

厚生労働科学研究研究費補助金

ヒトゲノム・再生医療等研究事業

「高齢者特発性造血障害の大規模ゲノミクス解析に
よる病態解明」に関する研究

平成18年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 間野 博行

平成19（2007）年4月

目 次

I.	総括研究報告書	
	「高齢者特発性造血障害の大規模ゲノミクス解析による病態解明」 に関する研究	
	自治医科大学・医学部・ゲノム機能研究部 間野博行 -----	1
II.	分担研究報告	
1.	「高齢者特発性造血障害の大規模ゲノミクス解析による病態解明」 に関する研究	
	自治医科大学・医学部・ゲノム機能研究部 間野博行 -----	6
2.	「不応性貧血患者血球における蛋白異常の同定とその解析」に関 する研究	
	東京女子医科大学・血液内科 寺村正尚 -----	9
3.	「ヒト骨髄系血液細胞における核内受容体関連分化に関する基礎検 討」に関する研究	
	国立国際医療センター研究所・血液疾患研究部 湯尾明-----	11
III.	研究成果の刊行に関する一覧表 -----	13
IV.	研究成果の刊行物・別冊 -----	17

主任研究者： 間野 博行 自治医科大学医学部 教授

研究要旨：DNA チップを用いることで数千～数万の遺伝子に関する発現変化を比較的簡便に解析することが可能となり、これまでは鑑別診断が困難であった血液疾患の診断に役立つ新たな分子マーカーが同定されると期待される。しかし DNA チップはあまりに高感度な検査法であるため、異なった造血障害患者の骨髓細胞全体を比べるような単純な解析を行うと、両患者の「骨髓中の構成細胞の違い」を反映した偽陽性結果を得ることになる。我々は広く患者さんの骨髓より造血幹細胞相当分画のみを純化し保存する「Blast Bank」を設立した。現在まで既に 700 例を越えるサンプルの保存に成功しており、本バンク細胞を用いた大規模 DNA チップ解析によって、遺伝子発現データおよび、各症例の臨床情報フォローアップデータより、様々な臨床データに発現量が連関する遺伝子セットを抽出することに成功した。さらに本サンプルを用いて SNP タイピング用 DNA マイクロアレイにハイブリダイズさせることにより、骨髓異形成候群の染色体ゲノムの微細な量異常を解析することができた。

分担研究者

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

口のさらなる高齢化を考慮すると、骨髓異形成症候群の病態解明、診断及び治療法の開発は血液内科学に限らず今日の医学研究の急務の一つであるといえる。

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

A 研究目的

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

B 研究方法

1) 造血幹細胞特異的マーカーである CD133 に対するアフィニティカラムを用いて、白血病を含む各種特発性血液疾患患者骨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 800 例を越えるサンプルの保存に成功しており、これは純化細胞を用いたゲノミクスプロジェクトとしては世界最大級である。

2) 上記検体群を用いて以下のように DNA チップ解析を行った。細胞よりトータル RNA を抽出し、これを T7 RNA ポリメラーゼを用いてまず *in vitro* にて増幅した。さらにこれをもとに二本鎖 cDNA を合成し、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。

3) RA 患者および正常人の末梢血よりデキストララン法を用いて好中球を分離した。その細胞より蛋白を抽出した後、二次元電気泳動を行った。両者の泳動パターンを解析ソフト (Ettan progenesis) で解析した。発現量に差が認められたスポットの質量分析を MALDI-TOF/TOF MS を用いて行い、その蛋白についてペプチドデータベース (MASCOT) を用いて同定した。また同定した蛋白に対する各種ポリクローナル抗体を作成し、その細胞内局在を免疫組織染色により検討し、また免疫沈降およびウエスタンブロッティングにより蛋白解析を行った。さ

4) ヒト骨髄系白血病細胞株は、NB4 を用いた。PPAR γ リガンドとしては、生体内に存在する生理的リガンドの PGJ2 と合成リガンドのピオグリタゾン (製品名アクトス) を用いた。PPAR γ の阻害剤としては、HX531、GW9662、BADGE を用いた。PPAR γ が、そのリガンド依存性にその核内受容体としての転写活性を発揮しているかに関しては、その特異的転写産物である adipocyte fatty acid binding protein (aP2) の転写によって確認した。

(倫理面への配慮)

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

C 研究結果

1) 我々は平成11年8月より Blast Bank を立ち上げ既に700例を越えるサンプルのストックに成功した。現在本バンク中に130例を超える MDS および急性骨髄性白血病 (AML) サンプルが保存されており、世界的にも極めて貴重なリソースとなっている。これら Blast Bank 分画を用いた解析が従来の骨髄単核球全体を用いたも

のに比べ実際に偽陽性データが少ないこと、またバンクに用いる AC133 陽性細胞がこれら疾患の責任クローンを含むことなども既に確認している

2) 全ヒト遺伝子が配置された Affymetrix 社 GeneChip を用いた解析によって Blast Bank 白血病検体における網羅的遺伝子発現定量を行った。さらに症例臨床情報と組み合わせることで、患者の長期予後に発現量がリンクする遺伝子 (予後予測遺伝子) をスクリーニングすることに成功した。これら予後予測遺伝子の発現量を基にさらに長期予後を予測するアルゴリズムを開発し、それによって実際に症例の化学療法反応性を予測可能なことが明らかになった。

3) RA 患者と正常者の末梢血好中球由来の蛋白の泳動パターンを解析ソフトで解析したところ、RA において異常発現しているスポットが認められた。それらのスポットについて MS によるペプチドマップを作製し、データベース上でペプチドマス・フィンガープリント測定を行い、蛋白を同定した。そのうちの2つは CapG および Thiol-specific antioxidant protein (TSA) であった。さらに RA 好中球における CapG の細胞内局在を検討するために、各種抗 CapG 抗体を作成し、それを用いて好中球の免疫染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡にて検討した。その結果、CapG は正常好中球ではほとんどすべての細胞において細胞質優位に存在していたのに対し、RA では核内優位に高発現する好中球が高頻度に認められた。また、抗チロシンリン酸化 CapG 抗体を用いて解析したところ、RA 好中球においてはチロシンリン酸化 CapG が明らかに核内優位に存在し、細胞質にはほとんど発現していなかった。一方、正常好中球では細胞質内とくに細胞膜周辺に存在し、核内にはほとんど認められなかった。また、TSA の発現は RA 患者好中球において増加していたが、mRNA 発現についてリアルタイム PCR 法で検討したところ、RA と正常人の好中球の間には明らかな発現量の違いは認められず、posttranslational な機序により、増加しているものと考えられた。

