

ヒトゲノム構造解析ツールとしての高密度ゲノム DNA マイクロアレイの開発と応用

●井本 逸勢¹⁾ ◆稲澤 譲治¹⁾ ◆蒔田 芳男²⁾

1) 東京医科歯科大学・難治疾患研究所 2) 旭川医科大学・医学部

<研究の目的と進め方>

ヒトゲノム DNA の配列情報が明らかになった現在、微細なレベルでの疾患遺伝子座の発見は疾患遺伝子の同定に直結する。先天異常や癌など、病型は同じでありながら複雑な表現型を示す本態不明の疾患の遺伝的要因を解明する上で、ゲノムの一次構造あるいは機能異常を高-throughputかつ高精度に探索できるシステムを用いた全ゲノムスキャンの果たす役割は大きい。このような背景のもと、①100Kb-数 Mb レベルでゲノムコピー数異常を高感度かつ安定に検出できる各種の高密度かつ高感度の実用 BAC アレイを作製する基盤技術を整備すること、②これらを用いたアレイ CGH 法ならびにその応用法を開発し、疾患のゲノム DNA 解析に適用することで、新規の疾患関連遺伝子やその調節領域の異常の探索・同定と、新規の症候群の同定ならびにその分子病態形成の解明を推進するとともに、ゲノムアレイ CGH 法を臨床診断ツールとして確立し、個別化医療の推進に寄与すること、③さらに、ゲノム解析の基盤技術・情報を提供し領域内外の他の研究技術との融合を図ることを目的とする。

<2007 年度の研究の当初計画>

(1) ゲノムアレイ作製ならびに解析システム整備と応用法開発

既に開発済みの、①ゲノムワイドな高密度アレイ (MCG Whole Genome Array-4500)、② X 染色体全体をカバーする高密度アレイ (MCG X-tiling Array)、ならびに③遺伝疾患診断用アレイ (MCG Genome Disorder Array, GD アレイ) の継続的な作製および改良のために、スポット用 DNA の単離、FISH やシーケンスによる位置確認、DNA の加工を行うと共に、これらの工程の自動化を図る。また、作製したアレイの作製、評価を行う。さらに、ゲノムコピー数異常同定のための基盤情報となる日本人における Copy-number variation (CNV) の収集を効率的に行うための新規アレイのデザインと作製を行う。

一方、アレイ CGH 法の実施プロトコル、機器の改良、ならびにゲノムデータベース情報の更新にあわせて解析ソフトの改良を行い、臨床応用に向けた利便化を図る。

さらに、ゲノムアレイを用いた DNA メチル化やヒストンコードなどエピゲノム情報の取得、あるいは転写因子の DNA 結合状態の検出など、各種応用法の開発・確立を行う。

(2) ゲノムアレイを用いたヒト疾患におけるゲノムの一次構造異常の解析と表現型のデータベース化

本態不明の様々な疾患の病因・病態に関与する遺伝子やゲノム構造・機能異常の同定のため、作製したゲノムアレイを用いて各種遺伝疾患を中心にヒト疾患における潜在的なゲノム一次構造異常解析あるいは応用解析を行う。検体収集は、特に遺伝疾患について重点的に展開し、ゲノムアレイ解析による既知の疾患の診断への臨床応用を推進するとともに、新たに得られたゲノム構造・機能異常を指標に、新規の疾患原因遺伝子・関連遺伝子の同定や調節領域異常の同定を行う。

得られた結果を総合し、臨床検査レベルでの運用を目指して、有用性の高いアレイのコンテンツ収集を継続的に行う。

<2007 年度の成果>

(1) ゲノムアレイ作製と解析システムの整備

既に開発済みのアレイの継続的な作製、Viewer のデータベース情報に連動した更新、運用を行うと共に、新規 copy-number variation (CNV) の情報収集用アレイ (MCG Genome Variation Array, ver.1) とその解析結果を可視化して表示する Viewer 作製を行った。また本アレイの QC を目的に評価ハイブリダイゼーションを行い、これまでのアレイ同様の閾値の設定が可能であることを確認した。

(2) ゲノムアレイを用いたヒト疾患ゲノム一次構造異常解析

羽田支援班により構築された検体収集システムにより、全国 18 施設からなる臨床遺伝コンソーシアム内で、先天性多発奇形 (MCA)/精神発達遅滞 (MR) を中心にこれまで 300 症例以上の検体を収集した。これらを対象に、既知 MCA/MR 診断用の GD アレイを用いて一次スクリーニングを行い、核型正常の非特異的 MCA/MR 症例で結果の確定した 244 症例中 24 例 (9.8%) にサブテロメアを中心とする微細ゲノムコピー数異常を検出した。GD アレイ陰性の 220 症例のうちゲノム異常の存在が疑われる 72 例を高密度 BAC アレイ (MCG Whole Genome Array-4500) で二次スクリーニングし、29 例 (40.2%) で *de novo* の微細コピー数異常を検出した。

異常を検出した症例を対象に (解析中のため、詳細は割愛)、①共通の領域にコピー数異常を認めないが表現型に共通する所見を持つ症例に関し、高密度オリゴアレイによる微細共通異常領域の探索ならびに異常領域内候補遺伝子の他症例での点突然変異のスクリーニングを行った。

②複数の独立した症例で共通の領域に重複するコピー数異常を認めたものを新規微細欠失症候群と考え、臨床情報との照合を行い類似症例の収集を進めるとともに、疾患原因・関連遺伝子の同定作業を行った。

さらに、収集された症例について、表現型などの情報に関して、羽田支援班の支援のもとで構築されたデータベース (CGH アレイ検索症例臨床情報データベース) への登録作業を進めた。

<国内外での成果の位置づけ>

(1) BAC を用いたゲノムアレイは、染色体解析技術を補完する診断法として臨床応用が期待される技術であり、病態に関与する異常を検出できる信頼性の高いクローンの選択と解析技術の開発・改良は、重要な技術的課題である。海外でも、BAC アレイは、微細コピー数異常に起因する新規の MCA/MR を呈する症候群同定の一次スクリーニング法として活用され (Ballif BC et al., Nat Genet 39:1071, 2007)、我々が検出している異常領域ならび各症例の表現型を指標にしたアプローチからの新規症候群ならびに疾患遺伝子同定が見込まれるため、さらに研究の加速が必要である。一方ゲノム研究の面でも、BAC アレイは大きいサイズの CNV の検出など、SNP アレイやオリゴアレイと並立したゲノム情報取得のツールとして活用されている。

(2) CGH アレイ検索症例臨床情報データベースの構築は、日本版の DECIPHER (Database of Chromosomal Imbalance and

Phenotype in Humans using Ensembl Resources) プロジェクトと
 言えるものであり、微細染色体異常からの新規症候群の同定への
 活用が期待される。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

期間内に、予定の研究計画を達成し、目標としていた新規症候
 群の同定につながることを期待される領域の複数例での検出も達
 成している。

<今後の課題>

(1) ゲノムアレイ作製と解析システムの整備

最新のゲノム情報にあわせて各アレイのプローブ情報の更新を
 進め、Viewerに反映させる。BACアレイ CGH法の臨床応用を
 考え、必要サンプルDNA量を減らすために、増幅法ならびによ
 り安定したS/N比を得るためのラベル化とハイブリダイゼーショ
 ン効率の改善を試みる。

(2) ゲノムアレイを用いたヒト疾患ゲノム一次構造異常解析

コンソーシアム参加施設の拡充を行いMCA/MR症例の収集を進
 めると共に、微細ゲノムコピー数異常が認められた症例の特徴的
 表現型の抽出により類似症例に絞った症例の収集を行う。同時に、
 共通の微細ゲノムコピー数異常が認められた症例について、疾患
 原因・関連遺伝子の同定を目指してさらに詳細な解析を進める。

また、遺伝疾患と関連しないコピー数変化の除外のために、
 MCG Genome Variation ArrayならびにWhole Genome Array-4500
 を用いて得られる日本人CNVの情報を蓄積しデータベース化す
 る。

<成果公表リスト>

1) 論文/プロシーディング

1. 0801161827
 Okamoto N, Kubota T, Nakamura Y, Murakami R, Nishikubo
 T, Tanaka I, Takahashi Y, Hayashi S, Imoto I, Inazawa J,
 Hosokai N, Kohsaka S, Uchino S. 22q13 microduplication in
 two patients with common clinical manifestations: A
 recognizable syndrome? *Am J Med Genet A* 143:2804-9, 2007

2. 0702031537
 Honda S, Hayashi S, Kato M, Niida I, Okuyama T, Imoto I,
 Mizutani S, Inazawa J. Clinical and molecular cytogenetic
 characterization of two patients with non-mutational
 aberrations of the FMR2 gene. *Am J Med Genet A* 143: 687-93,
 2007..

