

厚生労働科学研究研究費補助金

第3次対がん総合戦略研究事業

「早期膵臓がん検出マーカーの同定」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 山下 義博

平成17(2005)年3月

厚生労働科学研究研究費補助金

第3次対がん総合戦略研究事業

「早期膵臓がん検出マーカーの同定」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 山下 義博

平成17(2005)年3月

目 次

I.	総括研究報告書	
	「早期膵臓がん検出マーカーの同定」に関する研究	
	自治医科大学・医学部・ゲノム機能研究部 山下義博 -----	1
II.	分担研究報告	
1.	「DNA チップを用いた早期膵臓がん検出マーカーの同定」に関する研究	
	自治医科大学・医学部・ゲノム機能研究部 山下義博 -----	8
2.	「cDNA サブトラクシヨンクローニング法による早期膵臓がん検出マーカーの同定」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 -----	10
3.	「早期膵臓がん検出マーカーの同定」に関する研究	
	自治医科大学・医学部・消化器内科学 菅野健太郎 -----	12
III.	研究成果の刊行に関する一覧表 -----	14
IV.	研究成果の刊行物・別冊 -----	15

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）

総括研究報告書

「早期膵臓がん検出マーカーの同定」に関する研究

主任研究者： 山下義博 自治医科大学医学部 助手

研究要旨：膵臓がんは最も予後不良な悪性腫瘍の一つであり、外科的切除を受けても根治する例は極めて稀である。確定診断のためには逆行性膵胆管造影（ERCP）検査の際に得る膵液の細胞診検査が重要であるが、本検査の正診率は現在なお低い。膵臓がんの治癒率向上のためにも、治癒切除が可能な早期の段階で信頼性良く膵臓がん診断を可能にする新規分子マーカーの同定が世界的な急務である。ERCPの際に採取される膵液は膵管上皮細胞を豊富に含み、特に担がん患者のそれには正常膵管上皮と膵臓がん細胞（悪性化した膵管上皮）とが共に存在する。我々は本研究計画において、健常人及び膵がん患者の膵液より膵管上皮細胞を純化し両者を直接比較すれば膵臓がん特異的分子マーカーが効率良く同定することを目指した。既にこれまで健常人38例、慢性膵炎48例、良性膵腫瘍41例、膵臓がん72例、その他67例の膵管上皮細胞の収集に成功している。これら膵管上皮細胞を試料としてAffymetrix社全ヒト遺伝子チップHGU133A&Bセットによる大規模発現解析とcDNAサブトラクションクローニング法によるスクリーニングを平行して解析しており、既に複数の膵臓がん特異的遺伝子が同定されている。またこれらについて健常人、良性膵腫瘍及び膵臓がんサンプル各30例程の定量的real-time PCR法解析を行い、一部の遺伝子については既に膵臓癌特異的発現が確認された。

分担研究者

山下義博	自治医科大学・ゲノム機能研究部・助手
間野博行	自治医科大学・ゲノム機能研究部・教授
菅野健太郎	自治医科大学・内科学消化器・教授

A 研究目的

膵臓がんは極めて予後不良な悪性腫瘍であり、特徴的臨床所見に乏しく、診断が確定した時点では既にがんが進行し根治手術が困難な例がほとんどを占める。しかも診断目的で施行する膵液細胞診による膵臓がんの診断率も依然高くなく新たな診断マーカーの同定が世界的な急務といえる。DNAチップは数千～数万種類の遺伝子の発現変化を数回の実験で解析可能にする最新の研究機器であり、本システムを用いることで膵臓がん

の新たな分子診断マーカーが同定されることが期待される。我々は本研究計画において既に、健常人及び膵臓がん患者より膵胆管造影検査（ERCP）の際に得られる膵液より膵管上皮細胞を純化保存する大規模バンク事業「Pancreas Bank」を開始した。本バンク細胞を用いたDNAチップ解析を大規模に行うことにより、膵がん細胞特異的発現を示す遺伝子の同定が可能になると期待される。平成17年3月現在で健常人38例、慢性膵炎48例、良性膵腫瘍41例、膵臓がん72例、その他67例の純化検体細胞の保存に成功している。本研究計画では更にPancreas Bankの拡充を行い（目標症例数：正常、膵臓がん各200例）DNAチップによる網羅的スクリーニングを続行すると共に、既に同定された新規分子診断マーカーを用いたRT-PCR法による膵臓がん早期診断キットの開発を行う。

B 研究方法

(1) サンプルの採取。上皮細胞特異的表面蛋白MUC1は正常膵管上皮および膵臓がん

ズムの開発を試みた。Weighted-vote 法あるいは k-nearest neighbor 法を用いて検証したところ、前者を用いて5種類の遺伝子による予後予測を行う際に最も精度が高く、8割以上の精度で疾患の予測する事が可能であった。

5) 一方健常者 mRNA プールと膵臓がん患者 mRNA プールとを用いて cDNA サブトラクション実験を行い、後者のみにおいて発現する遺伝子の同定を別のアプローチから試みた。

6) PSC は Angiotensin II (AT-II) による増殖刺激により活性化するが、その機序について EGF 受容体を transactivation することにより PSC の増殖を促進することを報告した。しかし、EGF 受容体阻害剤では AT-II の PSC 増殖促進作用を約 50% しか抑制できず、これより AT-II の PSC におけるもう一つの増殖刺激伝達経路の存在が予測された。我々はその新しい AT-II の増殖刺激伝達経路の検討をおこなった。PSC は TGF- β を自ら産生、放出しそのオートクリン機構により自らの増殖を抑制している。しかし、AT-II は TGF- β 刺激伝達機構の細胞内抑制蛋白である Smad 7 の発現を増強することにより、オートクリン TGF- β の PSC 増殖抑制機構を阻害し、その結果 PSC の増殖を促進することを見いだした。更にはその AT-II による Smad 7 発現誘導は protein kinase C を介していることを明かにした。これらのデータは、TGF- β / Smad シグナリング系と Angiotensin シグナリング系との負の相互作用を示した初めての知見である。

7) 慢性炎症を伴う胆嚢上皮には腸上皮化生が発生しており、Goblet 細胞ならびに腸型粘液の発現が認められた。この発現部には CDX2 が発現しており、胃や食道上皮と同様に CDX2 の発現が胆嚢における腸上皮化生発現にも重要な役割を果たしていることが示唆された。

E. 結論

本研究事業において膵臓がんの早期診断マーカー同定を目指した研究が順調に進行している。膵液より膵管上皮細胞を純化するバ

ンク事業も順調に拡大しており、来年度から新たな研究協力施設も2カ所増加する予定である。膵液より純化した膵管上皮細胞のバンク事業として計266例を超えており、我々の Pancreas Bank は世界最大の膵管上皮バンクとなっている。本バンクサンプルによる膵臓がん早期診断マーカーの同定も、カスタム DNA チップ、アフィメトリクス社全ヒト遺伝子チップ、および cDNA サブトラクションクロニング法など多方面から解析がなされており、成果も確実に得られている。来年度は Pancreas Bank をさらに拡充し、また得られた遺伝子発現情報を統合するとともに、既に膵臓がん早期診断マーカーの良い候補として同定されたものについては、本遺伝子発現を RT-PCR 法により検出する「膵臓がん早期診断キット」の開発に着手する予定である。

F. 健康危険情報

無し

G. 研究発表

1. 論文発表

山下義博

- 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) 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.
 - 8) 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.
- 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) 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.*, 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) 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., Masuya, 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-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.
- 菅野健太郎
- 1) Mutoh, H., Sakurai, S., Satoh, K., Osawa, H., Tomiyama, T., Kita, H., Yoshida, T., Tamada, K., Yamamoto, H., Isoda, N., Ido, K. & Sugano, K. "Pericryptal fibroblast sheath in intestinal metaplasia and gastric carcinoma" *Gut*, **54**:33-39, 2005. ㄆ
- 2) Osawa, H., Nakazato, M., Date, Y., Kita, H., Ohnishi, H., Ueno, H., Shiiya, T., Satoh, K., Ishino, Y. & Sugano, K. "Impaired Production of Gastric Ghrelin in Chronic Gastritis Associated with Helicobacter pylori" *J Clin Endocrinol Metab*, **90**:10-16, 2005.
- 3) Hama, K., Ohnishi, H., Yasuda, H., Ueda, N., Mashima, H., Satoh, Y., Hanatsuka, K., Kita, H., Ohashi, A., Tamada, K. & Sugano, K. "Angiotensin II stimulates DNA synthesis of rat pancreatic stellate cells by activating ERK through EGF receptor transactivation" *Biochem Biophys Res Commun*, **315**:905-911, 2004.
- 4) Inamori, H., Ido, K., Isoda, N., Hozumi, M., Onobuchi, Y., Nagae, G., Kita, H., Satoh, Y., Nagamine, N., Ono, K. & Sugano, K. "Laparoscopic radiofrequency ablation of hepatocellular carcinoma in the caudate lobe by using a new laparoscopic US probe with a forward-viewing convex-array transducer" *Gastrointest Endosc*, **60**:628-631, 2004.
- 5) Koizumi, Y., Isoda, N., Sato, Y., Iwaki, T., Ono, K., Ido, K., Sugano, K., Takahashi, M., Nishizawa, T. & Okamoto, H. "Infection of a Japanese patient by genotype 4 hepatitis e virus while traveling in Vietnam" *J Clin Microbiol*, **42**:3883-3885, 2004.
- 6) Kuno, A., Yamamoto, H., Kita, H., Sunada, K., Yano, T., Hayashi, Y., Sato, H., Miyata, T., Sekine, Y., Iwamoto, M., Ido, K. & Sugano, K. "Double-balloon enteroscopy through a Roux-en-Y anastomosis for EMR of an early carcinoma in the afferent duodenal limb" *Gastrointest Endosc*, **60**:1032-1034, 2004.
- 7) Miyata, T., Ohnishi, H., Suzuki, J., Yoshikumi, Y., Ohno, H., Mashima, H., Yasuda, H., Ishijima, T., Osawa, H., Satoh, K., Sunada, K., Kita, H., Yamamoto, H. & Sugano, K. "Involvement of syntaxin 4 in the transport of membrane-type 1 matrix

- metalloproteinase to the plasma membrane in human gastric epithelial cells" *Biochem Biophys Res Commun*, **323**:118-124, 2004.
- 8) Miyata, T., Yamamoto, H., Kita, H., Yano, T., Sunada, K., Sekine, Y., Iwamoto, M., Kuno, A., Onishi, N., Ido, K., Nokubi, M., Tanaka, A. & Sugano, K. "A case of inflammatory fibroid polyp causing small-bowel intussusception in which retrograde double-balloon enteroscopy was useful for the preoperative diagnosis" *Endoscopy*, **36**:344-347, 2004.
- 9) Mutoh, H., Sakurai, S., Satoh, K., Tamada, K., Kita, H., Osawa, H., Tomiyama, T., Sato, Y., Yamamoto, H., Isoda, N., Yoshida, T., Ido, K. & Sugano, K. "Development of gastric carcinoma from intestinal metaplasia in Cdx2-transgenic mice" *Cancer Res*, **64**:7740-7747, 2004.
- 10) Mutoh, H., Sakurai, S., Satoh, K., Osawa, H., Hakamata, Y., Takeuchi, T. & Sugano, K. "Cdx1 induced intestinal metaplasia in the transgenic mouse stomach: comparative study with Cdx2 transgenic mice" *Gut*, **53**:1416-1423, 2004.
- 11) Nishimura, M., Yamamoto, H., Kita, H., Yano, T., Sunada, K., Miyata, T., Sugimoto, T., Iino, S., Sekine, Y., Iwamoto, M., Ohnishi, N., Kuno, A., Ohnishi, H., Sakurai, S., Ido, K. & Sugano, K. "Gastrointestinal stromal tumor in the jejunum: diagnosis and control of bleeding with electrocoagulation by using double-balloon enteroscopy" *J Gastroenterol*, **39**:1001-1004, 2004.
- 12) Ohnishi, H., Miyata, T., Yasuda, H., Satoh, Y., Hanatsuka, K., Kita, H., Ohashi, A., Tamada, K., Makita, N., Iiri, T., Ueda, N., Mashima, H. & Sugano, K. "Distinct roles of Smad2-, Smad3-, and ERK-dependent pathways in transforming growth factor-beta1 regulation of pancreatic stellate cellular functions" *J Biol Chem*, **279**:8873-8878, 2004.
- 13) Satoh, Y., Kita, H., Kihira, K., Mutoh, H., Osawa, H., Satoh, K., Ido, K., Sakata, Y. & Sugano, K. "Gastrointestinal angiodysplasia in a patient with type 2 von Willebrand's disease and analysis of exon 28 of the von Willebrand factor gene" *Am J Gastroenterol*, **99**:2495-2498, 2004.
- 14) Shinozaki, S., Yamamoto, H., Kita, H., Yano, T., Miyata, T., Sunada, K., Sekine, Y., Kuno, A., Onishi, N., Iwamoto, M., Sasaki, A., Ido, K. & Sugano, K. "Direct observation with double-balloon enteroscopy of an intestinal intramural hematoma resulting in anticoagulant ileus" *Dig Dis Sci*, **49**:902-905, 2004.
- 15) Sugano, K. "[Japanese guideline for the management of gastric ulcer]" *Nippon Rinsho*, **62**:1389-1395, 2004.
- 16) Sugano, K. "[Strategy for peptic ulcer therapy in the era of H. pylori eradication therapy]" *Nippon Rinsho*, **62**:477-482, 2004.
- 17) Wada, S. & Sugano, K. "[Pancreatic lipase]" *Nippon Rinsho*, **62 Suppl 11**:402-404, 2004.
- 18) Yamamoto, H., Kita, H., Sunada, K., Hayashi, Y., Sato, H., Yano, T., Iwamoto, M., Sekine, Y., Miyata, T., Kuno, A., Ajibe, H., Ido, K. & Sugano, K. "Clinical outcomes of double-balloon endoscopy for the diagnosis and treatment of small-intestinal diseases" *Clin Gastroenterol Hepatol*, **2**:1010-1016, 2004.
- 19) Yamamoto, H., Kita, H., Sunada, K., Yano, T., Hayashi, Y., Sato, H., Iwamoto, M. & Sugano, K. "[Clinical value of enteroscopic examinations using the double-balloon endoscope]"

H. 知的財産権の出願・登録状況

- 1 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
- 2 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
- 3 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
- 4 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
- 5 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
- 6 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

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）
分担研究報告書
「DNAチップを用いた早期膵臓がん検出マーカーの同定」に関する研究

分担研究者： 山下義博 自治医科大学医学部 助手

研究要旨：膵臓がんは最も予後不良な悪性腫瘍の一つであり、外科的切除を受けても根治する例は極めて稀である。確定診断のためには逆行性膵胆管造影（ERCP）検査の際に得る膵液の細胞診検査が重要であるが、本検査の正診率は現在なお低い。我々は診断目的に採取する膵液より正常および悪性膵管上皮細胞純化保存する「Pancreas Bank」事業を推進し、それより純化したサンプルを用いて大規模 DNA チップ遺伝子発現解析を行った。具体的には健常者 25 例および膵臓がん患者 24 例サンプルについて、全ヒト遺伝子が配置された Affymetrix 社 HGU133DNA チップを用いて約 3 万 3 千種類の遺伝子発現データを得た。得られた発現プロファイルを健常者および膵臓がん患者群で比較し、両群間で発現量の平均値にかんする t 検定を行った。その結果両群を選別可能な遺伝子セットの抽出に成功した。さらに、遺伝子発現量による膵臓がん診断アルゴリズムの開発を試みた。Weighted-vote 法あるいは k-nearest neighbor 法を用いて検証したところ、前者を用いて 5 種類の遺伝子による予後予測を行う際に最も精度が高く、8 割以上の精度で疾患の予測する事が可能であった。

A 研究目的

膵臓がんは極めて予後不良な悪性腫瘍であり、特徴的臨床所見に乏しく、診断が確定した時点では既にかんが進行し根治手術が困難な例がほとんどを占める。しかも診断目的で施行する膵液細胞診による膵臓がんの診断率も依然高くなく新たな診断マーカーの同定が世界的な急務といえる。我々は本研究計画において既に、健常人及び膵臓がん患者より膵胆管造影検査（ERCP）の際に得られる膵液より膵管上皮細胞を純化保存する大規模バンク事業「Pancreas Bank」を開始した。本バンク細胞を用いた DNA チップ解析を大規模に行うことにより、膵がん細胞特異的発現を示す遺伝子の同定が可能になると期待される。

B 研究方法

(1) サンプルの採取。上皮細胞特異的表面蛋白 MUC1 は正常膵管上皮および膵臓がんの両者において発現することが既に知られている。そこで本蛋白に対する抗体を用いたマグネティックビーズカラムによる MUC1 陽性細胞の簡便な純化装置を開発した。また本邦に広く分布する研究協力施設において、周辺病院より採取した膵液から膵管上皮細胞

を効率よく純化保存する事業を開始した。既に自治医科大学消化器内科だけでなく、福島県会津中央病院消化器病センターを含む、全国レベルでの新たな膵液検体収集システム「Pancreas Bank」を構築している。これによって我々は膵管上皮細胞を膵臓がん患者 72 例、良性膵腫瘍 41 例、慢性膵炎 48 例、健常者 38 例、その他 67 例、計 266 例について収集することに成功した。

(2) DNA チップ解析。Pancreas Bank の健常人 25 例および膵臓がん 24 例より純化した膵管上皮サンプルより mRNA 分画を調整し、二本鎖 cDNA とした後、T7 RNA ポリメラーゼによって cRNA を作成した。これをアフィメトリクスジャパン社の全ヒト遺伝子 DNA チップ（HGU133）にハイブリダイズさせ、GeneChip スキャナーによって結合 cRNA 量を定量した。

（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&D. 研究結果および考察

(1) 膵臓がん 24 例、健常者 25 例、計 49 例の純化膵管上皮細胞において GeneChip 解析

を行い、4,4000種類のプローブセット（計3万3千種類の遺伝子に相当）における遺伝子発現データを得た。両群間で発現の平均値の差の検定をWelch ANOVA法によって行い、 $P < 0.001$ となる遺伝子セットを抽出することに成功した。さらに膵臓がん特異的新規診断用遺伝子マーカーを検出するために、健常者においては全く発現しないが、少なくとも一部の膵臓がんサンプルにおいて高発現する遺伝子を選択した。

(2) 上述の遺伝子発現データを用いて、遺伝子発現量による膵臓がん診断アルゴリズムの開発を試みた。Weighted-vote法あるいはk-nearest neighbor法を用いて検証したところ、前者を用いて5種類の遺伝子による予後予測を行う際に最も精度が高く、8割以上の精度で疾患の予測する事が可能であった。

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) 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.
- 8) 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

なし

「cDNA サブトラクシヨクローニング法による早期膵臓がん検出マーカーの同定」
に関する研究

分担研究者： 間野博行 自治医科大学医学部教授

研究要旨：膵臓がんは最も予後不良な悪性腫瘍の一つであり、外科的切除を受けても根治する例は極めて稀である。確定診断のためには逆行性膵胆管造影（ERCP）検査の際に得る膵液の細胞診検査が重要であるが、本検査の正診率は現在なお低い。膵臓がんの治癒率向上のためにも、治癒切除が可能な早期の段階で信頼性良く膵臓がん診断を可能にする新規分子マーカーの同定が世界的な急務である。ERCPの際に採取される膵液は膵管上皮細胞を豊富に含み、特に担がん患者のそれには正常膵管上皮と膵臓がん細胞（悪性化した膵管上皮）とが共に存在する。我々は本研究計画において、健常人及び膵がん患者の膵液より膵管上皮細胞を純化し両者を直接比較すれば膵臓がん特異的分子マーカーが効率良く同定することを目指した。既にこれまで健常人38例、慢性膵炎48例、良性膵腫瘍41例、膵臓がん72例、その他67例の膵管上皮細胞の収集に成功している。これら膵管上皮細胞を試料として健常人と膵臓がんサンプル間でcDNA サブトラクシヨクローニング法によるスクリーニングを行い、膵臓がん特異的な発現を示す遺伝子群を同定する事に成功した。

A 研究目的

膵臓がんは極めて予後不良な悪性腫瘍であり、特徴的臨床所見に乏しく、診断が確定した時点では既にがんが進行し根治手術が困難な例がほとんどを占める。しかも診断目的で施行する膵液細胞診による膵臓がんの診断率も依然高くなく新たな診断マーカーの同定が世界的な急務といえる。我々は本研究計画において既に、健常人及び膵臓がん患者より膵胆管造影検査（ERCP）の際に得られる膵液より膵管上皮細胞を純化保存する大規模バンク事業「Pancreas Bank」を開始した。本バンク細胞を用いたcDNA サブトラクシヨクローニング実験を行うことで、膵臓がんのみに発現する遺伝子の同定を網羅的に試み、これら遺伝子を利用した同疾患の早期診断キットの開発を試みる。

B 研究方法

(1) サンプルの採取。上皮細胞特異的表面蛋白MUC1は正常膵管上皮および膵臓がんの両者において発現することが既に知られている。そこで本蛋白に対する抗体を用いたマグネティックビーズカラムによるMUC1陽性細胞の簡便な純化装置を開発した。また本邦に広く分布する研究協力施設において、周辺病院より採取した膵液から膵管上皮細胞を効率よく純化保存する事業を開始した。既に自治医科大学消化器内科だけでなく、福島県会津中央病院消化器病センターを含む、

全国レベルでの新たな膵液検体収集システム「Pancreas Bank」を構築している。これによって我々は膵管上皮細胞を既にこれまで健常人38例、慢性膵炎48例、良性膵腫瘍41例、膵臓がん72例、その他67例の計266例について収集することに成功した。

(2)cDNAサブトラクシヨクローニング。健常者検体4例および膵臓がん患者検体4例よりそれぞれcDNA画分を作成し、それぞれ「健常」および「膵がん」cDNAプールを得た。後者においてのみ発現する遺伝子を取り出すため、cDNAサブトラクシヨクローニング解析を行い、当該cDNA断片をランダムに384種類クローニングし、その塩基配列を決定した。

（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&D. 研究結果および考察

(1) 膵臓がん4例および健常者4例のサンプルからcDNA調整しそれぞれプールした後、両グループ間で発現が異なるcDNA断片のサブトラクシヨクローニングを行った。同定された約400種類のcDNAについてはone-pass sequenceを行い、そのannotationも終了した。現在これら膵臓がん選択的cDNAの中で真に早期診断マーカーとして有用なものを、DNAチップ実験の

場合と同様に、サンプルを拡大して real-time RT-PCR法による発現定量を大規模に行っている。

(2) 既に我々はカスタムDNAチップを用いたPancreas Bankの解析も終了しており、その結果複数の膵臓がん特異的遺伝子の同定に成功している。得られた遺伝子については既に50例を超えるサンプルを用いて real-time RT-PCR法による発現定量を終了しており、複数の膵臓がん特異的遺伝子を同定した。これら複数のマーカーを組み合わせて偽陰性を減らす工夫を行っている。

E. 結論

本研究事業において膵臓がんの早期診断マーカー同定を目指した研究が順調に進行している。我々のPancreas Bankサンプルによる膵臓がん早期診断マーカーの同定も、確実に成果を得た。

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.*, 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) 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., 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

- 1 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

「早期膵臓がん検出マーカーの同定」に関する研究

分担研究者：菅野健太郎 自治医科大学医学部教授

研究要旨：膵癌発症のハイリスク状態である慢性膵炎における膵組織の線維化の機序を解明するため、ラット膵から線維化に中心的な役割を果たすと考えられる細胞である Stellate cell を単離し、昨年度に引き続きその活性化機構、増殖反応について検討した。実際のヒト膵疾患における膵液からの診断を実用化するための第一歩として、留置カニューレ下で純粋膵液を大量に採取するシステムを確立し、各種膵疾患から細胞診を行うとともに、後日の遺伝子発現プロファイル解析等のために、臨床サンプルを採取した。次年度以降さらに多数のサンプルの収集を行い、発現解析を行う予定である。胆嚢の慢性炎症では腸上皮化生様の変化が認められることが知られており、この変化にわれわれが胃粘膜の腸上皮化生の発生に重要であると考えている転写因子 CDX2 が関与していることを見出し報告した。CDX2 の発現異常は粘液産生膵腫瘍でも報告されており、膵、胆道系の前癌病態として重要である可能性が示唆される。

A. 研究目的

- ①膵癌の発生母地である慢性膵炎における線維化のメカニズムを解明するため、ラットを用いてその病態に最も重要であると考えられる膵Stellate細胞（PSC）を単離し、その分子応答について検討した。
- ②膵癌のDNAチップ解析に用いる膵液収集を行う。
- ③腸上皮化生の発現に重要な転写因子 CDX2の遺伝子発現を胆道疾患で検討する。

B. 研究方法

- ①ラットからPSCをコラゲナーゼ、プロナーゼによる酵素処理後、Nycodenz を用いて密度勾配遠心分離を行い、分離精製し初代培養系を作成した。この培養系を用いて、膵の線維化に重要であると考えられるActivin A, TGF β , Angiotensin IIの効果を中心に検討した。
- ②インフォームドコンセントに基づいて慢性膵炎、比較的緩徐な経過を辿る膵腫瘍であるIntraductal papillary mucinous tumor（IPMT）及び膵癌患者のERCP検査後、膵管内に留置カニューレ下で純粋膵液を採取し、病理細胞診に供するとともに、連結可能匿名化とした後、識別番号を付したサンプルの収集事業を行った。
- ③胆嚢摘出標本を腸上皮に発現する粘液染色ならびにCDX2特異抗体による免疫

染色を行い、胆道系における腸上皮化生の発現との関連を検討した。

（倫理面の配慮）

遺伝子解析のための倫理規定は自治医科大学学内の遺伝子研究審査委員会ならびに倫理委員会の承認を得ており、文書による同意を得て検体の採取を行った。

C. 研究結果

①PSCの分子応答

PSCはAngiotensin II（AT-II）による増殖刺激により活性化するが、その機序についてEGF受容体をtransactivationすることによりPSCの増殖を促進することを報告した（論文1）。しかし、EGF受容体阻害剤ではAT-IIのPSC増殖促進作用を約50%しか抑制できず、これよりAT-IIのPSCにおけるもう一つの増殖刺激伝達経路の存在が予測された。我々はその新しいAT-IIの増殖刺激伝達経路の検討をおこなった。PSCはTGF β を自ら産生、放出しそのオートクリン機構により自らの増殖を抑制している。しかし、AT-IIはTGF β 刺激伝達機構の細胞内抑制蛋白であるSmad 7の発現を増強することにより、オートクリンTGF β のPSC増殖抑制機構を阻害し、その結果PSCの増殖を促進することを見いだした。更にはそのAT-IIによるSmad 7発現誘導はprotein kinase Cを介していることを明かにした。これら

のデータは、TGF- β /Smad シグナリング系と Angiotensin シグナリング系との負の相互作用を示した初めての知見である。

慢性膵炎を生じた膵組織では、各種炎症疾患で中心的なメディエーターとして機能する Cyclooxygenase-2 (COX-2) の発現が増強している事が知られるが、その役割は不明であった。我々は慢性膵炎発症、進展における COX-2 の機能を明らかにするために、PSC の機能性御における Cox-2 の役割を検討している。これまでの検討で、PSC を活性化させることにより膵繊維化を促進することが知られる TGF- β , Interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6) などの炎症性サイトカインにより PSC において Cox-2 の発現が誘導されることを明かにした。一方、2種類の Cox-2 特異的抑制剤 NS-398 と SC-236 はともに PSC における Cox-2 活性を阻害すると同時に PSC の活性化を強く抑制した。これらより、各種炎症性サイトカインは Cox-2 発現を誘導することにより PSC の活性化させ、かつ Cox-2 発現は PSC 活性化に不可欠であることが示された。更に TGF- β シグナルの主たるメディエーターである Smad2/3 蛋白質機能をその Dominant-negative mutant gene を発現させることにより阻害したところ、TGF- β のによる Cox-2 誘導作用だけでなく IL-1 β や IL-6 による Cox-2 誘導作用までもが強く抑制され、同時に IL-1 β や IL-6 の PSC 活性化作用も阻害された。強い炎症反応を惹起する代表的 Interleukin の PSC 活性化作用が、実は直接的作用でなく TGF- β シグナリングを介した間接的なものである可能性をこの知見は示しており、現在その更なる分子機序の解明に向け研究を進めている。

②昨年引き続き、純粋膵液の採取を継続した。一部を細胞診に供した残りを連結可能匿名化し、DNA チップ解析のためのサンプルとして保存した。なお、チップ解析ならびに候補遺伝子の探索は一括して次年度に行う予定である。しかしセ

クレチン製剤の販売が中止となり、今後セクレチン刺激による膵液採取が困難になると考えられる。

③慢性炎症を伴う胆嚢上皮には腸上皮化生が発生しており、Goblet 細胞ならびに腸型粘液の発現が認められた。この発現部には CDX2 が発現しており、胃や食道上皮と同様に CDX2 の発現が胆嚢における腸上皮化生発現にも重要な役割を果たしていることが示唆された(論文2)。

D&E. 考察及び結論

①ラット PSC を用いて線維化に関与する様々な因子の関与と、その相互作用についての一部を明らかにした。種々の受容体阻害薬、COX-2 阻害薬が線維化の抑制に有用である可能性が示唆された。

②膵液サンプリングを進め、遺伝子発現プロファイル等の解析を進めている。

③胆嚢上皮の腸上皮化生には他の組織での腸上皮化生の発生に関与する転写因子 CDX2 が関与している。粘液産生膵腫瘍の初期段階においても CDX2 が関与していると推察されるので、この点の検討今後行いたいと考えている。

F. 健康危険情報

無し

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Hama K, Ohnishi H, Yasuda H, Ueda N, Mashima H, Satoh Y, Hanatsuka K, Kita H, Ohashi A, Tamada K, Sugano K.:

Angiotensin II stimulates DNA synthesis of rat pancreatic stellate cells by activating ERK through EGF receptor transactivation. *Biochim. Biophys. Res. Comm.* 314, 905-911, 2004

2) Osawa H, Kita H, Satoh K, Ohnishi H, Kaneko Y, Muto H, Tamada K, Ido K, Sugano K: Aberrant expression of CDX2 in the metaplastic epithelium and inflammatory mucosa of the gallbladder. *Am. J. Surg. Pathol.* 28, 1253-4, 2004

H. 知的財産権の出願・登録状況

無し

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., 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
Mano, H.	Stratification of Acute Myeloid Leukemia Based on Gene Expression Profiles	Int.J.Hematol.		80 389-394	2004
Hama, K., Ohnishi, H., Yasuda, H., Ueda, N., Mashima, H., Satoh, Y., Hanatsuka, K., Kita, H., Ohashi, A., Tamada, K., Sugano, K.	Angiotensin II stimulates DNA synthesis of rat pancreatic stellate cells by activating ERK through EGF receptor transactivation	BBRC		315 905-911	2004
Osawa, H., Kita, H., Satoh, K., Ohnishi, H., Kanedo, Yoshinari, Muto, H., Tamada, K., Ido, K., Sugano, K.	Aberrant expression of CDX2 in the metaplastic epithelium and inflammatory mucosa of the gallbladder	Am J Surg Pathol		28 1-2	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.visualstats.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