

201220023A

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24年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 間野 博行

平成25(2013)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24年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 間野 博行

平成25(2013)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.	「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 -----	10
3.	「急性白血病に対する新規治療標的分子の探索と薬剤耐性の克服」に関する研究 自治医科大学・医学部・血液内科 永井正 -----	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 -----	23

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。本年度はこれを用いて慢性骨髄性白血病急性転化期由来細胞株KCL22から変異RAC2を同定した。変異RAC2は点突然変異によって29番目のアミノ酸であるプロリンがグルタミンに変化しており、その結果恒常的にGTP結合型へと変化して強力な発がん能を獲得することが示された。またRAC2(P29Q)以外にも多くのがん腫においてRAC1/RAC2が発がん変異を獲得していることが示され、これら変異陽性がん種においてはRACタンパクが有効な治療標的と考えられた。一方、転写因子ELF4による標的遺伝子発現活性化は野生型/変異型NPM1の量比によって変化することが確認された。ELF4の過剰発現はNIH3T3細胞のコロニー形成能を増強するが、野生型NPM1はそれを抑制し、変異型NPM1が増強することが明らかとなった。従って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増殖を制御する可能性が示唆された。また急性骨髄性白血病芽球においてRCAN1分子が異所性に高発現しており、同遺伝子産物がcalcineurin-NF-AT系を介して白血病増殖に働く事を示した。

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
宮崎泰司	長崎大学大学院医歯薬学総合研究科・教授
永井正	自治医科大学医学部・准教授

ミノ酸置換を伴う配列変異」が計181個同定されたが、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。

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

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腫瘍性を獲得

するかを検討する。

B 研究方法

1) 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」を用いて、白血病芽球分画および白血病細胞株から変異遺伝子をスクリーニングした。また同じ細胞から調製した cDNA を用いてレトロウイルス cDNA 発現ライブラリーを構築し、発がん能を有する遺伝子を同定した。この領すスクリーニングを組み合わせて解析する事で、配列変異があり、かつ発がん能を有する異常遺伝子を同定した。

2) ELF4 の転写活性化は *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。ELF4 による NIH3T3 細胞のコロニー形成能は ELF4 発現バクターを NIH3T3 細胞に導入し、軟寒天培地培養で計測した。また AML 患者 22 例より CD34 陽性細胞をカラムビーズ法を用いて選択し、定量的 RT-PCR 法を用いて *ELF4*, *HDM2* 遺伝子発現量を定量した。

3) AML を始めとする造血器腫瘍由来細胞株および骨髓細胞臨床検体における RCAN1 の発現を RT-PCR で解析した。また AML 細胞での RCAN1 の発現を shRNA により抑制し、apoptosis シグナルへの影響などについて検討した。さらに、RCAN1 抑制による calcineurin-NFAT 系への作用について検討した。

(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) のリシークエンス

我々は一度のシークエ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、それを用いて CML 細胞株 KCL-22 における細胞増殖関連遺伝子の解析を行った。その結果、同細胞株に低分子量 G タンパクをコードする *RAC2* cDNA の c203_204CC>AA 変異が存在し、本変異の結果 *RAC2* タンパクの 29 番目のアミノ酸であるプロリンがグルタミンに置換されることが明らかになった。驚くべき事に *RAC2*(P29Q) は極めて強いがん化能を有しており、3T3 細胞の形質転

換フォーカスを生じるだけでなく、代表的ながん遺伝子である *NRAS*(Q61K) よりも強く、3T3 細胞の足場非依存性増殖を誘導した。*RAC* タンパクは一般に細胞のアクチン重合を調整しており、活性化に伴って細胞膜の膜状仮足

(lamellipodium) や membrane ruffling を誘導する事が知られているが、*RAC2*(P29Q) を発現する 3T3 細胞は実際に著明な膜状仮足を示した。

さらに、CML 細胞株 4 種を含む計 39 種類の様々なヒトがん細胞株において

RAC1/*RAC2*/*RAC3* および *NRAS*/*KRAS*/*HRAS* の変異の有無をスクリーニングしたところ、

RAC1(P29S)、*RAC1*(N92I)、*RAC1*(C157Y)、*RAC2*(P29L) などが様々ながん検体・細胞株に存在し、がん化能を有していることを明らかにした。興味深いことに線維肉腫細胞株 HT1080 は *RAC1*(N92I) と別の低分子量 G タンパクである *NRAS*(Q61K) の両者を同時に保有していた。どちらの変異が発がんの本質的な役割を有しているかを検証する目的で、同細胞株に *RAC1* および *NRAS* の siRNA を導入したところ、*NRAS* siRNA では細胞死は誘導されず、*RAC1* siRNA 導入によってのみ著明な細胞死が誘導された。

2) *ELF4* の機能解析

ELF4 による転写活性化は野生型 *NPM1* によって抑制され、変異型 *NPM1* によって増強された。その活性は細胞に導入した野生型/変異型 *NPM1* 遺伝子の量比によって変化した。さらに *ELF4* の過剰発現により NIH3T3 は軟寒天培地においてコロニーを形成した。*ELF4* と同時に変異型 *NPM1* を導入するとコロニー数は増加し、コロニーサイズも大きくなった。一方、野生型 *NPM1* の導入は *ELF4* による NIH3T3 コロニー数、サイズ共に抑制した。これによって *ELF4* は NIH3T3 に形質転換をもたらすこと、その形質転換能は *NPM1* 変異の有無によって影響を受けることが明らかとなった。

3) *RCAN1* の機能解析

Calcineurin の阻害分子として知られる *RCAN1* が、CML 急性期において高い発現を示すことを見出した。さらに、*RCAN1* は AML 患者の骨髓単核細胞および AML、急性リンパ性白血病でも高頻度に発現していた。一方、正常骨髓では、CD34(+)CD38(-) (造血幹細胞) を含む全ての細胞分画で *RCAN1* の発現を認めなかった。次に、*RCAN1* shRNA をヒト AML 細胞株 HL60 に

導入してRCAN1発現を抑制したところ、1%FBS存在下でアポトーシスが誘導され、生存細胞数およびメチルセルロース培地上でのコロニー形成能が著明に低下した。さらに、RCAN1の発現抑制により、calcineurinのリン酸化活性の増加およびNF-AT転写因子の核移行を認めた。このことから、AML細胞においても、RCAN1はcalcineurin-NF-AT系の調節に関与していると結論された。

D&E. 考察及び結論

CML細胞株から全く新しいがん遺伝子RAC2(P29L)を発見した。さらに解析対象を広げること、RACファミリータンパクは様々なヒト腫瘍の直接的な発症原因となることが明らかになり、変異RASより強力ながん遺伝子であることを確認した。この事はさらに、(1) RASファミリーの変異それ自体では発がん能が不十分であるため、実際の発がんには他のがん遺伝子を必要とすること、(2) おそらくそのためにRAS機能をブロックするだけでは治療効果が乏しいこと、(3) RACファミリーのがん化変異はRASファミリーのそれに比べて相対的に強力ながん能を持つ事、(4) RACとRASのがん化変異が共存することは、おそらく両者は異なった細胞内系路を利用して細胞増殖をもたらすこと、などを示唆している。またELF4およびRCAN1の発現が共に白血病発症に促進的に働く事も明らかになった。

F. 健康危険情報

無し

G. 研究発表

1. 論文発表

間野博行

- 1) Kawazu M, Ueno T, Kontani K, Ogita Y, Ando M, Fukumura K, Yamato A, Soda M, Takeuchi K, Miki Y, Yamaguchi H, Yasuda T, Naoe T, Yamashita Y, Katada T, Choi YL & Mano H. “Transforming mutations of RAC guanosine triphosphatases in human cancers” *Proc Natl Acad Sci U S A*, doi: 10.1073/pnas.1216141110, 2013
- 2) Yamada T, Takeuchi S, Nakade J, Kita K, Nakagawa T, Nanjo S, Nakamura T, Matsumoto K, Soda M, Mano H, Uenaka T & Yano S. “Paracrine receptor activation by microenvironment triggers bypass survival signals and ALK inhibitor resistance in EML4-ALK lung cancer cells” *Clin Cancer Res*, **18**: 3592-3602, 2012
- 3) 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
- 4) 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
- 5) 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*, **18**: 378-381, 2012
- 6) 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*, **118**: 4427-4436, 2012
- 7) Soda M, Isobe K, Inoue A, Maemondo M, Oizumi S, Fujita Y, Gemma A, Yamashita Y, Ueno T, Takeuchi K, Choi YL, Miyazawa H, Tanaka T, Hagiwara K & Mano H. “A prospective PCR-based screening for the EML4-ALK oncogene in non-small cell lung cancer” *Clin Cancer Res*, **18**: 5682-5689, 2012
- 8) Ng KP, Hillmer AM, Chuah CT, Juan WC, Ko TK, Teo AS, Ariyaratne PN, Takahashi N, Sawada K, Fei Y, Soh S, Lee WH, Huang JW, Allen JC, Jr., Woo XY, Nagarajan N, Kumar V, Thalamuthu A, Poh WT, Ang AL, Mya HT, How GF, Yang LY, Koh LP, Chowbay B, Chang CT, Nadarajan VS, Chng WJ, Than H, Lim LC, Goh YT, Zhang S, Poh D, Tan P, Seet JE, Ang MK,

Chau NM, Ng QS, Tan DS, Soda M, Isobe K, Nothen MM, Wong TY, Shahab A, Ruan X, Cacheux-Rataboul V, Sung WK, Tan EH, Yatabe Y, Mano H, Soo RA, Chin TM, Lim WT, Ruan Y & Ong ST. “A common BIM deletion polymorphism mediates intrinsic resistance and inferior responses to tyrosine kinase inhibitors in cancer” *Nat Med*, **18**: 521-528, 2012

- 9) Mano H. “ALKoma: a cancer subtype with a shared target” *Cancer Discov*, **2**: 495-502, 2012
- 10) 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
- 11) 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*, **33**: 956-961, 2012
- 12) 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

宮崎泰司

- 1) Ando K, Tsushima H, Matsuo E, Horio K, Tominaga-Sato S, Imanishi D, Imaizumi Y, Iwanaga M, Itonaga H, Yoshida S, Hata T, Moriuchi R, Kiyoi H, Nimer S, Mano H, Naoe T, Tomonaga M, Miyazaki Y. “Mutations in the nucleolar phosphoprotein, nucleophosmin, promote the expression of the oncogenic transcription factor MEF/ELF4 in leukemia cells and potentiates transformation” *J Biol Chem*, in press, 2013.
- 2) Itonaga H, Taguchi J, Fukushima T, Tsushima H, Sato S, Ando K, Sawayama Y, Matsuo E, Yamasaki R, Onimaru Y, Imanishi D, Imaizumi Y, Yoshida S, Hata T, Moriuchi Y, Honda S, Miyazaki Y. “Distinct clinical features of infectious complications in adult T-cell leukemia/lymphoma patients after allogeneic hematopoietic stem cell” *Biol Blood Marrow Transplant*, in press, 2013.
- 3) Itonaga H, Tsushima H, Taguchi J, Fukushima T, Taniguchi H, Sato S, Ando K, Sawayama Y, Matsuo E, Yamasaki R, Onimaru Y, Imanishi D, Imaizumi Y, Yoshida S, Hata T, Moriuchi Y, Uike N, Miyazaki Y. “Treatment of relapsed adult T-cell leukemia/lymphoma after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: the Nagasaki Transplant Group experience” *Blood*, **121**: 219-225, 2012.
- 4) Ishida T, Hishizawa M, Kato K, Tanosaki R, Fukuda T, Taniguchi S, Eto T, Takatsuka Y, Miyazaki Y, Moriuchi Y, Hidaka M, Akashi K, Uike N, Sakamaki H, Morishima Y, Kato K, Suzuki R, Nishiyama T, Utsunomiya A. “Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for adult T-cell leukemia-lymphoma with special emphasis on preconditioning regimen: a nationwide retrospective study” *Blood*, **120**: 1734-1741, 2012.
- 5) Wakita A, Ohtake S, Takada S, Yagasaki F, Komatsu H, Miyazaki Y, Kubo K, Kimura Y, Takeshita A, Adachi Y, Kiyoi H, Yamaguchi T, Yoshida M, Ohnishi K, Miyawaki S, Naoe T, Ueda R, Ohno R. “Randomized comparison of fixed-schedule versus response-oriented individualized induction therapy and use of ubenimex during and after consolidation therapy for elderly patients with acute myeloid leukemia: the JALSG GML200 Study” *Int J Hematol*, **96**: 84-93, 2012.
- 6) Ohnishi K, Nakaseko C, Takeuchi J, Fujisawa S, Nagai T, Yamazaki H, Tauchi T, Imai K, Mori N, Yagasaki F, Maeda Y, Usui N, Miyazaki Y, Miyamura K, Kiyoi H, Ohtake S, Naoe T. “Long-term outcome of imatinib therapy, with assessment of its dosage and blood levels, for chronic myelogenous leukemia” *Cancer Sci*, **103**: 1071-1078, 2012.
- 7) Usuki K, Tojo A, Maeda Y, Kobayashi Y, Matsuda A, Ohyashiki K, Nakaseko C, Kawaguchi T, Tanaka H, Miyamura K, Miyazaki Y, Okamoto S, Oritani K, Okada M, Usui N,

