

15 - 11 分子基盤に基づく難治性リンパ系腫瘍の診断及び治療法の開発に関する研究

主任研究者 愛知県がんセンター 中村 栄 男

研究成果の要旨

1)我々が新たに難治性疾患単位として提唱した CD5 陽性びまん性 B 大細胞リンパ腫の CGH 法、gene expression profile による分子病態の解明。2) 全国多施設共同研究として血管内 B 大細胞型リンパ腫、および 3)我々が先駆して提唱した老人性 EBV 関連 B 細胞性リンパ増殖症を各 100 例以上集積し病態解明を図ると共に前方視的調査臨床研究のための拠点網・登録システムを構築、4) 東アジアに多い NK/T 細胞リンパ腫の放射線療法と DeVIC 療法の併用第 I/II 相試験を遂行すると共に、5)同腫瘍に対する遺伝子治療を目的とした EBV 特異的エンハンサーの応用による腫瘍細胞特異的ターゲティング法の開発。6) 成人 T 細胞性白血病において CCR4、FoxP3 発現解析により制御性 T 細胞由来を示唆すると共に、ヒトキメラ型抗 CCR4 単クローン抗体による免疫療法の可能性を検討。さらに非非特定型 T 細胞腫瘍における予後不良因子として CCR4 発現の意義を解明。7)SKY 法、FISH 法を用いた成熟 T 細胞腫瘍、骨髄腫および消化管リンパ腫における特異的染色体転座を検討。8)胃 MALT リンパ腫における *H. pylori* 除菌不応性関連因子としての *API2-MALT1* キメラ遺伝子の意義を解明。

研究者名および所属施設

研究者名	所属施設および職名	分担研究課題
中村 栄 男	愛知県がんセンター病院 部長	難治性リンパ系腫瘍の分子病理、診断・治療ネットワークの開発と班の総括
上田 龍 三	名古屋市立大学大学院医学研究科 教授	難治性リンパ系腫瘍の分子機序に基づく治療法の開発
押味 和 夫	順天堂大学医学部 教授	NK 類縁リンパ腫の分子機序に基づく治療法の開発
谷脇 雅 史	京都府立医科大学 教授	難治性リンパ系腫瘍における FISH 法、SKY 法による臨床病態の解明と診断法の開発
田村 和 夫	福岡大学医学部 教授	難治性リンパ系腫瘍の分子機序に基づく臨床病態解明と治療法の開発
飛内 賢 正	国立がんセンター中央病院 医長	難治性リンパ系腫瘍の生物学的特性に基づく治療法の開発・推進
(班 友)		
大橋 春 彦	国立名古屋病院	Epstein-Barr virus (EBV) ゲノムの多型を利用した移植後リンパ増殖疾患(PT-LPD)の発症機序の解明
柳 壹 夫	*1 国立感染症研究所	EBV 核抗原-1 の細胞 DNA 複製複合体への結合 EBV 陽性リンパ腫の予防・治療の標的
原田 志津子	*2 国立感染症研究所	EBV 核蛋白変異体を用いたリンパ腫細胞増殖制御

総括研究報告

1 研究目的

本計画研究班は難治性リンパ系リンパ腫を分子レベルから病理形態、臨床病態に至るまでを学際的に解析し、臨床に有用な診断・治療を開発することにある。悪性リンパ腫は、現在、患者の増加率の最も高い新生物の一つである。一般に薬剤感受性は高いとされるが、現実には約半数が臨床経過中に治療不応性の転帰をとる。また、疾患の生物学的特性は極めて幅広い。分子基盤に基づく難治性リンパ系腫瘍の正確な特定、病態の把握、さらに quality of life (QOL) をも考慮した疾患毎の個別的治療の開発からなる統合的アプローチ(分子生物、病理、および臨床)こそが、現状の限界を打破する鍵と云える。臨床応用を目的とした分子マーカーの同定・検討と共に、最も頻度の高いびまん性 B 大細胞リンパ腫の層別化に基づく治療戦略の確立を目指す。また、東南アジアに多い NK/T リンパ腫や EBV 関連リンパ増殖症、新遺伝子が同定された MALT リンパ腫の臨床分子病態から治療をも網羅する研究を全班員の協力のもとに推進する。本研究のような学際的研究による治療戦略の確立により、難治性リンパ腫の克服、さらにはより治癒困難な固形癌医療への展開が期待される。診断と治療のための reference center などの拠点整備を視野に入れれば、成果を適宜、医療の現場へ還元し、国民医療水準全体の向上が期待される。

2 研究成果(本年度の成果を以下に列挙する)

1) CD5 陽性びまん性 B 大細胞リンパ腫(DLBCL)の病態把握、分子基盤の解明と治療開発(全員)

