

## 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：32645

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592655

研究課題名(和文) 眼内悪性リンパ腫の病態解明ならびに新規治療に向けた研究

研究課題名(英文) Investigation of pathogenesis and novel treatment for intraocular lymphoma

研究代表者

後藤 浩(Goto, Hiroshi)

東京医科大学・医学部・教授

研究者番号：10201500

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：原発眼内リンパ腫は、その多くが中枢神経系リンパ腫を併発するため5年生存率が約60%と生命予後不良な疾患である。一般に診断には硝子体を用いた細胞診などが行われるが、眼内液中の40種類以上の液性因子を網羅的に検索したところ、BCA-1などの新たな診断マーカーを同定することができた。また眼内に浸潤した細胞のゲノムを網羅的に解析したところ、IL-10遺伝子が存在するchromosome 1qなどの特定の遺伝子では高頻度にコピー数が増加しており、この染色体に異常のある患者は有意に眼内液中のIL-10濃度が高く生命予後とも相関することが判明した。

これらのデータは新たな治療法の開発に繋がることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Five year survival rate of primary intraocular lymphoma (PIOL) is approximately 60 %, because most the patients develop central nervous system lymphoma.

In this study, we detected new diagnostic marker including BCA-1 by analyzing multiple humoral factors in the vitreous of patients with PIOL. We also identified recurrent copy number gain regions in PIOL, most frequently on chromosome 1q. In addition, there was a correlation between gain of the IL-10 gene and intravitreal interleukin-10 concentration. We have reported that life prognosis of the patients with higher concentration of IL-10 in the vitreous is worse compared to those with lower. These data may contribute to understand pathogenesis of PIOL and develop a novel treatment for patients with PIOL.

研究分野：ぶどう膜炎・眼腫瘍・眼窩疾患・眼形成・眼病理

キーワード：眼内悪性腫瘍 眼内リンパ腫 ぶどう膜炎 サイトカイン ケモカイン BCA-1 IL-10

1. 研究開始当初の背景

眼内に発生するリンパ腫は、組織学的にはびまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫に相当し、その多くが経過中に中枢神経系にリンパ腫を生じるため、5 年生存率は約 60% と極めて生命予後不良な疾患である。眼内リンパ腫は近年増加傾向にあるが、ぶどう膜炎との鑑別が容易でないことから治療が遅れがちとなる点は憂慮すべき問題である。申請者が平成 20 年に実施した“眼内リンパ腫の多施設全国調査”によれば、本症の生命予後には確定診断の遅れとともに、発症時の年齢、や硝子体液中の IL-10 値等が関与することが明らかとなっている。B 細胞系の悪性腫瘍は B 細胞が分化・成熟していく過程で腫瘍化し、制御不能な増殖を繰り返すことによって生じるとされる。眼内リンパ腫の多くは B 細胞由来であるが、その理由として眼内で発現されるケモカインやサイトカインの多くが B 細胞の遊走に関与することが報告されている。また、機能的に異なる B 細胞のサブセットには、それぞれ特異的に発現するケモカインレセプターの存在が知られているため、眼内リンパ腫に特異的に発現するケモカインレセプターを解析することは、増殖する異型リンパ球の起源や病態解明の一助につながると考えられる。現在までに眼内リンパ腫の病態に関与するケモカインとして CXCR4、CXCR5、BLC、SDF-1 などが報告されているが(Chan, et al. Ophthalmology, 2003), ケモカインは現時点でも 40 種類以上もの存在が知られており、個々のケモカインの相互作用については不明な点も少なくない。したがって眼内リンパ腫の眼内におけるケモカインやサイトカインを網羅的に解析することが、本症の病態解明を進めていく上で重要と考えられる。本来、正常な眼内に B 細胞はほとんど存在しないため、何らかの病的状態では眼内組織由来のサイトカイン、ケモカイン、ケモカインレセプターによって B 細胞が眼内局所に誘導されるメカニズムが推測される。B 細胞が眼内へのホーミングを生じた後には、ケモカインやサイトカインの作用によって腫瘍性に分化、増殖している可能性なども報告されている(Grary-Gouy, et al. Blood, 2002, Kakinuma, et al. J Leukoc Biol, 2006)。さらに、眼内リンパ腫の多くが数年後に脳や脊髄などの中枢神経系に病変が生じるため、眼内や中枢神経に発現しているサイトカインやケモカインによって眼内リンパ腫が選択的に中枢神経に病変を生じている可能性が推察される。

