

ヒトゲノム構造解析ツールとして的高密度ゲノム 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。このため、先天異常や癌など病型は同じであっても複雑な表現型を示す本態不明の疾患におけるゲノムの一次構造あるいは機能異常を示す領域を、全ゲノムを対象に高精度かつ high-throughput に探索できるシステムを構築し効率よくスクリーニングを行っていくことは、これらの疾患の遺伝的要因を解明する重要な手段である。

このような背景のもと、①数 10Kb - 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高密度・高感度の実用 BAC アレイを作製する基盤技術を整備し、②これらを用いたアレイ CGH 法 (コピー数異常解析) とならびにその応用法 (ゲノム機能異常解析) を、対象疾患ごとに体系的に遂行していくシステムを構築して、効率よく新規疾患関連遺伝子やその調節領域の異常の探索、ならびに新規症候群の同定と分子病態解明を推進するとともに、③実際の臨床診断ツールとなりうるゲノムアレイのデザインとその適応を確立することで個別化医療の推進に寄与し、④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。

<2008 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

BAC 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ことから、①ゲノムワイド高密度アレイ (MCG Whole Genome Array-4500、WG アレイ)、②遺伝疾患診断用アレイ (MCG Genome Disorder Array、GD アレイ) の継続的作製および改良のために、BAC DNA の単離と加工、FISH 等による確認、ならびにこれらの工程の自動化を進める。特に②は、対象疾患を増やしたバージョン (Ver. 3) へ移行を図るため、新規に設計する。作製したアレイは評価を行う。

アレイ CGH 法のプロトコルや機器の改良、およびデータベース情報の更新にあわせた各アレイの専用解析ソフトの改変ならびに機能追加による高機能化を図る。

(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

①自作ゲノムアレイを中心に、ヒト疾患における潜在的ゲノム一次構造異常解析あるいはエピゲノム解析を行う。対象検体収集は、継続して羽田支援班と協力し遺伝疾患 (多発奇形を伴う精神発達遅滞、MCA/MR) について重点的に展開する。GD アレイについては、これらを用いた検証研究により既知染色体異常疾患の診断能が確認され、さらに原因不明の MCA/MR の約 10% にサブテロメアを中心とした構造異常を検出する能力があることが確かめられていることから、改良 (Ver.3) を加えてゲノムアレイ解析による遺伝疾患診断の臨床応用を推進する。

②高密度アレイ解析により得られたゲノム構造・機能異常を指標に、新規の疾患原因/関連遺伝子や調節領域異常の同定を行う。特に、収集した症例中、複数例で重複する箇所に異常が認められる症例や臨床病型が類似する症例を中心に疾患原因・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。

③羽田支援班の協力で構築した CGH アレイ検索症例臨床情報データベース (連携研究者：蒔田芳男旭川医科大学教授) は、微細染色体異常からの新規症候群同定への活用が期待されることから、①での症例収集にあわせてさらに臨床情報の充実を図るとともに、類似症例の検索など病型の分析を進める。また、疾患と関連しないコピー数変化の除外のために、アレイ解析で得られるコピー数多型情報をデータベース化する。

<2008 年度の成果>

(1) ゲノムアレイ作製ならびに解析システム整備

ゲノムワイド高密度アレイ (MCG Whole Genome Array-4500、WG アレイ) および遺伝疾患診断用アレイ (MCG Genome Disorder Array、GD アレイ) の継続的作製、改良を行うとともに、病態に關与する異常を検出できる信頼性の高いクローンの評価と選択を進めた。さらに、GD アレイ Ver.3 は、検出対象疾患を見直して新規に設計して最適なクローンの選択を行い、技術を民間移転たうえて作製支援を行って完成させ、評価の後 (2) における解析での使用を開始した。

各アレイのバージョンアップと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データを修正するとともに、フラッグの自動認識、正常範囲の簡易検出、出力機能の見直しなどの高機能化を行った。

(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

自作ゲノムアレイを中心に、ヒト疾患における潜在的ゲノム一次構造異常・エピゲノム異常解析を継続した。対象検体収集は、羽田支援班との協力を継続して、全国 22 施設からなる臨床遺伝コンソーシアム内で多発奇形を伴う精神発達遅滞 (MCA/MR) 症例について重点的に展開した (現在約 500 例)。収集された非特異的 MCA/MR 症例のうち、GD アレイにより核型正常の非特異的 MCA/MR 症例で結果の確定した 449 症例中 48 例 (10.7%) 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。また、GD アレイのバージョンアップによりサブテロメア以外にも比較的高頻度に異常を検出する領域を見出すことを確認した (未発表データ)。さらに、GD アレイ陰性の 401 症例のうちゲノム異常の存在がより疑われる 114 例を対象にした WG アレイによる二次解析を進めた結果、29 例 (25.4%) に病態と関連すると考えられる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、疾患遺伝子同定を目指し、①共通の領域にコピー数異常を認めないが共通の表現型を持つ症例について、高密度オリゴアレイによる微細異常領域の探索と領域内候補遺伝子の点突然変異のスクリーニングを行うとともに、②共通の領域に重複するコピー数異常を認めた症例について、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を収集し、疾患原因・関連遺伝子の同定作業を進めた (成果論文発表 1、2 など)。

(3) ゲノム一次構造異常と表現型のデータベース化

各症例の表現型・ゲノム異常情報に関して、羽田支援班、連携研究者の協力により構築した CGH アレイ検索症例臨床情報データベースへの情報登録、更新を進めた。また、アレイ解析で

得られるコピー数多型情報をデータベース化している。

<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。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を補完する情報を得るツールとして重要である。

(2) 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、多数例での成果が報告されてきている。我々が検出している異常領域から同定した遺伝子異常（成果論文発表 2 など）は新規症候群として海外からも報告され、本課題でのアプローチが有効であることは実証されている。今後、アレイ CGH 検索症例臨床情報データベースに登録される症例数の増加に加えて各症例の表現型を指標に、さらに新規症候群ならびに疾患遺伝子同定が見込まれる。

<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異常も検出されている。

<今後の課題>

(1) ゲノムアレイ作製と解析システムの整備

これまで蓄積された解析結果ならびにゲノム情報・国内外での解析情報を基盤に、より検出感度の高い一次スクリーニング用アレイ（診断用ターゲットアレイ）の設計とクローン選択を進める。

UCSC genome browser (2006 March, hg18)にあわせて各アレイのプローブ情報の更新をすすめ、Viewer・解析ソフトに反映させる。

(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

症例数の拡大を図るべくコンソーシアム参加施設のさらなる拡充を行い MCA/MR 症例の収集を進めると共に、GD アレイ陰性症例の WG アレイによる二次解析を進めて微細ゲノムコピー数異常検出を行う。また、異常検出症例の表現型を解析することで類似症例の選択と収集を行う。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は、疾患原因・関連遺伝子の同定を目指して、詳細にコピー数、シーケンス、エピゲノム異常解析を進める。

<成果公表リスト>

1) 論文／プロシーディング（査読付きのものに限る）

1. 0811102045
Hayashi S, Okamoto N, Makita Y, Hata A, Imoto I, Inazawa J. Heterozygous deletion at 14q22.1-q22.3 including the BMP4 gene in a patient with psychomotor retardation, congenital corneal opacity and feet polysyndactyly. *Am J Med Genet A* 146A:2905-10, 2008.

2. 0806061748
Hayashi S, Mizuno S, Migita O, Okuyama T, Makita Y, Hata A, Imoto I, Inazawa J. The CASK gene harbored in a deletion detected by array-CGH as a potential candidate for a gene causative of X-linked dominant mental retardation. *Am J Med Genet A* 146A:2145-51, 2008..

3. 0806061748
Kikuchi R, Tsuda H, Kozaki K, Kanai Y, Kasamatsu T, Sengoku K, Hirohashi S, Inazawa J, Imoto I. Frequent inactivation of a putative tumor suppressor, angiopoietin-like protein 2, in ovarian cancer. *Cancer Res* 68:5067-75, 2008.

4. 0806061756
Nakamura E, Kozaki KI, Tsuda H, Suzuki E, Pimkhaokham A, Yamamoto G, Irie T, Tachikawa T, Amagasa T, Inazawa J,

Imoto I. Frequent silencing of a putative tumor suppressor gene melatonin receptor 1 A (MTNR1A) in oral squamous-cell carcinoma. *Cancer Sci* 99:1390-400, 2008.

5. 0806061730
Ishihara T, Tsuda H, Hotta A, Kozaki K, Yoshida A, Noh-Yoshimura J, Ito K, Imoto I, Inazawa J. ITC is a putative target for a novel 20q11.22 amplification detected in anaplastic thyroid carcinoma cells by array-based comparative genomic hybridization. *Cancer Sci* 99:1940-9, 2008.

6. 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 a pancreatic cancer cell line by in-house array-based comparative genomic hybridization. *Cancer Sci* 99:986-94, 2008.

7. 0901111352
Arai E, Ushijima S, Fujimoto H, Hosoda F, Shibata T, Kondo T, Yokoi S, Imoto I, Inazawa J, Hirohashi S, Kanai Y. Genome-wide DNA methylation profiles in both precancerous conditions and clear cell renal cell carcinomas are correlated with malignant potential and patient outcome. *Carcinogenesis* (in press)

8. 0806061737
Arai E, Ushijima S, Tsuda H, Fujimoto H, Hosoda F, Shibata T, Kondo T, Imoto I, Inazawa J, Hirohashi S, Kanai Y. Genetic clustering of clear cell renal cell carcinoma based on array-CGH: Its association with DNA methylation alteration and patient outcome. *Clin Cancer Res* 14:5531-9, 2008.

9. 0806061744
Kikuchi S, Honda K, Tsuda H, Hiraoka N, Imoto I, Kosuge T, Umaki T, Onozato K, Shitashige M, Yamaguchi U, Ono M, Tsuchida A, Aoki T, Inazawa J, Hirohashi S, Yamada T. Expression and gene amplification of actinin-4 in invasive ductal carcinoma of the pancreas. *Clin Cancer Res* 14:5348-56, 2008.

10. 0811102127
Katsuki Y, Nakada S, Yokoyama T, Imoto I, Inazawa J, Nagasawa M, Mizutani S. Caffeine yields aneuploidy through asymmetrical cell division caused by misalignment of chromosomes. *Cancer Sci* 99:1539-45, 2008.

11. 0811102132
Qi S, Mogi S, Tsuda H, Tanaka Y, Kozaki K, Imoto I, Inazawa J, Hasegawa S, Omura K. Expression of cIAP-1 correlates with nodal metastasis in squamous cell carcinoma of the tongue. *Int J Oral Maxillofac Surg* (in press).

12. 0811102136
Ooi A, Suzuki S, Nakazawa K, Itakura J, Imoto I, Nakamura H, Dobashi Y. Gene amplification of Myc and its coamplification with ERBB2 and EGFR in gallbladder adenocarcinomas. *Anticancer Res* (in press).

2) データベース／ソフトウェア
1. アレイ CGH に関する情報
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>)