

ヒトゲノム二次元電気泳動法による疾患関連遺伝子の解明と仮想解析法への展開

●上田政和¹⁾ ◆関 博章¹⁾ ◆小長谷明彦²⁾

1) 慶應義塾大学医学部外科 2) 北陸先端科学技術大学院大学

〈研究の目的と進め方〉

ヒューマンゲノム研究の急速な進歩により、膨大なヒトゲノム配列情報や遺伝子情報が蓄積され、今後これらの情報をいかに臨床に応用するかが重要な問題となりつつある。ところで、多くの疾患が遺伝子の異常に基づき発生してくることが近年の分子生物学の進歩により明らかにされ、診断・治療への応用が期待されている。われわれは、ヒト癌とりわけ食道癌や乳癌において臨床特性を反映する遺伝子変化が存在し、これらの情報を利用した癌治療体系が可能であることを明らかにしてきた。しかし、従来の方法だけでは疾患特異的なDNA変化を見つけて出すことが困難な疾患も多くある。

Restriction landmark genomic scanning (RLGS) 法は、特定のプライマーやプローブを用いることなくゲノムの制限酵素断片を放射性同位元素でラベルしさらに制限酵素により断片化した後、電気泳動にて二次元に展開して一度に網羅的に遺伝子変化を検索する方法である。そこで、RLGS法を用いて多くの癌組織における遺伝子変化を検出し、それぞれの癌組織に特徴的な遺伝子変化を同定するとともに、その生物学的特性や臨床特性との関連をあきらかにする。

ところで、RLGS法により明らかにされるDNA変化は断片化されたものであり、しかも微量なので必ずしもその遺伝子構造やDNA構造を明らかにするのは簡単なことではない。そこで、ヒトゲノムプロジェクトの成果を踏まえて、仮想ヒトゲノム二次元電気泳動法を開発し、以上の問題点を解決しようとした。

〈研究開始時の研究計画〉

1. RLGS法によるヒト肝細胞癌における遺伝子変化の同定とその生物学的・臨床腫瘍学的特性
2. RLGS法によるヒト脳腫瘍における遺伝子変化の同定とその生物学的・臨床腫瘍学的特性
3. 12 RLGS法によるヒト乳癌における遺伝子変化とその生物学的・臨床腫瘍学的特性
4. ヒト末梢血ゲノムRLGSプロフィールの同定とデータベース化
5. 仮想大腸菌ゲノム二次元電気泳動法の確立
6. ヒトゲノムRLGSプロフィールのデータベース化
7. 仮想ヒトゲノム二次元電気泳動法の確立

〈研究期間の成果〉

1. RLGS法によるヒト肝細胞癌における遺伝子変化の同定とその生物学的・臨床腫瘍学的特性。

1) ヒト肝細胞癌肝切除例における癌部と非癌部のRLGSプロフィールを比較すると、5個のスポットが約40%の症例に共通して認められること、さらに症例ごとにスポットの変化数が異なっており、変化数が15以上ある症例ではそれ未満の症例に比較して、肝切除後の再発が高率であり累積健存率が低下していることを明らかにした。文献6

2) ヒト肝細胞癌に共通して変化していた5スポット

のうち非常に濃く発現する2スポットをクローニングしてその塩基配列を明らかにすると、それぞれヒト染色体8q21に位置するhuman tandem repeat sequenceと多くの染色体の中心部に位置しているcentromeric Not. clusterであった。さらに、両スポットのdensityは各症例に認められるスポット変化数と正の相関が認められ、かつdensityの高い症例は肝切除後の再発が高率で低い症例に比較して累積健存率は有意に低下していた。文献5

3) 上記の2スポットの変化はそれぞれhuman tandem repeat sequenceとcentromeric Not. clusterにおけるdemethylationの程度と相関していた。これらのDNA配列のdemethylationをreal time PCRで測定し、高demethylation群と低demethylation群の2群に分けて、肝切除術後の累積健存率を比較すると高demethylation群で有意に低下していた。

4) ヒト肝細胞癌でヒト染色体13q34で増幅が認められこの部分にはTFDP1, CUL4A, and CDC16が含まれていた。文献4

2. RLGS法によるヒト脳腫瘍における遺伝子変化の同定とその生物学的・臨床腫瘍学的特性

1) 同一患者から手術時に得られたglioma組織と末梢血中のリンパ球とのRLGSプロフィールを比較検討すると両者のプロフィールでは12個のスポットに腫瘍組織で消失もしくは減少という変化が認められた。

2) 11個のスポットをクローニングして塩基配列を決定したところ、5個はそれぞれtranscription regulatorであるRFX1と、Neurotransmitter transporterであるBGT-1と、ProteaseであるADMTS2と、Transcription factorであるHOXD9と、Intracellular signal transducerであるALK-1と、2個は機能が不明な遺伝子であるFKSG88とCGI-112proteinと関連していた。なお、4個のスポットについては遺伝子と関連する配列は認められなかった。

3) すべてのglioma組織でRFX1の第7イントロンのCpG islandでhypermethylationが認められ。

4) glioma cellsをdemethylating agentである5-azacytidineで処理すると、glioma cellsでRFX1の発現が認められた。

以上、gliomaに関しては文献2

3. 12 RLGS法によるヒト乳癌における遺伝子変化とその生物学的・臨床腫瘍学的特性

1) 乳癌患者から手術時に得られた同一患者の癌部と非癌部からDNAを抽出して、RLGSプロフィールを比較し両者の変化を調べ、再発などの臨床特性を比較すると、癌部と非癌部におけるプロフィールでのスポット変化数は症例ごとに異なっており、変化数の多い症例ほどリンパ節転移数が多く、乳癌術後の累積健存率が有意に低下していることが判明し、予後因子として使用できる可能性が示された。

2) 乳癌切除症例14例で同一患者から癌部と非癌部よりDNAを抽出し、RLGSプロフィールを得て、両者を比較検討すると非癌部組織では認められないが、4例の癌組織で出現するスポットAと癌部および非癌部で全

例認められるけれど4例の癌部で著明に増強するスポットBが同定された。

3) スポットAおよびスポットBをクローニングして塩基配列を決定すると、その配列はスポットAはヒト染色体16p13に位置しているcalcium channel α 1Hの一部とほぼ一致していた。一方、スポットBはGrb7の下流にある配列とほぼ一致していた。

4) スポットAの変化はヒト乳癌細胞株7株中で3株、スポットBは9株中6株で認められた。2) - 4) は文献1

4. ヒト末梢血ゲノムRLGSプロフィールの同定とデータベース化

1) 健康成人から静脈血10mlを採取し、Ficoll法でリンパ球を分離後、DNAを抽出してRLGS法を施行しても、明瞭なRLGSプロフィールが得られた。

2) 10人の健康成人から得られたそれぞれのRLGSプロフィールを比較すると、95%以上のスポットは完全に一致しており、数%で変化が認められるのみであった。

5. 仮想大腸菌ゲノム二次元電気泳動法の確立

1) 既に、全塩基配列が決定されている大腸菌株E.ColiK12W3110株よりDNAを抽出し、RLGS法によるRLGSプロフィールを得た。

2) 既に解析された全塩基配列をコンピューターにより、制限酵素により切断されるDNA断片長から二次元電気泳動法における移動度を計算し、大腸菌仮想ゲノムRLGSプロフィールを作製した。

3) 上記で得られた2個のRLGSプロフィールを比較し、それぞれに対応するスポットを同定した。

4) 大腸菌から得られたRLGSプロフィールにあるスポットのうち3個についてクローニングしその塩基配列を決定し、この3個に対応する大腸菌仮想ゲノムRLGSプロフィール上の3点の塩基配列を比較検討したところ塩基配列は100%と一致した。

6. ヒトゲノムRLGSプロフィールのデータベース化

1) 手術時に得られた正常肝組織、大腸組織、乳腺組織、食道組織、リンパ球などから抽出されたDNAについてRLGSプロフィールを作製し、それぞれを比較したが、それぞれの組織に特異的なスポット変化は同定できなかった。

2) いずれの組織のRLGSプロフィールも95%以上のスポットで同一であった。これらのスポットを同定した。

8. 仮想ヒトゲノム二次元電気泳動法の確立

$\log(M) = a - bm$ M=分子量 m=相対移動度 右の式に制限酵素断片をあてはめコンピューター処理を行い二次元画像を得た。最初に、ヒトリボゾームDNA、centromeric Not. cluster, human tandem repeatについて計算し、仮想ヒトゲノム二次元電気泳動法によるRLGSプロフィールとreal RLGSプロフィールを比較しそれぞれが一致することを確かめた。

〈国内外での成果の位置づけ〉

従来のゲノム研究により癌化に伴う多くの遺伝子異常の蓄積が明らかになり、それらの遺伝子異常が意味する生物学的特性や臨床腫瘍学的特性なども明らかになってきた。しかし、従来の方法では既に配列の決定されている遺伝子などしか検討できなかったが、RLGS法により網羅的にDNA異常を検索できるので種々の癌組織で従来法では発見できなかった変化を本研究により章にすることができた。ヒト肝細胞癌でのみhuman tandem repeat や centromeric Not. clusterといった繰り返し配列に生じているメチル化が脱メチル化を生じ、同じヒト癌組織であ

っても大腸癌や食道癌や乳癌などでは認められなかった。肝細胞癌でのみこのような変化が認められることは国内・外でいまままで報告は見られていない。しかも、脱メチル化の程度は肝切除術後の再発と密接に関連しており、予後因子として臨床応用可能であることを世界で始めて報告した。ヒト肝細胞癌は容易に再発・再燃を繰り返すが、それを予知する優れたマーカーがなく今後臨床的に重要な情報を提供することが大いに期待される。

Gliomaにおける遺伝子変化についても今回われわれの研究により明らかにされたものは従来gliomaについては報告されていなかったものである。RFX1 遺伝子のイントロンにメチル化が生じRFX1の発現が抑制されていた。Gliomaに認められた変化は肝細胞癌や大腸癌や乳癌などでは認められなかった。

乳癌における変化もひとつは従来の研究により乳癌で高頻度に認められるGrb7領域の増幅であったが、もうひとつは従来まったく報告のみられないcalcium channel α H1遺伝子の脱メチル化であった。乳癌組織では微小な石灰化が高頻度にみられるのでこのような事象と関連があるのかもしれない。

以上に述べた3種類のヒトがん組織以外でもわれわれは食道癌、大腸癌、胃癌に骨肉腫などの腫瘍についてもRLGS法にてDNA異常を検索してそれぞれの腫瘍に特異的な遺伝子変化を見出した。骨肉腫ではCa代謝と関連した酵素遺伝子における変化が認められた。この変化は食道癌、大腸癌、肝細胞癌、乳癌、胃癌など他のヒト癌組織ではまったく変化を認めなかった。われわれ以外では、泌尿器科領域における悪例腫瘍についてRLGS法を用いてDNA異常を検索した報告や米国のPlassらからの報告も認められるが、主として悪性腫瘍領域の研究である。

また、静脈血10mlから末梢血を採血してリンパ球を分離してDNAを抽出して検討しても明瞭なRLGSプロフィールが得られることが判明したのである種の遺伝性疾患の診断に用いることが可能であることが判明した。癌化に伴って、遺伝子のメチル化や脱メチル化が生じることは近年多くの研究により明らかになってきた。以上われわれの研究成果からみてもRLGS法を用いてDNA異常を網羅的に検索することにより従来法では判明しなかった変化を効率よく検出することが可能であり種々のDNA異常に応用可能と考えている。

仮想ゲノム二次元電気泳動法については大腸菌についてはほぼ100%、virtualとreal RLGSプロフィールが一致するようになった。また、ヒトリボゾームDNAやcentromeric Not. cluster, human tandem repeatについても両者はほぼ一致しており、仮想ゲノム二次元電気泳動法を行うことの妥当性を示しているものと考えている。しかし、仮想ゲノム二次元電気泳動法はわれわれ以外にも理化学研究所植物機能研究室の松山らも研究を行っており、かれらは植物のゲノムについてvirtual RLGS法を行い2003年のNucleic Acids ResearchにGlobal methylation screening in the Arabidopsis thaliana and Mus musculus genome: application of virtual image restriction landmark genomic scanning (Vi-RLG) という論文を報告している。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

