

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 16 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26860724

研究課題名(和文) 悪性リンパ腫の臓器指向性のメカニズム解明と節外臓器浸潤を抑制する新規治療法の開発

研究課題名(英文) Elucidation of a mechanism of organ tropism in malignant lymphoma to develop novel treatment for intractable extranodal involvement

研究代表者

島田 和之 (SHIMADA, Kazuyuki)

名古屋大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：50631503

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：悪性リンパ腫の治療成績は、抗体医薬併用化学療法により向上しているが、経過中の節外臓器浸潤はしばしば予後不良となる。本研究では、悪性リンパ腫の臓器特異的な病変形成に関わるメカニズムのための研究を行った。その結果、血管内大細胞型B細胞リンパ腫においては、腫瘍細胞の細胞遊走が阻害されていることが病態に関与している可能性を明らかにすることが出来た。さらに節外病変を形成する悪性リンパ腫に高頻度に認められる19番染色体長腕の増幅に着目し、同染色体上に存在するSPIB遺伝子が抗アポトーシス作用に関与し、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫の新たな予後不良因子となることを明らかにすることが出来た。

研究成果の概要(英文)：Although clinical outcomes of malignant lymphoma have been improved due to the application of monoclonal antibody therapies, the outcomes of extranodal involvement including central nervous system during the clinical course are still intractable. In this study, we investigated an underlying mechanism of organ specific lymphoma development using patient derived xenograft models. We could uncover that the inhibition of cell migration was potentially associated with a pathogenesis in intravascular large B-cell lymphoma. Moreover we focused on an amplification of chromosome 19q known to be involved in extranodal B-cell lymphoma. We could also uncover SPIB, a member of the Ets family of transcription factors located on chromosome 19q, was novel poor prognostic factor in diffuse large B-cell lymphoma through an anti-apoptotic mechanism.

研究分野：血液内科学

キーワード：悪性リンパ腫 腫瘍微小環境 節外臓器浸潤

1. 研究開始当初の背景

悪性リンパ腫の治療成績は、抗体医薬併用化学療法により向上しているが、現在でもおよそ半数の患者は治癒に至らない。中枢神経や肝臓を含む節外臓器浸潤は治癒率低下の一因であるが、その分子機序は未だ明らかではなく、特に中枢神経浸潤を来した患者の治療成績は極めて不良である。そのため、節外臓器浸潤を抑制する治療法の開発は、更なる治療成績向上のために重要であると考えられる。一方、悪性リンパ腫患者由来腫瘍細胞を用いた異種移植マウスモデルにおいては、由来となった患者腫瘍細胞の遺伝子異常や表面形質のみならず、病変の浸潤臓器までもが再現される。この事象からは、悪性リンパ腫細胞は偶然にある節外臓器に病変を形成するのではなく、腫瘍細胞と節外臓器の支持細胞との間の相互作用の結果、病変を形成していることが示唆される。

2. 研究の目的

本研究では、中枢神経、精巣、血管内など特定の節外臓器やリンパ節に病変を形成した腫瘍に着目し、これらの臓器に病変を形成した患者由来腫瘍細胞から樹立した異種移植マウスモデル(PDXモデル)の解析を通じて、節外臓器に病変を形成する分子機構の解明と、それを阻害する新規治療法の開発を目指す。さらに節外病変形成に関与する可能性のある遺伝子の臨床的意義について検討を加え、予後不良病型に対する新たなバイオマーカーを探索することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 経過中に中枢神経浸潤を来した悪性リンパ腫、精巣原発びまん性大細胞型B細胞リンパ腫(PTL)、血管内大細胞型B細胞リンパ腫(IVLBCL)、節性病変を来した悪性リンパ腫それぞれの病型の患者腫瘍細胞よりPDXモデルを作製し、生着が得られた腫瘍細胞を、ヒトCD45抗原を指標としたフローサイトメトリーおよび組織学所見により確認した。生着が得られた腫瘍細胞と患者細胞の同一性は免疫グロブリン重鎖遺伝子再構成により確認した。特定の節外臓器に病変を形成する腫瘍細胞と通常のびまん性大細胞型B細胞リンパ腫(DLBCL)との異同、同一個体における各臓器に生着した腫瘍細胞の異同については、腫瘍細胞より全RNAおよびゲノムDNAを抽出し、網羅的遺伝子発現解析、アレイCGH法によるゲノムコピー数解析にて比較検討した。

(2) 各臓器における腫瘍細胞と微小環境との相互作用を確認するために、各臓器の微小環境を模倣する*in vitro*の評価系の構築を試みた。ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)とIVLBCL細胞、中枢神経病変由来腫瘍細胞とアストロサイト、節性リンパ腫病変由来腫瘍細胞と癌関連線維芽細胞などの組み合わせにおいて、腫瘍細胞と間質細胞を*in vitro*にて共培養を行い、間質細胞による腫瘍細胞に生存支持効果を評価し、背景にあるメカニズムについて検討を加えた。

(3) 中枢神経原発悪性リンパ腫(PCNSL)、PTL、IVLBCLにおいて高頻度に報告される19番染色体長腕の増幅に着目し、病態との関連が示唆されるSPIB遺伝子のDLBCLにおける意義について検討した。SPIB発現を病理組織標本における免疫染色により評価し、患者の臨床情報との関連について検討した。さらにSPIB発現ベクターを作成し、DLBCL細胞株に導入し、腫瘍細胞の治療感受性について検討を加え、SPIB発現のDLBCLにおける意義について検討した。

4. 研究成果

(1) IVLBCL患者の腫瘍細胞を用いて、8例の患者由来腫瘍細胞の異種移植マウスモデル(PDXモデル)を作製した。初期に作製された4例のPDXモデルについて検討を進め、病理組織像において、血管内に腫瘍細胞が増殖する形質が維持されていることを確認した。また、PDXモデルの末梢血に腫瘍細胞が僅かにしか検出されないことをフローサイトメトリー法にて確認した。次に患者腫瘍細胞とPDXモデル腫瘍細胞のIgH再構成をPCR法にて確認し、PDXモデルにおけるクローンが患者腫瘍細胞中に検出されることを確認した。PDX腫瘍細胞の細胞接着関連因子LFA-1、ITGB1、CD62L、CXCR4、CXCR5、ITGA4、CD18、CD44について検討を加え、共通した欠失が認められないことを確認した。

IVLBCLにおいては、腫瘍細胞が実際の患者内においてどのような増殖形式を取るのかについて明らかとはなっていない。そこで、PDXモデルにおいて腫瘍細胞が患者腫瘍細胞の形質を保持していると考えられることから、PDXモデルにおける腫瘍細胞の増殖様式を、腫瘍細胞を移植後、経時的にマウスを解剖し臓器の組織像を観察することにより検討を加えた。PDXモデルにおいては、腫瘍細胞は、移植後1週間の時点で肝臓洞および副腎において増殖していることが複数のモ

デルにおいて観察された。移植後2週間の時点では、骨髄を含む全身の臓器で増殖していることが観察され、少なくとも PDX モデルにおいては、造血組織を最初の増殖の場とするのではなく、内皮細胞をニッチとして増殖を開始することが明らかとなった。腫瘍細胞の移植経路すなわち腹腔内移植および経静脈移植においては、腫瘍細胞の生着臓器に明らかな差を認めなかった。次に同一個体におけるそれぞれの臓器に生着した腫瘍細胞間に相違が認められるかについて検討した。一次移植マウスの骨髄、肝臓、副腎に生着した腫瘍細胞をそれぞれ二次移植マウスに移植すると、骨髄、肝臓に生着した腫瘍細胞は二次移植マウスの各臓器に腫瘍を形成したのに対し、副腎に生着した腫瘍細胞は二次移植マウスの副腎に主たる病変を形成していることが観察された。さらに同一個体の脾臓、腎臓、骨髄、副腎に生着した腫瘍細胞のゲノムコピー数解析において、生着臓器間でゲノムコピー数に相違が認められることが観察され、生着する臓器ごとに何らかの差が生じている可能性が示唆された。

次に腫瘍細胞が HUVEC との共培養下において生存が支持されるかどうかについて検討した。特定の腫瘍細胞においては、HUVEC と腫瘍細胞との共培養の方が、単独培養と比較して、明らかにその生存が支持されることが確認された。一方、節性病変由来腫瘍細胞の生存が支持される線維芽細胞との共培養においては、IVLBCL 細胞は生存支持を受けなかった。さらにアレイ CGH 法によるゲノムコピー数解析、網羅的遺伝子発現解析により、腫瘍細胞が活性化 B 細胞型 (ABC like) DLBCL と類似したゲノムコピー数異常を呈することを確認し、網羅的遺伝子発現解析においても、ABC like DLBCL に分類されることを確認した。さらに遺伝子発現を、健常 B 細胞を対照として GSEA 解析により比較すると、IVLBCL 細胞にて細胞遊走に関わるミオシン経路関連遺伝子群の発現が抑制され、転写因子 E2F3 に関連する遺伝子群の発現が亢進していることが確認された。これまで IVLBCL については、血管内に腫瘍細胞が局限するという性質から十分な解析が困難であったが、本研究により IVLBCL における生物学的側面の一端を明らかにすることが出来た。

(2) 中枢神経浸潤に関しては、経過中に中枢神経に浸潤を来した悪性リンパ腫患者から得られた腫瘍細胞を経静脈的に異種移植し、腹部臓器および中枢神経に有意な病変を

形成する PDX モデルを作製した。脳の凍結切片を抗 PAX5 抗体にて免疫染色し、染色された腫瘍細胞をレーザーマイクロディセクション法にて採取したが、十分な解析に至らなかった。そこで、腫瘍細胞の投与経路を再検討したところ、解析可能な中枢神経病変を形成させることに成功した。

そこで3例の DLBCL および PTL 患者由来腫瘍細胞を NOG マウスに異種移植し、中枢神経病変、腹部病変、骨髄病変を持つ PDX モデルを作製した。各々の病変より採取した腫瘍細胞をセルソーターおよび磁気ビーズにて純化し、腫瘍細胞の全 RNA およびゲノム DNA を抽出した。抽出した全 RNA およびゲノム DNA に対して全エクソン解析、全 RNA 配列解析を施行し、各病変を形成した腫瘍細胞間の異同について検討を加えた。さらに PDX モデルの中枢神経病変よりアストロサイトを分離培養することに成功し、腫瘍細胞とアストロサイトとの共培養下における相互作用の解明に着手した。

(3) 134 例の DLBCL 患者病理組織標本を抗 SPIB 抗体による免疫染色にて検討し、108 例を SPIB 陰性群、26 例を SPIB 陽性群と分類した。同様に患者の病型を Hans' criteria に従い、47 例の胚中心型 (GCB type) および 85 例の非胚中心型 (non-GCB type) に分類し、臨床情報と SPIB 発現との関連について検討した。初回治療反応性については、全患者においては SPIB 陰性群の完全奏効割合 (CRR) は 86%、SPIB 陽性群の CRR は 50% ($p < 0.001$) であり、GCB type においては、SPIB 陰性群の CRR は 85%、SPIB 陽性群の CRR は 25% ($p < 0.001$)、non-GCB type においては、SPIB 陰性群の CRR は 87%、SPIB 陽性群の CRR は 75% ($p = 0.376$) で、SPIB 陽性群は全患者および GCB type において有意に高値であった。生存についての検討では、全患者において生存者の追跡期間中央値 39 ヶ月において、SPIB 陽性群の 3 年無増悪生存割合 (PFS) は 38%、SPIB 陰性群の PFS は 74%、SPIB 陽性群の 3 年全生存割合 (OS) は 59%、SPIB 陰性群の PFS は 79% と SPIB 陽性群が有意に予後不良であった (それぞれ、 $p < 0.001$ および $p = 0.024$)。GCB type においては、SPIB 陽性群と陰性群の 3 年 PFS は、それぞれ 17%、75%、3 年 OS はそれぞれ 22%、85% で、SPIB 陽性群で有意に予後が不良であった (それぞれ $p < 0.001$ および $p = 0.002$)。non-GCB type においては、SPIB 陽性群と陰性群の 3 年 PFS は、それぞれ 56%、75%、3 年 OS はそれぞれ 88%、77% で、両群で差を認めなかった (それぞれ

p=0.201 および p=0.682)、Cox 比例ハザードモデルによる予後因子解析においては、SPIB 発現が全患者および GCB type において PFS、OS に対して独立した予後不良因子であった。

