

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 9 月 1 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09474

研究課題名(和文) マウスを用いた活性化B細胞型びまん性大細胞型B細胞リンパ腫の発症機序の解明

研究課題名(英文) Clarifying the pathogenesis of ABC-DLBCL in a mouse model

研究代表者

錦織 桃子(Nishikori, Momoko)

京都大学・医学研究科・講師

研究者番号：60378635

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：活性化B細胞型びまん性大細胞型B細胞リンパ腫(ABC-DLBCL)の発症機序を解明するために、同病型で認められるHOIP遺伝子の活性化型SNPの作用を模倣するマウスとしてCre-loxP反応依存性にB細胞でHOIP遺伝子の恒常的高発現が生じるトランスジェニックマウスを作出した。さらにHOIPのSNP変異を持つDLBCL症例で特に併存する頻度の高いMyD88の活性化型変異をB細胞で発現するマウスを作出し、HOIPトランスジェニックマウスと交配した。本研究により、これらの遺伝子異常を契機に発症するマウスリンパ腫モデルを作出し、その発症機序やこれらの協調作用を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：To clarify the pathogenesis of ABC-type diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL), we generated a mouse lymphoma model by crossing gene-engineered mice carrying HOIP and mutant MyD88 transgenes. We have found how these genes cooperate with each other during lymphomagenesis.

研究分野：血液腫瘍学

キーワード：悪性リンパ腫 マウスモデル

1. 研究開始当初の背景

びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫 (DLBCL) は悪性リンパ腫の約 4 割を占める最多の病型であるが、従来の化学療法では依然難治の症例が存在し、生物学的病態に基づく新規治療の導入による予後の向上が望まれる。DLBCL の病態は遺伝子発現プロファイルに基づき、胚中心 B 細胞様 DLBCL (GCB-DLBCL) と活性化 B 細胞様 DLBCL (ABC-DLBCL) とに大別され、後者においては MYD88 の活性化型変異である MYD88 L265P が約 30% と最も頻度の高い異常として知られる。

一方、HOIP は直鎖型ユビキチン複合体のサブユニットとして NF- κ B やその他のシグナルの制御に関わる分子であるが、HOIP の活性化型稀少 SNP により ABC-DLBCL 発症のリスクが高まることが報告されている。また HOIP の活性化型一塩基多型 (SNPs) を有する症例の ABC-DLBCL において、MYD88 L265P 変異を合併する頻度が高いことが知られている (Cancer Discovery 2014;4:480-493)。これらの遺伝子は協調して B 細胞リンパ腫の形成に関わることが推測されるが、そのメカニズムについてはまだ十分明らかにされていない。

2. 研究の目的

HOIP の活性化および MyD88 変異を模倣する遺伝子改変マウスを作成し、それらが実際に協調してリンパ腫を発症させる作用をもつかどうかを明らかにする。また、それぞれの遺伝子がリンパ腫発症において果たす生体内での役割について、マウスモデルを用いて解明する。形成された B 細胞腫瘍がヒトの ABC-DLBCL を模倣するモデルになっているかどうかを、病理組織学的観察やフローサイトメトリーによる形質解析、さらに遺伝子学的解析により検証する。また、本生体モデルを利用したリンパ腫の治療研究の可能性につき検討を行う。

3. 研究の方法

HOIP 遺伝子の活性化型 SNP の作用を模倣するマウスとして、Cre-loxP 反応依存性に野生型 HOIP 遺伝子を恒常的に高発現するコンディショナルトランスジェニックマウスを作成し、CD19 プロモータ下に Cre リコンビナーゼを発現するトランスジェニックマウス (CD19-Cre マウス) と交配させることにより、B 細胞特異的に HOIP を高発現するマウスを作った。同様に、Cre-loxP 反応依存性にヒト MyD88 L265P 変異と相同の MyD88 L252P 変異を恒常的に高発現するコンディショナルトランスジェニックマウスを作成して CD19-Cre マウスと交配し、B 細胞特異的に MyD88 L252P を発現するマウスも作製し、それぞれのマウスの成熟 B 細胞の

性状を詳細に解析した。

また、それらのマウスにおける B 細胞腫瘍形成の頻度や死亡割合を調べるとともに、これらのマウスを交配し、両遺伝子を併せ持つマウスを作成することにより、相乗的な腫瘍形成がもたらされるかどうかをマウスの系で検証した。形成された B 細胞腫瘍の形質をフローサイトメトリーで解析し、また遺伝子学的にクローナリティや遺伝子異常の蓄積について評価し、HOIP や MyD88 L252P の遺伝子高発現が腫瘍形成において果たす役割についての解析を行った。

4. 研究成果

HOIP を B 細胞で強制発現させたトランスジェニックマウスでは、B 細胞における NF- κ B 活性が恒常的に活性化しており、その下流遺伝子も発現亢進していることが示された。MyD88 L252P マウスでは B 細胞の分裂が速く B 細胞の数の増加がみられ、導入遺伝子の発現した B 細胞に起因するリンパ増殖性疾患や悪性リンパ腫を発症し致命的となるマウスが観察された。

さらに MyD88 L252P マウスを HOIP トランスジェニックマウスと交配させると腫瘍の形成割合および致死率が一層上昇した。以上より、ヒトにおける両遺伝子異常の相乗効果がマウスモデルでも確認することができた。また、形成された B 細胞腫瘍の性状評価により、生物学的にも ABC-DLBCL をよく模倣すると考えられた。それぞれの導入遺伝子の腫瘍形成における詳細の役割についての知見が得られ、現在論文にまとめる準備を進めており、本年秋の学会でも発表を行う予定である。

さらに、本遺伝子改変マウスは正常な免疫環境において DLBCL を自然発症することから、腫瘍の免疫微小環境も同時に再現すると考えられ、シグナル阻害薬や免疫標的薬などのリンパ腫の治療研究において高い意義と発展性を持つものと期待される。現在、本マウスモデルを活用して、リンパ腫の薬物治療研究について研究を進めている。

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 8 件)

Umeda M, Kondo T, Nishikori M, Kitano T, Hishizawa M, Kadowaki N, Takaori-Kondo A. A case of neurolymphomatosis caused by follicular lymphoma successfully treated with bendamustine. Clin Case Rep. 2016;4(1):23-5.

Nishikori M, Kitawaki T, Tashima M,

Shimazu Y, Mori M, Hishizawa M, Kondo T, Ohmori K, Takaori-Kondo A. Diminished CD2 Expression in T cells Permits Tumor Immune Escape. *J Clin Cell Immunol*. 2016;7:406.

Maruyama D, Nagai H, Fukuhara N, Kitano T, Ishikawa T, Shibayama H, Choi I, Hatake K, Uchida T, Nishikori M, Kinoshita T, Matsuno Y, Nishikawa T, Takahara S, Tobinai K. Efficacy and safety of ibrutinib in Japanese patients with relapsed or refractory mantle cell lymphoma. *Cancer Sci* 2016;107(12):1785-90.

Kishimoto W, Nishikori M, Arima H, Miyoshi H, Sasaki Y, Kitawaki T, Shirakawa K, Kato T, Imaizumi Y, Ishikawa T, Ohno H, Haga H, Ohshima K, Takaori-Kondo A. Expression of Tim-1 in primary CNS lymphoma. *Cancer Med* 2016;5(11):3235-45.

Yamazaki H, Aoki K, Kondo T, Nishikori M, Kitano T, Hishizawa M, Yamashita K, Takaori-Kondo A. Outcome of Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation in Cases of Mature T/NK-Cell Neoplasms: A Single-center Retrospective Analysis. *Ann Hematol*. 2017;96:323-26.

Yamazaki H, Aoki K, Kondo T, Nishikori M, Kitano T, Hishizawa M, Yamashita K, Takaori-Kondo A. Outcome of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in cases of mature T/NK-cell neoplasms: a single-center retrospective analysis. *Ann Hematol*. 2017;96(2):323-326.

Otsuka Y, Nishikori M, Kitano T, Oka T, Ishikawa T, Haga H, Takaori-Kondo A. Persistence of a t(11;14)-positive clone in a patient with mantle cell lymphoma for 20 years. *Clin Case Rep*. 2017;5(4):477-481.

Arima H, Fujimoto M, Nishikori M, Kitano T, Kishimoto W, Hishizawa M, Kondo T, Yamashita K, Hirata M, Haga H, Takaori-Kondo A. Prognostic impact of activation-induced cytidine deaminase expression for patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Leuk Lymphoma*. unpublished online.

{学会発表}(計 13 件)

Nishikori M, Kitawaki T, Takaori-Kondo A. PD-1 Blockade for the Treatment of Lymphoid Malignancies: Its Usefulness

and Challenges. Plenary Session, The 7th JSH International Symposium ; 2016 年 5 月 13 日 ; 淡路 .

大塚泰幸、白川康太郎、錦織桃子、菱澤方勝、北野俊行、高折晃史. 極めて急速な臨床経過をたどった cMYC/IGH, BCL2/IGH, PAX5/IGH 転座を有する triple-hit DLBCL の一例. 第 56 回 日本リンパ網内系学会学術集会 ; 2016 年 9 月 3 日 ; 熊本 (ポスター).

Arima H, Nishikori M, Otsuka Y, Kishimoto W, Shirakawa K, Takaori-Kondo A. Constitutive activation of Notch1 in mature B cells causes cellular immunodeficiency in mice. 第 75 回 日本癌学会学術総会; 2016 年 10 月 7 日; 横浜(ポスター).

Arima H, Nishikori M, Otsuka Y, Kishimoto W, Shirakawa K, Takaori-Kondo A. Constitutive activation of Notch1 in mature B cells causes cellular immunodeficiency in mice. 第 78 回 日本血液学会学術集会; 2016 年 10 月 14 日 ; 横浜 (口演) .

Shimazu Y, Hishizawa M, Kitano T, Nishikori M, Kazuma Y, Ishii A, Kondo T, Yamashita K, Takaori-Kondo A. Cord blood transplantation for refractory angioimmunoblastic T-cell lymphoma: a series of 3 cases. 第 78 回 日本血液学会学術集会; 2016 年 10 月 14 日 ; 横浜 (ポスター) .

錦織桃子 . モーニングセミナー : B 細胞リンパ腫の病態と治療について . 第 78 回 日本血液学会学術集会 ; 2016 年 10 月 14 日 ; 横浜 .

Kishimoto W, Tashima M, Nishikori M, Arima H, Hishizawa M, Kitano T, Takaori-Kondo A. Prognostic significance of early progression after initial chemotherapy varies with age in follicular lymphoma patients. 第 78 回 日本血液学会学術集会; 2016 年 10 月 15 日 ; 横浜 (口演) .

錦織桃子 . JSH 女性医師・研究者シンポジウム : 悪性リンパ腫の発症機序を考える . 第 78 回 日本血液学会学術集会 ; 2016 年 10 月 15 日 ; 横浜 .

Arima H, Nishikori M, Otsuka Y, Izumi K, Kishimoto W, Takaori-Kondo A. Notch1-Activated B Cells Have an Immunomodulatory Function Enhancing Th2 and Treg Immune Response via

IL-33-ST2 Pathway. 58th ASH Annual Meeting & Exposition; 2016年12月3-6日; San Diego (口演).

京都大学大学院医学研究科血液・腫瘍内科学

大塚泰幸、錦織桃子、岡知美、北野俊行、高折晃史．極めて長期の寛解期間後に再発した悪性リンパ腫の2症例．第57回日本リンパ網内系学会総会（ポスター）2017年7月1日 東京

Arima H, Nishikori M, Otsuka Y, Kishimoto W, Izumi K, Takaori-Kondo A. Immunomodulatory function of Notch1-activated B cells and its implications in tumor immune escape of B-cell malignancies. 第76回日本癌学会学術総会（口演）9月28-30日 東京

Otsuka Y, Nishikori M, Hishizawa M, Kitano T, Kitawaki T, Kondo T, Yamashita K, Takaori-Kondo A. A retrospective analysis of outcomes of primary central nervous system lymphoma patients. 第79回日本血液学会学術集会（優秀ポスター）2017年12月20-22日 東京

Arima H, Nishikori M, Otsuka Y, Kishimoto W, Izumi K, Takaori-Kondo A. Immunomodulatory function of Notch1-activated B cells and its implication in the pathogenesis of B-cell malignancies. 第79回日本血液学会学術集会（口演）2017年12月20-22日 東京

〔その他〕

ホームページ

<https://www.kuhp.kyoto-u.ac.jp/~hemonc/classroom/staff.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

錦織 桃子 (NISHIKORI, Momoko)

京都大学大学院医学研究科 血液・腫瘍内科学 講師

研究者番号：60378635

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

岩井一宏 (IWAI, Kazuhiro) 京都大学大学院医学研究科 細胞機能制御学講座 教授

研究者番号：60252459

(4) 研究協力者

城友泰 (JO, Tomoyasu)

京都大学大学院医学研究科血液・腫瘍内科学

有馬浩史 (ARIMA, Hiroshi)