

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：32409

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K16200

研究課題名(和文) MYC関連蛋白MAXからとらえなおすDLBCLの分子動態

研究課題名(英文) The molecular mechanism of DLBCL according to MYC associated factor X (MAX)

研究代表者

山下 高久 (Yamashita, Takahisa)

埼玉医科大学・医学部・講師

研究者番号：60464749

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)：本研究ではびまん性大細胞リンパ腫(DLBCL)におけるMYC associated factor X (MAX)によるMYCの調節機構の解明を行った。約160症例のDLBCL症例に対しMYC、MAXの免疫染色を行い、その結果や公共データベース上の遺伝子発現データよりMYCにMAXの解析を加えることでDLBCLの予後の層別化が可能であることを見出した。とくにMYC高発現MAX低発現群では、double hit lymphoma関連分子との関連性がみられ、MYC高発現、MAX低発現はDLBCLの予後不良マーカーとなりうる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではMYCとその関連分子であるMAXを用いてDLBCLの層別化を行い、MYC高発現、MAX低発現症例ではDouble hit signatureとの関連性が高く、予後不良であることを見出した。DLBCLでは網羅的な遺伝子異常や遺伝子発現解析による層別化が現在の研究の中心となっているが、検査が高額かつその結果の解釈に時間がかかり、臨床応用には至っていない。本研究では、MYCとMAXの免疫染色といった安価かつ速やかな方法による予後不良症例の抽出が可能であり、臨床応用されれば社会的な意義は高いものと思われる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we conducted an investigation into the regulatory mechanism of MYC and MYC associated factor X (MAX) in diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL). Immunohistochemistry(IHC) for MYC and MAX was performed on approximately 160 DLBCL cases. The IHC result and four public gene expression data indicate that the stratification of DLBCL prognosis by two expression profiles is possible. Particularly in the group with high expression of MYC and low expression of MAX, we observed an association with double-hit lymphoma-related molecules, suggesting that high MYC expression and low MAX expression could serve as poor prognostic markers for DLBCL.

研究分野：腫瘍病理学

キーワード：DLBCL MYC MAX

1. 研究開始当初の背景

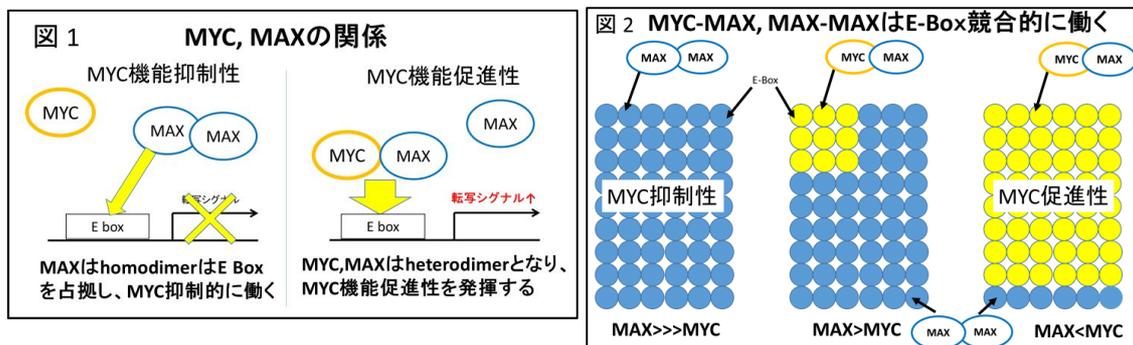
(1) DLBCLにおけるMYC 蛋白発現の評価の難しさ

悪性リンパ腫のうち diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) ではがん遺伝子の1つである MYC は重要な分子であり、約 10 %の DLBCL で MYC 遺伝子の再構成が認められる。MYC の遺伝子再構成を伴った DLBCL の多くでは、MYC の蛋白発現が上昇するとされ、MYC の遺伝子再構成の有無は予後予測因子の1つとされる。一方病理組織学的解析では、MYC の発現の評価法については、陽性、陰性の cut off を 40 %とする方法が一般的である。しかし、いまだその評価法は未だばらつきがあり問題があるとされている。現在まで我々は MYC 蛋白を蛍光ナノ粒子 (PID) を用いた発現評価の試みを行い、MYC 蛋白の半定量的な評価法を確立した(ref1)。その評価法により MYC の蛋白の半定量的な評価は予後と相関することを示した。しかしながら、MYC の蛋白の高発現群の中には、R-CHOP 治療感受性群と治療抵抗性の群が混在していた。すなわち MYC 蛋白の評価においてより MYC のみならず、他の分子を加えた解析により繊細な予後不良群の抽出方法が必要と考えられる。

(2) 悪性リンパ腫における MYC の分子パートナー-MAX の役割

MYC の分子パートナーである MYC-associated factor X (MAX) は、MYC と heterodimer を形成し、標的遺伝子のプロモーター内にある E-Box (CACGTG) へ結合し、それらの転写活性を上昇させる。しかし、MAX 同士は homodimer を形成し、E-Box へ結合し、転写活性を低下させる。つまり、MYC-MAX, MAX-MAX が MYC 標的遺伝子の E-Box sequence へ競合的に結合し、MYC 下流の遺伝子の発現を調整していると考えられている (図 1)。

我々は、すでに T-cell lymphoma の1つである anaplastic large cell lymphoma (ALCL) において MYC 高発現、MAX 低発現症例は予後不良であることを見出している(ref2)。しかしながら DLBCL において MAX の分子動態は不明な点が多い。



2. 研究の目的

本研究では DLBCL GCB type 症例における MYC と MAX の蛋白発現を免疫組織学的に検索し、MYC と MAX の関係を解析する。とくに、MYC 高発現群の中で MAX 低発現 (MYC high/MAX low) と MAX 高発現 (MYC high/MAX high) の症例の分子発現の特徴を解析する。

3. 研究の方法

1. 当院の DLBCL 症例における免疫染色解析、予後解析

埼玉医科大学総合医療センターで 2002 ~ 2014 年に DLBCL GCB type もしくは high grade B-cell lymphoma, double-hit と診断された 158 例の FFPE 標本。免疫染色用抗体は MYC (Abcam, Y69), MAX (Abcam, ab101271) を使用し、染色結果判定については Pathoscope ver.1.2.4 (MITANI Corporation, Fukui, Japan) を用いた。予後解析も同時に行った。

2. バイオインフォマティクス解析

公共データベース: GSE4475 (ref3), GSE11318 (ref4), GSE31312 (ref5), GSE117556 (ref6) も用いた。MYC, MAX の mRNA 発現量を基準にし、4 群 (MYC 低発現/MAX 低発現, MYC 低発現/MAX 高発現, MYC 高発現/MAX 低発現, MYC 高発現/MAX 高発現) にわけた。MYC 高発現群に対し、Double hit Signature (DHS) を用いてクラスタリング解析を行った。また GSE117556 のデータセットを用いて予後解析を加えた。統計解析には JMP 12 (SAS, Tokyo, Japan) を用いた。

3. クロマチン免疫沈降を用いた MYC, MAX が結合する遺伝子プロモーター領域解析

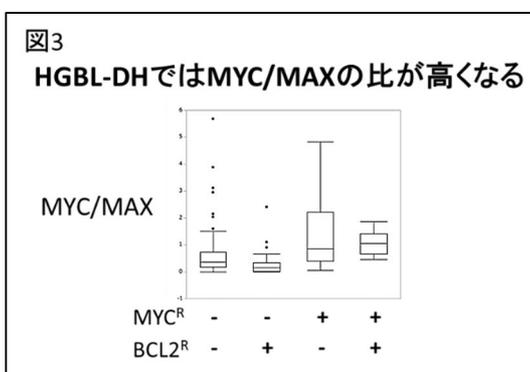
DLBCL の cell line を用いて、MYC と MAX が結合する遺伝子プロモーター領域を同定し、MAX の DLBCL における遺伝子発現制御の仕組みを調べる。

本研究は当院の倫理委員会で承認済みである。

4. 研究成果

1. MYC と MAX の蛋白発現と MYC, BCL2 の遺伝子再構成との関係

155 症例の DLBCL, GCB type における MYC と MAX の蛋白発現と MYC, BCL2 の遺伝子再構成との関係性を解析した。MYC/MAX と MYC, BCL2 の遺伝子再構成との関係について図 3 で示す。MYC, BCL2 の遺伝子再構成を伴った High grade B-cell lymphoma, double hit (HGBL-DH) の症例では MYC/MAX が高い症例が多かった。



2. MYC と MAX の蛋白発現と予後との関係性

当院の DLBCL における MYC と MAX の蛋白発現と予後との関係性を調べたところ、MYC 高発現、MAX 低発現群では他と比較して有意に予後不良であった。

3. バイオインフォマティクス解析による MYC 高発現, MAX 低発現症例と Double hit signature との関係

免疫染色の結果から MYC 高発現、MAX 低発現症例では高悪性度のリンパ腫、とくに HGBL-DH の症例が多かったことから、4 つの DLBCL の遺伝子発現セットを用いて、MYC 高発現、MAX 低発現症例と DHS 関連遺伝子の発現の関連性を調べた(表 1)。

4 つの遺伝子セットいずれも MYC 高発現、MAX 低発現症例では DHS を有する割合が有意に多かった。自検例での蛋白発現の結果と類似していた。

さらに、GSE117556 では MYC 高発現群においては、MAX 低発現群が高発現群と比較して DFS, OS ともに有意差をもって再発率する症例が多く、予後が悪かった。

以上より、MYC 高発現、MAX 低発現症例では DHS 関連分子との関連性が示唆され、MYC 高発現、MAX 低発現が予後不良マーカーとなる可能性が示された。

表1

DLBCLの遺伝子発現データセットを用いたMYC高発現、MAX低発現症例の特徴

Dataset	Signature	COO	MAX ^{low} / DH sig cases	MAX ^{low} / Non-DH sig cases	P-value
Hummel et al. (GSE4475)	DH	GCB	23/41	3/19	0.005
Lenz et al. (GSE11318)	DH	GCB	10/11	7/16	0.02
Visco et al (GSE31312)	DH	GCB	20/27	14/34	0.01
Sha et al. (GSE117556)	DH	GCB	22/50	19/81	0.02
Sum			75/129	43/150	<0.0001

4. クロマチン免疫沈降法を用いた MYC、MAX のプロモーター結合部位の同定

現在までに 2 種類の DLBCL の cell line の Chip-seq が終了しているが、解析に十分な数にはいっておらず、まだ施行中である。

< 引用文献 >

1. N.Takayanagi, S.Momose, J.Kikuchi, Y.Tanaka, T.Anan, T.Yamashita, M.Higashi, M.Tokuhira, M.Kizaki, JI.Tamaru. Fluorescent nanoparticle-mediated semiquantitative MYC protein expression analysis in morphologically diffuse large B-cell lymphoma. *Pathol Int.* 2021 Sep;71(9):594-603.
2. T. Yamashita et al. Decreased MYC-associated factor X (MAX) expression is a new potential biomarker for adverse prognosis in anaplastic large cell lymphoma, *Sci Rep.* 2020 Jun 25;10(1):10391.
3. M.Hummel et al. A biologic definition of Burkitt lymphoma from transcriptional and genomic profiling, *N Engl J Med.* 2006 Jun 8;354(23):2419-30.
4. G.Lenz et al. Molecular subtypes of diffuse large B-cell lymphoma arise by distinct genetic pathways, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 Sep 9;105(36):13520-5.
5. C.Visco et al. Comprehensive gene expression profiling and immunohistochemical studies support application of immunophenotypic algorithm for molecular subtype classification in diffuse large B-cell lymphoma: a report from the International DLBCL

Rituximab-CHOP Consortium Program Study, *Leukemia*. 2012 Sep;26(9):2103-13.

6. C.Sha et al. Molecular High-Grade B-Cell Lymphoma: Defining a Poor-Risk Group That Requires Different Approaches to Therapy, *J Clin Oncol*. 2019 Jan 20;37(3):202-212.

D.Ennishi et al. Double-Hit Gene Expression Signature Defines a Distinct Subgroup of Germinal Center B-Cell-Like Diffuse Large B-Cell Lymphoma, *J Clin Oncol*. 2019 Jan 20;37(3):190-201.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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 山下高久, 東守洋, 多林孝之, 木崎昌弘, 百瀬修二, 田丸淳一
2. 発表標題 DLBCLにおけるMYC-associated factor X (MAX)の分子発現解析
3. 学会等名 第61回日本リンパ網内系学会総会
4. 発表年 2021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
---------	---------