

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19981

研究課題名(和文) IL-10産生による中枢神経系悪性リンパ腫の免疫回避と増殖/浸潤機構の解明

研究課題名(英文) central nervous malignant lymphoma with IL-10 secretion

研究代表者

笹川 泰生 (Sasagawa, Yasuo)

金沢大学・附属病院・特任助教

研究者番号：70387372

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：中枢神経悪性リンパ腫(びまん性大細胞型B細胞リンパ腫)の早期診断と有効な治療薬の確立を目指し、本研究ではサイトカインIL-10に注目した。中枢神経悪性リンパ腫患者の脳脊髄液におけるIL-10を測定し有意な上昇を検出した。手術で得られた病理標本切片を用いて免疫組織学的にIL-10、IL-10Rの発現の有無を検討し、他腫瘍や正常脳組織とその発現を比較した。IL-10、IL-10Rの陽性コントロールとしては脾臓の組織標本を用いた。リンパ腫細胞の細胞質にIL-10および細胞膜にレセプターIL-10の過剰発現を認めた。

研究成果の概要(英文)：Preoperative diagnosis of central nervous system (CNS) lymphoma is very important in neurosurgery because biopsy can be selected for pathological diagnosis. The purpose of this study was to evaluate the diagnostic value of IL-10 in cerebrospinal fluid (CSF) in patients with CNS lymphoma compared with other CNS diseases, including CNS tumors and inflammatory diseases. CSF IL-10 were measured in patients with CNS lymphoma and 26 non-lymphoma patients. CSF IL-10 was detected at significant levels. These results indicate that CSF IL-10 is a superior biomarker for initial screening for patients with CNS lymphoma and give useful information for planning of a neurosurgical procedure.

研究分野：Neurosurgery

キーワード：IL-10 Lymphoma cerebrospinal fluid

1. 研究開始当初の背景

中枢神経悪性リンパ腫 (び慢性大細胞型 B 細胞リンパ腫) の生存期間中央値は約 3 年であり、脳腫瘍の中でも予後不良な悪性新生物である。予後を改善するために、早期診断と有効な治療薬の確立が重要となる。

A 診断: 他の悪性脳腫瘍や炎症性疾患と病状や画像所見が類似しており、術前診断が困難である。また脳の深部に発生しやすく確定診断 (病理診断) を得るための手術 (生検) が不可能なことがあり、診断不能例も存在する。

B 治療: 全身性の B 細胞性リンパ腫では CD20 を標的とした分子標的薬リツキシマブが存在する。しかし中枢神経原発の B 細胞性リンパ腫は血液脳関門による薬剤通過性の問題からリツキシマブの有効性は乏しい。

中枢神経系悪性リンパ腫と IL-10

IL-10 の生物活性は多岐に渡るが、他のサイトカインと際立って異なる特徴として “免疫抑制活性” を有することであり、抗炎症性サイトカインとして免疫を負に制御する。IL-10 は癌の免疫機構において免疫寛容に関わり、正常な癌免疫を抑制するとも言われるが、その作用機構は未だ不明である。

近年、全身性 B 細胞性リンパ腫において血清 IL-10 値が優位に上昇するといわれている (Gupta T et al. Elevated serum IL-10 levels in diffuse large B-cell lymphoma. Blood 2012)。このことは IL-10 の発現や分泌が腫瘍細胞の増殖に関与しているとも考えられている。中枢神経系悪性リンパ腫は 90%以上が B 細胞性リンパ腫であり、全身性 B 細胞性リンパ腫を参考にすれば髄液内における IL-10 値が上昇していると思われる。髄液 IL-10 上昇のメカニズムと中枢神経 B 細胞性リンパ腫細胞の増殖との関連を解明し、IL-10 をターゲットとした標的療法としての基盤を確立するために以下を目標に研究をすすめた。

2. 研究の目的

本研究では眼窩内リンパ腫で過剰発現しているサイトカイン IL-10 に注目した。中枢神経悪性リンパ腫でも IL-10 が過剰分泌されていると仮説し、中枢神経悪性リンパ腫における IL-10 の過剰分泌を検討し、コントロール (他の鑑別疾患) と比較検討する。また、リンパ腫細胞における IL-10 およびレセプターの発現を臨床病理学および培養細胞を用いて検討する。

3. 研究の方法

A 中枢神経悪性リンパ腫患者と鑑別を要する患者 (悪性脳腫瘍、脱髄性や炎症性神経疾患) において手術で切除した検体を用いて免疫組織学的に IL-10、IL-10R の発現を検討する。また、IL-10 に関連したシグナル分子の発現

(JAK/STAT ファミリー) についても検討する。次にウェスタンブロット法により IL-10、IL-10R と関連シグナル分子をタンパク定量解析する。免疫染色の評価: 免疫染色標本についてリンパ腫細胞中の陽性細胞数を計測し、その平均を百分率で評価する。リンパ腫と鑑別を要した他頭蓋内疾患においても同様の手法でおこない比較する。染色部位については IL-10、IL-10R は細胞膜、JAK は細胞質、STAT は細胞質および核内で発現の有無を評価する。また、これまでに採取された脳脊髄液における IL-10 を測定し他の検査法と比較検討した。

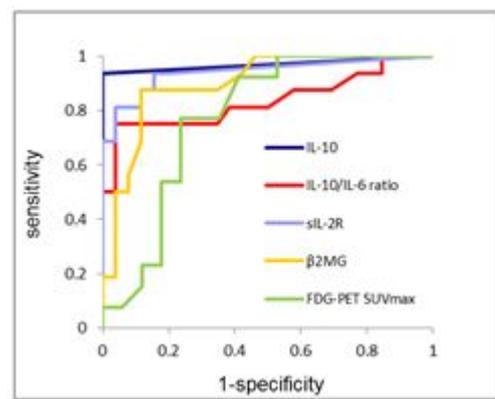
B 手術で摘出されたリンパ腫標本をトリプシン-EDTA 処理後、電気泳動法 (SDS-PAGE 法) により行う。一次抗体は、抗 IL-10、IL-10R 抗体および各 JAK/STAT ファミリーの抗体を用いる。リンパ腫と鑑別を要した他頭蓋内疾患においても同様の手法でおこない比較する。これにより実際に摘出されたリンパ腫細胞で IL-10、IL-10R と各 JAK/STAT ファミリーのタンパク質レベルでの発現を確認し、その量を他疾患と比較する。

C リンパ腫培養細胞における IL-10、IL-10R の発現および細胞増殖解析を行い、リンパ腫細胞における IL-10 および IL-10R の意義を明らかにする。抗 IL-10 抗体や IL-10 シグナル遮断薬 (JAK inhibitor, STAT inhibitor) 付加による細胞増殖抑制を検討する。

4. 研究成果

A 中枢神経系悪性リンパ腫における脳脊髄液 IL-10 とその診断価値

中枢神経系悪性リンパ腫の早期診断の指標として脳脊髄液の IL-10 (以下、髄液 IL-10) に着目し ERAISA 法を用いて微量測定を行った。その結果、グリオーマや転移性脳腫瘍などの他の悪性脳腫瘍やサルコイドーシスなどの炎症性疾患と比べて髄液 IL-10 が有意に高く、髄液 IL-10 測定の診断的価値が見いだされた。



(図 1) 中枢神経悪性リンパ腫の各マーカーの診断率髄液 IL-10 値は他の検査に比べて

優れた感度 (94.7%)特異度 (100%) を示し、中枢神経系悪性リンパ腫の診断的バイオマーカーとして有用であった。

これらの研究結果は英文雑誌に報告した (研究業績 5: Sasagawa et al. J Neurooncol 2015) (図 1)。

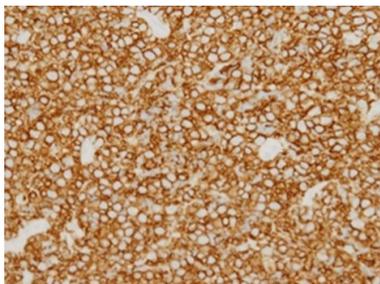
脳脊髄液 IL-10 と悪性リンパ腫の治療予後判定について

中枢神経悪性リンパ腫の特性として IL-10 を産生し過剰分泌している可能性が高いと示唆された。治療前の髄液 IL-10 値は 1 例を除いて有意な上昇を認めた (median: 28 pg/ml, range: 3-1040 pg/ml)。このうち 9 例において化学療法全コース終了後、髄液 IL-10 を測定できた。9 例すべてにおいて治療前に比べて髄液 IL-10 は有意に低下していた (median: 2 pg/ml, range: 2-212 pg/ml)。また、6/9 例では髄液 IL-10 は感度以下 (2 pg/ml 以下) となった。その後の経過で再発は 4/9 例で認め、再発した時点で髄液 IL-10 は化学療法後と比べて上昇していた。髄液 IL-10 は PCNSL における診断的マーカーだけでなく、治療評価や再発マーカーとしても有用であると考えられた。この結果については今後症例数を増やし、英文雑誌へ投稿を検討している。

B 悪性リンパ腫の免疫組織染色と IL-10 およびレセプターの発現

IL-10, IL-10R の陽性コントロールとしては脾臓の組織標本を用い、陰性コントロールとしては一次抗体を省いたものとした。IL-10 の関連サイカイン関連シグナル分子を同定するために各 JAK/STAT ファミリー (JAK 1-3 Tyk2/STAT 1-6) についても同染色を行った。

免疫染色の評価：免疫染色標本でリンパ腫細胞中の陽性細胞数を計測し、その平均を百分率で評価する。リンパ腫と鑑別を要した他頭蓋内疾患も同様の手法で行い比較した。染色部位については IL-10, IL-10R は細胞膜、JAK は細胞質、STAT は細胞質および核内で発現の有無を評価する。リンパ腫細胞において IL-10 の高発現を認めた (図 2)。ただし、この発現の程度は髄液 IL-10 値と明らかな相関は得られなかった。これはサンプル数の影響もしくは抗体の染色性の問題が考えられた。今後も症例を蓄積し検討する必要がある。



(図 2) 悪性リンパ腫における IL-10 の免疫組織学的検討で細胞質に高発現を認める

C ウェスタンブロット解析

手術で摘出されたリンパ腫標本をトリプシン-EDTA 処理後、電気泳動法 (SDS-PAGE 法) により行った。一次抗体は、抗 IL-10, IL-10R 抗体および各 JAK/STAT ファミリーの抗体を用いた。IL-10, IL-10R は蛋白レベルでの上昇をみとめたが、他の腫瘍とは有意差がなく、検出方法の再検討を要する結果となった。抗体の特性や希釈倍率を考慮し、再度実験を予定している。

今後の展望としてこれらの実験で中枢神経系悪性リンパ腫の IL-10 と関連シグナルのタンパク質レベルでの関与が明らかになることが期待される。本来、リンパ組織の無い中枢神経系において悪性リンパ腫が発生する病態は未だ明らかではない。また脳は血液脳関門という特殊な環境から有効な抗がん剤や分子標的薬剤はなく、中枢神経悪性リンパ腫に対する新たな薬剤の開発が望まれる。本研究は IL-10 というサイトカインにターゲットを絞り、その分泌機構およびこれに関与した増殖機構を解明することで、標的療法のターゲットとして応用されることを目指す。著者らは最近の研究により (業績 1)、悪性リンパ腫群では他の頭蓋内病変に比べ有意に IL-10 値が上昇していた結果が得られており、IL-10 が悪性リンパ腫の増殖/浸潤において何らかの役割を持っている可能性が高い。一方で IL-10 がリンパ腫自体から過剰分泌されるのか、二次的な反応で周囲の集簇リンパ球から分泌されるのか明らかなではない。また、リンパ腫の増殖に IL-10 がどのように関与しているのかも不明である。元来 IL-10 は抗炎症性サイトカインであり、炎症細胞の誘導を抑制的に作用する。もし、リンパ腫細胞から過剰分泌されているのであれば、リンパ腫細胞が IL-10 を分泌することで腫瘍免疫応答から逃れている可能性も示唆される。本研究において臨床病理学や培養細胞などを用いて悪性リンパ腫における IL-10 の関与を証明し、治療のターゲットとしての基盤の確立を目指す。

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 1 件)

1. Sasagawa Y, Tachibana O, Akai T, Iizuka H. Diagnostic value of interleukin-10 in cerebrospinal fluid for diffuse large B-cell lymphoma of the central nervous system. J Neurooncol. 121:177-83, 2015

doi: 10.1007/s11060-014-1622-z.

〔学会発表〕(計5件)

1. 笹川 泰生 1、立花 修 2、正木 康史 3、飯塚 秀明 2、中田 光俊 1

1 金沢大学脳神経外科 2 金沢医科大学脳神経外科 3 金沢医科大学血液免疫内科学
第34回日本脳腫瘍学会 2016/12/4-6 甲府
中枢神経系悪性リンパ腫における髄液 IL-10
は治癒評価や再発予測に有用か

2. Sasagawa Y, Akai T, Tachibana O, Iizuka H, Mitsutoshi Nakda

第13回アジア脳腫瘍学会 2016. 9.11-14
シドニー

Post-treatment interleukin-10 levels in cerebrospinal fluid can predict tumour recurrence in diffuse large B-cell lymphoma of the central nervous system

3. 笹川 泰生 1、赤井 卓也 2、中田 聡子 3、福井 一生 1、林 康彦 1、立花 修 2、野島 孝之 3、飯塚 秀明 2、中田 光俊 1

金沢大学 脳神経外科 1 金沢医科大学 脳神経外科 2 金沢医科大学 臨床病理学 3
脳室内腫瘍における神経内視鏡下生検術と Narrow Band Imaging の利用
第22回日本神経内視鏡学会 2015. 11. 5-6
宮城

4. 笹川 泰生 1、赤井 卓也 2、林 康彦 1、飯塚 秀明 2、中田 光俊 1

金沢大学 脳神経外科 1、金沢医科大学 脳神経外科 2
脳実質内腫瘍に対する神経内視鏡下生検術の適応と限界
第74回日本脳神経外科学会学術総会 2015. 10. 14-16 札幌

5. 笹川 泰生 1、赤井 卓也 2、林 康彦 1、飯塚 秀明 2、中田 光俊 1

金沢大学 脳神経外科 1、金沢医科大学 脳神経外科 2
脳実質内腫瘍に対するナビゲーション誘導内視鏡下生検術の安全性と課題
第20回日本脳腫瘍の外科学会 2015. 9. 25-26 名古屋

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

笹川 泰生 (SASAGAWA, YASUO)

金沢大学・附属病院・助教

研究者番号: 70387372