

ゲノムアレイCGHを用いた造血器腫瘍における染色体欠失・増幅領域の網羅的解析

●小川 誠司¹⁾ ◆千葉 滋²⁾ ◆黒川 峰夫²⁾ ◆神田 善伸²⁾ ◆熊野 恵城²⁾ ◆伊豆津 宏二²⁾

1) 東京大学医学部造血再生医療寄付講座 2) 東京大学医学部附属病院血液腫瘍内科

＜研究の目的と進め方＞

癌細胞で生じている染色体異常は発癌のメカニズムと不可分の関係にある。白血病や悪性リンパ腫をはじめとする造血器腫瘍においては、従来より、病型・腫瘍特異的な染色体の構造異常がゲノムレベルで解析され、多数の白血病・リンパ腫関連遺伝子が同定されてきた。一方、これまで主として解析されてきたのは、切断点の解析から比較的容易に標的遺伝子の同定が可能であった相互転座による異常であるが、他方、これらの腫瘍では、染色体の増幅・欠失によるゲノムコピー数の異常も高頻度に認められることが知られている。5q, 6q, 7q, 9q, 11q, 12p, 13q, 16q, 20qなどは造血器腫瘍に特徴的報告されている異常であるが、その標的遺伝子については未だ解析が進んでいない。Rb遺伝子、p16/p15遺伝子など、ヒト腫瘍の発症に関与する多くの重要な癌抑制遺伝子が特定の染色体欠失領域から同定されていることを考えると、これらの異常の解析とその標的遺伝子の同定は、白血病・リンパ腫の発症機序を解明する上で重要である。また、これらの欠失の多くが腫瘍の予後と密接な相関を示すことから、これらの腫瘍に対する治療戦略を考える上からもこうした欠失の標的遺伝子を同定することが必要である。本研究では、ゲノムに生じたコピー数の変化をゲノムワイドに解析することを可能にするアレイCGHシステムを独自に構築し、これを用いて造血器腫瘍にみとめられる増幅および欠失領域を解析することにより、造血器腫瘍の発症に関わる遺伝子群を網羅的に同定することを試みる。

＜研究開始時の研究計画＞

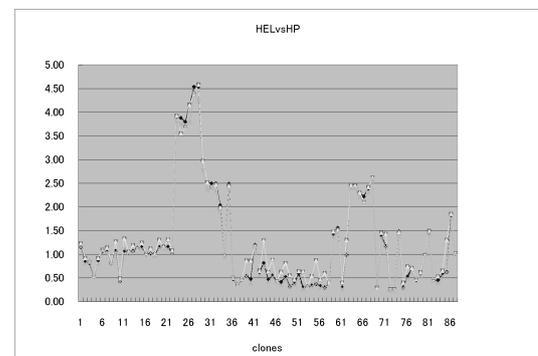
(1) BAC DNAの調整とアレイの作成およびアレイCGHのための指摘条件の検討: FISH法によりヒト染色体上への特異的なハイブリダイゼーションが確認された約3200個のBACクローンより小スケールでDNAを抽出し、これを異型としてDegenerated Oligonucleotide Primer によるPCR反応により、繰り返し配列をのぞくクローン特異的な塩基配列を濃縮したDNA増幅を行うことにより、アレイ作成に必要な大量のBAC由来DNAを調整する。調整したDNAをDEMISO溶液に溶解し、アミノシランコートをしたガラススライド上にduplicateでスポットすることにより、約1Mbpの平均プローブ間隔を有するHuman 1Mアレイの作成を行う。上記アレイを用いて、diploidのbackgroundで1アレルの欠失を高い精度で検出するための基礎的なCGHの条件について検討する。アレイCGHは、腫瘍DNAと正常DNAを異なる蛍光色素(Cy5およびCy3)で標識し、これをアレイスライド上で、プローブDNAにハイブリダイズさせ、洗浄操作を繰り返したのち、プローブ特異的にハイブリダイズした標的DNAに由来する蛍光シグナルをマイクロアレイスキャナーで計測し、2種類の蛍光シグナルの比を評価することにより、ゲノムコピー数の定量を行う。既に欠失、増幅の状態が分かっている細胞株DNAを用いて、アレイ化する際のプローブDNAの濃度、spotting solution、spot方式、アレイに用い