- Nagai T, Amagasaki T, Wanajo A, Naoe T
 “Efficacy and safety of nilotinib in Japanese patients with imatinib-resistant or -intolerant Ph+ CML or relapsed/refractory Ph+ ALL: a 36-month analysis of a phase I and II study” *Int J Hematol*, **95**: 409-419, 2012.
- 8) Tsushima H, Iwanaga M, Miyazaki Y . “Late effect of Atomic bomb radiation on myeloid disorders: leukemia and myelodysplastic syndromes” *Int J Hematol*, **95**: 232-238, 2012.
- 9) Kanda J, Hishizawa M, Utsunomiya A, Taniguchi S, Eto T, Moriuchi Y, Tanosaki R, Kawano F, Miyazaki Y, Masuda M, Nagafuji K, Hara M, Takanashi M, Kai S, Atsuta Y, Suzuki R, Kawase T, Matsuo K, Nagamura-Inoue T, Kato S, Sakamaki H, Morishima Y, Okamura J, Ichinohe T, Uchiyama T. “Impact of graft-versus-host disease on outcomes after allogeneic hematopoietic cell transplantation for adult T-cell leukemia: a retrospective cohort study” *Blood*, **119**: 2141-2148, 2012.
- 10) Itonaga H, Tsushima H, Hata T, Matsuo E, Imanishi D, Imaizumi Y, Kawaguchi Y, Fukushima T, Doi Y, Mori S, Kamihira S, Tomonaga M, Miyazaki Y. “Successful treatment of a chronic-phase T-315I- mutated chronic myelogenous leukemia patient with a combination of imatinib and interferon-alfa” *Int J Hematol*, **95**: 209-213, 2012.
- ALL: a 36-month analysis of a phase I and II study” *Int J Hematol*, **95**: 409-419, 2012
- 3) Sato K, Nagai T, Izumi T, Ohmine K, Ozaki K, Muroi K & Ozawa K. “Rituximab-induced interstitial pneumonia due to CD8-positive T cell infiltration” *Acta Haematol*, **128**: 107-109, 2012
- 4) Oka S, Muroi K, Sato K, Fujiwara S, Oh I, Matsuyama T, Ohmine K, Suzuki T, Ozaki K, Mori M, Nagai T, Fukushima N, Tanaka A & Ozawa K. “Flow cytometric analysis of kappa and lambda light chain expression in endoscopic biopsy specimens before the diagnosis of B-cell lymphoma” *J Clin Exp Hematop*, **52**: 127-131, 2012
- 5) Oka S, Muroi K, Fujiwara S, Oh I, Matsuyama T, Ohmine K, Suzuki T, Ozaki K, Mori M, Nagai T, Ozawa K & Hanafusa T. “Prediction of progression from refractory cytopenia with unilineage dysplasia by analysis of bone marrow blast cell composition” *J Clin Exp Hematop*, **52**: 63-66, 2012
- 6) Ohnishi K, Nakaseko C, Takeuchi J, Fujisawa S, Nagai T, Yamazaki H, Tauchi T, Imai K, Mori N, Yagasaki F, Maeda Y, Usui N, Miyazaki Y, Miyamura K, Kiyoi H, Ohtake S & Naoe T. “Long-term outcome following imatinib therapy for chronic myelogenous leukemia, with assessment of dosage and blood levels: the JALSG CML202 study” *Cancer Sci*, **103**: 1071-1078, 2012
- 7) Meguro A, Ozaki K, Sato K, Oh I, Fujiwara S, Hosonuma R, Sasazaki M, Kikuchi Y, Hirata Y, Yamamoto C, Uesawa M, Kobayashi H, Matsu H, Okabe H, Uehara E, Nishikawa A, Tatara R, Hatano K, Matsuyama T, Toshima M, Ueda M, Ohmine K, Suzuki T, Mori M, Nagai T, Muroi K & Ozawa K. “Rituximab plus 70% cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine and prednisone for Japanese patients with diffuse large B-cell lymphoma aged 70 years and older” *Leuk Lymphoma*, **53**: 43-49, 2012
- 8) Kobayashi H, Nagai T, Omine K, Sato K, Ozaki K, Suzuki T, Mori M, Muroi K, Yano T, Yamamoto H & Ozawa K. “Clinical outcome of non-surgical treatment for primary small
- 永井正
- 1) Fujiwara S, Muroi K, Hirata Y, Sato K, Matsuyama T, Ohmine K, Suzuki T, Ozaki K, Mori M, Nagai T, Tanaka A & Ozawa K. “Clinical features of de novo CD25(+) diffuse large B-cell lymphoma” *Hematology*, **18**: 14-19, 2013
- 2) Usuki K, Tojo A, Maeda Y, Kobayashi Y, Matsuda A, Ohyashiki K, Nakaseko C, Kawaguchi T, Tanaka H, Miyamura K, Miyazaki Y, Okamoto S, Oritani K, Okada M, Usui N, Nagai T, Amagasaki T, Wanajo A & Naoe T. “Efficacy and safety of nilotinib in Japanese patients with imatinib-resistant or -intolerant Ph+ CML or relapsed/refractory Ph+

intestinal lymphoma diagnosed with
double-balloon endoscopy” *Leuk Lymphoma*,
2012

- 9) Kobayashi H, Matsuyama T, Oka S, Fujiwara S,
Oh I, Suzuki T, Ozaki K, Mori M, Nagai T,
Ozawa K & Muroi K. “Autologous
hematopoietic recovery with aberrant antigen
expression after allogeneic bone marrow
transplantation” *J Clin Exp Hematop*, **52**: 81-83,
2012

