

厚生労働科学研究研究費補助金

第3次対がん総合戦略研究事業

「DNAチップによる急性白血病の新規分類法提案」
に関する研究

平成18年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 間野 博行

平成19(2007)年4月

目 次

I.	総括研究報告書	
	「DNA チップによる急性白血病の新規分類法提案」に関する研究 自治医科大学・医学部・ゲノム機能研究部 間野博行 -----	1
II.	分担研究報告	
1.	「DNA チップによる急性白血病の新規分類法提案」に関する研究 自治医科大学・医学部・ゲノム機能研究部 間野博行 -----	8
2.	「DNA チップによる急性白血病の新規分類法提案」に関する研究 自治医科大学・医学部・内科学講座血液 小澤 敬也 -----	11
3.	「Farnesytransferase inhibitor R115777とpaclitaxelの併用効果」に関する研究 栃木県立がんセンター 副病院長 加納康彦 -----	14
III.	研究成果の刊行に関する一覧表 -----	17
IV.	研究成果の刊行物・別冊 -----	22

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）

総括研究報告書

「DNAチップによる急性白血病の新規分類法提案」に関する研究

主任研究者： 間野 博行 自治医科大学医学部 教授

研究要旨：DNAチップを用いることで数千～数万の遺伝子に関する発現変化を比較的簡便に解析することが可能となり、これまでは鑑別診断が困難であった血液疾患の診断に役立つ新たな分子マーカーが同定されると期待される。しかしDNAチップはあまりに高感度な検査法であるため、異なった白血病患者の骨髄細胞全体を比べるような単純な解析を行うと、両患者の「骨髄中の構成細胞の違い」を反映した偽陽性結果を得ることになる。我々は広く患者さんの骨髄より造血幹細胞相当分画のみを純化し保存する「Blast Bank」を設立した。現在まで既に800例を越えるサンプルの保存に成功しており、本バンク細胞を用いた大規模DNAチップ解析によって、遺伝子発現データおよび、各症例の臨床情報フォローアップデータより、初回寛解導入療法の成績にリンクする遺伝子、治療開始後365日の時点で寛解を維持できているか否かにリンクする遺伝子、など様々な臨床データに発現量が連関する遺伝子セットを抽出することに成功した。さらに本年度は成人T細胞白血病の病期進展機構を解明するだけでなく、白血病発症に重要な役割を果たす低分子RNAであるマイクロRNAの発現様式を世界に先駆けて白血病において解析することが出来た。

分担研究者

間野博行	自治医科大学医学部ゲノム機能研究部・教授
小澤敬也	自治医科大学医学部内科学講座血液・教授
加納康彦	栃木県立がんセンター研究検査部・部長

細胞を用いてDNAチップ解析を行うことで、疾患の種類に拘わらず分化レベルがほぼ均一な細胞群を比較することが可能になり、疾患の病態解明に有用な知見が得られると期待された。本システムを用いて、(1)白血病の鑑別診断に有効な遺伝子マーカーの同定、(2)白血病の薬剤感受性に関与する遺伝子マーカーの同定、(3)病期が進行する白血病類縁疾患の病期特異的分子マーカーの同定、等を本研究計画で目指した。また同様な解析法を成人T細胞性白血病(ATL)などに対しても行った。これらの膨大な知見を元に、白血病関連疾患の診断用カスタムDNAチップの開発、および新規分指標的療法の開発を行う。

A 研究目的

現在なお正確な診断が困難であり、かつ有効な治療法の存在しない白血病類縁疾患が数多くある。各患者の有効な治療法を選択する上でも正確な鑑別診断は必須であり、そのためには新たな分子診断マーカーの同定が最も重要であると考えられる。DNAチップは数千-数万の遺伝子発現変化を簡便に解析可能にする最新の研究システムであり、上述の目的に適したスクリーニング法であると期待される。

我々は白血病などの特発性血液疾患の多くが造血幹細胞（あるいはその近傍）の異常に起因することに着目し、これら疾患患者のフレッシュ検体より造血幹細胞相当分画のみを純化しストックするバンク事業「Blast Bank」をスタートした。本バンク

B 研究方法

1)造血幹細胞特異的マーカーであるCD133に対するアフィニティカラムを用いて、白血病を含む各種特発性血液疾患患者骨髄より造血幹細胞分画を純化保存し、これをBlast Bankと名付けた。平成19年3月現在で800例を越えるサンプルの保存に成功しており、これは純化細胞を用いたゲノミクスプロジェクトとしては世界最大級である。

2) ATLの病期進展機構解明を目的として、ATL患者末梢血よりCD4陽性ATL細胞のみを純化保存するATL Bankも行い60例を

越えるサンプルの保存に成功した。またコントロールサンプルとして健常者末梢血より CD4 陽性 T 細胞分画を純化し、一部を PHA にて刺激した。

3) 上記検体群を用いて以下のように DNA チップ解析を行った。細胞よりトータル RNA を抽出し、これを T7 RNA ポリメラーゼを用いてまず *in vitro* にて増幅した。さらにこれをもとに二本鎖 cDNA を合成し、ビオチン CTP の存在下で再び T7 RNA ポリメラーゼと反応させることで、ビオチン標識化した complementary RNA (cRNA) を作製した。このビオチン化 cRNA を DNA チップとハイブリダイズさせ、洗浄後、蛍光色素 PE 結合アビジンと反応させた。この DNA チップ上の cRNA 結合スポットを Affymetrix 社の蛍光スキャナーで励起させ、各スポットの蛍光強度を測定した後統計処理を GeneSpring 7.0 (Silicon Genetics 社) にて行った。

4) ヒトがん株化細胞として MDA-MB-231 (乳がん)、A549 (肺がん)、PA1 (卵巣がん)、培養液として RPMI1640+10%FCS を用いた。各種濃度の tipifarnib と paclitaxel を 1) tipifarnib + paclitaxel、2) tipifarnib → paclitaxel、3) paclitaxel → tipifarnib のスケジュールで各 24 時間加え培養し、4 ないし 3 日後、MTT assay により dose-response curve を得、 IC_{50} における併用効果を isobologram (Steel & Peckham) で判定した。

C 研究結果

1) ATL の慢性期から急性期への移行メカニズムを明らかにするべく、慢性期 ATL 22 例、急性期 ATL 19 例の患者末梢血より CD4 陽性白血病分画を純化し、Affymetrix HGU133 A&B マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析を行った。その結果、慢性期と急性期 ATL が互いに異なった遺伝子発現プロファイルを有すること、また特定のサブセットの遺伝子発現量に基づき病期を予測することが可能なことが明らかになった。さらに ATL の病期進行機構を明らかにするべく、我々の遺伝子発現データベースより、急性期 ATL においてのみ発現する

遺伝子の抽出を試みたところ、興味深いことに肝細胞成長因子 (hepatocyte growth factor: HGF) の細胞表面受容体である MET チロシンキナーゼ遺伝子が ATL の急性期の一部においてのみ高発現することが示された。しかも興味深いことに HGF の血中濃度は急性期のみならず慢性期 ATL においても極めて高い値になっていることが示された。ATL は活性型 T 細胞の腫瘍であり、多くのリンフォカインを産生することが知られる。その中には IL-1 等もあり、これらは白血球あるいは繊維芽細胞に働いて HGF 発現を誘導する。以上より ATL は、間接的に HGF を誘導し血中 HGF 濃度が高値となっており、そのような環境下において MET の高発現が生じた ATL クローンが選択的に増殖し、急性期へと移行する可能性が示唆された。

2) miRNA は個体の発生・分化に重要なだけでなく、癌を初めとする様々な疾患の病態に関与することが予想されている。しかしこれまでの miRNA プロファイル法はいずれも数百マイクログラムの RNA をその解析に必要としており、実際の臨床検体を用いた解析は困難であった。我々は新たに、数 ng の RNA から 10 万クローン以上の miRNA を簡便に単離・同定する新しい miRNA クローニング法 (miRNA amplification profiling: mRAP) を開発した。まず哺乳動物における全身の miRNA ボディマップを決定するために、様々な発達レベルのマウス胎児および、成マウスの様々な臓器における miRNA のプロファイリングを行い、miRNA の発現が発生段階、時間、空間において精妙に制御されていることを明らかにした。さらに mRAP 法を用いて CD133 陽性白血病芽球の miRNA プロファイリングを行った結果、新規 miRNA を百種類以上同定すると共に疾患特異的な miRNA プロファイルを明らかにすることが出来た。さらに同定された miRNA の発現ライブラリーを構築し、その機能スクリーニングをする過程で形質転換能を有する miRNA の同定に成功した。興味深いことにこの miRNA は一部の白血病患者検体で高発現していることが確認された。

3) 薬剤反応性を解析した何れの細胞株においても、tipifarnibとpaclitaxelは同時投与の場合、および、tipifarnibを先行させた場合、強い相乗作用を示した。一方、paclitaxelを先行させた場合は相加作用にとどまった。細胞増殖抑制効果からみたtipifarnibとpaclitaxel併用における至適投与スケジュールは両者の同時投与、またはtipifarnib先行投与と考えられる

D&E. 考察及び結論

本研究事業において各種白血病類縁疾患の大規模な純化細胞DNAチップ解析を行い、膨大な遺伝子発現データを得た。これらを元に「発現量から統計的有意に診断」を可能にする遺伝子群の抽出に成功し、カスタムDNAチップによる診断法の可能性を示した。

GOは本邦で昨年、発売された新しいユニークな抗がん剤である。私達は、GOと他剤との併用効果を3種のCD33(+)白血病株化細胞を用いて検討した。GOに対する感受性は細胞によりかなり異なったが、他の抗がん剤との併用効果について調べてみると、殆ど差を認めなかった。すなわち、いずれの細胞を用いてもGOはmitoxantroneと相乗作用、cytarabine、doxorubicin、idarubicin、etoposideおよび6-mercaptopurineと相加作用、methotrexateおよびvincristineと拮抗作用を示した。このことから臨床においてGOはmethotrexate、vincristineを除くすべての薬剤との併用において優れた抗腫瘍効果が期待される

F. 健康危険情報

無し

G. 研究発表

1. 論文発表

間野博行

- 1) Kano Y, Akutsu M, Tsunoda S, Izumi T, Kobayashi H, Mano H & Furukawa Y: Cytotoxic effects of histone deacetylase inhibitor FK228 (depsipeptide, formally named FR901228) in combination

with conventional anti-leukemia/lymphoma agents against human leukemia/lymphoma cell lines. *Invest New Drugs*, **25**: 31-40, 2007.

- 2) Choi YL, Kaneda R, Wada T, Fujiwara S, Soda M, Watanabe H, Kurashina K, Hatanaka H, Enomoto M, Takada S, Yamashita Y & Mano H: Identification of a constitutively active mutant of JAK3 by retroviral expression screening. *Leuk Res*, **31**: 203-209, 2007.
- 3) Yamashita Y, Ohashi J, Hirai Y, Choi YL, Kaneda R, Fujiwara S-i, Arai Y, Akutsu M, Tsutsumi C, Miyazaki Y, Usuki K, Teramura M, Mitani K, Kano Y, O'Neill MC, Urabe A, Tomonaga M, Ozawa K & Mano H: Gene expression profiles of CD133-positive fractions predict the survival of individuals with acute myeloid leukemia. *Cancer Genomics & Proteomics*, **3**: 169-182, 2006.
- 4) Yamada T, Katagiri H, Ishigaki Y, Ogihara T, Imai J, Uno K, Hasegawa Y, Gao J, Ishihara H, Nijjima A, Mano H, Aburatani H, Asano T & Oka Y: Signals from intra-abdominal fat modulate insulin and leptin sensitivity through different mechanisms: neuronal involvement in food-intake regulation. *Cell Metab*, **3**: 223-229, 2006.
- 5) Takada S, Wada T, Kaneda R, Choi YL, Yamashita Y & Mano H: Evidence for activation of Amh gene expression by steroidogenic factor 1. *Mech Dev*, **123**: 472-480, 2006.
- 6) Takada S, Ota J, Kansaku N, Yamashita H, Izumi T, Ishikawa M, Wada T, Kaneda R, Choi YL,

- Koinuma K, Fujiwara S, Aoki H, Kisanuki H, Yamashita Y & Mano H: Nucleotide sequence and embryonic expression of quail and duck Sox9 genes. *Gen Comp Endocrinol*, **145**: 208-213, 2006.
- 7) Takada S, Berezikov E, Yamashita Y, Lagos-Quintana M, Kloosterman WP, Enomoto M, Hatanaka H, Fujiwara S, Watanabe H, Soda M, Choi YL, Plasterk RH, Cuppen E & Mano H: Mouse microRNA profiles determined with a new and sensitive cloning method. *Nucleic Acids Res*, **34**: e115, 2006.
- 8) Taguchi J, Miyazaki Y, Tsutsumi C, Sawayama Y, Ando K, Tsushima H, Fukushima T, Hata T, Yoshida S, Kuriyama K, Honda S, Jinnai I, Mano H & Tomonaga M: Expression of the myeloperoxidase gene in AC133 positive leukemia cells relates to the prognosis of acute myeloid leukemia. *Leuk Res*, **30**: 1105-1112, 2006.
- 9) Omi T, Kumada M, Kamesaki T, Okuda H, Munkhtulga L, Yanagisawa Y, Utsumi N, Gotoh T, Hata A, Soma M, Umemura S, Ogihara T, Takahashi N, Tabara Y, Shimada K, Mano H, Kajii E, Miki T & Iwamoto S: An intronic variable number of tandem repeat polymorphisms of the cold-induced autoinflammatory syndrome 1 (CIAS1) gene modifies gene expression and is associated with essential hypertension. *Eur J Hum Genet*, 2006.
- 10) Mano H: Epigenetics and hematological disorders. *Rinsho Ketsueki*, **47**: 3-8, 2006.
- 11) Mano H: DNA microarray analysis of myelodysplastic syndrome. *Leuk Lymphoma*, **47**: 9-14, 2006.
- 12) Koinuma K, Yamashita Y, Liu W, Hatanaka H, Kurashina K, Wada T, Takada S, Kaneda R, Choi YL, Fujiwara SI, Miyakura Y, Nagai H & Mano H: Epigenetic silencing of AXIN2 in colorectal carcinoma with microsatellite instability. *Oncogene*, **25**: 139-146, 2006.
- 13) Kano Y, Akutsu M, Tsunoda S, Izumi T, Kobayashi H, Inoue K, Mori K, Fujii H, Mano H, Odgerel T & Furukawa Y: Schedule-dependent interactions between pemetrexed and cisplatin in human carcinoma cell lines in vitro. *Oncol Res*, **16**: 85-95, 2006.
- 14) Choi YL, Tsukasaki K, O'Neill M C, Yamada Y, Onimaru Y, Matsumoto K, Ohashi J, Yamashita Y, Tsutsumi S, Kaneda R, Takada S, Aburatani H, Kamihira S, Nakamura T, Tomonaga M & Mano H: A genomic analysis of adult T-cell leukemia. *Oncogene*, in press.
- 15) Berezikov E, van Tetering G, Verheul M, van de Belt J, van Laake L, Vos J, Verloop R, van de Wetering M, Guryev V, Takada S, van Zonneveld AJ, Mano H, Plasterk R & Cuppen E: Many novel mammalian microRNA candidates identified by extensive cloning and RAKE analysis. *Genome Res*, **16**: 1289-1298, 2006.
- 小澤敬也
- 1) Ideno J, Mizukami H, Kakehashi A, Saito Y, Okada T, Urabe M, Kume A, Kuroki M, Kawakami M, Ishibashi S & Ozawa K: Prevention of diabetic retinopathy by intraocular soluble flt-1 gene transfer in a spontaneously diabetic rat model. *Int J Mol Med*, **19**: 75-79, 2007.

- 2) Ishiwata A, Mimuro J, Kashiwakura Y, Niimura M, Takano K, Ohmori T, Madoiwa S, Mizukami H, Okada T, Naka H, Yoshioka A, Ozawa K & Sakata Y: Phenotype correction of hemophilia A mice with adeno-associated virus vectors carrying the B domain-deleted canine factor VIII gene. *Thromb Res*, **118**: 627-635, 2006.
- 3) Kawano-Yamamoto C, Muroi K, Nagatsuka Y, Higuchi M, Kikuchi S, Nagai T, Hakomori SI & Ozawa K: Establishment and characterization of a new erythroblastic leukemia cell line, EEB: phosphatidylglucoside-mediated erythroid differentiation and apoptosis. *Leuk Res*, **30**: 829-839, 2006.
- 4) Li XG, Okada T, Kodera M, Nara Y, Takino N, Muramatsu C, Ikeguchi K, Urano F, Ichinose H, Metzger D, Chambon P, Nakano I, Ozawa K & Muramatsu S: Viral-mediated temporally controlled dopamine production in a rat model of Parkinson disease. *Mol Ther*, **13**: 160-166, 2006.
- 5) Madoiwa S, Someya T, Hironaka M, Kobayashi H, Ohmori T, Mimuro J, Sugiyama Y, Morita T, Nishimura Y, Tarumoto T, Ozawa K, Saito K & Sakata Y: Annexin 2 and hemorrhagic disorder in vascular intimal carcinomatosis. *Thromb Res*, **119**: 229-240, 2007.
- 6) Meguro-Hashimoto A, Takatoku M, Ohmine K, Toshima M, Mori M, Nagai T, Muroi K & Ozawa K: The usefulness of magnetic resonance imaging (MRI) for disseminated trichosporosis of the gastrocnemius muscles. *J Infect*, **53**: e135-138, 2006.
- 7) Miyakoshi S, Kami M, Yuji K, Matsumura T, Takatoku M, Sasaki M, Narimatsu H, Fujii T, Kawabata M, Taniguchi S, Ozawa K & Oshimi K: Severe pulmonary complications in Japanese patients after bortezomib treatment for refractory multiple myeloma. *Blood*, **107**: 3492-3494, 2006.
- 8) Mizukami H, Mimuro J, Ogura T, Okada T, Urabe M, Kume A, Sakata Y & Ozawa K: Adipose tissue as a novel target for in vivo gene transfer by adeno-associated viral vectors. *Hum Gene Ther*, **17**: 921-928, 2006.
- 9) Nagashima T, Muroi K, Kawano-Yamamoto C, Miyoshi T, Tataka R, Meguro A, Fujiwara S, Obara Y, Oh I, Kikuchi S, Sato K, Matsuyama T, Toshima M, Ohmine K, Ozaki K, Takatoku M, Mori M, Nagai T & Ozawa K: Pleocytosis after hemopoietic stem cell transplantation. *Leuk Lymphoma*, **47**: 1613-1617, 2006.
- 10) Nakata M, Okada T, Ozawa K & Yada T: Resistin induces insulin resistance in pancreatic islets to impair glucose-induced insulin release. *Biochem Biophys Res Commun*, **353**: 1046-1051, 2007.
- 11) Ogura T, Mizukami H, Mimuro J, Madoiwa S, Okada T, Matsushita T, Urabe M, Kume A, Hamada H, Yoshikawa H, Sakata Y & Ozawa K: Utility of intraperitoneal administration as a route of AAV serotype 5 vector-mediated neonatal gene transfer. *J Gene Med*, **8**: 990-997, 2006.
- 12) Ohmori T, Mimuro J, Takano K, Madoiwa S, Kashiwakura Y, Ishiwata A, Niimura M, Mitomo K,

- Tabata T, Hasegawa M, Ozawa K & Sakata Y: Efficient expression of a transgene in platelets using simian immunodeficiency virus-based vector harboring glycoprotein Ibalph promoter: in vivo model for platelet-targeting gene therapy. *Faseb J*, **20**: 1522-1524, 2006.
- 13) Okada T, Uchibori R, Iwata-Okada M, Takahashi M, Nomoto T, Nonaka-Sarukawa M, Ito T, Liu Y, Mizukami H, Kume A, Kobayashi E & Ozawa K: A histone deacetylase inhibitor enhances recombinant adeno-associated virus-mediated gene expression in tumor cells. *Mol Ther*, **13**: 738-746, 2006.
- 14) Ozaki K, Hishiya A, Hatanaka K, Nakajima H, Wang G, Hwu P, Kitamura T, Ozawa K, Leonard WJ & Nosaka T: Overexpression of interleukin 21 induces expansion of hematopoietic progenitor cells. *Int J Hematol*, **84**: 224-230, 2006.
- 15) Sato K, Ozaki K, Oh I, Meguro A, Hatanaka K, Nagai T, Muroi K & Ozawa K: Nitric oxide plays a critical role in suppression of T-cell proliferation by mesenchymal stem cells. *Blood*, **109**: 228-234, 2007.
- 16) Sutheesophon K, Kobayashi Y, Takatoku MA, Ozawa K, Kano Y, Ishii H & Furukawa Y: Histone deacetylase inhibitor depsipeptide (FK228) induces apoptosis in leukemic cells by facilitating mitochondrial translocation of Bax, which is enhanced by the proteasome inhibitor bortezomib. *Acta Haematol*, **115**: 78-90, 2006.
- 17) Takei Y, Mizukami H, Saga Y, Yoshimura I, Hasumi Y, Takayama T, Kohno T, Matsushita T, Okada T, Kume A, Suzuki M & Ozawa K: Suppression of ovarian cancer by muscle-mediated expression of soluble VEGFR-1/Flt-1 using adeno-associated virus serotype 1-derived vector. *Int J Cancer*, **120**: 278-284, 2007.
- 18) Uesawa M, Sato K, Ozaki K, Nagai T, Muroi K & Ozawa K: Bone marrow metastasis of malignant melanoma. *Intern Med*, **45**: 341, 2006.
- 19) Urabe M, Nakakura T, Xin KQ, Obara Y, Mizukami H, Kume A, Kotin RM & Ozawa K: Scalable generation of high-titer recombinant adeno-associated virus type 5 in insect cells. *J Virol*, **80**: 1874-1885, 2006.
- 20) Urabe M, Xin KQ, Obara Y, Nakakura T, Mizukami H, Kume A, Okuda K & Ozawa K: Removal of empty capsids from type 1 adeno-associated virus vector stocks by anion-exchange chromatography potentiates transgene expression. *Mol Ther*, **13**: 823-828, 2006.
- 21) Zhang Y, Wang C, Mizukami H, Itoh H, Kusama M, Ozawa K & Jinbu Y: Increased expression and activation of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) in O-1N: hamster oral squamous cell carcinoma with high potential lymph node metastasis. *J Exp Clin Cancer Res*, **25**: 417-423, 2006.
- 加納泰彦
1. Kano Y, Akutsu M, Tsunoda S, Izumi T, Kobayashi H, Inoue K, Mori K, Fujii H, Mano H, Odgerel T, Furukawa Y. Schedule-dependent interactions between pemetrexed and cisplatin in human carcinoma cell lines in vitro. *Oncol Res*. **16**: 85-95, 2006.
2. Yamashita Y, Ohashi J, Choi Y,

- Kaneda R, Fujiwara S, Arai Y, Skutsu, Tsutsumi C, Miyazaki Y, Usuki K, Teramura M, Mitani K, Kano Y, Oneill MC, Urabe A, Tomonaga M, Ozawa K, Mano H. Gene expression profiles of CD133-positive fractions predict the survival of individuals with acute myeloid leukemia. *Cancer Genomics Proteomics*. 3:169-182, 2006.
3. Yamada H, Arakawa Y, Saito S, Agawa M, Kano Y, Horiguchi-Yamada J. Depsipeptide-resistant KU812 cells show reversible P-glycoprotein expression, hyper-acetylated histones, and modulated gene expression profile. *Leuk Res*. 30: 723-34, 2006.
 4. Kobayashi Y, Ohtsuki M, Murakami T, Kobayashi T, Sutheesophon K, Kitayama H, Kano Y, Kusano E, Nakagawa H, Furukawa Y. Histone deacetylase inhibitor FK228 suppresses the Ras-MAP kinase signaling pathway by upregulating Rap1 and induces apoptosis in malignant melanoma. *Oncogene*. 25: 512-24, 2006.
 5. Sutheesophon K, Kobayashi Y, Takatoku MA, Ozawa K, Kano Y, Ishii H, Furukawa Y. Histone deacetylase inhibitor depsipeptide (FK228) induces apoptosis in leukemic cells by facilitating mitochondrial translocation of Bax, which is enhanced by the proteasome inhibitor bortezomib. *Acta Haematol*. 115: 78-90, 2006.
 6. Mori K, Kamiyama Y, Kondo T, Kano Y, Kodama T. Pilot phase II study of weekly chemotherapy with paclitaxel and carboplatin for refractory or relapsed small-cell lung cancer. *Cancer Chemother Pharmacol*. 58: 86-90, 2006.
 7. Kano Y, Akutsu M, Tsunoda S, Izumi T, Kobayashi H, Mano H, Furukawa Y. Cytotoxic effects of histone deacetylase inhibitor FK228 (depsipeptide, formally named FR901228) in combination with conventional anti-leukemia/lymphoma agents against human leukemia/lymphoma cell lines. *Invest New Drugs*. 25: 31-40, 2007.
 8. Furukawa Y, Vu HA, Akutsu M, Odgerel T, Izumi T, Tsunoda S, Matsuo Y, Kirito K, Sato Y, Mano H, Kano Y. Divergent cytotoxic effects of PKC412 in combination with conventional antileukemic agents in FLT3 mutation-positive versus negative leukemia cell lines. *Leukemia*. (in press)
 9. Mori K, Kamiyama Y, Kondo T, Kano Y, Kodama T. Phase II study of weekly chemotherapy with paclitaxel and gemcitabine as second-line treatment for advanced non-small cell lung cancer after treatment with platinum-based chemotherapy. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2006 Nov 10; [Epub ahead of print]
- H. 知的財産権の出願・登録状況
 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

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）
分担研究報告書
「DNA チップによる急性白血球の新規分類法提案」に関する研究

分担研究者： 間野 博行 自治医科大学医学部 教授

研究要旨：我々は広く白血病患者骨髄より造血幹細胞相当分画のみを純化し保存する「Blast Bank」を設立した。同バンクに既に保存された700例を越えるサンプルの中から、急性骨髄性白血病99例について、全ヒト遺伝子の発現量解析をDNAチップを用いて行った。得られた膨大な遺伝子発現データおよび各症例の臨床情報フォローアップデータより、初回寛解導入療法の成績にリンクする遺伝子、治療開始後365日の時点で寛解を維持できているか否かにリンクする遺伝子、など様々な臨床データに発現量が連関する遺伝子セットを抽出することに成功した。さらにこれら遺伝子の発現量を基にAMLの新たなサブグループを定義可能なこと、またこれらサブグループが患者長期予後に連関することなども明らかにした。

A 研究目的

現在なお正確な診断が困難であり、かつ有効な治療法の存在しない白血病類縁疾患が数多くある。各患者の有効な治療法を選択する上でも正確な鑑別診断は必須であり、そのためには新たな分子診断マーカーの同定が最も重要であると考えられる。DNAチップは数千-数万の遺伝子発現変化を簡便に解析可能にする最新の研究システムであり、上述の目的に適したスクリーニング法であると期待される。

我々は白血病などの特発性血液疾患の多くが造血幹細胞（あるいはその近傍）の異常に起因することに着目し、これら疾患患者のフレッシュ検体より造血幹細胞相当分画のみを純化しストックするバンク事業「Blast Bank」をスタートした。本バンク細胞を用いてDNAチップ解析を行うことで、（1）白血病の鑑別診断に有効な遺伝子マーカーの同定、（2）白血病の薬剤感受性に関与する遺伝子マーカーの同定、（3）病期が進行する白血病類縁疾患の病期特異的分子マーカーの同定、等を本研究計画で目指した

B 研究方法

上記検体群を用いて以下のようにDNAチップ解析を行った。細胞よりトータルRNAを抽出し、これをT7 RNAポリメラーゼを用いてまずin vitroにて増幅した。さらにこれをもとに二本鎖cDNAを合成し、ピオチンCTPの存在下で再びT7 RNAポリメラーゼと反応させることで、ピオチン標識化したcomplementary RNA（cRNA）を作製した。このピオチン化cRNAをDNAチップとハイブリダイズさせ、洗浄後、蛍光色素PE結合アビジンと反応させた。この

DNAチップ上のcRNA結合スポットをAffymetrix社の蛍光スキャナーで励起させ、各スポットの蛍光強度を測定した後統計処理をGeneSpring 7.0 (Silicon Genetics社)にて行った。

（倫理面への配慮）

検体収集に関しては自治医科大学及び栃木県立がんセンターの生命倫理委員会認可を受けた事業として開始し、連結可能匿名化のもとで研究を行った。

C 研究結果

1) ATLのアレイ解析

ATLの慢性期から急性期への移行メカニズムを明らかにするべく、慢性期ATL 22例、急性期ATL 19例の患者末梢血よりCD4陽性白血病分画を純化し、Affymetrix HGU133 A&Bマイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析を行った。その結果、慢性型と急性型ATLが互いに異なった遺伝子発現プロファイルを有すること、また特定のサブセットの遺伝子発現量に基づき病期を予測することが可能なことが明らかになった。さらにATLの病期進行機構を明らかにするべく、我々の遺伝子発現データベースより、急性期ATLにおいてのみ発現する遺伝子の抽出を試みたところ、興味深いことに肝細胞成長因子（hepatocyte growth factor: HGF）の細胞表面受容体であるMETチロシンキナーゼ遺伝子がATLの急性型の一部においてのみ高発現することが示された。しかも興味深いことにHGFの血中濃度は急性型のみならず慢性型ATLにおいても極めて高い値になっていることが示された。ATLは活性型T細胞の腫瘍であり、多くのリンフ

ォカインを産生することが知られる。その中にはIL-1等もあり、これらは白血球あるいは繊維芽細胞に働いてHGF発現を誘導する。以上よりATLは、間接的にHGFを誘導し血中HGF濃度が高値となっており、そのような環境下においてMETの高発現が生じたATLクローンが選択的に増殖し、急性型へと移行する可能性が示唆された。

2) マイクロRNA (miRNA) 解析

miRNAは個体の発生・分化に重要なだけでなく、癌を初めとする様々な疾患の病態に関与することが予想されている。しかしこれまでのmiRNAプロファイル法はいずれも数百マイクログラムのRNAをその解析に必要としており、実際の臨床検体を用いた解析は困難であった。我々は新たに、数ngのRNAから10万クローン以上のmiRNAを簡単に単離・同定する新しいmiRNAクローニング法(miRNA amplification profiling: mRAP)を開発した。まず哺乳動物における全身のmiRNAボディマップを決定するために、様々な発達レベルのマウス胎児および、成マウスの様々な臓器におけるmiRNAのプロファイリングを行い、miRNAの発現が発生段階、時間、空間において精妙に制御されていることを明らかにした。さらにmRAP法を用いてCD133陽性白血病芽球のmiRNAプロファイリングを行った結果、新規miRNAを百種類以上同定すると共に疾患特異的なmiRNAプロファイルを明らかにすることが出来た。さらに同定されたmiRNAの発現ライブラリーを構築し、その機能スクリーニングをする過程で形質転換能を有するmiRNAの同定に成功した。興味深いことにこのmiRNAは一部の白血病患者検体で高発現していることが確認された。

今後は白血病のマイクロアレイ解析について症例数を増加させるだけでなく、miRNAの臨床検体におけるプロファイリングもさらに拡充するとともに、大規模塩基配列解析事業も展開予定である。

D&E. 考察及び結論

本研究事業において各種白血病類縁疾患の大規模な純化細胞DNAチップ解析を行い、膨大な遺伝子発現データを得た。これらを元に「発現量から統計的有意に診断」を可能にする遺伝子

群の抽出に成功し、カスタムDNAチップによる診断法の可能性を示した。一方、診断マーカーだけでなく、実際の病因に関与する遺伝子もATLプロジェクトの解析結果に示される通り同定可能なことが明らかになった。

F. 健康危険情報

無し

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kano Y, Akutsu M, Tsunoda S, Izumi T, Kobayashi H, Mano H & Furukawa Y: Cytotoxic effects of histone deacetylase inhibitor FK228 (depsipeptide, formally named FR901228) in combination with conventional anti-leukemia/lymphoma agents against human leukemia/lymphoma cell lines. *Invest New Drugs*, **25**: 31-40, 2007.
- 2) Choi YL, Kaneda R, Wada T, Fujiwara S, Soda M, Watanabe H, Kurashina K, Hatanaka H, Enomoto M, Takada S, Yamashita Y & Mano H: Identification of a constitutively active mutant of JAK3 by retroviral expression screening. *Leuk Res*, **31**: 203-209, 2007.
- 3) Yamashita Y, Ohashi J, Hirai Y, Choi YL, Kaneda R, Fujiwara S-i, Arai Y, Akutsu M, Tsutsumi C, Miyazaki Y, Usuki K, Teramura M, Mitani K, Kano Y, O'Neill MC, Urabe A, Tomonaga M, Ozawa K & Mano H: Gene expression profiles of CD133-positive fractions predict the survival of individuals with acute myeloid leukemia. *Cancer Genomics & Proteomics*, **3**: 169-182, 2006.
- 4) Yamada T, Katagiri H, Ishigaki Y, Ogihara T, Imai J, Uno K, Hasegawa Y, Gao J, Ishihara H, Nijijima A, Mano H, Aburatani H, Asano T & Oka Y: Signals from intra-abdominal fat modulate insulin and leptin sensitivity through different mechanisms: neuronal involvement in food-intake regulation. *Cell Metab*, **3**: 223-229, 2006.
- 5) Takada S, Wada T, Kaneda R, Choi YL, Yamashita Y & Mano H: Evidence for activation of Amh gene expression by steroidogenic factor 1. *Mech Dev*, **123**: 472-480, 2006.
- 6) Takada S, Ota J, Kansaku N, Yamashita H, Izumi T, Ishikawa M, Wada T, Kaneda R, Choi YL, Koinuma K, Fujiwara S, Aoki H, Kisanuki H, Yamashita Y & Mano H: Nucleotide sequence and embryonic expression of quail and duck Sox9 genes. *Gen Comp Endocrinol*, **145**: 208-213, 2006.
- 7) Takada S, Berezikov E, Yamashita Y, Lagos-Quintana M, Kloosterman WP, Enomoto M, Hatanaka H, Fujiwara S,

- Watanabe H, Soda M, Choi YL, Plasterk RH, Cuppen E & Mano H: Mouse microRNA profiles determined with a new and sensitive cloning method. *Nucleic Acids Res*, **34**: e115, 2006.
- 8) Taguchi J, Miyazaki Y, Tsutsumi C, Sawayama Y, Ando K, Tsushima H, Fukushima T, Hata T, Yoshida S, Kuriyama K, Honda S, Jinnai I, Mano H & Tomonaga M: Expression of the myeloperoxidase gene in AC133 positive leukemia cells relates to the prognosis of acute myeloid leukemia. *Leuk Res*, **30**: 1105-1112, 2006.
- 9) Omi T, Kumada M, Kamesaki T, Okuda H, Munkhtulga L, Yanagisawa Y, Utsumi N, Gotoh T, Hata A, Soma M, Umemura S, Ogihara T, Takahashi N, Tabara Y, Shimada K, Mano H, Kajii E, Miki T & Iwamoto S: An intronic variable number of tandem repeat polymorphisms of the cold-induced autoinflammatory syndrome 1 (CIAS1) gene modifies gene expression and is associated with essential hypertension. *Eur J Hum Genet*, 2006.
- 10) Mano H: Epigenetics and hematological disorders. *Rinsho Ketsueki*, **47**: 3-8, 2006.
- 11) Mano H: DNA microarray analysis of myelodysplastic syndrome. *Leuk Lymphoma*, **47**: 9-14, 2006.
- 12) Koinuma K, Yamashita Y, Liu W, Hatanaka H, Kurashina K, Wada T, Takada S, Kaneda R, Choi YL, Fujiwara SI, Miyakura Y, Nagai H & Mano H: Epigenetic silencing of AXIN2 in colorectal carcinoma with microsatellite instability. *Oncogene*, **25**: 139-146, 2006.
- 13) Kano Y, Akutsu M, Tsunoda S, Izumi T, Kobayashi H, Inoue K, Mori K, Fujii H, Mano H, Odgerel T & Furukawa Y: Schedule-dependent interactions between pemetrexed and cisplatin in human carcinoma cell lines in vitro. *Oncol Res*, **16**: 85-95, 2006.
- 14) Choi YL, Tsukasaki K, O'Neill M C, Yamada Y, Onimaru Y, Matsumoto K, Ohashi J, Yamashita Y, Tsutsumi S, Kaneda R, Takada S, Aburatani H, Kamihira S, Nakamura T, Tomonaga M & Mano H: A genomic analysis of adult T-cell leukemia. *Oncogene*, in press.
- 15) Berezikov E, van Tetering G, Verheul M, van de Belt J, van Laake L, Vos J, Verloop R, van de Wetering M, Guryev V, Takada S, van Zonneveld AJ, Mano H, Plasterk R & Cuppen E: Many novel mammalian microRNA candidates identified by extensive cloning and RAKE analysis. *Genome Res*, **16**: 1289-1298, 2006.

H. 知的財産権の出願・登録状況

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

出願番号：特願2006-277718。出願日：平成18年10月11日。発明名称：肺がん特異的融合遺伝子および肺がん治療剤

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）

分担研究報告書

「DNAチップによる急性白血病の新規分類法提案」に関する研究

分担研究者： 小澤 敬也 自治医科大学医学部 教授

研究要旨：DNAチップによる各種特発性血液疾患の大規模な解析を行う目的で、様々な血液疾患患者骨髄よりCD133陽性造血幹細胞分画を純化保存する検体収集事業を行った。また本収集のために、自治医科大学だけでなく我が国の主要臨床施設との大規模な共同研究システムを構築し、全国規模でのサンプル収集を行った。平成19年度初頭で800例を超える検体の保存に成功した。またCD133陽性幹細胞分画だけでなく、例えば成人T細胞性白血病(ATL)の解析にはCD4陽性成熟T細胞分画の純化収集を、さらに多発性骨髄腫の解析にはCD188陽性形質細胞分画の純化収集を行った。これらを用いたDNAチップ解析を実行し、例えばATLについては病期進行にHGF-MET系の活性化が重要な役割を担うことを明らかにした。さらに新しいベクター導入システムを用いた造血幹細胞への高効率遺伝子導入法の開発も行った。その際にアデノ随伴ウイルスのサブタイプによる宿主特異性についても多くの知見を得た。

A 研究目的

現在なお正確な診断が困難であり、かつ有効な治療法の存在しない白血病類縁疾患が数多くある。各患者の有効な治療法を選択する上でも正確な鑑別診断は必須であり、そのためには新たな分子診断マーカーの同定が最も重要であると考えられる。DNAチップは数千～数万種類の遺伝子発現変化を簡便に解析可能にする最新の研究システムであり、上述の目的に適したスクリーニング法であると期待される。

我々は白血病などの特発性血液疾患の多くが造血幹細胞（あるいはその近傍）の異常に起因することに着目し、これら疾患患者のフレッシュ検体より造血幹細胞相当分画のみを純化しストックするバンク事業「Blast Bank」をスタートした。本バンク細胞を用いてDNAチップ解析を行うことで、疾患の種類に拘わらず分化レベルがほぼ均一な細胞群を比較することが可能になり、疾患の病態解明に有用な知見が得られると期待された。また同様な解析法を成人T細胞性白血病(ATL)などに対しても行った。これらの膨大な知見を元に、白血病関連疾患の診断用カスタムDNAチップの開発、および新規分指標的療法の開発を行う。

さらに将来の遺伝子治療に向けた基盤技術開発として、アデノ随伴ウイルスのサブタイプ依存性宿主感染高率の解明、および造血幹細胞への高効率遺伝子導入法の開発などを行う。

B 研究方法

1) 造血幹細胞特異的マーカーであるCD133に対するアフィニティカラムを用いて、白血病を含む各種特発性血液疾患患者骨髄より造血幹細胞分画を純化保存し、これをBlast Bankと名付けた。平成19年3月現在で800例を超えるサンプルの保存に成功しており、これは純化細胞を用いたゲノミクスプロジェクトとしては世界最大級である。

（倫理面への配慮）

検体収集に関しては自治医科大学及び栃木県立がんセンターの生命倫理委員会認可を受けた事業として開始し、連結可能匿名化のもとで研究を行った。

C 研究結果

1) 平成11年8月よりBlast Bankを立ち上げ既に800例を超えるサンプルのストックに成功した。現在本バンク中に130例を超える急性骨髄性白血病(AML)幹細胞サンプルが保存されており、世界的にも極めて貴重なリソースとなっている。これらBlast Bank分画を用いた解析が旧来の骨髄単核球全体を用いたものに比べ実際に偽陽性データが少ないこと、またバンクに用いるAC133陽性細胞がこれら疾患の責任クローンを含むことなども既に確認している。

慢性期ATL患者19例、急性期ATL患者22例の末梢血よりCD4陽性分画のみを純化保存するプロジェクトを行った。得られた純化ATL細胞をAffymetrix社HGU133マイクロアレイによって解析する事でATLの世界最大の遺伝子発現デー

データベースを構築した。本データベースを用いて急性期特異的な発現を示す遺伝子セットを抽出したところhepatocyte growth-factor (HGF)の受容体であるMET遺伝子が同定された。しかも患者血漿中のHGF濃度を測定したところ、慢性期、急性期共にATL患者においてHGF濃度が亢進している事が確認された。以上よりATLの病期進展機構としてHGF-MET系の活性化の存在が示唆された。

2) SIV, AAVなど様々な遺伝子導入ベクターを用いたマウス各臓器への遺伝子導入法開発を試みた。導入遺伝子の発現箇所依存したAAVサブタイプの解明を行い、さらにSIVを用いて血小板に外来遺伝子を発現させる手法の開発にも成功した。

D&E. 考察及び結論

本研究事業において各種白血病類縁疾患の大規模な純化細胞 DNA チップ解析を行い、膨大な遺伝子発現データを得た。これらを元に「発現量から統計的に有意に診断」を可能にする遺伝子群の抽出に成功し、カスタム DNA チップによる診断法の可能性を示した。

F. 健康危険情報

無し

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ideno J, Mizukami H, Kakehashi A, Saito Y, Okada T, Urabe M, Kume A, Kuroki M, Kawakami M, Ishibashi S & Ozawa K: Prevention of diabetic retinopathy by intraocular soluble flt-1 gene transfer in a spontaneously diabetic rat model. *Int J Mol Med*, **19**: 75-79, 2007.
- 2) Ishiwata A, Mimuro J, Kashiwakura Y, Niimura M, Takano K, Ohmori T, Madoiwa S, Mizukami H, Okada T, Naka H, Yoshioka A, Ozawa K & Sakata Y: Phenotype correction of hemophilia A mice with adeno-associated virus vectors carrying the B domain-deleted canine factor VIII gene. *Thromb Res*, **118**: 627-635, 2006.
- 3) Kawano-Yamamoto C, Muroi K, Nagatsuka Y, Higuchi M, Kikuchi S, Nagai T, Hakomori SI & Ozawa K: Establishment and characterization of a new erythroblastic leukemia cell line, EEB: phosphatidylinositol-mediated erythroid differentiation and apoptosis. *Leuk Res*, **30**: 829-839, 2006.
- 4) Li XG, Okada T, Kodera M, Nara Y, Takino N, Muramatsu C, Ikeguchi K, Urano F, Ichinose H, Metzger D, Chambon P, Nakano I, Ozawa K & Muramatsu S: Viral-mediated temporally controlled dopamine production in a rat model of Parkinson disease. *Mol Ther*, **13**: 160-166, 2006.
- 5) Madoiwa S, Someya T, Hironaka M, Kobayashi H, Ohmori T, Mimuro J, Sugiyama Y, Morita T, Nishimura Y, Tarumoto T, Ozawa K, Saito K & Sakata Y: Annexin 2 and hemorrhagic disorder in vascular intimal carcinomatosis. *Thromb Res*, **119**: 229-240, 2007.
- 6) Meguro-Hashimoto A, Takatoku M, Ohmine K, Toshima M, Mori M, Nagai T, Muroi K & Ozawa K: The usefulness of magnetic resonance imaging (MRI) for disseminated trichosporosis of the gastrocnemius muscles. *J Infect*, **53**: e135-138, 2006.
- 7) Miyakoshi S, Kami M, Yuji K, Matsumura T, Takatoku M, Sasaki M, Narimatsu H, Fujii T, Kawabata M, Taniguchi S, Ozawa K & Oshimi K: Severe pulmonary complications in Japanese patients after bortezomib treatment for refractory multiple myeloma. *Blood*, **107**: 3492-3494, 2006.
- 8) Mizukami H, Mimuro J, Ogura T, Okada T, Urabe M, Kume A, Sakata Y & Ozawa K: Adipose tissue as a novel target for in vivo gene transfer by adeno-associated viral vectors. *Hum Gene Ther*, **17**: 921-928, 2006.
- 9) Nagashima T, Muroi K, Kawano-Yamamoto C, Miyoshi T, Tatara R, Meguro A, Fujiwara S, Obara Y, Oh I, Kikuchi S, Sato K, Matsuyama T, Toshima M, Ohmine K, Ozaki K, Takatoku M, Mori M, Nagai T & Ozawa K: Pleocytosis after hemopoietic stem cell transplantation. *Leuk Lymphoma*, **47**: 1613-1617, 2006.
- 10) Nakata M, Okada T, Ozawa K & Yada T: Resistin induces insulin resistance in pancreatic islets to impair glucose-induced insulin release. *Biochem Biophys Res Commun*, **353**: 1046-1051, 2007.
- 11) Ogura T, Mizukami H, Mimuro J, Madoiwa S, Okada T, Matsushita T, Urabe M, Kume A, Hamada H, Yoshikawa H, Sakata Y & Ozawa K: Utility of intraperitoneal administration as a route of AAV serotype 5 vector-mediated neonatal gene transfer. *J Gene Med*, **8**: 990-997, 2006.
- 12) Ohmori T, Mimuro J, Takano K, Madoiwa S, Kashiwakura Y, Ishiwata A, Niimura M, Mitomo K, Tabata T, Hasegawa M, Ozawa K & Sakata Y: Efficient expression of a transgene in platelets using simian immunodeficiency virus-based vector harboring glycoprotein Ibalph promoter: in vivo model for

- platelet-targeting gene therapy. *Faseb J*, **20**: 1522-1524, 2006. なし
- 13) Okada T, Uchibori R, Iwata-Okada M, Takahashi M, Nomoto T, Nonaka-Sarukawa M, Ito T, Liu Y, Mizukami H, Kume A, Kobayashi E & Ozawa K: A histone deacetylase inhibitor enhances recombinant adeno-associated virus-mediated gene expression in tumor cells. *Mol Ther*, **13**: 738-746, 2006.
 - 14) Ozaki K, Hishiya A, Hatanaka K, Nakajima H, Wang G, Hwu P, Kitamura T, Ozawa K, Leonard WJ & Nosaka T: Overexpression of interleukin 21 induces expansion of hematopoietic progenitor cells. *Int J Hematol*, **84**: 224-230, 2006.
 - 15) Sato K, Ozaki K, Oh I, Meguro A, Hatanaka K, Nagai T, Muroi K & Ozawa K: Nitric oxide plays a critical role in suppression of T-cell proliferation by mesenchymal stem cells. *Blood*, **109**: 228-234, 2007.
 - 16) Sutheesophon K, Kobayashi Y, Takatoku MA, Ozawa K, Kano Y, Ishii H & Furukawa Y: Histone deacetylase inhibitor depsipeptide (FK228) induces apoptosis in leukemic cells by facilitating mitochondrial translocation of Bax, which is enhanced by the proteasome inhibitor bortezomib. *Acta Haematol*, **115**: 78-90, 2006.
 - 17) Takei Y, Mizukami H, Saga Y, Yoshimura I, Hasumi Y, Takayama T, Kohno T, Matsushita T, Okada T, Kume A, Suzuki M & Ozawa K: Suppression of ovarian cancer by muscle-mediated expression of soluble VEGFR-1/Flt-1 using adeno-associated virus serotype 1-derived vector. *Int J Cancer*, **120**: 278-284, 2007.
 - 18) Uesawa M, Sato K, Ozaki K, Nagai T, Muroi K & Ozawa K: Bone marrow metastasis of malignant melanoma. *Intern Med*, **45**: 341, 2006.
 - 19) Urabe M, Nakakura T, Xin KQ, Obara Y, Mizukami H, Kume A, Kotin RM & Ozawa K: Scalable generation of high-titer recombinant adeno-associated virus type 5 in insect cells. *J Virol*, **80**: 1874-1885, 2006.
 - 20) Urabe M, Xin KQ, Obara Y, Nakakura T, Mizukami H, Kume A, Okuda K & Ozawa K: Removal of empty capsids from type 1 adeno-associated virus vector stocks by anion-exchange chromatography potentiates transgene expression. *Mol Ther*, **13**: 823-828, 2006.
 - 21) Zhang Y, Wang C, Mizukami H, Itoh H, Kusama M, Ozawa K & Jinbu Y: Increased expression and activation of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) in O-1N: hamster oral squamous cell carcinoma with high potential lymph node metastasis. *J Exp Clin Cancer Res*, **25**: 417-423, 2006.

H. 知的財産権の出願・登録状況

「Farnesyltransferase inhibitor R115777 と paclitaxel の併用効果」に関する研究

分担研究者： 加納康彦
栃木県立がんセンター 副病院長

研究要旨： Farnesyltransferase inhibitor(FTI)は FT を標的とする新しいタイプの抗がん剤で Ras を含む広範なタンパクの farnesyl 化を抑制する。R115777 (tipifarnib)は FTI の一種で、膵臓がん、肺がん、大腸がんに対し期待された効果を認めなかったものの、乳がんや白血病で有効性が報告され注目されている。私達は tipifarnib が白血病株化細胞において、mitotic inhibitor と相乗的に作用することを観察したが(unpublished data)、乳がんをはじめ広く固形がんで使用されている paclitaxel との併用について、その至適投与スケジュールについて検討を行った。ヒトがん株化細胞として MDA-MB-231 (乳がん)、A549 (肺がん)、PA1 (卵巣がん)、培養液として RPMI1640+10%FCS を用いた。いずれの細胞の併用実験においても、tipifarnib と paclitaxel は同時投与、および、tipifarnib を先行させた場合、強い相乗作用を示した。一方、paclitaxel を先行させた場合は相加作用にとどまった。これらの結果から tipifarnib と paclitaxel 併用における至適投与スケジュールは両者の同時投与、または tipifarnib 先行投与で、この結果は臨床プロトコルの作成に有益と思われる。

A 研究目的

Ras の活性化はがんの約 30%に認められ、がんの発症、増殖に深く関与している。Ras は farnesyl 化を受けて活性化されるが、この farnesyl 化は Farnesyltransferase (FT)によって触媒される。Farnesyltransferase inhibitors (FTIs)はこの FT を標的とした新しいタイプの抗がん剤で Ras を含む広範なタンパクの farnesyl 化を抑制する。FTI の R115777(tipifarnib)は臨床試験で膵臓がん、肺がん、大腸がんに対し期待された効果を認めなかったが、乳がんや白血病の臨床試験で有効性が報告され期待を集めている。その一方、当初、FTIs の分子標的は Ras タンパク質の活性の抑制にあると考えられていたが、Ras 活性化変異と FTI の抗腫瘍効果が必ず一致せず、詳しい作用機序は現在まで不明である。

臨床における multigenic ながんに対する治療は、一般に multitargeted な併用療法が支持されている。私達は tipifarnib が白血病株化細胞において、mitotic inhibitor と相乗的に作用することを観察したが(unpublished data)、乳がんをはじめ広く固形がんで使用されている paclitaxel との併用について、その至適投与スケジュールについて検討を行った。

B 研究方法

ヒトがん株化細胞として MDA-MB-231 (乳がん)、A549 (肺がん)、PA1 (卵巣がん)、培養液として RPMI1640+10%FCS を用いた。各種濃度の tipifarnib と paclitaxel を 1) tipifarnib + paclitaxel、2) tipifarnib→paclitaxel、3) paclitaxel→tipifarnib のスケジュールで各 24 時間加え培養し、4 ないし 3 日後、MTT assay により dose-response curve を得、IC₅₀における併用効果を isobologram (Steel & Peckham) で判定した。

(倫理面への配慮)

一般に使用されている株化細胞を用いた実験のため不要。

C 研究結果

いずれの細胞の実験においても、tipifarnib と paclitaxel は同時投与の場合、および、tipifarnib を先行させた場合、強い相乗作用を示した。一方、paclitaxel を先行させた場合は相加作用にとどまった。細胞増殖抑制効果からみた tipifarnib と paclitaxel 併用における至適投与スケジュールは両者の同時投与、または tipifarnib 先行投与と考えられる

D&E 考察及び結論

私達は、tipifarnib について paclitaxel との併用効果を 3 種のヒト固形がん株化細胞と用いて 3 つの投与スケジュールで検討をおこなった。いずれの細胞を用いても tipifarnib は paclitaxel の併用では、同時投与、及び、tipifarnib 先行投与で、相乗作用、paclitaxel 先行投与で、相加作用を示した。この結果から臨床において tipifarnib と paclitaxel と併用する場合、同時投与ないし tipifarnib 先行が薦められる。Tipifarnib は白血病細胞株においても vinca alkaloids 及び taxanes と相乗的に働くことから (unpublished data)、これらの併用を試みる価値がある。私たちの分析では vinca alkaloids 及び taxanes は、同時併用において殆どの抗がん剤と相加、ないし拮抗作用を示しており、tipifarnib との併用で相乗作用を示すことは、興味ある現象である。Tipifarnib の作用機序、mitotic inhibitor と相乗的に働く機序は不明であり、さらに詳細な検討が必要である。

