

令和 4 年 5 月 30 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08817

研究課題名(和文) B細胞リンパ腫における新しいCD20陰性化機序の解明

研究課題名(英文) A novel molecular mechanism of CD20-negative conversion in B-cell lymphoma

研究代表者

谷口 亜裕子 (Taniguchi, Ayuko)

高知大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：30403885

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)：B細胞リンパ腫における抗CD20抗体治療後のCD20陰転化の機序としてCD20 (MS4A1) 遺伝子自体の欠落という新しい現象を示すことができた。
また、CD20陰性高悪性度B細胞性リンパ腫に対する効果的な治療法として、HDAC阻害薬が有効である可能性が示唆された。さらにHDAC阻害薬にBETプロモドメイン阻害薬あるいはpolo様キナーゼ1 (PLK1) 阻害薬を併用することで、相乗的な抗腫瘍効果が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

B細胞腫瘍患者におけるCD20発現の陰性化はリツキシマブなどの抗CD20抗体治療の効果が十分に得られないことを意味し、患者予後不良に直結する重要な問題である。本研究において、これまで十分に認識されていなかったCD20遺伝子の脱落という新しい現象を示されたことは、CD20遺伝子が完全欠落する前の段階での治療強度の選択へと還元できる可能性がある。
さらに、CD20陰性高悪性度B細胞性リンパ腫に対する治療上の標的分子を提示できたことにより、本リンパ腫に對峙できる効果的な新規治療法の開発につながることを期待できる。

研究成果の概要(英文)：CD20-negative conversion after immuno-chemotherapy of anti-CD20 antibody such as rituximab is clinically significant in patients with B-cell lymphoma because it is often associated with chemo-refractory and loss of the therapeutic target. Therefore, it is necessary to clarify the molecular mechanisms underlying the development of CD20-negative conversion in B-cell lymphoma. Using paired CD20-positive and -negative B-cell lymphoma cell lines derived from the same clones before and after rituximab use, respectively, we have found homozygous deletion of the CD20 (MS4A1) gene as a newly identified molecular mechanism of CD20-negative conversion. Moreover, we have found approaches to the effective therapeutic strategy against aggressive CD20-negative B-cell lymphoma using a histone deacetylase (HDAC) inhibitor and in combination with BET or PLK1 inhibitors.

研究分野：血液腫瘍学

キーワード：悪性リンパ腫 治療抵抗性 遺伝子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

B細胞リンパ腫においてCD20の発現が認められない場合には下記の2通りがある。

- ・抗CD20抗体治療後にCD20陰性化するB細胞リンパ腫
- ・初診時からCD20発現が認められないB細胞リンパ腫

これらの学術的背景として、以下があげられる。

(1) 抗CD20抗体治療後にCD20陰性化するB細胞リンパ腫

これまではCD20陽性B細胞リンパ腫に対する抗CD20抗体治療後にCD20が陰性化する機序についてはメチル化などのエピジェネティックな機序が提唱されている。しかしながら、それ以外のCD20陰性化機序については明らかにされていなかった。そのため、CD20陰転化機序の全容解明が望まれていた。

(2) 初診時からCD20発現が認められないB細胞リンパ腫

B細胞リンパ腫患者におけるCD20発現の陰性化は、リツキシマブなどの抗CD20抗体治療の効果が得られないことを意味し、患者予後不良に直結する重要な問題である。したがって、CD20陰性B細胞リンパ腫に対する効果的な新規治療法の開発が望まれていた。

2. 研究の目的

以上の背景を基に、本研究では以下の項目を目的とした。

(1) CD20陽性B細胞リンパ腫において、リツキシマブ投与後にCD20の陰性化をきたす新しい機序を見出し、解明することを目的とした。

(2) *de novo* CD20低発現B細胞リンパ腫における効果的な新規治療法開発に向けての基盤研究を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 我々の研究グループは、CD20陽性B細胞リンパ腫患者から、リツキシマブ投与前および投与後に耐性になった2つのリンパ腫細胞株(P20とN20)の樹立に成功した。P20細胞株はCD20陽性であるが、N20細胞株のCD20は陰転していた。両細胞株は同一患者より樹立された同一クローン細胞由来であることが証明されており、このペア細胞株を比較することにより、CD20陽性からのCD20陰転化機序の検討を行った。

CD20(MS4A1)遺伝子をはじめ、その近傍に位置するMS4Aクラスター遺伝子(11番染色体長腕11q12)に特異的なプライマーを設定し、それら遺伝子DNA量を定量的リアルタイムPCR法で測定した。

(2) 我々の研究グループは、高悪性度B細胞リンパ腫(High-grade B-cell lymphoma with MYC and BCL2 and/or BCL6 rearrangements)いわゆるダブルヒットリンパ腫の細胞株を樹立した。これは、MYC-IgH融合遺伝子とBCL6-IgH融合遺伝子の双方を有する*de novo*発生のダブルヒットリンパ腫症例から樹立された細胞株であり、CD20の発現は認められなかった。ダブルヒットリンパ腫ではCD20の発現が弱い症例が少なからず存在する。今回の研究では、このCD20低発現のダブルヒットリンパ腫細胞株を用いて、新規治療標的分子の探索を行った。

