

機関番号：16401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20591133

研究課題名（和文）造血器腫瘍における予後規定因子となる新規メチル化マーカーの同定とその臨床応用

研究課題名（英文）Identification of a novel methylated gene as a prognostic factor in hematological malignancies and its clinical application.

研究代表者

大畑 雅典（DAIBATA MASANORI）

高知大学・教育研究部医療学系・教授

研究者番号：50263976

研究成果の概要（和文）：遺伝子がメチル化されることにより、その遺伝子情報が制御されることが知られている。本研究では造血器腫瘍における予後規定因子となる新規メチル化遺伝子の同定を目的として、リンパ球増殖抑制やアポトーシスに關与する *BMP-6* 遺伝子に着目した。白血病の中では、成人 T 細胞白血病（ATL）が他のタイプの白血病に比べて、有意に *BMP-6* 遺伝子がメチル化されていることが判明した。ATL の病型別にみると、進行型で予後不良である急性型・リンパ腫型で本遺伝子のメチル化がほぼ全例に認められた。*BMP-6* 遺伝子メチル化は ATL において、病期進行を予測する新規メチル化マーカーになりうることを示された。

研究成果の概要（英文）：Bone morphogenetic proteins (BMP) are multifunctional regulators of cell proliferation and apoptosis in various types of malignant cells. In this study, we investigated *BMP-6* promoter methylation in patients with various types of leukemias. The *BMP-6* methylation was found preferentially in adult T-cell leukemia (ATL) compared with other types of leukemias. Among subtypes of ATL, the *BMP-6* gene was more frequently methylated in aggressive ATL forms of acute and lymphoma types than less malignant chronic ATL and smoldering ATL. Serial analysis demonstrated an increasing methylation of CpG sites in the *BMP-6* promoter and the resultant suppression of *BMP-6* expression as ATL progressed. These findings suggested that *BMP-6* promoter methylation is likely to be a common epigenetic event at later stages of ATL and that the methylation profiles may be useful for the staging of ATL as well as for evaluation of the individual risk of developing the disease.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
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、造血器腫瘍、メチル化遺伝子

## 1. 研究開始当初の背景

DNA メチル化などのエピジェネティックな

異常は、DNA の一次構造の変化を起こすことなく、遺伝子情報を制御するメカニズムとし

て研究の重要性が認識されている。ヒト癌において、DNA メチル化は発癌における重要な因子である。造血器腫瘍においても他の悪性腫瘍と同様に、様々な遺伝子がプロモーター領域の DNA メチル化によって不活性化を受け、病態形成に深く関わっている。その多くは *TP53* (*p53*), *CDKN2A*, *CDKN2B*, *DAPK* などの癌抑制遺伝子、細胞の増殖制御やアポトーシスに関係する遺伝子である。

BMP (Bone Morphogenetic Protein-6) は TGF- $\beta$  スーパーファミリーに属し、腫瘍細胞を含め、様々な細胞の増殖制御やアポトーシスに関与することが知られている。これまでに造血器腫瘍における TGF- $\beta$  関連遺伝子のメチル化についての詳細な報告がなく、本研究において、*BMP* 遺伝子のメチル化解析を行なうに至った。*BMP* 遺伝子の中でもプロモーター領域に CpG を多く含む *BMP-6* 遺伝子に着目した。

## 2. 研究の目的

悪性リンパ腫、白血病、多発性骨髄腫などの造血器腫瘍において、*BMP-6* 遺伝子のメチル化解析を行い、各腫瘍の病型・病期によりそのメチル化に差異が認められるのか、また患者の予後や病期進展を予測できるメチル化マーカーとして臨床応用できるかどうかの基礎的研究を行なうことを目的とした。

## 3. 研究の方法

*BMP-6* 遺伝子のメチル化解析を COBRA 法と Bisulfite シークエンス法により、また遺伝子発現は RT-PCR 法と Western Blot 法により解析した。

COBRA 法ではメチル化を定量することが可能である。まず抽出した DNA を Bisulfite 反応に供する。メチル化しているアレルとメチル化していないアレルを平等に PCR 増幅した後、メチル化されている CpG は CpG のまま保存されるが、メチル化されていない CpG は TpG に変換されることを利用して、認識部位に CpG を含む制限酵素 (本解析の場合は *Bst*U I) で消化することにより、メチル化を検出した (図 1)。

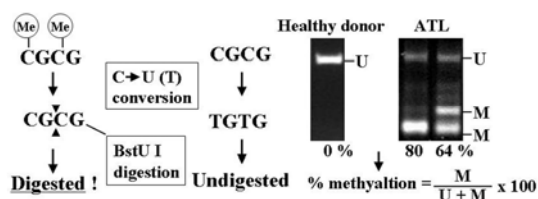


図 1 COBRA 法の原理

図 1 は COBRA 法で急性型成人 T 細胞白血病 (ATL) の 2 症例の *BMP-6* 遺伝子メチル化を示したものである (U は非メチル化バンド、M はメチル化バンドを示す)。まずこの方法で、

メチル化のスクリーニングを行なった。

次に、個々の CpG 配列のメチル化の状態を把握するために Bisulfite シークエンス法を行なった。Bisulfite 処理した DNA を PCR に供し、その PCR プロダクトをクローニングした後に、シークエンス解析を行なった。

## 4. 研究成果

### (1) 悪性リンパ腫

高悪性度を示すバーキットリンパ腫 (BL) の 83% (6 例中 5 例)、またびまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫 (DLBCL) の 60% (21 例中 35 例) で *BMP-6* 遺伝子のメチル化が確認された。一方、調べた他の組織型 49 例中、メチル化があったのはわずか 1 例 (末梢性 T 細胞リンパ腫) であった。

メチル化が認められた症例では、*BMP-6* 遺伝子の発現 (mRNA、蛋白) が抑制されていた。調べた限り、健康人末梢血単核球、反応性リンパ節組織ではメチル化は検出されなかった。つまり BL や DLBCL の一部など、高悪性度のリンパ腫で *BMP-6* 遺伝子のメチル化とそれに伴う遺伝子発現の不活化が高率に認められた。

また DLBCL 患者を *BMP-6* 遺伝子メチル化群と非メチル化群に分け、その予後解析として disease-free survival (DFS) と overall survival (OS) を Kaplan-Meier 法で検討した。メチル化群で DFS ( $P=0.014$ )、OS ( $P=0.038$ ) ともに有意差をもって不良であった。さらに多変量解析の結果、*BMP-6* 遺伝子メチル化は、DFS、OS ともに独立した予後不良因子であることが判明した。

### (2) 白血病

治療前の各種白血病 186 例の末梢血や骨髄液から抽出した DNA を材料とした。その内訳は、ATL 60 例 (急性型 28 例、リンパ腫型 18 例、慢性型 9 例、くすぶり型 5 例) 急性骨髄性白血病 (AML) 67 例、急性リンパ性白血病 (ALL) 38 例、慢性リンパ性白血病 21 例 (CLL) である。また平行して、健康人 (7 例) の末梢血単核球、22 例の良性リンパ節病変材料も DNA メチル化解析に供した。

*BMP-6* 遺伝子プロモーター領域のメチル化は他のタイプの白血病 (126 例中 10 例) と比較して ATL (60 例中 49 例) で統計学的有意差をもって認められた ( $p < 0.001$ )。その内訳は ATL 82% であるのに対し、AML 5%、ALL 16%、CLL 5% であった。また ATL の病型分類においては、*BMP-6* 遺伝子のメチル化が認められたのは、進行型である急性型の 96% およびリンパ腫型の 94% に対し、進行の緩徐な型である慢性型では 44% およびくすぶり型では 20% であった (図 2)。すなわち、より進行型の症例で *BMP-6* 遺伝子のメチル化が高頻度で検出された。

また健常人の末梢血単核球や、反応性リンパ節炎などの非悪性リンパ節病変に関しては、検索した限りの全てにおいて *BMP-6* 遺伝子のメチル化は認められなかった。

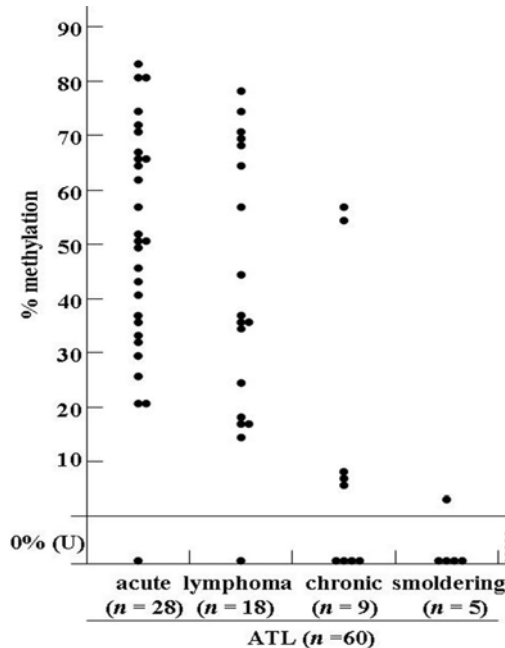


図2 ATL病型別の *BMP-6* 遺伝子メチル化頻度

*BMP-6* 遺伝子のメチル化が mRNA 転写抑制と蛋白発現低下をきたすことも確認された。さらには脱メチル化剤である 5-aza-2'-deoxycytidine を加えることで *BMP-6* 遺伝子転写物の発現が回復した。以上の結果は、*BMP-6* 遺伝子プロモーター領域のメチル化が転写サイレンスに関連していることを示している。

ATL の臨床経過として、慢性型 ATL 症例の一部で、後に急性型 ATL に進行していくものがある。経時的にメチル化解析が可能であった症例研究において、ATL の病期進展に伴い *BMP-6* 遺伝子プロモーター領域の CpG 部位でのメチル化の増加が認められ、さらに慢性型 ATL 期にすでに *BMP-6* 遺伝子プロモーターに部分的なメチル化をきたしていたものでは、メチル化のない症例と比較して、高率に数年以内に急性型 ATL に進展していることが確認された。これらの結果より、*BMP-6* 遺伝子プロモーター領域のメチル化状態が、慢性型 ATL 症例における急性転化のリスクを予測するための新たなバイオマーカーになりうる可能性があると考えられた。

一般に HTLV-I 感染後、くすぶり型あるいは慢性型 ATL を経て、より悪性度の高い急性型/リンパ腫型 ATL へと進展する。本研究において、臨床病期進展に伴い、*BMP-6* 遺伝子プロモーターの CpG 部位のメチル化の増加が、結果として ATL 進展期にみられるような

*BMP-6* 遺伝子発現抑制を惹起していることが示唆された。つまり *BMP-6* 遺伝子プロモーター領域のメチル化は ATL 進行例において一般的なエピジェネティックな出来事であることを示している。ATL ではこれまでに *BMP-6* 遺伝子メチル化の他に、癌抑制遺伝子の *CDKN2A* 遺伝子や、細胞周期制御因子である *Kruppel-like-factor4* 遺伝子、また転写因子である *early growth response3* 遺伝子などでも ATL の病期進展に伴いメチル化が増強されることが報告されている。したがって、*BMP-6* 遺伝子を含むこれら遺伝子の総合的なメチル化解析は、症例毎の ATL 進展のリスク評価や ATL の病期分類にも有用であると考えられる。また臨床的応用として、慢性型 ATL の急性型 ATL への進展予防法としての、脱メチル化剤使用についての検討が今後期待される。