F. 健康危険情報
なし

G. 研究発表

1. Kano Y, Akutsu M, Tsunoda S, Izumi T, Kobayashi H, Inoue K, Mori K, Fujii H, Mano H, Odgerel T, Furukawa Y. Schedule-dependent interactions between pemetrexed and cisplatin in human carcinoma cell lines in vitro. *Oncol Res.* 16: 85-95, 2006.
2. Yamashita Y, Ohashi J, Choi Y, Kaneda R, Fujiwara S, Arai Y, Skutsu, Tsutsumi C, Miyazaki Y, Usuki K, Teramura M, Mitani K, Kano Y, Oneill MC, Urabe A, Tomonaga M, Ozawa K, Mano H. Gene expression profiles of CD133-positive fractions predict the survival of individuals with acute myeloid leukemia. *Cancer Genomics Proteomics.* 3:169-182, 2006.
3. Yamada H, Arakawa Y, Saito S, Agawa M, Kano Y, Horiguchi-Yamada J. Depsipeptide-resistant KU812 cells show reversible P-glycoprotein expression, hyper-acetylated histones, and modulated gene expression profile. *Leuk Res.* 30: 723-34, 2006.
4. Kobayashi Y, Ohtsuki M, Murakami T, Kobayashi T, Sutheesophon K, Kitayama H, Kano Y, Kusano E, Nakagawa H, Furukawa Y. Histone deacetylase inhibitor FK228 suppresses the Ras-MAP kinase signaling pathway by upregulating Rap1 and induces apoptosis in malignant melanoma. *Oncogene.* 25: 512-24, 2006.
5. Sutheesophon K, Kobayashi Y, Takatoku MA, Ozawa K, Kano Y, Ishii H, Furukawa Y. Histone deacetylase inhibitor depsipeptide (FK228) induces apoptosis in leukemic cells by facilitating mitochondrial translocation of Bax, which is enhanced by the proteasome inhibitor bortezomib. *Acta Haematol.* 115: 78-90, 2006.
6. Mori K, Kamiyama Y, Kondo T, Kano Y, Kodama T. Pilot phase II study of weekly chemotherapy with paclitaxel and carboplatin for refractory or relapsed small-cell lung cancer. *Cancer Chemother Pharmacol.* 58: 86-90, 2006.
7. Kano Y, Akutsu M, Tsunoda S, Izumi T, Kobayashi H, Mano H, Furukawa Y. Cytotoxic effects of histone deacetylase inhibitor FK228 (depsipeptide, formally named FR901228) in combination with conventional anti-leukemia/lymphoma agents against human leukemia/lymphoma

- cell lines. Invest New Drugs. 25: 31-40, 2007.
8. Furukawa Y, Vu HA, Akutsu M, Odgerel T, Izumi T, Tsunoda S, Matsuo Y, Kirito K, Sato Y, Mano H, Kano Y. Divergent cytotoxic effects of PKC412 in combination with conventional antileukemic agents in FLT3 mutation-positive versus negative leukemia cell lines. Leukemia. (in press)
 9. Mori K, Kamiyama Y, Kondo T, Kano Y, Kodama T. Phase II study of weekly chemotherapy with paclitaxel and gemcitabine as second-line treatment for advanced non-small cell lung cancer after treatment with platinum-based chemotherapy. Cancer Chemother Pharmacol. 2006 Nov 10; [Epub ahead of print]

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

研究成果の刊行に関する一覧表

主任研究者: 間野博行

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kano Y, Akutsu M, Tsunoda S, Izumi T, Kobayashi H, Mano H & Furukawa Y	Cytotoxic effects of histone deacetylase inhibitor FK228 (depsipeptide, formally named FR901228) in combination with conventional anti-leukemia/lymphoma agents against human leukemia/lymphoma cell lines.	<i>Invest New Drugs</i>		25 31-40	2007
Choi YL, Kaneda R, Wada T, Fujiwara S, Soda M, Watanabe H, Kurashina K, Hatanaka H, Enomoto M, Takada S, Yamashita Y & Mano H	Identification of a constitutively active mutant of JAK3 by retroviral expression screening.	<i>Leuk Res</i>		31 203-209	2007
Yamashita Y, Ohashi J, Hirai Y, Choi YL, Kaneda R, Fujiwara S-i, Arai Y, Akutsu M, Tsutsumi C, Miyazaki Y, Usuki K, Teramura M, Mitani K, Kano Y, O'Neill MC, Urabe A, Tomonaga M, Ozawa K & Mano H	Gene expression profiles of CD133-positive fractions predict the survival of individuals with acute myeloid leukemia.	<i>Cancer Genomics & Proteomics</i>		3 169-182	2006
Yamada T, Katagiri H, Ishigaki Y, Ogihara T, Imai J, Uno K, Hasegawa Y, Gao J, Ishihara H, Nijijima A, Mano H, Aburatani H, Asano T & Oka Y	Signals from intra-abdominal fat modulate insulin and leptin sensitivity through different mechanisms: neuronal involvement in food-intake regulation.	<i>Cell Metab</i>		3 223-229	2006
Takada S, Wada T, Kaneda R, Choi YL, Yamashita Y & Mano H	Evidence for activation of Amh gene expression by steroidogenic factor 1.	<i>Mech Dev</i>		123 472-480	2006
Takada S, Ota J, Kansaku N, Yamashita H, Izumi T, Ishikawa M, Wada T, Kaneda R, Choi YL, Koinuma K, Fujiwara S, Aoki H, Kisanuki H, Yamashita Y & Mano H	Nucleotide sequence and embryonic expression of quail and duck Sox9 genes.	<i>Gen Comp Endocrinol</i>		145 208-213	2006
Takada S, Berezikov E, Yamashita Y, Lagos-Quintana M, Kloosterman WP, Enomoto M, Hatanaka H, Fujiwara S, Watanabe H, Soda M, Choi YL, Plasterk RH, Cuppen E & Mano H	Mouse microRNA profiles determined with a new and sensitive cloning method.	<i>Nucleic Acids Res</i>		34 e115	2006
Taguchi J, Miyazaki Y, Tsutsumi C, Sawayama Y, Ando K, Tsushima H, Fukushima T, Hata T, Yoshida S, Kuriyama K, Honda S, Jinnai I, Mano H & Tomonaga M	Expression of the myeloperoxidase gene in AC133 positive leukemia cells relates to the prognosis of acute myeloid leukemia	<i>Leuk Res</i>		30 1105-1112	2006
Omi T, Kumada M, Kamesaki T, Okuda H, Munkhtulga L, Yanagisawa Y, Utsumi N, Gotoh T, Hata A, Soma M, Umemura S, Ogihara T, Takahashi N, Tabara Y, Shimada K, Mano H, Kajii E, Miki T & Iwamoto S	An intronic variable number of tandem repeat polymorphisms of the cold-induced autoinflammatory syndrome 1 (CIAS1) gene modifies gene expression and is associated with essential hypertension	<i>Eur J Hum Gene</i>			2006
Mano H	[Epigenetics and hematological disorders].	<i>Rinsho Ketsueki</i>		47 3-8	2006
Mano H	DNA microarray analysis of myelodysplastic syndrome	<i>Leuk Lymphoma</i>		47 9-14	2006
Koinuma K, Yamashita Y, Liu W, Hatanaka H, Kurashina K, Wada T, Takada S, Kaneda R, Choi YL, Fujiwara S, Miyakura Y, Nagai H & Mano H	Epigenetic silencing of AXIN2 in colorectal carcinoma with microsatellite instability.	<i>Oncogene</i>		25 139-146	2006
Kano Y, Akutsu M, Tsunoda S, Izumi T, Kobayashi H, Inoue K, Mori K, Fujii H, Mano H, Odgerel T & Furukawa Y	Schedule-dependent interactions between pemetrexed and cisplatin in human carcinoma cell lines in vitro.	<i>Oncol Res</i>		16 85-95	2006

Choi YL, Tsukasaki K, O'Neill M C, Yamada Y, Onimaru Y, Matsumoto K, Ohashi J, Yamashita Y, Tsutsumi S, Kaneda R, Takada S, Aburatani H, Kamihira S, Nakamura T, Tomonaga M & Mano H	A genomic analysis of adult T-cell leukemia.	<i>Oncogene</i>				2006
Berezikov E, van Tetering G, Verheul M, van de Belt J, van Laake L, Vos J, Verloop R, van de Wetering M, Guryev V, Takada S, van Zonneveld AJ, Mano H, Plasterk R & Cuppen E	Many novel mammalian microRNA candidates identified by extensive cloning and RAKE analysis.	<i>Genome Res</i>	16	1289-1298		2006