

図. 診断時期別にみたPBLの発生数 (n =22)

リンパ腫発症検出に関する血清学的検査法に関する研究 その3

分担研究者 照井 康仁 がん研究会有明病院 血液腫瘍担当部長

研究要旨 AIDS患者のリンパ腫発症を早期に発見することは、診断後の治療効果を大きく改善することが可能であると考えられる。我々は平成22年度に、チロシンキナーゼ阻害剤 imatinib により誘導される HIV-suppressive modulator (Murabutide) 処理により CD8-depleted PBMNC で発現低下する遺伝子、TRIM68 を同定し、血清中抗 TRIM68 抗体検出 ELISA 法を確立した。本年度は、平成23年度に引き続き、症例数を増やし、各血液がん患者血清にて測定を施行した。その結果、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫のCD22陽性症例では陰性および弱陽性症例と比較して有意に高い抗体価を示すことが判明した。

A. 研究目的

HAART 治療によるエイズ患者の延命により、エイズ関連リンパ腫は、年々増加傾向にある。HIV 関連リンパ腫の治療の問題点は、標準療法が存在せず、治療抵抗性であり、抗がん剤治療によって免疫能がさらに低下する可能性がありリンパ腫治療が成功しても感染死のリスクが高くなることで、予後の改善がみられないことである。

この問題点を解決するためには、リンパ腫診断を早期の段階で行い、より早い段階で治療を開始すれば、免疫能低下も回避できる。さらに、R-CHOP 療法などのリンパ腫治療の免疫系への影響を解析し、免疫系の干渉のより少ない治療法を開発することも必要である。すなわち、早期診断法の確立、予後を延長する治療法の開発は急務な課題である。

我々は、いままで、CD5 陽性びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫(DLBCL)の難治性、CD20 遺伝子変異が関与したリツキシマブ抵抗性、HCV 感染リンパ腫患者のリツキシマブ投与後の HCV-RNA 量増加と IgG レベル低下、可溶性 IL-2 受容体レベルの R-CHOP 療法施行後の DLBCL の予後への影響、を報告してきた。チロシンキナーゼ阻害剤イマチニブは EBV 関連リンパ腫に対するリツキシマブの抗腫瘍効

果を減弱することが知られ、補体阻害系を可逆化し、補体依存性細胞障害作用を阻害することによってイマチニブはリツキシマブの抗腫瘍効果を減弱するが、NK 細胞への影響はないとされている。

このことより、イマチニブにより発現増強する遺伝子群の解析は意義があり、最近、我々はイマチニブ処理により誘導される TRIM68 遺伝子を同定し、血清中抗 TRIM68 抗体検出 ELISA 法を確立した。

B. 研究方法

平成23年度と同様に、TRIM68 遺伝子をクローニングし、無細胞系タンパク合成系ベクターに組み換え、TRIM68 タンパクを合成する。そのタンパクを 96 穴プレートに固相化し、同意取得した患者血清を添加する。96 穴プレートから血清を除去後、洗浄し、ヤギ抗ヒト抗体を添加しする。TMB/E 液による発色を OD450nm にて吸光度測定をした。

(倫理面への配慮)

ヒト由来試料（血清等）を用いた研究はがん研究会倫理委員会の承認を受け、規則に従い実施している。

1) 研究対象者に対する人権擁護上の配慮

研究に用いる血清等は、他の研究目的には使

用しない。血清等は匿名処理を行うため、個人情報流出することはない。また、同意書に署名後も試料採取・使用までの期間に同意を撤回することを可能としている。

2) 研究方法による研究対象者に対する利益・不利益

本研究により、直接提供者が医学上の利益・不利益を得ることはない。

3) 危険性の排除

採血は、医師が問診した上で健康に問題ないと判断した場合に限り、検査技師が採血している。採血に伴う身体への危険性はあるが、これは通常の診療行為を越えるものではない。一回の採取量は約 10ml であり、採血量は、本人の了解のもとに決定している。

4) インフォームドコンセントに係わる状況

血液採取に関しては、がん研究会有明病院のスタッフ（医師）が本研究の趣旨を説明し、血液提供の同意を得られた方のみ同意書に署名していただいている。この際、説明を行った医師名を明記し、同意書はがん研究会において厳重に保管している。

