

厚生労働科学研究研究費補助金

第3次対がん総合戦略研究事業

「DNAチップによる急性白血病の新規分類法提案」
に関する研究

平成17年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 間野 博行

平成18(2006)年4月

目次

I.	総括研究報告書	
	「DNA チップによる急性白血病の新規分類法提案」に関する研究 自治医科大学・医学部・ゲノム機能研究部 間野博行	1
II.	分担研究報告	
1.	「DNA チップによる急性白血病の新規分類法提案」に関する研究 自治医科大学・医学部・ゲノム機能研究部 間野博行	8
2.	「DNA チップによる急性白血病の新規分類法提案」に関する研究 自治医科大学・医学部・内科学講座血液 小澤 敬也	10
3.	「急性骨髄性白血病株化細胞に対するgemtuzumab oozogamicinと抗白血 病薬の併用効果について」に関する研究 栃木県立がんセンター 加納康彦	12
III.	研究成果の刊行に関する一覧表	14
IV.	研究成果の刊行物・別冊	18

主任研究者： 間野 博行 自治医科大学医学部 教授

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

分担研究者

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

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

A 研究目的

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

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

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

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

B 研究方法

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

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

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

4) ヒト白血病株化細胞として、U937 (AML)、HL-60 (APL)、TCC-S (CML myeloid crisis) を用いた。GO の併用薬として抗白血病剤の cytarabine、doxorubicin、daunorubicin、idarubicin、mitoxantrone、etoposide、6-mercaptopurine、methotrexate および vincristine を用いた。ヒト白血病株化細胞を GO と他剤の存在下で 4 日間培養し、MTT assay

で dose-response curve を得、 IC_{80} における併用効果を isobologram (Steel and Peckham) で分析した。

C 研究結果

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

2) 骨髄異形成症候群の refractory anemia with excess of blasts (RAEB) 11 例を含む計 99 例の AML 類縁疾患について、Affymetrix 社 GeneChip HGU133A & B

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

3) これまで急性白血病の予後予測は主に白血病細胞の核型を基に行われてきた。同分類法によって「予後不良群」に分類された患者の予後はきわめて不良であることが知られているが、「予後良好群」と「予後中間群」はいずれも予後良好患者と不良患者の両者を含んでおり、実際の予後判定に有効ではなかった。そこで我々の遺伝子発現データから「予後良好群」+「予後中間群」の中で長期完全寛解患者に特異的な発現を示す遺伝子セットを選出し、これら遺伝子の発現量から長期予後良好患者を予測するコンピューターアルゴリズムを開発した。

本アルゴリズムの有効性をテストセットサンプルにおいて検証したところ長期予後を有効に予測する事が出来た。

4) 急性期ATL患者特異的に高発現している成長因子受容体および、そのリガンド濃度が患者末梢血中で高値であることが実際のATL細胞の増殖に関与していることを検証する目的で、ATL由来細胞株KK1に対してその成長因子を培養上清に添加したところ、成長因子濃度依存性にKK1細胞の増殖が誘導されることが明らかになった。以上より本成長因子-受容体シグナルがATL細胞の増殖を直接的に制御可能なことが明らかになった。

5) U937, HL-60, TCC-SのGOに対するIC₈₀は各々10.2, 5.5, 103 ng/mlであった。これらの細胞による併用実験では、GOはいずれの細胞をもちいても、mitoxantrone と相乗作用、cytarabine、doxorubicin、idarubicin、etoposide、6-mercaputopurineと相加作用、methotrexateおよびvincristineと拮抗作用を示した。

D&E. 考察及び結論

本研究事業において各種白血病類縁疾患の大規模な純化細胞 DNA チップ解析を行い、膨大な遺伝子発現データを得た。これらを元に「発現量から統計的有意に診断」を可能にする遺伝子群の抽出に成功し、カスタム DNA チップによる診断法の可能性を示した。

GOは本邦で昨年、発売された新しいユニークな抗がん剤である。私達は、GOと他剤との併用効果を3種のCD33(+)白血病株化細胞と用いて検討した。GOに対する感受性は細胞によりかなり異なったが、他の抗がん剤との併用効果について調べてみると、殆ど差を認めなかった。すなわち、いずれの細胞を用いてもGOはmitoxantroneと相乗作用、cytarabine、doxorubicin、idarubicin、etoposideおよび6-mercaputopurineと相加作用、methotrexateおよびvincristineと拮抗作用を示した。このことから臨床においてGOはmethotrexate、vincristineを除くすべての薬剤との併用において優れた抗腫瘍効果が期待される

F. 健康危険情報

無し

G. 研究発表

1. 論文発表

間野博行

- 1) Takada S, Ota J, Kansaku N, Yamashita H, Izumi T, Ishikawa M, Wada T, Kaneda R, Choi YL, Koinuma K, Fujiwara S, Aoki H, Kisanuki H, Yamashita Y & Mano, H "Nucleotide sequence and embryonic expression of quail and duck Sox9 genes" *Gen Comp Endocrinol*, **145**: 208-213, 2006.
- 2) Taguchi J, Miyazaki Y, Tsutsumi C, Sawayama Y, Ando K, Tsushima H, Fukushima T, Hata T, Yoshida S, Kuriyama K, Honda S, Jinnai I, Mano, H & Tomonaga M "Expression of the myeloperoxidase gene in AC133 positive leukemia cells relates to the prognosis of acute myeloid leukemia" *Leuk Res*, 2006.
- 3) Mano, H "Epigenetics and hematological disorders" *Rinsho Ketsueki*, **47**: 3-8, 2006.
- 4) Mano, H "DNA microarray analysis of myelodysplastic syndrome" *Leuk Lymphoma*, **47**: 9-14, 2006.
- 5) Koinuma K, Yamashita Y, Liu W, Hatanaka H, Kurashina K, Wada T, Takada S, Kaneda R, Choi YL, Fujiwara SI, Miyakura Y, Nagai H & Mano, H "Epigenetic silencing of AXIN2 in colorectal carcinoma with microsatellite instability" *Oncogene*, **25**: 139-146, 2006.
- 6) Takada S, Mano, H & Koopman P "Regulation of Amh during sex determination in chickens: Sox gene expression in male and female gonads" *Cell Mol Life Sci*, **62**: 2140-2146, 2005.
- 7) Ohki R, Yamamoto K, Ueno S, Mano, H, Misawa Y, Fuse K, Ikeda U & Shimada K "Gene expression profiling of human atrial myocardium with atrial fibrillation by DNA microarray analysis" *Int J Cardiol*, **102**: 233-238, 2005.
- 8) Numata A, Shimoda K, Kamezaki K, Haro T, Kakumitsu H, Shide K, Kato K, Miyamoto T, Yamashita Y, Oshima Y, Nakajima H, Iwama A, Aoki K,

