

令和元年6月10日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10342

研究課題名(和文) 悪性リンパ腫におけるアミノ酸トランスポーターの解析と治療への応用

研究課題名(英文) Amino acid transporter in malignant lymphoma; its analysis and clinical application

研究代表者

塚本 憲史 (Tsukamoto, Norifumi)

群馬大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：10292583

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)：リンパ腫細胞株でアミノ酸トランスポーターおよび関連する蛋白LAT1、ASCT-2、CD98が亢進し、xCTの発現は限局的であった。リンパ腫臨床検体112例でLAT1、CD98の発現、MIB1陽性率を免疫組織化学染色で検討し、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫(DLBCL)ではほぼ全例で強陽性、濾胞性リンパ腫(FL)で10-30%、濾胞辺縁帯B細胞リンパ腫(MZBCL)および小リンパ球性リンパ腫(SLL)では陽性率10%以下であった。CD98も同様の傾向であった。MIB-1陽性率、ASCT-2の発現との相関については検討中である。FAMT-PETは濾胞性リンパ腫11例で行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アミノ酸トランスポーターおよび関連する蛋白LAT1、ASCT-2、CD98は、リンパ腫細胞株で発現が亢進していた。リンパ腫症例の臨床検体でのアミノ酸トランスポーターLAT-1の発現の強さは、Aggressiveタイプ>Indolentタイプであり、LAT-1関連分子であるCD98も同様の傾向であった。増殖能の高いタイプでアミノ酸トランスポーターが発現していることは、その阻害により細胞増殖を抑えられる可能性があり、リンパ腫治療の新たな戦略となりうる。

研究成果の概要(英文)：Expression of amino acid transporter and its related protein LAT1, ASCT2 and CD98 on lymphoma cells using real-time PCR was analyzed and reveal that these expressions were enhanced in half or lymphoma cell lines. Based on these data, immunohistological staining of LAT-1 and MIB1 were performed in 112 of lymphoma patients. In diffuse large cell lymphoma patients, almost of all cases were strongly positive, while this expression was low (5-30%) in indolent lymphoma such as follicular lymphoma, marginal-zone B-cell lymphoma and small lymphocytic lymphoma. The relation to MIB1 and CD98 are now analyzing. FAMT-PET was performed in 11 of follicular lymphoma patient.

研究分野：医学

キーワード：悪性リンパ腫 アミノ酸トランスポーター アミノ酸代謝 FAMT-PET MIB1

## 1. 研究開始当初の背景

がん細胞は好氣的条件下でも解糖系が亢進することは Warburg 効果として知られ、ATP、増殖に必要な核酸、タンパク質、脂質を産生している。同時にアミノ酸の必要量も高く、いろいろなアミノ酸トランスポーターの発現を高めることで対応している。

アミノ酸トランスポーター-xCT (system X<sub>c</sub><sup>-</sup> transporter-related protein) は Cancer stem cell マーカーCD44 と結合し、薬剤耐性獲得に関与する。LAT1 (L-type amino acid transporter 1) は CD98 と協働で中性アミノ酸を細胞内に取り込み、タンパク合成、糖・脂質代謝を亢進し、細胞増殖に関与する。がん遺伝子 c-myc、NF-κB がグルタミン代謝、糖代謝に関与し、間接的に LAT1 に影響を与えている可能性がある。

最近、造血幹細胞維持には Valine が必須で、その輸送には LAT1、LAT3、ATB<sup>0+</sup>などのアミノ酸トランスポーターが関与することが報告された。悪性リンパ腫をアミノ酸代謝の視点から解析することは、その新たな病態解明、治療法の開発に結びつくと考えた。

18F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography (FDG-PET) は悪性リンパ腫の診断、治療効果判定に不可欠であるが、炎症との鑑別が難しく、糖尿病患者では感度が鈍るなど欠点もある。18F-FAMT (L-3-F-α-methyltyrosine) を用いる FAMT-PET はこれらに影響されない利点があり、悪性リンパ腫症例における FAMT-PET の意義について、検討が必要と考えた。

## 2. 研究の目的

(1) リンパ腫細胞株のアミノ酸トランスポーターの発現量を array、qPCR で網羅的に検討し、ホジキンリンパ腫細胞株、非ホジキンリンパ腫細胞株で発現が亢進しているアミノ酸トランスポーターの種類を同定する。同定された遺伝子に対する siRNA を導入し、抗腫瘍効果があるかを明らかにする。

(2) 悪性リンパ腫患者検体における、アミノ酸トランスポーターLAT1、ASCT2、xCT、および関連する CD98、CD44 の免疫組織化学染色を行い、その発現量の病理組織型間での違い、臨床所見、予後との相関を明らかにする。また、びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫 (Diffuse large B-cell lymphoma : DLBCL) の Germinal center B-cell (GCB) タイプ、Activated B-cell (ABC) タイプの 2 群間でアミノ酸トランスポーターの発現に違いがあるか検討する。

(3) FAMT-PET 集積の病理組織型間での違い、FAMT 集積とアミノ酸トランスポーターの発現、治療効果との相関について解析する。さらに FDG-PET、CT 所見と比較検討し、FAMT-PET の悪性リンパ腫診療における位置づけを明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) リンパ腫細胞株でのアミノ酸トランスポーター発現を調べるにあたり、コントロールとなる健常人の細胞分画ごとのアミノ酸トランスポーターを比較する。

リンパ腫細胞株から核酸を抽出し、そのメッセンジャーRNA (mRNA) の量をリアルタイム PCR で比較検討し、発現が増強しているアミノ酸トランスポーターの種類を明らかにする。

(2) リンパ腫細胞株で発現が増強しているアミノ酸トランスポーター-mRNA が、リンパ腫症例でも実際に発現が亢進しているかを、リアルタイム PCR 法で検討する。

(3) 悪性リンパ腫患者検体を用いて、アミノ酸トランスポーターLAT1、ASCT2、xCT、およ

び関連する CD98、CD44 の免疫組織化学染色を行い、その発現プロフィールを病理組織型ごとに明らかにする。そして、免疫染色強度、陽性細胞比率と、臨床所見、予後、FAMT 集積との相関について解析する。またびまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫(DLBCL)を GC タイプ、non-GC タイプに分けた場合 (Hans CP et al. Blood, 2004)、これらアミノ酸トランスポーターの発現、FAMT 集積に差があるかについても明らかにする。

(4) FAMT 集積の病型間の違いを明らかにし、臨床所見、予後との相関について検討する。また、FDG-PET、CT 所見と比較し、FAMT-PET の病変検出感度、特異度を求め、悪性リンパ腫診療における意義を明らかにする。

#### 4. 研究成果

(1) リンパ腫細胞株のアミノ酸トランスポーターLAT-1、ASCT-2、xCT の mRNA 発現量を、T 細胞・単球・好中球を negative selection した末梢血単核球 (ほぼ B 細胞) をコントロールとして、リアルタイム PCR を行った。LAT-1 の発現はコントロールの 5~6 倍増強していたが、ASCT-2 のそれは、コントロールとほぼ同程度であった。xCT の発現はコントロールの数倍あったが、GADPH 遺伝子の発現の約 50%程度しかなかった。

(2) びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫 (DLBCL) 7 例で各遺伝子の発現を検討し、LAT-1 の発現はコントロールの 3 倍、ASCT-2 はコントロールと同程度であった。xCT はコントロールの約 2 倍であったが、GAPDH の発現の 20%程度であり、それ以後の解析対象外とした。なお、今回用いたコントロールの各アミノ酸トランスポーター mRNA 量は、Ficoll で分離した単核細胞分画 (ほぼ T 細胞) に比し、3~5 倍発現が増強していた。

(3) リンパ腫臨床検体 112 例における LAT1 を免疫組織化学染色で検討した。びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫 (DLBCL) 10 例ではほぼ全例で強陽性、濾胞性リンパ腫 (FL) 40 例で 10-30%、その他の Indolent リンパ腫 37 例 (濾胞辺縁帯 B 細胞リンパ腫 (MZBCL) 25 例、小リンパ球性リンパ腫 (SLL) 12 例) では陽性率 10%以下であった。ホジキンリンパ腫 25 例では標本上の細胞の約 50%で陽性であったが、その詳細については病理医と検討中である。反応性リンパ節腫大の一部の症例でも 20~30 陽性例があった。また、一部の Indolent リンパ腫で例外的に陽性率が高い症例があったが、その臨床的特徴、および MIB-1 陽性率との相関についても検討中である。一部の症例で CD98 の発現を免疫組織化学染色で検討したが、DLBCL で他の病型よりも陽性率が高い傾向であった。ASCT-2 はいずれの病型でも陽性率が低かった。現在、DLBCL 症例数を増やすとともに、GC タイプ、Non-GC タイプ両群で差があるかを検討中である。

Aggressive リンパ腫で LAT-1 の発現が亢進していたことは、その発現を抑制することにより細胞増殖を抑える可能性があり、新たな治療戦略として有望と考え、細胞株を用いて In vitro で検討中である。

(4) FAMT-PET は倫理指針変更に伴ってプロトコール修正が必要となり、その申請、承認に時間を取られ、また、一部 PET 器械の入れ替え作業があったこともあり、11 例の実施にとどまった。以前に行い、比較可能な 12 例を加えた、計 23 例で結果を評価した。患者年齢平均 62 歳、男 11、女 12、Aggressive リンパ腫 14、Indolent リンパ腫 10 であった。SUVmax は Aggressive リンパ腫 2.35、Indolent リンパ腫 1.76 であり、現時点では両者に有意差は得られていない。症例数を増やし、比較検討する必要がある。

## 5 . 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計 11 件)

1. Mitsui T, Yokohama A, Koiso H, (他 14 名、最後) Prognostic impact of trisomy 21 in follicular lymphoma. **Br J Haematol** 2019 Feb;184(4):570-577 査読有
2. Tsukamoto N, Yokohama A, Higuchi T, (他 14 名、1 番目) Tumor long-axis diameter and SUVmax predict long-term responders in 90Y-ibritumomab tiuxetan monotherapy. **Int J Hematol**. 2019 Jan;109(1):91-97 査読有
3. Tahara K, Koiso H, Osaki YH, (他 7 名、7 番目) Malignancy-Associated Hypercalcemia Related with Receptor Activator of NF- $\kappa$ B Ligand (RANKL) Expression in T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. **Acta Haematol**. 2019 Feb 15;141(3):135-137. 査読有
4. Yamaguchi M, Suzuki R, Kim SJ, (他 20 名、13 番目) Early disease progression in patients with localized natural killer/T-cell lymphoma treated with concurrent chemoradiotherapy. **Cancer Sci**. 2018 Jun;109(6):2056-2062. 査読有
5. Nagashima T, Yokohama A, Nagai K, (他 8 名、10 番目) Short-term administration of recombinant human erythropoietin decreases B cell number in human peripheral blood. **Transfus Apher Sci**. 2018 Apr;57(2):208-214. 査読有
6. Kobayashi N, Mitsui T, Ogawa Y, (他 9 名、9 番目) A Rare Case of Chronic Active Epstein-Barr Virus (EBV) Infection Accompanied by the Infiltration of EBV-infected CD8+ T Cells into the Muscle. **J Pediatr Hematol Oncol**. 2018 Apr;40(3):e171-e175 査読有
7. Sekine H, Akaiwa A, Onozawa Y, (他 10 名、最後) The Incidence and Management of Hypersensitivity and Infusion Reactions in an Outpatient Chemotherapy Center. **Gan To Kagaku Ryoho**. 2018 Nov;45(11):1625-1629. 査読有
8. Yokohama A, Hashimoto Y, Takizawa M, (他 17 名、最後) Clinical management and outcomes of completely resected stage I follicular lymphoma. **J Clin Exp Hematop**. 2018 Mar 16;58(1):10-16. 査読有 doi: 10.3960/jslrt.17031. Epub 2018 Feb 8.
9. Handa H, Kuroda Y, Kimura K, (他 15 名、15 番目) Long non-coding RNA MALAT1 is an inducible stress response gene associated with extramedullary spread and poor prognosis of multiple myeloma. **Br J Haematol**. 2017 Nov;179(3):449-460. 査読有 doi: 10.1111/bjh.14882. Epub 2017 Aug 2.
10. Saito A, Isoda A, Kojima M, (他 19 名、最後) Retrospective analysis of prognostic factors for Waldenström macroglobulinemia: a multicenter cooperative study in Japan. **Int J Hematol**. 2017 Nov;106(5):681-690. 査読有 doi: 10.1007/s12185-017-2297-y. Epub 2017 Jul 7.
11. Alkebsi L, Handa H, Yokohama A, (他 3 名、4 番目) Saitoh T, Tsukamoto N, Murakami H. Chromosome 16q genes CDH1, CDH13 and ADAMTS18 are correlated and frequently methylated in human lymphoma. **Oncol Lett**. 2016 Nov;12(5):3523-3530. 査読有.

### 〔学会発表〕(計 4 件)

- 1) Ishihara R, Murakami Y, Homma K, (他 17 名、11 番目) Matrix Metalloproteinase and Tissue Inhibitor of Metalloproteinases Is Associated with Multiple Myeloma Progression, Prognosis and Extramedullary Plasmacytoma *Blood* 2018 132:3178; doi: <https://doi.org/10.1182/blood-2018-99-113355> (2018 年第 60 回米国血液学会、サンディエゴ)
- 2) Mitsui T, Yokohama A, Koiso H, Saito A, Toyama K, Shimizu H, Ishizaki T, Irisawa H, Saito T, Murayama K, Matsumoto M, Handa H, Murakami H, Tsukamoto N. Prognostic Value of Chromosomal Abnormalities for Follicular Lymphoma in the Rituximab-Era. 58<sup>th</sup> Annual Meeting of ASH, San Diego
- 3) Yokohama A, Mitsui T, Koiso H, (他 13 名、最後) Cytogenetic Alterations Are Differently Associated with Disease Progression Depending on t(14;18) in Follicular Lymphoma (2017 年第 59 回米国血液学会、アトランタ)
- 4) Hiromi Koiso et al. Clinical feature and MYD88 mutation in 12 case of LPL with non-IgM paraproteinemia.

### 〔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：  
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：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<https://oncoc.showa.gunma-u.ac.jp/>

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：横濱 章彦

ローマ字氏名：YOKOHAMA Akihiko

所属研究機関名：群馬大学

部局名：医学部附属病院

職名：准教授

研究者番号（8桁）：40323365

研究分担者氏名：滝沢 牧子

ローマ字氏名：TAKIZAWA Makiko

所属研究機関名：群馬大学

部局名：医学部附属病院

職名：助教

研究者番号（8桁）：70613090

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

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。