2. 研究の目的

眼内悪性リンパ腫の眼内液中の液性因子の発現を網羅的に検索することによって臨床症状や生命予後との関係を解析し、今後の本疾患に対する治療戦略として応用していくことを目的とする。

3. 研究の方法

眼内リンパ腫の眼内液を用いて Cytometric beads array 法により 40 種類以上のサイトカイン、ケモカイン、増殖因子、アポトーシス関連因子(IL-1, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, TNF-, TNF-, IFN-, MCP-1, MIP-1, MIP-1, IP-10, Mig, SDF-1, SDF-1, BLC, RANTES, TARC, LARC, ELC, SLC, Fractalkine, VEGF, PEDF, LT-, Angiogenin, basic FGF, Fas Ligand, Eotaxin, GM-CSF, G-CSF, OSM)を網羅的に検索し、特に発現量の高いものを眼内リンパ腫症例の眼内から得られるリンパ腫細胞ならびに末梢血 B 細胞とともに共培養し、増殖能や分化能を解析する。また、これらのケモカイン・サイトカインと各症例の臨床像との相関、予後との関連を分析し、診断用マーカーや予後因子としての可能性のほか、新規治療法の開発の基礎データとする。また、発現の高かったサイトカインやケモカインの一塩基多型を調べ、遺伝子学的関与を検索する。

4. 研究成果

1) 眼内リンパ腫の眼内液における液性因子の網羅的解析と診断への応用

眼内リンパ腫の眼内液には、B 細胞増殖因子である bFGF, IL-10, MCP-1, B 細胞の遊走に関連した BCA-1, SDF-1a, 悪性腫瘍に伴った炎症因子である IFN $\gamma$ , IL-6, IL-8, IP-10, MIP-1a, MIP-1b, Mig などが有意に上昇していた(以下 Table)。

	Vitreoretinal B cell lymphoma (n = 28)	Control subjects (n = 27)	p values
Age (years)			
Angiogenin (pg/ml)	3823.8 (2348.5-5004.7)	3260.1 (2242.8-4158.1)	0.4795
BCA-1 (pg/ml)	9949.0 (429.2-1664.9)	12.0 (2.8-18.1)	<0.0001
bFGF (pg/ml)	52.9 (0-114.8)	11.3 (0-17.5)	0.0416
CD40 ligand (pg/ml)	2.4 (0-0.9)	1.5 (0-0)	0.7876
Eotaxin (pg/ml)	2.9 (0-0)	0.6 (0-0)	0.9195
Fas ligand (pg/ml)	59.4 (6.4-80.3)	1.0 (0-0)	<0.0001
Fractalkine (pg/ml)	16.3 (0-4.6)	8.7 (0-0)	0.6374
G-CSF (pg/ml)	1.3 (0-0)	0.2 (0-0)	0.4795
GM-CSF (pg/ml)	0.2 (0-0)	0.1 (0-0)	0.8202
Granzyme A (pg/ml)	88.1 (26.4-148.3)	0.6 (0-0)	<0.0001
Granzyme B (pg/ml)	152.5 (0-67.3)	1.1 (0-0)	0.0004
IFN- $\gamma$ (pg/ml)	5.6 (0-7.7)	0	0.0031
IL-1 $\alpha$ (pg/ml)	3.3 (0-0)	0	0.3633
IL-1 $\beta$ (pg/ml)	0	0.2 (0-0)	0.3458
IL-2 (pg/ml)	0	0.5 (0-0)	0.7941
IL-3 (pg/ml)	0.7 (0-0)	0.3 (0-0)	0.6616
IL-4 (pg/ml)	1.1 (0-0)	0	0.6494
IL-5 (pg/ml)	0	0.1 (0-0)	0.9866
IL-6 (pg/ml)	128.6 (27.2-95.0)	24.8 (1.3-12.7)	<0.0001
IL-8 (pg/ml)	159.6 (26.5-155.8)	7.5 (1.5-11.0)	<0.0001
IL-9 (pg/ml)	0.5 (0-0)	0.2 (0-0)	0.9866
IL-10 (pg/ml)	2367.5 (474.4-2776.5)	0.1 (0-0)	<0.0001
IL-11 (pg/ml)	7.5 (0-0)	0	0.1727
IL-12p70 (pg/ml)	0.8 (0-0)	0.1 (0-0)	0.9866
IL-17A (pg/ml)	2.5 (0-0)	1.5 (0-0)	0.6862
IL-21 (pg/ml)	24.9 (0-0)	0	0.1727
IP-10 (pg/ml)	2026.9 (393.3-3522.9)	59.8 (20.5-64.8)	<0.0001
ITAC (pg/ml)	318.4 (0-10.0)	2.3 (0-0)	0.232
LT- $\alpha$ (pg/ml)	0	0.1 (0-0)	0.7941
MCP-1 (pg/ml)	8874.6 (2961.2-13250.0)	367.8 (221.9-391.5)	<0.0001
Mig (ng/ml)	237.4 (0.4-8.6)	0	<0.0001
MIP-1 $\alpha$ (pg/ml)	12.2 (2.9-16.4)	0.1 (0-0)	<0.0001
MIP-1 $\beta$ (pg/ml)	74.9 (33.4-108.5)	2.6 (0-2.0)	<0.0001
OSM (pg/ml)	8.3 (0-11.8)	0.8 (0-0)	0.0004
RANTES (pg/ml)	22.9 (0-27.3)	0.3 (0-0)	0.0001
SDF-1 $\alpha$ (pg/ml)	816.8 (343.1-794.8)	220.6 (16.3-327.6)	<0.0001
TNF- $\alpha$ (pg/ml)	0.4 (0-0)	0	0.4953
VEGF (pg/ml)	180.0 (0-12.9)	15.1 (0-0)	0.192

Immune mediator levels are expressed as mean with interquartile range in parenthesis.  
 BCA-1 = B cell-attracting chemokine-1; bFGF = basic fibroblast growth factor;  
 G-CSF = granulocyte-colony stimulating factor; GM-CSF = granulocyte macrophage-colony stimulating factor; IFN = interferon; IL = interleukin; IP-10 = interferon gamma-induced protein 10 kDa; ITAC = interferon-inducible T-cell alpha chemoattractant; LT- $\alpha$  = lymphotoxin- $\alpha$ ;  
 MCP = monocyte chemoattractant protein; MIG = monokine induced by interferon  $\gamma$ ;  
 MIP = macrophage inflammatory protein; OSM = oncostatin M; RANTES = regulated upon activation, normal T expressed, and presumably secreted; SDF = stromal cell-derived factor;  
 TNF = tumor necrosis factor; VEGF = vascular endothelial growth factor

眼内リンパ腫とぶどう膜炎群の眼内液を比較したところ、B細胞の増殖に関わる IL-10、bFGF、B細胞の遊走に関連した BCA-1 と SDF-1、単球やT細胞およびB細胞の遊走に関連した MCP-1、MIP-1、MIP-1、血管透過性および新生血管に関連した VEGF が有意に上昇することを報告した。以上の結果から、ぶどう膜炎との鑑別に硝子体液中の IL-10/IL-6 以外にも BCA-1 などの液性因子を測定することで、眼内リンパ腫の診断効率が上昇することを報告した (以下 Table)。

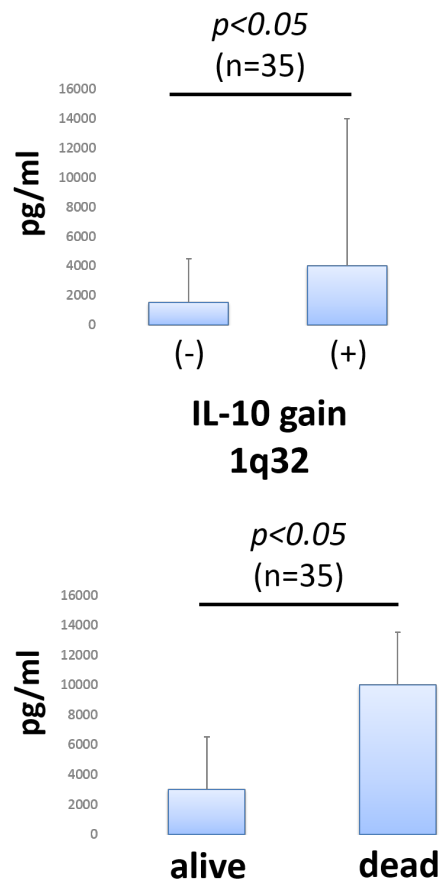
Invest Ophthalmol Vis Sci 誌(53:5395-5402, 2012)

Table.			
	Vitreoretinal B cell lymphoma uveitis		
	(n = 28)	(n = 26)	p values
Age (years)			
Angiogenin (pg/ml)	3823.8 (2348.5-5004.7)	7639.1 (3866.8-9422.7)	0.0045
BCA-1 (pg/ml)	9949.0 (429.2-1664.9)	274.1 (16.3-408.7)	<0.0001
bFGF (pg/ml)	52.9 (0-114.8)	5.5 (0-11.4)	0.0181
CD40 ligand (pg/ml)	2.4 (0-0.9)	2.0 (0-0)	0.5915
Eotaxin (pg/ml)	2.9 (0-0)	1.3 (0-0)	0.9586
Fas ligand (pg/ml)	59.4 (6.4-80.3)	33.4 (8.8-47.7)	0.3820
Fractalkine (pg/ml)	16.3 (0-4.6)	18.1 (0-25.4)	0.0347
G-CSF (pg/ml)	1.3 (0-0)	9.8 (0-4.7)	0.1132
GM-CSF (pg/ml)	0.2 (0-0)	0	0.8219
Granzyme A (pg/ml)	88.1 (26.4-148.3)	486.3 (1.6-42.7)	0.0019
Granzyme B (pg/ml)	152.5 (0-67.3)	66.4 (0-52.0)	0.4672
IFN-γ (pg/ml)	5.6 (0-7.7)	15.1 (0-18.0)	0.0386
IL-1α (pg/ml)	3.3 (0-0)	1.7 (0-0)	0.6778
IL-1β (pg/ml)	0	1.6 (0-0)	0.3323
IL-2 (pg/ml)	0	1.2 (0-0)	0.5975
IL-3 (pg/ml)	0.7 (0-0)	0.4 (0-0)	0.6652
IL-4 (pg/ml)	1.1 (0-0)	0	0.6526
IL-5 (pg/ml)	0	0	0.8219
IL-6 (pg/ml)	128.6 (27.2-95.0)	825.1 (128.6-912.7)	<0.0001
IL-8 (pg/ml)	159.6 (26.5-155.8)	372.0 (58.1-352.9)	0.1000
IL-9 (pg/ml)	0.5 (0-0)	0	0.6526
IL-10 (pg/ml)	2367.5 (474.4-2776.3)	21.7 (6.0-24.6)	<0.0001
IL-11 (pg/ml)	7.5 (0-0)	0.6 (0-0)	0.4360
IL-12p70 (pg/ml)	0.8 (0-0)	0.2 (0-0)	1.000
IL-17A (pg/ml)	2.5 (0-0)	0.4 (0-0)	0.8085
IL-21 (pg/ml)	24.9 (0-0)	3.5 (0-0)	0.3323
IP-10 (pg/ml)	2026.9 (393.3-3522.9)	42859.8 (1708.3-100124.0)	0.0010
ITAC (pg/ml)	318.4 (0-10.0)	19.3 (0-30.8)	0.1769
LT-α (pg/ml)	0	0	0.8219
MCP-1 (pg/ml)	8874.6 (2961.2-13250.0)	1878.4 (848.4-2908.6)	<0.0001
Mig (ng/ml)	237.4 (0.4-8.6)	2.9 (0.6-3.5)	0.6778
MIP-1α (pg/ml)	12.2 (2.9-16.4)	6.4 (0-7.6)	0.0140
MIP-1β (pg/ml)	74.9 (33.4-108.5)	51.0 (6.9-51.4)	0.0033
RANTES (pg/ml)	22.9 (0-27.3)	64.1 (0-40.0)	0.9310
SDF-1α (pg/ml)	816.8 (343.1-794.8)	348.9 (81.2-482.1)	0.0075
TNF-α (pg/ml)	0.4 (0-0)	0.1 (0-0)	0.9931
VEGF (pg/ml)	180.0 (0-12.9)	140.9 (0-66.3)	0.0279

Immune mediator levels are expressed as mean with interquartile range in parenthesis.  
 BCA-1 = B cell-attracting chemokine-1; bFGF = basic fibroblast growth factor;  
 G-CSF = granulocyte-colony stimulating factor; GM-CSF = granulocyte macrophage-colony stimulating factor; IFN = interferon; IL = interleukin; IP-10 = interferon gamma-induced protein 10 kDa; ITAC = interferon-inducible T-cell alpha-chemoattractant; LT-α = lymphotoxin-α;  
 MCP = monocyte chemoattractant protein; MIG = monokine induced by interferon γ;  
 MIP = macrophage inflammatory protein; RANTES = regulated upon activation, normal T expressed, and presumably secreted; SDF = stromal cell-derived factor; TNF = tumor necrosis factor;  
 VEGF = vascular endothelial growth factor

2) 眼内リンパ腫における遺伝子および染色体異常の網羅的解析と臨床との相関  
 近年、生命予後不良な悪性腫瘍に対する染色体および遺伝子の解析は、その重要性を増しており、予後を推測する上でも欠かせない評価項目となっている。このような背景から、眼内リンパ腫の病態や予後の解析につながるべく、染色体およびゲノムの網羅的解析を行った。アレイとして、網羅的かつ高解像度で微細なゲノムの異常を検出することが可能な高感度 SNP アレイ(Affymetrix 社製 GeneChip Human Mapping 250K array)を用いた。解析ソフトとしては Copy number Analyzer for GeneChip (CNAG)を使用した。その結果、chromosome 1q(76%)、18q(70%)、19q(70%)に高頻度にコピー数の増加、chromosome 6q(30%)にコピー数の減少をみと

めた。特に chromosome 1q32.1 上には IL-10 遺伝子が存在し、この染色体に異常のある患者は有意に眼内液中の IL-10 濃度も高く、生命予後と相関するという結果が得られた(下図)。さらに、近年ゲノムの異常として注目されている uniparental disomy (UPD:片親性ダイソミー)が chromosome 9p, 9p, 10q, 11p, 11q, 19p, 19q, 21q にみられた。また、これらのゲノムの異常は、脳原発リンパ腫と眼内原発リンパ腫で相違がみられたことから、眼内原発のリンパ腫は脳内原発リンパ腫とはゲノム異常の観点からは異なる病態である可能性が示唆された。  
 Cancer Science 誌(105:592-9, 2014)



## 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5件)

Wang L, Sato-Otsubo A, Sugita S, Takase H, Mochizuki M, Usui Y, Goto H, Koyama T, Akiyama H, Miura O, Ogawa S, Arai A.: High-resolution genomic copy number profiling of primary intraocular lymphoma by single nucleotide polymorphism microarrays. Cancer Sci:105:592-599, 2014. 査読 有 DOI: 10.1111/cas.12388.

後藤 浩: 眼底疾患と悪性腫瘍 原発性眼内リンパ腫. 臨床眼科 68: 42-49, 2014.

査読 無

Mikami R, Nakayama H, Goto H, Kimura K, Usui Y, Nogi S, Tajima Y, Okubo M, Kanesaka N, Sugahara S, Tokuyue K. Preliminary results of radiotherapy for primary intraocular non-Hodgkin lymphoma. Leuk Lymphoma 54:2181-2184, 2013. 査読 有 DOI: 10.3109/10428194.2013.769216.

後藤 浩: 眼内リンパ腫. 臨床眼科 66: 126-131, 2012. 査読 無

Kimura K, Usui Y, Goto H, The Japanese Intraocular Lymphoma Study Group. Clinical features and diagnostic significance of the intraocular fluid of 217 patients with intraocular lymphoma. Jpn J Ophthalmol: 56: 383-389, 2012. 査読 有 DOI: 10.1007/s10384-012-0150-7.

〔学会発表〕(計4件)

Goto H: Symposium: The pathology of ocular tumors. The Pathology of intraocular lymphomas. 34<sup>th</sup> World congress of ophthalmology. Tokyo, Japan. Apr. 3, 2014.

Goto H: Symposium: Evaluation of ocular fluids to reveal disease mechanisms. Analysis of intraocular fluids to diagnose intraocular lymphoma. 12<sup>th</sup> International ocular inflammation society congress, Valencia, Spain. Feb 28, 2014.

Goto H: Intraocular inflammation / uveitis; diagnosis one should not miss; infectious uveitis and masquerade syndrome: Masquerading intraocular tumors. First Indo-China meeting on ocular inflammations and infections / Uveitis meeting, Siem Reap, Cambodia. December 8, 2012.

Usui Y, Wakabayashi Y, Okunuki Y, Mori H, Kezuka T, Goto H: Immune mediators in vitreous fluids from patients with vitreoretinal B cell lymphoma. Annual meeting: Association for research in vision and ophthalmology (ARVO) 2012 Fort Lauderdale, U.S.A. May 9, 2012.

〔図書〕(計1件)

木村圭介, 後藤 浩: 眼内リンパ腫の診断と治療. 眼科臨時増刊号 眼科診療指針のパラダイムシフト, 248-257, 2014. 金原出版.

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

後藤 浩 (GOTO, Hiroshi)  
東京医科大学・医学部・教授  
研究者番号: 10201500

(2) 研究分担者

臼井 嘉彦 (USUI, Yoshihiko)  
東京医科大学・医学部・講師  
研究者番号: 50408142

(3) 研究分担者

山川 直之 (YAMAKAWA, Naoyuki)  
東京医科大学・医学部・助教  
研究者番号: 80599134