

## 科学研究費補助金研究成果報告書

平成 21 年 6 月 18 日現在

研究種目：基盤研究(C)  
 研究期間：平成 19 年度—平成 20 年度  
 課題番号：19591150  
 研究課題名(和文) 造血器腫瘍における p57KIP2 遺伝子を中心とした発癌ネットワークの解析  
 研究課題名(英文) The analysis of p57KIP2 gene in hematologic malignancies  
 研究代表者 国立病院機構 名古屋医療センター 臨床研究センター 血液・腫瘍研究部長 永井宏和

## 研究成果の概要：

CDKI の一種である p57KIP2 遺伝子が DNA メチル化によりリンパ系腫瘍において高頻度にご不活化されている。本研究の当該年度には p57KIP2 遺伝子と悪性リンパ腫の病態の関連を検討した。63 例のびまん性大細胞性 B 細胞性リンパ腫(DLBCL)の病変検体の p57KIP2 遺伝子 DNA メチル化を methylation specific real time quantitative PCR (MS-RQ-PCR)に検討した。63 例中 53 例 (84%) にメチル化を認めた。メチル化の有無と DLBCL の病変の広がり、臨床的予後予測因子との相関は認められなかった。しかし、80%を越える頻度で p57KIP2 遺伝子 DNA メチル化が認められたことから、DLBCL においては最も頻度が高い遺伝子変異であり、当該遺伝子のメチル化が DLBCL のバイオマーカーとして有用であると考えられた。そのため、微少残存病変 (MRD) の検出において p57KIP2 遺伝子 DNA メチル化を用いることを検討した。p57KIP2 遺伝子の MS-RQ-PCR 法による MRD の検出感度は  $10^{-4}$  であり、従来の分子生物学的的手法での検出感度と同等であった。また、従来法と比べ簡便であり、広く応用が可能であることが示唆された。当手法により MRD 検出が系統的に行われるようになれば、DLBCL の治療選択や治療効果判定において重要な知見を与えるものと考えられる。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
19 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
20 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研究費の分科・細目：血液内科学

キーワード：p57KIP、悪性リンパ腫、癌抑制遺伝子、微少残存病変、DNAメチル化

## 1. 研究開始当初の背景

悪性リンパ腫は多段階の分子異常を経て発症するといわれている。細胞周期に関する遺伝子は細胞の増殖に影響を与えるため、癌関連遺伝子の候補となるものが多い。CDKIは細胞周期を負に制御し、その機能失活は細胞の異常増殖につながる。CDKIであるp16INK4A遺伝子やp15INK4B遺伝子は癌抑制遺伝子と考えられている。p57KIP2はCDKIの一種類であり、p21CIP1、p27KIP1とともにKIP familyに属する遺伝子で各種のcyclin/CDK複合体を阻害するとされている。p57KIP2は各種癌腫で染色体欠失が認められる11p15.5に位置し、また一部のBeckwith-Wiedemann症候群（高率に悪性腫瘍を合併）の原因遺伝子とされており、癌抑制遺伝子の候補の一つとして多くの解析がなされてきた。しかし、これまでの研究では実際の癌腫で遺伝子異常などは見つからず、癌抑制遺伝子としての評価はなされていない。

我々のこれまでの研究により悪性リンパ腫特にB細胞性リンパ腫においてp57KIP2遺伝子の発現が消失しており、その発現消失がp57KIP2遺伝子のプロモーター領域の異常なDNAメチル化によることを明らかにした。

## 2. 研究の目的

当研究ではp57KIP2遺伝子のメチル化が高頻度にびまん性大細胞型B細胞性リンパ腫(DLBCL)に認められることから、当遺伝子異常をDLBCLのバイオマーカーとして用い、リンパ腫細胞の骨髄における微少残存病変(MRD)の検出への応用を行った。これまでDLBCLのMRDの検出法はIgHのCDRIII

領域の各症例における塩基配列を決定し、症例毎のPCRプライマーとプローブを設計して行う煩雑なものであった。本研究ではp57KIP2遺伝子のメチル化を定量的に検出する系を開発し、簡便で感度が高い検査法を確立することを目的とした。

