

平成21年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2005－2008
 課題番号：17390165
 研究課題名（和文） 造血器腫瘍の MIC 検査パラダイムの確立と検証
 -形質検査と遺伝子検査の相補性
 研究課題名（英文） Establishment and Verification of MIC Diagnostic Paradigm in Cancers

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
 研究番号：80108290

研究成果の概要：

研究の促進に不可欠な Cell and Gene Bank の充実をはかり、それを活用して、ATL 細胞を腫瘍細胞のモデルとして HDL inhibitor や TRAIL+BB1 及び TRAIL+JCB の抗癌作用に伴うがんシグナルを明らかにした。将来のサイトカイン+small chemical の併用分子標的療法に繋がるものと期待される。造血器腫瘍の治療指向型診断、thernostics, を目指した MIC 検査については、形質検査の長所と欠点を整理し、弱点を相補する実践的遺伝子検査の技術開発導入に一部成功した。例えば、サザンブロット検査の短縮化と品質保証、特に検出感度の方法論的確立、Long InversePCR 法の迅速化・精度の向上を樹立した。また、Imatinib などの分子標的療法の導入にて tumor burden の評価、治療効果の至適判断に不可欠な MRD の代理検査としての絶対的 real-time RT PCR 法の正確性の向上、至適 cDNA 化、至適な内部 control、Data normalization について成果を得、BCR-ABL, PML-RARa、WT1, Tax Cyclin D1 mRNA の定量系を確立し、患者中心の科学的医療支援体制を検査室の立場から構築し、一部 Clinical Setting し、その有用性や将来の新たな視点での検査パラダイムの一部を確立した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
17年度	7,800,000	0	7,800,000
18年度	2,200,000	0	2,200,000
19年度	1,800,000	540,000	2,340,000
20年度	1,800,000	540,000	2,340,000
年度			
総計	13,600,000	1,080,000	14,680,000

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：発癌、遺伝子検査、形質検査

分子標的療法

1. 研究開始当初の背景

がんは遺伝子異常に起因するシグナル異常、即ち cancer signal が病態の本体であることが判明しつつあり、この論理を検査に取り入れた新しい検査体系を造血器腫瘍を1つのモデルとして樹立し、患者中心の癌の臨床検査・診断法の確立を動機とした。

2. 研究の目的

Laboratory Medicine の本質である Bench-work と bed-work のバランスのとれた研究を目指して、

- (1) 生体試料 Bank の確立
- (2) 遺伝子検査の実用化的改良

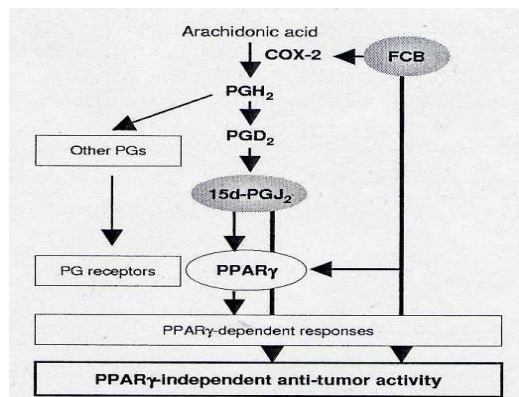
- (3) 形質検査を相補する遺伝子検査の導入の促進
- (4) Theranostics 指向検査の導入
- (5) MIC パラダイム検査の有用性の検証と実証
- (6) 将来の新しい分子標的療法や診断法の基礎になるガン細胞の分子生物学的特性を明らかにする。

3. 研究の方法

- (1) 腫瘍細胞免疫形質の bank の樹立
- (2) SBHの精度管理法の確立と TATの短縮化への改良。
- (3) 種々PCR 法の実用化へのプロコール化 (Long Inverse PCR, Chimerical gene mRNA RT PCR, HTLV-1 proviral qPCR)
- (4) mRNA real-time RT qPCR 法の確立 (cDNA 化、IC, Normalization の至適化)
- (5) ATL を多段階発癌モデルとして癌の分子生物学的研究の促進
- (6) Cancer signaling の特性と治療への応用: K-Ras codon12,13 超感度法や HRM genescanning 法の開発