- Takase K, Gondo H, Mano, H & Harada M "Signal transducers and activators of transcription 3 augments the transcriptional activity of CCAAT/enhancer-binding protein alpha in granulocyte colony-stimulating factor signaling pathway" *J Biol Chem*, **280**: 12621-12629, 2005.
- 9) Koinuma K, Kaneda R, Toyota M, Yamashita Y, Takada S, Choi YL, Wada T, Okada M, Konishi F, Nagai H & Mano, H "Screening for genomic fragments that are methylated specifically in colorectal carcinoma with a methylated MLH1 promoter" *Carcinogenesis*, **26**: 2078-2085, 2005.
 - 10) Kisanuki H, Choi YL, Wada T, Moriuchi R, Fujiwara SI, Kaneda R, Koinuma K, Ishikawa M, Takada S, Yamashita Y & Mano, H "Retroviral expression screening of oncogenes in pancreatic ductal carcinoma" *Eur J Cancer*, **41**: 2170-2175, 2005.
 - 11) Kaneda R, Ueno S, Yamashita Y, Choi YL, Koinuma K, Takada S, Wada T, Shimada K & Mano, H "Genome-wide screening for target regions of histone deacetylases in cardiomyocytes" *Circ Res*, **97**: 210-218, 2005.
 - 12) Ishikawa M, Yoshida K, Yamashita Y, Ota J, Takada S, Kisanuki H, Koinuma K, Choi YL, Kaneda R, Iwao T, Tamada K, Sugano K & Mano, H "Experimental trial for diagnosis of pancreatic ductal carcinoma based on gene expression profiles of pancreatic ductal cells" *Cancer Sci*, **96**: 387-393, 2005.
 - 13) Fujiwara S, Yamashita Y, Choi YL, Wada T, Kaneda R, Takada S, Maruyama Y, Ozawa K & Mano, H "Transforming activity of the lymphotoxin-beta receptor revealed by expression screening" *Biochem Biophys Res Commun*, **338**: 1256-1262, 2005.
 - 14) Choi YL, Moriuchi R, Osawa M, Iwama A, Makishima H, Wada T, Kisanuki H, Kaneda R, Ota J, Koinuma K, Ishikawa M, Takada S, Yamashita Y, Oshimi K & Mano, H "Retroviral expression screening of oncogenes in natural killer cell leukemia" *Leuk Res*, **29**: 943-949, 2005.
- 小澤敬也
- 1) Yoshioka T, Ageyama N, Shibata H, Yasu T, Misawa Y, Takeuchi K, Matsui K, Yamamoto K, Terao K, Shimada K, Ikeda U, Ozawa K & Hanazono Y "Repair of infarcted myocardium mediated by transplanted bone marrow-derived CD34+ stem cells in a nonhuman primate model" *Stem Cells*, **23**: 355-364, 2005.
 - 2) Urabe M, Xin KQ, Obara Y, Nakakura T, Mizukami H, Kume A, Okuda K & Ozawa K "Removal of Empty Capsids from Type 1 Adeno-Associated Virus Vector Stocks by Anion-Exchange Chromatography Potentiates Transgene Expression" *Mol Ther*, 2006.
 - 3) Urabe M, Nakakura T, Xin KQ, Obara Y, Mizukami H, Kume A, Kotin RM & Ozawa K "Scalable generation of high-titer recombinant adeno-associated virus type 5 in insect cells" *J Virol*, **80**: 1874-1885, 2006.
 - 4) Takei Y, Mizukami H, Saga Y, Kobayashi H, Suzuki M, Matsushita T, Ozawa K & Suzuki M "Overexpression of a hybrid gene consisting of the amino-terminal fragment of urokinase and carboxyl-terminal domain of bikunin suppresses invasion and migration of human ovarian cancer cells in vitro" *Int J Cancer*, **113**: 54-58, 2005.
 - 5) Sutheesophon K, Kobayashi Y, Takatoku MA, Ozawa K, Kano Y, Ishii H & Furukawa Y "Histone deacetylase inhibitor depsipeptide (FK228) induces apoptosis in leukemic cells by facilitating mitochondrial translocation of Bax, which is enhanced by the proteasome inhibitor bortezomib" *Acta Haematol*, **115**: 78-90, 2006.
 - 6) Sato K, Izumi T, Toshima M, Nagai T, Muroi K, Komatsu N & Ozawa K "Retropharyngeal abscess due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a case of acute myeloid leukemia" *Intern Med*, **44**: 346-349, 2005.

