

200911011A

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

多施設共同研究に登録された白血病の検体収集と

中央保存システムの確立に関する研究

平成21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 直江 知樹

平成22(2010)年3月

厚生労働科学研究費補助金  
創薬基盤推進研究事業

多施設共同研究に登録された白血病の検体収集と中央保存システムの確立に関する研究

平成21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 直江 知樹  
名古屋大学大学院医学系研究科 血液・腫瘍内科学

## 《目 次》

I. 研究組織	3
II. 総括研究報告書	7
直江 知樹                      研究代表者	
III. 分担研究報告書	
1. フィラデルフィア染色体陽性白血病における免疫不全マウスへの連続移植系の確立	17
直江 知樹	
2. 急性骨髄性白血病における遺伝子異常による予後予測因子の解析	19
麻生 範雄	
3. 提案研究の審査と遺伝子解析	21
清井 仁	
4. 臨床プロトコールとの調整	24
小林 幸夫	
5. 急性前骨髄球性白血病細胞における ATRA 分化誘導時にみられる <i>Flt3</i> 遺伝子発現の変化	27
前田 智也	
6. 標的分子の臨床応用における保存検体の有用性	30
竹下 明裕	
7. 検体収集より得られた白血病細胞を用いての分子標的薬剤の併用効果の解析	33
田内 哲三	
8. 染色体のセントラルレビュー	36
滝 智彦	
IV. 研究成果の刊行に関する一覧表	41

# I. 研 究 組 織

【多施設共同研究に登録された白血病の検体収集と

中央保存システムの確立に関する研究】 平成 21 年度名簿

	氏 名	所 属 ・ 職 名
研究代表者	直江 知樹	名古屋大学大学院医学系研究科 教授
研究分担者	麻生 範雄	熊本大学大学院医学薬学研究部 准教授
	清井 仁	名古屋大学医学部附属病院 講師
	小林 幸夫	国立がんセンター中央病院 医長
	前田 智也	埼玉医科大学国際医療センター 助教
	竹下 明裕	浜松医科大学 准教授
	田内 哲三	東京医科大学医学部 准教授
	滝 智彦	京都府立医科大学大学院医学研究科 講師

## Ⅱ. 總 括 研 究 報 告 書

「多施設共同研究に登録された白血病の検体収集と中央保存システムの確立」  
研究代表者 直江 知樹 名古屋大学大学院医学系研究科 血液・腫瘍内科学 教授

#### 研究要旨

多施設共同研究に登録し、同一プロトコールで治療された白血病患者コホートにおいて、白血病検体を逐次的に収集・保存・解析しうるシステムを構築することを班の共同研究目標としつつ、白血病患者から得られる検体を用い、班員はそれぞれの個別研究も進めた。まず多施設共同研究AML201に登録された急性骨髄性白血病症例での染色体異常と予後の関係について明らかにした。またヒト白血病研究における新たなバイオソースとしてPh陽性白血病検体をNOGマウスに継代することによって、安定的かつ大量の新鮮検体を得ることに成功した。さらに臨床検体を用いて、イマチニブ耐性克服のためのmTOR阻害剤併用の有用性、急性前骨髄球性白血病におけるATRA分化時のFLT3発現量の低下、カリケアマイシン抱合型抗ヒトCD22ヒト化抗体の有用性を報告した。またイマチニブ血中薬剤濃度が慢性骨髄性白血病のイマチニブ反応性に関連することも示した。

#### A. 研究目的

白血病において明らかにされてきた病型特異的な染色体異常や、病態に関与している遺伝子異常の多くは白血病治療上の重要な予後因子でもあり、治療法の選択など臨床的にも重要な情報を与えてきた。しかし、EBMの確立に直結する、臨床情報との関連性を加味した上での網羅的かつ系統的な大規模解析は極めて不十分である。

本研究は、白血病に対するJALSG登録症例において、病態に関与する遺伝子異常、発現状態を臨床的データとの関連性を考慮した中で網羅的に解析し、これら疾患群における分子病態に基づく細分化から最適な治療法の選択と治療成績の向上を目指すことを全体の目的とした。個別研究では、白血病検体あるいは臨床材料を用いて展開できうる研究を進めた。

#### B & C. 方法と結果

滝は、JALSG AML-97臨床試験登録症例の染色体異常と予後との関係について、特に、予後不良と考えられる染色体異常について検討した。予後不良の染色体転座群としてt(9;22)、11p15転座、t(10;11)(p13;q14)、t(6;9)、t(16;21)(p11;q22)、8p11転座を抽出したところ、これら全体では寛解率、5年全生存率、5年無病生存率とも低い傾向だった。ただし、それぞれの染色体転座ごとの意義については今後の症例の集積が必要である。欠失型の代表的な異常である-5/5q-は他の報告と同様予後不良であったが、-7/7q-の有無では予後に差がなかった。-7/7q-の予後を決めている

のは合併する他の染色体異常の種類によると思われる。AML-97の結果とこれまでの海外の報告には多くの異なる点が存在する。AML-201での検討など、今後さらに症例を蓄積していくことにより日本人特有の染色体異常の臨床的な特徴を明らかにできることが期待される。

直江は、ヒト白血病研究における新たなバイオソースとして、免疫不全マウスへの移植系を確立した。この系で樹立されたヒト白血病細胞ラインは対外培養系では維持できないが、継代移植により維持・増幅が長期間可能である。この系では細胞分裂の少ないCD34+CD38-やより分裂の活発なCD34+CD38+、さらにNOD/SCIDマウスでは継代移植できないCD34-CD38+など不均一な集団を維持しており、イマチニブ治療後の白血病残存のモデルになり得ることを明らかにした。

麻生は、急性骨髄性白血病は染色体転座や遺伝子変異などによる複数の遺伝子異常を基盤に発症し、病態や治療反応性が異なることが明らかにされつつある、しかし、まだ遺伝子異常が明らかでない病型も多く、その解析は重要な課題である。本年度は昨年度に引き続き、自施設の白血病症例146例におけるFLT3、CEBPA、NPM1、WT1およびJAK2遺伝子変異を検索し、その組み合わせが予後予測に有用であることが示し、これらの遺伝子変異を全く認めない症例群の予後が極めて不良なことを明らかにした。さらに、これらの既知の遺伝子変異がない症例群において新しい転写因子の遺伝子変異を同定し、その機能を解析した。また、CEBPA遺伝子変異による家族性白血病例を解析し、発症機構

に関する重要な知見を得た。今後はこれらの知見をJALSGにおいて収集した同一治療プロトコール登録例の検体を用いて検証し、予後予測因子としての意義を確立する。

田内は、検体収集システムより得られた臨床検体を用いて、分子標的薬剤の作用機序の解析を行うことは、細胞株から得られない臨床上の有用性を明らかにする上で重要である。本研究では新規ABLキナーゼ阻害剤(Nilotinib)及びPI3キナーゼ/mTOR阻害剤(BEZ235)の併用効果について細胞株を用いて解析した。さらに検体収集システムより得られた臨床検体を用いて、*in vivo*における併用効果をNOD/SCIDマウスシステムにて解析を試みた。BEZ235 100nM添加にてK562細胞株の細胞増殖抑制、アポトーシス誘導が確認された。BaF3細胞株を用いたBCR-ABL Saturation Mutagenesis ScreenではBEZ235とnilotinib併用により、薬剤耐性細胞の増殖を有意に抑制した。検体収集システムより得られた臨床検体(T315I BCR-ABL発現症例)においてもnilotinib、BEZ235併用により細胞増殖抑制効果の増強が確認された。今後は分子標的薬の併用効果を確認する上で、臨床検体を用いての詳細な解析が必要と考えられる。

前田は、急性前骨髄球性白血病(AML)は、全トランス型レチノイン酸(ATRA)による分化誘導療法により他の急性骨髄性白血病(AML)に比して優れた治療反応性と長期生存率を示す。近年、AMLの約30%で*Flt3*遺伝子変異

(*Flt3/ITD*)が認められ、*Flt3/ITD*がAMLの独立した予後不良因子であることが報告されている。一方、APLでは同変異を30%前後に認めるものの、明らかな予後不良因子とはされていない。本研究では、APL細胞株NB4を用いてATRAによる分化誘導が*Flt3*の発現に与える影響を検討した。結果、Flow cytometry法を用いたNB4細胞における*Flt3*、*c-Kit*、*CD11b*の発現は、ATRA添加48時間後にそれぞれ11.1%→4.1%、3.6%→1.5%、7.5%→36.5%に変化した。また、同様の条件下でRQ-PCR法を用いて*Flt3* mRNA発現量を検討すると、添加前に比して2.5%に低下した。また、HL-60細胞株での*Flt3*発現細胞数は1.2%と少なく検討が困難であったが、mRNA発現量はATRA添加により約0.4%へと低下し同様の傾向を示した。一方、*Flt3*強発現ALL細胞株であるKOCL-58では、ATRA添加による*Flt3*mRNA発現の変化を認めなかった。さらにATRA投与前後でのAPL患者骨髄検体3例において*Flt3*発現細胞数は低下する傾向が認められた。今回得られたATRAによるAPL細胞の分化に伴って*Flt3*の発現が低下するという知見は、APLに

おける*Flt3*変異の意義を考える上で重要である。今後は収集される臨床検体でのさらなる解析が必要と考えられ、患者検体における*Flt3*陽性細胞が細胞集団の一部であることや症例によりその陽性率が異なることから施設間での検体保存処理の画一化も必要になることが予想される。

竹下は、がん治療を考える上では、難治・再発例に対する、既存の治療法とは作用機序を異にする新しい治療方法の発見が期待されている。その根幹となる分子標的治療では、有効な、予後に直結した標的分子を探索し、その標的分子の特性に合った治療設計をすることが重要である。短期間に予後に関わる分子標的を選別する上で、事前に収集した検体を使用し、検討することは極めて有効な手段であるといえる。化学療法剤抱合型抗CD22抗体であるinotuzumab ozogamicinをモデルとして、標的分子を介した殺細胞効果を検討した。B細胞腫瘍患者由来の臨床検体を使用したところ、CD22以外にも多剤耐性P糖蛋白は重要で、その抗原量は細胞回転や細胞の大きさとも深い関わりがあった。今後は分子標的薬ががん治療の主体となってくると予想されるが、直接的標的分子のみならず、殺細胞効果に関わる分子の解析も重要である。

清井は、慢性骨髄性白血病(CML)に対してはBCR-ABL選択的阻害剤であるイマチニブが極めて高い有効性を示し、標準的治療法として確立されている。しかし、イマチニブ治療によって治療効果が得られるまでの期間や内服用量には個人差が認められる。本研究ではイマチニブ治療を一年以上受けている慢性期CML患者における血中イマチニブ濃度を測定し、治療効果との相関性を検討した。また、治療中の患者血漿が有するBCR-ABLキナーゼ阻害活性(Plasma inhibitory activity, PIA)を検討し、血中イマチニブ濃度の生物学的意義を検討した。65人の慢性期CML患者のトラフ時イマチニブ血中濃度(Cmin)を異なる2ポイントで測定した。治療開始12ヶ月の時点でのmajor molecular response(MMR)達成例のCminは非達成例のCminよりも有意に高く、ROC解析によって1002 ng/mLが閾値濃度として算出された。また、トラフ時血漿を用いたPIA試験では、Cmin閾値濃度を超える症例のPIAは有意に高く、その生物学的意義が証明された。

小林は、ホジキン病臨床検体でのA20遺伝子の役割を見るためにメタノール固定パラフィン包埋標本のホジキン細胞からのDNA抽出を試みた。マーカー染色後、必要細胞を顕微鏡で確認下マイクロダイセクションを行いPCR反応液に100細胞を捕捉してproteinase処



理を行いその失活後、高精度高感度 polymerase 酵素で PCR を行ったところ 200bp 程度の塩基配列決定が可能であった。免疫染色を行った上で FISH 法を行い、癌抑制遺伝子の候補である遺伝子の欠失と変異を同時に解析した。すなわち、CD30 陽性細胞の免疫染色を行った後に A20 遺伝子プローブを用いて FISH 法を行い、CD30 陽性細胞内での A20 遺伝子の欠失を確認した。

微量検体でも十分塩基配列決定が可能であることが判明した。ただし、臨床検体で塩基配列を決定した場合には、ホモ欠失が病態に関係すると考えられる場合、明らかな腫瘍細胞分画をマーカーで選択して、塩基配列を求めることが望ましいことが判明した。

JALSG 内に検体保存・付随研究委員会を発足させ、検体採取・保存、保存同意撤回などのフォーマットを整備するとともに、JALSG ホームページに“付随研究へのご協力のおねがい”を掲載し ([www.jalsg.jp](http://www.jalsg.jp))、付随研究に関してはいつでも撤回できることと同時に、現在行っている付随研究については、その目的、対象、検体種類、採取時期などを明示し、付随研究ごとに同意の撤回を可能にすべく研究内容の概略を開示した。

既に登録が終了している JALSG AML-201 臨床試験登録症例において、遺伝子解析ならびに検体保存に関する同意が得られ、初診時白血球細胞が保存されている症例のアンケート調査を実施したのち、後ろ向きに 249 症例の DNA を収集した。また APL204 試験：298 例の mRNA、Ph 陰性 ALL202 試験：461 例の mRNA、PhALL208-IMA 試験：71 例の mRNA を中央保存した。これらの試験では、残存白血病の定量あるいは BCR/ABL キメラ遺伝子の有無によって、治療プロトコルが選択されるような仕組みになっており、収集率が 100% に近い。これらの経験と各施設へのインセンティブを考慮し、検体収集を効率的に行うためのとして、白血病関連キメラ遺伝子スクリーニングを検査会社に委託し、同時に DNA/RNA の抽出を行い、匿名化の上中央保存するシステムを導入することを考えた。このシステムは匿名性を担保しつつ検体の中央保存が効率的に実施されること、施設間の検体移送がなく、Validate された検査環境での定量測定が可能であるので測定施設への負担が少なくなるなどの利点があった。

研究期間中に JALSG AML201 試験：249 症例の DNA、APL204 試験：298 例の mRNA、Ph 陰性 ALL202 試験：461 例の mRNA、PhALL208-IMA

試験：71 例の mRNA を中央保存した。

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、プロトコル小委員会と連携し、2008 年 6 月より開始された PhALL208-IMA 試験では試験登録にあたり行われるキメラ遺伝子スクリーニング検査、再発時に行われる遺伝子変異解析検査の残余検体を中央保存するための同意文書を組み入れ前方視的検体収集が開始された。

また AML209 試験では、キメラ遺伝子と FLT3/ITD 変異において分子層別化し、治療介入を行うという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 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。

本研究班員施設において保存された染色体および保存検体を用いた分子病態の解明を開始し、中央保存された検体において優先的に行うべき遺伝子解析を決定するための予備的検討を開始した。

#### D. 健康危険情報

該当無し。

#### E. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Suzuki M, Abe A, Imagama S, Nomura Y, Tanizaki R, Minami Y, Hayakawa F, Ito Y, Katsumi A, Yamamoto K, Emi N, Kiyoi H, Naoe T. BCR-ABL-independent and RAS / MAPK pathway-dependent form of imatinib resistance in Ph-positive acute lymphoblastic leukemia cell line with activation of EphB4. *Eur J Haematol*. 84:229-38. 2010.
2. Miyata Y, Liu Y, Jankovic V, Sashida G, Lee JM, Shieh JH, Naoe T, Moore M, Nimer SD. Cyclin C regulates human hematopoietic stem/progenitor cell quiescence. *Stem Cells*. 28:308-17. 2010.
3. Shiotsu Y, Kiyoi H, Ishikawa Y, Tanizaki R, Shimizu M, Umehara H, Ishii K, Mori Y, Ozeki K, Minami Y, Abe A, Maeda H, Akiyama T, Kanda Y, Sato Y, Akinaga S, Naoe T. KW-2449, a novel multikinase inhibitor, suppresses the growth of leukemia cells with FLT3 mutations or T315I-mutated BCR/ABL translocation. *Blood*. 114:1607-17. 2009.
4. Akao Y, Nakagawa Y, Iio A, Naoe T. Role of microRNA-143 in Fas-mediated apoptosis

- in human T-cell leukemia Jurkat cells. *Leuk Res*. 33(11):1530-8. 2009.
5. Ishikawa Y, Kiyoi H, Tsujimura A, Miyawaki S, Miyazaki Y, Kuriyama K, Tomonaga M, Naoe T. Comprehensive analysis of cooperative gene mutations between class I and class II in de novo acute myeloid leukemia. *Eur J Haematol*. 83:90-8. 2009.
  6. Furuhashi A, Murakami M, Ito H, Gao S, Yoshida K, Sobue S, Kikuchi R, Iwasaki T, Takagi A, Kojima T, Suzuki M, Abe A, Naoe T, Murate T. GATA-1 and GATA-2 binding to 3' enhancer of WT1 gene is essential for its transcription in acute leukemia and solid tumor cell lines. *Leukemia*. 23:1270-7. 2009.
  7. Suzushima H, Wada N, Yamasaki H, Eto K, Shimomura T, Kugimiya MH, Horikawa K, Nishimura S, Tsuda H, Mitsuya H, Asou N. Low-dose cytarabine and aclarubicin in combination with granulocyte colony-stimulating factor for elderly patients with previously untreated acute myeloid leukemia. *Leuk Res* (in press)
  8. Jacob B, Osato M, Yamashita N, Wang CQ, Taniuchi I, Littman DR, Asou N, and Ito Y. Stem cell exhaustion due to Runx1 deficiency is prevented by Evi5 activation in leukemogenesis. *Blood*. 115:1610-1620, 2010.
  9. Iwanaga E, Nakamura M, Nanri T, Kawakita T, Horikawa K, Mitsuya H, Asou N. Acute promyelocytic leukemia harboring a *STAT5B-RARA* fusion gene and a G596V missense mutation in the STAT5B SH2 domain of the *STAT5B-RARA*. *Eur J Haematol*. 83:499-501, 2009
  10. Powell JA, Thomas D, Barry EF, Kok CH, McClure BJ, Tsykin A, To LB, Brown A, Lewis ID, Herbert K, Goodall GJ, Speed TP, Asou N, Jacob B, Osato M, Haylock DN, Nilsson SK, D'Andrea RJ, Lopez AF, and Guthridge MA. Expression profiling of a hemopoietic cell survival transcriptome implicates osteopontin as a functional prognostic factor in AML. *Blood*. 114:4859-4870, 2009.
  11. Fujiwara S, Miyake H, Nosaka K, Yoshida M, Ishihara S, Horikawa K, Yonemura Y, Iyama K, Mitsuya H, and Asou N. Hairy cell leukemia responsive to anti-thymocyte globulin used as immunosuppressive therapy for aplastic anemia. *Int J Hematol*. 90:471-475, 2009.
  12. Ohtake S, Miyawaki S, Kiyoi H, Miyazaki Y, Okumura H, Matsuda S, Nagai T, Kishimoto Y, Okada M, Takahashi M, Handa H, Takeuchi J, Kageyama S, Asou N, Yagasaki F, Maeda Y, Ohnishi K, Naoe T, Ohno R. Randomized trial of response-oriented individualized versus fixed-schedule induction chemotherapy with idarubicin and cytarabine in adult acute myeloid leukemia: the JALSG AML95 study. *Int J Hematol*. 2010. [Epub ahead of print]
  13. Tanizaki R, Nomura Y, Miyata Y, Minami Y, Abe A, Hanamura A, Sawa M, Murata M, Kiyoi H, Matsushita T, Naoe T. Irrespective of CD34 expression, lineage-committed cell fraction reconstitutes and re-establishes transformed Philadelphia chromosome-positive leukemia in NOD / SCID / IL-2R $\gamma$  mice. *Cancer Sci*. 2009. [Epub ahead of print]
  14. Suzuki M, Abe A, Imagama S, Nomura Y, Tanizaki R, Minami Y, Hayakawa F, Ito Y, Katsumi A, Yamamoto K, Emi N, Kiyoi H, Naoe T. BCR-ABL-independent and RAS / MAPK pathway-dependent form of imatinib resistance in Ph-positive acute lymphoblastic leukemia cell line with activation of EphB4. *Eur J Haematol*. 84: 229-238, 2010.
  15. Inamoto Y, Murata M, Katsumi A, Kuwatsuka Y, Tsujimura A, Ishikawa Y, Sugimoto K, Onizuka M, Terakura S, Nishida T, Kanie T, Taji H, Iida H, Suzuki R, Abe A, Kiyoi H, Matsushita T, Miyamura K, Kodera Y, Naoe T. Donor single nucleotide polymorphism in the CCR9 gene affects the incidence of skin GVHD. *Bone Marrow Transplant*. 45: 363-369, 2010.
  16. Sugimoto T, Tomita A, Hiraga J, Shimada K, Kiyoi H, Kinoshita T, Naoe T. Escape mechanisms from antibody therapy to lymphoma cells: downregulation of CD20 mRNA by recruitment of the HDAC complex and not by DNA methylation. *Biochem Biophys Res Commun*. 390: 48-53, 2009.
  17. Shiotsu Y\*, Kiyoi H\*, Ishikawa Y, Tanizaki R, Shimizu M, Umehara H, Ishii K, Mori Y, Ozeki K, Minami Y, Abe A, Maeda H, Akiyama T, Kanda Y, Sato Y, Akinaga S, Naoe T. KW-2449, a novel multi-kinase inhibitor, suppresses the growth of leukemia cells with FLT3 mutations or T315I-mutated BCR/ABL translocation. *Blood*. 114: 1607-1617, 2009. \*equal contribute.
  18. Takeshita A, Shinjo K, Yamakage N, Ono T, Hirano I, Matsui H, Shigeno K, Nakamura

- a S, Tobita T, Maekawa M, Ohnishi K, Sugimoto Y, Kiyoi H, Naoe T, Ohno R. CMC-544 (inotuzumab ozogamicin) shows less effect on multidrug resistant cells: analyses in cell lines and cells from patients with B-cell chronic lymphocytic leukaemia and lymphoma. *Br J Haematol*.146:34-43, 2009.
19. Takeshita A, Yamakage N, Shinjo K, Ono T, Hirano I, Nakamura S, Shigeno K, Tobita T, Maekawa M, Kiyoi H, Naoe T, Ohnishi K, Sugimoto Y, Ohno R. CMC-544 (inotuzumab ozogamicin), an anti-CD22 immun-conjugate of calicheamicin, alters the levels of target molecules of malignant B-cells. *Leukemia*. 146: 34-43, 2009.
  20. Ishikawa Y, Kiyoi H, Tsujimura A, Miyawaki S, Miyazaki Y, Kuriyama K, Tomonaga M, Naoe T. Comprehensive analysis of cooperative gene mutations between class I and class II in de novo acute myeloid leukemia. *Eur J Haematol*. 83: 90-98, 2009.
  21. Hiraga J, Tomita A, Sugimoto T, Shimada K, Ito M, Nakamura S, Kiyoi H, Kinoshita T, Naoe T. Down-regulation of CD20 expression in B-cell lymphoma cells after treatment with rituximab-containing combination chemotherapies: its prevalence and clinical significance. *Blood*. 113:4885-4893, 2009.
  22. Maeshima A M, Kobayashi Y, et al. Histological and immunophenotypic changes in 59 cases of B-cell non-Hodgkin's lymphoma after rituximab therapy. *Cancer Sci*. 100:54-61, 2009.
  23. Kobayashi Y, Takeshita A, Naoe T, et al. Phase I/II study of humanized anti-CD33 antibody conjugated with calicheamicin, gemtuzumab ozogamicin, in relapsed or refractory acute myeloid leukemia: final results of Japanese multicenter cooperative study. *Int J Hematol*. 89:460-9, 2009.
  24. Maeshima A M, Kobayashi Y, et al. Secondary CD5+ diffuse large B-cell lymphoma not associated with transformation of chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma (Richter syndrome). *Am J Clin Pathol*. 131:339-46, 2009.
  25. Tojo A, Kobayashi Y, et al. A Phase I/II study of nilotinib in Japanese patients with imatinib resistant or intolerant Ph+ CML or relapsed/refractory Ph+ ALL. *Int J Hematol*. 89:679-88, 2009.
  26. Kato M, Kobayashi Y, et al. Frequent inactivation of A20 in B-cell lymphomas. *Nature*. 459: 712-6, 2009
  27. Kobayashi Y. Recent advances in the treatment of follicular lymphoma. *Int J Clin Oncol*. 14:191-6, 2009.
  28. Yamaguchi M, Kobayashi Y, et al. Phase I/II study of concurrent chemoradiotherapy for localized nasal NK/T-cell lymphoma: Japan Clinical Oncology Group Study JCOG0211. *J Clin Oncol*. 27:5594-600, 2009.
  29. Watanabe T, Kobayashi Y, et al. Potential efficacy of the oral histone deacetylase inhibitor vorinostat in a phase I trial in follicular and mantle cell lymphoma. *Cancer Sci*. 101:196-200, 2010.
  30. Mori M, Kobayashi Y, et al. The indolent course and high incidence of t(14;18) in primary duodenal follicular lymphoma. *Ann Oncol*. 2009 [in press]
  31. Takeshita A, Shinjo K, Yamakage N, Ono T, Hirano I, Matsui H, Shigeno K, Nakamura S, Tobita T, Maekawa M, Ohnishi K, Sugimoto Y, Kiyoi H, Naoe T, Ohno R. CMC-544 (inotuzumab ozogamicin) shows less effect on multidrug resistant cells: analyses in cell lines and cells from patients with B-cell chronic lymphocytic leukaemia and lymphoma. *Br J Haematol*. 146:34-43, 2009.
  32. Takeshita A, Asai T, Murakami M, Fujihara H, Ishizuka T, Nakai S, Yamada C, Suzumura T, Uchiyama Y, Maekawa M, Shigeno K, Washiyama N, Yamashita K, Unno N, Shinjo K. Effective Blood Utilization via System for Massive Blood Transfusion, including Cardiovascular Operation in Local Areas. *Jpn J Transfusion Cell Therapy*. 55:63-7, 2009.
  33. Takeshita A, Yamakage N, Shinjo K, Ono T, Hirano I, Nakamura S, Shigeno K, Tobita T, Maekawa M, Kiyoi H, Naoe T, Ohnishi K, Sugimoto Y, Ohno R. CMC-544 (inotuzumab ozogamicin), an anti-CD22 immun-conjugate of calicheamicin, alters the levels of target molecules of malignant B-cells. *Leukemia*. 23:1329-36, 2009.
  34. Kobayashi Y, Tobinai K, Takeshita A, Naito K, Asai O, Dobashi N, Furusawa S, Saito K, Mitani K, Morishima Y, Ogura M, Yoshida F, Hotta T, Bessho M, Matsuda S, Takeuchi J, Miyawaki S, Naoe T, Usui N, Ohno R. Phase I/II study of humanized anti-CD33 antibody conjugated with calicheamicin, gemtuzumab ozogamicin, in relapsed or refractory acute myeloid leukemia: final results of Japanese multicenter cooperative study. *Int J Hematol* 89;460-9, 2009.
  35. Okabe S, Tauchi T, et al. Mechanism of M K-0457 efficacy against BCR-ABL positive leukemia cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 380:775-779, 2009.
  36. Ohyashiki J, Tauchi T, et al. The oral iron c

- helator deferasirox represses signaling through the mTOR in myeloid leukemia cells by enhancing expression of REDD1. *Cancer Sci*. 100:970-977, 2009.
37. Ono R, Kumagai H, Nakajima H, Hishiya A, Taki T, Horikawa K, Takatsu K, Satoh T, Hayashi Y, Kitamura T, Nosaka T. MLL fusion protein collaborates with Raf to induce acute leukemia through aberrant Hox expression and Raf activation. *Leukemia*. 23: 2197-2209, 2009.
  38. Isoda T, Ford AM, Tomizawa D, van Delft FW, Gonzalez De Castro D, Mitsuiki N, Score J, Taki T, Morio T, Takagi M, Saji H, Greaves M, Mizutani S. Immunologically silent cancer clone transmission from mother to offspring. *Proc Natl Acad Sci USA*. 106: 17882-17885, 2009.
  39. Nakahata S, Saito Y, Hamasaki M, Hidaka T, Arai Y, Taki T, Taniwaki M, Morishita K. Alteration of enhancer of polycomb 1 at 10p11.2 is one of the genetic events for developing adult T-cell leukemia/lymphoma. *Gene Chromosome Canc*. 48: 768-776, 2009.
  40. Takita J, Motomura A, Koh K, Ida K, Taki T, Hayashi Y, Igarashi T. Acute megakaryoblastic leukemia in a child with the MLL-AF4 fusion gene. *Eur J Haematol*. 83: 149-153, 2009.
  41. Mizoguchi Y, Fujita N, Taki T, Hayashi Y, Hamamoto K. Juvenile myelomonocytic leukaemia with t(7;11)(p15;p15) and NUP98-HOXA11 fusion. *Am J Hematol*. 84: 295-297, 2009.
  42. Park M, Taki T, Oda M, Watanabe T, Yumura-Yagi K, Kobayashi R, Suzuki N, Hara J, Horibe K, Hayashi Y. FBXW7 and NOTCH1 mutations in childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia and T cell non-Hodgkin's lymphoma. *Br J Haematol*. 145: 198-206, 2009.
  43. Matsumoto Y, Taki T, Fujimoto Y, Taniguchi K, Shimizu D, Shimura K, Uchiyama H, Kuroda J, Nomura K, Inaba T, Shimazaki C, Horiike S, Taniwaki M. Monosomies 7p and 12p and FLT3 internal tandem duplication: possible markers for diagnosis of T/myeloid biphenotypic acute leukemia and its clonal evolution. *Int J Hematol*. 89: 352-358, 2009.
  44. Taketani T, Taki T, Nakamura H, Taniwaki M, Masuda J, Hayashi Y. NUP98-NSD3 fusion gene in radiation-associated myelodysplastic syndrome with t(8;11)(p11;p15) and expression pattern of the NSD family genes. *Cancer Genet Cytogenet*. 190: 108-112, 2009.
2. 学会発表
    1. Minami Y, Minami M, Kuwatsuka Y et al. (2009) Treatment with mTOR inhibitor, Everolimus (RAD001) overcomes resistance to imatinib in Ph-leukemia quiescent or T315I-mutated cells, Fifty-first annual meeting, American Society of Hematology. Dec 5-8, 2009, New Orleans USA.
    2. Yachiyo Kuwatsuka et al. Treatment with Bortezomib Overcomes Resistance to Imatinib in Ph-Leukemia Quiescent Cells, Fifty-first annual meeting, American Society of Hematology. Dec 5-8, 2009, New Orleans USA.
    3. Sugimoto T, Kiyoi H, et al. MS4A1 (CD20) Gene Expression Is Down-Regulated by Recruiting the Histone Deacetylase Protein Complex to the Promoter in the CD20-Negative B-Lymphoma Cells After Treatment with Rituximab. The American Society of Hematology 51th Annual Meeting. Dec 2009, New Orleans USA.
    4. Kuwatsuka Y, Kiyoi H, et al. Treatment with Bortezomib Overcomes Resistance to Imatinib in Ph-Leukemia Quiescent Cells. The American Society of Hematology 51th Annual Meeting. Dec 2009, New Orleans USA.
    5. Goto E, Kiyoi H, et al. Double Genetic Mutations in PML-Rara Fusion Gene Confirmed in a Patient Showing Resistance to All-Trans Retinoic Acid and Arsenic-Trioxide Therapy. The American Society of Hematology 51th Annual Meeting. Dec 2009, New Orleans USA.
    6. Mori Y, Kiyoi H, et al. FL-Dependent Wild-Type FLT3 Signals Reduce the Inhibitory Effects of FLT3 Inhibitors On Wild-Type and Mutant FLT3 Co-Expressing Cell. The American Society of Hematology 51th Annual Meeting. Dec 2009, New Orleans USA.
    7. Katsumi A, Kiyoi H, et al. FLT3/ITD Regulates Leukemia Cell Adhesion through  $\alpha 4\beta 1$  Integrin and Pyk2 Signaling. The American Society of Hematology 51th Annual Meeting. Dec 2009, New Orleans USA.
    8. Minami Y, Kiyoi H, et al. Treatment with mTOR Inhibitor, Everolimus (RAD001) Overcomes Resistance to Imatinib in Ph-Leukemia Quiescent or T315I-Mutated Cells. The American Society of Hematology 51th Annual Meeting. Dec 2009, New Orleans USA.

- eting. Dec 2009, New Orleans USA.
9. Kato M, Kobayashi Y, et al. Aberrations of Genes Regulating NF kappa B pathway in B-cell Malignant lymphoma. The 51<sup>st</sup> annual meeting. Dec 2009, New Orleans USA.
  10. Nomoto J, Kobayashi Y, et al. Detection of loss of A20 gene by FICTION in Hodgkin's lymphoma cases. The 51<sup>st</sup> annual meeting. Dec 2009, New Orleans USA.
  11. Watanabe H, Takeshita A, Oshida M, Fujihara H, Tomoda Y, Yurugi K Ohto H. The role of medical technologists on the education of transfusion medicine: Results of the multi-institutional surveys for the 21th Transfusion Conference of University Hospitals in Japan. *20<sup>th</sup> Congress of International Society of Blood Transfusion*.
  12. Takeshita A, Watanabe H, Oshida M, Yurugi K, Tomoda Y, Uchikawa M, Kino S, Ohto H. Collaborative study on erythrocyte irregular antibodies in Japan Results from Japanese Study Group of Allo-Immunity to Antigen Diversity in Asian populations. *20<sup>th</sup> Congress of International Society of Blood Transfusion*.
  13. Watanabe H, Takeshita A, Kim DW, Han KS, Kwon SY, Suh JS, Natalie CPH, Nadarajan VS, Permpikul P, Nuranissa Bte Yacob Marican NBY, Uchikawa M, Kino S, Ohto H. Collaborative Study Group of Allo-immunity to Antigen Diversity in Asian Populations. Differences in allo-immunity to erythrocytes in Asian countries; Cooperative study of allo-immunity to antigen diversity in Asian populations. *51th Annual Meeting of the American Society of Hematology*.
  14. Takeshita A, Watanabe H, Kim DW, Han KS, Kwon SY, Suh JS, Natalie CPH, Nadarajan VS, Permpikul P, Nuranissa Bte Yacob Marican NBY, Uchikawa M, Kino S, Ohto H. Collaborative Study Group of Allo-immunity to Antigen Diversity in Asian Populations. Allo-immunity to erythrocytes in relation to blood transfusion and pregnancy; Cooperative study of allo-immunity to antigen diversity in Asian populations. *51th Annual Meeting of the American Society of Hematology*.
  15. Takeshita A, Yamakage N, Shinjo K, Hirano I, Ono T, Fujihara H, Watanabe H, Iino K, Hashimoto D, Maekawa M, Ohnishi K, Ohno R. CMC-544, an anti-CD22 immuno-conjugate of calicheamicin, decreases the level of complement inhibitory factors on malignant B-cell lymphoma cells. *14<sup>th</sup> congress of European Society of Hematology*.
  16. Tauchi T, Okabe S, Ashihara E, Kimura S, Maekawa T, Ohyashiki K. Combined effects of novel heat shock protein 90 inhibitor NV P-AUY922 and nilotinib in a random mutagenesis screen. *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)*, Nov 2009; 114:1149.
  17. Okabe S, Tauchi T, Kimura S, Maekawa T, Ohyashiki K. The efficacy of dual PI3K and mTOR inhibitor, BEZ235 against BCR-ABL positive cells include ABL kinase domain mutation in combination with nilotinib. *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)*, Nov 2009; 114:1455.
- F. 知的財産権の出願・登録状況  
(予定を含む)
1. 特許取得
  2. 実用新案登録  
該当無し。
  3. その他  
なし。

### Ⅲ. 分 担 研 究 報 告 書

「フィラデルフィア染色体陽性白血病における免疫不全マウスへの連続移植系の確立」  
研究代表者 直江 知樹 名古屋大学大学院医学系研究科 血液・腫瘍内科学 教授

#### 研究要旨

ヒト白血病研究における新たなバイオリソースとして、免疫不全マウスへの移植系を確立した。この系で樹立されたヒト白血病細胞ラインは対外培養系では維持できないが、継代移植により維持・増幅が長期間可能である。この系では細胞分裂の少ないCD34+CD38-やより分裂の活発なCD34+CD38+、さらにNOD/SCIDマウスでは継代移植できないCD34-CD38+など不均一な集団を維持しており、イマチニブ治療後の白血病残存のモデルになり得ることを明らかにした。

#### A. 研究目的

白血病研究において臨床検体（白血病細胞）を保存する重要性については論をまたないが、保存検体には限りがあり、その質については、DNA・mRNAについてはほぼ問題ないが、生細胞の回収率は必ずしも高くない。またex vivo培養では増殖できず長くとも数日以内に死滅する。そのため、多くの研究は白血病細胞株を用いて行われてきた。しかし、白血病細胞株はきわめてまれにしか樹立されないこと、樹立された細胞株は培養液中で無限増殖を行う特殊な細胞であり、自己複製、分化・増殖、細胞死といった生体内の細胞ヒエラルキーを反映するものではない。我々は白血病検体を免疫不全マウスに継代移植し、新たなバイオリソースとしての有用性を検討した。

#### B. C. 研究方法と結果

本研究においてはフィラデルフィア染色体（Ph）陽性白血病（慢性骨髄性白血病急性転化 CML/BC:3例、急性リンパ性白血病 Ph+ALL:3例）を対象とし、3例は初診時に、3例はイマチニブ投与後再発時に検体を採取した。1.5-10X10<sup>6</sup>をNOGマウス（3-5匹/症例）尾静脈へ移植し、その生着をCD45やCD19などで解析した。生着はすべてのマウスで認められ、細胞表面抗原、染色体分析、BCR/ABL変異などの形質と遺伝型は、移植前後で一致した。移植細胞の不均一性を調べるため、CD34、CD38、およびCD34+CD38+分画におけるIL-3R、CD45RAなどを移植前後で比較し、細胞間の不均一性も保たれていることが明らかになった。これは5-6代まで継代を重ねても不変であった

白血病を移植しうる分画がどこにあるのかを解析するため、CD34,CD38でソートした白血病細胞を5X10<sup>4</sup>移植し、移植の可否とCD34,CD38を調べた。CD34+38-, CD33+CD38+, CD34-CD38+いずれの分画

を移植しても白血病は生着した。しかし、CD34-C38+を移植したマウスでの白血病形質はCD34-CD38+が優性であった。この生着したCD34-CD38+をNOGではなくNOD/SCIDマウスに移植したところ、その生着はきわめて抑制された。以上より、CML/BCおよびPh+ALLにおいては、白血病幹細胞分画はCD34やCD38に関わらず存在すること、しかしCD34+からCD34-へのヒエラルキーが存在し、マウス宿主によってはCD34-CD38+の移植性はきわめて減弱することが示された。

この移植マウスから由来する白血病細胞を用いて、イマチニブ処理をしたところ、CD34+CD38-でのG0/G1分画に属する非分裂期集団が増加する傾向が認められた。一方、イマチニブ処理でのp-BCR/ABLやp-Crkは減弱しており、イマチニブ治療後に認められる白血病残存での背景には、薬剤深達度ではなく非増殖分画が可能性が示唆された。

#### D. 健康危険情報

特になし。

#### E. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Suzuki M, Abe A, Imagama S, Nomura Y, Tanizaki R, Minami Y, Hayakawa F, Ito Y, Katsumi A, Yamamoto K, Emi N, Kiyoi H, Naoe T. BCR-ABL-independent and RAS / MAPK pathway-dependent form of imatinib resistance in Ph-positive acute lymphoblastic leukemia cell line with activation of EphB4. *Eur J Haematol.* 84:229-38. 2010.

2. Miyata Y, Liu Y, Jankovic V, Sashida G, Lee JM, Shieh JH, Naoe T, Moore M, Nimer SD. Cyclin C regulates human hematopoietic stem/progenitor cell quiescence. *Stem Cells*. 28:308-17. 2010.
3. Shiotsu Y, Kiyoi H, Ishikawa Y, Tanizaki R, Shimizu M, Umehara H, Ishii K, Mori Y, Ozeki K, Minami Y, Abe A, Maeda H, Akiyama T, Kanda Y, Sato Y, Akinaga S, Naoe T. KW-2449, a novel multikinase inhibitor, suppresses the growth of leukemia cells with FLT3 mutations or T315I-mutated BCR/ABL translocation. *Blood*. 114:1607-17. 2009.
4. Akao Y, Nakagawa Y, Iio A, Naoe T. Role of microRNA-143 in Fas-mediated apoptosis in human T-cell leukemia Jurkat cells. *Leuk Res*. 33(11):1530-8. 2009.
5. Ishikawa Y, Kiyoi H, Tsujimura A, Miyawaki S, Miyazaki Y, Kuriyama K, Tomonaga M, Naoe T. Comprehensive analysis of cooperative gene mutations between class I and class II in de novo acute myeloid leukemia. *Eur J Haematol*. 83:90-8. 2009.
6. Furuhashi A, Murakami M, Ito H, Gao S, Yoshida K, Sobue S, Kikuchi R, Iwasaki T, Takagi A, Kojima T, Suzuki M, Abe A, Naoe T, Murate T. GATA-1 and GATA-2 binding to 3' enhancer of WT1 gene is essential for its transcription in acute leukemia and solid tumor cell lines. *Leukemia*. 23:1270-7. 2009.

## 2. 学会発表

1. Minami Y, Minami M, Kuwatsuka Y et al (2009) Treatment with mTOR inhibitor, Everolimus (RAD001) overcomes resistance to imatinib in Philadelphia-leukemia quiescent or T315I-mutated cells, Fifty-first annual meeting, American Society of Hematology. Dec 5-8, 2009, New Orleans USA.

## 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

「急性骨髄性白血病における遺伝子異常による予後予測因子の解析」  
研究分担者 麻生範雄 熊本大学大学院医学薬学研究部血液内科学 准教授

研究要旨

急性骨髄性白血病は染色体転座や遺伝子変異などによる複数の遺伝子異常を基盤に発症し、病態や治療反応性が異なることが明らかにされつつある、しかし、まだ遺伝子異常が明らかでない病型も多く、その解析は重要な課題である。本年度は昨年度に引き続き、自施設の白血病症例146例におけるFLT3、CEBPA、NPM1、WT1およびJAK2遺伝子変異を検索し、その組み合わせが予後予測に有用であることが示し、これらの遺伝子変異を全く認めない症例群の予後が極めて不良なことを明らかにした。さらに、これらの既知の遺伝子変異がない症例群において新しい転写因子の遺伝子変異を同定し、その機能を解析した。また、CEBPA遺伝子変異による家族性白血病症例を解析し、発症機構に関する重要な知見を得た。今後はこれらの知見をJALSGにおいて収集した同一治療プロトコール登録例の検体を用いて検証し、予後予測因子としての意義を確立する。

A. 研究目的

急性骨髄性白血病（AML）の治療反応性は病型により大きく異なり、年齢と染色体異常が最も大きな予後因子である。染色体異常による予後良好群は約30%、予後不良群は10%を占め、残る60%は予後中間群とされる。予後中間群の治療反応性には種々混在しており、その予後の幅は広い。臨床的な治療方針、例えば同種造血幹細胞移植の適応の決定に当たっては予後予測は不可欠であり、染色体異常に加えて有用な分類が求められている。最近、遺伝子変異と治療反応性の関係が徐々に明らかにされつつある。例えば受容体型チロシンキナーゼFLT3の膜近傍部の繰り返し変異（FLT3-ITD）は予後不良例に多く、NPM1の変異は予後良好例に多い。いずれも正常染色体例に多く、予後予測因子として期待され、2008年の改訂WHO分類にも一部は取り入れられた。これまでひとつひとつの遺伝子変異については予後との関係が報告されてきたが、いくつもの遺伝子変異を網羅的に解析して相対的な関係を検討する解析はほとんどなく、日本人における報告も少ない。本研究では多数例のAMLの遺伝子変異を網羅的に解析し、予後予測因子としての有用性を検討することを目的とする。また、既知の異常を認めない症例については新たな遺伝子変異を見いだすことを目的とする。さらに、得られた知見を同一治療プロトコール登録例の検体を用いて検証し、予後予測因子としての意義を確立する

B. 研究方法

AML 症例において既知の異常として FLT3、NPM1、N-RAS、K-RAS、CEBPA、MLL、AML1 および p53

等の遺伝子変異の有無を PCR 法と直接シーケンス法で解析する。遺伝子変異を認めない症例において新しい遺伝子変異の同定を試みる。とくに骨髄系細胞の分化増殖を調節する転写因子を網羅的に解析する。新しく同定した遺伝子変異を細胞内へ導入して機能解析を行う。さらに、遺伝子変異と病態とくに治療反応性との関係を解析し、日本人の AML 症例における遺伝子変異の予後予測因子としての有用性を検討する。

C. 研究結果

自施設のAML症例146例においてFLT3、NPM1、CEBPA、WT1およびJAK2遺伝子変異を検索した。FLT3-ITDを27例(18%)、FLT3-TKDを10例(7%)、NPM1変異を33例(23%)、CEBPA変異を17例(12%)、WT1変異を7例(5%)およびJAK2変異を2例(1%)に認めた。FLT3-ITDとNPM1変異は重複例が多く、全体では45%にこれらの遺伝子変異を認めた。正常核型AMLの53例では75%に遺伝子変異が認められた。正常核型AMLにおいてはFLT3-ITDとともに遺伝子変異を認めない症例群の予後が不良であった。さらに、これらの既知の遺伝子変異がない症例群において新しい転写因子の欠失による遺伝子変異を同定した。Hela細胞へこの遺伝子を導入したところ、野生型では増殖抑制を来すのに対し、変異型では増殖亢進を示した。また、CEBPA遺伝子変異を認める家族性AML例を見いだした。家族内で共通のN端変異と異なるC端変異を認め、N端変異はC端変異を促進して発症に至ること

が強く示唆された。今後はこれらの知見を同一治療プロトコール登録例の検体を用いて検証し、予後予測因子としての意義を確立する。また、検体収集システムの確立、整備を進めることにより質の高い臨床研究の推進をサポートする。

#### D. 健康危険情報

該当無し。

#### E. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Suzushima H, Wada N, Yamasaki H, Eto K, Shimomura T, Kugimiya MH, Horikawa K, Nishimura S, Tsuda H, Mitsuya H, Asou N. Low-dose cytarabine and aclarubicin in combination with granulocyte colony-stimulating factor for elderly patients with previously untreated acute myeloid leukemia. *Leuk Res* (in press)
  2. Suzushima H, Wada N, Yamasaki H, Eto K, Shimomura T, Kugimiya MH, Horikawa K, Nishimura S, Tsuda H, Mitsuya H, Asou N. Low-dose cytarabine and aclarubicin in combination with granulocyte colony-stimulating factor for elderly patients with previously untreated acute myeloid leukemia. *Leuk Res* (in press)
  3. Suzushima H, Wada N, Yamasaki H, Eto K, Shimomura T, Kugimiya MH, Horikawa K, Nishimura S, Tsuda H, Mitsuya H, Asou N. Low-dose cytarabine and aclarubicin in combination with granulocyte colony-stimulating factor for elderly patients with previously untreated acute myeloid leukemia. *Leuk Res* (in press)
  4. Jacob B, Osato M, Yamashita N, Wang CQ, Taniuchi I, Littman DR, Asou N, and Ito Y. Stem cell exhaustion due to Runx1 deficiency is prevented by Evi5 activation in leukemogenesis. *Blood*. 115:1610-1620,2010.
  5. Iwanaga E, Nakamura M, Nanri T, Kawakita T, Horikawa K, Mitsuya H, Asou N. Acute promyelocytic leukemia harboring a *STAT5B-RARA* fusion gene and a G596V missense mutation in the *STAT5B* SH2 domain of the *STAT5B-RARA*. *Eur J Haematol*. 83:499-501,2009
  6. Powell JA, Thomas D, Barry EF, Kok CH, McClure BJ, Tsykin A, To LB, Brown A, Lewis ID, Herbert K, Goodall GJ, Speed TP, Asou N, Jacob B, Osato M, Haylock DN, Nilsson SK, D'Andrea RJ, Lopez AF, and Guthridge MA. Expression profiling of a hemopoietic cell survival transcriptome implicates osteopontin as a functional prognostic factor in AML. *Blood*. 114:4859-4870,2009.
  7. Fujiwara S, Miyake H, Nosaka K, Yoshida M, Ishihara S, Horikawa K, Yonemura Y, Iyama K, Mitsuya H, and Asou N. Hairy cell leukemia responsive to anti-thymocyte globulin used as immunosuppressive therapy for aplastic anemia. *Int J Hematol*. 90:471-475,2009.
2. 学会発表
    1. 堀川健太郎、石原園子、河北敏郎、麻生範雄、満屋裕明、川口辰哉 顆粒リンパ球白血病における好中球減少発生機序:NKG2D-NKG2Dリガンド系を介した造血障害の関与 第71回日本血液学会総会 2009年10月23日～10月25日、京都
    2. 南里 知子, 麻生 範雄, 日高 道弘, 山田 恭裕, 宮家 宏定, 堀川健太郎、満屋裕明 移植後再発ALLに対するリツキシマブ療法 第71回日本血液学会総会 2009年10月23日～10月25日、京都
    3. 藤原志保、宮家宏定、野坂生郷、石原園子、吉田稔、堀川健太郎、米村雄士、猪山賢一、満屋裕明、麻生範雄 再生不良性貧血と診断され、ATGが奏効したhairy cell leukemia 第71回日本血液学会総会 2009年10月23日～10月25日、京都
    4. 久間粧子、川口辰哉、南里知子、田原由紀子、濱田哲暢、堀川健太郎、麻生範雄、満屋裕明 ニロチニブが有効であったイマチニブ体制pypび不耐容の慢性骨髄性白血病の2症例 第71回日本血液学会総会 2009年10月23日～10月25日、京都
    5. 河野 和、中村 美紀、星乃 光有、堀川健太郎、満屋 裕明、麻生 範雄 赤芽球癆とサイトメガロウイルス感染症を併発したB-CLL 第71回日本血液学会総会 2009年10月23日～10月25日、京都
    6. 麻生範雄、南里知子、岩永栄作、満屋裕明 APL治療後に併発したt(5;12)陽性慢性骨髄単球性白血病に対する少量イマチニブ療法 第71回日本血液学会総会 2009年10月23日～10月25日、京都
    7. 宮下要、本多絵美、崔日承、油布祐二、阿南建一、麻生範雄、鵜池直邦 カップ様 (cup-like) の核形態を呈するHLA-DR陰性急性骨髄性白血病の臨床病理学的解析 第71回日本血液学会総会 2009年10月23日～10月25日、京都

#### F. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得  
該当無し。
2. 実用新案登録  
該当無し。
3. その他

「提案研究の審査と遺伝子解析」

研究分担者 清井 仁 名古屋大学 医学部附属病院 難治感染症部 講師

研究要旨

慢性骨髄性白血病（CML）に対してはBCR-ABL選択的阻害剤であるイマチニブが極めて高い有効性を示し、標準的治療法として確立されている。しかし、イマチニブ治療によって治療効果が得られるまでの期間や内服用量には個人差が認められる。本研究ではイマチニブ治療を1年以上受けている慢性期CML患者における血中イマチニブ濃度を測定し、治療効果との相関性を検討した。また、治療中の患者血漿が有するBCR-ABLキナーゼ阻害活性（Plasma inhibitory activity, PIA）を検討し、血中イマチニブ濃度の生物学的意義を検討した。65人の慢性期CML患者のトラフ時イマチニブ血中濃度（Cmin）を異なる2ポイントで測定した。治療開始12ヶ月の時点でのmajor molecular response (MMR)達成例のCminは非達成例のCminよりも有意に高く、ROC解析によって1002 ng/mLが閾値濃度として算出された。また、トラフ時血漿を用いたPIA試験では、Cmin閾値濃度を超える症例のPIAは有意に高く、その生物学的意義が証明された。

A. 研究目的

イマチニブ（グリベック®）投与中の慢性期慢性骨髄性白血病（CML-CP）患者における血中イマチニブ濃度と治療効果との相関性を検証するために、イマチニブによる治療開始後1年以上を経過した慢性期CML患者におけるトラフ時の血中イマチニブ濃度と治療開始12ヶ月の時点でのmajor molecular response (MMR)達成率との相関性を後方視的に明らかにする。また、トラフ時患者血漿によるBCR/ABLキナーゼ抑制効果（Plasma inhibitory activity, PIA）の治療効果を予測するサロゲートマーカーとしての有用性と血中濃度測定 of 生物学的意義を検討する。

B. 研究方法

イマチニブによる治療を1年以上受けているCML-CP患者65例においてトラフ時イマチニブ血中濃度（Cmin）を測定した。

治療開始12ヶ月の時点でのMMR達成例と非達成例間のCmin値の相違を検討した。また、ROC解析によりMMR達成に関する閾値設定を試みた。

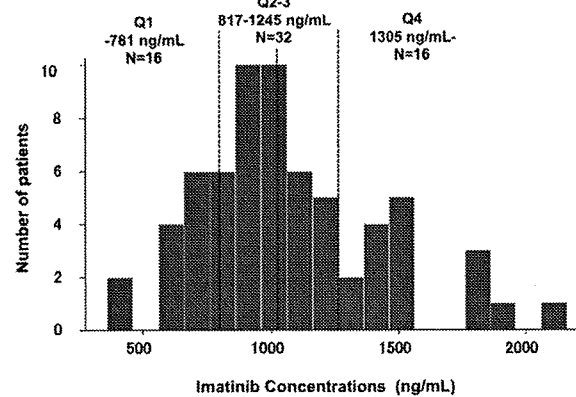
トラフ時患者血漿によるBCR-ABLキナーゼならびにSTAT5に対するPIAを検討し、治療効果ならびにCminとの相関性を検討した。

本研究に用いた残余血漿の保存を行った。

本研究は名古屋大学医学部倫理委員会の承認を受け、文書による患者同意を得た上で実施した。

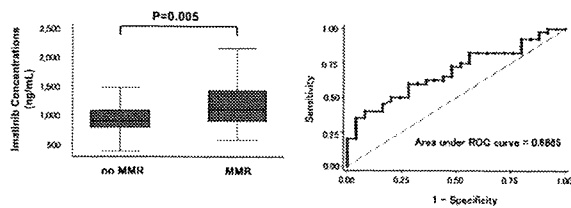
C. 研究結果

イマチニブ血中濃度中央値は1006 ng/mLで361～2150 ng/mLの広範囲に渡っていた。血中トラフ値に基づいて症例を4分位に層別化したところ、各群の血中トラフ値は第1分位群（Q1）の16例では781ng/mL未満、第2分位群（Q2）および第3分位群（Q3）の33例では817～1245ng/mL、第4分位群（Q4）の16例では1306ng/mLを超える値が得られた（図1）。

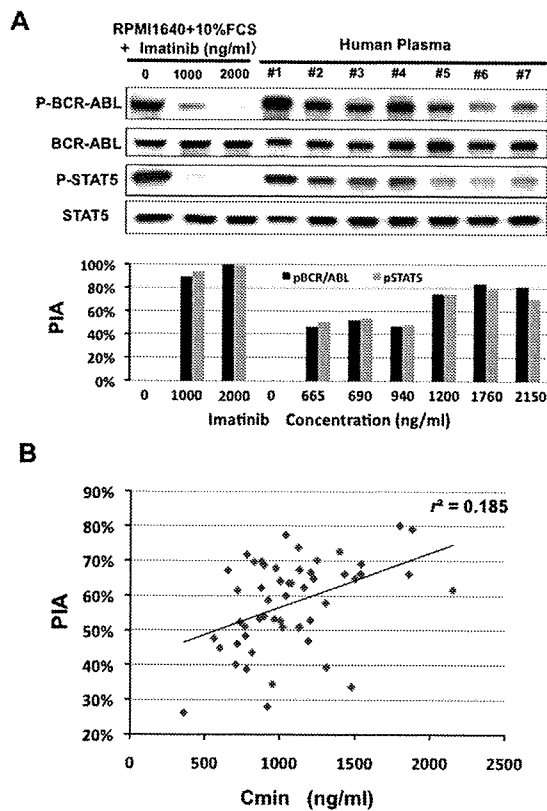


Q1～Q4ごとにMMR達成状況を比較した結果、12ヶ月後のMMR達成率はQ1が43.7%、Q2およびQ3が57.6%、Q4が87.5%と3群間で有意差を認めた（P=0.032）。

ROC解析の結果、12ヶ月時点でのMMR達成に関し感度62.5%、得意度64.0%で1002 ng/mLの閾値が算出された（図2）。



患者血漿を用いたPIA試験では、リン酸化 (P-) BCR-ABLに対し26~80% (中央値61.5%) の阻害活性を示した。CminとPIAとは弱い相関関係 ( $r^2=0.186$ ) を示したが、12ヶ月時点でのMMR達成閾値である1002 ng/mL以上のイマチニブ濃度を示した血漿では有意に高いPIAを示した (図3)。



以上の結果によりイマチニブ血中濃度は治療効果と有意に相関し、MMR達成閾値以上の濃度を示す血漿は有意にP-BCR-ABLの阻害活性が強く、生物学的傍証が示された。今後、血中濃度に基づく薬剤投与量の変更が、更なる治療成績の向上と副作用軽減に有用であるかについて、前方視的に検証を行う必要がある。

#### D. 健康危険情報

該当無し。

#### E. 研究発表

##### 1. 論文発表

- Ohtake S, Miyawaki S, Kiyoi H, Miyazaki Y, Okumura H, Matsuda S, Nagai T, Kishimoto Y, Okada M, Takahashi M, Handa H, Takeuchi J,

Kageyama S, Asou N, Yagasaki F, Maeda Y, Ohnishi K, Naoe T, Ohno R. Randomized trial of response-oriented individualized versus fixed-schedule induction chemotherapy with idarubicin and cytarabine in adult acute myeloid leukemia: the JALSG AML95 study. *Int J Hematol*. 2010. [Epub ahead of print]

- Tanizaki R, Nomura Y, Miyata Y, Minami Y, Abe A, Hanamura A, Sawa M, Murata M, Kiyoi H, Matsushita T, Naoe T. Irrespective of CD34 expression, lineage-committed cell fraction reconstitutes and re-establishes transformed Philadelphia chromosome-positive leukemia in NOD / SCID / IL-2R $\alpha$  mmac mice. *Cancer Sci*. 2009. [Epub ahead of print]
- Suzuki M, Abe A, Imagama S, Nomura Y, Tanizaki R, Minami Y, Hayakawa F, Ito Y, Katsumi A, Yamamoto K, Emi N, Kiyoi H, Naoe T. BCR-ABL-independent and RAS / MAPK pathway-dependent form of imatinib resistance in Ph-positive acute lymphoblastic leukemia cell line with activation of EphB4. *Eur J Haematol*. 84: 229-238, 2010.
- Inamoto Y, Murata M, Katsumi A, Kuwatsuka Y, Tsujimura A, Ishikawa Y, Sugimoto K, Onizuka M, Terakura S, Nishida T, Kanie T, Taji H, Iida H, Suzuki R, Abe A, Kiyoi H, Matsushita T, Miyamura K, Kodera Y, Naoe T. Donor single nucleotide polymorphism in the CCR9 gene affects the incidence of skin GVHD. *Bone Marrow Transplant*. 45: 363-369, 2010.
- Sugimoto T, Tomita A, Hiraga J, Shimada K, Kiyoi H, Kinoshita T, Naoe T. Escape mechanisms from antibody therapy to lymphoma cells: downregulation of CD20 mRNA by recruitment of the HDAC complex and not by DNA methylation. *Biochem Biophys Res Commun*. 390: 48-53, 2009.
- Shiotsu Y\*, Kiyoi H\*, Ishikawa Y, Tanizaki R, Shimizu M, Umehara H, Ishii K, Mori Y, Ozeki K, Minami Y, Abe A, Maeda H, Akiyama T, Kanda Y, Sato Y, Akinaga S, Naoe T. KW-2449, a novel multi-kinase inhibitor, suppresses the growth of leukemia cells with FLT3 mutations or T315I-mutated BCR/ABL translocation. *Blood*. 114: 1607-1617, 2009. \*equal contribute.
- Takehita A, Shinjo K, Yamakage N, Ono