

綜合臨牀 第54巻第6号

(平成17年6月1日発行 別刷)

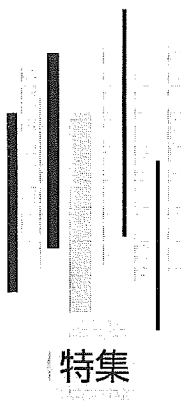
マイクロアレイを用いた 造血器悪性腫瘍の分類と予後

Microarray-based prediction of prognosis for hematological malignancies

間野 博行

MANO Hiroyuki

永 井 書 店



特集

マイクロアレイを用いた 造血器悪性腫瘍の分類と予後

Microarray-based prediction of prognosis for hematological malignancies

間野 博行

MANO Hiroyuki

臨床血液学 最近の進歩

Key words DNA マイクロアレイ 遺伝子発現プロファイル 急性骨髄性白血病

I. DNA マイクロアレイ

約30億塩基対に及ぶヒトゲノムの核酸配列を決定する大規模事業である「ヒトゲノムプロジェクト」がついに2003年4月に終了宣言を行い、ヒト染色体の euchromatin 領域のほぼ完全な塩基配列が決定された (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/seq/>). ヒトの持つ蛋白をコードする総遺伝子数はおそらく2万~2万5千種類前後になると予想されている¹⁾. かつて夢であったヒトの全遺伝子プールの全貌がいよいよ明らかになるうとしており、ポストゲノム時代が訪れたと言える.

DNA マイクロアレイはスライドガラスなどの小さな担体上に、解析する遺伝子由来の cDNA あるいはオリゴヌクレオチドを高密度に配置したものであり、いわば超高密度ドットプロット法といえよう²⁾. 一度のハイブリダイゼーション実験で、アレイ上のすべての遺伝子の発現を定量することが可能であり、例えば全ヒト遺伝子の発現量を任意のサンプル間で比較することも現実のものとなりつつある. このようにマイクロアレイを用いることで、これまでとは比較にならないような膨大な遺伝子発現データを解析することができる

自治医科大学ゲノム機能研究部 教授

ようになった. こうして得られた遺伝子の発現様式・発現パターンのことを「遺伝子発現プロファイル (gene expression profile)」と呼ぶ. このプロファイルの中に悪性腫瘍の長期予後に相関するものがあるのではないか, というスクリーニングが現在さまざまな造血器悪性疾患で行われている. これまでのところ, 多くの例において遺伝子発現プロファイルに基づいた疾患の予後予測が可能ことが示唆されている.

II. 急性骨髄性白血病 (AML) の予後予測

AML は未熟な血液細胞が癌化して生じる疾患であり, これまで核型による分類が予後予測に有用であることが証明されてきた³⁾. しかしながら, 核型分類における Intermediate 群は明らかに予後良好群と不良群の両者を含んでおり, 例えば全 AML の過半数を占める正常核型 (Intermediate に属する) の患者の治療反応性を予測することは困難である.

Bullinger らは AML 患者116例の骨髓単核球より mRNA を調整し, 約3万9千種類の cDNA を配置したマイクロアレイで解析を行っている⁴⁾. 彼らは患者を training set と test set に分け, 前者のデータを用いて患者予後に発現量がリンクす

る遺伝子をスクリーニングした。その結果100種類以上の予後予測遺伝子セットを同定することに成功している。さらにこれら遺伝子の発現量を基に患者を2群に分け、その予後を比較したところ、2群の生命予後は有意に異なっていた($P < 0.001$)。また、あらかじめ取っておいた test set において検証したところ、やはり2群の予後は大きく違っている($P = 0.006$)ことが示された。これらの予後分類法が現行の核型に基づく分類法とは独立したものであることを示すために、彼らは核型分類では中間群に分類される「正常核型」を持った患者のみを選択し、その予後予測も試みている。彼らの分類法を適応したところ、正常核型の中でも予後良好群と不良群とを区別することに成功した($P = 0.046$)。彼らの解析は旧来の核型分類法とは異なった新しい予後予測法の可能性を示唆しており興味深い。

また山下らは、ヒト全遺伝子が配置されたDNAマイクロアレイを用いて、標準的化学療法を受けたAML患者66例の骨髓AC133陽性細胞について遺伝子発現プロファイルデータを得た。これら66例の患者中、初回化学療法によって完全寛解(complete remission: CR)に到達した症例は51例有り、残り15例は寛解導入に失敗した。後者15例は一年以内に全員死亡しておりきわめて予後不良なグループといえる。この初回化学療法に成功した患者と失敗した患者の間では遺伝子発現プロファイルは違うのであろうか?それを検討するために4万4千種類のプローブセット(3万3千種類の遺伝子に相当)の発現データ中、両グループ間で発現が有意に異なる遺伝子を選び出し、さらに少なくともどちらかのグループでは高い発現量を示す遺伝子をスクリーニングしたところ、最終的に約30種類の遺伝子が得られた。得られた遺伝子の発現プロファイルはそれぞれが互いに独立なわけではなくよく似たものも多い。そこで correspondence analysis 法⁵⁾によって、これら30種類の発現量パターンから全体を最も代表する仮想発現プロファイルを3種類抽出した(すなわち代

表的な仮想発現パターンそれぞれを作る仮想遺伝子3種類を作成したことになる)。これら仮想遺伝子3種類を軸とした仮想空間に各サンプルを投射したのが図1である⁶⁾。その結果興味深いことに治療奏功症例と失敗症例とは空間上不連続な位置に独立して存在することが判った。言い換えると両グループは遺伝子発現プロファイルの面では異なった集団に属するのだ。

このような空間上の位置は患者予後にリンクしているのであろうか?図1をよく見てみると、患者サンプルはZ軸上で最も強く分離されていることがわかる。そこで症例の仮想空間上でのZ軸上の値が-0.3未満か-0.3以上かによって大きく2群に分け、その長期生命予後をKaplan-Meier法によって解析してみた。図2で明らかなように両群は大きく予後が異なることが判る。

Ⅲ. 悪性リンパ腫の解析

Bリンパ球由来のびまん性大細胞型リンパ腫は日常の臨床で最も高頻度に遭遇する非Hodgkinリンパ腫のサブタイプである。同疾患はしばしばCHOP療法などアントラサイクリン系薬剤を中心とした化学療法が有効であるが、寛解となった症例の中には再発を繰り返すものも多い。AlizadehらはDNAマイクロアレイを用いてびまん性大細胞リンパ腫の中で再発が少ない予後良好群と予後不良群とを鑑別する可能性を検討した⁷⁾。この目的のためにまず濾胞中心Bリンパ球および各種悪性リンパ腫のcDNAライブラリーから得られたcDNAなど計17,856遺伝子をスポットしたカスタムチップを用意し、びまん性大細胞型リンパ腫、濾胞性リンパ腫および慢性リンパ性白血病の患者サンプルを用いてDNAマイクロアレイ解析を行った。また、比較のために健常人より得られた各種リンパ組織サンプル、および刺激を加え活性化させた末梢B、Tリンパ球などについても検討している。

その結果、びまん性大細胞リンパ腫には濾胞中

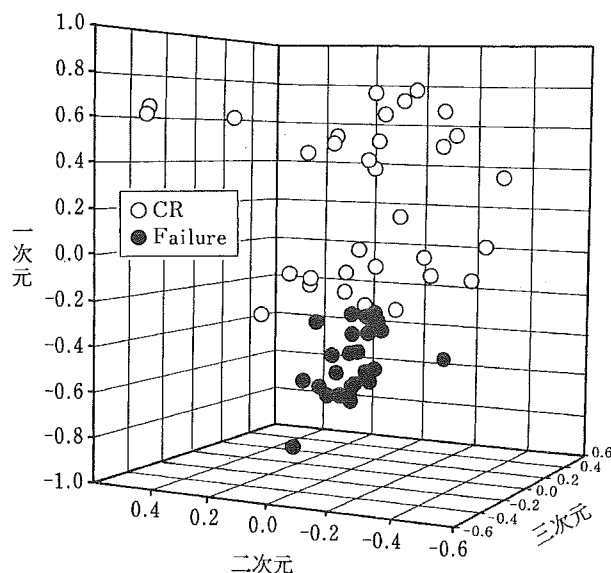


図1 初回治療反応性と遺伝子発現プロファイル(文献6より引用改変)

化学療法による初回寛解導入が成功した群(CR)と失敗した群(Failure)との間で有意に発現量が異なる遺伝子をスクリーニングし、その発現プロファイルから代表的なものを3種類抽出した。これらプロファイル上の仮想発現量に基づいてサンプルを空間に投射したところ、CR群とFailure群とは異なった位置に配置された。

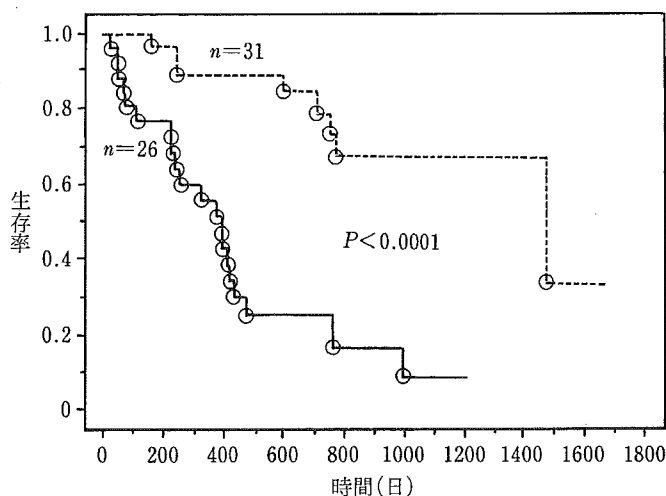


図2 長期予後にリンクした患者階層化(文献6より引用改変)

図1の仮想空間においてZ軸の値が-0.3未満(——)か以上(-----)かによって患者を二分し、その予後をKaplan-Meier法で比較した。両群の予後は統計的に有意に異なる(log-rankテスト)ことが判る。

心Bリンパ球に遺伝子発現パターンが似ている群と活性化Bリンパ球に似ている群が存在することが示され、しかも両群間で予後に有意な差が認められることが明らかになった。すなわち活性化Bリンパ球に似た細胞からなるリンパ腫患者の5年生存率(16%)は濾胞中心Bリンパ球に似た細胞からなるリンパ腫患者のそれ(76%)に比べ

て有意に低いのである。

さいごに

マイクロアレイによる予後予測法の開発は、いわば発癌原因遺伝子の細胞内における最終的な表現形である遺伝子発現を「網羅的発現解析データ」

というフィルターを通して類推しパターン分類している, といえるのではないだろうか? 現行のマイクロアレイ実験は手技も煩雑であり費用もかかるが, パターン認識の精度が上がるに伴い少ない

遺伝子セットで分類できるようになると予想される. そのためには何よりも大量の検体の解析データが重要であろう.

文 献

- 1) The genome international sequencing consortium : Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* 431 : 931-945, 2004.
- 2) Duggan DJ, Bittner M, Chen Y, et al : Expression profiling using cDNA microarrays. *Nat Genet* 21 : 10-14, 1999.
- 3) Grimwade D, Walker H, Oliver F, et al : The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML : analysis of 1,612 patients entered into the MRC AML 10 trial. The Medical Research Council Adult and Children's Leukaemia Working Parties. *Blood* 92 : 2322-2333, 1998.
- 4) Bullinger L, Dohner K, Bair E, et al : Use of gene-expression profiling to identify prognostic subclasses in adult acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 350 : 1605-1616, 2004.
- 5) Fellenberg K, Hauser NC, Brors B, et al : Correspondence analysis applied to microarray data. *Proc Natl Acad Sci USA* 98 : 10781-10786, 2001.
- 6) Mano H : Stratification of acute myeloid leukemia based on gene expression profiles. *Int J Hematol* 80 : 389-394, 2004.
- 7) Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, et al : Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* 403 : 503-511, 2000.

総論 / 5. 病態

DNAチップによる
リンパ腫解析*

間野 博行**

Key Words : DNA microarray, genomics, expression profile

はじめに

ヒトゲノムプロジェクトの成果であるドラフトシーケンスが2001年2月に公表され¹⁾²⁾, またついにeuchromatinの完全版配列決定が2003年4月14日に宣言された。現在得られた配列上に遺伝子の割付作業が行われているが, 近い将来にその成果が公表されると思われる。ヒト遺伝子の総数はおそらく3万数千種類程度になると予想されており, これはたとえば体細胞が1,000個ほどしかない線虫の約2倍ほどにすぎない³⁾。おそらくヒトなどの高等真核生物は1個の遺伝子から複数のメッセンジャーRNAをalternative splicing機構などによって合成することで, 多様な蛋白質群を産生しているのだと予想される。ゲノム配列が決定されたからといって全ヒト遺伝子の同定・構造解明が終了するにはまだ時間がかかるが, 今後cDNAシーケンスプロジェクトなどの成果を取り入れることにより, ヒトのもつ遺伝子・蛋白質セットの全容が日々明らかにされていくことは間違いない。

ヒトのほとんどの遺伝子構造が(機能は不明であるにしろ)明らかになった今後の「ポスト・ゲノム時代」においては医療・医学研究の分野でも方法論の転換が求められるであろう。たとえば, あ

る疾患の原因遺伝子を同定することを考えると, 旧来の方法であれば発現スクリーニング法であったり, 連鎖解析法などによってまったく未知の遺伝子を最初から同定せざるを得なかった。しかしポスト・ゲノム時代においては, 理論上「未知」の遺伝子は存在しなくなり, 膨大ではあるがあくまで有限なヒト遺伝子のプールの中から特定の特徴を備えた遺伝子を効率よく同定することが必要になる。現段階でこのような大規模発現スクリーニングにもっとも適した方法はDNAチップ・DNAマイクロアレイ(以下DNAチップ)であろう。

DNAチップはスライドガラスなどの担体の上に, cDNAあるいは遺伝子由来のオリゴヌクレオチドを高密度に配置したものであり, スライド上の数千から数万種類の遺伝子の相対的発現量を一度の実験で解析することができる⁴⁾。すでにデータベース上に存在するヒトの全遺伝子を配置したDNAチップも市販されており(<http://www.affymetrix.com>), これらの高密度DNAチップを用いることで, たとえばヒト全遺伝子の発現量を任意の疾患間(あるいは健常人と)比較し, 新しい分子診断マーカーを同定することも実現するであろう。また, DNAチップによって得られる発現データを用いて疾患の分類自体に新しい体系を導入することも可能であろうし, これまでとは違った予後予測法も開発されるかもしれない。

悪性リンパ腫はリンパ節の組織像, 腫瘍細胞

* Analysis of malignant lymphoma by DNA microarray.

** Hiroyuki MANO, M.D., Ph.D.: 自治医科大学ゲノム機能研究部[☎329-0498 栃木県河内郡南河内町薬師寺3311-1]; Division of Functional Genomics, Jichi Medical School, Tochigi-ken 329-0498, JAPAN

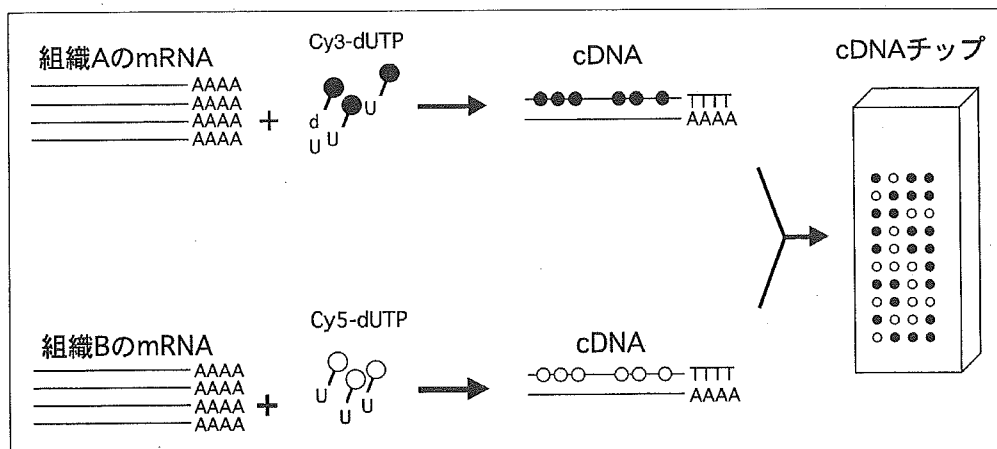


図1 DNAチップを用いた発現解析の原理

組織 A と B との間で遺伝子発現プロファイルを比較した場合、まず組織 A と B それぞれから等量の mRNA を調整する。次にこれら mRNA からオリゴdTプライマーと逆転写酵素を用いて cDNA を合成する。その際に蛍光色素である Cy3 あるいは Cy5 で標識した dUTP を加えることで、各組織由来の cDNA をそれぞれ異なる蛍光色素で標識する。この標識 cDNA 混合物を、DNA チップとハイブリダイゼーションさせることで、各スポットに標識 cDNA が統合する。その結果、任意のスポット上の遺伝子に関する組織 A と B における発現量の比は、Cy3 と Cy5 との蛍光強度の比で表されることになる。

の起源、また患者の生命予後などに基づいてサブタイプを分類する REAL 分類あるいは新 WHO 分類が広く用いられている。しかし残念なことに、これら悪性リンパ腫において疾患発症のメカニズムが分子レベルで明らかになっている例は少なく、直接リンパ腫発症に関与するものとして cyclin D1, bcl-2 および c-myc などの遺伝子が、また間接的にがん化を導くものとして Epstein-Barr ウイルス、HTLV-1 などが知られているにすぎない。上述の DNA チップを悪性リンパ腫の解析に応用することで、いまだなお発症機構が不明な本疾患の病態解析に、新たなブレイクスルーがもたらされると予想される。

DNA チップの原理

では具体的に cDNA チップを用いて、スポットされた遺伝子群の組織 A と組織 B における発現の変化を解析する実験を考えてみよう(図 1)。組織 A と B からそれぞれ mRNA を抽出し、オリゴdTプライマーを結合させる。これに逆転写酵素を加えて組織 A と B それぞれの cDNA を作製するわけであるが、組織 A の cDNA を合成する際に蛍光色素 Cy3 が結合した dUTP を添加し、cDNA に Cy3 を取り込ませる。同様に組織 B の

cDNA を合成する際には Cy5-dUTP を添加して、蛍光色素 Cy5 を取り込ませる。その結果、A と B の cDNA は異なる波長の emission light を有する蛍光色素で標識されたことになる。これらを等量混合し、先程の cDNA チップとハイブリダイゼーションさせるわけである⁵⁾。

その結果、Cy3 標識 cDNA と Cy5 標識 cDNA はスポット上の各遺伝子の組織 A と B における発現量の比に応じた形でスポットに結合する。この DNA チップをレーザーで励起すると Cy3 は緑色、Cy5 は赤色の蛍光を発するため、あるスポット上の遺伝子が組織 A のみに発現していれば緑色のスポットとなり、B のみに発現していれば赤色のスポットとなる。また両組織においてほぼ等量に発現している遺伝子の場合は、黄色のスポットとしてみえる(図 2-A)。このようにして各スポットにおける両色素の蛍光強度を測定することで、それぞれのスポット上の遺伝子の測定サンプル間における発現比が定量できる。1 枚の DNA チップ上には数千の DNA 断片が配置されており、1 回の実験でこれら数多くの遺伝子の発現変化を包括的に解析できる。

なお、オリゴヌクレオチドチップ(図 2-B)の場合は、上述のような Cy3 と Cy5 の二重染色によ

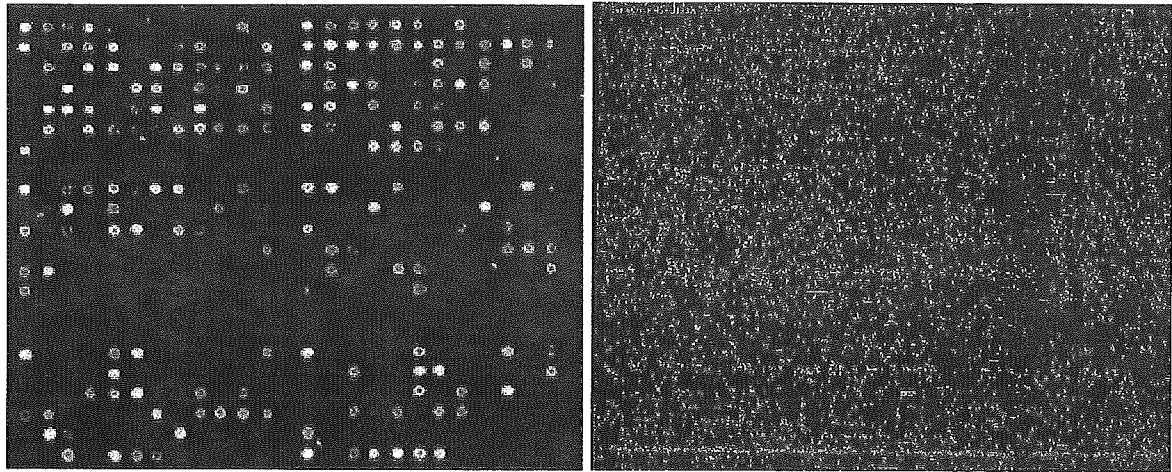


図2 DNAチップのスキャン画像

A/B

cDNAチップ(A)およびAffymetrix社のGeneChip(B)をスキャンした画像をそれぞれ示す。cDNAチップの場合には2種類のサンプルから調整したcDNAをそれぞれCy3とCy5の蛍光色素で標識し、混合してハイブリダイズした。Cy3標識cDNAが主に結合したスポットは緑色、Cy5標識cDNAが主に結合したスポットは赤色、両者がほぼ等量結合したスポットは黄色で表される。(B)は単一のサンプルより調整した標識cRNAをハイブリダイズさせてあり、実際は単色のグレースケールで表されるが発現強度を判りやすくするためにpseudo-colorで表してある。

る二検体間発現比較でなく、1種類の検体を1種類の蛍光染色で解析することの方が多。したがって1枚のチップからは単一の組織の発現プロファイルが得られるのみであり、ほかの組織と比べる場合は、それぞれ異なったチップで得られたデータを正規化させた後、コンピュータ上で比較することになる。

