

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26293078

研究課題名(和文) 濾胞性リンパ腫の再発・形質転換に関わる遺伝子変異とその分子病理学的解析

研究課題名(英文) Molecular mechanism of relapse and transformation of follicular lymphoma

研究代表者

吉野 正 (Yoshino, Tadashi)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：70183704

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,500,000円

研究成果の概要(和文)：ろ胞性リンパ腫は罹患率増加の著しいリンパ腫のなかでも本邦で患者さんが増加している。その増加原因は不明であるが、推計値では年間約6000人が罹患されており全リンパ腫の2割程度を占める。このリンパ腫は進行は緩徐であるが、再発しやすい傾向があり、大型リンパ腫へ移行することがかなりある。その場合、治療はかなり困難である。われわれは再発しやすい原因として癌幹細胞を同定し、論文を作成している。また、高悪性度化についてcMYC BCL2の役割も研究した。

研究成果の概要(英文)：Follicular lymphoma is one of the most frequent lymphoma, and it has increased in number of patients: approximately 6000 new patients a year and it is almost 20% of all lymphoma. Although this lymphoma is quite indolent clinical course, it recurs so frequently, and high-grade transformation is the serious problem to control. We revealed that cancer initiating cells are present in this lymphoma which is closely associated with high frequent recurrence, and examined the role of c-MYC and BCL2 translocation at the course of high-grade transformation.

研究分野：病理学

キーワード：リンパ腫 濾胞性リンパ腫 がん幹細胞 形質転換

1. 研究開始当初の背景

近年の分子標的薬の進歩により、血液疾患を含め様々な疾患で予後の改善がみられるようになってきました。しかし、現行の分子標的薬を用いても未だに根治不可能な疾患が多数存在します。濾胞性リンパ腫は全悪性リンパ腫の約20%を占める代表的な難治性悪性リンパ腫で、現行の分子標的薬であるCD20抗体(rituximab)を用いても再発・再燃をおこし、さらに罹患中に約3-4割の患者でびまん性大細胞型B細胞リンパ腫へと組織学的形質転換を起こします。一方で、残りの約6割の患者では形質転換が起こらず経過するとされています(J Clin Oncol 2007; 25: 2426)。形質転換を起こした群の平均予後は著しく不良で、現行の分子標的薬を用いた多剤併用化学療法においても、生存期間中央値は約1年以内とされています。一方で非形質転換群の患者の生存期間中央値は約10年とされています。国内外の研究において、特に腫瘍を構成する背景因子(組織球、濾胞樹状細胞、非腫瘍性のT細胞)の存在と形質転換の関連性については報告がなされています。しかし、腫瘍細胞自体において再発・再燃を起こす患者群や、形質転換を起こす患者群についての明確な遺伝子変異の同定や分子生物学的なメカニズムの解明は未だ行われておらず、これらに対する治療の基盤情報を提供することは臨床治療学的に極めて重要であると考えます。われわれは、従来腸管原発の濾胞性リンパ腫の存在を見出し(Am J Surg Pathol, 2000)、その臨床病理学的特徴(J Clin Pathol, 2007)、VH usage と FDC パターンの消失、memoryB細胞への分化(Mod Pathol, 2009, 2013)を報告し、2008年のWHO分類にnew variantとして収蔵されました。このように

豊富な症例を有するため、再発、形質転換の分子機序を検討することを企図しました。

2. 研究の目的

中長期的視点では濾胞性リンパ腫は依然として根治不可能で、致死的な疾患と言えます。この形質転換および薬剤抵抗性のメカニズムは依然として解明されておらず、喫緊の解決課題となっています。本研究では、濾胞性リンパ腫の再発・再燃および形質転換に関わる遺伝子変異を同定すること、薬剤抵抗性のメカニズムに関わる遺伝子変異の同定を試みることを目的としています。

3. 研究の方法

(1) 形質転換群と非形質転換群、再発群の患者抽出

現時点で形質転換した患者群は全1000症例の濾胞性リンパ腫で複数回生検された患者の約25%ですが、これらについて、病理組織検体(新鮮凍結検体)を得られるものを10例を検索に用いました。

(2) ペア患者検体による whole exome sequencing 解析

上記で抽出された患者組織を用いて、初発時・再発時、および形質転換時の病理組織について、whole exome sequencing (HiSeq 2000, Illumina社)によりSNV(SNP)、InDel変異を抽出し、特に再発、形質転換時に高率に起こっている変異を同定しました。

(3) 遺伝子発現プロファイル解析による発現変動遺伝子抽出

これまでに反応性リンパ節、節性濾胞性リンパ腫、腸管原発濾胞性リンパ腫(計55症例)において遺伝子発現プロファイル解析を行い、濾胞性リンパ腫において特異的に発現変動す

る遺伝子群を抽出しました。

(4) 抽出した変異遺伝子のヒトリンパ腫細胞株における機能解析

がん幹細胞についての研究を以下のように進めました。幹細胞を認識する分子標的を事前の検討により候補を絞っており、それがヒト正常組織、リンパ腫組織での分布と細胞周期との関係、ヒト由来リンパ腫細胞株における機能解析を行いました。具体的に、ヒト濾胞性リンパ腫由来リンパ腫細胞株 (FL-18, FL-218) を用いてがん幹細胞としての薬剤耐性機序があるかどうかを検討するために、CD20 抗体 (rituximab) や既知の抗癌剤 (ベンダマスチン) による apoptosis 回避能については、annexinV 染色による細胞膜の変化について flowcytometry を用いた検討を行いました。また、ヌードマウスへの可移植性についても検討しました。

4. 研究成果

(1) データの出た順番に示します。がん幹細胞については、現在論文準備中であり、それを認識する分子は明示しませんが、正常リンパ胚中心内に陽性細胞が存在し、それが Ki67 で認識される細胞周期に入っていないこと、濾胞性リンパ腫では、濾胞間に存在し、血管との密な関係を有しており (ニッチ) これも細胞周期に入っていないこと、これを発現する細胞は抗癌剤や CD20 抗体に抵抗性であること、可移植性を有することを見出しました。これらの性状はがん幹細胞とってよいもので、臨床検体でも治療をするとがん幹細胞の数が増加することから、本リンパ腫が再発しやすいことに関係する所見と考えています。

(2) 高悪性度化については、濾胞性リンパ

腫の形質転換で最も重要な c-MYC と BCL2 のダブルヒットリンパ腫と背景に濾胞性リンパ腫を有しないダブルヒットリンパ腫を比較検討しました。その結果、いずれも治療抵抗性の症例が多かったが、興味深いことに濾胞性リンパ腫のダブルヒット例では MYC の免疫組織学的発現が高く、と Ki67 の陽性率も高い傾向がありました。ゲノムプロファイルではダブルヒット濾胞性リンパ腫では 2p25.3-p11.1, 7p22.3-q36.3, 12q11-q24.33, loss of 18q21.32-q23 (P<0.05) がありました。濾胞性リンパ腫の背景がないダブルヒットリンパ腫と比較し、濾胞性リンパ腫のダブルヒット例では 2p16.1 のコピー数と gain が少ないという差がありました。これについては、Nature 系の Mod Pathol に報告しました。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計5件)

1 Miyaoka M, Kikuti YY, Carreras J, Ikoma H, Hiraiwa S, Ichiki A, Kojima M, Ando K, Yokose T, Sakai R, Hoshikawa M, Tomita N, Miura I, Takata K, Yoshino T, Takizawa J, Bea S, Campo E, Nakamura

N.Clinicopathological and genomic analysis of double-hit follicular lymphoma: comparison with high-grade B-cell lymphoma with MYC and BCL2 and/or BCL6 rearrangements.

Mod Pathol. 2018 Feb;31(2):313-326. doi: 10.1038/modpathol.2017.134. Epub 2017 Oct 6.

PMID: 28984304 PMID: 28984304

2 Takata K, Miyata-Takata T, Sato Y, Iwamuro M, Okada H, Tari A, Yoshino T.

Gastrointestinal follicular lymphoma:
Current knowledge and future challenges.
Pathol Int. 2018 Jan;68(1):1-6. doi:
10.1111/pin.12621. Review.
PMID: 29292593

3 Tari A, Asaoku H, Takata K, Fujimori S,
Tanaka S, Fujihara M, Koga T, Yoshino T.
The role of "watch and wait" in intestinal
follicular lymphoma in rituximab era.
Scand J Gastroenterol. 2016
Mar;51(3):321-8. doi:

10.3109/00365521.2015.1087589. Epub 2015
Sep 18. PMID: 26382560

4 Miyata-Takata T, Takata K, Toji T, Goto
N, Kasahara S, Takahashi T, Tari A,
Noujima-Harada M, Miyata T, Sato Y, Yoshino
T. Elevation of serum interleukins 8, 4,
and 1 levels in patients with
gastrointestinal low-grade B-cell
lymphoma.

Sci Rep. 2015 Dec 17;5:18434. doi:
10.1038/srep18434. PMID: 26674732

5. Ohnishi N, Takata K, Miyata-Takata T,
Sato Y, Tari A, Gion Y, Noujima-Harada M,
Taniguchi K, Tabata T, Nagakita K, Omote S,
Takahata H, Iwamuro M, Okada H, Maeda Y,
Yanai H, Yoshino T. CD10 down expression in
follicular lymphoma correlates with the
gastrointestinal lesion involving the
stomach and large intestine.

Cancer Sci. 2016 Aug 11. doi:
10.1111/cas.13031. [Epub ahead of print]
PMID: 27513891

{図書} (計 11 件)

1. 吉野 正、佐藤康晴 リンパ系腫瘍の分類
(WHO 分類 2017 改訂第 4 版) pp76-83、佐藤
康晴、吉野 正 濾胞性リンパ腫、マンツル
細胞リンパ腫、びまん性大細胞型 B 細胞リン
パ腫、血管内大細胞型 B 細胞リンパ腫、未分
化大細胞型リンパ腫 ALK 陽性、末梢性 T 細胞
リンパ腫、MYC および BCL2 と BCL 6 の両方が
一方の再構成を伴う高悪性度 B 細胞リンパ腫、
古典的 Hodgkin リンパ腫、佐藤康晴、榊原佳
奈枝、吉野 正 脾辺縁帯リンパ腫、Burkitt
リンパ腫 アグレッシブ NK 細胞白血病、節外
性 NK/T 細胞リンパ腫鼻型 pp340-390 血液細
胞アトラス 第 6 版 通山 薫、張替秀郎編
文光堂 東京 2018 年 2 月 7 日
ISBN978-4-8306-1426-2

2. T. Yoshino, NL. Harris, BN Nathwani, SH
Swerdlow, D de Jong, ES Jaffe, G Ott, D
Spagnolo Follicular lymphoma. WHO
classification of Tumours (Revised 4th Ed)
Ed: SH Swerdlow, E Campo, NL Harris, ES
Jaffe, SA Pileri, H Stein, J Thiele, DA
Arber, RP Hasserjian, MM Le Beau, A Oraji,
R Siebert pp. 266-273, IARC Press, Lyon,
2017
ISBN978-92-832-4494-3

3. 吉野 正 インフォームドコンセントの
ための図説シリーズ
悪性リンパ腫 改訂版 堀田知光編 第二章
診断と分類 pp. 10-15 医薬ジャーナル社
大阪 2017 年 ISBN978-4-7532-2855-3

4. 吉野 正 血液病理学 第 20 章 カラー
ルーピン病理学 改訂版 鈴木利光、中村栄
男、深山正久、山川光徳、吉野 正監訳 西
村 書店 東京 2017 年
ISBN978-4-89013-478-6

5. 谷口恒平、吉野 正 リンパ腫の病理・分

類 白血病・リンパ腫薬物療法 松村 到編
pp21-26 南江堂 東京
ISBN978-4-524-25875-8 2016年

6. 吉野 正 血液・造血器 坂本穆彦監修
北川昌伸、仁木利郎編集標準病理学第5版
医学書院 東京 pp302-329
ISBN978-4-260-02026-8 C3047 2015年

7. 吉野 正 血液病理学 河原 栄、中谷行
雄監訳 ルーピン基本病理学第5版西村書店
東京 pp511-533 ISBN978-4-89013-449-6
C3047 2015年

8. 吉野 正 南山堂医学大辞典 第20版
南山堂 東京 ISBN978-4-525-01080-5
C3547 2015年

9. 吉野 正 リンパ節生検像 日本血液学
会編 血液専門医テキスト改訂第2版南江堂
東京 pp516-531 ISBN978-4-524-26157-4
C3047 2015年

10. 吉野 正、高田尚良 リンパ腫とは 血
液疾患診断・治療指針 金倉 譲編 pp340-347
ISBN978-4-521-74279-3 中山書店 東京
2015年

11. 吉野 正 胃リンパ腫 胃癌第2版 腫
瘍病理鑑別診断アトラス刊行委員会監修 pp
187-197 文光堂 東京 ISBN
978-4-8306-2248-9 2015年

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉野 正 (YOSHINO, Tadashi)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究
科・教授
研究者番号 70183704

(2) 研究分担者

高田尚良 (TAKATA, Katsuyoshi)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究
科・講師
研究者番号 90580259

竹内真衣 (TAKEUCHI, Mai)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究
科・助教
研究者番号 10759666