DLBCL はリンパ腫の中で最も発生頻度が高い。疾患単位としては単一ではなく、病態・病理ともに不均一な疾患群である。予後不良群の同定は、治療戦略上、必須である。

我々は新たに CD5 陽性 B 大細胞リンパ腫 *de novo* CD5+DLBCL という難治性疾患単位を提唱した(*Blood* 2002;99:815)。すなわち、有意に高齢者に多く予後不良であり、節外臓器浸潤や血管内増殖像など特異な病態を呈することを指摘した。特に後述する血管内 B 大細胞リンパ腫との関連が示唆された。

今回、さらに分子基盤の解明を目的として継続的に解析を進めた。前年からの comparative genomic hybridization (CGH) 法による染色体分析に加え、新たに gene expression profile (GEP) による分子異常を詳細、かつ系統的に解析した。CGH 分析では、*de novo* CD5+

DLBCL に特徴的な所見として gains of 10p14-p15 and 19q13、および losses of 1q43-q44 and 8p23 が検出された。さらに同腫瘍は gain of 13q21-q34 および loss of 1p34-p36 に着目することにより予後的に亜分類が可能であった。GEP 分析では *de novo* CD5+ DLBCL 17 例と CD5-DLBCL 15 例を対比した。その結果、得られた前者に特有の profile が validation study においても優れた予後指標となることを明らかにした。現段階で得られた所見は、分子レベルにおいても *de novo* CD5+DLBCL が明確に特異な疾患(群)を形成することを支持するものといえる。

2) 血管内 B 大細胞型リンパ腫(IVL)の多施設共同研究による臨床病理学的解析(全員)

IVL は、腫瘍形成性病変がないという特殊性のために依然として生前診断が困難であり、また極めて難治である。とくに本邦症例が、欧米報告例とは異なり皮膚・中枢神経病変がなく、むしろ汎血球減少症、肝脾腫など特異な病態により特徴づけられる Asian variant を形成することを報告した(*Br J Haematol* 2000;111:826, 中村)。全国多施設共同研究として IVL を 100 例以上集積した。うち 80 例が生前診断され多剤併用療法が施されたものであり、約 30% が CD5 陽性であることが明らかにされた。

3) 加齢性(老人性)EBV 関連 B 細胞リンパ増殖異常症(senile EBV+ B-LPD)の病因・臨床病態の解明を目指した全国多施設共同研究(全員)

EBV は免疫不全関連 B 細胞増殖症の発症に深く関与している。我々は高齢患者(60 歳以上)における EBV 陽性 22 症例の解析により加齢性(老人性)EBV 関連 B 細胞性リンパ増殖症(senile EBV+ B-LPD)という新たな疾患単位を提唱した(*Am J Surg Pathol* 2003;27:16)。加齢そのものによる免疫力低下が発症要因の可能性を示唆した。しかし、senile EBV+ B-LPD と他の EBV+ B-LPD との関連には未だ不明な点が多い。今回、我々は EBV+ B-LPD の頻度と病理学的所見について、さらに検討を進めた。びまん性 B 大細胞リンパ腫(DLBCL)を中心とする 1546 例に及び large B-cell LPD を対象として、EBV の関与の有無を EBER-ISH にて検索した。その結果、EBV 陽性例は 213 例(14%)であった。うち senile EBV+ B-LPD と目される腫瘍は 126 例であり、本邦における EBV+ B 細胞腫瘍全体の約 59%(126/213)を占めた。本邦人口構成における急速な高齢化により、今後さらに本疾患の発症は増加するものと考えられる。現在、此記 2)、3) の疾患については本研究班を中心とした多施設共同研究として各地に診断・治療拠点を設け、前方視的調査臨床研究体制を構築し平成 16 年度後期より運用中である(中村、全班員)。

4) NK 細胞腫瘍の本態解明と治療研究(飛内、押味、全

員)

東南アジア地域に多い NK リンパ腫への対応は急務であり、NK 腫瘍リンパ腫第三次全国実態調査による 1994 - 1998 年の 5 年間に発生した中央診断による確診例 263 例の臨床像、治療、予後の解析を行ない、現在、順次報告中である(押味、中村、全班員)。特に多施設共同臨床試験として限局期症例に対する放射線療法と DeVIC 療法の併用第 I/II 相試験を 2003 年 9 月より開始した(飛内、押味、全班員)。現在、さらに進行期症例に対するプロトコルの作成を計ると共に国際共同研究の可能性を模索中である(押味)。

5) Adeno-associated virus (AAV)ベクターを用いた NK 細胞腫瘍の遺伝子治療に関する基礎的研究(押味)

NK 腫瘍の多くに Epstein-Barr virus (EBV)の関与が認められる。日本を含むアジアに多く、化学療法抵抗性で、極めて予後不良である。このため、従来の化学療法に代わる新しい治療法が求められている。押味らは、これまでに安全で効率のよいウイルスベクターである AAV を用いて、他の遺伝子導入法では難しいとされる培養 NK 細胞株へも高い効率で遺伝子導入ができることを明らかにしてきた。さらに、EBV 陽性細胞でのみ発現する EBV 特異的エンハンサーが正常細胞内では抑制され EBNA1 発現細胞内でのみ働くことを確認した。この EBV 特異的エンハンサーの下流に CPA や IFM の抗癌剤活性化酵素 (CYP3A4)を組み込んだベクターを作製し、EBV 陽性 NK 細胞へ導入し、抗腫瘍効果を測定した。その結果、目的遺伝子は、EBNA1 を発現している EBV 陽性 NK 細胞内で高率に発現し、EBV 陰性の正常細胞では発現が抑制された。すなわち、EBV に特異的な転写因子を利用して EBV+腫瘍細胞のみに抗癌剤活性化酵素を発現させることにより、抗癌剤を活性型に変化させ特異的な抗腫瘍効果が得られることを明らかにした(押味)。これにより個体間の SNP の差に関係なく、最大の抗腫瘍効果の獲得が予想される。

6) 成熟 T 細胞腫瘍におけるケモカイン受容体発現の臨床病的解析(上田、田村)

成熟 T 細胞腫瘍は、本邦に地理病理学に偏在する成人 T 細胞白血病・リンパ腫(ATLL)をはじめ一般に極めて難治であり、未だ標準治療はない。その生物学的性状も不明な点が多い。上田らは、成人 T 細胞性白血病 (ATLL) が CCR4 を高度に陽性であり、FoxP3 発現と相関を示すことより制御性 T 細胞 regulatory T cell 由来の可能性を示した(上田、田村)。さらに、同細胞株に対してヒトキメラ型抗 CCR4 単クローン抗体による免疫療法の可能性を検討した。その結果、正常人末梢血単核球の存在下で、同抗体が ATLL 細胞株に対して強い抗体依存性細胞障害

性を示し、有効な腫瘍免疫を惹起する可能性が示された(上田)。また、HTLV-1 non-endemic 地域で T 細胞腫瘍 (PTCL)中の最大頻度を占める非特定型 T 細胞リンパ腫で CCR4 発現が独立した生物学的予後不良因子であった(上田、田村)。

7) FISH 法、SKY 法による成熟 T 細胞腫瘍、骨髄腫および消化管リンパ腫に特異的な染色体異常の同定(谷脇、上田)

B 細胞腫瘍に比して成熟 T 細胞腫瘍(PTCL)の分子生物学的解析は著しく遅れたものといえる。その染色体再構成が非常に複雑であり、特異的な異常の同定が困難なためである。谷脇らは SKY 法あるいは G 染色法を用いて、ATLL 細胞株 6 株、臨床例 30 例の SKY 解析を行い特異的な染色体異常として 14q11.2 を切断点とした染色体転座再構成を高頻度に認め、幾つかの転座相手染色体を同定した。14q11.2 には、*TCR* / 遺伝子が局在しており、PTCL の腫瘍発生に深く関与している可能性を示した。多発性骨髄腫(MM)の染色体異常のうち、高頻度に検出されるのは 14q32 に局在する免疫グロブリン H 鎖 (*IGH*)遺伝子とがん関連遺伝子の染色体転座である。谷脇、上田らは *IGH* 転座の相手遺伝子と臨床像ならびに予後を検討した。MM52 例(年齢 40 ~ 89 歳)の骨髄血を用いて、double-color FISH 法により *IGH* 転座の相手遺伝子として同定できたのは、*CCND1* 16 例 (31%)、*c-MYC* 12 例 (23%)、*FGFR3* 3 例(6%) を同定した。また、谷脇らは消化管リンパ腫 98 例を組織 FISH 法で検討し、組織型毎に特徴的な染色体転座を見出すと共に臨床病理学的な相関を示した。

8) MALT リンパ腫における *API2/MALT1* キメラ発現の臨床病理学的意義(上田、中村)

MALT リンパ腫の発生に t(11;18)(q21;q21)染色体転座が深く関わる。同転座部位より *API2-MALT1* キメラ遺伝子がクローニングされた。本研究班は、この遺伝子が明らかにされると同時に胃 MALT リンパ腫の *H. pylori* 除菌療法に対する反応性と t(11;18)(q21;q21)転座による *API2-MALT1* キメラ遺伝子との関連について検討を進めた。その結果、t(11;18)染色体転座が、*H. pylori* とは独立した胃 MALT リンパ腫発生病因であることを示した。

3 倫理面への配慮

本研究における倫理面への配慮については細心の注意を払い、遺伝子研究は「ヒトゲノム遺伝子解析研究に関する共通指針」(平成 13 年 3 月 29 日文科科学省、厚生労働省、経済産業省共同告示第 1 号、平成 16 年 2 月 28 日全部改正)に則り、且つ各施設の倫理委員会の承認を得て行なった。