

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23501307

研究課題名(和文) 白血病細胞の機能薬理に基づく抗腫瘍薬耐性の克服とテーラーメイド化学療法の確立

研究課題名(英文) Overcoming resistance and pharmacologically-directed tailor-made chemotherapy for leukemia

研究代表者

山内 高弘 (Yamauchi, Takahiro)

福井大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：90291377

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：急性白血病のテーラーメイド化学療法確立のために、従来の白血病治療のkey drugシタラピンとは代謝経路が異なる新ヌクレオシドアナログ、クロファラビンの作用機序、耐性機序を解明しシタラピンとの差異を検討した。クロファラビン耐性には、3つのトランスポーターと2つのキナーゼの低下による3リン酸体の低下ならびに抗アポトーシスが関与した。一方、シタラビン耐性には1つのトランスポーターと1つのキナーゼの低下のみが関与し、クロファラビンによる耐性克服が可能であった。3リン酸体、抗アポトーシスというクロファラビンの感受性規定因子を用いた薬理的見地による化学療法の個別化の可能性が強く示唆された。

研究成果の概要(英文)：To establish pharmacologically-directed tailor-made chemotherapy for leukemia, the mechanisms of action and resistance of clofarabine were investigated using two newly developed clofarabine-resistant leukemic cell lines.

The resistant cell lines exhibited reduced clofarabine triphosphate production due to decreased mRNA levels of 3 cell membrane transporters and low protein levels of 2 kinases. The cell lines also showed increased Bcl-2 protein levels, suggestive of antiapoptosis. A cytarabine-resistant leukemic cell line that had been previously developed showed reduction in only one transporter and one kinase, and 1/10 reduced cytarabine triphosphate. This cell line still possessed the sensitivity to clofarabine, which was attributable to the capacity to produce clofarabine triphosphate.

Thus, pharmacologically-directed tailor-made chemotherapy will be established using surrogate markers (intracellular triphosphate production and Bcl-2 expression) to overcome resistance of leukemia.

研究分野：総合生物

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍治療学

キーワード：白血病 化学療法 機能薬理 耐性克服 テーラーメイド ヌクレオシドアナログ

### 1. 研究開始当初の背景

急性骨髄性白血病(AML)の治療はヌクレオシドアナログ シタラビンとアンソラサイクリンの併用を核に様々な検討され発展した(Shibley JL, Exp Hematol 2009)。しかしその治療成績は 60 歳以下の若年成人ですら初回寛解率 70 - 80%、5 年生存率 40%で、驚くべきことにここ 20 年ほとんど変わらない。その理由は多くの症例が寛解後再発し治療抵抗性となるためである。治療成績の画期的進展の為に既存の抗腫瘍薬の耐性を克服しうる新規薬剤の導入とその至適投与の確立が不可欠である。

我々は一貫して最重要の抗白血病薬 シタラビンの白血病細胞における薬理学的耐性機序・薬物動態を検討してきた。白血病細胞内シタラビン活性体(シタラビン 3 リン酸)濃度、白血病細胞核 DNA 内転入シタラビン濃度の微量定量法(Cancer Res 1996; Biochem Pharmacol 2005)を確立し、腫瘍細胞内・核 DNA 内薬物動態と治療効果の関連を明らかにした(Cancer Sci 546 2001; Cancer Sci 975 2001)。更にシタラビン感受性を規定する白血病細胞の代謝酵素群を tumorous surrogate marker として同定し成果を臨床へ応用した(Biochem Pharmacol 2009)。また白血病細胞の細胞機能としての DNA 修復機能を利用して、シタラビンの DNA 合成期特異的效果を非増殖分画に拡大する併用療法を提案した(Clin Cancer Res, 2001; Mol Cancer Ther 2002; Cancer Sci 567 2002; Cancer Sci 1334 2002)。このように、腫瘍細胞の細胞機能特性に基づき、シタラビンの感受性を治療前に予測し、治療中の腫瘍細胞内の薬物濃度モニタリング(細胞内、核 DNA 内 TDM)により投与量方法を至適化し、さらに薬理的に相乗作用を有する併用薬を用いることで白血病治療のテーラーメイド化を推進してきた。

クロファラビンは AML 治療に期待される新ヌクレオシドアナログで、シタラビン類似化合物でありながら細胞内活性化経路が若干異なることから、シタラビン耐性白血病において抗腫瘍活性を保持し耐性を克服しうる事が期待される。

