

200936132A

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患克服研究事業

AML1 および 7q 欠失責任遺伝子変異情報を
有する骨髄異形成症候群検体バンクの構築

平成 21 年度 総括研究報告書

研究代表者 稲葉俊哉

平成 22 (2010) 年 3 月

目 次

I.	総括研究報告	1
	AML1 および 7q 欠失責任遺伝子変異情報を有する骨髄異形成 症候群検体バンクの構築	
	研究代表者 稲葉俊哉	
II.	参考資料	5
	広島大学原爆放射線医科学研究所 共同利用・共同研究申請書	
III.	研究成果の刊行に関する一覧表	9

I. 總括研究報告

AML1 および 7q 欠失責任遺伝子変異情報を有する 骨髄異形成症候群検体バンクの構築

研究代表者 稲葉 俊哉 広島大学原爆放射線医科学研究所 教授

研究要旨

骨髄異形成症候群(MDS)の治療成績は不良であるため、新規治療法の開発が急がれている。MDSは多彩な遺伝子・エピゲノム異常の蓄積で発症する不均一な疾患群で、細胞株の樹立が困難であるため、個々の症例の病因となる遺伝子・エピゲノム異常の情報を付加した検体バンクの構築がその基盤となる。本研究では、特に予後不良な症例で高頻度に検出される遺伝子異常である7番染色体長腕欠損(7q-)とAML1遺伝子点変異のゲノム情報を付加したMDS細胞バンクの整備を試みた。リアルタイムPCR法やマイクロアレイCGH法など、従来法によるゲノム解析によって得られた遺伝子情報を付加したMDS細胞バンクを立ち上げることができた。これに加え、現在精力的に準備を進めている次世代シーケンサを用いた最先端のゲノム・(将来的にはエピゲノム)解析情報も加えて、MDS細胞バンクの一層の充実を図っている。

A. 研究目的

多彩な遺伝子・エピゲノム異常の蓄積で発症する不均一な疾患群である骨髄異形成症候群(MDS)の予後改善のため、個々の症例の病因となる遺伝子・エピゲノム異常の情報を付加した検体バンクの構築を行うことを目的とする。

このため、申請者らが世界に先駆けて解明してきた、予後不良なサブグループを形成する-7/7q-欠失責任遺伝子欠損(約20%)やAML1/Runx1転写因子の点変異(15~25%)などの情報をスクリーニングする技術の確立と、そうした情報を付加したMDS検体バンクの構築をおこない、広く研究者・臨床家へ提供する。

B. 研究方法

(1) 遺伝子情報解析手法の開発

長期的かつ大量の検体処理を行うため、7qの片アレルの欠損やAML1の点変異を検出する方法を最適化する。遺伝子の片アレル欠損の検出は、実時間PCR法や申請者の開発した短プローブゲノム断片を用いたマイクロアレイCGH法などを用いて、対象とな

る7q上の4遺伝子(*Samd9*, *Samd9L*, *CG-NAP*, *Miki* = LOC253012)に対し、プライマーや検査過程の最適化を進め、検査プロトコルを標準化する。AML1の点変異は広い範囲にわたって散在するので、従来行われてきたSSCP法や、D-HPLC法による変異の検出から、シーケンスによる確認までの作業を効率的かつ漏れなく進められるようにする。このため、プライマーや測定機器の最適化をおこない、標準化された作業工程を確立する。

以上のような方法論で研究をスタートしたが、研究期間中に次世代シーケンサが当研究所に導入された。次世代シーケンサを用いることにより、従来検討が困難であったイントロン領域を含め、点変異を網羅的に解析することが可能である。また、片アレルの欠失に対してもきわめて有用な結果が得られる可能性が高い。したがって、次世代シーケンサを用いた手法も検討課題に加えた。

(2) MDS検体集積事業生体試料への遺伝子情報の付加

最適化作業が終わり次第、50例を当面の目

標に、広島大学原爆放射線医科学研究所(以下、原医研)内に蓄積されている検体や厚生労働省 MDS 検体集積事業(親バンク)より生体試料の提供を受け、(1)で標準化された作業工程に基づき、遺伝子変異を解析する。その情報を親バンクに通知するとともに残余検体を返却する。なお、生体試料は当研究によって得られた遺伝子変異情報を付加された上、一定のルールのもと、研究者や臨床家に広く公開される。

(倫理面への配慮)

本研究で実施される患者検体を用いた遺伝子解析研究は、MDS 細胞の体細胞突然変異を扱う。原医研内に蓄積されている検体は、適正な手続きを進め、広く公開できるような体制を整える。また、MDS 検体集積事業(小澤班・三谷班)の枠組みの中では、平成 16 年文部科学省、厚生労働省および経済産業省告示第 1 号「ヒトゲノム・遺伝子研究に関する倫理指針」や平成 20 年厚生労働省告示第 415 号「臨床研究に関する倫理指針」に基づいた運営が行われている。

C. 研究結果

(1) 遺伝子情報解析手法の開発

7q 片アレル欠失の検出は、実時間 PCR プライマーの最適化を繰り返した結果、高頻度に片アレルの欠失が認められる領域で重点 4 遺伝子を含む 27 遺伝子の欠失が検出できるシステムを確立した。この方法を用いて、89 例について 7q 高頻度欠失領域のゲノムコピー数の情報を得た。

上述したように、次世代シーケンサが使用可能となったため、この先進テクノロジーを本研究課題に適応するための予備実験を行った。次世代シーケンサは全ゲノムシーケンスが可能であるが、費用の面(一検体 500 万円以上)で現実的ではない。そこで、必要なゲノム領域のみを選択し、シーケンスするシステムの構築を行った。7q 領域では、高頻度に欠失が見られる 7.6 メガベースの領域に約 5.8 万個の 120 bp プローブを設定して、DNA を選択できる態勢を整えた。細胞株の DNA を用いたパイロットスタディでは期待通りの純度に濃縮すること

に成功した。AML1 遺伝子周辺についてもプローブの作製を進めている。

(2) 生体試料への遺伝子情報の付加

原医研内に蓄積されている検体に遺伝情報を付加し公開するための承認を広島大学臨床研究倫理審査委員会に申請し(課題名:造血器腫瘍の多段階発がん過程の解析と腫瘍細胞バンクの整備)、承認された(第ヒ-36号、H21.10.19)。(1)で得られたシステムを用い、本報告書の作成時点で 89 例について 7q 欠失情報を得て、検体にゲノム情報を付加した。倫理審査が遅れたため、MDS 検体集積事業(小澤班・三谷班)との連携は断念せざる得なかった。本研究のゴールである、遺伝子情報付きの MDS 検体バンクの充実を図るため、次世代シーケンサによる 7q や AML1 遺伝子周辺のゲノム情報の解析を進めている。

D. 考察

MDS は多彩な遺伝子・エピゲノム異常の蓄積で発症する不均一な疾患群であり、細胞株の樹立も困難であることから、遺伝子情報を付加した生体試料の蓄積は、新治療開発の基盤である。十分な症例数を持った細胞バンクを整備し、研究者に広く公開することは、学術的・国際的・社会的に大きな意義のある事業である。MDS 検体集積事業(小澤班・三谷班)でも、多大な労力を費やして細胞バンクの整備をおこなっている。

今回の研究では、最善の効率を目指して遺伝子異常検索システムを構築し、それを用いて得た遺伝情報を原医研内に蓄積された検体に付加し、目標症例数を大幅に上回るサンプルが公開可能になった。

次世代シーケンサは、長大な領域のゲノム情報を読み取ることができるのみならず、遺伝子コピー数も計測することが可能であるという点で、従来の技術的な制約を打ち破る、大きな飛躍の可能性を秘めたテクノロジーである。この機器の細胞バンク整備への応用にとって最大の隘路は、コスト高であり、例えば全ゲノム配列を決定して登録することなどは、1 検体 500 万円を超えるそのコストを考慮すると、現時点では全

く現実的ではない。そこで、ゲノム領域や遺伝子領域を絞った解析システムの構築をすすめている。

原医研は平成 22 年 4 月から全国共同利用・共同研究拠点として再発足した。このため、遺伝子情報を付加した MDS 検体の公開は、共同利用・共同研究事業の一環として行われることになる(参考資料添付)。

E. 結論

遺伝子・エピゲノム異常の情報を付加した MDS 検体バンクの構築を行ない、広く研究者・臨床家へ提供するという当初の目的は達成されたが、次世代シーケンサを用いたシステムの拡張を念頭に、細胞バンクのさらなる整備を進めている。

F. 健康危険情報 該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Asou H., Matsui H., Ozaki Y., Nagamachi A., Nakamura M., Aki D., Inaba T. Identification of a common microdeletion cluster in 7q21.3 subband among patients with myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 383(2): 245-251,2009
2. Nagamachi A., Yamasaki N., Miyazaki K., Oda H., Miyazaki M., Honda Z-i., Kominami R., Inaba T., Honda H. Haploinsufficiency and acquired loss of *Bcl11b* and *H2AX* induced blast crisis of chronic myelogenous leukemia in a transgenic mouse model. **Cancer Sci.** 100: 1219-1226, 2009
3. Okuya M., Kurosawa H., Kikuchi J., Furukawa Y., Matsui H., Aki D., Matsunaga T., Inukai T., Goto H., Altura R. A., Sugita K., Arisaka O., Look A. T., Inaba T. Upregulation of survivin by the E2A-HLF chimera is indispensable for the survival of t(17;19)-positive leukemia cells. **J. Biol. Chem.** 285: 1850-1860,

2010

4. Yamasaki N., Miyazaki K., Nagamachi A., Koller R., Oda H., Miyazaki M., Sasaki T., Honda Z, Wolff L., Inaba T., Honda H. Identification of *Zfp521/ZNF521* as a cooperative gene for *E2A-HLF* to develop acute B-lineage leukemia. **Oncogene**, *in press*
5. Akahane K., Inukai T., Inaba T., Kurosawa H., Look A.T., Kiyokawa N., Fujimoto J., Goto H., Endo M., Zhang X., Hirose K., Kuroda I., Honna H., Kagami J., Goi K., Nakazawa S., and Sugita K. Specific induction of CD33 expression by E2A-HLF: the first evidence for aberrant myeloid antigen expression in ALL by a fusion transcription factor. **Leukemia**, *in press*
6. Hirose K., Inukai T., Kikuchi J., Furukawa Y., Ikawa T., Kawamoto H., Oram S.H., Göttgens B., Kiyokawa N., Miyagawa Y., Okita H., Akahane K., Zhang X., Kuroda I., Honna H., Kagami K., Goi K., Kurosawa H., Look A.T., Matsui H., Inaba T., Sugita K. Aberrant induction of LMO2 by the E2A-HLF chimeric transcription factor and its implication in leukemogenesis of B-precursor ALL with t(17;19). **Blood**, *in press*

2. 学会発表

1) 国内

口頭発表 5 件

そのうち主なもの

松井啓隆、長町安希子、尾崎佑子、安藝大輔、麻生博也、本田浩章、稲葉俊哉：7q 欠失責任遺伝子候補 Titan の機能解析：アクチンリモデリング活性化と古典的 wnt 経路抑制による造血細胞 第 71 回日本血液学会学術集会(京都) 臨床血液 50; 941, 2009

2) 海外

口頭発表 1 件

そのうち主なもの

Matsui H, Nagamachi A, Ozaki Y, Aki D,

Honda H, Inaba T. Loss of *Titan (Samd9L)*, a candidate -7/7q- responsible gene encoding an actin remodeling regulator, develops MDS/AML in cooperation with *Evi1* or *Fbxl10*
第 51 回米国血液学会 (New Orleans)
2009.12.7

H. 知的財産権の出願・登録状況
該当なし

II. 参 考 資 料

平成21年11月1日

関係各教育・研究機関の長 殿

広島大学原爆放射線医科学研究所長
神谷 研二〔公印省略〕

平成22年度 共同利用・共同研究の募集について

広島大学原爆放射線医科学研究所は、昭和36年に設置以来、原子爆弾やその他の放射線による急性及び晩発障害の研究に加え、放射線被ばく者の疾病の診断・治療法の開発や放射線防護システムの確立といった広範な研究を行って参りました。最近では、ゲノム医学的研究手法による放射線障害研究と、急性障害に対する治療開発を目指した再生医学的研究も実施しております。

本研究所は、この度、文部科学大臣より放射線影響・医科学分野の共同利用・共同研究拠点として認定を受けました。これを受け、本研究所は、平成22年度よりこれまで蓄積した研究成果・資料や研究技術、及び関連情報を公開し、先端的な各種研究施設・器機を用いた共同利用・共同研究を推進することに致しました。

つきましては、下記のとおり「重点プロジェクト研究課題」の共同利用・共同研究を募集いたしますので、貴機関所属の研究者等に周知方よろしくお願いいたします。

なお、重点プロジェクト研究課題以外の共同研究も歓迎いたします。

記

1. 重点プロジェクト研究課題

- (1) ゲノム損傷修復の分子機構に関する研究
- (2) 低線量放射線の影響に関する研究
- (3) 放射線発がん機構とがん治療開発に関する研究
- (4) 放射線災害医療開発の基礎的研究
- (5) 被ばく医療の改善に向けた再生医学的基礎研究
- (6) 被ばく者の健康影響と放射線リスク評価研究

2. 申請資格：平成22年4月1日の時点で、大学・研究機関の研究者、大学院生又はこれらに相当する方（見込みを含む。）

3. 研究期間：平成22年4月1日から平成23年3月31日までの1年間

4. 提出書類：円滑な研究活動が可能となるようあらかじめ所内の受入研究者と連絡を取ったうえ、

1) 共同利用・共同研究申請書（様式1）、

2) 所属機関長の承諾書（様式2）、

3) 原医研受入研究員の承諾書（様式3）

をご提出ください。

4. 申請締切：平成22年2月1日（月）（必着のこと）

5. 採 否：当研究所運営委員会の議を経て所長が採否を決定し、平成22年3月末日までに申請者に連絡します。

6. 所要経費：重点プロジェクト研究課題として採択された共同研究のうち、審査により100万円を上限として経費を負担します。

7. その他：採択課題は期間終了時に「成果報告書」を代表者から提出していただきます。報告書の記載要領などについては、後日連絡いたします。知的財産権の取り扱いにつきましては、広島大学共同研究取扱規則に準じます。

本研究所については、ホームページ（<http://www.rbm.hiroshima-u.ac.jp/index-j.html>）をご参照ください。

申請様式も同ホームページよりダウンロードしてお使いください。

送 付 先：〒734-8553

広島市南区霞一丁目2番3号

広島大学原爆放射線医科学研究所事務室

（封筒に「共同利用・共同研究申請書在中」と記載のこと）

問合せ先：TEL 082-257-1515

FAX 082-255-8339

E-mail : bimes-gen-sen@office.hiroshima-u.ac.jp

* 受付番号

広島大学原爆放射線医科学研究所 共同利用・共同研究申請書

平成 年 月 日

広島大学原爆放射線医科学研究所長 殿

申請者

代表者氏名
所属機関
所属部局
住 所 〒
電 話
F A X
e-mail

下記のとおり申請します。

1. 共同研究課題名				新規・継続 (○を付してください)					
2. 研究課題種目	重点(1)	重点(2)	重点(3)	重点(4)	重点(5)	重点(6)	自由研究	(いずれかに○を付してください)	
3. 共同研究期間	平成 年 月 日 ~ 平成 年 月 日								
4. 研究組織	氏 名	所属機関・部局			職 名				
	代表者								
	共同研究者								
	〃								
	〃								
	〃								
	原医研受入研究者								
5. 共同研究の目的・計画									
6. 共同研究の実施内容(使用する設備等の具体的な使用方法等)									
<p>下記について明記願います。</p> <p>※動物実験 : 該当あり ・ 該当なし</p> <p>※組換えDNA実験 : 該当あり ・ 該当なし</p> <p>※放射線同位元素等(γ線等放射線照射装置を含む) : 使用する ・ 使用しない</p> <p>※倫理委員会承認 : 該当あり ・ 該当なし</p>									

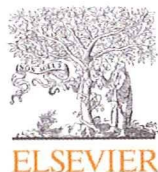
7. 期待される成果															
8. 利用する設備等 ※ 使用するものに○を付してください。															
(1)	放射線先端医学実験施設	放射線実験系	ガンマセル照射装置	低線量率 ガンマ線照射装置	紫外線レーザーマイ クロ照射システム	その他									
		動物実験系	トランスジェニックマウス	ノックアウトマウス	一般飼育室	特殊飼育室									
		遺伝子実験系	プロテオーム解析装置	三次元タイムラプス画像構築取込システム	フローサイトメーター	次世代シーケンサー									
(2)	原爆被爆者データベース (ABS)		被爆者の年齢、性別、住所、被爆状況等のデータベース												
	附属国際放射線情報センター所蔵文献資料		新聞切り抜き記事	原爆被爆関連図書	米国陸軍病理学研究所よりの返還資料	その他									
	研究材料		原爆被爆者細胞	ヒト放射線感受性細胞	遺伝子改変マウス	その他									
9. 来所計画															
区分	氏名	職名	来所回数	実験希望時期 ※ 希望する月に日数を記入してください。											
				4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	1月	2月	3月
代表者			回												
共同研究者			回												
〃			回												
〃			回												
〃			回												
10. 準備状況(原医研受入研究者との連絡状況、組換えDNA実験・動物実験の有無、放射線作業従事者登録の有無、倫理委員会承認の有無)															

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻・号	ページ	出版年
Asou H., Matsui H., Ozaki Y., Nagamachi A., Nakamura M., Aki D., Inaba T.	Identification of a common microdeletion cluster in 7q21.3 subband among patients with myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome.	Biochem. Biophys. Res. Commun.	383(2)	245-251	2009
Nagamachi A., Yamasaki N., Miyazaki K., Oda H., Miyazaki M., Honda Z-i., Kominami R., Inaba T., Honda H.	Haploinsufficiency and acquired loss of <i>Bcl11b</i> and <i>H2AX</i> induced blast crisis of chronic myelogenous leukemia in a transgenic mouse model.	Cancer Sci.	100	1219-1226	2009
Okuya M., Kurosawa H., Kikuchi J., Furukawa Y., Matsui H., Aki D., Matsunaga T., Inukai T., Goto H., Altura R. A., Sugita K., Arisaka O., Look A. T., Inaba T.	Upregulation of survivin by the E2A-HLF chimera is indispensable for the survival of t(17;19)-positive leukemia cells.	J. Biol. Chem.	285	1850-1860	2010
Yamasaki N., Miyazaki K., Nagamachi A., Koller R., Oda H., Miyazaki M., Sasaki T., Honda Z, Wolff L., Inaba T., Honda H.	Identification of <i>Zfp521/ZNF521</i> as a cooperative gene for <i>E2A-HLF</i> to develop acute B-lineage leukemia.	Oncogene			<i>in press</i>
Akahane K., Inukai T., Inaba T., Kurosawa H., Look A.T., Kiyokawa N., Fujimoto J., Goto H., Endo M., Zhang X., Hirose K., Kuroda I., Honna H., Kagami J., Goi K., Nakazawa S., and Sugita K.	Specific induction of CD33 expression by E2A-HLF: the first evidence for aberrant myeloid antigen expression in ALL by a fusion transcription factor.	Leukemia			<i>in press</i>
Hirose K., Inukai T., Kikuchi J., Furukawa Y., Ikawa T., Kawamoto H., Oram S.H., Göttgens B., Kiyokawa N., Miyagawa Y., Okita H., Akahane K., Zhang X., Kuroda I., Honna H., Kagami K., Goi K., Kurosawa H., Look A.T., Matsui H., Inaba T., Sugita K.	Aberrant induction of LMO2 by the E2A-HLF chimeric transcription factor and its implication in leukemogenesis of B-precursor ALL with t(17;19).	Blood			<i>in press</i>



Identification of a common microdeletion cluster in 7q21.3 subband among patients with myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome

Hiroya Asou, Hirotaka Matsui, Yuko Ozaki, Akiko Nagamachi, Megumi Nakamura, Daisuke Aki, Toshiya Inaba *

Department of Molecular Oncology and Leukemia Program Project, Research Institute for Radiation Biology & Medicine, Hiroshima University, 1-2-3 Kasumi, Minami-ku, Hiroshima 734-8553, Japan

ARTICLE INFO

Article history:

Received 31 March 2009

Available online 7 April 2009

Keywords:

Monosomy 7

Myeloid malignancy

Tumor suppressor

Mitosis

ABSTRACT

Monosomy 7 and interstitial deletions in the long arm of chromosome 7 ($-7/7q-$) is a common non-random chromosomal abnormality found frequently in myeloid disorders including acute myeloid leukemia (AML), myelodysplastic syndrome (MDS), and juvenile myelomonocytic leukemia (JMML). Using a short probe-based microarray comparative genomic hybridization (mCGH) technology, we identified a common microdeletion cluster in 7q21.3 subband, which is adjacent to 'hot deletion region' thus far identified by conventional methods. This common microdeletion cluster contains three poorly characterized genes; *Samd9*, *Samd9L*, and a putative gene *LOC253012*, which we named *Miki*. Gene copy number assessment of three genes by real-time PCR revealed heterozygous deletion of these three genes in adult patients with AML and MDS at high frequency, in addition to JMML patients. *Miki* locates to mitotic spindles and centrosomes and downregulation of *Miki* by RNA interference induced abnormalities in mitosis and nuclear morphology, similar to myelodysplasia. In addition, a recent report indicated *Samd9* as a tumor suppressor. These findings indicate the usefulness of the short probe-based CGH to detect microdeletions. The three genes located to 7q21.3 would be candidates for myeloid tumor-suppressor genes on 7q.

© 2009 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

Monosomy 7 and interstitial deletions in 7q ($-7/7q-$) are a common nonrandom chromosomal abnormality found frequently in myeloid disorders. In 1964, prior to chromosome band identification, monosomy 7 was first reported in three patients with refractory anemia as monosomy of a C-group chromosome [1]. Since that time, $-7/7q-$ have been identified in 10–20% of a wide range of myeloid malignancies including MDS, AML, and JMML [2].

Enormous efforts have been made to identify genes responsible for $-7/7q-$. In the absence of definitive familial cases, the basic strategy for gene hunting began with identifying patients that carried 7q-. Detailed maps of regions deleted from individual patients were then generated from the results of loss of heterogeneity assays or fluorescence *in situ* hybridization. Unfortunately, the cumulative results from thousands of patients were confounded by the fact that the boundaries of commonly deleted regions derived by separate research groups showed a poor degree of overlap [3].

Currently, it is generally accepted that two or more genes near bands 7q22 and/or 7q34 are involved in myeloid tumors.

Microarray-based comparative genomic hybridization (mCGH) technology allows efficient detection of microdeletions (<100 kb) that affect one or a few genes, enabling to search for small 7q deletions that are not visible cytogenetically in marrow cells of MDS/AML patients. Initially, bacterial artificial chromosome (BAC)-based mCGH systems were developed, but this system had limited potential to detect microdeletions because of the long probe size (>100 kb). Thereafter, SNP-array hybridization turned out to be a powerful method for detecting not only single nucleotide polymorphism, but also microdeletions [4]. However, because SNPs tend to cluster within introns and intergenic spaces, SNP-array may bias against the detection of microdeletions in critical genes.

Here, we describe the application of a modified BAC-based mCGH system that uses short (<10 kb) genomic DNA fragments without any repetitive sequences as probes to improve the detection of small deletions and reduce background hybridization. Because repeat-free fragments generally overlap exon-containing regions, this type of probe not only yields a high signal/noise ratio, but also can be useful in determining the copy number of a corresponding gene. Using this system for identification of responsible gene(s) for $-7/7q-$, we report the isolation of a common microde-

* Corresponding author. Fax: +81 82 256 7103.

E-mail address: tinaba@hiroshima-u.ac.jp (T. Inaba).

letion among JMML patients that contains three poorly characterized genes.

Materials and methods

Short probe-based mCGH. This system was similar to that described by others [5]. Briefly, total 292 repeat-free segments (2.7–9.5 kb) were identified using BlastN at the NCBI server (235 probes in 7q21.2–7q31.1, 15 in 4q12, 27 in 20q, and 15 in 21q). Each of these fragments was PCR amplified from human placenta DNA (Clontech, Mountain View, CA) and cloned into the pCR-XL-TOPO vector (Invitrogen, Carlsbad, CA). The primer sets used to amplify probes #14–#16 are listed in Table 1. Sequences of other primer sets are available upon request. Five micrograms of each target DNA, PCR-amplified fragments using universal primers in the vector, was printed on poly-L-lysine coated glass slides (Matsunami Glass, Osaka, Japan) using a spotter (SPBIO, Hitachi Software, Tokyo, Japan). Bone marrow samples were obtained after informed consent and approval from the Institutional Review Board at Hiroshima University. Test samples and reference placenta DNA (2.5 µg) were random-prime labeled with CY3- and CY5-dCTP (GE healthcare), respectively, and then hybridized to the slide. Scanning of microarrays was performed using G2505A scanner (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) and signals were analyzed with ArrayVision (GE healthcare).

Cell culture and gene transfer. EOL-1 and MUTZ-3 cells ([6] and references in it) were cultured in RPMI1640 medium with 10% (FBS). 293 and HeLa(tc) [7] cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS). siRNA oligonucleotides (100 nM, otherwise indicated, Table 2) were transfected using Oligofectamine (Invitrogen). C-terminal FLAG-tagged Miki α or β protein, or Miki Δ N-FLAG(C) protein (lacking N-terminal hydrophobic 30 aa of Miki β) was expressed using the pcDNA3 expression vector (Invitrogen).

Other experimental procedures and reagents. Copy number assessment by qPCR was performed according to the procedure described [8]. qRT-PCR was performed as previously described [9] using primer sets (Table 1). Immunoprecipitation and immunoblot analyses were performed according to the standard procedures [10] using 2% gelatin as a blocking agent. Immunostaining and image analyses were performed as described [7,11]. Rabbit anti-Miki antibodies was raised against GST-Miki α (377–462 aa) and affinity purified according to the standard procedures [10].

Table 2

Target sequences for RNAi.

Name	Sequence
siRNA#79	CGGUUGAUGAUCCUGUCAC
siRNA#80	GGAAGACAUUGGAAUUC
siRNA#81	AGGCAUUUAUGCAAAUUGAA
shMiki#1	AUGCAUCUCUGCUUUAUACAC
shMiki#2	GAAGGCAUUUAUCUUGAAG
shMiki#3	UCAGGAAAUGGAACUCUAUC
shMiki#4	AGAAGACAAUGGACUAUGUGU
shMiki#5	GAAACUCAUUUCACAGUUAUC
shMiki#6	UGACUUCGAAUUAUGAAUU

Results

Identification of three candidate myeloid tumor-suppressor genes in a common microdeletion cluster among JMML patients

Two hundred thirty-five probes in a region spanning 21.7 Mb within 7q21.2–7q31.1 and additional 57 control probes in 4q, 20q, and 21q were applied to a search for microdeletions using a short probe-based mCGH system (see Materials and methods). Test (leukemia) and reference DNA samples were labeled with CY3- and CY5-dCTP, respectively, and then hybridized to slides on which probes were printed.

We initially tested whether this system can detect copy number changes in a small region. Genomic DNA extracted from EOL-1 cells, which is known to harbor a deletion spanning 800 Kb between the *Rhe* (*FIP1L1*) gene and the *PDGF α* gene in 4q [12]. All eight probes (#239–#246) that locate within the deletion showed low fluorescence ratios (Fig. 1A, bracket), demonstrating the potential of this system to detect microdeletions. For detection of microdeletion in myeloid leukemia cells, we selected fresh bone marrow samples from adult AML/MDS patients or DNA from myeloid leukemia cell lines that did not show apparent 7q abnormalities. However, as shown, for an example, in Fig. 1B, gross regional copy number changes were still detected, and 'single copy events', which could include both real copy number changes in a small region and noise of the system, were frequently observed, recognized as general problems in detection of microdeletions in leukemia cells [13]. We then applied the microarray CGH system to samples from JMML patients, which is a subtype of MDS and is occasionally associated with monosomy 7 [2]. In contrast to adult MDS/AML pa-

Table 1
Primer sets.

	Forward	Reverse
Probe#14	5'-AACTTCTCTGACTCCAGTCATAGCTCCTT-3'	5'-ATCCATAGACCTGACATGTGTATCATATCC-3'
Probe#15	5'-GTGGGAATCGTCTACTTCTGCCTCAAGA-3'	5'-TGATTAAGACTGGACCAAGAGCATGTGA-3'
Probe#16	5'-TGCTCACTCAACCGAAATCAATATTGAGAT-3'	5'-ATGCTTTAGGCTCTAAGCCTTCTTCTTCTT-3'
Top2b	5'-CAACTTTTTGTGGCATCTG-3'	5'-GCTGGAATGTCTGGAAAAGC-3'
Tel	5'-ACAAATCACCGCCTTCTCTGACCC-3'	5'-GGCTGGATGGCTTCGGTGGGACTC-3'
Albumin	5'-AGCTATCCGTGGTCTGAAC-3'	5'-TTCTCAGAAAGTGTGCATATATCTG-3'
c7orf16	5'-CAGGCCAGCCTCGGTGAGC-3'	5'-GCACAACCCCTGGCCACCAG-3'
DDC	5'-CTCATGGCTCACCGTCCAG-3'	5'-CAAGCCGACCTAGGTGGTG-3'
Cdk6	5'-ACACTGCCTTGTGGCAAAG-3'	5'-AGGTTTGCAGAATCGAGGCC-3'
Samd9-5'	5'-AACCCAGATATGGCTAATCC-3'	5'-CAGGCTATGGATGGTTGCC-3'
Samd9-3'	5'-CGTTTACAAGGTCGAGCTGA-3'	5'-CCCAGTAAAAAGACACCTT-3'
Samd9L	5'-CATTCTGTGCTTCTCCTTG-3'	5'-GGATTCCGGGATCTCATGCA-3'
Miki-5'	5'-CCTGGTGAGGAACCTGTCA-3'	5'-TCTCTGTGACTATCCTGGGA-3'
Miki-3'	5'-CAAGGCATTCGGTTTGAAG-3'	5'-CTCTGGTGAAGCAGAATCT-3'
CCDC132	5'-AGGATACCCCTGGGTCGGCTC-3'	5'-TTACCCGCCCGGACTTACC-3'
Col1A2	5'-GCAGTAACCTTATGCTAGC-3'	5'-GAGAGTCTGCCCTCCAAGTG-3'
Rint-1	5'-GCTGAGTATGTCTGTTGAAG-3'	5'-CCAACTAGATACAGGTGCC-3'
Lep	5'-GTATCTCCAGGATTGAAGAG-3'	5'-CCCACCTTTGCTGGGTGA-3'
Miki(RT)	5'-AACTCTATCTCCAGTCAGAAG-3'	5'-TTTAGCCATTGGTAAGCTAGCC-3'
HPRT(RT)	5'-CCTCATGGACTAATTATGGACAG-3'	5'-GCAGGTCAGCAAGAATTTATAG-3'

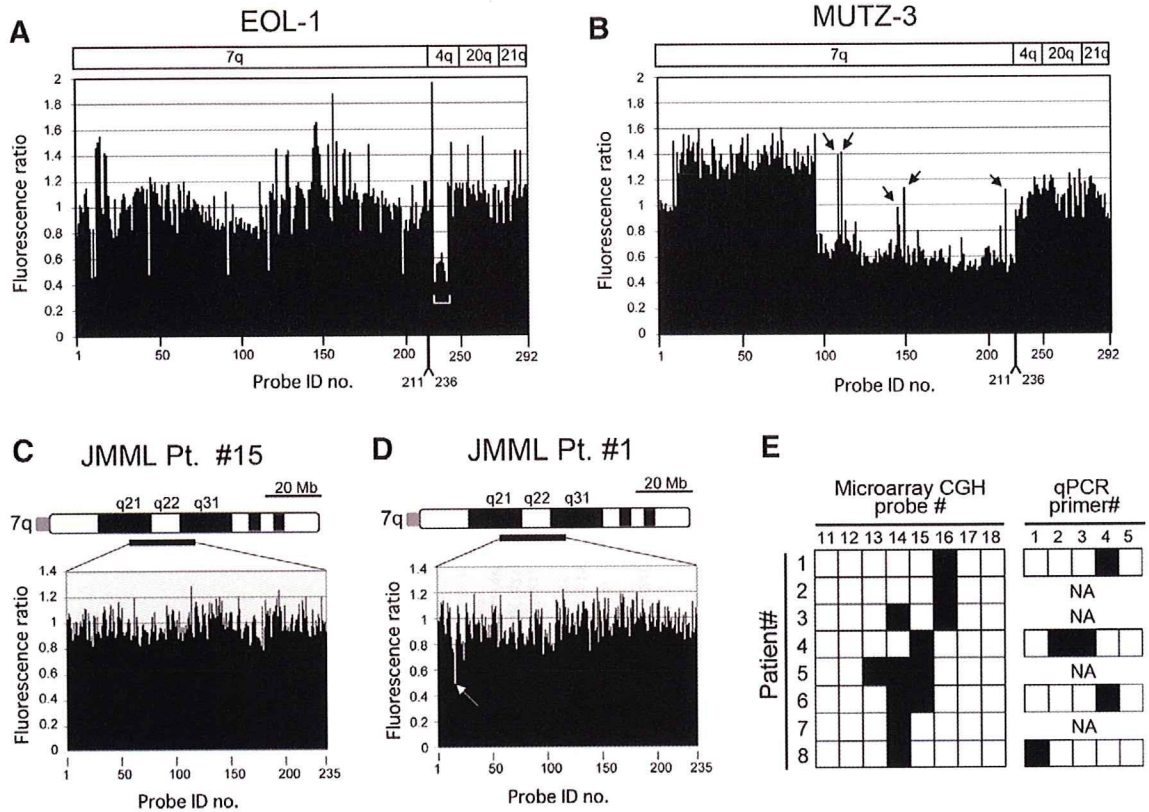


Fig. 1. Detection of microdeletions. (A–D) Profiles of short probe-based mCGHs. Normalized average fluorescence ratios by control placenta DNA (Y-axis) were derived from three replicates for each probe (X-axis). EOL-1 cells (A) which show reduced signals from eight probes located in a 4q12 microdeletion (bracket). A monocytic leukemia cell line MUTZ-3 (B); arrows indicate isolated copy number changes. JMML patients #15 (C) and #1 (D); an arrow shows reduced signals with probe #16. (E) Deletion profile summary for eight JMML patients using microarray CGH probes (#11–#18, left) and qPCR primer sets (#1–#5, right). Black boxes indicate a deletion in one allele. NA, samples not available.

tients and cell lines, JMML patients mostly carried no gross regional copy number changes nor single copy events (Fig. 1C). However, three contiguous probes (#14–#16) in the 7q21.2–21.3 subband were repeatedly found to show a low fluorescence ratio (Fig. 1D). In eight of the 21 JMML patients with normal karyotype, at least one of these three probes detected a microdeletion in one allele (Fig. 1E, left), suggesting that a region containing these probes is deleted frequently in JMML.

Three contiguous genes (*Samd9*, *Samd9L*, and *LOC253012*) identified by the human genome sequencing consortium (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) were found to overlap probes #14–#16, respectively (Fig. 2A). This region does not contain any known copy number polymorphisms (CNPs) [14], nor does it represent any microRNA sequence in miRBase [15] (<http://microrna.sanger.ac.uk/>).

To confirm the presence of a microdeletion cluster in chromosome 7 of JMML patients, we prepared five primer sets for real-time quantitative PCR analyses (qPCR) that efficiently amplify DNA fragment to allow estimating the copy number of each of these three genes (Fig. 2A) [8]. One allele loss of either one of the three genes was detected in all four patients whose DNA samples were available (Fig. 1E, right). We then extended the qPCR copy number assessment to 65 adult AML or MDS patients with diploid or near-diploid karyotype using the five primer sets for the three genes and additional sets for control genes on chromosome 7 and other chromosomes (Fig. 2B). Nearly 25% (15/61) of patients showed loss of one allele in at least one of the three genes (Fig. 2C), indicating that these three genes are heterozygously deleted at high frequency in both adult and childhood myeloid leukemia. In contrast to the chromosome 7 microdeletions among JMML

patients (Fig. 1D), these three genes are more commonly lost with larger deletions in adult MDS/AML patients (Fig. 2D).

Miki-downregulation induced mitotic arrest and abnormal nuclear morphology

Among the three genes, we named a putative gene *LOC253012 Miki* (mitotic kinetics regulator), because of the function of the gene product described below. Candidate *Miki* orthologues were identified in other vertebrates by search of Ensemble Genome Browser (<http://www.ensembl.org/index.html>), but not in invertebrates, plants, yeast, or prokaryotes. *Miki* transcript was detected on a Northern blot as a single 2.6 kb band in kidney and small intestine RNA with very weak signals, suggesting relatively low expression (data not shown). However, two alternatively splicing *Miki* messages, *Miki* α (*LOC253012* transcript variant-1, Genbank Accession No. NM_001039372) and *Miki* β (variant-2, NM_198151), which are derived from separate first coding exons (1a and 1b, Fig. 2A), were readily amplified by RT-PCR analyses of all examined organs (data not shown). *Miki* α and *Miki* β transcripts encode distinctive 26- and 14-amino acid (aa) N-termini, respectively, which precede the same 436-aa C-terminal sequence (Fig. 3A).

Both *Miki* polypeptides encode three domains suggestive of cell surface proteins: an N-terminal hydrophobic region, a central region homologous to the immunoglobulin superfamily cell adhesion molecule, and a transmembrane domain-like region. Unexpectedly, immunostaining of HeLa cells using antibodies against the C-terminus of *Miki* showed an intense signal in the perinuclear re-

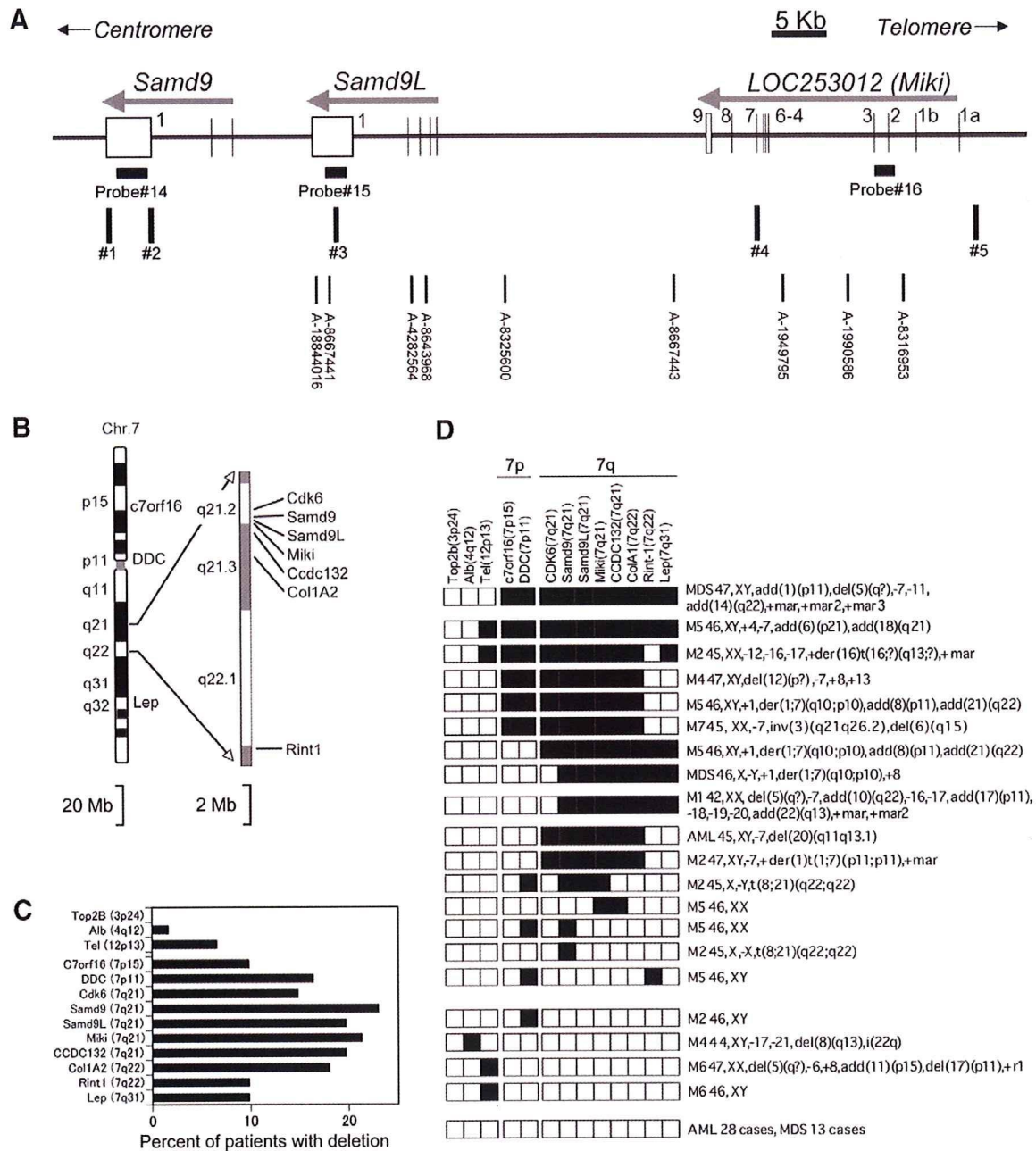


Fig. 2. Isolation of *Samd9*, *Samd9L*, and *Miki*. (A) A map of 7q21.3. The relative locations of exons for the three genes are depicted as boxes with coding exon numbers above. The positions of probes used in MCGH (#14–#16) and primer sets used for qPCR (#1–#5) are shown below. The positions of SNP probes in a SNP-array system (Genome-Wide SNP6.0) are also shown (bottom). (B–C) Percent of patients with adult MDS/AML (C) who lack one allele of each of the genes indicated in the diagram (C). Results of qPCR study (C). (D) Deletion profile summary of qPCR data from adult MDS/AML patients. Each column of boxes corresponds to results from a patient whose diagnosis and karyotype are indicated in the right. Black boxes indicate a deletion in one allele.

gion (Fig. 3B, left), which co-localized with Golgi-markers such as Golgin-97 in the interphase (middle). In mitosis, Miki immunostaining localized to centrosomes/spindles (right).

Miki seems to be modified post-translationally in a complex way. Four major bands were detected in immunoblots of 293-cell extracts with anti-Miki antibody (Fig. 3C, lane 1). The migration of the fastest band agreed with the predicted molecular mass (50 kDa). In contrast, transient expression of plasmid pcDNA3-Mikiβ-FLAG(C) generated C-terminal FLAG-tagged Mikiβ proteins that migrated as a broad band between 75 and 95 kDa (lane 2). Because peptide N-glycosidase F (PNGaseF) treatment of immunoprecipi-

tated products from the transfected cells altered the migration of these bands to 50 kDa (lanes 3–5). Treatment of transfected cells with tunicamycin, a glycosylation inhibitor, also shifted the broad band to 50 kDa (lanes 6–7), suggesting that this broad band represents glycosylated forms of Miki. In transfected cells, exogenously expressed Mikiα protein also migrated as a broad band (lane 8); however, expression of MikiΔN-FLAG(C) (which lacks the N-terminal hydrophobic region) produced only one band that migrated slightly faster than p50 (lane 9), suggesting that Miki's N-terminal region functions as a signal peptide. The same blot analyzed with anti-FLAG antibody confirmed the identities of the broad band of

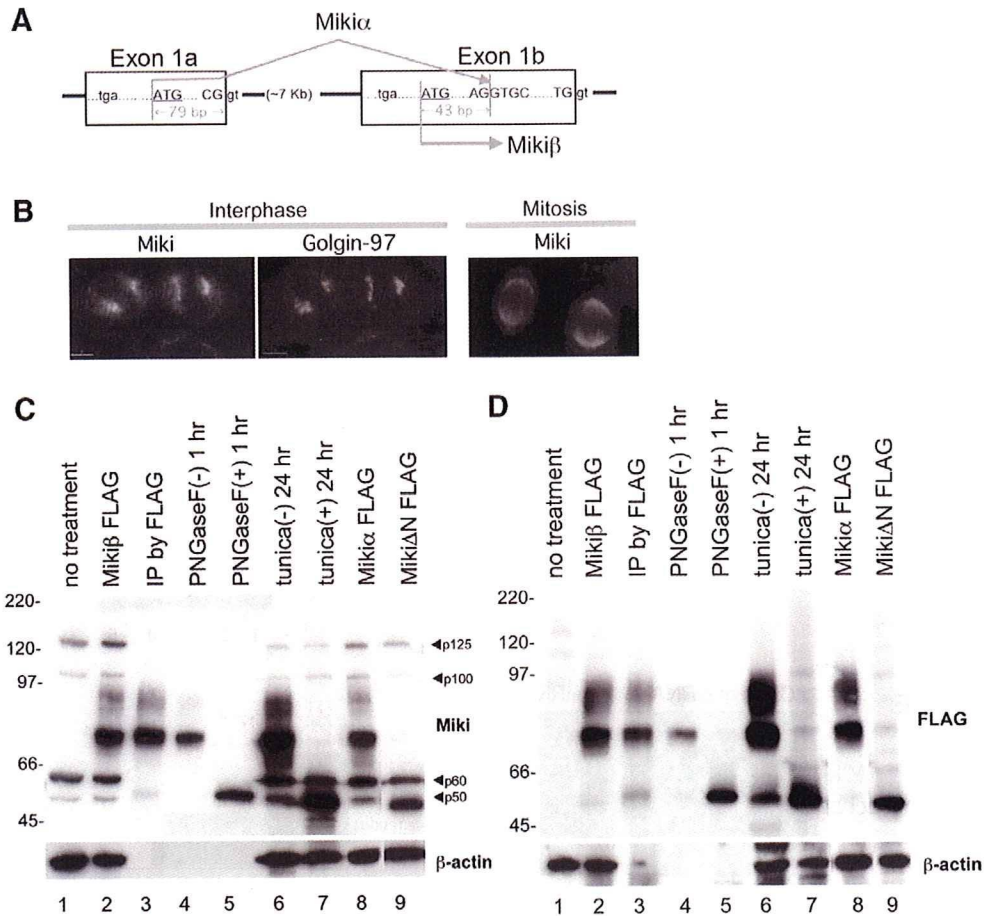


Fig. 3. Expression and localization of Miki. (A) Diagram of *Miki* gene structure. The initiation codon for Miki α or Miki β is located in exon 1a or 1b, respectively. The Miki α transcript is spliced using a cryptic splice acceptor in exon 1b. Exons 1a and 1b both encode *in frame* stop codons (tga) upstream of the initiation codons. The 5' ends of exons 1a and 1b have not yet been determined. (B) Immunostaining of HeLa cells with Miki (FITC) and Golgin-97 (PE). Interphasic (left and middle), and mitotic cells (right). (C,D) Immunoblot analysis using Miki (C, top), FLAG (D, top) or β -actin (bottom) antibodies. Lane 1, untreated 293 cells; lane 2, cells transfected with pcDNA3-Miki β -FLAG(C); lane 3, anti-FLAG immunoprecipitates of cells transfected with pcDNA3-Miki β -FLAG(C); lanes 4–5, anti-FLAG immunoprecipitates incubated for 1 h in the absence or presence of PNGaseF; lanes 6–7, cells transfected with pcDNA3-Miki β -FLAG(C) cultured in the absence or presence of tunicamycin (1 μ g/ml); lanes 8–9, cells transfected with pcDNA3-Miki α -FLAG(C) or pcDNA3-Miki Δ N-FLAG(C).

exogenous Miki protein (Fig. 3D, lanes 2–3, 6, 8), as well as deglycosylated Miki (lanes 5, 7) or Miki Δ N protein (lane 9).

Because transient expression of Miki from a variety of virus-derived or eukaryotic promoters resulted uniformly in glycosylated protein, we predict that exogenously expressed Miki is altered by cryptic glycosylation events. In view of these results with Miki overexpression, we applied RNA interference to downregulate endogenous Miki. Six candidate Miki-specific short hairpin RNA (shRNA) sequences were selected and corresponding shRNA-expressing vectors [piGENE-mU6(neo)-hMiki#1–#6] were prepared. Immunoblot analysis of 293 cells co-transfected with pcDNA3-Miki β -FLAG(C) and each one of the six shRNA-expressing vectors demonstrate that three shRNAs (#1, #3, and #6) downregulated levels of glycosylated Miki efficiently (Fig. 4A). When cells were transfected with the shRNA-expressing vectors alone, shRNAs expressed from piGENE-mU6(neo)-hMiki#1, #3, or #6 also downregulated steady-state levels of endogenous Miki p125 and p50 (and p100 and p60 less effectively) (Fig. 4B).

In an alternate experiment, three Miki-based short interference RNAs (siRNAs) reduced steady-state levels of Miki mRNA to varying degrees when transfected directly into 293 cells (Fig. 4C). Immunoblots prepared from these cells showed that the intensities of Miki p125 and p50 signals (and p100 and p60 less effectively)

were attenuated within 48 h of transfection with siRNA#79 or siRNA#80 (Fig. 4D), but not by siRNA#81 and control siRNA. These observations indicated that the p50 represents the unmodified Miki and that p125 could be a post-translationally modified Miki protein, although additional experiments for confirmation are required. Also demonstrated was that siRNA#79 and #80, as well as shRNA#1 efficiently downregulate Miki expression.

To elucidate function of Miki, HeLa cells were treated with siRNA#80 for 48 h. Mitotic cells increased from 3% (control siRNA-treated cells) to 12%, suggesting that Miki-downregulation causes mitotic arrest. As expected, Miki staining decreased significantly in cells treated with siRNA#80 (Fig. 4E, left and middle), and showed disorganized spindle formation (middle). Hoechst 33342 staining revealed scattered chromosomes (middle), which is clearly distinguishable from normal prometaphase by wide and irregular distribution of chromosomes. These abnormal prometaphases were observed in 15–43% of mitotic cells treated with either siRNA#79 or siRNA#80 (Fig. 4E, right). In contrast, cells treated with control siRNA rarely (<2%) showed scattered chromosomes. Miki-downregulation also affects nuclear morphology. Cultures of HeLa cells which stably expressed shRNA#1 frequently (approximately 20%) contained more than two nuclei (Fig. 4F, left).

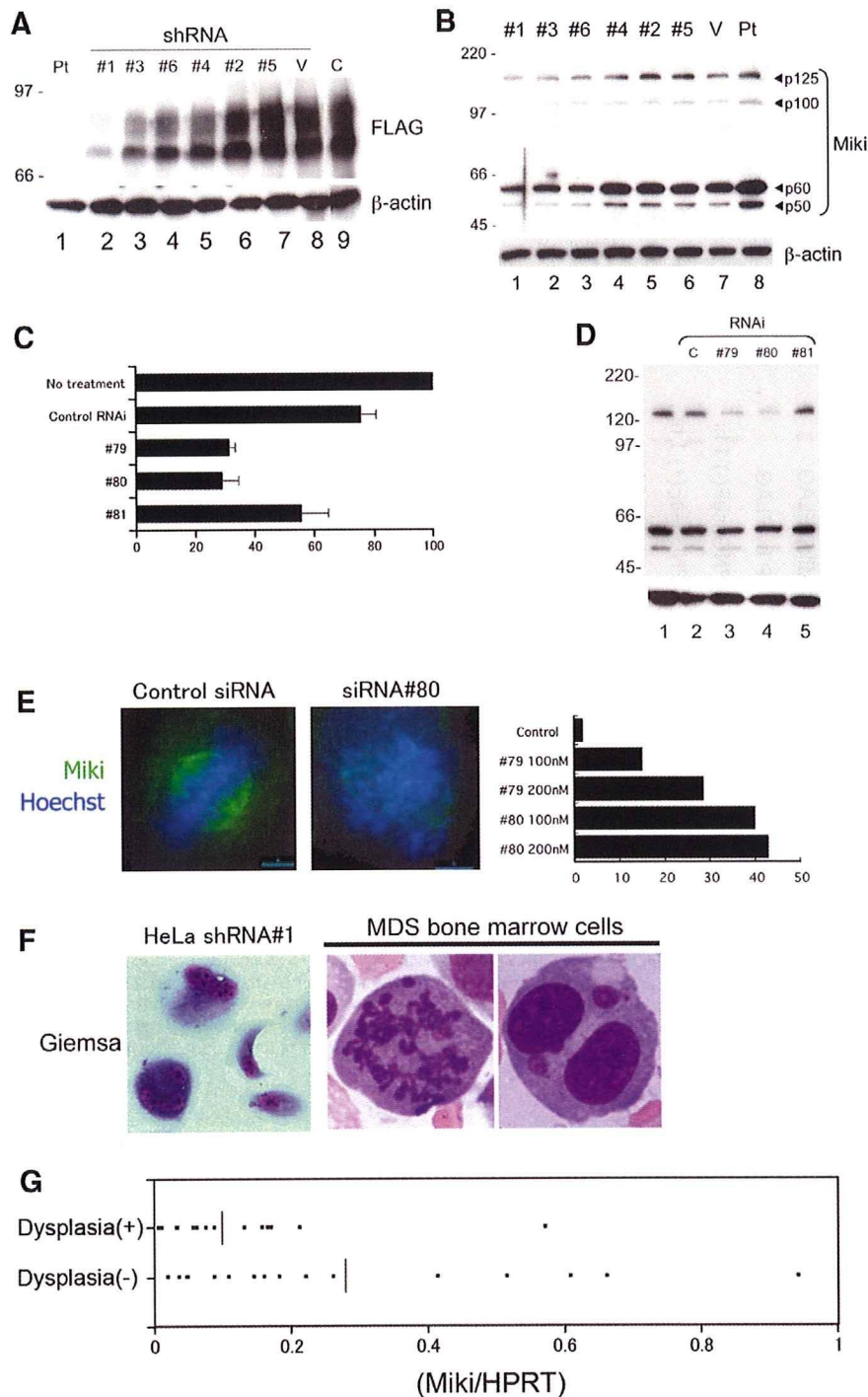


Fig. 4. Miki-downregulation by RNAi. (A) Immunoblot analysis using FLAG (top) or β -actin (bottom) antibodies: lane 1, lysate from untreated 293 cells; lanes 2–9, cells transfected with pcDNA3-Miki β -FLAG(C) with shRNA-expressing vectors for six candidate Miki-based shRNA (lanes 2–7) or empty shRNA-expressing vector (lane 8). (B) Immunoblot analysis of HeLa(tc) cells transfected with shRNA-expressing vectors for six candidate Miki-based shRNA (lanes 1–6), or an empty shRNA-expressing vector (V; lane 7). Lysates from untreated 293 cells (lane 8). (C) Miki mRNA expression levels in 293 cells treated with control siRNA, siRNA#79, #80, or #81 for 48 h are expressed as percent signal (measured using qRT-PCR) relative to an untreated control. The mean and SD for four independent experiments. (D) 293 cells were either untreated (lane 1) or transfected with control siRNA (lane 2), siRNA#79 (lanes 3), siRNA#80 (lane 4 at 40 nM), or siRNA#81 (lanes 5). (E) Immunostaining with Miki antibody of mitotic HeLa(tc) cells treated with control siRNA or siRNA#80 (48 h). DNA was stained with Hoechst 33342 (left and middle). Percentages of mitosis with scattered chromosomes in 200 mitotic cells (right). (F) Giemsa staining of HeLa cells expressing Miki shRNA#1 (left) and bone marrow cells of a MDS patient (middle and right). (G) Miki transcripts analyzed by qRT-PCR and normalized by HPRT in MDS/AML with ($n = 20$) or without ($n = 17$) dysplasia. Vertical short lines indicate average.

These findings suggested a possibility that Miki-downregulation may be implicated in mitosis with scattered chromosomes and bi- or tri-nucleated cells that are routinely observed in myeloid

malignancies (Fig. 4F, middle and right). To test this hypothesis, mRNA levels of Miki in bone marrow cells from MDS or AML patients were estimated by real-time qRT-PCR. Expression levels of