3. 0702031610
 Hayashi S, Ono M, Makita Y, Imoto I, Mizutani S, Inazawa J.
 Fortuitous Detection of a Submicroscopic Deletion at 1q25 in
 a girl with Cornelia-de Lange syndrome carrying t(5;13)
 (p13.1;q12.1) by array-based comparative genomic
 hybridization. *Am J Med Genet A* 143:1191-7, 2007

4. 0702031619
 Hayashi S, Honda S, Minaguchi M, Makita Y, Okamoto N,
 Kosaki R, Okuyama T, Imoto I, Mizutani S, Inazawa J.
 Construction of a high-density and high-resolution human
 chromosome X array for comparative genomic hybridization
 analysis. *J Hum Genet* 52:397-405, 2007

5. 0801161842
 Udaka T, Imoto I, Aizu Y, Torii C, Izumi K, Kosaki R,
 Takahashi T, Hayashi S, Inazawa J, Kosaki K. Multiplex
 PCR/Liquid Chromatography Assay for Screening of
 Subtelomeric Rearrangements. *Genet Test* 11:241-8, 2007.

7. 0710071433

Kikuchi R, Tsuda H, Kanai Y, Kasamatsu T, Sengoku K,
 Hirohashi S, Inazawa J, Imoto I. Promoter hypermethylation
 contributes to frequent inactivation of a putative conditional
 tumor-suppressor gene connective tissue growth factor in
 ovarian cancer. *Cancer Res* 67:7095-105, 2007..

8. 0710071439
 Suzuki E, Imoto I, Pimkhaokham A, Nakagawa T, Kamata N,
 Kozaki K, Amagasa T, Inazawa J. PRTFDC1, a possible
 tumor-suppressor gene, is frequently silenced in oral
 squamous-cell carcinomas by aberrant promoter
 hypermethylation. *Oncogene* 26:7921-32, 2007.

9. 0710071448
 Zhao C, Inoue J, Imoto I, Otsuki T, Iida S, Ueda R, Inazawa J.
 POU2AF1, an amplification target at 11q23, promotes growth
 of multiple myeloma cells by directly regulating expression of
 a B-cell maturation factor, TNFRSF17. *Oncogene* 27:63-75,
 2008.

10. 0710071500
 Kawanishi H, Takahashi T, Ito M, Matsui Y, Watanabe J, Ito
 N, Kamoto T, Kadowaki T, Tsujimoto G, Imoto I, Inazawa J,
 Nishiyama H, Ogawa O. Genetic analysis of multifocal
 superficial urothelial cancers by array-based comparative
 genomic hybridisation. *Br J Cancer* 97:260-6, 2007.

11. 0801181247
 Suzuki A, Shibata T, Shimada Y, Murakami Y, Horii A,
 Shiratori K, Hirohashi S, Inazawa J, Imoto I. Identification
 of SMURF1 as a possible target for 7q21.3-22.1 amplification
 detected in pancreatic cancer cell line by in-house array-based
 comparative genomic hybridization. *Cancer Sci* (in press)

12. 0704281503
 Sugino Y, Misawa A, Inoue J, Kitagawa M, Hosoi H, Sugimoto
 T, Imoto I, Inazawa J. Epigenetic silencing of prostaglandin E
 receptor 2 (PTGER2) is associated with progression of
 neuroblastomas. *Oncogene* 26:7401-13, 2007

13. 0801161836
 Katoh H, Ojima H, Kokubu A, Saito S, Kondo T, Kosuge T,
 Hosoda F, Imoto I, Inazawa J, Hirohashi S, Shibata T.
 Genetically distinct and clinically relevant classification of
 hepatocellular carcinoma: putative therapeutic targets.
Gastroenterology 133:1475-86, 2007.

14. 0704281521
 Shinoda Y, Kozaki K, Imoto I, Obata W, Tsuda H, Mizutani Y,
 Shuin T, Fujioka T, Miki T, Inazawa J. Association of KLK5-
 overexpression with invasiveness of urinary bladder carcinoma
 cells. *Cancer Sci* 98:1078-86, 2007

15. 0704281513
 Kawasaki T, Yokoi S, Tsuda H, Izumi H, Kozaki K, Aida S,
 Ozeki Y, Yoshizawa Y, Imoto I, Inazawa J. BCL2L2 is a
 probable target for novel 14q11.2 amplification detected in a
 non-small cell lung cancer cell line. *Cancer Sci* 98:1070-7,
 2007

16. 0704281532
 Tanaka K, Imoto I, Inoue J, Kozaki K, Tsuda H, Shimada Y,
 Aiko S, Yoshizumi Y, Iwai T, Kawano T, Inazawa J. Frequent
 methylation-associated silencing of a candidate tumor-
 suppressor, CRABP1, in esophageal squamous-cell carcinoma.
Oncogene 26:6456-68, 2007

2) データベース/ソフトウェア
 東京医科歯科大学・難治疾患研究所・分子細胞遺伝 CGH デー
 タベース (<http://www.cgthmd.jp/cghdatabase/index.html>)