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

「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

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。本年度はこれを用いて慢性骨髄性白血病急性転化期由来細胞株KCL22からBCR-ABL1融合cDNAと共に変異RAC2を同定した。変異RAC2は点突然変異によって29番目のアミノ酸であるプロリンがグルタミンに変化しており、その結果、恒常的にGTP結合型へと変化して強力な発がん能を獲得することが示された。また本細胞株のRAC2(P29Q)以外にも多くのがん腫においてRAC1/RAC2が発がん変異を獲得していることが示され、これら変異陽性がん種においては、RACタンパクが有効な治療標的と考えられた。

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

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」を用いて、白血病芽球分画および白血病細胞株か

ら変異遺伝子をスクリーニングする。また同じ細胞から調製したcDNAを用いてレトロウィルスcDNA発現ライブラリーを構築し、発がん能を有する遺伝子を同定する。この領すクリーニングを組み合わせる事で、配列変異があり、かつ発がん能を有する異常遺伝子を効率よく同定する。

(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) 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KCL-22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。その結果、同細胞株にBCR-ABL1融合cDNA、TP53 cDNAの1塩基欠失が検出されただけでなく、479種類の非同義点突然変異(non-synonymous point mutations)が計388遺伝子上に存在する事がわかった。その中にRASスーパーファミリーに属する低分子GタンパクをコードするRAC2 cDNAのc203_204CC>AA変異が存在し、本変

異の結果RAC2タンパクの29番目のアミノ酸であるプロリンがグルタミンに置換することが明らかになった。驚くべき事にRAC2(P29Q)は極めて強いがん化能を有しており、3T3細胞の形質転換フォーカスを生じるだけでなく、代表的ながん遺伝子であるNRAS(Q61K)よりも強く、3T3細胞の足場非依存性増殖を誘導した。

RAC2(P29Q)は恒常的にGTP結合型となっており、ルシフェラーゼアッセイからもRAC経路シグナルが著明に活性化されていることがわかった。RACタンパクは一般に細胞のアクチン重合を調整しており、活性化に伴って細胞膜の膜状仮足 (lamellipodium)やmembrane rufflingを誘導する事が知られているが、RAC2(P29Q)を発現する3T3細胞は実際に著明な膜状仮足を示した。すなわちKCL22はBCR-ABL1以外に第2の強力ながん遺伝子としてRAC2(P29Q)を有することが示された。

さらに、CML細胞株4種を含む計39種類の様々なヒトがん細胞株において

RAC1/RAC2/RAC3およびNRAS/KRAS/HRASの変異の有無をスクリーニングしたところ、乳がん細胞株MB-157にRAC1(P29S) および線維肉腫細胞株HT1080にRAC1(N92I)をそれぞれ同定した。さらに既知のがん変異データベースCOSMICには、別の乳がん細胞株HCC1143にRAC2(P29L)が、またがん臨床検体の口腔腫瘍1例にRAC1(P29S)、肺腺がん1例に

RAC1(C157Y)が、それぞれ存在する事が報告されていた。これらRAC1/RAC2変異体はいずれもRAC2(P29Q)と同様に強力ながん化能を有していることを確認した。興味深いことに

HT1080はRAC1(N92I)とNRAS(Q61K)の両者を同時に保有していた。NRAS/KRAS/HRASのがん化変異は、ヒト腫瘍に最も高頻度に存在する発がん変異として知られているが、興味深いことに、RAS阻害剤の臨床試験で有効性が示されたものはこれまでない。同じ低分子GタンパクであるRAC1とNRASのがん化変異が同時に存在するHT1080において、どちらの変異が発がんの本質的な役割を有しているかを検証する目的で、同細胞株にRAC1およびNRASのsiRNAを導入した。驚くべき事にNRAS siRNAでは細胞死は誘導されず、RAC1 siRNA導入によってのみ著明な細胞死が誘導された。

RAC1/NRASのsiRNAを同時に導入しても

RAC1 siRNA単独時と増殖抑制効果は同じであった事から、RAC1(N92I)がHT1080の発がんの本質的な変異である事が明らかになった。この事はさらに、(1) RASファミリーの変異それ自体では発がん能が不十分であるため、実際の発がんには他のがん遺伝子を必要とすること、(2) おそらくそのためにRAS機能をブロックするだけでは治療効果が乏しいこと、(3) RACファミリーのがん化変異はRASファミリーのそれに比べて相対的に強力な発がん能を持つ事、(4) RACとRASのがん化変異が共存することは、おそらく両者は異なった細胞内系路を利用して細胞増殖をもたらすこと、などを示唆している。

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細胞株から全く新しいがん遺伝子RAC2(P29L)を発見した。さらに解析対象を広げることで、RACファミリータンパクは様々なヒト腫瘍の発症原因となることを示した。RACファミリーのがん化変異は頻度は低いものの、極めて強力な造腫瘍能を有していることから、RACの活性阻害剤あるいはRACの直ぐ下流に存在する機能分子の活性阻害剤はRAC変異腫瘍の全く新しい分子標的療薬となると予想され、そのような薬剤開発が期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kawazu M, Ueno T, Kontani K, Ogita Y, Ando M, Fukumura K, Yamato A, Soda M, Takeuchi K, Miki Y, Yamaguchi H, Yasuda T, Naoe T, Yamashita Y, Katada T, Choi YL & Mano H. "Transforming mutations of RAC guanosine triphosphatases in human cancers" *Proc Natl Acad Sci U S A*, doi: 10.1073/pnas.1216141110, 2013

- 2) Yamada T, Takeuchi S, Nakade J, Kita K, Nakagawa T, Nanjo S, Nakamura T, Matsumoto K, Soda M, Mano H, Uenaka T & Yano S. “Paracrine receptor activation by microenvironment triggers bypass survival signals and ALK inhibitor resistance in EML4-ALK lung cancer cells” *Clin Cancer Res*, **18**: 3592-3602, 2012
- 3) 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
- 4) 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
- 5) 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*, **18**: 378-381, 2012
- 6) 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*, **118**: 4427-4436, 2012
- 7) Soda M, Isobe K, Inoue A, Maemondo M, Oizumi S, Fujita Y, Gemma A, Yamashita Y, Ueno T, Takeuchi K, Choi YL, Miyazawa H, Tanaka T, Hagiwara K & Mano H. “A prospective PCR-based screening for the EML4-ALK oncogene in non-small cell lung cancer” *Clin Cancer Res*, **18**: 5682-5689, 2012
- 8) Ng KP, Hillmer AM, Chuah CT, Juan WC, Ko TK, Teo AS, Ariyaratne PN, Takahashi N, Sawada K, Fei Y, Soh S, Lee WH, Huang JW, Allen JC, Jr., Woo XY, Nagarajan N, Kumar V, Thalamuthu A, Poh WT, Ang AL, Mya HT, How GF, Yang LY, Koh LP, Chowbay B, Chang CT, Nadarajan VS, Chng WJ, Than H, Lim LC, Goh YT, Zhang S, Poh D, Tan P, Seet JE, Ang MK, Chau NM, Ng QS, Tan DS, Soda M, Isobe K, Nothen MM, Wong TY, Shahab A, Ruan X, Cacheux-Rataboul V, Sung WK, Tan EH, Yatabe Y, Mano H, Soo RA, Chin TM, Lim WT, Ruan Y & Ong ST. “A common BIM deletion polymorphism mediates intrinsic resistance and inferior responses to tyrosine kinase inhibitors in cancer” *Nat Med*, **18**: 521-528, 2012
- 9) Mano H. “ALKoma: a cancer subtype with a shared target” *Cancer Discov*, **2**: 495-502, 2012
- 10) 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
- 11) 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*, **33**: 956-961, 2012
- 12) 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
- 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る。これまでの検討で変異型 NPM1 は ETS 転写因子の一つである ELF4 蛋白質を活性化する一方、野生型 NPM1 はその活性を抑制した。さらに ELF4 は P53 の調節因子である HDM2 プロモーターを活性化する。今回、（1）ELF4 による HDM2 プロモーター活性化は野生型/変異型 NPM1 の量によって変化すること、（2）ELF4 の過剰発現が NIH3T3 細胞のコロニー形成能を増強するが、野生型 NPM1 はそれを抑制し、変異型 NPM1 が増強することが明らかとなった。さらに、（3）野生型 NPM1 による ELF4 機能抑制は ELF4 の DNA 結合抑制によることが考えられた。AML 検体を用いた検討においては（4）変異型 NPM1 の例は野生型と比較して HDM2 発現が高く、ELF4 発現の高い例で HDM2 発現が高いことが示され、*in vitro* の解析結果を反映したものであった。以上より、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 HDM2/P53 経路を介して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。NPM1 遺伝子は正常核型 AML の約半数に変異が見られるが、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を活性化する。これまでの検討で ELF4 は HDM2 プロモーターを活性化すること、NPM1 と結合すること、変異型 NPM1 は ELF4 の持つ転写活性能を増強することを明らかにしてきた。高率に NPM1 変異が見られる正常核型 AML における ELF4 の役割をさらに解析するために、NPM1 と ELF4 の機能的関連を *in vitro* にて検討し、また AML 検体を用いても解析を実施した。

B 研究方法

ELF4 の転写活性化は 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。対象としては白血病細胞株、上皮系細胞株を用いた。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 DNA への結合における NPM1 タンパク質の機能解析には、ELF4 結合コンセンサス DNA 配列を持つ APET オリゴヌクレオチドを使った EMSA 法を用いた。

ELF4 による NIH3T3 細胞のコロニー形成能は発現ベクターに組み込んだ ELF4 をリン酸カルシウム法で NIH3T3 に導入した後、軟寒天培地で2週間培養後、コロニー数を計測した。ELF4 と同時に野生型/変異型 NPM1 を発現させ、その影響を検討した。

AML 患者 22 例より CD34 陽性細胞をカラムビーズ法を用いて選択し、total RNA を抽出した。cDNA に転換後、定量的 PCR 法を用いて ELF4、HDM2 遺伝子発現量を定量した。また、これらの検体における NPM1 遺伝子の変異の有無を、NPM1 遺伝子配列を調べることで同定した。

（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) 野生型/変異 NPM1 による ELF4 の活性調節
培養細胞（U937, 293T 細胞）に ELF4、HDM2 プロモーターを組み込んだレポーター、野生型/変異型 NPM1 を導入し、HDM2 プロモーター活性を検討したところ、ELF4 による HDM2 プロモーター活性化は野生型 NPM1 によって抑制され、

変異型NPM1によって増強された。その活性は細胞に導入した野生型/変異型NPM1遺伝子の量（両者の比）によって変化した。これによってHDM2プロモーターは白血病細胞内でELF4によって活性化されること、変異型NPM1によるELF4活性化は野生型/変異型の量的な関係で決定されることが示された。

2) 野生型NPM1によるELF4のDNA結合の阻害

EMSAを用いて検討したところ、野生型NPM1を強制発現するとELF4のDNAへの結合が低下した。

3) NIH3T3のコロニー形成解析

ELF4の過剰発現によりNIH3T3は軟寒天培地においてコロニーを形成した。ELF4と同時に変異型NPM1を導入するとコロニー数は増加し、コロニーサイズも大きくなった。一方、野生型NPM1の導入はELF4によるNIH3T3コロニー数、サイズ共に抑制した。これによってELF4はNIH3T3に形質転換をもたらすこと、その形質転換能はNPM1変異の有無によって影響を受けることが明らかとなった。

4) 臨床検体を用いての検討

AMLの22検体を用いて、NPM1変異の有無、並びにCD34陽性細胞におけるELF4およびHDM2発現量を定量した。その結果、NPM1変異のある例はない例に比較してHDM2発現量が有意に高く、ELF4発現量が高い例はHDM2発現量が有意に高かった。

D&E. 考察及び結論

本研究によって、ELF4の細胞形質転換能がNPM1変異によって増強すること、野生型NPM1がELF4のDNA結合阻害を通じてELF4転写活性抑制をおこしていることが示された。変異型NPM1は野生型NPM1と結合し両者とも核内から細胞質へ移動することが知られており、変異によって野生型/変異型NPM1の細胞局在が核内から細胞質に移ることになる。変異型NPM1によるELF4活性化の機序は、野生型NPM1の局在変化に伴うELF4へのDNA結合阻害が失われるためと考えられる。ELF4が白血病細胞においてHDM2プロモーターを活性化することと合わせて、ELF4/NPM1/HDM2の関連は、AML

検体においても今回の検討を反映したものであることが示された。すなわち、ELF4発現はHDM2発現と関連し、NPM1変異があると(ELF4上昇を通じて)HDM2発現が高くなっていた。

ELF4の細胞形質転換能がNPM1の変異状況によって変化するという結果は重要であり、AMLに見られる遺伝子異常によって細胞動態の変化があり、従ってそれにとまって治療戦略も異なる可能性がある。実際、NPM1変異の有無によってAMLの治療反応性(予後)が異なるという報告もあり、今後、重要なポイントと考えられる。

NPM1は正常核型AMLにおいてきわめて高率(約50%)に変異が同定される。今回の検討は、正常核型のAMLにおいてELF4がその発症または維持に一定の役割を果たすこと、その機能がNPM1変異の有無によって変動していること、また、そこにはP53の関与があることを示唆している。AMLにおける様々な遺伝子異常が同定されていく中、こうした遺伝子異常による蛋白機能の変化とそれによる細胞動態の変化を捉えることは、今後AML治療の方向を考える上で重要である。

F. 健康危険情報

無し

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ando K, Tsushima H, Matsuo E, Horio K, Tominaga-Sato S, Imanishi D, Imaizumi Y, Iwanaga M, Itonaga H, Yoshida S, Hata T, Moriuchi R, Kiyoi H, Nimer S, Mano H, Naoe T, Tomonaga M, Miyazaki Y. "Mutations in the nucleolar phosphoprotein, nucleophosmin, promote the expression of the oncogenic transcription factor MEF/ELF4 in leukemia cells and potentiates transformation" *J Biol Chem*, in press, 2013.
- 2) Itonaga H, Taguchi J, Fukushima T, Tsushima H, Sato S, Ando K, Sawayama Y, Matsuo E, Yamasaki R, Onimaru Y, Imanishi D, Imaizumi Y, Yoshida S, Hata T, Moriuchi Y, Honda S, Miyazaki Y. "Distinct clinical features of infectious complications

- in adult T-cell leukemia/lymphoma patients after allogeneic hematopoietic stem cell" *Biol Blood Marrow Transplant*, in press, 2013.
- 3) Itonaga H, Tsushima H, Taguchi J, Fukushima T, Taniguchi H, Sato S, Ando K, Sawayama Y, Matsuo E, Yamasaki R, Onimaru Y, Imanishi D, Imaizumi Y, Yoshida S, Hata T, Moriuchi Y, Uike N, Miyazaki Y. "Treatment of relapsed adult T-cell leukemia/lymphoma after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: the Nagasaki Transplant Group experience" *Blood*, **121**: 219-225, 2012.
 - 4) Ishida T, Hishizawa M, Kato K, Tanosaki R, Fukuda T, Taniguchi S, Eto T, Takatsuka Y, Miyazaki Y, Moriuchi Y, Hidaka M, Akashi K, Uike N, Sakamaki H, Morishima Y, Kato K, Suzuki R, Nishiyama T, Utsunomiya A. "Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for adult T-cell leukemia-lymphoma with special emphasis on preconditioning regimen: a nationwide retrospective study" *Blood*, **120**: 1734-1741, 2012.
 - 5) Wakita A, Ohtake S, Takada S, Yagasaki F, Komatsu H, Miyazaki Y, Kubo K, Kimura Y, Takeshita A, Adachi Y, Kiyoi H, Yamaguchi T, Yoshida M, Ohnishi K, Miyawaki S, Naoe T, Ueda R, Ohno R. "Randomized comparison of fixed-schedule versus response-oriented individualized induction therapy and use of ubenimex during and after consolidation therapy for elderly patients with acute myeloid leukemia: the JALSG GML200 Study" *Int J Hematol*, **96**: 84-93, 2012.
 - 6) Ohnishi K, Nakaseko C, Takeuchi J, Fujisawa S, Nagai T, Yamazaki H, Tauchi T, Imai K, Mori N, Yagasaki F, Maeda Y, Usui N, Miyazaki Y, Miyamura K, Kiyoi H, Ohtake S, Naoe T. "Long-term outcome of imatinib therapy, with assessment of its dosage and blood levels, for chronic myelogenous leukemia" *Cancer Sci*, **103**: 1071-1078, 2012.
 - 7) Usuki K, Tojo A, Maeda Y, Kobayashi Y, Matsuda A, Ohyashiki K, Nakaseko C, Kawaguchi T, Tanaka H, Miyamura K, Miyazaki Y, Okamoto S, Oritani K, Okada M, Usui N, Nagai T, Amagasaki T, Wanajo A, Naoe T "Efficacy and safety of nilotinib in Japanese patients with imatinib-resistant or -intolerant Ph+ CML or relapsed/refractory Ph+ ALL: a 36-month analysis of a phase I and II study" *Int J Hematol*, **95**: 409-419, 2012.
 - 8) Tsushima H, Iwanaga M, Miyazaki Y. "Late effect of Atomic bomb radiation on myeloid disorders: leukemia and myelodysplastic syndromes" *Int J Hematol*, **95**: 232-238, 2012.
 - 9) Kanda J, Hishizawa M, Utsunomiya A, Taniguchi S, Eto T, Moriuchi Y, Tanosaki R, Kawano F, Miyazaki Y, Masuda M, Nagafuji K, Hara M, Takanashi M, Kai S, Atsuta Y, Suzuki R, Kawase T, Matsuo K, Nagamura-Inoue T, Kato S, Sakamaki H, Morishima Y, Okamura J, Ichinohe T, Uchiyama T. "Impact of graft-versus-host disease on outcomes after allogeneic hematopoietic cell transplantation for adult T-cell leukemia: a retrospective cohort study" *Blood*, **119**: 2141-2148, 2012.
 - 10) Itonaga H, Tsushima H, Hata T, Matsuo E, Imanishi D, Imaizumi Y, Kawaguchi Y, Fukushima T, Doi Y, Mori S, Kamihira S, Tomonaga M, Miyazaki Y. "Successful treatment of a chronic-phase T-315I-mutated chronic myelogenous leukemia patient with a combination of imatinib and interferon-alfa" *Int J Hematol*, **95**: 209-213, 2012.
- H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

ゲノミクス解析に基づく白血病の新規分類法開発

急性白血病に対する新規治療標的分子の探索と薬剤耐性の克服

研究分担者 永井 正（自治医科大学・医学部・准教授）

研究要旨：急性骨髄性白血病(AML)において RCAN1 分子が異所性に高発現しており、低濃度血清下での細胞の生存に重要であることを見出した。また、calcineurin-NF-AT 系が RCAN1 の作用標的の一つであることを明らかにし、RCAN1 シグナル系が治療標的となる可能性を示した。さらに、DNA メチル化阻害薬 Azacitidine(AZA)に対する耐性細胞株を樹立し、耐性機序の解析を行った。その結果、uridine-cytidine kinase 2 (UCK2)の変異に起因する AZA 活性化プロセスの障害が示唆され、耐性克服法の開発に有用な知見が得られた。

A. 研究目的

急性骨髄性白血病(AML)の治療成績向上のためには、分子標的治療の応用が必須である。本研究では、calcineurin 阻害分子として知られる RCAN1 の白血病細胞における発現、役割を解析することで、新たな標的分子の探索を試みた。一方、本研究では、DNA メチル化阻害薬 Azacitidine(AZA)に対する効果的な耐性克服法を確立する目的で、AZA 耐性機序についても解析した。さらに、histone deacetylase 阻害薬 (HDACI)による耐性克服の可能性について検討した。

B. 研究方法

1. RCAN1 の解析

AML を始めとする造血器腫瘍由来細胞株および患者骨髄単核細胞、さらに健常人骨髄細胞における RCAN1 の発現を RT-PCR および定量 PCR 法で解析した。AML 細胞での RCAN1 の発現を shRNA により抑制し、apoptosis シグナルへの影響などについて検討した。さらに、RCAN1 抑制による calcineurin-NF-AT 系への作用について検討した。

2. AZA 耐性機序の解析

ヒト AML 由来細胞株 THP-1 および HL60 より AZA 耐性細胞株 THP-1/AR および HL60/AR を

樹立し、AZA 耐性機序を解析した。さらに、HDACI である romidepsin による AZA 耐性克服について、検討した。

(倫理面への配慮)

本研究は「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遺伝子解析研究倫理審査委員会の承認を得ている。検体は文書による同意を得たうえで採取し、連結可能匿名化したうえで使用した。

C. 研究結果

1. RCAN1 の解析

慢性骨髄性白血病の骨髄から CD133 陽性細胞を単離し、各病期における遺伝子発現の差異を DNA microarray 法で検討した。その結果、calcineurin の阻害分子として知られる RCAN1 が、急性期において高い発現を示すことを見出した。さらに、RCAN1 は AML 患者の骨髄単核細胞および AML、急性リンパ性白血病でも高頻度に発現していた。一方、正常骨髄では、CD34(+)CD38(-) (造血幹細胞)を含む全ての細胞分画で RCAN1 の発現を認めなかった。次に、RCAN1 shRNA をヒト AML 細胞株 HL60 に導入して RCAN1 発現を抑制したところ、1%FBS 存在下でアポトーシスが誘導され、生存細胞数

およびメチルセルロース培地上でのコロニー形成能が著明に低下した。さらに、RCAN1の発現抑制により、calcineurinのリン酸化活性の増加およびNF-AT転写因子の核移行を認めた。このことから、AML細胞においても、RCAN1はcalcineurin-NF-AT系の調節に関与していると結論された。

2. AZA 耐性機序の解析

ヒトAML細胞株THP-1およびHL60を親株として、AZA耐性株THP-1/ARおよびHL60/ARをクローニングした。親株で認めたAZA投与によるG2/M期細胞の増加およびJNK/SAPK系の活性化に続くapoptosisの誘導が、AZA耐性株では認めなかった。また、AZA耐性株では、AZA投与後もDNA methyltransferase(DNMT)の活性および蛋白量の低下を認めなかった。この機序を解明するため、AZA活性化プロセスの律速酵素であるuridine-cytidine kinase 2(UCK2)の遺伝子変異の有無について検討した。その結果、THP-1/AR細胞およびHL60/AR細胞において共通の点変異を、exon 4およびexon 5領域に複数個認めた。このことから、UCK2活性の低下に起因するAZA活性化プロセスの低下がAZA耐性の重要な機序であると推察された。

3. RomidepsinによるAZA耐性克服

親株ではAZA投与によるp16 mRNAの増加を認めたが、AZA耐性株では認めなかった。一方、HDACIであるromidepsin投与後では、AZA耐性株でもp16 mRNAの発現増加を認めた。さらに、romidepsin投与後はAZA耐性株においてもapoptosisが誘導され、細胞増殖が抑制された。一方、AZAとromidepsinとの併用効果をSteel and Peckham法によるisobologram解析で検討したところ、親株、AZA耐性株の全てで相加効果を認めた。最後に、HL60およびHL60/ARをBalb/c AJcl-nu/nuマウスに移植し、AZAおよびromidepsinの効果を検討した。その結果、HL60/AR移植マウスでは、AZAによる腫瘍増大抑制効果を認めなかったが、romidepsinは腫瘍増大を抑制した。さらに、併用において最も高い腫瘍増大抑制効果を示した。

D. 考察

本研究では、RCAN1に着目したAMLの分子病態の解析を行った。RCAN1は正常骨髄では造血幹細胞も含めてほとんど発現しておらず、aggressive typeの白血病において異所性に高発現しているものと推察された。異所性の発現調節機序を明らかにするため、AML細胞におけるRCAN1遺伝子プロモーターの機能解析を行った。しかしながら、特異的な発現調節領域の同定には至らず、今後のさらなる検討が必要である。RCAN1の発現抑制実験の結果から、1%FBS存在下ではAML細胞の生存にRCAN1が重要であることが示された。この結果は、劣悪な環境での生存・増殖においてRCAN1の存在が非常に重要であることを示唆している。また、AML細胞においてもcalcineurin-NF-AT系がRCAN1の作用標的の一つであることが示された。今後は、RCAN1によるシグナル系が有効な治療標的になるか検討する必要がある。

本研究では、AMLに対しても応用が期待されているDNAメチル阻害薬AZAに対する耐性機序の解析も行った。AZA耐性細胞株では、AZA投与後も主要な標的であるDNMTの抑制が起こらないことが示された。この結果は、細胞内におけるAZA活性の低下を示唆する。AZAの活性低下の原因を明らかにするため、AZAの細胞内移行に関与するトランスポーター蛋白hENT1、hENT2、hCNT1および細胞外への排出に関与するp糖蛋白の発現量を検討したが、いずれもAZA耐性株と親株とで差を認めなかった。一方、AZA活性化プロセスの律速酵素UCK2の遺伝子変異が見出された。この遺伝子変異によるUCK2活性の低下が、細胞内取込後のAZA活性化を障害しているものと思われ、現在、その証明実験を施行中である。

本研究では、HDACIであるromidepsinがAZA耐性を克服する可能性を示した。AZAとHDACIとの併用は既に海外において臨床試験が開始されているが、AZA耐性の克服ないしAZA耐性細胞の出現の予防という観点からも興味深い知見と思われる。

E. 結論

1. RCAN1はaggressive typeの白血病に異所性に発現しており、その生存に重要な役割を果たしている。

2. AZA 耐性機序として、UCK2 遺伝子変異による AZA 活性化プロセスの障害が考えられた。
3. HDACI である romidepsin による AZA 耐性克服の可能性が示された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Fujiwara S, Muroi K, Hirata Y, Sato K, Matsuyama T, Ohmine K, Suzuki T, Ozaki K, Mori M, Nagai T, Tanaka A & Ozawa K. "Clinical features of de novo CD25(+) diffuse large B-cell lymphoma" *Hematology*, **18**: 14-19, 2013
- 2) Usuki K, Tojo A, Maeda Y, Kobayashi Y, Matsuda A, Ohyashiki K, Nakaseko C, Kawaguchi T, Tanaka H, Miyamura K, Miyazaki Y, Okamoto S, Oritani K, Okada M, Usui N, Nagai T, Amagasaki T, Wanajo A & Naoe T. "Efficacy and safety of nilotinib in Japanese patients with imatinib-resistant or -intolerant Ph+ CML or relapsed/refractory Ph+ ALL: a 36-month analysis of a phase I and II study" *Int J Hematol*, **95**: 409-419, 2012
- 3) Sato K, Nagai T, Izumi T, Ohmine K, Ozaki K, Muroi K & Ozawa K. "Rituximab-induced interstitial pneumonia due to CD8-positive T cell infiltration" *Acta Haematol*, **128**: 107-109, 2012
- 4) Oka S, Muroi K, Sato K, Fujiwara S, Oh I, Matsuyama T, Ohmine K, Suzuki T, Ozaki K, Mori M, Nagai T, Fukushima N, Tanaka A & Ozawa K. "Flow cytometric analysis of kappa and lambda light chain expression in endoscopic biopsy specimens before the diagnosis of B-cell lymphoma" *J Clin Exp Hematop*, **52**: 127-131, 2012
- 5) Oka S, Muroi K, Fujiwara S, Oh I, Matsuyama T, Ohmine K, Suzuki T, Ozaki K, Mori M, Nagai T, Ozawa K & Hanafusa T. "Prediction of progression from refractory cytopenia with unilineage dysplasia by analysis of bone marrow blast cell composition" *J Clin Exp Hematop*, **52**: 63-66, 2012
- 6) Ohnishi K, Nakaseko C, Takeuchi J, Fujisawa S, Nagai T, Yamazaki H, Tauchi T, Imai K, Mori N, Yagasaki F, Maeda Y, Usui N, Miyazaki Y,

Miyamura K, Kiyoi H, Ohtake S & Naoe T. "Long-term outcome following imatinib therapy for chronic myelogenous leukemia, with assessment of dosage and blood levels: the JALSG CML202 study" *Cancer Sci*, **103**: 1071-1078, 2012

- 7) Meguro A, Ozaki K, Sato K, Oh I, Fujiwara S, Hosonuma R, Sasazaki M, Kikuchi Y, Hirata Y, Yamamoto C, Uesawa M, Kobayashi H, Matsu H, Okabe H, Uehara E, Nishikawa A, Tataru R, Hatano K, Matsuyama T, Toshima M, Ueda M, Ohmine K, Suzuki T, Mori M, Nagai T, Muroi K & Ozawa K. "Rituximab plus 70% cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine and prednisone for Japanese patients with diffuse large B-cell lymphoma aged 70 years and older" *Leuk Lymphoma*, **53**: 43-49, 2012
 - 8) Kobayashi H, Nagai T, Omine K, Sato K, Ozaki K, Suzuki T, Mori M, Muroi K, Yano T, Yamamoto H & Ozawa K. "Clinical outcome of non-surgical treatment for primary small intestinal lymphoma diagnosed with double-balloon endoscopy" *Leuk Lymphoma*, 2012
 - 9) Kobayashi H, Matsuyama T, Oka S, Fujiwara S, Oh I, Suzuki T, Ozaki K, Mori M, Nagai T, Ozawa K & Muroi K. "Autologous hematopoietic recovery with aberrant antigen expression after allogeneic bone marrow transplantation" *J Clin Exp Hematop*, **52**: 81-83, 2012
- ##### 2. 学会発表
- 1) Sripayap P, Nagai T, Uesawa M, Kobayashi H, Tsukahara T, Ohmine K, Muroi K, Ozawa K.: Histone deacetylase inhibitor romidepsin overcomes AZA-resistance in AZA-resistant cell lines. The 3rd JSH International Symposium, Kawagoe, Japan, May 26-27, 2012
 - 2) Sripayap P, Nagai T, Uesawa M, Kobayashi H, Tsukahara T, Ohmine K, Muroi K, Ozawa K.: Histone deacetylase inhibitor romidepsin overcomes 5-azacytidine (AZA) resistance. 第 74 回日本血液学会学術集会, 2012 年 10 月 19-21 日、京都
 - 3) Sripayap P, Nagai T, Uesawa M, Kobayashi H,

Tsukahara T, Ohmine K, Muroi K, Baley G, Ozawa K.: Overcoming resistance to 5-azacytidine in acute myeloid leukemia. The 54th Annual Meeting of American Society for Hematology, Atlanta, USA, December 8-11, 2012.

G. 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
Kawazu M, Ueno T, Kontani K, Ogita Y, Ando M, Fukumura K, Yamato A, Soda M, Takeuchi K, Miki Y, Yamaguchi H, Yasuda T, Naoe T, Yamashita Y, Katada T, Choi YL & Mano H	Transforming mutations of RAC guanosine triphosphatases in human cancers	Proc Natl Acad Sci U S A		doi: 10.1073/pnas.1216141110	2013
Yamada T, Takeuchi S, Nakade J, Kita K, Nakagawa T, Nanjo S, Nakamura T, Matsumoto K, Soda M, Mano H, Uenaka T & Yano S	Paracrine receptor activation by microenvironment triggers bypass survival signals and ALK inhibitor resistance in EML4-ALK lung cancer cells	Clin Cancer Res	18	3592-3602	2012
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	18	378-381	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	118	4427-4436	2012
Soda M, Isobe K, Inoue A, Maemondo M, Oizumi S, Fujita Y, Gemma A, Yamashita Y, Ueno T, Takeuchi K, Choi YL, Miyazawa H, Tanaka T, Hagiwara K & Mano H	A prospective PCR-based screening for the EML4-ALK oncogene in non-small cell lung cancer	Clin Cancer Res	18	5682-5689	2012