

機関番号 : 37104

研究種目 : 基盤研究 (C)

研究期間 : 2008~2010

課題番号 : 20500327

研究課題名 (和文) 中枢神経原発悪性リンパ腫の腫瘍発生におけるケモカインおよび EB ウイルスの役割

研究課題名 (英文) The analysis of chemokines and Epstein-Barr virus in the tumor genesis of primary central nervous system lymphomas

研究代表者

杉田 保雄 (Yasuo Sugita)

久留米大学・医学部・教授

研究者番号 : 80216316

研究成果の概要 (和文) : 中枢神経原発悪性リンパ腫(PCNL)の腫瘍発生において EB ウイルスの関与が免疫不全患者において知られていたが、今回の研究で EB ウイルス関連の PCNSL は正常な免疫能を有する高齢者の患者においても発生することが明らかになった。これらの症例では病理組織型は壊死を伴うびまん性大細胞型であった。EB ウイルスの型は Epstein-Barr nuclear 2 (EBNA2) の A type が多く、30-bp の latent membrane protein 1(LMP1)の deletion が高頻度であった。したがって EB ウイルス関連の PCNSL の腫瘍発生においては EBNA2 strain あるいは LMP1 deletion が重要である。また EB ウイルス関連の PCNL の腫瘍発生は加齢による免疫機能の低下が関与している可能性がある。またケモカインでは CXCL12/CXCR4 が PCNL に高頻度に発現しており、CXCL12/CXCR4 signaling が PCNL の腫瘍発生に重要な役割を担っている。

研究成果の概要 (英文) : In this study, Epstein-Barr virus (EBV) was implicated in the pathogenesis of primary central nervous system lymphomas (PCNLs) in immunocompetent hosts (elderly immunocompetent patients; age ≥ 60 years). Histologically, all cases were diagnosed as diffuse large B-cell lymphoma with extensive necrosis. EBV subtyping-PCR analysis demonstrated that many cases were EBNA 2A type and showed 30-bp LMP-1 deletion on PCR analysis. These results indicate that LMP-1 deletion may have more potent tumor-promoting activity than EBV containing the full-size LMP-1 gene in the pathogenesis of PCNLs in immunocompetent hosts. In addition, some EBV subtypes may show more potent tumor-promoting activity. Regarding chemokines, we have shown that CXCL12/CXCR4 was frequently expressed in PCNLs and other brain cells. Thus, the results suggest that the CXCL12/CXCR4 signaling mediates PCNLs development.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	900,000	270,000	1170,000
2009 年度	800,000	240,000	1040,000
2010 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	2,200,000	660,000	2,860,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経解剖学・神経病理学

キーワード：神経科学、脳神経疾患、病理学

1. 研究開始当初の背景

(1) PCNS リンパ腫発生における EB ウイルスの役割

従来から AIDS 患者の PCNS リンパ腫発生に EB ウイルス感染が関連するとされており、AIDS 患者関連の PCNS リンパ腫発生の起点は EB ウイルス感染による inflammatory lesion in situ であることが示唆されていた (Smith JR et al. Blood 2003;101:815-821)。

Kimura et al. (Genes Immun 2003;4:356-361) は EB ウイルスによって変換された lymphoblastoid cell は抹消血の正常リンパ球に比較してケモカイン SDF1(CXCL12)の messenger RNA を有意に高発現することを明らかにしていた。しかし、申請者らの調査によると頻度は高くはないが、従来の文献ではほとんど記載されていない非 AIDS 患者の EB ウイルス関連 PCNS リンパ腫は予想以上に存在していた。言い換えれば一部の PCNS リンパ腫では EB ウイルスは発癌の大きな要因である。したがって申請者らは以上の点を踏まえて EB ウイルス関連 PCNS リンパ腫の病理病態の解明を試みた。

(2) PCNS リンパ腫におけるケモカインの解析

PCNS 悪性リンパ腫の大部分は Non-Hodgkin, diffuse, large B cell lymphoma であるが、PCNS リンパ腫の脳内進展機構については不明な点が少ない。申請者らは PCNS リンパ腫の病理組織像の特徴として腫瘍細胞が血管周囲に集簇を示して浸潤することに着目して PCNS リンパ腫の脳内進展時の血管新生の特徴について明かにした (Sugita et al. J Neuro-oncol 2007;82:249-256)。すなわち、PCNS リンパ腫は Virchow-Robin 腔に集簇する初期段階では血管新生は示さないが、glia limitans perivascularis を破壊して脳実質に浸潤すると著明な腫瘍血管を新生する。また、腫瘍の増殖機構として cyclooxygenase-VEGF が関与していることも明らかにした (Sugita et al. Oncol Rep 2007;18:617-622)。一方、PCNS リンパ腫細胞、脳内血管、ニューロン、髄膜からのケモカイン発現が PCNS リンパ腫の浸潤、増生に関与するという報告も散見された。したがって申請者らは以上の点を踏まえて「PCNS リンパ腫瘍細胞は Virchow-Robin 腔に集簇した後に glia limitans perivascularis を破壊して脳実質に浸潤する。その際にリンパ腫細胞および周囲組織から発現されるケモカイン

により誘導される。またケモカインは腫瘍細胞の脳浸潤後は腫瘍血管新生にも関与する。」という仮説を立てた。

2. 研究の目的

中枢神経原発悪性リンパ腫 (PCNS リンパ腫) の脳内浸潤機構、腫瘍発生についてのケモカイン・レセプターおよび Epstein Barr (EB) ウイルスについて役割を解決することであり、PCNS リンパ腫の診断、治療などの臨床応用へと展開するための研究基盤を確立することである。

3. 研究の方法

(1) 2008~2009 の研究では PCNS リンパ腫における EB ウイルスの役割について検討を行った。当施設および関連施設の PCNS リンパ腫 67 症例を対象とした。方法として腫瘍発生における EB ウイルスの関与を In situ hybridization (ISH)法、免疫染色で EB 関連蛋白(lateral membrane protei-1 (LMP1), EB nuclear antigen(EBNA)-2) の検索を行った。更に LMP1, EBNA-2 陽性例で PCR 法を用いて LMP-1 oncogene の変異の有無、EBNA2 の亜型の解析を行った。また臨床病理学的な裏付けを行った。

(2) PCNS リンパ腫におけるケモカインの解析

2009~2010 の研究ではとくに PCNS リンパ腫におけるケモカインの発現と腫瘍血管新生の関係に着目して腫瘍細胞、血管内皮細胞でのケモカイン、CD105(endoglin)の発現を比較検討した。EnVision kit による免疫染色法を用いた。抗体は CD105, anti-CXCL12, anti-CXCL13 を用いた。CXCL12, CXCL13 の評価は腫瘍細胞の標識率により 3 段階で評価した (1+:0-5%, 2+:5-50%, 3+:>50%)。血管内皮細胞の陽性は高視野 (X400) で 5 個以上の血管が染色された場合を陽性と判定した。

4. 研究成果

(1) PCNS リンパ腫発生における EB ウイルスの役割についての結果

67 症例中 7 例(10.4%)で EB 陽性症例が検出された(図 1)。これらの症例はいずれも背景に免疫機能不全を伴わない 60 歳以上の男性患者に発生していた。PCNS リンパ腫における EB ウイルス関連の蛋白レベルの検索結果ではこの 7 例全例で LMP1, EBNA-2 陽性所見が得られた(図 2)。以上の結果から EB 関連の PCNS リンパ腫の EBV 関連癌におけ

る潜伏感染遺伝子発現型は背景に免疫機能不全を伴わない患者に発生したにもかかわらず、日和見リンパ腫にみられる様式 type III に相当した。LMP-1 oncogene の解析では 7 例中 5 例で 30bp の欠失がみられた (LMP-1-del) が 2 例ではみられなかった (LMP-1-wild)。EBNA2 の亜型の解析では 7 例中 6 例で type A, 残り 1 例が type B であった (図 3)。これらの遺伝子変異の組み合わせは (1) LMP-1-del, type A, (2) LMP-1-wild, type A, (3) LMP-1-wild, type B であった。(1) の型は 5 例であり、3 例は 9 カ月以内に患者は死亡した。(2), (3) の型はそれぞれ 1 例であり、いずれも 4 カ月以内に患者は死亡した。

〔考察〕 ① 罹患患者に免疫不全を伴っていないにもかかわらず、PCNS リンパ腫の約 1 割の症例では腫瘍発生に EB ウイルスが関与する。② EB 関連の PCNS リンパ腫の罹患患者は全例が 60 歳以上であり、高齢化による免疫機能低下が腫瘍発生原因として推定される。③ EB 関連の PCNS リンパ腫では LMP-1-del を伴う例が多く、患者の予後は不良である。④ EB 関連の PCNS リンパ腫の潜伏感染遺伝子発現型は蛋白レベルの検索では日和見リンパ腫にみられる様式 type III に相当するが、LMP-1, EBNA-2 などの遺伝子変異の組み合わせでは必ずしも日和見リンパ腫とは一致しない。

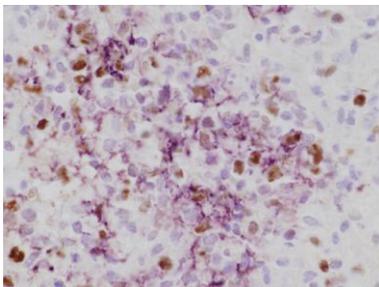


図 1 EBV in-situ hybridization と CD20 免疫染色との二重染色 (茶色:EBV, 紫色:CD20)

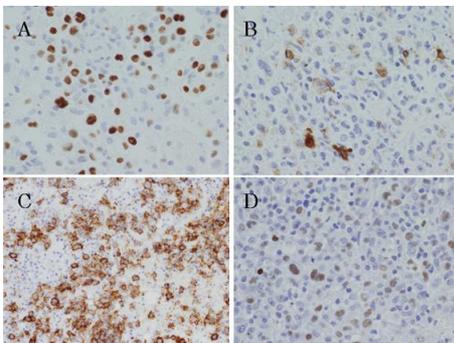


図 2 A:EBNA2, B:LMP-1, C:CD20, D:EBV-encoded in situ hybridization

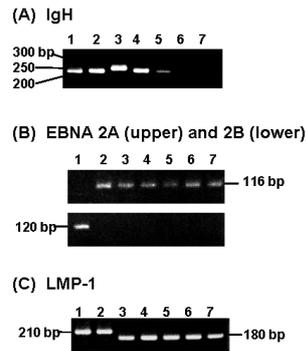


図 3 A:IgH-PCR 分析 (6 例中 5 例で 230,270bp の PCR 産物が見られる。B:症例 1 は EBNA2A 型, 症例 2-7 は EBNA2B 型 C:症例 1,2 (EBV wild type), 症例 3-7 (EBV, 30-bp LMP-1 deletion)

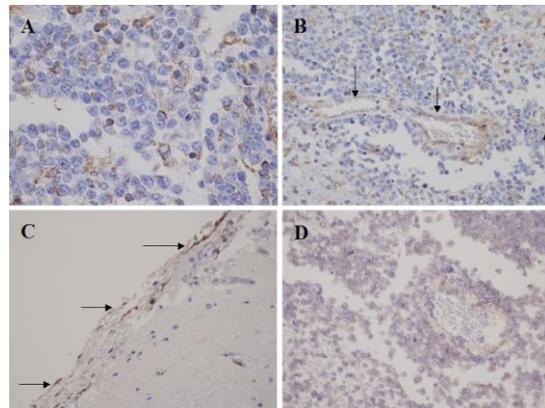


図 4 CXCL12, CXCR4 の PCNS リンパ腫における発現. A: CXCL12 (リンパ腫細胞), B: CXCL12 (血管内皮細胞), C: CXCL12 (髄膜), D: CXCR4 (リンパ腫細胞)

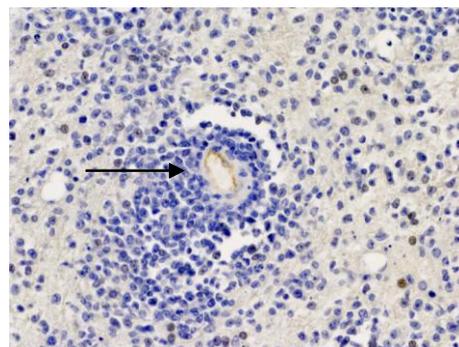


図 5 PCNS リンパ腫の腫瘍新生血管における CD105(endoglin)の発現

(2) PCNS リンパ腫におけるケモカインの解析についての結果

CXCL12 陽性は 26 例中 26 例(1+:3, 2+:23)であった。CXCL12 陽性例は全例で血管内皮細胞においても CXCL12 陽性所見を示

した(図4)。CXCL13陽性は26例中23例(1+:19, 2+:4)であった。CXCL13陽性例中2例のみが血管内皮細胞に陽性を示した。CD105で血管が標識された症例は26例中11例であった(図5)。

〔考察〕① CD105(endoglin)で標識される腫瘍新生血管以外の既存血管においてもCXCL12の発現がみられた。したがってPCNSLの増殖、浸潤においてCXCL12のオートクリン/パラクリン機構が重要な役割を担っている。

② CXCL13の発現は大部分の症例で血管での発現はみられず、CXCL12、CXCL13のPCNSLにおける作用機序は異なっていることが推定される。

③ PCNSLにおいてCXCL13の発現率、強度はCXCL12に比較して弱かったが、PCNSLの増殖、浸潤においてこれらは相補っている可能性が考えられる。

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)

〔雑誌論文〕(計4件)

1. Terasaki M, Sugita Y, Arakawa F, Okada Y, Miyagi N, Ohshima K, Shigemori M. CXCL12/CXCR4 signaling in malignant brain tumors:a potential pharmacological therapeutic targets. Brain Tumor Pathol 28:89-97, 2011 (査読有)

2. Sugita Y, Terasaki M, Niino D, Ohshima K, Arakawa F, Shigemori M, Sato Y, Asano N. Epstein-Barr virus-associated primary central nervous system lymphomas in elderly patients:analysis for latent membrane protein-1 oncogene deletion and EBNA-2 strain typing. J Neurooncol 100:271-279, 2010 (査読有)

3. Fukushima S, Terasaki M, Sakata K, Miyagi N, Kato S, , Sugita Y, Shigemori M. Sensitivity and usefulness of anti-phosphohistone-H3 antibody immunostaining for counting mitotic figures in meningioma cases. Brain Tumor Pathol 26:51-57,2009 (査読有)

4. Komatani H, Sugita Y, Arakawa F, Ohshima K, Shigemori M. Expression of CXCL12 on psuedopalisading cells and proliferating microvessels in glioblastomas: An accelerated growth

factor in glioblastomas. Int J of Oncol 34:665-672, 2009 (査読有)

〔学会発表〕(計3件)

1) 杉田 保雄, 新野 大介, 岡田 洋介, 中村 晋彦, 大島 孝一 中枢原発悪性リンパ腫の増殖・血管新生におけるケモカインCXCL12, CXCL13の役割. 第100回日本病理学会, 2011/04/28, 横浜

2) Sugita Y, Niino D, Ohshima K, Arakawa F. Epstein-Barr virus-associated primary central nervous system lymphomas in elderly patients. 86th Annual meeting of the American Association of Neuropathologists, 2010/06/12, Philadelphia

3) Sugita Y, Terasaki M, Niino D, Ohshima K, Arakawa F, Shigemori M, Ito M. Primary central nervous system lymphomas associated with Epstein-Barr virus in an immunocompetent host : The clinicopathological features of 5 cases. 第1回 アジア神経病理学会, 2008/05/22, 東京

〔図書〕(計1件)

Sugita Y Glioblastomas:role of CXCL12 chemokine. In: Tumors of the Central Nervous System, Hayat MA(eds), Springer, New York, 2011.

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

杉田 保雄 (SUGITA YASUO)

久留米大学医学部・教授

研究者番号: 80216316

(2)研究分担者

大島 孝一 (OHSIMA KOICHI)

久留米大学医学部・教授

研究者番号: 50203766

寺崎 瑞彦 (TERASAKI MIZUHIKO)

久留米大学医学部・教授

研究者番号: 70320223

(3) 連携研究者 なし