

機関番号：14101
 研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20390166
 研究課題名（和文）悪性腫瘍における治療選択検査と分子標的治療の開発：プリン代謝酵素欠損モデル
 研究課題名（英文） Development of companion diagnostics and molecular target therapy in malignancy: a model of the purine metabolic enzyme deficiency
 研究代表者
 登 勉 (NOBORI TSUTOMU)
 三重大学・大学院医学系研究科・教授
 研究者番号：60106995

研究成果の概要（和文）：

核酸代謝とメチオニン代謝に関係する Methylthioadenosine phosphorylase (MTAP) の異常（酵素欠損）は、多くの癌で高頻度に認められる。

本研究では、MTAP タンパクの有無を診断する方法が遺伝子欠失診断より有用であることを証明した。MTAP 酵素欠損と DNA メチル化の検討では、MTAP 陰性細胞では DNA メチル化が促進されることを確認し、発癌過程における epigenetic mechanism に MTAP 酵素欠損も関与している可能性を新たに見出した。白血病における MTAP 酵素欠損の診断法として FACS analysis による方法を開発した。これらの研究成果は、MTAP 酵素欠損を分子標的とする選択的化学療法の実現に向かって大きなステップとなり、近い将来には Companion diagnostics として完成することが期待される。

研究成果の概要（英文）：Methylthioadenosine phosphorylase (MTAP) is an enzyme involved in the metabolism of purine and methionine. Genetic analysis of the MTAP-negative cancer cell lines indicated that the all enzyme-negative cell lines but one had the partial or total deletion of MTAP gene. When this exceptional cell line was incubated with 5'-deazacytidine, the MTAP gene expression was confirmed by RT-PCR, indicating that the promoter hypermethylation is one of the mechanisms for MTAP deficiency in malignancy. In addition to IHC and Western blotting with anti-human MTAP monoclonal antibody, FACS analysis was found to be useful for the diagnosis of MTAP deficiency in leukemic cell lines.

In conclusions, MTAP deficiency will be diagnosed more precisely with IHC and FACS analysis than with the genetic test alone. Since the frequency of MTAP deficiency in a variety of primary tumors is relatively high, one could exploit this metabolic difference between normal and cancer cells for the development of the selective chemotherapy. Furthermore, the combination of MTAP deficiency as a molecular target and the selective chemotherapy is a good example of companion diagnostics.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	5,000,000	1,500,000	6,500,000
2009年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
2010年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
年度			
年度			
総計	12,400,000	3,720,000	16,120,000

研究代表者の専門分野：検査医学、遺伝子診断学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：MTA 酵素欠損、プリン代謝、免疫組織染色、選択的化学療法、DNA メチル化

1. 研究開始当初の背景

がん対策基本法が平成 20 年 4 月 1 日から施行され、がん治療専門医や放射線治療医の育成と診断・治療体制の充実が求められている。癌診療では、治療成績や予後を左右する因子として早期発見・早期治療の重要性が強調されてきた。たくさんの腫瘍マーカーが臨床現場に導入され、日常診療で活用されている。腫瘍マーカーの定義（国立がんセンター大倉久直先生）にあるように、これらのバイオマーカーは癌細胞によって、または癌細胞に反応した正常細胞によって産生されたものである。当然の帰結として、癌の存在診断に関する感度・特異度が満足すべきレベルに達している腫瘍マーカーは少ない。他方、腫瘍マーカーは、癌のスクリーニングや診断（存在、種類、部位）、転移、治療・再発モニタリング等々、様々な目的に活用されている。

ヒトゲノム計画の完了とともに、人類共通の財産ともいべきゲノム情報に基づく科学研究や医学研究が始まった。臨床検査医学分野でも、ゲノム情報を用いた診断が行なわれているが、癌細胞に起こったゲノム変化（癌化の原因であれ結果であれ）を対象とする診断方法や解析技術の開発と臨床応用は、癌診療にとって特に重要である。既に多くのゲノムマーカーが発見され、臨床的有用性に関する報告がなされている。例えば、よく知られている癌抑制遺伝子 p53 の変異の有無が乳癌患者の長期生存と関連し、変異がある場合には生存期間が短いことが報告された（Olivier M et al. Clin Cancer Res 12:1157-67, 2006）。また、遺伝子多型 CYP2D6*4 を有する乳癌患者では、Tamoxifen を活性型に代謝できないため、効果が少ないことが報告された（Goetz M et al. J Clin Oncol 23:9312-8, 2005）。前者は、日本人についても同じ結果が予想されるが、後者については、CYP2D6*4 遺伝子多型の頻度が 0.4%（欧米人は 4%）であることから、日本人での臨床的有用性については疑問視される。これらの例のように、ゲノムマーカーについては人種差を考慮することが重要であり、非小細胞肺癌での EGFR 遺伝子変異とイレッサの効果に関する欧米人と東アジア人での差が有名である。

これからの癌診療においては、癌特異的な分子標的を発見し、分子標的治療薬の創薬とともに診断法を開発することが更に重要になるであろう。すなわち、最近米国を中心に注目された Theranostics（テラノスティクス；治療選択的検査）（Pollack A. New York Times Nov. 13, 2005）や Companion diagnostics（Papadopoulos N et al. Nature Biotechnol 24:985-95, 2006）という概念で

ある。

種々の分子生物学的手法を用いた検討の結果、同じ組織から発生した癌であってもそれぞれに個性があり、治療効果や予後にも関係していることがわかった。しかし、治療という側面から見ると、正常細胞と癌細胞の違いを発見し、その差違を標的にした治療法が可能であれば、より選択性の高い癌治療となりうることは容易に想像される。これが **Therapy-specific Diagnostics（テラノスティクス）** の語意であると理解される。

プリン代謝酵素 Methylthioadenosine phosphorylase(MTAP)は、全ての正常細胞及び正常組織では活性を認めるが、小児白血病、肺癌、脳腫瘍などの癌で高頻度に欠損している。これらの悪性腫瘍以外にも、膀胱癌、肝癌、骨肉腫、中皮腫、Mantle cell lymphoma などでも MTAP 欠損が報告された。この酵素はプリン・サルベージ経路を介したアデニン・ヌクレオチドの供給に関与しているので、酵素欠損癌細胞では、プリン新生合成阻害剤に感受性である。一方、正常細胞は、癌患者血中に存在する MTAP の基質 Methylthioadenosine (MTA)を利用してアデニン・ヌクレオチドを産生する。従って、癌細胞はプリン欠乏になり死滅するが、正常細胞は生き残る。我々のグループや他の研究者が、肺癌細胞をはじめ多くの癌細胞株を用いた試験管内実験によって、この作業仮説を証明した。MTAP 酵素欠損を標的にした化学療法は有望であり、選択性の高い化学療法の可能性が高いと言える。

2. 研究の目的

MTAP 酵素欠損を標的とする分子標的治療法を臨床応用する場合の課題は、正常細胞が混入した臨床検体に適した MTAP 欠損診断法の開発である。正確な酵素欠損の診断無しには、選択的薬療法の対象患者を選別することさえ不可能である。研究代表者は、診断法の確立のために遺伝子欠失診断法と特異抗体による免疫組織染色法を開発した。骨肉腫の臨床検体を用いて検討した結果は良好で（Int J Oncol 31:1069,2007）、①他の固形腫瘍（非小細胞肺癌など）や血液腫瘍（リンパ腫、急性リンパ性白血病）における有用性の検討、②蛋白質レベルでの MTAP 酵素欠損の診断と他の genetic or epigenetic mechanisms の検討、③白血病細胞での酵素欠損診断法の確立、そして④分子標的治療薬の探索を目指して本研究を計画するに至った。

本研究は、治療選択検査と分子標的治療の組み合わせ（companion diagnostics）の重要性を示すモデルとなり、今後の臨床検査の方向性に大きな示唆を与えるであろう。

3. 研究の方法

(1) MTAP 酵素欠損診断アルゴリズムの有用性の検証

診断アルゴリズムの検討を骨肉腫の臨床検体を用いて行なった。その結果の一部は報告したが (Int J Oncol 31:1069,2007)、遺伝子欠失以外の機序に起因する酵素欠損についての検討は十分でないため、肺癌の臨床検体を用いて検証した。まず、免疫組織染色検査を行い、陽性であれば、酵素蛋白は存在すると判断した。一方、陰性あるいは判定不能の場合、遺伝子欠失診断を行なった。欠失ありの場合は、酵素遺伝子欠失による酵素欠損と診断した。

欠失が無い場合、epigenetic mechanism が考えられるので、Bisulfite 処理 DNA を鋳型にして Methylation-specific PCR を行なった。プロモーター・メチル化が認められれば、酵素欠損の機序と考えた。

肺癌臨床検体を用いて、診断アルゴリズムの有用性と、各機序別の酵素欠損頻度を検討した。なお、全例について、遺伝子欠失診断を実施した。

(2) 免疫組織染色によるMTAP欠損診断

酵素蛋白発現の有無を知るには、免疫組織染色による診断が有効である。MTAP の場合、全ての正常組織は MTAP 酵素蛋白陽性で、組織切片に存在する正常組織が常に陽性コントロールになるので、免疫組織染色による診断は容易と考えられる。抗ヒト MTAP モノクロナル抗体は我々の研究室で既に作製し、免疫組織染色に用いている。パラフィン包埋ホルマリン固定組織を用いた。0.3 ミクロン厚の切片スライドガラス上に置いて 24 時間乾燥させ、脱パラフィン後、電子レンジ処理を 3 分間 3 回行った。その後の染色は UltraView Universal Diaminobenzidine (DAB) kit を用いた Ventana EX system (Ventana Medical Systems, Inc) により行った。骨肉腫組織での検討では、染色範囲 25% 以上と Real-time PCR 法による MTAP/pseudoMTAP 比 (M/P 比) 0.6 以上が相関し、陽性判定基準とした。この基準が、今回検討する腫瘍組織 (非小細胞肺癌、NSCLC) にも適用できるかを検証した。

(3) Real-time PCRによるMTAP遺伝子欠失診断

Real-time PCR に使用する PCR プライマーやプローブの塩基配列、PCR 条件等は既に報告したが (Leukemia14:935-940,2000)、簡単に述べると、MTAP エクソン 8 (染色体 9p21) と MTAP 偽遺伝子 (染色体 3q28) を増幅するプライマーやこれらのプライマーに挟まれた部分に相補的なプローブ (TaqMan プロー

ブ)を用いて、Real-time PCR を行った。この方法を腫瘍組織から抽出した DNA に適用し、MTAP 欠失を調べた。正常細胞の混入した白血病患者検体で検討した結果では、腫瘍細胞が 30% 以上存在すれば、欠失の診断は可能であった。肉眼的に明らかな腫瘍組織と正常組織からの DNA を用いて、腫瘍と正常での M/P 比を比較し、カットオフ値を設定した。また、これらのデータを組織染色結果と相関させた。

(4) FACSによるMTAP蛋白欠損診断

FACS による白血病の病型診断は日常診療でルーチン化しており、本学附属病院検査部でも実施している。MTAP 蛋白の細胞内局在は細胞質および核で、細胞膜上には発現していない。従って、細胞の前処理 (permeabilization) に工夫が必要であるが、白血病細胞における MTAP 蛋白欠損を FACS によって診断する方法の開発を行なった。

(5) MTAP酵素欠損とDNAメチル化

MTAP酵素欠損細胞では、メチル基ドナーである S-adenosylmethionine (SAM) 濃度が増加する。MTAP酵素欠損が癌細胞のみに観察されることから、酵素欠損、DNAメチル化亢進、そして発癌の間に関係があるかどうかを知ることは、興味深い。また、MTAP酵素欠損癌の治療薬として脱メチル化剤が有望であるかどうかの検討にも重要である。

まず、通常の状態では DNAメチル化されている遺伝子を対象に、脱メチル化剤で処理した後に経時的に遺伝子発現を観察した。さらに、遺伝子発現プロファイルを DNA マイクロアレイにより検討した。

(6) MTAP transfectomaを用いた分子標的治療のin vitro 実験

我々は、既に MTAP 発現ベクターにより酵素欠損細胞株を形質転換した細胞株 (MTAP transfectoma) を樹立したので、MTAP 以外には同じ遺伝的背景を持つ細胞株を実験に用いた。

4. 研究成果

(1) MTAP 酵素欠損診断アルゴリズムの検証

骨肉腫臨床検体を用いた検討結果に基づいて、診断アルゴリズムを作成したが、他の固形腫瘍である NSCLC の臨床検体を用いて検証した。

検討した NSCLC 69 例 (男性 48 例、女性 21 例) の組織型は、Adenocarcinoma 38 例、Squamous cell carcinoma 26 例、Large cell carcinoma 2 例、Adenosquamous carcinoma 3 例であった。

	MTAP immunostaining		χ^2
	Positive	Negative	
MTAP status determined by immunohistochemistry (n = 69)			
Gender			
Male	29	19	p < 0.01
Female	20	1	
Histology			
Adenocarcinoma	32	6	n.s.
Squamous cell carcinoma	14	12	
Large cell carcinoma	0	2	
Adenosquamous carcinoma	3	0	
Differentiation			
Well	17	6	n.s.
Moderately	20	5	
Poorly	12	9	
Pathological stage			
I	34	14	n.s.
II	2	2	
III	11	2	
IV	2	2	

表 1. 臨床データと IHC による MTAP 酵素欠損の診断

これら全例について免疫組織染色 (IHC) を行い、腫瘍部の染色性と染色領域を決定した。

IHC の代表例を図 1 に示した。A は Well-differentiated adenocarcinoma、B は Well-differentiated squamous cell carcinoma で、それぞれ(a)と(b)は MTAP 陽性で、(c)と(d)は MTAP 陰性である。

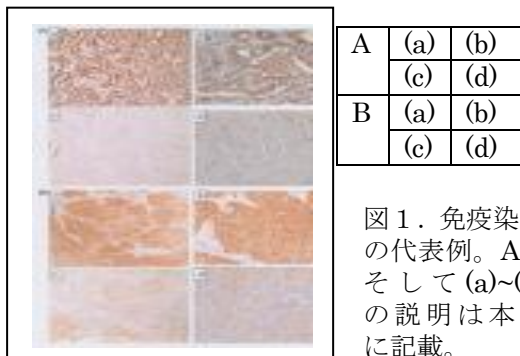


図 1. 免疫染色の代表例。A, B そして (a)~(d) の説明は本文に記載。

これら 69 例の臨床検体から腫瘍部を microdissection により採取し、DNA を抽出した。MTAP エクソン 8 の欠失は real-time PCR により定量し、MTAP 偽遺伝子をコントロールにして「3. 研究の方法 (3) Real-time PCR による MTAP 遺伝子欠失診断」に述べた通りに M/P 比を求めた。縦軸を M/P 比、そして横軸を染色領域%として、69 例の結果をプロットした。横軸の染色領域%でみると、70%以上と 30%以下の 2 群に分かれた。一方、M/P 比 0.5 をカットオフ値とした場合、IHC 染色領域%が 30%以下の例では、MTAP 欠損の診断は困難であった。

M/P 比が 0.5 を超える例で MTAP プロモーターのメチル化を検討したところ、6 例ではメチル化が認められた。MTAP 酵素欠損機序の解析には興味深い結果であったが、MTAP 欠損診断には、IHC による MTAP タンパクの有無を調べるのが遺伝子検査よ

り有用であることを示す結果であった。

(2) FACS による MTAP 酵素欠損診断法の開発

固形腫瘍での MTAP 酵素欠損の診断については上述の IHC による方法が確立したと言える。白血病などの浮遊癌細胞については、従来から FACS 解析が病型診断に多用されている。MTAP 酵素欠損が高頻度に認められる急性 T リンパ性白血病 (TALL) に用いるために、FACS 解析による MTAP タンパク検出を検討した。MTAP タンパクは細胞内に局在するため、細胞膜透過剤を用いて一次ならびに二次抗体を細胞内に移入し、FACS 解析を行った。膜透過剤の条件や抗体使用量の設定を行い、培養白血病細胞株の MTAP タンパクの解析が可能となった。この結果、MTAP 陰性 T 細胞白血病細胞と MTAP 陽性 B 細胞白血病細胞を同じフラスコで培養し、様々な薬剤の効果を FACS により判定する実験が可能となり、分子標的治療薬のスクリーニングや開発にとって大きな進歩である。

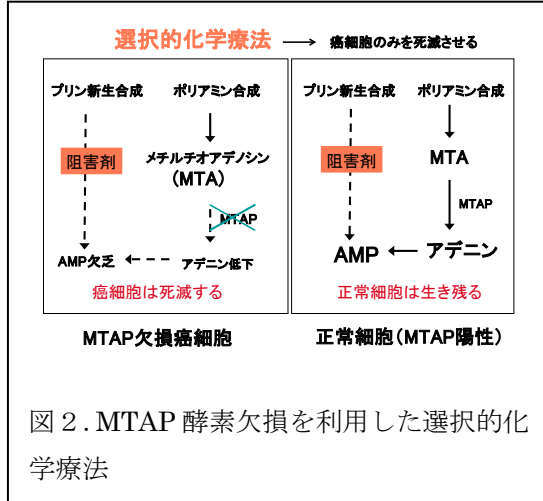
(3) MTAP 酵素欠損と DNA メチル化

MTAP 酵素欠損細胞では、メチル基ドナーといわれる S-adenosylmethionine (SAM) の細胞内濃度が増加する。この結果、MTAP 酵素欠損が DNA メチル化を促進すると予想される。そこで、MTAP 陽性 A549 肺癌細胞と MTAP 陰性 A549 肺癌細胞を脱メチル化剤存在下で 4 日間培養した後、脱メチル化剤無添加培地に移し、経時的に DNA メチル化の変化を観察した。TKTL1 遺伝子は、脱メチル化処理しない状態ではメチル化されており、脱メチル化剤処理で発現が亢進することを我々は発見し、本実験での対象遺伝子として用いた。4 日間の脱メチル化剤処理により、TKTL1 遺伝子の発現を誘導し、その後の脱メチル化剤除去による再メチル化に及ぼす MTAP 酵素欠損の影響を観察した。遺伝子発現は、脱メチル化剤による影響を受けない GAPDH 遺伝子と TKTL1 遺伝子の発現量比 (TKTL1/GAPDH 比) で表わした。MTAP 陽性細胞に比べ、MTAP 陰性細胞では TKTL1/GAPDH 比が低下した。このことは、MTAP 陰性細胞では DNA メチル化の促進により、TKTL1 遺伝子の発現が抑制されたことを示しており、発癌過程における DNA メチル化の促進と MTAP 酵素欠損との関係を示唆する結果であった。

(4) MTAP 酵素欠損を分子標的とする選択的化学療法

正常細胞は常に MTAP 酵素を発現し、癌細胞では MTAP 酵素を欠損する頻度が高い。図 2 に示すように、MTAP 酵素欠損による代謝の違いは、選択的化学療法の開発に利用でき

る。



プリン代謝阻害剤によって purine nucleotides (AMP, ADP, ATP)の合成を抑制すると、MTAP 陰性癌細胞では MTA からアデニンが産生されないため、AMP が欠乏して癌細胞は死ぬ。一方、MTAP 陽性である正常細胞では MTA からアデニンが産生されるので、AMP の欠乏は起こらない。結果、正常細胞へのプリン代謝阻害剤の影響は少なく、MTAP 酵素欠損の癌細胞に選択的な化学療法が可能となる。従って、選択的化学療法の成否を決める要因の一つは正確な診断である。既に、IHC と FACS による MTAP 酵素欠損診断法は確立したので、次の課題は、治療法の開発である。

図 3. MTAP 陽性骨肉腫細胞と陰性骨肉腫細胞での薬剤感受性の差

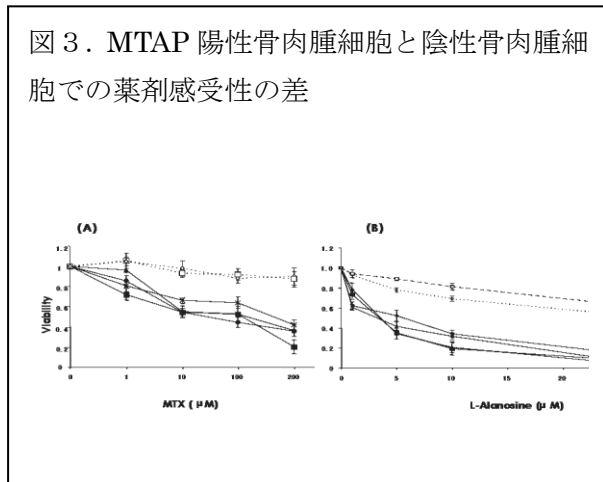
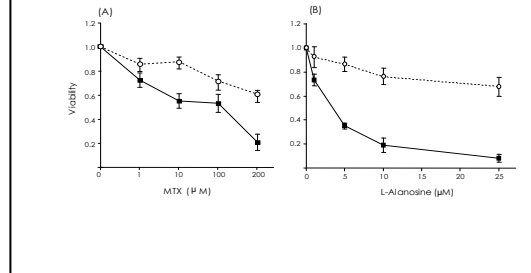


図 3 には、MTAP 陽性骨肉腫細胞株 2 株と陰性細胞株 4 株を用いて、MTX と L-alanosine に対する感受性の差を示した。MTX に対する感受性は、薬剤濃度を高くするにつれて MTAP 陽性細胞と陰性細胞の間での差が大きくなり、MTAP 陰性細胞では生存率が低下した。L-alanosine では、MTX で観察された傾向がより顕著であった。

次に、MTAP 陰性の G292 骨肉腫細胞株と MTAP cDNA によって形質転換した G292/MTAP transfectoma を用いて、図 3 と同様の実験を行った(図 4)。MTX に比して、L-alanosine では MTAP 酵素欠損による代謝の差は生存率に顕著に影響した。これら、二つの実験結果は、MTAP 酵素欠損は選択的
化学療法の分子標的になることを示した。

図 4. MTAP transfectoma を用いた選
択的化学療法



L-alanosine に加えて、新しい機序のプリン代謝阻害剤の開発や、従来から臨床で用いられている抗癌剤の組合せについては、本研究で開発されたスクリーニング法を用いて検討する計画である。

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 6 件)

- ① Jinda S, Nakatani K, Nishioka J, Yasuda K, Soya Y, Hayashi A, Wada H, Nobori T: Personalized treatment in the eradication therapy for *Helicobacter pylori*. *International Journal of Molecular Medicine* 27:255-261;2010、査読(有)
- ② 中谷 中, 登 勉: ファーマコゲノミクス検査によるオーダーメイド医療の動向臨床検査 54(13)1607-1613;2010、査読(無)
- ③ Watanabe F, Takao M, Inoue K, Nishioka J, Nobori T, Shiraishi T, Kaneda M, Sakai T, Yada I, Shimpo H: Immunohistochemical diagnosis of methylthioadenosine phosphorylase(MTAP) deficiency in non-small cell lung carcinoma. *Lung Cancer* 63:39-44;2009、査読(有)
- ④ Tanaka K, Mohri Y, Nishioka J,

Kobayashi M, Ohi M, Miki C, Tonouchi H, Nobori T, Kusunoki M: Neurotrophic receptor tropomyosin-related kinase B as an independent prognostic marker in gastric cancer patients. Journal of Surgical Oncology 99:307-310;2009、査読 (有)

- ⑤ Hayashi A, Nakatani K, Nishioka J, Sakamoto Y, Jinda S, Wada H, Nobori T: Neurotrophic receptor tyrosine kinase B induces c-fos-associated cell survival. International Journal of Molecular Medicine 24:807-811;2009、査読 (有)
- ⑥ 登 勉: 臨床検査からみたゲノム医療の現状と課題 臨床病理 56 (5) 387-394;2008、査読 (無)

[学会発表] (計 3 件)

- ① 登 勉: From the discovery of p16 tumor suppressor gene to the personalized medicine.(2010 Shanghai Laboratory Medicine Conference)、2010.10.10 Shanghai
- ② 坂本佑子 他:TRC 法を用いた Survivin mRNA 定量による膀胱癌診断の有用性 (第 57 回日本臨床検査医学会学術集会)、2010.9.9 東京
- ③ 登 勉: 医療における遺伝子検査～Companion Diagnostics の意義～(第 19 回生物試料分析科学大会)、2009.2.21 名古屋

6. 研究組織

(1) 研究代表者

登 勉 (NOBORI TSUTOMU)
三重大学・大学院医学系研究所科・教授
研究者番号: 60106995

(2) 研究分担者

中谷 中 (NATATANI KANAME)
三重大学・医学部附属病院・講師
研究者番号: 80237304

(3) 研究分担者

高尾 仁二 (TAKAO MOTOSHI)
三重大学・医学部附属病院・准教授
研究者番号: 30263007

(4) 研究分担者

白石 泰三 (SHIRAISHI TAIZOU)
三重大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号: 30162762

(5) 連携研究者 ()

研究者番号: