

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08832

研究課題名(和文) 難治性B細胞腫瘍の新たな分子標的COTとその臨床的バイオマーカーとしての有用性

研究課題名(英文) COT, a new molecular target in refractory B-cell malignancies and its clinical application

研究代表者

長尾 俊景 (NAGAO, TOSHIKAGE)

東京医科歯科大学・東京医科歯科大学病院・助教

研究者番号：10622798

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究において我々は、難治性B細胞リンパ腫の一種ABC-DLBCLにおいてCOTキナーゼが活性化し、病態特異的にIL-6/IL-10のautocrineを介してSTAT3を活性化し、腫瘍原性に関与していることを見出した。また、この機序はABC-DLBCLに特徴的に認めMYD88変異体に依存性で、COT/p105経路が、ABC-DLBCLの主要な活性化シグナル伝達経路と協調的に作用し、腫瘍細胞の増殖を調節していることを示した。一方病理組織学的検討により、COTの高発現がABC-DLBCLの最も予後不良な一群と関連する可能性が示唆され、臨床的バイオマーカーとしての有用性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ABC-DLBCLなど難治性リンパ腫の治療戦略は、NGS関連技術の進歩を背景に新たな時代を迎えている。特に予後不良群においては、細胞起源や特異的遺伝子異常など、より生物学的特性に基づいた分子標的の抽出が重要な課題であるが、本研究で我々が見出したCOTは、ABC-DLBCLにおける新たな分子標的として有望である。また他疾患領域では既にCOT阻害薬の臨床応用が見込まれており、将来の抗腫瘍薬の領域への応用も十分に期待できる。また、免疫組織学的染色を用いた解析で、予後不良症例を同定するための臨床的バイオマーカーとしての有用性も示されており、実臨床における治療成績の向上に貢献できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：ABC-DLBCL is a B-cell lymphoma subtype with relatively unfavorable prognosis. It is characterized by the constitutive activation of NF- $\kappa$ B pathway due to specific mutations in BCR- or TLR-signaling, contributing to the lymphomagenesis. In this project, we identified COT, an intracellular kinase, as a novel drug-able target in ABC-DLBCL. We found that COT/p105 complex, specifically activated by IKK downstream of TLR/MYD88-L265P, promotes activation of NF- $\kappa$ B or MAPK pathway as well as IL-6/IL-10 autocrine loop and resultant JAK/STAT3 activation. In addition, in our results COT accelerated cell cycle progression in ABC-DLBCL by regulating c-MYC and other cell cycle associated molecules. Intriguingly, in IHC-based analysis, high COT expression was significantly associated with relatively worse prognosis among DLBCL patients with ABC phenotype treated in our institute. Together, COT could aid in risk-stratification of ABC-DLBCL and emerge as a new molecular target in this subtype.

研究分野：造血器腫瘍

キーワード：難治性B細胞腫瘍 COT (TPL2) 臨床的バイオマーカー

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年分子標的治療の著しい発展により、造血器腫瘍の治療成績・予後は改善しつつある。その一方で活性化 B 細胞様びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫 (ABC-DLBCL) などの一部の成熟 B 細胞腫瘍では、治療成績は十分でなく未だ予後は不良である。これらの腫瘍の再発性・治療抵抗性と関係が深く、共通する特徴の一つに NF- $\kappa$ B 経路の構成的活性化がある。NF- $\kappa$ B 経路の活性化は同時に、もう一つの重要な経路である JAK-STAT3 系を初めとする様々な経路と相互に関連し、難治性病態の形成に寄与している (*Nat. Rev. Clin. Oncol* 11,12-23:2014)。これまでに NF- $\kappa$ B 経路を標的にした様々な小分子阻害薬の臨床試験が行われているが、正常細胞の機能維持にとっても重要な経路であるが故に、IKK など主要構成分子に対する直接の阻害薬は、その重篤な副作用プロファイルが臨床応用への大きなハードルとなる。このため、より腫瘍細胞特異的なメカニズムによる NF- $\kappa$ B 経路やその関連シグナルを阻害する介入方法が求められている。

COT (TPL2) は MAP3K の一種として知られる多機能細胞内セリン・スレオニンキナーゼで、造血系を含むほぼ全ての組織で発現しており、IKK の調節下に、p50 の前駆体 p105/NF- $\kappa$ B1 のリン酸化・分解を介して活性化され、MEK 以下の MAPK 系を活性化するという特徴的なメカニズムを有し、免疫応答や生存・増殖など多様な細胞機能に関与することが知られる。COT は近年、炎症性疾患や膠原病・自己免疫疾患に対する、マクロファージを中心とした免疫担当細胞における分子標的としてのみならず、多様な固形腫瘍、さらに一部の造血器腫瘍の病態や腫瘍微小環境での免疫応答における役割が報告されるなど注目を集めている (*Cancer Letters* 304:80-89,2011) が、B 細胞腫瘍における機能に関する報告は限定的である。

一方申請者は、近年自身で樹立した未発表細胞株を含む複数の ABC-DLBCL 細胞株において、特異的 COT 阻害薬が濃度・時間依存性に NF- $\kappa$ B 系の抑制とともに STAT3 活性を抑制し抗腫瘍効果を発揮することを見出した。また興味深いことに、この効果は他の重要な DLBCL のサブタイプである GCB-DLBCL では観察されず、ABC-タイプに特異的であることが示唆された。これらの結果から、申請者は ABC-DLBCL に代表される難治性成熟 B 細胞腫瘍において、COT が NF- $\kappa$ B 及び JAK-STAT3 両経路の活性化と制御に関与し、細胞増殖の調節や薬剤感受性など難治性の形成に強く寄与しているという仮説を立て、さらにその延長線上に、これらの疾患群において COT が、重要な予後予測因子あるいは難治性の臨床的バイオマーカーとなり得る可能性について検討する必要があると考えるに至った。

### 2. 研究の目的

(1) 本研究の第一の目的は、COT の難治性成熟 B 細胞腫瘍における役割、特に難治性形成に関与の深いシグナル伝達経路への寄与とそのメカニズムについて解析し、同時にこれらの腫瘍における新たな分子治療標的としての可能性を評価することである。

(2) さらに第二の目的として、ABC-DLBCL を含むこれら難治性 B 細胞腫瘍における、予後予測因子・難治性に関する臨床的バイオマーカーとしての COT の有用性を明らかにし、実臨床への応用を提案することである。

(3) 上記(1)(2)に関連する第三の目的として、腫瘍の微小環境におけるマクロファージや T リンパ球などの免疫応答担当細胞における COT の機能を解析し、特異的阻害薬による COT 機能抑制が腫瘍の増殖の制御、殺細胞薬などへの薬剤感受性の改善等に寄与するか否か、評価することが挙げられる。このような腫瘍・免疫・微小環境など多様な側面に包括的に作用する介入方法/分子標的治療は、新しい時代の抗腫瘍メカニズムのコンセプトとして注目を集める可能性がある。

### 3. 研究の方法

#### (1) COT の難治性 B 細胞腫瘍の病態形成における役割に関する解析

難治性成熟 B 細胞腫瘍における COT の腫瘍原性およびその調節機構、細胞周期・アポトーシス制御への関与を明らかにする(当初の計画)。具体的には、このカテゴリーの代表的腫瘍である ABC-DLBCL 細胞株とその対照である GCB-DLBCL 細胞株を用いて、COT の発現・活性化とその下流経路、特に本来の基質である MAP2K 以下の MAPK 経路のみならず、NF- $\kappa$ B および STAT3 などの病態形成に深く関与する経路の活性化調節への関与に加え、c-MYC や Cyclin E、p27 などの細胞周期調節因子発現調節への影響についてウエスタンブロット法、免疫沈降法、フローサイトメトリー法の分子生物学的手法により解析する。特異的阻害薬および shRNA 法による COT のノックダウン、さらにその発現回復実験により COT 以下のシグナル伝達経路に特異的な機序を確認する。得られた結果に関して、定量的リアルタイム RT-PCR 法により mRNA 発現を評価することで、その傾向を裏付ける。またレトロウイルス法により COT の強発現細胞、あるいは構成的活性化体やドミナントネガティブ体の COT 発現細胞を作成し、阻害薬への耐性や、上記した関連するシグナル伝達経路への影響を解析する。さらにマウス異種移植モデルを用いて、上記の結果について検証する。具体的には ABC-DLBCL 細胞株 2 種および対照 (GCB-DLBCL 細胞株) を免疫不全マウスに異種移植した腹部皮下腫瘍モデルを用いて、特異的 COT 阻害薬治療 (傍腫瘍皮下注射) の効果について解析する。腫瘍径の変化・対照群との比較により、治療効果を経時的に評価する。適切に安楽死させたマウスから腫瘍を摘出し固定、病理組織標本作製し、免疫染色にて COT および病態関連分子の発現・活性化を比較する。さらに腫瘍中の DNA、RNA、タンパクの抽出を行い、分子生物学的手法により特異的 COT 阻害薬の効果の詳細に解析する。これらの検討により、難治性成熟 B 細胞腫瘍、特に ABC-DLBCL における COT の役割を明確にする。

