

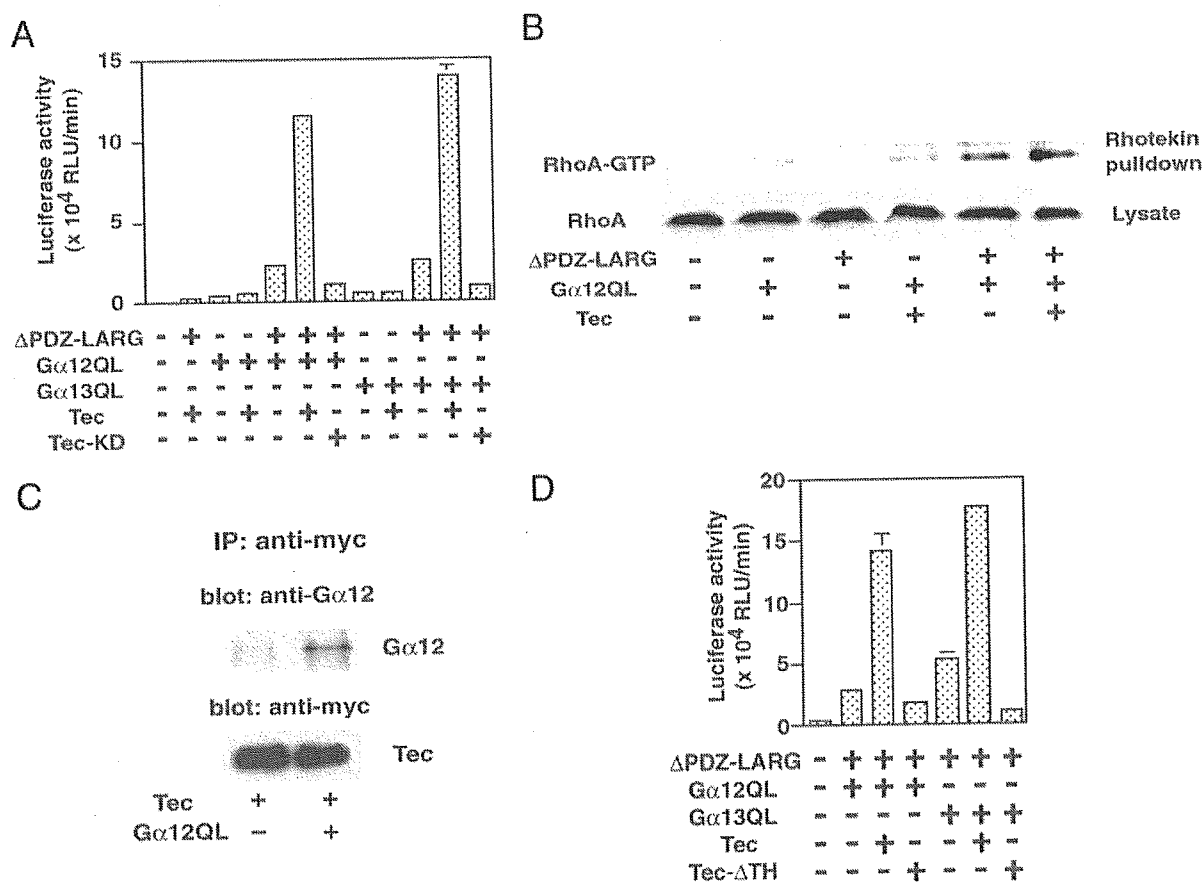


Fig. 3. Effect of Tec for Rho activation by Gα12/13-LARG. (A) Activation of SRF activity by Tec. HeLa cells were cotransfected with 0.1 μg of SRE.L-luciferase reporter plasmid with the indicated constructs: 0.01 μg of Gα12QL, 0.01 μg of Gα13QL, 0.1 μg of ΔPDZ-LARG, 0.1 μg of Tec, and 0.1 μg of Tec-KD. SRF activities of cell lysates were measured after 24 h. (B) RhoA activation by Gα12-LARG and Tec in HeLa cells. HeLa cells were transiently transfected with the plasmids encoding ΔPDZ-LARG, Gα12QL, or Tec. GTP-bound RhoA in cell lysates was detected using GST-RBD pull-down assay. The result shown is a representative of three separate experiments with similar results. (C) Direct interaction of Tec with Gα12. COS1 cells were transfected with myc-tagged Tec with or without Gα12QL. Tec was immunoprecipitated from the lysate, and the immunoprecipitates were analyzed by immunoblotting using Gα12 antibody. (D) Requirement of the TH domain of Tec in Gα12/13-LARG signaling pathway. HeLa cells were cotransfected with 0.1 μg of SRE.L-luciferase reporter plasmid with indicated plasmids as described for A or with 0.1 μg of Tec-ΔTH. SRF activities of cell lysates were measured after 24 h.

the region including its RGS domain (amino acid residues 307–617 of LARG).

Finally, we examined the effect of phosphorylation of LARG on its RhoGEF activity (Fig. 4 C and D). LARG was first phosphorylated by preincubation with Tec, and then RhoGEF assays were started by adding RhoA and Gα subunits. The preincubation with Tec did not affect the basal RhoGEF activity of LARG. However, Gα12 stimulated the RhoGEF activity of LARG in a phosphorylation-dependent manner. This stimulation was almost similar to the level by Gα13 without Tec. The stimulatory effect by Gα12 was also dependent on the presence of ATP during preincubation (data not shown), confirming that the phosphorylation of LARG is required for Gα12 to activate Rho. These results indicate that Gα12 can activate Rho through phosphorylated LARG. Tyrosine phosphorylation of LARG also modestly stimulated RhoGEF activity mediated by Gα13 (Fig. 4D).

Discussion

The results of this study demonstrated the biochemical mechanism of Rho activation through Gα12. Although Gα12 and Gα13 are similar in amino acid sequences and biochemical properties and both are involved in Rho activation, several studies indicated the functional differences between these two Gα subunits. The

most striking difference was demonstrated in Gα13 gene knock-out mice, which showed embryonic lethality due to the defect of vascular system formation (26). Gα12 could not rescue the function of Gα13 in these mice. In reconstitution experiments, Gα13 stimulated the GEF activity of p115RhoGEF. However, Gα12 could not stimulate the GEF activity of p115 and competitively inhibited the stimulatory effect of Gα13 (7). In this report, we demonstrated that the tyrosine phosphorylation of LARG is required for Gα12 to activate Rho. Although tyrosine phosphorylation of LARG could further stimulate the effect of Gα13, it was not required for Rho activation by Gα13. These differences in the regulatory mechanisms of Gα12- and Gα13-mediated pathways may be responsible for the different cellular effects induced by Gα12 or Gα13.

Because the TH domain was required for Tec to stimulate Gα12-LARG-mediated SRF activation, this domain may be involved in the interaction with Gα12 similar to the case of Btk. However, we could not detect the activation of Tec kinase by Gα12 *in vitro* (data not shown). The exact mechanism of Gα12 to regulate Tec kinase is currently unclear. However, it is interesting to note that thrombin, which can activate the Gα12/13 pathway, has also been reported to activate Tec in platelets (17). It is possible that activated Gα12 may recruit Tec

