

200823035A

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」

平成20年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 間野 博行

平成21(2009)年4月

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20年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 間野 博行

平成21(2009)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 -----	6
2.	「Methotrexate (MTX)と他剤併用時の至適投与方法」に関する研究 栃木県立がんセンター 加納康彦 -----	9
3.	「白血病に発現するラミニン受容体の意義」に関する研究 長崎大学医学部・歯学部附属病院 宮崎 泰司-----	11
III.	研究成果の刊行に関する一覧表 -----	15
IV.	研究成果の刊行物・別冊 -----	20

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：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。既に同バンクには800例を超える白血病芽球が保存されており、貴重な我が国の臨床試料リソースとなっている。これらについて以下の多面的なアプローチを取って白血病の病態解明を目指した。(1) 配列異常によるがん遺伝子の有無を塩基配列解析用大型DNAチップにより解析し、複数の病因遺伝子を発見した。(2) マイクロRNA (miRNA) の高感度クローニング法を開発し、それを用いて白血病芽球におけるmiRNA発現プロファイルを決定すると共に、新規miRNAを発見した。(3) 白血病の薬剤感受性メカニズムを明らかにするべく、methotrexate (MTX) と他剤との併用効果について、T細胞白血病患者細胞株を用いて網羅的に検討した。(4) 白血病患者の長期予後を予測する目的で、予後不良白血病患者芽球においてラミニン受容体が高発現していることを明らかにした。

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
加納康彦	栃木県立がんセンター・副病院長
宮崎泰司	長崎大学医学部・歯学部附属病院・講師

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。

これら貴重な我が国の急性骨髄性白血病患者リソースを用い、新たながん遺伝子の発見、マイクロRNA (miRNA) の発現プロファイル、予後不良関連遺伝子の同定および分子標的治療剤の有効なプロトコール開発を目指した。

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20年2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。

2) 米国ベンチャー起業と共同で世界最大の塩基配列解析用DNAチップを開発した。これはヒトのがん関連遺伝子約5400種類について、そのprotein-coding exon領域の塩基配列異常およびスプライシング異常のスクリーニングを可能にするものであり、計900万塩基について塩基配列の決定が可能である。この超大型DNAチップを用いて、Phase Iプロジェクトとして疾患細胞より調整したゲノムDNAを増幅・標識した後シーケンスアレイにハイブリダイズさせる。得られた配列変異がSNP多型でないことを確認するため、解析対象症例のCD4陽性分画を正常コントロールとして用い、Phase Iで同定された塩基配列変異のみを集積した小型シーケンスチップにそのDNAをハイブリダイズさせる(Phase II)。その結果真に白血病患者細胞におけるsomatic mutationsと判定された配列異常（およびその異常があった遺伝子の全cDNA配列）についてBlast Bankサンプルを試料とした多検体大規模Sangerシーケンスを行う。

3) miRNAを微量の検体から同定する目的で、microRNA amplification profiling (mRAP)法を新たに開発した。これは数十ngの微量RNAか

らも miRNA クローンを 100 万種類以上回収可能な極めて鋭敏なクローニング法であり、こうして同定された miRNA クローンをシークエンスすることにより、臨床検体における発現プロファイルを決定し、さらに新規 miRNA の同定も行う。

5) ヒト白血病細胞株として T 細胞白血病の MOLT 3 を用いた。併用に用いた抗がん剤は carboplatin, doxorubicin, etoposide, 5-fluorouracil, F-ara-A, gemcitabine, 4-hydroperoxy-ifosfamide, mitoxantrone である。同時投与の実験では MTX とこれらの薬剤の存在下で 4 日間培養した。一方、MTX 先行の場合、MTX を 24 時間投与し、培養液を交換し、併用薬を加えさらに 4 日間培養を行い、その細胞増殖抑制効果を MTT assay で調べ IC₅₀ における併用効果を isobologram (Steel and Peckham) で分析した。

6) 初診時患者骨髓細胞より CD34 陽性細胞をカラム法にて分離し、抗 LR 抗体によって処理後ベクトンディッキンソンの FACSscan を用いて CD34 陽性細胞における LR 発現量を調べた。正常コントロール細胞も同時に測定した。LRcDNA を発現ベクターに組み込み、GM-CSF 依存性ヒト白血病細胞株 TF-1 に導入して LR 過剰発現 TF-1 株 (TF-1LR) を作製した。LR 発現を低下させるために発現誘導型 siRNA を導入し LR 低発現 TF-1 株 (TF-1si) を作製した。これらの細胞株を用い、液体培地における細胞増殖を調べるために WST-1 アッセイを実施した。コロニー形成能の変化はメチルセルロース培地にて検討した。細胞集期の変化は BrdU 法によった。アポトーシス検出のために低 GM-CSF 濃度培養条件下で細胞表面の Annexin V 発現を抗 Annexin V 抗体によって測定した。細胞内で STAT5 リン酸化は、抗リン酸化 STAT5 抗体をもちい、フローサイトメータにて検討した。

(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、長崎大学医学部歯学部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) 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い

く我々は微量の臨床検体から miRNA を高効率に単離する新たな手法 (mRAP; microRNA Amplification Profiling) を開発したが、さらにこの mRAP 産物を Solexa deep sequencer にて直接解析する mRAP-Solexa 法を新たに開発することに成功した。本法を用いることで 1×10^4 細胞ほどの微量な臨床検体からも数千万個の miRNA クローンを正確かつ比較的簡便に解析可能であり、今後の臨床検体を用いた miRNA 発現解析における重要な技術になると予想される。さらに本法を用いて高等真核生物の miRNA 全容を明らかにするべく、様々な発達段階のマウス胎児、及び成獣マウス各種臓器より mRAP-Solexa 解析を行い、3 億個以上の低分子 RNA 由来 cDNA を決定し、マウスにおける miRNA のほぼ全容を明らかにすることに成功した。

2) 白血病芽球ゲノムのリ・シーケンシング

遺伝子異常に基づく白血病の分類を可能にする目的で、遺伝子配列異常の大規模解析を行った。ヒトにおいて発がんに関連が予想される 5600 種類のタンパクコード遺伝子について、その coding exon の配列異常を超大型 DNA チップによりスクリーニングした。その結果チロシンキナーゼ遺伝子の新規活性化型変異を同定することに成功した。さらに同キナーゼ変異を計 286 例の白血病検体で解析したところ、9 例で変異を発見した。我々が同定した変異キナーゼをマウス骨髓細胞に導入したところ急性リンパ性白血病が発症した。以上より我々が発見したキナーゼ変異は、白血病の新たな原因であり治療標的として重要な分子と考えられた。さらに我々が同定した白血病芽球の体細胞変異として、エピジェネティック状態を司る酵素のアミノ酸置換を発見した。本変異を持つ酵素はその活性が約 50% 程度に低下する事が示され、白血病におけるエピジェネティック異常の新たな原因となる事が確認された。

3) MTX 感受性解析

MTX の IC₅₀ 値は 96 h exposure の場合 15 nM、24 h exposure では 490 nM であった。得られた dose-response curve をもとに isobologram で併用効果を分析すると、MTX は今までに調べた抗がん剤、同様、今回の抗がん剤すべてと拮抗作用を示した。一方、MTX を先行させた場合 doxorubicin と相加効果、carboplatin, etoposide, 5-fluorouracil, F-ara-A, gemcitabine, 4-hydroperoxy-ifosfamide, mitoxantrone と相乗効果を示した。同時投与で

MTXと相加、相乗作用を示す薬剤はなく、一方、MTX先行投与で拮抗作用を示す薬剤もなかった。

4) ラミニン受容体発現解析

CD34陽性白血病細胞におけるLRは、症例間で異なっていたが、正常CD34陽性細胞ではLR発現は25%の細胞にまで見られた。そこで25%以上の例を高発現群、それ以下を低発現群として両者を比較したところ、高発現群では初診時白血球数が有意に高値であり、予後は有意に不良であった。TF-1LR, TF-1si, 野生型TF-1 (wtTF-1)はそれぞれ異なる細胞表面LR発現を示し、TF-1LR > wtTF-1 > TF-1siの順に細胞表面LR発現が減少していた。液体培地での細胞増殖、コロニー形成能、アポトーシス抵抗性のいずれもLR発現量と関連しており、細胞集期におけるS期細胞割合もTF-1LR > wtTF-1 > TF-1siの順となった。

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検体収集を行い、その体細胞遺伝子変異をスクリーニングすることで、新たながん遺伝子を発見することに成功した。また同様にはケツ血病臥球を用いてmiRNAプロファイルを明らかにすると共に、白血病細胞のMTX抗腫瘍効果に関する薬剤感受性解析、さらに新たな白血病患者予後予測マーカーの同定にも成功した。

F. 健康危険情報

無し

G. 研究発表

1. 論文発表

間野博行

- 1) Kato N, Miyata T, Tabara Y, Katsuya T, Takeuchi K, Choi YL, Togashi Y, Soda M, Hatano S, Inamura K, Takada S, Ueno T, Yamashita Y, Sato Y, Okumura S, Nakagawa K, Ishikawa Y and Mano H. "KIF5B-ALK, a novel fusion oncokinas identified by an immunohistochemistry-based diagnostic system for ALK-positive lung cancer" *Clin Cancer Res* in press.
- 2) Kaneda R, Takada S, Yamashita Y, Choi YL, Nonaka-Sarukawa M, Soda M, Misawa Y, Isomura T, Shimada K and Mano H.

"Genome-wide histone methylation profile for heart failure" *Genes Cells* 14: 69-77, 2009.

- 3) Takeuchi K, Choi YL, Soda M, Inamura K, Togashi Y, Hatano S, Enomoto M, Takada S, Yamashita Y, Sato Y, Okumura S, Nakagawa K, Ishikawa Y and Mano H. "Multiplex reverse transcription-PCR screening for *EML4-ALK* fusion transcripts" *Clin Cancer Res* 14: 6618-6624, 2008.
- 4) Takada S, Yamashita Y, Berezikov E, Hatanaka H, Fujiwara SI, Kurashina K, Watanabe H, Enomoto M, Soda M, Choi YL and Mano H. "MicroRNA expression profiles of human leukemias" *Leukemia* 22: 1274-1278, 2008.
- 5) Soda M, Takada S, Takeuchi K, Choi YL, Enomoto M, Ueno T, Haruta H, Hamada T, Yamashita Y, Ishikawa Y, Sugiyama Y and Mano H. "A mouse model for *EML4-ALK*-positive lung cancer" *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 19893-19897, 2008.
- 6) Sato T, Toki T, Kanezaki R, Xu G, Terui K, Kanegane H, Miura M, Adachi S, Migita M, Morinaga S, Nakano T, Endo M, Kojima S, Kiyoi H, Mano H and Ito E. "Functional analysis of JAK3 mutations in transient myeloproliferative disorder and acute megakaryoblastic leukaemia accompanying Down syndrome" *Br J Haematol* 141: 681-688, 2008.
- 7) Saga Y, Ohwada M, Suzuki M, Konno R, Kigawa J, Ueno S and Mano H. "Glutathione peroxidase 3 is a candidate mechanism of anticancer drug resistance of ovarian clear cell adenocarcinoma" *Oncol Rep* 20: 1299-1303, 2008.
- 8) Onimaru Y, Tsukasaki K, Murata K, Imaizumi Y, Choi YL, Hasegawa H, Sugahara K, Yamada Y, Hayashi T, Nakashima M, Taguchi T, Mano H. Kamihira S and Tomonaga M. "Autocrine and/or paracrine growth of aggressive ATLL cells caused by HGF and c-Met" *Int J Oncol* 33: 697-703, 2008.
- 9) Nagai K, Jinnai I, Hata T, Usui T, Sasaki D, Tsukasaki K, Sugahara K, Hishikawa Y, Yamada Y, Tanaka Y, Koji T, Mano H. Kamihira S and Tomonaga M. "Adhesion-dependent growth of primary adult T cell leukemia cells with down-regulation of HTLV-I p40Tax protein: a novel in vitro model of the growth of acute ATL cells" *Int J Hematol* 88: 551-564, 2008.
- 10) Mano H. "Non-solid oncogenes in solid tumors: *EML4-ALK* fusion genes in lung cancer" *Cancer Sci* 99: 2349-2355, 2008.
- 11) Mano H. "Epigenetic abnormalities in cardiac hypertrophy and heart failure" *Environ Health Prev Med* 13: 25-29, 2008.
- 12) Kurashina K, Yamashita Y, Ueno T, Koinuma K, Ohashi J, Horie H, Miyakura Y, Hamada T,

- Haruta H, Hatanaka H, Soda M, Choi YL, Takada S, Yasuda Y, Nagai H and Mano H. "Chromosome copy number analysis in screening for prognosis-related genomic regions in colorectal carcinoma" *Cancer Sci* 99: 1835-1840, 2008.
- 13) Kato N, Miyata T, Tabara Y, Katsuya T, Yanai K, Hanada H, Kamide K, Nakura J, Kohara K, Takeuchi F, Mano H, Yasunami M, Kimura A, Kita Y, Ueshima H, Nakayama T, Soma M, Hata A, Fujioka A, Kawano Y, Nakao K, Sekine A, Yoshida T, Nakamura Y, Saruta T, Ogiwara T, Sugano S, Miki T and Tomoike H. "High-density association study and nomination of susceptibility genes for hypertension in the Japanese National Project" *Hum Mol Genet* 17: 617-627, 2008.
 - 14) Inamura K, Takeuchi K, Togashi Y, Nomura K, Ninomiya H, Okui M, Satoh Y, Okumura S, Nakagawa K, Soda M, Choi YL, Niki T, Mano H and Ishikawa Y. "EML4-ALK fusion is linked to histological characteristics in a subset of lung cancers" *J Thorac Oncol* 3: 13-17, 2008.
 - 15) Fujiwara SI, Yamashita Y, Nakamura N, Choi YL, Ueno T, Watanabe H, Kurashina K, Soda M, Enomoto M, Hatanaka H, Takada S, Abe M, Ozawa K and Mano H. "High-resolution analysis of chromosome copy number alterations in angioimmunoblastic T-cell lymphoma and peripheral T-cell lymphoma, unspecified, with single nucleotide polymorphism-typing microarrays" *Leukemia* 22: 1891-1898, 2008.
 - 16) Choi YL, Takeuchi K, Soda M, Inamura K, Togashi Y, Hatano S, Enomoto M, Hamada T, Haruta H, Watanabe H, Kurashina K, Hatanaka H, Ueno T, Takada S, Yamashita Y, Sugiyama Y, Ishikawa Y and Mano H. "Identification of novel isoforms of the EML4-ALK transforming gene in non-small cell lung cancer" *Cancer Res* 68: 4971-4976, 2008.
 - 17) Chen Y, Takita J, Choi YL, Kato M, Ohira M, Sanada M, Wang L, Soda M, Kikuchi A, Igarashi T, Nakagawara A, Hayashi Y, Mano H and Ogawa S. "Oncogenic mutations of ALK kinase in neuroblastoma" *Nature* 455: 971-974, 2008.
 - 2) Mori K, Kobayashi H, Kamiyama Y, Kano Y and Kodama T. "A phase II trial of weekly chemotherapy with paclitaxel plus gemcitabine as a first-line treatment in advanced non-small-cell lung cancer" *Cancer Chemother Pharmacol* 2008.
 - 3) Murakami T, Sato A, Chun NA, Hara M, Naito Y, Kobayashi Y, Kano Y, Ohtsuki M, Furukawa Y and Kobayashi E. "Transcriptional modulation using HDACi depsipeptide promotes immune cell-mediated tumor destruction of murine B16 melanoma" *J Invest Dermatol* 128: 1506-1516, 2008.
 - 4) Nakajima TE, Yasunaga M, Kano Y, Koizumi F, Kato K, Hamaguchi T, Yamada Y, Shirao K, Shimada Y and Matsumura Y. "Synergistic antitumor activity of the novel SN-38-incorporating polymeric micelles, NK012, combined with 5-fluorouracil in a mouse model of colorectal cancer, as compared with that of irinotecan plus 5-fluorouracil" *Int J Cancer* 122: 2148-2153, 2008.
 - 5) Noborio-Hatano K, Kikuchi J, Takatoku M, Shimizu R, Wada T, Ueda M, Nobuyoshi M, Oh I, Sato K, Suzuki T, Ozaki K, Mori M, Nagai T, Muroi K, Kano Y, Furukawa Y and Ozawa K. "Bortezomib overcomes cell adhesion-mediated drug resistance through downregulation of VLA-4 expression in multiple myeloma" *Oncogene* 28: 231-242, 2009.
 - 6) Odgerel T, Kikuchi J, Wada T, Shimizu R, Futaki K, Kano Y and Furukawa Y. "The FLT3 inhibitor PKC412 exerts differential cell cycle effects on leukemic cells depending on the presence of FLT3 mutations" *Oncogene* 27: 3102-3110, 2008.

宮崎泰司

加納康彦

- 1) Akutsu M, Tsunoda S, Izumi T, Tanaka M, Katano S, Inoue K, Igarashi S, Hirabayashi K, Furukawa Y, Ohmine K, Sato K, Kobayashi H, Ozawa K, Kirito K, Nagashima T, Teramukai S, Fukushima M and Kano Y. "Long-term results of dose-intensive chemotherapy with G-CSF support (TCC-NHL-91) for advanced intermediate-grade non-Hodgkin's lymphoma: a review of 59 consecutive cases treated at a single institute" *Oncol Res* 17: 137-149, 2008.
- 1) Fukushima T, Horio K, Matsuo E, Imanishi D, Yamasaki R, Tsushima H, Imaizumi Y, Ohshima K, Hata T, Yoshida S, Miyazaki Y and Tomonaga M. "Successful cord blood transplantation for mycosis fungoides" *Int J Hematol* 88: 596-598, 2008.
- 2) Iwanaga M, Tagawa M, Tsukasaki K, Matsuo T, Yokota K, Miyazaki Y, Fukushima T, Hata T, Imaizumi Y, Imanishi D, Taguchi J, Momita S, Kamihira S and Tomonaga M. "Relationship between monoclonal gammopathy of undetermined significance and radiation exposure in Nagasaki atomic bomb survivors" *Blood* 113: 1639-1650, 2009.
- 3) Matsuda A, Jinnai I, Miyazaki Y and Tomonaga M. "Proposals for a grading system for diagnostic accuracy of the Myelodysplastic syndromes" *Clin Leuk* 2: 102-106, 2008.
- 4) Sawayama Y, Miyazaki Y, Ando K, Horio K, Tsutsumi C, Imanishi D, Tsushima H, Imaizumi Y, Hata T, Fukushima T, Yoshida S, Onimaru Y, Iwanaga M, Taguchi J, Kuriyama K and Tomonaga M. "Expression of

myeloperoxidase enhances the chemosensitivity of leukemia cells through the generation of reactive oxygen species and the nitration of protein” *Leukemia* 22: 956-964, 2008.

- 5) Suzuki T, Tomonaga M, Miyazaki Y, Nakao S, Ohyashiki K, Matsumura I, Kohgo Y, Niitsu Y, Kojima S and Ozawa K. “Japanese epidemiological survey with consensus statement on Japanese guidelines for treatment of iron overload in bone marrow failure syndromes” *Int J Hematol* 88: 30-35, 2008.
- 6) Wakui M, Kuriyama K, Miyazaki Y, Hata T, Taniwaki M, Ohtake S, Sakamaki H, Miyawaki S, Naoe T, Ohno R and 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: 144-151, 2008.
- 7) Yanada M, Sugiura I, Takeuchi J, Akiyama H, Maruta A, Ueda Y, Usui N, Yagasaki F, Yujiri T, Takeuchi M, Nishii K, Kimura Y, Miyawaki S, Narimatsu H, Miyazaki Y, Ohtake S, Jinnai I, Matsuo K, Naoe T and Ohno R. “Prospective monitoring of BCR-ABL1 transcript levels in patients with Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukaemia undergoing imatinib-combined chemotherapy” *Br J Haematol* 143: 503-510, 2008.
- 8) Yanada M, Takeuchi J, Sugiura I, Akiyama H, Usui N, Yagasaki F, Nishii K, Ueda Y, Takeuchi M, Miyawaki S, Maruta A, Narimatsu H, Miyazaki Y, Ohtake S, Jinnai I, Matsuo K, Naoe T and Ohno R. “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: 287-290, 2008.

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

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： 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800例を超えるサンプルを用いて、配列異常を有する遺伝子の網羅的スクリーニングとマイクロRNA (miRNA) の発現プロファイルを行った。またこれらのプロジェクトのために、前者については世界最大の塩基配列解析用DNAチップを開発し、後者については微量の臨床検体から大量のmiRNA配列を同定できる新しいクローニング法を開発した。まず白血球芽球を用いて5400種類のヒト腫瘍関連遺伝子群のcoding exonの配列解析を行い、約10種類の芽球特異的な後天的遺伝子配列異常を発見した。その中には活性化型チロシンキナーゼをコードする新たな異常がん遺伝子が含まれていた。さらに我々は 10^4 個以下の微量の細胞から数百万種類のmiRNAを同定可能にする技術を確認し、これを用いてBlast Bankに属する白血球芽球のmiRNAプロファイルを解析した。その結果芽球に発現するmiRNAパターンは芽球の核型に良くリンクすることを発見した。

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球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。我々は白血球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。

クローナルな疾患の病因に遺伝子配列異常が主要な役割を果たすこと広く知られているが、これまでは遺伝子配列異常を比較的簡便かつ網羅的にスクリーニングする手法が存在しなかった。我々は米国ベンチャー企業と共同で約9 Mbpの塩基配列を一度の実験で解析可能にする超大型シーケンスDNAチップを開発した。本研究計画ではこれを用いた大規模シーケンスデータと発現情報とを統合することで、これまでにない精度で特発性造血障害の診断法及び予後予測法を開発し、新たな治療標的分子の単離を目指す。

B 研究方法

1) 大規模遺伝子配列解析:癌化に関与すると予想される多くの遺伝子のcoding exonに関して、

既に収集した検体を用いて大規模配列解析を行う。具体的には20例のAML症例について白血球芽球細胞とCD4陽性コントロール細胞それぞれからゲノムDNAを抽出し、大規模リ・シーケンス用DNAを用いてハイブリダイゼーションを行い、芽球ゲノムには存在するが、コントロール細胞ゲノム中には存在しない塩基配列異常を同定する。一部は既に同定済みであるが、20例全例に対して行い、そこで得られたsomatic mutation陽性遺伝子について、より大規模な検体セットにおける配列異常の頻度解析を行う。

2) 新規miRNAの同定:微量の臨床検体からマイクロRNA (miRAP) を高感度にクローニングする手法 miRNA amplification profiling (mRAP) を持ちいて、白血球検体のmiRNA発現プロファイルを明らかにすると共に、新規miRNAの同定を目指す。

(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、長崎大学医学部歯学部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) 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我々は微量の臨床検体からmiRNAを高効率に単離する新たな手法 (mRAP; microRNA Amplification Profiling)を開発したが、さらにこのmRAP産物をSolexa deep sequencerにて直接解析する mRAP-Solexa法を新たに開発する

ことに成功した。本法を用いることで 1×10^4 細胞ほどの微量な臨床検体からも数千万個のmiRNA クローンを正確かつ比較的簡便に解析可能であり、今後の臨床検体を用いた miRNA 発現解析における重要な技術になると予想される。さらに本法を用いて高等真核生物の miRNA 全容を明らかにするべく、様々な発達段階のマウス胎児、及び成獣マウス各種臓器より mRAP-Solexa 解析を行い、3 億個以上の低分子 RNA 由来 cDNA を決定し、マウスにおける miRNA のほぼ全容を明らかにすることに成功した。

2) 白血病芽球ゲノムのリ・シークエンシング 遺伝子異常に基づく白血病の分類を可能にする目的で、遺伝子配列異常の大規模解析を行った。ヒトにおいて発がんに関連が予想される 5600 種類のタンパクコード遺伝子について、その coding exon の配列異常を超大型 DNA チップによりスクリーニングした。その結果チロシンキナーゼ遺伝子の新規活性化型変異を同定することに成功した。さらに同キナーゼ変異を計 286 例の白血病検体で解析したところ、9 例で変異を発見した。我々が同定した変異キナーゼをマウス骨髄細胞に導入したところ急性リンパ性白血病が発症した。以上より我々が発見したキナーゼ変異は、白血病の新たな原因であり治療標的として重要な分子と考えられた。さらに我々が同定した白血病芽球の体細胞変異として、エピジェネティック状態を司る酵素のアミノ酸置換を発見した。本変異を持つ酵素はその活性が約 50%程度に低下する事が示され、白血病におけるエピジェネティック異常の新たな原因となる事が確認された。

D&E. 考察及び結論

我々が行った白血病のリシークエンシングは世界最大の白血病ゲノム解析であり、新たな急性骨髄性白血病の原因遺伝子を発見することに成功した。本遺伝子変異は白血病の分子診断、minimal residual diseaseの評価に役立つだけでなく、白血病の新たな分子標的療法の開発に重要な知見となる。また我々の解析データには、既知のNRAS, KIT, FLT3, AML1 遺伝子群の変異も発見されており、これら主要ながん遺伝子変異と同時に存在する遺伝子変異プロファイルに関する重要な知見も得ている。一方miRNAの同定については、全マウスmiRNA同定プロジェ

クトによってマウスの全miRNAがおおよそ1600種類ほどからなることが明らかになった。微量のトータルRNAから数千万種類のmiRNAクローンを同定する我々の手法は、今後の発がんにおけるmiRNAの機能を解析するための重要な基盤技術となるであろう。

F. 健康危険情報

無し

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Takeuchi K, Choi YL, Togashi Y, Soda M, Hatano S, Inamura K, Takada S, Ueno T, Yamashita Y, Sato Y, Okumura S, Nakagawa K, Ishikawa Y and Mano H. "KIF5B-ALK, a novel fusion oncokininase identified by an immunohistochemistry-based diagnostic system for ALK-positive lung cancer" *Clin Cancer Res* in press.
- 2) Kaneda R, Takada S, Yamashita Y, Choi YL, Nonaka-Sarukawa M, Soda M, Misawa Y, Isomura T, Shimada K and Mano H. "Genome-wide histone methylation profile for heart failure" *Genes Cells* 14: 69-77, 2009.
- 3) Takeuchi K, Choi YL, Soda M, Inamura K, Togashi Y, Hatano S, Enomoto M, Takada S, Yamashita Y, Satoh Y, Okumura S, Nakagawa K, Ishikawa Y and Mano H. "Multiplex reverse transcription-PCR screening for *EML4-ALK* fusion transcripts" *Clin Cancer Res* 14: 6618-6624, 2008.
- 4) Takada S, Yamashita Y, Berezikov E, Hatanaka H, Fujiwara SI, Kurashina K, Watanabe H, Enomoto M, Soda M, Choi YL and Mano H. "MicroRNA expression profiles of human leukemias" *Leukemia* 22: 1274-1278, 2008.
- 5) Soda M, Takada S, Takeuchi K, Choi YL, Enomoto M, Ueno T, Haruta H, Hamada T, Yamashita Y, Ishikawa Y, Sugiyama Y and Mano H. "A mouse model for *EML4-ALK*-positive lung cancer" *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 19893-19897, 2008.
- 6) Sato T, Toki T, Kanazaki R, Xu G, Terui K, Kanegane H, Miura M, Adachi S, Migita M, Morinaga S, Nakano T, Endo M, Kojima S, Kiyoi H, Mano H and Ito E. "Functional analysis of JAK3 mutations in transient myeloproliferative disorder and acute megakaryoblastic leukaemia accompanying Down syndrome" *Br J Haematol* 141: 681-688, 2008.
- 7) Saga Y, Ohwada M, Suzuki M, Konno R, Kigawa J, Ueno S and Mano H. "Glutathione peroxidase 3 is a candidate mechanism of anticancer drug resistance of ovarian clear cell

- adenocarcinoma" *Oncol Rep* 20: 1299-1303, 2008.
- 8) Onimaru Y, Tsukasaki K, Murata K, Imaizumi Y, Choi YL, Hasegawa H, Sugahara K, Yamada Y, Hayashi T, Nakashima M, Taguchi T, Mano H, Kamihira S and Tomonaga M. "Autocrine and/or paracrine growth of aggressive ATLL cells caused by HGF and c-Met" *Int J Oncol* 33: 697-703, 2008.
 - 9) Nagai K, Jinnai I, Hata T, Usui T, Sasaki D, Tsukasaki K, Sugahara K, Hishikawa Y, Yamada Y, Tanaka Y, Koji T, Mano H, Kamihira S and Tomonaga M. "Adhesion-dependent growth of primary adult T cell leukemia cells with down-regulation of HTLV-I p40Tax protein: a novel in vitro model of the growth of acute ATL cells" *Int J Hematol* 88: 551-564, 2008.
 - 10) Mano H. "Non-solid oncogenes in solid tumors: EML4-ALK fusion genes in lung cancer" *Cancer Sci* 99: 2349-2355, 2008.
 - 11) Mano H. "Epigenetic abnormalities in cardiac hypertrophy and heart failure" *Environ Health Prev Med* 13: 25-29, 2008.
 - 12) Kurashina K, Yamashita Y, Ueno T, Koinuma K, Ohashi J, Horie H, Miyakura Y, Hamada T, Haruta H, Hatanaka H, Soda M, Choi YL, Takada S, Yasuda Y, Nagai H and Mano H. "Chromosome copy number analysis in screening for prognosis-related genomic regions in colorectal carcinoma" *Cancer Sci* 99: 1835-1840, 2008.
 - 13) Kato N, Miyata T, Tabara Y, Katsuya T, Yanai K, Hanada H, Kamide K, Nakura J, Kohara K, Takeuchi F, Mano H, Yasunami M, Kimura A, Kita Y, Ueshima H, Nakayama T, Soma M, Hata A, Fujioka A, Kawano Y, Nakao K, Sekine A, Yoshida T, Nakamura Y, Saruta T, Ogihara T, Sugano S, Miki T and Tomoike H. "High-density association study and nomination of susceptibility genes for hypertension in the Japanese National Project" *Hum Mol Genet* 17: 617-627, 2008.
 - 14) Inamura K, Takeuchi K, Togashi Y, Nomura K, Ninomiya H, Okui M, Satoh Y, Okumura S, Nakagawa K, Soda M, Choi YL, Niki T, Mano H and Ishikawa Y. "EML4-ALK fusion is linked to histological characteristics in a subset of lung cancers" *J Thorac Oncol* 3: 13-17, 2008.
 - 15) Fujiwara SI, Yamashita Y, Nakamura N, Choi YL, Ueno T, Watanabe H, Kurashina K, Soda M, Enomoto M, Hatanaka H, Takada S, Abe M, Ozawa K and Mano H. "High-resolution analysis of chromosome copy number alterations in angioimmunoblastic T-cell lymphoma and peripheral T-cell lymphoma, unspecified, with single nucleotide polymorphism-typing microarrays" *Leukemia* 22: 1891-1898, 2008.
 - 16) Choi YL, Takeuchi K, Soda M, Inamura K, Togashi Y, Hatano S, Enomoto M, Hamada T, Haruta H, Watanabe H, Kurashina K, Hatanaka H, Ueno T, Takada S, Yamashita Y, Sugiyama Y, Ishikawa Y and Mano H. "Identification of novel isoforms of the EML4-ALK transforming gene in non-small cell lung cancer" *Cancer Res* 68: 4971-4976, 2008.
 - 17) Chen Y, Takita J, Choi YL, Kato M, Ohira M, Sanada M, Wang L, Soda M, Kikuchi A, Igarashi T, Nakagawara A, Hayashi Y, Mano H and Ogawa S. "Oncogenic mutations of ALK kinase in neuroblastoma" *Nature* 455: 971-974, 2008.
- H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

厚生労働科学研究費補助金（がん予防等健康科学総合研究事業）
分担研究報告書

「Methotrexate (MTX)と他剤併用時の至適投与法」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：私たちは長年、抗がん剤の併用研究をおこなっているが、Methotrexate (MTX)が種々の抗がん剤と同時投与で拮抗作用、MTX 先行で相乗作用を示すことを観察していた。さらに多くの薬剤と MTX の間の併用効果を調べ、併用時の MTX のスケジュール依存性の性格を明らかにするために研究をおこなった。ヒト白血病細胞株として T 細胞白血病の MOLT3 を用い、併用する抗がん剤として carboplatin, doxorubicin, etoposide, 5-fluorouracil, F-ara-A(fludarabe の活性化物質), gemcitabine, 4-hydroperoxy-ifosfamide (ifosfamide の活性化物質), mitoxantrone を用いた。MOLT3 細胞を MTX と他剤を同時投与と MTX 先行で培養し MTT assay で dose-response curve を得、IC₈₀における併用効果を isobologram (Steel and Peckham)で分析した。その結果、MTX はすべての薬剤と同時投与で拮抗作用、MTX 先行で doxorubicin 以外の薬剤と相乗作用を認めた。

MTX は最も古い抗がん剤のひとつで、併用しにくい薬剤として知られており、併用しても抗腫瘍効果があがらず単独に使用されることも多かった。しかし、MTX を先行投与すると明らかに相乗作用を示すことが示された。臨床で MTX を併用する場合、MTX を先行させるスケジュールを考える必要がある。

A 研究目的

がん化学療法は通常、多剤併用療法が行われている。しかし、抗がん剤は併用薬や投与スケジュールによりその抗腫瘍効果がかなり異なることが知られており、その併用には細心の注意が必要である。私たちは過去 25 年、抗がん剤の至適併用を in vitro の系をもちいて研究してきた。そしてその結果は新規抗がん剤の臨床試験のプロトコル作成のために貴重な情報を提供してきた。あらためて、その結果を見直してみると、MTX がその併用において極めてユニークな特徴的な併用パターンを示すことがわかった。すなわち、種々のがん株化細胞も用いた実験で MTX は amsacrine, amurubicin, cytarabine, bleomycin, carboplatin, depsipeptide, 4-hydroperoxy-ifosfamide, SN-38, F-ara-A, 6-mercaptopurine, mitoxantrone, paclitaxel, sobuzoxane, PKC412, raltitrexed, vincristine 等、調べたすべての抗がん剤と同時投与において拮抗作用を示すこと、また、MTX 先行の時間差投与を検討した cytarabine, SN-38, 6-mercaptopurine, paclitaxel, raltitrexed, vincristine との併用ではいずれも相乗作用を示すことを見いだした。この現象が MTX とそれ以外の抗がん剤の併用でもみられるか検討をおこなった。

B 研究方法

ヒト白血病細胞株として T 細胞白血病の MOLT 3 を用いた。併用に用いた抗がん剤は carboplatin, doxorubicin, etoposide, 5-fluorouracil, F-ara-A, gemcitabine, 4-hydroperoxy-ifosfamide, mitoxantrone である。同時投与の実験では MTX とこれらの薬剤の

存在下で 4 日間培養した。一方、MTX 先行の場合、MTX を 24 時間投与し、培養液を交換し、併用薬を加えさらに 4 日間培養を行い、その細胞増殖抑制効果を MTT assay で調べ IC₈₀における併用効果を isobologram (Steel and Peckham)で分析した。

C 研究結果

MTX の IC₈₀ 値は 96 h exposure の場合 15 nM、24 h exposure では 490 nM であった。得られた dose-response curve をもとに isobologram で併用効果を分析すると、MTX は今までに調べた抗がん剤、同様、今回の抗がん剤すべてと拮抗作用を示した。一方、MTX を先行させた場合 doxorubicin と相加効果、carboplatin, etoposide, 5-fluorouracil, F-ara-A, gemcitabine, 4-hydroperoxy-ifosfamide, mitoxantrone と相乗効果を示した。同時投与で MTX と相加、相乗作用を示す薬剤はなく、一方、MTX 先行投与で拮抗作用を示す薬剤もなかった。

D&E 考察及び結論

私達は以前から MTX を他の抗がん剤と併用させた場合、同時投与で拮抗作用を示し、MTX を先行させると相乗作用を示すことを観察していた。今回、今まで詳細に時間差投与を検討していなかった doxorubicin, carboplatin, doxorubicin, etoposide, 5-fluorouracil, F-ara-A, gemcitabine, 4-hydroperoxy-ifosfamide, mitoxantrone について同時投与と MTX 先行の時間差投与について検討をおこなった。その結果、MTX 先行投与が doxorubicin を除くいずれの抗がん剤でも相乗作用を示すことが認められた。このような傾向

を示す抗がん剤はほかにない。私達は併用効果の分析に用いた isobologram による方法は、相乗作用や拮抗作用に非常に厳密であり、他の分析方法を用いても同様の結果が得られるのは確実である。

MTX は dihydrofolate reductase を阻害する抗葉酸剤である。一方、併用に用いた抗がん剤はアルキル化剤、Topo-II 阻害剤、Topo-I 阻害剤、代謝拮抗剤、mitotic 阻害剤など作用機序の異なる抗がん剤である。MTX と殆どすべての抗がん剤がなぜ拮抗的に働き、また、MTX を先行させると相乗的に作用するかその機序は不明である。併用時の data point をみると、同時投与では protection 領域にはいるものが多く、これはお互いに他方の抗がん剤の作用を阻害していることを意味している。一方、MTX を先行させた場合の相乗作用については、MTX が G₁/S 期に細胞を同調させることから、これにより第2の抗がん剤の細胞内輸送が亢進するのではないかと考えられるが推察の域をでない。この点については今後検討の必要がある。

何れにしても、臨床で MTX と他剤を併用する場合、MTX と他の抗がん剤の同時投与は避け、MTX を先行させるスケジュールを考えるべきである。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. Noborio-Hatano K, Kikuchi J, Takatoku M, Shimizu R, Wada T, Ueda M, Nobuyoshi M, Oh I, Sato K, Suzuki T, Ozaki K, Mori M, Nagai T, Muroi K, **Kano Y**, Furukawa Y, Ozawa K. Bortezomib overcomes cell adhesion-mediated drug resistance through downregulation of VLA-4 expression in multiple myeloma. *Oncogene*. 28:231-42, 2009
2. Akutsu M, Tsunoda S, Izumi T, Tanaka M, Katano S, Inoue K, Igarashi S, Hirabayashi K, Furukawa Y, Ohmine K, Sato K, Kobayashi H, Ozawa K, Kirito K, Nagashima T, Teramukai S, Fukushima M, **Kano Y**. Long-term results of dose-intensive chemotherapy with G-CSF support (TCC-NHL-91) for advanced intermediate-grade non-Hodgkin's lymphoma: a review of 59 consecutive cases treated at a single institute. *Oncol Res*. 17:137-49, 2008

3. Murakami T, Sato A, Chun NA, Hara M, Naito Y, Kobayashi Y, **Kano Y**, Ohtsuki M, Furukawa Y, Kobayashi E. Transcriptional modulation using HDACi depsipeptide promotes immune cell-mediated tumor destruction of murine B16 melanoma. *J Invest Dermatol*. 128:1506-16, 2008, 2007
 4. Odgerel T, Kikuchi J, Wada T, Shimizu R, Futaki K, **Kano Y**, Furukawa Y. The FLT3 inhibitor PKC412 exerts differential cell cycle effects on leukemic cells depending on the presence of FLT3 mutations. *Oncogene*. 27:3102-10, 2008
 5. O Nakajima TE, Yasunaga M, **Kano Y**, Koizumi F, Kato K, Hamaguchi T, Yamada Y, Shirao K, Shimada Y, Matsumura Y. Synergistic antitumor activity of the novel SN-38-incorporating polymeric micelles, NK012, combined with 5-fluorouracil in a mouse model of colorectal cancer, as compared with that of irinotecan plus 5-fluorouracil. *Int J Cancer*. 122:2148-53, 2008
 6. Mori K, Kobayashi H, Kamiyama Y, **Kano Y**, Kodama T. A phase II trial of weekly chemotherapy with paclitaxel plus gemcitabine as a first-line treatment in advanced non-small-cell lung cancer. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2008 Oct 22. [Epub ahead of print]
- #### H. 知的財産権の出願・登録状況
- なし

「白血病に発現するラミニン受容体の意義」

分担研究者： 宮崎 泰司 長崎大学医学部・歯学部附属病院 講師

研究要旨：白血病は、少数の白血病幹細胞の増殖により成立しており、そのような白血病幹細胞は骨髄中の「ニッチ」と呼ばれる特殊な環境に存在すると考えられている。ラミニンは細胞外基質の主要構成成分であり、ニッチにおいても細胞への刺激を与えている可能性がある。そこで、白血病細胞に発現する 67kD ラミニン受容体発現の意義を検討した。ラミニン受容体高発現の症例は低発現例と比較して治療抵抗性であり、白血病細胞株を用いた検討よりラミニン受容体発現によって細胞増殖、アポトーシス抵抗性が付与されることが示唆された。これらの結果は、白血病細胞に発現するラミニン受容体が細胞増殖機転に影響を与え、治療反応性に反映されていることを示唆した

A 研究目的

白血病は、白血病幹細胞と呼ばれる少数の分画によって成立しており、正常造血における造血幹細胞と同じく自己複製能を持つとされる。骨髄中の「ニッチ」と呼ばれる特殊な環境がこうした正常、あるいは異常な「幹細胞」の未分化性維持に必須であると考えられている。ここではニッチを形成する細胞成分（骨芽細胞など）と幹細胞との刺激のやりとり、液性因子による幹細胞への刺激と同時に、細胞外基質からの刺激も幹細胞動態の制御に関わっている。

ラミニンは細胞外基質の主要な構成成分であり、細胞表面に発現する受容体を通じて様々なシグナルを細胞に伝える。ラミニンにはインテグリン系、非インテグリン系の複数の受容体が同定されているが、その一つが非インテグリン系 67kD ラミニン受容体 (LR) である。LR の発現は造血細胞を含む幅広い組織に見られる。悪性腫瘍において転移・浸潤や腫瘍の悪性化と関連することが指摘されているが、白血病での詳細な検討はなされていない。

ニッチにおいてもラミニンは存在すると思われ、こうした背景のもと我々は、急性骨髄性白血病 (AML) における LR 発現の意義を検討した。

B 研究方法

初診時患者骨髄細胞より CD34 陽性細胞をカラム法にて分離し、抗 LR 抗体によって処理後ベクトンディッキンソン社の FACSscan を用いて CD34 陽性細胞における

LR 発現量を調べた。正常コントロール細胞も同時に測定した。LRcDNA を発現ベクターに組み込み、GM-CSF 依存性ヒト白血病細胞株 TF-1 に導入して LR 過剰発現 TF-1 株 (TF-1LR) を作製した。LR 発現を低下させるために発現誘導型 siRNA を導入し LR 低発現 TF-1 株 (TF-1si) を作製した。これらの細胞株を用い、液体培地における細胞増殖を調べるために WST-1 アッセイを実施した。コロニー形成能の変化はメチルセルロース培地にて検討した。細胞集期の変化は BrdU 法によった。アポトーシス検出のために低 GM-CSF 濃度培養条件下で細胞表面の Annexin V 発現を抗 AnnexinV 抗体によって測定した。細胞内で STAT5 リン酸化は、抗リン酸化 STAT5 抗体をもちい、フローサイトメータにて検討した。

(倫理面への配慮)

検体を用いた検討に関しては長崎大学倫理委員会認可を受けた研究として実施した。

C 研究結果

1) 患者検体における LR 発現

CD34陽性白血病細胞における LR は、症例間で異なっていたが、正常 CD34 陽性細胞では LR 発現は 25% の細胞にまで見られた。そこで 25% 以上の例を高発現群、それ以下を低発現群として両者を比較したところ、高発現群では初診時白血球数が有意に高値であり、予後は有意に不良であった。

2) LR 発現のことなる細胞株の樹立

TF-1LR, TF-1si, 野生型 TF-1 (wtTF-1) はそれぞれ異なる細胞表面 LR 発現を示し、

TF-1LR > wtTF-1 > TF-1siの順に細胞表面LR発現が減少していた。

3) LR発現の違いと細胞動態の変化

液体培地での細胞増殖、コロニー形成能、アポトーシス抵抗性のいずれもがLR発現量と関連しており、細胞集期におけるS期細胞割合もTF-1LR > wtTF-1 > TF-1siの順となった。

4) STAT5蛋白質リン酸化の検討

上記で見られた様々な細胞の変化はサイトカインであるGM-CSF刺激によって造血細胞に生ずる変化と類似していた。そこで、GM-CSF刺激伝達の下流に存在するSTAT5蛋白質のリン酸化が変化しているかを調べたところそのリン酸化の程度はTF-1LR > wtTF-1 > TF-1siの順に低下しており、LR発現によってSTAT5を介する刺激が増強していることが示唆された。

D&E. 考察及び結論

本研究によって、CD34陽性白血病細胞におけるLR発現と細胞増殖、ひいては治療反応性の低下と関連していることが示唆された。また、そのメカニズムとしてSTAT5を含むシグナル伝達経路が関わっている可能性が出てきた。今後は、こうした点についてさらに検討する必要がある。

白血病細胞におけるラミニン受容体発現は、細胞増殖とアポトーシス抵抗性を介して治療抵抗性を付与しているとすれば、新たな治療開発のターゲットと出来る可能性がある。

F. 健康危険情報

無し

G. 研究発表

1. 論文発表

(1) 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.

Masamitsu Yanada, Jin Takeuchi, Isamu Sugiura, Hideki Akiyama, Noriko Usui, Fumiharu Yagasaki, Kazuhiro Nishii, Yasunori Ueda, Makoto Takeuchi, Shuichi Miyawaki, Atsuo Maruta, Hiroto Narimatsu, Yasushi Miyazaki, Shigeki Ohtake, Itsuro Jinnai, Keitaro Matsuo, Tomoki Naoe, and Ryuzo Ohno, for the Japan Adult Leukemia Study Group

Haematologica 2008; 93: 287-290.

(2) Proposals for a grading system for diagnostic accuracy of the Myelodysplastic syndromes.

Akira Matsuda, Itsuro Jinnai, Yasushi Miyazaki, Masao Tomonaga

Clinical Leukemia, 2008; 2 (2): 102-106.

(3) Expression of myeloperoxidase enhances the chemosensitivity of leukemia cells through the generation of reactive oxygen species and the nitration of protein. Yasushi Sawayama, Yasushi Miyazaki, Koji Ando, Kensuke Horio, Chizuko Tsutsumi, Daisuke Imanishi, Hideki Tsushima, Yoshitaka Imaizumi, Tomoko Hata, Takuya Fukushima, Shinichiro Yoshida, Yasuyuki Onimaru, Masako Iwanaga, Jun Taguchi, Kazutaka Kuriyama, Masao Tomonaga. Leukemia 2008; 22: 956-964.

(4) Diagnosis of acute myeloid leukemia according to the WHO classification in the Japan Adult Leukemia Study Group AML-97 protocol.

Wakui M, Kuriyama K, Miyazaki Y, Hata T, Taniwaki M, Ohtake S, Sakamaki H, Miyawaki S, Naoe T, Ohno R, Tomonaga M.

International Journal of Hematology, 2008; 87 (2): 144-151.

(5) Japanese epidemiological survey with consensus statement on Japanese guidelines for treatment of iron overload in bone marrow failure syndromes.

Suzuki T, Tomonaga M, Miyazaki Y, Nakao S, Ohyashiki K, Matsumura I, Kohgo Y, Niitsu Y, Kojima S, Ozawa K.

Int J Hematol. 2008 ;88(1):30-35.

(6) Prospective monitoring of BCR-ABL transcript levels in patients with Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukaemia undergoing imatinib-combined chemotherapy.

Yanada M, Sugiura I, Takeuchi J, Akiyama H, Maruta A, Ueda Y, Usui N, Yagasaki F, Yujiri T, Takeuchi M, Nishii K, Kimura Y, Miyawaki S, Narimatsu H, Miyazaki Y, Ohtake S, Jinnai I, Matsuo K, Naoe T, Ohno R. for the Japan Adult Leukemia Study Group

Brit J Haematol. 2008;143:503-510.

(7) Relationship between Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance and Radiation Exposure in Nagasaki Atomic Bomb Survivors.

Masako Iwanaga, Masuko Tagawa, Kunihiro Tsukasaki, Tatsuki Matsuo,

Ken-ichi Yokota, Yasushi Miyazaki, Takuya Fukushima, Tomoko Hata, Yoshitaka Imaizumi, Daisuke Imanishi, Jun Taguchi, Sabro Momita, Shimeru Kamihira, and Masao Tomonaga

Blood in press.

(8) Successful cord blood transplantation for Mycosis fungoides.

Takuya Fukushima, Kensuke Horio, Emi Matsuo, Daisuke Imanishi, Reishi

Yamasaki, Hideki Tsushima, Yoshitaka Imaizumi, Koichi Ohshima, Tomoko Hata,

Shinichiro Yoshida, Yasushi Miyazaki, Masao Tomonaga.

International Journal of Hematology 88:596-598, 2008.

(9) Long-term efficacy of imatinib in a practical setting is correlated with imatinib trough concentration that is influenced by body size: a report by the Nagasaki CML Study Group.

Mari Sakai, Yasushi Miyazaki, Emi Matsuo, Yuki Yoshi Moriuchi, Tomoko Hata, Takuya

Fukushima, Yoshitaka Imaizumi, Daisuke Imanishi, Jun Taguchi, Masako Iwanaga,

Hideki Tsushima, Yoriko Inoue, Yumi Takasaki, Takeshi Tsuchiya, Minori

Komoda, Koji Ando, Kensuke Horio, Yuji Moriwaki, Shinya Tominaga, Hidehiro

Itonaga, Kazuhiro Nagai, Kunihiro

Tsukasaki, Chizuko Tsutsumi, Yasushi Sawayama, Reishi Yamasaki, Daisuke

Ogawa, Yasuhisa Kawaguchi, Shuichi

Ikeda, Shinichiro Yoshida, Yasuyuki
Onimaru, Masayuki Tawara, Sunao
Atogami, Satoshi Koida, Tatsuro Joh,
Masaomi Yamamura, Yuji Matsuo, Hisashi
Soda, Hiroaki Nonaka, Itsuro Jinnai,
Kazutaka Kuriyama, Masao Tomonaga.
International Journal of Hematology in
press.

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

自治医科大学

間野博行 業績リスト

発表者名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kaneda, R., Takada, S., Yamashita, Y., Choi, Y.L., Nonaka-Sarukawa, M., Soda, M., Misawa, Y., Isomura, T., Shimada, K. and Mano, H.	Genome-wide histone methylation profile for heart failure	Genes Cells	14	69-77	2009
Takeuchi, K., Choi, Y.L., Soda, M., Inamura, K., Togashi, Y., Hatano, S., Enomoto, M., Takada, S., Yamashita, Y., Satoh, Y., Okumura, S., Nakagawa, K., Ishikawa, Y. and Mano, H.	Multiplex reverse transcription-PCR screening for EML4-ALK fusion transcripts	Clin. Cancer Res.	14	6618-6624	2008
Takada, S., Yamashita, Y., Berezikov, E., Hatanaka, H., Fujiwara, S.I., Kurashina, K., Watanabe, H., Enomoto, M., Soda, M., Choi, Y.L. and Mano, H.	MicroRNA expression profiles of human leukemias	Leukemia	22	1274-1278	2008
Soda, M., Takada, S., Takeuchi, K., Choi, Y.L., Enomoto, M., Ueno, T., Haruta, H., Hamada, T., Yamashita, Y., Ishikawa, Y., Sugiyama, Y. and Mano, H.	A mouse model for EML4-ALK-positive lung cancer	Proc. Natl. Acad. Sci. U S A	105	19893-19897	2008
Sato, T., Toki, T., Kanezaki, R., Xu, G., Terui, K., Kanegane, H., Miura, M., Adachi, S., Migita, M., Morinaga, S., Nakano, T., Endo, M., Kojima, S., Kiyoi, H., Mano, H. and Ito, E.	Functional analysis of JAK3 mutations in transient myeloproliferative disorder and acute megakaryoblastic leukaemia accompanying Down syndrome	Br. J. Haematol.	141	681-688	2008
Saga, Y., Ohwada, M., Suzuki, M., Konno, R., Kigawa, J., Ueno, S. and Mano, H.	Glutathione peroxidase 3 is a candidate mechanism of anticancer drug resistance of ovarian clear cell adenocarcinoma	Oncol. Rep.	20	1299-1303	2008
Onimaru, Y., Tsukasaki, K., Murata, K., Imaizumi, Y., Choi, Y.L., Hasegawa, H., Sugahara, K., Yamada, Y., Hayashi, T., Nakashima, M., Taguchi, T., Mano, H., Kamihira, S. and Tomonaga, M.	Autocrine and/or paracrine growth of aggressive ATLL cells caused by HGF and c-Met	Int. J. Oncol.	33	697-703	2008
Nagai, K., Jinnai, I., Hata, T., Usui, T., Sasaki, D., Tsukasaki, K., Sugahara, K., Hishikawa, Y., Yamada, Y., Tanaka, Y., Koji, T., Mano, H., Kamihira, S. and Tomonaga, M.	Adhesion-dependent growth of primary adult T cell leukemia cells with down-regulation of HTLV-I p40Tax protein: a novel in vitro model of the growth of acute ATL cells	Int. J. Hematol.	88	551-564	2008
Mano, H.	Non-solid oncogenes in solid tumors: EML4-ALK fusion genes in lung cancer	Cancer Sci.	99	2349-2355	2008
Mano, H.	Epigenetic abnormalities in cardiac hypertrophy and heart failure	Environ. Health Prev. Med.	13	25-29	2008
Kurashina, K., Yamashita, Y., Ueno, T., Koinuma, K., Ohashi, J., Horie, H., Miyakura, Y., Hamada, T., Haruta, H., Hatanaka, H., Soda, M., Choi, Y.L., Takada, S., Yasuda, Y., Nagai, H. and Mano, H.	Chromosome copy number analysis in screening for prognosis-related genomic regions in colorectal carcinoma	Cancer Sci.	99	1835-1840	2008
Kato, N., Miyata, T., Tabara, Y., Katsuya, T., Yanai, K., Hanada, H., Kamide, K., Nakura, J., Kohara, K., Takeuchi, F., Mano, H., Yasunami, M., Kimura, A., Kita, Y., Ueshima, H., Nakayama, T., Soma, M., Hata, A., Fujioka, A., Kawano, Y., Nakao, K., Sekine, A., Yoshida, T., Nakamura, Y., Saruta, T., Ogihara, T., Sugano, S., Miki, T. and Tomoike, H.	High-density association study and nomination of susceptibility genes for hypertension in the Japanese National Project	Hum. Mol. Genet.	17	617-627	2008
Inamura, K., Takeuchi, K., Togashi, Y., Nomura, K., Ninomiya, H., Okui, M., Satoh, Y., Okumura, S., Nakagawa, K., Soda, M., Choi, Y.L., Niki, T., Mano, H. and Ishikawa, Y.	EML4-ALK fusion is linked to histological characteristics in a subset of lung cancers	J. Thorac. Oncol.	3	13-17	2008

Fujiwara, S.I., Yamashita, Y., Nakamura, N., Choi, Y.L., Ueno, T., Watanabe, H., Kurashina, K., Soda, M., Enomoto, M., Hatanaka, H., Takada, S., Abe, M., Ozawa, K. and Mano, H.	High-resolution analysis of chromosome copy number alterations in angioimmunoblastic T-cell lymphoma and peripheral T-cell lymphoma, unspecified, with single nucleotide polymorphism-typing microarrays	Leukemia	22	1891-1898	2008
Choi, Y.L., Takeuchi, K., Soda, M., Inamura, K., Togashi, Y., Hatano, S., Enomoto, M., Hamada, T., Haruta, H., Watanabe, H., Kurashina, K., Hatanaka, H., Ueno, T., Takada, S., Yamashita, Y., Sugiyama, Y., Ishikawa, Y. and Mano, H.	Identification of novel isoforms of the EML4-ALK transforming gene in non-small cell lung cancer	Cancer Res.	68	4971-4976	2008
Chen, Y., Takita, J., Choi, Y.L., Kato, M., Ohira, M., Sanada, M., Wang, L., Soda, M., Kikuchi, A., Igarashi, T., Nakagawara, A., Hayashi, Y., Mano, H. and Ogawa, S.	Oncogenic mutations of ALK kinase in neuroblastoma	Nature	455	971-974	2008

栃木県立がんセンター加納康彦 業績リスト

発表者名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Odgerel T, Kikuchi J, Wada T, Shimizu R, Futaki K, Kano Y, Furukawa Y.	FLT3 inhibitor PKC412 exerts differential cell cycle effects on leukemic cells depending on the presence of FLT3 mutations.	Oncogene.	27	3102-3110	2008
Murakami T, Sato A, Chun NA, Hara M, Naito Y, Kobayashi Y, Kano Y, Ohtsuki M, Furukawa Y, Kobayashi E.	Transcriptional modulation using HDACi depsipeptide promotes immune cell-mediated tumor destruction of murine B16 melanoma.	J Invest Dermatol.	128	1506-1516	2008
Nakajima TE, Yasunaga M, Kano Y, Koizumi F, Kato K, Hamaguchi T, Yamada Y, Shirao K, Shimada Y, Matsumura Y.	Synergistic antitumor activity of the novel SN-38-incorporating polymeric micelles, NK012, combined with 5-fluorouracil in a mouse model of colorectal cancer, as compared with that of irinotecan plus 5-fluorouracil.	Int J Cancer.	122	2148-53.	2008
Akutsu M, Tsunoda S, Izumi T, Tanaka M, Katano S, Inoue K, Igarashi S, Hirabayashi K, Furukawa Y, Ohmine K, Sato K, Kobayashi H, Ozawa K, Kirito K, Nagashima T, Teramukai S, Fukushima M, Kano Y.	Long-term results of dose-intensive chemotherapy with G-CSF support (TCC-NHL-91) for advanced intermediate-grade non-Hodgkin's lymphoma: a review of 59 consecutive cases treated at a single institute.	Oncol Res.	17	137-149	2008
Noborio-Hatano K, Kikuchi J, Takatoku M, Shimizu R, Wada T, Ueda M, Nobuyoshi M, Oh I, Sato K, Suzuki T, Ozaki K, Mori M, Nagai T, Muroi K, Kano Y, Furukawa Y, Ozawa K.	Bortezomib overcomes cell adhesion-mediated drug resistance through downregulation of VLA-4 expression in multiple myeloma.	Oncogene.	28	231-242	2009
Mori K, Kobayashi H, Kamiyama Y, Kano Y, Kodama T.	A phase II trial of weekly chemotherapy with paclitaxel plus gemcitabine as a first-line treatment in advanced non-small-cell lung cancer.	Cancer Chemother Pharmacol.	[Epub ahead of print]	2008.10.22.	2008