

総説（教授就任記念講演）

ゲノム・エピゲノム異常を指標とするがんと遺伝疾患関連遺伝子探索研究

井本 逸 勢

徳島大学大学院 HBS 研究部人類遺伝学

（平成24年9月30日受付）（平成24年10月1日受理）

はじめに

単一遺伝子病である遺伝疾患，多くの生活習慣病を含む多因子疾患，あるいは体細胞における遺伝子異常が発生と増悪に関わる癌をはじめ，ほとんどのヒト疾患の発症には遺伝的要因が関わっている（図1）。今世紀初頭にヒトゲノム配列が明らかにされたことで，ゲノム情報を基盤としたヒト疾患の新しい診断，治療，予防法の開発研究や基礎研究で得られた成果を臨床医学に橋渡ししていく研究に多大な期待が寄せられ，さらに，最近の次世代シーケンサーによる塩基配列決定技術とコンピュータ科学を基盤とした情報解析技術の進展が，遺伝子異常解析研究とその臨床応用に対するさらに強い推進力として働いている。

多くのヒト癌は，生殖細胞系列における遺伝的多型を背景にして，後天的に体細胞レベルでゲノムの構造異常（塩基配列やゲノムコピー数などの一次構造に変化が生

じるゲノム異常）や機能異常（ゲノムの一次構造の変化を伴わずDNAメチル化などの修飾やヒストンコードの変化などによるエピゲノム異常）が蓄積していった結果，シグナル伝達，細胞周期，代謝などの細胞機能の正常な制御を逸脱して発生・進展し，最終的に個体を死に至らしめる。個々の癌において浸潤・転移・薬剤耐性といった悪性形質を決定すると考えられるさまざまなゲノム・エピゲノム異常とその蓄積のパターンを解明する上では，癌細胞（組織）に生じたゲノム・エピゲノム異常の全てをゲノムワイドに正確に把握し，その情報を基に統合的な癌の異常の成り立ちを理解することが有用なアプローチと考えられる。対象とする個々の癌の発生，さまざまな形質，病態形成に重要なゲノム異常が網羅的に解明できれば，これらの情報を基盤にした診断や治療効果予測などのマーカーの同定，ゲノム異常を基盤に生じる異常分子を標的にした分子標的薬の開発などを加速する。このような全ゲノムスキャンによる癌研究アプローチは，ヒトゲノム配列の解読がほぼ終了した現在，配列情報を基盤にした塩基配列レベルあるいはコピー数レベルでの全ゲノム解析技術の進歩により現実のものとなっている。本稿では，東京医科歯科大学難治疾患研究所分子細胞遺伝学分野の稲澤譲治教授のもとで筆者らが進めてきた，ヒト癌におけるゲノム構造異常やエピゲノム異常を指標にした新規癌関連遺伝子の同定アプローチについて主に紹介する。

1. 癌細胞における全ゲノムコピー数解析の意義

癌のゲノムレベルで生じる異常には，ゲノム一次構造異常（点突然変異，欠失，挿入，増加・増幅，転座など）とエピゲノム異常があり，これらにより遺伝子産物

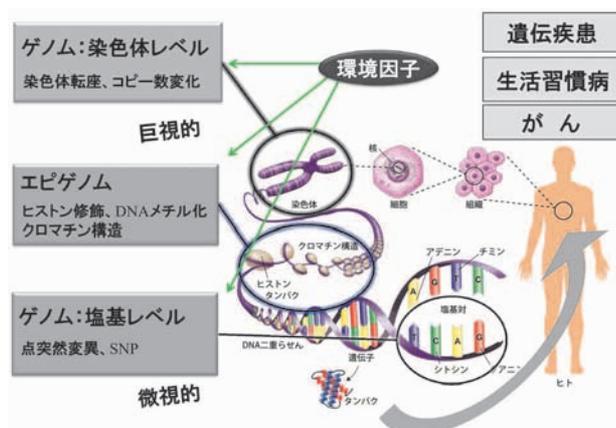


図1：ヒト疾患形成におけるさまざまなレベルでのゲノム・エピゲノム異常の関与

の量的（過剰，減少）あるいは質的（変異・融合産物）異常が生じると，細胞機能の異常につながる。良く知られた癌遺伝子あるいは癌抑制遺伝子の点突然変異による活性化や不活性化に加え，ほとんどの癌細胞で認められる染色体不安定性を背景に生じる比較的大きな染色体レベルでの増幅・欠失といったコピー数変化により多くの遺伝子の量の異常が効率よく起こることで，次々と新たな形質を獲得し劇的な変化を遂げていく癌細胞の遺伝子異常の蓄積に関与する^{1,2)}。最近，chromothripsis と呼ばれる一度のイベントで多くのゲノム異常が生じる場合があることが報告されたが³⁾，いずれにしても，癌を構成する個々の癌細胞の表現型の多様性が各癌細胞に蓄積される遺伝子異常の多様性により生じる結果，宿主の環境に適応した癌細胞クローンが選択優位性によってさらに悪性度の高い癌を形成する，このような正の淘汰を受けて優位性成立の鍵となる遺伝子異常が「ドライバー変異」と呼ばれ，優位性に関与しない「パッセンジャー変異」と区別される⁴⁾。このため，既知の遺伝子機能に関らず，ゲノムワイドにゲノムコピー数異常を高密度に検出し，これを指標として異常を示す領域内にある蛋白を

コードする遺伝子に限らずマイクロRNA やタンパク非コードRNA も含めた遺伝子からコピー数変化あるいはその他の機序により発現が一群の癌細胞特異的に変化するものを選び出してくることが，癌の発症・進展において重要な新たな遺伝子の発見とこれらを標的にした分子標的治療薬の開発に通じる。実際，コピー数レベル（増幅，欠失），染色体転座に伴う再構成で生じるキメラ遺伝子，点突然変異は，これらをランドマークにして多くの癌関連遺伝子が発見されてきただけでなく，癌に特異的な治療標的分子として分子標的治療薬が開発，実用化され，実際の治療現場で多大な効果をあげてきた（表1）。例えば，トラスツズマブ（ハーセプチン[®]）は，乳癌において *ERBB2* 遺伝子の増幅などに伴い産物である受容体型チロシンキナーゼ Her2 タンパクが高発現している症例に有効な抗体薬である。ゲフィチニブ（イレッサ[®]）は，EGF 受容体のキナーゼ活性阻害剤として開発され，EGFR の点突然変異の認められる例での有効性⁵⁾だけでなくコピー数増加のある群での有効性⁶⁾が報告されている。さらに，EGF 受容体に対する抗体治療薬セツキシマブ（エルビタックス[®]）において，EGFR

表1. 癌で認められる増幅遺伝子の例（Sanger institute, Cancer Gene Census より抜粋¹⁾）

増幅遺伝子	異常の認められる代表的な癌腫	分子標的治療薬
ERBB2 (HER2/neu)	乳癌，卵巣癌，胃癌，非小細胞肺癌	トラスツズマブ（ハーセプチン [®] ） ²⁾
EGFR	非小細胞肺癌，神経膠腫	セツキシマブ（アービタックス [®] ） ³⁾ ゲフィチニブ（イレッサ [®] ） ⁴⁾ エルロチニブ（タルセバ [®] ） ⁴⁾
その他		
AKT2	卵巣癌，膵癌	
ALK	非小細胞肺癌，神経芽細胞種	
CCNE1	漿液性卵巣癌	
LMO1	神経芽細胞種	
MDM2	神経膠腫，大腸癌，その他	
MDM4	神経膠芽腫，膀胱癌，網膜芽細胞腫	
MITF	悪性黒色腫	
MYC	各種癌	
MYCL1	小細胞肺癌	
MYCN	神経芽細胞種	
NKX2-1	非小細胞肺癌	
SOX2	非小細胞肺癌，食道扁平上皮癌	

- 1) <http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/Census/amplification.shtml>, 2011年12月18日検索
- 2) 日本では乳癌，胃癌に対して適応がある
- 3) 日本ではEGFR陽性の治療切除不能な進行・再発の結腸・直腸癌の治療役として承認を受ける
- 4) 日本では非小細胞肺癌に適応があるが，EGFR増幅例に対する有効性については不明である

コピー数が大腸癌の肝転移巣に対する治療効果予測の指標となることが報告されている⁷⁾。さらに、機能獲得性変異を有する BRAF, KRAS を持った大腸癌細胞に対し効果を示す下流分子 MEK1/2 に対する治療薬 selumetinib に対する薬剤耐性が変異 BRAF, KRAS 遺伝子増幅により獲得されることが報告されるなど⁸⁾、薬剤耐性の機序解明とその克服のためにも増幅遺伝子探索は重要なアプローチである。多数の遺伝子異常が蓄積している固形癌においても 1 つの分子を標的にした治療薬が奏効することは、臨床的にも癌の増殖や細胞死に対する抵抗性その他の悪性形質維持の要となるドライバー遺伝子が存在し、これが有効な治療標的になることを示している (表 1)。そして、特定のドライバー変異をマーカーとして捉えることで、その異常分子を対象にした分子標的薬に対する感受性の期待できる症例を選択する「コンパニオン診断」⁹⁾ が可能であり、効果の高い症例を選択して癌に特異的な治療を行う「個別化医療」につながる (図 2)。

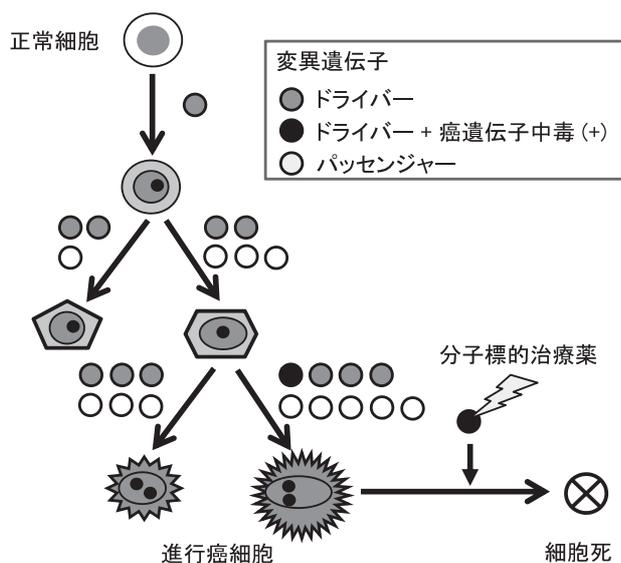


図 2：癌の段階的進展における遺伝子異常の蓄積

2. 癌細胞における高密度全ゲノムコピー数解析法

従来癌や先天異常における CNA を含む染色体構造変化は、局所であれば fluorescent *in situ* hybridization (FISH) 法、ゲノムワイドであれば染色体分染法や比較ゲノムハイブリダイゼーション (comparative genomic hybridization, CGH) 法でなされてきた。しかし、1990 年代の終わりにアレイをプラットフォームとして用いた CGH 法 (アレイ CGH 法) が開発された (表 2)。初期は、癌細胞などテスト試料由来の DNA と正常二倍体細胞由来の対照 DNA を各々異なる蛍光色素でラベルした後に、バクテリア人工染色体 (bacterial artificial chromosome, BAC) クローン由来 DNA あるいは合成オリゴ DNA などをアレイ化したスライドガラス上で競合的にハイブリダイゼーションし、その蛍光比から相対的ゲノムコピー数を定量する手法が用いられており、筆者らも自作の BAC アレイの開発に 2003 年に成功したことで、これを用いたゲノムコピー数解析研究や臨床応用としての実用化研究を推進できた¹⁾。今日では市販の一塩基多型 (single nucleotide polymorphism, SNP) ジェノタイピング用アレイや CGH 用オリゴアレイによる網羅的かつ高分解能の解析に移行している。このようなオリゴアレイによる virtual karyotype は、短いプローブ DNA (低い複雑性) が微小な領域 (微量の DNA) にスポットされていることから蛍光量や S/N 比が低く蛍光強度のばらつきが大きくなり、複数の連続するスポットで結果が再現されないと微細なコピー数異常の断定は難しいが、プローブ間隔を狭めることでキロベースレベルの微細な領域に至るまでの分解能のコピー数変化が検出可能である。また、SNP ジェノタイピング用アレイを用いた方法では、テストサンプルのみを用いたハイブリダイゼーションによる蛍光強度の定量と SNP パターンからコピー数の絶対量を推定するもので、アレル毎のコピー数解析ができることからヘテロ接合性の消失 (loss of het-

表 2. ゲノムコピー数解析に用いられる市販のオリゴアレイ

アレイの種類	コピー数推定法	作製・供給元	特徴
SNP ジェノタイピング用アレイ	サンプルの蛍光量と SNP パターン	Affymetrix 社 Illumina 社	・アレルごとにコピー数の評価が可能 ・Loss of heterozygosity (LOH) の検出 ・片親性ダイソミー Uniparental disomy (UPD) の検出
CGH 用アレイ	サンプル/対照の蛍光量比	Agilent Technologies 社 NimbleGen 社 Operon 社/Filgen 社 東レ, 等	・少ない枚数から安価にカスタムアレイ作製が可能 ・コントロールに対する相対的なコピー数比が、比較的安定した値として得られる

erozygosity, LOH) の検出や、一見コピー数は変化していなくても片アレルが消失しもう一方のアレルが重複した片親性ダイソミー (uniparental disomy, UPD) の検出ができる。ちなみに、プラットフォームとなるアレイに対して、これにハイブリダイズさせる DNA の方を工夫することで特定の DNA 領域の断片を選択できれば、特徴的な変異を示す場所のみを同定することもできる。例えば DNA メチル化が密に起こっている領域の DNA 断片を何らかの方法で濃縮できれば (PCR 法やメチル化 DNA 断片の免疫沈降など)、癌で異常メチル化を起こしている領域の同定も可能なことになる¹⁾。

このようなアレイを用いたゲノムコピー数解析は、CNA パターンから腫瘍の亜型分類や悪性度鑑別など分子病理学的診断に寄与でき臨床的有用性がみこまれる¹⁰⁾。しかし、標準解析方法、異なるプラットフォーム間の互換性、検査ガイドラインなどが無いのが現状であり、データベース作製や検査の標準化など多施設間での情報共有によるアレイ技術の癌臨床の場での活用を目指して 2009 年 8 月より米国を中心に The Cancer Cytogenomics Microarray Consortium (<http://www.urmc.rochester.edu/ccmc/index.cfm>) が設立されている。

3. 癌細胞における全ゲノムコピー数解析を基盤とした新規癌関連遺伝子の探索研究

癌関連遺伝子の活性化や不活性化のゲノムレベルの機序はさまざまであるが、指標となるゲノムコピー数異常が検出さえできるリソースにあたれば、主要な異常が他の機序で生じる (エピゲノム異常も含め) 遺伝子であっても、既知の機能や発現情報によらず癌関連遺伝子の同定が可能であり、新規の癌関連遺伝子を同定するのに有用である。すなわち、大まかには、癌ゲノムのコピー数をスキャンした際に検出できる増幅領域 (特に高度増幅領域) からは癌遺伝子が、欠失領域 (特に遺伝子が完全に欠失するホモ欠失領域) からはがん抑制遺伝子が同定できる可能性があることになる。実際に筆者らは、自作 BAC アレイを用いた低密度あるいは高密度の全ゲノムスキャンにより検出した増幅領域、ホモ欠失領域から 60 を超す癌遺伝子、癌抑制遺伝子候補を同定している。もちろん、ゲノムコピー数異常領域は時として大きく複数の遺伝子とその異常領域中に含んでおり、それらの遺伝子が全て癌の発症や進展に関わっている訳ではない。増幅領域を指標にドライバー変異遺伝子を同定するとは

言っても、癌細胞にはゲノム不安定性を背景に多くのドライバー、パッセンジャー増幅変異が混在し、1つの増幅領域内にも両方の変異遺伝子がある上、細胞や組織系譜によりドライバー、パッセンジャー変異遺伝子が変わる場合もあるなど、特異的な治療標的分子の同定は容易ではない¹¹⁾。このような場合、増幅により発現が上昇することで機能亢進が生じ特定の機能パスウェイが活性化される増幅遺伝子の場合、癌遺伝子の探索の指標になり得る¹⁾ことから、①ゲノムワイドな増幅領域の探索、②検出した異常領域を指標とした異常領域内遺伝子から増幅あるいはその他の機序により発現亢進が生じる増幅標的候補の選択、③候補遺伝子の生物学的、臨床病理学的意義の解明による増幅標的遺伝子としての妥当性の証明、の各段階を経て、信頼性の高い癌の治療標的候補が決定され、より信頼性が高く創薬に適した増幅標的遺伝子候補同定が、新薬開発の流れを加速することになる (表 2)¹²⁾。筆者らは、このような観点から、異常領域の検出から癌関連遺伝子としての妥当性までの証明までを一つの完結した流れとするように、研究を展開してきた¹³⁾。

全ゲノムをより高分解能でカバーできるゲノムアレイを用いたゲノムワイドな癌の超高密度ゲノムコピー数解析 (SNP アレイの場合はアレル毎) が広く利用可能になった現在、これまで検出できなかったコピー数異常部位の網羅的検出が行えるようになり、解析技術やデータ処理法の報告あるいは実際に検出した領域のカタログ的な報告に留まらず、われわれのアプローチで有用性が示された異常領域を指標にした新たな癌遺伝子・癌抑制遺伝子の同定とその病態との関りが報告されるようになってきている¹⁴⁾。

おわりに

癌において、既知の機能的視点にとらわれず分子標的治療の対象となりうる分子を同定し、有用である可能性の高いものに対して分子標的薬候補を作製して臨床応用へとつなげて行く一連の研究は、トランスレーショナル・リサーチの推進の成功の鍵を握っている。この中で、癌細胞が癌遺伝子中毒を示すドライバー変異を持つ癌遺伝子を効率よく同定するアプローチは、癌治療上有用な分子候補のスクリーニングのひとつの効率的な道である。ゲノム一次構造異常に注目したスクリーニングにより検出される異常領域内遺伝子の中から標的遺伝子候補を探

索する順遺伝学的アプローチは、より確度の高い治療標的候補同定に至る戦略の有用性が確認されている。しかし、中毒（依存性）の本態（分子機序）は未だ明らかではなく、また特定の組織（癌腫）においてのみ発現して中毒を示す遺伝子があるなど、単純な系を用いたスクリーニングでは擬陰性・擬陽性ともに避けられず効率的に進めることができないジレンマも存在する。今後、逆遺伝学アプローチや *in vivo*, *in vitro* での体系的機能ゲノム解析に加えて、システムバイオロジーなど *in silico* 解析も加えたより高効率の分子標的遺伝子同定アルゴリズムの開発が進むことで、分子標的治療薬の開発が加速すると共に、標的分子をマーカーとするコンパニオン診断薬開発により、治療効果の期待できる症例を選択して有効な治療を行う癌の個別化医療推進が期待される。

また本稿では割愛したが、有効な治療法が得にくい先天異常疾患でも療育や予後予測に有用な情報が得られることから、全ゲノムスキャンアプローチは、これらの疾患における臨床的有用性の高いゲノム情報取得とこれに基づく個別化医療の実現に寄与しうると考えられる。

文 献

- 1) Inazawa, J., *et al.*: Comparative genomic hybridization (CGH)-arrays pave the way for identification of novel cancer-related genes. *Cancer Sci.*, **95**(7) : 559-563, 2004
- 2) Stallings, R. L. : Are chromosomal imbalances important in cancer? *Trends Genet.*, **23**(6) : 278-283, 2007
- 3) Stephens, P. J., Greenman, C. D., Fu, B., Yang, F., *et al.*: Massive genomic rearrangement acquired in a single catastrophic event during cancer development. *Cell*: 14427-14440, 2011
- 4) Stratton, M. R., Campbell, P. J., Futreal, P. A. : The cancer genome. *Nature*, **458** : 719-724, 2009
- 5) Paez, J. G., *et al.*: EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science*, **304**(5676) : 1497-1500, 2004
- 6) Cappuzzo, F., *et al.*: Epidermal growth factor receptor gene and protein and gefitinib sensitivity in non-small-cell lung cancer. *J. Natl. Cancer Inst.*, **97**(9) : 643-655, 2005
- 7) Moroni, M., *et al.*: Gene copy number for epidermal growth factor receptor (EGFR) and clinical response to antiEGFR treatment in colorectal cancer: a cohort study. *Lancet Oncol.*, **6**(5) : 279-286, 2005
- 8) Little, A. S., Balmanno, K., Sale, M. J., *et al.*: Amplification of the driving oncogene, KRAS or BRAF, underpins acquired resistance to MEK1/2 inhibitors in colorectal cancer cells. *Sci. Signal.*, **4** : ra17, 2011
- 9) Papadopoulos, N., Kinzler, K. W., Vogelstein, B. : The role of companion diagnostics in the development and use of mutation-targeted cancer therapies. *Nat. Biotechnol.*, **24** : 985-995, 2006
- 10) Alvarez, K., Kash, S. F., Lyons-Weiler, M. A., *et al.*: Reproducibility and performance of virtual karyotyping with SNP microarrays for the detection of chromosomal imbalances in formalin-fixed paraffin-embedded tissues. *Diagn. Mol. Pathol.*, **19** : 127-134, 2010
- 11) Albertson, D. G., Collins, C., McCormick, F., *et al.*: Chromosome alterations in solid tumors. *Nat. Genet.*, **34** : 369-376, 2003
- 12) Santarius, T., Shipley, J., Brewer, D., *et al.*: A census of amplified and overexpressed human cancer genes. *Nat. Rev. Cancer*, **10** : 59-64, 2010
- 13) Komatsu, S., Imoto, I., Tsuda, H., *et al.*: Overexpression of SMYD2 relates to tumor cell proliferation and malignant outcome of esophageal squamous cell carcinoma. *Carcinogenesis*, **30** : 1139-46, 2009
- 14) Sawey, E. T., Chanrion, M., Cai, C., *et al.*: Identification of a therapeutic strategy targeting amplified FGF19 in liver cancer by Oncogenomic screening. *Cancer Cell*, **19** : 347-358, 2011

Identification of human cancer-associated genes using comparative genomic and epigenomic analyses

Issei Imoto

Department of Human Genetics, Institute of Health Biosciences, the University of Tokushima Graduate School, Tokushima, Japan

SUMMARY

Genetic abnormalities/variations contribute to the most of human diseases including cancer and congenital disorders. Advances in tools for human genome analysis, such as genomic arrays and next-generation sequences, based on the information of human genome sequences provided a great opportunity to identify novel causative genes and disease-associated genes through whole exploration of disease-specific abnormalities in the sequence and copy-number levels. Novel target genes for cancer diagnosis and therapy could be identified through combined structural and functional approach for cancer genome using whole genome and epigenome scanning by array and sequencer as well as functional and expression analyses of candidate genes, resulting in the development of novel diagnostic and therapeutic methods useful for the 'personalized medicine'.

Key words : Cancer, genome, epigenome, copy-number analysis