

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590339

研究課題名(和文)

マイクロアレイ法を用いた骨髄に初発するびまん性大細胞性B細胞性リンパ腫の発現解析  
研究課題名(英文)Gene expression profiling of bone-marrow derived diffuse large B-cell lymphoma  
研究代表者

山下 依子(YORIKO YAMASHITA)

名古屋大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：90303643

研究成果の概要(和文)：血管内(骨髄初発)大細胞型B細胞リンパ腫の免疫グロブリン遺伝子の解析及びケモカイン・ケモカインリセプターに局限した発現アレイを行った。免疫グロブリン遺伝子のVH領域の解析の結果、本腫瘍ではVH3-7, VH4-34, VH4-39のファミリーを有する頻度が高く、VH3-48, VH3-23, VH3-21を含めて自己免疫疾患の際に使用されるものが多く認められた(14/18; 77.8%)。また、ケモカインリセプターであるXCR1の発現がコントロールの大細胞型B細胞リンパ腫と比較して有意に高かった( $P < .05$ )。以上より、本腫瘍は特異なBリンパ球の由来であることが示唆されるとともに、他のリンパ腫との鑑別の際にXCR1が有用であると考えられた。本研究はAm J Clin Patholに掲載される予定である。

研究成果の概要(英文)：A total of 29 cases of diffuse large B-cell lymphoma initially manifesting in the bone marrow (BM-DLBCL) were analyzed for V<sub>H</sub> gene sequence, and expression microarray of chemokines and chemokine receptors and immunohistochemical analysis were done. Seminested polymerase chain reaction (PCR) and sequencing analyses of 18 cases revealed that V<sub>H</sub>3-7, V<sub>H</sub>4-34, and V<sub>H</sub>4-39 were frequently used, and the V<sub>H</sub> gene usage in 14 of 18 V<sub>H</sub> genes including V<sub>H</sub>3-48, V<sub>H</sub>3-23, V<sub>H</sub>3-21 were those associated with autoimmune diseases. Furthermore, cDNA microarray analysis specific for chemokine and chemokine receptors revealed that chemokine receptor XCR1 expression was significantly elevated in the BM-DLBCL cases ( $P < .05$ ), which was confirmed by quantitative reverse transcriptase-PCR and immunohistochemical analysis. Expression of the chemokine receptor XCR1 and frequent usage of autoreactive V<sub>H</sub> genes seem to be distinct characteristics of BM-DLBCL. Am J Clin Pathol, In press.

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	1,170,000
2009年度	500,000	150,000	650,000
2010年度	400,000	120,000	520,000
年度			
年度			
総計	1,800,000	540,000	2,340,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：骨髄、びまん性大細胞型B細胞性リンパ腫、免疫グロブリン遺伝子、ケモカイン、ケモカインリセプター、マイクロアレイ、XCR1、B1細胞

## 1. 研究開始当初の背景

1997年に村瀬らがびまん性大細胞型B細胞リンパ腫のなかで独特の臨床病理学的特徴を有する5例の剖検例について報告した(Br J Haematol. 1997 Dec;99(3):656-64.)。彼等は本疾患をAsian-variantのintravascular lymphomatosis (IVL)と位置付けた。また、最近、ヨーロッパのグループとの共同研究で、本疾患の特徴を詳細にまとめ、報告した(Ponzoni M et al; J Clin Oncol. 2007 Jul 20;25(21):3168-73.)。しかしながら、本疾患を特徴づける特異的分子については未だ明らかでない。症例の観察結果より、我々は本疾患において腫瘍細胞は類洞の内外にかかわらず、初発時より常に骨髄に浸潤することに着目した。

マウスのBリンパ球にはB1細胞とB2細胞があることが知られており、マウスではB1細胞が腹腔内に分布し、自己抗原を認識するなどの点で通常型のB2細胞とは生物学的に異なる性質を有するとされる。本腫瘍ではリンパ節よりも肝臓や脾臓に浸潤することが多く、血球貪食症候群を伴うなどの特徴があることから、我々は本疾患における腫瘍細胞は人体内で特徴的な分布をする通常型とは異なるB細胞の由来であろうと考え、研究を開始した。

## 2. 研究の目的

当時の報告(Berberich S et al; Blood. 2007 Jun 1;109(11):4627-34.)にもあったようにマウスのB1細胞は微小環境との間にケモカイン、ケモカインリセプターを介して移動、存在すると言われている。そこで、我々は血管内(骨髄初発)大細胞型B細胞リンパ腫と通常型のびまん性大細胞型B細胞リンパ腫との違いを決定付ける特異的分子があり、特にケモカインおよびケモカインリセプターが関与している可能性が高いと考え、本研究においてはこの特異的分子を明らかにすることを目的とした。また、B細胞性リンパ腫は単クローン性の免疫グロブリン遺伝子再構成を有しており、その体細胞突然変異を調べることによってB細胞としての分化段階を推定することができる。さらには、自己免疫疾患などにおいて使用されるVHファミリー遺伝子には偏りがあることが知られていることから、VH遺伝子の塩基配列を調べることは腫瘍細胞の性質を解明するうえで非常に有意義であると考えられる。

## 3. 研究の方法

血管内(骨髄初発)大細胞型B細胞リンパ腫の症例のDNAを用いて免疫グロブリン遺伝子の解析を行う。またメッセンジャーRNAを用いてケモカイン・ケモカインリセプターに局限した発現アレイを行う。得られたメッセンジャーRNAを用いて定量RT-PCRを行い、またXCR1抗体を用いて免疫染色を行う。コントロールとしては骨髄由来以外のびまん性大細胞型B細胞リンパ腫、MALTリンパ腫、マンツル細胞リンパ腫、濾胞性リンパ腫などの各種B細胞性リンパ腫を用いた。

## 4. 研究成果

血管内(骨髄初発)大細胞型B細胞リンパ腫の免疫グロブリン遺伝子の解析及びケモカイン・ケモカインリセプターに局限した発現アレイを行った。用いた29例の症例は骨髄、肝臓、脾臓にリンパ腫病変を有しており、血球貪食症候群の合併などを伴う悪性度の高い症例が多かった。

免疫グロブリン遺伝子のVH領域の解析の結果、本腫瘍ではVH3-7, VH4-34, VH4-39のファミリーを有する頻度が高く、VH3-48, VH3-23, VH3-21を含めて自己免疫疾患の際に使用されるものが多く認められた(14/18; 77.8%)。免疫グロブリン遺伝子解析の結果、ファミリー遺伝子の偏り以外にはpost-germinal center由来のものが多くに加え、on-going mutationが少数例で認められた。免疫染色による解析においても血管内(骨髄初発)大細胞型B細胞リンパ腫はIRF4 / MUM1陽性、CD10及びBCL-6陰性というpost-germinal center phenotypeを呈しており、遺伝子解析の結果を裏付けるものであった。

発現アレイのクラスタリング解析ではコントロールびまん性大細胞型B細胞リンパ腫は一つのグループを形成したが、血管内(骨髄初発)大細胞型B細胞リンパ腫症例数が少なかったためか二つに分かれる結果となった。しかし、Toll-like receptor 4、Endothelial cell growth factor 1、IL-8リセプターベータサブユニット、CXCR7、Platelet factor 4、プロラクチンなどともにケモカインリセプターXCR1の発現が血管内(骨髄初発)大細胞型B細胞リンパ腫で有意に上昇しており( $P < .05$ )、CCR1、CCL7、CCR8、CCL8などのケモカイン・ケモカインリセプターの発現が血管内(骨髄初発)大細胞型B細胞リンパ腫で有

意に低下していた( $P < .01$ )。興味深いことに、XCR1 自己免疫疾患との関係が知られている TNF アルファと同一クラスター内に認められた。そこで我々はケモカインリセプター XCR1 の発現に注目し、以後の解析を進めることにした。

定量 RT-PCR でも XCR1 の発現は血管内(骨髓初発)大細胞型 B 細胞リンパ腫ではコントロールびまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫と比較して有意に発現が高いことが確認された。また、免疫染色では血管内(骨髓初発)大細胞型 B 細胞リンパ腫ではほとんどの症例で XCR1 が強陽性となったが、コントロールびまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫や濾胞性リンパ腫、マントル細胞リンパ腫では強陽性を示す症例は認められず、MALT リンパ腫でも強陽性となった症例は稀であった。

さらに我々は慢性関節リウマチの関節組織内においても XCR1 の発現が認められることを見出し、特に滑膜内の B リンパ球、形質細胞に発現していることを二重免疫染色法などによって確認している(未発表データ)。

以上より、本腫瘍は特異な B リンパ球の由来であることが示唆されるとともに、他のリンパ腫との鑑別の際に XCR1 が有用であると考えられた。

本研究の成果を 2009 年の United States and Canadian Academy of Pathology 年総会で発表し、(Biased Immunoglobulin VH Recombination and Increased Expression of Chemokine Receptor XCR1 Are Distinct Features of Bone Marrow-Derived Diffuse Large B-Cell Lymphoma LAB INVEST 89: 292A MOD PATHOL : 22 : 292A) 好評を得た。また論文は Am J Clin Pathol に掲載されることが決定した。

## 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 6 件)

① Yamashita Y, Kajiura D, Tang L, Hasegawa Y, Kinoshita T, Nakamura S, Akatsuka S, Toyokuni S, and Mori N. XCR1 expression and biased VH gene usage are distinct features of diffuse large B-cell lymphoma initially manifesting in the bone marrow. Am J Clin Pathol In press. 査読有

② Ohara H, Akatsuka S, Nagai H, Liu YT, Jiang L, Okazaki Y, Yamashita Y, Nakamura T, Toyokuni S. Stage-specific roles of fibulin-5 during oxidative stress-induced renal carcinogenesis in rats. Free Radic Res. 2011 Feb;45(2):211-20.

査読有

③ Jiang L, Yamashita Y, Toyokuni S. A novel method for efficient collection of normal mesothelial cells in vivo. J Clin Biochem Nutr. 2010 May;46(3):265-8. 査読有

④ Hu Q, Akatsuka S, Yamashita Y, Ohara H, Nagai H, Okazaki Y, Takahashi T, Toyokuni S. Homozygous deletion of CDKN2A/2B is a hallmark of iron-induced high-grade rat mesothelioma. Lab Invest. 2010 Mar;90(3):360-73. 査読有

⑤ Hishida M, Toriyama K, Yamashita Y, Akatsuka S, Hayakawa A, Torii S, Kamei Y. Omental flap closure of refractory wounds: rat model. Nagoya J Med Sci. 2010 Feb;72(1-2):91-9. 査読有

⑥ Murata T, Isomura H, Yamashita Y, Toyama S, Sato Y, Nakayama S, Kudoh A, Iwahori S, Kanda T, Tsurumi T. Efficient production of infectious viruses requires enzymatic activity of Epstein-Barr virus protein kinase. Virology. 2009 Jun 20;389(1-2):75-81. 査読有

[学会発表] (計 1 件)

① Yamashita Y, Kajiura D, Nakamura S, Toyokuni S, Mori N. Biased Immunoglobulin VH Recombination and Increased Expression of Chemokine Receptor XCR1 Are Distinct Features of Bone Marrow-Derived Diffuse Large B-Cell Lymphoma Mod Pathol / Lab Invest 22 292A S1 Jan 2009

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況（計0件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

山下 依子 (YORIKO YAMASHITA)  
名古屋大学・大学院医学系研究科・講師  
研究者番号：90303643

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし