されたがん抑制遺伝子を、該当領域を含むYACクローン等の導入によるヒトがん細胞組織培養株のヌードマウスでの造腫瘍能の抑制を指標に突き止める。(2) AP-PCRフィンガープリンティングで種々のヒトがんDNAを解析し、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解析を行うことにより、疾病関連遺伝子を同定する。(3) 高度にメチル化されたDNA断片をメチル化DNA結合カラムクロマトグラフィーで分画し、クローン化したのち、CpGアイランド由来のDNA断片を同定するために開発した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し、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。

(倫理面への配慮)

手術検体は、臨床検査時、治療方針決定のための病理学的検索時に採取された組織の残りを使用する。検体はコード化され、DNA解析の結果が患者に不利益とならないように配慮する。新たに検体の採取が必要な場合には被験者に説明し、その同意を得る。胚細胞突然変異の解析が必要な症例に関しては、施設倫理委員会で研究計画の承認を受け、被験者に対する説明を行い、その同意を得る。

C. 研究結果

(1) ヒト肺非小細胞がんにおける染色体11q23欠失領域に関し、1個のYACクローンDNAの導入で、ヒト肺がん細胞の造腫瘍能が抑制されることから、がん抑制遺伝子の存在を明らかにした。さらに、詳細な物理的地図の情報を基盤に、酵母細

胞内での相同組み換えで断片化したYACクローンDNAの抑制活性を指標に、候補遺伝子IGSF4/TSLC1遺伝子を同定し、そのcDNAクローンが造腫瘍能抑制活性を示すことを明らかにした。(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) 肺非小細胞がんで高度にメチル化されているDNA断片をメチル化DNA結合カラムクロマトグラフィーで分画し、DNAライブラリー作成した。含まれるクローンをSPM解析し、種々のがん関連遺伝子、インプリンティング遺伝子のCpGアイランドに由来するDNA断片を多数単離した。その結果、作成したライブラリーにはメチル化CpGアイランドに由来するDNA断片が900個存在し、そのうちの100個ががん特異的にメチル化されるCpGアイランドに由来することを明らかにし、さらに、解析を進めることにより該当遺伝子の網羅的単離が可能と考えられた。

D. 考察

ヘテロ接合性消失の解析ではその単離に至ることのできないがん抑制遺伝子を、異常領域に対応するDNA断片の持つ生物学的活性を指標とすることにより単離できたことは、数多く知られている染色体上の欠失領域におけるがん抑制遺伝子の単離を可能とすると考える。

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、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

別添 3

を特定できる。ゲノム上の遺伝子配列決定の進行に応じて、また、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。

アフィニティーカラムクロマトグラフィーと新たに開発したCpGアイランド単離技術の組み合わせで、がんにおいてメチル化されているCpGアイランドの網羅的な単離が可能となったことは、塩基配列変化を伴わない遺伝子異常の解明につながる。この高度にメチル化されたCpGアイランドを持つ遺伝子の網羅的な単離は、本プロジェクト独自の成果であり、これら遺伝子の全てを単離、同定することは日本の成果となると考えられ、国際的な貢献が極めて大きいと考える。

E. 結論

AP-PCR法やヘテロ接合性の欠失解析によって検出された染色体上の欠失領域における該当遺伝子の追求に、その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り、造腫瘍抑制活性を示す候補遺伝子を単離した。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で、エビジェネティックなDNA異常の把握に必要な、メチル化CpGアイランドの網羅的単離を可能とするライブラリーを作成した。含まれるクローンの解析結果から、正常肺組織細胞でメチル化されているCpGアイランドが800個、がん化に伴いメチル化されCpGアイランドが100個存在すると算定され、現在までにその多くを単離した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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.

