

令和 4 年 5 月 19 日現在

機関番号：34419

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K17413

研究課題名(和文) DLBCL,NOSの血算値に基づく新規予後予測指標の確立及び血球減少の病態解明

研究課題名(英文) Establishment of a novel prognostic predictor based on complete blood count and elucidation of pathogenesis in cytopenia in DLBCL,NOS

研究代表者

中山 聖子(Nakayama, Shoko)

近畿大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：90755977

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：びまん性大細胞型B細胞リンパ腫・非特異型(DLBCL,NOS)の新たな予後予測指標として、我々は貧血や血小板減少の有無に基づく Hemoglobin-platelet index (HPI) を提唱した。Cox比例ハザードモデルによる生存時間分析にて統計学的に解析した結果、HPI score が高い症例ほど全生存期間及び無増悪生存期間が有意に短かった。さらにHPIは、既存の国際予後指標(NCCN-IPI)と独立した予後予測指標であった。また、免疫染色でリンパ腫細胞がIL-6陽性の患者群では、陰性群よりヘモグロビン値と血小板数が有意に低かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々が提唱したHPIは、診断時の血算所見だけで算定できるため簡便かつ安価であり、臨床現場で有用な予後予測指標である事を明らかにした。HPIを既存の国際予後指標(NCCN-IPI)と併用することで、より正確な予後予測が可能になり、患者の適切な治療方針の選択に寄与する。また、DLBCL,NOSに随伴する貧血及び血小板減少には、腫瘍細胞が産生するIL-6が関与している事を示した。本研究成果は、今後の血球減少の病態解明や新たな抗サイトカイン療法の開拓につながる。

研究成果の概要(英文)： We assessed the utility of a novel hemoglobin-platelet index (HPI), based on anemia and thrombocytopenia, as a prognostic predictor in diffuse large B-cell lymphoma, not otherwise specified (DLBCL,NOS). The patients with a higher HPI score had significantly worse outcomes, and the HPI was independent of the National Comprehensive Center Network-International Prognostic Index (NCCN-IPI) to predict the prognosis. In addition, the patients which tumor cells were immunohistochemically positive for interleukin-6 (IL-6) had significantly lower hemoglobin levels or platelet counts than those which tumor cells were negative for IL-6.

HPI was a simple and useful prognostic predictor for DLBCL,NOS patients. Therefore, combining HPI with NCCN-IPI might be useful to predict the prognosis of the patients more accurately. Moreover, anemia and thrombocytopenia complicated in DLBCL, NOS patients might be caused by IL-6 production by lymphoma cells themselves.

研究分野：悪性リンパ腫の予後予測

キーワード：悪性リンパ腫 びまん性大細胞型B細胞リンパ腫・非特異型 予後予測 サイトカイン interleukin-6
貧血 血小板減少

1. 研究開始当初の背景

びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫 (diffuse large B-cell lymphoma: DLBCL) は悪性リンパ腫全体の約 40%を占め、リンパ腫の中では最も多い疾患群である。病理学的または臨床的に特徴がある DLBCL の一部は T-cell/histiocyte-rich large B-cell lymphoma、primary mediastinal large-B cell lymphoma などと独立した疾患に分離されているが、大半はびまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫・非特異型 (DLBCL,not otherwise specified: DLBCL,NOS) として包括されている。DLBCL,NOS はヘテロな集団にもかかわらず、治療法としては一律的に多剤併用化学療法 (R (rituximab)-CHOP (cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisolone) 療法) が用いられている。Rituximab の登場で治療成績は向上したものの、DLBCL,NOS の 5 年生存率はいまだ約 65%にとどまっている。そのため予後不良例の抽出と、予後不良例に対してより強力な化学療法の選択や新たな治療戦略が必要とされている。

現在は、rituximab 時代の DLBCL の新たな予後予測として 2014 年に提唱された、患者の年齢、臨床病期、血清 LDH 値、節外病変の有無、performance status に基づいた国際予後指標 (National Comprehensive Cancer Network-International Prognostic Index: NCCN-IPI) が用いられているが、十分とはいえない。さらに NCCN-IPI の評価には侵襲を伴う骨髄検査や PET 検査などを要するが、これらは常時施行できるとは限らない。DLBCL,NOS の予後予測において、近年遺伝子レベルで gene expression profile による腫瘍起源に基づく層別化、次世代シーケンス法による遺伝子変異による層別化など新たな予後予測指標が報告されているが、未だ十分に確立されておらず、費用や技術面の問題で日常臨床での実用化に至っていない。そのため、臨床現場で実用できる安価で簡便かつ正確な予後予測指標の確立が求められている。

2. 研究の目的

本研究では、診断時の血算値に基づく簡便な予後予測指標の確立を目的とした。炎症に伴う二次性貧血には interleukin-6 (IL-6) の関与が報告されている。本研究では腫瘍細胞が産生するサイトカインに焦点を当て、DLBCL,NOS の予後を左右する血球減少のメカニズムを解明することで、患者の予後の改善のみならず血球減少に伴う倦怠感、易感染性、貧血、出血などの諸症状を改善し、患者の Quality of life を向上する新たな治療法の開拓につなげる。

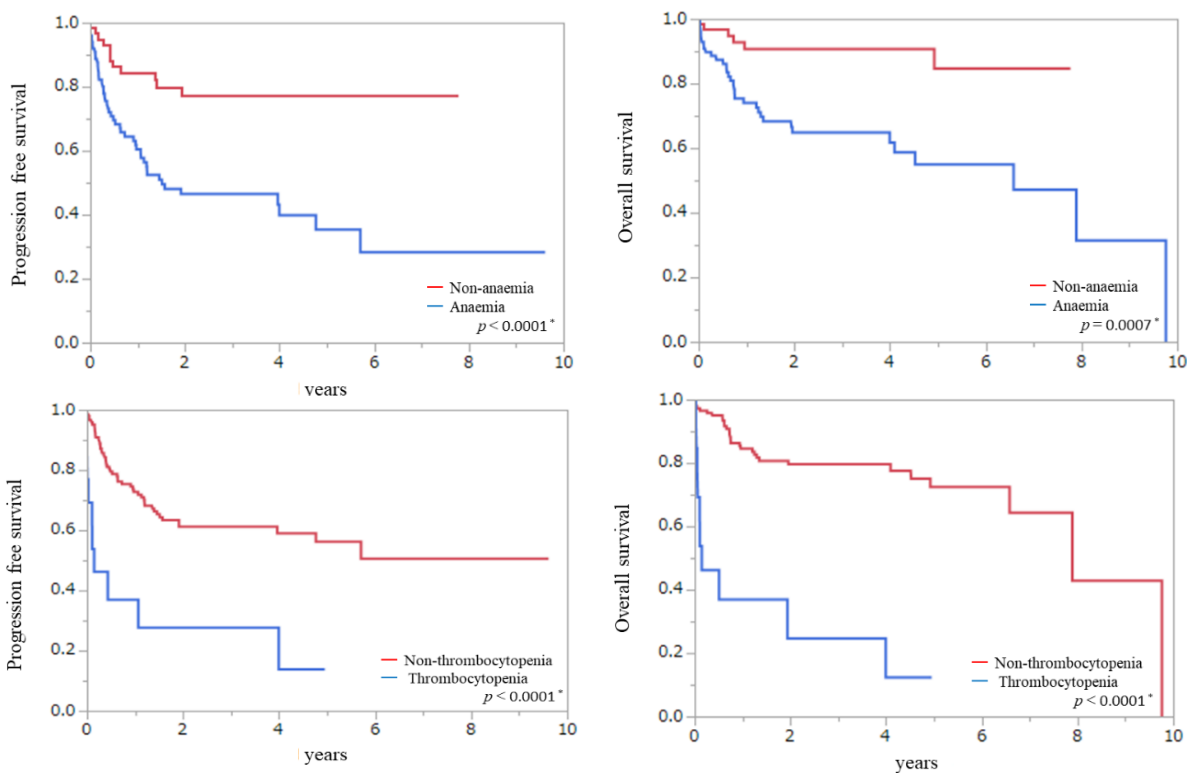
3. 研究の方法

- (1) DLBCL, NOS と診断され、R-CHOP 療法が実施された 160 症例を用いて、診断時の白血球数、ヘモグロビン (Hb) 値、血小板数と予後との関連性を統計学的に Kaplan-Meier method および Cox proportional hazards regression model による生存時間分析を用いて解析した。また、年齢、性別、病期、骨髄浸潤の有無などの臨床所見と血算値との関連性についても統計学的に解析した。
- (2) 貧血 (男性: Hb < 130 g/L, 女性 Hb < 120 g/L) や血小板減少 (< $100 \times 10^9/L$) を認めた場合に、それぞれ 1 点とした Hemoglobin-platelet index (HPI) を提唱し、high 群 (2 点)、intermediate 群 (1 点)、low 群 (0 点) の 3 群に層別化し、HPI が有用な予後因子となりうるか統計学的解析を行った。さらに、HPI の有用性について既存の予後指標である NCCN-IPI や、血液検査データに基づく Glasgow prognostic score (GPS: アルブミン値と CRP 値) および Platelet-albumin score (PA score: 血小板数とアルブミン値) と比較検討した。
- (3) パラフィン包埋された DLBCL,NOS のリンパ節生検組織ブロックから 111 検体の薄切標本を作製し、IL-6 抗体を用いて免疫組織染色を施行し、IL-6 発現の有無と白

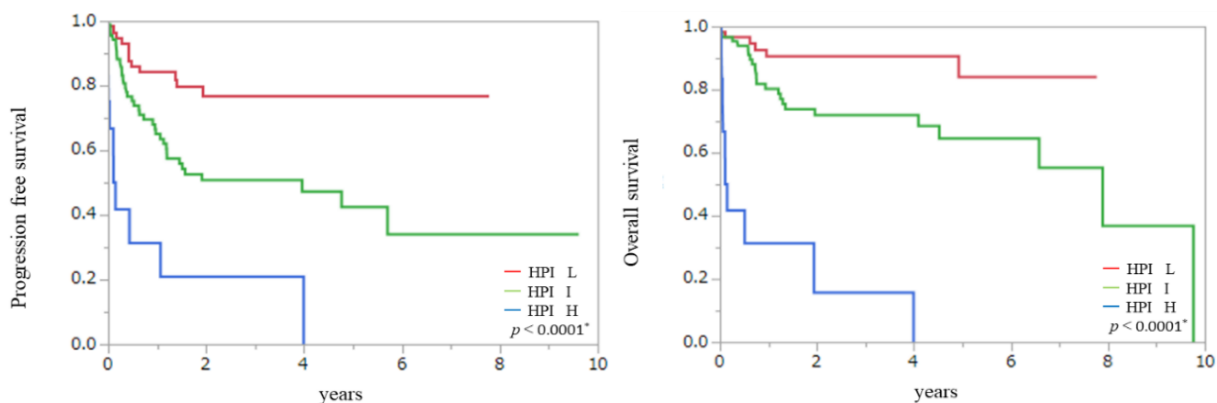
血球数、Hb値および血小板数との関連性を検討した。さらに、B-cell lymphoma 6 (BCL6) 抗体、B-cell lymphoma 2 (BCL2) 抗体、mutated myeloma-associated antigen 1 (MUM1) 抗体、Ki-67抗体、MYC抗体による免疫組織染色を施行し、Ki67 index、MYC 発現の有無、cell of origin (germinal center B-cell [GCB] type/ non-GCB type)、double expressor lymphoma (MYC と BCL6 の同時発現) と IL-6発現との関連性を検討した。

4. 研究成果

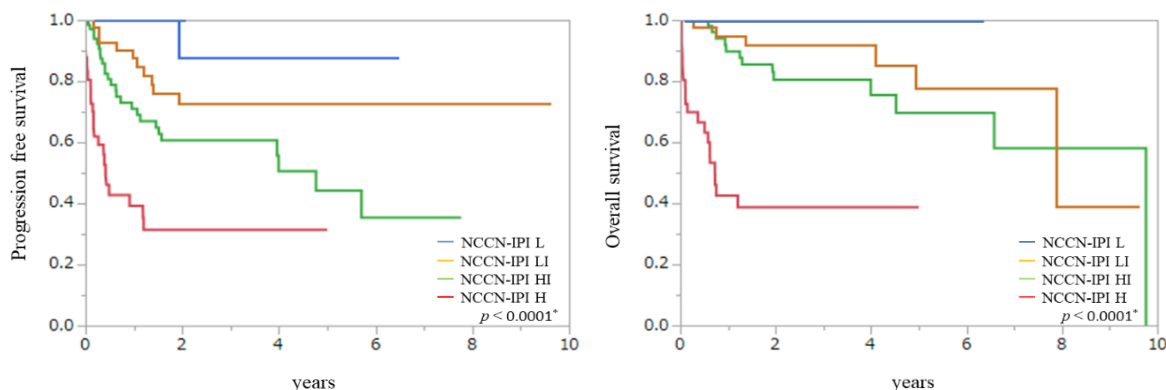
白血球数減少 ($< 4.0 \times 10^9/L$) と DLBCL, NOS 患者の予後には関連がなかったが、貧血症例 (男性: Hb < 130 g/L, 女性 Hb < 120 g/L) や血小板減少症例 ($< 100 \times 10^9/L$) では、無増悪生存期間 (PFS) および全生存期間 (OS) が有意に短かった。貧血症例は年齢、臨床病期および NCCN-IPI score が有意に高かった。血小板減少症例は年齢、性別、臨床病期とは関連はなかったが、NCCN-IPI score が有意に高かった。貧血の有無は骨髄浸潤の有無と関連はなかったが、血小板減少症例では骨髄浸潤のある症例がない症例より有意に多く認められた (62% vs. 26%, $p = 0.0064$)。



Hb 値と血小板減数に基づく HPI を算出した結果、HPI score が高い症例ほど PFS と OS がともに有意に短かった (PFS: $p < 0.0001$, OS: $p < 0.0001$)。HPI score が高い症例は、年齢、臨床病期および NCCN-IPI score が有意に高かった。



さらに、NCCN-IPI および HPI による層別化を比較した結果、HPI -high 群は NCCN-IPI-high 群よりも早期再発/病勢進行症例および早期死亡症例の抽出に優れていた (PFS at 1 year: HPI 31.2% vs. NCCN-IPI 39.2%; OS at 1 year: HPI 31.2% vs. NCCN-IPI 42.5%)。また、Cox proportional hazards regression model による 2 変量解析の結果、HPI と NCCN-IPI は互いに独立した予後因子であることが分かった。

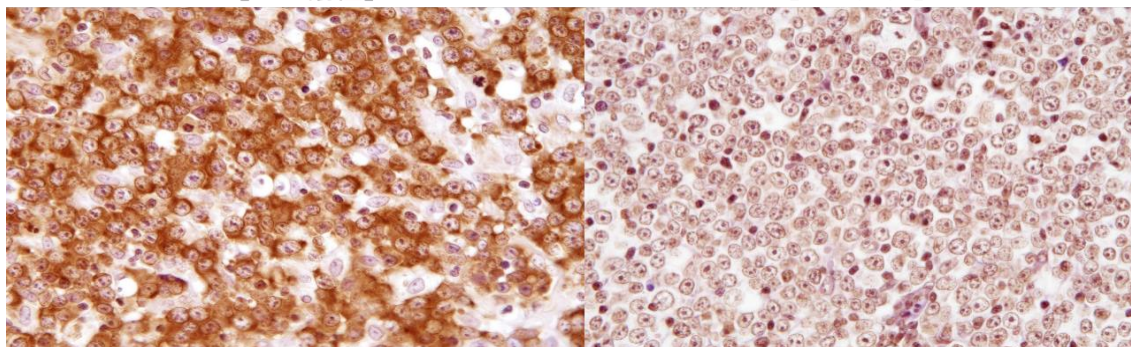


さらに HPI の有用性について、すでに有用性が報告されている血液検査データに基づく予後予測指標である GPS や PA score と統計学的に比較検討を行ったところ、HPI は GPS より有用であり、PA score とほぼ同程度に有用であることが示された (PFS: HPI $p < 0.0001$, GPS $p = 0.0137$, PA score $p < 0.0001$; OS: HPI $p < 0.0001$, GPS $p = 0.0311$, PA score $p < 0.0001$)。