ヒトの各組織は多くの細胞から構成されているため、手術時に得られた各組織からDNAを抽出してRLGS法を行っても、各組織は各組織に固有の細胞以外に間質系の細胞や血管内皮細胞など多く細胞から構成されているために、特定の細胞の変化だけを見るのではなく、各組織

に含まれている各細胞の総和をみるしかないため、悪性腫瘍のように主として特定の細胞だけ増殖しているような疾患ではそのDNA異常を検出することが可能で、われわれの研究でもヒト各種組織由来の悪性腫瘍における新しいDNA異常や遺伝子異常を明らかにすることが出来た。しかし、悪性腫瘍以外の他の疾患における遺伝子異常を検出することは非常に困難であり、われわれを含め国内・外における研究も主として悪性腫瘍における遺伝子変化を検討しているものが大部分である。

また、大腸菌などのように比較的遺伝子の数が少ないものでは、プロフィール画面上のスポットなどの重なりも少なく背後にあるDNA断片の影響なども受けにくい。ヒトのように多数の遺伝子があるものではDNA断片にも多くの種類があることなどの理由も加わって、大腸菌のvirtual RLGS法は比較的早く完成し、大腸菌のreal RLGS法とほぼ一致したプロフィールが得られることは証明したが、ヒトのvirtual RLGS法の開発に少し手間取っている間に日本の他の研究グループから植物やヒトのvirtual RLGS法に関する論文が報告されてしまった。

〈今後の課題〉

まず、本研究により明らかにされた各種悪性腫瘍における遺伝子異常についてさらなる腫瘍生物学的特性や臨床腫瘍学的特性との関連を明らかにして、ヒト癌の予防・診断・治療へ応用できるようにするのが今後の重要な課題であると考えている。

さらには、まだ検討していない婦人科領域における悪性腫瘍や小児悪性腫瘍における遺伝子異常を網羅的にRLGS法により検索して、これらに特異的な変化を同定し、その生物学的特性や臨床腫瘍学的特性や意義を明らかにして行きたい。

また、現状では悪性疾患にしか応用できていないが、10mlの末梢血からのサンプルでもRLGS法が可能であることが判明したので遺伝性疾患など悪性疾患以外にも応用してvirtual RLGS法と組み合わせて多くの疾患における遺伝子異常を明らかにしていきたいと考えている。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

1. Asaga S., Ueda M., Jinno H., Ikeda T., Kitajima M.: Identification of a new breast cancer related gene by restriction landmark genomic scanning. *Anticancer Res.* In press.
2. Ohashi Y., Ueda M., Kawase T., Kawakami Y., Toda M. Identification of an epigenetically silenced gene4,RFX,in human glioma cells using restriction landmark genomic scanning. *Oncogene* 23:7772-7779.2004.
3. Janssen J.W.G., Imoto I., Inoue J., Shimada Y., Ueda M., Imamura M., Bartram C.R., Inazawa J.:MYEOV, a gene at 11q13, is coamplified with CCND1, but epigenetically inactivated in a subset of esophageal squamous cell carcinoma. *J.Hum.Genet.* 47:460-464.2002
4. Yasui K., Arii S., Zhao C., Imoto I., Ueda M., Nagai H., Emi M., Inazawa J.:TFDP1,CUL4A,and CDC16 identified as targets for amplification at 13q34 in hepatocellular carcinomas. *Hepatology* 35,1476-1484.2002
5. Itano O., Ueda M., Kikuchi K., Hashimoto O., Hayatsu S., Kawaguchi M., Seki H., Kitajima M.: Correlation of post operative recurrence in hepatocellular carcinoma

with demethylation of repetitive sequences. *Oncogene* 21,789-797.2002

6. Itano., Ueda M., Kikuchi K., Shimazu M., Kitagawa Y., Aiura K., Kitajima M.: A new predictive factor for hepatocellular carcinoma based on two-dimensional electrophoresis of genomic DNA. *Oncogene* 19:1676-1683,2000.