

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591119

研究課題名(和文)

リツキシマブ治療における腫瘍側の生物学的作用機序の解明と感受性増強療法の開発

研究課題名(英文) Study on the molecular mechanisms of rituximab action and the enhancement of its actions

研究代表者

木下 朝博 (KINOSHITA TOMOHIRO)

名古屋大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：60283446

研究成果の概要(和文)：Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL)に対する rituximab の治療効果を規定する分子機構を解明することを目的にして、DLBCL 由来細胞株を用いて in vitro の rituximab 感受性を検討したが、CD20 発現レベルの差を考慮した場合には DLBCL 亜型による明らかな差は認められなかった。Rituximab 感受性への関与が推定される NF- κ B 経路に関わる CD79B、CARD11 および EZH2 について DLBCL 臨床材料で変異解析を行い、DLBCL138 例中 28 症例にいずれかの遺伝子変異を認めた。さらに CARD11 遺伝子変異を持つ症例が予後不良であることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：To investigate the molecular mechanisms of heterogeneity in rituximab efficacies, rituximab-sensitivities of cell lines established from patients with diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) were analyzed by ADCC and CDC assays. Tumor samples from patients with DLBCL were evaluated for their mutations on CD79B, CARD11 and EZH2, and their correlations with the prognoses of the patients were analyzed. In vitro sensitivity of DLBCL cell lines to rituximab showed no clear patterns with respect to their DLBCL subtypes. CD79B, CARD11 and EZH2 showed somatic mutations in several patients, and patients with mutated CARD11 genes showed significant poor prognoses.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・血液内科学

キーワード：悪性リンパ腫、分子標的治療、モノクローナル抗体、rituximab

1. 研究開始当初の背景

抗 CD20 モノクローナル抗体 rituximab 併用 CHOP (R-CHOP) 療法によって Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) の治療成績は大きく改善した。しかし R-CHOP 療法によっても治癒が得られない患者も多くさらなる治療

成績の改善が必要である。

近年 DNA microarray を用いた遺伝子発現プロファイル解析によって DLBCL が germinal center B-cell-like (GCB), activated B-cell-like (ABC), および type 3 の 3 亜型に分類可能で、GCB がそれ以外の亜型よりも予後良好であ

ることが明らかにされた。

GCB と non-GCB では CHOP 療法への rituximab 上乗せ効果が異なることが報告されている。すなわち R-CHOP で治療された場合、GCB と non-GCB では予後の差が認められない。これは CHOP への rituximab 追加効果が GCB と non-GCB では異なっていることを強く示唆する結果である。

Rituximab の作用機序としては ADCC、CDC が知られている。また apoptosis 誘導も直接的な作用機序とされる。その分子機序としては NF- κ B および ERK1/2 経路を介した Bcl-2 や Bcl-xL などの発現抑制などが関わっていると報告されている。しかし rituximab 作用の分子機構は不明な点が多い。このため DLBCL に対する R-CHOP の治療効果を予測する分子指標は未確立である。

2. 研究の目的

先に述べたとおり、DLBCL 亜型では rituximab の臨床的治療効果が異なることが報告されている。DLBCL に対する rituximab の治療効果を規定する分子機序を解明することを目的にして、DLBCL の各亜型から樹立された細胞株を用いて、主に rituximab の直接的な作用が GCB 由来および non-GCB 由来細胞株で異なるかどうかを検討する。細胞株や臨床材料を用いて rituximab の作用に関わる遺伝子の異常について検討を行い、rituximab 効果を規定する分子機構を明らかにする。

これらによって同定した rituximab 治療効果に関連する分子は臨床的にも有用な予後因子となる可能性がある。臨床材料を用いた検討によって、これらの異常と亜型との関連や R-CHOP 療法を受けた DLBCL 患者での治療効果との関連を調べることによって、R-CHOP 時代における DLBCL の新たなバイオマーカー・生物学的予後因子を同定する。

3. 研究の方法

GCB DLBCL 由来細胞株 (DHL-4, DHL-10) および non-GCB DLBCL 由来細胞株 (Ly-3, Ly-10) などを用いて DLBCL 亜型別に rituximab 効果を評価し、その効果を規定する分子機構を分子生物学的手法によって明らかにする。Rituximab 感受性は主に ^{51}Cr releasing assay を用いた CDC、ADCC assay で評価する。

1987年12月から2010年10月の間に DLBCL と診断された患者138例より得られたリンパ節生検組織を用いた。病理組織切片を抗 CD10, 抗 BCL6, 抗 MUM1 抗体により免疫染色を施行し、DLBCL 症例を GCB 型および non-GCB 型に亜分類した。

細胞株、臨床検体より定法により DNA・RNA、タンパク質を抽出した。PCR 法及び RT-PCR 法によって CD79B、EZH2、CARD11 遺伝子

を増幅した後、直接遺伝子解析法、TA cloning 法、Pyrosequencing 法によって塩基配列を決定した。

4. 研究成果

【結果】

(1) DLBCL 細胞株の rituximab 感受性 GCB-type DLBCL 由来細胞株 (DHL-4、DHL-10)、ABC-DLBCL 由来細胞株 (Ly-3、Ly-10) を用いて *in vitro* で rituximab の作用について検討した。直接的な apoptosis 誘導作用では ABC-DLBCL 細胞株が GCB-DLBCL 細胞株に比べて低感受性だった。また ADCC および CDC については ABC-DLBCL 細胞株に比べて GCB-DLBCL 細胞株において感受性が高いことが判明した。しかし用いた細胞株では ABC-DLBCL に比べて GCB-DLBCL で CD20 発現強度が高かったため、標的分子発現レベルが作用の違いに関連している可能性も示唆された。

このように DLBCL 亜型による rituximab 感受性には一定の傾向を認めなかった。本研究開始後に、DNA microarray を用いた大規模解析により、rituximab 併用化学療法で治療された DLBCL の予後は GCB-DLBCL が ABC-DLBCL よりも良好であることが報告された (N Engl J Med. 359:2313-23, 2008)。この結果は DLBCL 亜型によって rituximab 感受性が異なるという本研究の仮説とはことなる結果だった。このため、引き続き rituximab 感受性に関わると報告されている NF- κ B 経路関連遺伝子の異常などについて主に臨床材料を用いて解析し、DLBCL 亜型との関連を検討した。

(2) DLBCL における遺伝子異常の解析 DLBCL 患者138例の生検組織を用いて遺伝子変異解析を行った。免疫組織による亜分類の検討では、GCB 型が37例、non-GCB 型が40例、不明61例だった。

① CD79B ITAM 変異

CD79B ITAM 領域の遺伝子変異は15例 (10.9%) に認められた。亜分類可能であった77例における変異は、GCB 型で2/37症例 (5.4%)、non-GCB 型で4/40症例 (10.0%) に認められた。

② EZH2 Y641 変異

DLBCL における EZH2 遺伝子変異は、641番目のチロシン (Y641) に特異的に認められることが報告されている。今回の検討で同変異が検出されたのは、9症例 (6.5%) であった。亜分類可能であった77例における変異は GCB 型において6/37症例 (16.2%)、non-GCB 型で2/40 (5.0%) だった。

③ CARD11 遺伝子変異

DLBCL における遺伝子変異は、coiled-coil ドメインに集積することがこれまでに報告されているため、coiled-coil ドメインをコード

するエクソン (Ex) 5, 6, 9 について検討した。DLBCL138 例における同部の変異は 4 例 (2.9%) で、亜分類可能であった 77 例における変異は GCB 型において 1/37 症例 (2.7%), non-GCB 型で 1/40 (2.5%) だった。

④ CD79B ITAM, EZH2 Y641, CARD11 遺伝子変異と予後との関連

検討した DLBCL 138 症例の 10 年全生存率は約 40% であり、既報と同等の結果であった。また亜分類が可能であった症例 (GCB n=37, non-GCB n=40) における 10 年における OS は、GCB 62%, non-GCB 20% であり、既報と同様、GCB における生存率が有意に高い傾向であった ($p=0.05$)。

CD79B ITAM 変異の有無による生存割合については、DLBCL 138 症例のうち、変異例 (15 例) の 5 年生存割合は約 38%、野生型 (123 例) では約 52% であり、変異症例において予後の悪い傾向が確認されたが有意差は認められなかった ($p=0.12$)。EZH2 変異の有無による生存割合については、DLBCL 138 症例のうち、変異例 (n=9) の 5 年における生存期間は約 62%、野生型 (n=131) においては約 40% であり有意差を認めなかった ($p=0.57$)。CARD11 変異の有無による生存割合については、DLBCL 138 症例のうち、変異例 (n=4) の 5 年における生存期間は約 0%、野生型 (n=134) においては約 50% であり、変異症例の予後が極めて不良だった ($p<0.0001$)。

【考察】

今回用いた DLBCL 由来細胞株では ADCC や CDC、およびアポトーシス誘導作用において ABC 由来細胞株と比較して GCB 由来細胞株において rituximab 感受性が高い可能性を示唆する結果だった。しかし、今回用いた細胞株では CD20 蛋白発現レベルが ABC 由来細胞株と比べて GCB 由来細胞株で高かったため、これが感受性の違いに関連した可能性が示唆される。

本研究開始後、DNA microarray を用いた大規模解析により、rituximab 併用化学療法で治療された DLBCL の予後は GCB-DLBCL が ABC-DLBCL よりも良好であることが報告された (N Engl J Med. 359:2313-23, 2008)。この結果は当初の免疫組織学的な病型分類に基づく検討で示された、rituximab 併用化学療法で治療された GCB-DLBCL と ABC-DLBCL の予後に差は認められないという結果と異なるものである。この報告の結果からは GCB-DLBCL と ABC-DLBCL に対する rituximab の臨床的効果には本研究開始当初に想定したような差はない可能性が示唆される。

今回遺伝子変異解析を行った遺伝子は悪性リンパ腫での変異が報告されている CD79B、EZH2、CARD11 である。CD79B は、B 細胞

膜上に発現している B 細胞レセプター (B-cell receptor: BCR) 複合体の構成要素である。BCR シグナル伝達は NF- κ B や PI3K、MAPK などの下流シグナル伝達経路に関わっている。CARD11 は NF- κ B 経路のシグナル伝達において重要な因子である。EZH2 はヒストン修飾を通して遺伝子発現調節を行う。このように特に CD79B と CARD11 は rituximab 感受性への関与が推定される NF- κ B 経路に関わっている。

今回の解析において CD79B ITAM に変異を持つ症例では予後不良である可能性が示唆された。しかしその変異は non-GCB 型に多く、non-GCB 型であること自体が予後に影響している可能性が否定できない。EZH2 Y641 の変異はこれまで GCB 型のみで報告されていたが、今回の検討において non-GCB 型における変異症例も確認された (2/40; non-GCB 症例中 5%)。予後解析においては、EZH2 Y641 の変異症例においてむしろ予後がよい傾向が示唆された。CARD11 遺伝子変異は 138 症例中 4 症例に確認され、病型は GCB、Non-GCB、IVL が 1 例ずつ、残り 1 例については病型不明であった。4 例はすべて診断後から 1 年以内に死亡しており、極めて予後不良だった。CARD11 変異と DLBCL の予後に関する報告はこれまでない。

今回解析した DLBCL 症例に対する治療は rituximab 併用 CHOP 療法や CHOP 療法などさまざまである。現在 rituximab 治療の有無による治療効果や予後についての検討を進めている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 16 件)

- ① Nagai H, Ogura M, Kusumoto S, Takahashi N, Yamaguchi M, Takayama N, Kinoshita T, Motoji T, Ohyashiki K, Kosugi H, Matsuda S, Ohnishi K, Omachi K, Hotta T. Cladribine combined with rituximab (R-2-CdA) therapy is an effective salvage therapy in relapsed or refractory indolent B-cell non-Hodgkin lymphoma. Eur J Hematol. 2011;86: pp117-123. 査読有
- ② Watanabe T, Kinoshita T, Itoh K, Yoshimura K, Ogura M, Kagami Y, Yamaguchi M, Kurosawa M, Tsukasaki K, Kasai M, Tobinai K, Kaba H, Mukai K, Nakamura S, Ohshima K, Hotta T, Shimoyama M. Pretreatment total serum protein is a significant prognostic factor for the outcome of patients with peripheral T/natural killer-cell lymphomas. Leuk Lymphoma 2010; 51: pp813-21. 査読有
- ③ Tobinai K, Ogura M, Itoh K, Kinoshita T,

- Hotta T, Watanabe T, Morishima Y, Igarashi T, Terauchi T, Ohashi Y. Randomized phase II study of concurrent and sequential combinations of rituximab plus CHOP (cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine and prednisolone) chemotherapy in untreated indolent B-cell non-Hodgkin lymphoma: 7-year follow-up results. *Cancer Sci.* 2010;101:pp2579-2585. 査読有
- ④ Suzuki R, Suzumiya J, Yamaguchi M, Nakamura S, Kameoka J, Kojima H, Abe M, Kinoshita T, Yoshino T, Iwatsuki K, Kagami Y, Tsuzuki T, Kurokawa M, Ito K, Kawa K, Oshimi K. Prognostic factors for mature natural killer (NK) cell neoplasms: aggressive NK cell leukemia and extranodal NK cell lymphoma, nasal type. *Ann Oncol* 2010; 21: pp1032-40. 査読有
- ⑤ Shimada K, Murase T, Matsue K, Okamoto M, Ichikawa N, Tsukamoto N, Niitsu N, Miwa H, Asaoku H, Kosugi H, Kikuchi A, Matsumoto M, Saburi Y, Masaki Y, Yamamoto K, Yamaguchi M, Nakamura S, Naoe T, Kinoshita T. Central nervous system involvement in intravascular large B-cell lymphoma: a retrospective analysis of 109 patients. *Cancer Sci.* 2010;101: pp1480-6. 査読有
- ⑥ Ogura M, Itoh K, Kinoshita T, Fukuda H, Takenaka T, Ohtsu T, Kagami Y, Tobinai K, Okamoto M, Asaoku H, Sasaki T, Mikuni C, Hirano M, Chou T, Ohnishi K, Ohno H, Nasu K, Okabe K, Ikeda S, Nakamura S, Hotta T, Shimoyama M. Phase II study of ABVD therapy for newly diagnosed clinical stage II-IV Hodgkin lymphoma: Japan Clinical Oncology Group study (JCOG 9305). *Int J Hematol.* 2010;92: pp713-724. 査読有
- ⑦ Itoh K, Kinoshita T, Watanabe T, Yoshimura K, Okamoto R, Chou T, Ogura M, Hirano M, Asaoku H, Kurosawa M, Maeda Y, Omachi K, Moriuchi Y, Kasai M, Ohnishi K, Takayama N, Morishima Y, Tobinai K, Kaba H, Yamamoto S, Fukuda H, Kikuchi M, Yoshino T, Matsuno Y, Hotta T, Shimoyama M. Prognostic analysis and a new risk model for Hodgkin lymphoma in Japan. *Int J Hematol* 2010; 91: pp446-55. 査読有
- ⑧ Hagiwara K, Li Y, Kinoshita T, Kunishima S, Ohashi H, Hotta T, Nagai H. Aberrant DNA methylation of the p57KIP2 gene is a sensitive biomarker for detecting minimal residual disease in diffuse large B cell lymphoma. *Leuk Res.* 2010; 34: pp50-4. 査読有
- ⑨ Ennishi D, Kinoshita T, et al. Hepatic toxicity and prognosis in HCV-infected patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab-containing chemotherapy regimens: a Japanese multicenter analysis. *Blood.* 2010;116:pp5119-25. 査読有
- ⑩ 木下朝博：悪性リンパ腫—最近の診断と治療の進展、総合臨床60巻3号：459-460、2010、査読無。
- ⑪ 島崎 千尋、村上 博和、澤村 守夫、松田 正之、木下 朝博、畑 裕之、杉浦 勇、津下 圭太郎、名倉 英一、小杉 浩史、伊藤淳治、清水 一之：単クローン性γグロブリン血症における血清遊離軽鎖測定 of 臨床的有用性、臨床血液51：245-252、2010、査読有。
- ⑫ 島田 和之、木下 朝博：【難治性悪性リンパ腫の治療戦略】血管内リンパ腫、血液フロンティア20巻2号：71-76、2010、査読無。
- ⑬ 島田 和之、木下 朝博：【リンパ系腫瘍研究におけるわが国からの情報発信と今後の課題】Intravascular large B-cell lymphoma：これまでの研究成果と今後の課題、血液・腫瘍科61：24-28、2010、査読無。
- ⑭ 木下 朝博：【ドラッグラグ解消に向けて】プロテアソーム阻害薬（ボルテゾミブ）によるマントル細胞リンパ腫の治療、血液フロンティア別冊 - 血液疾患における分子標的治療 - : 150-156、2010、査読無。
- ⑮ 木下 朝博：非Hodgkin リンパ腫、*medicina* 47 巻13号：2156-2158、2010、査読無。
- ⑯ 木下 朝博：初発限局期 DLBCL に対する標準的治療と最新の治療動向、臨床血液51巻10号、75-81、2010、査読無。
- [学会発表] (計4件)
- ① Akihiro Tomita, Tomohiro Kinoshita, et al.: CD20-Negative Phenotypic Change In B-Cell Lymphoma Cells After Using Rituximab: Possibility of a Particular Clinicopathologic Phenomenon Post-Rituximab Extranodal CD20-Negative Lymphoma. The 52nd American Society of Hematology Annual Meeting, Florida, 2010.12.4-7.
- ② Takashi Tokunaga, Tomohiro Kinoshita, et al.: Discrepancy of CD20 protein expression in IHC nad FCM analyses in primary B-cell lymphoma cells, 第72回日本血液学会学術集会、横浜、2010.9.24-27.
- ③ 木下朝博：教育講演 S-4 びまん性大細

胞型 B 細胞リンパ腫 (Diffuse large B-cell lymphoma:DLBCL) に対する標準的治療と最新の治療動向、初発限局期 DLBCL に対する標準的治療と最新の治療動向、第 72 回日本血液学会学術集会、横浜、2010.9.24-27.

- ④ 富田章裕、木下朝博他：Post-rituximab era における新たな予後不良疾患群の可能性 リツキシマブ治療後の CD20 陰転化、第 50 回リンパ網内系学会総会、新潟、2010.6.18-19.

〔図書〕 (計 6 件)

- ① 木下 朝博：末梢性 T 細胞リンパ腫，非特定型、みんなに役立つ 悪性リンパ腫の基礎と臨床 改訂版：450-460、医薬ジャーナル社、2011。
- ② 木下朝博：悪性リンパ腫 疾病と治療 II 消化器系／代謝・内分泌系／血液・造血器系／アレルギー／膠原病 : 271-275、南江堂、2010。
- ③ 木下 朝博：胃 MALT(mucosa-associated lymphoid tissue) リンパ腫に対する Helicobacter pylori 除菌のエビデンス、奏効例のエビデンスと抵抗例の治療は？、EBM がん科学療法・分子標的治療法 2011-2012: 503-506、中外医学社、2010。
- ④ 木下 朝博、満間 綾子：びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫、血液疾患最新の治療 2011-2013: 195-198、南江堂、2011。
- ⑤ 木下 朝博：Burkitt リンパ腫 (BL)、悪性リンパ腫 - 診療ハンドブック - : 128-129、134-137、南江堂、2010。
- ⑥ 木下 朝博：濾胞性リンパ腫の治療、悪性リンパ腫 : 50-63、中外医学社、2010。

6. 研究組織

研究代表者

木下 朝博 (KINOSHITA TOMOHIRO)

名古屋大学・医学系研究科・准教授

研究者番号 : 60283446

(2) 研究分担者

なし