

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590430

研究課題名(和文)濾胞性リンパ腫の予後を規定する分子の解明

研究課題名(英文)Pathological analysis of prognosis factor of follicular lymphoma

研究代表者

中村 直哉 (NAKAMURA, Naoya)

東海大学・医学部・教授

研究者番号：50227922

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：濾胞性リンパ腫(FL)についてcDNAマイクロアレイとGSE法の組み合わせを用いて解析し108の遺伝子を抽出しその中からBTLA(T細胞)とHVEM(濾胞樹状細胞・樹状細胞)、FOXP3(制御性T細胞)、PD-1(濾胞内ヘルパーT細胞)、腫瘍関連マクロファージからCD68とCD16、MiTF、CD163を用いて免疫組織化学に解析した。高悪性度FLで有意にCD68+とMiTF+の割合が有意に多く、FLに比べてDLBCLでPD-1が有意に減少していた。FLの進展およびDLBCLへの移行は腫瘍細胞のみならず、微小環境、特にマクロファージと樹状細胞、T細胞が関与していることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Out of 108 genes identified by gene set enrichment analysis and functional association network analysis for Follicular lymphoma (FL), we focused 4 molecules of BTLA for T-cells, HVEM for dendritic cells, FOXP3 for regulatory T-cells and PD-1 for follicular helper T-cells. We also retrieved 4 molecules as tumor associated macrophages (TAM) of CD68 for pan-macrophage, CD16 for M1-like, and MiTF & CD163 for M2-like. Immunohistochemistry using formalin-fixed paraffin-embedded sections of low grade FL (LG-FL), high grade FL (HG-FL), diffuse large B-cell lymphoma transformed from FL (tDLBCL) was performed. Each of CD68+ cells and MiTF+ cells was increased in HG-FL other than LG-FL. PD-1+ cells was decreased in transformed DLBCL compared to LG-FL and HG-FL. Each of CD68+ cells and CD163+ cells was increased. Therefore, microenvironment including macrophages, dendritic cells and T-cells have important role for progression of FL and transformation to DLBCL.

研究分野：人体病理学

キーワード：濾胞性リンパ腫 腫瘍関連マクロファージ cDNA microarray Gene Set Enrichment解析 免疫組織化学

1. 研究開始当初の背景

濾胞性リンパ腫 (Follicular lymphoma, FL) は、本邦では 1990 年頃から 2000 年頃に掛けてほぼ倍増したリンパ腫の亜型であり (その要因については明らかではない) びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫 (Diffuse large B-cell lymphoma, DLBCL) に次いで多い (1)。最近 10 年間の東海大学医学部附属病院における病理診断実績では DLBCL が 40-50% で、FL は 15-20% を占める。主に bcl-2 遺伝子と免疫グロブリン重鎖遺伝子 (immunoglobulin heavy chain gene, IgH) の相互転座 t(14;18)(q32;q21) に起因し、病理組織学的に腫瘍性濾胞の増生により診断される低悪性度 B 細胞リンパ腫であるが、bcl-2 遺伝子と IgH 遺伝子の相互転座以外の腫瘍発生メカニズムについて詳細は未だ不明である。

臨床的には低侵襲性リンパ腫 (indolent lymphoma) であり、8 年~10 年程度の間生存率を有する。しかし、FL のうち 10-15% の症例はリンパ腫の増生が著しいか、DLBCL への転化を示す予後不良群とみなされ、予後不良な FL を抽出することは予後の判定、治療法の選択に重要である。

FL は病理組織学的に大型で水泡状クロマチンと明瞭な核小体をもつ細胞 (中心芽球, centroblast) の数により Grade 1-2 と Grade 3a, Grade 3b に分けているが、形態学的に Grade 1-2 であっても免疫組織化学に計測された MIB-1 index が高い症例の予後は Grade 3 に順ずるとの報告 (2) もあり、病理組織学的な因子 (Grading) と免疫組織化学な因子、予後との関係も結論が下されてはいない。さらに、FL から DLBCL に転化した症例について各々のクローンが同一であるか、異なるクローンであるのか、詳細な解析はなされていない。

2. 研究の目的

本研究では Array-CGH のデータを新しい解析法である Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) 法を用いて FL の発生メカニズムについて新たな理解と展開を得たいと考えている。特に腫瘍細胞の生物学的特徴のみならず、腫瘍性濾胞における微小環境、非腫瘍性細胞の生物学的意義についても解析する。腫瘍細胞、非腫瘍細胞いずれにおいても、FL 予後不良群に関係するような新しいマーカーを見出し、検証することを目的とする。

3. 研究の方法

材料：

東海大学医学部附属病院病理診断センターで新規に診断され、治療として R-CHOP が適用された 2002 年~2013 年の FL を用いた。また一部は研究協力者である Carreras J 氏がバルセロナ大学で経験した FL も使用した。

方法：

(1) 遺伝子学的解析:cDNA microarray 法, protein-protein interaction analysis 法および Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) 法

FL の凍結材料から RNA を抽出し、cDNA microarray を行う。cDNA microarray 法, protein-protein interaction analysis 法, GSEA 法で得られたデータを比較検討する。GSEA 法はアレイ上の遺伝子を含むパスウェイを変動有意な順にリストアップする。個々のパスウェイには複数個の遺伝子が含まれ、これらの遺伝子が持つ発現値変動が、アレイ全体の発現値変動のばらつきと比べてどの程度有意であるか、コンピュータ解析する。その結果、個々のパスウェイに含まれるグループ内遺伝子群の発現値が全体と比べて統計学的に有意である順にリストを作成することが可能になる。特に FL においてどのようなパスウェイが重要か、解析する。また、FL の臨床的予後、DLBCL への転化例との関連について検討し、FL の予後を規定しうるような候補遺伝子を抽出する。以下の二つにわけて解析する。リンパ腫細胞に関連するもの、T 細胞やマクロファージに関連するものである。

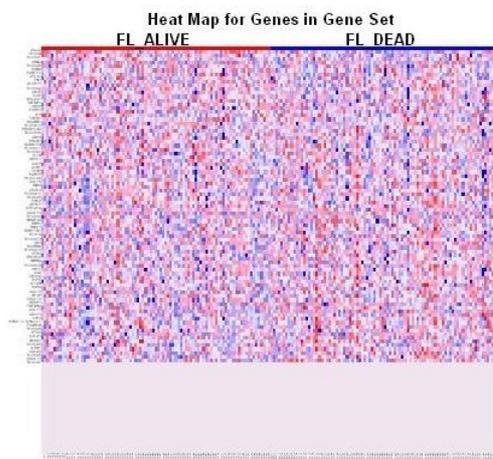
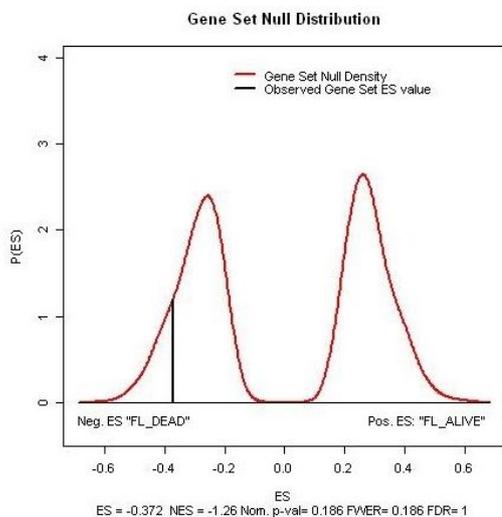
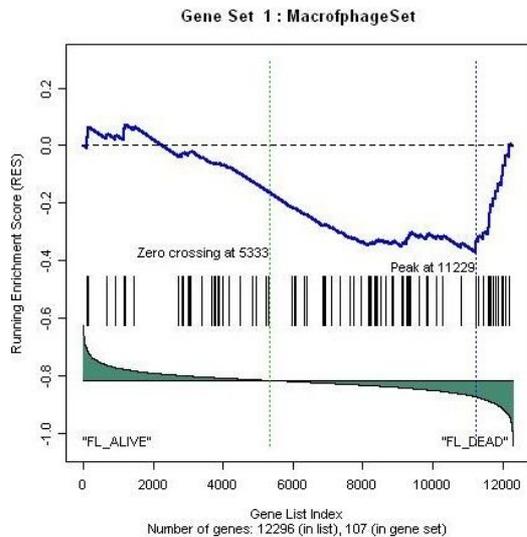
(2) 免疫組織化学的解析

FL のパラフィン材料を用いて、(1) で見出された新たなマーカーについて、免疫組織化学的に検討する。そのほか、MIB-1 index や、各種マーカー、すなわち、FL の診断に必要な既知のマーカーとして、CD3, CD5, CD10, CD20, CD30, BCL-2, BCL-6, MUN-1, P53, EBV のほか、濾胞樹状細胞のネットワークの程度について CD21, CD23, CD35 を合わせて検討する。

4. 研究成果

(1) cDNA microarray 法, protein-protein interaction analysis および GSEA 法によって得られた候補分子について

FL の cDNA microarray と GSEA 法の組み合わせから、アレイ上の遺伝子を含むパスウェイを変動有意な順にリストアップし、これらの遺伝子が持つ発現値変動がアレイ全体の発現値変動のばらつきと比べてどの程度有意であるか、コンピュータ解析した(図 1-4)。



個々のパスウェイに含まれるグループ内遺伝子群の発現値が全体と比べて統計学的に有意である順にリストを作成し、108の遺伝子をリストアップした。

<陽性に傾ける遺伝子>

FOS, LTA, TNFSF12, TNFRSF4, LILRA4, IL17A, RUNX1, ICOS, CTLA4, CD40LG, PILRA, ICOSLG, CD247, IL4, CBL, MAPK8, TRADD

<陰性に傾ける遺伝子>

IL10, TAF5L, LTBR, IFNG, TBX21, IL1R2, HMOX1, VTCN1, MDM2, FCGR2A, TNFSF18, INS

<protein-protein interaction analysis>

IL2 (percentile 99.4), CD28, CTLA4, CD4, CD8A, IFNG, TNFRSF14, CD80, IL2RA, PTPN11, CD86, ICOS, PTPN6, IL4, TNFRSF4, LCK, IL10

(2) 候補分子の中から免疫組織化学で検索可能な分子の選定、および正常細胞(組織)での反応性について

これらの抗原を同定する抗体を調べたところ、BTLA, HVEM, FOXP3, PD-1の4つが入手することができた。正常リンパ組織(非腫瘍性リンパ組織として扁桃もしくはリンパ節)における発現を解析し以下の結果を得た。

BTLA: リンパ濾胞胚中心の中と濾胞間に存在するT細胞に陽性となった。ときにマントル層もしくはマージナル層のB細胞にも陽性反応を認めたが胚中心内B細胞には陰性と考えられた。

HVEM: 濾胞樹状細胞(Follicular dendritic cell, FDC)と濾胞間の樹状細胞(DC)の胞体内ゴルジ野にドット状に陽性となった。

FOXP3: regulatory T細胞(Tregs)に陽性。

PD-1: 胚中心内のhelper T細胞(TFH)に陽性を示した。

(3) FLにおけるtumor-associated macrophage (TAM)の免疫組織化学的検討について

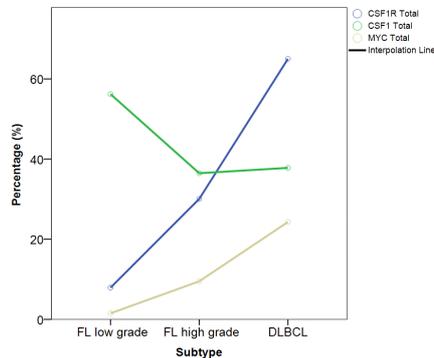
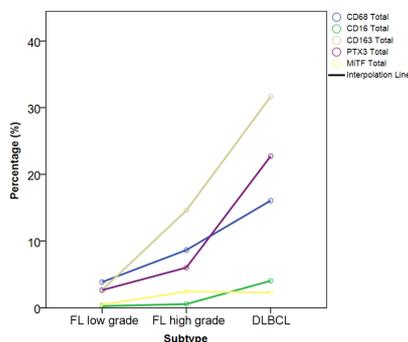
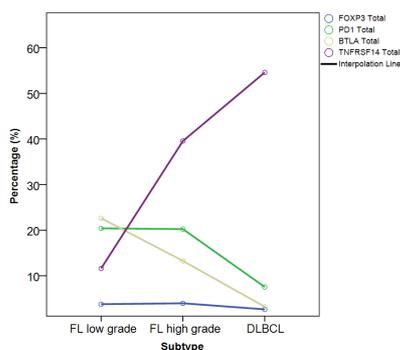
FLと診断された80例のホルマリン固定パラフィン包埋切片(formalin-fixed paraffin embedded section, FFPE)を用いた。1次抗体として以下を用いた。

CD68 : pan-macrophage マーカー
 CD16 : M1 TAM マーカー
 CD163 : M2 TAM マーカー
 MiTF : M2 TAM マーカー
 PD-1 : Follicular helper T細胞 (TFH)
 FOXP3 : regulatory T細胞 (T reg)

CD68、MiTF は腫瘍性胚中心 (neoplastic germinal center, nGC) と濾胞間 (interfollicular areas, IF) の両者に存在し、 $2.29\% \pm 2.99\%$ (平均 \pm 標準偏差) であった。Grade 1-2 (G1-2)FL で $1.7\% \pm 1.5\%$ 、G3FL で $4.9\% \pm 5.6\%$ であり、G3FL で有意に CD68+TAM 割合は多かった。MiTF+M2 は全体で $2.62\% \pm 3.1\%$ 、G1-2FL で $1.8\% \pm 2.2\%$ 、G3FL で $5.5\% \pm 4.2\%$ で G3FL で有意に多かった ($P < 0.05$)。CD163+M2 は IF > nGC を示し、全体で $3.2\% \pm 0.89\%$ 、nFC で $1.04\% \pm 0.24\%$ 、IF で $5.07\% \pm 1.2\%$ 、G1-2FL と G3FL ではほぼ同程度であった。CD16 では分布が異なっていた。FL では G1-2 に比べて G3 では TAM の割合が上昇し、M1、M2 いずれも同様であった。TAM は FL の progression に関係する可能性がある。

(4) FL および transformed DLBCL を用いた免疫組織化学検討について

FL 23 例 [low grade, 13 例 (Grade 1-2); high grade 10 例 (Grade 3a 7 例, Grade 3b 3 例)] と FL から転化したびまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫 (transformed diffuse large B-cell lymphoma, tDLBCL) 3 例を用いて比較した。



LG-FL, HG-FL の両者に比べて、tDLBCL では FOXP3, BTLA に変化はなかったが、PD-1 が有意に減少していた ($P=0.033$)。また、CD68 および CD163、HVEM は有意に増加していた ($P=0.022, 0.003, 0.022$)。これらの結果から、FL の進展および DLBCL への移行は腫瘍細胞のみならず、微小環境、特に macrophage と DC、T 細胞が関与していることを明らかにした。

文献

- (1) Lymphoma Study Group of Japanese Pathologists. The world health organization classification of malignant lymphomas in japan: incidence of recently recognized entities. *Pathol Int.* 2000;50: 696-702.
- (2) Wang SA, et al. Low histologic grade follicular lymphoma with high proliferation index: morphologic and clinical features. *Am J Surg Pathol.* 2005;29:1490-6.

5. 主な発表論文等 〔雑誌論文〕(0 件)

〔学会発表〕(計 5 件)

- (1) Carreras J, Nakamura N, et al. Increased macrophagic networks are associated with disease progression in Follicular Lymphoma. The 12th Japanese-Korean Lymphoreticular Workshop. January 24-26, 2014. Nagoya University, Nagoya.
- (2) Carreras J, Nakamura N, et al. Macrophagic signature in Follicular Lymphoma. 第 102 回 日本病理学会総会. 2013 年 6 月 6-8 日. ホテルロイトン札幌他, 札幌市
- (3) Carreras J, Nakamura N, et al. The balancing costimulation and inhibition with BTLA-TNFRSF14 pathway predicts the overall survival in Follicular Lymphoma. *USCAP.* 2013 March 02-08, Baltimore, United state
- (4) Carreras J, Nakamura N, et al. Micro-

environment simulation of Follicular Lymphoma and its transformation towards Diffuse Large B-Cell Lymphoma. 第 52 回日本リンパ網内系学会総会. 2012 年 6 月 15-16 日. 福島ビューホテル, 福島市

(5) Carreras J, Nakamura N, et al. Connecting the dots: biological simulation of the follicular lymphoma microenvironment highlights the prediction value of the co-stimulatory BTLA-HVEM pathway. 11th Korean-Japanese Lymphoreticular Workshop. 2012 January 27-29, 2012. Seoul.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願なし, 取得なし

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 直哉 (NAKAMURA, Naoya)

東海大学・医学部・教授

研究者番号: 50227922

(2) 研究分担者なし

(3) 連携研究者 (1 名)

カレラス ジョアキム (CARRERAS, Joaquim)

東海大学・医学部・講師

研究者番号: 90637191

(4) 研究協力者 (1 名)

菊地イアラ幸江 (KIKUTI, Yara Yukie)

東海大学・医学部・研究員