#### (2) COT の B 細胞腫瘍における臨床的バイオマーカーとしての可能性に関する解析

申請者の所属する医療施設及で経験された難治性 B 細胞リンパ腫症例のうち、臨床経過の追跡と病理/保存細胞検体の利用が可能なものについて、腫瘍細胞における COT の発現と活性化を評価し、臨床経過との関連を統計学的に解析する。具体的には、当施設の倫理委員会の審査・許可を受けた後に、当施設病理部との共同研究の元に、難治性 B 細胞腫瘍の代表として、臨床経過が追跡可能な ABC-DLBCL (病理学的診断としては non-GCB DLBCL) 症例のうち、診断時のパラフィン固定標本が利用可能な症例を少なくとも 30 例抽出し、COT の高/低発現を定義したうえで、COT、STAT3 や NF- $\kappa$ B 経路構成分子、細胞周期関連分子など ABC-DLBCL の病態に特異的に関与する分子の免疫染色を試み、これら相互の相関関係や、臨床的特徴、治療経過、予後との関連について統計的に解析する。保存細胞が利用可能な症例については、並行して阻害薬実験を行い蛋白や mRNA を抽出し COT の発現・活性化や他の関連分子との相関を裏付ける。以上の解析により、これらの疾患群における難治性のマーカーとしての有用性を検討する。

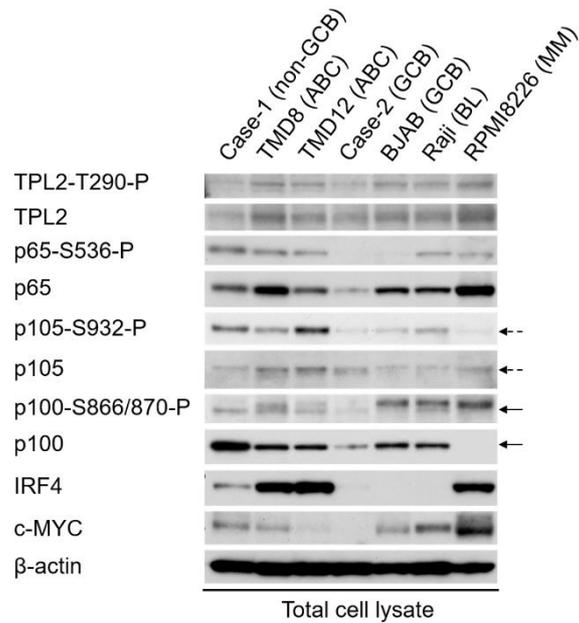
### 4. 研究成果

#### (1) 新規樹立 ABC-DLBCL 細胞株 TMD12、COT の ABC-DLBCL の病態形成における役割

まず、COT は広く B 細胞性悪性腫瘍に比較可能なレベルで発現・活性化していることをウエスタンブロット法にて確認した。この検討には、当施設で 2006 年に樹立された ABC-DLBCL 細胞株 TMD8 と、本研究の研究期間に申請者が新たに樹立した同じく ABC タイプの細胞株 TMD12 を含む、複数の B 細胞性悪性腫瘍細胞株に加え、施設内の倫理委員会で審査・承認を得て、当施設で治療された悪性リンパ腫症例の臨床検体が用いられた。この中で、ABC タイプの細胞株および non-GCB タイプの臨床検体では、GCB タイプの細胞株および GCB タイプの臨床検体と比較し、IKK や p65 など NF- $\kappa$ B 経路構成分子の活性化、COT とシグナル伝達複合体を形成する p105 の活性化

(S932リン酸化) また STAT3の活性化や IRF4の高発現が観察された(図1)。興味深いことに ABCタイプの細胞は GCBタイプの細胞と比べて特異的 COT 阻害薬へ高い感受性を示し、有意な増殖の抑制を呈した。これは CCK-8 細胞生存アッセイでも同様の傾向を認めており、COTのABCサブタイプ特異的な機能と病態形成への関与が示唆された。加えてCOTの活性化がイブルチニブ(BTK阻害薬)やイデラリシブ(PI3K阻害薬)、ダサチニブ(SRCファミリー阻害薬)など、ABC-DLBCLへの有効性が報告される小分子阻害薬への耐性形成に関与している可能性、さらにCOTの上流に存在する分子であるIKKの活性化調節への関与も推察された。さらにこのCOT阻害による細胞増殖抑制作用は、細胞周期解析や定量的リアルタイムPCR法を用いた解析にて、MYCおよび

図1

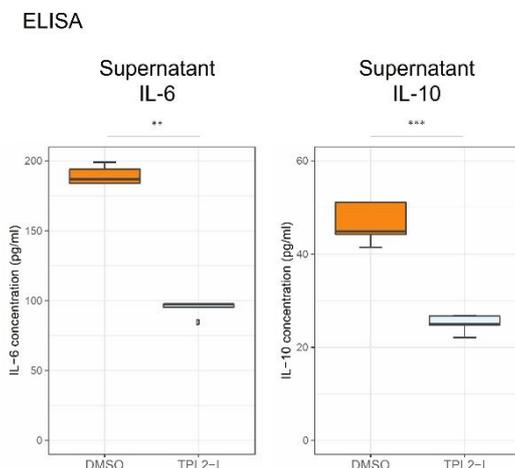


Cyclin Eの発現抑制、p27の発現亢進を介してG1細胞周期静止を誘導することで生じることが示された。またCOTの基質であるMEK、p38などMAP2K以下のMAPK経路を通じたシグナル伝達も相乗的に作用していることも示唆された。一方でアポトーシスの誘導作用は目立たないことから、COTの機能は細胞周期関連分子の調節による細胞増殖の促進が主体とも考えられた。これらの結果についてはTMD12の樹立報告およびABC-DLBCLのモデル細胞としての有用性とあわせて2019年(第81回)および2020年(第82回)日本血液学会総会で各々発表し、現在Experimental Hematology誌に投稿中である。

(2) COTはMYD88変異体依存性にIL-6/IL-10のautocrineを介しJAK/STAT3系を活性化する

(1)の結果を受け、COTがABC-DLBCLの病態形成に関与するメカニズムについて、研究協力者である吉藤康太、本村鷹多朗とともに解析を進めた。上記のABC-DLBCL細胞株TMD8を用いた検討において、特異的COT阻害薬処理により、用量および時間依存性にp105やNF- $\kappa$ B系構成分子であるp65の活性化のみならず、ABC-DLBCLのもう一つの特徴的な性質とされるSTAT3の活性化も有意に抑制された。shRNAを用いたCOTのノックダウンの系においてもこれと同様の傾向が観察された。興味深いことに、COT阻害薬処理した細胞培養液上清中のIL-6/IL-10は、コントロール(非阻害薬処理)上清と比較して著明に低下していた(図2)。このことから、COTはABC-DLBCLにおいて、IL-6/IL-10の産生と、サイトカインレセプターを介したJAK/STAT3経路のautocrine的機序による活性化を調節していることが示唆された。NIHが公表しているDLBCLの大規模RNA-seqデータベースを活用した解析においてもこれに矛盾しない結果、すなわちCOTとIL-6およびIL-10の発現には正の相関が認められた。また(1)で記載したCyclinEやCDK2などの細胞周期関連分子とも相関を示唆された。さらに、興味深いことに293T細胞モデルを用いた検討では、

図2



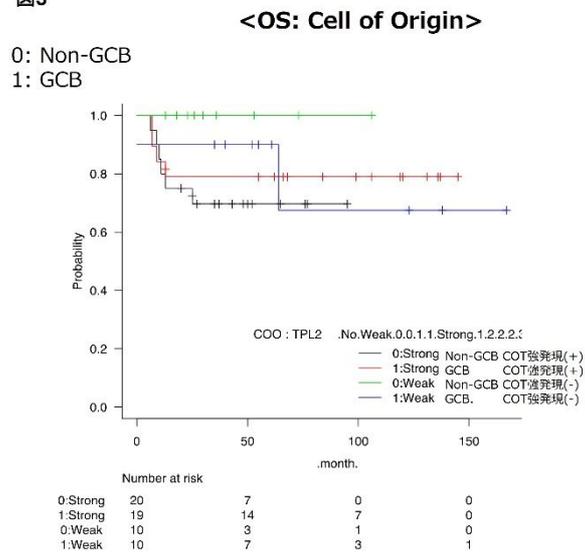
\* 0.005 <math>p</math> <math>\leq</math> 0.05  
 \*\* 0.0005 <math>p</math> <math>\leq</math> 0.005  
 \*\*\* <math>p</math> <math>\leq</math> 0.0005

コントロール(非阻害薬処理)上清と比較して著明に低下していた(図2)。このことから、COTはABC-DLBCLにおいて、IL-6/IL-10の産生と、サイトカインレセプターを介したJAK/STAT3経路のautocrine的機序による活性化を調節していることが示唆された。NIHが公表しているDLBCLの大規模RNA-seqデータベースを活用した解析においてもこれに矛盾しない結果、すなわちCOTとIL-6およびIL-10の発現には正の相関が認められた。また(1)で記載したCyclinEやCDK2などの細胞周期関連分子とも相関を示唆された。さらに、興味深いことに293T細胞モデルを用いた検討では、

COT は MYD88-L265P 変異体の共発現依存性に STAT3 及び NF- $\kappa$ B 経路の活性化を誘導すること、さらに COT のドミナントネガティブ体ではこれが抑制されることが示され、MYD88 変異を有する ABC-DLBCL における、COT の病態形成への関与が強く示唆された。これらの結果については 2021 年（第 83 回）日本血液学会総会にて口演発表した。なお当初予定された免疫不全マウスを用いた異種腫瘍移植実験、並びに腫瘍組織関連免疫担当細胞における COT の機能解析については、本研究期間における COVID-19 パンデミックによる研究活動抑制の影響も大きく、現段階では遂行を保留とし、関連研究における将来的な課題の一部として引き継ぐものとした。

(3) COT の ABC-DLBCL における臨床的バイオマーカー、予後不良因子としての可能性  
 申請者の施設で治療された、臨床経過の追跡が可能な non-GCB (ABC) タイプ、および GCB タイプの DLBCL 症例、各々約 30 例、計約 60 例の診断時パラフィン固定標本を集約し、免疫染色による COT タンパクの発現強度と、各症例の臨床的特徴や予後との関連について統計的解析を行った。興味深いことに COT は non-GCB 群で有意に高発現であるとともに、non-GCB における COT-high 群は、それ以外の群と比較し、節外病変や B 症状などの予後不良因子と有意な相関があり、より予後不良な傾向を認めた(図 3)。さらに COT-high かつ STAT3 の活性化を伴う症例群の予後はこれらを伴わない症例と比較し不良であることから、COT の発現に注目することで、元々相対的に予後不良とされる ABC タイプにおける最も予後の悪い群を抽出する方法論につながる可能性が示唆された。以上から COT は、ABC-DLBCL の層別化治療戦略における新たな分子標的となる可能性のみならず、病理組織免疫組織染色を利用した予後不良群の抽出という、実臨床への早期の貢献も期待できる有望な分子として、難治性 B 細胞腫瘍の領域にブレイクスルーをもたらす可能性があると考えられた。この研究成果については米国血液学会での発表およびこれと並行した論文投稿の準備中である。

図3



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Toshikage Nagao, Kota Yoshifuji, Ayako Nogami, Keigo Okada, Shuji Tohda
2. 発表標題 TPL2 (COT kinase) regulates cell survival and proliferation in ABC-like DLBCL.
3. 学会等名 第82回日本血液学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Toshikage Nagao, Ayako Nogami, Yoshihiro Umezawa, Ken Watanabe, Osamu Miura
2. 発表標題 Establishment and characterization of the new ABC-type DLBCL cell line TMD12
3. 学会等名 第81回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kota Yoshifuji, Yotaro Motomura, Ayako Nogami, Keigo Okada, Takehiko Mori, Toshikage Nagao
2. 発表標題 Involvement of TPL2/p105/STAT3 axis in tumorigenesis of ABC-DLBCL
3. 学会等名 第83回日本血液学術集会
4. 発表年 2021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
研究協力者	吉藤 康太  (Yoshifuji Kota)		

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	本村 鷹多朗  (Motomura Yotaro)		

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