

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461802

研究課題名(和文)悪性リンパ腫におけるグルコース代謝の解析と治療への応用

研究課題名(英文)Glucose metabolism in malignant lymphoma; its application for treatment

## 研究代表者

塚本 憲史 (Tsukamoto, Norifumi)

群馬大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：10292583

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：リンパ腫細胞株におけるグルコーストランスポーターGLUT1-GLUT12のmRNA発現量を調べた。一部の細胞株でGLUT5の発現が亢進しており、そのshRNA発現ベクターを作成し、細胞増殖、糖代謝への影響を検討している。

リンパ腫患者のGLUT1、3、5、Hexokinase (HK)の発現を、免疫組織化学染色で検討した。びまん性大細胞型B細胞リンパ腫では、GLUT1、3の少なくとも片方が陽性、GLUT5、HKは一部の症例で陽性であった。治療前FDG-PET所見と予後との相関について今後の検討課題である。

研究成果の概要(英文)：Expression of GLUT1 to GLUT12 on lymphoma cells using real-time PCR was analyzed and reveal that GLUT5 expression was enhanced in some lymphoma cell lines. Based on this datum, shRNA vector was constructed and its effect on cell growth and glucose metabolism is investigating. Then, immunohistological staining of GLUT1, GLUT3, GLUT5, and hexokinase II were performed. In diffuse large cell lymphoma patients, either GLUT1 or GLUT3 was positive, while GLUT5 and hexokinase II were partially positive. The relation to clinical data, such as SUVmax level on FDG-PET scan and prognosis, is now analyzing.

研究分野：腫瘍学

キーワード：悪性リンパ腫 グルコース代謝 グルコーストランスポーター 免疫組織化学染色 リアルタイムPCR  
hexokinase FDG-PET

## 1. 研究開始当初の背景

(1) がん細胞は好氣的条件下でも解糖系を使ってエネルギーを獲得する性質はワールブルグ効果として知られ、その性質を利用してペット検査 (FDG-PET) ががんの診断に威力を発揮し、悪性リンパ腫では病型の推定、治療効果判定規準にも用いられている。グルコース類似物質である FDG 集積に関わる因子として、グルコースを細胞内に取り込むグルコーストランスポーター・タイプ 1 (GLUT-1: グルット 1) および代謝酵素ヘキソキナーゼがいろいろな固形がんで調べられ、その発現と FDG 集積に相関があることが示されている。一方、悪性リンパ腫では少数例での報告があるものの、病型による違いなどについては不明である。予後予測への FDG-PET 応用の試みもあるが、その理論的裏付けに乏しい。

(2) グルコーストランスポーターには 10 種類以上のサブタイプがある。良く調べられているのは GLUT1、GLUT3 であるが、多発性骨髄腫ではそれ以外のグルコーストランスポーターが働いており、この働きを抑えることで細胞増殖が抑えられることが実験的に明らかになっている。一方、B 細胞の腫瘍増殖に深くかかわる転写因子 NF- $\kappa$ B (エヌエフ・カッパ・ビー) が解糖系亢進に作用していることが報告された。びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫は、細胞起源から Germinal center B 細胞由来 (GCB タイプ) とそれ以外 (Non-GCB タイプ) に分かれ、後者 NF- $\kappa$ B の影響を受けることが知られている。

## 2. 研究の目的

(1) リンパ腫細胞株で、グルコーストランスポーター・タイプ 1~タイプ 12 (GLUT1~GLUT12) 遺伝子の発現量を網羅的に調べ、発現が亢進しているグルコーストランスポーターの種類を同定する。発現が増強してい

るグルコーストランスポーター遺伝子の働きを抑える短い RNA (siRNA) を導入し、細胞増殖、グルコース代謝への影響を調べ、抗腫瘍効果があるかを明らかにする。

(2) リンパ腫患者のグルコーストランスポーター (とくに GLUT-1、GLUT-3)、ヘキソキナーゼ、MIB1、p53 の発現と、FDG 集積、臨床所見、予後との相関を検討し、FDG 集積を規定するバイオマーカーを明らかにし、FDG-PET で予後予測が可能かについて検討する。

(3) びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫は、細胞起源から Germinal center B 細胞由来 (GCB タイプ) とそれ以外 (Non-GCB タイプ) に分かれる。両方で遺伝子の発現、FDG 集積に違いがあるかについて明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) リンパ腫細胞株でのグルコーストランスポーター発現を調べるにあたり、コントロールとなる健常人の細胞分画ごとのグルコーストランスポーターを比較する。リンパ腫細胞株から核酸を抽出し、GLUT1~GLUT12 のメッセンジャー RNA (mRNA) 量をリアルタイム PCR で定量的に比較検討し、発現が増強しているグルコーストランスポーターの種類を明らかにする。

(2) リンパ腫細胞株で発現が増強しているグルコーストランスポーター遺伝子の働きを抑える shRNA ベクターを作成、細胞株に導入し、細胞へのグルコースの取り込み、細胞増殖速度に変化があるかを調べ、抗腫瘍効果があるか明らかにする。

(3) 悪性リンパ腫患者検体を用いて、GLUT-1、GLUT-3、および (1) で発現が増強しているグルコーストランスポーター、ヘ

キソキナーゼ、MIB1 等のリアルタイム PCR、免疫組織化学染色を行い、その発現プロフィールを病理組織型ごとに明らかにする。そして、遺伝子発現量、陽性細胞比率と、FDG 集積、予後との間に相関があるかを検討し、悪性リンパ腫で FDG 集積を規定するバイオマーカー、FDG-PET で予後予測が可能か検討する。

また、びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫症例を CD10、MUM1、BCL6 の免疫組織化学染色およびフローサイトで GCB タイプ、Non-GCB タイプに分け、両者でこれらバイオマーカーの発現、FDG 集積に差があるかも検討する。

#### 4. 研究成果

(1) ヒト末梢血から、単核細胞分画、CD19 陽性細胞を抗体で集めた分画、T 細胞・単球・好中球を除去した分画を取り出し、それぞれから RNA を抽出し、GLUT1-GLUT12 の発現をリアルタイム PCR 法で調べたところ、 $\beta$  がコントロールとして最もふさわしいことがわかった。5 種類のリンパ腫細胞株(CTB-1、TL-2、SLVL、HKBML、HDMar2)の GLUT1~GLUT12 の mRNA 遺伝子発現量をコントロールと比較した。その遺伝子発現量は、リンパ腫細胞株とコントロールとでほぼ同じであったが、一部の細胞株で GLUT5 の mRNA 量が増加していた。そこで、GLUT5 遺伝子の働きを抑えることを目的として、同遺伝子に対する shRNA ベクターを 5 種類作成し、GLUT5 の発現の強い細胞株に導入する実験を行なった。shRNA の細胞への導入効率が不十分なため先に進めていないが、グルコース、フルクトースの取り込み、細胞増殖にどのような影響が出るかを調べる予定である。

(2) これら実験に並行して、悪性リンパ腫症例のリンパ節生検検体を用いて GLUT5 の

発現を免疫組織化学染色で検討した。低悪性度リンパ腫 6 例(濾胞辺縁帯リンパ腫 3、小細胞性リンパ腫(SLL)6)に陽性例はなかったが、びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫 28 中 5 例で陽性であった。今後さらに症例数を増やして、その臨床的意義について明らかにする予定である。

(3) びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫 97 例、低悪性度リンパ腫 6 例のリンパ節生検未染パラフィン切片を用いて、GLUT1、GLUT3、ヘキソキナーゼ、MIB1 の免疫組織化学染色を行った。肺がん症例と比較してリンパ腫検体の染色性は総じて弱かったものの、びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫では、GLUT1 は 73 例(75%)、GLUT3 は 51 例(53%)、両者のうち少なくとも一方が陽性、ヘキソキナーゼも 20%の症例で陽性であり、低悪性度リンパ腫 6 例全例がいずれも陰性であったのと対照的であった。染色の強度、陽性率と、FDG の取り込みおよび予後との相関は解析中である。

一方、濾胞性リンパ腫では、GLUT1 13/16 (80%)、GLUT3 10/16 (61%)で陽性、ヘキソキナーゼは全例で陰性であった。

(4) DLBCL136 例に対し、CD10、BCL-6、MUM-1 の染色組織化学染色および CD10 のフローサイトメトリーを行ない、GC タイプ、Non-GC タイプに分け、両タイプで FDG-PET 所見を比較検討した。GC タイプ 70 例、Non-GC タイプ 66 例で、投与した FDG 集積の程度を示す指標である SUVmax の中央値は、GC タイプ 16.4、Non-GC タイプ 15.8 と差がなく、治療に対する奏功割合にも差がなかった。よって、FDG-PET の SUVmax 値のみで GC タイプ、Non-GC タイプの区別はできないと思われた。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 10 件)

- 1) Mitsui T, Koiso H, Yokohama A, Tsukamoto N (他 13 名 1、7 番目、最後) SF3B1 and IGHV gene mutation status predict poor prognosis in Japanese CLL patients. *Int J Hematol.* 2016; 103(2): 219-26. 査読有 doi: 10.1007/s12185-015-1912-z.
- 2) Yanagisawa K, Mitsui T, Yokohama A, Tsukamoto N. (他 7 名 7、8、10 番目) Gene polymorphisms of mannose-binding lectin confer susceptibility to *Pneumocystis pneumonia* in HIV-infected patients. *J Infect Chemother.* 2015 ;21(11):769-75. 査読有 doi: 10.1016/j.jiac.2015.07.006.
- 3) Chihara D, Asano N, Tsukamoto N (他 11 名、9 番目) Ki-67 is a strong predictor of central nervous system relapse in patients with mantle cell lymphoma (MCL). *Ann Oncol.* 2015; 26(5):966-973. 査読有 doi: 10.1093/annonc/mdv074
- 4) Nakajima A, Masaki Y, Tsukamoto N (他 29 名、9 番目) Decreased Expression of Innate Immunity-Related Genes in Peripheral Blood Mononuclear Cells from Patients with IgG4-Related Disease. *PLoS One.* 2015 May 14;10(5):e0126582. 査読有 doi: 10.1371/journal.pone.0126582.
- 5) Hashimoto Y, Yokohama A, Tsukamoto N. (他 17 名、2 番目、最後) Prognostic importance of the soluble form of IL-2 receptor $\alpha$  (sIL-2R $\alpha$ ) and its relationship with surface expression of IL-2R $\alpha$  (CD25) of lymphoma cells in diffuse large B-cell lymphoma treated with CHOP-like regimen with or without rituximab: a retrospective analysis of 338 cases. *J Clin Exp Hematop.* 2013;53:197-205. 査読有
- 6) Osaki Y, Yokohama A, Tsukamoto N (他

- 13 名、15 番目) Characterization of CD56+ dendritic-like cells: a normal counterpart of blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm? *PLoS One.* 2013 Nov 29;8(11):e81722. 査読有 doi: 10.1371/journal.pone.0081722
- 7) Alkebsi L, Handa H, Tsukamoto N (他 12 名、12 番目) DNMT3B7 expression related to MENT expression and its promoter methylation in human lymphomas. *Leuk Res* 2013;37:1662-7. 査読有 doi: 10.1016/j.leukres.2013.09.014.
- 8) Mitsui T, Yokohama A, Koiso H, Tsukamoto N (他 12 名、1、2 番目、最後) Development of IgG4-related disease 10 years after chemotherapy for diffuse large B cell lymphoma and longstanding bronchial asthma. *Int J Hematol.* 2013 ;98(1):122-128. 査読有 doi: 10.1007/s12185-013-1359-z.

〔学会発表〕(計 5 件)

- 1) Mitsui T, Koiso H, Yokohama A, Tsukamoto N. (他 13 名、1、7 番目、最後) Mutation of the SF3B1 predict a poor prognosis in Japanese CLL patients. (2015 年 9 月 17 日 第 44 回国際実験血液学会、京都)
- 2) Saito A, Akihiko Yokohama, Hiroshi Handa, Norifumi Tsukamoto (他 18 名、2、4 番目) Retrospective Analysis of Prognostic Factors for Waldenström Macroglobulinemia: A Multicenter Cooperative Study in Japan (2015 年 12 月 5 日 第 57 回米国血液学会、米国、オランダ)
- 3) Yokohama A, Hashimoto Y, Mitsui T, Tsukamoto N. (他 20 名、1、13 番目、最後) Recent management of stage I follicular lymphoma in Gunma. 2015 年 10 月 16 日、第 77 回日本血液学会総会. 金沢
- 4) Yokohama A, Hashimoto Y, Mitsui T, Tsukamoto N. (他 17 名、1、9 番目、最後)

Soluble IL-2 receptor  $\alpha$  is a more sensitive diagnostic biomarker than  $\beta$ 2 microglobulin and predicts survival in follicular lymphoma: Retrospective analysis of 305 cases. (2014年12月16日 第56回米国血液学会、米国、サンフランシスコ)

5) Koiso H, Mitsui t, Yokohama A, Tsukamoto N. (他5名、4、6番目、最後) Immunological analysis of relapsed or refractory low grade lymphoma patients treated with bendamustine. (2013年8月30日 第11回日本臨床腫瘍学会総会、仙台)

〔図書〕(計 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  
[mcs.dept.med.gunma-u.ac.jp/](http://mcs.dept.med.gunma-u.ac.jp/)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

塚本 憲史 (TSUKAMOTO Norifumi)  
群馬大学・医学部附属病院・准教授  
研究者番号： 10292583

### (2) 研究分担者

横濱 章彦 (YOKOHAMA Akihiko)  
群馬大学・医学部附属病院・准教授  
研究者番号： 40323365

三井 健揮 (MITSU TAKEKI)  
群馬大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号： 80420181

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：