

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

「DNAチップによる急性白血病の新規分類法提案」

に関する研究

平成16年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 間野 博行

平成17(2005)年3月

厚生労働科学研究研究費補助金

第3次対がん総合戦略研究事業

「DNAチップによる急性白血病の新規分類法提案」
に関する研究

平成16年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 間野 博行

平成17(2005)年3月

目次

I.	総括研究報告書	
	「DNAチップによる急性白血病の新規分類法提案」に関する研究 自治医科大学・医学部・ゲノム機能研究部 間野博行 -----	1
II.	分担研究報告	
1.	「DNAチップによる急性白血病の新規分類法提案」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 -----	7
2.	「DNAチップによる急性白血病の新規分類法提案」に関する研究 自治医科大学・医学部・内科学講座血液 小澤 敬也 -----	9
3.	「白血病株化細胞に対するFarnesytransferase inhibitor R115777と抗 白血病薬の併用効果について」に関する研究 栃木県立がんセンター 加納康彦 -----	11
III.	研究成果の刊行に関する一覧表 -----	13
IV.	研究成果の刊行物・別冊 -----	15

主任研究者： 間野 博行 自治医科大学医学部 教授

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

分担研究者

間野博行 自治医科大学医学部ゲノム機能研究部・教授
小澤敬也 自治医科大学医学部内科学講座血液・教授
加納康彦 栃木県立がんセンター研究検査部・部長

る患者と90%ある患者の骨髓単核球を分離して、そこから得たmRNAを用いてDNAチップ比較を行えば、白血病患者特有の遺伝子の発現量は後者において14倍に増加しているため骨髓全体の遺伝子発現プロファイルは大きく異なってしまい、両患者が全く異なった疾患に罹患しているとの誤った結論が導かれるであろう。したがって真に臨床にフィードバック可能な精度の高いDNAチップ解析を行うためには、このようなポピュレーションの変化に影響されない新たなスクリーニング法の開発が必須と考えられる。

A 研究目的

現在なお正確な診断が困難であり、かつ有効な治療法の存在しない白血病類縁疾患が数多くある。各患者の有効な治療法を選択する上でも正確な鑑別診断は必須であり、そのためには新たな分子診断マーカーの同定が最も重要であると考えられる。DNAチップは数千-数万の遺伝子発現変化を簡便に解析可能にする最新の研究システムであり、上述の目的に適したスクリーニング法であると期待される。

しかしこれまでのような正常組織と癌組織を単純にDNAチップで比較するような実験においては、両組織の構成細胞成分があまりに異なるため「偽陽性」遺伝子群の同定に終始することが殆どであった。例えば全く同じ白血病患者の骨髓中に5%あ

我々は白血病患者などの特発性血液疾患の多くが造血幹細胞（あるいはその近傍）の異常に起因することに着目し、これら疾患患者のフレッシュ検体より造血幹細胞相当分画のみを純化しストックするバンク事業「Blast Bank」をスタートした。本バンク細胞を用いてDNAチップ解析を行うことで、疾患の種類に拘わらず分化レベルがほぼ均一な細胞群を比較することが可能になり、疾患の病態解明に有用な知見が得られると期待された。本システムを用いて、(1)白血病患者の鑑別診断に有効な遺伝子マーカーの同定、(2)白血病患者の薬剤感受性に関与する遺伝子マーカーの同定、(3)病期が進行する白血病患者類縁疾患の病期特異的分子マーカーの同定、等を本研究計画で目指した。

また同様な解析法を成人 T 細胞性白血病 (ATL) などに対しても行った。これらの膨大な知見を元に、白血病関連疾患の診断用カスタム DNA チップの開発、および新規分指標的療法の開発を行う。

B 研究方法

1) 造血幹細胞特異的マーカーである AC133 に対するアフィニティカラムを用いて、白血病を含む各種特発性血液疾患患者骨髄より造血幹細胞分画を純化保存し、これを Blast Bank と名付けた。平成 17 年 3 月現在で 600 例を越えるサンプルの保存に成功しており、これは純化細胞を用いたゲノミクスプロジェクトとしては世界最大級である。

2) ATL の病期進展機構解明を目的として、ATL 患者末梢血より CD4 陽性 ATL 細胞のみを純化保存する ATL Bank も行い 60 例を越えるサンプルの保存に成功した。またコントロールサンプルとして健常者末梢血より CD4 陽性 T 細胞分画を純化し、一部を PHA にて刺激した。

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

4) ヒト白血病株化細胞として、MOILT-3 (T-cell ALL)、HL-60 (APL)、U937 (AMoL) を用いた。

抗がん剤：R115777 の併用薬として cytarabine、doxorubicin、idarubicin、mitoxantrone、etoposide、F-ara-A (fludarabine の活性化体)、gemcitabine、4-hydroperoxy cyclophosphamide

(cyclophosphamide の活性化体)、methotrexate、mitoxantrone、SN-38 (irinotecan の活性化体)、vincristine、vinblastine 及び paclitaxel を用いた。

培養：ヒト白血病株化細胞を R115777 と他剤の存在下で 4 日間培養し、MTT assay で dose-response curve を得、 IC_{80} における併用効果を isobologram (Steel and Peckham) で分析した。

(倫理面への配慮)

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

C 研究結果

1) 我々は平成 11 年 8 月より Blast Bank を立ち上げ既に 600 例を越えるサンプルのストックに成功した。現在本バンク中に 130 例を超える急性骨髄性白血病 (AML) 幹細胞サンプルが保存されており、世界的にも極めて貴重なリソースとなっている。これら Blast Bank 分画を用いた解析が旧来の骨髄単核球全体を用いたものに比べ実際に偽陽性データが少ないこと、またバンクに用いる AC133 陽性細胞がこれら疾患の責任クローンを含むことなども既に確認している

2) 骨髄異形成症候群の refractory anemia with excess of blasts (RAEB) 11 例を含む計 99 例の AML 類縁疾患について、

Affymetrix 社 GeneChip HGU133A & B (44,000 probe sets = 33,000 遺伝子) を用いた解析を行い、上記 99 例における全ヒト遺伝子の発現プロファイルデータベースを構築した。これら膨大な遺伝子発現データおよび、各症例の臨床情報フォローアップデータより、初回寛解導入療法の成績にリンクする遺伝子、治療開始後 365 日の時点で寛解を維持できているか否かにリンクする遺伝子、など様々な臨床データに発現量が連関する遺伝子セットを抽出することに成功した。さらにこれら遺伝子の発現量を基に AML の新たなサブグループを定義可能なこと、またこれらサブグループが患者長期予後に連関することなども明らかにした。

3) これまで急性白血病の予後予測は主に白

血病細胞の核型を基に行われてきた。同分類法によって「予後不良群」に分類された患者の予後はきわめて不良であることが知られているが、「予後良好群」と「予後中間群」はいずれも予後良好患者と不良患者の両者を含んでおり、実際の予後判定に有効ではなかった。そこで我々の遺伝子発現データから「予後良好群」+「予後中間群」の中で長期完全寛解患者に特異的な発現を示す遺伝子セットを選出し、これら遺伝子の発現量から長期予後良好患者を予測するコンピューターアルゴリズムを開発した。本アルゴリズムの有効性をテストセットサンプルにおいて検証したところ長期予後を有効に予測する事が出来た。

4) 慢性期ATL患者19例、急性期ATL患者22例の末梢血よりCD4陽性分画のみを純化保存するプロジェクトを行った。得られた純化ATL細胞をAffymetrix社HGU133マイクロアレイによって解析する事でATLの世界最大の遺伝子発現データベースを構築した。本データベースを用いて急性期特異的な発現を示す遺伝子セットを抽出したところhepatocyte growth-factor (HGF)の受容体であるMET遺伝子が同定された。しかも患者血漿中のHGF濃度を測定したところ、慢性期、急性期共にATL患者においてHGF濃度が亢進している事が確認された。以上よりATLの病期進展機構としてHGF-MET系の活性化の存在が示唆された。

5) R115777のMOLT-3, U937, HL-60に対するIC₅₀は各々0.34, 2.7, 6.5 mMであった。これらの細胞による併用実験では、R115777はcytarabine、doxorubicin、idarubicin、mitoxantrone、etoposide、fludarabine、gemcitabine、4-hydroperoxy cyclophosphamide、mitoxantrone及びSN-38と相加作用、methotrexateと拮抗作用を示した。一方、vincristine、vinblastine、paclitaxelを用いた併用実験では、相乗作用を示した。

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。またチップ解析の結果得られた疾患関連遺伝子のうち治療抵抗性にリンクして発現すると思われるものについては、実際の血液細胞に発現導入して薬剤反応性の変化を解析した。その結果チップ実験からピンクアルカロイド耐性遺伝子が同定された。また疾患あるいは合併症の発症に関与すると思われる遺伝子も複数単離することに成功し、これらを標的とした分子療法の開発に向けて基盤技術の開発に成功した。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

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.

- 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.
- 小澤敬也
- 1) Takei, Y., Mizukami, H., Saga, Y., Kobayashi, H., Suzuki, M., Matsushita, T. & Ozawa, K.: "Overexpression of a hybrid gene consisting of the amino-terminal fragment of urokinase and carboxyl-terminal domain of bikunin suppresses invasion and migration of human ovarian cancer cells in vitro" *Int J Cancer*, **113**:54-58, 2005.
 - 2) Yoshioka, T., Okada, T., Maeda, Y., Ikeda, U., Shimpo, M., Nomoto, T., Takeuchi, K., Nonaka-Sarukawa, M., Ito, T., Takahashi, M., Matsushita, T., Mizukami, H., Hanazono, Y., Kume, A., Ookawara, S., Kawano, M., Ishibashi, S., Shimada, K. & Ozawa, K.: "Adeno-associated virus vector-mediated interleukin-10 gene transfer inhibits atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice" *Gene Ther*, **11**:1772-1779, 2004.
 - 3) Ueda, K., Hanazono, Y., Shibata, H., Ageyama, N., Ueda, Y., Ogata, S., Tabata, T., Nagashima, T., Takatoku, M., Kume, A., Ikehara, S., Taniwaki, M., Terao, K., Hasegawa, M. & Ozawa, K.: "High-level in vivo gene marking after gene-modified autologous hematopoietic stem cell transplantation without marrow conditioning in nonhuman primates" *Mol Ther*, **10**:469-477, 2004.
 - 4) Uchida, M., Watanabe, T., Kunitama, M., Mori, M., Kikuchi, S., Yoshida, K., Kirito, K., Nagai, T., Ozawa, K. & Komatsu, N.: "Erythropoietin overcomes imatinib-induced apoptosis and induces erythroid differentiation in TF-1/bcr-abl cells" *Stem Cells*, **22**:609-616, 2004.
 - 5) Tarumoto, T., Nagai, T., Ohmine, K., Miyoshi, T., Nakamura, M., Kondo, T., Mitsugi, K., Nakano, S., Muroi, K., Komatsu, N. & Ozawa, K.: "Ascorbic acid restores sensitivity to imatinib via suppression of Nrf2-dependent gene expression in the imatinib-resistant cell line" *Exp Hematol*, **32**:375-381, 2004.
 - 6) Takeda, S., Takahashi, M., Mizukami, H., Kobayashi, E., Takeuchi, K., Hakamata, Y., Kaneko, T., Yamamoto, H., Ito, C., Ozawa, K., Ishibashi, K., Matsuzaki, T., Takata, K., Asano, Y. & Kusano, E.: "Successful gene transfer using adeno-associated virus vectors into the kidney: comparison among adeno-associated virus serotype 1-5 vectors in vitro and in vivo" *Nephron Exp Nephrol*, **96**:e119-126, 2004.
 - 7) Takatoku, M., Muroi, K., Kawano-Yamamoto, C., Nagai, T., Komatsu, N. & Ozawa, K.: "Involvement of the esophagus and stomach as a first manifestation of varicella zoster virus infection after allogeneic bone marrow transplantation" *Intern Med*, **43**:861-864, 2004.
 - 8) Sato, K., Mori, M., Meguro, A., Miyoshi, T., Nagai, T., Muroi, K., Komatsu, N. & Ozawa, K.: "[Minor bcr/abl positive acute lymphoblastic leukemia preceded by knee joint pain due to bone marrow necrosis]" *Rinsho Ketsueki*, **45**:1203-1207, 2004.
 - 9) Sasaki, K., Inoue, M., Shibata, H., Ueda, Y., Muramatsu, S.I., Okada, T., Hasegawa, M., Ozawa, K. & Hanazono, Y.: "Efficient and stable Sendai virus-mediated gene transfer into primate embryonic stem cells with pluripotency preserved" *Gene Ther*, 2004.
 - 10) Ozawa, K.: "[Development and application of gene therapy technologies]" *Uirusu*, **54**:49-57, 2004.

- 11) Okada, T., Caplen, N.J., Ramsey, W.J., Onodera, M., Shimazaki, K., Nomoto, T., Ajalli, R., Wildner, O., Morris, J., Kume, A., Hamada, H., Blaese, R.M. & Ozawa, K.: "In situ generation of pseudotyped retroviral progeny by adenovirus-mediated transduction of tumor cells enhances the killing effect of HSV-tk suicide gene therapy in vitro and in vivo" *J Gene Med*, **6**:288-299, 2004.
 - 12) Ogata, K., Mimuro, J., Kikuchi, J., Tabata, T., Ueda, Y., Naito, M., Madoiwa, S., Takano, K., Hasegawa, M., Ozawa, K. & Sakata, Y.: "Expression of human coagulation factor VIII in adipocytes transduced with the simian immunodeficiency virus agmTYO1-based vector for hemophilia A gene therapy" *Gene Ther*, **11**:253-259, 2004.
 - 13) Obara, Y., Nagai, T., Mori, M., Ohmine, K., Toshima, M., Komatsu, N. & Ozawa, K.: "[Pseudomonas sepsis with ecthyma gangrenosum in an acute myeloid leukemia patient]" *Rinsho Ketsueki*, **45**:1138-1140, 2004.
 - 14) Nagashima, T., Muroi, K., Kawano-Yamamoto, C., Komatsu, N. & Ozawa, K.: "Paraproteinemia after hematopoietic stem cell transplantation" *Leuk Lymphoma*, **45**:135-137, 2004.
 - 15) Mochizuki, S., Mizukami, H., Ogura, T., Kure, S., Ichinohe, A., Kojima, K., Matsubara, Y., Kobayahi, E., Okada, T., Hoshika, A., Ozawa, K. & Kume, A.: "Long-term correction of hyperphenylalaninemia by AAV-mediated gene transfer leads to behavioral recovery in phenylketonuria mice" *Gene Ther*, **11**:1081-1086, 2004.
 - 16) Mizukami, H., Okada, T., Ogasawara, Y., Matsushita, T., Urabe, M., Kume, A. & Ozawa, K.: "Separate control of Rep and Cap expression using mutant and wild-type loxP sequences and improved packaging system for adeno-associated virus vector production" *Mol Biotechnol*, **27**:7-14, 2004.
 - 17) Mimuro, J., Mizukami, H., Ono, F., Madoiwa, S., Terao, K., Yoshioka, A., Ozawa, K. & Sakata, Y.: "Specific detection of human coagulation factor IX in cynomolgus macaques" *J Thromb Haemost*, **2**:275-280, 2004.
 - 18) Matsushita, T., Okada, T., Inaba, T., Mizukami, H., Ozawa, K. & Colosi, P.: "The adenovirus E1A and E1B19K genes provide a helper function for transfection-based adeno-associated virus vector production" *J Gen Virol*, **85**:2209-2214, 2004.
 - 19) Kuribara, R., Honda, H., Matsui, H., Shinjyo, T., Inukai, T., Sugita, K., Nakazawa, S., Hirai, H., Ozawa, K. & Inaba, T.: "Roles of Bim in apoptosis of normal and Bcr-Abl-expressing hematopoietic progenitors" *Mol Cell Biol*, **24**:6172-6183, 2004.
 - 20) Kikuchi, J., Mimuro, J., Ogata, K., Tabata, T., Ueda, Y., Ishiwata, A., Kimura, K., Takano, K., Madoiwa, S., Mizukami, H., Hanazono, Y., Kume, A., Hasegawa, M., Ozawa, K. & Sakata, Y.: "Sustained transgene expression by human cord blood derived CD34+ cells transduced with simian immunodeficiency virus agmTYO1-based vectors carrying the human coagulation factor VIII gene in NOD/SCID mice" *J Gene Med*, **6**:1049-1060, 2004.
 - 21) Kikuchi, S., Muroi, K., Takahashi, S., Kawano-Yamamoto, C., Takatoku, M., Miyazato, A., Nagai, T., Mori, M., Komatsu, N. & Ozawa, K.: "Severe hepatitis and complete molecular response caused by imatinib mesylate: possible association of its serum concentration with clinical outcomes" *Leuk Lymphoma*, **45**:2349-2351, 2004.
 - 22) Kanazawa, T., Mizukami, H., Nishino, H., Okada, T., Hanazono, Y., Kume, A., Kitamura, K., Ichimura, K. & Ozawa, K.: "Topoisomerase inhibitors enhance the cytotoxic effect of AAV-HSVtk/ganciclovir on head and neck cancer cells" *Int J Oncol*, **25**:729-735, 2004.
 - 23) Hara, T., Kume, A., Hanazono, Y., Mizukami, H., Okada, T., Tsurumi, H., Moriwaki, H., Ueda, Y., Hasegawa, M. & Ozawa, K.: "Expansion of genetically corrected neutrophils in chronic granulomatous disease mice by cotransferring a therapeutic gene and a selective amplifier gene" *Gene Ther*, **11**:1370-1377, 2004.
- 加納康彦
- 1) 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.
 - 2) Mori, K., Kamiyama, Y., Kondo, T., Kano, Y. & Tominaga, K.: "Phase II study of the combination of vinorelbine and cisplatin in advanced non-small-cell lung cancer" *Cancer Chemother Pharmacol*, **53**:129-132, 2004.
 - 3) Sutheesophon, K., Nishimura, N., Kobayashi, Y., Furukawa, Y., Kawano, M., Itoh, K., Kano, Y. & Ishii, H.: "Involvement of the tumor necrosis factor (TNF)/TNF receptor system in leukemic cell apoptosis induced by histone deacetylase inhibitor depsipeptide (FK228)" *J Cell Physiol*, 2004.
- H. 知的財産権の出願・登録状況
 国際公開番号：PCT/WO97/34007・発明者：間野博行・名称「PROMOTER」・出願人：間野博行、株式会社 DNAVEC 研究所・公開日：1997年9月18日

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

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

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

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

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

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チップによる急性白血病の新規分類法提案」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：我々は広く白血病患者骨髄より造血幹細胞相当分画のみを純化し保存する「Blast Bank」を設立した。同バンクに既に保存された600例を越えるサンプルの中から、急性骨髄性白血病99例について、全ヒト遺伝子の発現量解析をDNAチップを用いて行った。得られた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。

A 研究目的

現在なお正確な診断が困難であり、かつ有効な治療法の存在しない白血病類縁疾患が数多くある。各患者の有効な治療法を選択する上でも正確な鑑別診断は必須であり、そのためには新たな分子診断マーカーの同定が最も重要であると考えられる。DNAチップは数千-数万の遺伝子発現変化を簡便に解析可能にする最新の研究システムであり、上述の目的に適したスクリーニング法であると期待される。

我々は白血病などの特発性血液疾患の多くが造血幹細胞（あるいはその近傍）の異常に起因することに着目し、これら疾患患者のフレッシュ検体より造血幹細胞相当分画のみを純化しストックするバンク事業「Blast Bank」をスタートした。本バンク細胞を用いてDNAチップ解析を行うことで、(1)白血病の鑑別診断に有効な遺伝子マーカーの同定、(2)白血病の薬剤感受性に関与する遺伝子マーカーの同定、(3)病期が進行する白血病類縁疾患の病期特異的分子マーカーの同定、等を本研究計画で目指した

B 研究方法

上記検体群を用いて以下のようにDNAチップ解析を行った。細胞よりトータルRNAを抽出し、これをT7 RNAポリメラーゼを用いてまずin vitroにて増幅した。さらにこれをもとに二本鎖cDNAを合成し、ピオチンCTPの存在下で再びT7 RNAポリメラーゼと反応させることで、ピオチン標識化

したcomplementary RNA (cRNA) を作製した。このピオチン化cRNAをDNAチップとハイブリダイズさせ、洗浄後、蛍光色素PE結合アビジンと反応させた。このDNAチップ上のcRNA結合スポットをAffymetrix社の蛍光スキャナーで励起させ、各スポットの蛍光強度を測定した後統計処理をGeneSpring 7.0 (Silicon Genetics社)にて行った。

(倫理面への配慮)

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

C 研究結果

1) 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。
 2) 慢性期ATL患者19例、急性期ATL患者22例の末梢血よりCD4陽性分画のみを純化保存するプロジェクトを行った。得られた純化ATL細胞をAffymetrix社HGU133マイクロアレイによって解析する事でATLの世界最大の遺伝子発現データベースを構築した。本データベースを用いて急性期特異的な発現を示す遺伝子セットを抽出したところhepatocyte growth-factor (HGF)の受容体であるMET遺伝子が同定された。しかも患者血漿中のHGF濃度を測定したところ、慢性期、急性期共にATL患者においてHGF濃度が亢進している事が確認された。以上よりATLの病期進展機構としてHGF-MET系の活性化の存在が示唆された。

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「発現量から統計的に有意に診断」を可能にする遺伝子群の抽出に成功し、カスタムDNAチップによる診断法の可能性を示した。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.*, 2004.

H. 知的財産権の出願・登録状況

国際公開番号：PCT/WO97/34007・発明者：間野博行・名称「PROMOTER」・出願人：間野博行、株式会社 DनावेC 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・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チップによる急性白血病の新規分類法提案」に関する研究

分担研究者： 小澤 敬也 自治医科大学医学部 教授

研究要旨：DNAチップを用いることで数千～数万の遺伝子に関する発現変化を比較的簡便に解析することが可能となり、これまでは鑑別診断が困難であった血液疾患の診断に役立つ新たな分子マーカーが同定されると期待される。しかしDNAチップはあまりに高感度な検査法であるため、異なった白血病患者の骨髄細胞全体を比べるような単純な解析を行うと、両患者の「骨髄中の構成細胞の違い」を反映した偽陽性結果を得ることになる。我々は白血病などの特発性血液疾患の多くが造血幹細胞（あるいはその近傍）の異常に起因することに着目し、これら疾患患者のフレッシュ検体より造血幹細胞相当分画のみを純化しストックするバンク事業「Blast Bank」をスタートした。現在まで既に600例を越えるサンプルの保存に成功しており、本バンク細胞を用いた大規模DNAチップ解析によって、白血病の新規鑑別診断マーカー遺伝子の同定に成功しただけでなく、白血病病期進展機構に関わるシグナル分子等の同定にも成功した。

A 研究目的

現在なお正確な診断が困難であり、かつ有効な治療法の存在しない白血病類縁疾患が数多くある。各患者の有効な治療法を選択する上でも正確な鑑別診断は必須であり、そのためには新たな分子診断マーカーの同定が最も重要であると考えられる。DNAチップは数千～数万種類の遺伝子発現変化を簡便に解析可能にする最新の研究システムであり、上述の目的に適したスクリーニング法であると期待される。

我々は白血病などの特発性血液疾患の多くが造血幹細胞（あるいはその近傍）の異常に起因することに着目し、これら疾患患者のフレッシュ検体より造血幹細胞相当分画のみを純化しストックするバンク事業「Blast Bank」をスタートした。本バンク細胞を用いてDNAチップ解析を行うことで、疾患の種類に拘わらず分化レベルがほぼ均一な細胞群を比較することが可能になり、疾患の病態解明に有用な知見が得られると期待された。

また同様な解析法を成人T細胞性白血病（ATL）などに対しても行った。これらの膨大な知見を元に、白血病関連疾患の診断用カスタムDNAチップの開発、および新規分指標的療法の開発を行う。

B 研究方法

1) 造血幹細胞特異的マーカーであるAC133に対するアフィニティカラムを用いて、白血

病を含む各種特発性血液疾患患者骨髄より造血幹細胞分画を純化保存し、これをBlast Bankと名付けた。平成17年3月現在で600例を越えるサンプルの保存に成功しており、これは純化細胞を用いたゲノミクスプロジェクトとしては世界最大級である。

2) ATLの病期進展機構解明を目的として、ATL患者末梢血よりCD4陽性ATL細胞のみを純化保存するATL Bankも行い60例を越えるサンプルの保存に成功した。またコントロールサンプルとして健常者末梢血よりCD4陽性T細胞分画を純化し、一部をPHAにて刺激した。（倫理面への配慮）

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

C 研究結果

平成11年8月よりBlast Bankを立ち上げ既に600例を越えるサンプルのストックに成功した。現在本バンク中に130例を超える急性骨髄性白血病（AML）幹細胞サンプルが保存されており、世界的にも極めて貴重なリソースとなっている。これらBlast Bank分画を用いた解析が旧来の骨髄単核球全体を用いたものに比べ実際に偽陽性データが少ないこと、またバンクに用いるAC133陽性細胞がこれら疾患の責任クローンを含むことなども既に確認している。

慢性期ATL患者19例、急性期ATL患者22

例の末梢血よりCD4陽性分画のみを純化保存するプロジェクトを行った。得られた純化ATL細胞をAffymetrix社HGU133マイクロアレイによって解析する事でATLの世界最大の遺伝子発現データベースを構築した。本データベースを用いて急性期特異的な発現を示す遺伝子セットを抽出したところ hepatocyte growth-factor (HGF)の受容体であるMET遺伝子が同定された。しかも患者血漿中のHGF濃度を測定したところ、慢性期、急性期共にATL患者においてHGF濃度が亢進している事が確認された。以上よりATLの病期進展機構としてHGF-MET系の活性化の存在が示唆された。

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「発現量から統計的に有意に診断」を可能にする遺伝子群の抽出に成功し、カスタムDNA チップによる診断法の可能性を示した。

F. 健康危険情報

無し

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Takei, Y., Mizukami, H., Saga, Y., Kobayashi, H., Suzuki, M., Matsushita, T. & Ozawa, K.: "Overexpression of a hybrid gene consisting of the amino-terminal fragment of urokinase and carboxyl-terminal domain of bikunin suppresses invasion and migration of human ovarian cancer cells in vitro" *Int J Cancer*, **113**:54-58, 2005.
- 2) Yoshioka, T., Okada, T., Maeda, Y., Ikeda, U., Shimpo, M., Nomoto, T., Takeuchi, K., Nonaka-Sarukawa, M., Ito, T., Takahashi, M., Matsushita, T., Mizukami, H., Hanazono, Y., Kume, A., Ookawara, S., Kawano, M., Ishibashi, S., Shimada, K. & Ozawa, K.: "Adeno-associated virus vector-mediated interleukin-10 gene transfer inhibits atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice" *Gene Ther*, **11**:1772-1779, 2004.
- 3) Ueda, K., Hanazono, Y., Shibata, H., Ageyama, N., Ueda, Y., Ogata, S., Tabata, T., Nagashima, T., Takatoku, M., Kume, A., Ikehara, S., Taniwaki, M., Terao, K., Hasegawa, M. & Ozawa, K.: "High-level in vivo gene marking after gene-modified autologous hematopoietic stem cell transplantation without marrow

conditioning in nonhuman primates" *Mol Ther*, **10**:469-477, 2004.

- 4) Uchida, M., Watanabe, T., Kunitama, M., Mori, M., Kikuchi, S., Yoshida, K., Kirito, K., Nagai, T., Ozawa, K. & Komatsu, N.: "Erythropoietin overcomes imatinib-induced apoptosis and induces erythroid differentiation in TF-1/bcr-abl cells" *Stem Cells*, **22**:609-616, 2004.
- 5) Tarumoto, T., Nagai, T., Ohmine, K., Miyoshi, T., Nakamura, M., Kondo, T., Mitsugi, K., Nakano, S., Muroi, K., Komatsu, N. & Ozawa, K.: "Ascorbic acid restores sensitivity to imatinib via suppression of Nrf2-dependent gene expression in the imatinib-resistant cell line" *Exp Hematol*, **32**:375-381, 2004.
- 6) Takeda, S., Takahashi, M., Mizukami, H., Kobayashi, E., Takeuchi, K., Hakamata, Y., Kaneko, T., Yamamoto, H., Ito, C., Ozawa, K., Ishibashi, K., Matsuzaki, T., Takata, K., Asano, Y. & Kusano, E.: "Successful gene transfer using adeno-associated virus vectors into the kidney: comparison among adeno-associated virus serotype 1-5 vectors in vitro and in vivo" *Nephron Exp Nephrol*, **96**:e119-126, 2004.
- 7) Takatoku, M., Muroi, K., Kawano-Yamamoto, C., Nagai, T., Komatsu, N. & Ozawa, K.: "Involvement of the esophagus and stomach as a first manifestation of varicella zoster virus infection after allogeneic bone marrow transplantation" *Intern Med*, **43**:861-864, 2004.
- 8) Sato, K., Mori, M., Meguro, A., Miyoshi, T., Nagai, T., Muroi, K., Komatsu, N. & Ozawa, K.: "[Minor bcr/abl positive acute lymphoblastic leukemia preceded by knee joint pain due to bone marrow necrosis]" *Rinsho Ketsueki*, **45**:1203-1207, 2004.
- 9) Sasaki, K., Inoue, M., Shibata, H., Ueda, Y., Muramatsu, S.I., Okada, T., Hasegawa, M., Ozawa, K. & Hanazono, Y.: "Efficient and stable Sendai virus-mediated gene transfer into primate embryonic stem cells with pluripotency preserved" *Gene Ther*, 2004.
- 10) Ozawa, K.: "[Development and application of gene therapy technologies]" *Uirusu*, **54**:49-57, 2004.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

「白血病株化細胞に対する Farnesyltransferase inhibitor R115777 と抗白血病薬の併用効果について」に関する研究

分担研究者： 加納康彦
栃木県立がんセンター 副病院長

研究要旨：ヒト造血器腫瘍において高頻度にみられる遺伝子異常として Ras の活性化がある。この活性化には farnesyltransferase による farnesyl 化が必須であり、この酵素を阻害する farnesyltransferase inhibitors (FTI) が分子標的薬として開発された。FTI は当初、活性化 Ras 蛋白の抑制にのみ働くと考えられていたが、Ras 活性化変異と FTI の抗腫瘍効果が必ずしも一致せず、現在では Ras 以外にもいくつかの標的分子が存在すると考えられている。R115777 は FTI のひとつで臨床試験において、血液悪性腫瘍に対し、ある一定の抗腫瘍効果を示し、現在、他の抗がん剤との併用臨床試験が進行中である。しかし、基礎併用実験は殆ど行われていない。我々は白血病細胞を用いて、R115777 と抗白血病薬との併用効果について検討を行った。

A 研究目的

ヒト造血器腫瘍において高頻度にみられる遺伝子異常として Ras の活性化がある。この活性化には farnesyltransferase による farnesyl 化が必須であり、この酵素を阻害する farnesyltransferase inhibitors (FTI) が分子標的薬として開発された。FTI は当初、活性化 Ras 蛋白の抑制にのみ働くと考えられていたが、Ras 活性化変異と FTI の抗腫瘍効果が必ずしも一致せず、現在では Ras 以外にもいくつかの標的分子が存在すると考えられている。R115777 は FTI のひとつで臨床試験において、血液悪性腫瘍に対し、ある一定の抗腫瘍効果を示し、現在、他の抗がん剤との併用臨床試験が進行中である。しかし、基礎併用実験は殆ど行われていない。我々は白血病細胞を用いて、R115777 と抗白血病薬との併用効果について検討を行った。

B 研究方法

株化細胞：ヒト白血病株化細胞として、MOLT-3 (T-cell ALL)、HL-60 (APL)、U937 (AMoL) を用いた。
抗がん剤：R115777 の併用薬として cytarabine、doxorubicin、idarubicin、mitoxantrone、etoposide、F-ara-A (fludarabine の活性化体)、gemcitabine、4-hydroperoxy cyclophosphamide (cyclophosphamide の活性化体)、

methotrexate、mitoxantrone、SN-38 (irinotecan の活性化体)、vincristine、vinblastine 及び paclitaxel を用いた。

培養：ヒト白血病株化細胞を R115777 と他剤の存在下で4日間培養し、MTT assay で dose-response curve を得、IC₈₀ における併用効果を isobologram (Steel and Peckham) で分析した。

(倫理面への配慮)

一般に使用されている株化細胞を用いた実験のため不要。

C 研究結果

R115777 の MOLT-3, U937, HL-60 に対する IC₈₀ は各々 0.34, 2.7, 6.5 μM であった。これらの細胞による併用実験では、R115777 は cytarabine、doxorubicin、idarubicin、mitoxantrone、etoposide、fludarabine、gemcitabine、4-hydroperoxy cyclophosphamide、mitoxantrone 及び SN-38 と相加作用、methotrexate と拮抗作用を示した。一方、vincristine、vinblastine、paclitaxel を用いた併用実験では、相乗作用を示した。

D&E 考察及び結論

私達は、R115777 について他剤との併用効果を3種のヒト白血病株化細胞と用いて検討した。R115777 に対する感受性は細胞によりかなり異なった。しかし、R115777

と他の抗がん剤との併用効果について調べてみると、殆ど差を認めなかった。すなわち、いずれの細胞を用いても R115777 は cytarabine、doxorubicin、idarubicin、mitoxantrone、etoposide、fludarabine、gemcitabine、4-hydroperoxy cyclophosphamide、mitoxantrone 及び SN-38 と相加作用、vincristine、vinblastine、paclitaxel と相乗作用、methotrexate と拮抗作用を示した。この結果から臨床において R115777 は methotrexate を除くすべての薬剤との併用において優れた抗腫瘍効果が期待される。特に R115777 は vinca alkaloids 及び paclitaxel と相乗的に働くことから、臨床的に同時併用を試みる価値がある。私たちの今までの分析では vinca alkaloids 及び paclitaxel は、同時併用において殆どの抗がん剤と相加、ないし拮抗作用を示しており、R115777 との併用で相乗作用を示すことは、興味ある発見である。しかし、相乗的に働く機序は不明であり、さらに詳細な検討が必要である。

F. 健康危険情報

無し

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Sutheesophon K, Nishimura N, Kobayashi Y, Furukawa Y, Kawano M, Itoh K, Kano Y, Ishii H, Furukawa Y. Involvement of the tumor necrosis factor (TNF)/TNF receptor system in leukemic cell apoptosis induced by histone deacetylase inhibitor depsipeptide (FK228). *J Cell Physiol.* 2004 Oct 28; [Epub ahead of print]

2) 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 Dec; **54**(6):505-13.

3) Kawano T, Horiguchi-Yamada J, Saito S, Iwase S, Furukawa Y, Kano Y, Yamada H. Ectopic cyclin D1 expression blocks STI571-induced erythroid differentiation of K562 cells. *Leuk Res.* 2004 Jun; **28**(6):623-9.

4) Mori K, Kamiyama Y, Kondo T, Kano Y, Tominaga K. Phase II study of the combination of vinorelbine and cisplatin in advanced non-small-cell lung cancer. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2004 Feb; **53**(2):129-32.

5) Kawano T, Horiguchi-Yamada J, Iwase S, Furukawa Y, Kano Y, Yamada H. Inactivation of ERK accelerates erythroid differentiation of K562 cells induced by herbimycin A and STI571 while activation of MEK1 interferes with it. *Mol Cell Biochem.* 2004 Mar; **258**(1-2):25-33.

6) Ueda M, Ota J, Yamashita Y, Choi YL, Ohki R, Wada T, Koinuma K, Kano Y, Ozawa K, Mano H. DNA microarray analysis of stage progression mechanism in myelodysplastic syndrome. *Br J Haematol.* 2003 Oct; **123**(2):288-96.

H. 知的財産権の出願・登録状況 なし

研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Choi, Y.L., Moriuchi, R., Osawa, M., Iwama, A., Makishima, H., Wada, T., Kisanuki, H., Kaneda, R., Ota, J., Koinuma, K., Ishikawa, M., Takada, S., Yamashita, Y. & Mano, H.	Retroviral expression screening of oncogenes in natural killer cell leukemia	Leuk. Res.		in press	2005
Tsutsumi, C., Ueda, M., Miyazaki, Y., Yamashita, Y., Choi, Y.L., Ota, J., Kaneda, R., Koinuma, K., Fujiwara, S., Kisanuki, H., Ishikawa, M., Ozawa, K., Tomonaga, M. & Mano, H.	DNA microarray analysis of dysplastic morphology associated with acute myeloid leukemia	Exp. Hematol		32 828-835	2004
Choi, Y.L., Makishima, H., Ohashi, J., Yamashita, Y., Ohki, R., Koinuma, K., Ota, J., Isobe, Y., Ishida, F., Oshimi, K. & Mano, H.	DNA microarray analysis of natural killer cell-type lymphoproliferative disease of granular lymphocytes with purified CD3(-)CD56(+) fractions	Leukemia		18 556-565	2004
Koinuma, K., Shitoh, K., Miyakura, Y., Furukawa, T., Yamashita, Y., Ota, J., Ohki, R., Choi, Y.L., Wada, T., Konishi, F., Nagai, H. & Mano, H.	Mutations of BRAF are associated with extensive hMLH1 promoter methylation in sporadic colorectal carcinomas	Int. J. Cancer		108 237-242	2004
Kaneda, R., Toyota, M., Yamashita, Y., Koinuma, K., Choi, Y.L., Ota, J., Kisanuki, H., Ishikawa, M., Takada, S., Shimada, K. & Mano, H.	High-throughput screening of genome fragments bound to differentially acetylated histones	Genes Cells		9 1167-1174	2004
Ohki-Kaneda, R., Ohashi, J., Yamamoto, K., Ueno, S., Ota, J., Choi, Y.L., Koinuma, K., Yamashita, Y., Misawa, Y., Fuse, K., Ikeda, U., Shimada, K. & Mano, H.	Cardiac function-related gene expression profiles in human atrial myocytes	Biochem. Biophys. Res. Commun.		320 1328-1336	2004
Ohki, R., Yamamoto, K., Ueno, S., Mano, H., Misawa, Y., Fuse, K., Ikeda, U. & Shimada, K.	Transcriptional profile of genes induced in human atrial myocardium with pressure overload	Int. J. Cardiol		96 381-387	2004
Kano, Y., Akutsu, M., Tsunoda, S., Jzumi, 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
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
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
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
Takei, Y., Mizukami, H., Saga, Y., Kobayashi, H., Suzuki, M., Matsushita, T. & Ozawa, K.	Overexpression of a hybrid gene consisting of the amino-terminal fragment of urokinase and carboxyl-terminal domain of bikunin suppresses invasion and migration of human ovarian cancer cells in vitro	Int J Cancer		113 54-58	2005
Yoshioka, T., Okada, T., Maeda, Y., Ikeda, U., Shimpo, M., Nomoto, T., Takeuchi, K., Nonaka-Sarukawa, M., Ito, T., Takahashi, M., Matsushita, T., Mizukami, H., Hanazono, Y., Kume, A., Okawara, S., Kawano, M., Ishibashi, S., Shimada, K. & Ozawa, K.	Adeno-associated virus vector-mediated interleukin-10 gene transfer inhibits atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice	Gene Ther		11 1772-1779	2004
Ueda, K., Hanazono, Y., Shibata, H., Ageyama, N., Ueda, Y., Ogata, S., Tabata, T., Nagashima, T., Takatoku, M., Kume, A., Ikehara, S., Taniwaki, M., Terao, K., Hasegawa, M. & Ozawa, K.	High-level in vivo gene marking after gene-modified autologous hematopoietic stem cell transplantation without marrow conditioning in nonhuman primates	Mol Ther		10 469-477	2004
Tanamoto, T., Nagai, T., Ohmine, K., Miyoshi, T., Nakamura, M., Kondo, T., Mitsugi, K., Nakano, S., Muroi, K., Komatsu, N. & Ozawa, K.	Ascorbic acid restores sensitivity to imatinib via suppression of Nrf2-dependent gene expression in the imatinib-resistant cell line	Exp Hematol		32 375-381	2004

Okada, T., Caplen, N.J., Ramsey, W.J., Onodera, M., Shimazaki, K., Nomoto, T., Ajalli, R., Wildner, O., Morris, J., Kume, A., Hamada, H., Blaese, R.M. & Ozawa, K.	In situ generation of pseudotyped retroviral progeny by adenovirus-mediated transduction of tumor cells enhances the killing effect of HSV-tk suicide gene therapy in vitro and in vivo	J Gene Med	6	288-299	2004
Ogata, K., Mimuro, J., Kikuchi, J., Tabata, T., Ueda, Y., Naito, M., Madoiwa, S., Takano, K., Hasegawa, M., Ozawa, K. & Sakata, Y.	Expression of human coagulation factor VIII in adipocytes transduced with the simian immunodeficiency virus agmTYO1-based vector for hemophilia A gene therapy	Gene Ther	11	253-259	2004
Mochizuki, S., Mizukami, H., Ogura, T., Kure, S., Ichinohe, A., Kojima, K., Matsubara, Y., Kobayashi, E., Okada, T., Hoshika, A., Ozawa, K. & Kume, A.	Long-term correction of hyperphenylalaninemia by AAV-mediated gene transfer leads to behavioral recovery in phenylketonuria mice	Gene Ther	11	1081-1086	2004
Mizukami, H., Okada, T., Ogasawara, Y., Matsushita, T., Urabe, M., Kume, A. & Ozawa, K.	Separate control of Rep and Cap expression using mutant and wild-type loxP sequences and improved packaging system for adeno-associated virus vector production	Mol Biotechnol	27	7-14	2004
Mimuro, J., Mizukami, H., Ono, F., Madoiwa, S., Terao, K., Yoshioka, A., Ozawa, K. & Sakata, Y.	Specific detection of human coagulation factor IX in cynomolgus macaques" J Thromb Haemost	J Thromb Haemost	2	275-280	2004
Matsushita, T., Okada, T., Inaba, T., Mizukami, H., Ozawa, K. & Colosi, P	The adenovirus E1A and E1B19K genes provide a helper function for transfection-based adeno-associated virus vector production	J Gen Virol	85	2209-2214	2004
Kuribara, R., Honda, H., Matsui, H., Shinjo, T., Inukai, T., Sugita, K., Nakazawa, S., Hirai, H., Ozawa, K. & Inaba, T.	Roles of Bim in apoptosis of normal and Bcr-Abl-expressing hematopoietic progenitors	Mol Cell Biol	24	6172-6183	2004
Kikuchi, J., Mimuro, J., Ogata, K., Tabata, T., Ueda, Y., Ishiwata, A., Kimura, K., Takano, K., Madoiwa, S., Mizukami, H., Hanazono, Y., Kume, A., Hasegawa, M., Ozawa, K. & Sakata, Y.	Sustained transgene expression by human cord blood derived CD34+ cells transduced with simian immunodeficiency virus agmTYO1-based vectors carrying the human coagulation factor VIII gene in NOD/SCID mice	J Gene Med	6	1049-1060	2004
Kikuchi, S., Muroi, K., Takahashi, S., Kawano-Yamamoto, C., Takatoku, M., Miyazato, A., Nagai, T., Mori, M., Komatsu, N. & Ozawa, K.	Severe hepatitis and complete molecular response caused by imatinib mesylate: possible association of its serum concentration with clinical outcomes	Leuk Lymphoma	45	2349-2351	2004
Kanazawa, T., Mizukami, H., Nishino, H., Okada, T., Hanazono, Y., Kume, A., Kitamura, K., Ichimura, K. & Ozawa, K.	Topoisomerase inhibitors enhance the cytotoxic effect of AAV-HSVtk/ganciclovir on head and neck cancer cells	Int J Oncol	25	729-735	2004
Toyo-Oka, T., Kawada, T., Nakata, J., Xie, H., Urabe, M., Masui, F., Ebisawa, T., Tazuka, A., Iwasawa, K., Nakajima, T., Uehara, Y., Kumagai, H., Kostin, S., Schaper, J., Nakazawa, M., Ozawa, K.	Translocation and cleavage of myocardial dystrophin as a common pathway to advanced heart failure: A scheme for the progression of cardiac dysfunction	PNAS	101	7381-7385	2004
Nagashima, T., Ueda, Y., Hanazono, Y., Kume, A., Shibata, H., Ageyama, N., Terao, K., Ozawa, K., Hasegawa, M.	In vivo expansion of gene-modified hematopoietic cells by a novel selective amplifier gene utilizing the erythropoietin receptor as a molecular switch	J Gene Medicine	6	22-31	2004
Mori, K., Kamiyama, Y., Kondo, T., Kano, Y., Tominaga, K.	Phase II study of the combination of vinorelbine and cisplatin in advanced non-small-cell lung cancer	Cancer Chemother Pharmacol	53	129-132	2004
Kawano, T., Horiguchi-Yamada, J., Saito, S., Iwase, S., Furukawa, Y., Kano, Y., Yamada, H.	Ectopic cyclin D1 expression blocks ST1571-induced erythroid differentiation of K562 cells	Leukemia Research	28	623-629	2004
Kawano, T., Horiguchi-Yamada, J., Iwase, S., Furukawa, Y., Kano, Y., Yamada, H.	Inactivation of ERK accelerates erythroid differentiation of K562 cells induced by herbimycin A and ST1571 while activation of MEK1 interferes with it	Molecular and Cellular Biochemistry	258	25-34	2004
Sutheesophon, K., Nishimura, N., Kobayashi, Y., Furukawa, Y., Kawano, M., Itoh, K., Kano, Y., Ishii, H., Furukawa, Y.	Involvement of the tumor necrosis factor (TNF)/TNF receptor system in leukemic cell apoptosis induced by histone deacetylase inhibitor depsipeptide (FK228)	J Cell Physiol			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,
Yōung Lim Choi^c, Jun Ota^{c,d}, Ruri Kaneda^c, Koji Koinuma^c, Shin-ichiro Fujiwara^{b,c},
Hiroyuki Kisanuki^c, Madoka Ishikawa^c, Keiya Ozawa^b, Masao Tomonaga^a, and Hiroyuki Mano^{c,d}

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Patients and methods

Purification of AC133⁺ cells

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

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

DNA microarray analysis

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

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

Statistical analysis

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

Results

Comparison of AML-MLD and MDS-related AML

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

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

Table 1. Patient characteristics

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

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

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

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

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

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

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

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

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