

200924021A

厚生労働科学研究費補助金

第3次対がん総合戦略研究事業

「DNAチップによる急性白血病の新規分類法提案」

に関する研究

平成21年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 間野 博行

平成22(2010)年5月

厚生労働科学研究費補助金

第3次対がん総合戦略研究事業

「DNAチップによる急性白血病の新規分類法提案」

に関する研究

平成21年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 間野 博行

平成22(2010)年5月

# 目次

I.	総括研究報告書	
	「DNA チップによる急性白血病の新規分類法提案」に関する研究 自治医科大学・医学部・ゲノム機能研究部 間野博行 -----	1
II.	分担研究報告	
1.	「DNA チップによる急性白血病の新規分類法提案」に関する研究 自治医科大学・医学部・ゲノム機能研究部 間野博行 -----	6
2.	「Methotrexate (MTX)と他剤併用時の至適投与方法」に関する研究 栃木県立がんセンター 加納康彦 -----	9
3.	「白血病に発現するラミニン受容体の意義」に関する研究 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 宮崎 泰司-----	11
III.	研究成果の刊行に関する一覧表 -----	14
IV.	研究成果の刊行物・別冊 -----	17

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）

総括研究報告書

「DNA チップによる急性白血病の新規分類法提案」に関する研究

主任研究者： 間野 博行 自治医科大学医学部 教授

研究要旨：我々は広く白血病患者骨髄より造血幹細胞相当分画のみを純化し保存する「Blast Bank」を設立した。既に同バンクには1000例を超える白血病芽球が保存されており、貴重な我が国の臨床試料リソースとなっている。これらについて以下の多面的なアプローチを取って白血病の病態解明を目指した。(1) 配列異常によるがん遺伝子の有無を塩基配列解析用大型 DNA チップにより解析し、複数の体細胞変異遺伝子を発見した。(2) マイクロ RNA (miRNA) の網羅的高感度クローニング法を開発し、それを用いて白血病芽球における miRNA 発現プロファイルを決定すると共に、新規 miRNA を発見した。(3) 白血病の薬剤感受性メカニズムを明らかにするべく、bendamustine と他剤との併用効果について造血器悪性腫瘍由来細胞株を用いて網羅的に検討した。(4) 予後不良白血病患者芽球においてラミニン受容体が高発現していることを明らかにするとともに白血病患者細胞表面のラミニン受容体と GM-CSF 受容体の発現量が相関することを確認した。

分担研究者

間野博行	自治医科大学医学部ゲノム機能研究部・教授
加納康彦	栃木県立がんセンター・副病院長
宮崎泰司	長崎大学大学院医歯薬学総合研究科・教授

る超大型シーケンス DNA チップ開発した。本研究計画ではこれを用いた大規模シーケンスデータと発現情報とを統合することで、これまでにない精度で特発性造血障害の診断法及び予後予測法を開発し、新たな治療標的分子の単離を目指す。

A 研究目的

現在なお正確な診断が困難であり、かつ有効な治療法の存在しない白血病類縁疾患が数多くある。各患者の有効な治療法を選択する上でも正確な鑑別診断は必須であり、そのためには新たな分子診断マーカーの同定が最も重要であると考えられる。DNA チップは網羅的な遺伝子解析を可能にする研究システムであり、上述の目的に適したスクリーニング法であると期待される。我々は白血病などの特発性血液疾患の多くが造血幹細胞（あるいはその近傍）の異常に起因することに着目し、これら疾患患者のフレッシュ検体より造血幹細胞相当分画のみを純化しストックするバンク事業「Blast Bank」をスタートした。

クローナルな疾患の病因に遺伝子配列異常が主要な役割を果たすこと広く知られているが、これまでは遺伝子配列異常を比較的簡便かつ網羅的にスクリーニングする手法が存在しなかった。我々は米国ベンチャー企業と共同で約 9 Mbp の塩基配列を一度の実験で解析可能にする

B 研究方法

1) 造血幹細胞特異的マーカーである CD133 に対するアフィニティカラムを用いて、白血病を含む各種特発性血液疾患患者骨髄より造血幹細胞分画を純化保存し、これを Blast Bank と名付けた。平成 22 年 2 月現在で 1000 例を超えるサンプルの保存に成功しており、これは純化細胞を用いたゲノミクスプロジェクトとしては世界最大級である。

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

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

4) ヒトがん株化細胞として BALL-1 (B 細胞性白血病)、HBL-1 (マントル細胞リンパ腫)、U266 (多発性骨髄腫)、培養液として RPMI1640 + 10%胎児ウシ血清を用いた。Bendamustine と他の抗がん剤を同時に加え、4-7 日間培養し、MTT assay で細胞増殖の阻害を調べ、bendamustine 単剤及び併用時の dose-response curve を得、 $IC_{50}$  における併用効果を Steel らの Isobologram で検討した。

5) 初診時患者骨髄細胞より CD34 陽性細胞をカラム法にて分離し、抗 LR 抗体によって処理後ベクトンディッキンソン社の FACScan を用いて CD34 陽性細胞における LR 発現量、顆粒球・マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF) 受容体  $\alpha$  鎖 (GM-CSFR $\alpha$ ) 発現量を測定した。LRcDNA を発現ベクターに組み込み、GM-CSF 依存性ヒト白血病細胞株 TF-1, AML193 に導入して LR 過剰発現 TF-1 株 (TF-1LR) 並びに LR 過剰発現 AML193 株 (AML193-LR) を作製した。LR 発現を低下させるために発現誘導型 siRNA を導入し LR 低発現 TF-1 株 (TF-1si) を作製した。これらの細胞株を用い、LR と GM-CSFR の細胞内結合を検討し、さらに細胞表面、細胞全体における GM-CSFR 発現をフローサイトメータ、ウエスタンブロット法にて検討した。

(倫理面への配慮)

検体収集に関しては自治医科大学及び栃木県立がんセンター、長崎大学医学部歯学部生命倫理委員会認可を受けた事業として開始し、連結可能匿名化のもとで研究を行った。

## C 研究結果

### 1) マイクロ RNA (miRNA) 解析

miRNA は個体の発生・分化に重要なだけでなく我々は微量の臨床検体から miRNA を高効率に単離する新たな手法 (mRAP; microRNA Amplification Profiling)を開発したが、さらにこの mRAP 産物を Solexa deep sequencer にて直接解析する mRAP-Solexa 法を新たに開発す

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

### 2) 白血病芽球ゲノムのリ・シーケンシング

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

### 3) Bendamustine 感受性解析

Bendamustine のこれらの細胞に対する  $IC_{50}$  に必要な濃度は 0.7-2.0  $\mu$ M であった。Bendamustine は cytarabine、gemcitabine 及び 4-hydroperoxy cyclophosphamide と相乗作用、doxorubicin、etoposide、F-ara-A、mitoxantrone、vincristine と相加効果、methotrexate と拮抗作用を示した。さらに、相乗作用を示した cytarabine との併用時の細胞周期分析をおこなった。Bendamustine 単剤では後期 S から  $G_2/M$  期、cytarabine 単剤では S 期に細胞が集積したが、併用するとこれらの細胞が減少し sub- $G_1$  分画が増加し

た。4-hydroperoxy cyclophosphamide との併用でも同様の傾向が得られた。これらの結果は MTT assay の結果と一致したものである。

#### 4) ラミニン受容体発現解析

TF-1LR, AML193-LR における細胞表面 GM-CSFRa 発現は、それぞれのコントロールと比較して上昇していた。しかし、全細胞蛋白質を対象としたウエスタンブロット解析では LR 過剰発現株とコントロール細胞において GM-CSFRa タンパク量に差はなかった。以上より、LR 発現によって GM-CSFRa は細胞表面へ移動し、発現が増えたと考えられた。さらに CD34 陽性急性骨髄性白血病細胞 (16例) における両者の発現を、フローサイトメーターを用いて検討したところ、両蛋白質の mean fluorescent intensity ratio には、 $R^2=0.27$ ,  $p=0.02$  と有意な関連が見られた。

#### D&E. 考察及び結論

本研究事業において各種白血病類縁疾患の大規模な純化細胞検体収集を行い、その体細胞遺伝子変異をスクリーニングすることで、新たながん遺伝子を発見することに成功した。また同様に白血病芽球を用いて miRNA プロファイルを明らかにすると共に、白血病細胞の MTX 抗腫瘍効果に関する薬剤感受性解析、さらに新たな白血病患者予後予測マーカーの同定にも成功した。

#### F. 健康危険情報

無し

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

間野博行

- 1) Susaki K, Kitanaka A, Dobashi H, Kubota Y, Kittaka K, Kameda T, Yamaoka G, Mano H, Mihara K & Ishida T. "Tec protein tyrosine kinase inhibits CD25 expression in human T-lymphocyte" *Immunol Lett* **127**: 135-142, 2010.
- 2) Mano H & Takeuchi K. "EML4-ALK Fusion in Lung" *Am J Pathol* in press, 2010.
- 3) Yamashita Y, Yuan J, Suetake I, Suzuki H, Ishikawa Y, Choi YL, Ueno T, Soda M, Hamada T, Haruta H, Takada S, Miyazaki Y, Kiyoi H, Ito E, Naoe T, Tomonaga M, Toyota M, Tajima S, Iwama A & Mano H. "Array-based genomic resequencing of human leukemia" *Oncogene* in press, 2010.
- 4) Wada T, Yamashita Y, Saga Y, Takahashi K, Koinuma K, Choi YL, Kaneda R, Fujiwara S, Soda M, Watanabe H, Kurashina K, Hatanaka H, Enomoto M, Takada S, Mano H & Suzuki M. "Screening for genetic abnormalities involved in ovarian carcinogenesis using retroviral expression libraries" *Int J Oncol* **35**: 973-976, 2009.
- 5) Tanaka M, Kano Y, Akutsu M, Tsunoda S, Izumi T, Yazawa Y, Miyawaki S, Mano H & Furukawa Y. "The cytotoxic effects of gemtuzumab ozogamicin (mylotarg) in combination with conventional antileukemic agents by isobologram analysis in vitro" *Anticancer Res* **29**: 4589-4596, 2009.
- 6) Takeuchi K, Choi YL, Togashi Y, Soda M, Hatano S, Inamura K, Takada S, Ueno T, Yamashita Y, Satoh Y, Okumura S, Nakagawa K, Ishikawa Y & Mano H. "KIF5B-ALK, a novel fusion oncokine identified by an immunohistochemistry-based diagnostic system for ALK-positive lung cancer" *Clin Cancer Res* **15**: 3143-3149, 2009.
- 7) Takada S, Berezikov E, Choi YL, Yamashita Y & Mano H. "Potential role of miR-29b in modulation of Dnmt3a and Dnmt3b expression in primordial germ cells of female mouse embryos" *RNA* **15**: 1507-1514, 2009.
- 8) Kano Y, Tanaka M, Akutsu M, Mori K, Yazawa Y, Mano H & Furukawa Y. "Schedule-dependent synergism and antagonism between pemetrexed and docetaxel in human lung cancer cell lines in vitro" *Cancer Chemother Pharmacol* **64**: 1129-1137, 2009.
- 9) Kaneda R, Takada S, Yamashita Y, Choi YL, Nonaka-Sarukawa M, Soda M, Misawa Y, Isomura T, Shimada K & Mano H. "Genome-wide histone methylation profile for heart failure" *Genes Cells* **14**: 69-77, 2009.
- 10) Inamura K, Takeuchi K, Togashi Y, Hatano S, Ninomiya H, Motoi N, Mun MY, Sakao Y,

Okumura S, Nakagawa K, Soda M, Choi YL, Mano H & Ishikawa Y. "EML4-ALK lung cancers are characterized by rare other mutations, a TTF-1 cell lineage, an acinar histology, and young onset" *Mod Pathol* **22**: 508-515, 2009.

加納康彦

- 1) Kano Y, Tanaka M, Akutsu M, Mori K, Yazawa Y, Mano H, Furukawa Y. Schedule-dependent synergism and antagonism between pemetrexed and docetaxel in human lung cancer cell lines in vitro. *Cancer Chemother Pharmacol.* **64**: 1129-1137, 2009.
- 2) Vu HA, Xinh PT, Kano Y, Tokunaga K, Sato Y. The juxtamembrane domain in ETV6/FLT3 is critical for PIM-1 up-regulation and cell proliferation. *Biochem Biophys Res Commun.* **383**: 308-313, 2009.
- 3) Noborio-Hatano K, Kikuchi J, Takatoku M, Shimizu R, Wada T, Ueda M, Nobuyoshi M, Oh I, Sato K, Suzuki T, Ozaki K, Mori M, Nagai T, Muroi K, Kano Y, Furukawa Y, Ozawa K. Bortezomib overcomes cell-adhesion-mediated drug resistance through downregulation of VLA-4 expression in multiple myeloma. *Oncogene.* **28**: 231-242, 2009.
- 4) Mori K, Kobayashi H, Kamiyama Y, Kano Y, Kodama T. A phase II trial of weekly chemotherapy with paclitaxel plus gemcitabine as a first-line treatment in advanced non-small-cell lung cancer. *Cancer Chemother Pharmacol.* **64**: 73-78, 2009.
- 5) Tanaka M, Kano Y, Akutsu M, Tsunoda S, Izumi T, Yazawa Y, Miyawaki S, Mano H, Furukawa Y. The cytotoxic effects of gemtuzumab ozogamicin (mylotarg) in combination with conventional antileukemic agents by isobologram analysis in vitro. *Anticancer Res.* **29**: 4589-4596, 2009.