次に、パラフィン包埋された DLBCL,NOS のリンパ節生検組織から 111 検体の薄切標本を作製し、IL-6 抗体を用いて免疫組織染色を施行した結果、IL-6 陽性群 (75/111 cases) と IL-6 陰性群 (36/111 cases) に分かれることが明らかになった。

【IL-6 陽性】

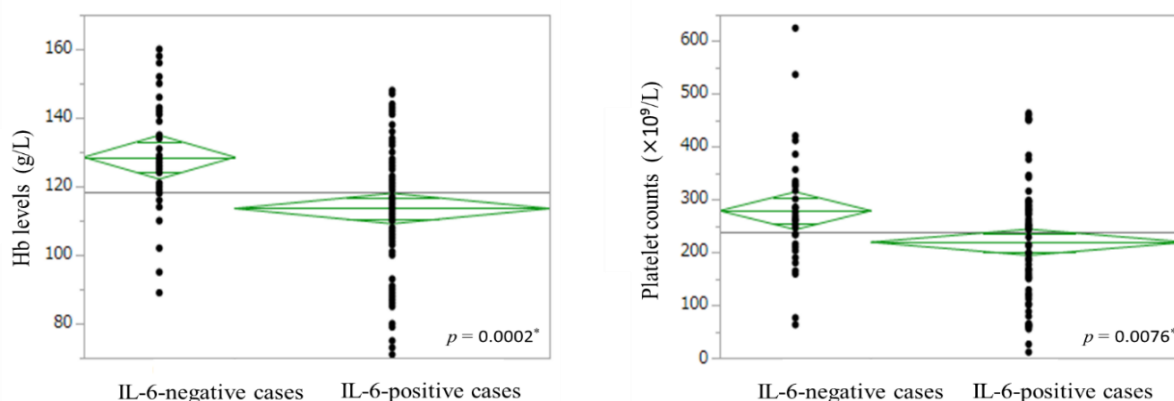
【IL-6 陰性】



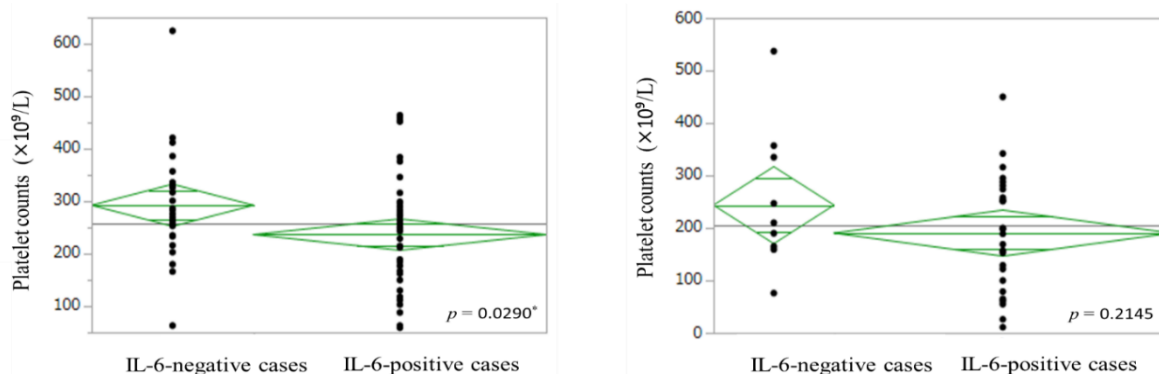
さらに、予後に関する病理学的因子との関連性について検討した結果、IL-6 発現と Ki67 index、MYC 発現、biologic phenotype (double expressor/non-double expressor) に関連性はなかったが、IL-6 陽性群は IL-6 陰性群と比較して non-GCB type が GCB type より有意に多かった (69% vs. 35%, $p = 0.001$)。Activated B-cell type では、NF κ B 経路関連因子である CD79B、MYD88 などにシグナル伝達を活性化する変異が集積するという報告や、IL-6 は JAK1/STAT3 経路を介して autocrine growth factor として働くとの報告があることから、IL-6 陽性 DLBCL,NOS の病態に NF κ B/JAK1/STAT3 pathway が関連していることが示唆された。

IL-6 発現と DLBCL,NOS 患者の白血球数、Hb 値および血小板数との関連性を検討した。IL-6 陽性群は陰性群と比較して Hb 値が有意に低かった (mean \pm standard error [SE]: 113.54 \pm 2.23 g/L vs. 128.52 \pm 3.22 g/L, $p = 0.0002$)。同様に、IL-6 陽

性群は陰性群と比較して血小板数が有意に低かった (mean \pm SE: 219.21 \pm 12.48 /L vs. 278.80 \pm 18.02 /L, $p = 0.0076$)。白血球数に差は認められなかった。



さらに、血小板減少症例は骨髄浸潤症例に多くみられたことより、骨髄浸潤の有無別に IL-6 発現の有無と血小板数との関連性を検討した。骨髄浸潤がない症例においては、IL-6 陽性群は陰性群と比較して血小板数が有意に低かった (mean \pm SE: 236.42 \pm 14.97 /L vs. 292.34 \pm 20.13 /L, $p = 0.0290$)。骨髄浸潤がある症例においても、IL-6 陽性群は陰性群と比較して血小板数が低い傾向がみられた (mean \pm SE: 190.32 \pm 21.63 /L vs. 243.60 \pm 36.19 /L, $p = 0.2145$)。



また、IL-6 はアルブミンの合成を抑制し、CRP の生成を促進することから、160 人の DLBCL,NOS 患者の Hb 値および血小板数と血清アルブミン値および血清 CRP 値との関連性を統計学的に解析した。その結果、Hb 値は血清アルブミン値と有意な正の相関関係 (correlation coefficient, 0.5709; 95%CI, 0.4562 to 0.6670; $p < 0.0001$)、血清 CRP 値と有意な負の相関関係 (correlation coefficient, -0.4416 ; 95%CI, -0.5585 to -0.3075 ; $p < 0.0001$) を示した。血小板数についても血清アルブミン値と有意な正の相関関係 (correlation coefficient, 0.1632; 95%CI, 0.0083 to 0.3105; $p = 0.0392$) を示し、血清 CRP 値とは負の相関傾向 (correlation coefficient, -0.1071 ; 95%CI, -0.2580 to -0.0489 ; $p = 0.1777$) を認めた。

本研究により、我々が提唱した HPI は簡便かつ安価であり、日常の実地臨床で有用な予後予測指標である事を明らかにした。HPI を既存の NCCN-IPi と併用する事で、より正確な予後予測が可能になり、患者の適切な治療方針の選択に寄与する。また、我々は DLBCL,NOS に随伴する貧血及び血小板減少には、腫瘍細胞が産生する IL-6 が関与している事を示した。本研究成果は、今後の血球減少の病態解明や新たな抗サイトカイン療法の開拓につながる。

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 Takahide Taniguchi, Shoko Nakayama, Hirokazu Tanaka, Shinya Rai, Chikara Hirase, Yasuyoshi Morita, Yoichi Tatsumi, Takashi Ashida, Mitsuhiro Matsuda, Shigeo Hashimoto, and Itaru Matsumura	4. 巻 -
2. 論文標題 Novel prognostic predictor of haemoglobin -platelet index in diffuse large B-cell lymphoma, not otherwise specified: anaemia and thrombocytopenia are associated with IL-6 production in lymphoma cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 British journal of haematology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/bjh.18208	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0件

〔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
---------	---------