

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) 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。

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) 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.
- 3) 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.
- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) 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.
- 7) 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.
- 8) 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.*, **54**: 505-513, 2004.
- 9) He, H., Hirokawa, Y., Gazit, A., Yamashita, Y., Mano, H., Kawakami, Y., 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) 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.
- 11) Araki H, Katayama N, Yamashita Y, Mano, H., Fujieda, A., Usui, E., Mitani, H., Ohishi, K., Nishii, K., Nasuya, M., Minami, N., Nobori, T. & Shiku, H.: Reprogramming of human postmitotic neutrophils into macrophages by growth factors. *Blood*, **103**: 2973-2980, 2004.
- 12) Aoki N, Ueno S-i, Mano H, Yamasaki, S., Shiota, M., Miyazaki, H., Yamaguchi, 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.
- H. 知的財産権の出願・登録状況
 ・国際公開番号:PCT/W097/34007・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
 ・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

厚生労働科学研究費補助金(萌芽的先端医療技術推進研究事業)
分担研究報告書

「マイクロアレー実施・データ解析・精度管理」に関する研究

分担研究者 大島康雄 自治医科大学臨床薬理学助手

研究要旨

Affymetrix 社の DNA マイクロアレーの一種、GeneChip® HG-U133A および HG-U133B を用いて、薬物曝露遺伝子発現解析を行った。平成 16 年度に解析した薬物は 20 種類であり、その中のプラチナ錯体曝露後の発現変化を、さらに詳細に検討した。また、遺伝子発現における個人差を評価する目的で、薬物未曝露の腎臓由来細胞の RNA を 11 症例分 GeneChip を用いて遺伝子発現解析を行った。

A. 研究目的

本研究は日本人における医薬品の安全性を、前臨床試験において予測するシステムを構築するために、ヒト組織を用いた研究に関する基盤を整備することを目的とする。

医薬品の有効性や体内動態に人種差が存在することは広く知られている。したがって、日本人ヒト組織を用いて医薬品の研究開発を行うことは、日本人にとってより有効で安全性の高い医薬品を創製するために必要である。

B. 研究方法

平成 15 年度までに報告した方法により得られたプライマリーカルチャー細胞を用いて、薬物曝露・遺伝子発現解析を行った。腎臓尿管由来の細胞は、形態・Glut2発現・ γ GTP発現・NAG 発現で評価した。また、肝細胞由来の細胞は、形態・アルブミン産生能・およびチトクロームP450発現で評価した。

バイオインフォマティクス部門では発

現解析して得られたデータを処理し、知識データベースを構築した。

C. 研究結果

1. 日本人プライマリーカルチャーの遺伝子発現における個人差等の評価

1-a. 個人差の評価に使用することができた細胞

これまで 11 人分の患者由来の細胞をプライマリーカルチャーにすることができた。薬物曝露刺激などを行わずに培養して、基礎的な遺伝子発現を解析した。11 人分の細胞をそれぞれ3回に分けて培養し、遺伝子発現解析を行った。結果的に 9 人分のサンプルが解析対象として我々の基準に適合し、評価の対象となった。2 人分の細胞は、凍結保存後の発育が不良で、良質な RNA が得られなかったため、解析対象として適さなかった。

一方、参考のため海外調整済みの腎臓由来細胞 RNA も入手し、遺伝子発現解析をおこなった。海外由来のサン

ルは 8 ロット(8人分)入手し、1 ロットあたり 3 回に分けてラベリング・発現解析を行った。このうち 5 ロット分が解析対象として我々の基準に適合した。発現が陽性と判断され、日本人由来と海外由来の発現の差を、ノンパラメトリックテストで行い、ベンジャミン・ホクバーク補正を行った。

1-b. 個人差

各個人ごとの平均と分散を遺伝子ごとに計算して、t-test, p 値の 0.01 を有意水準として検定したところ、63 のトランスクリプトが個人間で有意に発現量が異なると判定できた。約 44,000 トランスクリプトの中の 63 であり、日本人の中でのばらつきは少ないと考えられた。

海外由来のサンプルは細胞の処理手順などが明らかにされておらず、単純な比較は注意が必要であることを指摘しておく。その上であえて比較するならば以下のような結果が得られた。有意水準 p 値 0.05 未満を有意と設定し、さらに発現量として 5 倍以上両群間で差のある遺伝子を計算したところ、343 トランスクリプトが結果として得られた。こうして得られた遺伝子発現を観察したところ、日本人由来の遺伝子発現は比較的均一であったが、海外由来の遺伝子発現は変化量が大きいと思われた。

2. 解析手順の標準プロトコール

当研究部で行っている解析プロトコールである。GeneChip システムでは 4 万を超えるトランスクリプトが一度に測定されるため、データハンドリングには通常の生物学的な統計学的手法とは異なるテクニックが必要である。

多くの測定された遺伝子は発現していない・あるいは有意な変化を来していないものと推定される。こうした前

提でデータから有意な変化を来す遺伝子発現データを抽出する手順として以下の手順を踏んでいる。3 ステップからなるノーマライゼーション・3ステップからなるノイズ除去・時間経過を軸とした発現量変化のクラスタリングを行った。測定されるトランスクリプトは 44760 であるが、プラチナ錯体の解析を例とするとノイズ除去後は 10,789 transcripts が残った。さらに、最近 GeneChip データと定量 PCR のデータとの相関情報をもとにさらなる手直しを考慮している。

3. 薬物曝露

平成 16 年度は 20 種類の薬物の曝露研究を行った。

アミノグリコシド系抗生物質の誘導する遺伝子発現変化は4つのクラスターに分類され、これらの抗生物質はすべて同様の変化を誘導するように見えた。

プラチ錯体曝露後の遺伝子発現変を上記の手順で解析したところ 3 つのクラスターに分類された。

4. 定量 PCR との比較

上記のプラチナ錯体曝露研究により得られたクラスタリング中の遺伝子について real-time PCR を行った。real-time PCR は taqMan 法(アプライドバイオシステムズ社、アッセイオンデマンド試薬)を用い、ABI7700 機種を用いた。発現量変化の相関性が最も良好であったものは、AP1S1 (adaptor-related protein complex 1, sigma 1, GeneBank accession #NM_001283) であった。

2 種類の AP1S1 遺伝子導入細胞において Cisplatin 感受性が増加し、同様に 2 種類の遺伝子ノックダウン細胞において Cisplatin 耐性獲得が観察された。このため、AP1S1 の遺伝子発現制御は

Cisplatin による殺細胞活性との関連があると考えられた。

D. 考案

本研究により臨床サンプルより肝細胞・尿細管細胞を培養することが可能となり、研究基盤がほぼ整備されたものと考えられる。今後はさらに曝露実験を行ない、遺伝子発現解析を積み重ねてゆく予定である。プラチナ錯体の研究により得られた AP1S1 遺伝子と同様に他の薬物曝露により得られた結果についても、遺伝子発現の確認を行うとともに、腎障害メカニズムへアプローチを予定している。

本研究で得られたデータを基に、本研究で用いた方法論のバリデーションとして、既知の腎障害分子メカニズムが発現データに反映されているか否か、あるいは、海外・国内臨床試験成績に差が出たケースを、我々の腎臓細胞遺伝子発現の人種差データで解釈可能か否か、などについて、公開・非公開の外部データと照合する作業を予定している。

E. 結論

倫理的監視の元で手術時に得られたヒト組織(肝臓・腎臓)を使用して、臨床検体を得るシステムを構築することができた。さらに、これらの検体より尿細管細胞・肝細胞を主たる成分とするプライマリーカルチャーを得ることができ、これらの細胞に薬物を曝露して遺伝子発現解析を行った。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1) 国内 発表論文

大島康雄, 藤村昭夫: 日本人組織を用いたトキシコゲノミクス研究: 臨床薬理 2005年1月号; 36(1): 11-12

学会発表

大島康雄, 藤村昭夫: シンポジウムトキシコゲノミクス-現状と臨床薬理学への応用- 日本人組織を用いたトキシコゲノミクス研究: 臨床薬理学会年会 2004年9月 静岡

2) 海外 発表論文

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 α in G-CSF signaling
Pathway: J Biol Chem. 2005 Jan 21; [Epub ahead of print]

Oshima Y, Tojo A, Fujimura A, Niho Y, Asano S.: Potent receptor-mediated cytotoxicity of granulocyte colony-stimulating factor-Pseudomonas exotoxin, a fusion protein against myeloid leukemia cells: Biochem Biophys Res

Commun. 2004 Jun 25;319(2):582-9.

Oshima Y, Tojo A.: Gene expression profiles in the cellular response to recombinant Pseudomonas exotoxin A: Cancer Sci, 2004 Sep; 95(suppl1)

Oshima Y, Komatsu N, Ozawa K, Fujimura A.: CML Developed in a Japanese Family Transmitting a Novel Point Mutation in the Thrombopoietin Gene (TPO). blood, 2004 Nov; 104(11- part 2 of 2 parts): 141b (Abs# 4220)

Oshima Y, Kurokawa S, Tokue A, Mano H, Saito K, Suzuki M, Imai M, Fujimura A: Primary Cell Preparation of Human Renal Tubular Cells for Transcriptome Analysis: Toxicol Mechanisms and Methods, 2004 Sep/Oct; 14(5): 309-316

Oshima Y, Ishida Y, Shinohara A, Mano H, Fujimura A: Expression Profiling of Gene with Upstream AML1 Recognition Sequence in Hematopoietic Stem Cell-Like Fractions from Individuals with The

M2 Subtype of Human Acute Myeloid Leukemia: Experimental Hematology, 2004 Jul; 32(suppl): 34 (Abs# 14)

学会発表

Yasuo Oshima, Yusuke Ishida, Ayumi Shinohara, Hiroyuki Mano, Akio Fujimura.: Expression Profiling of Gene with Upstream AML1 Recognition Sequence in Hematopoietic Stem Cell-Like Fractions from Individuals with The M2 Subtype of Human Acute Myeloid Leukemia: 33rd Annual Meeting of International Society for Experimental Hematology, Jul 2004, New Orleans, USA

Fujimura A: Recent advances of clinical pharmacology: Toxicogenomics: Japan-China Joint Meeting Of Basic And Clinical Pharmacology Sep 2004, Shizuoka, Japan

Fujimura A, Oshima Y: Toxicogenomics: The 17th Korea-Japan Joint Seminar on Pharmacology, Oct 2004, Jeonju, Korea

Kishimoto S, Oshima Y, Gemba M, Fujimura A: Cisplatin induced gene expression in primary human renal cortical cell ~ an approach to get rid of cisplatin's nephrotoxicity ~: Toxicogenomics International Forum 2004, Oct 2004, Kyoto Japan

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得:なし
 6. 実用新案登録:なし
- その他:なし

厚生労働科学研究費補助金(萌芽的先端医療技術推進研究事業)
分担研究報告書
バイオインフォマティクス

分担研究者 篠原 歩 東北大学大学院情報科学科 教授

研究要旨

本プロジェクトを遂行するためには、実験によって得られたデータを維持・管理し、新たな仮説を導き出すために、情報処理の最先端技術を取り入れながら強固かつ柔軟なデータベースシステムを構築することが必須である。本年度は、ヒトのすべての遺伝子を対象として、白血病の発症に関連の深いとされている AML1 binding motif である TGYGGT 配列をはじめとして、アフィメトリクス社のプローブセットの遺伝子上流配列中の出現位置に関するデータを整理し、データベースとしてまとめあげた。そしてこれをウェブで公開し、インターネットを通じた検索サービスを開始した。

A. 研究目的

白血病の発症に関連の深いとされている AML1 について、ヒトのすべての遺伝子を対象として、遺伝子上流部分に AML1 binding motif が出現する位置をまとめたデータベースを構築する。そしてこのデータベースをウェブで公開し、インターネットを通じて全世界から検索を行えるサービスを提供する。

B. 研究方法

今回の作業では、次のデータセットを用いた。

1. NCBI から取得したデータセット

seq_gene.md。

2. アフィメトリクス社が提供している HG-U95Av2 遺伝子チップに関するファイル。これを各遺伝子とその遺伝子の存在する染色体、遺伝子の開始位置等の情報をマッピングするためのデータとして用いる。
3. バイオベース社のモチーフ群。バイオベース社の提供しているモチーフのデータは、あるタンパク質が特定の塩基配列に結合することがわかっているそのモチーフとタンパク質のセットのリストであり、ここに記載された 4,999 個のモチーフを用

いた。

まず初めにアフィメトリクス社の Gene Chip のプローブセット ID に対応するそれぞれの遺伝子を seq_gene.md から検索し、遺伝子上流配列 1000 塩基を抜き出した。また CDS の開始位置と gene の開始位置の差を抜き出した。CDS の開始位置を 0 とみて、gene の相対的な開始位置を見ている。例えば CDS の開始位置が 2000 で gene の開始位置が 1200 ならば差は -800 ととる。この際、いくつかの例外処理により、HG-U95Av2 の中のすべてのプローブセットに対し、遺伝子を見つけられないものを例外処理して別に示した。例外処理は以下の通りである。

- (1) まず HG-U95Av2 の中で遺伝子名と対応がとれないものを除外する。
- (2) マッピングファイルで遺伝子名が見つからないものを除外する。
- (3) マッピングファイルで複数のヒット箇所が見つかる場合、得られた複数の遺伝子の開始位置と遺伝子コーディング領域の開始位置との差を取り、その差が 10 を越えるものを除外する。
- (4) 上流配列の場所が特定できても、その上流配列が得られないものは除外する。

この例外処理によって除外されなかったすべてのプローブセットに対して、そ

の上流配列を 1,000 塩基分取り出して記録しておくことで、データベース検索を高速化している。

次に、与えられたプローブセットの中に有意に現れるモチーフの検出に関して、フィッシャーの正確な確率を用いて各モチーフに対する検定を行った。この実装においては、統計解析ツール R を用いてフィッシャーの正確な確率を計算している。検定のしかたは次の通りである。まず、入力として与えられたプローブセットの集合を P とする。次にバイオベース社の提供するモチーフ群を 1 つずつ抜き出し、そのモチーフが集合 P の中のプローブセットの上流配列に出現するかどうかを数え上げる。ただしその際、1つのプローブセットの上流配列に複数回出現しても1回とカウントする。こうして、そのモチーフが現れるかどうかに関するクロス集計表を求め、それにたしてフィッシャーの正確な確率を計算し、それが 5%を下回る場合に、そのモチーフは入力として与えられたプローブセット集合 P に対して有意に出現すると判断する。この操作をバイオベース社の提供するすべてのモチーフ群に対しておこない、有意なものをすべて出力する。なお、上流配列の長さに関しては、最大 1,000 までの範囲で、ユーザが任意に指定できるようにしている。

当初の目標通り、アフィメトリクス社のプローブセットの上流配列のテーブルセットを作成しデータベースを構築した。HG-U95Av2 のプローブセットの総数 44,760 個のうち、上記の例外処理によってそれぞれ次の個数が除外された。

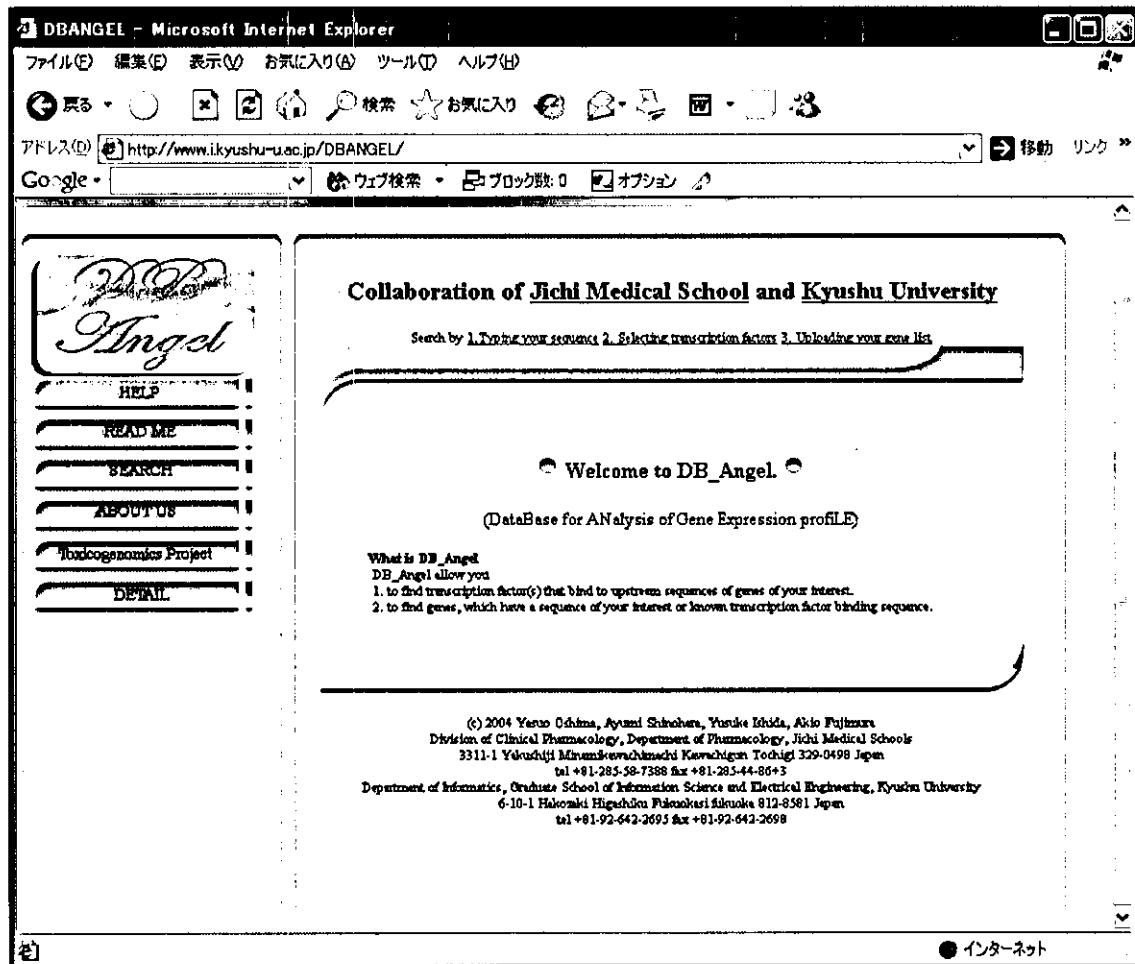
- (1) 遺伝子名と対応がとれないもの 9,855 個。
- (2) マッピングファイルで遺伝子名が見つからないもの 3,084 個
- (3) マッピングファイルで複数のヒット箇所が見つかるもののうち、遺伝子の開始位置と CDS の開始位置との差が 10 を越えるもの 559 個
- (4) マッピングファイルに遺伝子名は

C. 研究結果

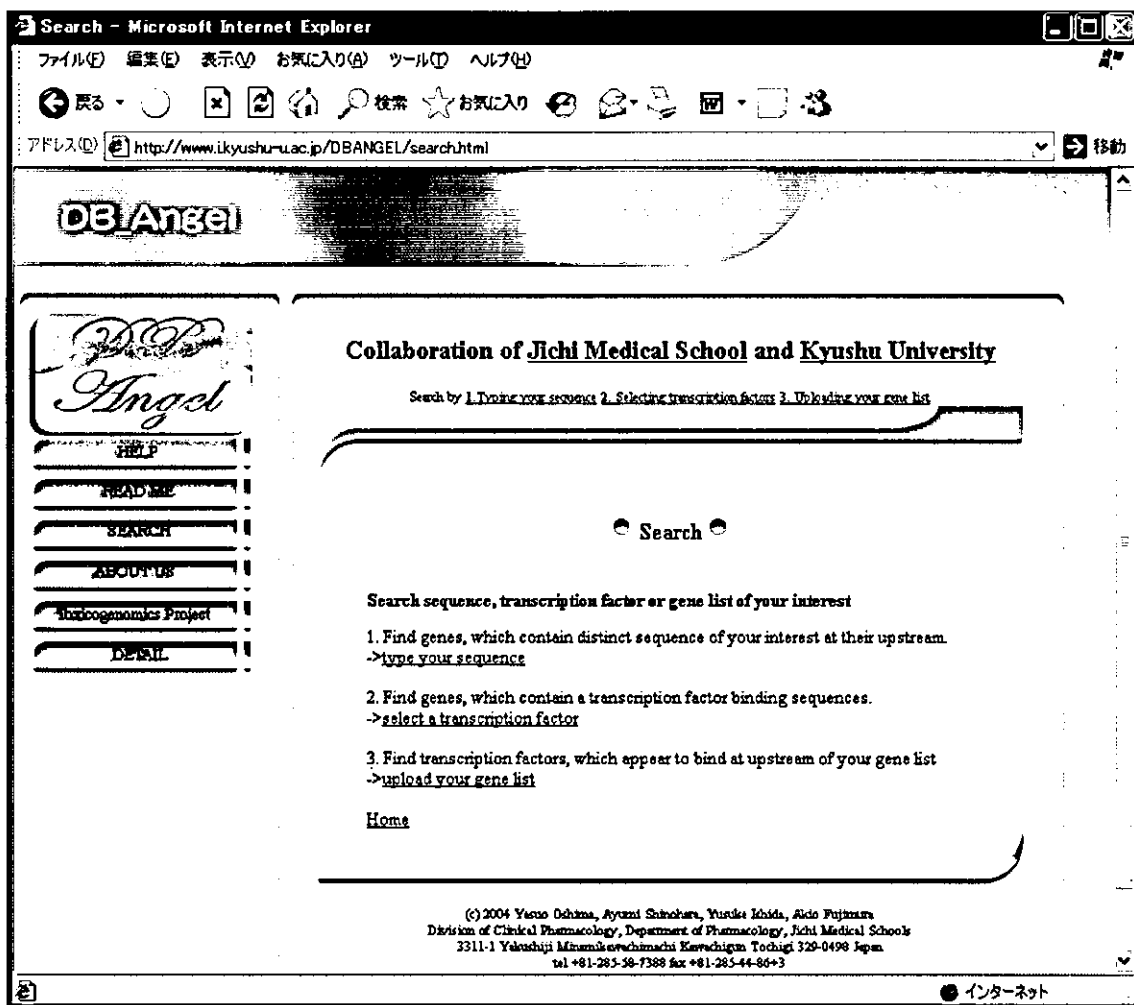
記載されているが上流配列を取れないもの 1 個

この処理によって除外されずに残ったプローブセットは 31,281 個であった。なお、例外処理(3)において、複数ヒットするプローブセットは 1,510 個存在した。

こうして得られたものをウェブ上のデータベースとしてまとめあげ、インターネットを通じてどこからでもアクセスできるようにし、検索サービスを開始した。この検索サービスを DBANGLE として、<http://www.i.kyushu-u.ac.jp/DBANGLE> に公開している(図1、図2)。



DBANGLE



検索画面

D. 考察

利用した基礎データが必ずしも一般的な形式をみだしていなかったため、データの変換プログラム作成の際に、例外的な処理を多用せざるを得ず、そのために当初の見積もりよりもシステムの開発に多くの時間を要した。しかしながら、これらの作業はすべてプログラムの中に明示的に記述しているため、今後データベースのバージョンアップなどの際にも、更新作業はそれほど困

難なく行えるようになるはずである。このデータベースに対するユーザからの意見を採り入れて、インターフェース部を改良し、機能を向上させていく予定である。

E. 結論

各プローブセットの CDS 領域の上流部分に対して出現位置の範囲を自由に指定して検索できるデータベースを構築し、検索サービスを開始した。このこ

とにより、このデータを遺伝子発現プロファイルのデータと照らし合わせていくことで、疾病の発症に関連する遺伝子配列を特定するための準備が整いつつある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得:なし
2. 実用新案登録:なし
3. その他:なし

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

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 YL, Moriuchi R, Osawa M, Iwama A, Makishima H, Wada T, Kisanuki H, Kaneda R, Ota J, Koinuma K, Ishikawa M, Takada S, Yamashita Y and <u>Mano H.</u>	Retroviral expression screening of oncogenes in natural killer cell leukemia.	<i>Leuk. Res.</i>	in press		2005
Tsutsumi C, Ueda M, Miyazaki Y, Yamashita Y, Choi YL, Ota J, Kaneda R, Koinuma K, Fujiwara S, Kisanuki H, Ishikawa M, Ozawa K, Tomonaga M and <u>Mano H.</u>	DNA microarray analysis of dysplastic morphology associated with acute myeloid leukemia	<i>Exp. Hematol.</i>	32	828-835	2004
Choi YL, Makishima H, Ohashi J, Yamashita Y, Ohki R, Koinuma K, Ota J, Isobe Y, Ishida F, Oshimi K and <u>Mano H.</u>	DNA microarray analysis of natural killer cell-type lymphoproliferative disease of granular lymphocytes with purified CD3(-)CD56(+) fractions	<i>Leukemia</i>	18	556-565	2004
Koinuma K, Shitoh K, Miyakura Y, Furukawa T, Yamashita Y, Ota J, Ohki R, Choi YL, Wada T, Konishi F, Nagai H and <u>Mano H.</u>	Mutations of BRAF are associated with extensive hMLH1 promoter methylation in sporadic colorectal carcinomas	<i>Int J Cancer</i>	108	237-242	2004
Kaneda R, Toyota M, Yamashita Y, Koinuma K, Choi YL, Ota J, Kisanuki H, Ishikawa M, Takada S, Shimada K and <u>Mano H.</u>	High-throughput screening of genome fragments bound to differentially acetylated histones	<i>Genes Cells</i>	9	1167-1174	2004
Ohki-Kaneda R, Ohashi J, Yamamoto K, Ueno S, Ota J, Choi YL, Koinuma K, Yamashita Y, Misawa Y, Fuse K, Ikeda U, Shimada K and <u>Mano H.</u>	Cardiac function-related gene expression profiles in human atrial myocytes	<i>Biochem. Biophys. Res. Commun.</i>	320	1328-1336	2004

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Ohki R, Yamamoto K, Ueno S, <u>Mano H</u> , Misawa Y, Fuse K, Ikeda U and Shimada K.	Transcriptional profile of genes induced in human atrial myocardium with pressure overload	<i>Int. J. Cardiol.</i>	96	381-387	2004
Kano Y, Akutsu M, Tsunoda S, Izumi T, Mori K, Fujii H, Yazawa Y, <u>Mano H</u> and Furukawa Y.	Schedule-dependent synergism and antagonism between pemetrexed and paclitaxel in human carcinoma cell lines in vitro	<i>Cancer Chemother. Pharmacol.</i>	54	505-513	2004
He H, Hirokawa Y, Gazit A, Yamashita Y, <u>Mano H</u> , Kawakami Y, Hsieh CY, Kung HJ, Lessene G, Baell J, Levitzki A and Maruta H.	The Tyr-Kinase Inhibitor AG879, That Blocks the ETK-PAK1 Interaction, Suppresses the RAS-Induced PAK1 Activation and Malignant Transformation	<i>Cancer. Biol. Ther.</i>	3	96-101	2004
Bai J, Sata N, Nagai H, Wada T, Yoshida K, <u>Mano H</u> , Sata F and Kishi R.	Genistein-Induced Changes in Gene Expression in Panc 1 Cells at Physiological Concentrations of Genistein.	<i>Pancreas</i>	29	93-98	2004
Araki H, Katayama N, Yamashita Y, <u>Mano H</u> , Fujieda A, Usui E, Mitani H, Ohishi K, Nishii K, Nasuya M, Minami N, Nobori T and Shiku H.	Reprogramming of human postmitotic neutrophils into macrophages by growth factors.	<i>Blood</i>	103	2973-2980	2004
Aoki N, Ueno S-i, <u>Mano H</u> , Yamasaki S, Shiota M, Miyazaki H, Yamaguchi Y, Matsuda T & Ullrich A.	Mutual regulation of protein-tyrosine phosphatase 20 and protein-tyrosine kinase Tec activities by tyrosine phosphorylation and dephosphorylation.	<i>J. Biol. Chem.</i>	279	10765-10775	2004
大島康雄, 藤村昭夫	日本人組織を用いたトキシコゲノミクス研究	臨床薬理	36	11-12	2005
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.	<i>J Biol Chem</i>	280	12621-12629	2005

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Oshima Y, Tojo A, Fujimura A, Niho Y, Asano S.	Potent receptor-mediated cytotoxicity of granulocyte colony-stimulating factor-Pseudomonas exotoxin, a fusion protein against myeloid leukemia cells.	Biochem Biophys Res Commun	319	582-589	2004
Oshima Y, Tojo A	Gene expression profiles in the cellular response to recombinant Pseudomonas exotoxin A	Cancer Sci	95 (suppl1)	488	2004
Oshima Y, Komatsu N, Ozawa K, Fujimura A	CML Developed in a Japanese Family Transmitting a Novel Point Mutation in the Thrombopoietin Gene (TPO).	blood	104(11-part 2 of 2 parts)	141b (Abs# 4220)	2004
Oshima Y, Kurokawa S, Tokue A, Mano H, Saito K, Suzuki M, Imai M, Fujimura A	Primary Cell Preparation of Human Renal Tubular Cells for Transcriptome Analysis	Toxicol Mechanisms and Methods	14	309-316	2004
Oshima Y, Ishida Y, Shinohara A, Mano H, Fujimura A	Expression Profiling of Gene with Upstream AML1 Recognition Sequence in Hematopoietic Stem Cell-Like Fractions from Individuals with The M2 Subtype of Human Acute Myeloid Leukemia	Experimental Hematology	32 (suppl)	34	2004

健康危険情報

なし

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, Keiia 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].

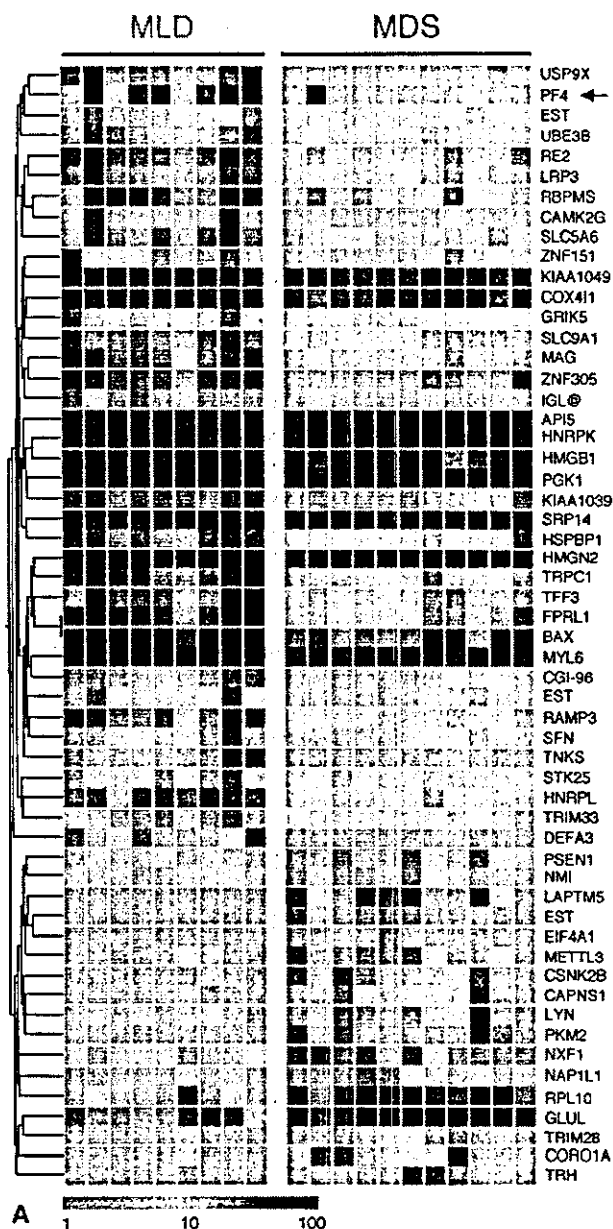
To clarify directly whether de novo AML-MLD is truly a clinical entity distinct from MDS-related leukemia, we searched for differences between the transcriptomes of AC133⁺ cells derived from the individuals diagnosed with these two conditions. Among the 11 cases of AML-MLD studied, 9 were revealed not 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.

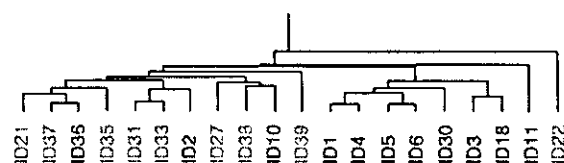
For the expression data set of these 20 subjects, we first set a condition that the expression level of a given gene should receive the "Present" call (from the Microarray Suite 4.0 software) in at least 30% (6 cases) of the samples, aiming to remove transcriptionally silent genes from the analysis. 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

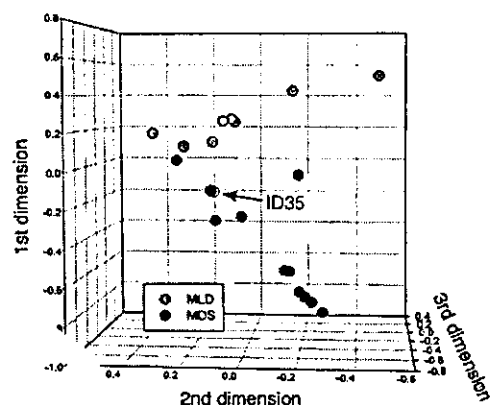


Figure 1. Continued

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