

ゲノム情報を利用した造血器悪性腫瘍の新規治療戦略

●間野 博行 ◆小澤 敬也 ◆山下 義博
自治医科大学医学部

＜研究の目的と進め方＞

造血器悪性腫瘍には急性骨髄性白血病 (AML)、骨髄異形成症候群 (MDS)、慢性骨髄性白血病 (CML) 等の白血病類縁疾患だけでなく、不応性貧血、発作性夜間血色素尿症 (PNH) など「前白血病」状態と考えられている特発性造血障害も存在する。これら現行の疾患分類法は必ずしも各患者の生命予後、治療反応性を反映しておらず、しかも鑑別診断に有用な信頼に足る分子診断マーカーが存在する例は稀である。我々は上述の血液疾患群がいずれも造血幹細胞のクローン性異常に起因することに着目し、様々な特発性造血障害及び白血病類縁疾患患者骨髄より造血幹細胞相当分画のみを純化保存する全国規模の検体収集事業「Blast Bank」を開始した。平成 19 年 11 月現在で既に 800 例を超えるサンプルの収集に成功しており、本バンクはヒト疾患純化細胞を用いたゲノミクスプロジェクトとして世界最大の一つとなっている。また本邦に患者、キャリア共に多い成人 T 細胞性白血病 (ATL) についても疾患責任分画である CD4 陽性フラクションを純化・保存する検体収集事業を行っている。我々は本研究計画において、このように大規模に収集保存した造血器悪性腫瘍臨床検体に関するゲノミクス解析を行い、新しい分子診断マーカーの同定・新規治療法の開発を目指す。また多くのヒト疾患発症機構に深く関わるマイクロ RNA (miRNA) のプロファイル手法を新たに開発し、miRNA の発現異常についても臨床検体による大規模解析を行う。

＜2007 年度の研究の当初計画＞

1) 新規 miRNA の同定：白血病細胞における miRNA の発現様式、発現異常を明らかにする目的で、我々の開発した新たな高感度 miRNA 同定法「microRNA Amplification Profiling (mRAP)」を白血病検体に応用し、BlastBank 検体を用いた miRNA プロファイリングを行う。また同定された新規・未知 miRNA について、疾患の臨床的特徴にリンクするものをスクリーニングする。さらに我々が同定する全ての miRNA について、それぞれを発現するレトロウィルスのライブラリーを構築し、これらを用いた新たな機能スクリーニングを行う。白血病細胞の癌化・薬剤感受性などに寄与する miRNA 異常を明らかにする。

2) 遺伝子配列解析：白血病の過半数が 46XY や 46XX などの正常核型であること、しかもこれら正常核型患者の予後が比較的不良であることは、正常核型白血病細胞中に微細な DNA 異常が多く存在することを強く示唆する。実際正常核型患者細胞に FLT3 遺伝子や NPM 遺伝子の配列異常が存在することが知られている。しかしこれらの陽性率は高くなく、他の配列異常が存在していると考えられている。そこで癌化に関与すると予想される候補遺伝子の配列異常について、既に収集した検体を用いて大規模配列解析を行う予定である。

＜2007 年度の成果＞

1) 造血幹細胞特異的マーカーである CD133 に対するアフィニティカラムを用いて、白血病を含む各種特発性血液疾患患者骨髄

より造血幹細胞分画を純化保存し、これを Blast Bank と名付けた。平成 19 年 11 月現在で 800 例を超えるサンプルの保存に成功しており、これは純化細胞を用いたゲノミクスプロジェクトとしては世界最大級である。これら Blast Bank 分画を用いた解析が旧来の骨髄単核球全体を用いたものに比べ実際に偽陽性データが少ないこと、またバンクに用いる CD133 陽性細胞がこれら疾患の責任クローンを含むことなども既に確認している

2) 慢性期 ATL 患者 19 例、急性期 ATL 患者 22 例の末梢血より CD4 陽性分画のみを純化保存するプロジェクトを行った。得られた純化 ATL 細胞を Affymetrix 社 HGU133 マイクロアレイによって解析する事で ATL の世界最大の遺伝子発現データベースを構築した。本データベースを用いて急性期特異的な発現を示す遺伝子セットを抽出したところ hepatocyte growth-factor (HGF) の受容体である MET 遺伝子が同定された。しかも患者血漿中の HGF 濃度を測定したところ、慢性期、急性期共に ATL 患者において HGF 濃度が亢進している事が確認された。以上より ATL の病期進展機構として HGF-MET 系の活性化の存在が示唆された。

3) 微量臨床検体より miRNA の同定を可能にする新たな miRNA プロファイル解析法「mRAP 法」を開発した。これは解析対象として 10 ng 以下の微量の低分子量 RNA から数十万クロンの miRNA クローンを同定可能な極めて鋭敏な方法であり、様々なヒト臨床検体における miRNA の発現解析が可能になった。さらに本年は mRAP 法を超高速度シーケンサーに組み合わせる変法も開発した。近年、一度に数十万クロン以上の DNA 断片の塩基配列解析を可能にする新しい並列シーケンスシステムが開発されている。我々は Illumina 社の Solexa システムと mRAP とを組み合わせることに成功し、これを用いて 1 サンプルから数千万クロンの miRNA を同定する方法を新たに開発した。またこの Solexa システムでは一度に 8 種類の異なったサンプルのシーケンス解析も可能であり、一回の実験で 8 種類のサンプルにおいてそれぞれ 500 万クロンほどの miRNA を決定可能になった。

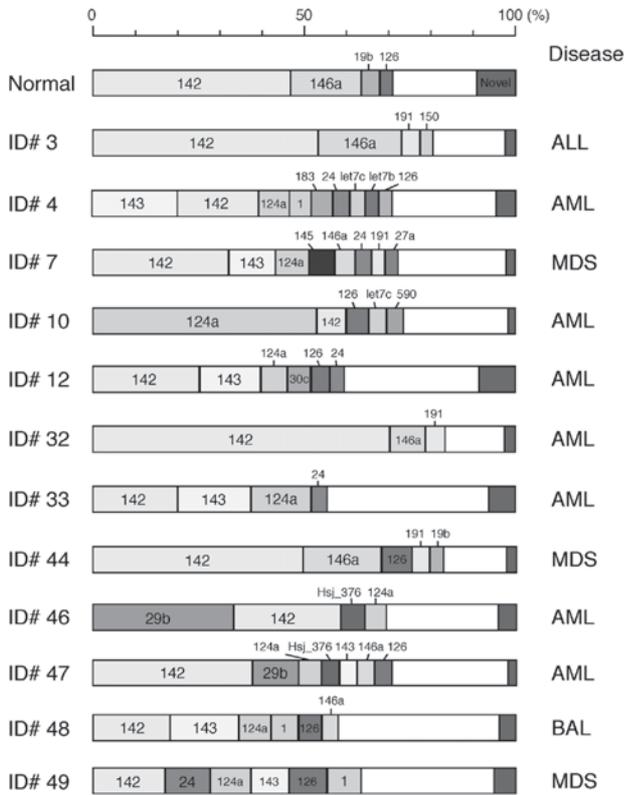
また本 mRAP を用いたテスト解析として、6.5 dpc から 17.5 dpc にいたるマウス胎児と、30 種類以上のマウス臓器における網羅的 miRNA プロファイルを決した。またその過程において 400 種類以上の新規 miRNA を発見した。

さらに血液悪性腫瘍における miRNA の機能解析を行う目的で、12 例のヒト白血病 Blast Bank 検体の mRAP 解析を行った。その結果次回に示すように各白血病芽球がそれぞれ大きく異なった miRNA 発現プロファイルを有しており、また 134 種類の新規 miRNA 候補を同定することに成功した。白血病芽球の miRNA プロファイルは白血病診断名や生命予後にリンクしていなかったが、興味深いことに芽球の核型は発現プロファイルに強く相関していた。例えば「正常核型」の芽球に強く発現する miRNA 分子を同定したが、そのうちの 1 種類は形質転換能を有していることが明らかになった。

こうして同定された既知 miRNA だけでなく、新規 miRNA 候

補についてもそれらの細胞内機能を解析する目的で、これら既知・新規 miRNA を発現するレトロウィルスライブラリーを構築し、簡便な機能スクリーニングシステムを開発した。

白血病芽球における miRNA プロファイル



<国内外での成果の位置づけ>

一般に miRNA の発現解析には、ノーザンブロット法あるいは locked nucleic acid (LNA) プローブを用いた DNA マイクロアレイなどが汎用されている。しかし、miRNA は極めて短い機能分子であるため、数塩基の違いを精度良く全ての miRNA に対して鑑別することは現実的に難しい。我々の mRAP のようにクローニングを大量に行い、そこで得られる頻度を発現量の近似値として用いる方法は、(1) 精度良く全ての miRNA を鑑別できる、(2) 未知の miRNA 分子を同定可能である、(3) 充分大量のクローン数の解析を行えば発現量を精度良く予測可能である、などの大きな利点を有している。本法は現在の miRNA クローニング法として最も感度が良い方法であり、今後の白血病の miRNA 解析に大きな貢献が期待される。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

特になし

<今後の課題>

mRAP 法を用いて更に大規模に白血病芽球における解析を行い、protein-coding genes の遺伝子発現プロファイルや、遺伝子配列異常プロファイルと統合して患者の予後予測を行うことを目指す。また大規模に protein-coding genes の配列異常をスクリーニングする手法を開発し、白血病における新たな癌遺伝子の同定を目指す。

<成果公表リスト>

1) 論文/プロシーディング

1. 0801151635
Yamashita Y, Minoura K, Taya T, Fujiwara SI, Kurashina K, Watanabe H, Choi YL, Soda M, Hatanaka H, Enomoto M, Takada S and Mano H: Analysis of chromosome copy number in leukemic cells by different microarray platforms. *Leukemia* 21: 1333-1337, 2007.
2. Takada S, Yamashita Y, Berezikov E, Hatanaka H, Fujiwara SI, Kurashina K, Watanabe H, Enomoto M, Soda M, Choi YL and Mano H: MicroRNA expression profiles of human leukemias. *Leukemia*, in press.
3. 0801151638
Takada S and Mano H: Profiling of microRNA expression by mRAP. *Nat Protoc* 2: 3136-3145, 2007.
4. 0801151640
Soda M, Choi YL, Enomoto M, Takada S, Yamashita Y, Ishikawa S, Fujiwara S, Watanabe H, Kurashina K, Hatanaka H, Bando M, Ohno S, Ishikawa Y, Aburatani H, Niki T, Sohara Y, Sugiyama Y and Mano H: Identification of the transforming *EML4-ALK* fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature* 448: 561-566, 2007.
5. 0801151641
Mano H and Takada S: mRAP, a sensitive method for determination of microRNA expression profiles. *Methods* 43: 118-122, 2007.
6. 0801151644
Hatanaka H, Takada S, Choi YL, Fujiwara S, Soda M, Enomoto M, Kurashina K, Watanabe H, Yamashita Y, Sugano K and Mano H: Transforming activity of purinergic receptor P2Y₂, G-protein coupled, 2 revealed by retroviral expression screening. *Biochem Biophys Res Commun* 356: 723-726, 2007.
7. 0801151656
Furukawa Y, Vu HA, Akutsu M, Odgerel T, Izumi T, Tsunoda S, Matsuo Y, Kirito K, Sato Y, Mano H and Kano Y: Divergent cytotoxic effects of PKC412 in combination with conventional antileukemic agents in FLT3 mutation-positive versus -negative leukemia cell lines. *Leukemia* 21: 1005-1014, 2007.
8. 0801151658
Fujiwara S, Yamashita Y, Choi YL, Watanabe H, Kurashina K, Soda M, Enomoto M, Hatanaka H, Takada S, Ozawa K and Mano H: Transforming activity of purinergic receptor P2Y₂, G protein coupled, 8 revealed by retroviral expression screening. *Leuk Lymphoma* 48: 978-986, 2007.
9. 0702052043
Choi YL, Tsukasaki K, O'Neill M C, Yamada Y, Onimaru Y, Matsumoto K, Ohashi J, Yamashita Y, Tsutsumi S, Kaneda R, Takada S, Aburatani H, Kamihira S, Nakamura T, Tomonaga M and Mano H: A genomic analysis of adult T-cell leukemia. *Oncogene* 26: 1245-1255, 2007.
10. 0801172101
Kano Y, Akutsu M, Tsunoda S, Izumi T, Kobayashi H, Mano H and Furukawa Y: Cytotoxic effects of histone deacetylase inhibitor FK228 (depsipeptide, formally named FR901228) in combination with conventional anti-leukemia/lymphoma agents against human leukemia/lymphoma cell lines. *Invest New Drugs* 25: 31-40, 2007.