

図1 DNAチップのスキャン画像

cDNA チップ (A) およびオリゴヌクレオチドチップ (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。

色素で標識された cDNA を作成し、組織 B からは赤色の蛍光で標識した cDNA を作成したとする。両者を混合し cDNA チップとハイブリダイズさせると、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、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黄色のスポットとして見える (図 1A)。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。なおオリゴヌクレオチドチップの場合は、上述のような Cy3 と Cy5 の二重染色による二検体間発現比較でなく、一種類の検体を一種類の蛍光染色で解析することの方が多 (図 1B)。したがって一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、他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ー上で比較することになる。近年多くの疾患において DNA チップを用いた網羅的発現解析が行われ、新たな診断マーカーの同定や予後予測法の開発などが試みられた。現在 DNA チップによる疾患解析の第一段階が終了したところであり、これからいわば「第二世代」の DNA チップ解析がスタートしようとしている。今後の DNA チップ解析の展開において重要なポイントとして、「サンプルのバックグラウンドを揃える」点と「バイオインフォマティクスの進歩」があげられる。

1. BAMP スクリーニング

例えば健常人や各種白血病患者の骨髓単核球全体を DNA チップによって単純に比較すると、各個人の骨髓構成成分の違いに起因する遺伝子発現

パターンの違いを主に観察することになり、極めて偽陽性の多い効率の悪い解析を行わざるを得ない。したがって骨髓中の芽球の割合や芽球の分化傾向の違いなどに影響されない解析を行うためには、「解析したいポイント」以外の点でできるだけ形質・バックグラウンドを揃えたサンプルを予め純化し、これを用いてDNAチップ解析を行うことが重要であろう。

例えば抗癌剤が有効であった時期と、再発し治療抵抗性になった時期を比べて薬剤感受性を規定する遺伝子を同定するのであれば、両時期の患者骨髓より白血病細胞のみを純化し比較することが有効なはずである。我々はこのようにバックグラウンドを揃えた細胞分画を用いて網羅的解析を行う方法論を「Background-matched population (BAMP) スクリーニング」として提唱する³⁾。最近のDNAチップ解析ではこのようなアプローチによる報告が増えつつある。

1) Blast Bank

様々な白血病をBAMPスクリーニングにて解析する場合を考えてみると、これらに共通して存在する疾患分画を純化する必要がある。それは具体的にどのような分画であろうか？

急性骨髄性白血病 (acute myelogenous leukemia: AML) や慢性骨髄性白血病 (chronic myelogenous leukemia: CML), 骨髓異形成症候群などの疾患はいずれも造血幹細胞あるいはそのごく近傍の未分化細胞の悪性転化によって発症すると考えられる。そこでこれらの疾患で共通に含まれる分画である造血幹細胞相当分画を予め純化・保存し、これを用いて比較すれば各白血病芽球の骨髓中の割合や分化傾向などに影響されない偽陽性の

少ないゲノミクス解析が可能になると期待される。我々は各種白血病のBAMPスクリーニングを目的として、白血病患者骨髓より造血幹細胞分画のみを同分画特異的細胞表面抗原であるCD133に対するアフィニティカラムを用いて純化保存する大規模バンク事業を開始した (Blast Bank と命名)³⁾。

CMLは比較的症状の少ない慢性期 (chronic phase: CP) を数年経た後、移行期 (accelerated phase: AP) から、極めて予後不良な急性転化期 (blastic crisis: BC) へと変化する。CPがPh1染色体転座の結果発症することは示されているが、どのようなメカニズムでAP/BCへと悪性転化するかは全く不明である。そこで大嶺らはBlast Bank中のCMLサンプルを用いて、CPからAP/BCへの移行に伴って発現量が変化する遺伝子群の解明を試みた。その結果AP/BCへ移行すると発現が著明に減少する遺伝子としてdeath-associated protein kinase 3 (DAPK3) およびPIASyが同定された (図2)⁴⁾。

PIASyはもともとSTAT1の機能を抑制する細胞内分子として同定され⁵⁾、現在はさらに細胞内蛋白分解系への関与も示唆されている⁶⁾。大嶺らはPIASyの発現低下がCMLにおける病期進行メカニズムに直接関与している可能性を検証する目的で、同遺伝子をCML BC期由来の細胞株に導入し、細胞増殖が抑制される可能性を検討した。その結果図3に示されるように、PIASyの発現誘導に伴って著明なアポトーシスが認められることがわかった。したがってPIASyは単に遺伝子マーカーとして有用だけでなく「癌抑制遺伝子」としての機能があることが示され、PIASyの発現低下

《略語一覧》

BAMP (background-matched population)

CML (chronic myelogenous leukemia; 慢性骨髄性白血病)

CP (chronic phase; 慢性期)

BC (blastic crisis; 急性転化期)

AML (acute myelogenous leukemia; 急性骨髄性白血病)

AP (accelerated phase; 移行期)

DAPK3 (death-associated protein kinase 3)

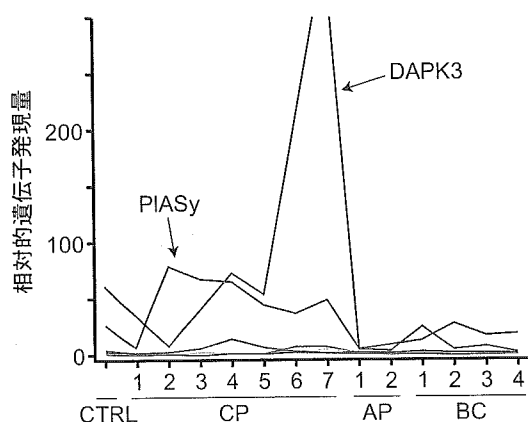


図2 CML 初期特異的遺伝子の同定
(文献4より改変)

CML 各病期のサンプルを用いて DNA チップ解析を行い、正常～CML CP 期特異的に発現し、病期が進行すると発現が低下する遺伝子を同定した。PIASy および DAPK3 遺伝子の発現が病期の進行に伴って低下していることがわかる。

が CML 病期進行の新たなメカニズムである可能性が注目されるに至った。

2) 多発性骨髄腫

では造血幹細胞以外の分化レベルで癌化が生じている疾患は、どの様にアプローチするべきであろうか。例えば多発性骨髄腫は悪性形質細胞が増殖する疾患であるし、顆粒リンパ球増多症は成熟 T 細胞あるいは NK 細胞の原因不明の異常増殖を特徴とする。そこでこれら疾患の BAMP スクリーニングのためには、形質細胞、成熟 T 細胞あるいは NK 細胞をそれぞれ純化して比較することが必要であろう。

