

急性前骨髄性白血病細胞株 HT93A において
G-CSF の併用は ATRA 及び亜ヒ酸の分化誘導と
亜ヒ酸の細胞内取り込みを増強させる

日本大学医学部内科学系血液膠原病内科学分野

入山 規良

2012 年

指導教員 竹内 仁

目次

頁

1.	研究概要	p 1
2.	緒言	p 4
3.	対象と方法	p 8
4.	結果	p 14
5.	考察	p 21
6.	まとめ	p 27
7.	謝辞	p 28
8.	表	p 29
9.	図および図説	p 33
10.	引用文献	p 50
11.	研究業績	p 62

1. 研究概要

近年、急性骨髄性白血病の中の一病型である急性前骨髄性白血病 (acute promyelocytic leukemia; APL) は、全トランスレチノイン酸 (all-*trans* retinoic acid; ATRA) や亜ヒ酸 (arsenic trioxide; ATO) の臨床応用により、治療成績の向上が著しい。APL に特異的に有効である ATRA や ATO の作用メカニズムの解明は、代表的な APL 細胞株である NB4 が主に用いられているが、治療反応性の違いを研究する上では、基礎研究に応用できる細胞株が殆ど無いことが問題である。NB4 以外の APL 細胞株としては AP-1060 と UF-1 があるが、いずれも ATRA 及び ATO に耐性である。この研究では岸らによって樹立された HT93A を用い、この研究において HT93A が ATRA のみならず ATO で分化が誘導されることを初めて示し、かつ顆粒球刺激因子 (granulocyte colony-stimulating factor; G-CSF) を加えた場合の分化誘導の増強と ATO の取り込みの増加を明らかにした。また NB4 と HT93A を用い、ATO のトランスポーターである aquaporin 9 (AQP9) の発現強度が NB4 と HT93A で大きく異なり、患者 APL 細胞間でも異なることをはじめて示した。さらに、患者 APL 細胞における ATO の

感受性が、AQP9 発現強度と関連し、AQP9 発現強度が ATO の感受性に
関連する因子であることを示した。

HT93A は ATO に感受性を示す数少ない APL 細胞株の一つであり、か
つ NB4 と対照的な性格をもつ。NB4 は ATRA に対して感受性を有する
が ATRA 耐性の患者から樹立された細胞である。対して HT93A は ATRA
の曝露を受けていない患者から樹立された唯一の APL 細胞株である。
CD11b、CD11c、及び CD15 の発現が分化マーカーとして有用であった。
また、NB4 には発現していない CD34 や CD56 を発現しており、分化誘
導により CD34 発現が低下するという表面抗原の変化を示した。HT93A
は ATO の作用メカニズムを研究する上で NB4 と対比させて考えるこ
とが可能な唯一の細胞株であることが示され、今後、基礎研究にお
いて APL をより深く理解するために重要な位置づけとなることが期
待される。

加えて、APL 細胞における AQP9 の発現強度が、APL 患者における
ATO 治療の有効なバイオマーカーとなることがはじめて基礎実験で
示された。ATO 治療における予後因子は ATRA 時代のそれとは同一で
はないことが指摘されており、フローサイトメトリー法における
AQP9 発現の評価はすみやかに臨床応用が可能であるため、ATO 治療

における臨床研究に容易に導入可能である。結論として、この研究は、APLにおける将来の基礎研究の幅を拡張するにとどまらず、新しい併用療法や AQP9 のバイオマーカーとしての臨床研究の可能性を明らかにした。

2. 緒言

急性前骨髄性白血病(acute promyelocytic leukemia; APL)は、15番と17番染色体の均衡型転座 $t(15;17)$ により生じる promyelocytic leukemia(PML) 遺伝子とレチノイン酸受容体遺伝子(retinoic acid receptor alpha; RAR α)の融合遺伝子の形成が特徴であり(Figure 1)、その遺伝子の転写・翻訳の結果として生じる PML/RAR α 蛋白が腫瘍発生に重要な役割を持つ特異的な急性骨髄性白血病(acute myeloid leukemia; AML)の一病型である[1-3]。PML/RAR α 蛋白は histone deacetylase(HDAC)と複合体を形成し、様々な標的遺伝子の転写を抑制する[4]。その結果、細胞の分化停止と自己複製をきたし腫瘍化に導くことが明らかとなっている [1-4] (Figure 2)。

全トランスレチノイン酸(all-*trans* retinoic acid; ATRA)が APL 細胞の分化を誘導することが明らかとなり臨床応用されるようになってからは、化学療法との組み合わせによっておよそ70%の患者が治癒を得られるという良好な成績が報告されている[5, 6]。しかし約30%の患者は再発をきたすか、治療抵抗性であり、再発・治療抵抗性の患者の予後は一般的に不良であった。近年、亜ヒ酸(arsenic trioxide; ATO)が APL の再発症例に有効であることが報告され、再

発後に ATO 単独で治療した場合、90%程度の再寛解が得られたという卓越した効果の報告がある[7, 8]。

APL における薬剤の作用メカニズムを解明するために、基礎研究においては t(15;17) を有する APL 細胞株である NB4 が汎用されている。NB4 は ATRA 治療後に再発した APL 患者の骨髄細胞から樹立された細胞株であり[9]、ATRA 及び ATO に感受性を有する[10-15]。

NB4 を用いた基礎実験では、ATRA は薬理的濃度 ($10^{-6} \sim 10^{-7}$ M) の濃度で PML/RAR α 蛋白から co-repressor を解離させ、co-activator をリクルートさせることで下流の転写因子を発現させ、APL 細胞の分化を誘導することが知られている[16-18]。また、患者細胞と NB4 を用いた基礎研究によって、ATO は濃度依存的に異なる薬理効果を発揮することが示されている。すなわち、低濃度 ($0.1 \sim 0.5 \mu\text{M}$) の ATO では顆粒球系細胞に分化を誘導し、高濃度 ($1 \sim 2 \mu\text{M}$) ではアポトーシス誘導をきたす[14, 15]。ATO の APL 細胞に対する主たる作用メカニズムは、ATO が PML 及び PML/RAR α 蛋白のシステイン残基に直接結合し、プロテアソーム依存性に PML 及び PML/RAR α 蛋白を分解することにある[19, 20]。

また、ATO の細胞内取り込みに重要な役割を果たすトランスポータ

一として Aquaporin (AQP) 9 がある。AQP9 は膜貫通型の低分子輸送経路であり、尿素や重金属を通過させる [21]。AQP9 mRNA の発現は末梢血の白血球で高く、肝細胞にもみられる。一方、造血組織である胸腺や脾臓では発現がほとんどみられない [21]。現在までに AQP3, AQP7 および AQP9 が ATO の細胞内取り込みに関与するという報告があるが、これらのうち AQP9 の関与が最も大きい [22]。一方、ATO の細胞外への排出には multidrug resistance-associated protein 2 が関与すると報告されている [23, 24]。近年では、マウス肝細胞やヒト卵膜由来細胞における AQP9 の発現強度が ATO の感受性と関連していることが示されている [24, 25]。また、AML 細胞株においては AQP9 発現強度と ATO の感受性が関連し [13]、K562 細胞株において AQP9 遺伝子を導入すると ATO の感受性が亢進することが知られている [13, 26]。AQP9 を sorbitol で競合拮抗すると、apoptosis 誘導が低下することも示されている [24, 25]。さらに、AQP9 発現強度は白血病の分化と関係しており、ATRA 処理での分化誘導に伴い発現が亢進することが知られている [13]。臨床的にも、ATRA と ATO の併用療法は、化学療法を用いずとも 60-70% の初発 APL 患者を治癒に導き [27, 28]、また化学療法の併用でより高い長期生存率を実現することから、

AQP9 の発現を高めることが ATO の効果を増強させ、より高い有効性をもたらすと考えられている [28]。さらに、顆粒球コロニー刺激因子 (granulocyte colony-stimulating factor; G-CSF) は ATRA での分化誘導を増強する効果が示されている [29, 30]。G-CSF 単独で APL 細胞の分化を誘導するかは疑問ではあるが、G-CSF を中和抗体で抑制すると ATRA や ATO による APL 細胞の分化が抑制されることから、G-CSF は分化誘導に関係することが示されている [10]。これらの研究は、ATRA と ATO を併用することで、AQP9 発現誘導を介した ATO の細胞内取り込みを増加させ、ATO の薬理効果を増強させることを示唆している。しかし APL 細胞を用い ATRA 処理後に ATO の細胞内取り込みの増加を直接示した報告は無い。さらに、G-CSF 併用により ATO の分化誘導が増強するか、また G-CSF 併用による ATRA の分化誘導の増強が AQP9 発現や ATO の取り込みに影響を与えるかどうかは明らかにはされていない。

過去の研究では APL に対する種々の薬剤の作用メカニズムの解析は主として NB4 を用いて行われている。これは、NB4 以外の APL 細胞株である UF-1 と AP-1060 は ATRA や ATO に対し耐性をもつ為である [31, 32]。HT93A は樹立前に ATRA 及び ATO の曝露を受けておらず、ATRA

に感受性をもち、G-CSF の併用で ATRA による分化誘導が増強される [33]。しかし、ATO に対する感受性の有無は検討されていない。NB4 と HT93A の対比を Table 1 に示す。この研究において、HT93A 細胞における ATO、ATRA および G-CSF の併用の効果を観察しその併用の意義を検討した。また、NB4 と HT93A における AQP9 発現強度の違いと ATO 取り込み及び ATO の感受性の違いを検討した。さらに、APL 患者検体を用いて、APL 細胞の AQP9 発現強度と ATO によるアポトーシス誘導との関連性を検討した。

3. 対象と方法

① 使用試薬

ATRA 及び ATO は Sigma 社 (St. Louis, MO, USA) から購入し、ATO は 1 M の水酸化ナトリウム水溶液に溶解した後、 $0.22\ \mu\text{m}$ のフィルターで濾過させ、リン酸緩衝液 (PBS) で希釈し、1 mM の濃度に調整した。ATRA は無水エタノールに溶解し、2 mM の濃度に調整し $-20\ ^\circ\text{C}$ で保存した。G-CSF (Filgrastim) は協和発酵キリン社 (Tokyo, Japan) から提供され、PBS に溶解し $50\ \mu\text{g/ml}$ の濃度に調整した。

Phycoerythrin (PE) で標識されたマウス抗ヒト CD11b IgG_{2a} 抗体、CD34 IgG₁ 抗体及び fluorescein isothiocyanate (FITC) で標識されたマウス抗ヒト CD15 IgM 抗体は Beckton Dickinson 社 (San Jose, CA, USA) から購入し、FITC で標識されたマウス抗ヒト CD11c IgG₁ 抗体は eBiosciences 社 (San Diego, CA, USA) から購入した。ウサギ抗ラット AQP9 抗体は Alpha Diagnostic International 社 (San Antonio, TX, USA) から購入した。抗 AQP9 抗体の二次抗体として、ヤギ抗ウサギ IgG 抗体は KPL 社 (Gaithersburg, MD, USA) から購入した。陰性コントロール用の PE 及び FITC で標識された同一 isotype のマウス IgG 抗体

と FITC で標識された同一 isotype のマウス IgM 抗体は Beckton Dickinson 社から購入した。アポトーシス解析の試薬キットである Apoptosis Detection Kit I は、Beckton Dickinson 社から購入し、これには FITC で標識された annexin V と、propidium iodide (PI)、及び annexin V binding buffer が含まれている。

② 細胞培養

株化ヒト APL 細胞である HT93A は、細胞を樹立した岸らから提供された。HT93A 及び NB4 は、RPMI 1640 に 56 °C 30 分間の不活化処理を行ったウシ胎児血清 (FBS) を 10% 加え、さらにペニシリンとストレプトマイシンをそれぞれ 100 U/ml、100 μ g/ml の濃度になるように加えた培地で、37 °C、5% CO₂ インキュベーターで培養した。RPMI 1640、FBS、ペニシリン及びストレプトマイシンは Gibco-BRL (Grand Island, NY, USA) から購入した。

③ 細胞増殖と Wright-Giemsa 染色による形態評価

HT93A の細胞増殖は 1×10^5 /ml の濃度で培養を開始し、2、4、8 日間で評価した。Trypan blue exclusion method によって死細胞を除外し、生存細胞数を計算板を用いて評価した。Wright-Giemsa 染色は、

回収した細胞を 600 rpm、10 分間サイトスピンし、スライドガラスへ散布させた。乾燥後、Wright 染色液で 5 分間染色し、流水で洗淨した後、Giemsa 染色液で 20 分間染色し、光学顕微鏡下で観察した。

④ フローサイトメトリー法による表面抗原及び AQP9 発現の解析

HT93A は 1×10^5 /ml の濃度で培養を開始し、8 日間培養した後、表面抗原の発現を評価した。AQP9 発現は 2、4、7、10 日間の培養後に評価した。細胞を回収し、2.5% FBS と 0.5% アジ化ナトリウムを加えた PBS (PBSF) で 3 回洗淨し、目的の抗体及び同一 isotype の抗体を $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で加え、細胞を 4°C 、30 分間、暗所で静置させ抗体と反応させた。抗 AQP9 抗体は同様の条件で反応させ、PBSF で洗淨後、さらに二次抗体を同様の条件で反応させた。抗原抗体反応後、PBSF で 3 回洗淨し、フローサイトメーター (Cyto ACE 150, Jasco, Tokyo, Japan) で測定した。表面抗原である CD11b、CD11c、CD15、及び CD34 は同一 isotype 抗体によって規定された境界領域を用いた陽性細胞割合で評価し、AQP9 発現強度は抗 AQP9 抗体で染色した細胞の mean fluorescence intensity (MFI) 値で評価し、各細胞株や患者検体の比較にはそれぞれ得られた MFI 値から自家蛍光の MFI 値を引くことで定量的に評価した。細胞数は 10,000 個以上の細胞を解析した。

⑤ アポトーシス解析

アポトーシス解析は Beckton Dickinson 社のプロトコールに準じて行われた。回収された細胞を PBS で 2 回洗浄し、Annexin V binding buffer 100 μ l に 1×10^5 個の細胞が含まれるように調整し、Annexin V と PI を各々 5 μ l ずつ加え、室温で 15 分間静置した。未染色の細胞を陰性コントロールとし、フローサイトメーター (Cyto-ACE 150) を用いて測定した。過去の報告に従い、Annexin V 陽性、PI 陰性分画を早期アポトーシス、Annexin V、PI 共に陽性の分画を後期アポトーシスとして評価した [34]。APL 患者サンプルを用いたアポトーシス解析は、APL 患者の骨髄または末梢血から Lymphoprep™ (Cosmo Bio, Tokyo, Japan) を用いて APL 細胞を分離し Cell banker® (Mitsubishi Chemical Medience, Tokyo, Japan) を用いて凍結保存した検体を用いた。解凍後に 90% 以上の芽球比率と 80% 以上の細胞生存率を有する検体を使用した。患者細胞を用いたアポトーシス解析では、2,000 個以上の細胞を解析した。この患者検体を用いた臨床研究は、日本大学医学部附属板橋病院の倫理委員会の承認を受けた上で施行された。

⑥ 細胞内ヒ素濃度の測定

非アポトーシス濃度である $0.5 \mu\text{M}$ の濃度の ATO を加え、細胞を 30 分、60 分、120 分間培養し、細胞をすみやかに回収、遠心分離し、PBS で 3 回洗浄した。総細胞数を数えた上、測定まで -20°C で凍結保存した。測定は、細胞ペレットに 68% 硝酸を $100 \mu\text{l}$ 加えて溶解し、15 ml のポリプロピレン遠心分離管に移し、ホットプレートで 80°C 、90 分間の処理を行った。その後、超純水で 3 ml に希釈し、誘導結合プラズマ質量分析 (ICP-MS) (ELAN DRC-e, PerkinElmer SCIEX, ON, Canada) を用いて我々が行った過去の報告と同様の条件でヒ素濃度を測定した [35, 36]。

⑦ 統計処理

以上の実験で得たデータは平均値±標準偏差で示した。有意差検定には、Student's t-test もしくは Mann-Whitney U-test を用い、p 値が 0.05 未満のものを統計学的に有意とみなした。また、2 つの因子の関連については Pearson product-moment correlation coefficient を用いた。

4. 結果

4-1. HT93A の ATO に対する感受性と分化誘導のプロファイル

① ATO の HT93A に対する増殖抑制効果とアポトーシス誘導能

最初に、HT93A が亜ヒ酸に感受性を示すか、増殖抑制とアポトーシス誘導に焦点を置き検討した。増殖抑制の結果を Figure 3 に示す。HT93A は ATO により濃度依存性の増殖抑制作用を示した。2 μ M の濃度で 8 日間培養すると、生存細胞はほぼみられなくなった。

アポトーシス誘導能を Figure 4 に示す。1 μ M 以上の濃度で有意にアポトーシスを誘導した。また濃度が高いほど、後期アポトーシスに入る傾向がみられた。

② HT93A における分化マーカーの決定

HT93A を用いた基礎実験は少なく、分化マーカーの詳細なデータは殆ど示されていない。この研究では最初に、ATRA で処理された HT93A を顆粒球分化の陽性コントロールとして、表面抗原の変化のプロファイルを検討した。1 μ M の ATRA で 8 日間処理し、23 種類の表面抗

原を検査した結果を Table 2 に示す。CD11b、CD11c、及び CD15 は分化に伴い発現が増強されるが、一方、HT93A は未分化なマーカーである CD34 が発現しており、分化誘導によって発現が低下することが示された。この結果より、HT93A の分化マーカーが決定された。

③ ATRA、ATO、G-CSF 及び併用による HT93A の分化誘導

HT93A は ATRA 1 μ M、ATO 0.125 μ M、G-CSF 50 ng/ml 及びそれらの併用にて 8 日間処理された。Wright-Giemsa 染色の結果を Figure 5 に、分化マーカーの変化を Figure 6 に示す。HT93A は ATRA により、形態的に核の凝縮と分葉をきたし、分化マーカーである CD11b、CD11c、及び CD15 の発現を増加させ、CD34 の発現を低下させた。G-CSF の併用により、形態的に核の分葉はより顕著になり、ATRA 単独に比して有意に CD11 b、CD11c の発現を増強させ、CD34 の発現を低下させた。ATO は形態的に核のくびれをきたすが分葉まではみられず、表面抗原は CD11c と CD15 の発現を亢進させたが CD11b 発現の亢進や CD34 発現の低下をきたさなかった。しかし、G-CSF の併用により、核の分葉が促進され、CD11 b の発現が増強した。この結果から、HT93A において、G-CSF は ATRA 及び ATO の分化誘導を共に増強することが示され

た。

HT93A においては、ATRA と ATO の併用は形態的に核の分葉が ATRA 単独よりも顕著となるものの、分化マーカーの変化は ATRA 単独の処理とほぼ同様であった。ATRA と G-CSF に ATO を加えた場合は、ATRA と G-CSF のみよりも形態的な変化が乏しくなり、CD11b 発現に対しても抑制的に働いた。分化マーカーの変化を Table 3 に要約した。

分化に関しては、ATRA と G-CSF の併用が最も高い分化誘導をきたしており、ATO の併用は ATRA もしくは ATRA+G-CSF の分化誘導に対し増強効果を示さなかった。尚、HT93A は G-CSF 単独で分化しなかった。

4-2. HT93A の分化誘導療法による AQP9 発現と ATO の取り込みへの影響

① HT93A に対する ATRA、ATO、G-CSF 及び併用における AQP9 発現誘導効果

Figure 7A&7B に示されるように、HT93A を $1 \mu\text{M}$ の ATRA 及び $0.125 \mu\text{M}$ の ATO で 7 日間培養処理した場合、時間依存的に細胞膜表面の AQP9 の発現が亢進した。ATO 処理においては AQP9 発現が有意に亢進

したが、ATRA に比してその程度は少なかった (Figure 7A)。これは ATRA と ATO の分化誘導の程度の差を反映していると考えられる。しかし、ATRA 及び ATO に G-CSF を加えた場合は、AQP9 の発現はそれぞれ ATRA 及び ATO 単独と同程度であった (Figure 7B)。また、G-CSF 単独は AQP9 の発現を亢進させなかった。(data not shown)

Figure 8A では ATRA による AQP9 発現の Time-course が示されている。2 日目までは AQP9 の発現がコントロールと同等であるが、4 日目から 7 日目にかけて AQP9 の発現が増強した。10 日目は 7 日目とほぼ同等の発現強度であった。また、ATRA の濃度を 1 nM~1 μ M まで 10 倍毎に振り分け、7 日間培養処理し、AQP9 発現強度を測定したところ、濃度依存的に AQP9 の発現がみられた (Figure 8B)。これは CD11b と CD15 の発現程度と関連しており (Figure 8C)、AML 患者細胞において分化傾向をもつ病型において AQP9 発現が高いとする過去の報告を支持するものである。

② ATO の細胞内濃度の解析

ATRA の分化誘導作用により AQP9 発現が亢進したため、ATO の取り込みは亢進すると予想された。その仮説の検証のため、10 nM 及び 1

μM の ATRA で 7 日間処理した HT93A と未処理の HT93A の培養液中に ATO を $0.5\mu\text{M}$ の濃度になるように加え、30 分、60 分、120 分で細胞を回収し、細胞数を測定の上、細胞内のヒ素濃度を測定した (Figure 9)。予想に反し ATRA 処理により ATO の細胞内濃度は低下した。ATRA+G-CSF で処理した細胞は ATRA 単独の場合と比較して AQP9 発現の程度は変わらなかったが、細胞内のヒ素濃度が ATRA 単独処理よりも有意に高かった。G-CSF 単独では細胞内のヒ素濃度はコントロールと同程度であった。尚、ATO で未処理の細胞の ATO 濃度は検出感度未満であった。

4-3. ATRA と G-CSF の HT93A の細胞増殖に与える影響

ATRA は濃度依存的に HT93A の細胞増殖を抑制した (Figure 10)。G-CSF は単独では細胞増殖に寄与しなかったが、ATRA と G-CSF を併用すると ATRA による細胞増殖抑制効果は有意に減弱した (Figure 11)。

4-4. NB4 と HT93A および患者細胞株における AQP9 発現と ATO 感受性の関係

① APL 細胞株 NB4 と HT93A における ATO の感受性と AQP9 発現強度の関係

この研究において、HT93A が ATO に感受性を示すことから、HT93A を APL の代表細胞株である NB4 と比較した。ATO を $1\mu\text{M}$ 、 $2\mu\text{M}$ の濃度とした培養液中で NB4 と HT93A を 48 時間培養したところ、NB4 は HT93A よりも有意にアポトーシス誘導がみられた (Figure 12)。HT93A と同様に NB4 で ATO の細胞内取り込みを測定したところ、NB4 は HT93A に較べて 4~7 倍高い ATO の取り込みを示した (Figure 13)。そのため、ATO の取り込みに影響を及ぼすとされる AQP9 の発現を評価した。ここでは過去に報告されている白血病細胞株の AQP9 発現と、新たに HT93A の AQP9 発現を評価し比較した。この研究では AQP9 発現をフローサイトメーターで測定し、発現強度は NB4 > K562 > Jurkat > HL-60 の順であった。特筆すべきことに、HT93A は NB4 と同じ APL の細胞株であるにもかかわらず、AQP9 の発現が低く、この 5 種類の中では最も発現が低かった (Figure 14)。

② 患者検体を用いた APL 細胞の AQP9 発現と AT0 によるアポトーシス誘導能の関連性の検討

APL の細胞株である NB4 と HT93A において、AQP9 発現が著しく異なることから、AT0 治療の薬剤感受性のバイオマーカーとなる可能性があると考え、患者サンプルを用いて AQP9 発現と生存細胞割合の関連を検討した。Figure 15 に示されるように、6 人の APL 患者から分離された腫瘍細胞と 2 種類の APL 細胞株を用いて検討した結果、AQP9 の発現が高いほど生存細胞が少なくなるという有意な負の関係を示した。(R²=0.7592, P=0.0049)

また、どのような APL 細胞が AQP9 の発現が高いか、また AT0 感受性が高いかを推定するために、診断時における APL 細胞の表面抗原のプロファイルや、t(15;17)以外の付加的染色体異常の有無が AQP9 発現や AT0 感受性に関連するかを検討した(Table 4)。しかし、AQP9 発現と表面抗原の発現パターン及び付加染色体異常の有無との関連はみられず、また AT0 のアポトーシスの程度も関連しなかった。この結果から、AQP9 の発現強度が AT0 の感受性に関連する因子であることが示された。

5. 考察

この研究において、ATO が HT93A の増殖抑制、分化誘導、及びアポトーシスを引き起こすことを初めて実証した。また、ATRA と ATO の分化誘導が、G-CSF を加えることで増強され、ATRA 処理後の ATO の取り込み低下を G-CSF が回復させることを示した。さらに、NB4 と HT93A を用い、ATO のトランスポーターである AQP9 発現強度と ATO の取り込みが NB4 と HT93A で大きく異なり、患者 APL 細胞間でも異なることをはじめて示した。さらに臨床検体を用い、APL 細胞の AQP9 発現が ATO の感受性に関連することを明らかにした。

APL に特異的に有効である ATRA や ATO の作用メカニズムは、APL 細胞株である NB4 が主に用いられているが、APL 細胞の治療反応性の違いを研究する上では、基礎研究で利用可能な他の細胞株が殆ど存在しないことが問題であった。APL の細胞株は NB4 の他に AP-1060 と UF-1 があるが、共に ATRA 及び ATO に耐性である [31, 32]。HT93A は ATO に感受性を示す数少ない APL 細胞株の一つであり、かつ NB4 と対照的な性格をもつ。NB4 は ATRA に対して感受性を有するが、ATRA 耐性の患者から樹立された細胞である。対して HT93A は ATRA の曝露

を受けていない患者から樹立された唯一の APL 細胞株である。分化マーカーとして CD11b、CD11c、及び CD15 は有用であったが、NB4 にみられない CD34 や CD56 を発現しており、分化誘導により CD34 が低下するという興味深い表面抗原の変化を示す。実際に、CD34 陽性の APL は存在し、分化誘導療法によって CD34 の発現が低下する例が報告されている [36]。また t(15;17) 以外に t(1;12) を有し ets variant gene 6 (ETV6)/Abelson-related gene (ARG) の融合遺伝子を形成し、その結果、ARG の過剰活性化をきたし腫瘍の自律性増殖に寄与されていると報告されている [37]。HT93A は ATO による分化誘導の作用メカニズムを研究する上で NB4 と対比させて考えることが可能な唯一の細胞株であることが示され、今後、基礎研究において APL の発症メカニズムや薬剤の作用をより深く理解するために重要な位置づけとなることが期待される。

過去には AQP9 が ATO の取り込みの主要経路であること、APL や AML (M2) のような分化傾向を示す AML が AQP9 を高発現していることが報告されている [13, 22, 24, 25, 38]。さらに ATRA による分化誘導で AQP9 mRNA 及び蛋白が共に発現誘導されることから [13, 27]、細胞分化と AQP9 発現が関連していると考えられる。しかし一方で、この研

究では ATRA+G-CSF や ATO+G-CSF は、それぞれ ATRA 単独や ATO 単独に比して分化誘導が増強されたにも関わらず、AQP9 発現強度は同等である結果を得た。また症例数は少ないが、患者検体及び APL 細胞株における AQP9 発現強度は表面抗原の発現の程度と有意な関連が認められなかった。この結果は、ATRA 感受性を有する細胞においては ATRA の作用として分化誘導とは異なる AQP9 発現誘導効果をもつ可能性を示唆している。この仮説の検証のためには、ATRA 耐性株を含めたより多くの細胞株における解析や、APL 症例を集積し検討する必要がある。

APL においては他の病型の AML と比較して AQP9 発現が高いことが ATO の感受性が高い理由の一つと考えられているが[13]、さらにこの研究では APL 細胞における AQP9 の発現が個々の患者で異なり、APL 患者における ATO 治療の有効なバイオマーカーとなることをはじめ基礎実験で示した。種々の細胞株の AQP9 発現をウェスタン・ブロット法で評価した報告によると、NB4 > K562 > Jurkat > HL-60 の順で AQP9 の発現が強いとされている[13]。この研究におけるフローサイトメトリー法による AQP9 発現の評価は過去の報告と一致しており、その有用性が示された。

ATO 治療における予後因子は ATRA 時代のそれとは同一ではないことが指摘されており、フローサイトメトリー法における AQP9 発現の評価はすみやかに臨床応用が可能であるため、ATO 治療における臨床研究に容易に導入可能であると考えられる。

近年の臨床研究において、ATO、ATRA の併用療法は化学療法を行わずとも 60~70%の初発 APL 患者を治癒に導くことが可能であり、さらに化学療法の併用によりさらに治療成績が向上する可能性が示され [27, 28]、ATRA による AQP9 の upregulation が ATO の作用を増強するためと考えられていた [28]。しかし、この研究では ATRA は AQP9 発現を増強するが、ATRA がよく機能した場合は ATO の細胞内濃度を低下させてしまうことが示された。実際に、ATRA 感受性である NB4 は ATRA と ATO を併用した場合には ATO のアポトーシス作用を増強しない [39]。この研究の中ではその機序を示すことは出来ておらず、その機序の解明が研究課題として残された。薬剤の細胞内濃度に影響を与える因子としては、細胞内取り込みだけではなく排出機構も重要である。ATO の細胞内取り込みに AQP9 が関連することは明らかにされている一方で、ATO の排出機構は十分解明されていない。近年、ATO の排出には multidrug resistance-associated protein 2 が関与

することが示されており [23, 24]、ATO 排出機構の解明とともに ATRA によって排出機構の発現が影響を受けるか検討する必要があると考えられた。

近年には ATO 単独治療でも 60~70% の初発 APL 患者を治癒させることが可能であると示されたため [40, 41]、臨床的に ATRA と ATO の併用効果があるかは疑問が残る。G-CSF の併用により分化誘導が促進されるのみならず、低下した ATO の取り込みを増強することが可能であることは、この 3 剤併用により、APL 患者により高い有効性をもたらす可能性を示唆する。ATO は細胞周期阻害因子である p21 及び p27 の発現を増加させるため [42]、G-CSF 併用により静止期細胞を S 期へ導入し、より薬剤感受性を高めることが期待される。また、G-CSF は一時的に腫瘍増殖をきたすが、その効果は長期的には維持されないと考えられている [29]。さらに、*in vivo* 及び *in vitro* において G-CSF レセプターを介して ATRA の感受性を増強する可能性が報告されている [10, 43-46]。この研究においては、HT93A は G-CSF 単独では細胞増殖、分化誘導、AQP9 発現および ATO 取り込み増強をきたさなかったが、ATRA や ATO との併用で分化誘導の増強のみならず ATO の取り込みの増加をきたすことが示された。その G-CSF に対する反応

性の違いから、分化誘導薬剤により G-CSF レセプターが発現し G-CSF に対する感受性が亢進する可能性が推測された。さらに、ATRA に G-CSF を併用した場合の ATO 取り込みの増加は、AQP9 発現強度とは関係せず、AQP9 発現とは異なる ATO 取り込みに影響を及ぼす機序が存在することが推測された。

結論として、この研究は分化誘導療法における将来の基礎研究の基盤を拡張するにとどまらず、APL の新しい併用療法や AQP9 のバイオマーカーとしての臨床研究の可能性を明らかにした。

6. まとめ

この研究において、APL に対する分化誘導療法の併用療法において、G-CSF 併用の意義を明らかにしたのみならず、HT93A が APL の分化誘導療法の研究や、分子メカニズムを解明する上での重要な研究資料となることを示した。また、AQP9 が APL における ATO 治療のバイオマーカーとなる可能性をはじめて示した。これらの知見は既存薬剤の併用により APL 治療に更なる進歩をもたらす可能性を示し、また今回はじめて行われた AQP9 発現をフローサイトメトリー法で定量的に評価する手法は、AQP9 発現が ATO 治療におけるバイオマーカーとなるか臨床研究を行う上で非常に簡便であり優れた手法であると考えられる。この研究は今後の APL の基礎及び臨床研究における礎となることが期待される。

7. 謝辞

本研究の遂行におきまして、懇切な御指導を賜りました日本大学医学部内科学系血液・膠原病内科学分野教授 竹内 仁先生に心より深く感謝申し上げます。

本研究の研究計画立案、研究の遂行、本論文執筆について直接終始御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました日本大学医学部内科学系血液・膠原病内科学分野准教授 八田善弘先生、東京薬科大学臨床ゲノム生化学教室教授 豊田裕夫先生、同教室助教 袁 博先生に心から深く感謝を申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、終始的確な御助言、丁寧な御指導をいただきました日本大学医学部機能形態学系生体構造医学分野教授 相澤 信先生に心より深く感謝申し上げます。また、研究にご協力頂いた東京薬科大学臨床ゲノム生化学教室 吉野雄大先生、日本大学医学部内科学系血液・膠原病内科学分野診療教授 堀越 昶先生、同研究室研究員 石塚瑛子さんに厚く御礼を申し上げます。

最後に、臨床検体の解析にあたり、症例集積と検体の保存に携わって下さった医局員の皆様に改めて心より深く感謝いたします。

8. 表

Table 1 NB4 と HT93A における分化誘導および AQP9 発現

	NB4	HT93A
分化マーカー	CD11b, CD15	CD11b, CD15, CD34
細胞株樹立前の治療	ATRA・化学療法 (再発時に樹立)	化学療法のみ (再発時に樹立)
ATRAによる 分化誘導	10 ⁻⁶ M-10 ⁻⁷ M で CD11b の発現を増強	10 ⁻⁶ M で CD11b の発現を増強
ATRA+G-CSFによる 分化誘導	ATRA 単独より増強	ATRA 単独より増強
ATOによる分化誘導	0.1-0.5μM で CD11b の発 現が増強	報告されていない
ATO+G-CSFによる 分化誘導	報告されていない	報告されていない
ATRAによる AQP9 発現	発現が増強する	報告されていない
ATOによる AQP9 発現	発現が増強しない	報告されていない
ATRA 処理後の ATO 取り込みの変化	報告されていない	報告されていない

過去の報告から NB4 と HT93A の異同を示した。HT93A に関しては ATO の薬理作用の研究や、AQP9 発現に関して報告が無い。

Table 2 ATRA 処理前後の HT93A の表面抗原発現のプロファイル

Antigens	Clones	Positivity of control (%)	Positivity after ATRA treatment (%)	Differentiation marker expression
CD2	MT910	0.4	0.7	
CD3	SK7	0.8	1.0	
CD4	SK3	0.1	0.1	
CD5	53-7.3	0.3	1.1	
CD7	M-T701	0.6	0.9	
CD8	SK-1	0.4	0.8	
CD10	HI10a	0.2	0.1	
CD11b	D12	0.3	13.6	Upregulated
CD11c	S-HCL-3	0.4	16.9	Upregulated
CD13	L138	0.3	3.2	
CD14	MφP9	0.1	6.7	
CD15	MMA	19.4	44.5	Upregulated
CD16	NKP15	0.4	0.4	
CD19	4G7	0.5	0.8	
CD20	L27	0.2	0.1	
CD33	WM53	99.0	99.5	
CD34	8G12	66.2	30.9	Downregulated
CD41	HIP8	0.6	7.6	
CD56	MY31	99.5	99.8	
CD117	YB5.B8	0.4	0	
KORSA	KOR-SA3544	0.2	0.5	
HLA-DR	L243	0.4	4.6	
MPO	MPO-7	2.4	2.3	

HT93A を $1\mu\text{M}$ の ATRA で 8 日間培養し、フローサイトメーターで表面抗原の発現を測定した。この測定は Bio Medical Laboratories 社 (Tokyo, Japan) に委託し行われた。

Table 3 HT93A の ATRA, ATO, G-CSF 併用における表面抗原の変化

treatment	CD11b expression	CD11c expression	CD15 expression	CD34 expression
G-CSF	-	-	-	-
ATRA	+	+	+++	+
ATO	-	+	++	-
ATRA+G-CSF	+++	++	+++	++
ATO+G-CSF	+	+	+++	-
ATRA+ATO	+	+	+++	+
ATRA+ATO+G-CSF	++	-	+++	+

ATRA, ATO, G-CSF 併用における表面抗原発現の変化の程度を要約し示す。G-CSF は ATRA, ATO の分化誘導を促進するが、ATRA と ATO の併用は分化誘導を増強せず抑制方向に働いた。

Table 4 APL 患者細胞および細胞株のプロファイル

Samples	AQP9 Relative MFI	CD11b (%)	CD13 (%)	CD15 (%)	CD34 (%)	CD56 (%)	Additive chromosome
Patient 1	54.8	0.5	12.7	65.2	0.1	0.1	Add(11)q(25)
Patient 2	48.6	0.5	42.8	52.7	0.1	0.6	(-)
Patient 3	39.5	0.3	43.1	19.9	0.1	1.8	(-)
Patient 4	36.9	1.9	90.0	13.0	0.3	0.1	(-)
Patient 5	33.1	1.6	97.5	78.8	8.2	86.2	-10, -12
Patient 6	94.3	23.7	97.5	19.1	0.1	27.8	(-)
NB4	95.7	48.2	97.8	61.7	0.5	8.2	complex
HT93A	7.3	1.2	6.4	24.3	88.1	99.5	t(1;21)

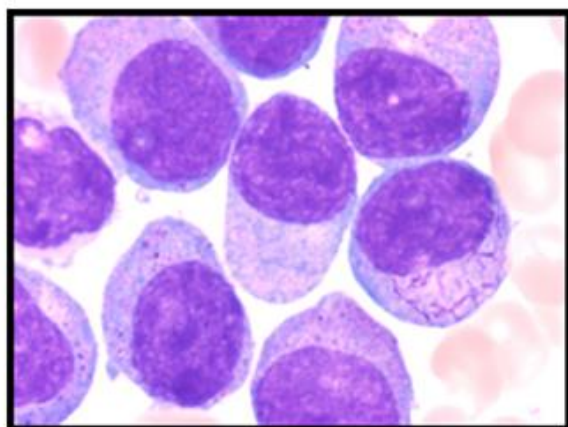
Clones: CD11b, D12; CD13, L138; CD15, MMA; CD34, 8G12; CD56, MY31

APL 患者細胞および細胞株のプロファイルを示す。APL 細胞の AQP9 発現強度と表面抗原の発現もしくは染色体の付加異常の間に明らかな関連性は認められなかった。APL 患者細胞の表面抗原の測定は、APL 診断時の骨髄液を Bio Medical Laboratories 社 (Tokyo, Japan) に委託し行われた。染色体分析は当院で施行された。

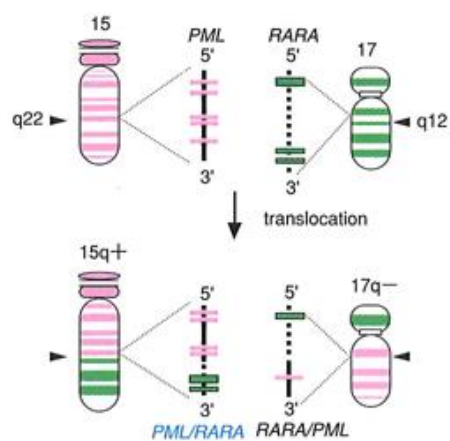
9. 図および図説

Figure 1 APL 細胞形態と染色体転座

(A)

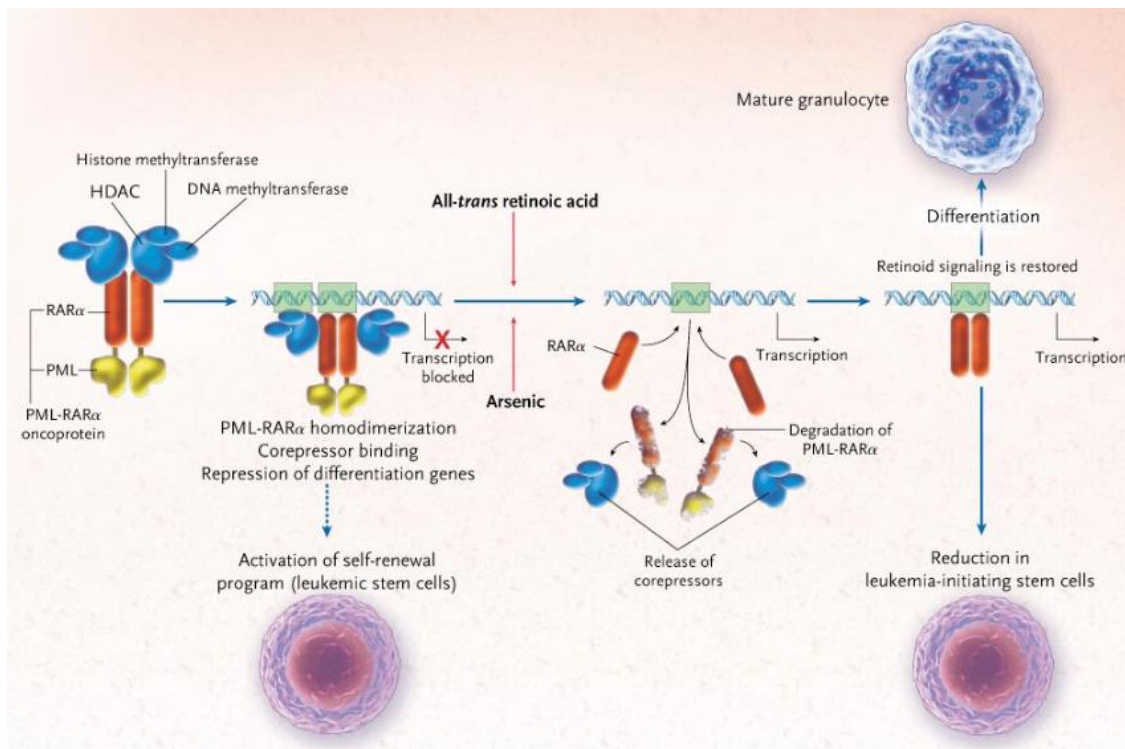


(B)



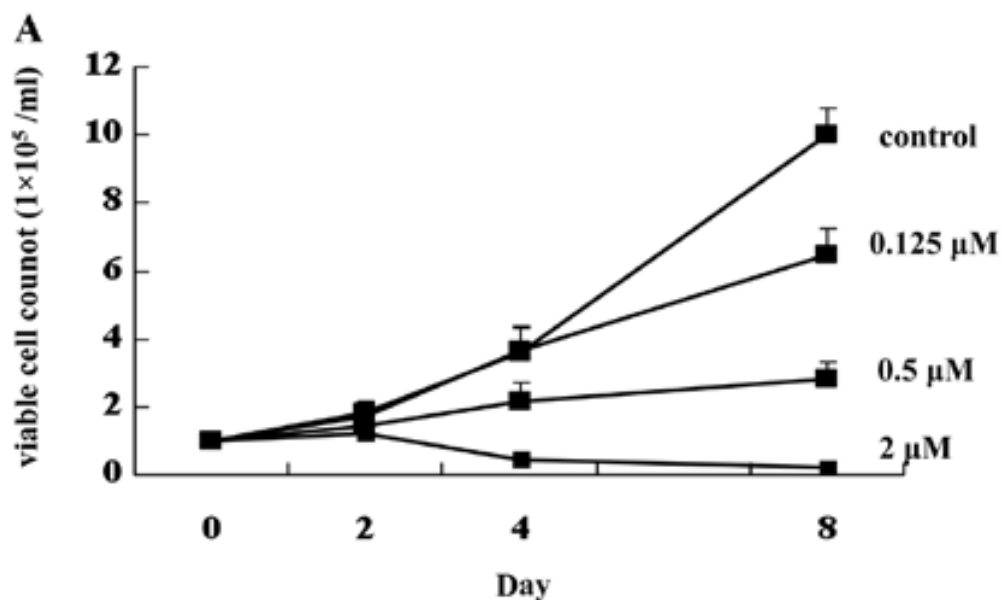
患者 APL 細胞の Wright-Giemsa 染色標本と、15 番および 17 番染色体の模式図を示す。典型的な APL 細胞は形態的に auer body が束になった faggot body を形成し、faggot cell と呼ばれる (A)。染色体転座 $t(15;17)$ により 15q22 に位置する PML 遺伝子と 17q12 に位置する RAR α 遺伝子が融合し PML/RAR α 遺伝子を形成する (B)。

Figure 2 PML/RAR α 蛋白と APL 発生の模式図 (文献 47 から引用)



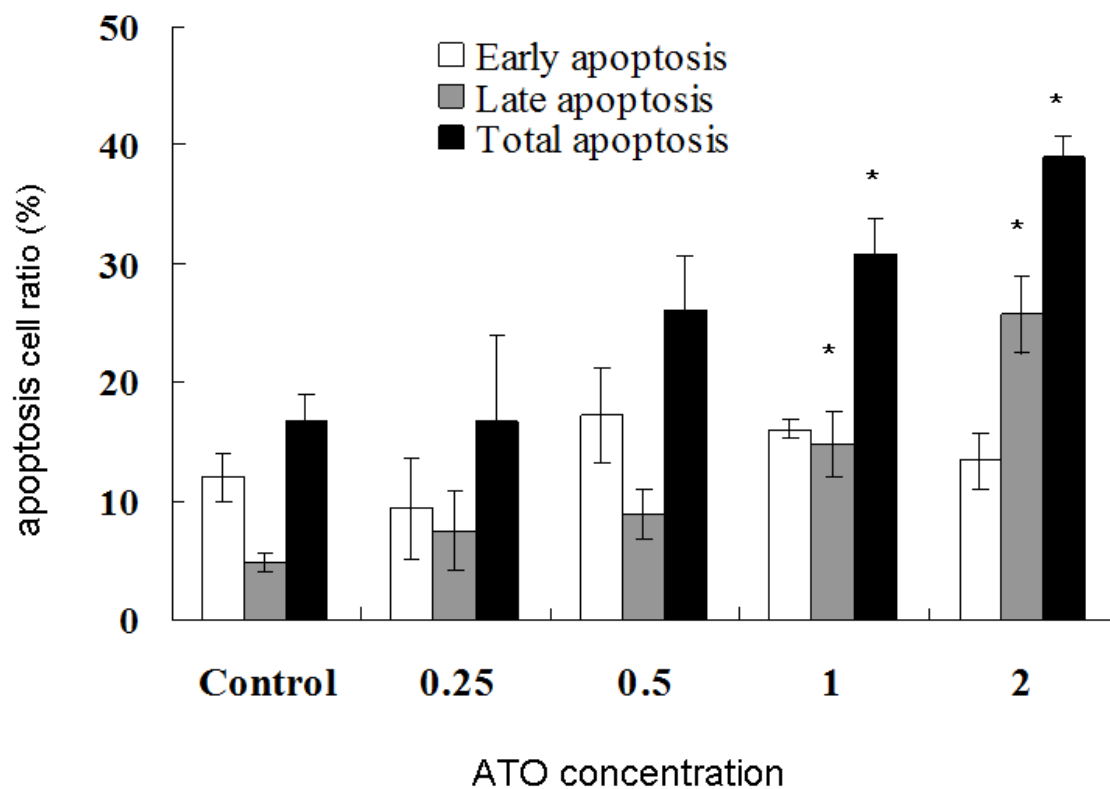
PML/RAR α 蛋白は様々な蛋白と複合体を形成し、DNA と結合することで下流の転写因子発現を抑制し分化停止をきたす。さらに自己複製能を獲得し腫瘍として成立する。ATRA と ATO はこの APL 発生に重要な PML/RAR α を標的とした分子標的治療薬であり、corepressor の解離や PML/RAR α 蛋白の分解により腫瘍としての機能を喪失させ分化に導く。

Figure 3 ATO による HT93A の増殖抑制



細胞数のカウントは Trypan blue exclusion method を用い、計算板にて生存細胞数を計算した。グラフは 3 回反復して行った結果の平均値 \pm 標準偏差で示した。有意差検定は Student' s t-test を用いた。ATO は濃度依存性に HT93A 増殖を抑制し、2 μ M の濃度で 8 日間培養すると生存細胞はほぼ 0 となった。

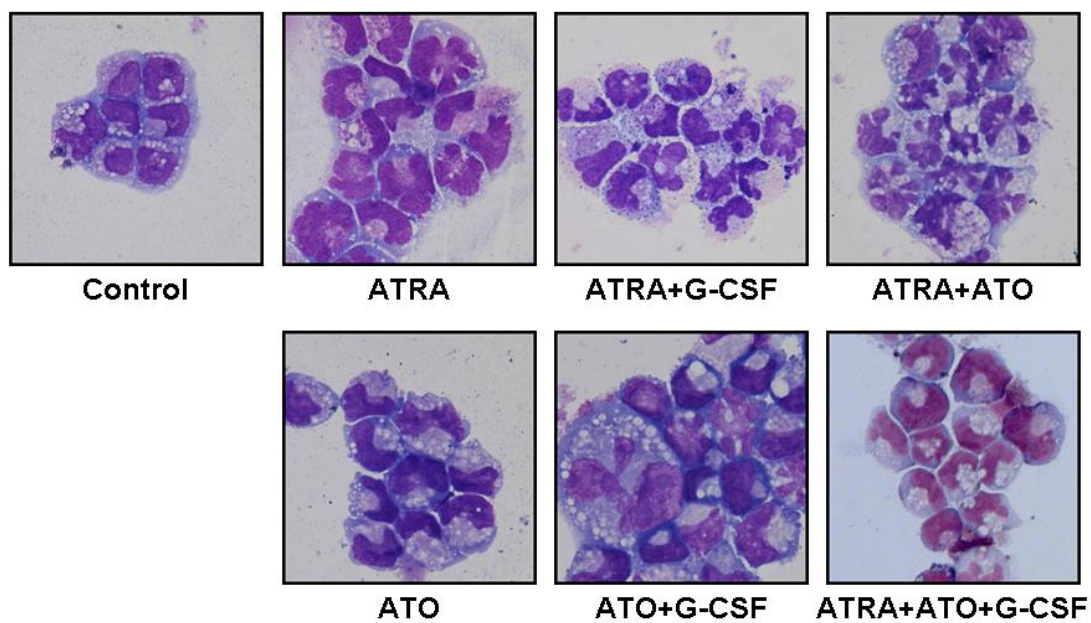
Figure 4 ATO による HT93A のアポトーシス誘導



*P<0.05 vs. control

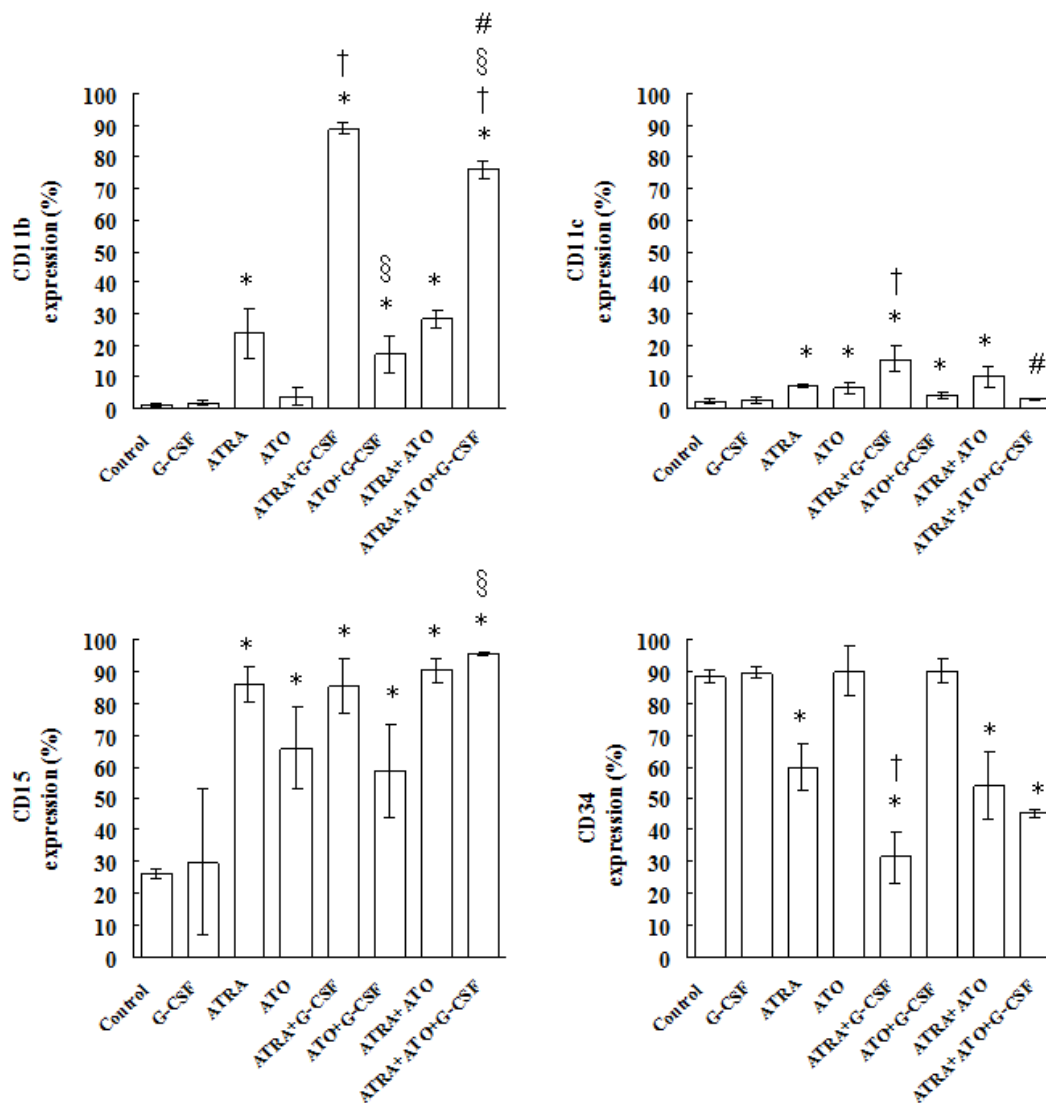
HT93A はグラフに示す濃度(μ M)の ATO で 4 日間培養され、Annexin V と PI の二重染色を行いフローサイトメーターで測定した。グラフは 3 回反復して行った結果の平均値 \pm 標準偏差で示した。有意差検定は Student' s t-test を用いた。

Figure 5 HT93A の形態変化



HT93A の細胞形態の変化を示す。HT93A を ATRA $1 \mu\text{M}$ 、ATO $0.125 \mu\text{M}$ 、G-CSF 50 ng/ml 及びそれらの併用にて 8 日間培養し、Wright-Giemsa 染色で評価した。

Figure 6 HT93A の分化マーカーの変化

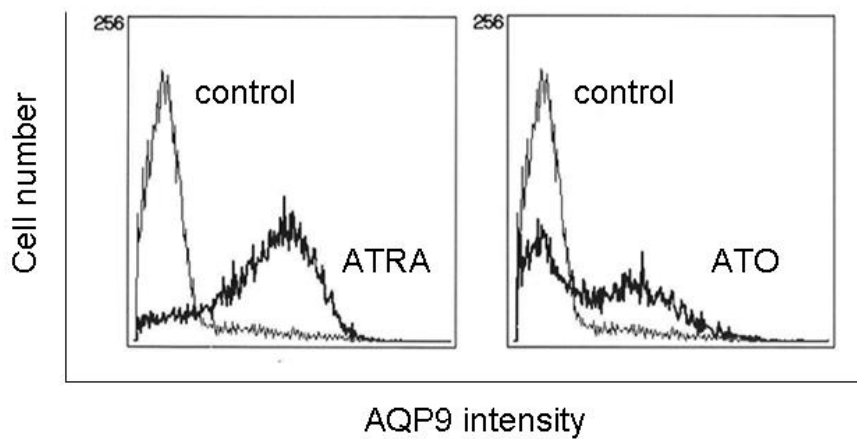


*P<0.05 vs. control; †P<0.05 vs. ATRA; §P<0.05 vs. ATO; #P<0.05 vs. ATRA+ATO

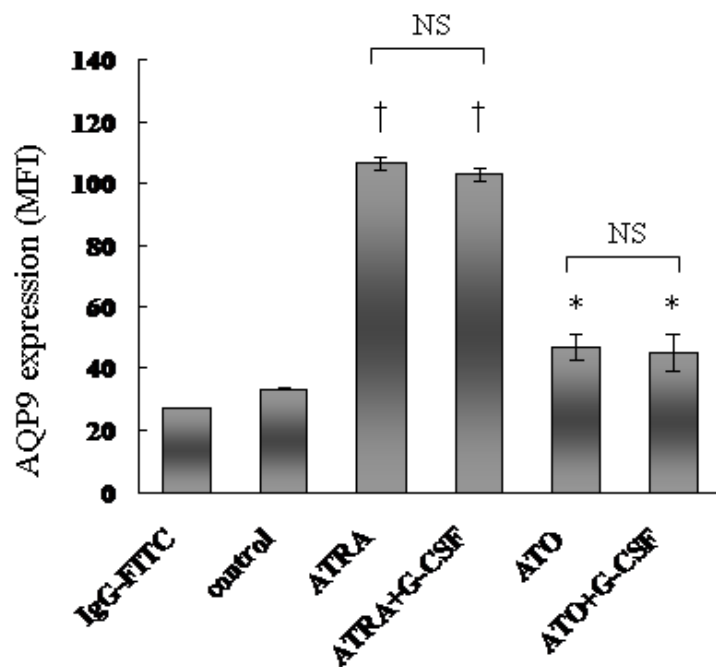
HT93A は ATRA 1 μ M、ATO 0.125 μ M、G-CSF 50 ng/ml 及びそれらの併用にて 8 日間培養し、フローサイトメーターで陽性率を評価した。グラフは 3 回反復して行った結果の平均値±標準偏差で示した。有意差検定は Student's t-test を用いた。

Figure 7 HT93A の AQP9 発現誘導

(A)



(B)

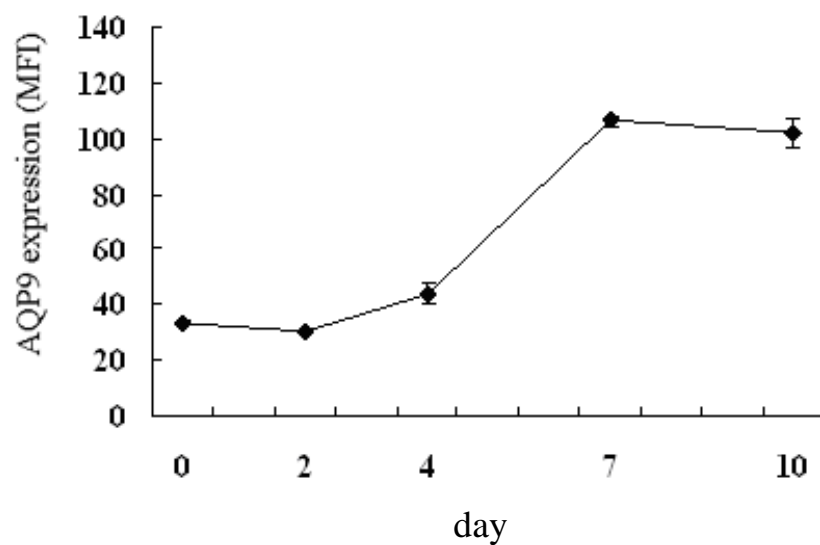


*P<0.05 vs. control; † P<0.05 vs. control

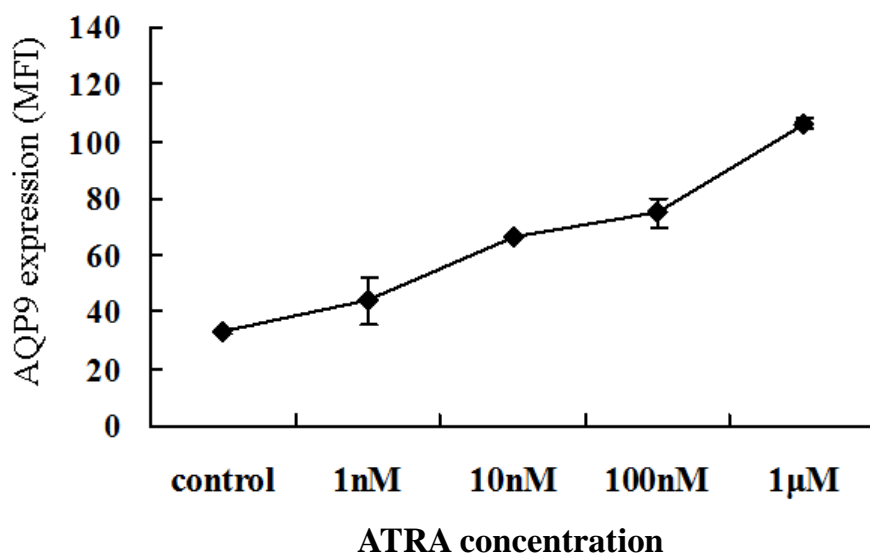
HT93A 細胞を ATRA ($1 \mu\text{M}$) および ATO ($0.125 \mu\text{M}$) で 7 日間培養し、フローサイトメーターにて AQP9 発現を評価した。ヒストグラムを示す (A)。ATRA は顕著に AQP9 発現を誘導し、また、ATO はコントロールに比し有意に AQP9 を誘導するが、ATRA よりも AQP9 発現の増加は少なかった (A & B)。ATO、ATRA 共に G-CSF の添加により AQP9 発現は増強されなかった (B)。グラフは 3 回反復して行った結果の平均値 ± 標準偏差で示した。有意差検定は Student' s t-test を用いた。

Figure 8 ATRA による HT93A の時間・濃度依存性の AQP9 発現誘導

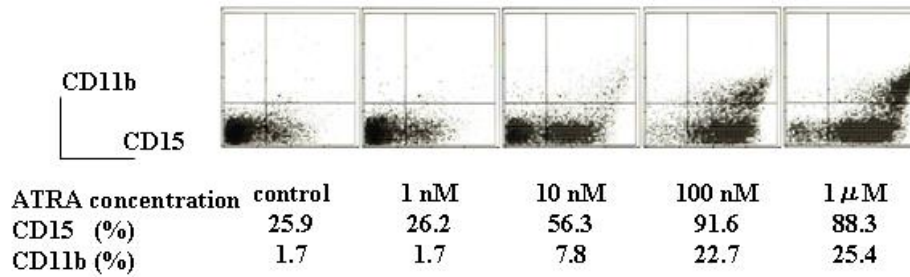
(A)



(B)

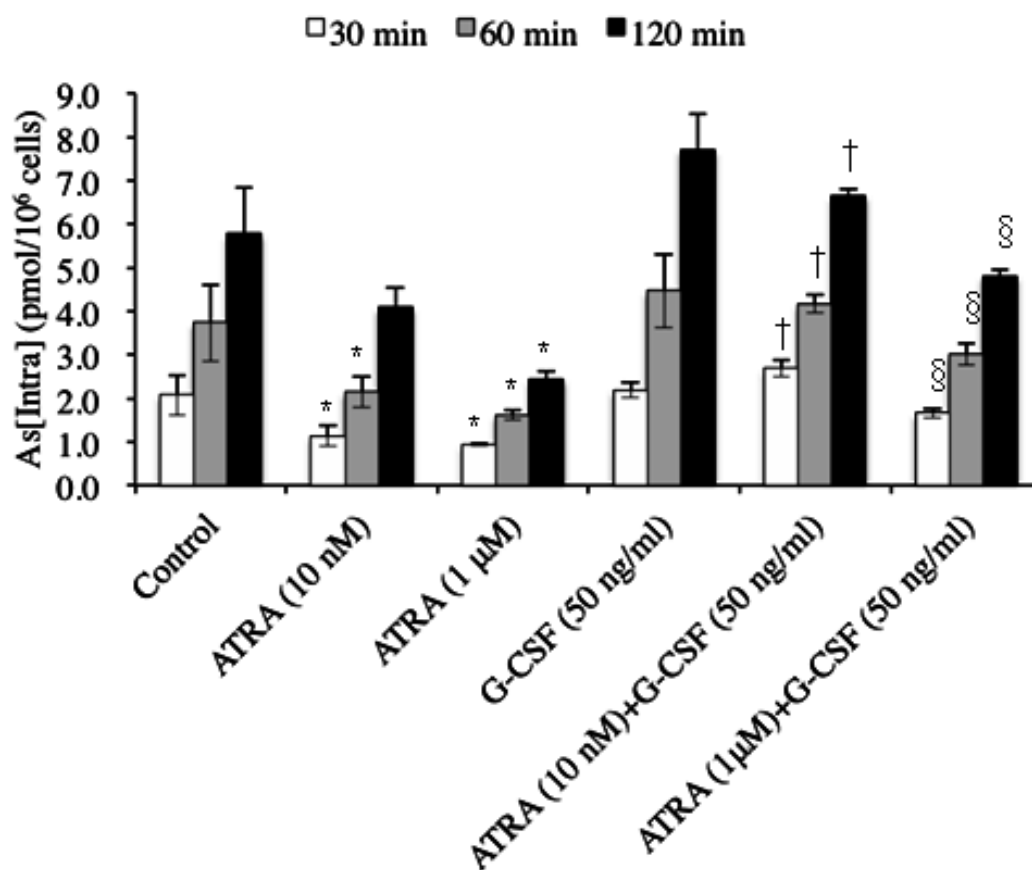


(C)



HT93A における AQP9 発現の誘導を示す。1 μ M の濃度の ATRA の処理により、時間依存的に AQP9 が誘導された (A)。また、濃度を 1 nM-1 μ M とし 7 日間培養した場合の AQP9 発現 (B) と CD11b 及び CD15 の発現 (C) を示す。濃度依存的に AQP9 発現は誘導され、CD15 と CD11b の発現に示されるように分化程度と関連していた。グラフは 3 回反復して行った結果の平均値 \pm 標準偏差で示した。有意差検定は Student' s t-test を用いた (A, B)。また、CD15 と CD11b の陽性率は 3 回行いほぼ同様の結果であり、代表的なヒストグラムを示した (C)。

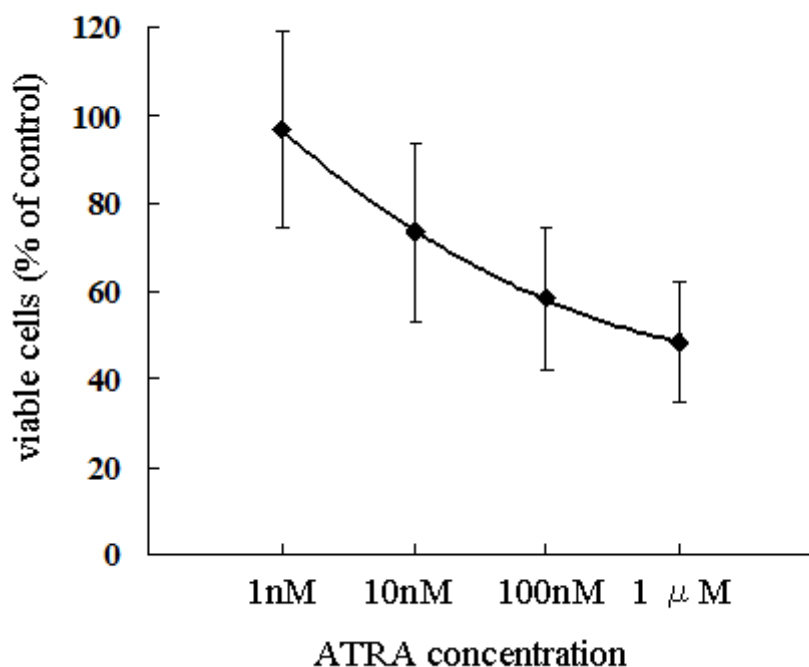
Figure 9 細胞内ヒ素濃度の解析



*P<0.05 vs. control; †P<0.05 vs. ATRA (10 nM); §P<0.05 vs. ATRA (1 μM)

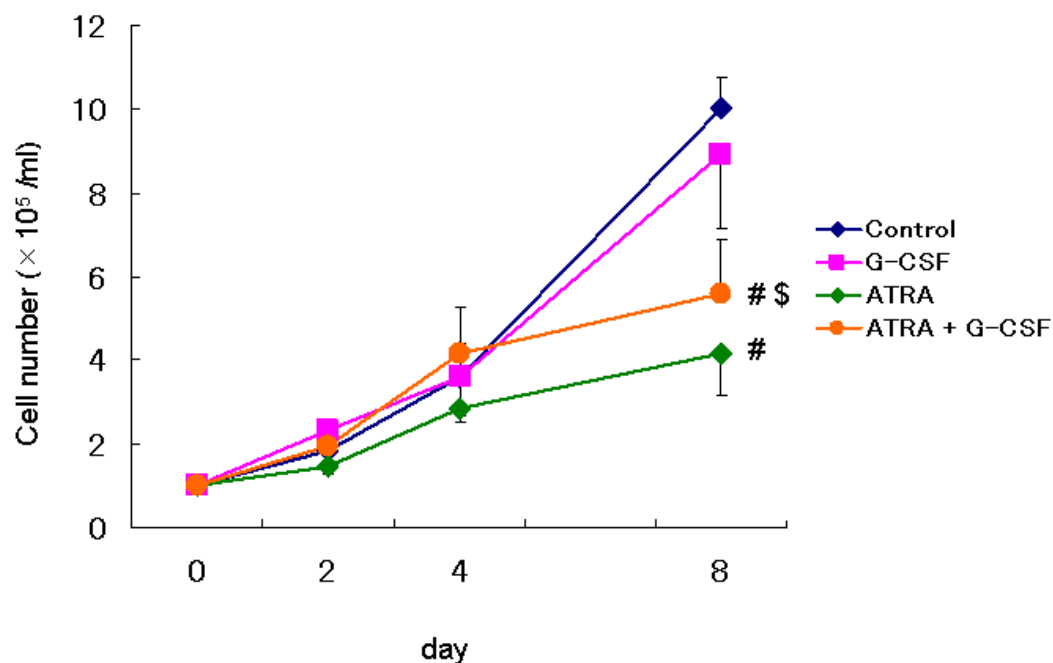
コントロールと ATRA、G-CSF 及びそれらの併用にて 7 日間培養した HT93A の培養液中に ATO 0.5 μM を添加し、30 分、60 分、120 分で細胞を回収し ICP-MS を用いて細胞内ヒ素濃度を測定した。グラフは 3 回反復して行った結果の平均値±標準偏差で示した。有意差検定は Student' s t-test を用いた。ATRA を加えて培養した HT93A はコントロールと比較し ATO の取り込みが有意に低下した。しかし、G-CSF 併用により、ATRA 単独より有意に ATO の取り込みを増加した。

Figure 10 ATRA による濃度依存性の細胞増殖抑制効果



ATRA 未治療のコントロールと、ATRA の濃度を 1 nM-1 μ M とし 8 日間培養した HT93A の生存細胞数を比較した。生存細胞数は Trypan blue exclusion method で測定した。グラフは 3 回反復して行い、コントロールと比較した割合を算出し、平均値 \pm 標準偏差で示した。結果、HT93A の生存細胞数は ATRA の濃度依存性に低下し、ATRA が HT93A の増殖を濃度依存的に抑制することが示された。

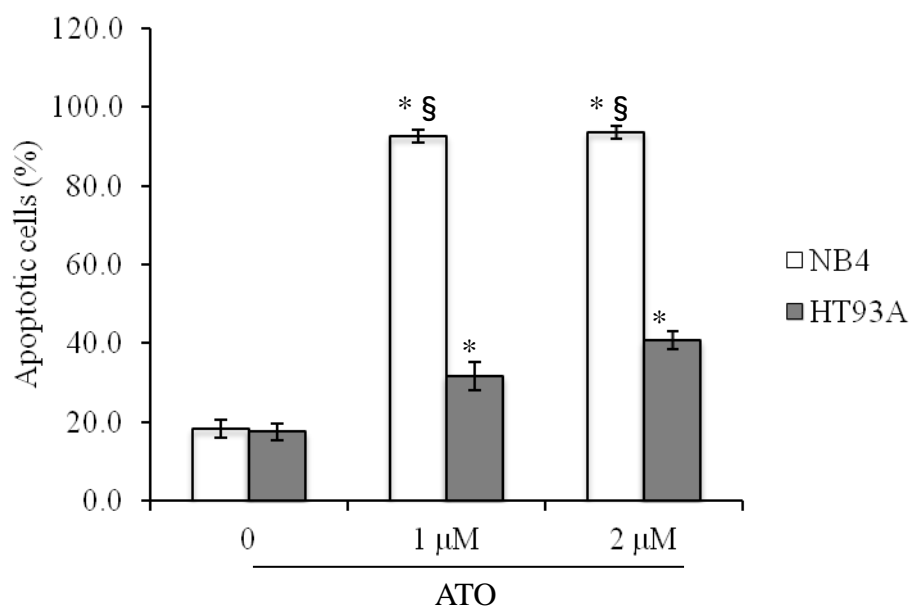
Figure 11 G-CSF の細胞増殖に対する影響



P<0.01 vs. control; \$ P<0.05 vs. ATRA

コントロール、ATRA 1 μ M、G-CSF 50ng/ml 及び ATRA に G-CSF を併用し生存細胞数を Trypan blue exclusion method で測定した。グラフは 3 回反復して行った結果の平均値 \pm 標準偏差で示した。有意差検定は Mann-Whitney U-test を用いた。ATRA による増殖抑制効果は G-CSF 併用により有意に減弱した。

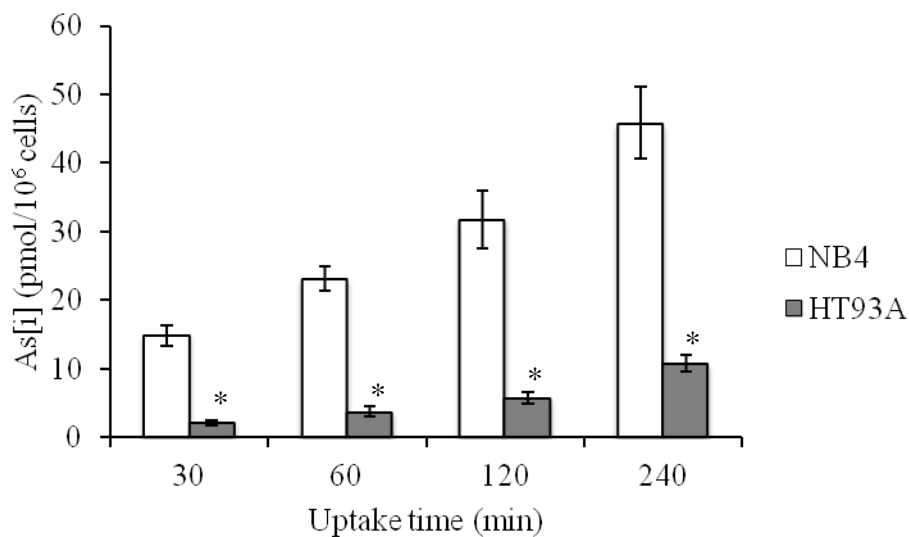
Figure 12 ATO による NB4 と HT93A のアポトーシス誘導の比較



*, $p < 0.01$ vs. control; §, $p < 0.05$ vs. HT93A

NB4 と HT93A における ATO のアポトーシス誘導能の違いが示されている。ATO 1 μ M と 2 μ M でそれぞれ 48 時間培養し、Annexin V 及び PI で二重染色し、フローサイトメーターで測定した。HT93A は NB4 より低感受性であることが示された。グラフは 3 回反復して行った結果の平均値 \pm 標準偏差で示した。有意差検定は Student' s t-test を用いた。

Figure 13 NB4 と HT93A における ATO の細胞内取り込みの比較

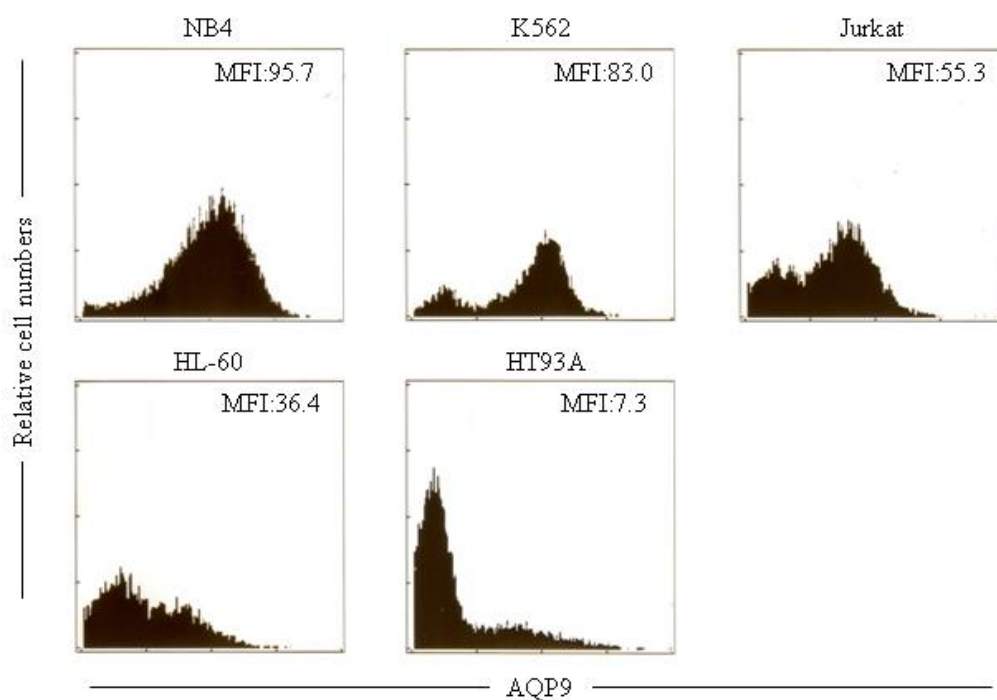


*, $p < 0.01$ NB4 vs. HT93A

NB4 と HT93A の ATO の細胞内取り込みの違いを示した。NB4 及び HT93A の培養液中に ATO $0.5 \mu\text{M}$ を添加し、30 分、60 分、120 分、240 分で細胞を回収し、ICP-MS を用いて細胞内ヒ素濃度を測定した。グラフは 3 回反復して行った結果の平均値±標準偏差で示し、有意差検定は Student' s t-test を用いた。NB4 は HT93A よりも ATO の取り込みが 4~7 倍高い結果であった。

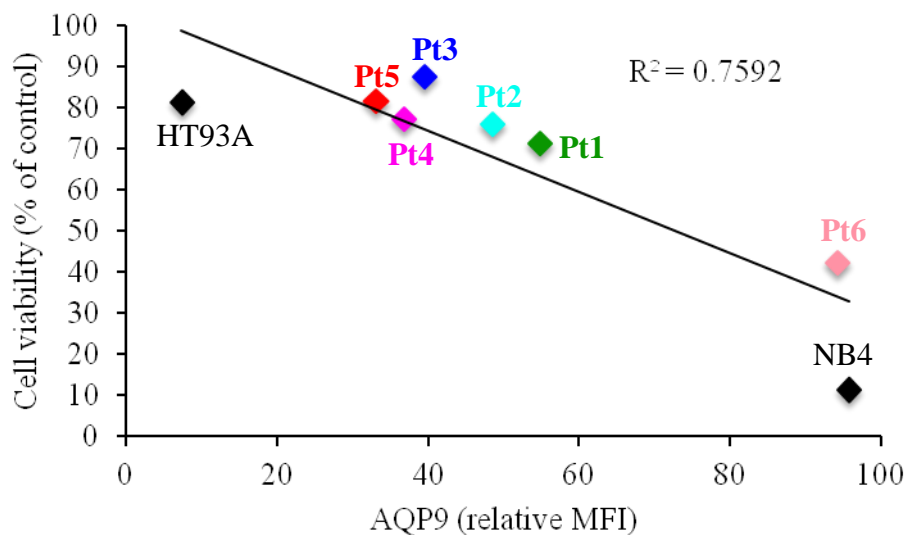
Figure 14 白血病細胞におけるフローサイトメトリー法による

AQP9 発現の比較



フローサイトメーターによる AQP9 発現のヒストグラムを示す。AQP9 発現はフローサイトメーターで評価可能であることが示され、5 種類の白血病細胞のうち、NB4 は AQP9 の発現強度が最も高く、HT93A は AQP9 の発現強度が最も低かった。2 回行い、ほぼ同様の結果を得たため、代表的なヒストグラムを示した。

Figure 15 AQP9 発現強度と AT0 感受性の関連



AQP9 発現と AT0 による生存細胞割合への関連を示す。患者サンプルと細胞株を、コントロールと $1\mu\text{M}$ の AT0 を加えたペアとして 48 時間培養し、前述と同様の方法でフローサイトメーターを用い生存細胞を測定し、コントロールと AT0 治療の細胞の生存比率を算出した。細胞の生存比率と AQP9 発現強度の関連の解析は、Pearson product-moment correlation coefficient を用いた。結果、AQP9 発現強度と細胞の生存比率は有意に負の関係にあり ($P=0.0049$)、AQP9 発現が AT0 の感受性に影響することが示された。

10. 引用文献

1. Goddard AD, Borrow J, Freemont PS and Solomon E:
Characterization of a zinc finger gene disrupted by the t(15;17) in acute promyelocytic leukemia. *Science* 254: 1371-1374, 1991.
2. Tong JH, Dong S, Geng JP, Huang W, Wang ZY, Sun GL, Chen SJ, Chen Z, Larsen CJ and Berger R: Molecular rearrangements of the MYL gene in acute promyelocytic leukemia (APL, M3) define a breakpoint cluster region as well as some molecular variants. *Oncogene* 7: 311-316, 1992.
3. de Thé H, Chomienne C, Lanotte M, Degos L and Dejean A: The t(15;17) translocation of acute promyelocytic leukaemia fuses the retinoic acid receptor alpha gene to a novel transcribed locus. *Nature* 347: 558-561, 1990.
4. Lin RJ, Nagy L, Inoue S, Shao W, Miller WH Jr and Evans RM: Role of the histone deacetylase complex in acute promyelocytic leukaemia. *Nature* 391: 811-814, 1998.
5. Melnick A and Licht JD: Deconstructing a disease: RAR α , its

fusion partners, and their roles in the pathogenesis of acute promyelocytic leukemia. *Blood* 93: 3167-3215, 1999.

6. Burnett AK, Grimwade D, Solomon E, Wheatley K and Goldstone AH: Presenting white blood cell count and kinetics of molecular remission predict prognosis in acute promyelocytic leukemia treated with all-*trans* retinoic acid: result of the Randomized MRC Trial. *Blood* 93: 4131-4143, 1999.

7. Shen ZX, Chen GQ, Ni JH, Li XS, Xiong SM, Qiu QY, Zhu J, Tang W, Sun GL, Yang KQ, *et al*: Use of arsenic trioxide (As₂O₃) in the treatment of acute promyelocytic leukemia (APL): II. Clinical efficacy and pharmacokinetics in relapsed patients. *Blood* 89: 3354-3360, 1997.

8. Soignet SL, Maslak P, Wang ZG, Jhanwar S, Calleja E, Dardashti LJ, Corso D, DeBlasio A, Gabrilove J, Scheinberg DA, *et al*: Complete remission after treatment of acute promyelocytic leukemia with arsenic trioxide. *N Engl J Med* 339: 1341-1348, 1998.

9. Lanotte M, Martin-Thouvenin V, Najman S, Balerini P, Valensi

F and Berger R: NB4, a maturation inducible cell line with t(15;17) marker isolated from a human acute promyelocytic leukemia (M3). *Blood* 77: 1080-1086, 1991.

10. Matsui W, Smith BD, Vala M, Beal N, Huff CA, Diehl LF and Jones RJ: Requirement for myeloid growth factors in the differentiation of acute promyelocytic leukaemia. *Br J Haematol* 128: 853-862, 2005.

11. Caprodossi S, Pedinotti M, Amantini C, Santoni G, Minucci S, Pelicci PG and Fanelli M: Differentiation response of acute promyelocytic leukemia cells and PML/RAR α leukemogenic activity studies by real-time RT-PCR. *Mol Biotechnol* 30: 231-238, 2005.

12. Cunha De Santis G, Tamarozzi MB, Sousa RB, Moreno SE, Secco D, Garcia AB, Lima AS, Faccioli LH, Falcão RP, Cunha FQ and Rego EM: Adhesion molecules and Differentiation Syndrome: phenotypic and functional analysis of the effect of ATRA, As₂O₃, phenylbutyrate, and G-CSF in acute promyelocytic leukemia. *Haematologica* 92: 1615-1622, 2007.

13. Leung J, Pang A, Yuen WH, Kwong YL and Tse EW:
Relationship of expression of aquaglyceroporin 9 with arsenic uptake and sensitivity in leukemia cells. *Blood* 109: 740-746, 2007.
14. Chen GQ, Shi XG, Tang W, Xiong SM, Zhu J, Cai X, Han ZG, Ni JH, Shi GY, Jia PM, *et al*: Use of arsenic trioxide (As₂O₃) in the treatment of acute promyelocytic leukemia (APL): I. As₂O₃ exerts dose-dependent dual effects on APL cells. *Blood* 89: 3345-3353, 1997.
15. Chen GQ, Zhu J, Shi XG, Ni JH, Zhong HJ, Si GY, Jin XL, Tang W, Li XS, Xiong SM, *et al*: In vitro studies on cellular and molecular mechanisms of arsenic trioxide (As₂O₃) in the treatment of acute promyelocytic leukemia: As₂O₃ induces NB4 cell apoptosis with downregulation of Bcl-2 expression and modulation of PML-RAR α /PML proteins. *Blood* 88: 1052-1061, 1996.
16. Grignani F, De Matteis S, Nervi C, Tomassoni L, Gelmetti V, Cioce M, Fanelli M, Ruthardt M, Ferrara FF, Zamir I, *et al*:

Fusion proteins of the retinoic acid receptor-alpha recruit histone deacetylase in promyelocytic leukaemia. *Nature* 391: 815-818, 1998.

17. He LZ, Guidez F, Tribioli C, Peruzzi D, Ruthardt M, Zelent A and Pandolfi PP: Distinct interactions of PML-RARalpha and PLZF-RARalpha with co-repressors determine differential responses to RA in APL. *Nat Genet* 8: 126-135, 1998.

18. Hong SH, David G, Wong CW, Dejean A and Privalsky ML: SMRT corepressor interacts with PLZF and with the PML-retinoic acid receptor alpha (RARalpha) and PLZF-RARalpha oncoproteins associated with acute promyelocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 9028-9033, 1997.

19. Zhang XW, Yan XJ, Zhou ZR, Yang FF, Wu ZY, Sun HB, Liang WX, Song AX, Lallemand-Breitenbach V, Jeanne M, *et al*: Arsenic trioxide controls the fate of the PML-RARalpha oncoprotein by directly binding PML. *Science* 328: 240-243, 2010.

20. Lallemand-Breitenbach V, Jeanne M, Benhenda S, Nasr R,

Lei M, Peres L, Zhou J, Zhu J, Raught B and de Thé H: Arsenic degrades PML or PML-RARalpha through a SUMO-triggered RNF4/ubiquitin-mediated pathway. *Nat Cell Biol* 10: 547-555, 2008.

21. Ishibashi K, Kuwahara M, Gu Y, Tanaka Y, Marumo F and Sasaki S: Cloning and functional expression of a new aquaporin (AQP9) abundantly expressed in the peripheral leukocytes permeable to water and urea, but not to glycerol. *Biochem Biophys Res Commun* 244: 268-274, 1998.

22. Liu Z, Carbrey JM, Agre P and Rosen BP: Arsenic trioxide uptake by human and rat aquaglyceroporins. *Biochem Biophys Res Commun* 316: 1178-1185, 2004.

23. Lee TC, Ho IC, Lu WJ and Huang JD: Enhanced expression of multidrug resistance-associated protein 2 and reduced expression of aquaglyceroporin 3 in an arsenic-resistant human cell line. *J Biol Chem* 281: 18401-18407, 2006.

24. Yoshino Y, Yuan B, Kaise T, Takeichi M, Tanaka S, Hirano T, Kroetz DL and Toyoda H: Contribution of aquaporin 9 and

multidrug resistance-associated protein 2 to differential sensitivity to arsenite between primary cultured chorion and amnion cells prepared from human fetal membranes. *Toxicol Appl Pharmacol* 257: 198-208, 2011.

25. Shinkai Y, Sumi D, Toyama T, Kaji T and Kumagai Y: Role of aquaporin 9 in cellular accumulation of arsenic and its cytotoxicity in primary mouse hepatocytes. *Toxicol Appl Pharmacol* 237: 232-236, 2009.

26. Bhattacharjee H, Carbrey J, Rosen BP and Mukhopadhyay R: Drug uptake and pharmacological modulation of drug sensitivity in leukemia by AQP9. *Biochem Biophys Res Commun* 322: 836-841, 2004.

27. Ravandi F, Estey E, Jones D, Faderl S, O'Brien S, Fiorentino J, Pierce S, Blamble D, Estrov Z, *et al*: Effective treatment of acute promyelocytic leukemia with all-trans-retinoic acid, arsenic trioxide, and gemtuzumab ozogamicin. *J Clin Oncol* 27: 504-510, 2009.

28. Hu J, Liu YF, Wu CF, Xu F, Shen ZX, Zhu YM, Li JM, Tang W,

Zhao WL, Wu W, *et al*: Long-term efficacy and safety of all-*trans* retinoic acid/arsenic trioxide-based therapy in newly diagnosed acute promyelocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 3342-3347, 2009.

29. Pébusque MJ, Lafage M, Lopez M and Mannoni P: Preferential response of acute myeloid leukemias with translocation involving chromosome 17 to human recombinant granulocyte colony-stimulating factor. *Blood* 72: 257-265, 1998.

30. Souza LM, Boone TC, Gabrilove J, Lai PH, Zsebo KM, Murdock DC, Chazin VR, Bruszewski J, Lu H, Chen KK, *et al*: Recombinant human granulocyte colony-stimulating factor: effects on normal and leukemic myeloid cells. *Science* 232: 61-65, 1986.

31. Kizaki M, Matsushita H, Takayama N, Muto A, Ueno H, Awaya N, Kawai Y, Asou H, Kamada N and Ikeda Y: Establishment and characterization of a novel acute promyelocytic leukemia cell line (UF-1) with retinoic acid-resistant features. *Blood* 88: 1824-1833, 1996.

32. Sun Y, Kim SH, Zhou DC, Ding W, Paietta E, Guidez F, Zelent A, Ramesh KH, Cannizzaro L, Warrell RP, *et al*: Acute promyelocytic leukemia cell line AP-1060 established as a cytokine-dependent culture from a patient clinically resistant to all-trans retinoic acid and arsenic trioxide. *Leukemia* 18: 1258-1269, 2004.
33. Kishi K, Toba K, Azegami T, Tsukada N, Uesugi Y, Masuko M, Niwano H, Hashimoto S, Sakaue M, Furukawa T, *et al*: Hematopoietic cytokine-dependent differentiation to eosinophils and neutrophils in a newly established acute promyelocytic leukemia cell line with t(15;17). *Exp Hematol* 26: 135-142, 1998.
34. Charoensuk V, Gati WP, Weinfeld M and Le XC: Differential cytotoxic effects of arsenic compounds in human acute promyelocytic leukemia cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 239: 64-70, 2009.
35. Yoshino Y, Yuan B, Miyashita SI, Iriyama N, Horikoshi A, Shikino O, Toyoda H and Kaise T: Speciation of arsenic trioxide metabolites in blood cells and plasma of a patient with acute

promyelocytic leukemia. *Anal Bioanal Chem* 393: 689-697, 2009.

36. Iriyama N, Yoshino Y, Yuan B, Horikoshi A, Hirabayashi Y, Hatta Y, Toyoda H and Takeuchi J: Speciation of arsenic trioxide metabolites in peripheral blood and bone marrow from an acute promyelocytic leukemia patient. *J Hematol Oncol* 5: 1-11, 2012.

37. Iijima Y, Ito T, Oikawa T, Eguchi M, Eguchi-Ishimae M, Kamada N, Kishi K, Asano S, Sakaki Y and Sato Y: A new ETV6/TEL partner gene, ARG (ABL-related gene or ABL2), identified in an AML-M3 cell line with a t(1;12)(q25;p13) translocation. *Blood* 95: 2126-2131, 2000.

38. Bhattacharjee H, Carbrey J, Rosen BP and Mukhopadhyay R: Drug uptake and pharmacological modulation of drug sensitivity in leukemia by AQP9. *Biochem Biophys Res Commun* 322: 836-841, 2004.

39. Jing Y, Wang L, Xia L, Chen GQ, Chen Z, Miller WH and Waxman S: Combined effect of all-*trans* retinoic acid and arsenic trioxide in acute promyelocytic leukemia cells in vitro and in vivo. *Blood* 97: 264-269, 2001.

40. Ghavamzadeh A, Alimoghaddam K, Rostami S, Ghaffari SH, Jahani M, Iravani M, Mousavi SA, Bahar B and Jalili M: Phase II study of single-agent arsenic trioxide for the front-line therapy of acute promyelocytic leukemia. *J Clin Oncol* 29: 2753-2757, 2011.
41. Mathews V, George B, Chendamarai E, Lakshmi KM, Desire S, Balasubramanian P, Viswabandya A, Thirugnanam R, Abraham A, Shaji RV, *et al*: Single-agent arsenic trioxide in the treatment of newly diagnosed acute promyelocytic leukemia: long-term follow-up data. *J Clin Oncol* 28: 3866-3871, 2010.
42. Wang X, Gao P, Long M, Lin F, Wei JX, Ren JH, Yan L, He T, Han Y and Zhang HZ: Essential role of cell cycle regulatory genes p21 and p27 expression in inhibition of breast cancer cells by arsenic trioxide. *Med Oncol* 28: 1225-1254, 2011.
43. Higuchi T, Kizaki M and Omine M: Induction of differentiation of retinoic acid-resistant acute promyelocytic leukemia cells by the combination of all-*trans* retinoic acid and granulocyte colony-stimulating factor. *Leuk Res* 28: 525-532, 2004.

44. Jansen JH, de Ridder MC, Geertsma WM, Erpelinck CA, van Lom K, Smit EM, Slater R, vd Reijden BA, de Greef GE, Sonneveld P and Löwenberg B: Complete remission of t(11;17) positive acute promyelocytic leukemia induced by all-*trans* retinoic acid and granulocyte colony-stimulating factor. *Blood* 94: 39-45, 1999.
45. Tsurumi H, Tojo A, Takahashi T, Moriwaki H, Asano S and Muto Y: The combined effects of all-*trans* retinoic acid and granulocyte colony-stimulating factor as a differentiation induction therapy for acute promyelocytic leukemia. *Intern Med* 32: 648-650, 1993.
46. Gianni M, Terao M, Zanotta S, Barbui T, Rambaldi A and Garattini E: Retinoic acid and granulocyte colony-stimulating factor synergistically induce leukocyte alkaline phosphatase in acute promyelocytic leukemia cells. *Blood* 83: 1909-1921, 1994.
47. Licht JD: Acute promyelocytic leukemia--weapons of mass differentiation. *N Engl J Med* 360: 928-930, 2009.

11. 研究業績

I 発表	①一般発表	12	
	②特別発表	1	
II 論文	①原著論文	10	(共 10)
	②症例報告	7	(共 7)
	③総説	なし	
III 著書		なし	

I 発表

① 一般発表

1. 入山規良, 松川吉博, 山本仁, 西成田進, 堀江孝至, 澤田滋正: シェーグレン症候群と鑑別が困難であったリンパ球性下垂体炎, 第40回関東リウマチ学会, 東京, 1999年6月
2. 入山規良, 蔵良政, 八田善弘, 上野川久美, 齋木実, 石塚光, 山崎哲男, 伊藤武善, 澤田海彦, 竹内仁, 堀江孝至: 本態性血小板血症に合併した骨髓異形成症候群, 第42回臨床血液学会総会, 岡山, 2000年11月
3. 柴田光太郎, 宮澤拓也, 入山規良, 井口森智, 隈部威道, 増田尚己, 西成田進, 岡田清己: 洞不全症候群をきたしたIgG型多発性骨髓腫の一例, 第457回日大医学会例会, 東京, 2004年9月
4. 宮下振一, 堀越昶, 入山規良, 下谷真仁, 木下健司, 貝瀬利一: 急性前骨髓球性白血病治療に用いた亜ヒ酸製剤の体内動態, 第51回日本薬学会関東支部大会, 東京, 2007年10月
5. 小林優人, 小林寿美子, 入山規良, 八田善弘, 上野川久美, 石塚光, 竹井和大, 竹内仁: 亜ヒ酸使用後にautoPBSCTを行った再発APLの3例, 第48回臨床血液学会, 神奈川, 2006年10月
6. 入山規良, 堀越昶, 林国樹, 大島暢, 小林寿美子, 小林優人, 八田善弘, 竹内仁, 澤田滋正: 巨大脾腫を呈し特発性門脈圧亢進症と鑑別が困難であった悪性リンパ腫, 第478回日大医学会例会, 東京, 2007年9月
7. 入山規良, 堀越昶, 林国樹, 平塚宗久, 小林寿美子, 小林優人, 八田善弘, 竹内仁, 澤田滋正: microscopic polyangitis の治療中に合併した肺ノカルジア症, 第7回血液感染症フォーラム, 東京, 2007年10月

8. 入山規良, 堀越昶, 宮下振一, 貝瀬利一, 八田善弘, 竹内仁: 急性前骨髄性白血病患者における亜ヒ酸の血中濃度の分析, 第70回日本血液学会総会, 京都, 2008年10月
9. 入山規良, 堀越昶, 平林幸生, 八田善弘, 竹内仁: ステロイド投与患者における itraconazole oral solution の予防的投与の有用性の検討, 第9回血液感染症フォーラム, 東京, 2009年10月
10. 入山規良, 堀越昶, 八田善弘, 小林寿美子, 平林幸生, 竹内仁: Profiling of arsenic metabolism and bone marrow concentration in an APL patient, 第72回日本血液学会総会, 神奈川, 2010年9月
11. 入山規良, 吉野雄大, 八田善弘, 袁博, 吉野雄大, 豊田裕夫, 竹内仁: ATRA and G-CSF potentiate the effects of ATO on HT93 through differentiation and AQP9 upregulation, 第73回日本血液学会総会, 名古屋, 2011年10月
12. 入山規良, 袁博, 八田善弘, 吉野雄大, 堀越昶, 豊田裕夫, 竹内仁: Aquaporin-9, a proposed new biomarker for APL in arsenic era, 第74回日本血液学会総会, 京都, 2012年10月

② 特別発表

1. 入山規良, 吉野雄大, 八田善弘, 袁博, 吉野雄大, 豊田裕夫, 堀越昶, 竹内仁: 急性髓性白血病患者における亜ヒ酸代謝の検討, 第23回日本微量元素学会学術集会, 東京, 2012年7月

II 論文

① 原著論文

1. Hatta Y, Takeuchi J, Saitoh T, Itoh T, Ishizuka H, Iriyama N, Miyajima T, Kaneita Y, Saiki M, Yasukawa K, Yasukawa R, Kura Y, Nishinarita S, Sawada U, Horie T: WT1 expression level and clinical factors in multiple myeloma, *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 24:595-599, 2005.
2. Miura K, Hatta Y, Kobayashi S, Iriyama N, Takei K, Takeuchi J: Feasibility and eligibility of retreatment with rabbit anti-T lymphocyte globulin for aplastic anemia previously treated with horse anti-thymocyte globulin, *International Journal of Hematology*, 90:426-428, 2009.
3. Yoshino Y, Yuan B, Miyashita SI, Iriyama N, Horikoshi A, Shikino O, Toyoda H, Kaise T: Speciation of arsenic trioxide metabolites in blood cells and plasma of a patient with acute promyelocytic leukemia, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 393:689-697, 2009.
4. Kobayashi Y, Miura K, Hojo A, Hatta Y, Tanaka T, Kurita D, Iriyama N, Kobayashi S, Takeuchi J: Charlson Comorbidity Index is an independent prognostic factor among elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma, *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 137:1079-1084, 2011.
5. Iriyama N, Matsukawa Y, Miura K, Inomata H, Hirabayashi Y, Hatta Y, Horikoshi A, Takeuchi J: Efficacy and safety of antifungal prophylaxis with oral itraconazole solution among patients receiving corticosteroids: who should be given prophylaxis? *Journal of Infection and Chemotherapy*, 17:744-749, 2011.

6. Miura K, Takei K, Kobayashi S, Kiso S, Hirabayashi Y, Hojo A, Kodaira H, Yagi M, Kurita D, Kobayashi Y, Tanaka T, Iriyama N, Hatta Y, Kura Y, Yamazaki T, Sawada U, Takeuchi J: An effective salvage treatment using ifosfamide, etoposide, cytarabine, dexamethasone, and rituximab (R-IVAD) for patients with relapsed or refractory aggressive B-cell lymphoma, *International Journal of Hematology*, 94:90-96, 2011.
7. Iriyama N, Yoshino Y, Yuan B, Horikoshi A, Hirabayashi Y, Hatta Y, Toyoda H, Takeuchi J: Speciation of arsenic trioxide metabolites in peripheral blood and bone marrow from an acute promyelocytic leukemia patient, *Journal of Hematology and Oncology*, 5:1, 2012.
8. Uchino Y*, Iriyama N*, Matsumoto K, Hirabayashi Y, Miura K, Kurita D, Kobayashi Y, Yagi M, Kodaira H, Hojo A, Kobayashi S, Hatta Y, Takeuchi J: A Case Series of Bacillus Cereus Septicemia in Patients with Hematological Disease, *Internal Medicine*, 51:2733-2738, 2012. *: Contributed equally
9. Iriyama N, Yuan B, Hatta Y, Horikoshi A, Yoshino Y, Toyoda H, Aizawa S, Takeuchi J: Granulocyte colony-stimulating factor potentiates differentiation induction by all-trans retinoic acid and arsenic trioxide and enhances arsenic uptake in the acute promyelocytic leukemia cell line HT93A, *Oncology Reports*, 28:1875-1882, 2012.
10. Kobayashi Y, Hatta Y, Hojo A, Kura Y, Uchino Y, Takahashi H, Kiso S, Hirabayashi Y, Yagi M, Kodaira H, Kurita D, Tanaka T, Miura K, Iriyama N, Kobayashi S, Sawada U, Sugitani M, Takeuchi J: Long-term follow-up of localized, primary gastric diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab and CHOP, *Experimental and Therapeutic Medicine*, 3:304-308, 2012.

② 症例報告

1. 入山 規良, 平塚 宗久, 堀越 昶, 澤田 滋正, 林 國樹, 竹内 仁: Microscopic polyangiitis の治療中に合併した肺ノカルジア症, The Japanese Journal of Antibiotics, 61:89-91, 2008.
2. Kobayashi Y, Kobayashi S, Ishizuka H, Kurita D, Tanaka T, Miura K, Iriyama N, Uenogawa K, Hatta Y, Takeuchi J: Arsenic trioxide is effective in relapsed acute promyelocytic leukemia followed by cryopreserved autologous stem cell transplantation, Low Temperature Medicine, 34:105-107, 2008.
3. Horikoshi A, Takei K, Iriyama N, Uenogawa K, Ishizuka H, Shiraiwa H, Hosokawa Y, Sawada S, Kitoh T: Effect of L-asparaginase combined with vincristine and prednisolone on acute myeloblastic leukemia (M0) associated with non-Hodgkin lymphoma, Acta Haematologica, 122:54-57, 2009.
4. Iriyama N, Horikoshi A, Hatta Y, Kobayashi Y, Sawada S, Takeuchi J: Localized, Splenic Diffuse Large B-Cell Lymphoma Presenting with Hypersplenism: Risk and Benefit of Splenectomy, Internal Medicine, 49:1027-1030, 2010.
5. 砂川 恵伸, 逸見 明博, 西川 英里, 入山 規良, 山田 勉, 根本 則道: ステロイド治療中に空洞形成を特徴とした侵襲性肺アスペルギルス症の一例, 臨床病理, 58:786-791, 2010.
6. Yamamoto T, Morita K, Iriyama N, Wakui K, Hiroi A, Sawada T, Masuda A, Kobayashi M: Intravascular Large B-Cell Lymphoma of the Uterus: A Case Showing Favorable Clinical Outcome, International Journal of Surgical Pathology, 19:672-676, 2011.
7. Iriyama N, Horikoshi A, Tanaka T, Hirabayashi Y, Kodaira H, Hatta Y, Takeuchi J: Successful treatment of Hodgkin lymphoma in second trimester

of pregnancy: feasibility of ABVD regimen, International Journal of Hematology, 94:104-107, 2011.