

的化学療法を受けたAML患者 66 例の骨髓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極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だろうか? 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¹²⁾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 3A である。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であろうか? 図 3A 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 3B 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。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

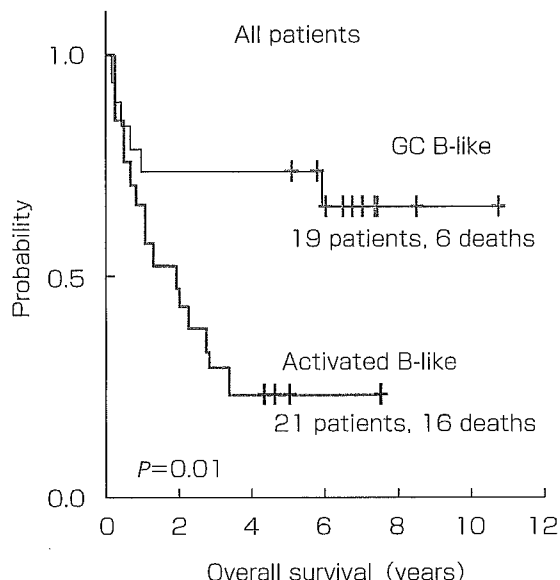


図 4. びまん性大細胞型リンパ腫の予後 (文献 14 より改変)

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「活性型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判る。

者の長期予後を予測可能なことまで明らかになった¹³⁾。これらの予後関連遺伝子数は, 以前の骨髓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。

4. 悪性リンパ腫の予後予測

多くのリンパ腫は未だなお原因不明であり, 原因遺伝子の解析に基づいて患者の治療方針決定・予後予測を行う事は不可能である。そこでDNAチップを用いた発現解析が近年盛んに試みられるようになった。

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チップを用いてびまん性大細胞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¹⁴⁾。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チップ解析を行った。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チップによる解析で非Hodgkin悪性リンパ腫の新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、今後の臨床の場におけるDNAチップの新たな可能性を示したものとして意義深い。またRosenwaldらも基本的にAlizadehらと一致する解析結果を報告している。

ところがShippらが行った解析では異なった結果が得られている¹⁵⁾。彼らはやはりDLBCL (diffuse large B-cell lymphoma) 患者58例の腫瘍リンパ節よりmRNAを抽出し、Affymetrix社HU6800DNAチップによる遺伝子発現プロファイルを得た。全症例を「完全寛解を維持している群」

32例と「腫瘍死あるいは再発中の群」26例に分け、両群を最もよく選別する遺伝子セットを抽出した。さらにこれら遺伝子の発現量から各患者予後を予測した。その結果予後良好群と不良群とを選別する13種類の遺伝子が同定された。これら13種類の遺伝子の発現量からweighted-vote法によって患者予後を予測した際、「良好群」と診断された症例の5年生存率は70%であり、不良群のそれ(12%)より有意($P < 0.00004$)に良好であった。ShippらのデータにおいてもRosenwaldらの提唱するグループでの層別化法は有効に患者を分けることができたが、驚くべきことにその階層化は患者予後にリンクしていなかった。この結果は、DNAチップによる階層化が未だ再現性の悪いものであることを明瞭に示している。この不一致の原因は、異なったDNAチップシステムを用いている点および解析症例数の少なさにあると予想される。

おわりに

DNAチップによる予後予測法の開発は、いわば発癌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だろうか？ 現行のDNAチップ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。そのためには何よりも大量の検体の解析データが重要であろう。

文 献

- 1) International Human Genome Sequencing Consortium: Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* 431: 931-945, 2004.
- 2) Dhanasekaran SM, et al: Delineation of prognostic biomarkers in prostate cancer. *Nature* 412: 822-826, 2001.
- 3) van't Veer LJ, et al: Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* 415: 530-536,

- 2002.
- 4) Duggan DJ, et al : Expression profiling using cDNA microarrays. *Nat Genet* 21 : 10-14, 1999.
- 5) Grimwade D, 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* 92 : 2322-2333, 1998.
- 6) Bennett JM, et al : Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. A report of the French-American-British Cooperative Group. *Ann Intern Med* 103 : 620-625, 1985.
- 7) Yagi T, et al : Identification of a gene expression signature associated with pediatric AML prognosis. *Blood* 102 : 1849-1856, 2003.
- 8) Bullinger L, et al : Use of gene-expression profiling to identify prognostic subclasses in adult acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 350 : 1605-1616, 2004.
- 9) Valk PJ, et al : Prognostically useful gene-expression profiles in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 350 : 1617-1628, 2004.
- 10) Miyazato A, et al : Identification of myelodysplastic syndrome-specific genes by DNA microarray analysis with purified hematopoietic stem cell fraction. *Blood* 98 : 422-427, 2001.
- 11) Tsutsumi C, et al : DNA microarray analysis of dysplastic morphology associated with acute myeloid leukemia. *Exp Hematol* 32 : 828-835, 2004.
- 12) Fellenberg K, et al : Correspondence analysis applied to microarray data. *Proc Natl Acad Sci USA* 98 : 10781-10786, 2001.
- 13) Mano H : Stratification of acute myeloid leukemia based on gene expression profiles. *Int J Hematol* 80 : 389-394, 2004.
- 14) Alizadeh AA, et al : Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* 403 : 503-511, 2000.
- 15) Shipp MA, et al : Diffuse large B-cell lymphoma outcome prediction by gene-expression profiling and supervised machine learning. *Nat Med* 8 : 68-74, 2002.

分子細胞治療

別刷

発行：株式会社 先端医学社
〒103-0007 東京都中央区日本橋浜町2-17-8 浜町花長ビル

マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析でもたらされた新知見

間野博行*

ヒトゲノムプロジェクトが終了しわれわれのもつ蛋白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・組織間で簡便にくらべることが可能になった。現在、急性骨髄性白血病や骨髄異形成症候群などさまざまな造血器悪性腫瘍の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なか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おこなわれている。同定された予後関連遺伝子群の発現量をもと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もとづいた造血器悪性腫瘍の新しい分類法が提案されると期待される。

はじめに

約 30 億塩基対におよ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 月に終了宣言をおこない、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/>)。ヒトのも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ろう

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、造血器悪性腫瘍の解析においても重要な役割を担うことは間違いない。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」のなか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。ゲノミクス技術のなかでも DNA チップ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⁾。

DNA チップ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⁴⁾。一枚の DNA チップ上には数千～数万種類の DNA 断片が配置されており、一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。

Key Word

DNA マイクロアレイ
急性骨髄性白血病
骨髄異形成症候群
遺伝子発現プロファイル

* MANO Hiroyuki/自治医科大学ゲノム機能研究部

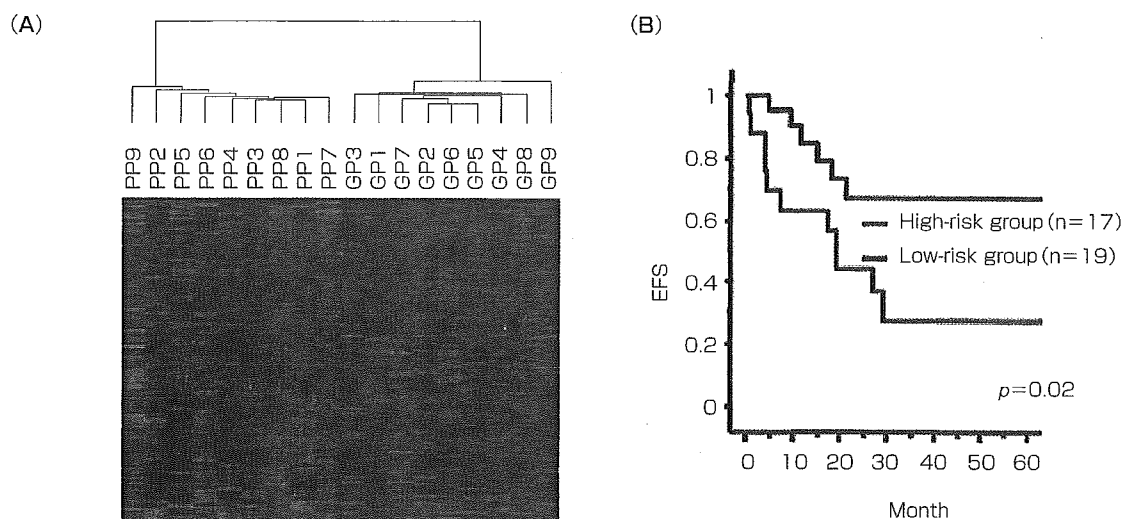


図1 骨髄単核球の発現プロファイルによる予後予測(Yagi T *et al*, 2003⁷⁾より改変引用)

(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おこなった。(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、大きく分かれた二群間で予後を比較した。

このように DNA チップを用いることで、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ようになった。こうして得られた特定の遺伝子群の発現様式、発現パターンのことを「遺伝子発現プロファイル (gene expression profile)」とよぶ。このプロファイルをくらべることで疾患の特性・病因に迫れるのではないかと考えられる。

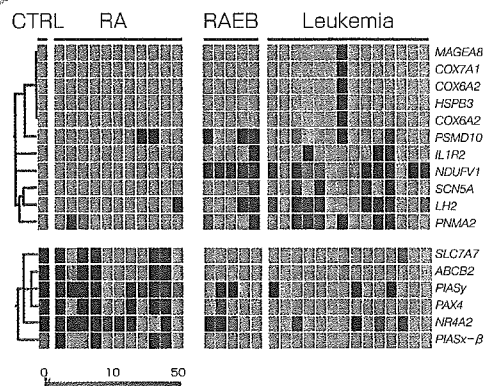
1. 急性骨髄性白血病(acute myeloid leukemia : AML)の予後予測

AML は未熟な血液細胞ががん化して生じる疾患であり、これまでさまざま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⁹⁾。現在臨床の場で白血病の診断および予後予測をおこなう場合、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、② FACS 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 細胞表面レセプター遺伝子の再構成、*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⁹⁾。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おこなえるが、上記の解析をすべておこなうのは煩雑であり多くの専門

技術も必要となる。一方、例えば一枚の DNA チップを用いることで旧来の方法で得られる情報がすべ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とよばれる分画に相当し、これまで AML 患者骨髄単核球を用いた DNA チップ実験により患者予後を予測する試みがおこなわれてきた。

Yagi ら⁷⁾ は小児 AML 患者 54 例について Affymetrix 社製 GeneChip® Human Genome U95A チップを用いた遺伝子発現解析をおこない、小児 AML 内での予後良好群と不良群とを予測する試みをおこなっている。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 1 A)、これら予後関連遺伝子の発現量をもとして、患者全体を二次元クラスタリング法あるいは supported vector machine (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 1 B)。すなわち遺伝子発現プロファイルをもと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⁸⁾ は AML 患者 116 例の骨髄単核



図② MDS の病期進行に伴い発現量が変化する遺伝子 (Ueda M *et al.*, 2003¹¹⁾より改変引用)

「健常人+RA」期と「RAEB+白血病」期とを比較した結果、後者で発現誘導する遺伝子 11 種類(上図)、および低下する遺伝子 6 種類(下図)が同定された。それぞれの発現パターンを遺伝子系統樹(gene tree)の形で表す。遺伝子名は右に示しており、また発現量は下にあるカラーバーに沿って色で示される。

球より mRNA を調整し、約 3 万 9 千種類の cDNA を配置した DNA チップで解析をおこなっている。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もとに患者を 2 群に分け、その予後と比較したところ、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もと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、正常核型のなか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 ら⁹⁾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。

2. 骨髄異形成症候群(MDS)の病期進展機構

MDS については、その発症機構、再生不良性貧血との鑑別、病期進展機構、また MDS 由来白血病と特発性 AML との鑑別など、現在なお不明な点が多く残されている。マイクロアレイによる解析はこれらの疑問に答えるうえで有用だと思われるが、しかしながら MDS の

ように骨髄中の悪性芽球が患者ごとに大きく異なる疾患の場合は偽陽性データを減らすよう工夫する必要がある。たとえば MDS 初期の不応性貧血(RA)と MDS 由来白血病とを比較する場合と考えると、前者患者骨髄中の悪性芽球は 5%以下であり、後者では少なくとも悪性芽球が 20%以上を占める。単純に両骨髄をアレイによって比較すると、未分化な血球に特異的な遺伝子は白血病患者骨髄中では必ず発現が誘導されているように結論づけられてしまう。しかしこれは、骨髄中での幼弱な白血病芽球の増加を反映した結果であり、ほとんどの場合実際の芽球一細胞あたりの mRNA 量に変化は認められない。

われわれは造血幹細胞分画に特異的に発現する膜蛋白 CD133(AC133)¹⁰⁾に着目し、CD133 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。2005 年 9 月現在ですでに Blast Bank のサンプル数は 600 例を越えており、純化ヒト疾患細胞のゲノミクスプロジェクトとしては世界最大級のものである。

Ueda ら¹¹⁾は本バンクに属する MDS の各病期サンプルをマイクロアレイで比較することで、病期進展機構の解明を目指した。健常人骨髄 1 例、RA 期 11 例、RAEB 期 5 例、および MDS 由来白血病 15 例のバンクサンプルより mRNA 分画を抽出し、ヒト転写因子、膜蛋白質、およびシグナル伝達分子などの 2304 種類の遺伝子を配置した DNA マイクロアレイによる解析をおこなっている。その結果、複数の病期特異的遺伝子を同定することに成功している。一方、病初期から、RAEB/AML への移行メカニズムをこのデータセットから解析

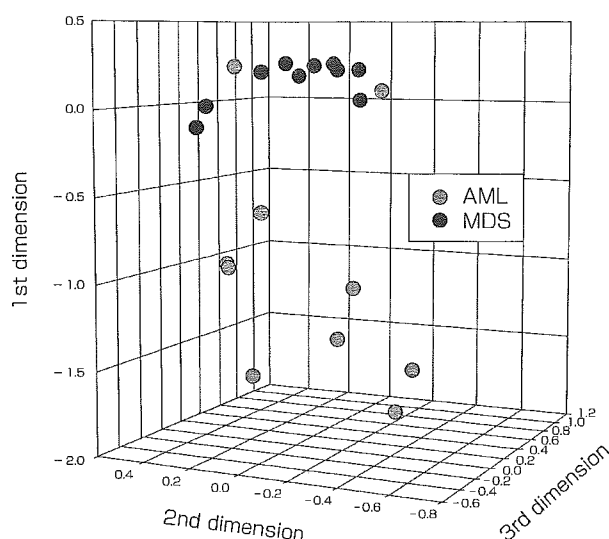


図6 MDS 由来白血病と *de novo* AML サンプルの仮想空間への投射(筆者作成)

両疾患間で発現量が有意に異なる遺伝子を抽出し、これらの遺伝子発現パターンの主成分を3種類抽出した。得られたパターンを仮想軸とする三次元空間にサンプルを投射したところ、両疾患群が遺伝子発現パターンの上から、異なる疾患単位であることが示唆された。

することも可能である。たとえば全体を予後良好群である「正常+RA」期と予後不良群である「RAEB+AML」期に大きく分け、両者の間で発現量が大きく異なる遺伝子を同定することも試みた。その結果、図2に示すように11種類の遺伝子が病期の進展に伴い発現量が増加することが明らかになり、一方6種類の遺伝子の発現量が減少することも示された。前者は病期進展に関与するがん遺伝子の、また後者はがん抑制遺伝子のよい候補といえる。

たとえば後者の遺伝子群に属する PIASy は当初転写因子 STAT1 の機能を抑制する細胞内分子としてクローニングされ、現在はユビキチン類似分子である SUMO (small ubiquitin-like modifier) の結合酵素そのものであると考えられている。細胞内蛋白分解系専用の「蛋白タグ」であるユビキチンとは異なり、SUMO の細胞内機能は多彩であり、PIASy の機能も STAT1, p53, アンドロゲンレセプターの活性調節など多岐にわたる。また、Ueda ら¹⁴⁾は PIASy の発現低下が MDS における病期進行メカニズムに直接関与している可能性を検証する目的で、G-CSF 依存性に顆粒球へと分化するマウス骨髓系細胞株 32D へ同遺伝子を導入した。その結果 PIASy の発現誘導に伴って細胞の著明なアポトーシスが認められることがわかった。これらの結果は PIASy の「がん抑制遺伝子」としての機能を強く示唆しており、PIASy の発現低下が MDS 病期進行の新たなメカニズムである可能

性が注目される。

3. MDS と AML の鑑別診断

一方、鑑別診断マーカーのスクリーニングにもマイクロアレイは有用である。MDS 由来の AML は *de novo* AML にくらべ治療抵抗性であることが多く、その鑑別診断は重要であるが、両者を明確に区別することはしばしば困難である。Miyazato ら¹²⁾は MDS 由来 AML および *de novo* AML 両群の Blast Bank サンプルそれぞれ5例を選び、1152 遺伝子の発現量を比較した。その結果膜蛋白 Dlk が MDS 由来群特異的に高発現していることを確認し、またその疾患特異的発現は症例を追加した定量的 real-time RT-PCR 法によっても確認された。

Oshima ら¹³⁾は、はたして MDS 由来 AML と *de novo* AML が遺伝子発現の面から鑑別可能か否かを正確に検証する目的で、Blast Bank に属する両疾患群のうち、FAB サブタイプで M2 に分類されるサンプルのみ各10例を選び、12,000 種類以上の遺伝子発現量をマイクロアレイで比較した。この解析により分化傾向 (FAB サブタイプ) もそろった CD133 陽性細胞間での詳細な比較が可能になる。まず t 検定により両群間で発現量が統計的に有意に異なる遺伝子を抽出し、さらに各群における発現量の平均値が群間で大きく異なる遺伝子を選び出した。その結果計 73 種類の遺伝子が最終的に同定

された。実際には、これら遺伝子の発現量のパターンは、73 遺伝子がそれぞれ独立しているわけではなく、よく似たものも多い。そこで correspondence analysis 法によって発現量の変化パターン 73 種類から代表的なもの 3 種類を抽出した(すなわち代表的な仮想発現パターンそれぞれ作る仮想遺伝子 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 9 である。その結果 MDS 由来 AML と *de novo* AML のサンプルの多くが仮想空間上で異なった位置に存在することがわかった。すなわち両疾患は異なった単位と考えてよいことを示唆している。一方図 9 において、一部の症例が遺伝子発現パターンと臨床診断が合致していないことも明らかである。これらの結果は遺伝子発現プロファイルにもとづく新しい診断法が可能であることを示唆しているが、その正当性は長期的な患者生命予後とのリンクが証明されてはじめて明らかになるであろう。

おわりに

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 世紀の医療は成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* 431 : 931-945, 2004
- 2) Dhanasekaran SM *et al* : Delineation of prognostic biomarkers in prostate cancer. *Nature* 412 : 822-826, 2001
- 3) van't Veer LJ *et al* : Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* 415 : 530-536, 2002
- 4) Duggan DJ *et al* : Expression profiling using cDNA microarrays. *Nat Genet* 21 : 10-14, 1999
- 5) Grimwade D *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* 92 : 2322-2333, 1998
- 6) Bennett JM *et al* : Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. A report of the French-American-British Cooperative Group. *Ann Intern Med* 103 : 620-625, 1985
- 7) Yagi T *et al* : Identification of a gene expression signature associated with pediatric AML prognosis. *Blood* 102 : 1849-1856, 2003
- 8) Bullinger L *et al* : Use of gene-expression profiling to identify prognostic subclasses in adult acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 350 : 1605-1616, 2004
- 9) Valk PJ *et al* : Prognostically useful gene-expression profiles in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 350 : 1617-1628, 2004
- 10) Hin AH *et al* : AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* 90 : 5002-5012, 1997
- 11) Ueda M *et al* : DNA microarray analysis of stage progression mechanism in myelodysplastic syndrome. *Br J Haematol* 123 : 288-296, 2003
- 12) Miyazato A *et al* : Identification of myelodysplastic syndrome-specific genes by DNA microarray analysis with purified hematopoietic stem cell fraction. *Blood* 98 : 422-427, 2001
- 13) Oshima Y *et al* : DNA microarray analysis of hematopoietic stem cell-like fractions from individuals with the M2 subtype of acute myeloid leukemia. *Leukemia* 17 : 1990-1997, 2003

MANO Hiroyuki

まの・ひろゆき
1959 年、岡山県生まれ
1984 年、東京大学医学部医学科卒
1986 年、東京大学医学部第三内科入局
1989 年、米国テネシー州 St. Jude 小児研究病院生化学部門 留学
1991 年、東京大学医学部第三内科文部教官 助手
1993 年、自治医科大学分子生物学講座 講師
2001 年より自治医科大学ゲノム機能研究部 教授(現職)
専門は血液内科、ゲノム医学
研究テーマはゲノミクス技術を用いた造血器悪性腫瘍の病態解明

特集●個別化医療の実現を目指して

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

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

間野博行

自治医科大学ゲノム機能研究部

DNA マイクロアレイを用いることで、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なか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に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もと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。

Key words DNA microarray, genomics, AC133, karyotype

遺伝子発現プロファイル

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、ヒト染色体のユークロマチン (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/>)。ヒトのもつタンパク質をコードする総遺伝子数はおそらく 20,000~25,000 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」のなかから、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。ゲノミクス技術のなかでも DNA マイクロアレイ、DNA チップ (以下 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)}。

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⁴⁾。たとえば今、組織 A 由来の cDNA を蛍光色素 Cy3 で標識し、組織 B 由来の cDNA を蛍

Prediction of prognosis for AML based on gene expression profile

Hiroyuki Mano

まの・ひろゆき 1984 年東京大学医学部卒業。86 年同第三内科入局、医学博士、91 年同助手、93 年自治医科大学医学部分子生物学講座講師、2001 年同大学医学部ゲノム機能研究部教授 (現在に至る)。研究テーマ: ゲノミクス技術を用いた造血器悪性腫瘍の病態解明。

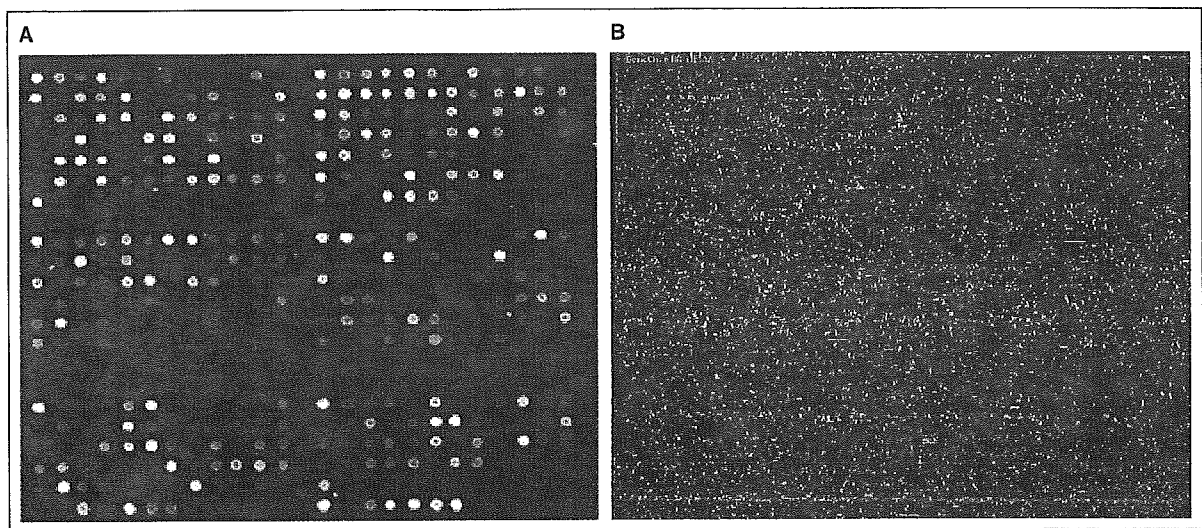


図1 DNA マイクロアレイのスキャン画像

cDNA タイプマイクロアレイ (A) および Affymetrix 社の GeneChip (B) をスキャンした画像をそれぞれ示す。

A: cDNA アレイの場合は2種類のサンプルから調製したcDNAをそれぞれCy3とCy5の蛍光色素で標識し、混合してハイブリダイズした。Cy3標識cDNAが主に結合したスポットは緑色、Cy5標識cDNAが主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。

B: 単一のサンプルより調製した標識cRNAをハイブリダイズさせてあり、実際は単色のグレースケールで表されるが、発現強度をわかりやすくするためにpseudo-colorで表してある。

光色素Cy5で標識したとする。両者の混合物をcDNAを高密度に配置したマイクロアレイとハイブリダイズさせると、標識cDNAは各スポット上の遺伝子の組織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(図1A)。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。また両組織においてほぼ等量に発現している遺伝子の場合には黄色のスポットとして見える。このようにして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のである。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。

なお、担体上にオリゴヌクレオチドを配置したオリゴヌクレオチドアレイの場合は、上述のようなCy3とCy5の二重染色による2検体間発現比

較ではなく、1種類の検体を1種類の蛍光染色で解析することのほうが多い。したがって、1枚のアレイからは単一の組織の発現プロファイルが得られるのみであり、他の組織と比べる場合は、それぞれ異なったアレイで得られたデータをなんらかの方法でノーマライズさせた後にコンピュータ上で比較することになる(図1B)。また、オリゴヌクレオチドアレイの場合はスポットの蛍光強度を増強するために、mRNAからいったん二本鎖cDNAを作製し、さらにT7 RNAポリメラーゼなどを用いてRNAを増幅するとともに蛍光色素を取り込ませることが多い。

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ようになった。こうして得られた遺伝子群の発現様式、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。

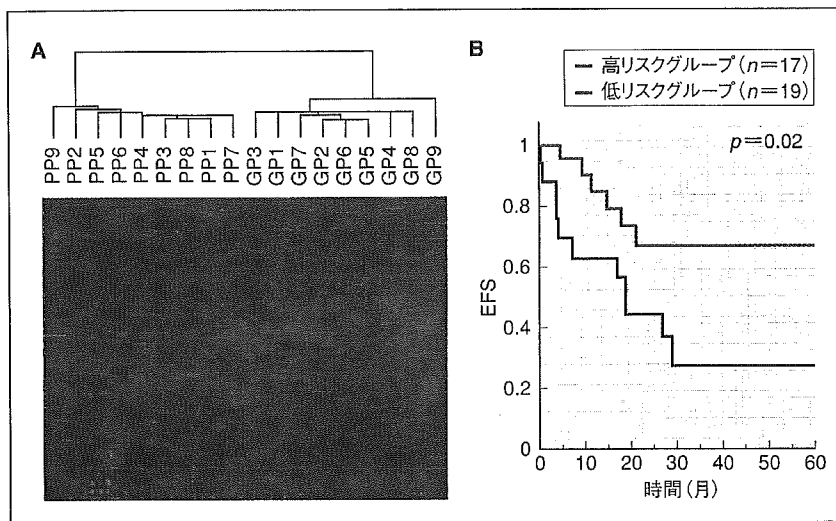


図2 骨髄単核球の発現プロファイルによる予後予測

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 2 次元クラスターリングを行った。

B: 上記遺伝子の発現量でテストサンプルを 2 次元クラスターリングし、大きく分かれた 2 群間で予後を比較した。EFS: event-free survival

(Yagi T, et al. Blood 2003; 102: 1849-56⁷⁾より)

DNA マイクロアレイを用いた急性骨髄性白血病の新しい予後予測

急性骨髄性白血病 (AML) は未熟な血液細胞が癌化して生じる疾患であり、これまでさまざまなパラメータ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 細胞表面レセプター遺伝子の再構成、*BCR-ABL* 遺伝子、*PML-RARα* 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、上記の解析をすべ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すべ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) と呼ばれる分画に相当し、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 (complete remission; CR) を維持している症例 9 例と初回寛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にして、患者全体を 2 次元クラスターリング法、あるいは supported vector machine (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もと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 を調製し、約 39,000 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

