

高密度CGHアレイを用いた新規白血病・リンパ腫治療薬の標的分子の探索

所属 東京大学医学部附属病院造血再生医療寄付講座
研究者 小川 誠司

研究要旨 3264 個の BAC DNA を搭載する Human 1M アレイの作成とこれを用いた造血器腫瘍ゲノムの解析、および Affymetrix GeneChip を用いた超高解像度なゲノムコピー数の新規解析法を確立した。また、新たな分子標的療法の有力な候補分子として Notch 蛋白を同定した。

分担研究者

- | | |
|---------------------------|------|
| (1) 国立がんセンター中央病院
薬物療法部 | 小林幸夫 |
| (2) 獨協医科大学血液内科 | 三谷絹子 |
| (3) 東京大学医学部附属病院無菌治療部 | 千葉滋 |
| (4) (財) 癌研究会癌研究所病理部 | 竹内賢吾 |
| (5) 株式会社ラボ | 杉田一憲 |

A. 研究目的

造血器腫瘍の治療成績の向上には、腫瘍に特異的な原因分子を同定し、これに特異的に作用する薬剤を開発することにより、腫瘍特異的で副作用の少ない治療薬の開発を進めることが急務である。

一方、ヒトゲノムの全塩基配列の決定と遺伝子構造の解明、さらにはゲノムの構造を高速に解析することを可能にするアレイ技術の開発に代表される近年のゲノム科学の急速な進展によって、ゲノムの変異によって発症する造血器腫瘍の原因分子の探索のための強力な基盤が提供されつつある。

本研究では、最新のアレイ解析技術その他を用いて、造血器腫瘍ゲノムにおけるコピー数変化の網羅的解析を行うことにより、造血器腫瘍の発症に関わる遺伝子を同定し、あるいはその機能的解析を通じて、新たな分子標的治療薬の開発に資することを目指す。

B. 研究方法

1) Human 1M アレイの作成 (杉田)

FISH 法によりヒト染色体上での局在が確認された 3264 個の BAC DNA について、小スケール

で BAC DNA を抽出し、DOP PCR 法によりスポットに必要な大量の BAC 由来 DNA の調整を行った。得られた DNA をアミノシランコートしたガラススライド上に duplicate でスポットすることによりアレイ化した。

2) CGH 解析 (小川)

健常男性由来のゲノム DNA および造血器腫瘍ゲノム DNA を random priming 法により、それぞれ Cy3、Cy5 でラベルし、Human 1M アレイ上で comparative genomic hybridization を行ったのち、各蛍光シグナルの検出を行い、Cy3/Cy5 シグナル比を解析することにより、3200 個の遺伝子座についてコピー数の変化を探索した。

3) Affymetrix GeneChip を用いたゲノムワイドなコピー数解析ソフトウェアの開発 (小川)

Affymetrix GeneChip のプロトコールに従い、PCR 増幅した正常および腫瘍ゲノム断片を蛍光標識し、アレイ上でハイブリダイゼーションを行ったのち、蛍光シグナルを専用スキャナーで測定した。得られたシグナル強度について、実験間誤差を種々の回帰で補正し、多数の正常ゲノムのシグナルを用いることにより、腫瘍および正常ゲノム由来の蛍光シグナルの \log_2 比における S/N 比の極小化を試みた。

4) Notch ファミリー遺伝子群の変異解析 (千葉)

千葉らは種々の Notch ファミリー遺伝子について、腫瘍ゲノムから PCR 法で増幅した HD ドメインおよび PEST ドメインに対応するゲノム断片を直接シーケンス法により塩基配列を決定し、変異の有無を解析した。また、Notch の変異が確認された腫瘍細胞株をヌードマウスに皮下投与したのち、Notch 分子の共通の阻害剤で

ある γ -セクレターゼ阻害剤の投与による腫瘍形成の阻害作用について検討を行った。

5) AML1/Evi-1 遺伝子改変マウスの検討 (三谷)

MDS の原因遺伝子として同定された AML1/Evi-1 遺伝子について、同遺伝子を AML1 遺伝子座にノックインしたマウスを作成し、その造血発生に及ぼす影響を解析した。

6) リンパ腫のゲノム解析の基盤整備 (小林・竹内)

国立がんセンターおよび癌研究会附属病院では、平成 17 年度の解析に向けて、政府の研究倫理指針に基づいた、リンパ腫試料の収集、データベースの構築、解析、のための基盤整備を行った。

(倫理面への配慮)

急性白血病、MDS および CML 患者試料を用いたゲノム解析については、ヒトゲノム遺伝子解析に関する倫理指針、疫学研究に関する倫理指針および臨床研究に関する倫理指針に基づき、東京大学医学部の設置する倫理委員会の承認を得て行った。

実験に使用したマウスの安楽死には頸椎脱臼を用い、可能な限り苦痛を与えないよう配慮した。

C. 研究結果

1) Human 1M アレイの作成と性能評価

Human 1M アレイを用いた 2 つの健常ゲノム間の CGH において、各プローブにおける Cy3/Cy5 の \log_2 比は 0 ± 0.09 で、プローブ間のばらつきは極めて正確にコントロールされ、また、異性間 CGH における X 染色体シグナルの \log_2 比の平均は 0.49 で高い S/N 比の解析が可能であった。

2) Human 1M アレイによる造血器腫瘍の CGH 解析

本アレイを用いた造血器腫瘍ゲノムの解析として、62 例の MDS 検体および 40 例の CML 検体について、全ゲノムにおけるコピー数の変化を 1Mb の平均解像度で解析したところ、従来の染色体分析等で同定される染色体レベルでの異常に加えて、極めて微細なゲノムの欠失・増幅についても多数同定が可能であった。

3) Affymetrix GeneChip によるコピー数解析プログラムの性能

Affymetrix Gene Chip SNP Mapping100K アレイは、約 200 万個の多型特異的プローブを配置し、全ゲノムで 116204 個の SNP 座について遺伝子型を判定する目的で開発された超高密度

oligonucleotide アレイであるが、多型解析で得られる各プローブのシグナルがゲノムのコピー数と高い相関を有することから、本アレイを用いて腫瘍ゲノムのコピー数を解析可能である。しかし、既存の Affymetrix 社の解析プログラムでは腫瘍と正常対照におけるシグナル比のばらつきが大きく、精度の高いコピー数の解析が困難であった。そこで、我々は、シグナルの計測で得られる raw データに種々の補正を施すことにより、同アレイを用いた高精度な解析プログラムの開発を試みた。我々は、2 つのアレイ実験におけるシグナルの \log_2 比に影響を及ぼす因子として、各 SNP を含む PCR 産物の長さおよび GC 含有量を同定し、これらについて多重回帰を行うことにより、 \log_2 比の補正を図るとともに、多数の正常検体を対象として用いることにより、 \log_2 比の S/N 比が著しく改善することを見いだした (\log_2 比の SD 値で 0.49 から 0.18 まで低下)。さらに、SNP 解析から得られる多型情報をもとにして、コピー数の評価とともに、腫瘍における LOH の領域を正確にマップすることも可能となった。

4) 造血器腫瘍検体の試料の収集とデータベースの構築

国立がんセンターおよび癌研究会附属病院におけるリンパ腫解析のための基盤整備は順調に進行しており、平成 17 年度に試料の解析を開始することが可能な見通しである。一方、これらのリンパ腫の解析では、既知の染色体異常その他の情報が重要となることから、各センターで FISH 法その他による遺伝子病型分類を行った。

5) 造血器腫瘍における Notch 遺伝子変異の解析

種々の造血器腫瘍細胞株を用いた変異の検討では、近年報告された T-ALL における Notch1 変異が確認された。また γ -セクレターゼ阻害剤の投与により、Notch1 変異を有する 2 つの細胞株において腫瘍形成の阻害効果が確認された。

6) AML1/Evi-1+マウスの解析

AML1/EVI-1/+マウスは中枢神経系の出血及び成体型造血の欠如のため胎生致死であった。胎仔肝の造血前駆細胞は高い自己複製能を有する一方、成体型造血、特に赤芽球系細胞への著しい分化障害を認めた。また胎仔肝の PU.1 の発現は維持されていたが、SCL 及び LM02 の発現は著減していた。

D. 考察

我々が独自に作成した Human 1M アレイは CGH 法を用いて 1Mb の平均解像度で網羅的に腫瘍ゲノムにおけるコピー数の解析が可能なアレイである。アレイの品質を含めた解析システムの性能は、1 個の BAC 領域のコピー数の変化についても検出することが可能であり、今後造血器腫瘍におけるゲノムのコピー数の変化を比較的低コストで解析する有用なシステムであると考えられる。実際、本アレイシステムを用いた MDS および CML の解析では、従来の方法では検出することのできなかった微細な異常が多数同定され、これらの領域から新たな分子標的薬剤のターゲットとなる遺伝子が同定されることが期待される。