るスライドガラス、blockingの方法、標的DNAのラベルの方法、washの諸条件等について至適条件を検討する。(2) Human 1Mアレイを用いた造血器腫瘍の解析: 対象とするのは、50例の慢性骨髄性白血病(CML)および70例の骨髄異形成症候群(MDS)の症例、およびそれぞれ50例の急性骨髄性白血病(AML)および急性リンパ性白血病(ALL)、濾胞性リンパ腫(FL)、およびび慢性大細胞型リンパ腫(DLBCL)の症例である。これらの症例の腫瘍細胞よりゲノムDNAを抽出し、上記で構築したアレイCGHシステムを用いて、これらの腫瘍におけるゲノムコピー数の網羅的な解析を行う。多数の症例の解析から、異常が集積する領域およびホモ接合性欠失を認める領域を同定し、これらの領域にマップされる遺伝子群について変異解析その他により腫瘍特異的な遺伝子変異の探索、in vitroにおける遺伝子導入実験を行うことにより、当該異常領域から造血器腫瘍の発症に関わる標的遺伝子の同定を行う。

＜研究期間の成果＞

(1) Human 1Mアレイの作成とその性能評価: アレイ作成には、3000クローン以上のBACクローンについてゲノムDNAを調整する必要があるため、

図 1



そこで、Ligation mediated PCR(LMP)法ないしDOP PCR法を用いたDNA増幅によるプローブの調整を検討した。96個のBACクローンを用いて調整したDNAをアレイにスポットし、調整法によるCGHの解析の品質について比較検討を行った。DOP PCR産物、およびLM-PCR産物をプローブとしてCGHを行った結果、両者ともBAC DNAと同等の解析結果が得られることが確認されたため、以後は実験操作が最も容易なDOP PCR法により、BACクローンの大量調整を行い、得られたDNAをアミノシランコートスライド上にスポットすることにより、BACアレイを作成した。

作成したアレイを用いたCGHの諸条件を検討したのち、実際の造血器腫瘍の検討を行った。

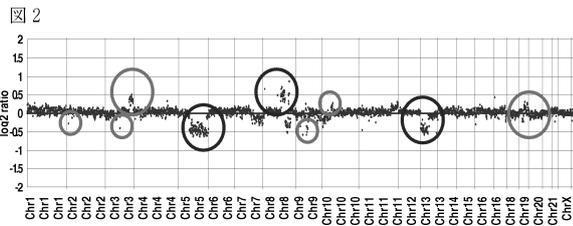
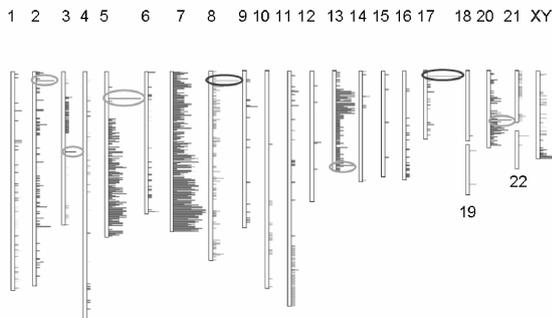


図2にMDSにおけるCGH解析の一例を示した。各プローブについて、腫瘍DNA由来のシグナルと健常DNA由来のシグナルのlog2比を染色体順にプロットしている。赤○で示したような染色体レベルでの異常に加えて、緑の○で示したような従来の方法では検出できなかった微細なコピー数の異常が検出されており、本システムにより高精度にゲノムコピー数の異常が検出できることを示している。

我々は、本アレイを用いたアレイCGH法により、74例MDSおよび55例の慢性骨髄性白血病検体について、ゲノムワイドにコピー数の異常を解析した。図3に、MDS 74例におけるアレイCGHによる解析結果をまとめた。コピー数の増加・減少を認めるBACプローブを、染色体ごとにそれぞれ青および赤のバーで示した。バーの高さは、異常を認めた症例数に対応している。異常はしばしば染色体のバンド程度の大きさに分布しているが、単独のBACプローブのみで検出される微細な領域の異常が複数の症例で共通して観察されており、これらの領域にはMDSの発症に関わる遺伝子の存在が推定された。また、CMLにおいても同様に単独のBACのみで異常が観察される領域が認められており (data not shown)、とくにCMLの急性転化に伴って認められる異常については急性転化のメカニズムを考えた上で興味深いと思われた。

図3



〈国内外での成果の位置づけ〉

アレイCGHを用いた悪性腫瘍のゲノム解析に関しては、近年多数の研究が発表されているが、我々の研究は、独自に開発した高密度なCGHアレイを用いて、慢性骨髄性白血病(CML)および骨髄異形成症候群のゲノム変化を解析した研究として高い評価を受けつつある。CGHの研究は、これまでに報告はなく、とくにCMLの急性転化に伴って認められるゲノムの微細な変化については、今後同定したゲノム異常を示す領域からの標的遺伝子の同定が期待される。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

本研究の当初の計画では、今回解析したMDS, CMLの他にAML, ALL, FL,およびDLBCLについても解析を行う予定であったが、これらの腫瘍についての解析をBACアレイを用いて行うことはできなかった。実際、3000個

以上のBACクローンを調整し、高い品質のアレイを短時間で大量に作成することは予想外に大量の労力を要するものであった。また、BACアレイシステムの解像度は1Mnbに達するとはいえ、検出される多くの異常はなお、数MB程度以上の大きさを有しており、これらの異常を示す領域からの単一遺伝子の同定は極めて困難であった。そこで我々は、解析のスループットおよび解析性能(解像度)の向上を目的として、Affymetrix社のGeneChipを用いたゲノムコピー数解析システムCNAGを構築した。本システムは、現時点で平均解像度5.8kbに達しており、解析のスループットの点においてもCGHシステムを遙かに上回っており、AML, ALL, FL,およびDLBCLについては本システムを用いた解析を進めている。

〈今後の課題〉

マイクロアレイ技術を用いたゲノムコピー数の解析は、癌の成因を明らかにする上で極めて強力なプラットフォームであると期待されている。現在主流となっているのは、BACアレイを用いたアレイCGH法であるが、同アレイシステムでは、解析の解像度がすでに限界に達しており、今後より高い解像度の解析を進めていく上では、Affymetrix社のGeneChipに代表される高密度オリゴヌクレオチドアレイが期待されている。我々はGeneChipを用いて高品質なゲノムコピー数の解析を可能にするシステムCNAGを独自に構築し、世界的に高い注目を集めている。同システムでは、CGHアレイでは全く不可能なLOHの解析やアレル別のゲノムコピー数の解析を行うことが可能となっており、癌ゲノムの異常に関する新たな知見が得られると期待されている。現在我々はGeneChipとCNAGシステムを用いて1000例以上の腫瘍検体の解析を進めており、これまでに癌で繰り返し認められる多数の微細な変化の同定を進めており、今後これらの癌ゲノムの解析を通じて癌の病態解明を進めていく予定である。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

1. Hosoya N, Sanada S, Nannya Y, Nakazaki K, Wang L, Hangaishi A, Kurokawa M, Chiba S, Ogawa S: Genome-wide screening of DNA copy number changes in chronic myelogenous leukemia with the use of high-resolution array-based comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes and Cancer*, in press (2006).
2. Nannya Y, Sanada M, Nakazaki K, Hosoya N, Wang L, Hangaishi A, Kurokawa M, Chiba S, Bailey DK, Kennedy GC, Ogawa S: A robust algorithm for copy number detection using high-density oligonucleotide single nucleotide polymorphism genotyping arrays. *Cancer Res.* 65: 6071-6079 (2005).
3. Hosoya N, Qiao Y, Hangaishi A, Wang L, Nannya Y, Sanada M, Kurokawa M, Chiba S, Hirai H, Ogawa S. Identification of a SRC-like tyrosine kinase gene, FRK, fused with ETV6 in a patient with acute myelogenous leukemia carrying a t(6;12)(q21;p13) translocation. *Genes Chromosomes Cancer*. 2005;42:269-279.
4. Wang L, Ogawa S, Hangaishi A, Qiao Y, Hosoya N, Nanya Y, Ohyashiki K, Mizoguchi H, Hirai H. Molecular characterization of the recurrent unbalanced translocation der(1;7)(q10;p10). *Blood*. 102:2597-2604 (2003).
5. Qiao Y, Ogawa S, Hangaishi A, Yuji K, Izutsu K, Kunisato A, Imai Y, Wang L, Hosoya N, Nannya Y, Sato Y, Maki M, Mitani K, and Hirai H. Identification of a Novel Fusion Gene, TTL, Fused to ETV6 in Acute Lymphoblastic

Leukemia with t(12;13)(p13;q14), And Its Implication in Leukemogenesis. *Leukemia*. in press.

6. Nakamura F, Ogawa S, Izutsu K, Maki K, Yamagata T, Mitani K, Hirai H. Should Young Patients with e19a2 type bcr/abl rearrangement undergo stem cell transplantation? *Leukemia and Lymphoma*, 2003;44:381-382

7. Ogawa S, Hangaishi A, Hirai H. Identificaiton of candidate tumor suppressor genes from critical deletions of long arm of chromosome 6 in hematopoietic neoplasm. *International Congress Series 1246*, 2002: 251-260.