

平成18年度

政策創薬総合研究
重点研究報告書（I）

目 次

課題番号		
KH11001	バイオフィotonicsを利用した細胞組織障害を視る、測る、解析する技術の開発	川西 徹 …… 1
KH11002	成長制御機構の解明と成長障害治療法の開発	緒方 勤 …… 16
KH12072	変異を克服した画期的抗ウイルス薬の開発	野口博司 …… 21
KH21004	動脈硬化症と血栓症にかかわるスフィンゴシン1-リン酸 (S1P) 受容体 (S1P3) の拮抗薬の開発	望月直樹 …… 30
KH21005	遺伝子改変動物を用いた病態関連因子の解明と創薬への応用に関する研究	田上昭人 …… 40
KH21006	病態時の侵害情報伝達に関与するプリン受容体の機能解明	井上和秀 …… 100
KH21007	蛋白立体構造異常を原因とするコンフォメーション病に対する病態解明と創薬探索システムの確立	桃井 隆 …… 126
KH21008	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	小川誠司 …… 144
KH21009	脂質代謝・機能の解明とその抗微生物薬開発への応用	花田賢太郎 …… 154
KH21010	繊維芽細胞の放出するmacrophage活性化因子とJAG1蛋白の関連と臓器繊維化の機序解明	香坂隆夫 …… 168
KH21011	血管におけるレクチンを介する生体防御システムの解明と創薬への応用	若宮伸隆 …… 181
KH21012	コネキシン遺伝子の癌抑制機能の網羅的解析；癌予防および治療への応用	矢野友啓 …… 196
KH21013	免疫グロブリン大量静注療法的作用機序解明と新しい治療標的分子の探索	阿部 淳 …… 208
KH21014	受精および初期胚発生における糖鎖の役割解析とその応用に関する研究	藤本純一郎 …… 221
KH21015	細胞内エネルギー代謝制御分子の機能発現機構の解明と新規治療薬への応用	江崎 治 …… 235
KH21018	アルツハイマー病における新規創薬ターゲット検索のための、APP細胞内ドメインの機能解析	中山耕造 …… 247
KH21019	創薬への応用を目標としたB細胞の分化・増殖・細胞死の制御機構解明に関する研究	上出利光 …… 262
KH21021	エンドトキシン認識・刺激伝達機構の解明と医療への応用に関する研究	西島正弘 …… 286
KH21022	ウイルスRNA結合ペプチドを用いたC型肝炎治療薬の開発	鈴木哲朗 …… 300
KH21023	末梢血幹細胞の分化増殖機構の解明と創薬への応用に関する研究	葛西正孝 …… 310
KH21101	DNAマイクロアレイによる多発性硬化症の迅速診断法の樹立に関する研究	佐藤準一 …… 318

KH22073	機能性精神疾患のハイスループットSNPs解析と機能解析による創薬標的分子の解明	功 刀 浩 …… 344
KH31024	超難溶性薬物の効率的製剤化に非晶質の特異性を活用する技術とその評価法の確立	吉岡澄江 …… 358
KH31025	生薬及び漢方処方of科学的品質保証に関する研究	合田幸広 …… 373
KH31026	食中毒細菌の新規迅速検査法の開発とその評価法に関する研究	工藤由起子 …… 390
KH31027	ハイスループット・ヒト型遺伝毒性試験系の構築	能美健彦 …… 402
KH31028	ヒト肝細胞で置換された肝臓を持つマウスの医薬品開発への利用ー非拘束マウスの胆汁採取分析技術の確立ー	吉里勝利 …… 417
KH31029	高度分析評価技術を応用した医薬品製剤開発および製造工程管理手法の研究	檜山行雄 …… 435
KH31030	患者個別化薬物治療のための遺伝子タイピング法及びメタボロミクス的手法の開発に関する研究	斎藤嘉朗 …… 449
KH31031	細胞医療に用いられる細胞組織利用医薬品の品質・安全性評価技術の開発	山口照英 …… 466
KH31032	医薬品等の有効性・安全性を保証するための分析・解析技術の評価と標準化に関する研究	林 讓 …… 481
KH31034	プロテオミクス及び構造生物学的アプローチ等を用いたバイオ医薬品の特性解析・品質評価技術の開発	川崎ナナ …… 494
KH31035	生物由来製品のウイルス安全性に関する基盤研究	内田恵理子 …… 509
KH31036	臨床薬理学的視点による薬効ゲノム情報活用のための基盤研究	東 純一 …… 525
KH32074	IT技術を用いた低コストかつ高品質な大規模臨床試験実施基盤の構築	永井洋士 …… 537
KH41037	抗フリーラジカル療法を目指した基盤研究と創薬への応用	網脇祥子 …… 551
KH41038	ボツリヌス神経毒素有効成分を利用したジストニア・痙縮等の治療法の確立と筋萎縮性側索硬化症に対するdrug delivery systemの開発	梶 龍兒 …… 566
KH42075	熱帯病・寄生虫症に対する稀少疾病治療薬の輸入・保管・治療体制の開発研究	名和行文 …… 576

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 東京大学大学院21世紀COE
研究者 小川 誠司

研究要旨 Affymetrix® GeneChip®を用いて正常試料の混入の著しい検体についてアレール特異的なゲノムコピー数解析を可能にする新規アルゴリズム AsCNAR を開発した。これを用いて種々の病型を含む計 1250 例の造血器腫瘍試料について高精度の網羅的ゲノムコピー数異常/アレール不均衡の異常の解析(molecular allelokaryotyping)を行い、造血器腫瘍の発症に関わる標的遺伝子(異常)の同定を行った。また、高密度タイリングアレイを用いた網羅的な DNA メチル化の解析システムを構築した。その他、B 細胞性リンパ腫における Notch2 遺伝子の活性化型変異、MDS における ETV6 遺伝子の発現異常、アイソフォームの異常が認められることを明らかにした。

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

造血器腫瘍の治癒率向上のためには、慢性骨髄性白血病(CML)に対するイマチニブや急性前骨髄性白血病に対するレチノイン酸に代表されるような、疾患の原因分子に対して特異的に作用する薬剤の開発が有効かつ重要である。

造血器腫瘍の発症に関しては、染色体転座、遺伝子の点突然変異、遺伝子増幅あるいは、遺伝子の欠失などのゲノムの異常、またメチル化などのエピジェネティックな変化が、その腫瘍化に関与することが知られているが、主要な染色体転座を除いて、従来有効な標的遺伝子同定の手段がなく、その具体的な標的遺伝子についての知見は極めて限られている。

本研究事業では、造血器腫瘍ゲノムに生ずるコピー数の変化・メチル化に着目し、マイクロアレイ技術を駆使して造血器腫瘍ゲノムに生ずるゲノムコピー数の変化、メチル化の異常を網羅的に探索し、これらの異常の標的となる遺伝子を同定することにより、分子標的薬・診断シ

ステム開発のための知的基盤を構築する。

B. 研究方法

1) CNAG/AsCNAR を用いた造血器腫瘍検体 1250 例の molecular allelokaryotyping (小川)

Affymetrix 社の SNP アレイ (GeneChip) により腫瘍ゲノムおよび正常人ゲノムを解析し、腫瘍試料でヘテロ接合を示す SNP 座について、同様にヘテロ接合を示す複数の正常試料を正常対照として利用することにより、アレール特異的なゲノムコピー数を算出するアルゴリズム (CNAG/AsCNAR) を作成した。1250 例の造血器腫瘍検体について、ゲノム DNA を抽出し、GeneChip 50K/250K アレイによる解析を行った。得られたアレイデータから、CNAG/AsCNAR プログラムを用いてアレール特異的なゲノムコピー数の変化およびアレールの不均衡の網羅的な解析を行った。

2) 造血器腫瘍における新規標的分子の同定 (小川)

1) の解析結果に基づいて、複数の試料で認められる異常について、発現の異常を RT-PCR 法を用いて解析した。また、dHPLC 法 / direct sequencing 法により変異解析を行った。同定された変異分子については、3T3 細胞でのトランスフォーメーションアッセイ等により機能的評価を行った。

3) タイリングアレイを用いた腫瘍ゲノムの網羅的メチル化解析 (小川)

腫瘍検体よりゲノム DNA を抽出後、4ug の DNA を超音波破碎により 400bp 程度に断片化し、抗メチル化シトシン抗体と抗免疫グロブリンF を用いて免疫沈降した。沈降産物を Sequenase と ampliTaQ により増幅し、得られた増幅産物をラベル化した後、タイリングアレイ上で 16 時間ハイブリダイズさせることにより、沈降物中のメチル化 DNA を同定した。

