

幅の検討は、Ph転座陽性細胞株K562と陰性細胞株REHとの混合試験により行った。至適条件を探り、10,000細胞に1個のPh陽性細胞の存在まで検出することが可能となった。これは、K562のtotalRNA 1 $\mu$ gあたりのキメラmRNA発現コピー数が約10<sup>6</sup>コピーであることから、本検査の適用限界は、直近のキメラmRNA定量値が10<sup>2</sup>コピーオーダーを有している患者検体であると考えられた。

インベーター法による変異DNAの検出感度を検討した結果、野生型（正常配列）に対する変異型の存在比率が1%まで検出可能であり、かつ、反応ウエルに最少10コピーの変異型DNAの存在までが検出可能であった。

以上の測定性能が確認されたことで、実用に供することが可能な方法であろうと判断し、臨床での検査の妥当性を評価するために国立がんセンター中央病院内で実際の患者検体6例を測定した。その結果、1例にQ252Ht、1例にT315Iが検出された。これらはダイレクトシーケンスによって変異配列が検証された。

慢性期のCMLに対するイマチニブ治療効果は、大部分の症例にてPh染色体の減少効果を得るが、長期経過に伴い耐性をきたす症例が出現する。イマチニブ耐性の作用機序としてBCR/ABLキメラmRNAの過剰発現、BCR/ABLゲノム自体の増幅や、Ph1染色体以外の付加染色体異常など様々に考えられているが、現在最も頻度が多く臨床的に意義があるとされているのがABL遺伝子のキナーゼ領域に生じた遺伝子変異である。その遺伝子変異には、大きく分けてATP阻害剤であるイマチニブが直接に接触するとされるP-loop領域と、その他（catalytic domainおよびactivating loop）の領域に生じるものに大別され、P-loop変異群、その他領域変異群、および変異無群の間では予後予測が異なるという報告もある。

現在、CMLの治療においては、イマチニブに無効な例、初めは奏功するが途中から効果が減弱する例、長期投与にて分子再発する例などが見られるが、早期にキナーゼ領域の変異を調べることにより、その後の予後予測や高容量、移植治療への治療選択、さらには第二世代のBCR/ABLインヒビター（nilotinib, dasatinib）への選択を考慮することができる。

これまでは、BCR/ABLキメラmRNAが再出現してきた症例に対しては、そのPCR産物をダイレクトシーケンスで確認するしかなく、耐性クローンがドミナントな状態でしか遺伝子変異の検出が困難であったが、本PCR-インベーター法では10<sup>2</sup>コピーのキメラmRNAが検出される状態にあれば、25種類の変異mRNAを1%という高感度で検出することができるため、より早期に治療方針の決定、変更を行うための情報を提供することが可能となるものと考えられる。

## 2. 倫理的側面

既に治療がされている慢性骨髄性白血病においては、診断目的でRNA分離がなされており、再検査の目的のため、保存されている。すなわち、診療契約の範疇である。また、それら検体の多くは当院の診療開始時にいわゆる包括同意が得られている。この同意は目的なく収集された検体が、将来、検査あるいは研究目的として使用される場合に供与することに対する同意である。

今回はあらたに残余検体での臨床研究として本研究を倫理委員会に提出し、承認が得られた。ホームページ状で掲示されているので、不同意の場合には撤回が可能となっている。現在までのところ、不同意の連絡が来ていない。

## 3. 前方視的検体収集

現在、JALSGで計画中の次期臨床研究において、前方視的検体収集と中央保存を研究計画書に盛り込むべく、プロトコール小委員会との連携を開始した。この方法であらかじめ収集すれば、将来的にあらたな予後因子が発見された場合に検討することが可能である。

## 4. 遺伝子解析研究提案

遺伝子解析に関する研究提案について、JALSG検体研究・付随研究委員会と統一性をもって審議・承認を実施していく基本方針を確認し、JALSGの中での提案研究に際しては、残余検体の中央保存化を求めている。今回は院内での研究であったので、当院で倫理委員会の審査対象となった。自施設以外での研究の承認を得るためには、当該研究施設での多目的への利用などが確実にできない体制の構築など透明性が必要である。研究施設への監査を行うことも考慮すべきであろう。

## D. 健康危険情報

該当無し。

## E. 研究発表

### 1. 論文発表

Fusako Ohara, Yukio Kobayashi, et al. Abdominal Pain and Syndrome of Inappropriate Anti-diuretic Hormone Secretion (SIADH) as a Manifestation of Visceral Varicella-zoster Virus (VZV) Infection in a Patient with Non-Hodgkin Lymphoma. *Am J Hematol* 82:414-418, 2007.

Tanimoto K, Kobayashi Y, et al. Primary ocular

adnexal MALT lymphoma: A long-term follow-up study of 114 patients.

Jpn J Clin Oncol 37: 337-344, 2007.

Maruyama D, Kobayashi Y, et al. Primary bone lymphoma: a new and detailed characterization of 28 patient in a single-institution study.

Jpn J Clin Oncol 37: 216-223, 2007.

## 2. 学会発表

第66回日本癌学会

Kobayashi, Y, et al. Oligonucleotide Microarray Analysis of Ocular Adnexal MALT Lymphoma (OAL) using Oligonucleotide Microarray.

第49回米国血液学会 Atlanta, GA

Asakura Y, Kobayashi Y et al. High frequency of loss of heterozygosity due to uniparental disomy or allelic deletion of ocular adnexal MALT-type lymphoma

第69回日本血液学会 第49回日本臨床血液学会 合同総会. 横浜. 2007年10月11日

丸山 大、小林幸夫他。相澤 信、飛内賢正多発性骨髄腫患者におけるbortezomib投与後の発熱とサイトカインとの関連性およびその機序の検討

横山 洋紀、小林 幸夫他。R-CHOP中に進行性多発性白質脳症を合併したDLBCL

## F. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）  
分担研究報告書

「PhALL再発例におけるABL変異の後方視的解析に関するアンケート調査」  
分担研究者 矢ヶ崎史治 埼玉医科大学国際医療センター 造血器腫瘍科 講師

研究要旨

日本成人白血病治療共同研究グループ（JALSG）ではPh-ALL202第II相試験により、imatinib併用化学療法が短期的にPh-ALLの予後を改善することを明らかにしたが依然として高い再発率が問題となっている。再発の原因としてImatinib感受性低下を来すABL点変異が指摘されている。Ph-ALL202試験ではBCR-ABL mRNA量を経時的に測定しており残存RNAは保存されている。本研究は登録施設での再発時におけるABL変異検査実施状況とその結果、保存検体を用いたABL変異解析の可能性をアンケート調査により検討した。（結果）試験登録施設64施設のうち43施設から回答を得た。76例中、18施設で22例が再発が認められたが独自にABL変異解析が施行されたのは4例（4施設）で、3例に変異が認められ、内訳はY253H 2例、E255V 1例であった。検体保存に関する同意が得られ保存検体に関する後方視的ABL変異研究が可能と回答を得たのは7施設9例だったが、再発時に検体が提出されているのは4例のみであった。以上から後方視的研究を可能にする検体収集の基盤作りが急務と考えられた。特に臨床試験登録例の検体保存、検体保存に対する同意取得、保存検体を用いた研究に対する参加施設間でのコンセンサス作りは重要と考えられた。

A. 研究目的

Ph-ALLの従来の化学療法に対する反応性は乏しく、寛解(CR)率は60%、CR維持期間の中央値は16-19ヶ月で、長期生存率は10%以下である。Ph-ALLの腫瘍化に寄与するBCR-ABLチロシンキナーゼに対する分子標的治療薬imatinib mesylateは単剤で寛解を得ることが出来るものの、短期間で再発し生命予後を改善しえないことが知られている。日本成人白血病治療共同研究グループ（JALSG）ではPh-ALL202第II相試験を施行し、imatinib併用化学療法が短期的なPh-ALLの予後を改善することを明らかにした。Ph-ALL202では80例が登録され、早期死亡した2例と治療抵抗例1例を除き全例が寛解に到達した。またPh-ALL202試験ではimatinib併用化学療法による治療反応性を明確にするため、BCR-ABL RNA量を経時的に測定した。その結果、71.3%が分子生物学的寛解（定量的PCR感度以下）に達することが明らかになった。以上のようにImatinibと化学療法ではPh-ALLの短期的な治療成績は改善するが、依然として高い再発率が問題であり、寛解後治療として幹細胞移植が必要である。再発の原因としてImatinib感受性低下を来すABL点変異が指摘されている。本研究は、imatinib併用化学療法における再発機序を明らかにする為、Ph-ALL202第II相試験登録施設に対し、再発時における自施設におけるABL変異検査実施の有無、登録患者からのRNA保存の同意の取得の状況、各施設の保存検体を用いた研究に対する考え方をアンケート調査した。

B. 研究方法

Ph-ALL202 参加した 64 施設に対し、登録患者の予後、再発時期、再発時の変異検査の有無と結果、登録時の RNA 保存に対する同意の取得の有無、定量的 PCR 後の保存 RNA 検体を用いた後方視的 ABL 変異研究の可能性について、書面によるアンケート調査を行った。

C. 研究結果

アンケート送付施設64施設のうち43施設から回答を得た（回収率67.2%）。JALSG Ph-ALL202臨床試験登録76例中、18施設で22例が再発したことが明らかになった。再発時に施設独自でABL変異解析が施行されたのは4例（4施設）で、3例に変異が認められ、内訳はY253H 2例、E255V 1例であった。検体保存に関する同意が得られ保存検体に関する後方視的ABL変異研究が可能と回答を得たのは7施設9例であったが、再発時に検体が提出されているのは4例のみであった。また再発を認めた6施設では、試験登録時にRNA保存に対する同意の取得を行っていなかった。以上から、前方向のみならず、後方視的研究を可能にする検体収集の基盤作りが急務と考えられた。特に臨床試験登録時に、検体保存および検体保存に対する同意を取得しておくこと、保存検体を用いた研究に対する参加施設でのコンセンサス作りは重要と考えられた。今後解析可能な4例におけるABL変異解析を行う予定である。

D. 健康危険情報

該当無し。

E. 研究発表

1. 論文発表

該当無し。

2. 学会発表

該当無し。

F. 知的財産権の出願・登録状況

該当無し。

1. 特許取得

該当無し。

2. 実用新案登録

該当無し。

3. その他

該当無し。

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）  
分担研究報告書

「検体収集より得られた白血病細胞の予後関連作用分子の選択」  
分担研究者 竹下明裕 浜松医科大学医学部 臨床検査医学 准教授

研究要旨

臨床検体を有用に活用する上では、既報に掲載されている分子の解析を計画的に進めていく一方で、開発が盛んである分子標的薬の標的自身の検討も予後因子として必要になると思われる。今回 inotuzumab ozogamicin、gemtuzumab ozogamicin といった白血病細胞表面分子を標的とした薬剤をモデルとして、予後因子としての解析の重要性を検討した。その結果、CD22、CD33、CD55などの薬剤の効果をつかさどる分子は殺細胞効果に影響すること、既存の薬剤耐性機序への関与の程度も各薬剤で差異があることが判明した。プロトコール中の薬剤に応じた解析分子を設定していく必要がある。

A. 研究目的

がん化学療法の研究を遂行していく上で、がんの予後と関わる重要な因子を抽出することは、これまでの研究でも行われてきた。しかし、予後関連因子は数多く存在し、それらを系統的に検討していく必要がある。これまでの施行されていた、個別の研究提案に個別に検体を送付していたのでは、研究の進歩から次々と発見される新しい予後関連分子に対応できず、検体量も余分に消費されることになる。また症例ごとに取得する同意書に関しても多大な労力が費やされる。サンプル数で圧倒的な数を誇る欧米の臨床研究においても、サンプルを多面的にそして有効利用している。本邦では、症例数も限られるにもかかわらず、1検体を多施設で有効利用しようとする試みは行われてこなかった。

白血病をモデルとして、腫瘍細胞を収集し、一括して管理するとともに、多施設がその有効利用を推進できれば、予後関連分子に関する世界的なレベルの研究を遂行することが可能となる。それらは治療方法の改善や優れた創薬にもつながり、白血病のみならず、がん治療を進歩させる上でも重要である。

今回、今後飛躍的に増加してくると思われる細胞表面上の分子を標的とした薬剤である抗体療法薬において、標的とする分子の重要性を細胞株と少数の臨床検体を使用して検討した。これにより標的分子の予後因子解析への有効性を簡便に検討する手段とした。また全ての腫瘍に共通して予後に関係するとされる代表的な薬剤耐性関連因子である、MDR、MRP、LRP等に関して、その発現細胞を樹立した。そしてがん薬物療法耐性機序の検討細胞株モデルを基に、各薬物に特異的な耐性機序を明らかにしようとした。薬剤固有の耐性機序が明確化されることにより、がん化学療法、予後関連分子と予後の関係が明らかとなる。

B. 研究方法

本研究班の検体収集に協力するとともに、別にインフォームドコンセントを取得して得られた白血病細胞上のMDR、MRP、LRP発現量を検討した。使用された分子標的薬剤として inotuzumab ozogamicin (io; calicheamicin conjugated anti-CD22 monoclonal antibody)、gemtuzumab ozogamicin (go; calicheamicin conjugated anti-CD33 monoclonal antibody) を使用した。これらの薬剤は細胞表面上の特定分子（それぞれCD22とCD33）を標的とするため、その発現量は直接、殺細胞効果に関係する。また細胞内で遊離された calicheamicin 自身がDNAを障害するため、細胞死に関わるいくつかの分子の発現に影響されうる。今回はCD22、CD33、CD20、CD34、CD55、CD56などの細胞表面抗原の変化を併せて検討した。抗原量の解析はPCR、flow cytometry そして laser scanning microscope により観察された。以前我々が報告したようにMDR、MRP、LRPが本薬剤においても殺細胞効果に影響しているかを検討した。殺細胞効果は細胞回転、Annexin-V-PI、video-microscope etc.にて検討された。

C. 研究結果

これまで、耐性細胞の研究は主として過去に樹立された細胞株をモデルとすることによりなされてきたが、上記の遺伝子を直接細胞内に導入することで、耐性機能的に純化された系を確立した。これにより各薬剤がこれらの遺伝子産物により直接影響を受ける機序が明らかとなった。また今後もその応用範囲は広がると思われる。臨床的に得られた検体でもCD33 (go)、CD22 (io)、CD55 (io)は重要でその発現量はそれぞれの薬剤において殺細胞効果に直接影響し

た。CD34、CD56発現量は殺細胞効果に影響を認めなかった。

これらの結果は臨床研究において予後に関係する因子を想定する上で有効である。CD22やCD33は薬剤の直接の標的分子であり、発現量を分子生物学的にも蛋白量面からも検討する必要があると思われた。またrituximabの耐性機序でも報告されている表面分子の変化に関しても検討される必要がある。

薬剤耐性因子、中でもMDRは本実験に使用された薬剤では強力にその影響を受けていることが判明した。MDRは多くのがん細胞に再発例を中心に発現していることが、明らかであるが、各薬剤の特性でその重要性が高まる。本実験に使用された薬剤の細胞内の作用は内在化したのちに遊離されるcalicheamicinによるところが大きい。calicheamicinは抱合した抗体によらず、特にMDRの影響を受けやすいことが明らかとなった。このことから、本薬剤を抗白血病化学療法に組み入れた臨床研究をする上では予後因子として特に重要視され、解析に必要であると思われる。

本研究の主幹である検体収集事業を遂行し、優れた臨床研究を発信していく上ではエビデンス上重要な分子を含むことは当然として、既報にとらわれず、臨床研究のプロトコールに採用された薬剤の特異的な分子や作用機序を包含させる必要があることを示した。検体を収集して一連の予後因子を平面的に抽出するのではなく、標的とされる分子やその分子に関連して変化する分子にも着目して検討をしていく必要があることが認識された。

#### D. 健康危険情報 特記事項なし

#### E. 研究発表 1. 論文発表

Fujisawa S, Ohno R, Shigeno K, Sahara N, Nakamura S, Naito K, Kobayashi M, Shinjo K, Takeshita A, Suzuki Y, Hashimoto H, Kinoshita K, Shimoya M, Kaise T, Ohnishi K. Pharmacokinetics of arsenic species in Japanese patients with relapsed or refractory acute promyelocytic leukemia treated with arsenic trioxide. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2007 Mar;59(4):485-93.

Horii T, Suzuki Y, Takeshita A, Maekawa M. Molecular characterization of 8-methoxyfluoroquinolone resistance in a clinical isolate of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Chemotherapy*. 2007;53(2):104-9.

Miyawaki S, Kawai Y, Takeshita A, Komatsu N, Usui N, Arai Y, Ishida F, Morii T, Kano Y,

Ogura M, Doki N, Ohno R. Phase I trial of FLAGM with high doses of cytosine arabinoside for relapsed, refractory acute myeloid leukemia: study of the Japan Adult Leukemia Study Group (JALSG). *Int J Hematol*. 2007 Nov;86(4):343-7.

Asou N, Kishimoto Y, Kiyoi H, Okada M, Kawai Y, Tsuzuki M, Horikawa K, Matsuda M, Shinagawa K, Kobayashi T, Ohtake S, Nishimura M, Takahashi M, Yagasaki F, Takeshita A, Kimura Y, Iwanaga M, Naoe T, Ohno R; Japan Adult Leukemia Study Group. A randomized study with or without intensified maintenance chemotherapy in patients with acute promyelocytic leukemia who have become negative for PML-RARalpha transcript after consolidation therapy: the Japan Adult Leukemia Study Group (JALSG) APL97 study. *Blood*. 2007 Jul 1;110(1):59-66.

#### 2. 学会発表

Takeshita A, Shinjo K, Yamakage N, Ono T, Hirano I, Okinaka K, Matsui H, Nakamura S, Shigeno K, Maekawa M, Ohnishi K, Ohno R. Reduced effect of inotuzumab ozogamicin (CMC544) on P-glycoprotein positive malignant B cells and its restoration by multidrug resistance modifiers. *Blood* 2007; 110 (Suppl. 1): 702a. 49<sup>th</sup> Annual Meeting of American Society of Hematology. Atlanta, USA.

Yamakage N, Takeshita A, Shinjo K, Ono T, Matsui H, Nakamura S, Shigeno K, Maekawa M, Ohnishi K, Ohno R. Cell features and quantitative alternation of target molecule of malignant B cells treated with inotuzumab ozogamicin (CMC544) alone or in combination with rituximab. *Blood* 2007; 110 (Suppl. 1): 698a. 49<sup>th</sup> Annual Meeting of American Society of Hematology. Atlanta, USA.