各種薬剤による細胞増殖抑制効果については、アポトーシスをアネキシンV結合アッセイで測定した。

4. 研究成果

(1) B細胞リンパ腫における新しいCD20陰性化機序

まず、P20とN20細胞株の元になった患者オリジナルリンパ腫細胞において、CD20遺伝子の7つのエクソン領域にそれぞれプライマーを設定し、定量的リアルタイムPCRで各々のゲノム量を測定した。解析の結果、再発時CD20陰性リンパ腫細胞(N20のオリジナル細胞)では、初診時CD20陽性リンパ腫細胞(P20のオリジナル細胞)に比べてCD20ゲノム量に著しい低下がみられたものの、各々のエクソンゲノム量には違いがあった。例えば、エクソン3では約30倍、エクソン6では約150倍低下していた。細胞株の解析で、15代継代培養のN20細胞では、同じ15代継代培養のP20細胞と比べて、エクソン3では約1000倍、エクソン6では約5000倍低下していた。これらの結果からCD20遺伝子領域でも欠損しやすい領域があることが示唆された。

次に、樹立安定したP20とN20細胞株を比較することにより、CD20(MS4A1)遺伝子

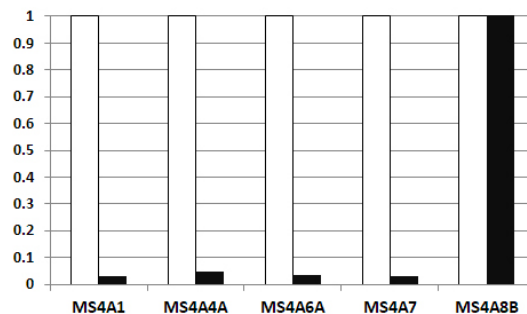


図1 MS4Aクラスター遺伝子DNA量の相違

近傍に位置する MS4A クラスター遺伝子群のゲノム欠落の有無について解析した(図1)。その結果、P20 細胞の MS4A クラスター遺伝子の全てについては、失われた部分のない完全なままの状態であった。しかし N20 細胞では MS4A13 遺伝子から上流に位置する MS4A3 遺伝子 (MS4A13、MS4A12、MS4A1、MS4A7、MS4A4A、MS4A6A、MS4A3) までが欠落していた。一方、MS4A8 から下流の MS4A15、MS410 遺伝子は欠落していなかった。これらの結果は、抗 CD20 抗体治療後に起きる CD20 (MS4A1) 遺伝子の欠落は、CD20 遺伝子のみで起きる現象でなく、MS4A1 遺伝子近傍に位置する一部の MS4A クラスター遺伝子群も巻き込んで起きることが示された(図2)。

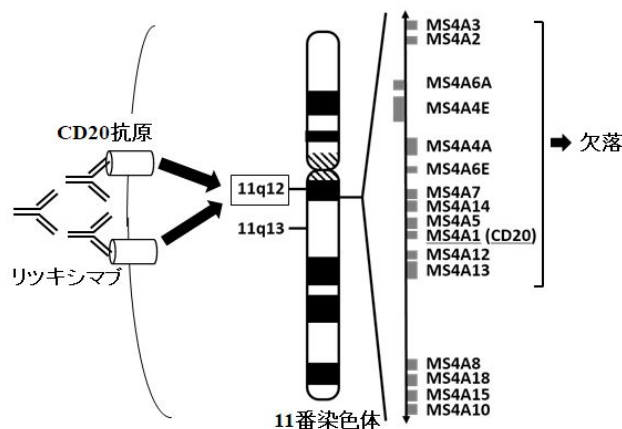


図2 MS4A クラスター遺伝子の欠落

(2) CD20 陰性 B 細胞リンパ腫に対する新規治療法開発に向けての基盤研究

CD20 低発現ダブルヒット B 細胞リンパ腫症例から樹立された細胞株を用いて、ヒストン脱アセチル化酵素 (histone deacetylase, HDAC) 阻害薬によるリンパ腫細胞増殖抑制効果を調べた。

HDAC 阻害薬であるポリノスタット (250 nM, 500 nM, 1000 nM) をこの細胞株に加えると、濃度依存的にアポトーシスが誘導された。1000 nM のポリノスタットは統計学的有意差をもってアポトーシスの誘導が確認された。

ポリノスタット (500 nM) に BET プロモドメイン阻害薬で MYC 活性を抑制する JQ1 (500 nM) を併用すると、ポリノスタット単独より相乗的にアポトーシスが誘導された。

さらに、ポリノスタット (500 nM) に細胞分裂に関わる Polo-like kinase 1 (PLK1) の阻害薬であるボラセルチブ (2.5 nM) を併用すると、ポリノスタット単独より相乗的にアポトーシスが誘導された。

以上の結果から、次の結論を導いた。

(1) 抗 CD20 抗体治療後に起きる CD20 (MS4A1) 発現の陰転化機序の一つとして、CD20 遺伝子自体の欠落という新しい現象を示すことができた。その場合、CD20 遺伝子のみで起きる現象ではなく、MS4A1 遺伝子近傍に位置する一部の MS4A クラスター遺伝子群の欠落ももたらすことが明らかにされた。

(2) ダブルヒットリンパ腫など高悪性度 B 細胞リンパ腫では、抗 CD20 抗体の使用に関係なく、CD20 の低発現がみられることが報告されている。本研究で、CD20 陰性高悪性度 B 細胞リンパ腫に対する治療として、HDAC 阻害薬が有効である可能性が示唆された。さらに HDAC 阻害薬に BET プロモドメイン阻害薬あるいは PLK1 阻害薬を併用することで、相乗的な抗腫瘍効果が示された。これらの成果を基に、研究をさらに発展させることで CD20 陰性高悪性度 B 細胞性リンパ腫に対峙できる新規治療法の開発につながることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 小笠原史也、伊藤孟彦、中村 真、佐伯恭昌、谷口亜裕子、砥谷和人、小島研介	4. 巻 62
2. 論文標題 ステロイド治療中に後天性フィブリノゲン低下症をきたした白血病	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 臨床血液	6. 最初と最後の頁 193-195
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.11406/rinketsu.62.193	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 Tomonori Higuchi, Kazuhiko Matsuo, Yumiko Hashida, Kosuke Kitahata, Takako Ujihara, Ayuko Taniguchi, Osamu Yoshie, Takashi Nakayama, Masanori Daibata.	4. 巻 453
2. 論文標題 Epstein-Barr virus-positive pyothorax-associated lymphoma expresses CCL17 and CCL22 chemokines that attract CCR4-expressing regulatory T cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Letters	6. 最初と最後の頁 184-192
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.canlet.2019.03.053	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 Nishimori Tomohiro, Higuchi Tomonori, Hashida Yumiko, Ujihara Takako, Taniguchi Ayuko, Ogasawara Fumiya, Kitamura Naoya, Murakami Ichiro, Kojima Kensuke, Daibata Masanori	4. 巻 10
2. 論文標題 Development of a novel cell line derived xenograft model of primary herpesvirus 8 unrelated effusion large B cell lymphoma and antitumor activity of birabresib in vitro and in vivo	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Medicine	6. 最初と最後の頁 8976 ~ 8987
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/cam4.4394	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6件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Tomohiro Nishimori, Tomonori Higuchi, Yumiko Hashida, Ayuko Taniguchi, Kensuke Kojima, Masanori Daibata.
2. 発表標題 Establishment of a new cell line derived from human herpesvirus 8-unrelated primary effusion lymphoma-like lymphoma.
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小笠原史也、 砥谷和人、中谷 優、中村 真、佐伯恭昌、 谷口亜裕子、 小島研介
2. 発表標題 Blinatumomab投与後, CD19陰性で再発を来したフィラデルフィア染色体陽性急性リンパ性白血病 (Ph ALL)
3. 学会等名 第59回日本血液学会中国四国地方会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 澤村大造、佐伯恭昌、小笠原史也、中村 真、谷口亜裕子、砥谷和人、大西広志、 小島研介
2. 発表標題 Acute fibrinous and organizing pneumonia を発症した骨髄異形成症候群の一例
3. 学会等名 第59回日本血液学会中国四国地方会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山形清子、小笠原史也、中村 真、佐伯恭昌、谷口亜裕子、砥谷和人、小島研介
2. 発表標題 高心拍出性心不全を併発した多発性骨髄腫
3. 学会等名 第59回日本血液学会中国四国地方会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中村 真、小笠原史也、佐伯恭昌、谷口亜裕子、砥谷和人、小島研介
2. 発表標題 胃原発びまん性大細胞型B細胞リンパ腫の初回化学療法中に発症した胃気腫症
3. 学会等名 第60回日本血液学会中国四国地方会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 江田仁海、小笠原史也、中谷 優、中村 真、佐伯恭昌、谷口垂裕子、砥谷和人、小島研介
2. 発表標題 上大静脈に発生したびまん性大細胞性Bリンパ腫
3. 学会等名 日本内科学会四国地方会
4. 発表年 2019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	樋口 智紀 (Higuchi Tomonori) (00448771)	高知大学・教育研究部医療学系基礎医学部門・講師 (16401)	
研究 分担者	大畑 雅典 (Daibata Masanori) (50263976)	高知大学・教育研究部医療学系基礎医学部門・教授 (16401)	

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
---------	---------