

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-512557

(P2005-512557A)

(43) 公表日 平成17年5月12日(2005.5.12)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)	
C 1 2 Q 1/68	C 1 2 Q 1/68	Z N A A	4 B 0 2 4
A 6 1 K 45/00	A 6 1 K 45/00		4 B 0 6 3
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 35/00		4 C 0 8 4
G O 1 N 33/53	G O 1 N 33/53	M	5 B 0 5 7
G O 1 N 33/566	G O 1 N 33/566		5 L 0 9 6
	審査請求 未請求 予備審査請求 未請求	(全 84 頁)	最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2003-553979 (P2003-553979)	(71) 出願人	500517271
(86) (22) 出願日	平成14年11月7日 (2002. 11. 7)		ザ ボード オブ トラスティーズ オブ
(85) 翻訳文提出日	平成16年7月5日 (2004. 7. 5)		ザ ユニヴァーシティー オブ アーカ
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/035724		ンソー
(87) 国際公開番号	W02003/053215		アメリカ合衆国 アーカンソー州 7 2 2
(87) 国際公開日	平成15年7月3日 (2003. 7. 3)		0 7 - 3 6 0 8 リトル ロック ノース
(31) 優先権主張番号	60/348, 238		ユニヴァーシティー アヴェニュー 2
(32) 優先日	平成13年11月7日 (2001. 11. 7)		4 0 4
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100073184
(31) 優先権主張番号	60/355, 386		弁理士 柳田 征史
(32) 優先日	平成14年2月8日 (2002. 2. 8)	(74) 代理人	100090468
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 佐久間 剛
(31) 優先権主張番号	60/403, 075		
(32) 優先日	平成14年8月13日 (2002. 8. 13)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 遺伝子発現プロファイリングに基づく多発性骨髄腫の診断、予後、および治療標的候補の同定

(57) 【要約】

正常B細胞/形質細胞と多発性骨髄腫細胞との間の遺伝子発現プロファイリングは、予後不良と関連することが知られている臨床徴候と有意な相関を有する、多発性骨髄腫形質細胞の4つの異なる部分集団を明らかにした。14個の遺伝子の発現の差に基づく多発性骨髄腫(およびおそらく意義不明単クローン性免疫グロブリン血症)の診断、ならびに24個の遺伝子の発現に基づく多発性骨髄腫の4つの部分集団の予測もまた確立された。遺伝子発現プロファイリングはまた、正常形質細胞分化の発生図式と平行する発生図式に多発性骨髄腫を当てはめることを可能にする。遺伝子発現または発生段階に基づく多発性骨髄腫の分類システムの開発は、多発性骨髄腫のためのより正確で高感度の診断、予測および腫瘍特異的治療の合理的設計に繋がる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】

多発性骨髄腫を有する個体または有さない個体から形質細胞を単離し；
 前記形質細胞から核酸試料を単離し；
 前記核酸試料をDNAマイクロアレイにハイブリダイズさせ；さらに
 前記ハイブリダイゼーションから得られたデータについて階層的クラスタリング分析を実施する；各工程を含み、前記クラスタリング分析が、多発性骨髄腫を有する個体と有さない個体とを異なる部分集団に分類することを特徴とする、遺伝子発現に基づく多発性骨髄腫の分類方法。

【請求項2】

多発性骨髄腫の前記部分集団が、MM1、MM2、MM3およびMM4であることを特徴とする請求項1記載の方法。

【請求項3】

多発性骨髄腫を有する個体から形質細胞を単離し；
 前記形質細胞から核酸試料を単離し；
 前記核酸試料をDNAマイクロアレイにハイブリダイズさせ；さらに
 前記ハイブリダイゼーションから得られたデータについて階層的クラスタリング分析を実施する；各工程を含み、前記クラスタリング分析が、多発性骨髄腫患者の部分集団において高い発現を有する遺伝子を特定することを特徴とする、多発性骨髄腫患者の部分集団において高い発現を有する遺伝子を特定する方法。

【請求項4】

前記遺伝子が、M64347、U89922、X67325、X59798、U62800、U35340、X12530、X59766、U58096、U52513、X76223、X92689、D17427、L11329、L13210、U10991、L10373、U60873、M65292、HT4215、D13168、AC002077、M92934、X82494、およびM30703より成る群から選択される登録番号を有することを特徴とする請求項3記載の方法。

【請求項5】

多発性骨髄腫を有する個体または有さない個体から形質細胞を単離し；
 前記形質細胞から核酸試料を単離し；
 前記核酸試料をDNAマイクロアレイにハイブリダイズさせ；
 前記ハイブリダイゼーションから得られたデータについて階層的クラスタリング分析を実施し；さらに
 多発性骨髄腫患者において健常者と比較して発現レベルが有意に異なる遺伝子を特定する；各工程を含み、前記遺伝子が多発性骨髄腫の治療標的候補であることを特徴とする、多発性骨髄腫の治療標的候補を特定する方法。

【請求項6】

多発性骨髄腫の前記治療標的候補が、L36033、M63928、U64998、M20902、M26602、M21119、M14636、M26311、M54992、X16832、M12529、M15395、Z74616、HT2152、U97105、U81787、HT3165、M83667、L33930、D83657、M11313、M31158、U24577、M16279、HT2811、M26167、U44111、X59871、X67235、U19713、Y08136、M97676、M64590、M20203、M30257、M93221、S75256、U97188、Z23091、M34344、M25897、M31994、Z31690、S80267、U00921、U09579、U78525、HT5158、X57129、M55210、L77886、U73167、X16416、U57316、Y09022、M25077、AC002115、Y07707、L22005、X66899、D50912、HT4824、U10324、AD000684、U68723、X16323、U24183、D13645、S85655、X73478、L77701、U20657、M59916、D16688、X90392、U07424、X54199、L06175、M55267、M87507、M90356、U35637、L06845、U81001、U76189、U53225、X04366、U77456、L42379、U09578、Z80780、HT4899、M74088、X57985、X79882、X77383、M91592、X63692、M60752、M96684、U16660、M86737、U35113、X81788、HT2217、M62324、U09367、X89985、L19871、X69398、X05323、X04741、D87683、D17525、M64347、U89922、X67325、X59798、U62800、U35340、X12530、X59766、U58096、U52513、X76223、X92689、D17427、L11329、L13210、U10991、L10373、U60873、M65292、HT4215、D13168、AC002077、M92934、X82494、およびM30703より成る群から選択される登録番号を有する遺伝

10

20

30

40

50

子であることを特徴とする請求項5記載の方法。

【請求項7】

多発性骨髄腫を有する個体または有さない個体から形質細胞を単離し；

前記形質細胞から核酸試料を単離し；

前記核酸試料をDNAマイクロアレイにハイブリダイズさせ；

統計的に有意な差のある遺伝子発現パターンを特定し；さらに

直線回帰分析を適用して一群の遺伝子を特定する；各工程を含み、前記一群の遺伝子が正常形質細胞と多発性骨髄腫の形質細胞とを正確に識別することができることを特徴とする、正常形質細胞と多発性骨髄腫の形質細胞とを識別することができる一群の遺伝子を特定する方法。

10

【請求項8】

前記一群の遺伝子が、登録番号HT5158、L33930、L42379、L77886、M14636、M26167、U10324、U24577、U35113、X16416、X64072、X79882、Z22970、およびZ80780を有することを特徴とする請求項7記載の方法。

【請求項9】

多発性骨髄腫を有する個体から形質細胞を単離し；

前記形質細胞から核酸試料を単離し；

前記核酸試料をDNAマイクロアレイにハイブリダイズさせ；

統計的に有意な差のある遺伝子発現パターンを特定し；さらに

直線回帰分析を適用して一群の遺伝子を特定する；各工程を含み、前記一群の遺伝子が多発性骨髄腫の部分集団を正確に識別することができることを特徴とする、多発性骨髄腫の部分集団を識別することができる一群の遺伝子を特定する方法。

20

【請求項10】

前記一群の遺伝子が、登録番号X54199、M20902、X89985、M31158、U44111、X16416、HT2811、D16688、U57316、U77456、D13645、M64590、L77701、U20657、L06175、M26311、X04366、AC002115、X06182、M16279、M97676、U10324、S85655、およびX63692を有することを特徴とする請求項9記載の方法。

【請求項11】

個体から形質細胞を単離し；

前記形質細胞内における、登録番号HT5158、L33930、L42379、L77886、M14636、M26167、U10324、U24577、U35113、X16416、X64072、X79882、Z22970、およびZ80780を有する一群の14遺伝子の発現を調べて；さらに

30

前記一群の遺伝子の発現レベルについて統計分析を実施する；各工程を含み、前記分析の統計的に有意である値が、前記個体が多発性骨髄腫を有することを示唆することを特徴とする、多発性骨髄腫の診断方法。

【請求項12】

前記14遺伝子の発現が、核酸レベルまたはタンパク質レベルで調べられることを特徴とする請求項11記載の方法。

【請求項13】

個体から形質細胞を単離し；

前記形質細胞内における、登録番号X54199、M20902、X89985、M31158、U44111、X16416、HT2811、D16688、U57316、U77456、D13645、M64590、L77701、U20657、L06175、M26311、X04366、AC002115、X06182、M16279、M97676、U10324、S85655、およびX63692を有する一群の24遺伝子の発現を調べて；さらに

40

前記一群の遺伝子の発現レベルについて統計分析を実施する；各工程を含み、前記分析の統計的に有意である値が、多発性骨髄腫の部分集団の診断を提供することを特徴とする、多発性骨髄腫の部分集団の診断方法。

【請求項14】

前記24遺伝子の発現が、核酸レベルまたはタンパク質レベルで調べられることを特徴とする請求項13記載の方法。

50

【請求項 15】

U09579、U78525、HT5158、X57129、M55210、L77886、U73167、X16416、U57316、Y09022、M25077、AC002115、Y07707、L22005、X66899、D50912、HT4824、U10324、AD000684、U68723、X16323、U24183、D13645、S85655、X73478、L77701、U20657、M59916、D16688、X90392、U07424、X54199、L06175、M55267、M87507、M90356、U35637、L06845、U81001、U76189、U53225、X04366、U77456、L42379、U09578、Z80780、HT4899、M74088、X57985、X79882、X77383、M91592、X63692、M60752、M96684、U16660、M86737、U35113、X81788、HT2217、M62324、U09367、X89985、L19871、X69398、X05323、X04741、D87683、D17525、M64347、U89922、X67325、X59798、U62800、U35340、X12530、X59766、U58096、U52513、X76223、X92689、D17427、L11329、L13210、U10991、L10373、U60873、M65292、HT4215、D13168、AC002077、M92934、X82494、およびM30703より成る群から選択される登録番号を有する遺伝子の発現を阻害する工程を含む、多発性骨髄腫の治療方法。

【請求項 16】

L36033、M63928、U64998、M20902、M26602、M21119、M14636、M26311、M54992、X16832、M12529、M15395、Z74616、HT2152、U97105、U81787、HT3165、M83667、L33930、D83657、M11313、M31158、U24577、M16279、HT2811、M26167、U44111、X59871、X67235、U19713、Y08136、M97676、M64590、M20203、M30257、M93221、S75256、U97188、Z23091、M34344、M25897、M31994、Z31690、S80267、U00921より成る群から選択される登録番号を有する遺伝子の発現を高める工程を含む、多発性骨髄腫の治療方法。

【請求項 17】

(a) 健常者から形質細胞およびB細胞を単離し；
 (b) 前記形質細胞およびB細胞から核酸試料を単離し；
 (c) 前記核酸試料をDNAマイクロアレイにハイブリダイズさせ；
 (d) 前記ハイブリダイゼーションから得られたデータについて階層的クラスタリング分析を実施し、ここで該クラスタリング分析が、前記形質細胞およびB細胞をその発生段階にしたがって分類する遺伝子を特定する；
 (e) 多発性骨髄腫を有する個体から多発性骨髄腫形質細胞を単離し；
 (f) 前記多発性骨髄腫形質細胞から核酸試料を単離し；
 (g) (f)の核酸試料をDNAマイクロアレイにハイブリダイズさせ；
 (h) (d)および(g)から得られたデータについて階層的クラスタリング分析を実施し、ここで該クラスタリング分析が前記多発性骨髄腫形質細胞を正常B細胞および形質細胞の発生段階にしたがって分類する；各工程を含むことを特徴とする、多発性骨髄腫の発生段階に基づく分類の方法。

【請求項 18】

扁桃、骨髄、粘膜組織、リンパ節および末梢血より成る群から選択された器官から前記形質細胞が単離されることを特徴とする請求項17記載の方法。

【請求項 19】

扁桃、骨髄、リンパ節および末梢血より成る群から選択された器官から前記B細胞が単離されることを特徴とする請求項17記載の方法。

【請求項 20】

DNAマイクロアレイによって遺伝子発現データを得て；さらにロジスティック回帰、決定樹、投票集団、ナイーブベイズ、ベイズネットワークおよびサポートベクトルマシンより成る群から選択される方法によって前記データについて統計分析を実施する；各工程を含み、前記分析が、正常、過形成および悪性の形質細胞を識別することを特徴とする、正常、過形成および悪性の形質細胞を識別する方法。

【請求項 21】

DNAマイクロアレイによって遺伝子発現データを得て；さらにロジスティック回帰、ツリー、投票集団、ナイーブベイズ、ベイズネットワークおよびサポートベクトルマシンより成る群から選択される方法によって前記データについて統計分析を実施する；各工程を含み、前記分析が正常と悪性の形質細胞間で発現が異なる遺伝子

を同定することを特徴とする、正常と悪性の形質細胞間で発現が異なる遺伝子を同定する方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は概して癌研究の分野に関する。より具体的には、本発明は健常者、および多発性骨髄腫と意義不明単クローン性免疫グロブリン血症を有する患者に由来する形質細胞の遺伝子発現プロファイリングに関する。

【背景技術】

【0002】

多発性骨髄腫 (MM)は、骨髄にホーミングして骨髄中で増殖する最終分化した形質細胞 (PCs)の様に致死的な腫瘍である。IGV遺伝子の体細胞突然変異の存在によって示唆されるように、多発性骨髄腫の発症に繋がる最初の形質転換現象は、発生の胚中心後の段階 (post-germinal center)に生じると考えられているが、多発性骨髄腫の生物学および遺伝学の理解および治療の発展における進歩は遅い。

【0003】

多発性骨髄腫細胞は多様な抗アポトーシスシグナル伝達機構を有し、これが現在の化学療法に対する抵抗性、およびしたがって大部分の患者にとって最終的に致死的な結果の原因となる。間期蛍光 *in situ*ハイブリダイゼーション (FISH)およびDNAフローサイトメトリーによる異数性が症例の >90%で観察される一方、この典型的には低増殖性の腫瘍における細胞遺伝学的異常は症例の約30%だけで有用であり、また典型的には複雑で、平均して7つの異なる染色体が関与する。この「遺伝的混沌」を考慮すると、遺伝子異常と臨床転帰との間に相関を確立することは困難だった。最近になって漸く、第13染色体欠失が重篤な予後を有する明確な疾患単位として同定されている。しかし、 κ -2-ミクログロブリン (κ 2M)、C反応性タンパク質 (CRP)、形質細胞標識率 (PCLI)、中期核型分析、およびFISHといった臨床検査項目の最も包括的な分析を用いても、臨床的不均一性の20%しか説明することができないため、多発性骨髄腫に罹患した患者の臨床経過は概算することしかできない。このように、多発性骨髄腫の異なる臨床的部分集団が存在し、現代の分子検査がこれらの実体を同定できる可能性がある。

【0004】

意義不明単クローン性免疫グロブリン血症 (MGUS)と多発性骨髄腫は、単クローン性免疫グロブリン血症の最も頻度の高い形である。意義不明単クローン性免疫グロブリン血症は最も一般的な形質細胞疾患であり、75歳を超える集団の最大10%の頻度を有する。意義不明単クローン性免疫グロブリン血症および多発性骨髄腫の分子的基盤はあまりよく理解されておらず、その2つの疾患を鑑別するのは容易でない。多発性骨髄腫または意義不明単クローン性免疫グロブリン血症の診断は症例の2/3で同一であり、骨髄形質細胞増殖の量、尿中または血清中の単クローン性免疫グロブリン濃度、骨病変の存在といった臨床基準の組み合わせに基づく分類システムを用いる。特に多発性骨髄腫の初期では、鑑別診断はある程度の不確実性を伴う。

【0005】

さらに、多発性骨髄腫の診断においては、臨床医は、たとえば慢性関節リウマチ、結合組織疾患、または患者が骨転移に伴う溶骨性病変を有しうる転移性癌といった、形質細胞反応が起こりうる他の疾患を除外しなければならない。したがって、多発性骨髄腫が長い潜伏期間を有すると考えられておりまた臨床徴候が悪性の発生から何年も後に認められることを考慮すると、この疾患をスクリーニングし、多発性骨髄腫の鑑別診断を提供する、たとえば、意義不明単クローン性免疫グロブリン血症に対して多発性骨髄腫を、または多発性骨髄腫のさまざまな亜型を識別する、新しい分子診断手法が必要とされている。

【0006】

このように、従来手法は、鑑別診断、および違いのある予後診断的に関連する多発性骨髄腫の臨床的部分集団を同定する方法を欠く。本発明は、当該分野におけるこの長年にわ

10

20

30

40

50

たる必要と要望を満たす。

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0007】

新たに診断された多発性骨髄腫の患者74名、意義不明単クローン性免疫グロブリン血症(MGUS)患者5名、および健常者31名(正常形質細胞)に由来する骨髄形質細胞をCD138+ 選択によって精製した。精製形質細胞と7つの多発性骨髄腫細胞株の遺伝子発現を、6,800個の遺伝子を調べる高密度オリゴヌクレオチドマイクロアレイを用いてプロファイリングした。階層的クラスタリング分析で、正常および多発性骨髄腫形質細胞を識別し、多発性骨髄腫の4つの異なる部分集団(MM1、MM2、MM3、MM4)を同定した。MM1の発現パターンは、正常形質細胞および意義不明単クローン性免疫グロブリン血症と同様であったが、一方、MM4は多発性骨髄腫細胞株と同様であった。異常核型(P=0.0003)および高い血清 2-ミクログロブリン濃度(P=0.0004)のような、予後不良と関連する臨床パラメータは、MM4で非常に多かった。DNA代謝および細胞周期調節に関与する遺伝子は、MM1とMM4の比較で過剰発現していた。

10

【0008】

カイ二乗検定およびWilcoxonの順位和検定を用いて、正常と悪性の形質細胞の間で差が見られた(P<0.0001)120個の新しい疾患遺伝子候補が同定された。これらの候補遺伝子の多くは、接着、アポトーシス、細胞周期、薬物耐性、増殖停止、腫瘍形成、シグナル伝達、転写に関与している。さらに、FGFR3とCCND1を含む合計156個の遺伝子が、多発性骨髄腫74例のうち少なくとも4例で非常に高い(「スパイクした」)発現を示した(スパイク幅:4から25)。FGFR3とCCND1の高発現は、t(4;14)(p16;q32)またはt(11;14)(q13;q32)の転座によって引き起こされた。

20

【0009】

本発明はまた、多変量逐次選択判別分析を通じて、発現が多発性骨髄腫の悪性の徴候と密接に関連している遺伝子の最小部分集団を特定する。14個の遺伝子が、多発性骨髄腫患者の形質細胞を正常形質細胞から高い精度で識別することのできる予測因子として特定され、そして24個の遺伝子が、ここで記載する多発性骨髄腫の異なる部分集団(MM1、MM2、MM3、MM4)を識別することのできる予測因子として特定された。

30

【0010】

さらに、ここで開示するデータは、多発性骨髄腫は正常形質細胞分化の発生図式と平行する発生図式に当てはめることができることを示した。遺伝子発現プロファイリングに基づき、上述のMM4、MM3、およびMM2部分集団はそれぞれ、扁桃B細胞、扁桃形質細胞、および骨髄形質細胞と類似性を有することがわかった。これらのデータは、不可解な多発性骨髄腫を、遺伝子発現/発生段階に基づく分類システムに修正可能であることを示唆する。

【0011】

本発明の一態様では、DNA マイクロアレイおよび階層的クラスタリング分析を用いて、多発性骨髄腫の部分集団を分類し、多発性骨髄腫患者の部分集団において高発現である遺伝子を同定し、そして多発性骨髄腫の治療標的候補を同定する方法が提供される。

40

【0012】

本発明の別の態様では、多発性骨髄腫患者の形質細胞を正常形質細胞から識別することができるか、または多発性骨髄腫の異なる部分集団を識別することができる遺伝子群を同定する方法が提供される。

【0013】

本発明のさらに別の態様では、14個の遺伝子の集団または24個の遺伝子の集団の発現にそれぞれ基づいた、多発性骨髄腫または多発性骨髄腫の診断方法が提供される。

【0014】

本発明のさらに別の態様では、多発性骨髄腫の治療法が提供される。そのような方法は、ここで開示されるように多発性骨髄腫患者においてそれぞれ過剰発現されているかま

50

たはダウンレギュレートされていることが見出された遺伝子の発現を阻害または促進することを含む。

【0015】

本発明はまた、多発性骨髄腫細胞と正常B細胞または形質細胞との間の遺伝子発現プロファイリングに基づく、多発性骨髄腫のための発生段階に基づく分類の方法を提供する。

【0016】

本発明のさらに他の態様、特徴、利点は、本発明の現在好ましい実施形態の以下の記述から明らかになる。これらの実施形態は開示の目的のために与えられる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0017】

本発明の上記の特徴、利点、および目的ならびに明らかになるその他が達成され詳細に理解されるために、上記に簡潔に要約した本発明の、より詳細な記述および一部の実施例を付属の図で説明する。これらの図は本明細書の一部をなす。しかし、付属の図は本発明の好ましい実施例を説明し、ゆえにその範囲において制限的であるとは理解すべきでないことに注意すべきである。

【0018】

図1Aはクラスター順序化データ表を示す図である。クラスタリングは着色像として画像的に示されている。縦軸に沿って、分析された遺伝子はクラスタリングアルゴリズムによって順序化された通りに並べられている。最も類似した発現パターンを持つ遺伝子は互いに隣接して配置されている。同様に、横軸に沿って、実験試料が並べられている；すべての遺伝子にわたって最も類似した発現パターンを持つ試料は互いに隣接して配置されている。試料と遺伝子の群分けの両方は、個々の成分をより大きな群に結びつける実線（枝）をたどることによってさらに記述することができる。表形式の画像の各セルの色は各遺伝子の発現レベルを表し、赤は平均より高い発現を示し、緑は平均より低い発現を示し、色の強さが濃いほど平均からの偏差の程度が大きいことを示す。

【0019】

図1Bは、MMでダウンレギュレートされる遺伝子を示す、増幅された遺伝子クラスターを示す図である。特徴付けられ、かつ配列が確認されたcDNAがコードする遺伝子のほとんどは免疫グロブリンであることが分かっている。

【0020】

図1Cは、発現レベルが腫瘍形成、細胞周期、および増殖速度と相関する遺伝子を多く含むクラスターを示す図である。これらの遺伝子の多くはまた、多発性骨髄腫統計的に有意にアップレギュレートされた（²およびWRS検定）（表5を参照）。

【0021】

図1Dは、階層的なクラスターの樹状図を示す図である。74例の新たに診断された未治療の多発性骨髄腫、5例の意義不明単クローン性免疫グロブリン血症、8株の多発性骨髄腫細胞株、そして31例の正常骨髄形質細胞試料が、5,483個の遺伝子（プローブセット）との相関に基づいてクラスター化された。別々に着色した枝は、正常形質細胞（緑）、意義不明単クローン性免疫グロブリン血症（青矢印）、多発性骨髄腫（黄色）および多発性骨髄腫細胞株（茶矢印）を表す。

【0022】

図1Eは、74例の新たに診断された未治療の多発性骨髄腫単独の階層的なクラスター分析の樹状図を示す図である（クラスター図は記載しない）。二つの主要な枝は2つの異なるクラスター群を含んだ。MM1（水色）およびMM2（青）と表した、右の枝の下の部分集団は、図1Dの意義不明単クローン性免疫グロブリン血症の症例とより関連していた。MM3（紫）およびMM4（赤）と表した、左の枝の下の2個の部分集団は、図1Dで多発性骨髄腫細胞株とより関連していた試料を表す。

【0023】

図2は、FGFR3、CST6、IFI27、およびCCND1遺伝子発現のスパイクプロファイル分布を示す図である。プローブセットとハイブリダイズしたストレプトアビジン-フィコエリトリ

10

20

30

40

50

ン染色ピオチニル化cRNAの蛍光強度の正規化平均差(AD)値を縦軸に、試料を横軸に取っている。試料は左から右へ順に:正常形質細胞(NPC)(緑)、MM1(水色)、MM2(紺)、MM3(紫)、MM4(赤)である。31例の正常形質細胞における相対的に低い発現、および多発性骨髄腫試料(多発性骨髄腫形質細胞)74例中5例の部分集団におけるスパイクした発現に注意する。有意な非ランダムスパイク分布についての検定のP値が示されている。

【0024】

図3AはMS4A2(CD20)遺伝子発現のGeneChip HuGeneFL分析を示す図である。MS4A2遺伝子の異なる領域に位置する2つの独立したプローブセット(登録番号M27394(青)およびX12530(赤)とハイブリダイズしたストレプトアビジン-フィコエリトリン染色ピオチニル化cRNAの蛍光強度の正規化平均差(AD)値を縦軸に、試料を横軸に取っている。31例の正常形質細胞における相対的に低い発現、および多発性骨髄腫試料(多発性骨髄腫形質細胞)74例中5例におけるスパイクした発現に注意する。また、2つの異なるプローブセットによって検出された発現レベルの類似性にも注意する。

10

【0025】

図3Bはクローン性多発性骨髄腫形質細胞におけるCD20発現についての免疫組織化学法を示す図である:(1)非同期型多発性骨髄腫細胞を示す骨髄生検断面(H&E,x500);(2)CD20⁺多発性骨髄腫細胞(x100;挿入像x500);(3)非同期型およびMarschalko型多発性骨髄腫細胞の混合した患者由来の生検(H&E,x500);(4)CD20⁺単一リンパ球およびCD20⁻多発性骨髄腫細胞(x200)。CD20免疫組織化学法は病歴または遺伝子発現知見の知識無しに検査した。

【0026】

図4は遺伝子発現がタンパク質発現と相関することを示す図である。B細胞分化の間に発現に差があることが知られているCDマーカーの遺伝子とタンパク質発現を、多発性骨髄腫細胞株CAG(左図)とEpstein-Barrウイルス(EBV)形質転換Bリンパ芽球株ARH-77(右図)との間で比較した。両方の図で、8種類のCDマーカーが各図の左列に列記されている。タンパク質発現のフローサイトメトリー分析は2つめの列に示されている;遺伝子発現の平均差(AD)と絶対評定(AC)値は第3と第4の列に示されている。CAG細胞におけるCD138およびCD38について遺伝子とタンパク質の両方の強い発現と、しかしARH77細胞における低発現に注意する。残りのマーカーについては反対相関が観察される。

20

【0027】

図5は、すべての正常形質細胞、MM、意義不明単クローン性免疫グロブリン血症および多発性骨髄腫細胞株の14特性の多変量判別分析を示す図である。この散布図は、2つの中心によって定義される平面上への症例ごとの値の正射影の結果として得られた。緑のプロットは正常形質細胞を表す;青のプロットは多発性骨髄腫形質細胞および多発性骨髄腫細胞株を表す;桃色のプロットは意義不明単クローン性免疫グロブリン血症を表す。

30

【0028】

図6Aは5,483遺伝子(プローブセット)との相関に基づいてクラスター化した269症例の多発性骨髄腫、7株の多発性骨髄腫細胞株、7例の意義不明単クローン性免疫グロブリン血症および32例の正常形質細胞試料を示す図である。2本の主要な枝が2つの異なるクラスター群を含んだ。正常形質細胞試料を含む部分集団は、1例の意義不明単クローン性免疫グロブリン血症(緑矢印)および2例の誤って分類された多発性骨髄腫試料(桃色矢印)を含んだ

40

【0029】

図7は、すべての多発性骨髄腫、意義不明単クローン性免疫グロブリン血症および多発性骨髄腫細胞株の24特性の多変量判別分析を示す図である。この散布図は、4つの中心によって定義される平面上への症例ごとの値の正射影の結果として得られた。赤のプロットはMM1部分集団を表す;緑のプロットはMM2部分集団を表す;青のプロットはMM3部分集団を表す;桃色のプロットはMM4部分集団を表す;水色のプロットは群分けされない症例である;大きい黄色のプロットは群中心を表す。

【0030】

50

図8Aは正常形質細胞および約200名の骨髄腫患者におけるPIから始まりP226までのエンドセリンB受容体(ENDBR)発現を示す図であり、Y軸上に描かれたマイクロアレイデータの平均蛍光強度によって示される。図8Bは正常形質細胞および新たに診断された骨髄腫患者におけるエンドセリンB受容体発現を示す図である。

【0031】

図9Aは支持細胞および骨髄腫細胞P323とP322における共培養前後のエンドセリンB受容体(ENDBR)の発現を示す図である。図9Bは支持細胞および骨髄腫細胞P323とP322における共培養前後のエンドセリン1の発現を示す図である。

【0032】

図10は正常B細胞および形質細胞試料のフローサイトメトリー、免疫蛍光および細胞学的分析を示す図である。

10

【0033】

CD19ソート扁桃B細胞:扁桃由来単核球画分を、CD20/CD38(aおよびb)に対する抗体を用いた二重染色FACS分析による抗CD19免疫磁気ビーズソートの前に、扁桃B細胞のパーセンテージについて検査した。扁桃B細胞試料のソート後の純度は、CD20/CD38(cおよびd)、CD138/CD20(e)、およびCD138/CD38(f)染色によって測定した。精製扁桃B細胞試料のサイトスピン標本をライトギムザ染色し、細胞形態を光学顕微鏡で観察した(g)。精製B細胞はまた細胞質免疫グロブリン(cIg)軽鎖(KおよびA)に対するAMCAおよびFITC抗体で染色し、免疫蛍光顕微鏡法で観察した(h)。cIg染色が無いこと、したがって扁桃B細胞画分における形質細胞混入が最小であることを注意する。

20

【0034】

CD138でソートした扁桃形質細胞:扁桃単核球画分を、CD38/CD45(i)およびCD138/CD45(j)に対する抗体を用いた二重染色FACS分析による抗CD138免疫磁気ビーズソートの前に、形質細胞のパーセンテージについて検査した。扁桃形質細胞試料のソート後の純度は、CD38/CD45(k)、CD138/CD45(l)、CD38/CD20(m)、およびCD138/CD38(n)の二重染色FACS分析によって測定した。精製扁桃形質細胞のサイトスピン標本を形態学的外観(o)およびcIg(p)について分析した。

【0035】

CD138でソートした骨髄形質細胞:骨髄吸引液由来の単核球画分を、CD38/CD45(q)およびCD138/CD45(r)に対する抗体を用いた二重染色FACS分析による抗CD138免疫磁気ビーズソートの前に、形質細胞のパーセンテージについて検査した。骨髄形質細胞試料のソート後の純度は、CD38/CD45(s)、CD138/CD45(t)、CD38/CD20(u)、およびCD138/CD38(v)の二重染色FACS分析によって測定した。精製骨髄形質細胞のサイトスピン標本を形態学的外観(w)およびcIg(x)について分析した。明らかな形質細胞の形態学的特徴を有するcIg陽性骨髄形質細胞の割合が高いことに注意する。

30

【0036】

図11は正常ヒト形質細胞の2次元階層的クラスター分析を示す図である。4866プローブセットの実験による発現プロファイルの相関に基づいてクラスター化された、7例の扁桃BC(TBC)、7例の扁桃PC(TPC)、および7例の骨髄PC(BPC)試料が含まれる。クラスタリングは着色像として画像で示す。縦軸に沿って、分析された遺伝子は、クラスタリングアルゴリズムによって順序化された通りに配列されている。発現のパターンが最も類似している遺伝子は互いに隣接して配置されている。実験試料は同様に横軸に配列されている。表形式図中の各セルの色は各遺伝子の発現レベルを表し、赤は平均より高い発現を示し、緑は平均より低い発現を示し、色の強さが濃いほど平均からの偏差の程度が大きいことを示す。上の樹状図は2本の主要な枝を生じ、扁桃BCをPCから分離する。さらに、PCクラスター内で、扁桃PCと骨髄PCは3本の独自の枝に分かれる。

40

【0037】

図12は30例のEDG-MMの実験的発現プロファイルおよび遺伝子の挙動の2次元階層的クラスター分析を示す図である。B細胞、扁桃および骨髄形質細胞、そして多発性骨髄腫(MM)試料を、クラスター順序化データ表を用いて分析した。扁桃B細胞、扁桃形質細胞、骨髄

50

形質細胞試料はそれぞれ赤、青、金色の棒線で示す。74例のMM試料の命名はZhan et al.(2002)に示される通りである。縦軸に沿って、分析された遺伝子は、クラスタリングアルゴリズムによって順序化された通りに配列されている。発現のパターンが最も類似している遺伝子は互いに隣接して配置されている。試料と遺伝子の群分けの両方は、個々の成分をより大きな群に結びつける実線(枝)をたどることによってより詳しく記述される。扁桃B細胞クラスターは赤い横棒によって識別される。表形式図中の各セルの色は各遺伝子の発現レベルを表し、赤は平均より高い発現を示し、緑は平均より低い発現を示し、色の強さが濃いほど平均からの偏差の程度が大きいことを示す。

【0038】

図13は50例のLDG-MM1遺伝子の実験的発現プロファイルおよび遺伝子の挙動の2次元階層的クラスター分析を示す図である。類似性にしたがって、遺伝子は縦軸(右側)に沿ってプロットされ、実験試料は上側の横軸に沿ってプロットされている。扁桃形質細胞クラスターは青い横棒によって識別される。扁桃B細胞、扁桃形質細胞、および骨髄形質細胞試料は、図12と同様に示されている。

【0039】

図14は50例のLDG-MM2遺伝子の実験的発現プロファイルおよび遺伝子の挙動の2次元階層的クラスター分析を示す図である。類似性にしたがって、遺伝子は縦軸(右側)に沿ってプロットされ、実験試料は上側の横軸に沿ってプロットされている。骨髄形質細胞クラスターは金色の横棒によって識別される。扁桃B細胞、扁桃形質細胞、および骨髄形質細胞試料は、図12と同様に示されている。

【0040】

図15は増殖遺伝子の発現における差が扁桃B細胞とMM4の間の類似性を明らかにすることを示す図である。データはKruskal-Wallis検定値のボックスプロットで示されている。分析した7つの群(扁桃B細胞、扁桃形質細胞、骨髄形質細胞、および遺伝子発現で定義される部分集団MM1、MM2、MM3、MM4)をx軸に沿って並べ、自然対数に変換した平均差をy軸にプロットしている。EZH2; $P=7.61 \times 10^{-11}$; KNSL1、 $P=3.21 \times 10^{-8}$; PRKDC、 $P=2.86 \times 10^{-11}$; SNRPC、 $P=5.44 \times 10^{-12}$; CCNB1、 $P=2.54 \times 10^{-8}$; CKS2、 $P=9.49 \times 10^{-11}$; CKS1、 $P=5.86 \times 10^{-9}$; PRIM1、 $P=4.25 \times 10^{-5}$ 。

【0041】

図16は意義不明単クローン性免疫グロブリン血症(MGUS)と対比した多発性骨髄腫(MM)分類についての受信者操作特性(ROC)曲線を示す図である。

【0042】

現在、全体的な遺伝子発現プロファイリングが、識別困難であった類似のまたは関連する造血器腫瘍の分子的異質性を明らかにできるという強力な証拠がある。正常および悪性の細胞の比較において最も有意に発現量の異なる遺伝子は、臨床的に意義のある診断の開発に用いることができ、また細胞形質転換の基礎的機構についての手掛かりを提供する。実際、これらのプロファイルは、臨床症状が存在しない場合でさえ、悪性細胞を発見するのに用いることができる可能性がある。さらに、これらの遺伝子産物が作用する生化学経路は、新しい治療薬の標的となりうる。

【0043】

本発明は、抗CD138ベースの免疫磁気ビーズ陽性選択を用いて、骨髄吸穿刺から、正常および悪性の形質細胞の両方を精製して均質にすることができることを実証する。これらの細胞を用いて、本発明は新しく診断された多発性骨髄腫患者の最初の包括的な全体的遺伝子発現プロファイリングを提供し、これらの発現パターンを正常形質細胞の発現パターンと比較した。ここに開示する遺伝子発現プロファイリングの方法を用いて、新規の多発性骨髄腫疾患遺伝子候補が同定され、このプロファイリングは多発性骨髄腫用の遺伝子に基づく分類システムの開発に結びついている。

【0044】

多発性骨髄腫および正常形質細胞、ならびに良性の形質細胞障害である意義不明単クローン性免疫グロブリン血症および末期様多発性骨髄腫細胞株についての階層的クラスター

10

20

30

40

50

分析の結果は、正常形質細胞は独特であり、また原発性多発性骨髄腫は意義不明単クローン性免疫グロブリン血症または多発性骨髄腫細胞株のいずれかに似ていることを明らかにした。さらに、多発性骨髄腫細胞株遺伝子発現は、階層的分析における密なクラスタリングによって証明されるように均質である。多発性骨髄腫細胞株発現パターンの、原発性の新たに診断された形の多発性骨髄腫との類似性は、多発性骨髄腫細胞株を多発性骨髄腫のモデルとして使用することの妥当性を支持する。

【0045】

多発性骨髄腫単独の階層的クラスタリングに際して、4つの異なる臨床的多発性骨髄腫部分集団(MM1からMM4)が識別された。MM1部分集団は意義不明単クローン性免疫グロブリン血症により近い試料を含み、一方、MM4部分集団は多発性骨髄腫細胞株により近い試料を含んだ。MM1とMM4に差を付ける最も有意な遺伝子発現パターンは細胞周期調節およびDNA代謝遺伝子であり、MM4部分集団は、細胞遺伝学的異常、血清₂M高値、クレアチニン高値、および第13染色体の欠失を有する可能性がより高かった。これらは予後不良に従来から結びつけられている重要な変数である。

10

【0046】

多発性骨髄腫における遺伝子発現変化

ここで開示するデータは、MM4部分集団が最も高リスクな疾患単位を表す可能性が高いことを示した。したがって、この特定の部分集団の分子遺伝学の知識は、その生物学への洞察を提供し、おそらく適当な亜型特異的な治療的介入のための理論的根拠を提供するはずである。MM1とMM4部分集団に差を付ける最も有意な遺伝子発現変化は、MM4がより増殖性で自律性である表現型を有することを明らかに示唆する活性をコードする。その比較において最も有意に変化した遺伝子であるTYMS(チミジル酸合成酵素)は、ピリミジン合成経路で機能するが、大腸癌におけるフルオロピリミジン化学療法に対する抵抗性、および予後不良とも結びつけられている。MM4においてアップレギュレートされる他の注目すべき遺伝子は、CAAXファルネシルトランスフェラーゼ遺伝子FTNAであった。ファルネシルトランスフェラーゼはRASをプレニル化し、RASが細胞膜に付着するのを可能にするために必要な翻訳後修飾である。これらのデータは、高レベルのFTNA発現を有する患者を治療するのにファルネシルトランスフェラーゼ阻害剤が有効である可能性があることを示唆する。

20

【0047】

プロテアソーム経路の構成成分をコードする2つの他の遺伝子、POH1(26Sプロテアソーム関連pad1ホモログ)およびUBL1(ユビキチン様タンパク質1)もまたMM4で過剰発現していた。POH1の過剰発現は、P-糖タンパク質非依存性の、多面的な薬物耐性を哺乳類細胞に与える。UBL1は、別名をセントリンといい、二本鎖修復経路でRADS1、RADS2、およびp53タンパク質に結合;核タンパク質取り込みに関与するRANOAP1と結合;そして多発性骨髄腫にとって重要なことに、Fas/Apo-1(TNFRSF6)またはTNFRJ誘導性アポトーシスの両方に対する保護、を含む多くの経路に関与する。正常形質細胞とは対照的に、75%を超える多発性骨髄腫形質細胞が、多剤耐性遺伝子である肺抵抗性関連タンパク質(MVP)のmRNAを多量に発現する。これらのデータは、多発性骨髄腫におけるMVPの発現は予後不良因子であることを示す以前の報告と合致する。多発性骨髄腫における化学療法抵抗性の一様な発生を考慮すると、POH1とMVPの組み合わせの過剰発現がこの表現型に重大な影響を与える可能性がある。産物がプロテアソーム経路で機能する多数の遺伝子の、調節解除された発現を、PS-341 (Millennium Pharmaceuticals, Cambridge, MA)のようなプロテアソーム阻害剤の有効性の薬理ゲノム学的分析に利用しうる。

30

40

【0048】

MM4で有意にアップレギュレートされたもう1つの遺伝子は、一本鎖DNA依存性ATP依存性ヘリカーゼ(G22P1)であり、これは別名をKu70自己抗原という。DNAヘリカーゼII複合体は、p70およびp80から成り、細胞周期に依存して、二本鎖DNAのフォーク末端に優先的に結合する。DNAへの結合はp70によって媒介されると考えられており、p80との二量体化はATP依存性DNA巻き戻し酵素(ヘリカーゼII)を形成し、同じくMM4で有意にアップレギュレートされたDNA依存性タンパク質キナーゼ(DNPK)の調節成分として作用する。DNA二

50

本鎖切断修復、V(D)J組み換え、および特に染色体転座におけるヘリカーゼII複合体の関与が提案されている。アップレギュレートされるもう1つの遺伝子はDNA断片化因子(DFFA)であった。カスパーゼ-3はDFFAにコードされる45 kD サブユニットを2ヶ所で切断し、アポトーシスシグナル伝達中にDNA断片化を引き起こす活性因子を生じる。多発性骨髄腫におけるアポトーシスまでの多数の障害を考慮すると、DFFA活性化は結果としてDNA断片化を生じる可能性があり、これはヘリカーゼII複合体を活性化しそれが次いで染色体転座を促進しうる。異常核型、およびしたがって染色体転座は、これらの二つの遺伝子を過剰発現する傾向にあったMM4つの部分集団に付随することは注目すべきである。

【0049】

したがって、ここで開示する結果は、多発性骨髄腫と正常形質細胞における遺伝子発現パターンの直接比較によって、形質細胞の悪性形質転換に伴う基礎的な変化を表しうる新規遺伝子を同定することができたことを実証する。 10

【0050】

低増殖性腫瘍としての多発性骨髄腫の進行は、速い細胞複製でなく、プログラム細胞死の欠陥に結びついていると考えられている。多発性骨髄腫で過剰発現されている2つの遺伝子、プロヒビチン(PHB)およびクワイエスシンQ6(QSCN6)は、増殖停止に関与する。これらの遺伝子の過剰発現は、多発性骨髄腫で見られる典型的には低い増殖指数の原因でありうる。したがって、これらの遺伝子の治療的ダウンレギュレーションの結果として増殖を促進することで、多発性骨髄腫細胞を細胞周期活性の化学療法剤により感受性にすることができることが考えられる。 20

CD27をコードする遺伝子TNFRSF7は、多発性骨髄腫で二番目に有意に低発現である遺伝子であるが、TおよびB細胞増殖そしてB細胞免疫グロブリン産生およびアポトーシスについて同時刺激シグナルを提供する、腫瘍壊死因子受容体(TNFR)スーパーファミリーのメンバーである。抗CD27は形質細胞分化が決定した細胞で作動するBlimp-1およびJ-chain転写産物の誘導を有意に阻害し、CD27のB細胞への連結反応が最終分化を妨げうることを示唆する。CD27リガンド(CD70)はIL-10媒介アポトーシスを妨げ、CD27⁺記憶B細胞の形質細胞への分化をIL-10と協同して導く。したがって多発性骨髄腫におけるCD27遺伝子発現のダウンレギュレーションはアポトーシスプログラムを阻害する可能性がある。

【0051】

多発性骨髄腫でのCD47の過剰発現は、多発性骨髄腫細胞の免疫監視の回避に関係している可能性がある。CD47を欠く細胞は赤脾髄マクロファージによって血流から速やかに除去されること、および正常赤血球上のCD47がこの除去を防ぐことを研究が示している。 30

【0052】

多発性骨髄腫で過剰発現しているDNMT1すなわちDNAメチルトランスフェラーゼ1の遺伝子産物は、哺乳類におけるシトシンのメチル化を担っており、後生的な遺伝子抑制に重要な役割を有する。実際、腫瘍抑制遺伝子の異常な高度メチル化は、多くの腫瘍の発生において重要な役割を果たす。p16/INK4aのde novoメチル化は、原発性多発性骨髄腫で頻度が高い所見である。また、最近の研究は、DNMTのアップレギュレートされる発現が、異常な局所的な高度メチル化を誘導することによって白血病の病因に寄与している可能性があることを示している。DNAメチル化は、メチル-CpG-結合タンパク質MeCP2を動員し、それは次いでヒストン脱アセチル酵素活性を動員するが、部分的にはそのことによって遺伝子を抑制する。Dnmt1に媒介されるDNAメチル化の過程は、ヒストン脱アセチル酵素活性を介するクロマチンの状態の変化に依存するかまたはその状態変化を生じさせる可能性があることが示されている。多発性骨髄腫の症例はまた、metastasis associated(転移関連)1(MTA1)の遺伝子の有意な過剰発現も示すことは潜在的に重要である。MTA1は当初、転移性細胞で高発現であるとして特定された。より近年にはMTA1は、ATP依存性ヌクレオソーム破壊活性だけでなくヒストン脱アセチル酵素活性も有する、NURD(ヌクレオソーム再構築およびヒストン脱アセチル化)複合体のサブユニットの一つであることが見出されている。したがって、DNMT1とMTA1の過剰発現は、多発性骨髄腫における遺伝子発現の抑制に劇的な作用を有する可能性がある。 40

【0053】

多発性骨髄腫で活性化される発癌遺伝子には、ABLおよびMYCが含まれた。ABLチロシンキナーゼ活性が多発性骨髄腫で存在するかどうかは明らかでないが、ablおよびc-mycの過剰発現の結果としてマウス形質細胞腫の発生促進が生じたことに注目することは重要である。したがって、多発性骨髄腫細胞がABLおよびMYCを有意に過剰発現することは偶然の一致だけでない可能性がある。

【0054】

MYC 発癌遺伝子ならびに IGHと IGL 遺伝子が関与し、その結果として MYC 発現の調節異常が生じる染色体転座は、パーキット型リンパ腫の証明であり、マウス形質細胞腫で実験的に誘導される；しかし、MYC/IGH関連転座は多発性骨髄腫では稀である。MYCの高発現は我々の多発性骨髄腫患者集団では一般的な特性であったが、それは非常に変化が大きく、発現がほとんどまたは全く無しから非常に増加した発現までの範囲にあった。産物がMYCに結合しMYC発現を活性化することが知られているMAZ 遺伝子が、MM4つの部分集団で有意にアップレギュレートされたことは注目すべきである。B細胞新生物におけるMYCの重要な役割を考慮すると、多発性骨髄腫におけるMYCおよびおそらく ABLの過剰発現は、生物学およびおそらく予後診断的意義を有すると推測される。

【0055】

EXT1およびEXT2は、遺伝性多発性外骨腫症に関与する腫瘍抑制遺伝子であり、ヘテロ二量体化し、また細胞表面へパラン硫酸グリコサミノグリカン(GAGs)の合成および提示に重要である。EXT1は多発性骨髄腫および正常形質細胞の両方で発現している。EXT2Lは多発性骨髄腫で過剰発現しており、機能するグリコシルトランスフェラーゼが多発性骨髄腫において生成されうること示唆した。膜貫通型ヘパラン硫酸プロテオグリカンであるシンデカン-1(CD138/SDC1)は多発性骨髄腫細胞上で多量に発現しており、また血清中に入った場合は予後不良因子であることは注目すべきである。したがって、異常GAG修飾SDC1は多発性骨髄腫の生物学において重要でありうる。多発性骨髄腫の生物学へのSDC1の繋がりはさらに、近年のWNTプロト発癌遺伝子産物によって誘導されるシグナル伝達カスケードでのSDC1の関連によって確認される。シンデカン-1(SDC1)はWnt-1誘導乳癌形成に必要であることが示されている。ここで開示するデータは、原発性多発性骨髄腫の症例においてWNT10Bの有意なダウンレギュレーションを示した。おとりWNT受容体をコードするWNT5A遺伝子およびFRZB遺伝子が、新たに診断された多発性骨髄腫においてわずかにアップレギュレートされたこともまた注目に値する。WNTは新しいクラスのB細胞調節因子を表すことを考慮すると、これらの成長因子(WNT5A、WNT10B)およびその受容体(たとえば、FRZB)および受容体シグナル伝達を調節する遺伝子産物(たとえば、SDC1)の発現の調節解除が、多発性骨髄腫の発生に重要である可能性がある。

【0056】

本発明はまた、多変量逐次選択判別分析を通じて、発現が多発性骨髄腫の悪性の特質と密に関連している遺伝子の最小の部分集団を同定する。直線回帰分析を統計的に有意である発現量の異なる遺伝子の上位50個に適用することによって、14個の遺伝子が、多発性骨髄腫を正常形質細胞から高い精度で識別することのできる予測因子として定義された。このモデルを、118例の多発性骨髄腫、6例の正常形質細胞および7例のMGUSから成る妥当性評価群に適用した場合、99%を超える分類精度が達成された。重要なことには、7例のMGUSのうち6例が多発性骨髄腫と分類され、MGUSが悪性の遺伝子発現の特徴を有することを示した。したがって、調査した6,000個を超える遺伝子のうちの14個の遺伝子の発現変化は多発性骨髄腫を定義することができる。同様の多変量判別分析はまた、上述の4つの多発性骨髄腫部分集団を識別することのできる24遺伝子の組を同定した。

【0057】

正常形質細胞と多発性骨髄腫形質細胞の群間で統計的に異なる遺伝子を同定することに加えて、本発明は、FGFR3とCCND1のように、多発性骨髄腫の部分集団において非常に高い「スパイクした」発現を示す遺伝子を同定した。これらの遺伝子の高発現がある患者は、4つの遺伝子発現クラスター部分集団の中で有意な分布の違いを有しうる。たとえば、FGF

10

20

30

40

50

R3スパイクはMM1とMM2で見られ、一方、IF127のスパイクはMM3とMM4で見られる可能性がより高い。インターフェロン誘導性遺伝子IF127の非常に高い発現は、全身性または特異的にこれらの患者からの形質細胞内の、ウイルス感染を示している可能性がある。相関分析は、IF127スパイクはMX1、MX2、OAS1、OAS2、IFIT1、IFIT4、PLSCR1、およびSTAT1を含む14個のインターフェロン誘導性遺伝子の高発現と有意に関連(ピアソン相関係数値0.77から0.60)していることを示している。多発性骨髄腫患者の大きな集団(N=280)のより近年の分析は、全患者の25%近くがIF127遺伝子のスパイクを有したことを示した。MM4部分集団にクラスター化されるIF127スパイク患者が不良な臨床経過を有する可能性がより高いかどうかを調べることで、およびこのクラスの遺伝子のアップレギュレーションを引き起こす疑いのあるウイルス感染を特定することは興味ある問題である。したがって、スパイクした遺伝子発現もまた、臨床的に意義のある予後診断群を開発するのに用いることができる可能性がある。

10

【0058】

最後に、スパイクしたFGFR3またはCCND1遺伝子発現とt(4;14)(p14;q32)またはt(11;14)(q13;q32)転座の存在との100%一致、ならびにタンパク質発現と遺伝子発現との間の強い相関は、遺伝子発現プロファイリングの精度の重要な妥当性確認を表し、遺伝子発現プロファイリングが最終的に細胞表面マーカー免疫表現型分析や分子細胞遺伝学および細胞遺伝学のような労働集約的で費用のかかる臨床検査手順に取って代わる可能性があることを示唆する。

【0059】

本発明によって同定された、多発性骨髄腫において有意にアップレギュレートまたはダウンレギュレートされた発現を示す遺伝子は、多発性骨髄腫の治療標的候補である。過剰発現された遺伝子は、その発現を低下させる小分子または阻害因子の標的になりうる。遺伝子発現を阻害するのに用いることができる方法および材料、たとえば薬物小分子;アンチセンスオリゴ、または抗体は、本分野で通常の技能を有する者に容易に明らかになる。一方、低発現遺伝子は遺伝子治療によって置き換えることができ、または薬物によって誘導することができる。

20

正常形質細胞発生との多発性骨髄腫の比較

ここで開示するデータは、多発性骨髄腫は正常形質細胞分化の発生図式と平行する発生図式に当てはめることができることを示した。全体的な遺伝子発現プロファイリングは、ヒト形質細胞分化に伴う転写における明瞭な変化を明らかにする。4866個の遺伝子との階層的クラスタリング分析は、扁桃B細胞、扁桃形質細胞、および骨髄形質細胞を分離した。² およびWilcoxonの順位和検定を組み合わせ、359個の以前に定義された遺伝子および新規遺伝子が有意に(P<0.0005)扁桃B細胞を扁桃形質細胞から識別し、そして500個の遺伝子が扁桃形質細胞を骨髄形質細胞から有意に識別した。扁桃B細胞から扁桃形質細胞への移行で有意に発現に差があった遺伝子は「初期分化遺伝子」(EDGs)と称し、扁桃形質細胞から骨髄形質細胞への移行で発現に差があった遺伝子は「後期分化遺伝子」(LDGs)と称した。一元配置分散分析を次いでEDGsおよびLDGsに適用し、多発性骨髄腫(MM)と扁桃B細胞(EDG-MM)、扁桃形質細胞(LDG-MM1)、または骨髄形質細胞(LDG-MM2)との間の統計的に有意である発現の差異を特定した。

30

40

【0060】

階層的なクラスタリング分析は、MM4(予後不良亜型と推測される)の18例中13例(P=0.00005)が扁桃B細胞と共に密にクラスター化したことを明らかにした。残りの群(MM1、2、3)はそのような関連を示さなかった。対照的に、扁桃形質細胞と14/15MM3の15例中14例(P=0.00001)との間に密なクラスタリングが存在し、骨髄形質細胞と(P=0.00009)MM2の20例中14例との間に有意な類似性が見出された。MM1は試験した正常細胞型とは有意な繋がりを示さなかった。さらに、XBP1は、形質細胞分化に必須の転写因子であるが、発生段階関係と合致して、MM1からMM4へ発現に有意な漸進的低下を示した。したがって、後期B細胞分化と結びついた全体的な遺伝子発現パターンが確認され、そして全体的な遺伝子発現に定義される多発性骨髄腫の分類システムが拡張され、多発性骨髄腫は独自の起源を有する異なる

50

疾患亜型群を表すことを示唆した。

【0061】

本発明は多発性骨髄腫について遺伝子に基づく分類方法を導く。多発性骨髄腫を有するかまたは有しない個体に由来する単離された形質細胞の核酸試料にDNAマイクロアレイを適用し、マイクロアレイから得られたデータについて実施した階層的クラスタリング分析によって、個体をここで開示するMM1、MM2、MM3およびMM4部分集団のような異なる部分集団に分類する。

【0062】

本発明の別の一実施形態では、多発性骨髄腫患者の部分集団において高発現である遺伝子を同定する方法を提供する。多発性骨髄腫を有する個体に由来する単離された形質細胞の核酸試料にDNAマイクロアレイを適用し、マイクロアレイから得られたデータについて実施した階層的クラスタリング分析によって、多発性骨髄腫患者の部分集団において高発現である遺伝子を同定する。これらの遺伝子の代表的な例を表8に列挙する。

10

【0063】

本発明の別の一実施形態では、多発性骨髄腫の治療標的候補を同定する方法を提供する。多発性骨髄腫を有するかまたは有しない個体に由来する単離された形質細胞の核酸試料にDNAマイクロアレイを適用し、マイクロアレイから得られたデータについて階層的クラスタリング分析を実施した。健常者と比較して多発性骨髄腫患者において有意に異なる発現レベルを有する遺伝子が、多発性骨髄腫の治療標的候補である。これらの遺伝子の代表的な例を表4、5および8に列挙する。

20

【0064】

本発明のさらに別の一実施形態では、正常形質細胞と多発性骨髄腫の形質細胞とを識別できる遺伝子の群を同定する方法を提供する。多発性骨髄腫を有するかまたは有しない個体に由来する単離された形質細胞の核酸試料にDNAマイクロアレイを適用し、マイクロアレイから得られたデータについて階層的クラスタリング分析を実施した。発現パターンに統計的に有意な差のある遺伝子が同定され、直線回帰分析を用いて、正常形質細胞と多発性骨髄腫の形質細胞とを正確に識別できる遺伝子の群を同定した。これらの遺伝子の代表的な例を表6に列挙する。

【0065】

本発明のさらにまた別の一実施形態では、多発性骨髄腫の部分集団を識別できる遺伝子の群を同定する方法を提供する。多発性骨髄腫を有する個体に由来する単離された形質細胞の核酸試料にDNAマイクロアレイを適用し、マイクロアレイから得られたデータについて階層的クラスタリング分析を実施した。発現パターンに統計的に有意な差のある遺伝子が同定され、直線回帰分析を用いて、多発性骨髄腫の部分集団を正確に識別できる遺伝子の群を同定した。これらの遺伝子の代表的な例を表7に列挙する。

30

【0066】

本発明の別の一実施形態では、多発性骨髄腫の診断のための方法を提供する。統計的に有意である発現の差がそのような個体が多発性骨髄腫を有することを示す、表6に列挙する通りの14遺伝子の群の発現レベルを個体に由来する形質細胞で調べた。遺伝子発現レベルは、本分野の熟練者に良く知られている方法に従って、核酸レベルまたはタンパク質レベルで調べることができる。

40

本発明のさらに別の一実施形態では、多発性骨髄腫の部分集団についての診断方法を提供する。統計的に有意である発現の差が多発性骨髄腫の部分集団についての診断を提供する、表7に列挙する通りの24遺伝子の群の発現レベルを個体に由来する形質細胞で調べた。遺伝子発現レベルは、本分野の熟練者に良く知られている方法に従って、核酸レベルまたはタンパク質レベルで調べることができる。

【0067】

本発明の別の一実施形態では、多発性骨髄腫のための治療方法を提供する；そのような方法は、表5または表8に列挙する遺伝子のうちの一つの発現を阻害すること、または表4に列挙する遺伝子のうちの一つの発現を増加させることを含む。アンチセンスオリゴヌク

50

レオチドまたは抗体を用いる方法のような、遺伝子発現を阻害または増加する方法は、当業者によく知られている。

本発明はまた、多発性骨髄腫についての発生段階に基づく分類の方法を導く。単離されたB細胞および多発性骨髄腫を有するかまたは有しない個体に由来する形質細胞の核酸試料にDNAマイクロアレイを適用し、マイクロアレイから得られたデータについて実施した階層的クラスタリング分析が多発性骨髄腫細胞を、正常B細胞および形質細胞の発生段階にしたがって分類する。一般的に、正常B細胞および形質細胞は扁桃、骨髄、粘膜組織、リンパ節または末梢血から単離される。

【0068】

下記の実施例は本発明のさまざまな実施例を説明する目的で提示され、いかなる形でも本発明を制限することを意図しない。 10

【実施例】

【0069】

実施例1

細胞単離および分析

以下の研究の試料は、多発性骨髄腫の74例の新たに診断された症例と、意義不明単クローン性免疫グロブリン血症を有する5名に由来する形質細胞、7試料の扁桃Bリンパ球(扁桃BC)、11試料の扁桃形質細胞(扁桃PC)、および正常で健康な提供者に由来する31試料の骨髄PCを含んだ。多発性骨髄腫細胞株(U266、ARP1、RPMI-8226、UUN、ANBL-6、CAG、およびH929 (P.L. Bergsagelより寄贈)およびEpstein-Barrウイルス(EBV)形質転換Bリンパ芽球細胞株(ARH-77)は推奨通りに培養した(ATCC、Chantilly、VA)。 20

【0070】

扁桃は慢性扁桃腺炎で扁桃切除を受けた患者から得た。扁桃組織は細かく切り、穏和に処理して濾過した。扁桃試料および骨髄吸引液由来の単核球画分は標準的なFicoll-Hypaqueグラジエント(Pharmacia Biotech、Piscataway、NJ)で分離した。低密度画分(S.G. 1.077)中の細胞は10%胎児ウシ血清を含む細胞培地に再懸濁し、赤血球溶解し、PBS洗浄段階を数回行った。形質細胞単離は以前に記載された通りに抗CD138免疫磁気ビーズソートを用いて行った(Zhan et al.、2002)。Bリンパ球単離は、直接結合した単クローン性マウス抗ヒトCD19抗体と自動セルソーター(Miltenyi-Biotec、Auburn、CA)を用いて行った。

【0071】

細胞学検査用に、約40,000個の精製扁桃 BCおよび PC 単核球を1000 x g で5分間、室温にて細胞遠心分離した。形態学的研究用に、細胞は直ちにDiffQuick固定剤および染色剤(Dade Diagnostics、Aguada、PR)を用いた固定および染色によって処理した。

【0072】

免疫蛍光については、スライドは基本的に記載された通りに処理した(Shaughnessy et al.、2000)。要約すると、スライドは一夜自然乾燥し、次に100%エタノール中で5分間室温にて固定し、乾式37°Cインキュベーター内で6時間乾燥した。スライドは次いで7-アミノ-4-メチルクマリン-3-酢酸(AMCA)結合ヤギ抗ヒト免疫グロブリン 軽鎖(Vector Laboratories、Burlingame、GA)の1:20希釈液100 μLを用いて30分間、加湿器内で染色した。インキュベート後、スライドを1xPBS+0.1%NP-40(PBD)中で2回洗浄した。AMCAシグナルを強めるため、スライドにAMCA標識ウサギ-抗ヤギIgG抗体の1:40希釈液100 μLを加え30分間、加湿器内でインキュベートした。スライドは1xPBDで2回洗浄した。スライドは次いでFITC結合ヤギ抗ヒト免疫グロブリン 軽鎖(Vector Laboratories、Burlingame、CA)の1:100希釈液100 μLで30分間、加湿器内で染色した;スライドは1xPBDで2回洗浄した。その後スライドはヨウ化プロピジウム0.1 μg/mLの1xPBS溶液にて5分間染色し、1xPBDで洗浄し、10 μLの褪色防止剤(Molecular Probes、Eugene、OR)を加え、カバーガラスをかけた。細胞質免疫グロブリン軽鎖陽性PCは、適当なフィルターを付けたOlympus BX60落射蛍光顕微鏡を用いて視覚化した。画像はQuips XL genetic workstation (Vysis、Downers Grove、IL)を用いて取り込んだ。 40

【0073】

未精製単核球と扁桃BC、扁桃PC、および骨髄PCに由来する精製画分の両方を、FITCまたはPEに直接結合した抗体の一群を用いて、CDマーカー発現のフローサイトメトリー分析に供した。分析に使用したマーカーは、FITC標識CD20、PE標識CD38、FITC標識またはBCD標識CD45、PE標識またはPC5標識CD138(Beckman Coulter、Miami、FL)を含んだ。CD138ソート後のPCs上のCD138の検出には、免疫磁気選別法に使用したマウス単クローン性抗CD138抗体BB4を検出するFITC標識ウサギ抗マウスIgG抗体(Beckman Coulter)を用いる間接検出法を採用した。細胞はFicoll Hypaqueグラジエント後または細胞精製後に取り、PBSで洗浄し、4℃にてCD抗体またはアイソタイプ一致対照GI抗体(Beckman Coulter)を用いて染色した；染色後、細胞は1xPBSに再懸濁し、EpicsXL-MCLフローサイトメトリーシステム(Beckman Coulter)を用いて分析した。

10

【0074】

実施例2標識cRNAの調製および高密度マイクロアレイへのハイブリダイゼーション

総RNAはRNeasy Mini Kit (Qiagen、Valencia、CA)を用いて単離された。二本鎖cDNAおよびビオチニル化cRNAを総RNAから合成し、HuGeneFL GeneChip マイクロアレイ (Affymetrix、Santa Clara、CA)とハイブリダイズし、製造元の作製した手順に従って洗浄しスキャンした。アレイはHewlett Packard共焦点レーザーキャナを用いてスキャンし、Affymetrix3.3ソフトウェア(Affymetrix)を用いて可視化した。アレイは平均強度1,500に倍率調整し、独立に分析した。

【0075】

20

実施例3Genechipデータ分析

高密度オリゴヌクレオチドDNAマイクロアレイデータを効率的に管理しデータマイニングするために、新しいデータ取り扱い手法を開発した。GeneChip由来発現データはMS SQLサーバー上に保存した。このデータベースは、Clinical Gene-Organizer (臨床遺伝子オーガナイザー)と称するMS Accessインターフェイスを経由して多発性骨髄腫患者の複数の臨床パラメータデータベースに接続した。このデータマート構想は、遺伝子発現プロファイルを、標準的な統計ソフトウェアを用いて、臨床パラメータおよび臨床転帰と直接関連させることを可能にする。この分析で使用したすべてのデータはAffymetrix 3.3ソフトウェアから得た。GeneChip3.3出力ファイルは、(1)配列特異的完全マッチプローブセットと mismatchプローブセットの強度間の差を表す平均差(average difference)(AD)、または(2)GeneChip3.3アルゴリズムによって判定される存在または非存在の絶対評定(absolute call)(AC)、として与えられた。平均差判定値は、平均差が60未満の試料をどれも60の値(生ノイズ平均値の2.5倍)で置換後に、自然対数で変換された。データの統計分析はSPSS 10.0 (SPSS、Chicago、IL)、S-Plus 2000 (Insightful Corp.、Seattle、WA)、およびGene Cluster/Treeview (Eisen et al、1998)のソフトウェアパッケージを用いて行った。

30

【0076】

多発性骨髄腫の4つの異なる部分集団(MM1、MM2、MM3、MM4)を識別するために、the centered 相関 metricを用いた平均距離クラスタリングの階層的クラスタリングを採用した。クラスタリングは5,483 遺伝子の平均差データについて行った。クラスター群とACデータの有意差を見出すのに、カイ二乗(χ^2)検定またはFisherの直接確率検定のいずれかを用いた。発現レベルの比較には、ノンパラメトリックなWilcoxonの順位和(WRS)検定を用いた。この検定は、正規分布したデータでなく順位に基づく帰無仮説を用いる。上記の検定を実施する前に、すべての試料にわたって存在しない(AC)遺伝子は除去した；5,483 遺伝子を分析に用いた。 χ^2 検定およびWRS検定の両方について有意($P < 0.0001$)であった遺伝子は、発現に有意に差があると考えられた。

40

【0077】

臨床パラメータを多発性骨髄腫クラスター群にわたって検定した。連続変数を検定するには分散分析検定を用い、離散変数を検定するには独立 χ^2 検定またはFisherの直接確率

50

検定を用いた。多発性骨髄腫で発現の「スパイクしたプロファイル」を有する遺伝子を見出すために、平均差データの自然対数を用いた。患者および正常試料の大多数で発現が低いか検出不能である遺伝子が同定された(存在絶対評定[P-AC]が4以下)。合計2,030遺伝子がこの分析の判定基準に合致した。患者試料すべてにわたる遺伝子それぞれの発現の中央値を決定した。i番目の遺伝子について、この値をmedgene(i)と称した。少なくとも4患者の発現値 $>2.5 + \text{medgene}(i)$ である場合、i番目の遺伝子は「スパイク(spiked)」遺伝子であった。定数2.5は平均差データの対数に基づいた。これらの「スパイク」遺伝子は、最大のスパイクの平均差発現値が10,000より大きいかどうかによってさらに部分集団に分けられた。

【0078】

ヒト形質細胞分化に伴う転写変化を調べるために、扁桃B細胞、扁桃形質細胞、および骨髄形質細胞のそれぞれ7例にわたって合計4866遺伝子をスキャンした。4866遺伝子は、6800個からすべての対照遺伝子、および最大値 - 最小値 <1.5 (1.5は平均差の自然対数)のテストを満たさない遺伝子を除外することによって得た。²検定を用いて、非存在絶対評定(AAC)を持つ遺伝子を除外した。たとえば、扁桃形質細胞の骨髄形質細胞との比較において、3.84より大の²値($P < 0.05$)を有するかまたは各群の試料の半数以上で「存在」AC(PAC)を有する遺伝子は保持された。扁桃B細胞の扁桃形質細胞との比較および扁桃形質細胞の骨髄形質細胞との比較においては、それぞれ2662および2549遺伝子が2つの群を識別するとして保持された。遺伝子発現レベルを比較するには、ノンパラメトリックなWilcoxonの順位和(WRS)検定を用いて自然対数変換ADを使用して2群を比較した。カットオフP値は、試料の大きさ、比較する2集団の不均一性(扁桃B細胞、扁桃形質細胞、および骨髄形質細胞はADにより高い安定度を示した)、および有意度に依存した。この分析において、扁桃B細胞に対し扁桃形質細胞、および扁桃形質細胞に対し骨髄形質細胞の比較で、それぞれ496および646遺伝子が有意に($P < 0.0005$)発現に差があることが見出された。有意性の方向(一方の群における発現変化が他方と比較して上または下である)を定義するために、ADのノンパラメトリックSpearman相関検定を用いた。

【0079】

扁桃B細胞から扁桃形質細胞への移行において有意に発現に差があった遺伝子は「初期分化遺伝子」(EDGs)と称し、扁桃形質細胞から骨髄形質細胞への移行で発現に差があった遺伝子は「後期分化遺伝子」(LDGs)と称した。以前に定義された遺伝子および新規遺伝子が、扁桃B細胞を扁桃形質細胞から識別(359遺伝子)、そして扁桃形質細胞を骨髄形質細胞から(500遺伝子)、有意に識別したことが同定された。

【0080】

多発性骨髄腫をEDGおよびLDGに関して分類するために、74例の新たに診断された多発性骨髄腫と7試料の扁桃B細胞,7試料の扁桃形質細胞,および7試料の骨髄形質細胞を、359個のEDGsおよび500個のLDGsにわたって変動について試験した。すべての試料にわたって最も有意な変動を示した上位50個のEDGを骨髄腫(EDG-MM)に関する初期分化遺伝子と定義した。同様に、すべての試料にわたって最も有意な変動を示した上位50個のLDGを骨髄腫-1(LDG-MM1)に関する後期分化遺伝子と定義した。LDG-MM1を500個のLDGから差し引き、次いで残りの遺伝子に分散についての一元配置分散分析検定を適用することで、骨髄形質細胞と多発性骨髄腫の間で類似性を示す上位50個の遺伝子を同定した。これらの遺伝子をLDG-MM2と定義した。

EDG-MM50個中30個を用いて階層的クラスタリングをすべての試料に適用した。合計20遺伝子を最大値 - 最小値 <2.5 を用いて除外した。上位50個のEDG-MMのうち多数が多発性骨髄腫の全体で変動性を示さず、したがって多発性骨髄腫部分集団を識別するのに用いることができなかつたため、この群についてこの除外を実施した。50個のLDG-MM1および50個のLDG-MM2を用いて試料をクラスター化するのに、同様のクラスタリング方法を採用した;しかし、これらの場合には50個すべての有意な遺伝子をクラスター分析に用いた。

【0081】

実施例4

10

20

30

40

50

RT-PCRおよび免疫組織化学

FGFR3 MMSETについてのRT-PCRは、マイクロアレイ分析に使用したのと同じのcDNAで実施した。要約すると、cDNAはIGJH2(5'-CAATGGTCACCGTCTCTTCA-3'：配列番号1)プライマー、およびMMSETプライマー(5'-CCTCAATTCCTGAAATTGGTT-3'：配列番号2)と混合した。PCR反応は、58℃のアニーリング温度および72℃にて1分間の伸長時間のサイクル30回から成り、Perkin-Elmer GeneAmp 2400サーモサイクラー(Wellesley, MA)を用いた。PCR産物はアガロースゲル電気泳動後に臭化エチジウム染色によって視覚化した。

【0082】

免疫組織化学染色は、Ventana ES (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ)で、Zenker固定パラフィン包埋骨髄切片、アビジン-ビオチンペルオキシダーゼ複合体手法 (Ventana Medical Systems)、および抗体L26(CD20, Ventana Medical Systems)を用いて実施した。熱誘導性エピトープ回収は、pH6.0の濃度1.0-mmol/Lのクエン酸緩衝液中で28秒間、切片を電子レンジ処理して行った。

実施例5

間期FISH

t(11;14)(q13;q32)転座融合シグナルの間期検出には、LSI IGH/CCND1二重染色、二重融合転座プローブを使用した(Vysis, Inc, Downers Grove, IL)。試料を分析するために用いたTRI-FISH手順は以前に記載されている。要約すると、cIg染色で同定された少なくとも100のクローン形質の形質細胞を、1つを除くすべての試料で転座融合シグナルの存在または非存在について計数し、35形質細胞だけが得られた。多発性骨髄腫試料は、細胞の>25%がその融合を含む場合にその転座を有すると定義された。

【0083】

実施例6

形質細胞遺伝子発現の階層的クラスタリング

118形質細胞試料における656,000回の遺伝子発現測定の結果として、多発性骨髄腫試料における遺伝子発現変化が同定された。二次元階層的クラスタリングは、118試料のうち少なくとも1試料で発現していた5,483遺伝子について実施した場合に、遺伝子発現によって細胞型を識別した(図1A)。試料樹状図は2本の主要な枝を生じた(図1Aおよび1D)。枝の1本は正常の31試料すべてと意義不明単クローン性免疫グロブリン血症の1例を含み、一方、第二の枝は多発性骨髄腫の74例すべてと意義不明単クローン性免疫グロブリン血症の4例および8細胞株を含んだ。多発性骨髄腫を含む枝はさらに2本の分枝に分かれ、一方は4例の意義不明単クローン性免疫グロブリン血症を、もう一方は8株の多発性骨髄腫細胞株を含んだ。細胞株はすべて互いに隣接してクラスタ化し、したがって遺伝子発現における細胞株間の高度の類似性を示した。このことは、多発性骨髄腫を正常形質細胞から識別可能であること、そして意義不明単クローン性免疫グロブリン血症により近い一方と、多発性骨髄腫細胞株に近いもう一方の、少なくとも二つの異なる分類の多発性骨髄腫を区別することができることを示唆した。

【0084】

手法および分析の再現性を示すため、118試料すべてと患者12名からの2連の試料(最初の試料の24時間後または48時間後に採取した形質細胞)を合わせた階層的クラスタリング分析を繰り返した。長期的に研究した患者12名に由来するすべての試料は互いに隣接してクラスタ化することが見出された。このことは、同一患者に由来する試料における遺伝子発現は他のすべての試料とよりも互いにより似通っていたことを示した(データ記載せず)。

上記のクラスタリングの再現性の実証に加えて、患者一名に由来する単一起源RNAについて3回のマイクロアレイ分析もまた実施された。クラスタ分析に含められた場合、その3試料は互いに隣接してクラスタ化した。取扱説明書に合致して、試料で見られた倍数の変化は、全遺伝子の2%未満が2倍を超える差を有したことを示した。したがって、これらのデータは同じ試料についての再現性を示す。

【0085】

クラスター図(図1A)は、無関係の配列であるが同様の機能の遺伝子が、縦軸に沿って互いに密にクラスター化したことを示した。たとえば、主に免疫グロブリン分子および主要組織適合遺伝子をコードする22遺伝子の特定のクラスターは、多発性骨髄腫形質細胞で相対的に低発現であり、正常形質細胞で高発現であった(図1B)。多発性骨髄腫から単離された形質細胞はクローン性であってゆえに単一の免疫グロブリン軽鎖および重鎖の可変および定常領域遺伝子を発現するだけであり、一方、正常提供者由来の形質細胞は多クローン性であってこれらの2つのクラスの多数の異なる遺伝子を発現することを考慮すると、このことは予測された。195遺伝子のもう一つのクラスターは、多数の発癌遺伝子/成長関連遺伝子(たとえば、MYC、ABL1、PHB、EXT2)、細胞周期関連遺伝子(たとえば、CDC37、CDK4、CKS2)、および翻訳機構遺伝子(E1F2、E1F3、HTF4A、TFIIA)(図1C)に非常に富んでいた

10

【0086】

実施例7

新たに診断された多発性骨髄腫の階層的クラスタリングは4つの異なる部分集団を認める

多発性骨髄腫の74例だけについて二次元クラスタリング分析を実施した。試料樹状図は、各枝の内部に2つの異なる部分集団を有する2本の主要な枝を認めた(図1E)。4つの部分集団をMM1、MM2、MM3、およびMM4と命名し、それぞれが20、21、15、および18名の患者を含んだ。MM1部分集団は、形質細胞が意義不明単クローン性免疫グロブリン血症形質細胞に最も関係の近い患者を表し、MM4は多発性骨髄腫細胞株に最も似ている(図1Dを参照)。これらのデータは、その4つの遺伝子発現部分集団は信頼性を有した4つの異なる疾患単位を表す可能性があることを示唆した。

20

【0087】

次いで4つの部分集団にわたる遺伝子発現の差を、²検定およびWRS検定を用いて検討した(表1)。予想通り、最大の差はMM1とMM4の間(205遺伝子)で、最小の差はMM1とMM2の間(24遺伝子)であった。次に、MM4でMM1と比較して作動しているまたはアップレギュレートされる遺伝子の上位30個を検討した(表2)。データは、最も有意な遺伝子30個のうち13個(上位15遺伝子のうち10個)がDNA複製/修復または細胞周期調節に関与していたことを示した。チミジル酸合成酵素(TYMS)は、MM4部分集団を構成する18試料すべてに存在したが、MM1の20試料中3試料だけに存在し、²検定で最も有意な遺伝子を表した。DNAミスマッチ修復遺伝子であるmutS(*E. coli*)ホモログ2(MSH2)はWRSのP値が 2.8×10^{-6} で、WRS検定で最も有意な遺伝子であった。リスト中の他の注目すべき遺伝子には、CAAXファルネシルトランスフェラーゼ(FNTA)、zesteホモログ2の転写因子エンハンサー(EZH2)およびMFC関連亜鉛フィンガータンパク質(MAZ)、真核翻訳開始因子(EIF2S1およびEIF2B1)、ならびにミトコンドリア翻訳開始因子2(MTIF2)、シャペロンe(CCT4)、UDP-グルコースピロホスホリラーゼ2(IUGP2)、および26Sプロテアソーム関連pad1ホモログ(POH1)があった。

30

【0088】

臨床徴候に関してクラスターの妥当性を評価するために、4つの部分集団にわたってさまざまな臨床パラメータとの相関を分析した(表3)。試験した17個の臨床変数のうち、異常核型の存在($P=0.0003$)および血清2M濃度($P=0.0005$)は4つの部分集団間で有意に差があり、クレアチニン上昇($P=0.06$)および第13染色体の細胞遺伝学的欠失($P=0.09$)はわずかに有意であった。傾向としては、MM4部分集団で他の3つの部分集団と比較してより高い2Mおよびクレアチニンならびに異常核型および第13染色体欠失を有した。

40

【表 1】

多発性骨髄腫部分集団間の遺伝子発現の差

比較	WRS の P 値の範囲	遺伝子の数
MM1 対 MM4	0.00097~9.58x10 ⁻⁷	205
MM2 対 MM4	0.00095~1.04x10 ⁻⁶	162
MM3 対 MM4	0.00098~3.75x10 ⁻⁶	119
MM1 対 MM3	0.00091~6.27x10 ⁻⁶	68
MM2 対 MM3	0.00097~1.98x10 ⁻⁵	44
MM1 対 MM2	0.00083~2.93x10 ⁻⁵	24

*Wilcoxon の順位和検定。比較は有意な遺伝子の数に基づいて並べてある。比較は WRS の P 値<0.001 である。

【表 2 - 1】

表2
MM1とMM4の比較で最も発現量の異なる30個の遺伝子
部分集団

登録番号*	機能	遺伝子記号	MM1 MM4		カイ二乗	WRS [†] P値	
			(N=20)	(N=18)			
			<i>P</i>	<i>P</i>			
D00596	DNA 複製	<i>TYMS</i>	3	18	24.35	1.26x10 ⁻⁴	
U35835	DNA 修復	<i>PRKDC</i>	2	17	23.75	4.55x10 ⁻⁶	10
U77949	DNA 複製	<i>CDC6</i>	1	13	15.62	5.14x10 ⁻⁶	
U91985	DNA 断片化	<i>DFFA</i>	1	12	13.38	6.26x10 ⁻⁵	
U61145	転写	<i>EZH2</i>	4	15	12.77	1.67x10 ⁻⁴	
U20979	DNA 複製	<i>CHAF1A</i>	2	12	10.75	1.10x10 ⁻⁴	
U03911	DNA 修復	<i>MSH2</i>	0	9	10.48	2.88x10 ⁻⁶	
X74330	DNA 複製	<i>PRIMI</i>	0	9	10.48	9.36x10 ⁻⁶	
X12517	SnRNP	<i>SNR PC</i>	0	9	10.48	5.26x10 ⁻⁶	20
D85131	転写	<i>MAZ</i>	0	9	10.48	1.08x10 ⁻⁵	
L00634	ファルネシルトランスフェラーゼ	<i>FNTA</i>	10	18	9.77	7.28x10 ⁻⁵	
U21090	DNA 複製	<i>POLD2</i>	11	18	8.27	8.05x10 ⁻⁵	
X54941	細胞周期	<i>CKS1</i>	10	17	7.07	1.26x10 ⁻⁴	
U62136	細胞周期	<i>UBE2V2</i>	13	18	5.57	4.96x10 ⁻⁶	
D38076	細胞周期	<i>RANBP1</i>	13	18	5.57	7.34x10 ⁻⁶	
X95592	不明	<i>C1D[†]</i>	13	18	5.57	1.10x10 ⁻⁴	30
X66899	細胞周期	<i>EWSR1</i>	14	18	4.35	1.89x10 ⁻⁴	
L34600	翻訳開始	<i>MTIF2</i>	14	18	4.35	3.09x10 ⁻⁵	
U27460	代謝	<i>IUGP2</i>	15	18	3.22	1.65x10 ⁻⁴	
U15009	SnRNP	<i>SNRPD3</i>	15	18	3.22	1.47x10 ⁻⁵	
J02645	翻訳開始	<i>EIF2S1</i>	16	18	2.18	7.29x10 ⁻⁵	
X95648	翻訳開始	<i>EIF2B1</i>	16	18	2.18	1.45x10 ⁻⁴	
M34539	カルシウムシグナル伝達	<i>FKBP1A</i>	18	18	0.42	1.71x10 ⁻⁵	40
J04611	DNA 修復	<i>G22P1</i>	18	18	0.42	7.29x10 ⁻⁵	
U67122	抗アポトーシス	<i>UBL1</i>	20	18	0.00	7.29x10 ⁻⁵	
U38846	シャペロン	<i>CCT4</i>	20	18	0.00	1.26x10 ⁻⁴	

【表 2 - 2】

U80040 代謝	<i>ACO2</i>	20	18	0.00	8.38×10^{-5}
U86782 プロテアソーム	<i>POH</i> [†]	20	18	0.00	5.90×10^{-5}
X57152 シグナル伝達	<i>CSNK2B</i>	20	18	0.00	7.29×10^{-5}
D87446 不明	<i>KIAA0257</i> [†]	20	18	0.00	1.26×10^{-5}

・表記の登録番号はGeneBank番号である。† HUGO未承認の遺伝子記号。‡ Wilcoxonの順位和検定。

10

【表 3】

多発性骨髄腫部分集団に関連する臨床パラメータ

臨床パラメータ	多発性骨髄腫部分集団				P 値
	1	2	3	4	
細胞遺伝学的異常	40.0%	5.3%	53.3%	72.2%	0.00028
β2-ミクログロブリン平均値 (mg/L)	2.81	2.73	4.62	8.81	0.00047

20

有意性判定には分散分析、カイ二乗、および Fisherの直接確率検定を用いた。

【0089】

実施例8

悪性形質細胞における120遺伝子の発現変化

上記で開示した階層的なクラスター分析は、多発性骨髄腫形質細胞を正常形質細胞から識別可能であることを示した。多発性骨髄腫を正常形質細胞から識別する遺伝子は、²分析およびWRS検定で有意であると認められた ($P < 0.0001$)。統計分析は、120個の遺伝子が多発性骨髄腫を正常形質細胞から識別したことを示した。発現量の異なる120個の遺伝子のPearson相関分析を用いて、MMにおいてその遺伝子がアップレギュレートされるかまたはダウンレギュレートされるかを調べた。

30

【0090】

有意にダウンレギュレートされる遺伝子の大多数にあたる、免疫機能と関連している遺伝子(たとえばIGH、IGL、HLA)を除外した場合、50個の遺伝子が多発性骨髄腫において有意なダウンレギュレーションを示した(表4)。WRS検定のP値は 9.80×10^{-5} から 1.56×10^{-14} までの範囲にわたり、群における遺伝子の発現の有無の²検定は18.83から48.45の範囲となった。²検定で最も有意な差を示した遺伝子はCXCケモカインSDF1であった。多発性骨髄腫形質細胞の扁桃由来形質細胞との比較で、多発性骨髄腫形質細胞のように、扁桃形質細胞もまたSDF1を発現しないことが示されたことに注意するのは重要である。2つの別のCXCケモカインであるPF4およびPF4V1もまた多発性骨髄腫形質細胞に存在しなかった。2番目に最も有意な遺伝子は、腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリーメンバーのTNFRF7であり、形質細胞の成熟およびアポトーシスの調節と結びつけられている分子であるCD27をコードする。

40

【0091】

遺伝子の最大の群である50個中20個は、シグナル伝達カスケードと結びついていた。多発性骨髄腫形質細胞は、カルシウムシグナル伝達(S100A9とS100A12)またはリポタンパク質シグナル伝達(LIPA、LCN2、PLA2G7、APOE、APOC1)に関連する遺伝子の発現が低いかまたは見られなかった。LCN2は、別名24p3であるが、分泌型リポカリンをコードし

50

、これは成長因子欠乏後に前駆B細胞におけるアポトーシスを誘導することが最近示されている。多発性骨髄腫 形質細胞に存在しないもう一つの主要な分類は、接着関連遺伝子であった(ITGA2B、IGTB2、GP5、VCAM、MIC2)。

【 0 0 9 2 】

相関分析は、多発性骨髄腫において70個の遺伝子が作動したかまたはアップレギュレートされたことを示した(表5)。発現が存在するかないかの²検定を考慮した場合、サイクリン依存性阻害因子CDKN1Aは最も有意に発現に差がある遺伝子であった(²=53.33、WRS=3.65x10⁻¹¹)。WRS検定を用いて量的変化を考慮した場合、チロシンキナーゼ発癌遺伝子ABL1が最も有意であった(²=43.10、WRS=3.96x10⁻¹⁴)。リスト中の他の発癌遺伝子には、USF2、USP4、MLLT3、MYCがあった。遺伝子の最大の分類は、産物がアミノ酸合成、翻訳開始、タンパク質折りたたみ、グリコシル化、輸送、およびタンパク質分解を含むタンパク質代謝に関与するものに相当した(12遺伝子)。他の複数メンバーのクラスには、転写(11遺伝子)、シグナル伝達(9遺伝子)、DNA合成および修飾(6遺伝子)、ヒストン合成および修飾(5遺伝子)があった。

10

QSCN6、PHB、ホスファターゼPTPRKおよびPPP2R4、およびキナーゼMAPKAPK3といったシグナル伝達遺伝子の過剰発現は、増殖停止と結びつけられてきた。シグナル伝達クラスの唯一の分泌型成長因子は、多発性骨髄腫の生物学において役割を果たすことが知られている因子のHGFであった。MOX2遺伝子は、その産物は通常、活性化T細胞およびCD19⁺B細胞上の内在性膜タンパク質として発現しておりマクロファージ活性化の阻害に関与するが、シグナル伝達クラスに属した。腫瘍抑制因子遺伝子および β -カテニンシグナル伝達の負の調節因子APCは、シグナル伝達クラスの別のメンバーであった。2つのメンバーを含むクラスには、RNA結合、ミトコンドリア呼吸、細胞骨格マトリックス、代謝、細胞周期、接着があった。1つのメンバーのクラスは、補体カスケード(MASP1)、薬物耐性(MVP)、グリコサミノグリカン異化、ヘパリン硫酸合成(EXTL2)、小胞輸送(TSCJ)があった。機能不明の4個の遺伝子もまた、MMにおいて有意にアップレギュレートされるとして認められた。

20

【表 4 - 1】

表4

多発性骨髄腫において正常骨髄形質細胞との比較で最も有意にダウンレギュレートされた50個の遺伝子

登録番号*	機能	遺伝子記号	カイ二乗	WRS ¹ P値	
L36033	cxcケモカイン	<i>SDF1</i>	48.45	3.05x10 ⁻¹²	
M63928	シグナル伝達	<i>TNFRSF7</i>	48.45	6.35x10 ⁻¹¹	
U64998	リボヌクレアーゼ	<i>RNASE6</i>	46.44	2.82x10 ⁻⁹	10
M20902	リポタンパク質シグナル伝達	<i>APOC1</i>	45.62	4.63x10 ⁻¹⁰	
M26602	免疫	<i>DEFA1</i>	40.75	1.06x10 ⁻¹²	
M21119	免疫	<i>LYZ</i>	40.73	6.24x10 ⁻¹⁰	
M14636	代謝	<i>PYGL</i>	39.84	1.15x10 ⁻¹⁰	
M26311	カルシウムシグナル伝達	<i>SI00A9</i>	38.96	3.60x10 ⁻¹³	
M54992	シグナル伝達	<i>CD72</i>	36.14	2.40x10 ⁻⁹	
X16832	タンパク質分解	<i>CTSH</i>	35.26	1.81x10 ⁻¹²	20
M12529	リポタンパク質シグナル伝達	<i>APOE</i>	34.50	3.95x10 ⁻¹⁴	
M15395	接着	<i>ITGB2</i>	34.02	1.74x10 ⁻¹³	
Z74616	細胞外マトリックス	<i>COL1A2</i>	34.02	8.06x10 ⁻¹¹	
HT2152	受容体シグナル伝達	<i>CD163</i>	33.01	1.66x10 ⁻¹²	
U97105	ピリミジン代謝	<i>DPYSL2</i>	32.52	2.22x10 ⁻¹⁰	
U81787	シグナル伝達	<i>WNT10B</i>	32.50	1.77x10 ⁻⁵	
HT3165	受容体チロシンキナーゼ	<i>AXL</i>	31.36	5.26x10 ⁻¹¹	30
M83667	転写	<i>CEBPD</i>	31.19	4.69x10 ⁻¹⁰	
L33930	受容体シグナル伝達	<i>CD24</i>	30.33	1.56x10 ⁻¹⁴	
D83657	カルシウムシグナル伝達	<i>SI00A12</i>	29.91	6.58x10 ⁻⁸	
M11313	プロテイナーゼ阻害因子	<i>A2M</i>	29.91	1.07x10 ⁻¹⁰	
M31158	シグナル伝達	<i>PRKAR2B</i>	29.91	2.20x10 ⁻⁹	
U24577	リポタンパク質シグナル伝達	<i>PLA2G7</i>	29.78	2.08x10 ⁻¹⁰	
M16279	接着	<i>MIC2</i>	28.75	8.01x10 ⁻¹¹	40
HT2811	細胞周期	<i>CDK8</i>	28.32	6.53x10 ⁻⁹	
M26167	cxcケモカイン	<i>PF4V1</i>	27.35	4.68x10 ^{-11z}	
U44111	代謝	<i>HNMT</i>	27.24	2.07x10 ⁻¹¹	

【表 4 - 2】

X59871	転写	<i>TCF7</i>	26.79	7.16×10^{-10}
X67235	転写	<i>HHEX</i>	25.21	2.07×10^{-10}
U19713	カルシウムシグナル伝達	<i>AIF1</i>	25.21	2.57×10^{-10}
Y08136	アポトーシス	<i>ASM3A</i> †	24.74	3.30×10^{-8}
M97676	転写	<i>MSX1</i>	24.58	9.80×10^{-5}
M64590	ハウスキーピング	<i>GLDC</i>	24.27	4.10×10^{-8}
M20203	プロテアーゼ	<i>ELA2</i>	24.03	6.36×10^{-12}
M30257	接着	<i>VCAM1</i>	23.42	1.71×10^{-10}
M93221	エンドサイトーシスを 媒介	<i>MRC1</i>	23.30	1.15×10^{-7}
S75256	リポタンパク質 シグナル伝達	<i>LCN2</i>	23.30	4.17×10^{-7}
U97188	RNA結合	<i>KOC1</i> †	22.47	5.86×10^{-9}
Z23091	接着	<i>GP5</i>	22.47	7.58×10^{-7}
M34344	接着	<i>ITGA2B</i>	21.99	8.00×10^{-8}
M25897	cxcケモカイン	<i>PF4</i>	21.89	1.12×10^{-8}
M31994	ハウスキーピング	<i>ALDH1A1</i>	21.36	4.86×10^{-9}
Z31690	リポタンパク質 シグナル伝達	<i>LIPA</i>	20.67	1.50×10^{-9}
S80267	シグナル伝達	<i>SYK</i>	20.42	5.90×10^{-5}
U00921	シグナル伝達	<i>LY117</i>	18.83	1.57×10^{-8}

*表記の登録番号はGeneBank番号であるが、Institute of Genomic Research (TIGR)が提供する「HT」で始まるものを除く。† HUGO未承認の遺伝子記号。‡ Wilcoxonの順位和検定。

10

20

30

【表 5 - 1】

表5

正常骨髄形質細胞と比較して多発性骨髄腫で最も有意にアップレギュレートされる70個の遺伝子

登録番号*	機能	遺伝子記号	カイ二乗	WPS ‡ P値	
U09579	細胞周期	<i>CDKN1A</i>	53.33	3.65x10 ⁻¹¹	
U78525	アミノ酸合成	<i>EIF3S9</i>	49.99	2.25x10 ⁻¹²	10
HT5158	DNA合成	<i>GMPS</i>	47.11	4.30x10 ⁻¹²	
X57129	ヒストン	<i>HIF2</i>	46.59	5.78x10 ⁻¹³	
M55210	接着	<i>LAMC1</i>	45.63	1.34x10 ⁻⁹	
L77886	シグナル伝達、ホスファターゼ	<i>PTPRK</i>	45.62	5.42x10 ⁻¹⁰	
U73167	グリコサミノグリカン異化	<i>HYAL3</i>	44.78	1.07x10 ⁻¹⁰	
X16416	オンコジーン、キナーゼ	<i>ABL1</i>	43.10	3.96x10 ⁻¹⁴	20
U57316	転写	<i>GCN5L2</i>	43.04	1.36x10 ⁻¹²	
Y09022	タンパク質グリコシル化	<i>NOT56L</i> †	42.05	5.53x10 ⁻¹⁰	
M25077	RNA結合	<i>SSA2</i>	41.26	1.69x10 ⁻⁷	
AC002115	ミトコンドリア呼吸	<i>COX6B</i>	41.16	2.16x10 ⁻⁸	
Y07707	転写	<i>NRF</i> †	37.59	4.79x10 ⁻¹⁰	
L22005	タンパク質ユビキチン化	<i>CDC34</i>	34.50	2.89x10 ⁻⁶	
X66899	転写	<i>EWSR1</i>	34.39	4.23x10 ⁻⁸	30
D50912	RNA結合	<i>RBM10</i>	33.93	2.61x10 ⁻⁶	
HT4824	アミノ酸合成	<i>CBS</i>	33.77	1.49x10 ⁻⁶	
U10324	転写	<i>ILF3</i>	33.33	3.66x10 ⁻¹¹	
AD000684	オンコジーン、転写	<i>USF2</i>	32.18	7.41x10 ⁻¹¹	
U68723	細胞周期	<i>CHES1</i>	31.68	1.03x10 ⁻⁶	
X16323	シグナル伝達、成長因子	<i>HGF</i>	30.67	4.82x10 ⁻⁹	
U24183	代謝	<i>PFKM</i>	30.47	8.92x10 ⁻¹⁰	
D13645	不明	<i>KIAA0020</i> †	30.47	7.40x10 ⁻⁶	40
S85655	シグナル伝達、増殖停止	<i>PHB</i>	29.37	1.32x10 ⁻⁸	
X73478	シグナル伝達、ホスファターゼ	<i>PPP2R4</i>	28.32	6.92x10 ⁻⁹	

【表 5 - 2】

L77701	ミトコンドリア呼吸	<i>COX17</i>	27.81	1.33×10^{-6}	
U20657	オンコジーン、プロテアソーム	<i>USP4</i>	27.71	2.31×10^{-6}	
M59916	シグナル伝達、DAGシグナル伝達	<i>SMPD1</i>	27.49	3.52×10^{-8}	
D16688	オンコジーン、DNA結合	<i>MLLT3</i>	27.24	6.97×10^{-13}	
X90392	DNAエンドヌクレアーゼ	<i>DNASE1L1</i>	26.98	4.72×10^{-7}	
U07424	アミノ酸合成	<i>FARSL</i>	26.93	1.66×10^{-6}	
X54199	DNA合成	<i>GART</i>	26.57	9.61×10^{-11}	10
L06175	不明	<i>P5-1</i> [†]	26.57	5.16×10^{-7}	
M55267	不明	<i>EVI2A</i>	25.92	3.79×10^{-6}	
M87507	タンパク質分解	<i>CASP1</i>	25.78	5.46×10^{-7}	
M90356	転写	<i>BTF3L2</i>	25.78	9.68×10^{-8}	
U35637	細胞骨格マトリックス	<i>NEB</i>	25.40	9.15×10^{-6}	
L06845	アミノ酸合成	<i>CARS</i>	25.34	5.39×10^{-8}	
U81001	DNA、核マトリックス接着	<i>SNURF</i>	24.58	4.54×10^{-5}	20
U76189	ヘパラン硫酸合成	<i>EXTL2</i>	24.58	7.28×10^{-6}	
U53225	タンパク質輸送	<i>SNX1</i>	24.48	5.53×10^{-7}	
X04366	タンパク質分解	<i>CAPN1</i>	24.35	1.26×10^{-9}	
U77456	タンパク質折りたたみ	<i>NAP1L4</i>	24.27	4.23×10^{-10}	
L42379	シグナル伝達、増殖停止	<i>QSCN6</i>	24.27	1.28×10^{-10}	
U09578	シグナル伝達、キナーゼ	<i>MAPKAPK3</i>	24.27	2.35×10^{-9}	30
Z80780	ヒストン	<i>H2BFH</i>	24.27	3.44×10^{-12}	
HT4899	オンコジーン、転写	<i>MYC</i>	24.27	1.77×10^{-5}	
M74088	シグナル伝達、 β -カテニン調節因子	<i>APC</i>	23.94	1.50×10^{-5}	
X57985	ヒストン	<i>H2BFQ</i>	23.90	3.25×10^{-12}	
X79882	薬物耐性	<i>MVP</i>	23.47	1.77×10^{-11}	
X77383	タンパク質分解	<i>CTSO</i>	23.18	4.68×10^{-7}	
M91592	転写	<i>ZNF76</i>	23.16	1.12×10^{-8}	40
X63692	DNAメチルトランスフェラーゼ	<i>DNMT1</i>	23.12	5.15×10^{-11}	
M60752	ヒストン	<i>H2AFO</i>	21.60	1.46×10^{-8}	
M96684	転写	<i>PURA</i>	21.25	4.54×10^{-5}	
U16660	代謝	<i>ECH1</i>	21.18	5.52×10^{-5}	

【表 5 - 3】

M86737	DNA修復	<i>SSRP1</i>	20.60	2.62×10^{-5}	
U35113	ヒストン脱アセチル化酵素	<i>MTA1</i>	20.60	6.67×10^{-10}	
X81788	不明	<i>ICT1</i>	20.42	2.97×10^{-7}	
HT2217	シグナル伝達	<i>MUC2A</i>	20.33	2.61×10^{-7}	
M62324	不明	<i>MRF-1</i> †	20.31	3.98×10^{-9}	
U09367	転写	<i>ZNF136</i>	20.30	7.72×10^{-9}	
X89985	細胞骨格マトリックス	<i>BCL7B</i>	19.81	5.50×10^{-9}	10
L19871	転写抑制	<i>ATF3</i>	19.43	1.13×10^{-6}	
X69398	接着	<i>CD47</i>	19.16	6.44×10^{-7}	
X05323	シグナル伝達 マクロファージ阻害因子	<i>MOX2</i>	19.16	8.58×10^{-6}	
X04741	タンパク質ユビキチン化	<i>UCHL1</i>	19.14	9.76×10^{-5}	
D87683	小胞輸送	<i>TSC1</i>	19.12	6.81×10^{-6}	
D17525	補体カスケード	<i>MASP1</i>	18.81	4.05×10^{-7}	20

*表記の登録番号はGeneBank番号であるが、Institute of Genomic Research (TIGR)が提供する「HT」で始まるものを除く。† HUGO未承認の遺伝子記号。‡ Wilcoxonの順位和検定。

実施例 9

悪性形質細胞を正常形質細胞から識別する14遺伝子の発現変化

本発明はまた、最小の数の遺伝子の発現パターンを、正常、前癌および悪性の形質細胞を明瞭に識別するのに用いることができるかどうか調べることを目指した。多変量逐次選択判別分析(MSDA)を、正常形質細胞(N=26)および多発性骨髄腫形質細胞(N=162)にわたって有意に発現量の異なる遺伝子の上位50個に適用し、正常形質細胞群と多発性骨髄腫群との間の線形判別関数を観察した。変数増加および減少の両方の選択方法を実施した。変数を加えるか除くかの選択は、下記のように定義されるWilksの分析に基づいた： $(x) = \det W(x) / \det T(x)$ 、ここで $W(x)$ と $T(x)$ はそれぞれ群内および全体の変動行列である。Wilksのは0から1までの範囲の値を取ることができる。の変化の有意性をF検定を用いて検定した。多変量逐次選択判別分析の終わりに、14個の遺伝子だけが選択され、正準判別関数を計算した(表6)。多変量逐次選択判別分析は以下の式を選択した：判別得点 = $HG4716 \times 3.683 - L33930 \times 3.134 + L42379 \times 1.284 + L77886 \times 1.792 + M14636 \times 5.971 - M26167 \times 6.834 + U10324 \times 2.861 - U24577 \times 10.909 + U35112 \times 2.309 + X16416 \times 6.671 - X64072 \times 5.143 + 79822 \times 5.53 + Z22970 \times 4.147 + Z80780 \times 2.64 - 87.795$ 。カットオフ値は-3.3525であった。-3.3525未満の値はその試料が正常群に属することを示し、-3.3525より大の値はその試料が多発性骨髄腫に属することを示した。

【0093】

14遺伝子モデルを次いで162試料の多発性骨髄腫および26試料の正常形質細胞から成る練習群に適用した(データ記載せず)。交差検定分析を実施し、ここでその試料セットから試料を一度に1個取り除き、変更した試料セットの各クラスについて練習統計値および発現平均値を再計算した。変更した試料セットのP値<0.05である遺伝子を用いた予測値を生成した。練習群中の試料の型の100%正確な予測が得られた。

【0094】

検証群を次いでそのモデルに適用した。多変量逐次選択判別分析は、原発性多発性骨髄腫の118試料中116試料(98.31%)、およびヒト骨髄腫細胞株の8株中8株(100%)を多発性骨髄

腫と正確に分類した。さらに、正常形質細胞の6試料中6試料は正常と分類された。重要なことには、本モデルは意義不明単クローン性免疫グロブリン血症の7例のうち6例を多発性骨髄腫と予測し、意義不明単クローン性免疫グロブリン血症の1例を正常と予測した(図5)。意義不明単クローン性免疫グロブリン血症の6例を多発性骨髄腫とした分類は、この良性的の条件にある細胞が完全に形質転換した細胞と強い類似性を有することを示唆した点で、重要な派生的問題を有する。これらの結果はまた、意義不明単クローン性免疫グロブリン血症の病因およびその顕在的な多発性骨髄腫への移行について重要な示唆を有する。本モデルが意義不明単クローン性免疫グロブリン血症を多発性骨髄腫と分類したという事実は、意義不明単クローン性免疫グロブリン血症がたとえば多発性骨髄腫で一般的なIGH遺伝子座の転座および第13染色体の欠失といった染色体異常を有することを示した最近の研究と合致する。将来の研究は、意義不明単クローン性免疫グロブリン血症を多発性骨髄腫から実際に識別できる遺伝子発現パターンの特定に向けられるであろう。意義不明単クローン性免疫グロブリン血症の症例の大多数が多発性骨髄腫と分類されたことを考慮すると、意義不明単クローン性免疫グロブリン血症の1例が正常と分類されたことは、1)その患者は意義不明単クローン性免疫グロブリン血症を有しないかまたは2)その意義不明単クローン性免疫グロブリン血症細胞はその試料中の形質細胞の少数派に相当したことを示しうる。その意義不明単クローン性免疫グロブリン血症の症例および正常と分類された2例の多発性骨髄腫は、将来その試料が多発性骨髄腫群に変化するかどうかを調べるため、長期的に追跡される。

10

20

30

40

【0095】

判別結果をさらに妥当性評価するため、少なくとも1試料で発現している927遺伝子について二次元階層的クラスタリングを実施した。検証群からの多発性骨髄腫118試料、正常形質細胞32試料、多発性骨髄腫細胞株7株、および意義不明単クローン性免疫グロブリン血症7例を試験した。横軸に沿って、実験試料を、すべての遺伝子にわたって最も類似した発現パターンを有するものが互いに隣接して配置されるように並べた。驚くべきことに、判別分析で誤って分類された多発性骨髄腫の2例および正常形質試料と分類された意義不明単クローン性免疫グロブリン血症の1例は、クラスター分析でもまた正常群に結びつけられた(図6)。この結果は、14遺伝子判別モデルが927遺伝子階層的クラスタモデルと合致したことを示した。

【0096】

上記の分析中の14遺伝子の機能の調査はいくつかの興味深い特性を示した。その遺伝子は機能では関係が無く、したがって明らかに正常細胞と悪性細胞の署名として用いることができる独特で独立した遺伝子マーカーに相当する。遺伝子は微小環境(ITGB2)、細胞形質転換(ABL1)および薬物耐性(MVP)に関連している。これらの遺伝子の調節解除された発現が、形質細胞の悪性形質転換における根本的な遺伝子異常を表す可能性がある。たとえば、ITGB2遺伝子は、細胞-細胞および/または細胞-マトリックス接着現象を媒介することが知られているインテグリンヘテロ二量体の形成に決定的である糖タンパク質-2インテグリン(CD18)をコードする。形質細胞は構成的にICAM-1を発現し、この分子は骨髄接着細胞上に誘導可能であるため、ITGB2/ICAM-1接着経路が形質細胞間ならびに骨髄微小環境中の細胞との接着を媒介する機構を想定することができる。ヒトリンパ腫では、ITGB2発現は軽度および中等度の悪性リンパ腫の腫瘍細胞にみられ、一方でITGB2の非存在は重度の悪性リンパ腫の特徴と思われる。他のBリンパ腫と同様に、ITGB2の非存在は多発性骨髄腫において免疫監視の回避に貢献している可能性がある。

【0097】

要約すると、本発明は14遺伝子の発現の差を用いることによって多発性骨髄腫の診断を可能にするモデルを記載する。これらの遺伝子の調節解除された発現が悪性表現型の生成に関与しているかどうか、または根本となっているがまだ知られていない何らかの遺伝子欠陥の前哨をこれらが表すのかがどうかは現在のところ明らかでない。しかし、これらの遺伝子の機能は、調節解除された発現と悪性度との間に根本の因果関係を示唆する。

【表6】

表6
最適診断モデルを定義する14遺伝子

登録番号*	遺伝子記号	Wilksのλ	除外のF	P値
HT5158	<i>GMPS</i>	0.090	10.99	0.0011
L33930	<i>CD24</i>	0.089	8.80	0.0034
L42379	<i>QSCN6</i>	0.087	4.24	0.0409
L77886	<i>PTPRK</i>	0.088	6.46	0.0119
M14636	<i>PYGL</i>	0.091	12.62	0.0005
M26167	<i>PF4VI</i>	0.091	12.39	0.0005
U10324	<i>ILF3</i>	0.090	11.98	0.0007
U24577	<i>PLA2G7</i>	0.107	44.28	3.23x10 ⁻¹⁰
U35113	<i>MTA1</i>	0.088	6.22	0.0135
X16416	<i>ABL1</i>	0.099	27.65	4.04x10 ⁻⁷
X64072	<i>ITGB2</i>	0.097	24.63	1.59x10 ⁻⁶
X79882	<i>MVP</i>	0.098	25.83	9.19x10 ⁻⁷
Z22970	<i>CD163</i>	0.088	6.08	0.0146
Z80780	<i>H2B</i>	0.092	14.58	0.0002

*表記の登録番号はGeneBank番号であるが、Institute of Genomic Researchが提供する「HT」で始まるものを除く。

10

20

30

40

50

【0098】

実施例10

24遺伝子の発現の差が、遺伝子発現に定義される多発性骨髄腫の部分集団を正確に識別することができる

本発明はまた、最小の数の遺伝子の発現パターンを、5,000を超える遺伝子の階層的クラスタリングで識別される、遺伝子発現に定義される多発性骨髄腫の部分集団を明瞭に識別するのに用いることができるかどうか調べることを目指した。上記で考察した通り、263例の多発性骨髄腫、14試料の正常形質細胞、7例のMGUSおよび7株の多発性骨髄腫細胞株の二次元クラスター分析を実施した。試料樹状図は、4つの部分集団MM1、MM2、MM3、MM4を示し、それぞれ患者50、75、67、71名を含んだ。次いで、31試料の正常形質細胞および74例の新たに診断された多発性骨髄腫のカイ二乗およびWilcoxon検定によって決定された、統計的に有意である発現量の異なる遺伝子上位120個を、正準判別分析に用いるために選んだ。直線回帰分析を用いることによって、24遺伝子が多発性骨髄腫部分集団を識別することのできる予測因子と定義された(表7)。

【0099】

24 遺伝子 予測因子モデルを、各階層的クラスタリング群の中心に位置する多発性骨髄腫 形質細胞 試料から成る練習群に適用した[合計N=129; MM1=23、MM2=33、MM3=34、MM4=39]。練習群について交差検定分析を実施し、ここでその試料セットから試料を一度に1個取り除き、変更した試料セットの各クラスについて練習統計値および発現平均値を再計算した。変更した試料セットのP値<0.05である遺伝子を用いた予測値を生成した。練習群中の試料の型の100%正確な予測が得られた。

【 0 1 0 0 】

検証群を次いでそのモデルに適用した。多変量 逐次選択 判別分析は、原発性多発性骨髄腫の134試料中116試料(86.56%)を別々の部分集団に、階層的クラスタリングによって定義された部分集団と比較して正しく分類した。重要なことには、ヒト 骨髄腫 細胞株 の7株中7株(100%)が予想通りにMM4へ分類された。さらに、本モデルはMGUSの7例中5例をMM1と予測し、残りの例をそれぞれMM2およびMM3と予測した(図7)。

【 表 7 】

表7

多発性骨髄腫の部分集団を定義する24個の遺伝子

登録番号*	遺伝子記号	Wilksのλ	除外のF	P値
X54199	<i>GART</i>	0.004	3.13	0.0791
M20902	<i>APOC1</i>	0.005	4.05	0.0462
X89985	<i>BCL7B</i>	0.005	4.47	0.0365
M31158	<i>PRKAR2B</i>	0.005	5.07	0.0260
U44111	<i>HNMT</i>	0.005	5.68	0.0186
X16416	<i>ABL1</i>	0.005	6.72	0.0106
HT2811	<i>NEK2</i>	0.005	8.35	0.0045
D16688	<i>MLLT3</i>	0.005	8.36	0.0045
U57316	<i>CCN5L2</i>	0.005	8.49	0.0042
U77456	<i>NAP1L4</i>	0.005	8.57	0.0040
D13645	<i>KIAA00</i>	0.005	9.17	0.0030
M64590	<i>GLDC</i>	0.005	9.92	0.0020
L77701	<i>COX17</i>	0.005	10.01	0.0019
U20657	<i>USP4</i>	0.005	11.10	0.0011
L06175	<i>P5-1</i>	0.005	11.11	0.0011
M26311	<i>SI00A9</i>	0.005	11.20	0.0011
X04366	<i>CAPN1</i>	0.005	11.67	0.0009
AC002115	<i>COX6B</i>	0.006	13.64	0.0003
X06182	<i>C-KIT</i>	0.006	13.72	0.0003
M16279	<i>MIC2</i>	0.006	16.12	0.0001
M97676	<i>MSX1</i>	0.006	16.41	0.0001
U10324	<i>LIF3</i>	0.006	19.66	0.0000
S85655	<i>PHB</i>	0.007	20.63	0.0000
X63692	<i>DNMT1</i>	0.007	21.53	0.0000

*表記の登録番号はGeneBank番号であるが、Institute of Genomic Researchが提供する「HT」で始まるものを除く。

【 0 1 0 1 】

実施例 11

多発性骨髄腫の部分集団における遺伝子発現の「スパイク(spikes)」

多発性骨髄腫の統計分析において正常形質細胞に対して発現が異ならないとされたが、多発性骨髄腫の部分集団において非常に過剰発現されている合計156遺伝子もまた特定された。少なくとも1試料において10,000より大のADスパイクを有する合計25遺伝子を示す(表8)。接着関連遺伝子FBLN2は最もスパイクの頻度が高く、27例でスパイクした。インターフェロン誘導性タンパク質27の遺伝子IFI27は2番目にスパイクの頻度が高く25例でスパイクし、10,000を超えるスパイクの数が最大であった(N=14)。FGFR3遺伝子は74例中の9例でスパイクした(図2A)。これはすべてのスパイクが10,000ADより大であった唯一の遺伝子であった。実際、最低のAD値は18,961で最大は62,515であり、これはすべてのスパイクのうちの最大値を表した。FGFR3のスパイクの知見は、これらのスパイクが多発性骨髄腫特異的なFGFR3活性化t(4;14)(p21;q32)転座によって誘導されたことを示唆した。上記の仮説を検証するために、IGH遺伝子座と遺伝子MMSETとの間でt(4;14)(p21;q32)転座特異的融合転写産物についてRT-PCRを行った(データ記載せず)。転座特異的転写産物は9試料すべてのFGFR3スパイク試料に存在したが、FGFR3を発現しなかった5試料には存在しなかった。これらのデータは、そのスパイクがt(4;14)(p21;q32)転座によって引き起こされたことを示唆した。

10

【 0 1 0 2 】

CCND1遺伝子は、10,000より大のAD値で13例においてスパイクしていた。TRI-FISH分析をt(11;14)(q13;q32)転座について実施した(表9)。評価可能な11試料すべてがTRI-FISHによってt(11;14)(q13;q32)転座について陽性であった;2試料は保存中に細胞の全体性が失われたことにより分析不能であった。このように、すべてのFGFR3およびCCND1スパイクはそれぞれt(4;14)(p21;q32)転座またはt(11;14)(q13;q32)転座の存在のいずれかによって説明することができた。

20

【 0 1 0 3 】

次に、遺伝子発現に定義される多発性骨髄腫部分集団内の、FGFR3、CST6、IFI27、およびCCND1スパイクの分布を調べた(図2)。データは、FGFR3およびCST6スパイクはMM1またはMM2でみられる可能性がより高かった(P<0.005)一方、IFI27のスパイクはMM3およびMM4の分布と関連していた(P<0.005)ことを示した。CCND1スパイクはどの特定の部分集団とも関連していなかった(P>0.1)。CST6とCCND1は両方が11q13にマッピングされそしてスパイクに重なりが無かったことは注目に値する。CST6過剰発現は変異体であるt(11;14)(q13;q32)転座が原因であるかどうかは不明である。MS4A2(CD20)の5例のスパイクはMM1(3例のスパイク)またはMM2(2例のスパイク)部分集団のいずれかで見られた(データ記載せず)。

30

【 0 1 0 4 】

CD20分子をコードする遺伝子MS4A2もまた4例でスパイクした遺伝子であることが見出された(図3A)。スパイクした遺伝子発現がタンパク質発現と相関したかどうかを調べるため、CD20について免疫組織化学法を、多発性骨髄腫試料74例のうち15例に由来する生検で実施した(図3B)。免疫組織化学法によって、スパイクしたMS4A2遺伝子発現を有した4例すべてがCD20タンパク質発現についても陽性であった一方、MS4A2遺伝子発現が見られなかった11例はCD20についても陰性であった。遺伝子発現プロファイリングに追加の妥当性確認を加えるため、CDマーカータンパク質と、多発性骨髄腫細胞株CAGおよびEBV形質転換リンパ芽球細胞株ARH-77における遺伝子発現との比較もまた実施した(図4)。CD138およびCD38タンパク質の発現と遺伝子発現とはCAGで高かったがARH-77細胞では存在しなかった。一方、CD19、CD20、CD21、CD22、CD45およびCDw52の発現はARH-77で強くCAG細胞では存在しないことが見出された。FGFR3またはCCND1のスパイクした遺伝子発現とt(4;14)(p14;q32)またはt(11;14)(q13;q32)転座の存在とのほぼ100%の一致;原発性多発性骨髄腫におけるCD20とMS4A2遺伝子発現との強い相関;およびB細胞と形質細胞におけるCDマーカータンパク質と遺伝子発現との強い相関は、ここで開示する遺伝子発現プロファイリングの精度の重要な妥当性確認を表す。

40

50

【表 8】

表8

新たに診断された多発性骨髄腫患者由来の形質細胞で「スパイク」発現を有する遺伝子

登録番号*	機能	遺伝子 記号	スパイク 数	スパイク >10K	最大 スパイク	
M64347	シグナル伝達	<i>FGFR3</i>	9	9	62,515	
U89922	免疫	<i>LTB</i>	4	2	49,261	
X67325	インターフェロンシグナル 伝達	<i>IFI27</i>	25	14	47,072	10
X59798	細胞周期	<i>CCND1</i>	6	13	42,814	
U62800	システインプロテアーゼ 阻害剤	<i>CST6</i>	17	6	36,081	
U35340	眼レンズタンパク質	<i>CRYBB1</i>	4	1	35,713	
X12530	B細胞シグナル伝達	<i>MS4A2</i>	5	5	34,487	
X59766	不明	<i>AZGP1</i>	18	4	28,523	
U58096	不明	<i>TSPY</i>	4	1	23,325	
U52513	インターフェロンシグナル 伝達	<i>IFIT4</i>	5	2	21,078	
X76223	小胞輸送	<i>MAL</i>	19	5	20,432	20
X92689	O-結合型グリコシル化	<i>GALNT3</i>	4	1	18,344	
D17427	接着	<i>DSC3</i>	8	7	17,616	
L11329	シグナル伝達	<i>DUSP2</i>	14	1	15,962	
L13210	接着、 マクロファージレクチン	<i>LGALS3BP</i>	8	2	14,876	
U10991	不明	<i>G2†</i>	7	1	14,815	
L10373	内在性膜タンパク質	<i>TM4SF2</i>	4	2	14,506	30
U60873	不明	<i>I37308</i>	12	1	12,751	
M65292	補体調節	<i>HFL1</i>	9	1	12,718	
HT4215	リン脂質輸送	<i>PLTP</i>	23	1	12,031	
D13168	成長因子受容体	<i>ENDRB</i>	18	1	11,707	
AC002077	シグナル伝達	<i>GNAT1</i>	21	1	11,469	
M92934	成長因子	<i>CTGF</i>	4	1	11,201	
X82494	接着	<i>FBLN2</i>	27	7	10,648	
M30703	成長因子	<i>AR</i>	5	1	10,163	40

*表記の登録番号はGeneBank番号であるが、Institute of Genomic Research(TIGR)が提供する「HT」で始まるものを除く。†HUGO未承認の遺伝子記号。

【表9】

表9

CCND1スパイクとFISHに定義されるt(11:14)(q13;q32)との相関

GC PT*	CCND1スパイク (AD値)	FISH t(11;14)	転座を有するPC(%)	細胞カウント数
P168	42,813	陽性	59%	113
P251	33,042	陽性	80%	124
P91	31,030	実施していない	—	—
P99	29,862	陽性	65%	111
P85	26,737	陽性	92%	124
P241	25,611	陽性	96%	114
P56	23,654	陽性	100%	106
P63	22,358	陽性	98%	104
P199	18,761	陽性	60%	35
P107	15,205	陽性	100%	147
P75	14,642	陽性	100%	105
P187	14,295	陽性	25%	133
P124	10,594	実施していない	—	—

*GCPT=患者識別子; †AD=平均差

【0105】

実施例12

多発性骨髄腫の治療標的候補としてのエンドセリンB受容体

上記で開示した通り、本発明は多発性骨髄腫に由来する形質細胞において正常対照のものと比較して有意に異なる発現レベルを有するいくつかの遺伝子を同定している。遺伝子多発性骨髄腫において有意にアップレギュレートまたはダウンレギュレートされる遺伝子は多発性骨髄腫の治療標的候補である。これらの遺伝子の例は表4、5、8に挙げられている。これらの発現量の異なる遺伝子の中に、エンドセリンB受容体(ENDBR)がある。この遺伝子は正常形質細胞では発現されていなかったが、骨髄腫の部分集団では非常に高い発現を示す。実際、この遺伝子は現在、骨髄腫患者の30~40%で高度に発現されているように見える。図8は、ENDBRの正常形質細胞およびP1に始まってP226までの約200名の骨髄腫患者における発現の比較を示す。ENDBRは多発性骨髄腫患者では動作していないか高度に発現しているかのいずれかであった(図8A)。ENDBR発現レベルの程度は新たに診断された患者と以前に治療を受けた患者でほぼ同じであり、その活性化は進行現象ではないことを示唆した(図8B)。

【0106】

ENDBRのいくつかの重要な特性は注目すべきである。ENDBR遺伝子は第13染色体上に位置する。第13染色体における転座または欠失といった異常が多発性骨髄腫の最も強い負のリスク因子のひとつを表すことを考えると、これは潜在的に重要である。したがって、ENDBR発現の異常活性化は多発性骨髄腫について予後不良の指標である可能性がある。エンドセリンシグナル伝達を細胞成長と結びつける多数の報告もあり、またエンドセリンは、形質細胞腫瘍形成における病因的役割が記録されているいくつかの鍵分子を活性化すること

10

20

30

40

50

が示されている。マウス形質細胞腫の100%で活性化されており多くの原発性ヒト骨髓腫細胞で異常活性化されている遺伝子であるc-MYC発癌遺伝子、および骨髓腫細胞の主要な成長および生存因子であるIL-6は注目すべきである。エンドセリンはまた、B細胞の主要なシグナル伝達経路であるホスホリパーゼC経路を通じてシグナル伝達を行うように見える。さらに、最近の論文はエンドセリンシグナル伝達を阻害することの結果としてカポジ肉腫細胞の増殖の阻害が生じたことを報告した。

【0107】

多発性骨髓腫患者の腫瘍細胞が骨髓の微小環境から取り出された場合、腫瘍細胞はその集団の大部分がエンドセリン遺伝子を発現しているようには見えなかった。それらは大部分の例でエンドセリン1、2、3の発現を欠いていた。しかし、骨髓腫細胞を骨髓から取り出し、骨髓微小環境を模した独自の支持層上で48~72時間培養した場合、エンドセリン1遺伝子発現は骨髓腫細胞P323とP322の両方、ならびに支持層で大幅にアップレギュレートされた(図9)。したがって、多発性骨髓腫内の主な変数はエンドセリンの利用可能性でありうる。局所におけるENDBRのアップレギュレートされた発現と組み合わせさせたエンドセリンの産生促進は、多発性骨髓腫の新生物表現型に寄与する可能性があり、またエンドセリンとエンドセリン受容体相互作用を阻害することは悪性表現型の発生を妨げる可能性がある。

10

【0108】

実施例13

ヒト形質細胞分化の遺伝子発現比較プロファイリング

実施例13~15は、ヒト形質細胞分化に伴う転写の異なる変化を明らかにする全体的な遺伝子発現プロファイリングを記載する。

20

【0109】

下記に示すデータは、2つの独自の造血器である扁桃および骨髓から、高度に精製された形質細胞を単離することができたことを初めて実証する。何百万の細胞のこの精製は、非特異的細胞型からのバックグラウンド「ノイズ」を除外し(図10を参照)、それによって高感度遺伝子発現プロファイリング技術を用いたこれらの試料の正確な遺伝子プロファイルおよび特徴づけを可能にした。ここに開示した結果は、異なる細胞段階に伴う分子的な転写変化を特徴づけ、特に、形態学的判定基準に基づいて最終分化産物を表すと以前に考えられていた細胞である形質細胞における差異を識別した。

30

【0110】

本研究で用いた扁桃と骨髓から単離されたCD19⁺扁桃B細胞とCD138⁺形質細胞は、独特の表現型の特徴を持つ均一な集団を表す。したがって、示した結果は、フローサイトメトリー、形態、およびclgの発現によって示す通り、よく特徴づけられた細胞に基づく。B細胞の発生を理解するためには大きな努力がなされてきているが、形質細胞についてはおそらくフローサイトメトリー特徴づけだけに注目する大部分の以前の研究では稀であるためほとんど知られていないので、これらの結果は重要である。

【0111】

結果からのもう一つの独自の知見は、階層的な遺伝子発現クラスター分析を用いてB細胞と形質細胞が2本の枝に分かれたことである。さらに、形質細胞の枝の中で、扁桃形質細胞は骨髓形質細胞と区別することができ、独特の造血器からの逸脱から疑われる通り、その細胞が発生の独自段階を表すことを示した。ここで特定された遺伝子(たとえば、細胞表面マーカーおよび転写因子)は、後期B細胞発生を識別するとして以前に特定されたものと一致した。見出された新規遺伝子に加えて、以前に特定された遺伝子がアップおよびダウンレギュレーションの予測パターンに従い、形質細胞分化と結びついているかまたは形質細胞分化に必須の転写因子であることがすでに示されている遺伝子と合致した。

40

【0112】

B細胞発生の異なる段階にある細胞がCD19を発現するが、ここで試験した扁桃B細胞の大多数が胚中心の胚中心芽細胞を表す可能性が高い。胚中心の中心細胞および中心芽細胞は

50

CD44の発現に基づいて識別可能であることが知られている(胚中心細胞CD44⁺;胚中心芽細胞CD44⁻)。CD44遺伝子の発現はこの試験で用いた扁桃B細胞試料では検出不能であった。さらに、増殖に結びついた遺伝子、たとえばMKI67、PCNA、CCNB1の高レベルの発現(データ記載せず)は、芽細胞が扁桃B細胞の中で細胞の最大の集団をなすことを示唆する。最後に、MYBLは、その発現がCD38⁺CD39⁻中心芽細胞のマーカーであるが、扁桃B細胞で高度に発現され、扁桃形質細胞でダウンレギュレートされ(P=0.00068)、そして骨髓形質細胞で消滅することが見出された。中心芽細胞はすでにスイッチ組み換えを受けているため、ここで試験した扁桃B細胞は、初期形質細胞分化に伴う遺伝子発現変化の比較研究に使用するためには最適な後期B細胞集団に相当する。

この試験で用いた正常細胞型の代表的な分析を図10に示す。ソート前の扁桃試料のFACs分析は、CD20^{hi}/CD38^{lo}細胞が集団の70%、CD38⁺/CD20⁻細胞が30%に相当したことを示した(図10a,b)。抗CD19免疫磁気ビーズソート後、CD20^{hi}/CD38^{lo}細胞は98%に濃縮され、CD38⁺/CD20⁻、CD138⁻/CD20⁺、およびCD138⁻/CD38⁺画分は集団の1%に相当した(図10b、c、e、f)。精製画分の細胞形態もまた、細胞の大多数は典型的なB細胞形態を有したことを示した(図10g)。抗cIgおよび抗CD19抗体を用いた免疫蛍光顕微鏡観察は、cIg⁺CD19⁺細胞のわずかな混入を示した(図10g)。

【0113】

扁桃形質細胞単離の前に、扁桃単核球画分のFACs分析は、CD38^{hi}/CD45⁻(図10i)およびCD138^{hi}/CD45⁻細胞(図10j)が集団の2.4%に相当したことを示した。抗CD138免疫磁気ビーズソート後、CD38^{hi}/CD45^{lo}(95%)、CD138^{hi}/CD45^{lo}(94%)、CD38^{hi}/CD20^{lo}(91%)、またはCD138^{hi}/CD38^{hi}(92%)のいずれかの形質細胞表現型を持つ細胞は大幅に濃縮された(図10k、l、m、n)。扁桃CD138でソートした細胞はまた、核周囲Hoffまたは小胞体の核に対する細胞質の比率が高い典型的な形質細胞形態を有することが見出され(図10o)、また細胞の>95%がcIg陽性であった(図10p)。

骨髓単核球試料の抗CD138免疫磁気ビーズソート前のFACs分析は、扁桃試料と比較して同様であるが異なるプロファイルを示した。CD38^{hi}/CD45^{int}およびCD138^{hi}/CD45^{int}画分は、骨髓形質細胞中に、CD45の発現がより低いより多くの細胞と、より高い割合のCD138⁺細胞を示した(図10q、r)。精製後のFACs分析は、CD38^{hi}/CD45⁻およびCD38^{hi}/CD20^{lo}細胞がそれぞれ99%と91%に濃縮されたことを示した(図10s、u)。ソート後の扁桃形質細胞と骨髓形質細胞の間の差もまた明らかであり、扁桃形質細胞CD38⁺/CD45⁺およびCD38⁺/CD20⁺細胞の明らかな証拠を有した一方、これらの画分は骨髓CD138ソートした細胞では大幅に減少していた。骨髓形質細胞はまた、扁桃形質細胞より高いレベルのCD38を発現した(図10s、k)。CD138^{hi}/CD45⁻およびCD138^{hi}/CD38^{hi}集団は骨髓形質細胞集団の96%および95%に相当し(図10t、v)、ここでも扁桃形質細胞と比較して少ない量のCD45⁺細胞とより高い割合のCD38⁺細胞を有した。扁桃形質細胞については、骨髓細胞の大多数は形質細胞形態を有し(図10w)またcIg陽性であった(図10x)。このように、免疫磁気ビーズ選択の結果として、相対的に均一な扁桃B細胞集団および異なる形質細胞集団が2つの異なる器官から精製され、異なる成熟段階の細胞に相当する可能性が高い。

【0114】

細胞の表現型の特徴を実証したところで、次いで全体的なmRNA発現を、約6800個の命名され注釈付きの遺伝子を調べるAffymetrix高密度オリゴヌクレオチドマイクロアレイを用いて、7試料の扁桃B細胞、11試料の扁桃形質細胞、および31試料の骨髓形質細胞で分析した。細胞分析に用いたCDマーカーの遺伝子のAD発現レベルの平均値、ならびに他のCDマーカー、ケモカイン受容体、アポトーシス調節因子、および一群の転写因子を正常試料の全体で分析した(表10)。CD45は扁桃B細胞で高度に発現され、扁桃形質細胞では発現がより低く、骨髓形質細胞には存在しないことが見出された。CD20、CD79B、CD52、およびCD19の遺伝子は、扁桃B細胞から扁桃形質細胞への漸進的ダウンレギュレーションを伴うCD45様の発現パターンを示した。CD21は扁桃B細胞から扁桃形質細胞へ有意な変化を示さなかったが、その遺伝子は骨髓形質細胞でダウンレギュレートされた。CD22、CD83、およびCD72は漸進的ダウンレギュレーションを示した。

【 0 1 1 5 】

FACS分析と合致して、シンデカン-1(CD138)およびCD38は、形質細胞分化の鍵となる抗体であるが、扁桃B細胞上には存在しないかまたは弱く発現され、扁桃形質細胞では中等度で、骨髓形質細胞上では最も高い発現であった。CD138発現の中等度のレベルは、扁桃形質細胞画分中の不均一な混合物のCD138⁺細胞を直接反映する可能性が高く(上記参照)、その一部の細胞は高度にCD138⁺であり残りは弱く陽性であるがCD138の表面発現に基づいてソートが可能である。CD38発現は正常細胞で、CD138に伴って見られる漸増を示した。

【 0 1 1 6 】

CD63遺伝子が骨髓形質細胞で有意にアップレギュレートされたことも観察された。これは、このマーカーが形質細胞分化中の調節に差がありうることを初めて示す。CD27の遺伝子はB細胞から扁桃形質細胞への移行で有意なアップレギュレーションを示し、一方、骨髓形質細胞および扁桃形質細胞は同様のレベルを示した。

10

【 0 1 1 7 】

形質細胞発生において発現に差がある転写因子は予測された変化を示した。IRF4とXBP1は扁桃および骨髓形質細胞で有意にアップレギュレートされ、そしてCTIIA、BCL6、およびSTAT6は形質細胞試料でダウンレギュレートされた。BSAP(PAX5)は予測された変化を示さなかったが、これは、BSAP標的遺伝子であるBLKは扁桃および骨髓形質細胞で予測されたダウンレギュレーションを示さなかったため、BSAP遺伝子についての無効なプローブセットが原因であったと考えられる。興味深いことに、MYCは扁桃B細胞から扁桃形質細胞への移行において有意なダウンレギュレーションを示した一方、その遺伝子は骨髓形質細胞で、扁桃B細胞で見られたより高いレベルまで再活性化された。ケモカイン受容体CXCR4およびCXCR5は扁桃B細胞から扁桃形質細胞への移行においてダウンレギュレーションを示した一方、CXCR4は遺伝子が骨髓形質細胞で再活性化されるMYC様のプロファイルを示した。BCL2ホモログBCL2A1もまた予測された変化を示した。このように、細胞表面マーカーの遺伝子発現パターンは表現型のパターンと合致しており、また形質細胞分化と強く関連していることが知られている遺伝子は予想されたパターンを示した。これらのデータは、扁桃B細胞、扁桃形質細胞、および骨髓形質細胞はB細胞分化の異なる段階に相当し、またこれらの細胞の遺伝子発現プロファイリングを用いて分化の分子機構のより良い理解を得ることができるという考えを支持する。

20

【表10】

表10

形質細胞の分化によって発現に差があることが分かっているCDマーカーおよびタンパク質の遺伝子発現

登録	記号	TBC	TPC	BPC
Y00062	<i>CD45</i>	11495±2198	4979±2522	1385±706
M27394	<i>CD20</i>	23860±5494	3799±2977	289±358
M89957	<i>CD79B</i>	14758±3348	4696±2440	1243±1357
X62466	<i>CD52</i>	14576±2395	4348±2074	2831±1002
M84371	<i>CD19</i>	12339±1708	6174±1345	2852±852
M26004	<i>CD21</i>	8909±1640	5434±4053	458±140
X59350	<i>CD22</i>	10349±1422	5356±1610	1929±612
Z11697	<i>CD83</i>	9201±1900	2380±1087	392±403
M54992	<i>CD72</i>	6177±1620	865±554	454±548
Z48199	<i>CD138</i>	719±519	9935±3545	24643±6206
D84276	<i>CD38</i>	3122±967	9833±3419	14836±3462
X62654	<i>CD63</i>	2310±431	6815±1582	16878±3305
M63928	<i>CD27</i>	6235±1736	15937±6691	16714±4442
M31627	<i>XBPI</i>	12978±1676	54912±13649	49558±10798
U52682	<i>IRF4</i>	1863±630	8422±3061	11348±3118
U00115	<i>BCL6</i>	7979±1610	3303±2070	618±335
X74301	<i>CHITA</i>	1553±263	236±217	113±82
U16031	<i>STAT6</i>	1314±512	386±335	191±187
S76617	<i>BLK</i>	3654±1551	388±592	95±86
X68149	<i>CXCR5</i>	3381±1173	183±299	92±183
U29680	<i>BCL2A1</i>	3290±1073	1121±817	483±209
L00058	<i>MYC</i>	1528±474	348±239	2103±903
L06797	<i>CXCR4</i>	11911±2093	6673±3508	18033±5331

登録=GeneBank登録番号。記号=HUGO承認遺伝子記号。
 扁桃B細胞(TBC)、扁桃形質細胞(TPC)、骨髄形質細胞(BPC)検体の下の列の数字は、
 任意の遺伝子についての平均差(AD)の平均値±標準偏差(STD)を表す。比較全体の
 発現の差は、太字で示す以外は有意であった(P<0.01)。

【0118】

実施例14

扁桃B細胞から扁桃形質細胞への移行および扁桃形質細胞から骨髄形質細胞への移行において発現量の異なる遺伝子の同定

扁桃B細胞から扁桃形質細胞への移行に伴う遺伝子発現変化、および未熟扁桃形質細胞がリンパ節胚中心を出て骨髄へ移動する際に起こる変化を調べるために、より詳細で包括的な評価を実施した。試料間の全体的な発現の差を明らかにするため、階層的なクラスター分析を7例の扁桃B細胞、7例の扁桃形質細胞、および7例の骨髄形質細胞の4866遺伝子について実施した(図11)。予測通り、この分析は扁桃B細胞試料と形質細胞試料の間の大きな分離を明らかにし、扁桃形質細胞の1試料が扁桃B細胞と共にクラスター化した例外を伴った。正常形質細胞はさらに、扁桃形質細胞と骨髄形質細胞の2つの異なる群に部分分割

10

20

30

40

50

された。このように、全体的な遺伝子発現パターンは扁桃形質細胞と骨髄形質細胞の分離を確認し、また扁桃B細胞を両方の形質細胞型から識別することを可能にした。

【0119】

²およびWilcoxonの順位和分析を用いて、扁桃B細胞の扁桃形質細胞との比較および扁桃形質細胞の骨髄形質細胞との比較でmRNA発現レベルが有意に変化した($P < 0.00005$)それぞれ359個と500個の遺伝子を同定した。扁桃B細胞から扁桃形質細胞への移行で有意に発現に差がある遺伝子を「初期分化遺伝子」(EDGs)と称し、扁桃形質細胞から骨髄形質細胞への移行で発現に差がある遺伝子を「後期分化遺伝子」(LDGs)と称した。

【0120】

初期分化遺伝子

EDGの上位50個のうち(表11)、遺伝子の大部分(43)はダウンレギュレートされ、7遺伝子だけがこの移行でアップレギュレートされた。遺伝子発現は可能なレベルの1~5で記載した。AACは、検出不能かまたは存在しない遺伝子転写産物を示し、「-」と定義した。群内のすべての試料について、遺伝子転写産物が存在して $AD < 1000$ であった場合は発現レベルは「+」、 $1000 < AD < 5000$ の場合は「++」、 $5000 < AD < 10,000$ の場合は「+++」、 $AD > 10,000$ の場合は「++++」と定義した。EDGの最大の群は転写因子をコードした。16転写因子のうち、XBP-1、IRF4、BMI1の3つだけがアップレギュレートされるEDGであった。ダウンレギュレートされる転写因子の中に、MYCとCIITAが見出された。最大のファミリーはets領域を有するタンパク質を4つ含んだ:ETS1、SPIB、SPI1、およびELF1。他の転写因子には、抑制因子EEDおよびID3、ならびに活性化因子RUNX3、ICSBP1、REL、ERGS、FOXM1があった。IRF4が扁桃B細胞から扁桃形質細胞への移行および扁桃形質細胞から骨髄形質細胞への移行の両方でアップレギュレートされる際、IRFファミリーメンバーインターフェロン共通配列結合タンパク質であるICSBP1は、リンパ球特異的な負の調節因子であるが、扁桃B細胞で+++レベルで発現していた唯一の遺伝子であって、また扁桃形質細胞と骨髄形質細胞の両方で停止されていたことは潜在的に重要である。これらの結果は、ICSBP1をIRF結合部位から除去することはIRF4機能の調節において重要な機構でありうることを示唆する。

【0121】

EDGの2番目に多いクラスはシグナル伝達に関与するタンパク質をコードする。アポトーシスの実行を担うカスパーゼの活性化カスケードに関与するCASP10は、扁桃形質細胞でアップレギュレートされる唯一のシグナル伝達タンパク質に相当した。3つの低分子量Gタンパク質である、RhoファミリーメンバーのARHGとARHH、および前発癌遺伝子HRASはダウンレギュレートされるEDGであった。腫瘍壊死因子ファミリー(TNF)の2つのメンバーとリンフォトキシン(LTB)、ならびにTNF受容体結合タンパク質はLDGであった。クラススイッチ組み換えの開始におけるIL-4の重要な役割を考慮すると、IL4Rのダウンレギュレーション(扁桃B細胞から扁桃形質細胞へ)、および最終的な消滅(扁桃形質細胞から骨髄形質細胞へ)の観察は、研究対象の細胞の分化状態とよく合致する。

【0122】

最後に、発現がBリンパ球に限られまたシグナル伝達経路で機能する可能性のある、Bリンパ球チロシンキナーゼ(BLK)のダウンレギュレーションは、このキナーゼの低下が初期の形質細胞分化で重要であることを示唆している。形質細胞の生物学における細胞接着の重要な役割を考慮すると、ITGA6およびPECAM1のアップレギュレーションは特に重要である可能性がある。実際、これらの遺伝子はまた扁桃形質細胞から骨髄形質細胞への移行において継続的なアップレギュレーションを示し、そしてEDG群の中で唯一の細胞外接着遺伝子に相当した。他のダウンレギュレートされるEDGの複数メンバーのクラスには、細胞周期に関与するもの(CCNF、CCNG2、CDC20)またはDNA修復/維持(TERF2、LIG1、MSH2、RPA1)に関与するものがあった。これらの遺伝子のダウンレギュレーションは、したがって、形質細胞の最終分化状態を誘導および/または維持するのに重要である可能性がある。

【0123】

後期分化遺伝子

LDGの上位50個のうち、33個がアップレギュレートされるかまたは作動し、17遺伝子が

10

20

30

40

50

ダウンレギュレートされるかまたは停止した(表12)。16個のEDGは転写因子であったが、5個のLDGだけがこのクラスに属した。BMI1遺伝子は、アップレギュレートされるEDGであったが、LDGでもあり、その遺伝子が扁桃B細胞から扁桃形質細胞への移行および扁桃形質細胞から骨髄形質細胞への移行の両方において発現が有意に増加することを示す。BMI1は唯一のアップレギュレートされる転写因子であった。MYBL1、MEF2B、およびBCL6は骨髄形質細胞で停止し、転写伸長因子TCEA1はダウンレギュレートされた。LDGの最大の群は(n=16; 11個がアップ、5個がダウンレギュレートされる)シグナル伝達に關与するタンパク質をコードした。核接着および接着斑の両方の局在化を有するLIM含有タンパク質FHL1;分泌型タンパク質JAG1、Notchリガンド、インシュリン様成長因子IGF1;および骨形成タンパク質BMP6はアップレギュレートされた。二重特異性ホスファターゼDUSP5およびケモカイン受容体CCR2は最も劇的な発現変化を有する遺伝子に相当し、骨髄形質細胞では極めて高いレベルまで作動した一方、扁桃形質細胞には存在しなかった。別のシグナル伝達遺伝子は、物質の輸送および多数のシグナル伝達経路の組織化に重要な細胞膜タンパク質である膜小窩CAV1およびCAV2を含め、アップレギュレートされるLDGであった。

10

【0124】

扁桃形質細胞(数日)および骨髄形質細胞(数週間から数ヶ月)の寿命の劇的な差を考慮すると、抗アポトーシス遺伝子BCL2のアップレギュレーション(扁桃B細胞で-、骨髄形質細胞で++)およびアポトーシス誘導タンパク質BIKの随伴するダウンレギュレーション(扁桃B細胞で+++、骨髄形質細胞で-)は正常プログラム細胞死の調節において決定的である可能性がある。EDGでのように、LDGは複数の接着関連遺伝子を含み、また、EDGでのように、LDG接着遺伝子はすべてアップレギュレートされた。

20

【0125】

PECAM1遺伝子はEDGとLDGの両方であることが見出され、この遺伝子の細胞表面発現の段階的变化が発生に決定的であることを示唆した。インテグリンファミリーメンバーITGA6がEDGであった一方、ITGA4はLDGであったことが判った。ITGA4すなわちVLA-4(最晩期抗原4)がLDGであったという知見は、このインテグリンが後期形質細胞上で最も優勢であることを示す出版されたデータと合致する。P-、E-、L-セレクチンとの高親和性の、カルシウム依存性結合を媒介し、好中球およびTリンパ球の内皮細胞上の結合および解離を媒介する接着分子のセレクチンPリガンド(SELPLG)は後期形質細胞で同様の機構を促進する可能性がある。さらに、細胞-細胞相互作用に關与するとされる内在性膜糖タンパク質である上皮膜タンパク質3(EMP3)が同定された。リンパ球に制限された、MRVI1(IRAG)との強いホモロジーに基づく内在性ER膜タンパク質であって小胞体貯蔵からのIPS誘導性カルシウム放出の重要な酸化窒素/CGKI依存性調節因子である可能性が高いLRMP(JAW1)は、ダウンレギュレートされるLDGであることが見出された。LRMPはダウンレギュレートされるLDGであるという発見は、リンパ球前駆細胞で高度に発現されているが形質細胞では停止されていることを示した以前の研究と合致する。

30

【0126】

このように、扁桃B細胞と扁桃形質細胞と扁桃形質細胞と骨髄形質細胞を比較する場合、遺伝子発現プロファイリング結果は以前の観察を確認し、ならびにmRNA合成における新しい非常に有意な変化を発見した。

40

【表 1 1 - 1】

初期分化遺伝子:扁桃B細胞と扁桃および骨髄形質細胞の比較において発現量の異なる上位50遺伝子

登録	記号	機能	定量的遺伝子発現			
			TBC	TPC	BPC	
U60519	CASP10	アポトーシス	-	+	++	
X53586	1TGA6	接着	-	+	++	
U04735	STCH	シャペロン	+	++	++	10
L13689	BMI1	転写;抑制因子;PcG	+	++	+++	
L34657	PECAM1	接着	+	++	+++	
U52682	IRF4	転写;IRF ファミリー	+	+++	+++	
M31627	XBP1	転写;bZip ファミリー	+++	++++	++++	
AB000410	OGG1	DNA グリコシラーゼ	+	-	-	
D87432	SLC7A6	溶質輸送体	+	-	-	
J04101	ETS1	転写; <i>ets</i> ファミリー	+	-	-	
L38820	CD1D	免疫	+	-	-	20
M28827	CD1C	免疫	+	-	-	
M55542	GBP1	シグナル伝達;GTP 結合	+	-	-	
M81182	ABCD3	ABC 輸送体	+	-	-	
M85085	CSTF2	mRNA 切断刺激因子	+	-	-	
U74612	FOXM1	転写; フォークヘッドファミリー	+	-	-	
U84720	RAE1	RNA 輸出	+	-	-	
V00574	HRAS	シグナル伝達;GTP 結合タンパク質	+	-	-	30
X02910	TNF	シグナル伝達;TNF	+	-	-	
X63741	EGR3	転写; <i>egr</i> ファミリー	+	-	-	
X93512	TERF2	テロメア反復結合タンパク質	+	-	-	

【表 1 1 - 2】

登録	記号	機能	定量的遺伝子発現			
			TBC	TPC	BPC	
Z36714	CCNF	細胞周期;サイクリンF	+	-	-	
AB000409	MNK1	シグナル伝達;キナーゼ	+	-	+	
M33308	VCL	細胞骨格	+	-	++	
D16480	HADHA	ミトコンドリア酸化	++	-	-	
M63488	RPA1	DNA複製/修復	++	-	-	10
U03911	MSH2	DNA修復	++	-	-	
U69108	TRAF5	シグナル伝達;TNFR 関連タンパク質	++	-	-	
X12517	SNRPC	mRNA スプライシング	++	-	-	
X52056	SP11	転写; <i>ets</i> ファミリー	++	-	-	
X68149	BLR1	シグナル伝達; <i>cxcr</i> 受容体	++	-	-	
X74301	CIITA	転写;アダプター	++	-	-	
X75042	REL	転写; rel/dorsal ファミリー	++	-	-	20
L00058	MYC	転写;bHLHZip	++	-	++	
M36067	LIG1	DNA リガーゼ	++	+	+	
M82882	ELF1	転写; <i>ets</i> ファミリー	++	+	+	
S76617	BLK	シグナル伝達;キナーゼ	++	+	+	
U47414	CCNG2	細胞周期;サイクリンG	++	+	+	
U61167	SH3D1B	不明;SH3 含有タンパク質	++	+	+	
X61587	ARHG	シグナル伝達;RhoG	++	+	+	30
Z35278	RUNX3	転写; <i>runt</i> 領域を含む	++	+	+	

【表 1 1 - 3】

登録	記号	機能	定量的遺伝子発現		
			TBC	TPC	BPC
M91196	ICSBP1	転写;IRF ファミリー	+++	-	-
M34458	LMNB1	細胞骨格マトリックス	+++	+	-
U90651	EED	転写;抑制;PcG	+++	+	+
X69111	ID3	転写;抑制;bHLH	+++	+	+
X52425	IL4R	シグナル伝達; サイトカイン受容体	+++	++	-
Z35227	ARHH	シグナル伝達;RhoH	+++	++	+
U89922	LTB	シグナル伝達;TNF-c	++++	+	+
U05340	CDC20	細胞周期; APC の活性化因子	++++	++	-
X66079	SPIB	転写;ets ファミリー	++++	++	-

10

登録=GeneBank 登録番号。記号=HUGO 承認遺伝子記号。

TBC=扁桃 B 細胞;TPC=扁桃形質細胞;BPC=骨髄形質細胞;AD=平均差;AC=絶対評定。定量的遺伝子発現:-=AC 非存在;+=AC 存在かつ AD<1,000;+=AD1,000~5,000;+=AD5,000~10,000;+=AD>10,000。

20

【表 1 2 - 1】

後期分化遺伝子:扁桃および骨髄形質細胞の比較において発現量の異なる上位50遺伝子

登録	記号	機能	定量的遺伝子発現		
			TPC	BPC	
U32114	CAV2	シグナル伝達;膜小窩	-	+	
U60115	FHL1	シグナル伝達;LIM 領域	-	+	
U73936	JAG1	シグナル伝達;Notch リガンド	-	+	10
X57025	IGF1	シグナル伝達;成長因子	-	+	
Z32684	XK	膜輸送	-	+	
D10511	ACAT1	代謝:ケトン	-	++	
Y08999	ARPC1A	アクチンポリマー化	-	++	
M14745	BCL2	シグナル伝達;抗アポトーシス	-	++	
M24486	P4HA1	コラーゲン合成	-	++	
M60315	BMP6	シグナル伝達;TGF ファミリー	-	++	
U25956	SELPLG	接着	-	++	20
X16983	ITGA4	接着	-	++	
Z18951	CAV1	シグナル伝達;膜小窩	-	++	
M60092	AMPD1	代謝;エネルギー	-	+++	
U15932	DUSP5	シグナル伝達;ホスファターゼ	-	++++	
U95626	CCR2	シグナル伝達;ケモカイン受容体	-	++++	
D78132	RHEB2	シグナル伝達;ras ホモログ	+	++	
L41887	SFRS7	mRNA スプライシング因子	+	++	
M23161	LOC90411 ^a	不明	+	++	30
M37721	PAM	代謝;ホルモンアミド化	+	++	
M69023	TSPAN-3 ^a	不明	+	++	
U02556	TCTE1L	dynein ホモログ	+	++	
U41060	LIV-1 ^a	不明	+	++	
U44772	PPT1	リソソーム酵素	+	++	
U70660	ATOX1	代謝;抗酸化物質	+	++	
X92493	PIP5K1B	シグナル伝達;キナーゼ	+	++	

【表 1 2 - 2】

登録	記号	機能	定量的遺伝子発現		
			TPC	BPC	
M23254	CAPN2	システインプロテアーゼ	+	+++	
J02763	S100A6	シグナル伝達;カルシウム結合	++	+++	
L13689	BMI1	転写;抑制因子;PcG	++	+++	
L34657	PECAM1	接着	++	+++	
M23294	HEXB	代謝:ヘキソサミニダーゼ	++	+++	10
M64098	HLDBP	代謝:ステロール	++	++++	
U52101	EMP3	接着	++	++++	
X66087	MYBL1	転写;myb 様	+	-	
X54942	CKS2	細胞周期;キナーゼ調節因子	++	-	
X73568	SYK	シグナル伝達;キナーゼ	++	-	
L08177	EBI2	シグナル伝達;受容体	++	-	
M25629	KLK1	プロテアーゼ;セリン	++	-	
U00115	BCL6	転写;Zn フィンガー	++	-	20
U23852	LCK	シグナル伝達;キナーゼ	++	-	
U60975	SORL1	エンドサイトーシス	++	-	
X63380	MEF2B	転写;MADs ボックス	++	-	
L25878	EPXH1	代謝;エポキシドヒドロラーゼ	++	+	
Z35227	ARHH	シグナル伝達;RhoC	++	+	
X89986	BIK	シグナル伝達;アポトーシス	+++	-	
M13792	ADA	代謝;プリン	+++	+	
U10485	LRMP	ER 膜タンパク質	+++	+	30
M81601	TCEA1	転写;伸長	+++	++	
X70326	MACMARCK	アクチン結合	++++	+	
X56494	PKM2	代謝;エネルギー	++++	+	

登録=GeneBank 登録番号。記号=HUGO 承認遺伝子記号。

*未承認記号。TBC=扁桃 B 細胞;BPC=骨髄形質細胞;AD=平均差平均値;AC=絶対評定。

定量的遺伝子発現: -=AC 非存在;+=AC 存在かつ AD<1,000; +=AD1,000~

5,000; +++=AD5,000~10,000; ++++=AD>10,000。

40

実施例 15

形質細胞分化における以前に同定された遺伝子および新規遺伝子

この遺伝子発現プロファイリング研究において、形質細胞発生に関連する以前に同定された遺伝子だけでなく新規遺伝子もまた見つかった。形質細胞分化に関連する可能性のある一部の遺伝子をここで考察する。

【 0 1 2 7 】

mRNAのポリアデニル化は、3種類の切断刺激因子(CSTF1、CSFT2、CSTF3)を含む複数のタンパク質因子を必要とする複雑な過程である。CSTF2の濃度はB細胞活性化の間に上昇することが示されており、このことはIgM重鎖mRNA発現を膜結合型から分泌型へスイッチする

50

のに十分である。CSTF2遺伝子は扁桃B細胞では低レベルで発現していたが、扁桃および骨髓形質細胞では停止しており、CSTF2遺伝子発現もまた形質細胞分化を定義するのに用いることができることを示した。

【0128】

CD63の遺伝子は試験した3つの細胞型にわたって遺伝子発現の漸増を示した。CD63は膜タンパク質の膜貫通型4スーパーファミリー(TM4SF)に属する。発現は骨髓中の造血前駆細胞の細胞内リソソーム膜、マクロファージ、血小板、および血管内皮のWeibel-Palade小体に見つかっている。重要なことには、CD63は黒色腫進行のマーカーとして記載され、腫瘍細胞の運動性、接着、および1インテグリンと結合した基質上への移動を調節する。

【0129】

非常に重要なことには、ここで報告した新規遺伝子の発見は、形質細胞分化に関する分子機構のより広い知識に結びつく。具体的には、EDGの上位50個のうち、大部分はダウンレギュレートされ、EDGの大多数は転写因子であって、転写調節が分化の調節に重要な機構であることを示唆した。LDGの中で、転写因子の発現量はEDGの中よりずっと低かった。

【0130】

細胞周期調節とプログラム細胞死

形質細胞の最終分化と合致して、細胞周期調節とDNA代謝に関する多くの遺伝子はダウンレギュレートされるEDGであった。DNAリガーゼLIG1;修復酵素MSHC、およびRPA1、CDC20;そしてサイクリンCCNG2およびCCNFの調節は形質細胞の休止状態の誘導において重要な結果を有しうる。テロメア反復結合タンパク質TERF2は、最近クローンされた2種類の哺乳類テロメア結合タンパク質遺伝子のうちの1つであるが、ダウンレギュレートされるEDGであった。TERF2はテロメア末端を保護する作用をし、テロメア末端どうしの融合を防ぎ、遺伝子の安定性を維持するのに重要である可能性がある。TERF2がすべての細胞型の最終分化中にダウンレギュレートされるかどうか、また最終分化した細胞の腫瘍におけるこの遺伝子産物の不足の結果として、TERF2遺伝子発現を欠く多発性骨髓腫の顕著な特徴である高度な染色体構造再構成が生じるのかどうかを調べることは興味深い(未出版データ)。

【0131】

CDC28タンパク質キナーゼ2遺伝子CKS2は、サイクリン依存性キナーゼの触媒サブユニットと結合しその生物学的機能に不可欠であるが、LDG遺伝子で唯一の細胞周期遺伝子であった。それは中程度の増殖能力がある扁桃形質細胞で発現していた;しかし、CKS2は骨髓形質細胞では完全に消滅していた。したがって、CKS2発現の停止は、骨髓形質細胞の増殖能を破壊することにおいて決定的である可能性がある。

【0132】

形質細胞最終分化の際立った特徴は、骨髓形質細胞における延長した寿命の獲得である。この現象はプログラム細胞死またはアポトーシスを通じて調節されている可能性が高い。抗アポトーシス遺伝子およびアポトーシス促進性遺伝子であるBCL2およびBIKが発現において相反する変化を示したという知見は、これらの2個の遺伝子が骨髓形質細胞の寿命を延長する上で主要な役割を担っていることと合致する。

【0133】

転写因子

発現量の異なる遺伝子の大多数は転写因子ファミリーに属する。50個のEDGのうち、7個だけがアップレギュレートされた。形質細胞分化中にアップレギュレートされることが知られている2個の遺伝子IRF4とXBP1はこの群に含まれた。両方の遺伝子は扁桃および骨髓形質細胞で同等のレベルで発現し、これらの重要な調節因子の発現における継続的な増加は起こらないことを示唆した。HuGenFLマイクロアレイ上ではないが、第三世代AffymetrixU95Av2マイクロアレイを用いた最近の研究はまた、扁桃B細胞と比較して形質細胞におけるBlimp-1(PRDM1)発現の誘導を明らかにしており(未出版データ)、これらの転写因子の予測パターンを確認している。

【0134】

10

20

30

40

50

EDGの大多数はダウンレギュレートされ、EDGの単独で最大の部分集団は転写因子に相当する(43遺伝子中の13個)。13転写因子のうち4個の、ETS1、SPI1、SPIB、ELF1はetsファミリーに属する。これらの結果は、いくつかのETSタンパク質(ETS1、ELF1、PU.1(SPI1)、SPI-B)はB細胞系統で発現していることを示した以前の研究と合致する。ETS1ノックアウトマウスは脾臓および末梢血中の形質細胞の劇的な増加を示すため、扁桃B細胞から扁桃形質細胞への移行の間のETS1のダウンレギュレーションは重要なスイッチである可能性があることに注意するのは興味深い。さらに、SPI1(PU.1)はBlimp-1⁺胚中心扁桃B細胞および形質細胞のIRF4と相互作用するが、ここに示すデータは、IRF4は形質細胞の移行においてアップレギュレートされる一方、SPI1は扁桃および骨髓形質細胞で停止されることを示していることは興味深い。このように、これらのデータは、転写因子のetsファミリーは造血に重要であること、および少なくとも4個のファミリーメンバーのダウンレギュレーションが形質細胞の最終分化において重要な現象に見えることを支持する。

10

【0135】

細胞骨格遺伝子ピンキュリン(VCL)とMAPキナーゼ相互作用セリン/スレオニンキナーゼ1遺伝子(MKNK1)は新規のEDGに相当する。ピンキュリンはF-アクチンを膜に固定する機能を持つと考えられる一方、MKNK1はeIF4Gへの結合によるeIF4F複合体への動員後にeIF4eをリン酸化するERK基質である。これらの2個の遺伝子は、扁桃B細胞から扁桃形質細胞への移行においては停止されたが、骨髓形質細胞では再活性化された。MYC前発癌遺伝子もまた扁桃B細胞から扁桃形質細胞への移行において劇的なダウンレギュレーションを示し、骨髓形質細胞での再活性化を伴った。これらの2個の遺伝子がMYCによって直接または間接に調節されているかどうかを理解することは重要になる。PRDF1-BF1が形質細胞の生成を促進する機構の1つがMYCの抑制であり、それによってB細胞が細胞周期を出て最終分化を受けることを可能にする。扁桃B細胞から扁桃形質細胞への移行においてMYCの消失を示した本研究はこのデータと合致する。骨髓形質細胞におけるMYCの、高度に増殖性である芽細胞と思われる扁桃B細胞で見られるのと同程度のレベルまでの再活性化は、解決されていないがMYCが二重の役割を有することを示唆する。

20

扁桃B細胞から扁桃形質細胞への移行と同様に、転写因子の大多数は扁桃から骨髓形質細胞への移行においてダウンレギュレートされた。BCL6遺伝子は、有意なEDGの上位50個には入らないが、LDGの上位50個のリストには含まれた。BCL6は扁桃B細胞から扁桃形質細胞へ発現の漸減を示したが(表10を参照)、その後には骨髓形質細胞で発現の劇的な消失があった。別の転写因子であるmyb様遺伝子MYBL1、およびMADSボックス因子MEF2B、もまた骨髓形質細胞で停止され、形質細胞分化の最終段階の主要な調節因子である可能性がある。転写伸長因子TCEA1はダウンレギュレートされたが存在しつづけた。BMI1は、発生を通じてHOX遺伝子を抑制することによって体節の同一性を調節する脊椎動物Polycomb複合体のメンバーであるが、すべての群にわたって発現に有意な漸増を示した。BMI1は、当初はB細胞リンパ腫の誘導において遺伝子導入c-Mycと協同するとして発見された、マウスBmi-1前発癌遺伝子のヒトホモログであることは注意すべきである。

30

【0136】

転写因子の発現レベルにおける変化は、形質細胞分化の最も著しい特徴にあたるのと、ここで発見されたさまざまなクラスの転写因子によって進められる転写調節の異なる経路を解明することは興味深い。このことは、全体的な発現プロファイリングおよびベイズネットワークのような洗練されたデータマイニング手法を用いて行うことができる。

40

【0137】

実施例16

多発性骨髓腫とB細胞発生のさまざまな段階の細胞との間で同様の発現である遺伝子の同定

実施例16および17は、全体的な遺伝子発現プロファイリングを用いてB細胞発生段階に基づく多発性骨髓腫の分類の確立を記載する。

【0138】

多発性骨髓腫を上記で報告したEDGおよびLDGに関して分類するために、74例の新たに診

50

断された多発性骨髄腫、7試料の扁桃B細胞、7試料の扁桃形質細胞、および7試料の骨髄形質細胞を、上で開示した359個のEDGおよび500個のLDGにわたって変動を調べた。すべての試料にわたって最も有意な変動を示した上位50個のEDGを、骨髄腫に関する初期分化遺伝子(EDG-MM)と定義した;同様に、すべての試料にわたって最も有意な変動を示した上位50個のLDGを、骨髄腫-1に関する後期分化遺伝子(LDG-MM1)として特定した。LDG-MM1を500個のLDGから除外し、その後に残りの遺伝子について変動に関する一元配置分散分析を適用することで、骨髄形質細胞と多発性骨髄腫との間で類似性を示す上位50個の遺伝子を特定した。これらの遺伝子はLDG-MM2と定義した。

【0139】

上位50個のEDG-MMの中で(表13)、扁桃B細胞から扁桃形質細胞への移行においてアップレギュレーションを示した18個の遺伝子が、扁桃B細胞で見られるレベル以下へのダウンレギュレーションを示した。残りの32個のEDG-MMは逆のプロファイルを示し、ここではこれらの遺伝子は扁桃B細胞から形質細胞への移行においてはダウンレギュレートされたが、多発性骨髄腫においては扁桃B細胞様の発現を示した。表13では、遺伝子発現は5段階の可能なレベルのうちの一つとして記載された。非存在絶対評価(AAC)は、検出不能かまたは存在しない遺伝子転写産物を示し、「-」と定義した。群内のすべての試料について、遺伝子転写産物が存在して平均差(AD)<1000であった場合は発現レベルは「+」、1000 AD<5000の場合は「++」、5000 AD<10,000の場合は「+++」、AD 10,000の場合は「++++」と定義した。

10

【0140】

EDG-MMを定義する最も著しい遺伝子の一つはサイクリン依存性キナーゼ8(CDK8)であって、扁桃B細胞では存在しなかったが扁桃および骨髄形質細胞では極端に高いレベルまでアップレギュレートされその後事実上すべての多発性骨髄腫症例で再び停止されたことが見出された。有糸分裂サイクリンは扁桃B細胞(++)から扁桃形質細胞(+)へそして骨髄形質細胞(-)へ発現に漸減を示し、一方、多発性骨髄腫症例は、骨髄様のレベルかまたは扁桃B細胞レベルのいずれかを示した。本研究に用いた扁桃B細胞は高度に増殖性である芽細胞に相当する可能性が高いことを考えると、同様のレベルを有する多発性骨髄腫症例は本疾患の増殖性の型を示唆する可能性がある。上位50個のEDG-MMのうち合計27個が多発性骨髄腫において変動性を示さず、すなわち、すべての多発性骨髄腫および扁桃B細胞試料が同様の発現レベルを示した。

20

30

【0141】

上位50個のLDG-MM1(表14)のうち大多数(50個中34個)が、扁桃形質細胞から骨髄形質細胞への移行からアップレギュレーションを示した遺伝子であったが、多発性骨髄腫では扁桃形質細胞レベルへのダウンレギュレーションを示した。LDG-MM1について見られた全体のパターンは、EDG-MMについて見られたものの逆であり、ここではこれらの遺伝子の大多数が扁桃B細胞から形質細胞へダウンレギュレーションを示し多発性骨髄腫では扁桃B細胞様のレベルへのアップレギュレーションを示した。最も劇的に変化したLDG-MM1は、cxcケモカインであるSDF1、PF4、およびPPBPの、すべての多発性骨髄腫における検出可能な転写産物の完全な非存在とは対照的な、骨髄形質細胞における大幅なアップレギュレーションで見られた。これらの結果は、SDF1の異なる領域を調べる2組の別々で異なるプロセ

40

【0142】

骨髄形質細胞と多発性骨髄腫の部分集団との間の類似性を示すLDG-MM2遺伝子(表15)は、すべての遺伝子が多発性骨髄腫の中で変動性を示し、その変動性はたとえばアポトーシス阻害因子BIKのように劇的でありうることを明らかにした。EDG-MMおよびLDG-MM1で見られるものとは異なり、LDG-MM2の大きなクラスは代謝に関与する酵素をコードする

50

遺伝子に相当し、その大多数がグルコース代謝に関与した。

【表 1 3 - 1】

EDG-MM:扁桃B細胞様多発性骨髄腫遺伝子

登録	記号	機能	定量的 遺伝子発現				
			TBC	TPC	BPC	MM	
D28364	ANXA2	アネキシンファミリー	-	+	+	-/+	
U81787	WNT10B	シグナル伝達;リガンド	-	+	++	-/++	
U88898	LOC51581 ^a	不明	-	+	+	-/+	10
X12451	CTSL	プロテアーゼ;システイン	-	++	++	-	
Z25347	CDK8	細胞周期;キナーゼ	-	++++	++++	-/++	
D38548	KIAA0076 ^a	不明	+	++	++	+ / ++	
D86479	AEBP1	細胞外マトリックス	+	++	++	+	
U04689	OR1D2	シグナル伝達;受容体	+	++	+	+	
M31328	GNB3	シグナル伝達; Gタンパク質	+	++	++	+	
U13395	WWOX	代謝;酸化還元酵素	+	++	++	+	20
X14675	BCR	シグナル伝達; RACのGTPase	+	++	++	+	
X16665	HOXB2	転写;ホメオボックス領域	+	++	++	-/+	
Z11899	POU5F1	転写;ホメオボックス領域	+	++	++	+	
Z36531	FGL2	分泌型フィブリノゲン様	+	++	++	+	
X80907	PIK3R2	シグナル伝達;キナーゼア ダプター	+	+++	+++	++	
D31846	AQP2	アクアポリン	++	+++	+++	++	30
L18983	PTPRN	ホスファターゼ;膜	++	++++	++++	++	

【表 1 3 - 2】

登録	記号	機能	定量的 遺伝子発現				
			TBC	TPC	BPC	MM	
M23323	CD3E	シグナル伝達; TCR パートナー	++	++++	++++	++	
D83781	KIAA0197 ^a	不明	+	-	-	+	
HT4824	CBS	代謝: シスタチオン-β-合成酵素	+	-	-	-/++	10
S78873	RABIF	シグナル伝達; GTP 放出因子	+	-	-	+ / ++	
U32645	ELF4	転写; <i>ets</i> 領域	+	-	-	- / +	
X97630	EMK1	シグナル伝達; キナーゼ: ELK 領域	+	-	-	+	
Z24724	不明 ^a	細胞周期	+	-	-	+ / ++	
D16480	HADHA	ミトコンドリア酸化	++	-	-	- / ++	20
L77701	COX17	ミトコンドリア酸化	++	-	-	- / ++	
M90356	BTF3L2	転写; NAC 領域	++	-	-	++	
U08815	SF3A3	スプライセオソーム	++	-	-	+ / ++	
U53225	SNX1	細胞内輸送	++	-	-	+ / ++	
M25753	CCNB1	細胞周期	++	+	-	- / ++	
D87448	TOPBP1 ^a	トポイソメラーゼ II 結合 タンパク質	++	+	+	+ / ++	
L38810	PSMC5	26S プロテアソームサブユ ニット5	++	+	+	++	30
M29551	PPP3CB	シグナル伝達; カルシウム 依存性ホスファターゼ	++	+	+	+ / ++	

【表 1 3 - 3】

登録	記号	機能	定量的遺伝子発現				
			TBC	TPC	BPC	MM	
M32886	SRI	シグナル伝達; カルシウム結合	++	+	+	++	
U24704	PSMD4	26S プロテアソーム サブユニット 4	++	+	+	++	
U25165	FXR1	RNA 結合タンパク質	++	+	+	++	10
U37022	CDK4	細胞周期;キナーゼ	++	+	+	++	
U53003	C21orf33	不明;高度保存	++	+	+	++	
X89985	BCL7B	アクチン架橋	++	+	+	++	
D49738	CKAP1	チューブリン折りたたみ	+++	+	+	++	
D43950	CCT5	シャペロニン	+++	++	++	+++	
D82348	ATIC	代謝;プリン生合成	+++	++	++	+++	
D86550	DYRK1A	シグナル伝達;キナーゼ	+++	++	++	+++	
L06132	VDAC1	陰イオンチャンネル	+++	++	++	++/+++	20
L43631	SAFB	核足場因子	+++	++	++	++/+++	
M30448	CSNK2B	シグナル伝達;カゼインキ ナーゼ調節	+++	++	++	++/++++	
X76013	QARS	代謝; グルタミンイル tRNA 合成酵素	+++	++	++	++/+++	
D83735	CNN2	アクチン結合	++++	++	++	++/++++	
M86667	NAP1L1	ヌクレオソーム構築	++++	++	++	+++	
X04828	GNAI2	シグナル伝達;G タンパク 質	++++	++	++	++/+++	30

【表 1 3 - 4】

登録	記号	機能	定量的遺伝子発現			
			TBC	TPC	BPC	MM

一元配置分散分析によって同定された遺伝子。登録=GeneBank 登録番号。記号=HUGO 承認遺伝子記号;未承認記号は^aで示した。

TBC=扁桃 B 細胞;TPC=扁桃形質細胞;BPC=骨髄形質細胞;AC=絶対評定;AD=平均差。定量的遺伝子発現: -=AC 非存在;+=AC 存在かつ AD<1,000;+=AD1,000~5,000;+=AD5,000~10,000;+=AD>10,000。

【表 1 4 - 1】

LDG-MM1:扁桃形質細胞様多発性骨髄腫遺伝子

登録	記号	機能	定量的 遺伝子 発現			
			TPC	BPC	MM	
U90902	23612 ^a	不明;TIAM1 に関係	-	+	-/++	
D12775	AMPD3	代謝;AMP デアミナーゼ	-	+	-/++	
U37546	BIRC3	シグナル伝達;抗アポトーシス	-	++	-/++	
Z11793	SEPP1	代謝:セレン輸送	-	+++	-/+	10
L36033	SDF1	シグナル伝達;cxc ケモカイン	-	+++	-	
U19495	SDF1	シグナル伝達;cxc ケモカイン	-	+++	-	
M27891	CST3	プロテアーゼ阻害因子	-	++++	-/++++	
M26602	DEFA1	免疫	-	++++	-/++++	
M25897	PF4	シグナル伝達;cxc ケモカイン	-	++++	-	
M54995	PPBP	シグナル伝達;cxc ケモカイン	-	++++	-	
U79288	KIAA0513 ^a	不明	+	++	+ / ++	
M59465	TNFAIP1	シグナル伝達;抗アポトーシス	+	++	+ / +++++	20
X53586	ITGA6	接着	+	++	+ / ++	
D50663	TCTEL1	ダイニン軽鎖	+	++	+ / ++	
U40846	NAGLU	代謝;ヘパラン硫酸	+	++	+ / ++	
M80563	S100A4	シグナル伝達;カルシウム結合	+	++	+ / +++++	
X04085	CAT	代謝:カタラーゼ	+	++	+ / ++	
L02648	TCN2	代謝;ビタミン B12 輸送	+	++	+	
L35249	ATP6B2	リソソーム;液胞プロトンポン プ	+	++	+	30
L09209	APLP2	アミロイドβ 前駆体様	+	++	+	
L41870	RB1	細胞周期	+	++	+ / ++	
X76732	NUCB2	シグナル伝達;カルシウム結合	+	+++	+ / +++++	
D29805	5B4GALT1	接着	+	+++	+	

【表 1 4 - 2】

登録	記号	機能	定量的 遺伝子発現			
			TPC	BPC	MM	
M29877	FUCA1	リソソーム;フコシダーゼ	+	+++	+ / ++	
M32304	TIMP2	メタロプロテイナーゼ 2 阻害因子	+	+++	+ / +++++	
D10522	MACS	アクチン架橋	+	++++	- / ++	
L38696	RALY ^a	RNA 結合	++	+++	++	10
U05875	1FNCR2	シグナル伝達;インターフェロ ンγ受容体	++	+++	++ / +++++	
U78095	SPINT2	プロテアーゼ阻害因子;HGF を 阻害	++	+++	- / +++++	
L13977	PRCP	リソソームの;アンギオテンシ ナーゼ C	++	++++	++	
U12255	FCGRT	IgG Fc 受容体	++	++++	- / +++++	
L06797	CXCR4	シグナル伝達;SDF1 受容体	++	++++	++ / +++++	20
D82061	FABGL	代謝	++	++++	++ / +++++	
Y00433	GPX1	酸化防止	+++	++++	++ / +++++	
M60752	H2AFA	ヒストン;ヌクレオソーム	+	-	- / ++	
U18300	DDB2	DNA 修復	+	-	+	
X63692	DNMT1	DNA メチルトランスフェラー ゼ	+	-	+	
D11327	PTPN7	シグナル伝達;ホスファターゼ	++	-	++	
X54942	CKS2	細胞周期;キナーゼ調節因子	++	-	+ / +++++	30
D14874	ADM	アドレノメデュリン	++	+	+ / +++++	
D86976	KIAA0223 ^a	マイナー組織適合性抗原	++	+	+ / +++++	
X52979	SNRPB	mRNA スプライシング	++	+	+ / ++	
Z49254	MRPL23	ミトコンドリアリボソームタ ンパク質	++	+	++	
U66464	HPK1	シグナル伝達;キナーゼ	++	+	+ / ++	
U91903	FRZB	シグナル伝達;WNT 拮抗因子	++	+	+ / ++	
D87453	MRPS27	ミトコンドリアリボソームタ ンパク質	++	+	+ / ++	40
X59932	CSK	シグナル伝達;キナーゼ	+++	++	++	
L17131	HMG1Y	転写;高移動性群	++++	+	++ / +++++	

【表 1 4 - 3】

登録	記号	機能	定量的 遺伝子 発現		
			TPC	BPC	MM
L19779	H2AF0	ヒストン;ヌクレオソーム	++++	++	++++
U70439	SSP29*	不明	++++	+++	+++ /++++

一元配置分散分析によって同定された遺伝子。登録=GeneBank 登録番号。記号=HUGO 承認遺伝子記号；未承認記号は^aで示した。

TPC=扁桃形質細胞；BPC=骨髄形質細胞；AC=絶対評定；AD=平均差。定量的遺伝子発現：- =AC 非存在；+ =AC 存在かつ AD<1,000；++ =AD1,000～5,000；+++ =AD5,000～10,000；++++ =AD>10,000。

【表 15 - 1】

LDG-MM2:骨髄形質細胞様多発性骨髄腫遺伝子

登録	記号	機能	定量的遺伝子発現		
			BPC	MM	
U61145	EZH2	転写;SET 領域	-	-/+	
HT4000	SYK	シグナル伝達;リンパ球キナーゼ	-	-/++	
X89986	BIK	シグナル伝達;アポトーシス誘導因子	-	-/+	
D85181	SC5DL	代謝;ステロール-C5-不飽和化酵素	+	-/+	10
M98045	FPGS	代謝;葉酸ポリグルタミン酸合成酵素	+	-/++	
L41559	PCBD	転写;TCF1 活性を促進	+	-/++	
L25876	CDKN2	細胞周期;CDK 阻害因子; ホスファターゼ	+	+/++	
U76638	BRAD1	転写;BRCA1 ヘテロ二量体	+	+/++	
L05072	IRF1	転写;IRF ファミリー	+	+/++	
D87440	KIAA025 ^a	不明	+	+/++	
U02680	PTK9	チロシンキナーゼ	+	+/++	20
U28042	DDX10	発がん遺伝子;ATP 依存性 RNA ヘリカーゼ	+	+/++	
L20320	CDK7	細胞周期;キナーゼ	+	+/++	
X56494	PKM2	代謝;ピルビン酸キナーゼ	+	+/+	
M12959	TCRA	シグナル伝達;T 細胞受容体	++	-/++	
HT3981	INSL3	シグナル伝達;インシュリン様ペプチド;IGF ファミリー	++	-/++	
U21931	FBP1	代謝:フルクトースビスホスファターゼ	++	-/+	30
Z48054	PXR1	代謝;ペルオキシソーム形成	++	+/++	
D84145	WS-3 ^a	dynatin6	++	+/++	
D14661	KIAA0105 ^a	転写;WT1-結合タンパク質	++	+/++	
X77548	NCOA4	転写;核受容体コアクチベーター	++	+/++	

【表 15 - 2】

登録	記号	機能	定量的遺伝子発現		
			BPC	MM	
M90696	CTSS	システインプロテアーゼ	++	+ / ++	
D11086	IL2RG	サイトカイン受容体	++	+ / ++	
U70426	RGS16	シグナル伝達;GTPase 活性化タンパク質	++	+ / +++	
X14850	H2AX	ヒストン;抗体成熟に必要	++	+ / +++	10
M29927	OAT	代謝;オルニチンアミノトランスフェラーゼ	++	+ / +++	
S74017	NFE2L2	転写;	++	+ / +++	
HT4604	GYG	代謝;グリコーゲン生合成	++	+ / +++	
M55531	SLC2A5	代謝:フルクトース輸送体	++	+ / ++++	
M60750	H2BFL	ヒストン;ヌクレオソーム	++	+ / ++++	
L19437	TALD01	代謝:トランスアルドラーゼ	++	++ / +++	
M10901	NR3C1	転写;グルココルチコイド受容体	++	++ / +++	20
L41887	SFRS7	MRNA スプライシング因子	++	++ / +++	
M34423	GLB1	代謝;ガラクトシダーゼ	++	++ / ++++	
X15414	AKR1B1	代謝;アルドース還元酵素	+++	+ / ++++	
J04456	LGALS1	シグナル伝達;CD45 ホスファターゼを阻害	+++	+ / ++++	
X92493	PIP5K1B	シグナル伝達;キナーゼ	+++	+ / ++++	
U51478	ATPIB3	Na ⁺ , K ⁺ 輸送体	+++	++ / ++++	
X91257	SARS	セリル-tRNA 合成酵素	+++	++ / ++++	30
D30655	EIF4A2	翻訳開始	+++	++ / ++++	
D31887	KIAA0062 ^a	不明	+++	++ / ++++	
X04106	CAPN4	システインプロテアーゼ;カルシウム依存性	+++	++ / ++++	

【表 15 - 3】

登録	記号	機能	定量的遺伝子発現	
			BPC	MM
D87442	NCSIN ^a	ニカストリン	+++	++/++++
L76191	IRAK1	シグナル伝達; サイトカイン受容体キナーゼ	+++	+++/++++
HT1428	HBB	ヘモグロビン	++++	-/++++
U44975	COPEB	発がん遺伝子; 転写因子	++++	-/++++
X55733	EIF4B	翻訳開始	++++	+/++++
L09604	PLP2	シグナル伝達; 結腸上皮分化	++++	+/++++
HT1614	PPP1CA	シグナル伝達; ホスファターゼ	++++	+++/++++
L26247	SUI1 ^a	翻訳開始; 推定	++++	+++/++++

登録=GeneBank 登録番号または TIGR データベース。記号=HUGO 承認遺伝子記号; 未承認記号は^aで示した。BPC=骨髄形質細胞; AC=絶対評定; AD=平均差。定量的遺伝子発現: -=AC 非存在; +=AC 存在かつ AD<1,000; ++=AD1,000~5,000; +++=AD5,000~10,000; ++++=AD>10,000。

10

20

実施例 17

EDG-MM、LDG-MM1、LDG-MM2についての階層的クラスター分析は多発性骨髄腫の発生段階に基づく分類を明らかにする

多発性骨髄腫(MM)で見られる遺伝子発現の変動性を、疾患の部分集団を識別するのに用いることができるかどうかを確かめるため、階層的なクラスター分析を、74試料の新たに診断されたMM、7試料の扁桃B細胞、7試料の扁桃形質細胞、および7試料の骨髄試料について、EDG-MM(図12)、LDG-MM1(図13)、およびLDG-MM2(図14)を用いて実施した。50個のEDG-MMのうち30個を用いて、階層的クラスタリングをすべての試料に適用した。合計20個の遺伝子は最大値-最小値<2.5で除外された。上位50個のEDG-MMのうち多数がMMの全体で変動性を示さず、したがってMM部分集団を識別するのに用いることができなかつたため、この群についてこの除外を実施した。50個のLDG-MM1および50個のLDG-MM2を用いて試料をクラスター化するのに、同様のクラスタリング方法を採用した。

30

【0143】

次いで、MM症例の扁桃B細胞との、または扁桃および骨髄形質細胞とのクラスタリングを、遺伝子発現に定義されるMM部分集団と関連させることができるかどうかを決定するため、扁桃B細胞試料とのMM試料クラスタリングを調べた(表16)。このデータは、扁桃B細胞試料と密にクラスタリングしたMM症例のうち、22例中13例はMM4部分集団に属し、MM4の全症例のうちの大多数を占めた(MM4試料18例中の13例)ことを示した。遺伝子発現に定義されるMM部分集団の、LDG-MMに定義されるクラスター分布は、扁桃形質細胞試料とクラスタリングしたMM28試料のうち14試料がMM3部分集団に属した(MM3試料15例中の14例)という点で劇的に異なった。LDG-MMもまた、このクラスターの20例のMMのうち14例がMM2部分集団に属した(MM2の21例中の14例)という点でMM部分集団と強い相関を示した。このように、MMのMM4、MM3、およびMM2亜型はそれぞれ、扁桃B細胞、扁桃形質細胞、および骨髄形質細胞と類似性を有した。MM1はここで試験した対応する正常細胞と強い相関を何も有しない唯一の部分集団を表し、この分類は未発見の独自の特徴を有することを示唆する。

40

【0144】

正常細胞クラスター群における4つのMM部分集団の分布を次に調べた(表17)。結果は、

50

すべてのMM3症例が分類可能であった一方、6例のMM1、5例のMM2、および3例のMM4が3回のクラスター分析のどの正常細胞群ともクラスター化しなかったことを示した。クラスター化が可能であったすべての試料で、遺伝子発現に定義される部分集団と正常細胞型との間に、MM1を除いて強い相関があった。データはまた、3例のMM1、2例のMM2、4例のMM3、および1例のMM4が2つの群にクラスター化したのが見出されたことを示す。3つの群に入るのが見つかった試料は無く、2つの正常群とクラスタリングする試料のすべては常に、隣接する、時間的に適当な群に入っていた。P241は骨髄形質細胞群と扁桃B細胞群にクラスター化した点で例外であった。

【0145】

EDG-MMのうちの1つがサイクリンB1(CCNB1)(表13)であることが発見されたため、MM4でアップレギュレートされることが最近見出された一群の増殖関連遺伝子を、MMのいわゆる扁桃B細胞様型としてのMM4の分類を進めまた妥当性を確認するのに用いることができるかどうかを調べた。CCNB1、CKS1、CKS2、SNRPC、EZH2、KNSL1、PRKDC、およびPRIM1の発現パターンのボックスプロットは、試験したすべての群にわたる有意差を、扁桃B細胞とMM4の間の強い有意な相関と共に示した(図15)。この分析についていくつかの重要な観察がなされた。すべての遺伝子について、SNRPCを例外として、扁桃B細胞から扁桃形質細胞へそして骨髄形質細胞への移行において発現に漸減が見られた。さらに、PRIM1について著しい相関が観察された(図15)。PRIM1発現は群全体にわたって有意に差があったが($P=4.25 \times 10^{-5}$)、扁桃B細胞とMM4の間(Wilcoxonの順位和[WRS] $P=0.1$)、または扁桃形質細胞とMM3の間(WRS $P=0.6$)に差は存在しない。形質細胞分化を進めるおよび/または維持することにおけるいくつかの転写因子の重要な機能を考慮して、これらの因子が試験対象の群にわたって発現変化を示したかどうかを決定した。他の因子は有意な変化を示さなかったが、XB P1(図15)は予測通り、扁桃B細胞と扁桃形質細胞との間で非常に大きなアップレギュレーションを示した。しかし、その遺伝子は骨髄形質細胞で減少を、また4つのMM部分集団にわたって漸減を示し、MM4で最低レベルを示した($P=3.85 \times 10^{-10}$)。

【0146】

従来 of 形態学的特性に基づいて、形質細胞は均一な最終段階の細胞型を表すと考えられてきた。しかし、ここで開示する表現型分析および遺伝子発現プロファイリングは、異なる器官から単離された形質細胞は発生の異なる段階に属すると考えることができることを実証した。多発性骨髄腫形質細胞は骨髄に由来し、正常最終分化した骨髄形質細胞の形質転換した対応物を表すと考えられている。しかし、生存における劇的な違いは、数ヶ月から10年を超えるまでの幅を取りうるが、多発性骨髄腫が疾患のいくつかの亜型の集団を表す可能性があることを示唆する。従来 of 臨床検査値は、適当なリスク層化を可能にする十分な頑健性で、異なる疾患亜型を分離することについては特に有用ではなかった。さらに、同様の非ランダム反復性染色体転座に基づいた白血病およびリンパ腫の分類における業績とは異なり、多発性骨髄腫の極端な核型の不均一性は、本疾患の分子機構を理解する試みおよび分類予測を事実上不可能にしてきた。

【0147】

ここに示す研究では、多数のEDGおよびLDGが高度に変動する発現を多発性骨髄腫で示すことが明らかになり、多発性骨髄腫が発生段階に基づく分類に従う可能性があることを示唆した。本研究の結果から、多発性骨髄腫は実際に、B細胞分化の異なる段階を表す細胞との遺伝子発現における類似性に基づいて分類することができるように見える。この発生に基づくシステムは、上記で報告した遺伝子発現に基づくシステムと組み合わせて、発生に基づくシステムの妥当性の決定的な確認を表す。

【0148】

近年の研究は、MM3が本疾患の扁桃形質細胞様型を表すという仮説に支持を提供する。150例の新たに診断された患者(ここに記載の74例を含む)についてのU95Av2GeneChipを用いたマイクロアレイプロファイリングは、第13染色体欠失の分析と合わせて、RB1転写産物と第13染色体のモノソミーまたは部分欠失のいずれかとの間に有意な繋がりを明らかにした(未出版データ)。これらの研究で、第13染色体欠失を有するかまたは有しないいくつ

10

20

30

40

50

かの多発性骨髄腫の症例が、正常扁桃形質細胞で見られるのと同様のレベルでRB1転写産物を有したことが観察された。RB1を含む細菌人工染色体BACのFISH分析は、これらの症例がRB1遺伝子座の中間部欠失を有しないことを示した。RB1がLDG-MM1であることが分かったことを考慮して、RB1の低レベルが扁桃形質細胞様MM、すなわちMM3と関連している可能性があるかどうかを調べた。RB1のAD値が<1100(RB1のAD値は試験した正常骨髄形質細胞35試料で1100以上であった)である多発性骨髄腫35例について、74%がMM3分類に属した。対照的に、13番欠失が無くRB1のAD値が1100より大である多発性骨髄腫の38例のうち、21%だけがMM3亜型に属した(未出版データ)。

【0149】

ここに開示する細胞発生に基づく分類と遺伝子発現プロファイリングに基づく分類との間には有意な結びつきがあるが、予想通りにMM4症例の大多数が扁桃B細胞-クラスター部分集団に属したが、5例のMM3、1例のMM2、および3例のMM1もまたこのクラスターに入っただけであったという点で例外がある。遺伝子発現に定義される1つの部分集団内の症例を、正常細胞に定義される2つのクラスターに分類することができるという認識は、これらの症例が異なる臨床転帰を伴う中間の特徴を有しうることを示唆する。監視されない遺伝子発現に基づくシステムまたは発生段階に基づくシステムが単独または組み合わせで、頑健なリスク層化システムを創造することができるかどうかを調べることは興味深い。このことは、診断でプロファイリングを実施している、150例を超える一律に治療した多発性骨髄腫症例について、十分な追跡時間を与えることによって試験することができる。

10

【0150】

MM1は、本研究で分析した正常細胞型のどれとも強い類似性を欠いた唯一の、遺伝子発現に定義される部分集団であった。MM1が、異なる型の形質細胞を表すことが最近示されている粘膜由来形質細胞または末梢血形質細胞のいずれかと類似している可能性はある。将来の研究は、この亜型に発生段階の位置を与えることを目標とする。

20

【0151】

多発性骨髄腫の低増殖性の性質は、1%をほとんど超えることがないクローン性形質細胞の標識指数と共に、多発性骨髄腫は形質転換して増殖性である、最終分化した形質細胞に分化する前駆細胞から生じる腫瘍であるという仮説に結びついている。IgM配列に結合した多発性骨髄腫形質細胞由来VDJをIgG-およびIgA-分泌性多発性骨髄腫において転写する骨髄B細胞集団が存在することが示されている。他の調査は、多発性骨髄腫におけるクローン原性細胞は、スイッチ前であるが体細胞突然変異した、クローン内変動を欠くB細胞から生じることを示している。この仮説は、クローン形質のIg重鎖VDJ再構成を多発性骨髄腫形質細胞と共有する循環B細胞の高い頻度を検出するための、単一細胞およびin situ逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応の最近の使用によって支持される。研究はまた、これらの前駆細胞が疾患の展開の媒介患者生存への影響に関与することを示唆している。

30

【0152】

多発性骨髄腫の部分集団とB細胞分化の後期のさまざまな段階を表す細胞との間の遺伝子発現パターンの関連は、MM4とMM3はいわゆる「多発性骨髄腫幹細胞」に起源を有する可能性があるという点で上記の仮説をさらに支持する。この仮説は、MM3およびMM4患者の扁桃またはリンパ節または末梢血からB細胞を単離し、それらをTarte et al. (2002)によって記載された新しい方法を用いてin vitroで形質細胞に分化させ、次いで分化した集団内で多発性骨髄腫遺伝子発現特性の存在について試験することによって検証することができる。多発性骨髄腫幹細胞がB細胞のうちの少数集団に当たるとしても、従来のマイクロアレイを用いてでなければ、より高感度な定量的リアルタイムRT-PCRによって、多発性骨髄腫遺伝子発現特性は認識されうる。リアルタイムRT-PCR法は、悪性の多発性骨髄腫形質細胞を正常形質細胞から99.5%の精度で識別するわずか20個の遺伝子を用いる発現プロファイルモデルが開発されていることから想定されている(未出版データ)。

40

【0153】

これらの実験の結果にかかわらず、形質細胞分化の分子機構、およびこれらの現象がどのように多発性骨髄腫の発生および進行と関係するかを評価する上で、遺伝子発現プロフ

50

アイリングが極めて強力な手法となっていることは明らかであり、それはこの現在のところ致死的である疾患を治療するより合理的な方法を提供する。

【表 16】

EDG-MM、LDG-MM1、およびLDG-MM2 遺伝子によって定義された階層的クラスターにおける多発性骨髄腫部分集団の分布

遺伝子発現に定義された MM 部分集団					
正常細胞に定義されたクラスター	MM1 (n=20)	MM2 (n=21)	MM3 (n=15)	MM4 (n= 18)	P
EDG-MM (n=22)	3	1	5	13	0.00005
LDG-MM1 (n=29)	8	4	14	3	0.000008
LDG-MM2 (n=20)	6	14	0	0	0.000001

【表 17 - 1】

表17

EDG-MM、LDG-MM1、およびLDG-MM2によって定義された正常細胞クラスターにおける
 遺伝子発現に定義された多発性骨髄腫部分集団症例の分布

M M 1	T B C	T P C	B P C	M M 2	T B C	T P C	B P C	M M 3	T B C	T P C	B P C	M M 4	T B C	T P C	B P C
P 02 6		Y	Y	P 2 3 7		Y	Y	P 0 5 2	Y	Y		P 0 3 4	Y	Y	
P 03 7		Y	Y	P 2 4 1	Y		Y	P 0 9 8	Y	Y		P 0 5 1	Y		
P 02 9	Y	Y		P 0 7 9			Y	P 1 0 7	Y	Y		P 0 5 7	Y		
P 06 1		Y		P 0 8 3			Y	P 1 5 8	Y	Y		P 0 6 3	Y		
P 06 6		Y		P 1 2 1			Y	P 1 1 9		Y		P 0 6 5	Y		
P 00 6		Y		P 1 4 4			Y	P 2 2 1		Y		P 0 7 5	Y		
P 12 0		Y		P 1 5 7			Y	P 0 3 0		Y		P 0 8 4	Y		
P 13 1		Y		P 1 7 1			Y	P 0 4 3		Y		P 1 2 2	Y		
P 00 2			Y	P 1 7 6			Y	P 0 5 3		Y		P 1 2 7	Y		
P 01 0			Y	P 2 1 3			Y	P 0 5 5		Y		P 1 5 4	Y		
P 06 7			Y	P 2 1 5			Y	P 1 3 8		Y		P 1 8 7	Y		
P 22 6			Y	P 2 5 1			Y	P 1 5 5		Y		P 1 9 9	Y		
P 02 5	Y			P 2 5 0			Y	P 1 6 3		Y		P 2 5 5			
P 08	Y			P 2		Y		P 2		Y		P 0		Y	

10

20

30

40

【表 17 - 2】

2		2		3		5	
P		P	Y	P	Y	P	Y
08		10		17		10	
5		3		5		1	
P		P	Y			P	
09		20				05	
9		2				6	
P		P				P	
00		01				09	
1		5				1	
P		P				P	
01		04				16	
6		8				8	
P		P					
03		12					
6		4					
P		P					
11		21					
8		2					
		P					
		2					
		4					
		9					

MM1、MM2、MM3、MM4、およびPXXXは、遺伝子発現に定義された部分集団および患者識別子をそれぞれ表す。Yはその症例が正常細胞に定義されたクラスターで見られたことを示す。斜体の症例はどの正常細胞型ともクラスター化しなかったことが分かった。一部の症例は2つの正常細胞型とクラスター化したのが見出された。TBC=扁桃B細胞;TPB=扁桃形質細胞;BPC=骨髄形質細胞。

実施例 18

多発性骨髄腫、意義不明単クローン性免疫グロブリン血症、および正常形質細胞を識別する診断モデル 30

関連する形質細胞疾患である意義不明単クローン性免疫グロブリン血症(MGUS)および多発性骨髄腫(MM)の分子機構はほとんど分かっていない。さらに、これらの2つの疾患を識別できることは難しい可能性がある。これは、意義不明単クローン性免疫グロブリン血症は良性の形質細胞過形成である一方、MMは一律に致死的な悪性疾患であるため、重要な臨床的意味を持つ。単クローン性免疫グロブリン血症は、血清または尿中の単クローン性免疫グロブリンの検出および基礎となる形質細胞/Bリンパ球クローンの増殖によって特徴づけられる。意義不明単クローン性免疫グロブリン血症の患者は最も進行度の低い疾患を有し、骨髄中の検出可能な形質細胞集団(<10%)および血清中への検出可能な(<30g/L)単クローン性タンパク質の分泌によって特徴づけられるが、顕在的な悪性の臨床徴候(たとえば溶解性骨病変、貧血、または高カルシウム血症)を欠く。顕在性MMの患者は骨髄形質細胞の増加(>10%)、血清Mタンパク質の増加(>30g/L)を有し、および一般的に貧血、溶解性骨病変、高カルシウム血症、または腎不全を示す。 40

意義不明単クローン性免疫グロブリン血症の全症例のうち年間に約2%が顕在性の多発性骨髄腫に変化するが、これらの症例のうちどれが変化するかを予測するのは事実上不可能である。多発性骨髄腫の臨床管理における一つの難点は、生存の極端な不均一性であって、わずか2ヶ月から8年を超えるまでの幅を取ることがあり、この変動性の20%だけしか現在の臨床検査では説明されない。したがって、これらの疾患の分類および層化のより頑健な方法が強く求められている。

【0154】

この実施例は、多発性骨髄腫(MM)、意義不明単クローン性免疫グロブリン血症および正常形質細胞を分類するための、統計およびデータマイニングの方法論について報告する。高度に精製した形質細胞における12,000遺伝子の発現を、高密度オリゴヌクレオチドマイクロアレイ上で分析した。全体的な遺伝子発現データに適用したさまざまな方法が、発現変化によって正常と悪性の形質細胞を識別することができ、ならびに意義不明単クローン性免疫グロブリン血症の一部を「類似」MM、その他を「非類似」MMと分類することができる一群の遺伝子を特定した。産物がたとえば接着およびシグナル伝達といったさまざまな細胞過程に関与する、この遺伝子の小さい部分集団の極めて高い予測力は、それらの調節解除された発現が分子診断を行う上で有用であることを証明するだけでなく、MMの発生機構および/または意義不明単クローン性免疫グロブリン血症の良性的状態から非常に悪性で一律に致死的なMMへの変化についての重要な洞察を提供しうる。

10

【0155】

ここでは6つの異なる方法を採用した:ロジスティック回帰、ツリー、サポートベクトルマシン(SVM)、情報利得が最大である20個の遺伝子を用いた投票者集団(EOV)、ナイーブベイズ、およびベイズネットワーク。6つすべてのモデルはAffymetrix(version5)高密度オリゴヌクレオチドマイクロアレイ分析から得られたマイクロアレイデータについて実行した。未治療MM156試料、34健常試料、および意義不明単クローン性免疫グロブリン血症とされた32試料を比較した。Affymetrixソフトウェアから入手可能な正規化アルゴリズムを用いた。マイクロアレイデータの正規化および標準化に関する情報はAffymetrixのウェブサイトから入手可能である。

20

【0156】

統計およびデータマイニング方法論

2つの目標を想定してさまざまな方法を採用した。第1の目標は、健常試料、意義不明単クローン性免疫グロブリン血症試料、および悪性のMM(多発性骨髄腫)試料の比較において過剰発現または低発現が明らかである遺伝子を同定することである。第2の目標は、マイクロアレイデータの分析に用いる最適な方法、具体的にはMGUSおよびMM患者に由来する試料についてのマイクロアレイデータの分析に適用可能な方法を特定することである。これは識別遺伝子の同定と、骨髄腫、意義不明単クローン性免疫グロブリン血症、および健常試料の間の差を予測し記載するためのモデルの作成とを同時に行った最初の研究である。

【0157】

方法のそれぞれ(および比較のそれぞれ)について、予測誤差を推定するため10倍交差検定交差検定を採用した。10倍交差検定を用いて、データの10回毎に1回を除去し(「テスト」データ)、データの残り90%(「訓練」データ)だけを用いてモデル全体を作成した。テストデータをその後、訓練モデルで分析し、分類誤りがあれば記録した。誤り率は10回の独立した試行の各回からの分類誤りを集計して計算した。実験的結果は、10倍交差検定はより一般的なリーブワンアウト交差検定と比べて良い精度推定を与えることを示唆する(Kohavi、1995)。

30

【0158】

ロジスティック回帰

ロジスティック手順は0と1の間の数字を与える線形モデルを作成する。この値は、たとえば多発性骨髄腫試料の中にある(1に近い予測値)または正常試料の中にある(0に近い予測値)ことの予測確率を表す。その構造は、将来の試料の群成員度を予測する上での不確実性の知識の余地を与える。たとえば、新しい試料は予測確率0.53で分類されて多発性骨髄腫に分類されうるが、予測確率が0.99である別の試料より信頼性は低い。

40

【0159】

決定樹

決定樹誘導アルゴリズムは、分類と最も相関している単一の性質を見つけることで始まる。今の議論のためには、相互情報が用いられ、分類は多発性骨髄腫に対し正常、多発性骨髄腫に対し意義不明単クローン性免疫グロブリン血症、意義不明単クローン性免疫グロブリン血症に対し正常、であった。各性質について、アルゴリズムは検出および実数値(

50

シグナル)の最適分岐点の情報利得を計算する。情報利得は次のように定義される:データセットのエントロピーは $-p \log_2 p - (1-p) \log_2 (1-p)$ 、ここで p はある分類の試料の割合である。分岐は1つのデータセットを取りそれを2つのデータセットに分割する:特性が分岐点(または特定の表示値)未満の値を有するデータ点のセットおよびその遺伝子が分岐点(または任意の他の表示値)を上回るデータ点のセット。

【0160】

投票者集団

刈り込みを行っても、決定樹はときどきデータをオーバーフィットしうる。オーバーフィットを回避する一つの方法は、 n 個の最も単純な決定樹を学習し、予測すべき新しい例のそれぞれについてこれらの樹に投票させることである。最も単純な決定樹は決定株であり、単一の内部ノードすなわち決定ノードを有する決定樹である。「投票者集団」(EOV)手法は、情報利得によって得点を付けられた上位20個の決定株の、重みづけをしない多数決である。

10

【0161】

ナイーブベイズ

ナイーブベイズは、すべての特性(たとえば遺伝子発現レベル)は与えられた分類値(たとえばMMまたは正常)から条件付き独立であるという(しばしば)素朴な仮定を行うためそのように名付けられている。この素朴な仮定にもかかわらず、実際にはそれはしばしば非常に良好に動作する。ロジスティック回帰のように、ナイーブベイズは分類値上の確率分布を返す。本モデルは単純に、素朴な条件付き独立を仮定したベイズ則の形を取る。

20

【0162】

ベイズネットワーク

ベイズネットワーク(ベイズネット)は、決定樹とは非常に異なった形の画像的モデルである。決定樹のように、ベイズネット中のノードは特性または変数に対応する。分類作業のためには、1個のノードはまた分類変数に対応する。ベイズネットは変数全体にわたって複合確率分布を特定する。非循環性の有向グラフ(DAG)である。ノード間のアークは変数間の依存性を特定する一方、アークが存在しないことは条件付き独立を推論するのに用いることができる。条件付き独立が存在する場合にはそれを捕捉することによって、ベイズネットは完全な同時表または他の表示よりもはるかに簡潔な同時分布の表示を与えることができる。ベイズネットモデルをデータから構築するためのアルゴリズムの開発については多くの現在の研究がある(Friedman et al., 1999; Murphy, 2001; Pe'er et al., 2001.)。ベイズネットは分類のための際立った手法であることが証明されている。たとえば、100を超える参加数の国際データマイニングコンテストであるKDD Cup 2001では、ベイズネット学習アルゴリズムであるPowerPredictorはマイクロアレイデータと強い類似性を持つデータに関して最高の成績であった(Cheng et al., 2000)。これは本研究に採用したアルゴリズムである。

30

【0163】

サポートベクトルマシン

サポートベクトルマシン(SVM)(Vapnik, 1998; Cristianini and Shawe Taylor, 2000)は、遺伝子発現マイクロアレイデータに良く適合することが証明されているもう一つの新しいデータマイニング手法である(Brown et al., 1999; Furey et al., 2000.)。最も単純な段階では、サポートベクトルマシンは2群のデータ点間に分離直線を見出すことを試みるアルゴリズムである。サポートベクトルマシンは、2群の間の幅、すなわち分離を最大化することを追求する。分離幅を最大化することは線形プログラミング手法を用いて解決しうる最適化作業と見なすことができる。「カーネル法」に基づくサポートベクトルマシンは他の機能群に属する分離子を効率的に特定することができる。一般に用いられているカーネルはガウスクーネルである。にもかかわらず、遺伝子発現マイクロアレイデータのためには、単純な線形SVMのほうが他のカーネルを用いるSVMより良い性能を与えることが実験的にくりかえし実証されている(Brown et al., 1999; Furey et al., 2000)。

40

【0164】

50

結果

前述の通り、各モデルは誤差（分類誤り）率を得るため10倍交差検定を用いて試験した。データの10回試行毎に、試料の10%を除き予測モデルを作成した。その後、作成したモデルを用いて、テスト試料の群分けを予測し精度を記録した。10回試行のすべてを完了後、精度値を下記の表にまとめた(表18)。

【表18】

表18

10倍交差検定結果

正しく分類された <i>MM</i> 割合(%)	正常	<i>MM</i>	MGUS	<i>MGUS</i>	正常
ロジスティック 98.72%	91.18%	89.1%	18.8%	90.63%	97.06%
決定樹 97.44%	94.12%	87.18%	37.5%	90.63%	94.12%
SVM 98.72%	97.06%	89.10%	34.38%	90.63%	100%
ベイズネット 98.72%	100%	93.56%	34.38%	90.63%	97.06%
EOV 98.08%	100%	57.69%	68.75%	90.63%	100%
ナイーブベイズ 98.08%	100%	91.67%	43.75%	90.63%	100%

10

20

【0165】

群成員度の予測に関して1つの方法が他より優れているようには見えない。多発性骨髄腫(MM)対MGUSの難しい分類では、投票者集団はMGUSを正しく分類する数が最大(68.75%)であるが、多発性骨髄腫を正しく分類する数は最小(57.69%)である。ナイーブベイズを用いることで、他の方法より目立って良くは見えないが、最良の分類が得られる。すべての方法は、多発性骨髄腫対正常を非常に良く、またMGUS対正常をほぼ同程度に分類することができるように見える。

【0166】

方法間の精度の違いを検定するために、手順の各回についてそれぞれの比較の全体としての正しい分類率に関して対応のあるt検定を実施した。MGUS対多発性骨髄腫の検定で他の方法と比較した場合のEOV以外は方法に有意差 ($p < 0.05$) は無かった。対応のあるt検定は、MGUS対多発性骨髄腫の検定で他の5つのモデルと比較したEOVについて0.002~0.031のp値を与える(多重比較について補正していない)。この検定によると、EOVは、上記に示す通り最も正確なMGUSの分類方法であるが、正しい分類の率が有意に低い。2群の比較では、これはしばしば感度と特異性の間のトレードオフである。

30

【0167】

群成員度を予測するモデルを各方法について特定した。多発性骨髄腫対MGUSを分類するモデルは、多発性骨髄腫対正常(12個の固有遺伝子)またはMGUS対正常(10個の固有遺伝子)を分類するモデルよりも多数の重なり合う遺伝子(17個の固有遺伝子)を有した。このことの可能な説明は、多発性骨髄腫と正常試料を識別する遺伝子は、その2群は非常に異なるため、おそらく多数存在するということである。しかし、多発性骨髄腫とMGUSとの間の遺伝的類似性は、2群にわたって異なる遺伝子の数がより少ないことに結びつく。識別遺伝子のこの不足は、どのような良いモデルも同じ限られた数の遺伝子を含むように制約する。特定遺伝子のより詳細な考察を結論に記載する。

40

【0168】

メタ投票

方法の予測能力を改善する追加段階として、「メタ」予測値を計算した。ロジスティック回帰、サポートベクトルマシン、およびベイズネット手順の各回について、限界予測

50

群を計算し、その後最多得票群として最終予測を与えた。試料は、ある群を3つの方法のうち少なくとも2つが予測する場合にその群に分類される。計算はメタ投票手順が結果を改善しないことを示す。

【0169】

受信者操作特性(ROC)曲線

受信者操作特性(ROC)曲線は、感度(より重症の群への正しい予測)と特異性(より軽症の群への正しい予測)との間の関係を示す。図16はMM(多発性骨髄腫)対MGUS分類の比較に関する受信者操作特性曲線を与える。難しい比較(多発性骨髄腫対MGUS)はすべての方法にとって困難である。たとえば、ナイーブベイズは高い感度を持つが低い特異性の代償としてである。平凡な特異性の値のためにさえ、感度は非常に急速に低下する。いずれかの方法で高感度を得るために(すなわち、多発性骨髄腫の偽陽性を非常に少なくするために)、MGUSを正確に予測する能力(特異性)を比較した。

10

【0170】

MGUSの予測

多発性骨髄腫と正常試料を異なる群に分類するモデルは、臨床データに基づいてどちらの群にも明瞭に入らない試料についての予測モデルとして用いることもできる可能性がある。概して、MGUS試料は臨床的に健康であり(免疫グロブリンの高レベル以外は)、しかし遺伝的には悪性に見える。多発性骨髄腫対正常モデルをMGUS試料に適用することは、MGUS試料がどの群により近く見えるかについての知識を与える。表19は、多発性骨髄腫を正常試料と比較したモデルに基づくMGUS試料の多発性骨髄腫群および正常群への予測分布を提供する。平均して、約90%のMGUS試料が多発性骨髄腫と分類され、約10%が正常と分類される。このことの原因として可能なのは、正常と分類される10%はより長い生存期間とより低い疾患進行を持つ可能性があるということである。にもかかわらず、MGUSの多発性骨髄腫との類似性(MGUS無しで得られたモデルでさえ)は、MGUSが実際に遺伝的に正常献体より多発性骨髄腫とはるかに類似しているということに追加の証拠を与える。2分群の予測および2極群へのMGUS試料の分類の両方から、それらの方法に目立った差は無いと結論することができる。

20

【0171】

MGUS試料の分類結果が(多発性骨髄腫と比較した場合)悪い背景である機構をよりよく理解するために、ロジスティック回帰、SVM、およびベイズネットの3つの方法それぞれについて、多発性骨髄腫と分類されたMGUSの数を表にした。MGUSの32試料のうち、誤分類率を表20に示す。MGUSの26試料がロジスティック手順を用いて誤分類された;26試料のうち17試料はまたSVMを用いても誤分類され、26試料のうち18試料はベイズネットを用いて誤分類された。この交差表は、誤分類されたMGUS試料は続けて誤分類されていることを示し、遺伝的に多発性骨髄腫試料と類似しているMGUS試料の部分集団の可能性に証拠を与える。

30

【表19】

MM対正常 (MGUSを予測)		
MGUSが分類された割合 (%)	MM	正常
ロジスティック	87.5%	12.5%
決定樹	93.75%	6.25%
SVM	93.75%	6.25%
ベイズネット	93.75%	6.25%
EOV	84.37%	15.63%
ナイーブベイズ	93.75%	6.25%

40

【表 2 0】

誤分類された MGUSの数	ロジスティック	SVM	ベイズネット
ロジスティック	26	17	18
SVM		21	17
ベイズネット			21

【0172】

10

考察

6つの異なる統計およびデータマイニングアルゴリズムを、正常、過形成、および悪性の細胞を最大12,000個の遺伝子の発現パターンに基づいて識別する能力について調べた。モデルは正常形質細胞の異常細胞からの識別において非常に正確であった。しかし、これらのモデルは過形成細胞と悪性細胞の間の識別では一律の誤りを示した。本研究の主な目標は、たとえば正常、前癌、および癌細胞といった細胞の群を識別するために、巨大な遺伝子発現データセットから遺伝子の小さな部分集団を捕捉する目的で、データマイニング手法を開発または改変することであり、究極の目標は高感度で再現性のある分子に基づく診断検査を作り出すことであった。さらに、将来の研究は、リスク層化および予測のために、疾患の部分集団を識別することのできる遺伝子の最小の部分集団を特定するのに同様の方法を用いることを目指すことができる。多発性骨髄腫における全体の生存は非常に変動が大きく、一部の患者は10年もの長期間生存する一方、別の患者は診断の数ヶ月以内に死亡するため、これは特に重要な概念である。現在のマイクロアレイ試験は多数の細胞の単離を要し、先進設備と専門技術が必要である。遺伝子のより小さな、高い予測力を有する部分集団(10~20個)は、スケールの大幅な縮小を可能にし、それが今度は商業的検査の開発をより大量生産に乗せやすくし、したがって臨床利用を広めるため、本実施例で記載した研究はこの過程の合理化に向けた最初の段階に相当する。

20

【0173】

モデルが意義不明単クローン性免疫グロブリン血症を多発性骨髄腫から識別することができないことの可能な理由の1つは、MGUSが少なくとも2つの異なる疾患に相当することである。これは表19-20に示す通り、MGUS試料の誤分類における重なりによって支持される。単純化すると、MGUSは無症候性に留まる疾患または悪性の顕在化へ変化する疾患と見なすことができる。安定性および進行性のMGUS症例を十分な追跡期間とともに十分数集めることはこの問題の解決に役立つ。

30

【0174】

モデルがその2つの病型を識別することに失敗したのは、現在の方法の限界と関係づけることができる。ここで利用したマイクロアレイプロファイリングは、推定35,000個のヒト遺伝子(International Human Genome Sequencing Consortium, 2001; Venter et al., 2001)の1/3しか調べておらず、したがって全ゲノム調査が識別可能な特性を明らかにする可能性がある。すべてのヒト遺伝子を調べると考えられている新型のAffymetrixU133GeneChipシステムを、この問題に対処するために用いることができる。全ゲノム分析が有意差を示さないこともまたありうる。これが明らかになることはさまざまな可能性のいずれをも意味する:(1)2つの疾患の間には遺伝子の差が無い、(2)多発性骨髄腫と分類されるMGUSだけが多発性骨髄腫と遺伝的に類似しており、臨床検査はその違いを識別することができない、(3)現在のマイクロアレイ技術は特異性が十分でなく、2つの疾患の間の差を測定できない、(4)上記の方法はこの型の分析には適当でない。(1)または(2)が真である場合は、これらの結果は、たとえば遺伝子的疾病素質、または遺伝子発現に明示されない体細胞DNA突然変異、素因となるこれらの遺伝子特性と相互作用する特異な環境曝露、あるいは形質細胞成長を促進する非腫瘍細胞微小環境または「土壌」、といった無症候性または悪性の経過の別の決定因子を示す。

40

50

【0175】

本研究のもう1つの目標は、全体的な 遺伝子発現 プロファイリングのモデルを用いて、形質細胞の正常ホメオスタシスから良性の過形成へ、および過形成から悪性顕在化への移行に伴う決定的な遺伝子変化を定義することであった。6つのモデルからのデータを統合して、モデルのうち2つ以上に見られた一群の遺伝子が明らかになった。本研究の目的のために、これらの遺伝子はこれらの移行において最も発現に差がある遺伝子に相当すると解釈された。10個の共通遺伝子が正常とMGUS(意義不明単クローン性免疫グロブリン血症)との比較において同定され、その遺伝子のうち8個が異常細胞でダウンレギュレートされるかまたは停止されていた。同様の現象が正常対多発性骨髄腫の比較でみられ、12個の共通遺伝子のうち9個がダウンレギュレートされていた。これはMGUS対多発性骨髄腫の比較でプローブセットのほぼ半分(17個の固有遺伝子に相当する18プローブセットのうち8個)が多発性骨髄腫でアップレギュレートされていたのと対照的であった。4個の異なるケモカイン遺伝子SCYA23(正常対MGUS)、SDF1(正常対MM)、およびSCYC2とSCYA18(MGUS対MM)のプローブセットがその3つの比較のそれぞれにおいて後者の群でダウンレギュレートされた。SCYA18の2個のプローブセットがMGUS対MMの比較で見つかった。これはSCYA18遺伝子発現がその2つの条件で真に異なっていることの重要な確認である。ケモカインは免疫反応の重要な媒介因子であり、特定の免疫細胞の炎症部位への移動を誘導する可溶性因子として作用する。形質細胞疾患において複数のケモカイン遺伝子の発現が失われることの潜在的な意義は不明であるが、腫瘍がどのように抗腫瘍反応を抑制するかを示す可能性がある。

10

20

【0176】

SCYA18についてと同じように、キイロショウジョウバエ遺伝子frizzled(FZD2)のヒトホモログに対する2つの無関係のプローブセットが、正常からMGUSへの移行においてダウンレギュレートされた。FZD2は、WNTとして知られる可溶性リガンドの高度に保存されたファミリーと結合する膜結合受容体をコードする。WNTシグナル伝達はハエからヒトにわたる多細胞生物でホメオティックパターン形成および細胞運命決定を調節する。マウスにおいてウイルス挿入突然変異によるWnt-1遺伝子の異常活性化は自然発症乳癌形成を引き起こしたため、Wntシグナル伝達カスケードはまた腫瘍形成に関与することが示されている。発現プロファイリングが多発性骨髄腫および形質細胞白血病においてWNTシグナル伝達経路の複数メンバーの調節解除された発現を明らかにしている(結果は上記に示す; Zhan et al., 2002; De Vos et al., 2001)ことを考慮して、FZD2発現のMGUSにおける消失は潜在的な重要性を有すると推測されている。上記の実施例中の結果はまた、WNTシグナル伝達の分泌型拮抗因子であるFRZBが、正常形質細胞と多発性骨髄腫の比較において高発現を示すことを明らかにする(Zhan et al., 2002; De Vos et al., 2001)。その同時に起こるかまたはおそらく連続的な、機能するWNT受容体(FZD2)のダウンレギュレーションおよびおとり受容体のアップレギュレーションは、WNTシグナル伝達の破壊が多発性骨髄腫発生において病因的役割を果たすことを強く示唆する。受容体遺伝子およびおとり遺伝子の異常に加えて、リガンドの遺伝子WNT5AおよびWNT10Bが多発性骨髄腫で変化していることが特定されている(結果は上記に示す; Zhan et al., 2002)。WNT5Aが多発性骨髄腫でアップレギュレートされる一方、WNT10Bは正常形質細胞では高レベルで発現されているが多発性骨髄腫形質細胞の大多数ではそうでない(Zhan et al., 2002)。最近の研究が、Wnt-5A、Wnt-2B、Wnt-10B、Wnt-11は造血細胞調節因子の新規のクラスを構成することを示していることは注目すべきである。

30

40

【0177】

これらの知見を総合すると、調節解除された自己分泌および/または傍分泌Wntシグナル伝達は形質細胞疾患において中心的な役割を果たす可能性があり、またそのシグナル伝達複合体の複数の成分の漸進的な調節解除は、正常形質細胞から過形成のしかし良性のMGUSへ、次いで顕在性の多発性骨髄腫への疾患進行を伴う可能性があることが示唆される。結論として、ここで採用したような方法が、新しい分子的診断および予測検査の作成を可能にし、腫瘍形成形質転換の遺伝子機構についての有用な洞察を与えることが予期される。

50

【 0 1 7 8 】

下記の参考文献がここに引用されている：

【 参考文献 】

【 0 1 7 9 】

Brown et al., Support vector machine classification of microarray gene expression data. UCSC-CRL 99-09, Department of Computer Science, University California Santa Cruz, Santa Cruz, CA (1999).

Chauhan et al., *Oncogene* 21:1346-1358 (2002).

10

Cheng et al., KDD Cup 2001. *SIGKDD Explorations* 3:47-64 (2000).

Cristianini and Shawe-Taylor, An Introduction to Support Vector Machines and other kernel-based learning methods. Cambridge University Press (2000).

De Vos et al., *Blood* 98:771-80 (2001).

Eisen et al., *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:14863-14868 (1998).

Friedman et al., Learning Bayesian network structure from massive datasets: the “sparse candidate” algorithm. *Proc of the International Conf on Uncertainty in Artificial Intelligence* (1999).

20

Furey et al., *Bioinformatics* 16:906-914 (2000).

International Human Genome Sequencing Consortium, Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409:860-921 (2001).

Kohavi, A study of cross-validation and bootstrap for accuracy estimation and model selection. *Proceedings of the International Joint Conference on Artificial Intelligence (IJCAI)* (1995).

Murphy, The Bayes Net Toolbox for Matlab. *Computing Science and Statistics: Proceedings of the Interface*, (2001).

30

Pe'er et al., Inferring Subnetworks from Perturbed Expression Profiles. *Proc of Ninth Intl Conf on Intelligent Systems for Mol Biol* (2001).

Shaughnessy et al., *Blood* 96:1505-1511 (2000).

Vapnik, Statistical Learning Theory. John Wiley & Sons (1998).

Venter et al., *Science* 291:1304-51 (2001).

Zhan et al., *Blood* 99:1745-1757 (2002).

40

本明細書中で言及された特許または刊行物は、本発明の属する分野の熟練者のレベルを示す。さらに、これらの特許および刊行物は、各刊行物について具体的かつ個別に引用によって開示に含まれることが示されるのと同様に、引用によって本開示に含まれる。

【 0 1 8 0 】

本発明が目的を達成し記載の結果および利点ならびに固有の結果および利点をを得るのによく適していることを当業者は容易に理解しうる。本実施例は、ここに記載の方法、手順、処理、分子、および特定の化合物とともに好ましい実施例を現在のところ代表し、典型的であり、また発明の範囲の制限を意図しない。請求項の範囲によって定義された本発明の精神内に包含されたその変更および他の使用を、当該分野の熟練者は考えることがで

50

きる。

【図面の簡単な説明】

【0181】

【図1A】図1Aはクラスター順序化データ表を示す図である。

【図1B】図1Bは、MMでダウンレギュレートされる遺伝子を示す、増幅された遺伝子クラスターを示す図である。

【図1C】図1Cは、発現レベルが腫瘍形成、細胞周期、および増殖速度と相関する遺伝子を多く含むクラスターを示す図である。

【図1D】図1Dは、階層的なクラスターの樹状図を示す図である。

【図1E】図1Eは、74例の新たに診断された未治療の多発性骨髄腫単独の階層的なクラスター分析の樹状図を示す図である 10

【図2】図2はFGFR3、CST6、IFI27、およびCCND1遺伝子発現のスパイクプロファイル分布を示す図である。

【図3A】図3AはMS4A2(CD20)遺伝子発現のGeneChip HuGeneFL分析を示す図である。

【図3B】図3Bはクローン性多発性骨髄腫形質細胞におけるCD20発現についての免疫組織化学法を示す図である

【図4】図4は遺伝子発現がタンパク質発現と相関することを示す図である。

【図5】図5は、すべての正常形質細胞、MM、意義不明単クローン性免疫グロブリン血症および多発性骨髄腫細胞株の14特性の多変量判別分析を示す図である。

【図6A】図6Aは5,483遺伝子(プローブセット)との相関に基づいてクラスター化した269 20
症例の多発性骨髄腫、7株の多発性骨髄腫細胞株、7例の意義不明単クローン性免疫グロブリン血症および32例の正常形質細胞試料を示す図である。

【図6B】図6Bは正常群と結びついた試料を示している増幅された試料クラスターを示す図である。

【図7】図7は、すべての多発性骨髄腫、意義不明単クローン性免疫グロブリン血症および多発性骨髄腫細胞株の24特性の多変量判別分析を示す図である。

【図8A】図8Aは正常形質細胞および約200名の骨髄腫患者におけるPIから始まりP226までのエンドセリンB受容体(ENDBR)発現を示す図であり、Y軸上に描かれたマイクロアレイデータの平均蛍光強度によって示される。

【図8B】図8Bは正常形質細胞および新たに診断された骨髄腫患者におけるエンドセリン 30
B受容体発現を示す図である。

【図9A】図9Aは支持細胞および骨髄腫細胞P323とP322における共培養前後のエンドセリンB受容体(ENDBR)の発現を示す図である。

【図9B】図9Bは支持細胞および骨髄腫細胞P323とP322における共培養前後のエンドセリン1の発現を示す図である。

【図10】図10は正常B細胞および形質細胞試料のフローサイトメトリー、免疫蛍光および細胞学的分析を示す図である。

【図11】図11は正常ヒト形質細胞の2次元階層的クラスター分析を示す図である。

【図12】図12は30例のEDG-MMの実験的発現プロファイルおよび遺伝子の挙動の2次元階層的クラスター分析を示す図である。 40

【図13】図13は50例のLDG-MM1遺伝子の実験的発現プロファイルおよび遺伝子の挙動の2次元階層的クラスター分析を示す図である。

【図14】図14は50例のLDG-MM2遺伝子の実験的発現プロファイルおよび遺伝子の挙動の2次元階層的クラスター分析を示す図である。

【図15】図15は増殖遺伝子の発現における差が扁桃B細胞とMM4の間の類似性を明らかにすることを示す図である。

【図16】図16は意義不明単クローン性免疫グロブリン血症(MGUS)と対比した多発性骨髄腫(MM)分類についての受信者操作特性(ROC)曲線を示す図である。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Shaughnessy, John
 Zhan, Fenghuang
 Barlogie, Bart

<120> Diagnosis, Prognosis and Identification of
 Potential Therapeutic Targets of Multiple
 Myeloma Based on Gene Expression Profiling

<130> D6432PCT

<141> 2002-11-07

<150> US 60/348,238
 US 60/355,386
 US 60/403,075 10

<151> 2001-11-07
 2002-02-08
 2002-08-13

<160> 2

<210> 1
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220> 20

<221> primer_bind
 <223> primer IGJH2

<400> 1
 caatgggtcac cgtctcttca 20

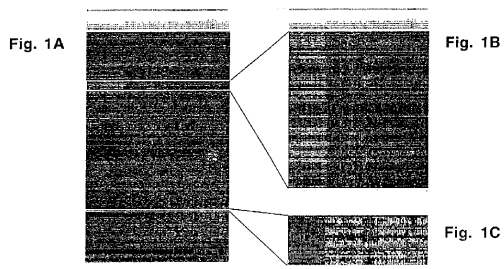
<210> 2
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220> 30

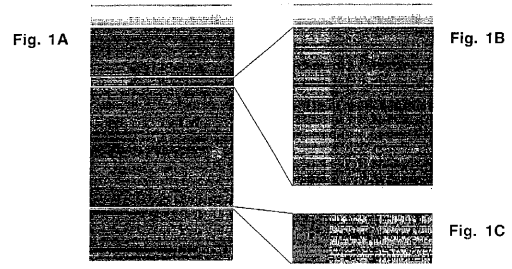
<221> primer_bind
 <223> primer MMSET

<400> 2
 cctcaatttc ctgaaattgg tt 22

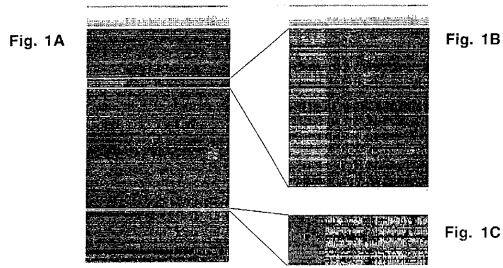
【 図 1 A 】



【 図 1 C 】



【 図 1 B 】



【 図 1 D 】

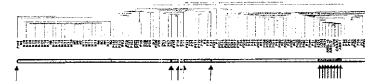


Fig. 1D

【 図 1 E 】

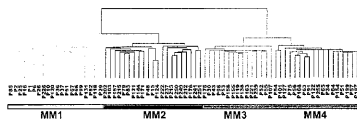
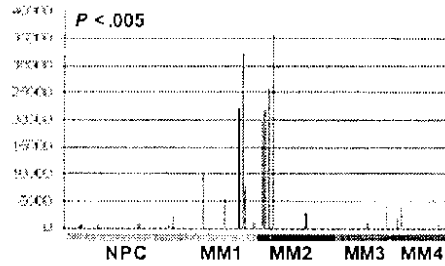
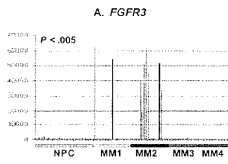


Fig. 1E

B. CST6



【 図 2 】



C. IFI27

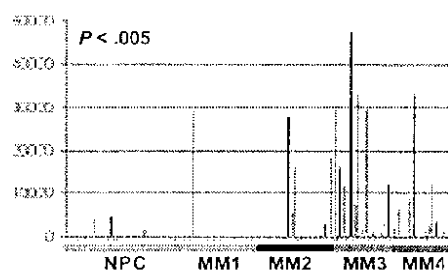
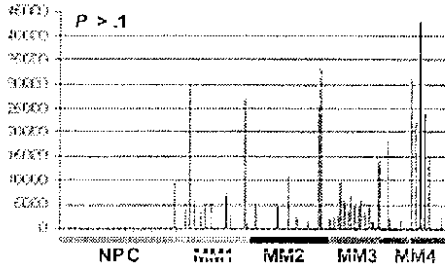
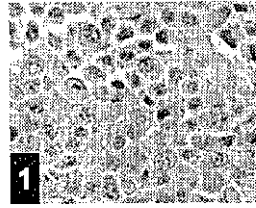


Fig. 2

D. CCND1



【 3 B 】



【 3 A 】

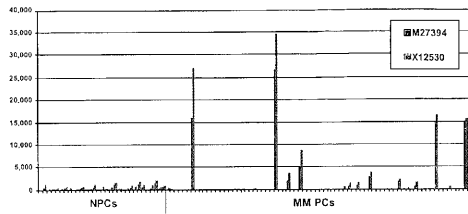
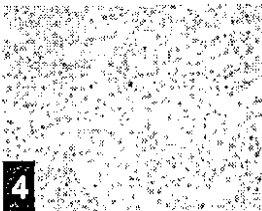
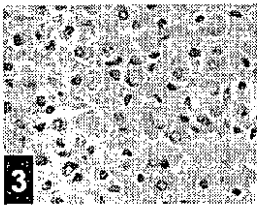


Fig. 3A

Fig. 3B



【 4 】

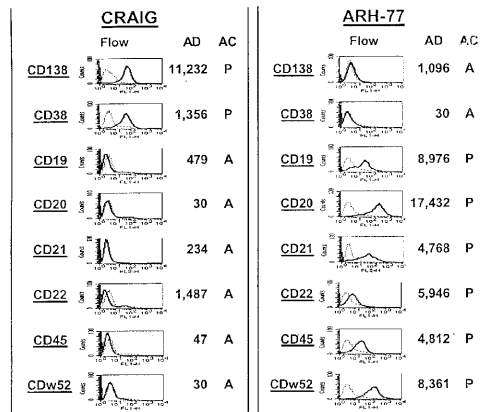


Fig. 4

【 図 5 】

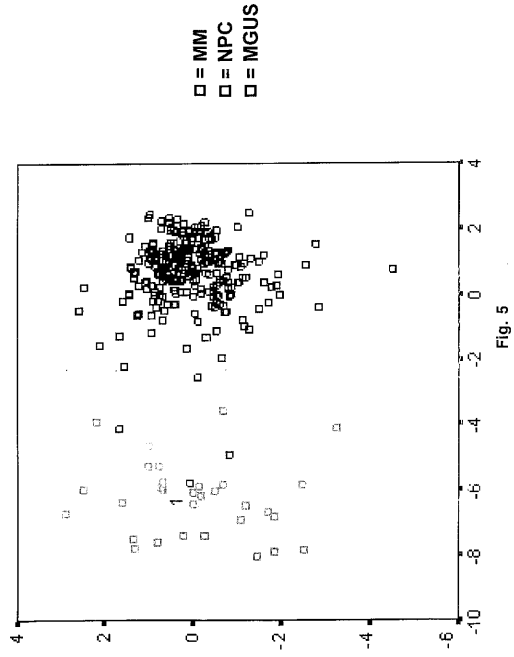


Fig. 5

【 図 6 A 】

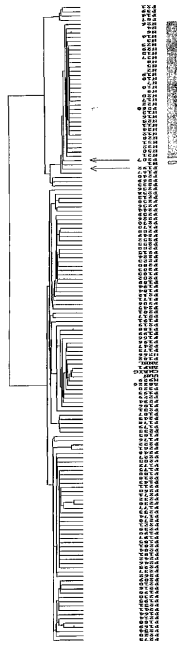


Fig. 6A

【 図 6 B 】

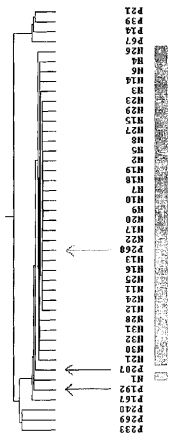
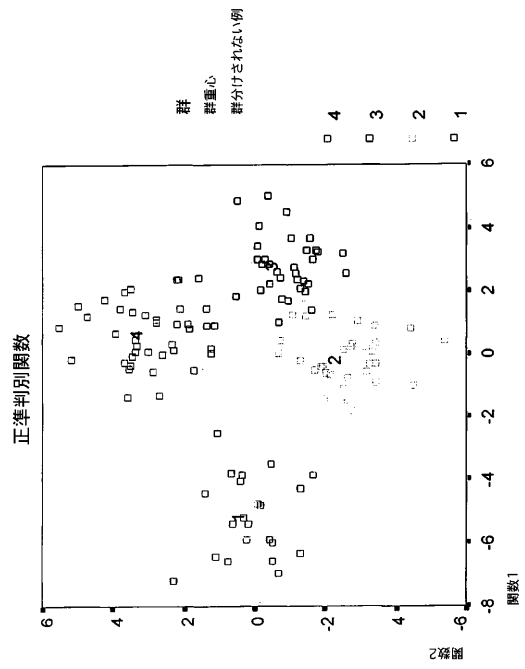
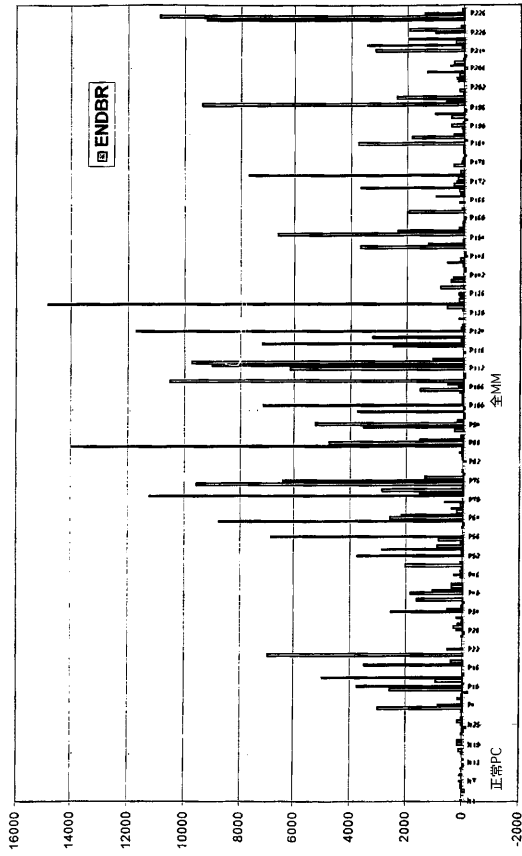


Fig. 6B

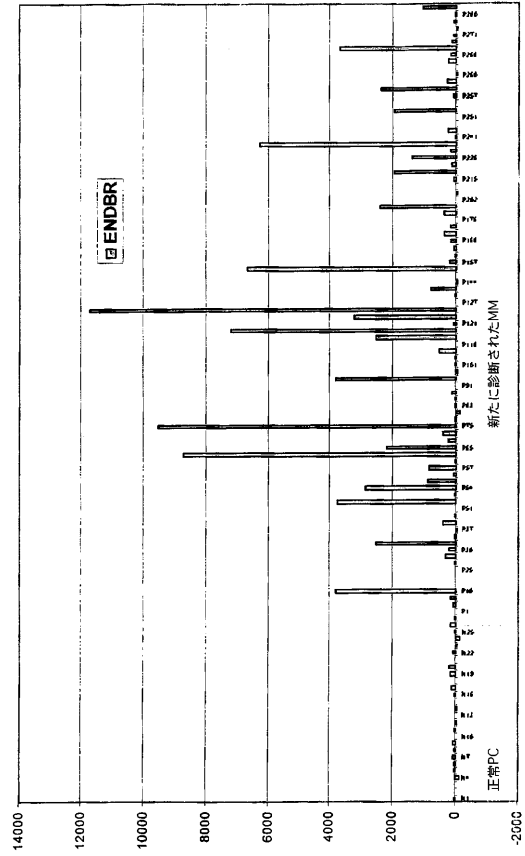
【 図 7 】



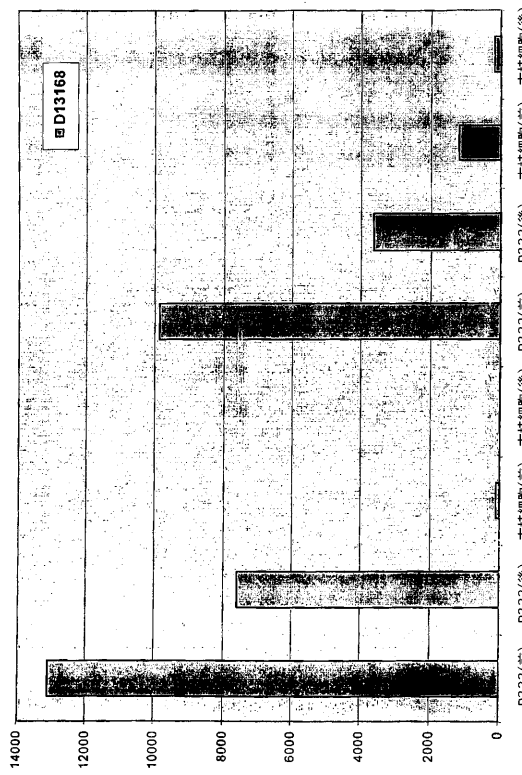
【 図 8 A 】



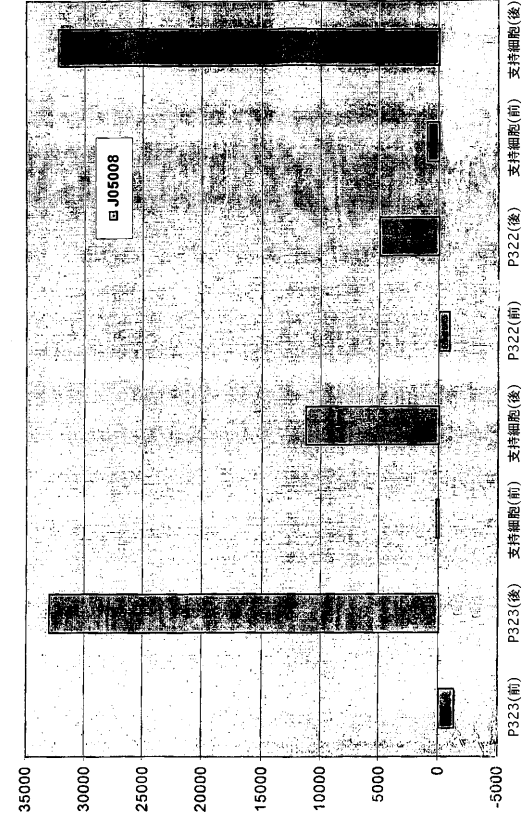
【 図 8 B 】



【 図 9 A 】



【 図 9 B 】



【 図 15 】

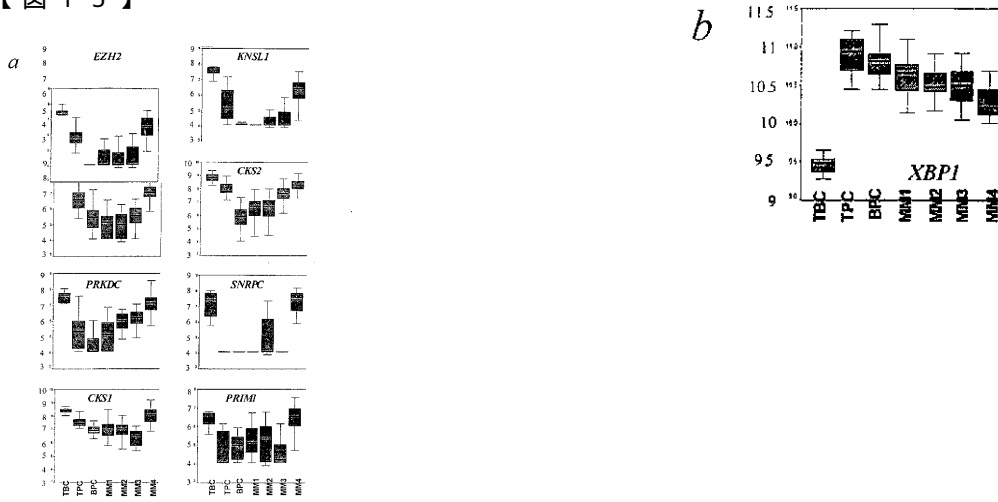
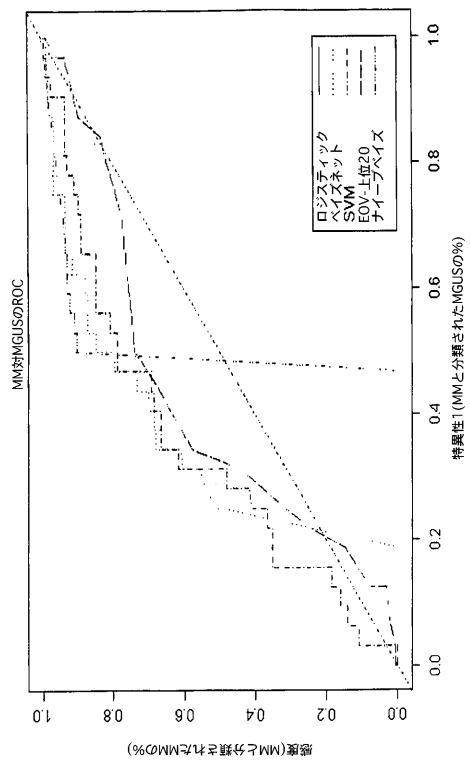


Fig. 15

【 図 16 】



【手続補正書】

【提出日】平成16年10月14日(2004.10.14)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】追加

【補正の内容】

【配列表】

2005512557000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US02/35724	
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER			
IPC(7) : C12Q 1/00, 1/68; C12N 15/09; C07H 21/00; G01N 33/48 US CL : 435/4, 6; 435/174; 536/23.1; 702/19 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC			
B. FIELDS SEARCHED			
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 435/4, 6; 435/174; 536/23.1; 702/19			
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched			
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Please See Continuation Sheet			
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT			
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	
Y	NG et al. Hierarchical Cluster Analysis of SAGE Data for Cancer Profiling. BIODKKO1: Workshop on Data Mining in Bioinformatics 2001, August 26, San Francisco, CA, see entire document.	1-2	
Y	DUGGAN et al. Expression Profiling Using cDNA Microarrays. Nature Genetics Supplement 1999, Vol. 21, pages 10-14, see entire document.	1-2	
X, P	SHAUGHNESSY et al. Integrating Cytogenetics and Gene Expression Profiling in the Molecular Analysis of Multiple Myeloma. International Journal of Hematology Supplement II 2002, Vol. 76, pages 60-64, see entire document.	1-2	
Y	EISEN et al. Cluster Analysis and Display of Genome-Wide Expression Patterns. Proceedings of the National Academy of Sciences 1998, Vol. 95, pages 14863-14868, see entire document.	1-2	
Y, P	CLAUDIO et al. A Molecular Compendium of Genes Expressed in Multiple Myeloma. Blood 15 September 2002, Vol. 100, pages 2175-2186, see entire document.	1-2	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.			
* Special categories of cited documents:			
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T"	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"B"	earlier application or patent published on or after the international filing date	"X"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&"	document member of the same patent family
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 03 November 2003 (03.11.2003)		Date of mailing of the international search report 16 JUN 2004	
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703)305-3230		Authorized officer Lori A. Clow <i>Rugenia Zagan</i> Telephone No. 703-308-0916	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US02/35724

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	DEVOS et al. Identifying Intercellular Signaling Genes Expressed in Malignant Plasma Cells by Using Complementary DNA Arrays. Blood 2001, Vol. 98, pages 771-780, see entire document.	1-2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US02/35724

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

This international report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claim Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. Claim Nos.: 4,6,8 and 10-16
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claim Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
Please See Continuation Sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
 2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
 3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
 4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 1 and 2
- Remark on Protest The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US02/35724

Box I Observations where certain claims were found unsearchable 1. because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claims 4, 6, 8, and 10-16 contain accession numbers which are unsearchable. Accession numbers representing sequences in a database, such as GenBank can be annotated and thus are unsearchable as to what was originally filed in the application.

BOX II. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING

- I. Claims 1 and 2, drawn to a method of classification for multiple myeloma.
- II. Claim 3, drawn to a method of identifying genes with elevated expression in subsets of multiple myeloma patients.
- III. Claim 5, drawn to a method of identifying therapeutic targets for multiple myeloma.
- IV. Claim 7, drawn to a method of identifying a group of genes that can distinguish between normal plasma cells and plasma cells of multiple myeloma.
- V. Claim 9, drawn to a method of identifying genes that can distinguish between subgroups of multiple myeloma.
- VI. Claims 17-19, drawn to a method of developmental stage-based classification of multiple myeloma.
- VII. Claim 20, drawn to a method of discriminating normal, hyperplastic, and malignant plasma cells.
- VIII. Claim 21, drawn to a method of identifying a gene with altered expression between normal and malignant plasma cells.

The inventions listed as Groups I-VIII do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons: The method of Group IV (claim 7) is not a novel contribution over the art and cannot be considered a linking group or a special technical feature linking all the separate and distinct methods claimed. DE VOS et al. (Blood, 1 August 2001, Vol.98, pages 771-780.) disclose methods of analyzing gene expression data for multiple myeloma plasma samples utilizing microarrays. Various cell types were analyzed, including normal plasma cells. Each of the other Groups is drawn to a differing method, requiring various distinct steps which are not common to all groups.

Claims 4, 6, 8, and 10-16 contain accession numbers which are unsearchable. Accession numbers representing sequences in a database, such as GenBank can be annotated and thus are unsearchable as to what was originally filed in the application.

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:

WEST, MEDLINE, SCIRUS, BIOSIS

Multiple Myeloma; DNA Microarray; Classification; Gene Expression; Subgroups; Subtypes

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
G 0 1 N 37/00	G 0 1 N 37/00	1 0 2
G 0 6 T 1/00	G 0 6 T 1/00	2 9 5
G 0 6 T 7/00	G 0 6 T 7/00	2 5 0
// C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/09	A

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW

(72) 発明者 シャフネッシー, ジョン ディー
 アメリカ合衆国 アーカンソー州 7 2 2 0 2 リトル ロック オールド オーク ドライブ
 4 3 1 7

(72) 発明者 バーロギー, バート
 アメリカ合衆国 アーカンソー州 7 2 2 0 5 リトル ロック エドガーストーン ドライブ
 3 1 1 8

(72) 発明者 チャン, フェンホアン
 アメリカ合衆国 アーカンソー州 7 2 2 0 5 リトル ロック ダブリュ マークハム ストリ
 ート 4 4 0 0 アpartment 1 7

F ターム(参考) 4B024 AA12 CA01 CA04 CA11 HA14
 4B063 QA01 QA18 QA19 QQ42 QQ52 QQ58 QR08 QR32 QR56 QR62
 QR66 QR84 QS25 QS34 QX02
 4C084 AA17 NA14 ZB262
 5B057 AA10 DA12 DB06 DC25
 5L096 AA02 BA13 FA15 KA11 MA07

专利名称(译)	基于基因表达谱的多发性骨髓瘤的治疗靶候选物的诊断，预后和鉴定		
公开(公告)号	JP2005512557A	公开(公告)日	2005-05-12
申请号	JP2003553979	申请日	2002-11-07
申请(专利权)人(译)	阿肯色州的盐湖城大学董事会		
[标]发明人	シャフネッシー ジョン デイ バーロギー バート チャン フェン ホアン		
发明人	シャフネッシー, ジョン デイ バーロギー, バート チャン, フェン ホアン		
IPC分类号	G01N33/53 A61K45/00 A61P35/00 C12N15/09 C12Q1/68 G01N33/48 G01N33/50 G01N33/566 G01N37/00 G06F19/00 G06T1/00 G06T7/00		
CPC分类号	A61P35/00 C12Q1/6837 C12Q1/6886 C12Q2600/158		
FI分类号	C12Q1/68.ZNA.A A61K45/00 A61P35/00 G01N33/53.M G01N33/566 G01N37/00.102 G06T1/00.295 G06T7/00.250 C12N15/00.A		
F-TERM分类号	4B024/AA12 4B024/CA01 4B024/CA04 4B024/CA11 4B024/HA14 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/ QA19 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QQ58 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR56 4B063/QR62 4B063/QR66 4B063/QR84 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QX02 4C084/AA17 4C084/NA14 4C084/ ZB262 5B057/AA10 5B057/DA12 5B057/DB06 5B057/DC25 5L096/AA02 5L096/BA13 5L096/FA15 5L096/KA11 5L096/MA07		
代理人(译)	佐久间刚		
优先权	60/348238 2001-11-07 US 60/355386 2002-02-08 US 60/403075 2002-08-13 US		
其他公开文献	JP2005512557A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

正常B细胞/浆细胞与多发性骨髓瘤细胞之间的基因表达谱分析揭示了多发性骨髓瘤浆细胞的四个不同的亚组，这些亚组与已知与不良预后有关的临床特征具有显著相关性。还建立了基于14个基因差异表达的多发性骨髓瘤(可能还有意义尚未确定的单克隆性丙种球蛋白病)的诊断方法，并基于24个基因的表达确定了多发性骨髓瘤的四个亚组的预后。基因表达谱分析还允许将多发性骨髓瘤置于与正常浆细胞分化平行的发展模式。基于基因表达或发育阶段的多发性骨髓瘤分类系统的发展将导致合理设计更准确，更敏感的多发性骨髓瘤诊断，预后和肿瘤特异性疗法。

1

表6
最適診断モデルを定義する14遺伝子

登録番号*	遺伝子記号	Wilksのλ	除外のF	P値
HT5158	<i>GMPS</i>	0.090	10.99	0.0011
L33930	<i>CD24</i>	0.089	8.80	0.0034
L42379	<i>QSCN6</i>	0.087	4.24	0.0409
L77886	<i>PTPRK</i>	0.088	6.46	0.0119
M14636	<i>PYGL</i>	0.091	12.62	0.0005
M26167	<i>PF4V1</i>	0.091	12.39	0.0005
U10324	<i>ILF3</i>	0.090	11.98	0.0007
U24577	<i>PLA2G7</i>	0.107	44.28	3.23x10 ⁻¹⁰
U35113	<i>MTA1</i>	0.088	6.22	0.0135
X16416	<i>ABL1</i>	0.099	27.65	4.04x10 ⁻⁷
X64072	<i>ITGB2</i>	0.097	24.63	1.59x10 ⁻⁶
X79882	<i>MVP</i>	0.098	25.83	9.19x10 ⁻⁷
Z22970	<i>CD163</i>	0.088	6.08	0.0146
Z80780	<i>H2B</i>	0.092	14.58	0.0002

*表記の登録番号はGeneBank番号であるが、Institute of Genomic Researchが提供する「HT」で始まるものを除く。