

of *DLK* in blasts from individuals with MDS has also been demonstrated in other studies [18,23].

Cell fractions other than CD133⁺ cells are also potential targets for microarray analysis. Pellagatti et al chose peripheral blood neutrophils to investigate the gene expression profiles of MDS and MDS-associated AML [24]. They identified genes whose expression was dependent on MDS subtype. Given the high activity of ribonuclease in neutrophils, however, it is important to confirm the reproducibility of expression data obtained with these cells.

2.3. Dysplasia

In addition to the dysplastic blood cells associated with MDS, prominent dysplasia is apparent in certain individuals with de novo AML for whom the possibility of a prior MDS phase can be excluded [25,26]. Such de novo AML with dysplasia has a poor outcome with conventional chemotherapy [27], as does MDS-related leukemia. In the revised classification of AML by the World Health Organization [8], an entity of AML with multilineage dysplasia (AML-MLD) has been proposed; this entity probably includes both de novo AML with dysplasia and AML secondary to MDS. Whether such an amalgamation has clinical relevance awaits further studies.

To clarify directly whether de novo AML-MLD is indeed a clinical entity distinct from de novo AML without dysplasia, we searched for differences between the transcriptomes of CD133⁺ cells derived from individuals with diagnoses of these 2 conditions [28]. We attempted to construct a 3D view of the samples with the coordinates calculated from correspondence analysis of genes found to be associated with dysplasia (Figure 1C). Most cases of AML-MLD were separated from those of AML without dysplasia in the 3D space. In contrast to the prominent separation power of the first dimension in Figure 1B, both the first and second dimensions substantially contributed to separation of the samples in Figure 1C. These data indicate that de novo AML without dysplasia can be differentiated from de novo AML-MLD on the basis of gene expression profiles.

3. Stratification of AML

3.1. Analysis of BM MNCs

Given that the current classification of AML is not sufficiently powerful to predict the prognosis of each affected individual, it is hoped that DNA microarray analysis will provide a better stratification scheme to separate AML patients into prognosis-dependent subgroups. To this end, Bullinger et al isolated MNCs from either BM or peripheral blood of 116 adult AML patients and examined the gene expression profiles of these cells with DNA microarrays harboring >39,000 cDNAs [29]. From the data set, they then screened "class predictor" genes, whose expression was correlated with the duration of patient survival. Class prediction based on such genes separated the patients into 2 classes, and long-term survival differed significantly between these 2 classes for both the training set ($P < .001$, log-rank test) and the test set ($P = .006$). This expression profile-based classification

also separated AML patients with normal karyotype into 2 classes with distinct prognoses ($P = .046$). Although the number of genes used for the class prediction was relatively large ($n = 133$), these data demonstrated that DNA microarray analysis is able to predict the prognosis of AML patients in a manner independent of karyotype.

Similarly, Valk et al measured the expression levels of approximately 13,000 genes in BM MNCs isolated from 285 patients with AML [30]. Unsupervised clustering based on the gene expression profiles separated the patients into 16 subgroups. The prognoses of patients differed among these clusters, but whether the ability to predict prognosis was independent of karyotype was not addressed.

The gene expression profiles of BM MNCs from 54 pediatric AML patients were compared for those individuals who maintained complete remission (CR) for >3 years and those who failed to enter initial CR [14]. Thirty-five genes were identified as associated with prognosis and were used to separate the individuals into 2 groups. The difference in survival between the 2 groups was again statistically significant ($P = .03$), although whether this approach was independent of the current classification system was not addressed.

3.2. Analysis of Purified Fractions

As described in section 2.2, microarray analysis of purified fractions is likely to be more accurate than is that of BM MNCs for the extraction of prognosis-associated molecular signatures. We have analyzed the expression intensities of approximately 33,000 genes (likely representing almost the entire human genome) in CD133⁺ HSC-like fractions isolated from 66 patients with AML who received standard chemotherapy. Of these patients, 51 individuals entered initial CR, whereas the remaining 15 failed to do so. Comparison of the data set for these 2 classes resulted in the identification of a small number of outcome-related genes (Yamashita et al, unpublished data). Principal components were extracted from the gene expression patterns, and the patients were projected into a virtual 3D space based on the coordinates obtained by correspondence analysis. Individuals who entered CR were separated from those who did not (Figure 2A), indicating that the gene expression profile of leukemic blasts indeed differs between AML patients who respond to chemotherapy and those who do not. In this analysis, the separation of the 2 groups of patients was achieved mostly in the first dimension. We therefore separated the patients into 2 subgroups according to whether the coordinate in the first dimension was < -0.3 or ≥ -0.3 . The individuals in the latter group lived significantly longer than did those in the former (Figure 2B). These data support the feasibility of a novel stratification scheme for AML based on the gene expression profile.

4. Conclusion

Newly developed genomics tools allow global assessment of mRNA levels, DNA copy number, or genomic polymorphisms. Among these tools, DNA microarray analysis has proved highly successful in studies of human specimens, not only from individuals with hematopoietic disorders but also

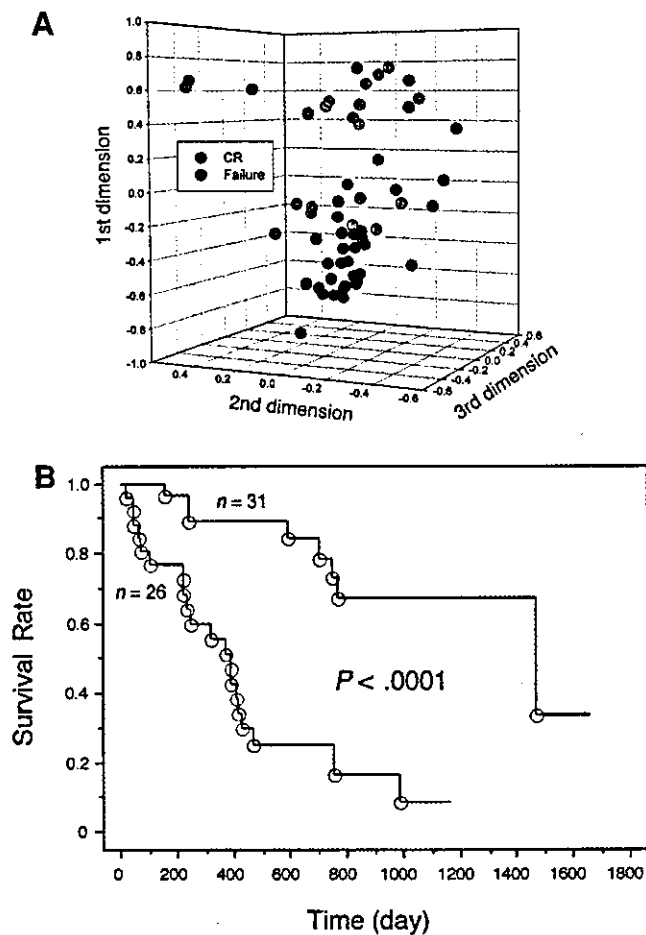


Figure 2. Stratification of acute myeloid leukemia (AML) on the basis of microarray analysis of gene expression. A, Projection of specimens from patients with AML who underwent initial chemotherapy-induced complete remission (CR) and those who did not (Failure) into a 3-dimensional space based on correspondence analysis of differences in gene expression. B, Kaplan-Meier analysis of the subjects in (A), revealing significantly different prognoses for the 2 classes with a coordinate in the first dimension of <-0.3 or ≥-0.3 .

