

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 6 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23790398

研究課題名（和文）悪性リンパ腫内に浸潤するマクロファージでの特性と予後についての検討
 研究課題名（英文）Investigation into the relationship between prognosis and characteristics of macrophages in malignant lymphomas

研究代表者

和田 直樹 (WADA NAOKI)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：80521731

研究成果の概要（和文）：瀰漫性大細胞型 B 細胞性リンパ腫（DLBCL）、ホジキンリンパ腫（HL）について M1 型 TAM (tumor-associated macrophage) [HLA-DR+/CD68+]、M2 型 TAM [CD163+/CD68+] の役割を検討した。DLBCL において M2-TAM が多いと有意に予後不良であった。DLBCL のうち既存リンパ濾胞を残しながら濾胞間領域で増殖する DLBCL (DLBCL-IF) は通常組織所見を示す DLBCL より有意に予後良好であった。また、M2-TAM の少ない DLBCL-IF 患者は全て観察終了時点で生存していた。HL において M2-TAM が多いと有意に予後不良であった。また、HL のうち混合細胞型に限定すると、M1-TAM が多いと有意に予後良好であった。

研究成果の概要（英文）：Immunohistochemical double staining with antibodies for HLA-DR/CD68 (markers for M1-tumour-associated macrophage [M1-TAM]) or CD163/CD68 (M2-TAM) was performed to investigate the significance of TAMs in diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) and Hodgkin lymphoma (HL). In DLBCL, a higher number of M2-TAM was a significant factor for poor prognosis. The overall survival rate of the patients with DLBCL-IF, DLBCL showing an interfollicular pattern of proliferation preserving lymphoid follicles, was significantly better than those with DLBCL control group. All DLBCL-IF patients with a low M2-TAM count were alive at the end of observation. In HL, a higher number of M2-TAM was significantly correlated with shorter overall survival. When confined to mixed cellularity subtype of HL, a higher number of M1-TAM was significantly correlated with favorable prognosis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科学費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：血液、悪性リンパ腫

1. 研究開始当初の背景

(1) マクロファージは M1 型と M2 型に分けられる。M1 型の主な働きは病原微生物や腫瘍細胞を殺すこと、M2 型の主な働きは免疫を抑制すること（炎症を鎮め、残屑を貪食・掃除し、組織修復を促進する一方、腫瘍については進

行性に働く可能性がある) と考えられている。しかし、本研究開始当初、悪性リンパ腫におけるそれらの役割は十分確定していなかった。

(2) DLBCL は全リンパ腫の 30-40% を占める最も頻度の高い非ホジキンリンパ腫で、臨床経

過のうえから予後不良な高悪性度リンパ腫に分類される。DLBCL は多様な疾患群よりなるため治療法の選択を困難にしていることから、近年、DLBCL の層別化が試みられている。DLBCL の層別化として、遺伝子発現プロファイリングを用いてDLBCL をgerminal center B-cell type (GCB)とnon-GCB に分ける試みがなされ、GCB とnon-GCBの頻度はほぼ1:1 であり、GCB はnon-GCB より予後良好であると報告された。その後、CD10、bc16、MUM1 の各種蛋白発現を免疫組織化学的に検討することによってGCB とnon-GCB に分類することが提唱された。しかしながら、DLBCL の層別化は未だ十分とは言えず、一層の研究の進展が期待されている。

(3)以上の背景をふまえて、DLBCL 腫瘍組織中のマクロファージ (tumor-associated macrophage : TAM)の性質に基づいてDLBCL の層別化を試みる。また、HLについても検討する。

2. 研究の目的

(1)TAM の性質に基づいてDLBCL の層別化を試みる。上述のごとくマクロファージにはM1, M2 型が存在することが知られており、M1 型は主として腫瘍抑制性に、M2 型は主として腫瘍進行性に働く可能性がある。よって、DLBCL のTAM に関してM1, M2 型と予後との関係を検討する。なお、TAM の亜型については、CD68+/HLA-DR+(二重免疫染色)をM1-TAM、CD68+/CD163+ (二重免疫染色)をM2-TAM とする。

(2)既存リンパ濾胞を残しながら濾胞間領域で増殖する非ホジキンリンパ腫は通常はT 細胞性リンパ腫であるが、稀にDLBCL でも同様の増殖パターンがみられ (DLBCL-IF) 、DLBCL-IF12 例の特徴が報告された。その際、

DLBCL-IF は通常の組織所見を示すDLBCL より予後が良い傾向を示したが、症例数が少ないため統計学的に有意な結果ではなかった。DLBCL-IF 症例をさらに収集し、予後およびリンパ腫細胞の特性を検討する。また、DLBCL-IF は通常のDLBCL に比べて多彩な細胞浸潤を伴う頻度が高いので、TAM にも着目し、M1, M2 型について検討する。

(3)ホジキンリンパ腫においてTAM (CD68 陽性細胞) 浸潤が強いと予後不良であることが報告された。よって、ホジキンリンパ腫でもTAM をM1, M2 型に分けてそれらと予後との関係を検討する。

3. 研究の方法

(1)本研究代表者の研究室は 1999 年に設立された大阪リンパ腫研究会 (OLSG) の病理中央診断事務局を務める。豊富な症例が登録され、登録された悪性リンパ腫症例は全て免疫染色が行われ、必要に応じてクローナリティ解析も併用のうえ、WHO 分類に基づく分類がなされる。このシステムを活用のうえ、臨床情報や未染色標本の収集を行う。収集手段は郵便及び施設の訪問による。

(2)HE 染色標本、免疫染色標本を検討する。免疫染色に用いる主な抗体の種類は CD20、CD79a、CD3、CD10、bc16、MUM1、MIB-1、CD4、CD8、CD56、TIA-1、CD138、CD68、HLA-DR、CD163 である。CD68、HLA-DR、CD163 についてはCD68/HLA-DR、CD68/CD163 の二重免疫染色を行う。

(3)必要に応じて、パラフィン切片を用いた In situ hybridization 法を行う。EBER PNA プローブ/FITC 標識および ENVISION+ポリマー試薬による DAB 発色 in situ hybridization 検出法により、鮮明で解像

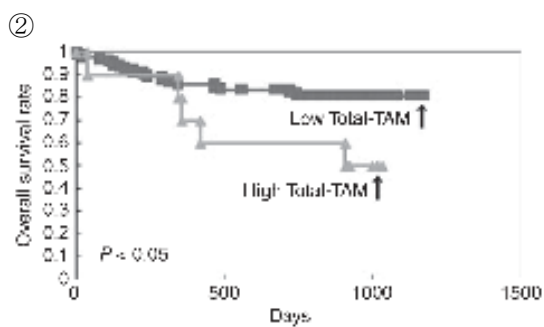
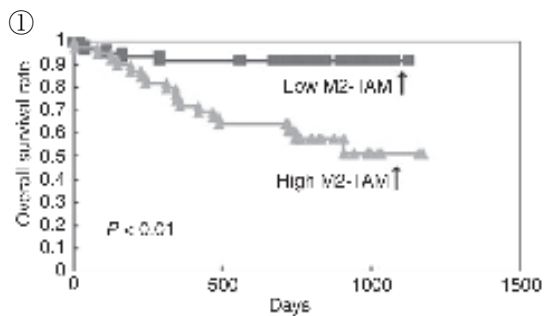
度の高い EBER 染色結果を永久保存標本として得ることができる。

(4) 必要に応じて、材料から抽出した DNA を用いた PCR・GeneScan によるクローナリティ解析を行う。

(5) マクロファージ (M1, M2 型) の出現と患者予後との関係を単変量、多変量解析により検討する。

4. 研究成果

(1) DLBCL 101 例の検討において、M2-TAM が多いと有意に予後不良であった。以下に結果をまとめた図表を載せる。①は M2-TAM が多い群と少ない群の生存曲線をカプラン・マイヤー法で求め、ログ・ランクテストで比較した単変量解析の結果である ($p < 0.01$)。②は Total (M1+M2)-TAM が多い群と少ない群の生存曲線をカプラン・マイヤー法で求め、ログ・ランクテストで比較した単変量解析の結果である ($p < 0.05$)。③は多変量解析の結果であり、M2-TAM が独立した予後不良因子であることが示された ($p < 0.05$)。

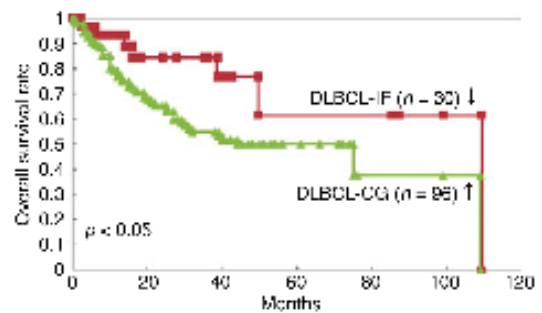


③

Multivariate analysis of clinicopathological factors for overall survival in 101 cases			
Characteristic	Relative risk	95% CI	P
B symptoms	2.28	0.70-7.44	NS
Bulky mass	3.32	1.23-9.01	<0.05
Serum LDH level > normal	3.34	0.37-30.52	NS
Performance status 2-4	2.30	0.63-8.41	NS
Stage III or IV	0.59	0.10-3.35	NS
Involved extranodal organ >1	0.71	0.17-2.95	NS
IPI, HI/H	2.50	0.20-32.00	NS
High M2 TAMs	4.01	1.26-12.74	<0.05
High total TAMs	2.30	0.68-7.82	NS

CI, confidence interval; HI/H, high-intermediate/high; IPI, International Prognostic Index; NS, not significant; TAM, tumour-associated macrophage.

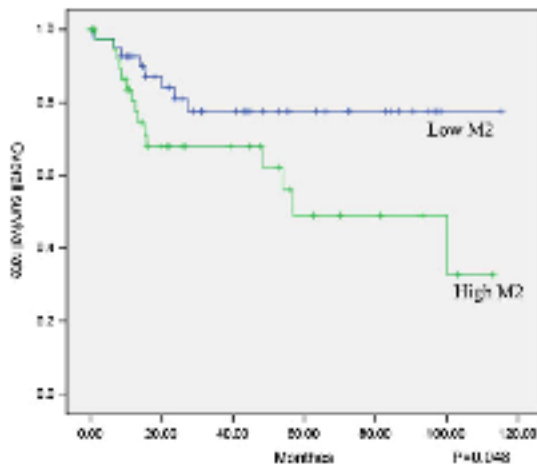
(2) DLBCL-IF 30 例の検討において、DLBCL-IF は通常の組織所見を示す DLBCL (DLBCL-CG) より有意に予後良好であった。以下に DLBCL-IF と DLBCL-CG の生存曲線をカプラン・マイヤー法で求め、ログ・ランクテストで比較した単変量解析の結果を示す図を載せる ($p < 0.05$)。



また、多彩な細胞浸潤を伴う DLBCL-IF 16 例の検討において、M2-TAM の少ない患者は全て観察終了時点 (観察期間; 8~42.5 ヶ月, 中央値; 22.3 ヶ月) で生存していた。

(3) HL 82 例の検討において、M2-TAM が多いと有意に予後不良であった。以下に M2-TAM が多い群と少ない群の生存曲線をカプラン・マイヤー法で求め、ログ・ランクテスト

で比較した単変量解析の結果を示す図を載せる ($p < 0.05$)。



また、HL のうち混合細胞型に限定すると、M1-TAM が多い混合細胞型 HL は有意に予後良好であった ($p < 0.05$)。

(4)以上、主な対象目標としていたリンパ腫サブタイプに関して M1-TAM, M2-TAM の役割を検討することができた。具体的には DLBCL, HL において M2-TAM は腫瘍進行性に働いていると考えられ、混合細胞型 HL において M1-TAM は腫瘍抑制性に働いていると考えられる。DLBCL, HL, 混合細胞型 HL において M1-TAM, M2-TAM を評価すれば予後予測が可能である。

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)

①Wada N, Zaki MA, et al (10 人省略、1 番目) . Diffuse large B-cell lymphoma with an interfollicular pattern of proliferation shows a favorable prognosis: a study of the Osaka Lymphoma Study Group. Histopathol (査読有) 2012;60:924-932. DOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/j.1365-2559.2011.04161.x

②Wada N, Zaki MA, et al (12 人省略、1 番目) . Tumor-associated macrophages in diffuse large B-cell lymphoma: a study of the Osaka Lymphoma Study Group. Histopathol (査読有) 2012;60:313-319. DOI

(デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/j.1365-2559.2011.04096.x

③Zaki MA*, Wada N*, et al (10 人省略、equally contributed の 2 番目) . Prognostic implication of types of tumor-associated macrophages in Hodgkin lymphoma. Virchows Arch (査読有) 2011;459:361-366. *equally contributed. DOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00428-011-1140-8

[学会発表] (計 1 件)

①和田直樹 (発表代表者)、Tumor-associated macrophages (TAMs) in diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL)、第 101 回日本病理学会総会、2012 年 04 月 26 日～2012 年 04 月 28 日、京王プラザホテル (東京都新宿区西新宿 2-2-1)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

和田 直樹 (WADA NAOKI)
大阪大学・医学系研究科・助教
研究者番号：80521731

(2) 研究協力組織

OLSG 事務局・参加施設