- 2) 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* 15, 5-8, 1999
- 3) 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* 96, 2913-2918, 1999
- 4) 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* 258, 271-277, 1999
- 5) Shiraishi M, Sekiguchi A, Chuu YH and Sekiya T. Tight interactions between densely methylated DNA fragments and the methyl-CpG binding domain of the rat protein MeCP2 attached to a solid support. *Biol Chem*, 380, 1127-1131, 1999
- 6) Kuchiki H, Saino M, Nobukuni T, Yasuda J, Maruyama T, Kayama T, Murakami Y and Sekiya T, Detection of amplification of a chromosomal fragment at 6p21 including the cyclin D3 gene in a glioblastoma cell line by arbitrarily primed polymerase chain reaction. *Int J Cancer*, 85, 113-116, 1999

2. 学会発表

- 1) 斎野真、朽木秀雄、安田純、丸山智子、嘉山孝正、村上善則、関谷剛男、Arbitrarily primed PCR (AP-PCR) 法を用

別添3

- いたヒト神経膠芽腫培養細胞における増幅DNA断片の解析、日本癌学会第56回総会、広島、1999.
- 2) 関谷剛男、関口あづみ、Chuu Yin、白石昌彦、ヒト肺がんにおけるリボソーム遺伝子繰り返し単位メチル化のモザイクパターンの変化、日本癌学会第56回総会、広島、1999.
- 3) 倉持雅巳、信國宇洋、福原浩、丸山智子、関谷剛男、村上善則、第11染色体q23領域におけるヒト肺非小細胞がん抑制遺伝子の探索 (I)、日本癌学会第56回総会、広島、1999.
- 4) 信國宇洋、福原浩、倉持雅巳、丸山智子、関谷剛男、村上善則、第11染色体q23領域におけるヒト肺非小細胞がん抑制遺伝子の探索 (II)、日本癌学会第56回総会、広島、1999.
- 5) 信國宇洋、福原浩、倉持雅巳、丸山智子、磯村実、小野塚祐二、大木操、Roger Reeves、関谷剛男、村上善則、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22回日本分子生物学会年会、福岡、1999.
- 6) 白石昌彦、関口あづみ、Adam J. Oates、関谷剛男、メチル化DNA結合カラムクロマトグラフィーとSPM法によるヒト肺がんにおけるメチル化CpGアイランドの網羅的単離、第22回日本分子生物学会年会、福岡、1999.
- 7) 白石昌彦、関口あづみ、Yin H. Chuu、関谷剛男、高密度メチル化DNA断片とラット核蛋白質MeCP2のDNA結合部位の間の強い相互作用、第22回日本分子生物学会年会、福岡、1999.
- 8) 小井詰史朗、関谷剛男、白石昌彦、ヒトがん細胞株におけるCDH1遺伝子CpGアイランドのメチル化の解析、第22回日本分子生物学会年会、福岡、1999.
- 9) 関谷剛男、DNA解析による遺伝子情報の解明とがんにおける遺伝子異常の把握、日本薬学会第120年会、岐阜、2000.

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案特許
なし
3. その他
なし

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

第11染色体に異常を有する精神発達遅滞の解析

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 de novo t(9;11)(q21;q23)転座をもつ高度の精神発達遅滞患者から樹立した培養細胞株を用いて、染色体転座と精神発達遅滞症状との関連を調べる目的でt(9;11)転座部位のゲノム解析を行った。11q23の転座部位周辺には転座により影響を受けるような遺伝子の存在が見つからなかった。第9染色体側を調べたところ、9q21転座部位周辺に1.5 Mbの欠失領域があることがわかった。本領域に含まれる遺伝子が精神発達遅滞症に関与するのではないかと考え、フィジカルマップの作成と遺伝子の検索を行い、ショウジョウバエの神経発生や体節形成期に細胞の分化決定を制御する転写抑制因子のヒトホモログを見出した。

A. 研究目的

一般に小児の精神発達遅滞症に見られる染色体異常は広範囲の欠失や多重である場合が多く、原因遺伝子の特定は困難である。本研究で対象とする症例では染色体異常としてde novo t(9;11)の相互転座のみが確認されており、精神発達遅滞症におけるこのような転座報告例はかつてない。研究対象として染色体転座の場合は転座部位近傍の遺伝子のみが影響を受けることが多く、異常を起こした遺伝子の特定が比較的容易であるという利点がある。転座部位周辺のゲノム解析によって原因候補遺伝子を探し、その異常と精神発達遅滞症状の関連性を明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

11q23の転座部位は、作成した第11染色体長腕のNotI制限酵素地図を利用してマップしたDNAマーカーからP1クローンを単離し、これらをプローブに用いたFISH法により、患者より樹立された培養細胞株JHGP56における転座点を同定した。転座部位周辺の約1 Mb領域についてP1クローンコンティグを作成し、ESTマッピング、cDNAスクリーニングにより遺伝子探索を行った。また第9染色体側のq21転座部位についても、JHGP56 DNAより転座部位を含む断片のクローン化を行い、転座部位周辺約1.5 Mbのクローンコンティグ作成、ESTマッピング、cDNAスクリーニング、ゲノムシーケンス解析を行った。本研究においては、研究内容に関する患者家族への説明を随時行い、了解を得たうえで患者の臨床的症状についての追跡調査を行っており、倫理上の配慮を

している。

C. 結果

t(9;11)(q21;q23)転座部位は第11染色体においては、q23.3に位置するMLL遺伝子の遠位にあたり、その近辺約1 Mb領域内には既知遺伝子としてTHY1が約400 kb離れて存在し、EST 5個がマップされた。しかしながら、転座点をまたぐような遺伝子や、この転座により発現に影響を受けるような遺伝子は領域内に見出されなかった。ゲノミックサザン法により検出したJHGP56 DNAに特異的なリアレンジバンドをクローン化することにより、第9染色体q21の転座部位周辺のゲノミッククローンを得たところ、9q21側に約1.5 Mbの欠失が起きていることがわかった。この領域を含む4.5 Mbの範囲についてYACコンティグの作成と、YAC上へのESTマッピングを行った。16個のESTをマップしたが、そのうち1.5 Mb欠失領域に含まれるものは5種、7個あった。マップしたESTからcDNAの単離を行い、うち1種（2個EST）からショウジョウバエの神経発生、体節形成期に機能する転写抑制因子のヒトホモログを単離同定した。本候補遺伝子についてはJHGP56細胞株における遺伝子変異の検索をSSCP法により行ったが、遺伝子変異は検出されなかった。この他に1つのESTからcDNAクローンを得ているが、その実態はまだ明らかでない。また、1.5 Mb領域の70%をカバーするPAC、BACコンティグを作成し、合計500 kbのゲノムシーケンス解析を行ったが、特異的な遺伝子構造は見出されなかった。

D. 考察

染色体転座によって起こる異常は遺伝子発現の量的変化、組織特異性の変化、融合遺伝子形成による機能の変化などが多いが、本研究で対象とした症例においては転座に付随したミクロ欠失が、精神発達遅滞症状の発症に関係しているのではないかと考えられる。現在最も有力な候補遺伝子と考えているものは、中枢神経系発生期の細胞の分化を決定づけるNotchシグナル系に含まれ、DNA非結合性転写抑制因子として機能することが知られている。患者由来JHGP56細胞株で遺伝子変異が見つからなかったため、現在疾病原因としてhaplotype insufficiencyの可能性を考慮してノックアウトマウスの作製を計画している。

E. 結論

t(9;11)(q21;q23)転座を持つ精神発達遅滞患者を対象として、11q23および9q21の転座部位周辺のゲノム解析を行い、9q21領域に転座に付随した染色体のミクロ欠失が起こっていることを明らかにした。欠失領域内には中枢神経系発生期の細胞の分化決定を制御する転写抑制因子として機能する有力な原因候補遺伝子が見つかった。

F. 研究発表

1. 論文発表

M. Narita, K. Shimizu, Y. Hayashi, T. Taki, M. Taniwaki, F. Hosoda, H. Kobayashi, H. Nakamura, N. Sadamori, H. Ohnishi, F. Bessho, M. Yanagisawa and M. Ohki: Consistent detection of CALM-AF10 chimaeric transcripts in haematological malignancies with t(10;11)(p13;q14) and identification of novel transcripts. *Brit. J. Haematol.* 105, 928-937, 1999.

M. Nishiyama, Y. Arai, Y. Tsunematsu, H. Kobayashi, K. Asami, M. Yabe, S. Kato, M. Oda, H. Eguchi, M. Ohki and Y. Kaneko: 11p15 translocations involving the NUP98 gene in childhood therapy-related acute myeloid leukemia/Myelodysplastic syndrome. *Genes Chrom. Cancer* 26, 215-220, 1999.

P. Gaudray, G. F. Carle, D. S. Gerhard, M. Gessler, M. M. Mannens, M. Athanasiou, J. Blik, A. Calender, L. V. Debelenco, M. -D. Devignes, G. A. Evans, R. Favier, S. Forbes, G. Gaudray, B. Gawin, M. Gordon, S. Grimmond, P. Grossfeld, J. Harris, M. Hattori, F. Hosoda, H. Hummerich, M. James, J. Kalla, N. Kasanis, P. Little, T. Mattina, M. Negrini, M. Ohki,

S. Osborne Lawrence, F. Parente, D. Quincey, S. Raynaud, L. Reid, L. A. Rethy, E. Schuurig, G. Sellar, S. Stilgenbauer, C. Talbot, P. Tauschnner, T. Thangarajah, A. Tunnacliffe, C. Turc-Carel, V. Van Heyningen, G. Weber, B. Zabel: Report of the sixth international workshop on human chromosome 11 mapping 1998. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 86: 167-186, 1999

H. Gomyo, Y. Arai, A. Tanigami, Y. Murakami, M. Hattori, F. Hosoda, K. Arai, Y. Aikawa, H. Tsuda, S. Hirohashi, S. Asakawa, N. Shimizu, E. Soeda, Y. Sakaki, and M. Ohki: A 2.Mb sequence-ready contig map and a novel immunoglobulin superfamily gene IGSF4 in the LOH region of chromosome 11q23.2. *Genomics*, 62, 139-146, 1999.

2. 学会発表

Y. Arai, H. Gomyo, A. Tanigami, Y. Murakami, F. Hosoda, K. Arai, Y. Aikawa, H. Tsuda, S. Hirohashi, S. Asakawa, N. Shimizu, M. Hattori, Y. Sakaki, E. Soeda, and M. Ohki: A 2 Mb sequence-ready contig map and a novel candidate tumor suppressor gene IGSF4 in the LOH region of chromosome 11q23.2. The 19th international symposium on cancer, 1999.

Y. Kobayashi, M. Nakata, M. Takahashi, T. Takenaka, K. Tobinai, F. Hosoda, and M. Ohki: Detection of t(11;18) MALT lymphoma with double color FISH and/or RT-PCR. The American Society of Hematology, 1999.

小林幸夫、高橋路子、中田匡信、竹中武昭、飛内賢正、細田文恵、大木 操：t(11;18)転座型 MALT リンパ腫の2色FISH法での診断、第41回日本臨床血液学会総会、1999年

細田文恵、赤羽 努、福島美智代、新井享子、添田栄一、新井康仁、大木 操：ヒト11番染色体q23.1の癌抑制遺伝子領域コンテグ作成と遺伝子探索、第22回日本分子生物学会年会、1999年

新井康仁、金子安比古、小林幸夫、池田宇次、池田和真、新井享子、細田文恵、大木 操：白血病におけるNUP98遺伝子の転座点の解析、第22回日本分子生物学会年会、1999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

厚生省科学研究費補助金（ヒトゲノム・遺伝子治療研究事業）

（総括・分担）研究報告書

染色体上の欠失・転座・メチル化部位の遺伝子地図作成と疾患関連遺伝子の単離

（主任 又は分担）研究者 横田淳 （国立がんセンター研究所生物学部部長）

がん細胞において欠失、転座等の異常を起こしているゲノム領域の同定、物理的地図の作製を行ない、染色体異常の標的となる遺伝子を検討した。肺がんにおける第9染色体短腕p21欠失では、p16がん抑制遺伝子を含まない領域が独立に欠失し、その共通欠失領域のサイズは約300kbであることを明らかにした。肺小細胞がんでは第8染色体長腕q24の増加が生じており、その増加領域にはC-mycがん遺伝子がしばしば含まれることを明らかにした。t(1;3)(p36;q21)を有する白血病における3q21および1p36領域の転座点集中領域のゲノム構造を明らかにし、3q21領域のRibophorin 1遺伝子が1p36領域に存在する未知の遺伝子を活性化していることを明らかにした。また、t(3;7;8)転座をもつ白血病細胞株Kasumi-3では、7q35領域のT cell receptor-beta遺伝子により3q26のEvi1遺伝子の活性化が生じていることを明らかにした。

キーワード：がん抑制遺伝子、がん遺伝子、欠失、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、転座等のゲノム変化領域を同定し、その領域のゲノム構造を明らかにすると共に、遺伝子地図を作成してゲノム変化の標的とな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、増加等のゲノム異常を起こしている領域を探索した。具体的には、DNAマーカーを用いたPCR解析による染色体欠失領域の同定、AP-PCR法を用いた染色体コピー数減少および増加領域の同定、FISH法およびPFGE電気泳動法を用い

た染色体転座部位の同定を行った。

また、同定された異常ゲノム領域については、領域をカバーする物理的地図を、BAC、P1等を用いて作製した。領域のゲノム配列を決定し、リピート配列の分布やGC分布などのゲノム領域の特徴的な構造を明らかにした。BLASTやGENSCAN等のコンピュータプログラムを用いて、領域内に存在する遺伝子の探索を行った。

C. 研究結果

1. 新規がん抑制遺伝子の存在が示唆されている9p21のp16遺伝子座近位領域、約750kbをカバーするBACコンティグ地図を作製し、18個の新しいDNAマーカーを単離した。また、この地図情報をもとに、35個のDNAマーカーのオーダリングを行った。次に、これらの整列したDNAマーカーを用いて、肺がん細胞株149例における9p21領域における詳細なホモ欠失（両相同染色体完全欠失）地図を作製した。ホモ欠失は39例（26%）に見られ、2つの独立した領域にクラスターした。ひとつは、p16がん抑制遺伝子を含む領域で、32例（

21%)の細胞株で欠失していた。もう一つはp16遺伝子よりも3 Mb 近位側に位置するD9S171 座を含む領域 (D9S171領域) であり、11例 (12%) の細胞株で欠失していた。また、2例の細胞株では、p16遺伝子領域は欠失しておらず、D9S171領域のみが欠失していた。その結果、9p21領域にはp16遺伝子座とは独立のホモ欠失の標的領域が存在することを明らかにした。また、共通欠失領域大きさは約300kbであった。

D9S171座の近位側約20kbに大きさ17, 036bpの欠失・挿入型の多型が存在することを明らかにした。欠失型アレルは日本人には見つからず、アメリカ人の16%に見られた。この多型により欠失している領域は、GC含量が35%と低く、LINEやLTR等のリピート配列に富み、コーディングエクソンは含んでいなかった。

2. AP-PCR法を用いて、肺小細胞がん13例におけるコピー数減少および増加領域の探索を行った。その結果、肺小細胞がんでは8q24領域のコピー数の増加が高頻度 (8/13, 62%) に生じていることが明らかになった。8q24領域の増加を示した症例のうち5例は、8q24に存在するC-mycがん遺伝子の増加を伴っていたが、残りの3例ではC-myc遺伝子の増加は見られなかった。

