

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.

8. 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 immuno-conjugate of calicheamicin, alters the levels of target molecules of malignant B-cells. *Leukemia.* 146: 34-43, 2009.
9. 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.
10. 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.

2. 学会発表

1. 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.
2. 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.
3. 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.
4. 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 C

o-Expressing Cells. The American Society of Hematology 51th Annual Meeting. Dec 2009, New Orleans USA.

5. 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.
6. 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.

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

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

「臨床プロトコールとの調整」

研究分担者 小林 幸夫 国立がんセンター中央病院 臨床検査部 医長

研究要旨

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。

A. 研究目的

保存検体での遺伝子の塩基配列、遺伝子多寡を検討する場合、白血病でもっとも普遍的に保存されているのは、塗抹標本ではないかと考えられる。ホジキンリンパ腫の保存検体でホジキン細胞に対してCD30染色を施した後にmicro-dissectionを行い、標的遺伝子の遺伝子増幅、塩基配列決定、および、FICTION (Fluorescence Immunophenotyping and interphase Cytogenetic as a Tool for the Investigation of Neoplasm)法が可能かどうかを検討する。

B. 研究方法

1. Phusion DNA polymeraseを用いたマイクロダイセクションによるシングルセルからのDNA抽出とPCR
Leica社製のmicro-dissectionシステムを用いた、ダイセクションした切片がcapに付着したままにならないように注意して、1×PhusionHF Reaction Buffer 25ul bufferを入れたtube底に落とした。Tris buffer 0.5μlにproteinase K (20mg/ml)を最終濃度0.2mg/mlとなるように加え、混和した。60℃で一晩incubationした後、98℃、10分でproteinase Kを失活させた。1.5ml tubeに溶液を全量移し、16000xg、2分、遠心した。上清をPCRサンプルとしてPhusion DNA polymeraseを用いてTNF関連遺伝子であるA20遺伝子のPCRを行った。

2. 保存検体でのFICTION 法

脱パラフィン（キシロール5槽、エタノール5槽、各2分）後、蒸留水にて水洗、クエン酸バッファー

(Dako)に浸した後、オートクレーブ 121℃、10分処理後、自然冷却。その後、蒸留水で水洗した。PBSにて5分、3回、その後、ペプシン溶液 (Dako) 10分、室温にて処理、PBSで洗浄、5分、3回処理。その後、10%NHS/PBSにて10分ブロッキングを行った後、CD30抗体で室温、一晩遮光下、処理を行った。

翌日、遮光下で連続的に、PBS処理5分、3回、10%NHS/PBSで洗浄。2次抗体 (Alexa fluor 647 Rabbit Anti-mouse IgG), 室温、30分 処理。PBS 5分、3回後、10%NHS/PBSで洗浄。2次抗体 (Alexa fluor 647 Goat Anti-rabbit IgG) 室温、30分処理、PBS 5分、3回、10%NHS/PBSで洗浄。Alexa fluor 647 Donkey Anti-goat IgG抗体で室温、30分間処理。PBS 5分、3回。MgCl₂/PBS 5分。Formalin- MgCl₂/PBS10分。順に遮光下に、PBS 5分、2回 70%エタノール 置換、さらに100%エタノールに置換後、風乾。73℃、2分Denature後、急速に冷70%エタノールで5分間処理、さらに冷100%エタノール処理。前処理 73℃、5分を行った、プローブでハイブリダイゼーション 37℃、一晩。

通常のFISH法で行うように遮光下に洗浄。鏡検を行った。

遺伝子プローブは1で塩基配列を求めたA20遺伝子とそのcentromere領域のCEP6 (Vysis) probeを用いた。

C. 研究結果

昨年の検討でマイクロダイセクションによる

100個程度の細胞からも10回程度のPCRが可能なDNAが抽出できた。より高精度で高感度であるPhusion DNA polymeraseによることが大きいと考えられる。

通常のホルマリン保存検体で5年以上経過した検体でFICTION法（免疫染色と同時のFISH法）が可能であった。ちなみに、マイクロダイセクションとFICTION法との両方が可能であった30検体があったが、うち、4例で突然変異が認められ。その塩基配列パターンを見ると正常配列がまったく欠如しており、正常アレルが欠失していることが示された。この検体でのFICTION法のパターンは確かにcentromereシグナルに比べて、数が少なく、欠失が認められていた。そのシグナル数の割合は0.70であったので、この数字がFICTION法での欠失と判断するcut-offレベルと考えられた。注目すべきはcentromereシグナルに比べて0.30以下のおそらくhomo欠失と考えられる検体が30例中4例あったことで、これらの検体での塩基配列は正常とされていた。このことは、CD30細胞周囲の正常リンパ球の塩基配列決定がされていたことを示し、臨床検体で塩基配列を決定した場合ホモ欠失が病態に関係すると考えられる場合、検出出来ないことを示している。すなわち白血病に応用した場合でも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。

適切なDNA抽出キットの選択によって骨髄塗抹標本からこの量は現在知られている一回に必要なDNAの量を10-50ngとすると、理論上1000回分の量であるので、包括的に塩基配列決定が可能な用量である。

D. 健康危険情報
該当無し。

E. 研究発表

1. 論文発表

1. 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.
2. 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.
3. 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.
4. 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.

5. 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.
6. Kato M, Kobayashi Y, et al. Frequent inactivation of A20 in B-cell lymphomas. *Nature*. 459: 712-6, 2009.
7. Kobayashi Y. Recent advances in the treatment of follicular lymphoma. *Int J Clin Oncol*. 14:191-6, 2009.
8. 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.
9. 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]

2. 学会発表

1. Kato M, Kobayashi Y, et al. Genome-wide analysis identifies frequent inactivation of A20 in B-cell lymphomas. 第68回日本癌学会学術総会 2009年10月1日-3日 横浜
2. Kawahata R, Kobayashi Y, et al. Mutation analysis of genes regulating NFkappaB pathway in malignant lymphoma. 第68回日本癌学会学術総会 2009年10月1日-3日 横浜
3. Kato M, Kobayashi Y, et al. Frequent inactivation of A20 through gene mutation in B-cell lymphomas. 第71回日本血液学会学術集会 2009年10月23-25日 京都
4. Kato M, Kobayashi Y, et al. Aberrations of Genes Regulating NF kappa B pathway in B-cell Malignant lymphoma. The 51st annual meeting. Dec 2009, New Orleans USA.
5. Nomoto J, Kobayashi Y, et al. Detection of loss of A20 gene by FICTION in Hodgkin's lymphoma cases. The 51st annual meeting. Dec 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
該当無し。
2. 実用新案登録

該当無し。

3. その他
該当無し。

「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*Flt3*遺伝子発現の変化」
研究分担者 前田 智也 埼玉医科大学国際医療センター 造血器腫瘍科 助教

研究要旨

急性前骨髄球性白血病（APL）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。

A. 研究目的

急性前骨髄球性白血病（APL）は、前骨髄球のレベルで分化が停止した急性骨髄性白血病（AML）の一群であり、AML全体の15%を占め、全トランス型レチノイン酸（ATRA）を用いた分化誘導療法により寛解率94%と6年生存率83.9%の優れた治療反応性と長期生存率を示す。APLは（15;17）転座の染色体異常を有し、その結果生じる*PML-RAR α* 融合遺伝子は、核内転写因子である正常*RAR α* の顆粒球系細胞の分化に関連した遺伝子群への発現調節に対して dominant negative に作用し、転写抑制的に作用し血球分化を阻害する。このため*PML-RAR α* 融合遺伝子は、APLの原因遺伝子とされている。しかしながらトランスジェニックマウスを用いた研究から*PML-RAR α* の導入だけではAPLを発症しないことが知られており、腫瘍化には*Flt3*などの細胞増殖に関わる遺伝子の関与が必要と考えられている。

近年、APLを除く成人AML全体の28~32%で*Flt3*遺伝子の膜貫通領域の一部が重複して繰り返される internal tandem duplication 変異（*Flt3/ITD*）が認められ、APLを除くAMLではその再発率が高いことから独立した予後不良因子と考えられている。*Flt3/ITD*変異は膜貫通領域に重複する遺伝子の一部が回文配列に近い構造を有しヘアピン構造を形成することからDNA複製時のスリップにより生じる変異と考えられており、この膜近傍領域の塩基配列の重

複による傍膜貫通部の伸長がFLT3受容体の重合を来すことで活性化し、リガンド非依存性の恒常的チロシンキナーゼ活性を引き起こすと考えられている。APLにおいても20~36%で同変異を認め、変異を有する場合には初診時の白血球数やLDHとの相関が報告されているが、明らかな予後不良因子との報告はない。今回、ATRA分化誘導療法がAPLにおける*Flt3*遺伝子の発現の変化に与える影響についてAPL細胞株NB4を用いて検討した。

B. 研究方法

APL細胞株NB4、AML(M2)細胞株HL-60、およびFlt3高発現*MLL*遺伝子変異細胞株KOCL-58を用いて各々、ATRA添加によるFlt3発現細胞数の変化をFlow cytometry法による細胞表面抗原解析により検討した。細胞表面抗原解析ではFlt3（CD135）の他に、c-kit（CD117）およびその他の顆粒球系分化抗原（CD13、CD33、CD34、CD11b、CD15、CD64）の変化も検討した。

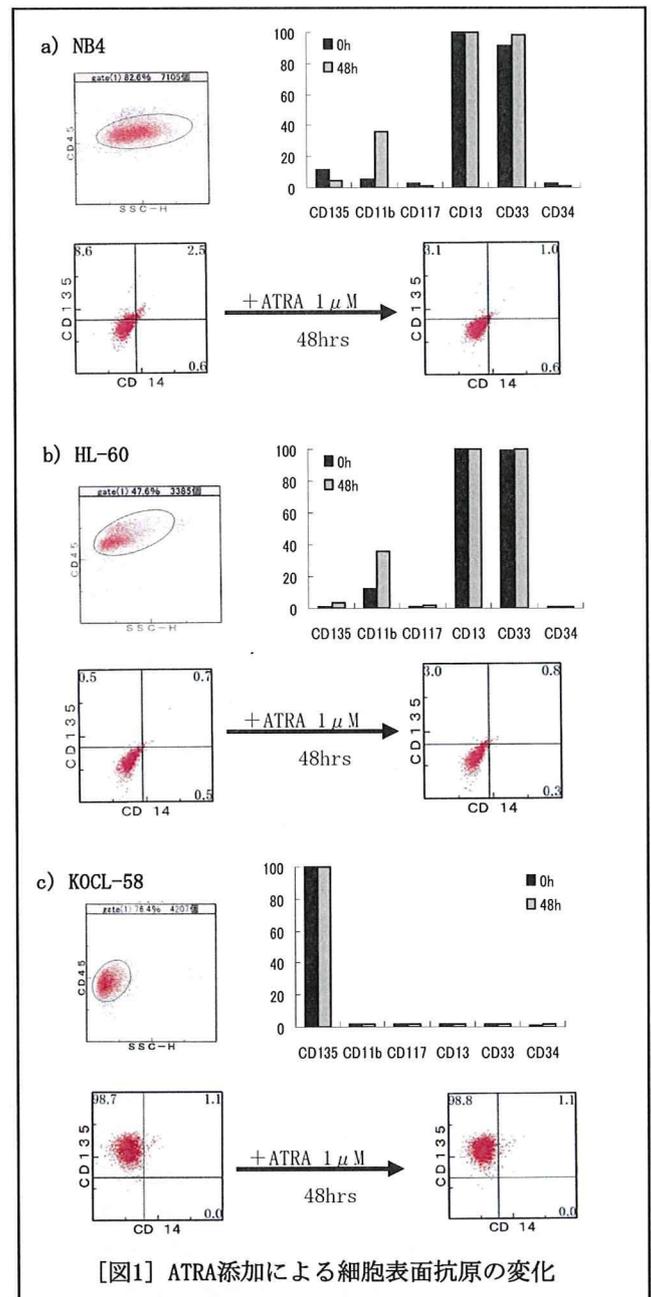
次に、各細胞からtotal RNA抽出とRTによるcDNAの作成を行い、定量PCRを行った。定量PCRは、TaqMan Universal PCR Master Mixを用い、7900HT Fast Real-Time PCR System上で検出した。PCRの条件は50°Cで2分のウラシル-DNA グリコシラーゼ（UNG）処理を行い、

95°Cで10分処理した後、95°C15秒 (denature) と60°C1分 (annealing/extension) のPCR反応を1サイクルとし、40サイクル行った。PrimerとしてFlt3 (Assay ID ; Hs00174690_m1, Reference Sequence*; NM_004119.2, Exon Boundary;23-24) と内在性コントロールとしてハウスキーピング遺伝子であるGAPDH (Assay ID ; Hs99999905_m1, Reference Sequence*; NM_002046.3, Exon Boundary;3-3) を用いた (* ; GenBank Accession number)。希釈検体を用いて両primerにおける Δ Ct値が同様であることの確認とPCRの増幅効率が等しいことを確認した。また、ATRA添加による遺伝子発現の変化はKOCL-58をキャリブレーションサンプルとした $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 値から相対定量法である比較Ct法 ($=2^{-\Delta\Delta Ct}$) を用いた倍率変化により検討した。

C. 研究結果

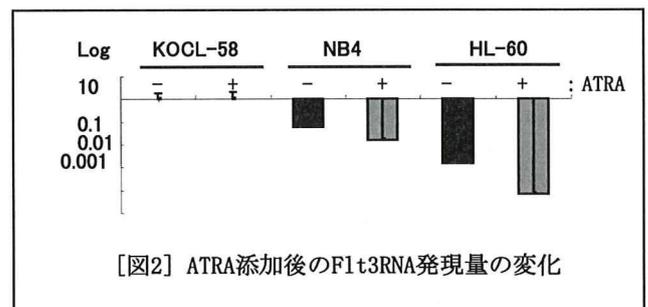
はじめに、NB4の分化誘導に必要なATRAの至適添加時間の検討を行った。結果、ATRA (1 μ M) によるNB4の分化誘導作用は24時間より確認されはじめ、その後分葉球の比率は48時間以降で20%に達することが明らかとなった。60時間では16%と極端にviabilityが下がる傾向が認められた為、至適添加時間を48時間とした。HL-60では血球分化に関してはNB4と同様の傾向を認めたが、全細胞のviabilityは48時間で80%と比較的保たれていた。一方、KOCL-58では分化傾向は認められなかった。ATRA添加濃度を3段階に調節し (0.5、1.0、1.5 μ M) 検討したが、分化誘導作用に大きな違いは認めず、Idres Nらの報告 (Cancer Res. 61(2):700-5. 2001) 同様、その後の解析には1 μ M 48時間を採用した (data not shown)。

次に、ATRA添加時の各細胞における細胞表面抗原の変化を検討した。結果、NB4細胞株におけるFlt3の発現は、全細胞の11.1%と一部の細胞集団に認められた (図1a)。一方でHL-60においても1.2%というわずかな細胞集団が陽性を示したが、蛍光ビーズを用いた蛍光強度の分布の違いからHL-60におけるFlt3の発現については不明と考えられた (data not shown)。NB4においてはATRA添加48時間後には顆粒球分化抗原であるCD11b陽性細胞が5.0%から36.0%に増加し、一方でFlt3発現細胞は11.1%から4.1%に減少することが示された。また、c-kit受容体であるCD117抗原発現には変化が認められなかった。一方でHL-60ではATRA添加によりCD11b陽性細胞が12.6%から35.4%に増加した。ATRAによる分化誘導作用がないKOCL-58においてはATRA添加による影響を認めなかった。以上のことからNB4においてはATRAによる分化誘導作用によりCD135陽性細胞が減少することが明らかとなった。



【図1】 ATRA添加による細胞表面抗原の変化

定量PCRでの解析では、表1に示すようにKOCL-58でのFlt3 mRNA発現を1とした時、NB4およびHL-60におけるmRNAの発現相対比率はそれぞれ0.06、0.001であった。ATRA添加での変化はKOCL-58では大きな変化を認めないが、NB4では0.06から0.016、HL-60では0.016から0.00007へと



【図2】 ATRA添加後のFlt3 mRNA発現量の変化

[表1] 比較Ct法による相対定量 (内部コントロール ; GAPDH、外部コントロール ; KOCL-58)

Cell	Flt3	GAPDH	Δ Ct	$\Delta\Delta$ Ct	Flt3
	Average Ct	Average Ct	Flt3-GAPDH	Δ Ct - Δ Ct KOCL-58	Rel. to KOCL-58
KOCL-58	22.94±0.09	16.84±0.15	6.10±0.24	0±0.24	1.00 (0.85-1.18)
KOCL-58 +ATRA 1 μ M	23.48±0.10	17.41±0.10	6.07±0.20	-0.03±0.20	1.02 (0.89-1.17)
NB4	25.89±0.04	16.30±0.10	9.59±0.14	3.96±0.14	0.06 (0.058-0.07)
NB4 +ATRA 1 μ M	28.37±0.08	16.77±0.05	11.6±0.13	5.97±0.13	0.0015 (0.0014-0.0017)
HL-60	31.45±0.10	16.42±0.00	15.0±0.10	9.37±0.10	0.016 (0.015-0.017)
HL-60 +ATRA 1 μ M	34.17±0.02	15.14±0.10	19.0±0.12	13.74±0.12	0.00007 (0.00006-0.00007)

RNA発現量は有意に変化した (p=0.0035、0.0034 ; Paired t-Test) (図2)。

さらにAPL患者骨髄検体3例における生細胞を用いたflow cytometryCD45blast Gating法による検討では、Flt3発現細胞数はATRA内服投与により低下する傾向が認められた (表2)。

結語

ヒトAPL細胞株NB4を用いてATRA分化誘導療法がFlt3のmRNA発現量を低下させることを示した。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。APLにおけるFlt3陽性細胞の役割は不明であり、今後Flt3陽性細胞の生物学的特徴を検討する必要があると考える。

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

(予定を含む)

1. 特許取得

該当無し。

[表2] APL患者骨髄検体におけるFlt3発現細胞数の変化

Patient (age/sex)	%CD135+ cells of (%CD45 low fraction)	
	ATRA内服前	ATRA内服後 (内服日数)
No. 1 (33yo./M)	15.1 (85.5%)	→ 3.6 (85.8%) (35日)
No. 2 (62yo./M)	18.5 (80.3%)	→ 9.9 (84.8%) (7日)
No. 3 (60yo./F)	68.7 (32.7%)	→ 6.0 (21.1%) (5日)