4) PPAR γ 蛋白が NB4 細胞に存在するか否かについてイムノブロットにより確認したところ、未分化な NB4 細胞と核内受容体リガンドで刺激した NB4 のいずれにおいても、ほぼ同量の PPAR γ 蛋白が確認された。生理的リガンドの PGJ2 と合成リガンドのピオグリタゾン (製品名アクトス) のいずれも NB4 細胞の増殖を抑制し、低濃度の ATRA (RAR/RXR リガンド) はこれらの PPAR γ リガンドによる増殖抑制を相

加的に増強した。

D&E. 考察及び結論

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

F. 健康危険情報

無し

G. 研究発表

1. 論文発表

間野博行

- 1) Kano Y, Akutsu M, Tsunoda S, Izumi T, Kobayashi H, Mano H & Furukawa Y: Cytotoxic effects of histone deacetylase inhibitor FK228 (depsipeptide, formally named FR901228) in combination with conventional anti-leukemia/lymphoma agents against human leukemia/lymphoma cell lines. *Invest New Drugs*, **25**: 31-40, 2007.
- 2) Choi YL, Kaneda R, Wada T, Fujiwara S, Soda M, Watanabe H, Kurashina K, Hatanaka H, Enomoto M, Takada S, Yamashita Y & Mano H: Identification of a constitutively active mutant of JAK3 by retroviral expression screening. *Leuk Res*, **31**: 203-209, 2007.
- 3) Yamashita Y, Ohashi J, Hirai Y, Choi YL, Kaneda R, Fujiwara S-i, Arai Y, Akutsu M, Tsutsumi C, Miyazaki Y, Usuki K, Teramura M, Mitani K, Kano Y, O'Neill MC, Urabe A, Tomonaga M, Ozawa K & Mano H: Gene expression profiles of CD133-positive fractions predict the survival of individuals with acute myeloid leukemia. *Cancer Genomics & Proteomics*, **3**: 169-182, 2006.
- 4) Yamada T, Katagiri H, Ishigaki Y, Ogihara T, Imai J, Uno K, Hasegawa Y, Gao J, Ishihara H, Nijima A, Mano H, Aburatani H, Asano T & Oka Y: Signals from intra-abdominal fat modulate

insulin and leptin sensitivity through different mechanisms: neuronal involvement in food-intake regulation. *Cell Metab*, **3**: 223-229, 2006.

- 5) Takada S, Wada T, Kaneda R, Choi YL, Yamashita Y & Mano H: Evidence for activation of Amh gene expression by steroidogenic factor 1. *Mech Dev*, **123**: 472-480, 2006.
- 6) 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.
- 7) Takada S, Berezikov E, Yamashita Y, Lagos-Quintana M, Kloosterman WP, Enomoto M, Hatanaka H, Fujiwara S, Watanabe H, Soda M, Choi YL, Plasterk RH, Cuppen E & Mano H: Mouse microRNA profiles determined with a new and sensitive cloning method. *Nucleic Acids Res*, **34**: e115, 2006.
- 8) 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*, **30**: 1105-1112, 2006.
- 9) Omi T, Kumada M, Kamesaki T, Okuda H, Munkhtulga L, Yanagisawa Y, Utsumi N, Gotoh T, Hata A, Soma M, Umemura S, Ogihara T, Takahashi N, Tabara Y, Shimada K, Mano H, Kajii E, Miki T & Iwamoto S: An intronic variable number of tandem repeat polymorphisms of the cold-induced autoinflammatory syndrome 1 (CIAS1) gene modifies gene expression and is associated with essential hypertension. *Eur J Hum Genet*, 2006.
- 10) Mano H: Epigenetics and hematological disorders. *Rinsho Ketsueki*, **47**: 3-8, 2006.

- 11) Mano H: DNA microarray analysis of myelodysplastic syndrome. *Leuk Lymphoma*, **47**: 9-14, 2006.
- 12) 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.
- 13) Kano Y, Akutsu M, Tsunoda S, Izumi T, Kobayashi H, 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 Res*, **16**: 85-95, 2006.
- 14) Choi YL, Tsukasaki K, O'Neill M C, Yamada Y, Onimaru Y, Matsumoto K, Ohashi J, Yamashita Y, Tsutsumi S, Kaneda R, Takada S, Aburatani H, Kamihira S, Nakamura T, Tomonaga M & Mano H: A genomic analysis of adult T-cell leukemia. *Oncogene*, 2006.
- 15) Berezikov E, van Tetering G, Verheul M, van de Belt J, van Laake L, Vos J, Verloop R, van de Wetering M, Guryev V, Takada S, van Zonneveld AJ, Mano H, Plasterk R & Cuppen E: Many novel mammalian microRNA candidates identified by extensive cloning and RAKE analysis. *Genome Res*, **16**: 1289-1298, 2006.

寺村正尚

- 1) Ishiyama M, Teramura M, Iwabe K, Kato T & Motoji T: Clonally expanded T-cells in the peripheral blood of patients with idiopathic Thrombocytopenic purpura and Helicobacter pylori infection. *Int J Hematol*, **83**: 147-151, 2006.

湯尾明

- 1) Yasugi E, Horiuchi A, Uemura I, Okuma E, Nakatsu M, Saeki K, Kamisaka Y, Kagechika H, Yasuda K, Yuo A: Peroxisome proliferator-activated receptor γ ligands stimulate myeloid differentiation and lipogenesis in the human leukemia NB4 cells. *Dev Growth Differ* **48**:177-188,2006.

- 2) Doshi M, Koyanagi M, Nakahara M, Saeki K, Saeki K, Yuo A: Identification of human neutrophils during experimentally induced inflammation in mice transplanted with human umbilical cord blood CD34-positive cells. *Int J Hematol* **84**:231-237,2006.
- 3) Nakai-Murakami C, Shimura M, Kinomoto M, Takizawa Y, Tokunaga K, Taguchi T, Hoshino S, Miyagawa K, Sata T, Kurumizaka H, Yuo A, Ishizaka Y: HIV-1 Vpr induces ATM-dependent cellular signal with enhanced homologous recombination. *Oncogene* **26**:477-486,2007.
- 4) Nakahara M, Saeki K, Yogiashi Y, Kimura A, Horiuchi A, Nakamura N, Yoneda A, Saeki K, Matsuyama S, Nakamura M, Toda T, Kondo Y, Kaburagi Y, Yuo A: The protein expression profile of cynomolgus monkey embryonic stem cells in two-dimensional gel electrophoresis: a successful identification of multiple proteins using human databases. *J Electrophoresis*, in press.