4) リンパ腫のゲノム解析 (竹内・小林)

国立がんセンターおよび癌研究会附属病院では、東京大学と平行して、マイクロアレイを用いたリンパ腫の標的遺伝子の探索を行う目的で、リンパ腫検体の収集(竹内)、および眼球付属器の MALT リンパ腫の GeneChip による解析(小林)を行った。

5) MDS における TEL 遺伝子の発現異常の解析 (三谷)

MDS 40 例および正常人の骨髓検体より RNA を抽出し、定量 PCR 法を用いた TEL 遺伝子の発現量の解析、RT-PCR 法による TEL アイソフォームの解析、および直接シーケンス法を用いた TEL 遺伝子の機能ドメイン変異解析を行った。また、TEL と機能的関連が深いと考えられる *p53*, *MDM2* および *KAP1* についても同様に遺伝子変異の解析を行った。

6) BAC クローンを用いた全ゲノムタイリングアレイの作成 (杉田)

約 32000 個からなるヒトゲノムを隙間無くカバーする BAC クローンより、96well plate 上で BAC DNA を微量調整し、DOP PCR 法により、各 BAC クローンを代表する non-repetitive DNA にとんだ PCR 産物を大量調整した。増幅した DNA を凍結乾燥後、70% DMSO 溶液に 1ug/ul の濃度で溶解したのち、アミノシランコートをしたガラススライド上に duplicate でスポットすることにより BAC アレイを作成した。正常 DNA および白血病細胞株 (HEL) 由来の DNA を用いてゲノムコピー数を測定することにより、アレイの性能評価を行った。

(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。

C. 研究結果

1) GeneChip を用いた造血器腫瘍のゲノムワイドなコピー数解析

我々があらたに開発した CNAG/AsCNAR を用いることにより、既存の SNP アレイデータについて、自己正常対照のアレイデータに依存することなくアレル特異的なゲノムコピー数の高感度な解析が可能であった。実際、意図的に正常細胞を混入した腫瘍検体における解析から、ゲノムに生じたアレル不均衡および LOH を 80-70% の正常細胞の混入下においても鋭敏に同定することが可能であった。

そこで、昨年度までに開発した 961 例に新たな症例を加えた 1250 検体(下表)のアレイデータを CNAG/AsCNAR を用いて解析を行った。

病型	検体数
急性骨髄性白血病 (AML)	144
急性リンパ性白血病 (ALL)	80
急性リンパ性白血病 (小児)	470
骨髄異形成症候群 (MDS)	153
骨髄増殖性疾患 (MPD)	53
慢性リンパ性白血病 (CLL)	56
慢性骨髄性白血病 (CML)	30
非ホジキンリンパ腫 (NHL)	150
成人 T 細胞白血病	102
JMML	12
計	1250

膨大な症例数の解析により、極めて多数のゲノムコピー数の異常を同定し、これをもとに各造血器腫瘍におけるゲノムコピー数異常の genome imbalance マップを作成した。染色体分析においても同定可能な染色体バンドレベルでの異常に加えて、従来のシステムでは同定不能な微小な領域の異常が多数同定され、腫瘍のタイプによって特異的に異常が集積する領域が明らかとなった。全てを概観することは困難であるが、例えば、399 例の小児 ALL の解析においては、9p13 に存在する PAX5 遺伝子を含む種々の不均衡転座が同定された。SNP アレイの高い解像度を利用することにより、これらの染色体転座の転座切断点の多くが直ちに同定され、小児 ALL において PAX5 が種々の遺伝子と融合遺伝子を形成することが明らかとなった。PAX5 の標的遺伝子の一つである CD19 遺伝子のプロモ-

ターを用いたこれらの転座で形成される融合遺伝子は、ドミナントネガティブに PAX5 の転写能を抑制することから、PAX5 遺伝子の不活化が小児 ALL の発症に重要な役割を担っていることが示唆された。

その他、MDS や悪性リンパ腫についても、これまでに報告されていない新たな標的遺伝子が同定された。MDS でしばしば点突然変異を来す MDS-A (lab name) では、特定のドメインに変異が集中しており、変異アレルはつねに UPD を生じて重複することが明らかとなった。本変異分子は *in vitro* で NIH3T3 細胞を強くトランスフォームすることから、MDS とくに高リスクの RAEB, CMMOL の発症に重要な役割を担う新たな標的分子であることが示された。

2) リンパ腫のゲノム解析

小林は、眼球付属器に発生する MALT リンパ腫 38 例について、小川と共同で GeneChip250K アレイを用いた網羅的なゲノムコピー数の解析を行い、これらの腫瘍に特徴的な染色体異常を同定した。また、竹内らは、3 種類の helicase 遺伝子について悪性リンパ腫におけるメチル化解析をおこない、ある種の helicase がリンパ腫で高頻度にメチル化されていることを見いだしている。

4) MDS の標的遺伝子 TEL の機能解析

骨髄異形成症候群の患者検体における TEL mRNA のアイソフォームの発現パターンの検討の結果、MDS から白血病に移行した症例において TEL のドミナント・ネガティブアイソフォームの発現が高頻度に認められた。また、32D 細胞において野生型 TEL は IL-3 存在下では増殖抑制に作用し、G-CSF 存在下ではアポトーシスを誘導した。この作用の一部は TEL が p53 の蛋白レベルを上昇させることによるものであることが明らかになった。

D. 考察

1) 造血器腫瘍ゲノムの網羅的解析

患者由来の腫瘍試料では、しばしば自己正常対照試料が得られておらず、また、高度の正常細胞の混入が認められ、コピー数解析における S/N 比の低下や SNP コールに依存した LOH/アレル不均衡の解析の性能が極端に低下する。本年度に我々が独自に開発した AsCNAR アルゴリズムによって、このような高度の正常細胞混入下に

においても、自己正常対照を必要とすることなく、腫瘍ゲノムに生じたアレル不均衡/LOH を高感度に検出することが可能となった。また、コピー数変化はアレル特異的に検出されるため、コピー数解析の S/N 比の大きな改善が得られる。本アルゴリズムの開発によって、SNP アレイの性能を極限まで引き出すことが可能となった。AsCNAR による解析では、ゲノムコピー数の変化とアレルの異常が分子レベルの解像度で検出することから、我々は molecular allelokaryotyping という概念を提唱し、昨年度までに解析した 961 例に加えて新たな試料の解析を追加した計 1250 例の造血器腫瘍について molecular allelokaryotyping を行った。

造血器腫瘍は病型により特徴的なゲノムプロファイルを示し、各病型のゲノム異常の解析から、各病型で共通して認められる標的遺伝子の候補が多数同定された。一例としては、小児 ALL における PAX5 であるが、本遺伝子は種々の遺伝子と融合遺伝子を形成することにより、その融合遺伝子産物がドミナントネガティブに PAX5 の転写活性を阻害する。PAX5 は B 細胞の分化に必須の転写因子であるから、小児 ALL では PAX5 融合遺伝子の形成によって PAX5 の機能が不活化される結果、ALL の発症が誘導される可能性が示唆される。また、骨髄異形性症候群で認められる MDS-A の変異は、強力に繊維芽細胞のトランスフォーメーションを誘導し、現時点での知見によれば、チロシンキナーゼ経路を活性化することにより、腫瘍化に関与することが推測される。また、眼球付属器由来の MALT リンパ腫においても特徴的なゲノム異常パターンがみとめられ、ゲノム診断の観点から、今後の臨床診断への応用が期待される。

2) 網羅的メチル化解析システムの構築

ゲノム網羅的なメチル化の解析技術の確立は昨年度からの課題であったが、本年度は抗メチル化シトシン抗体を用いた免疫沈降とタイリングアレイ上でのハイブリダイゼーションを組み合わせた高感度なメチル化 DNA 解析システムを構築することができた。今後、本法とプロモータータイリングアレイを用いて、多数の造血器腫瘍検体について網羅的なメチル化解析を行い、新規標的遺伝子の探索を行う予定である。

3) MDS における TEL 遺伝子の異常

MDS においては、TEL 遺伝子の発現低下、また、

機能的にドミナントネガティブとなるΔETS 型アイソフォームの発現が約 5 割の症例に見いだされ、TEL 遺伝子の機能的喪失が MDS の病態に関与している可能性が示唆された。

E. 結論

(1) 高度の正常細胞の混入を有する腫瘍試料について、自己正常対照に依存することなく、アレル特異的なゲノムコピー数の解析を可能とするプログラム AsCNAR を開発した。

(2) AsCNAR および SNP アレイを用いて、計 1250 例の造血器腫瘍試料の molecular allelokaryotyping を行うことにより、造血器腫瘍で病型特異的に認められるゲノムの異常の網羅的探索をおこなった結果、PAX5 その他の新規標的遺伝子、および標的遺伝子の候補を多数同定した。

(3) 抗メチル化シトシン抗体とタイリングアレイを用いたゲノム網羅的なメチル化 DNA 解析システムを構築した。

(4) MDS では TEL 遺伝子の発現低下、ドミナントネガティブタイプのアイソフォームが高頻度にとめられ、TEL の機能的活性の低下が MDS の発症に関与している可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Sanada M, Uike N, Ohyashiki K, et al. Unbalanced translocation der(1;7)(q10;p10) defines a unique clinicopathological subgroup of myeloid neoplasms. *Leukemia*. 2007.
2. Jacobs S, Thompson ER, Nannya Y, et al. Genome-wide, high-resolution detection of copy number, loss of heterozygosity, and genotypes from formalin-fixed, paraffin-embedded tumor tissue using microarrays. *Cancer Res*. 67:2544-2551, 2007.
3. Nakagawa M, Ichikawa M, Kumano K, et al. AML1/Runx1 rescues Notch1-null mutation-induced deficiency of para-aortic splanchnopleural hematopoiesis. *Blood*. 108:3329-3334, 2006.
4. Hosoya N, Sanada M, Nannya Y, et al. Genomewide screening of DNA copy number changes in chronic myelogenous leukemia with the use of high-resolution array-based

comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer*. 45:482-494, 2006.

5. Nakamura Y, Yamagata T, Maki K, Sasaki K, Kitabayashi I, Mitani K. TEL/ETV6 binds to corepressor KAP1 via the HLH domain. *Int J Hematol*. 84: 377-380, 2006.

6. Yamagata T, Maki K, Waga K, Mitani K. TEL/ETV6 induces apoptosis in 32D cells through p53-dependent pathways. *Biochem Biophys Res Commun*. 347:517-526, 2006.

7. Tokita K, Maki K, Tadokoro J, Nakamura Y, Arai Y, Sasaki K, Eguchi-Ishimae M, Eguchi M, Mitani K. Chronic idiopathic myelofibrosis expressing a novel type of TEL-PDGFRB chimera responded to imatinib mesylate therapy. *Leukemia* 21:190-192, 2006.

2. 学会発表

1. 真田 昌、山本 豪、南谷 泰仁、中崎 久美、王 莉莉、加藤 元博、細谷 紀子、半下石 明、千葉 滋、黒川 峰夫、小川 誠司 高密度 SNP アレイを用いた骨髄異形成症候群・骨髄増殖性疾患の網羅的なアレル不均衡/LOH の解析 一般口演 O-717 (第 64 回日本癌学会総会記事 p447)
2. 山本 豪、南谷 泰仁、真田 昌、中崎 久美、王 莉莉、半下石 明、細谷 紀子、千葉 滋、黒川 峰夫、小川 誠司 高密度オリゴアレイを用いた成人白血病における UPD の網羅的解析 一般口演 O-718 (第 64 回日本癌学会総会記事 p448)
3. 中崎 久美、真田 昌、南谷 泰仁、山本 豪、細谷 紀子、王 莉莉、半下石 明 1、黒川 峰夫、千葉 滋、小川 誠司 高密度オリゴヌクレオチドアレイを用いた慢性リンパ球性白血病の網羅的なゲノム解析 一般口演 O-715 (第 64 回日本癌学会総会記事 p447)
4. 南谷 泰仁、真田 昌、中崎 久美、山本 豪、王 莉莉、細谷 紀子、半下石 明、千葉 滋、黒川 峰夫、小川 誠司 小児急性リンパ性白血病の網羅的ゲノム解析 一般口演 O-714 (第 64 回日本癌学会総会記事 p447).

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

平成18年度

政策創薬総合研究
重点研究報告書(Ⅰ)

平成19年7月31日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団
〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号
共同ビル(小伝馬町駅前)4F
電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

印刷 株式会社 ソーラン社