

令和元年6月13日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K21284

研究課題名(和文) CDKN2A/2B遺伝子欠失を伴う難治性B細胞性リンパ腫に対する診断・治療開発

研究課題名(英文) Development of novel diagnostic and therapeutic approach for the diffuse large B cell lymphoma with CDKN2A deletion

研究代表者

知念 良顕 (Chinen, Yoshiaki)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：10757602

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：CDKN2A/2B遺伝子欠失を伴う難治性B細胞性リンパ腫に対する診断・治療開発として、微小領域欠失検出用DNAプローブを用いた増幅FISH法を考案した。これは、通常のFISH法では解析困難であった染色体微小欠失領域を検出可能とする新たな染色体解析技術であり、通常FISH法を作成する過程の中で蛍光標識に対する抗蛍光色素抗体を加えることで、50kb以下の微小染色体領域にハイブリダイズされたDNAプローブを可視化する技法である。増幅FISH法は、通常FISH法と比べ感度・特異度共にすぐれていることが明らかとなり、増幅FISH法は腫瘍検体の特定の微小領域欠損の有無が診断可能であることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって、B細胞リンパ腫(BCL)の高度悪性化の誘因となるCDKN2A/2B遺伝子欠失症例が、簡便、迅速、安価にスクリーニング可能であることが示され、CDKN2A/2B遺伝子欠損をもつBCL患者群の予後予測や治療層別化など新たな治療戦略の構築に寄与するものと考えられた。また、診断・治療に染色体微小欠失の有無の鑑別が必要となるその他の疾患についても応用可能であり、血液悪性腫瘍以外の領域にも応用可能であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Chromosomal microdeletions frequently cause the loss of prognostically relevant tumor suppressor genes in B cell lymphomas (BCLs). However, the detection of minute deletions has been mostly impossible by conventional methods due to their low resolution. We developed a novel method designated here as amplified-FISH (AM-FISH), which enables the detection of chromosomal microdeletion shorter than 50 kb in BCLs. In the AM-FISH, the 31 kb Fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated DNA probe encoding only CDKN2A gene was first hybridized with chromosome, and then, was labeled with Alexa Fluor 488-conjugated anti-FITC secondary antibody to help increase sensitivity. CDKN2A signals were equally identifiable by AM-FISH and conventional FISH, and AM-FISH could detect tumor cells with CDKN2A deletion even in the clinical sample contaminated with normal cells to some extent. AM-FISH is a highly sensitive, specific and easy method for the diagnoses of various types of chromosomal microdeletions.

研究分野：血液学

キーワード：FISH法 CDKN2A/B欠失 B細胞性リンパ腫 染色体微小領域欠損

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、分子遺伝学的・細胞生物学的解析技術の進歩により診断・予後予測精度が向上し、分子標的治療薬の臨床応用により造血器悪性腫瘍の治療予後は飛躍的に改善した。しかし、こうした治療戦略の発達によっても病初期から高度の治療抵抗性を示し生存予後が極めて不良な症例は依然存在する。したがってそれら予後不良症例の治療成績向上は残された重要課題である。造血器悪性腫瘍のなかで最も高頻度である B 細胞リンパ腫 (BCL) は、治療強度の層別化や分子標的薬の使用により治療成績が劇的に改善した疾患群であるが、初発時より既存のあらゆる治療戦略に対して抵抗性を呈する予後不良症例が存在する。しかし、このような症例における問題点のひとつは、これまでに BCL の日常診療において汎用されてきた国際予後指数などではしばしば予後予測困難なことであり、これらサブグループを診断時に抽出しうるバイオマーカーの同定と、迅速・簡便で高精度な診断技術の開発は、早急に日常診療への応用が求められる喫緊の研究課題である。近年、これらの予後不良群では、染色体 9p21 領域に存在する CDKN2A/2B 遺伝子の欠失、あるいはプロモーター領域の高メチル化による不活化を高頻度に認めることが明らかとなった。CDKN2A/2B 遺伝子欠失の存在と予後不良の関連は他の癌腫でも既報告があるほか、CDKN2A/2B は TP53 経路や Rb 経路など強力な癌抑制経路の制御に関与することから、その異常は BCL の治療抵抗性においても機能的関与が強く推測される。しかしながら、BCL において CDKN2A/2B 異常がいかなるメカニズムで治療抵抗性を惹起するののかについては依然不明確であり、その克服戦略の開発については全く進捗がないのが実情である。したがって、CDKN2A/2B 遺伝子を標的とした診断・治療開発は BCL の治療成績の向上を目指す上で解決すべき課題である。

2. 研究の目的

本研究を遂行するにあたって、CDKN2A/2B 遺伝子特有の 3 つの解決すべき重要課題が考えられた。第一に CDKN2A/2B 遺伝子欠失を同定するにあたり、同遺伝子が 9 番染色体短腕領域 (9p21) において従来の核型検査では検出できないようなわずかな 42kb の範囲に位置しているため、従来の検査法では微小欠失症例を抽出するのに十分でない点である。既存の次世代シーケンサーや SNP アレイを用いた解析により CDKN2A/2B 遺伝子微小欠失の検出は可能であるが、これらはいずれも時間・費用ともに膨大であり、日常臨床への応用には不適である。したがって本研究では、CDKN2A/2B の遺伝子欠損を迅速・簡便・安価に同定可能とする新規の検査手法を開発することを第一の目的とした。第二に CDKN2A/2B 遺伝子はスプライスバリエーションにより一遺伝子から二種の転写産物である p14ARF と p16INK4a を産生するパイロダクト遺伝子であり、各々の遺伝子の作用するシグナル経路が異なる点である。CDKN2A/2B 欠損が予後不良であることはこれまでも報告されているが、CDKN2A/2B 遺伝子の欠損の大きさと予後との関係についての考察は少なく、CDKN2A/2B の欠損の程度による予後予測は検討すべき課題であると考えた。すなわち、これまでに BCL に対して治療を行った症例を後方視的に解析し、新たな予後因子を見出すことを第二の研究目的とした。さらに第三の課題として、従前よりがん抑制遺伝子の欠失に対する有効な治療的アプローチが乏しい点である。生理的条件下では CDKN2A から転写される p16INK4a はサイクリン依存性キナーゼ (Cdk) の活性化を抑制し Rb 経路を阻害する一方、p14ARF は MDM2 の活性化抑制を介して TP53 活性化に寄与することで、いずれもがん抑制性分子として機能する。しかし、腫瘍細胞内において p14ARF や p16INK4a の欠失分子を薬理的に標的化することは不可能であるため、これらがん抑制遺伝子欠損症例においてもなお有効である治療標的分子を同定できれば、難治性造血器悪性腫瘍の治療成績を向上させるために不可欠な検討課題である。したがって、既知・未知の分子制御を含め、これらの分子が存在した場合に本来制御するリンパ腫細胞特有の分子・シグナル経路を特定し、その制御を可能とする代替的な戦略の確立を第三の研究目的とした。本研究では CDKN2A/2B 遺伝子異常の簡易スクリーニング法の開発、CDKN2A/2B 異常を含めた難治性 BCL の新たな予後予測法の開発、ならびに克服戦略の開発によって、CDKN2A/2B 異常を有する高悪性度 BCL の治療成績改善を目指した。

3. 研究の方法

以下のように段階的に研究を進めた。

(1) BAC クローンを用いた CDKN2A/2B 特異的 FISH プロローブ作成

CDKN2A/2B 領域を含む BAC クローンを独自に作成し、申請者らが従前より実施している手法により DNA 大量複製・抽出・蛍光色素標識を行い CDKN2A/2B 特異的 FISH プロローブを複数作成した。作成したプロローブは CDKN2A/2B のゲノムコピー数が判明している細胞株にて CDKN2A/2B 欠失の感度、陽性的中率を検証し、最も検出力の優れたプロローブを選択した。

(2) CDKN2A/2B 特異的 FISH プロローブを用いた新しい検査技術の開発

上記で開発したプロローブに、抗蛍光色素抗体を加えることによって、従来よりも小さな DNA プロローブからの蛍光シグナルを増強する新たな検査技術 (増幅 FISH 法) を開発した。

(3) 増幅 FISH 法を用いた CDKN2A/2B 遺伝子欠失の有無による予後予測モデルの開発

作成した CDKN2A/2B 特異的プロローブを用いて当研究室に保管している BCL 症例サンプルを対象に増幅 FISH 法を行い、予後予測モデルの構築を行った。

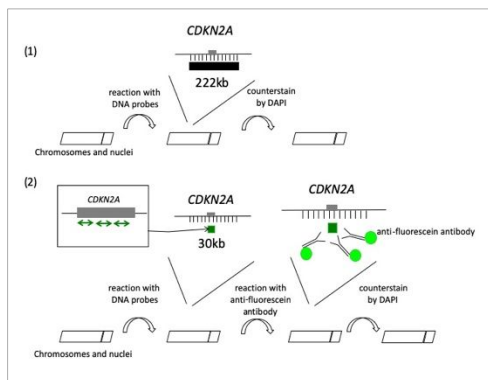
(4) CDKN2A/2B 遺伝子欠失を有する BCL 細胞に対する新規治療戦略の開発

遺伝子発現ベクターを用いて CDKN2A/2B の遺伝子導入・遺伝子抑制を行い、p14ARF または p16INK4a の発現レベルが変化した細胞株を作成し、既存抗悪性腫瘍薬に対する薬剤感受性の変化を比較検討した。

4. 研究成果

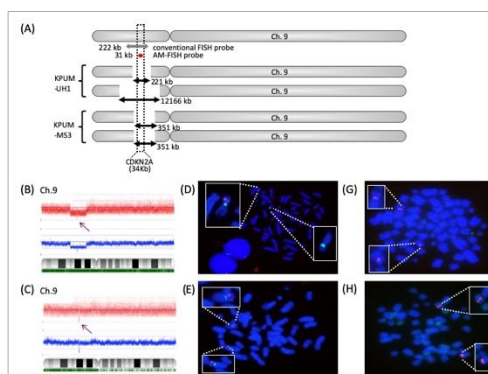
(1)CDKN2A 欠失を検出可能とする新規 FISH 法（増幅 FISH 法）の開発

本研究では、左上図のように 10-15kb の DNA プローブを PCR で作成し、複数のプローブで標的遺伝子の全長と同じ範囲をカバーできるようにした（左上図）。加えて、従来の FISH 法の作業工程中に抗蛍光色素抗体を二次抗体反応として用いることで、従来の蛍光色素量では不十分であった微小領域の DNA プローブを蛍光顕微鏡で認識可能とするレベルまで増幅することに成功した。CDKN2A 微小領域欠失をもつリンパ腫細胞株および正常細胞に対して、増幅 FISH 法、通常の FISH 法を用いて細胞内の CDKN2A 遺伝子検出の正確性を比較した結果、増幅 FISH 法は通常 FISH 法と比べ正常細胞のみならず、染色体微小欠失を有する細胞においても感度・特異度が共にすぐれていることが明らかとなった（左中図）。さらに、SNP アレイで CDKN2A 遺伝子の微小領域欠失を認めた患者検体に対して増幅 FISH 法を行った結果、通常 FISH 法では偽陽性となった CDKN2A シグナルが増幅 FISH 法では検出されず、偽陽性となる可能性が極めて少ないことを確認した。以上から、微小領域欠失検出用 DNA プローブを用いた増幅 FISH 法は臨床検体に対しても応用可能であることが示された。



(2)BCL における新規の予後予測因子の同定

上記(1)で得た結果をもとに、当研究室で保存している臨床検体を用いて CDKN2A 欠失の有無と予後予測について検討を行った。我々の研究室では 200 例あまりの BCL 検体を保管していたが、治療開始前の病変を有するカルノア検体は 82 例しか残っておらず、細胞数や検体の保存状態の関係で増幅 FISH 法を行えた症例は 26 例にとどまり、CDKN2A/2B の欠失の有無と予後についての関係性は明らかにできなかった。しかし、同時に DLBCL の新たな予後予測因子の同定を目的として、当院および 関連施設の臨床データを後方視的に解析し、DLBCL に罹患した患者群には過去に癌の既往をもつ者が一定数存在し、予後に影響を与えている可能性を見出した（左下図）。

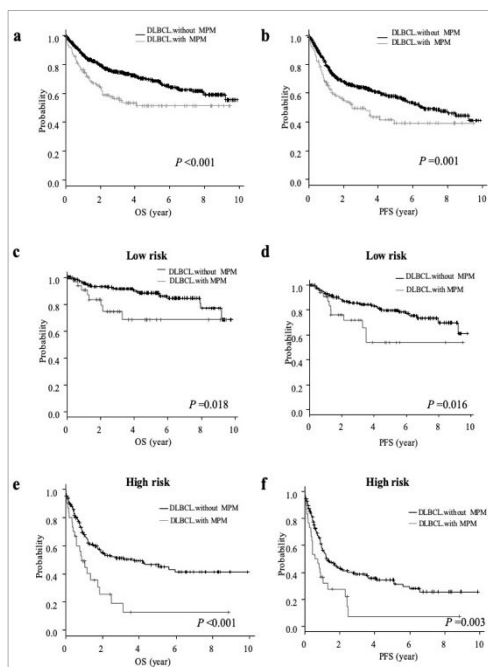


(3) CDKN2A 以外の微小領域欠損への臨床応用

TNFAIP3(A20)は BCL において CDKN2A/2B と同様に微小欠失を生じる遺伝子であり、欠失症例は予後不良であることが知られている。A20 を標的とした DNA プローブを用いた増幅 FISH 法は CDKN2A と同様に検出可能であることが示された。

(4) CDKN2A/2B 遺伝子欠失を有する BCL 細胞に対する新規治療戦略の開発

CKNN2A、CDKN2B を BCL 細胞株に遺伝子導入を試みたが、親株と比べて遺伝子発現が十分に増加した細胞株は作成できておらず、引き続き研究を継続する予定である。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

知念良顕、造血における long noncoding RNA の意義、血液内科、77、pp537-542、2018
Tanba K, Chinen Y, Uchiyama H, Uoshima N, Shimura K, Fuchida S, Kiyota M, Nakao M, Shimura Y, Kobayashi T, Horiike S, Wada K, Shimazaki C, Kaneko H, Kobayashi Y, Taniwaki M, Kuroda J. Blood Cancer Journal. 査読有,8,2018.pp.1.
doi: 10.1038/s41408-017-0043-6.

Mizuno Y, Chinen Y, Tsukamoto T, Takimoto-Shimomura T, Matsumura-Kimoto Y, Fujibayashi Y, Kuwahara-Ota S, Fujino T, Nishiyama D, Shimura Y, Kobayashi T,

Horiike S, Taniwaki M, Kuroda J. International Journal of Hematology. 査読有, 109,2019, pp.593-602.

doi: 10.1007/s12185-019-02617-x.

〔学会発表〕(計 5 件)

水野芳美、知念良顕、塚本拓、下村とも子、志村勇司、古林勉、堀池重夫、谷脇雅史、黒田純也、増幅 FISH 法による B 細胞リンパ腫の CDKN2A 微小欠損の検出、第 80 回日本血液学会学術集会、2018

知念良顕、塚本拓、木元弥生、滝本とも子、水野芳美、前川紗央梨、大田沙絵子、丹波和奈、志村勇司、古林勉、堀池重夫、黒田純也、Cyclin D1 transcript variant in mantle cell lymphoma and myeloma with chromosome 11q13 abnormalities、第 78 回日本血液学会学術集会、2017

知念良顕、立川章太郎、滝本とも子、木元弥生、塚本拓、前川紗央梨、丹波和奈、志村勇司、古林勉、堀池重夫、黒田純也、11 番染色体異常陽性骨髄腫における腫瘍特異的 cyclin D1 transcript variant、第 42 回日本骨髄腫学会学術集会、2017

Kazuna Tanba, Yoshiaki Chinen, Hitoji Uchiyama, Nobuhiko Uoshima, Kazuho Shimura, Shin-ichi Fuchida, Miki Kiyota, Mitsushige Nakao, Yuji Shimura, Tsutomu Kobayashi, Shigeo Horiike, Katsuya Wada, Chihiro Shimazaki, Hiroto Kaneko, Yutaka Kobayashi, Masafumi Taniwaki, Junya Kuroda, Prognostic Impact of Past History of Other Malignancies in Diffuse Large B Cell Lymphoma, American society of Hematology, 59th Annual Meeting and Exposition(国際学会), 2017

丹波和奈、知念良顕、内山人二、魚嶋伸彦、志村和穂、淵田真一、清田実希、中尾光成、和田勝也、島崎千尋、兼子裕人、小林裕、古林勉、谷脇雅史、黒田純也、びまん性大細胞型 B 細胞性リンパ腫における多重癌の意義、第 78 回日本血液学会学術集会、2016

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

(2)研究協力者
研究協力者氏名：
ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。