

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08719

研究課題名（和文）CD5陽性DLBCLの新規バイオマーカーの同定

研究課題名（英文）The identification of the new biomarker of CD5 positive diffuse large B cell lymphoma

研究代表者

平塚 拓也（Hiratsuka, Takuya）

京都大学・医学研究科・特定講師

研究者番号：90641639

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：びまん性大細胞性B細胞性リンパ腫(DLBCL)は、悪性リンパ腫の中で、最も頻度の高いリンパ腫であるが、その中のCD5陽性DLBCLは、きわめて予後が悪いことが知られている。我々は、FFPE標本から効率的にタンパク質を抽出するプロトコルを開発し、LC-MSによりCD5陽性DLBCLにおいて、1204個のタンパク質が同定された。その中では特にBcl-2、TCL-1AやMAPキナーゼがCD5陽性DLBCLでは、CD5陰性DLBCLよりも発現が亢進していることを発見した。このことから、CD5陽性DLBCLでは、Tcl-1A、ERK2、Bcl-2というカスケードが活性化していると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

CD5陽性DLBCLは、DLBCLの中できわめて予後が悪いことが知られている。今まで、CD5陽性DLBCLのoncogenesisや進展に関する分子機構は明らかではなく、有効な治療も開発されていなかった。それに対し、我々の研究では、Bcl-2、TCL-1AやMAPキナーゼがCD5陽性DLBCLでは、CD5陰性DLBCLよりも発現が亢進しており、CD5陽性DLBCLの腫瘍化にTcl-1A、ERK2、Bcl-2というカスケードの活性化が関与している可能性を示した。このことにより、これらのカスケードを阻害することによるCD5陽性DLBCLの新規治療法の開発の可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：Diffuse large-cell B cell lymphoma (DLBCL) is most frequent in malignant lymphoma. Especially, It is known that CD5-positive DLBCL has one of the poorest diagnosis in malignant lymphoma. We succeeded to develop the protocol to extract protein from Formalin fixed paraffin embedded (FFPE) specimen effectively. By this way, 1,204 proteins were identified in CD5-positive DLBCL by LC-MS. We clarified that the expression of Bcl-2, TCL-1A and MAP kinase in CD5-positive DLBCL were higher in than CD5-negative DLBCL. In addition, we confirmed that the expression of Bcl-2 in CD5-positive DLBCL than in CD5-negative DLBCL immunohistochemistry. It suggests the cascade of the signal pathway of Tcl-1A, ERK2, Bcl-2 is activated in CD5-positive DLBCL.

研究分野：人体病理学

キーワード：悪性リンパ腫 質量分析 病理組織 バイオマーカー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

びまん性大細胞性 B 細胞性リンパ腫(DLBCL)は、悪性リンパ腫の中で、最も頻度の高いリンパ腫である。しかし、この DLBCL の中で 5-10%程度は CD5 陽性 DLBCL であり activated B cell type(ABC)の DLBCL に属する(Tagawa H et al.Blood 2005)。リツキシマブが治療に使用されるようになり、CD5 陰性 DLBCL の予後は大いに改善された。しかし、それに関わらず CD5 陽性 DLBCL の 5 年生存率は依然低いままである(Miyazaki K et al. Ann Oncol 2011)。また、中枢神経再発率も CD5 陰性 DLBCL に比較して高いのが特徴である(CD5+: 2012)12.7%, CD5-:5%)(Niitsu N et al. Ann Oncol2010)。この CD5 陽性 DLBCL における発がん機構、予後、広範囲の節外臓器への進展、中枢神経再発、腫瘍微小環境に関してはほとんど明らかにされていない状況である。

ホルマリン固定病理組織標本(FFPE)標本は診療検体として、臨床データと紐づけされ、従来病院内で大量に保管されている点、長期保管が容易であり、廉価である点などの多くの長所を有している。しかし、FFPE 標本は、病理学研究への利用は、免疫染色などを用いて既知のタンパク質の発現を調べることに留まっているが、質量分析を応用することで、未知のタンパク質の探索が可能になる。その一方で、FFPE 標本中のたんぱく質を分析することは困難であるとされてきた。これは、ホルマリン固定により、たんぱく質分子内あるいは分子間のメチレン架橋が生じるため、たんぱく質の抽出ならびに質量分析に必要なペプチド断片のイオン化が困難である、という問題点を抱えていたためである。

そこで、FFPE 標本よりたんぱく質の効率の良い抽出法を確立し、CD5 陽性 DLBCL の FFPE 標本を用いて、質量分析を実施し、本疾患の進展、予後に関する分子機構を明らかにすることを目指した。

2. 研究の目的

- ・ FFPE 標本から効率的にたんぱく質を抽出法を確立する。
- ・ CD5 陽性 DLBCL の FFPE 標本を用いて質量分析を実施し、本疾患の進展、予後に関する分子機構を明らかにする。

3. 研究の方法

- ・これまで診断された HE 標本、免疫染色、臨床所見・検査より CD5 陽性 DLBCL と診断できた患者 5 例および対照群として CD5 陰性 ABC type DLBCL 6 例を解析の対象とする。
- ・それぞれ病理組織からタンパク質を抽出し、液相クロマトグラフィーと質量分析を連結した LC-MS を行い、CD5 陽性 DLBCL の特異的なタンパク質の同定を同定する。
- ・同定されたタンパク質について、免疫染色を行い、CD5 陽性 DLBCL と CD5 陰性 ABC type DLBCL の発現について比較検討する。

4. 研究成果

我々はまず、FFPE標本よりたんぱく質の効率の良い抽出法を確立するためのプロトコールの開発を行った。加熱による架橋の除去法を検討した結果、95 °Cの加熱を180分行うことで、最も高い収量が得られることがわかった。この時、緩衝液pHの違いはタンパク質抽出量を変化させないことを明らかにした。また、タンパク質抽出液組成について検討した結果、0.1 Mの重炭酸アンモニウム、30%のアセトニトリルの組み合わせで最も高い収量が得られた。

これらの検討結果から得た最適な条件によって、CD5陽性DLBCL症例のFFPE標本5検体、CD5陰性DLBCL症例のFFPE標本6検体からタンパク質抽出を行い、LC-MSによる網羅的解析を行った。その結果、1204個のタンパク質が同定された。その中では特にBcl-2がCD5陽性DLBCLでは、CD5陰性DLBCLの約30倍発現が上昇していた。また、アポトーシス制御因子であるBAXタンパク質はCD5陽性DLBCLでは、CD5陰性DLBCLの約2倍、MAPキナーゼは約1.5倍、T-Cell Leukemia/Lymphoma 1 (TCL-1A)やCaspase 3は1.5倍、CD5陽性DLBCLでは、CD5陰性DLBCLよりも発現が更新していることを発見した。このように、CD5陽性DLBCLは、CD5陰性DLBCLとは分子プロファイリングが異なることを明らかにした。

このうち、Bcl-2に着目し、CD5陽性DLBCLの5検体、CD5陰性DLBCLの6検体について、Bcl-2について免疫染色を行った。その結果、CD5陽性DLBCLにおけるBcl-2発現はCD5陰性

DLBCLの症例よりも高く、LC-MSの結果と一致していた。その結果より、Bcl-2はCD5陽性DLBCLのマーカーとして有効であることが確認された。

Bcl-2陽性はDLBCLにおいて予後が悪い因子の一つである。Bcl-2はERK2によって活性化される。Tcl-1Aは、T細胞だけでなく、B細胞においてもその分化に重要な役割を果たしている分子であり、その腫瘍化において多くのシグナル伝達機構を調整している。Tcl-1Aは、B細胞受容体と協働しているSYKの発現を更新し、その下流のRAS, RAF, ERK2の発現を活性化している。このようにして、CD5陽性DLBCLでは、Tcl-1A, ERK2, Bcl-2というカスケードが活性化していると考えられる。

現在、さらに検証を進め、近日中に論文報告を行う予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Hiratsuka Takuya, Arakawa Yoshiki, Yajima Yuka, Kakimoto Yu, Shima Keisuke, Yamazaki Yuzo, Ikegami Masahiro, Yamamoto Takushi, Fujiwake Hideshi, Fujimoto Koichi, Yamada Norishige, Tsuruyama Tatsuaki	4. 巻 10
2. 論文標題 Hierarchical Cluster and Region of Interest Analyses Based on Mass Spectrometry Imaging of Human Brain Tumours	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1-11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-62176-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yajima Yuka, Hiratsuka Takuya, Kakimoto Yu, Ogawa Shuichiro, Shima Keisuke, Yamazaki Yuzo, Yoshikawa Kenichi, Tamaki Keiji, Tsuruyama Tatsuaki	4. 巻 8
2. 論文標題 Region of Interest analysis using mass spectrometry imaging of mitochondrial and sarcomeric proteins in acute cardiac infarction tissue	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1038/s41598-018-25817-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 平塚 拓也、小川秀一郎、鶴山竜昭
2. 発表標題 Very acute cardiac infarction is visualized by mass spectrometry imaging of formalin fixed tissue.
3. 学会等名 日本病理学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 平塚 拓也、鶴山竜昭
2. 発表標題 The diagnosis of glioblastoma and metastatic brain tumors signals by mass spectrometry
3. 学会等名 日本病理学会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	鶴山 竜昭 (Tsuruyama Tatsuaki) (00303842)	京都大学・医学研究科・特定教授 (14301)	