

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：32610

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592140

研究課題名(和文) 中枢神経系悪性リンパ腫の遺伝子異常解析による病態と治療向上因子の解明

研究課題名(英文) Investigation of molecular genetic alterations and prognostic factors of primary central nervous system lymphoma

研究代表者

塩川 芳昭 (SHIOKAWA, YOSHIKI)

杏林大学・医学部・教授

研究者番号：20245450

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：中枢神経系原発悪性リンパ腫(PCNSL)の予後因子を免疫組織化学染色法により抽出した。年齢、KPSは過去の報告同様有意に予後と相関した。Methotrexate(MTX)基盤療法により高い完全奏効割合(83%)を認め、予後改善に強い影響を認めた。MTXの排出・分布にかかわるLRPの発現は予後と負の相関を示した。Germinal center B細胞分化に関与するBcl6の低発現例、及びがん遺伝子c-myc高発現例では予後が不良であった。Mismatch repair機構のMLH1、MSH2、MSH6の発現低下は増殖能の高いPCNSLにおいて有意な予後不良因子であった。

研究成果の概要(英文)：We investigated prognostic markers for primary central nervous system lymphoma (PCNSL) using immunohistochemistry. Age and KPS were strong prognosticators as reported previously. Methotrexate-based chemoradiotherapy achieved a high rate of complete response (83%), improving survival of PCNSL patients. Multiplicity of PCNSL lesions was significantly associated with a short survival. High expression of LRP, drug efflux pump protein, was associated with a poor response to chemotherapy and shorter overall survival, suggesting that LRP may be a clinically relevant drug-resistance factor in PCNSL. Expression of a germinal center marker Bcl-6 was a favorable prognostic factor, whereas c-myc high protein expression was associated with an inferior survival. Low protein expression of mismatch repair proteins, MLH1, MSH2 and MSH6, was a significant indicator for a short survival in patients with PCNSL.

研究分野：医師薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・脳神経外科学

キーワード：悪性リンパ腫 脳腫瘍 遺伝子解析 予後因子 治療感受性 Germinal center MGMT Mismatch repair

1. 研究開始当初の背景

中枢神経系原発悪性リンパ腫 (Primary Central Nervous System Lymphoma, PCNSL) は本来リンパ組織の存在しない中枢神経系に原発し、浸潤性に脳脊髄実質内を増殖する致死性疾患である。全脳腫瘍の約 3% を占める稀少腫瘍であるが、高齢者中心に近年増加傾向を示している。PCNSL の起源はいまだ不明であるが、そのほとんどが B cell 由来の diffuse large B cell lymphoma (DLBCL) であり、中枢神経系のみならず繰り返して再発する傾向がある。細胞の形態学的特徴は全身性 DLBCL と似ているが、全身性 DLBCL と併発することは少なく、生命予後や再発頻度など生物学的特徴に違いがみられる。全身性非ホジキン悪性リンパ腫 (NHL) では R-CHOP 療法 (rituximab, CPA, Dox, VCR, Dex) が標準治療法であるが、PCNSL ではこれらの薬剤が血液脳関門 (BBB) 非透過性であることから有効性がみられていない。現在は大量 methotrexate (MTX) 療法および全脳照射の併用療法が標準治療法となっているが、治療抵抗性や早期再発などの問題があり、5 年生存率は 20-35% と低い。PCNSL は稀少腫瘍であることから腫瘍の起源や薬剤代謝・耐性機構など不明な点が多く、重要な研究課題である。近年の Neuro-Oncology の進歩に伴い、PCNSL の予後因子が検索されているが、まだ確立した biomarker はなく、分子細胞学的に検討が続けられている。

PCNSL は CD20 陽性 DLBCL であることから分化過程で発現する抗原マーカー (CD10, Bcl-6, MUM-1, CD138) により germinal center B-cell-like (GCB) と non-GCB の subtype に分類でき、予後と関連することが報告されている。また、標準治療薬 MTX の感受性を規定する因子として標的分子の dehydrofolate reductase (DHFR) や MTX の細胞外排出に関与する MRP 蛋白、lung resistance protein (LRP) が注目され、予後との関連が推測されている。DLBCL は一般に増殖能が高い腫瘍であり、これを反映する Ki-67 や細胞周期抑制因子 p27 が予後と相関する報告がある。また、NHL で発現が確認されているがん遺伝子 (Bcl-2, c-myc, phosphorylated STAT3) と PCNSL の関連が注目されている。更に、今後 PCNSL の治療薬として期待され、JCOG 脳腫瘍グループ臨床試験 (JCOG 1114 試験) が計画中の temozolomide (TMZ) に対する耐性因子 (MGMT) および mismatch repair protein (MMR) が新規予後因子として期待されている。