形質細胞は細胞表面に CD138 を特異的に発現しており、これは多発性骨髄腫細胞においても同様である。Zahn らは CD138 に対するアフィニティカラムを用いて、健常人、良性単クローン性高ガンマグロブリン血症患者、および多発性骨髄腫患者より形質細胞のみを純化し DNA チップに

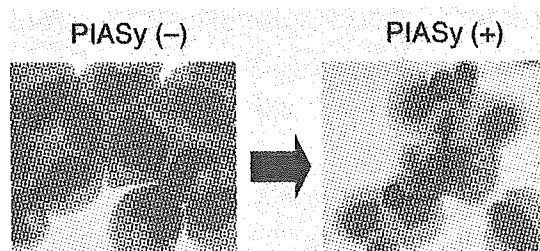


図3 PIASy 発現によるアポトーシス誘導
(文献4より改変)

CML BC 期由来の細胞株である KCL22 に PIASy の発現を誘導したところ (+)、非発現状態 (-) に比べて著明な細胞のアポトーシスが誘導された。(ライトギムザ染色)

よる発現解析を行った⁷⁾。その結果多発性骨髄腫患者が大きく 4 種類のサブグループ (MM1 ～ MM4) に分類可能なこと、またその中で多発性骨髄腫細胞株に類似した発現プロファイルを持つ MM4 の患者は予後不良なことが示された。また多発性骨髄腫の新たな診断マーカーも複数同定されている。

3) 顆粒リンパ球増多症

牧島らは T 細胞性顆粒リンパ球増多症の病態解明を目的として、CD4 陰性 CD8 陽性 T 細胞が増殖している患者末梢血より増殖分画のみを純化し、DNA チップによる発現解析を行った。また比較のために、年齢、性を一致させた健常人より同じ CD4 陰性 CD8 陽性 T 細胞分画を純化し同様な解析を行った⁸⁾。その結果、計 6 種類の遺伝子が疾患顆粒リンパ球特異的に発現していることが示された。これら疾患特異的遺伝子の中には、興味深いことにインターロイキン-1 β (interleukin: IL-1 β) 遺伝子が含まれていた。

IL-1 β は強力な炎症反応惹起因子であり、慢性関節リウマチにおける関節障害にも関与していると考えられている。顆粒リンパ球増多症患者の合併症として慢性関節リウマチはしばしば観察され

《略語一覧》

IL (interleukin; インターロイキン)

るため、IL-1 β の増殖リンパ球における高発現は慢性関節リウマチ合併の原因としての可能性も示唆される。牧島らは患者および健常人の血中IL-1 β 濃度も測定し、同因子が患者血中においてのみ高値を示すことを明らかにした(図4)。

2. バイオインフォマティクスの充実

DNA チップ実験は膨大な量の遺伝子発現データを産生する。この中から各実験目的に即した遺伝子セットを抽出するのは簡単ではない。そのためにはバイオインフォマティクスの進歩が不可欠であるが、この分野も未だ黎明期にある。ここでは現在使用され始めているいくつかの方法論を紹介したい。

例えばAMLと急性リンパ性白血病(acute lymphocytic leukemia: ALL)とを鑑別診断する際、単一の遺伝子マーカーで全症例を判断するのは難しい。したがって実際には両グループで最も発現パターンが異なる複数の遺伝子群の発現パターンから判断することになる。このような例において「weighted-vote method」のような統計的手法が有用となる。まず予め診断が確定しているサンプルのDNAチップを行い両グループ間で最も発現が異なる遺伝子群を選び出す。このときの発現量の絶対値とグループ特異性を基に各遺伝子の有用性=重み(weight)を計算する。次に診断したいサンプルのDNAチップ解析を行い、得られた診断用遺伝子の発現量を「重み」に掛け合わせ、サンプルの診断を行うのである。Golubらは本法を応用してAMLとALLとのDNAチップによる鑑別診断を試みている⁹⁾。

一方、DNAチップの発現プロファイルを基に、これまでの形態学的診断とは異なる疾患分類を

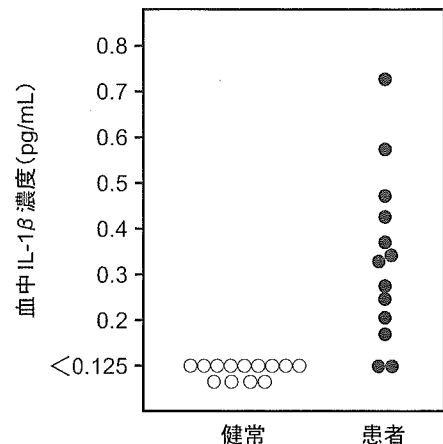


図4 T細胞型顆粒リンパ球増多症患者の血中IL-1 β 濃度(文献8より改変)
健常人およびT細胞型顆粒リンパ球増多症患者(いずれも13例)の血清IL-1 β 濃度をELISA法にて測定しプロットした。患者サンプルにおいてのみ血中IL-1 β が高値であることがわかる。

行うことも可能である。このような場合「主成分分析法」などが用いられる。小児ALLは一般に治療反応性が良いが、mixed-lineage leukemia (MLL) 遺伝子の転座の存在は重要な予後不良因子である。ArmstrongらはMLL染色体転座を持つ白血病が、果たして一般的なALLと異なった遺伝子発現プロファイルを持つ疾患か否かをDNAチップを用いて検証した¹⁰⁾。主成分分析法によって各サンプルにおける最も特徴的な遺伝子発現パターンの類似性を比較したところ、AML, MLL転座型ALLおよびMLLの転座を認めないALLの3群が大きく異なる疾患グループであるとの結論が得られた。すなわち、MLL転座型白血病はこれまでALLとして分類されてきたが、AML, ALLとは異なる第3の急性白血病とすべきではないか、と提唱されている。

《略語一覧》

ALL (acute lymphocytic leukemia; 急性リンパ性白血病)

MLL (mixed-lineage leukemia)

おわりに

DNA チップもその新規性で話題となった時期を過ぎ、真にその有用性が問われる段階に至った。未だなお高額な DNA チップシステムを用いることが本当に医学・医療に「pay する」のかを見直す必要がある。

ヒトゲノムプロジェクトの成果は、医学にとって極めて貴重(かつ膨大)な情報リソースであり、この有効活用なくして 21 世紀の医療は成り立たないであろう。必ずしも DNA チップが理想のシステムとは言えないが、現段階でヒトゲノム情報の利用に関して DNA チップを超える技術は存在しない。本稿で述べたような、サンプルの注意深い選択、バイオインフォマティクスの活用などを前提とすることで、真に医学に貢献する DNA チップ解析が可能になると思われる。

文 献

- 1) Peltonen L and McKusick VA: Genomics and medicine. Dissecting human disease in the post-genomic era. *Science* 291 : 1224, 2001
- 2) Cheung VG, et al: Making and reading microarrays. *Nat Genet* 21 : 15, 1999
- 3) Miyazato A, et al: Identification of myelodysplastic syndrome-specific genes by DNA microarray analysis with purified hematopoietic stem cell fraction. *Blood* 98 : 422, 2001
- 4) Ohmine K, et al: Characterization of stage progression in chronic myeloid leukemia by DNA microarray with purified hematopoietic stem cells. *Oncogene* 20 : 8249, 2001
- 5) Nelson V, et al: A putative protein inhibitor of activated STAT (PIASy) interacts with p53 and inhibits p53-mediated transactivation but not apoptosis. *Apoptosis* 6 : 221, 2001
- 6) Sachdev S, et al: PIASy, a nuclear matrix-associated SUMO E3 ligase, represses LEF1 activity by sequestration into nuclear bodies. *Genes Dev* 15 : 3088, 2001
- 7) Zhan F, et al: Global gene expression profiling of multiple myeloma, monoclonal gammopathy of undetermined significance, and normal bone marrow plasma cells. *Blood* 99 : 1745, 2002
- 8) Makishima H, et al: DNA microarray analysis of T cell-type lymphoproliferative disease of granular lymphocytes. *Br J Haematol* 118 : 462, 2002
- 9) Golub TR, et al: Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science* 286 : 531, 1999
- 10) Armstrong SA, et al: *MLL* translocations specify a distinct gene expression profile that distinguishes a unique leukemia. *Nat Genet* 30 : 41, 2002

©「現代医療」Vol. 35 No. 12 2003. 別刷

基礎

プロテオミクスによる疾病解析

間 野 博 行

自治医科大学分子病態治療研究センター ゲノム機能研究部 (教授)

株式会社 現代医療社

プロテオミクスによる疾病解析

間 野 博 行

自治医科大学分子病態治療研究センター ゲノム機能研究部 (教授)

はじめに

ヒトゲノムプロジェクトの最初の成果であるドラフト配列が2001年に公表され¹⁾、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(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/guide/human/>)。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、今後の疾患解析においてもこの膨大なゲノム情報を積極的に利用することが重要な視点となるであろう。

では、実際に我々が利用できる疾患解析アプローチとしては、どのようなものがあるのだろうか。代表的な方向性を表1にまとめてみたが、大きく「核酸の解析」と「蛋白質の解析」に分類することができる。遺伝子“gene”に「集合・総体」を意味する接尾語である“-ome”を付加して“genome”という言葉が作られ、特定の生物種の遺伝子全体を意味するように、最近では蛋白質“protein”に“-ome”を付けて特定の種あるいは組織における蛋白質全体を指し示す“proteome”(プロテオーム)という名称が用いられる²⁾。また、特定の遺伝子ではなくgenome全体を解析する手法を意味する言葉と

して、“-ics”という「技術」を表す接尾語をさらに付加した“genomics”(ゲノミクス)が作成され、同様にプロテオームを解析する技術に“proteomics”(プロテオミクス)という名前が付けられた。したがって、表1はゲノミクスとプロテオミクスの解析法のリストと考えてよい。

ゲノミクスにはゲノムの塩基配列を直接解析する手法と、そこから生じる mRNA の発現様式を測定する手法に分けられる。塩基配列異常は、おもに SNP(single nucleotide polymorphism)などの遺伝的素因をゲノムワイドでスクリーニングすることにより、生活習慣病の素因を定量化したり、薬剤の反応性を予測することが重要な解析目標となる。一方、遺伝子発現量の定量法としては DNA マイクロアレイ³⁾、サブトラクションクロニング法および SAGE(serial analysis of gene expression)法⁴⁾などが挙げられる。これらの大規模スクリーニングを通して疾患の新しい診断マーカーの同定や発症機構の解析が求められている。

しかし、遺伝子の mRNA レベルでの発現量は、その蛋白産物量との相関が驚くほど低いことも明らかになりつつある^{5,6)}。すなわち転写

表 1. ゲノム情報を利用した疾病解析

1	塩基配列異常解析
a)	一塩基多型の解明
b)	欠失, 挿入などその他の塩基配列異常の同定
2	遺伝子発現プロファイル
a)	DNA マイクロアレイ
b)	サブトラクションクローニング
c)	SAGE 法
3	プロテオーム解析
a)	二次元電気泳動
b)	質量分析
c)	プロテインチップ
d)	組織マイクロアレイ
e)	蛋白間相互作用の網羅的スクリーニング

後の修飾が遺伝子産物の量に大きく影響すると考えられ, やはり DNA マイクロアレイなどを用いた mRNA の定量だけでは片手落ちになる. 今後はプロテオミクスを用いたアプローチの重要性はさらに増すであろう.

二次元電気泳動と質量分析

蛋白質に関する大規模スクリーニングは疾患の病態解析の上で必須であろうが, 現段階で遺伝子発現プロファイリングにおけるマイクロアレイのような優れたスクリーニングシステムがプロテオミクスにおいては存在しない. 感度の面でも, また一度に解析できる蛋白数の面でも現行のツールはいずれも発展途上にある. 今日において最もスタンダードなプロテオミクスツールは二次元電気泳動と質量分析法の組合せであろう.

蛋白質をその分子量によって展開する電気泳動が, 一般に用いられている SDS-PAGE (SDS-polyacrylamide gel electrophoresis) 法である. しかし, SDS-PAGE では一度に解析・比較できる蛋白質の種類が少なく, ヒトが

持つと予想される 10 万種類以上の蛋白質を解析するには不十分である. 一般に蛋白質は荷電アミノ酸の総和に依存した形でそれぞれ固有の等電点 (pI) を持つ. そこでまず蛋白質群を等電点に沿って一次元目で展開し, 次に SDS-PAGE を行って分子量で展開する二次元電気泳動法が O'Farrell らによって開発された (図 1a). 優れた二次元電気泳動によって数千種類の蛋白質スポットが同定可能である. そこで二次元電気泳動によって蛋白質を展開し, 異なったサンプル間で比較することで, 分子量あるいは pI が変化する蛋白質スポットをスクリーニングすることができる.

実際には市販の蛋白スポット比較用ソフトウェアを用いることが多いが, 網羅的にゲルイメージ群を比較し, 発現量, pI あるいは泳動パターンなどが変化したスポットに含まれる蛋白質を同定する. 旧来であれば, 得られたスポットから蛋白質を回収し適当な酵素で消化した後, Edman 分解によってアミノ酸を決定していた. そのためにはスポットあたり 1 pmole 前後の蛋白質が必要であり, マススクリーニングには不適切であった. しかし, ヒトゲノム情報の充実によってまったく新しい蛋白質同定法である「質量分析法」が主流となりつつある. たとえば同定したい蛋白質をトリプシンで消化すると, 塩基性アミノ酸の C 末側でペプチド結合が切断され, リジンまたはアルギニンを C 末端に持つペプチドの混合物が生成される (図 2). これを MALDI-TOF タイプなどの高精度質量分析計にかけて, それぞれのペプチドの精密な質量を測定する⁷⁾. この質量分析計は短時間に微量のサンプルを大量に処理可能であり, 今日のシステムでは 1~10 fmole のペプチドの測定ができる. 本機器の発達とゲノム情報の充実が現在のプロテオミクス台頭の 2 本柱といえよう.

さて質量分析計で, たとえば分子量 1640.75, 2233.57, 3608.87 の 3 本のペプチドの質量が

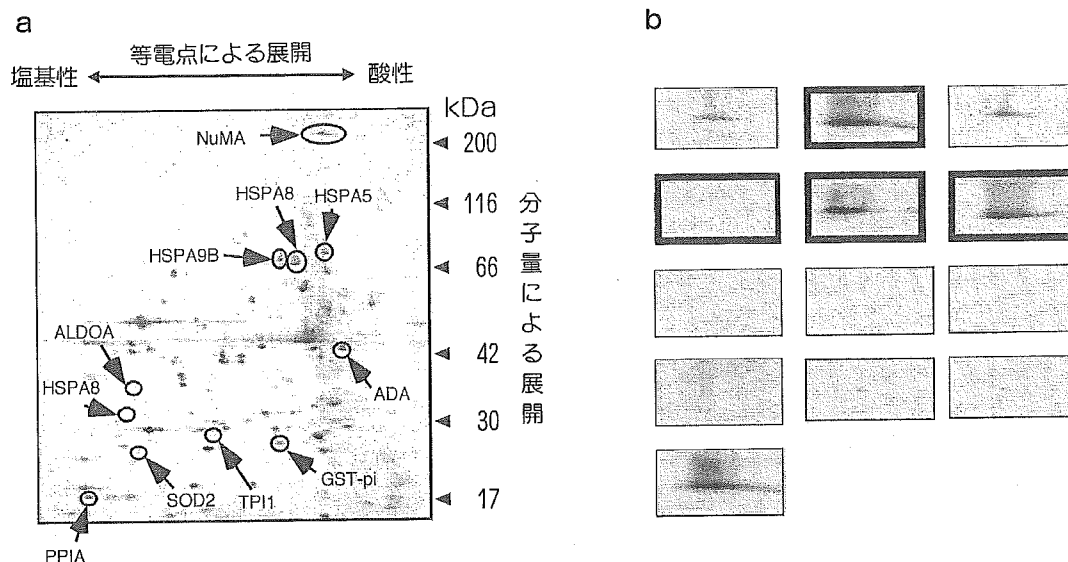


図 1. 二次元電気泳動の実際

- a：細胞質可溶画分をアクリルアミドゲル中で蛋白質の等電点(pI)および分子量に従って展開した。得られたゲルを銀染色した結果、数百種類の蛋白質スポットが同定可能であった。
- b：さまざまな白血病患者サンプルにおける NuMA1 蛋白スポットのイメージを示す。3 種類以上の染色体転座を伴う症例から得られたサンプルは太枠で示される。

(文献 11 より改変引用)

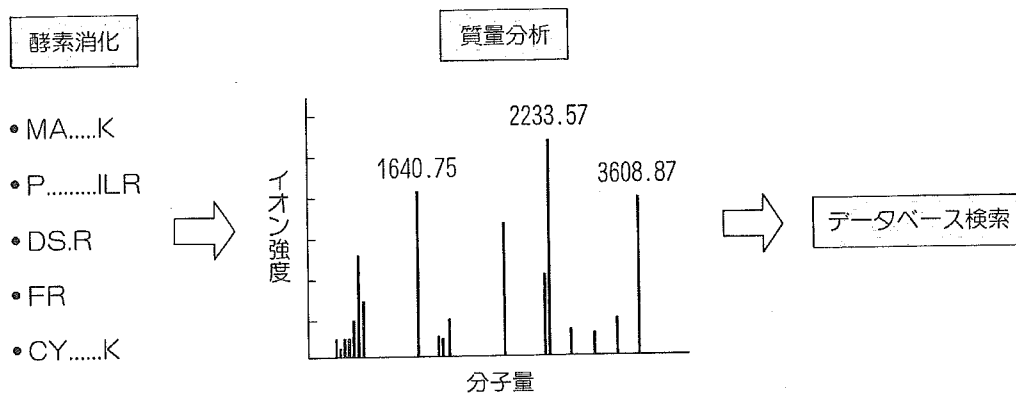


図 2. 質量分析計を用いた蛋白質同定法

同定したい蛋白質をたとえばトリプシンで消化すると C 末端がリジン(K)かアルギニン(R)残基のペプチドが複数産生される。これを質量分析計にて解析し、ペプチドの正確な質量を測定する。蛋白質データベースを検索し、トリプシンで消化した場合に測定された分子量のペプチド群を産生し得る蛋白質を同定する。多くの場合において 1 種類の蛋白質を決定可能である。

