

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 4 月 22 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590686

研究課題名(和文) 血液細胞における糖鎖を含む抗原の発現解析と細胞機能及び病態との関係の解明

研究課題名(英文) Analysis of the expression of antigens including carbohydrate chains and the association of the antigen expression between cell function and disease

研究代表者

室井 一男 (MUROI, KAZUO)

自治医科大学・医学部・教授

研究者番号：50190939

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：前胚中心細胞由来と後胚中心細胞由来のB細胞性リンパ腫のCD25陽性率は、胚中心細胞由来のB細胞性リンパ腫のそれに比して高かった。CD25陽性の瀰漫性大細胞型B細胞性リンパ腫と濾胞性リンパ腫の予後は、CD25低発現のそれより不良であった。CD25陽性B細胞性リンパ腫とCD25陰性のそれで、マイクロアレイを用いた遺伝子発現に差は見られなかった。骨髓異形成症候群の不応性貧血で進行する例では、骨髓芽分画中のBリンパ芽球が減少していた。造血幹細胞移植後の回復期の顆粒球は、CD56を発現することを見出した。成人発症の慢性肉芽腫症の顆粒球では、CD10の発現が低下していた。

研究成果の概要(英文)：The positivity of CD25 in B cell lymphomas derived from pregerminal center and postgerminal center were higher than that derived from germinal center. The prognosis of CD25+ diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) and CD25+ follicular lymphoma (FL) were worse than that of CD25- DLBCL and CD25- FL. No difference between gene expression in CD25+ B-cell lymphoma cells and CD25- B-cell lymphoma cells was shown. Decrease of B lymphoblasts in the bone marrow blast region was shown to predict progression of refractory anemia of myelodysplastic syndrome. Granulocytes in a recovery state after hemopoietic stem cell transplantation were shown to express CD56. CD10 expression was observed in granulocytes of a patient with adult-onset chronic granulomatous disease.

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：抗原 細胞分化 悪性リンパ腫 骨髓異形成症候群

1. 研究開始当初の背景

血液細胞の分化や腫瘍化に伴い、細胞の抗原発現が変化する現象は良く知られている。しかし、CD25 (IL-2 リセプター) の B 細胞性リンパ腫の発現は検討されておらず、CD25 陽性の B 細胞性リンパ腫の臨床的な意義は不明である。骨髄異形成症候群の不応性貧血では、病態が進行する場合があるが、病態の進行を予測する細胞抗原の変化は知られていない。CD56 は、NK 細胞に発現する抗原で、急性骨髄性白血病の芽球や骨髄異形成症候群の顆粒球に発現することが知られているが、正常の顆粒球での発現は知られていない。phosphatidylglucoside が血液細胞に発現することは知られているが、血液疾患との関係は不明である。

2. 研究の目的

(1) B 細胞性リンパ腫における CD25 の発現を flow cytometry を用いて検討し、CD25 を発現する B 細胞性リンパ腫の組織型を同定する。CD25 陽性 B 細胞性リンパ腫の予後を検討する。B 細胞性リンパ腫細胞株を用いて、CD25 遺伝子発現を検討する。

(2) 骨髄異形成症候群の不応性貧血の骨髄芽球分画に含まれる細胞の抗原発現を flow cytometry を用いて検討し、細胞抗原の変化と病態進行との関係を明らかにする。

(3) 造血幹細胞移植後の骨髄検体を flow cytometry を用いて検査し、造血回復期の顆粒球における CD56 の発現を検討する。

(4) 顆粒球異常を来す血液疾患における phosphatidylglucoside の発現を検討し、疾患との関係を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 過去 20 年間に flow cytometry 検査した B 細胞性リンパ腫の中で CD25 陽性例を抽出し、CD25 陽性 B 細胞性リンパ腫の細胞生物学的性状と臨床的意義を明らかにする。研究に当たり、倫理委員会の承認 (細胞表面マーカーを用いた悪性リンパ腫の臨床的検討、疫 11-55 号、平成 24 年 3 月 30 日承認) を得た。日常診療として提出された検体を、CD19/CD25 と CD20/CD25 で二重染色し、B 細胞性リンパ腫における CD25 の発現を確認する。CD25 陽性 B 細胞性リンパ腫細胞株の遺伝子プロファイリングを検査し、特異的な mRNA の発現を検討する。

(2) 骨髄異形成症候群の不応性貧血と診断され、その後病態が進行した例と進行しなかった例の 2 群に分け、不応性貧血と診断された時点における骨髄芽球分画中の細胞構成を後方視的に比較検討し、病態進行を予測する因子を抽出する。

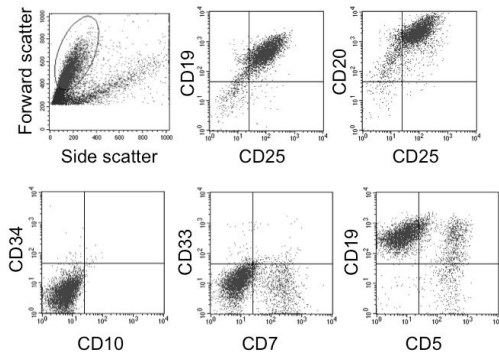
(3) 造血幹細胞移植を受けた後、生着確認の一部として骨髄細胞の flow cytometry 検査が行われる。顆粒球の表面抗原を後方視的に解析し、CD56 の発現を検討する。

(4) 顆粒球に異常を来す疾患の顆粒球の phosphatidylglucoside の発現を検討し、疾患との関係を明らかにする。

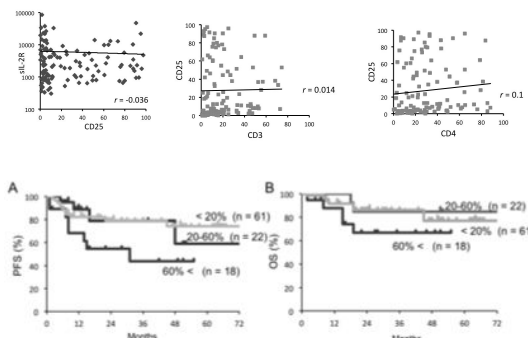
4. 研究成果

瀰漫性大細胞型 B 細胞性リンパ腫

リンパ腫細胞は、CD19+CD25+, CD20+CD25+ で、リンパ腫細胞自身が CD25 を発現していた。CD25 陽性率と可溶性 IL-2 receptor 値に相関なく、CD25 陽性率と CD4 陽性率または CD8 陽性率との間に相関はなかった。従って、CD25 陽性細胞は、反応性 T 細胞の CD25 の発現をみているわけではないことが確認された。



治療はリツキサン CHOP 療法を受けていた。CD25 陽性率で、20%未満、20-60%、60%以上の 3 群に分けると、生存率は 3 群で差がなかったが、無増悪生存率は CD25 陽性率で最も低かった。

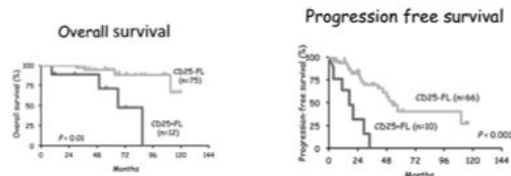


CD25 陽性率が 60%以上を呈する CD25-high とそれ未満の CD25-low の 2 群に分けて検討した。両群で、性別、年齢、performance status、血清 LDH、可溶性 IL-2 リセプター、染色体異常、臨床病期、節外病変、B 症状、国際予後指標に差がなかった。両群で、寛解率と奏功率に差はなかったが、CD25-high では有意 ($p=0.044$) に再発率が高かった。以上から、CD25 の発現は、瀰漫性大細胞型 B 細胞性リン

パ腫の予後因子の一つであると判明した。

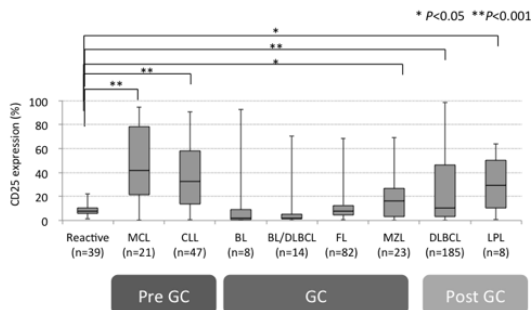
濾胞性リンパ腫

CD25 陽性（陽性率が 20%以上陽性）と CD25 陰性（陽性率が 20%未満）の 2 群に分け検討した。リンパ腫細胞は、CD19+CD25+, CD20+CD25+で、リンパ腫細胞自身が CD25 を発現していた。CD25 陽性率と可溶性 IL-2 receptor 値に相関なく、CD25 陽性率と CD4 陽性率または CD8 陽性率との間に相関はなかった。従って、CD25 陽性細胞は、反応性 T 細胞の CD25 の発現をみているわけではないことが確認された。次に、CD25 陽性濾胞性リンパ腫（CD25+FL）と CD25 陰性濾胞性リンパ腫（CD25-FL）に分け検討した。両群で、臨床病期、節外病変、B 症状、濾胞性リンパ腫国際予後指標、組織型、染色体異常、PET 検査、リツキサン CHOP 実施率に差は無かった。生存率と無増悪生存率は、CD25+FL で劣っていた。多変量解析でも、CD25 は生存率と無増悪生存率の独立した予後不良因子であった。

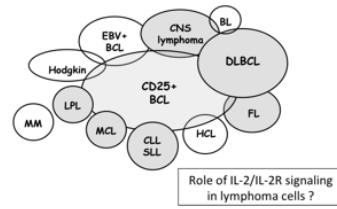


造血器腫瘍における CD25 陽性 B 細胞性リンパ腫の位置づけ

B 細胞性リンパ腫は、起源によって前胚中心細胞由来、胚中心細胞由来、後胚中心細胞由来の 3 つに大別される。前胚中心細胞由来と後胚中心細胞由来の B 細胞性リンパ腫の CD25 陽性率は、胚中心細胞由来の B 細胞性リンパ腫のそれに比して高かった。B 細胞性リンパ腫の CD25 の発現は、B 細胞の分化と関係があることが示唆された。CD25 陽性 B 細胞性リンパ腫は、様々な造血器腫瘍と密な接点があると考えられた。CD25（IL-2 リセプター）を発現している造血器腫瘍では、IL-2 と CD25 との相互作用が、腫瘍細胞の増殖や悪性度に影響を及ぼしている可能性が示唆された。



Hypothetical scheme of CD25-positive B-cell lymphomas

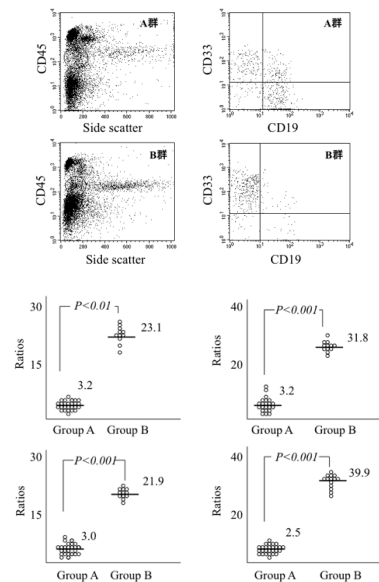


CD25 陽性 B 細胞性リンパ腫細胞株の遺伝子プロファイリング

ヒト B 細胞性リンパ腫由来細胞株で、CD25 陰性の Raji および CD25 陽性の Ramos を使用した。マイクロアレイを用いた遺伝子発現解析により両細胞株の遺伝子発現を比較した。CD25 発現との関連が報告されているアポトーシス関連遺伝子 (bcl-2, bcl-XL) や細胞周期関連遺伝子 (p27, p21) の発現に、両細胞株で差を認めなかった。他の遺伝子発現においても有意な差を認めなかった。

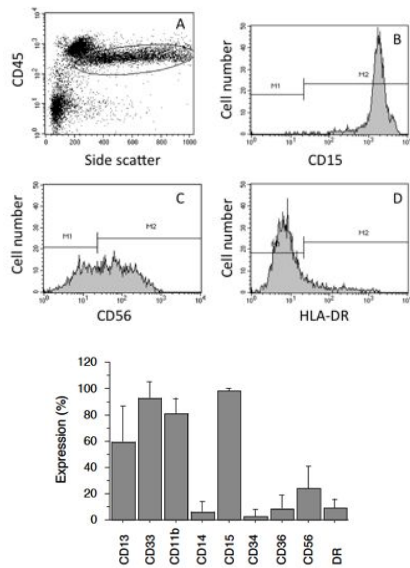
(2) 骨髄異形成症候群の不応性貧血の病態進行の予測因子の検討

骨髄異形成症候群の不応性貧血と診断された 71 人の骨髄血の芽球分画の細胞の性状を flow cytometry で検査した。診断後、病態が進行しなかった群を A 群、病態が進行した群を B 群とした。両群で、年齢、性別、末梢白血球数、ヘモグロビン値、血小板数、骨髄の芽球の割合、国際予後スコアリングシステムに差が無かった。A 群に比べ、B 群では CD19+ または CD10+ の B リンパ芽球が減少し、CD13+ または CD33+ の骨髄芽球が増加していた。CD13/CD10、CD13/CD19、CD33/CD10、CD33/CD19 の比は、B 群で増加していた。初診時の不応性貧血の骨髄芽球分画の細胞の性状を検査することによって、将来の病態の進行を予測できる可能性がある。



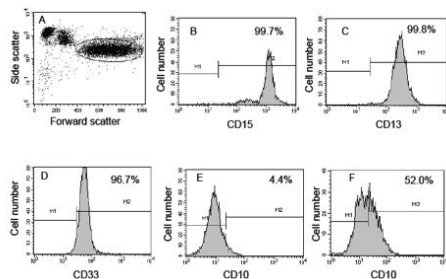
(3) 顆粒球の CD56 発現の検討

同種造血幹細胞移植後、生着確認のため採取された骨髓血の単核細胞の表面抗原を flow cytometry を用いて検査した。骨髓血から単核細胞を分離し、その中の顆粒球分画の抗原発現を検討した。骨髓単核細胞の顆粒球には、前骨髄球、骨髄球、後骨髄球、桿状球の様な未熟顆粒球が含まれている。顆粒球全体で、 $24.3 \pm 16.7\%$ の陽性率を呈し、最大の陽性率は 73.1%であった。顆粒球が 24%以上陽性を呈した群とそれ未満の群に分け検討した。両群で、移植前の疾患の状態、性別、ドナー、移植された造血幹細胞数、flow cytometry を行った移植後の日数、末梢血の細胞数に差が無かった。CD56 は、未熟顆粒球に発現すること、CD56 を発現した顆粒球は、必ずしも腫瘍化した顆粒球とは言えないことが示唆された。



(4) 顆粒球異常と phosphatidylglucoside の発現

成人発症の慢性肉芽腫症の顆粒球の抗原発現を検討した。慢性肉芽腫症の顆粒球は、正常顆粒球と同様に、CD13+, CD15+, CD33+, phosphatidylglucoside+であったが、CD10の発現が弱いことを見いだした。



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 11 件)

- (1) Fujiwara S, Muroi K, Tataru R, Matsuyama T, Ohmine K, Suzuki T, Mori M, Nagai T, Tanaka A, Ozawa K.: Clinical features of de novo CD25-positive follicular lymphoma. Leuk Lymphoma. 査読有 55:307-313, 2014. DOI: 10.3109/10428194.2013.806658
- (2) Muroi K, Fujiwara S, Tataru R, Sugimoto M, Yamamoto C, Uehara E, Meguro A, Hatano K, Okazuka K, Oh I, Ohmine K, Suzuki T, Mori M, Nagai T, Ozawa K.: CD56 expression in normal immature granulocytes after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. J Clin Exp Hematop. 査読有 53(3):247-250, 2013. DOI: 10.3960/jslrt.53.247
- (3) Muroi K, Miyamura K, Ohashi K, Murata M, Eto T, Kobayashi N, Taniguchi S, Imamura M, Ando K, Kato S, Mori T, Teshima T, Mori M, Ozawa K.: Unrelated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal stem cells for steroid-refractory acute graft-versus-host disease: a phase I/II study. Int J Hematol. 査読有 98:206-213, 2013. DOI: 10.1007/s12185-013-1399-4
- (4) Sugimoto M, Fujiwara S, Hosonuma R, Matsu H, Uehara E, Yamamoto C, Kobayashi H, Hatano K, Meguro A, Tataru R, Okabe H, Oh I, Matsuyama T, Ohmine K, Suzuki T, Mori M, Nagai T, Ozawa K, Muroi K.: Analysis of hemolysis in collected bone marrow for bone marrow transplantation. Transfus Apher Sci. 査読有 49:95-96, 2013. DOI: 10.1016/j.transci.2013.02.045
- (5) Yamamoto C, Muroi K, Okabe H, Uehara E, Hirano T, Sugiyama Y, Ozawa K.: Adult-onset chronic granulomatous disease and CD10-negativity in neutrophils. J Clin Exp Hematop. 査読有 52:219-221, 2012. DOI: 10.3960/jslrt.52.219
- (6) Oka S, Muroi K, Sato K, Fujiwara S, Oh I, Matsuyama T, Ohmine K, Suzuki T, Ozaki K, Mori M, Nagai T, Fukushima N, Fukushima N, Tanaka A, Ozawa K.: Flow cytometric analysis of kappa and lambda light chain expression in endoscopic biopsy specimens before the diagnosis of B-cell lymphoma. J Clin Exp Hematop. 査読有 52:127-131, 2012. DOI: 10.3960/jslrt.52.127

- (7) Fujiwara S, Muroi K, Hirata Y, Sato K, Matsuyama T, Ohmine K, Suzuki T, Ozaki K, Mori M, Nagai T, Tanaka A, Ozawa K.: Clinical features of de novo CD25(+) diffuse large B-cell lymphoma. Hematology. 査読有 18:14-19, 2013. DOI: 10.1179/1607845412Y.0000000024
- (8) Kobayashi H, Nagai T, Omine K, Sato K, Ozaki K, Suzuki T, Mori M, Muroi K, Yano T, Yamamoto H, Ozawa K.: Clinical outcome of non-surgical treatment for primary small intestinal lymphoma diagnosed with double-balloon endoscopy. Leuk Lymphoma. 査読有 54:731-736, 2013. DOI: 10.3109/10428194.2012.725850
- (9) Kobayashi H, Matsuyama T, Oka S, Fujiwara S, Oh I, Suzuki T, Ozaki K, Mori M, Nagai T, Ozawa K, Muroi K.: Autologous hematopoietic recovery with aberrant antigen expression after allogeneic bone marrow transplantation. J Clin Exp Hematop. 査読有 52:81-83, 2012. DOI: 10.3960/jslrt.52.81
- (10) Oka S, Muroi K, Fujiwara S, Oh I, Matsuyama T, Ohmine K, Suzuki T, Ozaki K, Mori M, Nagai T, Ozawa K, Hanafusa T.: Prediction of progression from refractory cytopenia with unilineage dysplasia by analysis of bone marrow blast cell composition. J Clin Exp Hematop. 査読有 52:63-66, 2012. DOI: 10.3960/jslrt.52.63
- (11) Hirata Y, Kishino K, Onozaki F, Nakaki Y, Fujiwara S, Yamamoto C, Sato K, Matsuyama T, Ozaki K, Mori M, Ozawa K, Muroi K.: Use of cryoprotectant-depleted allogeneic peripheral blood stem cells for transplantation. Hematology. 査読有 16:221-224, 2011. doi: 10.1179/102453311X13025568941664

〔学会発表〕(計5件)

- (1) Fujiwara S, Muroi k, 他8名; Profiles Of De Novo CD25-Positive Mature B-Cell Lymphomas. 2013 Annual Meeting of the American Society of Hematology, December 9, 2013, New Orleans, USA.
- (2) Muroi K. Third-party derived mesenchymal stem cells for steroid-resistant acute GVHD: a multicenter phase I/II study. AsiaCord 2013, April 20, 2013, Kobe

- (3) Fujiwara S, Muroi k, 他9名.: Prognostic significance of CD11b expression in de novo diffuse large B-cell lymphoma.第75回日本血液学会学術集会 10月12日, 2013年, 札幌
- (4) Fujiwara S, Muroi K, 他7名.: Clinical Features of Newly Diagnosed CD25-Positive Follicular Lymphoma. 2012 Annual Meeting of the American Society of Hematology, December 8, 2012, Atlanta, USA.
- (5) Fujiwara S, Muroi K, 他9名.: Clinical features of de novo CD25-positive diffuse large B-cell lymphoma. 2011 Annual Meeting of the American Society of Hematology, December 11, 2011, San Diego, USA.

〔図書〕(計1件)

- (1) 室井一男, 藤原慎一郎. 医薬ジャーナル社、血液・造血器疾患のマネジメント-血液内科医と病理医との対話-、2011年、219ページ.

6. 研究組織

(1)研究代表者

室井 一男 (MUROI KAZUO)
自治医科大学・医学部・教授
研究者番号: 50190939

(2)研究分担者

山本 千鶴 (YAMAMOTO CHIZURU)
自治医科大学・医学部・助教
研究者番号: 60306149

藤原 慎一郎 (FUJIWARA SHINICHIRO)
自治医科大学・医学部・講師
研究者番号: 20438667

(3)連携研究者

なし ()

研究者番号: