

ランチオン：特別講演

ゲノム科学からみた未来医療

岡田 浩美*[§] 林 崎 良 英*

【Key Words】オミックス科学、6P 医療、バイオマーカー、健康寿命、核酸診断技術

はじめに

ゲノム DNA・RNA・トランスクリプトーム・プロテオーム・メタボローム解析、そして代謝物などの生体分子の情報を系統的に収集して解析する科学であるオミックス科学の驚くべき進展のために、医学分野の領域は「従来の治療医学から、予防医学・健康医学へ」、すなわち「疾患の治療を目指す医学から、疾患の発症を阻止または遅延させて健康寿命を延伸させるヘルスケア」を目指す領域へと急速に展開している。さらに近年の次世代シーケンサーの発達は、高速にシーケンスするだけの技術ではなく、遺伝情報を解析する手法に様々な可能性をもたらした。医療現場では、ゲノム DNA 解析による疾患のリスク因子にもとづ

いた診断や治療選択が取り入れられ、遺伝子産物解析 (RNA 解析) による疾患のモニタリング、予後予測も可能になりつつある。本稿では、オミックス科学を応用した新規バイオマーカー、新規検査法、それらを用いた新規診断システムがもたらす、未来医療「6P 医療」(表 1)による健康寿命の延伸を実現化させる可能性について紹介したい。

I. FANTOM の歴史と RNA 新大陸の発見

A. 完全長 cDNA プロジェクト

1990 年に国際ヒトゲノムコンソーシアムによって開始された「ヒトゲノム計画」は 2003 年をもって完了した。ゲノム上の機能領域を知るにはゲノムシーケンスだけではなく転写産物の大規模解析(トランスクリプトーム解析)が不可欠であり、

表 1 6P 医療 —医療の新しい側面
オミックス科学の飛躍的な進展は、未来医療「6P 医療」の実現化をもたらす。

6P 医療	
予防医療	Preventive Medicine
予測医療	Predictive Medicine
先制医療	Preemptive Medicine
個別化医療	Personalized Medicine
参加型医療	Participative Medicine
ポイント・オブ・ケア	Point of Care

*理化学研究所 社会知創成事業 予防医療・診断技術開発プログラム [§]hiromi.okada.jg@riken.jp

1995年より林崎らは成熟化したRNAの全長塩基配列を完全な形で解析するための完全長cDNA技術を開発し、その技術を用いてトランスクリプトーム(RNA)解読を行うことを進めてきた。

B. FANTOMの歴史

収集した完全長cDNAデータの機能注釈づけを目的とした共同研究を呼び掛け、2000年に11カ国45機関によって結成されたFANTOMコンソーシアムが結成された。これまでに5段階のプロジェクトのほぼ完了を迎え、続く、第6段階へとプロジェクトは現在も進行中である。FANTOM1と2では、総計60,770個の完全長cDNAクロンを対象に全長配列決定と機能注釈付けを実施した^{1,3)}。続くFANTOM3では、総計約103,700個の完全長cDNAの機能注釈が行われた⁴⁾。数年前までは、ヒトゲノムではタンパク質の設計情報が書かれている領域は全体の2%程度とされ、生物にとってゲノム上の重要な情報は、タンパク質のアミノ酸配列情報とプロモーターなどの発現調節領域情報であり、それ以外の部分は意味をもたない塩基配列の連続であると信じられていた。イメージするなら、ゲノムとは見渡す限り広がるジャンクDNAの砂漠に重要な領域がオアシスのように散在するだけの世界だと考えられていたのである。しかしながら、FANTOMデータベースの解析により、ゲノムDNAの70%以上が転写さ

れ、タンパク質をコードしていないRNA(non-coding RNA; ncRNA)が大量に存在していることが明らかとなった⁴⁾。さらに、近年の飛躍的なRNA研究の進展によって、かつては意味をもたない転写産物または転写の際に生じたジャンクと考えられてきた多くのncRNAは、実際には、ヒトの生命活動において重要かつ多様な機能を持ち、ゲノムは総体として働いているという、旧来のゲノム観を大きく覆す新たなゲノム観が誕生した(図1)。

II. 新しいセントラルドグマの概念

生命科学では、DNAにコードされている遺伝子情報はRNAへ書き換えられ(転写)、それをもとにタンパク質へと変換される(翻訳)という生命活動の流れは揺るぎない柱「セントラルドグマ」とされてきた。しかし、RNA研究が進むにつれて、ncRNAは生命を理解するためには必須の存在であり、DNA・RNA・タンパク質と続く従来のセントラルドグマの中に組み込んで考える必要があるだろう(図2)。ncRNAの機能を解明する研究が進展することにより、今までタンパク質のアミノ酸配列を有する遺伝子の違いでは説明できなかった生命の発生・分化、発症原因が不明とされている多くの疾患についてその発症メカニズムを包括的に解明される可能性が考えられる。また、

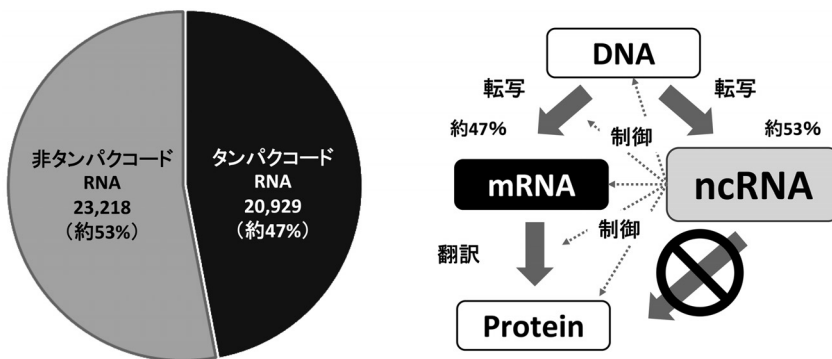


図1 タンパク質をコードしないRNAの機能
ncRNA(non-coding RNA)はDNAの転写レベルとタンパク質の翻訳レベルを制御する機能を持つ。

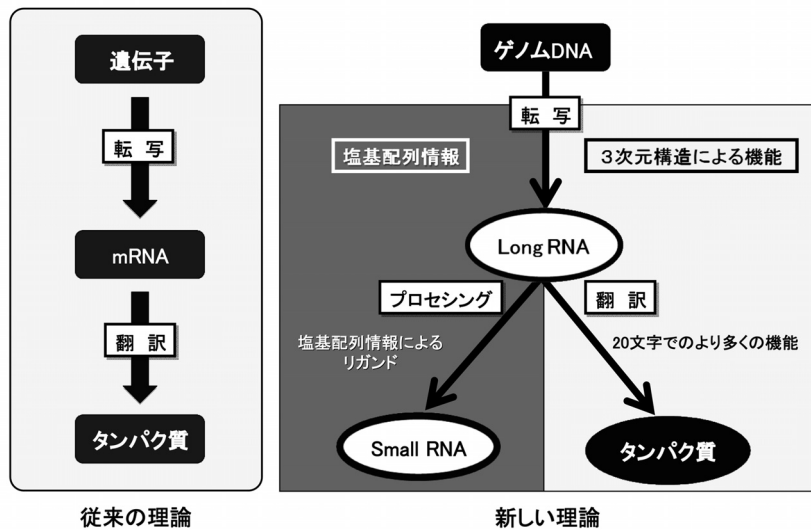


図2 新しいセントラルドグマの概念
Long RNA と Small RNA は遺伝子発現制御の中心的な役割を果たす。

機能性 RNA の研究が、早期診断のためのバイオマーカーへの応用や、その多様な機能を利用した新しい医薬品開発や再生医療技術を含めた医療分野へ応用されることが今後さらに期待される。

III. Japan Syndrome と 6P 医療

日本の少子高齢化が GDP にまで影響を与えはじめ、日本が抱える最大の社会問題になっている。平均余命は 2020 年には女性は 90.5 歳に達すると予測されており、三菱 UFJ リサーチ & コンサルティング社によると、2055 年には 65 歳以上の人口が、全人口の約 40% にあたる 3,646 万人に達し、要介護認定者数は 922 万人に急増することが算出されている。健康な状態の高齢者の割合が相対的に減少し、今後、社会保障費歳出が急激に増加することが見込まれるため、さらに労働者の負担が増加することは明らかであり、高額医療、介護負担の抑制を進めることは喫緊の課題である。

Quality of Life (QOL) を保ち、健康で長期働ける長寿国を達成するためには、発症した病気を治療するだけでなく、発症前に予防・予測したり (予防医療: Preventive Medicine、予測医療: Predictive Medicine)、治療介入したり (先制医療:

Preemptive Medicine)、発症初期に個人にあった薬や治療法を選択する (個別化医療: Personalized Medicine) ことが重要である。それらは、医師など医療従事者だけでなく、患者とその家族、研究者も含めて、協力して初めて実現できる参加型の医療 (Participative Medicine) の形態が大切であり、さらに、検査結果をすぐに出せるポイント・オブ・ケア (Point of Care) 技術の必要性も明らかである。近年のライフサイエンスの急速な展開により、未来医療であるこれら「6P 医療」のトータルヘルスケアが現実のものとなってきている (表 1)。

IV. 2 種類の核酸バイオマーカー： ゲノム DNA と RNA

我々のゲノム DNA 配列は、個々の体型、体質、薬の効き方など、ヘルスケアに関わる重要な形質のリスク因子を決定している。その「リスク因子の多様性」のため、個人ごとに最適な医療はそれぞれ違うはずである。現在、病院の検査室にゲノム DNA 解析などの遺伝子検査が広く普及するなか、個人のゲノム配列と Single Nucleotide Polymorphism (SNP) をベースに個人の疾患リスク因子を検査し、予防的治療を行う傾向が高まってき

表2 ゲノム DNA と RNA のバイオマーカーとしての違い

核酸バイオマーカー	バイオマーカーの特徴		医療への応用
ゲノム DNA	疾患 リスク因子	<ul style="list-style-type: none"> 生殖細胞 DNA と体細胞 DNA がある。 受精したときから決まっていた個々の体質を決定。 エピジェネティクス機構によりゲノム修飾をうける。 疾患の原因遺伝子や感受性遺伝子解析により疾患リスクがわかる。 	がんのリスク因子を保有する場合は、定期健診を受けるなどの対応をすることでがんの早期発見につながる。
RNA	病態 モニタリング	<ul style="list-style-type: none"> 体の変化に応じて発現する RNA の種類や量が変化する。 RNA の発現パターンは発症前の体の変化を敏感に反映。 発症直後から疾患の進行度を調べるためのバイオマーカーになる。 	早期診断、治療効果の評価、予後予測が可能。

ている。

しかし、一方で、ゲノム DNA は受精卵の段階から決定論的に決まっており、疾患の進行度や発症前の状態からの発症予測・予後予測などの情報は、ゲノム DNA 配列からは抽出することはできない。そこで、今後、期待されるバイオマーカーは RNA である。RNA を解析することにより、実際に体の中で起きている遺伝子の活動(遺伝子発現パターンや発現量)を調べることができる。RNA 解析を行い、発症直後から病態進行をモニタリングすることで、早期診断や適切な治療の選択、治療効果の判定、予後予測が可能となる(表 2)。

V. ゲノム DNA 解析が与える医療へのインパクト

A. 生殖細胞変異の検出

遺伝子多型検査は個別化医療に有用であり、そして医療経済においても大きな影響を与える。薬剤感受性に関連する遺伝子を調べることで、薬剤治療に対する応答性が分かるため、最適な薬剤を選択することが可能となり、副作用の予測・防止にもつながる。また、放射線治療に対する感受性も遺伝子多型によって異なることが明らかにされており、関連する遺伝子多型を検査することによって、放射線障害の発症を防ぐことができる。

最近では、次世代 DNA シーケンサーの飛躍的な発達にともない、個人の臨床データと SNP などのゲノムバリエーション情報を用いて行う、Genome-wide association study(GWAS)や連鎖解析によって、疾患因子を同定する研究が急速に進んでいる。単一遺伝子による疾患のみならず、多因子疾患の原因遺伝子も次々と同定され、研究レベルでは年間 2 万人以上のゲノムが解析されている。

B. 個人の全ゲノムシーケンスの時代が到来

個人のゲノムバリエーションを解析することで、疾患が発症する前に、個人の各疾患におけるリスク因子が推定できる。近年の次世代シーケンサーの急速な発達により、1 人の全ゲノムシーケンス検査が 50 万円程度で可能となり、今後は参入する検査企業も増え、さらに価格も下がることが予測できる。気軽に個人で全ゲノムシーケンス検査を受けて、自分の体質や、疾患リスクについて知ることのできる時代は近くまで来ているかもしれない。すでに、US などではゲノム産業は大きな市場となっており、将来、国内でも全ゲノムシーケンス検査がビジネスとして拡大していく可能性は大きい。多くの研究によって、遺伝子多型と疾患発症の関連性が明らかにされてきているが、遺伝子はすべての表現形質において支配的ではなく、

疾患リスクにおいても、環境因子に大きく影響されることがあることが多い。単一因子性疾患以外の疾患リスクは、複数の遺伝子の違いや、環境因子がエピジェネティクス機構(DNAメチル化、ヒストン修飾、クロマチン制御)に与える影響が疾患発症に大きく関与して、その浸透率も低い。遺伝子多型の検査を本当の医療につなげるためには、①その遺伝子多型によって疾患が発症する分子メカニズムが明らかになっていること、また、②疾患発症との関連性を示すための研究に、大規模な集団(数十万から数百万人)の遺伝子情報が使用されていることが重要である。さらには、③遺伝子の違いには人種差が大きく関わるため、関連解析に用いられている集団には、人種が考慮されなければならない。ゲノムDNAから得られる情報は、単一性遺伝子疾患のような明らかな疾患原因遺伝子以外は、その疾患になりやすいかどうかの「リスク」であり、「確定診断」ではないことを理解しておくことが重要である。

C. 体細胞変異：がん遺伝子変異に基づくがん分類

ゲノムDNAの変異には、先に述べた生殖細胞変異と体細胞変異に分けられる。がんの体細胞変異は、がんの性質(薬剤への反応性、転移能、予後など)を支配しているため、生殖細胞変異とは異なる解釈が必要である。がん遺伝子変異の検査によって、治療に高い効果を示したケースとして、上皮性増殖因子受容体(EGFR)遺伝子の変異がある。通常、正常な細胞ではEGFRからのシグナルによって正常の細胞増殖が起きるが、がん細胞の場合では、がん細胞の増殖を促進させる。ゲフィチニブ(商品名イレッサ)は、EGFR細胞内のチロシンキナーゼ領域のATP結合部位においてATPと競合的に拮抗することで、この増殖シグナルを抑制、アポトーシス誘導によって抗腫瘍効果を発揮する。イレッサの投与によって劇的に治療効果を示す症例もあるなか、投薬後に重篤な間質性肺炎を引き起こす副作用を持つために、医療現場ではその使用において議論が続いていた。その後の研究によって、EGFRのATP結合部位に特定の変異がある患者にはイレッサの効果があることが明らかとなったため、イレッサの適応対象

となる患者をより絞り込むことが可能となった。さらに、2011年に投与前のEGFR遺伝子の検査が義務付けられたことにより、有効性と安全性が高まった。また、転移性乳がんの予後因子の1つで知られているHER2(human epidermal growth factor receptor type 2)の過剰発現は、進行性の胃癌にも認められ、2011年に承認された分子標的薬剤である抗HER2ヒト化モノクローナル抗体トラスツズマブ(商品名ハーセプチン)の適応が、2011年にHER2過剰発現が確認された進行・再発胃癌へ追加された。従来の臓器別病理診断によるがんの分類に、がん遺伝子の変異による分類が加わることによって、臓器横断的ながん治療として薬剤適応が広がり、今後、がん遺伝子変異にもとづいた薬剤選択が可能となることが期待できる。

VI. RNA解析による医療への新たなアプローチ

A. CAGE法(cap analysis gene expression)

いろいろな階層で制御され、細胞レベルで特異的に発現する何万もの遺伝子に由来するトランスクリプトームを包括的にその特性を解明するには、個々のトランスクリプトームの複雑さを明らかにしてくれる新しいアプローチ方法で取り組む必要がある。新たな解析手法として、転写開始点や転写終了点を網羅的かつハイスループットに同定できる「Cap Analysis of Gene Expression(CAGE)法」と「Gene Signature Cloning(GSC)法」が開発され、完全長cDNA技術だけでは得ることができない新たな知見が数多く得られた。CAGE法は、完全長cDNAの5'末端にアダプターをライゲーションさせる完全長cDNAライブラリー作製技術をベースとして開発された⁵⁾。このアダプターライゲーションにより、cDNAの5'末端に隣接した部分にクラスIII制限酵素の認識サイトが付加され、そしてクラスIII制限酵素(EcoP15I)による処理で、転写産物の5'末端由来の短いタグがクローニングされ、次世代高速シーケンス解析を行うことが可能となる。

B. 転写因子ネットワーク解析: Basin Network

近年、人類がこれまで予想もしていなかった膨

大な数の新規 RNA が見つかり、まだその数は増えつつある。さらに、その発現制御も転写因子ネットワークが解明される新時代に入り、細胞の形質を維持する転写因子ネットワークが、自律的安定性を保つようになってきていることから、疾患による正常な細胞形質の維持を行うために、転写因子のネットワークを介して発現制御に影響がある RNA を、新規バイオマーカー候補として抽出することができる。林崎らは、FANTOM の活動において、次世代シーケンサーと CAGE 法を組み合わせ、遺伝子発現プロファイルを取得する方法を確立した。そして、この技術を軸とし、ヒト急性骨髄性白血病の細胞株である THP-1 細胞の単芽球様細胞から、単球様細胞への分化モデルを用いて、細胞分化におけるプロモーターレベルでの動的転写制御ネットワークの構築に世界で初めて成功した⁶⁾。このネットワーク解析で、林崎らは、独自の概念である「Basin Network」を新たに提唱した。細胞が一定の形質を維持するためには、それを制御する限られた数の転写因子と ncRNA がネットワークを形成し、ポジティブに、時には、ネガティブフィードバックをかけながら制御し合うことにより、核内で一定の濃度を作っている。この安定したエネルギー状態を「Basin Network」と呼んでいる。一旦、このネットワークを形成すると、細胞はその限られた数の転写因子などの制御因子濃度で末梢遺伝子をコントロールする。この Basin Network は、細胞がどんな形質を持つかを制御しているため、細胞そのものの定義ともいえる。この転写制御ネットワーク解析より、細胞分化は少数のマスター遺伝子によって担われているのではなく、複数の転写因子が協奏的に役割を果たすことによって達成されることが明らかになった。また、彼らが開発したプロモーターレベルでの動的転写制御ネットワーク解析手法は、転写制御に関する一切の文献情報を必要とせず、実験データのみから転写制御ネットワークの高度な推定を可能にした。この手法を応用すれば、標的細胞への分化を人為的に制御できる可能性が広がり、再生医療にも貢献することが期待できる。これらの転写制御ネットワークを解析する

ことで、疾患をモニタリングするために、疾患組織(パーキンソン病・アルツハイマー病などでは脳組織)以外でも白血球を使用して、ネットワークの維持のバイアスを計測することができる。このような、新規バイオマーカーとそれを用いた検査診断システムが、従来の医療を、未来の医療体制に重要な「先制医療」に変貌させるポテンシャルを持つ。

VII. 新しい核酸診断技術：SmartAmp 技術

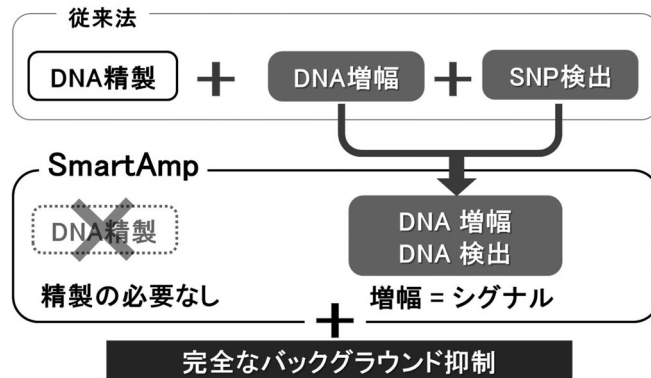
A. SmartAmp (Smart Amplification Process) 法

臨床現場における核酸検査の重要性が強まるなか、操作が簡便かつ迅速であり、高感度、低コストに向けて新しい SNP 診断技術の開発も進んでいる。SmartAmp 法は PCR 法に代わる日本発の新規遺伝子診断技術⁷⁾であり、2007 年に理化学研究所と株式会社ダナフォームらの研究チームが実用化を開始した。5 種類の特徴的なプライマーセットと新規に開発された鎖置換型 DNA ポリメラーゼ (*Aac* DNA Polymerase)、ミスマッチ結合タンパク (*TaqMutS*) を用いることで、60°C の等温条件下、30 分程度で目的の核酸を増幅しながら SNP を診断することが可能である (図 3)。SmartAmp 法の特徴として、① 高感度：SNP を診断する特異的なプライマーとミスマッチ結合タンパクを用いることで、プライマーが SNP 塩基に対してフルマッチな場合は特異的に増幅され、ミスマッチの場合はミスマッチ結合タンパク質がそのミスマッチ部分に結合し増殖が抑制される、② 簡便・迅速：血液からゲノム DNA を精製することなく、簡便な加熱処理と SmartAmp 増幅試薬を組み合わせるだけの操作、③ 安価：遺伝子増幅の検出に非常に強い蛍光強度が得られる S/N 比の大きいエキシトンプライマーの使用 (後述 VII-B. 参照) などが挙げられる。

B. エキシトンプライマーの開発とその応用

これまで数多くの蛍光プライマーが遺伝子解析のために設計されてきた。既存の蛍光プライマーは、標的 DNA の増幅量に対してプライマーの蛍光発光が敏感に応答し、非特異的な蛍光発光・バックグラウンド蛍光をできる限り小さくするため

a. 検出ステップ



b. 検出方法

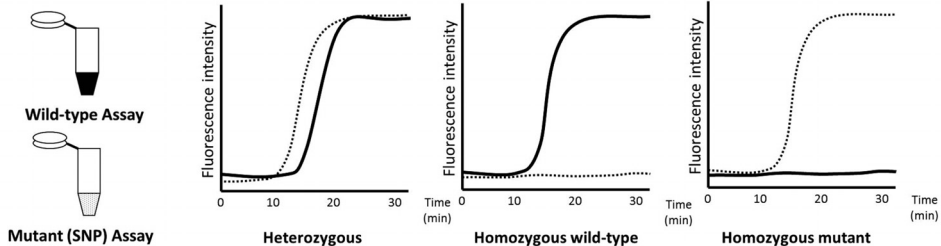


図3 SmartAmp 法の遺伝子検査

PCR 法などの従来法による遺伝子検査は、サンプルからの DNA 精製、PCR 法による DNA 増幅、その増幅産物の SNP 検出の 3 ステップに分かれているが、SmartAmp 法では、DNA 精製することなく、DNA 増幅、SNP 検出が可能である。

の技術開発が課題とされてきた。岡本らは、配列を認識していない状態におけるプライマーの発光を最小限に抑える新しい技術として、DNA 結合発光性蛍光色素の一つであるチアゾールオレンジ色素の集合体形成に伴う色素間励起子(エキシトン)相互作用によって発光が強く消光される効果を利用したエキシトンプライマーを設計した⁸⁾。このプライマー配列には一つのチミジンに対し 2 個のチアゾールオレンジ色素が導入され、標的 DNA とハイブリダイゼーションする前には発光発光が強く抑制されるが、相補的 DNA 鎖とハイブリダイゼーションした時は、色素会合体の解離とそれらの核酸構造への結合によってエキシトン相互作用は解除され、強い発光を発生する。エキシトンプライマーを応用した SmartAmp 法では、エキシトンプライマーの非特異的発光が小さく、その特異的増幅を示す発光強度は、広く用いられ

ている SYBR Green I の数十倍であるために、反応後のチューブに UV を照射するだけで目視判定、さらには定量も可能となった。

C. 核酸診断機器の小型化と未来像

現在、検査現場で一般的に広く使用されている PCR 法は、急速な温度変化に対応する加温・冷却システムと冷却用の放熱システムを必要とする。そのため、装置に一定以上のサイズが要求され小型化は困難であり、厳密な温度制御のために高価なシステムが必要となる。遺伝子の増幅と検出を同時に進行するリアルタイム PCR 装置では、卓上サイズのものも開発されているが、価格は非常に高額で、購入できる施設はかぎられているのが現状である。一方で、SmartAmp 法は PCR 法などの従来法とは異なり、特定の遺伝子だけを一定の温度で増幅し、その増幅をシグナルとして検出する診断技術であるため、増幅工程の温度が 60°C

と一定であるために、温度制御は容易で、安価なヒーターで十分であり、放熱システムが不要のために装置が小型化しやすい。これらの利点を活かして、ハンディタイプの小型装置の開発が進み、将来的には、携帯電話内蔵型による遺伝子検査キットの開発も期待できる。携帯電話を利用した場合には、その場で検査が実施可能であり、同時にデータの送信、診断結果の受信も行うことができる。簡易検査であるため、検査の利用法ならびに、個人の遺伝子情報の取り扱いなど、議論を必要とする課題は多いが、利用者はその検査結果により、専門的な病院で診察を受ける必要性の判断、早期受診・治療開始に活用することができる。

最後に

今後さらに進む超少子高齢化社会に向け、健康寿命を伸ばして生産労働人口の低下を防ぎ、国民が尊厳を持って健康に生活できる QOL を向上させることが大きな課題である。ゲノム DNA と RNA の 2 種類のバイオマーカーを用いた核酸診断技術が、個別化医療の重要なポイントである ① 疾患のリスク予測、② 早期発見・適切な治療選択、③ 予後予測・予防的治療介入、④ 薬剤反応性の検出に大きな可能性をもたらすと考えられる。ゲノム科学を含むオミックス科学を学問・研究レベルから、臨床現場で検査診断や治療に応用するためには、研究施設などの基礎研究領域だけではなく、病院の検査業務を担っている臨床検査領域との全面的な協力関係を築かなければ達成しえない。新規バイオマーカーの探索から、新しい検査法の開発・評価、それにもとづいた診断・治療の効果を総合的に検討する臨床研究の遂行、そして臨床現場で実際に使用されるまでには、長い年数がかかることを覚悟しなければならないだろう。こうした未来医療を開拓していく領域に、こ

れからの若い臨床検査技師が重要な役割を担っていくことを期待する。

文 献

- 1) Kawai J, Shinagawa A, Shibata K, Yoshino M, Itoh M, Ishii Y, et al. Functional annotation of a full-length mouse cDNA collection. *Nature* 2001; 409: 685-90.
- 2) Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001; 409: 860-921.
- 3) Okazaki Y, Furuno M, Kasukawa T, Adachi J, Bono H, Kondo S, et al. Analysis of the mouse transcriptome based on functional annotation of 60,770 full-length cDNAs. *Nature* 2002; 420: 563-73.
- 4) Carninci P, Kasukawa T, Katayama S, Gough J, Frith MC, Maeda N, et al. The transcriptional landscape of the mammalian genome. *Science* 2005; 309: 1559-63.
- 5) Shiraki T, Kondo S, Katayama S, Waki K, Kasukawa T, Kawaji H, et al. Cap analysis gene expression for high-throughput analysis of transcriptional starting point and identification of promoter usage. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 15776-81.
- 6) Suzuki H, Forrest A, van Nimwegen E, Daub D, Balwierz P, Irvine K, et al. The transcriptional network that controls growth arrest and differentiation in a human myeloid leukemia cell line. *Nat Genet* 2009; 41: 553-62.
- 7) Mitani Y, Lezhava A, Kawai Y, Kikuchi T, Oguchi-Katayama A, Kogo Y, et al. Rapid SNP diagnostics using asymmetric isothermal amplification and a new mismatch-suppression technology. *Nat Methods* 2007; 4: 257-62.
- 8) Ikeda S, Okamoto A. Hybridization-Sensitive On-Off DNA Probe: Application of the Exciton Coupling Effect to Effective Fluorescence Quenching. *Chem Asian J* 2008; 3: 958-68.