

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月31日現在

機関番号：37104

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22650234

研究課題名（和文）悪性腫瘍における未知の融合遺伝子の発見を可能とする新規ベクターシステムの開発

研究課題名（英文）Development of a novel method for discovering fusion genes causative for tumorigenesis

研究代表者

水野 晋一（MIZUNO SHINICHI）

久留米大学・医学部・講師

研究者番号：40569430

研究成果の概要（和文）：悪性腫瘍における未知の融合遺伝子探索を行うことを可能とする新規システムを開発した。本法はメイトペア法を基本としているが、従来法では、複数 DNA 分子の環状化という不可避のノイズ混入のため、その解析精度は低く、実験過程や解析は煩雑困難であり、高額な解析費用を必要としていた。本研究では、この問題を抜本的に解決し、シンプルなベクターシステムにより正確なメイトペア配列のみを解析する新規方法の開発に成功しその有効性を実証した。本法により、悪性腫瘍の融合遺伝子の高精度かつ経済的な系統的探索が可能となるであろう。

研究成果の概要（英文）：We developed a novel tool of gene analysis, based on a mate-pair analysis, to discover fusion genes that could be causative for tumorigenesis. In conventional mate-pair analysis, there must contain circularized DNAs derived from multiple DNAs and their mate-pair fragments can be a cause of false positive fusion genes. To solve this problem we developed a novel method which allows us to prepare circularized DNA libraries in which each circularized DNA is originated from each single DNA. By this method, we can make a systematic survey of the presence of fusion genes in cancers in a highly precise manner.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,100,000	0	1,100,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,200,000	330,000	2,530,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍診断学

キーワード：発現解析

1. 研究開始当初の背景

染色体構造異常による融合遺伝子（fusion gene）は主に造血系腫瘍に限られるとされてきたが、近年、上皮性固形腫瘍においても融合遺伝子の関与が推測され、実際に前立腺がん、肺がんから責任融合遺伝子が発見され、

その重要性が明らかとなってきている。

従来、固形腫瘍では染色体分析に限界があり、核型分析からの融合遺伝子の同定は困難であった。一方、現在では各種の次世代高速シーケンサーが開発され、腫瘍ゲノム・遺伝子の高速・大量塩基配列解析が可能となって

きており、「未知の融合遺伝子の探索」が始まりつつある。

しかし、実際のがんのゲノムから融合遺伝子を同定するためには、ゲノムあるいは mRNA を対象として大量の塩基配列解析が必要となり、多数症例の解析は困難な上に高額のコストが必要であり、効率よく系統的に融合遺伝子を探索してゆくための新たな方法の開発が必要である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、従来の方法では分析上限があった悪性腫瘍において、ゲノム構造異常による「融合遺伝子」を新たに発見する新規ベクターシステムを開発し、新たな融合遺伝子を系統的に探索してゆくことにある。

本システムは環状化 DNA の結合両末端（メイトペア）解析を基本とし、腫瘍由来の環状化 cDNA ライブラリーにおけるメイトペア塩基配列解析から未知の融合遺伝子を発見するものである。特徴は、ライブラリーの各 cDNA 単分子に固有の塩基配列部位を導入し 2 段階の核酸連結（ligation）により、単分子のみの環状化 cDNA 形成を許し、正確なメイトペア配列解析を可能とすることであり、高精度の解析とともに多数症例の解析を可能とする方法である。

本システムは、これまで染色体分析に限界のあった固形腫瘍においても新たな融合遺伝子の発見を可能にする新規の方法であり、新たな融合遺伝子の発見は、腫瘍の分子診断・分子標的療法へ役立つであろう。さらに本システムの高精度メイトペア解析法は、ゲノム解析効率化やトランス・スプライシング遺伝子の発見へと幅広い波及効果が期待される。

3. 研究の方法

(1) 高精度システムの確立、および (2) 融合遺伝子探索の実際を目標とし、以下のような方法で研究を行った。

(1) 高精度システムの確立

本システムは環状化 DNA のメイトペア解析が基本であり、腫瘍由来の環状化 cDNA ライブラリーにおけるメイトペア塩基配列解析から未知の融合遺伝子を発見する方法である。本法は、cDNA ライブラリーの各 cDNA 単分子に固有の塩基配列部位を導入し 2 段階の ligation により、単分子のみの環状化 cDNA 形成を許し、正確なメイトペア配列解析を可能とすることである。

研究の目的はこのベクターシステムを最適化することにより、高精度の系統的融合遺伝子の探索を可能とすると同時に、幅広く研究者が利用することができる汎用性の高い技術開発を行うことであるが、その際に解析精

度をどこまで高精度化できるかが最も重要な点となる。

研究開始時に提出した方法において、既に解析精度を左右するメイトペアの「ノイズ」を 100 分の 1 にまで減少させることに成功している。理論上はほぼノイズは“0”にすることができるはずであるが、この理論と実際の実験結果の差異は、DNA 結合（ligation）における不適合結合（mismatch-ligation）によることが判明した。

次世代シーケンサーの高速大量解析能力に見合った解析精度としては、「ノイズ」が 1 万分の 1 以下の精度のシステムを確立する必要があり、この mismatch-ligation を endonuclease 酵素により排除する方法を導入した。この解決策により、ノイズを現在のさらに 100 分の 1、つまり解析ノイズが 1 万分の 1 以下の高精度のシステムを作成し、融合遺伝子の探索のみならずゲノム構造解析においても強力なサーチツールとして本法を確立する。

(2) 融合遺伝子探索の実際

①がん細胞株およびがん組織からの融合遺伝子の同定

本技術では、がんの原因である融合遺伝子の発見を、従来にない高い精度と効率で且つ優れた経済性で実施することが可能であり、実際のがん細胞株およびがん組織から融合遺伝子を系統的に同定してゆく。

具体的には、まず bcr/abl 融合遺伝子を有する CML 細胞株である K562 を対象としてシステムの最適化を行う。その後、上皮性固形腫瘍の細胞株より融合遺伝子を探索し、同時にすでにサンプル保存している血液腫瘍・胃癌・大腸癌から融合遺伝子を同定する。Illumina GA シーケンサーを用いて計 4 x 1 億リードの解析を行う。

②正常細胞および癌細胞におけるゲノム構造解析

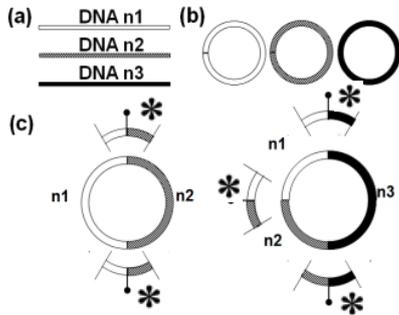
本技術は、ゲノムの構造解析に直接応用できるため、正常およびがん組織を対象に、ゲノムの構造解析が従来の方法と比較して遥かに容易に且つ経済的に行える可能性がある。特にゲノム構造解析は、次世代のがん診断および悪性度診断に必須となることが予想され、さらに本法によるゲノム構造解析はヒト疾患のみならず、農業・畜産の分野での遺伝子解析へも幅広く応用される技術となることが期待される。このゲノム構造解析への応用の実証のため、正常細胞（2 サンプル）およびがん組織（2 サンプル）に対してゲノム構造解析を行う。同じく Illumina GA シーケンサーを用いて計 1 億リードの解析を行う。

4. 研究成果

(1) 高精度システムの確立

本研究は、悪性腫瘍を含む様々な疾患における未知の融合遺伝子の探索を高い精度でかつ経済的に行うことを可能とする新規システムの開発およびその有効性の実証である。

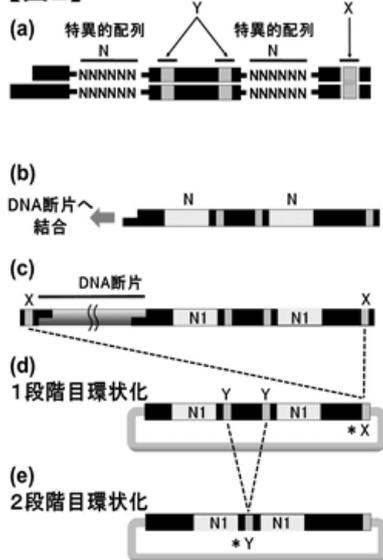
【図1】



本システムはメイトペア法を基本としているが、従来のメイトペア法では DNA を環状化する際に、複数遺伝子による環状化 DNA の混入が原理上不可避であり、誤って偽融合遺伝子と判断されてしまうため (図 1 *)、その解析精度は低く操作も煩雑であり高額 of 解析費用を必要としていた。

研究開始時に準備した新規開発の方法と予備実験データは、cDNA ライブラリーに特異配列アダプター付加し、特異配列前後の酵素処理による、2段階環状化で単分子環状化 DNA のみを作成するものであった。

【図2】



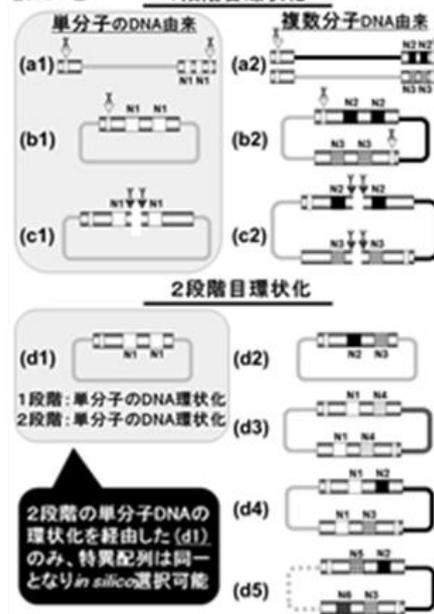
しかし、研究方法に記載したようにシステム精度を上げるべく改良を行ったが、1/1000 程度にノイズを減少させることが限界であり、目標の 1 万分の 1 以下の精度に達しなかつ

た。この方法でも実用性はあるが、今後の展開を行うためには、この方法ではノイズ排除が不十分であると判断した。

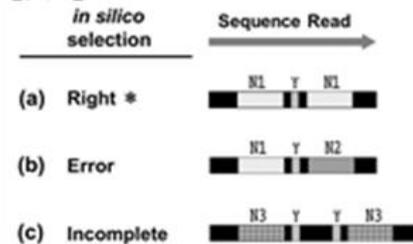
そこで、我々は開始時の方法をさらに精錬し、複数分子環状化 DNA のノイズの混入を減少させるのではなく、不適格ノイズそのものを解析上で完全に排除する、高精度のメイトペア解析方法を新たに確立することに成功した。

具体的には、2つの相同特異的配列の間に制限酵素サイトを有するアダプターを対象 DNA 分子に付加し (図 2 a, b)、1段階目環状化の後 (図 2 c) に制限酵素 Y で切断し (図 2 d)、さらに2段階目環状化を行う (図 2 e)。得られた環状化 DNA は、単分子 DNA 由来であれば同一相同配列組合せとなるが (図 3 a1 → d1)、複数分子 DNA 由来であれば異なる組合せとなる (図 3 a2 → d5)。

【図3】



【図4】



つまり、環状化 DNA のアダプターの特異配列が同一であれば単分子環状 DNA であり、異なれば複数分子環状 DNA であると判定することができ (図 4)、目的配列をコンピューター上でデータ解析時に正確に選択することができる (*in silico* selection)。

本法は、2回の環状化反応を行うだけの極めてシンプルな方法であり、メイトペア配列解

析において単分子 DNA 環状化分子由来のメイトペアを確実に選択できる。本法により、融合遺伝子の系統的探索を容易かつ高精度・高効率に行うことが可能となる。

(2) 融合遺伝子探索の実際

この新規システムを、既知の融合遺伝子 (bcr/abl) を有する CML 検体に応用し、プロトコルに従い 2 段階環状化反応を行い、そのメイトペア断片を illumina GA で解析した。その結果、1 億リードの有効配列解析が得られ (有効ペア配列として、0.5 億ペア)、その内、本法のタグ・アダプター構造を有したリードが 75% であり、その 91% において、タグ解析から特異配列が同一であったクローンであった。つまり単分子 DNA 由来の環状化分子からのメイトペアとして解析が可能であり、BCR-ABL 融合遺伝子を確認できることが実証された。

内容としては、タグ・アダプター構造を有したリード配列が 75% に留まっており、25% にアダプター構造を有しない配列が混入していたが、今後はビオチンによる濃縮過程の追加で、この効率を上げることが可能である。タグ解析による単分子 DNA 由来の環状化分子の選択は他の遺伝子の検討からも正確であり、十分な高精度が期待できることが明らかになった。本システムではデータ解析の段階で正しいクローンを選択し不適格クローンを排除することができるため、実験条件や習熟度によらずに安定した結果が得られる点も大きな特色である。

また、本システムは従来法では不可能であった高精度メイトペア解析を可能とするため、融合遺伝子探索のみならず、原理的には「ゲノム構造解析」にも応用可能であり、長期的には畜産・農業を含め幅広く生物全般に応用されることが期待される。

そこで、本研究において実際のゲノム構造解析への応用の可能性についても実証研究を行い、ヒトゲノムから DNA 断片を作成し、本システムを適用した後に PCR 増幅サンプルを解析した。一部の直接塩基配列解析の結果であるが、アダプター配列を中心として実際にゲノム構造を反映していることも実証でき、ゲノムへの応用にも十分に期待できる方法であることが確認された。

一方、研究開始時の方法の精度を上げるため、新たに抜本的に改良した方法の確立に時間を割いたことから、実際の未知のがん融合遺伝子の探索は緒に着いたところである。この点に関しては、一時的には時間を費やしたが、実際にはより完全なシステムの確立に成功したことから、今後の展開において、融合遺伝子探索の効率はより向上することが期待される。

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)

[学会発表] (計 2 件)

- ① 水野晋一
新しい遺伝子検査法-がん融合遺伝子の新規探索法-
BioJapan 2011(横浜) 2011 年 10 月 7 日
- ② 水野晋一
新しい遺伝子検査法-がん融合遺伝子の新規探索法-
BIO tech 2012 (東京) 2012 年 4 月 26 日

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

名称: 単分子 DNA から形成される環状 DNA の作成方法

発明者: 水野晋一、長藤宏治、岡村孝

権利者: 久留米大学

種類: 特願

番号: 2010-196719

出願年月日: 2010 年 9 月 2 日

国内外の別: 国内

名称: DNA 分子の環状化において単分子による環状化 DNA のみを選別する方法

発明者: 水野晋一、小澤秀俊、長藤宏司、
岡村孝

権利者: 久留米大学

種類: 特願

番号: 2011-189280

出願年月日: 2011 年 8 月 31 日

国内外の別: 国内

○取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

水野 晋一 (MIZUNO SHINICHI)

久留米大学・医学部・講師

研究者番号: 40569430

(3) 連携研究者

奥 英二郎 (OKU EIJIRO)

久留米大学・医学部・助教

研究者番号: 10569429