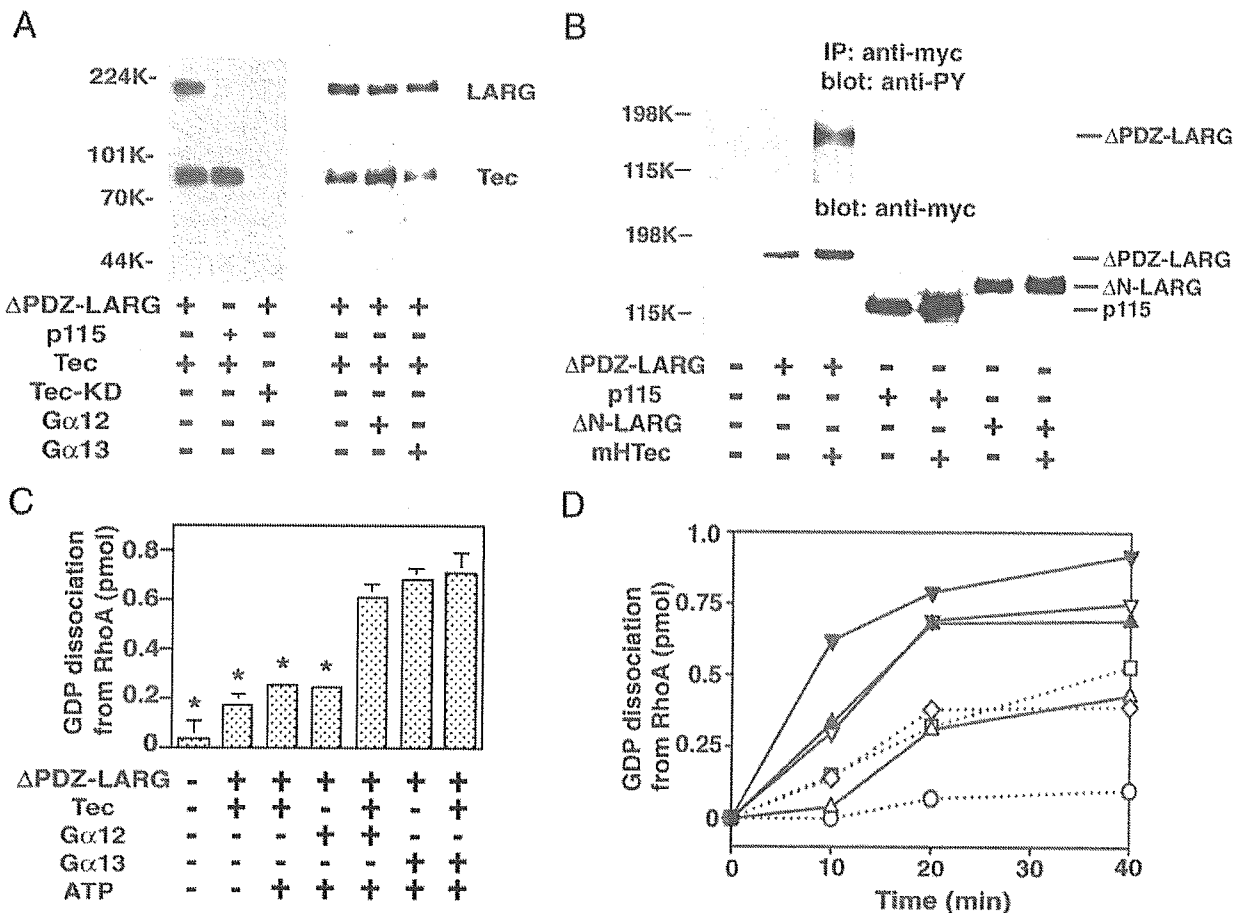


Fig. 4. Tyrosine phosphorylation of LARG by Tec. (A) Tyrosine phosphorylation of LARG by Tec *in vitro*. Myc-tagged Tec or Tec-KD was overexpressed in COS1 cells, immunoprecipitated by anti-myc antibody, and used for kinase assays. Recombinant Δ PDZ-LARG or p115RhoGEF (600 nM each) with or without 1 μ M AIF $_4^-$ -activated G α 12 or G α 13 were incubated with immunoprecipitated Tec in the presence of ATP for 20 min at 30°C. Proteins were separated by SDS/PAGE, followed by immunoblotting with antiphosphotyrosine antibody. (B) Tyrosine phosphorylation of LARG by Tec *in vivo*. HEK293 cells were cotransfected with myc-tagged Δ PDZ-LARG, Δ N-LARG, or p115 with or without mHTec. RhoGEFs were immunoprecipitated by anti-myc antibody from the cell lysates, and the immunoprecipitates were separated by SDS/PAGE, followed by immunoblotting using antiphosphotyrosine antibody or anti-myc antibody. (C) Stimulation of GDP dissociation from RhoA by Δ PDZ-LARG was assayed for 20 min at 20°C in the presence of the indicated proteins (as described in Methods): 10 nM Δ PDZ-LARG, 200 nM AIF $_4^-$ -activated G α 12, and 200 nM AIF $_4^-$ -activated G α 13. *, $P < 0.01$, significant difference from the data with G α 12 + LARG + Tec. The results shown are from a representative experiment of three such experiments with similar results. (D) Time course of GDP dissociation from RhoA. GDP dissociation from RhoA was measured with the indicated proteins: ○, control; ◇, 10 nM Δ PDZ-LARG; △, 10 nM Δ PDZ-LARG + Tec; ▽, 10 nM Δ PDZ-LARG + 200 nM G α 12; ▲, 10 nM Δ PDZ-LARG + 200 nM G α 13 + Tec.

in close proximity of LARG and facilitate the phosphorylation of LARG. Tec is also activated by other stimuli, such as cytokines and growth factors. These signaling pathways will also be able to regulate the G α 12-LARG pathway.

In addition to Tec, the involvement of Pyk2 in the G12/13-RhoGEF pathway has been reported (27). Furthermore, Chikumi *et al.* (28) recently demonstrated that thrombin stimulation activated nonreceptor tyrosine kinase FAK in HEK293 cells and that activated FAK could phosphorylate PDZ-RhoGEF or LARG but not p115RhoGEF. They also demonstrated the enhancement of Rho activation by coexpression of activated FAK and PDZ-RhoGEF in cells. They proposed that tyrosine phosphorylation of PDZ-RhoGEF or LARG by FAK might be involved in the

activation of Rho. However, its biochemical mechanism remained unclear. We demonstrated here that tyrosine phosphorylation of LARG by Tec does not affect its basal RhoGEF activity, but rather changes its regulation by G α subunits. It is possible that the activity of PDZ-RhoGEF is also regulated by tyrosine phosphorylation. The modulation of the G α 12/13-RhoGEF pathway by tyrosine kinases may be a widely used mechanism for G protein-coupled receptor-mediated Rho activation.

We thank Dr. T. Nagase for providing cDNAs for KIAA0380 and KIAA0382 and P. M. Sternweis for the assistance in cloning full-length LARG cDNA. This work was supported in part by the National Institutes of Health and the American Heart Association (T.K.). T.K. is an Established Investigator of the American Heart Association.

- Hall, A. (1998) *Science* **279**, 509–514.
- Whitehead, I. P., Campbell, S., Rossman, K. L. & Der, C. J. (1997) *Biochim. Biophys. Acta* **1332**, F1–F23.
- Gohla, A., Harhammer, R. & Schultz, G. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 4653–4659.
- Aragay, A. M., Collins, L. R., Post, G. R., Watson, A. J., Feramisco, J. R., Brown, J. H. & Simon, M. I. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 20073–20077.

- Kranenburg, O., Poland, M., van Horck, F. P. G., Drechsel, D., Hall, A. & Moolenaar, W. H. (1999) *Mol. Biol. Cell* **10**, 1851–1857.
- Kozasa, T., Jiang, X., Hart, M. J., Sternweis, P. M., Singer, W. D., Gilman, A. G., Bollag, G. & Sternweis, P. C. (1998) *Science* **280**, 2109–2111.
- Hart, M. J., Jiang, X., Kozasa, T., Roscoe, W., Singer, W. D., Gilman, A. G., Sternweis, P. C. & Bollag, G. (1998) *Science* **280**, 2112–2114.

8. Buhl, A. M., Johnson, N. L., Dhanasekaran, N. & Johnson, G. L. (1996) *J. Biol. Chem.* **270**, 24631–24634.
9. Crespo, P., Schuebel, K. E., Ostrom, A. A., Gutkind, J. S. & Bustelo, X. R. (1997) *Nature* **385**, 169–172.
10. Schuebel, K. E., Movilla, N., Rosa, J. L. & Bustelo, X. R. (1998) *EMBO J.* **17**, 6608–6621.
11. Kato, J., Kaziro, Y. & Satoh, T. (2000) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **268**, 141–147.
12. Katoh, H., Aoki, J., Yamaguchi, Y., Kitano, Y., Ichikawa, A. & Negishi, M. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 28700–28707.
13. Klages, B., Brandt, U., Simon, M. I., Schultz, G. & Offermanns, S. (1999) *J. Cell Biol.* **144**, 745–754.
14. Mao, J., Xie, W., Yuan, H., Simon, M. I., Mano, H. & Wu, D. (1998) *EMBO J.* **17**, 5638–5646.
15. Jiang, Y., Ma, W., Wan, Y., Kozasa, T., Hattori, S. & Huang, X.-Y. (1998) *Nature* **395**, 808–813.
16. Mano, H. (1999) *Cytokine Growth Factor Rev.* **10**, 267–280.
17. Hamazaki, Y., Kojima, H., Mano, H., Nagata, Y., Todokoro, K., Abe, T. & Nagasawa, T. (1998) *Oncogene* **16**, 2773–2780.
18. Nagase, T., Ishikawa, K., Nakajima, D., Ohira, M., Seki, N., Miyajima, N., Kotani, H., Nomura, N. & Ohara, O. (1997) *DNA Res.* **4**, 141–150.
19. Yoshida, K., Yamashita, Y., Miyazato, A., Ohya, K., Kitanaka, A., Ikeda, U., Shimada, K., Yamanaka, T., Ozawa, K. & Mano, H. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 24945–24952.
20. Kozasa, T. (1999) *G Proteins: Analysis of Technique*, ed. Manning, D. R. (CRC, Boca Raton, FL), pp. 23–38.
21. Ren, X. D. & Schwartz, M. A. (2000) *Methods Enzymol.* **325**, 264–272.
22. Kourlas, P. J., Strout, M. P., Becknell, B., Veronese, M. L., Croce, C. M., Theil, K. S., Krahe, R., Ruutu, T., Knuutila, S., Bloomfield, C. D. & Caligiuri, M. A. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 2145–2150.
23. Fukuhara, S., Murga, C., Zohar, M., Igishi, T. & Gutkind, J. S. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 5868–5879.
24. Fukuhara, S., Chikumi, H. & Gutkind, J. S. (2000) *FEBS Lett.* **485**, 183–188.
25. Fromm, C., Coso, O. A., Montaner, S., Xu, N. & Gutkind, J. S. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 10098–10103.
26. Offermanns, S., Mancino, V., Revel, J.-P. & Simon, M. I. (1997) *Science* **275**, 533–536.
27. Shi, C. S., Sinnarajah, S., Cho, H., Kozasa, T. & Kehrl, J. H. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 24470–24476.
28. Chikumi, H., Fukuhara, S. & Gutkind, J. S. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 12463–12473.

BAMP スクリーニング：白血病への包括的アプローチ

間 野 博 行

臨 床 血 液 第 44 卷 第 7 号 別刷

(2003 年 7 月)

BAMP スクリーニング：白血病への包括的アプローチ

間 野 博 行

Key words: DNA microarray, Genomics, Proteomics, AC133

1. ゲノミクス・プロテオミクスとは何か

ヒトゲノムプロジェクトの成果であるドラフトシーケンスが2001年2月に公表され^{1,2)}、またついに euchromatin の完全版配列決定が2003年4月14日に宣言された (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/guide/human/>)。現在得られた配列上に遺伝子の割付作業が行われているが近い将来にその成果が公表されると思われる。ヒト遺伝子の総数は恐らく3万数千種類程度になると予想されており、いよいよ「ポストゲノム時代」が訪れようとしている。

今後の医学研究において膨大なゲノム情報を積極的に利用することが重要な視点となるであろうし、もちろん血液学もその例外ではない。遺伝子変異、遺伝子発現の定量化および蛋白質の変化などに関してゲノム情報を利用した新しい網羅的スクリーニング法が有効なツールとなるであろう。

では実際にわれわれが利用できる解析手法としてはどのようなものがあるのでしょうか。代表的なアプローチの方向性として大きく「核酸の解析」と「蛋白質の解析」に分類することができる。遺伝子「gene」に「集合・総体」を意味する接尾語である「-ome」を付加して「genome」という言葉が作られ、特定の生物種の遺伝子全体を意味するように、最近では蛋白質「protein」に「-ome」を付けて特定の種あるいは組織における蛋白質全体を指し示す「proteome」（プロテオーム）という名称が作られた。また特定の遺伝子ではなく genome 全体を解析する手法を意味する言葉として、「-ics」という接尾語をさらに付加した「genomics」（ゲノミク

ス）が作成され、同様にプロテオームを解析する技術に「proteomics」（プロテオミクス）という名前が付けられた。

ゲノミクス技術にはゲノムの塩基配列を直接解析する手法と、そこから生じる mRNA の発現様式を測定する手法に分けられる。塩基配列異常は主に SNP などの遺伝的素因をゲノムワイドにスクリーニングすることにより、生活習慣病の素因を定量化したり薬剤の反応性などを予測することが重要な解析目標となる。一方、遺伝子発現量の定量法としては DNA マイクロアレイ⁴⁾、サブトラクショナルクローニング法および SAGE (serial analysis of gene expression) 法⁵⁾などがあげられる。これらの大規模スクリーニングを通して疾患の新しい診断マーカーの同定や発症機構の解析が求められている。

多くの遺伝子の役割というのは極論すれば特定の蛋白質を作ることにある。したがって mRNA の定量だけでは不十分であり、やはり最終的な蛋白産物の大規模スクリーニングが必要であろう。実際 mRNA の発現量とその蛋白産物の発現量との間の相関係数は 0.1~0.5 程度と驚く程低い^{6,7)}。すなわち転写後の修飾が細胞内蛋白質の量に大きく影響すると考えられ、やはり DNA マイクロアレイなどを用いた mRNA の定量だけでは片手落ちになる。したがってプロテオミクスを用いたアプローチの重要性はさらに増すであろう。

2. DNA マイクロアレイによる白血病解析

DNA マイクロアレイの原理はいわば超高密度ドットプロット法であり、一度に数千~数万種類の遺伝子の発現を比較的簡便に定量可能である⁸⁾。具体的な DNA マイクロアレイの白血病解析への応用としては大きく2種類の方向性があると考えられる。

それは (1) 新規分子診断マーカーの同定, と (2) 病因遺伝子の探索である。例えば白血病 A と白血病 B の患者から得られたメッセンジャー RNA を用いて DNA マイクロアレイによる比較を行うことで, どちらかの疾患に固有な発現パターンを取る遺伝子群を同定することが可能であろう。旧来の細胞形態学などでは困難であった新たな鑑別診断法がこのようなアプローチで開発可能になると期待される。また病因解析に関しても, 例えば健康人と白血病 A とのメッセンジャー RNA を DNA マイクロアレイで比較することにより, 白血病 A においてのみ発現が亢進あるいは低下している遺伝子群を同定することが可能になり, その中には疾患の発症に関与する遺伝子が含まれている可能性が高い。このようにゲノム医学の手法を用いることで, 白血病の病態解析に新たな知見が数多くもたらされると予想される。

例えば白血病の診断の場合を考えると, 旧来の方法では患者骨髓細胞を (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, などの情報を基にそれぞれの疾患における FAB 分類を行ってきた。これらを総合的に解析することで予後判定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する。一方, 例えば一枚の 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。またチップ解析の結果は新たな診断マーカーの同定だけでなく, 疾患発症機構に関しても新たな情報を提供するのではないかと期待される。

このような DNA マイクロアレイを用いた診断の試みとして, Golub らは 6817 遺伝子を配置した DNA マイクロアレイによる急性骨髄性白血病 (AML) と急性リンパ性白血病 (ALL) とを鑑別する可能性について検討した⁹⁾。AML 11 例, ALL 27 例をこの DNA マイクロアレイによって解析した結果, 約 50 個の遺伝子が AML と ALL の間で偏って発現していることが明らかになった。そこでこれら “informative genes” から 20 個の遺伝子を選びそれらの発現量の偏りの程度を数値化したものに実際の発現量をかけあわせ合計することで, それ

Fig. 1 Changes in gene expression profile due to a shift in cell population composition (modified from reference 12)

(A) The normal bone marrow (BM) is composed of various cell types, whereas the leukemic BM is composed predominantly of the malignant blasts (green). Expansion of the leukemic cells thus results in a decrease in the proportion of the other cell types. The overall level of expression in the leukemic BM of genes that are selectively expressed in one type of noncancer cell (purple) would thus appear decreased (arrow), compared with that in the normal BM, only because of the corresponding decrease in the purple cell population. Conversely, expansion of the green cells gives rise to an apparent increase in the tissue expression level of genes specifically expressed in this cell type, regardless of whether the number of the corresponding transcripts per cell is actually increased or not.

(B) Previous comparisons of transcriptomes in the studies of blood cells have been performed with MNCs of sample A and sample B, irrespective of their cellular compositions (MNC screening). In the present study, transcriptomes were compared between leukemic blasts (shown in green) in order to reduce the occurrence of pseudopositive and pseudonegative results generated by a shift in cell population composition. For this approach (BAMP screening), the target leukemic blasts were purified by affinity chromatography on a column containing anti-AC133.

Fig. 2 Comparison of MNC and BAMP screening for a healthy volunteer and an AML patient (modified from reference 12)

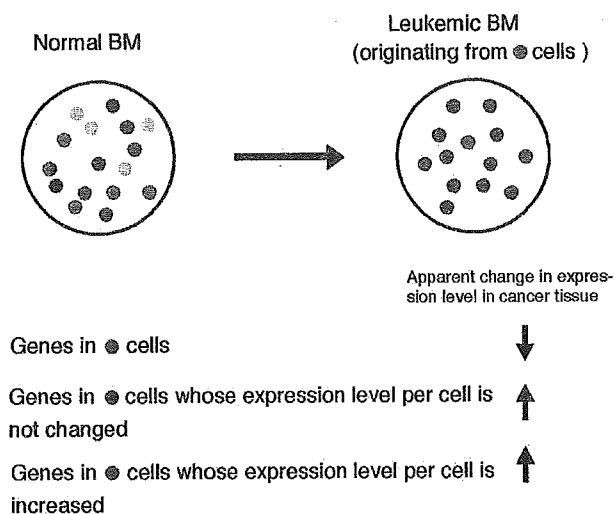
Total RNA isolated from the MNCs of a healthy volunteer and a leukemia patient was used to synthesize cDNA labeled with Cy5 and Cy3 dyes, respectively. A mixture of the labeled cDNA preparations was then subjected to hybridization with a cDNA microarray containing fragments of 382 cancer-related genes (left panel). Red and green spots thus indicate genes specifically expressed in the healthy volunteer or in the patient, respectively; yellow spots correspond to genes expressed to similar extents in both samples. RNA prepared from purified AC133+ cells of the healthy volunteer and the patient was similarly analyzed (right panel). A part of the scanned image is demonstrated. Some spots, including those numbered, exhibited opposite patterns of expression by MNC screening and BAMP screening.

ぞれの患者の AML あるいは ALL の確からしさを数値化した。本法を患者における AML と ALL の鑑別診断に応用してみると 38 例中 34 例で正しい診断が行われ、1 例不明、3 例が誤診であった。したがってある程度の確からしさを持って DNA マイクロアレイによる疾患診断が可能であることが判った。

小児 ALL は一般に治療反応性が良いが、Ph 1 染色体あるいは MLL (mixed-lineage leukemia) 遺伝子の転座の存在は重要な予後不良因子である。11 番染色体長腕に存在する MLL 遺伝子は HOX 遺伝子の発現を制御する転写因子をコードすると考えられており、染色体転座の結果 LTG 4 など数多くの遺伝子と融合遺伝子産物を生じる。MLL 転座をもつ ALL は MLL の名前の由来にあるように ALL と AML の両方の細胞表面抗原を持つことが多い。Armstrong らは MLL 染色体転座を持つ白血病が、

はたして一般的な ALL と異なった遺伝子発現プロファイルを持つ疾患か否かを DNA マイクロアレイを用いて検証した¹⁰⁾。一般の ALL と MLL 転座型 ALL とで発現量が異なる遺伝子群をスクリーニングしたところ、後者特異的な発現を示す遺伝子として、造血幹細胞マーカーである AC 133 や FLT 3 が同定された。さらに HOX 遺伝子群の一部も MLL 転座型白血病で発現が亢進することが明らかになった。さらに彼らは MLL 転座型白血病と AML および一般的な ALL とは全体的な遺伝子発現パターンが異なる疾患か否かを検定したところ、統計的にこれら 3 者の発現パターンが大きく異なり、DNA マイクロアレイによって 3 者の鑑別診断が可能であるとの結論が得られた。すなわち、MLL 転座型白血病はこれまで ALL として分類されてきたが、AML, ALL とは異なる第三の急性白血病とするべきではないか、と提唱されている。

A



B

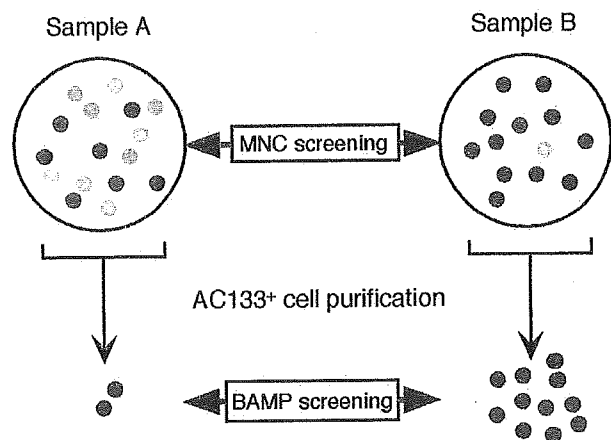


Fig. 1

MNC

AC133

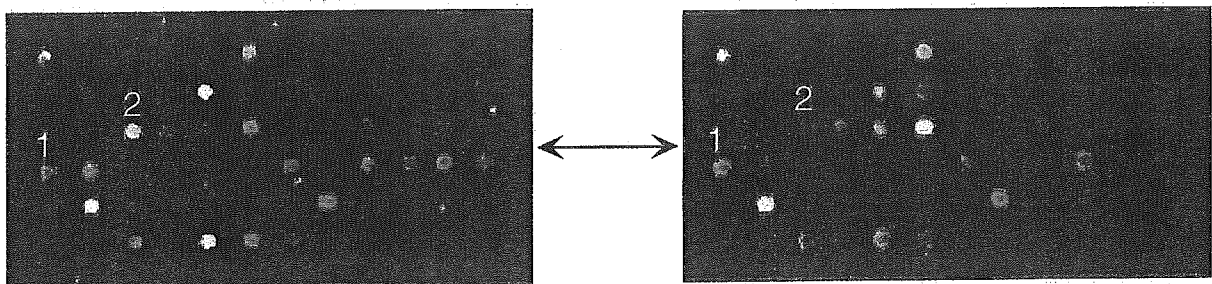
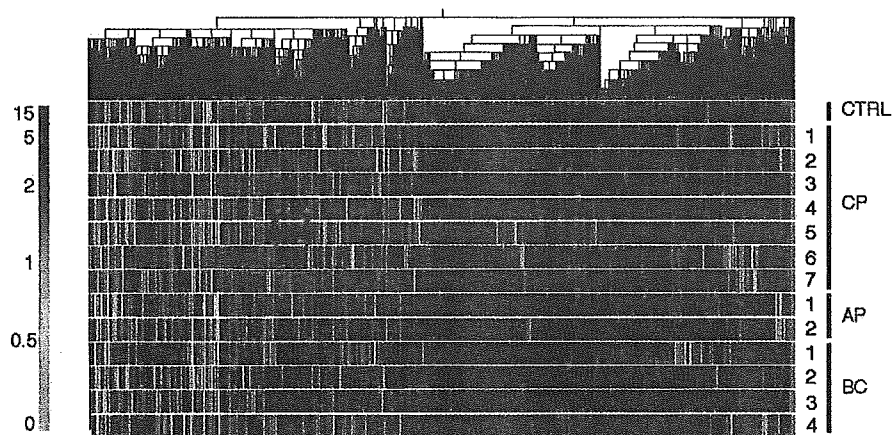


Fig. 2

A



B

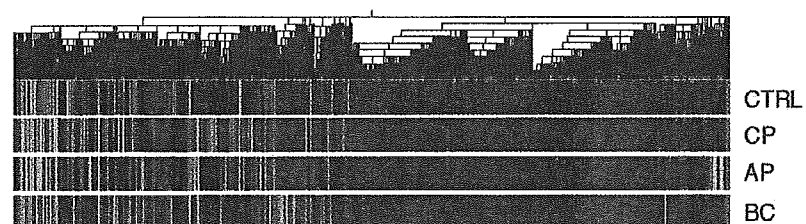


Fig. 3

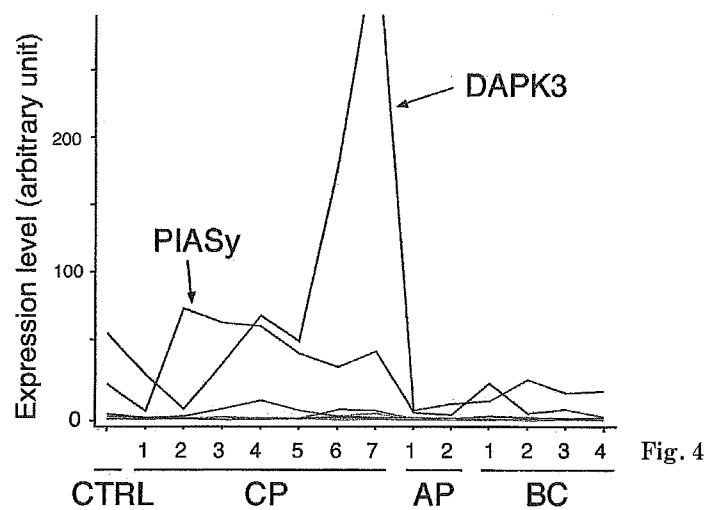


Fig. 4

PIASy(-)



PIASy(+)

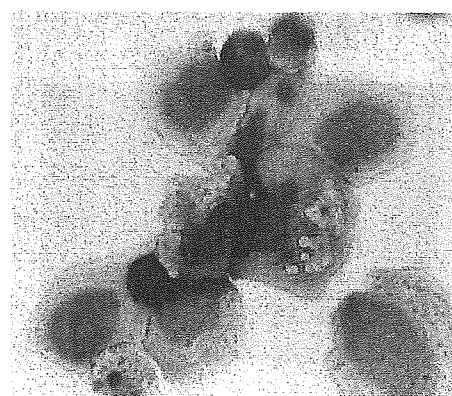


Fig. 5

3. BAMP スクリーニングの特性

しかし実際に DNA マイクロアレイ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。その理由を例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 (Fig. 1 A)。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 マイクロアレイ解析を行うと、造血幹細胞分画以外の細胞 (例えば Fig. 1 A の紫色細胞) 特異的に発現する遺伝子などは全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、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拘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。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極めて困難であろう。

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良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

Table 1 Blast Bank

Disease	Sample No.
AML	129
ALL	23
MDS	91
CML	60
AA	17
Others	80
Total	400

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 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。われわれは造血幹細胞分画に特異的に発現する膜蛋白 AC 133¹¹⁾ に着目し、AC 133 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 (Fig. 1 B)¹²⁾。平成 15 年 2 月現在で既に Blast Bank のサンプル数は 400 例を越えており、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 (Table 1)。このように、癌か正常か、あるいは薬剤感受性か耐性か、等「着目する解析点」以外の細胞形質を出来るだけ揃えた分画を予め純化調整し、これを用いて偽陽性の少ないゲノミクス解析を行う方法をわれわれは BACKGROUND-MATCHED Population スクリーニング (BAMP スクリーニング) としてここに提唱する¹²⁾。

Fig. 3 Transcriptomes of CML blasts (modified from reference 14)

(A) Hierarchical clustering of 3,456 genes based on their expression profiles in Blast Bank samples derived from 13 individuals with CML and in a pooled healthy control sample (CTRL). Each column represents a single gene on the microarray, and each row a separate patient sample. The fluorescence intensity of every gene was normalized relative to the mean fluorescence value of all spots in each hybridization, and the normalized value is shown color-coded as indicated on the left. The position of a cluster of CP-specific genes is indicated by the arrow. Gray indicates blank spots. (B) Mean expression value for each gene was calculated for CP, AP, and BC stages, and used to generate another dendrogram, “average tree”. The presence of clusters of genes whose expression is specific to healthy control, CP, AP, or BC samples is evident.

Fig. 4 Identification of early stage-specific genes (modified from reference 14)

Profiles of genes whose expression level is reduced in AP or BC blasts relative to that in healthy control or CP blasts. The profiles of the genes for PIASy and DAPK3 are indicated.

Fig. 5 PIASy as an apoptosis inducer (modified from reference 14)

KCL22 cells were infected with a retrovirus, MX-tetOFF/PIASy-F, for the conditional expression of PIASy. The cells were cultured under non-induced (–) or induced (+) condition, and were stained with the Wright-Giemsa solutions. Original magnification $\times 400$.

BAMP スクリーニングの有用性を証明するためには、例えば AC 133 陽性分画の比較が、旧来の骨髓単核球の比較とは異なった実験結果を与えることを示す必要がある。そこでわれわれは健常人と急性白血病患者各 1 例の骨髓穿刺液より単核球を純化し、さらに同じペアから AC 133 陽性幹細胞分画も純化した。単核球より調整した mRNA と AC 133 陽性細胞より調整した mRNA それぞれより蛍光標識 cDNA を合成し、cDNA マイクロアレイにハイブリダイズさせた (Fig. 1 B)。すなわち同じ症例の組合せから得られる発現プロファイルが、単核球を用いた場合と造血幹細胞分画を用いた場合で異なったデータになるか否かを検証したわけである。健常人から得た cDNA は赤色の、白血病患者由来 cDNA は緑色の蛍光で標識されているが、マイクロアレイをレーザーにてスキャンした結果いくつかのスポットでは赤色/緑色の比が逆転していることが判る (Fig. 2)。すなわち健常人と白血病患者のどちらで発現が高いのか、というデータが単核球と幹細胞とは異なった結論を導くことが明らかになった。ではどちらのデータが真実を反映しているのだろうか。われわれは本データの中で血液前駆細胞特異的に発現している CD 34 遺伝子に着目した。単核球のアレイ比較では白血病患者細胞において CD 34 の発現が著明に「増加」していたが、それぞれから純化した AC 133 陽性分画で比較すると CD 34 遺伝子は両者の間で同程度に発現していることが確認された。したがって単核球比較で認められた CD 34 の発現増加は細胞あたりの mRNA の増加によるものではなく、単に CD 34 陽性白血病芽球数の増加を反映しているに過ぎないと考えられた¹²⁾。以上より BAMP スクリーニングは旧来の単核球比較とは異なる実験結果を与えること、しかも偽陽性の少ない解析が行えることが確認された。

4. BAMP スクリーニングの実際

では具体的に Blast Bank を用いた白血病のアレイ解析を行ってみよう。慢性骨髓性白血病 (CML) は比較的症状の少ない慢性期 (CP) を数年へた後、移行期 (AP) から、極めて予後不良な急性転化期 (BC) へと変化する¹³⁾。CP が Ph 1 染色体転座の結果発症することは示されているが、どのようなメカニズムで AP/BC へと悪性転化するかは全く不明である。そこでわれわれは Blast Bank 中

の CML サンプルを用いて、CP から AP/BC への移行に伴って発現量が変化する遺伝子群の同定を試みた¹⁴⁾。まず健常人 1 例、CP 7 例、AP 2 例、BC 4 例の Blast Bank サンプルより蛍光標識 cRNA を合成し、オリゴヌクレオチドアレイへハイブリダイズさせることで 3456 種類のヒト遺伝子に関する発現量の定量を行った。その結果を階層的クラスタリング法¹⁵⁾にて処理したのが Fig. 3 A である。

これは一般に「gene tree」とも呼ばれる図を作製する方法であり、各遺伝子のサンプル間における発現変化のパターンが近いものを、より近くに置くような遺伝子系統樹を作るものである。Fig. 3 A においては縦軸一本一本がそれぞれ 3456 種類の各遺伝子を表し、Blast Bank 各サンプルにおける発現量は左に示すスケールにしたがって色で表されている。すなわち発現が高い場合は赤色、逆に低い場合は緑色で示されている。また図の上に表示されている系統樹の枝が短い遺伝子群は相同性が高い遺伝子クラスターといえる。この図から、解析した半数近くの遺伝子がほとんど転写されておらず、また各病期中でも遺伝子発現プロファイルが似たサブグループが存在することがわかる (例えば CP の 6 番と 7 番)。

さらに各病期特異的な遺伝子を可視化するため、それぞれの遺伝子の各病期における平均値を計算し、この値を基に gene tree を作製しなおした (Fig. 3 B)。われわれはこの平均値による gene tree を「average tree」と呼んでおり、本図から少なくとも平均値においては病期特異的な遺伝子群が存在することがわかる。こうして 3456 種類の遺伝子の中から平均値としていずれかの病期に固有の発現を示す遺伝子群が同定された。これら遺伝子の実際の患者サンプルにおける発現量を確認することで、更なる絞り込みが可能になる。

その結果 AP/BC へ移行すると発現が著明に減少する遺伝子として DAPK 3 (death-associated protein kinase 3) および PIASy が同定された (Fig. 4)。PIASy は当初転写因子 STAT 1 の機能を抑制する細胞内分子としてクローニングされ¹⁶⁾、現在はさらに細胞内蛋白分解系への関与も示唆されている¹⁷⁾。われわれは PIASy の発現低下が CML 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、同遺伝子を CML BC 期由来の細胞株に導入し、細胞増殖が抑制される可能性を検

討した。その結果 Fig. 5 に示されるように 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「癌抑制遺伝子」としての機能を強く示唆しており、PIASy の発現低下が CML 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。

5. プロテオミクスによる BAMP スクリーニング

初めに述べたように蛋白質に関する大規模スクリーニングは疾患の病態解析の上で必須である。しかし分化レベルが異なる細胞間ではプロテオームも大きく異なるため、プロテオミクス解析においても BAMP スクリーニングの概念は重要である。したがって Blast Bank に属するサンプルはプロテオーム解析の良いターゲットといえる。しかし実際には現段階で mRNA プロファイリングにおけるマイクロアレイのような優れたスクリーニングシステムがプロテオミクスにおいては存在しない。感度の面でも、また一度に解析できる蛋白数の面でも現行のツールは何れも発展途上にある。

今日において最もスタンダードなプロテオミクスツールは二次元電気泳動と質量分析法の組合せであろう。蛋白質をその分子量によって展開する電気泳動が、一般に用いられている SDS-PAGE (SDS-polyacrylamide gel electrophoresis) 法である。しかし SDS-PAGE では一度に解析・比較できる蛋白質の種類が少なく、ヒトが持つと予想される 10 万種類以上の蛋白質を解析するには不十分である。一般に蛋白質は荷電アミノ酸の総和に依存した形でそれぞれ固有の等電点 (pI) を持つ。そこでまず蛋白質群を等電点に沿って一次元目で展開し、次に SDS-PAGE を行って分子量で展開する二次元電気泳動法が O'Farrell らによって開発された (Fig. 6)¹⁸⁾。優れた二次元電気泳動によって数千種類の蛋白質スポットが同定可能である。そこで二次元電気泳動によって蛋白質を展開し、異なったサンプル間で比較することで分子量あるいは等電点に変化する蛋白質スポットをスクリーニングすることができる。ただし本システムの最大の欠点は検出感度にある。銀染色で蛋白スポットを検出するためには各スポットが少なくとも数ナノグラム必要であり、サンプルの初期総量で少なくとも数百マイクログラムの蛋白質が必要である。しかし造血幹細胞分画は当然

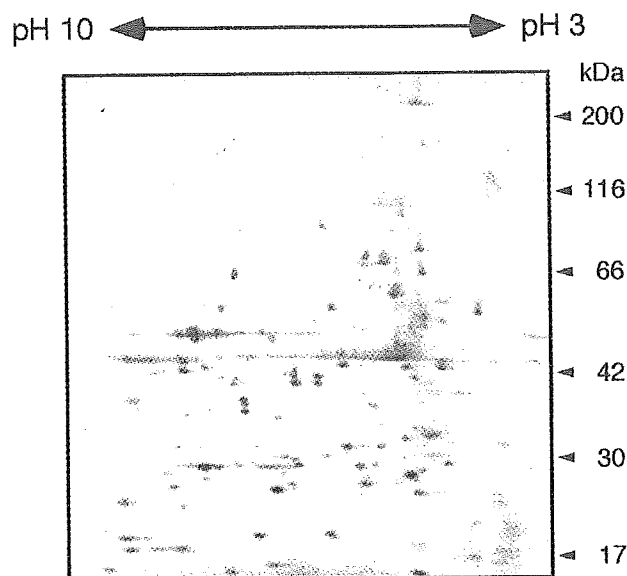


Fig. 6 Two-dimensional (2D) SDS-PAGE analysis of Blast Bank samples

The cytosolic fraction ($\sim 10 \mu\text{g}$ of protein) isolated from AC133⁺ leukemic blasts was subjected to 2D SDS-PAGE on a 7.5 to 15% gradient gel. The scanned image of the silver-stained gel was then used to detect and compare protein spots. The positions of molecular mass standards (in kilodaltons) are shown at the right.

のことながら細胞数として僅かしか得られず、これまで二次元電気泳動法を用いた解析がなされたのは主に細胞株を用いた実験であった¹⁹⁾。

一部の急性白血病患者からは AC 133 陽性細胞が 1×10^7 個以上純化可能であり、われわれはこのようなサンプルを用いてプロテオミクス解析を行ってみた。急性骨髄性白血病より得た Blast Bank サンプルを二次元電気泳動で展開したところ Fig. 6 に示されるように数百種類の蛋白スポットが同定された。次に二次元電気泳動のスポット同定・比較専用ソフトウェアを用いてこれらスポットをサンプル間で比較し、分子量、スポットサイズあるいは pI が変化しているものをスクリーニングするのである。さらにこれらスポットから蛋白質を溶出し蛋白分解酵素で処理した後 MALDI-TOF タイプなどの高精度質量分析計にかけて、それぞれのペプチドの精密な質量を測定する²⁰⁾。得られたペプチドの分子量をヒトゲノム配列より作られたヒトプロテオームデータベースにてスクリーニングし、蛋白質の同定を行う。

6. Blast Bank 以外の BAMP スクリーニング

では造血幹細胞以外のレベルで悪性化が生じている疾患群はどの様に解析を行えばよいのであろうか。ここでは大顆粒リンパ球 (large granular lymphocyte: LGL) 増殖性疾患を例にとって検討してみよう。LGL は T 細胞由来と NK 細胞由来があり、どちらも慢性に増殖する病態が存在する²¹⁾。LGL 増多症の一部は反応性と考えられているが、広く認められた診断基準さえ存在しないのが現状である。患者末梢血には当然ながら LGL が著明に増加しているため、単純に末梢血単核球を比較すると LGL 特異的遺伝子 (異常増殖に関与していないものも含め) は必ず患者サンプルで誘導しているように結論づけられる。そこで牧島らは T 細胞性 LGL 増多症の病態解明を目的として、CD 4⁺CD 8⁺ 型 LGL 増多症患者の末梢血よりこれら表面抗原の形質にしたがって増殖分画のみを純化し、年齢、性を一致させた健常人より同じ CD 4⁺CD 8⁺ 分画を純化しマイクロアレイを用いて発現比較を行った²²⁾。その結果計 6 種類の遺伝子が患者 LGL 特異的に発現していることが示された。これら疾患特異的遺伝子の中には興味深いことにインターロイキン-1 β (IL-1 β) 遺伝子が含まれていた。

IL-1 β は強力な炎症反応惹起因子であり慢性関節リウマチにおける関節障害にも関与していると考えられている²³⁾。顆粒リンパ球増多症患者の合併症として慢性関節リウマチはしばしば観察されることから、IL-1 β の LGL における高発現は慢性関節リウマチ合併の原因としての可能性も示唆される。牧島らは患者および健常人の血中 IL-1 β 濃度も測定し、同因子が患者血中においてのみ高値を示すことを明らかにした (Fig. 7)。すなわちマイクロアレイ実験によって、疾患の病態理解に重要な知見が得られたと言える。

7. 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、医学にとって極めて貴重 (かつ膨大) な情報リソースであり、この有効活用無くして 21 世紀の医療は成り立たないであろう。必ずしも DNA マイ

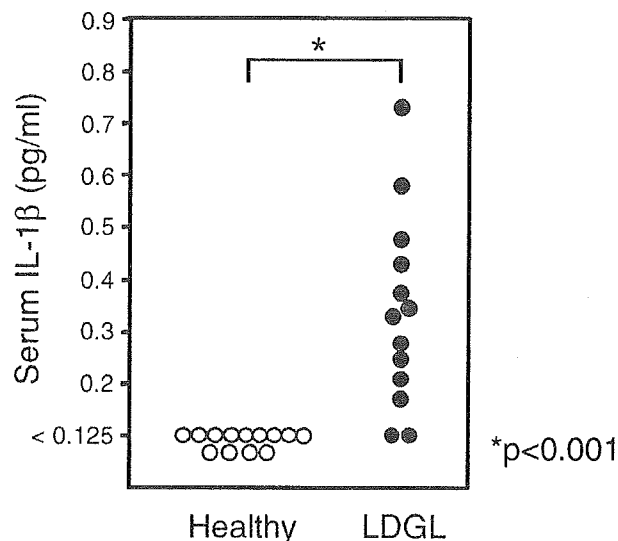


Fig. 7 Comparison of IL-1 β expression between healthy donors and patients (modified from reference 22)

Expression level of IL-1 β protein in the sera of 13 volunteers and 13 patients was assayed by ELISA. The p-value for the statistical comparison is provided.

クロアレイが理想のシステムとは言えないが、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良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、その極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) The genome international sequencing consortium: Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* **409**: 860~921, 2001
- 2) Venter JC, et al.: The sequence of the human genome. *Science* **291**: 1304~1351, 2001
- 3) Abbott A: Workshop prepares ground for human proteome project. *Nature* **413**: 763, 2001
- 4) Cheung VG, et al.: Making and reading microarrays. *Nat Genet* **21** (1 Suppl): 15~19, 1999
- 5) Velculescu VE, et al.: Serial analysis of gene expression. *Science* **270**: 484-487, 1995
- 6) Gygi SP, et al.: Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Mol Cell Biol* **19**: 1720~1730, 1999

- 7) Futcher B, et al.: A sampling of the yeast proteome. *Mol Cell Biol* **19**: 7357-7368, 1999
- 8) Duggan DJ, et al.: Expression profiling using cDNA microarrays. *Nat Genet* **21** (1 Suppl): 10~14, 1999
- 9) Golub TR, et al.: Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science* **286**: 531~537, 1999
- 10) Armstrong SA, et al.: MLL translocations specify a distinct gene expression profile that distinguishes a unique leukemia. *Nat Genet* **30**: 41~47, 2002
- 11) Yin AH, et al.: AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* **90**: 5002~5012, 1997
- 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) Ben-Yehuda D, et al.: Molecular follow-up of disease progression and interferon therapy in chronic myelocytic leukemia. *Blood* **90**: 4918~4923, 1997
- 14) Ohmine K, et al.: Characterization of stage progression in chronic myeloid leukemia by DNA microarray with purified hematopoietic stem cells. *Oncogene* **20**: 8249~8257, 2001
- 15) Alon U, et al.: Broad patterns of gene expression revealed by clustering analysis of tumor and normal colon tissues probed by oligonucleotide arrays. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 6745~6750, 1999
- 16) Liu B, et al.: A transcriptional corepressor of Stat1 with an essential LXXLL signature motif. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 3203~3207, 2001
- 17) Sachdev S, et al.: PIASy, a nuclear matrix-associated SUMO E3 ligase, represses LEF1 activity by sequestration into nuclear bodies. *Genes Dev* **15**: 3088~3103, 2001
- 18) O'Farrell PH: High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem* **250**: 4007~4021, 1975
- 19) Lian Z, et al.: Genomic and proteomic analysis of the myeloid differentiation program. *Blood* **98**: 513~524, 2001
- 20) Taniguchi H, et al.: A mass spectrometric study on the in vivo posttranslational modification of GAP-43. *J Biol Chem* **269**: 22481-22484, 1994
- 21) Semenzato G, et al.: The lymphoproliferative disease of granular lymphocytes: updated criteria for diagnosis. *Blood* **89**: 256~260, 1997
- 22) Makishima H, et al.: DNA microarray analysis of T cell-type lymphoproliferative disease of granular lymphocytes. *Br J Haematol* **118**: 462~469, 2002
- 23) Arend WP: Cytokine imbalance in the pathogenesis of rheumatoid arthritis: the role of interleukin-1 receptor antagonist. *Semin Arthritis Rheum* **30** (5 Suppl 2): 1~6, 2001

《病態理解のために》
白血病のマイクロアレイ解析

間 野 博 行

特集 白血病 ― 最新の治療の動向と今後の展望

臨床雑誌「内 科」第92巻 第3号〔2003年9月号〕別 刷

南 江 堂

《病態理解のために》 白血病のマイクロアレイ解析

間野 博行*

はじめに●

ヒトゲノムプロジェクトの成果であるドラフトシーケンスが2001年2月に公表され¹⁾、また、ついに euchromatin の完全版配列決定が2003年4月14日に宣言された。現在得られた配列上に遺伝子の割付作業が行われているが、近い将来にその成果が公表されると思われる。ヒト遺伝子の総数はおそらく3万数千種類程度になると予想されており、いよいよ「ポストゲノム時代」が訪れようとしている。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であろう。現段階でこのような大規模発現スクリーニングにもっとも適した方法はDNAチップ・DNAマイクロアレイ(以下マイクロアレイ)である²⁾。

マイクロアレイの原理●

では具体的にマイクロアレイを用いて、組織Aと組織Bにおける遺伝子の網羅的発現解析を行う実験を考えてみよう(Fig. 1)。まず組織AとBからそれぞれメッセンジャーRNA(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由来のcDNAを合成するわけであるが、その際に組織AのcDNAには緑色の蛍光色素Cy3を、また組織BのcDNAには赤色の蛍光色素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、マイクロアレイとハイブリダイズさせるわけである³⁾。

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。このマイクロアレイをレーザーで励起すると、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みえる(Fig. 2)。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枚のマイクロアレイ上には数千～数万の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。

白血病の解析●

では実際の白血病解析にマイクロアレイはどのように応用可能であろうか。具体的な方向としては大きく2種類あると考えられる。それは、①新規分子診断マーカーの同定と、②病因遺伝子の探索である。たとえば白血病Aと白血病Bの患者から得られたmRNAを用いてマイクロアレイによる比較を行うことで、どちらかの疾患に固有な発現パターンをとる遺伝子群を同定することが可能であろう。旧来の細胞形態学などでは困難であった新たな鑑別診断法がこのようなアプローチで開発可能になると期待される。また、病因解析に関しても、たとえば健常人と白血病Aとの

* H. Mano(教授)：自治医科大学ゲノム機能研究部。

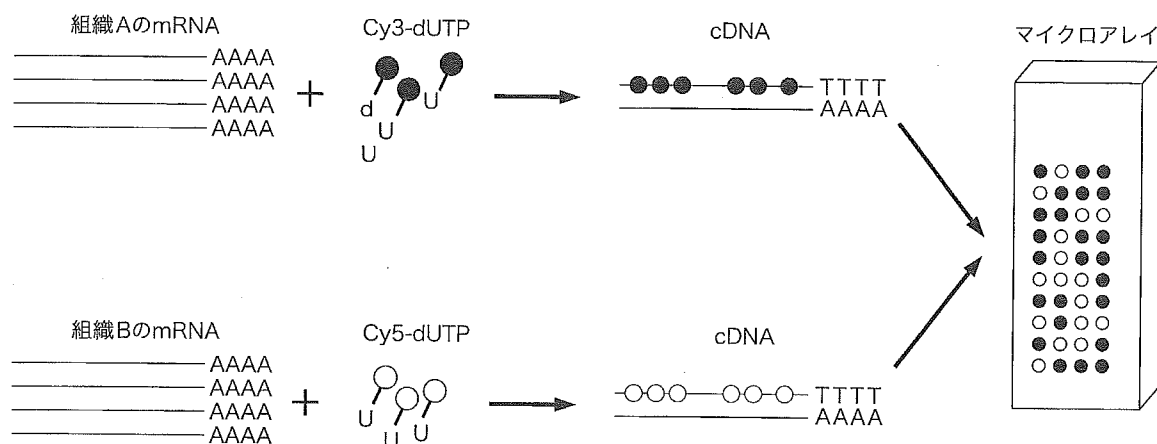


Fig. 1. マイクロアレイを用いた発現解析の原理

組織 A と B とのあいだで遺伝子発現プロファイルを比較したい場合、まず組織 A と B それぞれから等量の mRNA を調整する。次にこれら mRNA からオリゴ dT プライマーと逆転写酵素を用いて cDNA を合成する。その際に蛍光色素である Cy 3 あるいは Cy 5 で標識した dUTP を加えることで、各組織由来の cDNA をそれぞれ異なった蛍光色素で標識する。この標識 cDNA 混合物をマイクロアレイとハイブリダイゼーションさせることで、各スポットに標識 cDNA が結合する。その結果、任意のスポット上の遺伝子に関する組織 A と組織 B における発現量の比は、Cy 3 と Cy 5 との蛍光強度の比で表されることになる。

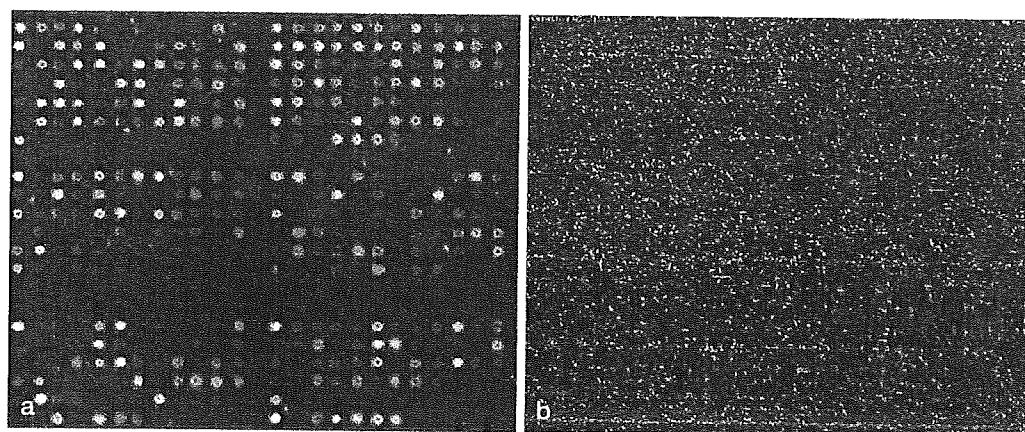


Fig. 2. マイクロアレイのスキャン画像

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 : 2 種類のサンプルから調整した cDNA をそれぞれ Cy 3 と Cy 5 の蛍光色素で標識し、混合してハイブリダイズした。Cy 3 標識 cDNA が主に結合したスポットは緑色、Cy 5 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整した標識 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。

mRNA をマイクロアレイで比較することにより、白血病 A においてのみ発現が亢進あるいは低下している遺伝子群を同定することが可能になり、その中には疾患の発症に関与する遺伝子が含

まれている可能性が高い。このようにゲノム医学の手法を用いることで、白血病の病態解析に新たな知見が数多くもたらされると予想される。

たとえば前述の ① の「マイクロアレイを用いた

診断の試み」として、Golub らは 6,817 遺伝子を配置したマイクロアレイによる急性骨髄性白血病 (AML) と急性リンパ性白血病 (ALL) とを鑑別する可能性について検討した。AML 11 例, ALL 27 例をこのマイクロアレイによって解析した結果、約 50 個の遺伝子が AML と ALL のあいだで偏って発現していることが明らかになった。そこでこれら “informative genes” から 20 個の遺伝子を選び、それらの発現量の偏りの程度を数値化したものに実際の発現量をかけあわせ合計することで、それぞれの患者の AML あるいは ALL の確からしさを数値化した。本法を患者における AML と ALL の鑑別診断に応用してみると 38 例中 34 例で正しい診断が行われ、1 例不明、3 例が誤診であった。したがってある程度の確からしさをもってマイクロアレイによる疾患診断が可能であることがわかった⁵⁾。

小児 ALL は一般に治療反応性がよいが、MLL (mixed-lineage leukemia) 遺伝子の転座の存在は重要な予後不良因子である。Armstrong らは MLL 染色体転座をもつ白血病が、果たして一般的な ALL と異なった遺伝子発現プロファイルをもつ疾患か否かをマイクロアレイを用いて検証した⁶⁾。一般の ALL と MLL 転座型 ALL とで発現量が異なる遺伝子群をスクリーニングしたところ、後者に特異的な発現を示す遺伝子として、造血幹細胞マーカーである AC 133 や FLT 3 が同定された。さらに彼らは MLL 転座型白血病と AML および一般的な ALL の全体的な遺伝子発現パターンが大きく異なることを明らかにし、マイクロアレイによって三者の鑑別診断が可能であるとの結論が得られた。

第二世代のマイクロアレイ解析●

しかし実際にマイクロアレイ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わるい手技であることにも気づく。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。正常骨髄はさまざまな系統の細胞

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マイクロアレイ解析を行うと、造血幹細胞分画以外の細胞特異的に発現する遺伝子などはすべ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。これらのさまざま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。

われわれは、造血幹細胞分画に特異的に発現する膜タンパク AC 133 に着目し、AC 133 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。2003 年 2 月現在ですでに Blast Bank のサンプル数は 400 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。われわれは Blast Bank を用いた大規模遺伝子発現解析によって骨髄異形成症候群特異的遺伝子の同定や、慢性骨髄性白血病の病期進行メカニズムの解明などに成功

している^{7,8)}。

おわりに●

マイクロアレイは「両刃の剣」としての側面がある。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が有意義な実験結果を生むと考えられる。ポストゲノム時代における医学の発展のうえで、マイクロアレイシステムが重要な役割を果たすことは間違いないであろう。白血病類縁疾患においても本邦に特徴的な疾患が数多くあり、これらの解析がマイクロアレイという新しいアッセイ系を得て大きく進歩することを期待したい。

文 献●

- 1) The genome international sequencing consortium : Initial sequencing and analysis of the human genome. Nature **409** : 860, 2001
- 2) Venter JC et al : The sequence of the human genome. Science **291** : 1304, 2001
- 3) Duggan DJ et al : Expression profiling using cDNA microarrays. Nat Genet **21** : 10, 1999
- 4) 間野博行 : マイクロアレイ法. 血液・固形腫瘍診断マニュアル, 第2版, フジメディカル出版, 大阪, p 70-75, 2002
- 5) Golub TR et al : Molecular classification of cancer : class discovery and class prediction by gene expression monitoring. Science **286** : 531, 1999
- 6) Armstrong SA et al : *MLL* translocations specify a distinct gene expression profile that distinguishes a unique leukemia. Nat Genet **30** : 41, 2002
- 7) Ohmine K et al : Characterization of stage progression in chronic myeloid leukemia by DNA microarray with purified hematopoietic stem cells. Oncogene **20** : 8249, 2001
- 8) Miyazato A et al : Identification of myelodysplastic syndrome-specific genes by DNA microarray analysis with purified hematopoietic stem cell fraction. Blood **98** : 422, 2001



高血圧テキスト 正しい知識と管理・治療

●著 鈴木洋通 埼玉医科大学教授

最新刊

高血圧は、肥満、糖尿病、高脂血症などと密接な関係のある生活習慣病であり、ライフスタイルの修正を同時に行いつつ、血圧のコントロールを進めていくことが重要である。本書は、血圧についての基本的な知識から測定の実際、高血圧によっておこる障害、その治療について、開業医、一般臨床医およびコメディカル・スタッフを対象に腎臓専門家がわかりやすく解説した。

■B5判／94頁 定価(本体2,300円＋税) 2003.7.第1版

南江堂

特集：ゲノム医学の血液臨床への応用

6. DNA チップの血液臨床への応用

間野 博行

自治医科大学分子病態治療研究センターゲノム機能研究部 教授

血液フロンティア (2003 年 3 号) 別刷

Hematology Frontier Vol. 13, No. 3, 65 ~ 70

〒 101-0061

東京都千代田区三崎町 3 丁目 1 番 1 号
高橋セーフビル 電話 03 (3265) 7681 (代)

(株) 医薬ジャーナル社

〒 541-0047

大阪市中央区淡路町 3 丁目 1 番 5 号
淡路町ビル 21 電話 06 (6202) 7280 (代)

6. DNA チップの血液臨床への応用

間野 博行*

Mano Hiroyuki

*自治医科大学分子病態治療研究センターゲノム機能研究部 教授

Summary DNA チップを用いた網羅的遺伝子発現解析によって造血器腫瘍の新たな疾患分類提案, 新規診断法の開発, および病態の急速な解明が可能になると期待される。ただし DNA チップは偽陽性データの多い実験法であり, 効率の良いチップ解析のためには, 比較する細胞間のバックグラウンドを揃えるなどの工夫が重要であろう。また得られた膨大な遺伝子発現情報から目的とする遺伝子セットを抽出するためには, バイオインフォマティクスの進歩が不可欠である。

はじめに

2000 年 6 月にヒトゲノムのドラフトシーケンスが完了し, 2003 年のヒトゲノム完全解読に向けて順調にゲノムプロジェクトが進行中である (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/guide/human/>)。いよいよ「ポスト・ゲノム時代」が到来しようとしている。

ポストゲノム時代においてはヒトのかなりの遺伝子構造が(機能は不明であるにしろ)明らかになり, 今後の医学研究においても方法論の転換が求められるであろう。例えばある疾患の原因遺伝子を同定することを考えると, 旧来の方法であれば発現スクリーニング法であったり, 連鎖解析法などによって全く未知の遺伝子を最初から同定せざるを得なかった。しかし「ポスト・ゲノム」時代においては理論上「未知」の遺伝子は存在しなくなり, 膨大ではあるがあくまで有限なヒト遺伝子のプールの中から特定の特徴を備えた遺伝子を効率良く同定することが必要になる¹⁾。

現段階でこのような大規模発現スクリーニングに最も適した方法は DNA チップであろう。DNA チップ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スポットしたものであり, スライド上に配置された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²⁾。

cDNA チップを用いた解析の場合には, 一枚のチップ上で 2 検体の発現比較を直接行うことが多い。例えば組織 A 由来の mRNA から緑色の蛍光

《略語一覧》

DNA (deoxyribonucleic acid ; デオキシリボ核酸)

RNA (ribonucleic acid ; リボ核酸)