

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 月 24 日現在

機関番号：14101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790909

研究課題名（和文）難治性リンパ腫の病態に関連する遺伝子群の解明と新規治療標的分子の同定

研究課題名（英文）Identification of molecular target for malignant lymphoma treatment through understanding of clinicopathological genes

研究代表者

宮崎 香奈（MIYAZAKI KANA）

三重大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：60571627

研究成果の概要（和文）：

難治群である CD5 陽性 DLBCL の予後不良性、中枢神経系再発機序の解明のため、遺伝子発現網羅的解析を行い、CD5 陽性 DLBCL の大多数が activated B cell-like DLBCL に分別されることを確認した。CD5 陽性 DLBCL を特徴づける遺伝子群を抽出し、その top gene が SH3BP5 であり、神経構成成分あるいは神経機能に関連する多数の遺伝子が含まれることを明らかにした。免疫組織学的検討においても SH3BP5 抗原の腫瘍細胞における発現が確認された。

研究成果の概要（英文）：

CD5+ DLBCL shows a poor prognosis and high incidence of central nervous system relapse. By gene expression profiling, we confirmed that most of CD5+ DLBCLs are classified as activated B cell-like DLBCL. A classifier based on gene expression at supervised analysis also correctly identified CD5 expression. The top classifier gene supervised by CD5 expression was SH3BP5. A lot of neurological component- and function-related genes were contained in the CD5 DLBCL signature genes. Immunohistochemical analysis confirmed that SH3BP5 expression was detected on the tumor cell.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

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、網羅的遺伝子解析、びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫、中枢神経系

1. 研究開始当初の背景

悪性リンパ腫の約 70% が B 細胞性リンパ腫であり、その予後は抗 CD20 抗体である rituximab の導入により飛躍的に改善した。一方、rituximab 導入以後も依然として寛解に至らず、長期予後が望めない予後不良群

が存在している。悪性リンパ腫の約 40% を占め、最大病型であるびまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫 (diffuse large B-cell lymphoma; DLBCL) は病因論的・臨床病理学的・分子生物学的に不均一な疾患群であり、その分子生物学的予後因子はこれまでに多く報告さ

れている。それらのひとつとして、特に CD5 陽性 DLBCL が陰性群に比べて有意に予後不良で、DLBCL 全体の 5-10%を占め、高齢女性に多く、節外病変を高率に伴うなど多くの特徴的病態を有している。さらに、中枢神経系 (central nerve system; CNS)再発/増悪が 13% に生じ、これは通常の DLBCL が 5%以下であるのに比べて高率である (Yamaguchi M, et al. Blood 2002, Haematologica 2008)。2008 年に改訂された WHO 分類第 4 版では immunohistochemical subgroup として記載された。

DLBCL の標準治療は rituximab 併用 CHOP (類似)化学療法に移行したことから、CD5 陽性 DLBCL の rituximab 導入以降の治療反応性、予後を解析するため、我々は第三次となる国内多施設共同研究を行った。2002-2007 年に診断された CD5 陽性 DLBCL 401 例のうち化学療法を実施された 337 例での検討を報告した (Miyazaki K, et al.: 2009 年 6 月米国臨床腫瘍学会年次総会示説発表, Miyazaki K, et al. Ann Oncol 2011)。その結果 rituximab 併用化学療法実施群は化学療法単独群と比較して有意に予後良好であったが ($P=0.002$)、依然として 2 年生存率 68%と不十分な治療成績であった。また、rituximab 導入後も CNS 再発率に改善がなく、診断後 2 年時点で 12.7%と高率であることが確認された。Rituximab は血液脳関門を通過せず、CNS 病変に対して無効とされる。それに加えて、CNS 再発に対する確立した標準治療は皆無であり、再発後生存期間中央値は 2.2 ヶ月である (Bernstein SH, et al. J Clin Oncol, 2008)。近年網羅的な遺伝子解析手段として DNA マイクロアレイを用いた遺伝子発現プロファイリングが確立された。遺伝子発現プロファイリング解析を用いた CD5 陽性 DLBCL における検討は散見されるが、正常起源細胞解明を目指した遺伝子解析が主体である。

2. 研究の目的

本研究の目的は CD5 陽性 DLBCL の予

後不良性の病因、CNS 再発の機序を解明するとともに、CNS 再発予防を可能とする有効な治療開発への応用可能性について検討することである。

3. 研究の方法

(1) CD5 陽性 DLBCL を特徴づける遺伝子データセットの同定

対象は凍結切片使用免疫組織化学に CD5 の発現検索が行われた DLBCL 計 90 例を対象として解析を行った。この 90 症例の凍結組織から total RNA を抽出し、得られた cRNA を使用して Agilent oligo microarray 44K (41,056 遺伝子搭載)上にハイブリダイズし、2 色法にて遺伝子発現解析を行い、GeneSpring 7.3 software を用いてゲノム網羅的な解析を実施した。Germinal center B-cell-like (GCB) 群と ABC activated B-cell-like (ABC)群の 2 群に分ける遺伝子セットは Rosenwald らの報告(Rosenwald A, et al. N Engl J Med. 2002)にある 100 遺伝子のうち 92 遺伝子を用いた。

(2) Gene Ontology 解析

CD5 関連遺伝子群を機能的な遺伝子グループとして捉えるため、Webgestalt を使用し、Gene Ontology (GO)カテゴリー解析を行った。

(3) 免疫組織化学による各種抗原発現の検討

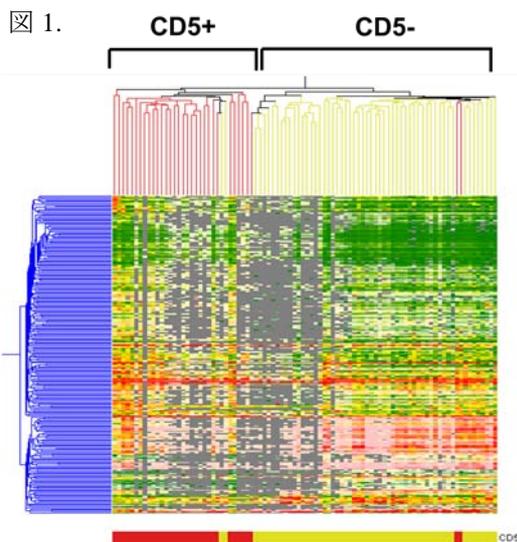
正常神経組織の混在を避けるため、遺伝子発現解析を行った DLBCL 計 90 例中、リンパ節検体を用いた症例の中から CD5 陽性 DLBCL 18 例および CD5 陰性 DLBCL 10 例を対象とした。凍結切片使用免疫組織化学により、リンパ節検体での CD5 陽性 ABC DLBCL を特徴づける遺伝子セットに含まれた SH3BP5, LMO3, SNAP25 各抗原発現を検討した。保存凍結組織から凍結切片を作製し、各種市販モノクローナル抗体を用い、難波らの Labeled avidin-biotin 法により免疫

組織染色を実施した。

4. 研究成果

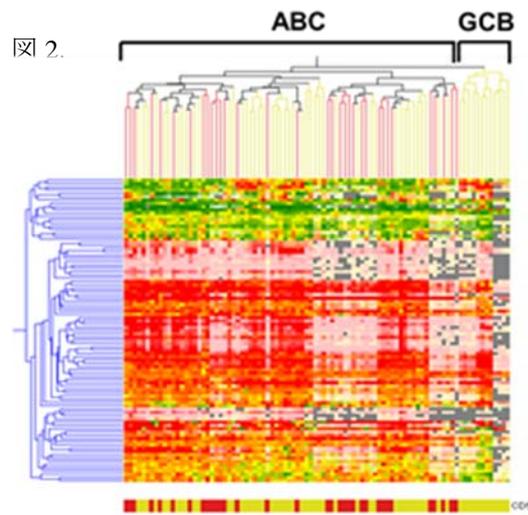
(1) CD5 陽性 DLBCL を特徴づける遺伝子データセットの同定

CD5 発現に注目し、CD5 陽性 DLBCL33例と CD5 陰性 DLBCL57例の計90例を対象として遺伝子発現プロファイリングを行い、CD5 陽性 DLBCL と CD5 陰性 DLBCL 間で 2.0 fold 以上の発現差がある遺伝子を抽出し、289 遺伝子からなる CD5 DLBCL signature gene set を同定した。この CD5 DLBCL signature gene set を用い、supervised 法により、クラスタリングを行った結果、CD5+ DLBCL 型と CD5- DLBCL 型の2群に分別された (図 1)。CD5+ signature genes の top feature gene は *SH3BP5* で、CD5 に最も関連していた遺伝子は *SH3BP5* だった。

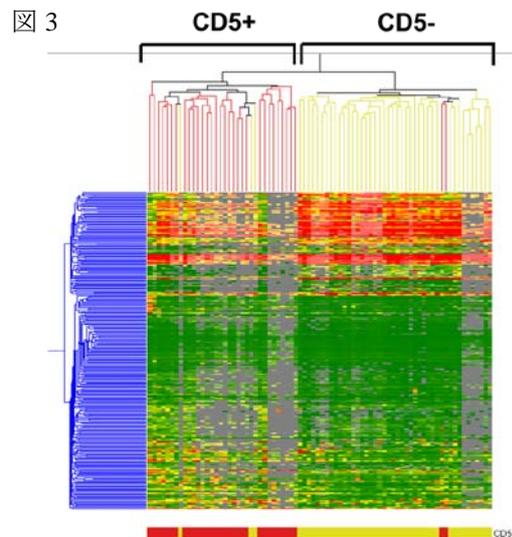


Rosenwald らが用いた GCB/ABC 遺伝子データセットでのクラスタリングの結果、DLBCL90 例のうち、78 例が ABC 群で、12 例が GCB 群に分類された。また CD5 陽性 DLBCL はすべて ABC 群に分別され、ABC 群の 42% が CD5 陽性 DLBCL であった (図 2)。

さらに ABC DLBCL78 例において CD5 陽性 DLBCL と CD5 陰性 DLBCL の発現差が 2.0 fold 以上を示す遺伝子を抽出し、CD5



陽性に優位な 198 個の遺伝子と CD5 陰性に優位な 105 個の遺伝子からなる計 303 個の遺伝子群を抽出した。(図 3) その結果 ABC DLBCL78 例は 2 群に分かれ、CD5+群、CD5-群に分別された。



(2) Gene Ontology 解析

ABC DLBCL における CD5 発現に関係している遺伝子群に最も関連する GO カテゴリは synapse であり ($P=6.14e-05$)、ほかにも神経構成成分あるいは神経機能に関連する遺伝子が多数含まれていた。

(3) 免疫組織化学による各種抗原発現の検討

CD5 陽性 DLBCL での結果は以下のようであった (腫瘍細胞での陽性例数/検索例数): *SH3BP5*, 17/18; *LMO3*, 9/18; *SNAP25*,

16/18。CD5-DLBCL では同様に SH3BP5, 5/10; LMO3, 1/10;SNAP25, 0/10 であった。SH3BP5 抗原の CD5 陽性 DLBCL 腫瘍細胞における発現が初めて確認された。LMO3 および SNAP25 は正常ヒトでは神経系組織に特異的に発現し、正常および腫瘍化造血細胞での抗原発現は過去に報告がない。

以上の研究成果は難治群である CD5 陽性 DLBCL の予後不良性、CNS 再発機序の解明に貢献すると思われる。今後も CD5 陽性 DLBCL の研究で同定されたターゲット遺伝子群に加え、CNS 再発に強く関連する遺伝子の単離、蛋白抗原発現、pathway を決定するため基礎的研究を続ける予定である。

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 3 件)

- ① Miyazaki K, Yamaguchi M, Suzuki R, Kobayashi Y, Maeshima AM, Niitsu N, Ennishi D, Tamaru JI, Ishizawa K, Kashimura M, Kagami Y, Sunami K, Yamane H, Nishikori M, Kosugi H, Yujiri T, Hyo R, Katayama N, Kinoshita T, Nakamura S. CD5-positive diffuse large B-cell lymphoma: a retrospective study in 337 patients treated by chemotherapy with or without rituximab. *Ann Oncol.* 2011;22: 1601-1607. 査読有
- ② 宮崎香奈 :【CD5 陽性びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫は Rituximab 導入により予後が改善されたか?】*血液内科* 63;34-39、2011、査読無
- ③ 宮崎香奈「トランスクリプトームを用いた悪性リンパ腫の新たなバイオマーカーの探索」*血液フロンティア* 2010;20:1009-1015 査読無

[学会発表] (計 16 件)

- ① 宮崎香奈、山口素子、小林恭子、横江香里、今井 裕、小林 透、珠玖 洋、

片山直之 DLBCL における遺伝子発現プロファイリング- CD5 発現による比較 第 73 回日本血液学会総会 [口演]、2011 年 10 月 16 日、名古屋

- ② 横江香里、山口素子、宮崎香奈、小林恭子、片山直之 CD5 陽性びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫細胞で新たに確認された特徴的抗原発現 第 73 回日本血液学会総会 [口演]、2011 年 10 月 16 日、名古屋
- ③ 宮崎香奈、山口素子 Clinical and molecular features of CD5+ DLBCL 第 70 回日本癌学会学術集会 [英語招待講演]、2011 年 10 月 4 日、名古屋
- ④ 宮崎香奈、山口素子、南 博仁、小林恭子、片山直之 DA-EPOCH-R 療法および大量 MTX 療法で治療を行った CD5 陽性びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫 第 51 回日本リンパ網内系学会総会 [ポスター(示説)]、2011 年 7 月 2 日、福岡
- ⑤ 宮崎香奈、山口素子 NK/T 細胞腫瘍治療における最近の進歩 第 51 回日本リンパ網内系学会総会 [招待講演]2011 年 7 月 1 日、福岡
- ⑥ K Miyazaki, M Yamaguchi, J Tamaru, N Niitsu, T Yujiri, K Sunami, N Nakamura, T Kinoshita, M Kato, R Suzuki, S Nakamura, N Katayama, I Miura. Cytogenetic features of CD5-positive diffuse large B-cell lymphoma: updated results from a multicenter, retrospective study with 77 patients. 11th International Conference on Malignant Lymphoma [ポスター(示説)] 2011 年 6 月 4 日、Lugano, Switzerland
- ⑦ Kana Miyazaki, Motoko Yamaguchi, Hiroshi Imai, Satoshi Tamaru, Tohru Kobayashi, Hiroshi Shiku, Naoyuki Katayama Gene Expression Profiling of Diffuse Large B-Cell Lymphomas Supervised by CD5 Expression. [ポスター(示説)] 52th Annual Meeting, 2010 年

12月5日, Orlando, FL, USA

- ⑧ Kana Miyazaki, Motoko Yamaguchi, Noriko Ii, Yoshihito Nomoto, Atsushi Yuta, Hiroshi Imai, Masahiro Masuya, Kazunori Nakase, Naoyuki Katayama A retrospective study of 31 patients with NK/T-cell lymphoma: Mie University Hospital experience 第72回日本血液学会総会 [口演] 2010年9月25日、横浜
- ⑨ 江間菜々恵、山口素子、宮崎香奈、片山直之 CD5陽性びまん性大細胞型B細胞リンパ腫の新規治療開発に向けた免疫組織化学による各種抗原発現の検討 第72回日本血液学会総会 [ポスター(示説)] 2010年9月25日、横浜
- ⑩ 宮崎香奈、山口素子、伊井憲子、野本由人、湯田厚司、今井裕、中瀬一則、片山直之 三重大学における節外性NK/T細胞リンパ腫、鼻型31例の治療成績、第50回日本リンパ網内系学会総会[ポスター(示説)]2010年6月19日、新潟

[図書] (計1件)

- ① 宮崎香奈 「Castleman病その診断と治療」症例2症例検討を通して学ぶ悪性リンパ腫診療の実際ーリンフォーマ井戸端会議から学んだことー」pp125-126 メディカルレビュー社、2010。

6. 研究組織

(1)研究代表者

宮崎 香奈 (MIYAZAKI KANA)

三重大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：60571627

(2)研究分担者 なし

()

研究者番号：

(3)連携研究者 なし

()

研究者番号：