

機関番号：16401
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20591132
 研究課題名（和文） 小児急性リンパ性白血病における治療法の改善および新規癌抑制遺伝子の同定
 研究課題名（英文） Development of therapy and identification of new tumor suppressor genes in childhood acute Lymphoblastic leukemia
 研究代表者
 武内 世生 (TAKEUCHI SEISHO)
 高知大学・教育研究部医療学系・准教授
 研究者番号：50253349

研究成果の概要（和文）：

95例の小児 ALL 検体を用い、遺伝子異常メチル化を解析した。RAR beta (33%), FHIT (28%), p15 (25%) において高頻度のメチル化が認められた。MGMT と p16 のメチル化は高い年齢と関係していた。p15 と SHP1 のメチル化は T-ALL に多く認められ、一方 DAPK のメチル化は precursor B-ALL に多く認められた。複数遺伝子のメチル化を有する患者は T-ALL で、中間または高リスクに分類された。以上の結果から、遺伝子異常メチル化は小児 ALL の臨床・病理的特徴と関連している事が明らかになった。

研究成果の概要（英文）：

Methylation profile was analyzed in patients with childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL). Methylation of both MGMT and p16 genes were associated with higher age. Methylation of both p15 and SHP1 genes occurred more frequently in T-ALL than in precursor B-ALL. In contrast, methylation of the DAPK gene was more frequent in precursor B-ALL. Patients with methylation of multiple genes more likely had T cell phenotype, and are classified as medium/high risk. These results suggest that methylation status is associated with clinicopathological features in childhood ALL.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・血液内科学

キーワード：血液腫瘍学、小児急性リンパ性白血病、異常メチル化、癌抑制遺伝子

1. 研究開始当初の背景

申請者はこれまで、約 250 例の小児 ALL の検体を用い、LOH 分析による遺伝子欠損の検討、マイクロサテライト不安定性の検討、PCR-SSCP 法による遺伝子点突然変異の検討、

及び遺伝子異常メチル化の検討を行ってきた。この約 250 例の小児 ALL 患者は、プレドニン、メソトレキセート、および 6-MP 等を含む、統一プロトコールにより治療されている。そこで、それぞれの薬剤反応性に関連

する遺伝子多型と、実際のそれぞれの薬剤に対する治療反応性および副作用・毒性の関連を解析することで、個人個人の薬物反応性の違いを予知して個別最適化された、より安全でより効果の高いテーラーメイド医療の可能性を探りたいと考えている。現在まで、小児 ALL の検体を用いた、このような大規模な遺伝子多型の研究の報告はなく、この研究により、小児 ALL における治療法の改善に大きく貢献するものと思われる。以上の遺伝子多型に関する研究と平行して、申請者は癌抑制遺伝子プロモーターの異常メチル化、およびその周囲のヒストン蛋白の脱アセチル化に関する研究も継続して行いたいと考えている。申請者は最近、小児 ALL における癌抑制遺伝子異常メチル化の解析を行い、RAR beta, FHIT, p15 遺伝子のプロモーターに高頻度のメチル化が認められることを明らかにした。本研究では、異常メチル化が認められた遺伝子の発現を解析し、各遺伝子のプロモーター領域の異常メチル化の状態と遺伝子発現の有無の関係を明らかにしたいと考えている。この検討により、遺伝子異常メチル化の意義がより明らかになると期待できる。さらに、脱メチル化薬 (5-Aza-2'-deoxycytidine) の、異常メチル化、遺伝子発現、および細胞増殖能に対する影響も検討したいと考えている。もし脱メチル化薬により、異常メチル化が解除され、遺伝子発現が回復し、細胞増殖が低下すれば、脱メチル化薬が小児 ALL の治療薬として期待できる。

2. 研究の目的

小児急性リンパ性白血病 (ALL) は小児において最も頻度の高い悪性腫瘍である。現在の抗癌剤治療での奏効率は 70-80 % であるが、ひとたび再発すると治癒は望めない事が多い。本研究では、治療法の改善、新規治療薬の開発、新規癌抑制遺伝子の同定を目的とする。治療法改善のため、薬剤反応性に関連する遺伝子多型を解析し、実際の治療反応性および副作用・毒性との関連を明らかにし、より安全でより効果の高い治療法の可能性を探る。新規治療薬の開発のため、申請者が発見した癌抑制遺伝子の異常メチル化が、脱メチル化薬により解除され、細胞増殖が低下するか検討し、脱メチル化薬が新規治療薬として期待できるかを明らかにする。新規癌抑制遺伝子の同定のため、申請者がこれまで DAC+SAHA 後にマイクロアレイでスクリーニングして発見した 149 個の候補遺伝子の解析を進める。

3. 研究の方法

(1) 小児 ALL における、薬剤反応性に関連する遺伝子多型と、実際の治療反応性および

毒性の解析。

約 250 例の小児 ALL 検体より DNA を抽出し、薬物代謝酵素遺伝子 (CYP1A1, CYP2D6, CYP3A, CYP450, NAT1, NAT2, NQO1, GSTM1, GSTT1, GSTP1, MPO, TPMT, MTHFR)、薬剤反応性関連遺伝子 (Glucocorticoid receptor, RFC1, Methylenetetrahydrofolate reductase, methionine synthase)、薬剤耐性関連遺伝子 (MDR1)、発癌物質代謝遺伝子 (CYP2A6) などに関し、各遺伝子産物の機能・活性に違いを生じる SNPs に特異的なプライマーと、PCR サーマルサイクラー (研究室に完備している) を用いて SNPs 部分を増幅し、その産物を SNPs 特異的な制限酵素で切断した後、サブマージ・アガロース電気泳動検出セットで解析することにより遺伝子多型の網羅的な解析を行う (PCR-RFLP 法)。各遺伝子多型と、実際のそれぞれの薬剤に対する治療反応性および副作用・毒性の関連を解析する。

(2) 小児 ALL における各種癌抑制遺伝子プロモーターのメチル化と遺伝子発現の関係の検討。

小児 ALL 検体より RNA を抽出し、これまでの検討で高頻度に異常メチル化が認められた RAR beta, FHIT, p15 それぞれに特異的なプライマーと PCR サーマルサイクラーで増幅し、その産物をサブマージ・アガロース電気泳動検出セットを用いて解析し (RT-PCR 法)、各遺伝子のプロモーター領域の異常メチル化の状態と遺伝子発現の有無の関係を明らかにする。

(3) 脱メチル化薬の、異常メチル化、遺伝子発現、および細胞増殖能に対する影響の検討。RAR beta, FHIT, p15 遺伝子の異常メチル化を、急性リンパ性白血病細胞株において検討する。細胞株において異常メチル化が認められた遺伝子については、脱メチル化薬 (5-Aza-2'-deoxycytidine) 処理後に異常メチル化が解除されているか、および遺伝子発現が回復しているかを bisulfite mapping 法および RT-PCR 法で検討する。さらに脱メチル化薬により細胞増殖が低下するかどうかを bromodeoxyuridine 取り込み法により検討する。

(4) 新規癌抑制遺伝子の同定

申請者がこれまで発見した、149 個の癌抑制遺伝子の候補について、

1. リアルタイム RT-PCR を用いて、急性リンパ性白血病細胞株 (TALL-1, PALL-1, NALL-1) および、臨床 ALL 検体において発現が減弱しているかどうか調べる。

2. 発現抑制の機序としてどのような epigenetic change が関与しているのかを調

べる。細胞株に脱メチル化薬とヒストン脱アセチル化酵素阻害薬を単独あるいは一緒に使い、その効果をまず colony assay などで評価する。脱メチル化薬で反応があれば、シーケンス解析、および methylation specific PCR (MSP) を用いて CpG 部位の異常メチル化の頻度や程度を評価していく。ヒストン脱アセチル化酵素阻害薬で反応がある場合、Chromatin immunoprecipitation (ChIP) によってそのヒストンのアセチル化を評価する。

3. 候補遺伝子を組み込んだ inducible construct を作製し、ALL 細胞株に transfection して細胞株の増殖が抑制されるかどうかを bromodeoxyuridine 取り込み法により検討する。

4. どのようなメカニズムで細胞死にいたるのかを western blot やフローサイトメトリーなどを使って apoptosis や cell cycle の観点から調べる。

5. 予想される機能から、癌抑制遺伝子であると考えられるか検討し、候補を絞り込み、データを総合して候補遺伝子から新規癌抑制遺伝子として適当なものを同定していく。

4. 研究成果

(1) 小児 ALL における、TNF 遺伝子多型の解析。

214 例の小児 ALL 検体より DNA を抽出し、tumor necrosis factor (TNF) 遺伝子に関し、その遺伝子産物の機能・活性に違いを生じる SNPs に特異的なプライマーと PCR サーマルサイクラーを用いて SNPs 部分を増幅し、その産物を SNPs 特異的な制限酵素で切断した後、サブマージ・アガロース電気泳動検出セットで解析することにより遺伝子多型の解析を行った。その遺伝子多型と、各種臨床情報の関連を解析した結果、高リスクと考えられる遺伝子多型は年齢が高い患者に有意に多く認められた ($p=0.024$)。しかし、TNF 遺伝子多型は、白血球数、性別、化学療法反応性、および予後とは有意な関係を示さなかった。以上より、TNF 遺伝子多型のインパクトは限定的である。

(2) 多発性骨髄腫 (MM) における各種癌抑制遺伝子プロモーターのメチル化の検討。

MM 49 例を対象に、14 遺伝子について、methylation-specific PCR 法を用いて、DNA メチル化パターンを解析した。p16, DAPK, FHIT 遺伝子において、25%以上のメチル化が認められたが、p21, p27, cyclin D2 遺伝子ではほとんどメチル化が認められなかった。これらの結果を、以前解析した小児急性リンパ性白血病 (ALL) の結果と比較した。p21, p27, cyclin D2 遺伝子は MM, ALL ともにメチル化がほとんど認められなかった。また、

DAPK, FHIT 遺伝子は、MM, ALL ともに高頻度のメチル化が認められた。一方、p15, RAR β 遺伝子のメチル化は ALL でのみ認められた。以上の結果より、MM と ALL は発症機序が一部共通であると考えられた。

(3) 小児急性リンパ性白血病 (ALL) における各種癌抑制遺伝子プロモーターのメチル化の検討。

95 例の小児 ALL 検体を用い、methylation specific PCR 法にて p14, p15, p16, RB, hMLH1, MGMT, APC, RAR beta, DAPK, FHIT, p21, p27, cyclin D2, SHP1 遺伝子の異常メチル化を解析した。その結果、RAR beta (33%), FHIT (28%), p15 (25%) において高頻度のメチル化が認められた。一方、p14 および p21 遺伝子には、異常メチル化は全く認められなかった。69%の症例において、少なくとも 1 つの遺伝子のメチル化が認められた。いくつかの遺伝子のメチル化は同時に起こっておりその関係を調べた結果、p15 のメチル化は、p16, MGMT、および RAR beta のメチル化に関連していた (それぞれ $p=0.049$, $p=0.004$, $p=0.013$)。メチル化と臨床情報の関連を調べた結果、MGMT と p16 のメチル化は高い年齢 (それぞれ $p=0.01$ と $p=0.03$) と関係していた。p15 と SHP1 のメチル化は T-ALL に多く認められ (それぞれ $p=0.02$, $p=0.01$)、一方 DAPK のメチル化は precursor B-ALL に多く認められた ($p=0.01$)。複数遺伝子のメチル化を有する患者は T-ALL で、中間または高リスクに分類された (それぞれ $p=0.004$ と $p=0.03$)。以上の結果から、遺伝子異常メチル化は小児 ALL の臨床・病理的特徴と関連している事が明らかになった。

(4) 慢性骨髄性白血病急性転化 (CML-BC) における、各種遺伝子プロモーターのメチル化の検討。

CML-BC 16 例を対象に、13 遺伝子について、methylation-specific PCR 法を用いて、DNA メチル化パターンを解析した。P15 遺伝子で 18%、MGMT 遺伝子と RAR β 遺伝子でそれぞれ 12%、p16 遺伝子・DAPK 遺伝子・および FHIT 遺伝子において、それぞれ 6% の症例でメチル化が認められ、全体としては、25% の症例で、少なくとも 1 つの遺伝子のメチル化が認められた。一方、p14・RB・hMLH1・hMSH2・APC・RIZ・および SOCS-1 遺伝子ではメチル化が認められなかった。以上の結果より、DNA ミスマッチ修復遺伝子より細胞周期調節遺伝子の方が、CML-BC に関与していると考えられた。ただ、本検討では慢性骨髄性白血病慢性期のメチル化については検討できていない。したがって、これらの異常が CML の発症に関与するのか、CML-BC への進展に関与するのかは不明である。

(5) 小児急性リンパ性白血病における新規癌抑制遺伝子の同定。

申請者がこれまで発見した、149 個の癌抑制遺伝子の候補について、リアルタイム RT-PCR を用いて、急性リンパ性白血病細胞株 (TALL-1, PALL-1, NALL-1) において発現が減弱しているか検索した結果、76 個の候補遺伝子の発現が低下していた。次に、それらの遺伝子の発現が臨床 ALL 検体において減弱しているかどうか調べた結果、52 個の候補遺伝子の発現が低下していた。これらの候補遺伝子の予想される機能から、癌抑制遺伝子であると考えられるか検討し、データを総合して候補を絞り込んだ結果、新規癌抑制遺伝子として適当なものが 23 個同定された。

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 6 件)

① Nishioka C, Ikezoe T, Yang J, Takeuchi S, Koeffler HP, Yokoyama A: MS-275, a novel histone deacetylase inhibitor with selectivity against HDAC1, induces degradation of FLT3 via inhibition of chaperone function of heat shock protein 90 in AML cells. *Leukemia Research*、査読有 32: 1382-1392, 2008

② Takeuchi S, Matsushita M, Zimmermann M, Ikezoe T, Komatsu N, Seriu T, Schrappe M, Bartram CR, Koeffler HP: Clinical significance of aberrant DNA methylation in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia Research*、査読有, in press

③ Uehara E, Takeuchi S, Yang Y, Fukumoto T, Matsushashi Y, Tamura T, Matsushita M, Nagai M, Koeffler HP, Tasaka T: Aberrant methylation in promoter-associated CpG islands of multiple genes in blast crisis of chronic myelogenous leukemia. *Oncology Letters*、査読有, in press

[学会発表] (計 3 件)

① 松下雅英、武内世生、松下千世、小松直樹、池添隆之：造血器悪性腫瘍における MLH1 遺伝子の異常メチル化 第 67 回日本癌学会学術総会 2008 年 10 月 2 日、名古屋市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

武内 世生 (TAKEUCHI SEISHO)

高知大学・教育研究部医療学系・准教授

研究者番号：50253349