2. 研究の目的

本研究では、手術で摘出された腫瘍標本を用いて、薬理作用上 MTX の感受性を規定する諸因子並びに厚労省研究班で計画中の

temozolomide (TMZ) 療法への感受性因子 (MGMT など) の検索と、新規の規定因子の探索的を行い、治療の反応性、予後との関連性について解析する。

3. 研究の方法

(1) 対象

2000 年以降に当院および関連病院で診療を行った PCNSL 症例の中から、手術で得られた十分な検体が確認できた 41 症例を対象とした (本学医学部倫理委員会承認)。

(2) 標的因子・免疫染色条件検討

Bcell 分化関連: CD10・Bcl-6・MUM-1・CD138・FOXP1・GCET1-CD20 陽性 DLBCL の分化過程で発現する細胞表面抗原マーカーであり、発現パターンにより GCB と non-GCB の subtype に分類される (Hans 分類、Choi 分類、Visco-Young 分類使用)

MTX 代謝関連: DHFR (MTX 標的分子) MRP family・LRP (MTX 排出関連因子)

細胞周期関連; p27Kip1 (細胞周期抑制因子)・Ki67 (細胞増殖反映)

がん遺伝子: c-myc・Bcl-2・pSTAT3

薬剤耐性関連: MGMT (TMZ 耐性の主因をなす DNA 修復酵素)・MMR 分子 (DNA 修復酵素; MLH1・MSH2・MSH6・PMS2)

それぞれの抗体に対して kidney, lymphoma, glioblastoma, breast cancer を用いて染色条件を検討し、positive control 作成した。(表 1)

表1 抗体・処理条件

抗体	clone	希釈倍率	処理条件	抗体	clone	希釈倍率	処理条件
CD10	56C6	1:50	ventana	p27	57/Kip1/p27	1:50	autoclave
BCL6	G1 191E/A8	1:100	ventana	Ki-67	MIB-1	1:200	ventana
MUM1	MUM1p	1:100	ventana	MGMT	MT3.1	1:50	autoclave
CD138	M115	1:100	ventana	MLH1	G168-728	1:150	autoclave
GCET1	RAM341	1:200	温浴	MSH2	FE11	1:80	autoclave
FOXP1	JC12	1:6000	autoclave	MSH6	44/MSH6	1:600	autoclave
DHFR	Ab82171	1:200	autoclave	PMS2	A16-4	1:200	autoclave
MRP1	MRPr1	1:200	非加熱	c-myc	EP121	1:100	autoclave
MRP2	M2III-6	1:50	非加熱	bcl2	124	1:50	ventana
MRP3	M3 II -9	1:50	温浴	pSTAT3	Tyr705	1:400	温浴
LRP	LRP-56	1:50	非加熱				

(3) 免疫染色

手術で得られた検体は 10%ホルマリン固定後のパラフィンブロックで保存されており、3µm に薄切して脱パラフィン後に酵素抗体法を用いて免疫染色を行った。得られた標本より標的細胞の陽性率を測定し、それぞれのカットオフ値を用いて陽性群と陰性群に分類して検討した。(図 1)

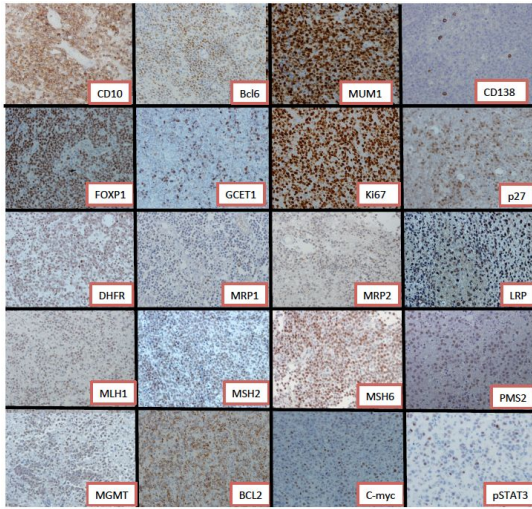


図1. Immunohistochemical stain in PCNSL

(4)臨床情報 .

患者の背景因子 (年齢、性別、Karnofsky performance scale( KPS ))、画像評価( 病変数、部位 )、治療効果、再発までの期間、全生存期間を臨床情報として使用した。

(5)統計学的解析 .

病理学的情報と臨床情報を基に統計解析 (Logrank 検定、Kaplan-Meier 法)を行い、さらに有意な因子に関しては多変量解析 (Cox proportional hazard regression 解析)を行い、独立した予後因子を抽出した。

4 . 研究成果

(1) 患者背景・臨床経過・治療効果の検討

本症例の殆どが部分摘出や生検術であったにもかかわらず、MTX を中心とした治療で 83%の症例に Complete response (CR)が得られ、Progression-free survival ( PFS ) および Overall survival ( OS ) とともに有意な延長を認めた。他に、KPS 60 以上や単発病変の症例では OS の延長傾向がみられた。( 表 2 )

表2. Univariate analysis of clinical variables for PCNSL patients

characteristics	number of patients	median PFS(months)	P	median OS(months)	P
Age					
70>	26	12.385	0.2201	33.05	0.3055
70≤	15	10.12		15.61	
sex					
male	25	10.12	0.9005	17.54	0.7111
female	16	17.58		24.84	
KPS					
60>	13	9.69	0.642	12.78	0.1117
60≤	28	12.845		33.05	
number of lesions					
single	13	12.42	0.1553	25.79	0.1879
multiple	28	10.875		20.055	
Depth of involved lesions					
Deep lesion	30	9.905	0.2711	20.055	0.3424
other lesion	11	13.27		45.24	
LDH					
230>	24	9.085	0.8795	27.76	0.3354
230≤	14	13.025		22.355	
IL2 receptor					
400>	21	10.12	0.8247	17.54	0.5149
400≤	16	14.455		31.77	
response to treatment					
CR	34	13.025	0.0022	26.085	0.005
PR	7	5.95		6.41	

(2) Bcell 分化関連因子と予後の検討

Germinal center 発現マーカーである Bcl6 陽性群 ( 陽性率 30%以上 ) において PFS・OS の延長傾向がみられたが、Hans 分類、Choi 分類、Visco-Young 分類を用いた subtype ( GCB vs. non-GCB ) では有意差は見られなかった。

(3) MTX 代謝関連因子

MTX の分布・排出にかかわる Lung resistance protein (LRP)の高発現(40%以上)症例で予後悪化傾向がみられた。DHFR は全体的に高発現しており、MRP family と予後の関係はみられなかった。

(4) 細胞周期関連因子

増殖能を反映する Ki67、細胞周期抑制因子 p27 とともに予後と有意な関係はみられなかった。

(5) がん遺伝子

c-myc、Bcl2、pSTAT3 の検討では c-myc の高発現(20%以上)症例で OS が短い傾向を認めた。

(6) 薬剤耐性・DNA 修復関連因子

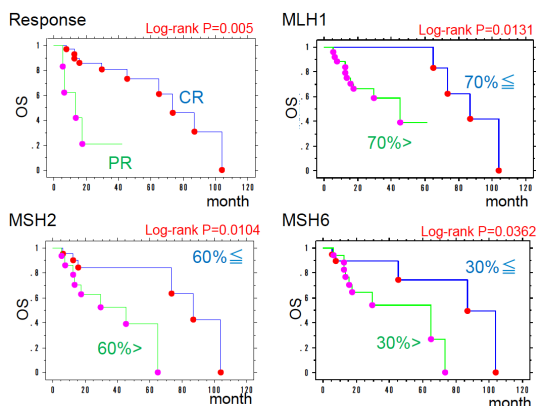
DNA mismatch repair 蛋白である MLH1( 70%以上 )、MSH2(60%以上)、MSH6(30%以上)の高発現で PFS・OS とともに有意な延長を認め、PMS2 (70%以上)の高発現症例で OS 延長傾向がみられた。本症例では TMZ 使用症例は含んでおらず、MGMT と予後の関係はみられなかった。( 表 3 )( 図 3 )

表3. Univariate analysis of immunohistochemical variables for PCNSL patients

characteristics	number of patients	median PFS(months)	P	median OS(months)	P
Hans					
GCB	7	12.78	0.934	17.54	0.6803
nonGCB	34	11.99		24.84	
Choi					
GCB	11	19.52	0.2441	21.91	0.2291
non-GCB	28	11.235		23.345	
Visco-Young					
GCB	10	16.15	0.6931	21.765	0.5736
noGCB	29	12.35		23.89	
CD10					
positive(≥30%)	5	12.78	0.3839	12.78	0.9491
negative	36	11.99		24.84	
BCL6					
positive(≥30%)	20	12.565	0.1671	21.765	0.1634
negative	21	10.12		25.79	
MUM1					
positive(≥30%)	33	11.63	0.8575	21.62	0.285
negative	8	27.71		35.48	
FOXP1					
positive(≥60%)	26	11.12	0.8042	14.46	0.3837
negative	13	19.52		29.73	
MRP1					
positive(≥30%)	20	12.385	0.8737	23.345	0.8195
negative	21	11.63		21.91	
LRP					
positive(≥40%)	11	9.96	0.3115	15.61	0.1072
negative	30	12.6		24.295	
p27					
positive(≥25%)	15	12.35	0.4229	21.62	0.6809
negative	26	11.27		25.135	
Ki67					
positive(≥70%)	31	12.35	0.286	22.8	0.2151
negative	10	14.36		23.85	
BCL2					
positive(≥50%)	22	10.005	0.6051	13.045	0.3786
negative	19	23.89		44.58	
c-myc					
positive(≥20%)	13	10.12	0.3235	21.62	0.1821
negative	28	12.385		23.345	
pSTAT3					
positive(≥5%)	8	10.005	0.8592	22.21	0.4773
negative	31	12.78		23.89	
MLH1					
positive(≥70%)	12	17.2	0.032	57.295	0.0131
negative	27	10.12		21.91	
MSH2					
positive(≥60%)	23	19.52	0.0176	23.89	0.0104
negative	16	8.79		19.58	
MSH6					
positive(≥30%)	19	13.27	0.0602	33.81	0.0362
negative	20	9.905		20.055	
PMS2					
positive(≥70%)	15	12.78	0.2618	36.8	0.1777
negative	24	10.875		21.765	
MGMT					
positive(≥50%)	10	19.22	0.6786	35.875	0.2981
negative	29	12.35		18.2	

細胞分化関連  
 MTX代謝  
 細胞周期  
 がん遺伝子  
 薬剤耐性・DNA修復関連

図2. Kaplan-Meier 解析



(7) 予後因子の多変量解析

すべての検討因子のうち、有意な因子を用いた多変量解析を行った結果、PFS では初期治療 CR、単発病変、c-myc 低発現(20%未満)症例で有意な予後改善を認め、70 未満で PFS 延長傾向がみられた。OS では 70 歳未満、初期治療 CR、単発病変、Bcl6 高発現(30%以上)、LRP 低発現(40%未満)、c-myc 低発現(20%未満)で有意な延長を認め、KPS(60 以上)で OS 延長傾向を認めた。(表 4)

表4 . Predictors for progression-free and overall survival using multivariate Cox regression analysis

Prognostic factor	HR(95% CI)	p-value
<b>Progression-free survival</b>		
Age (70)	4.319(0.915-20.376)	0.0646
KPS(60)	0.757(0.171-3.355)	0.7141
CR	0.086(0.019-0.392)	0.0015
Number of lesions(1)	5.755(1.288-25.703)	0.0219
BCL6(30)	0.544(0.198-1.495)	0.2375
LRP(40)	2.006(0.615-6.541)	0.2486
c-myc(20)	3.437(1.094-10.800)	0.0346
<b>Overall survival</b>		
Age (70)	21.940(1.349-356.817)	0.0300
KPS(60)	0.087(0.007-1.043)	0.0540
CR	0.008(0.0004696-0.130)	0.0007
Number of lesions(1)	21.046(2.244-197.397)	0.0076
BCL6(30)	0.108(0.019-0.623)	0.0128
LRP(40)	8.414(1.330-53.242)	0.0236
c-myc(20)	35.963(3.131-413.047)	0.0040

結論：

本研究では PCNSL の予後因子として、age、KPS、response CR、number of lesions、BCL6、LRP、c-myc、MLH1、MSH2、MSH6 を認めた。Age、KPS は以前より予後と強い関係があり、本研究でも同様な結果がみられた。対象症例のほとんどが生検や部分摘出にもかかわらず、MTX を中心とした治療により高い CR 率(83%)を認め、予後改善にも強い影響を認めた。また、MTX 薬理作用に MTX の排出・分布にかかわる LRP の発現が予後に影響した。PCNSL の背景としては Bcl6 低発現および c-myc 高発現症例では予後が悪い結果であった。Mismatch repair protein である MLH、MSH2、MSH6 の発現低下は増殖能の高い PCNSL において有意に予後が悪く、新たな予後因子として期待される。

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 12 件)

Shishido-Hara Y , Nagane M ,他 6 名: JC viral inclusions in progressive multifocal leukoencephalopathy: Scaffolding promyelocytic leukemia nuclear bodies grow with cell cycle transition through an S-to-G2-like state in enlarging oligodendrocyte nuclei. J Neuropathol Exp Neurol 73 (5), 442-453, 2014, doi: 10.1097/NEN.0000000000000066. 査読有

Nagane M , Shiokawa Y , 他 5 名. Predictive value of mean apparent diffusion coefficient value for responsiveness of temozolomide-refractory malignant glioma to bevacizumab. Int J Clin Oncol 19: 16-23, 2014; DOI 10.1007/s10147-013-0517-x, 査読有

永根基雄<sup>①</sup>, 塩川芳昭<sup>②</sup>, 他 3 名: 高齢者中枢神経系原発悪性リンパ腫に対する大量 methotrexate 基盤初期治療の成績と展望. Geriatric Neurosurgery 26, 63-70, 2014. 査読無

永根基雄: 脳神経外科医が解説する血液腫瘍: 悪性リンパ腫. 脳神経外科速報 in press, 2014. 査読無

Nagane M , Shiokawa S , 他 2 名: Multidrug immunochemotherapy (R-MPV-A) for newly diagnosed and recurrent primary central nervous system lymphomas (abstr NO-097). Neuro-Oncology 15 Supplement 3: iii122, 2013. 査読有

Nagane M, Nishikawa R: Bevacizumab for glioblastoma – a promising drug or not? Cancers 5(4): 1456-1468 2013; doi:10.3390/cancers5041456 . 査読有

〔学会発表〕(計 12 件)

李政勲、塩川芳昭、永根基雄、他 4 名: 原発性中枢神経系悪性リンパ腫の予後規定因子の検討. 第 31 回 日本脳腫瘍学会学術総会, 宮崎, 2013. 12.8

Nagane M , Yoshiaki Shiokawa , 他 2 名: Multidrug immunochemotherapy (R-MPV-A) for newly diagnosed and recurrent primary central nervous system lymphomas. 2013 The 4<sup>th</sup> Quadrennial Meeting of the World Federation of Neuro-Oncology /The 18th Annual Meeting of the Society for Neuro-Oncology. San Francisco, CA, U.S.A. 2013. 11. 22

永根基雄: 悪性脳腫瘍治療の現状と展望. 第 8 回岐阜脳腫瘍研究会. 岐阜市, 岐阜県. 2013. 11. 9.

永根基雄 , 塩川芳昭 , 他 2 名: 初発中枢神経系原発悪性リンパ腫に対する多剤併用免疫化学療法 (R-MPV-A) の治療効果. 第 51 回 日本癌治療学会, 京都, 2013. 10. 26

李政勲、塩川芳昭、永根基雄、他 1 名: 原発性中枢神経系悪性リンパ腫の予後規定因子の検討. 第 72 回 日本脳神経外科学会学術総会, 横浜, 2013. 10.18

永根基雄: 悪性脳腫瘍の化学療法 up-to-date . 第 3 回長崎脳腫瘍研究会. 長崎市, 長崎県.

2013. 4. 22

永根基雄, 小林啓一, 塩川芳昭: 中枢神経系原発悪性リンパ腫に対する大量 methotrexate 基盤初期治療の成績と展望. 第 71 回 日本脳神経外科学会総会, 大阪, 2012. 10.19.

永根基雄, 塩川芳昭, 他 2 名: 中枢神経系原発悪性リンパ腫に対する大量 AraC 単独療法. 第 29 回 日本脳腫瘍学会, 下呂, 2011. 11.28

永根基雄, 塩川芳昭, 他 3 名: CT 及び MR perfusion images を用いた中枢神経系悪性リンパ腫と悪性神経膠腫の術前鑑別. 第 70 回 日本脳神経外科学会総会, 横浜, 2011. 10.12

〔図書〕(計 1 件)

永根基雄: ニムスチン. In プロフェッショナルがんナーシング 2013 別冊. これだけは押さえておきたいがん化学療法の薬. 古瀬純司(編), メディカ出版, 大阪, 2013, 150

〔その他〕

ホームページ等

<http://plaza.umin.ac.jp/~kyorin-n/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

塩川 芳昭 (SHIOKAWA, Yoshiaki)

杏林大学・医学部・教授

研究者番号: 2 0 2 4 5 4 5 0

### (2) 連携研究者

永根 基雄 (NAGANE, Motoo)

杏林大学・医学部・教授

研究者番号: 6 0 3 2 7 4 6 8