

平成 21 年 5 月 15 日現在

研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2007～2008 年度
 課題番号：19790661
 研究課題名（和文） 高密度 SNP アレイを用いた ATL 治療標的分子の探索
 研究課題名（英文） Search for molecular targets in ATL therapy
 using high-resolution SNP-typing microarray
 研究代表者
 山本 豪 (YAMAMOTO GO)
 東京大学・医学部附属病院・助教
 研究者番号 70396753

研究成果の概要：成人 T 細胞白血病(ATL)に対する新規分子標的薬剤開発のためのターゲット分子を探索する目的で、高密度 SNP アレイを用いて、ATL 検体を解析し、ATL で特徴的に認められるゲノムコピー数の変異およびアレルの不均衡について網羅的な解析を行った。計 171 例の検体についてアレイ解析を行い、アレイ解析の結果、ATL を特徴づけるゲノムプロファイルが確認され、さらに、増幅・欠失の標的となる遺伝子の候補が多数同定された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,200,000	0	2,200,000
2008 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	330,000	3,630,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・血液内科学

キーワード：マイクロアレイ、ゲノム、癌、遺伝子

1. 研究開始当初の背景

成人 T 細胞白血病/リンパ腫(ATL)は HTLV-1 に感染した末梢性 T 細胞が腫瘍化したものであり、これまでの研究により、HTLV-1 感染による末梢性 T 細胞の不死化が、感染後数十年を経て発症する ATL の第一段階であること、また、HTLV-1 がコードする Tax 蛋白質が HTLV-1 に感染した T 細胞の不死化に中心的な役割を担うことが明らかにされている。しかし、HTLV-1 感染者のうち ATL 発症に至るのはいくつか報告があるものの、現在までのところ、ATL 発症機序の解明には至っておらず、より解像度の高いゲノム異常の網羅的な解析が必要であると考えられる。

ATL のゲノム異常については、これまでに

SNP アレイを用いたゲノムコピー数異常の解析は、これまでの染色体分析や、CGH アレイ解析などに比してはるかに解像度をもつ手法である。しかし、SNP アレイを用いたゲノムコピー数の異常の解析については、基礎的研究の報告が少数みられるものの、実際に臨床検体を用いて網羅的なゲノム解析を行った報告はほとんどなく、特に ATL についての報告は皆無である。

2. 研究の目的

ATL の臨床検体について、SNP アレイを用いてゲノムコピー数の異常を網羅的に解析し、多数例の解析結果から、異常の集積する領域から疾患原因遺伝子候補を同定する。

疾患原因遺伝子候補について、分子生物学的手法、疾患モデル動物を用いた実験などにより、ATL の発症機序への関与を明らかにするとともに、治療標的分子の同定を目指す。

3. 研究の方法

ATL の臨床検体について、SNP アレイを用いてゲノムコピー数の変化を網羅的に解析する。またそれらの結果を用いることにより、疾患原因遺伝子候補の同定を行う。具体的には以下のような手順になる。

(1) DNA の抽出

ATL の検査目的に採取した検体(末梢血やリンパ節)の残余を用いて DNA を抽出する。また同意が得られれば同一対象の正常組織(末梢血など)を提供してもらい DNA を抽出する。これとは別に健康人ボランティアより末梢血を採取し同様に DNA を抽出する。

(2) アレイ解析

GeneChip SNP アレイの通常のプロトコールに従い、アレイ解析を行う。具体的には、1)で抽出したゲノム DNA を制限酵素で切断した後、アダプターを付加し、アダプター特異的プライマーを用いた PCR 法にてゲノム全体を増幅する。増幅された DNA を精製後、TdT 酵素にてラベリングを行い、DNA 分解酵素にて適切な DNA 断片長に部分分解し、DNA プローブを作成する。このようにして作成したプローブをマイクロアレイ上にてハイブリダイゼーションを行い、蛍光色素を付加後、スキャナーを用いて SNP シグナルを検出する。

(3) ゲノムコピー数の解析

疾患由来 DNA の SNP 解析の結果を正常組織由来の DNA の解析結果あるいは健康人ボランティア由来の DNA の解析結果と比較する。データ解析は、われわれが独自に開発した解析アルゴリズムを用いたソフトウェア(CNAG)を用いて行う。このアルゴリズムはアレイにより検出される SNP 毎のシグナル強度を、各種パラメータに対して高次・多重回帰分析などにより種々の補正を行うことにより、ノイズを除去し、コピー数の解析を行うものであり、従来にない高感度でゲノムコピー数変化をとらえることが可能である。また、SNP アレイでは、膨大な SNP の多型情報が同時に得られることから、単なるコピー数の変化だけではなく、従来は全く不可能であったアレル別のコピー数の解析も行う。これにより、ゲノムのコピー数が正常であっても、heterozygosis を失う異常(loss of heterozygosis, LOH)を検出することができ

る。

特に我々の開発した解析アルゴリズムは、正常組織の混入による検出感度の低下がほとんど無く、正常細胞と ATL 細胞が混在した検体しか得られないことが多い ATL の解析には有効な手段である。

(4) 結果の確認

得られた染色体コピー数の異常に対して、実際にゲノム異常が生じているか、FISH 法、PCR 法、シーケンス法などを用いて確認を行う。

(5) 原因遺伝子候補の同定

共通して、高頻度に欠失や増幅あるいは LOH が確認される領域より、疾患原因遺伝子候補の同定を行う。共通領域に存在する遺伝子に対して、染色体コピー数の変化を伴わない点突然変異などの遺伝子異常の有無や、腫瘍細胞株における異常の有無などを検索し、当該遺伝子の既知の機能や腫瘍細胞株での発現状況などを参考に原因遺伝子候補を絞り込んでいく。

ATL の原因遺伝子候補に対して、様々な機能解析を行うことにより、ATL の発症・進展などにおいて当該遺伝子が果たす役割について解明する。

4. 研究成果

171 例の ATL の SNP アレイ解析で認められたゲノムコピー数異常の集積図を図 1 に示した。ATL で特徴的に認められるゲノム異常としては、1q, 3p, 3q, 6p, 7q, 9q, 14q, 16p, 18q, 19p におけるコピー数の増加と 2q, 4p, 5q, 6q, 7q, 9q, 10p, 13q, 17p 18p におけるコピー数減少が認められた。これらによって ATL 特有のゲノムプロファイルが作られることが明らかとなった。

一方、このような染色体バンドレベルの比較的大きな領域における異常に加えて、今回用いたマイクロアレイの解像度が高いことと関連して、非常に小さな領域に集中して高頻度に認められる異常も多数検出された(図 1 矢印)。こうした領域には、通常 1 ないし 2 個の遺伝子が存在しているのみで、こうした領域からは ATL の発症に関わる可能性のある標的遺伝子の候補が多数同定された。ATL で増幅や欠失の標的となっていると考えられるこれらの遺伝子の多くは、成熟 T 細胞の機能における重要性が示されている遺伝子や T 細胞において高い発現を示す遺伝子であった。

また、急性型および慢性型の症例に加えて、リンパ腫型の症例 40 例の解析を行い、ATL の病型におけるゲノム異常の相違について解析した。本質的には、これらの病型によるゲノムプロファイルに大きな差異は認められなかったが、リンパ腫型においては、hyperploid の症例、および 3 番染色体の片親

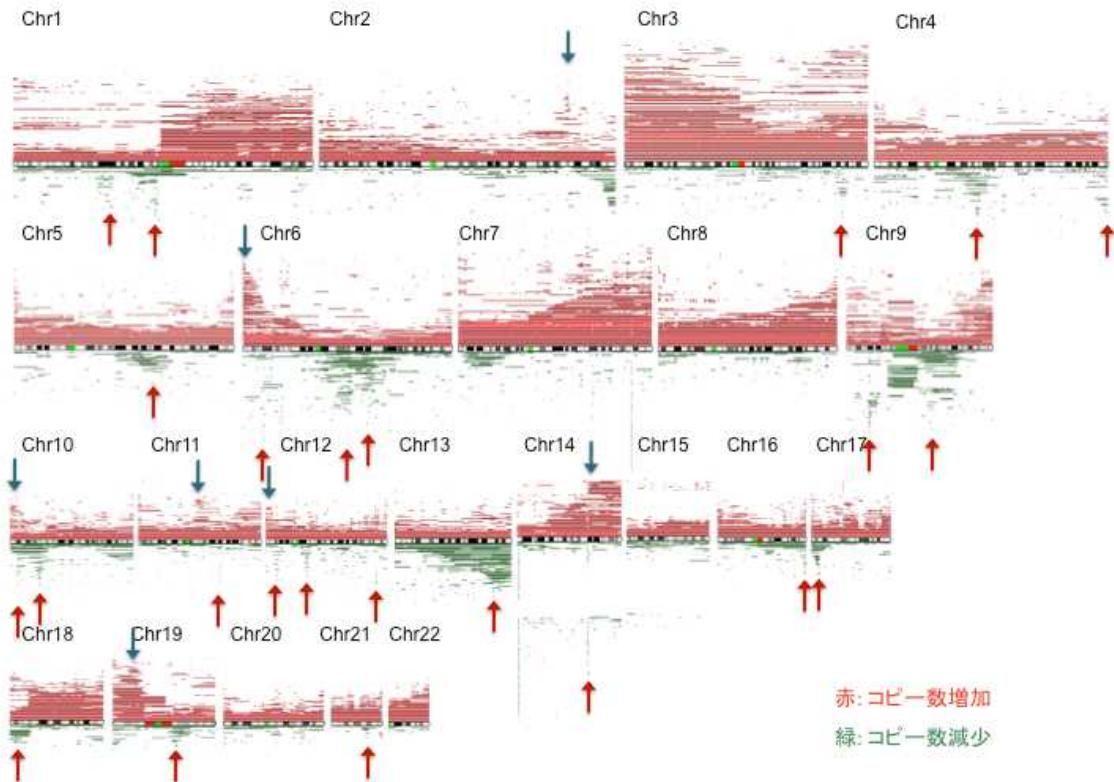


図1. 171例のATL/ATLLのゲノムプロファイル

性2倍体を示す症例が多いこと、また、*helios*を含む領域の欠失の頻度が高いこと、などの特徴がみられた。

[考察]

計171例のATLゲノムを高密度SNPアレイで解析することにより、ATLゲノムに認められるコピー数異常およびアレル不均衡の特徴が明らかとなった。他の腫瘍と同様に、個々のATL検体におけるゲノム異常は症例によって大きく異なっているものの、ATL症例全体としてみると、ゲノム異常は特定の染色体領域に集積する傾向が認められた。このような特定の領域に集積する異常は、ATLの腫瘍化と密接に関連していることが示唆された。

ATLのゲノムプロファイルの全体像は病型によらず、非常に類似したパターンが認められた。このことはATLの各病型が、共通した発症の遺伝学的基盤を有していることを類推させる。一方で、リンパ腫型においては、特徴的なゲノム異常が認められた。これらのゲノム異常は病型の相違の原因となっている遺伝的な変化である可能性が示唆され、臨床的な意義も含め興味深い結果である。

ゲノム異常による症例のクラスタリングからは、個々の腫瘍が互いに共通した異常により複数の亜型に分類される可能性が示された。このようなクラスタリングにより分類される亜分類が臨床的な予後や治療反応性などどのように関連するかは今後の検討課題である。

多くの症例の解析を、高い解像度で行ったことにより、微細な染色体領域の増加や欠失

の集積がより明確になった。こうした微細な異常の集積領域から、ATLの発症に関わる可能性のある標的遺伝子の候補が多数同定された。このようにして同定された遺伝子の多くは、成熟T細胞の機能の制御に関わることが知られている遺伝子、あるいは、T細胞で高い発現を示す遺伝子であった。この結果は、ATLが末梢T細胞の腫瘍であることから予想されることではあるが、本解析で見いだされた多数のゲノムの異常が、単に腫瘍ゲノムの不安定性の結果として偶発的に生じたものではなく、腫瘍化の原因としてクローン選択に関わった可能性を示している。また、多数の遺伝子領域に共通の異常を認めることは、ATLの腫瘍化が単一の遺伝子によるものでない多段階発癌であることを強く示唆し興味深い結果である。

[結論]

ATL症例171例について、高密度SNPアレイを用いてゲノムの網羅的なコピー数変化、アレル不均衡の解析を行い、ATLを特徴づけるゲノムの異常を網羅的かつ高解像度で同定した。これらの解析により、ATL症例に共通して異常の集積するT細胞の機能に関わる遺伝子が多数同定された。これらの遺伝子は、HTLV-1による末梢T細胞の不死化からATLの発症に至る過程に関与すると考えられる遺伝子群の候補である。

今後同定されたゲノム異常に基づいたATLの新たなゲノム診断技術、あるいは、今回同定されたATLの発症に関わるとされる遺伝子をターゲットとした分子標的薬剤の開発が期待される。

5. 主な発表論文等
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

投稿準備中

〔学会発表〕(計 1 件)

Muto S, Yamamoto G, et al. Molecular Allelo Karyotyping of Adult T-Cell Leukemia Using High SNP Genotyping Microarrays. American Society of Hematology 49th Annual Meeting, 9th Dec 2007, Atlanta, USA

〔図書〕(計 0 件)

なし

〔産業財産権〕

なし

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

山本 豪(YAMAMOTO GO)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号 70396753

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし