

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 3 月 16 日現在

機関番号：32409

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009 年度～2011 年度

課題番号：21591218

研究課題名（和文）悪性リンパ腫における NM23 の細胞外環境の検討と分子標的治療法の開発

研究課題名（英文） The examination of the extracellular environment of NM23 and the molecule target therapy in malignant lymphoma

研究代表者

新津 望 (NIITSU NOZOMI)

埼玉医科大学・医学部・教授

研究者番号：20256697

研究成果の概要（和文）：nm23-H1 は悪性リンパ腫の予後不良因子であることを報告してきた。Rituximab 時代においても nm23-H1 が予後不良因子となるかどうかをびまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫(DLBCL)について検討した。化学療法を施行した DLBCL では、BCL-2 陽性、MUM-1 陽性、非胚中心型、nm23-H1 高発現している場合有意に予後不良であることを見いだした。同様に末梢性 T 細胞リンパ腫(PTCL)についても検討したが、nm23-H1 が高発現で有意に予後不良であることがわかった。この結果から、nm23-H1 は DLBCL および PTCL における分子標的となりうる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）： We examined whether nm23-H1 is a prognostic factor of DLBCL in the rituximab-era. The subjects were DLBCL patients who underwent chemotherapy and in whom markers could be analyzed. Among DLBCL patients who underwent chemotherapy, BCL2-positivity, MUM1-positivity, non-GCB, and nm23-H1-positivity were associated with significantly shorter overall survival and progression-free survival . We demonstrated that among patients with DLBCL who underwent chemotherapy, patients with nm23-H1 expression had a significantly poorer prognosis than patients without nm23-H1 expression. These results suggest an important role for nm23-H1 in malignant progression and a potential therapeutic target for DLBCL.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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：癌、蛋白質

1. 研究開始当初の背景

悪性リンパ腫において血清nm23-H1は、新規の優れた予後因子であることを報告してきた。nm23の機能解析を行なうことにより、分子標的治療の標的分子になる可能性が高い。そのため、悪性リンパ腫に対するnm23の機能解析および細胞外環境の検討を行ない、分子標的治療薬の開発につなげたい。

悪性リンパ腫の治療成績は向上し、ホジキンリンパ腫では約 80%の症例で治癒可能となってきた。そのため、不妊や二次性発癌といった晩期有害事象の発現をおさえるための治療法が選択されており、また、抗 CD30 抗体などの分子標的治療の開発が盛んに行なわれている。一方、非ホジキンリンパ腫は第 4 版 WHO 分類により約 70 種類に細分類されており、近年は各々の病型に対する病型特異的治療が行なわれ、治療成績の改善が見られている。現在は、B 細胞リンパ腫に対しては抗 CD20 モノクローナル抗体である rituximab の臨床応用により治療成績は改善したが、それでも約 30%の症例では再発あるいは治療抵抗性を認め、高用量化学療法を併用した末梢血幹細胞移植、同種骨髄移植、ミニ移植などが必要となっている。また、B 細胞リンパ腫に対する新規治療法は、新規プリンアナログ（フルダラピン、クラドリピン）、ベンダムスチン、放射性同位元素を結合させた抗 CD20 抗体（ゼヴァリン）などが臨床的に使用されはじめ、今後益々の予後の改善が期待される。しかし、T 細胞性あるいは NK 細胞性リンパ腫に対する治療薬は 20 年以上前からほとんど新規薬剤がなく、既存の治療薬と放射線療法の組み合わせにより、ほとんど治療成績に改善が見られていないことが現状である。また、リンパ腫患者は年々増加し、全腫瘍死亡率の第 6-7 位を占め、白血病の 3 倍の発生頻度と

も言われている。また、高齢化社会を反映してリンパ腫患者の年齢中央値は 60-65 歳と言われ、高齢者に対する有害事象が少なく、より効果のある分子標的治療法の開発は急務である。近年腫瘍細胞の生物学的特性に基づく予後因子が明らかにされ、それによる予後の判定が行われ、個々の患者に最適と考えられる治療方法の選択が行われつつある。また、DNA マイクロアレーを用いた予後因子の検討が行われているが、B 細胞リンパ腫に対しては成功しているが、T 細胞リンパ腫に対しては未だ新規予後因子の報告が少ない。また、DNA マイクロアレーは、高価であり、検査に時間がかかるため、治療前に行うことは難しく、臨床応用にはまだ時間がかかり、治療前に簡便に使用できる予後因子が臨床の場では重要である。また、分子標的療法による予後因子は一般的な化学療法による予後因子と異なる可能性が考えられる。

2. 研究の目的

nm23 遺伝子は、高転移性がん細胞において低い発現を示す転移抑制遺伝子として単離され、ヌクレオシド二リン酸キナーゼ活性、シヨウジョウバエ形態形成遺伝子、c-myc 転写因子活性、及び白血病の分化誘導抑制因子活性などを示す多機能性蛋白である。nm23-H1 および nm23-H2 は 88%のアミノ酸配列にホモロジーを持ち、これらは 17q21 染色体上に認められる。我々は、以前埼玉県立がんセンター研究所との共同研究で急性骨髄性白血病において nm23-H1 mRNA 発現レベルが高い程有意に予後不良であることを報告してきた。しかし、nm23-H1 の mRNA レベルでの発現を検討することは時間および手間がかかり、治療開始前に予後予測し治療方法を検討することは難しい。特にリンパ腫では、リンパ節お

よびリンパ組織の再生検をすることは患者さんへの侵襲も大きく、ほとんど不可能である。

そのため、我々は簡単に測定できる血清での nm23 の測定が可能かどうかを検討し、血中に nm23-H1 蛋白が検出されることを見出し、少量の血清で短時間で定量的に測定できる系を ELISA 法で作成し報告してきた。その結果、急性骨髄性白血病および悪性リンパ腫患者で正常対照に比し高値を示し、新しい優れた予後不良因子となることを明らかにし報告してきた。その後、血清 nm23-H1 は indolent リンパ腫および NK/T 細胞性リンパ腫に対しても単独で有意な独立した予後因子であることを報告した。また、細胞表面および細胞質内 nm23 についても検討し、血清 nm23-H1 とそれぞれが相関することを見いだした。また、再発例に対する予後因子になるかどうかを検討し、再発あるいは難治性高齢者 T 細胞性リンパ腫における予後不良因子であることを報告した。非ホジキンリンパ腫は節外性に発症することが約半数あり、それぞれの節外臓器によって予後が異なることより、臓器別の予後因子として細胞質内 nm23 を検討し、甲状腺では非胚中心型とは独立した予後不良因子になることを見いだした。また、非ホジキンリンパ腫のみならずホジキンリンパ腫に対しても細胞質内 nm23 を検討し、ほかのホジキンリンパ腫の予後因子との比較検討を行った。

3 . 研究の方法

細胞質内 nm23 の発現を検討するために、免疫染色法を用い nm23-H1, nm23-H2, TIA-1, granzyme B などを免疫組織化学的に検討した。Cut-off 値は 30 ~ 50% とし、30%以下の症例を陰性、30 ~ 50%を弱陽性、50%以上を陽性とした。

また、nm23 過剰発現発現が誘導するがん細胞の生物学的特性を検討する。具体的には、白血病およびリンパ腫細胞株における nm23-H1, nm23-H2, PRUNE, OCT-1, BOB-1, EDG2 などの発現を real time PCR 法を用い検討した。また、各種抗がん剤の添加により細胞の増殖、分化、発現の変化を検討した。

4 . 研究成果

悪性リンパ腫において血清 nm23-H1 は、新規の優れた予後因子であることを報告してきた。nm23 の機能解析を行なうことにより、分子標的治療の標的分子になる可能性が高い。また、B 細胞リンパ腫に対しては抗 CD20 モノクローナル抗体である rituximab が使用され、治療成績の改善が見られている。そのため、rituximab 時代にも nm23 が予後因子になるかどうかを検討した。まず、びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫に対する rituximab 併用 Cyc10BEAP (rituximab, cyclophosphamide, vincristine, bleomycin, etoposide, doxorubicin, prednisolone) 療法を施行した症例に対して nm23-H1 の免疫組織学的検討を行い、nm23-H1 を高発現している症例は予後不良であることを見いだした。Rituximab 時代以前に nm23-H1 はびまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫の予後不良因子であることを報告してきたが、rituximab 時代でも nm23-H1 は予後不良因子となった。また、末梢性 T 細胞リンパ腫に対する予後因子を検討する目的で nm23-H1 を検討したが、びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫と同様に有意な予後不良因子となることがわかった。

そのため、次に nm23 が白血病、B 細胞リンパ腫および T 細胞リンパ腫で予後不良となる一因を検討する目的で、nm23-H1 に関連する遺伝子である PRUNE, OCT-1, BOB-1 などの発現を検討した。まず、白血病細胞株である HL60,

NB4, U937 を用い分化誘導剤である ATRA および Vitamin D3 を添加することにより nm23-H1, nm23-H2, EDG2, PRUNE, OCT-1, BOB-1 の発現の変化を検討した。その結果、白血病細胞株において、nm23-H1 および nm23-H2 の発現が分化誘導剤により濃度依存性に低下することを認めしたが、PRUNE, OCT-1, BOB-1 は変化を認めなかった。次に、リンパ腫細胞株において同様の検討を行ったが、EDG2, PRUNE に関して nm23 と有意な相関を認めしたが、OCT-1, BOB-1 とは有意な相関を認めなかった。そのため、nm23 による予後不良の原因のひとつとして EDG2 および PRUNE との関連が示唆された。

また、nm23 の発現を抑制する薬剤を検討する目的で、種々の抗がん剤をリンパ腫細胞株に添加し、nm23-H1, nm23-H2 の発現量を RT-PCR を用いて検討した。その中で、B 細胞リンパ腫に対する新規治療薬が nm23-H1, nm23-H2 発現を有意に抑制することを見いだした。そのため、新規治療薬処理後のリンパ腫細胞株における nm23-H1 と nm23-H2 の発現量を real time PCR 法を用いて検討した。その結果、新規治療薬は濃度依存性に nm23-H1 および nm23-H2 の発現の低下を認めた。そのため、新規治療薬はアポトーシス関連遺伝子とともに nm23 の発現が低下させることが判明し、今後 nm23 を標的とした治療に役立つと考えられた。

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6件)

1. Niitsu N, et al. Expression of nm23-H1 is associated with poor prognosis in peripheral T-cell lymphoma, not otherwise specified. Clin Cancer Res. 2011 17:2893-9. 査読有

2. Niitsu N, et al. Multicentre phase II study of the CycloBEAP regimen for patients with peripheral T-cell lymphoma with analysis of biomarkers. Br J Haematol. 2011 ;153:582-588. 査読有

3. Niitsu N, et al. .Clinicopathologic characteristics and treatment outcome of the addition of rituximab to chemotherapy for CD5-positive in comparison with CD5-negative diffuse large B-cell lymphoma. Annals of Oncology 2010; 2069-74. 査読有

4. Niitsu N, et al. Multicentre phase II study of CycloBEAP plus rituximab in patients with diffuse large B-cell lymphoma. Hematol Oncol. 2010;28:68-74.

5. Hagiwara Y, Niitsu N, et al. .Ellagic acid, a natural polyphenolic compound, induces apoptosis and potentiates retinoic acid-induced differentiation of human leukemia HL-60 cells. Int J Hematol. 2010 (1):136-43. 査読有

6. Niitsu N. Current treatment strategy of diffuse large B-cell lymphomas. Int J Hematol. 2010 ;92:231-237. 査読有

[学会発表](計6件)

1. Niitsu N , et al. Clinical significance of biomarkers of diffuse large B-cell lymphoma in the rituximab era. 11th international conference on malignant lymphoma. Lugano, Switzerland. June 15-18 2011.

2. Hayama M, Niitsu N, et al. Clinical significance of immunohistochemical markers of diffuse large B-cell lymphoma in the rituximab era Blood (ASH Annual Meeting Abstracts), Dec 4 2010. San Francisco, USA

3. Niitsu,N, et al. Multicenter phase II study of the CycloBEAP regimen for patients with peripheral T-cell lymphoma with analysis of biomarkers. Blood (ASH Annual Meeting Abstracts), Dec 5 2010. San Francisco, USA
4. Niitsu N, et al, Expression of nm23-H1 is associated with poor prognosis in peripheral T-cell lymphoma-NOS. .第69回日本癌学会学術総会 . 大阪.2010.9.22-24
5. Niitsu N, et al, Expression of nm23-H1 is associated with poor prognosis in peripheral T-cell lymphoma-NOS.T-cell lymphoma forum.Jan 28-30 2010, Maui USA.
6. Niitsu N, et alMulticenter phase II study of the CycloBEAP plus rituximab in diffuse large B-cell lymphoma with analysis of biomarkers. Blood (ASH Annual Meeting Abstracts), Dec 4 2009. San Francisco, USA

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕
ホームページ等;なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

新津 望(NIITSU NOZOMI)
埼玉医科大学・医学部・教授
研究者番号：20256697