決定したとしよう。これらの情報から元の蛋白質が決定できるのであろうか。実は多くの例で可能なのである。4種類のほぼ同じ分子量の塩基の組合せからなる核酸と違い、蛋白質を構成するのは大きく分子量が異なる20種類以上のアミノ酸である。したがってまったく同じ分子量のペプチドはアミノ酸配列がまったく同じである以外には、ほとんど存在しない。しかも、一つの蛋白質から得られる複数のペプチドがまったく同じ分子量であることは、まずあり得ない。ゲノムプロジェクトの進行に伴ってヒトの遺伝子の全構造がかなりの程度分かってきた。言い換えれば、ヒトにおいて作られる全蛋白質が決定されつつあるということである。それぞれの蛋白質をトリプシンで消化した際に得られるペプチドの分子量は、元のアミノ酸配列が分かっているれば一義的に決定される。そこで、たとえば上述の3本の分子量のペプチドを同時に産生し得る蛋白質がデータベース中にあるかどうかを検索するのである。データベースが正確でかつペプチドが単一の蛋白由来であれば、かなりの確率で元になった蛋白質がたった一つ同定される。先の3本のペプチドを産生し得るのはヒト Tec チロシンキナーゼだけである。こうして、それぞれの蛋白質のアミノ酸配列情報が分からなくてもトリプシン消化ペプチドの分子量の組合せだけから元の蛋白質が決定される。ゲノム情報の精度と予想蛋白質の情報が充実するに従い、決定不能な蛋白質は急速に減少していくと予想される。

BAMP スクリーニングの重要性

しかし、実際に疾病解析目的で患者サンプルのプロテオームを比較すると本法が意外にも偽陽性の多い解析方法であることに気付く。たとえば、健常者と白血病患者の骨髓間でプロテオミクス比較を行う場合を考えてみよう。健常者の骨髓が多様な系統の細胞からなるヘテロな集団であるのに比し、白血病患者骨髓ではきわめ

て未分化な白血病細胞が骨髓細胞の過半数を占めることが多い。遺伝子発現プロファイルだけでなく、プロテオームも細胞の分化に伴い大きく変化することが知られており⁸⁾、健常者と白血病患者の骨髓細胞の単純な比較を行えば、検体の構成成分の変化自体に起因するプロテオーム変化を検出してしまうのは当然である。

このような偽陽性を最小に押さえるためには、比較する検体から「癌化しているか正常か」などの着目するポイント以外の細胞の特性をできるだけ揃えた分画をあらかじめ純化し、これを直接比較することが重要であろう。我々はこのようなゲノミクス・プロテオミクスアプローチを BAcground-Matched Population (BAMP) スクリーニングとして提唱する⁹⁾。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。そこで白血病解析の場合であれば、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プロテオーム比較を行えば、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 AC133¹⁰⁾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⁹⁾。平成15年2月現在ですでに Blast Bank のサンプル数は400例を超えており、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。さまざまな急性白血病患者骨髓より得た Blast Bank サンプルを二次元電気泳動で展開し比較したところ、図1aに示されるように約10種類ほどの蛋白質スポットが疾患間で大きく変化することが明らかになった¹¹⁾。たとえば NuMA1 蛋白の発現量は図1bに示されるように患者間で異なるが、興味深いことに白血病の複雑な染色体異常の有無に NuMA1 の発現量が有意に

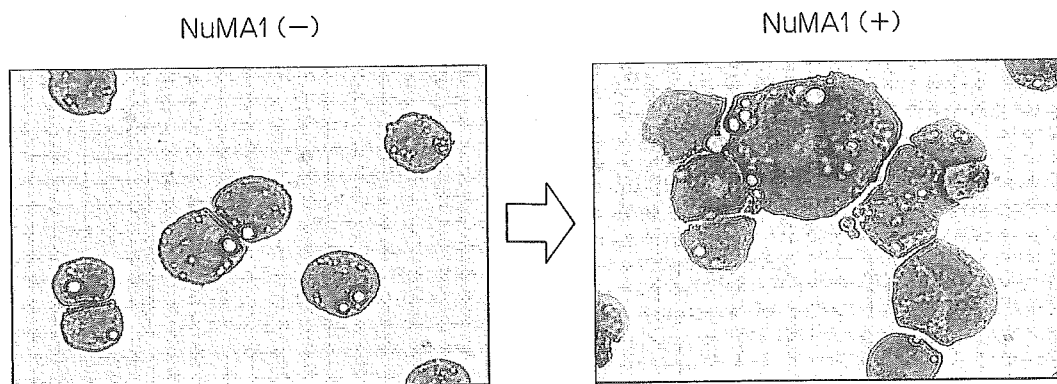


図 3. NuMA1 高発現に伴う多核化

ヒト NuMA1 cDNA を発現誘導ベクターを用いてマウス骨髄系細胞株 32D に導入した。発現抑制条件(-)または誘導条件下(+)にて4日間培養後、細胞のサイトスピンサンプルを Wright-Giemsa 溶液にて染色した。NuMA1 発現に伴い細胞の著明な多核化とアポトーシス誘導が確認される。
(文献 11 より改変引用)

リンクしていることが明らかになった。

NuMA1 は細胞分裂の際に認められる「紡錘系」の形成に重要な役割を果たすことが知られる¹²⁾。したがって、もし NuMA1 の異常な高発現が正常の細胞分裂に障害となるのであれば、白血病細胞における染色体数異常・核型異常の原因となっている可能性も考えられる。そこで、我々はマウス骨髄系細胞株 32D に発現誘導ベクターを用いて NuMA1 cDNA を導入した。同細胞で NuMA1 を誘導したところ、図 3 に示されるように NuMA1 の発現に伴って著明な多核化およびアポトーシスが誘導されることが分かった。このように特性を揃えた細胞間でプロテオーム解析をすることで、効率良く疾病の病態解明に近づくことが示された。

おわりに

遺伝子発現解析技術としての DNA マイクロアレイはハードの面では完成に近づきつつあり、全ヒト遺伝子の発現プロファイリングも夢ではない。本稿で述べたような BAMP スクリーニングの概念はマイクロアレイ解析でも本

質的であり、疾病の理解に大きく貢献するであろう。一方ゲノム配列それ自体あるいはプロテオームの多様性解析手法には、いまだマイクロアレイのような決定打が存在しない。しかし、ゲノム配列、転写調節、蛋白質の解析どれ一つとして疾病の解析のために欠かすことができない。プロテオミクスはサンプルの微量化および解析蛋白数の増加に向けて技術が急速に進歩しつつある。今後 10~20 年の医学研究は、これらの最新の技術を応用するポストゲノム時代として捉えることが可能であろう。

文 献

- 1) The genome international sequencing consortium: Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* **409** : 860, 2001.
- 2) Abbott A : Workshop prepares ground for human proteome project. *Nature* **413** : 763, 2001.
- 3) Duggan DJ *et al* : Expression profiling using cDNA microarrays. *Nat Genet* **21** : 10, 1999.
- 4) Velculescu VE *et al* : Serial analysis of gene expression. *Science* **270** : 484, 1995.
- 5) Gygi SP *et al* : Correlation between protein

- and mRNA abundance in yeast. *Mol Cell Biol* **19** : 1720, 1999.
- 6) Futcher B *et al* : A sampling of the yeast proteome. *Mol Cell Biol* **19** : 7357, 1999.
 - 7) Taniguchi H *et al* : A mass spectrometric study on the *in vivo* posttranslational modification of GAP-43. *J Biol Chem* **269** : 22481, 1994.
 - 8) Lian Z *et al* : Genomic and proteomic analysis of the myeloid differentiation program. *Blood* **98** : 513, 2001.
 - 9) Miyazato A *et al* : Identification of myelodysplastic syndrome-specific genes by DNA microarray analysis with purified hematopoietic stem cell fraction. *Blood* **98** : 422, 2001.
 - 10) Hin AH *et al* : AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* **90** : 5002, 1997.
 - 11) Ota J *et al* : Proteomic analysis of hematopoietic stem cell like fractions in leukemic disorders. *Oncogene* **22** : 5270, 2003.
 - 12) Compton DA, Cleveland DW : NuMA is required for the proper completion of mitosis. *J Cell Biol* **120** : 947, 1993.

ゲノム医学

(株) メディカルレビュー社

〒113-0034 東京都文京区湯島3-19-11 イトーピア湯島ビル

Tel.(03)3835-3043 Fax.(03)3835-3040

DNAチップによる造血器腫瘍の解析

Analysis of hematological malignancies with DNA microarray

Key Words

ゲノム用語解説109ページ～

⇒DNAチップ

⇒顆粒リンパ球増多症
(granular lymphocyte-proliferative
disorders ; GLPD)

間野博行

自治医科大学ゲノム機能研究部教授

はじめに

2000年6月にヒトゲノムのドラフトシーケンスが完了し、いよいよ「ポスト・ゲノム時代」が到来しようとしている^{1,2)}。21番や22番染色体などのようにすでに完全版のゲノムシーケンスが明らかになっているものもあり、2003年のヒトゲノム完全解読に向けて順調にゲノムプロジェクトが進行している (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/guide/human/>)。染色体の塩基配列が明らかになったからといって全ヒト遺伝子の同定・構造決定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。

現段階ではヒトのもつ総遺伝子数は4万前後と予想されており、これはしばらく前に予想されていた10万前後に比べて驚くほど少ない。たとえば体細胞が1,000個ほどしかない線虫の約2倍ほどの遺伝子数し

かないのである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、多様な蛋白質を産生しているのだと予想される。多細胞生物としてのヒトの複雑性にはこのような機構が関与しているのであろう。いずれにしろ、ヒトのかんりの遺伝子構造が(機能は不明であるにしろ)明らかになり、今後の医学研究において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全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なか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最

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 (高価ではあるが) 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 (あるいは健康人と) 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。

DNA チップによる悪性リンパ腫の解析

では、悪性リンパ腫を例にして具体的な解析結果を見てみよう。悪性リンパ腫はリンパ節の組織像、腫瘍細胞の起源、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/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についての分子レベルでの知見が得られている例は少なく、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、間接的に癌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。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なかには再発を繰り返すものも多い。

Alizadeh らは cDNA アレイを用いてびまん性大細胞リンパ腫のなか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⁵⁾。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、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。さらに Rosenwalds らはこの研究を発展させ、240 例のサンプルで解析した結果、発現プロファイルの面からは患者検体が上記 2 群とさらに第 3 のグループと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% と異なっていた⁶⁾。旧来用いられてきた予後予測法 (international prognostic index; IPI) 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。これらのデータは DNA アレイによる解析で非 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 アレイの新たな可能性を示したものとして意義深い。

では同じようなアプローチで、たとえば Hodgkin リンパ腫を解析可能であろうか? Hodgkin リンパ腫の腫大リンパ節中に実際の疾患責任細胞である Hodgkin 細胞/Reed Sternberg 細胞 (H/RS 細胞) はごく一部を占めるにすぎない。リンパ節内の多くを占めるのはさまざまな発達段階の正常リンパ球と炎症性浸潤細胞である。したがって、たとえばさまざまな Hodgkin 病患者リンパ節を DNA チップで単純に比較すれば、同定される遺伝子発現変化の多くは「正常リンパ球がどの程度残存しているか?」あるいは「炎症性細胞浸潤がどの程度顕著であるか?」を反映するであろう。すなわち旧来の顕微鏡的分類とあまり変わらない結果になるのではないだろうか? 実際最近の Hodgkin リンパ腫の発現解析はいずれも H/RS 細胞を単離・収集したうえで解析している^{7,8)}。非 Hodgkin リンパ腫のチップ解析が前述のような成果をあげられたのは、リンパ節内が比較的均一な diffuse large cell 型を対象とした点が大きいと思われる。

白血病類縁疾患の解析

このような比較する対象の選別は白血病類縁疾患の解析でも重要であろう。末梢血や骨髓血中の単核球全体を単純に比較するような実験は、骨髓や末梢血中の構成細胞成分の変化を反映するデータをもたらすと予想される。では、どのようにすれば偽陽性の少ないチップ実験が可能であろうか？ いまた例えば「疾患の発症メカニズム」を知りたいと仮定しよう。この場合は着目する「疾患の有無」以外の細胞の形質をできるだけ揃えた細胞分画を、健常人および患者よりあらかじめ純化したうえでチップ比較を行えばよい。

その一例として顆粒リンパ球増多症(*granular lymphocyte-proliferative disorders ; GLPD*)を検討してみよう。GLPDは細胞内にアズール顆粒を有する中～大型のリンパ球が末梢血中で原因不明に増加する疾患であり、多くは慢性の経過をとるが一部は急性白血病様の病態を呈し予後不良となる⁹⁾。増殖細胞の本態はT細胞の場合とnatural killer(NK)細胞の場合とがあるが、どちらの例においても病因・治療法のみならず、信頼できる診断法さえないのが現状である。ではたとえばT細胞性GLPDをDNAチップで解析するにはどうしたら良いであろうか。現段階では、T

細胞性GLPDには大きくCD4⁻CD8⁺リンパ球型のもの、とCD4⁺CD8⁻リンパ球型のものに分けられる。両リンパ球はその機能も細胞表面形質も大きく異なるため、単純にT細胞性GLPDということで両群をまとめて比較すればCD8タイプやCD4タイプの含まれる割合によって大きく結果が影響されるであろう。むしろどちらか一方に焦点を絞り、たとえばCD4⁻CD8⁺型のGLPD症例の末梢血より腫瘍分画であるCD8陽性細胞を純化して、健常人(できれば性別と年齢もマッチさせて)より集めた末梢血CD8陽性細胞とのあいだでチップ解析を行えば偽陽性の少ない解析が可能になると期待される。

Makishimaらはこのような仮定に基づいて、CD8陽性T細胞性GLPD患者および健常人末梢血より単核球を純化したのち、CD8に対するアフィニティカラムを用いてCD8⁺Tリンパ球を単離した。図1に示されるようにカラム操作の結果均一な中～大型のリンパ球(しばしば顆粒を含む)が純化されていることがわかる。健常人および患者各4例よりCD8⁺細胞を単離し、約3,500種類のヒト遺伝子が配置されたDNAチップにて遺伝子発現量を検定した¹⁰⁾。得られたデータをもとに「gene tree」を作成したのが図2Aである。この図によって遺伝子発現プロファイルの各サンプルの特徴を可視化することができる。その結果、計

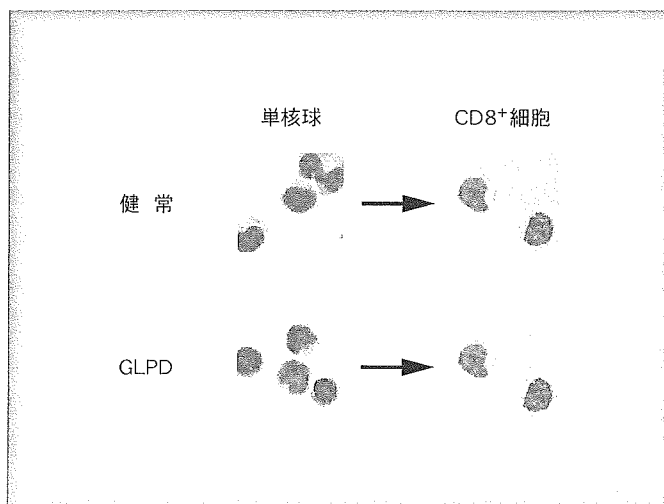
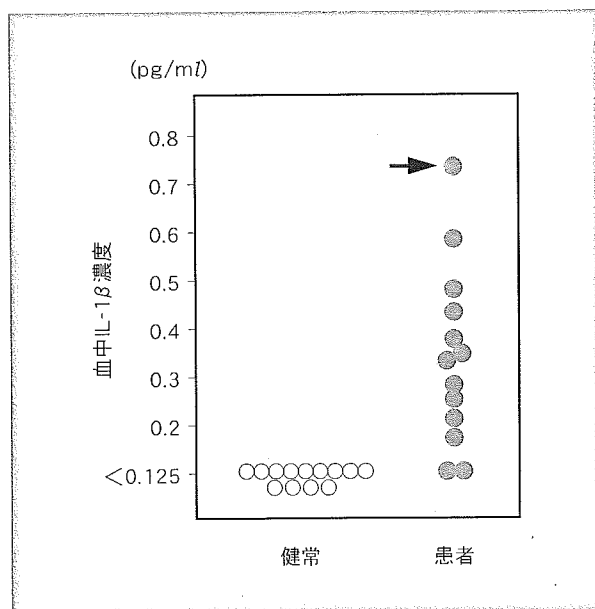
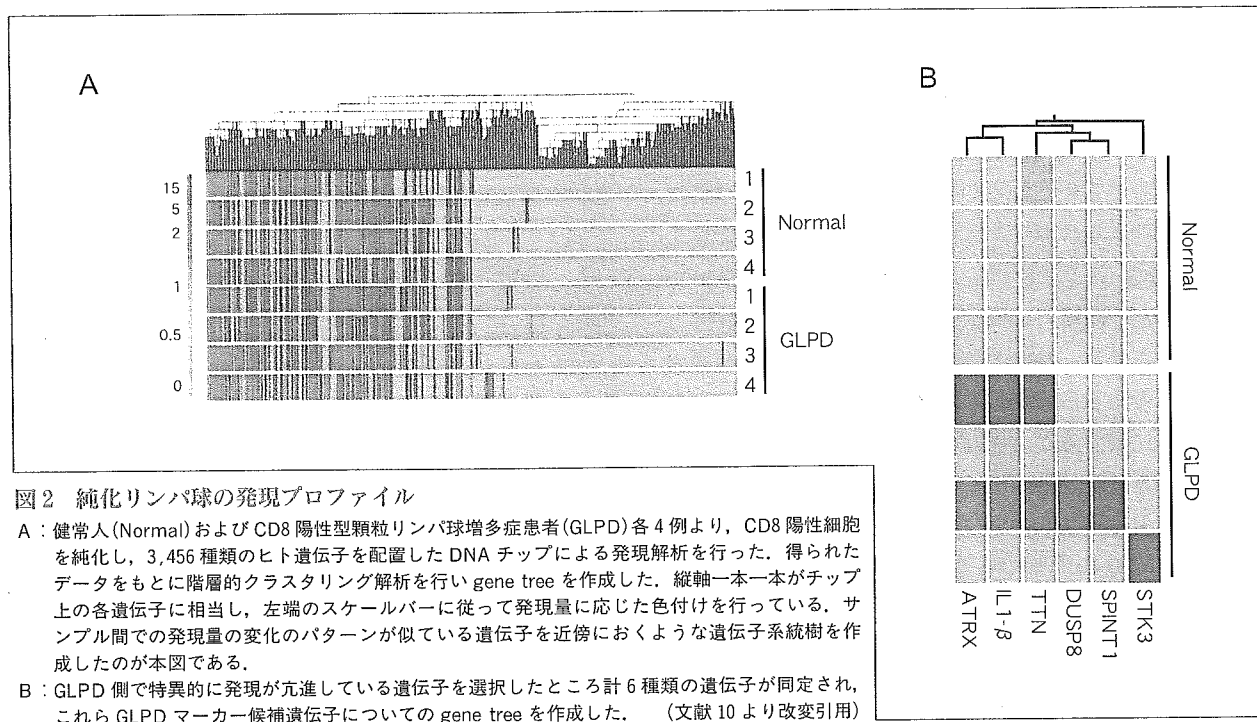


図1 顆粒リンパ球の純化

健常人および顆粒リンパ球増多症患者(GLPD)の末梢血より単核球を純化し、さらにそこからCD8陽性Tリンパ球を純化した。両者のサイトスピン標本をライト-ギムザ染色した図を示す。細胞質に顆粒を含むリンパ球が純化されていることがわかる。

(文献10より改変引用)



6種類の遺伝子が疾患顆粒リンパ球特異的に発現していることが示された(図2B)。

これら疾患特異的遺伝子のなかには興味深いことにインターロイキン-1 β (IL-1 β)遺伝子が含まれていた。IL-1 β は強力な炎症反応惹起因子であり慢性関節リウマチにおける関節障害にも関与していると考えられている。顆粒リンパ球増多症患者の合併症として慢性関節リウマチはしばしば観察されることより、IL-1 β の増殖リンパ球における高発現は慢性関節リウマチ合併の原因としての可能性も示唆される。そこで患者および健常人の血中IL-1 β 濃度も測定したところ、興味深いことに同因子が患者血中においてのみ高値を示すことが明らかになった(図3)。すなわちDNAチップ実験によって、疾患の病態理解に重要な知見が得られたといえる。

おわりに

DNAチップのコストを考えると、単に「DNAチップを使ってサンプルを解析してみました」というよ

うな報告が許される時代は終りつつある。これからは本当に疾患の病態理解に役立つ、あるいは新しい診断法・分類法の提唱につながる、チップ解析が求められるであろう。その場合重要なのは、研究者がチップ解析で「何を明らかにしたいか？」を明確にしたうえでプロジェクトをデザインすることである。本稿で示したT細胞性GLPD解析のような「純化細胞を用いたDNAチップ研究」は第二世代のDNAチップ研究として期待される。われわれは造血幹細胞近傍が疾患の発症の場である白血病についても、造血幹細胞分画を純化して比較することを試みており、その有効性を実証してきた^{11,12)}。極論すればDNAチップとはこれまでにない大規模なスクリーニング法の一つであり、それ以上でもそれ以下でもない。21世紀の医療において重要な柱である「ポストゲノム医療」が真に有用なものになるべく本邦からも独創的な報告がもたらされることを期待したい。

References

- 1) The genome international sequencing consortium: Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409: 860-921, 2001
- 2) Venter JC, Adams MD, Myers EW et al: The sequence of the human genome. *Science* 291: 1304-1351, 2001
- 3) The *C. elegans* sequencing consortium: Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. *Science* 282: 2012-2018, 1998
- 4) Duggan DJ, Bittner M, Chen Y et al: Expression profiling using cDNA microarrays. *Nat Genet* 21: 10-14, 1999
- 5) 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
- 6) 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* 346: 1937-1947, 2002
- 7) 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* 189: 1939-1946, 1999
- 8) 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* 97: 250-255, 2001
- 9) Semenzato G, Zambello R, Starkebaum G et al: The lymphoproliferative disease of granular lymphocytes: updated criteria for diagnosis. *Blood* 89: 256-260, 1997
- 10) Makishima H, Ishida F, Ito T et al: DNA microarray analysis of T cell-type lymphoproliferative disease of granular lymphocytes. *Br J Haematol* 118: 462-469, 2002
- 11) Ohmine K, Ota J, Ueda M et al: Characterization of stage progression in chronic myeloid leukemia by DNA microarray with purified hematopoietic stem cells. *Oncogene* 20: 8249-8257, 2001
- 12) Miyazato A, Ueno S, Ohmine K et al: Identification of myelodysplastic syndrome-specific genes by DNA microarray analysis with purified hematopoietic stem cell fraction. *Blood* 98: 422-427, 2001

白血病：診断と治療の進歩

IV. 白血病の最近のトピックス

1. DNAチップ

間野 博行

日本内科学会雑誌 第92巻 第6号別刷

2003年6月10日

トピックス

IV. 白血病の最近のトピックス

1. DNAチップ

間野 博行

要 旨

ヒトゲノム配列の解明に伴い人間の持つ全遺伝子情報が開示される日も近い。21世紀の医学・医療はこれら膨大なヒトゲノム情報の応用無くして成り立たないであろう。DNAチップはゲノム情報を利用した網羅的遺伝子発現定量システムであり、これまでとは異なった観点からの疾患の診断および病態解明が可能になると期待される。注意深くデザインされたDNAチップ実験によって白血病の根治に向けた臨床研究が加速されると予想される。

〔日内会誌 92：1030～1035, 2003〕

Key words：DNAチップ，DNAマイクロアレイ，ヒトゲノムプロジェクト，AC133

1. DNAチップとは

2001年2月にヒトゲノムのドラフト配列が公表され¹⁾，さらに完全版配列が明らかになった染色体も日々増え続けている。本年中にはヒト全euchromatin配列の完全版が公表されると予定されており，いよいよ「ポスト・ゲノム時代」が現実のものになりつつある。今後の「ヒトの多くの遺伝子構造が(機能は不明であるにしろ)明らかになった時代」においては，医学研究のあり方も大きく変化すると予想される。

例えばヒトの様々な疾患の発症機序を考えてみても，特定の遺伝子産物量が過剰になったり不足することが原因で発症することが多い。このような疾患の発症責任遺伝子を同定する際に，旧来であれば発現クローニング法やサブトラクション法あるいは連鎖解析を用いて全く未知の遺伝子を同定する必要があった。これは多大な労力と時間を要するアプローチでありしかも成

功率も必ずしも高くなかった。しかしヒトゲノムプロジェクトの完成に伴って全てのヒト遺伝子リストが明らかになれば，これからの医学研究は「膨大ではあるがあくまで有限な遺伝子プールの中から効率良く疾患関連遺伝子をスクリーニングする」ことに重点が移って行くであろう。このような大規模網羅的スクリーニングには，現在のところDNAチップ・DNAマイクロアレイ(以下DNAチップ)が最適なアプローチといえる²⁾。

DNAチップの原理はいわば超高密度ドットプロット法であり，一度に数千～数万種類の遺伝子の発現量を定量するために開発された。実際のDNAチップはスライドガラスなどの小さな担体上に，解析したい遺伝子由来の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，チップ上の配置全遺伝子の相対的発現量を一度の実験で明らかにすることが出来る。DNAチップの関連用語にはDNAマイクロアレイ，GeneChipなど様々な名称があり混乱しやすいので図1にDNAチップの種類を整理してみた。まずDNAを配置する担体のサイズから，ノーザン

まの ひろゆき：自治医科大学ゲノム機能研究部