

FIG. 8. Granulocyte-specific gene expressions after C/EBP α induction. The time course of NGAL (A and B), G-CSF receptor (*G-CSFR*) (C and D), and lysozyme M (E and F) mRNA expression following G-CSF stimulation in 32Dcl3 and 32Dcl3/DNStat3 cells (A, C, and E) or by G-CSF stimulation with 4-HT or vehicle in 32Dcl3/DNStat3/CEBPA cells (B, D, and F) is shown. Cells maintained in IL-3 were starved of cytokines for 8 h and stimulated with G-CSF, G-CSF, plus 4-HT and G-CSF plus vehicle. Total RNA was isolated at the indicated times after the stimulation and transcribed to cDNA, which was subjected to real-time PCR. The numbers given on the vertical axis represent the fold induction of ratios of average GAPDH-normalized expression values when compared with those before stimulation. Three independent experiments were performed, and similar results were obtained and shown data are the representative of them.

The C/EBP family of transcription factor is expressed in multiple cell types, including hepatocytes, adipocytes, keratinocytes, enterocytes, and cells of the lung (30, 31). C/EBP α transactivates the promoters of hepatocyte- and adipocyte-specific genes, which are important for energy homeostasis (32, 33), and C/EBP α -deficient mice lack hepatic glycogen stores and die from hypoglycemia within 8 h of birth (34). In the hematopoietic system, C/EBP α is exclusively expressed in myelomonocytic cells (35, 36). C/EBP α expression is prominent in mature myeloid cells, and previous investigations found that C/EBP α is critical for early granulocytic differentiation. Mice with a targeted disruption of the C/EBP α gene demonstrate an early block in granulocytic differentiation, but they develop normal monocytes (19). Conditional expression of C/EBP α is sufficient to induce granulocytic differentiation (17). In contrast to the essential role of C/EBP α in granulocytic differentiation, the role of Stat in granulopoiesis is controversial. Stat3 is the principle Stat protein activated by G-CSF, with Stat5 and Stat1 also activated to a lesser degree (8, 10). In mice lacking *Stat5a* and *Stat5b*, the number of colonies produced in response to G-CSF was reduced 2-fold despite normal circulating numbers of neutrophils (9). Myeloid cell lines expressing dominant-negative forms of Stat3 (11, 37, 38) and transgenic mice with a targeted mutation of the G-CSF receptor that abolishes G-CSF-dependent Stat3 activation (12) demonstrate that Stat3-activation is required for G-CSF-dependent granulocytic proliferation and differentiation.

In the present study, we clearly demonstrate that the expression of C/EBP α mRNA is up-regulated through the activation of

Stat3 in response to G-CSF, and the Stat3-C/EBP α signaling cascade plays an important role in G-CSF-induced differentiation. Contrary to these data, however, we and others showed that mice conditionally lacking Stat3 in their hematopoietic progenitors developed neutrophilia, and bone marrow cells were hyper-responsive to G-CSF stimulation (23, 39). Additionally, mice with tissue-specific disruption of *Stat3* in bone marrow cells die within 4–6 weeks after birth with Crohn's disease-like pathogenesis (40). These mice exhibit phenotypes with dramatic expansion of myeloid cells, leading to massive infiltration of the intestine with neutrophils, macrophages, and eosinophils. Cells of the myeloid lineage also demonstrate autonomous proliferation. These apparently disparate results may be explained by the need for molecules in addition to Stat3 to regulate C/EBP α expression *in vivo*, the *in vivo* functional redundancy among C/EBP α regulators, or the absence of the abrogation of SOCS3 induction by G-CSF in 32Dcl3/DNStat3 cells. In 32Dcl3 cells, the Stat3-C/EBP α pathway might be favored, and other pathways may contribute little to granulocytic differentiation in response to G-CSF.

Among C/EBP family, C/EBP ϵ is important for late phase of granulocytic differentiation, and its expression is up-regulated by G-CSF independent of Stat3 (11). A previous report showed that C/EBP ϵ is a transcriptional target of C/EBP α in 32Dcl3 cells (41). From these reports and our results, we speculated that a small amount of C/EBP α is enough for the induction of the transcription of C/EBP ϵ by G-CSF or that there are multiple signaling steps except for Stat3-C/EBP α to induce the transcription of C/EBP ϵ by G-CSF.

Induction of C/EBP α led to not only morphologic differentiation but also expression of granulocyte-specific genes (17). In 32Dcl3/DNStat3 cells, the induction of the G-CSF receptor, lysozyme M, and NGAL in response to G-CSF was abrogated (Fig. 8). Restoration of C/EBP α in these cells led to expression of only the NGAL gene, and thus, 32Dcl3/DNStat3 cells differentiated by the induction of C/EBP α may not be functional as mature neutrophils. In these cells, therefore, activation of C/EBP α is not sufficient for the induction of lysozyme M or G-CSF receptor genes, and the presence of other molecules appears to be required for their expression.

Acknowledgments—We thank M. Sato, R. Hasegawa, and M. Ito for excellent technical assistance.

REFERENCES

1. Metcalf, D. (1989) *Nature* **339**, 27–30
2. Demetri, G. D., and Griffin, J. D. (1991) *Blood* **78**, 2791–2808
3. Lieschke, G. J., Grail, D., Hodgson, G., Metcalf, D., Stanley, E., Cheers, C., Fowler, K. J., Basu, S., Zhan, Y. F., and Dunn, A. R. (1994) *Blood* **84**, 1737–1746
4. Liu, F., Wu, H. Y., Wesselschmidt, R., Kornaga, T., and Link, D. C. (1996) *Immunity* **5**, 491–501
5. Ihle, J. N., Nosaka, T., Thierfelder, W., Quelle, F. W., and Shimoda, K. (1997) *Stem Cells* **15**, Suppl. 1, 105–111; discussion 112
6. Ihle, J. N. (1995) *Nature* **377**, 591–594
7. Shimoda, K., Iwasaki, H., Okamura, S., Ohno, Y., Kubota, A., Arima, F., Otsuka, T., and Niho, Y. (1994) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **203**, 922–928
8. Shimoda, K., Feng, J., Murakami, H., Nagata, S., Watling, D., Rogers, N. C., Stark, G. R., Kerr, I. M., and Ihle, J. N. (1997) *Blood* **90**, 597–604
9. Teglund, S., McKay, C., Schuetz, E., van Deursen, J. M., Stravopodis, D., Wang, D., Brown, M., Bodner, S., Grosfeld, G., and Ihle, J. N. (1998) *Cell* **93**, 841–850
10. Tian, S. S., Lamb, P., Seidel, H. M., Stein, R. B., and Rosen, J. (1994) *Blood* **84**, 1760–1764
11. Nakajima, H., and Ihle, J. N. (2001) *Blood* **98**, 897–905
12. McLemore, M. L., Grewal, S., Liu, F., Archambault, A., Poursine-Laurent, J., Haug, J., and Link, D. C. (2001) *Immunity* **14**, 193–204
13. Fukunaga, R., Ishizaka-Ikeda, E., Seto, Y., and Nagata, S. (1990) *Cell* **61**, 341–350
14. Reddy, V. A., Iwama, A., Iotzova, G., Schulz, M., Elsasser, A., Vangala, R. K., Tenen, D. G., Hiddemann, W., and Behre, G. (2002) *Blood* **100**, 483–490
15. Bromberg, J. F., Wrzeszczynska, M. H., Devgan, G., Zhao, Y., Pestell, R. G., Albanese, C., and Darnell, J. E., Jr. (1999) *Cell* **98**, 295–303
16. Aoki, N., and Matsuda, T. (2002) *Mol. Endocrinol.* **16**, 58–69
17. Radomska, H. S., Huettner, C. S., Zhang, P., Cheng, T., Scadden, D. T., and Tenen, D. G. (1998) *Mol. Cell. Biol.* **18**, 4301–4314
18. Wang, X., Scott, E., Sawyers, C. L., and Friedman, A. D. (1999) *Blood* **94**, 560–571
19. Zhang, D. E., Zhang, P., Wang, N. D., Hetherington, C. J., Darlington, G. J., and Tenen, D. G. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 569–574
20. Christy, R. J., Kaestner, K. H., Geiman, D. E., and Lane, M. D. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**, 2593–2597
21. Legraverend, C., Antonson, P., Flodby, P., and Xanthopoulos, K. G. (1993) *Nucleic Acids Res.* **21**, 1735–1742
22. Ihle, J. N. (1996) *BioEssays* **18**, 95–98
23. Kamezaki, K., Shimoda, K., Numata, A., Haro, T., Kakumitsu, H., Yosie, M., Yamamoto, M., Takeda, K., Matsuda, T., Akira, S., Ogawa, K., and Harada, M. (2005) *Stem Cells* **23**, 252–263
24. Dahl, R., Walsh, J. C., Lancki, D., Laslo, P., Iyer, S. R., Singh, H., and Simon, M. C. (2003) *Nat. Immunol.* **4**, 1029–1036
25. Horvath, C. M., Wen, Z., and Darnell, J. E., Jr. (1995) *Genes Dev.* **9**, 984–994
26. Xu, X., Sun, Y. L., and Hoey, T. (1996) *Science* **273**, 794–797
27. Tang, Q. Q., Jiang, M. S., and Lane, M. D. (1999) *Mol. Cell. Biol.* **19**, 4855–4865
28. Jiang, M. S., Tang, Q. Q., McLenithan, J., Geiman, D., Shillinglaw, W., Henzel, W. J., and Lane, M. D. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 3467–3471
29. Mink, S., Mutschler, B., Weiskirchen, R., Bister, K., and Klempnauer, K. H. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 6635–6640
30. Johnson, P. F., Landschulz, W. H., Graves, B. J., and McKnight, S. L. (1987) *Genes Dev.* **1**, 133–146
31. Landschulz, W. H., Johnson, P. F., Adashi, E. Y., Graves, B. J., and McKnight, S. L. (1988) *Genes Dev.* **2**, 786–800
32. Costa, R. H., Grayson, D. R., Xanthopoulos, K. G., and Darnell, J. E., Jr. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **85**, 3840–3844
33. Lin, P. T., and Lane, M. D. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 8757–8761
34. Wang, N. D., Finegold, M. J., Bradley, A., Ou, C. N., Abdelsayed, S. V., Wilde, M. D., Taylor, L. K., Wilson, D. R., and Darlington, G. J. (1995) *Science* **269**, 1108–1112
35. Scott, L. M., Civin, C. I., Rorth, P., and Friedman, A. D. (1992) *Blood* **80**, 1725–1735
36. Natsuka, S., Akira, S., Nishio, Y., Hashimoto, S., Sugita, T., Isshiki, H., and Kishimoto, T. (1992) *Blood* **79**, 460–466
37. Shimozaaki, K., Nakajima, K., Hirano, T., and Nagata, S. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 25184–25189
38. de Koning, J. P., Soede-Bobok, A. A., Ward, A. C., Schelen, A. M., Antonissen, C., van Leeuwen, D., Lowenberg, B., and Touw, I. P. (2000) *Oncogene* **19**, 3290–3298
39. Lee, C. K., Raz, R., Gimeno, R., Gertner, R., Wistinghausen, B., Takeshita, K., DePinho, R. A., and Levy, D. E. (2002) *Immunity* **17**, 63–72
40. Welte, T., Zhang, S. S., Wang, T., Zhang, Z., Hesslein, D. G., Yin, Z., Kano, A., Iwamoto, Y., Li, E., Craft, J. E., Bothwell, A. L., Fikrig, E., Koni, P. A., Flavell, R. A., and Fu, X. Y. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 1879–1884
41. Wang, Q. F., and Friedman, A. D. (2002) *Blood* **99**, 2776–2785

Annual Review 血液 2006

2006年1月25日発行

中外医学社

4. 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

自治医科大学ゲノム機能研究部教授 間野博行

key words DNA microarray, genomics, AC133, karyotype

動 向

ヒトゲノムプロジェクトが終了し我々のもつ蛋白質をコードする遺伝子の全体像が明らかになりつつある。DNA マイクロアレイを用いることで、これら数万種類の遺伝子の発現量を任意の細胞・組織間で簡便に比べることが可能になった。現在急性骨髄性白血病患者サンプルをマイクロアレイで解析し、得られた遺伝子発現プロファイルの中から患者の長期予後にリンクするものをスクリーニングする試みが精力的に行われている。また最近では患者骨髄の単核球全体を解析するのではなく、きわめて幼弱な造血幹細胞分画のみをあらかじめ純化した後マイクロアレイ解析を行うことも試みられている。同定された予後関連遺伝子群の発現量を基に各患者の予後を予測することがこれらのプロジェクトの目標であり、今後は遺伝子発現プロファイルに基づいた急性白血病の新しい分類法が提案されると期待される。

A. 予後予測法の開発— Over view

ついに2003年4月にヒトゲノムプロジェクトの終了宣言が行われ、ヒト染色体の euchromatin 領域のほぼ完全な塩基配列が決定された (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/seq/>)。

ヒトのもつ蛋白質をコードする総遺伝子数はおそらく2万~2万5千種類前後になると予想されている¹⁾。かつて夢であったヒトの全遺伝子プール²⁾の全貌がいよいよ明らかになる³⁾としており、ポストゲノム時代が訪れたといえる。この膨大な遺伝子情報を有効に使う技術であるゲノミクス・プロテオミクスが、白血病の解析においても重要な役割を担うことは間違いないであろう。今後の医学研究においては、「膨大ではあるがあくまで有限なヒト遺伝子プール」の中から特定の特徴を備えた遺伝子を効率よく同定することが重要になる。ゲノミクス技術の中でもDNAマイクロアレイはすでに複数の疾患で有用な解析ツールとなることが示されてきた^{2,3)}。

マイクロアレイを用いることで数千から数万種類の遺伝子の発現量が比較的簡便に解析可能になった。このようにして得られる遺伝子群の発現様式、発現パターン⁴⁾のことを「遺伝子発現プロファイル (gene expression profile)」とよぶ。このプロファイルを比べることで白血病の特性に迫れるのではないかと考えられる⁴⁾。

具体的な予後予測法の開発手段を図1にまとめる。アルゴリズムの開発を行わずにもともとの遺伝子全体の発現パターンから患者を分ける方法 (unsupervised method) もあるが、そのような

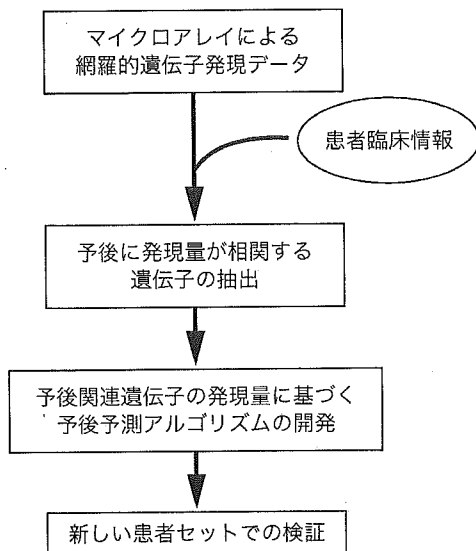


図1 マイクロアレイによる予後予測法開発

DNA マイクロアレイにより得られた膨大な網羅的遺伝子発現データと患者の臨床情報を照合し、予後にリンクした発現量を示す遺伝子をスクリーニングする。次にこれら「予後関連遺伝子」の発現量による予後予測アルゴリズムを開発する。予測法の検証には、最初の解析に用いなかったサンプルを用いることが重要である。

シンプルな解析法で「患者予後」が予測できることはまれであり、図1に示すようなアルゴリズム開発がほぼ必須である。

まず膨大な遺伝子発現データと患者臨床情報（治療反応性、生存期間等）とを照合し、希望する臨床パラメーターに最もよく相関する遺伝子セット、すなわち「予後関連遺伝子」のスクリーニングを行う。具体的には、たとえば患者を「初回寛解導入成功群」と「失敗群」に分け、両群間で統計的に有意に発現量が異なる遺伝子を取り出す、などの処理を行う。この場合、一般的なt検定のみのセレクションでは、どちらの群においてもほとんど発現していない遺伝子がしばしば選ばれるため、何らかの付加的なフィルタリングを行う必要がある。また生存期間に直接リンクする遺伝子をCox proportional hazard解析などで取り

出すこともしばしば行われる。さらに後述のアルゴリズム開発の際に、アルゴリズムソフトウェア自身で最適の遺伝子セットを選び出してくれるものもある。

次の段階として選び出された予後関連遺伝子の発現量を用いて患者サンプルの予後を予測するアルゴリズムを開発する必要がある。これには様々なアプローチがあり、代表的なものに weighted-vote 法、k-nearest neighbor 法、Cox proportional hazard 解析による risk index、supported vector machine (SVM) 法、人工知能、などがある。たとえば前2者についてはフリーソフトウェアの GeneCluster2 (<http://www.broad.mit.edu/cancer/software/geneccluster2/gc2.html>) などを用いて解析可能であり、またこのソフトウェアは各アルゴリズムに最適な遺伝子セット自体の抽出も可能である。これらアルゴリズムを用いて各患者の予後関連遺伝子発現量に基づく予後予測を行う。さらにこれら解析法の有用性は、アルゴリズム開発には用いていないサンプルセットによって検証する必要がある。具体的な検証の仕方には、患者全体を「アルゴリズム開発用のトレーニングセット」と「検証用テストセット」に分ける方法と、「全体から1例のみを取りだし残りのサンプルでアルゴリズムを開発して、外しておいた1例を予測する → これを全サンプルについて繰り返す」方法である cross-validation（または drop-one-out 法）とがある。

B. 急性骨髄性白血病（AML）での応用 —単核球を用いて

AMLは未熟な血液細胞が癌化して生じる疾患であり、これまで様々なパラメーターが治療予後にリンクすることが報告されてきた⁵⁾。現在臨床の場で白血病の診断および予後予測を行う場合、患者骨髄細胞に関して①ペルオキシダーゼ、エス

テラーゼなどの特殊染色, ②FACSを用いた細胞表面マーカーの解析, ③遺伝子異常の有無の解析 (免疫グロブリン遺伝子やT細胞表面受容体遺伝子の再構成, BCR-ABL 遺伝子, PML-RAR α 遺伝子などの有無), ④染色体型の解析, などの検査が利用される⁶⁾. これらを総合的に解析することで予後にある程度リンクした診断が行えるが, 上記の解析を全て行うのは煩雑であり多くの専門技術も必要となる. 一方, たとえば1枚のDNAマイクロアレイを用いることで旧来の方法で得られる情報が全て解析可能となれば, 診断はより簡便になりかつ異なった施設間での診断の一致率も上昇するであろう. 骨髄中の血球の多くは単核球 (mononuclear cell) とよばれる分面に相当し, これまでAML患者骨髄単核球を用いたDNAマイクロアレイ実験により患者予後を予測する試みが行われてきた.

Yagiらは小児AML患者54例についてAffymetrix社GeneChip HGU95Aチップを用いた遺伝子発現解析を行い, 小児AML内での予後

良好群と不良群とを予測する試みを行っている⁷⁾. 彼らのサンプル内で3年以上完全寛解を維持している症例9例と初回緩解導入に失敗した症例9例の間で発現量が統計的に異なる遺伝子133種類を抽出し (図2A), これら予後関連遺伝子の発現量をもととして, 患者全体を二次元クラスタリング法あるいはSVM法によって層別化した. その結果どちらの方法によってもAML内で生命予後が異なるサブグループを検出することに成功している (図2B). すなわち遺伝子発現プロファイルを基にした新しい疾患分類法の可能性が提示されたことになる.

同様にBullingerらはAML患者116例の骨髄単核球よりmRNAを調整し, 約3万9千種類のcDNAを配置したマイクロアレイで解析を行っている⁸⁾. 彼らは患者をtraining setとtest setに分け, 前者のデータを用いて患者予後に発現量がリンクする遺伝子をスクリーニングした. その結果, 100種類以上の予後予測遺伝子セットを同定することに成功している. さらにこれら遺伝子の発現

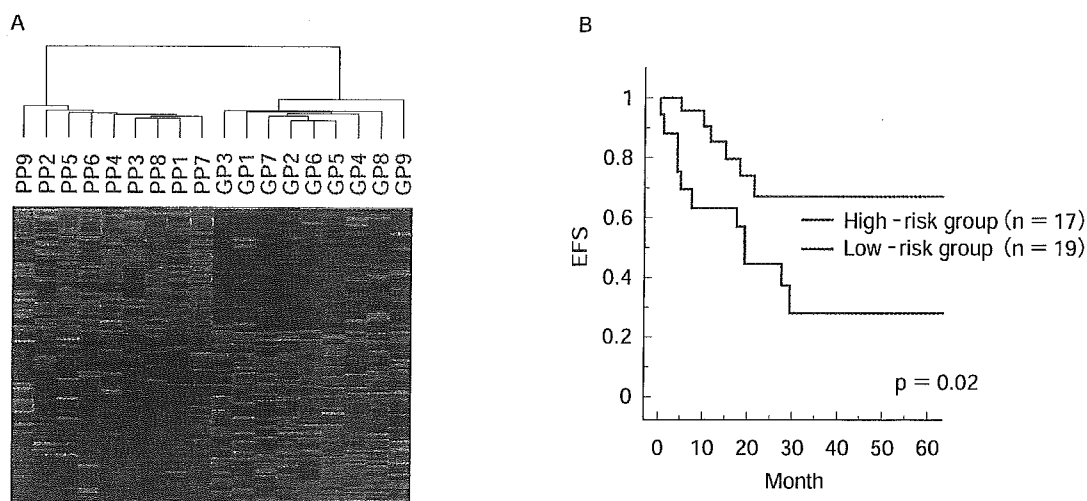


図2 骨髄単核球の発現プロファイルによる予後予測 (文献7より改変)

A: 長期生存症例 (GP) と予後不良症例 (PP) 間で発現が異なる遺伝子を取り出したところ133種類同定された. これら遺伝子の発現量で二次元クラスタリングを行った. B: 上記遺伝子の発現量でテストサンプルを二次元クラスタリングし, 大きくわかれた2群間で予後を比較した.

量を基に患者を2群に分け、その予後を比較したところ、2群の生命予後は有意に異なっていた ($p < 0.001$)。またあらかじめ取っておいた test set において検証したところ、やはり2群の予後は大きく違っている ($p = 0.006$) ことが示された。これらの予後分類法が現行の核型に基づく分類法とは独立したものであることを示すために、彼らは核型分類では中間群に分類される「正常核型」をもった患者のみを選択し、その予後予測も試みている。彼らの分類法を適応したところ、正常核型の中でも予後良好群と不良群とを区別することに成功した ($p = 0.046$)。彼らの解析は旧来の核型分類法とは異なった新しい予後予測法の可能性を示唆しており興味深い。

また Valk からも同様の目的から、285 例の AML 患者骨髄単核球を用いて約 13,000 種類の遺伝子に関する発現量を測定した。彼らもやはり予後にリンクした遺伝子発現プロファイルがあることを検出している⁹⁾。

C. 急性骨髄性白血病 (AML) での応用 — 純化細胞を用いて

しかし実際に DNA チップを用いた実験を行うと、本法が意外にも偽陽性データが多く効率の悪い手技であることにも気付く。その理由をたとえば健常人と白血病患者の骨髄を比べる場合で考えてみよう (図3)。正常骨髄は様々な系統の細胞群からなる「ヘテロ」な集団である。もし今この骨髄中の多能性幹細胞の1クローンが悪性転化し白血病になったと仮定すると、白血病患者の骨髄は幹細胞由来の白血病細胞が多くを占めるようになり、それ以外の細胞の骨髄における割合は相対的に低下する。したがって両者の骨髄細胞 (あるいは単核球) 全体を単純に比較するような DNA チップ解析を行うと、造血幹細胞分画以外の細胞 (たとえば図3の青色細胞) 特異的に発現する遺

伝子などは全て減少してみえてしまう。この変化は、それぞれの遺伝子の細胞内における mRNA のコピー数を反映しておらず、誤って「発現減少」と判断されたわけである。一方、幹細胞特異的に発現していた遺伝子は、細胞あたりの発現量の変化の有無にかかわらず骨髄中における割合が増加するために誤って「発現誘導」と判断されることになる¹⁰⁾。これらの様々な偽陽性や偽陰性データのノイズの中から真に「癌化に伴って細胞あたりの発現量が増加する」遺伝子を選択するのはきわめて困難であろう。

ではどのようにしてこれら偽陽性データを回避する効率のよいゲノム解析が可能であろうか? 白血病を含む多くの血液悪性疾患が、造血幹細胞あるいはそのごく近傍の幼若細胞における悪性転化に起因することが知られる。そこで患者骨髄より造血幹細胞相当分画のみを純化しこれを用いてマ

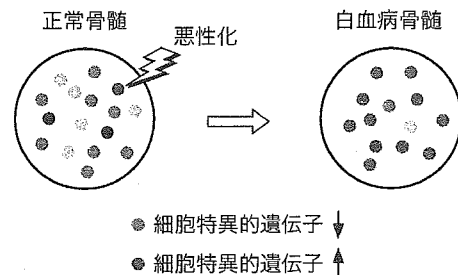


図3 「Population shift 効果」による偽陽性データ
正常骨髄は様々な細胞からなるヘテロな集団である。今その中から緑色細胞が悪性化し白血病が生じたとすると、患者骨髄内は結果的に緑色由来の細胞が大半を占めることになり、それ以外の細胞の割合は相対的に減少する。したがって骨髄全体を正常と白血病患者で比べるような単純なマイクロアレイ解析を行えば、青色細胞特異的な遺伝子は必ず減少しているように見え、逆に緑色細胞特異的な遺伝子の発現は必ず増加しているようにみえてしまう。このような変化は実際の細胞内での発現変化を反映しているわけではなく、単に骨髄内でのポピュレーションの変化を見ているに過ぎない。この「population shift 効果」による見せかけの発現変化が大量の偽陽性データを生み出すもととなる。

マイクロアレイ解析を行えば、患者骨髄中の芽球の割合や芽球の分化傾向の違いに影響されない、精度の高い解析が可能になると期待される。我々は造血幹細胞分画に特異的に発現する膜蛋白 AC133¹¹⁾ に着目し、AC133 に対するアフィニティカラムを用いて広く血液悪性疾患患者より造血幹細胞相当分画を純化保存するバンク事業「Blast Bank」を開始した。2004年12月現在すでに Blast Bank のサンプル数は 600 例を超えており、純化細胞のゲノミクスプロジェクトとしては世界最大級といえる¹²⁻¹⁴⁾。

では具体的に Blast Bank を用いて白血病の予後予測が可能か否か検討してみよう。我々はヒト全遺伝子が配置された DNA マイクロアレイを用いて標準的治療を受けた AML 患者 66 例の骨髄 AC133 陽性細胞について遺伝子発現プロファイルデータを得た。これら 66 例の患者中初回化学療法によって完全寛解 (complete remission: CR) に到達した症例は 51 例あり、残り 15 例は寛解導入に失敗した。後者 15 例は 1 年以内に全員死亡しておりきわめて予後不良なグループといえる。この初回化学療法に成功した患者と失敗した

患者の間では遺伝子発現プロファイルは違うのであろうか？ それを検討するために 4 万 4 千種類のプローブセット (3 万 3 千種類の遺伝子に相当) の発現データ中、両グループ間で発現が有意に異なる遺伝子を選び出し、さらに少なくともどちらかのグループでは高い発現量を示す遺伝子をスクリーニングしたところ、最終的に約 30 種類の遺伝子が得られた。得られた遺伝子の発現プロファイルはそれぞれが互いに独立なわけではなく、よく似たものも多い。そこで correspondence analysis 法¹⁵⁾ によって、これら 30 種類の発現量パターンから全体を最も代表する仮想発現プロファイルを 3 種類抽出した (すなわち代表的な仮想発現パターンそれぞれを作る仮想遺伝子 3 種類を作成したことになる)。これら仮想遺伝子 3 種類を軸とした仮想空間に各サンプルを投射したのが図 4A である。その結果興味深いことに治療奏効症例と失敗症例とは空間上不連続な位置に独立して存在することがわかった。いい換えると両グループは遺伝子発現プロファイルの面では異なった集団に属するのだ。

このような空間上の位置は患者予後にリンクし

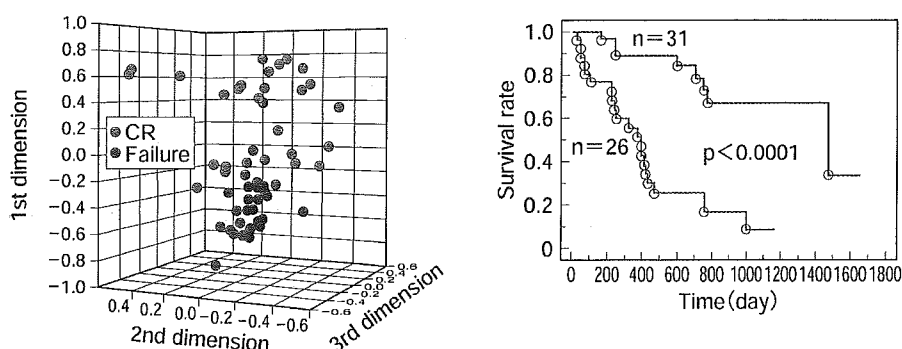


図4 AC133陽性細胞を用いた予後予測 (文献16より改変)

A: 化学療法による初回寛解導入が成功した群 (CR) と失敗した群 (Failure) との間で有意に発現量が異なる遺伝子を選択し、その発現プロファイルから代表的なものを 3 種類抽出した。これらプロファイル上の仮想発現量に基づいてサンプルを空間に投射したところ、CR 群と Failure 群とは異なる位置に配置された。B: 仮想空間の Z 軸の値が -0.3 未満 (青色) か以上 (赤色) かによって患者を 2 分し、その予後を Kaplan-Meier 法で比較した。

ているのであろうか？ 図4Aをよく見てみると、患者サンプルはZ軸上で最も強く分離されていることがわかる。そこで症例の仮想空間上でのZ軸上の値が-0.3未満か-0.3以上かによって大きく2群に分け、その長期生命予後をKaplan-Meier法によって解析してみた。図4Bで明らかのように両群は大きく予後が異なることがわかる。しかも様々な方法で予後関連遺伝子を絞り込んだ結果、数種類の遺伝子の発現量を測定するだけで患者の長期予後を予測可能なことまで明らかになった¹⁶⁾。これらの予後関連遺伝子数は、以前の骨髄単核球による解析で同定された100種類以上の予後関連遺伝子数に比べて明らかに少ない。純化した細胞を標的として解析することで分化傾向などによるノイズが低減し、少数の遺伝子で予後予測可能になったのではないかと考えられる。

むすび

DNA マイクロアレイがその新規性のみで注目・検討された時期は終わりつつあり、比較的高額な実験費用に見合うだけの有用性が本当にあるのかが問われる時代になった。ヒトゲノムプロジェクトの成果は、医学にとってきわめて貴重(かつ膨大)な情報リソースであり、この有効活用なくして21世紀の医療はなり立たないであろう。必ずしもDNA マイクロアレイが理想のシステムとはいえないが、現段階でヒトゲノム情報の網羅的利用に関してDNA マイクロアレイを超える技術は存在しない。実際の実験にあたっては「網羅的発現比較によって何を明らかにしたいのか」を明確に念頭に置き、そのための最も効率よいアプローチを検討することが重要であろう。DNA マイクロアレイシステムは慎重にデザインされた実験においてのみ、そのきわめて高いスクリーニング能力を発揮すると考えられる。

文献

- 1) International Human Genome Sequencing Consortium. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature*. 2004; 431: 931-45.
- 2) Dhanasekaran SM, Barrette TR, Ghosh D, et al. Delineation of prognostic biomarkers in prostate cancer. *Nature*. 2001; 412: 822-6.
- 3) van't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, et al. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature*. 2002; 415: 530-6.
- 4) Rhodes DR, Chinnaiyan AM. Integrative analysis of the cancer transcriptome. *Nat Genet*. 2005; 37 Suppl: S31-7.
- 5) Grimwade D, Walker H, Oliver F, et al. The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: analysis of 1,612 patients entered into the MRC AML 10 trial. The Medical Research Council Adult and Children's Leukaemia Working Parties. *Blood*. 1998; 92: 2322-33.
- 6) Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, et al. Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. A report of the French-American-British Cooperative Group. *Ann Intern Med*. 1985; 103: 620-5.
- 7) Yagi T, Morimoto A, Eguchi M, et al. Identification of a gene expression signature associated with pediatric AML prognosis. *Blood*. 2003; 102: 1849-56.
- 8) Bullinger L, Dohner K, Bair E, et al. Use of gene-expression profiling to identify prognostic subclasses in adult acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2004; 350: 1605-16.
- 9) Valk PJ, Verhaak RG, Beijnen MA, et al. Prognostically useful gene-expression profiles in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2004; 350: 1617-28.
- 10) Miyazato A, Ueno S, Ohmine K, et al. Identification of myelodysplastic syndrome-specific genes by DNA microarray analysis with purified hematopoietic stem cell fraction. *Blood*. 2001; 98: 422-7.
- 11) Hin AH, Miraglia S, Zanjani ED, et al. AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood*. 1997; 90: 5002-12.
- 12) Tsutsumi C, Ueda M, Miyazaki Y, et al. DNA microarray analysis of dysplastic morphology associated with acute myeloid leukemia. *Exp Hematol*. 2004; 32: 828-35.

- 13) Ota J, Yamashita Y, Okawa K, et al. Proteomic analysis of hematopoietic stem cell-like fractions in leukemic disorders. *Oncogene*. 2003; 22: 5720-8.
- 14) Oshima Y, Ueda M, Yamashita Y, et al. DNA microarray analysis of hematopoietic stem cell-like fractions from individuals with the M2 subtype of acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2003; 17: 1990-7.
- 15) Fellenberg K, Hauser NC, Brors B, et al. Correspondence analysis applied to microarray data. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001; 98: 10781-6.
- 16) Mano H. Stratification of acute myeloid leukemia based on gene expression profiles. *Int J Hematol*. 2004; 80: 389-94.

表 題

著 者 名

醫學のあゆみ 別刷

第 卷・第 号： 年 月 日号

遺伝子発現解析に基づく予後判定

Prognosis prediction based on gene expression profile



間野 博行

Hiroyuki MANO

自治医科大学ゲノム機能研究部

◎すでに病因となる遺伝子が明らかなリンパ腫においては、その遺伝子の発現を RT-PCR 法で定量することにより鑑別診断および患者の予後判定が可能になりつつある。一方、病因が不明なリンパ腫においては、DNA マイクロアレイを用いた患者の層別化が新しいリンパ腫の予後予測法として注目されている。DNA マイクロアレイを用いることで数千～数万種類の遺伝子の発現量を一度の実験で明らかにすることができるが、これら膨大な発現データのなかから患者の治療反応性・長期予後にリンクした遺伝子を同定することが現在研究されている。

Key word : 定量的real-time RT-PCR法, 染色体転座, DNAマイクロアレイ, 遺伝子発現プロファイル

t(15;17)を有する急性前骨髄球性白血病が、その原因遺伝子産物を標的としたオールトランスレチノイン酸によって寛解導入可能なこと、また t(9;22)を有する慢性骨髄性白血病が、やはりその原因遺伝子産物を標的とした STI571 によって高率に細胞遺伝学的寛解に導入可能なことは、いずれも病因単位の疾患分類が治療・予後予測に直結していることを明瞭に示している。したがって、WHO による新しい白血病分類案も原因遺伝子による区分を優先したものになった¹⁾。

一方、リンパ腫の発生メカニズムはいまだ不明な点が多く、原因遺伝子異常が明らかになったものとして、①マンテル細胞リンパ腫における cyclin D1 の高発現、②濾胞性リンパ腫における BCL2 の高発現、③びまん性大細胞型リンパ腫における BCL6 の高発現、④未分化大細胞型リンパ腫における NPM-ALK 融合遺伝子の発現、および、⑤MALT リンパ腫における API2-MALT1 融合遺伝子の発現などがあげられるにすぎない。したがって、現行のリンパ腫の疾患分類単位は多くの場合“症候群”と考えるべきであろう。

病因が解明されている場合は、その発症責任遺伝子あるいは遺伝子産物の発現を定量すること

で、治療法の選択および患者の予後予測などに重要な情報を得ることができる。しかし、病因が不明な場合のさらなる層別化には、このようなアプローチは不可能であり、現段階では DNA マイクロアレイが有効なツールと期待されている。これら遺伝子発現の定量法は、他の免疫組織化学染色、核型解析、フローサイトメータ解析などと組み合わせられることで、各患者の予後予測に重要な役割を果たすと予想される。

単一遺伝子の発現定量

1. マントル細胞リンパ腫

マンテル細胞リンパ腫の多くに t(11;14) (q13;q32) 転座が認められる。この染色体異常の結果、免疫グロブリン *IgH* 遺伝子の転写調節領域がサイクリン D1 (*CCND1*) 遺伝子と結合し、後者の遺伝子発現を誘導することになる。*CCND1* は代表的な G1 期サイクリンであり、サイクリン依存性キナーゼ (CDK) を活性化させることで細胞周期を G1 期から S 期に移行させる。マンテル細胞リンパ腫においては *CCND1* の発現が正常のコントロールからはずれ、*IgH* のプロモーターエンハンサーによって強制的に活性化されることで細胞の

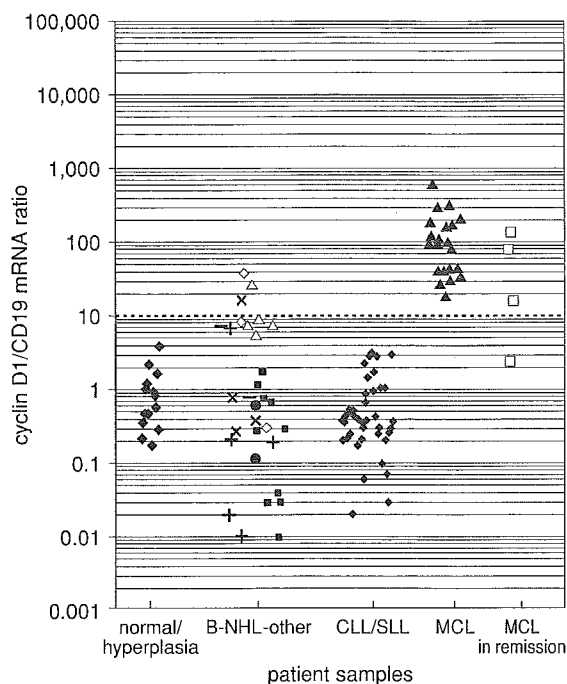


図1 リンパ腫患者におけるcyclin D1 mRNAレベル(文献³⁾より改変)

健常人および良性リンパ節過形成(normal/hyperplasia), 慢性リンパ性白血病および小リンパ球性リンパ腫(CLL/SLL), マントル細胞リンパ腫(MCL)およびその寛解期(in remission), さらにそれ以外のBリンパ球性非Hodgkinリンパ腫(B-NHL-other)の各検体について定量的real-time RT-PCR法を行い, cyclin D1 cDNAとCD19 cDNAの比をプロットした。

異常増殖がもたらされると予想されている。CCND1転写の異常活性化は他のリンパ腫ではほとんど認められず, マントル細胞リンパ腫の鑑別診断上きわめて重要である。とくに同リンパ腫の生命予後は悪いため, CD5⁺リンパ腫の診断上, CCND1の発現確認は必須の検査といえよう。

これまで, CCND1の発現は抗CCND1抗体を用いた免疫組織化学染色によって判定されることが多かった。しかし, CCND1蛋白の染色性は用いる抗体によってまちまちであり, 近年は定量的RT-PCR法によってCCND1 mRNAを直接測定することが試みられるようになった。Huiらは定量的PCR法であるreal-time RT-PCR法によりパラフィン包埋リンパ節検体のCCND1 mRNAの定量を行い, 他の蛋白質定量法との比較検討を行っている。その結果, mRNA定量法は免疫組織化学染色法と同程度以上の検出感度を有することが明ら

かになった²⁾。CCND1 mRNAの高発現が真にマントル細胞リンパ腫に特異的であれば, 本来悪性細胞が微量にしか存在しない末梢血や骨髓血細胞などを検体としても, 同疾患の診断が可能ではないかと予想される。そこでHoweらは, これら腫大リンパ節以外の臨床検体においてRT-PCR法により疾患特異的なCCND1 mRNA増加を検出できないか検討した³⁾。CCND1 mRNAとCD19 mRNAとの量比をプロットしたところ, 図1に示されるとおりマントル細胞リンパ腫特異的な上昇が確認された。本法は, 最適化されることで実際の臨床の場できわめて予後不良のリンパ腫を精度よく診断可能にすると期待される。しかも図1にあるように, その測定値はリンパ腫細胞量の減少に伴い低下しており, 末梢血を用いた検査でリンパ腫の残存量をフォローできる可能性が示唆された。

2. MALTリンパ腫

一部の悪性リンパ腫においては, 染色体転座の結果, 疾患特異的な融合遺伝子が生じる。融合遺伝子は疾患細胞以外には存在しないため, その検出は鋭敏かつ信頼性の高い診断法となる。悪性リンパ腫における融合遺伝子として, これまでMALTリンパ腫におけるAPI2-MALT1と未分化大細胞型リンパ腫のNPM-ALKが知られている。前者はt(11;18)(p21;q21.2)の, 後者はt(2;5)(p23;q35)の染色体転座の結果それぞれ生じたものである。たとえば, API2-MALT1融合遺伝子はAPI2遺伝子の図2上の矢印に示す位置で切断が生じ, 同図下の矢印の箇所でMALT1遺伝子に結合する。したがって, この結合部位を挟む形でAPI2 cDNA上に5'-プライマーを, MALT1 cDNA上に3'-プライマーを設定すれば, 融合遺伝子由来cDNAのみを増幅することができる。実際, Liuらは罹患部位より調整したRNAをもとにcDNAを作製し, 融合部位の5'側, 3'側それぞれに2種類のプライマーを設定したnested PCRをかけて融合cDNAの検出(RT-PCR)を行った⁴⁾。彼らは100万個中に1個しか存在しない悪性細胞もこの方法で検出可能なことを示しており, きわめて鋭敏に診断可能なことを明らかにした(ただしnested PCRのデータは定量的ではなくことが多い)。

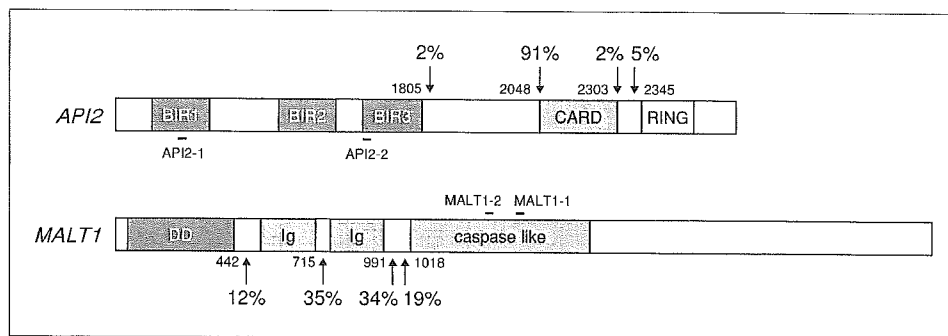


図 2 API2-MALT1融合遺伝子(文献⁴⁾より改変)

API2 遺伝子と MALT1 遺伝子の蛋白産物の構造と t(11;18)における各遺伝子の切断部位を矢印で示す(各切断点の頻度も%で表す)。これら切断点を挟むように API2 cDNA 上で 2 カ所(API2-1, API2-2), MALT1 cDNA 上で 2 カ所(MALT1-1, MALT1-2)にプライマーを設置し, RT-PCR を行った。

上述のとおり, 染色体転座の結果, 融合遺伝子が生じる場合は精度の高い鑑別診断が可能になる。しかし, これまでのところ融合遺伝子が明らかになったリンパ腫はむしろ例外的であり, 多くの場合は転写調節領域の置き換えによって何らかの内在性遺伝子の発現が上昇するのみである。このような場合は, 遺伝子の発現量を定量的に測定することが重要になるが, リンパ腫特異的な発現量を定義することは簡単ではない。このような場合は, 長い領域を増幅可能な long-distance PCR を行い, 融合したゲノム自体を検出する方法も有効である⁵⁾。

● 複数遺伝子の発現定量 — DNAマイクロアレイ

1. DNAマイクロアレイの仕組み

多くのリンパ腫はいまだなお原因不明であり, 前項のように原因遺伝子の発現に基づいて患者の予後予測を行うことは不可能である。そこで近年盛んに研究されるようになったのが, DNAマイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析である。

DNAマイクロアレイはスライドガラスなどの担体の上に cDNA, あるいは遺伝子由来のオリゴヌクレオチドを高密度に配置したものであり, スライド上の数千から数万種類の遺伝子の相対的発現量を一度の実験で解析することができる。データベース上に存在するヒトの全遺伝子を配置した DNAマイクロアレイもすでに市販されており(アフィメトリクス社, HG-U133 GeneChip[®] な

ど), これらの高密度 DNA マイクロアレイを用いることで, たとえばヒト全遺伝子の発現量を任意の疾患間(あるいは健常人)と比較し, 新しい予後予測法を開発することも可能であると期待されるし, また DNA マイクロアレイによって得られる発現データを用いて疾患の分類自体に新しい体系を導入することも予想される。

では, 具体的に DNA マイクロアレイを用いてスポットされた遺伝子群の組織 A と組織 B における発現の変化を解析する実験を考えてみよう。組織 A と B からそれぞれ mRNA を抽出し, オリゴ dT プライマーを結合させる。これに逆転写酵素を加えて組織 A と B それぞれの cDNA を作製するわけであるが, 組織 A の cDNA を合成する際に蛍光色素 Cy3 が結合した dUTP を添加し, cDNA に Cy3 を取り込ませる。同様に, 組織 B の cDNA を合成する際には Cy5-dUTP を添加して蛍光色素 Cy5 を取り込ませる。その結果, A と B の cDNA は異なった波長の emission light を有する蛍光色素で標識されたことになる。これらを等量混合し, さきほどの cDNA マイクロアレイと hybridize させるわけである⁶⁾。その結果, Cy3 標識 cDNA と Cy5 標識 cDNA は, スポット上の各遺伝子の組織 A と B における発現量の比に応じた形でスポットに結合する。この DNA マイクロアレイをレーザーで励起すると, Cy3 は緑色, Cy5 は赤色の蛍光を発するため, あるスポット上の遺伝子が組織 A のみに発現していれば緑色のスポットとなり, B のみに発現していれば赤色のスポットとなる。また,

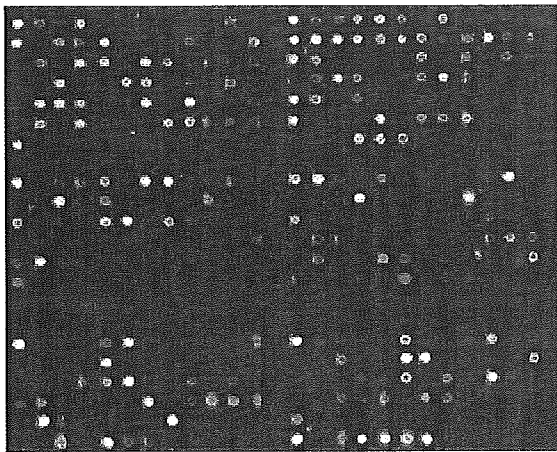


図3 DNAチップのスキャン画像

cDNAチップをスキャンした画像を示す。2種類のサンプルから調整したcDNAをそれぞれCy3とCy5の蛍光色素で標識し、混合してhybridizeした。Cy3標識cDNAがおもに結合したスポットは緑色、Cy5標識cDNAがおもに結合したスポットは赤色、両者がほぼ等量結合したスポットは黄色で表される。

両組織においてほぼ等量に発現している遺伝子の場合は黄色のスポットとしてみる(図3)。

このようにして各スポットにおける両色素の蛍光強度を測定することで、それぞれのスポット上の遺伝子の測定サンプル間における発現比が定量できる。1枚のDNAマイクロアレイ上には数千~数万種類のDNA断片が配置されており、1回の実験でこれら数多くの遺伝子の発現変化を包括的に解析できるのである。

2. びまん性大細胞型リンパ腫

Bリンパ球由来のびまん性大細胞型リンパ腫は、日常の臨床でもっとも高頻度に遭遇する非Hodgkinリンパ腫のサブタイプである。同疾患はしばしばCHOP療法などアントラサイクリン系薬剤を中心とした化学療法が有効であるが、寛解となった症例のなかには再発を繰り返すものも多い。Alizadehらは、DNAマイクロアレイを用いてびまん性大細胞リンパ腫のなかで再発が少ない予後良好群と予後不良群とを鑑別する可能性を検討した⁷⁾。この目的のために、まず濾胞中心Bリンパ球および各種悪性リンパ腫のcDNAライブラリーから得られたcDNAなど計17,856遺伝子をスポットしたカスタムチップを用意し、びまん性大細胞型リンパ腫、濾胞性リンパ腫、および慢性

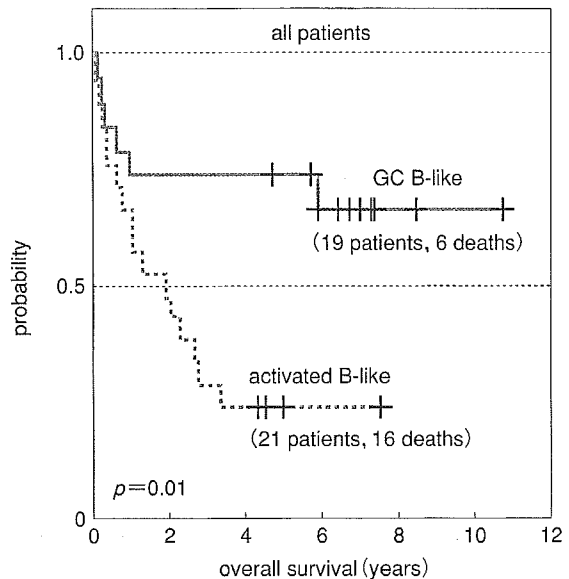


図4 びまん性大細胞型リンパ腫の予後(文献⁷⁾より改変)

びまん性大細胞型悪性リンパ腫患者をリンパ節の遺伝子発現プロファイルから“濾胞中心Bリンパ球に発現パターンが似たサンプル群(GC B-like)”と“活性化Bリンパ球に似た群(activated B-like)”に分け、両者の生命予後をグラフにした。後者が有意に予後不良群であることがわかる。

リンパ性白血病の患者サンプルを用いてDNAマイクロアレイ解析を行った。また、比較のために健常人より得られた各種リンパ組織サンプル、および刺激を加え活性化させた末梢B、Tリンパ球などについても検討している。

その結果、びまん性大細胞リンパ腫には濾胞中心Bリンパ球に遺伝子発現パターンが似ている群と活性化Bリンパ球に似ている群が存在することが示され、しかも両群間で予後に有意な差が認められることが明らかになった。すなわち、活性化Bリンパ球に似た細胞からなるリンパ腫患者の5年生存率(16%)は、濾胞中心Bリンパ球に似た細胞からなるリンパ腫患者のそれ(76%)に比べて有意に低いのである(図4)。このことは、DNAマイクロアレイによる解析で非Hodgkin悪性リンパ腫のあらたなサブグループが定義可能なこと、しかもその分類が予後判定に有意な情報を与えることを示唆しており、今後の臨床におけるDNAマイクロアレイのあらたな可能性を示したものとして意義深い。

また、Rosenwaldらは、アメリカ National Cancer

Instituteにて作製したcDNAマイクロアレイ(Lymphochip, 約12,200種類のヒト遺伝子cDNAを配置)を用いてびまん性大細胞型リンパ腫240例のサンプルにおいて遺伝子発現プロファイルを得た⁸⁾。Alizadehらが報告した“濾胞中心Bリンパ球に発現パターンが似たサンプル群”と“活性型Bリンパ球に似たサンプル群”を鑑別するのに役立つ100種類の遺伝子における発現量をもとに今回の240例をクラスタリングすると、サンプルがAlizadehらの提唱する2群とさらに第3のグループ“type 3 subgroup”に分けられることがわかり、また各グループの平均5年生存率はそれぞれ60%、35%、および39%であった。旧来用いられてきた予後予測法(international prognostic index: IPI)⁹⁾によるサブグループの割合はこれら3群間で分布に偏りが無いため、遺伝子発現プロファイルはIPIスコアとは独立した予後予測法であることがわかった。

おわりに

悪性リンパ腫の多くが原因不明な今日において、DNAマイクロアレイによる網羅的発現解析は予後予測法の開発だけでなく、発症原因の解明自体にも有用である。しかし、これらの研究のためにはそれぞれのプロジェクトに即した注意深い実験デザインが必要であろう。

マイクロアレイによる予後予測法の開発は、いわば原因遺伝子の細胞内における最終的な表現形である遺伝子発現を“網羅的発現解析データ”とい

うフィルターを通して類推し、パターン分類しているといえるのではないであろうか。現行のマイクロアレイ実験は手技も煩雑であり、費用もかかるが、パターン認識の精度が上がるに伴い、少ない遺伝子セットで分類できるようになると予想される。そのためには、なによりも大量の検体の解析データが重要であろう。一方、病因自体の解明をめざす解析の場合は、対象となるリンパ節内の何を何と比べるかについて慎重な考察が必要である。たとえば、Hodgkin病のリンパ節のように非腫瘍細胞が多くを占めるような場合は、単にリンパ節全体をマイクロアレイで比較しても正解にたどり着くのは困難であろう。本稿で便宜的に区分した“単一遺伝子による予測”と“マイクロアレイによる予測”が、遠くない将来に合流することを期待したい。

文献

- 1) Jaffe, E. S. et al. (eds.) : Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. IARC Press, Lyon, 2001.
- 2) Hui, P. et al. : *Leuk. Lymphoma.*, **44** : 1385-1394, 2003.
- 3) Howe, J. G. et al. : *Clin. Chem.*, **50** : 80-87, 2004.
- 4) Liu, H. et al. : *Blood*, **98** : 1182-1187, 2001.
- 5) Akasaka, T. et al. : *Genes Chromosomes Cancer*, **21** : 17-29, 1998.
- 6) Duggan, D. J. et al. : *Nat. Genet.*, **21** : 10-14, 1999.
- 7) Alizadeh, A. A. et al. : *Nature*, **403** : 503-511, 2000.
- 8) Rosenwald, A. et al. : *N. Engl. J. Med.*, **346** : 1937-1947, 2002.
- 9) The International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project : *N. Engl. J. Med.*, **329** : 987-994, 1993.

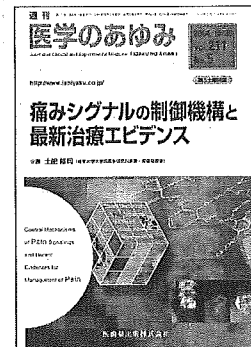
* * *

痛みシグナルの制御機構と最新治療エビデンス

企画／土肥修司 岐阜大学大学院医学研究科麻酔・疼痛制御学

B5判・270頁・定価5,040円(本体4,800円 税5%)

- 痛みの基礎的・臨床的研究は飛躍的に進歩している。とくに近年その情報伝達に関する分子メカニズムの解明が進んできているが、ニューロパシクペインなど難治性疼痛のメカニズムは複雑で、その機序の一端が基礎的研究で明らかとなった段階である。
- これまで十分に理解されていなかった“患者の訴える痛みの本体”がかなり明らかになってきた。痛みは単一の原因によるものではなく、生理的(侵害受容性)疼痛、炎症性疼痛、ニューロパシクな疼痛の3つのカテゴリーに属する痛みが組み合わさった病態であり、複数の機序が関与している。
- 本別冊では、痛みの基礎的メカニズムから最新治療エビデンスまでを網羅し、わが国痛み研究の最前線を紹介。



CONTENTS

はじめに—“痛み研究の10年”この5年

【疼痛の生理機構と分子メカニズム】

痛み受容体の神経生理と炎症時の変化 慢性疼痛発現における電位依存性Naチャンネルの役割—最近の研究の展望 オピオイド鎮痛の分子メカニズム—オピオイド受容体複合体形成と受容体間相互作用 セロトニン受容体サブタイプと慢性痛 ノシセプチンの疼痛制御 プロスタグランジンと疼痛修飾—新規鎮痛薬の開発に向けて ATP・アデノシンの疼痛受容における役割—ATPを介するミクログリア活性化と神経因性疼痛 カプサイシン受容体の役割 痛覚伝達における炎症性サイトカインの役割 オレキシンと痛み—とくに脊髄侵害刺激伝達におけるオレキシンの役割 侵害受容ニューロンにおけるMAPKの活性化と痛み 痛覚伝達路の可塑性と神経栄養因子 神経因性疼痛誘発因子としてのリゾホスファチジン酸

【複雑な痛みの機構—ニューロパシクペイン・侵害受容性疼痛・疾患特有】

CRPSの病態とニューロパシクペイン 痛みと交感神経活動—痛みに対する交感神経系の関与 手術後痛 筋・骨格系の痛み 線維筋痛症 視床痛と幻肢痛 手術後の慢性痛—特徴と対策 ペインイメージング—イメージング手法を用いた痛覚認知のメカニズムの研究 痛みの評価法と治療効果

【治療の最前線 1—疾患別治療】

片頭痛・群発頭痛の治療トピックス 心血管系の虚血性疼痛 CRPS type I—ペインクリニックでの治療 CRPS type II (カウザルギー)の治療 急性帯状疱疹痛と帯状疱疹後神経痛 関節リウマチと痛み がん性疼痛治療—患者が満足する治療法をめざして 糖尿病性神経障害—痛みの成因と治療 PCAポンプを利用した術後痛管理の実際 ペインクリニック医が携わる肩・上肢痛の治療 胸部痛—診断治療のポイントと疼痛学 腹痛に対する治療方針 椎間板ヘルニアによる腰痛・下肢痛に対する新しい保存療法—基礎的研究と臨床応用の可能性 分娩痛の発生機構とその制御(無痛分娩) 小児の痛みをどう治療するか

【治療の最前線 2—特殊な治療】

NSAIDsを用いた治療の新展開 “痛みが楽になった”と実感させるオピオイド鎮痛薬の使い方 慢性痛での抗うつ薬の適応—SSRIとSNRIを中心に 硬膜外鎮痛と先制鎮痛 イオンチャンネル作用薬による疼痛治療—Naチャンネル遮断薬を中心にして 鎮痛補助薬の使い方—GABA受容体作動薬, α_2 受容体作動薬, NMDA受容体拮抗薬を中心に 神経ブロックの適応—診断への応用 交感神経ブロック 慢性疼痛に対する神経ブロック療法—胸部傍脊椎ブロックの有用性 神経ブロックの適応—腹部内臓痛 椎間関節ブロックが適応となる痛み 神経ブロックの適応—くも膜下腔酢酸メチルプレドニゾロン投与の鎮痛効果とメカニズム 脊髄電気刺激療法—現状と将来 難治性求心路遮断痛に対する大脳一次運動野選択的刺激療法 物理的鎮痛法—光線療法, 温熱療法, 電気療法 東洋医学的治療—漢方療法 心因性疼痛—慢性疼痛

【特別寄稿】

“痛み10年”宣言と脳の世紀

● 弊社の全出版物の情報はホームページでご覧いただけます。 <http://www.ishiyaku.co.jp/>



医歯薬出版株式会社

〒113-8612 東京都文京区本駒込1-7-10 / TEL. 03-5395-7630 FAX. 03-5395-7633

2004年11月作成.15

綜合臨牀 第54巻第6号
(平成17年6月1日発行 別刷)

マイクロアレイを用いた
造血器悪性腫瘍の分類と予後
Microarray-based prediction of prognosis for hematological malignancies

間野 博行
MANO Hirayuki

永 井 書 店

マイクロアレイを用いた 造血器悪性腫瘍の分類と予後

Microarray-based prediction of prognosis for hematological malignancies

特集

間野 博行
MANO Hiroyuki

臨床血液学 最近の進歩

Key words DNA マイクロアレイ 遺伝子発現プロファイル 急性骨髄性白血病

I. DNA マイクロアレイ

約30億塩基対に及ぶヒトゲノムの核酸配列を決定する大規模事業である「ヒトゲノムプロジェクト」がついに2003年4月に終了宣言を行い、ヒト染色体の euchromatin 領域のほぼ完全な塩基配列が決定された(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/seq/>)。ヒトの持つ蛋白をコードする総遺伝子数はおそらく2万~2万5千種類前後になると予想されている¹⁾。かつて夢であったヒトの全遺伝子プールの全貌がいよいよ明らかになるうとしており、ポストゲノム時代が訪れたと言える。

DNA マイクロアレイはスライドガラスなどの小さな担体上に、解析する遺伝子由来の cDNA あるいはオリゴヌクレオチドを高密度に配置したものであり、いわば超高密度ドットプロット法といえよう²⁾。一度のハイブリダイゼーション実験で、アレイ上のすべての遺伝子の発現を定量することが可能であり、例えば全ヒト遺伝子の発現量を任意のサンプル間で比較することも現実のものとなりつつある。このようにマイクロアレイを用いることで、これまでとは比較にならないような膨大な遺伝子発現データを解析することができる

自治医科大学ゲノム機能研究部 教授

ようになった。こうして得られた遺伝子の発現様式・発現パターンのことを「遺伝子発現プロファイル (gene expression profile)」と呼ぶ。このプロファイルの中に悪性腫瘍の長期予後に相関するものがあるのではないかと、というスクリーニングが現在さまざまな造血器悪性疾患で行われている。これまでのところ、多くの例において遺伝子発現プロファイルに基づいた疾患の予後予測が可能なが示唆されている。

II. 急性骨髄性白血病 (AML) の予後予測

AML は未熟な血液細胞が癌化して生じる疾患であり、これまで核型による分類が予後予測に有用であることが証明されてきた³⁾。しかしながら、核型分類における Intermediate 群は明らかに予後良好群と不良群の両者を含んでおり、例えば全 AML の過半数を占める正常核型 (Intermediate に属する) の患者の治療反応性を予測することは困難である。

Bullinger らは AML 患者116例の骨髄単核球より mRNA を調整し、約3万9千種類の cDNA を配置したマイクロアレイで解析を行っている⁴⁾。彼らは患者を training set と test set に分け、前者のデータを用いて患者予後に発現量がリンクす

る遺伝子をスクリーニングした。その結果100種類以上の予後予測遺伝子セットを同定することに成功している。さらにこれら遺伝子の発現量を基に患者を2群に分け、その予後を比較したところ、2群の生命予後は有意に異なっていた ($P < 0.001$)。また、あらかじめ取っておいた test set において検証したところ、やはり2群の予後は大きく違っている ($P = 0.006$) が示された。これらの予後分類法が現行の核型に基づく分類法とは独立したものであることを示すために、彼らは核型分類では中間群に分類される「正常核型」を持った患者のみを選択し、その予後予測も試みている。彼らの分類法を適応したところ、正常核型の中でも予後良好群と不良群とを区別することに成功した ($P = 0.046$)。彼らの解析は旧来の核型分類法とは異なった新しい予後予測法の可能性を示唆しており興味深い。

また山下らは、ヒト全遺伝子が配置された DNA マイクロアレイを用いて、標準的化学療法を受けた AML 患者66例の骨髄 AC133陽性細胞について遺伝子発現プロファイルデータを得た。これら66例の患者中、初回化学療法によって完全寛解 (complete remission : CR) に到達した症例は51例有り、残り15例は寛解導入に失敗した。後者15例は一年以内に全員死亡しておりきわめて予後不良なグループといえる。この初回化学療法に成功した患者と失敗した患者の間では遺伝子発現プロファイルは違うのであろうか?それを検討するために4万4千種類のプローブセット(3万3千種類の遺伝子に相当)の発現データ中、両グループ間で発現が有意に異なる遺伝子を選び出し、さらに少なくともどちらかのグループでは高い発現量を示す遺伝子をスクリーニングしたところ、最終的に約30種類の遺伝子が得られた。得られた遺伝子の発現プロファイルはそれぞれが互いに独立なわけではなくよく似たものも多い。そこで correspondence analysis 法⁵⁾によって、これら30種類の発現量パターンから全体を最も代表する仮想発現プロファイルを3種類抽出した(すなわち代

表的な仮想発現パターンそれぞれを作る仮想遺伝子3種類を作成したことになる)。これら仮想遺伝子3種類を軸とした仮想空間に各サンプルを投射したのが図1である⁶⁾。その結果興味深いことに治療奏功症例と失敗症例とは空間上不連続な位置に独立して存在することが判った。言い換えると両グループは遺伝子発現プロファイルの面では異なった集団に属するのだ。

このような空間上の位置は患者予後にリンクしているのだろうか?図1をよく見てみると、患者サンプルはZ軸上で最も強く分離されていることがわかる。そこで症例の仮想空間上でのZ軸上の値が-0.3未満か-0.3以上かによって大きく2群に分け、その長期生命予後を Kaplan-Meier 法によって解析してみた。図2で明らかなように両群は大きく予後が異なることが判る。

III. 悪性リンパ腫の解析

Bリンパ球由来のびまん性大細胞型リンパ腫は日常の臨床で最も高頻度に遭遇する非 Hodgkin リンパ腫のサブタイプである。同疾患はしばしば CHOP 療法などアントラサイクリン系薬剤を中心とした化学療法が有効であるが、寛解となった症例の中には再発を繰り返すものも多い。Alizadehらは DNA マイクロアレイを用いてびまん性大細胞型リンパ腫の中で再発が少ない予後良好群と予後不良群とを鑑別する可能性を検討した⁷⁾。この目的のためにまず濾胞中心 B リンパ球および各種悪性リンパ腫の cDNA ライブラリーから得られた cDNA など計17,856遺伝子をスポットしたカスタムチップを用意し、びまん性大細胞型リンパ腫、濾胞性リンパ腫および慢性リンパ性白血病の患者サンプルを用いて DNA マイクロアレイ解析を行った。また、比較のために健常人より得られた各種リンパ組織サンプル、および刺激を加え活性化させた末梢 B, T リンパ球などについても検討している。

その結果、びまん性大細胞型リンパ腫には濾胞中