我々はアレイ CGH システムの構築と平行して、より詳細なコピー数解析システムとして、Affymetrix 社から提供される GeneChip を用いた解析システムの開発を行った。強力なデータ補正アルゴリズムの搭載により、従来の同アレイ用いた解析の大きな難点であったノイズの除去に成功し、全ゲノムについて 23.6kb (100K アレイを用いた場合) の解像度でコピー数を解析することが可能となった。平成 17 年度には搭載 SNP プローブ数が 52 万個に増強されたアレイを用いて、平均解像度 5-6kb という驚異的な解像度で造血器腫瘍の標的遺伝子の同定を試みる。

一方、Notch ファミリー遺伝子の変異解析では、近年小児 T-ALL で報告された Notch1 の異常が成人例においても確認されること、また、Notch 変異を有する 2 つの腫瘍細胞株について、Notch 分子については共通の阻害薬である γ -secretase による腫瘍形成の阻害が確認された。これは新規分子標的薬の開発という観点からは、最も早期に実用化につながる知見であると考えられる。

また、MDS に対する新規薬剤開発のモデル動物として期待した AML1/Evi1 遺伝子改変マウスは、残念ながら胎生致死となったが、今後 Cre/loxP システムを用いて成体で異常遺伝子を発現するシステムを用いた変異マウスの作成も考慮されよう。

E. 結論

(1) 3264 個の BAC クローンを搭載した Human 1M

アレイを作成しこれを用いたアレイ CGH システムを構築した。

(2) Human 1M アレイを用いた MDS、CML におけるゲノムワイドなコピー数の異常の探索を行い、これらの造血期疾患で認められる多数の微細なゲノムコピー数の変化を同定した。

(3) 超高解像度のコピー数の解析方法として、Affymetrix 社の SNP タイピングアレイを導入し、同アレイを用いて腫瘍ゲノムにおけるコピー数の変化および LOH を詳細に解析するためのシステムの確立を行った。

(4) 成人 T-ALL において Notch1 遺伝子に活性型変異が高頻度に認められることを明らかにした。

F. 研究発表

1. 論文発表

- Hosoya N, Qiao Y, Hangaishi A, Wang L, Nannya Y, Sanada M, Kurokawa M, Chiba S, Hirai H, Ogawa S. Identification of a SRC-like tyrosine kinase gene, FRK, fused with ETV6 in a patient with acute myelogenous leukemia carrying a t(6;12)(q21;p13) translocation. *Genes Chromosomes Cancer*: 42:269-279, 2005.
- Kawazu M, Asai T, Ichikawa M, Yamamoto G, Saito T, Goyama S, Mitani K, Miyazono K, Chiba S, Ogawa S, Kurokawa M, Hirai H. Functional Domains of Runx1 Are Differentially Required for CD4 Repression, TCR β Expression, and CD4/8 Double-Negative to CD4/8 Double-Positive Transition in Thymocyte Development. *J Immunol*: 174, 3526-33, 2005.
- Ogawa S. Molecular genetics of Myelodysplastic syndrome. *Educational Program Book: Japanese Society of Hematology and Japanese Society of Clinical Hematology*:10-25, 2004.
- Goyama S, Yamaguchi Y, Imai Y, Kawazu M, Nakagawa M, Asai T, Kumano K, Mitani K, Ogawa S, Chiba S, Kurokawa M, Hirai H. The transcriptionally active form of AML1 is required for hematopoietic rescue of the AML1-deficient embryonic para-aortic splanchnopleural (P-Sp) region. *Blood*: 104:3558-3564, 2004.
- Gunji, H., Waga, K., Nakamura, F., Maki, K., Sasaki, K., Nakamura, Y., Mitani, K. TEL/AML1 shows dominant-negative effects over TEL as well

as AML1. *Biochem Biophys Res Comm* 322, 623-630, 2004.

2. 学会発表

Sanada M, Nanya Y, Hangaishi A, Hosoya N, Wang L, Kurokawa M, Omine M, Chiba S, Ogawa S. Array-Based Comparative Genomic Hybridization for Genome-Wide Analysis of DNA Copy Number in Myelodysplastic Syndromes. *The 46th Annual Meeting of American Society of Hematology, 2004, USA*

G. 知的財産権の出願・登録状況

Affymetrix GeneChip を用いた悪性腫瘍における網羅的なゲノムコピー数/LOH 解析プログラム (CNAG) の開発 (申請予定)