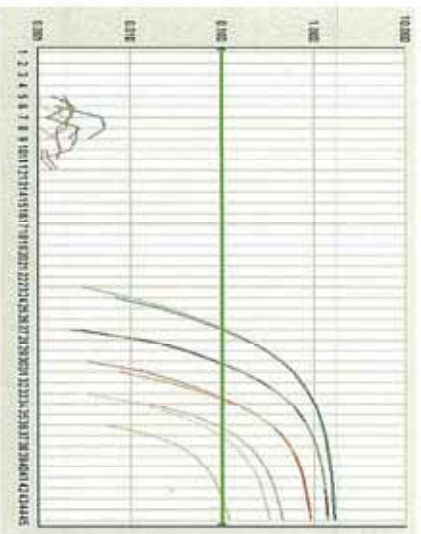
## 3. 研究の方法

63例のDLBCL症例の病変DNA、54例の健康人末梢血単核球DNA、14例の良性血液疾患症例の骨髄単核球DNAを用いた。DNAはBisulfite処理後、メチル化特異的プライマーを用いて、p57KIP2遺伝子のメチル化の検出をmethylation specific real time quantitative PCR (MS-RQ-PCR)を行った。p57KIP2遺伝子が100%メチル化している細胞株SU-DHL-6のDNAをとメチル化が認められない細胞株K562のDNAにて段階希釈することにより検出感度の検討を行った。既存のバイオマーカーとの比較のためBCL2/IgHの転座の定量PCRを平行して解析した。

## 4. 研究成果

解析したDLBCL63例中52例にp57KIP2遺伝子のメチル化を認めた(84%)。54症例の健康人末梢血単核球、14症例の良性造血器疾患ではp57KIP2遺伝子のメチル化は認められず、特異度の高い検出系であることが示唆された。

検出感度は1/10000であり、bc12/IgHの定量PCRでの感度と同等であった。これは一回の反応で1.5 genomeを検出できると換算される。下図は検出感度実験の結果である。



P57KIP2 遺伝子の検出感度



Bcl2/IgH の検出

上記の患者検体での MRD 検出感度はそれぞれ 0.015% と 0.01% であった。

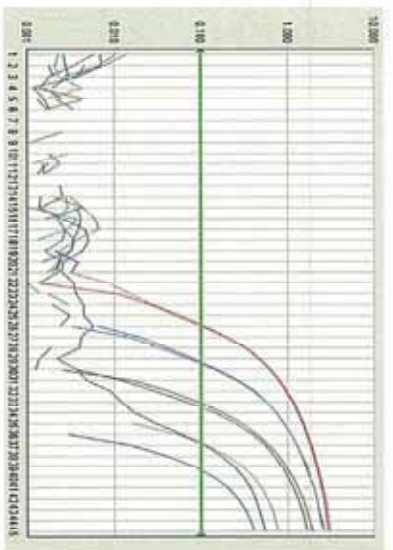
従来、DLBCL の MRD 検討はその手技の煩雑さから実地臨床では施行されていなかった。しかし、臨床 MRD 検討は重要であり、簡便で感度の高い手法の開発が望まれていた。本研究では p57KIP2 遺伝子のメチル化が DLBCL 患者の 80% 以上に認められる事を明らかにした。DLBCL の遺伝子異常としては最も頻度の高いものであることが判った。また、この遺伝子異常をバイオマーカーとして用いることにより、DLBCL 患者の MRD が高感度で検出出来た。この手法により、DLBCL において MRD 解析が系統的に可能となり、DLBCL の病態解析に重要な役割を果たすと考えられる。

##### 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 15 件)

- ・Terasawa T, Lau J, Bardet S, Couturier O, Hotta T, Hutchings M, Nishashi T, Nagai H. Fluorine-18-Fluorodeoxyglucose Positron Emission Tomography for Interim Response Assessment of Advanced-Stage Hodgkin's Lymphoma and Diffuse Large B-cell Lymphoma



Bcl2/IgH の検出感度

この検出系を実際の患者骨髄で検討した例を示す。



P57KIP2 遺伝子の検出

- ma: A Systematic Review  
 J Clin Oncol. 27: 1906-1914, 2009
- ・Nagai H, Yano T, Watanabe T, Uike N, Okamura S, Hanada S, Kawano F, Sunami K, Inoue N, Sawamura M, Niishiura T, Hotta T, Horibe H. Remission induction therapy containing rituximab markedly improved the outcome of untreated mature B cell lymphoma. British J Haematol. 143: 672-680, 2008
  - ・Nagai H, Iwasaki N, Odawara T, Okada S. Actual status of AIDS-related lymphoma management in Japan. Int J Hematol. 87: 442-443, 2008
  - ・Kubota T, Moritani S, Yoshino T, Nagai H, Terasaki H. Ocular adnexal mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma with polyclonal hypergammaglobulinemia. Am J Ophthalmol. 145:1002-1006, 2008
  - ・Terazawa T, Nihashi T, Hotta T, Nagai H. Fluorine-18-fluorodeoxyglucose positron emission tomography for post-therapy assessment of Hodgkin's lymphoma and aggressive non-Hodgkin's lymphoma. J Nucl Med 49: 13-21, 2008
  - ・Hagiwara K, Nagai H, Li Y, Ohashi H, Hotta T, Saito H. Frequent DNA methylation but no mutation of *DD4* gene in malignant lymphoma. J Clin Exp Hematopathol. 47: 15-18, 2007
  - ・永井宏和  
 ホジキンリンパ腫 がん薬物療法学—基礎・臨床研究のアップデート—