宮崎泰司

- 1) Sakai M, Miyazaki Y, Matsuo E, Moriuchi Y, Hata T, Fukushima T, Imaizumi Y, Imanishi D, Taguchi J, Iwanaga M, Tsushima H, Inoue Y, Takasaki Y, Tsuchiya T, Komoda M, Ando K, Horio K, Moriwaki Y, Tominaga S, Itonaga H,

Nagai K, Tsukasaki K, Tsutsumi C, Sawayama Y, Yamasaki R, Ogawa D, Kawaguchi Y, Ikeda S, Yoshida S, Onimaru Y, Tawara M, Atogami S, Koida S, Joh T, Yamamura M, Matsuo Y, Soda H, Nonaka H, Jinnai I, Kuriyama K, Tomonaga M. : Long-term efficacy of imatinib in a practical setting is correlated with imatinib through concentration that is influenced by body size: a report by the Nagasaki CML Study Group. *Int J Hematol.* **89**(3):319-325, 2009

- 2) Sakamaki H, Ishizawa K, Taniwaki M, Fujisawa S, Morishima Y, Tobinai K, Okada M, Ando K, Usui N, Miyawaki S, Utsunomiya A, Uoshima N, Nagai T, Naoe T, Motoji T, Jinnai I, Tanimoto M, Miyazaki Y, Ohnishi K, Iida S, Okamoto S, Seriu T, Ohno R. : Phase 1/2 clinical study of dasatinib in Japanese patients with chronic myeloid leukemia or Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *Int J Hematol.* **89**(3):332-41. 2009
- 3) Tojo A, Usuki K, Urabe A, Maeda Y, Kobayashi Y, Jinnai I, Ohyashiki K, Nishimura M, Kawaguchi T, Tanaka H, Miyamura K, Miyazaki Y, Hughes T, Branford S, Okamoto S, Ishikawa J, Okada M, Usui N, Tani H, Amagasaki T, Natori H, Naoe T. : 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**(5):679-88, 2009
- 4) Doi Y, Sasaki D, Terada C, Mori S, Tsuruda K, Matsuo E, Miyazaki Y, Nagai K, Hasegawa H, Yanagihara K, Yamada Y, Kamihira S. : High-resolution melting analysis for a reliable and two-step scanning of mutations in the tyrosine kinase domain of the chimerical bcr-abl gene. *Int J Hematol.* **90**(1):37-43, 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**(2):90-8, 2009
- 6) Matsuda A, Germing U, Jinnai I, Araseki K,

Kuendgen A, Strupp C, Iwanaga M, Miyazaki Y, Hata T, Bessho M, Gattermann N, Tomonaga M : Differences in the distribution of subtypes according to the WHO classification 2008 between Japanese and German patients with Refractory Anemia according to the FAB classification in Myelodysplastic Syndromes. *Leukemia Res* in press.

- 7) Morita Y, Kanamaru A, Miyazaki Y, Imanishi D, Yagasaki F, Tanimoto M, Kuriyama K, Kobayashi T, Imoto S, Ohnishi K, Naoe T, Ohno R : Comparative analysis of remission induction therapy for high-risk MDS and AML progressed from MDS in the MDS200 study of Japan Adult Leukemia Study Group. *Int J Hematol*, 91(1):97-103,2010.
- 8) Ohtake, S., Miyawaki, S., Kiyoi, H., Miyazaki Y, Okumura, H., Matsuda, S., Nagai, T., Kishimoto, Y., Okada, M., Takahashi, M., Honada H., Takeuchi, J., Kageyama, S., Asou, N., Yagasaki, N., 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* in press.
- 9) Sakamaki H, Miyawaki S, Ohtake S, Ygasaki F, Mitani K, Matsuda S, Kishimoto Y, Miyazaki Y, Asou N, Takahashi M, Ogawa Y, Honda S, Ohno R: Allogeneic Stem Cell Transplantation versus Chemotherapy as Post-remission Therapy for Intermediate or Poor Risk Adult Acute Myeloid Leukemia: Results of the JALSG AML97 Study. *Int J Hematol* in press.

H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし



分担研究者： 間野 博行 自治医科大学医学部 教授

研究要旨：我々は広く白血病患者骨髄より造血幹細胞相当分画のみを純化し保存する「Blast Bank」を設立した。同バンクに既に保存された1000例を越えるサンプルを用いて、配列異常を有する遺伝子の網羅的スクリーニングとマイクロRNA (miRNA) の発現プロファイルを行った。またこれらのプロジェクトのために、前者については世界最大の塩基配列解析用DNAチップを開発し、後者については微量の臨床検体から大量のmiRNA配列を同定できる新しいクローニング法を開発した。まず白血球芽球を用いて5400種類のヒト腫瘍関連遺伝子群のcoding exonの配列解析を行い、約10種類の芽球特異的な後天的遺伝子配列異常を発見した。その中には活性化型チロシンキナーゼをコードする新たな異常がん遺伝子が含まれていたのみならず、ゲノムメチル化レベルを制御する酵素の全く新しい配列異常も含まれていた。さらに我々は $10^4$ 個以下の微量の細胞から数百万種類のmiRNAを同定可能にする技術を確立し、これを用いてBlast Bankに属する白血球芽球のmiRNAプロファイルを解析した。その結果芽球に発現するmiRNAパターンは芽球の核型に良くリンクすることを発見し、さらに次世代シーケンサーを用いる網羅的miRNA発現解析法も開発した。

#### A 研究目的

現在なお正確な診断が困難であり、かつ有効な治療法の存在しない白血球類縁疾患が数多くある。各患者の有効な治療法を選択する上でも正確な鑑別診断は必須であり、そのためには新たな分子診断マーカーの同定が最も重要であると考えられる。DNAチップは数千～数万種類の遺伝子発現変化を簡便に解析可能にする最新の研究システムであり、上述の目的に適したスクリーニング法であると期待される。我々は白血球などの特発性血液疾患の多くが造血幹細胞（あるいはその近傍）の異常に起因することに着目し、これら疾患患者のフレッシュ検体より造血幹細胞相当分画のみを純化しストックするバンク事業「Blast Bank」をスタートした。

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

#### B 研究方法

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

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

(倫理面への配慮)

検体収集に関しては自治医科大学及び栃木県立がんセンター、長崎大学医学部歯学部の生命倫理委員会認可を受けた事業として開始し、連結可能匿名化のもとで研究を行った。

#### C 研究結果

##### 1) マイクロRNA (miRNA) 解析

miRNAは個体の発生・分化に重要なだけでなく我々は微量の臨床検体からmiRNAを高効率に単離する新たな手法(mRAP; microRNA

Amplification Profiling)を開発したが、さらにこのmRAP産物を次世代シーケンサーであるIllumina社 Genome Analyzerにて直接解析するmRAP-GA法を新たに開発することに成功した。本法を用いることで $1 \times 10^4$ 細胞ほどの微量な臨床検体からも数億個のmiRNAクローンを正確かつ簡便に解析可能であり、既に高等真核生物における全miRNA同定プロジェクトを完成させた。さらに本mRAP-GA法を用いた白血病におけるmiRNAの大規模解析を開始したところである。

#### 2) 白血病芽球ゲノムのリ・シーケンシング

白血病の発症原因を解明するべく、白血病芽球における遺伝子配列異常の大規模解析を行った。発がんに関連が予想される5600種類のタンパクコード遺伝子について、そのcoding exonの配列異常を超大型シーケンスチップによりスクリーニングした。その結果JAK3チロシンキナーゼ遺伝子の新規活性型変異を一般の急性骨髄性白血病において初めて同定した。さらに白血病における活性型JAK3の意義を解析するためその変異の有無を286例の白血病検体で解析したところ、9例で変異を発見した。一方我々のリシーケンシング解析の結果、ゲノムのメチル化責任酵素であるDNMT3Aに機能抑制変異が存在することが明らかになった。これは体細胞における初めてのDNMT遺伝子変異の発見である。変異DNMT3Aは正常タンパクに比べて50%以下の触媒活性しか有しておらず、しかも同部位の変異は白血病症例中約4%に認められることが明らかになった。また我々は今後の大規模解析のための基盤技術として、イルミナ社の次世代シーケンサー

「Genome Analyzer」を用いて極めて高精度に塩基配列異常を検出する新しいリシーケンス技術の開発にも成功した。

#### D&E. 考察及び結論

我々が行った白血病のリシーケンス解析により、新たな発がん原因遺伝子が同定されただけでなく、世界で初めてゲノムメチル化酵素であるDNMT3Aの体細胞変異が発見された。これは一部のがんでゲノムメチル化の異常が生じる事に対して初めて分子基盤を与える重要な知見である。今後は次世代シーケンサーを用いる我々の新たなリシーケンス技術によって、これまで収集した検体による白血病の大規模体細胞変異スクリーニングを行う。さらにmiRNA解

析についても我々のmRAP-GA法により、微量の白血病検体からでも大規模かつ正確なmiRNA異常の解析が可能になる。

#### F. 健康危険情報

無し

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Susaki K, Kitanaka A, Dobashi H, Kubota Y, Kittaka K, Kameda T, Yamaoka G, Mano H, Mihara K & Ishida T. "Tec protein tyrosine kinase inhibits CD25 expression in human T-lymphocyte" *Immunol Lett* **127**: 135-142, 2010.
- 2) Mano H & Takeuchi K. "EML4-ALK Fusion in Lung" *Am J Pathol* in press, 2010.
- 3) Yamashita Y, Yuan J, Suetake I, Suzuki H, Ishikawa Y, Choi YL, Ueno T, Soda M, Hamada T, Haruta H, Takada S, Miyazaki Y, Kiyoi H, Ito E, Naoe T, Tomonaga M, Toyota M, Tajima S, Iwama A & Mano H. "Array-based genomic resequencing of human leukemia" *Oncogene* in press, 2010.
- 4) Wada T, Yamashita Y, Saga Y, Takahashi K, Koinuma K, Choi YL, Kaneda R, Fujiwara S, Soda M, Watanabe H, Kurashina K, Hatanaka H, Enomoto M, Takada S, Mano H & Suzuki M. "Screening for genetic abnormalities involved in ovarian carcinogenesis using retroviral expression libraries" *Int J Oncol* **35**: 973-976, 2009.
- 5) Tanaka M, Kano Y, Akutsu M, Tsunoda S, Izumi T, Yazawa Y, Miyawaki S, Mano H & Furukawa Y. "The cytotoxic effects of gemtuzumab ozogamicin (mylotarg) in combination with conventional antileukemic agents by isobologram analysis in vitro" *Anticancer Res* **29**: 4589-4596, 2009.
- 6) Takeuchi K, Choi YL, Togashi Y, Soda M, Hatano S, Inamura K, Takada S, Ueno T, Yamashita Y, Satoh Y, Okumura S, Nakagawa K, Ishikawa Y & Mano H. "KIF5B-ALK, a novel fusion oncokine identified by an immunohistochemistry-based diagnostic system for ALK-positive lung cancer" *Clin Cancer Res* **15**: 3143-3149, 2009.
- 7) Takada S, Berezikov E, Choi YL, Yamashita Y & Mano H. "Potential role of miR-29b in modulation of Dnmt3a and Dnmt3b expression in primordial germ cells of female mouse embryos" *RNA* **15**: 1507-1514, 2009.
- 8) Kano Y, Tanaka M, Akutsu M, Mori K, Yazawa Y, Mano H & Furukawa Y. "Schedule-dependent synergism and antagonism between pemetrexed and docetaxel in human lung cancer cell lines in vitro"

*Cancer Chemother Pharmacol* **64**: 1129-1137, 2009.

- 9) Kaneda R, Takada S, Yamashita Y, Choi YL, Nonaka-Sarukawa M, Soda M, Misawa Y, Isomura T, Shimada K & Mano H. "Genome-wide histone methylation profile for heart failure" *Genes Cells* **14**: 69-77, 2009.
- 10) Inamura K, Takeuchi K, Togashi Y, Hatano S, Ninomiya H, Motoi N, Mun MY, Sakao Y, Okumura S, Nakagawa K, Soda M, Choi YL, Mano H & Ishikawa Y. "EML4-ALK lung cancers are characterized by rare other mutations, a TTF-1 cell lineage, an acinar histology, and young onset" *Mod Pathol* **22**: 508-515, 2009.

H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

「Bendamustine と抗白血病治療薬の併用効果」に関する研究

分担研究者： 加納康彦  
栃木県立がんセンター 副病院長

**研究要旨：** Bendamustine はアルキル化剤と代謝拮抗薬の作用機序をもつユニークな抗がん剤で、他のアルキル化剤と殆ど交叉耐性をもたない。最近の臨床試験で慢性リンパ性白血病、悪性リンパ腫、多発性骨髄腫等に対し従来の抗がん剤に同等ないしそれ以上の効果が認められ、FDA は慢性リンパ性白血病及び低悪性度非ホジキンリンパ腫に対し承認した。現在、bendamustine 単剤や他剤併用で、様々な悪性腫瘍に対して臨床試験が行われているが、併用基礎研究は殆どおこなわれていない。私たちはヒトリンパ系細胞株を用いて、bendamustine と他の抗がん剤の併用効果を検討した。ヒトリンパ系白血病、リンパ腫、骨髄腫株化細胞として BALL-1、HBL-1、U266 の3種、培養液として RPMI1640 + 10%胎児ウシ血清を用いた。Bendamustine と他の抗がん剤を同時に加え、4-7日間培養し、細胞増殖の阻害を MTT assay でおこない、単剤及び併用時の dose-response curve を得、 $IC_{50}$ の併用効果を Steel & Peckham による Isobologram で検討した。いずれの細胞を用いても、bendamustine は cytarabine、gemcitabine 及び 4-hydroperoxy cyclophosphamide (cyclophosphamide の active metabolite) と相乗作用、doxorubicin、etoposide、F-ara-A (fludarabine の active metabolite)、mitoxantrone vincristine と相加効果、methotrexate と拮抗作用を示した。以上の結果より bendamustine は多くの薬剤と併用しやすい抗がん剤で、特に cytarabine、gemcitabine、cyclophosphamide との併用は臨床試験で検討する価値がある。一方、methotrexate との併用は避けた方が望ましい。

#### A 研究目的

Bendamustineは1960年代に東ドイツで開発されたアルキル化剤と代謝拮抗薬としての作用をもつユニークな二機能性抗がん剤で、他のアルキル化剤とは殆ど交叉耐性がない。その後、東ドイツで慢性リンパ性白血病、悪性リンパ腫、多発性骨髄腫等に対し広く用いられていたが、近年の欧米の臨床試験において、これらの疾患に対し優れた治療成績が証明され、FDAは慢性リンパ性白血病及び低悪性度非ホジキンリンパ腫に対する使用を承認した。Bendamustineはこれらの疾患に対する第一選択のアルキル化剤になる可能性がある。有害事象は骨髄抑制、発熱、消化器症状等だが、その程度は比較的軽いため、他の抗がん剤との併用しやすい薬剤と考えられる。現在、bendamustine単剤や他剤併用で、様々な悪性腫瘍に対して臨床試験が行われているが、bendamustineの基礎併用研究は殆どおこなわれていない。私たちはヒトリンパ系腫瘍株化細胞を用いて、bendamustineと他の抗がん剤の併用効果を検討した。

#### B 研究方法

ヒトがん株化細胞として BALL-1 (B細胞性白血病)、HBL-1 (マントル細胞リンパ腫)、U266 (多発性骨髄腫)、培養液として RPMI1640 + 10%胎児ウシ血清を用いた。Bendamustine と他の抗がん剤を同時に加え、4-7日間培養し、MTT assay で細胞増殖の阻害を調べ、bendamustine 単剤及び併用時の dose-response curve を得、

$IC_{50}$ における併用効果を Steel らの Isobologram で検討した。

(倫理面への配慮)

一般に使用されている株化細胞を用いた実験のため不要。

#### C 研究結果

Bendamustine のこれらの細胞に対する  $IC_{50}$  に必要な濃度は 0.7 -2.0 $\mu$ M であった。Bendamustine は cytarabine、gemcitabine 及び 4-hydroperoxy cyclophosphamide と相乗作用、doxorubicin、etoposide、F-ara-A、mitoxantrone、vincristine と相加効果、methotrexate と拮抗作用を示した。さらに、相乗作用を示した cytarabine との併用時の細胞周期分析をおこなった。Bendamustine 単剤では後期 S から G<sub>2</sub>/M 期、cytarabine 単剤では S 期に細胞が集積したが、併用するとこれらの細胞が減少し sub-G<sub>1</sub> 分画が増加した。4-Hydroperoxy cyclophosphamide との併用でも同様の傾向が得られた。これらの結果は MTT assay の結果と一致したものである。

#### D&E 考察及び結論

私達は悪性リンパ腫、白血病に広く用いられている抗がん剤と bendamustine の併用効果を3種のヒトリンパ系腫瘍株化細胞を用いて検討した。Bendamustine は抗がん剤との併用において殆

どの抗がん剤と相加作用以上の効果を示し、併用時に優れた抗腫瘍効果が期待できる。その中でも cytarabine、gemcitabine、4-hydroperoxy cyclophosphamide との併用は特に優れた抗腫瘍効果を示し、これらの薬剤との併用は臨床試験で検討する価値がある。一方、methotrexate との併用は明らかな拮抗作用を示し不相当と考えられる。私達のデータは bendamustine 併用の臨床プロトコール作成に有用な情報になると考える。

H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

#### F 健康危険情報

なし

#### G 研究発表

1. Kano Y, Tanaka M, Akutsu M, Mori K, Yazawa Y, Mano H, Furukawa. Schedule-dependent synergism and antagonism between pemetrexed and docetaxel in human lung cancer cell lines in vitro Y. *Cancer Chemother Pharmacol.* 64: 1129-1137, 2009.
2. Vu HA, Xinh PT, Kano Y, Tokunaga K, Sato Y. The juxtamembrane domain in ETV6/FLT3 is critical for PIM-1 up-regulation and cell proliferation. *Biochem Biophys Res Commun.* 383: 308-313, 2009.
3. Noborio-Hatano K, Kikuchi J, Takatoku M, Shimizu R, Wada T, Ueda M, Nobuyoshi M, Oh I, Sato K, Suzuki T, Ozaki K, Mori M, Nagai T, Muroi K, Kano Y, Furukawa Y, Ozawa K. Bortezomib overcomes cell-adhesion-mediated drug resistance through downregulation of VLA-4 expression in multiple myeloma *Oncogene.* 28: 231-242, 2009.
4. Mori K, Kobayashi H, Kamiyama Y, Kano Y, Kodama T. A phase II trial of weekly chemotherapy with paclitaxel plus gemcitabine as a first-line treatment in advanced non-small-cell lung cancer. *Cancer Chemother Pharmacol.* 64: 73-78, 2009.
5. Tanaka M, Kano Y, Akutsu M, Tsunoda S, Izumi T, Yazawa Y, Miyawaki S, Mano H, Furukawa Y. The cytotoxic effects of gemtuzumab ozogamicin (mylotarg) in combination with conventional antileukemic agents by isobologram analysis in vitro. *Anticancer Res.* 29: 4589-4596, 2009.

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）  
分担研究報告書

「白血病におけるラミニン受容体とサイトカイン受容体発現の関連」

分担研究者： 宮崎 泰司 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 教授

研究要旨：ラミニンは細胞外基質の主要構成成分であり、造血制御に関与している可能性がある。白血病細胞ではラミニン受容体発現レベルは細胞の増殖やアポトーシスに関連し、急性骨髄性白血病ではラミニン受容体発現と治療反応性に相関がみられた。こうした機構の解明のために顆粒球系サイトカインである顆粒球・マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）の受容体（GM-CSFR）との関連を検討したところ両者は細胞内において結合し、かつ白血病細胞株においてラミニン受容体発現は GM-CSFR 発現を上昇させ、臨床検体においても両者の発現には相関があった。白血病細胞においてラミニン受容体はサイトカイン受容体発現と関連しつつ細胞増殖機構に影響を与えていることが示唆された。

A 研究目的

白血病幹細胞における骨髄中の「ニッチ」は、正常造血幹細胞と同様に白血病幹細胞においてもその生存、増殖、未分化性の維持に重要と考えられている。そこでは、細胞外基質からの刺激も幹細胞動態を制御する重要なシグナルの一つとされている。

ラミニンは細胞外基質の主要な構成成分であり、受容体を通じて血液細胞に様々なシグナルを伝えて細胞動態の制御に関わっている。ラミニン受容体の一つである非インテグリン系 67kD ラミニン受容体（LR）は造血細胞を含む幅広い組織に発現し、固形腫瘍の転移・浸潤や腫瘍の悪性化と関連している。我々の検討では LR 発現は白血病細胞においても細胞増殖動態と関連が見られた。すなわち、LR 発現によって白血病細胞の細胞周期が促進され、液体培地、半固形培地における増殖が亢進した。さらに、低サイトカイン状態におけるアポトーシス抵抗性、STAT5 蛋白のリン酸化亢進がみられた。患者検体の解析では LR 抗発現例における初診時白血球数、並びに LDH の有意な増加が観察された。こうした効果は造血細胞に対する増殖性造血因子の効果と類似していると考えられた。

そこで、LR 発現と白血病細胞の生物学的特性について、急性骨髄性白血病（AML）における LR 発現の意義、特にサイトカイン受容体との関連を検討した。

B 研究方法

初診時患者骨髄細胞より CD34 陽性細胞をカラム法にて分離し、抗 LR 抗体によって

処理後ベクトンディッキンソン社の FACScan を用いて CD34 陽性細胞における LR 発現量、顆粒球・マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）受容体  $\alpha$  鎖（GM-CSFR $\alpha$ ）発現量を測定した。LRcDNA を発現ベクターに組み込み、GM-CSF 依存性ヒト白血病細胞株 TF-1、AML193 に導入して LR 過剰発現 TF-1 株（TF-1LR）並びに LR 過剰発現 AML193 株（AML193-LR）を作製した。LR 発現を低下させるために発現誘導型 siRNA を導入し LR 低発現 TF-1 株（TF-1si）を作製した。これらの細胞株を用い、LR と GM-CSFR の細胞内結合を検討し、さらに細胞表面、細胞全体における GM-CSFR 発現をフローサイトメータ、ウエスタンブロット法にて検討した。

（倫理面への配慮）

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

C 研究結果

1) 白血病細胞における LR と GM-CSFR の結合  
cDNA を細胞に導入して LR、GM-CSFR を発現させ、それぞれに対する抗体を用いて免疫沈降—ウエスタンブロット解析を行ったところ、両蛋白は同一免疫沈降物の中に存在した。

2) LR 発現による GM-CSFR 発現の増強

TF-1LR、AML193-LR における細胞表面 GM-CSFR $\alpha$  発現は、それぞれのコントロールと比較して上昇していた。しかし、全細胞蛋白質を対象としたウエスタンブロット解析では LR 過剰発現株とコントロール細胞におい

てGM-CSFRαタンパク量に差はなかった。以上より、LR発現によってGM-CSFRαは細胞表面へ移動し、発現が増えたと考えられた。

### 3) 臨床検体におけるLRとGM-CSFRαの発現

CD34陽性急性骨髄性白血病細胞（16例）における両者の発現を、フローサイトメーターを用いて検討したところ、両蛋白質のmean fluorescent intensity ratioには、 $R^2=0.27$ ,  $p=0.02$ と有意な関連が見られた。

## D&E. 考察及び結論

本研究によって、CD34陽性白血病細胞におけるLR発現と細胞増殖、抗アポトーシスの関連は、サイトカイン受容体であるGM-CSFRの発現亢進が影響していることが示唆された。GM-CSFRからの顆粒球系細胞シグナルの重要性は、若年骨髄単急性白血病においてその経路に高頻度に遺伝子異常が認められること、急性骨髄性白血病においてもシグナルの増強が観察されることなどより、これまででも指摘されていた。我々の以前の検討でLR発現におけるSTAT5を含むシグナル伝達経路の関与（STAT5高リン酸化）が示されていたが、GM-CSFR下流にSTAT5が位置することより、今回の結果と合致するものであった。

LR発現がサイトカインシグナル伝達を調節することで白血病細胞の動態を制御するのであれば、こうした経路が治療抵抗性白血病に対する新たな治療標的となる可能性がある。今後は、LRと他のサイトカイン受容体、シグナル伝達との関わりも検討する必要がある。

## F. 健康危険情報

無し

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Sakai M, Miyazaki Y, Matsuo E, Moriuchi Y, Hata T, Fukushima T, Imaizumi Y, Imanishi D, Taguchi J, Iwanaga M, Tsushima H, Inoue Y, Takasaki Y, Tsuchiya T, Komoda M, Ando K, Horio K, Moriwaki Y, Tominaga S, Itonaga H,

Nagai K, Tsukasaki K, Tsutsumi C, Sawayama Y, Yamasaki R, Ogawa D, Kawaguchi Y, Ikeda S, Yoshida S, Onimaru Y, Tawara M, Atogami S, Koida S, Joh T, Yamamura M, Matsuo Y, Soda H, Nonaka H, Jinnai I, Kuriyama K, Tomonaga M.: Long-term efficacy of imatinib in a practical setting is correlated with imatinib through concentration that is influenced by body size: a report by the Nagasaki CML Study Group. *Int J Hematol*, 89(3):319-325, 2009

2) Sakamaki H, Ishizawa K, Taniwaki M, Fujisawa S, Morishima Y, Tobinai K, Okada M, Ando K, Usui N, Miyawaki S, Utsunomiya A, Uoshima N, Nagai T, Naoe T, Motoji T, Jinnai I, Tanimoto M, Miyazaki Y, Ohnishi K, Iida S, Okamoto S, Seriu T, Ohno R.: Phase 1/2 clinical study of dasatinib in Japanese patients with chronic myeloid leukemia or Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *Int J Hematol*. 89(3):332-41. 2009

3) Tojo A, Usuki K, Urabe A, Maeda Y, Kobayashi Y, Jinnai I, Ohyashiki K, Nishimura M, Kawaguchi T, Tanaka H, Miyamura K, Miyazaki Y, Hughes T, Branford S, Okamoto S, Ishikawa J, Okada M, Usui N, Tanii H, Amagasaki T, Natori H, Naoe T. : 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(5):679-88, 2009

4) Doi Y, Sasaki D, Terada C, Mori S, Tsuruda K, Matsuo E, Miyazaki Y, Nagai K, Hasegawa H, Yanagihara K, Yamada Y, Kamihira S.: High-resolution melting analysis for a reliable and two-step scanning of mutations in the tyrosine kinase domain of the chimerical bcr-abl gene. *Int J Hematol*. 90(1):37-43, 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(2):90-8, 2009

- 6) Matsuda A, Germing U, Jinnai I, Araseki K, Kuendgen A, Strupp C, Iwanaga M, Miyazaki Y, Hata T, Bessho M, Gattermann N, Tomonaga M : Differences in the distribution of subtypes according to the WHO classification 2008 between Japanese and German patients with Refractory Anemia according to the FAB classification in Myelodysplastic Syndromes. *Leukemia Res* in press.
- 7) Morita Y, Kanamaru A, Miyazaki Y, Imanishi D, Yagasaki F, Tanimoto M, Kuriyama K, Kobayashi T, Imoto S, Ohnishi K, Naoe T, Ohno R : Comparative analysis of remission induction therapy for high-risk MDS and AML progressed from MDS in the MDS200 study of Japan Adult Leukemia Study Group. *Int J Hematol*, 91(1):97-103,2010.
- 8) Ohtake, S., Miyawaki, S., Kiyoi, H., Miyazaki Y., Okumura, H., Matsuda, S., Nagai, T., Kishimoto, Y., Okada, M., Takahashi, M., Honada H., Takeuchi, J., Kageyama, S., Asou, N., Yagasaki, N., 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* in press.
- 9) Sakamaki, H., Miyawaki, S., Ohtake, S., Yagasaki, F., Mitani, K., Matsuda, S., Kishimoto, Y., Miyazaki Y., Asou, N., Takahashi, M., Ogawa, Y., Honda, S., Ohno, R : Allogeneic Stem Cell Transplantation versus Chemotherapy as Post-remission Therapy for Intermediate or Poor Risk Adult Acute Myeloid Leukemia: Results of the JALSG AML97 Study. *Int J Hematol* in press.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし



発表者名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Inamura K, Takeuchi K, Togashi Y, Hatano S, Ninomiya H, Motoi N, Mun MY, Sakao Y, Okumura S, Nakagawa K, Soda M, Choi YL, Mano H & Ishikawa Y.	EML4-ALK lung cancers are characterized by rare other mutations, a TTF-1 cell lineage, an acinar histology, and young onset	Mod Pathol	22	508-515	2009
Kaneda R, Takada S, Yamashita Y, Choi YL, Nonaka-Sarukawa M, Soda M, Misawa Y, Isomura T, Shimada K & Mano H.	Genome-wide histone methylation profile for heart failure	Genes Cells	14	69-77	2009
Kano Y, Tanaka M, Akutsu M, Mori K, Yazawa Y, Mano H & Furukawa Y.	Schedule-dependent synergism and antagonism between pemetrexed and docetaxel in human lung cancer cell lines in vitro	Cancer Chemother Pharmacol	64	1129-1137	2009
Takada S, Berezikov E, Choi YL, Yamashita Y & Mano H.	Potential role of miR-29b in modulation of Dnmt3a and Dnmt3b expression in primordial germ cells of female mouse embryos	RNA	15	1507-1514	2009
Takeuchi K, Choi YL, Togashi Y, Soda M, Hatano S, Inamura K, Takada S, Ueno T, Yamashita Y, Satoh Y, Okumura S, Nakagawa K, Ishikawa Y & Mano H.	KIF5B-ALK, a novel fusion oncokinasase identified by an immunohistochemistry-based diagnostic system for ALK-positive lung cancer	Clin Cancer Res	15	3143-3149	2009
Tanaka M, Kano Y, Akutsu M, Tsunoda S, Izumi T, Yazawa Y, Miyawaki S, Mano H & Furukawa Y.	The cytotoxic effects of gemtuzumab ozogamicin (mylotarg) in combination with conventional antileukemic agents by isobologram analysis in vitro	Anticancer Res	29	4589-4596	2009
Wada T, Yamashita Y, Saga Y, Takahashi K, Koinuma K, Choi YL, Kaneda R, Fujiwara S, Soda M, Watanabe H, Kurashina K, Hatanaka H, Enomoto M, Takada S, Mano H & Suzuki M.	Screening for genetic abnormalities involved in ovarian carcinogenesis using retroviral expression libraries	Int J Oncol	35	973-976	2009
Mano H & Takeuchi K.	EML4-ALK Fusion in Lung	Am J Pathol			2010
Susaki K, Kitanaka A, Dobashi H, Kubota Y, Kittaka K, Kameda T, Yamaoka G, Mano H, Mihara K & Ishida T.	Tec protein tyrosine kinase inhibits CD25 expression in human T-lymphocyte	Immunol Lett	127	135-142	2010

栃木県立がんセンター 加納康彦 業績リスト

発表者名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Vu HA, Xinh PT, Kano Y, Tokunaga K, Sato Y.	The juxtamembrane domain in ETV6/FLT3 is critical for PIM-1 up-regulation and cell proliferation	Biochem Biophys Res Commun.	383	308-313	2009
Noborio-Hatano K, Kikuchi J, Takatoku M, Shimizu R, Wada T, Ueda M, Nobuyoshi M, Oh I, Sato K, Suzuki T, Ozaki K, Mori M, Nagai T, Muroi K, Kano Y, Furukawa Y, Ozawa K.	Bortezomib overcomes cell-adhesion-mediated drug resistance through downregulation of VLA-4 expression in multiple myeloma	Oncogene	28	231-242	2009
Mori K, Kobayashi H, Kamiyama Y, Kano Y, Kodama T.	A phase II trial of weekly chemotherapy with paclitaxel plus gemcitabine as a first-line treatment in advanced non-small-cell lung cancer	Cancer Chemother Pharmacol.	64	73-78	2009
Kano Y, Tanaka M, Akutsu M, Mori K, Yazawa Y, Mano H, Furukawa Y.	Schedule-dependent synergism and antagonism between pemetrexed and docetaxel in human lung cancer cell lines in vitro	Cancer Chemother Pharmacol.	64	1129-1137	2009
Tanaka M, Kano Y, Akutsu M, Tsunoda S, Izumi T, Yazawa Y, Miyawaki S, Mano H,	The cytotoxic effects of gemtuzumab ozogamicin (mylotarg) in combination with conventional antileukemic agents by isobologram analysis in vitro	Anticancer Res.	29	4589-4596	2009

## 長崎大学

## 宮崎泰司 業績リスト

発表者名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Sakai M, Miyazaki Y, Matsuo E, Moriuchi Y, Hata T, Fukushima T, Imaizumi Y, Imanishi D, Taguchi J, Iwanaga M, Tsushima H, Inoue Y, Takasaki Y, Tsuchiya T, Komoda M, Ando K, Horio K, Moriwaki Y, Tominaga S, Itonaga H, Nagai K, Tsukasaki K, Tsutsumi C, Sawayama Y, Yamasaki R, Ogawa D, Kawaguchi Y, Ikeda S, Yoshida S, Onimaru Y, Tawara M, Atogami S, Koida S, Joh T, Yamamura M, Matsuo Y, Soda H, Nonaka H, Jinnai I, Kuriyama K, Tomonaga M.	Long-term efficacy of imatinib in a practical setting is correlated with imatinib trough concentration that is influenced by body size: a report by the Nagasaki CML Study Group.	Int J Hematol	89(3)	319-325	2009
Sakamaki H, Ishizawa K, Taniwaki M, Fujisawa S, Morishima Y, Tobinai K, Okada M, Ando K, Usui N, Miyawaki S, Utsunomiya A, Uoshima N, Nagai T, Naoe T, Motoji T, Jinnai I, Tanimoto M, Miyazaki Y, Ohnishi K, Iida S, Okamoto S, Seriu T, Ohno R.	Phase 1/2 clinical study of dasatinib in Japanese patients with chronic myeloid leukemia or Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia.	Int J Hematol	89(3)	332-341	2009
Tojo A, Usuki K, Urabe A, Maeda Y, Kobayashi Y, Jinnai I, Ohyashiki K, Nishimura M, Kawaguchi T, Tanaka H, Miyamura K, Miyazaki Y, Hughes T, Branford S, Okamoto S, Ishikawa J, Okada M, Usui N, Tani H, Amagasaki T, Natori H, Naoe T.	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(5)	679-688	2009
Doi Y, Sasaki D, Terada C, Mori S, Tsuruda K, Matsuo E, Miyazaki Y, Nagai K, Hasegawa H, Yanagihara K, Yamada Y, Kamihira S.	High-resolution melting analysis for a reliable and two-step scanning of mutations in the tyrosine kinase domain of the chimerical bcr-abl gene.	Int J Hematol	90(1)	37-43	2009
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(2)	90-98	2009
Matsuda A, Germing U, Jinnai I, Araseki K, Kuendgen A, Strupp C, Iwanaga M, Miyazaki Y, Hata T, Bessho M, Gattermann N, Tomonaga M.	Differences in the distribution of subtypes according to the WHO classification 2008 between Japanese and German patients with Refractory Anemia according to the FAB classification in Myelodysplastic Syndromes.	Leukemia Res			2009 Dec 16. [Epub ahead of print]
Morita Y, Kanamaru A, Miyazaki Y, Imanishi D, Yagasaki F, Tanimoto M, Kuriyama K, Kobayashi T, Imoto S, Ohnishi K, Naoe T, Ohno R	Comparative analysis of remission induction therapy for high-risk MDS and AML progressed from MDS in the MDS200 study of Japan Adult Leukemia Study Group	Int J Hematol	91(1)	97-103	2010
Ohtake, S., Miyawaki, S., Kiyoi, H., Miyazaki, Y., Okumura, H., Matsuda, S., Nagai, T., Kishimoto, Y., Okada, M., Takahashi, M., Honada, H., Takeuchi, J., Kageyama, S., Asou, N., Yagasaki, N., 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 Jan7 [Epub ahead of print]
Sakamaki, H., Miyawaki, S., Ohtake, S., Yagasaki, F., Mitani, K., Matsuda, S., Kishimoto, Y., Miyazaki, Y., Asou, N., Takahashi, M., Ogawa, Y., Honda, S., Ohno, R.	Allogeneic Stem Cell Transplantation versus Chemotherapy as Post-remission Therapy for Intermediate or Poor Risk Adult Acute Myeloid Leukemia: Results of the JALSG AML97 Study	Int J Hematol			2010 Jan9. [Epub ahead of print]

## Schedule-dependent synergism and antagonism between pemetrexed and docetaxel in human lung cancer cell lines in vitro

Yasuhiko Kano · Masaru Tanaka · Miyuki Akutsu · Kiyoshi Mori · Yasuo Yazawa · Hiroyuki Mano · Yusuke Furukawa

Received: 26 August 2008 / Accepted: 27 February 2009 / Published online: 22 March 2009  
© Springer-Verlag 2009

### Abstract

**Background** Pemetrexed and docetaxel show clinical activities against a variety of solid tumors including lung cancers. To identify the optimal schedule for combination, cytotoxic interactions between pemetrexed and docetaxel were studied at various schedules using three human lung cancer cell lines A-549, Lu-99, and SBC-5 in vitro.

**Methods** Cells were incubated with pemetrexed and docetaxel simultaneously for 24 or 120 h. Cells were also incubated with pemetrexed for 24 h, followed by a 24 h exposure to docetaxel, and vice versa. Growth inhibition was determined using 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay and cell cycle

analysis. Cytotoxic interactions were evaluated by the isobologram method.

**Results** Simultaneous exposure to pemetrexed and docetaxel for 24 and 120 h produced antagonistic effects in all three cell lines. Pemetrexed (24 h) followed by docetaxel (24 h) produced additive effects in A-549 cells and synergistic effects in Lu-99 and SBC-5 cells. Docetaxel followed by pemetrexed produced additive effects in A-549 and Lu-99 cells and antagonistic effects in SBC-5 cells. The results of cell cycle analysis were fully consistent with those of isobologram analysis, and provide the molecular basis of the sequence-dependent difference in cytotoxic interactions between the two agents.

**Conclusions** Sequential administration of pemetrexed followed by docetaxel may provide the greatest anti-tumor effects for this combination in the treatment of lung cancer.

Y. Kano (✉) · M. Tanaka · M. Akutsu  
Division of Hematology,  
Tochigi Cancer Center, Yonan,  
Utsunomiya, Tochigi 320-0834, Japan  
e-mail: ykano@tcc.pref.tochigi.jp

K. Mori  
Division of Thoracic Diseases,  
Tochigi Cancer Center, Utsunomiya,  
Tochigi 320-0834, Japan

Y. Yazawa  
Division of Orthopedic Oncology,  
Tochigi Cancer Center, Utsunomiya,  
Tochigi 320-0834, Japan

H. Mano  
Division of Functional Genomics,  
Jichi Medical University,  
Tochigi 329-0431, Japan

Y. Furukawa  
Division of Stem Cell Regulation,  
Jichi Medical University,  
Tochigi 329-0431, Japan

**Keywords** Pemetrexed · Docetaxel · Isobologram · Lung cancer

### Introduction

Lung cancer is the leading cause of cancer mortality in industrialized countries, with non-small cell lung cancer (NSCLC) accounting for nearly 80% [1]. Although surgery may be curative in early-stage NSCLC, most patients present with inoperable advanced disease. These patients managed with best supportive care alone have a median survival time of only 5 months and a 1-year survival rate of approximately 10% [2]. First-line treatment for patients with advanced NSCLC includes platinum compounds combined with vinorelbine, gemcitabine, or taxanes [3]. This is associated with improved quality of life, but only moderate survival advantages when compared with best supportive