

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23590188

研究課題名(和文) MALTリンパ腫に対するマクロライド系抗菌薬の抗腫瘍効果

研究課題名(英文) Anti-tumor effect of macrolide antibiotics on MALT lymphoma

研究代表者

石松 祐二 (ISHIMATSU, Yuji)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(保健学科)・教授

研究者番号：40533899

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：非抗菌活性作用も有するマクロライド系抗菌薬(MCL)がMucosa-associated lymphoid tissue(MALT)リンパ腫に対して直接的な抗腫瘍効果を有しているかを検証した。胃あるいは肺MALTリンパ腫組織をアポトーシス抑制との関連が言われているBcl-xLの発現について、免疫染色を行い検討した。臨床経過でMCL投与が有効であった症例ではBcl-xL発現が認められたのに対し、MCL投与の抗腫瘍効果が臨床的、不十分あるいは無効であった症例ではBcl-xLが認めないかごく軽度の発現に留まった。MALTリンパ腫へのMCL有効性はBcl-xL発現の有無で予測できる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：This study was aimed at determining whether macrolide antibiotics (MCL) have a direct anti-tumor effect on mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) lymphoma. Gastric and pulmonary MALT lymphomas were immunohistochemically examined for Bcl-xL (apoptosis regulator) expression. Patients with a good clinical course after MCL administration showed high Bcl-xL expression, whereas those with a poor response to MCL showed no or very faint Bcl-xL expression. The results of this study suggest that the direct anti-tumor effect of MCL on MALT lymphoma could be predicted by Bcl-xL expression.

研究分野：呼吸器内科

キーワード：MALTリンパ腫 マクロライド系抗菌薬 アポトーシス

1. 研究開始当初の背景

マクロライド系抗菌薬(MCL)は抗菌作用以外に、抗炎症作用や緑膿菌に対する作用など非抗菌活性作用が報告されている。我々も MCL がリンパ球に直接アポトーシスを誘導することを報告した。また、最近、Mucosa-associated lymphoid tissue(MALT)リンパ腫において *Helicobacter pylori*(HP) 関連胃炎や自己免疫疾患などの慢性炎症が nuclear factor(NF)- B を活性化し、それに伴い Bcl-xL 発現が亢進させるなど、その病態の一部が解明された。また、HP 関連の胃 MALT リンパ腫では MCLs の一つであるクラリスロマイシン (CAM) を含む除菌治療が有効であったり、CAM 長期投与が有効である症例も散見し、我々も肺 MALT リンパ腫に対して CAM 長期投与が有効であった 2 症例を経験し、症例報告を行った。そこで、MALT リンパ腫に対する MCLs の直接的な抗腫瘍効果を有するか検証を行った。

2. 研究の目的

(1) 当院および関連施設で MALT リンパ腫と診断された症例の病変組織を用いて、Bcl-xL などアポトーシス関連抗原の発現を確認し、症例の HP 除菌あるいは MCLs 長期療法 (CAM など) による MALT リンパ腫への効果に関して検討を行う。

(2) また、in Vitro において第 14 員環系 MCL である CAM と第 16 員環系 MCL であるアジスロマイシン (AZM) のリンパ球のアポトーシス誘導能を単独暴露群、併用暴露群のそれぞれで効果を検討し、抗腫瘍効果への相加効果の有無、または作用機序の違いを検討する。

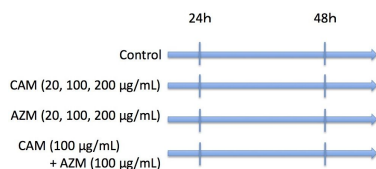
3. 研究の方法

(1) 臨床症例の生検や手術により得られた MALT リンパ腫の未染標本を用いて、アポトーシスに関連し、アポトーシスシグナル伝達の抑制型として Bcl-xL などの発現に関して DAB 発色による免疫染色を行い、染色の程度やその局在を確認する。また、Bcl-xL 等の免疫染色の結果と臨床症例の CAM を含む HP 除菌治療、あるいは MCL (CAM) 長期療法による MALT リンパ腫の予後との関係を検討する。

(2) 健康人の末梢血液からリンパ球を単離し、CAM 含有 10%FCS RPMI1640 培地 (20 µg/mL、100 µg/mL、200 µg/mL) と AZM 含有同培地 (20 µg/mL、100 µg/mL、200 µg/mL) さらに CAM (100 µg/mL) と AZM (100 µg/mL) 含有の併用同培地で培養した。培養 24 時間後、48 時間後に Annexin V アポトーシスキットおよび FITC でラベルした各抗 Fas、抗 Fas-ligand、抗 NFkB、抗 Bcl-2、抗 Bcl-xL 抗体を反応させて、フロー

サイトメーターで解析を行う。
(図 1)

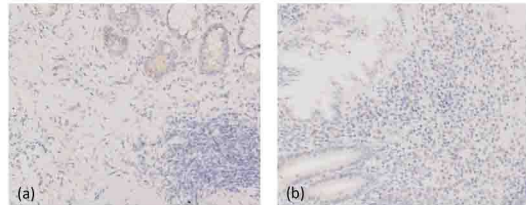
図 1



4. 研究成果

(1-i). MALT リンパ腫 Bcl-xL 発現の分布

臨床で得られた MALT リンパ腫の病理組織に関して、免疫染色を用いて Bcl-xL 発現分布・部位ならびに程度を確認した。胃および肺いずれの病変においても浸潤しているリンパ球に Bcl-xL 発現を明瞭に確認できない症例 [図 2(a)]と明瞭に確認できる症例[図 2(b)]が認められた。また、胃 MALT リンパ腫の場合、図 2(a)のように胃腺細胞に Bcl-xL の強い発現を確認できる症例も認めた。



胃腺細胞にBcl-xL (++)
リンパ球にBcl-xL (-)
胃腺細胞にBcl-xL (+)
リンパ球にBcl-xL (+)

図 2. MALT リンパ腫 Bcl-xL 発現

(1-ii). MALT リンパ腫 Bcl-xL 発現と CAM 投与に対する反応の比較検討

臨床で得られた MALT リンパ腫の病理組織に関して、免疫染色を用いて Bcl-xL に関して発現強度、発現部位を評価し、さらに症例の CAM 投与に伴う MALT リンパ腫への反応性を検証した。CAM 投与に奏功し、反応が良好であったものは、胃 MALT リンパ腫[図 3(a)]、肺 MALT リンパ腫[図 3(b)]ともにリンパ球に Bcl-xL 発現を認めた。また、一方で CAM 投与に反応が乏しかった症例では、胃 MALT リンパ腫[図 3(c)]、肺 MALT リンパ腫[図 3(d)]ともにリンパ球に Bcl-xL 発現は明らかではなかった。

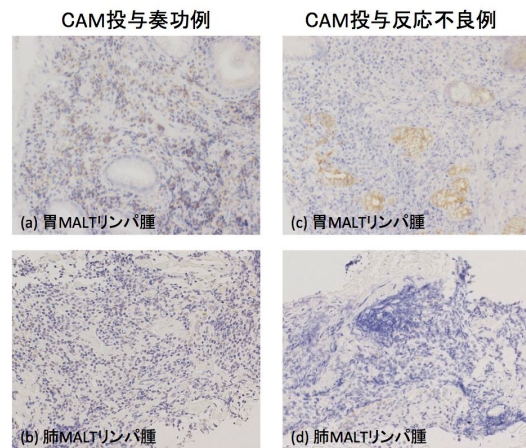


図 3. Bcl-xL 発現と CAM 反応の検討

(2-i). in Vitro におけるヒト末梢血液リンパ球へ MCL のアポトーシス誘導の相加効果

フローサイトメーター用の Annexin V を用いたアポトーシス検出キットを使用して各濃度 MCL (CAM、AZM) 暴露下、また CAM+AZM

両 MCL 暴露下でリンパ球へのアポトーシス誘導能を確認したところ、図 4 (24 時間後)、図 5 (48 時間後) のような結果を示した (図 4、図 5 は同実験の結果を代表する結果である)。

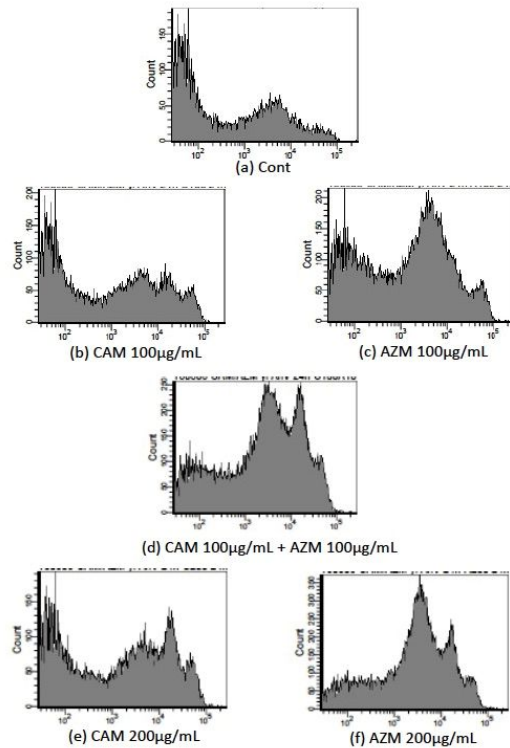


図 4 .MCL 投与 24 時間後 Annexin V 発現

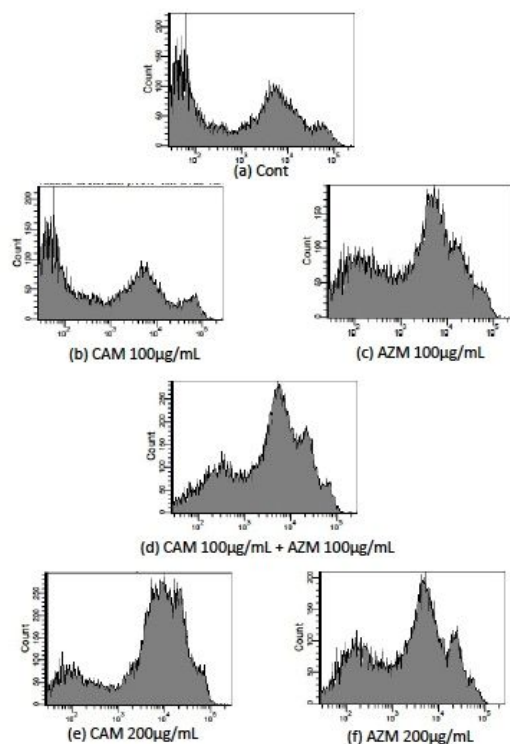


図 5.MCL 投与 48 時間後 Annexin V 発現

MCL 投与 24 時間後、48 時間後ともにリンパ

球の Annexin V の発現は CAM、AZM 投与により、濃度依存性に増強していた。また、同濃度の場合、CAM より AZM の方が Annexin V の発現は増強していた。また、CAM 100µg/mL と AZM 100µg/mL の併用投与では CAM 100µg/mL 単剤、AZM 100µg/mL 単剤の場合より、Annexin V の発現は強く、CAM 200µg/mL 単剤、AZM 200µg/mL 単剤の場合濃度と同程度の発現を認めた。

(2-ii) in Vitro におけるヒト末梢血液リンパ球へ MCL によるアポトーシス関連 Fas、Fas-ligand、NFkB、Bcl2、Bcl-xL の発現における相加効果

フローサイトメーターを用いて、Fas、Fas-ligand、NFkB、Bcl-2、Bcl-xL に対する MCL の効果を見たところ、結果を示さないが Fas-ligand、NFkB、Bcl-2 に関しては、MCL 投与に伴う有意な影響は認めなかった。

図 6 は MCL 投与 24 時間後の Fas の発現を示したものである。Fas の発現に関しては、図 6 (a) CAM 100µg/mL や同 (b) AZM 100µg/mL の濃度では Fas の誘導は軽微であったが、同 (c) CAM 100 µg/mL+AZM 100 µg/mL において、増強し、同 (d) CAM 200µg/mL、(e) AZM 200µg/mL と同程度の発現を認め、Fas の発現に関しても相加作用は認められた。

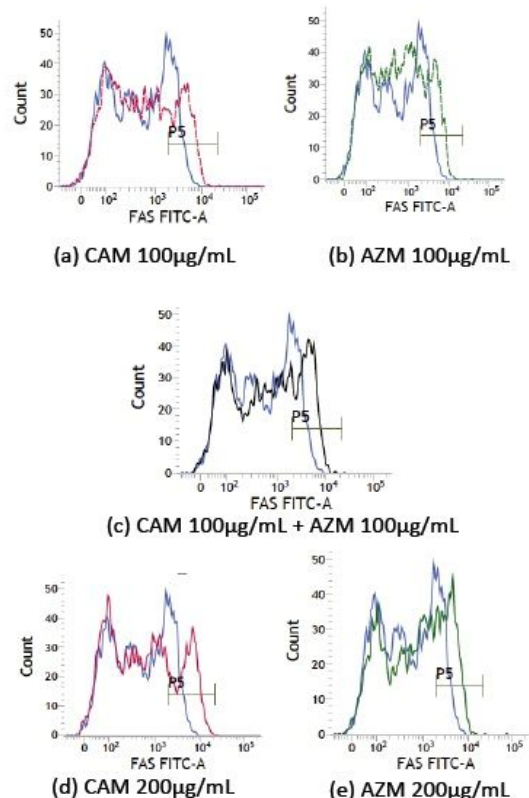


図 6. MCL 投与 24 時間後 Fas 発現

(青線はコントロールであり、(a)赤破線が CAM 100 µg/mL、(b)緑破線が AZM 100 µg/mL、(c)黒線が CAM 100 µg/mL+AZM 100 µg/mL、(d)赤線が CAM 200 µg/mL、(e)緑線が AZM 200 µg/mL である。)

図 7 は MCL 投与 24 時間後の BCL-xL の発現

を示したものである。Bcl-xL の発現に関しては、図 7(a)CAM 100 μ g/mL でコントロールに比べて若干、発現が抑えられていたが、同 (b)AZM 100 μ g/mL、同 (c) CAM 100 μ g/mL+AZM 100 μ g/mL 同 (d)CAM 200 μ g/mL、(e)AZM 200 μ g/mL では発現が抑制する傾向が認められた。

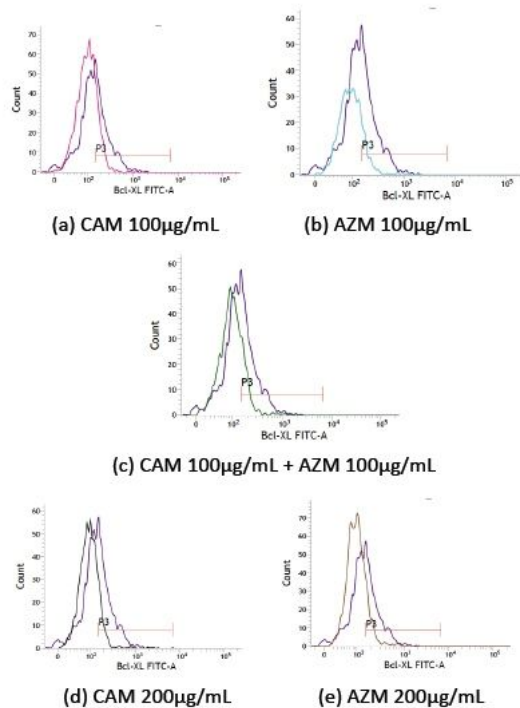


図 7. MCL 投与 24 時間後 Bcl-xL 発現 (紫線はコントロールであり、(a)赤線が CAM 100 μ g/mL、(b)青破線が AZM 100 μ g/mL、(c)緑線が CAM 100 μ g/mL+AZM 100 μ g/mL、(d)黒線が CAM 200 μ g/mL、(e)茶色線が AZM 200 μ g/mL である。)

(3). 結論

MALT リンパ腫病理組織において、MCL である CAM を含む HP 除菌治療や MCL 単独投与により、MALT リンパ腫の反応が良好であった症例では、リンパ球上に Bcl-xL が発現していたのに対し、MCL 投与による MALT リンパ腫の反応が乏しかった症例では Bcl-xL の発現をほとんど認めなかった。

また、in Vitro において MCL である CAM、AZM は 100 μ g/mL、200 μ g/mL と高濃度の存在下ではリンパ球に対してアポトーシスを誘導する効果を有しており、しかも CAM、AZM を同時投与した場合、相加効果を認めた。また、その機序としては Bcl-xL の発現を抑制することに寄与する可能性が示唆された。

以上より MALT リンパ腫を構成するリンパ球に Bcl-xL 発現が認められた場合、MALT リンパ腫で MCL 投与が期待され、その一つの機序として MCL が発現している Bcl-xL を抑制し、アポトーシスを誘導することによることが示唆された。

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 1 件)

1. Ishimatsu Y, Mukae H, Sakamoto N. Activity of clarithromycin in mucosa-associated lymphoid tissue-type lymphomas: anti-proliferative drug or simple antibiotic? Chest 139: author reply 725-726, 2011. 査読あり doi:10.1378/chest.10-2768

〔学会発表〕(計 2 件)

1. 原田達彦、原 敦子、石松祐二、他「クラリスロマイシン耐性化後、15 員環系マクロライド薬が有効であった MALT リンパ腫の 1 例」第 15 回 長崎マクロライド研究会.2014 年 1 月 28 日.ホテルニュー長崎(長崎県、長崎市)

2. 原 敦子、石松祐二、由良博一、他「マクロライド系抗菌薬投与が有効であったシェーグレン症候群合併 MALT リンパ腫の 1 例」第 18 回マクロライド新作用研究会.2011 年 7 月 16 日. 北里大学 コンベンションホール (東京都、港区)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等 なし

6 . 研究組織

(1)研究代表者

石松 祐二 (ISHIMATSU, Yuji)
長崎大学医歯薬総合研究科(保健学科)教授
研究者番号：40533899