

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2022

課題番号：18K08356

研究課題名(和文) TFL発現異常による免疫制御の破綻が引き起こすがん病態悪化機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism of cancer pathology caused by disruption of immune regulation through TFL deficit

研究代表者

皆川 健太郎 (Kentaro, Minagawa)

神戸大学・医学研究科・医学研究員

研究者番号：80432574

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：RNA調節分子TFLをリンパ腫の染色体異常より発見、TFL<sup>-/-</sup>マウスを作成、リンパ腫予後との関係を検討するため、TFL<sup>-/-</sup>とリンパ腫マウスとの交配を試みたところ、TFL欠失群では炎症増強によるcachexiaの病態が観察された。さらにケモカインCXCL-13の上昇を認め、腫瘍発症時期に相関し血清CXCL-13の上昇と体重減少を認めた。TFLに対する抗体を作成し、臨床検体を用いて免疫染色でTFL発現がDLBCLの予後に関わるかの検証を行ったところ、TFLの欠損している群において予後良好である傾向が認められた。今後、免疫染色の再検討を行うとともに、対象を他のリンパ腫にも広げて検討を行っていく。

研究成果の学術的意義や社会的意義

TFLは免疫調節という重要な分野にも関わらずあまり研究されて来なかった。近年、少しずつTFLに関わる報告が増えてきており、いずれも免疫、腫瘍の分野で重要な働きをしていることを示唆するものである。今回我々はマウスのデータを論文発表において、TFLが免疫調節を制御しながら腫瘍のあるマウスの体重減少に関与したことを示した。今後、ますますこの分子の研究が盛んになっていくものと思われる。近い将来TFLが何らかの腫瘍、自己免疫疾患のマーカーとして用いられると考えられる。

研究成果の概要(英文)：RNA regulatory molecule TFL is discovered in a chromosomal aberration in lymphomas, and TFL<sup>-/-</sup> mice are created. TFL<sup>-/-</sup> mice were bred to lymphoma model mice to investigate the relationship between TFL<sup>-/-</sup>. Cachexia due to enhanced inflammation was observed in the TFL-deficient mice. We also observed an increase in the chemokine CXCL-13 and a significant decrease in their body weight in correlation with the time of tumor onset. The results showed a trend toward a better prognosis in the TFL-deficient group. In the future, we will reexamine immunostaining and expand the target to other lymphomas.

研究分野：腫瘍免疫

キーワード：TFL ZC3H12D Regnase4 CXCL13 Cachexia RNA regulation Lymphoma Bcl2

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

RNA 調節を介した免疫制御機構を司る分子として、57 個のヒト CCCH 型ジンク・フィンガー (C3HZnF) 遺伝子が報告されているが、疾病との関わりは明らかでない。我々は C3HZnF のひとつ TFL をリンパ腫患者の染色体異常より発見し、これまでに TFL-/-マウスを作成、IL-17a の炎症性サイトカイン制御を通じ TFL が自己免疫疾患に関わることを報告した。今回、リンパ腫予後との関係を検討するため、TFL-/-とリンパ腫モデルマウス(Vav-Bcl2-Tg)との交配を試みたところ、TFL 欠失群では腫瘍の大きさに差が無いにもかかわらず、瀕死状態になる時期が早まり、炎症増強によるがん患者の cachexia と似た病態が観察された。さらに TFL 欠失群の骨髄 B220-IgM+異常細胞集団の遺伝子網羅的解析でケモカイン CXCL-13 の上昇を認め、TFL 欠失群の腫瘍発症時期に相関して血清 CXCL-13 の上昇と体重減少を認めた。本研究で TFL がリンパ腫の予後マーカーであることを臨床的に示し、がん制御に関わるメカニズムを動物モデルを用いて明らかにする。

### 2. 研究の目的

我々が見出しているヒトリンパ腫 (DLBCL) の TFL 欠失が、生命予後に影響するか臨床研究で明らかにするとともに、TFL 欠失マウスリンパ腫モデルの早期瀕死ならびに体重減少、すなわち cachexia の分子病態を紐解くことを本研究の目的とする。

### 3. 研究の方法

1) リンパ腫病理専門医の判定で DLBCL の TFL の発現強度が生命予後に相関するか確かめるため、病理診断医による TFL 免疫染色判定で検討を行った。ヒト検体の免疫染色に使う TFL 抗体は申請者が独自で作成したものを西脇病院と姫路赤十字病院の協力の下全自動免疫染色機で染色を行い、従来の Hans 法での病型との関連を検討した。また後ろ向き予後解析も行った。協力施設は多数の DLBCL を診療しており、倫理委員会承認後、研究を行った。

2) TFL 欠損リンパ腫モデルマウスの体重減少・早期死亡の要因として、骨髄 B220-IgM+異常分画で CXCL-13 などサイトカインの産生異常を明らかにし、cachexia との関連を解明するため、Vav-Bcl2-Tg/TFL-/-マウス骨髄の B220-IgM+異常分画で CXCL-13 の産生異常が優位であることを確かめるために、分取した骨髄細胞培養上清の CXCL-13 測定を行った。CXCL-13 の血清中の濃度上昇に伴って Vav-Bcl2-Tg/TFL-/-マウスの体重減少が起こる原因を検証するため、Vav-Bcl2-Tg/TFL-/-で一旦体重が増加する時期 (20 週令ごろ) の CBC の検討も行った。また、B220-IgM+分画の細胞起源の検討については詳細なマーカー検討を行った。

### 4. 研究成果

今回 2 つの評価項目をもって検査結果の一致度を評価した。5000 倍希釈の方が、判定の一致率が高まっていることが分かった。2000 倍希釈での「完全一致率」は 19/41 例 (46%)、別の評価項目で 15/41 例 (37%) であった。5000 倍希釈での「完全一致率」は 23/37 例 (62%)、別の評価項目で 21/37 例 (57%) と改善が認められた。

倫理委員会承認後、100 例の DLBCL 患者症例の免疫染色を新たに行った。評価表を作成し、病理医と血液内科専門医の計 3 名で評価を行った。これまでの TFL 免疫染色結果同様、判定は評価者によってばらつきが認められた。評価者 3 名がほぼ一致した症例は約 1/3 にとどまった。

この陽性と陰性の確定症例 30 例につき、生存率と無病生存率を検討したところ、予想とは反対に TFL の欠損している群において予後良好である傾向が認められた。

これに関しては以下の要因が考えられる

- 1) TFL の染色の評価にばらつきがある理由として、TFL が濾胞間に染まっている場合と濾胞そのものに染まっている場合があり、それぞれのタイプに分けて検討する必要がある。
- 2) 細胞内の染色様式も薄く細胞質全体に染まる場合、細胞膜のみに染色されている場合、核内のみの染色などばらつきがあるため、それぞれの検討を行う必要がある。
- 3) TFL の欠損によりサイトカイン産生など腫瘍免疫に影響を与える結果、予後改善につながる。
- 4) 別のリンパ腫病態では結果が異なる可能性がある。
- 5) DLBCL のサブタイプについては検討しておらず、それにより結果が異なる可能性がある。

以上の可能性を踏まえて、今後病理検討の症例数を増やして、更なる検討を考えている。

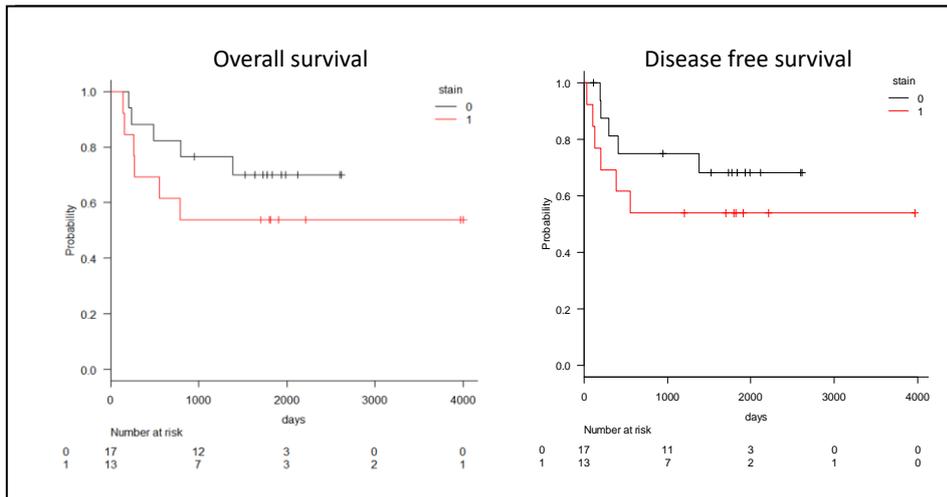


図1  
TFLの欠損と DLBCLの夜毎の関係。  
TFLの発現が強い(=1)もののほうが TFLの発現の弱い(=0)ものと比べて、生存率が悪い傾向にあった。(p = 0.3)

Vav-Bc12-Tg/TFL<sup>-/-</sup>マウス骨髄の B220-IgM<sup>+</sup>異常分画で CXCL-13の産生異常が優位であることを確かめるために、分取した骨髄細胞培養上清の CXCL-13 測定を行ったところ BMの B220-IgM<sup>+</sup>異常分画で CXCL-13の上昇を認め、これが主な CXCL-13 産生細胞であることを確認した。

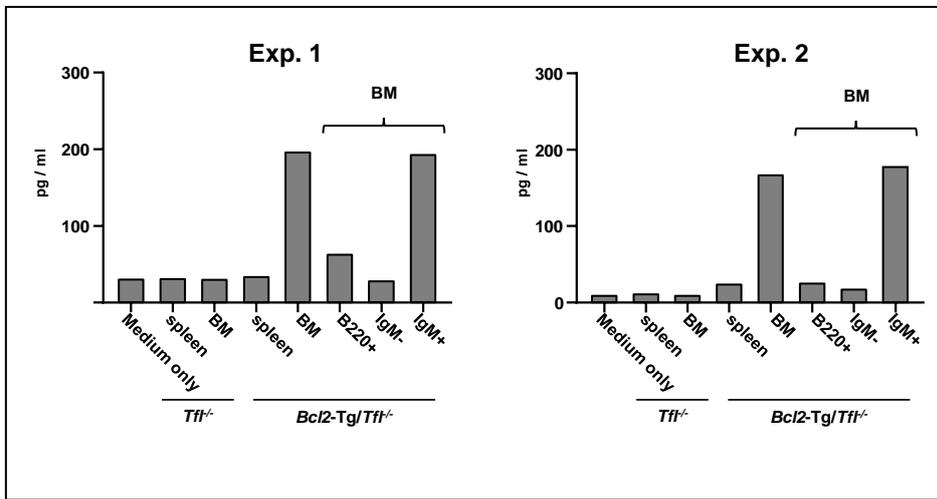


図2 マウスの骨髄 (BM) の IgM+B220 陰性分画 (IgM<sup>+</sup>) の細胞を分取して培養したところ、培養上清中の CXCL-13の産生が BM中の他の細胞に比べて高いことが示された。

また、CBCの検討では Vav-Bc12-Tg/TFL<sup>-/-</sup>で死亡時期(35-45週令ごろ)に血小板の低下を認め、炎症に伴う反応と考えられた。

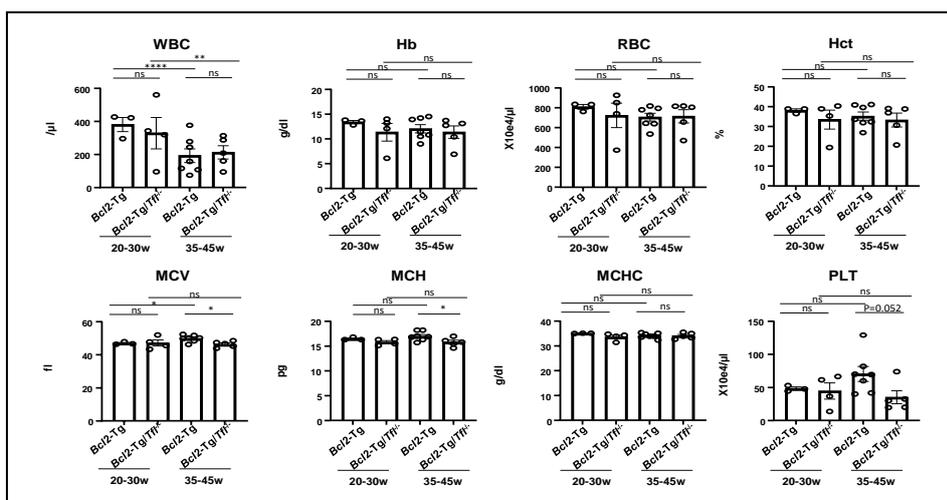


図3 CBCの変化  
Bc12-Tg と Bc12-Tg/TFL<sup>-/-</sup>の CBCの比較、35-45週において血小板 (PLT)の低下を認め、炎症に伴う変化と考えられた。

また、B220-IgM<sup>+</sup>分画の細胞起源の検討については詳細なマーカー検討を行い、マクロファージ系の細胞であることを突き止めた。

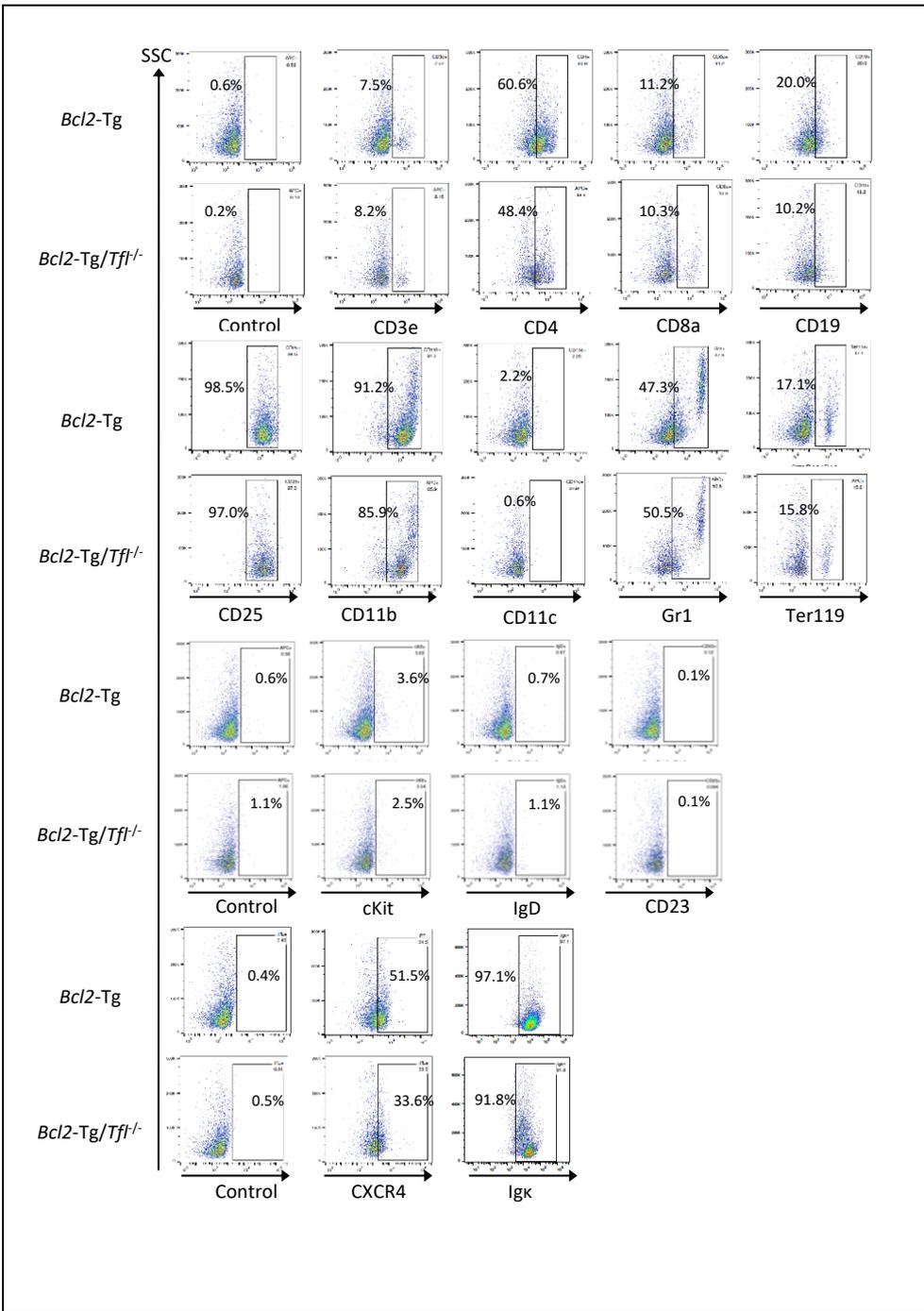


図4 マウスの骨髄の IgM+B220 陰性分画のフローサイトメトリーの結果。  
*Bcl2-Tg* と *Bcl2-Tg/Tff1-/-* ともに CD4+CD11 b+Gr1+Igk+であり、マクロファージ由来の細胞であると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Wakahashi Senn, Kawakami Fumi, Wakahashi Kanako, Minagawa Kentaro, Matsuo Keitaro, Katayama Yoshio, Yamada Hideto, Matsui Toshimitsu, Sudo Tamotsu	4. 巻 27
2. 論文標題 Transformed Follicular Lymphoma (TFL) Predicts Outcome in Advanced Endometrial Cancer	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention	6. 最初と最後の頁 963 ~ 969
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/1055-9965.EPI-17-0762	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Minagawa Kentaro, Wakahashi Kanako, Fukui Chie, Kawano Yuko, Kawano Hiroki, Suzuki Tomohide, Ishii Shinichi, Sada Akiko, Nishikawa Shinichiro, Asada Noboru, Katayama Yoshio, Matsui Toshimitsu	4. 巻 14
2. 論文標題 Tfl deletion induces extraordinary Cxcl13 secretion and cachexia in VavP-Bcl2 transgenic mice	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 1-13
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2023.1197112	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Yoshio Katayama, Kentaro Minagawa, Kanako Wakahashi, Chie Fukui, Shinichiro Nishikawa, Noboru Asada, Yuko Kawano, Hiroki Kawano, Tomohide Suzuki, Shinichi Ishii, and Toshimitsu Matsui
2. 発表標題 TFL Deletion Induces Incredible CXCL13 Secretion and Cachexia in Vavp-Bcl2 Transgenic Mice
3. 学会等名 The 10th JSH International Symposium 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kentaro Minagawa, Kanako Wakahashi, Chie Fukui, Shinichiro Nishikawa, Noboru Asada, Yuko Kawano, Hiroki Kawano, Tomohide Suzuki, Shinichi Ishii, Yoshio Katayama, and Toshimitsu Matsui,
2. 発表標題 TFL Deletion Induces Incredible CXCL13 Secretion and Cachexia in Vavp-Bcl2 Transgenic Mice
3. 学会等名 American Society of Hematology (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	若橋 香奈子  (Wakahashi Kanako)  (40817178)	神戸大学・医学研究科・医学研究員    (14501)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------