

令和 4 年 9 月 8 日現在

機関番号：22701
 研究種目：若手研究
 研究期間：2018～2021
 課題番号：18K16565
 研究課題名（和文）中枢神経系原発悪性リンパ腫に対する患者由来脳腫瘍細胞株を用いた新規治療法の探索

研究課題名（英文）Novel approach for analyzing NF- κ B pathway activity in primary CNS lymphoma

研究代表者
 中村 大志（Nakamura, Taishi）
 横浜市立大学・附属市民総合医療センター・助教

研究者番号：60771615
 交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：Primary CNS lymphoma（PCNSL）の腫瘍組織を集積し、臨床情報と併せて本研究の対象とした。併せて研究協力が樹立したPCNSL腫瘍細胞株を利用してNF- κ B pathwayが腫瘍で活性化していることを見出しなかでもNF- κ Bのサブドメインp65がPCNSLにおいて主要な役割を果たすことを同定した。そこからp65及び核内に移行し標的遺伝子の発現調整に関与する状態であるリン酸化p65が悪性度を規定するか検証した。タンパク発現を安定的に評価できる条件設定を行い、網羅的メチル化状態及を解析し、複数の鍵となる遺伝子変異と併せてリン酸化p65発現量の関連や予後への関連を調べた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

PCNSLにおいてNF- κ B pathwayが腫瘍において恒常的に活性化し、なかでもcanonical pathwayに依存している結果を得た上でそのサブドメインであるp65のリン酸化状態の発現が核内移行し標的遺伝子を活性化させることを明らかにした。集積した症例についてNF- κ B pathwayの恒常的活性化及びリン酸化p65の発現がPCNSLの予後を規定していないことが示された。一方で、壊死や腫瘍境界部分での活性は腫瘍の浸潤性と関与しておりより詳細な発現評価が臨床においてもインパクトを示すことが示された。

研究成果の概要（英文）：In this project, we obtained primary CNS lymphoma (PCNSL) tumors and the patients' clinical data. We found out a key subdomain of p65 in constitutive NF- κ B pathway activation using established PCNSL cell-line. We focused on phosphorylated p65 distribution and expression level in PCNSL tissues. We combined genome-wide methylation data, multiple mutation status and analyzed correlation between these molecular status and clinical prognosis. Though resulted in no clinical impact of phosphorylated p65 distribution and expression level to PCNSL patient prognosis in the primary analysis, the phosphorylated p65 were activated in infiltrating zone in the tumor. So we are conducting additional analysis to find out clinical impact of it.

研究分野：悪性脳腫瘍

キーワード：中枢神経原発悪性リンパ腫 DNAメチル化 NF- κ B pathway リン酸化p65

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

PCNSL は脳実質内において発生・増殖し、現在の標準的治療法によって平均生存期間が 40-55 ヶ月程度と最も治療困難な原発性脳腫瘍のひとつである。我々はこれまでに PCNSL に対して遺伝子および、エピゲノムについて DNA メチル化について、網羅的な解析やその解析結果に基づく腫瘍多様性に関わる研究について取り組んできた。これらの結果に基づき当研究室で樹立された PCNSL 細胞株を用いて治療応用に向けた研究が推進されることが期待される。

2. 研究の目的

PCNSL における網羅的遺伝子解析に続き、エピゲノムの解析が行われ腫瘍特異性が明らかにされている。この腫瘍特異性を反映させた治療に関する探索を行い、基づき当研究室で樹立された PCNSL 細胞株を用いて治療応用に向けた研究が推進することを目的とする。

3. 研究の方法

- (1)PCNSL に対するマルチターゲット遺伝子解析と DNA メチル化解析によって腫瘍遺伝子プロファイルを調べた。
- (2)また共同研究者が PCNSL 腫瘍株樹立実験を行い PCNSL 特有の治療標的の同定を行った。
- (3)NF-κB pathway の Key domain である p65 及びリン酸化 p65 の発現について適正化を経て免疫染色発現解析を行った。
- (4)この結果と PCNSL 症例の臨床情報を併せて生存解析を行った。

4. 研究成果

PCNSL39 症例の症例を集積し、臨床・画像情報と PCNSL における mutation hotspot である MYD88 L265 周囲と CD79B Y196 周囲のマルチターゲット遺伝子解析を施行した。またメチル化解析のデータを二次利用してコピー数異常についても解析を行なった (Fig.1)。

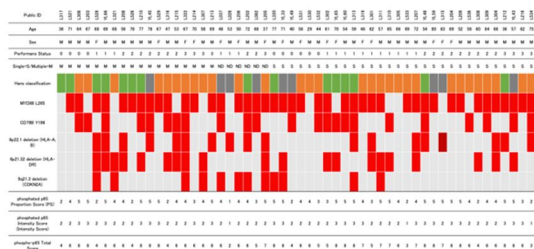


Fig.1: 分子生物学的背景

続いて PCNSL において NF-κB pathway の恒常的活性化が特徴づけられているが、その鍵となる NF-κB のサブドメインである p65 の発現について着目し、特に標的遺伝子の調整に直接関与するリン酸化 p65 の発現解析を行なった。共同研究者宇高博士が主導し、乳がんにおける Allred score 免疫染色評価方法を引用してリン酸化 p65 の状態を分布や intensity でスコアリングした (Fig. 2a-b)。

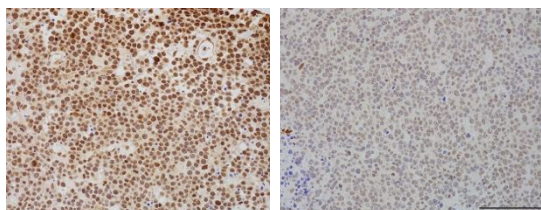


Fig. 2a-b: リン酸化 p65 陽性(a)及び陰性(b)の免疫組織染色標本

PCNSL 症例の生存解析を JMP ソフトウェアを用いて行い (Fig.3) 予後因子としてリン酸化 p65 がインパクトを与えるか検証した (Fig.4)。

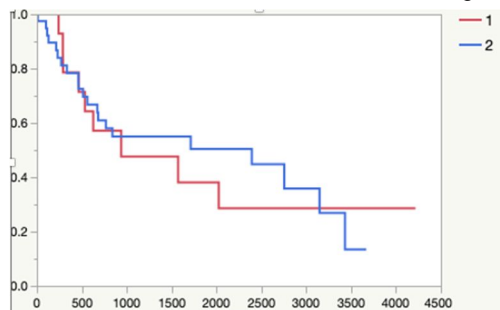


Fig.3:PCNSL 症例におけるリン酸化 p65 発現による生存解析.Allred score のようにしてスコアリングし 3 点以下と 4 点以上で発現有無を規定した

要因	p値(Prob>ChiSq)
Age	0.0371*
Sex	0.1958
PS	0.0127*
Single=S/Multiple=M	0.0003*
phospho-p65 Definition 1	0.611
phospho-p65 Definition 2	0.9402
MYD88 L265	0.0009*
CD79B Y196	0.5582
6p22.1 deletion (HLA-A, B) deletion	0.6442
9q21.3 deletion (GDKN2A) deletion	0.7069

Fig.4 : PCNSL 症例における予後因子の探索. 従来報告と併せてリン酸化 p65 の発現状態をいくつかの定義を設けて (Definition1/2) を設けてみたものの全体としては予後因子として抽出されなかった

これらの分子生物学的解析結果と PCNSL 症例の臨床予後との関連性について生存解析を加えてどのようなインパクトを及ぼすか評価を進めている。これらの結果を 2021 年日本脳神経外科学会に発表した。生存解析において初期の解析では p65 の活性が生存へのインパクトが生じなかった。壊死や腫瘍境界部分での活性は腫瘍の浸潤性と関与しており、より詳細な発現評価が臨床においてもインパクトを示すことが示されたものの、条件を加え生存解析を継続した上で 2022 年度内において論文投稿ができるよう準備をしている。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Nagao, K. Nakamura, T. Tateishi, K. Sato, H. Shimizu, N. Suenaga, J. Murata, H. Kanno, H. Yamamoto, T.	4. 巻 46
2. 論文標題 Efficacy and Safety of Salvage ESHAP Chemotherapy for Recurrent/Refractory PCNSLs	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 No Shinkei Geka	6. 最初と最後の頁 575-581
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.11477/mf.1436203773	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 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 松本修太郎, 中村大志, 宇高直子, 三宅勇平, 清水信行, 末永潤, 村田英俊, 山中正二, 立石健祐, 山本哲哉
2. 発表標題 Primary CNS lymphoma (PCNSL) におけるp65免疫染色を用いた 分子生物学的予後因子の検討
3. 学会等名 日本脳神経外科学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中村大志, 宇高直子, 立石健祐, 三宅勇平, 高見浩数, 木嶋教行, 篠山隆司, 成田善孝, 永根 基雄, 市村幸一, 山本哲哉
2. 発表標題 Clinical impact of hyperactivation of p65 primary central nervous system lymphomas
3. 学会等名 日本脳神経外科学術総会
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 松本 修太郎
2. 発表標題 PCNSL腫瘍病態生理におけるp65/リン酸化p65
3. 学会等名 一般社団法人日本脳神経外科学会第78回学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 三宅 勇平
2. 発表標題 Target therapy for ATRX in primary central nervous system lymphoma
3. 学会等名 第37回日本脳腫瘍学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nakamura Taishi
2. 発表標題 Genome-wide DNA methylation profiling reveals molecular heterogeneity of anaplastic pleomorphic xanthoastrocytoma
3. 学会等名 19th International Congress of Neuropathology/ 36th Annual Meeting of the Japan Society of Brain Tumor Pathology
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中村大志
2. 発表標題 De novo PTEN遺伝子生殖細胞系変異を伴った松果体部胚細胞腫瘍の一例
3. 学会等名 第36回日本脳腫瘍学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中村大志
2. 発表標題 De novo PTEN遺伝子生殖細胞系変異を伴った松果体部胚細胞腫瘍の一例
3. 学会等名 第77回日本脳神経外科学会
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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------