#### F. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）  
分担研究報告書

「新規ABLチロシンキナーゼ阻害剤による難治性白血病薬剤耐性の克服の研究」  
分担研究者 田内哲三 東京医科大学内科第一講座 講師

研究要旨：

Thr315はBCR-ABLのキナーゼドメインの中心部に位置しており、ATP結合部位を覆っているため、ABLキナーゼ阻害剤に対してgatekeeperと呼ばれている。T315I変異型BCR-ABLはimatinib抵抗性Ph陽性白血病の約20%に認められる変異であり、第2世代型チロシンキナーゼ阻害剤、dasatinib及びnilotinibも無効であるため、有効な治療法は確立されていない。MK-0457はATP競合型のAuroraキナーゼ阻害剤であり、BCR-ABL、Jak-2、Flt-3に対しても阻害効果を有する。本研究ではMK-0457及びdasatinibのT315I BCR-ABLに対する併用効果を明らかにし、Ph陽性白血病に対する有用性を検討した。MK-0457、dasatinib併用によりT315I BaF3細胞においてアポトーシス誘導の増加、in vivoにおいてもT315IBCR-ABL BaF3 BCR-ABL移植マウスの生存期間を延長させた。

A. 研究目的

近年、細胞分子生物学の急速な進歩に伴い、シグナル伝達経路の分子レベルでの解析が可能となり、腫瘍の生存・増殖に必要な遺伝子および蛋白についての情報が蓄積されてきた。Imatinib療法による慢性骨髄性白血病(chronic myeloid leukemia; CML)の治療成績は慢性期では大部分の症例に効果が得られるが、年平均2%は急性期へと進展し、効果の喪失を加えると年平均4%は増悪する。また分子寛解に関しては、ほとんどの症例に微小残存病変(minimal residual disease: MRD)が認められる。Michor等はイマチニブ治療中のCML 169例のPCRデータを解析し、白血病幹細胞はimatinib投与中も増幅を続け、そこからMRDが供給されるとしている。耐性細胞は2年以内に慢性期早期 12%、慢性期後期 32%、移行期 62%で変異が検出されると推定された。実際に、分子寛解後にimatinib投与を中止した場合、ほとんどの症例で再発が見られているため、分子寛解が得られてもimatinib継続投与が必要とされ、医療経済の面からもMRDは今後解決しなければならない大きな問題である。微小残存病変をさらに減少させることが期待できる次世代型ABLキナーゼ阻害剤が臨床応用されているが、imatinib耐性化症例の20%を占めるT315I変異症例に対しては有効な治療法は確立されていない。

MK-0457はAuroraキナーゼに対する強力な阻害剤である。Auroraキナーゼは細胞分裂において、その分裂期に触媒活性のピークを迎える分裂期キナーゼであり、細胞分裂を遂行する中心的な酵素である。ヒトおよびマウスには3種類のAurora遺伝子が存在し、Aurora A, B, Cと名付けられており、中でもAurora A遺伝子はヒト染色体20q13.31に存在するが、こ

の部位は様々な癌で遺伝子増幅の見られる領域であることから、癌遺伝子の存在が示唆されている。Bischoff等はAurora-Aを過剰発現させることによって、Rat1およびNIH3T3細胞がトランスフォームし、体細胞が癌化することを証明した(EMBO J 17: 3052-3065, 1998)。Aurora Aの発現は正常組織および良性腫瘍では検出されないか弱い発現が見られるのみであるが、造血器腫瘍、乳癌や大腸癌を始めとするヒトの癌腫でAurora-Aの過剰発現が認められている。従って、Aurora-Aは造血期腫瘍を含めた悪性腫瘍に対する治療を行う上で格好の標的分子である。MK-0457はAurora-A, B, Cを阻害すると共にOff TargetとしてBCR-ABL、Flt-3、Jak-2を阻害する。本研究ではMK-0457とdasatinib併用効果をT315I変異型BCR-ABL発現細胞株を用いて明らかにするとともに、Ph陽性白血病に対する有効な治療法を確立することを目的とする。

B. 研究方法

MK-0457 及び dasatinib in vivo における併用効果を T315IBCR-ABL 発現 BaF3 細胞株移植マウスを用いて解析した。アポトーシス誘導効果に関しては Annexin V を用いて解析した。

C. 研究結果

MK-0457はBaF3 WT-p185BCR-ABL細胞及びBaF3 T315IBCR-ABL細胞に対し、100nMにて細胞増殖抑制効果を示した。一方、dasatinibはBaF3 WT-p185BCR-ABL細胞に対し10nMにて細胞増殖抑制を示すのに対し、BaF3 T315IBCR-ABL細胞に対しては100nMにても増殖抑制効果は見られな

かった。

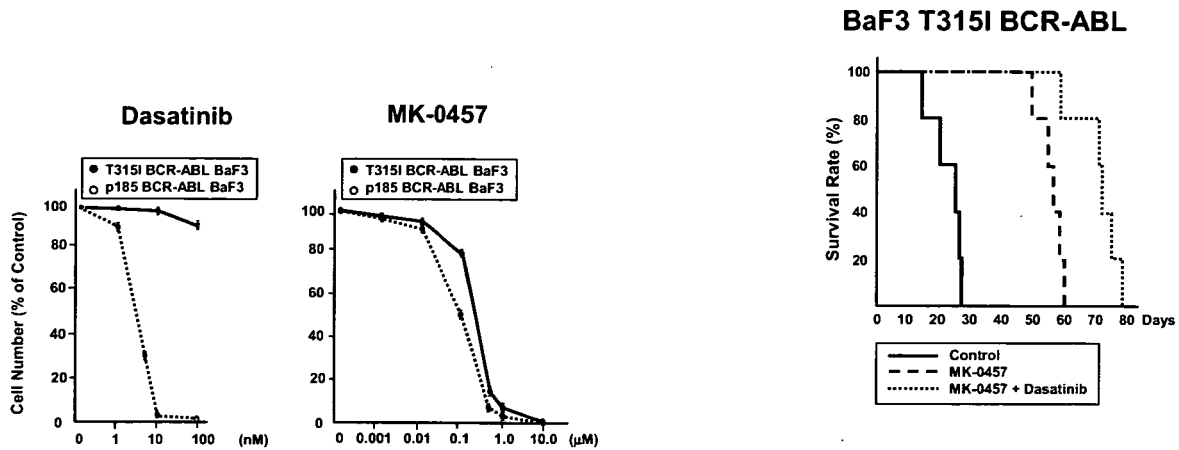


図1. MK-0457による細胞増殖抑制効果

MK-0457とdasatinib併用によるアポトーシス誘導効果をBaF3 T315IBCR-ABL細胞を用いて解析した。MK-0457はdasatinibとの併用によりアポトーシス誘導効果の増加が確認された。

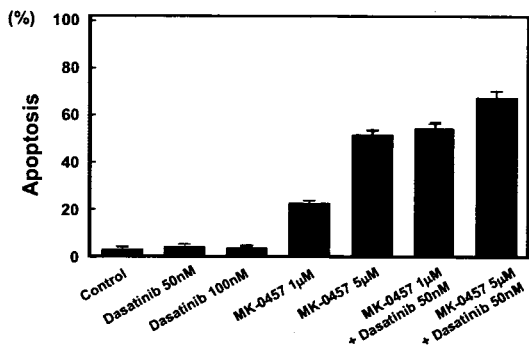


図2. MK-0457及びdasatinib併用によるT315IBCR-ABL変異細胞に対するアポトーシス誘導効果

さらに、in vivoにおけるMK-0457の生物活性についてBaF3 T315I BCR-ABL移植マウスを用いて解析した。①MK-0457 30mg/kg b.i.d. ip 5日間投与、3週間休薬、②MK-0457 30mg/kg b.i.d. ip + Dasatinin 10mg/kg po 5日間投与、3週間休薬、③Dasatinin 10mg/kg po 5日間投与、3週間休薬のスケジュールにて行った。コントロール群では骨髄内への白血病細胞浸潤、脾腫を伴ない移植後28日以内に全例死亡したのに対し、MK-0457投与群では60日以上生存、MK-0457 + Dasatinib投与群では70日以上生存した。

MK-0457及びdasatinib併用によりBaF3 T315I BCR-ABL細胞においてアポトーシス誘導の増加が確認された。MK-0457及びdasatinib併用投与はin vivoにおいてもBaF3 BCR-ABL移植マウス生存期間を延長させた。Imatinib耐性化症例の出現は次世代型の ABLチロシンキナーゼ阻害剤の開発をもたらし、nilotinib及びdasatinibの臨床応用につながった。しかしながら、imatinib耐性の約20%を占めるT315I変異型BCR-ABLに対してはnilotinib、dasatinibともに有効性を示さないことから、T315Iに対する対策を構築しなければならない。CML治療の今後の最大の課題はキナーゼ阻害剤を駆使してMRDを根絶させ真の治癒をめざすことであり、新規ABLキナーゼ阻害剤の開発は医療経済面においても大きな貢献になるとと思われる。

D. 健康危険情報  
特になし。

E. 研究発表  
1. 論文発表

- 1) Nunoda K, Tauchi T, et al. Identification and functional signature of genes regulated by structurally different the ABL kinase inhibitors. *Oncogene* 26・4179-4188, 2007.
- 2) Okabe S, Tauchi T, et al. Depsipeptide (FK228) preferentially induces apoptosis in BCR/ABL-expressing cell lines and cells from patients with chronic myelogenous leukemia in blast crisis. *Stem Cells & Development* 16・503-514, 2007.
- 3) Ohyashiki K, Akahane D, Gotoh A, Tauchi T, et al. Uncontrolled thrombocytosis in polycythemia vera is a risk for thrombosis, regardless of JAK2(V617F) mutational stat



us. Leukemia 21・2544-2545, 2007.

4) Ohyashiki K, Tauchi T, et al. Recurrent chromosomal aberration at 12q15 in chronic idiopathic myelofibrosis with or without JAK2(V617F) mutation. Leukemia 21・1578-1580, 2007.

## 2. 学会発表

1) Tauchi T. Combined effect of a pan-aurora kinase inhibitor MK-0457 and dasatinib or vorinostat against T315I BCR-ABL. 第69回日本血液学会、第49回日本臨床血液学会合同シンポジウム.

2) Tauchi T, et al. Combined effect of a pan-aurora kinase inhibitor MK-0457 and dasatinib against T315I BCR-ABL: in vitro and in vivo studies. 49th Annual Meeting of American Society of Hematology.

## F. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

### 1. 特許取得

特になし

### 2. 実用新案登録

特になし

### 3. その他

特になし

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）  
分担研究報告書

「染色体のセントラルレビュー」

分担研究者 滝 智彦 京都府立医科大学大学院医学研究科分子病態検査医学 講師

研究要旨

JALSG AML-97臨床試験登録症例809例の染色体レビューを行い、新規の染色体異常を含む染色体異常の正確な頻度を明らかにした。染色体異常の有無についてのレビュー前後での不一致率は5.5%であり、単純な記載ミスその他、染色体についての知識不足が原因と思われる解釈の間違いが多く含まれていた。染色体異常は予後などの臨床像と密接に関係していると考えられ、その正確な意義を明らかにするためには正確な染色体データが必要であり、専門家によるレビューを行うことが重要である。

また、G分染法のみでは診断が困難な症例に対しては、SKY法やFISH法を追加した解析が必要であり、このような症例を含む未知の染色体異常の正確な診断のためには、カルノア固定液および白血病細胞を確実に保存するシステムの確立が必要である。

A. 研究目的

急性骨髄性白血病（AML）でみられる染色体異常は、従来用いられていたFAB分類と強く関連し、現在のWHO分類では特異的な染色体異常の有無がさらに重要な情報として扱われている。これらの染色体異常は予後と関連し、さらに最近ではKIT, NPM1などの遺伝子異常との関係も明らかにされた。

本研究では、JALSGの臨床試験の登録症例の染色体レビューを行い、染色体レビューによって明らかになった問題点と、染色体異常の特徴について検討した。

B. 研究方法

JALSG AML-97 臨床試験登録症例 809 例について、データセンターに登録された核型データと染色体検査報告書の照合を行った。染色体レビューは、以下のJALSG染色体小委員会メンバーが行った。谷脇雅史（委員長、京都府立医大）、大竹茂樹（金沢大）、大屋敷一馬（東京医大）、陣内逸郎（埼玉医大）、三浦偉久男（聖マリアンナ医大）、宮崎泰司（長崎大）、竹内 仁（日本大）、西田一弘（京都府立医大）、滝 智彦（京都府立医大）

C. 研究結果

1. 染色体レビューの結果

JALSG AML-97臨床試験登録症例に登録された809例のうち評価可能な核型データが得られたのは650例（80.3%）であり、そのうち核型分析成功例は637

例（98.0%）であった。370例に染色体異常を認め（レビュー前381例）、正常核型は267例（レビュー前254例）であった。染色体異常の有無についてのレビュー前後での不一致例は35例（5.5%）であった。不一致例の中には、単純な記載ミスその他、染色体についての知識不足が原因と思われる解釈の間違いが多く含まれており、専門家によるレビューが重要であると思われる。

2. AML-97登録症例の染色体の特徴

おもな染色体異常の内訳は、t(8;21) 111例（17.4%）、inv(16) 25例（3.9%）、11q23転座 39例（6.1%）、-5/5q- 22例（3.4%）、-7/7q- 37例（5.8%）、12p- 15例（2.4%）であった。t(8;21)の頻度は欧米での頻度比べて高頻度であった。頻度は少ないものの特異的な染色体異常として、t(9;22) 13例（2.0%）、11p15転座 7例（1.1%）、t(16;21)(p11;q22) 4例（0.6%）、t(10;11)(p12-14;q21) 3例（0.5%）などがみられた。11p15転座は東洋人での頻度が高い可能性が示唆されていたが、本邦での頻度が初めて明らかになった。また、急性前骨髄球性白血病に特異的な染色体異常であり、異なる臨床試験に登録されるべきt(15;17)が5例（0.8%）にみられた。その他、AML1遺伝子の関与が予想される新しい染色体異常として、t(1;21)(p32;q22)、t(2;21)(q33;q22)が含まれていた。

核型が複雑でG分染法のみでは診断が困難な症例もあり、これらではSKY法やFISH法を追加

した解析が必要である。このような症例を含む未知の染色体異常を正確に診断するためには、カルノア固定液および白血病細胞を確実に保存するシステムの確立が必要である。

#### D. 健康危険情報

該当無し

#### E. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Shimizu D, Taki T, Utsunomiya A, Nakagawa H, Nomura K, Matsumoto Y, Nishida K, Horiike S, Taniwaki M. Detection of *NOTCH1* mutations in adult T-cell leukemia/lymphoma and peripheral T-cell lymphoma. *Int J Hematol* 85: 212-218, 2007
2. Shimada A, Taki T, Kubota C, Tawa A, Horibe K, Tsuchida M, Hanada R, Tsukimoto I, Hayashi Y. No nucleophosmin mutation in pediatric acute myeloid leukemia with normal karyotype: a study of the Japanese Childhood AML Cooperative Study Group. *Leukemia* 21: 1307, 2007
3. Nemoto N, Suzukawa K, Shimizu S, Takei N, Taki T, Hayashi Y, Kojima H, Kawakami Y, Nagasawa T. Identification of a novel fusion gene *MLL-MAML2* in secondary acute myelogenous leukemia and myelodysplastic syndrome with *inv(11)(q21q23)*. *Genes Chromosomes Cancer* 46: 813-819, 2007
4. Ashihara E, Nakamura S, Inaba T, Taki T, Hayashi Y, Shimazaki C. A novel *AF10-CALM* fusion transcript in gamma/delta-T cell type lymphoblastic lymphoma. *Am J Hematol* 82: 859-860, 2007
5. Shimada A, Taki T, Kubota C, Itou T, Tawa A, Horibe K, Tsuchida M, Hanada R, Tsukimoto I, Hayashi Y. N822 mutation of *KIT* gene was frequent in pediatric acute myeloid leukemia patients with *t(8;21)* in Japan: a study of the Japanese Childhood AML Cooperative Study Group. *Leukemia* 21: 2218-2219, 2007
6. Shimada A, Ichikawa H, Taki T, Kubota C, Hongo T, Sako M, Morimoto A, Tawa A, Tsukimoto I, Hayashi H. Low frequency of *KIT* mutations in pediatric acute myeloid leukemia with *inv(16)(p13q22)*: a study of the Japanese Childhood AML Cooperative Study Group. *Int J Hematol* 86: 289-290, 2007
7. Kawamura M, Kaku H, Taketani T, Taki T, Shimada A, Hayashi Y. Good prognosis for 7-year-old Down syndrome patient with acute myeloid leukemia (FAB-M2), lacking mutations in *GATA1*, *FLT3*, *MLL*, *NRAS* and *AML1* genes. *Cancer Genet Cytogenet* 180: 74-78, 2008
8. Shimada A, Taki T, Tabuchi K, Taketani T, Hanada R, Tawa A, Tsuchida M, Horibe K, Tsukimoto I, Hayashi Y. Tandem duplications of *MLL* and *FLT3* are correlated with poor prognoses in pediatric acute myeloid leukemia: a study of the Japanese childhood AML Cooperative Study Group. *Pediatr Blood Cancer* 50: 264-269, 2008
9. Chinen Y, Taki T, Nishida K, Shimizu D, Okuda T, Yoshida N, Kobayashi C, Koike K, Tsuchida M, Hayashi Y, Taniwaki M. Identification of the novel *AML1* fusion partner gene, *LAF4*, a fusion partner of *MLL*, in childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia with *t(2;21)(q11;q22)* by bubble PCR method for cDNA. *Oncogene* in press
10. Tanaka R, Kuroda J, Stevenson W, Ashihara E, Ishikawa T, Taki T, Kobayashi Y, Kamitsuji Y, Kawata E, Takeuchi M, Murotani Y, Yokota A, Hirai M, Majima S, Taniwaki M, Maekawa T, Kimura S. Fully automated and super-rapid system for the detection of *JAK2V617F* mutation. *Leuk Res* in press

##### 2. 学会発表

1. Chinen Y, Taki T, Nishida K, Shimizu D, Okuda T, Yoshida N, Kobayashi C, Koike K, Tsuchida M, Hayashi Y, Taniwaki M. Cloning of *AML1-LAF4* fusion gene in childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia with *t(2;21)(q11;q22)* by bubble PCR method for cDNA. 49th Annual Meeting of the American Society of Hematology, Atlanta, December 8-11, 2007
2. Park MJ, Taki T, Suzuki N, Oda M, Yagi K, Kobayashi R, Hara J, Horibe K, Hayashi Y. *CDC4* and *NOTCH1* mutations in childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia and T cell non-Hodgkin's lymphoma; a Japan Association of Childhood Leukemia Study Group. 49th Annual Meeting of the American Society of Hematology, Atlanta, December 8-11, 2007
3. Tanaka R, Kuroda J, Ashihara E, Ishikawa T, Taki T, Hirai M, Majima S, Taniwaki M, Maekawa T, Kimura S. Detection of the V617F mutation of *JAK2* using a novel fully automated SNP super-rapid detector. 49th Annual Meeting of the American Society of Hematology, Atlanta, December 8-11, 2007
4. Takita J, Kato M, Nakamura F, Chen Y, Yamamoto G, Nannya Y, Sanada M, Taki T, Kikuchi A, Igarashi T, Hayashi Y, Ogawa S. High-resolution analyses of genetic and epigenetic aberrations in infant leukemia with

- MLL rearrangement. 49th Annual Meeting of the American Society of Hematology, Atlanta, December 8-11, 2007
5. 滝 智彦、清水大介、知念良顕、柳井文男、滝田順子、迫 正廣、林 泰秀、谷脇雅史. 同一の遺伝子が関与するキメラ遺伝子産物の多様性とその評価. 日本人類遺伝学会第52回大会、東京、2007年9月13-15日
  6. Myoung-ja Park, Tomohiko Taki, Megumi Oda, Keizo Horibe, Yasuhide Hayashi. Mutational analysis of NOTCH1 and cyclin related genes in childhood T cell acute lymphoblastic leukemia. 第66回日本癌学会総会、横浜、2007年10月3-5日
  7. Daisuke Shimizu, Tomohiko Taki, Kazuhiro Nishida, Kenichi Nomura, Yousuke Matsumoto, Shigeo Horiike, Tomonori Hidaka, Kiyoshi Yamashita, Hirohito Tsubouchi, Kazuhiro Morishita, Masafumi Taniwaki. Molecular analysis of T cell receptor  $\alpha/\delta$  locus at 14q11 and BCL11B at 14q32 in adult T cell leukemia/lymphoma. 第66回日本癌学会総会、横浜、2007年10月3-5日
  8. Ryoichi Ono, Hidetoshi Kumagai, Hideaki Nakajima, Yukio Tonozuka, Ai Hishiya, Tomohiko Taki, Yasuhide Hayashi, Toshio Kitamura, Tetsuya Nosaka. MLL fusion protein induces acute leukemia through cooperation between Hoxa9 and Ras-MAP kinase. 第66回日本癌学会総会、横浜、2007年10月3-5日
  9. Takashi Okuda, Kazuhiro Nishida, Yasuhiko Tsutsumi, Yasutaka Morimoto, Naohisa Yoshida, Yosuke Matsumoto, Kenichi Nomura, Tomohiko Taki, Shigeo Horiike, Chohei Sakakura, Takemi Ohtsuki, Eigo Otsuji, Masafumi Taniwaki. Improved cytogenetic analysis of cancer-associated chromosomal rearrangements by simultaneous SKY and FISH procedure. 第66回日本癌学会総会、横浜、2007年10月3-5日
  10. Yoshiaki Chinen, Tomohiko Taki, Kazuhiro Nishida, Daisuke Shimizu, Takashi Okuda, Naohisa Yoshida, Chie Kobayashi, Kazutoshi Koike, Masahiro Tsuchida, Yasuhide Hayashi, Masafumi Taniwaki. Molecular cloning of AML1-LAF4 fusion gene in childhood T-ALL with t(2;21)(q11;q22) by bubble PCR method for cDNA. 第66回日本癌学会総会、横浜、2007年10月3-5日
  11. 滝 智彦、清水大介、知念良顕、柳井文男、迫 正廣、滝田順子、林 泰秀、谷脇雅史. 切断点集中領域の外側に切断点を有するMLL再構成陽性白血病症例の解析. 第69回日本血液学会総会・第49回日本臨床血液学会総会、横浜、2007年10月11-13日
  12. 水嶋康浩、足立壮一、滝 智彦、嶋田 明、林 泰秀、月本一郎、由井理洋、上辻由里、平海良美、松原 央、渡部基信、梅田雄嗣、渡邊健一郎、中畑龍俊. 小児AML (normal karyotype)におけるBAALCの発現量および isoform pattern と予後相関性に関する検討. 第69回日本血液学会総会・第49回日本臨床血液学会総会、横浜、2007年10月11-13日
  13. 嶋田 明、滝 智彦、多和昭雄、花田良二、堀部敬三、土田昌宏、月本一郎、林 泰秀. 急性骨髄性白血病におけるWT1 mRNAの高発現はFLT3遺伝子変異と相関する. 第69回日本血液学会総会・第49回日本臨床血液学会総会、横浜、2007年10月11-13日
  14. 小埜良一、熊谷英敏、中島秀明、殿塚行雄、菱谷 愛、滝 智彦、林 泰秀、北村俊雄、野阪哲哉. MLL融合蛋白はRas-MAPキナーゼ系の活性化と相乗的に協調して急性白血病を発症する. 第69回日本血液学会総会・第49回日本臨床血液学会総会、横浜、2007年10月11-13日
  15. 清水大介、滝 智彦、西田一弘、野村憲一、松本洋典、堀池重夫、日高智徳、山下 清、坪内博仁、森下和広、谷脇雅史. 成人T細胞白血病・リンパ腫における14q11のT細胞受容体 $\alpha/\delta$ 遺伝子領域と14q32のBCL11B遺伝子領域の解析. 第69回日本血液学会総会・第49回日本臨床血液学会総会、横浜、2007年10月11-13日
  16. 朴 明子、滝 智彦、小田 慈、八木啓子、小林良二、鈴木信寛、原 純一、堀部敬三、林 泰秀. 小児T細胞白血病におけるNOTCH1 遺伝子変異についての解析と臨床的意義. 第69回日本血液学会総会・第49回日本臨床血液学会総会、横浜、2007年10月11-13日
  17. 松原康策、滝 智彦、中川温子、田中孝之、仁紙 宏之、深谷 隆. ATIC-ALKのキメラが同定された未分化大細胞性リンパ腫 - 本邦初例-. 第69回日本血液学会総会・第49回日本臨床血液学会総会、横浜、2007年10月11-13日
  18. 大橋博文、木附 康、喜安純一、崔 日承、油布祐二、鶴池直邦、大島孝一、滝 智彦、谷脇雅史. MOZ遺伝子関連AML M4t(8;19)(p11;q13)の一例. 第69回日本血液学会総会・第49回日本臨床血液学会総会、横浜、2007年10月11-13日
  19. 大西宏明、吉野 浩、滝 智彦、滝田順子、井田孔明、康 勝好、古屋彩夏、谷脇雅史、林 泰秀、渡邊 卓. MLL-p300キメラ遺伝子を認めた二次性白血病の1例. 第69回日本血液学会総会・第49回日本臨床血液学会総会、横

浜、2007年10月11～13日

20. 田中瑠璃子、木村晋也、芦原英司、前川 平、石川隆之、黒田純也、谷脇雅史、滝 智彦. 超迅速・全自動JAK2V617F検出法の開発. 第69回日本血液学会総会・第49回日本臨床血液学会総会、横浜、2007年10月11～13日

F. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

#### IV. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Akao Y, Nakagawa Y, Kitade Y, Kinoshita T, Naoe I.	Downregulation of microRNAs-143 and -145 in B-cell malignancies.	Cancer Sci.	98	1914-20	2007
Zembutsu H, Yanada M, Hishida A, Katagiri T, Tsuruo T, Sugiyura I, Takeuchi J, Usui N, Naoe I, Nakamura Y, Ohno R.	Prediction of risk of disease recurrence by genome-wide cDNA microarray analysis in patients with Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia treated with imatinib-combined chemotherapy.	Int J Oncol.	31	313-22	2007
Asou N, Kishimoto Y, Kiyoi H, Okada M, Kawai Y, Tsuzuki M, Horikawa K, Matsuda M, Shinagawa K, Kobayashi T, Ohtake S, Nishimura M, Takahashi M, Yagasaki F, Takeshita A, Kimura Y, Iwanaga M, Naoe I, Ohno R; Japan Adult Leukemia Study Group.	A randomized study with or without intensified maintenance chemotherapy in patients with acute promyelocytic leukemia who have become negative for PML-RARalpha transcript after consolidation therapy: the Japan Adult Leukemia Study Group (JALSG) APL97 study.	Blood.	110	59-66	2007
Asou N, Yanagida M, Huang L, Yamamoto M, Shigesada K, Mitsuya H, Ito Y, and Osato M.	Concurrent transcriptional deregulation of AML1/RUNX1 and GATA factors by the AML1-TRPS1 chimeric gene in t(8;21)(24;q22) acute myeloid leukemia.	Blood.	109	4023-4027	2007
Asou N, Izuno Y, Okubo T, Ide K, Ueno H, Kawakita M, Mitsuya H, Hata H.	Oral melphalan, dexamethasone and thalidomide for the treatment of refractory multiple myeloma.	Int J Hematol.	86	69-71	2007
Narimatsu H, Emi N, Kohno A, Iwai M, Yanada M, Yokozawa T, Saito S, Shimada K, Kiyoi H, Naoe I, Yamamoto K, Morishita Y.	High incidence of secondary failure of platelet recovery after autologous and syngeneic peripheral blood stem cell transplantation in acute promyelocytic leukemia.	Bone Marrow Transplant.	40	773-778	2007
Ohara F, Kobayashi Y, Akabane D, Maruyama D, Tanimoto K, Sung-Won Kim, Watanabe T, Tobinai K.	Abdominal pain and syndrome of inappropriate antidiuretic hormone secretion as a manifestation of visceral varicella zoster virus infection in a patient with non-Hodgkin's lymphoma.	Am J Hematol.	82	414-418	2007
Tanimoto K, Kaneko A, Suzuki S, Sekiguchi N, Watanabe T, Kobayashi Y, Kagami Y, MiyagiMaeshima A, Matsuno Y and Tobinai K.	Primary Ocular Adnexal MALT Lymphoma: A Long-term Follow-up Study of 114 Patients.	Jpn J Clin Oncol.	37	337-344	2007

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Maruyama D, Watanabe T, Beppu Y, Kobayashi Y, Sung-Won Kim, Tanimoto K, Makimoto A, Kagami Y, Terauch T, Matsuno Y and Tobinai K.	Primary bone lymphoma: a new and detailed characterization of 28 patient in a single-institution study.	Jpn J Clin Oncol.	37	216-223	2007
Miyawaki S, Kawai Y, Takeshita A, Komatsu N, Usui N, Arai Y, Ishida F, Morii T, Kano Y, Ogura M, Doki N, Ohno R.	Phase I trial of FLAGM with high doses of cytosine arabinoside for relapsed, refractory acute myeloid leukemia: study of the Japan Adult Leukemia Study Group (JALSG).	Int J Hematol.	86	343-7	2007
Horii T, Suzuki Y, Takeshita A, Maekawa M.	Molecular characterization of 8-methoxyfluoroquinolone resistance in a clinical isolate of methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> .	Chemotherapy	53	104-9	2007
Fujisawa S, Ohno R, Shigeno K, Sahara N, Nakamura S, Naito K, Kobayashi M, Shinjo K, Takeshita A, Suzuki Y, Hashimoto H, Kinoshita K, Shimoya M, Kaise T, Ohnishi K.	Pharmacokinetics of arsenic species in Japanese patients with relapsed or refractory acute promyelocytic leukemia treated with arsenic trioxide.	Cancer Chemother Pharmacol.	59	485-93	2007
Nunoda K, Tauchi I, Takaku T, Okabe S, Akahane D, Sashida G, Ohyashiki JH, Ohyashiki K.	Identification and functional signature of genes regulated by structurally different ABL kinase inhibitors.	Oncogene	26	4179-4188	2007
Okabe S, Tauchi I, Nakajima A, Sashida G, Gotoh A, Broxmeyer HE, Ohyashiki JH, Ohyashiki K.	Depsipeptide (FK228) preferentially induces apoptosis in BCR/ABL-expressing cell lines and cells from patients with chronic myelogenous leukemia in blast crisis.	Stem Cells & Development.	16	503-514	2007
Ohyashiki K, Akahane D, Gotoh A, Ito Y, Tauchi I, Miyazawa K, Kimura Y, Ohyashiki JH.	Uncontrolled thrombocytosis in polycythemia vera is a risk for thrombosis, regardless of JAK2(V617F) mutational status.	Leukemia	21	2544-2545	2007
Ohyashiki K, Tauchi I, Kuroda M, Kodama A, Ohyashiki JH.	Recurrent chromosomal aberration at 12q15 in chronic idiopathic myelofibrosis with or without JAK2(V617F) mutation.	Leukemia	21	1578-1580	2007
Shimizu D, Iaki T, Utsunomiya A, Nakagawa H, Nomura K, Matsumoto Y, Nishida K, Horiike S, Taniwaki M.	Detection of NOTCH1 mutations in adult T-cell leukemia/lymphoma and peripheral T-cell lymphoma.	Int J Hematol.	85	212-218	2007



発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Shimada A, <u>Iaki I</u> , Kubota C, Tawa A, Horibe K, Tsuchida M, Hanada R, Tsukimoto I, Hayashi Y.	No nucleophosmin mutation in pediatric acute myeloid leukemia with normal karyotype: a study of the Japanese Childhood AML Cooperative Study Group.	Leukemia	21	1307	2007
Nemoto N, Suzukawa K, Shimizu S, Takei N, <u>Iaki I</u> , Hayashi Y, Kojima H, Kawakami Y, Nagasawa T.	Identification of a novel fusion gene MLL-MAML2 in secondary acute myelogenous leukemia and myelodysplastic syndrome with inv(11)(q21q23).	Chromosomes Cancer	46	813-819	2007
Wakui M, Kuriyama K, Miyazaki Y, Hata T, Taniwaki M, Ohtake S, Sakamaki H, Miyawaki S, <u>Naoe I</u> , Ohno R, Tomonaga M.	Diagnosis of acute myeloid leukemia according to the WHO classification in the Japan Adult Leukemia Study Group AML-97 protocol.	Int J Hematol.	87	144-51	2008
Yanada M, Takeuchi J, Sugiura I, Akiyama H, Usui N, <u>Yagasaki E</u> , Nishii K, Ueda Y, Takeuchi M, Miyawaki S, Maruta A, Narimatsu H, Miyazaki Y, Ohtake S, Jinnai I, Matsuo K, <u>Naoe I</u> , Ohno R; Japan Adult Leukemia Study Group.	Karyotype at diagnosis is the major prognostic factor predicting relapse-free survival for patients with Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia treated with imatinib-combined chemotherapy.	Haematologica.	93	287-90	2008
Xu J, Suzuki M, Niwa Y, Hiraga J, Nagasaka T, Ito M, Nakamura S, Tomita A, Abe A, <u>Kivoji H</u> , Kinoshita T, <u>Naoe I</u> .	Clinical significance of nuclear non-phosphorylated beta-catenin in acute myeloid leukaemia and myelodysplastic syndrome.	Br J Haematol.	140	394-401	2008
Narimatsu H, Yokozawa T, Iida H, Tsuzuki M, Hayakawa M, Takeo T, Iino M, Ichihashi T, Kato C, Sawamoto A, Sao H, Yanada M, Emi N, <u>Kivoji H</u> , Yamaguchi T, <u>Naoe I</u> , Suzuki R, Sugiura I.	Clinical characteristics and outcomes in patients with t(8;21) acute myeloid leukemia in Japan.	Leukemia.	22	428-432	2008

# Downregulation of microRNAs-143 and -145 in B-cell malignancies

Yukihiro Akao,<sup>1,4</sup> Yoshihito Nakagawa,<sup>1</sup> Yukio Kitade,<sup>2</sup> Tomohiro Kinoshita<sup>3</sup> and Tomoki Naoe<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Department of Medical Oncology, Gifu International Institute of Biotechnology, 1-1 Naka-Fudogaoka, Kakamigahara, Gifu 504-0838; <sup>2</sup>United Graduate School of Drug Discovery and Medical Information Sciences, Gifu University, Yanagido, Gifu 501-1193; <sup>3</sup>Department of Hematology and Oncology, Nagoya University, Graduate School of Medicine, 65 Tsurumai-cho, Showa-ku, Nagoya 466-8550, Japan

(Received June 15, 2007/Revised August 6, 2007/Accept August 15, 2007/Online publication September 24, 2007)

Recently, it has been found that inappropriate expression of microRNAs (miRNAs) is strongly associated with carcinogenesis. In this study, we demonstrated that the expression of miRNAs (miRs) -143 and -145, the levels of which were previously shown to be reduced in colon cancers and various kinds of established cancer cell lines, was also decreased in most of the B-cell malignancies examined, including chronic lymphocytic leukemias (CLL), B-cell lymphomas, Epstein-Barr virus (EBV)-transformed B-cell lines, and Burkitt lymphoma cell lines. All samples from 13 CLL patients and eight of nine B-cell lymphoma ones tested exhibited an extremely low expression of miRs-143 and -145. The expression levels of miRs-143 and -145 were consistently low in human Burkitt lymphoma cell lines and were inversely associated with the cell proliferation observed in the EBV-transformed B-cell lines. Moreover, the introduction of either precursor or mature miR-143 and -145 into Raji cells resulted in a significant growth inhibition that occurred in a dose-dependent manner and the target gene of miRNA-143 was determined to be ERK5, as previously reported in human colon cancer DLD-1 cells. Taken together, these findings suggest that miRs-143 and -145 may be useful as biomarkers that differentiate B-cell malignant cells from normal cells and contribute to carcinogenesis in B-cell malignancies by a newly defined mechanism. (*Cancer Sci* 2007; 98: 1914–1920)

MicroRNAs are endogenous ~22-nt non-coding RNAs that regulate gene expression by inhibiting the translation of mRNAs in a sequence-specific manner.<sup>(1–8)</sup> With more than 400 already identified, the human genome may contain up to 1000 miRNAs<sup>8</sup> (<http://microrna.sanger.ac.uk/>). Up to one-third of human mRNAs are predicted to be miRNA targets.<sup>(9)</sup> Each miRNA can target more than 200 transcripts directly or indirectly,<sup>(10,11)</sup> whereas more than one miRNA can converge on a single mRNA target.<sup>(9,12–15)</sup> Therefore, the potential regulatory circuitry afforded by miRNA is enormous. These findings support the notion that alterations of miRNAs copy number and their regulatory genes highly prevalent in cancer because of genomic aberrations is closely associated with carcinogenesis.

Recent increasing evidence shows that the expression of miRNA genes is deregulated in human cancer.<sup>(16–19)</sup> Specific over- or underexpression has been shown to correlate with particular tumor types.<sup>(20–24)</sup> miRNA overexpression can result in downregulation of tumor suppressor genes, whereas their underexpression can lead to oncogene upregulation.<sup>(16–19)</sup> For example, let-7, downregulated in lung cancer,<sup>(25–27)</sup> suppresses *Ras*,<sup>(26)</sup> miR-15 and miR-16, deleted or downregulated in CLL,<sup>(28)</sup> suppress *BCL2*,<sup>(29)</sup> miR-17-5p and miR-20a control the balance of cell death and proliferation driven by the proto-oncogene *c-Myc*.<sup>(30)</sup> Clear evidence indicates that miRNA polycistron miR-17-92 serves as an oncogene in lymphoma,<sup>(23)</sup> and lung cancer,<sup>(31)</sup> and that miR-372 and miR-373 are novel oncogenes in testicular germ cell tumors that act by numbing the p53 pathway.<sup>(32)</sup> Thus, miRNA expression profiles may predict the outcome of disease.<sup>(25,27,33)</sup>

First, by differential hybridization using a DNA microarray for miRNAs and then by semi-quantitative RT-PCR analysis between tumor and non-tumor tissues, we previously found that miRs-143 and -145, whose genes are located within 1.8 kb of each other in the chromosome 5q32 region, were downregulated in colon cancer,<sup>(34)</sup> as also reported by Michael *et al.*<sup>(35)</sup> Furthermore, all of the various kinds of human cancer cell lines tested exhibited an extremely low-expression of miRs-143 and -145, whereas the normal tissues in which they originate showed a good expression of both.<sup>(34)</sup>

In the present study, we investigated the expression of miRs-143 and -145 in hematopoietic malignancies, and found that the expression levels of both miRs were significantly decreased in B-cell malignancies, thus suggesting that they are good markers for B-cell malignancies, especially for CLL in combination with miRs-15 and -16.<sup>(28)</sup> Furthermore, the expression levels of miRs-143 and -145 were consistently low in Burkitt lymphoma cell lines and were inversely related to the growth of EBV-transformed cell lines. The transfection experiment of Raji cells with either precursor miR-143 or -145 demonstrated that both miRs negatively contributed to the cell growth.

## Materials and Methods

**Patients and tissue preparation.** All human blood and lymph node samples were obtained from patients who had undergone collection for diagnosis at Nagoya University Hospital and its collaborating hospitals in Nagoya, Aichi Prefecture. Human tonsils were also obtained by tonsilectomy. Informed consent in writing was obtained from each patient. Collection and distribution of the samples were approved by the appropriate Institution Review Board. The patients comprised 13 cases of chronic lymphocytic leukemia (CLL) and nine cases of B-cell lymphoma (8DLBCL, 1MALT). Pathological review and FACS analysis showed B-cell non-Hodgkin lymphoma. PBL from three healthy donors were used as normal controls. Fresh lymphoma biopsy specimens and tonsils obtained by operation were gently minced over a wire mesh screen to obtain a cell suspension, which was then centrifuged over Ficoll-Hypaque (Amersham Biosciences AB, Uppsala, Sweden). CD19<sup>+</sup> B-cells from the tonsils were used as control cells. Purity was assessed,

\*To whom correspondence should be addressed. E-mail: yakao@giiib.or.jp  
Abbreviations: 5-Aza, 5-Aza-2'-deoxycytidine; C/EBP, CCAAT/enhancer binding protein; CLL, chronic lymphocytic leukemia; Ct, threshold cycle; DLBCL, diffuse large B cell lymphoma; DNMT-1, DNA methyltransferase; EBV, Epstein-Barr virus; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; ERK, extracellular signal regulated kinase; FACS, fluorescence-activated cell sorting; FBS, fetal bovine serum; FITC, fluorescein isothiocyanate; GAPDH, glyceraldehyde phosphate dehydrogenase; HRP, horseradish peroxidase; MALT, extranodal marginal zone B-cell lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue; MAPK, mitogen-activated protein kinase; miRNAs, microRNAs; PBL, peripheral blood lymphocytes; PBS, phosphate-buffered saline; PCR, polymerase chain reaction; PLSD, protected least significant difference; PVDF, polyvinylidene fluoride; RISC, RNA-induced silencing complex; RT, reverse transcription; SDS, sodium dodecyl sulfate; TSA, Tricostatin A; UTR, untranslated region.

and isolation carried out by FACS. All samples were prepared by gravity centrifugation through Ficoll-Hypaque and then frozen in liquid nitrogen until the experiments could be carried out. Such thawed specimens were used for the extraction of total RNA.

**Cell culture, viability and treatment with 5-Aza-2'-deoxycytidine or trichostatin A.** Human Burkitt cell lines Raji, Daudi, P3, and KHM-10B; and human EBV-transformed cells IC, L11, L22, and L25 were grown in RPMI-1640 medium supplemented with 10% (v/v) heat-inactivated FBS (Sigma, St. Louis, MO, USA) and 2 mM L-glutamine under an atmosphere of 95% air and 5% CO<sub>2</sub> at 37°C.

The number of viable cells was determined by use of the trypan-blue dye exclusion test. 5-Aza (Sigma) was used for demethylation of DNA and histone. TSA (Sigma), a histone deacetylase inhibitor, was also used to examine the effect of acetylation of histone on miR-143 and -145 expression. The cells were treated with these agents for 18 h at various concentrations.

**Quantitative RT-PCR and genomic PCR.** Total RNA was isolated from the cells by the phenol/guanidium thiocyanate method with DNase I treatment. To determine the expression of miRNAs by semi-quantitative RT-PCR, we measured their levels by using a mirVana™ qRT-PCR miRNA Detection Kit (Ambion, Austin, TX, USA) and mirVana qRT-PCR Primer set (Ambion). Briefly, after reverse transcription of 50 ng of total RNA, cDNA was generated. The PCR reaction consisted of 22 cycles (95°C for 15 s, 60°C for 30 s) after an initial denaturation step (95°C for 3 min). The cycle number was initially determined by quantitative PCR. The PCR primer pairs for miRs-143, -145, and -15a were obtained commercially from Ambion. The PCR products obtained by using such primer pairs were confirmed to be from loci of miRs-143 and -145 by DNA sequencing. U6 was used as a control and was determined in each case. In addition, in order to examine the expression level in detail we also carried out TaqMan® MicroRNA Assays using real-time PCR.<sup>(16)</sup> The Ct is defined as the fractional cycle number at which the fluorescence passes a fixed threshold. miR-143 and miR145 concentration in each type of cell were measured and were normalized to U6, which was used as an internal control. To determine the level of ERK5 mRNA we prepared cDNA from the total RNA samples by using a PCR purification kit (Qiagen, Hilden, Germany) and used them for PCR (Takara, Ohtsu, Japan). The primers for ERK5 were as follows: ERK5-sense-211, 5'-CCTTCGATGTGACCTTTGAC-3'; and ERK5-antisense-1418, 5'-TGACACCATTGATCTGACCC-3'. To examine the presence of the genomic loci of miRs-143 and -145, we extracted DNA from the cell lines tested and used it for PCR (Takara). The primers for genomic loci of miRs-143 and -145 were as follow: 5q32-sense, 5'-TTGGTCCTGGGTGCTCAAAT-3'; and 5q32-antisense, 5'-AGGAAGCTCCCAAGCTCAAGT-3'. The primers amplified the DNA fragment including both loci at 5q32. The genomic locus of GAPDH was used as an internal control. The PCR reaction consisted of 30 cycles (94°C for 30 s, 57.5°C for 1 min, 72°C for 1 min) after an initial denaturation step (95°C for 1 min). The PCR products were analyzed by electrophoresis on 2% agarose gels.

**Transfection of Raji cells with precursor or mature miR-143 and -145 miRNAs.** Raji cells were seeded in six-well plates at a concentration of 1–2 × 10<sup>5</sup>/well on the day before the transfection. The miRs-143 and -145 precursors (20–100 nM/mL; Ambion) and mature miRNAs (20–60 nM/mL) were used for the transfection of the cells, which was achieved by using cationic liposomes (i.e. TransIT-TKO) (Mirus Bio Company, Madison, WI, USA) according to the manufacturer's lipofection protocol. The transfection efficiency was evaluated by the transfection of the cells with a duplex siRNA-FITC (Dharmacon, Lafayette, CO, USA). Non-specific control miRNA (NS, 57% GC content; Ambion) was used as a control for non-specific effects. The sequences of mature miRNA-143 (miRNA-143 m) and -145 (miRNA-145 m) were as follows: UGAGAUGAAGCACUGUAGCUCA and GUCCAGUUUCCAGGAAUCCUU,

respectively. The effects manifested by the introduction of the precursor or mature miRNAs into the cells were assayed at 36 h after the transfection. At the same time, semi-quantitative RT-PCR was carried out on the cells transfected with the precursors.

**Western blotting.** The cells were homogenized in chilled lysis buffer comprising 10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 1% NP-40, 0.1% deoxycholic acid, 0.1% SDS, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, and 1% protease inhibitor cocktail (Sigma) and stood for 30 min on ice. After centrifugation at 16 000g for 20 min at 4°C, the supernatants were collected as protein samples. Protein contents were measured with a DC protein assay kit (Biorad, Hercules, CA, USA). 10 µg of lysate protein for western blotting of ERK5 and c-myc was separated by SDS-PAGE using a 10% polyacrylamide gel and electroblotted onto a PVDF membrane (DuPont, Boston, MA, USA). After blockage of non-specific binding sites for 1 h with 5% non-fat milk in PBS containing 0.1% Tween 20, the membrane was incubated overnight at 4°C with antihuman ERK5 antibody (Cell Signaling Tec. Inc., Beverly, MA, USA), antihuman c-myc antibody (Santa Cruz, Santa Cruz, CA, USA) or with DNMT-1 (Santa Cruz). The membranes were then washed three times with PBS containing 0.1% Tween 20, incubated further with HRP-conjugated sheep antimouse or donkey antirabbit Ig antibody (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA) at room temperature, and then washed three times with PBS containing 0.1% Tween 20. The immunoblots were visualized by use of an enhanced chemiluminescence detection kit (New England Biolabs, Beverly, MA, USA).

**Statistics.** Differences were statistically evaluated by one-way ANOVA followed by Fisher's PLSD. A *P*-value of less than 0.05 was considered to be statistically significant.

## Results

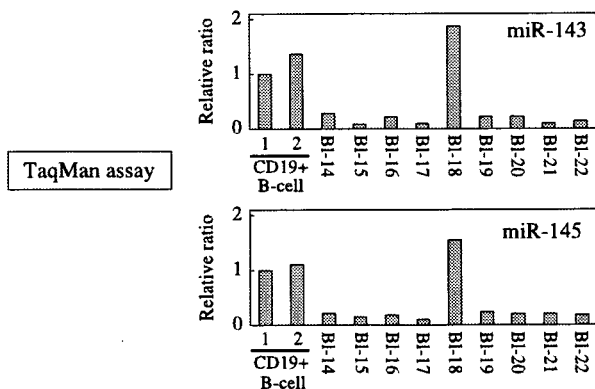
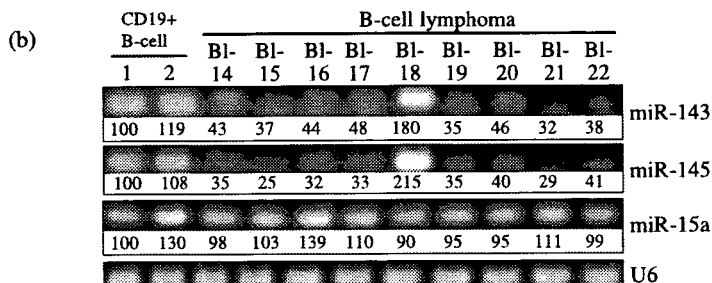
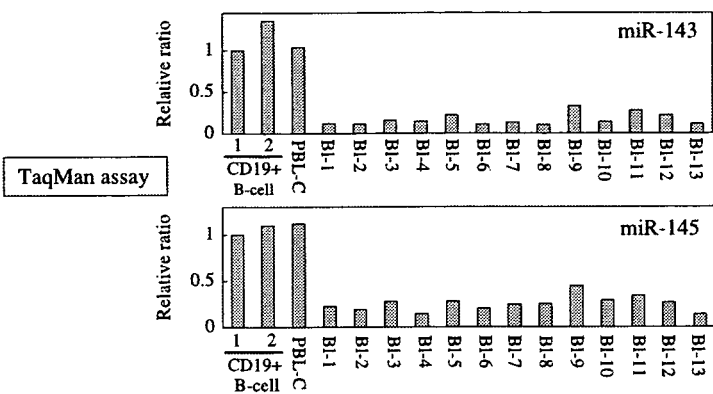
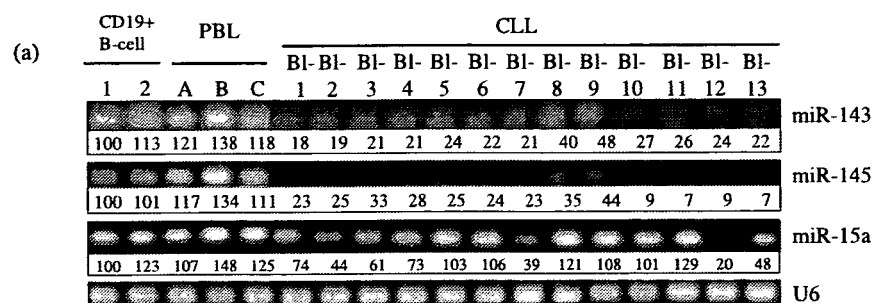
**Expression levels of miRs-143 and -145 were significantly decreased in B-cell malignancies.** We examined the expression of miRs-143 and -145 in the samples from patients with B-cell malignancies by conducting semi-quantitative RT-PCR and TaqMan assays using real-time PCR. Representative bands of expression obtained by the former and the mean values of TaqMan assays from two independent experiments using the latter are presented in Fig. 1. There was no patient with any abnormality of chromosome 5q32, where miRs-143 and -145 are colocalized within a 1.8-kb distance from each other. In TaqMan assays, Ct values of the samples detected by TaqMan probes corresponding to U6, miR-143 and miR-145 are shown in Table 1. Notably, all of the cases of CLL showed an extremely low-expression (Fig. 1a). Among the B-cell lymphomas, all of the samples except Bl-18 exhibited a low level (Fig. 1b). Recent reports by Calin *et al.*<sup>(28)</sup> demonstrated that the expression levels of miR-15a and -16 from 13q13.4 were decreased in CLLs with an incidence of approximately 68%. However, the incidence of reduced miR-15a expression in our Japanese CLLs was not so high (approximately 54%, Fig. 1a).

**Relationship between the expression levels of miRs-143 and -145 and cell growth.** In order to clarify the relationship between the

**Table 1.** The Ct values of U6, miR-143, and miR-145 in real-time PCR using the TaqMan probes.

Standard Curve	Ct	
	Mean ± SD	CV (%)
U6	27.1 ± 0.12	0.4
miR-143	31.0 ± 0.12	0.4
miR-145	28.1 ± 0.08	0.3

Ct, cycle threshold; CV, coefficient variation; miR, miRNA; SD, standard deviation.



expression levels of miRs-143 and 145 and cell growth in B-cell lines, we examined the expression levels of EBV-transformed B-cell lines from healthy donors (IC, L11, L22, and L25) and established Burkitt cell lines (Raji, Daudi, P32, and KHM-10B; Fig. 2a). It should be noted that the expression levels were inversely related to the cell growth of EBV-transformed cells from the data of semi-quantitative RT-PCR (Ambion) (Fig. 2a,b; expression level, L25 < L22 = L11 < IC; growth, IC < L22 < L11 < L25). Furthermore, all of the Burkitt cell lines, in which cells have genetic aberrations including *c-Myc*, showed a fairly low level of the expression of both miRNAs like the L25 cells (Fig. 2a), which showed the highest cell proliferation among the EBV-transformed B-cell lines (Fig. 2b). The data in Fig. 2a,b clearly indicate an inverse

relationship between the expression levels of miR-143 and -145 and cell growth.

**Transfection of RAJI cells with precursor or mature miR-143 or -145, respectively, causes growth inhibition.** In order to examine the suppressive function of miR-143 and -145 with respect to cell growth and to examine which enzymatic modification during miRNA biogenesis is perturbed, we transfected low-expressant Raji cells with precursor miR-143 (miR-143p) or -145 (miR-145p), in which transfection resulted in a significant growth inhibition that occurred in a dose-dependent manner (Fig. 3a). Semi-quantitative RT-PCR using the primers for miR-143 or -145 demonstrated a significant increase in the levels of miR-143 and 145 in the Raji cells transfected with the respective precursors compared with their levels in the control cells

**Fig. 1.** Expression of microRNAs (miRNAs)-143 and -145 in human B-cell malignancies examined by quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). Blood samples or lymph nodes (Bl) from patients were obtained on admission or after relapse of the disease. Thirteen cases of chronic lymphocytic leukemia (CLL) (a) and nine cases of B-cell lymphoma (b) were examined. Peripheral blood lymphocytes (PBL) from individuals a, b, and c and CD19<sup>+</sup> B-cells from the tonsils (1 and 2) were used as controls. In CLLs, the expression of miR-15a<sup>(28)</sup> was also examined by semi-quantitative RT-PCR. U6 was used as an internal standard. The intensity of the bands for miR-143, -145 and -15a expression was determined by densitometry and the value is given under each band. The levels of CD19<sup>+</sup> B-cells for CLL and B-cell lymphoma were designated as 100 in semi-quantitative RT-PCR and as 1 in quantitative RT-PCR by TaqMan assays using a real-time PCR. The results of real-time PCR are expressed as the mean values of two independent experiments.