2. 実用新案登録

該当無し。

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

「標的分子の臨床応用における保存検体の有用性」

研究分担者 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

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。

A. 研究目的

がん細胞における標的分子の発現の有無や発現量、そして標的分子の変異等により薬剤の効果が影響されることは広く知られている。既知の分子のみならず、新しく発見される分子も予後に大きく関わる可能性がある。臨床検体においてこれら標的分子を検討することは極めて重要なことであるが、採取、分離、測定、予後、他の因子との比較等、膨大な作業があり、少数検体を使用した検討にとどまることが多い。検体収集事業から得られた検体由来がん細胞を使用すれば、既出のデータ利用が簡易となり、他の因子や予後に関する検討が容易に実現可能となる。多くの因子が既に検討されている検体を使用して測定することは、薬剤開発から治療方法の選択にいたるまで、有益性が高い。

造血器腫瘍に対する分子標的療法に関する研究は最近急速に進歩している。なかでも、抗体療法の一つである抗CD20抗体、rituximabは、B細胞性腫瘍の治療に飛躍的な進歩をもたらせた。

新規抗体 inotuzumab ozogamicin (IO) は gemtuzumab ozogamicin (抱合型抗CD33抗体; GO) 同様 calicheamicin 抱合型の抗ヒトCD22ヒト化抗体である。CD22はB細胞上に幅広く分布するが、幹細胞、顆粒球、巨核球細胞上には発現が認められず、抗体が結合すると細胞内に内在化するという特徴を有する。このため抗がん剤や毒素を抱合させ、標的細胞内にこれらを送り込むことが可能である。このように本剤は分子標的や作用機序、抗がん剤が既存の薬剤とは異なり、通常の治療に耐性を獲得、再発した事例にも有効性が期待される。

今回、新規抗体、IOの特性を臨床検体を使用し

て検討し、その有用性を予測した。

B. 研究方法

症例由来細胞を扱う上で、本研究は本学の倫理審査委員会の承認をえた。B細胞腫瘍である malignant lymphoma (ML)、chronic lymphocytic leukemia (CLL) のリンパ節および末梢血より腫瘍細胞を、informed consent を取得した上で、採取した。Ficoll 密度勾配を使用し、腫瘍細胞を濃縮分離し、さらに CD45-SSC 法を使用し、正常細胞の混入を可及的に除外した。細胞表面 κ/λ 比が 20 以上の乖離がある場合、腫瘍細胞の検体とし、それ以外は解析の対象から除外した。IO、calicheamicin そして非抱合型抗 CD22 ヒト化抗体 (G5/44) は米国 Wyeth 社より提供を受けた。表面抗原に加え、耐性因子の量的、機能的発現、*in vitro* の薬剤効果として viable cell count や apoptosis 等の直接作用、CDC や ADCC 効果を観察した。

耐性化因子として細胞表面上の P-glycoprotein (P-gp)、MRP、LRP の量的発現を蛍光色素ラベル抗体により検討した。また、rhodamine-123 (Rh123) を使用した色素取り込み能を multi-drug resistant (MDR) modifier である SAZ-PSC833 (Novartis) または MS209 (Mitsi Pharm) 存在下、非存在下に flow cytometry にて、測定した。細胞を IO 存在下、非存在下で *in vitro* にて培養し、cell cycle 上の hypo-diploid portion を薬剤効果として使用した。

C. 研究結果

抗原抗体法を使用して求められたP-gp発現量とIOの殺細胞効果との間には負の相関関係が認められた。(図1)

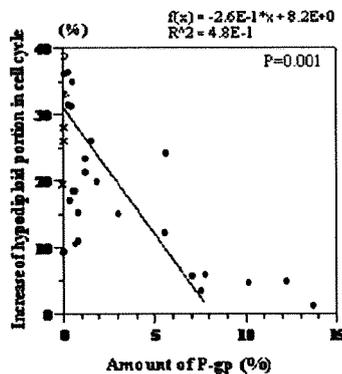


図1

横軸はP-gpの発現量をflow cytometryにて測定し、増加率を%表示した。縦軸はIO非使用下で培養した場合と比較して、使用した場合、cell cycle上のhypo-diploid portionの増加率(%)を示す。

P糖蛋白の機能をMDR modifier (PSC833またはMS209)存在、非存在下でRh123の色素取込として測定した。IOの殺細胞効果との間には負の相関関係が認められた。(図2)

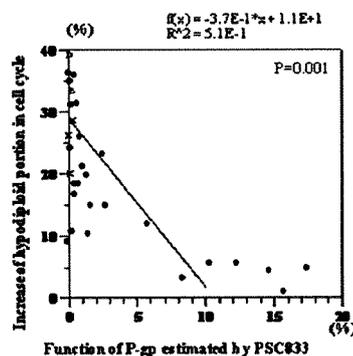


図2

横軸はP-gpの機能をRh123の色素取込量から算出した。PSC833非存在に比較してPSC833存在下の色素取込の増加率(%)で示した。縦軸はIO非使用下で培養した場合と比較して、IOを使用した場合、cell cycle上のhypo-diploid portionの増加率(%)を示す。

MRPとLRPに関しては、IOの*in vitro*殺細胞効果と相関関係を認めなかった。遊離calicheamicinを使用した場合にも同様の結果が得られた。G5/44をIOの代わりに使用しても、殺細胞効果に影響はなかった。

新しい標的分子CD22は有用な抗原であるが、本標的を使用した抱合型抗体による治療は、多剤耐性因子であるP-gpの影響を受けることが判明した。これらの結果はGOの臨床前の結果と類似しているが、今後IOによる治療の予後を見極めていく上で重要である。Prospectiveな研究では、CD22の発現に加えて、P-gpの発現も検討していく必要があることが示唆された。

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重要である。新規分子標的薬が次々と開発する現在、過去の報告から予後因子を抽出することには限界もある。分子標的治療ががん薬物療法の主幹になろうとする現在、既報にとらわれず、臨床研究レジメに採用される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。そのた

めには、検体を連続して収集し、今後標的とされる分子や、その分子に以外にもその発現が予後にする分子に着目して検討をしていく必要性がある。これらの手法はprospective studyを効率的に行わせ、医療費の削減にも寄与すると考える。

D. 健康危険情報

該当無し。

E. 研究発表

1. 論文発表

1. [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.
2. [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.
3. [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 immuno-conjugate of calicheamicin, alters the levels of target molecules of malignant B-cells. *Leukemia*. 23:1329-36, 2009.
4. Kobayashi Y, Tobinai K, [Takeshita A](#), Naito K, Asai O, Dobashi N, Furusawa S, Saito K, Mitani K, Morishima Y, Ogura M, Yoshiba 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.

2. 学会発表

1. [Takeshita A](#), Shinjo K, Watanabe Y, Maekawa M, Ohnishi K, Sugimoto Y, Ohno R. Internalization speed may be one of the factors in the efficacy of CMC-544 (inotuzumab ozogamicin), the newly developed

calicheamicin-conjugated antibody. *68th Annual Meeting of Japanese Cancer Society.*

2. 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. *20th Congress of International Society of Blood Transfusion.*
3. 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. *20th Congress of International Society of Blood Transfusion.*
4. 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.*
5. 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.*
6. 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 compliment inhibitory factors on malignant B-cell lymphoma cells. *14th congress of European 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
該当無し。
2. 実用新案登録
該当無し。
3. その他
なし

「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」
研究分担者 田内哲三 東京医科大学内科第一講座 准教授

研究要旨

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的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。

A. 研究目的

イマチニブ療法による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。イマチニブ治療中のCML症例のPCRデータを解析し、分子的応答の速度論が造血細胞分化の4-COMPARTMENT MODELにより説明可能という仮説をもとに、慢性期CMLのイマチニブ療法における白血病細胞数をBCR-ABL mRNAよりイマチニブ耐性化の算定がなされた。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ている。実際に、分子寛解後にイマチニブ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イマチニブ継続投与が必要とされる。

これに対し、次世代型ABLキナーゼ阻害剤の開発が進み、平成21年1月21日に本邦においてNilotinib及びDsatiniibの製造承認が下された。イマチニブとABLの結合様式はhelix-Cによる比較的大きな結合ポケットを必要とするが、NilotinibはABLとの結合様式を適正化することによってABLに対する親和性がイマチニブよりも向上しているため、基本的薬理作用はイマチニブを強化しT315I変異以外はカバーできる薬剤としてとらえることができる。これに対しDasatinibはSRC-familyチロシンキナーゼとABLチロシンキナーゼを抑制し、イマチニブより300倍以上強力でBCR-ABLチロシンキナーゼ活性を抑制する。しかもT315Iを除くBCR-ABL変異に対しても有効である。Dasatinibの特徴はSRCキナーゼ阻害剤に特有な、少ないcontact pointにてキナーゼドメインと結合

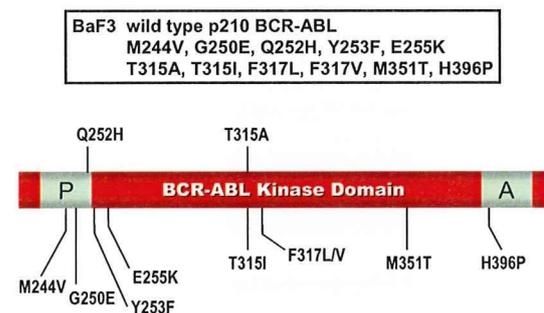
することができることに起因しており、イマチニブの延長線上にない薬理学的特性を有する。

本研究ではCMLの治療を目的としたABLキナーゼ阻害剤とPI3キナーゼ/mTOR阻害剤(BEZ235)の併用効果を白血病細胞株及び検体収集より得られた白血病細胞を用いて検討した。

B. 研究方法

使用した細胞株はWild-type(WT) p210BCR-ABL, M244V, G250E, Q252H, Y253F, E255K, T315A, T315I, F317L, F317V, M351T, H396Pを発現したBaF3細胞である。(図1)

BCR-ABL Mutants

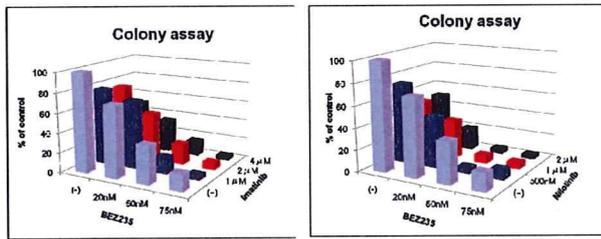


さらに、Random mutagenesis BCR-ABLを感染させたBaF3細胞株を使用した。

C. 研究結果

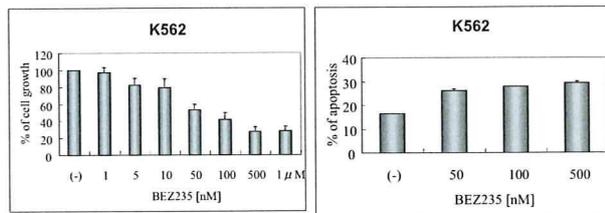
BCR-ABL Random mutagenesis screenを用いてABLキナーゼ阻害剤(imatinib及びnilotinib)とBEZ235の併用効果についてColony assayを用いて解析した。ABLチロシンキナーゼ阻害剤単独では薬剤耐性クローンのrecoverが認められたが、BEZ235を併用する

BCR-ABL Random mutagenesis Screenを用いたBEZ235とimatinib、nilotinib併用効果



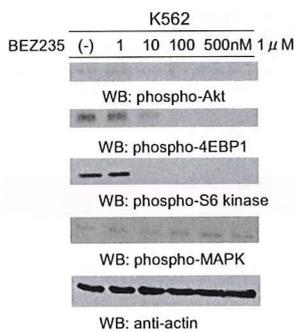
ことにより、相乗的なColony形成の低下が確認された。

BEZ235によるK562に対する増殖抑制効果



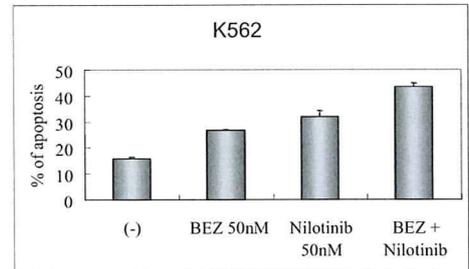
BEZ235は単独ではK562細胞株に対し、100nMにて細胞増殖抑制、アポトーシス誘導が確認された。

K562に対するBEZ235の作用



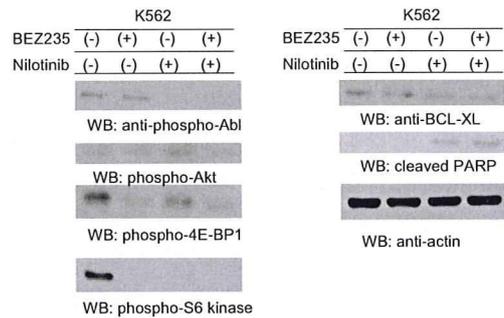
K562細胞株を用いてphospho-Akt, phosphor-4EBP1, phosphor-S6Kinaseについて免疫ブロットにて解析した。BEZ235はphospho-Akt, phosphor-4EBP1, phosphor-S6Kinaseを10nMレベルにて抑制した。

BCR-ABL陽性細胞に対するBEZ235、nilotinibの併用効果



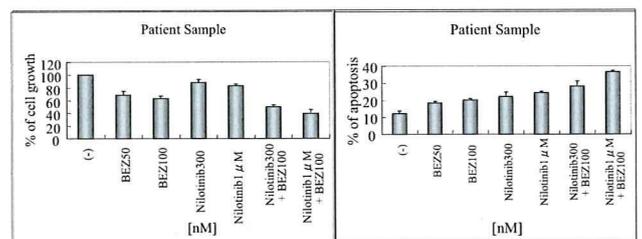
K562細胞におけるBEZ235及びnilotinibの併用効果をAnexinVを用いたフローサイトメーターにて解析した。BEZ235 50nM + Nilotinib 50nMにてアポトーシス誘導細胞の増加が確認された。

BCR-ABL陽性細胞に対するBEZ235、nilotinibの併用



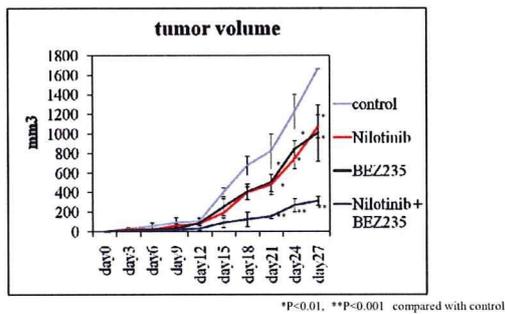
BEZ235及びnilotinibの併用効果をphospho-Akt, phosphor-4EBP1, phosphor-S6Kinase, cleavedPARPに関して免疫ブロットにて解析した。BEZ235 + nilotinib併用により、phospho-Akt, phosphor-4EBP1, phosphor-S6Kinaseの抑制、cleavedPARPの増加が確認された。

T315I変異陽性細胞に対するBEZ235、nilotinibの併用効果



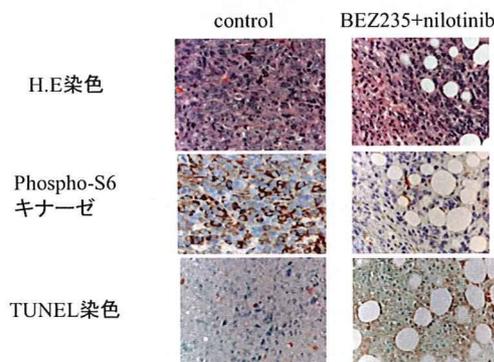
BEZ235 + nilotinibの併用効果を検体収集より得られた白血病細胞を用いて解析した。BEZ235 + nilotinibの併用によりT315I BCR-ABL発現細胞においても、細胞増殖抑制、アポトーシス誘導の増加が確認された。

BCR-ABL陽性細胞に対する BEZ235、nilotinibによるマウスモデルでの効果



Random mutagenesis BCR-ABLを感染させたBaF3細胞株をヌードマウス皮下に移植後、nilotinib単独群、BEZ235単独群、nilotinib + BEZ235併用群にて皮下腫瘍形成能について解析した。Nilotinib + BEZ235併用群では有意な腫瘍形成能の抑制が確認された。

BCR-ABL変異細胞に対する BEZ235、nilotinibによるin vivoでの効果



さらに、腫瘍組織をH.E.染色、Phospho-S6キナーゼ免疫染色、TUNNELにて解析したところ、nilotinib + BEZ235併用群ではTUNNEL陽性細胞の増加、Phospho-S6キナーゼの抑制、アポトーシス誘導細胞の増加が確認された。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in vivo studyを含めた詳細な解析が必要と考えられる。

D. 健康危険情報
特になし。

E. 研究発表

1. 論文発表

- Okabe S, Tauchi T, et al. Mechanism of MK-0457 efficacy against BCR-ABL positive leukemia cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 380:775-779, 2009.
- Ohyashiki J, Tauchi T, et al. The oral iron chelator deferasirox represses signaling through the mTOR in myeloid leukemia cells by enhancing expression of REDD1. *Cancer Sci.* 100:970-977, 2009.

2. 学会発表

- Tauchi T, Okabe S, Ashihara E, Kimura S, Maekawa T, Ohyashiki K. Combined effects of novel heat shock protein 90 inhibitor NVP-AUY922 and nilotinib in a random mutagenesis screen. Blood (ASH Annual Meeting Abstracts), Nov 2009; 114:1149.
- 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.
- 田内哲三、木村晋也、芦原英司、岡部聖一、前川平、大屋敷一馬. AUY922とNilotinib併用によるBCR-ABL変異体に対するin vitro 及びin vivoでの有効性の検討. 第71回日本血液学会総会、京都.
- 岡部聖一、田内哲三、木村晋也、芦原英司、岡部聖一、前川平、大屋敷一馬. ヒストン脱アセチル化阻害剤とダサチニブ併用によるイマチニブ耐性慢性骨髄性白血病細胞株に対する効果. 第71回日本血液学会総会、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

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」

研究分担者 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。

A. 研究目的

急性骨髄性白血病(AML)に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、2008年に改訂されたWHO分類第4版では、さらに多くの特異的染色体異常がその分類のために採用されている。これらの染色体異常の種類と予後との関係はこれまで海外のいくつかの大規模研究によって検討され報告されてきたが、個々の染色体異常におけるリスクの評価は必ずしも一定でない。本研究では、JALSGのAML研究における染色体異常と予後との関係を検討し、独自の予後因子となる染色体異常を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

JALSG AML-97登録症例のうち、染色体小委員会によるセントラルレビューが641例で行われ、今回はその中でも特に、予後不良と考えられる染色体異常について検討した。

C. 研究結果

高リスク群転座としては、まずこれまでのさまざまな報告で予後不良と報告されているt(9;22)(q34;q11)、11p15転座、t(10;11)(p13;q14)、t(6;9)(p23;q34)、t(16;21)(p11;q22)、8p11転座を抽出した。これらはそれぞれBCR-ABL、NUP98キメラ、CALM-AF10、DEK-CAN(NUP214)、FUS-ERG、MOZキメラが形成されると考えられる。これらを有したのは29例(4.5%)で、全体では寛解率(65.5%)、5年全生存率(18.1%)、5年無病生存率(14.0%)とも低かった。ただし、それぞれの染色体転座ごとの症例数は2-8例といずれも少なく、個々の染色体異常が臨床

的な予後不良とどの程度関連しているかの評価については今後の症例の集積が必要である。

次に、やはり多くの報告で予後不良因子とされている染色体異常の中で-5/5q-と-7/7q-について検討した。代表的な欠失型異常である-5/5q-と-7/7q-を有する症例はそれぞれ23例と31例であった。-5/5q-を有する症例は、寛解率(39.1%)、5年全生存率(0%)、5年無病生存率(0%)とも有意に低く、他の報告と同様の結果だった。一方、-7/7q-を有する症例は、寛解率(58.1%)は有意に低かったものの5年生存率ではまったく有意差を認めなかった。-7/7q-を有する症例では、31例中27例(87%)は他の染色体異常を合併しており、これを-7と7q-に分けて、非寛解、寛解後再発、寛解継続ごとに合併する染色体異常の比較を行った。-7の非寛解例あるいは寛解後再発例では-5/5q-、t(9;22)、3q異常などの、7q-の非寛解例あるいは寛解後再発例では-5/5q-、11p15転座、複雑核型などの、いずれも他の報告で予後不良とされている染色体異常を合併している症例が多くみられた。逆に、-7および7q-の寛解継続例ではt(8;21)、inv(16)など予後良好の染色体異常を合併していた。-7/7q-では、-7/7q-の有無よりも、-7/7q-にどのような他の染色体異常が合併するかが予後に重要な影響を与えている可能性が示唆された。-7と7q-の間で予後因子としての意義が異なるという報告もあるが、今回の解析では両者の間に差は認めなかった。同じように-7/7q-に合併する染色体異常に注目した小児および若年成人での国際共同研究の結果が最近報告されているが、-7と7q-でそれぞ

- Matsumoto, Junya Kuroda, Shigeo Horiike, Masafumi Taniwaki. Identification of the immunoglobulin heavy chain and BACH2 fusion in diffuse large B-cell lymphoma. 第68回日本癌学会総会, 横浜, 2009年10月1-3日
4. Takeshi Isoda, Masatoshi Takagi, Masayuki Nagasawa, Tomohiro Morio, Tomohiko Taki, Masafumi Taniwaki, Shuki Mizutani. Materno-fetal transmission and loss of non-inherited maternal MHC in p190 type BCR-ABL leukemia. 第68回日本癌学会総会, 横浜, 2009年10月1-3日
 5. Hisao Nagoshi, Tomohiko Taki, Kazuhiro Nishida, Minako Goto, Satoru Kobayashi, Yasuhiko Tsutsumi, Yosuke Matsumoto, Junya Kuroda, Shigeo Horiike, Takemi Otsuki, Masafumi Taniwaki. Alteration of DCC gene in multiple myeloma cell lines. 第71回日本血液学会学術集会, 京都, 2009年10月23-25日
 6. Takeshi Taketani, Tomohiko Taki, Seiji Fukuda, Seiji Yamaguchi, Yasuhide Hayashi. Clinical significance of somatic mutations in hematological malignancies with NUP98-fusion genes. 第71回日本血液学会学術集会, 京都, 2009年10月23-25日
 7. Satoru Kobayashi, Tomohiko Taki, Kazuhiro Nishida, Muneo Ohshiro, Kayoko Kurita, Natsumi Sakamoto, Yoshiaki Chinen, Hisao Nagoshi, Yasuhiko Tsutsumi, Yosuke Matsumoto, Junya Kuroda, Shigeo Horiike, Masafumi Taniwaki. Novel fusion of the immunoglobulin heavy chain with BACH2 gene in diffuse large B-cell lymphoma. 第71回日本血液学会学術集会, 京都, 2009年10月23-25日
 8. Yosuke Matsumoto, Shigeo Horiike, Ryuko Nakayama, Shinsuke Mizutani, Yuji Shimura, Hisao Nagoshi, Mio Yamamoto, Muneo Ohshiro, Yasuhiko Tsutsumi, Tsutomu Kobayashi, Daisuke Shimizu, Hitoji Uchiyama, Junya Kuroda, Kenichi Nomura, Tomohiko Taki, Chihiro Shimazaki, Masafumi Taniwaki. Immunohistochemistry of master regulators of helper T-cell differentiation in PTCL-NOS. 第71回日本血液学会学術集会, 京都, 2009年10月23-25日
 9. Takeshi Isoda, Noriko Mitsuiki, Yuki Aoki, Dausuke Tomizawa, Masatoshi Takagi, Masayuki Nagasawa, Tomohiro Morio, Nakaba Ochiai, Tomohiko Taki, Masafumi Taniwaki, Hiroh Saji, Shuki Mizutani. Loss of NIMA as a possible role of materno-fetal transmission of p190 type BCR-ABL leukemia. 第71回日本血液学会学術集会, 京都, 2009年10月23-25日

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
該当無し。

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
Ohtake S, Miyawaki S, <u>Kiyoi H</u> , Miyazaki Y, Okumura H, Matsuda S, Nagai T, Kishimoto Y, Okada M, Takahashi M, Handa H, Takeuchi J, Kageyama S, <u>Asou N</u> , <u>Yagasaki E</u> , Maeda Y, Ohnishi K, <u>Naoe I</u> , 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		in press	2010
Tanizaki R, Nomura Y, Miyata Y, Minami Y, Abe A, Hanamura A, Sawa M, Murata M, <u>Kiyoi H</u> , <u>Matsushita T</u> , <u>Naoe I</u> .	Irrespective of CD34 expression, lineage-committed cell fraction reconstitutes and re-establishes transformed Philadelphia chromosome-positive leukemia in NOD / SCID / IL-2Rgammac mice.	Cancer Sci.		in press	2009
Suzushima H, Wada N, Yamasaki H, Eto K, Shimomura T, Kugimiya MH, Horikawa K, Nishimura S, Tsuda H, Mitsuya H, <u>Asou N</u> .	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	2010
Suzuki M, Abe A, Imagama S, Nomura Y, Tanizaki R, Minami Y, Hayakawa F, Ito Y, Katsumi A, Yamamoto K, Emi N, <u>Kiyoi H</u> , <u>Naoe I</u> .	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	2009
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, <u>Kiyoi H</u> , <u>Matsushita T</u> , Miyamura K, Kodera Y, <u>Naoe I</u> .	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, <u>Kiyoi H</u> , Kinoshita T, <u>Naoe I</u> .	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*, <u>Kiyoi H</u> *, 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, <u>Naoe I</u> .	KW-2449, a novel multi-kinase inhibitor, suppresses the growth of leukemia cells with FLT3 mutations or T3151-mutated BCR/ABL translocation.	Blood	114	1607-1617	2009
<u>Takehita A</u> , Shinjo K, Yamakage N, Ono T, Hirano I, Matsui H, Shigeno K, Nakamura S, Tobita T, Maekawa M, Ohnishi K, Sugimoto Y, <u>Kiyoi H</u> , <u>Naoe I</u> , 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

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
<u>Takeshita A</u> , Yamakage N, Shinjo K, Ono T, Hirano I, Nakamura S, Shigeno K, Tobita T, Maekawa M, Kiyoi H, <u>Naoe T</u> , Ohnishi K, Sugimoto Y, Ohno R.	CMC-544 (inotuzumab ozogamicin), an anti-CD22 immuno-conjugate of calicheamicin, alters the levels of target molecules of malignant B-cells	Leukemia	146	34-43	2009
Ishikawa Y, <u>Kiyoi H</u> , Tsujimura A, Miyawaki S, Miyazaki Y, Kuriyama K, Tomonaga M, <u>Naoe T</u> .	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
Hiraga J, Tomita A, Sugimoto T, Shimada K, Ito M, Nakamura S, <u>Kiyoi H</u> , Kinoshita T, <u>Naoe T</u> .	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
Iwanaga E, Nakamura M, Nanri T, Kawakita T, Horikawa K, Mitsuya H, <u>Asou N</u> .	Acute promyelocytic leukemia harboring a <i>STAT5B-RARA</i> fusion gene and a G596V missense mutation in the STAT5B SH2 domain of the <i>STAT5B-RARA</i> .	Euro J Haematol	83	499-501	2009
Powell JA, Thomas D, Barry EF, Kok CH, McClure BJ, Tsykin A, To LB, Brown A, Lewis ID, Herbert K, Goodall GJ, Speed TP, <u>Asou N</u> , 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
Fujiwara S, Miyake H, Nosaka K, Yoshida M, Ishihara S, Horikawa K, Yonemura Y, Iyama K, Mitsuya H, and <u>Asou N</u> .	Hairy cell leukemia responsive to anti-thymocyte globulin used as immunosuppressive therapy for aplastic anemia.	Int J Hematol	90	471-475	2009
Nanri T, Uike N, Kawakita T, Iwanaga E, Mitsuya H, and <u>Asou N</u> .	A family harboring a germ-line N-terminal C/EBPa mutation and development of acute myeloid leukemia with an additional somatic C-terminal C/EBPa mutation.	Genes Chromosomes Cancer	49	237-241	2010
Jacob B, Osato M, Yamashita N, Wang CQ, Taniuchi I, Littman DR, <u>Asou N</u> , and Ito Y.	Stem cell exhaustion due to Runx1 deficiency is prevented by Evi5 activation in leukemogenesis.	Blood	115	1610-1620	2010

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Ono R, Kumagai H, Nakajima H, Hishiya A, <u>Taki T</u> , 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
Isoda T, Ford AM, Tomizawa D, van Delft FW, Gonzalez De Castro D, Mitsuiki N, Score J, <u>Taki T</u> , 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
Nakahata S, Saito Y, Hamasaki M, Hidaka T, Arai Y, <u>Taki T</u> , 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.	Genes Chromosomes Cancer	48	768-776	2009
Takita J, Motomura A, Koh K, Ida K, <u>Taki T</u> , Hayashi Y, Igarashi T.	Acute megakaryoblastic leukemia in a child with the MLL-AF4 fusion gene.	Eur J Haematol	83	149-153	2009
Taketani T, <u>Taki T</u> , 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
Mizoguchi Y, Fujita N, <u>Taki T</u> , Hayashi Y, Hamamoto K.	Juvenile myelomonocytic leukaemia with t(7;11)(p15;p15) and NUP98-HOXA11 fusion.	Am J Hematol	84	295-297	2009
Matsumoto Y, <u>Taki T</u> , 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
Park M, <u>Taki T</u> , Oda M, Watanabe T, Yumura-Yagi K, Kobayashi R, Suzuki N, Hara J, Horibe K, Hayashi Y.	FBW7 and NOTCH1 mutations in childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia and T cell non-Hodgkin's lymphoma.	Br J Haematol	145	198-206	2009
Okabe S, <u>Tauchi T</u> , Ohyashiki JH, Ohyashiki K.	Mechanism of MK-0457 efficacy against BCR-ABL positive leukemia cells.	Biochem Biophys Res Commun	380	775-779	2009
Ohyashiki JH, Kobayashi C, Hamamura R, Okabe S, <u>Tauchi T</u> , Ohyashiki K.	The ora iron chelator deferasirox represses signaling through the mTOR in myeloid leukemia cells by enhancing expression of REDD1.	Cancer Sci	100	970-977	2009