Hodgkin病のチップ解析

では悪性リンパ腫の病因解明の上でもDNAチップは有用であろうか？悪性リンパ腫は大きくHodgkin病と非Hodgkinリンパ腫とに分けられる。Hodgkin病は多発性に腫大したリンパ節内にHodgkin細胞あるいはReed-Sternberg細胞(H/RS細胞)と呼ばれる大型の細胞が散在することが特徴であり、リンパ節内に炎症反応による細胞浸潤が著明なことも特異的である。H/RS細胞はおそらくBリンパ球由来であると考えられているが、Hodgkin病が具体的にどのようなメカニズムで発症するかはまったく不明である。Kappらは950種類のヒト遺伝子を配置したDNAチップを用いて、Hodgkin病由来の細胞株2種類と、Epstein-Barrウイルスによって不死化した健常人由来のB細胞株1種類との発現比較を行った。その結果、インターロイキン(IL)-13を含む複数の遺伝子がHodgkin病由来の細胞株で高発現しているこ

とを確認した⁶⁾。サンプル数を増やしてノーザンブロット法にて発現確認をしたところ、IL-13のみがHodgkin病細胞において特異的に発現していることが示された。しかもIL-13に対する中和抗体を培養上清に添加したところ、Hodgkin病細胞株においてのみ増殖抑制効果が得られたのである。これらの事実はHodgkin病の発生にIL-13のオートクラインメカニズムが関与している可能性を示唆しており興味深い。

さらに、彼らのグループはHodgkin病のリンパ節を*in situ*ハイブリダイズすることにより、リンパ節中のH/RS細胞に高率にIL-13のmRNAが認められること、しかもその一部にはIL-13受容体mRNAも同時に存在していることを確認した。したがってIL-13の発現はHodgkin病の細胞株だけにみられる所見ではなく、実際のリンパ節検体においても活性化されていることが明らかになった⁷⁾。なおIL-13の発現はHodgkin病以外にも未分化大細胞リンパ腫などでも高頻度に検出されており、必ずしもHodgkin病特異的な所見ではなかった。

非Hodgkinリンパ腫のチップ解析

1. 未分化大細胞型リンパ腫

非Hodgkinリンパ腫は、その腫瘍細胞の起源により、大きくT細胞型とB細胞型とに分けるこ

とができる。両者ともさらに、病型、予後、腫瘍細胞の分化度によって多くのサブタイプに区別される。未分化大細胞型リンパ腫(anaplastic large cell lymphoma)は予後不良の疾患であるが、チロシンキナーゼであるALK1の高発現が存在する群と、しない群とに、さらに区別される。ALK1の活性化が認められないグループの生命予後は不良であり、現段階ではその発症機序・治療法ともまったく不明なままである。Wellmanらは588個の遺伝子をスポットしたDNAチップ(Clontech社製)を用いて、さまざまな造血器悪性腫瘍由来細胞株における遺伝子発現の特徴を解析した。その結果、未分化大細胞型リンパ腫由来の4種類の細胞株すべてでクラスタリンと呼ばれる分泌蛋白が高発現していることが確認された⁹⁾。さらに彼らは、抗クラスタリン抗体を用いてリンパ節の免疫組織染色を行い、未分化大細胞型リンパ腫36例中全例で、またB細胞型非Hodgkinリンパ腫78例中2例でクラスタリンの発現を確認した。Hodgkin病リンパ腫(30例)ではクラスタリンは発現しておらず、同蛋白の疾患特異性が高いことが示された。クラスタリンは細胞接着に重要な役割を果たしていると言われているが、クラスタリン高発現がもつ生理的意義は不明である。

2. 菌状息肉腫(mycosis fungoides)

本邦では、欧米に比べてT細胞型リンパ腫の頻度が高く、同疾患はしばしば皮膚への浸潤を伴う。皮膚浸潤が主要病変となったT細胞性非Hodgkinリンパ腫の一種を菌状息肉腫と呼ぶが、同疾患は治療抵抗性でありきわめて予後が悪い。Storzらは、患者菌状息肉腫病変より細胞を分離し8週間培養することで異常細胞のみを純化して、Wellmanらと同様なDNAチップを用いた解析を行った⁹⁾。また、コントロールとしては健常人より得たCD4陽性T細胞を用いている。その結果、tumor necrosis factor(TNF)/TNF receptorファミリーに属するCD40、CD40Lが菌状息肉腫由来の細胞で高発現していることを確認している。またCD40、CD40Lの高発現については、免疫組織染色法によって実際の皮膚病変においても示された。

さらに皮膚浸潤T細胞型リンパ腫の異なった

病期について8,000個の遺伝子発現解析を行った報告もある。Liらは同一の患者の病初期と進行期それぞれから細胞を採取し、細胞株を樹立した後にサンプルmRNAを調整し、約8,000個のヒト遺伝子をスポットしたカスタムチップを用いて発現解析を行った¹⁰⁾。その結果、グアニンヌクレオチド交換因子など複数の遺伝子が病期特異的に発現していることが示され、またその一部についてはRT-PCR法によっても確認された。

3. びまん性大細胞型リンパ腫

Bリンパ球由来のびまん性大細胞型リンパ腫は、日常の臨床でもっとも高頻度に遭遇する非Hodgkinリンパ腫のサブタイプである。同疾患はしばしばCHOP療法などアントラサイクリン系薬剤を中心とした化学療法が有効であるが、寛解となった症例の中には再発を繰り返すものも多い。AlizadehらはDNAチップを用いて、びまん性大細胞リンパ腫の中で再発が少ない予後良好群と予後不良群とを鑑別する可能性を検討した¹¹⁾。この目的のために、まず濾胞中心Bリンパ球および各種悪性リンパ腫のcDNAライブラリーから得られたcDNAなど計17,856遺伝子をスポットしたカスタムチップを用意し、びまん性大細胞型リンパ腫、濾胞性リンパ腫および慢性リンパ性白血病の患者サンプルを用いてDNAチップ解析を行った。また比較のために健常人より得られた各種リンパ組織サンプル、および刺激を加え活性化させた末梢B、Tリンパ球などについても検討している。

その結果、びまん性大細胞リンパ腫には、濾胞中心Bリンパ球に遺伝子発現パターンが似ている群と活性化Bリンパ球に似ている群が存在することが示され(図3)、しかも両群間で予後に有意な差が認められることが明らかになった。すなわち、活性化Bリンパ球に似た細胞からなるリンパ腫患者の5年生存率(16%)は濾胞中心Bリンパ球に似た細胞からなるリンパ腫患者のそれ(76%)に比べて有意に低いのである(図4)。このことは、DNAチップによる解析で非Hodgkin悪性リンパ腫の新たなサブグループが定義可能なこと、しかもその分類が予後判定に有意な情報を与えることを示唆しており、今後の臨床の場におけるDNAチップの新たな可能性を示し

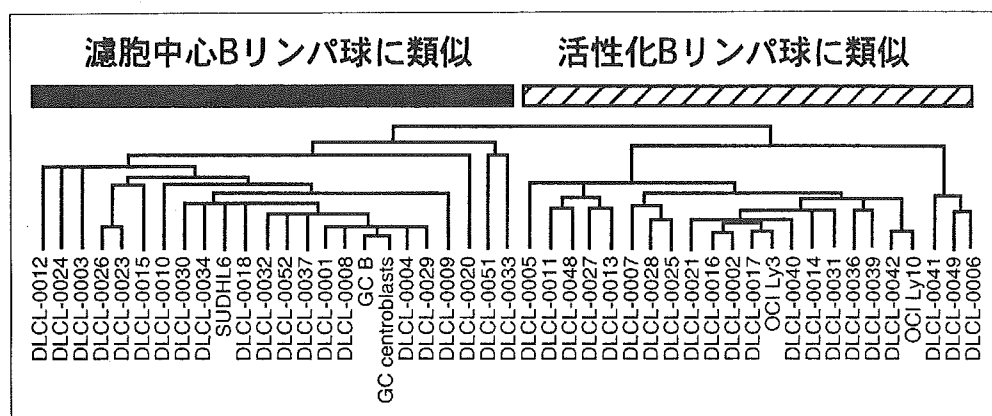


図3 トランスクリプトームのパターンによる悪性リンパ腫患者の分類

濾胞中心 B リンパ球(GC B)に高発現する遺伝子のクラスターがあり、これらGC B特異的遺伝子群における発現パターンを基に、びまん性大細胞型リンパ腫の患者をクラスター解析した。その結果GC B遺伝子群の発現が高いグループと低いグループとに分けられた。また後者の遺伝子発現プロファイルは活性化 B リンパ球のそれに類似していた。さらにこれら 2 群の患者の予後は大きく異なることが示された。(文献¹¹⁾より改変)

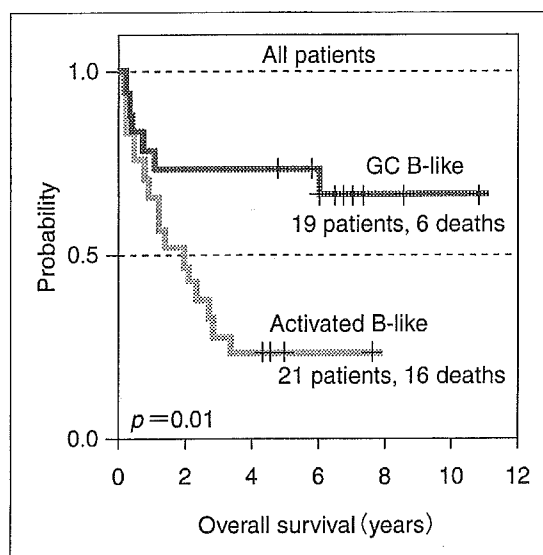


図4 びまん性大細胞型リンパ腫の予後

びまん性大細胞型悪性リンパ腫患者を、リンパ節の遺伝子発現プロファイルから「濾胞中心 B リンパ球に発現パターンが似たサンプル群(GC B-like)」と「活性化 B リンパ球に似た群(Activated B-like)」に分け、両者の生命予後をグラフにした。後者が有意に予後不良群であることが判る。(文献¹¹⁾より改変)

たものとして意義深い。

またRosenwaldらは米国National Cancer Instituteで作製したcDNAマイクロアレイ(Lymphochip, 約12,200種類のヒト遺伝子cDNAを配置)を用いてびまん性大細胞型リンパ腫240例のサンプルにおいて遺伝子発現プロファイルを得た¹²⁾。Alizadeh

らが報告した「濾胞中心 B リンパ球に発現パターンが似たサンプル群」と「活性化 B リンパ球に似たサンプル群」を鑑別するのに役立った100種類の遺伝子における発現量を基に今回の240例をクラスタリングすると、サンプルがAlizadehらの提唱する 2 群とさらに第三のグループ“type 3 subgroup”に分けられることがわかり、また各グループの平均 5 年生存率はそれぞれ60%, 35%および39%であった。旧来用いられてきた予後予測法(international prognostic index: IPI)⁴⁾によるサブグループの割合はこれら 3 群間で分布に偏りがないため、遺伝子発現プロファイルはIPIスコアとは独立した予後予測法であることがわかった。

おわりに

DNAチップはいまだ発展途上にある技術であり、これまでなされてきたリンパ腫の解析も体系的なものは少ない。今後DNAチップを用いたリンパ腫研究が爆発的に増加すると予想されるが、以下のような点で注意深いプロジェクトデザインが必要である。第一には細胞株と患者フレッシュ検体とを区別して考えるべきである。実際の実験でリンパ腫を含む造血器悪性腫瘍から細胞株を樹立するのは簡単ではない。したがってリンパ腫の患者細胞の多くは、そのままでは *in vitro* で永代培養できないのである。たとえば

白血病などでも、フレッシュな検体と白血病細胞株ではp53の変異率が大きく異なる。すなわち細胞株として樹立したクローンは元の検体の代表的なポピュレーションを反映していないのであり、株化を試みる操作の中で新たに導入された遺伝子異常が存在する可能性がある。細胞株と患者組織とを単純に比較するような実験は「株化を可能にする遺伝子異常」のスクリーニングを行っている可能性があり、安易に行うべきではないと思われる。

また第二に、異常細胞を「何」と比較するか、という問題がある。たとえば悪性リンパ腫のリンパ節全体と健常人のリンパ節全体を比較するようなDNAチップ解析は真に適切な比較となり得るであろうか。健常人のリンパ節はさまざまな分化段階のリンパ球が複雑な層構造をなしているが、悪性リンパ腫の多くでは、そのごく一部の細胞が異常増殖しリンパ節全体を占有するに至っている。もしT細胞性リンパ腫と健常リンパ節とを比較すれば、B細胞特異的な遺伝子は当然前者で「発現が低下」しているようにみえる。しかしそれはT細胞性リンパ腫で細胞内のBリンパ球特異的遺伝子の発現低下があったわけではなく、もともとBリンパ球特異的遺伝子を発現しないTリンパ球(から派生したがん細胞)という集団が増加していることを反映しているにすぎないであろう。

DNAチップは「両刃の剣」としての側面がある。慎重にデザインされた実験においてのみ、そのきわめて高いスクリーニング能力が有意義な実験結果を生むと考えられる。ポスト・ゲノム時代における医学の発展の上で、DNAチップシステムが重要な役割を果たすことは間違いないであろう。悪性リンパ腫でも本邦に特徴的な疾患が数多くあり、これらの解析がDNAチップという新しいアッセイ系を得て大きく進歩することを期待したい。

文 献

- 1) Lander ES, Linton LM, Birren B, et al. International Human Genome Sequencing Consortium. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001 ; 409 : 860.
- 2) Venter JC, Adams MD, Myers EW, et al. The sequence of the human genome. *Science* 2001 ; 291 : 1304.
- 3) The C. elegans Sequencing Consortium. Genome sequence of the nematode *C. elegans* : a platform for investigating biology. *Science* 1998 ; 282 : 2012.
- 4) Duggan DJ, Bittner M, Chen Y, et al. Expression profiling using cDNA microarrays. *Nat Genet* 1999 ; 21 : 10.
- 5) 間野博行. DNAチップ法. In : 血液・固形腫瘍診断マニュアル. 大阪 : フジメディカル出版 ; 2002. p. 70.
- 6) Kapp U, Yeh WC, Patterson B, et al. Interleukin 13 is secreted by and stimulates the growth of Hodgkin and Reed-Sternberg cells. *J Exp Med* 1999 ; 189 : 1939.
- 7) Skinnider BF, Elia AJ, Gascoyne RD, et al. Interleukin 13 and interleukin 13 receptor are frequently expressed by Hodgkin and Reed-Sternberg cells of Hodgkin lymphoma. *Blood* 2001 ; 97 : 250.
- 8) Wellmann A, Thieblemont C, Pittaluga S, et al. Detection of differentially expressed genes in lymphomas using cDNA arrays : identification of clusterin as a new diagnostic marker for anaplastic large-cell lymphomas. *Blood* 2000 ; 96 : 398.
- 9) Storz M, Zepter K, Kamarashev J, et al. Coexpression of CD40 and CD40 ligand in cutaneous T-cell lymphoma (mycosis fungoides). *Cancer Res* 2001 ; 61 : 452.
- 10) Li S, Ross DT, Kadin ME, et al. Comparative genome-scale analysis of gene expression profiles in T cell lymphoma cells during malignant progression using a complementary DNA microarray. *Am J Pathol* 2001 ; 158 : 1231.
- 11) Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* 2000 ; 403 : 503.
- 12) Rosenwald A, Wright G, Chan WC, et al. The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med* 2002 ; 346 : 1937.

特集●個別化医療の実現を目指して

いかにして個別化医療が可能か

間野 博行

OVERVIEW

いかにして 個別化医療が可能か

間野博行

自治医科大学ゲノム機能研究部

ヒトゲノムの全塩基配列を決定し、すべての遺伝子構造を明らかにする壮大な研究計画である「ヒトゲノムプロジェクト」の完了が2003年4月に宣言された (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/guide/human/>)。すなわち、ヒトゲノムのユークロマチン (euchromatin) 領域のうち99%について99.999%の正確性で塩基配列が決定されたのである。得られた配列に対する遺伝子の割付 (annotation) も、まだ完全ではないものの発表されており¹⁾、ヒトのもつ総遺伝子数 (タンパク質をコードするもの) がわずか20,000~25,000種類程度に過ぎないと予測されている。ヒトゲノムプロジェクト終了後の「ポストゲノム」時代がいよいよ到来しており、医学・医療の面でも大きな変革を迎えようとしている。

static な遺伝子変化

ヒトゲノムの解明が医学・医療にもたらす影響は甚大であるが、それには具体的に2種類の方向性があると思われる (表)²⁾。一つの方角としては、個人のもつ先天的なゲノムの多様性・個性の解明である。ヒトゲノムの配列は各個人間で完全に同じではなく、たとえばアングロサクソンとコーカシアンでは人種特異的な塩基配列の違いが存在することが知られる。また、たとえば同じ日本人のなかでも地域によって固有の塩基配列の多型があり、さらに部分的には各家系、個人にも固有の配列多型があると思われる。一塩基多型 (single nucleotide polymorphism ; SNP) が話題に上がることが多いが、これら SNP を含む遺伝子配列の多型が個人の遺伝的個性を決定していると予想される。

臨床場において実感するように、癌、高血圧や糖尿病など、多くの疾患において家族集積性が存在する。たとえば、生活習慣病には複数の疾患感受性遺伝子座が存在すると予想されており、それらの「感受性の総和」が各個人の遺伝的バックグラウンドにな

The ways toward the tailored medicine

Hiroyuki Mano

まの・ひろゆき 1984年東京大学医学部卒業。86年同第三内科入局、医学博士、91年同助手、93年自治医科大学医学部分子生物学講座講師、2001年同大学医学部ゲノム機能研究部教授 (現在に至る)。研究テーマ：ゲノミクス技術を用いた造血器悪性腫瘍の病態解明。

表 ゲノム情報がもたらす新しい医学研究

1. 先天的な遺伝素因の解明
a) 多因子疾患の発症危険率の予測
b) 単因子疾患の発症危険率の予測
c) 薬剤感受性・副作用の予測
2. 後天的な遺伝子変化の解明
a) 新たな疾患分類法の開発
b) 診断用遺伝子マーカーの同定
c) 病態の理解と治療法の開発

るのであろう。発癌についても、ある家系では特定の癌遺伝子が遺伝的に活性化しているのかもしれないし、癌抑制遺伝子の機能が（たとえば対立遺伝子の片側だけ）遺伝的に失活している場合も考えられる。そして、このような疾患の感受性を規定している遺伝的素因こそが、SNPなどの遺伝子配列の多型であると考えられている。現段階でそれぞれの疾患において具体的にどのような遺伝子座の多型が発症に寄与しているのかは不明であり、世界中で疾患関連 SNP の同定が試みられている。

個別化治療において遺伝子多型がもつもう一つの重要な意義は、薬剤感受性あるいは薬剤の副作用発症の予測である³⁾。たとえば、アミノグリコシド系抗生剤の重要な副作用に難聴があるが、薬剤投与の結果難聴が生じるのはごく一部の患者のみである。詳細な解析の結果、12S リボソーム RNA 遺伝子に A1555G 変異があると重度の難聴が発症することがわかっており、このような多型をあらかじめ検査することで副作用の発生を最小限にとどめることが可能になるであろう。代表的な薬剤毒性関連遺伝子多型に関する個人情報が入力された ID カードをもって診療を受ける、というような時代も遠からず訪れるであろう。

dynamic な遺伝子変化—DNA マイクロアレイを中心として

前項のような「ゲノムの個性」を明らかにすることはきわめて重要であるが、一方それだけでは個別化治療の実現には不十分であろう。SNP などの遺伝的背景はあくまで static な素因を扱うのみであり、日々変化する疾患責任細胞・組織の遺伝子変異のリアルタイムな定量的把握は、任意の患者の任意の時期における治療方針を決定するうえで不可欠である。これは遺伝的素因の強い心血管系疾患の場合でも同様で、たとえばうつ血性心不全を有するある患者が、どのような長期予後・経過をとる病型で、診察をした時点でそのなかのどの時期に位置するかを評価することは、臨床上きわめて重要である。すなわち、dynamic に変化する後天的遺伝子変異をリアルタイムで明らかにすることが、static な遺伝子変化である SNP の解明と補完しあうことで、はじめて真の個別化医療が可能になると予測される。

このような大規模遺伝子発現測定法として現在注目されているのが DNA マイクロアレイ法である⁴⁾。2 種類の組織間で発現量が異なる遺伝子を単離する場合、サブトラクションクロニング法や SAGE (serial analysis of gene expression) 法などを利用す

ることもできるが、これらの方法は手技が煩雑であり、また発現量の差を定量的に評価することは難しい。一方、DNA マイクロアレイでは数千～数万種類の遺伝子の発現変化を一度の実験で解析でき、これまでとは異なったスケールで発現変化のスクリーニングが可能である。このような膨大な遺伝子発現データベースを用いることで、「遺伝子発現」情報に基づいた新たな（予後にリンクした）疾患分類法の提案が期待されるし、また、その際の診断に利用する新たな分子診断マーカーも今後の解析で同定されると予想される。さらに遺伝子発現変化の特徴から、診断法の開発だけでなく疾患発症機構自体を明らかにすることも可能であろう。

本特集では、個別化医療の実現に向けて世界をリードする研究をしているわが国の研究者の方々にご執筆いただいた。読者は、悪性疾患から生活習慣病まで広い範囲の疾患解析にゲノム情報が利用されていることを理解するとともに、独自のアプローチ開発をぜひ目指していただきたい。

文献

- 1) International Human Genome Sequencing Consortium. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* 2004 ; 431 : 931-45.
- 2) Peltonen L, McKusick VA. Genomics and medicine. Dissecting human disease in the postgenomic era. *Science* 2001 ; 291 : 1224-9.
- 3) Roses AD. Pharmacogenetics and the practice of medicine. *Nature* 2000 ; 405 : 857-65.
- 4) Cheung VG, Morley M, Aguilar F, et al. Making and reading microarrays. *Nat Genet* 1999 ; 21 : 15-9.

