

- 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.
4. 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.
  5. 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.
  6. 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.
  7. 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.
  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.
  11. Ishikawa Y, Xu J, Sakashita G, Urano T, Suzuki T, Tomita A, Kiyoi H, Nakamura S, Naoe T. Abnormal cytoplasmic dyslocalisation and/or reduction of nucleophosmin protein level rarely occurs in myelodysplastic syndromes. *Leuk Lymphoma.* 49: 2359-2364, 2008.
  12. Abe A, Minami Y, Hayakawa F, Kitamura K, Nomura Y, Murata M, Katsumi A, Kiyoi H, Jamieson CH, Wang JY, Naoe T. Retention but significant reduction of BCR-ABL transcript in hematopoietic stem cells in chronic myelogenous leukemia after imatinib therapy. *Int J Hematol.* 88: 471-475, 2008.
  13. Tanizaki R, Katsumi A, Kiyoi H, Kunishima S, Iwasaki T, Ishikawa Y, Kobayashi M, Abe A, Matsushita T, Watanabe T, Kojima T, Kaibuchi K, Kojima S, Naoe T. Mutational analysis of SOS1 gene in acute myeloid leukemia. *Int J Hematol.* 88: 460-462, 2008.
  14. Ishida H, Isami S, Matsumura T, Umehara H, Yamashita Y, Kajita J, Fuse E, Kiyoi H, Naoe T, Akinaga S, Shiotsu Y, Arai H. Novel and orally active 5-(1,3,4-oxadiazol-2-yl)pyrimidine derivatives as selective FLT3 inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett.* 18:5472-5477, 2008.
  15. Iwasaki T, Katsumi A, Kiyoi H, Tanizaki R, Ishikawa Y, Ozeki K, Kobayashi M, Abe A, Matsushita T, Watanabe T, Amano M, Kojima T, Kaibuchi K, Naoe T. Prognostic implication and biological roles of RhoH in acute myeloid leukaemia. *Eur J Haematol.* 81: 454-460, 2008.
  16. Narimatsu H, Ino M, Ichihashi T, Yokozawa T, Hayakawa M, Kiyoi H, Takeo T, Sawamoto A, Iida H, Tsuzuki M, Yanada M, Naoe T, Suzuki R, Sugiura I. Clinical significance of minimal residual disease in patients with t(8;21) acute myeloid leukemia in Japan. *Int J Hematol.* 88: 154-158, 2008.
  17. Gotoh M, Sasaki Y, Iguchi T, Fujimoto H, Kodama A, Kiyoi H, Naoe T, Ohyashiki K. Karyotypically independent clones with del(11q) and trisomy 10 in acute myeloid leukemia: trisomy 10 may appear as an additional change. *Int J Hematol.* 88:123-124, 2008.
  18. Murata M, Ishikawa Y, Ohashi H, Terakura S, Ozeki K, Kiyoi H, Naoe T. Donor cell leukemia after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation: a case report and literature

- review. *Int J Hematol.* 88:111-115, 2008.
19. 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, 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.
  20. Hama A, Yagasaki H, Takahashi Y, Matsumoto K, Kiyoi H, Kojima S. Mutations of JAK2, JAK3 and GATA1 in acute megakaryoblastic leukemia of Down syndrome. *Blood.* 111: 2493-2494, 2008.
  21. Narimatsu H, Yokozawa T, Iida H, Tsuzuki M, Hayakawa M, Takeo T, Iino M, Ichihashi T, Kato C, Sawamoto A, Sao H, Yanada M, Emi N, Kiyoi H, Yamaguchi T, Naoe T, Suzuki R, Sugiura I. Clinical characteristics and outcomes in patients with t(8;21) acute myeloid leukemia in Japan. *Leukemia.* 22: 432-434, 2008.
  22. Xu J, Suzuki M, Niwa Y, Hiraga J, Nagasaka T, Ito M, Nakamura S, Tomita A, Abe A, Kiyoi H, Kinoshita T, Naoe T. Clinical significance of nuclear non-phosphorylated beta-catenin in acute myeloid leukaemia and myelodysplastic syndrome. *Br J Haematol.* 140: 394-401, 2008.
  23. Kajiguchi T, Chung EJ, Lee S, Stine A, Kiyoi H, Naoe T, Levis MJ, Neckers L, Trepel JB. FLT3 regulates beta-catenin tyrosine phosphorylation, nuclear localization, and transcriptional activity in acute myeloid leukemia cells. *Leukemia.* 21:2476-2484, 2007.
  24. Narimatsu H, Emi N, Kohno A, Iwai M, Yanada M, Yokozawa T, Saito S, Shimada K, Kiyoi H, Naoe T, Yamamoto K, Morishita Y. High incidence of secondary failure of platelet recovery after autologous and syngeneic peripheral blood stem cell transplantation in acute promyelocytic leukemia. *Bone Marrow Transplant.* 40:773-778, 2007.
  25. Imagama S, Abe A, Suzuki M, Hayakawa F, Katsumi A, Emi N, Kiyoi H, Naoe T. LRP16 is fused to RUNX1 in monocytic leukemia cell line with t(11;21)(q13;q22). *Eur J Haematol.* 79: 25-31, 2007.
  26. Kiyoi H, Shiotsu Y, Ozeki K, Yamaji S, Kosugi H, Umehara H, Arai H, Ishii K, Akinaga S, Naoe T. A novel FLT3 inhibitor FI-700 selectively suppress the growth of leukemia cells with FLT3 mutations. *Clin Cancer Res.* 13: 4575-4582, 2007.
  27. Tomita A, Hiraga J, Kiyoi H, Ninomiya M, Sugimoto T, Ito M, Kinoshita T, Naoe T. Epigenetic regulation of CD20 protein expression in a novel B-cell lymphoma cell line, RRBL1, established from a patient treated repeatedly with Rituximab-containing chemotherapy. *Int J Hematol.* 86: 49-57, 2007.
  28. Mizutani E, Narimatsu H, Murata M, Tomita A, Kiyoi H, Naoe T. Successful second cord blood transplantation using fludarabine and cyclophosphamide as a preparative regimen for graft rejection following reduced-intensity cord blood transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 40: 85-87, 2007.
  29. Hiraga J, Katsumi A, Iwasaki T, Abe A, Kiyoi H, Matsushita T, Kinoshita T, Naoe T. Prognostic analysis of aberrant somatic hypermutation of RhoH gene in diffuse large B cell lymphoma. *Leukemia.* 21:1846-1847, 2007.
  30. Asou N, Kishimoto Y, Kiyoi H, Okada M, Kawai Y, Tsuzuki M, Horikawa K, Matsuda M, Shinagawa K, Kobayashi T, Ohtake S, Nishimura M, Takahashi M, Yagasaki F, Takeshita A, Kimura Y, Iwanaga M, Naoe T, Ohno R. A randomized study with or without intensified maintenance chemotherapy in patients with acute promyelocytic leukemia who have become negative for PML-RAR{alpha} transcript after consolidation therapy: The Japan Adult Leukemia Study Group (JALSG) APL97 study. *Blood.* 110: 59-66, 2007.
  31. Kiyoi H, Yamaji S, Kojima, Naoe T. JAK3 mutations occur in acute megakaryoblastic leukemia both in Down syndrome children and non-Down syndrome adults. *Leukemia.* 21: 574-576, 2007.
  32. Okamoto M, Hayakawa F, Miyata Y, Watamoto K, Emi N, Abe A, Kiyoi H, Towatari M, Naoe T. Lyn is an important component of the signal transduction pathway specific to FLT3/ITD and can be a therapeutic target in the treatment of AML with FLT3/ITD. *Leukemia.* 21: 403-410, 2007.
  33. Abe A, Kiyoi H, Ninomiya M, Yamazaki T, Murase T, Ozeki K, Suzuki M, Hayakawa F, Katsumi A, Emi N, Naoe T. Establishment of a Stroma-Dependent Human Acute Myelomonocytic Leukemia Cell Line, NAMO-2, with FLT3 Tandem Duplication. *Int J Hematol.* 84: 328-336, 2007.
  34. Ninomiya M, Abe A, Katsumi A, Xu J, Ito M, Arai F, Suda T, Ito M, Kiyoi H, Kinoshita T, Naoe T. Homing, proliferation and survival sites of human leukemia cells in vivo in immunodeficient mice. *Leukemia.* 21: 136-142,

2007.