### (3) 多発性骨髄腫

多発性骨髄腫において *BMP-6* 遺伝子のメチル化解析を 34 症例、骨髄腫細胞株 5 例について行なった。34 症例中メチル化が認められたのはわずか 1 例 (3%) で、細胞株 5 例中では 1 例であった。メチル化が認められたサンプルでは、Bisulfite シークエンス法によりメチル化の存在が確認され、また RT-PCR により *BMP-6* 遺伝子の発現が抑制されていることが判明した。メチル化が認められた症例は、進行が極めて早い悪性度の高い骨髄腫であった。これらの結果により、多発性骨髄腫においては *BMP-6* 遺伝子プロモーター領域のメチル化は普遍的なものではないが、極めて悪性度の高い骨髄腫では、本遺伝子のメチル化が認められ、悪性度を示すメチル化マーカーになり得る可能性が示唆された。

また、上記の遺伝子メチル化研究と平行して、本研究期間中に悪性リンパ腫の腫瘍化メカニズムの解明、および造血器腫瘍を中心とした腫瘍と癌ウイルスの関係についての研究にも携わった。

### 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 11 件)

- ① Taniguchi A, Nemoto Y, Yokoyama A, Kotani N, Imai S, Shuin T, Daibata M. Promoter methylation of the bone morphogenetic protein-6 gene in association with adult T-cell leukemia. *International Journal of Cancer*. 査読有, 123, 2008, 1824-1831. (<http://hdl.handle.net/10126/4656>)
- ② Ohtsuki Y, Daibata M, Bandobashi K, Lee,

- G.H, Furihata M, Yokoyama A, Miyoshi I. Ultrastructural study of the morphogenesis of human herpesvirus 6 type B in human T-lymphotropic virus type I-producing lymphoid cells. *Medical Molecular Morphology*. 査読有, 41, 2008, 204-210.
- ③ Rizzatti E, Mora-Jensen H, Weniger MA, Gibellini F, Lee E, Daibata M; Lai R, Wiestner A. Noxa mediates bortezomib induced apoptosis in both sensitive and intrinsically resistant mantle cell lymphoma cells and this effect is independent of constitutive activity of the AKT and NF-kappaB pathways. *Leukemia and Lymphoma*. 査読有, 49, 2008, 798-808.
- ④ Takakuwa T, Tresnasari K, Rahadiani N, Miwa H, Daibata M, Aozasa K. Cell origin of pyothorax-associated lymphoma: a lymphoma strongly associated with Epstein-Barr virus infection. *Leukemia*. 査読有, 22, 2008, 620-627.
- ⑤ Watanabe H, Daibata M, Tohyama M, Batchelor J, Hashimoto K, Ijima M. Chromosomal integration of human herpesvirus 6 DNA in anticonvulsant hypersensitivity syndrome. *British Journal of Dermatology*. 査読有, 158, 2008, 640-642.
- ⑥ Kamioka M, Imamura J, Komatsu N, Daibata M, Sugiura T. Testican 3 expression in adult T-cell leukemia. *Leukemia Research*. 査読有, 33, 2009, 913-918. (<http://hdl.handle.net/10126/4617>)
- ⑦ Mathas S, Kreher S, Meaburn K.J, Jöhrens K, Lamprecht B, Assaf C, Sterry W, Kadin M,E, Daibata M, Joos S, Hummel M, Stein H, Janz M, Anagnostopoulos I, Schrock E, Misteli T, Dörken B. Gene deregulation and spatial genome reorganization near breakpoints prior to formation of translocations in anaplastic large cell lymphoma. *Proceeding of the National Academy of Science of the USA*. 査読有, 106, 2009, 5831-5836.
- ⑧ Miyoshi I, Uemura Y, Nakai T, Daibata M, Ly M, Saintigny P. Erythropoietin-producing Lung Cancer. *Internal Medicine*. 査読有, 48, 2009, 389-390. (<http://hdl.handle.net/10126/3088>)
- ⑨ Nemoto Y, Taniguchi A, Kamioka M, Nakaoka Y, Hiroi M, Yokoyama A, Enzan H, Daibata M. Epstein-Barr virus-infected subcutaneous panniculitis-like T-cell lymphoma associated with methotrexate treatment. *International Journal of Hematology*. 査読有, 92, 2010, 364-368.
- ⑩ Hoshiba H, Uchiyama J, Kato S, Ujihara T, Muraoka A, Daibata M, Wakiguchi H, Matsuzaki S. Isolation and characterization of a novel Staphylococcus aureus Bacteriophage  $\phi$ MR25 and its therapeutic potential. *Archives of Virology*. 査読有, 155, 2010, 545-552.
- ⑪ Murakami M, Imajoh M, Ikawa T, Nakajima H, Kamioka M, Nemoto Y, Ujihara T, Uchiyama J, Matsuzaki S, Sano, S, Daibata M. Presence of Merkel cell polyomavirus in Japanese cutaneous squamous cell carcinoma. *Journal of Clinical Virology*. 査読有, 50, 2011, 37-41.
- [学会発表] (計 9 件)
- ① 大畑雅典、外傷後膿胸を母地に発症した EB ウイルス陽性膿胸関連リンパ腫、日本血液学会総会、2008 年 10 月 10 日、京都国際会議場 (京都市)
- ② Mathas S, Daibata M, 他, Gene deregulation and spatial genome reorganization near breakpoints prior to formation of translocations in ALCL. 2008 年 12 月 6 日, American Society of Hematology Annual Meeting, San Francisco Convention Center (San Francisco, USA).
- ③ 谷口亜裕子、大畑雅典 他、成人 T 細胞白血病における BMP-6 遺伝子プロモーター領域のメチル化、日本血液学会総会、2009 年 10 月 23 日、国立京都国際会館 (京都府)
- ④ 小松直樹、大畑雅典 他、肺原発悪性リンパ腫 (T cell/histiocyte rich diffuse large B-cell lymphoma) の一例、日本内科学会四国地方会、2009 年 11 月 22 日、香川県社会福祉総合センター (香川県)
- ⑤ 村上雅尚、大畑雅典 他、転移抑制蛋白 Nm23-H1 と EBV、EB ウイルス感染症研究会、2009 年 3 月 6 日、ベルサール八重洲 (東京都)
- ⑥ 大畑雅典、ヒト T 細胞白血病ウイルス (HTLV-I) 関連造血器腫瘍：成人 T 細胞白血病における新規メチル化遺伝子の同定、中四国乳酸菌研究会総会、2010 年 5 月 14 日、岡山全日空ホテル (岡山市)
- ⑦ 谷口亜裕子、大畑雅典 他、Epstein-Barr virus-associated subcutaneous panniculitis-like T-cell lymphoma arising during methotrexate therapy for rheumatoid arthritis、日本血液学会学術集会、2010 年 9 月 25 日、パシフィコ横浜会議センター (横浜市)
- ⑧ 村上雅尚、大畑雅典 他、Association of Merkel cell polyomavirus with skin squamous cell carcinoma of Japanese patients、日本癌学会学術総会、2010 年 9 月 22 日、大阪国際会議場 (大阪市)
- ⑨ 村上雅尚、大畑雅典 他、Multiple

oncogenic viruses identified in ocular  
surface squamous neoplasia in HIV patients、  
日本ウイルス学会学術集会、2010年11  
月9日、徳島県郷土文化会館（徳島市）

〔図書〕（計1件）

- ① 大畑雅典、他、医学書院、medicina 目  
でみるトレーニング、2010、2

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.kochi-ms.ac.jp/~ff\\_mcrbi/index.htm](http://www.kochi-ms.ac.jp/~ff_mcrbi/index.htm)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

大畑 雅典 (DAIBATA MASANORI)

高知大学・教育研究部医療学系・教授

研究者番号：50263976