

平成 22 年 4 月 1 日現在

研究種目：特定領域研究
 研究期間：2005～2009
 課題番号：17019060
 研究課題名（和文）ゲノム情報を利用した造血器悪性腫瘍の新規治療戦略
 研究課題名（英文）Molecular targeted therapy of hematological malignancies based on the genomic information

研究代表者
 間野 博行 (MANO HIROYUKI)
 自治医科大学・医学部・教授
 研究者番号：90240704

研究成果の概要（和文）：白血病類縁疾患の多くにおいて未だなお有効な分子標的療法が存在せず、正確な分子診断さえ困難な例が多い。我々は本研究計画において白血病類縁疾患患者骨髄より芽球分画のみ純化保存するバンク事業を行い、それらに対して網羅的遺伝子発現解析や大規模ゲノムリシーケンスを行うことで、白血病の治療反応性予測法を開発し、さらに実際に白血病の発症原因遺伝子変異を同定することに成功した。

研究成果の概要（英文）：In many of human leukemias, we still do not have effective molecular targeted therapies nor accurate diagnostic means. To address these issues, here we have purified and collected CD133-positive stem cell fractions from bone marrow of affected individuals, and applied a variety of genomics approaches toward such purified fractions. Through such screenings, we could construct a prediction scheme for patients' prognosis based on the expression level of the selected genes, and could identify novel oncogenes responsible for the development of acute myeloid leukemia.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	6,500,000	0	6,500,000
2006年度	6,800,000	0	6,800,000
2007年度	6,700,000	0	6,700,000
2008年度	6,700,000	0	6,700,000
2009年度	6,700,000	0	6,700,000
総計	33,400,000	0	33,400,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・血液内科学

キーワード：DNA マイクロアレイ、CD133、白血病、リシーケンス

1. 研究開始当初の背景

造血器悪性腫瘍には急性骨髄性白血病 (AML)、骨髄異形成症候群 (MDS)、慢性骨髄性白血病 (CML) 等の白血病類縁疾患だけでなく、不応性貧血、発作性夜間血色素尿症 (PNH) など「前白血病」状態と考えられて

いる特発性造血障害も存在する。これら現行の疾患分類法は必ずしも各患者の生命予後、治療反応性を反映しておらず、しかも鑑別診断に有用な信頼に足る分子診断マーカーが存在する例は稀であった。発がん原因自体もほとんどの造血

器悪性腫瘍において不明であり、有効な治療開発のためにも、適切な患者の層別化および発症機構の解明が待たれていた。

2. 研究の目的

ゲノミクス解析を用いた造血器悪性腫瘍の病態解析は新たな診断マーカーの同定のみならず各患者の生命予後予測に有用と考えられるが、患者骨髄単核球を用いた単純なゲノミクス解析は、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。我々は造血器悪性腫瘍疾患群の多く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類縁疾患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。既に 1000 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純化 Blast Bank サンプルにおける網羅的遺伝子発現解析、体細胞遺伝子変異解析などを大規模に行い、遺伝子発現の面から化学療法反応性を予測すると共に、配列異常を生じる遺伝子変異をスクリーニングする。

3. 研究の方法

CD133 抗体を用いた純化磁気ビーズシステムにより、白血病患者骨髄より CD133 陽性造血幹細胞分画を純化保存する。またこうして得られた純化細胞より定法に従い RNA を純化し、cDNA を合成する。また mRNA 分画については T7 RNA polymerase を用いた増幅法を用いて RNA 量の増幅を行い、Affymetrix 社の DNA 発現マイクロアレイにハイブリダイズさせ、網羅的な遺伝子発現解析を行う。

一方、ヒト発がんに関連が予想される遺伝子群については、上記純化細胞から抽出したゲノム DNA を基質としてコード領域を増幅し、シーケンスを決定することにより配列異常遺伝子をスクリーニングする。

4. 研究成果

急性骨髄性白血病、慢性骨髄性白血病、骨髄異形成症候群など各種造血器悪性腫瘍疾患患者骨髄より CD133 陽性白血病芽球分画を純化し、すでに 1000 例ほどの検体芽球保存に成功した。

我々はまず Blast Bank 検体を用いて化学療法の治療反応性を予測することを試みた。今日における急性骨髄性白血病の予後予測は、主に白血病芽球の核型に依っている。各患者は核型に基づき大きく三群に分類さ

れるが、患者の過半数を占める

「Intermediate 群」における各患者の予後は殆ど不明な状態である。我々は遺伝子発現プロファイルに基づく新しい急性骨髄性白血病の予後予測法開発を目指して、Blast Bank に属する約 100 例の白血病類縁疾患における全ヒト遺伝子の発現データベースを DNA マイクロアレイ解析によって構築した。得られた発現プロファイルの中から、長期生命予後にリンクする遺伝子 4 種類を抽出した。これらわずか 4 種類の遺伝子データと核型とを組み合わせた新たな予後予測法 Gene Expression-based Stratification (GES) システムを我々は開発した。Kaplan-Meier 解析を行った結果、GES システムを用いることで長期生存可能な患者を精度良く選び出すことが出来た。

さらに Blast Bank 芽球より抽出したゲノム DNA を大規模にシーケンス解析する事で、急性骨髄性白血病において JAK3 チロシンキナーゼの後天的活性型変異を発見することに成功した。さらに Blast Bank 検体において JAK3 変異の有無を広くスクリーニングしたところ、約 3% において様々な活性型変異が存在することが示された。今回発見した変異 JAK3 を骨髄細胞に導入したマウスを作成すると、これらマウスは急性白血病を発症したことから、我々が発見した変異 JAK3 は一部の急性骨髄性白血病の直接的な原因となっていることを確認することができた。

以上より我々の本解析の結果、遺伝子発現レベルの測定で精度良く急性骨髄性白血病の予後を予測可能なことを明らかにしただけでなく、具体的な白血病の発症原因遺伝子を特定することにも成功した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 34 件)

- 1) Yamashita Y, Yuan J, Suetake I, Suzuki H, Ishikawa Y, Choi YL, Ueno T, Soda M, Hamada T, Haruta H, Takada S, Miyazaki Y, Kiyoi H, Ito E, Naoe T, Tomonaga M, Toyota M, Tajima S, Iwama A & Mano H. “Array-based genomic resequencing of human leukemia” Oncogene 査読有り in press, 2010.
- 2) Susaki K, Kitanaka A, Dobashi H, Kubota Y, Kittaka K, Kameda T, Yamaoka G, Mano H, Mihara K & Ishida T. “Tec protein tyrosine kinase inhibits CD25 expression in human T-lymphocyte”

Immunol Lett 査読有り 127: 135-142, 2010.

3) Takeuchi K, Choi YL, Togashi Y, Soda M, Hatano S, Inamura K, Takada S, Ueno T, Yamashita Y, Satoh Y, Okumura S, Nakagawa K, Ishikawa Y & Mano H. “KIF5B-ALK, a novel fusion oncokinese identified by an immunohistochemistry-based diagnostic system for ALK-positive lung cancer” Clin Cancer Res 査読有り 15: 3143-3149, 2009.

4) Takada S, Berezikov E, Choi YL, Yamashita Y & Mano H. “Potential role of miR-29b in modulation of Dnmt3a and Dnmt3b expression in primordial germ cells of female mouse embryos” RNA 査読有り 15: 1507-1514, 2009.

5) Kano Y, Tanaka M, Akutsu M, Mori K, Yazawa Y, Mano H & Furukawa Y. “Schedule-dependent synergism and antagonism between pemetrexed and docetaxel in human lung cancer cell lines in vitro” Cancer Chemother Pharmacol 査読有り 64: 1129-1137, 2009.

6) Kaneda R, Takada S, Yamashita Y, Choi YL, Nonaka-Sarukawa M, Soda M, Misawa Y, Isomura T, Shimada K & Mano H. “Genome-wide histone methylation profile for heart failure” Genes Cells 査読有り 14: 69-77, 2009.

7) Takeuchi K, Choi YL, Soda M, Inamura K, Togashi Y, Hatano S, Enomoto M, Takada S, Yamashita Y, Satoh Y, Okumura S, Nakagawa K, Ishikawa Y & Mano H. “Multiplex reverse transcription-PCR screening for EML4-ALK fusion transcripts” Clin Cancer Res 査読有り 14: 6618-6624, 2008.

8) Takada S, Yamashita Y, Berezikov E, Hatanaka H, Fujiwara SI, Kurashina K, Watanabe H, Enomoto M, Soda M, Choi YL & Mano H. “MicroRNA expression profiles of human leukemias” Leukemia 査読有り 22: 1274-1278, 2008.

9) Soda M, Takada S, Takeuchi K, Choi YL, Enomoto M, Ueno T, Haruta H, Hamada T, Yamashita Y, Ishikawa Y, Sugiyama Y & Mano H. “A mouse model for *EML4-ALK*-positive lung cancer” Proc Natl Acad Sci U S A 査読有り 105: 19893-19897, 2008.

10) Sato T, Toki T, Kanazaki R, Xu G, Terui K, Kanegane H, Miura M, Adachi S, Migita M, Morinaga S, Nakano T, Endo M, Kojima S, Kiyoi H, Mano H & Ito E.

“Functional analysis of JAK3 mutations in transient myeloproliferative disorder and acute megakaryoblastic leukaemia accompanying Down syndrome” Br J Haematol 査読有り 141: 681-688, 2008.

11) Mano H. “Non-solid oncogenes in solid tumors: EML4-ALK fusion genes in lung cancer” Cancer Sci 査読有り 99: 2349-2355, 2008.

12) Fujiwara SI, Yamashita Y, Nakamura N, Choi YL, Ueno T, Watanabe H, Kurashina K, Soda M, Enomoto M, Hatanaka H, Takada S, Abe M, Ozawa K & Mano H. “High-resolution analysis of chromosome copy number alterations in angioimmunoblastic T-cell lymphoma and peripheral T-cell lymphoma, unspecified, with single nucleotide polymorphism-typing microarrays” Leukemia 査読有り 22: 1891-1898, 2008.

13) Choi YL, Takeuchi K, Soda M, Inamura K, Togashi Y, Hatano S, Enomoto M, Hamada T, Haruta H, Watanabe H, Kurashina K, Hatanaka H, Ueno T, Takada S, Yamashita Y, Sugiyama Y, Ishikawa Y & Mano H. “Identification of novel isoforms of the EML4-ALK transforming gene in non-small cell lung cancer” Cancer Res 査読有り 68: 4971-4976, 2008.

14) Chen Y, Takita J, Choi YL, Kato M, Ohira M, Sanada M, Wang L, Soda M, Kikuchi A, Igarashi T, Nakagawara A, Hayashi Y, Mano H & Ogawa S. “Oncogenic mutations of ALK kinase in neuroblastoma” Nature 査読有り 455: 971-974, 2008.

15) Yamashita Y, Minoura K, Taya T, Fujiwara SI, Kurashina K, Watanabe H, Choi YL, Soda M, Hatanaka H, Enomoto M, Takada S & Mano H. “Analysis of chromosome copy number in leukemic cells by different microarray platforms” Leukemia 査読有り 21: 1333-1337, 2007.

16) Takada S & Mano H. “Profiling of microRNA expression by mRAP” Nat Protoc 査読有り 2: 3136-3145, 2007.

17) Soda M, Choi YL, Enomoto M, Takada S, Yamashita Y, Ishikawa S, Fujiwara S, Watanabe H, Kurashina K,

- Hatanaka H, Bando M, Ohno S, Ishikawa Y, Aburatani H, Niki T, Sohara Y, Sugiyama Y & Mano H. "Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer" *Nature* 査読有り 448: 561-566, 2007.
- 18) Mano H & Takada S. "mRAP, a sensitive method for determination of microRNA expression profiles" *Methods* 査読有り 43: 118-122, 2007.
- 19) Hatanaka H, Takada S, Choi YL, Fujiwara S, Soda M, Enomoto M, Kurashina K, Watanabe H, Yamashita Y, Sugano K & Mano H. "Transforming activity of purinergic receptor P2Y, G-protein coupled, 2 revealed by retroviral expression screening" *Biochem Biophys Res Commun* 査読有り 356: 723-726, 2007.
- 20) Furukawa Y, Vu HA, Akutsu M, Odgerel T, Izumi T, Tsunoda S, Matsuo Y, Kirito K, Sato Y, Mano H & Kano Y. "Divergent cytotoxic effects of PKC412 in combination with conventional antileukemic agents in FLT3 mutation-positive versus -negative leukemia cell lines" *Leukemia* 査読有り 21: 1005-1014, 2007.
- 21) Fujiwara S, Yamashita Y, Choi YL, Watanabe H, Kurashina K, Soda M, Enomoto M, Hatanaka H, Takada S, Ozawa K & Mano H. "Transforming activity of purinergic receptor P2Y, G protein coupled, 8 revealed by retroviral expression screening" *Leuk Lymphoma* 査読有り 48: 978-986, 2007.
- 22) Choi YL, Tsukasaki K, O'Neill MC, 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* 査読有り 26: 1245-1255, 2007.
- 23) 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* 査読有り 31: 203-209, 2007.
- 24) 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* 査読有り 3: 223-229, 2006.
- 25) 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* 査読有り 34: e115, 2006.
- 26) 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* 査読有り 30: 1105-1112, 2006.
- 27) Mano H. "DNA microarray analysis of myelodysplastic syndrome" *Leuk Lymphoma* 査読有り 47: 9-14, 2006.
- 28) 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* 査読有り 25: 139-146, 2006.
- 29) 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* 査読有り 16: 85-95, 2006.
- 30) 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* 査読有り 16: 1289-1298, 2006.

- 31) 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 査読有り 26: 2078-2085, 2005.
- 32) 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 査読有り 97: 210-218, 2005.
- 33) 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 査読有り 96: 387-393, 2005.
- 34) 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 査読有り 29: 943-949, 2005.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

間野 博行 (MANO HIROYUKI)

自治医科大学・医学部・教授

研究者番号：90240704

(2) 研究分担者

山下 義博 (YAMASHITA YOSHIHIRO)

自治医科大学・医学部・准教授

研究者番号：10326861

小澤 敬也 (OZAWA KEIYA)

自治医科大学・医学部・教授

研究者番号：30137707

(H17→H20)