35. Yanada M, Jinnai I, Takeuchi J, Ueda T, Miyawaki S, Tsuzuki M, Hatta Y, Usui N, Wada H, Morii T, Matsuda M, Kiyoi H, Okada M, Honda S, Miyazaki Y, Ohno R, Naoe T. Clinical features and outcome of T-lineage acute lymphoblastic leukemia in adults: A low initial white blood cell count, as well as a high count predict decreased survival rates. *Leuk Res.* 31: 907-914, 2007.
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*. New Orleans USA. Dec, 2009
  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*. New Orleans USA. Dec, 2009
  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*. New Orleans USA. Dec, 2009
  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 Co-Expressing Cells. *The American Society of Hematology 51th Annual Meeting*. New Orleans USA. Dec, 2009
  5. Katsumi A, Kiyoi H, et al. FLT3/ITD Regulates Leukemia Cell Adhesion through  $\alpha 4\beta 1$  Integrin and Pyk2 Signalin. *The American Society of Hematology 51th Annual Meeting*. New Orleans USA. Dec, 2009
  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*. New Orleans USA. Dec, 2009
  7. Abe A, Kiyoi H, et al. Retention but Significant Reduction of BCR-ABL Transcript in Hematopoietic Stem Cells in Chronic Myelogenous Leukemia after Imatinib Therapy. *The American Society of Hematology 50th Annual Meeting*. San Francisco USA. Dec, 2008
  8. Minami Y, Kiyoi H, et al. Treatment with Hsp90 Inhibitor, 17-AAG Overcomes Resistance to Small Molecule FLT3-Inhibitors in FLT3/ITD-Positive Leukemia Cells Harboring N676K-Mutation. *The American Society of Hematology 50th Annual Meeting*. San Francisco USA. Dec, 2008
  9. Wakita A, Kiyoi H, et al. A Randomized Trial Comparing Individualized Vs. Non-Individualized Treatment for Elderly Acute Myeloid Leukemia: JALSG GML200 Study. *The American Society of Hematology 50th Annual Meeting*. San Francisco USA. Dec, 2008
  10. Ishikawa Y, Kiyoi H, et al. The Genotype Consisting of Complex Karyotype and TP53 Gene Mutation Is Specific to Acute Myeloid Leukemia with Multilineage Dysplasia. *The American Society of Hematology 50th Annual Meeting*. San Francisco USA. Dec, 2008
  11. Katsumi A, Kiyoi H, et al. Prognostic Implication and Biological Roles of RhoH in Acute Myeloid Leukemia. *The American Society of Hematology 50th Annual Meeting*. San Francisco USA. Dec, 2008
  12. Shiotsu Y, Kiyoi H, et al. KW-2449, a Novel Multi-Kinase Inhibitor, Suppresses the Growth of Imatinib-Resistant Ph<sup>+</sup> Leukemia Including BCR-ABL/T315I Both in Vitro and in Vivo. *The American Society of Hematology 50th Annual Meeting*. San Francisco USA. Dec, 2008
  13. Ohtake S, Kiyoi H, et al. Updated Results of JALSG AML201 Study Comparing Intensified Daunorubicin with Idarubicin in Patients with De Novo Acute Myeloid Leukemia: Effect of Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *The American Society of Hematology 50th Annual Meeting*. San Francisco USA. Dec, 2008
  14. Miyawak S, Kiyoi H, et al. Long-Term Follow-up of the Randomized JALSG AML 201 Study Comparing High Dose Ara-C Therapy with Conventional Consolidation Therapy in Adult Acute Myeloid Leukemia (AML). *The American Society of Hematology 50th Annual Meeting*. San Francisco USA. Dec, 2008
  15. Sugimoto T, Kiyoi H, et al. Relationship Between Post-Translational Modification of CD20 Protein and the Responsiveness to Rituximab Treatment. *The American Society*

- of Hematology 50th Annual Meeting.* San Francisco USA. Dec, 2008
16. Iwasaki T, Kiyoi H, et al. Prognostic Implications and Biological Roles of RhoH in Acute Myeloid Leukemia. *The American Society of Hematology 49th Annual Meeting.* Atlanta USA. Dec, 2007
  17. Narimatsu H, Kiyoi H, et al. Clinical Characteristics and Outcomes in Patients with t(8;21) Acute Myeloid Leukemia in Japan. *The American Society of Hematology 49th Annual Meeting.* Atlanta USA. Dec, 2007
  18. Ishikawa Y, Kiyoi H, et al. Comprehensive Analysis of Genetic Alterations in Acute Myeloid Leukemia According to the WHO Classification. *The American Society of Hematology 49th Annual Meeting.* Atlanta USA. Dec, 2007
  19. Abe A, Kiyoi H, et al. Analysis of the Role of Wnt Signaling for the Interaction between Leukemia Cells and Stroma. *The American Society of Hematology 49th Annual Meeting.* Atlanta USA. Dec, 2007
  20. Sato T, Kiyoi H, et al. Activating JAK3 Mutations in Transient Myeloproliferative Disorder and Acute Megakaryoblastic Leukemia Accompanying Down Syndrome. *The American Society of Hematology 49th Annual Meeting.* Atlanta USA. Dec, 2007
  21. Shiotsu Y, Kiyoi H, et al. KW-2449, a Novel Multi-Kinase Inhibitor Against FLT3, Abl, FGFR1 and Aurora, Suppresses the Growth of AML Both In Vitro and In Vivo. *The American Society of Hematology 49th Annual Meeting.* Atlanta USA. Dec, 2007
  22. Tomita A, Kiyoi H, et al. Epigenetic Regulation of CD20 Protein Expression in B-Cell Lymphoma Cells after Rituximab-Containing Chemotherapy. *The American Society of Hematology 49th Annual Meeting.* Atlanta USA. Dec, 2007

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。

「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：

保存されている骨髄および末梢血塗抹検体が使用出来れば、白血病検体での後方視的研究が可能である。微量検体でのDNA, RNA抽出法を比較検討した。最初にホルマリン固定パラフィン包埋組織スライド切片1枚から塩基配列を決定することを試みたところ適切なTaq polymeraseの使用により可能であった。免疫染色を施した上でのFISH法、さらにそのマイクロダイセクション検体からの塩基配列も高精度DNA polymeraseの使用により可能であった。この方法は腫瘍細胞が一部にしかない場合に用いることができる。

実際のカルノワ固定残余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ので、慢性骨髄性白血病でのabl遺伝子の変異解析をインバーダー法で行う系を確立し、臨床検体で検討した。これらのさまざまな検体解析方法は白血病治療プロトコールに組み込みが可能である。

A. 研究目的

すべての施設で確実に保存されている白血病検体は骨髄あるいは末梢血の塗抹標本である。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、塗抹標本である。この残余検体から材料が採取可能であれば、たとえばある遺伝子の変異有無による予後の解析などレトロスペクティブな解析が可能となる。骨髄、末梢血塗抹標本を用いて、DNA抽出、塩基配列決定が可能であるかどうかを検討した。微量検体からの抽出の可否を判断するためにエタノール固定のホジキンリンパ腫のサンプルからホジキン細胞をmicrodissection法で切り出した細胞を用いた。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microdissection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。また、塗抹標本からの抽出することの可否を判断するためにカルノワ固定された骨髄塗抹標本で検討した。

白血病に対する多施設共同治療研究登録症例において、病態に関与する遺伝子異常、発現を網羅的に解析し、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ために、簡便かつ、迅速な検査システムを構築し、後方視的に解析を行う方法を探索した。その際、倫理性についての問題点を取り上げ、普遍化する方法を考察した。

B. 研究方法

1. 4 $\mu$ mホルマリン固定パラフィン包埋組織スライドホルマリン固定パラフィン包埋組織スライドからのDNA抽出とPCR

組織の部分のみを滅菌した薬匙により鈍的に剥離し、0.1M NaOH 100 $\mu$ lと共に1.5ml マイクロチューブに分注した。よく混和した後にヒートブロックで100 $^{\circ}$ C, 20分間インキュベートした。室温で15分冷却した後、4 $^{\circ}$ Cで保存した。この原液を0.5mlに滅菌蒸留水18.6ml, 10x PCR Buffer(100mM Tris-HCl, 500mM KC1) 2.5ml, 250mM Mg溶液0.15ml, dNTP混合液(dATP, dCTP, dGTP, dTTPを各2.5 mM) 0.5 $\mu$ l, 20mM プライマー2.5 $\mu$ l, DNA polymeraseとしてEx Taq<sup>a</sup> HS (Takara) 0.25 $\mu$ lを加えて、DNA混合液の総量を5 $\mu$ lとした。

Tyrosine hydroxylase 遺伝子 (TH01)、Von Willebrand factor 遺伝子 (vWA)、D5S818 遺伝子 (D5S818) のPCRを通常法で行った。

コントロールとして同一症例の凍結組織から抽出したDNAを使用した。

吸光度による抽出・増幅DNA量の測定をした。Bioanalyzer電気泳動を行い (DNA 500 LabChip<sup>a</sup> (Agilent Technologies)) を使用した。ChipにGel-dye mix, DNA Marker, DNA Ladderを注入後、各wellに各DNA増幅産物を1 $\mu$ l注入した。Chipを1分間攪拌した後、Agilent 2100 bioanalyzer<sup>a</sup> (Agilent Technologies) により泳動した。

2. 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 $\times$ PhusionHF Reaction Bu

ffer 25ul bufferを入れたtube底に落とした。Tris buffer 0.5mlにptoteinase K (20mg/ml)を最終濃度0.2mg/mlとなるように加え、混和した。60°Cで一晩incubationした後、98°C、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。

### 3. 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°C、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。MgCl<sub>2</sub>/PBS 5分。Formalin- MgCl<sub>2</sub>/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°C、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°C、5分を行った、プローブでハイブリダイゼーション 37°C、一晩。通常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2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。

### 4. カルノワ固定骨髄からの DNA 抽出、PCR

QIAGEN QIAamp DNA Mini Kitを用いた。Buffer ATL 90ul を塗抹部分にのせ、平型のチップ先で剥離し、1.5ml tube へ入れることを3回繰り返した。85°Cで10分間インキュベートした後、室温に戻し、Proteinase K stock solution 30 ul 加え、56°Cで1時間~インキュベート行った。Buffer AL 300ul 加え、vortex で十分に混和して、70°Cで10分間インキュベートした。100% EtOH 300ul 加え、vortex で十分に混和した。QIAamp Mini Spin Column にサンプルを半量ずつ載せ、Buffer AW1,2で洗い、Buffer AE 150

ul で抽出した。

### 5. CML 変異解析

CML の分子標的薬剤であるイマチニブに対して耐性を示す、ABL 遺伝子キナーゼ領域の遺伝子変異として 25 種類を選択し、それらの変異を一括して定性的にスクリーニング解析できる検査方法の確立を目的とした。正常 ABL 遺伝子の mRNA を増やすことなく、BCR/ABL キメラ mRNA のみを RT-PCR 法により増幅させ、その希釈産物を鋳型にしてインベーター法により変異解析を行うことを基本とするが、通常の BCR/ABL キメラ mRNA 定量検査と異なり、ABL のキナーゼ領域を全て含む、約 1,600bp の長い cDNA を増幅させるために RT-PCR 効率の向上が求められる。また、変異 DNA と正常 DNA の混在 PCR 産物から高感度に一塩基置換の変異を検出するために、他の同目的の検査 (HBV ゲノタイプ) で経験と実績のあるインベーター法を本検査にも採用した。感度の評価は、各変異を人工的に組み込んだプラスミド DNA を用いて行った。

この研究を遂行するにあたり、当院倫理委員会に諮り、同意取得の必要性などにつき検討した。

### C. 研究結果

#### 1. ホルマリン固定パラフィン包埋組織スライドホルマリン固定パラフィン包埋組織スライドからのDNA抽出とPCR

ホルマリン固定パラフィン包埋組織スライドより抽出したDNAでは凍結組織から抽出したDNAと比較し、OD値で確認する限り不純物が含まれていることが明らかであったが、DNA抽出、塩基配列検討は可能であった。1枚の塗抹標本からDNAは5μg抽出された。

適切なDNA抽出キットの選択によって骨髄塗抹標本から採取さらえる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。

通常保存されているのはギムザ染色による標本であり、固定はメタノール単独である。カルノワ固定 (メタノール+酢酸) ではDNAがいったん酸性液に触れるのでより、不安定であるといわれている。一方、ギムザ染色では残るので赤血球膜などが以後の酵素反応を阻害する可能性があり、経時変化を受けやすいといわれているが十分可能であると考えられる。

#### 2. 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

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。

### 3. 保存検体でのFICTION 法

通常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、A20遺伝子は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。注目すべきは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。

### 4. カルノワ固定骨髄からのDNA抽出、PCR

適切なDNA抽出キットの選択によって骨髄塗抹標本からDNA抽出、塩基配列決定が可能であった。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。

### 5. CML変異解析

BCR/ABLキメラmRNA約1,600bpの効率的増幅の検討は、Ph転座陽性細胞株K562と陰性細胞株REHとの混合試験により行った。至適条件を探り、10,000細胞に1個のPh陽性細胞の存在まで検出することが可能となった。これは、K562のtotal RNA 1μgあたりのキメラmRNA発現コピー数が約 $10^6$ コピーであることから、本検査の適用限界は、直近のキメラmRNA定量値が $10^2$ コピーオーダーを有している患者検体であると考えられた。

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

以上の測定性能が確認されたことで、実用に供することが可能な方法であろうと判断し、臨床での検査の妥当性を評価するために国立がんセンター中央病院内で実際の患者検体6例を測定した。その結果、1例にQ252H、1例にT315Iが検出された。これらはダイレクトシーケンスによって変異配列が検証された。

これまでは、BCR/ABLキメラmRNAが再出現してきた症例に対しては、そのPCR産物をダイレ

クトシーケンスで確認するしかなく、耐性クローンがドミナントな状態にしか遺伝子変異の検出が困難であったが、本PCR-インベーター法では $10^2$ コピーのキメラmRNAが検出される状態にあれば、25種類の変異mRNAを1%という高感度で検出することができるため、より早期に治療方針の決定、変更を行うための情報を提供することが可能となるものと考えられる。

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

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

JALSGで臨床研究において、前方視的検体収集と中央保存を研究計画書に盛り込んだ。この方法であらかじめ検体を収集しておけば、将来的にあらたな予後因子が発見された場合に検討することが可能である。

### D. 健康危険情報

特になし。

### 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. 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]
3. 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.
4. Kobayashi Y. Recent advances in the treatment of follicular lymphoma. *Int J Clin Oncol*. 14: 191-6, 2009.
5. Kato M, Kobayashi Y, et al. Frequent inactivation of A20 in B-cell lymphomas. *Nature*. 459:712-6, 2009.
6. 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.
7. Maeshima AM, 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.
  8. Kobayashi Y, Takeshita A, Naoe T, et al. Phase I/II study of humanized anti-CD33 antibody conjugated with calicheamicin, gemtuzumab or ozogamicin, in relapsed or refractory acute myeloid leukemia: final results of Japanese multicenter cooperative study. *Int J Hematol.* 89:460-9, 2009.
  9. 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.
  10. Ogawa Y, Kobayashi Y, et al. Phase I and II pharmacokinetic and pharmacodynamic study of the proteasome inhibitor bortezomib in Japanese patients with relapsed or refractory multiple myeloma. *Cancer Sci.* 99:140-4, 2008.
  11. Yokoyama H, Kobayashi Y, et al. Progressive multifocal leukoencephalopathy in a patient with B-cell lymphoma during rituximab-containing chemotherapy: case report and review of the literature. *Int J Hematol.* 88:443-7, 2008.
  12. Maruyama D, Kobayashi Y, et al. Stromal Cells in Bone Marrow Play Important Roles in Pro-Inflammatory Cytokine Secretion Causing Fever Following Bortezomib Administration in Patients with Multiple Myeloma. *Int J Hematol.* 88:396-402, 2008.
  13. Ono M, Kobayashi Y, et al. Nocardia axilla brain abscess in a patient with follicular lymphoma. *Int J Hematol.* 88:95-100, 2008.
  14. Sentani K, Kobayashi Y, et al. Follicular lymphoma of the duodenum: clinicopathologic analysis of 26 cases. *Jpn J Clin Oncol.* 38:547-52, 2008.
  15. Maeshima AM, Kobayashi Y, et al. Diffuse large B-cell lymphoma after transformation from low-grade follicular lymphoma: morphological, immunohistochemical and FISH analyses. *Cancer Sci.* 99:1760-8, 2008.
  16. Maruyama D, Kobayashi Y, et al. Primary bone lymphoma: a new and detailed characterization of 28 patients in a single-institution study. *Jpn J Clin Oncol.* 37:216-23, 2007.
  17. Tanimoto K, Kobayashi Y, et al. Primary ocular adnexal MALT lymphoma: A long-term follow-up study of 114 patients. *Jpn J Clin Oncol.* 37:337-44, 2007.
  18. Ohara F, Kobayashi Y, et al. Abdominal Pain and Syndrome of Inappropriate Anti-diuretic Hormone Secretion (SIADH) as a Manifestation of Visceral Varicella-zoster Virus (VZV) Infection in a Patient with Non-Hodgkin Lymphoma. *Am J Hematol.* 82:414-8, 2007.
2. 学会発表
    1. Nomoto J, Kobayashi Y, et al. Detection of loss of A20 gene by FICTION in Hodgkin's lymphoma cases. *The American Society of Hematology 51th Annual Meeting.* New Orleans USA. Dec, 2009
    2. Kato M, Kobayashi Y, et al. Aberrations of Genes Regulating NF kappa B pathway in B-cell Malignant lymphoma. *The American Society of Hematology 51th Annual Meeting.* New Orleans USA. Dec, 2009
    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. 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
    5. 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
    6. Tobinai K, Kobayashi Y, et al. Phase I and Pharmacokinetic Study of Inotuzumab Ozogamicin (CMC-544) as a Single Agent in Japanese Patients with Follicular Lymphoma Pretreated with Rituximab. *The American Society of Hematology 50th Annual Meeting.* San Francisco USA. Dec, 2008
    7. Kato M, Kobayashi Y, et al. Genome-Wide Analysis of B Cell Non-Hodgkin's Lymphoma Disclosed Frequent Involvement of Genes in NFkB Pathway. *The American Society of Hematology*

y 50th Annual Meeting. San Francisco US

A. Dec, 2008

8. 横山 洋紀、小林 幸夫他. リツキマシブ併用  
CHOP(R-CHP)療法施行中に進行性多巣性  
白質脳症を合併したB細胞リンパ腫. 第69回  
日本血液学会・第49回日本臨床血液学会 合  
同総会. 2007年10月11日-13日 横浜
9. 丸山 大、小林幸夫他. 多発性骨髄腫患者に  
おけるbortezomib投与後の発熱とサイトカイン  
との関連性およびその機序の検討. 第69回日  
本血液学会・第49回日本臨床血液学会 合同  
総会. 2007年10月11日-13日 横浜
10. Asakura Y, Kobayashi Y, et al. High frequ  
ency of loss of heterozygosity due to unipa  
rental disomy or allele deletion of ocular a  
dnexal MALT-type lymphoma. *The America  
n Society of Hematology 49th Annual Mee  
ting*. Atlanta USA. Dec, 2007
11. Kobayashi, Y, et al. Oligonucleotide Microa  
rray Analysis of Ocular Adnexal MALT Ly  
mphoma (OAL). 第66回日本癌学会学術総  
会 2007年10月3日-5日 横浜

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）  
総合研究報告書

「多施設共同研究での患者検体を用いた研究における問題点」

研究分担者 矢ヶ崎 史治 埼玉医科大学 国際医療センター造血管腫瘍科 講師  
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管腫瘍科 助教

研究要旨

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、白血病検体を収集・保存し前方視的および後方視的に解析しうるシステムを構築することは、治療反応性予測や腫瘍化機序の解明に重要である。分担研究者は、多施設共同研究での患者検体を用いた、研究における問題を明らかにするため、JALSG（成人白血病治療共同研究グループ）の治療プロトコールによって治療されたPh陽性白血病患者における保存検体を用いた後方視的解析、遺伝子検査法の検討、新規プロトコールにおける前方向の検体収集を実際に行った。研究初年度は、JALSG ALL202研究参加施設に対し、保存検体を用いた再発例におけるABL変異解析の実施可能性に関するアンケート調査を行った。その結果、調査対象施設64施設のうち43施設から回答を得た。本試験では登録76例中、18施設で22例の再発が認められたが施設独自に変異解析が施行されたのは4例（4施設）のみで、検体保存に関する同意が得られ後方視的研究への参加が可能と回答を得たのは7施設9例だったが、再発時に検体が提出されているのは4例のみであった。以上から後方視的研究を可能にする検体収集の基盤作りが急務と考えられた。平成20年度は、慢性骨髄性白血病（CML）における分子遺伝学的効果判定に用いられる種々の定量的遺伝子検査法とヨーロッパ標準法（EAC）との相関性を検討した。その結果、JALSGで採用されているAmp-CML法はEAC法と100copies/ $\mu$ gRNAまで良好な相関を示し、Amp-CML法で100copies/ $\mu$ g RNA以下を分子生物学的到達の判断に用いて良いと考えられた。また、患者由来凍結RNAを用いた検討から、凍結期間1年であれば定量検査に影響を与えないことが明らかになった。また、平成21年度に、分担研究者は埼玉医科大学から独立行政法人医薬品医療機器総合機構へ異動となったため、同年度からJALSG CML-DR1試験に登録された患者からの検体保存が可能となるように予め体制を整えた。さらに分担研究者変更後、後任者は白血病細胞株および白血病患者骨髄検体を用いた研究を行い、急性前骨髄球性白血病（APL）細胞では全トランス型レチノイン酸（ATRA）添加による細胞分化に伴いF1t3遺伝子の発現が低下するという知見を得た。このことはAPLにおけるF1t3変異の意義を考える上で重要となるが、保存検体ではその保存過程で細胞表面抗原量が修飾されるため多施設共同研究での各施設における細胞保存検体処理法の画一化や長期保存に伴う患者白血病細胞の変化を検討することが必要と考えられた。

A. 研究目的

H19年度は、JALSG参加施設に対し保存検体を用いた後方視的遺伝子解析の実施可能性に関する施設アンケート調査を行った。Ph-ALL202試験により、イマチニブ併用化学療法は短期的にPh-ALLの予後を改善するが、ABL変異等により高率に再発をきたすことが問題となっている。Ph-ALL202試験ではB CR-ABL mRNA量を経時的に測定しており残余検体は保存されている。そこで、本研究は登録施設での再発時におけるABL変異検査実施状況とその結果、保存検体を用いたABL変異解析の可能性についてアンケート調査を行った。

H20年度は、分担研究者が責任者となっているJALSG CML-DR1試験や現行のCML207において分子生物学的寛解（MMR）の評価に用いられているTMA法を用いたRNA定量法であるAmp-CML法と海

外で使用されているヨーロッパ標準との相関について検討した。RNA保存がAmp-CMLの測定結果に与える影響を調べることにより、保存検体を用いた定量的遺伝子検査法の可能性を検討した。

H21年度は、分担研究者が埼玉医科大学から独立行政法人医薬品医療機器総合機構へ異動となり研究を続行することが困難になることから、JALSG CML-DR1試験に登録された患者からの検体保存が可能となるように予め体制を整えた。

分担研究者変更後の後任者（前田）は、多施設共同研究での患者検体研究における問題点を新たに模索するため、患者骨髄検体および細胞株を用いて全トランス型レチノイン酸（ATRA）分化誘導療法が急性前骨髄球性白血病（APL）にお

ける *Flt3* 遺伝子の発現に与える影響について検討した。

## B. 研究方法

H19年度：Ph-ALL202試験に参加した64施設に対し、登録患者の予後、再発時期、再発時の変異検査の有無と結果、登録時のRNA保存に対する同意の取得の有無、定量的PCR後の保存RNA検体を用いた後方視的ABL変異研究の可能性について、書面によるアンケート調査を行った。

H20年度：対象はCMLと診断されイマチニブによる治療中の患者62名より採取した末梢血64検体および健常者末梢血50検体で、患者検体を用いた研究の遂行にあたっては、患者からのインフォームドコンセントを得た。測定には、Amp-CML、In-house RQ-PCR、FusionQuant®M-BCRを用い遺伝子定量検査を実施した。また保存検体を用いた後方視的解析の可能性を検討するために一部の検体で抽出直後と約1年後の保存検体(-80℃)を用いてAmp-CMLの測定結果を比較した。

H21年度（前田）：APL細胞株NB4および*Flt3*高発現MLL遺伝子変異細胞株KOCL-58を用いてATRA添加による*Flt3*発現細胞数の変化をフローサイトメトリー法による細胞表面抗原解析により行なった。同時に*Flt3* mRNAの変化を定量PCR法による比較Ct法(=2<sup>-ΔΔCt</sup>)により検討した。さらに*Flt3*発現細胞数の変化についてはATRA投与前後のAPL患者骨髄検体でも同様に検討した。

## C. 研究結果

H19年度：アンケート送付施設64施設のうち43施設から回答を得た(回収率67.2%)。JALSG Ph-ALL202臨床試験登録76例中、18施設で22例が再発したことが明らかになった。再発時に施設独自でABL変異解析が施行されたのは4例(4施設)で、3例に変異が認められ、内訳はY253H 2例、E255V 1例であった。検体保存に関する同意が得られ保存検体に関する後方視的ABL変異研究が可能と回答を得たのは7施設9例であったが、再発時に検体が提出されているのは4例のみであった。また再発を認めた6施設では、試験登録時にRNA保存に対する同意の取得を行っていなかった。H21年度：Amp-CML、in-house RQ-PCR、FusionQuant®M-BCRの測定値は3法間全てで良い相関(相関係数：R>0.97、P<0.01)を示しAmp-CMLで100copies/μg RNA以下をMMR到達の指標とするべきと考えられた。また凍結RNA 19検体では抽出1週間以内と1年後のAmp-CMLによる測定結果は良好な相関(R>0.93、P<0.01)を示し、約1年間のRNA凍結保存は検査結果に影響を与えないことが示された。H21年度（矢ヶ崎）：CML-DR1試験に登録された患者の検体保存の体制を整えた。現時点で3例でのima

tinib減量開始前後の患者検体を研究事務局で保存した。

結語：今後施行される前方向試験のみならず、すでに予後データが明らかにされている検体を用いた後方視的研究を可能にする検体収集及び研究実施体制の基盤作りが急務と考えられた。特に臨床試験登録時に、検体保存および検体保存に対する同意を取得しておくこと、保存検体を用いた研究に対する参加施設でのコンセンサス作りは重要と考えられた。

H21年度（前田）：Preliminaryな検討によりNB4の分化誘導に必要なATRAの至適添加濃度および時間を1μM 48時間とし、ATRA添加前後の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、ATRA添加により4.1%に減少した。顆粒球分化抗原であるCD11b陽性細胞は5.0%から36.0%に増加したが、c-kit受容体であるCD117抗原発現は変化を認めなかった。ATRAによる分化誘導作用がないKOCL-58ではATRA添加による影響を認めなかった。定量PCR法での解析では、KOCL-58での*Flt3* mRNA発現を1とした時、NB4におけるmRNAの発現相対比率は0.06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かったが、NB4では0.06から0.016へとRNA発現量が有意に変化した(p=0.0035: Paired t-Test)。

さらにAPL患者骨髄検体3例における生細胞を用いたflow cytometry CD45blast 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1)。

【表1】 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)

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と思われた。さらに患者検体における*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さらなる患者検体での解析と多施設共同研究での各施設における細胞保存検体処理法の画一化や長期保存に伴う細胞表面抗原蛋白の変化について新たに検討が

必要と考えられた。

D. 健康危険情報  
該当無し。

E. 研究発表

1. 論文発表

1. Thao le B, Vu HA, Yasuda K, Taniguchi S, Yagasaki F, Taguchi T, Watanabe T, Sato Y. Cas-L was overexpressed in imatinib-resistant gastrointestinal stromal tumor cells. *Cancer Biol Ther.* 8:683-8, 2009.
2. Nicolini FE, Mauro MJ, Martinelli G, Kim DW, Soverini S, Müller MC, Hochhaus A, Cortes J, Chuah C, Dufva IH, Apperley JF, Yagasaki F, Pearson JD, Peter S, Sanz Rodriguez C, Preudhomme C, Giles F, Goldman JM, Zhou W. Epidemiologic study on survival of chronic myeloid leukemia and Ph(+) acute lymphoblastic leukemia patients with BCR-ABL T315I mutation. *Blood.* 114:5271-8, 2009.
3. 矢ヶ崎史治、丹羽敏博、阿部亜紀、石川真穂、加藤千明、小倉健二、佐々木宏、許泰一、陣内逸郎、別所正美、宮村耕一: Major bcr-abl mRNA 定量におけるTMA法(Amp-CML)と Realtime quantitative PCR の相関 臨床血液 2009 ; 50 (6) pp. 481-487.
4. 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, Ohno R; Japan Adult Leukemia Study Group. Karyotype at diagnosis is the major prognostic factor predicting relapse-free survival for patients with Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia treated with imatinib-combined chemotherapy. *Haematologica.* 93:287-90, 2008.
5. 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; Japan Adult Leukemia Study Group. Prospective monitoring of BCR-ABL1 transcript levels in patients with Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukaemia undergoing imatinib-combined chemotherapy. *Br J Haematol.* 143:503-10, 2008.
6. Ishikawa M, Yagasaki F, Okamura D, Maeda T, Sugahara Y, Jinnai I, Bessho M. A novel gene, ANKRD28 on 3p25, is fused with NUP98 on

11p15 in a cryptic 3-way translocation of t(3;5;11)(p25;q35;p15) in an adult patient with myelodysplastic syndrome/acute myelogenous leukemia. *Int J Hematol.* 86:238-45, 2007.

7. 矢ヶ崎史治 白血病の化学療法耐性化機構とその対策. 内科 2007 ; 100(2) pp. 323-329
  8. 矢ヶ崎史治 チロシンキナーゼ阻害薬. 日本内科学会雑誌 2007 ; 96(7) pp. 83-91
2. 学会発表
1. 白杉由香理、岡本真一郎、田内哲三、猪口孝一、鈴木裕子、矢ヶ崎史治、得平道英、淡谷典弘、伊藤良和、木村之彦、堀江良一、黒川峰夫、木崎昌弘、陣内逸朗、東原正明、安藤潔、大屋敷一馬、壇和夫、池田康夫、東京STI研究グループ. : 本邦の慢性骨髄性白血病患者におけるイマチニブの血中濃度と有効性の相関についての多施設共同試験(中間報告). 第71回日本血液学会総会、京都.
  2. 石川真穂、加藤琢也、岡村大輔、前田智也、矢ヶ崎史治、川井信孝、松田晃、別所正美. Dasatinib 治療中に消化管出血を認めた2症例の検討. 第71回日本血液学会総会、京都.
  3. 岡村大輔、矢ヶ崎史治、前田智也、石川真穂、川井信孝、松田晃、別所正美. FGFR3 関連造血器腫瘍に対するPyk2 を標的とした新規の分子標的治療. 第71回日本血液学会総会、京都.
  4. 矢ヶ崎史治、岡村大輔、石川真穂、前田智也、川井信孝、松田晃、宮村耕一、小寺良尚、陣内逸郎、別所正美. CMLにおける高感度AMP-CML法を用いたMMR到達後のMRDモニタリングの可能性. 第70回日本血液学会総会、京都.
  5. 前田智也、矢ヶ崎史治、岡村大輔、石川真穂、関根理恵子、川井信孝、松田晃、陣内逸郎、別所正美. 再発急性前骨髄球性白血病患者への Gemtuzumab Ozogamicin(GO)を用いた救済療法. 第70回日本血液学会総会、京都.
  6. 大西一功、西村美樹、竹内仁、藤澤信、永井正、大竹茂樹、木村之彦、今井陽俊、泉二登志子、矢ヶ崎史治、秋山秀樹、前田智也、薄井紀子. イマチニブによる慢性骨髄性白血病患者に対するJALSG CML202試験中間解析結果. 第69回日本血液学会、第49回日本臨床血液学会合同シンポジウム.
  7. 石川真穂、矢ヶ崎史治、前田智也、岡村大

輔、陣内逸郎. CMLにおける貧血遷延の検討. 第  
69回日本血液学会、第49回日本臨床血液学会合  
同シンポジウム.

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。

「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

多施設共同前方向研究では、同一プロトコールで治療された白血病患者由来の臨床検体を逐次的に収集・保存解析することが可能である。優れた臨床成績を得るためには、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る。根幹となりつつある分子標的治療では、予後に影響標的分子を探索し、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。この重要性を理解するために、B細胞系腫瘍の表面抗原として注目されるCD20、CD22、CD55、CD59を標的分子とし、抗体療法であるrituximabとinotuzumabを薬剤モデルとして、殺細胞効果を検討した。これらの標的は殺細胞効果に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。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り、新しい予後因子となりうるマーカーを保存された検体を使用して、効率よく行うことが可能となる。

A. 研究目的

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

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

現在も飛躍的に増加している細胞表面上の分子を標的とした薬剤である抗体療法薬において、標的分子の予後因子解析への有効性と多面性を検討することは重要である。今回、B細胞腫瘍をモデルにあげ、因子解析の継続的なrenewalの重要性を検討した。

B細胞性造血器腫瘍に関する研究は最近急速に進歩している。なかでも抗CD20抗体であるrituximabはmalignant lymphoma (ML)、chronic lymphocytic leukemia (CLL)等に有効であり、直接作用、補体依存性細胞障害作用(CDC)そしてNK細胞等を介した

細胞障害作用(ADCC)が主たる作用機序として考えられる。これらの作用機序を考える上で、CD20に加えてCD55やCD59も重要との報告も最近ある。事実、rituximabの薬剤耐性機序として、CD20の発現量の減少、CD55とCD59の発現量の増加が報告されている。また、これらの分子の発現を調節する薬剤の報告もある。

これとは別にinotuzumab ozogamicin (IO)は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せ、標的細胞内にこれらを送り込むことが可能である。IOはrituximabと異なった分子標的を持つことから、rituximabに耐性となったB細胞腫瘍にも有効と思われ、期待されている。

新規抗体IOの標的分子と関連分子への影響に関して、rituximabとの併用の面から検討した。本研究をもとに、今後の新規標的分子の多様性と予後解析における検体収集の重要性を考察した。

B. 研究方法

本研究班の検体収集に協力するとともに、別にインフォームドコンセントを取得して得られたB細胞腫瘍細胞表面上のCD45、CD20、CD22、CD55、CD59発現量を検討した。B細胞腫瘍としてMLとCLLのリンパ節および末梢血を使用した。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。使用された分子標的薬剤としてIO (calicheamicin

conjugated anti-CD22 monoclonal antibody)、free calicheamicin、G5/44 (un-conjugated anti-CD22 monoclonal antibody)を米国 Wyeth 社より提供を受け使用した。

細胞は 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 $\kappa/\lambda$ 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。前述の表面抗原に加え、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

蛍光顕微鏡下の観察および flow cytometry では Daudi細胞と Raji細胞においてはIOと培養することで、CD20の発現量の増加と、CD22とCD55の発現量の低下を認めた。CD59の発現量には変化を認めなかった。CD20の発現の増加はRT-PCRでは有意差が認められなかった。位相差顕微鏡下の観察においてはIO投与後6-12時間で細胞の大きさが増大し、flow cytometry上でも forward scatterの増大が認められた。Rituximabとの培養ではこれら抗原量の変化は認められなかった。またcalicheamicinを抱合していない抗CD22抗体(G5/44)ではこれらの変化は認められなかった。患者由来のB細胞を使用した検討でも同様の結果を得た。CD59発現量が減少している事例も14例中6例に認めた。

*in vitro*にて rituximab と IO の併用効果を観察した。これら2剤を同時に反応させ、その後の直接効果、CDC、ADCC効果をみた。IOを12時間前に反応させた群において、direct effectおよびCDCが増強していた。Rituximabを先行して反応させた群では併用群と比較して有意差は認められなかった。G5/44抗体ではこれらの変化は認められなかった。抗C3抗体を使用して細胞表面吸着C3量を検討したところ、IOとの反応によりその吸着量の増加を認めた。患者検体を使用した実験でも同様の結果が得られた。

IOによりB腫瘍細胞のCD20の発現は維持または増加していた。これはIOの先行投与によっても rituximabの標的は一定時間維持されることを意味し、併用の有用性が推測された。IOとの反応により、

CD55とCD59の発現の減少が認められたが、これらの抗原が補体反応の抑制因子であることから、CDC反応が増強されることが予想される。このように直接の標的分子以外でもその作用過程上重要な分子は薬剤効果に重要であり、予後因子となりうる。

これまで、耐性細胞の研究は主として過去に樹立された細胞株をモデルとすることによりなされてきたが、上記の遺伝子を直接細胞内に導入することで、耐性機能的に純化された系を確立した。これにより各薬剤がこれらの遺伝子産物により直接影響を受ける機序が明らかとなった。また今後もその応用範囲は広がると思われる。

これらの結果は臨床研究において予後に関係する因子を想定する上で有効である。CD20やCD22は薬剤の直接の標的分子であり、発現量を分子生物学的にも蛋白量面からも検討する必要性がある。さらに、他の表面分子の変化に関しても系統的に検討される必要性がある。

本実験に使用された薬剤の細胞内の作用は内在化したのちに遊離されるcalicheamicinによるところが大きい。calicheamicinは抱合した抗体によらず、特にMDRの影響を受けやすいことが明らかとなった。IOを組み入れた臨床研究をする上では予後因子として特に重要視され、解析に必要であると思われる。

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

### 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, Mackawa 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*. 9. 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, 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.
  5. Fujisawa S, Ohno R, Shigeno K, Sahara N, Nakamura S, Naito K, Kobayashi M, Shinjo K, Takeshita A, Suzuki Y, Hashimoto H, Kinoshita K, Shimoya M, Kaise T, Ohnishi K. Pharmacokinetics of arsenic species in Japanese patients with relapsed or refractory acute promyelocytic leukemia treated with arsenic trioxide. *Cancer Chemother Pharmacol*. 59:485-93, 2007.
  6. Horii T, Suzuki Y, Takeshita A, Maekawa M. Molecular characterization of 8-methoxyfluoroquinolone resistance in a clinical isolate of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Chemo-therapy*. 53:104-9, 2007.
  7. Miyawaki S, Kawai Y, Takeshita A, Komatsu N, Usui N, Arai Y, Ishida F, Morii T, Kano Y, Ogura M, Doki N, Ohno R. Phase I trial of FLAGM with high doses of cytosine arabinoside for relapsed, refractory acute myeloid leukemia: study of the Japan Adult Leukemia Study Group (JALSG). *Int J Hematol*. 86: 343-7, 2007.
  8. Asou N, Kishimoto Y, Kiyoi H, Okada M, Kawai Y, Tsuzuki M, Horikawa K, Matsuda M, Shinagawa K, Kobayashi T, Ohtake S, Nishimura M, Takahashi M, Yagasaki F, Takeshita A, Kimura Y, Iwanaga M, Naoe T, Ohno R; Japan Adult Leukemia Study Group. A randomized study with or without intensified maintenance chemotherapy in patients with acute promyelocytic leukemia who have become negative for PML-RARalpha transcript after consolidation therapy: the Japan Adult Leukemia Study Group (JALSG) APL97 study. *Blood*. 110:59-66, 2007.
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. *68<sup>th</sup> Annual Meeting of Japanese Cancer Society* Yokohama Japan. Oct, 2009
    2. 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* Berlin Germany. Jun 2009
    3. Wakita A, Ohtake S, Takada S, Yagasaki F, Komatsu H, Miyazaki Y, Kubo K, Kimura Y, Takeshita A, Adachi A, Kiyoi H, Yamaguchi T, Yoshida M, Ohnishi K, Miyawaki S, Naoe T, Ueda R, Ohno R. A Randomized Trial Comparing Individualized Vs. Non-Individualized Treatment for Elderly Acute Myeloid Leukemia: JALSG GML200 Study. *The American Society of Hematology 50<sup>th</sup> Annual Meeting*. San Francisco USA. Dec, 2008
    4. Takeshita A, Shinjo K, Yamakage N, Ono T, Hirano I, Okinaka K, Matsui H, Nakamura S, Shigeno K, Maekawa M, Ohnishi K, Ohno R. Reduced effect of inotuzumab ozogamicin (CMC544) on P-glycoprotein positive malignant B cells and its restoration by multidrug resistance modifiers. *The American Society of Hematology 49<sup>th</sup> Annual Meeting*. Atlanta USA. Dec, 2007
    5. Yamakage N, Takeshita A, Shinjo K, Ono T, Matsui H, Nakamura S, Shigeno K, Maekawa M, Ohnishi K, Ohno R. Cell features and quantitative alternation of target molecule of malignant B cells treated with inotuzumab ozogamicin (CMC544) alone or in combination with rituximab. *The American Society of Hematology 49<sup>th</sup> Annual Meeting*. Atlanta

USA. Dec, 2007

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及び耐性化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。本研究では樹立した新規ABLキナーゼ阻害剤(Dasatinib、Nilotinib)の耐性細胞株を用いて薬剤耐性化の機序を臨床検体から得られた白血病細胞と比較検討した。さらにABLキナーゼ阻害剤及びPI3キナーゼ/ mTOR阻害剤(BEZ235)の併用効果、ABLキナーゼ阻害剤及びAuroraキナーゼ阻害剤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。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。

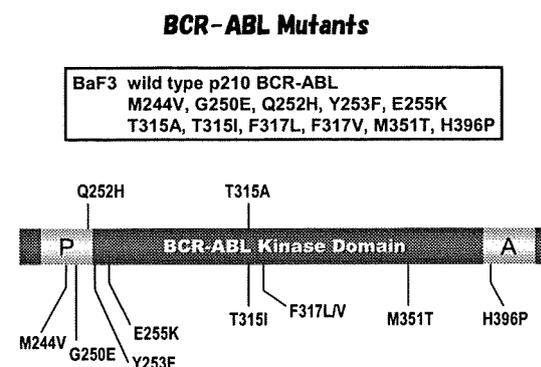
これに対し、次世代型ABLキナーゼ阻害剤の開発が進み、平成21年1月21日に本邦においてNilotinib及びDasatinibの製造承認が下された。イマチニブとABLの結合様式はhelix-Cによる比較的大きな結合ポケットを必要とするが、NilotinibはABLとの結合様式を適正化することによってABLに対する親和性がイマチニブよりも向上しているため、基本的薬理作用はイマチニブを強化しT315I変異以外はカバーできる薬剤としてとらえることができる。これに対しDasatinibはSRC-familyチロシンキナーゼとABLチロシンキナーゼを抑制し、イマチニブより300倍以上強力でBCR-ABL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

本研究では本研究では次世代ABLキナーゼ阻害剤の耐性化機序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。さらにCMLの治療を目的としたABLキナーゼ阻害剤と分子標的薬剤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

BCR-ABL陽性白血病細胞株、K562をイマチニブまたはDasatinib長期間暴露により耐性細胞株を樹立した。耐性細胞株はプロテインアレイシステム、及び免疫ブロットにて解析した。さらにDasatinib耐性症例より得られた白血病細胞との差異についても検証した。分子標的薬併用効果も解析に用いた細胞株は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)



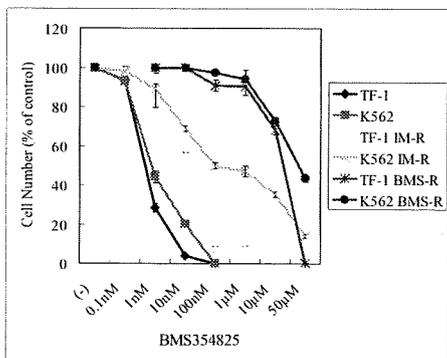
さらに、Random mutagenesis BCR-ABLを感染させたBaF3細胞株を使用した。

C. 研究結果

(1) 新規ABLキナーゼ阻害剤 (Dasatinib, Nilotinib) の耐性細胞株を用いて薬剤耐性化の機序の解析:

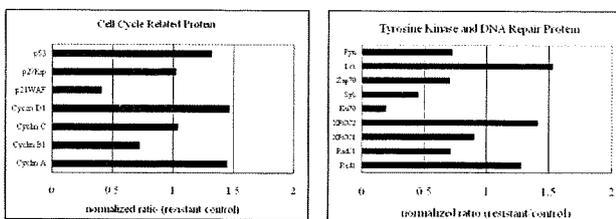
Dasatinib耐性細胞株 (K562-BMSR, TF-1-BMSR) 及びイマチニブ耐性細胞株 (K562-IMR, TF-1-IMR) を樹立した。これらの細胞株ではBCR-ABLキナーゼドメインの遺伝子変異は確認されなかった。

耐性株における、細胞増殖抑制効果



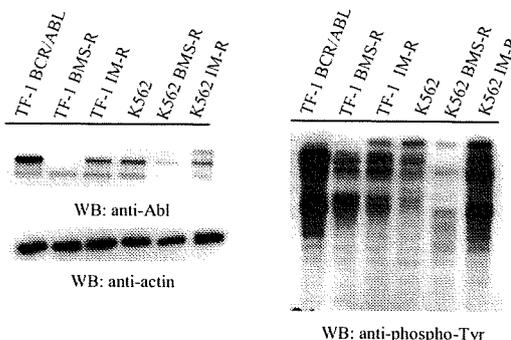
Dasatinib耐性細胞株 (K562-BMSR, TF-1-BMSR) では Dasatinib 20μM にも増殖抑制を認めず、臨床上、Cmaxを大幅にうわまわっており、高度耐性を示した。プロテインアレイによる細胞内分子の発現パターンを耐性株を用いて解析した。

ダサチニブ耐性細胞によるプロテインアレイ解析



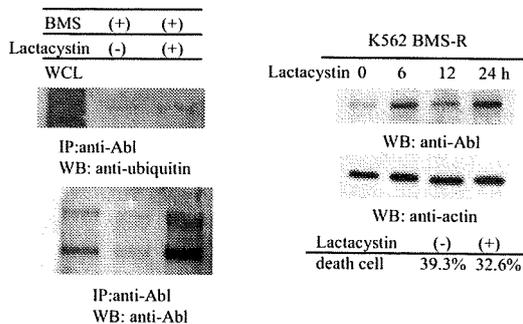
Dasatinib耐性株において細胞周期関連分子p53, Cyclin A, CyclinDの発現上昇、p21の発現低下が確認された。チロシンキナーゼ及びDNA修復関連分子ではLck, XRCC2, Rad1の発現増加が認められた。次に免疫プロットにて細胞内情報伝達分子の解析を行った。

耐性株における、細胞内シグナル解析



Dasatinib耐性細胞株ではBCR-ABL蛋白の発現の低下が確認された。さらにDasatinib耐性細胞株におけるBCR-ABL蛋白発現の低下のメカニズムについて解析した。Dasatinib耐性細胞株におけるBCR-ABLはユビクチンと共沈降され、さらにプロテアソーム阻害剤であるLactastatinにて処理を行うとBCR-ABL蛋白発現の回復が認められた。このことからDasatinib耐性細胞株におけるBCR-ABL蛋白の発現の低下にはユビクチン-プロテアソームpathwayの関与が示された。

Lactacystin投与によるBCR/ABL蛋白の変化



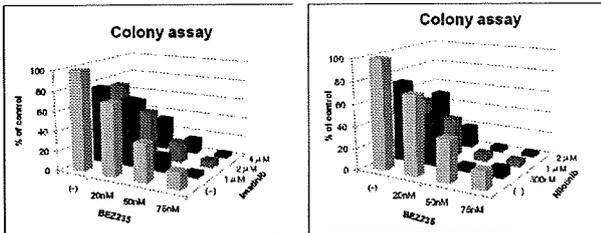
検体収集によりDasatinib耐性症例から得られた白血病細胞について解析を行った。2症例の検体収集から得られた白血病細胞のBCR-ABLキナーゼドメインの遺伝子変異はT315I, F359Vが確認された。細胞内分子解析を試みたが細胞数が不足しており、十分な結果が得られなかった。臨床的にはBCR-ABL遺伝子変異は耐性化機序の一部であり、臨床検体を用いての詳細な解析が必要と考えられる。

(2) 新規ABLキナーゼ阻害剤 (Nilotinib) 及びPI3キナーゼ/mTOR阻害剤 (BEZ235) の併用効果の解析: 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

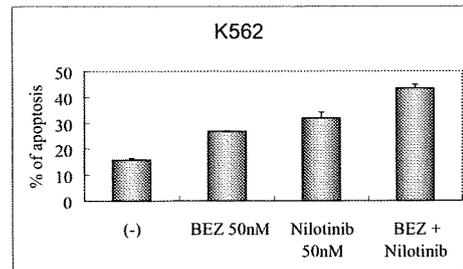
K562細胞株を用いてphospho-Akt, phosphor-4EBP1, phosphor-S6Kinaseについて免疫ブロットにて解析した。BEZ235はphospho-Akt, phosphor-4EBP1, phosphor-S6Kinaseを10nMレベルにて抑制した。

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

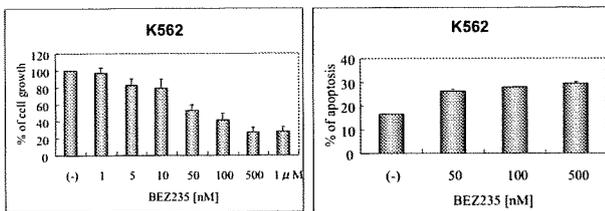


ことにより、相乗的なColony形成の低下が確認された。

### BCR-ABL陽性細胞に対するBEZ235、nilotinibの併用効果



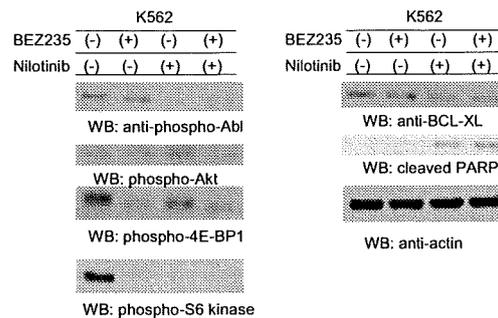
### BEZ235によるK562に対する増殖抑制効果



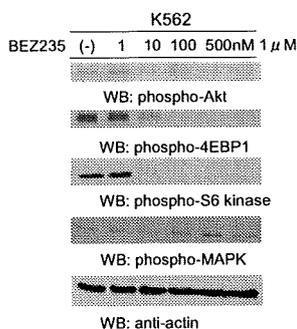
BEZ235は単独ではK562細胞株に対し、100nMにて細胞増殖抑制、アポトーシス誘導が確認された。

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



### K562に対するBEZ235の作用



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。