

平成 22 年 6 月 21 日現在

研究種目： 若手研究 (B)  
研究期間： 2007~2009  
課題番号： 19790273  
研究課題名 (和文) リンパ腫におけるホスファチジルイノシトール 3 キナーゼ阻害剤実用化への基礎的研究

研究課題名 (英文) A basic research for phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor utilization in lymphoma

## 研究代表者

竹内 賢吾 (TAKEUCHI KENGO)  
財団法人癌研究会・癌研究所病理部・研究員  
研究者番号：40323612

## 研究成果の概要 (和文)：

408 例のリンパ腫検体を搭載した組織アレイを構築し臨床データを完備した。これを用い、PI3K 活性化のバイオマーカーであるリン酸化分子 X の発現を、免疫染色で簡便に証明しようとしたが陰性であった。PI3K 経路を負に制御する PTEN の発現を抑えるメチル化の状態をメチル化特異的 PCR で調べたところ 4/15 (26.7%) がメチル化陽性という結果であった。

## 研究成果の概要 (英文)：

Tissue microarray (TMA) blocks containing 408 lymphoma cases were established. All of the cases are accompanied by clinical information. In order to develop a biomarker analysis for PI3K pathway activation, we tried to immunostain the TMA slides for a phosphorylated substance X using various enhancement techniques. However, we failed to obtain a positive result. We also analyzed the methylation status of PTEN, which suppresses the PI3K pathway. Methylation-specific PCR revealed that the gene was methylated in 4 of 15 cases.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,700,000		1,700,000
2008 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2009 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	450,000	3,650,000

研究分野：人体病理学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：リンパ腫, PI3K

## 1. 研究開始当初の背景

Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)の活性化は生存・増殖シグナル生成を介して発癌へ関与するのみならず、様々な細胞運動亢進などを介して癌の悪性度を増大すると考え

られている。これらに加え、近年、多種の癌において PI3K の触媒サブユニット p110 $\alpha$  遺伝子の増幅や変異をはじめとする PI3K シグナル系の異常が報告されてきており、PI3K シグナル系の癌への関与は疑いないものと

なった。これらのことは、PI3K が癌治療の有力な標的の候補となりうることを意味している。

しかし、これまでの PI3K 阻害剤の中で臨床試験に進んだものはない。

悪性リンパ腫は、本邦で年間推計 12,000 例程度の発症がある悪性腫瘍である。世界標準である 2001 年発表の WHO 分類によって 50 近くの亜型が定義されている。亜型によって病因、治療反応性、予後が異なることから、適切な診断が短期的および長期的治療計画策定に直接影響する。したがって、その亜型は単なる形態学的亜型にとどまらず、異なる疾患であるといってもよい。近年、抗 CD20 抗体であるリツキシマブが、リンパ腫治療のパラダイムを転換し B 細胞性リンパ腫の標準的治療薬となった。しかし、一般的に難治性である T および NK 細胞性リンパ腫や形質細胞腫、またリツキシマブに耐性となった B 細胞性リンパ腫に対しては、新たな分子標的薬の開発が切望されている。

## 2. 研究の目的

本研究は、リンパ腫における PI3K シグナル系の異常を調べ、上述の新規 PI3K 阻害剤の臨床応用のための基礎データ—リンパ腫において治療候補症例がどの程度存在するか?—の構築を試みることを目的としている。また、副次的目的として、組織アレイ構築による大規模症例データベースの作成、及びリンパ腫の臨床病理学的検討を挙げる。

## 3. 研究の方法

408 例の連続診断リンパ腫症例の組織アレイを構築し、臨床データを完備した。アレイのコアの径は特注し 1mm とした。

PI3K 阻害剤の有効性を示唆するバイオマーカーのうちもっとも有効と考えられるリン酸化分子 X の発現を免疫染色により検討した。肺癌の染色にて実績のある市販抗体を用い、通常のポリマー法、intercalated antibody-enhanced polymer (iAEP)法、TSA 法などを用いて最適化を試みた。PTEN 遺伝子のメチル化をメチル化特異的 PCR にて解析した。

## 4. 研究成果

408 例の組織アレイの病型ごとの割合は以下の通り。

これを用いて、リン酸化分子 X の免疫染色の検定 (後述) を行った。また、研究期間中に EML4-ALK 融合遺伝子の発現がリンパ腫でもみられるという研究が報告されたので、研究代表者の開発した抗 ALK 高感度免疫染色法 iAEP 法を用いて追試をおこなった。全例が陰性であり、我々の従来からの主張を裏付けた。これを受けて、反駁のレターを書いたが、フルペーパーにするようとの返事であ

った。

B lymphoblastic lymphoma	1
T lymphoblastic lymphoma	3
Chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma	6
Splenic B-cell marginal zone lymphoma	1
Extranodal marginal zone lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue	31
Nodal marginal zone lymphoma	3
Follicular lymphoma	77
Mantle cell lymphoma	8
Diffuse large B-cell lymphoma, not otherwise specified	194
T-cell/histiocyte-rich large B-cell lymphoma	2
EBV-positive diffuse large B-cell lymphoma of the elderly	2
Plasmablastic lymphoma	1
Burkitt lymphoma	3
Adult T-cell leukemia/lymphoma	3
Extranodal NK/T-cell lymphoma, nasal type	10
Subcutaneous panniculitis-like T-cell lymphoma	1
Primary cutaneous anaplastic large cell lymphoma	1
Peripheral T-cell lymphoma, not otherwise specified	21
Angioimmunoblastic T-cell lymphoma	11
Anaplastic large cell lymphoma, ALK-positive	1
Anaplastic large cell lymphoma, ALK-negative	4
Nodular lymphocyte predominant Hodgkin lymphoma	3
Nodular sclerosis classical Hodgkin lymphoma	11
Mixed cellularity classical Hodgkin lymphoma	7
Lymphocyte-rich classical Hodgkin lymphoma	2
Lymphocyte-depleted classical Hodgkin lymphoma	1
Total	408

当初の予定では PI3KCA の変異ホットスポットをシークエンスレスクリーニングをする予定であったが、他の研究者の報告や Sanger 研究所のデータベースにより、変異はないか極めて稀であることが判明した。そのため、PI3K 経路を負に制御する PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10) 遺伝子に着目し、その発現を抑えるメチル化の状態をメチル化特異的 PCR で調べることにした。現在までに 15 例検討し、4 例 (26.7%) がメチル化陽性という結果であった。

PI3K 活性化のバイオマーカーとなりうるリン酸化分子 X を、肺癌における我々の研究にて実績のある市販抗体を用い、通常のポリマー法、intercalated antibody-enhanced polymer (iAEP)法、TSA 法などを用いて染色した。後者になるほど感度の高い方法であり、コントロール検体では陽性となったが、リンパ腫では陰性であった。

## 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 10 件)

1. Hiramatsu M, Ninomiya H, Inamura K, Nomura K, Takeuchi K, Satoh Y, Okumura S, Nakagawa K, Yamori T, Matsuura M, Morikawa T, Ishikawa Y. Activation status of receptor tyrosine kinase downstream pathways in primary lung adenocarcinoma with reference of KRAS and EGFR mutations. Lung Cancer. 2010.

2. Ennishi D, Asai H, Maeda Y, Shinagawa K, Ikeda K, Yokoyama M, Terui Y, Takeuchi K, Yoshino T, Matsuo K, Hatake K, Tanimoto M. Statin-independent prognosis of patients with diffuse large B-cell lymphoma receiving rituximab plus CHOP therapy. *Ann Oncol.* 2010;21:1217-1221.
3. Asai H, Yokoyama M, Terui Y, Ennishi D, Takeuchi K, Hatake K. Is Statin Use Really Associated With Efficacy of Rituximab? *J Clin Oncol.* 2010.
4. Terui Y, Mishima Y, Sugimura N, Kojima K, Sakurai T, Kuniyoshi R, Taniyama A, Yokoyama M, Sakajiri S, Takeuchi K, Watanabe C, Takahashi S, Ito Y, Hatake K. Identification of CD20 C-Terminal Deletion Mutations Associated with Loss of CD20 Expression in Non-Hodgkin's Lymphoma. *Clin Cancer Res.* 2009;15:2523-2530.
5. Takeuchi K, Choi YL, Togashi Y, Soda M, Hatano S, Inamura K, Takada S, Ueno T, Yamashita Y, Satoh Y, Okumura S, Nakagawa K, Ishikawa Y, Mano H. KIF5B-ALK, a Novel Fusion Oncokinase Identified by an Immunohistochemistry-based Diagnostic System for ALK-positive Lung Cancer. *Clin Cancer Res.* 2009;15:3143-3149.
6. Kato M, Sanada M, Kato I, Sato Y, Takita J, Takeuchi K, Niwa A, Chen Y, Nakazaki K, Nomoto J, Asakura Y, Muto S, Tamura A, Iio M, Akatsuka Y, Hayashi Y, Mori H, Igarashi T, Kurokawa M, Chiba S, Mori S, Ishikawa Y, Okamoto K, Tobinai K, Nakagawa H, Nakahata T, Yoshino T, Kobayashi Y, Ogawa S. Frequent inactivation of A20 in B-cell lymphomas. *Nature.* 2009;459:712-716.
7. Ennishi D, Yokoyama M, Terui Y, Asai H, Sakajiri S, Mishima Y, Takahashi S, Komatsu H, Ikeda K, Takeuchi K, Tanimoto M, Hatake K. Soluble interleukin-2 receptor retains prognostic value in patients with diffuse large B-cell lymphoma receiving rituximab plus CHOP (RCHOP) therapy. *Ann Oncol.* 2009;20:526-533.
8. Ennishi D, Takeuchi K, Yokoyama M, Asai H, Mishima Y, Terui Y, Takahashi S, Komatsu H, Ikeda K, Yamaguchi M, Suzuki R, Tanimoto M, Hatake K. CD5 expression is potentially predictive of poor outcome among biomarkers in patients with diffuse large B-cell lymphoma receiving rituximab plus CHOP therapy. *Ann Oncol.* 2008;19:1921-1926.
9. Oyama T, Yamamoto K, Asano N, Oshiro A, Suzuki R, Kagami Y, Morishima Y, Takeuchi K, Izumo T, Mori S, Ohshima K, Suzumiya J, Nakamura N, Abe M, Ichimura K, Sato Y, Yoshino T, Naoe T, Shimoyama Y, Kamiya Y, Kinoshita T, Nakamura S. Age-related EBV-associated B-cell lymphoproliferative disorders constitute a distinct clinicopathologic group: a study of 96 patients. *Clin Cancer Res.* 2007;13:5124-5132.
10. Ennishi D, Yokoyama M, Mishima Y, Watanabe C, Terui Y, Takahashi S, Takeuchi K, Ikeda K, Tanimoto M, Hatake K. Rituximab plus CHOP as an initial chemotherapy for patients with disseminated MALT lymphoma. *Leuk Lymphoma.* 2007;48:2241-2243.
- [学会発表] (計 2 件)  
竹内 賢吾 T/NK 細胞リンパ腫  
第 49 回日本リンパ網内系学会  
2009/7/10 淡路夢舞台国際会議場
- 竹内 賢吾 Lymphomatoid  
gastropathy:本邦発の新しい NK 細胞増殖症  
第 55 回日本病理学会秋季特別総会  
2009/11/19 九段会館
- [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 竹内賢吾 (Kengo Takeuchi)

研究者番号：40323612

(2)研究分担者 なし  
( )

研究者番号：

(3)連携研究者 なし  
( )

研究者番号：