

201118039A

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23年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 間野 博行

平成24(2012)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23年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 間野 博行

平成24(2012)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. 「次世代シーケンサーによる造血器悪性腫瘍大規模リシーケンス」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. 「抗がん剤併用におけるの至適投与法」に関する研究
栃木県立がんセンター 加納康彦 ----- 11
3. 「急性骨髄性白血病における NPM1 蛋白質と ELF4 蛋白質の相互作用」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 ----- 17

IV. 研究成果の刊行物・別冊 ----- 21

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髓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一度の次世代シーケンサー解析でゲノムの点突然変異、挿入・欠失のみならず融合遺伝子も同時に検出可能な手法として cDNA キャプチャー法を開発した。これを用いて慢性骨髄性白血病細胞株から実際に BCR-ABL1 融合 cDNA を同定可能なことを確認すると共に、様々な点突然変異および挿入・欠失を検出することにも成功した。さらに既に収集した末梢性 T 細胞悪性リンパ腫の腫大リンパ節を上記手法で解析し、セリンスレオニンキナーゼ A の新たな非同義変異を発見した。本変異を有するキナーゼ A は細胞内 NF- κ B を活性化し、T 細胞のデキサメサゾンによる細胞死誘導を抑制する事がわかった。したがって同変異は T 細胞の悪性化に寄与する遺伝子異常であると考えられた。また白血病に対する様々な抗がん剤の相互作用を検証する目的で IC₅₀ における併用効果を isobologram で分析した。さらに NPM1 と ELF4 が細胞内で会合することを確認し、AML に高頻度に見られる NPM1 の変異は、ELF4 の転写能に変化を与えることで白血病細胞のアポトーシスや増殖機構に影響を与えていることを示した。

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

れたが、驚くべき事にそのうち 152 個はシーケンサー、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)。

そこで本研究計画では、次世代シーケンサーを用いて上記検体バンクを大規模にリシーケンスし、配列異常の面から造血器腫瘍の新たな分子診断マーカーおよび発症原因異常の探索を目指すとともに、白血病に存在する遺伝子異常がどのようなメカニズムで造血陽性を獲得するかを検討し、併せて、こららゲノムタイプに基づく有効な化学療法のプロトコル開発も目指す。

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。

近年のゲノムシーケンス技術の急速な進歩により、今や全ゲノムシーケンス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) ヒトの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 遺伝子について、その cDNA を純化し、次世代シーケンサーによって大規模配列決定を行うアプローチを開発した。さらに、得られた大量の cDNA データから所期の配列異常を検出可能なコンピューターパイプラインを構築した。またこうして開発した cDNA キャプチャー法を用いて、慢性骨髄性白血病細胞株によるコントロール実験を行うと共に、末梢性 T 細胞悪性リンパ腫の臨床検体を用いた大規模 cDNA リシーケンスを行った。

2) がん株化細胞に抗がん剤の組み合わせを同時投与し、その細胞増殖抑制効果を MTT assay で調べるとともに、単剤、併用時の dose-response curve を得、 IC_{50} における併用効果を isobologram で分析した。

3) Tandem affinity purification (TAP)法と蛋白質ペプチド配列解析法を用いて ELF4 と結合する核内蛋白質を検索、同定した。また ELF4 の転写活性は ELF4 結合コンセンサス配列を持ったルシフェラーゼレポーター、HDM2 プロモーターを組み込んだルシフェラーゼレポーターを用いて検討した。

(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) 慢性骨髄性白血病 (CML) のリシーケンス

我々は次世代シーケンサーを用いた一度の実験で、遺伝子の点突然変異・挿入欠失・融合の全てを解析可能な「cDNA キャプチャー法」を開発した。さらに本手法を用いて、CML 細胞株における 913 種類の細胞増殖関連遺伝子に対する cDNA リシーケンスを行った。

MEG-01s、KCL-22、K562、NCO2 および KU812 の計 5 種類の CML 細胞株を cDNA キャプチャー法で解析する事で、それぞれから 2.6 Gbp, 4.7 Gbp, 2.7 Gbp, 3.1 Gbp および 2.6 Gbp の塩基情報を得た。我々の 913 標的遺伝子中には BCR は含まれていないが、上記 CML 配列データ中には、BCR-ABL 融合点をまたぐリード配列がそ

れぞれの細胞株で検出され、本手法が融合遺伝子を同定可能なことが確認された。

さらにこれらデータから点突然変異をスクリーニングし、非同義変異を検出したところ、KCL22を除く4細胞株では1検体当たり 39.8 ± 13.0 (平均 $\pm$ 標準偏差) 種類の非同義変異が検出されたが、KCL22だけは420種類と約10倍の数の非同義変異が確認された。これらの中には、既に報告されている *PIK3CA* 遺伝子の E545G 変異、*CDKN2A* 遺伝子 (p16INK4A) の S12L 変異、*DUSP22* 遺伝子の V106I 遺伝子などが含まれており、また *TP53* 遺伝子についても既知の G266R 変異、K132R 変異が確認された。さらに挿入・欠失についても解析したところ、*TP53* 遺伝子の H233 欠失、Q136 のフレームシフト変異、P310 のフレームシフト変異などが検出された。興味深いことに今回解析した 5 種類の CML 細胞株はすべて何らかの *TP53* 変異を有することが確認された。

2) 末梢性 T 細胞悪性リンパ腫 (PTCL) のリシーケンス

次に上記 cDNA キャプチャー法を用いて PTCL の腫大リンパ節検体 11 例に関する検討を行った。一検体当たり平均 4.9 Gbp の塩基配列情報を取得したが、このデータセットを独自のコンピューターパイプラインにて解析することで、全検体から計 197 種類の遺伝子上に 263 種類の非同義変異を発見することが出来た。

我々が同定した非同義変異の中には非受容体型セリンスレオニンキナーゼ A の R→H 変異が存在した。同キナーゼ A は T リンパ球で高発現していることが知られているため、我々はこの R→H 変異が PTCL の発がんに寄与する可能性についてさらに検討した。細胞内の Fos、Myc、NF- κ B、Bcl-xL など様々なシグナル伝達経路にキナーゼ A 変異が及ぼす影響を検討したところ、変異体が特異的に NF- κ B 活性を上昇させることが明らかになった。次にキナーゼ A の野生型と R→H 変異型をそれぞれマウス T 細胞株 CTLL-2 に導入し、デキサメサゾン添加によるアポトーシス誘導実験を行った。その結果、1 μ M デキサメサゾン添加時において野生型導入 CTLL-2 細胞ではアポトーシスが確認されたのに対し、R→H 変異型導入細胞ではアポトーシスの明瞭な減弱が認められた。以上の結果から R→H 変異はリンパ球に抗アポトーシス作用を及

ばし発がんへ寄与することが想定された。

3) 抗がん剤併用療法最適化解析

私達の用いた isobologram は放射線治療と化学療法併用の分析に広く用いられている方法であり、単剤での dose-response curve をもとに envelope of additivity を求め、併用時の data point が左下にきた場合（予想よりはるかに少ない量の併用で IC_{50} に達する）を相乗作用、envelope に入る場合を相加作用、envelope の右上に来る場合を拮抗作用とするものである。私達の研究では anthracycline 系の薬剤 (doxorubicin、daunorubicin、aclarubicin、mitoxantrone)、alkylating agents (4-hydroperoxy cyclophosphamide、4-hydroperoxy ifosfamide、bleomycin、cisplatin、carboplatin、mitomycin C)、HDAC 阻害剤の romidepsin、5-fluorouracil、gemtuzumab 及び etoposide は methotrexate と mitotic inhibitor (taxanes、vinca alkaloids) との同時併用では拮抗作用、それ以外の多くの薬剤と相加作用を示した。代謝拮抗薬の cytarabine と gemcitabine や topoisomerase-I 阻害剤の irinotecan(SN-38)は platinum と相乗作用、それ以外は anthracycline 系の薬剤や alkylating agents と同様の傾向を示した。

Methotrexate は殆どの薬剤と強い拮抗作用を示したが、methotrexate を先行投与すると強い相乗作用が認められた。Paclitaxel については殆どの薬剤と同時投与で弱い拮抗作用を示したが、paclitaxel を先行投与すると相加作用が認められた。このことから methotrexate や paclitaxel を他剤と併用する場合は同時投与よりも methotrexate や paclitaxel を先行することにより、より強い併用効果が期待できる。

4) NPM1 と ELF4 の相互作用

TAP法にて得られた ELF4 との結合蛋白の一つがペプチド配列解析によって NPM1 と同定された。それぞれの遺伝子を発現ベクターに組み込み、293 T 細胞に発現させ、免疫沈降法を用いて結合を確認した。さらに、in vitro translation法によっても両者の結合が見られ、二つの蛋白質は直接結合していることが示唆された。ELF4 発現ベクター、ELF4 結合コンセンサス配列を持つルシフェラーゼレポーターに加えて野生型又は変異 NPM1 発現ベクターを 293

T 細胞に導入し、ELF4 転写活性に与える NPM1 の影響を検討した。野生型 NPM1 は ELF4 転写活性を抑制したが、変異 NPM1 は転写活性を上昇させた。NPM1 変異の有無は ELF4 の細胞内局在を変化させなかった。EMSA において ELF4 の DNA 結合は NPM1 添加によって減少した。HDM2 プロモーターを用いた ChIP 解析でも野生型 NPM1 は ELF4 のプロモーターへの結合を抑制した。以上より、野生型 NPM1 は ELF4 の DNA 結合を抑制することで転写活性化機能を抑制し、変異 NPM1 は野生型 NPM1 を核内から細胞質へ移動させることで、野生型 NPM1 による ELF4 抑制機構を解除するものと考えられた。

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、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。薬剤併用療法の解析により、多くの抗がん剤は併用時、相加的に作用するため、同時投与が便宜的にも優れているが、methotrexate や taxanes の場合はこれら薬剤を先行させるスケジュールを考えるべきである事が示された。また本研究によって、正常核型 AML で最も変異の多い NPM1 と転写因子である ELF4 との直接の結合が確認され、NPM1 の変異によって ELF4 の転写活性化能が増強されることが明らかとなった。

F. 健康危険情報

無し

G. 研究発表

1. 論文発表

間野博行

- 1) Ueno T, Yamashita Y, Soda M, Fukumura K, Ando M, Yamato A, Kawazu M, Choi YL & Mano H. "High-throughput resequencing of target-captured cDNA in cancer cells" *Cancer Sci*, **103**: 131-135, 2012.
- 2) Togashi Y, Soda M, Sakata S, Sugawara E, Hatano S, Asaka R, Nakajima T, Mano H & Takeuchi K. "KLC1-ALK: a novel fusion in lung cancer identified using a formalin-fixed

- paraffin-embedded tissue only” *PLoS ONE*, in press, 2012.
- 3) Takeuchi K, Soda M, Togashi Y, Suzuki R, Sakata S, Hatano S, Asaka R, Hamanaka W, Ninomiya H, Uehara H, Choi YL, Satoh Y, Okumura S, Nakagawa K, Mano H & Ishikawa Y. “RET, ROS1, and ALK fusions in lung cancer” *Nat Med*, in press, 2012.
 - 4) Sugawara E, Togashi Y, Kuroda N, Sakata S, Hatano S, Asaka R, Yuasa T, Yonese J, Kitagawa M, Mano H, Ishikawa Y & Takeuchi K. “Identification of anaplastic lymphoma kinase fusions in renal cancer: Large-scale immunohistochemical screening by the intercalated antibody-enhanced polymer method” *Cancer*, in press, 2012.
 - 5) Ng KP, Hillmer AM, Chuah CTH, Juan WC, Ko T-K, Teo ASM, Ariyaratne PN, Takahashi N, Sawada K, Fei Y, Soh S, Lee WH, Huang JWJ, Allen Jr. JC, Woo XY, Nagarajan N, Kumar V, Thalamuthu A, Poh WT, Ang AL, Mya HT, How GF, Yang LY, Koh LP, Chowbay B, Chang C-T, Nadarajan VS, Chung WJ, Than H, Lim LC, Goh YT, Zhang S, Poh D, Tan P, Seet J-E, Ang M-K, Chau N-M, Ng Q-S, Tan DSW, Soda M, Isobe K, Nothen MM, Wong TY, Shahab A, Ruan X, Cacheux-Rataboul V, Sung W-K, Tan EH, Yatabe Y, Mano H, Soo RA, Chin TM, Lim W-T, Ruan Y & Ong ST. “A common BCL2L1 deletion polymorphism mediates intrinsic resistance and inferior responses to tyrosine kinase inhibitors in cancer” *Nat Med*, in press, 2012.
 - 6) Kimura H, Nakajima T, Takeuchi K, Soda M, Mano H, Iizasa T, Matsui Y, Yoshino M, Shingyoji M, Itakura M, Itami M, Ikebe D, Yokoi S, Kageyama H, Ohira M & Nakagawara A. “ALK fusion gene positive lung cancer and 3 cases treated with an inhibitor for ALK kinase activity” *Lung Cancer*, **75**: 66-72, 2012.
 - 7) Choi YL, Soda M, Ueno T, Hamada T, Haruta H, Yamato A, Fukumura K, Ando M, Kawazu M, Yamashita Y & Mano H. “Oncogenic MAP2K1 mutations in human epithelial tumors” *Carcinogenesis*, in press, 2012.
 - 8) Butler MO, Imataki O, Yamashita Y, Tanaka M, Ansen S, Berezovskaya A, Metzler G, Milstein MI, Mooney MM, Murray AP, Mano H, Nadler LM & Hirano N. “Ex vivo expansion of human CD8 T cells using autologous CD4 T cell help” *PLoS One*, **7**: e30229, 2012.
 - 9) Tominaga-Sato S, Tsushima H, Ando K, Itonaga H, Imaizumi Y, Imanishi D, Iwanaga M, Taguchi J, Fukushima T, Yoshida S, Hata T, Moriuchi Y, Kuriyama K, Mano H, Tomonaga M & Miyazaki Y. “Expression of myeloperoxidase and gene mutations in AML patients with normal karyotype: double CEBPA mutations are associated with high percentage of MPO positivity in leukemic blasts” *Int J Hematol*, **94**: 81-89, 2011.
 - 10) Takeuchi K, Soda M, Togashi Y, Sugawara E, Hatano S, Asaka R, Okumura S, Nakagawa K, Mano H & Ishikawa Y. “Pulmonary inflammatory myofibroblastic tumor expressing a novel fusion, PPFIBP1-ALK: reappraisal of anti-ALK immunohistochemistry as a tool for novel ALK fusion identification” *Clin Cancer Res*, **17**: 3341-3348, 2011.
 - 11) 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*, **96**: 464-467, 2011.
 - 12) Suzuki HI, Arase M, Matsuyama H, Choi YL, Ueno T, Mano H, Sugimoto K & Miyazono K. “MCPIP1 ribonuclease antagonizes dicer and terminates microRNA biogenesis through precursor microRNA degradation” *Mol Cell*, **44**: 424-436, 2011.
 - 13) Sasaki D, Imaizumi Y, Hasegawa H, Osaka A, Tsukasaki K, Choi YL, Mano H, Marquez VE, 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*, **96**: 712-719, 2011.
 - 14) Matsuyama H, Suzuki HI, Nishimori H, Noguchi M, Yao T, Komatsu N, Mano H, Sugimoto K &

- Miyazono K. "miR-135b mediates NPM-ALK-driven oncogenicity and renders IL-17-producing immunophenotype to anaplastic large cell lymphoma" *Blood*, **118**: 6881-6892, 2011.
- 15) 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*, **52**: 3008-3017, 2011.
- 宮崎泰司
- 1) Tominaga-Sato S, Tsushima H, Ando K, Itonaga H, Imaizumi Y, Imanishi D, Iwanaga M, Taguchi J, Fukushima T, Yoshida S, Hata T, Moriuchi Y, Kuriyama K, Mano H, Tomonaga M, Miyazaki Y. "Expression of myeloperoxidase and gene mutations in AML patients with normal karyotype: double CEBPA mutations are associated with high percentage of MPO positivity in leukemic blasts." *Int J Hematol* **94**: 81-89, 2011.
- 2) Usui N, Takeshita A, Nakaseko C, Dobashi N, Fujita H, Kiyoi H, Kobayashi Y, Sakura T, Yahagi Y, Shigeno K, Ohwada C, Miyazaki Y, Ohtake S, Miyawaki S, Naoe T, Ohnishi K; for the Japan Adult Leukemia Study Group. "Phase I trial of gemtuzumab ozogamicin in intensive combination chemotherapy for relapsed or refractory adult acute myeloid leukemia (AML): Japan Adult Leukemia Study Group (JALSG)-AML206 study." *Cancer Sci*. **102**:1358-1365, 2011.
- 3) 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* **117**:2366-2372, 2011.
- 4) 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* **117**:2358-2365, 2011.
- 5) 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* **25**:259-265, 2011.
- 6) 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.e4, 2011.
- 7) Iwanaga M, Hsu WL, Soda M, Takasaki Y, Tawara M, Joh T, Amenomori A, 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* **29**: 428-434, 2011.
- 8) 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.

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」を設立し既に 1000 例を超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一度の次世代シーケンサー解析でゲノムの点突然変異、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 キャプチャー法を開発した。これを用いて慢性骨髄性白血病細胞株から実際に BCR-ABL1 融合 cDNA を同定すると共に、様々な点突然変異および挿入・欠失を検出することに成功した。さらに既に収集した末梢性 T 細胞悪性リンパ腫の腫大リンパ節を解析し、セリンスレオニンキナーゼ A の新たな非同義変異を発見した。本変異を有するキナーゼ A は細胞内 NF- κ B を活性化し、T 細胞のデキサメサゾンによる細胞死誘導を抑制する事がわかった。したがって同変異は T 細胞の悪性化に寄与する遺伝子異常であると考えられた。

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)。

そこで本研究計画では、次世代シーケンサーを用いて上記検体バンクを大規模にリシーケンスし、配列異常の面から造血器腫瘍の新たな分子診断マーカーおよび発症原因異常の探索を目指す。

B 研究方法

ゲノム上の点突然変異・挿入・欠失だけでなく、遺伝子融合も検出可能な大規模リシーケンス法として、特定の遺伝子セットの cDNA を exon capture する手法「cDNA キャ

プチャー法」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 遺伝子を純化するシステムを開発し、さらにそこで得られた大量の cDNA データから所期の配列異常を検出可能なコンピューターパイプラインを構築する。

またこうして開発した cDNA キャプチャー法を用いて、実際に様々なゲノム変異を検出可能か否かを検証する目的で、BCR-ABL1 陽性慢性骨髄性白血病 (CML) 細胞株をコントロールとして解析を行う。また本手法を拡大し、これまで収集した造血器悪性腫瘍バンクにおける大規模 cDNA キャプチャー解析を行う。

(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) 慢性骨髄性白血病 (CML) のリシーケンス

我々は既に次世代シーケンサーを用いて高精度配列データを取得する技術を開発し、さらに一度のシーケンス実験で遺伝子の点突然変異・挿入欠失・融合の全てを解析可能な「cDNA capture法」を開発した。本年度は両

手法を組み合わせ、CML細胞株における913種類の細胞増殖関連遺伝子に対するcDNAリシーケンスを行った。MEG-01s、KCL-22、K562、NCO2およびKU812の計5種類のCML細胞株をcDNAキャプチャー法で解析する事で、それぞれから2.6 Gbp, 4.7 Gbp, 2.7 Gbp, 3.1 Gbp および2.6 Gbpの塩基情報を得た。我々の913標的遺伝子中にはBCRは含まれていないが、上記CML配列データ中には、BCR-ABL融合点をまたぐリード配列がそれぞれの細胞株で検出され、本手法が融合遺伝子を同定可能なことが確認された。しかもKCL22、MEG-01s及びNCO2細胞においてBCR遺伝子のエクソン13がABLのエクソン2へ融合していること、他の2細胞においてはBCRのエクソン14がABLへ融合していることも正確に検出可能であった。

これらデータから点突然変異をスクリーニングし、非同義変異 (non-synonymous mutations) を検出したところ、KCL22を除く4細胞株では1検体当たり 39.8 ± 13.0 (平均 $\pm$ 標準偏差) 種類の非同義変異が検出されたが、KCL22だけは420種類と約10倍の非同義変異が確認された。これらの中には、既に報告されているPIK3CA遺伝子のE545G変異、CDKN2A遺伝子 (p16INK4A) のS12L変異、DUSP22遺伝子のV106I遺伝子などが含まれており、またTP53遺伝子についても既知のG266R変異、K132R変異が確認された。さらに挿入・欠失についても解析したところ、TP53遺伝子のH233欠失、Q136のフレームシフト変異、P310のフレームシフト変異などが検出された。興味深いことに今回解析した5種類のCML細胞株はすべて何らかのTP53変異を有することが確認された。

同一の非同義変異が2種類以上の細胞株で検出されたものは無かったが、これら非同義変異を有する遺伝子群の細胞内機能をIngenuity Pathway Analysisで解析したところ、最も特徴的な細胞内機能は「Molecular mechanism of cancer」であり ($P = 1.71 \times 10^{-15}$)、次に特徴的な機能は「B cell receptor signaling」であった ($P = 1.72 \times 10^{-13}$)。すなわちCMLの急性転化において発がんに関わる遺伝子の変異が選択的に生じている事が確認された。

2) 末梢性T細胞悪性リンパ腫 (PTCL)のリシーケンス

次に上記cDNA exon-capture法を用いてPTCLの腫大リンパ節検体11例に関する検討を行った。純化cDNAを断片化した上で次世代シーケンサー解析を行い、一検体当たり平均4.9 Gbpの塩基配列情報を取得したが、このデータセットを独自のコンピューターパイプラインにて解析することで、全検体から計197種類の遺伝子上に263種類の非同義変異を発見することが出来た。

我々が同定した非同義変異の中には非受容体型セリンスレオニンキナーゼAのR→H変異が存在した。同キナーゼAはTリンパ球で高発現していることが知られているため、我々はこのR→H変異がPTCLの発がんに関与する可能性についてさらに検討した。細胞内のFos、Myc、NF- κ B、Bcl-xLなど様々なシグナル伝達経路にキナーゼA変異が及ぼす影響を検討したところ、変異体が特異的にNF- κ B活性を上昇させることが明らかになった。次にキナーゼAの野生型とR→H変異型をそれぞれマウスT細胞株CTLL-2に導入し、デキサメサゾン添加によるアポトーシス誘導実験を行った。その結果、1 μ Mデキサメサゾン添加時において野生型導入CTLL-2細胞ではアポトーシスが確認されたのに対し、R→H変異型導入細胞ではアポトーシスの明瞭な減弱が認められた。以上の結果からR→H変異はリンパ球に抗アポトーシス作用を及ぼし発がんへ関与することが想定された。

さらに、がんゲノム変異データベースであるCOSMIC

(<http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/>) に登録されているキナーゼAの変異を調べた結果、R→H変異以外にも別の2つの変異 (L→P および K→E) が報告されていた。これらについてもNF- κ B誘導能を検討したところ、興味深いことにどちらもR→H変異よりさらに強くNF- κ B活性を誘導する事が確認された。なおL→P変異は卵巣がん検体で、またK→E変異は精巣腫瘍検体において、それぞれ体細胞変異として報告されている。以上よりキナーゼAは広いがん腫において非同義変異が生じており、細胞のアポトーシスをブロックすることで発がんに関与すると考えられる。

D&E. 考察及び結論

我々は細胞増殖関連遺伝子群について、一度の実験で点突然変異、挿入欠失、遺伝子融合を同時に検出可能な次世代シーケンサー解析技術を開発し、これを用いてCML、PTCLから複数の非同義変異を同定することに成功した。さらにこれらの中から、NF- κ B活性を誘導する新たなアミノ酸置換をセリンスレオニンキナーゼに発見した。また予想外にも同キナーゼのNF- κ B誘導変異は様々なヒトがん種に存在することが確認され、我々の成果は新たながん抑制遺伝子の発見と言える。平成24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) Ueno T, Yamashita Y, Soda M, Fukumura K, Ando M, Yamato A, Kawazu M, Choi YL & Mano H. “High-throughput resequencing of target-captured cDNA in cancer cells” *Cancer Sci*, **103**: 131-135, 2012.
- 2) Togashi Y, Soda M, Sakata S, Sugawara E, Hatano S, Asaka R, Nakajima T, Mano H & Takeuchi K. “KLC1-ALK: a novel fusion in lung cancer identified using a formalin-fixed paraffin-embedded tissue only” *PLoS ONE*, in press, 2012.
- 3) Takeuchi K, Soda M, Togashi Y, Suzuki R, Sakata S, Hatano S, Asaka R, Hamanaka W, Ninomiya H, Uehara H, Choi YL, Satoh Y, Okumura S, Nakagawa K, Mano H & Ishikawa Y. “RET, ROS1, and ALK fusions in lung cancer” *Nat Med*, in press, 2012.
- 4) Sugawara E, Togashi Y, Kuroda N, Sakata S, Hatano S, Asaka R, Yuasa T, Yonese J, Kitagawa M, Mano H, Ishikawa Y & Takeuchi K. “Identification of anaplastic lymphoma kinase fusions in renal cancer: Large-scale immunohistochemical screening by the intercalated antibody-enhanced polymer method” *Cancer*, in press, 2012.
- 5) Ng KP, Hillmer AM, Chuah CTH, Juan WC, Ko T-K, Teo ASM, Ariyaratne PN, Takahashi N, Sawada K, Fei Y, Soh S, Lee WH, Huang JWJ, Allen Jr. JC, Woo XY, Nagarajan N, Kumar V, Thalamuthu A, Poh WT, Ang AL, Mya HT, How GF, Yang LY, Koh LP, Chowbay B, Chang C-T, Nadarajan VS, Chung WJ, Than H, Lim LC, Goh YT, Zhang S, Poh D, Tan P, Seet J-E, Ang M-K, Chau N-M, Ng Q-S, Tan DSW, Soda M, Isobe K, Nothen MM, Wong TY, Shahab A, Ruan X, Cacheux-Rataboul V, Sung W-K, Tan EH, Yatabe Y, Mano H, Soo RA, Chin TM, Lim W-T, Ruan Y & Ong ST. “A common BCL2L11 deletion polymorphism mediates intrinsic resistance and inferior responses to tyrosine kinase inhibitors in cancer” *Nat Med*, in press, 2012.
- 6) Kimura H, Nakajima T, Takeuchi K, Soda M, Mano H, Iizasa T, Matsui Y, Yoshino M, Shingyoji M, Itakura M, Itami M, Ikebe D, Yokoi S, Kageyama H, Ohira M & Nakagawara A. “ALK fusion gene positive lung cancer and 3 cases treated with an inhibitor for ALK kinase activity” *Lung Cancer*, **75**: 66-72, 2012.
- 7) Choi YL, Soda M, Ueno T, Hamada T, Haruta H, Yamato A, Fukumura K, Ando M, Kawazu M, Yamashita Y & Mano H. “Oncogenic MAP2K1 mutations in human epithelial tumors” *Carcinogenesis*, in press, 2012.
- 8) Butler MO, Imataki O, Yamashita Y, Tanaka M, Ansen S, Berezovskaya A, Metzler G, Milstein MI, Mooney MM, Murray AP, Mano H, Nadler LM & Hirano N. “Ex vivo expansion of human CD8 T cells using autologous CD4 T cell help” *PLoS One*, **7**: e30229, 2012.
- 9) Tominaga-Sato S, Tsushima H, Ando K, Itonaga H, Imaizumi Y, Imanishi D, Iwanaga M, Taguchi J, Fukushima T, Yoshida S, Hata T, Moriuchi Y, Kuriyama K, Mano H, Tomonaga M & Miyazaki Y. “Expression of myeloperoxidase and gene mutations in AML patients with normal karyotype: double CEBPA mutations are associated with high percentage of MPO positivity in leukemic blasts” *Int J Hematol*, **94**: 81-89, 2011.
- 10) Takeuchi K, Soda M, Togashi Y, Sugawara E, Hatano S, Asaka R, Okumura S, Nakagawa K, Mano H & Ishikawa Y. “Pulmonary inflammatory myofibroblastic tumor expressing a novel fusion, PPFIBP1-ALK: reappraisal of anti-ALK immunohistochemistry as a tool for novel ALK fusion identification” *Clin Cancer Res*, **17**: 3341-3348, 2011.
- 11) 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*, **96**: 464-467, 2011.
- 12) Suzuki HI, Arase M, Matsuyama H, Choi YL, Ueno T, Mano H, Sugimoto K & Miyazono K. “MCPIP1 ribonuclease antagonizes dicer and terminates microRNA biogenesis through precursor microRNA degradation” *Mol Cell*, **44**: 424-436, 2011.
- 13) Sasaki D, Imaizumi Y, Hasegawa H, Osaka A, Tsukasaki K, Choi YL, Mano H, Marquez VE, 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*, **96**: 712-719, 2011.
- 14) Matsuyama H, Suzuki HI, Nishimori H, Noguchi M, Yao T, Komatsu N, Mano H, Sugimoto K & Miyazono K. “miR-135b mediates NPM-ALK-driven oncogenicity and renders IL-17-producing immunophenotype to anaplastic large cell lymphoma” *Blood*, **118**: 6881-6892, 2011.
- 15) Iida A, Shinoue T, Baba Y, Mano H & Watanabe S. “Dicer plays essential roles for retinal development by regulation of survival and differentiation” *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **52**: 3008-3017, 2011.

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

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：私たちは長年、抗がん剤の基礎併用研究をおこなってきたが、その組み合わせ、投与スケジュールは膨大な数になる。今回、その結果をまとめて報告する。ヒト白血病や固形がんの株化細胞を2つの抗がん剤存在下で3—4日間同時投与し、その細胞増殖抑制効果をMTT assayで調べ、dose-response curveを得、 IC_{80} における併用効果をisobologram (Steel and Peckham)で分析した。一部の抗がん剤では、種々の投与スケジュールで他剤との併用効果を、また細胞周期の面から検討した。その結果、anthracyclines、alkylating agents、romidepsin、5-fluorouracil、gemtuzumab、etoposideはmethotrexateとmitotic inhibitor (taxanes、vinca alkaloid)との同時併用では拮抗作用、それ以外の多くの抗がん剤と相加作用を示した。Cytarabine、gemcitabine、fludarabineやirinotecanはplatinumと相乗作用を示したが、それ以外はanthracycline系の薬剤やalkylating agentsと同様の傾向を示した。Bcr/abl tyrosine kinase 阻害剤のimatinibやfarnesyl transferase inhibitorのtipifamibはmitotic inhibitorと強い相乗作用を示した。一方、topoisomerase II catalytic inhibitorのsobuzoxaneはanthracyclinesやetoposideと強い相乗作用をもち今後の臨床併用が期待される。特記すべきはmethotrexateが殆どの薬剤と強い拮抗作用を示し、taxanesは弱いながらもやはり拮抗作用を示した点である。しかし、時間差投与で調べてみるとmethotrexateやtaxanesは他剤より先行して投与すると相乗ないし相加効果を示し、他剤と併用する場合はこれらの薬剤を先行した時間差投与することが勧められる。これらのデータは臨床における至適な併用療法の開発に貢献すると考えられる。

A 研究目的

がん化学療法は通常、多剤併用療法が行われている。しかし、抗がん剤は併用薬や投与スケジュールによりその抗腫瘍効果がかなり異なることが知られており、併用には細心の注意が必要である。しかし、多剤併用療法の臨床研究は多くの制約があり、実際には経験的にレジメンが決められていることが少なくない。

組織培養を用いた併用研究が注目されているがその長所は、短時間で種々のがん細胞における併用効果を純粋に見ることができ、再現性を確かめられる点にある。一方、短所として分析方法が多く存在すること、毒性が見られないこと、細胞の性格や薬理動態が臨床と異なる点などである。私たちは長年、抗がん剤の至適併用について組織培養を用いて研究してきたが、各抗がん剤には併用時に相性の良い薬、悪い薬があることがわかり、特に新規抗がん剤の臨床試験のプロトコル作成のために貴重な情報を提供してきた。今回、conventional anticancer agentsについての併用時の性格について網羅的にまとめてみた。

B 研究方法

それぞれの抗がん剤の対象となるがんの株化細胞を数種類用いて併用効果を分析した。多くの実験では併用する抗がん剤を3—4日間同時投与し、その細胞増殖抑制効果をMTT assayで調

べ、単剤、併用時のdose-response curveを得、 IC_{80} における併用効果をisobologram (Steel & Peckham)で分析した。一部の抗がん剤 (methotrexateやpaclitaxel等)では、種々の投与スケジュールで他剤との併用効果を分析した。また、一部の併用については細胞周期についても検討した。

C&D 研究結果及び考察

抗がん剤の併用効果の分析については、万人が認める理想的な方法はない。抗がん剤のdose-response curveは多彩であり、その対応策として種々な方法が提案されているが、分析方法によりしばしば結果が異なる点がおおきな問題である。私達の用いたisobologramは放射線治療と化学療法併用の分析に広く用いられている方法であり、単剤でのdose-response curveをもとにenvelope of additivityを求め、併用時のdata pointが左下にきた場合（予想よりはるかに少ない量の併用で IC_{80} に達する）を相乗作用、envelopeに入る場合を相加作用、envelopeの右上に来る場合を拮抗作用とするものである。この方法は他の方法より相乗作用、拮抗作用に対して、厳密である。

私達の研究ではanthracycline系の薬剤 (doxorubicin、daunorubicin、aclarubicin、mitoxantrone)、alkylating agents

(4-hydroperoxy cyclophosphamide、4-hydroperoxy ifosfamide、 bleomycin、 cisplatin、 carboplatin、 mitomycin C)、 HDAC 阻害剤の romidepsin、 5-fluorouracil、 gemtuzumab 及び etoposide は methotrexate と mitotic inhibitor (taxanes、 vinca alkaloids) との同時併用では拮抗作用、それ以外の多くの薬剤と相加作用を示した。代謝拮抗薬の cytarabine と gemcitabine や topoisomerase-I 阻害剤の irinotecan(SN-38)は platinum と相乗作用、それ以外は anthracycline 系の薬剤や alkylating agents と同様の傾向を示した。

Bcr/abl tyrosine kinase 阻害剤の imatinib や farnesyl transferase inhibitor の tipifamib は mitotic inhibitor と相乗作用を示した点が注目される。私達の調べる限りでは mitotic inhibitor と相乗作用を示す薬剤は imatinib と tipifamib 以外になかった。Topoisomerase II catalytic inhibitor の sobuzoxane は anthracyclines や etoposide と相乗的に働き、しかも anthracyclines の心毒性を軽減することから、今後の併用は期待される。

同時併用を嫌う薬剤として antifolate (methotrexate、 pemetrexed) と mitotic inhibitor (paclitaxel) については時間差投与スケジュールの面から検討した。Methotrexate は殆どの薬剤と強い拮抗作用を示したが、methotrexate を先行投与すると強い相乗作用が認められた。Paclitaxel については殆どの薬剤と同時投与で弱い拮抗作用を示したが、paclitaxel を先行投与すると相加作用が認められた。このことから methotrexate や paclitaxel を他剤と併用する場合は同時投与よりも methotrexate や paclitaxel を先行することにより、より強い併用効果が期待できる (methotrexate と paclitaxel の併用の場合は methotrexate 先行が相乗作用)。Methotrexate は dihydrofolate reductase を阻害する抗葉酸剤で、作用機序の異なる抗がん剤と拮抗作用を示し、methotrexate を先行させると相乗的に作用すが、そのメカニズムは不明である。併用時の data point をみると、同時投与では protection 領域にはいるものが多い。これはお互いに他方の抗がん剤の作用を阻害していることを意味している。一方、methotrexate を先行させた場合の相乗作用については、methotrexate が G₁/S 期に細胞を同調させることから、これにより第2の抗がん剤の細胞内輸送が亢進するのではないかと考えられるが推察の域をでない。この点については今後検討の必要がある。

これらのデータは臨床プロトコルの作成に大きく貢献すると考えられる。

E 結論

多くの抗がん剤は併用時、相加的に作用するため、同時投与が便宜的にも優れているかもしれない。注意すべきは methotrexate や taxanes と他剤を併用で、この場合は同時投与は避け、毒性を考慮しながらこれら薬剤を先行させるスケジュールを考えるべきである。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

本年度は英文論文無し

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

「急性骨髄性白血病における NPM1 蛋白質と ELF4 蛋白質の相互作用」
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：NPM1 は正常核型の急性骨髄性白血病（AML）において約 50% に変異の見られる遺伝子であり、変異によって細胞内局在が核内から細胞質へ変化する多機能蛋白質をコードしている。ETS 転写因子の一つである ELF4 蛋白は造血細胞に発現している転写活性化因子で、その機能調節には不明の部分が多い。今回、ELF4 と結合する蛋白質を検索したところ NPM1 が同定された。ELF4 は HDM2 プロモーターに結合して、転写を活性化するが、野生型 NPM1 は ELF4 による HDM2 転写を抑制する一方、変異 NPM1 は転写を活性化した。HDM2 が TP53 の調節蛋白であることを考えると、AML に高頻度に見られる NPM1 の変異は、ELF4 の転写能に変化を与えることで白血病細胞のアポトーシスや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

急性骨髄性白血病（AML）は、造血幹細胞、あるいは造血前駆細胞が様々な遺伝子異常を獲得して発症に至り、そうした遺伝子異常は AML 細胞の特徴や個々の症例の病態と深く関連すると考えられている。例えば、AML 細胞の染色体異常は、最も強力な予後（治療反応）予測因子であり、世界的に広く利用されている。一方、染色体レベルでは異常のない正常核型例が約半数存在しており、その遺伝子解析が進んでいる。NPM1 遺伝子は正常核型 AML の約半数に変異が見られる遺伝子だが、どのような機構で正常核型 AML の病態と関連しているのかは明らかでは無い。ELF4 は ETS 転写因子の一つで、造血細胞をはじめ多くの組織で発現し転写活性化する。ELF4 については、正常核型 AML と比較して予後良好染色体 AML において ELF4 遺伝子は低発現であること、造血幹細胞における細胞周期調節に関わること、NK/T 細胞の発生にかかわることなど、正常並びに異常造血細胞における役割が示されている。

今回、AML 細胞において予後良好症例と正常核型症例で発現に差があることを受け、正常核型 AML の病態を明らかにする目的で、NPM1 と ELF4 間に機能的関連があるのかを両者の結合の有無、機能調節の有無などを通して検討することとした。

B 研究方法

Tandem affinity purification (TAP)法と蛋白質ペプチド配列解析法を用いて ELF4 と結合する核内蛋白質を検索、同定する。それ

ぞれの蛋白質の結合は遺伝子導入による蛋白質の細胞内発現と免疫沈降法により確認する。ELF4 の転写活性化は ELF4 結合コンセンサス配列を持ったルシフェラーゼレポーター、HDM2 プロモーターを組み込んだルシフェラーゼレポーターを用いて検討した。野生型又は変異 NPM1 を発現ベクターに組み込み、ELF4 発現ベクター、レポーターと同時に細胞内に導入することで ELF4 の転写活性化に対する NPM1 変異の影響を検討した。さらに野生型 NPM1 の ELF4 機能に与える効果を siRNA で NPM1 発現を抑制することで調べた。ELF4 の HDM2 プロモーターへの結合とそれに対する NPM1 の効果は ChIP 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) NPM1 と ELF4 の結合

TAP法にて得られた ELF4 との結合蛋白の一つがペプチド配列解析によって NPM1 と同定された。それぞれの遺伝子を発現ベクターに組み込み、293 T 細胞に発現させ、免疫沈降法を用いて結合を確認した。さらに、in vitro translation法によっても両者の結合が見られ、二つの蛋白質は直接結合していることが示唆された。

2) 野生型および変異 NPM1 による転写活性化能の調節

ELF4 発現ベクター、ELF4 結合コンセンサス配列を持つルシフェラーゼレポーターに加

えて野生型又は変異NPM1発現ベクターを293T細胞に導入し、ELF4転写活性に与えるNPM1の影響を検討した。野生型NPM1はELF4転写活性を抑制したが、変異NPM1は転写活性を上昇させた。NPM1変異の有無はELF4の細胞内局在を変化させなかった。

次に、細胞内に発現している野生型NPM1をsiRNAを用いて抑制したところ、ELF4の転写活性可能は低下した。また、EMSAにおいてELF4のDNA結合はNPM1添加によって減少した。HDM2プロモーターを用いたChIP解析でも野生型NPM1はELF4のプロモーターへの結合を抑制下。以上より、野生型NPM1はELF4のDNA結合を抑制することで転写活性化機能を抑制し、変異NPM1は野生型NPM1を核内から細胞質へ移動させることで、野生型NPM1によるELF4抑制機構を解除するものと考えられた。

D&E. 考察及び結論

本研究によって、正常核型AMLで最も変異の多いNPM1と転写因子であるELF4との直接の結合、並びにNPM1によるELF4機能調節が示された。また、NPM1の変異によってELF4の転写活性化能が増強されることが明らかとなり、正常核型AMLにおけるNPM1の変異の影響の一部がELF4の転写機能の変化による可能性が示された。

また、今回の検討でHDM2発現がELF4の影響を受けており、さらにNPM1変異によってそれが増強すると考えられた。HDM2がTP53機能を調節していることを考え合わせると、NPM1の変異がTP53を通じて白血病細胞の特性に影響している可能性がある。

白血病細胞の抗がん剤に対する感受性、アポトーシス誘導など重要な特性との関連など今後さらに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) Tominaga-Sato S, Tsushima H, Ando K, Itonaga H, Imaizumi Y, Imanishi D, Iwanaga M, Taguchi J, Fukushima T, Yoshida S, Hata T, Moriuchi Y, Kuriyama K, Mano H, Tomonaga M, Miyazaki Y. "Expression of myeloperoxidase and gene mutations in AML patients with normal karyotype: double CEBPA mutations are associated with high percentage of MPO positivity in leukemic blasts." *Int J Hematol* **94**: 81-89, 2011.
- 2) Usui N, Takeshita A, Nakaseko C, Dobashi N, Fujita H, Kiyoi H, Kobayashi Y, Sakura T, Yahagi Y, Shigeno K, Ohwada C, Miyazaki Y, Ohtake S, Miyawaki S, Naoe T, Ohnishi K; for the Japan Adult Leukemia Study Group. "Phase I trial of gemtuzumab ozogamicin in intensive combination chemotherapy for relapsed or refractory adult acute myeloid leukemia (AML): Japan Adult Leukemia Study Group (JALSG)-AML206 study." *Cancer Sci*. **102**:1358-1365, 2011.
- 3) 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* **117**:2366-2372, 2011.
- 4) 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* **117**:2358-2365,2011.

- 5) 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* **25**:259-265, 2011.
- 6) 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.e4, 2011.
- 7) Iwanaga M, Hsu WL, Soda M, Takasaki Y, Tawara M, Joh T, Amenomori A, 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* **29**: 428-434,2011.
- 8) 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.

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

発表者名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Ueno T, Yamashita Y, Soda M, Fukumura K, Ando M, Yamato A, Kawazu M, Choi YL & Mano H	High-throughput resequencing of target-captured cDNA in cancer cells	Cancer Sci	103	131-135	2012
Togashi Y, Soda M, Sakata S, Sugawara E, Hatano S, Asaka R, Nakajima T, Mano H & Takeuchi K	KLC1-ALK: a novel fusion in lung cancer identified using a formalin-fixed paraffin-embedded tissue only	PLoS ONE	7	e31323	2012
Takeuchi K, Soda M, Togashi Y, Suzuki R, Sakata S, Hatano S, Asaka R, Hamanaka W, Ninomiya H, Uehara H, Choi YL, Satoh Y, Okumura S, Nakagawa K, Mano H & Ishikawa Y	RET, ROS1, and ALK fusions in lung cancer	Nat Med		in press	2012
Sugawara E, Togashi Y, Kuroda N, Sakata S, Hatano S, Asaka R, Yuasa T, Yonese J, Kitagawa M, Mano H, Ishikawa Y & Takeuchi K	Identification of anaplastic lymphoma kinase fusions in renal cancer: Large-scale immunohistochemical screening by the intercalated antibody-enhanced polymer method	Cancer		in press	2012
Ng KP, Hillmer AM, Chuah CTH, Juan WC, Ko T-K, Teo ASM, Ariyaratne PN, Takahashi N, Sawada K, Fei Y, Soh S, Lee WH, Huang JWJ, Allen Jr. JC, Woo XY, Nagarajan N, Kumar V, Thalamuthu A, Poh WT, Ang AL, Mya HT, How GF, Yang LY, Koh LP, Chowbay B, Chang C-T, Nadarajan VS, Chung WJ, Than H, Lim LC, Goh YT, Zhang S, Poh D, Tan P, Seet J-E, Ang M-K, Chau N-M, Ng Q-S, Tan DSW, Soda M, Isobe K, Nothen MM, Wong TY, Shahab A, Ruan X, Cacheux-Rataboul V, Sung W-K, Tan EH, Yatabe Y, Mano H, Soo RA, Chin TM, Lim W-T, Ruan Y & Ong ST	A common BCL2L1 deletion polymorphism mediates intrinsic resistance and inferior responses to tyrosine kinase inhibitors in cancer	Nat Med		in press	2012
Kimura H, Nakajima T, Takeuchi K, Soda M, Mano H, Iizasa T, Matsui Y, Yoshino M, Shingyoji M, Itakura M, Itami M, Ikebe D, Yokoi S, Kageyama H, Ohira M & Nakagawara A	ALK fusion gene positive lung cancer and 3 cases treated with an inhibitor for ALK kinase activity	Lung Cancer	75	66-72	2012
Choi YL, Soda M, Ueno T, Hamada T, Haruta H, Yamato A, Fukumura K, Ando M, Kawazu M, Yamashita Y & Mano H	Oncogenic MAP2K1 mutations in human epithelial tumors	Carcinogenesis		in press	2012

Butler MO, Imataki O, Yamashita Y, Tanaka M, Ansen S, Berezovskaya A, Metzler G, Milstein MI, Mooney MM, Murray AP, Mano H, Nadler LM & Hirano N	Ex vivo expansion of human CD8 T cells using autologous CD4 T cell help	PLoS One	7	e30229	2012
Tominaga-Sato S, Tsushima H, Ando K, Itonaga H, Imaizumi Y, Imanishi D, Iwanaga M, Taguchi J, Fukushima T, Yoshida S, Hata T, Moriuchi Y, Kuriyama K, Mano H, Tomonaga M & Miyazaki Y	Expression of myeloperoxidase and gene mutations in AML patients with normal karyotype: double CEBPA mutations are associated with high percentage of MPO positivity in leukemic blasts	Int J Hematol	94	81-89	2011
Takeuchi K, Soda M, Togashi Y, Sugawara E, Hatano S, Asaka R, Okumura S, Nakagawa K, Mano H & Ishikawa Y	Pulmonary inflammatory myofibroblastic tumor expressing a novel fusion, PPFIBP1-ALK: reappraisal of anti-ALK immunohistochemistry as a tool for novel ALK fusion identification	Clin Cancer Res	17	3341-3348	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	96	464-467	2011
Suzuki HI, Arase M, Matsuyama H, Choi YL, Ueno T, Mano H, Sugimoto K & Miyazono K	MCPIP1 ribonuclease antagonizes dicer and terminates microRNA biogenesis through precursor microRNA degradation	Mol Cell	44	424-436	2011
Sasaki D, Imaizumi Y, Hasegawa H, Osaka A, Tsukasaki K, Choi YL, Mano H, Marquez VE, 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	96	712-719	2011
Matsuyama H, Suzuki HI, Nishimori H, Noguchi M, Yao T, Komatsu N, Mano H, Sugimoto K & Miyazono K	miR-135b mediates NPM-ALK-driven oncogenicity and renders IL-17-producing immunophenotype to anaplastic large cell lymphoma	Blood	118	6881-6892	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	52	3008-3017	2011