

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 4月 1日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究 B

研究期間：平成21年度～平成23年度

課題番号：21390182

研究課題名（和文） 薬物-腫瘍遺伝学的支援検査の樹立

研究課題名（英文） Development of Pharmacogenomics in Clinical Oncology

研究代表者

上平 憲 (KAMIHIRA SHIMERU)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：80108290

概要（和文）：

現在、国民の30%は癌死で、近い将来の高齢化社会では、70%のヒトはがんにより1度は苦しむであろうと言われている。従って、理想的な医療モデルと言われる Personalized Oncology の促進をはかることを国民広く望んでいる。

特に、臨床検査の立場から「がん細胞の免疫形質特性（Immunophenotype）や遺伝子特性（Cytogenetic）の評価と同時に個体の体質的特性（生殖細胞遺伝子情報）と腫瘍ゲノム特性とを合わせ、同時に Personalized Oncology の発展に寄与出来る genomic test system を構築することを目的とし、一部実施した。

研究成果の概要（英文）：

Now, 30% of people are death by cancer and 70% of humans are said to be once troubled with cancer in the future near aging society. therefore, the thing for which promotion of Personalized Oncology called ideal medical model is aimed at -- people -- it wishes widely. Especially simultaneously with evaluation of the immunity character characteristic (Immunophenotype) of the position of a clinical examination to "cancer cell, or the gene characteristic (Cytogenetic), it is the constitutional characteristic (germ-line-genes information) and the tumor genome characteristic of an individual. It is made to meet and genomic test system which can contribute to development of Personalized Oncology simultaneously is built. The part was carried out for the purpose of things.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	6,400,000	1,920,000	8,200,000
2010年度	5,800,000	1,740,000	7,540,000
2011年度	1,900,000	570,000	2,470,000
年度			
年度			
総計	14,100,000	4,230,000	18,330,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：腫瘍検査学

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

1950年代から急速に進歩してきた分子生命科学が2007年のヒト全ゲノムの解読を堺にヒトへの応用学、即ち translation 研究が加速してきた。

一方、発がんにかんする分子機構も **addictive oncogene** を中心とするシグナル **path way** の異常であることがわかり、分子標的療法が次々に開発されつつあった。他方、脱シグナル異常を制御する標的分子抗体や小分子ケミカルの発見があり、新しい医療モデルが臨床の現場に次々に途上しつつあった。

ところが個別化療法に不可欠な **bio-marker** の検査体制は遅々としていた。

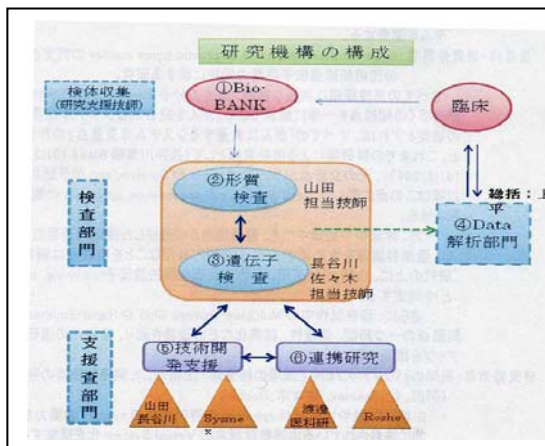
2. 研究の目的

現在、国民の30%は癌死で、近い将来の高齢化社会では、70%のヒトはがんにより一度は苦しむであろうと言われている。従って、理想的な医療モデルと言われる **Personalized Oncology** の促進をはかることを国民広く望んでいる。

特に、臨床検査の立場から「がん細胞の免疫形質特性 (**Immunophenotype**) や遺伝子特性 (**Cytogenetic**) の評価と同時に個体の体質的特性 (生殖細胞遺伝子情報) と腫瘍ゲノム特性とを合わせ、同時に **Personalized Oncology** の発展に寄与出来る **genomic test system** を構築することを目的とする。

3. 研究の方法

本研究は、実際の臨床および検査の現場と Bench work が一体となった研究法が必要である。そこで、研究体制を下記のように整備し、教官・臨床検査技師とともに一致協力して研究に対応する体制とした。



主要な部門として、

- ① 総括・検体バンク部門
- ② 形質・形態部門

③ 遺伝子検査部門

④ 臨床情報部門

- ⑤ 検査法改良・開発部門などで、有機的に研究代表者がオーガナイズし、定期的に検討会を設けた。

4. 研究成果

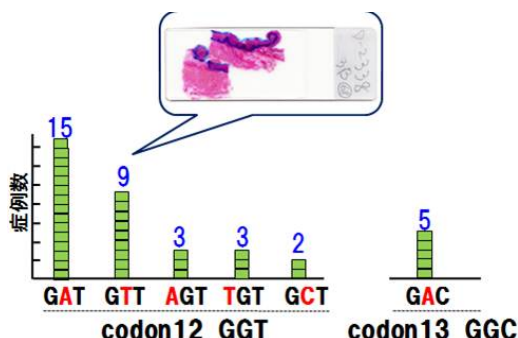
Personalized Oncology として、今、臨床の現場であたらしい医療モデルとして、先陣を切っているのが造血器腫瘍分野である。長崎地区は成人 T 細胞白血病 (ATL) の多発地区であり、その臨床的多様性が他の腫瘍の診断との鑑別に挙がり、正確な診断に悪影響を与えている。

そこで、第一の成果として、他の腫瘍から ATL を確実に診断するためにサザンブロット法 (SBH) を導入してその問題点の解決に寄与した。同時に、ATL 細胞・FCM-形質・HTLV-1 proviral load (PVL)・SBH データの ATL data/cell Bank を樹立した。現在までに、約 1000 例の SBH の data が蓄積された。これらの data データを活用した研究成果として、下記の原著論文の No. 1 から No. 6 が国際誌に報告された。

第二の成果として、これまで診断の hallmark のなかった MDS (骨髄異形性症候群) や染色体異常のない Acute Leukemia の universal tumor marker と期待されている WT-1 mRNA の定量検査を導入し、治療の monitor となりうるか? さらに MPD における Jak-2 遺伝子変異検査の outcome での臨床的有用性の評価を血液内科と共同にて検討中である。

第三の成果として、画期的な分子標的薬として登城したグリベックに耐性となる機序が Chimeric *abl* の Mutation (変異) であることが判明している。そこで、直ちにその問題に対処すべく MRD (minimum Residual Disease) の超微量 Tumor Burden 時期に変異を monitoring する検査体制を PCR-Melting Curve 法と Pyosequencer 法にて確立し、Monitoring して、その有用性を確認しつつある。

一方、これらの chimeric 変異と Gleevec の感受性低下の検討の過程で *abl* 遺伝子は chimeric *abl* に関わらず 35 base pairs



insertion していることが分かった。これがどのような生物学的意義があるかは今後の研究成果として期待したい。

(K-Ras 変異の genotype 頻度)

第5の成果として、Epidermal Growth Factor (EGF)-Receptor (R) の aberrancy と転移性大腸がんに対する分子標的薬 Erbitux の適応としての選択の有用性に関する検討を Companion Diagnostics として直ちに検討を開始した。

Erbitux の抗大腸がんに対する奏効性の岐路は EGFR の下流のがん原遺伝子 K-Ras の変異の有無で決まるとされているが、K-Ras 自体の検査法や統一的な測定法、変異率と奏効性の関係および data harmonization の問題など解決すべき問題が多い。本シリーズでは2009年から、パラフィンブロックから標本病理学的に癌組織であることを専門の病理医と相談して、がん病変部位を確認して、その部位から検査用 genome を抽出している。現在までに150例において、Pyrosequencing 法にて codon 12 (GGT) と 13 (GGC) を調べ、変異率は45.3%であった。

今後は outcome での有効性の評価に研究の主体をシフトしている。

第6の成果として、ウイルス性発がんに関する早期の先進的治療法の開発の一巻として HTLV-1 の carriers 期から smoldering stage の病態学的特徴をあきらかにした。即ち、最初に、昨年から全国規模で HTLV-1 感染の妊婦検診が始まったが、HTLV-1 感染の血清学的最終診断のためのパラダイムが定まっていない。通常は Western blot(WB)法にて検査し、WHO 判定基準にて評価される。この方法では、PA、CLEIA 法の低力価抗体陽性者を中心に約15%で WB 判定保留がでる。そこで、感染が確かな同種骨髄移植 (BMT) を受け、完全寛解になった ATL 患者の血液サンプルを検出限界 0.01% の real time qPCR 法で定量し、q PCR 陰性サンプルについては更に 0.0001% の検出限界の nested PCR で感染細胞の有無を評価し、抗体像との関係を比較した。その結果、q PCR 法で陰性のヒトでは抗体の陽性検出頻度は半半で、q PCR(-)・nPCR(+) では抗体は陰性 (undetectable) であった。即ち、感染細胞が極端に少ないヒトでは undetectable 抗体しか産生しない超低 PVL の非定型的存在が考えられる。一方、非循環血には感染細胞がなく、dormant infection with undetectable な特異な感染状態の存在もある可能性が示唆された。

また、HTLV-1 は AIDS ウイルスや C 型肝炎ウイルス (HCV) との co-infection 率が高くこれらのウイルスがもたらす疾病の増悪

因子となっている。その一因に IL-28B mRNA の発現に影響を及ぼす rs8099917 SNP が関与していることを示唆する結果を得た。

最後に、本研究をとおして感じたことは、膨大な研究費で明らかになった「がん病態」解明の成果がそれに追従する検査法の開発に感心がなく、この為に患者への還元が遅れている可能性がある印象には危惧を感じた。

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 23 件)

Kamihira S, Usui T, Ichikawa T, Uno N, Morinaga Y, Mori S, Ngai K, Sasaki D, Hasegawa H, Yanagihara K, Honnda T, Ymada Y, Iwanaga M, Kanematu T, Nakao K. Paradoxical expression of IL-28B mRNA in peripheral blood in human T-cell leukemia virus Type-1 mono-infection and Co-infection with hepatitis C Virus. *Virology* 9(1):40, 2012. [Epub ahead of print]

Itonaga H, Tsushima H, Hata T, Matsuo E, Imanishi D, Imaizumi Y, Kawaguchi Y, Fukushima T, Doi Y, Mori S, Kamihira S, Tomonaga M, Miyazaki Y. Successful treatment of a chronic-phase T-315I-mutated chronic myelogenous leukemia patient with a combination of imatinib and interferon-alfa. *Int J Hematol* 95(2):209-13, 2012. Epub 2012 Jan 20

Yamada Y, Atogami S, Hasegawa H, Kamihira S, Soda M, Satake M, Yamaguchi K. Nationwide survey of adult T-cell leukemia/lymphoma (ATL) in Japan. *Rinsho Ketsueki* 52(11):1765-71, 2011.

Miyaaki H, Ichikawa T, Yatsuhashi H, Taura N, Miura S, Usui T, Mori S, Kamihira S, Tanaka Y, Mizokami M, Nakao K. Suppressor of cytokine signal 3 and IL28 genetic variation predict the viral response to peginterferon and ribavirin. *Hepatology* 41(12):1216-1222, 2011.

Hasegawa H, Komoda M, Yamada Y, Yonezawa S, Tsutsumida H, Nagai K, Atogami S, Tsuruda K, Osaka A, Sasaki D, Yanagihara K, Imaizumi Y, Tsukasaki K, Miyazaki Y, Kamihira S. Aberrant overexpression of membrane-associated mucin contributes to tumor progression in adult T-cell leukemia/lymphoma cells. *Leuk Lymphoma* 52(6):1108-17, 2011.

Hasegawa H, Yamada Y, Tsukasaki K, Mori N, Tsuruda K, Sasaki D, Usui T, Osaka A, Atogami S, Ishikawa C, Machijima Y, Sawada S, Hayashi T, Miyazaki Y, Kamihira S. LBH589, a deacetylase inhibitor, induces apoptosis in adult T-cell leukemia/lymphoma cells via activation of a novel RAIDD-caspase-2 pathway. *Leukemia* 25(4):575-87, 2011. Epub 2011 Jan 18.

Sasaki D, Imaizumi Y, Hasegawa H, Osaka A, Tsukasaki K, Choi YL, Mano H, Marquez VE, Hayashi T, Yanagihara K, Moriwaki Y, Miyazaki Y, Kamihira S, Yamada Y. leukemia/lymphoma as a target for epigenetic therapy. *Haematologica* 96(5):712-9, 2011. Epub 2011 Jan 12.

Hirai M, Kadowaki N, Kitawaki T, Fujita H, Takaori-Kondo A, Fukui R, Miyake K, Maeda T, Kamihira S, Miyachi Y, Uchiyama T. Bortezomib suppresses function and survival of plasmacytoid dendritic cells by targeting intracellular trafficking of Toll-like receptors and endoplasmic reticulum homeostasis. *Blood* 117(2):500-9, 2011. Epub 2010 Oct 18.

Takenouchi H, Umeki K, Sasaki D, Yamamoto I, Nomura H, Takajo I, Ueno S, Umekita K, Kamihira S, Morishita K, Okayama A. Defective human T-lymphotropic virus type 1 provirus in asymptomatic carriers. *Int J Cancer* 128(6):1335-43, 2011.

Kamihira S, Yamano Y, Iwanaga M, Sasaki D, Satake M, Okayama A, Umeki K, Kubota R, Izumo S, Yamaguchi K, Watanabe T. Intra- and inter-laboratory variability in human T-cell leukemia virus type-1 proviral load quantification using real-time polymerase chain reaction assays: a multi-center study. *Cancer Sci* 101(11):2361-7, 2010. Epub 2010 Sep 28.

Iwanaga M, Watanabe T, Utsunomiya A, Okayama A, Uchimaruru K, Koh KR, Ogata M, Kikuchi H, Sagara Y, Uozumi K, Mochizuki M, Tsukasaki K, Saburi Y, Yamamura M, Tanaka J, Moriuchi Y, Hino S, Kamihira S, Yamaguchi K; Human T-cell leukemia virus type I (HTLV-1) proviral load and disease progression in asymptomatic HTLV-1 carriers: a nationwide prospective study in Japan. Joint Study on Predisposing Factors of ATL Development investigators. *Blood* 116(8):1211-9, 2010. Epub 2010 May 6.

Takasaki Y, Iwanaga M, Imaizumi Y, Tawara M, Joh T, Kohno T, Yamada Y, Kamihira S, Ikeda S, Miyazaki Y, Tomonaga M, Tsukasaki K. Long-term study of indolent adult T-cell leukemia-lymphoma. *Blood* 115(22):4337-43, 2010. Epub 2010 Mar 26.

Masuda M, Maruyama T, Ohta T, Ito A, Hayashi T, Tsukasaki K, Kamihira S, Yamaoka S, Hoshino H, Yoshida T, Watanabe T, Stanbridge EJ, Murakami Y. CADM1 interacts with Tiam1 and promotes invasive phenotype of human T-cell leukemia virus type I-transformed cells and adult T-cell leukemia cells. *J Biol Chem* 285(20):15511-22, 2010. Epub 2010 Mar 9.

Koga Y, Iwanaga M, Soda M, Inokuchi N, Sasaki D, Hasegawa H, Yanagihara K, Yamaguchi K, Kamihira S, Yamada Y. Trends in HTLV-1 prevalence and

incidence of adult T-cell leukemia/lymphoma in Nagasaki, Japan. *J Med Virol* 82(4):668-74, 2010.

Yamada Y, Okada M, Kamitamari A, Moriuchi H, Yanai M, Hano O, Tsukasaki K, Tsuruda K, Hasegawa H, Yanagihara K, Kamihira S. Multiple immune abnormalities in a patient with idiopathic CD4+ T-lymphocytopenia. *Intern Med* 48(22):1967-71, 2009. Epub 2009 Nov 16.

Hasegawa H, Yamada Y, Iha H, Tsukasaki K, Nagai K, Atogami S, Sugahara K, Tsuruda K, Ishizaki A, Kamihira S. Activation of p53 by Nutlin-3a, an antagonist of MDM2, induces apoptosis and cellular senescence in adult T-cell leukemia cells. *Leukemia* 23(11):2090-101, 2009. Epub 2009 Aug 27.

Osaka A, Yanagihara K, Yamada Y, Hasegawa H, Inokuchi N, Hayashi T, Komoda M, Nakamura S, Aoyama M, Sawada T, Kamihira S. Elevation of serum KL-6 glycoprotein or surfactant protein-D in adult T-cell leukemia with distinct pulmonary complications. *Tohoku J Exp Med* 218(2):99-105, 2009.

Doi Y, Sasaki D, Terada C, Mori S, Tsuruda K, Matsuo E, Miyazaki Y, Nagai K, Hasegawa H, Yanagihara K, Yamada Y, Kamihira S. High-resolution melting analysis for a reliable and two-step scanning of mutations in the tyrosine kinase domain of the chimerical bcr-abl gene. *Int J Hematol* 90(1):37-43, 2009. Epub 2009 May 23.

Kamihira S, Terada C, Sasaki D, Yanagihara K, Tsukasaki K, Hasegawa H, Yamada Y. Aberrant p53 protein expression and function in a panel of hematopoietic cell lines with different p53 mutations. *Eur J Haematol* 82(4):301-7, 2009. Epub 2008 Jan 29.

Osaka A, Hasegawa H, Yamada Y, Yanagihara K, Hayashi T, Mine M, Aoyama M, Sawada T, Kamihira S. A novel role of serum cytochrome c as a tumor marker in patients with operable cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 135(3):371-7, 2009. Epub 2008 Sep 30.

Yamamoto K, Utsunomiya A, Tobinai K, Tsukasaki K, Uike N, Uozumi K, Yamaguchi K, Yamada Y, Hanada S, Tamura K, Nakamura S, Inagaki H, Ohshima K, Kiyoi H, Ishida T, Matsushima K, Akinaga S, Ogura M, Tomonaga M, Ueda R. Phase I study of KW-0761, a defucosylated humanized anti-CCR4 antibody, in relapsed patients with adult T-cell leukemia-lymphoma and peripheral T-cell lymphoma. *J Clin Oncol* 28(9):1591-8, 2010. Epub 2010 Feb 22.

Osaka A, Hasegawa H, Tsuruda K, Inokuchi N, Yanagihara K, Yamada Y, Aoyama M, Sawada T, Kamihira S. Serum cytochrome c to indicate the extent of ongoing tumor cell death. *Int J Lab Hematol* 31(3):307-14, 2009. Epub 2008 Feb 12.

Horie I, Ando T, Inokuchi N, Mihara Y, Miura S, Imaizumi M, Usa T, Kinoshita N, Sekine I, Kamihira S, Eguchi K. First Japanese patient treated with parathyroid hormone peptide immunization for refractory hypercalcemia caused by metastatic parathyroid carcinoma. *Endocr J* 57(4):287-92, 2010. Epub 2010 Jan 6.

[学会発表] (計 37 件)

Sasaki D, Kamihira S. The Overexpression of Enhancer of Zeste Homologue 2 is Associated with Tumor Proliferation and Aggressive Behavior in Adult T-Cell Leukemia/Lymphoma. ASH American Annual Meeting, 2009.12, USA.

上平 憲、自然の実験系 ATL に学ぶ臨床化、
第 49 回日本臨床化学会学術集会、
2009.9.18-20、長崎市。

Sasaki D, Overexpression of enhancer of
zeste homolog 2 with trimethylation of
lysine 27 on histone H3 in ATL as a target
for epigenetic therapy. IJH, 2010.10.23,
Kyoto.

鶴田一人、上平 憲、MDS の形態学的異形性
に基づく診断確度区分、日本臨床検査医学会、
平成 21 年度、三重。

〔図書〕(計 2 件)

上平 憲、臨床検査ガイド 2009-2010、文光
堂(東京)、2009.

上平 憲、臨床検査カレッジ、文光堂(東京)、
2009.

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上平 憲 (Kamihira Shimeru)
長崎大学大学院・医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号：80108290

(2) 研究分担者

長谷川寛雄 (Hasegawa Hiroo)
長崎大学病院・講師
研究者番号：00398166

山田恭暉 (Yamada Yasuaki)

長崎大学大学院・医歯薬学総合研究科・准教
授

研究者番号：60145232

*但し、2010 年度で退職のため、2009～
2010 年度のみ分担者として登録

(3) 連携研究者

()

研究者番号：