

令和元年6月26日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09875

研究課題名(和文) B細胞性リンパ腫における微小免疫環境を標的とした新規治療法の開発

研究課題名(英文) The lymphoma microenvironment is a novel therapeutic target in the treatment of patients with B-cell lymphoma

研究代表者

加藤 光次 (Kato, Koji)

九州大学・大学病院・講師

研究者番号：20571764

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000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)は、全リンパ腫で最も罹患数が多い。現状R-CHOPが標準レジメンとされるが、その治療反応性は症例によって大きく異なる。我々は、微小環境に着目したDLBCLの新たな予後層別化モデルの構築を試みた。新規RNA解析技術(nCounter)やDNAシーケンスによる網羅的解析を行うことで、胚中心(Germinal center: GC)型の微小環境をもつDLBCLは予後良好であることが判明した。一方、GC型の微小環境を欠く症例は特定の遺伝子異常と関連し、その予後不良であった。DLBCLが有する微小環境パターンによって、DLBCLの予後層別化が可能であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来までのDLBCL予後層別化は、B細胞リンパ腫自体の遺伝子プロファイリングが中心で、微小環境との関連について、ほとんど研究されてこなかった。本研究により、リンパ腫微小環境のパターンが、DLBCLの予後をより正確に層別化しうることが分かった。治療開発という側面においても、本研究は、従来行われてきた腫瘍細胞(B細胞)そのものを標的とする治療を革新する次世代の新規治療法の創出に役立つことが期待される。

研究成果の概要(英文)：Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) is the most common B-cell malignancy with varying prognosis. We assess the clinical impact of the tumor microenvironment on the clinical outcomes and pathophysiological, molecular signatures in DLBCL using transcriptome analysis by nCounter and DNA sequencing. The present study showed that the presence of normal germinal center (GC)-microenvironmental cells, including follicular T, macrophage/dendritic, and stromal cells, in lymphoma tissue is highly associated with better prognosis. Novel prognostic model, based on quantitation of ICOS, CD11c, and FGFR1 transcripts as distinct GC-microenvironmental cell markers, clearly identified patients with graded prognosis. We also found an increased incidence of unfavorable molecular signatures such as poor prognostic genomic alterations or proliferation-related gene expression in DLBCL tissues lacking GC-microenvironmental cells. The specific microenvironmental signature in DLBCL predicts clinical outcomes.

研究分野：血液内科

キーワード：悪性リンパ腫 微小環境

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(以降 DLBCL)は、全悪性リンパ腫で最も罹患数の多い B 細胞性リンパ腫である。現在、B 細胞特異的 CD20 蛋白を標的とした抗体治療薬 rituximab を組み入れた化学療法(R-CHOP)が標準レジメンとされるが、その治療反応性は症例によって大きく異なる。このように、DLBCL は細胞生物学的に多様なため、最適な層別化治療アルゴリズムを設計する必要がある。DLBCL の層別化の試みは、cDNA マイクロアレイなどの相対的 RNA 量の情報に基づくプロファイリングで最初に試みられた(Nature 2000)。その結果、胚中心 B 細胞型(Germinal center B cell type: GCB type) と、そうでないもの(non-GCB type)に分類された。臨床的にはさらに簡便にした免疫化学染色法(Hans の基準)が用いられている。しかし、R-CHOP を中心とした最近の治療では、これらの分類で予後を予測できないことが明らかになってきた。そのため、DLBCL の治療選択において、新しい治療のための予後層別化技術が注目されてきた。しかし、いまだ確立されたものはなく、ブレイクスルーが求められている状況である。

2. 研究の目的

申請者らは、先行研究で RNA 絶対定量が可能な新規 RNA 解析技術(Nanostring Counter System; NCS)を導入、従来の定量方法では測定困難な微小遺伝子変化も正確な定量性に基づき測定することで、微小なリンパ腫周囲環境(特に T 細胞)が DLBCL において予後を左右することを見いだした。本研究は、DLBCL の遺伝子変異に加え、リンパ腫微小環境の遺伝子発現変化も同時に評価し、新たな予後層別化を確立するとともに、リンパ腫発症や腫瘍の進展に関する遺伝子変異の蓄積を規定するような微小環境側の因子を同定することを目指す。以上、浸潤 T 細胞を含む微小環境を含めた DLBCL の全貌を明らかにすることで、新たな微小環境関連分子を同定、それを標的とする新規治療法開発のための基盤を作ることが目標である。

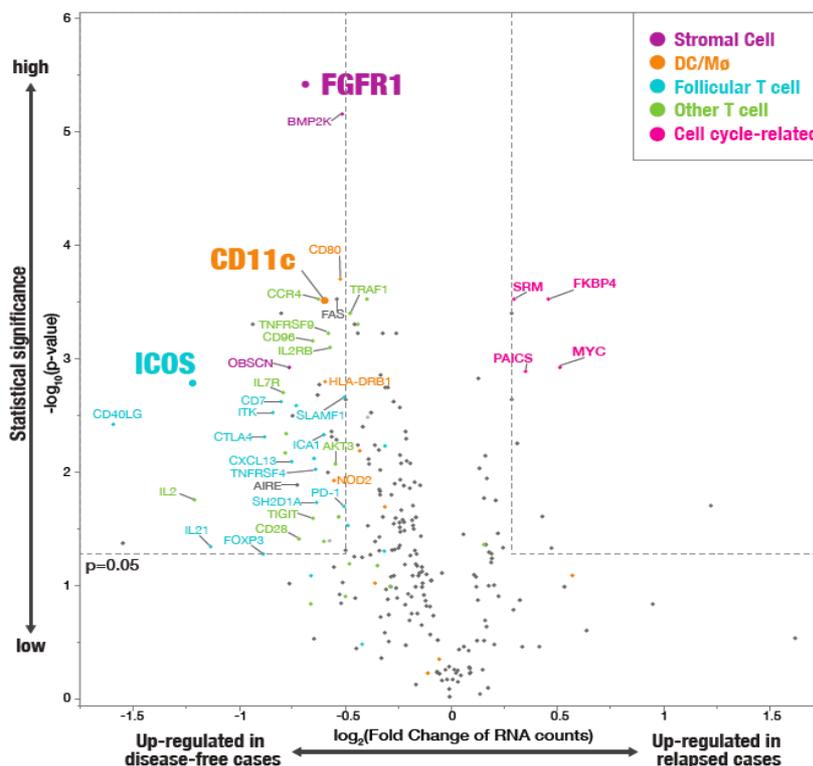
3. 研究の方法

- (1) DLBCL の遺伝子変異とリンパ腫微小環境由来の遺伝子変化を同一検体で解析し、リンパ腫進展に関する遺伝子変異蓄積を規定する可能性がある微小環境側の遺伝子変化を同定する。
- (2) DLBCL の予後を規定する微小環境の細胞亜集団を同定する。
- (3) マウスモデルを用いて、浸潤 T 細胞を含む DLBCL 微小環境の全体像を検証する。リンパ腫進展に関わる微小環境関連分子や新たに獲得された DLBCL の遺伝子変異蓄積を検討し、新たな治療標的を探索する。

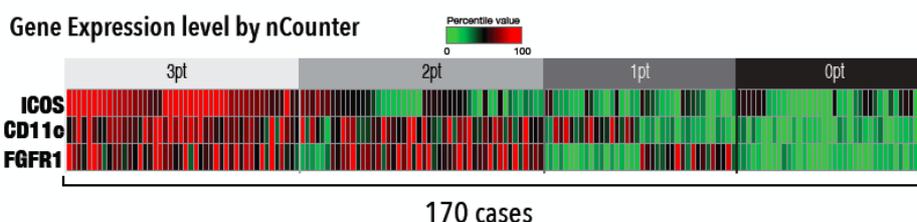
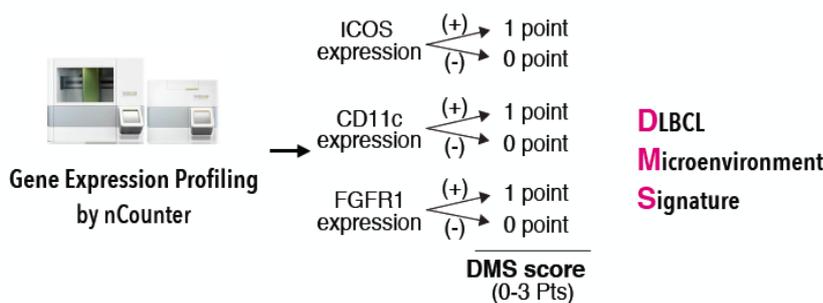
4. 研究成果

- (1) DMS スコアの構築: NCS や RNA シーケンスにより抽出された予後規定遺伝子の中で最も予後を規定する ICOS、CD11c、FGFR1 の 3 因子により、DMS (DLBCL Microenvironment Signature) スコアを構築した。DMS スコアが高い症例は有意に予後良好であり、DMS スコアが低い(微小環境細胞に乏しい)症例は予後不良であった(図 1, 2, 3)。

(図1) nCounterによる予後良好因子: Microenvironment related genesが中心

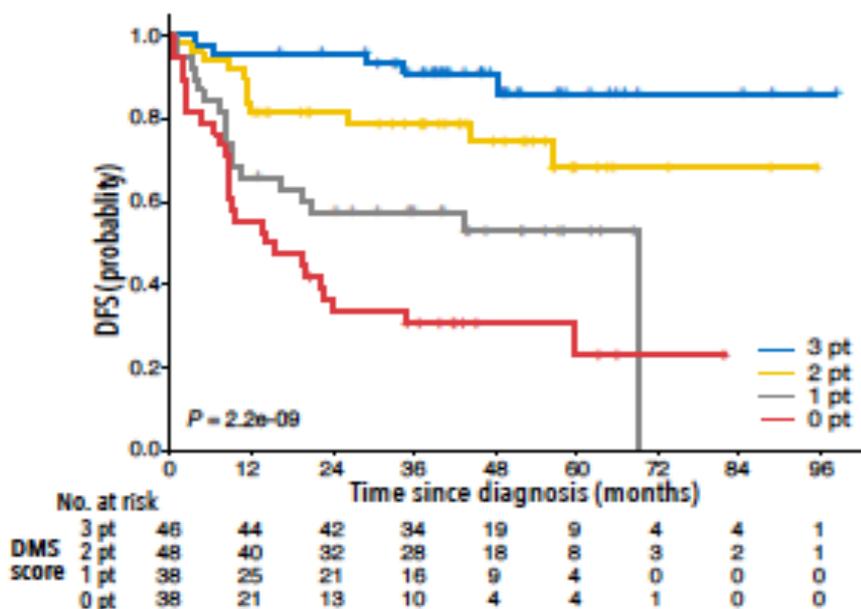


(図2) DMS: nCounterによるスコア化



The indicator for the enrichment of GC microenvironment signature

(図3) DMS: nCounterによるスコア化



(2) 高感度シングルセル RNA 増幅システム C1 により、予後良好患者群で抽出された分子の多くが、follicular helper/regulatory T cell (Tfh/Tfr) や CD68 陽性マクロファージ、FGFR1 陽性間質細胞で発現されていることが明らかとなった。これらの微小環境の破綻が予後不良な臨床経過に深く関与している可能性が明らかになった。

(3) DLBCL の遺伝子変異解析: 107 症例の FFPE 検体から DNA を抽出、ゲノム変異解析を行った。DMS スコアが低い患者群では、B 細胞受容体経路活性化を及ぼす CD79B・CARD11・MYD88 分子などの予後不良な遺伝子変異を高い頻度で伴っていた。また、P53 変異も単独で強力な予後不良因子であったが、これらの症例では T 細胞関連の遺伝子発現が低下、T 細胞が機能不全に陥っていることが明らかになった。以上から、DLBCL の特定のゲノム変異が微小環境に及ぼす変化が明らかになった。

(4) DLBCL 周囲環境の中でも Tfh に関連する ICOS について、DLBCL の予後をいかに規定するのか、マウスモデルを用いて検証を行なった。DLBCL のモデルマウス BCL6 トランスジェニックマウス (BCL6Tg) と ICOS ノックアウトマウスと交配し新規の DLBCL モデルマウス (BCL6Tg/ICOS^{-/-}) を作成、DLBCL の早期発症を認めた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計7件)

- ① **Kato K**, Uike N, Wake A, Yoshimitsu M, Tobai T, Sawayama Y, Takatsuka Y, Fukuda T, Uchida N, Eto T, Nakashima Y, Kondo T, Taguchi J, Miyamoto T, Nakamae H, Ichinohe T, Kato K, Suzuki R, Utsunomiya A. The outcome and characteristics of patients with relapsed adult T-cell leukemia/lymphoma after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Hematol Oncol.* 2019; 37: 54-61. (査読あり)
- ② Sugio T, Miyawaki K, **Kato K**, Sasaki K, Yamada K, Iqbal J, Miyamoto T, Ohshima K, Maeda T, Miyoshi H, Akashi K. Microenvironmental immune cell signatures dictate clinical outcomes for PTCL-NOS. *Blood Adv.* 2018; 2: 2242-2252. (査読あり)
- ③ Shimono J, Miyoshi H, Yoshida N, Kato T, Sato K, Sugio T, Miyawaki K, Kurita D, Sasaki Y, Kawamoto K, Imaizumi Y, **Kato K**, Nagafuji K, Akashi K, Seto M, Teshima T, Ohshima K. Analysis of GNA13 Protein in Follicular Lymphoma and its Association With Poor Prognosis. *Am J Surg Pathol.* 2018; 42: 1466-1471. (査読あり)
- ④ Kawamoto K, Miyoshi H, Suzuki T, Kozai Y, **Kato K**, Miyahara M, Yujiri T, Oishi N, Choi I, Fujimaki K, Muta T, Kume M, Moriguchi S, Tamura S, Kato T, Tagawa H, Makiyama J, Kanisawa Y, Sasaki Y, Kurita D, Yamada K, Shimono J, Sone H, Takizawa J, Seto M, Kimura H, Ohshima K. A distinct subtype of Epstein Barr virus positive T/NK-cell lymphoproliferative disorder: Adult patients with chronic active Epstein Barr virus infection-like features. *Haematologica.* 2018; 103: 1018-1028. (査読あり)
- ⑤ Yoshimitsu M, Tanosaki R, **Kato K**, Ishida T, Choi I, Takatsuka Y, Fukuda T, Eto T, Hidaka M, Uchida N, Miyamoto T, Nakashima Y, Moriuchi Y, Nagafuji K, Miyazaki Y, Ichinohe T, Takanashi M, Atsuta Y, Utsunomiya A; ATL Working Group of the Japan Society for Hematopoietic Cell Transplantation. Risk Assessment in Adult T Cell Leukemia/Lymphoma Treated with Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2018; 24: 832-839. (査読あり)
- ⑥ Karube K, Enjuanes A, Dlouhy I, Jares P, Martin-Garcia D, Nadeu F, Ordóñez GR, Rovira J, Clot G, Royo C, Navarro A, Gonzalez-Farre B, Vaghefi A, Castellano G, Rubio-Perez C, Tamborero D, Briones J, Salar A, Sancho JM, Mercadal S, Gonzalez-Barca E, Escoda L, Miyoshi H, Ohshima K, Miyawaki K, **Kato K**, Akashi K, Mozos A, Colomo L, Alcoceba M, Valera A, Carrió A, Costa D, Lopez-Bigas N, Schmitz R, Staudt LM, Salaverria I, López-Guillermo A, Campo E. Integrating genomic alterations in diffuse large B-cell lymphoma identifies new relevant pathways and potential therapeutic targets. *Leukemia.* 2018; 32: 675-684. (査読あり)
- ⑦ Shimono J, Miyoshi H, Kato T, Sugio T, Miyawaki K, Kamimura T, Miyagishima T, Eto T, Imaizumi Y, **Kato K**, Nagafuji K, Akashi K, Seto M, Teshima T, Ohshima K. Hepatitis C virus infection is an independent prognostic factor in follicular lymphoma. *Oncotarget.* 2017; 9: 1717-1725. (査読あり)

〔学会発表〕(計7件)

- ① **加藤光次**. 新規分子標的薬時代の造血幹細胞移植. 第80回日本血液学会学術集会(大阪2018年10月)
- ② 佐々木謙介, 宮脇恒太, 杉尾健志, 大島孝一, 前田高宏, **加藤光次**, 赤司浩一. マルチオミクス解析により明らかになった TP53 変異陽性 DLBCL の特徴. 第80回日本血液学会学術集会(大阪2018年10月)
- ③ **加藤光次**. 造血幹細胞移植 scientific update: 造血幹細胞移植における新規免疫療法の位置付け. 第66回日本輸血細胞治療学会総会(宇都宮2018年5月)
- ④ **Koji Kato**. Immunotherapy in SCT: The role of immunotherapy in patients with adult T-cell leukemia/lymphoma. 第40回日本造血幹細胞移植学会総会(札幌2018年2月)
- ⑤ Kohta Miyawaki, Takeshi Sugio, **Koji Kato**, Kensuke Sasaki, Hiroaki Miyoshi, Jon C. Aster, Frank C. Kuo, Koichi Ohshima, Takahiro Maeda, Koichi Akashi. Lymphoma Microenvironment Signature Predicts Clinical Outcomes in Diffuse Large B-cell Lymphoma Patients. 59th American Society of Hematology Annual Meeting and Exposition (USA 2017年12月)
- ⑥ Takeshi Sugio, Kohta Miyawaki, **Koji Kato**, Kensuke Sasaki, Hiroaki Miyoshi, Takahiro Maeda, Koichi Ohshima, Koichi Akashi. Novel Subtypes Based on Microenvironment Immune Signature Provides Prognostic Stratification and Therapeutic Strategy in Peripheral T-Cell Lymphoma. 59th American Society of Hematology Annual Meeting and Exposition (USA 2017年12月)
- ⑦ Kohta Miyawaki, Takeshi Sugio, **Koji Kato**, Hiroaki Miyoshi, Kensuke Sasaki, Takahiro Maeda, Koichi Ohshima, Koichi Akashi. Establishment of the novel prognostic model of DLBCL based on microenvironment signature. 第79回日本血液学会学術集会(東京2017年10月)

〔図書〕（計1件）

① **加藤光次**, 菊繁 吉謙, 赤司 浩一. 「成熟リンパ系腫瘍の多様性に潜む共通の発症メカニズム（がん不均一性を理解し、治療抵抗性に挑む）」実験医学（増刊）2018;36:294-299.

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

○取得状況（計0件）

〔その他〕

ホームページ等：なし

6. 研究組織

(1) 研究分担者：なし

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：宮脇恒太, 杉尾健志, 佐々木謙介, 大島孝一, 赤司浩一

ローマ字氏名：Kohta Miyawaki, Takeshi Sugio, Kensuke Sasaki, Koichi Ohshima, Koichi Akashi.

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。