

厚生労働科学研究研究費補助金

ヒトゲノム・再生医療等研究事業

「高齢者特発性造血障害の大規模ゲノミクス解析に
よる病態解明」に関する研究

平成16年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 間野 博行

平成17(2005)年3月

厚生労働科学研究研究費補助金

ヒトゲノム・再生医療等研究事業

「高齢者特発性造血障害の大規模ゲノミクス解析に
よる病態解明」に関する研究

平成16年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 間野 博行

平成17(2005)年3月

目次

I.	総括研究報告書	
	「高齢者特発性造血障害の大規模ゲノミクス解析による病態解明」に関する研究	
	自治医科大学・医学部・ゲノム機能研究部 間野博行 -----	1
II.	分担研究報告	
1.	「高齢者特発性造血障害の大規模ゲノミクス解析による病態解明」に関する研究	
	自治医科大学・医学部・ゲノム機能研究部 間野博行 -----	6
2.	「プロテオーム解析による骨髄異形成症候群の病態解明」に関する研究	
	東京女子医科大学・血液内科 寺村正尚 -----	8
3.	「ヒト血液細胞における増殖・分化・細胞死に関わる重要分子p21の細胞質局在機構」に関する研究	
	国立国際医療センター研究所・血液疾患研究部 湯尾明-----	10
III.	研究成果の刊行に関する一覧表 -----	12
IV.	研究成果の刊行物・別冊 -----	13

主任研究者： 間野 博行 自治医科大学医学部 教授

研究要旨：DNA チップを用いることで数千～数万の遺伝子に関する発現変化を比較的簡便に解析することが可能となり、これまでは鑑別診断が困難であった血液疾患の診断に役立つ新たな分子マーカーが同定されると期待される。しかし DNA チップはあまりに高感度な検査法であるため、異なった造血障害患者の骨髄細胞全体を比べるような単純な解析を行うと、両患者の「骨髄中の構成細胞の違い」を反映した偽陽性結果を得ることになる。我々は広く患者さんの骨髄より造血幹細胞相当分画のみを純化し保存する「Blast Bank」を設立した。現在まで既に 600 例を超えるサンプルの保存に成功しており、本バンク細胞を用いた大規模 DNA チップ解析によって、遺伝子発現データおよび、各症例の臨床情報フォローアップデータより、初回寛解導入療法の成績にリンクする遺伝子、治療開始後 365 日の時点で寛解を維持できているか否かにリンクする遺伝子、など様々な臨床データに発現量が連関する遺伝子セットを抽出することに成功した。さらに本サンプルを用いて骨髄異形成症候群由来の白血病と de novo 急性骨髄性白血病との鑑別診断マーカーの同定、及び骨髄異形成症候群の病期進行メカニズムの解明などに成功した。

分担研究者

間野博行	自治医科大学医学部ゲノム機能研究部・教授
寺村正尚	東京女子医科大学血液内科・講師
湯尾明	国立国際医療センター研究所血液疾患研究部・部長

症時の年齢から骨髄移植の適応外であることが殆どである。さらに本疾患の一部は急性白血病へと移行する事が知られており、骨髄異形成症候群から移行した白血病の多くは薬剤耐性である。したがって今後の本邦人口のさらなる高齢化を考慮すると、骨髄異形成症候群の病態解明、診断及び治療法の開発は血液内科学に限らず今日の医学研究の急務の一つであるといえる。

ヒトゲノムプロジェクトの結果得られた遺伝子情報を元に DNA チップなどを用いた疾患解析が可能となってきた。しかし単純に患者骨髄細胞を用いて DNA チップによる比較を行った場合、各個人間の骨髄構成細胞のポピュレーションの違いが大きいため「偽陽性」な結果を得ることが殆どである。そこで真に骨髄異形成症候群の臨床にフィードバック可能な情報を得るため、我々は本研究計画において骨髄異形成症候群を含めた各種血液疾患患者より、疾患の種類によらず分化レベルがほぼ均一である造血幹細胞分画のみを大規模に収集する造血幹細胞バンク「Blast Bank」を設立する。これら純化した造血幹細胞間で DNA チップ解析及びプロテオミクス解析を行うことによって、偽陽性の極めて少ない効率的なゲノム解析が可能になり、世界に先駆けた病態解明が行われると期待される。本研究計画の具体的な目標として、骨髄異形成症候群の(1)分子診断、(2)発症機構の解

A 研究目的

骨髄異形成症候群 (MDS) は赤血球を含む各種血球の慢性減少を特徴とする疾患であり、白血球減少に伴う感染症に対する治療や、赤血球・血小板の減少に対する成分輸血をしばしば必要とする。本症は末梢血中の血球減少にもかかわらず患者骨髄中の造血細胞数はむしろ正常～増加することが多く、「無効造血」と呼ばれる特徴的な病態を呈する。骨髄異形成症候群は造血幹細胞のクローン性異常に起因すると考えられているが、その具体的な分子メカニズムは未だ全く不明のままである。本疾患の年間発症率は人口 10 万人あたり 60 歳台で約 10 人、80 歳台で約 100 人と高齢化に伴い急速に上昇し、本邦における高齢者の主要な血液疾患の一つとなっている。治療法も他家骨髄移植以外に有効な方法が無く、発

明、(3)薬剤耐性獲得機構の解析、及び(4)新たなアプローチによる治療法の開発を目指す。

B 研究方法

1) 造血幹細胞特異的マーカーであるAC133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17年3月現在で600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。

2) 上記検体群を用いて以下のようにDNAチップ解析を行った。細胞よりトータルRNAを抽出し、これをT7 RNAポリメラーゼを用いてまずin vitroにて増幅した。さらにこれをもとに二本鎖cDNAを合成し、ビオチンCTPの存在下で再びT7 RNAポリメラーゼと反応させることで、ビオチン標識化したcomplementary RNA (cRNA)を作製した。このビオチン化cRNAをDNAチップとハイブリダイズさせ、洗浄後、蛍光色素PE結合アピチンと反応させた。このDNAチップ上のcRNA結合スポットをAffymetrix社の蛍光スキャナーで励起させ、各スポットの蛍光強度を測定した後統計処理をGeneSpring 7.0 (Silicon Genetics社)にて行った。

3) MDS患者および正常人の末梢血よりデキストラン法を用いて好中球を分離した。その細胞より蛋白質を抽出した後、二次元電気泳動を行った。両者の泳動パターンを解析ソフト(Ettan progenesis)で解析した。発現量に差が認められるスポットの質量分析をMALDI-TOF/TOF MSを用いて行い、その蛋白質についてペプチドデータベース(MASCOT)を用いて同定した。

4) HL-60、U937、WEHI3BD+細胞等の培養上清にビタミンDやPMAの添加、もしくはp21の強制発現を行い、細胞の分化を誘導した。

(倫理面への配慮)

検体収集に関しては自治医科大学及び栃木県立がんセンターの生命倫理委員会認可を

受けた事業として開始し、連結可能匿名化のもとで研究を行った。

C 研究結果

1) 我々は平成11年8月よりBlast Bankを立ち上げ既に600例を超えるサンプルのストックに成功した。現在本バンク中に130例を超える急性骨髄性白血病(AML)幹細胞サンプルが保存されており、世界的にも極めて貴重なリソースとなっている。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AC133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) 骨髄異形成症候群のrefractory anemia with excess of blasts (RAEB) 11例を含む計99例のAML類縁疾患について、

Affymetrix社GeneChip HGU133A & B

(44,000 probe sets = 33,000遺伝子)を用いた解析を行い、上記99例における全ヒト遺伝子の発現プロファイルデータベースを構築した。これら膨大な遺伝子発現データおよび、各症例の臨床情報フォローアップデータより、初回寛解導入療法の成績にリンクする遺伝子、治療開始後365日の時点で寛解を維持できているか否かにリンクする遺伝子、など様々な臨床データに発現量が連関する遺伝子セットを抽出することに成功した。さらにこれら遺伝子の発現量を基にAMLの新たなサブグループを定義可能なこと、またこれらサブグループが患者長期予後に連関することなども明らかにした。

3) MDS患者と正常人の末梢血好中球由来の蛋白質の泳動パターンを解析ソフトで解析したところ、MDSにおいて明らかに高発現しているスポットが認められた。それらのスポットについてMSによるペプチドマップを作製し、データベース上でペプチドマス・フィンガープリント測定を行い、蛋白質を数種同定した。そのうちの2つはCapGおよびThiol-specific antioxidant protein (TSA)であった。現在これらの蛋白質についてその機能解析を行っている。

4) p21の様々の欠失変異体を用いた検討から、p21の細胞核局在はC末端側の各局在シグナル(nuclear localization signal, NLS)の有無によってきて規定されている

事が明らかになった。さらに、NLSを有する p21 と欠失している p21 のいずれにも GFP を融合させて、血液細胞株に導入発現させて、分化誘導の前後での細胞内局在を検討したところ、NLSを有する p21 の発現時においてのみ、分化誘導後に p21 の細胞質局在が観察された。

以上より、p21 の細胞内局在は何らかの機序で NLS が機能しなくなることが原因と考えられた。NLS 機能が失われる機序としては、当該部位のアミノ酸のリン酸化と、当該配列に対する他の蛋白の結合が提唱され、前者は、p21 の電気泳動における移動度の変化が認められないことから否定的で、後者の可能性を想定して研究を進めた。NLS に結合する細胞蛋白は、Brp2 以外にはほとんど報告されておらず、Brp2 を候補として研究を進めた。

まず、Brp2 が無細胞系において p21 の NLS に結合することを、NLS 部分を欠く p21 も用いて検討したところ、p21NLS と Brp2 の特異的な結合を確認できた。

次に、細胞内で実際に p21 と Brp2 が結合することを、両者の共発現と免疫沈降を用いて手法で確認し、しかも、NLS を有しない p21 と Brp2 が結合しないこともあわせて確認できた。さらに、NLS を有する p21 の発現の有無によって、Brp2 の局在が変わる (Brp2 も共発現した時にのみ p21 が細胞質にも認められる) 事を確認した。Brp2 の C 端側に p21NLS との結合部位が存在する事も確認した。

血液細胞の分化過程で、実際に Brp2 の mRNA と蛋白が増加する事を確認した。また、増加した Brp2 は同じく分化過程で増加する細胞質 p21 と会合していることも確認された。

D&E. 考察及び結論

本研究事業において骨髄異形成症候群の大規模な純化細胞 DNA チップ解析を行い、膨大な遺伝子発現データを得た。これらを元に「発現量から統計的に有意に診断」を可能にする遺伝子群の抽出に成功し、カスタム DNA チップによる診断法の可能性を示した。またプレテオミクス技術から MDS 細胞を解析する事により蛋白質レベルでの MDS の異常を同定した。またこれら異常遺

伝子・蛋白質を標的とした分子療法の開発に向けて基盤技術の開発に成功した。

F. 健康危険情報

無し

G. 研究発表

1. 論文発表

間野博行

- 1) Choi, Y.L., Moriuchi, R., Osawa, M., Iwama, A., Makishima, H., Wada, T., Kisanuki, H., Kaneda, R., Ota, J., Koinuma, K., Ishikawa, M., Takada, S., Yamashita, Y. & Mano, H. "Retroviral expression screening of oncogenes in natural killer cell leukemia" *Leuk. Res.*, in press, 2005.
- 2) Numata, A., Shimoda, K., Kamezaki, K., Haro, T., Kakumitsu, H., Shide, K., Kato, K., Miyamoto, T., Yamashita, Y., Oshima, Y., Nakajima, H., Iwama, A., Aoki, K., Takase, K., Gondo, H., Mano, H. & Harada, M. "Signal transducers and activators of transcription 3 augments the transcriptional activity of CCAAT/enhancer binding protein a in G-CSF signaling pathway" *J. Biol. Chem.*, 2005.
- 3) Tsutsumi, C., Ueda, M., Miyazaki, Y., Yamashita, Y., Choi, Y.L., Ota, J., Kaneda, R., Koinuma, K., Fujiwara, S., Kisanuki, H., Ishikawa, M., Ozawa, K., Tomonaga, M. & Mano, H. "DNA microarray analysis of dysplastic morphology associated with acute myeloid leukemia" *Exp. Hematol.*, **32**:828-835, 2004.
- 4) Ohki-Kaneda, R., Ohashi, J., Yamamoto, K., Ueno, S., Ota, J., Choi, Y.L., Koinuma, K., Yamashita, Y., Misawa, Y., Fuse, K., Ikeda, U., Shimada, K. & Mano, H. "Cardiac function-related gene expression profiles in human atrial myocytes"

- Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **320**:1328–1336, 2004.
- 5) Ohki, R., Yamamoto, K., Ueno, S., Mano, H., Misawa, Y., Fuse, K., Ikeda, U. & Shimada, K. "Transcriptional profile of genes induced in human atrial myocardium with pressure overload" *Int. J. Cardiol.*, **96**:381–387, 2004.
 - 6) Koinuma, K., Shitoh, K., Miyakura, Y., Furukawa, T., Yamashita, Y., Ota, J., Ohki, R., Choi, Y.L., Wada, T., Konishi, F., Nagai, H. & Mano, H. "Mutations of BRAF are associated with extensive hMLH1 promoter methylation in sporadic colorectal carcinomas" *Int. J. Cancer*, **108**:237–242, 2004.
 - 7) Kano, Y., Akutsu, M., Tsunoda, S., Izumi, T., Mori, K., Fujii, H., Yazawa, Y., Mano, H. & Furukawa, Y. "Schedule-dependent synergism and antagonism between pemetrexed and paclitaxel in human carcinoma cell lines in vitro" *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 2004.
 - 8) Kaneda, R., Toyota, M., Yamashita, Y., Koinuma, K., Choi, Y.L., Ota, J., Kisanuki, H., Ishikawa, M., Takada, S., Shimada, K. & Mano, H. "High-throughput screening of genome fragments bound to differentially acetylated histones" *Genes Cells*, **9**:1167–1174, 2004.
 - 9) He, H., Hirokawa, Y., Gazit, A., Yamashita, Y., Mano, H., Kawakami, Y., Kawakami, Hsieh, C.Y., Kung, H.J., Lessene, G., Baell, J., Levitzki, A. & Maruta, H. "The Tyr-Kinase Inhibitor AG879, That Blocks the ETK-PAK1 Interaction, Suppresses the RAS-Induced PAK1 Activation and Malignant Transformation" *Cancer Biol. Ther.*, **3**:96–101, 2004.
 - 10) Choi, Y.L., Makishima, H., Ohashi, J., Yamashita, Y., Ohki, R., Koinuma, K., Ota, J., Isobe, Y., Ishida, F., Oshimi, K. & Mano, H. "DNA microarray analysis of natural killer cell-type lymphoproliferative disease of granular lymphocytes with purified CD3(-)CD56(+) fractions" *Leukemia*, **18**:556–565, 2004.
 - 11) Bai, J., Sata, N., Nagai, H., Wada, T., Yoshida, K., Mano, H., Sata, F. & Kishi, R. "Genistein-Induced Changes in Gene Expression in Panc 1 Cells at Physiological Concentrations of Genistein" *Pancreas*, **29**:93–98, 2004.
 - 12) Araki, H., Katayama, N., Yamashita, Y., Mano, H., Fujieda, A., Usui, E., Mitani, H., Ohishi, K., Nishii, K., Masuya, M., Minami, N., Nobori, T. & Shiku, H. "Reprogramming of human postmitotic neutrophils into macrophages by growth factors" *Blood*, **103**:2973–2980, 2004.
 - 13) Aoki, N., Ueno, S.-i., Mano, H., Yamasaki, S., Shiota, M., Miyazaki, H., Yamaguchi-Aoki, Y., Matsuda, T. & Ullrich, A. "Mutual regulation of protein-tyrosine phosphatase 20 and protein-tyrosine kinase Tec activities by tyrosine phosphorylation and dephosphorylation" *J. Biol. Chem.*, **279**:10765–10775, 2004.
 - 14) Mano, H. "Stratification of acute myeloid leukemia based on gene expression profiles" *Int. J. Hematol.*, **80**:389–394, 2004.
- 寺村正尚
- 1) Okamoto, H., Teramura, M. & Kamatani, N. "Myelodysplastic syndrome associated with low-dose methotrexate in rheumatoid arthritis" *Ann. Pharmacother.*, **38**:172–173, 2004.
- 湯尾明
- 1) Asada, M., Ohmi, K., Delia, D., Enosawa, S., Suzuki, S., You, A., Suzuki, H., Mizutani, S. "Brap2 functions as a cytoplasmic retention protein for p21 during monocytic differentiation" *Mol. Cell. Biol.*,

24:8236-8243, 2004.

H. 知的財産権の出願・登録状況

国際公開番号：PCT/WO97/34007・発明者：間野博行・名称「PROMOTER」・出願人：間野博行、株式会社 DNAVEC 研究所・公開日：1997年9月18日

公開番号：特開 2001-269174・発明者：間野博行・名称「骨髓異形成症候群(MDS)の検出方法及び MDS の治療剤」・出願人：間野博行・公開日：2001年10月2日

国際公開番号：PCT/WO 01/64946 A1・発明者：間野博行・名称「METHOD OF DETECTING CHRONIC MYELOGENOUS LEUKEMIA」・出願人：間野博行、宝酒造株式会社・公開日：2001年9月7日

出願番号：特願 2001-337752・発明者：間野博行・名称「多発性骨髄腫の分子診断方法」・出願人：藤沢薬品工業株式会社・出願日：2001年11月2日

出願番号：特願 2001-56438・発明者：間野博行・名称「慢性骨髄性白血病の分子診断方法」・出願人：藤沢薬品工業株式会社・出願日 2001年3月1日

出願番号：特願 2004-505392・発明者：間野博行・名称「膵管細胞を利用した膵管癌特異的遺伝子の同定方法、同方法により同定される膵管癌特異的遺伝子を利用した膵管癌の検査方法、および膵管癌の治療または予防のための医薬候補化合物のスクリーニング方法」・出願人：藤沢薬品工業株式会社・出願日 2003年5月22日・国際出願番号：PCT/JP/03/006398

分担研究者： 間野 博行 自治医科大学医学部 教授

研究要旨：貧血あるいは汎血球減少症が慢性に持続する「特発性造血障害」の発生頻度は加齢に伴い著明に増加し、特に80歳代の罹患人口は10万人あたり100人を越える。ヒトゲノムプロジェクトの成果を利用するDNAチップは特発性造血障害の病態解明にも有効であると予想されるが、一方不用意な患者骨髄単核球を用いたDNAチップ実験は、骨髄内の疾患クローンの割合の変化を反映するにすぎない多くの偽陽性データを生じることになる。我々は特発性造血障害を構成する3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17年3月現在で既に600例を越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。本研究計画において我々はBlast Bankに属する特発性造血障害の臨床検体を用いてゲノミクス・プロテオミクス解析を行うことにより、3疾患群の病因解明及び精度の高い新規鑑別診断法の開発を行うと共に、これら疾患群から急性白血病への進展を予測可能にするカスタムメイドDNAチップの開発を目指す。

A 研究目的

特発性造血障害は、再生不良性貧血、骨髄異形成症候群（MDS）、発作性夜間血色素尿症（PNH）の3疾患群からなり、本邦における高齢者の最も主要な血液疾患となっている。特発性造血障害に伴う各種血球の慢性減少はしばしば重篤となり、白血球減少に伴う感染症に対する治療や、赤血球・血小板の減少に対する成分輸血など定期的な対症療法を必要とする。同種骨髄移植は根治療法の一つであるが、高齢のため骨髄移植の適応外となる症例がほとんどである。これら疾患群は「染色体不安定性・白血病への高率の移行」といった臨床的特徴を共有し、現段階では、これら疾患群が果たして独立した疾患単位なのかそれとも互いにオーバーラップするのか、さらにはこれら3疾患とは全く独立の新しい疾患定義が臨床的にはより適切なのかなど「特発性造血障害」という症候群の定義づけさえが不明瞭な状態である。高齢者に好発する特発性造血障害の有効な治療法を開発する上でも、信頼性の高い分子診断マーカーの開発およびそれを用いた各患者個人個人の予後予測法の開発（さらに治療法・予後に基づいた疾患単位の定義）が急務である。

B 研究方法

1) 造血幹細胞特異的マーカーであるAC133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17年3月現在で600例を越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。

2) 上記検体群を用いて以下のようにDNAチップ解析を行った。細胞よりトータルRNAを抽出し、これをT7 RNAポリメラーゼを用いてまずin vitroにて増幅した。さらにこれをもとに二本鎖cDNAを合成し、ビオチンCTPの存在下で再びT7 RNAポリメラーゼと反応させることで、ビオチン標識化したcomplementary RNA (cRNA) を作製した。このビオチン化cRNAをDNAチップとハイブリダイズさせ、洗浄後、蛍光色素PE結合アピチンと反応させた。このDNAチップ上のcRNA結合スポットをAffymetrix社の蛍光スキャナーで励起させ、各スポットの蛍光強度を測定した後統計処理をGeneSpring 7.0 (Silicon Genetics社)にて行った。

（倫理面への配慮）

検体収集に関しては自治医科大学及び栃木県立がんセンターの生命倫理委員会認可を受けた事業として開始し、連結可能匿名化のもとで研究を行った。

C 研究結果

1) 我々は平成11年8月よりBlast Bankを立ち上

げ既に600例を越えるサンプルのストックに成功した。現在本バンク中に130例を超えるMDSおよび急性骨髄性白血病（AML）サンプルが保存されており、世界的にも極めて貴重なリソースとなっている。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AC133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) MDSのrefractory anemia with excess of blasts (RAEB) 11例を含む計99例のAML類縁疾患について、Affymetrix社GeneChip HGU133A & B (44,000 probe sets = 33,000 遺伝子) を用いた解析を行い、上記99例における全ヒト遺伝子の発現プロファイルデータベースを構築した。これら膨大な遺伝子発現データおよび、各症例の臨床情報フォローアップデータより、初回寛解導入療法の成績にリンクする遺伝子、治療開始後365日の時点で寛解を維持できているか否かにリンクする遺伝子、など様々な臨床データに発現量が連関する遺伝子セットを抽出することに成功した。さらにこれら遺伝子の発現量を基にAMLの新たなサブグループを定義可能なこと、またこれらサブグループが患者長期予後に連関することなども明らかにした。

D&E. 考察及び結論

本研究事業において各種白血病類縁疾患の大規模な純化細胞 DNA チップ解析を行い、膨大な遺伝子発現データを得た。これらを元に「発現量から統計的有意に診断」を可能にする遺伝子群の抽出に成功し、カスタム DNA チップによる診断法の可能性を示した。このように研究計画は極めて順調に推移したといえる。

F. 健康危険情報

無し

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Choi, Y.L., Moriuchi, R., Osawa, M., Iwama, A., Makishima, H., Wada, T., Kisanuki, H., Kaneda, R., Ota, J., Koinuma, K., Ishikawa, M., Takada, S., Yamashita, Y. & Mano, H. "Retroviral expression screening of oncogenes in natural killer cell leukemia" *Leuk. Res.*, in press, 2005.
- 2) Numata, A., Shimoda, K., Kamezaki, K., Haro, T., Kakumitsu, H., Shide, K., Kato, K., Miyamoto, T., Yamashita, Y., Oshima, Y.,

Nakajima, H., Iwama, A., Aoki, K., Takase, K., Gondo, H., Mano, H. & Harada, M. "Signal transducers and activators of transcription 3 augments the transcriptional activity of CCAAT/enhancer binding protein a in G-CSF signaling pathway" *J. Biol. Chem.*, 2005.

- 3) Tsutsumi, C., Ueda, M., Miyazaki, Y., Yamashita, Y., Choi, Y.L., Ota, J., Kaneda, R., Koinuma, K., Fujiwara, S., Kisanuki, H., Ishikawa, M., Ozawa, K., Tomonaga, M. & Mano, H. "DNA microarray analysis of dysplastic morphology associated with acute myeloid leukemia" *Exp. Hematol.*, **32**:828-835, 2004.
- 4) Ohki-Kaneda, R., Ohashi, J., Yamamoto, K., Ueno, S., Ota, J., Choi, Y.L., Koinuma, K., Yamashita, Y., Misawa, Y., Fuse, K., Ikeda, U., Shimada, K. & Mano, H. "Cardiac function-related gene expression profiles in human atrial myocytes" *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **320**:1328-1336, 2004.
- 5) Choi, Y.L., Makishima, H., Ohashi, J., Yamashita, Y., Ohki, R., Koinuma, K., Ota, J., Isobe, Y., Ishida, F., Oshimi, K. & Mano, H. "DNA microarray analysis of natural killer cell-type lymphoproliferative disease of granular lymphocytes with purified CD3(-)CD56(+) fractions" *Leukemia*, **18**:556-565, 2004.
- 6) Araki, H., Katayama, N., Yamashita, Y., Mano, H., Fujieda, A., Usui, E., Mitani, H., Ohishi, K., Nishii, K., Masuya, M., Minami, N., Nobori, T. & Shiku, H. "Reprogramming of human postmitotic neutrophils into macrophages by growth factors" *Blood*, **103**:2973-2980, 2004.

H. 知的財産権の出願・登録状況

出願番号：特願 2004-505392・発明者：間野博行・名称「膵管細胞を利用した膵管癌特異的遺伝子の同定方法、同方法により同定される膵管癌特異的遺伝子を利用した膵管癌の検査方法、および膵管癌の治療または予防のための医薬候補化合物のスクリーニング方法」・出願人：藤沢薬品工業株式会社・出願日 2003年5月22日・国際出願番号：PCT/JP/03/006398

プロテオーム解析による骨髓異形成症候群の病態解明

分担研究者 寺村 正尚 東京女子医科大学血液内科 講師

研究要旨:特発性造血障害の1つである骨髓異形成症候群(MDS)を対象として、その異常血球のプロテオーム解析を行った。MDS患者と正常人における末梢血好中球の蛋白を抽出し、二次元電気泳動を行った。両者の蛋白発現パターンについて解析ソフトを用いて比較検討した結果、MDSに特異的に高発現しているタンパクを数種類同定した。それらの蛋白はMDSの病態に深く関与していると考えられ、機能解析を進めている。

A. 研究目的

近年、DNAチップなどの解析手法を用いて、疾患特異的な遺伝子の検索が大規模に行われている。しかし、遺伝子の発現と蛋白質の発現には相関関係がない場合が少なくなく、疾患の病因や病態を解析するためには、プロテオミクスの手法を用いて蛋白レベルでの解析を行う必要もあると考えられる。本研究は高齢者特発性造血障害の1つである骨髓異形成症候群(myelodysplastic syndrome:MDS)における異常血球のプロテオーム解析を行い、本症に特異的に高発現している蛋白を明らかにし、その機能解析をすることにより、MDSの病態を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

MDS、特に不応性貧血 (refractory anemia: RA) 患者の末梢血中の好中球をターゲットとして蛋白質の解析を行うこととした。これらを解析対象とした理由は以下の通りである。

- (1)MDS(RA)の好中球は異常クローン由来であり、形態学的、細胞生化学的な異常が明らかにあり、何らかの蛋白異常が存在していると考えられる。
- (2)臨床的に末梢血を検査するだけで、MDS

を診断しうるような、実用的な疾患特異的マーカーを同定できる可能性がある。

(3)検体の採取が容易であるため、骨髓に比して検体の収集が進みやすい。

研究方法としては、MDS患者および正常人の末梢血よりデキストラン法を用いて好中球を分離した。その細胞より蛋白質を抽出した後、二次元電気泳動を行った。両者の泳動パターンを解析ソフト(Ettan progenesis)で解析した。発現量に差が認められるスポットの質量分析をMALDI-TOF/TOF MSを用いて行い、その蛋白質についてペプチドデータベース(MASCOT)を用いて同定した。

(倫理面への配慮)

MDS患者および正常人に対して本研究について説明した後、文書にて同意を得た上で血液の提供を受けた。

C. 研究結果

MDS患者と正常者の末梢血好中球由来の蛋白の泳動パターンを解析ソフトで解析したところ、MDSにおいて明らかに高発現しているスポットが認められた。それらのスポットについてMSによるペプチドマップを作製し、データベース上でペプチドマス・フィンガープリント測定を行い、蛋白質を数種同定した。

そのうちの 2 つは CapG および Thiol-specific antioxidant protein (TSA) であった。現在これらの蛋白質についてその機能解析を行っている。

(図) MDS 患者の好中球の二次元タンパク電気泳動の 1 例



D. 考察

MDS 患者の好中球には、正常人と比較し、明らかに高発現している蛋白が数種類存在することが明らかになった。その 1 つは CapG である。CapG は gelsolin family に属し、アクチンの capping に関わるタンパクであり、細胞骨格のダイナミックな変化に重要な働きになっているタンパクである。ちなみに CapG ノックアウトマウスでは好中球の遊走能の低下が認められている。以上より CapG は MDS の病態に深く関与している蛋白であることが示唆される。現在 MDS の好中球における CapG の機能解析を行っている。

MDS に高発現していた蛋白の 1 つである Thiol-specific antioxidant protein (TSA) は peroxiredoxin family に属する蛋白であり、活性酸素種 (ROS) 除去に重要な役割を担っている。MDS の血球はさまざまなサイトカインによる酸化ストレスにより、活性細胞種が増加していることが知られている。したがって、それらの酸化ストレスに対するフィードバック機構として TSA の発現が増加して

いる可能性が考えられる。今回同定された MDS に高発現している蛋白の機能解析を進めることは、MDS の診断および治療の標的となる蛋白の同定につながるものと考えられる。今後はさらに MDS の骨髄細胞を検体として、CD34 陽性細胞レベルでのプロテオーム解析も行い、MDS の病態に関与する蛋白の同定を進める予定である。

E. 結論

MDS 患者と正常人の好中球の蛋白発現パターンを比較検討した結果、MDS 好中球に特異的に高発現している蛋白を同定した。それらの蛋白群の解析を進めることにより、MDS の病態の一部が明らかになると考える。

F. 研究危険情報

なし

G. 研究発表

- 1) Kazama H, Teramura M, Yoshinaga K, Kato T, Motoji T, Mizoguchi H. "Proteomics approach to identifying proteins abnormally expressed in neutrophils in patients with myelodysplastic syndrome. 8th International symposium on myelodysplastic syndromes." 2005 発表予定
- 2) Okamoto, H., Teramura, M. & Kamatani, N. "Myelodysplastic syndrome associated with low-dose methotrexate in rheumatoid arthritis" *Ann. Pharmacother.*, **38**:172-173, 2004.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

ヒト血液細胞における増殖・分化・細胞死に関わる重要分子 p21 の細胞質局在機構

分担研究者 湯尾 明 国立国際医療センター研究所部長

研究要旨

細胞周期（G1 期）停止に関わる核内分子 p21 は、ヒト血液細胞の分化の過程において細胞質に移行して、その細胞のアポトーシス耐性を誘導する。このように、核局在シグナル（NLS）を有し、本来核蛋白であるはずの分子が、細胞質に局在する機序を解析した。作業仮説として、細胞質に局在して核局在シグナルに会合する乳ガン関連遺伝子 Brap2 の関与を仮定した。検討の結果、Brp2 が無細胞系において p21 の NLS に結合すること、細胞内でも p21 と Brap2 が NLS 依存的に結合すること、Brp2 の C 端側に p21NLS との結合部位が存在すること、血液細胞の分化過程で Brap2 の mRNA と蛋白が増加すること、増加した Brap2 が細胞質 p21 と会合していること、Brp2 特異的 siRNA が Brap2 タンパク量を減少させることにより細胞質 p21 の量を減らして細胞のアポトーシス耐性を減弱させること、を確認できた。このような p21、Brp2 のシステムに何らかの異常が生じて造血障害が起こりうる可能性を、今後検討することが重要である。

A. 研究目的

骨髄異形性症候群等の特発性造血障害においては、血液細胞の増殖、分化、アポトーシスが障害されており、病因・病態の重要な要素となっている。この様な観点から、ヒト血液細胞の増殖、分化、アポトーシスの分子機序の解析は、疾患の解明のために極めて重要である。

細胞周期を停止させる分子のうちで、p21 は、細胞周期の停止のみではなく、細胞分化の誘導、アポトーシスの抑制、など、様々の局面に関与している重要な分子であることが知られている。すなわち、当初は G1 期の進行を停止させる分子として発見されたが、その後、強制発現実験の結果から骨髄系血液細胞の分化にも関わることが報告され、さらに、今回の研究成果に関連するアポトーシス耐性誘導作用も見出された。

アポトーシス誘導作用に関しては、非常に興味深いことに、本来、核内に局在して細胞周期を制御する p21 が細胞質に移動するという現象が観察された。実際に、成熟単球の p21 は細胞質に局在することが観察されている。

このように、核に有るべき分子の細胞質移動の機序解析を目的として、細胞質に局在して乳ガン遺伝子（BACA1）の産物を細胞質に牽引する分子 Brap2 に焦点を定めて研究を行った。

B. 研究方法

分化誘導実験に際して、細胞は、HL-60、U937、等のヒト血液細胞株に加えて、マウス血液細胞株 WEHI3BD+を用いた。

分化誘導実験は、ビタミン D や PMA の添

加、もしくは p21 の強制発現、などによって行った。

さらに、遺伝子導入発現実験においては、導入効率の優れた接着系の細胞（HeLa, HEK293）も使用した。

遺伝子導入は、エレクトロポレーションもしくはカチオン性脂質を用いて行った。

様々の分子の細胞内局在の検討においては、共焦点顕微鏡を用いた。

Brp2 などに対するポリクローナル抗体は、抗原を所定の方法でウサギに免疫して作成した。

ウエスタンブロッティングや免疫沈降は、通常の方法によって行った。

RNAi の実験は、Brp2 遺伝子の標的配列を有する 2 重鎖 RNA を Ambion 社製キットにて作成して、HVJ エンベロープベクターを用いて細胞に導入して行った。

C. 研究結果

p21 の様々の欠失変異体を用いた検討から、p21 の細胞核局在は C 末端側の各局在シグナル（nuclear localization signal, NLS）の有無によって規定されている事が明らかになった。さらに、NLS を有する p21 と欠失している p21 のいずれにも GFP を融合させて、血液細胞株に導入発現させて、分化誘導の前後での細胞内局在を検討したところ、NLS を有する p21 の発現時においてのみ、分化誘導後に p21 の細胞質局在が観察された。

以上より、p21 の細胞内局在は何らかの機序で NLS が機能しなくなることが原因と考えられた。NLS 機能が失われる機序としては、当該部位のアミノ酸のリン酸化と、当該配列に対する他の蛋白の結合が提唱され、前

者は、p21 の電気泳動における移動度の変化が認められないことから否定的で、後者の可能性を想定して研究を進めた。NLS に結合する細胞蛋白は、Brap2 以外にはほとんど報告されておらず、Brap2 を候補として研究を進めた。

まず、Brap2 が無細胞系において p21 の NLS に結合することを、NLS 部分を欠く p21 も用いて検討したところ、p21NLS と Brap2 の特異的な結合を確認できた。

次に、細胞内で実際に p21 と Brap2 が結合することを、両者の共発現と免疫沈降を用いて手法で確認し、しかも、NLS を有しない p21 と Brap2 が結合しないこともあわせて確認できた。さらに、NLS を有する p21 の発現の有無によって、Brap2 の局在が変わる

(Brap2 も共発現した時のみ p21 が細胞質にも認められる) 事を確認した。Brap2 の C 末端側に p21NLS との結合部位が存在する事も確認した。

血液細胞の分化過程で、実際に Brap2 の mRNA と蛋白が増加する事を確認した。また、増加した Brap2 は同じく分化過程で増加する細胞質 p21 と会合していることも確認された。

最後に、血球分化過程で増加する Brap2 が細胞質 p21 の増加やそれに伴うアポトーシス耐性といった生物学的な現象に本当に関係している事を確認するために、RNAi 法を用いた Brap2 の阻害実験を行った。Brap2 特異的 siRNA は、Brap2 タンパク量を実際に減少させ、その条件下において、細胞質 p21 の量が減少し、分化誘導に伴うアポトーシス耐性も減弱してアポトーシス感受性になることを確認できた。

D. 考察

細胞質 p21 は、細胞株のみではなく正常の末梢血ヒト単球においても観察される現象で、血球の成熟・分化過程でのアポトーシス耐性において重要な役割を果たす事はもちろんのこと、骨髄異形性症候群のような造血障害性の疾患においても、病態に貢献している物と想定される。細胞質 p21 の重要な役割はアポトーシス耐性であり、その機序として ASK1 関連の MAP キナーゼのシグナル伝達経路の関与が示唆されている。このような一連の p21 関連の細胞内刺激伝達機構の、患者検体での異常の有無の研究が今後重要である。

このような細胞質 p21 を制御している分子として、今回の研究において Brap2 が同定された。この分子は、その C 末端側の領域が p21

の C 末端側に存在する NLS に結合して、p21 の核局在を阻害して細胞質 p21 を誘導することが示された。このような形で、本来核に存在する分子の細胞質誘導を促す機序は、他に例が無く、極めて興味深い現象と考えられる。

Brap2 は、当初は乳ガン抑制遺伝子 BRCA1 の細胞質局在に関わる遺伝子として単離された。本来核内において機能する癌抑制遺伝子 BRCA1 は、正常乳腺上皮細胞においては核内に局在するが、乳ガン細胞（特に悪性度の高いもの）においては細胞質に局在して機能し得ず、その原因として Brap2

(BRCA1-associated protein 2) が重要という説明であった。しかし、その後の詳細な研究により、実際の細胞内においては Brap2 と BRCA1 は関連が無いことが明らかとなり、Brap2 の役割が宙に浮いたような状態となっていた。今回の研究によって、Brap2 の重要な役割が解明された。ごく最近の論文 (Nature 427:256-260,2004) においては、Brap2 が Ras のシグナルに関連することも証明され、ますます注目を浴びる分子となった。

以上のように重要な細胞内分子である Brap2 の疾患における役割を解明すべく、今後の研究が望まれる。

E. 結論

ヒト血液細胞において分化過程において観察される重要な現象として、細胞周期制御分子である核蛋白 p21 が細胞質に移動して、細胞のアポトーシス耐性に関与することが証明されてきた。本研究においては、細胞質 p21 の分子機序を解明するために実験を行い、Brap2 という乳ガン抑制遺伝子関連分子が p21 を細胞質内にとどめるための鍵となる分子であることを証明した。今後は、p21 や Brap2 のヒト血液疾患における役割を明らかにすることが重要である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

Asada M, Ohmi K, Delia D, Enosawa S, Suzuki S, Yuo A, Suzuki H, Mizutani S: Brap2 functions as a cytoplasmic retention protein for p21 during monocytic differentiation. Mol Cell Biol 24:8236-8243,2004.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Choi, Y.L., Moriuchi, R., Osawa, M., Iwama, A., Makishima, H., Wada, T., Kisanuki, H., Kaneda, R., Ota, J., Koinuma, K., Ishikawa, M., Takada, S., Yamashita, Y. & Mano, H.	Retroviral expression screening of oncogenes in natural killer cell leukemia	Leuk. Res.	in press		2005
Tsutsumi, C., Ueda, M., Miyazaki, Y., Yamashita, Y., Choi, Y.L., Ota, J., Kaneda, R., Koinuma, K., Fujiwara, S., Kisanuki, H., Ishikawa, M., Ozawa, K., Tomonaga, M. & Mano, H.	DNA microarray analysis of dysplastic morphology associated with acute myeloid leukemia	Exp. Hematol		32 828-835	2004
Choi, Y.L., Makishima, H., Ohashi, J., Yamashita, Y., Ohki, R., Koinuma, K., Ota, J., Isobe, Y., Ishida, F., Oshimi, K. & Mano, H.	DNA microarray analysis of natural killer cell-type lymphoproliferative disease of granular lymphocytes with purified CD3(-)CD56(+) fractions	Leukemia		18 556-565	2004
Koinuma, K., Shitoh, K., Miyakura, Y., Furukawa, T., Yamashita, Y., Ota, J., Ohki, R., Choi, Y.L., Wada, T., Konishi, F., Nagai, H. & Mano, H.	Mutations of BRAF are associated with extensive hMLH1 promoter methylation in sporadic colorectal carcinomas	Int. J. Cancer		108 237-242	2004
Kaneda, R., Toyota, M., Yamashita, Y., Koinuma, K., Choi, Y.L., Ota, J., Kisanuki, H., Ishikawa, M., Takada, S., Shimada, K. & Mano, H.	High-throughput screening of genome fragments bound to differentially acetylated histones	Genes Cells		9 1167-1174	2004
Ohki-Kaneda, R., Ohashi, J., Yamamoto, K., Ueno, S., Ota, J., Choi, Y.L., Koinuma, K., Yamashita, Y., Misawa, Y., Fuse, K., Ikeda, U., Shimada, K. & Mano, H.	Cardiac function-related gene expression profiles in human atrial myocytes	Biochem. Biophys. Res. Commun.		320 1328-1336	2004
Ohki, R., Yamamoto, K., Ueno, S., Mano, H., Misawa, Y., Fuse, K., Ikeda, U. & Shimada, K.	Transcriptional profile of genes induced in human atrial myocardium with pressure overload	Int. J. Cardiol		96 381-387	2004
Kano, Y., Akutsu, M., Tsunoda, S., Izumi, T., Mori, K., Fujii, H., Yazawa, Y., Mano, H. & Furukawa, Y.	Schedule-dependent synergism and antagonism between pemetrexed and paclitaxel in human carcinoma cell lines in vitro	Cancer Chemother. Pharmacol			2004
He, H., Hirokawa, Y., Gazit, A., Yamashita, Y., Mano, H., Kawakami, Y., Kawakami, Hsieh, C.Y., Kung, H.J., Lessene, G., Baeil, J., Levitzki, A. & Maruta, H.	The Tyr-Kinase Inhibitor AG879, That Blocks the ETK-PAK1 Interaction, Suppresses the RAS-Induced PAK1 Activation and Malignant Transformation	Cancer Biol. Ther.		3 96-101	2004
Mano, H.	Stratification of Acute Myeloid Leukemia Based on Gene Expression Profiles	Int.J.Hematol.		80 389-394	2004
Asada, M., Ohmi, K., Delia, D., Enosawa, S., Suzuki, S., You, A., Suzuki, H., Mizutani, S.	Brap2 Functions as a Cytoplasmic Retention Protein for p21 during Monocyte Differentiation	Mol.Cell.Biol.		24 8236-8243	2004
間野博行.	予後の予測：急性白血病	臨床医		30 2151-2153	2004
間野博行.	ゲノミクス解析に基づく白血病治療	血液・免疫・腫瘍		9 181-185	2004
間野博行.	マイクロアレイによる造血器腫瘍の鑑別診断	Currents in Hemato-immunology		20 4-8	2004
間野博行.	ゲノムと技術	JIM		14 110-113	2004
間野博行.	多発性骨髄腫と関連疾患の遺伝子発現プロファイル	Annual Review血液2004		156-164	2004

DNA microarray analysis of dysplastic morphology associated with acute myeloid leukemia

Chizuko Tsutsumi^a, Masuzu Ueda^b, Yasushi Miyazaki^a, Yoshihiro Yamashita^c,
Young Lim Choi^c, Jun Ota^{c,d}, Ruri Kaneda^c, Koji Koinuma^c, Shin-ichiro Fujiwara^{b,c},
Hiroyuki Kisanuki^c, Madoka Ishikawa^c, Keiya Ozawa^b, Masao Tomonaga^a, and Hiroyuki Mano^{c,d}

^aDepartment of Hematology and Molecular Medicine Unit, Nagasaki University, Nagasaki, Japan; Divisions of ^bHematology and ^cFunctional Genomics, Jichi Medical School, Kawachigun, Tochigi, Japan; ^dCREST, Japan Science and Technology Agency, Saitama, Japan

(Received 17 February 2004; revised 17 May 2004; accepted 5 June 2004)

Objective. Acute myeloid leukemia (AML) develops de novo or secondarily to either myelodysplastic syndrome (MDS) or anticancer treatment (therapy-related leukemia, TRL). Prominent dysplasia of blood cells is apparent in individuals with MDS-related AML as well as in some patients with TRL or even with de novo AML. The clinical entity of AML with multilineage dysplasia (AML-MLD) is likely to be an amalgamation of MDS-related AML and de novo AML-MLD. The aim of this study was to clarify, by the use of high-density oligonucleotide microarrays, whether these subcategories of AML are intrinsically distinct from each other.

Materials and Methods. The AC133⁺ hematopoietic stem cell-like fractions were purified from the bone marrow of individuals with de novo AML without dysplasia (n = 15), AML-MLD (n = 11), MDS-related AML (n = 11), or TRL (n = 2), and were subjected to the synthesis of cRNA which was subsequently hybridized to microarray harboring oligonucleotide corresponding to more than 12,000 probe sets.

Results. We could identify many genes whose expression was specific to these various subcategories of AML. Furthermore, with the correspondence analysis/three-dimensional projection strategy, we were able to visualize the independent, yet partially overlapping, nature of current AML subcategories on the basis of their transcriptomes.

Conclusion. Our data indicate the possibility of subclassification of AML based on gene expression profiles of leukemic blasts. © 2004 International Society for Experimental Hematology. Published by Elsevier Inc.

Acute myeloid leukemia (AML) may develop de novo or as a result of either myelodysplastic syndrome (MDS) or anticancer treatment [1]. Given that MDS is characterized by dysplastic changes in differentiated blood cells, individuals with MDS-related leukemia often manifest prominent dysplasia in their blood cells. Therapy-related acute leukemia (TRL) may develop after the administration of alkylating agents, topoisomerase inhibitors, or radiotherapy. The clinical outcome of TRL is generally worse than that of de novo AML [2], and a subset of individuals with TRL also exhibit multilineage dysplasia of blood cells.

A clinical record of a preceding MDS phase is also an indicator of poor prognosis for the individuals with AML.

Therefore, to predict the outcome of, and to optimize the treatment for, each AML patient, it would be important to differentiate de novo AML from MDS-related AML and TRL. However, even in the bone marrow (BM) of healthy elderly people, it is not rare to find dysplastic changes (in particular, dyserythropoiesis) in differentiated blood cells [3]. Therefore, the differential diagnosis among such AML-related disorders is not always an easy task in the clinical settings, especially if a prior record of hematopoietic parameters is not available.

Making issues further complicated, prominent dysplasia in blood cells may be found among certain cases of de novo AML, with which prior MDS phases can be excluded [4,5]. It is known that such de novo AML with dysplasia has a poor outcome with conventional chemotherapy, as does MDS-related leukemia [6]. However, Taguchi et al. have argued that the former may be a distinct clinical entity from the

Offprint requests to: Prof. Hiroyuki Mano, M.D., Ph.D., Division of Functional Genomics, Jichi Medical School, 3311-1 Yakushiji, Kawachigun, Tochigi 329-0498, Japan; E-mail: hmano@jichi.ac.jp

latter based on the finding that the former cases respond far better to allogeneic bone marrow transplantation than the latter one [7]. In the revised classification of AML by the World Health Organization (WHO) [1], an entity of AML with multilineage dysplasia (AML-MLD) has been proposed, which includes both de novo AML with dysplasia and secondary AML from MDS. Whether such amalgamation holds a clinical relevance awaits further studies on this issue.

DNA microarray has made it possible to measure the expression levels in tens of thousands of genes simultaneously, and thus should be a promising tool to discover useful and reliable molecular markers for these AML-related disorders. However, a simple comparison of BM mononuclear cells (MNCs) with DNA microarray is likely to generate a large body of pseudopositive and pseudonegative data, which may only reflect different proportions of blastic cells within BM or the different lineage commitment of leukemic cells [8]. To minimize such “population-shift effect,” it should be effective to isolate and compare leukemic blasts at the same differentiation level from AML-related disorders.

Toward this goal, we started the Blast Bank project to purify and store AC133 surface marker [9]-positive hematopoietic stem cell (HSC)-like fractions from patients with a wide range of hematological disorders. Microarray analysis of these Blast Bank specimens has been highly successful in the isolation of molecular markers to differentiate de novo AML from MDS-related leukemia [8,10], and in the identification of genes that may be involved in the stage progression mechanism in chronic myeloid leukemia (CML) [11] or MDS [12]. Further, a proteomics approach with these Bank cells could identify a protein that may be associated with chromosome instability in leukemic cells [13].

We have now determined the expression intensities for more than 12,000 human probe sets in a total of 39 Blast Bank specimens, including those from 15 cases of de novo AML without dysplasia, 11 cases of MDS-related leukemia, 11 cases of AML-MLD, and 2 cases of TRL. The resulting large data set was analyzed to address whether these clinical entities are actually distinct from each other or whether they partially overlap.

Patients and methods

Purification of AC133⁺ cells

BM aspirates were obtained from the study subjects with written informed consent. From each specimen, MNCs were isolated by Ficoll-Hypaque density gradient centrifugation, and were labeled with magnetic bead-conjugated anti-AC133 monoclonal antibody (AC133 MicroBead; Miltenyi Biotec, Auburn, CA, USA). AC133⁺ HSC-like fractions were then purified through a miniMACS magnetic cell separation column (Miltenyi Biotec), and enrichment of the HSC-like fraction was evaluated by subjecting portions of the MNC and AC133⁺ cell preparations either to staining with Wright-Giemsa solution or to the analysis of the expression of CD34,

CD38, and AC133 by flow cytometry (FACScan; Becton-Dickinson, Mountain View, CA, USA). In most instances, the CD34^{high}CD38^{low} fraction constituted greater than 90% of the eluate of the affinity column.

DNA microarray analysis

Total RNA was extracted from the AC133⁺ cell preparations by an RNeasy Mini column with RNase-free DNase (both from Qiagen Inc., Valencia, CA, USA), and was subjected to two rounds of amplification of mRNA fractions by T7 RNA polymerase [14]. The high fidelity of the amplification step was confirmed previously [10]. One microgram of the amplified complementary RNA (cRNA) was then converted to double-stranded cDNA by PowerScript reverse transcriptase (BD Biosciences Clontech, Palo Alto, CA, USA), which was used to prepare biotin-labeled cRNA with ENZO BioArray transcript labeling kit (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA). Hybridization of the samples with GeneChip HGU95Av2 microarrays was conducted by the GeneChip system (Affymetrix), revealing the expression intensities of 12,625 probe sets in each sample.

The transcriptome of 10 cases each with de novo AML and MDS-related AML has been already reported separately [10], aiming at the comparison between these two clinical conditions with the same differentiation background; the M2 subtype according to the classification of the French-American-British (FAB) Cooperative Group [15].

Statistical analysis

The fluorescence intensity for each gene was normalized relative to the median fluorescence value for all human genes with a “Present” or “Marginal” call (Microarray Suite; Affymetrix) in each hybridization. Hierarchical clustering of the data set and analysis of variance (ANOVA) were performed with GeneSpring 6.0 software (Silicon Genetics, Redwood, CA, USA). Correspondence analysis [16] was performed with the ViSta software (<http://www.visual-stats.org>) for all genes showing a significant difference. Each sample was plotted in three dimensions based on the coordinates obtained from the correspondence analysis. All array data as well as details of the genes shown in the figures are available as supplementary information at the *Experimental Hematology* web site.

Results

Comparison of AML-MLD and MDS-related AML

Summarized in Table 1 are the clinical characteristics of 39 patients enrolled in this study, including 15 cases with de novo AML without dysplasia, 11 cases with AML-MLD, 11 cases with MDS-related AML, and 2 cases with TRL. The presence of “MLD” was determined according to the definition in the WHO classification [1], by a central review at the Department of Hematology and Molecular Medicine Unit, Nagasaki University, which is also a “central review institute” for the Japan Adult Leukaemia Study Group. It should be noted that favorable karyotypes, t(8;21) and inv(16), were found only in the cases with AML without dysplasia.

According to the WHO proposal of classification, AML-MLD is likely to be an amalgamation of bona fide de novo

Table 1. Patient characteristics

Patient ID	Disease	Age (year)	Sex	Karyotype
1	MDS	79	M	+8
2	MDS	80	M	+8
3	MDS	71	F	Other
4	MDS	44	M	Normal
5	MDS	61	M	+8
6	MDS	69	M	+8
7	AML	83	M	-7
8	MLD	61	M	Other
9	AML	85	M	-7
10	MDS	84	M	-7
11	MDS	57	M	Normal
12	AML	58	M	t(8;21)
13	AML	37	M	t(8;21)
14	AML	84	M	Normal
15	AML	43	M	Normal
16	MLD	41	M	Normal
17	AML	38	M	t(8;21)
18	MDS	69	M	+8
19	AML	49	F	t(8;21)
20	AML	61	F	t(8;21)
21	MLD*	38	M	Normal
22	MLD*	80	M	Normal
23	AML	53	F	-7
24	AML	32	F	Other
25	AML	46	F	Other
26	AML	53	M	Normal
27	MLD*	57	F	+8
28	TRL	59	M	Other
29	TRL	67	M	-7
30	MDS	70	M	Other
31	MLD*	64	M	-7
32	AML	22	F	inv(16)
33	MLD*	16	F	Normal
34	AML	67	M	t(8;21)
35	MLD*	67	M	-7
36	MDS	88	F	Other
37	MLD*	53	M	Normal
38	MLD*	46	M	Other
39	MLD*	50	M	Other

AML, de novo AML; MLD, AML with multilineage dysplasia; MDS, MDS-associated AML, TRL, therapy-related AML; M, male; F, female.

*Individuals proven not to have a prior history of MDS.

AML with dysplasia and secondary AML evolving from an undiscovered phase of MDS. Although the clinical characteristics of the former have not been fully defined, it has been reported that de novo AML-MLD may be associated with poor prognosis [17,18] and, in some cases, with an increased megakaryopoiesis in BM [5].

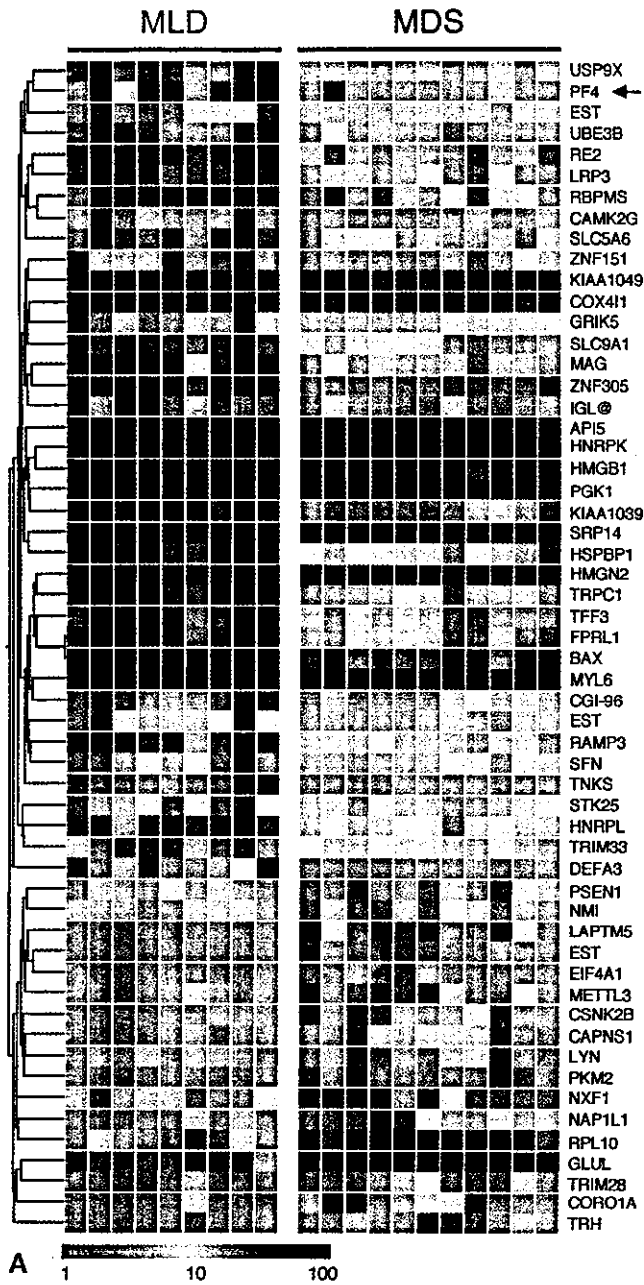
To clarify directly whether de novo AML-MLD is truly a clinical entity distinct from MDS-related leukemia, we searched for differences between the transcriptomes of AC133⁺ cells derived from the individuals diagnosed with these two conditions. Among the 11 cases of AML-MLD studied, 9 were revealed not to have prior MDS records, while we could not obtain the clinical information for the other two with regard to their prior MDS history. Therefore, we could not exclude the possibility that the latter cases

had evolved from MDS stages. The former nine cases were thus used to measure the difference between de novo AML-MLD and MDS-related secondary AML.

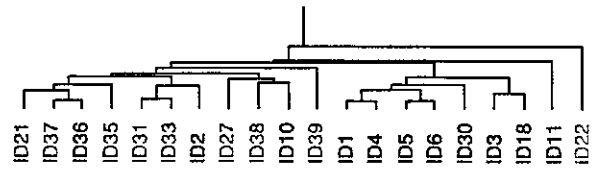
For the expression data set of these 20 subjects, we first set a condition that the expression level of a given gene should receive the "Present" call (from the Microarray Suite 4.0 software) in at least 30% (6 cases) of the samples, aiming to remove transcriptionally silent genes from the analysis. A total of 4851 genes passed this selection window. Toward such genes was then applied a Student's *t*-test ($p < 0.001$) to extract genes, expression level of which significantly differed between the two classes, de novo AML-MLD and MDS-related AML. However, many of the genes thus identified yet had very low absolute expression levels throughout the samples, even though the ratio of the expression levels between the two classes might be relatively large. To eliminate such "nearly silent" genes and to enrich genes whose expression levels were significantly high in at least one of the classes, we further selected those whose effect size (absolute difference in the mean expression intensities) [19] between the two classes was at least 10 arbitrary units (U).

We could finally identify a total of 56 genes significantly contrasting the two clinical conditions, expression profiles of which are shown in a "gene-tree" format (Fig. 1A). Here genes with similar expression patterns across the samples were clustered near each other. Many of the genes thus identified were preferentially expressed in de novo AML-MLD (upper two-thirds of the tree), while some were so in MDS-related AML (bottom third). Given the association of de novo AML-MLD with dysmegakaryopoiesis in BM, it was of interest to find that the gene for platelet factor 4 (PF4) was preferentially expressed in individuals with this condition. PF4 is a CXC-type chemokine secreted from platelets, and its serum level is known to reflect platelet activities [20]. High production of PF4 from MLD blasts should influence the environment within BM, and may thereby affect megakaryopoiesis.

Were the expression profiles of these 56 genes potent enough to differentiate AML-MLD from MDS-related AML? To examine this possibility, two-way clustering analysis [21] was conducted on the data set to make a "patient tree" among the subjects, based on the standard correlation values with a separation ratio of 1.0 (Fig. 1B). This tree, which reflects the similarity in the expression profiles of the 56 genes among the subjects, showed the presence of a cluster of individuals only with MDS-related AML. However, the large branch at the left contained not only most of the patients with de novo AML-MLD, but also some individuals with MDS-related AML. It was not clear whether the failure in the clear separation of the two clinical categories was due to an inadequacy of the separation power of the clustering method or to an inaccurate clinical diagnosis. Further, it has not been addressed whether de novo AML-MLD should be treated as a single clinical entity distinct



B



C

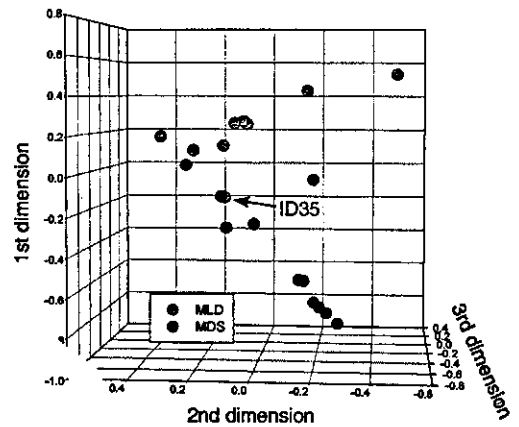


Figure 1. Continued

Figure 1. Comparison of gene expression profiles between individuals with de novo AML-MLD and those with MDS-related leukemia. (A): Gene tree for the expression levels (color-coded as indicated by the scale at the bottom) of 56 human genes in AC133⁺ cells from patients with de novo AML-MLD (MLD) or MDS-related leukemia (MDS). Each row corresponds to a single gene and each column to a different patient. The gene symbols are indicated at the right. The position of the *PF4* gene is indicated by an arrow. (B): Two-way clustering analysis of the patients with de novo AML-MLD (green) or MDS-related leukemia (red) based on the similarities in the expression profiles of the 56 genes shown in (A). (C): Correspondence analysis of the 56 genes identified three major dimensions in their expression profiles. Projection of the specimens into a virtual space with these three dimensions revealed that those from de novo AML-MLD and those from MDS-related leukemia were separated from each other. The arrow indicates a nonconforming specimen (ID 35).

from MDS-related AML in, at least, the point of view of gene expression profiles.

To address these issues, we tried to visualize the similarity/difference between the two classes. Correspondence analysis is a novel method to decompose multidimensional data [16]. It enables not only a low-dimensional projection of expression profiles for numerous genes, but measurement of the contribution of each gene to a given extracted dimension and, at the same time, measurement of the contribution of each extracted dimension to the whole complexity. Correspondence analysis was performed on the expression data of the 56 genes in Figure 1A, successfully reducing the complexity of 56 dimensions into 3. On the basis of the calculated three-dimensional (3D) coordinates for each sample, the specimens were then projected into a virtual space (Fig. 1C). It was clear from this figure that most of the samples could be separated into two diagnosis-related groups (whether the coordinate in the first dimension was greater than or equal to 0 or less than 0), supporting the feasibility to set a clinical entity “de novo AML-MLD.” Figure 1C also suggests that gene expression profiling could be applied to the differential diagnosis of AML-MLD and MDS-related AML. There was, however, a single patient with AML-MLD

(ID 35) who was misplaced in the MDS group (indicated by an arrow in Fig. 1C).

Comparison of AML without dysplasia and de novo AML-MLD

Similarly, we compared the gene expression profiles between the cases with de novo AML-MLD and AML without dysplastic changes. From the data set of microarray experiments for de novo AML-MLD ($n = 9$) and de novo AML without dysplasia ($n = 15$), we selected those whose expression profile received the “Present” call in at least 30% of the cases. Toward such 3608 genes identified, we then applied Student’s t -test ($p < 0.001$) to extract disease-associated genes between AML-MLD and AML without dysplasia. Further selection with an effect size of at least 10 U led to the identification of four genes whose expression profiles were shown as a gene tree format in Figure 2A.

Similar to the comparison between AML-MLD and MDS-related AML (Fig. 1A), the *PF4* gene was again chosen as a selective marker for AML-MLD. Therefore, among the three classes of AML (de novo AML without dysplasia, de novo AML-MLD, and MDS-related AML), high expression of *PF4* was appreciated only in a single subclass, AML-MLD. It should be also noted that *PF4* was the only gene commonly selected in the comparison of MDS-related AML vs AML-MLD and de novo AML without dysplasia vs AML-MLD.

Two-way clustering of the samples according to the profiles in Figure 2A failed to separate the samples into two major branches corresponding to the clinical diagnosis (Fig. 2B). Three cases of AML-MLD (ID 21, 27, and 35) were misplaced in the large branch of AML without dysplasia, while a patient with AML-MLD (ID 9) was included in the right branch of AML-MLD.

This figure did not clearly tell us how the two conditions are independent or overlapped. Therefore, as in Figure 1C, we tried to construct a 3D view of the samples with the coordinates calculated from correspondence analysis on the four genes. As shown in Figure 2C, the majority of the cases with AML-MLD and AML without dysplasia were separated in the 3D space. In contrast to the prominent separation power of the first dimension in Figure 1C, both of the first and second dimensions in Figure 2C significantly contributed to the separation of the samples. These data indicate that de novo AML without dysplasia can be differentiated from de novo AML-MLD on the basis of gene expression profiles. Again, there was a single subject (ID 27) whose place was incompatible with its clinical diagnosis (indicated by an arrow).

Comparison of de novo AML without dysplasia and MDS-related AML

We have also compared the expression profiles of leukemic blasts between de novo AML ($n = 15$) and MDS-related leukemia ($n = 11$). A similar comparison has been previously tried between 10 individuals with de novo AML and

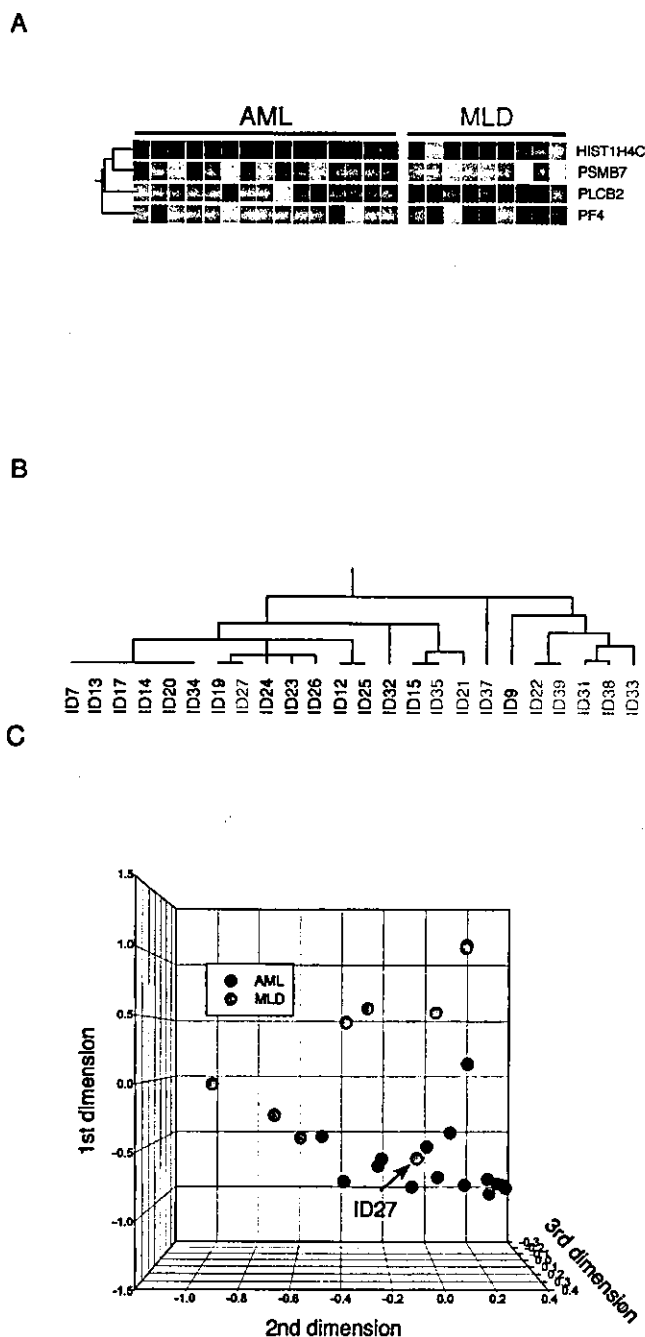


Figure 2. Comparison of gene expression profiles between patients with de novo AML without dysplasia and those with de novo AML-MLD. (A): Gene tree for the expression levels of four human genes in AC133⁺ cells from individuals with de novo AML without dysplasia (AML) or de novo AML-MLD (MLD). (B,C): Two-way clustering analysis (B) and 3D projection based on correspondence analysis (C) for the patients with de novo AML without dysplasia (blue) or de novo AML-MLD (green) were performed as in Figure 1B and C. The arrow indicates a nonconforming specimen (ID 27).

10 with MDS-related AML matched for the M2 subtype in the FAB classification [10]. In the present study, we identified 30 probe sets (28 genes) whose expression level differed between the two conditions ($p < 0.001$ in Student’s t test and