

平成 30 年 5 月 31 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10332

研究課題名(和文) 中枢神経悪性リンパ腫における JAK-STAT 阻害薬による新たな治療法の開発

研究課題名(英文) A study of new treatment by JAK-STAT inhibition for central nervous system lymphoma

研究代表者

西原 賢在 (Nishihara, Masamitsu)

神戸大学・医学研究科・医学研究員

研究者番号：20452493

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：中枢神経悪性リンパ腫(PCNSL)における髄液中インターロイキン-10(IL-10)濃度と JAK-STAT 経路の活性化との関連性を解析すると、髄液 IL-10 値が高い PCNSL では JAK-STAT の活性が高くその下流分子(PIN-1 など)の mRNA の発現も増加していた。PCNSL 組織中のマクロファージ(TAM)の浸潤量が髄液 IL-10 濃度と相関していた。in vivo においてマウスへの移植腫瘍内に IL-10 を投与するとリンパ腫細胞の JAK-STAT3 経路の活性化が生じたが、JAK-STAT 阻害剤を投与しても有意な腫瘍縮小効果は認められなかった。

研究成果の概要(英文)：Cerebrospinal fluid (CSF) interleukin-10 (IL-10) level was associated with activation level of JAK-STAT pathway in central nervous system lymphoma (PCNSL). PCNSL with high CSF IL-10 had strong expression of PIN-1 and SOCS, downstream molecules of JAK-STAT pathway. In addition, CSF IL-10 levels were associated with infiltration levels of tumor associated macrophages (TAMs) in PCNSL. When IL-10 protein was injected into inoculated subcutaneous PCNSL tumor of mouse, JAK and STAT3 in tumor cells was phosphorylated and activated by IL-10. But, JAK/STAT inhibitors could not show a antitumor effect in mouse models.

研究分野：脳腫瘍

キーワード：Lymphoma JAK STAT IL-10

## 1. 研究開始当初の背景

中枢神経原発悪性リンパ腫(PCNSL)は、全脳腫瘍の約5%を占める。PCNSLの生存期間中央値は30~40か月であり、脳以外の悪性リンパ腫と比較すると極めて予後不良である。(Lancet, 2012, 379) また、PCNSLは高齢化の促進等の要因により近年増加しており、臨床的にも重要な脳腫瘍の1つである。全身性悪性リンパ腫に対しては様々な新規治療法が基礎レベル、臨床レベルで検討されている一方、PCNSLは血液脳関門(BBB)の存在や生物学的特質のため治療抵抗性と考えられているため、PCNSLの新規治療は殆ど行われていない。

申請者は以前よりPCNSLの髄液中IL-10に着目して、その作用について研究してきた。IL-10は免疫抑制を誘導するサイトカインであり、リンパ球の生存や増殖、分化に関与し、B cell, T cell マクロファージや腫瘍細胞から産生される。PCNSLではほとんどの患者で髄液中IL-10が上昇しており、PCNSLの診断に非常に有用なバイオマーカーである(図1A)。しかし、個々の患者の髄液中IL-10は様々である(図1B)。また、髄液IL-10高値の患者は、低値の患者に比べ、無増悪生存期間(Progression free survival time)や全生存期間(overall survival)が短いことが明らかとなった(Sasayama, Neuro Oncol. 2012;14)(図2)。このことから、IL-10はPCNSLに対して相当な影響を及ぼしているものと考えられる。

AK(Janus kinase)及びSTAT(Signal Transducers and Activator of Transcription)は、サイトカイン受容体機構の重要な構成分子で、増殖、生存、分化を制御している。サイトカインのレセプターへの結合はJAKを活性化し、その下流のSTATをリン酸化する。リン酸化STATは二量体を形成して核内に移行し、標的遺伝子の転写を調節し、サイトカイン産生やアポトーシス抑制、細胞増殖や浸潤・転移を促進させる。特にSTAT3は多くのがんにおいて恒常的に活性化していることが報告されている。

事前研究としてPCNSL患者から摘出した臨床サンプルを用いて、IL-10やそのレセプターであるIL-10RAを免疫染色にて解析すると、多くのPCNSLで高発現していた。また、患者由来のPCNSL培養細胞の培養液では高濃度のIL-10が検出された(右図A)。これらのことから、IL-10はPCNSL細胞自身によって産生・分泌されることが判明した。また、PCNSL細胞にIL-10を投与すると、JAK1,2, STAT3のリン酸化が誘導され、IL-10によりPCNSL細胞のJAK-STAT経路が活性化された(右図B)。そして、PCNSL臨床サンプルでも、リン酸化JAK2やリン酸化STAT3が認められ、JAK-STATの活性化

が起こっていた(右図C)。

以上の研究から、IL-10はPCNSL細胞自身から産生され、髄液等を介してオートクライン・パラクラインにPCNSL細胞に作用してJAK-STATを活性化しているものと思われる。しかし、これまでに実際のPCNSL患者の腫瘍組織でJAK/STATの活性化状態について報告したものは無く、さらにPCNSLで髄液IL-10とJAK/STATの関連性を研究した報告もない。近年、いくつかのJAK inhibitorが登場しており、その一部は全身性非ホジキンリンパ腫の治療薬として臨床研究が進められている(J Clin Oncol, 2012)。PCNSLにおいてもIL-10の下流でJAK-STATが活性化していれば、JAK-STATの抑制で抗腫瘍効果が得られる可能性は高いと考え、本研究を計画した。

## 2. 研究の目的

PCNSLにおいて、髄液IL-10とJAK-STATの活性化の関係を明らかにし、さらに、JAK/STAT経路の抑制による抗腫瘍効果を明らかにしたい。具体的には以下の4点である。

1. PCNSL臨床サンプルを用いて、JAK/STATのリン酸化状態を解析し、髄液IL-10値との相関性を明らかとする。
2. PCNSL細胞株や患者由来のPCNSL細胞を用いて、IL-10投与によるJAK-STAT経路の活性化状態や、増殖能、薬剤耐性、アポトーシス抵抗性などについて検討する。
3. PCNSL細胞にJAK阻害薬を投与し、増殖能低下やアポトーシス誘導などの抗腫瘍効果を解析し、IL-10の発現量やJAK-STATの活性化状態とJAK阻害薬による効果の関連性を検討する。
4. ノドラットの脳内に患者由来のPCNSL細胞を移植し、JAK阻害剤による抗腫瘍効果を明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) 術前に髄液を採取し、髄液中IL-10を測定。また、手術で摘出した腫瘍サンプルを用いて、IL-10, JAK1, JAK2, STAT3, STAT5などJAK-STAT経路の活性化状態を免疫染色およびwestern blotで調べる。

(2) PCNSLの組織を用いて、CD163, CD204, CD68で染色し、マクロファージの浸潤率を測定する。CD163とIL-10での共染色を行い、マクロファージでのIL-10の発現をみて、髄液IL-10の濃度とマクロファージの浸潤との関連を見る。

(3) ノドマウス皮下にPCNSLの細胞株HKBML細胞を移植し、IL-10を腫瘍内に

投与して JAK, STAT3 のリン酸化状態を解析する。

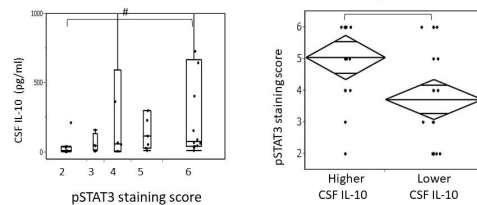
(4) HKBML の培養細胞に JAK 阻害剤を投与し、細胞増殖、コロニー形成、STAT3 美リン酸化について解析する。また、HKBML 細胞をヌードマウス皮下に移植し、JAK 阻害剤を投与し、抗腫瘍効果を解析する。

#### 4. 研究成果

- (1) 臨床サンプルを用いて PCNSL における IL-10 と JAK-STAT 経路の活性化との関連性を解析すると、IL-10 の発現が高い PCNSL では JAK-STAT の活性化が高く相関していることが明らかとなった。また、IL-10 による JAK-STAT の活性化で、その下流の PIN-1, SOCS, CIS などの mRNA の発現が増加しており、IL-10 の mRNA 量も上昇し、positive feedback が認められた。
- (2) PCNSL の IL-10 の上昇が腫瘍細胞から分泌されるものか、腫瘍内炎症性細胞から分泌されるものか検討したところ、腫瘍細胞からも分泌されるが、腫瘍内マクロファージ (Tumor-associated macrophage, TAM) にも強く発現しており、TAM の浸潤量が IL-10 の発現量と相関していた。このことから、腫瘍細胞が TAM を腫瘍内に誘導し、M1 マクロファージから M2 マクロファージに変換させて IL-10 を分泌できる状態にし、さらに TAM から放出された IL-10 が腫瘍細胞の JAK-STAT 経路を活性化して IL-10 がさらに亢進するという腫瘍細胞と TAM との相互関係が示唆された。
- (3) ヌードマウスに PCNSL の細胞である HKBML を脳内移植して腫瘍内の STAT3 の活性化を検討すると、STAT3 のリン酸化は強く生じており、IL-10 の投与で STAT3 の活性化は亢進した。
- (4) HKBML 培養細胞に JAK1/2 阻害薬である Ruxolitinib を投与すると、腫瘍細胞の増殖、コロニー形成は抑制され、STAT3 のリン酸化も抑制された。しかし、ヌードマウスに PCNSL の細胞である HKBML を脳内移植して JAK2 inhibitor である Ruxolitinib,

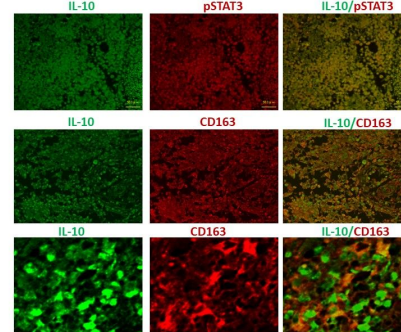
AZD1480, JAK3inhibitor である Tafacitinib, AT9283, Stattic 等をマウスに投与して腫瘍の縮小を観察したが、コントロールに比較して有意な腫瘍縮小効果は認められなかった。

髄液IL-10濃度と腫瘍内STAT3のリン酸化の関係



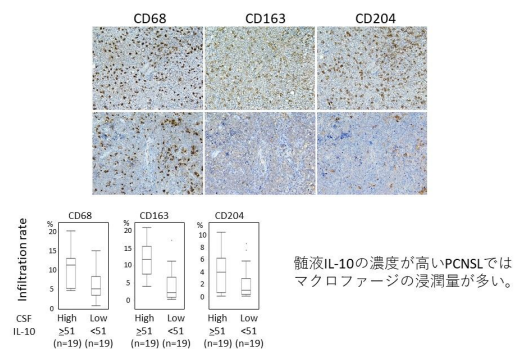
髄液IL-10が高いPCNSLでは腫瘍内STAT3のリン酸化は亢進している。

PCNSL組織でのIL-10の発現とpSTAT3, CD163との共染色



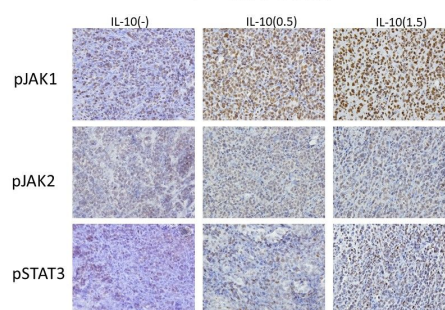
IL-10陽性細胞ではSTAT3のリン酸化が亢進している。また、CD163陽性細胞(TAM)ではIL-10の発現は高い。

PCNSL組織内のmacrophageの浸潤と髄液IL-10との関連



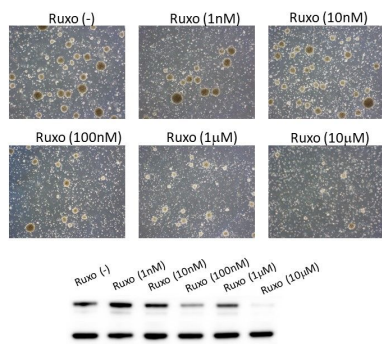
髄液IL-10の濃度が高いPCNSLではマクロファージの浸潤量が多い。

HKBML皮下移植腫瘍にIL-10投与後、JAK, STAT3のリン酸化を検討



IL-10にてリンパ腫皮下腫瘍のJAK1/2, STAT3のリン酸化が亢進した。

JAK1/2 inhibitor(Ruxolitinib) 投与によるHKBMLのコロニー抑制効果  
およびSTAT3のリン酸化の抑制効果



## 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 9 件 )

Tumor-Associated Macrophages Associate with Cerebrospinal Fluid Interleukin-10 and Survival in Primary Central Nervous System Lymphoma (PCNSL). Sasayama T, Tanaka K, Mizowaki T, Nagashima H, Nakamizo S, Tanaka H, Nishihara M, Mizukawa K, Hirose T, Itoh T, Kohmura E. *Brain Pathol.* 2016 Jul;26(4):479-87. doi: 10.1111/bpa.12318

Combined IDH1 mutation and MGMT methylation status on long-term survival of patients with cerebral low-grade glioma. Tanaka K, Sasayama T, Mizukawa K, Takata K, Sulaiman NS, Nishihara M, Kohta M, Sasaki R, Hirose T, Itoh T, Kohmura E. *Clin Neurol Neurosurg.* 2015 Nov;138:37-44. doi: 10.1016/j.clineuro.2015.07.019

STAT3 activation is associated with cerebrospinal fluid interleukin-10 (IL-10) in primary central nervous system diffuse large B cell lymphoma. Mizowaki T, Sasayama T, Tanaka K, Mizukawa K, Takata K, Nakamizo S, Tanaka H, Nagashima H, Nishihara M, Hirose T, Itoh T, Kohmura E. *J Neurooncol.* 2015 Sep;124(2):165-74. doi: 10.1007/s11060-015-1843-9

Myo-inositol concentration in MR spectroscopy for differentiating high grade glioma from primary central nervous system lymphoma. Nagashima H, Sasayama T, Tanaka K, Kyotani K, Sato N, Maeyama M, Kohta M, Sakata J, Yamamoto Y, Hosoda K, Itoh T, Sasaki R, Kohmura E. *J Neurooncol.* 2018 Jan;136(2):317-326. doi: 10.1007/s11060-017-2655-x

Diagnostic value of glutamate with

2-hydroxyglutarate in magnetic resonance spectroscopy for IDH1 mutant glioma. Nagashima H, Tanaka K, Sasayama T, Irino Y, Sato N, Takeuchi Y, Kyotani K, Mukasa A, Mizukawa K, Sakata J, Yamamoto Y, Hosoda K, Itoh T, Sasaki R, Kohmura E. *Neuro Oncol.* 2016 Nov;18(11):1559-1568

Combined metabolic and transcriptional profiling identifies pentose phosphate pathway activation by HSP27 phosphorylation during cerebral ischemia. Imahori T, Hosoda K, Nakai T, Yamamoto Y, Irino Y, Shinohara M, Sato N, Sasayama T, Tanaka K, Nagashima H, Kohta M, Kohmura E. *Neuroscience.* 2017 May 4;349:1-16. doi: 10.1016/j.neuroscience.2017.02.036

Focal hyperintensity in the dorsal brain stem of patients with cerebellopontine angle tumor: A high-resolution 3 T MRI study. Yamamoto H, Fujita A, Imahori T, Sasayama T, Hosoda K, Nibu KI, Kohmura E. *Sci Rep.* 2018 Jan 17;8(1):881. doi: 10.1038/s41598-018-19232-1

Organotypic brain explant culture as a drug evaluation system for malignant brain tumors. Minami N, Maeda Y, Shibao S, Arima Y, Ohka F, Kondo Y, Maruyama K, Kusuhashi M, Sasayama T, Kohmura E, Saya H, Sampetean O. *Cancer Med.* 2017 Nov;6(11):2635-2645. doi: 10.1002/cam4.1174

Genome-wide DNA methylation profiling identifies primary central nervous system lymphoma as a distinct entity different from systemic diffuse large B-cell lymphoma. Nakamura T, Yamashita S, Fukumura K, Nakabayashi J, Tanaka K, Tamura K, Tateishi K, Kinoshita M, Fukushima S, Takami H, Fukuoka K, Yamazaki K, Matsushita Y, Ohno M, Miyakita Y, Shibui S, Kubo A, Shuto T, Kocialkowski S, Yamanaka S, Mukasa A, Sasayama T, Mishima K, Maehara T, Kawahara N, Nagane M, Narita Y, Mano H, Ushijima T, Ichimura K. *Acta Neuropathol.* 2017 Feb;133(2):321-324. doi: 10.1007/s00401-016-1664-8

[ 学会発表 ] ( 計 6 件 )

西原賢在 武田直也 蘆田典明 東野真志 篠山隆司 甲村英二、ベバシズマブ投与後の再発悪性神経膠腫に対する手術所見、一般社団法人日本脳神経外科学会第76回学術総会、2017年

西原賢在 武田直也 蘆田典明 東野真志 篠山隆司 甲村英二、前大脳動脈および中大脳動脈と癒着がある神経膠腫の剥離摘出、第22回日本脳腫瘍の外科学会、2017年

山西俊介 西原賢在 木戸口慶司 高原佳央里 武田直也 橋本公夫、成人発症の脊椎癒合不全を伴わない脊髄脂肪腫の1例、第73回日本脳神経外科学会近畿支部学術集会、2017年

篠山隆司、田中一寛、前山昌博、堀達雄、甲村英二、初発PCNSLに対するリツキシマブ併用大量メトトレキサート療法の有用性について、第55回日本癌治療学会学術集会、2017年

篠山隆司、田中一寛、長嶋宏明、前山昌博、佐藤直子、西原賢在、甲村英二、髄液中CXCL13は中枢神経原発悪性リンパ腫のバイオマーカーとして有用か、第18回日本分子脳神経外科学会、2017年

Takashi Sasayama, Kazuhiro Tanaka, Masamitsu Nishihara, Satoshi Nakamizo, Hiroaki Nagashima, Eiji Kohmura, CXCL13 in cerebrospinal fluid (CSF) as a biomarker for primary central nervous system lymphoma (PCNSL). The 14th Meeting of the Asian Society for Neuro-Oncology, 2017

〔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

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

西原賢在 (NISHIHARA Masamitsu)  
神戸大学

医学(系)研究科(研究院)研究員  
研究者番号：20452493

(2)研究分担者

篠山隆司 (SASAYAMA Takashi)  
神戸大学  
医学部附属病院 講師  
研究者番号：10379399

田中一寛 (TANAKA Kazuhiro)  
神戸大学  
医学部附属病院 特定助教  
研究者番号：70467661

水川克 (MIZUKAWA Katsu)  
神戸大学  
医学部附属病院・非常勤講師  
研究者番号：80403260