

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：18001

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08371

研究課題名(和文)びまん性大細胞型B細胞リンパ腫におけるJAK-STAT経路活性化の意義

研究課題名(英文)Analysis of JAK-STAT pathway in diffuse large B-cell lymphoma

研究代表者

加留部 謙之輔 (Karube, Kennosuke)

琉球大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：20508577

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：びまん性大細胞型B細胞リンパ腫(DLBCL)におけるSTAT3活性化状態および臨床病理学的所見との具体的な関連性を解析した。

pSTAT3は279例中122例(44%)に陽性を示した。pSTAT3発現はnon-GCB型、MYD88 L265P変異例、EBV陽性例、STAT3変異例において有意に高頻度に認められたが、L265P以外のMYD88変異例はpSTAT3発現に関連性を認めなかった。STAT3変異を有する症例は予後良好、EBV感染例は有意に予後不良であった(P=0.01)。

以上のようにDLBCLにおけるJAK-STAT経路活性化の多様性およびその臨床的意義を解明することができた。

研究成果の概要(英文)：STAT3 associated genes are often mutated in diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) and their roles as prognostic markers and therapeutic targets were analyzed.

Immunohistochemistry and mutation analysis focusing STAT3 associated genes were performed with FFPE samples from 279 DLBCL patients. Cell of origin was determined with Hans algorithm. Phosphorylated STAT3 (pSTAT3) was detected in 122 cases (44%) and biased toward non-GCB type (P<0.001). MYD88 L265P and EBV positivity were significantly associated with non-GCB type and pSTAT3 expression (P<0.001).

STAT3 and non-L265P MYD88 mutations were relatively enriched in GCB type and only the former was significantly associated with pSTAT3 expression (P=0.02). Clinically, pSTAT3 expression and COO was not associated with overall survival. EBV positivity and STAT3 mutations were correlated with poorer and better prognosis, respectively. Our data clarified clinicopathological diversity of STAT3 activation in DLBCL.

研究分野：血液病理学

キーワード：遺伝子変異 JAK-STAT 悪性リンパ腫 次世代シーケンス STAT3 びまん性大細胞型B細胞リンパ腫

1. 研究開始当初の背景

びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫 (DLBCL) は血液腫瘍の中で最も頻度の高い悪性疾患で予後不良な ABC 型と予後良好な GCB 型の 2 つの亜型に分類されている。多くの腫瘍でがん化への関与が報告されている STAT3 は DLBCL においても活性化が高頻度に認められ、予後との相関が報告されているが、その背景には複数の原因が考えられる。MYD88 変異は IL-2 や IL-6 の autocrine を誘導し、STAT3 を活性化させる。また、JAK-STAT 抑制機能の報告がある SOCS1 は 16-27% の DLBCL 症例に変異を認める。その他に STAT3 遺伝子そのものの変異や EB ウイルス感染によっても活性化が引き起こされるとの報告がある。しかし、これらの異常と実際の症例における STAT3 活性化状態および臨床病理学的所見との具体的な関連性は十分に解明されていない。

2. 研究の目的

DLBCL 症例の、臨床情報、病理組織学的所見、ゲノム異常を網羅的に解析することにより、JAK-STAT 活性化の意義を明らかにする。

3. 研究の方法

2003 年から 2017 年において新規に診断された DLBCL 症例の FFPE 検体および臨床情報を収集した。HE 染色において生検組織中に腫瘍細胞が 50% 以上含まれる 298 症例を抽出し、リン酸化 STAT3 (pSTAT3) を含む免疫染色および EBER *in situ* hybridization を行った。また、これらの検体から DNA を抽出し、MYD88, STAT3, SOCS1 各遺伝子について次世代シーケンシングを用いて変異解析を行った。また、DLBCL 細胞株に JAK 阻害剤を添加し、細胞増殖抑制効果の検討およびウエスタンブロット法を用いた pSTAT3 発現状態の解析

を行った。統計解析については STATA ソフトウェアを使用し、 P 値 < 0.05 で有意差ありと判断した。

4. 研究成果

全 298 症例中、GCB 型 148 例、non-GCB 型 131 例の合計 279 例における遺伝子変異を調べることができた。このうち、臨床情報も確認出来た症例は 262 例であった。pSTAT3 は 122 例 (44%) に陽性を示した。pSTAT3 発現は non-GCB 型に有意に多く認められた ($P < 0.001$)。MYD88 L265P 変異は non-GCB 型に多く ($P < 0.001$)、これらは pSTAT3 発現を示した ($P < 0.001$)。一方で、L265P 以外の MYD88 変異例は GCB 型に多く (10/14; 71.4%)、pSTAT3 発現に関連性を認めなかった ($P = 0.96$)。STAT3 変異を有する症例は 15 例 (5.4%) あり、これらは pSTAT3 発現と有意に相関した ($P = 0.02$)。EBER 陽性例は pSTAT3 発現を示しやすかった ($P < 0.001$)。一方、SOCS1 のナンセンスあるいはフレームシフト変異は 23 例 (8.2%) 存在し、興味深いことにこれらは pSTAT3 発現を示しにくい傾向にあった ($P = 0.08$)。GCB 型と non-GCB 型間 ($P = 0.24$) や、pSTAT3 発現の有無による予後の差は認めなかった ($P = 0.80$)。STAT3 変異を有する症例は予後が良い傾向を示した ($P = 0.09$) のに対して、EBV 感染例は有意に予後不良であった ($P = 0.01$)。In vitro 実験において MYD88 L265P 変異を有する細胞株は pSTAT3 発現が陽性で JAK 阻害剤に有効だったが、SOCS1 変異株は pSTAT3 を発現しておらず、JAK 阻害剤に対して抵抗性を示した。

DLBCL における、pSTAT3 発現の予後指標としての有用性は過去の報告間で乖離があったが、これは背景となる分子生物学的異常の多様性を考慮に入れていなかった

めであると考えられる。SOCS1 は JAK-STAT 経路の代表的な抑制分子として知られているが、その遺伝子変異は DLBCL においては必ずしも STAT3 活性化とは関連せず、*in vitro* 実験の結果は SOCS1 変異症例への JAK 阻害剤の使用を支持しない。近年個別化医療を目的にクリニカルシーケンスが実施される症例が増えているが、今回の結果は、適切な治療選択のためには遺伝子変異のみではなく免疫染色などを組み合わせた総合的な病理学的解釈が必要であることを示唆する。

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 11 件)(全て査読あり)

1. Karube K, Campo E et al. (39 人中 1 番目). Integrating genomic alterations in diffuse large B-cell lymphoma identifies new relevant pathways and potential therapeutic targets. *Leukemia*, 2018;32:675-684
2. Magnano L, Karube K et al. (17 人中 5 番目). Clinicobiological features and prognostic impact of diffuse large B-cell lymphoma component in the outcome of patients with previously untreated follicular lymphoma. *Ann Oncol*, 2017;28:2799-2805
3. Sakihama S, Morishima S, Karube K, Fukushima T et al. (19 人中 15, 16 及び 19 番目). Human T-cell leukemia virus type Tax genotype analysis in Okinawa, the southernmost and remotest islands of Japan: Different distributions compared with mainland Japan and the potential value for the prognosis of aggressive adult T-cell leukemia/lymphoma. *Leuk Res* 2017;61:18-24.
4. Dlouhy I, Karube K et al. (15 人中 11 番目). High serum levels of soluble interleukin-2 receptor (sIL2-R), interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor alpha (TNF) are associated with adverse clinical features and predict poor outcome in diffuse large B-cell lymphoma. *Leuk Res* 2017;59:20-25.
5. Karube K. (単著) Genetic heterogeneity of DLBCL, not otherwise specified. *Rinsho Ketsueki*. 2017;58:669-675.
6. Kawasaki K, Karube K. Peripheral T-cell lymphoma with EBV-infected "anaplastic" B-cell proliferation confined to sinuses. *Blood*. 2017;129:1885.
7. Rovira J, Karube K et al. (15 人中 2 番目). MYD88 L265P Mutations, But No Other Variants, Identify a Subpopulation of DLBCL Patients of Activated B-cell Origin, Extranodal Involvement, and Poor Outcome. *Clin Cancer Res*. 2016;22:2755-64.
8. Nishi Y, Fukushima T, Karube K et al. (23 人中 2 番目及び 22 番目). Characterization of patients with aggressive adult T-cell leukemia-lymphoma in Okinawa, Japan: a retrospective analysis of a large cohort. *Int J Hematol*. 2016;104:468-75.
9. Morichika K, Karube K, Fukushima T et al. (13 人中 9 番目及び 10 番目). Recurrence of Psoriasis Vulgaris Accompanied by Treatment with C-C Chemokine Receptor Type 4 (CCR4) Antibody (Mogamulizumab) Therapies in a Patient with Adult T cell Leukemia/ Lymphoma: Insight into Autoinflammatory Diseases. *Intern Med*. 2016;55:1345-9.
10. Yoshida N, Karube K et al. (11 人中 3 人目). STX11 functions as a novel tumor suppressor gene in peripheral T-cell lymphomas. *Cancer Sci*. 2015;106:1455-62.
11. Karube K, Campo E. MYC alterations in diffuse large B-cell lymphomas. *Semin Hematol*. 2015;52:97-106.

[学会発表](計 2 件)

- (1) 第 56 回日本リンパ網内系学会 シンポジウム 1 「Current and Future Management of B-Cell Lymphoma Based on Molecular Biology」 「Genetic heterogeneity of DLBCL

and future perspective」 Kennosuke
Karube, Elias Campo 2016.9.2 ホテル
日航熊本
抄録：日本リンパ網内系学会会誌
56 2016 p56

(2) 第78回日本血液学会学術集会 シン
ポジウム 8 「Molecular
heterogeneity and target therapies
of malignant lymphoma in new WHO
classification era」 「Genetic
heterogeneity of DLBCL」 Kennosuke
Karube, Elias Campo 2016.10.15
パシフィコ横浜
抄録：臨床血液 57(9) 2016 p187

〔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

加留部謙之輔 (Karube Kennosuke)
琉球大学・大学院医学研究科 教授
研究者番号：20508577

(2) 研究分担者

大島孝一 (Ohshima Koichi)
久留米大学病理学講座 教授

研究者番号：50203766

(3) 連携研究者
()

研究者番号：

(4) 研究協力者
()