- 日本臨床、67: 764-770, 2009
- ・永井宏和  
 再発または難治性多発性骨髄腫におけるレナリドマイドの役割  
 医薬ジャーナル、44: 113-118, 2008
  - ・永井宏和  
 濾胞性リンパ腫—悪性リンパ腫 update in 2008  
 内科、102: 293-299, 2008
  - ・岡田誠治、永井宏和、味沢篤  
 エイズ関連リンパ腫の現状と治療戦略  
 臨床血液、49: 206-214
  - ・永井宏和 造血器腫瘍—基礎・臨床領域における最新の研究動向—病因・病態解析—最近の展開—悪性リンパ腫 日本臨床、65(suppl 1): 80-85, 2007
  - ・永井宏和 濾胞性リンパ腫に対するリツキシマブの維持療法 血液・腫瘍科、54:732-736, 2007
  - ・永井宏和 がん診療の最前線—ホジキンリンパ腫—最新医学、67: 1329-1340, 2007
  - ・永井宏和 低悪性度B細胞性リンパ腫に対する標準的治療戦略 血液・腫瘍科、56: 1-6, 2008
  - ・濱口元洋、加藤千明、横澤敏也、寺澤晃彦、鈴木伸明、青木恵洋子、大橋春彦、永井宏和 単一施設におけるHLA 不一致NIMA(non-inherited maternal antigen)相補的血縁間造血幹細胞移植 13 例の検討 日本輸血細胞治療学会誌 53: 591-597, 2007
- [学会発表] (計 18 件)
- ・Nagai H, Hagiwara K, Hamaguchi M, Hotta T. p57KIP2 gene methylation is useful to detect minimal residual disease in diffuse large B cell lymphoma. 10th International Congress on Malignant lymphoma. (Lugano Switzerland) June



- 4-7, 2008.
- ・ Nagai H, Yano T, Watanabe T, Uike N, Okamura S, Kawano F, Hanada S, Sunami K, Ikeda H, Sawamura M, Nishihara T, Hotta T, Horibe K. Remission induction therapy containing rituximab improved the outcome of untreated DLBCL especially at poor risk of R-IP1- a retrospective analysis. The 32<sup>nd</sup> World Congress of the International Society of Hematology, (Bangkok, Thailand) October 19-23, 2008
  - ・ Sakiai T, Nagai H, Watanabe T, Uike N, Okamura S, Yano T, Kawano F, Hanada S, Sunami K, Ikeda H, Sawamura M, Nishihara T, Hotta T, Horibe K. Addition of rituximab improves progression-free and overall survival in patients with B-cell lymphoma receiving doxorubicin-containing chemotherapy. The 49<sup>th</sup> annual meeting of American society of hematology. ( Atlanta, USA) Dec 7-11, 2007
  - ・ Hagiwara K, Nagai H, Yokozawa T, Kato C, Hamaguchi M, Hotta T, Horibe K. Detection of p57KIP2 gene methylation is useful marker for minimal residual disease in diffuse large B cell lymphoma. The 49<sup>th</sup> annual meeting of American society of hematology. (Atlanta, USA) Dec 7-11, 2007
  - ・ 永井宏和、岩崎奈美、小田原隆、岡田誠治. 本邦での AIDS-related lymphoma の診療実態調査. 第 70 回日本血液学会総会、2008 年 10 月 10-12 日、京都
  - ・ 塚崎邦宏、渡辺隆、吉村健一、木下朝博、鏡味良豊、伊藤国明、小椋美知則、加藤晴美、山口素子、黒澤光俊、笠井正晴、飛内賢正、鈴木孝世、薄井紀子、正木康史、末

- 岡榮三郎、張高明、永井宏和、安藤潔、大西一功、畑裕之、吉田功、松田信、前田嘉治、向井清、中村栄男、大島孝一、堀田知光、下山正徳. 多施設共同臨床試験併合解析による末梢 T/NK 細胞性リンパ腫の新たな予後予測モデル (JC0060108A) 第 70 回日本血液学会総会、2008 年 10 月 10-12 日、京都
- ・ 萩原和美、小栗佳代子、堀田知光、永井宏和. 癌抑制遺伝子としての PROX1 の機能解析. 第 70 回日本血液学会総会、2008 年 10 月 10-12 日、京都
  - ・ 鈴木康裕、横澤敏也、萩原彰人、青木恵津子、加藤千明、大橋春彦、堀田知光、濱口元洋、永井宏和. 高齢者急性骨髄性白血病における救援化学療法としての Gentuzumab Ozogamicin (60). 第 70 回日本血液学会総会、2008 年 10 月 10-12 日、京都
  - ・ 小島勇貴、萩原彰人、森谷鈴子、鈴木康裕、横澤敏也、青木恵津子、大橋春彦、市原周、濱口元洋、堀田知光、永井宏和. HIV 陰性 HIV-8 陰性の primary effusion lymphoma の一例. 第 70 回日本血液学会総会、2008 年 10 月 10-12 日、京都
  - ・ 萩原彰人、鈴木康裕、青木恵津子、森谷鈴子、間宮均人、加藤千明、横澤敏也、大橋春彦、堀田知光、市原周、濱口元洋、永井宏和. HAART と強力化学療法を併用した AIDS 関連 Burkitt lymphoma/leukemia の 3 例. 第 70 回日本血液学会総会、2008 年 10 月 10-12 日、京都
  - ・ 萩原彰人、森谷鈴子、鈴木康裕、青木恵津子、加藤千明、横澤敏也、大橋春彦、堀田知光、市原周、濱口元洋、永井宏和. ALLT と診断された MTX 関連リンパ増殖症 (MTX-LPD) の 1 例. 第 48 回日本リンパ腫内科学会総会、2008 年 6 月 13, 14 日、札幌
  - ・ 永井宏和. 悪性リンパ腫の臨床—エイズリンパ腫と非エイズリンパ腫 (シンポジウム). 第 22 回日本エイズ学会学術集会、2008 年 11 月 26-28 日、大阪
  - ・ 永井宏和. 末梢血幹細胞移植の今日的課題、

臨床応用の現況と将来 悪性リンパ腫（シ  
ンボジウム）、第52回日本輸血・細胞治療  
学会東海支部例会、2008年10月25日、名  
古屋。

・永井宏和 B細胞性リンパ腫に対する抗体  
療法の動向「Rituximabによる濾胞性リン  
パ腫治療の進歩と最新の臨床試験成績」  
第47回日本リンパ腫内系学会総会、2007  
年5月24-26日、淡路

・永井宏和、横澤敏也、渡辺智之、鵜池直邦、  
岡村精一、矢野尊啓、花田修一、河野文夫、  
角南一貴、池田弘和、澤村守夫、西浦哲雄、  
堀田知光、堀部敬三、B細胞性リンパ腫の治  
療成績の後方視的解析（リツキスマゾ導入  
前後の比較）. 第69回日本血液学会・第49  
回日本臨床血液学会合同総会、2007年10  
月11-13日、横浜

・大橋春彦、梁晃晶子、小栗佳代子、永井宏  
和、横澤敏也、濱口元洋、堀田知光、骨髓  
増殖性疾患患者の造血コロニーを対象と  
した JAK2/V617F 変異と X 染色体の不活化  
パターンの検討. 第69回日本血液学会・  
第49回日本臨床血液学会合同総会、2007  
年10月11-13日、横浜

・鈴木康裕、横澤敏也、萩原彰人、寺澤晃彦、  
青木恵津子、加藤千明、大橋春彦、永井宏  
和、堀田知光、濱口元洋、当施設における  
高齢者急性骨髄性白血病の臨床的検討：単  
一施設での治療成績. 第69回日本血液学  
会・第49回日本臨床血液学会合同総会、  
2007年10月11-13日、横浜

・萩原和美、横澤敏也、堀田知光、永井宏  
和、p57KIP2 遺伝子のメチル化を指標とし  
た B 細胞性リンパ腫における微小残存病変  
の検出. 第54回日本臨床検査医学会学術集  
会、2007年11月22-25日、大阪

【図書】(計1件)

・永井宏和

ホジキンリンパ腫

Cancer Treatment Navigator (中川和彦編)、  
メデイカルビュー社、pp206-207, 2008

【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  
永井宏和

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし