

平成 21 年 5 月 15 日現在

研究種目：基盤研究 (C)  
 研究期間：2006～2008  
 課題番号：18591228  
 研究課題名 (和文) 体細胞超変異関連因子の解析による皮膚 B 細胞リンパ腫の早期診断法の確立  
 研究課題名 (英文) The investigation to establish an early diagnosis for cutaneous B cell lymphoma through the analysis for somatic hypermutation associated factors.  
 研究代表者  
 小玉 和郎 (KODAMA KAZUO)  
 北海道大学・大学院医学研究科・非常勤講師  
 研究者番号：20322810

## 研究成果の概要：

皮膚 B 細胞リンパ腫の早期診断法を確立するために、皮膚 B 細胞リンパ腫、特にリンパ濾胞構造を伴うものおよび皮膚 B 細胞性偽リンパ腫症例において、体細胞超変異 (somatic hypermutation) に関与する分子の発現を解析して 2 者間の差異を同定することを試みた。B 細胞のマーカーとの 2 重染色を施行して、共焦点レーザー顕微鏡にて確認を行って複数の分子に免疫組織学的には差が認められ、しかしながら、その後の遺伝子変異の有無の検索では polymorphism はあったが変異が見つからず、リンパ腫か偽リンパ腫かを決定づける可能性のある分子の同定はできなかった。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	1,500,000	0	1,500,000
2007 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2008 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	600,000	4,100,000

## 研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：B 細胞リンパ腫 早期診断 体細胞超変異

## 1. 研究開始当初の背景

悪性リンパ腫とは、リンパ球の DNA のうち主に癌抑制遺伝子あるいはアポトーシス関連遺伝子に遺伝子異常が起こり、その異常リンパ球が調節機能を失って無秩序な

増殖が引き起こされるために発生すると考えられており、他の悪性新生物と同様に予後不良である。さらに近年、環境因子の変動あるいは平均寿命の延長による影響のためか、世界的に増加傾向を示しており、我

が国も例外ではない。ゆえに悪性リンパ腫の早期診断に関する研究は早期治療にとって不可欠と考えられ、実際に世界中の研究者たちの重要な研究テーマとなっている。

その早期診断法の確立は、ときに予後不良な経過をたどる悪性リンパ腫の一つのカテゴリーである皮膚B細胞リンパ腫においても同様に必要であると考えられる。しかし、早期診断法の確立には良性の反応性病変である皮膚B細胞性偽リンパ腫の存在が大きな障壁となっている。その中でも特にリンパ濾胞を伴う皮膚B細胞リンパ腫とは確実な鑑別ができない。しかし、皮膚B細胞リンパ腫は生命予後に影響を与える悪性疾患であり、ゆえに予後良好な皮膚B細胞性偽リンパ腫と確実に、しかも初期の段階で区別しなければならない。

## 2. 研究の目的

本研究は、「リンパ濾胞構造を伴う皮膚B細胞リンパ腫におけるリンパ濾胞および濾胞中心B細胞は抗原特異的な抗体を産生するBリンパ球に分化するという正常の細胞性格が損なわれているため、初期の段階から somatic hypermutation に関連する細胞増殖関連マーカーやアポトーシス関連マーカー、BCR、リンパ濾胞構造におけるB細胞の遊走やホーミング、分化に関するサイトカイン・ケモカインの発現の異常が認められると予想される。これらの異常を検出・パネル化し、皮膚B細胞性偽リンパ腫の発現パターンと比較・検討することで両者の客観的鑑別が初期から可能ではないか？」

という仮説に基づき、皮膚B細胞リンパ腫、特にリンパ濾胞構造を伴うものおよび皮膚B細胞性偽リンパ腫症例において、正常のリンパ濾胞構造中心でB細胞が分化するために必要かつ活発に行われている体細胞超変

異 (somatic hypermutation) に関与する因子の発現を免疫組織化学レベル、分子レベル、蛋白レベルで解析して2者間の差異を同定し、皮膚B細胞リンパ腫の客観的な早期診断法を確立することにあつた。

## 3. 研究の方法

(1) 検体の準備：凍結検体と症例組織からのB細胞の培養：

①当施設およびオーストリア共和国・グラーツ大学皮膚科から得られた15例のリンパ濾胞構造を伴う皮膚B細胞リンパ腫症例、15例のリンパ濾胞を伴わない皮膚B細胞リンパ腫症例および30例の皮膚B細胞性偽リンパ腫症例のパラフィンブロックおよび凍結検体を準備した。

②コントロールとして正常および反応性リンパ節30例を用いた。

(2) 選定症例の臨床学的経過検討：

①(1)によって選定された皮膚B細胞リンパ腫および皮膚B細胞性偽リンパ腫の症例の臨床経過(発症部位、皮疹の性状、治療の有無と反応、予後)を検討した。

(3) 選定症例の病理組織学的検討：

①(1)によって選定された皮膚B細胞リンパ腫および皮膚B細胞性偽リンパ腫の症例のHE染色プレパラートを光学顕微鏡を用いて、病理組織学的に浸潤細胞の種類、増殖リンパ球の形態(centroblastあるいはcentrocyte、小型リンパ球)、増殖様式を検討した。

(4) 免疫組織化学による症例の浸潤細胞の phenotype の検討：

①次に症例のパラフィン切片を用いて、浸潤細胞の phenotype とその浸潤パターンをCD20, CD79a, CD3, CD10, bcl-6, bcl-2, CD38, CD138, MUM-1, Fox-p1,  $\kappa$ ,  $\lambda$ , CD68の各マーカーについて免疫染色を行い、解

析した。

(5) 上記 2-4 の総合的検討による症例の再診断およびグループ分け：

① (2) - (4) の行程によって症例の再診断を行った。

② さらにリンパ腫は WHO/EORTC の皮膚リンパ腫の分類に基づいて, follicular center cell lymphoma, marginal zone lymphoma, diffuse large cell lymphoma に分けた。

③ また, 偽リンパ腫も単発あるいは多発か, 再発性か否か, 濾胞構造を伴うものか否か, 浸潤様式が top heavy か bottom heavy かによってグループ分けを行った。

(6) somatic hypermutation 関連因子に対する免疫染色の施行および共焦点レーザー顕微鏡による確認：

① (1) によって選定された皮膚 B 細胞リンパ腫および皮膚 B 細胞性偽リンパ腫の症例のパラフィン包埋切片あるいは凍結切片を用いて, hypersomatic hypermutation 関連因子について酵素抗体法を利用した免疫組織化学的検討を細胞増殖関連マーカー：MIB-1, アポトーシス関連マーカー：Fas, Fas L, B 細胞抗原受容体 (BCR)：CD22, CD72, CD19, CD21/CD35, CD40, BAFF-R, TLR9, FcγRIIb, リンパ濾胞における B 細胞の遊走やホーミングに関するサイトカイン・ケモカイン：Pax-5, AID, IL-2, IL-4, IL-5, IL6, IL-13, IL-21, IFN-γ, TGF-β で試みた。

② 発現が B 細胞に特異的にみられるか否かを確認するために, B 細胞のマーカーとの 2 重染色を施行して, 共焦点レーザー顕微鏡にて確認した。

(7) 発現異常因子の遺伝子変異の検索および確認：

① (6) において, コントロールと発現に差異が見つかった皮膚 B 細胞リンパ腫およ

び皮膚 B 細胞性偽リンパ腫症例における somatic hypermutation 関連因子について, 発現異常がその遺伝子そのものの異常であるか否か遺伝子変異を検索, 確認した。

② その検索にあたって, microdissection 法を用いて DNA を抽出した。

③ 抽出した DNA から, 標的遺伝子を PCR によって増幅し, シーケンサーで塩基配列を調べ, 変異があるか否か検索した。

#### 4. 研究成果

(1) 9 例の follicular center cell lymphoma, 16 例の marginal zone lymphoma, 5 例の diffuse large cell lymphoma と 30 例の皮膚 B 細胞性偽リンパ腫および 30 例の対照コントロールを検討した。

(2) B 細胞のマーカーとの 2 重染色を施行して, 共焦点レーザー顕微鏡にて確認を行って MIB-1, bcl-2, Fas, AID, CD19 に免疫組織学的には差が認められた。

(3) しかし, 手技的問題もあったためかその他のマーカーに差は見られなかった。

(4) その後の遺伝子変異の有無の検索でも変異が見つからず, リンパ腫か偽リンパ腫かを決定づける可能性のある分子の同定はできなかった。

(5) そのため, 以下の項目の研究は準備したものの終了できなかった。

① RT-PCR による mRNA 発現解析

② リンパ腫と偽リンパ腫間に発現の差異がみられた mRNA の鋳型遺伝子変異の検索および確認

③ それらの異常発現遺伝子がコードする somatic hypermutation 関連因子蛋白の SDS-PAGE による発現解析

④ 皮膚 B 細胞リンパ腫症例と皮膚 B 細胞性偽リンパ腫症例における somatic hypermutation 関連因子の差異の解析とパ

ネル化

⑤ ④で得られたデータを元に、皮膚 B 細胞リンパ腫の早期診断法が確立するか否かを検証

⑥点数化した早期診断法の作成

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)

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小玉 和郎 (KODAMA KAZUO)

北海道大学・大学院医学研究科・非常勤講師

研究者番号：20322810

(2) 研究分担者

芝木 晃彦 (SHIBAKI AKIHIKO)

北海道大学・北海道大学病院・講師

研究者番号：40291231

秋山 真志 (AKIYAMA MASASHI)

北海道大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：60222551

(3) 連携研究者

なし