医学と医療の最前線

DNAチップ解析による造血器腫瘍診断

間野 博行

日本内科学会雑誌 第94巻 第10号別刷

2005年10月10日

DNAチップ解析による造血器腫瘍診断

間野 博行

要 旨

ヒトゲノムプロジェクトが終了し我々の持つ蛋白質をコードする遺伝子の全体像が明らかになりつつある。DNAチップを用いることで、これら数万種類の遺伝子の発現量を任意の細胞・組織間で簡便に比べることが可能になった。現在急性骨髄性白血病や悪性リンパ腫など様々な造血器悪性腫瘍の患者サンプルをDNAチップで解析し、得られた遺伝子発現プロファイルの中から患者の長期予後にリンクするものをスクリーニングする試みが精力的に行われている。また最近では患者骨髄の単核球全体を解析するのではなく、極めて幼弱な造血幹細胞分画のみをあらかじめ純化した後DNAチップ解析を行う事も試みられている。同定された予後関連遺伝子群の発現量を基に各患者の予後を予測することがこれらのプロジェクトの目標であり、今後は遺伝子発現プロファイルに基づいた造血器悪性腫瘍の新しい分類法が提案されると期待される。

〔日内会誌 94:2224~2230, 2005〕

Key words: DNAチップ, 急性骨髄性白血病, 悪性リンパ腫, 遺伝子発現プロファイル

1. 遺伝子発現プロファイル

約 30 億塩基対に及ぶヒトゲノムの核酸配列を決定する大規模事業である「ヒトゲノムプロジェクト」がついに 2003 年 4 月に終了宣言を行い、ヒト染色体の euchromatin 領域のほぼ完全な塩基配列が決定された (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/seq/>)。ヒトの持つ蛋白質をコードする総遺伝子数はおそらく 2 万~2 万 5 千種類前後になると予想されている¹⁾。かつて夢であったヒトの全遺伝子プールの全貌がいよいよ明らかになるうとしており、ポストゲノム時代が訪れたと言える。

この膨大な遺伝子情報を有効に使う技術であるゲノミクス・プロテオミクスが、造血器悪性腫瘍の解析においても重要な役割を担うことは間違いない。今後の医学研究においては、「膨大

ではあるがあくまで有限なヒト遺伝子プール」の中から特定の特徴を備えた遺伝子を効率良く同定することが重要になる。ゲノミクス技術の中でも DNA (deoxyribonucleic acid) チップは既に複数の疾患で有用な解析ツールとなることが示されてきた^{2,3)}。

DNA チップはスライドガラスなどの小さな担体上に、解析する遺伝子由来の cDNA あるいはオリゴヌクレオチドを高密度に配置したものであり、いわば超高密度ドットプロット法といえよう⁴⁾。例えばいま、組織 A 由来の cDNA を蛍光色素 Cy3 で標識し、組織 B 由来の cDNA を蛍光色素 Cy5 で標識したとする。両者の混合物を cDNA を高密度に配置した DNA チップとハイブリダイズさせると、標識 cDNA は各スポット上の遺伝子の組織 A と B における発現量の比に応じた形でスポットに結合する。レーザーで励起すると Cy3 は緑色、Cy5 は赤色の蛍光を発するため、あるスポット上の遺伝子が組織 A のみに発現していれば緑色のスポットとなり、B のみに発現していれば

まの ひろゆき：自治医科大学ゲノム機能研究部

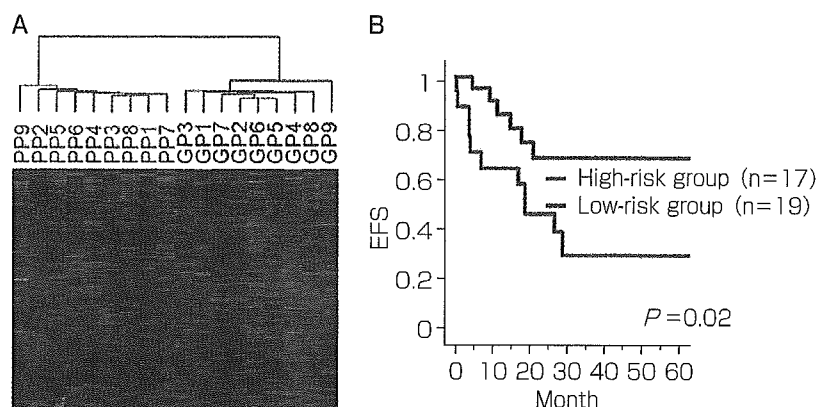


図1. 骨髄単核球の発現プロファイルによる予後予測 (文献7より改変)
 (A)長期生存症例(GP)と予後不良症例(PP)間で発現が異なる遺伝子を取り出したところ133種類同定された。これら遺伝子の発現量で二次元クラスタリングを行った。(B)上記遺伝子の発現量でテストサンプルを二次元クラスタリングし、大きく分かれた二群間で予後を比較した。

ば赤色のスポットとなる。また両組織においてほぼ等量に発現している遺伝子の場合には黄色のスポットとして見える。このようにして両色素の蛍光強度を測定する事で、それぞれのスポット上の遺伝子の測定サンプル間における発現比が定量できるのだ。一枚のDNAチップ上には数千～数万種類のDNA断片が配置されており、一回の実験でこれら数多くの遺伝子の発現変化を包括的に解析できる。

このようにDNAチップを用いることで、これまでとは比較にならないような膨大な遺伝子発現データを解析することが出来るようになった。こうして得られた特定の遺伝子群の発現様式、発現パターンのことを「遺伝子発現プロファイル (gene expression profile)」と呼ぶ。このプロファイルを比べることで疾患の特性・病因に迫れるのではないかと考えられる。

2. 急性骨髄性白血病(AML)の予後予測-1

AMLは未熟な血液細胞が癌化して生じる疾患であり、これまで様々なパラメーターが治療予後にリンクすることが報告されてきた⁵⁾。現在臨床の場で白血病の診断および予後予測を行う場合、患者骨髄細胞に関して (1) ペルオキシダー

ゼ、エステラーゼなどの特殊染色, (2) FACS (Fluorescence Activated Cell Sorter) を用いた細胞表面マーカーの解析, (3) 遺伝子異常の有無の解析(免疫グロブリン遺伝子やT細胞表面受容体遺伝子の再構成, BCR-ABL遺伝子, PML-RAR α 遺伝子などの有無), (4) 染色体型の解析, などの検査が利用される⁶⁾。これらを総合的に解析することで予後にある程度リンクした診断が行えるが、上記の解析を全て行うのは煩雑であり多くの専門技術も必要となる。一方、例えば一枚のDNAチップを用いることで旧来の方法で得られる情報が全て解析可能となれば、診断はより簡便になりかつ異なった施設間での診断の一致率も上昇するであろう。骨髄中の血球の多くは単核球 (mononuclear cell) と呼ばれる分画に相当し、これまでAML患者骨髄単核球を用いたDNAチップ実験により患者予後を予測する試みが行われてきた。

Yagiらは小児AML患者54例についてAffymetrix社GeneChip HGU95Aチップを用いた遺伝子発現解析を行い、小児AML内での予後良好群と不良群とを予測する試みを行っている⁷⁾。彼らのサンプル内で3年以上完全寛解を維持している症例9例と初回緩解導入に失敗した症例9例の間で発現量が統計的に異なる遺伝子133種

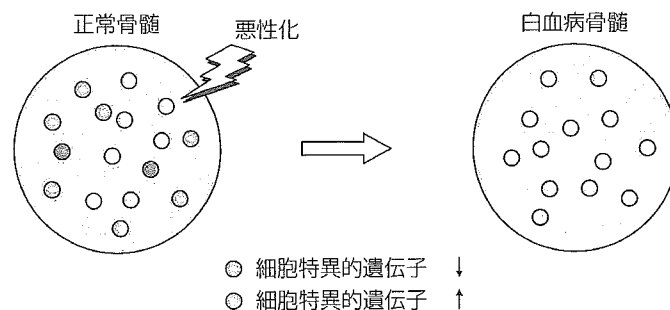


図2. 「Population shift効果」による偽陽性データ (文献10より改変)

