

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25年 6月18日現在

機関番号：87102

研究種目：基盤(C)

研究期間：平成22年度～平成24年度

課題番号：22591173

研究課題名（和文）小児血液腫瘍におけるDNAミスマッチ修復異常の実態解明と化学療法戦略への応用

研究課題名（英文）DNA mismatch repair deficiency in paediatric haematological malignancies: research and application for chemotherapeutic strategies

研究代表者

岡村 純 (OKAMURA JUN)

独立行政法人国立病院機構（九州がんセンター臨床研究センター）・その他の部局等・その他
研究者番号：40360854

研究成果の概要（和文）：本研究は、メソトレキセート(MTX)、6-MPといった抗がん剤の感受性を左右するとされるDNAミスマッチ修復(DNA mismatch repair, MMR)の異常が小児血液腫瘍でどのように分布するのか、その詳細を明らかにすることを目的とした。具体的には、(1)小児血液腫瘍、とくに急性リンパ性白血病および非ホジキンリンパ腫において、MMR異常がどのように分布するかを明らかにする。また、(2)腫瘍のMMR statusとMTX、6-MP感受性との関係について、後方視的検討より両者の関係を明らかにすることを目的とした。まず、この2疾患のうち急性リンパ性白血病につき、約30例の症例の蓄積と骨髄細胞などの試料標品を集積した。腫瘍細胞におけるMMR異常は、マイクロサテライト不安定性(microsatellite instability, MSI)により解析可能であるため、これらの試料標品から染色体DNAを抽出し、MSI解析をおこなった。その結果、少ない症例数の解析にもかかわらず、MSI陽性を示唆する解析結果が少数の症例で見出されてきた。さらに詳細なMSI解析に加え、これらの症例における抗がん剤治療への反応性について解析をすすめた結果、少数の症例で見出されたMSI陽性を示唆する所見は、造血幹細胞移植による影響であることが判明した。不良な予後が予想される症例では、早期に造血幹細胞移植が施されるため、マイクロサテライトを用いた評価が困難となる。MMR蛋白質の発現を観察するなど、血液腫瘍におけるMMR異常には、MSI解析に加えて、多角的な観察が必要であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：This study aimed to elucidate the reality of DNA mismatch repair (MMR) deficiency in the paediatric haematological malignancies, particularly acute lymphocytic leukaemia (ALL) and non-Hodgkin lymphoma, and, consequently, the relationship between the MMR status and the chemosensitivity of tumours against methotrexate (MTX) and 6-mercaptopurine (6-MP) in this category of human malignancies. In a panel of 30 ALL patients, we analysed microsatellite instability (MSI) in the tumour DNA and found a few MSI-positive tumours. However, the detailed examination of the clinical backgrounds of the patients revealed that the observed microsatellite alterations reflected the haematopoietic stem cell transplantation that they underwent, which suggests that MSI analysis is not applicable to some cases of haematological malignancies. Multi-angle analysis is needed in this subject.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 22 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
平成 23 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
平成 24 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：小児腫瘍学、血液腫瘍、化学療法、薬剤反応性、DNA 修復

1. 研究開始当初の背景

抗がん剤感受性の予測は腫瘍臨床の積年の夢である。抗がん剤感受性研究が当初、感受性因子として見出したものは、細胞膜上のトランスポーター分子や細胞質内の解毒機構などであった。現在、大規模スクリーニング技術の発達とポストゲノムの情報とが一体となって、新たな感受性因子探索が行われている。しかし、抗がん剤のバラエティーに目をやると、ビンカルカロイドやタキサン系薬剤以外のすべての抗がん剤がDNA代謝阻害剤であることに気づく。DNA代謝の諸過程、すなわち複製、転写、修復過程が、これら抗がん剤の作用点であることは明らかである。しかし、これまでDNA修復をはじめとするDNA代謝過程が感受性因子として注目されることは少なかった。最近になって漸く、DNA修復の感受性因子としての意義がクローズ・アップされるようになったが、DNA代謝諸活性の抗がん剤感受性因子としての意義はまだ十分には追求されていない。とくに、DNA mismatch 修復 (DNA mismatch repair, MMR) は、小児悪性腫瘍の抗がん剤治療において主要な役割を演じるメソトレキセート (MTX)、6-MP の両薬剤において、その感受性を左右する重要な因子とされているが、小児悪性腫瘍において、どのような頻度と特徴をもって、MMR 異常が分布しているのかは、詳細且つ体系的に研究されたことはない。

1993 年、MMR 遺伝子の変異が家系内に遺伝することで生じるとされる遺伝性の高発がん症候群、遺伝性非ポリポーシス大腸癌 (hereditary non-polyposis colorectal cancer, HNPCC) では、マイクロサテライト配列が異常な動態を示していることが明らかになった。マイクロサテライトとは、真核生物のゲノム上、遺伝子間に散在するショートタンデムリピートの一種で、1 ないし数塩基対といったもっとも短い繰り返し単位をもつカテゴリーの総称である。HNPCC 患者に発

生した腫瘍では、マイクロサテライト配列長が、正常組織にくらべ著名に変化していたのである。この現象はその後、マイクロサテライト不安定性 (microsatellite instability, MSI) と呼ばれるようになり、ヒト腫瘍でしばしば観察される MSI は MMR 異常によるものと考えられるようになった。

MSI はとくに腫瘍学の分野で注目され、文献には膨大なデータが集積された。しかし、各々の疾患におけるその頻度となると、報告によって極めてまちまちであることがわかる。MSI 解析は今や日常的なものとなったが、実は MSI 解析は技術論的に未解決な問題が少なくない。研究代表者の共同研究者は、これらの技術論的問題をほぼすべて解決した高精度マイクロサテライト解析系を 1997 年に報告した。この系を用いた多面的な解析により、ヒト腫瘍にみられる MSI には、実は質的に異なる 2 つのモードが存在することが明らかになった。MMR 遺伝子ノックアウトマウスを用いた解析から、多くのヒト腫瘍で観察されている。MMR 異常とヒト腫瘍における MSI との関係は、これまで考えられてきたように単純ではないことがわかった。

MSI を指標に MMR に異常をもつ集団を同定し、抗がん剤感受性を予測しようとする試みは、現在、進行大腸癌の術後補助化学療法を舞台に研究がすすめられている。しかし、著名誌に公表される結果は、二転三転としており、フィールドは未だ結論を得るに至っていない。このことはとりもなおさず、上述したように、正確な MSI 解析が一般に認識されている以上に困難であること、MSI に 2 つのモードがあること、が原因となっていることは想像にかたくない。高精度マイクロサテライト解析系を用いることで、MMR に異常をもつ腫瘍が正確に同定され、その抗がん剤感受性が予測可能となることが期待される。

2. 研究の目的

本研究では以下を目的とした。

1) 小児血液腫瘍におけるDNAミスマッチ修復(MMR)異常

以下の小児血液腫瘍において、MMR異常がどのように分布するかを明らかにする。

- A. 急性リンパ性白血病
- B. 非ホジキンリンパ腫

解析は以下について行う。

- a. 高精度マイクロサテライト不安定性解析
- b. MMR遺伝子発現解析(免疫組織化学、ウエスタンブロットィング)
- c. *MLH1*遺伝子プロモーター領域のメチル化状態解析

2) 腫瘍のMMR statusとMTX、6-MP感受性との関係

後方視的検討より両者の関係を明らかにする。可能であれば、前方視的な臨床研究を開始する。

3. 研究の方法

1) 小児血液腫瘍におけるDNAミスマッチ修復(MMR)異常

(1) 生体試料の収集

MTX、6-MPを用いたレジメンによる治療を受け、且つ評価可能な効果指標を有し、奏効度情報を得ることができる症例を中心に、試料の収集を行った。

急性リンパ性白血病症例においては、末梢血を採取し、密度勾配遠心分離等により白血病細胞を濃縮し、液体窒素中に保存した。非ホジキンリンパ腫症例においては、生検等で得られた組織標本を凍結保存した。正常対照としては、寛解期の末梢血有核細胞等を用いた。

(2) 解析

a. 高精度マイクロサテライト不安定性解析

詳細は文献(Oda S *et al.* Nucleic Acids Res 25: 3415-20, 1997)に拠った。

b. MMR遺伝子発現解析

MSH2、MLH1といった主要なMMRタンパク質群については、免疫組織化学による発現解析を予定した。

c. *MLH1*遺伝子プロモーター解析

*MLH1*遺伝子については、プロモーター領域のメチル化状態の解析(methylation-specific PCR、bisulfite sequencing)を予定した。

2) 腫瘍のMMR statusとMTX、6-MP感受性との関係

(1) 奏効度情報の収集

(2) MMR statusと薬剤感受性との相関

両者の関係を奏効度情報をもとに、統計学的に検討することとした。

4. 研究成果

対象2疾患のうち、まず急性リンパ性白血病につき、約30例の症例の蓄積と骨髄細胞などの試料標本を集積した。これらの症例に対し、MSI解析をおこなったところ、少ない症例数の解析にもかかわらず、MSI陽性を示唆する解析結果が少数の症例で見出されてきた。さらに詳細なMSI解析に加え、これらの症例における抗がん剤治療への反応性について解析をすすめた結果、少数の症例で見出されたMSI陽性を示唆する所見は、造血幹細胞移植による影響であることが判明した。不良な予後が予想される症例では、早期に造血幹細胞移植が施されるため、マイクロサテライトを用いた評価が困難となる。本研究においても計画したように、血液腫瘍におけるMMR異常には、MSI解析に加えて、多角的な観察が必要であることが示唆された。今後は、より多くの症例や非ホジキンリンパ腫症例を対象に、MMR蛋白質の発現解析などをおこなっていきたい。

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9件)

① Choi I, Tanosaki R, Uike N, Utsunomiya A, Tomonaga M, Harada M, Yamanaka T, Kannagi M, Okamura J: Long-term outcomes after hematopoietic stem cell transplantation for adult T-cell leukemia/lymphoma: results of prospective trials. Bone Marrow Transplant 46: 116 - 118, 2010
DOI: 10.1038/bmt.2010.92.

② Hishizawa M, Kanda J, Utsunomiya A, Taniguchi S, Eto T, Moriuchi Y, Tanosaki R, Kawano F, Miyazaki Y, Masuda M, Nagafuji K, Hara M, Takanashi M, Kai S, Atsuta Y, Suzuki R, Kawase T, Matsuo K, Nagamura-Inoue T, Kato S, Sakamaki H, Morishima Y, Okamura J, Ichinohe T, Uchiyama T: Transplantation of allogeneic hematopoietic stem cells for adult T-cell leukemia: a nationwide retrospective study. Blood 116: 1369 - 1376, 2010
DOI: 10.1182/blood-2009-10-247510

③ Ishida Y, Sakamoto N, Kamibeppu K, Kakee N, Iwai T, Ozono S, Maeda N, Okamura J, Asami K, Inada H, Honda M, Horibe K: Late effects and quality of life of childhood cancer survivors: Part 2. Impact of radiotherapy. Int J Hematol 92: 95 - 104, 2010
DOI: 10.1007/s12185-010-0611-z

- ④ Inagaki J, Nagatoshi Y, Sakiyama M, Nomura Y, Teranishi H, Sasaki T, Okamura J: TBI and melphalan followed by allogeneic hematopoietic SCT in children with advanced hematological malignancies. *Bone Marrow Transplant* 46: 1057 - 1062, 2011
DOI: 10.1038/bmt.2010.253
- ⑤ Ishida Y, Honda M, Kamibeppu K, Ozono S, Okamura J, Asami K, Maeda N, Sakamoto N, Inada H, Iwai T, Kakee N, Horibe K.: Social outcomes and quality of life of childhood cancer survivors in Japan: a cross-sectional study on marriage, education, employment and health-related QOL (SF-36). *Int J Hematol* 93: 635 - 644, 2011
DOI: 10.1007/s12185-011-0843-6
- ⑥ Kanda J, Hishizawa M, Utsunomiya A, Taniguchi S, Eto T, Moriuchi Y, Tanosaki R, Kawano F, Miyazaki Y, Masuda M, Nagafuji K, Hara M, Takanashi M, Kai S, Atsuta Y, Suzuki R, Kawase T, Matsuo K, Nagamura-Inoue T, Kato S, Sakamaki H, Morishima Y, Okamura J, Ichinohe T, Uchiyama T: Impact of graft-versus-host disease on outcomes after allogeneic hematopoietic cell transplantation for adult T-cell leukemia: a retrospective cohort study. *Blood* 119: 2141 - 2148, 2012
DOI: 10.1182/blood-2011-07-368233
- ⑦ Kikuchi A, Hasegawa D, Ohtsuka Y, Hamamoto K, Kojima S, Okamura J, Nakahata T, Manabe A; Japanese Paediatric Myelodysplastic Syndrome (MDS) Study Group: Outcome of children with Refractory Anaemia with excess of blast (RAEB) and RAEB in Transformation (RAEB-T) in the Japanese MDS99 study. *Br J Haematol* 158: 657 - 661, 2012
DOI:10.1111/j.1365-2141.2012.09210.x
- ⑧ Nishikawa T, Nakashima K, Fukano R, Okamura J, Inagaki J: Successful treatment with plasma exchange for disseminated cidofovir - resistant adenovirus disease in a pediatric SCT recipient. *Bone Marrow Transplant* 47: 1138 - 1139, 2012
DOI: 10.1038/bmt.2011.227
- ⑨ Nishikawa T, Inagaki J, Nagatoshi Y, Fukano R, Nakashima K, Ito N, Sawa D, Kawano Y, Okamura J: The second therapeutic trial for children with hematological malignancies who

relapsed after their first allogeneic SCT: long-term outcomes. *Pediatr Transplant* 16: 722 - 728, 2012
DOI:10.1111/j.1399-3046.2012.01737.x

[学会発表] (計 7 件)

- ① Choi I, Tanosaki R, Uike N, Utsunomiya A, Okamura J: Antiviral effect of allo-SCT with RIC for ATLL: Short and long-term kinetics of HTLV-1 proviral load. The 1st International Society of Cell Therapy (ISCT) Asia-Pacific Regional Meeting 2010 年 10 月 19 日 宮崎
- ② Eto T, Choi I, Tanosaki R, Takatsuka Y, Utsunomiya A, Takemoto S, Taguchi J, Fukushima T, Kato K, Teshima T, Suehiro Y, Yamanaka T, Okamura J, Uike N: A prospective Feasibility trial of unrelated bone marrow transplantation with reduced intensity conditioning regimen for elderly patients with adult T-cell leukemia/lymphoma (ATL). 53th American Society of Hematology Annual meeting and Exposition 2011 年 12 月 10 日 San Diego
- ③ Hasegawa A, Takamori A, Utsunomiya A, Maeda Y, Yamano Y, Shimizu Y, Tamai Y, Sasada A, Zeng N, Choi I, Uike N, Okamura J, Watanabe T, Masuda T, Kannagi: Functional impairment of Tax-specific but not CMV-specific CTLs in a minor population of asymptomatic HTLV-I-carriers. 15th International Conference on Human Retrovirology 2011 年 6 月 5 日 Leuven
- ④ Uike N, Tanosaki R, Utsunomiya A, Choi I, Okamura J: Can allo-SCT with RIC cure ATLL? : Long-term survivors with excellent PS and with heterogenous HTLV-1 proviral load level. 2011 年 6 月 5 日 Leuven
- ⑤ Hasegawa A, Tamai Y, Takamori A, Sasada A, Tanosaki R, Choi I, Utsunomiya A, Maeda Y, Yamano Y, Eto T, Koh K, Nakamae H, Suehiro Y, Kato K, Takemoto S, Okamura J, Uike N, Kannagi M: Identification of a novel HLA-DR1-restricted dominant epitope recognized by HTLV-1 Tax-specific CD4+ T-cells augmenting HTLV-1-specific CTL expansion in ATL patients after allogeneic HSCT. The 9th Joint Conference of the American Association for Cancer Research and the Japanese Cancer Association 2013

年 02 月 21 日 Maui

- ⑥ Tamai Y, Hasegawa A, Takamori A, Sasada A, Tanosaki R, Choi I, Utsunomiya A, Etoh T, Koh H, Suehiro Y, Okamura J, Uike N, Kannagi M: Identification of a novel HLA-DR1-restricted epitope that is recognized by Tax-specific CD4+ T cells with the potential to enhance Tax-specific CD8+ responses in ATL patients after allo-HSCT. 第 71 回日本癌学会総会 2012 年 09 月 19 日 札幌
- ⑦ Choi I, Eto T, Tanosaki R, Utsunomiya A, Fukushima T, Teshima T, Suehiro Y, Yamanaka T, Okamura J, Uike N: Clinical trial of unrelated bone marrow transplantation with reduced intensity conditioning for elderly ATL patient. 第 71 回日本癌学会総会 2012 年 09 月 19 日 札幌

[図書] (計 0 件)

[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

岡村 純 (OKAMURA JUN)

独立行政法人国立病院機構(九州がんセンター臨床研究センター)・その他の部局等・その他

研究者番号：40360854

(2) 研究分担者 ()

研究者番号：

(3) 連携研究者 ()

研究者番号：