

令和 5 年 5 月 15 日現在

機関番号：32409

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K07467

研究課題名(和文) 悪性リンパ腫の脂質代謝経路におけるLR11の分子機能

研究課題名(英文) Molecular function of LR11 in lipid metabolism of malignant lymphoma

研究代表者

東 守洋 (Higashi, Morihiro)

埼玉医科大学・医学部・教授

研究者番号：00323395

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、びまん性大細胞型B細胞性リンパ腫(DLBCL)におけるLR11発現と細胞内脂肪滴との関連、さらにLR11を中心とした脂質代謝について検討した。脂肪滴が多く有するDLBCLおよびそのマーカーであるPLN1高発現DLBCLは予後不良であること、rituximabにも抵抗性であることを見出した。さらに培養細胞を用いた実験ではLR11は細胞膜のLipid raftに存在し、またCD20と共局在していることを見出した。以上のことから、LR11は1) 細胞内のLDLをlipid raftに輸送すること、2) LR11の存在下でrituximabの補体依存性細胞傷害を抑制する可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

リンパ腫においては古典的には細胞診時のメルクマールとされており、細胞診においては診断的意義を有している。しかしながらこれまでこの脂肪滴の役割はほとんど明らかにならなかった。本研究ではその機能的意義を明らかにした。

さらにLDL受容体であるLR11の発現と細胞内脂肪滴の関連について、明らかにした。このことにより臨床病理学的にLR11発現および細胞内脂肪滴と、予後を含めた臨床病理学的事項に関連があることを見出した。このことはLR11や脂質代謝関連分子が悪性リンパ腫の治療ターゲットとなりうる可能性を示唆している。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the relationship between LR11 expression and intracellular lipid droplets, as well as lipid metabolism centered around LR11 in diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL). We found that DLBCL with a high number of lipid droplets and PLN1 high expression, a marker for lipid droplets, had poor prognosis and resistance to rituximab therapy. Additionally, experiments using lymphoma cell lines revealed that LR11 was present in the lipid rafts of the cell membrane and co-localized with CD20. Based on these findings, we discovered that LR11 1) transports LDL in the cell to lipid rafts and 2) suppresses the complement-dependent cytotoxicity of rituximab in the presence of LR11.

研究分野：病理学

キーワード：悪性リンパ腫 細胞内脂肪滴 LR11

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

びまん性大細胞型 B 細胞性リンパ腫 (DLBCL) は、非ホジキンリンパ腫の約 40%を占め、最も一般的なタイプの悪性リンパ腫である。DLBCL は、様々な臨床的特徴や遺伝子変化、転帰を伴う不均一な疾患である。遺伝子発現プロファイル(GEP)により、DLBCL は胚中心 B 細胞 (GCB)型と活性化 B 細胞(ABC)型に分類される。DLBCL 患者のうち、GCB の GEP を発現する患者は、ABC の GEP を発現する患者よりも予後良好であることが知られている。リツキシマブと化学療法併用療法により、DLBCL の治療効果が向上し、生存期間が延長されたが、とくに ABC type の DLBCL ではリツキシマブが無効な症例も存在する。また GCB type の DLBCL ではリツキシマブでも 2-3 割の症例において難治性症例が存在する。この治療抵抗性のメカニズムは完全に解明されておらず、CD20 の細胞表面での発現減少が原因の一つとして考えられている。さらに、DLBCL の ABC 型と GCB 型でリツキシマブの効果が異なる機序についても解明されていない。リツキシマブによる細胞傷害には、抗体依存性細胞傷害(ADCC)、補体依存性細胞傷害(CDC)が知られているが、そのいずれにも CD20 の腫瘍細胞原形質膜上の脂質ラフトへの移動が必要であることが知られている。

LR11 は、LDL 受容体ファミリーのひとつであり DLBCL や濾胞性リンパ腫患者の良好な予後と関連することが報告されている。

### 2. 研究の目的

本研究では、DLBCL における LR11 発現と細胞内脂肪滴の関連、さらに細胞内脂質代謝における LR11 の機能、とくにリツキシマブによる細胞傷害能に与える影響について検討した。

### 3. 研究の方法

本研究は、埼玉医科大学総合医療センター病理学教室において、1992 年から 2012 年までにびまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫 (DLBCL) と診断された患者 149 名の腫瘍生検標本と臨床データをレトロスペクティブに収集した。CD5+ DLBCL と EVB+ DLBCL は除外した。免疫組織化学を用いて、症例を胚中心 B (GCB) 型と非 GCB 型の 2 群にサブクラス分けした。LR11 の発現は、免疫組織化学染色で検出した。脂肪滴の多寡については組織診と同一検体から行われた細胞診検体を用いた。LR11 の発現、脂肪滴の多寡と臨床病理学的特徴との間の相関は、フィッシャーの正確検定およびスチューデント t 検定を用いて検証した。生存分析は、Kaplan-Meier Cox 法に従って行い、一般化ウィルコクソン検定を用いて曲線を比較した。また、リツキシマブを介した補体依存性細胞傷害性に与える影響を調べるためヒト B リンパ腫細胞株である Raji 細胞におけるリツキシマブによる補体依存性細胞傷害能に対する影響を CDC アッセイを用いて検討した。さらに LR11 と CD20 の相互作用を解析するために、共免疫沈降法およびプルダウンアッセイを実施した。統計解析は、コンピュータソフトウェア R を用いて行った。

### 4. 研究成果

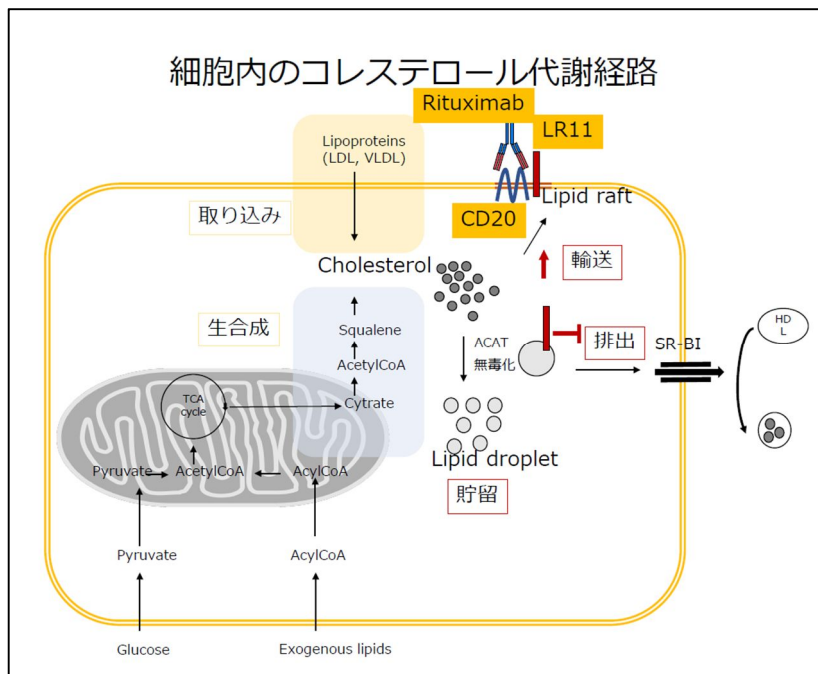
LR11 の発現は DLBCL 130 例中 64 例に認められ、DLBCL の胚中心 B 細胞 (GCB) サブタイプと相関していることが判明した。LR11 は細胞質内に顆粒状のパターンが観察された。66 例では発現なし、もしくは微弱な染色が観察された。LR11 の発現は、DLBCL の GCB サブタイプと関連し、CD10、Bcl6、Mum-1 の発現と相関していた。これまでに血清内における可溶性 LR11 が多い症例では予後不良であることが知られていたが、細胞内の全長型 LR11 の発現は予後良好であることが明らかとなった。脂肪滴の多い症例においては予後不良であることが明らかとなった。

次に B リンパ腫細胞株を用いた *in vitro* での LR11 の役割を検討した。LR11 をノックダウンすると、*in vitro* でリツキシマブを介した補体依存性細胞傷害 (CDC) が増加することが明らかになった。pull down assay, 免疫沈降法を用いた検討では、LR11 は CD20-リツキシマブ-補体の 3 者が複合体を作ること、リツキシマブ処理により LR11 が脂質ラフトに移動することが、明らかとなった。また、LR11 ノックダウン細胞においては培養液中に LDL 負荷をかけた場合に脂肪滴が増加していることがあきらかとなった。脂肪滴の増加に伴い cell viability が減少していることも明らかとなった。

細胞内コレステロールは Acyl-CoA:cholesterol acyl-transferase (ACAT) や、Scavenger receptor B1 (SR-B1) 等を介して細胞外に排出されることが知られており、これらの知見と併せると、DLBCL においては、一部の LDL は細胞膜上へ輸送され、脂質ラフトを形成し、この脂質ラフト上で LR11-CD20-リツキシマブが複合体をつくることにより補体依存性細胞傷害能を発揮しているものと考えられる。この脂質ラフトへの輸送と排出能を超えた LDL は細胞質内に蓄積し

脂肪滴として観察されるものと考えられる(図)。

本研究では、DLBCLにおけるLR11の発現がGCB typeと関連し、LR11がリツキシマブによる補体依存性細胞傷害を抑制することを示した。これらの知見は、LR11がリツキシマブ療法に対するリンパ腫細胞の抵抗性に関与している可能性を示唆し、リツキシマブの有効性を向上させる治療標的となる可能性が考えられた。今後、全長LR11と可溶性LR11の機能的な違いや、リンパ腫症例における脂質代謝との関連を明らかにするためのさらなる研究が必要と考えられる。



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件 / うち国際共著 4件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Takayanagi Natsuko, Momose Shuji, Kikuchi Jun, Tanaka Yuka, Anan Tomoe, Yamashita Takahisa, Higashi Morihiro, Tokuhira Michihide, Kizaki Masahiro, Tamaru Jun ichi	4. 巻 71
2. 論文標題 Fluorescent nanoparticle mediated semiquantitative MYC protein expression analysis in morphologically diffuse large B cell lymphoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pathology International	6. 最初と最後の頁 594 ~ 603
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/pin.13131	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yano Hiromu, Fujiwara Yukio, Horlad Hasita, Pan Chang, Kai Keitaro, Niino Daisuke, Ohsawa Kumiko, Higashi Morihiro, Nosaka Kisato, Okuno Yutaka, Tamaru Jun ichi, Mukasa Akitake, Matsuoka Masao, Komohara Yoshihiro	4. 巻 March 2022
2. 論文標題 Blocking cholesterol efflux mechanism is a potential target for antilymphoma therapy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 epub ahead
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15349	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Higashi Morihiro, Momose Shuji, Takayanagi Natsuko, Tanaka Yuka, Anan Tomoe, Yamashita Takahisa, Kikuchi Jun, Tokuhira Michihide, Kizaki Masahiro, Tamaru Jun ichi	4. 巻 March 2022
2. 論文標題 CD24 is a surrogate for 'immune cold' phenotype in aggressive large B cell lymphoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of Pathology: Clinical Research	6. 最初と最後の頁 epub ahead
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cjp2.266	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Higashi Morihiro, Kikuchi Jun, Murakami Chiaki, Takayanagi Natsuko, Momose Shuji, Kizaki Masahiro, Tamaru Jun-ichi	4. 巻 61
2. 論文標題 Better method for detection of CD30: Immunohistochemistry or flow cytometry?	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Clinical and Experimental Hematopathology	6. 最初と最後の頁 221 ~ 223
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3960/jslrt.21019	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tanaka Yuka, Momose Shuji, Tabayashi Takayuki, Sawada Keisuke, Yamashita Takahisa, Higashi Morihiko, Sagawa Morihiko, Tokuhira Michihide, Rosenwald Andreas, Kizaki Masahiro, Tamaru Jun-ichi	4. 巻 111
2. 論文標題 Abemaciclib, a CDK4/6 inhibitor, exerts preclinical activity against aggressive germinal center derived B cell lymphomas	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 749 ~ 759
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14286	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamashita Takahisa, Higashi Morihiko, Momose Shuji, Adachi Akiko, Watanabe Toshiki, Tanaka Yuka, Tokuhira Michihide, Kizaki Masahiro, Tamaru Jun-ichi	4. 巻 10
2. 論文標題 Decreased MYC-associated factor X (MAX) expression is a new potential biomarker for adverse prognosis in anaplastic large cell lymphoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 10391
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-67500-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tokuhira Michihide, Tanaka Yuka, Takahashi Yasuyuki, Kimura Yuta, Tomikawa Tatsuki, Anan Tomoe, Watanabe Junichi, Sagawa Morihiko, Higashi Morihiko, Momose Shuju, Amano Koichi, Tabayashi Takayuki, Nakaseko Reiko, Tamaru Jun-ichi, Kizaki Masahiro	4. 巻 60
2. 論文標題 The clinical impact of absolute lymphocyte count in peripheral blood among patients with methotrexate - associated lymphoproliferative disorders	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Clinical and Experimental Hematopathology	6. 最初と最後の頁 41 ~ 50
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3960/jslrt.19039	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tokuhira M, Saito S, Suzuki K, Higashi M, Momose S, Shimizu T, Mori T, Kimura Y, Amano K, Okamoto S, Takeuchi T, Tamaru JI, Kizaki M.	4. 巻 60
2. 論文標題 Clinicopathological features of clinical methotrexate-related lymphoproliferative disorders.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Leuk Lymphoma.	6. 最初と最後の頁 2508-2515
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/10428194.2019.1585841	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Tanaka Y, Momose S, Tabayashi T, Sawada K, Yamashita T, Higashi M, Sagawa M, Tokuhira M, Rosenwald A, Kizaki M, Tamaru JI.	4. 巻 111
2. 論文標題 Abemaciclib, a CDK4/6 inhibitor, exerts preclinical activity against aggressive germinal center-derived B-cell lymphomas.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Sci. 2020 Feb;111(2):	6. 最初と最後の頁 749-759
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14286	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Yamashita T, Higashi M, Kawano R, Momose S, Tokuhira M, Kizaki M, Tamaru JI.	4. 巻 69
2. 論文標題 Anaplastic large cell lymphoma with TP63 rearrangement: A dismal prognosis.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Pathol Int.	6. 最初と最後の頁 155-159
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/pin.12758	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Tokuhira M, Tanaka Y, Takahashi Y, Kimura Y, Tomikawa T, Anan T, Watanabe J, Sagawa M, Higashi M, Momose S, Amano K, Tabayashi T, Nakaseko R, Tamaru JI, Kizaki M.	4. 巻 -
2. 論文標題 The clinical impact of absolute lymphocyte count in peripheral blood among patients with methotrexate - associated lymphoproliferative disorders.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Clin Exp Hematop.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3960/jslirt.19039	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 東 守洋, 高柳 奈津子, 田中 佑加, 阿南 朋恵, 山下 高久, 得平 道英, 百瀬 修二, 木崎 昌弘, 田丸 淳一
2. 発表標題 DLBCLにおけるCD24分子発現の役割
3. 学会等名 110回日本病理学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 村上 千明, 百瀬 修二, 清水 朋実, 今田 浩生, 増田 渉, 中村 翔, 大宅 宗一, 東 守洋, 田丸 淳一
2. 発表標題 脳のlymphomatoid granulomatosisを機に診断された慢性リンパ球性白血病(CLL/SLL)の一例
3. 学会等名 110回日本病理学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 東 守洋
2. 発表標題 DLBCLにおけるCD24分子発現の役割
3. 学会等名 110回日本病理学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山下 高久, 東 守洋, 清水 朋美, 沢田 圭佑, 伊藤 梢絵, 山崎 真美, 高柳 奈津子, 菊地 淳, 今田 浩生, 川野 竜太郎, 増田 渉, 百瀬 修二, 田中 佑加, 得平 道英, 木崎 昌弘, 田丸 淳一
2. 発表標題 MYC-associated factor X(MAX)発現量の低下は未分化大細胞リンパ腫の予後不良に関する新規の有望なバイオマーカーである
3. 学会等名 第60回日本リンパ網内系学会
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	田丸 淳一 (Tamaru Jun-ichi) (30188429)	埼玉医科大学・医学部・客員教授  (32409)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------