

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 8 月 21 日現在

機関番号：83904

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22591055

研究課題名（和文）p57KIP2 遺伝子メチル化を指標とした悪性リンパ腫の予後予測モデルの開発

研究課題名（英文）p57KIP2 methylation as a prognostic biomarker of malignant lymphoma

研究代表者

永井宏和（HIROKAZU NAGAI）

国立病院機構名古屋医療センター・臨床研究センター・部長

研究者番号：30360811

研究成果の概要（和文）：

p57KIP2 遺伝子メチル化の有無を指標とした悪性リンパ腫の予後予測モデルの開発を目的とした。リンパ腫症例では病変のみではなく末梢血の血清検体からも DNA の p57KIP2 遺伝子メチル化が検出可能でありバイオマーカーとして汎用性が高いと考えられた。臨床試験での検証が重要である。

研究成果の概要（英文）：

Biomarkers are critical in the diagnosis and monitoring of diseases. This research was conducted to establish the molecular biomarker for malignant lymphoma. p57KIP2 gene was highly methylated in malignant lymphoma. This methylation was detected in lesions but also in peripheral blood serum DNAs of lymphoma patients. It would be an efficient and convenient marker for lymphoma.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
22 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
23 年度	900,000	270,000	1,170,000
24 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：内科系臨床医学

科研費の分科・細目：血液内科学

キーワード：癌、悪性リンパ腫、予後予測因子、がん抑制遺伝子、p57KIP2 遺伝子

1. 研究開始当初の背景

悪性リンパ腫は多段階の分子異常を経て発症するといわれている。p57KIP2 は各種癌腫で染色体欠失が認められる 11p15.5 に位置し、また一部の Beckwith-Wiedemann 症候群（高率に悪性腫瘍を合併）の原因遺伝子とされており、癌抑制遺伝子の候補の一つとして多く

の解析がなされてきた。これまでに造血器系腫瘍において p57KIP2 遺伝子の発現が消失しており、その発現消失が p57KIP2 遺伝子のプロモーター領域の異常な DNA メチル化によることを明らかにした。またこの DNA メチル化は細胞株のみならず実際の臨床検体特に B 細胞性リンパ腫で高率に起こっている事もわ

かり、p57KIP2 遺伝子が造血器系腫瘍における癌抑制遺伝子の候補となりうる可能性を示した。びまん性大細胞型 B 細胞性リンパ腫 (DLBCL) においては約 85% の症例で p57KIP2 遺伝子の異常メチル化が認められた。この頻度は DLBCL において認められる遺伝子異常として単独では最も高頻度であり、バイオマーカーとして汎用性があることが示唆された。Methylation specific real time quantitative PCR (MS-RQ-PCR) を用いると 10^{-4} 感度で検出できることがわかった。DLBCL 患者の血清 DNA における p57KIP2 遺伝子メチル化を指標とすることが病態解析・予後予測において検討の価値が高いと考えられた。

2. 研究の目的

p57KIP2 遺伝子メチル化を指標に悪性リンパ腫の微小残存病変などの疾患モニタリングシステムを構築する。
悪性リンパ腫の病態に重要な他のがん関連遺伝子の解析を進め、新規バイオマーカーとなりうるかを検証する。

3. 研究の方法

DLBCL 患者の末梢血から血清を分離し DNA を抽出する。10ml 採血から得られる 5ml の血清を対象とした。DNA の bisulfite 処理後、メチル化特異的プライマーを用いて、p57KIP2 遺伝子のメチル化の検出を MS-RQ-PCR にて行った。対象として健常人の血清を用いた。p57KIP2 遺伝子が 100%メチル化している細胞株 SU-DHL-6 の DNA をとメチル化が認められない細胞株 K562 の DNA にて段階希釈することにより検出感度の検討を行った。また、DLBCL 患者で高頻度にメチル化していることが特徴的である PROX1 遺伝子の発癌に関わるメカニズムを解析することにより新たなバイオマーカーの同定を試みた。PROX1 遺伝子を導入することにより遺伝子発現が

変動する遺伝子群を cDNA アレイ解析 (Sentrix™ Human-6 V2 Expression BeadChip (Illumina), 48000 遺伝子) をした。また同定された遺伝子のがん関連遺伝子候補であるかを検討した。

4. 研究成果

MS-RQ-PCR での p57KIP2 遺伝子メチル化検出感度を検討した。検出感度は 10^{-4} であった。他の遺伝子での希釈倍率を用いた検討から同方法にて、1.5 genome を検出できる感度と同等であることが検証された。DLBCL 患者 (末梢血には腫瘍細胞が混在していない症例) 血清 5ml から DNA を用いて p57KIP2 遺伝子メチル化を定性にて検討したところ、陽性所見を得た。健常人では同方法ではメチル化 DNA は検出できなかった。MS-RQ-PCR での解析は若干安定性が不良であり、未だ条件検討の余地がある。末梢血を用いた p57KIP2 遺伝子メチル化検出は汎用性が高い検査方法であると考えられた。

p57KIP2 遺伝子と同様に DLBCL にて高頻度にメチル化されておりがん抑制遺伝子候補である PROX1 遺伝子についても同様にバイオマーカーとして有効であるかを検討した。同遺伝子では MS-RQ-PCR での解析が困難であったため、同遺伝子の下流にある遺伝子群を cDNA アレイにて検討しがん関連遺伝子およびバイオマーカー候補とした。以下に PROX1 にて遺伝子発現が低下する遺伝子群、上昇する遺伝子群を示す。

Symbol Genbank

Prox1-downregulated genes

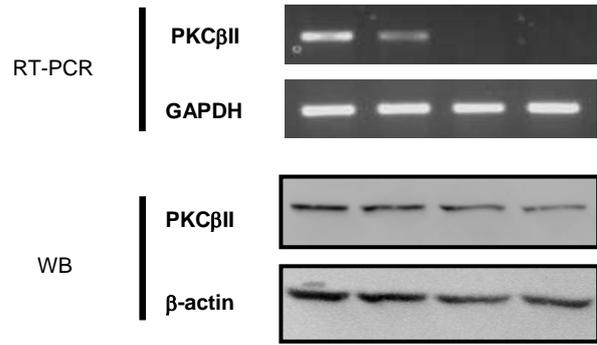
PRKCB1	NM_002738
EPB41L3	NM_012307
EVA1	NM_005797
COL4A3	NM_000091
LXN	NM_020169
CXCR4	NM_003467
EGFLAM	NM_152403
UTS2D	NM_198152
PCDHA4	NM_018907
CSS3	NM_175856

Prox1-upregulated genes

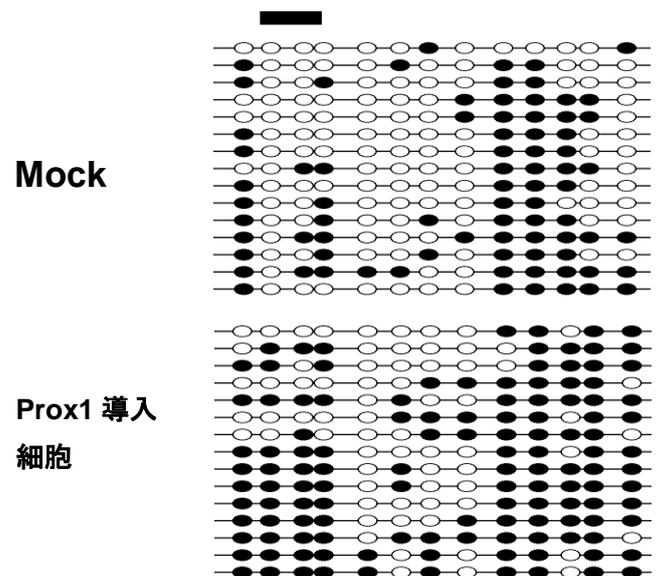
ABCB1	NM_000927
LZTFL1	NM_020347
KIAA1914	NM_001001936
ABCG2	NM_004827
CCRL1	NM_178445
ROR1	NM_005012
SPANXB1	NM_032461
ICAM1	NM_000201
FAM20A	NM_017565
ZNF230	NM_006300

これら遺伝子群でがん遺伝子候補である PRKCB1 (PKC・II) と PROX1 の関連を追加解析した。

PROX1 遺伝子導入にて明らかに PKC・II の発現が抑制されることが分かった。以下が RT-PCR とえ Western blot の結果である。



PKC・II 遺伝子のプロモーター領域の解析から PROX1 遺伝子が PKC・II 遺伝子プロモーターのメチル化を促進し遺伝子発現を調節していることが明らかとなった。以下の図は PKC・II 遺伝子プロモーターの bisulfite mapping であり、PROX1 導入にてメチル化が高頻度になっていることを示す。



現在 PKC・II 遺伝子のメチル化の有無を悪性リンパ腫のバイオマーカーとして使用可能であるかの検討を行っている。

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) Kihara R, Watanabe T, Yano T, Uike N, Okamura S, Kawano F, Hanada S, Sunami K, Inoue N, Sawamura M, Yoshida S, Shimomura T, Kitano K, Kojima Y, Horibe K, Nagai H; Prognosis of mature T cell lymphoma is poorer than that of diffuse large B cell lymphoma in IPI low-risk group, but not in intermediate- and high-risk groups. *Int J Hematol.* 98(1):98-102, 2013
- 2) Hagiwara S, Yotsumoto M, Odawara T, Ajisawa A, Uehira T, Nagai H, Tanuma J, and Okada S; Non-AIDS-defining hematological malignancies in HIV-infected patients: an epidemiological study in Japan. *AIDS.* 27(2): 279-283, 2013
- 3) Hagiwara K, Ito H, Murate T, Miyata Y, Ohashi H, and Nagai H; PROX1 overexpression inhibits protein kinase C beta II transcription through promoter DNA methylation. *Genes Chromosomes Cancer.* 51(11):1024-1036, 2012
- 4) Yotsumoto M, Hagiwara S, Ajisawa A, Tanuma J, Uehira T, Nagai H, Fujikawa Y, Maeda S, Kitano K, Arima N, Uno K, Iwai T, Hongo I, Ota Y, Fukutake K, and Okada S; Clinical characteristics of human immunodeficiency virus-associated Hodgkin lymphoma patients in Japan. *Int J Hematol.* 96(2):247-53, 2012
- 5) Ogura M, Tsukasaki K, Nagai H, Uchida T, Oyama T, Suzuki T, Taguchi J, Maruyama D, Hotta T, Tobinai K; Phase I study of BCX1777 (forodesine) in patients with relapsed or refractory peripheral T/natural killer-cell malignancies. *Cancer Sci.* 103(7):1290-5, 2012
- 6) Tobinai K, Igarashi T, Itoh K, Kurosawa M, Nagai H, Hiraoka A, Kinoshita T, Uike N, Ogura M, Nawano S, Mori S, Ohashi Y; IDEC-C2B8 Study Group. Rituximab monotherapy with eight weekly infusions for relapsed or refractory patients with indolent B cell non-Hodgkin lymphoma mostly pretreated with rituximab: a multicenter phase II study. *Cancer Sci.* 102(9):1698-705, 2011
- 7) Nagai H, Ogura M, Kusumoto S, Takahashi N, Yamaguchi M, Takayama N, Kinoshita T, Motoji T, Ohyashiki K, Kosugi H, Matsuda S, Ohnishi K, Omachi K, Hotta T; Cladribine combined with rituximab (R-2-CdA) therapy is an effective salvage therapy in relapsed or refractory indolent B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Eur J Haematol.* 86(2):117-23, 2011
- 8) Nagai H, Odawara T, Ajisawa A, Hagiwara S, Watanabe T, Uehira T, Uchiumi H, Yotsumoto M, Miyakawa T, Watanabe A, Kambe T, Konishi M, Saito S, Takahama S, Tateyama M, Okada S; Whole brain radiation alone produces favourable outcomes for AIDS-related primary central nervous system lymphoma in the HAART era. *Eur J Haematol.* 84(6):499-505, 2010
- 9) Ohmachi K, Ando K, Ogura M, Uchida T, Itoh K, Kubota N, Ishizawa K, Yamamoto J, Watanabe T, Uike N, Choi I, Terui Y, Usuki K, Nagai H, Uoshima

N, Tobinai K; The Japanese Bendamustine Lymphoma Study Group. Multicenter phase II study of bendamustine for relapsed or refractory indolent B-cell non-Hodgkin lymphoma and mantle cell lymphoma. *Cancer Sci.* 101(9): 2059-64, 2010

- 10) Kubota T, Moritani S, Yoshino T, Nagai H, Terasaki H; Ocular adnexal marginal zone B cell lymphoma infiltrated by IgG4-positive plasma cells. *J Clin Pathol.* 63(12):1059-65, 2010

[学会発表] (計 6 件)

- 1) Hagiwara K, Murate T, Miyata Y, Hotta T, Nagai H. Prox1 suppressed tumor cell growth by the down regulation of PKC β II through the DNA methylation
53rd American Society of Hammatology, Dec 10-13, San Diego USA
- 2) Morisima S, Yamamoto K, Kimura H, Iwata S, Kinoshita T, Nagai H, Sugiura I, Tsushita K, Kagami Y, Miyamura K, Kuzushima K, Nakamura S, Morishima Y. Increased Peripheral T Cell Response to EBV-Infected Cells with Frequent Detection of EBV-DNA In Plasma and Viral mRNA In Peripheral B-Cells In Immunocompetent EBV-Positive Diffuse Large B-Cell Lymphoma Patients. 52th Annual Meeting of the American Society of Hematology (Orland, USA) Dec. 4-7, 2010
- 3) 萩原和美、宮田泰彦、永井宏和. 血液腫瘍細胞に対するベンダマスチンとキナーゼ阻害剤併用による殺細胞効果の検討

第 71 回日本癌学会学術総会 札幌、平成 24 年 9 月 19-21 日

- 4) Hagiwara K, Miyata Y, Nagai H. Cytotoxicity of bendamustine combined with new generation kinase inhibitors in lymphoid cell lines. 第 74 回日本血液学会学術集会、京都、平成 24 年 10 月 19-21 日
- 5) Hagiwara K, Murate T, Miyata Y, Hotta T, Nagai H. The mechanisms of tumor suppression by PROX1 第 70 回日本癌学会学術総会、平成 23 年 10 月 3-5 日、名古屋
- 6) 萩原和美、村手隆、宮田泰彦、堀田知光、永井宏和、癌抑制遺伝子としての PROX1 の機能解析、第 73 回日本血液学会学術集会、平成 23 年 10 月 14-16 日、名古屋

[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

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

永井宏和 (HIROKAZU NAGAI)

国立病院機構名古屋医療センター・臨床研
究センター・部長

研究者番号：30360811

(2)研究分担者

該当者なし

(3)連携研究者

該当者なし