

戦略的創造研究推進事業 CREST  
研究領域「テーラーメイド医療を目指した  
ゲノム情報活用基盤技術」  
研究課題「遺伝子発現調節機構の包括的解析  
による疾病の個性診断」

## 研究終了報告書

研究期間 平成14年11月～平成20年3月

研究代表者: 間野 博行  
(自治医科大学分子病態治療研究  
センター、教授)

## 1 研究実施の概要

### a) 検体収集事業

有効なテーラーメイド医療のためには、ゲノム情報を利用した形でのリアルタイムな患者個々の疾病の評価が不可欠である。その実現のためには疾患責任細胞・組織における遺伝子発現プロファイルおよびエピジェネティックな変化をゲノムワイドで評価し、それに基づいた新規疾患分類法、診断法、予後予測法及び治療法を開発することが必要である。この目的のために本研究計画においては、様々なヒト疾患の発症責任細胞を純化・保存する大規模バンク事業を実施し、これらを試料とした包括的ゲノミクス解析を自治医科大学ゲノム機能研究部にて行うことを目指した。対象疾患は主に悪性腫瘍を選択した。

まず疾患検体の収集事業として、白血病細胞の幹細胞分画のみを純化保存する大規模検体収集を行い、計 850 例を超えるサンプル保存に成功した。これらは全て連結可能匿名化の条件下で収集したものであり、生命予後、治療反応性などフォローアップ情報を任意に得ることができる。同様に膵臓がん 330 例、大腸がん 249 例、胃がん 342 例など 1000 例を超える固形腫瘍の検体収集事業も行った。

### b) 網羅的遺伝子発現解析

これらを用いて網羅的遺伝子発現解析を行い、疾患の病態解析・腫瘍の予後予測法の開発を行った。まず急性骨髄性白血病(AML)を対象とした網羅的遺伝子発現解析を行い、造血器悪性腫瘍の検討を行った。AML は特発性に生じる以外にも骨髄異形成症候群(MDS)や骨髄増殖性疾患(MPD)などから移行する例(二次性 AML)も多い。一般に特発性 AML は二次性に比べ予後不良と考えられているが、実際の AML 患者を診察する際にその白血病が特発性か否かを鑑別するのは困難なことが多い。今日において AML 患者の治療反応性・長期予後を予測する最も重要な因子は白血病細胞の核型(karyotype)である。白血病細胞に t(8;21)のような予後良好染色体転座が認められれば「Favorable group」、monosomy 7 など予後不良染色体異常が認められれば「Adverse group」、それ以外が「Intermediate」群に分類される。Adverse group が極めて予後不良であることは多くの追試で確認されているが、Favorable および Intermediate 群のどちらも予後不良患者を含んでいる事が知られる。さらに全体の過半数を占める正常核型患者は Intermediate group に属し、これら患者の実際の長期予後を予測することは現在では不可能である。

我々は AML 類縁疾患が造血幹細胞近傍の極めて未分化な分画から発生することに着目し、造血幹細胞特異的細胞表面抗原の一つである CD133 の陽性幹細胞分画を純化する手法を確立した。本邦全域に研究協力病院のネットワークを構築し、これら病院において CD133 陽性白血病幹細胞を純化保存する大規模細胞バンク事業「Blast Bank」を開設した。得られた Blast Bank サンプル 99 例について Affymetrix 社の全ヒト遺伝子チップ(HGU133)による網羅的遺伝子発現定量を行った。化学療法に反応し「完全寛解」を 1 年以上維持している患者群と初回化学療法に失敗し治療後 1 年以内に死亡している患者群との間で発現量が大きく異なる遺伝子を我々の膨大な遺伝子発現データベースより抽出したところ、最終的に計 4 種類の遺伝子が選別された。さらにこれら「予後関連遺伝子」の発現量から risk index (RI) を計算し、RI の値によって患者予後を予測する分類アルゴリズムを開発した。この手法を患者 test セットに当てはめたところ、長期生存が期待される予後良好症例が極めて精度良く選別されることが明らかになった。

また本邦にキャリア症例が多い成人 T 細胞白血病(ATL)についても、患者末梢血より CD4 陽性分画(ATL 細胞分画)を純化保存するプロジェクトを行い、慢性型 ATL および正常 CD4 陽性細胞においては発現していないが、急性型 ATL 症例においてのみ発現が誘導される遺伝子として受容体型チロシンキナーゼ MET 遺伝子を同定した。MET 蛋白の発現は FACS によっても確認され、しかも MET のリガンドである肝細胞増殖因子(HGF)依存性に ATL 細胞の増殖が誘導されることが

確認された。興味深いことに HGF 濃度が ATL 患者末梢血において著明に亢進していることも明らかになり、HGF-MET 系の活性化が ATL の病期進行に関与する可能性が明らかになった。

c) 新規肺癌原因遺伝子 EML4-ALK の発見

本研究計画で同定された疾患関連遺伝子の機能解析を行い、さらに発がん原因遺伝子自体をスクリーニングする事もめざし、高効率 cDNA ライブラリー構築法を開発した。本法を喫煙歴のある 62 才男性の肺腺がん切除検体に応用し、3T3 細胞 focus formation アッセイを行って、肺癌原因遺伝子のスクリーニングを行った。形質転換フォーカスから単離された cDNA の一種は、微少管会合蛋白の一種である echinoderm microtubule-associated protein-like 4 (EML4) の N 末側半分と、受容体型チロシンキナーゼ anaplastic lymphoma kinase (ALK) の細胞内キナーゼドメインとが融合した新たな融合型チロシンキナーゼ EML4-ALK をコードすることが明らかになった(図 1)。EML4 と ALK 両遺伝子は第 2 番染色体短腕中に互いに反対向きにマップされるが、2 番染色体内に小さな逆位が生じることにより EML4 と ALK とが融合することになる。本遺伝子融合は非小細胞肺癌の約 1 割に生じていることが明らかになった。

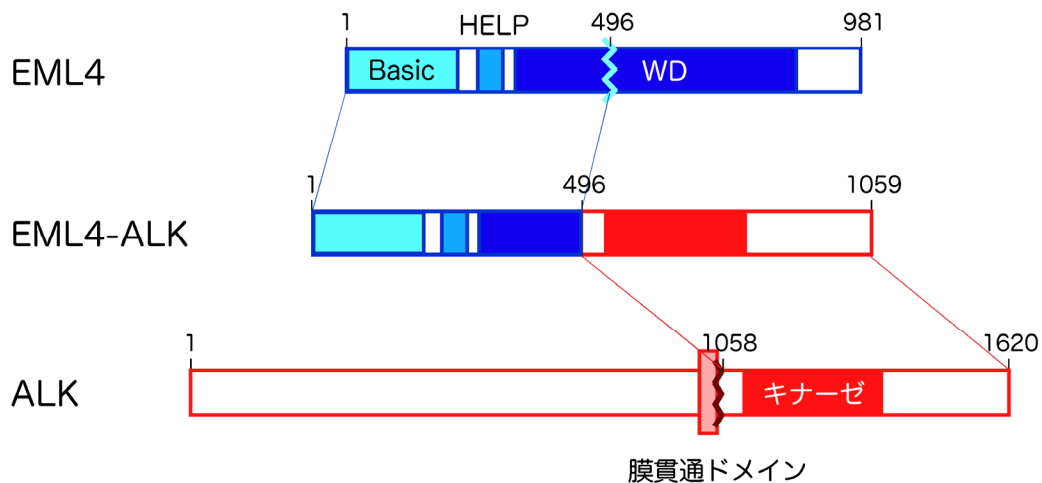


図 1

EML4-ALK は活性型チロシンキナーゼであり、その酵素活性依存性に形質転換フォーカスを発生し、また同遺伝子導入細胞はヌードマウスに皮下腫瘍を産生した。また同遺伝子導入細胞は増殖因子依存性細胞株に増殖因子非依存性成長を可能にした。興味深いことに EML4-ALK 陽性肺癌は上皮成長因子受容体 (epidermal growth factor: EGFR) 変異を認めず、また KRAS 変異も存在しない。これまで EGFR 変異陽性肺癌には EGFR 活性阻害剤イレッサが有効であったが、これまで有効な治療法が存在しない EGFR 変異陰性例に対して、ALK 阻害剤が新たな治療法となる可能性が示唆された。また EML4-ALK を標的とした RT-PCR 法は高感度肺癌診断法として期待される。実際喀痰に様々な濃度で EML4-ALK 陽性細胞を混和して RT-PCR 解析を行ったところ、1 ml あたり 10 細胞しかない状態でも明瞭な RT-PCR バンドを検出することができた。すなわち同遺伝子を標的とした検出法が肺癌の早期診断として有効なことが示された。

#### d) 大規模ヒト遺伝子配列解析

白血病細胞の解析を新たな方向から行うために、米国ベンチャー企業 Perlegen Sciences, Inc.との共同研究で、大規模リ・シーケンス用アレイを開発した。約 900 万塩基対を解析可能な大規模リ・シーケンス用ウェファアを開発し、解析対象遺伝子として以下のものを選択した。まず既知の癌関連配列変異を Sanger Center データベースより抽出し、345 遺伝子を対象とした。さらに細胞増殖・悪性化に関連する可能性があるたんぱく質をコードする遺伝子を計 5400 種類選定した。これらについてアミノ酸をコードする領域およびエクソン・イントロン境界の配列について、全てを解析するためのリ・シーケンスウェファアを作成した。

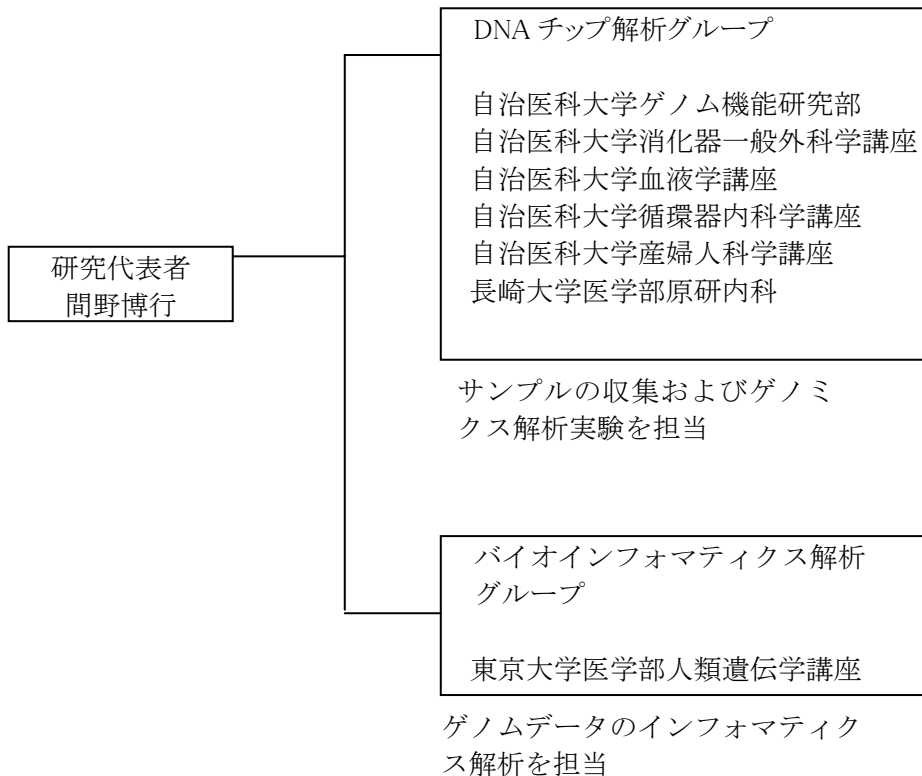
次に 20 例の白血病症例について CD34 陽性分画と CD4 陽性分画を純化した。前者を白血病分画として、後者をペア正常分画として用いた。前者についてゲノム DNA を抽出し、増幅・標識後リ・シーケンスウェファアにハイブリダイズさせた。その結果、数千種類の配列異常が存在することが明らかになった。さらにこれら配列異常のみ集めた 2 次リ・シーケンス用ウェファアを作成した。これを用いて 20 例の CD34 陽性分画と CD4 陽性分画両者をそれぞれハイブリダイズさせる 2 次リ・シーケンス実験を行った。その結果殆どの配列異常は既に CD4 陽性分画において存在しており、多型であると考えられた。最終的に CD34 陽性分画にのみ認められる配列異常が 11 種類同定された。これらの遺伝子について三次解析を行っている。

## 2 研究構想及び実施体制

### (1) 研究構想

自治医大を中心として本邦に広がる検体収集システムを構築し、その検体を自治医大ゲノム機能研究部に収集保存する。検体のゲノクス解析は自治医科大学ゲノム機能研究部において行い、得られた膨大なゲノクスデータの統計処理を東京大学医学部人類遺伝学講座にて行った。

### (2) 実施体制



### 3 研究実施内容及び成果

#### 3.1 DNA チップ解析グループ

##### (1)研究実施内容及び成果

##### a) 急性骨髄性白血病 (AML) の解析

AML は特発性に生じる以外にも骨髄異形成症候群 (MDS) や骨髄増殖性疾患 (MPD) などから移行する例 (二次性 AML) が多い。一般に特発性の AML は二次性 AML に比べ予後不良と考えられているが、実際の AML 患者を診た際にその白血病が特発性か否かを鑑別するのは困難なことが多い。今日において AML 患者の治療反応性・長期予後を予測する最も重要な因子は白血病細胞の核型 (karyotype) である。白血病細胞に t(8;21) のような予後良好染色体転座が認められれば「Favorable group」、monosomy 7 など予後不良染色体異常が認められれば「Adverse group」、それ以外が「Intermediate」群に分類される。Adverse group が極めて予後不良であることは多くの追試で確認されているが、Favorable および Intermediate 群のどちらも予後不良患者を含んでいる事が知られる。さらに全体の過半数を占める正常核型患者は Intermediate group に属し、これら患者の実際の長期予後を予測することは現在では不可能である。

これまで AML 臨床検体の DNA チップ解析により新しい予後予測法を開発することが試みられてきたが、いずれも予測に大量の遺伝子解析を必要とし、しかも予測精度が低い。AML 類縁疾患の患者骨髄中の悪性芽球の割合は 20% から 100% と様々であり、また AML のサブタイプによって悪性芽球は様々な系統への分化傾向を有する。例えば急性前骨髄球性白血病 (FAB 分類での M3 サブタイプ) の患者骨髄は、その殆どが分化した異常前骨髄球によって占められている。もしこの骨髄の血球 (単核球) 全体を DNA チップによって解析すれば、発現プロファイルの主要なパターンは分化した大量の前骨髄球によって規定されるであろう。このように、骨髄中の細胞構成割合の変化の大きさが「予後に直接リンクする遺伝子」の同定を困難にしている原因だと予想される。

我々は AML 類縁疾患が造血幹細胞近傍の極めて未分化な分画から発生することに着目し、これら患者骨髄より造血幹細胞分画のみを純化保存するプロジェクトを設立した。純化細胞に対するゲノクス解析により骨髄中の悪性細胞の割合やその分化傾向に影響されない精度の高いゲノクス解析が可能になると期待される。そこで我々は、造血幹細胞特異的細胞表面抗原の一つである CD133 に対するアフィニティカラムを開発し、簡便に CD133 陽性幹細胞分画を純化する手法を確立した。本邦全域に研究協力病院のネットワークを構築し、これら病院において CD133 陽性白血病幹細胞を純化保存する大規模細胞バンク事業「Blast Bank」を開発した。得られた Blast Bank サンプルを用いて DNA チップ解析を行い、白血病幹細胞における遺伝子発現データベースを構築した。また解析患者について治療経過等の臨床情報も収集した。

Blast Bank 事業は既に 850 例を超える臨床検体の収集に成功しており、これは純化ヒト疾患細胞のバンク事業として世界最大級のものといえる。この中に AML は特発性、続発性を含め計 175 例が保存されており、そのうち 99 例について Affymetrix 社の全ヒト遺伝子チップ (HG133) による網羅的遺伝子発現定量を行った。我々はこれら Blast Bank 検体を用いた DNA マイクロアレイ解析により、急性骨髄性白血病と骨髄異形成症候群とを鑑別する遺伝子マーカーの同定や、慢性骨髄性白血病および骨髄異形成症候群における病期進展機構などの解明を行ってきた。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 (karyotype) 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」の実際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)システムを我々は提案する。Kaplan-Meier 解析を行った結果、核型による分類では Favorable 群と Intermediate 群の予後は有意に異ならず、しかも長期生存患者が Favorable と Intermediate 群両者に含まれてしまう(図 2&4)。しかし GES システムを用いることで training set (図 3)でも、また test set (図 5)においても長期生存可能な患者をクラス I に選び出すことが出来た。以上より純化分画を解析することでごくわずかの遺伝子データにより精度良く患者予後を予測可能なことが明らかになった。

図2 核型による分類 (training set)

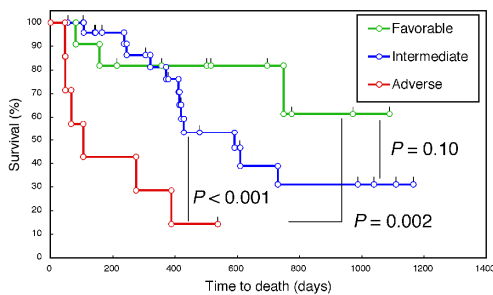


図3 GES法による分類 (training set)

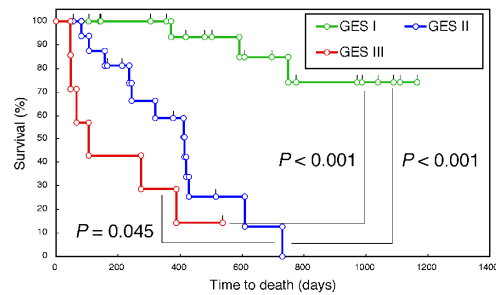


図4 核型による分類 (test set)

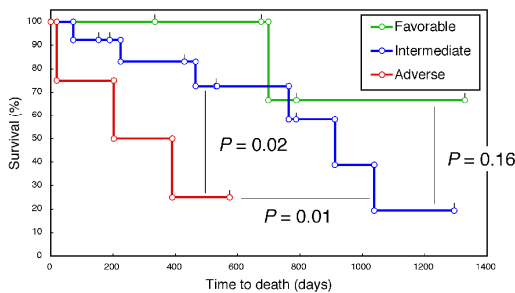
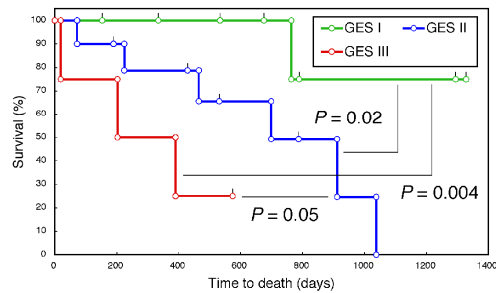


図5 GES法による分類 (test set)



こうして Blast Bank サンプルによる解析の結果選び出された「予後関連遺伝子」はわずか 4 種類であった。これらごく少数の遺伝子の解析で精度良く患者予後を予測可能なことは Blast Bank のような疾患責任細胞純化アプローチが有効であることを示唆していると考えられる。

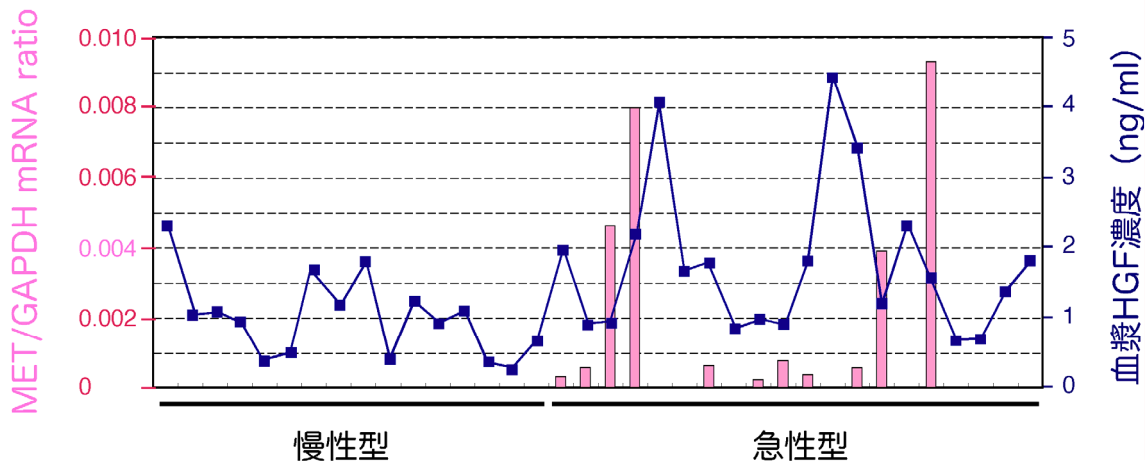
#### b) 成人 T 細胞白血病 (ATL) の解析

ATL は human T cell leukemia virus-type I (HTLV-I) の感染によって発症する予後不良の疾患である。HTLV-I キャリアは本邦南西部に多く、そのうち数%の患者が ATL を発症する。ATL の一病型である慢性型は、患者末梢血中で多数の ATL 細胞を認めるものの臨床症状は少ない。しかし多くの慢性型 ATL は数年の経過の後極めて予後不良の急性型 ATL へと移行する。この病期移行メカニズムは不明なままであり、我々は DNA チップを用いてこの病期移行メカニズムの解明を目指した。前項の AML における Blast Bank の有効性を鑑みて、我々は ATL 解析においても疾患責任細胞のみを純化して解析することを試みた。多くの ATL 細胞は CD4 陽性成熟 T 細胞の形質を取る。そこで慢性型および急性型 ATL の患者末梢血より CD4 陽性細胞を純化保存し、DNA チップによる解析を行った。

CD4 陽性 ATL 細胞の収集事業は順調に推移しており既に 60 例を超えるサンプルの保存に成

功した。その中から慢性型 19 例、急性型 22 例を用いて全ヒト遺伝子 DNA チップによる発現解析を行った。本遺伝子発現データより、「慢性型で発現が全く認められないが、急性型の少なくとも一部で高発現する」遺伝子を選び出したところ(そのような遺伝子は ATL の病期進行に關与している可能性があるため)、hepatocyte growth factor (HGF) の受容体である MET 遺伝子が選び出された。ATL 細胞自身には HGF の産生は検出されなかったが、興味深いことに ATL 患者末梢血血漿中には高濃度の HGF が存在することが判った(図 6)。しかも MET 陽性 ATL 細胞株及び新鮮患者検体を用いた実験から、HGF 依存性の ATL 細胞増殖が確認された。

図6



今回の解析の結果、ATL の新たな病期進展機構として HGF-MET 系の活性化が見いだされた。より広汎な症例解析により、さらに HGF-MET 系の ATL における意義を検証予定である。

### c) 消化器悪性腫瘍の解析

消化器悪性腫瘍についても血液疾患の解析と同じく、多くの臨床検体を集めてそのゲノミクス解析により疾患の発症メカニズム解明・新規分子診断マーカーの同定を目指した。具体的には大腸癌と膵臓癌を主たる解析対象とした。大腸癌の一部には、正常核型ながらゲノム上のマイクロサテライトリピート数に異常が認められる microsatellite instability (MSI) 陽性症例が存在し、一般の核型異常を認める大腸癌とは異なった発癌経路をたどると考えられている。しかし MSI 陽性大腸癌が具体的にどのような遺伝子異常によって発癌するかは殆ど不明なままである。そこで我々は MSI 陽性症例と陰性症例とで DNA チップ解析を行い、MSI 特異的遺伝子発現プロファイルの同定を目指した。大腸癌症例 248 例について MSI の有無を検討した結果、213 例は MSI 陰性であり、35 例について MSI 陽性である事が判った。各グループより年齢を一致させた 10 例を選び、全ヒト遺伝子チップによる網羅的遺伝子発現解析を行った。

得られたデータより MSI 依存性発現を示す遺伝子を選び出した。MSI 陽性と陰性の大腸癌計 20 例のチップ解析の結果、両群間で発現量が有意に異なる遺伝子 (Welch's ANOVA,  $p < 0.001$ ; effect size  $> 50$ ) を抽出したところ、24 種類の遺伝子が同定された。興味深いことに、その中には WNT シグナル伝達分子である AXIN2 遺伝子が含まれていた。AXIN2 は AXIN1 と同様に細胞内  $\beta$  カテニンの分解に促進的に働く蛋白質であり、そのタンパク量減少あるいは機能異常は  $\beta$  カテニンの蓄積を経て細胞増殖に働く事が知られる。我々のデータから MSI 陽性大腸癌特異的に

AXIN2 mRNA の減少が確認され、同様に AXIN2 タンパク量の減少も生じていることが確認された。さらに AXIN2 遺伝子の発現減少は、同遺伝子のプロモーター領域に存在する CpG island のメチル化と相関することが判った。そこで MSI 陽性で AXIN2 が減少している大腸癌細胞株に 5'-azacytidine 投与、あるいは AXIN2 cDNA を導入したところ、細胞のアポトーシスが速やかに誘導された。

以上より大腸癌のチップ解析の結果、新たな発癌メカニズムの候補として AXIN2 遺伝子の発現低下が同定された。MSI 陽性大腸癌細胞においては DNA ミスマッチ修復遺伝子 MLH1 のプロモーター領域がメチル化されて MLH1 の発現が減少することが多くの例で認められる。AXIN2 の場合も同様なプロモーター領域のメチル化と転写抑制が確認されたことになり、特定の大腸癌においてゲノムのメチル化が発癌に寄与する新たな例を示したと言える。

一方膵臓癌については、逆行性膵胆管造影検査 (ERCP) の際に得られる膵液より膵管上皮細胞を純化保存する事業を行い、膵臓癌患者 72 例、良性膵腫瘍 41 例を含む計 266 例の検体収集に成功した。これらから膵臓癌 24 例、健常者 25 例を用いた全ヒト遺伝子 DNA チップによる解析を行った。さらに今回の遺伝子発現データベースより、癌群と正常群とで大きく発現量が異なる遺伝子を抽出し、これらを用いて膵臓癌診断アルゴリズムの開発を試みた。その結果加重投票法を用いたときに 81.6% の精度で膵臓癌が診断可能なことが示された。

#### d) 心疾患の解析

心血管系の圧・容量負荷あるいは液性因子刺激によって反応性あるいは代償性に心肥大と全身性高血圧が生じる。しかしこれら負荷が長期にわたるとやがて心筋の収縮力は低下し細胞死が誘導され「心不全」と呼ばれる病態へと至る。一旦低下した心筋収縮力を回復させることは現在でも殆ど不可能であり、心不全は本邦成人の代表的な死因となっている。「長期にわたる心臓への負荷」を *in vitro* でシミュレーションする系は存在せず、心不全発症機構の解明と新しい分子標的療法の開発のためには実際の臨床検体を解析することが必須といえる。我々は心臓手術の際に得られる心房筋、左心耳筋、および左室心筋の収集を行い、これら実際のヒト心筋検体を用いた網羅的遺伝子発現解析とエピジェネティック解析を目指した。

具体的には本邦の複数の病院と共同研究で実際の患者心筋収集事業を開始し、これまで左室心筋 33 例および右房心筋 47 例の収集に成功した。左室心筋は世界的に入手困難であるが、本プロジェクトではバチスタ手術を施行する国内の病院よりサンプルを得た。なお健常左室心筋は米国企業より購入した。

心房筋の一部は多くの心臓手術の際に切除されるため、心室筋に比べるとはるかに入手が容易である。心房筋を解析することで心機能の長期変化を予測することが出来れば臨床の面からも重要な情報を得ることが出来る。これまで心房筋がどの程度心臓全体の機能にリンクしているかは全く不明であった。そこで本プロジェクトの心房筋検体を用いた DNA チップ解析を行った。得られた遺伝子発現データより、心房細動の有無、心房への圧負荷、心房への容量負荷、等様々な臨床的パラメーターにリンクして発現量が変化する遺伝子セットの抽出に成功した。さらに心房と心機能の直接的な連関を検証するために、左室駆出率 (ejection fraction: EF) の数値 (%) に発現量が相関する遺伝子をスクリーニングした。その結果計 4 種類の遺伝子が  $P < 0.001$  で有意に連鎖している事が判った。さらにこれら遺伝子の発現量を用いて EF 値を予測する回帰式を作成したところ、いずれの遺伝子についても単変量の一次方程式によって精度良く EF を計算可能であった。この結果は心房筋 (の遺伝子の一部) が心機能全体の強い影響下にあることを示唆している。実際心房筋検体を training set と test set に分け前者のサンプルのみで EF 予測式を作成したところ、test set サンプルの EF 値を精度良く予測することができた。

一方、心不全の進行にエピジェネティックな変化が重要な役割を果たすことが知られている。特

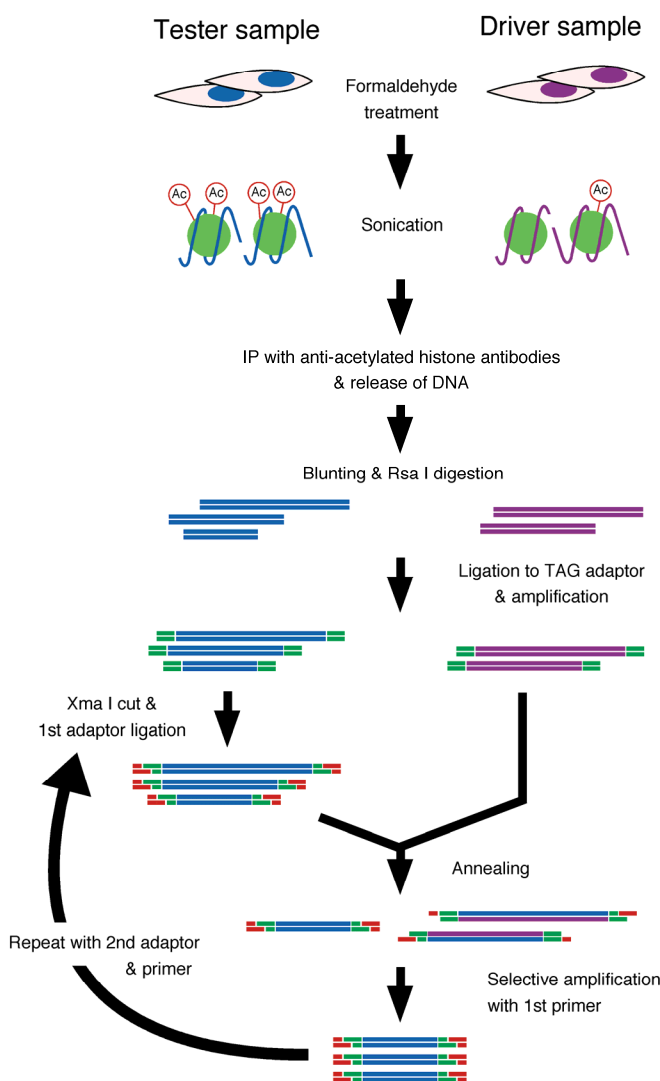


に染色体ヒストン蛋白質のアセチル化レベル異常は心肥大・心不全の発症メカニズム自体に関与していることが発生工学を用いた実験によって明らかにされてきた。しかしながら実際の心不全発症の際に具体的にどのような遺伝子のヒストンアセチル化レベルに異常が生じているのかは全く不明なままである。これまで任意のサンプル間でヒストンアセチル化レベルの違いをゲノムワイドにスクリーニングする手法は存在しなかった。我々はこの目的のために新たな解析技術「Differential Chromatin Scanning (DCS)法」を開発した(図7)。

我々はDCS法の信頼性を検証する目的で、心筋由来細胞株にヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)の阻害剤 trichostatin A (TSA)を添加し、ヒストンアセチル化レベルが変化する遺伝子をスクリーニングした。DCS法で同定された288個のゲノムフラグメントの塩基配列を決定したところ、そのうち178クローンはゲノム上の遺伝子の5'領域にマップされることが判った。ランダムに選んだ38クローンについてTSA刺激によるヒストンアセチル化の変化を測定したところ37クローン(97%)において著明なアセチル化レベルの上昇が確認された。以上よりDCS法を用いることで効率よくHDACの標的遺伝子を同定することが示された。

本プロジェクトの結果、心房筋を解析することで様々な心機能を評価可能なことが示された。さらに心機能の低下(心不全)メカニズムで中心的な役割を果たすと考えられるエピジェネティック異常をゲノムワイドにスクリーニングする手法を開発することに成功した。

図7



#### e) 肺癌の解析

肺癌のため、我が国では2005年に約6万2千人が死亡しており、また米国においても2006年に16万2千人が亡くなっている。肺癌は先進国における癌死因の第一位を占めるに至っており、抗癌剤による化学療法ではほとんど延命が期待できない。しかし、最近、キナーゼ活性を有する上皮成長因子受容体(EGFR)遺伝子の変異が一部の肺癌症例で発見され、この変異を有する肺癌に対し

てEGFRのキナーゼ活性阻害剤であるゲフィチニブ (gefitinib) の有効性が示された。ただし、このEGFR遺伝子変異は非喫煙者の肺癌症例に好発しており、肺癌症例の多くを占める「喫煙による肺癌」が、具体的にどのような遺伝子異常を有しているのかは不明なままであった。

我々は、喫煙歴を持つ肺腺癌患者由来の外科切除標本から mRNA を抽出し、cDNA 発現レトロウィルスライブラリーを構築し、マウス3T3細胞を用いたフォーカスフォーメーションアッセイによって癌化能を示す遺伝子を探索した。その結果、数十種類の形質転換フォーカスが得られたが、そのうち一つから導入 cDNA を回収したところ、驚くべき事に cDNA の 5' 側と 3' 側は違う遺伝子由来であった。5' 側は微小管会合タンパクの一種である EML4 (echinoderm microtubule-associated protein-like 4) のアミノ末端側約半分をコードし、3' 側は受容体型チロシンキナーゼ ALK (anaplastic lymphoma kinase) の細胞内チロシンキナーゼドメインをコードしていた (図 1)。ALK は当初 anaplastic large cell lymphoma という非ホジキンリンパ腫において NPM 遺伝子と融合し、活性型融合チロシンキナーゼ NPM-ALK を生じることで発見された遺伝子である。細胞内に酵素活性領域を有する受容体型チロシンキナーゼであるが、高等真核生物における ALK のリガンドは未だ不明である。興味深いことに NPM-ALK と我々の EML4-ALK とでは ALK 側の fusion-point は同じエクソンであった。

さらに興味深いことに、本来 EML4 と ALK 遺伝子はヒト 2 番染色体短腕上の近い場所 (12 Mbp 離れている) に互いに反対向きに存在するのである。従って EML4-ALK 融合遺伝子が作られるためには、この 12 Mbp の領域が 2p 内で小さな逆位を形成する必要がある。固形腫瘍は一般に染色体転座は稀であると言われてきたが、我々が患者ゲノムを基質として EML4 と ALK 上にそれぞれプライマーを設置して PCR を行ったところ、単一の産物が得られ、EML4 と ALK 遺伝子内での切断点・融合点が決定的に決定された。このような遺伝子融合は肺癌において極めて稀なイベントなのか確認する目的で、75 例の肺癌症例中での EML4-ALK cDNA を RT-PCR でスクリーニングしたところ 5 例 (6.7%) で陽性であった。すなわちこの染色体逆位は有る程度の頻度で肺癌に生じているのである。

慢性骨髄性白血病において ABL チロシンキナーゼ遺伝子と BCR 遺伝子が融合した結果、活性型チロシンキナーゼ BCR-ABL が生じる事が知られている。また上述のように NPM-ALK も強い癌化能を持った活性型チロシンキナーゼとなっている。EML4-ALK が同様な活性型チロシンキナーゼとしての癌化能を有しているのかを検討する目的で EML4-ALK を 3T3 繊維芽細胞に導入すると多数の形質転換フォーカスが生じた。しかもこの細胞をヌードマウスの皮下に接種すると巨大な腫瘍を形成した (図 8)。逆に、EML4-ALK の酵素活性領域中の ATP 結合部位にアミノ酸置換を導入しキナーゼ活性を失活させると (EML4-ALK(K589M))、この腫瘍造成能は消失した。正常の EML4 全長あるいは ALK 全長を発現させても形質転換フォーカスや皮下腫瘍は生じなかったため、ALK は EML4 と融合することによって癌遺伝子へと変化したことが明らかになった。

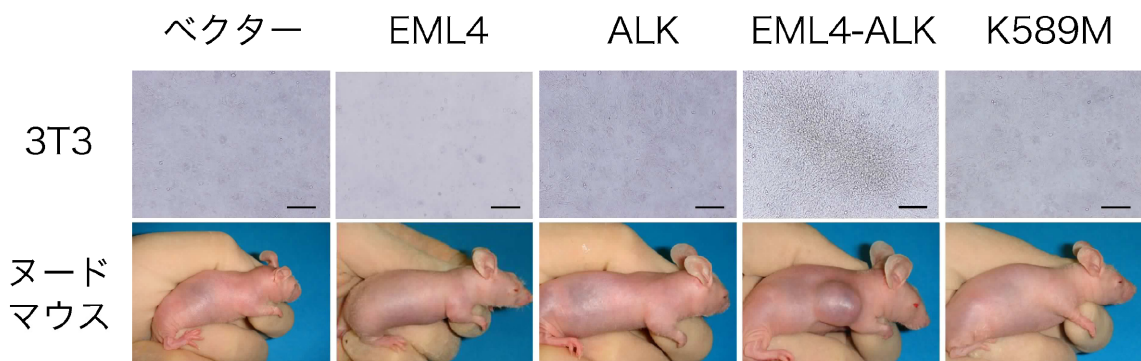


図8

さらに IL-3 依存性に増殖する細胞株 BA/F3 に EML4-ALK を導入すると細胞は IL-3 非存在下でも増殖可能になることから EML4-ALK の極めて強い癌化能が確認された。そこで ALK キナーゼの阻害剤である WHI-P154 を培養上清に添加すると濃度依存性に速やかな細胞死が誘導された(図9)。すなわち EML4-ALK 依存性に増殖している癌に対して ALK 阻害剤が有効な治療薬となることが示された。

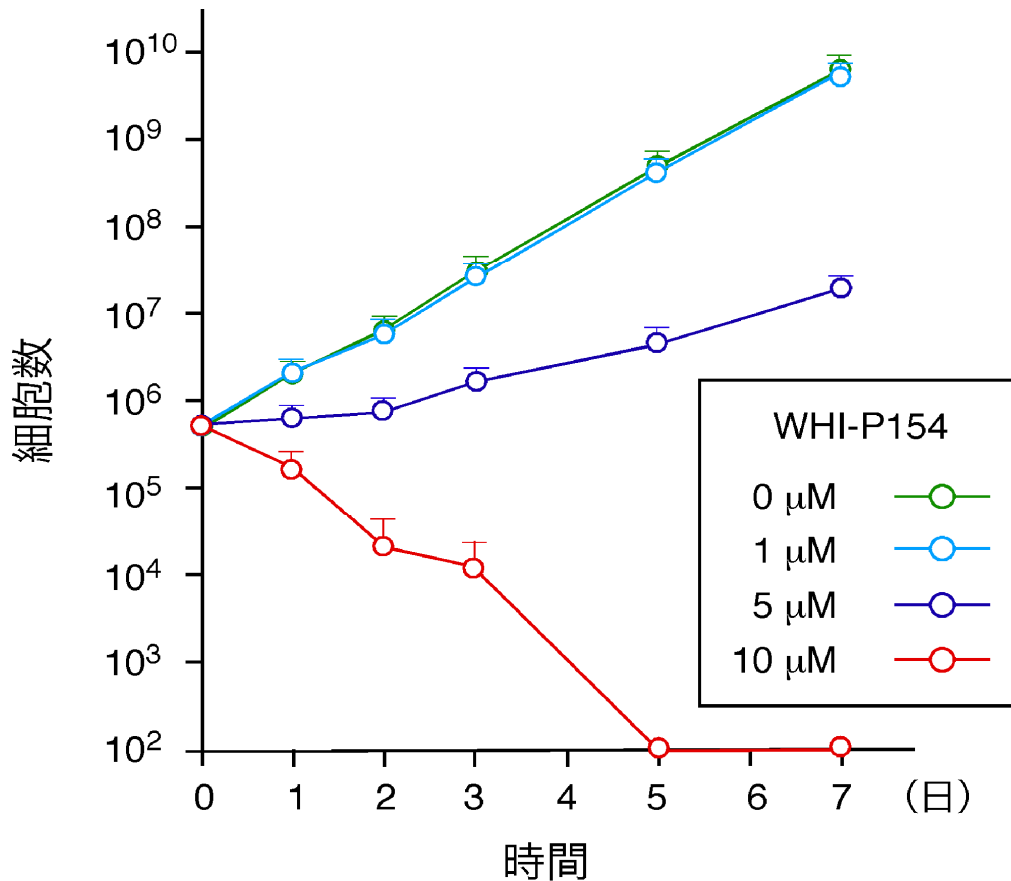


図9

一方 EML4 と ALK 遺伝子は本来互いに反対向きにマップされる遺伝子であるから、両遺伝子を挟むように設置した PCR では正常細胞において決して特異的産物が得られない。したがって EML4-ALK 融合 cDNA を検出する PCR は極めて鋭敏かつ精度の高い肺癌の分子診断法となると期待される。実際我々が試したところ、喀痰 1 ml 中わずか 10 細胞しか EML4-ALK 陽性細胞がない状態でも明瞭に検出が可能であった(図 10)。従って喀痰を用いた肺癌の高感度診断すなわち早期診断が現実のものになると期待される。

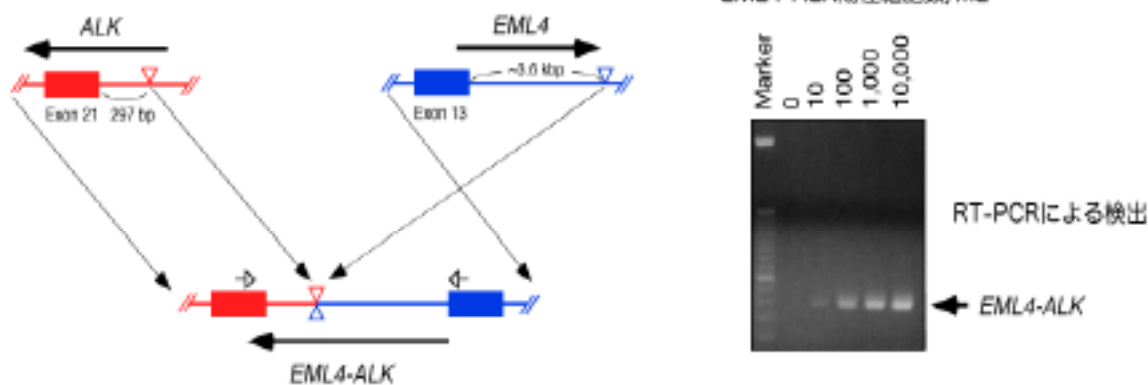


図10

f) 大規模リ・シーケンシング

さらに我々は遺伝子発現データのみでなく他の情報も統合して白血病の予後解析を目指す目的で、白血病症例の遺伝子変異スクリーニングに着手した。具体的には塩基配列解析用の世界最大のDNAマイクロアレイを米国Perlegen Sciences, Inc.と共同で開発することに成功した。これは約9 Mbpの塩基配列を決定するものであり、旧来に無い規模で体細胞変異を検出することが出来る。また本アレイで解析する遺伝子として、既のがん細胞において変異が報告されている遺伝子のみならず、発がんに関与する可能性が考えられるDNA修復遺伝子、染色体構造調節遺伝子、酸化還元関連遺伝子、エピジェネティクス調節遺伝子、プロテインキナーゼ、転写因子、細胞周期関連遺伝子、細胞死関連遺伝子等、計5600種類の遺伝子を選出した(図11)。これらの遺伝子のアミノ酸置換を誘導可能なエクソン配列に対してその塩基を決定すると共に、エクソン-イントロン境界についても塩基解析を行い、スプライシング異常も併せスクリーニングした。

癌関連5600遺伝子

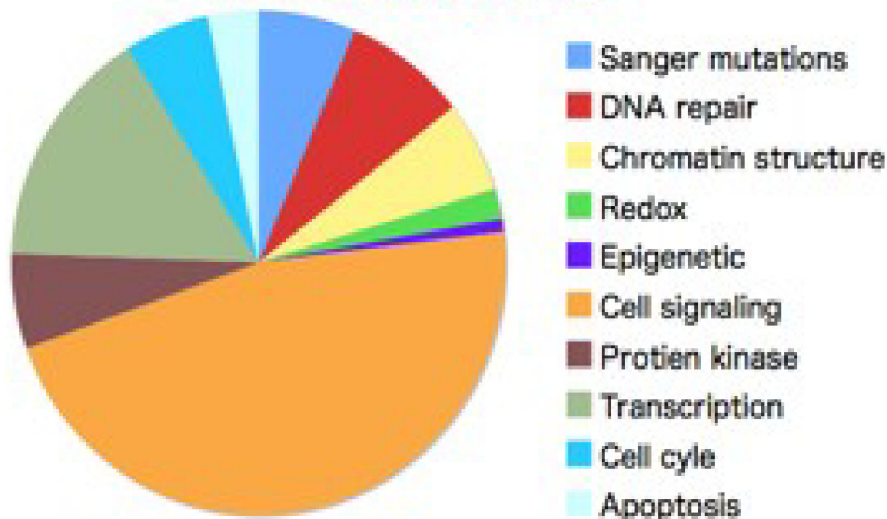


図11

まず白血病検体20例の骨髓より取り出した未分化細胞分画からゲノム DNA を抽出し、これをシーケンシングアレイにハイブリダイズした。その結果同定された配列異常について、それが後天的配列変化 (somatic mutations) であるか否かを検討する目的で、同定された塩基配列異常を配置した 2nd phase 用シーケンシングアレイを開発した。また白血病症例の骨髓より純化した CD4 陽性成熟 T 細胞からもゲノム DNA を抽出しコントロールゲノムとした。2nd phase アレイに、それぞれの症例の白血病分画とコントロール分画 (CD4) それぞれのゲノム DNA をハイブリダイズした。その結果両方で配列異常が同定されれば患者が本来有している遺伝子多型と考えられるが、もし白血病分画にのみ異常が見いだされればそれは我々が求める体細胞変異であると考えられる。こうして解析を行った結果、少数の遺伝子に異常が見いだされた。

## (2)研究成果の今後期待される効果

### 「肺癌原因遺伝子」

今回の我々の解析の結果、肺がんの約 1 割の症例において、EML4-ALK 融合型チロシンキナーゼが存在することが明らかになった。既知の肺がん原因遺伝子である EGFR 異常は非喫煙者、アジア人、女性に多く認められるが、今回解析した症例中、EGFR 変異を有するグループと EML4-ALK を有するグループは全く重なり合わなかった。つまり、これまで発癌機構が分かっておらず、有効な治療法も存在しなかった EGFR 変異陰性肺癌に対して、新たな治療戦略が現実のものとなる。具体的には、少なくとも以下の 2 点の臨床応用が挙げられる。

① 喀痰や肺泡洗浄液、肺生検、胸水などを試料とする RT-PCR による EML4-ALK の検出が、肺癌の高感度・高精度の診断法として利用できる。これまで肺癌の診断には喀痰や肺生検、胸水の病理細胞診が利用されてきたが、これらは何れも試料中にある程度の割合で癌細胞が存在しないと診断が困難である。つまり肺癌の進行期にならないと精度の良い診断は不可能であった。それに比べ、今回開発された RT-PCR による EML4-ALK 遺伝子の検出に基づく診断法は極めて感度が高いため、早期に肺癌の分子診断が可能になると期待される。

② 更なる応用として、ALK のキナーゼ活性に対する阻害剤が肺癌の全く新しい治療法になると期待される。しかも ALK 遺伝子破壊マウスは正常に成長することから、ALK 阻害剤はヒトに重篤な副作用を引き起こさないのではないかと考えられる。

以上により、今回の発見は診断・治療の両面で直接、臨床応用・医療に結びつくものと言えよう。なお今回用いたスクリーニング系をさらに他の癌種に応用することで、別の癌においても新たな癌遺伝子を発見することも期待される。

### 「白血病のゲノム解析」

今回の研究計画によって 850 例以上の白血病幹細胞検体収集に成功した。これらについては網羅的遺伝子発現解析に基づく患者予後予測法の開発に成功したのみでなく、大規模シーケンシングアレイによる遺伝子配列変異のスクリーニングも第 2 次段階まで終了している。その結果複数の体細胞変異を見出すことに成功し、しかもその中には活性型チロシンキナーゼをコードする配列異常も発見した。これは白血病の全く新しい治療剤開発に直結した知見であり、白血病の臨床に重要な寄与となると期待される。

## 3.2 バイオインフォマティクス解析グループ

### (1)研究実施内容及び成果

ゲノム解析の結果得られる膨大な情報を多次元のまま解析し臨床に有用な遺伝子マーカーの探索および診断法を開発するためには、現在のバイオインフォマティクス技術は不十分である。これまでのバイオインフォマティクスは実際の医療にたずさわる側からのフィードバックが少ない

め、例えば「疾患細胞の多様性(ヘテロクローナリティ)」などに充分配慮がなされてこなかった。本研究プロジェクトではDNAチップ解析グループの臨床医との間で密接な連携を取り、これまでのバイオインフォマティクスにとらわれない、新しい解析手法の開発を目指した。

具体的には DNA チップ解析グループから網羅的解析データを逐次入手し、臨床サイドからの要請に応じて「予後予測」など必要とされるパラメーターの計算アルゴリズムを開発した。作成されたアルゴリズムは DNA チップ解析グループのデータで検証され、また新たに得るデータを用いて前方向の検証も行われた。その結果を基にアルゴリズムは再び最適化される、というフィードバックを繰り返した。

これまで診断予測アルゴリズムとして複数の手法を開発した。臨床的な診断分類の蓋然性を検討する目的で correspondence analysis 法や主成分分析法など次元数を減少させる手法がしばしば用いられる。これらの結果は絞り込まれた次元数の仮想空間にサンプルを投射することで可視化することが出来る。そこでこの仮想空間上での位置を利用してどちらのクラスに属することになるかを決定する「加重距離法(weighted-distance method)」を開発した(図 12)。

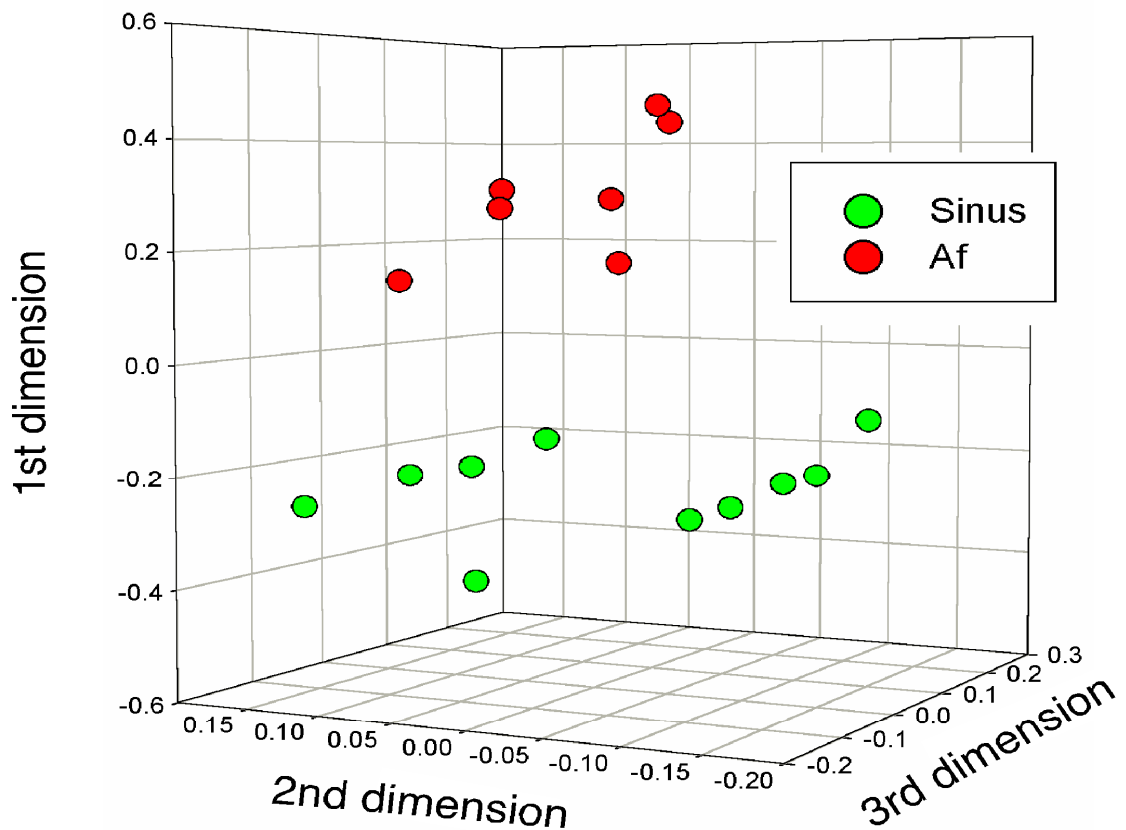


図12

図 12 はヒト心房筋における遺伝子発現プロファイルから、正常洞調律(Sinus)症例と、心房細動症例(Af)との間で統計的に有意に発現量が異なる遺伝子セットを抽出し、主成分分析を行ったものである。この図において少なくとも遺伝子発現パターンからは両心房筋が大きく異なるグループに

属することが予想される。これをより正確に検証する目的で、leave-on-out validation を行う際、この仮想空間中のどの場所にサンプルが置かれるか、またその場所は確率論的にどちらのグループに属するかを決定する手法として、加重距離法を開発した。またその方法により実際両疾患グループが異なる発現パターンを有していることが確認された。また本法は「正常NK細胞とNK細胞白血病とを鑑別する」事にも応用された。

急性骨髄性白血病(AML)の予後予測法開発では、現行の白血病細胞の核型分類を部分的に取り入れた新しい手法 Gene Expression-based Stratification (GES)法を開発した。核型分類でのAdverse 群は極めて予後不良なことが確立しているため、それ以外のAML患者のうち化学療法によって長期生存・治癒が期待される患者を精度良く抽出することを目指した。最終的に4種類の遺伝子の発現量を測定し、それらの値からRI値を計算することで長期生存が期待される患者を同定することに成功した。

また簡便な解析手技であるが、正常群と疾患群とを比較する際に「正常では全く発現しないが疾患群の少なくとも一部で高発現する(あるいはその逆)」のような特性を持つ遺伝子を選び出すことで、疾患発症メカニズムに関与する遺伝子を高頻度で選び出すことが可能なことも複数の疾患で検証出来た。

#### (2)研究成果の今後期待される効果

加重距離法は、遺伝子発現プロファイルから supervised clustering を行う際に簡便、かつ有用な方法であり、今後の大規模臨床データベースへの応用が期待される。またGES法についても急性白血病の予後予測に応用可能なことが示された。今後は遺伝子発現データだけでなく、ゲノムDNA量・LOH、あるいは遺伝子塩基配列異常のデータと統合的な解析を目指して開発を行う予定である。

## 4 研究参加者

### ①DNAチップ解析グループ（臨床検体の収集およびゲノミクス解析を担当）

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
間野 博行	自治医科大学 医学部	教授	研究の統括	H14.11～H20.3
島田 和幸	自治医科大学 医学部	教授	心不全の解析	H14.11～H20.3
小澤 敬也	自治医科大学 医学部	教授	血液疾患の解析	H14.11～H20.3
永井秀雄	自治医科大学 医学部	教授	膵臓癌の解析	H14.11～H20.3
鈴木 光明	自治医科大学 医学部	教授	婦人科腫瘍の解析	H14.11～H20.3
山下 義博	自治医科大学 医学部	講師	チップの解析実行	H14.11～H20.3
高田 修治	自治医科大学 医学部	助教	血液疾患の解析	H16.4～H20.3

太田 淳	自治医科大学 医学部	CREST 研究員	チップの解析実行	H15.4～H16.12
金田 るり	自治医科大学 医学部	大学院生 COE 研究員 CREST 研究員	心不全の解析	H15.4.～H16.3 H16.4.～H17.7 H17.8.～H18.3
崔 永林	自治医科大学 医学部 日本学術振興会 がん研究振興財団	大学院生 特別研究員 リサーチレジデント	血液疾患の解析	H15.4～H17.3 H17.4～H19.3 H19.4～H20.3
和田 智明	自治医科大学 医学部	大学院生	婦人科腫瘍の解析	H15.4～H18.3
鯉沼 広治	自治医科大学 医学部	大学院生	膵臓癌の解析	H15.4～H17.3
木佐貫博之	自治医科大学 医学部	大学院生	膵臓癌の解析	H15.4～H17.3
石川 円	自治医科大学 医学部	大学院生	血液疾患の解析	H15.4～H17.3
畑中 恒	自治医科大学 医学部	大学院生	消化器腫瘍の解析	H16.4～H20.3
渡辺 秀紀	自治医科大学 医学部	大学院生	消化器腫瘍の解析	H16.4～H20.3
宮崎 泰司	長崎大学 医学部	講師	血液疾患の解析	H17.4～H20.3
青木 弘貴	自治医科大学 医学部	大学院生	心不全の解析	H16.4～H17.3
曾田 学	自治医科大学 医学部	大学院生	呼吸器腫瘍の解析	H17.4～H20.3
藤原慎一郎	自治医科大学 医学部	大学院生	血液疾患の解析	H17.4～H20.3
倉科憲太郎	自治医科大学 医学部	大学院生	消化器腫瘍の解析	H17.4～H20.3
榎本 宗浩	自治医科大学 医学部	大学院生	呼吸器腫瘍の解析	H17.4～H20.3
春田 英律	自治医科大学 医学部	大学院生	消化器腫瘍の解析	H19.4～H20.3
浜田 徹	自治医科大学 医学部	大学院生	消化器腫瘍の解析	H19.4～H20.3

② バイオインフォマティクス解析グループ (バイオインフォマティクスによる発現データ解析)

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
大橋 順	東京大学医学系 研究科	助教	バイオインフォマティクス によるデータ解析	H14.11～H20.3



## 5 招聘した研究者等

なし

## 6 成果発表等

(1)原著論文発表 (国内誌 2件、国際誌 62件)

- 1) 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* **448**: 561-566, 2007.
- 2) 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* **21**: 1333-1337, 2007.
- 3) Yamasaki R, Miyazaki Y, Moriuchi Y, Tsutsumi C, Fukushima T, Yoshida S, Taguchi J, Inoue Y, Matsuo E, Imaizumi Y, Imanishi D, Fujimoto T, Tsushima H, Honda S, Hata T, Tsukasaki K & Tomonaga M. Small number of HTLV-1-positive cells frequently remains during complete remission after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation that are heterogeneous in origin among cases with adult T-cell leukemia/lymphoma. *Leukemia* **21**: 1212-1217, 2007.
- 4) Oh I, Ozaki M, Miyazato A, Sato K, Meguro A, Muroi K, Nagai T, Mano H & Ozawa K. Screening of genes responsible for differentiation of mouse mesenchymal stromal cells by DNA micro-array analysis of C3H10T1/2 and C3H10T1/2-derived cell lines. *Cytotherapy* **9**: 80-90, 2007.
- 5) Matsuo E, Miyazaki Y, Tsutsumi C, Inoue Y, Yamasaki R, Hata T, Fukushima T, Tsushima H, Imanishi D, Imaizumi Y, Iwanaga M, Sakai M, Ando K, Sawayama Y, Ogawa D, Kawaguchi Y, Nagai K, Tsukasaki K, Ikeda S, Moriuchi Y, Yoshida S, Honda M, Taguchi J, Onimaru Y, Tsuchiya T, Tawara M, Atogami S, Yamamura M, Soda H, Yoshida Y, Matsuo Y, Nonaka H, Joh T, Takasaki Y, Kawasaki C, Momita S, Jinnai I, Kuriyama K & Tomonaga M. Imatinib provides durable molecular and cytogenetic responses in a practical setting for both newly diagnosed and previously treated chronic myelogenous leukemia: a study in nagasaki prefecture, Japan. *Int J Hematol* **85**: 132-139, 2007.
- 6) Matsuda A, Germing U, Jinnai I, Iwanaga M, Misumi M, Kuendgen A, Strupp C, Miyazaki Y, Tsushima H, Sakai M, Bessho M, Gattermann N, Aul C & Tomonaga M. Improvement of criteria for refractory cytopenia with multilineage dysplasia according to the WHO classification based on prognostic significance of morphological features in patients with refractory anemia according to the FAB classification. *Leukemia* **21**: 678-686, 2007.
- 7) Mano H & Takada S. mRAP, a sensitive method for determination of microRNA expression profiles. *Methods* **43**: 118-122, 2007.
- 8) 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.

- 9) Imanishi D, Miyazaki Y, Yamasaki R, Sawayama Y, Taguchi J, Tsushima H, Fukushima T, Yoshida S, Sasaki H, Hata T & Tomonaga M. Donor-derived DNA in fingernails among recipients of allogeneic hematopoietic stem-cell transplants. *Blood* **110**: 2231–2234, 2007.
- 10) 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<sub>2</sub>, G-protein coupled, 2 revealed by retroviral expression screening. *Biochem Biophys Res Commun* **356**: 723–726, 2007.
- 11) 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* **21**: 1005–1014, 2007.
- 12) 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<sub>8</sub>, G protein coupled, 8 revealed by retroviral expression screening. *Leuk Lymphoma* **48**: 978–986, 2007.
- 13) 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* **26**: 1245–1255, 2007.
- 14) 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.
- 15) 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.
- 16) 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.
- 17) 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.
- 18) 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.
- 19) 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.
- 20) 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.

- 21) 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* **14**: 1295–1305, 2006.
- 22) Mano H. DNA microarray analysis of myelodysplastic syndrome. *Leuk Lymphoma* **47**: 9–14, 2006.
- 23) Mano H. Epigenetics and hematological disorders. *臨床血液* **47**: 3–8, 2006.
- 24) Komoda M, Fujimoto T, Kawaguchi Y, Tsushima H, Fukushima T, Hata T, Miyazaki Y, Tsukasaki K & Tomonaga M. Plasmodium vivax malaria with clinical presentation mimicking acute type idiopathic thrombocytopenic purpura. *臨床血液* **47**: 1453–1456, 2006.
- 25) 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.
- 26) 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.
- 27) Inoue Y, Tsushima H, Ando K, Sawayama Y, Sakai M, Yamasaki R, Matsuo E, Tsutsumi C, Imaizumi Y, Iwanaga M, Imanishi D, Taguchi J, Miyazaki Y & Tomonaga M. Chemokine expression in human erythroid leukemia cell line AS-E2: macrophage inflammatory protein-3alpha/CCL20 is induced by inflammatory cytokines. *Exp Hematol* **34**: 19–26, 2006.
- 28) 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.
- 29) 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.
- 30) 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.
- 31) 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.
- 32) Matsuda A, Germing U, Jinnai I, Misumi M, Kuendgen A, Knipp S, Aivado M, Iwanaga M, Miyazaki Y, Tsushima H, Sakai M, Bessho M & Tomonaga M. Difference in clinical features between Japanese and German patients with refractory anemia in myelodysplastic syndromes. *Blood* **106**: 2633–2640, 2005.
- 33) 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.

- 34) 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.
- 35) 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.
- 36) 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.
- 37) Fukushima T, Miyazaki Y, Honda S, Kawano F, Moriuchi Y, Masuda M, Tanosaki R, Utsunomiya A, Uike N, Yoshida S, Okamura J & Tomonaga M. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation provides sustained long-term survival for patients with adult T-cell leukemia/lymphoma. *Leukemia* **19**: 829–834, 2005.
- 38) 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.
- 39) 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.
- 40) Tsutsumi C, Ueda M, Miyazaki Y, Yamashita Y, Choi YL, Ota J, Kaneda R, Koinuma K, Fujiwara S, Kisanuki H, Ishikawa M, Ozawa K, Tomonaga M & Mano H. DNA microarray analysis of dysplastic morphology associated with acute myeloid leukemia. *Exp Hematol* **32**: 828–835, 2004.
- 41) Ohki-Kaneda R, Ohashi J, Yamamoto K, Ueno S, Ota J, Choi YL, Koinuma K, Yamashita Y, Misawa Y, Fuse K, Ikeda U, Shimada K & Mano H. Cardiac function-related gene expression profiles in human atrial myocytes. *Biochem Biophys Res Commun* **320**: 1328–1336, 2004.
- 42) Ohki R, Yamamoto K, Ueno S, Mano H, Misawa Y, Fuse K, Ikeda U & Shimada K. Transcriptional profile of genes induced in human atrial myocardium with pressure overload. *Int J Cardiol* **96**: 381–387, 2004.
- 43) Mano H. Stratification of acute myeloid leukemia based on gene expression profiles. *Int J Hematol* **80**: 389–394, 2004.
- 44) Koinuma K, Shitoh K, Miyakura Y, Furukawa T, Yamashita Y, Ota J, Ohki R, Choi YL, Wada T, Konishi F, Nagai H & Mano H. Mutations of BRAF are associated with extensive hMLH1 promoter methylation in sporadic colorectal carcinomas. *Int J Cancer* **108**: 237–242, 2004.
- 45) Kano Y, Akutsu M, Tsunoda S, Izumi T, Mori K, Fujii H, Yazawa Y, Mano H & Furukawa Y. Schedule-dependent synergism and antagonism between pemetrexed and paclitaxel in human carcinoma cell lines in vitro. *Cancer Chemother Pharmacol* **54**: 505–513, 2004.
- 46) Kaneda R, Toyota M, Yamashita Y, Koinuma K, Choi YL, Ota J, Kisanuki H, Ishikawa M, Takada S, Shimada K & Mano H. High-throughput screening of genome fragments bound to differentially acetylated histones. *Genes Cells* **9**: 1167–1174, 2004.
- 47) He H, Hirokawa Y, Gazit A, Yamashita Y, Mano H, Kawakami Y, Kawakami, Hsieh CY, Kung HJ, Lessene G, Baell J, Levitzki A & Maruta H. The Tyr-kinase inhibitor AG879, that blocks

- the ETK-PAK1 interaction, suppresses the RAS-induced PAK1 activation and malignant transformation. *Cancer Biol Ther* **3**: 96-101, 2004.
- 48) Choi YL, Makishima H, Ohashi J, Yamashita Y, Ohki R, Koinuma K, Ota J, Isobe Y, Ishida F, Oshimi K & Mano H. DNA microarray analysis of natural killer cell-type lymphoproliferative disease of granular lymphocytes with purified CD3(-)CD56(+) fractions. *Leukemia* **18**: 556-565, 2004.
- 49) Bai J, Sata N, Nagai H, Wada T, Yoshida K, Mano H, Sata F & Kishi R. Genistein-Induced Changes in Gene Expression in Panc 1 Cells at Physiological Concentrations of Genistein. *Pancreas* **29**: 93-98, 2004.
- 50) Araki H, Katayama N, Yamashita Y, Mano H, Fujieda A, Usui E, Mitani H, Ohishi K, Nishii K, Masuya M, Minami N, Nobori T & Shiku H. Reprogramming of human postmitotic neutrophils into macrophages by growth factors. *Blood* **103**: 2973-2980, 2004.
- 51) Aoki N, Ueno S-i, Mano H, Yamasaki S, Shiota M, Miyazaki H, Yamaguchi-Aoki Y, Matsuda T & Ullrich A. Mutual regulation of protein-tyrosine phosphatase 20 and protein-tyrosine kinase Tec activities by tyrosine phosphorylation and dephosphorylation. *J Biol Chem* **279**: 10765-10775, 2004.
- 52) Yoshida K, Ueno S, Iwao T, Yamasaki S, Tsuchida A, Ohmine K, Ohki R, Choi YL, Koinuma K, Wada T, Ota J, Yamashita Y, Chayama K, Sato K & Mano H. Screening of genes specifically activated in the pancreatic juice ductal cells from the patients with pancreatic ductal carcinoma. *Cancer Sci* **94**: 263-270, 2003.
- 53) Ueno S, Ohki R, Hashimoto T, Takizawa T, Takeuchi K, Yamashita Y, Ota J, Choi YL, Wada T, Koinuma K, Yamamoto K, Ikeda U, Shimada K & Mano H. DNA microarray analysis of in vivo progression mechanism of heart failure. *Biochem Biophys Res Commun* **307**: 771-777, 2003.
- 54) Ueda M, Ota J, Yamashita Y, Choi YL, Ohki R, Wada T, Koinuma K, Kano Y, Ozawa K & Mano H. DNA microarray analysis of stage progression mechanism in myelodysplastic syndrome. *Br J Haematol* **123**: 288-296, 2003.
- 55) Suzuki N, Nakamura S, Mano H & Kozasa T. Galpha 12 activates Rho GTPase through tyrosine-phosphorylated leukemia-associated RhoGEF. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**: 733-738, 2003.
- 56) Ota J, Yamashita Y, Okawa K, Kisanuki H, Fujiwara S, Ishikawa M, Choi YL, Ueno S, Ohki R, Koinuma K, Wada T, Compton D, Kadoya T & Mano H. Proteomic analysis of hematopoietic stem cell-like fractions in leukemic disorders. *Oncogene* **22**: 5720-5728, 2003.
- 57) Oshima Y, Ueda M, Yamashita Y, Choi YL, Ota J, Ueno S, Ohki R, Koinuma K, Wada T, Ozawa K, Fujimura A & Mano H. DNA microarray analysis of hematopoietic stem cell-like fractions from individuals with the M2 subtype of acute myeloid leukemia. *Leukemia* **17**: 1990-1997, 2003.
- 58) Ohmine K, Nagai T, Tarumoto T, Miyoshi T, Muroi K, Mano H, Komatsu N, Takaku F & Ozawa K. Analysis of gene expression profiles in an imatinib-resistant cell line, KCL22/SR. *Stem Cells* **21**: 315-321, 2003.
- 59) Ohki R, Yamamoto K, Ueno S, Mano H, Ikeda U & Shimada K. Effects of Olmesartan, an Angiotensin II Receptor Blocker, on Mechanically-Modulated Genes in Cardiac Myocytes. *Cardiovasc Drugs Ther* **17**: 231-236, 2003.

- 60) Ogata Y, Takahashi M, Ueno S, Takeuchi K, Okada T, Mano H, Ookawara S, Ozawa K, Berk BC, Ikeda U, Shimada K & Kobayashi E. Antiapoptotic Effect of Endothelin-1 in Rat Cardiomyocytes In Vitro. *Hypertension* **41**: 1156-1163, 2003.
- 61) Horwood NJ, Mahon T, McDaid JP, Campbell J, Mano H, Brennan FM, Webster D & Foxwell BM. Bruton's tyrosine kinase is required for lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor alpha production. *J Exp Med* **197**: 1603-1611, 2003.
- 62) Ohki R, Yamamoto K, Mano H, Lee RT, Ikeda U & Shimada K. Identification of mechanically induced genes in human monocytic cells by DNA microarrays. *J Hypertens* **20**: 685-691, 2002.
- 63) Ogata Y, Takahashi M, Takeuchi K, Ueno S, Mano H, Ookawara S, Kobayashi E, Ikeda U & Shimada K. Fluvastatin induces apoptosis in rat neonatal cardiac myocytes: a possible mechanism of statin-attenuated cardiac hypertrophy. *J Cardiovasc Pharmacol* **40**: 907-915, 2002.
- 64) Makishima H, Ishida F, Ito T, Kitano K, Ueno S, Ohmine K, Yamashita Y, Ota J, Ota M, Yamauchi K & Mano H. DNA microarray analysis of T cell-type lymphoproliferative disease of granular lymphocytes. *Br J Haematol* **118**: 462-469, 2002.

(2)その他の著作物

- 1) 間野博行. 非小細胞肺癌における形質転換EML4-ALK融合遺伝子の同定. *Lung Cancer Update* **61**: 1-2, 2007.
- 2) 間野博行. マイクロRNAのハイスループット解析. *バイオテクノロジージャーナル* **7**: 322-325, 2007.
- 3) 間野博行. SNPアレイCGH解析によるT細胞性リンパ腫のゲノム解析. *血液・腫瘍科* **54**: 388-393, 2007.
- 4) 間野博行. マイクロアレイ法. *モダンフィジシャン* **27**: 481-485, 2007.
- 5) 間野博行 & 松原謙一. DNAチップ実験の意義と今後の方向性. *Animus* **11**: 6-15, 2006.
- 6) 間野博行. ゲノミクスによる疾患関連遺伝子の同定. *THE LUNG* **14**: 435-439, 2006.
- 7) 間野博行. 膵癌におけるタンパク質・遺伝子発現の網羅的解析. *最新医学* **61**: 1813-1818, 2006.
- 8) 間野博行. MDSのゲノム解析. *血液・腫瘍科* **53**: 129-135, 2006.
- 9) 間野博行. マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析でもたらされた新発見. *分子細胞治療* **5**: 40-44, 2006.
- 10) 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. In *Annual Review 血液 2006*. pp 124-130, 中外医学社 (東京), 2006.
- 11) 間野博行. ゲノム医療. In *三輪血液学*. pp 871-879, 文光堂 (東京), 2005.
- 12) 間野博行. いかにして個別化医療が可能か. *Molecular Medicine* **42**: 848-850, 2005.
- 13) 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. *Molecular Medicine* **42**: 866-871, 2005.
- 14) 間野博行. マイクロアレイを用いた造血管器悪性腫瘍の分類と予後. *総合臨床* **54**: 1752-1755, 2005.
- 15) 間野博行. DNAチップ解析による造血管器腫瘍診断. *日本内科学会雑誌* **94**: 2224-2230, 2005.
- 16) 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.
- 17) 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.

- 18) 崔永林 & 間野博行. NK細胞型顆粒リンパ球増多症のDNAマイクロアレイ解析. 血液・腫瘍科 **51**: 479-484, 2005.
- 19) 間野博行. DNAマイクロアレイ法によるリンパ腫治療の層別化?. In EBM 血液疾患の治療. pp 477-482, 中外医学社 (東京), 2004.
- 20) 間野博行. 予後の予測:急性白血病. 臨床医 **30**: 2151-2153, 2004.
- 21) 間野博行. 遺伝子発現プロファイリング. In 慢性骨髄増殖性疾患. pp 49-57, 最新医学社 (大阪), 2004.
- 22) 間野博行. 骨髄異形成症候群のマイクロアレイ解析. 内科 **94**: 462-466, 2004.
- 23) 間野博行. プロテオミクスの癌診療への応用. Cancer Frontier **6**: 64-69, 2004.
- 24) 間野博行. ゲノミクス解析に基づく白血病治療. 血液・免疫・腫瘍 **9**: 181-185, 2004.
- 25) 間野博行. ポストゲノム時代の血液疾患EBMはどのようになるのか. EBMジャーナル **5**: 94-98, 2004.
- 26) 間野博行. 多発性骨髄腫と関連疾患の遺伝子発現プロファイル. In Annual Review 血液 2004. pp 156-164, 中外医学社 (東京), 2004.
- 27) 間野博行. DNAマイクロアレイの基礎と実際(4)-第2世代のアレイ実験:BAMPスクリーニング. Front Wave in Hematology **8**: 8-9, 2004.
- 28) 間野博行. マイクロアレイによる造血器腫瘍の鑑別診断. Currents in Hematoimmunology **20**: 4-8, 2004.
- 29) 間野博行. ゲノムと技術. JIM **14**: 110-113, 2004.
- 30) 間野博行. DNAマイクロアレイの基礎と実際(3)-発現解析の実際:クラス特異的遺伝子の抽出. Front Wave in Hematology **7**: 8-9, 2003.
- 31) 間野博行. プロテオミクスによる疾病解析. 現代医療 **35**: 2895-2900, 2003.
- 32) 間野博行. DNAマイクロアレイの基礎と実際(2)-発現解析の実際:データの抽出. Front Wave in Hematology **6**: 8-9, 2003.
- 33) 間野博行. ゲノム情報をもたらす個別化治療の夢. Front Wave in Hematology **4**: 4-7, 2003.
- 34) 間野博行. BAMPスクリーニング:白血病への包括的アプローチ. 臨床血液 **44**: 437-445, 2003.
- 35) 間野博行. 白血病のマイクロアレイ解析. 内科 **92**: 434-437, 2003.
- 36) 間野博行. DNAチップ. 日本内科学会雑誌 **92**: 1030-1035, 2003.
- 37) 間野博行. DNAマイクロアレイの基礎と実際(1)-DNAマイクロアレイとは何か?. Front Wave in Hematology **5**: 8-9, 2003.
- 38) 間野博行. DNAチップによる造血器腫瘍の解析. ゲノム医学 **3**: 167-171, 2003.
- 39) 間野博行. 造血幹細胞のゲノミクスとプロテオミクス. In Annual Review 血液2003. pp 21-25, 中外医学社 (東京), 2003.
- 40) 間野博行. DNAチップの血液臨床への応用. 血液フロンティア **13**: 65-70, 2003.
- 41) 間野博行. ポストゲノム時代の医療. 分子細胞治療 **2**: 1-2, 2003.
- 42) 間野博行. DNAチップ法-造血器腫瘍. Medical Technology **31**: 34-39, 2003.
- 43) 間野博行. DNAチップ法. In 血液・固形腫瘍診断マニュアル. pp 70-75, フジメディカル出版 (大阪), 2002.
- 44) 間野博行. 発現プロファイルにもとづくびまん性大細胞型B細胞リンパ腫の治療反応性予測. 分子細胞治療 **1**: 650-651, 2002.
- 45) 間野博行. 血液疾患とgenome医療. Die Nische **1**: 5-8, 2002.
- 46) 間野博行. 血液:DNAチップを用いた新たな展開. 最新医学 **9**: 2169-2176, 2002.
- 47) 間野博行. DNAアレイを用いた悪性リンパ腫の病態解析. 内科 **90**: 512-516, 2002.

- 48) 間野博行. 骨髄不全症候群とDNAチップ. *Medical Practice* **19**: 1338-1339, 2002.
- 49) 間野博行. DNAチップによる造血器腫瘍の解析. *遺伝子医学* **6**: 202-205, 2002.
- 50) 間野博行. 前立腺癌のmolecular fingerprint. *BIO Clinica* **17**: 553-556, 2002.
- 51) 間野博行. 造血幹細胞のfunctional genomics. In *造血幹細胞*. pp 117-125, 中外医学社 (東京), 2002.
- 52) 間野博行. 高血圧・心不全を対象とした遺伝子スクリーニングの知見. *血圧* **9**: 57-61, 2002.
- 53) 間野博行. DNAチップによる悪性リンパ腫の解析. In *Annual Review 血液* 2002. pp 121-127, 中外医学社 (東京), 2002.
- 54) 間野博行. DNAマイクロアレイによる白血病の解析. *ゲノム医学* **2**: 61-65, 2002.

(3)学会発表(国際学会発表及び主要な国内学会発表)

① 招待講演 (国内会議 16 件、国際会議 4 件)

国内会議

- 1) 間野博行:Epigeneticsと血液疾患、第67回日本血液学会・第47回日本臨床血液学会合同総会、横浜、2005年9月17-19日
- 2) 間野博行:DNAチップ入門、第67回日本血液学会・第47回日本臨床血液学会合同総会、横浜、2005年9月17-19日
- 3) 間野博行:DNAチップによる遺伝子異常検出—予後予測法の開発、第38回中国四国医学検査学会、愛媛、2005年11月5-6日
- 4) 間野博行:マイクロアレイを用いた遺伝子発現異常とゲノムコピー数異常の包括的解析、第28回日本分子生物学会年会、福岡、2005年12月7-10日
- 5) 間野博行:うつ血性心不全のジェノミクス。第4回Class Aシステムバイオロジーセミナー、東京、2006年7月10日
- 6) 間野博行:ゲノミクス技術によるうつ血性心不全の病態解明。川崎病院学術講演会、岡山、2006年11月2日
- 7) 間野博行:ヒトアレイを用いたうつ血性心不全のエピジェネティック解析。第22回Wakoワークショップ、東京、2006年11月24日
- 8) 間野博行:心疾患のエピジェネティクス。第77回日本衛生学会シンポジウム、大阪、2007年3月26日
- 9) 間野博行:miRNAによる臨床検体の高感度miRNAプロファイリング。第65回日本癌学会学術総会、横浜、2006年9月28-30日
- 10) 間野博行:DNAチップの新しい世界。文部科学省市民講座「次世代と考えるゲノム科学の未来」、東京、2007年1月20日
- 11) 間野博行:臨床疾患のジェネティクス。医薬ライセンシング協会月例会、東京、2007年5月16日
- 12) 間野博行:心不全のエピジェネティクス、第43回高血圧関連疾患モデル学術総会、大阪、2007年9月7-8日
- 13) 間野博行:非小細胞肺癌における新しい癌遺伝子の発見、第15回シグナリングセミナー、東京、2007年9月27日
- 14) 間野博行:肺非小細胞癌における新規癌遺伝子EML4-ALKの発見、第24回東日本呼吸器医研究会、東京、2007年9月28日
- 15) 間野博行:新しい肺がんの原因遺伝子を発見:診断と治療の展開、第25回プレスセミナー、東京、2007年10月2日
- 16) 間野博行:cDNA発現ライブラリーを用いた新規肺癌原因遺伝子の同定、生理研研究会、愛知、2007年11月13-14日

国際会議

- 1) Mano, H., Toyota, M., Kaneda, R.: Differential chromatin scanning :a novel method for



genome-wide screening of genes embedded in histone with differential acetylation level. AACR special conference in cancer research, Hawaii U.S.A., November 10-14, 2004

- 2) Mano, H., Yamashita, Y.: Novel Stratification scheme for AML based on a large-scale DNA microarray analysis of CD133-positive blasts. The 46th ASH Annual Meeting, San Diego, U.S.A., December 4-7, 2004.
- 3) Mano, H.: DNA microarray analysis of myelodysplastic syndromes with purified CD133-positive stem cell fractions. 8th International Symposium on Myelodysplastic Syndromes, Nagasaki, May 12-15, 2005.
- 4) Mano, H.: Clinical optimization of biochips in cancer/Integrative genomics in cancer. National Biochip Research Center Biochip Symposium 2006, Seoul, Korea, February 25, 2006.

② 口頭発表 (国内会議 26 件、国際会議 0 件)

国内会議

- 1) 太田淳, 上田真寿, 間野博行: MDS の病期進行に関与する遺伝子 PIASy, 第 1 回幹細胞シンポジウム, 大阪, 2003 年 5 月 29 日
- 2) 太田淳, 上田真寿, 大嶺謙, 崔永林, 山下義博, 間野博行: MDS の病期進行における SUMO ligase, PIASy の関与, 第 65 回日本血液学会, 大阪, 2003 年 8 月 28-31 日(臨床血液第 44 巻 8 号, 178, 2003)
- 3) 山下義博, 太田淳, 大川克也, 大嶺謙, 崔永林, 門屋利彦, 間野博行: 二次元電気泳動および質量分析による白血病類縁疾患のプロテオーム比較, 第 65 回日本血液学会, 大阪, 2003 年 8 月 28-31 日(臨床血液第 44 巻 8 号, 178, 2003.)
- 4) 金田るり: 心筋細胞におけるヒストン脱アセチル化酵素のターゲット遺伝子のゲノムワイドスクリーニング: 第 69 回日本循環器学会・学術集会、横浜、2004 年 3 月 19-21 日
- 5) 鯉沼広治, 山下義博、大木るり、豊田実、永井秀雄、間野博行: 大腸癌における DNA 異常メチル化の解析: 第 15 回日本消化器癌発生学会総会、第 3 回国際消化器癌学会、札幌、2004 年 8 月 19-20 日
- 6) 崔永林、篠塚邦弘、朝長万左男、間野博行: 純化 ATL 細胞の大規模アレイ解析による病期進展機構解明: 第 66 回日本血液学会総会、第 46 回日本臨床血液学会総会、京都、2004 年 9 月 17-19 日
- 7) 山下義博、間野博行: 大規模 DNA チップ解析による AML 予後予測法の開発: 第 66 回日本血液学会総会、第 46 回日本臨床血液学会総会、京都、2004 年 9 月 17-19 日
- 8) 高田修治: マイクロ RNA の網羅的スクリーニング法(mRAP 法)の開発と血液疾患への応用、第 67 回日本血液学会・第 47 回日本臨床血液学会合同総会、横浜、2005 年 9 月 17-19 日
- 9) 山下義博: 白血病類縁疾患における高密度オリゴヌクレオチド DNA マイクロアレイを用いた CGH 解析と染色体異常部位の同定、第 67 回日本血液学会・第 47 回日本臨床血液学会合同総会、横浜、2005 年 9 月 17-19 日
- 10) 倉科憲太郎、岡田真樹、堀江久永、小島正幸、安田是和、山下義博、高田修治、永井秀雄、間野博行: SNP タイピングアレイを用いた大腸癌のゲノム量的異常解析、第 17 回日本消化器癌発生学会、愛知、2006 年 9 月 14-15 日
- 11) 倉科憲太郎、山下義博、永井秀雄、間野博行: SNP タイピングアレイを用いた大腸癌のゲノム量的異常解析、第 65 回日本癌学会学術総会、横浜、2006 年 9 月 28-30 日
- 12) 榎本宗浩、山下義博、曾田 学、杉山幸比古、間野博行: 高密度 SNP アレイを用いた特発性肺線維症・肺癌における疾患特異的 LOH・染色体コピー数変化の同定、第 65 回日本癌学会学術総会、横浜、2006 年 9 月 28-30 日
- 13) 曾田 学、榎本宗浩、山下義博、杉山幸比古、間野博行: 完全長 cDNA 発現レトロウイルスライブラリーを用いた肺癌原因遺伝子の同定、第 65 回日本癌学会学術総会、横浜、2006 年 9 月 28-30 日

- 14) 崔永林、藤原慎一郎、山下義博、間野博行:レトロウィルスライブラリーによる活性型 JAK3 の同定、第 68 回日本血液学会総会、第 48 回日本臨床血液学会総会、福岡、2006 年 10 月 6-8 日
- 15) 藤原慎一郎、山下義博、中村直哉、崔永林、阿部正文、小澤敬也、間野博行:SNP アレイ CGH 解析による T 細胞性非ホジキンリンパ腫の予後関連ゲノム座位の同定、第 68 回日本血液学会総会、第 48 回日本臨床血液学会総会、福岡、2006 年 10 月 6-8 日
- 16) 倉科憲太郎、間野博行、岡田真樹、堀江久永、小島正幸、鯉沼広治、宮倉安幸、佐藤寛丈、安田是和、山下義博、高田修治、永井秀雄:SNP タイピングアレイを用いた大腸癌のゲノム量的異常解析、DDW-Japan2006、札幌、2006 年 10 月 11-14 日
- 17) 曾田 学、杉山幸比古、板東政司、大野彰二、蘇原泰則、仁木利郎、間野博行:完全長 cDNA 発現レトロウィルスライブラリーを用いた肺癌原因遺伝子の同定、第 47 回日本肺癌学会総会、京都、2006 年 12 月 14-15 日
- 18) 倉科憲太郎、細谷好則、俵藤正信、瑞木亨、佐久間和也、春田英律、山下義博、高田修治、安田是和、永井秀雄、間野博行:SNP タイピングアレイを用いた胃癌のゲノム量的異常解析、第 79 回日本胃癌学会総会、名古屋、2007 年 3 月 1-3 日
- 19) 榎本宗浩、杉山幸比古、曾田 学、板東政司、大野彰二、蘇原泰則、仁木利郎、間野博行:高密度 SNP アレイを用いた特発性肺線維症・肺癌における疾患特異的 LOH・染色体コピー数変化の同定、第 47 回日本呼吸器学会学術講演会、東京、2007 年 5 月 10-12 日(要旨集 p134)
- 20) 曾田 学、杉山幸比古、榎本宗浩、板東政司、大野彰二、蘇原泰則、仁木利郎、間野博行:肺癌の新たな癌遺伝子である新規融合型チロシンキナーゼの発見、第 47 回日本呼吸器学会学術講演会、東京、2007 年 5 月 10-12 日(要旨集 p119)
- 21) 曾田 学、榎本宗浩、山下義博、杉山幸比古、間野博行:非小細胞肺癌の新たな癌遺伝子である新規融合型チロシンキナーゼの発見、第 66 回日本癌学会学術総会、横浜、2007 年 10 月 3-5 日(要旨集 p450)
- 22) 高田修治、間野博行:高感度 miRNA プロファイリング法(mRAP)による癌細胞解析、第 66 回日本癌学会学術総会、横浜、2007 年 10 月 3-5 日(要旨集 p251)
- 23) 間野博行:心筋におけるエピジェネティック制御とマイクロ RNA、第 1 回日本エピジェネティック研究会、大阪、2007 年 6 月 15-16 日
- 24) 間野博行:心不全のエピジェネティックス、第 43 回高血圧関連疾患モデル学術総会、大阪、2007 年 9 月 7-8 日(要旨集 p38)
- 25) 間野博行:肺がんにおける活性型融合チロシンキナーゼの発見、第 66 回日本癌学会学術総会、横浜、2007 年 10 月 3-5 日(要旨集 p210)
- 26) 間野博行:白血病の大規模塩基配列解析、第 69 回日本血液学会・第 49 回日本臨床血液学会合同総会、横浜、2007 年 10 月 11-13 日

③ ポスター発表 (国内会議 10 件、国際会議 20 件)

国内会議

- 1) 鯉沼広治:サブトラクション cDNA クローニング法によるマイクロサテライト不安定性散発性大腸癌関連遺伝子の同定、第 103 回日本外科学会定期学術集会、2003 年 6 月 6 日(日本外科学会雑誌第 104 巻 2 号、2003)
- 2) 鯉沼広治:BRAF 遺伝子変異は hMLH1 異常メチル化に関連する大腸発癌に関与する:第 58 回日本消化器外科学会、2003 年 7 月 18 日(日本消化器外科学会雑誌 Vol.36 No.7、2003)
- 3) 鯉沼広治、紫藤和久、宮倉安幸、山下義博、小西文雄、永井秀雄、間野博行:BRAF 遺伝子変異は hMLH1 異常メチル化に関連する大腸発癌に関与する:第 62 回日本癌学会、名古屋、2003 年 9 月 25-27 日
- 4) 木佐貫博之、山下義博、間野博行:レトロウィルス発現ライブラリーを用いた膵臓がんの原因遺伝子スクリーニング:第 27 回日本分子生物学会、神戸、2004 年 12 月 8-11 日

- 5) 山下義博、石川円、木佐貫博之、間野博行:大規模 DNA チップ解析による急性骨髄性白血病の予後予測法開発:第 27 回日本分子生物学会、神戸、2004 年 12 月 8-11 日
- 6) 石川円、吉田浩司、山下義博、間野博行:DNA チップによる膵臓がん診断法の開発:第 27 回日本分子生物学会、神戸、2004 年 12 月 8-11 日
- 7) 高田修治:マイクロ RNA の網羅的スクリーニング法(mRAP)の開発とマウス胎児期生殖巣への応用、第 28 回日本分子生物学会年会、福岡、2005 年 12 月 7-10 日
- 8) 畑中 恒、山下義博、菅野健太郎、間野博行:組換えレトロウィルスによる cDNA 発現ライブラリーを用いた大腸癌の原因遺伝子スクリーニング、第 65 回日本癌学会学術総会、横浜、2006 年 9 月 28-30 日
- 9) 渡辺秀紀、山下義博、草間幹夫、間野博行:Retroviral cDNA expression library を用いた舌癌の原因遺伝子スクリーニング、第 65 回日本癌学会学術総会、横浜、2006 年 9 月 28-30 日
- 10) 畑中 恒、曾田 学、榎本宗浩、倉科憲太郎、渡辺秀紀、山下義博、菅野健太郎、間野博行:レトロウィルス発現ライブラリーを用いた胆嚢癌の原因遺伝子スクリーニング、第 66 回日本癌学会学術総会、横浜、2007 年 10 月 3-5 日(要旨集 p478)

#### 国際会議

- 1) Choi, L.Y., Makishima, H., Ohmine, K., Ota, J., Yamashita, Y., Oshimi, K., Mano, H.: DNA microarray analysis of chronic natural killer lymphocytosis with purified CD3-CD56+ fractions. Molecular Targets for Cancer Therapy, Banff Canada, March 19-24, 2003.(Abstracts p57)
- 2) Koinuma, K., Yamashita, Y., Wada, T., Shito, K., Miyakura, Y., Nagai, H., Mano, H.: cDNA subtraction cloning of disease-dependent genes between normal and transformed human colorectal mucosa. Molecular Targets for Cancer Therapy, Banff Canada, March 19-24, 2003. (Abstracts p70)
- 3) Ota, J., Ueda, M., Yamashita, Y., Ohmine, K., Yoshida, K., Choi, Y.L., Koinuma, K., Wada, T., Mano, H.: A SUMO ligase PIASy, is involved in the stage progression mechanism of myelodysplastic syndrome. Molecular Targets for Cancer Therapy, Banff Canada, March 19-24, 2003.(Abstracts p78)
- 4) Yamashita, Y., Ota, J., Ohmine, K., Choi, Y.L., Yoshida, K., Koinuma, K., Wada, T., Mano, H.: Proteomic analysis of hematopoietic stem cell-like fractions in leukemic disorders. Molecular Targets for Cancer Therapy, Banff Canada, March 19-24, 2003.(Abstracts p92)
- 5) Koinuma, K., Shitoh, K., Miyakura, Y., Furukawa, T., Konishi, F., Yamashita, Y., Nagai H., Mano, H.: BRAF mutations and hMLH1 promoter methylation status in non-familial colorectal carcinoma with microsatellite instability, Digestive Disease Week 2003, Orlando, USA, May 18-21, 2003.
- 6) Koinuma, K., Shitoh, K., Miyakura, Y., Furukawa, T., Konishi, F., Yamashita, Y., Nagai H., Mano, H.: BRAF mutations and hMLH1 promoter methylation status in non-familial colorectal carcinoma with microsatellite instability, The Americal Society of Colon & Rectal Surgeons Annual Meeting, New Orleans, USA, June 21-26, 2003.
- 7) Choi, L.Y., Tsukasaki, K., Yamashita, Y., Koinuma, K., Tomonaga, M., Mano, H.: DNA microarray analysis of stage progression mechanism in adult T-cell leukemia. Keystone Symposia: Biological Discovery Using Diverse High-Throughput Data, Steamboat Springs, U.S.A. March 30-April 4, 2004.
- 8) Koinuma, K., Yamashita, Y., Ota J., Ohki, R., Choi, L.Y., Fujiwara, S., Wada, T., Kisanuki, H., Ishikawa, M., Shitoh, K., Miyakura, Y., Nagai, H., Mano, H.: Gene expression profiling distinguishes sporadic colorectal cancers with and without microsatellite instability. Keystone Symposia: Biological Discovery Using Diverse High-Throughput Data, Steamboat Springs, U.S.A. March 30-April 4, 2004.

- 9) Yamashita, Y., Koinuma, K., Choi, L.Y., Mano, H.: A proposal of a microarray-based classification scheme for acute myeloid leukemia. Keystone Symposia: Biological Discovery Using Diverse High-Throughput Data, Steamboat Springs, U.S.A. March 30-April 4, 2004.
- 10) Choi, L.Y., Tukasaki, K., Onimaru, Y., Yamada, Y., Kamihira, S., Tomonaga, M., Mano, H.: DNA microarray analysis of stage progression mechanism in adult T-cell leukemia. The 46th ASH Annual Meeting, San Diego, U.S.A., December 4-7, 2004.
- 11) Kaneda, R.: High-Throughput screening of genome fragments bound to differentially acetylated histones in cardiomyocytes. Keystone Symposia, Steamboat Springs, Colorado, U.S.A., April. 3-8, 2005.
- 12) Kaneda, R.: Genome-Wide screening for target regions of histone deacetylases in cardiomyocytes. Circulation, Dallas, Texas, U.S.A., November, 13-16, 2005
- 13) Soda, M., Enomoto, M., Choi, Y., L., Bando, M., Ohno, S., Hironaka, M., Niki, T., Mano, M., Sugiyama, Y.: Retroviral Expression Screening of Oncogenes in Primary Non-small-cell Lung Cancer, 11th Congress of the Asian Pacific Society of Respiriology, Kyoto, Nov.19-22, 2006
- 14) Enomoto, M., Soda, M., Yamashita, Y., Bando, M., Ohno, S., Hironaka, M., Niki, T., Mano, M., Sugiyama, Y.: Identification of Disease-specific LOH for Lung Cancer and Idiopathic Pulmonary Fibrosis with High-density SNP-typing Arrays, 11th Congress of the Asian Pacific Society of Respiriology, Kyoto, Nov.19-22, 2006
- 15) Fujiwara, S., Yamashita, Y., Nakamura, N., Abe, M., Ozawa, K., Mano, H.: Outcome-Related Genome Loci in T-Cell Non-Hodgkin's Lymphoma Identified by High-Resolution SNP-Typing Arrays. The American Society of Hematology 48th Annual Meeting and Exposition, Florida, U.S.A., Dec.9-12, 2006
- 16) Hatanaka, H., Yamashita, Y., Soda, M., Watanabe, H., Kurashina, K., Sugano, K., Mano, H.: Retroviral expression screening of oncogenes in colorectal carcinoma. Keystone Symposia (Molecular Targets of Cancer), Whistler, British Columbia, Canada, Mar.18-23, 2007
- 17) Watanabe, H., Yamashita, Y., Hatanaka, H., Kurashina, K., Soda, M., Kusama, M., Mano, H.: Expression screening of oncogenes in Tong cancer with retroviral cDNA library. Keystone Symposia (Molecular Targets of Cancer), Whistler, British Columbia, Canada, Mar.18-23, 2007
- 18) Soda, M., Yamashita, Y., Watanabe, H., Hatanaka, H., Kurashina, K., Sugiyama, Y., Mano, H.: Retroviral expression screening of oncogenes in non-small-cell lung cancer (NSCLC). Keystone Symposia (Molecular Targets of Cancer), Whistler, British Columbia, Canada, Mar.18-23, 2007
- 19) Kurashina, K., Yamashita, Y., Hatanaka, H., Watanabe, H., Soda, M., Nagai, H., Mano, H.: High-resolution copy number analysis for the genome of colorectal carcinoma with SNP-typing microarrays. Keystone Symposia (Molecular Targets of Cancer), Whistler, British Columbia, Canada, Mar.18-23, 2007
- 20) Yamashita, Y., Kurashina, K., Watanabe, H., Soda, M., Hatanaka, H., Mano, H.: Analysis of chromosome copy number in leukemic cells by different microarray platforms. Keystone Symposia (Molecular Targets of Cancer), Whistler, British Columbia, Canada, Mar.18-23, 2007

#### (4)特許出願

##### ①国内出願 (2 件)

1. 出願番号:特願2005-168336、出願人:間野博行/中村敏一/クリングルファーマ(株)、  
発明名称:成人 T 細胞白血病予防治療剤、出願日:2005(平成 17)年6月8日

その他 1 件

②海外出願 (1 件)

1.PCT 出願:PCR/JP2006/311336、出願人:間野博行／中村敏一／クリングルファーマ(株)、  
発明名称:成人 T 細胞白血病予防治療剤、出願日:2006(平成 18)年 6 月 6 日

その他 0 件

(5)受賞等

①受賞

なし

②新聞報道

- ・ Medical Tribune 誌 2004 年 10 月 21 日号 成人 T 細胞白血病の DNA マイクロアレイ解析研究が掲載。
- ・ 日経バイオテク 2005 年 8 月 1 日号 我々が開発したクロマチン免疫沈降解析法「DCS 法」が掲載。
- ・ 日経バイオテク 2005 年 9 月 12 日号 我々が開発したマイクロ RNA 同定法が掲載。
- ・ NHK ニュース「おはよう日本」 2007 年 7 月 12 日 EML4-ALK 発見に関する記者会見内容を計 5 回放映
- ・ 朝日新聞、読売新聞、産経新聞、日本経済新聞、下野新聞、日刊工業新聞、日経産業新聞、フジサンケイビジネスアイ、科学新聞 2007 年 7 月 12 日 EML4-ALK 発見の記事が掲載。同じテーマが聖教新聞 2007 年 8 月 2 日号でも紹介された
- ・ 「がん治療最前線」誌、2007 年 11 月号に EML4-ALK の発見が紹介された。
- ・ Nature Medicine 8 月号の“Research Highlights”欄で EML4-ALK 発見内容が紹介された。
- ・ Nature Reviews Cancer 8 月号で EML4-ALK 発見内容が紹介された。
- ・ Medical Tribune 2007 年 8 月 16 日号で EML4-ALK 発見内容が紹介された。

③その他

- ・Nature 誌ダウンロード論文トップ 10 の第 4 位にランク(2007 年 8 月分)。

(6)その他特記事項

なし

7 研究期間中の主な活動

なし

8 結び

本研究計画で 1000 例以上の臨床検体の純化・保存に成功し、またそれらを使ったゲノミクス解析によって多くの疾患関連遺伝子を同定することが出来た。中でも肺がん試料から組換えレトロウイルスを用いた cDNA 発現ライブラリーを構築し、がん遺伝子スクリーニングを行った結果、微小管会合タンパク EML4 と受容体型チロシンキナーゼ ALK とが融合した活性型チロシンキナーゼ EML4-ALK を発見できたのは、本プロジェクトの大きな成果であった。白血病芽球の大規模シークエンスプロジェクトの結果新たな活性型がん遺伝子を同定することに成功した。この成果をさらに発

展するべく CREST の研究プロジェクトがさらに延長できれば有り難い。なおプロジェクトを通して、総括責任者の笹月健彦先生と科学技術振興機構の担当係官の方々には多くのご援助を賜りました。この場をかりて御礼申し上げます。