H. 知的財産権の出願・登録状況

国際公開番号：PCT/WO97/34007・発明者：間野博行・名称「PROMOTER」・出願人：間野博行、株式会社 DNAVEC 研究所・公開日：1997年9月18日

公開番号：特開 2001-269174・発明者：間野博行・名称「骨髓異形成症候群(MDS)の検出方法及び MDS の治療剤」・出願人：間野博行・公開日：2001年10月2日

国際公開番号：PCT/WO 01/64946 A1・発明者：間野博行・名称「METHOD OF DETECTING CHRONIC MYELOGENOUS LEUKEMIA」・出願人：間野博行、宝酒造株式会社・公開日：2001年9月7日

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

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

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

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

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

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

出願番号：特願 2006-303929。「霊長類動物胚性幹細胞の培養及び継代方法、並びにその分化誘導方法」発明者：湯尾明、佐伯久美子、佐伯晃一、中原正子、中村直子、過足芳子、松山さと子、米田麻子。出願人：国立国際医療センター、田辺製薬株式会社

分担研究者： 間野 博行 自治医科大学医学部 教授

研究要旨：貧血あるいは汎血球減少症が慢性に持続する「特発性造血障害」の発生頻度は加齢に伴い著明に増加し、特に80歳代の罹患人口は10万人あたり100人を越える。ヒトゲノムプロジェクトの成果を利用するDNAチップは特発性造血障害の病態解明にも有効であると予想されるが、一方不用意な患者骨髄単核球を用いたDNAチップ実験は、骨髄内の疾患クローンの割合の変化を反映するにすぎない多くの偽陽性データを生じることになる。我々は特発性造血障害を構成する3疾患群がいずれも造血幹細胞のクローン性異常に起因することに着目し、様々な特発性造血障害及び白血病患者骨髄より造血幹細胞相当分画のみを純化保存する全国規模の検体収集事業「Blast Bank」を開始した。平成19年3月現在で既に800例を越えるサンプルの収集に成功しており、本バンクはヒト疾患純化細胞を用いたゲノミクスプロジェクトとして世界最大の一つとなっている。本研究計画において我々はBlast Bankに属する特発性造血障害の臨床検体を用いてゲノミクス・プロテオミクス解析を行うことにより、3疾患群の病因解明及び精度の高い新規鑑別診断法の開発を行うと共に、これら疾患群から急性白血病への進展を予測可能にするカスタムメイドDNAチップの開発を目指す。

A 研究目的

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

B 研究方法

1) 造血幹細胞特異的マーカーであるCD133に対するアフィニティカラムを用いて、白血病を含む各種特発性血液疾患患者骨髄より造血幹細胞分画を純化保存し、これをBlast Bankと名付けた。平成19年3月現在で800例を越えるサ

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

2) 上記検体細胞よりトータル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ビオチン標識化したcomplementary RNA (cRNA) を作製し、Affymetrix社HGU133 A & Bマイクロアレイとハイブリダイズさせた。

（倫理面への配慮）

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

C 研究結果

1) 我々は平成11年8月よりBlast Bankを立ち上げ既に800例を越えるサンプルのストックに成功した。現在本バンク中に130例を超えるMDSおよび急性骨髄性白血病（AML）サンプルが保存されており、世界的にも極めて貴重なリソースとなっている。これらBlast Bank分画を用いた解析が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CD133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) 全ヒト遺伝子が配置されたAffymetrix社GeneChipを用いた解析によってBlast Bank白血病患者検体における網羅的遺伝子発現定量を行った。さらに症例臨床情報と組み合わせることで、

患者の長期予後に発現量がリンクする遺伝子（予後予測遺伝子）をスクリーニングすることに成功した。これら予後予測遺伝子の発現量を基にさらに長期予後を予測するアルゴリズムを開発し、それによって実際に症例の化学療法反応性を予測可能なことが明らかになった。

3) MDS症例のBlast Bank検体よりゲノムDNAを調整し、SNPタイピングアレイにハイブリダイズさせることで、高解像度のゲノム量異常解析を行った。その結果、MDSが染色体不安定群と安定群とに分かれることが明らかになった。また一部のゲノム量異常は数十kbpと極めて狭い領域に限局して生じており、疾患関連遺伝子の存在が予想された。

4) MDSにおける遺伝子配列異常を網羅的に解析する目的で、大規模シーケンシングアレイを新たに開発し、実際の症例ゲノムDNAハイブリダイズ実験を開始した。

D&E. 考察及び結論

本研究事業においてMDS骨髓幹細胞を用いた遺伝子発現プロファイリング解析とゲノムDNAを用いた染色体量異常解析を行った。これらの解析から、予後にリンクした発現量を示す遺伝子の同定、さらにMDSへ高頻度にゲノム量異常を示す領域を同定することができた。またこれらゲノム情報に加えて、新たに配列異常の網羅的解析手法を開発した。

F. 健康危険情報

無し

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kano Y, Akutsu M, Tsunoda S, Izumi T, Kobayashi H, Mano H & Furukawa Y: Cytotoxic effects of histone deacetylase inhibitor FK228 (depsipeptide, formally named FR901228) in combination with conventional anti-leukemia/lymphoma agents against human leukemia/lymphoma cell lines. *Invest New Drugs*, **25**: 31-40, 2007.
- 2) Choi YL, Kaneda R, Wada T, Fujiwara S, Soda M, Watanabe H, Kurashina K, Hatanaka H, Enomoto M, Takada S, Yamashita Y & Mano H: Identification of a constitutively active mutant of JAK3 by retroviral expression screening. *Leuk Res*, **31**: 203-209, 2007.
- 3) Yamashita Y, Ohashi J, Hirai Y, Choi YL, Kaneda R, Fujiwara S-i, Arai Y, Akutsu M, Tsutsumi C, Miyazaki Y, Usuki K, Teramura M, Mitani K, Kano Y, O'Neill MC, Urabe A, Tomonaga M, Ozawa K & Mano H: Gene expression profiles of CD133-positive fractions predict the survival of individuals with acute myeloid leukemia. *Cancer Genomics & Proteomics*, **3**: 169-182, 2006.
- 4) Yamada T, Katagiri H, Ishigaki Y, Ogihara T, Imai J, Uno K, Hasegawa Y, Gao J, Ishihara H, Nijijima A, Mano H, Aburatani H, Asano T & Oka Y: Signals from intra-abdominal fat modulate insulin and leptin sensitivity through different mechanisms: neuronal involvement in food-intake regulation. *Cell Metab*, **3**: 223-229, 2006.
- 5) Takada S, Wada T, Kaneda R, Choi YL, Yamashita Y & Mano H: Evidence for activation of Amh gene expression by steroidogenic factor 1. *Mech Dev*, **123**: 472-480, 2006.
- 6) 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.
- 7) Takada S, Berezikov E, Yamashita Y, Lagos-Quintana M, Kloosterman WP, Enomoto M, Hatanaka H, Fujiwara S, Watanabe H, Soda M, Choi YL, Plasterk RH, Cuppen E & Mano H: Mouse microRNA profiles determined with a new and sensitive cloning method. *Nucleic Acids Res*, **34**: e115, 2006.
- 8) 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*, **30**: 1105-1112, 2006.
- 9) Omi T, Kumada M, Kamesaki T, Okuda H, Munkhtulga L, Yanagisawa Y, Utsumi N, Gotoh T, Hata A, Soma M, Umemura S, Ogihara T, Takahashi N, Tabara Y, Shimada K, Mano H, Kajii E, Miki T & Iwamoto S: An intronic variable number of tandem repeat polymorphisms of the cold-induced autoinflammatory syndrome 1 (CIAS1) gene modifies gene expression and is associated with essential hypertension. *Eur J Hum Genet*, 2006.
- 10) Mano H: Epigenetics and hematological disorders. *Rinsho Ketsueki*, **47**: 3-8, 2006.
- 11) Mano H: DNA microarray analysis of myelodysplastic syndrome. *Leuk Lymphoma*, **47**: 9-14, 2006.
- 12) 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.

- 13) Kano Y, Akutsu M, Tsunoda S, Izumi T, Kobayashi H, 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 Res*, **16**: 85-95, 2006.
- 14) Choi YL, Tsukasaki K, O'Neill M C, Yamada Y, Onimaru Y, Matsumoto K, Ohashi J, Yamashita Y, Tsutsumi S, Kaneda R, Takada S, Aburatani H, Kamihira S, Nakamura T, Tomonaga M & Mano H: A genomic analysis of adult T-cell leukemia. *Oncogene*, 2006.
- 15) Berezikov E, van Tetering G, Verheul M, van de Belt J, van Laake L, Vos J, Verloop R, van de Wetering M, Guryev V, Takada S, van Zonneveld AJ, Mano H, Plasterk R & Cuppen E: Many novel mammalian microRNA candidates identified by extensive cloning and RAKE analysis. *Genome Res*, **16**: 1289-1298, 2006.

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

不応性貧血患者血球における蛋白異常の同定とその解析

分担研究者 寺村 正尚 東京女子医科大学血液内科 助教授

研究要旨：特発性造血障害の1つである不応性貧血(Refractory anemia :RA)患者の血球のプロテオーム解析を行った。その結果、RA患者好中球において疾患特異的に発現異常のある蛋白が同定された。それらの1つはCapG蛋白であり、チロシンリン酸化CapGはRA血球では正常好中球と異なり、核内優位に存在していた。CapGはアクチンだけでなく、イノシトールリン脂質代謝の制御に関わっていることから、本症の病因、病態に深く関与していると推察される。また、幹細胞に近いレベルにおけるRA特異的蛋白異常を同定するために、純化CD34陽性細胞を用いたプロテオーム解析を行っている。

A. 研究目的

蛋白の翻訳後修飾、たとえば蛋白のリン酸化や糖鎖の異常などが多くの疾患の病因、病態に関与していることが知られている。このような蛋白翻訳後修飾の異常を明らかにするためには、遺伝子レベルではなく蛋白レベルでの解析が必要である。本研究は高齢者特発性造血障害の1つである不応性貧血(Refractory anemia :RA)患者における異常血球のプロテオーム解析を行い、本症特異的に高発現している蛋白を明らかにし、その機能解析をすることにより、RAの病態を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

RA患者の末梢血中の好中球をターゲットとして蛋白解析を行うこととした。これらを解析対象とした理由は以下の通りである。
(1)RA患者の好中球は異常クローン由来であり、形態学的、細胞生化学的な異常が明らかにあり、何らかの蛋白異常が存在していると考えられる。
(2)臨床的に末梢血を検査するだけで、RAを

診断しうるような、実用的な疾患特異的マーカーを同定できる可能性がある。

(3)検体の採取が容易であるため、骨髄に比して検体の収集が進みやすい。

研究方法としては、RA患者および正常人の末梢血よりデキストラン法を用いて好中球を分離した。その細胞より蛋白を抽出した後、二次元電気泳動を行った。両者の泳動パターンを解析ソフト(Ettan progenesis)で解析した。発現量に差が認められたスポットの質量分析をMALDI-TOF/TOF MSを用いて行い、その蛋白についてペプチドデータベース(MASCOT)を用いて同定した。また同定した蛋白に対する各種ポリクローナル抗体を作成し、その細胞内局在を免疫組織染色により検討し、また免疫沈降およびウエスタンブロッティングにより蛋白解析を行った。さらに、好中球におけるそれらの遺伝子発現についてリアルタイムPCR法を用いて検討した。

(倫理面への配慮)

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

C. 研究結果

RA 患者と正常者の末梢血好中球由来の蛋白の泳動パターンを解析ソフトで解析したところ、RA において異常発現しているスポットが認められた。それらのスポットについて MS によるペプチドマップを作製し、データベース上でペプチドマス・フィンガープリント測定を行い、蛋白を同定した。そのうちの 2 つは CapG および Thiol-specific antioxidant protein (TSA) であった。

RA 好中球における CapG の細胞内局在を検討するために、各種抗 CapG 抗体を作成し、それを用いて好中球の免疫染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡にて検討した。その結果、CapG は正常好中球ではほとんどすべての細胞において細胞質優位に存在していたのに対し、RA では核内優位に高発現する好中球が高頻度に認められた。また、抗チロシンリン酸化 CapG 抗体を用いて解析したところ、RA 好中球においてはチロシンリン酸化 CapG が明らかに核内優位に存在し、細胞質にはほとんど発現していなかった。一方、正常好中球では細胞質内とくに細胞膜周辺に存在し、核内にはほとんど認められなかった。また、TSA の発現は RA 患者好中球において増加していたが、mRNA 発現についてリアルタイム PCR 法で検討したところ、RA と正常人の好中球の間には明らかな発現量の違いは認められず、posttranslational な機序により、増加しているものと考えられた。

D. 考察

RA 患者の好中球には正常人と比較し、発現異常を認める蛋白が複数存在することが明らかになった。その 1 つは CapG である。CapG はゲルソリンファミリーに属し、アクチンの capping に関わるタンパクであり、細胞骨格のダイナミックな変化に重要な働きを担っている。したがって、RA の特徴である血球形態異常、好中球遊走能の低下は CapG の異常によ

る可能性がある。ちなみに CapG ノックアウトマウスでは好中球遊走能の低下が認められている。また、CapG はホスファチジルイノシトール 4,5-二リン酸と結合し、イノシトールリン脂質代謝の制御に関わっており、クロマチン再構築、転写機構、アポトーシスシグナル、小胞輸送などさまざまな細胞機能に影響を与え、血球の増殖、分化を制御している可能性がある、以上より CapG の異常は RA の病因、病態に深く関与していることが示唆される。

RA 患者好中球において高発現を認めた TSA はペルオキシレドキシニンに属する蛋白であり、活性酸素種 (ROS) 除去に重要な役割を担っている蛋白である。RA の血球はさまざまなサイトカインにより酸化ストレスを受け、ROS が増加し、それが無効造血を来す一因となっていると可能性がある。したがって、それらの酸化ストレスに対するフィードバック機構として TSA の発現が増加している可能性が考えられる。この結果はペルオキシレドキシニンの作用を増強することにより、RA にみられる無効造血を改善できる可能性があることを示していると考えられる。