- 7) Sasaki K, Nagao Y, Kitano Y, Hasegawa H, Shibata H, Takatoku M, Hayashi S, Ozawa K & Hanazono Y "Hematopoietic microchimerism in sheep after in utero transplantation of cultured cynomolgus embryonic stem cells" *Transplantation*, **79**: 32-37, 2005.
- 8) Sasaki K, Inoue M, Shibata H, Ueda Y, Muramatsu SI, Okada T, Hasegawa M, Ozawa K & Hanazono Y "Efficient and stable Sendai virus-mediated gene transfer into primate embryonic stem cells with pluripotency preserved" *Gene Ther*, **12**: 203-210, 2005.
- 9) Ozawa K "[Methods of gene transfer]" *Nippon Rinsho*, **63 Suppl 12**: 481-485, 2005.
- 10) Okada T, Uchibori R, Iwata-Okada M, Takahashi M, Nomoto T, Nonaka-Sarukawa M, Ito T, Liu Y, Mizukami H, Kume A, Kobayashi E & Ozawa K "A Histone Deacetylase Inhibitor Enhances Recombinant Adeno-associated Virus-Mediated Gene Expression in Tumor Cells" *Mol Ther*, 2005.
- 11) Okada T, Nomoto T, Yoshioka T, Nonaka-Sarukawa M, Ito T, Ogura T, Iwata-Okada M, Uchibori R, Shimazaki K, Mizukami H, Kume A & Ozawa K "Large-scale production of recombinant viruses by use of a large culture vessel with active gassing" *Hum Gene Ther*, **16**: 1212-1218, 2005.
- 12) Nagashima T, Muroi K, Kawano-Yamamoto C, Miyoshi T, Ohmine K, Toshima M, Miyazato A, Takatoku M, Nagai T, Mori M, Komatsu N & Ozawa K "Autologous gamete cryopreservation before hemopoietic stem cell transplantation" *Med Sci Monit*, **11**: CR91-94, 2005.
- 13) Nagai T, Komatsu N, Sakata Y, Miura Y & Ozawa K "Iron deficiency anemia with marked thrombocytosis complicated by central retinal vein occlusion" *Intern Med*, **44**: 1090-1092, 2005.
- 14) Muramatsu S, Tsukada H, Nakano I & Ozawa K "Gene therapy for Parkinson's disease using recombinant adeno-associated viral vectors" *Expert Opin Biol Ther*, **5**: 663-671, 2005.
- 15) Miyoshi T, Nagai T, Ohmine K, Nakamura M, Kano Y, Muroi K, Komatsu N & Ozawa K "Relative importance of apoptosis and cell cycle blockage in the synergistic effect of combined R115777 and imatinib treatment in BCR/ABL-positive cell lines" *Biochem Pharmacol*, **69**: 1585-1594, 2005.
- 16) Miyakoshi S, Kami M, Yuji K, Matsumura T, Takatoku M, Sasaki M, Narimatsu H, Fujii T, Kawabata M, Taniguchi S, Ozawa K & Oshimi K "Severe pulmonary complications in Japanese patients after bortezomib treatment for refractory multiple myeloma" *Blood*, 2006.
- 17) Meguro-Hashimoto A, Takatoku M, Ohmine K, Toshima M, Mori M, Nagai T, Muroi K & Ozawa K "The usefulness of magnetic resonance imaging (MRI) for disseminated trichosporosis of the gastrocnemius muscles" *J Infect*, 2006.
- 18) Liu Y, Okada T, Sheykholslami K, Shimazaki K, Nomoto T, Muramatsu S, Kanazawa T, Takeuchi K, Ajalli R, Mizukami H, Kume A, Ichimura K & Ozawa K "Specific and efficient transduction of Cochlear inner hair cells with recombinant adeno-associated virus type 3 vector" *Mol Ther*, **12**: 725-733, 2005.
- 19) Li XG, Okada T, Kodera M, Nara Y, Takino N, Muramatsu C, Ikeguchi K, Urano F, Ichinose H, Metzger D, Chambon P, Nakano I, Ozawa K & Muramatsu S "Viral-mediated temporally controlled dopamine production in a rat model of Parkinson disease" *Mol Ther*, **13**: 160-166, 2006.
- 20) Kawano-Yamamoto C, Muroi K, Nagatsuka Y, Higuchi M, Kikuchi S, Nagai T, Hakomori SI & Ozawa K "Establishment and characterization of a new erythroblastic leukemia cell line, EEB: Phosphatidylglucoside-mediated erythroid differentiation and apoptosis" *Leuk Res*, 2005.
- 21) Ishiwata A, Mimuro J, Kashiwakura Y, Niimura M, Takano K, Ohmori T, Madoiwa S, Mizukami H, Okada T, Naka H, Yoshioka A, Ozawa K & Sakata Y "Phenotype correction of

- hemophilia A mice with adeno-associated virus vectors carrying the B domain-deleted canine factor VIII gene" *Thromb Res*, 2005.
- 22) Ishii H, Inageta T, Mimori K, Saito T, Sasaki H, Isobe M, Mori M, Croce CM, Huebner K, Ozawa K & Furukawa Y "Frag1, a homolog of alternative replication factor C subunits, links replication stress surveillance with apoptosis" *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**: 9655-9660, 2005.
 - 23) Inoue H, Ohsawa I, Murakami T, Kimura A, Hakamata Y, Sato Y, Kaneko T, Takahashi M, Okada T, Ozawa K, Francis J, Leone P & Kobayashi E "Development of new inbred transgenic strains of rats with LacZ or GFP" *Biochem Biophys Res Commun*, **329**: 288-295, 2005.
 - 24) Fujiwara S, Yamashita Y, Choi YL, Wada T, Kaneda R, Takada S, Maruyama Y, Ozawa K & Mano H "Transforming activity of the lymphotoxin-beta receptor revealed by expression screening" *Biochem Biophys Res Commun*, **338**: 1256-1262, 2005.
 - 25) Fujishiro J, Takeda S, Takeno Y, Takeuchi K, Ogata Y, Takahashi M, Hakamata Y, Kaneko T, Murakami T, Okada T, Ozawa K, Hashizume K & Kobayashi E "Gene transfer to the rat kidney in vivo and ex vivo using an adenovirus vector: factors influencing transgene expression" *Nephrol Dial Transplant*, **20**: 1385-1391, 2005.
- 加納泰彦
- 1) Mori K, Kamiyama Y, Kondo T, Kano Y & Kodama T "Pilot phase II study of weekly chemotherapy with paclitaxel and carboplatin for refractory or relapsed small-cell lung cancer" *Cancer Chemother Pharmacol*, 1-5, 2006.
 - 2) Sutheesophon K, Kobayashi Y, Takatoku MA, Ozawa K, Kano Y, Ishii H & Furukawa Y "Histone deacetylase inhibitor depsipeptide (FK228) induces apoptosis in leukemic cells by facilitating mitochondrial translocation of Bax, which is enhanced by the proteasome inhibitor bortezomib" *Acta Haematol*, **115**: 78-90, 2006.
 - 3) Kobayashi Y, Ohtsuki M, Murakami T, Kobayashi T, Sutheesophon K, Kitayama H, Kano Y, Kusano E, Nakagawa H & Furukawa Y "Histone deacetylase inhibitor FK228 suppresses the Ras-MAP kinase signaling pathway by upregulating Rap1 and induces apoptosis in malignant melanoma" *Oncogene*, **25**: 512-524, 2006.
 - 4) Kano Y & Akutsu M "[Immunologic tests: Intrinsic factor antibody]" *Nippon Rinsho*, **63 Suppl 7**: 559-561, 2005.
 - 5) Kano Y & Akutsu M "[Immunological tests: Parietal cell antibody]" *Nippon Rinsho*, **63 Suppl 7**: 556-558, 2005.
 - 6) Miyoshi T, Nagai T, Ohmine K, Nakamura M, Kano Y, Muroi K, Komatsu N & Ozawa K "Relative importance of apoptosis and cell cycle blockage in the synergistic effect of combined R115777 and imatinib treatment in BCR/ABL-positive cell lines" *Biochem Pharmacol*, **69**: 1585-1594, 2005.
 - 7) Mori K, Kamiyama Y, Kondo T, Kano Y & Kodama T "A phase II study of docetaxel and infusional cisplatin in advanced non-small-cell lung cancer" *Chemotherapy*, **51**: 120-125, 2005.
 - 8) Sutheesophon K, Nishimura N, Kobayashi Y, Furukawa Y, Kawano M, Itoh K, Kano Y, Ishii H & Furukawa Y "Involvement of the tumor necrosis factor (TNF)/TNF receptor system in leukemic cell apoptosis induced by histone deacetylase inhibitor depsipeptide (FK228)" *J Cell Physiol*, **203**: 387-397, 2005.
- H. 知的財産権の出願・登録状況
- 国際公開番号：PCT/WO97/34007・発明者：間野博行・名称「PROMOTER」・出願人：間野博行、株式会社 DNAVEC 研究所・公開日：1997年9月18日
- 公開番号：特開 2001-269174・発明者：間野博行・名称「骨髓異形成症候群(MDS)の検出方法及び MDS の治療剤」・出願人：間野博行・公開日：2001年10月2日
- 国際公開番号：PCT/WO 01/64946 A1・発明者：間野博行・名称「METHOD OF DETECTING CHRONIC MYELOGENOUS

LEUKEMIA」・出願人：間野博行、宝酒造株式会社・公開日：2001年9月7日

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

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

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

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

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

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

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）
分担研究報告書
「DNA チップによる急性白血病の新規分類法提案」に関する研究

分担研究者： 間野 博行 自治医科大学医学部 教授

研究要旨：我々は広く白血病患者骨髄より造血幹細胞相当分画のみを純化し保存する「Blast Bank」を設立した。同バンクに既に保存された700例を越えるサンプルの中から、急性骨髄性白血病患者99例について、全ヒト遺伝子の発現量解析をDNAチップを用いて行った。得られた膨大な遺伝子発現データおよび各症例の臨床情報フォローアップデータより、初回寛解導入療法の成績にリンクする遺伝子、治療開始後365日の時点で寛解を維持できているか否かにリンクする遺伝子、など様々な臨床データに発現量が連関する遺伝子セットを抽出することに成功した。さらにこれら遺伝子の発現量を基にAMLの新たなサブグループを定義可能なこと、またこれらサブグループが患者長期予後に連関することなども明らかにした。

A 研究目的

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

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

B 研究方法

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

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

(倫理面への配慮)

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

C 研究結果

1) 骨髄異形成症候群のrefractory anemia with excess of blasts (RAEB) 11例を含む計99例のAML類縁疾患について、Affymetrix社GeneChip HGU133A & B (44,000 probe sets = 33,000遺伝子)を用いた解析を行い、上記99例における全ヒト遺伝子の発現プロファイルデータベースを構築した。これら膨大な遺伝子発現データおよび、各症例の臨床情報フォローアップデータより、初回寛解導入療法の成績にリンクする遺伝子、治療開始後365日の時点で寛解を維持できているか否かにリンクする遺伝子、など様々な臨床データに発現量が連関する遺伝子セットを抽出することに成功した。さらにこれら遺伝子の発現量を基にAMLの新たなサブグループを定義可能なこと、またこれらサブグループが患者長期

予後に連関することなども明らかにした。
2) 急性期ATL患者特異的に高発現している成長因子受容体および、そのリガンド濃度が患者末梢血中で高値であることが実際のATL細胞の増殖に関与していることを検証する目的で、ATL由来細胞株KK1に対してその成長因子を培養上清に添加したところ、成長因子濃度依存性にKK1細胞の増殖が誘導されることが明らかになった。以上より本成長因子-受容体シグナルがATL細胞の増殖を直接的に制御可能なことが明らかになった。

D&E. 考察及び結論

本研究事業において各種白血病類縁疾患の大規模な純化細胞 DNA チップ解析を行い、膨大な遺伝子発現データを得た。これらを元に「発現量から統計的有意に診断」を可能にする遺伝子群の抽出に成功し、カスタム DNA チップによる診断法の可能性を示した。一方、診断マーカーだけでなく、実際の病因に関与する遺伝子もATLプロジェクトの解析結果に示される通り同定可能なことが明らかになった。

F. 健康危険情報

無し

G. 研究発表

1. 論文発表

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

female gonads" *Cell Mol Life Sci*, **62**: 2140-2146, 2005.

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

H. 知的財産権の出願・登録状況

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

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）
分担研究報告書

「DNAチップによる急性白血病の新規分類法提案」に関する研究

分担研究者： 小澤 敬也 自治医科大学医学部 教授

研究要旨：DNAチップを用いることで数千～数万の遺伝子に関する発現変化を比較的簡便に解析することが可能となり、これまでは鑑別診断が困難であった血液疾患の診断に役立つ新たな分子マーカーが同定されると期待される。しかしDNAチップはあまりに高感度な検査法であるため、異なった白血病患者の骨髓細胞全体を比べるような単純な解析を行うと、両患者の「骨髓中の構成細胞の違い」を反映した偽陽性結果を得ることになる。我々は白血病などの特発性血液疾患の多くが造血幹細胞（あるいはその近傍）の異常に起因することに着目し、これら疾患患者のフレッシュ検体より造血幹細胞相当分画のみを純化しストックするバンク事業「Blast Bank」をスタートした。現在まで既に700例を越えるサンプルの保存に成功しており、本バンク細胞を用いた大規模DNAチップ解析によって、白血病の新規鑑別診断マーカー遺伝子の同定に成功しただけでなく、白血病病期進展機構に関わるシグナル分子等の同定にも成功した。

A 研究目的

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

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

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

B 研究方法

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

病を含む各種特発性血液疾患患者骨髓より造血幹細胞分画を純化保存し、これをBlast Bankと名付けた。平成18年3月現在で700例を越えるサンプルの保存に成功しており、これは純化細胞を用いたゲノミクスプロジェクトとしては世界最大級である。

（倫理面への配慮）

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

C 研究結果

平成11年8月よりBlast Bankを立ち上げ既に700例を越えるサンプルのストックに成功した。現在本バンク中に130例を超える急性骨髄性白血病（AML）幹細胞サンプルが保存されており、世界的にも極めて貴重なリソースとなっている。これらBlast Bank分画を用いた解析が旧来の骨髓単核球全体を用いたものに比べ実際に偽陽性データが少ないこと、またバンクに用いるAC133陽性細胞がこれら疾患の責任クローンを含むことなども既に確認している。

慢性期ATL患者19例、急性期ATL患者22例の末梢血よりCD4陽性分画のみを純化保存するプロジェクトを行った。得られた純化ATL細胞をAffymetrix社HGU133マイクロアレイによって解析する事でATLの世界最大の遺伝子発現データベースを構築した。本データベースを用いて急性期特異的な発現

を示す遺伝子セットを抽出したところ hepatocyte growth-factor (HGF)の受容体であるMET遺伝子が同定された。しかも患者血漿中のHGF濃度を測定したところ、慢性期、急性期共にATL患者においてHGF濃度が亢進している事が確認された。以上よりATLの病期進展機構としてHGF-MET系の活性化の存在が示唆された。

D&E. 考察及び結論

本研究事業において各種白血病類縁疾患の大規模な純化細胞 DNA チップ解析を行い、膨大な遺伝子発現データを得た。これらを元に「発現量から統計的に有意に診断」を可能にする遺伝子群の抽出に成功し、カスタムDNA チップによる診断法の可能性を示した。

F. 健康危険情報

無し

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yoshioka T, Ageyama N, Shibata H, Yasu T, Misawa Y, Takeuchi K, Matsui K, Yamamoto K, Terao K, Shimada K, Ikeda U, Ozawa K & Hanazono Y "Repair of infarcted myocardium mediated by transplanted bone marrow-derived CD34+ stem cells in a nonhuman primate model" *Stem Cells*, **23**: 355-364, 2005.
- 2) Urabe M, Xin KQ, Obara Y, Nakakura T, Mizukami H, Kume A, Okuda K & Ozawa K "Removal of Empty Capsids from Type 1 Adeno-Associated Virus Vector Stocks by Anion-Exchange Chromatography Potentiates Transgene Expression" *Mol Ther*, 2006.
- 3) Urabe M, Nakakura T, Xin KQ, Obara Y, Mizukami H, Kume A, Kotin RM & Ozawa K "Scalable generation of high-titer recombinant adeno-associated virus type 5 in insect cells" *J Virol*, **80**: 1874-1885, 2006.
- 4) Takei Y, Mizukami H, Saga Y, Kobayashi H, Suzuki M, Matsushita T, Ozawa K & Suzuki M "Overexpression of a hybrid gene consisting of the amino-terminal fragment of urokinase and carboxyl-terminal domain of bikunin suppresses invasion and migration of human ovarian cancer cells in vitro" *Int J Cancer*, **113**: 54-58, 2005.
- 5) Sutheesophon K, Kobayashi Y, Takatoku MA, Ozawa K, Kano Y, Ishii H & Furukawa Y "Histone deacetylase inhibitor depsipeptide (FK228) induces apoptosis in leukemic cells by facilitating mitochondrial translocation of Bax, which is enhanced by the proteasome inhibitor bortezomib" *Acta Haematol*, **115**: 78-90, 2006.

- 6) Sato K, Izumi T, Toshima M, Nagai T, Muroi K, Komatsu N & Ozawa K "Retropharyngeal abscess due to methicillin-resistant Staphylococcus aureus in a case of acute myeloid leukemia" *Intern Med*, **44**: 346-349, 2005.
- 7) Sasaki K, Nagao Y, Kitano Y, Hasegawa H, Shibata H, Takatoku M, Hayashi S, Ozawa K & Hanazono Y "Hematopoietic microchimerism in sheep after in utero transplantation of cultured cynomolgus embryonic stem cells" *Transplantation*, **79**: 32-37, 2005.
- 8) Sasaki K, Inoue M, Shibata H, Ueda Y, Muramatsu SI, Okada T, Hasegawa M, Ozawa K & Hanazono Y "Efficient and stable Sendai virus-mediated gene transfer into primate embryonic stem cells with pluripotency preserved" *Gene Ther*, **12**: 203-210, 2005.
- 9) Ozawa K "[Methods of gene transfer]" *Nippon Rinsho*, **63 Suppl 12**: 481-485, 2005.
- 10) Okada T, Uchibori R, Iwata-Okada M, Takahashi M, Nomoto T, Nonaka-Sarukawa M, Ito T, Liu Y, Mizukami H, Kume A, Kobayashi E & Ozawa K "A Histone Deacetylase Inhibitor Enhances Recombinant Adeno-associated Virus-Mediated Gene Expression in Tumor Cells" *Mol Ther*, 2005.
- 11) Okada T, Nomoto T, Yoshioka T, Nonaka-Sarukawa M, Ito T, Ogura T, Iwata-Okada M, Uchibori R, Shimazaki K, Mizukami H, Kume A & Ozawa K "Large-scale production of recombinant viruses by use of a large culture vessel with active gassing" *Hum Gene Ther*, **16**: 1212-1218, 2005.
- 12) Nagashima T, Muroi K, Kawano-Yamamoto C, Miyoshi T, Ohmine K, Toshima M, Miyazato A, Takatoku M, Nagai T, Mori M, Komatsu N & Ozawa K "Autologous gamete cryopreservation before hemopoietic stem cell transplantation" *Med Sci Monit*, **11**: CR91-94, 2005.
- 13) Nagai T, Komatsu N, Sakata Y, Miura Y & Ozawa K "Iron deficiency anemia with marked thrombocytosis complicated by central retinal vein occlusion" *Intern Med*, **44**: 1090-1092, 2005.
- 14) Muramatsu S, Tsukada H, Nakano I & Ozawa K "Gene therapy for Parkinson's disease using recombinant adeno-associated viral vectors" *Expert Opin Biol Ther*, **5**: 663-671, 2005.
- 15) Miyoshi T, Nagai T, Ohmine K, Nakamura M, Kano Y, Muroi K, Komatsu N & Ozawa K "Relative importance of apoptosis and cell cycle blockage in the synergistic effect of combined R115777 and imatinib treatment in BCR/ABL-positive cell lines" *Biochem Pharmacol*, **69**: 1585-1594, 2005.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

「急性骨髄性白血病株化細胞に対する gemtuzumab oozogamicin と抗白血病薬の併用効果について」に関する研究

分担研究者： 加納康彦 栃木県立がんセンター 副病院長

研究要旨： Gemtuzumab oozogamicin (GO) は抗 CD33 抗体に抗がん剤のカリケアマイシンを結合させた新しいタイプの抗がん剤である。GO は白血病細胞の CD33 抗原に結合、白血病細胞内に取り込まれカリケアマイシンにより殺細胞効果を発揮する。CD33 抗原は殆どの AML および APL と ALL の約 25% で発現しており、これらの白血病に対し、すでに臨床応用が始まっている。CR が単剤で約 25 % に認められているが、CR 期間は短く抗腫瘍効果を高めるため、他の白血病との併用が必要である。私達は GO と他剤との併用効果を 3 種の CD33 (+) 白血病株化細胞 U937, HL-60, TCC-S を用いて検討した。GO に対する感受性は各々 10.2、5.5 および 103 ng/ml と細胞によりかなり異なったが、GO と他の抗がん剤との併用効果に差を認めなかった。すなわち、いずれの細胞に用いても GO は mitoxantrone と相乗作用、cytarabine、doxorubicin、idarubicin、etoposide、6-mercaptopurine と相加作用、methotrexate、vincristine と拮抗作用を示した。このことから臨床において GO は methotrexate、vincristine を除くすべての薬剤の併用で優れた抗腫瘍効果が期待される。私達の研究結果は GO の併用臨床試験のプロトコール作成に重要な情報を提供すると考えられる。しかし、いづれの薬剤も骨髄抑制を伴うため、臨床における dose finding study が必要である。

A 研究目的

GO はリンカーにより、遺伝子組み換えにより作成したヒト型 CD33 抗体と抗がん剤のカリケアマイシンを結合させた新しいタイプの抗がん剤である。GO は白血病細胞の CD33 抗原に結合、白血病細胞内に取り込まれカリケアマイシンにより、DNA-double strand を形成、G2 arrest をおこし、アポトーシスを誘導する。CD33 抗原は多能性幹細胞で発現しておらず、一方、殆どの急性骨髄性白血病細胞 (AML) で発現しており、再発 AML の治療薬として期待されている。また、急性前骨髄性白血病 (APL) 細胞のほぼ全例および急性リンパ性白血病 (APL) 細胞の 20% にも CD33 抗原が発現しており、これらの白血病の治療にも臨床試験がおこなわれており、その有効性が証明されている。GO は再発 CD33 (+) AML に対し、単剤で約 25% の患者に完全寛解が得られるが、寛解期間が 4-6 か月と短く、他の抗がん剤との併用が必要になる。現在、他の白血病薬との併用臨床試験が開始されているが、基礎併用実験は殆ど行われていない。我々は CD33 (+) 白血病細胞を用いて、GO と抗白血病薬との併用効果について検討を行った。

B 研究方法

株化細胞：ヒト白血病株化細胞として、U937

(AML)、HL-60 (APL)、TCC-S (CML myeloid crisis) を用いた。

抗がん剤：GO の併用薬として抗白血病剤の cytarabine、doxorubicin、daunorubicin、idarubicin、mitoxantrone、etoposide、6-mercaptopurine、methotrexate および vincristine を用いた。

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

(倫理面への配慮)

一般に使用されている株化細胞を用いた実験のため不要。

C 研究結果

U937, HL-60, TCC-S の GO に対する IC₈₀ は各々 10.2、5.5、103 ng/ml であった。これらの細胞による併用実験では、GO はいづれの細胞をもちいても、mitoxantrone と相乗作用、cytarabine、doxorubicin、idarubicin、etoposide、6-mercaptopurine と相加作用、methotrexate および vincristine と拮抗作用を示した。

D&E 考察及び結論

GO は本邦で昨年、発売された新しいユニークな抗がん剤である。私達は、GO と他剤

との併用効果を3種のCD33(+)白血病株化細胞と用いて検討した。G0に対する感受性は細胞によりかなり異なったが、他の抗がん剤との併用効果について調べてみると、殆ど差を認めなかった。すなわち、いずれの細胞を用いてもG0はmitoxantroneと相乗作用、cytarabine、doxorubicin、idarubicin、etoposideおよび6-mercaputopurineと相加作用、methotrexateおよびvincristineと拮抗作用を示した。このことから臨床においてG0はmethotrexate、vincristineを除くすべての薬剤との併用において優れた抗腫瘍効果が期待される。私達の研究結果はG0の併用臨床試験のプロトコール作成に重要な情報を提供すると考えられる。しかし、いずれの薬剤も骨髄抑制を伴うため、臨床におけるdose finding studyが必要である。

F. 健康危険情報

無し

G. 研究発表(論文発表)

1. Sutheesophon K, Nishimura N, Kobayashi Y, Furukawa Y, Kawano M, Itoh K, Kano Y. Involvement of the tumor necrosis factor (TNF)/TNF receptor system in leukemic cell apoptosis induced by histone deacetylase inhibitor depsipeptide (FK228). *J Cell Physiol.* 203; 387-97, 2005
2. Mori K, Kamiyama Y, Kondo T, Kano Y, Kodama T. A phase II study of docetaxel and infusional cisplatin in advanced non-small-cell lung cancer. *Chemotherapy.* 51;120-5, 2005
3. Miyoshi T, Nagai T, Ohmine K, Nakamura M, Kano Y, Muroi K, Komatsu N, Ozawa K. Relative importance of apoptosis and cell cycle blockage in the synergistic effect of combined R115777 and imatinib treatment in BCR/ABL-positive cell. *Biochem Pharmacol.* 69;1585-94, 2005
4. Van PN, Xinh PT, Kano Y, Tokunaga K, Sato Y. Establishment and characterization of A novel Philadelphia-chromosome positive chronic myeloid leukemia cell line,

TCC-S, expressing P210 and P190 BCR/ABL. *Hum Cell.* 18; 25-33, 2005

5. Kobayashi Y, Ohtsuki M, Murakami T, Kobayashi T, Sutheesophon K, Kitayama H, Kano Y, Kusano E, Nakagawa H, Furukawa Y. Histone deacetylase inhibitor FK228 suppresses the Ras-MAP kinase signaling pathway by upregulating Rap1 and induces apoptosis in malignant melanoma. *Oncogene.* 25;512-24, 2005
6. Yamada H, Arakawa Y, Saito S, Agawa M, Kano Y, Horiguchi-Yamada J. Depsipeptide-resistant KU812 cells show reversible P-glycoprotein expression hyper-acetylated histones, and modulated gene expression profile. *Leuk Res.* 2005 Oct 27; [Epub ahead of print]
7. Sutheesophon K, Kobayashi Y, Takatoku MA, Ozawa K, Kano Y, Ishii H, Furukawa Y. Histone deacetylase inhibitor depsipeptide (FK228) induces apoptosis in leukemic cells by facilitating mitochondrial translocation of Bax, which is enhanced by the proteasome inhibitor bortezomib. *Acta Haematol.* 115;78-90, 2006
8. Mori K, Kamiyama Y, Kondo T, Kano Y, Kodama T. Pilot phase II study of weekly chemotherapy with paclitaxel and carboplatin for refractory or relapsed small-cell lung cancer. *Cancer Chemother Pharmacol.* 31;1-5. 2006
9. Kano Y, Akutsu M, Tsunoda S, Izumi T, Kabayashi K, Inoue K, Mori K, Fujii H, Mano H, Odgerel T, Furukawa Y. Schedule-Dependent Interactions between Pemetrexed and Cisplatin in Human Carcinoma Cell Lines In Vitro. *Oncol Rep.* (in press)
- H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

研究成果の刊行に関する一覧表

主任研究者: 間野 博行

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

研究成果の刊行に関する一覧表

分担研究者:小澤 敬也

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Yoshioka T, Ageyama N, Shibata H, Yasu T, Misawa Y, Takeuchi K, Matsui K, Yamamoto K, Terao K, Shimada K, Ikeda U, Ozawa K & Hanazono Y	Repair of infarcted myocardium mediated by transplanted bone marrow-derived CD34+ stem cells in a nonhuman primate model	<i>Stem Cells</i>		23 355-364	2005
Urabe M, Xin KQ, Obara Y, Nakakura T, Mizukami H, Kume A, Okuda K & Ozawa K	Removal of Empty Capsids from Type 1 Adeno-Associated Virus Vector Stocks by Anion-Exchange Chromatography Potentiates Transgene Expression	<i>Mol Ther</i>			2006
Urabe M, Nakakura T, Xin KQ, Obara Y, Mizukami H, Kume A, Kotin RM & Ozawa K	Scalable generation of high-titer recombinant adeno-associated virus type 5 in insect cells	<i>J Virol</i>	80	1874-1885	2006
Takei Y, Mizukami H, Saga Y, Kobayashi H, Suzuki M, Matsushita T, Ozawa K & Suzuki M	Overexpression of a hybrid gene consisting of the amino-terminal fragment of urokinase and carboxyl-terminal domain of bikunin suppresses invasion and migration of human ovarian cancer cells in vitro	<i>Int J Cancer</i>	113	54-58	2005
Sutheesophon K, Kobayashi Y, Takatoku MA, Ozawa K, Kano Y, Ishii H & Furukawa Y	Histone deacetylase inhibitor depsipeptide (FK228) induces apoptosis in leukemic cells by facilitating mitochondrial translocation of Bax, which is enhanced by the proteasome inhibitor bortezomib	<i>Acta Haematol</i>	115	78-90	2006
Sato K, Izumi T, Toshima M, Nagai T, Muroi K, Komatsu N & Ozawa K	Retropharyngeal abscess due to methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> in a case of acute myeloid leukemia	<i>Intern Med</i>	44	346-349	2005
Sasaki K, Nagao Y, Kitano Y, Hasegawa H, Shibata H, Takatoku M, Hayashi S, Ozawa K & Hanazono Y	Hematopoietic microchimerism in sheep after in utero transplantation of cultured cynomolgus embryonic stem cells	<i>Transplantation</i>	79	32-37	2005
Sasaki K, Inoue M, Shibata H, Ueda Y, Muramatsu SI, Okada T, Hasegawa M, Ozawa K & Hanazono Y	Efficient and stable Sendai virus-mediated gene transfer into primate embryonic stem cells with pluripotency preserved	<i>Gene Ther</i>	12	203-210	2005
Ozawa K	Methods of gene transfer	<i>Nippon Rinsho</i>	63 Suppl 12	481-485	2005
Okada T, Uchibori R, Iwata-Okada M, Takahashi M, Nomoto T, Nonaka-Sarukawa M, Ito T, Liu Y, Mizukami H, Kume A, Kobayashi E & Ozawa K	A Histone Deacetylase Inhibitor Enhances Recombinant Adeno-associated Virus-Mediated Gene Expression in Tumor Cells	<i>Mol Ther</i>			2005
Okada T, Nomoto T, Yoshioka T, Nonaka-Sarukawa M, Ito T, Ogura T, Iwata-Okada M, Uchibori R, Shimazaki K, Mizukami H, Kume A & Ozawa K	Large-scale production of recombinant viruses by use of a large culture vessel with active gassing	<i>Hum Gene Ther</i>	16	1212-1218	2005
Nagashima T, Muroi K, Kawano-Yamamoto C, Miyoshi T, Ohmine K, Toshima M, Miyazato A, Takatoku M, Nagai T, Mori M, Komatsu N & Ozawa K	Autologous gamete cryopreservation before hemopoietic stem cell transplantation	<i>Med Sci Monit</i>	11	CR91-94	2005
Nagai T, Komatsu N, Sakata Y, Miura Y & Ozawa K	Iron deficiency anemia with marked thrombocytosis complicated by central retinal vein occlusion	<i>Intern Med</i>	44	1090-1092	2005
Muramatsu S, Tsukada H, Nakano I & Ozawa K	Gene therapy for Parkinson's disease using recombinant adeno-associated viral vectors	<i>Expert Opin Biol Ther</i>	5	663-671	2005
Miyoshi T, Nagai T, Ohmine K, Nakamura M, Kano Y, Muroi K, Komatsu N & Ozawa K	Relative importance of apoptosis and cell cycle blockage in the synergistic effect of combined R115777 and imatinib treatment in BCR/ABL-positive cell lines	<i>Biochem Pharmacol</i>	69	1585-1594	2005