### 2. 研究の目的

AML のテーラーメイド化学療法確立のために白血病細胞の細胞機能に基づいた薬物代謝特性(機能薬理)により耐性克服を試みた。本研究ではそのモデルとして、従来の AML 治療の key drug, シタラビンとは代謝経路が異なる新ヌクレオシドアナログ、クロファラビンの作用機序、耐性機序を解明した。そしてシタラビン耐性白血病においてクロファラビンによる耐性克服を in vitro で検討した。以上からクロファラビンの感受性を規定する薬理学的代替因子(tumorous surrogate marker)を同定し本薬による化学療法の個別化を目指した。

シタラビンとクロファラビンはいずれも

白血病細胞表面のトランスポーターにより細胞内に転入されたのち細胞内でリン酸化されそれぞれシタラビン 3 リン酸、クロファラビン 3 リン酸へと活性化される。これら 3 リン酸体の一部はヌクレオチダーゼにより分解されるが一部は核 DNA 内に転入され DNA 鎖伸長を阻害し細胞増殖を阻止する。リン酸化体は抗腫瘍効果の要であるが、2 薬の大きな違いはシタラビンが細胞膜トランスポーター ENT1 で転入され細胞質内デオキシシチジンキナーゼによりリン酸化されるのに対して、クロファラビンは細胞膜トランスポーター ENT と CNT3 で転入され細胞質内デオキシシチジンキナーゼとミトコンドリア内デオキシグアノシンキナーゼ双方によりリン酸化され、核 DNA 内だけでなくミトコンドリア DNA 内にも転入される点である(図 1)。

本研究で以下に焦点を絞り検討した。即ち、(1)当研究室で所有するシタラビン耐性培養白血病細胞系においてクロファラビンが克服しうる耐性機序を細胞機能としての薬物代謝特性の面から解析した。(2)培養白血病細胞を用いてクロファラビン耐性細胞系を樹立し耐性機序から本薬の感受性を規定する薬理学的代替因子(tumorous surrogate marker)を同定した。

### 3. 研究の方法

(1)クロファラビン耐性培養白血病細胞株の樹立と耐性機序の解明

培養白血病細胞 HL-60 を低濃度のクロファラビンと共培養し薬剤存在下にも増殖しうる耐性細胞を樹立した。耐性細胞系について耐性機序特異的な細胞機能を評価した。

細胞内クロファラビン 3 リン酸の測定

ヌクレオシドアナログの殺細胞効果の要は薬剤の細胞内 3 リン酸化体である(図 1)。親株 HL-60、クロファラビン耐性細胞系において細胞内クロファラビン 3 リン酸生成を高速度液体クロマトグラフィ法により測定した。

クロファラビン代謝因子の同定

クロファラビン 3 リン酸生成には細胞機能として細胞膜表面のトランスポーター、リン酸化酵素、不活化酵素、が関連する(図 1)。Real time RT-PCR 法、Western blot 法などにより発現レベルを定量した。

DNA 内薬剤転入と修復・アポトーシス経路

本薬は最終的に核 DNA 内に転入され DNA 合成を阻害する。放射性同位元素標識クロファラビンを用いて核 DNA 内転入薬剤量を定量した。細胞死に直接関連するアポトーシス関連タンパクレベルについても評価した。

(2)クロファラビンのシタラビン耐性克服

シタラビン耐性のメカニズムとしてリン酸化酵素 dCK の低下、トランスポーター ENT1 の減少、ヌクレオチド分解酵素 cN-II の亢進、抗アポトーシスタンパク bcl-2 の亢進などがある。シタラビン耐性細胞系におけるクロファラビンの感受性を検討し、クロファラビンの surrogate marker が耐性株における感受性に

合致するかについて解析した。

#### 4. 研究成果

##### (1) クロファラビン耐性細胞株の樹立

###### 耐性度の検討

クロファラビン耐性培養白血病株を2種類樹立した。親株 HL-60 をクロファラビン 50% 増殖阻止濃度の 1/10 から添加し徐々に濃度を上昇せしめた。その後 limiting dilution 法により2つの細胞を選択した。樹立した細胞株の耐性度はそれぞれ 20 倍 (HL/CAFdA20)、80 倍 (HL/CAFdA80) であった。シタラビンを含む他の代謝拮抗薬とは交差耐性を有するが、エトポシドやビンクリスチンとは交差耐性を示さなかった (表 1)。

