

厚生労働科学研究研究費補助金

ヒトゲノム・再生医療等研究事業

「高齢者特発性造血障害の大規模ゲノミクス解析に
よる病態解明」に関する研究

平成17年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 間野 博行

平成18(2006)年4月

目 次

I.	総括研究報告書	
	「高齢者特発性造血障害の大規模ゲノミクス解析による病態解明」に関する研究	
	自治医科大学・医学部・ゲノム機能研究部 間野博行 -----	1
II.	分担研究報告	
1.	「高齢者特発性造血障害の大規模ゲノミクス解析による病態解明」に関する研究	
	自治医科大学・医学部・ゲノム機能研究部 間野博行 -----	6
2.	「プロテオーム解析による骨髄異形成症候群の病態解明」に関する研究	
	東京女子医科大学・血液内科 寺村正尚 -----	8
3.	「ヒト血液細胞におけるプロテオミクスに関する基礎検討」に関する研究	
	国立国際医療センター研究所・血液疾患研究部 湯尾明-----	10
III.	研究成果の刊行に関する一覧表 -----	12
IV.	研究成果の刊行物・別冊 -----	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、異なった造血障害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 700 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、様々な臨床データに発現量が連関する遺伝子セットを抽出することに成功した。さらに本サンプルを用いて SNP タイピング用 DNA マイクロアレイにハイブリダイズさせることにより、骨髓異形成候群の染色体ゲノムの微細な量異常を解析することができた。

分担研究者

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

症候群の病態解明、診断及び治療法の開発は血液内科学に限らず今日の医学研究の急務の一つであるといえる。

ヒトゲノムプロジェクトの結果得られた遺伝子情報を元に DNA チップなどを用いた疾患解析が可能となってきた。しかし単純に患者骨髓細胞を用いて DNA チップによる比較を行った場合、各個人間の骨髓構成細胞のポピュレーションの違いが大きい「偽陽性」な結果を得ることが殆どである。そこで真に骨髓異形成症候群の臨床にフィードバック可能な情報を得るため、我々は本研究計画において骨髓異形成症候群を含めた各種血液疾患患者より、疾患の種類によらず分化レベルがほぼ均一である造血幹細胞分画のみを大規模に収集する造血幹細胞バンク「Blast Bank」を設立する。これら純化した造血幹細胞間で DNA チップ解析及びプロテオミクス解析を行うことによって、偽陽性の極めて少ない効率的なゲノミクス解析が可能になり、世界に先駆けた病態解明が行われると期待される。本研究計画の具体的な目標として、骨髓異形成症候群の(1)分子診断、(2)発症機構の解明、(3)薬剤耐性獲得機構の解析、及び(4)新たなアプローチによる治療法の開発を目指す。

A 研究目的

骨髓異形成症候群 (MDS) は赤血球を含む各種血球の慢性減少を特徴とする疾患であり、白血球減少に伴う感染症に対する治療や、赤血球・血小板の減少に対する成分輸血をしばしば必要とする。本症は末梢血中の血球減少にもかかわらず患者骨髓中の造血細胞数はむしろ正常～増加することが多く、「無効造血」と呼ばれる特徴的な病態を呈する。骨髓異形成症候群は造血幹細胞のクローン性異常に起因すると考えられているが、その具体的な分子メカニズムは未だ全く不明のままである。本疾患の年間発症率は人口 10 万人あたり 60 歳台で約 10 人、80 歳台で約 100 人と高齢化に伴い急速に上昇し、本邦における高齢者の主要な血液疾患の一つとなっている。治療法も他家骨髓移植以外に有効な方法が無く、発症時の年齢から骨髓移植の適応外であることが殆どである。さらに本疾患の一部は急性白血病へと移行する事が知られており、骨髓異形成症候群から移行した白血病の多くは薬剤耐性である。したがって今後の本邦人口のさらなる高齢化を考慮すると、骨髓異形成

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

2) 上記検体群を用いて以下のように DNA チップ解析を行った。細胞よりトータル RNA を抽出

し、これをT7 RNAポリメラーゼを用いてまず *in vitro* にて増幅した。さらにこれをもとに二本鎖 cDNA を合成し、ビオチン CTP の存在下で再び T7 RNA ポリメラーゼと反応させることで、ビオチン標識化した complementary RNA (cRNA) を作製した。このビオチン化 cRNA を DNA チップとハイブリダイズさせ、洗浄後、蛍光色素 PE 結合アピジンと反応させた。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。

3) 研究方法としては、MDS 患者および正常人の末梢血よりデキストラン法を用いて好中球を分離した。その細胞より蛋白質を抽出した後、二次元電気泳動を行った。両者の泳動パターンを解析ソフト (Ettan progenesis) で解析した。発現量に差が認められるスポットの質量分析を MALDI-TOF/TOF MS を用いて行い、その蛋白質についてペプチドデータベース (MASCOT) を用いて同定した。また、同定した蛋白質の好中球における遺伝子発現についてリアルタイム PCR 法を用いて検討し、さらにその細胞内局在を免疫細胞染色により検討した。

4) ヒト白血病細胞株は、HL-60 を用いた。この細胞株は、以前の研究成果により、トランスフェリン添加無血清培地の中で数日間培養することによりマクロオートファジー (アズール顆粒を含む自食空胞を細胞質に多数有する状態) を起こすことが明らかになっている。この様な状態の細胞に対して、インスリンを添加すると4時間で自食空胞が完全に消失して、細胞質にはアズール顆粒が戻り、ほぼ正常な形態に戻る。従って、この様な現象の機序として、インスリン添加1時間後の状態を添加後として解析した。

所定の方法によって細胞を可溶化して細胞内蛋白質を抽出した後に、アマーシャム社製の二次元電気泳動装置 (1次元目は等電点電気泳動、2時限目は SDS-PAGE) によって蛋白質を分離した。分離した蛋白質は、シプロルビー染色 (パイラッド社) によりスポットとして描出された。インスリン添加前と後の2検体間でどのスポットが有意さを持って変化しているかを、専用の解析ソフト (PDQuest) で解析した。

(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700例を超えるサンプルのストックに成功した。現在本バンク中に130例を超える MDS および急性骨髄性白血病 (AML) サンプルが保存されており、世界的にも極めて貴重なリソースとなっている。これら Blast Bank 分画を用いた解析が旧来の骨髄単核球全体を用いたものに比べ実際に偽陽性データが少ないこと、またバンクに用いる AC133 陽性細胞がこれら疾患の責任クローンを含むことなども既に確認している

2) さらに SNP タイピング用 DNA マイクロアレイを用いた患者検体ゲノム DNA の定量プロジェクトも行った。MDS および MDS 由来白血病の骨髄細胞を用いてゲノム DNA を抽出し、Affymetrix 100K SNP タイピングアレイ、HG133 Plus 2.0 アレイ および Agilent CGH44A アレイ それぞれに DNA をハイブリダイズさせた。得られたデータより、MDS サンプルの微細なゲノム DNA 量変化を明らかにすることができた。

3) MDS 患者と正常者の末梢血好中球由来の蛋白質の泳動パターンを解析ソフトで解析したところ、MDS において明らかに高発現しているスポットが認められた。そのうちの2つは CapG および Thiol-specific antioxidant protein (TSA) であった。MDS 好中球では正常好中球と比し、リン酸化 CapG が低下していた。また、MDS 好中球における CapG の細胞内局在について抗 CapG 抗体を用いて免疫染色し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて検討した。その結果、正常人好中球のほとんどは細胞質優位に細胞質および核内に存在していたのに対し、MDS では核内優位に強く発現している好中球が高頻度に認められた。

4) HL-60 の質量分析パターンを Mascot ソフトウェアで解析した結果、増加した蛋白質は CLIC1、Rho-GDI-2、GST-pi であり、減少したスポットはいずれも SRp20 であった。これらの蛋白質のうち、Rho-GDI-2 と GST-pi はいずれもインスリンのシグナル伝達に関与することが報告されていたので、報告のない CLIC1 と SRp20 を研究の対象とした。まず、Mascot 解析の結果を確認するために二次元電気泳動によるイムノプロットを行ったところ、それぞれのスポットが CLIC1 と SRp20 の特異的な抗体でいずれも陽性に染色され、確認された。最後に、1次元の通常のイムノプロットにおいて CLIC1 と SRp20 の増減を確認した。CLIC1 の増加は1次元のイムノプロットでは再現できず、二次元電気泳動における蛋白質抽出時において可溶性の異なる画分への移動によると考えられた、実際に、CLIC1 はインスリン刺激前後で免疫染色による細胞内分布が異なっていた。一方、SRp20

の減少は再現され、この減少はプロテアソーム阻害剤によって阻害され、インスリン添加後のプロテアソームによる分解と考えられた。

D&E. 考察及び結論

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

F. 健康危険情報

無し

G. 研究発表

1. 論文発表

間野博行

- 1) Takada S, Ota J, Kansaku N, Yamashita H, Izumi T, Ishikawa M, Wada T, Kaneda R, Choi YL, Koinuma K, Fujiwara S, Aoki H, Kisanuki H, Yamashita Y & Mano, H "Nucleotide sequence and embryonic expression of quail and duck Sox9 genes" *Gen Comp Endocrinol*, **145**: 208-213, 2006.
- 2) Taguchi J, Miyazaki Y, Tsutsumi C, Sawayama Y, Ando K, Tsushima H, Fukushima T, Hata T, Yoshida S, Kuriyama K, Honda S, Jinnai I, Mano, H & Tomonaga M "Expression of the myeloperoxidase gene in AC133 positive leukemia cells relates to the prognosis of acute myeloid leukemia" *Leuk Res*, 2006.
- 3) Mano, H "Epigenetics and hematological disorders" *Rinsho Ketsueki*, **47**: 3-8, 2006.
- 4) Mano, H "DNA microarray analysis of myelodysplastic syndrome" *Leuk Lymphoma*, **47**: 9-14, 2006.
- 5) Koinuma K, Yamashita Y, Liu W, Hatanaka H, Kurashina K, Wada T, Takada S, Kaneda R, Choi YL, Fujiwara SI, Miyakura Y, Nagai H & Mano, H "Epigenetic silencing of AXIN2 in colorectal carcinoma with microsatellite instability" *Oncogene*, **25**: 139-146, 2006.
- 6) Takada S, Mano, H & Koopman P "Regulation of Amh during sex determination in chickens: Sox gene expression in male and female gonads" *Cell Mol Life Sci*, **62**: 2140-2146, 2005.
- 7) Ohki R, Yamamoto K, Ueno S, Mano, H, Misawa Y, Fuse K, Ikeda U & Shimada K "Gene expression profiling of human atrial myocardium with atrial fibrillation by DNA microarray analysis" *Int J Cardiol*, **102**: 233-238, 2005.
- 8) Numata A, Shimoda K, Kamezaki K, Haro T, Kakumitsu H, Shide K, Kato K, Miyamoto T, Yamashita Y, Oshima Y, Nakajima H, Iwama A, Aoki K, Takase K, Gondo H, Mano, H & Harada M "Signal transducers and activators of transcription 3 augments the transcriptional activity of CCAAT/enhancer-binding protein alpha in granulocyte colony-stimulating factor signaling pathway" *J Biol Chem*, **280**: 12621-12629, 2005.
- 9) Koinuma K, Kaneda R, Toyota M, Yamashita Y, Takada S, Choi YL, Wada T, Okada M, Konishi F, Nagai H & Mano, H "Screening for genomic fragments that are methylated specifically in colorectal carcinoma with a methylated MLH1 promoter" *Carcinogenesis*, **26**: 2078-2085, 2005.
- 10) Kisanuki H, Choi YL, Wada T, Moriuchi R, Fujiwara SI, Kaneda R, Koinuma K, Ishikawa M, Takada S, Yamashita Y & Mano, H "Retroviral expression screening of oncogenes in pancreatic ductal carcinoma" *Eur J Cancer*, **41**: 2170-2175, 2005.
- 11) Kaneda R, Ueno S, Yamashita Y, Choi YL, Koinuma K, Takada S, Wada T, Shimada K & Mano, H "Genome-wide screening for target regions of histone deacetylases in cardiomyocytes" *Circ Res*, **97**: 210-218, 2005.
- 12) Ishikawa M, Yoshida K, Yamashita Y, Ota J, Takada S, Kisanuki H, Koinuma K, Choi YL, Kaneda R, Iwao T, Tamada K, Sugano K & Mano, H

- "Experimental trial for diagnosis of pancreatic ductal carcinoma based on gene expression profiles of pancreatic ductal cells" *Cancer Sci*, **96**: 387-393, 2005.
- 13) Fujiwara S, Yamashita Y, Choi YL, Wada T, Kaneda R, Takada S, Maruyama Y, Ozawa K & Mano, H "Transforming activity of the lymphotoxin-beta receptor revealed by expression screening" *Biochem Biophys Res Commun*, **338**: 1256-1262, 2005.
- 14) Choi YL, Moriuchi R, Osawa M, Iwama A, Makishima H, Wada T, Kisanuki H, Kaneda R, Ota J, Koinuma K, Ishikawa M, Takada S, Yamashita Y, Oshimi K & Mano, H "Retroviral expression screening of oncogenes in natural killer cell leukemia" *Leuk Res*, **29**: 943-949, 2005.
- 寺村正尚
) Teramura M "Erythropoietin" *Nippon Rinsho*, **63 Suppl 8**: 569-572, 2005.
- 2) Masuda M, Teramura M, Matsuda A, Bessho M, Shimamoto T, Ohyashiki K, Omine M, Motoji T & Mizoguchi H "Clonal T cells of pure red-cell aplasia" *Am J Hematol*, **79**: 332-333, 2005.
- 3) Tsuchiya K, Saito M, Okano-Sugiyama H, Nihei H, Ando M, Teramura M, Iwamoto YS, Shimada K & Akiba T "Monitoring the content of reticulocyte hemoglobin (CHr) as the progression of anemia in nondialysis chronic renal failure (CRF) patients" *Ren Fail*, **27**: 59-65, 2005.
- 湯尾明
 1) Zhang H, Saeki K, Kimura A, Saeki K, Nakahara M, Doshi M, Kondo Y, Nakano T & Yuo A "Efficient and repetitive production of hematopoietic and endothelial cells from feeder-free monolayer culture system of primate embryonic stem cells" *Biol Reprod*, **74**: 295-306, 2006.
- 2) Nakatsu M, Doshi M, Saeki K, Yuo A: Synergistic effects of dehydroepiandrosterone and retinoic acid on granulocytic differentiation of human promyelocytic NB4 cells. *Int J Hematol* 81:32-38,2005.
- 3) Yano T, Itoh Y, Kubota T, Sendo T, Koyama T, Fujita T, Saeki K, Yuo A, Oishi R: A prostacyclin analog prevents radiocontrast nephropathy via phosphorylation of cyclic AMP response element binding protein. *Am J Pathol* 166:1333-1342,2005.
- 4) Saeki K, Yasugi E, Okuma E, Breit SN, Nakamura M, Toda T, Kaburagi Y, Yuo A: Proteomic analysis on insulin signaling in human hematopoietic cells: identification of CLIC1 and SRp20 as novel downstream effectors of insulin. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 289:E419-E428,2005.
- 5) Horiuchi A, Yasugi E, Yuo A: Structural requirement of dolichyl phosphate as an apoptosis inducer. *J Oleo Science* 54:341-346,2005.
- 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「多発性骨髓腫の分子診断方法」・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「慢性骨髓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

出願番号：特願 2005-168336。出願
日：平成 17 年 6 月 8 日。発明名称：成人 T 細胞
白血病予防治療剤

米国国際出願番号：10/514235。発明名称：
Method of identifying pancreatic ductal
carcinoma-specific genes using pancreatic
ductal cells

カナダ国際出願番号：2486028。発明名称：
Method of identifying pancreatic ductal
carcinoma-specific genes using pancreatic
ductal cells

分担研究者： 間野 博行 自治医科大学医学部 教授

研究要旨：貧血あるいは汎血球減少症が慢性に持続する「特発性造血障害」の発生頻度は加齢に伴い著明に増加し、特に 80 歳代の罹患人口は 10 万人あたり 100 人を越える。ヒトゲノムプロジェクトの成果を利用する DNA チップは特発性造血障害の病態解明にも有効であると予想されるが、一方不用意な患者骨髄単核球を用いた DNA チップ実験は、骨髄内の疾患クローンの割合の変化を反映するにすぎない多くの偽陽性データを生じることになる。我々は特発性造血障害を構成する 3 疾患群がいずれも造血幹細胞のクローン性異常に起因することに着目し、様々な特発性造血障害及び白血病患者骨髄より造血幹細胞相当分画のみを純化保存する全国規模の検体収集事業「Blast Bank」を開始した。平成 18 年 3 月現在で既に 700 例を越えるサンプルの収集に成功しており、本バンクはヒト疾患純化細胞を用いたゲノミクスプロジェクトとして世界最大の一つとなっている。本研究計画において我々は Blast Bank に属する特発性造血障害の臨床検体を用いてゲノミクス・プロテオミクス解析を行うことにより、3 疾患群の病因解明及び精度の高い新規鑑別診断法の開発を行うと共に、これら疾患群から急性白血病への進展を予測可能にするカスタムメイド DNA チップの開発を目指す。

A 研究目的

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

B 研究方法

1) 造血幹細胞特異的マーカーである CD133 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 18 年 3 月現在で 700 例を越えるサ

ンプルの保存に成功しており、これは純化細胞を用いたゲノミクスプロジェクトとしては世界最大級である。

2) 上記検体群を用いて以下のように DNA チップ解析を行った。細胞よりトータル RNA を抽出し、これを T7 RNA ポリメラーゼを用いてまず *in vitro* にて増幅した。さらにこれをもとに二本鎖 cDNA を合成し、ビオチン結合 CTP の存在下で再び T7 RNA ポリメラーゼと反応させることで、ビオチン標識化した complementary RNA (cRNA) を作製した。このビオチン化 cRNA を Affymetrix 社 HGU133 A & B マイクロアレイとハイブリダイズさせた。

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

(倫理面への配慮)

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

C 研究結果

1) 我々は平成 11 年 8 月より Blast Bank を立ち上げ既に 700 例を越えるサンプルのストックに成功した。現在本バンク中に 130 例を超える MDS および急性骨髄性白血病 (AML) サンプル

が保存されており、世界的にも極めて貴重なリソースとなっている。これらBlast Bank分画を用いた解析が従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) さらにSNPタイピング用DNAマイクロアレイを用いた患者検体ゲノムDNAの定量プロジェクトも行った。MDSおよびMDS由来白血病の骨髄細胞を用いてゲノムDNAを抽出し、Affymetrix 100K SNPタイピングアレイ、HGU133 Plus 2.0アレイおよびAgilent CGH44AアレイそれぞれにDNAをハイブリダイズさせた。得られたデータより、MDSサンプルの微細なゲノムDNA量変化を明らかにすることができた。

D&E. 考察及び結論

本研究事業においてMDS骨髄幹細胞を用いた遺伝子発現プロファイリング解析とゲノムDNAを用いた染色体量異常解析を行った。これらの解析から、予後にリンクした発現量を示す遺伝子の同定、さらにMDSへ高頻度にゲノム量異常を示す領域を同定することができた。

F. 健康危険情報

無し

G. 研究発表

1. 論文発表

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Taguchi J, Miyazaki Y, Tsutsumi C, Sawayama Y, Ando K, Tsushima H, Fukushima T, Hata T, Yoshida S, Kuriyama K, Honda S, Jinnai I, Mano, H & Tomonaga M "Expression of the myeloperoxidase gene in AC133 positive leukemia cells relates to the prognosis of acute myeloid leukemia" *Leuk Res*, 2006.
- 2) Mano, H "DNA microarray analysis of myelodysplastic syndrome" *Leuk Lymphoma*, 47: 9-14, 2006.
- 3) Koinuma K, Yamashita Y, Liu W, Hatanaka H, Kurashina K, Wada T, Takada S, Kaneda R, Choi YL, Fujiwara SI, Miyakura Y, Nagai H & Mano, H "Epigenetic silencing of AXIN2 in colorectal carcinoma with microsatellite instability" *Oncogene*, 25: 139-146, 2006.
- 4) Takada S, Mano, H & Koopman P "Regulation of Amh during sex determination in chickens: Sox gene expression in male and female gonads" *Cell Mol Life Sci*, 62: 2140-2146, 2005.

- 5) Ohki R, Yamamoto K, Ueno S, Mano, H, Misawa Y, Fuse K, Ikeda U & Shimada K "Gene expression profiling of human atrial myocardium with atrial fibrillation by DNA microarray analysis" *Int J Cardiol*, 102: 233-238, 2005.
- 6) Numata A, Shimoda K, Kamezaki K, Haro T, Kakumitsu H, Shide K, Kato K, Miyamoto T, Yamashita Y, Oshima Y, Nakajima H, Iwama A, Aoki K, Takase K, Gondo H, Mano, H & Harada M "Signal transducers and activators of transcription 3 augments the transcriptional activity of CCAAT/enhancer-binding protein alpha in granulocyte colony-stimulating factor signaling pathway" *J Biol Chem*, 280: 12621-12629, 2005.
- 7) Koinuma K, Kaneda R, Toyota M, Yamashita Y, Takada S, Choi YL, Wada T, Okada M, Konishi F, Nagai H & Mano, H "Screening for genomic fragments that are methylated specifically in colorectal carcinoma with a methylated MLH1 promoter" *Carcinogenesis*, 26: 2078-2085, 2005.
- 8) Kisanuki H, Choi YL, Wada T, Moriuchi R, Fujiwara SI, Kaneda R, Koinuma K, Ishikawa M, Takada S, Yamashita Y & Mano, H "Retroviral expression screening of oncogenes in pancreatic ductal carcinoma" *Eur J Cancer*, 41: 2170-2175, 2005.
- 9) Kaneda R, Ueno S, Yamashita Y, Choi YL, Koinuma K, Takada S, Wada T, Shimada K & Mano, H "Genome-wide screening for target regions of histone deacetylases in cardiomyocytes" *Circ Res*, 97: 210-218, 2005.
- 10) Choi YL, Moriuchi R, Osawa M, Iwama A, Makishima H, Wada T, Kisanuki H, Kaneda R, Ota J, Koinuma K, Ishikawa M, Takada S, Yamashita Y, Oshimi K & Mano, H "Retroviral expression screening of oncogenes in natural killer cell leukemia" *Leuk Res*, 29: 943-949, 2005.

H. 知的財産権の出願・登録状況

出願番号：特願2005-168336。出願日：平成17年6月8日。発明名称：成人T細胞白血病予防治療剤

プロテオーム解析による骨髓異形成症候群の病態解明

分担研究者 寺村 正尚 東京女子医科大学血液内科 講師

研究要旨:特発性造血障害の1つである骨髓異形成症候群(MDS)を対象として、その異常血球のプロテオーム解析を行った。MDS患者と正常人における末梢血好中球の蛋白を抽出し、二次元電気泳動を行った。両者の蛋白発現パターンについて解析ソフトを用いて比較検討した結果、MDS特異的に発現異常のあるタンパクを数種類同定した。これらの蛋白のうち、gelsolin familyに属するCapG蛋白はMDS好中球においてその細胞内局在が正常好中球と異なっており、MDSの病態に深く関与していると考えられた。

A. 研究目的

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

B. 研究方法

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

(1)MDS(RA)の好中球は異常クローン由来であり、形態学的、細胞生化学的な異常が明らかにあり、何らかの蛋白異常が存在して

いると考えられる。

(2)臨床的に末梢血を検査するだけで、MDSを診断しうるような、実用的な疾患特異的マーカーを同定できる可能性がある。

(3)検体の採取が容易であるため、骨髓に比して検体の収集が進みやすい。

研究方法としては、MDS患者および正常人の末梢血よりデキストラン法を用いて好中球を分離した。その細胞より蛋白質を抽出した後、二次元電気泳動を行った。両者の泳動パターンを解析ソフト(Ettanprogenesis)で解析した。発現量に差が認められるスポットの質量分析をMALDI-TOF/TOF MSを用いて行い、その蛋白質についてペプチドデータベース(MASCOT)を用いて同定した。また、同定した蛋白の好中球における遺伝子発現についてリアルタイムPCR法を用いて検討し、さらにその細胞内局在を免疫細胞染色により検討した。

(倫理面への配慮)

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

C. 研究結果

MDS 患者と正常者の末梢血好中球由来の蛋白の泳動パターンを解析ソフトで解析したところ、MDS において明らかに高発現しているスポットが認められた。それらのスポットについて MS によるペプチドマップを作製し、データベース上でペプチドマス・フィンガープリント測定を行い、蛋白質を数種同定した。そのうちの2つは CapG および Thiol-specific antioxidant protein (TSA) であった。MDS 好中球では正常好中球と比し、リン酸化 CapG が低下していた。また、MDS 好中球における CapG の細胞内局在について抗 CapG 抗体を用いて免疫染色し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて検討した。その結果、正常人好中球のほとんどは細胞質優位に細胞質および核内に存在していたのに対し、MDS では核内優位に強く発現している好中球が高頻度に認められた。さらに TSA の mRNA 発現についてリアルタイム PCR 法で検討したところ、MDS と正常人の好中球の間には明らかな発現量の違いは認められなかった。

D. 考察

MDS 患者の好中球には正常人と比較し、発現異常を認める蛋白が数種類存在することが明らかになった。その1つは CapG である。CapG は gelsolin family に属し、アクチンの capping に関わるタンパクであり、細胞骨格のダイナミックな変化に重要な働きになっているタンパクである。ちなみに CapG ノックアウトマウスでは好中球の遊走能の低下が認められている。以上より CapG は MDS の病態に深く関与している蛋白であることが示唆される。また、MDS 好中球においては細胞内局在およびそのリン酸化状態に異常があることが明らかになった。今後、

これらの異常が MDS の病態にどのように関わっているかを明らかにしたいと考えている。

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

今回同定された MDS 特異的に発現異常を認める蛋白の機能解析を進めることは、MDS の診断および治療の標的となる蛋白の同定につながるものと考えられる。

E. 結論

MDS 患者と正常人の好中球の蛋白発現パターンを比較検討した結果、MDS 特異的に発現異常を有する蛋白が認められた。それらの蛋白の解析を進めることにより、MDS の病態の一部が明らかになると考える。

F. 研究危険情報

なし

G. 研究発表

Kazama H, Teramura M, Yoshinaga, K, Kato T, Motoji T, Mizoguchi H. Proteomics approach to identifying proteins abnormally expressed in neutrophils in patients with myelodysplastic syndrome. *Leukemia Research*, 29 (Suppl 1) S46, 2005

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

ヒト血液細胞におけるプロテオミクスに関する基礎検討

分担研究者 湯尾 明 国立国際医療センター研究所部長

研究要旨

臨床検体などのヒト血液細胞の網羅的な蛋白解析（プロテオミクス）を推進するために、本年度はまず、ヒト血液細胞株における特定の生物学的な現象に根ざした蛋白変化を解析するプロテオミクスを行った。本年度は、ヒト骨髄性白血病細胞株におけるインスリンによる増殖開始とオートファジー（自食）解除に関わる細胞内シグナル伝達機構の解析を目指して、インスリン添加前と添加後1時間における同白血病細胞株における蛋白の変化を検討した。手法は、細胞内蛋白を可溶化した後に2次元電気泳動で展開してインスリン添加前後で異なるスポットをPDQuestで明らかにしてピックアップし、ゲル内消化の後にMSにて解析し、MASCOTでどの蛋白かを同定した。その結果、従来のインスリンシグナル伝達では報告されていない2種類の蛋白（SRp20、CLIC1）の変化が明らかになった。今後はこの系を臨床検体に応用して臨床プロテオミクスにつなげる。

A. 研究目的

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

疾患の原因や病態を解明するために患者検体（患者由来の異常な血液細胞）の分子解析を網羅的に行うことは重要なアプローチ法であり、患者血液細胞の異常な増殖や分化やアポトーシスの解明にもつながると考えられる。その主な手段としては、DNAチップやcDNAマイクロアレーを用いるトランスクリプトームが有名であり、その網羅性に優れている。一方、細胞の挙動に直接つながる蛋白の網羅的な解析（プロテオミクス）は、網羅性には欠けるがトランスクリプトームにはない利点も有している。

今年度は、患者検体解析のためのヒト血液細胞のプロテオミクスの系を確立するために、ヒト白血病細胞株を用いた研究を行った。

B. 研究方法

ヒト白血病細胞株は、HL-60を用いた。この細胞株は、以前の研究成果により、トランスフェリン添加無血清培地の中で数日間培養することによりマクロオートファジー（アズール顆粒を含む自食空胞を細胞質に多数有する状態）を起こすことが明らかになっている。この様な状態の細胞に対して、インスリンを添加すると4時間で自食空胞が完全に消失して、細胞質にはアズール顆粒が戻り、ほぼ正常な形態に戻る。従って、この様な現象の機序として、インスリン添加1時間後の状態を

添加後として解析した。

所定の方法によって細胞を可溶化して細胞内蛋白を抽出した後に、アマーシム社製の2次元電気泳動装置（1次元目は等電点電気泳動、2時限目はSDS-PAGE）によって蛋白を分離した。分離した蛋白は、シプロルビー染色（パイラッド社）によりスポットとして描出された。インスリン添加前と後の2検体間でどのスポットが有意さを持って変化しているかを、専用の解析ソフト（PDQuest）で解析した。

有意差の有るスポットを、アナテック社製のピッカー（FluoroPhoreStar3000）によってピックアップした後に、トリプシンによってゲル内消化を行った。

トリプシン消化した検体は、島津製作所製MALDI-TOF-MSによって解析され、PMFのパターンはMascotによって既知の蛋白のうちのどれに相当するかが判定された。

ウエスタンブロッティングや免疫沈降は、通常の方法によって行った。一部の実験においては2次元でのウエスタンブロッティングが行われた。

C. 研究結果

HL-60細胞をインスリン非存在下に3日間培養した後に、インスリンによって1時間処理してインスリン添加細胞とした。今回用いた細胞可溶化法では、ウレアに不溶の高度疎水性蛋白は除外される。

予備的な2次元電気泳動においては、等電点電気泳動はpH3-10, nonlinearで行われ、シプロルビー染色で1000以上のスポットが確認されたが、インスリン処理で変化するスポットの等電点は主にpH4-6であったので、これ以降の等電点電気泳動はpH4-7で行った。

600以上のスポットのうちで、アクチンの5%異常の発現量で、インスリン添加前後で2倍以上増加、もしくは、半分以下に減少するスポットを選んだ。この基準により、増加するスポットを3個、減少するスポットを2個に焦点を絞り、ピックアップしてゲル内消化、MALDI-TOF-MSによる解析を行った。

MSのPMFパターンをMascotソフトウェアで解析した結果、増加した蛋白はCLIC1、Rho-GDI-2、GST-piであり、減少したスポットはいずれもSRp20であった。これらの蛋白のうちで、Rho-GDI-2とGST-piはいずれもインスリンのシグナル伝達に関与することが報告されていたので、報告のないCLIC1とSRp20を研究の対象とした。

まず、Mascot解析の結果を確認するために2次元電気泳動によるイムノブロットを行ったところ、それぞれのスポットがCLIC1とSRp20の特異的な抗体でいずれも陽性に染色され、確認された。

最後に、1次元の通常のイムノブロットにおいてCLIC1とSRp20の増減を確認した。CLIC1の増加は1次元のイムノブロットでは再現できず、2次元電気泳動における蛋白抽出時において可溶性の異なる画分への移動によると考えられた、実際に、CLIC1はインスリン刺激前後で免疫染色による細胞内分布が異なっていた。一方、SRp20の減少は再現され、この減少はプロテアソーム阻害剤によって阻害され、インスリン添加後のプロテアソームによる分解と考えられた。

D. 考察

今回の研究によって、ヒト白血病細胞株において2次元電気泳動によるオーソドックスなプロテオミクス解析が可能であり、蛋白の同定に至ることが明らかとなった。今後は、この手法を応用して造血器疾患の患者検体の解析を行うべく準備を進めている。ただし、患者検体を解析するためにはある程度の細胞数が必要であり、今後は、より少ない細胞数での可能性と条件検討を行う必要が有る。

今回はインスリンの細胞内刺激伝達機構に関わる新しい知見を得ることができた。通常の造血因子のみではなく、インスリン、IGF等のいわゆる増殖因子の血液細胞に対する作用も重要であり、血液疾患における異常が起こりうる可能性がある。この様な観点からの独自の検討を進める事が重要である。

E. 結論

本年度はヒト骨髄性白血病細胞におけるインスリンによる増殖開始とオートファジー(自食)解除に関わる細胞内シグナル伝達機

構の解析を目指して、インスリン添加前と添加後1時間におけるヒト白血病細胞株における蛋白の変化を検討した。手法は、細胞内蛋白を可溶化した後に2次元電気泳動で展開してインスリン添加前後で異なるスポットをPDQuestで明らかにしてピックアップし、ゲル内消化の後にMSにて解析し、MASCOTでどの蛋白かを同定した。その結果、従来のインスリンシグナル伝達では報告されていない4種類の蛋白(CLIC1、Rho-GDI-2、GST-pi、SRp20)の変化が明らかになった。前3者は増加であり、残りの1つは減少であった。これらのうち、インスリンの作用機構で報告のないCLIC1、SRp20について検討し、前者の増加はインスリン刺激後の可溶性画分への移動、後者はプロテアソームによる分解であることがそれぞれ明らかになった。今後はこの系を血液疾患患者の臨床検体に応用して臨床プロテオミクスにつなげて行きたい。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

Nakatsu M, Doshi M, Saeki K, Yuo A: Synergistic effects of dehydroepiandrosterone and retinoic acid on granulocytic differentiation of human promyelocytic NB4 cells. *Int J Hematol* 81:32-38, 2005.

Yano T, Itoh Y, Kubota T, Sendo T, Koyama T, Fujita T, Saeki K, Yuo A, Oishi R: A prostacyclin analog prevents radiocontrast nephropathy via phosphorylation of cyclic AMP response element binding protein. *Am J Pathol* 166:1333-1342, 2005.

Saeki K, Yasugi E, Okuma E, Breit SN, Nakamura M, Toda T, Kaburagi Y, Yuo A: Proteomic analysis on insulin signaling in human hematopoietic cells: identification of CLIC1 and SRp20 as novel downstream effectors of insulin. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 289:E419-E428, 2005.

Horiuchi A, Yasugi E, Yuo A: Structural requirement of dolichyl phosphate as an apoptosis inducer. *J Oleo Science* 54:341-346, 2005.

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

主任研究者:間野博行

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年	
Mano, H.	DNA micro-array analysis of myelodysplastic syndrome	<i>Leuk. Lymphoma</i>		47	9-14	2006
Koinuma, K., Yamashita, Y., Liu, W., Hatanaka, H., Kurashina, K., Wada, T., Takada, S., Kaneda, R., Choi, Y.L., Fujiwara, S.I., Miyakura, Y., Nagai, H. & Mano, H.	Epigenetic silencing of AXIN2 in colorectal carcinoma with microsatellite instability	<i>Oncogene</i>		25	139-146	2006
Takada, S., Mano, H. & Koopman, P.	Regulation of Amh during sex determination in chickens: Sox gene expression in male and female gonads	<i>Cell. Mol. Life Sci.</i>		62	2140-2146	2005
Ohki, R., Yamamoto, K., Ueno, S., Mano, H., Misawa, Y., Fuse, K., Ikeda, U. & Shimada, K.	Gene expression profiling of human atrial myocardium with atrial fibrillation by DNA microarray analysis	<i>Int. J. Cardiol.</i>		102	233-238	2005
Numata, A., Shimoda, K., Kamezaki, K., Haro, T., Kakumitsu, H., Shide, K., Kato, K., Miyamoto, T., Yamashita, Y., Oshima, Y., Nakajima, H., Iwama, A., Aoki, K., Takase, K., Gondo, H., Mano, H. & Harada, M.	Signal transducers and activators of transcription 3 augments the transcriptional activity of CCAAT/enhancer-binding protein alpha in granulocyte colony-stimulating factor signaling pathway	<i>J. Biol. Chem.</i>		280	12621-12629	2005
Koinuma, K., Kaneda, R., Toyota, M., Yamashita, Y., Takada, S., Choi, Y.L., Wada, T., Okada, M., Konishi, F., Nagai, H. & Mano, H.	Screening for genomic fragments that are methylated specifically in colorectal carcinoma with a methylated MLH1 promoter	<i>Carcinogenesis</i>		26	2078-2085	2005
Kisanuki, H., Choi, Y.L., Wada, T., Moriuchi, R., Fujiwara, S.I., Kaneda, R., Koinuma, K., Ishikawa, M., Takada, S., Yamashita, Y. & Mano, H.	Retroviral expression screening of oncogenes in pancreatic ductal carcinoma	<i>Eur. J. Cancer</i>		41	2170-2175	2005
Kaneda, R., Ueno, S., Yamashita, Y., Choi, Y.L., Koinuma, K., Takada, S., Wada, T., Shimada, K. & Mano, H.	Genome-wide screening for target regions of histone deacetylases in cardiomyocytes	<i>Circ. Res.</i>		97	210-218	2005
Ishikawa, M., Yoshida, K., Yamashita, Y., Ota, J., Takada, S., Kisanuki, H., Koinuma, K., Choi, Y.L., Kaneda, R., Iwao, T., Tamada, K., Sugano, K. & Mano, H.	Experimental trial for diagnosis of pancreatic ductal carcinoma based on gene expression profiles of pancreatic ductal cells	<i>Cancer Sci</i>		96	387-393	2005
Fujiwara, S., Yamashita, Y., Choi, Y.L., Wada, T., Kaneda, R., Takada, S., Maruyama, Y., Ozawa, K. & Mano, H.	Transforming activity of the lymphotoxin-beta receptor revealed by expression screening	<i>Biochem. Biophys. Res. Commun</i>		338	1256-1262	2005
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., Oshimi, K. & Mano, H.	Retroviral expression screening of oncogenes in natural killer cell leukemia	<i>Leuk. Res</i>		29	943-949	2005
間野博行.	いかにして個別化医療が可能か	<i>Molecular Medicine</i>		42	848-850	2005
間野博行.	遺伝子発現プロファイリングによる急性骨髄性白血病の予後予測	<i>Molecular Medicine</i>		42	866-871	2005
間野博行.	マイクロアレイを用いた造血器悪性腫瘍の分類と予後	総合臨床		54	1752-1755	2005
間野博行.	DNAチップ解析による造血器腫瘍診断	日本内科学会雑誌		94	2224-2230	2005
間野博行.	DNAチップによるリンパ腫解析	血液・腫瘍科		49 Suppl 4	248-253	2005
間野博行.	遺伝子発現解析に基づく予後判定	医学の歩み		212	355-359	2005
間野博行.	マイクロアレイ解析による急性骨髄性白血病の予後因子の同定	Annual Review 血液			124-130	2006

研究成果の刊行に関する一覧表

分担研究者: 寺村 正尚

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Teramura M	Erythropoietin	<i>Nippon Rinsho</i>	63 Suppl 8	569-572	2005
Masuda M, Teramura M, Matsuda A, Bessho M, Shimamoto T, Ohyashiki K, Omine M, Motoji T & Mizoguchi H	Clonal T cells of pure red-cell aplasia	<i>Am J Hematol</i>	79	332-333	2005
Tsuchiya K, Saito M, Okano-Sugiyama H, Nihei H, Ando M, Teramura M, Iwamoto YS, Shimada K & Akiba T	Monitoring the content of reticulocyte hemoglobin (CHr) as the progression of anemia in nondialysis chronic renal failure (CRF) patients	<i>Ren Fail</i>	27	59-65	2005

研究成果の刊行に関する一覧表

分担研究者:湯尾 明

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Zhang H, Saeki K, Kimura A, Saeki K, Nakahara M, Doshi M, Kondo Y, Nakano T & Yuo A	Efficient and repetitive production of hematopoietic and endothelial cells from feeder-free monolayer culture system of primate embryonic stem cells	<i>Biol Reprod</i>	74	295-306	2006
Nakatsu M, Doshi M, Saeki K & Yuo A	Synergistic effects of dehydroepiandrosterone and retinoic acid on granulocytic differentiation of human promyelocytic NB4 cells	<i>Int J Hematol</i>	81	32-38	2005
Yano T, Itoh Y, Kubota T, Sendo T, Koyama T, Fujita T, Saeki K, Yuo A & Oishi R	A prostacyclin analog prevents radiocontrast nephropathy via phosphorylation of cyclic AMP response element binding protein	<i>Am J Pathol</i>	166	1333-1342	2005
Saeki K, Yasugi E, Okuma E, Breit SN, Nakamura M, Toda T, Kaburagi Y & Yuo A	Proteomic analysis on insulin signaling in human hematopoietic cells: identification of CLIC1 and SRp20 as novel downstream effectors of insulin.	<i>Am J Physiol Endocrinol Metab</i>	289	E419-E428	2005
Horiuchi A, Yasugi E & Yuo A	Structural requirement of dolichyl phosphate as an apoptosis inducer.	<i>J Oleo Science</i>	54	341-346	2005

REVIEW

DNA micro-array analysis of myelodysplastic syndrome

HIROYUKI MANO

Division of Functional Genomics, Jichi Medical School, Kawachigun, Tochigi, Japan

Abstract

Myelodysplastic syndrome (MDS) is an enigmatic disorder characterized by ineffective hematopoiesis and dysplastic morphology of blood cells. The clinical course of MDS consists of distinct stages, with early stages often progressing to advanced ones or to acute myeloid leukemia (AML). Little is known of the molecular pathogenesis of MDS or of the mechanism of its stage progression. DNA micro-array analysis, which allows simultaneous monitoring of the expression levels of tens of thousands of genes, has the potential to provide insight into the pathophysiology of MDS. Several studies have applied this new technology to compare gene expression profiles either between MDS and the healthy condition, among the different stages of MDS or between MDS-derived AML and *de novo* AML. Selection of an appropriate hematopoietic fraction is important for such studies, which to date have been performed with differentiated granulocytes, CD34⁺ progenitors and CD133⁺ immature cells. These studies have revealed that each stage of MDS has its own 'molecular signature', indicating the feasibility of differential diagnosis of MDS based on gene expression profile. They have also demonstrated that the current clinical diagnosis of MDS results in the misclassification of patients with regard to these molecular signatures.

Keywords: *Myelodysplastic syndrome, DNA micro-array, acute myeloid leukemia, stage progression, gene expression profile*

Introduction

Myelodysplastic syndrome (MDS) is an enigmatic disorder that is characterized by 2 clinical manifestations: ineffective hematopoiesis (cytopenia in peripheral blood despite hyper- or normal cellularity in bone marrow) and dysplastic morphology of blood cells [1]. MDS mostly affects the elderly, with an incidence of 15–50 cases per 100 000 people per year [2]. Clonality in multiple lineages of blood cells is found in individuals with MDS, suggesting that MDS is a clonal disorder of multi-potent stem cells in bone marrow [3].

An important aspect of MDS is that it comprises different clinical stages. According to the World Health Organization (WHO) classification of MDS [4], affected individuals whose bone marrow contains < 5% blasts are diagnosed with refractory anemia (RA), RA with ringed sideroblasts (RARS), refractory cytopenia with multi-lineage dysplasia (RCMD) or refractory cytopenia with multi-lineage dysplasia and ringed sideroblasts (RCMD-RS), whereas those whose bone marrow contains 5–9%

or 10–19% blasts are diagnosed with RA with excess blasts (RAEB)-1 or RAEB-2, respectively. About 10–30% of MDS patients at the early stages (RA, RARS, RCMD or RCMD-RS) will eventually undergo stage progression to RAEB and, subsequently, to acute myeloid leukemia (AML).

Despite the relatively high incidence of MDS, its molecular pathogenesis is poorly understood (Figure 1). Gene mutations or other genomic alterations that might give rise to RA or RCMD remain to be identified and the ineffective hematopoiesis apparent in MDS patients remains to be characterized at the molecular biological level. It is also not known what triggers progression of early stages of MDS to advanced ones in some individuals but not others.

Cytopenia in peripheral blood is also found in patients with aplastic anemia (AA). Although the bone marrow of most individuals with AA is characterized by hypocellularity, the difference in marrow cellularity between patients with AA and those with RA or RCMD is not always clear. Antithymocyte globulin, a standard treatment for AA, is also effective in a sub-set of patients at the early

Correspondence: Hiroyuki Mano, MD, PhD, Division of Functional Genomics, Jichi Medical School, 3311-1 Yakushiji, Kawachigun, Tochigi 329-0498, Japan. Tel: +81-285-58-7449. Fax: +81-285-44-7322. E-mail: hmano@jichi.ac.jp

Received for publication 15 July 2005.

ISSN 1042-8194 print/ISSN 1029-2403 online © 2006 Taylor & Francis
DOI: 10.1080/10428190500264231

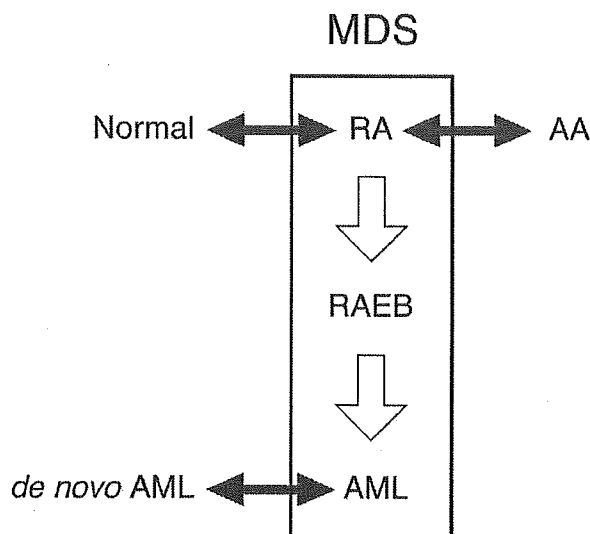


Figure 1. Stage progression of MDS and its relation to other conditions. Little is currently known of the molecular pathogenesis of MDS or of the similarities or differences between the early stages of MDS and aplastic anemia (AA) and between MDS-derived AML and *de novo* AML.

stages of MDS [5], further complicating the distinction between the two disorders.

It is widely believed that AML evolved from MDS has a poorer prognosis than does *de novo* AML, suggesting that the 2 clinical entities might be distinct. However, patients with MDS-associated AML are often older than are those with *de novo* AML and tend to possess karyotypes associated with high risk. It, thus, remains unclear whether the prognosis of *de novo* AML does indeed differ from that of MDS-associated AML if patient age and karyotype are matched.

The Human Genome Project is now close to completion, with 99% of DNA in euchromatin having been sequenced at 99.999% accuracy (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/guide/human/>). Annotation of the human genome has revealed an unexpectedly small number (20 000–25 000) of protein-coding genes [6] compared with the numbers identified in the nematode (~19 000 genes) [7] and fruit fly (~14 000 genes) genomes [8]. The development of DNA micro-array analysis now allows simultaneous measurement of the level of expression of tens of thousands of genes in a given sample [9,10]. With this approach, it is thus possible to obtain a total gene expression profile or 'transcriptome' for each of the various stages of MDS and then to compare these profiles either among MDS stages or with those of the healthy condition, AA or *de novo* AML. Such analysis has the potential both to identify novel molecular markers for the differential diagnosis of MDS vs AA or *de novo* AML as well as to reveal genes that contribute to the pathogenesis of MDS. It

might also be possible to determine whether MDS should be treated as a clinical entity distinct from AA or *de novo* AML.

It is important to bear in mind, however, that blood cells of different lineages and differentiation levels possess markedly different transcriptomes, even within the same individual. Any shift in cell composition in the specimens analysed will, thus, greatly influence the gene expression profile determined by micro-array studies [11].

Normal vs MDS

Several studies have attempted to compare transcriptomes between healthy individuals and patients with MDS in order to identify differences in gene expression. Pellagatti et al. [12] isolated RNA from differentiated granulocytes of 7 healthy individuals and 21 patients with MDS (17 with RA, 2 with RARS and 2 with RAEB according to the French-American-British (FAB) classification). The RNA was subjected to hybridization with a cDNA micro-array harboring probes corresponding to ~6000 human genes and the researchers identified 12 genes whose expression was frequently up-regulated (ratio of >2.0 in ≥ 9 patients) or down-regulated (ratio of <0.5 in ≥ 10 patients) in MDS. The relevance of these genes to the molecular diagnosis of MDS is unknown.

In contrast, Hofmann et al. [13] isolated CD34⁺ progenitor fractions from the bone marrow of 4 healthy subjects and 11 MDS patients (7 low-risk and 4 high-risk according to the International Prognostic Scoring System [14]) for analysis with micro-arrays containing >12 000 human probe sets. They identified 161 genes whose expression was down-regulated (ratio of <0.2) in low-risk MDS patients compared with healthy subjects. They also detected 117 genes whose expression was up-regulated (ratio of >5) in MDS patients and 27 of these genes encoded regulators of hematopoiesis, including acute myeloid leukemia 1 (AML1), activating transcriptional factor 3 (ATF3), homeobox 7 (HOX7) and Delta-like homolog 1 (DLK1).

Chen et al. [15] also chose CD34⁺ cells for comparison of transcriptomes between healthy controls and MDS patients, specifically those with monosomy 7 or trisomy 8. CD34⁺ progenitor cells were purified from the bone marrow of 4 control subjects, 4 MDS patients with trisomy 8 and 2 MDS patients with monosomy 7 and RNA isolated from these cells was subjected to hybridization with the same type of arrays (Affymetrix GeneChip HGU95Av2) as those used by Hofmann et al. [13]. Comparison of gene expression profiles among the subjects revealed that genes important in immune function and inflammation were frequently over-expressed in the MDS patients

with trisomy 8, consistent with previous findings implicating autoimmune activity in such patients [16]. In contrast, genes important in cell growth were often down-regulated in the patients with monosomy 7. These findings, thus, suggested that gene expression profiles differ between MDS blasts with trisomy 8 and those with monosomy 7.

Stage progression in MDS

A substantial proportion of MDS patients in early stages of the disease, especially those with an unfavorable karyotype [17], undergoes progression to advanced stages or to AML. Given that currently available chemotherapeutic regimens for advanced MDS are of limited efficacy, it would be clinically advantageous to block stage progression in MDS. Alterations of several oncogenes and tumor suppressor genes have been implicated in the progression of MDS [18]. Activating mutations of *RAS* genes are thought to be the most prevalent (affecting 10–30% of cases) of such changes in MDS [19,20]. It remains unclear, however, whether *RAS* mutation occurs at the early or late stages of MDS. Inactivation of the p53 gene is also apparent in 5–10% of MDS patients [21]. Again, however, it is not known whether loss of p53 function is an early or late event during MDS progression. In addition, epigenetic silencing of the p15 gene and shortening of telomeres have been detected in bone marrow cells of MDS patients [22]. None of these gene alterations is specific to MDS and it is unclear which changes are the cause of MDS itself and which are associated with stage progression.

To obtain insight into the mechanism of stage progression of MDS, in their comparison of gene expression profiles among healthy controls, low-risk MDS patients and high-risk MDS patients, Hofmann et al. [13] applied the class membership prediction method to identify genes whose expression was linked to separation of the 3 classes. They

identified 11 such genes (Table I) and a simple 2-way clustering analysis of the study subjects based on the expression patterns of these 11 genes clearly separated the 3 major classes. Furthermore, a similar clustering analysis of a second set of subjects ($n=8$) also separated individuals with high-risk MDS from those with low-risk MDS. Although the number of study subjects was small, these data support the notion that each stage of MDS has a characteristic gene expression profile or ‘molecular signature’.

CD133 (also known as AC133) is a cell surface protein that is expressed exclusively on CD34⁺CD38⁻ hematopoietic stem cells (HSCs) [23,24]. Many AML blasts also express CD133 [25], indicating that the differentiation of these cells is blocked at a highly immature stage. The existence of ‘cancer stem cells’ for AML and solid tumors has been recently demonstrated and such cells express CD133 in brain tumors [26], as do CD34⁺CD38⁻ cells in AML [27]. Analysis of CD133⁺ HSC-like fractions among MDS patients may, thus, reveal the character of ‘MDS stem cells’. Analysis of such fractions also has the advantage of eliminating from micro-array data the influence of variation in cell composition of bone marrow, which is especially important given that different stages of MDS are characterized by different numbers of immature blasts within marrow.

Ueda et al. [28] performed micro-array analysis with CD133⁺ cells isolated from the bone marrow of 2 healthy individuals, 11 patients with RA, 5 patients with RAEB and 14 patients with MDS-associated AML. Comparison of the gene expression profiles among the different stages of MDS led to the identification of 11 late stage (RAEB, MDS-associated AML)-specific genes and 6 early stage (healthy controls, RA)-specific genes. The latter set of genes included that for PIASy, which catalyses sumoylation of substrate proteins [29]. Loss of expression of the PIASy gene in advanced MDS suggested that the encoded protein might possess anti-tumor activity. Consistent with this notion, forced expression of PIASy in a mouse myeloid cell line resulted in rapid induction of apoptosis when the cells were cultured in the presence of granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) (Figure 2) [28]. These results suggest that PIASy functions to restrain cell growth and that loss of its expression may facilitate stage progression in MDS. Loss of PIASy expression has also been implicated in stage progression of chronic myeloid leukemia [30].

MDS-derived AML vs *de novo* AML

Although dysplastic morphology of blood cells is a hallmark of MDS and MDS-derived AML, such

Table I. Genes used for class separation of healthy individuals and low- or high-risk patients with MDS [13].

Gene symbol	Accession number	Chromosomal position
<i>TAGSTD2</i>	J04152	1p32
<i>UQCRC1</i>	L16842	3p21.3
<i>TNNC1</i>	M37984	3p21.3
<i>KDELRL</i>	M88458	7p
<i>CLC</i>	L01664	19q13.1
<i>H-PKL</i>	M5422	7
<i>RGS19</i>	Z91809	
<i>ATF3</i>	L19871	1
<i>FARP1</i>	AI701049	
<i>GNG7</i>	AW051450	
<i>TPD52L2</i>	U44429	6q22-q23

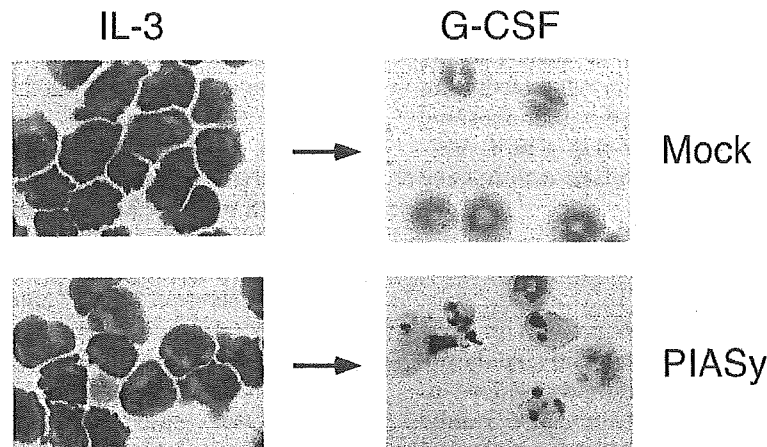


Figure 2. Induction of apoptosis by PIASy. 32Dcl3 cells were infected with a control retrovirus (Mock) or with a virus that encodes human PIASy and were then either maintained in the presence of interleukin-3 (IL-3) or exposed to G-CSF. Whereas control cells incubated with G-CSF underwent gradual differentiation into granulocyte-like cells, those expressing PIASy died rapidly by apoptosis on exposure to G-CSF. Reproduced with permission from Ueda et al. [28].

dysplasia is also apparent in the blood cells of some healthy older individuals. It is, thus, sometimes difficult to differentiate *de novo* AML from MDS-derived AML in the elderly, especially in the absence of a clinical history of the patient. Further complicating the issue, some younger patients with *de novo* AML also manifest blood cell dysplasia [31,32].

To provide insight into the differences or similarities between these clinical classes, Oshima et al. purified CD133⁺ cells from the bone marrow both of 10 patients with *de novo* AML of the M2 sub-type, according to the FAB classification [33] and of 10 patients with MDS-derived AML corresponding to the M2 sub-type [34]. They then subjected RNA from these cells to micro-array analysis with HGU95Av2 micro-arrays. Comparison of samples matched for FAB sub-type was performed to minimize the influence of the differentiation ability of the blasts on gene expression profile; any differences in gene expression identified with this approach would, thus, be expected to be related with a high probability to the difference in the nature of MDS-derived AML from that of *de novo* AML.

Statistical analysis of the resulting expression data (Welch's ANOVA, $p < 0.01$; effect size of ≥ 5.0 units) identified a total of 57 probe sets corresponding to genes whose expression was associated with diagnosis. However, a simple 2-way clustering analysis of the subjects based on the expression pattern for these probe sets failed to separate them into diagnosis-related sub-groups. To visualize the similarity or difference between the 2 classes, the researchers applied correspondence analysis, a method for the decomposition of multi-dimensional data [35].

This approach allows not only a low-dimensional projection of the expression profiles of numerous genes but also measurement both of the contribution of each gene to a given extracted dimension and of the contribution of each extracted dimension to the total complexity.

Correspondence analysis of the expression data for the 57 probe sets reduced the complexity from 57 to 3 dimensions. The specimens were then projected into a virtual space on the basis of their calculated 3-dimensional (3D) co-ordinates (Figure 3(a)). Most subjects with *de novo* AML were localized in a region of the space distinct from that occupied by those with MDS-derived AML. However, 2 individuals with *de novo* AML localized with those with MDS-derived AML. These observations indicated that the transcriptome of MDS-derived AML is distinct from that of *de novo* AML, but that current clinical diagnosis does not completely correlate with the difference in transcriptomes.

A similar analysis was performed on a larger scale by Tsutsumi et al. [36]. These researchers isolated CD133⁺ cells from the bone marrow of patients with MDS-derived AML ($n=11$), with *de novo* AML without dysplasia ($n=15$), with *de novo* AML with multi-lineage dysplasia ($n=11$) [32,37] or with therapy-related AML ($n=2$). The study subjects were not limited to a specific FAB sub-type, however. The transcriptomes of these clinical classes were compared with the use of HGU95Av2 arrays. Comparison of *de novo* AML without dysplasia and MDS-derived AML led to the identification of 30 probe sets corresponding to genes whose expression was related to diagnosis. Correspondence analysis