E. 結論

RA 患者好中球において特異的に異常発現している蛋白を同定した。これらの蛋白は RA の病因あるいは病態に深く関与していると推測され、それらの蛋白の解析を進めることは、本症の病因、病態の解明のみではなく、新規治療法の開発にもつながると考えられる。

F. 研究発表

風間啓至, 寺村正尚, 菅家美恵, 加藤智啓, 泉二登志子: プロテオミクスの手法を用いた RA 関連蛋白の同定. 臨床血液 47:1089, 2006

G. 知的財産権の出願・登録状況
なし

ヒト骨髄系血液細胞における核内受容体関連分化に関する基礎検討 分担研究者 湯尾 明 国立国際医療センター研究所部長

研究要旨

臨床検体などのヒト血液細胞の分化異常の解析を推進するために、本年度は、ヒト骨髄系血液細胞株における核内受容体刺激下での分化誘導の *in vitro* 解析を行った。ヒト骨髄性白血病細胞株をピオグリタゾン、PGJ2 などの PPAR γ リンガンドで刺激して、細胞増殖、細胞形態、細胞機能、脂質代謝などの面から、細胞の分化を評価した。まず、血液細胞に PPAR γ が発現していること、転写因子受容体として機能していることを確認した。細胞に PPAR γ リガンド（ピオグリタゾン、PGJ2）を投与すると、増殖抑制を惹起したが、それのみでは細胞分化は観察されなかった。しかし、RAR/RXR リガンドである ATRA と PPAR γ リガンドは、相乗的にヒト骨髄性白血病細胞株の分化を誘導した。さらに、両者の相乗的な効果は、トリアシルグリセロールを中心とする脂質の蓄積においても観察された。以上より、核内受容体刺激によってヒト骨髄系血液細胞の形態や機能の分化と中性脂質代謝が誘導されることが明らかとなった。

A. 研究目的

骨髄異形性症候群等の特発性造血障害においては、血液細胞の増殖、分化、生存、細胞死などの細胞生物学的な挙動が障害されており、病因・病態の重要な要素となっている。このような観点から、ヒト血液細胞の増殖、分化などの分子機序の解析は、疾患の解明のために極めて重要である。

一方、骨髄異形性症候群の治療においては、様々な試みがなされてきたが、疾患の根治を確約出来るような画期的な治療法は、未だに存在しない。治療の試みの1つとして、核内受容体を介した分化誘導療法にも焦点が向けられており、その基盤的な研究は治療法開発につながる可能性もある。

今年度は、このような観点から、ヒト骨髄性白血病細胞株を用いて、ヒト骨髄系血液細胞における核内受容体に関連する分化の基礎的な検討を行った。

B. 研究方法

ヒト骨髄系白血病細胞株は、NB4 を用いた。PPAR γ リガンドとしては、生体内に存在する生理的リガンドの PGJ2 と合成リガンドのピオグリタゾン（製品名アクトス）を用いた。PPAR γ の阻害剤としては、HX531、GW9662、BADGE を用いた。

PPAR γ が、そのリンガンド依存性にその核内受容体としての転写活性を発揮しているかに関しては、その特異的転写産物である adipocyte fatty acid binding protein (aP2) の転写によって確認した。

細胞分化の指標としては、細胞の形態（好

中球分化による核のくびれ）と活性酸素産生能（NBT 還元能）を評価した。PPAR γ 蛋白の確認は、イムノブロットにより行った。

細胞内の脂肪滴は、ニールレッド染色により同定し、トリアシルグリセロールの定量は薄相クロマトグラフィーにより行った。

C. 研究結果

まず、PPAR γ 蛋白が NB4 細胞に存在するか否かについてイムノブロットにより確認したところ、未分化な NB4 細胞と核内受容体リガンドで刺激した NB4 のいずれにおいても、ほぼ同量の PPAR γ 蛋白が確認された。

次に、PPAR γ リガンドが NB4 細胞において PPAR γ に結合してその特異的転写を誘導しているかを確認するために、adipocyte fatty acid binding protein (aP2) の発現を検討し、PPAR γ リガンド存在下でのみこの分子の転写、発現を確認した。

生理的リガンドの PGJ2 と合成リガンドのピオグリタゾン（製品名アクトス）のいずれも NB4 細胞の増殖を抑制し、低濃度の ATRA（RAR/RXR リガンド）はこれらの PPAR γ リガンドによる増殖抑制を相加的に増強した。

次に、PPAR γ リガンドの PGJ2 とピオグリタゾンの分化誘導能を検討した。両者は単独では NB4 細胞の活性酸素産生能を誘導しなかった。しかし、低濃度の ATRA で誘導される活性酸素産生能は、PPAR γ リガンドの PGJ2 とピオグリタゾンが存在すると著明に増強された。形態分化においても同様の所見が観察された。低濃度 ATRA と PPAR γ リガンドの共存下で誘導される分化誘導は、

PPAR γ の阻害剤である HX531、GW9662、BADGE によって抑制された。

細胞形態の評価において、PPAR γ リガンドと ATRA で分化誘導した NB4 細胞において多数の細胞質空胞が確認されたので、これが脂肪滴で有るか否かをナイルレッド染色で検討したところ、染色されていることが確認された。さらに、分化誘導された NB4 細胞においてトリアシルグリセロールが増加していることが明らかになった。

D. 考察

今回の検討により、PPAR γ リガンド（生理的リガンドの PGJ2 と合成リガンドのピオグリタゾン）は、いずれも単独ではヒト骨髓系血液細胞株の分化を誘導しなかったが、低濃度の ATRA（RAR/RXR リガンド）と組み合わせることによって、低濃度の ATRA の微弱な分化誘導作用を著明に増強することが明らかとなった。血液疾患の分化誘導療法においては、ATRA が臨床応用されているが、耐性になって効果が失われる場合も多い。今回の検討により、その様な ATRA 耐性の患者において、PPAR γ リガンドが治療耐性を克服できる可能性が示唆される。

今回の検討においては、特異的リガンドによる PPAR γ 核内転写因子受容体の刺激が、細胞増殖抑制、細胞機能分化促進のみではなく細胞内の脂質代謝にも強く影響を及ぼすことが明らかになった。白血球系の血液細胞が脂質代謝や動脈硬化においても重要な役割を果たすことを鑑みると、この様な今回の観察結果の意義は大きいものと考えられる。

E. 結論

本年度は、ヒト骨髓系白血病細胞株における核内受容体（PPAR γ ）刺激下での分化誘導の培養系を駆使した解析を行った。ヒト骨髓系白血病細胞株をピオグリタゾン、PGJ2 などの PPAR γ リンガンドで刺激して、細胞増殖、細胞形態、細胞機能、脂質代謝などの面から、細胞の分化を評価した。細胞に PPAR γ リガンド（ピオグリタゾン、PGJ2）を投与すると、増殖抑制を惹起したが、それのみでは細胞分化は観察されなかった。しかし、RAR/RXR リガンドである ATRA と PPAR γ リガンドは、相乗的にヒト骨髓系白血病細胞株の分化を誘導した。さらに、両者の相乗的な効果は、脂質の蓄積においても観察された。以上より、核内受容体刺激によってヒト骨髓系血液細胞の形態や機能の分化と中性脂質代謝が誘導されることが明らかとな

った。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. Yasugi E, Horiuchi A, Uemura I, Okuma E, Nakatsu M, Saeki K, Kamisaka Y, Kagechika H, Yasuda K, Yuo A: Peroxisome proliferator-activated receptor γ ligands stimulate myeloid differentiation and lipogenesis in the human leukemia NB4 cells. *Dev Growth Differ* 48:177-188, 2006.
2. Doshi M, Koyanagi M, Nakahara M, Saeki K, Saeki K, Yuo A: Identification of human neutrophils during experimentally induced inflammation in mice transplanted with human umbilical cord blood CD34-positive cells. *Int J Hematol* 84:231-237, 2006.
3. Nakai-Murakami C, Shimura M, Kinomoto M, Takizawa Y, Tokunaga K, Taguchi T, Hoshino S, Miyagawa K, Sata T, Kurumizaka H, Yuo A, Ishizaka Y: HIV-1 Vpr induces ATM-dependent cellular signal with enhanced homologous recombination. *Oncogene* 26:477-486, 2007.
4. Nakahara M, Saeki K, Yogiashi Y, Kimura A, Horiuchi A, Nakamura N, Yoneda A, Saeki K, Matsuyama S, Nakamura M, Toda T, Kondo Y, Kaburagi Y, Yuo A: The protein expression profile of cynomolgus monkey embryonic stem cells in two-dimensional gel electrophoresis: a successful identification of multiple proteins using human databases. *J Electrophoresis in press*.

H. 知的財産権の出願・登録状況

霊長類動物胚性幹細胞の培養及び継代方法、並びにその分化誘導方法

発明者：湯尾 明、佐伯久美子、佐伯晃一、中原正子、中村直子、過足芳子、松山さと子、米田麻子

出願人：国立国際医療センター、田辺製薬株式会社

特願 2006-303929

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
Kano Y, Akutsu M, Tsunoda S, Izumi T, Kobayashi H, Mano H & Furukawa Y	Cytotoxic effects of histone deacetylase inhibitor FK228 (depsipeptide, formally named FR901228) in combination with conventional anti-leukemia/lymphoma agents against human leukemia/lymphoma cell lines.	<i>Invest New Drugs</i>		25 31-40	2007
Choi YL, Kaneda R, Wada T, Fujiwara S, Soda M, Watanabe H, Kurashina K, Hatanaka H, Enomoto M, Takada S, Yamashita Y & Mano H	Identification of a constitutively active mutant of JAK3 by retroviral expression screening.	<i>Leuk Res</i>		31 203-209	2007
Yamashita Y, Ohashi J, Hirai Y, Choi YL, Kaneda R, Fujiwara S-i, Arai Y, Akutsu M, Tsutsumi C, Miyazaki Y, Usuki K, Teramura M, Mitani K, Kano Y, O'Neill MC, Urabe A, Tomonaga M, Ozawa K & Mano H	Gene expression profiles of CD133-positive fractions predict the survival of individuals with acute myeloid leukemia.	<i>Cancer Genomics & Proteomics</i>		3 169-182	2006
Yamada T, Katagiri H, Ishigaki Y, Ogihara T, Imai J, Uno K, Hasegawa Y, Gao J, Ishihara H, Nijima A, Mano H, Aburatani H, Asano T & Oka Y	Signals from intra-abdominal fat modulate insulin and leptin sensitivity through different mechanisms: neuronal involvement in food-intake regulation.	<i>Cell Metab</i>		3 223-229	2006
Takada S, Wada T, Kaneda R, Choi YL, Yamashita Y & Mano H	Evidence for activation of Amh gene expression by steroidogenic factor 1.	<i>Mech Dev</i>		123 472-480	2006
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.	<i>Gen Comp Endocrinol</i>		145 208-213	2006
Takada S, Berezikov E, Yamashita Y, Lagos-Quintana M, Kloosterman WP, Enomoto M, Hatanaka H, Fujiwara S, Watanabe H, Soda M, Choi YL, Plasterk RH, Cuppen E & Mano H	Mouse microRNA profiles determined with a new and sensitive cloning method.	<i>Nucleic Acids Res</i>		34 e115	2006
Taguchi J, Miyazaki Y, Tsutsumi C, Sawayama Y, Ando K, Tsushima H, Fukushima T, Hata T, Yoshida S, Kuriyama K, Honda S, Jimai I, Mano H & Tomonaga M	Expression of the myeloperoxidase gene in AC133 positive leukemia cells relates to the prognosis of acute myeloid leukemia	<i>Leuk Res</i>		30 1105-1112	2006
Omi T, Kumada M, Kamesaki T, Okuda H, Munkhtulga L, Yanagisawa Y, Utsumi N, Gotoh T, Hata A, Soma M, Umemura S, Ogihara T, Takahashi N, Tabara Y, Shimada K, Mano H, Kajii E, Miki T & Iwamoto S	An intronic variable number of tandem repeat polymorphisms of the cold-induced autoinflammatory syndrome 1 (CIAS1) gene modifies gene expression and is associated with essential hypertension	<i>Eur J Hum Gene</i>			2006
Mano H	[Epigenetics and hematological disorders].	<i>Rinsho Ketsueki</i>		47 3-8	2006
Mano H	DNA microarray 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 YL, Fujiwara SI, Miyakura Y, Nagai H & Mano H	Epigenetic silencing of AXIN2 in colorectal carcinoma with microsatellite instability.	<i>Oncogene</i>		25 139-146	2006
Kano Y, Akutsu M, Tsunoda S, Izumi T, Kobayashi H, 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.	<i>Oncol Res</i>		16 85-95	2006

Choi YL, Tsukasaki K, O'Neill M C, Yamada Y, Onimaru Y, Matsumoto K, Ohashi J, Yamashita Y, Tsutsumi S, Kaneda R, Takada S, Aburatani H, Kamihira S, Nakamura T, Tomonaga M & Mano H	A genomic analysis of adult T-cell leukemia.	<i>Oncogene</i>			2006
Berezikov E, van Tetering G, Verheul M, van de Belt J, van Laake L, Vos J, Verloop R, van de Wetering M, Guryev V, Takada S, van Zonneveld AJ, Mano H, Plasterk R & Cuppen E	Many novel mammalian microRNA candidates identified by extensive cloning and RAKE analysis.	<i>Genome Res</i>	16	1289-1298	2006

研究成果の刊行に関する一覧表

分担研究者: 寺村 正尚

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Araki T, Emoto M, Teramura M, Yokoyama H, Mori K, Hatsuda S, Maeno T, Shinohara K, Koyama H, Shoji T, Inaba M & Nishizawa Y	Effect of adiponectin on carotid arterial stiffness in type 2 diabetic patients treated with pioglitazone and metformin	<i>Metabolism</i>		55 996-1001	2006
Ishiyama M, Teramura M, Iwabe K, Kato T & Motoji T	Clonally expanded T-cells in the peripheral blood of patients with idiopathic Thrombocytopenic purpura and <i>Helicobacter pylori</i> infection.	<i>Int J Hematol</i>		83 147-151	2006
Mori K, Emoto M, Yokoyama H, Araki T, Teramura M, Koyama H, Shoji T, Inaba M & Nishizawa Y	Association of serum fetuin-A with insulin resistance in type 2 diabetic and nondiabetic subjects	<i>Diabetes Care</i>		29 468	2006
Sugimori C, Chuhojo T, Feng X, Yamazaki H, Takami A, Teramura M, Mizoguchi H, Omine M & Nakao S	Minor population of CD55-CD59- blood cells predicts response to immunosuppressive therapy and prognosis in patients with aplastic anemia	<i>Blood</i>		107 1308-1314	2006
Teramura M	[Anemia due to hematopoietic disorders. 1. Aplastic anemia and pre red cell aplasia].	<i>Nippon Naika Gakkai Zasshi</i>		95 2030-2035	2006
Yokoyama H, Emoto M, Mori K, Araki T, Teramura M, Koyama H, Shoji T, Inaba M & Nishizawa Y	Plasma adiponectin level is associated with insulin-stimulated nonoxidative glucose disposal	<i>J Clin Endocrinol Metab</i>		91 290-294	2006

研究成果の刊行に関する一覧表

分担研究者:湯尾 明

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Nakai-Murakami C, Shimura M, Kinomoto M, Takizawa Y, Tokunaga K, Taguchi T, Hoshino S, Miyagawa K, Sata T, Kurumizaka H, Yuo A & Ishizaka Y	HIV-1 Vpr induces ATM-dependent cellular signal with enhanced homologous recombination.	<i>Oncogene</i>	26	477-486	2007
Doshi M, Koyanagi M, Nakahara M, Saeki K, Saeki K & Yuo A	Identification of human neutrophils during experimentally induced inflammation in mice with transplanted CD34+ cells from human umbilical cord blood.	<i>Int J Hematol</i>	84	231-237	2006
Yasugi E, Horiuchi A, Uemura I, Okuma E, Nakatsu M, Saeki K, Kamisaka Y, Kagechika H, Yasuda K & Yuo A	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands stimulate myeloid differentiation and lipogenesis in human leukemia NB4 cells.	<i>Dev Growth Differ</i>	48	177-188	2006
Zhang H, Saeki K, Kimura A, Saeki K, Nakahara M, Doshi M, Kondo Y, Nakano T & Yuo A	Efficient and repetitive production of hematopoietic and endothelial cells from feeder-free monolayer culture system of primate embryonic stem cells.	<i>Biol Reprod</i>	74	295-306	2006



ONCOGENOMICS

A genomic analysis of adult T-cell leukemia

YL Choi¹, K Tsukasaki², MC O'Neill³, Y Yamada⁴, Y Onimaru², K Matsumoto⁵, J Ohashi⁶, Y Yamashita¹, S Tsutsumi⁷, R Kaneda¹, S Takada¹, H Aburatani⁷, S Kamihira⁴, T Nakamura⁵, M Tomonaga² and H Mano^{1,8}

¹Division of Functional Genomics, Jichi Medical University, Shimotsukeshi, Tochigi, Japan; ²Atomic Bomb Disease Institute, Nagasaki University Graduate School of Biomedical Science, Nagasaki, Japan; ³Department of Biological Sciences, University of Maryland, Baltimore, MD, USA; ⁴Department of Laboratory Medicine, Nagasaki University Graduate School of Biomedical Science, Nagasaki, Japan; ⁵Division of Molecular Regenerative Medicine, Osaka University Graduate School of Medicine, Osaka, Japan; ⁶Department of Human Genetics, Graduate School of Medicine, University of Tokyo, Tokyo, Japan; ⁷Research Center for Advanced Science and Technology, University of Tokyo, Tokyo, Japan and ⁸CREST, Japan Science and Technology Agency, Saitama, Japan

Adult T-cell leukemia (ATL) is an intractable malignancy of CD4⁺ T cells that is etiologically associated with infection by human T-cell leukemia virus-type I. Most individuals in the chronic stage of ATL eventually undergo progression to a highly aggressive acute stage. To clarify the mechanism responsible for this stage progression, we isolated CD4⁺ cells from individuals in the chronic ($n=19$) or acute ($n=22$) stages of ATL and subjected them to profiling of gene expression with DNA microarrays containing >44 000 probe sets. Changes in chromosome copy number were also examined for 24 cell specimens with the use of microarrays harboring ~50 000 probe sets. Stage-dependent changes in gene expression profile and chromosome copy number were apparent. Furthermore, expression of the gene for MET, a receptor tyrosine kinase for hepatocyte growth factor (HGF), was shown to be specific to the acute stage of ATL, and the plasma concentration of HGF was increased in individuals in either the acute or chronic stage. HGF induced proliferation of a MET-positive ATL cell line, and this effect was blocked by antibodies to HGF. The HGF-MET signaling pathway is thus a potential therapeutic target for ATL.

Oncogene (2007) 26, 1245–1255. doi:10.1038/sj.onc.1209898; published online 14 August 2006

Keywords: adult T-cell leukemia; DNA microarray; MET; artificial neural network

Introduction

Adult T-cell leukemia (ATL) is an intractable malignancy of CD4⁺ T cells that is etiologically associated with infection by human T-cell leukemia virus-type I

(HTLV-I) (Uchiyama *et al.*, 1977; Poiesz *et al.*, 1980; Yoshida *et al.*, 1982). Virally encoded proteins such as Tax trigger polyclonal growth of T cells in infected individuals, and there are an estimated 15–20 million such carriers worldwide (Edlich *et al.*, 2000). After a latency period of decades, a small proportion of carriers (~2%) develop ATL. Many ATL patients initially manifest only monoclonal (or oligoclonal) growth of leukemic clones without apparent clinical symptoms, a condition referred to as the chronic or smoldering stages (Shimoyama, 1991). Most individuals in the chronic stage, however, eventually undergo progression to a highly aggressive acute stage (Tajima, 1990). Given that the prognosis of individuals at the acute stage remains very poor, it is important to clarify the molecular mechanism that underlies stage progression.

Homozygous deletion or epigenetic silencing of the gene for the cyclin-dependent kinase inhibitor p16 (Hatta *et al.*, 1995; Yamada *et al.*, 1997; Nosaka *et al.*, 2000) as well as altered expression of other genes related to cell proliferation (Cesarman *et al.*, 1992; Tamiya *et al.*, 1998) have been detected in ATL cells at the acute stage. However, such genetic or epigenetic changes may be infrequent (Matsuoka, 2003), and the transforming events responsible for chronic to acute stage progression remain largely unknown.

DNA microarray analysis allows simultaneous comparison of the expression intensities of tens of thousands of genes. Such analysis of the transcriptomes of ATL cells at the chronic and acute stages might thus be expected to provide insight into the mechanism of stage progression in this disease. With the use of this approach, Sasaki *et al.* (2005) recently compared transcriptomes between normal CD4⁺ T cells ($n=5$) and mononuclear cells (MNCs) isolated from individuals in the acute stage of ATL ($n=8$). Tsukasaki *et al.* (2004) also compared transcriptomes between MNCs from patients in the chronic or acute stages of ATL ($n=4$ for each). However, the significance of these data may be limited by the small number of study subjects and by the use of unfractionated MNCs that contain various proportions of non-ATL cells.

Correspondence: Dr H Mano, Division of Functional Genomics, Jichi Medical University, 3311-1 Yakushiji, Shimotsukeshi, Tochigi 329-0498, Japan.

E-mail: hmano@jichi.ac.jp

Received 20 March 2006; revised 10 July 2006; accepted 11 July 2006; published online 14 August 2006

In addition to changes in gene expression, ATL cells frequently manifest various karyotype anomalies. Comparative genomic hybridization (CGH) has thus revealed recurrent gains in chromosomes 2p, 3p, 7q and 14q as well as losses in 6q in ATL cells (Ariyama *et al.*, 1999; Tsukasaka *et al.*, 2001). However, CGH or its successor, bacterial artificial chromosome (BAC) array-based CGH, is able to analyse chromosome copy number alterations (CNAs) at a resolution of only several hundred kilobase pairs (Lockwood *et al.*, 2005). High-density oligonucleotide microarrays originally designed for genotyping of single nucleotide polymorphisms (SNPs) have recently been adapted for CNA analysis (Lin *et al.*, 2004; Nannya *et al.*, 2005). With this approach, chromosome copy number is inferred from the signal intensity of SNP probe sets distributed throughout the human genome. For instance, with Affymetrix GeneChip Mapping 100K arrays developed for genotyping of ~100 000 SNPs, it is possible to determine CNAs at a mean resolution of 23.6 kbp, which is substantially greater than that achievable with BAC array-based technologies.

With both microarray-based gene expression profiling and SNP array-based CNA profiling, we have now performed a comprehensive genomic analysis of ATL in order to investigate the mechanism of stage progression from chronic to acute. Given that the CD4⁺CD8⁻ fraction of peripheral blood (PB) cells of individuals with chronic or acute ATL is composed predominantly of ATL cells, we purified this fraction from ATL patients. We then subjected the isolated cells to gene expression profiling with microarrays containing >44 000 probe sets and to CNA analysis with microarrays harboring ~50 000 probe sets. The gene expression data indicate that the transcriptomes for the chronic and acute stages of ATL are distinct, and the CNA data reveal frequent amplification or deletion of genomic fragments of various sizes in each ATL stage.

Results

Transcriptomes of ATL cells

To characterize the transcriptomes of ATL cells, we purified CD4⁺ cells from PB of ATL patients at either the chronic ($n=19$) or the acute ($n=22$) stage. The clinical characteristics of the patients are summarized in Supplementary Table 1. The CD4⁺ fraction was also purified from healthy volunteers ($n=3$) and was either activated with phytohemagglutinin (PHA) or not.

A simple, one-step column purification with antibodies to CD4 yielded a highly pure CD3⁺CD4⁺ T-cell fraction. For example, whereas the CD3⁺CD4⁺ fraction constituted only 29.1% of PB MNCs of one healthy individual, it constituted 98.8% of the corresponding column eluate (Figure 1a). Similarly, CD3⁺CD4⁺ cells constituted 25.7% of MNCs from one ATL patient at the acute stage, but accounted for 97.5% of cells in the corresponding column eluate (data not shown).

All of the ATL and normal CD4⁺ cell specimens were then subjected to expression profiling with ~44 000 probe sets (corresponding to ~33 000 transcripts) on Affymetrix HGU133 microarrays. To eliminate from the analysis genes that were transcriptionally silent in the ATL specimens, we first selected probe sets that received the 'Present' call by Microarray Suite 5.0 software (Affymetrix) in at least 30% ($n=13$) of the ATL samples. A total of 15 121 probe sets fulfilled this criterion. On the basis of the similarity of the expression profiles for these probe sets, all 47 samples were subjected to hierarchical two-way clustering (Alon *et al.*, 1999), yielding a dendrogram of the subjects (Figure 1b). All six normal samples, irrespective of PHA stimulation, formed a distinct branch separated from the ATL specimens, indicating that the overall gene expression profiles differed between normal and transformed T cells. However, samples corresponding to patients with chronic or acute ATL were not clearly separated from each other in this tree.

To compare the transcriptomes of ATL cells between chronic and acute stages, we conducted Student's *t*-test on the gene expression intensity for the 15 121 probe sets with the Benjamini and Hochberg false discovery rate (Reiner *et al.*, 2003) of 0.01, leading to the isolation of 84 probe sets (data not shown). To enrich probe sets whose expression level was high in at least one of the stages, we adopted another selection window, effect size (absolute difference in mean expression intensity) (Dhanasekaran *et al.*, 2001). We extensively compared the expression level of given probe sets determined by DNA microarray and by quantitative real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). With our normalization procedure (see Materials and methods), expression of genes with an array data of ≥ 100 units (U) was almost always detected by real-time RT-PCR (data not shown). Thus, we chose 100 U as the threshold value for the effect size.

A total of 21 probe sets (corresponding to 21 independent genes) whose expression level contrasted the two clinical conditions were finally identified. Hierarchical two-way clustering analysis of the expression profiles of these stage-associated genes revealed that only two genes were preferentially expressed at the chronic stage, whereas the other 19 genes were preferentially expressed in the acute stage (Figure 1c and Supplementary Table 2). Interestingly, the latter gene cluster contains several genes encoding for growth-related proteins, such as nuclear receptor coactivator 3 (NCOA3, GenBank accession no. NM_006534), heat-shock 60-kDa protein 1 (HSPD1, GenBank accession no. NM_002156) and general transcription factor IIIA (GTF3A, GenBank accession no. BE542815).

Gene expression-based prediction of ATL stage

We next attempted to develop a microarray-based class prediction algorithm for ATL. Among several approaches examined, an artificial neural network (ANN) provided the highest accuracy for prediction (O'Neill and Song, 2003). ANNs are computer-based