

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

WO2003/097097

発行日 平成17年10月20日 (2005. 10. 20)

(43) 国際公開日 平成15年11月27日 (2003. 11. 27)

(51) Int. Cl.⁷

F 1

A 6 1 K 45/00
 A 6 1 K 31/136
 A 6 1 K 31/4745
 A 6 1 K 31/52
 A 6 1 K 31/573

A 6 1 K 45/00
 A 6 1 K 31/136
 A 6 1 K 31/4745
 A 6 1 K 31/52
 A 6 1 K 31/573

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 42 頁) 最終頁に続く

出願番号 特願2004-505093 (P2004-505093)
 (21) 国際出願番号 PCT/JP2002/004704
 (22) 国際出願日 平成14年5月15日 (2002. 5. 15)
 (81) 指定国 CA, JP, US

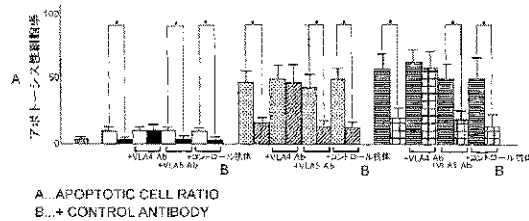
(71) 出願人 505033536
 新津 洋司郎
 北海道札幌市中央区南1条西16丁目29
 1番地 札幌医科大学内科学第4講座内
 (71) 出願人 505205535
 松永 卓也
 北海道札幌市中央区南1条西16丁目 札
 幌医科大学医学部内科学第四講座
 (72) 発明者 新津 洋司郎
 北海道札幌市中央区南1条西16丁目 札
 幌医科大学医学部内科学第四講座
 (72) 発明者 松永 卓也
 北海道札幌市中央区南1条西16丁目 札
 幌医科大学医学部内科学第四講座

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 V L A 4 アンタゴニストを含む治療用医薬組成物を用いた急性白血病の治療および／または再発予防方法ならびに V L A 4 を指標とした急性白血病の予後の診断方法

(57) 【要約】

本発明は、V L A 4 アンタゴニストを用いてフィブロネクチン - V L A 4 間相互作用を阻害することにより白血病細胞の細胞接着依存性抗癌剤耐性の獲得を抑制することを含む急性白血病の治療用医薬組成物、それを用いた急性白血病の治療および／または予防方法を提供する。さらに、急性白血病細胞における V L A 4 発現率に基づく急性白血病の診断方法も提供する。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

急性白血病患者に投与することにより該疾患を治療し得る、V L A 4 アンタゴニスト。

【請求項 2】

急性白血病患者に他の抗癌剤投与と併用して投与することにより該疾患を治療し得る、V L A 4 アンタゴニスト。

【請求項 3】

抗癌剤が、シトシンアラビノシド、エトポシド、ダウノルビシン、ミトキサントロン、ドキソルビシン、メソトレキセート、L - アスパラギナーゼ、ビンクリスチン、ビンデシン、6 - メルカプトプリン、アクラシノマイシン、プレドニゾロン、サイクロフォスファミドおよびデキサメサゾンからなる群より選択される、請求項 2 記載の V L A 4 アンタゴニスト。

10

【請求項 4】

抗 V L A 4 抗体である請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の V L A 4 アンタゴニスト。

【請求項 5】

抗 V L A 4 抗体が抗 V L A 4 モノクローナル抗体である、請求項 4 記載の V L A 4 アンタゴニスト。

【請求項 6】

抗 V L A 4 モノクローナル抗体がマウスハイブリドーマ S G / 7 3 株または S G / 1 7 株により産生されるものである、請求項 5 記載の V L A 4 アンタゴニスト。

20

【請求項 7】

V L A 4 アンタゴニストが抗 V L A 4 ヒト化抗体である、請求項 4 記載の V L A 4 アンタゴニスト。

【請求項 8】

抗 V L A 4 ヒト化抗体が、マウスハイブリドーマ S G / 7 3 株または S G / 1 7 株により産生される抗 V L A 4 モノクローナル抗体に由来する可変部の少なくとも一部を含み、該抗体の抗原結合性を維持しているものである、請求項 7 記載の V L A 4 アンタゴニスト。

【請求項 9】

請求項 1 記載の V L A 4 アンタゴニストを含有する、急性白血病治療用医薬組成物。

【請求項 10】

請求項 2 記載の V L A 4 アンタゴニストを含有する、急性白血病治療用医薬組成物。

30

【請求項 11】

請求項 3 記載の V L A 4 アンタゴニストを含有する、急性白血病治療用医薬組成物。

【請求項 12】

請求項 4 記載の V L A 4 アンタゴニストを含有する、急性白血病治療用医薬組成物。

【請求項 13】

請求項 5 記載の V L A 4 アンタゴニストを含有する、急性白血病治療用医薬組成物。

【請求項 14】

請求項 6 記載の V L A 4 アンタゴニストを含有する、急性白血病治療用医薬組成物。

【請求項 15】

請求項 7 記載の V L A 4 アンタゴニストを含有する、急性白血病治療用医薬組成物。

40

【請求項 16】

請求項 8 記載の V L A 4 アンタゴニストを含有する、急性白血病治療用医薬組成物。

【請求項 17】

1 種以上の他の抗癌剤をさらに含有する、請求項 9 ~ 1 6 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 18】

抗癌剤が、シトシンアラビノシド、エトポシド、ダウノルビシン、ミトキサントロン、ドキソルビシン、メソトレキセート、L - アスパラギナーゼ、ビンクリスチン、ビンデシン、6 - メルカプトプリン、アクラシノマイシン、プレドニゾロン、サイクロフォスファミ

50

ドおよびデキサメサゾンからなる群より選択される、請求項 17 記載の医薬組成物。

【請求項 19】

1 種以上の他の抗癌剤と併用して投与するための、請求項 9 ~ 16 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 20】

抗癌剤が、シトシンアラビノシド、エトポシド、ダウノルビシン、ミトキサントロン、ドキソルビシン、メソトレキセート、L-アスパラギナーゼ、ビンクリスチン、ビンデシン、6-メルカプトプリン、アクラシノマイシン、プレドニゾロン、サイクロフォスファミドおよびデキサメサゾンからなる群より選択される、請求項 19 記載の医薬組成物。

【請求項 21】

請求項 19 記載の医薬組成物と 1 種以上の他の抗癌剤とを含む、急性白血病治療用キット。

【請求項 22】

抗癌剤が、シトシンアラビノシド、エトポシド、ダウノルビシン、ミトキサントロン、ドキソルビシン、メソトレキセート、L-アスパラギナーゼ、ビンクリスチン、ビンデシン、6-メルカプトプリン、アクラシノマイシン、プレドニゾロン、サイクロフォスファミドおよびデキサメサゾンからなる群より選択される、請求 21 記載の急性白血病治療用キット。

【請求項 23】

VLA4 とフィブロネクチンとの間の相互作用を抑制するための手段を含む、急性白血病の治療方法。

【請求項 24】

他の 1 種以上の抗癌剤を併用して投与することをさらに含む、請求項 23 記載の治療方法。

【請求項 25】

抗癌剤が、シトシンアラビノシド、エトポシド、ダウノルビシン、ミトキサントロン、ドキソルビシン、メソトレキセート、L-アスパラギナーゼ、ビンクリスチン、ビンデシン、6-メルカプトプリン、アクラシノマイシン、プレドニゾロン、サイクロフォスファミドおよびデキサメサゾンからなる群より選択される、請求項 24 記載の治療方法。

【請求項 26】

上記手段が VLA4 アンタゴニストを投与することを含む、請求項 23 ~ 25 のいずれか 1 項に記載の治療方法。

【請求項 27】

VLA4 アンタゴニストが抗 VLA4 抗体である、請求項 26 記載の治療方法。

【請求項 28】

抗 VLA4 抗体が抗 VLA4 モノクローナル抗体である、請求項 27 記載の治療方法。

【請求項 29】

抗 VLA4 モノクローナル抗体がマウスハイブリドーマ SG/73 株または SG/17 株により産生されるものである、請求項 28 載の治療方法。

【請求項 30】

抗 VLA4 抗体が抗 VLA4 ヒト化抗体である、請求項 27 記載の治療方法。

【請求項 31】

抗 VLA4 ヒト化抗体が、マウスハイブリドーマ SG/73 株または SG/17 株により産生される抗 VLA4 モノクローナル抗体に由来する可変部の少なくとも一部を含み、該抗体の抗原結合性を維持しているものである、請求項 30 記載の治療方法。

【請求項 32】

急性白血病患者の急性白血病細胞における VLA4 の発現率を測定することにより、該患者の化学療法に対する応答性および該患者の予後を診断するための、抗 VLA4 抗体。

【請求項 33】

抗 VLA4 モノクローナル抗体である、請求項 32 記載の抗体。

10

20

30

40

50

【請求項 3 4】

マウスハイブリドーマ S G / 7 3 株または S G / 1 7 株により産生されるものである、請求項 3 3 記載の抗体。

【請求項 3 5】

急性白血病患者の急性白血病細胞における V L A 4 の発現率を測定することを包含する、該患者の化学療法に対する応答性および該患者の予後を診断する方法。

【請求項 3 6】

上記 V L A 4 の発現率の測定が、免疫化学的手法により実施されるものである、請求項 3 5 記載の方法。

【請求項 3 7】

請求項 3 2 ~ 3 4 のいずれか 1 項に記載の抗体を用いる、請求項 3 6 記載の方法。

【請求項 3 8】

上記 V L A 4 の発現率の測定が、4 インテグリン m R N A レベルを検出することにより実施されるものである、請求項 3 5 記載の方法。

【請求項 3 9】

急性白血病患者の急性白血病細胞における V L A 4 の発現率を測定することにより、該患者の化学療法に対する応答性および該患者の予後を診断するための、抗 V L A 4 抗体を含む診断用キット。

【請求項 4 0】

抗 V L A 4 抗体が請求項 3 2 ~ 3 4 のいずれか 1 項に記載の抗体である、請求項 3 9 記載の診断用キット。

【請求項 4 1】

急性白血病患者の治療および/または予防薬として有用な化合物をスクリーニングする方法であって、試験化合物の存在下または非存在下でフィブロネクチンまたはその誘導体と V L A 4 またはその誘導体とを接触させて、それらの相互作用を検出し、フィブロネクチンと V L A 4 との相互作用を阻害する試験化合物を特定することを含む、上記方法。

【発明の詳細な説明】

技術分野

本発明は、V L A 4 アンタゴニスト、特に抗 V L A 4 抗体を含有する急性白血病の治療用医薬組成物、それを用いた急性白血病の治療および/または予防方法、ならびに急性白血病細胞における V L A 4 発現率に基づく急性白血病の予後の診断方法に関する。

背景技術

成人の急性白血病（急性骨髄性白血病および急性リンパ性白血病の両方を含む）は、化学療法に対する感受性が高く、70 ~ 80 % の患者が完全寛解（C R）を得る [1 , 2]。しかし完全寛解後に再発することが多く、再発後は化学療法に耐性（多剤耐性）となり死亡に至るため、長期無病生存率は 20 ~ 30 % 程度である [1 - 4]。即ち、急性白血病の治療率を向上させるためには、再発を防止する戦略が必要であるが、未だ具体的な再発防止方法は見い出されていない。この再発防止法を見い出すためには、再発機序の解明が不可欠である。最近、通常の化学療法で C R を獲得した小児の急性リンパ性白血病（A L L）患者における、再発率の上昇と長期無再発生存率の低下の危険因子として、骨髄の微少残存病変（M R D）が重要であることが報告された [5 , 6]。このことは、急性白血病細胞が骨髄の造血微少環境にあって、化学療法による影響から逃れるための何らかの機序が存在することを伺わせる。

種々の細胞株を用いた *i n v i t r o* の実験で、多種に渡る正常上皮細胞が、細胞外マトリックスに接着することにより、その増殖や生存が促進されることが報告されている [7 , 8]。逆に言うと、これらの足場依存性の細胞は、細胞外マトリックスから解離するとアポトーシスに陥るということを示している。幾つかの悪性腫瘍細胞株においても、上記と同様の現象が確認されている [9 , 10]。このことから、急性白血病細胞においても、何らかの細胞接着がその細胞増殖および/または細胞の生存に影響を与えている可能性が考えられ、該細胞 - 細胞外マトリックス間相互作用により、急性白血病細胞化学療法

10

20

30

40

50

による影響から逃れるための機序が提供されている可能性がある。

事実、最近Mudryら[11]は、B-ALL細胞株であるJM-1とRS4を用いた *in vitro*の実験で、上記の機序について検討して報告した。即ち、彼らは、ALL細胞が、その細胞表面に発現している 4-1インテグリン(VLA4; Very Late Antigen 4; 遅延型抗原4)を介して、骨髄ストローマ細胞に発現しているVCAM1(Vascular Cell Adhesion Molecule-1; 血管細胞接着分子)と接着することにより、シトシンアラビノシド(Ara-C)とエトポシド(VP-16)によるアポトーシスから回避するというところを見出した。しかし、本来VLA4はALL細胞だけではなく、未熟リンパ球から成熟リンパ球まで、広く正常のリンパ球系細胞に発現していることが知られており[12]、VLA4を介したVCAM1への接着による抗癌剤への感受性低下は、B-ALL細胞に特有の現象ではなく、正常リンパ球においても同様の機序が働いている可能性がある。更に、B-ALLにおいては、このVLA4-VCAM1間相互作用が再発や予後に関与するか否かについては、全く検討されていない。

10

急性骨髄性白血病(AML)に関しても、上記と同様の細胞接着を介した抗癌剤耐性に関する報告が既になされている。即ち、Smadja-Joffeらは、AML細胞のCD44-6vが高発現であった患者群とCD44-6v陰性あるいは低発現の患者群とで、長期生存率および長期無病生存を比べた結果、CD44-6v陰性あるいは低発現の患者群では、長期生存率が48%および長期無病生存率が38%であり、CD44-6vが高発現であった患者群より有意に高いと報告した[13]。彼らは、その機序を解明する目的で、急性前骨髄球性(APL)細胞株であるHL60とNB4を用いて、*in vitro*における検討を行った[14]。その報告によると、彼らは急性白血病細胞のCD44をモノクローナル抗体で刺激することで、APL細胞がダウノルビシン(DNR)、ミトキサントロンおよびVP-16等の抗癌剤によるアポトーシスから回避し得ることを見出した。以上の結果から、彼らは、APL細胞は、骨髄ストローマ細胞表面に発現している細胞外マトリックスであるヒアルロン酸とCD44分子との結合を介して接着することにより、抗癌剤耐性を獲得することを推測した。

20

しかし、彼らはCD44に対する刺激抗体を用いているので、必ずしもリガンドとの結合効果を実際に調べていることにはならず、ヒアルロン酸とCD44分子との結合による該細胞の細胞外マトリックスへの接着が、抗癌剤耐性の獲得に関与しているということを実証していない。

30

更に、彼らが実験に用いた細胞はAPL細胞株のみである。即ち、このCD44刺激による抗癌剤耐性獲得の機序が、AMLに普遍的であるか否かについては、未だ不明である。また、Bendallら[15]は、患者由来の新鮮AML細胞は、VLA5を介してフィブロネクチン(FN)と接着することにより、生存し易くなる事を報告している。しかし、彼らは、この研究においてAML細胞の生存に対する幹細胞性因子の影響を検討する目的で、無血清の条件下で培養を行ない、かつ可溶性FNを用いている。この条件は、*in vivo*の環境を正確に反映するものとは言えず、血清存在下で固相化FNを用いた、より*in vivo*の環境を反映する環境下での検討を行っていない。さらに、彼らは抗癌剤によって誘発されるアポトーシスへのVLA5の影響については、全く検討を加えていない。即ち、彼らの実験系でVLA5-FN間相互作用が、AML細胞の抗癌剤感受性の低下をもたらすか否かについては不明である。

40

悪性腫瘍細胞株が細胞接着により抗癌剤耐性を獲得するということは急性白血病以外の悪性腫瘍細胞株においては諸家により既に幾つか報告がある。例えば、Damianoら[17]は、多発性骨髄腫由来の細胞株においては、細胞がFNと接着することにより、抗癌剤によるアポトーシスから回避し易くなることを報告している。彼らの考察では、抗癌剤によるアポトーシスを回避し易い形質を持つ細胞ではFNとの接着にはVLA4が関与しているとされている。彼らはヒトミエローマ細胞株S226/Sから抗癌剤の存在下で生存し得る株を選択的にクローン化するという人為的に設定された人工的な環境下での選択により得られたクローンについての細胞のVLA4分子の発現量と抗癌剤によるアポト

50

ーシスを回避する効果との相関を述べている。しかし、彼らが比較検討に用いた細胞の表面にはVLA5も発現しており、上記アポトーシスの回避には、VLA4のみが必要とされるのかという点について明示されいない。さらに、VLA4分子を介した細胞接着が実際に上記アポトーシスの回避効果に関与している直接的な証拠は示していない。

また、Sehtiraは、小細胞肺癌の細胞株を用いた*in vitro*の実験系で、該細胞株が、癌細胞に発現している細胞接着因子受容体インテグリンヘテロダイマーである、 $\alpha 2 \beta 1$ (VLA2)、 $\alpha 3 \beta 1$ (VLA3)および $\alpha 6 \beta 1$ (VLA6)などの $\beta 1$ -インテグリン分子と、癌周囲組織に発現しているFN、ラミニンまたはIV型コラーゲンとの接着により抗癌剤耐性を獲得し得ることを見出ししている[16]。しかし、彼らは患者由来の新鮮癌細胞を用いた検討は全く行っていない。また、小細胞肺癌においては、FN-VLA4間相互作用は、抗癌剤感受性には影響を与えないとしている。

つまり、腫瘍細胞の種類によって、細胞接着に起因する抗癌剤耐性に関する細胞接着因子と細胞外マトリックス分子との組み合わせは多様であり、そのいずれが抗癌剤耐性に関与しているかということは、実際に対象とする種類の腫瘍細胞を用いて実験的に実証せざるを得ない。

さらに、樹立細胞株の培養系は、体内に存在する悪性腫瘍細胞の形質を必ずしも正確に反映するとは限らないため、患者由来の新鮮な悪性腫瘍細胞を用いて検討することが必要である。しかしながら、上述のDamianoら[17]の報告およびSehtira[16]の報告のいずれも、患者由来の新鮮腫瘍細胞を用いた実験は行っておらず、これまでに、このような患者由来の新鮮な悪性腫瘍細胞を用いて細胞接着に起因する抗癌剤耐性を証明した報告はない。

急性白血病細胞のアポトーシスに関する細胞接着因子に関する知見としては、VLA5を介した細胞接着がAML細胞の生存に影響を与えることが報告されている。例えば、前述の通り、Bendallら[15]は、VLA5がAML細胞のアポトーシスの抑制に作用すると報告しているが、Sugaharaら[18]は、VLA5がアポトーシスの促進に作用することを報告している。上記2つの研究グループが用いたAML細胞および実験系は同一ではなく、VLA5のAML細胞に対する作用は未だ意見の一致が得られておらず、矛盾している。更にAML細胞の $\alpha 1 \beta 1$ インテグリンが、抗癌剤により引き起こされるアポトーシスに与える影響については未だ報告されていない。

発明の開示

以上の背景から、本発明者らは最初に、VLA4およびVLA5が急性白血病細胞の抗癌剤によるアポトーシスに与える影響を樹立細胞株を用いた*in vitro*およびマウスを用いた*in vivo*の実験で検討すると同時に、急性白血病細胞のVLA4およびVLA5の発現が通常の化学療法を受ける急性白血病患者の予後(完全寛解、再発、長期生存、長期無病生存など)に与える影響を検討した。

急性白血病細胞において、VLA4とVLA5が、AML細胞の骨髄ストローマ細胞への接着に関する接着因子としてCD44と並んで重要なことは周知の事実である[1-4]。VLA4では $\alpha 4 \beta 1$ インテグリンが、VLA5では $\alpha 5 \beta 1$ インテグリンが、それぞれ $\beta 1$ インテグリンとのヘテロダイマーを形成しており、VLA4とVLA5はそれぞれ、FN受容体であり、FNとの相互作用を介して、細胞接着、細胞分化および細胞生存維持等、種々の生物学的な役割に関与していると推測されている。VLA4分子を構成する $\alpha 4 \beta 1$ インテグリンおよび $\alpha 5 \beta 1$ インテグリンはいずれも、C末端近傍に膜貫通ドメインを有し、それよりN末端側が細胞外ドメインである。これら細胞外ドメインには、複数の2価金属結合部位が存在し、この金属結合部位が細胞接着因子との結合に重要であると考えられている。VLA4およびVLA5分子は、正常の骨髄芽球や前骨髄球などの未熟骨髄球系細胞には発現していない。したがって、急性白血病細胞において、VLA4とVLA5を介した骨髄ストローマ細胞への接着が抗癌剤感受性の変化に与える影響を検討することは、急性白血病の再発機序を解明するのみではなく、細胞生物学的にも意義が大きいと考えた。本発明者らのAML細胞株および患者由来の新鮮AML細胞を用いた*in vitro*の検討では、AML細胞上のVLA4は、骨髄ストローマ細胞の細胞外マトリックス構成成

10

20

30

40

50

分であるFNと相互作用することにより、抗癌剤（シトシンアラビノシド、ダウノルピシン）によるアポトーシスを回避し得ることが判明した。

AML細胞株および患者由来の新鮮AML細胞を用いた*in vitro*での検討では、AML細胞上のVLA4は、骨髄ストローマ細胞の細胞外マトリックス構成成分であるFNと相互作用することにより、抗癌剤（シトシンアラビノシド、ダウノルピシン）によるアポトーシスを回避し得ることが判明した。

重症複合免疫不全（SCID）マウスにヒトAML細胞株を移植して作製したAMLモデルマウスを用いた*in vivo*の実験の結果から、実際の骨髄においてAML細胞は、VLA4を介して抗癌剤による細胞傷害を回避することが確認された。

上記の知見より、FN-VLA4間相互作用を阻害し得るVLA4アンタゴニストが、抗癌剤による細胞傷害のFN-VLA4間相互作用を介した回避を妨害するのに有効であり、抗癌剤によるAML細胞のアポトーシスを促進すると考えた。そこで、VLA4アンタゴニストとしてVLA4とFNとの相互作用を遮断し得る抗VLA4モノクローナル抗体（VLA4Ab）を用いて、それを抗癌剤と併用してAMLモデルマウスに投与したところ、マウスの骨髄のMRDを根絶できることを発見した。また、VLA4Abは骨髄に存在するAML細胞を末梢血中へ動員させる作用を有することも判明した。

以上の結果から、VLA4Abは、化学療法と併用することにより、AMLの通常の化学療法による治療成績を向上させ得る。

さらに、VLA4陰性患者群とVLA4陽性患者群との完全寛解および予後について比較検討した結果、VLA4陰性患者群の通常の化学療法後の完全寛解率は驚くべきことに100%であり、VLA4陽性患者群のそれに比べて有意に高く、かつ再発率も低く、5年生存率と5年無病生存率はともに100%と極めて良好であった。

このことより、VLA4の発現は、AMLの初回の化学療法（寛解導入療法）に対する抗癌剤耐性の要因であると同時に、長期予後の危険因子であることが明らかになった。したがって、AML患者のAML細胞におけるVLA4の発現量および/またはVLA4発現率を測定することは、化学療法に対する応答の予測、および該患者の予後の非常に重要な知見をもたらす診断法であり得る。

すなわち、FN-VLA4間相互作用により誘導される抗アポトーシス性シグナルカスケードがAML細胞の生存に寄与しており、FN-VLA4間相互作用を遮断するVLA4アンタゴニストにより、AML細胞の抗癌剤感受性は顕著に向上し得ることが、樹立細胞株を用いた*in vitro*および疾患モデルマウスを用いた*in vivo*での試験より明らかとなった。さらに、AML細胞のVLA4発現率が高い患者では、抗癌剤による治療後の予後が、VLA4発現率が低い患者に比べて有意に不良であることを見出した。この知見を基に、本発明は、急性白血病細胞の抗癌剤感受性を増大させることによる急性白血病治療のためのVLA4アンタゴニスト（該アンタゴニストには、低分子化合物および抗体等の高分子物質が含まれる）、該VLA4アンタゴニストを含有する治療医薬組成物、および急性白血病細胞におけるVLA4発現率を測定することによる急性白血病患者の診断方法を提供する。さらに、急性白血病の治療用化合物のスクリーニング方法も本発明により提供される。

、本発明は、以下の1～41の態様：

- 1． 急性白血病患者に投与することにより該疾患を治療し得る、VLA4アンタゴニスト、
- 2． 急性白血病患者に他の抗癌剤投与と併用して投与することにより該疾患を治療し得る、VLA4アンタゴニスト、
- 3． 抗癌剤が、シトシンアラビノシド、エトポシド、ダウノルピシン、ミトキサントロン、ドキシソルピシン、メソトレキセート、L-アスパラギナーゼ、ビンクリスチン、ビンデシン、6-メルカプトプリン、アクラシノマイシン、プレドニゾロン、サイクロフォスファミドおよびデキサメサゾンからなる群より選択される、上記2記載のVLA4アンタゴニスト、
- 4． 抗VLA4抗体である上記1～3のいずれか1つに記載のVLA4アンタゴニスト

- 、
- 5 . 抗 V L A 4 抗体が抗 V L A 4 モノクローナル抗体である、上記 4 記載の V L A 4 ア
ンタゴニスト、
- 6 . 抗 V L A 4 モノクローナル抗体がマウスハイブリドーマ S G / 7 3 株または S G /
1 7 株により産生されるものである、上記 5 記載の V L A 4 アンタゴニスト、
- 7 . V L A 4 アンタゴニストが抗 V L A 4 ヒト化抗体である、上記 4 記載の V L A 4 ア
ンタゴニスト、
- 8 . 抗 V L A 4 ヒト化抗体が、マウスハイブリドーマ S G / 7 3 株 (「独立行政法人産
業技術総合研究所特許生物寄託センター (日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番地 1 中央第
6)」に 2 0 0 2 年 5 月 8 日に F E R M B P - 8 0 3 6 として寄託されている)または
S G / 1 7 株 (「独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター (日本国茨城県
つくば市東 1 丁目 1 番地 1 中央第 6)」に 2 0 0 2 年 5 月 8 日に F E R M B P - 8 0 3
5 として寄託されている)により産生される抗 V L A 4 モノクローナル抗体に由来する可
変部の少なくとも一部を含み、該抗体の抗原結合性を維持しているものである、上記 7 記
載の V L A 4 アンタゴニスト、
- 9 . 上記 1 記載の V L A 4 アンタゴニストを含有する、急性白血病治療用医薬組成物、
- 1 0 . 上記 2 記載の V L A 4 アンタゴニストを含有する、急性白血病治療用医薬組成物
、
- 1 1 . 上記 3 記載の V L A 4 アンタゴニストを含有する、急性白血病治療用医薬組成物
、
- 1 2 . 上記 4 記載の V L A 4 アンタゴニストを含有する、急性白血病治療用医薬組成物
、
- 1 3 . 上記 5 記載の V L A 4 アンタゴニストを含有する、急性白血病治療用医薬組成物
、
- 1 4 . 上記 6 記載の V L A 4 アンタゴニストを含有する、急性白血病治療用医薬組成物
、
- 1 5 . 上記 7 記載の V L A 4 アンタゴニストを含有する、急性白血病治療用医薬組成物
、
- 1 6 . 上記 8 記載の V L A 4 アンタゴニストを含有する、急性白血病治療用医薬組成物
、
- 1 7 . 1 種以上の他の抗癌剤をさらに含有する、上記 9 ~ 1 6 のいずれか 1 つに記載の
医薬組成物、
- 1 8 . 抗癌剤が、シトシンアラビノシド、エトポシド、ダウノルビシン、ミトキサント
ロン、ドキソルビシン、メソトレキセート、L - アスパラギナーゼ、ビンクリスチン、ピ
ンデシン、6 - メルカプトプリン、アクラシノマイシン、プレドニゾロン、サイクロフォ
スファミドおよびデキサメサゾンからなる群より選択される、上記 1 7 記載の医薬組成物
、
- 1 9 . 1 種以上の他の抗癌剤と併用して投与するための、上記 9 ~ 1 6 のいずれか 1 つ
に記載の医薬組成物、
- 2 0 . 抗癌剤が、シトシンアラビノシド、エトポシド、ダウノルビシン、ミトキサント
ロン、ドキソルビシン、メソトレキセート、L - アスパラギナーゼ、ビンクリスチン、ピ
ンデシン、6 - メルカプトプリン、アクラシノマイシン、プレドニゾロン、サイクロフォ
スファミドおよびデキサメサゾンからなる群より選択される、上記 1 9 記載の医薬組成物
、
- 2 1 . 上記 1 9 記載の医薬組成物と 1 種以上の他の抗癌剤とを含む、急性白血病治療用
キット、
- 2 2 . 抗癌剤が、シトシンアラビノシド、エトポシド、ダウノルビシン、ミトキサント
ロン、ドキソルビシン、メソトレキセート、L - アスパラギナーゼ、ビンクリスチン、ピ
ンデシン、6 - メルカプトプリン、アクラシノマイシン、プレドニゾロン、サイクロフォ
スファミドおよびデキサメサゾンからなる群より選択される、上記 2 1 または 2 1 記載の

10

20

30

40

50

急性白血病治療用キット、

23. V L A 4 とフィブロネクチンとの間の相互作用を抑制するための手段を含む、急性白血病の治療方法、

24. 他の1種以上の抗癌剤を併用して投与することをさらに含む、上記23記載の治療方法、

25. 抗癌剤が、シトシンアラビノシド、エトポシド、ダウノルビシン、ミトキサントロン、ドキシソルビシン、メソトレキセート、L - アスパラギナーゼ、ビンクリスチン、ビンデシン、6 - メルカプトプリン、アクラシノマイシン、プレドニゾロン、サイクロフォスファミドおよびデキサメサゾンからなる群より選択される、上記24記載の治療方法、

26. 上記手段がV L A 4 アンタゴニストを投与することを含む、上記23 ~ 25のいずれか1つに記載の治療方法、

27. V L A 4 アンタゴニストが抗V L A 4 抗体である、上記26記載の治療方法、

28. 抗V L A 4 抗体が抗V L A 4 モノクローナル抗体である、上記27記載の治療方法、

29. 抗V L A 4 モノクローナル抗体がマウスハイブリドーマS G / 7 3 株またはS G / 1 7 株により産生されるものである、上記28記載の治療方法、

30. 抗V L A 4 抗体が抗V L A 4 ヒト化抗体である、上記27記載の治療方法、

31. 抗V L A 4 ヒト化抗体が、マウスハイブリドーマS G / 7 3 株またはS G / 1 7 株により産生される抗V L A 4 モノクローナル抗体に由来する可変部の少なくとも一部を含み、該抗体の抗原結合性を維持しているものである、上記30記載の治療方法、

32. 急性白血病患者の急性白血病細胞におけるV L A 4 の発現率を測定することにより、該患者の化学療法に対する応答性および該患者の予後を診断するための、抗V L A 4 抗体、

33. 抗V L A 4 モノクローナル抗体である、上記32記載の抗体、

34. マウスハイブリドーマS G / 7 3 株またはS G / 1 7 株により産生されるものである、上記33記載の抗体、

35. 急性白血病患者の急性白血病細胞におけるV L A 4 の発現率を測定することを包含する、該患者の化学療法に対する応答性および該患者の予後を診断する方法、

36. 上記V L A 4 の発現率の測定が、免疫化学的手法により実施されるものである、上記35記載の方法、

37. 上記32 ~ 34のいずれか1つに記載の抗体を用いる、上記37記載の方法、

38. 上記V L A 4 の発現率の測定が、4 インテグリンm R N A レベルを検出することにより実施されるものである、上記35記載の方法、

39. 急性白血病患者の急性白血病細胞におけるV L A 4 の発現率を測定することにより、該患者の化学療法に対する応答性および該患者の予後を診断するための、抗V L A 4 抗体を含む診断用キット、

40. 抗V L A 4 抗体が上記32 ~ 34のいずれか1つに記載の抗体である、上記39記載の診断用キット、および

41. 急性白血病患者の治療および/または予防薬として有用な化合物をスクリーニングする方法であって、試験化合物の存在下または非存在下でフィブロネクチンまたはその誘導体とV L A 4 またはその誘導体とを接触させて、それらの相互作用を検出し、フィブロネクチンとV L A 4 との相互作用を阻害する試験化合物を特定することを含む、上記方法、

に関する。

本明細書中に用いる場合「V L A 4 アンタゴニスト」という用語は、V L A 4 - フィブロネクチン間相互作用を抑制または阻害する物質を指す。したがって、V L A 4 アンタゴニストは、該相互作用により誘導される細胞内シグナル伝達を遮断または抑制することができる。本明細書におけるV L A 4 アンタゴニストは、あらゆる分子量および構造を有する物質であってよく、すなわち、低分子化合物、核酸およびタンパク質などの高分子物質が含まれる。V L A 4 アンタゴニストは、必ずしも必要ではないが、その作用がフィブロネ

10

20

30

40

50

クチン - V L A 4 間の相互作用に特異性が高いものであることが好ましい。V L A 4 アンタゴニストは、種々のものが公知であり、例えば、T B C 4 2 5 7、C T - 5 2 1 9 および B I O - 1 2 1 1 などが挙げられるが、これらに限定はされない。これらは喘息および / またはアレルギー疾患の治療および / または予防薬として注目されているが、急性白血病に関して報告されているものはない。本発明において好ましい V L A 4 アンタゴニストとしては、抗 V L A 4 抗体が挙げられる。

抗 V L A 4 抗体の作製は当業者であれば容易になし得る。限定する意味ではないが、その代表的な作製法を述べると、免疫原として 4 インテグリン分子もしくは 1 インテグリン分子を含有する組成物またはこれらの分子を細胞膜上に担持している細胞を、場合によっては種々のアジュバントと共に、免疫する動物に適量（通常は 0 . 1 μ g ~ 1 g / 匹程度）を 1 回もしくは複数回投与する（該投与は、皮下、静脈内、腹腔投与などで可能であるがこれらに限定はされない）ことにより抗 V L A 4 抗体が得られる。ポリクローナル抗体の場合は、免疫化した動物から採血し、所望の組成および純度が得られるまで該血液から精製することができる。モノクローナル抗体の場合は、免疫化した動物から脾臓細胞を得、ミエローム細胞などとポリエチレングリコールなどの融合剤を用いて細胞融合してハイブリドーマを得、該ハイブリドーマを培養し、得られた増殖クローンの中から、4 インテグリン分子もしくは 1 インテグリン分子を含有する組成物またはこれらの分子を細胞膜上に担持している細胞を抗原として用いて該抗原に結合する抗体を産生するクローンをスクリーニングすることができる。このようにして得られたハイブリドーマクローンの培養液または該クローンを動物体内に移植して得られる体液（例えば腹水）等からモノクローナル抗体を得ることができる。

これらの抗体作製法に用いる免疫原ならびにスクリーニング用および抗体力価測定用の抗原には、上記 4 インテグリン分子もしくは 1 インテグリン分子を含有する組成物またはこれらの分子を細胞膜上に担持している細胞の他に、4 インテグリン分子もしくは 1 インテグリン分子およびこれらの少なくとも一部分を含む分子、または該分子を細胞膜上に担持している細胞などを用いることができる。これらは生物試料から部分的または完全に単離されたものでもよく、遺伝子工学的手法により得られたものでもよい。この他にも、抗体作製法は種々知られており、本明細書中の記載に限定されることなく、当業者であれば、目的および用途に応じた抗体を作製でき、またその抗体を目的および用途に応じた純度および組成が得られるように精製することもできる。

本明細書中に用いる場合「抗 V L A 4 抗体」という用語は、上記のようなポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体に限定されることなく、V L A 4、または V L A 4 を構成する 4 インテグリン分子もしくは 1 インテグリン分子のいずれかに結合する抗体を意味する。「抗体」という用語は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、ヒト化抗体および抗体ライブラリー由来の抗体、ならびにその (F a b)₂ フラグメントおよび (F a b) フラグメント等を含む抗体分子の可変部を保持しているあらゆる分子を意味する。該分子は、抗体の可変部を保持し、抗原への結合性を有しているものであれば、免疫グロブリンに由来しない分子（アミノ酸鎖、修飾分子などを含む）を含有していてもよい。V L A 4 アンタゴニストとして好ましい抗 V L A 4 抗体の例としては、V L A 4 と F N との相互作用を妨害し得る、抗 V L A 4 モノクローナル抗体およびその可変部を保持しているフラグメントが挙げられるが、これらに限定はされない。本発明に用いる「抗 V L A 4 抗体」は、V L A 5 分子は認識しないような 4 インテグリン分子に由来する抗原決定基を認識するものが好ましい。4 インテグリン分子の細胞外ドメインに存在する抗原決定基を認識するものが特に好ましい。V L A 4 アンタゴニストとして特に好ましい抗 V L A 4 抗体の例としては、マウスハイブリドーマ S G / 7 3 株または S G / 1 7 株が産生する抗 V L A 4 モノクローナル抗体およびその可変部を保持しているフラグメントが挙げられる。抗体をアンタゴニストとしてヒトに投与する場合、ヒト V L A 4 に対するアンタゴニスト作用を有する抗体およびその可変部を保持するフラグメントであって、ヒト体内において異物認識応答を起ささないものが好ましい。従って、一般にヒト化抗体と呼ばれている、キメラ抗体または再構成抗体等が好ましい。キメラ抗体とは、動物由来の抗体の可変部

10

20

30

40

50

を異種動物（この場合はヒト）の定常領域に接合したものであるが、さらに異種動物（この場合はヒト）における抗原性を低減または消滅させるために、上記可変部の抗原結合性を消失しないようにアミノ酸配列を置換することもできる（特開平 7 - 1 9 4 3 8 4、特開平 8 - 2 8 0 3 8 7）。再構成抗体とは、動物抗体由来の相補性決定領域（CDR）部分のみを異種動物（この場合はヒト）由来の抗体に移植して作製された分子である（特開平 1 1 - 4 6 9 4、特開平 1 1 - 2 4 3 9 5 5）。この際、上記可変部または相補性決定領域（CDR）部分はマウスハイブリドーマ SG / 7 3 株または SG / 1 7 株が産生する抗 V L A 4 モノクローナル抗体に由来する可変部の少なくとも一部を含むものであり、該ヒト化抗体は、上記モノクローナル抗体の抗原結合性を維持しているものであることが好ましい。これらのヒト化抗体は、トランスジェニック動物を利用して作製することが可能である。また、この他にも、ファージディスプレイヒト化抗体ライブラリーから V L A 4 分子または 4 インテグリン抗体への結合性を指標にスクリーニングした抗体を用いてもよい。これらの方法は当業者には公知である。

本明細書中に記載の医薬組成物は、抗 V L A 4 抗体またはその他の V L A 4 アンタゴニストの他に、薬学的に許容される担体を含み、必要に応じて増粘剤、安定剤および/または可溶化剤などの添加剤を含有することができる。「薬学的に許容される」という用語は、各国政府の監督当局により承認されているか、または各国の薬局方もしくは一般的に認知されている薬局方に動物、哺乳動物、および特にヒトへの使用に関して列記されていることを指し、当業者は容易に理解できる。本発明の医薬組成物は、様々な適切な経路で投与することができるが、静脈内ならびに連続輸液による非経口投与が望ましい。本発明の医薬組成物を含む製剤は、溶液、懸濁液、エマルジョンをはじめ、様々な用途に適した形態とすることができる。また該組成物は、1回または複数回の用量にて、凍結乾燥粉末またはペレットの形態で、投与の前に該組成物を所望の濃度となるように混合するための注射用の滅菌済みの水、生理的食塩水またはバッファの入ったアンプルと共に提供されることも有り得る。本発明の医薬組成物が含有する V L A 4 アンタゴニストが抗体である場合は、担体には生理的食塩水またはバッファが特に好ましいがこれらに限定はされない。その組成物の製剤は pH が中性付近であることが望ましく、pH 5 . 0 ~ pH 7 . 6 の範囲内であることがさらに好ましい。該組成物中に 1 種以上の他の抗癌剤がさらに含有される場合は、該抗癌剤の抗癌活性を消失させることのない条件で製剤することが望ましい。また、1 種以上の他の抗癌剤を上記組成物とは別個に製剤して、それと上記組成物を含む製剤とを組合わせて含む治療用キットとして提供することもできる。このような条件は、当業者であれば、それぞれの抗癌剤の種に応じて、選択することができる。本明細書における「抗癌剤」とは、種々の癌の治療および/または予防に有効なあらゆる物質、即ち腫瘍細胞の増殖を低減し得るかまたは腫瘍細胞に対して細胞傷害性を示す（その増殖の低減および細胞傷害性の程度は問わない）物質を指す。多種多様な抗癌剤が当業者には公知であり、それらから適宜選択して本発明に使用することができる。抗癌剤の例を少数挙げるならば、シトシンアラビノシド、エトポシド、ダウノルビシン、ミトキサントロン、ドキソルビシン、メソトレキセート、L - アスパラギナーゼ、ピンクリスチン、ビンデシン、6 - メルカプトプリン、アクラシノマイシン、ブレドニゾロン、サイクロフォスファミドおよびデキサメサゾンなどが挙げられるが、これらに限定はされることなく、現在は抗癌剤としては認知されていないが将来的に抗癌剤としての作用が認められる薬剤、将来において新規開発される抗癌剤も、本明細書中の「抗癌剤」に包含される。さらに、現在は抗癌剤としての作用が知られていないかまたは該作用が微弱であり抗癌剤として認知されていない薬剤が、V L A 4 アンタゴニストと併用することにより十分な抗癌剤としての作用を示す可能性もあり、さらに、V L A 4 アンタゴニストと併用することを前提に新規抗癌剤を開発することにより、V L A 4 アンタゴニストとの併用によってのみ抗癌剤としての作用を示す薬剤が得られる可能性もある。このような薬剤もまた、本明細書中の「抗癌剤」に包含される。また、さらに、S T I 5 7 1 および抗 C D 3 3 抗体をはじめあらゆる分子標的薬剤と呼ばれる薬剤ならびにオールトランスレチノイン酸および抗 C D 4 4 抗体をはじめとする分化誘導療法剤と呼ばれる薬剤も本明細書中においては「抗癌剤」という用

10

20

30

40

50

語に包含されることとする。即ち、1種以上の分子標的薬剤および/または分化誘導療法剤を他の抗癌剤(上記に列挙したもの等)を本発明のVLA4アンタゴニストと併用することもでき、さらには他の抗癌剤と共にVLA4アンタゴニストと併用することも可能である。また、1種以上の分子標的薬剤および/または分化誘導療法剤をVLA4アンタゴニストとともに医薬組成物中に含有させることができる。分子標的薬剤および分化誘導療法剤を包含するあらゆる抗癌剤は、その投与においては、抗癌剤それぞれに応じた用量、投与頻度は、患者の症状および状態に応じて、医療従事者の通常の知識で決定され得る。複数の抗癌剤を使用する場合も同様である。

本発明の組成物の治療に有効な量は、標準的な臨床技術により医療従事者により判断することができる。例えば、1種以上の他の抗癌剤と併用する場合は、通常、体重1kg当たり0.1~1000mgの抗VLA4抗体を、週に3~7回の抗癌剤の投与に合わせて投与するとよい。さらに、*in vitro*または*in vivo*アッセイを随意に利用して、最適用量範囲の特定に役立てることができる。用いる厳密な用量はまた、投与経路および疾患の重篤度にも依存し、実施者の判断および各患者の症状に応じて決定すべきである。本発明の組成物を1種以上の他の抗癌剤と併用して投与する場合は、別個の経路で別個にそれぞれを投与するか、同じ経路で別個に投与するか、または同じ経路で同時に投与するとよい。これらの適切な投与方法は、医療従事者の通常の知識、ならびにモデル動物を用いた試験等により決定することができる。本明細書中に用いる場合「他の抗癌剤投与と併用して投与する」とは、VLA4アンタゴニストまたはこれを含有する医薬組成物を、VLA4アンタゴニスト以外の抗癌剤の投与と同時に単一の経路で投与すること、あるいは24時間以下の任意の時間的間隔を開けておよび/または同一もしくは異なる経路で投与することを意味する。時間的間隔を開けて上記アンタゴニストまたは医薬組成物と抗癌剤を投与する場合、いずれを先に投与してもよいが、上記アンタゴニストまたは医薬組成物を先に投与することが好ましい。

本明細書中に用いる場合「治療」という用語は、AML等の疾患の症状(患者によって認識され得るか否かを問わない)の消失、低減または該疾患の進行の遅延をもたらすための行為を指す。本明細書中に用いる場合「患者」という用語は、あらゆる哺乳動物、好ましくはヒトを指す。

本明細書中に用いる場合、「化学療法」とは、抗癌剤を適切な用量および経路にて投与することによる急性白血病の治療方法を指す。

本明細書中に用いる場合、「化学療法への応答性」とは患者の化学療法による治療効果を指す。「化学療法に対する応答性が高い」という場合、化学療法に対する治療効果が高いことが期待される。さらに、本明細書中に用いる場合、「患者の予後を診断する」とは、完全寛解率、再発率、生存率、無病生存率などを含む患者の予後について予測または評価することを指す。

本明細書中に用いる「発現率」という用語は、試験した細胞集団中で対象とする分子を発現している細胞の占める比率をいう。すなわち、上記の態様における「急性白血病細胞におけるVLA4の発現率」という用語は、患者または被検体から採取した血液または骨髓液に含まれる急性白血病細胞のうち、VLA4を発現している細胞の比率を指す。急性白血病細胞におけるVLA4の発現率の測定は、抗VLA4抗体または抗4インテグリン抗体を用いて免疫化学的手法により実施することができる。用いる抗体は、モノクローナル抗体がさらに好ましく、マウスハイブリドーマSG/73株またはSG/17株により産生される抗VLA4モノクローナル抗体が特に好ましい。例えば、上記抗体と結合する細胞を定量的に検出するための手法は様々なものがあるが、当業者には公知である。例えば、上記抗体を標識(蛍光標識、放射性標識、化学発光標識)を付した二次抗体にさらに結合させることによる検出も可能である。検出には、通常のELISA法およびフローサイトメトリー法などを用いるとよいが、これらの方法に限定はされない。あるいは、所定の数の急性白血病細胞中の4mRNA量を定量的に検出することによりVLA4の発現率を測定することもできる。該mRNAの定量的検出は、RT-PCR法、*in situ*ハイブリダイゼーション法またはノーザンブロット法などがある。いずれの方法も当

10

20

30

40

50

業者には公知である。後述する実施例 4 において実証されるように、上記のように測定した急性白血球細胞における V L A 4 の発現率と患者の化学療法に対する応答性、完全寛解率、再発率、生存率、無病生存率等を含む予後の間には明確に相関がある。このことより、急性白血病患者の急性白血球細胞における V L A 4 の発現率の測定は、急性白血病患者の診断法として化学療法に対する応答性および予後に対する診断方法となり得る。

さらに、本発明は、急性白血病患者の治療および/または予防薬として有用な化合物をスクリーニングする方法をも提供する。該方法においては、試験化合物の存在下もしくは非存在下でフィブロネクチンと V L A 4 とを接触させてフィブロネクチンと V L A 4 との相互作用を検出し、該相互作用を阻害する試験化合物を特定することを含む。該方法に用いる V L A 4 は部分的もしくは完全に単離または精製されたものを用いてもよく、また細胞表面に V L A 4 を発現している細胞を用いてもよい。このような細胞は天然のものでも遺伝子工学的に作製したものでもよい。さらに、V L A 4 の細胞外ドメインまたはフィブロネクチン結合部位を含む V L A 4 の誘導体を用いてもよく、場合によっては他の化合物(アミノ酸鎖または修飾物)を含んでいてもよい。フィブロネクチンも、V L A 4 結合部位を含むフィブロネクチン誘導体を用いることができ、場合によっては他の化合物(アミノ酸鎖または修飾物)を含んでいてもよい。フィブロネクチンと V L A 4 との相互作用は、様々な公知の方法を用いて検出することができる。蛍光、化学発光、放射性標識もしくは抗原性ペプチド等の任意の標識物を利用することにより、検出は容易になり得る。フィブロネクチンまたは V L A 4 もしくはそれらの誘導体を任意の固相プレートまたはビーズ等の固相担体の表面をフィブロネクチンでコートしたものをを用いてもよい。細胞表面に V L A 4 を発現している細胞を用いる系の場合、上記固相担体上に接着する細胞を顕微鏡下で観察し、その数量またはその形態によりフィブロネクチンと V L A 4 との相互作用の程度を評価することもできる。さらには、V L A 4 または V L A 4 を細胞表面に発現している細胞を蛍光、化学発光、放射性標識もしくは抗原性ペプチド等の任意の標識物で標識し、フィブロネクチンへの結合および/または接着をその標識を指標に評価することもできる。この他にも、当業者であれば様々な手法で容易に達成し得る。

発明を実施するための最良の形態

実施例 1 : 樹立細胞株における細胞接着依存性抗癌剤耐性に関する検討

(1) 樹立細胞株における V L A 4 および V L A 5 の発現の検討

急性白血球モデル細胞として、急性骨髄性白血病 (A M L) 由来細胞株 U 9 3 7 と急性前骨髄球性白血病細胞 (A P L) 由来細胞株 H L 6 0 を用いた。まず、これらの 4 インテグリン、 5 インテグリン及び 1 インテグリンの発現をフローサイトメトリー法を用いて測定した。U 9 3 7 と H L 6 0 は、American Type Culture Collection (Rockville , Maryland) から入手した。これらの培養は、加熱により非働化したウシ胎仔血清 (F C S ; G I B C O - B R L , Grand Island , NY) を 1 0 % 、 L - グルタミンを 1 % 、ペニシリンおよびストレプトマイシン (それぞれ 1 0 0 U / m l) を添加した R P M I 1 6 4 0 培地中で、培養条件は 3 7 ° C 、 5 % C O 2 環境下にて行った。抗 1 インテグリンモノクローナル抗体 (A 1 A 5 ; Sigma Chemical , St Louis , MO) 、マウスハイブリドーマ S G / 7 3 株より産生される V L A 4 の 4 インテグリン分子に結合する抗 V L A 4 モノクローナル抗体 S G / 7 3 または V L A 5 の 5 インテグリン分子に結合する抗 V L A 5 モノクローナル抗体 K H / 7 2 を一次抗体として 1×10^6 個の上記 2 種の細胞それぞれと共にインキュベートした後、F I T C 標識ヤギ由来抗ラット I g G 抗体およびを反応させた。F I T C で標識された細胞を F A C S c a n (B e c t o n D i c k i n s o n I m m u n o c y t o m e t r y S y s t e m s , S a n J o s e , C A) を用いてフローサイトメトリー解析に供した。

U 9 3 7 では、V L A 4 が 9 5 . 9 % 、 V L A 5 が 9 5 . 4 % 、 1 インテグリンが 9 4 . 6 % の細胞に検出され、V L A 4 (4 1 インテグリン) および V L A 5 (5 1 インテグリン) とともに陽性であったのに対して、H L 6 0 では、V L A 4 が 9 8 . 8 % 、 V L A 5 が 0 . 8 % 、 1 が 9 6 . 0 % の細胞に検出され、V L A 4 のみを発現し、V L

A 5は発現していないことが判明した(データは示していない)。即ち、V L A 4とV L A 5のうち、U 9 3 7およびH L 6 0細胞の両方に発現しているのは、V L A 4のみであることがわかった。

(2) F N - コートプレート上で培養すると、急性白血病モデル樹立細胞株は抗癌剤による細胞傷害を回避する

U 9 3 7とH L 6 0に対する抗癌剤(D N RまたはA r a C)の細胞傷害作用に与える骨髄ストローマ細胞の細胞外マトリックス構成成分であるF NおよびV C A M 1の影響を検討した。まず最初に、U 9 3 7(図1、a、c)、H L 6 0(図1、b、d)を抗癌剤の非存在下で24時間培養した場合、F N - コートプレート、V C A M 1コートプレートまたはウシ血清アルブミン(B S A)コートプレートのそれぞれで培養した場合の生細胞率は、何れも90%以上であり、有意差を認めなかった(図1)。

10

上記と同様の培養条件で、D N RまたはA r a Cを0~500 μ g/mlの濃度でさらに加えて培養すると、抗癌剤非存在下に比べて、両細胞とも、3種類のプレートのいずれで培養した場合でも、D N RまたはA r a Cのいずれに対しても、抗癌剤の濃度依存的に生細胞率が低下したが、F N - コートプレートを用いた場合、B S A - コートプレートまたはV C A M 1 - コートプレートを用いた場合に比べて、試験した抗癌剤の濃度全域に渡って、一貫して生細胞率は有意に高値を示した。V C A M 1 - コートプレートを用いた場合の生細胞率は、B S A - コートプレートを用いた場合に比べて、いずれの抗癌剤でも、試験した抗癌剤の濃度全域に渡って、有意差が認められなかった(図1)。

臨床的にA M L患者にD N RとA r a Cを常用量で単回投与した時のそれらの血中濃度に近似するD N R 0.5 μ g/mlとA r a C 10⁻⁶Mの濃度で、F N - コートプレートを用いた場合のU 9 3 7およびH L 6 0の生存率と、B S A - コートプレートを用いた場合の生細胞率との差は最大となった。生細胞率50%を示す抗癌剤の濃度(L D 50)を見ると、いずれの抗癌剤においても、F N - コートプレートを用いた場合、B S A - コートプレートを用いた場合に比べてL D 50値が約10倍の値を示した。

20

以上の結果から、A M L細胞はV L A 4またはV L A 5 - F N間相互作用を介した細胞接着に依存して薬剤耐性を獲得し得ることが推測される。

次に α 1インテグリン - F N間相互作用依存性の薬剤耐性の存在の確認とその機序を解析することとした。

なお、後述する実験においては、上記の理由よりD N Rは0.5 μ g/ml、A r a Cは10⁻⁶Mの濃度で用いることとした。

30

(3) F N - コートプレート上で培養した急性白血病モデル樹立細胞株は、抗癌剤による細胞傷害およびアポトーシスを回避するが、V L A 4アンタゴニストである抗V L A 4抗体はこのF Nに起因するアポトーシスを回避を解除する

上述のように、U 9 3 7およびH L 6 0の両細胞株において、F N - コートプレートでは、抗癌剤存在下においても生細胞率が高く維持され、急性白血病細胞に対する抗癌剤による細胞傷害に対するF N介在性の防御作用が存在することが示唆された。そこで次に、V L A 4アンタゴニストである抗V L A 4モノクローナル抗体の該防御作用に対する影響を調べた。抗 α 4インテグリンモノクローナル抗体であるS G / 7 3は、V L A 4分子の α 4インテグリン分子に結合することによりV L A 4に対してアンタゴニストとして作用することを、本発明者らは予備的な実験により確認した(データは示していない)。その結果、V L A 4アンタゴニストである上記抗V L A 4モノクローナル抗体を抗癌剤を含有する培地中にさらに添加した場合、F N - コートプレートでの培養における生細胞率が、B S A - コートプレートでの培養におけるものとほぼ同程度となった(図2 aおよびb)。即ち、急性白血病細胞に対する抗癌剤による細胞傷害からのF Nが介在する防御作用は、抗V L A 4モノクローナル抗体(V L A 4 A b)の添加により解除された。コントロール抗体またはV L A 5のアンタゴニストである抗V L A 5モノクローナル抗体(V L A 5 A b)には、抗V L A 4抗体で見られるような作用は認められなかった。以上の結果より、U 9 3 7とH L 6 0はともにV L A 4を介したF Nへの接着により、D N RまたはA r a Cによる細胞死(即ち細胞傷害)から回避するという事実が判明した。

40

50

DNRおよびAracは双方とも、急性白血病細胞に対してアポトーシスを惹起することが良く知られている[19-21]。従って、上記の急性白血病モデル細胞株の細胞死がアポトーシスによるものか否かを確認するために、アポトーシス性細胞の表面に発現されることが知られているアネキシンVの発現をMEBYO-アポトーシスキット(MBL, 名古屋、日本)を用いて検討した。具体的には、抗癌剤の存在下で培養した後の上記AML細胞株(2×10^5)をFITC標識抗アネキシンV抗体で染色した後に、フローサイトメトリーを用いて解析した。FITC標識抗アネキシンV抗体を添加しない同一のサンプルを陰性コントロールとし、該陰性コントロールよりも強い蛍光を発現している細胞をアネキシンV陽性細胞と判定してその存在比を算定した。

図2bおよびdに示したように、両細胞株において、抗癌剤非存在下で24時間培養した後では、FN-コートプレートを用いた場合はBSA-コートプレートを用いた場合と比べて、アネキシンV陽性細胞(アポトーシス性細胞)の全細胞に対する存在比は有意に低値を示した。抗癌剤の存在下においても、前記いずれのプレートで培養した場合も共に、抗癌剤非存在下に比べてアポトーシス性細胞の存在比の上昇が認められたが、FN-コートプレートの培養ではBSA-コートプレートでの培養に比べてアポトーシス性細胞の割合が有意に低かった。また、いずれの培養条件の場合でも、アポトーシス性細胞の割合は生細胞率と相反する傾向を示した。即ち、抗癌剤DNRまたはAracによって、U937とHL60はアポトーシスを起こし、該アポトーシスはFNによって回避され得ることが確認された。また、このFNによるアポトーシスの回避は、VLA4Abの添加により解除されたが、コントロール抗体またはVLA5アンタゴニストである抗VLA5モノクローナル抗体では上記解除は認められなかった。

つまり、上記急性白血病モデル樹立細胞株であるU937およびHL60を用いた試験結果より、急性白血病細胞は、FN-VLA4間相互作用により、DNRまたはAracにより誘導されるアポトーシスから回避することが示唆された。

(4) 急性白血病モデル樹立細胞株における、FN-VLA4間相互作用により、抗癌剤が誘導するカスパーゼ3および9の活性化ならびにBc1-2のダウンレギュレーションが阻害される

DNRまたはAracによって急性白血病細胞がアポトーシスを起こす際にはカスパーゼ3およびカスパーゼ9などのカスパーゼが活性化されることは周知の事実である[19-21]。そこで、FN-VLA4間相互作用が、急性白血病モデル樹立細胞株であるU937およびHL60のDNRまたはAracによるカスパーゼの活性化に与える影響を検討した。

カスパーゼ3活性の測定には、PhiPhiLux-G1D2キット(MBL, 名古屋, 日本)を用いて、フローサイトメトリー法にて測定した。 5×10^5 個のU937細胞をDNRまたはArac(それぞれ、 $0.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ および 10^{-6}M)と共にインキュベートしたのち、細胞を回収してPBSにて洗浄後、カスパーゼ3基質溶液($10 \mu\text{M}$)を $75 \mu\text{L}$ 添加して、37°Cで5%CO₂環境下で1時間インキュベートした。その後、細胞の蛍光強度を、FACSscanで解析した。カスパーゼ3基質溶液を添加していない同一のサンプルを、陰性コントロールとし、該陰性コントロールよりも強い蛍光を発する細胞をカスパーゼ3陽性細胞として測定した。

一方、カスパーゼ9の活性は、カスパーゼ9/Mch6プロテアーゼ比色アッセイキット(MBL)を利用し、分光光度計を用いて測定した。簡単に述べると、 2×10^6 個の細胞を上記抗癌剤を添加または無添加でインキュベート後、細胞を回収してPBSにて洗浄し、[22]に記載の方法に従って細胞を溶解させた。遠心により残渣を除去し、タンパク質量を定量して、細胞溶解液中のタンパク質の濃度が、 $4 \mu\text{g}/\text{mL}$ になるように調製した。カスパーゼ9の基質ペプチド(Leu-Glu-Asp-p-ニトロアニリド(LEHD-pNA)(4mM)を $5 \mu\text{l}$ 添加したプロテアーゼアッセイは、反応バッファー(200mM EPES, pH 7.5, 40% v/v グリセロール、 10mM ジチオトレイトール、および 1.0mM EDTA) 50mL 中で行った。サンプルを37°Cで1時間インキュベートし、酵素触媒性のp-ニトロアニリドの遊離を 405nm での吸

光度を分光光度計にて測定することにより、酵素活性を定量した。

いずれの抗癌剤を用いた場合でもカスパーゼ3およびカスパーゼ9の活性は上昇したが、FN-コートプレートを用いた場合はBSA-コートプレートを用いた場合に比べてカスパーゼ3とカスパーゼ9の活性は低かった。

抗VLA4抗体をFN-コートプレートの細胞にさらに添加することにより、カスパーゼ3およびカスパーゼ9の活性がBSA-コートプレートと同様のレベルまで回復し、抗VLA4抗体によりFNの作用が遮断された(DNRについてのデータは図3aおよびbに示し、Aracについてのデータを図4aおよびbに示している)。HL60についても、U937における上記結果と同様の結果が得られた(データは示していない)。

U937とHL60の2種の樹立細胞株ともに、VLA4を介したFNへの接着によりカスパーゼ9およびカスパーゼ3の活性化が抑制されることから、AML細胞において、FN-VLA4間相互作用による細胞接着が抗癌剤によるアポトーシスを回避させ得るということがさらに明確に示唆された。

次に、VLA4とFNとの相互作用でAML細胞が抗癌剤によるアポトーシスから免れる機序について試験する目的で、上記と同様の条件下における急性白血病モデル樹立細胞株での、アポトーシス抑制タンパク質であることが公知であるBc1-2の発現量をFITC標識化抗ヒトBc1-2抗体(Pharmingen, San Diego, CA)を用いてフローサイトメトリー法にて検討した。図3cにU937を用いた実験結果を示す。抗癌剤非存在下において、FNによる細胞接着によりU937のBc1-2発現が亢進した。抗癌剤の存在下では非存在下に比べてBc1-2の発現が低下した。FN-コートプレートを用いた場合は、BSA-コートプレートを用いた場合に比べてBc1-2の発現低下の程度は小さかった。さらに抗VLA4抗体を添加することにより、このFN-コートプレートにおけるBc1-2発現量はBSA-コートプレートと同程度になった。

さらに、HL60においても、U937における上記結果と同様の結果が得られた(データは示していない)。

つまり、急性白血病モデル樹立細胞株において、FN-VLA4間相互作用によりBc1-2の発現が亢進されること、および抗癌剤によるBc1-2発現の低下をFN-VLA4間相互作用により抑制されることが判明し、これがFN-VLA4間相互作用が抗癌剤により誘導されるアポトーシスから回避させ得る機序として関与していることが強く示唆された。

以上の急性白血病モデル樹立細胞株HL60およびU937を用いた試験の結果から、FNを介する細胞接着が急性白血病細胞のアポトーシスの回避に関与し、抗癌剤による急性白血病細胞のアポトーシス誘導は、FNを介する細胞接着により低減されることが示唆された。そして、VLA4アンタゴニストである抗VLA4抗体は、FN-VLA4間相互作用を介する上記の作用を顕著に阻害したが、VLA5アンタゴニストである抗VLA5抗体では該阻害効果は認められなかったことから、抗癌剤に誘導される急性白血病細胞のアポトーシスの回避はFN-VLA4間相互作用に依存しており、VLA4と同じくFNの受容体であるVLA5は関与していないことが示唆された。

このことより、VLA4アンタゴニストによりFN-VLA4間相互作用を遮断することが急性白血病患者の化学療法に対する応答性を向上させ、該疾患の治療において有効であると考えられる。

実施例2：急性白血病患者由来白血病細胞における細胞接着依存性抗癌剤耐性の解析

(1) FN-VLA4間相互作用による細胞接着依存性抗癌剤耐性の解析

前述のAML細胞株を用いた検討でVLA4-FN相互作用が抗癌剤耐性に寄与するということが(本明細書中では、この現象を「細胞接着依存性抗癌剤耐性」と呼ぶ)が判明したため、札幌医科大学(札幌市、日本)の第4内科で診断を受けた初発性AML患者の中から無作為に抽出した30人の初発性AML患者について、その急性白血病細胞におけるVLA4の発現量に基づいて解析した。該患者は、全例65歳未満(平均年齢45.5歳)であった。性別は男性14例、女性16例であり、FAB分類ではM0 1例、M1 6例、M2 7例、M3 5例、M4 7例、M5a 4例であった。パフォーマンス状態

は0 - 2と比較的良好であり、白血球数と急性白血病細胞のミエロペルオキシダーゼの陽性率は、症例間でばらつきが認められた。急性白血病細胞の核型は、正常二倍体が17例、inv(16)が4例、t(15;17)が5例、t(8;21)が2例、del(11)(q14q23)が1例、add(20)(q13.3)が1例であった。

化学療法を行う前の該患者より採取した血液から、Ficoll-Hypaque (Pharmacia Biotech, Sweden)を用いた密度勾配遠心分離により、急性白血病細胞以外の細胞を実質的に含まない単核細胞画分を単離した。該分画方法は当業者には公知である。フローサイトメトリー法では、PE標識CD45抗体(Coulter, HiLeath, FL)を用いてCD45発現を測定し、CD45発現の低い細胞集団にゲートを絞る(芽球細胞ゲート法[23]参照のこと)、該ゲート内の細胞10,000個について解析を行った。急性白血病芽球細胞は有核骨髄細胞のうち平均で約93%を占めていた。1インテグリンとヘテロダイマーを形成してVLA4を構成する4インテグリンの抗4インテグリン抗体および標識2次抗体を用いてフローサイトメトリーにて解析し、その4インテグリン発現白血球細胞の比率を測定し、VLA4の発現率とDNRおよびAracによる患者由来新鮮白血病細胞の細胞傷害の程度との間に関連があるか否かを、30名のAML患者由来新鮮白血病細胞を用いて検討した。その結果、FN-コートプレートを用いた場合には、AML細胞のVLA4発現率とDNR(図5a)およびArac(図5b)で処理後の生細胞率との間には、正の相関があることが明らかとなった。図5a, bに示した結果から、FN-コートプレートで培養した時の生細胞率がBSA-コートプレートで培養した時のそれに比べて高値を示した場合をVLA4陽性と定義することにしたところ、そのVLA4発現率の境界は30%であった。その結果、M0 1症例、M1 2症例、M2 3症例、M4 2症例、M5a 2症例の合計10症例(33%)はVLA4陰性群に分類され、M1 4症例、M2 4症例、M3 5症例・M4 5症例、M5a 2症例の合計20症例(67%)はVLA4陽性群に分類された。

VLA4陽性であった20症例のうち最初入院した患者#3由来のAML細胞(4インテグリン発現率87.8%、1インテグリン発現率87.2%であった)を用いて、上記実施例と同様の実験を行った結果を図4に示す。急性白血病モデル樹立細胞株(これらがVLA4陽性であることは前述した)における結果と同様、FN-コートプレート上で培養した場合、BSA-コートプレート上で培養したものと比較して、抗癌剤による細胞死が抑制され、カスパーゼ3およびカスパーゼ9の誘導が抑制され、Bcl-2発現が亢進していた(図4a~e)。これらのデータは、他の19名のVLA4陽性患者由来の細胞においても同様であった(データは示していない)。以上のことより、FN-VLA4間相互作用により、患者新鮮AML細胞でも抗癌剤誘導性アポトーシスが抑制されること、即ち細胞接着依存性抗癌剤耐性が示唆された。また、抗VLA4抗体の添加により、FNによる抗癌剤誘導性アポトーシスの抑制作用が阻害されたが、抗VLA5抗体ではこの阻害効果が認められなかったことも、樹立細胞株における結果と一致していた。

上記患者#3以外の19名のVLA4陽性患者由来の細胞においても例外なく、患者#3由来の細胞における上記データと同様に細胞接着依存性抗癌剤耐性が認められたのに対して、10名のVLA4陰性患者由来の細胞では、例外なく細胞接着依存性抗癌剤耐性を認めなかった(データは示していない)。したがって、2種類の上記樹立細胞株と同様に、患者由来の新鮮急性白血病細胞でも、FN-VLA4間相互作用が細胞接着依存性抗癌剤耐性に関与しているという事実が裏付けられ、VLA4アンタゴニストである抗VLA4抗体が細胞接着依存性抗癌剤耐性を阻害し、該細胞の抗癌剤に対する感受性を回復させた。

(2) 細胞接着依存性抗癌剤耐性の機序についてのさらなる解析

FN-VLA4間相互作用による細胞接着依存性抗癌剤耐性の機序をさらに解明すべく、以下の検討を行った。

MDR-1(P-グリコプロテイン)は、ドキソルビシンおよびダウノルビシンなどの薬剤の細胞内からの排除に関与する薬物輸送タンパク質であることが知られている。上記実

10

20

30

40

50

施例で用いた患者由来急性白血病細胞における、該タンパク質の発現を F I T C 標識抗 M D R - 1 モノクローナル抗体 (P h a r m i n g e n , S a n D i e g o , C A) を用いてフローサイトメトリー法により解析した。試験した全ての患者由来急性白血病細胞で陰性であり、F N - コートプレート上で培養した場合でも、その発現は変化しなかった。このことから、F N を介した抗癌剤耐性が、抗癌剤の細胞外排除が亢進された結果ではないと考えられる。

さらに、カスパーゼ 3、カスパーゼ 9 および B c 1 - 2 以外のアポトーシスに關与するタンパク質の発現についても検討した。アポトーシス誘導性受容体タンパク質である F a s (A P O - 1 または C D 9 5 と呼ばれる) の発現についても F I T C 標識抗 F a s モノクローナル抗体 (M B L) を用いたフローサイトメトリー法にて調べたところ、U 9 3 7、H L 6 0、および 2 8 症例の新鮮急性白血病細胞の何れの細胞でも例外なく抗癌剤の暴露による発現の変化を認めなかった (データは示していない)。癌抑制遺伝子産物であり、アポトーシスに対して抑制的に作用することが知られている p 5 3 の発現についても調べた。U 9 3 7、H L 6 0 の 2 種類の細胞株は p 5 3 を発現していないため、患者由来の新鮮急性白血病細胞についてのみ、その p 5 3 の発現の動向について p 5 3 p a n E L I S A キット (R o c h e M o l e c u l a r B i o c h e m i c a l s , M a n h e i m , G e r m a n y) を用いて E L I S A 法を用いて検討した。その結果、抗癌剤の暴露により試験した 2 5 症例の何れの新鮮急性白血病細胞でも p 5 3 の発現は増強したが、F N - コートプレートを用いた場合と B S A - コートプレートを用いた場合で、その増強の程度に有意な差を認めなかった (データは示していない)。

このことから、A M L 細胞の F a s は上記抗癌剤により誘導されるアポトーシスには關与しておらず、また、p 5 3 は上記アポトーシスには關与しているものの、A M L 細胞の細胞接着依存性抗癌剤耐性には關与していないと推察される。

以上の患者由来急性白血病細胞についての検討の結果をまとめると、患者由来急性白血病細胞においても、急性白血病モデル樹立細胞株と同様、F N - V L A 4 間相互作用により、抗癌剤誘導性アポトーシスが抑制され、さらに V L A 4 アンタゴニストである抗 V L A 4 抗体により F N - V L A 4 間相互作用によるアポトーシス抑制効果が解除された。また、該アポトーシスには、カスパーゼ 3、カスパーゼ 9 および B c 1 - 2 を介する経路が關与しているが、該経路は F N により不活化され得るということがわかった。この結果から、F N - V L A 4 間相互作用は、急性白血病疾患において注目されるべき作用であり、その予後および治療の改善のための標的となり得る。さらに、V L A 4 アンタゴニストは急性白血病の治療薬としての用途もまた注目されるべきである。

(3) 患者由来新鮮急性白血病細胞における V L A 4 発現率と細胞接着依存性薬物耐性と の相関

V L A 4 の発現率と細胞接着依存性薬物耐性の程度との間に關連があるか否かを検討した。図 5 に前述 3 0 名の A M L 患者由来新鮮急性白血病細胞の 4 インテグリンの陽性率と、F N 存在下における抗癌剤による細胞傷害性との關係を示す。A M L 細胞の 4 インテグリンの発現率と D N R (図 5 a) および A r a C (図 5 b) で処理した後の細胞の生存率との間には、正の相関が存在することが明らかになった。

このことから、F N - V L A 4 間相互作用が急性白血病細胞の抗癌剤に対する耐性を誘導し、該相互作用が急性白血病細胞の細胞生存維持に寄与することがさらに示唆された。

実施例 3 : マウスに移植した急性白血病モデル細胞を用いた i n v i v o における細胞接着依存性抗癌剤耐性の検討

(1) U 9 3 7 移植 A M L モデルマウスにおける U 9 3 7 細胞の組織分布の解析

次に我々は実際に骨髓において急性白血病細胞が V L A 4 を介した機序で抗癌剤による細胞傷害から回避することを確かめるために、U 9 3 7 を S C I D マウスに移植して作製した A M L モデルマウスを用いて、i n v i v o の試験を実施した。

A M L モデルマウスは全身放射線照射 (4 G y) を施した S C I D マウスに尾静脈から U 9 3 7 (5×10^6) を注射して移植して作製した。該マウスは、約 3 週間で、肢部の麻痺などの急性白血病の症状を呈した。なお、以下に提示する i n v i v o 試験のデータ

は全て、一群10ずつのマウスを使用して得られたものである。

抗ヒトCD45モノクローナル抗体を用いたフローサイトメトリー法および免疫組織学的染色法を用いて試験したところ、移植後7日目のマウスでは、末梢血、骨髄および脾臓のいずれにおいてもU937は検出されなかった(データは示していない)。そこで、さらに高検出感度を示す方法として、U937の浸潤をヒトALU配列をポリメラーゼ連鎖反応(PCR)法による増幅させることにより検出した。その際のプライマーとしては、ALU-5(5' C A C C T G T A A T C C C A G C A G T T T 3' : 配列番号1)およびALU-3(5' C G C G A T C T C G G C T C A C T G C A 3' : 配列番号2)を用いた。PCR反応の条件は、94 1分(変性)、55 45秒(アニーリング)および72 1分(伸長)で21サイクルとした。得られた反応生成物を3%アガロースゲル上で電気泳動に供し、エチジウムブロマイドで染色することにより可視的に検出した。その結果、移植後7日目のマウスにおいてU937が骨髄にのみ存在していた(図6b-1)。これらの結果から、移植後7日目のマウスは、骨髄の微小残存病変(MRD)のモデルとなり得ることが明らかとなった。

一方、移植後14日目のマウスでは、U937細胞は末梢血と脾臓ではフローサイトメトリー法では検出されなかったが、骨髄においては単核細胞の約20%を占めていた。免疫組織学的染色法でも同様に、末梢血と脾臓ではU937細胞は検出されず、骨髄においてU937細胞の浸潤が確認された(データは示していない)。移植後14日目のマウスにおいて、U937の浸潤をヒトALU配列をポリメラーゼ連鎖反応(PCR)法による増幅させることにより検出したところ、試験した全ての臓器(骨髄、末梢血、大脳、肺、心臓、胸腺、肝臓、脾臓、腎臓および卵巣)においてU937の浸潤が確認された(図6b-2)。

(2) 抗VLA4抗体がU937細胞を骨髄から末梢血に動員する

次いで、抗VLA4抗体が骨髄に存在するU937を末梢血中へ動員させ得るか否かについて検討した。移植後14日目のマウスに抗VLA4抗体SG/17(SG/17株より産生される)(1mg)を腹腔投与後3時間および12時間の時点で、骨髄および末梢血中のU937細胞数をフローサイトメトリーを用いて測定した。SG/17抗体は、SG/73と同様、VLA4分子の4インテグリン分子に結合することによりVLA4に対してアンタゴニストとして作用することを、本発明者らは予備的な実験により確認した(データは示していない)。

骨髄および末梢血中のU937細胞数はコントロールとして用いたアイソタイプ抗体(IgG2a)およびビヒクルのみの投与では、ほとんど変化しなかった。抗VLA4抗体を投与すると、投与後3時間および12時間のそれぞれの点において、投与前に比べて、骨髄中のU937細胞数はそれぞれ52±16%および62±7%に減少し、末梢血中のU937細胞数はそれぞれ760±97%、590±75%に増加していた(データは示していない)。

以上の結果から、抗VLA4抗体は骨髄から末梢血中へとU937細胞を動員する作用を有することが明らかとなった。即ち、抗VLA4抗体により、骨髄におけるAML細胞のFN-VLA4間相互作用を介した細胞接着が阻害され、AML細胞が骨髄に留まることができず、末梢血に移動すると考えられ、AML細胞の骨髄への細胞接着は、FN-VLA4間相互作用に依存していることが示唆される。

(3) 抗VLA4モノクローナル抗体が、AMLモデルマウスの化学療法の治療効果を助長し得る

VLA4アンタゴニストと化学療法の併用が、化学療法単独に比べて、AMLモデルマウスの生存期間を延長することが可能か否かについて検討した。

上記移植後7日目のマウス(MRDのモデルマウス)を用いて抗VLA4抗体SG/17株と抗癌剤とを併用して投与した実験結果を図6aに示す。ビヒクルと生理的食塩水の併用、コントロール抗体と生理的食塩水の併用、抗VLA4抗体と生理的食塩水、ビヒクルと生理的食塩水に溶かしたArac(20mg)、およびコントロール抗体と生理的食塩水に溶かしたArac(20mg)のそれぞれを同時に静脈投与し、各実験群のマウ

10

20

30

40

50

スの平均生存期間を測定したところ、それぞれ26日、26日、27日、37日および38日であった。したがって、Ara-C投与による上記モデルマウスの生存期間が有意に延長された。そこで、抗VLA4抗体(1mg)をAra-Cを同時に静脈投与すると、Ara-C単独投与に比べて有意に生存期間が延長され、抗VLA4抗体とAra-Cを投与した群では投与後62日目の時点でも全マウスが生存していた。

即ち、抗VLA4抗体は、Ara-Cとの併用投与により、Ara-Cの効果を助長させ、AMLマウスの生存期間を有意に延長させた。このことから、VLA4アンタゴニストである抗VLA4抗体は、化学療法と併用するための非常に有効な急性白血病治療薬としての用途が示唆される。

さらに、移植後7日目のマウスに対して、抗VLA4抗体SG/17株をAra-Cと併用することにより、骨髄のMRDを根絶し得るか否かを検討した。即ち、移植後7日目のマウスに抗VLA4抗体とAra-Cとを併用投与またはAra-Cを単独投与し、24時間後の骨髄におけるU937の浸潤の有無をヒトALU配列のPCRを用いて検討した。PCRは前述の通り実施した。その結果、抗VLA4抗体とAra-Cの併用投与で治療されたマウスの骨髄ではU937は消失していた(図6b-3)。一方のコントロール抗体とAra-Cとの併用投与マウスでは、骨髄にU937が残存していた(図6b-4)。また、上記投与後62日目においても、ヒトALU配列DNAは検出されず、U937細胞は存在していなかった。

一方、抗VLA4抗体を単独で、コントロール抗体を単独で、またはコントロール抗体とAra-Cとを併用して投与されたマウスが後肢麻痺を起こした時点においては、いずれの実験群の全マウスにおいて例外なく、試験した全ての臓器(骨髄、末梢血、大脳、肺、心臓、胸腺、肝臓、脾臓、腎臓および卵巣)においてヒトALU配列DNAが検出され、U937が存在していることが確認された(データは示していない)。

以上のことから、MRDを有するVLA4陽性のAML症例においては抗VLA4抗体を化学療法に併用投与する事でMRDが根絶され、その予後が改善する可能性が示唆される。

実施例4：患者の急性白血病細胞におけるVLA4発現量と化学療法に対する応答性、完全寛解率、再発率、生存率、無病生存率における予後因子の解明

(1) 化学療法に対する応答性

VLA4の発現と抗癌剤感受性との関連を解明するため、上記30人の患者のうちオールトランスレチノイン酸(ATRA)で導入治療を行った5人の急性前骨髄球性白血病(APL)患者を除く25人の患者に限ってVLA4発現率と完全寛解率との関係を解析した。

まず、VLA4陽性患者群とVLA4陰性患者群との間で、各種パラメーターに差がないことを確認する目的で統計学的な解析を行った。年齢、白血球数および急性白血病細胞のミエロペルオキシダーゼ陽性率の比較にはt検定を用い、性別、FAB分類、パフォーマンス状態および核型の比較にはFisher検定法を用いた。その結果、性別、年齢だけでなく、これまでAMLの危険因子[1, 3, 21, 24]として報告されているFAB分類、パフォーマンス状態、白血球数、急性白血病細胞のミエロペルオキシダーゼ陽性率および核型の何れのパラメーターも両患者群の間で有意な差がないこと(いずれも $P > 0.05$)が明らかとなった(表1参照)。

表1

AML患者数およびAML細胞の解析

I. VLA4陰性患者 (n=10)

患者	性別/年齢	FAB	PS	WBC (/ μ L)	MPO (%)	核型	α 4 (%)	α 5 (%)	β 1 (%)
1	M/51	M1	2	13,800	20	46,XY	14.2	18.6	16.3
2	M/53	M0	1	17,200	0	46,XY	0.6	0.7	0.9
6	M/63	M2	1	6,700	60	46,XY	12.0	9.8	10.7
9	F/23	M2	0	11,600	70	t(8;21)	4.0	2.9	4.6
18	M/25	M4	2	62,000	33	Inv (16)	6.5	5.5	4.7
22	M/54	M1	1	17,500	26	46,XY	2.9	2.0	2.6
26	F/46	M5a	2	15,200	25	46,XX	18.6	1.9	14.5
27	M/40	M5a	2	20,300	40	46,XY	29.1	19.2	27.3
28	F/47	M4	1	21,700	35	46,XY	0.9	0.5	0.6
29	M/52	M2	0	900	22	add(20)(q13.3)	15.7	39.2	43.1

II. VLA4陽性患者 (n=20)

患者	性別/年齢	FAB	PS	WBC (/ μ L)	MPO (%)	核型	α 4 (%)	α 5 (%)	β 1 (%)
3	F/63	M4	1	120,200	97	Inv (16)	87.8	87.2	88.7
4	M/53	M4	1	27,400	25	46,XY	58.7	11.9	58.6
5	M/59	M5a	1	9,700	5	46,XY	80.9	0.6	81.9
7	F/22	M4	1	49,900	30	Inv (16)	95.4	17.1	98.2
8	M/45	M1	0	25,900	29	46,XY	81.9	48.6	83.0
10	F/64	M3	0	600	85	t(15;17)	96.8	90.1	98.6
11	M/41	M3	1	890	78	t(15;17)	80.8	70.6	83.3
12	F/63	M3	1	1,900	67	t(15;17)	89.3	77.8	83.5
13	M/38	M4	1	14,200	45	46,XY	87.7	49.5	88.8
14	F/48	M2	1	57,000	80	46,XX	96.5	62.1	92.6
15	F/55	M1	0	2,400	30	46,XX	90.4	3.5	99.5
16	F/53	M2	1	4,800	35	46,XX	89.1	91.9	90.0
17	F/22	M2	0	12,600	42	t(8;21)	75.5	65.3	84.1
19	F/97	M1	1	16,100	58	46,XX	78.7	34.5	76.1
20	F/26	M2	0	2,400	30	del(11)(q14q23)	42.5	0.8	48.6
21	F/48	M1	0	2,210	70	46,XX	60.3	74.6	68.3
23	M/54	M5a	2	10,700	35	46,XY	87.6	20.3	92.9
24	F/57	M3	1	1,070	90	t(15;17)	99.0	98.8	98.6
25	F/24	M4	1	9,800	50	Inv (16)	37.6	82.9	80.7
30	M/52	M3	0	1,600	99	t(15;17)	94.6	67.6	99.8

患者の番号は入院の日付順に付した。
 インテグリンの発現はインテグリンに対するモノクローナル抗体を用いた間接蛍光フローサイトメトリー法により測定した。
 FAB: FAB分類 PS: パフォーマンス状態
 MPO; ミエロペルオキシダーゼ染色陽性AML細胞 α 4; α 4インテグリン α 5; α 5インテグリン β 1; β 1インテグリン

上記25人の患者の完全寛解率を検討したところ、15人のVLA4陽性患者群の完全寛解率(60%)はVLA4陰性患者群のそれ(100%)に比べて有意に低かった(表2参照、表中*; P=0.029、Fisher検定法による)。

表2

新生AML患者25人のVLA4発現と完全寛解率		
VLA4発現	患者数	完全寛解率 (%)
陰性	10	100*
陽性	15	60*

次に我々は、AMLの再発率について解析した。VLA4陰性群では1例の再発も認められないのに対して、VLA4陽性群では完全寛解(CR)を獲得した9症例中5例(55.6%)に再発を認めた。即ち、VLA4陽性群では、VLA4陰性群に比べて、AMLの再発率が有意に高いことが判明した(表3参照、表中*; $P = 0.011$, Fisher検定法による)。

表3

完全寛解を獲得した患者19人のVLA4の発現と再発率		
VLA4発現	患者数	再発率 (%)
陰性	10	0*
陽性	9	55.6*

図7aに、Kaplan-Meier法を用いた上記の30人の患者のうち、APL患者以外の25人全体の予測生存曲線とVLA4発現量により分類した患者群別の予測生存曲線を示す。25症例全体の5年予測生存率は52.2%であり、これまでの報告[1-3]と同等であった。

次にVLA4発現量により分類した患者群別の5年予測生存率は、15例のVLA4陽性患者群の生存率は25%であり、VLA4陰性患者群は100%であった。VLA4陽性患者群では、VLA4陰性患者群に比べてその5年予測生存率が有意に低かった($P = 0.0011$, 対数ランク試験)。

次に5年無病生存率の解析結果を図7bに示す。上記5年生存率と同様に、VLA4陽性患者群の5年無病生存率は44.4%であり、VLA4陰性患者群のそれ(100%)に比べて、有意に($P = 0.0094$, 対数ランク試験)に低かった。この結果は、上述の再発率の差を反映しているものと考えられる。

ところで、本研究においては、我々はVLA4のカットオフ値を30%に設定して便宜的に患者をVLA4陽性とVLA4陰性に分類したが、VLA4陽性患者群の中にも2年以上生存中の症例が存在した($n = 4$)。これら4名のVLA4の発現率を再確認したところ37.8 - 60.3%であり、20名のVLA4陽性患者群の中では低い方から4名であった。

(2) 完全寛解率、再発率、生存率、無病生存率における予後因子の解明

完全寛解率、再発率、生存率、無病生存率に影響を与えるパラメーターを解析する目的で、比例推測モデル(proportional hazard model)によるCOX解析によりパフォーマンス状態、FAB分類、年齢、白血球数、急性白血病細胞のミエロペルオキシダーゼ陽性率、核型、VLA4発現の各パラメーターの検討を行ったが、上記モデルではデータが収束しない為、ステップワイズ判別分析モデルによる単変量解析と多変量解析を行った。

単変量解析の結果、VLA4のみが完全寛解の有無($P = 0.021$)、再発の有無(P

30

40

50

= 0 . 0 4 3)、長期生存の有無 (P = 0 . 0 0 0 1)、長期無病生存の有無 (P = 0 . 0 0 4) についての予後因子として影響を与えることが確認された。

更に、単変量解析でP値が0 . 3 0以下のパラメーターについて多変量解析を行った。その結果、V L A 4のみが完全寛解、再発率、長期生存、長期無病生存の予後因子になることが確認され、上述の単変量解析の結果が裏付けられた。

S m a d j a - J o f f e r a [1 3 , 1 4] は、C D 4 4 - 6 v が A M L の 予 後 不 良 因 子 であること、更に、C D 4 4 - 6 v が抗癌剤によって引き起こされるアポトーシスを抑制することを報告している。そこで、C D 4 4 と V L A 4 とを A M L 症 例 の 予 後 に 対 す る 影響について比較した。新鮮急性白血病細胞のC D 4 4 の発現を測定し得た9症例中6症例がC D 4 4 陽性であった。9症例中8症例がC Rを獲得した。C D 4 4 陽性の6症例は、全症例がC Rを獲得した。C Rを獲得できなかった患者# 2 3 は、C D 4 4 陰性であり治療開始後3ヵ月で死亡した。C Rを獲得した8症例の内、治療開始後最長で約33ヶ月経過したが未だ一人も再発をきたしていない。完全寛解率はC D 4 4 陽性患者群で100%、C D 4 4 陰性患者群で66.7%であり有意差を認めなかった (P = 0 . 3 7 5 , F i s h e r 法)。再発率は、C D 4 4 陽性患者群とC D 4 4 陰性患者群で共に0%であった (表4、表5参照)。上述のように、再発例が1例も存在しなかったため、両患者群の再発率の差を統計学的に解析することは不可能であった。32ヵ月の時点での生存率は、C D 4 4 陽性患者群が100%であり、C D 4 4 陰性患者群が66.7%であり有意差を認めなかった (P = 0 . 1 9 6 7 , 対 数 ラ ン ク 試 験)。以上の結果から、C D 4 4 の発現は通常の化学療法を受ける患者の予後には影響を与えないと考えられ、C D 4 4 ではなくV L A 4 が A M L の 予 後 不 良 因 子 であることが示唆された。

10

20

表4

AML患者におけるCD44の発現と化学療法の効果										
患者	性別/年齢	FAB	PS	WBC (/D)	MPO (%)	核型	CD44 (%)	CR	再発	生存期間 (ヶ月)
21	F/48	M1	0	2,210	70	46,XX	88.5	+	-	33+
22	M/54	M1	1	17,900	26	46,XY	0.7	+	-	23+
23	M/54	M5a	2	10,700	35	46,XY	0.6	-	-	3
25	F/24	M4	1	9,800	50	inv(16)	94.7	+	-	16+
26	F/46	M5a	2	15,200	25	46,XY	1.2	+	-	20+
27	M40	M5a	2	20,300	40	46,XY	92.9	+	-	14+
28	F/47	M4	1	21,700	35	46,XY	96.7	+	-	9+
29	M/52	M2	0	900	22	add(20)(q13.3)	96.9	+	-	4+
30	M/52	M4	1	1,600	99	t(15;17)	99.8	+	-	3+

患者の番号は入院の日付順に付した。
CD44の発現はCD44に対するモノクローナル抗体を用いた間接蛍光フローサイトメトリー法により測定した。
FAB;FAB分類 PS;パフォーマンス状態
MPO;ミエロペルオキシダーゼ染色陽性AML細胞

表5

完全寛解を獲得した患者7人のCD44の発現とその予後

CD44発現	患者数	完全寛解率 (%)	再発率 (%)	生存率 (%)
陰性	3	66.7*	0**	66.7***
陽性	5	100*	0**	100***

* : P=0.375 ; ** : 有意差検定不可 ;
*** : P=0.375 (Fisher法により有意差検定を行った)

以上の結果から、急性白血病細胞のV L A 4 発現率はその予後に多大な影響を与えることが判明した。V L A 4 発現率が低い患者では化学療法による完全寛解率が高く、さらに完全寛解後の再発率は無いかまたは非常に低く、かつ生存率および無病生存率ともに高く、予後の経過も良好であることが推測できる。これに対して、V L A 4 発現率が高い患者は、化学療法による完全寛解率が低く、完全寛解後の再発率が比較的高く、かつ生存率および無病生存率ともに低く、予後の経過により一層注意を払う必要がある。このように、急性白血病患者の急性白血病細胞のV L A 4 発現率を測定することは、急性白血病の診断および治療方法の選択における極めて有益な指標を提供する手段となり得ることが実証された。

産業上の利用の可能性

以上の実施例が明確に示すように、V L A 4 アンタゴニストである抗V L A 4 抗体により、V L A 4 発現急性白血病細胞の抗癌剤に対する感受性を増強する効果を有する。したがって、V L A 4 アンタゴニストを抗癌剤と併用して投与することが、急性白血病患者の治療、再発予防および良好な予後の維持に有効である。該アンタゴニストを含む組成物は、抗癌剤と併用するための、急性白血病の治療および/または予防薬として利用できる。

さらに、急性白血病患者の急性白血病細胞のV L A 4 発現率は、急性白血病の診断および治療方法の選択における極めて有益な指標となり得る。したがって、急性白血病患者の急性白血病細胞のV L A 4 発現率を測定することは、該患者の化学療法への応答性、その有効性、該患者の予後を予測するための有効な診断方法である。上記実施例において使用したマウス抗V L A 4 モノクローナル抗体は、上記診断のための試薬として非常に有用である。

本明細書に引用された全ての刊行物は、その内容の全体を本明細書に取り込むものとする、また添付の請求の範囲に記載される技術思想および発明の範囲を逸脱しない範囲内で本発明の種々の変形および変更が可能であることは、当業者には容易に理解されるであろう。本発明はこのような変形および変更をも包含することを意図している。

10

20

参考文献

1. Ohno, R. et al. Randomized study of individualized induction therapy with or without vincristine, and of maintenance-intensification therapy between 4 or 12 courses in adult acute myeloid leukemia. *Cancer*. 71, 3888-3895 (1993)
2. Hann, I.M. et al. Randomized comparison of DAT versus ADE as induction chemotherapy in children and younger adults with acute myeloid leukemia. Results of the Medical Research Council's 10 th AML trial (MRC AML10). Adult and Childhood Leukemia Working Parties of the Medical Research Council. *Blood*. 89, 2311-2318 (1997)
3. Lowenberg, B., Downing, J.R. & Burnett, A. Acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 341, 1051-1062 (1999)
4. Hussein, K.K. et al. Treatment of acute lymphoblastic leukemia in adults with intensive induction, consolidation, and maintenance chemotherapy. *Blood*. 73, 57-63 (1989)
5. Brisco, M.J. et al. Outcome prediction in childhood acute lymphoblastic leukaemia by molecular quantification of residual disease at the end of induction. *Lancet*. 343, 196-200 (1994)
6. Goulden, N. et al. PCR assessment bone marrow status in 'isolated' extramedullary relapse of childhood B-precursor acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol*. 87, 282-285 (1994)

7. Guadagno, T.M., Ohtsubo, M., Roberts, J.M. & Assoian, R.K. A link between cyclin A expression and adhesion-dependent cell cycle progression. *Science*, 262, 1572-1575 (1993)
8. Meredith, J.E., Fazeli, B. & Schwartz, M.A. The extracellular matrix as a cell survival factor. *Mol. Biol. Cell*, 4, 953-961 (1993)
9. Frisch, S.M. & Hunter, F. Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. *J Cell Biol*, 124, 619-626 (1994)
10. Rozzo, C. et al. Induction of apoptosis in human neuroblastoma cells by abrogation of integrin-mediated cell adhesion. *Int J Cancer*, 70, 688-698 (1997)
11. Mudry, R.E. et al. Stromal cells regulate survival of B-lineage leukemic cells during chemotherapy. *Blood*, 96, 1926-1932 (2000)
12. Alon, R. et al. The integrin VLA-4 supports tethering and rolling in flow on VCAM-1. *J Cell Biol*, 128, 1243-1253 (1995)
13. Legras, S. et al. A strong expression of CD44-6v correlates with shorter survival of patients with acute myeloid leukemia. *Blood*, 91, 3401-3413 (1998).
14. Allouche, M. et al. Ligation of the CD44 adhesion molecule inhibits drug-induced apoptosis in human myeloid leukemia cells. *Blood*, 96, 1187-1190 (2000)
15. Bendall, L.J. et al. Stem cell factor enhances the adhesion of AML cells to fibronectin and augments fibronectin-mediated anti-apoptotic and proliferative signals. *Leukemia*, 12, 1375-1382 (1998)
16. Sethi, T. et al. Extracellular matrix proteins protect small cell lung cancer cells against apoptosis: A mechanism for small cell lung cancer growth and drug resistance in vivo. *Nat Med*, 5, 662-668 (1999)
17. Damiano, J.S. et al. Cell adhesion mediated drug resistance

(CAM-DR): Role of integrins and resistance to apoptosis in human myeloma cell lines. *Blood*. 93, 1658-1667 (1999)

1 8 . Sugahara, H. et al. Induction of programmed cell death in human hematopoietic cell lines by fibronectin via its interaction with very late antigen 5. *J Exp Med*. 179, 1757-1766 (1994)

1 9 . Amarante-Mendes, G.P. et al. Bcr-Abl exerts its antiapoptotic effect against diverse apoptotic stimuli through blockage of mitochondrial release of cytochrome C and activation of caspase-3. *Blood*. 91, 1700-1705 (1998)

2 0 . Belaud-Rotureau, M.A. et al. Study of apoptosis-related responses of leukemic blast cells to in vitro anthracycline treatment. *Leukemia*. 14, 1266-1275 (2000)

2 1 . Datta, R. et al. XIAP regulates DNA damage-induced apoptosis downstream of caspase-9 cleavage. *J Biol Chem*. 275, 31733-31738 (2000)

2 2 . Thornberry, N.A., et al. Combinatorial Approach Defines Specificities of Members of the Caspase Family and Granzyme B. *J Biol Chem*. 272, 17907-17911 (1997)

2 3 . Lacombe, F., et al. Flow cytometry CD45 gating for immunophenotyping of acute myeloid leukemia. *Leukemia* 11, 1878-1866 (1997)

2 4 . Grimwade, D. et al. The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: analysis of 1,612 patients entered into the MRC AML 10 trial. The Medical Research Council Adult and Children's Leukaemia Working Parties. *Blood*. 92, 2322-2333 (1998)

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Treatment and/or recurrence prevention of acute myelogenous leukemia (AML) by a therapeutic pharmaceutical composition including VLA4 antagonist, and prognosis prediction of AML by using VLA4 as a marker

<120> Yoshiro Niitsu

<120> Takuya Matsunaga

<120> Kensuke Miyake

<130> PH1551PCT

<140>

<141>

<160> 2

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 1

cacctgtaat cccagcagtt t

21

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 2

cgcgatctcg gctcactgca

20

【図面の簡単な説明】

図1は、化学療法感受性に対する細胞外マトリックスタンパク質の影響を示す図である。aおよびbは、急性白血病モデル細胞株U937細胞(a)およびHL60細胞(b)におけるダウノルビシンに誘導される細胞傷害性への細胞外マトリックスタンパク質の影響を調べたものである。cおよびdは、U937細胞(c)およびHL60細胞(d)におけるAracに誘導される細胞傷害性への細胞外マトリックスタンパク質の影響を調べたものである。□：FN-コートプレート；○：VCAM1-コートプレート；◇：BSA-コートプレート。

図2は、急性白血病モデル細胞株が、VLA4介在性のFNへの接着によって、抗癌剤に誘導される細胞傷害性およびアポトーシスを回避するが、VLA5介在性のFNへの接着では、該回避が認められないことを示す図である。aおよびbは、U937細胞における、抗癌剤に誘導される細胞傷害性(a)およびアポトーシス(b)に対するVLA4インテグリン-FN間相互作用の影響を示す。cおよびdは、HL60細胞における、抗癌剤に誘導される細胞傷害性(c)およびアポトーシス(d)に対するFNの影響ならびにそれに対する抗VLA4抗体または抗VLA5抗体の作用を示す。FN-コートプレート(黒塗り)またはBSA-コートプレート(白塗り)内で細胞をSG/73抗VLA4モノクローナル抗体(VLA4Ab)、KH/72抗VLA5モノクローナル抗体(VLA5Ab)またはマウスIgG1(コントロール抗体)のいずれかを含む培地中で1時間プレインキュベートした後、さらに24時間インキュベートした。FN-コートプレート中(斜線)またはBSA-コートプレート(ドット)内で細胞をVLA4Ab、VLA5Abまたはコントロール抗体のいずれかを含む培地中で1時間プレインキュベートした後、培地にダウノルビシンを添加して24時間インキュベートした。FN-コートプレート中(格子)またはBSA-コートプレート(横縞)内で細胞をVLA4Ab、VLA5Abまたはコントロール抗体のいずれかを含む培地中で1時間プレインキュベートした後、培地にAracを添加して24時間インキュベートした。生細胞およびアネキシンV陽性アポトーシス性細胞を測定した。プレ(縦縞)は、インキュベーション前の生存AML細胞またはアポトーシス性AML細胞の比率である。有意差はt検定により求めた(*: P < 0.05)。

図3は、急性白血病モデル細胞株における抗癌剤に誘導されるアポトーシスのFN-VLA4間相互作用介在性阻害の機序についての解析データを示す図である。aおよびbは、U937細胞における、抗癌剤に誘導されるカスパーゼ3(a)およびカスパーゼ9(b)の活性化に対するFNの影響ならびにそれに対する抗VLA4抗体または抗VLA5抗体の作用の測定結果を示している。cは、U937細胞における、抗癌剤に誘導される細胞内Bcl-2のダウンレギュレーションに対するFNの影響ならびにそれに対する抗VLA4抗体または抗VLA5抗体の作用の測定結果を示している。5回の実験を行ったがいずれも同様の結果を示した。FN-コートプレート(黒塗り)またはBSA-コートプレート(白塗り)内で細胞をSG/73抗VLA4モノクローナル抗体(VLA4Ab)、KH/72抗VLA5モノクローナル抗体(VLA5Ab)またはマウスIgG1(コントロール抗体)のいずれかを含む培地中で1時間プレインキュベートした後、さらに24時間インキュベートした。FN-コートプレート中(aおよびb中、斜線)またはBSA-コートプレート(aおよびb中、ドット)内で細胞をVLA4Ab、VLA5Abまたはコントロール抗体のいずれかを含む培地中で1時間プレインキュベートした後、培地にダウノルビシンを添加して24時間インキュベートした。FN-コートプレート中(aおよびb中、格子)またはBSA-コートプレート(aおよびb中、横縞)内で細胞をVLA4Ab、VLA5Abまたはコントロール抗体のいずれかを含む培地中で1時間プレインキュベートした後、培地にAracを添加して24時間インキュベートした。それぞれについて、カスパーゼ3陽性細胞(a)、カスパーゼ9活性および細胞内Bcl-2発現細胞を測定した。プレ(aおよびb中、縦縞)は、インキュベーション前のカスパーゼ3陽性細胞およびカスパーゼ9活性のパーセントである。aおよびbにおける有意差はt検定により求めた(*: P < 0.05)。

10

20

30

40

50

図4は、患者由来の新鮮AML細胞は、VLA4介在性のFNへの接着によって抗癌剤に誘導される細胞傷害性およびアポトーシスを回避するが、VLA5介在性のFNへの接着では、該回避が認められないことを示す図である。aおよびbは、患者#3由来の新鮮AML細胞における、抗癌剤に誘導される細胞傷害性(a)およびアポトーシス(b)に対するFNの影響ならびにそれに対する抗VLA4抗体または抗VLA5抗体の作用を示す。cおよびdは、患者#3由来の新鮮AML細胞における、抗癌剤に誘導されるカスパーゼ3(c)およびカスパーゼ9(d)の活性化に対するFNの影響ならびにそれに対する抗VLA4抗体または抗VLA5抗体の作用を示す。eは、患者#3由来の新鮮AML細胞における、抗癌剤に誘導される細胞内Bc1-2のダウンレギュレーションに対するインテグリン-FN間相互作用の影響の測定結果を示している。5回の実験を行ったがい

10
ずれも同様の結果を示した。SG/73抗FN-コートプレート(a~d中、黒塗り)またはBSA-コートプレート((a~d中、白塗り)内で細胞をSG/73抗VLA4モノクローナル抗体(VLA4Ab)、KH/72抗VLA5モノクローナル抗体(VLA5Ab)またはマウスIgG1(コントロール抗体)のいずれかを含む培地中で1時間プレインキュベートした後、24時間インキュベートした。FN-コートプレート中((a~d中、斜線)またはBSA-コートプレート((a~d中、ドット)内で細胞をVLA4Ab、VLA5Abまたはコントロール抗体のいずれかを含む培地中で1時間プレイン

20
キュベートした後、培地にドウノルピシンを添加して24時間インキュベートした。FN-コートプレート中((a~d中、格子)またはBSA-コートプレート((a~d中、横縞)内で細胞をVLA4Ab、VLA5Abまたはコントロール抗体のいずれかを含む培地中で1時間プレインキュベートした後、培地にAraCを添加して24時間インキュベートした。それぞれについて、生細胞率、アネキシンV陽性アポトーシス性細胞率、カスパーゼ3陽性細胞率、カスパーゼ9活性および細胞内Bc1-2発現細胞を測定した。プレ((a~d中、縦縞)は、インキュベーション前の生細胞率、アポトーシス細胞、カスパーゼ3陽性細胞およびカスパーゼ9活性のパーセントである。a~dにおける有意差はt検定により求めた(*: P < 0.05)。

図5は、新鮮AML細胞のVLA4発現率と、*in vitro*での抗癌剤による細胞傷害性との相関を示す図である。白丸はBSA-コートプレートを用いた時のデータで、黒丸はFN-コートプレートを用いた時のデータである。FN-コートプレートを用いて実験した場合、患者由来のAML細胞のドウノルピシン(a)またはAraC(b)で処理した後の細胞生存率と4インテグリン陽性細胞の存在率との間には正の相関が認められた。一方、BSA-コートプレートを用いた場合には、細胞生存率と4インテグリン陽性細胞の存在率との間には全く相関を認めなかった。

30

図6は、U937細胞を移植したSCIDマウスにおける化学療法と、抗VLA4モノクローナル抗体を用いた抗細胞接着療法とを組合わせた結果を示す図である。aは、U937細胞の移植後7日目に、SG/17抗VLA4モノクローナル抗体(VLA4Ab)および/またはAraCで処理したSCIDマウスのKaplan-Meierの生存曲線である。細かい破線はビヒクルおよび通常の生理的食塩水で処理したマウス、白塗りの四角()はビヒクルおよびAraCで処理したマウス、実線はIgG2a(コントロール抗体)および通常の生理的食塩水で処理したマウス、黒塗りの四角()はコントロール抗体およびAraCで処理したマウス、三角()はVLA4Abおよび通常の生理的食塩水で処理したマウス、荒い破線はVLA4AbおよびAraCで処理したマウスである。下図bは、抗癌剤およびVLA4Abでの処理によるマウスの組織におけるU937の浸潤への影響を示している。b-1)は、U937細胞の注射後7日目のSCIDマウスの各組織へのU937の浸潤を示し、b-2)は、U937細胞の注射後14日目のSCIDマウスの各組織へのU937の浸潤を示す。b-3)は、U937細胞の注射後7日目のマウスをVLA4AbおよびAraCで処理した24時間後の各組織へのU937の浸潤を示し、b-4)はU937細胞の注射後7日目のマウスをコントロール抗体およびAraCで処理した24時間後の各組織へのU937の浸潤を示す。b5)は、U937細胞の注射後7日目のマウスをVLA4AbおよびAraCで

40
50

処理した62日後の各組織へのU937の浸潤を示す。* : $P < 0.001$; ** : $P < 0.001$; *** : $P < 0.001$; **** : $P < 0.001$ 。

図7は、AML患者の生存率とVLA4の発現率の相関を示す図である。aは、全体の生存率 (* : $P = 0.0011$ (対数ランクテスト))を示し、bは無病生存率 (* : $P = 0.0094$ (対数ランクテスト))を示す。

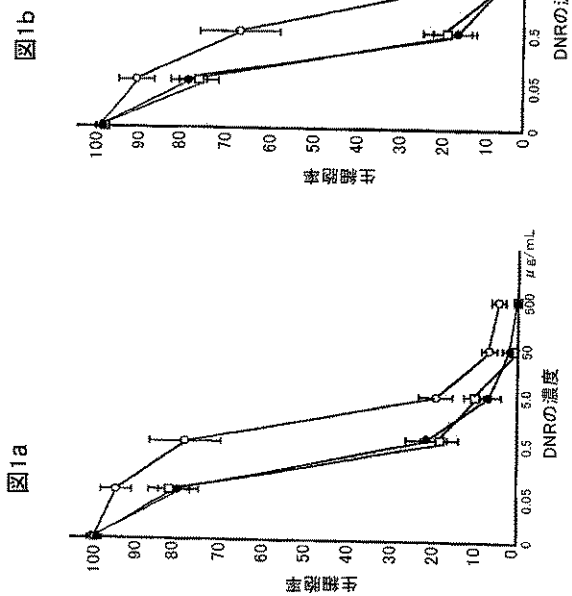


図1d

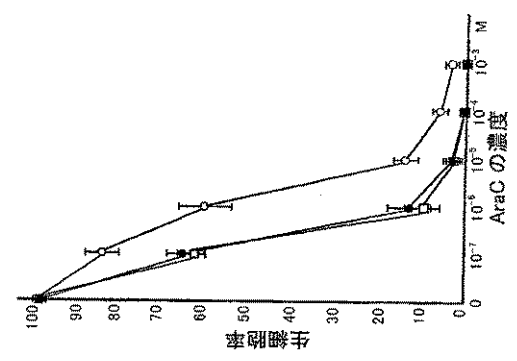
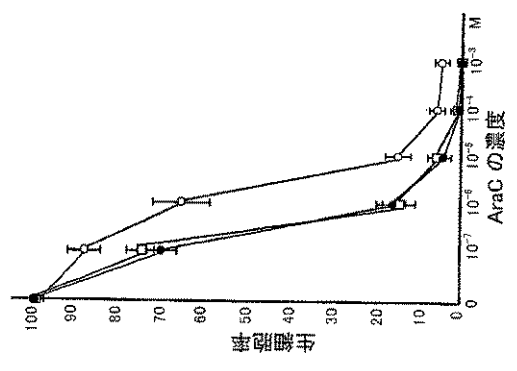


図1c



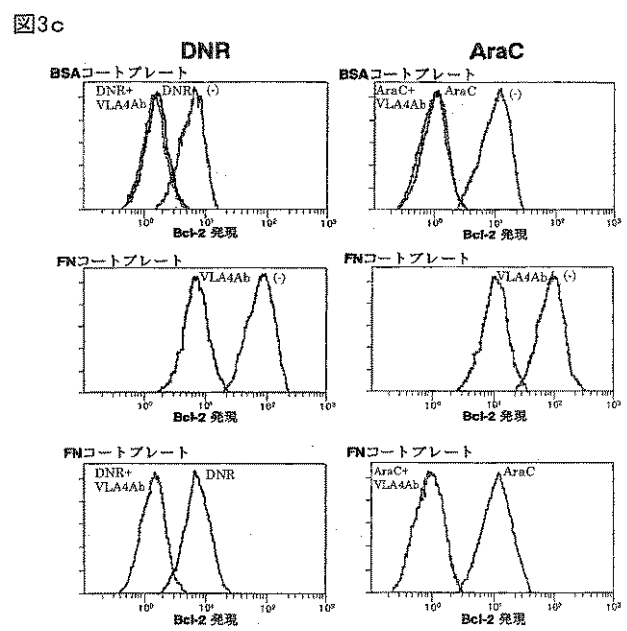
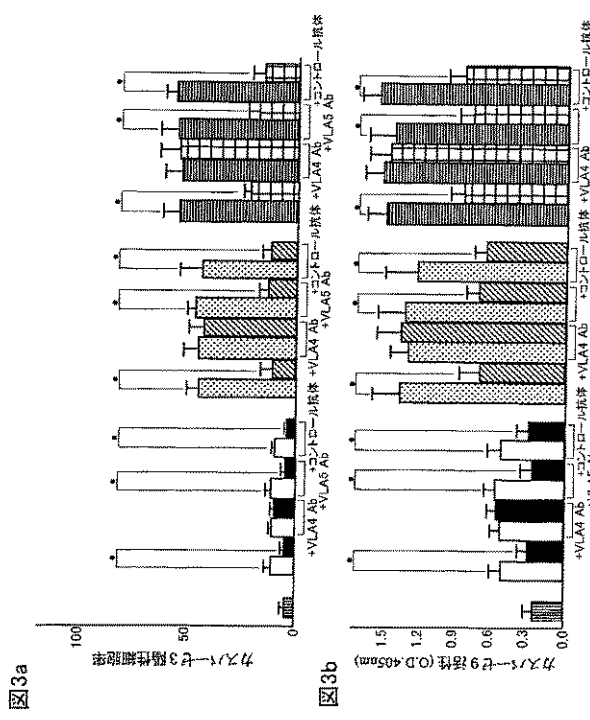
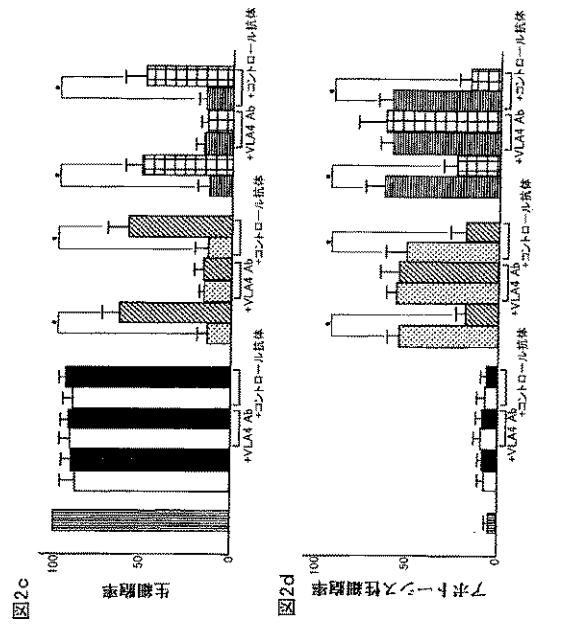
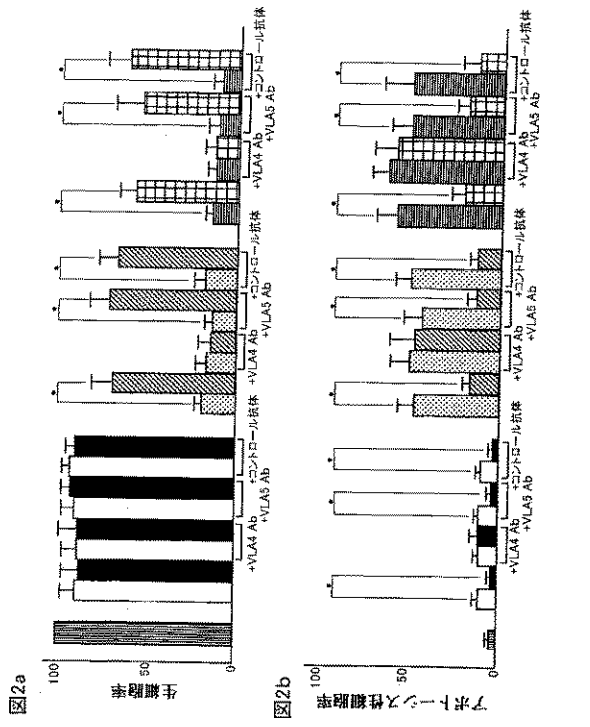


図6a

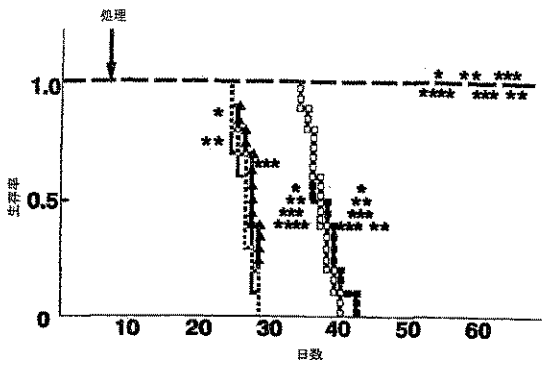


図6b

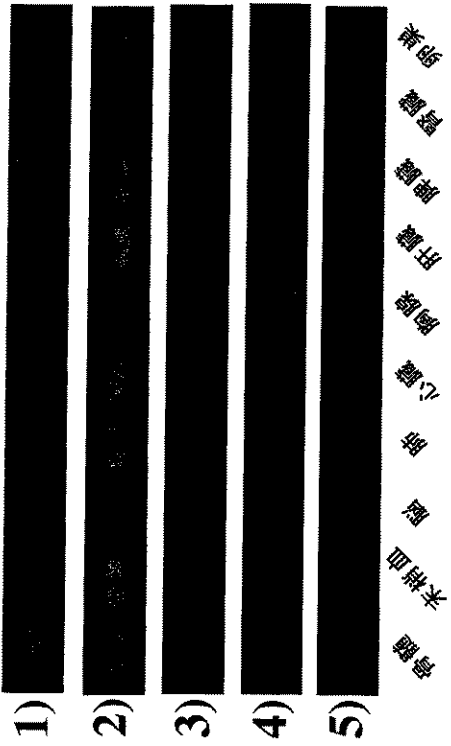


図7a

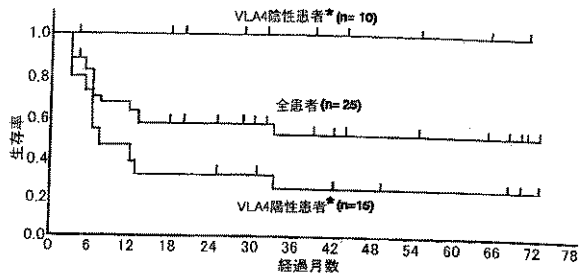
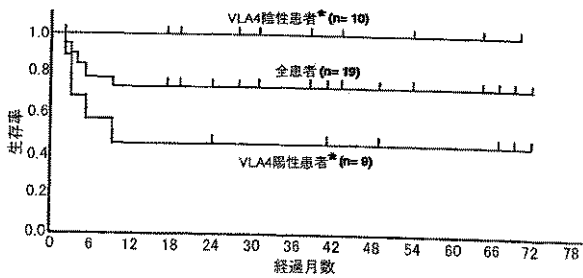


図7b



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/04704

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int.Cl. ⁷ A61K45/00, 39/395, A61P35/02		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.Cl. ⁷ A61K45/00, 39/395, A61P35/02		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CA (STN), MEDLINE (STN), EMBASE (STN), BIOSIS (STN)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Naofumi Takemoto et al., VLA4 ($\alpha 4 \beta 1$ -Integrin) Protects Acute Myelogenous Leukemia (AML) Cells from Undergoing Apoptosis by Chemotherapeutic Drugs: The Effectiveness of Anti-Adhesion Therapy in AML Using Anti-VLA4 Monoclonal Antibody In Vivo, Blood, Journal of the American Society of Hematology, 2001, Vol.98, No.11, page 104a, abstract#435	1-22, 32-34, 39-41
X Y A	Database Medline on STN, No.94146363, Ryan D H, Adherence of normal and neoplastic human B cell precursors to the bone marrow microenvironment, Blood cells, 1993, Vol.19, No.2, pages 225 to 241, abstract	1-16, 32-34 17-22 39-41
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:	"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention	
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone	
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art	
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family	
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 14 August, 2002 (14.08.02)	Date of mailing of the international search report 27 August, 2002 (27.08.02)	
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer	
Facsimile No.	Telephone No.	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/04704

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Shin'ichiro MORI et al., AML no Chiryō Senryaku, Igaku no Ayumi, 1999, Vol.190, No.5, pages 464 to 469	17-22
X	Database Medline on STN, No.96172121,	32-34, 39-41
Y	Bradstock K F et al., Interaction of acute leukemia cells with the bone marrow microenvironment: implications for control of minimal residual diseases, Leukemia and Lymphoma, Vol.18(1-2), pages 1 to 16, abstract	17-22

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/04704

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: 23-31, 35-38

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claims 23 to 31 pertain to methods for treatment of human body by therapy and claims 35 to 38 pertain to methods for diagnosis of human body and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions (continued to extra sheet)

2. Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/04704

Continuation of Box No.I-1 of continuation of first sheet(1)

of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JPO2/04704
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl. ⁷ A61K 45/00, 39/395, A61P35/02		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl. ⁷ A61K 45/00, 39/395, A61P35/02		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で利用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)		
CA (STN), MEDLINE (STN), EMBASE (STN), BIOSIS (STN)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び 一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	Naofumi Takemoto et al., VLA4 ($\alpha 4 \beta 1$ -Integrin) Protects Acute Myelogenous Leukemia (AML) Cells from Undergo Apoptosis by Chemotherapeutic Drugs: The Effectiveness of Anti-Adhesion Therapy in AML Using Anti-VLA4 Monoclonal Antibody In Vivo, Blood, Journal of the American Society of Hematology, 2001, Vol. 98, No. 11, p. 104a, Abstract#435	1-22, 32-34, 39-41
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー		
「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの	「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの	の日に後に公表された文献
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの	「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの	「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)	「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの	「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「O」 目頭による開示、使用、展示等に言及する文献	「&」 同一パテントファミリー文献	「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願		「O」 目頭による開示、使用、展示等に言及する文献
国際調査を完了した日	14.08.02	国際調査報告の発送日
		27.08.02
国際調査機関の名称及びあて先	特許庁審査官 (権限のある職員)	4C 9261
日本国特許庁 (ISA/JP)	八原 山美子	
郵便番号100-8915		
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	電話番号 03-3581-1101 内線 3451	

国際調査報告		国際公開番号 PCT/JP02/04704
C (続き)	関連すると認められる文献	
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び 一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y A	Database Medline on STN, NO. 94146363, Ryan D H, Adherence of normal and neoplastic human B cell precursors to the bone marrow microenvironment, Blood cells, 1993, Vol. 19, No. 2, p. 225-241, (abstract)	1-16, 32-34, 17-22 39-41
Y	森 慎一郎ら、AMLの治療戦略、医学のあゆみ、1999、 Vol. 190、No. 5、p. 464-469	17-22
X Y	Database Medline on STN, No. 96172121, Bradstock K F et.al., Interaction of acute leukemia cells with the bone marrow microenvironment: implications for control of minimal residual disease, Leukemia and Lymphoma, Vol. 18(1-2), p. 1-16, (abstract)	32-34, 39-41 17-22

国際調査報告	国際出願番号 PCT/JPO2/04704
<p>第1欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)</p>	
<p>法第8条第3項 (PCT第17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。</p>	
<p>1. <input checked="" type="checkbox"/> 請求の範囲 23-31, 35-38 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、請求の範囲 23-31 は、治療による人体の処置方法に関するものであり、また、請求の範囲 35-38 は、人体の診断方法に関するものであって、PCT第17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(iv)の規定により、この国際調査機関が国際調査を行うことを要しない対象に係るものである。</p> <p>2. <input type="checkbox"/> 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、</p> <p>3. <input type="checkbox"/> 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。</p>	
<p>第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)</p>	
<p>次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。</p>	
<p>1. <input type="checkbox"/> 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。</p> <p>2. <input type="checkbox"/> 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。</p> <p>3. <input type="checkbox"/> 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。</p> <p>4. <input type="checkbox"/> 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。</p>	
<p>追加調査手数料の異議の申立てに関する注意</p> <p><input type="checkbox"/> 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。</p> <p><input type="checkbox"/> 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。</p>	

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I
A 6 1 K 31/675	A 6 1 K 31/675
A 6 1 K 31/704	A 6 1 K 31/704
A 6 1 K 31/7048	A 6 1 K 31/7048
A 6 1 K 31/7068	A 6 1 K 31/7068
A 6 1 K 38/46	A 6 1 K 39/395 D
A 6 1 K 39/395	A 6 1 K 39/395 N
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 35/00
A 6 1 P 35/02	A 6 1 P 35/02
A 6 1 P 43/00	A 6 1 P 43/00 1 2 1
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/15 Z
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/50 Z
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/53 D
G 0 1 N 33/566	G 0 1 N 33/566
	A 6 1 K 37/54

(72)発明者 三宅 健介

東京都目黒区駒場3丁目6-15 東大駒場第2宿舎202号

(72)発明者 坂牧 純夫

北海道札幌市中央区南1条西16丁目 札幌医科大学医学部内科学第四講座

(72)発明者 秋山 剛英

北海道札幌市中央区南1条西16丁目 札幌医科大学医学部内科学第四講座

(72)発明者 藤見 章仁

北海道札幌市中央区南1条西16丁目 札幌医科大学医学部内科学第四講座

(72)発明者 田中 育太

北海道札幌市中央区南1条西16丁目 札幌医科大学医学部内科学第四講座

(72)発明者 竹本 尚史

北海道札幌市中央区南1条西16丁目 札幌医科大学医学部内科学第四講座

(注) この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。

专利名称(译)	使用含有VLA4拮抗剂的治疗性药物组合物治疗和/或预防急性白血病复发的方法和使用VLA4作为指标诊断急性白血病预后的方法		
公开(公告)号	JPWO2003097097A1	公开(公告)日	2005-10-20
申请号	JP2004505093	申请日	2002-05-15
[标]申请(专利权)人(译)	新津洋司郎 塔库亚·马萨内加		
申请(专利权)人(译)	新津 洋司郎 塔库亚·马萨内加		
[标]发明人	新津洋司郎 松永卓也 三宅健介 坂牧純夫 秋山剛英 藤見章仁 田中育太 竹本尚史		
发明人	新津 洋司郎 松永 卓也 三宅 健介 坂牧 純夫 秋山 剛英 藤見 章仁 田中 育太 竹本 尚史		
IPC分类号	A61K45/00 A61K31/136 A61K31/4745 A61K31/52 A61K31/573 A61K31/675 A61K31/704 A61K31/7048 A61K31/7068 A61K38/46 A61K39/395 A61P35/00 A61P35/02 A61P43/00 C07K16/28 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/566 G01N33/574		
CPC分类号	A61P35/00 A61P35/02 A61P43/00 C07K16/2842 G01N33/57426		
FI分类号	A61K45/00 A61K31/136 A61K31/4745 A61K31/52 A61K31/573 A61K31/675 A61K31/704 A61K31/7048 A61K31/7068 A61K39/395.D A61K39/395.N A61P35/00 A61P35/02 A61P43/00.121 G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/566 A61K37/54		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

用于治疗急性白血病的药物组合物，其中通过使用VLA4拮抗剂抑制纤连蛋白与VLA4之间的相互作用，从而调节白血病细胞对依赖细胞粘附的抗癌剂耐受性的获得；使用这些组合物治疗和/或预防急性白血病的方法；基于急性白血病细胞中VLA4表达比的急性白血病诊断方法。

完全寛解を獲得した患者19人のVLA4の発現と再発率

VLA4発現	患者数	再発率 (%)
陰性	10	0*
陽性	9	55.6*