###### クロファラビン代謝関連因子の検討

細胞膜トランスポーターについて ENT1, ENT2, CNT3 の mRNA 発現が低下していた。2つの耐性株 (20 倍耐性、80 倍耐性) の親株に比しての各トランスポーターの低下率は 53.9%/30.8%、41.8%/13.9% ( $P < 0.01$ )、17.7%/7.9% ( $P < 0.01$ ) であった (図 2)。特に CNT3 は親株でのクロファラビンの輸送に大きく関与することを初めて示した。また、クロファラビン細胞内リン酸化の律速酵素デオキシシチジンキナーゼ (dCK)、デオキシグアノシンキナーゼ (dGK) いずれにおいても mRNA と蛋白発現が低下していた (図 3)。Western Blot average density によるそれぞれの低下率は 20 倍耐性細胞で 53.0%、13.5%、80 倍耐性細胞で 55.5%、33.6% であった。

###### 細胞内 3 リン酸体生成量測定

耐性細胞において細胞内クロファラビン 3 リン酸体産生の低下を認めた。すなわち、10  $\mu\text{M}$  クロファラビン投与 4 時間培養後の細胞内 3 リン酸生成量は HL-60 で 63、HL/CAFdA20 で 20、HL/CAFdA80 で 3 であった (いずれも単位は  $\text{pmol}/10^7\text{cells}$ ) (図 1D)。

###### $^3\text{H}$ 標識クロファラビンの取り込み

$^3\text{H}$  標識クロファラビンを用いて細胞内分布 (細胞質、ミトコンドリア、細胞核) を検討した。耐性細胞株においては、どの分画においても低下を認めた。さらに  $^3\text{H}$  標識クロファラビンの核ならびにミトコンドリア DNA 内転入を定量したところ同様に耐性細胞において双方の分画にて低下していた。細胞内クロファラビン 3 リン酸、細胞質/ミトコンドリア内薬剤分布、DNA 鎖薬剤転入量のいずれにおいても 80 倍耐性細胞でより低下していた。

###### アポトーシス抵抗性の検討

HL-60 ではクロファラビンによりミトコンドリア依存アポトーシスが生じたが耐性細胞ではクロファラビンによるミトコンドリア膜電位の低下が抑制されていた。Annexin V 法による検討で、耐性細胞ではクロファラビンによるアポトーシス誘導に抵抗性であった。すなわち、1  $\mu\text{M}$  及び 10  $\mu\text{M}$  クロファラビン 72 時間培養後のアポトーシス割合は HL60 で 93.6%、90.7%、20 倍耐性細胞で 64.8%、

77.0%、80 倍耐性細胞 1.5%、77.9% であった。さらに耐性細胞における抗アポトーシスについて Western blot 法により Bcl2 増強と Bim の低下が認められた (図 4)。

###### アポトーシス抵抗性の克服

Bcl2 阻害薬 ABT737 単剤では白血病細胞には十分な効果がえられないが、クロファラビンとの併用は相乗作用を示した。Bcl2 阻害薬 ABT737 とクロファラビンの併用による併用効果を Combination Index として求めたところ、親株細胞、x20、x80 両耐性細胞において 0.65、0.27、0.23 であり、耐性細胞においてより強い相乗効果が認められた。

##### (2) クロファラビンによる耐性克服

###### シタラビン耐性細胞

シタラビン耐性培養 HL-60 亜株 HL-60/ara-C20 を用いた。シタラビンの 50% 増殖阻止濃度は HL-60 細胞、HL-60/ara-C60 細胞それぞれに 335  $\mu\text{M}$ 、5,300  $\mu\text{M}$  であり約 20 倍耐性であった。これに対してクロファラビンではそれぞれに 50  $\mu\text{M}$ 、320  $\mu\text{M}$  と約 6 倍しか差がなかった。すなわち、シタラビン高度耐性細胞はクロファラビンへの感受性を残存していた。また HL-60/ara-C20 細胞は HL-60 細胞に比しシタラビンによるアポトーシス誘導に耐性であったがクロファラビンによりアポトーシス死に誘導された。

###### クロファラビン代謝関連因子の検討

シタラビン、クロファラビンの細胞内活性化経路は類似であるが同一ではない。HL-60/ara-C20 において Western blot 法では細胞膜薬剤トランスポーターについてはシタラビンに関連する ENT1 の発現レベルのみが低下しクロファラビンに関連する CNT3 は低下していなかった。またリン酸化酵素でもシタラビンに関連するデオキシシチジンキナーゼ (dCK) のみが低下しデオキシグアノシンキナーゼ (dGK) は低下しなかった (図 5)。

###### 細胞内 3 リン酸体生成量測定

シタラビン 10  $\mu\text{M}$ 、6 時間培養後のシタラビン 3 リン酸生成量は HL-60/ara-C20 で HL-60 に比し約 1/5 に減少していた。一方、クロファラビン 10  $\mu\text{M}$ 、6 時間培養後の細胞内クロファラビン 3 リン酸生成量は HL-60/ara-C20 で 27  $\text{pmol}/10^7\text{cells}$ 、HL-60 で 54  $\text{pmol}/10^7\text{cells}$  と 50% の生成能を保持していた (図 5)。図 1 に示すようにクロファラビン特異的な活性化経路が保持されていることが 3 リン酸体生成能力については殺細胞効果の保持につながったと考えられた。

##### (3) 考察

本研究において耐性度の異なる 2 つのクロファラビン耐性亜株を樹立した。薬剤転入低下とリン酸化酵素減少による細胞内 3 リン酸化活性化体生成低下、そしてアポトーシス関連タンパクの変化による抗アポトーシスが主要な耐性機序として抽出された。クロファラビン耐性細胞ではシタラビンも完全交叉耐性を示した。一方クロファラビンの活性化

にはシタラピンと異なり、hCNT3、デオキシグアノシンキナーゼが関与しシタラピン耐性細胞ではこれらは全く intact でありクロファリンの感受性が保持されていた。

このように白血病細胞の薬理学的な機能特性に応じて薬剤の至適投与が考案されることが示唆された。とくに今回抽出された、細胞膜トランスポーター、リン酸化酵素、各薬剤の細胞内3リン酸体生成量、アポトーシス関連タンパクは tumorous surrogate marker として薬剤感受性を規定する因子として抽出されたものと解釈される。今後の治療抵抗性難治性白血病の克服にこのような細胞機能特性に基づく薬剤選択によるテーラメード化学療法の実践がきわめて有用である可能性が示唆された。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 42件)

#### 原著

- 1, Takai M, Yamauchi T 他 Controlling serum uric acid using febuxostat in cancer patients at risk of tumor lysis syndrome. *Oncol Let*, (in press) 査読あり
- 2, Yamauchi T 他 Prognostic influence of peripheral blood cell counts in advanced diffuse large B-cell lymphoma. *Oncol Let*, (in press) 査読あり
- 3, Hiraoka N, Kikuchi J, Yamauchi T 他 Purine analog-like properties of bendamustine underlie rapid activation of DNA damage response and synergistic effects with pyrimidine analogues in lymphoid malignancies. *Plos One*, 9:e90675, 2014. 査読あり
- 4, Tanaka Y, Komatsu T, Shigemi H, Yamauchi T 他 BIMEL is a key effector molecule in oxidative stress-mediated apoptosis in acute myeloid leukemia cells when combined with arsenic trioxide and buthionine sulfoximine. *BMC Cancer*, 14:27, 2014. 査読あり
- 5, Yamauchi T 他 Cytarabine-resistant leukemic cells are moderately sensitive to clofarabine in vitro. *Anticancer Res*, 34: 1657, 2014. 査読あり
- 6, Ono T, Takeshita A, Kishimoto Y, Kiyoi H, Okada M, Yamauchi T 他 CD56 expression is an unfavorable prognostic factor for acute promyelocytic leukemia patients with higher initial WBC counts. *Cancer Sci*, 105:97, 2014. 査読あり
- 7, Suzuki T, Yamauchi T 他 Phase I Study of Clofarabine (JC0707) in Adult Patients with Acute Myeloid Leukemia (AML) in Japan. *Jpn J Clin Oncol*, 43:1177, 2013. 査読あり
- 8, Fujita H, Asou N, Iwanaga M, Hyo R, Nomura S, Kiyoi H, Okada M, Tsuzuki M, Matsuda M, Yamauchi T 他 Role of hematopoietic stem cell transplantation as salvage treatment for acute promyelocytic leukemia initially treated with all-trans-retinoic acid and chemotherapy. *Cancer Sci*, 104:1339, 2013. 査読あり
- 9, Yamauchi T 他 A high serum uric acid level is associated with poor prognosis in patients with acute myeloid leukemia. *Anticancer Res*, 33:3947, 2013. 査読あり
- 10, Yamauchi T 他 Detectable Wilms'

- tumor-1 transcription at treatment completion is associated with poor prognosis of acute myeloid leukemia: A single institution's experience. *Anticancer Res*, 33:3335, 2013. 査読あり
- 11, Nakamura T, Nishi R, Tanaka T, Takagi K, Sakai K, Takai M, Morishima S, Yamauchi T 他 Variation of urate transport in the nephrons in subtype of hyperuricemia. *Nephron Extra*, 3:73, 2013. 査読あり
- 12, Yamauchi T 他 Aurora B inhibitor barasertib and cytarabine in combination exert greater-than-additive cytotoxicity against cytarabine-resistant acute myeloid leukemia cells. *Cancer Sci*, 104:926, 2013. 査読あり
- 13, Shigemi H, Yamauchi T 他 Establishment of novel leukemic cell lines resistant to clofarabine by dual mechanisms of decreased intracellular active metabolite and increased antiapoptotic factor. *Cancer Sci*, 104:732, 2013. 査読あり
- 14, Nishi R, Yamauchi T 他 Combination of guanine arabinoside and Bcl-2 inhibitor YC137 overcome the cytarabine resistance in HL-60 leukemia cell line. *Cancer Sci*, 104:502, 2013. 査読あり
- 15, Negoro E, Iwasaki H, Tai K, Ikegaya S, Takagi K, Kishi S, Yamauchi T 他 Utility of PCR amplification and DNA microarray hybridization of 16S rDNA for rapid diagnosis of bacteremia associated with hematological diseases. *Int J Infect Dis*, 17:e271, 2013. 査読あり
- 16, Ono T, Takeshita A, Kishimoto Y, Kiyoi H, Okada M, Yamauchi T 他 Long-term outcome and prognostic factors of elderly patients with acute promyelocytic leukemia. *Cancer Sci*, 103:1974, 2012. 査読あり
- 17, Yamauchi T 他 Early relapse is associated with high serum soluble interleukin-2 receptor level after the sixth cycle of R-CHOP chemotherapy in patients with advanced diffuse large B-cell lymphoma. *Anticancer Res*, 32:5051, 2012. 査読あり
- 18, Yamauchi T 他 Wilms' tumor-1 transcript in peripheral blood helps diagnose acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome in patients with pancytopenia. *Anticancer Res*, 32:4479, 2012. 査読あり
- 19, 池ヶ谷諭史、岩崎博道、李心、高井美穂子、細野奈穂子、岸慎治、山内高弘 他血液疾患に合併した発熱性好中球減少症に対する meropenem 1 g 1日3回投与の臨床的有用性、日化療雑誌, 60:49, 2012. 査読あり
- 20, Yamauchi T 他 The induction of DNA strand breaks is critical to predict the cytotoxicity of gemtuzumab ozogamicin against leukemic cells. *Cancer Sci*, 103:1722, 2012. 査読あり
- 21, Yoshida A, Zokumasu K, Wano Y, Yamauchi T 他 Marked upregulation of Survivin and Aurora-B kinase are associated with disease progression in the myelodysplastic syndromes. *Haematologica*, 97:1372, 2012. 査読あり
- 22, Takagi K, Kawai Y, Yamauchi T 他 Synergistic effects of combination with fludarabine and carboplatin depend on fludarabine-mediated inhibition of enhanced nucleotide excision repair in leukemia. *Int J Hematol*, 94:378, 2011. 査読あり
- 23, Yamauchi T 他 Determination of clofarabine triphosphate concentrations in leukemic cells using sensitive, isocratic high-performance liquid chromatography. *Anticancer Res*,

31:2863,2011. 査読あり  
 24, Nakamura T, Nishi R, Tanaka T, Takagi K, Yamashita T, **Yamauchi T** 他 Quantitative estimation of urate transport in nephrons in relation to urinary excretion employing benzbromarone-loading urate clearance tests in cases of hyperuricemia. *Nephron Extra*, 1;55, 2011. 査読あり  
 25, Tsuboi K, Yokozawa T, Sakura T, Watanabe T, Fujisawa S, **Yamauchi T** 他 A Phase I study to assess the safety, pharmacokinetics and efficacy of barasertib (AZD1152), an Aurora B kinase inhibitor, in Japanese patients with advanced acute myeloid leukemia. *Leuk Res*, 35:1384, 2011. 査読あり  
 26, Negoro E, **Yamauchi T** 他 Characterization of cytarabine-resistant leukemic cell lines established from five different blood cell lineages using gene expression and proteomic analyses. *Int J Oncol*, 38:911, 2011. 査読あり  
**総説**  
 27, **山内高弘** 他 特集：血液病と中枢神経病変 6. 薬剤性中枢神経病変 1) シタラビン、血液フロンティア, 23:1253, 2013. 査読なし  
 28, **山内高弘** 他、腫瘍崩壊症候群、成人病と生活習慣病, 43:529, 2013 査読なし  
 29, **山内高弘** 他、好塩基球減少症、別冊日本臨床 新領域別症候群シリーズ No.22 「血液症候群(第2版)II」, 168, 2013. 査読なし  
 30, **山内高弘** 他、好塩基球増加症、別冊日本臨床 新領域別症候群シリーズ No.22 「血液症候群(第2版)II」, 165, 2013. 査読なし  
 31, **山内高弘** 他、好酸球性血管性浮腫、別冊日本臨床 新領域別症候群シリーズ No.22 「血液症候群(第2版)II」, 152, 2013. 査読なし  
 32, **山内高弘** 他、血液内科領域における抗腫瘍薬の作用機序・副作用に基づく使い分け 3. シタラビンの作用機序、用量による使い分けと副作用対策、血液内科, 65:482, 2012. 査読なし  
 33, **山内高弘** 他、ABL 融合遺伝子、日本臨床「分子標的薬」, 70(supple 8):41, 2012. 査読なし  
 34, 上田孝典, **山内高弘**、病型分類、高尿酸血症と痛風, 20:131-137, 2012 査読なし  
 35, **山内高弘** 他、27. 腫瘍融解症候群のマネジメント、Medicina, 49:1409, 2012. 査読なし  
 36, **山内高弘** 他、III 血液 治療関連合併症 17. 腫瘍崩壊症候群、臨床雑誌 内科, 109:1132, 2012. 査読なし  
 37, **山内高弘** 他、病型分類をおこなうときに食事のプリン体を制限する必要があるのでしょうか、高尿酸血症と痛風, 20:38, 2012. 査読なし  
 38, **山内高弘** 他、薬物性高尿酸血症とその対応、Progress in Medicine, 32:55, 2012. 査読なし  
 39, **山内高弘** 他、二次性高尿酸血症、内分泌糖尿代謝内科, 33:439, 2011. 査読なし  
 40, **山内高弘** 他、二次性高尿酸血症、医薬の門, 51:250, 2011. 査読なし  
 41, **山内高弘** 他、慢性骨髄性白血病と二ロチニブ、癌と化学療法、特集：分子標的薬の二次治療, 38:911, 2011. 査読なし  
 42, **山内高弘** 他、抗がん薬投与による急性高尿酸血症への対応、日本医師会雑誌, 140:284, 2011 査読なし  
 【学会発表】(計 25 件)  
 1, **Yamauchi T** 他: Prognostic influence of blood cell counts of patients with advanced diffuse large B cell lymphoma treated with R-CHOP, 第 12 回日本臨床腫瘍学会学術集会、福岡、2014.7.18、(poster session)(確定)  
 2, **山内高弘** 他: 新規ヌクレオシドアナログクロファアラビンのシタラビン耐性白血病に

対する in vitro 効果、第 62 回日本化学療法学会総会、福岡、2014.6.20、(poster session) (確定)  
 3, Matsuda Y, **Yamauchi T** 他: The combination of panobinostat and ponatinib exerts synergistic cytotoxicity in imatinib-resistant chronic myeloid leukemia cell lines including BCR-ABL gene mutation with T315I, 第 19 回欧州血液学会総会(EHA)、ミラノ、イタリア、2014.6.13、(poster session)(確定)  
 4, **Yamauchi T** 他: Newly Established Nelarabine-resistant Leukemic Cell Line is Insensitive to Forodesine, 日本血液学会第 5 回国際シンポジウム、浜松、2014.5.24、(poster session) (確定)  
 5, 西理恵, **山内高弘** 他: 骨髄異形成症候群 MDS-L 細胞株に対するメチル化阻害薬 5-aza-2'-deoxycytidine の脱メチル化作用、第 47 回日本痛風核酸代謝学会総会、神戸、2014.2.21、(口演)  
 6, **山内高弘** 他: Purine nucleoside phosphorylase 阻害薬の培養白血病細胞株における増殖抑制効果、第 47 回日本痛風核酸代謝学会総会、神戸、2014.2.21、(口演)  
 7, **山内高弘**: がん化学療法 最新の成果、北陸がんプロフェッショナル養成プログラム、県民公開シンポジウム、がん治療最前線、福井、2013.12.15、(シンポジウム)  
 8, **山内高弘** 他: 新規ヌクレオシドアナログクロファアラビンのシタラビン耐性白血病に対する invitro 効果、第 34 回日本臨床薬理学会年会、東京、2013.12.4、(poster session)  
 9, Matsuda Y, **Yamauchi T** 他: Synergistic cytotoxicity between panobinostat and ponatinib on imatinib-resistant chronic myeloid leukemia cells, 第 55 回米国血液学会総会(ASH)、ニューオリンズ、米国、2013.12.9、(poster session)  
 10, **山内高弘** 他: Higher serum uric acid levels are associated with poorer overall survival in patients with acute myeloid leukemia, 第 75 回日本血液学会総会、北海道、2013.10.12、(poster session)  
 11, **山内高弘**: 慢性骨髄性白血病治療の最近の動向、Ph 白血病 Expert Meeting、福井、2013.9.27、(シンポジウム)  
 12, **山内高弘** 他: High Wilms' tumor 1 after chemotherapy is associated with early relapse in patients with acute myeloid leukemia-Single institution's experience, 第 11 回日本臨床腫瘍学会総会、仙台、2013.8.30、(口演)  
 13, **Yamauchi T** 他: Development of a novel T-lymphoblastic leukemia cell line CCRF-CEM variant resistant to nelarabine, 15th International Symposium on Purine and Pyrimidine Metabolism in Man, PP13. マドリッド、スペイン、2013.6.10、(シンポジウム)  
 14, **山内高弘** 他: オーロラキナーゼ阻害薬によるピリミジンヌクレオシドアナログ、シタラビンの抗白血病効果の増強、第 46 回日本痛風核酸代謝学会総会、東京、2013.2.15、(口演)  
 15, 重見博子, **山内高弘** 他: 新規プリン代謝拮抗薬(クロファアラビン)に対する培養白血病細胞株(HL60 耐性細胞)の樹立と耐性機序の検証、第 46 回日本痛風・核酸代謝学会総会、東京、2013.2.15、(口演)  
 16, Shigemi H, **Yamauchi T** 他: Establishment of novel leukemic cell lines resistant to clofarabine by dual mechanism of decreased active metabolite and increased antiapoptotic factor, 54th Annual Meeting of American Society of Hematology、アトランタ、米国 2012.12.8、(poster session)  
 17, **山内高弘** 他: Barasertib and cytarabine exert the greater cytotoxicity in acute

myeloid leukemia cells in vitro, 第74回日本血液学会総会、2012.10.19、(poster session)

18, 重見博子, 山内高弘他: Establishment of leukemic cell lines resistant to clofarabine with decreased intracellular triphosphate, 第74回日本血液学会総会、2012.10.19、(poster session)

19, 山内高弘他: Barasertib and cytarabine in combination exert greater-than-additive cytotoxicities against leukemic cells in vitro, 第71回日本血液学会総会、2012.9.20、(poster session)

20, 山内高弘: 白血病の分子標的療法～CML治療の新しい試み～, Ph白血球 Expert Meeting、2012.8.31、(シンポジウム)

21, 山内高弘他: Early relapse is associated with high serum soluble interleukin-2 receptor level after the 6th cycle of R-CHOP chemotherapy in patients with advanced diffuse large B-cell lymphoma, 第10回日本臨床腫瘍学会総会、2012.7.26、(poster session)

22, Yamauchi T他: Aurora B kinase inhibitor barasertib (AZD1152) and cytarabine in combination exert more than additive cytotoxicities against cytarabine-resistant acute myeloid leukemia cells in vitro, 103th Annual Meeting of American Association for Cancer Research, 2012.4.2, 米国 シカゴ、(poster session)

23, 重見博子, 山内高弘他: 新規プリンヌクレオシドアナログ clofarabine 耐性白血病細胞の樹立と耐性機序の解明, 第45回日本痛風・核酸代謝学会総会、2012.2.17、(口演)

24, 山内高弘他: 新規抗がん薬を用いた血液がん治療の進展～オーロラキナーゼ阻害薬、抗体医薬など～, 第32回日本臨床薬理学会年会、2011.12、(ワークショップ)

25, 山内高弘他: よく使う抗がん薬の特長, 第51回日本リンパ網内系学会、福岡、2011.07、(シンポジウム)

{ 図書 } (計 4 件)

1, 山内高弘他: アルキル化薬、チーム医療のための血液がんの標準的薬療法、直江知樹、服部敬三編、p37-48、MEDSI、東京 2013.

2, 上田孝典, 山内高弘: Cytarabine と類似化合物、プリン拮抗薬、抗がん薬の臨床薬理、代謝拮抗薬 相羽恵介編、p252-275、南江堂、東京 2012.

3, 山内高弘他: 第4章 急性白血病の管理・治療: 急性白血病に使用される薬物。新しい治療と診断のABC36、血液4、急性白血病、改訂第2版、大野竜三編、p71-82、最新医学社、大阪、2012.

4, 山内高弘他: 血液専門医テキスト、V-2 抗がん薬の作用機序と分類、p79-84、南江堂、東京 2011.

{ 産業財産権 }

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

{ その他 }

特になし。

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

福井大学・医学部・附属病院・講師

山内高弘 (Yamauchi, Takahiro)

研究者番号: 90291377

表1 親株、耐性細胞株における各種抗がん剤の感受性

	IC <sub>50</sub> (nM)		
	HL-60	HL/CAFdA20	HL/CAFdA80
Clofarabine	22.5	451.4	1775.0
Cytarabine	17.6	10001	ND
Gemcitabine	3.3	35.3	1124
Cladribine	4.1	373	1825
Fludarabine	113	217	489
Doxorubicin	57.4	98.1	323
Vincristine	28.3	33.3	30.9
Etoposide	79.7	93.3	153
ABT737	63.8	294	1135

HL-60, HL/CAFdA20, and HL/CAFdA80の細胞株に各種抗がん薬を添加して、72時間後に細胞増殖抑制度をXTT法により測定した。括弧内は親株と比較した耐性を示す。

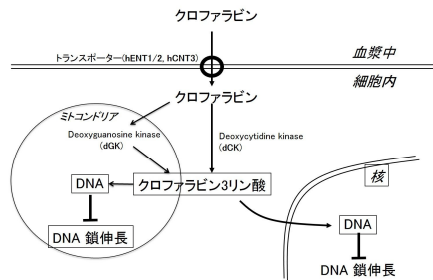


図1 クロファラビンの細胞内代謝

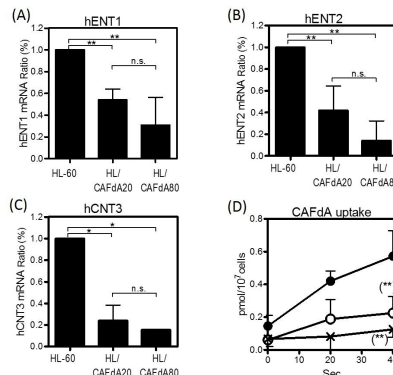


図2 細胞膜トランスポーター

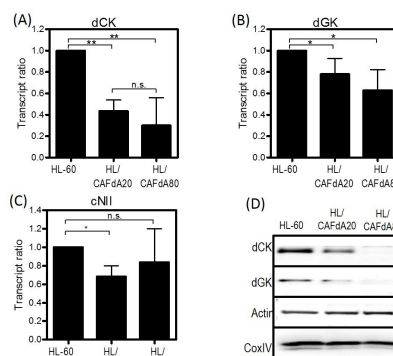


図3 リン酸化酵素

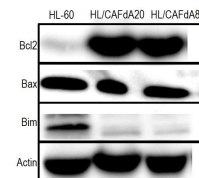


図4 アポトーシス関連因子

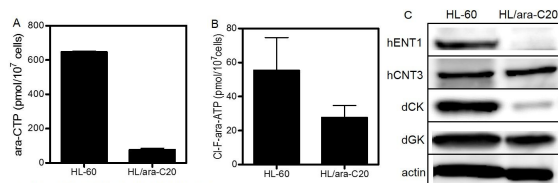


図5 3リン酸体生成と関連因子