

令和 3 年 5 月 11 日現在

機関番号：11501  
研究種目：若手研究  
研究期間：2019～2020  
課題番号：19K16577  
研究課題名（和文）濾胞樹状細胞核内エストロゲン受容体 を標的とした濾胞性リンパ腫の治療法確立戦略  
  
研究課題名（英文）Strategy of therapy on follicular lymphoma targeting estrogen receptor alpha-positive follicular dendritic cell  
  
研究代表者  
大江 倫太郎（Ohe, Rintaro）  
  
山形大学・医学部・講師  
  
研究者番号：40594338  
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：抗エストロゲン治療後の腋窩リンパ節では、無治療の腋窩リンパ節と比較して、エストロゲン受容体アルファ（ER $\alpha$ ）陽性細胞数が少なく、加えて胚中心、CD21陽性およびCD23陽性濾胞樹状細胞の面積が小さいことが判明した。濾胞性リンパ腫（FL）微小環境内においてGrade 3よりも、Grade 1-2の方にER $\alpha$ およびCD23発現細胞が多いことが判明した。全生存期間と無増悪生存期間のいずれにおいても、ER $\alpha$ 高発現群のFLは低発現群のFLよりも予後が良好であり、さらにER $\alpha$ の高発現はFLにおいて独立した予後良好因子となることが判明した。

#### 研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果より、抗エストロゲン治療が濾胞樹状細胞（FDC）の増生・増殖を抑えることが出来る可能性があることを見出した。さらに、ER陽性CD23陽性FDCはGrade 1-2の濾胞性リンパ腫（FL）に多く存在し、G3 FLではほとんどみられなかったことより、G3 FLよりもG1-2 FLに抗エストロゲン治療の効果が期待出来る。

研究成果の概要（英文）：The number of estrogen receptor alpha (ER $\alpha$ )-positive cells was found to be lower in axillary lymph nodes after anti-estrogen therapy compared to untreated axillary lymph nodes, and in addition, the area of germinal center, CD21-positive and CD23-positive follicular dendritic cells was smaller. Within the follicular lymphoma (FL) microenvironment, there were more ER $\alpha$ - and CD23-expressing cells in Grades 1-2 than in Grade 3. In terms of both overall survival and progression-free survival, FL in the high ER $\alpha$  group had a better prognosis than FL in the low ER $\alpha$  group, and high ER $\alpha$  expression was found to be an independent prognostic factor in FL.

研究分野：人体病理学

キーワード：estrogen receptor alpha CD23 FDC follicular lymphoma FLIPI prognosis

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

わが国における濾胞性リンパ腫 (follicular lymphoma; FL) の頻度は非 Hodgkin リンパ腫の 7-15% を占め、近年増加傾向にある。発症年齢中央値は約 60 歳とされ、超高齢社会を迎えているわが国では、生産性の高い年齢に発症している。臨床経過は一般的に緩慢であり、進行期症例であっても生存期間中央値は 7-10 年と比較的長い。しかしながら、標準治療では根治出来ない難治性疾患である。

FL が根治できない理由は 2 つある。1 つ目の理由は、リンパ腫細胞自身の増殖能によるものである。FL のリンパ腫細胞自身の要因として、BCL2 の過剰発現によりアポトーシス (生体内の不必要な細胞に生じるプログラム死) が抑制される。さらに、grade の低い FL では G0 期 (静止期; 細胞分裂を停止している状態) の細胞が多く、細胞周期に関与する化学療法の効果は低下する。なお、通常のがん細胞の多くは G0 期に止まらず、増殖し続ける。2 つ目の理由は、FL 背景の微小環境による腫瘍保護作用によるものである。胚中心は B 細胞が増殖・分化する場所であり、そこで濾胞樹状細胞 (follicular dendritic cell; FDC) は抗原提示といった中心的役割を担う。FL は胚中心内 B 細胞由来のリンパ腫であり、その背景には FDC が存在している (Ohe R, et al. Leuk Lymphoma 2016)。FDC は FL リンパ腫細胞の増殖促進作用 (血管新生、細胞接着・遊走の支持) と、保護作用 (抗アポトーシス作用や化学療法への多剤耐性への関与) を担う。すなわち、FL リンパ腫細胞を「人」、微小環境を「家」に例えるならば、FDC は「快適な住環境を保つ役割を担っている」と、イメージ可能である。現在 FL の標準治療 (化学療法) は FL リンパ腫細胞自体を標的とする。化学療法後の FL の腫瘍組織を観察したデータは未だないが、ステロイドなどの免疫抑制剤を用いた患者のリンパ節の胚中心内には、FDC の網目構造のみが残存する「FDC-Only Lymphoid Follicle」という構造物がみられることが、申請者の直属の指導者により明らかにされている (Yamakawa M, et al. Am J Surg Pathol. 1999;23:536-45.)。免疫抑制剤はリンパ球に対して作用し、同様に FL リンパ腫細胞自体に作用する化学療法後においても、治療後に FDC の網目構造のみが残存する、と考えられる。そして、FL における FDC の残存は微小環境の残存と考えられるため、FL 再発の温床となる。加えて、FDC による腫瘍保護作用により、FL が難治性となる。

一方、限局期 (病変が身体の特定の場所に限られている段階) の FL には放射線療法 (病変全体に放射線を当てる) が選択されるため、腫瘍細胞と FDC のどちらも細胞傷害をきたし、根治に至ることが多い。しかしながら、FL は進行期 (病変が全身に広がっている段階) で見つかることが多い。全身に放射線を当てることは、身体に与える影響 (合併症) が大きく、現実的に不可能である。従って、FDC を標的とすることは「腫瘍微小環境」を破壊し、FL リンパ腫細胞が生存しにくい状態を作り出す新規治療法の開発につながる、と考えた。

タモキシフェンとフルベストラントからなる抗エストロゲンホルモン療法は、エストロゲン受容体 (ER) 、プロゲステロン受容体、またはその両方を発現している乳癌患者の標準的な治療法として用いられている。既に、慢性リンパ性白血病、ホジキンリンパ腫、バーキットリンパ腫、マントル細胞リンパ腫、リンパ腫細胞株などの B 細胞悪性腫瘍に関連する ER<sup>+</sup>、ER<sup>-</sup>、グルココルチコイド受容体の発現に違いがある可能性が指摘されている。リンパ系間質細胞のうち、非腫瘍性リンパ節に存在する CD21 陽性 CD23 陽性 FDC は ER<sup>+</sup> を発現しており、タモキシフェン投与は胚中心 (GC) に影響を与え、ER<sup>+</sup> 陽性 FDC の増殖を誘導する、と報告されている。従って、FL の微小環境を形成する FDC を同定するマーカーとして、ER<sup>+</sup> に着目することにした。

### 2. 研究の目的

「FL の微小環境において ER<sup>+</sup> 発現が高い FDC を持つものは grade 1-2 であり、さらに ER<sup>+</sup> 陽性 FDC の腫瘍保護作用は grade 3 よりも grade 1-2 で大きく作用される」と仮説を立てた。本研究ではこの仮説を検証することを目的とする。

- 1) 非腫瘍性の二次リンパ組織における ER<sup>+</sup> の局在
- 2) ER<sup>+</sup> 発現の高い FL の分類
- 3) ER<sup>+</sup> 発現の程度による予後の比較

### 3. 研究の方法

#### Ex.1 材料

95 人の患者を対象とし、組織は FL 患者の 68 の組織サンプルと、抗エストロゲン療法を受けている患者と受けていない患者の腋窩 LN サンプルを含む非腫瘍性リンパ組織の 27 サンプルを用いた (1997-2018 年)。FL の症例は grade 1-2 または grade 3 (G3A, G3B) に分類した。FL の組織

パターンは、濾胞性、濾胞性とびまん性、局所濾胞性/主にびまん性、びまん性に分類した。組織は 10%中性緩衝ホルマリンで 6-12 時間、室温で固定し、パラフィンに包埋して、ヘマトキシリン・エオジン染色、免疫組織化学、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR) に用いた。本研究は、山形大学医学部の研究倫理委員会 (H29-343) およびハルビン医科大学附属腫瘍医院の研究倫理委員会 (KY2016-25) の承認を得て、ヘルシンキ宣言に則って実施された。

#### Ex.1-1

免疫染色の一次抗体として、ER、リン酸化 ER [pER (ser118)]、PgR、CD21、CD23、CD35、Clusterin、Podoplanin (D2-40) を用いた。ER と PgR に陽性の細胞は、各症例の非腫瘍性/腫瘍性の胚中心 5 個ずつでカウントした。pER (ser118) に陽性の細胞は、腫瘍性濾胞 5 個でカウントした。びまん性増殖を示す FL 症例では、びまん性増殖領域の 5 つの高倍率視野で陽性細胞をカウントした。免疫染色で同定された FDC 網目構造の半定量方法として、ImageJ を用いた。写真の背景を白に、茶色の陽性像のみを黒に変換し、面積を計算した。

#### Ex.1-2

ER の mRNA はリンパ節の胚中心でも検出されていることから、ポジティブコントロールとしたパラフィン包埋扁桃組織と FL (G1-2, G3) のサンプルを評価した。ヒト ER 用の 5'-GAAAGGTGGGATACGAAAGACC-3 および 5'-GCTGTCTTCTTAGAGCGTTTGA-3 (163bp)、内部コントロールとしてヒト GAPDH (138bp) 用の 5'-GCACCGTCAAGGCTGAGAAC-3 および 5'-TGGTGAAGACGCCAGT GGA-3 を用いた。cDNA は、MasterCycler 1 PCR サーマルサイクラーを用いて、94 で 10 分、94 で 30 秒、58 で 45 秒、72 で 30 秒、72 で 6 分を 1 サイクルとして 30 サイクル実施した。バンドの密度から、GAPDH mRNA に対する ER の比率を ImageJ で算出した。

#### Ex.1-3

二次リンパ組織と FL 組織における ER 陽性細胞の数を比較するために、Mann-Whitney 検定を行った。Spearman 順位相関を用いて、ER 陽性細胞の数と GC、CD21 陽性 FDC 網目構造、CD23 陽性 FDC 網目構造との相関を調べた。ER 陽性細胞の数で FL の grade を分類する ROC (receiver operating characteristic) 曲線を作成した。各解析において、 $P < 0.05$  の差を有意とした。

#### Ex.2 材料

治療前の FL 患者の 70 の組織サンプルを用いた (2003-2018 年)。診断後の治療は、リツキシマブを含むレジメンを用いて行われた。精巣型 FL、in situ FL、十二指腸型 FL、小児型 FL、原発性皮膚濾胞中心リンパ腫など、特定の亜型やサブタイプは本研究から除外した。FL の標本は、G1-2、G3A、G3B に分類した。組織は、10%中性緩衝ホルマリンで室温 6~12 時間固定し、パラフィンに包埋して、ヘマトキシリン・エオジン染色、免疫染色、in situ hybridization (ISH) に使用した。本研究は、山形大学医学部の研究倫理委員会 (H29-343 & 2019-108) およびハルビン医科大学附属腫瘍医院の研究倫理委員会 (KY2016-25) で承認され、ヘルシンキ宣言に則って実施された。

#### Ex.2-1

免疫染色は、一次抗体として ER を用い、自動免疫染色装置 Autostainer Link 48 (Agilent Technologies 社) で行った。ER の反応性は、既述の方法 (Ex.1-1) で推定した。WHO 分類改訂第 4 版の histological grading を参考にし、ER 陽性細胞数/HPF (ER /HPF,  $0.159\text{mm}^2$ ) の平均値を以下のように算出した。ER /HPF = ER 陽性細胞数の平均値/腫瘍濾胞面積 ( $\text{mm}^2$ )  $\times 0.159\text{mm}^2$  (高倍率視野)。

#### Ex.2-2

CD10、CD20、BCL2、BCL6、MUM1、CD21、CD23 免疫染色で、FL の免疫表現型を確認した。CD10、CD20、BCL2、BCL6、MUM1 の反応性は、FL リンパ腫細胞の 30%以上が陽性の場合に陽性とした。CD23 陽性 FDC パターンは、none/dim もしくは focal/marginal/diffuse の 2 つのグループに分けた。

#### Ex.2-3

ER を発現している細胞を同定するために、濾胞パターンをみの FL 患者 5 名、びまん性パターンの FL 患者 5 名、子宮内膜症がん患者 1 名 (ポジティブコントロール) の FFPE 連続切片を用いて、二重染色 (免疫染色/ISH) を行った。まず CD21 免疫染色を行い、次に、ヒト ER (ヒトエストロゲン受容体 1、854bp、ヌクレオチド 3001-3845) をコードするジゴキシゲニン標識リポプローブと ISH キット (Genostaff, Tokyo, Japan) で ISH を実施した。プローブは 60 で 24 時間ハイブリダイズさせ、抗ジゴキシゲニン-アルカリホスファターゼと室温で 1 時間インキュベートし、BCIP/ NBT Substrate System を用い可視化した。CD21 免疫染色と ER -ISH の画像は ImageJ を用いて重ね合わせた。核染色は Kernechtrot で行った。

#### Ex.2-4

FLの臨床病理学的特徴の比較には、<sup>2</sup>検定、Fisherの正確検定、またはMann-Whitney検定を用いた。OSとPFSのKaplan-Meier曲線を作成し、log-rank検定で比較した。予後因子を提案するために、単変量および多変量のCoxハザード回帰モデルを使用した。各解析において、 $P < 0.05$ の差を有意とした。

#### 4. 研究成果

以下の6つのことを明らかにした。

- 1) 非腫瘍性リンパ組織の胚中心において、ER<sup>+</sup>を発現する細胞はCD23陽性FDCであること
  - 2) 抗エストロゲン治療後の腋窩リンパ節では、無治療の腋窩リンパ節と比較して、ER<sup>+</sup>陽性細胞数が少なく、加えて胚中心、CD21陽性FDCおよびCD23陽性FDCの面積が小さいこと
  - 3) FL微小環境内においてGrade 3 FLよりも、Grade 1-2 FLの方にER<sup>+</sup>およびCD23発現細胞が多いこと
  - 4) FDCにおけるER<sup>+</sup>は蛋白/mRNAのいずれのレベルでも発現していたこと
  - 5) Kaplan-Meier法では、全生存期間と無増悪生存期間のいずれにおいても、ER<sup>+</sup>高発現群のFLは低発現群のFLよりも予後が良好であること
  - 6) ER<sup>+</sup>の高発現はFLにおいて独立した予後良好因子となること
- これらの成果より、「FLの微小環境においてER<sup>+</sup>発現が高いFDCを持つものはgrade 1-2であり、さらにER<sup>+</sup>陽性FDCの腫瘍保護作用はgrade 3よりもgrade 1-2で大きく作用される」という、仮説を検証することが出来た。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Ohe Rintaro, Meng Hong Xue, Yamada Akane, Ye Aung Naing, Kabasawa Takanobu, Tamura Yuka, Utsunomiya Aya, Tamazawa Nobuyuki, Kawamura Ichiro, Kitaoka Takumi, Suzuki Kazushi, Yanagiya Ryo, Toubai Tomomi, Ishizawa Kenichi, Yamakawa Mitsunori	4. 巻 38
2. 論文標題 Good prognosis for follicular lymphoma with estrogen receptor positive follicular dendritic cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Hematological Oncology	6. 最初と最後の頁 293 ~ 300
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/hon.2730	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 該当する

1. 著者名 Ohe Rintaro, Meng Hong Xue, Ye Aung Naing, Yamada Akane, Kabasawa Takanobu, Utsunomiya Aya, Tamazawa Nobuyuki, Tamura Yuka, Kitaoka Takumi, Hashimoto Toshio, Shibata Kenichi, Toubai Tomomi, Kimura Wataru, Ishizawa Kenichi, Yamakawa Mitsunori	4. 巻 37
2. 論文標題 Differential expression of estrogen receptor- on follicular dendritic cells from patients with grade 1 2 and grade 3 follicular lymphoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Hematological Oncology	6. 最初と最後の頁 151 ~ 159
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/hon.2577	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 該当する

1. 著者名 Suzuki Kazushi, Ohe Rintaro, Kabasawa Takanobu, Aung Naing Ye, Yano Mitsuhiro, Katsumi Shuichiro, Yanagiya Ryo, Yamamoto Masakazu, Toubai Tomomi, Ishizawa Kenichi, Yamakawa Mitsunori	4. 巻 15
2. 論文標題 A case of iatrogenic immunodeficiency-associated colonic lymphoma complicating ulcerative colitis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Diagnostic Pathology	6. 最初と最後の頁 34
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13000-020-00954-8	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 -

1. 著者名 Yang Suran, Ohe Rintaro, Aung Naing Ye, Kato Tomoya, Kabasawa Takanobu, Utsunomiya Aya, Takakubo Yuya, Takagi Michiaki, Yamakawa Mitsunori	4. 巻 31
2. 論文標題 Comparative study of H0-1 expressing synovial lining cells between RA and OA	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Modern Rheumatology	6. 最初と最後の頁 133 ~ 140
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/14397595.2019.1704976	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 Ohe Rintaro, Naing Ye Aung, Tamura Yuka, Kabasawa Takanobu, Utsunomiya Aya, Tamazawa Nobuyuki, Kitaoka Takumi, Meng Hong-Xue, Shibata Kenichi, Yamakawa Mitsunori	4. 巻 35
2. 論文標題 Diagnostic Utility of CD205 in Breast Cancer: Simultaneous Detection of Myoepithelial Cells and Dendritic Cells in Breast Tissue by CD205	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Histology and Histopathology	6. 最初と最後の頁 481-488
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 該当する

1. 著者名 Urano Yuka, Ohe Rintaro, Yamada Akane, Kabasawa Takanobu, Suzuki Kazushi, Kitaoka Takumi, Tamazawa Nobuyuki, Aung Naing Ye, Utsunomiya Aya, Toubai Tomomi, Ishizawa Kenichi	4. 巻 13
2. 論文標題 Other Iatrogenic Immunodeficiency-Associated Lymphoproliferative Disorders, Diffuse Large B-Cell Lymphoma Type, in a Patient with Behçet's Disease Treated with Cyclosporine A	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Case Reports in Oncology	6. 最初と最後の頁 1145 ~ 1151
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000510362	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 -

1. 著者名 Kabasawa Takanobu, Ohe Rintaro, Aung Naing Ye, Urano Yuka, Kitaoka Takumi, Tamazawa Nobuyuki, Utsunomiya Aya, Yamakawa Mitsunori	4. 巻 11
2. 論文標題 Potential role of M2 TAMs around lymphatic vessels during lymphatic invasion in papillary thyroid carcinoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1150
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-80694-3	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 -

1. 著者名 Ohe Rintaro, Kabasawa Takanobu, Utsunomiya Aya, Urano Yuka, Kitaoka Takumi, Suzuki Kazushi, Aung Naing Ye, Kawamura Ichiro, Tajima Katsushi, Ishiyama Tomoharu, Yamakawa Mitsunori	4. 巻 16
2. 論文標題 Nodal histiocytic sarcoma with prominent eosinophilic infiltration: expression of eotaxin-2 on tumor cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Diagnostic Pathology	6. 最初と最後の頁 6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13000-020-01061-4	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大江倫太郎, 孟宏学, 山田茜, ナイン・イエイ・アウン, 樺澤崇允, 宇都宮文, 玉澤暢之, 北岡匠, 石澤賢一, 山川光徳
2. 発表標題 エストロゲン受容体 陽性の 濾胞樹状細胞の存在は濾胞性リンパ腫の 予後良好因子である
3. 学会等名 第109回日本病理学会総会
4. 発表年 2020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		
中国	ハルビン医科大学附属腫瘍医院		