Miyakoshi S, Kami M, Yuji K, Matsumura T, Takatoku M, Sasaki M, Narimatsu H, Fujii T, Kawabata M, Taniguchi S, Ozawa K & Oshimi K	Severe pulmonary complications in Japanese patients after bortezomib treatment for refractory multiple myeloma	<i>Blood</i>				2006
Meguro-Hashimoto A, Takatoku M, Ohmine K, Toshima M, Mori M, Nagai T, Muroi K & Ozawa K	The usefulness of magnetic resonance imaging (MRI) for disseminated trichosporosis of the gastrocnemius muscles	<i>J Infect</i>				2006
Liu Y, Okada T, Sheykholeislami K, Shimazaki K, Nomoto T, Muramatsu S, Kanazawa T, Takeuchi K, Ajalli R, Mizukami H, Kume A, Ichimura K & Ozawa K	Specific and efficient transduction of Cochlear inner hair cells with recombinant adeno-associated virus type 3 vector	<i>Mol Ther</i>	12	725-733		2005
Li XG, Okada T, Kodera M, Nara Y, Takino N, Muramatsu C, Ikeguchi K, Urano F, Ichinose H, Metzger D, Chambon P, Nakano I, Ozawa K & Muramatsu S	Viral-mediated temporally controlled dopamine production in a rat model of Parkinson disease	<i>Mol Ther</i>	13	160-166		2006
Kawano-Yamamoto C, Muroi K, Nagatsuka Y, Higuchi M, Kikuchi S, Nagai T, Hakomori SI & Ozawa K	Establishment and characterization of a new erythroblastic leukemia cell line, EEB: Phosphatidylinositol-mediated erythroid differentiation and apoptosis	<i>Leuk Res</i>				2005
Ishiwata A, Mimuro J, Kashiwakura Y, Niimura M, Takano K, Ohmori T, Madoiwa S, Mizukami H, Okada T, Naka H, Yoshioka A, Ozawa K & Sakata Y	Phenotype correction of hemophilia A mice with adeno-associated virus vectors carrying the B domain-deleted canine factor VIII gene	<i>Thromb Res</i>				2005
Ishii H, Inageta T, Mimori K, Saito T, Sasaki H, Isobe M, Mori M, Croce CM, Huebner K, Ozawa K & Furukawa Y	Frag1, a homolog of alternative replication factor C subunits, links replication stress surveillance with apoptosis	<i>Proc Natl Acad Sci U S A</i>	102	9655-9660		2005
Inoue H, Ohsawa I, Murakami T, Kimura A, Hakamata Y, Sato Y, Kaneko T, Takahashi M, Okada T, Ozawa K, Francis J, Leone P & Kobayashi E	Development of new inbred transgenic strains of rats with LacZ or GFP	<i>Biochem Biophys Res Commun</i>	329	288-295		2005
Fujiwara S, Yamashita Y, Choi YL, Wada T, Kaneda R, Takada S, Maruyama Y, Ozawa K & Mano H	Transforming activity of the lymphotoxin-beta receptor revealed by expression screening	<i>Biochem Biophys Res Commun</i>	338	1256-1262		2005
Fujishiro J, Takeda S, Takeno Y, Takeuchi K, Ogata Y, Takahashi M, Hakamata Y, Kaneko T, Murakami T, Okada T, Ozawa K, Hashizume K & Kobayashi E	Gene transfer to the rat kidney in vivo and ex vivo using an adenovirus vector: factors influencing transgene expression	<i>Nephrol Dial Transplant</i>	20	1385-1391		2005

研究成果の刊行に関する一覧表

分担研究者: 加納 康彦

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Mori K, Kamiyama Y, Kondo T, Kano Y & Kodama T	Pilot phase II study of weekly chemotherapy with paclitaxel and carboplatin for refractory or relapsed small-cell lung cancer	<i>Cancer Chemother Pharmacol</i>		1-5	2006
Sutheesophon K, Kobayashi Y, Takatoku MA, Ozawa K, Kano Y, Ishii H & Furukawa Y	Histone deacetylase inhibitor depsipeptide (FK228) induces apoptosis in leukemic cells by facilitating mitochondrial translocation of Bax, which is enhanced by the proteasome inhibitor bortezomib	<i>Acta Haematol</i>	115	78-90	2006
Kobayashi Y, Ohtsuki M, Murakami T, Kobayashi T, Sutheesophon K, Kitayama H, Kano Y, Kusano E, Nakagawa H & Furukawa Y	Histone deacetylase inhibitor FK228 suppresses the Ras-MAP kinase signaling pathway by upregulating Rap1 and induces apoptosis in malignant melanoma	<i>Oncogene</i>	25	512-524	2006
Kano Y & Akutsu M	Immunologic tests: Intrinsic factor antibody	<i>Nippon Rinsho</i>	63 Suppl 7	559-561	2005
Kano Y & Akutsu M	Immunological tests: Parietal cell antibody	<i>Nippon Rinsho</i>	64 Suppl 7	556-558	2005
Miyoshi T, Nagai T, Ohmine K, Nakamura M, Kano Y, Muroi K, Komatsu N & Ozawa K	Relative importance of apoptosis and cell cycle blockage in the synergistic effect of combined R115777 and imatinib treatment in BCR/ABL-positive cell lines	<i>Biochem Pharmacol</i>	69	1585-1594	2005
Mori K, Kamiyama Y, Kondo T, Kano Y & Kodama T	A phase II study of docetaxel and infusional cisplatin in advanced non-small-cell lung cancer	<i>Chemotherapy</i>	51	120-125	2005
Sutheesophon K, Nishimura N, Kobayashi Y, Furukawa Y, Kawano M, Itoh K, Kano Y, Ishii H & Furukawa Y	Involvement of the tumor necrosis factor (TNF)/TNF receptor system in leukemic cell apoptosis induced by histone deacetylase inhibitor depsipeptide (FK228)	<i>J Cell Physiol</i>	203	387-397	2005

REVIEW

DNA micro-array analysis of myelodysplastic syndrome

HIROYUKI MANO

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

Abstract

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

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

Introduction

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

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

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

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

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

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

Received for publication 15 July 2005.

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