SPIB 発現が、GCB type において予後不良因子となることが示唆されることから、Flag-tagged SPIB 発現ベクターを作製し、内因性の SPIB 発現が低値である SU-DHL4 細胞株に導入し、SPIB 強制発現株を作製した。SPIB 強制発現株は対照株と比較して、BH3 mimetic である ABT-263 に対して治療抵抗性を示した (GI₅₀: 強制発現株: 3.73 μM、対照株: 0.50 μM、p=0.015)。アポトーシス関連タンパク BCL2、BCLxL、BCLw、MCL1 などについて検討すると、強制発現株では MCL1 発現が ABT-263 存在下において維持されていた。そこで MCL1 上流に存在する AKT および ERK 経路について検討し、強制発現株においてリン酸化 AKT 発現が維持され、下流のリン酸化 BAD 発現が維持されていることを確認した。さらに AKT 経路を阻害する ibrutinib、idelalisib、LY294002 と ABT-263 を併用することにより、SPIB 強制発現による ABT-263 耐性が克服されることを確認した。これらにより SPIB 発現が DLBCL における新たな予後不良因子であり、GCB type においては、抗アポトーシス作用を介して、治療抵抗性に関与していることを明らかにした。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 10 件)(全て査読有)

1. Kojima Y, Hayakawa F, Morishita T, Sugimoto K, Minamikawa Y, Iwase M, Yamamoto H, Hirano D, Imoto N, Shimada K, Okada S, Kiyoi H. YM155 induces apoptosis through proteasome-dependent degradation of MCL-1 in primary effusion lymphoma. *Pharmacol Res.* 120:242-51. 2017 doi: 10.1016/j.phrs.2017.04.006. [Epub ahead of print]
2. Aoki T, Shimada K, Sakamoto A, Sugimoto K, Morishita T, Kojima Y, Shimada S, Kato S, Iriymaya C, Kuno S, Harada Y, Tomita A, Hayakawa F, Kiyoi H. Emetine elicits apoptosis of intractable B-cell lymphoma cells with MYC rearrangement through inhibition of glycolytic metabolism. *Oncotarget.* 8:13085-98. 2017
3. Takagi Y, Shimada K, Shimada S, Sakamoto A, Naoe T, Nakamura S, Hayakawa F, Tomita A, Kiyoi H. SPIB is a novel prognostic factor in diffuse large B-cell lymphoma that mediates apoptosis via the PI3K-AKT pathway. *Cancer Sci.* 107:1270-80. 2016
4. Suzuki Y, Tomita A, Nakamura F, Iriyama C, Shirahata-Adachi M, Shimada K, Akashi A, Ishikawa Y, Kaneda N, Kiyoi H. Peripheral blood cell-free DNA is an alternative tumor DNA source reflecting disease status in myelodysplastic syndromes. *Cancer Sci.* 107:1329-37. 2016
5. Shimada K, Shimada S, Sugimoto K, Nakatochi M, Suguro M, Hirakawa A, Hocking TD, Takeuchi I, Tokunaga T, Takagi Y, Sakamoto A, Aoki T, Naoe T, Nakamura S, Hayakawa F, Seto M, Tomita A, Kiyoi H. Development and analysis of patient-derived xenograft mouse models in intravascular large B-cell lymphoma. *Leukemia.* 30:1568-79. 2016
6. Aoki T, Shimada K, Suzuki R, Izutsu K, Tomita A, Maeda Y, Takizawa J, Mitani K, Igarashi T, Sakai K, Miyazaki K, Mihara K, Ohmachi K, Nakamura N, Takasaki H, Kiyoi H, Nakamura S, Kinoshita T, Ogura M. High-dose chemotherapy followed by autologous stem cell transplantation for relapsed/refractory primary mediastinal large B-cell lymphoma. *Blood Cancer J.* 5:e372. 2015
7. Shimada K. Current understanding and future prospects for intravascular large B-cell lymphoma. *Rinsho Ketsueki* 56: 1032-7. 2015
8. Sugimoto K, Hayakawa F, Shimada S, Morishita T, Shimada K, Katakai T, Tomita A, Kiyoi H, Naoe T. Discovery of a drug targeting microenvironmental support for lymphoma cells by screening using patient-derived xenograft cells. *Sci Rep.* 5:13054. 2015
9. Aoki T, Izutsu K, Suzuki R, Nakaseko C, Arima H, Shimada K, Tomita A, Sasaki M, Takizawa J, Mitani K, Igarashi T, Maeda Y, Fukuhara N, Ishida F, Niitsu N, Ohmachi K, Takasaki H, Nakamura N, Kinoshita T, Nakamura S, Ogura M. Prognostic significance of pleural or pericardial effusion and the implication of optimal treatment in primary mediastinal large B-cell lymphoma: a multicenter retrospective study in Japan. *Haematologica.* 99:1817-25. 2014
10. Shimada K, Tomita A, Saito S, Kiyoi H. Effectiveness of ofatumumab to rituximab resistant CLL/SLL cells with reduced CD20

protein expression. Br J Haematol. 166:455-57. 2014.

