

201019041A

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

「ゲノミクス解析に基づく白血病の新規分類法開発」
に関する研究

平成22年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 間野 博行

平成23(2011)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

「ゲノミクス解析に基づく白血病の新規分類法開発」
に関する研究

平成22年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 間野 博行

平成23 (2011) 年 5月

目次

I.	総括研究報告書	
	「ゲノミクス解析に基づく白血病の新規分類法開発」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.	「ゲノミクス解析に基づく白血病の新規分類法開発」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 -----	7
2.	「Bendamustineとアルキル化剤の併用効果」に関する研究 栃木県立がんセンター 加納康彦 -----	11
3.	「正常核型急性骨髄性白血病におけるミエロペルオキシダーゼ発現と遺 伝子異常の関係」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-----	13
III.	研究成果の刊行に関する一覧表 -----	16
IV.	研究成果の刊行物・別冊 -----	21

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
「ゲノミクス解析に基づく白血病の新規分類法開発」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」を設立し既に1000例を越えるサンプル収集に成功している。またこれら臨床検体からゲノムの点突然変異、ゲノムの挿入・欠失のみならず融合遺伝子も併せ検出可能な手法としてcDNA-capture手法を開発した。これはヒト発がん関連遺伝子群のcDNAを、試料cDNAから高効率に純化した後に次世代シーケンサーで解析する手法であり、多検体をハイスループットにスクリーニングすることも可能である。本解析技術を用いて末梢性T細胞悪性リンパ腫のリンパ腫検体11例、慢性骨髄性白血病（CML）細胞株5例の計16例について配列データ取得およびその配列解析も終了した。こうして同定された様々なアミノ酸置換を伴う変異（non-synonymous mutations）について、現在その機能解析を行っているが、CML細胞株で検出された変異遺伝子に好中球分化抑制能があることが確認された。さらに白血病芽球リシークエンシングを通して、薬剤感受性に関連のあるミエロペルオキシダーゼ（MPO）発現量が、特定のゲノム配列異常とリンクしていることが明らかになった。さらに現行の化学療法剤についてその最適な投与法の検討も行われ bendamustine の抗腫瘍効果に重要な示唆が得られた。来年度以降はさらに造血器悪性腫瘍リシークエンシングを拡大遂行する予定である。

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

れたが、驚くべき事にそのうち152個はシーケンサーエラー、14個はSNPであり、しかも残った体細胞変異8種類の何れにもがん化能は存在していない事が判った。この論文の結果は、単純に現行の次世代シーケンサーを用いて解析するだけでは、効率良く発がん原因を同定することが困難であることを明示している。

我々はこれまでの第3次対がん総合戦略研究事業において、(1) 広く我が国の白血病症例からCD133陽性白血病芽球分画のみを純化保存するバンク事業を行い既に1000例に及ぶ芽球ストックを整備した（Blood 98:422）と共に、(2) 微量の臨床検体からでもマイクロRNA（miRNA）を大量にクローニングする手法を開発し（Nature Protocols 2:3136）、上記白血病芽球におけるmiRNA配列の大規模取得技術を確認した。さらに我々は、一般の方法とは異なり、エラー率の極めて低い次世代シーケンサー解析技術を新たに開発した（未発表データ）。そこで、我々が保存した上記白血病芽球バンク検体を用い、次世代シーケンサーによる超高精度大量シーケンシング解析を行うと共にmiRNAの大量プロフィールも取得し、これらの情報に基づく白血病の新規分類法を提案すると共に、新たな分子標的療法の開発を目指す。

A 研究目的

白血病は様々な遺伝子異常によって生じるヘテロな疾患群であり、PML-RARAやBCR-ABLのように具体的な発がん原因遺伝子・治療対象分子が明らかでない例はまれである。有効な分子標的療法を新たに開発するためには、それぞれの白血病サブグループの主たる発症原因遺伝子を明らかにすることが重要であり、そのためにはゲノミクス解析が有用なツールと考えられる。

近年のゲノムシーケンシング技術の急速な進歩により、今や全ゲノムシーケンシングを白血病に対して行うことも現実的になってきた。実際2008年末には白血病症例1例において、白血病芽球と正常皮膚細胞との全ゲノム配列を次世代シーケンサーを用いて決定し両者を比較するという論文が発表された（Nature 456:66）。その解析の結果、白血病芽球にのみ存在する「アミノ酸置換を伴う配列変異」が計181個同定さ

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 23 年 2 月現在で 1000 例を越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。本研究計画ではこれら Blast Bank 検体を活用するため、新たな解析手法を開発する。具体的には、次世代シーケンサーを用いて遺伝子融合、点突然変異、配列挿入・欠失の全てを検出可能な方法として、ゲノムの一部を純化するのではなく、特定の cDNA を exon capture する手法「cDNA-capture 法」の開発を行う。cDNA プールからエキソン配列を純化すれば「融合点をまたぐ cDNA 断片」も純化可能であり、適切なコンピューターアルゴリズムを開発すれば融合遺伝子も検出できると期待される。そこでヒトのタンパクコード遺伝子の中から全てのキナーゼおよび白血病関連転写因子など計 913 遺伝子を選び出し、その cDNA 配列全 3.77 Mbp を純化するカスタムビーズシステムを Agilent Technologies 社と共同で開発する。またこうして開発した cDNA-capture 法を用いて、既に我々が収集保存した様々な造血器悪性腫瘍の細胞株及び臨床検体における体細胞変異のスクリーニングを行う。同定されたアミノ酸置換を伴う変異については、その変異を有する完全長 cDNA の発現ベクターを作成し、細胞増殖・分化への影響を様々な機能アッセイ法を用いて検証する。

2) ヒトがん株化細胞として MOLT-3 と CCRF-CEM (T 細胞性白血病) および HBL-1 (マントル細胞リンパ腫)、培養液として RPMI1640 + 10%胎児ウシ血清を用いた。Bendamustine とアルキル化剤

(4-hydroperoxy-cyclophosphamide, 4-hydroperoxy-ifosfamide, bleomycin, cisplatin, melphalan, mitomycin C) を同時に加え、4 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 で分析する。

3) 正常核型 AML 患者 60 例を、初診時骨髄芽球ミエロペルオキシダーゼ (MPO) 陽性率によって MPO 高率群 (50%以上) と MPO 低率群 (50%未満) に分類した。それぞれの臨床所見

と治療反応性を調査した。また、FLT3 遺伝子、NPM1 遺伝子、CEBPA 遺伝子について初診時白血病細胞における変異を検討した。すなわち、FLT3 の internal tandem duplication (ITD)、NPM1 の exon 12 変異、CEBPA 遺伝子の変異である。いずれも白血病細胞より抽出したゲノム DNA をテンプレートとして必要な領域を PCR にて増幅、最終的には塩基配列を同定して変異を確認した。また、それぞれの変異と MPO 発現グループとの関連を調べた。

(倫理面への配慮)

検体収集に関しては自治医科大学及び長崎大学医学部歯学部生命倫理委員会認可を受けている。

C 研究結果

1) 造血器悪性腫瘍のリシーケンシング

現行の次世代シーケンサーを持ってしても患者検体ゲノムDNAの全てを高い重複度で解析するためには多くの時間を必要とする。しかしヒトゲノム中タンパクをコードするエキソン領域は僅か1.5%程に過ぎず、このエキソン領域のみを選択的に純化して次世代シーケンサーで解析するgenomic exon-capture法が近年行われるようになってきている。しかしこの手法では、重要な発がんメカニズムである「遺伝子融合」を検出する事が不可能である(遺伝子融合は多くの場合イントロン領域で生じるため、エキソン配列のみを純化すると遺伝子融合情報が失われてしまう)。

そこでがん関連遺伝子のcDNAを純化し、それを次世代シーケンサーを用いて解析するcDNA-capture法を開発した。本システムのパイロット実験としてBCR-ABL陽性慢性骨髄性白血病(CML)細胞株KCL22の解析をまず行った。KCL22由来cDNAに対してカスタムexon capture法による純化を行い、得られた純化産物について次世代シーケンサー解析を行って5.4 Gbpの塩基配列データを得た。その結果、得られたデータの約8割が標的遺伝子cDNA由来であることが確認され、cDNAを解析試料に用いても優れた純化効率を得られることが確認された。さらにこのリード配列データを解析する事で、アミノ酸置換を伴う点突然変異を143種類同定したのみでなく、BCR-ABL融合点をまたぐcDNA断片を77リード検出する事に成功し

た。なおカスタム exon capture の純化対象遺伝子に ABL は含まれているが BCR は含まれていない。しかしそれにもかかわらず BCR 領域を含む BCR-ABL 融合点 cDNA 断片が同定されたのである。すなわち、cDNA を試料とする exon capture 法は遺伝子融合を検出可能なことが実際のデータで証明されたことになる。こうして様々なゲノム配列異常を、少なくとも特定のタンパクコード遺伝子については網羅的に探索可能な解析プラットフォームが完成した。

さらに我々はこの cDNA-capture 法を使って、末梢性 T 細胞悪性リンパ腫 (PTCL) のリンパ腫検体 11 例、CML 細胞株 5 例の計 16 例について配列データ取得を終了した。本解析で計 9 億 9 千万リード、約 75 Gbp のデータを取得したが、これは各検体あたり平均 6200 万リード、4.7 Gbp の膨大なデータに相当する。こうして得られたリード配列をリファレンス配列に対して比較解析するコンピューターパイプラインを独自に開発し検討した結果、1 検体あたり平均 30.4 種類の「アミノ酸置換を伴う点突然変異

(nonsynonymous mutations)」を検出した。さらに BCR-ABL 融合 cDNA は全ての CML 細胞株で検出され、またそれ以外に様々な融合 cDNA および挿入・欠失変異を同定した。この中には既にかん検体における変異が報告されている TP53(G266R) 変異や PIK3CA(E545G) 変異などもあるが、ほとんど全ては今回の解析で新たに検出された異常であった。こうして同定されたアミノ酸変異について、それぞれの当該遺伝子の正常 cDNA 発現ベクター及び変異 cDNA 発現ベクターを作成し、これらをアッセイ細胞に導入した場合の発がんへの寄与について機能アッセイを行っている。

その中で、CML 細胞株で検出された変異遺伝子についてマウス細胞株を用いた分化誘導実験を行った。32D 細胞は IL-3 依存性に増殖するが、G-CSF 添加培地へシフトすると成熟好中球へと分化する。興味深いことに上記変異遺伝子を 32D 細胞へ導入すると G-CSF 依存性の好中球分化はブロックされた。一方、同じ遺伝子の正常 cDNA 導入は好中球分化に全く影響を与えなかったことから、我々の発見した遺伝子変異が CML の急性転化の責任分子である可能性が示唆された。

2) Bendamustine 感受性解析

Bendamustine の解析白血病細胞株に対する IC₅₀ に必要な濃度は 0.7-2.0 μM 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 G₂/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-G₁ 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。

3) MPO とゲノム変異の解析

解析対象患者 60 例はいずれも正常核型の AML で、その年齢中央値は 59.5 才、男女比は 32/28。MPO 高率群は 28 例で 32 例は低率群であった。FLT3-ITD は 11 例 (18.3%)、NPM1 遺伝子変異は 19 例 (31.7%)、CEBPA 変異は 11 例 (18.3%) に同定された。CEBPA 変異陽性例のうち、N 末端と C 末端の両方に変異を持つ例 (double mutation, DM) は 11 例中 10 例であった。FLT3-ITD 陽性例では明らかに初診時白血球増加が見られたが、NPM1 変異、CEBPA 変異は臨床所見との関連は同定されなかった。

CEBPA-DM 症例は全例、MPO 高発現群に属していた。一例の CEBPA single mutation 例は MPO 低発現群であった。FLT3-ITD、NPM1 変異、及びそれらの組み合わせによる四群はいずれも MPO 発現レベルとの関連は見られなかった。CEBPA-DM 陽性例は、強力化学療法を受けた症例 (35 例) のみで見ると他と比較して予後良好の傾向を示した (p=0.07)。

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、体細胞遺伝子変異スクリーニングを行った。またその際には、新たな高効率変異スクリーニング技術自体の開発も併せ行い、それによって多くの配列異常遺伝子を同定することに成功した。またこれらの解析を通して、白血病の薬剤感受性に関連する MPO 発現量が特定のゲノム変異にリンクすることも明らかになり、ゲノム変異が

MPO の発現量へ影響を与えている可能性も示唆された。さらに薬剤投与方法の最適化について bendamustine の検討を行った。

F. 健康危険情報
無し

G. 研究発表

I. 論文発表

間野博行

- 1) Takeuchi K, Soda M, Togashi Y, Ota Y, Sekiguchi Y, Hatano S, Asaka R, Noguchi M & Mano H. “Identification of a novel fusion, SQSTM1-ALK, in ALK-positive large B-cell lymphoma” *Haematologica*, in press.
- 2) Sasaki D, Imaizumi Y, Hasegawa H, Osaka A, Tsukasaki K, Choi YL, Mano H, Marquez V, Hayashi T, Yanagihara K, Moriwaki Y, Miyazaki Y, Kamihira S & Yamada Y. “Overexpression of enhancer of zeste homolog 2 with trimethylation of lysine 27 on histone H3 in adult T-cell leukemia/lymphoma as a target for epigenetic therapy” *Haematologica*, in press.
- 3) Iida A, Shinoe T, Baba Y, Mano H & Watanabe S. “Dicer plays essential roles for retinal development by regulation of survival and differentiation” *Invest Ophthalmol Vis Sci*, in press.
- 4) Choi YL, Soda M, Yamashita Y, Ueno T, Takashima J, Nakajima T, Yatabe Y, Takeuchi K, Hamada T, Haruta H, Ishikawa Y, Kimura H, Mitsudomi T, Tanio Y & Mano H. “EML4-ALK mutations in lung cancer that confer resistance to ALK inhibitors” *N Engl J Med* **363**: 1734-1739, 2010.
- 5) 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* **29**: 3723-3731, 2010.
- 6) Zhang MJ, Franklin S, Li Y, Wang S, Ru X, Mitchell-Jordan SA, Mano H, Stefani E, Ping P & Vondriska TM. “Stress signaling by Tec tyrosine kinase in the ischemic myocardium” *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **299**: H713-722, 2010.
- 7) 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.
- 8) Sakairi Y, Nakajima T, Yasufuku K, Ikebe D, Kageyama H, Soda M, Takeuchi K, Itami M, Iizasa T, Yoshino I, Mano H & Kimura H. “EML4-ALK Fusion Gene Assessment Using Metastatic Lymph Node Samples Obtained by Endobronchial Ultrasound-Guided Transbronchial Needle Aspiration” *Clin Cancer Res* **16**: 4938-4945, 2010.
- 9) Osoegawa A, Nosaki K, Miyamoto H, Kometani T, Hirai F, Ondo K, Seto T, Sugio K, Choi YL, Soda M, Mano H & Ichinose Y. “Incidentally proven pulmonary “ALKoma”” *Intern Med* **49**: 603-606, 2010.
- 10) Nakajima T, Kimura H, Takeuchi K, Soda M, Mano H, Yasufuku K & Iizasa T. “Treatment of Lung Cancer with an ALK Inhibitor After EML4-ALK Fusion Gene Detection Using Endobronchial Ultrasound-Guided Transbronchial Needle Aspiration” *J Thorac Oncol* **5**: 2041-2043, 2010.
- 11) Mano H & Takeuchi K. “EML4-ALK fusion in lung” *Am J Pathol* **176**: 1552-1553, 2010.
- 12) Hatanaka H, Tsukui M, Takada S, Kurashina K, Choi YL, Soda M, Yamashita Y, Haruta H, Hamada T, Ueno T, Tamada K, Hosoya Y, Sata N, Yasuda Y, Nagai H, Sugano K & Mano H. “Identification of transforming activity of free fatty acid receptor 2 by retroviral expression screening” *Cancer Sci* **101**: 54-59, 2010.
- 13) Hatanaka H, Takada S, Tsukui M, Choi YL, Kurashina K, Soda M, Yamashita Y, Haruta H, Hamada T, Tamada K, Hosoya Y, Sata N, Nagai H, Yasuda Y, Sugano K & Mano H. “Identification of the transforming activity of Indian hedgehog by retroviral expression screening” *Cancer Sci* **101**: 60-64, 2010.

加納康彦

- 1) Kikuchi J, Wada T, Shimizu R, Izumi T, Akutsu M, Mitsunaga K, Noborio-Hatano K, Nobuyoshi M, Ozawa K, Kano Y, Furukawa Y. "Histone deacetylases are critical targets of bortezomib-induced cytotoxicity in multiple myeloma" *Blood* **116**: 406-417, 2010.
- 2) Odgerel T, Kikuchi J, Wada T, Shimizu R, Kano Y, Furukawa Y. "MSK1 activation in acute myeloid leukemia cells with FLT3 mutations" *Leukemia* **24**: 11087-1090, 2010.
- 3) Shimizu R, Kikuchi J, Wada T, Ozawa K, Kano Y, Furukawa Y. "HDAC inhibitors augment cytotoxic activity of rituximab by upregulating CD20 expression on lymphoma cells" *Leukemia* **24**: 1760-1768, 2010.

宮崎泰司

- 1) 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" *Leuk Res* **34**: 974-980, 2010.
- 2) 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**: 97-103, 2010.
- 3) Sakamaki H, Miyawaki S, Ohtake S, Emi N, 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* **91**: 284-292, 2010.
- 4) Ohtake S, Miyawaki S, Kiyoi H, Miyazaki Y, Okumura H, Matsuda S, Nagai T, Kishimoto Y,

- Okada M, Takahashi M, Handa H, Takeuchi J, Kageyama S, Asou N, Yagasaki F, Maeda Y, Ohnishi K, Naoe T, Ohno R. "Randomized trial of response-oriented individualized versus fixed-schedule induction chemotherapy with idarubicin and cytarabine in adult acute myeloid leukemia: the JALSG AML95 study" *Int J Hematol* **91**: 276-283, 2010.
- 5) 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* **29**: 3723-3731, 2010.
- 6) Nagai T, Takeuchi J, Dobashi N, Kanakura Y, Taniguchi S, Ezaki K, Nakaseko C, Hiraoka A, Okada M, Miyazaki Y, Motoji T, Higashihara M, Tsukamoto N, Kiyoi H, Nakao S, Shinagawa K, Ohno R, Naoe T, Ohnishi K, Usui N. "Imatinib for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia: results of a prospective study in Japan" *Int J Hematol* **92**: 111-117, 2010.
- 7) Ohtake S, Miyawaki S, Fujita H, Kiyoi H, Shinagawa K, Usui N, Okumura H, Miyamura K, Nakaseko C, Miyazaki Y, Fujieda A, Nagai T, Yamane T, Taniwaki M, Takahashi M, Yagasaki F, Kimura Y, Asou N, Sakamaki H, Handa H, Honda S, Ohnishi K, Naoe T, Ohno R. "Randomized study of induction therapy comparing standard-dose idarubicin with high-dose daunorubicin in adult patients with previously untreated acute myeloid leukemia: JALSG AML201 Study" *Blood* 2010 Aug 6. [Epub ahead of print]
- 8) Jinnai I, Sakura T, Tsuzuki M, Maeda Y, Usui N, Kato M, Okumura H, Kyo T, Ueda Y, Kishimoto Y, Yagasaki F, Tsuboi K, Horiike S, Takeuchi J, Iwanaga M, Miyazaki Y, Miyawaki S, Ohnishi K, Naoe T, Ohno R. "Intensified consolidation therapy with dose-escalated doxorubicin did not improve the prognosis of adults with acute lymphoblastic leukemia: the JALSG-ALL97 study" *Int J Hematol* **92**: 490-502, 2010.

- 9) Takahashi N, Wakita H, Miura M, Scott SA, Nishii K, Masuko M, Sakai M, Maeda Y, Ishige K, Kashimura M, Fujikawa K, Fukazawa M, Katayama T, Monma F, Narita M, Urase F, Furukawa T, Miyazaki Y, Katayama N, Sawada K. "Correlation between imatinib pharmacokinetics and clinical response in Japanese patients with chronic-phase chronic myeloid leukemia" *Clin Pharmacol Ther* **88**: 809-813, 2010.
- 10) Mizuta S, Matsuo K, Yagasaki F, Yujiri T, Hatta Y, Kimura Y, Ueda Y, Kanamori H, Usui N, Akiyama H, Miyazaki Y, Ohtake S, Atsuta Y, Sakamaki H, Kawa K, Morishima Y, Ohnishi K, Naoe T, Ohno R. "Pre-transplant imatinib-based therapy improves the outcome of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for BCR-ABL-positive acute lymphoblastic leukemia" *Leukemia* **25**: 41-47, 2011.
- 11) Ando K, Miyazaki Y, Sawayama Y, Tominaga S, Matsuo E, Yamasaki R, Inoue Y, Iwanaga M, Imanishi D, Tsushima H, Fukushima T, Imaizumi Y, Taguchi J, Yoshida S, Hata T, Tomonaga M. "High expression of 67-kDa laminin receptor relates to the proliferation of leukemia cells and increases expression of GM-CSF receptor" *Exp Hematol* **39**: 179-186, 2011.
- 12) Kako S, Morita S, Sakamaki H, Ogawa H, Fukuda T, Takahashi S, Kanamori H, Onizuka M, Iwato K, Suzuki R, Atsuta Y, Kyo T, Sakura T, Jinnai I, Takeuchi J, Miyazaki Y, Miyawaki S, Ohnishi K, Naoe T, Kanda Y. "A decision analysis of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in adult patients with Philadelphia chromosome-negative acute lymphoblastic leukemia in first remission who have an HLA-matched sibling donor" *Leukemia* 2010 Nov 12. [Epub ahead of print]
- 13) Iwanaga M, Hsu WL, Soda M, Takasaki Y, Tawara M, Joh T, Amenomori T, Yamamura M, Yoshida Y, Koba T, Miyazaki Y, Matsuo T, Preston DL, Suyama A, Kodama K, Tomonaga M. "Risk of Myelodysplastic Syndromes in People Exposed to Ionizing Radiation: A Retrospective Cohort Study of Nagasaki Atomic Bomb Survivors" *J Clin Oncol* 2010 Dec 13. [Epub ahead of print]
- 14) Miyawaki S, Ohtake S, Fujisawa S, Kiyoi H, Shinagawa K, Usui N, Sakura T, Miyamura K, Nakaseko C, Miyazaki Y, Fujieda A, Nagai T, Yamane T, Taniwaki M, Takahashi M, Yagasaki F, Kimura Y, Asou N, Sakamaki H, Handa H, Honda S, Ohnishi K, Naoe T, Ohno R. "A randomized comparison of four courses of standard-dose multiagent chemotherapy versus three courses of high-dose cytarabine alone in post-remission therapy for acute myeloid leukemia in adults: the JALSG AML201 study" *Blood* 2010 Dec 29. [Epub ahead of print]
- 15) Hasegawa H, Yamada Y, Tsukasaki K, Mori N, Tsuruda K, Sasaki D, Usui T, Osaka A, Atogami S, Ishikawa C, Machijima Y, Sawada S, Hayashi T, Miyazaki Y, Kamihira S. "LBH589, a deacetylase inhibitor, induces apoptosis in adult T-cell leukemia/lymphoma cells via activation of a novel RAIDD-caspase-2 pathway" *Leukemia* 2011 Jan 18. [Epub ahead of print]
- 16) Sasaki D, Imaizumi Y, Hasegawa H, Osaka A, Tsukasaki K, Choi YL, Mano H, Marquez V, Hayashi T, Yanagihara K, Moriwaki Y, Miyazaki Y, Kamihira S, Yamada Y. "Overexpression of enhancer of zeste homolog 2 with trimethylation of lysine 27 on histone H3 in adult T-cell leukemia/lymphoma as a target for epigenetic therapy" *Haematologica* 2011 Jan 12. [Epub ahead of print]
- H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）
分担研究報告書
「ゲノミクス解析に基づく白血病の新規分類法開発」に関する研究

分担研究者： 間野 博行 自治医科大学医学部 教授

研究要旨：我々は広く白血病患者骨髄より造血幹細胞相当分画のみを純化し保存する「Blast Bank」を設立し既に1000例を越えるサンプル収集に成功している。またこれら臨床検体からゲノムの点突然変異、ゲノムの挿入・欠失のみならず融合遺伝子も併せ検出可能な手法としてcDNA-capture手法を開発した。これはヒト発がん関連遺伝子群のcDNAを、試料cDNAから高効率に純化した後に次世代シーケンサーで解析する手法であり、多検体をハイスループットにスクリーニングすることも可能である。実際慢性骨髄性白血病細胞株のパイロット解析から、BCR-ABL融合遺伝子が検出可能なことが確認された。我々はさらに末梢性T細胞悪性リンパ腫のリンパ腫検体11例、CML細胞株5例の計16例について配列データ取得およびその配列解析も終了した。こうして同定された様々なアミノ酸置換を伴う変異（non-synonymous mutations）について、現在その機能解析を行っているが、CML細胞株で検出された変異遺伝子に好中球分化抑制能があることが確認された。以上より我々の発見した遺伝子変異がCMLの急性転化の責任分子である可能性が示唆された。

A 研究目的

白血病は様々な遺伝子異常によって生じるヘテロな疾患群であり、PML-RARAやBCR-ABLのように具体的な発がん原因遺伝子・治療対象分子が明らかな例はまれである。有効な分子標的療法を新たに開発するためには、それぞれの白血病サブグループの主たる発症原因遺伝子を明らかにすることが重要であり、そのためにはゲノミクス解析が有用なツールと考えられる。

我々はこれまでの第3次対がん総合戦略研究事業において、(1) 広く我が国の白血病症例からCD133陽性白血病芽球分画のみを純化保存するバンク事業を行い既に1000例に及ぶ芽球ストックを整備した（*Blood* 98:422）と共に、(2) 微量の臨床検体からでもマイクロRNA（miRNA）を大量にクローニングする手法を開発し（*Nature Protocols* 2:3136）、上記白血病芽球におけるmiRNA配列の大規模取得技術を確立した。さらに我々は、一般の方法とは異なり、エラー率の極めて低い次世代シーケンサー解析技術を新たに開発した（未発表データ）。そこで、我々が保存した上記白血病芽球バンク検体を用い、次世代シーケンサーによる超高精度大量シーケンス解析を行うと共にmiRNAの大量プロファイルも取得し、これらの情報に基づく白血病の新規分類法を提案すると共に、新たな分子標的療法の開発を目指す。

B 研究方法

次世代シーケンサーを用いて遺伝子融合、点突然変異、配列挿入・欠失の全てを検出可能な方法として、ゲノムの一部を純化するのではなく、特定のcDNAをexon captureする手法「cDNA-capture法」の開発を行う。cDNAプールからエキソン配列を純化すれば「融合点をまたぐcDNA断片」も純化可能であり、適切なコンピューターアルゴリズムを開発すれば融合遺伝子も検出できると期待される。そこでヒトのタンパクコード遺伝子の中から全てのタンパクリン酸化酵素および白血病関連転写因子など計913遺伝子を選び出し、そのcDNA配列全3.77 Mbpを純化するカスタムビーズシステムをAgilent Technologies社と共同で開発する。

またこうして開発したcDNA-capture法を用いて、既に我々が収集保存した様々な造血器悪性腫瘍の細胞株及び臨床検体における体細胞変異のスクリーニングを行う。同定されたアミノ酸置換を伴う変異については、その変異を有する完全長cDNAの発現ベクターを作成し、細胞増殖・分化への影響を様々な機能アッセイ法を用いて検証する。

（倫理面への配慮）

本研究計画は「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に準拠した自治医科大学生命倫理委員会の認可を受けている。またサンプル採取に際しては研究計画説明書を患者さんに渡して担当医が説明すると共に、試料提供の同意書に署名をいただいている。

C 研究結果

1) 次世代シーケンサーを用いたcDNA-capture法の開発

現行の次世代シーケンサーを持ってしても患者検体ゲノムDNAの全てを高い重複度で解析するためには多くの時間を必要とする。しかし我々のゲノム中タンパクをコードするエクソン領域は僅か1.5%程に過ぎず、このエクソン領域のみを選択的に純化して次世代シーケンサーで解析するgenomic exon-capture法が近年行われるようになってきている。しかしこの手法では、重要な発がんメカニズムである「遺伝子融合」を検出する事が不可能である（遺伝子融合は多くの場合イントロン領域で生じるため、エクソン配列のみを純化すると遺伝子融合情報が失われてしまう）。

そこでがん関連遺伝子のcDNAを純化し、それを次世代シーケンサーを用いて解析するcDNA-capture法を開発した。本システムのパイロット実験としてBCR-ABL陽性慢性骨髄性白血病（CML）細胞株KCL22の解析をまず行った。KCL22由来cDNAに対してカスタムexon capture法による純化を行い、得られた純化産物について次世代シーケンサー解析を行って5.4 Gbpの塩基配列データを得た。その結果、得られたデータの約8割が標的遺伝子cDNA由来であることが確認され、cDNAを解析試料に用いても優れた純化効率を得られることが確認された。さらにこのリード配列データを解析する事で、アミノ酸置換を伴う点突然変異を143種類同定したのみでなく、BCR-ABL融合点をまたぐcDNA断片を77リード検出する事に成功した。なおカスタムexon captureの純化対象遺伝子にABLは含まれているがBCRは含まれていない。しかしそれにもかかわらずBCR領域を含むBCR-ABL融合点cDNA断片が同定されたのである。すなわち、cDNAを試料とするexon capture法は遺伝子融合を検出可能なことが実際のデータで証明されたことになる。こうして様々なゲノム配列異常を、少なくとも特定のタンパクコード遺伝子については網羅的に探索可能な解析プラットフォームが完成した。

2) 実際の臨床検体・細胞株解析

我々はこのcDNA-capture法を使ってさらに、末梢性T細胞悪性リンパ腫のリンパ腫検

体11例、CML細胞株5例の計16例について配列データ取得を終了した。本解析で計9億9千万リード、約75 Gbpのデータを取得したが、これは各検体あたり平均6200万リード、4.7 Gbpの膨大なデータに相当する。こうして得られたリード配列をリファレンス配列に対して比較解析するコンピューターパイプラインを独自に開発し検討した結果、1検体あたり平均30.4種類の「アミノ酸置換を伴う点突然変異

(nonsynonymous mutations)」を検出した。さらにBCR-ABL融合cDNAは全てのCML細胞株で検出され、またそれ以外に様々な融合cDNAおよび挿入・欠失変異を同定した。この中には既にかん検体における変異が報告されているTP53(G266R)変異やPIK3CA(E545G)変異などもあるが、ほとんど全ては今回の解析で新たに検出された異常であった。こうして同定されたアミノ酸変異について、それぞれの当該遺伝子の正常cDNA発現ベクター及び変異cDNA発現ベクターを作成し、これらをアッセイ細胞に導入した場合の発がんへの寄与について機能アッセイを行っている。

その中で、CML細胞株で検出された変異遺伝子についてマウス細胞株を用いた分化誘導実験を行った。32D細胞はIL-3依存性に増殖するが、G-CSF添加培地へシフトすると成熟好中球へと分化する。興味深いことに上記変異遺伝子を32D細胞へ導入するとG-CSF依存性の好中球分化はブロックされた。一方、同じ遺伝子の正常cDNA導入は好中球分化に全く影響を与えなかったことから、我々の発見した遺伝子変異がCMLの急性転化の責任分子である可能性が示唆された。

D&E. 考察及び結論

我々が発見したCMLにおける遺伝子変異は、CMLにおける分化抑制遺伝子として世界初のものであり、長きにわたって謎であったCMLの急性転化の分子メカニズムにヒントを与えるものである。今後は、当該遺伝子変異の有無を、我々が既に収集保存してある白血病芽球バンク「Blast Bank」検体において広くスクリーニングすると共に、更なる詳細な分子生物学的解析を行う予定である。

また上記遺伝子変異の同定は、我々のアプローチが「配列解析の面からがんの本質に迫

る」上で真に有効である事を示唆している。平成23年度以降は本プロジェクトをさらに拡充し、CML/PTCL内の変異の機能異常をさらに解析すると共に、解析対象疾患を他のAML/MDS等に広げ新たな発がん寄与分子の同定を試みる。

F. 健康危険情報

無し

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Takeuchi K, Soda M, Togashi Y, Ota Y, Sekiguchi Y, Hatano S, Asaka R, Noguchi M & Mano H. "Identification of a novel fusion, SQSTM1-ALK, in ALK-positive large B-cell lymphoma" *Haematologica*, in press.
- 2) Sasaki D, Imaizumi Y, Hasegawa H, Osaka A, Tsukasaki K, Choi YL, Mano H, Marquez V, Hayashi T, Yanagihara K, Moriwaki Y, Miyazaki Y, Kamihira S & Yamada Y. "Overexpression of enhancer of zeste homolog 2 with trimethylation of lysine 27 on histone H3 in adult T-cell leukemia/lymphoma as a target for epigenetic therapy" *Haematologica*, in press.
- 3) Iida A, Shinoe T, Baba Y, Mano H & Watanabe S. "Dicer plays essential roles for retinal development by regulation of survival and differentiation" *Invest Ophthalmol Vis Sci*, in press.
- 4) Choi YL, Soda M, Yamashita Y, Ueno T, Takashima J, Nakajima T, Yatabe Y, Takeuchi K, Hamada T, Haruta H, Ishikawa Y, Kimura H, Mitsudomi T, Tanio Y & Mano H. "EML4-ALK mutations in lung cancer that confer resistance to ALK inhibitors" *N Engl J Med* **363**: 1734-1739, 2010.
- 5) 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* **29**: 3723-3731, 2010.
- 6) Zhang MJ, Franklin S, Li Y, Wang S, Ru X, Mitchell-Jordan SA, Mano H, Stefani E, Ping P & Vondriska TM. "Stress signaling by Tec tyrosine kinase in the ischemic myocardium" *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **299**: H713-722, 2010.
- 7) 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.
- 8) Sakairi Y, Nakajima T, Yasufuku K, Ikebe D, Kageyama H, Soda M, Takeuchi K, Itami M, Iizasa T, Yoshino I, Mano H & Kimura H. "EML4-ALK Fusion Gene Assessment Using Metastatic Lymph Node Samples Obtained by Endobronchial Ultrasound-Guided Transbronchial Needle Aspiration" *Clin Cancer Res* **16**: 4938-4945, 2010.
- 9) Osoegawa A, Nosaki K, Miyamoto H, Kometani T, Hirai F, Ondo K, Seto T, Sugio K, Choi YL, Soda M, Mano H & Ichinose Y. "Incidentally proven pulmonary "ALKoma"" *Intern Med* **49**: 603-606, 2010.
- 10) Nakajima T, Kimura H, Takeuchi K, Soda M, Mano H, Yasufuku K & Iizasa T. "Treatment of Lung Cancer with an ALK Inhibitor After EML4-ALK Fusion Gene Detection Using Endobronchial Ultrasound-Guided Transbronchial Needle Aspiration" *J Thorac Oncol* **5**: 2041-2043, 2010.
- 11) Mano H & Takeuchi K. "EML4-ALK fusion in lung" *Am J Pathol* **176**: 1552-1553, 2010.
- 12) Hatanaka H, Tsukui M, Takada S, Kurashina K, Choi YL, Soda M, Yamashita Y, Haruta H, Hamada T, Ueno T, Tamada K, Hosoya Y, Sata N, Yasuda Y, Nagai H, Sugano K & Mano H. "Identification of transforming activity of free fatty acid receptor 2 by retroviral expression screening" *Cancer Sci* **101**: 54-59, 2010.
- 13) Hatanaka H, Takada S, Tsukui M, Choi YL, Kurashina K, Soda M, Yamashita Y, Haruta H, Hamada T, Tamada K, Hosoya Y, Sata N, Nagai H, Yasuda Y, Sugano K & Mano H. "Identification of the transforming activity of

Indian hedgehog by retroviral expression
screening” *Cancer Sci* **101**: 60-64, 2010.

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）
分担研究報告書

「Bendamustine とアルキル化剤の併用効果」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 はアルキル化剤と抗プリン剤が結合した構造をもつユニークな抗がん剤だが、作用機序は不明な点が多く、従来の多くのアルキル化剤と殆ど交叉耐性を示さない。欧米の最近の臨床試験で種々の血液がんに対し従来の抗がん剤と同等ないしそれ以上の効果が認められて注目されている。本邦では昨年末、治療抵抗性低悪性度非ホジキンリンパ腫、マンツル細胞リンパ腫に対し承認され、現在、種々の血液がんが臨床試験がおこなわれている。さらに臨床における併用療法が検討されているが、その基礎研究は殆どおこなわれていない。私たちは bendamustine と他のアルキル化剤の併用効果を検討した。ヒトリンパ系白血病、リンパ腫株化細胞として MOLT-3、CCRF-CEM、HBL-1 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日間培養し、細胞増殖の阻害を MTT assay で測定、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 4-hydroperoxy-cyclophosphamide, 4-hydroperoxy-ifosfamide, bleomycin, cisplatin, melphalan, mitomycin C と相乗作用を示した。以上の結果より bendamustine の強い抗腫瘍効果はアルキル化剤の作用を増強する autosynergism によるものかもしれない。

A 研究目的

Bendamustineは1960年代に東ドイツで開発された抗がん剤で、同国でのみ血液がんや肺がん、乳がん等の固形がんで使用されていた。近年、bendamustineの再評価が欧米でおこなわれ、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強い臨床効果を有することが証明された。本邦でも昨年末、治療抵抗性低悪性度非ホジキンリンパ腫、マンツル細胞リンパ腫に対し承認され、現在、種々の血液がんが臨床試験がおこなわれている。さらに最近のドイツからの報告で未治療の低悪性度非ホジキンリンパ腫やマンツル細胞リンパ腫に対し、これらの疾患に対する標準的治療であるR-CHOP療法（リツキササン+エンドキササン+アドリアシン+オンコピン+プレドニン）と比較してR-bendamustineがより有効で、副作用が少ないことが報告され、これらの疾患に対する標準治療としての可能性が示唆された。昨年、私達はヒト血液がん株化細胞を用いて bendamustineと他の抗がん剤の併用効果を検討したが、cytarabine、gemcitabine及び 4-hydroperoxy cyclophosphamide (cyclophosphamideのactive metabolite)と相乗作用があることを見いだした。Bendamustineの作用機序は不明な点が多いが、アルキル化剤と代謝拮抗薬として機能を持ち、他のアルキル化剤とは殆ど交叉耐性がないことが知られている。今回、

私たちはヒトリンパ系腫瘍株化細胞を用いて、強力な抗腫瘍効果の作用機序の要因を探るべく、bendamustineと種々のアルキル化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 MOLT-3 と CCRF-CEM (T細胞性白血病) および HBL-1 (マンツル細胞リンパ腫)、培養液として RPMI1640 + 10%胎児ウシ血清を用いた。Bendamustine とアルキル化剤 (4-hydroperoxy-cyclophosphamide, 4-hydroperoxy-ifosfamide, bleomycin, cisplatin, melphalan, mitomycin C) を同時に加え、4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 で分析した。
(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 10-20 μ M であった。Bendamustine はアルキル化剤に属する 4-hydroperoxy-cyclophosphamide (cyclophosphamide の活性物質)

4-hydroperoxy-ifosfamide (ifosfamide の活性物質), bleomycin, cisplatin, melphalan, mitomycin C のいずれの抗がん剤を用いても 3 つの株化細胞中 2 株化細胞で相乗作用、1 つの細胞で相加効果が認められた。Bendamustine と単剤では後期 S から G₂/M 期、4-hydroperoxy-cyclophosphamide 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-G₁ 画が増加した。

D&E 考察及び結論

Bendamustine とアルキル化剤の併用効果を知る目的で、3 種のヒトリンパ系腫瘍株化細胞を用いて検討した。今回の研究で bendamustine はいずれのアルキル化剤を用いても 2 種類の細胞で相乗効果を示した。抗がん剤の dose-response curve は多彩で、これをどのように分析するか、多くの研究者で意見がわかれており、一致して推薦する方法はない。私達は従来より Isobologram (Steel & Peckham)を用いているが、これはどのような dose-response curve にも対応できる利点があるが、相乗作用や拮抗作用に対し、評価が厳しい面がある。以上より bendamustine はアルキル化剤と相乗効果を示すと考えられる。

一方、以前の研究で bendamustine とプリン誘導体は相加効果を示したため、bendamustine の強い抗腫瘍効果は bendamustine の構造の中にアルキル化剤の作用を増強する薬剤 (構造) が含まれているためと考えられる。この点についての作用機序の詳細な分析が今後の課題である。

F 健康危険情報

なし

G 研究発表

1. Kikuchi J, Wada T, Shimizu R, Izumi T, Akutsu M, Mitsunaga K, Noborio-Hatano K, Nobuyoshi M, Ozawa K, Kano Y, Furukawa Y. Histone deacetylases are critical targets of bortezomib-induced cytotoxicity in multiple myeloma. *Blood*. **116**: 406-417, 2010.
2. Odgerel T, Kikuchi J, Wada T, Shimizu R, Kano Y, Furukawa Y. MSK1 activation in acute myeloid leukemia cells with FLT3 mutations. *Leukemia*. **24**: 11087-1090, 2010.
3. Shimizu R, Kikuchi J, Wada T, Ozawa K, Kano Y, Furukawa Y. HDAC inhibitors augment cytotoxic activity of rituximab by upregulating CD20 expression on lymphoma cells. *Leukemia*. **24**: 1760-1768, 2010.

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

「正常核型急性骨髄性白血病におけるミエロペルオキシダーゼ発現と遺伝子異常の
関係」に関する研究

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：急性骨髄性白血病（AML）における芽球ミエロペルオキシダーゼ（MPO）発現は予後と相関し、高発現例は良好な化学療法感受性を示す。その機構の一部は化学療法剤が MPO による活性酸素産生を強めることで白血病細胞そのものを傷害するためと考えられている。一方で近年、正常核型 AML で種々の遺伝子異常と予後との関連が明らかとなってきた。本研究では、正常核型 AML における MPO 発現と遺伝子異常の関連を調べた。その結果、MPO 高発現例には CEBPA 遺伝子の double mutation が全例含まれていた。CEBPA double mutation は化学療法高感受性と関連することが知られており、MPO 高発現例の化学療法高感受性の一部は、この遺伝子異常を含むためと考えられた。

A 研究目的

急性骨髄性白血病（AML）の発症には、未分化造血細胞に生じた遺伝子異常が大きな役割を果たすと考えられており、特徴的な遺伝子異常は AML の生物学的特性と強く相関する。AML に繰り返し見られる転座型染色体異常はその典型的な一例である。染色体核型は AML の予後予測において最もインパクトの大きな因子であるが、全体の 45% を占める正常核型例に対しては、染色体検査レベルでは同定できない遺伝子異常によって予後予測ができることが明らかとなりつつある。

一方、我々は、白血病芽球のミエロペルオキシダーゼ（MPO）発現が予後と関連すること、MPO 高発現例の化学療法高感受性には化学療法剤による MPO を通じての活性酸素産生が関与していることを示してきた。

今回の検討では、正常核型 AML を対象として白血病芽球における MPO 発現と種々の遺伝子異常との関連をしらべ、AML における MPO 発現の生物学的な意義を検討した。

B 研究方法

正常核型 AML 患者 60 例を、初診時骨髄芽球 MPO 陽性率によって MPO 高率群（50%以上）と MPO 低率群（50%未満）に分類した。それぞれの臨床所見と治療反応性を調査した。また、FLT3 遺伝子、NPM1 遺伝子、CEBPA 遺伝子について初診時白血病細胞における変異を検討した。すなわち、FLT3 の internal tandem duplication (ITD)、NPM1 の exon 12 変異、CEBPA 遺伝子の変異である。いずれも白血病細胞より抽出したゲノム DNA をテンプレートとして必要な領域を PCR にて増幅、最終的には塩基

配列を同定して変異を確認した。また、それぞれの変異と MPO 発現グループとの関連を調べた。（倫理面への配慮）

検体を用いた検討に関しては長崎大学および研究参加施設の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) 臨床的特徴

対象患者60例はいずれも正常核型のAMLで、その年齢中央値は59.5才、男女比は32/28。MPO 高率群は28例で32例は低率群であった。

2) 遺伝子変異の割合と臨床的特徴との関連

FLT3-ITDは11例（18.3%）、NPM1遺伝子変異は19例（31.7%）、CEBPA変異は11例（18.3%）に同定された。CEBPA変異陽性例のうち、N末端とC末端の両方に変異を持つ例（double mutation, DM）は11例中10例であった。FLT3-ITD陽性例では明らかに初診時白血球増加が見られたが、NPM1変異、CEBPA変異は臨床所見との関連は同定されなかった。

3) MPO発現と遺伝子異常の関連

CEBPA-DM症例は全例、MPO高発現群に属していた。一例のCEBPA single mutation例はMPO低発現群であった。FLT-ITD、NPM1変異、及びそれらの組み合わせによる四群はいずれもMPO発現レベルとの関連は見られなかった。CEBPA-DM陽性例は、強力化学療法を受けた症例（35例）のみで見ると他と比較して予後良好の傾向を示した（ $p=0.07$ ）。

D&E. 考察及び結論

本研究によって、MPO 高発現症例の中に CEBPA-DM 症例が含まれることが明らかとなっ

た。全く独立に正常核型 AML の予後良好因子として同定されていた MPO 高発現と CEBPA-DM とが結びついたことになる。MPO の酵素活性そのものがそれを発現する白血病細胞の化学療法感受性を高めるという結果とともに、こうした遺伝子異常との関連は今後 AML 治療を考える上で重要となる。

これまでの研究で示されている MPO 高発現と遺伝子異常は、染色体転座 t(8;21), inv(16)、つまり RUNX1-RUNX1T1, CBFB-MYH11 融合遺伝子である。こうした融合遺伝子の形成によって RUNX1, CBFB は機能異常を来すことが知られている。大変興味深いことに、今回の研究で明らかとなった CEBPA を合わせて RUNX1, CBFB はいずれも正常造血細胞の成熟過程において MPO プロモーターの転写活性化に働く因子である。転写を活性化する因子が機能不全を来すような変異を持った場合に何故その標的である MPO が高発現するのか、その機構は全く不明である。

今後 AML の化学療法感受性とそうした症例の特性とを考えていく上で、MPO 遺伝子発現の制御機構とともに、MPO 発現と更なる遺伝子異常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) 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" *Leuk Res* 34: 974-980, 2010.
- 2) 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: 97-103, 2010.
- 3) Sakamaki H, Miyawaki S, Ohtake S, Emi N, 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* 91: 284-292, 2010.
- 4) Ohtake S, Miyawaki S, Kiyoi H, Miyazaki Y, Okumura H, Matsuda S, Nagai T, Kishimoto Y, Okada M, Takahashi M, Handa H, Takeuchi J, Kageyama S, Asou N, Yagasaki F, Maeda Y, Ohnishi K, Naoe T, Ohno R. "Randomized trial of response-oriented individualized versus fixed-schedule induction chemotherapy with idarubicin and cytarabine in adult acute myeloid leukemia: the JALSG AML95 study" *Int J Hematol* 91: 276-283, 2010.
- 5) 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* 29: 3723-3731, 2010.
- 6) Nagai T, Takeuchi J, Dobashi N, Kanakura Y, Taniguchi S, Ezaki K, Nakaseko C, Hiraoka A, Okada M, Miyazaki Y, Motoji T, Higashihara M, Tsukamoto N, Kiyoi H, Nakao S, Shinagawa K, Ohno R, Naoe T, Ohnishi K, Usui N. "Imatinib for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia: results of a prospective study in Japan" *Int J Hematol* 92: 111-117, 2010.
- 7) Ohtake S, Miyawaki S, Fujita H, Kiyoi H, Shinagawa K, Usui N, Okumura H, Miyamura K, Nakaseko C, Miyazaki Y, Fujieda A, Nagai T, Yamane T, Taniwaki M, Takahashi M, Yagasaki F, Kimura Y, Asou N, Sakamaki H, Handa H, Honda S, Ohnishi K, Naoe T, Ohno R. "Randomized study of induction therapy comparing standard-dose idarubicin with high-dose daunorubicin in adult patients with previously untreated acute myeloid leukemia: JALSG AML201 Study" *Blood* 2010 Aug 6. [Epub ahead of print]
- 8) Jinnai I, Sakura T, Tsuzuki M, Maeda Y, Usui N, Kato M, Okumura H, Kyo T, Ueda Y, Kishimoto Y, Yagasaki F, Tsuboi K, Horiike S, Takeuchi J,

- Iwanaga M, Miyazaki Y, Miyawaki S, Ohnishi K, Naoe T, Ohno R. “Intensified consolidation therapy with dose-escalated doxorubicin did not improve the prognosis of adults with acute lymphoblastic leukemia: the JALSG-ALL97 study” *Int J Hematol* 92: 490-502, 2010.
- 9) Takahashi N, Wakita H, Miura M, Scott SA, Nishii K, Masuko M, Sakai M, Maeda Y, Ishige K, Kashimura M, Fujikawa K, Fukazawa M, Katayama T, Monma F, Narita M, Urase F, Furukawa T, Miyazaki Y, Katayama N, Sawada K. “Correlation between imatinib pharmacokinetics and clinical response in Japanese patients with chronic-phase chronic myeloid leukemia” *Clin Pharmacol Ther* 88: 809-813, 2010.
- 10) Mizuta S, Matsuo K, Yagasaki F, Yujiri T, Hatta Y, Kimura Y, Ueda Y, Kanamori H, Usui N, Akiyama H, Miyazaki Y, Ohtake S, Atsuta Y, Sakamaki H, Kawa K, Morishima Y, Ohnishi K, Naoe T, Ohno R. “Pre-transplant imatinib-based therapy improves the outcome of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for BCR-ABL-positive acute lymphoblastic leukemia” *Leukemia* 25: 41-47, 2011.
- 11) Ando K, Miyazaki Y, Sawayama Y, Tominaga S, Matsuo E, Yamasaki R, Inoue Y, Iwanaga M, Imanishi D, Tsushima H, Fukushima T, Imaizumi Y, Taguchi J, Yoshida S, Hata T, Tomonaga M. “High expression of 67-kDa laminin receptor relates to the proliferation of leukemia cells and increases expression of GM-CSF receptor” *Exp Hematol* 39: 179-186, 2011.
- 12) Kako S, Morita S, Sakamaki H, Ogawa H, Fukuda T, Takahashi S, Kanamori H, Onizuka M, Iwato K, Suzuki R, Atsuta Y, Kyo T, Sakura T, Jinnai I, Takeuchi J, Miyazaki Y, Miyawaki S, Ohnishi K, Naoe T, Kanda Y. “A decision analysis of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in adult patients with Philadelphia chromosome-negative acute lymphoblastic leukemia in first remission who have an HLA-matched sibling donor” *Leukemia* 2010 Nov 12. [Epub ahead of print]
- 13) Iwanaga M, Hsu WL, Soda M, Takasaki Y, Tawara M, Joh T, Amenomori T, Yamamura M, Yoshida Y, Koba T, Miyazaki Y, Matsuo T, Preston DL, Suyama A, Kodama K, Tomonaga M. “Risk of Myelodysplastic Syndromes in People Exposed to Ionizing Radiation: A Retrospective Cohort Study of Nagasaki Atomic Bomb Survivors” *J Clin Oncol* 2010 Dec 13. [Epub ahead of print]
- 14) Miyawaki S, Ohtake S, Fujisawa S, Kiyoi H, Shinagawa K, Usui N, Sakura T, Miyamura K, Nakaseko C, Miyazaki Y, Fujieda A, Nagai T, Yamane T, Taniwaki M, Takahashi M, Yagasaki F, Kimura Y, Asou N, Sakamaki H, Handa H, Honda S, Ohnishi K, Naoe T, Ohno R. “A randomized comparison of four courses of standard-dose multiagent chemotherapy versus three courses of high-dose cytarabine alone in post-remission therapy for acute myeloid leukemia in adults: the JALSG AML201 study” *Blood* 2010 Dec 29. [Epub ahead of print]
- 15) Hasegawa H, Yamada Y, Tsukasaki K, Mori N, Tsuruda K, Sasaki D, Usui T, Osaka A, Atogami S, Ishikawa C, Machijima Y, Sawada S, Hayashi T, Miyazaki Y, Kamihira S. “LBH589, a deacetylase inhibitor, induces apoptosis in adult T-cell leukemia/lymphoma cells via activation of a novel RAIDD-caspase-2 pathway” *Leukemia* 2011 Jan 18. [Epub ahead of print]
- 16) Sasaki D, Imaizumi Y, Hasegawa H, Osaka A, Tsukasaki K, Choi YL, Mano H, Marquez V, Hayashi T, Yanagihara K, Moriwaki Y, Miyazaki Y, Kamihira S, Yamada Y. “Overexpression of enhancer of zeste homolog 2 with trimethylation of lysine 27 on histone H3 in adult T-cell leukemia/lymphoma as a target for epigenetic therapy” *Haematologica* 2011 Jan 12. [Epub ahead of print]
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得
なし
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他
なし

自治医科大学 間野博行 業績リスト

発表者名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Sasaki D, Imaizumi Y, Hasegawa H, Osaka A, Tsukasaki K, Choi YL, Mano H, Marquez V, Hayashi T, Yanagihara K, Moriwaki Y, Miyazaki Y, Kamihira S & Yamada Y.	Overexpression of enhancer of zeste homolog 2 with trimethylation of lysine 27 on histone H3 in adult T-cell leukemia/lymphoma as a target for epigenetic therapy	Haematologica	in press		2011
Iida A, Shinoe T, Baba Y, Mano H & Watanabe S.	Dicer plays essential roles for retinal development by regulation of survival and differentiation	Invest Ophthalmol Vis Sci	in press		2011
Takeuchi K, Soda M, Togashi Y, Ota Y, Sekiguchi Y, Hatano S, Asaka R, Noguchi M & Mano H.	Identification of a novel fusion, SQSTM1-ALK, in ALK-positive large B-cell lymphoma	Haematologica	in press		2010
Choi YL, Soda M, Yamashita Y, Ueno T, Takashima J, Nakajima T, Yatabe Y, Takeuchi K, Hamada T, Haruta H, Ishikawa Y, Kimura H, Mitsudomi T, Tanio Y & Mano H.	EML4-ALK mutations in lung cancer that confer resistance to ALK inhibitors	N Engl J Med	363	1734-1739	2010
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	29	3723-3731	2010
Zhang MJ, Franklin S, Li Y, Wang S, Ru X, Mitchell-Jordan SA, Mano H, Stefani E, Ping P & Vondriska TM.	Stress signaling by Tec tyrosine kinase in the ischemic myocardium	Am J Physiol Heart Circ Physiol	299	713-722	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
Sakairi Y, Nakajima T, Yasufuku K, Ikebe D, Kageyama H, Soda M, Takeuchi K, Itami M, Iizasa T, Yoshino I, Mano H & Kimura H.	EML4-ALK Fusion Gene Assessment Using Metastatic Lymph Node Samples Obtained by Endobronchial Ultrasound-Guided Transbronchial Needle Aspiration	Clin Cancer Res	16	4938-4945	2010
Osoegawa A, Nosaki K, Miyamoto H, Kometani T, Hirai F, Ondo K, Seto T, Sugio K, Choi YL, Soda M, Mano H & Ichinose Y.	Incidentally proven pulmonary "ALKoma"	Intern Med	49	603-606	2010
Nakajima T, Kimura H, Takeuchi K, Soda M, Mano H, Yasufuku K & Iizasa T.	Treatment of Lung Cancer with an ALK Inhibitor After EML4-ALK Fusion Gene Detection Using Endobronchial Ultrasound-Guided Transbronchial Needle Aspiration	J Thorac Oncol	5	2041-2043	2010
Mano H & Takeuchi K.	EML4-ALK fusion in lung	Am J Pathol	176	1552-1553	2010
Hatanaka H, Tsukui M, Takada S, Kurashina K, Choi YL, Soda M, Yamashita Y, Haruta H, Hamada T, Ueno T, Tamada K, Hosoya Y, Sata N, Yasuda Y, Nagai H, Sugano K & Mano H.	Identification of transforming activity of free fatty acid receptor 2 by retroviral expression screening	Cancer Sci	101	54-59	2010

Hatanaka H, Takada S, Tsukui M, Choi YL, Kurashina K, Soda M, Yamashita Y, Haruta H, Hamada T, Tamada K, Hosoya Y, Sata N, Nagai H, Yasuda Y, Sugano K & Mano H.	Identification of the transforming activity of Indian hedgehog by retroviral expression screening	Cancer Sci	101	60-64	2010
--	---	------------	-----	-------	------