

長鎖応用CGHアレイによる染色体7番長腕欠失領域からの責任遺伝子同定

●麻生博也

広島大学原爆放射線医科学研究所・がん分子病態

〈研究の目的と進め方〉

子宮筋腫は、高齢結婚、高齢出産の増加に伴い増加しつつある現代社会の婦人病であり、卵巣ホルモンの影響、子宮周辺の血流障害、環境ホルモンの影響、動物性たんぱく質の摂取過量、食生活の変化などが、現在原因として考えられている多因子疾患である。我々は、子宮筋腫の約20%に報告されている染色体7番長腕欠失に着目し、独自に開発した長鎖PCR応用CGHアレイによる解析を行うことにより、ここからの責任遺伝子単離を行い、子宮筋腫のゲノム異常を明らかにする。この方法は、未知、既知に関係なく随意に抽出した遺伝子配列の欠失、増幅を高感度に検出することを可能にし、染色体検査上不可視な微小遺伝子欠損(50-100kb)を特定する技術で、2002年度のがん特定研究をもとに開発し、現在特許申請準備中である。これまでに急性骨髄性白血病サンプルの解析を20例に関して終了しており、-7,20q-, +21等を効率よく検出することを確認している。7qに関しては、現在の3Mbの領域よりもよりテロメア側に共通欠失が存在することを確認し、さらにプローブを増やして検討を重ねている。

〈研究開始時の研究計画〉

1) サンプルの調整 研究所の教授会により構成される管理委員会により管轄されている約200例の子宮筋腫サンプルについてDNAの調整を行う。
2) プローブ作成 新しいアレイCGH法開発のためにこれまでに作成した74個のプローブに加え、7q21.3-7q31.1(20Mb長)の領域内に約250個の新しいプローブを、長鎖PCR産物をプラスミドベクターにクローニングする手法で作成する。プローブはゲノムデータベース上で、可能な限り繰り返し配列を排除するかたちで設計する。作成したベクター中に組み込まれたDNAをベクターの共通配列をプライマーとしたPCR法で増幅し、プローブDNAを精製する。作成したプローブをスライド上に、アレイ作成装置を用いスポットすることでアレイを作成する。
3) アレイ解析 ペアで得られた正常組織DNAと、検査対象となる子宮筋腫細胞DNAを、Cy3,Cy5でマルチプライム法にてラベルし、コンペティターDNAを加えた後濃縮遠心後、3) で作成したスライド上でハイブリダイズをし、洗浄を行い、スキャナーにより蛍光の読み取りを行う。データの数値化、統計処理を行い、欠失領域の同定と、候補となる遺伝子を決定する。
4) 遺伝子の解析 候補遺伝子の発現を、ヒトの各臓器、子宮筋腫から抽出したRNAを用い、RT-PCR、ノザン法にて解析する。子宮筋腫細胞に残る対立遺伝子側に、点突然変異や欠失などの異常があるか否かをRT-PCR産物の塩基配列を直接検索することで明らかにする。

〈研究期間の成果〉

当研究は、白血病からの遺伝子クローニングが、成功したため、子宮筋腫を用いた研究以前に、本遺伝子の機能解析を行うことが主たる成果となった。当該研究者は、三年の歳月をかけて開発した染色体微小欠失領域同定法(長鎖PCR支援アレイCGH法)により、7q微小欠失領域から有望な発がん抑制候補遺伝子TITAN(仮称)の単離に成功した。TITAN遺伝子は、1)新規遺伝子であり、2)既知遺伝子との相同性が皆無で、3)未分化造血幹細胞で高度に発現し、4)データベース上、高等脊椎動物(哺乳類、鳥類)に存在するが、下等脊椎動物(魚類、両生類)や線虫、昆虫にはない、5)7q欠失を伴う成人白血病細胞において特異的に発現が欠落している、といった特徴を持つ。以上の成果より、TITANが新しい発がん抑制遺伝子であると同時に、正常造血においても重要な役割を担う遺伝子である可能性が非常に高いと考えた。TITANのアミノ酸配列は、その機能を推定する手がかりを含んでいなかった。そこで全長cDNA単離、抗体作成に引き続き、(1)細胞内局在解析、結合するタンパク質の同定、立体構造解析などをおこなってその生化学的な機能解明をすすめると同時に、(2)ヒト/マウスの幹細胞や各系統の幼若な前駆細胞でのmRNAやタンパク質発現の検索、(3)遺伝子改変マウスの作成による個体レベルの機能解析、(4)遺伝子欠損マウスからの幹細胞の単離とその性状の解析、などの検討を進めた。現在までにTITAN遺伝子は、DNA二重鎖切断の遺伝子修復に関与する造血系の重要な遺伝子であることがわかった。特に、non-homologous end joiningの機構で機能する可能性を示唆する実験結果を現在までに得ている。

〈国内外での成果の位置づけ〉

染色体欠失異常の責任遺伝子の同定は、白血病研究における大きな課題であったが、家族性の造血器腫瘍がほとんどないこともあり、固形腫瘍と比較して非常に遅れていた。研究代表者が3年の歳月を費やして成功した7q欠失からの新規遺伝子単離は、この分野における大きなブレイクスルーである。7q欠失は化学療法、放射線被曝に関連した白血病や骨髄異形成症候群にも高頻度で認められる。したがって、薬物や放射線による造血幹細胞のゲノム障害が、TITANを標的に生じている可能性があり、TITANの構造機能と疾患に生じるゲノム異常パターンを解析することにより、これら二次性白血病の発生機序を明らかにできる可能性がある。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

遺伝子の機能解析が優先されたので、まだ子宮筋腫のサンプルで十分な解析ができていない。

〈今後の課題〉

現在作成中の、ノックアウトマウスの解析、作成したRNAiのノックダウンの細胞を用いた表現型の解析が急がれる。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

遺伝子クローニングの成果は、競争の激しい分野であり、機能解析を加え、論文としてひとまとめにして提出する予定なので、当該研究に限局した論文はない（学会発表、各省の班会議では、経過を報告している）