3. t(1;3)(p36;q21)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。その結果、1p36転座点は1p36.3の約90kbの領域内に、3q21転座点はこれまでに同定されている3q21q26症候群の転座点の近位側約60kbの領域内にそれぞれ集中することが明らかになった。3q21転座点付近には各種臓器で普遍的に発現するRibophorin 1遺伝子が存在することから、t(1;3)(p36;q21)を有する白血病では、1p36転座点周辺に存在する遺伝子がRibophorin 1遺伝子により活性化されていることが予想された。

また、t(3;7;8)(3pter-3q26::7q35-7q22::8q22-

8qter)という複雑な転座をもつ急性骨髄性白血病細胞株Kasumi-3では、7q35領域に存在するT cell receptor-beta遺伝子のV-beta領域が3q26領域のEvi1遺伝子の上流に融合し、その結果、Evi1遺伝子の活性化が生じていることを明らかにした。

D. 考察

9p21 領域には2ヶ所の染色体ホモ欠失の標的領域が存在することが明らかになり、p16以外の未知のがん抑制遺伝子が存在する可能性が示された。この結果は、肺がんを含む種々のヒトがんにおいて9p21領域の欠失が高頻度に見られるにも関わらず、p16遺伝子の変異が低頻度しか検出されないことと合致する。しかしながら、p16遺伝子座周辺にはp15遺伝子やp14ARF遺伝子など他の候補がん抑制遺伝子も存在する。よって、ヒト発がんにおける9p21 領域欠失の意義を明らかにするためには、D9S171領域に存在する遺伝子の単離・解析とともに、種々のがんにおけるp16、p15、p14ARF 遺伝子の異常の検索及びこれらの遺伝子の失活の生物学的意義の追求が必要である。

また、10数キロにも及ぶ大きなサイズの挿入・欠失多型が9p21領域に存在することを明らかにした。今回の結果は、この多型分布には人種差が見られることを示唆している。この多型ががんや他の病気の発症に影響しているかどうかは明らかではない。しかしながら、一部の挿入・欠失多型とがんの易罹患性の相関が知られていることから、今後、この挿入・欠失多型と各種疾患への易罹患性の相関を調べることは有意義であろう。

肺小細胞がんでは8q24領域のコピー数の増加が頻繁に生じていることを明らかにした。この結果は、8q24増加領域に存在するC-mycや他の遺伝子の増加が肺小細胞がんの進展に有利に働いていることを示唆している。今後、8q24増加領域に含まれる遺伝子群を探索、解析する必要がある。

t(1;3)(p36;q21)を有するMDS発症急性単球性白血病ではRibophorin 1遺伝子による1p36転座点周辺遺伝子の活性化が、白血病の発生・進展に役割を果たしていることが明らかになった。現在、転座により活性化されている1p36遺伝子のクローニングを進行中である。単離できれば、その遺伝子の機能解析を進め、t(1;3)(p36;q21)転座の分子病理学的意義を追求する予定である。

細胞株Kasumi-3の解析結果は、白血病の発生・進展過程ではEvi1遺伝子はRibophorin 1遺伝子以外の遺伝子によっても活性化されていることが明らかになった。この結果は、Evi1遺伝子がinv(3)(q21q26)、t(3;3)(q21;q26)以外の様々な染色体転座の標的がん遺伝子として機能していることを示唆している。

E. 結論

ヒトがんで欠失、転座等の染色体異常領域を同定し、物理的地図を作製し、領域のゲノム構造の決定、領域内の遺伝子の単離を進めてきた。いくつかの領域については、すでに物理的地図の作製が完成し、染色体異常の標的となる遺伝子の同定があと一歩というところまできている。本研究の結果は、がんという疾患の発症とゲノム異常のかかわりを明らかにするための、重要な情報となるであろう。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hamada K, Kohno T, Takahashi M, Yamazaki M, Tashiro H, Sugawara C, Ohwada S, Sekido Y, Minna J and Yokota J. Two regions of homozygous deletion clusters at chromosome band 9p21 in human lung cancer. *Genes Chromosomes Cancer*, 27:308-318, 2000.
- 2) Kohno T, and Yokota J. How many tumor suppressor genes are involved in human carcinogenesis?

Carcinogenesis, 20:1403-1410, 1999.

- 3) Yamada T, Kohno T, Navarro JM, Ohwada S, Perucho M, and Yokota J. Frequent chromosome 8q gains in human small cell lung carcinoma detected by arbitrarily primed-PCR genomic fingerprinting. *Cancer Genet. Cytogenet.*, 2000, in press.

- 4) Shimizu S, Suzukawa K, Kodera T, Nagasawa T, Abe T, Taniwaki M, Yagasaki F, Tanaka H, Fujisawa S, Johansson B, Ahlgren T, Yokota J and Morishita K. Identification of breakpoint cluster regions at 1p36.3 and 3q21 in hematologic malignancies with t(1;3)(p36;q21). *Genes Chromosomes Cancer*, 27:229-238, 2000.

- 5) Suzukawa K, Kodera T, Shimizu S, Nagasawa T, Asou H, Kamada N, Taniwaki M, Yokota J and Morishita K. Activation of EVI1 transcripts with chromosomal translocation joining the TCRVbeta locus and the EVI1 gene in human acute undifferentiated leukemia cell line (Kasumi-3) with a complex translocation of der(3)t(3;7;8). *Leukemia*, 13:1359-1366, 1999.

2. 学会発表

- 1) 河野隆志、浜田邦弘、高橋身奈、山崎正明、田代弘行、菅原智代、大和田進、関戸好孝、横田淳、ヒト肺がんにおける9p21ホモ欠失は2つの領域に集中する、第22回日本分子生物学会年会、1999.
- 2) 森下和広、望月菜緒美、清水誠一、長澤俊郎、横田淳、t(1;3)を有するMDS/AMLにおいて転座集中領域近傍に存在する遺伝子の単離、第22回日本分子生物学会年会、1999.
- 3) 清水誠一、鈴川和己、望月菜緒美、長澤俊郎、横田淳、森下和広、t(1;3)(p36;q21)を有する造血器悪性腫瘍の分子生物学的解析、第58回日本癌学会総会、1999.

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 部長

研究要旨 腸上皮化生を伴う幽門腺胃粘膜で脱メチル化され、化生を伴わない胃底腺胃粘膜でメチル化されている DNA 断片を、methylation-sensitive-representational difference analysis (MS-RDA)法により分離した。幽門腺と胃底腺の違いや腸上皮化生の有無により、異なるメチル化のパターンを示す DNA 断片が合計 18 個分離され、近傍に既知の遺伝子を認めた 5 個について RT-PCR 法により発現を検討した。Integrin 遺伝子の一つが、腸上皮化生の発生に伴い、脱メチル化され、かつ、異常な発現を示すことを認め、免疫組織染色で確認した。また、bHLH 型の転写因子は、幽門腺に比べて胃底腺粘膜で特異的な発現を認め、腸上皮化生の発生に伴い幽門腺でも発現が認められるようになった。MS-RDA 法により同定された DNA 断片は、本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。本研究により、多クローナルな病態においても、メチル化の異常が認められることが示された。

A.研究目的

胃の腸上皮化生は、多くの腺管で多発的に発生してくること、女性の腸上皮化生では不活化された X 染色体の母方又は父方の由来が腺管ごとに異なることから、多クローナルな病態と考えられる。また、分化の異常であることから、エピジェネティックな機構により腸上皮化生が発生している可能性が高い。分担研究者らが開発した methylation-sensitive-representational difference analysis (MS-RDA)法は、未知の領域も含め、ゲノム全体についてメチル化の状態の違いを検索する方法である。本研究では、MS-RDA 法により腸上皮化生の発生に関与しているメチル化異常が存在するのかが否かを検討し、存在する場合には、どのような遺伝子の発現が変化しているのかを解明することを目的とした。

B.研究方法

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。また、腺管分離に用いた近傍の粘膜を固定し、HE 染色を行った。

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。

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した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。

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。

免疫組織染色

市販の抗体が入手可能であった integrin に関しては、ABC 法により、組織染色を行った。

倫理面への配慮

臨床材料は、採取施設の倫理規定に基づき採取した。

C. 研究結果

メチル化の異なる DNA 断片の分離

昨年度まで、50-60%程度の腺管に腸上皮化生が認められる幽門部粘膜をテスターに、腸上皮化生のない胃底腺粘膜をドライバーに用いて、MS-RDAを行った。本年度は、185個のDNA断片の解析を終了した。(1) 正常の胃底腺ではメチル化され、正常の幽門腺では脱メチル化されているものの、胃底腺での腸上皮化生の発生に伴い、脱メチル化されるもの7個(表: pattern-1, 3) (2) 正常の胃底腺ではメチル化され、正常の幽門腺では脱メチル化されており、腸上皮化生の発生の影響を受けないDNA断片6個(表: pattern-2)、(3) 正常の胃底腺及び幽門腺ではメチル化されているものの、腸上皮化生の発生に伴い脱メチル化されるDNA断片4個(表: pattern-4)、(4)一見ラ

ンダムにメチル化されるDNA断片1個(表: pattern-5)、の合計18個を分離した。

塩基配列決定の結果、これら18個のDNA断片のうち、(1)8個(表中*)が既知のゲノムクローンと一致し、うち、4個について近傍にCpGアイランドが存在した。近傍に既知の遺伝子が存在するもの4個、ESTが存在するもの2個が認められた。(2)1個(表中**)は、ゲノムクローンとは一致しないものの、既知の遺伝子の配列を含んでいた。(3)残り、9個については、ゲノム上の由来は不明であったが、CpGアイランド由来と思われるものが1個(表中***)認められた。

発現の変化の検討

メチル化が異なるDNA断片の近傍に同定された既知の遺伝子5個について、胃底腺と幽門腺とでの発現量の違い、及び、腸上皮化生の発生と発現量の変化との関連をRT-PCR法により検討した。

Integrinの遺伝子の一つのイントロン1に由来するDNA断片A-B6は、正常な胃底腺と幽門

表 MS-RDA法による腸上皮化生の解析により得られたDNA断片の一覧

Clone name	Size (bp)	CpGアイランド			Database search		
		GC%	CpG score	presence	genomic sequence	transcription unit	
Pattern-1: NF-hyper, NP-hypo; IM (F)-hypo							
1	B-C1	971	39	0.66	?	-	-
2	B-H2*	426	59	0.59	Yes	P1	Intron 6 of PkB kinase like gene 1
3	B-B2	708	47	0.37	?	-	-
4	A-D1	999	37	0.60	?	-	-
5	A-H11*	309	50	0.40	Flanked	PAC	Downstream of HIR
6	A-H2	675	46	0.88	?	-	-
Pattern-2: NF-hyper, NP-hypo; No correlation with IM							
1	A-D12	642	46	0.15	?	-	-
2	A-G9	595	53	0.56	?	-	-
3	B-C3*	1,105	35	0.61	No	BAC	-
4	A-C2*	675	54	0.49	Flanked?	Genomic seq.	Homology with EST
5	A-E9*	542	40	0.25	No	Genomic seq.	EST
6	B-F5	777	38	0.28	?	-	-
Pattern-3: NF-hyper, NP-hypo; IM (P)-hyper, IM (F)-hypo							
1	A-A1**	457	39	0.63	?	-	A homeobox gene
Pattern-4: NF-NP-hyper; IM (F&P)-hypo							
1	A-B6*	536	50	0.25	Flanked	Genomic seq.	Intron 1 of an integrin
2	A-C6***	693	51	0.63	Yes	-	-
3	B-D12	664	49	0.25	?	-	-
4	B-E9*	671	44	0.29	No	BAC	Not present
Pattern-5: "Random"							
1	B-A5*	398	66	0.59	Yes	Genomic seq.	Intron 2 of bHLH transcription factor