〔学会発表〕(計 11 件)

1. Aoki T, Shimada K, Sakamoto A, Sugimoto K, Morishita T, Kojima Y, Shimada S, Kato S, Iriyama C, Kuno S, Harada Y, Nakamura S, Tomita A, Hayakawa F, Kiyoi H. Emetin Elicits Apoptosis of Intractable B-Cell Lymphoma Cells with MYC Rearrangement through Inhibition of Glycolytic Metabolism. 第 58 回米国血液学会、2016 年 12 月 3 日～2016 年 12 月 6 日、サンディエゴ(米国)
2. 島田和之、異種移植マウスモデルを用いた血管内大細胞型 B 細胞リンパ腫の病態解析、第 54 回日本癌治療学会学術集会(シンポジウム;招待講演)、2016 年 10 月 20 日～2016 年 10 月 22 日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)
3. Aoki T, Shimada K, Sakamoto A, Morishita T, Harada Y, Iriyama C, Hayakawa F, Tomita A, Kiyoi H. Discovering the novel drug targeting tumor-microenvironment for intractable lymphoma. 第 78 回日本血液学会学術集会、2016 年 10 月 13 日～2016 年 10 月 15 日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)
4. 青木智広、島田和之、坂本明彦、森下喬允、早川文彦、富田章裕、清井仁、糖代謝の抑制が myc 陽性 DLBCL 腫瘍のアポトーシスを誘導する、第 75 回日本癌学会学術総会、2016 年 10 月 6 日～2016 年 10 月 8 日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)
5. Takagi Y, Shimada K, Shimada S, Hayakawa F, Sakamoto A, Nakamura S, Tomita A, Kiyoi H. SPIB expression is a novel poor prognostic factor in DLBCL. 第 77 回日本血液学会学術集会、2015 年 10 月 16 日～2015 年 10 月 18 日、石川県立音楽堂(石川県金沢市)
6. Sakamoto A, Shimada K, Katayama M, Hayakawa F, Tomita A, Kiyoi H. Lymph node-associated stromal fibroblasts support B-cell lymphoma cells via the PI3K pathway. 第 77 回日本血液学会学術集会、2015 年 10 月 16 日～2015 年 10 月 18 日、石川県立音楽堂(石川県金沢市)
7. Sakamoto A, Shimada K, Katayama M, Hayakawa F, Tomita A, Kiyoi H. Lymph node-associated stromal fibroblasts as a potential source of humoral factors to support B-cell lymphoma cells. 第 74 回日本学会学術集会、2015 年 10 月 8 日～2015 年 10 月 10 日、名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)
8. Sakamoto A, Shimada K, Katayama M, Hayakawa F, Tomita A, Kiyoi H. Lymph node-associated stromal fibroblasts as a potential source of humoral factors to support B-cell lymphoma cells via the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. 第 44 回国際実験血液学会、2015 年 9 月 17 日～2015 年 9 月 19 日、国立京都国際会館(京都府京都市)
9. Shimada K, Shimada S, Sugimoto K, Hayakawa F, Katayama M, Hirakawa A, Takagi Y, Nakamura S, Hayakawa F, Seto M, Naoe T, Tomita A, Kiyoi H. Development and Analysis of Novel Intravascular Large B-Cell Lymphoma NOD/Shi-Scid IL2R γ null Mouse Xenograft Model. 第 56 回米国血液学会、2014 年 12 月 6 日～2014 年 12 月 9 日、サンフランシスコ(米国)
10. Shimada K, Shimada S, Sugimoto K, Hayakawa F, Katayama M, Hirakawa A, Nakamura S, Hayakawa F, Seto M, Naoe T, Tomita A, Kiyoi H. Biological and genetic analyses of intravascular large B-cell lymphoma using xenograft mouse model. 第 76 回日本血液学会学術集会、2014 年 10 月 31 日～2014 年 11 月 2 日、大阪国際会議場(大阪府、大阪市)
11. Shimada K. Intravascular large B-cell lymphoma –from bench to bedside. 第 76 回日本血液学会学術集会(シンポジウム;招待講演)、2014 年 10 月 31 日～2014 年 11 月 2 日、大阪国際会議場(大阪府、大阪市)

6. 研究組織

(1)研究代表者

島田 和之 (SHIMADA, Kazuyuki)
名古屋大学・医学部附属病院・講師
研究者番号: 50631503