from those with solid tumors or nonmalignant degenerative diseases. Insight into many more human disorders is likely soon to be provided by such global profiling of gene expression. It is important to bear in mind, however, that DNA microarray data are prone to contamination with pseudopositive or pseudonegative results. The efficient characterization of AML thus appears to require optimal purification of target cell populations. Provided that experiments are designed carefully, DNA microarray analysis is likely to shed new light on the molecular pathogenesis of AML.

Acknowledgments

I thank colleagues in the Division of Functional Genomics, Jichi Medical School, for their enthusiasm in DNA microarray analyses, as well as the many physicians and patients who have participated in the Blast Bank project.

References

1. The Genome International Sequencing Consortium. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*. 2001;409:860-921.
2. The *C. elegans* Sequencing Consortium. Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. *Science*. 1998;282:2012-2018.
3. Cheung VG, Morley M, Aguilar F, Massimi A, Kucherlapati R, Childs G. Making and reading microarrays. *Nat Genet*. 1999;21:15-19.
4. Khan J, Bittner ML, Saal LH, et al. cDNA microarrays detect activation of a myogenic transcription program by the *PAX3-FKHR* fusion gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96:13264-13269.
5. Heller RA, Schena M, Chai A, et al. Discovery and analysis of inflammatory disease-related genes using cDNA microarrays. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94:2150-2155.
6. Dhanasekaran SM, Barrette TR, Ghosh D, et al. Delineation of prognostic biomarkers in prostate cancer. *Nature*. 2001;412:822-826.
7. Beer DG, Kardias SL, Huang CC, et al. Gene-expression profiles predict survival of patients with lung adenocarcinoma. *Nat Med*. 2002;8:816-824.
8. Jaffe ES, Harris NL, Vardman JW, eds. *Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. Lyon, France: IARC Press; 2001.
9. Grimwade D, Walker H, Oliver F, et al. The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: analysis of 1,612 patients entered into the MRC AML 10 trial: the Medical Research Council Adult and Children's Leukaemia Working Parties. *Blood*. 1998;92:2322-2333.
10. Byrd JC, Mrozek K, Dodge RK, et al. Pretreatment cytogenetic abnormalities are predictive of induction success, cumulative incidence of relapse, and overall survival in adult patients with de novo acute myeloid leukemia: results from Cancer and Leukemia Group B (CALGB 8461). *Blood*. 2002;100:4325-4336.
11. Smith SM, Le Beau MM, Huo D, et al. Clinical-cytogenetic associations in 306 patients with therapy-related myelodysplasia and myeloid leukemia: the University of Chicago series. *Blood*. 2003;102:43-52.
12. Bain BJ. The bone marrow aspirate of healthy subjects. *Br J Haematol*. 1996;94:206-209.
13. Schoch C, Kohlmann A, Schnittger S, et al. Acute myeloid leukemias with reciprocal rearrangements can be distinguished by specific gene expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99:10008-10013.
14. Yagi T, Morimoto A, Eguchi M, et al. Identification of a gene expression signature associated with pediatric AML prognosis. *Blood*. 2003;102:1849-1856.
15. Virtaneva K, Wright FA, Tanner SM, et al. Expression profiling reveals fundamental biological differences in acute myeloid leukemia with isolated trisomy 8 and normal cytogenetics. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98:1124-1129.
16. Miyazato A, Ueno S, Ohmine K, et al. Identification of myelodysplastic syndrome-specific genes by DNA microarray analysis with purified hematopoietic stem cell fraction. *Blood*. 2001;98:422-427.
17. Hin AH, Miraglia S, Zanjani ED, et al. AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood*. 1997;90:5002-5012.
18. Oshima Y, Ueda M, Yamashita Y, et al. DNA microarray analysis of hematopoietic stem cell-like fractions from individuals with the M2 subtype of acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2003;17:1990-1997.
19. Lefkowitz I, Kuhn L, Valiron O, Merle A, Kettman J. Toward an objective classification of cells in the immune system. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988;85:3565-3569.
20. Fellenberg K, Hauser NC, Brors B, Neutzner A, Hoheisel JD, Vingron M. Correspondence analysis applied to microarray data. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98:10781-10786.
21. Moore KA, Pytowski B, Witte L, Hicklin D, Lemischka IR.

- Hematopoietic activity of a stromal cell transmembrane protein containing epidermal growth factor-like repeat motifs. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94:4011-4016.
22. Smas CM, Sul HS. Pref-1, a protein containing EGF-like repeats, inhibits adipocyte differentiation. *Cell*. 1993;73:725-734.
 23. Hofmann WK, de Vos S, Komor M, Hoelzer D, Wachsman W, Koefler HP. Characterization of gene expression of CD34⁺ cells from normal and myelodysplastic bone marrow. *Blood*. 2002;100:3553-3560.
 24. Pellagatti A, Esoof N, Watkins F, et al. Gene expression profiling in the myelodysplastic syndromes using cDNA microarray technology. *Br J Haematol*. 2004;125:576-583.
 25. Brito-Babapulle F, Catovsky D, Galton DAG. Clinical and laboratory features of de novo acute myeloid leukemia with trilineage myelodysplasia. *Br J Haematol*. 1987;66:445-450.
 26. Jinnai I, Tomonaga M, Kuriyama K, et al. Dysmegakaryocytopoiesis in acute leukaemias: its predominance in myelomonocytic (M4) leukaemia and implication for poor response to chemotherapy. *Br J Haematol*. 1987;66:467-472.
 27. Kuriyama K, Tomonaga M, Matsuo T, et al. Poor response to intensive chemotherapy in de novo acute myeloid leukaemia with trilineage myelodysplasia: Japan Adult Leukaemia Study Group (JALSG). *Br J Haematol*. 1994;86:767-773.
 28. Tsutsumi C, Ueda M, Miyazaki Y, et al. DNA microarray analysis of dysplastic morphology associated with acute myeloid leukemia. *Exp Hematol*. 2004;32:828-835.
 29. Bullinger L, Dohner K, Bair E, et al. Use of gene-expression profiling to identify prognostic subclasses in adult acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2004;350:1605-1616.
 30. Valk PJ, Verhaak RG, Beijen MA, et al. Prognostically useful gene-expression profiles in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2004;350:1617-1628.

Annual Review 血液 2004

2004 年 1 月 30 日 発行

中外医学社

5. 多発性骨髄腫と関連疾患の遺伝子発現プロファイル

自治医科大学ゲノム機能研究部教授 問野博行

key words DNA microarray, multiple myeloma, MGUS, CD138

動 向

多発性骨髄腫 (multiple myeloma: MM) は形質細胞の異常増殖を本体とする悪性疾患であり高齢者に好発する¹⁾。MMはきわめて予後不良であり、ほとんどの例において最終的には化学療法に抵抗性となる²⁾。一方、以前は良性単クローン性免疫グロブリン血症とよばれていた monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) は、MMに比べて骨髄中の形質細胞の割合が少なく、また一般に全身症状も伴わない。しかしMGUS患者の中には1年に1%程度の割合でMMへ移行する症例が存在しており、MGUSとMMとの異同はいまだ不明確である³⁾。MGUSは前癌状態ともいべきものなのか、それともMGUSは不均一な集団であり一部の特徴的なサブグループのみがMMへ移行するのか、またMGUSとMMとを区別する genetic events は果たして何なのか? など疑問点は多い。

一方、MMも発症当初は化学療法が比較的奏効し、一旦は症状が軽減するが、化学療法自体でMM細胞が根治されることはほとんどなく、早晚、患者骨髄腫細胞は化学療法に抵抗性となる。現段階でMMの生命予後を明確に改善する治療法は骨髄移植のみであり⁴⁾、それも自家と同種のどちらが優れているかは議論の多いところであ

る⁵⁾。

比較的罹患人口の多い疾患にもかかわらず、MMの病態はほとんど不明なままである。このようなMMの発症機構を明らかにし、同時に各患者の予後を予測することを目的として、DNAチップを用いた新しいアプローチが複数の施設から報告されるようになった。これらの解析結果はいまだ必ずしも画期的とはいえないが、MMに関して全く新しい側面からの知見が急速に蓄積されつつあることは間違いない。本稿ではMM細胞の起源あるいはMM患者のサブグループの提言など、これらのチップ解析の結果得られた情報について概説したい。

A. 遺伝子発現プロファイル

ヒトゲノムプロジェクトの成果であるドラフトシーケンスが2001年2月に公表され^{6,7)}、またついに euchromatin の完全版配列決定が2003年4月14日に宣言された。現在、得られた配列上に遺伝子の割付作業が行われているが、近い将来にその成果が公表されると思われる。ヒトのほとんどの遺伝子構造が(機能は不明であるにしろ)明らかになった今後の「ポスト・ゲノム時代」においては医療・医学研究の分野でも方法論の転換が

求められるであろう。たとえばある疾患の原因遺伝子を同定することを考えるとき、旧来であれば発現スクリーニング法や連鎖解析法などによって全く未知の遺伝子を最初から同定せざるを得なかった。しかしポスト・ゲノム時代においては理論上「未知」の遺伝子は存在しなくなり、膨大ではあるがあくまで有限なヒト遺伝子のプールの中から特定の特徴を備えた遺伝子を効率よく同定することが必要になる。このような網羅的解析は、DNA シークエンス、遺伝子発現量 (mRNA 量) および蛋白質の全ての段階で行われるであろう。この中で現在すでに強力な網羅的解析技術が存在するのは「遺伝子発現量」の分野であり、その技術とは DNA チップである。

DNA チップはスライドガラスなどの担体の上に、cDNA あるいは遺伝子由来のオリゴヌクレオチドを高密度に配置したものであり、スライド上の数千から数万種類の遺伝子の相対的発現量を一度の実験で解析することができる⁸⁾。すでにデータベース上に存在するヒトの全予想遺伝子を配置した DNA チップも市販されており (<http://www.affymetrix.com>)、これら的高密度 DNA チップを用いることで、たとえば任意の細胞・組織における全遺伝子の発現パターン (遺伝子発現プロファイル) も比較的簡便に把握可能となる。gene に「全体」を表す「-ome」という接尾語を付けて genome (ゲノム) という単語が作られたように、transcript に -ome を付加した transcriptome (トランスクリプトーム) という造語も最近是用いられるようになった。

このような遺伝子発現プロファイル・トランスクリプトームをたとえば MM と MGUS 間で大規模に比較することで、両者を鑑別可能な新しい分子診断マーカーの同定も可能になると期待される。また DNA チップによって得られる発現データを用いて、疾患の分類自体に新しい体系を導入することも可能であろう。

B. CD138 陽性分画を用いた比較

しかし、たとえば健常者と MM 患者骨髄単核球 (mononuclear cell: MNC) を単純に比較するような DNA チップ実験を行うと、意外にも本アッセイが偽陽性の多い解析法であることに気づく。形質細胞は健常者骨髄中で数%を占めるに過ぎないが、MM 患者においては時に数十%に及ぶ。したがって骨髄 MNC 間で比較すると、形質細胞固有な遺伝子は MM 患者において見かけ上必ず発現が誘導されているように結論づけられてしまうのである。このような偽陽性結果を回避するためには、疾患責任分画である形質細胞のみを様々な患者より純化した上で、DNA チップによって比較することが重要であろう。B リンパ球は成熟形質細胞への分化に伴い細胞表面 CD19, CD20 の発現量が低下し、逆に CD138, CD38 の発現が誘導される。特に CD138 は骨髄中の血球において成熟形質細胞にのみ発現しており、同細胞分画を純化するのに好適である⁹⁾。

そこで我々を含め複数の研究グループにおいて、健常者、MGUS 患者及び MM 患者骨髄より CD138 陽性形質細胞を純化し DNA チップによって比較するプロジェクトが進行した。具体的な CD138 陽性細胞の純化ステップとして、抗 CD138 抗体に磁気ビーズを結合させた純化カラムが用いられている。フローサイトメーターを用いた細胞分画の純化も可能であるが、たとえば 1×10^6 個の CD138 陽性細胞を FACS によって純化するのは長時間を要する。それに比べて磁気ビーズカラムを用いれば同程度の細胞の純化も 1 時間以内に回収可能である。磁気ビーズカラムによる細胞純化の効率を図 1 に示す。たとえば本解析における健常者の骨髄 MNC 中 CD138 陽性細胞は 1.8% しか存在しないが、同じ健常者 MNC を純化カラムにかけると最終的に CD138 陽性細胞 94.9% のきわめて純度の高い形質細胞分画が得られるの

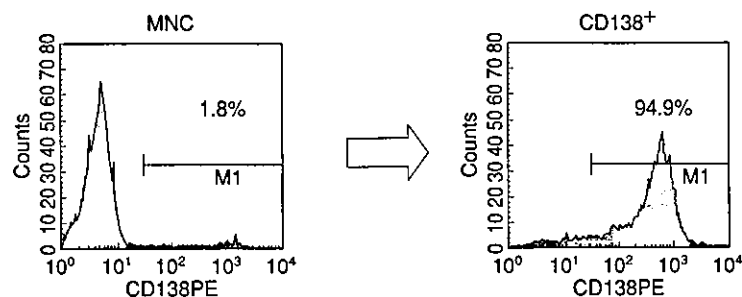


図1 CD138陽性細胞の純化

健常者より単核球 (MNC) を純化し、さらに抗CD138抗体を用いた磁気ビーズカラムによりCD138陽性細胞 (CD138⁺) を純化した。両断面に対してFITC結合抗CD138抗体によるFACS解析を行ったヒストグラムを表す。それぞれにおけるCD138陽性細胞の割合も%で示してある。

である。同断面のサイトスピン標本をWright-Giemsa染色にて鏡検すると、均質な形質細胞のみが純化されていることが確認された。

C. 多発性骨髄腫の解析

1. 免疫グロブリンサブタイプでの比較

Magrangeasらは、88例のMM患者および9例の形質細胞性白血病 (plasma cell leukemia: PCL) 患者骨髄よりCD138陽性形質細胞を純化し、各サンプルより放射標識したcDNAを作成してカスタムメイドのcDNAマクロアレイ (5376遺伝子) にハイブリダイズさせた¹⁰⁾。得られた遺伝子発現プロファイルをMMの異常免疫グロブリンのサブタイプ間で比較している。たとえば産生グロブリンがIgGであるもの (48例) とIgA (21例) とで比較し、両者を識別する発現プロファイルをもつ遺伝子群を抽出した。これらには免疫グロブリン関連遺伝子だけでなく、GATA6やLKF1等の転写因子、またBRCA1等のがん抑制遺伝子も含まれていた。またこれらサブタイプ依存性遺伝子セットにおける遺伝子発現パターンの類似性から、サンプルの系統樹を作成するとBence Jones proteinタイプのMM患者はIgG、

IgA産生型いずれとも異なる別の疾患グループを形成することがわかった。

また彼らは産生される免疫グロブリンのL鎖のサブタイプによる比較も行っている。λ鎖産生MMとκ鎖産生型との間で発現量に偏りがある遺伝子を抽出したところ、κ鎖産生MM細胞においてMIP1 α ¹¹⁾、TGF β ₃、BMP2などの骨代謝に関係する遺伝子群が特異的に発現していることが示された。一方、λ鎖型ではTGF β 機能を抑制するLTBP4遺伝子が特異的に発現することが示された (表1)。これらはMM細胞で産生されるL鎖のタイプ依存性に骨病変の重症度が異なる可能性を示唆する。そこでこれらL鎖依存性遺伝子の発現プロファイルを元に患者サンプルを並び替え、系統樹を作成すると、図2に示されるように骨病変が軽症の患者サンプルの多くはλ鎖産生グループに分類され、一方、骨病変が重症な患者サンプルの多くはκ鎖グループに分類されることが明らかになった。これまでもL鎖のサブタイプがMM患者における骨融解の程度にリンクするとの臨床情報があったが¹²⁾、Magrangeasらのデータは、分子生物学的な裏づけを与えるものとして興味深い。

表1 λ鎖型とκ鎖型で発現が異なる遺伝子¹⁰⁾

gene symbol	gene description	accession no.	discriminating score
<i>IGL@</i>	Ig λ	H14524	- 2.74
<i>IGL@</i>	Ig λ	R83196	- 1.81
<i>CDSN</i>	corneodesmosin	W95594	- 1.77
<i>MCP</i>	membrane cofactor protein (CD46)	H26673	- 1.66
<i>IGL@</i>	Ig λ	H15030	- 1.62
<i>ABCD4</i>	ATP-binding cassette, subfamily D, member 4	H51632	- 1.22
<i>SAMHD1</i>	SAM domain and HD domain, 1	H47862	- 1.07
<i>LTFP4</i>	latent transforming growth factor-β-binding protein 4	R73631	- 1.02
<i>TGF3</i>	transforming growth factor, β-3	W80655	0.73
<i>TNFRSF6</i>	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 6 (CD95)	AA031300	1.06
<i>BMP2</i>	bone morphogenetic protein 2	AA114112	1.34
<i>PRKCABP</i>	PRKCA-binding protein	AA641722	1.54
<i>HOX11</i>	homeobox 11	AA007444	1.61
<i>EXT1</i>	exostoses, multiple, type 1	R13402	1.70
<i>IGKC</i>	Ig κ	R71916	1.82

discriminating scoreは両群における平均値の差を標準偏差の差で割ったもので、両群間における発現量の偏りを表す。

2. 疾患サブタイプでの比較

Zhanらは、健常者31例、MGUS患者5例およびMM患者74例の骨髄よりCD138陽性形質細胞分画を純化し、Affymetrix社のGeneChip HuGeneFLチップ(~6800遺伝子)による解析を行った。また同様に8種類の多発性骨髄腫細胞株についてもチップ解析を行っている。これら計118例のチップデータを基にサンプル全体の系統樹を作成すると、健常者は「MGUS + MM + 細胞株」群とは異なるグループを形成することが示され、遺伝子発現プロファイルによる疾患解析の妥当性が支持される結果となった¹³⁾。

さらにMM内でのみサンプルの系統樹を作成すると、図3に示されるように大きく4種類の患者サブグループ(MM1~MM4)に分かれることが明らかになった。しかもMM1はMGUSに最も近い遺伝子発現プロファイルをもち、MM4は骨髄腫細胞株に最も近似したプロファイルをもつことも示された。すなわちMM内のこれらサブタイプが患者の予後にリンクする可能性が示唆される。実際MM1とMM4タイプ間で最も発現量

が異なる遺伝子をリストすると、DNA複製や修復に関わる遺伝子群 [thymidylate synthase (TYMS), mutS homolog 2 (MSH2) 等] がMM4グループに特異的に発現していることがわかる(表2)。これらのデータはMM4に属する骨髄腫細胞の増殖能力が亢進していることを支持するといえよう。またMM患者における既知の予後不良因子である血中β₂ミクログロブリン¹⁴⁾、クレアチニンレベルの増加は、ともにMM4群において顕著なことも確認された。

Zhanらは、同じデータセットから正常形質細胞とMM細胞との比較も行っている。たとえば骨髄腫の細胞において特異的に発現する遺伝子として、cyclin-dependent kinase inhibitor 1A, c-Ablキナーゼ等が疾患特異的に発現亢進していることが確認された。以上の実験結果から、遺伝子発現プロファイルによって正常形質細胞と異常(MGUS + MM)を区別することは可能であったが、MGUSとMMとを正確に判別することは困難であると結論づけられた。

D. 形質細胞の分化様式

Bリンパ球は最終的に形質細胞へと分化成熟し免疫グロブリン蛋白を大量に産生するようになる。しかし初期のBリンパ球発生が比較的詳細に検討されてきたのに比し、最終段階である形質細胞への分化がどのようなメカニズムによって調整されているかはほとんど知られていない。このようなBリンパ球の発達様式の解明にもDNAチップは強力なツールとなり得るであろうし、またそのような知見はMM細胞の起源にも重要な情報を与えるであろう。

扁桃でのBリンパ球は同じ組織内でCD138陽性形質細胞へと分化し、やがて末梢血中に移行した後、骨髄へホーミングすると考えられている¹⁵⁾。そこでZhanらは扁桃内に存在するCD19陽性Bリンパ球(7例)、扁桃のCD138陽性形質細胞(11例)および骨髄のCD138陽性形質細胞(31例)を、それぞれCD19あるいはCD138に対する親和性磁気ビーズカラムにて純化し、Affymetrix HuGeneFLまたはHG95Av2にて遺伝子発現プロファイル解析を行った¹⁶⁾。その結果、これまで知られているとおりCD45, CD19, CD20等の表面マーカーは形質細胞への分化に伴い発現が低下し、一方CD138, CD38, CD63な

どは最終分化に伴って誘導されることが確認された。

Zhanらは次に分化の初期過程である扁桃内でのCD19陽性Bリンパ球からCD138陽性形質細胞への分化に伴って発現量に変化する遺伝子を抽出し、表3に示されるようにBMI1やIRF4などの転写因子、アポトーシス調節因子であるCASP10、細胞接着に関わるITGA6, PECAM1等が分化に伴って発現が誘導されることを示した。一方、分化に伴い発現が抑制される遺伝子として転写因子であるETS1等が認められた。また、その他にも細胞周期調節因子やケモカイン、接着因子など様々な遺伝子の発現が扁桃内でのBリンパ球の成熟に際し大きく変化することも示された。興味深いことに細胞増殖に直結する転写因子であるMYCは、扁桃内でのCD138陽性への分化に伴い一旦発現が減少するが、骨髄へのホーミングに際して再び発現誘導されることも明らかになった。

次に扁桃内形質細胞から骨髄の形質細胞への移行に伴い発現が制御される遺伝子であるが、表3にあるBMI1やSTCHなど扁桃内で発現が誘導された遺伝子の一部は、骨髄への移行に際し発現がさらに活性化されることも確認された。また扁桃内では全く発現がないが骨髄において初めて発現が確認された遺伝子として、表4にあるように複

表3 扁桃内で発現量に変化する遺伝子¹⁶⁾

accession no.	symbol	function	TBC	TPC	BPC
U60519	<i>CASP10</i>	apoptosis	-	+	++
X53586	<i>ITGA6</i>	adhesion	-	+	++
U04735	<i>STCH</i>	chaperone	+	++	++
L13689	<i>BMI1</i>	transcription; repressor; PcG	+	++	+++
L34657	<i>PECAM1</i>	adhesion	+	++	+++
U52682	<i>IRF4</i>	transcription; IRF family	+	+++	+++
M31627	<i>XBPI</i>	transcription; bZip family	+++	++++	++++
AB000410	<i>OGG1</i>	DNA glycosylase	+	-	-
D87432	<i>SLC7A6</i>	solute transporter	+	-	-
J04101	<i>ETS1</i>	transcription; ets family	+	-	-

TBC: tonsil B cell, TPC: tonsil plasma cell, BPC: bone marrow plasma cell

数のシグナル伝達分子が認められた。

このようにしてBリンパ系細胞の最終分化における遺伝子発現プロファイルの変化が明らかにされたが、Zhanらによる本研究の重要性はむしろ、すでに明らかにされたMMのサブタイプがこれら異なった分化段階のそれぞれに相当することを示した点であろう。彼らはまず扁桃内で発現変化する遺伝子群（表3を含む）の中で、扁桃Bリンパ球およびMM細胞間で発現量が似ているのを選びだした。また扁桃形質細胞-骨髄形質細胞間で発現変化する遺伝子群（表4）の中でMM細胞と発現量が似ているものも抽出した。これら扁桃Bリンパ球-扁桃形質細胞-骨髄形質細胞のいずれかの段階とMM細胞間で発現量が似ている遺伝子群を用いてサンプル全体の系統樹を作成したところ、形質細胞の各分化段階のサンプルと同じグループに分類される患者サンプルが明らかになった。

本データはMM細胞の起源自体が複数の分化段階の細胞から生じうることを示唆するのもかも知

れないし、少なくとも遺伝子発現様式の面からは悪性化した骨髄腫細胞が未熟な扁桃Bリンパ球に似ているものから、成熟した骨髄形質細胞に似ているものまで多様であることが明らかである。これまでMMの起源を議論するときにMM自体は（少なくとも分化段階においては）均質なものと仮定されていたが、現実には異なるようである。しかも興味深いことに、これら「異なった分化段階の形質細胞」に類似した各患者グループは、Zhanらが以前報告したMMのサブグループ（MM1～4）にオーバーラップするのである（表5）。たとえば扁桃Bリンパ球に似た患者グループ22例の内、13例が以前報告されたMM4群に属し、残りはMM1群3例、MM2群1例、MM3群4例となった。同様に扁桃形質細胞に似た患者グループ29例の内14例はMM3群に属し、骨髄形質細胞に似た患者サンプル20例の内14例はMM2群に属する。もちろん両基準による患者分類は完全に一致しているわけではなく、どちらの分類法がより正確に患者予後に相関しているかは今後の解

表4 最終分化に伴い発現量に変化する遺伝子¹⁶⁾

accession no.	symbol	function	TPC	BPC
U32114	<i>CAV2</i>	signaling; membrane caveolae	-	+
U60115	<i>FHL1</i>	signaling; LIM domain	-	+
U73936	<i>JAG1</i>	signaling; Notch ligand	-	+
X57025	<i>IGF1</i>	signaling; growth factor	-	+
Z32684	<i>XK</i>	membrane transport	-	+
D10511	<i>ACAT1</i>	metabolism; ketone	-	++
Y08999	<i>ARPC1A</i>	actin polymerization	-	++
M14745	<i>BCL2</i>	signaling; antiapoptosis	-	++
M24486	<i>P4HAI</i>	collagen synthesis	-	++
M60315	<i>BMP6</i>	signaling; TGF family	-	++

TPC: tonsil plasma cell, BPC: bone marrow plasma cell

表5 正常細胞における分化レベルに近似したMMサブグループ¹⁶⁾

分化様式でのグループ	MM1 (n=20)	MM2 (n=21)	MM3 (n=15)	MM4 (n=18)	P
扁桃Bリンパ球に近似 (n=22)	3	1	5	13	0.00005
扁桃形質細胞に近似 (n=29)	8	4	14	3	0.000008
骨髄形質細胞に近似 (n=20)	6	14	0	0	0.000001

析を待たなくてはならない。しかし、おそらく予後不良群と考えられるMM4が正常形質細胞の分化段階においては未熟な扁桃Bリンパ球に近似しており、予後良好が予想されるMM2群が最も成熟した骨髄形質細胞に似ていることは、形質細胞の悪性化機構を考える上できわめて興味深いといえる。

むすび

著者らは以前より、疾患責任分画を純化した上でゲノミクス解析を行うアプローチ（BAMPスクリーニング）の重要性を提唱してきた¹⁷⁻¹⁹。たとえば急性骨髄性白血病の解析であればCD133陽性造血幹細胞相当分画が、NK細胞増多症の解析であればCD3陰性CD56陽性NK細胞分画がそのような解析の標的として適切であろうし、MM/MGUSの解析では本稿に示すようにCD138陽性分画こそが解析対象として最適であろう。これらの解析の結果得られたMMに関する情報はいずれも貴重であるが、実際の疾患発症機構解明にどの程度寄与できるかはいまだ不明である。言い換えればチップ解析の結果得られた疾患関連遺伝子の内どれがMM発症に直接寄与しているのかは今後の分子生物学的解析を待たなくてはならない。しかしながら、疾患の診断・分類を考える上では本稿で述べたような遺伝子発現情報は貴重であり、今後は実際の患者予後、化学療法に対する反応性などの臨床情報をどれだけ精度よく予測可能かに研究の焦点が移行するであろう。また臨床応用を目指す上では、解析に必要な遺伝子数をさらに絞り込むことも重要となると考えられる。

文献

- 1) Ludwig H, Meran J, Zojer N. Multiple myeloma: an update on biology and treatment. *Ann Oncol* 1999; 10: S31-43.
- 2) Hallek M, Bergsagel PL, Anderson KC. Multiple myeloma: increasing evidence for a multistep transformation process. *Blood* 1998; 91: 3-21.
- 3) Kyle RA, Therneau TM, Rajkumar SV, et al. A long-term study of prognosis in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *N Engl J Med* 2002; 346: 564-9.
- 4) Attal M, Harousseau JL, Stoppa AM, et al. A prospective, randomized trial of autologous bone marrow transplantation and chemotherapy in multiple myeloma. *Intergroupe Francais du Myelome. N Engl J Med* 1996; 335: 91-7.
- 5) Gahrton G, Svensson H, Cavo M, et al. Progress in allogeneic bone marrow and peripheral blood stem cell transplantation for multiple myeloma: a comparison between transplants performed 1983-93 and 1994-8 at European Group for Blood and Marrow Transplantation centres. *Br J Haematol* 2001; 113: 209-16.
- 6) The genome international sequencing consortium. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001; 409: 860-921.
- 7) Venter JC, Adams MD, Myers EW, et al. The sequence of the human genome. *Science* 2001; 291: 1304-51.
- 8) Cheung VG, Morley M, Aguilar F, et al. Making and reading microarrays. *Nat Genet* 1999; 21: 15-9.
- 9) Chilosi M, Adami F, Lestani M, et al. CD138/syndecan-1: a useful immunohistochemical marker of normal and neoplastic plasma cells on routine trephine bone marrow biopsies. *Mod Pathol* 1999; 12: 1101-6.
- 10) Magrangeas F, Nasser V, Avet-Loiseau H, et al. Gene expression profiling of multiple myeloma reveals molecular portraits in relation to the pathogenesis of the disease. *Blood* 2003; 101: 4998-5006.
- 11) Abe M, Hiura K, Wilde J, et al. Role for macrophage inflammatory protein (MIP)-1alpha and MIP-1beta in the development of osteolytic lesions in multiple myeloma. *Blood* 2002; 100: 2195-202.
- 12) Bataille R, Chappard D, Marcelli C, et al. Osteoblast stimulation in multiple myeloma lacking lytic bone

- lesions. *Br J Haematol* 1990; 76: 484-7.
- 13) Zhan F, Hardin J, Kordsmeier B, et al. Global gene expression profiling of multiple myeloma, monoclonal gammopathy of undetermined significance, and normal bone marrow plasma cells. *Blood* 2002; 99: 1745-57.
 - 14) Greipp PR, Katzmann JA, O'Fallon WM, et al. Value of beta 2-microglobulin level and plasma cell labeling indices as prognostic factors in patients with newly diagnosed myeloma. *Blood* 1988; 72: 219-23.
 - 15) Medina F, Segundo C, Campos-Caro A, et al. The heterogeneity shown by human plasma cells from tonsil, blood, and bone marrow reveals graded stages of increasing maturity, but local profiles of adhesion molecule expression. *Blood* 2002; 99: 2154-61.
 - 16) Zhan F, Tian E, Bumm K, et al. Gene expression profiling of human plasma cell differentiation and classification of multiple myeloma based on similarities to distinct stages of late-stage B-cell development. *Blood* 2003; 101: 1123-40.
 - 17) Miyazato A, Ueno S, Ohmine K, et al. Identification of myelodysplastic syndrome-specific genes by DNA microarray analysis with purified hematopoietic stem cell fraction. *Blood* 2001; 98: 422-7.
 - 18) Ohmine K, Ota J, Ueda M, et al. Characterization of stage progression in chronic myeloid leukemia by DNA microarray with purified hematopoietic stem cells. *Oncogene* 2001; 20: 8249-57.
 - 19) Makishima H, Ishida F, Ito T, et al. DNA microarray analysis of T cell-type lymphoproliferative disease of granular lymphocytes. *Br J Haematol* 2002; 118: 462-9.

CURRENTS IN HEMATOIMMUNOLOGY

Vol. 20 No. 1 2004

マイクロアレイによる
造血器腫瘍の鑑別診断

FROM THE EXCERPTA MEDICA DATABASE



Excerpta Medica

CURRENTS IN HEMATOIMMUNOLOGY

Vol. 20 No. 1 2004

編集

齋藤英彦

国立名古屋病院院長

朝長万左男

長崎大学教授

金丸昭久

近畿大学教授



Excerpta Medica

This publication has been made possible through a grant from



Bayer Yakuhin, Ltd.

©Excerpta Medica, Japan 2004
Elsevier Japan K.K.

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording or otherwise, without permission in writing from the publisher.

エクセプタ・メディカ

〒106-0044 東京都港区東麻布1-9-15 東麻布1丁目ビル

エルゼビア・ジャパン株式会社

乱丁・落丁がございましたら、上記エクセプタ・メディカ宛にお送りください。
送料小社負担にてお取り替えいたします。

目次

Review

マイクロアレイによる造血器腫瘍の鑑別診断	4
----------------------	---

Current Abstracts

General (No. 1 - 3)	9
造血幹細胞 (No. 4 - 8)	11
感染・免疫 (No. 9 - 15)	14
貧血・輸血 (No. 16 - 18)	19
血栓・止血 (No.19)	20
造血器腫瘍・化学療法・移植 (No. 20 - 37)	21

マイクロアレイによる造血器腫瘍の鑑別診断

自治医科大学ゲノム機能研究部

間野 博行

はじめに

ヒトゲノムプロジェクトの成果であるドラフトシーケンスが2001年2月に公表され¹⁾、また、ついに euchromatin の完全版配列決定が2003年4月14日に宣言された。現在、得られた配列上に遺伝子の割付作業が行われているが、近い将来にその成果が公表されると思われる。ヒト遺伝子の総数はおそらく3万種類前後になると予想されており、いよいよ「ポストゲノム時代」が訪れつつある。今後の医学研究においては、「膨大ではあるがあくまで有限なヒト遺伝子プール」のなかから特定の特徴を備えた遺伝子を効率良く同定することがますます重要になるであろう。現段階でこのような大規模発現スクリーニングに最も適した方法は、DNAチップ、DNAマイクロアレイ（以下、マイクロアレイ）といえる^{2, 3)}。

1. マイクロアレイの原理

では具体的に、マイクロアレイを用いて、組織Aと組織Bにおける遺伝子の網羅的発現解析を行う実験を考えてみよう（図1）。まず組織AとBからそれぞれメッセンジャーRNA（mRNA）を抽出し、オリゴdTプライマーを結合させる。これに逆転写酵素を加えて組織AとB由来の相補DNA（cDNA）を合成するわけであるが、その際に組織AのcDNAには緑色の蛍光色素Cy3を、また組織BのcDNAには赤色の蛍光色素Cy5を取り込ませる。その結果、組織AとBのcDNAは異なった波長の emission light を有する蛍光色素で標識されたことになる。これらを等量混合し、マイクロアレイとハイブリダイゼーションさせるわけである⁴⁾。

その結果、Cy3標識cDNAとCy5標識cDNAは、スポット上の各遺伝子の組織AとBにお

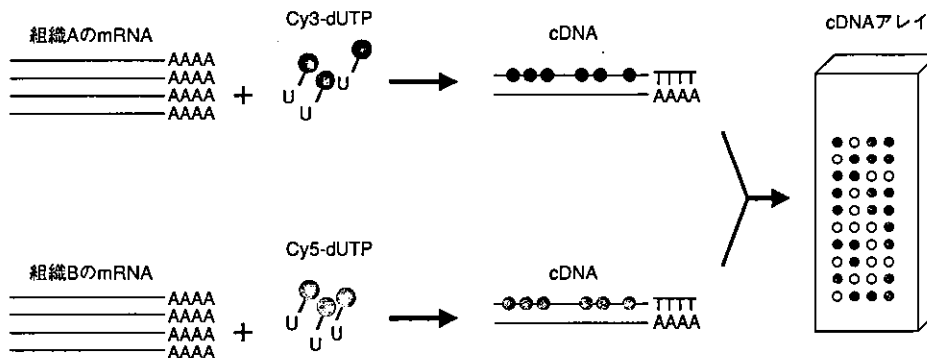


図1 DNAマイクロアレイを用いた発現解析の原理

組織AとBとの間で遺伝子発現プロファイルを比較したい場合、まず組織AとBそれぞれから等量のmRNAを調製する。次にこれらmRNAからオリゴdTプライマーと逆転写酵素を用いてcDNAを合成する。その際に蛍光色素であるCy3あるいはCy5で標識したdUTP（デオキシウリジン5'-三リン酸）を加えることで、各組織由来のcDNAをそれぞれ異なった蛍光色素で標識する。この標識cDNA混合物をDNAマイクロアレイとハイブリダイゼーションさせることで、各スポットに標識cDNAが結合する。その結果、任意のスポット上の遺伝子に関する組織Aと組織Bにおける発現量の比は、Cy3とCy5との蛍光強度の比で表されることになる。

ける発現量の比に応じた形でスポットに結合する。このマイクロアレイをレーザーで励起すると、あるスポット上の遺伝子が組織 A のみに発現していれば緑色のスポットとなり、B のみに発現していれば赤色のスポットとなる。また両組織においてほぼ等量に発現している遺伝子の場合、黄色のスポットとして見える。このようにして各スポットにおける両色素の蛍光強度を測定することで、それぞれのスポット上の遺伝子の測定サンプル間における発現比が定量できる。1枚のマイクロアレイ上には数千～数万の DNA 断片が配置されており、1回の実験でこれら数多くの遺伝子の発現変化を包括的に解析できるのである。

2. 白血病の鑑別診断

では、実際の白血病解析にマイクロアレイはどのように応用可能であろうか？ 旧来の白血病診断法では、①ペルオキシダーゼ、エステラーゼなどの特殊染色、②蛍光活性化セルソーター (FACS) を用いた細胞表面マーカーの解析、③遺伝子異常の解析 (免疫グロブリン遺伝子や T 細胞表面受容体遺伝子の再構成、*bcr-abl* 遺伝子、*PML-RAR α* 遺伝子などの有無)、④染色体型の解析、などの情報をもとにそれぞれの疾患における FAB 分類を行ってきた。これらを総合的に解析することで予後判定にある程度リンクした診断が行えるが、上記の解析をすべて行うのは煩雑であり多くの専門技術も必要とする。一方、1枚のマイクロアレイを用いることで旧来の方法で得られる情報がすべて解析可能となれば、診断はより簡便になり、かつ異なった施設間での診断の一致率も上昇するであろう。

たとえば、白血病 A と白血病 B を比べる場合を考えると、両患者から得られた mRNA を用いたマイクロアレイ実験を行うことで、どちらかの疾患に固有な発現パターンをとる遺伝子群を同定することが可能であろう。旧来の細胞形態学などでは困難であった新たな鑑

別診断法が、このようなアプローチで開発可能になると期待される。また病因解析に関しても、たとえば健康成人と白血病 A との mRNA をマイクロアレイで比較することにより、白血病 A においてのみ発現が亢進あるいは低下している遺伝子群を同定することが可能になり、そのなかには疾患の発症に直接関与する遺伝子が含まれている可能性が高い。このようにゲノム医学の手法を用いることで、白血病の病態解析に新たな知見が数多くもたらされると予想される。

マイクロアレイを用いた新しい鑑別診断の試みとして、Golub らは 6,817 遺伝子を配置したマイクロアレイによる急性骨髄性白血病 (AML) と急性リンパ性白血病 (ALL) とを鑑別する可能性について検討した。AML 11 例、ALL 27 例をこのマイクロアレイによって解析した結果、約 50 個の遺伝子が AML と ALL の間で偏って発現していることが明らかになった。そこでこれら “informative genes” から 20 個の遺伝子を選び、それらの発現量の偏りの程度を数値化したものに実際の発現量をかけあわせ、合計することで、それぞれの患者の AML あるいは ALL の確からしさを数値化した。本法を患者における AML と ALL の鑑別診断に応用してみると 38 例中 34 例で正しい診断が行われ、不明が 1 例、3 例が誤診であった。したがって、ある程度の確からしさをもってマイクロアレイによる疾患診断が可能であることがわかった⁵⁾。

小児 ALL は一般に治療反応性が良いが、*MLL* (mixed-lineage leukemia) 遺伝子の転座の存在は重要な予後不良因子である。11 番染色体長腕に存在する *MLL* 遺伝子は *HOX* 遺伝子の発現を制御する転写因子をコードすると考えられており、染色体転座の結果、*LTG4* など数多くの遺伝子と融合遺伝子産物を生じる。*MLL* 転座をもつ ALL は、*MLL* の名前の由来にあるように、ALL と AML の両方の細胞表面抗原をもつことが多い。Armstrong らは *MLL* 染色体転

座をもつ白血病が、はたして一般的な ALL と異なった遺伝子発現プロファイルをもつ疾患か否かについてマイクロアレイを用いて検証した⁶⁾。一般の ALL と *MLL* 転座型 ALL とで発現量が異なる遺伝子群をスクリーニングしたところ、後者に特異的な発現を示す遺伝子として、造血幹細胞マーカーである AC133 や FLT3 が同定された。さらに彼らは、*MLL* 転座型白血病がはたして AML, ALL のどちらにより近い疾患なのかをマイクロアレイデータをもとに考察している。まず AML と ALL 患者間で最も大きく発現量が異なる遺伝子 500 種類を選び、それら遺伝子群の発現パターンを比較した。500 種類の遺伝子の発現パターンは実際には互いに独立なわけではなく、患者間での発現の変化の仕方が似た遺伝子が多数存在している。そこで、発現変化が似た 2 つの遺伝子の中間パターンを示すような「仮想遺伝子」を作り出すことで 2 種類の遺伝子の発現パター

ンを 1 種類の遺伝子にて代用することができる。この方法を繰り返すことで、500 種類の遺伝子の発現パターンを任意の次元数まで「まとめる」ことができる。Armstrong らはこのような主成分分析法を用いて 500 種類の遺伝子の発現パターンを最終的に 3 種類まで絞り込み、これら 3 種類の仮想遺伝子の発現量をもとにサンプルを仮想空間に投射した (図 2)。その結果、興味深いことに、*MLL* 転座型白血病サンプルは AML や ALL のどちらとも異なる場所に位置することがわかった。

これらのデータは、マイクロアレイによる発現プロファイルに基づく新しい疾患概念の提唱が可能なことを示唆しており、意義深い。すなわち、マイクロアレイは旧来の診断カテゴリーに応じた鑑別診断マーカーを効率良く同定するだけでなく、診断カテゴリー自体を見直すうえでも有効なのである。

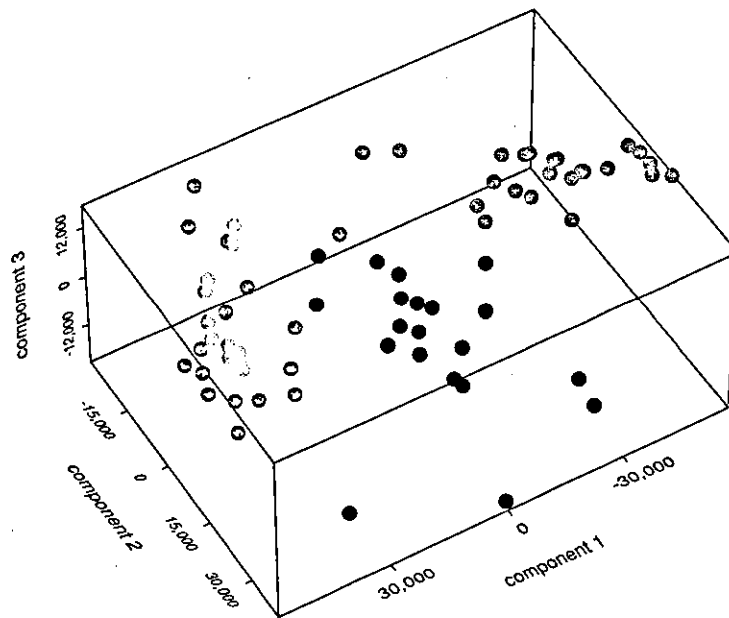


図 2 主成分分析による *MLL* 転座型白血病の独自性

AML と ALL とを鑑別する 500 種類の遺伝子の発現プロファイルより、3 種類の代表的発現パターンを主成分分析法により抽出し、それら仮想遺伝子上での各サンプルの発現量をもとに三次元空間にサンプルを投射した [AML: ○, *MLL* 転座型白血病: ●, ALL: ●で表す]。(文献 6 より引用)