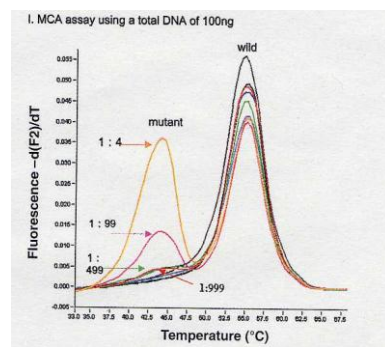
4. 研究成果

- (1) 形質バンク情報が約 10,000 を超した。
- (2) SBHの精度管理と TATの短縮化を実現し、2.5 日の TAT となり、診断の迅速化をもたらした。
- (3) Long PCR の安定化、TAT 短縮化に成功し、2.0 日にて結果が出る迅速法。
- (4) HTLV-1 proviral and chimeric mRNA の定量法のサービス開始。造血器腫瘍性キメラ遺伝子転写産物の定量法の改良と実践導入。BCR-ABL, PML-RALa, WT1, CyclinD1 RNA real-time RT qPCR 絶対定量法の確立と人選開始。
- (5) ATL Cancer signaling の特性と BB1+ TRAIL 分子標的療法の開発。



TRAIL-TRAIL-R 系による抗腫瘍作用は分子標的療法の理想の一つとして期待されている。その第一の理由は TRAIL-R は腫瘍細胞に選択的に up-regulated され、正常細胞にないために理想的な抗腫瘍作用が望める。そこで我々は TRAIL 抵抗性 ATL cell line (KOB) をモデルとして、経口可能な薬物による TRAIL 脱抵抗性の可能性を研究した。その

結果、自然の chemical agents を大量 screening した結果、BB-1 と JCB にその効果が期待された。前者は TRAIL-R の up-regulation を開始、後者は prostaglandin 系の P-PAR-r を介する両者共に最終的にはアポトシスの亢進によるものであった。このことから、Cytokine+小分子併用分子標的療法の可能性に道が開けた。(6)HDAC inhibitor, LBH, の ATL に対する in vivo の有用性の証明とその作用機序の解明。(7) 抗体療法を中心とする分子標的療法の本格化を見据え、遺伝子支援体制(例えば K-ras wild-type とセツキシマブ)の確立。パラフィン切片からの超鋭敏な検査法を下図の Double-PCR+MCA 法にて開



発した。

および chimeric ABL の Imatinab 抵抗性変異の HRM による gene scanning screening 法を開発し、実用化に setting した。

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 32 件)

- 1) Iwanaga M, Kamihira S, et al. Relationship between MGUS and radiation exposure in Nagasaki atomic bomb survivors. Blood. 2008.Oct10 (有査読)
- 2) Osaka a, Kamihira S. et al: A novel role of serum cyto-c as a tumor marker in patients with operable cancer. J Cancer Clin Oncol. 2008 Sep 30. (有査読)
- 3) Onimaru Y, Kamihira S. et al: Autocrine and/or paracrine growth of aggressive ATL cells caused by HGF and c-Met. Int J Oncol 2008;33:697-703. (有査読)
- 4) Abe M, Kamihira S. et al: Foxp3 expression on normal and leukemic CD4+CD25+ T-cells implicated in HTLV-1 is inconsistent with Treg cells. Eur J Haematol

- 2008;81:209-17. (有査読)
- 5) Usui T, Kamihira S. et al: Characteristic Expression of HBZ transcripts in HTLV-1 provirus-positive cells. *Retrovirology* 2008: Apr 22;5:34 (有査読)
 - 6) Ishizaki A, Sugahara K, Tsuruda K, Hasegawa H, Yanagihara K, Tsukasaki K, Yamada Y, Kamihira S. Usefulness of long-distance inverse polymerase chain reaction for molecular detection of 14q32 translocation in a clinical setting. *Scand J Clin Lab Invest*. 2008 Feb 11:1-7. [Epub ahead of print] (有査読)
 - 7) 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*. 2008 Feb 12. [Epub ahead of print] (有査読)
 - 8) Kohno T, Yamada Y, Tawara M, Takasaki Y, Kamihira S, Tomonaga M, Matsuyama T. Inactivation of p14ARF as a key event for the progression of adult T cell leukemia/lymphoma. *Leuk Res*. 2007 Dec;31(12):1625-32 (有査読)
 - 10) Akamatsu N, Yamada Y, Hasegawa H, Makabe K, Asano R, Kumagai I, Murata K, Imaizumi Y, Tsukasaki K, Tsuruda K, Sugahara K, Atogami S, Yanagihara K, Kamihira S. High IL-21 receptor expression and apoptosis induction by IL-21 in follicular lymphoma. *Cancer Lett*. 2007 Oct 28;256(2):196-206. Epub 2007 Jul 10. (有査読)
 - 10) Hasegawa H, Yamada Y, Komiyama K, Hayashi M, Ishibashi M, Sunazuka T, Izuhara T, Sugahara K, Tsuruda K, Masuda M, Takasu N, Tsukasaki K, Tomonaga M, Kamihira S. A novel natural compound, a cycloanthranilylproline derivative (Fulgocandin B), sensitizes leukemia cells to apoptosis induced by tumor necrosis factor related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) through 15-deoxy-Delta 12, 14 prostaglandin J2 production. *Blood*. 2007 Sep 1;110(5):1664-74. Epub 2007 Jun 5.(有査読)
 - 11) Uemura A, Mori S, Sugahara K, Akamatsu N, Tsuruda K, Tsukasaki K, Hirakata Y, Atogami S, Hasegawa H, Yamada Y, Kamihira S. Rapid and high-resolution detection of IgH gene rearrangements using PCR and melting curve analysis. *Int J Lab Hematol*. 2007 Jun;29(3):200-7. (有査読)
 - 12) Koida S, Tsukasaki K, Tsuchiya T, Harasawa H, Fukushima T, Yamada Y, Ohshima K, Kamihira S, Kikuchi M, Tomonaga M. Primary T-cell lymphoma of the thyroid gland with chemokine receptors of Th1 phenotype complicating autoimmune thyroiditis. *Haematologica*. 2007 Mar;92(3):e37-40. Review. (有査読)
 - 13) Mori S, Sugahara K, Uemura A, Yamada Y, Uzihara K, Hayashida H, Ideguchi T, Ishibashi K, Nakazato M, Maeda T, Takamura N, Kamihira S. The possibility of a valuable resource of circulating DNA for single nucleotide polymorphisms genotyping: the application of a rapid and simple polymerase chain reaction with melting curve analysis for methyltetrahydrofolate reductase polymorphisms. *Lab Hematol*. 2007;13(1):1-5 (有査読)
 - 14) Takasaki Y, Iwanaga M, Tsukasaki K, Kusano M, Sugahara K, Yamada Y, Kamihira S, Ikeda S, Tomonaga M. Impact of visceral involvements and blood cell count abnormalities on survival in adult T-cell leukemia/lymphoma (ATLL). *Leuk Res*. 2007 Jun;31(6):751-7. Epub 2006 Dec 22.(有査読)
 - 15) Harasawa H, Yamada Y, Hieshima K, Jin Z, Nakayama T, Yoshie O, Shimizu K, Hasegawa H, Hayashi T, Imaizumi Y, Ikeda S, Soda H, Soda H, Atogami S, Takasaki Y, Tsukasaki K, Tomonaga M, Murata K, Sugahara K, Tsuruda K, Kamihira S. Survey of chemokine receptor expression reveals frequent co-expression of skin-homing CCR4 and CCR10 in adult T-cell leukemia/lymphoma. *Leuk Lymphoma*. 2006 Oct;47(10):2163-73. (有査読)
 - 15) Kamihira S, Jiann C, Uemura A, Tsuruda K, Hasegawa H, Sugahara K, Yamada Y. A subtype of aggressive B-cell lymphoma with an unusual presentation of effusion without masses. *Leuk Lymphoma*. 2006 Sep;47(9):1991-3. No abstract available. (有査読)
 - 16) Choi YL, Tsukasaki K, O'Neill MC, Yamada Y, Onimaru Y, Matsumoto K, Ohashi J, Yamashita Y, Tsutsumi S, Kaneda R, Takada S, Aburatani H, Kamihira S, Nakamura T, Tomonaga M, Mano H. A genomic analysis of adult T-cell leukemia. *Oncogene*. 2007 Feb 22;26(8):1245-55.

- Epub 2006 Aug 14. (有査読)
- 17) Isomoto H, Urata M, Kawazoe K, Matsuda J, Nishi Y, Wada A, Ohnita K, Hirakata Y, Matsuo N, Inoue K, Hirayama T, Kamihira S, Kohno S. Endoscope disinfection using chlorine dioxide in an automated washer-disinfector. *J Hosp Infect.* 2006 Jul;63(3):298-305. (有査読)
- 18) Murata K, Hayashibara T, Sugahara K, Uemura A, Yamaguchi T, Harasawa H, Hasegawa H, Tsuruda K, Okazaki T, Koji T, Miyanishi T, Yamada Y, Kamihira S. A novel alternative splicing isoform of human T-cell leukemia virus type 1 bZIP factor (HBZ-SI) targets distinct subnuclear localization. *J Virol.* 2006 Mar;80(5):2495-505. (有査読)
- 19) Tsukasaki K, Lohr D, Sugahara K, Kamihira S, Tomonaga M, Bartram CR, Jauch A. Comparative genomic hybridization analysis of Japanese B-cell chronic lymphocytic leukemia: correlation with clinical course. *Leuk Lymphoma.* 2006 Feb;47(2):261-6. (有査読)
- 20) Yamada Y, Kamihira S. Inactivation of tumor suppressor genes and the progression of adult T-cell leukemia-lymphoma. *Leuk Lymphoma.* 2005 Nov;46(11):1553-9. (有査読)
- 21) Hasegawa H, Yamada Y, Komiyama K, Hayashi M, Ishibashi M, Yoshida T, Sakai T, Koyano T, Kam TS, Murata K, Sugahara K, Tsuruda K, Akamatsu N, Tsukasaki K, Masuda M, Takasu N, Kamihira S. Dihydroflavonol BB-1, an extract of natural plant *Blumea balsamifera*, abrogates TRAIL resistance in leukemia cells. *Blood.* 2006 Jan 15;107(2):679-88. (有査読)
- 22) Mori S, Sugahara K, Uemura A, Akamatsu N, Hirakata Y, Murata K, Hasegawa H, Yamada Y, Kamihira S. Usefulness of a comprehensive PCR-based assay for human herpes viral DNA in blood mononuclear cell samples. *Lab Hematol.* 2005;11(3):163-70 (有査読)
- 23) Kohno T, Yamada Y, Akamatsu N, Kamihira S, Imaizumi Y, Tomonaga M, Matsuyama T. Possible origin of adult T-cell leukemia/lymphoma cells from human T lymphotropic virus type-1-infected regulatory T cells. *Cancer Sci.* 2005 Aug;96(8):527-33. (有査読)
- 24) Kamihira S, Sugahara K, Tsuruda K, Minami S, Uemura A, Akamatsu N, Nagai H, Murata K, Hasegawa H, Hirakata Y, Takasaki Y, Tsukasaki K, Yamada Y. Proviral status of HTLV-1 integrated into the host genomic DNA of adult T-cell leukemia cells. *Clin Lab Haematol.* 2005 Aug;27(4):235-41. (有査読)
- 25) Watanabe M, Ohsugi T, Shoda M, Ishida T, Aizawa S, Maruyama-Nagai M, Utsunomiya A, Koga S, Yamada Y, Kamihira S, Okayama A, Kikuchi H, Uozumi K, Yamaguchi K, Higashihara M, Umezawa K, Watanabe T, Horie R. Dual targeting of transformed and untransformed HTLV-1-infected T cells by DHMEQ, a potent and selective inhibitor of NF-kappaB, as a strategy for chemoprevention and therapy of adult T-cell leukemia. *Blood.* 2005 Oct 1;106(7):2462-71. Epub 2005 Jun 14. (有査読)
- 26) Hasegawa H, Yamada Y, Harasawa H, Tsuji T, Murata K, Sugahara K, Tsuruda K, Masuda M, Takasu N, Kamihira S. Restricted expression of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor 4 in human peripheral blood lymphocytes. *Cell Immunol.* 2004 Sep-Oct;231(1-2):1-7. (有査読)
- 27) Tawara M, Hogerzeil SJ, Yamada Y, Takasaki Y, Soda H, Hasegawa H, Murata K, Ikeda S, Imaizumi Y, Sugahara K, Tsuruda K, Tsukasaki K, Tomonaga M, Hirakata Y, Kamihira S. Impact of p53 aberration on the progression of Adult T-cell Leukemia/Lymphoma. *Cancer Lett.* 2006 Mar 28;234(2):249-55. (有査読)
- 28) Uemura A, Sugahara K, Nagai H, Murata K, Hasegawa H, Hirakata Y, Tsukasaki K, Yamada Y, Kamihira S. An ATL cell line with an IgH pseudo-rearranged band pattern by southern blotting: a pitfall of genetic diagnosis. *Lab Hematol.* 2005;11(1):8-13. (有査読)
- 29) Maeda T, Murata K, Fukushima T, Sugahara K, Tsuruda K, Anami M, Onimaru Y, Tsukasaki K, Tomonaga M, Moriuchi R, Hasegawa H, Yamada Y, Kamihira S. A novel plasmacytoid dendritic cell line, CAL-1, established from a patient with blastic natural killer cell lymphoma. *Int J Hematol.* 2005 Feb;81(2):148-54. (有査読)
- 30) Maeda T, Murata K, Fukushima T, Sugahara K, Tsuruda K, Anami M, Onimaru Y, Tsukasaki K, Tomonaga M,

Moriuchi R, Hasegawa H, Yamada Y, Kamihira S. A novel plasmacytoid dendritic cell line, CAL-1, established from a patient with blastic natural killer cell lymphoma. Int J Hematol. 2005 Feb;81(2):148-54. (有査読)

31) Ishii M, Nakazawa K, Wada H, Nishioka J, Nakatani K, Yamada Y, Kamihira S, Kusunoki M, Nobori T. Methylthioadenosine phosphorylase gene is silenced by promoter hypermethylation in human lymphoma cell line DHL-9: another mechanism of enzyme deficiency. Int J Oncol. 2005 Apr;26(4):985-91 (有査読)

32) Hasegawa H, Yamada Y, Harasawa H, Tsuji T, Murata K, Sugahara K, Tsuruda K, Ikeda S, Imaizumi Y, Tomonaga M, Masuda M, Takasu N, Kamihira S. Sensitivity of adult T-cell leukaemia lymphoma cells to tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. Br J Haematol. 2005 Jan;128(2):253-65. (有査読)

[学会発表] (計 5 件)

1) Kamihira S. ATL cell biology. 3th International Conference on Human retrovirology -HTLV-1 and Related Viruses. 2007 may 22-25, Hakone

2) Hasegawa H, Kamihira S. et al: Nutlin-3a an MDM2 antagonist, induces cellular senescence in ATL cells: Blood 2006;108 (Suppl) ASH:2006. Dec. 9-12 Orlando, Florida, USA

3) Muto s, Kamihira S, et al: Molecular allelo-karyotyping of ATL using high SNP genotyping microarrays. ASH:2006. Dec. 9-12 Orlando, Florida, USA

4) Iwanaga M, Kamihira S. et al: Trend in Prevalence of HTLV-1 in Japanese blood donors, Nagasaki 1999 to 2006. ASH:2006. Dec. 9-12 Orlando, Florida, USA

5) Takasaki U, Kamihira S. et al: A long-term study on indolent ATL. ASH:2006. Dec. 9-12 Orlando, Florida, USA

[図書] (計 2 件)

1) 上平憲 渡邊俊樹、山口一成: HTLV-1 と疾患。文光堂、2007。

2) スタンダード検査血液学。上平憲 B. 白血球検査。医歯薬出版。2007。

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

1) 名称: 癌の浸潤と転移の検査方法および検査用試薬

発明者: 尾坂 明美
上平 憲
沢田 高志

権利者: 長崎大学

種類: 技術分野

番号: 2008-60050

出願年月日: 平成 20. 3. 10

国内外の別: 国内

○取得状況 (計 1 件)

1) 名称: 新規ヒト形質細胞様樹状細胞株。

発明者: 前田 隆浩・上平 憲

権利者: 長崎大学

種類:

番号: 2007-44008 (P2007-44008A)

出願年月日: 2005. 8. 12

国内外の別: 国内

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

1) 上平 憲 (KAMIHIRA SHIMERU)
長崎大学・医歯薬学・教授
研究者番号 8 0 1 0 8 2 9 0

(2) 研究分担者

1) 山田 恭暉 (YAMADA YASHUAKI)
長崎大学・医歯薬学・准教授
研究者番号 6 0 1 4 5 2 3 2

(3) 研究協力者

1) 菅原 和行 長崎大学・付属病院・技師
2) 佐々木 大介 長崎大学・付属病院・技師
3) 鶴田 一人 長崎大学・付属病院・技師
4) 石崎 明希子 長崎大学・付属病院・技師
5) 森 沙耶香 長崎大学・付属病院・技師