

本態性高血圧および心不全発症機構に関する包括的ゲノム解析

●間野 博行 ◆島田 和幸 ◆梶井 英治

自治医科大学医学部

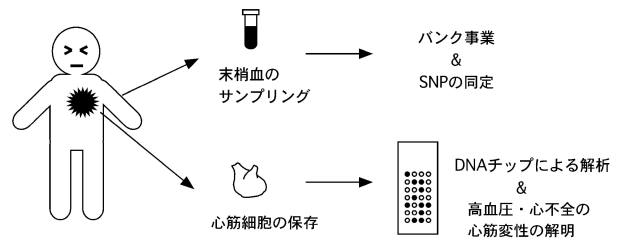
〈研究の目的と進め方〉

本邦における代表的な生活習慣病である本態性高血圧症は、遺伝的素因と環境因子が相互に作用しあって生じ、しかも人種による影響なども存在する多因子疾患であると予想されている。近年ゲノム解析の進歩に伴い、高血圧モデルラットの一部における原因遺伝子の同定や、ヒト検体を用いたsingle nucleotide polymorphism (SNP) 解析による疾患関連遺伝子の候補などが報告されるようになった。しかし高血圧原因候補遺伝子の解析は主に米国において行われており、且つ解析集団のサイズもいまだ小さいと言わざるを得ない。そのため、これまで同定されてきたような高血圧関連遺伝子群が実際の本邦における本態性高血圧症の発症にどの程度関与しているかは未だ全く不明のままである。

自治医科大学は、その卒業生が義務年限の期間を通して我が国の僻地医療および地域基幹病院での医療に従事しており、又これら卒業生は本学を中心とした緊密なネットワークで結ばれている。この様な本学のユニークな特徴は、本態性高血圧症のような生活習慣病を我が国において大規模に解析するには極めて適した環境といえ、全国より年齢、地域差、塩分摂取量などの異なる検体群をシステムティックに収集かつ解析可能である。

そこで本研究計画においては高血圧およびその終焉像の一種であるうっ血性心不全の原因遺伝子DNAチップ解析を用いたin vitroの基礎研究によって同定を目指すと共に、全国より収集したサンプルを用いた多型マーカー解析による候補遺伝子の同定も同時に試みる。これら基礎研究および臨床研究の両面で得られた候補遺伝子に関して、その発現量の変化およびSNPの有無を、独自に開発したDNAチップを用いて日本全国より収集したヒト検体を用いた大規模解析を行い、本邦における本態性高血圧症の発症機構を解明することを目指す。

実際の解析プロジェクトとしては以下のような多面的なアプローチを取った。(1) 遺伝性食塩感受性動物であるDahlラットは、食塩の過剰摂取に伴い速やかに高血圧・心肥大を発症し、まもなくうっ血性心不全となって死に至る。これら様々な病期におけるDahlラットの心筋より抽出したRNAによるDNAマイクロアレイ解析を行い、高血圧発症及び心不全への移行を規定する遺伝子を同定する。(2) 弁置換術の際に患者より得る心筋組織を用いてDNAマイクロアレイ解析を行い、左室駆出率あるいは心内圧と相関して発現する遺伝子群を同定する。(3) 自治医科大学の卒業生ネットワークを介して全国より本態性高血圧と正常圧コントロールサンプルを収集し、高血圧関連遺伝子多型を同定する。



〈研究開始時の研究計画〉

「in vitroにおいて心筋肥大および圧負荷に関与する遺伝子の同定」

新生仔ラットより得た培養心筋に対して、心肥大シグナルが惹起された場合の誘導遺伝子群を同定する。これまでcardiotrophin-1 (CT-1)、endothelin-1 (ET-1)、norepinephrinなど様々な細胞外刺激が心肥大シグナルを惹起することが知られているが、これらが具体的にどの様な遺伝子の発現誘導を介して心筋の肥大をコントロールしているのか、またこれら心肥大シグナルはそれぞれ異なった経路で心肥大を誘導しているのか否か殆ど知られていない。我々は既にラット培養心筋をこれら細胞外刺激で誘導した際にそれぞれ異なったサブセットの細胞内転写因子が誘導されることをDNAチップ解析によって明らかにしている。本実験はよりクローン数を増やしたDNAチップで解析を続ける一方、発現変化が明らかになった遺伝子群は後述のヒト検体解析においてその遺伝子発現量などを検討する予定である。またラット培養心筋および平滑筋細胞が物理的な伸展ストレスにさらされた際に生じる遺伝子誘導(あるいは抑制)に関しても、同様にDNAチップ解析を行うことにより明らかにする。

「ヒト心筋サンプルを用いた圧負荷に関与する遺伝子の同定」

自治医科大学循環器内科において心臓手術を施行する心疾患患者の右心耳および左心耳の一部を採取する。また同様に真性大動脈瘤や解離性大動脈瘤の手術によって得られた動脈硬化部位および辺縁の健常部よりRNAを抽出し、同様にDNAチップ解析を行う。これらの実験を通して、ヒト心筋において心臓カテーテル法によって計測した圧負荷と連鎖して発現量が変化する遺伝子群の同定、および実際の動脈硬化巣における遺伝子変化などもシステムティックに明らかにすることを目指す。

「遺伝的食塩感受性ラットを用いた心筋変性関連遺伝子の同定」

遺伝的食塩感受性ラットであるDahlラットは食塩負荷によって比較的短期間に高血圧および心不全をきたすため、本邦に多い食塩負荷型の高血圧発症の良いモデル動物となる。このDahlラットにおける末梢血圧・心機能をモニターしながら経時的に心筋細胞をサンプリングし、その遺伝子発現プロファイルの変化を解析する。本法によって心筋細胞の肥大にin vivoにおいて関与する遺伝子

群が明らかになると期待される。またその結果得られた心不全関連遺伝子の実際の疾患発症機構における意義を解明する目的で、これら候補遺伝子を心筋特異的に発現する遺伝子改変Dahlラットを作製する。さらに候補遺伝子産物のdominant negative変異体を発現するDahlラットも同様に作製し、心機能に対する影響を検証する。

「自治医科大学卒業生ネットワークを利用した全国規模での検体収集システムの確立」

自治医科大学は、厚生省の「手術等で摘出されたヒト組織を用いた研究開発のあり方について」に関する答申に基づいて制定されたヒューマンサイエンス振興財団バンク事業の指定協力機関となっており、全国からヒト検体を収集しストックする施設基盤はできている。本学において自治医科大学の卒業生ネットワークを通して、全国より高血圧患者および正常圧コントロールの血液サンプルを収集し、高血圧発症に寄与するSNPの同定を試みる。また解析に用いる臨床検体の採取に際しては、厚生省の指針に準拠する形で組織された自治医科大学の倫理委員会の認証・監視の基で患者さんのinformed consentを得た上で行う。

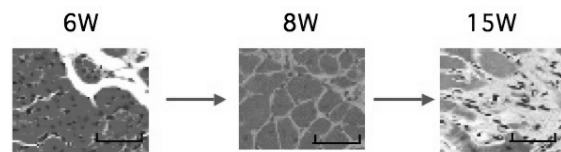
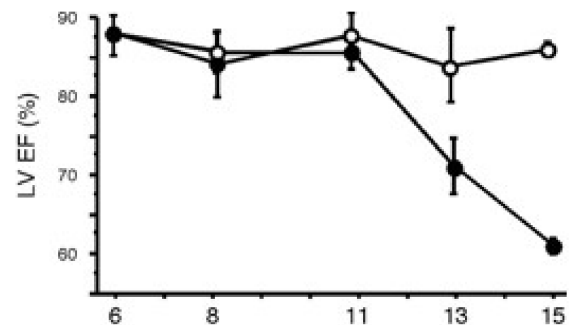
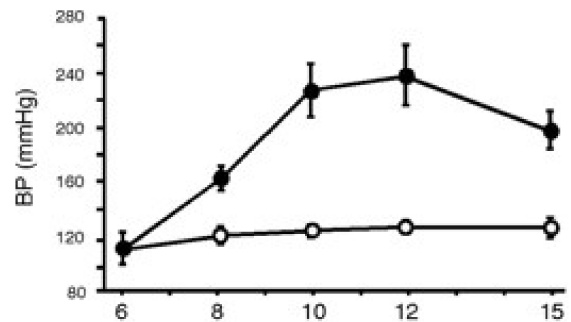
〈研究期間の成果〉

「in vitroにおいて心筋肥大および圧負荷に関与する遺伝子の同定」

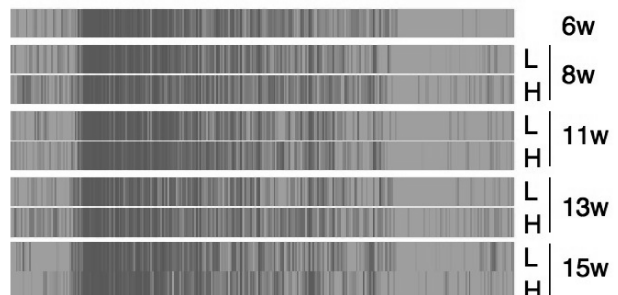
心筋細胞にはエンドセリン、エピネフリン、アンギオテンシンおよびカルジオトロフィンなど複数の肥大誘導因子が働くが、これら液性因子がどのような細胞内シグナルを惹起するのかは明かにされていない。我々はラット培養心筋細胞を用いてこれらの液性因子によってどのような細胞内系路が共通に、また各因子特異的に活性化されるかをDNAチップによる解析で検討した。その結果カルジオトロフィンは他の三因子とは極めて異なるセットの遺伝子発現を誘導することがわかり、また細胞死に関する制御もそれぞれの因子が特異的な系路を介していることが明らかになった。

「遺伝的食塩感受性ラットを用いた心筋変性関連遺伝子の同定」

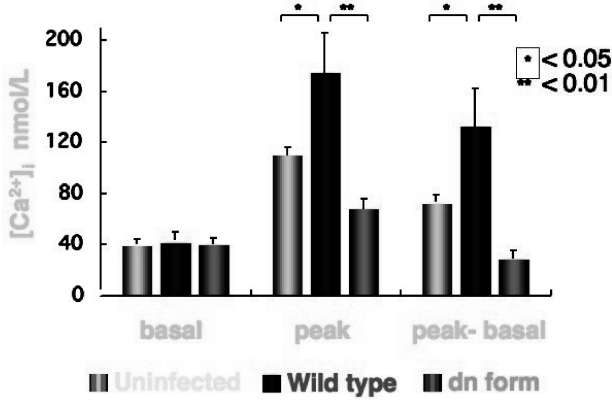
遺伝的に食塩感受性であるDahlラットは、高食塩含有食摂取によって速やかに高血圧→心肥大→うっ血性心不全へと移行する。我々はこれら各病期のDahlラット心室筋よりRNAを抽出しDNAマイクロアレイを用いて解析することで、「心肥大の発症」および「心肥大から心不全への移行」にどのような遺伝子発現の変化があるかを検討した。6週令のDahlラットに食塩負荷を開始したところ、翌週には高血圧が発症し、11週令まで高血圧・心肥大が進行した。しかし13週令の時点で心機能の低下、心拡大が生じ、うっ血性心不全への移行が確認された。



食塩負荷プラス群とマイナスのコントロール群それぞれから、各週令のラット2匹より心筋を取り出し、DNAマイクロアレイにて解析した。得られたデータのうち食塩負荷早期に発現誘導が生じる遺伝子は心肥大発症に関与すると予想され、また11週令から13週令の間に大きく発現量が変化するものは心不全への移行に関与する遺伝子群である可能性が高い。約8800種類のラット遺伝子を配置したAffymetrix社のGeneChipを用いて発現解析を行った結果、8週令の時点で食塩負荷群においてのみ発現が誘導される遺伝子が計5個同定された。



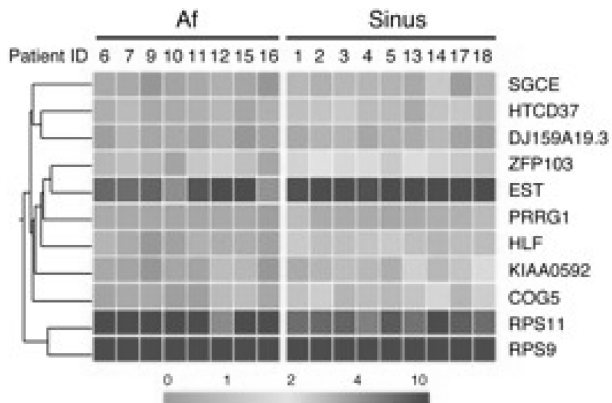
さらに食塩負荷前から発現が活性化されているが心不全発症期に低下する遺伝子としてアポトーシス制御転写因子をコードするDBP遺伝子が同定された。



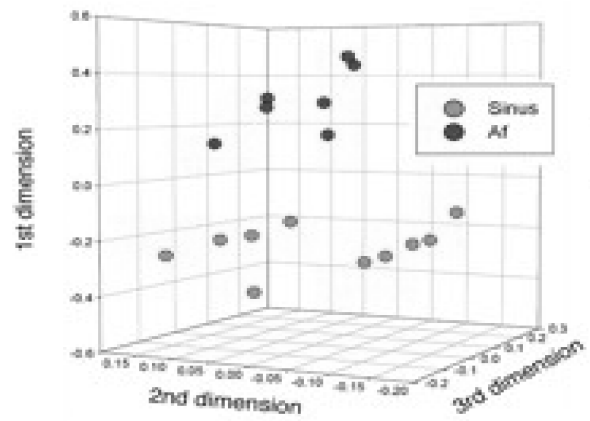
DBP遺伝子の発現低下が心筋細胞のアポトーシスに関与することを示す目的で、dominant negativeタイプDBPを発現する組換えアデノウィルスを作成し、培養心筋細胞に遺伝子導入したところ、速やかにアポトーシスが誘導された。またこの変化は正常DBP発現アデノウィルス感染によってはもたらされなかった。

「ヒト心筋サンプルを用いた圧負荷に関する遺伝子の同定」

自治医科大学において心臓弁置換術を施行する患者計24例より、切除した心房筋の一部を研究目的に用いることに承諾を得、18例についてはGeneChipを用いた網羅的遺伝子発現解析（12000種類以上のヒト遺伝子）が終了した。症例は正常洞調律及び心房細動症例がほぼ半数ずつ含まれたが、まず両グループが遺伝子発現プロファイルにおいて異なった単位として存在するか否かを検証した。調律依存性に発現量が変化する遺伝子を選出する目的で、正常洞調律群と心房細動群とで平均値の差をt-検定で行い、p値が0.01以下になる遺伝子セットを抽出した。さらにこれら遺伝子の各群における発現量の平均値を起算し、その群間での差が1以上になる遺伝子を選び出したところ最終的に以下の遺伝子セットが同定された。

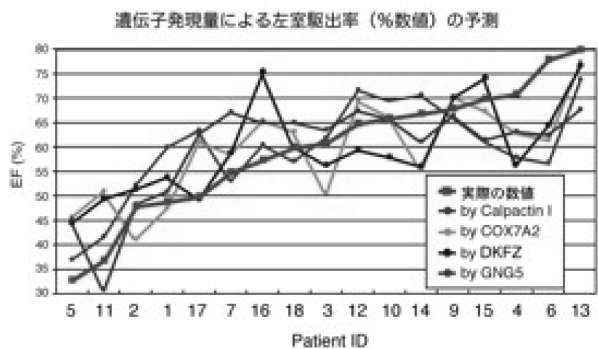


これら「心房細動依存性遺伝子」の発現パターンは高いに独立なわけではなく、互に関連した者も多い。そこでcorrespondence analysisを用いて、これら遺伝子発現パターンの中から3種類の代表的仮想発現パターン、すなわち「主成分」を抽出した。これら3種類の「主成分」を軸とした仮想空間にサンプルを配置したところ、興味深いことに正常洞調律群及び心房細動群は明らかに異なったグループを形成して配置されることが判った。



両群が異なった疾患単位であることは、我々が新たに開発した「weighted-distance method」法による「発現プロファイルからの不整脈予測」が全例において成功したことから明らかであった。

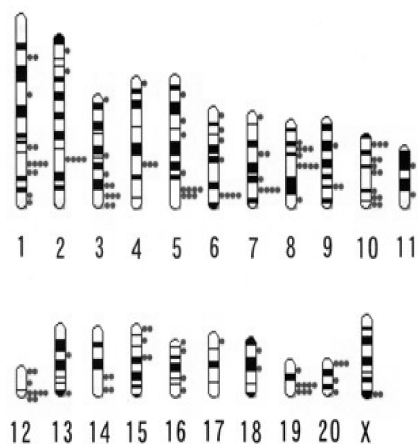
心房筋の一部は多くの心臓手術の際に切除されるため、心室筋に比べるとはるかに入手が容易である。心房筋を解析することで心機能の長期変化を予測することが出来れば臨床の面からも重要な情報を得ることが出来る。これまで心房筋がどの程度心臓全体の機能にリンクしているかは全く不明であった。そこで本プロジェクトの心房筋検体を用いたDNAチップ解析を行った。得られた遺伝子発現データより、心房細動の有無、心房への圧負荷、心房への容量負荷、等様々な臨床的パラメーターにリンクして発現量が変化する遺伝子セットの抽出に成功した。さらに心房と心機能の直接的な連関を検証するために、左室駆出率（ejection fraction: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



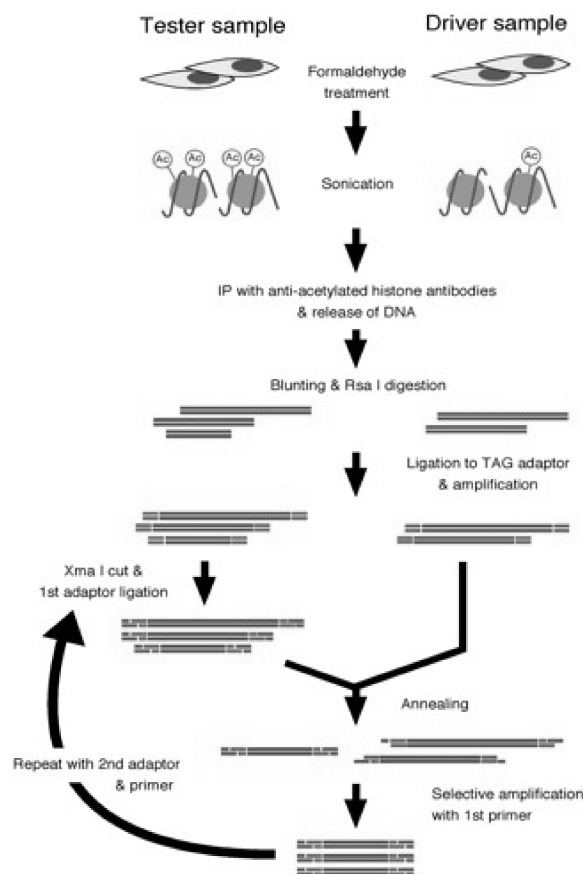
心不全の進行にエピジェネティックな変化が重要な役割を果たすことが知られている。特に染色体ヒストン蛋白質のアセチル化レベル異常は心肥大・心不全の発症メカニズム自体に関与していることが発生工学を用いた実験によって明らかにされてきた。しかしながら実際の心不全発症の際に具体的にどのような遺伝子のヒストンアセチル化レベルに異常が生じているのかは全く不明なままである。これまで任意のサンプル間でヒストンアセチ

ル化レベルの違いをゲノムワイドにスクリーニングする手法は存在しなかった。我々はこの目的のために新たな解析技術「Differential Chromatin Scanning (DCS)法」を開発した。DCS法は、修飾ヒストンに対する抗体でクロマチン免疫沈降を行ったのち、得られたゲノム断片間でsubtraction PCRを行うことで、任意のサンプル間でクロマチン修飾レベルが異なるゲノム断片を簡便にスクリーニング可能である。実際、DCS法の信頼性を検証する目的で、心筋由来細胞株にヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) の阻害剤trichostatin A (TSA)を添加し、ヒストンアセチル化レベルが変化する遺伝子をスクリーニングした。DCS法で同定された288個のゲノムフラグメントの塩基配列を決定したところ、そのうち178クローンはゲノム上の遺伝子の5'領域にマップされることが判った。ランダムに選んだ38クローンについてTSA刺激によるヒストンアセチル化の変化を測定したところ37クローン (97%) において著明なアセチル化レベルの上昇が確認された。以上よりDCS法を用いることで効率よくHDACの標的遺伝子を同定することが示された。

得られたHDAC標的遺伝子のラット染色体上の位置を下図に赤丸で示す。標的遺伝子はラット全染色体上に広く分布しているが、いくつかの箇所においてはHDAC標的遺伝子が密集して存在するホットスポットが存在することが判る。これらの領域はHDACの協調的な制御を受け、染色体構造自体の大きな変化が生じていることが予想される。



「自治医科大学卒業生ネットワークを利用した全国規模での検体収集システムの確立」



日本全国よりの大規模サンプル収集事業を拡充する目的で、卒業生ネットワークによる研究拠点病院を全国に100カ所設置し検体収集システムを構築した。臨床データを付した5万人のゲノムバンク完成を目指しており既に3500例以上のサンプル収集に成功した。得られたゲノムDNAを用いて17q領域の約15Mbpの範囲について高血圧関連SNPsをスクリーニングし、複数個の有意な連関を示すSNPsを同定した。また網羅的遺伝子発現解析および網羅的エピジェネティクス解析によって得られた心機能関連遺伝子についても同じバンクゲノムを用いてSNP解析を実行中である。

〈国内外での成果の位置づけ〉

本解析により心房筋、心室筋の100例に及ぶ検体ストックが成功し、しかもこれらを用いた遺伝子発現プロファイリングを行うことが出来た。臨床検体を用いた発現解析はこれまでごく僅かな症例数の解析が報告されているのみであり、未だなお我々の報告が世界最大のデータベースである。

しかも我々の解析は、心房のパラメーターによって心室の機能を直接予測した世界で最初の例である。又これらの解析は心房細動または心室機能に直接関係する遺伝子の良い候補を同定したと言える。

またゲノムワイドにヒストンアセチル化のレベルを把握する手法は世界的にも確立されておらず、我々のDCS法が世界で初めてのこのようなアプローチとなった。本解析法は心疾患だけでなく、今後様々な疾患の病態解析に有効と思われる。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

臨床心筋検体の収集事業は症例数に限りがあり、特に左室検体の収集は未だなお困難である。本来であれば正常心機能を有する心筋検体を含め、多くの左室心筋を用

いた遺伝子発現プロファイルリングの解析に興味を持たれる。

〈今後の課題〉

- 1) DahlラットのDNAマイクロアレイ解析で同定されたDBP遺伝子が、実際の生体内における心不全発症へ関与することをin vivoで検証する目的で、発生工学的手法を用いて解析する。まず心筋特異的発現を示すalpha myosin heavy chain遺伝子のエンハンサー・プロモーターによって正常DBP遺伝子を発現する遺伝子導入ユニットを作成し、これをDahlラットに導入したトランスジェニックラットを作成する。本ラットは高食塩負荷の有無に拘わらずDBP遺伝子の発現が変化しないはずであり、心不全の発症が遅延すると期待される。一方同じalpha myosin heavy chain遺伝子エンハンサー・プロモーターによってdominant negative DBPを発現するユニットを正常ラット (Dahlラットの親系であるSDラット) に導入したトランスジェニックラットを作成し、本ラットが遺伝性に心不全となるかを検証する。
- 2) DCS法を用いてDahlラットの高血圧期、心不全期など各病期の左室心筋検体を比較し、病期依存性にヒストンアセチル化レベルが変化する遺伝子群を解明する。これをさらに発展させ、ヒト臨床検体における解析も行う予定である。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

- 1) 論文
- 1) Ellmeier, W., Jung, S., Sunshine, M.J., Hatam, F., Xu, Y., Baltimore, D., Mano, H. & Littman, D.R., Severe B cell deficiency in mice lacking the Tec kinase family members Tec and Btk, *J. Exp. Med.*, 192, 1611-1624 (2000).
- 2) Maeda, Y., Ikeda, U., Ohya, K., Shimpo, M., Ueno, S., Okada, K., Saito, T., Mano, H., Ozawa, K. & Shimada, K., Endogenously generated nitric oxide by nitric-oxide synthase gene transfer inhibits cellular proliferation, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 292, 387-393 (2000).
- 3) Matsuda, K.M., Madoiwa, S., Hasumi, Y., Kanazawa, T., Saga, Y., Kume, A., Mano, H., Ozawa, K. & Matsuda, M., A novel strategy for the tumor angiogenesis-targeted gene therapy: generation of angiostatin from endogenous plasminogen by protease gene transfer, *Cancer Gene Ther.*, 7, 589-596 (2000).
- 4) van Dijk, T.B., van Den Akker, E., Amelvoort, M.P., Mano, H., Lowenberg, B. & von Lindern, M., Stem cell factor induces phosphatidylinositol 3'-kinase-dependent Lyn/Tec/Dok-1 complex formation in hematopoietic cells, *Blood*, 96, 3406-3413 (2000).
- 5) Yoshida, K., Yamashita, Y., Miyazato, A., Ohya, K., Kitanaka, A., Ikeda, U., Shimada, K., Yamanaka, T., Ozawa, K. & Mano, H., Mediation by the protein-tyrosine kinase Tec of signaling between the B cell antigen receptor and Dok-1, *J. Biol. Chem.*, 275, 24945-24952 (2000).
- 6) Bony, C., Roche, S., Ueno, S., Sasaki, T., Crackower, M.A., Penninger, J., Mano, H. & Puceat, M., A specific role of phosphatidylinositol 3-kinase γ : a regulation of autonomic Ca²⁺ oscillation in cardiac cells, *J. Cell.*

- Biol.*, 152, 717-727 (2001).
- 7) Kano, Y., Akutsu, M., Tsunoda, S., Mano, H., Sato, Y., Honma, Y. & Furukawa, Y., In vitro cytotoxic effects of a tyrosine kinase inhibitor STI571 in combination with antileukemic agents, *Blood*, 97, 1999-2007 (2001).
- 8) Miyazato, A., Ueno, S., Ohmine, K., Ueda, M., Yoshida, K., Yamashita, Y., Kaneko, T., Mori, M., Kirito, K., Toshima, M., Nakamura, Y., Saito, K., Kano, Y., Furusawa, S., Ozawa, K. & Mano, H., Identification of myelodysplastic syndrome-specific genes by DNA microarray analysis with purified hematopoietic stem cell fraction, *Blood*, 98, 422-427 (2001).
- 9) Ohmine, K., Ota, J., Ueda, M., Ueno, S.-i., Yoshida, K., Yamashita, Y., Kirito, K., Imagawa, S., Nakamura, Y., Saito, K., Akutsu, M., Mitani, K., Kano, Y., Komatsu, N., Ozawa, K. & Mano, H., Characterization of stage progression in chronic myeloid leukemia by DNA microarray with purified hematopoietic stem cells, *Oncogene*, 20, 8249-8257 (2001).
- 10) Tago, K., Funakoshi, M., Mano, H., Yanagisawa, K., Hayakawa, M., Kuroiwa, K., Iwahana, H., Kasahara, T. & Tominaga, S., Presence of a genistein-responsive inhibitory mechanism on interleukin-1 alpha-induced NF-kappaB activation, *Eur. J. Biochem.*, 268, 6526-6533 (2001).
- 11) Takahashi, M., Nishihira, J., Shimpo, M., Mizue, Y., Ueno, S., Mano, H., Kobayashi, E., Ikeda, U. & Shimada, K., Macrophage migration inhibitory factor as a redox-sensitive cytokine in cardiac myocytes, *Cardiovasc. Res.*, 52, 438-445 (2001).
- 12) Yamashita, Y., Kajigaya, S., Yoshida, K., Ueno, S., Ota, J., Ohmine, K., Ueda, M., Miyazato, A., Ohya, K., Kitamura, T., Ozawa, K. & Mano, H., Sak serine/threonine kinase acts as an effector of Tec tyrosine kinase, *J. Biol. Chem.*, 276, 39012-39020 (2001).
- 13) Yokohari, K., Yamashita, Y., Okada, S., Ohya Ki, K., Oda, S., Hatano, M., Mano, H., Hirasawa, H. & Tokuhisa, T., Isoform-Dependent Interaction of BRDG1 with Tec Kinase, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 289, 414-420 (2001).
- 14) Makishima, H., Ishida, F., Ito, T., Kitano, K., Ueno, S., Ohmine, K., Yamashita, Y., Ota, J., Ota, M., Yamauchi, K. & Mano, H., DNA microarray analysis of T cell-type lymphoproliferative disease of granular lymphocytes, *Br. J. Haematol.*, 118, 462-469 (2002).
- 15) Mano, H., TEC KINASES, In: *Wiley Encyclopedia of Molecular Medicine*. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Inc.; pp 3107-3110, 2002.
- 16) 303271403
Ogata, Y., Takahashi, M., Takeuchi, K., Ueno, S., Mano, H., Ookawara, S., Kobayashi, E., Ikeda, U. & Shimada, K., Fluvastatin induces apoptosis in rat neonatal cardiac myocytes: a possible mechanism of statin-attenuated cardiac hypertrophy, *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 40, 907-915 (2002).
- 17) 303271420
Ohki, R., Yamamoto, K., Mano, H., Lee, R.T., Ikeda, U. & Shimada, K., Identification of mechanically induced genes in human monocytic cells by DNA microarrays, *J. Hypertens.*, 20, 685-691 (2002).