現量をもとに患者を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。彼らの分類法を適用したところ、正常核型のなか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 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⁾。

純化細胞を用いた 急性骨髄性白血病の予後予測

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、たとえば健康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)。正常骨髄はさまざまな系統の細胞群から成る「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て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すべて減少して見えてしまう。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、

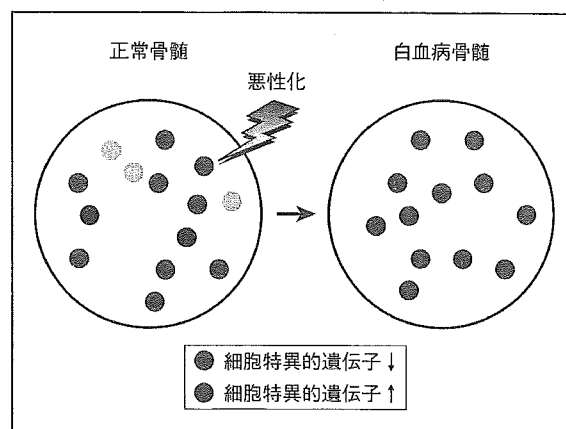


図3 「Population shift 効果」による偽陽性データ

正常骨髄はさまざまな細胞から成るヘテロな集団である。今そのなかから緑色の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見えてしまう。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。

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⁾。これらのさまざまな偽陽性や偽陰性データのノイズのなかから真に「癌化に伴って細胞あたりの発現量が変化する」遺伝子を選択するのはきわめて困難であろう。

では、どのようにすれば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となるのであろうか。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 DNA チップ解析を行えば、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。筆者らは、造血幹細胞分画に特異的に発現する膜

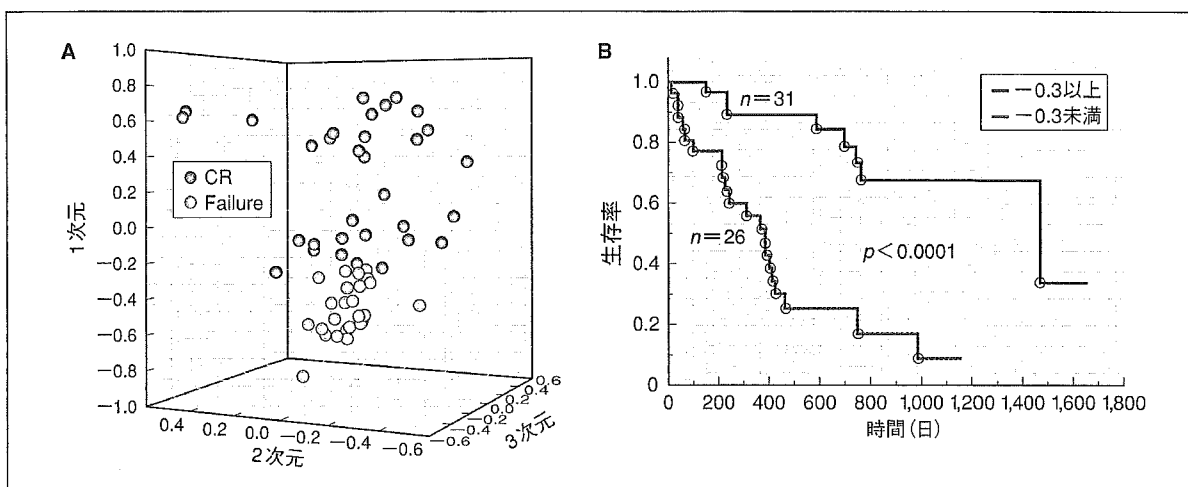


図4 AC133 陽性細胞を用いた予後予測

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スクリーニングし、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 群とは異なった位置に配置された。
B: 仮想空間のZ軸の値が-0.3未満 (灰色) か以上 (赤色) かによって患者を二分し、その予後をKaplan-Meier法で比較した。

タンパク質 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。平成16年12月現在ですでに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。筆者らは、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例の骨髓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。後者の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44,000種類のプローブセット (33,000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種類を作製したことになる)。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。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ことになる。

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で明らかに、両群は大きく予後が異なることがわかる。しかも、さまざま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(Yamashitaら、未発表データ)。これらの予後関連遺伝子数は、以前の骨髓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。

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世紀の医療は成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) Duggan DJ, Bittner M, Chen Y, et al. Expression profiling using cDNA microarrays. *Nat Genet* 1999 ; 21 : 10-4.
- 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.

STOMACH

Helicobacter pylori eradication induces marked increase in H^+/K^+ -adenosine triphosphatase expression without altering parietal cell number in human gastric mucosa

H Osawa, H Kita, H Ohnishi, H Hoshino, H Mutoh, Y Ishino, E Watanabe, K Satoh, K Sugano



Gut 2006;55:152–157. doi: 10.1136/gut.2005.066464

See end of article for authors' affiliations

Correspondence to: Dr H Osawa, Department of Internal Medicine, Division of Gastroenterology, Jichi Medical School, 3311–1 Yakushiji, Minamikawachi, Kawachi, Tochigi 329-0498, Japan; osawa@jichi.ac.jp

Revised version received 13 April 2005
Accepted for publication 28 April 2005
Published online first 4 May 2005

Background and aims: Gastric acid secretion is downregulated by *Helicobacter pylori* infection and upregulated after its eradication, but the mechanisms are still unclear. We examined the effects of *H pylori* eradication on the number of parietal cells and on expression of molecules functioning in acid secretion in the human gastric mucosa.

Methods: We enrolled 111 consecutive men with chronic gastritis induced by *H pylori*. Biopsy specimens were endoscopically obtained before and 12 weeks after successful eradication of *H pylori* and parietal cell numbers were counted. mRNA expression levels of H^+/K^+ -adenosine triphosphatase (H^+/K^+ -ATPase), anion exchanger 2, M3 muscarinic receptor, intrinsic factor, and interleukin 1 β were determined with a real time reverse transcriptase-polymerase chain reaction method. The severity of gastric atrophy was evaluated using the serum pepsinogen I/II ratio.

Results: No significant difference was observed in parietal cell numbers before and after *H pylori* eradication. Median mRNA expression levels of H^+/K^+ -ATPase in the gastric mucosa increased 250-fold after *H pylori* eradication accompanied by attenuation of interleukin 1 β . A large increase in H^+/K^+ -ATPase expression was observed even in patients with severe atrophic gastritis. In contrast, fold increases in mRNA expression levels, including intrinsic factor, anion exchanger 2, and M3 muscarinic receptor, after eradication therapy, were limited to 1.4, 2.3, and 2.5 times, respectively.

Conclusions: In the absence of alteration of parietal cell number, gastric H^+/K^+ -ATPase mRNA expression was markedly restored after successful *H pylori* eradication, suggesting a central role for the restoration of H^+/K^+ -ATPase expression in gastric acid secretion recovery after *H pylori* eradication.

Helicobacter pylori infection is a major cause of chronic gastritis and gastroduodenal ulcers.^{1,2} Furthermore, *H pylori* infection also affects gastric acid secretion. In the stomach infected with *H pylori*, maximum acid output was considerably attenuated.^{3–6} The effects of *H pylori* on gastric pH have been studied in association with administration of proton pump inhibitors (PPIs). Higher gastric pH is observed during administration of PPIs in *H pylori* positive than in *H pylori* negative subjects, and two plausible explanations have been reported. Bercik *et al* reported that a higher pH is predominantly ascribed to neutralisation by *H pylori* derived ammonia⁷ whereas Gillen *et al* reported that it is associated with marked inflammation of the oxyntic mucosa.⁸

Gastric acid secretion returns to normal after eradication of *H pylori* and this is thought to be responsible for gastro-oesophageal reflux disease seen after *H pylori* cure.^{9,10} Although these observations indicate a close association between *H pylori* infection and gastric acid secretion, the precise mechanisms by which *H pylori* eradication restores gastric acid secretion are still unclear. In this respect, there are two opposing hypotheses: *H pylori* eradication may increase the number of parietal cells in the gastric mucosa as a result of recovery from atrophy or, alternatively, it may restore the acid secretory ability of parietal cells.

Thus we conducted this study to compare the number of parietal cells in the human gastric mucosa before and 12 weeks after *H pylori* eradication. We also simultaneously compared mRNA expression levels of molecules involved in

acid secretion by parietal cells, including H^+/K^+ -adenosine triphosphatase (H^+/K^+ -ATPase), anion exchanger 2, and M3 muscarinic receptor. We report here that *H pylori* eradication did not increase parietal cell number in the early period after *H pylori* cure but strikingly enhanced mRNA expression of H^+/K^+ -ATPase in the stomach, even in patients with severe atrophic gastritis.

MATERIALS AND METHODS

Patients and samples

Of those who participated in the Gastric Cancer Surveillance Program from June 2001 to the end of 2002 at Tochigi, Japan, 115 consecutive men with *H pylori* infection had received eradication therapy, and eradication was successful in 111 subjects (mean age 49.2 (SEM 0.5) years). These 111 subjects were enrolled in the present study. Indications for eradication therapy in these patients included chronic gastritis alone (14 patients), chronic gastritis accompanied by adenoma, a family history of gastric cancer, gastric hyperplastic polyp, severe atrophic gastritis, or gastric ulcer (67 patients), and duodenal ulcer (30 patients). All subjects were clinically stable at the time of evaluation and had no history of eradication therapy before the study. Written informed

Abbreviations: H^+/K^+ -ATPase, H^+/K^+ -adenosine triphosphatase; RT-PCR, reverse transcriptase-polymerase chain reaction; IL, interleukin; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; PPI, proton pump inhibitor

Table 1 Primer pairs and TaqMan probes used in real time reverse transcriptase-polymerase chain reaction

	Sense (5' to 3') and antisense (5' to 3')	TaqMan probe (5' to 3')
H ⁺ /K ⁺ -ATPase	CTTGCCATCCAGGCTAGTGA GGTGACGACAACCACAGCAAT	ACCACCGACGACAATCTGTACCTGGC
Intrinsic factor	CACTGCTCTGGCTGTGGA GGGTCAATATCAAAGTCACTAAATGTG	CCCCACAAGGGCACACCATCACTC
Anion exchanger 2	CGGAGCAGATCCCCGATA CAACGCGCTCAC TGT CATG	CCCGCTGCTCCTTGACTTCTCTGAATCT
M3 receptor	CCCTGGCAGAGGGAACCT CCAAATATGTGCCATTA CTGTTTAT	CCCAGTCCATTGCTGCTGCTCTACA

Amounts of IL-1 β mRNA were measured using the probe and primers in TaqMan gene expression assays by Applied Biosystems.

consent was obtained from the participants in accordance with the Declaration of Helsinki and its later revision. The ethics committee of Jichi Medical School, Japan, approved the study.

Eradication therapy for *H pylori* infected subjects and data collection

A triple regimen (lansoprazole 30 mg twice daily, clarithromycin 200 mg twice daily, and amoxicillin 750 mg twice daily) was given for seven days after endoscopic examination. Eradication was confirmed when *H pylori* was not detected at 12 weeks after the end of therapy in any of the Giemsa stainings or culture of biopsy specimens. Venous blood samples were obtained after fasting overnight before and after eradication of *H pylori* for determination of serum levels of pepsinogen I and II.

Specimens

Five adjacent biopsy specimens from the greater curvature at the midcorpus of the stomach as well as five from the antrum were obtained endoscopically from all subjects. One biopsy specimen from the corpus of the stomach and one from the antrum were cultured individually to evaluate for the presence of *H pylori* infection. Three biopsy specimens from the corpus and three from the antrum were immediately snap frozen and stored in liquid nitrogen for later use. The remaining corpus and antral specimens were fixed and stained with haematoxylin-eosin and Giemsa. Histological assessments were performed by a single observer (H Osawa) to whom no clinical data for any patient were given at the time of evaluation. *H pylori* infection was evaluated by bacterial culture and histological examination.

RNA extraction

Total RNA was isolated from biopsy specimens with Isogen (Nippon Gene, Tokyo, Japan), and 2 μ g of total RNA were reverse transcribed with random nanomers and reverse transcriptase (Toyobo, Osaka, Japan).

Real time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR)

Evaluation of expression of five genes, including H⁺/K⁺-ATPase α , anion exchanger 2, M3 muscarinic receptor, intrinsic factor, and interleukin (IL)-1 β , was performed using a real time quantitative RT-PCR method with an ABI 7700 sequence detector system (PE Applied Biosystems, Foster City, California, USA). Sense primers, antisense primers, and target hybridisations used for each marker are shown in table 1. The reaction mixture was prepared according to the manufacturer's protocol using TaqMan PCR kits (PE Applied Biosystems). The probe was labelled with a reporter fluorescent dye, 6-carboxyfluorescein, at the 5' end. Thermal cycling conditions for all reactions included 50°C for two minutes and 95°C for 10 minutes, followed by 40

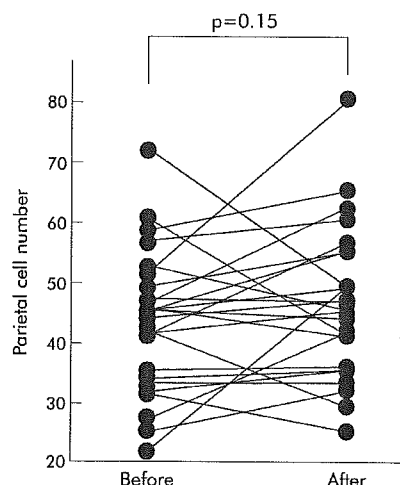


Figure 1 Changes in the number of parietal cells in the oxyntic mucosa before and after *Helicobacter pylori* eradication. Parietal cells were identified by immunostaining with anti-H⁺/K⁺-ATPase antibody. Numbers of parietal cells were similar before and after *H pylori* eradication (n=25; 46 (35–50) and 46 (36–56) (median (1st quartile–3rd quartile)); p=0.15 by Wilcoxon rank sum test). No significant change was observed before and after *H pylori* eradication.

cycles of 15 seconds of denaturation at 95°C and one minute of annealing and extension at 60°C. As a control, mRNA was also subjected to real time quantitative RT-PCR for measurement of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) using TaqMan GAPDH control reagents (PE Applied Biosystems). For relative quantification of expression of each marker, calibration curves were constructed using mRNA obtained from normal gastric mucosa without *H pylori* infection. Levels of each marker mRNA were normalised to GAPDH.

Counting parietal cells stained by anti-H⁺/K⁺-ATPase antibody

Parietal cells were immunostained by anti-H⁺/K⁺-ATPase antibody (1:100, developed in our laboratory) using biopsy specimens before and 12 weeks after eradication in the first consecutive 25 cases. After immunostaining slides were viewed at 200 $\times$ magnification and digitised with a digital HD microscope (VH-7000; Keyence, Tokyo, Japan). Immuno-reactive cells of oxyntic glands were counted in three visual fields at 200 $\times$ magnification. Results are presented as mean number of positive cells per visual field. Parietal cells were immunostained intensely with anti-H⁺/K⁺-ATPase antibody in all specimens before and after *H pylori* cure. Thus immunohistochemical analysis did not suffer from disparities in staining. In addition, portions of patchy atrophic changes

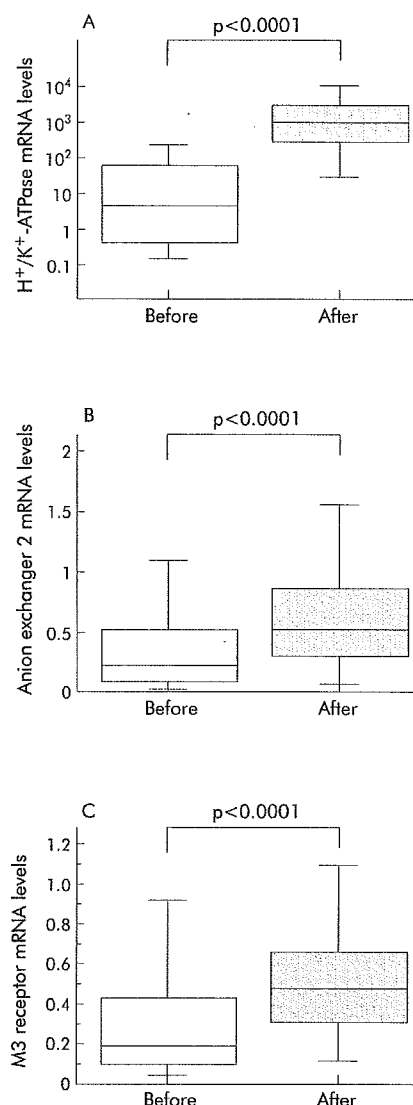


Figure 2 Comparison of $H^+/K^+-ATPase$ mRNA (A), anion exchanger 2 mRNA (B), and M3 muscarinic receptor mRNA (C) expression levels in the oxyntic mucosa before and after *Helicobacter pylori* eradication. There was a 250-fold restoration of median $H^+/K^+-ATPase$ mRNA expression after *H. pylori* cure in comparison with levels before (4.3 (0.4–61) and 1075 (301–3127) (median (1st quartile–3rd quartile)); $p < 0.0001$ by Wilcoxon rank sum test). *H. pylori* eradication induced a slight increase in anion exchanger 2 mRNA expression levels in the oxyntic mucosa (0.23 (0.01–0.52) and 0.53 (0.31–0.83); $p < 0.0001$ by Wilcoxon rank sum test). Similarly, *H. pylori* eradication induced a slight increase in M3 muscarinic receptor mRNA expression levels in the oxyntic mucosa (0.20 (0.10–0.43) and 0.48 (0.32–0.67); $p < 0.0001$ by Wilcoxon rank sum test).

of the gastric mucosa were not selected for counting of immunoreactive cells. The numbers of $H^+/K^+-ATPase$ expressing cells in the gastric mucosa were also compared between subjects before and 12 weeks after *H. pylori* cure.

Statistical analyses

Number of parietal cells and levels of mRNA expression are expressed as median (first quartile to third quartile). The Wilcoxon rank sum test was used to compare respective mRNA levels before and after *H. pylori* cure. Differences at $p < 0.05$ were considered significant.

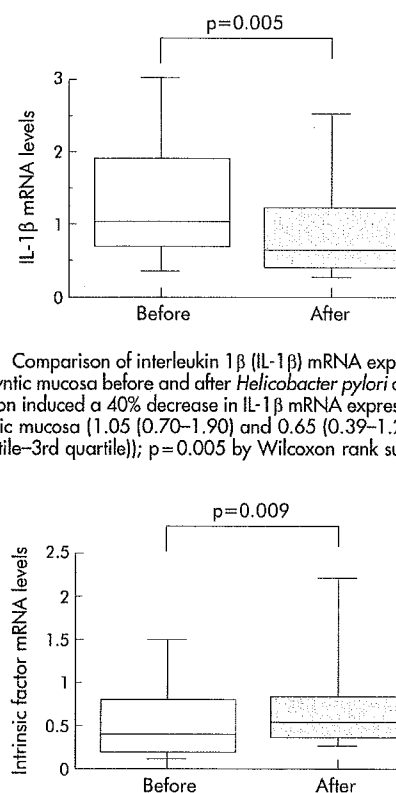


Figure 3 Comparison of interleukin 1 β (IL-1 β) mRNA expression levels in the oxyntic mucosa before and after *Helicobacter pylori* cure. *H. pylori* eradication induced a 40% decrease in IL-1 β mRNA expression levels in the oxyntic mucosa (1.05 (0.70–1.90) and 0.65 (0.39–1.22) (median (1st quartile–3rd quartile)); $p = 0.005$ by Wilcoxon rank sum test).

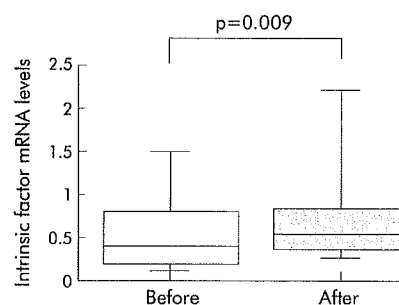


Figure 4 Comparison of intrinsic factor mRNA expression levels in the oxyntic mucosa before and after *Helicobacter pylori* cure. *H. pylori* eradication induced a slight increase in intrinsic factor mRNA expression levels in the oxyntic mucosa (0.40 (0.20–0.80) and 0.55 (0.36–0.82) (median (1st quartile–3rd quartile)); $p = 0.009$ by Wilcoxon rank sum test).

RESULTS

H. pylori eradication did not alter the number of parietal cells in the gastric mucosa during 12 weeks of follow up

In an effort to examine the effects of *H. pylori* cure on the number of parietal cells, we first attempted to compare the number of parietal cells before and 12 weeks after treatment by counting them in 25 patients. As shown in fig 1, there was no significant difference in the number of parietal cells before and 12 weeks after treatment.

Marked restoration of $H^+/K^+-ATPase$ mRNA expression after *H. pylori* eradication

We next attempted to assess the effects of *H. pylori* eradication on the acid secretory machinery of parietal cells. We compared mRNA levels of $H^+/K^+-ATPase$, anion exchanger 2, and M3 muscarinic receptor before and 12 weeks after *H. pylori* eradication. In addition, we also determined IL-1 β and intrinsic factor mRNA expression levels as an inflammatory reaction parameter and a control not involved in the acid secretory machinery, respectively. As shown in fig 2A, there was a 250-fold increase in median $H^+/K^+-ATPase$ mRNA expression levels in the gastric mucosa after *H. pylori* eradication ($n = 111$), accompanied by a 40% decrease in median IL-1 β mRNA expression levels ($n = 111$) (fig 3). These data suggest that *H. pylori* eradication restored $H^+/K^+-ATPase$ expression in the gastric mucosa, concomitant with improvement in gastric mucosal inflammation.

In contrast, the increase in mRNA expression of other molecules involved in acid secretion was relatively small. As

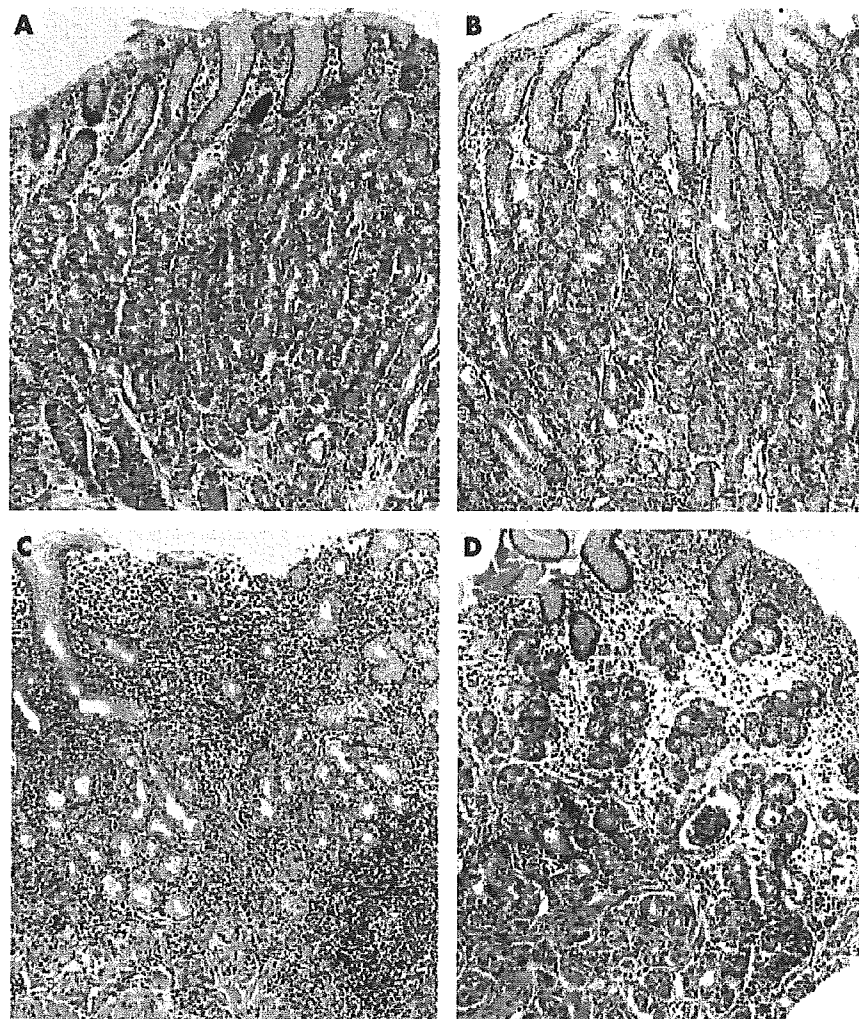


Figure 5 Representative images of biopsy specimens stained with haematoxylin-eosin used for histological assessment of gastric atrophy. The fundic mucosa before (A) and after (B) eradication in the non-severe atrophic group is shown for a subject with a pepsinogen I/II ratio of 4.7 before treatment. The fundic mucosa before (C) and after (D) eradication in the severe atrophic group is shown for a subject with a pepsinogen I/II ratio of 1.0 before treatment. The pepsinogen I/II ratio was closely correlated with gastric body atrophy grade assessed by histological examination.

shown in fig 2B and 2C, the increase in mRNA expression levels of anion exchanger 2 ($n = 111$) and M3 muscarinic receptor ($n = 111$) after *H. pylori* eradication was 2.3- and 2.5-fold, respectively, similar to intrinsic factor ($n = 111$) (fig 4). These data indicate that *H. pylori* eradication predominantly restored H⁺/K⁺-ATPase expression compared with other molecules expressed in parietal cells. As *H. pylori* eradication did not alter parietal cell numbers in the gastric mucosa, these data suggest that recovery of gastric acid secretion after *H. pylori* eradication in the gastric mucosa is due to an increase in H⁺/K⁺-ATPase expression in parietal cells.

Grade of gastric atrophy did not affect restoration levels of H⁺/K⁺-ATPase mRNA expression after *H. pylori* eradication

Based on the finding that *H. pylori* eradication restores H⁺/K⁺-ATPase expression in parietal cells, we then examined whether restoration of H⁺/K⁺-ATPase expression in parietal cells was related to the degree of gastric atrophy before *H. pylori* eradication. We thus compared gastric H⁺/K⁺-ATPase mRNA expression levels between the groups with different degrees of gastric atrophy. Pepsinogen I and pepsinogen II

differ in their location in the stomach. Both are located in chief and mucous neck cells of the oxyntic gland mucosa in the gastric corpus but only pepsinogen II is present in the gastric antrum. A pepsinogen I/II ratio < 3 is considered to be a reliable marker for severe atrophic gastritis.^{11 12} We thus evaluated gastric atrophy in subjects by determining the pepsinogen I/II ratio. In addition, gastric atrophy was evaluated by histological examination. Figure 5 shows representative images of biopsy specimens stained with haematoxylin-eosin used for histological assessment of gastric atrophy. In these cases, the pepsinogen I/II ratio was closely correlated with the gastric atrophy grade assessed by histological examination. We thus classified subjects into two groups using the pepsinogen I/II ratio as a gastric atrophy parameter: severe atrophy group ($n = 66$) (pepsinogen I/II ratio < 3) and non-severe atrophy group ($n = 45$) (pepsinogen I/II ratio ≥ 3). As shown in fig 6, median H⁺/K⁺-ATPase mRNA expression levels were increased from 0.9 to 960 in the severe atrophy group, and from 37 to 1273 in the non-severe atrophy group, respectively. These results indicate that H⁺/K⁺-ATPase expression in parietal cells is largely restored even in patients with high grade gastric atrophy.