

201313053A

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造血器悪性腫瘍の分子診  
断法開発」に関する研究

平成25年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 間野 博行

平成26(2014)年5月

# 目 次

I.	総括研究報告書	
	「ゲノミクス解析に基づく造血器悪性腫瘍の分子診断法開発」に関する研究 東京大学・大学院医学系研究科・細胞情報学分野 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 東京大学・大学院医学系研究科・細胞情報学分野 間野博行 .....	6
2.	「慢性骨髄性白血病における <i>BCR-ABL1</i> 遺伝子キナーゼドメイン変異の検討」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 .....	9
3.	「急性骨髄性白血病細胞における azacitidine 耐性機序の解析」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造血器悪性腫瘍の分子診断法開発」に関する研究

主任研究者： 間野 博行 東京大学大学院医学系研究科 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。急性骨髄性白血病の症例で造血幹細胞移植を行った後再発した症例があったが、各病期の検体を用いて全エクソン配列解析を行った。その結果、元の白血病クローンが再発したのではなく、ドナーの血中に存在する遺伝子異常を有するクローンが移植時に別のがん化変異を獲得して白血病へと移行していた事が明らかになった。すなわち一見正常な我々の体内に遺伝子異常を有するpre-leukemic cloneが存在する事が明らかになった。また慢性骨髄性白血病（CML）治療中の変異を明らかにするために91例の慢性期CML例に対して治療後1年のキナーゼドメイン変異の有無と変異出現に関連する臨床的因子を検討した。その結果、不十分な治療反応と関連したのは、minor BCR-ABL1の存在、治療薬の減量、イマチニブ抵抗性のキナーゼドメイン変異であった。また、十分な治療反応性の喪失と関連していたのは治療薬の減量と35bpインサーションを有するスプライスバリエーションの出現であった。以上より、治療12ヶ月後における治療反応不十分例においては遺伝子変異検索が必要なが示唆された。一方、DNAメチル化阻害薬Azacitidine(AZA)に対する耐性細胞株THP-1/ARおよびHL60/ARを用いて、急性骨髄性白血病(AML)細胞におけるAZA耐性機序の解析を行った。その結果、uridine-cytidine kinase 2 (UCK2)遺伝子変異が両細胞株に共通に認められた。さらに、UCK2遺伝子の発現実験によりこれらの遺伝子変異がAZA耐性に重要であることが明らかになった。

分担研究者

間野博行	東京大学大学院医学系研究科・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

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。

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

B 研究方法

1)各検体試料よりゲノムDNAを抽出して断片化した後、SureSelectシステム(Agilent社)を用いてエクソン領域のみを高効率に純化した。これを次世代シーケンサーによる配列解析を行い、各試料毎に30-40Gbpの大量の塩基

配列を得た。それを独自のコンピューターパイプラインによって非同義変異のリストを得た。

2) 長崎県下にて TKI 治療を受けている慢性期 CML 症例 91 例において、(a) 初診時の *BCR-ABL1* 融合遺伝子の検討 (変異の有無、major/minor *BCR-ABL1* 融合遺伝子の確認)、

(b) 治療後 1 年以降の分子治療反応性を *BCR-ABL1* 融合遺伝子の定量 PCR にて検討した。

3) ヒト AML 由来細胞株 THP-1 および HL60 より樹立した AZA 耐性細胞株 THP-1/AR および HL60/AR を用いて、AZA 耐性機序を詳細に解析した。

(倫理面への配慮)

検体収集に関しては東京大学医学部ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理委員会、自治医科大学遺伝子解析研究倫理審査委員会及び長崎大学医学部歯学部の生命倫理委員会認可を受けている。

## C 研究結果

### 1) ドナー由来白血病の解析

急性骨髄性白血病 (AML) 症例が兄弟よりの末梢血幹細胞移植後に再発したものがあった。未治療期、再発期に加えて移植ドナー骨髄血が入手できたので、それぞれから全エクソン配列を得た。全エクソン中の SNP を比較したところ、再発は元々の AML クローンではなくてドナー由来であり、ドナー由来白血病 (donor cell leukemia, DCL) であることがわかった。非同義変異プロファイルも両白血病クローン間で全く異なりやはり DCL である事が確認された。

興味深いことに DCL で変異が確認された遺伝子のうち *IDH2*(R140Q) 変異と *DNMT3A*(V150Gfs) 変異は低い頻度 (それぞれ 7.1%、8.7%) で健常ドナー骨髄にも存在した。そこでこれら遺伝子と *NRAS*(G13D) 変異について、超高重積度で次世代シーケンサー解析を行った。またその際に、移植後まだ DCL を発症していない時期の骨髄も同時に解析をした。その結果、*IDH2* 変異と *DNMT3A* 変異ともに確実にドナー骨髄中に存在することが明らかになった (それぞれ 1.6% と 2.1%)。移植後まだ DCL に至っていない時期に既にドミナントなクローンになり (それぞれ 13.4% と 25.1%)、DCL が発症すると主要なクローンになった (それぞれ 35.5% と 73.5%)。また *NRAS* のがん化変異はドナー骨髄中にはなく、移植後新たに加わった体細胞変異と考えられた。したがって本 DCL は、健常ドナー中に存在した *IDH2*/*DNMT3A* 変異クローン上に、移植後新たに *NRAS* 変異が生じ

て発症したものと考えられた。なおドナー自身は移植後 10 年経っているが未だ AML を発症していない。

### 2) CML の解析

治療反応性と関連する因子を同定するために年齢、性別、Sokal スコア、Major/Minor *BCR-ABL1* 遺伝子、チロシンキナーゼ阻害剤 (TKI) 投与量、TKI の種類、治療抵抗性のキナーゼドメイン変異、35INS の存在、について単変量解析を実施した。その結果、不十分な治療反応と関連する因子は、minor *BCR-ABL1* の存在、治療薬の減量、イマチニブ抵抗性のキナーゼドメイン変異であった。また、MMR 喪失と関連していたのは治療薬の減量と 35INS の存在であった。

### 3) Azacitidine 耐性機序の解析

THP-1/AR および HL60/AR はヒト AML 細胞株 THP-1 および HL60 より樹立した AZA 耐性白血病細胞株である。THP-1/AR および HL60/AR において、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ところ、両細胞株に共通の点変異を exon 4 および exon 5 領域に複数認めた。このことから、AZA 耐性白血病細胞では *UCK2* 遺伝子変異により *UCK* 活性が低下しており、そのため AZA 活性化プロセスが障害されているものと推察された。

## D&E. 考察及び結論

DCL の解析結果が明瞭にものがたっているのは、一見健常な我々の体内に一部 pre-malignant な細胞クローンが存在する事である。我々の知見は、健常な高齢者の末梢血に一部 *TET2* 変異クローンや *DNMT3A* 変異クローンが一部存在することがあるという Busque らの最近のデータと良く符合する。今後の骨髄移植、造血幹細胞移植の際に「適切」なドナーをどのようにして選ぶかと言うことに重要な示唆を与える知見だと言える。また CML 治療 12 ヶ月後における治療反応不十分例においては遺伝子変異検索が必要なことが示唆された。さらに AML 細胞における 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。

## F. 健康危険情報

無し

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

間野博行

- 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*, **288**: 9457-9467, 2013.
  - 2) Ando M, Kawazu M, Ueno T, Fukumura K, Yamato A, Soda M, Yamashita Y, Choi YL, Yamasoba T & Mano H. "Cancer-associated missense mutations of caspase-8 activate nuclear factor-kappaB signaling" *Cancer Sci*, **104**: 1002-1008, 2013.
  - 3) Fukumura K, Yamashita Y, Kawazu M, Sai E, Fujiwara SI, Nakamura N, Takeuchi K, Ando M, Miyazono K, Ueno T, Ozawa K & Mano H. "STK10 missense mutations associated with anti-apoptotic function" *Oncol Rep*, **30**: 1542-1548, 2013.
  - 4) Himpe E, Abdul Rahim SA, Verdood P, Mano H & Kooijman R. "Tec kinase stimulates cell survival in transfected Hek293T cells and is regulated by the anti-apoptotic growth factor IGF-I in human neutrophils" *Cell Signal*, **25**: 666-673, 2013.
  - 5) 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*, **110**: 3029-3034, 2013.
  - 6) Miyanaga A, Shimizu K, Noro R, Seike M, Kitamura K, Kosaihiira S, Minegishi Y, Shukuya T, Yoshimura A, Kawamoto M, Tsuchiya S, Hagiwara K, Soda M, Takeuchi K, Yamamoto N, Mano H, Ishikawa Y & Gemma A. "Activity of EGFR-tyrosine kinase and ALK inhibitors for EML4-ALK-rearranged non-small-cell lung cancer harbored coexisting EGFR mutation" *BMC Cancer*, **13**: 262, 2013.
  - 7) Ninomiya H, Kato M, Sanada M, Takeuchi K, Inamura K, Motoi N, Nagano H, Nomura K, Sakao Y, Okumura S, Mano H, Ogawa S & Ishikawa Y. "Allelotypes of lung adenocarcinomas featuring ALK fusion demonstrate fewer onco- and suppressor gene changes" *BMC Cancer*, **13**: 8, 2013.
  - 8) Suzuki HI, Matsuyama H, Noguchi M, Yao T, Komatsu N, Mano H, Sugimoto K & Miyazono K. "Computational dissection of distinct microRNA activity signatures associated with peripheral T cell lymphoma subtypes" *Leukemia*, **27**: 2107-2111, 2013.
  - 9) Yasuda T, Ueno T, Fukumura K, Yamato A, Ando M, Yamaguchi H, Soda M, Kawazu M, Sai E, Yamashita Y, Murata M, Kiyoi H, Naoe T & Mano H. "Leukemic evolution of donor-derived cells harboring IDH2 and DNMT3A mutations after allogeneic stem cell transplantation" *Leukemia*, **28**: 426-428, 2014.
- 宮崎泰司
- 1) Itonaga H, Tsushima H, Imanishi D, Hata T, Doi Y, Mori S, Sasaki D, Hasegawa H, Matsuo E, Nakashima J, Kato T, Horai M, Taguchi M, Matsuo M, Taniguchi H, Makiyama J, Sato S, Horio K, Ando K, Moriwaki Y, Sawayama Y, Ogawa D, Yamasaki R, Takasaki Y, Imaizumi Y, Taguchi J, Kawaguchi Y, Yoshida S, Joh T, Moriuchi Y, Nonaka H, Soda H, Fukushima T, Nagai K, Kamihira S, Tomonaga M, Yanagihara K, Miyazaki Y. "Molecular analysis for the BCR-ABL1 kinase domain in chronic-phase chronic myelogenous leukemia treated with tyrosine kinase inhibitors in practice: Study by the Nagasaki CML Study Group" *Leuk Res*, **38**: 76-83, 2014
  - 2) Matsuda A, Germing U, Miyazaki Y. "Correlation between the low marrow blast cutpoint and WHO classification for myelodysplastic syndromes" *Eur J Haematol*, **90**: 79-80, 2013
  - 3) Niino D, Tsuchiya T, Tomonaga M, Miyazaki Y, Ohshima K. "Clinicopathological features of acute megakaryoblastic leukaemia: Relationship between fibrosis and platelet-derived growth factor" *Pathol Int*, **63**: 141-149, 2013
  - 4) 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*,

288: 9457-9467, 2013

- 5) Hsu WL, Preston DL, Soda M, Sugiyama H, Funamoto S, Kodama K, Kimura A, Kamada N, Dohy H, Tomonaga M, Iwanaga M, Miyazaki Y, Cullings HM, Suyama A, Ozasa K, Shore RE, Mabuchi K. "The Incidence of Leukemia, Lymphoma and Multiple Myeloma among Atomic Bomb Survivors: 1950-2001" *Radiat Res*, **179**: 361-382, 2013
- 6) Yanada M, Tsuzuki M, Fujita H, Fujimaki K, Fujisawa S, Sunami K, Taniwaki M, Ohwada A, Tsuboi K, Maeda A, Takeshita A, Ohtake S, Miyazaki Y, Atsuta Y, Kobayashi Y, Naoe T, Emi N. "Phase 2 study of arsenic trioxide followed by autologous hematopoietic cell transplantation for relapsed acute promyelocytic leukemia" *Blood*, **121**: 3095-3102, 2013
- 7) Ueda Y, Mizutani C, Nannya Y, Kurokawa M, Kobayashi S, Takeuchi J, Tamura H, Ogata K, Dan K, Shibayama H, Kanakura Y, Niimi K, Sasaki K, Watanabe M, Emi N, Teramura M, Motoji T, Kida M, Usuki K, Takada S, Sakura T, Ito Y, Ohyashiki K, Ogawa H, Suzuki T, Ozawa K, Imai K, Kasai M, Hata T, Miyazaki Y, Morita Y, Kanamaru A, Matsuda A, Tohyama K, Koga D, Tamaki H, Mitani K, Naoe T, Sugiyama H, Takaku F. "Clinical evaluation of WT1 mRNA expression levels in peripheral blood and bone marrow in patients with myelodysplastic syndromes" *Leuk Lymphoma*, **54**: 1450-1458, 2013
- 8) Matsuda A, Jinnai I, Iwanaga M, Okamura D, Ishikawa M, Maeda T, Hata T, Kawai N, Miyazaki Y, Bessho M, Tomonaga M. "Correlation Between Dysplastic Lineage and Type of Cytopenia in Myelodysplastic Syndromes Patients With Refractory Anemia According to the FAB Classification" *Am J Clin Pathol*, **140**: 253-257, 2013
- 9) Iriyama N, Hatta Y, Takeuchi J, Ogawa Y, Ohtake S, Sakura T, Mitani K, Ishida F, Takahashi M, Maeda T, Izumi T, Sakamaki H, Miyawaki S, Honda S, Miyazaki Y, Taki T, Taniwaki M, Naoe T. "CD56 expression is an independent prognostic factor for relapse in acute myeloid leukemia with t(8;21)" *Leuk Res*, **37**: 1021-1026, 2013
- 10) Yanada M, Ohtake S, Miyawaki S, Sakamaki H, Sakura T, Maeda T, Miyamura K, Asou N, Oh I, Miyatake J, Kanbayashi H, Takeuchi J, Takahashi M, Dobashi N, Kiyoi H, Miyazaki Y, Emi N, Kobayashi Y, Ohno R, Naoe T; for the Japan Adult Leukemia Study Group. "The demarcation between younger and older acute myeloid leukemia patients: A pooled analysis of 3 prospective studies" *Cancer*, **119**: 3326-3333, 2013
- 11) Fujita H, Asou N, Iwanaga M, Hyo R, Nomura S, Kiyoi H, Okada M, Inaguma Y, Matsuda M, Yamauchi T, Ohtake S, Izumi T, Nakaseko C, Ishigatsubo Y, Shinagawa K, Takeshita A, Miyazaki Y, Ohnishi K, Miyawaki S, Naoe T; the Japan Adult Leukemia Study Group. "Role of hematopoietic stem cell transplantation for relapsed acute promyelocytic leukemia: A retrospective analysis of JALSG-APL97" *Cancer Sci*, **104**: 1339-1345, 2013
- 12) Hata T, Tsushima H, Baba M, Imaizumi Y, Taguchi J, Imanishi D, Nagai K, Tomonaga M, Miyazaki Y. "Long-term outcome of immunosuppressive therapy for Japanese patients with lower-risk myelodysplastic syndromes" *Int J Hematol*, **98**: 687-693, 2013

#### 永井正

- 1) Sripayap P, Nagai T, Uesawa M, Kobayashi H, Tsukahara T, Ohmine K, Muroi K, Ozawa K. "Mechanisms of resistance to azacitidine in human leukemia cell lines" *Experimental Hematology*, doi: 10.1016/j.exphem.2013.12.004.
- 2) Sripayap P, Nagai T, Ozawa K. "Combined azacitidine and romidepsin enhances cytotoxicity in azacitidine-sensitive but not in azacitidine-resistant multiple myeloma cell lines" *Jichi Medical University Journal*, **35**: 2013 (in press)
- 3) Sripayap P, Nagai T, Hatano K, Kikuchi J, Furukawa Y, Ozawa K. "Romidepsin overcomes cell adhesion-mediated drug resistance in multiple myeloma cells" *Acta Haematologica*, **132**: 1-4, 2014
- 4) Tataru R, Nagai T, Suzuki M, Oh I, Fujiwara S, Norizuki M, Muroi K, Ozawa K. "Sepsis and meningoenephalitis caused by *Bacillus cereus* in a patient with myelodysplastic syndrome" *Internal Med*, **52**: 1987-1990, 2013
- 5) Nagai T, Karakawa M, Komine M, Muroi K, Ohtsuki M, Ozawa K. "Development of psoriasis in a patient with chronic myelogenous leukemia during nilotinib treatment" *Eur J*

*Haematol*, **91**: 270-272, 2013

- 6) Kobayashi H, Nagai T, Uesawa M, Fujiwara S, Matsuyama T, Sato K, Omine K, Ozaki K, Suzuki T, Mori M, Muroi K, Baley G, Yamamoto H, Ozawa K. “Clinical outcome of non-surgical treatment for primary small intestinal lymphoma diagnosed with double-balloon endoscopy” *Leuk Lymphoma*, **54**: 731-736, 2013

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 東京大学大学院医学系研究科 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。急性骨髄性白血病の症例で造血幹細胞移植を行った後再発した症例があったが、各病期の検体を用いて全エクソン配列解析を行った。その結果、元の白血病クローンが再発したのではなく、ドナーの血中に存在する遺伝子異常を有するクローンが移植時に別のがん化変異を獲得して白血病へと移行していた事が明らかになった。すなわち一見正常な我々の体内に遺伝子異常を有するpre-leukemic cloneが存在することが示された。

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

各検体試料よりゲノムDNAを抽出して断片化した後、SureSelectシステム(Agilent

社)を用いてエクソン領域のみを高効率に純化した。これを次世代シーケンサーによる配列解析を行い、各試料毎に30-40Gbpの大量の塩基配列を得た。それを独自のコンピューターパイプラインによって非同義変異のリストを得た。またIDH2, DNMT3A, NRAS等の変異箇所についてはそれぞれPCR法で増幅した後次世代シーケンサーで解析し、平均重複度100万倍の深さで配列解析を行った。

(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」に準拠した東京大学医学部ヒトゲノム・遺伝子解析研究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

我々が集めた検体の中に、急性骨髄性白血病(AML)症例が、兄弟よりの末梢血幹細胞移植後に再発したものがあった。未治療期、再発期に加えて移植ドナー骨髄血が入手できたので、それぞれから全エクソン配列を得た。全エクソン中のSNPを比較したところ、再発は元々のAMLクローンではなくてドナー由来であり、ドナー由来白血病(donor cell leukemia, DCL)であることがわかった。非同義変異プロファイルも両白血病クローン間で全く異なりやはりDCLである事が確認された。



興味深いことにDCLで変異が確認された遺伝子のうちIDH2(R140Q)変異とDNMT3A(V150Gfs)変異は低い頻度（それぞれ7.1%、8.7%）で健常ドナー骨髄にも存在した。そこでこれら遺伝子とNRAS(G13D)変異について、超高重積度で次世代シーケンサー解析を行った。またその際に、移植後まだDCLを発症していない時期の骨髄も同時に解析をした。その結果、IDH2変異とDNMT3A変異ともに確実にドナー骨髄中に存在することが明らかになった（それぞれ1.6%と2.1%）。移植後まだDCLに至っていない時期に既にドミナントなクローンになり（それぞれ13.4%と25.1%）、DCLが発症すると主要なクローンになった（それぞれ35.5%と73.5%）。またNRASのがん化変異はドナー骨髄中にはなく、移植後新たに加わった体細胞変異と考えられた。したがって本DCLは、健常ドナー中に存在したIDH2/DNMT3A変異クローン上に、移植後新たにNRAS変異が生じて発症したものと考えられた。なおドナー自身は移植後10年経っているが未だAMLを発症していない。

#### D&E. 考察及び結論

今回の解析結果が明瞭にものがたっているのは、一見健常な我々の体内に一部pre-malignantな細胞クローンが存在する事である。我々の知見は、健常な高齢者の末梢血に一部TET2変異クローンやDNMT3A変異クローンが一部存在することがあるというBusqueらの最近のデータと良く符合する。今後の骨髄移植、造血幹細胞移植の際に「適切」なドナーをどのようにして選ぶかと言うことに重要な示唆を与える知見だと言える。

#### F. 健康危険情報

なし

#### 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*, **288**: 9457-9467, 2013.

- 2) Ando M, Kawazu M, Ueno T, Fukumura K, Yamato A, Soda M, Yamashita Y, Choi YL, Yamasoba T & Mano H. “Cancer-associated missense mutations of caspase-8 activate nuclear factor-kappaB signaling” *Cancer Sci*, **104**: 1002-1008, 2013.
- 3) Fukumura K, Yamashita Y, Kawazu M, Sai E, Fujiwara SI, Nakamura N, Takeuchi K, Ando M, Miyazono K, Ueno T, Ozawa K & Mano H. “STK10 missense mutations associated with anti-apoptotic function” *Oncol Rep*, **30**: 1542-1548, 2013.
- 4) Himpe E, Abdul Rahim SA, Verdood P, Mano H & Kooijman R. “Tec kinase stimulates cell survival in transfected Hek293T cells and is regulated by the anti-apoptotic growth factor IGF-I in human neutrophils” *Cell Signal*, **25**: 666-673, 2013.
- 5) 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*, **110**: 3029-3034, 2013.
- 6) Miyanaga A, Shimizu K, Noro R, Seike M, Kitamura K, Kosaihiira S, Minegishi Y, Shukuya T, Yoshimura A, Kawamoto M, Tsuchiya S, Hagiwara K, Soda M, Takeuchi K, Yamamoto N, Mano H, Ishikawa Y & Gemma A. “Activity of EGFR-tyrosine kinase and ALK inhibitors for EML4-ALK-rearranged non-small-cell lung cancer harbored coexisting EGFR mutation” *BMC Cancer*, **13**: 262, 2013.
- 7) Ninomiya H, Kato M, Sanada M, Takeuchi K, Inamura K, Motoi N, Nagano H, Nomura K, Sakao Y, Okumura S, Mano H, Ogawa S & Ishikawa Y. “Allelotypes of lung adenocarcinomas featuring ALK fusion demonstrate fewer onco- and suppressor gene changes” *BMC Cancer*, **13**: 8, 2013.

- 8) Suzuki HI, Matsuyama H, Noguchi M, Yao T, Komatsu N, Mano H, Sugimoto K & Miyazono K. “Computational dissection of distinct microRNA activity signatures associated with peripheral T cell lymphoma subtypes” *Leukemia*, **27**: 2107-2111, 2013.
- 9) Yasuda T, Ueno T, Fukumura K, Yamato A, Ando M, Yamaguchi H, Soda M, Kawazu M, Sai E, Yamashita Y, Murata M, Kiyoi H, Naoe T & Mano H. “Leukemic evolution of donor-derived cells harboring IDH2 and DNMT3A mutations after allogeneic stem cell transplantation” *Leukemia*, **28**: 426-428, 2014.

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

「慢性骨髄性白血病における *BCR-ABL1* 遺伝子キナーゼドメイン変異の検討」  
分担研究者： 宮崎 泰司 長崎大学大学原爆後障害医療研究所 教授

研究要旨：慢性骨髄性白血病（CML）は *BCR-ABL1* 融合遺伝子によって特徴付けられる造血器腫瘍で、*BCR-ABL1* 融合蛋白質の持つ恒常的に上昇したチロシンキナーゼ活性が疾患の発症、維持に極めて重要である。CML の治療では *BCR-ABL1* 融合蛋白質が治療標的分子であり、キナーゼドメインの変異は治療反応性に大きく影響するため、治療中の変異出現は臨床的には大きな問題である。この状況を明らかにするために 91 例の慢性期 CML 例に対して治療後 1 年のキナーゼドメイン変異の有無と変異出現に関連する臨床的因子を検討した。その結果、不十分な治療反応と関連したのは、minor *BCR-ABL1* の存在、治療薬の減量、イマチニブ抵抗性のキナーゼドメイン変異であった。また、十分な治療反応性の喪失と関連していたのは治療薬の減量と 35bp インサクションを有するスプライスバリエーションの出現であった。以上より、治療 12 ヶ月後における治療反応不十分例においては遺伝子変異検索が必要なことが示唆された。

#### A 研究目的

慢性骨髄性白血病（CML）は、造血幹細胞が *BCR-ABL1* 融合遺伝子を獲得して発症に至ると考えられており、CML の病態の根幹をなしている。現在の CML 治療は *BCR-ABL1* 融合蛋白質の持つチロシンキナーゼ活性の抑制であり、チロシンキナーゼ阻害薬（TKI）として国内ではイマチニブ、ダサチニブ、ニロチニブが治療に用いられている。TKI を用いた治療によって CML の予後は一変し、IRIS study によると慢性期例では 6 年の全生存率は 88% と報告され、我々のグループも実臨床の場ではほぼ同じ効果を確認している。しかし、一部の例では *BCR-ABL1* 遺伝子に様々な変異が出現し、TKI に対して抵抗性を獲得する。現在使用可能な 3 剤はこうした変異に対して異なる感受性があるため、変異がどのような例に出現するのかが治療上の重要な問題である。一方で *BCR-ABL1* 融合遺伝子の変異検索は同部位のシーケンスによるため、検査としては未だ研究レベルで実施されている。

本研究の目的は、TKI 治療を受けている慢性期 CML を対象として、どのような *BCR-ABL1* 融合遺伝子変異がどの程度出現するのか、変異出現と関連する臨床的因子は何かを探索し、どのような例に対して *BCR-ABL1* 融合遺伝子の変異検査が必要かを明らかにすることである。

#### B 研究方法

長崎県下にて TKI 治療を受けている慢性期 CML 症例 91 例において、（1）初診時の

*BCR-ABL1* 融合遺伝子の検討（変異の有無、major/minor *BCR-ABL1* 融合遺伝子の確認）、（2）治療後 1 年以降の分子治療反応性を *BCR-ABL1* 融合遺伝子の定量 PCR にて検討した。TKI による治療反応性は European LeukemiaNet (ELN) の定義に従って決定した。Major molecular response (MMR) は PCR 産物量の *BCR-ABL1/ABL1* 比が 0.042% 未満のものとした。これは初診時の *BCR-ABL1* 融合遺伝子量 3-log の減少と同等である。

PCR にて検体より *BCR-ABL1* 融合遺伝子が同定された場合は、nested PCR 反応の後、直接シーケンスを実施してキナーゼドメインの遺伝子配列を確定し、変異の有無を確認した。

臨床情報は診療記録を元に収集し、統計学的解析は Fisher's exact test を用いて分子反応と臨床的因子との関連を検討した。本研究では P 値が 0.05 未満をもって有意な関連があるとした。

（倫理面への配慮）

本研究は全ての参加施設において倫理委員会での承認が得られている。また、対象者には研究の参加については説明文書を用いて説明し、文書による同意を得た。得られた個人情報の管理には十分な配慮を行った。

#### C 研究結果

##### 1) 患者背景

新規に診断された 28 例を含む 115 例から本研究への参加同意を得た。男女比は 63/52、診断時の年齢中央値は 55 才（17-88 才）であった。この

中で1年以上のTKI治療をうけ、変異と関連する因子の解析対象となったのは91例であった。

## 2) 初診から治療12ヶ月までの変異解析

初診時検体が得られた28例において、*BCR-ABL1*融合遺伝子のキナーゼドメインに変異を有する例は無かった。しかし、そのうちの3例に治療後12ヶ月以内に変異が出現した。見られた変異はT315I, T406A, A433Tである。T315Iの変異を獲得した症例はTKIに加えて $\alpha$ インターフェロンが投与され、5ヶ月後にMMRを達成できた。その際にはT315Iは同定されなかった。35bpのインサージョンを持つスプライスバリエント(35INS)産物は28例中18例(64.2%)に同定された。

## 3) TKI治療12ヶ月以降の治療反応性とキナーゼドメイン変異解析

91例中60例はELN基準において”Optimal”治療反応を達成していた(安定MMR例)。この60例のうち、*BCR-ABL1*融合遺伝子産物が同定されなくなったのは31例、同定はされるが継続的にMMRが維持されていた(産物量が0.042%未満)のは29例である。”Optimal”以外の31例は、MMRに一度も到達していない例(MMR未到達)が16例、MMRに達したものの喪失した例(MMR喪失)が15例であった。

## 4) MMR未到達例のキナーゼドメイン変異

16例のうち3例(18.8%)にキナーゼドメイン変異が同定された。E279K, T315IとE255V(同一例)、G250EとL387M(同一例)で、イマチニブに抵抗性の変異である。

35INSは16例中12例(75%)に同定された。

## 5) MMR喪失例のキナーゼドメイン変異

15例中1例にR457Cの変異が同定された。この変異はイマチニブに対する抵抗性については報告がなく、不明であった。

35INSは15例中12例(80%)に同定された。

6) 安定MMR例におけるキナーゼドメイン変異  
*BCR-ABL1*融合遺伝子産物が0.042%未満だが同定はされた29例中一例でキナーゼドメイン変異を有していた(Q252R)。この変異の治療感受性は不明だった。

35INSは10例(34.5%)にみられた。

## 7) 治療反応性と関連する因子の解析

治療反応性と関連する因子を同定するために年齢、性別、Sokalスコア、Major/Minor *BCR-ABL1* 遺伝子、TKI投与量、TKIの種類、治療抵抗性の

キナーゼドメイン変異、35INSの存在、について単変量解析を実施した。

その結果、不十分な治療反応と関連する因子は、minor *BCR-ABL1*の存在、治療薬の減量、イマチニブ抵抗性のキナーゼドメイン変異であった。また、MMR喪失と関連していたのは治療薬の減量と35INSの存在であった。

## D&E. 考察及び結論

本研究によって、実臨床にて治療を受ける慢性期CML患者では一定の割合で*BCR-ABL1*融合遺伝子が同定されることが明らかとなった。また、これまで臨床的な重要性が確定していなかった35INSの存在が治療反応性と関連する可能性が示された。さらにCML患者のマネジメントにおける十分な治療薬投与の重要性があらためて確認された。TKI治療によって格段の治療成績が得られるようになったCMLであるが、分子レベルでの治療反応性のモニターは実临床上、必須となっており、さらに*BCR-ABL1*融合遺伝子キナーゼドメイン変異の解析は治療薬選択の重要な指針となる。一方で、全例に頻回に変異解析を実施することは現実的ではない。本研究の結果からは12ヶ月時点の治療反応性をみて変異解析を実施することが妥当であると考えられ、こうした対応は、今後、実臨床における一つの方向性と考えられる。

35INSについては治療反応と関連しないという報告も有り、更なる今後の検討が必要であろう。

## F. 健康危険情報

無し

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Itonaga H, Tsushima H, Imanishi D, Hata T, Doi Y, Mori S, Sasaki D, Hasegawa H, Matsuo E, Nakashima J, Kato T, Horai M, Taguchi M, Matsuo M, Taniguchi H, Makiyama J, Sato S, Horio K, Ando K, Moriwaki Y, Sawayama Y, Ogawa D, Yamasaki R, Takasaki Y, Imaizumi Y, Taguchi J, Kawaguchi Y, Yoshida S, Joh T, Moriuchi Y, Nonaka H, Soda H, Fukushima T, Nagai K, Kamihira S, Tomonaga M, Yanagihara K, Miyazaki Y. ”Molecular analysis for the *BCR-ABL1* kinase domain in chronic-phase

- chronic myelogenous leukemia treated with tyrosine kinase inhibitors in practice: Study by the Nagasaki CML Study Group” *Leuk Res*, **38**: 76-83, 2014
- 2) Matsuda A, Germing U, Miyazaki Y. “Correlation between the low marrow blast cutpoint and WHO classification for myelodysplastic syndromes” *Eur J Haematol*, **90**: 79-80, 2013
- 3) Niino D, Tsuchiya T, Tomonaga M, Miyazaki Y, Ohshima K. “Clinicopathological features of acute megakaryoblastic leukaemia: Relationship between fibrosis and platelet-derived growth factor” *Pathol Int*, **63**: 141-149, 2013
- 4) 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*, **288**: 9457-9467, 2013
- 5) Hsu WL, Preston DL, Soda M, Sugiyama H, Funamoto S, Kodama K, Kimura A, Kamada N, Dohy H, Tomonaga M, Iwanaga M, Miyazaki Y, Cullings HM, Suyama A, Ozasa K, Shore RE, Mabuchi K. “The Incidence of Leukemia, Lymphoma and Multiple Myeloma among Atomic Bomb Survivors: 1950-2001” *Radiat Res*, **179**: 361-382, 2013
- 6) Yanada M, Tsuzuki M, Fujita H, Fujimaki K, Fujisawa S, Sunami K, Taniwaki M, Ohwada A, Tsuboi K, Maeda A, Takeshita A, Ohtake S, Miyazaki Y, Atsuta Y, Kobayashi Y, Naoe T, Emi N. “Phase 2 study of arsenic trioxide followed by autologous hematopoietic cell transplantation for relapsed acute promyelocytic leukemia” *Blood*, **121**: 3095-3102, 2013
- 7) Ueda Y, Mizutani C, Nannya Y, Kurokawa M, Kobayashi S, Takeuchi J, Tamura H, Ogata K, Dan K, Shibayama H, Kanakura Y, Niimi K, Sasaki K, Watanabe M, Emi N, Teramura M, Motoji T, Kida M, Usuki K, Takada S, Sakura T, Ito Y, Ohyashiki K, Ogawa H, Suzuki T, Ozawa K, Imai K, Kasai M, Hata T, Miyazaki Y, Morita Y, Kanamaru A, Matsuda A, Tohyama K, Koga D, Tamaki H, Mitani K, Naoe T, Sugiyama H, Takaku F. “Clinical evaluation of WT1 mRNA expression levels in peripheral blood and bone marrow in patients with myelodysplastic syndromes” *Leuk Lymphoma*, **54**: 1450-1458, 2013
- 8) Matsuda A, Jinnai I, Iwanaga M, Okamura D, Ishikawa M, Maeda T, Hata T, Kawai N, Miyazaki Y, Bessho M, Tomonaga M. “Correlation Between Dysplastic Lineage and Type of Cytopenia in Myelodysplastic Syndromes Patients With Refractory Anemia According to the FAB Classification” *Am J Clin Pathol*, **140**: 253-257, 2013
- 9) Iriyama N, Hatta Y, Takeuchi J, Ogawa Y, Ohtake S, Sakura T, Mitani K, Ishida F, Takahashi M, Maeda T, Izumi T, Sakamaki H, Miyawaki S, Honda S, Miyazaki Y, Taki T, Taniwaki M, Naoe T. “CD56 expression is an independent prognostic factor for relapse in acute myeloid leukemia with t(8;21)” *Leuk Res*, **37**: 1021-1026, 2013
- 10) Yanada M, Ohtake S, Miyawaki S, Sakamaki H, Sakura T, Maeda T, Miyamura K, Asou N, Oh I, Miyatake J, Kanbayashi H, Takeuchi J, Takahashi M, Dobashi N, Kiyoi H, Miyazaki Y, Emi N, Kobayashi Y, Ohno R, Naoe T; for the Japan Adult Leukemia Study Group. “The demarcation between younger and older acute myeloid leukemia patients: A pooled analysis of 3 prospective studies” *Cancer*, **119**: 3326-3333, 2013
- 11) Fujita H, Asou N, Iwanaga M, Hyo R, Nomura S, Kiyoi H, Okada M, Inaguma Y, Matsuda M, Yamauchi T, Ohtake S, Izumi T, Nakaseko C, Ishigatsubo Y, Shinagawa K, Takeshita A, Miyazaki Y, Ohnishi K, Miyawaki S, Naoe T; the Japan Adult Leukemia Study Group. “Role of hematopoietic stem cell transplantation for relapsed acute promyelocytic leukemia: A retrospective analysis of JALSG-APL97” *Cancer Sci*, **104**: 1339-1345, 2013
- 12) Hata T, Tsushima H, Baba M, Imaizumi Y, Taguchi J, Imanishi D, Nagai K, Tomonaga M,

Miyazaki Y. “Long-term outcome of immuno-suppressive therapy for Japanese patients with lower-risk myelodysplastic syndromes” *Int J Hematol*, **98**: 687-693, 2013

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

「急性骨髄性白血病細胞における azacitidine 耐性機序の解析」に関する研究

分担研究者 永井 正（自治医科大学・医学部・准教授）

研究要旨：DNA メチル化阻害薬 Azacitidine(AZA)に対する耐性細胞株 THP-1/AR および HL60/AR を用いて、急性骨髄性白血病(AML)細胞における AZA 耐性機序の解析を行った。その結果、uridine-cytidine kinase 2 (UCK2)遺伝子変異が両細胞株に共通に認められた。さらに、UCK2 遺伝子の発現実験によりこれらの遺伝子変異が AZA 耐性に重要であることが明らかになった。AZA 耐性多発性骨髄腫細胞株では UCK2 遺伝子変異を認めなかったことから、本耐性機序は AML 細胞に特異的である可能性がある。

A. 研究目的

DNA メチル化阻害薬 azacitidine (AZA)は骨髄異形成症候群(MDS)のみならず急性骨髄性白血病(AML)に対しても有力な治療薬として期待されている。しかしながら、低分子治療薬は容易に耐性を獲得する場合が多く、AZA についても長期の奏効が得られない症例が多く存在する。本研究では、AML 細胞における AZA 耐性機序を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

ヒト AML 由来細胞株 THP-1 および HL60 より樹立した AZA 耐性細胞株 THP-1/AR および HL60/AR を用いて、AZA 耐性機序を詳細に解析した。さらに、白血病細胞における AZA 耐性機序が、他の造血器腫瘍においても共通して存在するのか明らかにするため、多発性骨髄腫細胞株を用いて検討した。

(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

THP-1/AR および HL60/AR はヒト AML 細胞株 THP-1 および HL60 より樹立した AZA 耐性白血病細胞株である。THP-1/AR および HL60/AR に

おいて、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ところ、両細胞株に共通の点変異を exon 4 および exon 5 領域に複数認めた。これらの変異を有する UCK2 遺伝子発現ベクターを構築し、THP-1 細胞に導入した。変異 UCK2 を発現させた THP-1 細胞では、AZA によるアポトーシス誘導が抑制され、AZA に対する IC<sub>50</sub> 値の増加を認めた。一方、野生型 UCK2 遺伝子の発現ベクターを THP-1/AR に導入したところ、AZA によるアポトーシス誘導が回復し、AZA に対する IC<sub>50</sub> 値の有意な低下を認めた。このことから、AZA 耐性白血病細胞では UCK2 遺伝子変異により UCK 活性が低下しており、そのため AZA 活性化プロセスが障害されているものと推察された。

最近 Cluzeau らがヒト AZA 耐性白血病細胞株 SKM-1-R を用いた検討により、抗アポトーシス分子である BCL2L10 の発現増加が AZA 耐性に関与していると報告した。そこで、THP-1/AR および HL60/AR における BCL2L10 の関与の有無についても検討した。THP-1/AR および HL60/AR では、THP-1 および HL60 と比較して BCL2L10 蛋白量が著明に増加していた。しかしながら、siRNA を用いて BCL2L10 の発現を抑制した場合も、AZA に対する IC<sub>50</sub> 値の変化を認めなかった。このことから、BCL2L10 は THP-1/AR および HL60/AR における AZA 耐性機序に積極的に関与していないと結論された。

次に、ヒト多発性骨髄腫細胞株 RPMI8226 お

よび U266 を用いて、AML 細胞における AZA 耐性機序が他の造血器腫瘍細胞に共通に存在するか否かについて検討した。IC<sub>50</sub> 値の決定により RPMI8226 が AZA 感受性であるのに対し、U266 は AZA 耐性であることが明らかになった。U266 では RPMI8226 と異なり、AZA 投与後も AZA の標的分子である DNA methyltransferase (DNMT) の活性低下および DNMT1、DNMT3a、DNMT3b の蛋白量低下を認めなかった。さらに、p16 mRNA の発現誘導も認められなかったことから、THP-1/AR および HL60/AR と同様に DNMT 依存性の耐性機序が存在すると結論された。しかしながら、UCK2 遺伝子変異は全く認められなかったことから、AZA による DNMT 阻害作用の欠落は他の要因によるものと推察された。

#### D. 考察

高リスク MDS および芽球比率が低く、かつ多剤併用化学療法の施行が困難と思われる AML 症例に対して AZA が積極的に用いられている。従って、AZA 耐性機序を明らかにし、その克服法を開発することは極めて重要な課題と思われる。本研究では、ヒト AZA 耐性 AML 細胞株を用いて、UCK2 遺伝子変異が AZA 耐性に重要であることを初めて明らかにした。一方、AZA 耐性のヒト多発性骨髄腫細胞株 U266 では UCK2 遺伝子変異は全く認められなかった。従って、UCK2 遺伝子変異による AZA 耐性機序は AML に特異的に認められる現象である可能性もある。今後は AZA 耐性の MDS ないし AML 症例の検討により、実際の臨床検体における UCK2 遺伝子変異の有無およびその頻度の確認が重要となる。既に、臨床検体を用いた検討は「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おり、検体収集が開始されている。

#### E. 結論

1. AML 細胞における 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。

2. AZA 耐性多発性骨髄腫細胞では、UCK2 遺伝子変異を認めず、他の要因による AZA 耐性機序

が存在するものと推察された。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Sripayap P, Nagai T, Uesawa M, Kobayashi H, Tsukahara T, Ohmine K, Muroi K, Ozawa K. “Mechanisms of resistance to azacitidine in human leukemia cell lines” *Experimental Hematology*, doi: 10.1016/j.exphem.2013.12.004.
- 2) Sripayap P, Nagai T, Ozawa K. “Combined azacitidine and romidepsin enhances cytotoxicity in azacitidine-sensitive but not in azacitidine-resistant multiple myeloma cell lines” *Jichi Medical University Journal*, **35**: 2013 (in press)
- 3) Sripayap P, Nagai T, Hatano K, Kikuchi J, Furukawa Y, Ozawa K. “Romidepsin overcomes cell adhesion-mediated drug resistance in multiple myeloma cells” *Acta Haematologica*, **132**: 1-4, 2014
- 4) Tatara R, Nagai T, Suzuki M, Oh I, Fujiwara S, Norizuki M, Muroi K, Ozawa K. “Sepsis and meningoencephalitis caused by *Bacillus cereus* in a patient with myelodysplastic syndrome” *Internal Med*, **52**:1987-1990, 2013
- 5) Nagai T, Karakawa M, Komine M, Muroi K, Ohtsuki M, Ozawa K. “Development of psoriasis in a patient with chronic myelogenous leukemia during nilotinib treatment” *Eur J Haematol*, **91**: 270-272, 2013
- 6) Kobayashi H, Nagai T, Uesawa M, Fujiwara S, Matsuyama T, Sato K, Omine K, Ozaki K, Suzuki T, Mori M, Muroi K, Baley G, Yamamoto H, Ozawa K. “Clinical outcome of non-surgical treatment for primary small intestinal lymphoma diagnosed with double-balloon endoscopy” *Leuk Lymphoma*, **54**: 731-736, 2013



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
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	288	9457-9467	2013
Ando M, Kawazu M, Ueno T, Fukumura K, Yamato A, Soda M, Yamashita Y, Choi YL, Yamasoba T & Mano H	Cancer-associated missense mutations of caspase-8 activate nuclear factor-kappaB signaling	Cancer Sci	104	1002-1008	2013
Fukumura K, Yamashita Y, Kawazu M, Sai E, Fujiwara SI, Nakamura N, Takeuchi K, Ando M, Miyazono K, Ueno T, Ozawa K & Mano H	STK10 missense mutations associated with anti-apoptotic function	Oncol Rep	30	1542-1548	2013
Himpe E, Abdul Rahim SA, Verdood P, Mano H & Kooijman R	Tec kinase stimulates cell survival in transfected Hek293T cells and is regulated by the anti-apoptotic growth factor IGF-I in human neutrophils	Cell Signal	25	666-673	2013
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	110	3029-3034	2013
Miyanaga A, Shimizu K, Noro R, Seike M, Kitamura K, Kosaihiira S, Minegishi Y, Shukuya T, Yoshimura A, Kawamoto M, Tsuchiya S, Hagiwara K, Soda M, Takeuchi K, Yamamoto N, Mano H, Ishikawa Y & Gemma A	Activity of EGFR-tyrosine kinase and ALK inhibitors for EML4-ALK-rearranged non-small-cell lung cancer harbored coexisting EGFR mutation	BMC Cancer	13	262	2013
Ninomiya H, Kato M, Sanada M, Takeuchi K, Inamura K, Motoi N, Nagano H, Nomura K, Sakao Y, Okumura S, Mano H, Ogawa S & Ishikawa Y	Allelotypes of lung adenocarcinomas featuring ALK fusion demonstrate fewer onco- and suppressor gene changes	BMC Cancer	13	8	2013

Suzuki HI, Matsuyama H, Noguchi M, Yao T, Komatsu N, Mano H, Sugimoto K & Miyazono K	Computational dissection of distinct microRNA activity signatures associated with peripheral T cell lymphoma subtypes	Leukemia	27	2107-2111	2013
Yasuda T, Ueno T, Fukumura K, Yamato A, Ando M, Yamaguchi H, Soda M, Kawazu M, Sai E, Yamashita Y, Murata M, Kiyoi H, Naoe T & Mano H	Leukemic evolution of donor-derived cells harboring IDH2 and DNMT3A mutations after allogeneic stem cell transplantation	Leukemia	28	426-428	2014

発表者名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Itonaga H, Tsushima H, Imanishi D, Hata T, Doi Y, Mori S, Sasaki D, Hasegawa H, Matsuo E, Nakashima J, Kato T, Horai M, Taguchi M, Matsuo M, Taniguchi H, Makiyama J, Sato S, Horio K, Ando K, Moriwaki Y, Sawayama Y, Ogawa D, Yamasaki R, Takasaki Y, Imaizumi Y, Taguchi J, Kawaguchi Y, Yoshida S, Joh T, Moriuchi Y, Nonaka H, Soda H, Fukushima T, Nagai K, Kamihira S, Tomonaga M, Yanagihara K, Miyazaki Y	Molecular analysis for the BCR-ABL1 kinase domain in chronic-phase chronic myelogenous leukemia treated with tyrosine kinase inhibitors in practice: Study by the Nagasaki CML Study Group	Leuk Res	38	76-83	2014
Matsuda A, Germing U, Miyazaki Y	Correlation between the low marrow blast cutpoint and WHO classification for myelodysplastic syndromes	Eur J Haematol	90	79-80	2013
Niino D, Tsuchiya T, Tomonaga M, Miyazaki Y, Ohshima K	Clinicopathological features of acute megakaryoblastic leukaemia: Relationship between fibrosis and platelet-derived	Pathol Int	63	141-149	2013
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	288	9457-9467	2013
Hsu WL, Preston DL, Soda M, Sugiyama H, Funamoto S, Kodama K, Kimura A, Kamada N, Dohy H, Tomonaga M, Iwanaga M, Miyazaki Y, Cullings HM, Suyama A, Ozasa K, Shore RE, Mabuchi K	The Incidence of Leukemia, Lymphoma and Multiple Myeloma among Atomic Bomb Survivors: 1950-2001	Radiat Res	179	361-382	2013
Yanada M, Tsuzuki M, Fujita H, Fujimaki K, Fujisawa S, Sunami K, Taniwaki M, Ohwada A, Tsuboi K, Maeda A, Takeshita A, Ohtake S, Miyazaki Y, Atsuta Y, Kobayashi Y, Naoe T, Emi N	Phase 2 study of arsenic trioxide followed by autologous hematopoietic cell transplantation for relapsed acute promyelocytic leukemia	Blood	121	3095-3102	2012