正常骨髄は様々な細胞からなるヘテロな集団である。今その中から緑色の細胞が悪性化し白血病が生じたとすると、患者骨髄内は結果的に緑色由来の細胞が大半を占めることになり、それ以外の細胞の割合は相対的に減少する。したがって骨髄全体を正常と白血病患者で比べるような単純なマイクロアレイ解析を行えば、青色細胞特異的な遺伝子は必ず減少しているように見え、逆に緑色細胞特異的な遺伝子の発現は必ず増加しているように見えてしまう。このような変化は実際の細胞内での発現変化を反映しているわけではなく、単に骨髄内でのポピュレーションの変化を見ているに過ぎない。この「population shift効果」による見せかけの発現変化が大量の偽陽性データを生み出すものとなる。

類を抽出し (図1A), これら予後関連遺伝子の発現量をもととして、患者全体を二次元クラスタリング法あるいはsupported vector machine (SVM) 法によって層別化した。その結果どちらの方法によってもAML内で生命予後が異なるサブグループを検出することに成功している (図1B)。すなわち遺伝子発現プロファイルを基にした新しい疾患分類法の可能性が提示されたことになる。

同様にBullingerらはAML患者116例の骨髄単核球よりmRNA (messenger ribonucleic acid) を調整し、約3万9千種類のcDNAを配置したDNAチップで解析を行っている⁸⁾。彼らは患者をtraining setとtest setに分け、前者のデータを用いて患者予後に発現量がリンクする遺伝子をスクリーニングした。その結果100種類以上の予後予測遺伝子セットを同定することに成功している。さらにこれら遺伝子の発現量を基に患者を2群に分け、その予後を比較したところ、2群の生命予後は有意に異なっていた ($P < 0.001$)。またあらかじめ取っておいたtest setにおいて検証したところ、やはり2群の予後は大きく違っている ($P = 0.006$) ことが示された。これらの予後分類

法が現行の核型に基づく分類法とは独立したものであることを示すために、彼らは核型分類では中間群に分類される「正常核型」を持った患者のみを選択し、その予後予測も試みている。彼らの分類法を適応したところ、正常核型の中でも予後良好群と不良群とを区別することに成功した ($P = 0.046$)。彼らの解析は旧来の核型分類法とは異なった新しい予後予測法の可能性を示唆しており興味深い。

またValkらも同様の目的から285例のAML患者骨髄単核球を用いて約13,000種類の遺伝子に関する発現量を測定した。彼らもやはり予後にリンクした遺伝子発現プロファイルがあることを検出している⁹⁾。

3. 急性骨髄性白血病 (AML) の予後予測-2

しかし実際にDNAチップを用いた実験を行うと、本法が意外にも偽陽性データが多く効率の悪い手技であることにも気付く。その理由を例えば健常人と白血病患者の骨髄を比べる場合で考えてみよう (図2)。正常骨髄は様々な系統の細胞群からなる「ヘテロ」な集団である。もし

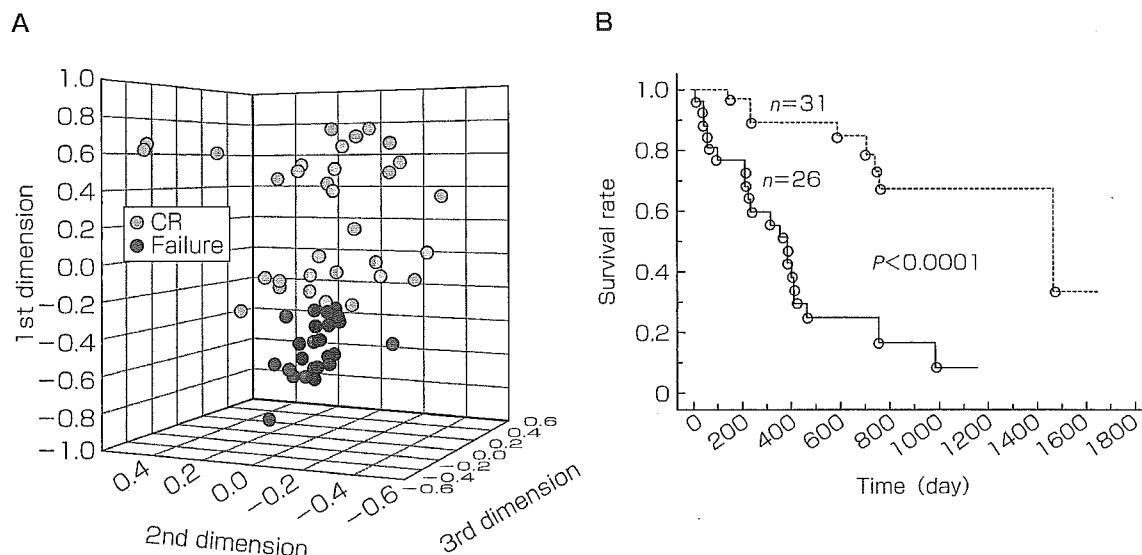


図3. AC133 陽性細胞を用いた予後予測 (文献13より改変)

(A) 化学療法による初回寛解導入が成功した群 (CR) と失敗した群 (Failure) との間で有意に発現量が異なる遺伝子をスクリーニングし、その発現プロファイルから代表的なものを3種類抽出した。これらプロファイル上の仮想発現量に基づいてサンプルを空間に投射したところ、CR群とFailure群とは異なった位置に配置された。(B) 仮想空間のZ軸の値が-0.3未満(——)か以上(——)かによって患者を2分し、その予後をKaplan-Meier法で比較した。

今この骨髓中の多能性幹細胞の1クローンが悪性転化し白血病になったと仮定すると、白血病患者の骨髓は幹細胞由来の白血病細胞が多くを占めるようになり、それ以外の細胞の骨髓における割合は相対的に低下する。したがって両者の骨髓細胞(あるいは単核球)全体を単純に比較するようなDNAチップ解析を行うと、造血幹細胞分画以外の細胞(例えば図2の青色細胞)特異的に発現する遺伝子などは全て減少して見えてしまう。この変化は、それぞれの遺伝子の細胞内におけるmRNAのコピー数を反映しておらず、誤って「発現減少」と判断されたわけである。一方、幹細胞特異的に発現していた遺伝子は、細胞あたりの発現量の変化の有無に拘わらず骨髓中における割合が増加するために誤って「発現誘導」と判断されることになる¹⁰⁾。これらの様々な偽陽性や偽陰性データのノイズの中から真に「癌化に伴って細胞あたりの発現量が変化する」遺伝子を選択するのは極めて困難であろう。

ではどのようにしてこれら偽陽性データを回避する効率の良いゲノム解析が可能であろうか? 白血病を含む多くの血液悪性疾患が、造血幹細胞あるいはそのごく近傍の幼若細胞における悪性転化に起因することが知られる。そこで患者骨髓より造血幹細胞相当分画のみを純化しこれを用いてDNAチップ解析を行えば、患者骨髓中の芽球の割合や芽球の分化傾向の違いに影響されない、精度の高い解析が可能になると期待される。我々は造血幹細胞分画に特異的に発現する膜蛋白AC133に着目し、AC133に対するアフィニティカラムを用いて広く血液悪性疾患患者より造血幹細胞相当分画を純化保存するバンク事業「Blast Bank」を開始した。平成17年5月現在で既にBlast Bankのサンプル数は600例を越えており、純化細胞のゲノミクスプロジェクトとしては世界最大級といえる¹¹⁾。

では具体的にBlast Bankを用いて白血病の予後予測が可能か否か検討してみよう。我々はヒト全遺伝子が配置されたDNAチップを用いて標準