- 18) Horwood, N.J., Mahon, T., McDaid, J.P., Campbell, J., Mano, H., Brennan, F.M., Webster, D. & Foxwell, B.M., Bruton's tyrosine kinase is required for lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor alpha production, *J. Exp. Med.*, 197, 1603-1611 (2003).
- 19) Ogata, Y., Takahashi, M., Ueno, S., Takeuchi, K., Okada, T., Mano, H., Ookawara, S., Ozawa, K., Berk, B.C., Ikeda, U., Shimada, K. & Kobayashi, E., Antiapoptotic Effect of Endothelin-1 in Rat Cardiomyocytes In Vitro, *Hypertension*, 41, 1156-1163 (2003).
- 20) 403271506
Ohki, R., Yamamoto, K., Ueno, S., Mano, H., Ikeda, U. & Shimada, K., Effects of Olmesartan, an Angiotensin II Receptor Blocker, on Mechanically-Modulated Genes in Cardiac Myocytes, *Cardiovasc Drugs Ther*, 17, 231-236 (2003).
- 21) Ohmine, K., Nagai, T., Tarumoto, T., Miyoshi, T., Muroi, K., Mano, H., Komatsu, N., Takaku, F. & Ozawa, K., Analysis of Gene Expression Profiles in an Imatinib-Resistant Cell Line, KCL22/SR, *Stem Cells*, 21, 315-321 (2003).
- 22) Oshima, Y., Ueda, M., Yamashita, Y., Choi, Y.L., Ota, J., Ueno, S., Ohki, R., Koinuma, K., Wada, T., Ozawa, K., Fujimura, A. & Mano, H., DNA microarray analysis of hematopoietic stem cell-like fractions from individuals with the M2 subtype of acute myeloid leukemia, *Leukemia*, 17, 1990-1997 (2003).
- 23) Ota, J., Yamashita, Y., Okawa, K., Kisanuki, H., Fujiwara, S., Ishikawa, M., Choi, Y.L., Ueno, S., Ohki, R., Koinuma, K., Wada, T., Compton, D., Kadoya, T. & Mano, H., Proteomic analysis of hematopoietic stem cell-like fractions in leukemic disorders, *Oncogene*, 22, 5720-5728 (2003).
- 24) 303271414
Suzuki, N., Nakamura, S., Mano, H. & Kozasa, T., Galph 12 activates Rho GTPase through tyrosine-phosphorylated leukemia-associated RhoGEF, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100, 733-738 (2003).
- 25) Ueda, M., Ota, J., Yamashita, Y., Choi, Y.L., Ohki, R., Wada, T., Koinuma, K., Kano, Y., Ozawa, K. & Mano, H., DNA microarray analysis of stage progression mechanism in myelodysplastic syndrome, *Br. J. Haematol.*, 123, 288-296 (2003).
- 26) 403271447
Ueno, S., Ohki, R., Hashimoto, T., Takizawa, T., Takeuchi, K., Yamashita, Y., Ota, J., Choi, Y.L., Wada, T., Koinuma, K., Yamamoto, K., Ikeda, U., Shimada, K. & Mano, H., DNA microarray analysis of in vivo progression mechanism of heart failure, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 307, 771-777 (2003).
- 27) 403271440
Yoshida, K., Ueno, S., Iwao, T., Yamasaki, S., Tsuchida, A., Ohmine, K., Ohki, R., Choi, Y.L., Koinuma, K., Wada, T., Ota, J., Yamashita, Y., Chayama, K., Sato, K. & Mano, H., Screening of genes specifically activated in the pancreatic juice ductal cells from the patients with pancreatic ductal carcinoma, *Cancer Sci.*, 94, 263-270 (2003).
- 28) Aoki, N., Ueno, S.-i., Mano, H., Yamasaki, S., Shiota, M., Miyazaki, H., Yamaguchi-Aoki, Y., Matsuda, T. & Ullrich, A., Mutual regulation of protein-tyrosine phosphatase 20 and protein-tyrosine kinase Tec activities by tyrosine phosphorylation and dephosphorylation, *J. Biol. Chem.*, 279, 10765-10775 (2004).
- 29) Araki, H., Katayama, N., Yamashita, Y., Mano, H., Fujieda, A., Usui, E., Mitani, H., Ohishi, K., Nishii, K., Masuya, M., Minami, N., Nobori, T. & Shiku, H., Reprogramming of human postmitotic neutrophils into macrophages by growth factors, *Blood*, 103, 2973-2980 (2004).
- 30) Bai, J., Sata, N., Nagai, H., Wada, T., Yoshida, K., Mano, H., Sata, F. & Kishi, R., Genistein-Induced Changes in Gene Expression in Panc 1 Cells at Physiological Concentrations of Genistein, *Pancreas*, 29, 93-98 (2004).
- 31) 403271433
Choi, Y.L., Makishima, H., Ohashi, J., Yamashita, Y., Ohki, R., Koinuma, K., Ota, J., Isobe, Y., Ishida, F., Oshimi, K. & Mano, H., DNA microarray analysis of natural killer cell-type lymphoproliferative disease of granular lymphocytes with purified CD3(-)CD56(+) fractions, *Leukemia*, 18, 556-565 (2004).
- 32) He, H., Hirokawa, Y., Gazit, A., Yamashita, Y., Mano, H., Kawakami, Y., Kawakami, Hsieh, C.Y., Kung, H.J., Lessene, G., Baell, J., Levitzki, A. & Maruta, H., The Tyr-kinase inhibitor AG879, that blocks the ETK-PAK1 interaction, suppresses the RAS-induced PAK1 activation and malignant transformation, *Cancer Biol. Ther.*, 3, 96-101 (2004).
- 33) Kaneda, R., Toyota, M., Yamashita, Y., Koinuma, K., Choi, Y.L., Ota, J., Kisanuki, H., Ishikawa, M., Takada, S., Shimada, K. & Mano, H., High-throughput screening of genome fragments bound to differentially acetylated histones, *Genes Cells*, 9, 1167-1174 (2004).
- 34) Kano, Y., Akutsu, M., Tsunoda, S., Izumi, T., Mori, K., Fujii, H., Yazawa, Y., Mano, H. & Furukawa, Y., Schedule-dependent synergism and antagonism between pemetrexed and paclitaxel in human carcinoma cell lines in vitro, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 54, 505-513 (2004).
- 35) Koinuma, K., Shitoh, K., Miyakura, Y., Furukawa, T., Yamashita, Y., Ota, J., Ohki, R., Choi, Y.L., Wada, T., Konishi, F., Nagai, H. & Mano, H., Mutations of BRAF are associated with extensive hMLH1 promoter methylation in sporadic colorectal carcinomas, *Int. J. Cancer*, 108, 237-242 (2004).
- 36) Mano, H., Stratification of acute myeloid leukemia based on gene expression profiles, *Int. J. Hematol.*, 80, 389-394 (2004).
- 37) Ohki, R., Yamamoto, K., Ueno, S., Mano, H., Misawa, Y., Fuse, K., Ikeda, U. & Shimada, K., Transcriptional profile of genes induced in human atrial myocardium with pressure overload, *Int. J. Cardiol.*, 96, 381-387 (2004).
- 38) Ohki-Kaneda, R., Ohashi, J., Yamamoto, K., Ueno, S., Ota, J., Choi, Y.L., Koinuma, K., Yamashita, Y., Misawa, Y., Fuse, K., Ikeda, U., Shimada, K. & Mano, H., Cardiac function-related gene expression profiles in human atrial myocytes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 320, 1328-1336 (2004).

- 39) Tsutsumi, C., Ueda, M., Miyazaki, Y., Yamashita, Y., Choi, Y.L., Ota, J., Kaneda, R., Koinuma, K., Fujiwara, S., Kisanuki, H., Ishikawa, M., Ozawa, K., Tomonaga, M. & Mano, H., DNA microarray analysis of dysplastic morphology associated with acute myeloid leukemia, *Exp. Hematol.*, 32, 828-835 (2004).
- 40) Choi, Y.L., Moriuchi, R., Osawa, M., Iwama, A., Makishima, H., Wada, T., Kisanuki, H., Kaneda, R., Ota, J., Koinuma, K., Ishikawa, M., Takada, S., Yamashita, Y., Oshimi, K. & Mano, H., Retroviral expression screening of oncogenes in natural killer cell leukemia, *Leuk. Res.*, 29, 943-949 (2005).
- 41) Fujiwara, S., Yamashita, Y., Choi, Y.L., Wada, T., Kaneda, R., Takada, S., Maruyama, Y., Ozawa, K. & Mano, H., Transforming activity of the lymphotoxin-beta receptor revealed by expression screening, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 338, 1256-1262 (2005).
- 42) Ishikawa, M., Yoshida, K., Yamashita, Y., Ota, J., Takada, S., Kisanuki, H., Koinuma, K., Choi, Y.L., Kaneda, R., Iwao, T., Tamada, K., Sugano, K. & Mano, H., Experimental trial for diagnosis of pancreatic ductal carcinoma based on gene expression profiles of pancreatic ductal cells, *Cancer Sci.*, 96, 387-393 (2005).
- 43) Kaneda, R., Ueno, S., Yamashita, Y., Choi, Y.L., Koinuma, K., Takada, S., Wada, T., Shimada, K. & Mano, H., Genome-wide screening for target regions of histone deacetylases in cardiomyocytes, *Circ. Res.*, 97, 210-218 (2005).
- 44) Kisanuki, H., Choi, Y.L., Wada, T., Moriuchi, R., Fujiwara, S.I., Kaneda, R., Koinuma, K., Ishikawa, M., Takada, S., Yamashita, Y. & Mano, H., Retroviral expression screening of oncogenes in pancreatic ductal carcinoma, *Eur. J. Cancer*, 41, 2170-2175 (2005).
- 45) Koinuma, K., Kaneda, R., Toyota, M., Yamashita, Y., Takada, S., Choi, Y.L., Wada, T., Okada, M., Konishi, F., Nagai, H. & Mano, H., Screening for genomic fragments that are methylated specifically in colorectal carcinoma with a methylated MLH1 promoter, *Carcinogenesis*, 26, 2078-2085 (2005).
- 46) Numata, A., Shimoda, K., Kamezaki, K., Haro, T., Kakumitsu, H., Shide, K., Kato, K., Miyamoto, T., Yamashita, Y., Oshima, Y., Nakajima, H., Iwama, A., Aoki, K., Takase, K., Gondo, H., Mano, H. & Harada, M., Signal transducers and activators of transcription 3 augments the transcriptional activity of CCAAT/enhancer-binding protein alpha in granulocyte colony-stimulating factor signaling pathway, *J. Biol. Chem.*, 280, 12621-12629 (2005).
- 47) Ohki, R., Yamamoto, K., Ueno, S., Mano, H., Misawa, Y., Fuse, K., Ikeda, U. & Shimada, K., Gene expression profiling of human atrial myocardium with atrial fibrillation by DNA microarray analysis, *Int. J. Cardiol.*, 102, 233-238 (2005).
- 48) Takada, S., Mano, H. & Koopman, P., Regulation of Amh during sex determination in chickens: Sox gene expression in male and female gonads, *Cell. Mol. Life Sci.*, 62, 2140-2146 (2005).

2) データベース/ソフトウェア
無し

3) 特許など

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

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

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

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

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

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

4) その他顕著なもの、
無し