B. 研究結果

1) TRIM68 遺伝子の同定と特徴

TRIM68 は RING finger タンパク 137 で、RING finger ドメインを N 末端に有し、SS-56 ともいわれる。分子量 56kDa で主に細胞質、核膜周辺に局在する。多くの組織で発現しているが、特に脾臓や肝臓で強発現している。RING finger タンパクは ubiquitin あるいは sumo E3 リガーゼ活性を有するが、我々の解析で、ubiquitinE3 リガーゼであることが判明した。現在、さらに、その基質の探索と結合タンパクの解析を行っている。

2) 抗 TRIM68 抗体検出 ELISA 法の確立

無細胞系タンパク合成系ベクターに組み換え、TRIM68 タンパクを合成した。TRIM68 タンパクを 96 穴プレートに固相化し、既存の抗 TRIM68 抗体を各濃度で添加した。96 穴プレートから血清を除去後、洗浄し、ウサギ抗マウス抗体を添加しする。TMB/E 液による発色を OD450nm にて吸光度測定をし、検量線を作製した。

3) 各種血液がんにおける血清抗 TRIM68 抗体の平成 22 年度は血液がん患者 254 名から血液を採取し、血清分離を行ったが、平成 24 年度は平成 23 年に引き続き、血液がん患者 587 名の血清を解析し、他のパラメーターとの相関を解析した。疾患の内訳は DLBCL 259 例、MALT 29 例、FL123 例、MCL 16 例、BL 2 例、CLL/SLL 6 例、ALL6 例、HL 35 例、AITL 6 例、MM 45 例、ALCL 5 例、NK/T 14 例、PTCL 11 例、ATLL 4 例、AML 17 例、MDS 7 例、PV 2 例であった。

血清抗 TRIM68 抗体の正常人の吸光度平均値は 0.47 であったので、0.5 以上の割合を疾患別にみると、それぞれ、DLBCL 52%、MALT 62%、FL 37%、MCL 50%、BL 0%、CLL/SLL1 33%、AML 76%、HL 69%、AITL 50%、MM 47%、ALCL 80%、NK/T 43%、PTCL 56%、ALL33%、AML 76%、CML 50%、ATL 50%、MDS 71%、PV 0%であった。DLBCL では病期に関係なく平均値が同等であったが、抗 TRIM68 抗体 0.4 未満と 0.4 以上で層別化すると 0.4 以上で病期 III/IV の割合が高かった。

DLBCL における免疫染色および細胞表面マーカー(CD5、CD10、CD19、CD20、CD22、kappa、Lamda、BCL2、BCL6、MIB1、MUM1、CD23、PAX5、LMP1)との関係を解析すると、CD5、CD10、CD19、CD20、kappa、Lamda、BCL2、BCL6、MIB1、MUM1、CD23、PAX5、LMP1 では有意差がみとめられなかったが、CD22 に関しては、0.47 対 0.69 ($p=0.009858$)と陽性症例では陰性および弱陽性症例と比較して有意に高い抗体価を示すことが判明した。

4) DLBCL における CD22 発現と各種パラメーターとの相関

DLBCL における CD22 陽性例と陰性例の各種パラメーターである白血球数、ヘモグロビン値、血小板数、LDH、sIL-2R、血清 β 2MG 値との相関を解析した。白血球数、ヘモグロビン値、血小板数、LDH は CD22 陽性例と陰性例で有意差がみとめられなかったが、血清 β 2MG 値では 1.40mg/l 対 2.37mg/l ($p=0.003$)、sIL-2R では 566U/ml 対 1882.6U/ml ($p=0.018$)と CD22 陽性症例では CD22 陰性および弱陽性症例と比較して有意に高値を示すことが判明した。

4) 考察

血清抗 TRIM68 抗体は血液がんによく検出される可能性が高い。

リンパ系腫瘍に特異的であるとは限定できないが、DLBCL の解析から CD22 のファミリーである Siglec ファミリーを発現している腫瘍に関連している可能性がある。

今回の解析では、白血球数、ヘモグロビン値、血小板数、LDH、とは相関しないが、CD22 の発現は血清 β 2MG 値 sIL-2R と相関しており、抗 TRIM68 抗体値と CD22 の発現、血清 β 2MG 値、sIL-2R との関係が示唆される。

5) 結論

TRIM68 の同定により、CD22 などの Siglec ファミリーを発現した腫瘍において血清抗 TRIM68 抗体の検出が早期診断に応用できる可能性が示唆された。HIV 関連リンパ腫における Siglec ファミリーの発現解析と血清抗 TRIM68 抗体値の関係を解析する必要があると考えられた。

6) 健康危機情報

該当なし

G. 研究発表

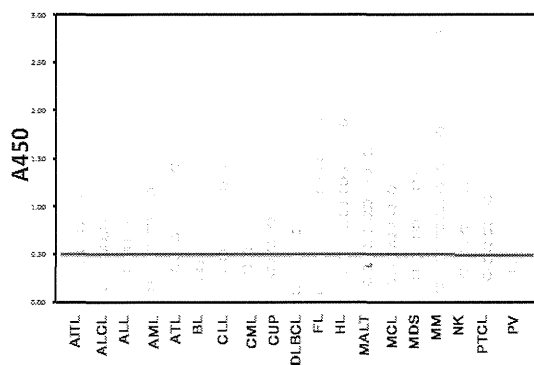
1. 論文発表

- Matsusaka S, Mishima Y, Suenaga M, Terui Y, Kuniyoshi R, Mizunuma N, Hatake K. Circulating endothelial progenitors and CXCR4-positive circulating endothelial cells are predictive markers for bevacizumab. *Cancer*. 117(17):4026-32, 2012.
- Suzuki K, Terui Y, Nakano K, Nara E, Nasu K, Ueda K, Nishimura N, Mishima Y, Sakajiri S, Yokoyama M, Takahashi S, Hatake K. High thymidine kinase activity is a strong predictive factor for poor prognosis in PTCLs treated by CHOP. *Leuk Lymphoma*. 53(5):849-54, 2012.
- Nishimura N, Nakano K, Ueda K, Kodaira M, Yamada S, Mishima Y, Yokoyama M, Terui Y, Takahashi S, Hatake K. Prospective evaluation of incidence and severity of oral mucositis induced by conventional chemotherapy in solid tumors and malignant lymphomas. *Support Care Cancer* 20(9):2053-9, 2012.
- Mishima Y, Terui Y, Mishima Y, Kuniyoshi R, Matsusaka S, Mikuniya M, Kojima K, Hatake K. High reproducible ADCC analysis revealed a competitive relation between ADCC and CDC and differences between Fc γ R11a polymorphism. *Int Immunol*. 24(8):477-83, 2012.
- Ogura M, Tobinai K, Hatake K, Uchida T, Suzuki T, Kobayashi Y, Mori M, Terui Y, Yokoyama M, Hotta T. Phase I study of obinutuzumab (GA101) in Japanese patients with relapsed or refractory B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Cancer Sci*. 2012
- Suzuki K, Terui Y, Nishimura N, Mishima Y, Sakajiri S, Yokoyama M, Takahashi S, Tsuyama N, Takeuchi K, Hatake K. Prognostic Value of C-reactive Protein, Lactate Dehydrogenase and Anemia in Recurrent or Refractory Aggressive Lymphoma. *Jpn J Clin Oncol*. 2012
- Mishima Y, Terui Y, Yokoyama M, Nishimura N, Sakajiri S, Ueda K, Kuboki Y, Nakano K, Suzuki K, Nara E, Tsuyama N, Takeuchi K, Oguchi M, Hatake K. R-CHOP with dose- attenuated radiation therapy could induce good prognosis in gastric diffuse large B cell lymphoma. *Exp Hematol Oncol*. 2012
- 照井康仁 mTOR 阻害剤 Around Hematological Malignancies Trends in Hematological Malignancies 4(1) 39-41、 2012

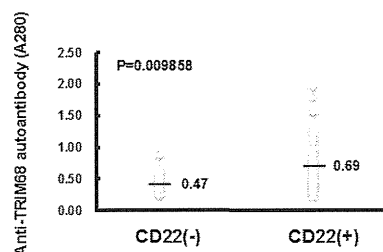
9. 照井康仁 抗体療法 III.造血器腫瘍の診断と治療 治療法 造血器腫瘍学-基礎と臨床の最新研究動向- 日本臨床 70 巻 増刊号 2 217-221、2012
10. 照井康仁 4. 新規抗がん剤（ベンダムスチン、ペグ化リポソーマルドキソルビシン） D. 新規治療薬 第 III 章多発性骨髄腫の治療手段 多発性骨髄腫マニュアル 159-166、2012 南江堂
11. 照井康仁 分子標的薬による血液毒性とその対策 臨床外科 67 (7) 878-881、2012
12. 照井康仁 多発性骨髄腫 成人病と生活習慣病 42 (6) 749-753、2012
13. 照井康仁 : ibritumomab tiuxetan (90Y 標識マウス型 CD20mb) エビデンスに基づいた癌化学療法ハンドブック 2012 有吉寛監修 メディカルレビュー社, 607-610, 2012
14. 照井康仁 リンパ腫に対する新規薬剤開発 内科 110 (2) 257-262, 2012
15. 照井康仁 悪性リンパ腫における可溶性 IL-2 受容体測定の意義 Medical Practice 29(8) 1314-1315, 2012
16. 照井康仁 濾胞性リンパ腫に対するリツキシマブ維持療法と再発・進行時の再治療の比較 : リツキシマブによる維持療法の意義 血液内科 65 (3) 442-447, 2012
17. 照井康仁 MLN9708 とその他の新規プロテアソーム阻害剤 多発性骨髄腫-現状と進歩医学のあゆみ 242 (13) 1152-1156, 2012
18. 照井康仁 第 19 節 造血障害 (骨髄異型性症候群) 第一章がん化学療法 (殺細胞剤) における副作用の疫学データと発現機序、診断・治療の現状 副作用軽減化 新薬開発技術情報協会出版 138-140, 2012
19. 照井康仁 CD 20 I I 基礎研究 分子標的薬の作用機序・薬理作用 免疫炎症関連標的分子・標的経路 分子標的薬—がんから他疾患までの治癒をめざして— 日本臨床 70 (8) 170-175, 2012
20. 照井康仁 1. 発熱性好中球減少症 (FN) 診療ガイドライン 特集 2 血液疾患診療のためのガイドライン—発熱性好中球減少症ならびに造血細胞移植後早期の感染管理 血液フロンティア 22(12) 83-92, 2012
- H. 知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む)
1. 特許取得 なし
 2. 実用新案登録 なし
 3. その他 なし

図 表

血液がんにおける抗TRIM6自己抗体

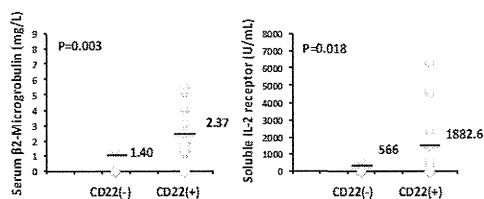


CD22 expression and anti-TRIM68 autoantibody



• CD5, CD10, CD19, CD20, kappa, Lamda, BCL2, BCL6, MIB1, MUM1, CD23, PAX5, and LMP1 did not show any significant relationship to anti-TRIM68 autoantibody.

Relationship between CD22 expression and Serum β 2-Microglobulin or Soluble IL-2 receptor



エイズリンパ腫における miRNA の発現異常と シグナル伝達系の解析

分担研究者 渡邊 俊樹 東京大学大学院新領域創成科学研究科
メディカルゲノム専攻病態医療科学分野 教授

研究協力者： 山岸誠（東京大学大学院新領域科学研究科
メディカルゲノム専攻病態医療科学分野）
片野晴隆（国立感染症研究所感染病理部）
大田泰徳（虎の門病院病理部）
比島恒和（東京都立駒込病院病理科）

研究要旨 エイズリンパ腫の分子病態と発症危険因子の決定に最も有効な方法は、実際の臨床検体を用いた系統的な解析とそこから得られた異常を示す遺伝子発現パターンの詳細な解析である。そこで前年度までに行ったエイズ合併リンパ腫検体における miRNA の網羅的な発現解析から明らかになった miR-200 ファミリーの発現抑制について、その分子メカニズムと機能的意義について検討を行った。その結果、リンパ腫細胞では miR-200 ファミリーはエピジェネティックな異常によって転写が抑制されていることがわかった。また機能面では、miR-200 ファミリーの新標的遺伝子を複数同定し、miRNA の低下が BCR シグナルの慢性的な活性化に寄与していることを明らかにした。さらに miR-200 ファミリーの発現抑制に関わる EZH2 の発現が BCR シグナルによって誘導されており、BCR、miR-200、Polycomb による feed-forward loop がリンパ腫細胞の生存に重要であることを明らかにした。

A. 研究目的

エイズ合併B細胞リンパ腫は一般に進行が早く予後が不良である。HAART の導入後エイズリンパ腫の発症は減少しているが、依然としてエイズ患者の予後を左右する重大な合併症であり、分子基盤の理解と治療法の開発、また発症危険因子の探索は急務である。

我々はこれまでに、成人 T 細胞白血病を始めとするリンパ腫細胞における重要な miRNA の異常として、miR-31 の発現異常機構とその生物学的意義を報告してきた (Yamagishi et al., Cancer Cell, 2012)。さらに昨年度までにエイズリンパ腫においても miR-31 が発現低下していることを明らかにした。エイズリンパ腫を含む

悪性リンパ腫、特にびまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫(DLBCL)では NF- κ B の恒常的活性化が腫瘍細胞の生存能の獲得に重要であり、その分子機構の解明が重要な課題であった。我々は B 細胞リンパ腫における miR-31 の発現低下の意義を検討すると同時に、エイズリンパ腫の臨床検体を用いて miRNA の網羅的な発現解析に着手した。エイズリンパ腫においてのみ見つかった異常 miRNA は、機能を検討されていないものが多く、悪性度の高いエイズリンパ腫の特性を説明できる可能性があると考えられた。一方でエイズと非エイズで共通して見つかった異常は、そのほとんどがエイズリンパ腫の方がその異常度が顕著であり、エイズリンパ腫に

において miRNA の発現異常が重要な因子であることも推察された。

発現異常のある miRNA ($p < 0.01$) でクラスター解析を行うと、エイズリンパ腫と非エイズリンパ腫が別のクラスターに属することがわかり、エイズの合併によりユニークな miRNA の発現を示す事もエイズリンパ腫の特徴であると考えられた。

このクラスターについて詳細に解析を進めた結果、リンパ腫において miR-200 ファミリーの発現が顕著に低下していることがわかった。miR-200 ファミリーはシード配列の類似性によって、miR-200b, miR-200c, miR-429 と miR-200a, miR-141 の二つのサブファミリーに分けられ、標的遺伝子も共通していることが多い。これらは特に固形癌で研究が進んでいる癌抑制性 miRNA で、標的遺伝子としては、*ZEB1*, *ZEB2*, *SUZ12*, *BM11*, *JAG1*, *β -catenin* などがある。しかし B 細胞における機能と標的遺伝子については報告されていない。miR-200 ファミリーと同様の挙動を示した miR-203 と miR-205 もやはりリンパ腫細胞で低下していた。miR-203 は Ph⁺ の慢性骨髄性白血病 (CML) 及び急性リンパ球性白血病 (B-ALL) で発現が低下し、その結果 *BCR-ABL* および *ABL1* の発現を上昇させる、癌抑制性 miRNA である。

エイズリンパ腫の発症危険因子の同定は、実際の臨床検体から貴重な情報を取り出す事が必須である。平成 24 年度は、我々独自の網羅的解析結果から得られた miRNA の発現異常の実態とその意義について詳細な解析を進めた。

B. 研究方法

1. メチル化 DNA の検出及びヒストン修飾の解析

エイズリンパ腫検体及び各リンパ腫細胞株からゲノム DNA を抽出し、バイサルファイト法により各 miRNA のプロモーター領域のメチル化 DNA の解析を行った。ヒストン H3K27 のメチル化については ChIP アッセイによって検討した。エピジェネティック薬を用いた再活性化実験では、DNA メチル化の阻害剤として 5-AzaC、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤として TSA、Polycomb の阻害剤として DZNep を用

いた。

2. miR-200 ファミリーの機能解析

各 miRNA の機能やシグナル伝達系を解析するために、目的の miRNA や shRNA を発現するレンチウイルスベクターの作成を行った。レンチウイルスベクターは理化学研究所バイオリソースセンター三好浩之教授が開発した系を利用した。miRNA の標的遺伝子の同定は、TargetScan による予測を行ったのち、3'UTR を luciferase につなげたレポーターアッセイにより検証を行った。また各 miRNA を過剰発現させた細胞を用いて RT-PCR 及び Western blot により標的遺伝子を決定した。さらに miRNA によって直接制御されているかを確認する為に、Ago2 の免疫沈降法により miRNA-mRNA の複合体の検討を行った。

細胞に与える影響については Flow cytometry、及び WST-8 アッセイを用いた。

3. B 細胞のシグナルについての検討

末梢血由来正常 B 細胞は PBMC から磁気ビーズを用いて濃縮を行った。BCR からのシグナルの活性化には α -IgM を用いた。また BCR シグナル阻害剤には、SYK の阻害剤として Dasatinib 及び Fostamatinib、PKC β の阻害剤として Enzastaurin、IKK β の阻害剤として BMS-345541 を用いた。また shRNA によるノックダウンによる検討も行った。B 細胞活性化の指標としては CD25、CD83 などの遺伝子発現レベルを検討し、また NF- κ B シグナルの活性化レベルを指標とした。

C. 研究結果

1. miR-200 ファミリーの発現低下の分子メカニズムの解析

miR-200 研究が専攻している固形癌の研究から、miR-200 ファミリーは miR-200b-200a-429 と miR-200c-141 の二つの Polycistronic RNA として転写されること、それぞれの転写開始点近傍には多重の CpG アイランドがあり、DNA のメチル化とクロマチン制御によって転写レベルで制御されることが明らかとなっている。また miR-203 についても CML や Ph(+)B-ALL では DNA のメチル化によって miR-203 の発現が抑制されている。そこで B 細胞リンパ腫における

DNA のメチル化を明らかにするために、エイズリンパ腫検体 6 例、正常末梢血 B 細胞、DLBCL 細胞株についてバイサルファイト法を用いてメチル化 DNA の検出を行った。その結果、miR-200a 及び 200b については正常 B 細胞でもメチル化が導入されており、成熟 B 細胞では発現が低いことが分かった。miR-200c は DNA のメチル化が誘導されているが、正常細胞では発現が高いことが分かった。また miR-203 については正常 B 細胞ではメチル化されておらず、リンパ腫検体及びリンパ腫細胞株ではメチル化が蓄積されており、これにより転写が抑制されていることがわかった。実際にリンパ腫細胞株に対して DNA メチル化阻害剤 5-Aza C により発現をレスキューできることがわかった。

阻害剤による再活性化実験において、miR-200c の発現を亢進させたのが、Polycomb ファミリー EZH2 の阻害剤である DZNep であった。そこで ChIP アッセイによりヒストン H3K27me3 レベルを定量した結果、miR-200c が発現減少しているリンパ腫細胞株において miR-200c のプロモーター領域に蓄積していることがわかった。

2. miR-200 ファミリー、miR-203、miR-31 の新規標的遺伝子の同定

B 細胞における miR-200 ファミリー、miR-203、miR-31 の機能を明らかにするために、まず B 細胞において重要な因子がこれらの miRNA によって標的となるか検索を行った。特に B 細胞受容体(BCR)シグナルの活性化がリンパ腫細胞の増殖や生存に重要であることが多数報告されている。TargetScan 標的予測アルゴリズムを用いて miRNA の標的遺伝子を予測した結果、BCR シグナルの中核に位置する *CD79B*、*SYK*、*PLCG1*、*PKCβ*、*IKKβ* という遺伝子が miR-200c、miR-203、miR-31 の標的遺伝子であることが示唆された。そこでこれらの遺伝子の 3'UTR を搭載した luciferase レポーターアッセイ系を構築し、各 miRNA によって抑制されるかを検討した。さらにレンチウイルスベクターを用いて各 miRNA を過剰発現する DLBCL 細胞株を作成し、RT-PCR 及び Western blot によって標的遺伝子候補の定量を行った。その結果、miR-200b 及び miR-200c の新規標的遺伝子として *PLCG1*、*PKCβ*、*IKKβ*、miR-203 の新規標的遺伝子とし

て *SYK*、*PKCβ*、miR-31 の新規標的遺伝子として *CD79B*、*PKCβ* を同定することに成功した。

3. リンパ腫細胞における miR-200c、-203、-31 の発現減少の意義

BCR シグナルの慢性的な活性化は NF-κB などのシグナル伝達系を介して細胞の増殖や生存に寄与する。そこでリンパ腫細胞で見られる miR-200c、-203、-31 の発現減少が上記の遺伝子の発現増加を介して BCR シグナルの活性化に寄与しているかを検討する為に、miRNA の発現を誘導するレンチウイルスを様々な DLBCL 細胞株に導入し、その効果を検討したところ、miR-200c、miR-203 及び miR-31 の発現誘導により細胞の増殖が低下し、アポトーシスを誘導することがわかった。これらの細胞では NF-κB の活性レベルが低下していることも確認された。

4. B 細胞リンパ腫における EZH2 の発現制御機構の解析

miR-200 ファミリーの抑制に関わる Polycomb の中心的酵素である EZH2 は、DLBCL、Burkitt リンパ腫などで過剰発現しており、予後との相関も示されている。また Germinal center 型 DLBCL (GCB-DLBCL) や濾胞性リンパ腫では EZH2 の gain-of-function mutation が報告されており、リンパ腫細胞では Polycomb によるエピジェネティックな異常が腫瘍細胞の背景にある。多くのがんで見られる EZH2 の過剰発現は、主に転写レベルで活性化されていることが原因であるが、様々な転写因子によって複雑に制御されることが示されており、リンパ腫における過剰発現の実態は不明である。

EZH2 のプロモーター領域を検索した結果、NF-κB 結合配列があることが分かった。そこで BCR シグナルの活性化が EZH2 の発現誘導に関わっているかを検討する為に、まず正常 B 細胞を PBMC から磁気ビーズで濃縮し、抗 IgM 抗体を用いて BCR シグナルの活性化を誘導した。その結果 EZH2 の発現が著しく誘導されることが分かった。そこで BCR シグナルの枢軸である *CD79B*、*SYK*、*PKCβ*、*IKKβ* に対する shRNA を設計しノックダウンによって DLBCL 細胞株の BCR シグナルの低下を誘導した。その結果 DLBCL 細胞株のアポトーシスが誘導され、その時 EZH2 の発現が著しく低下することがわか

った。さらに CD79B、SYK、PKC β 、IKK β を抑制する miR-200 ファミリーの発現誘導によっても EZH2 の発現が低下することがわかった。

さらに miR-200c と Polycomb の新たな関係も示された。miR-200b 及び 200c の標的遺伝子を検索したところ、Polycomb 複合体に必須の因子である SUZ12 が含まれていることが分かった。実際にレポーターアッセイ及び発現解析を行った結果、リンパ腫細胞で見られる miR-200c の発現低下が SUZ12 の発現上昇に寄与していることが示唆された。

5. BCR シグナルを低下させる各種阻害剤の効果の検討

BCR シグナル経路の阻害は B 細胞リンパ腫に対して有効であることが様々な研究で示されており、SYK、PKC β 、IKK β に対する阻害剤の開発が進められている。そこでこれらの阻害剤が DLBCL 細胞における EZH2 及び miRNA の発現に影響するかを検討した結果、Dasatinib 及び Fostamatinib (SYK 阻害剤)、Enzastaurin (PKC β 阻害剤)、BMS-345541 (IKK β 阻害剤) の処理により強力にアポトーシスを誘導し、その時 EZH2 の発現が大きく低下し、さらに抑制されていた miR-200c、miR-203、miR-31 の発現が回復することがわかった。

D. 考察

これまでの多くの報告から、miRNA の発現は細胞種や組織によって固有のパターンを示し、各細胞の正常な機能、分化、恒常性にとって非常に重要な役割をもつことがわかっている。裏を返せば miRNA の発現異常は細胞運命に重大な影響を与え、正常からの逸脱が予測される。現にほぼすべてのがんで miRNA の発現異常が見つかっている。B 細胞リンパ腫においても網羅的解析やいくつかの miRNA に焦点を当てた研究が盛んに進められているが、DLBCL や Burkitt リンパ腫をなどの高悪性度の腫瘍細胞の分子病態を説明するに至っていない。またエイズを合併したケースでもいくつかの miRNA 異常が示唆されているが、発症危険因子としての観点からの研究はなされていない。

平成 24 年度の成果は以下にまとめられる。① B 細胞リンパ腫細胞では miR-200 ファミリー、

miR-203、miR-31 の発現が低下しており、DNA のメチル化及び Polycomb による H3K27me3 の蓄積によるエピジェネティックな抑制が原因であることを明らかにした。② miR-200、miR-203、miR-31 の新規標的遺伝子を複数同定し、BCR シグナルに対して抑制的に働くことを明らかにした。③ miR-200、miR-203、miR-31 の発現誘導はリンパ腫細胞にアポトーシスを誘導する。④ リンパ腫で過剰発現する EZH2 が BCR シグナルの活性化によって誘導されていることがわかった。

上記の複雑な分子メカニズムはいずれもこれまでに報告がなく、B 細胞リンパ腫の新たな分子モデルとして重要な知見である。本研究で示された BCR シグナル、miRNA、Polycomb という 3 要素の feed-forward loop は、リンパ腫細胞の恒常的なシグナルの活性化とエピジェネティックな異常の維持に対して寄与していることが考えられる。また治験が先行している BCR 阻害剤が EZH2 の発現低下を誘導できることも興味深い。これらの複雑な分子機構の理解は正常 B 細胞の機能や維持においても重要であり、また新たな分子標的の同定にも役立つと期待される。

E. 結論

DLBCL における miRNA の発現異常は BCR シグナルの活性化を介して細胞の生存に寄与し、さらにエピジェネティック制御系に影響を与えることがわかった。

F. 健康危機情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yamagishi M, Watanabe T. New Paradigm of T cell Signaling: Learning from Malignancies (Review Article). *J Clin Cell Immunol.* S12:007, 15pp, 2012.
- 2) Yamagishi M, Watanabe T. Molecular Hallmarks of Adult T Cell Leukemia (Review Article). *Front Microbiol.* 3: 334. Sep. 2012.

- 3) Iwanaga M, Watanabe T, Yamaguchi K. Adult T-cell leukemia: a review of epidemiological evidence. **Front Microbiol** 3: 322. Sep. 2012.
- 4) Nakano K, Watanabe T. HTLV-1 Rex: the courier of viral messages, making use of the host vehicle. **Front Microbiol** 3:330. Sep. 2012.
- 5) Kobayashi-Ishihara M, Yamagishi M, Hara T, Matsuda Y, Takahashi R, Miyake A, Nakano K, Yamochi T, Ishida T, Watanabe T. HIV-1-encoded antisense RNA suppresses viral replication for a prolonged period. **Retrovirology**, 9:38, 17pp. May. 2012.
- 6) Ando T, Imamura H, Suzuki R, Hideki Aizaki H, Watanabe T, Wakita T, Suzuki T. Visualization and Measurement of ATP Levels in Living Cells Replicating Hepatitis C Virus Genome RNA. **PLoS Pathogens**, 8(3):e1002561, 2012.
- 7) Watanabe M, Nakano K, Togano T, Nakashima M, Higashihara M, Kadin M-E, Watanabe T, Horie R. Targeted repression of overexpressed CD30 downregulates NF- κ B and ERK1/2 pathway in Hodgkin lymphoma cell lines. **Oncol Res**, 19(10-11):463-9, 2011.

(総説)

- 1) 山岸誠、Person 人と研究「成人 T 細胞白血病の分子レベルの全体像と、Polycomb-miR-31-NF- κ B 経路の異常」、Trands in Hematological Malignancies、4(3) : 16-19、Dec. 2012.
- 2) 山岸誠、渡邊俊樹、特集：microRNA の発現制御の異常と疾患「成人 T 細胞白血病(ATL)における microRNA の発現異常」、細胞、44(10) : 15-22、2012 年 9 月
- 3) 山岸誠、渡邊俊樹、特集：ATL の基礎と臨床「ATL 細胞のゲノム エピゲノム異常と発現異常」、細胞、44(8) : 18-22、2012 年 7 月
- 4) 山岸誠、渡邊俊樹、総説「2.HTLV-1 感染症と miRNA」、ウイルス、62(1) : 9-18、2012 年 6 月
- 5) 中野和民、渡邊俊樹、特集：抗ウイルス薬 III. 新規抗ウイルス薬の開発動向と展望「抗 HTLV-1 薬開発の現状」、日本臨床、70(4) : 671-675、2012 年 4 月
- 6) 渡邊俊樹、特集：造血器腫瘍学-基礎と臨床の最新研究動向— II.造血器腫瘍の基礎 造血器発がんリスク「ウイルスによる発がんリスク」、日本臨床、70(Suppl 2) : 671-675、2012 年 4 月

2. 学会発表

(国際学会)

- 1) Watanabe T, “Polycomb—miRNA—NF- κ B linkage in ATL cells”, The 5th Annual Meeting & Symposium of The Association for HTLV and Related Diseases, IMSUT, Tokyo, 8.25-8.26, 2012 (Invited)
 - 2) Watanabe T, “The role of microRNAs in Adult T-Cell Leukemia”, Viruses, Genes and Cancer workshop, Venice, Italy, Oct. 25-27, 2012 (Invited)
- (国内学会)
- 1) Firouzi Sanaz、青木桜、鈴木穰、矢持忠徳、中野和民、中井謙太、菅野純夫、渡邊俊樹、”Development of a new high-throughput method to investigate T-cell-clonality and integration site preference among HTLV-1 infected individuals”, 平成24年度東京大学医科学研究所研究成果発表会、東京大学医科学研究所、2012年5月31日-6月1日 (ポスター発表)
 - 2) 中野和民、安東友美、山岸誠、石田尚臣、大杉剛生、田中勇悦、David W. Brighty、渡邊俊樹、「RNAウイルスと宿主細胞の新たな攻防：HTLV-1 RexによるmRNA品質管理機構 Nonsense-Mediated mRNA Decay (NMD) の抑制」、平成24年度東京大学医科学研究所研究成果発表会、東京大学医科学研究所、2012年5月31日-6月1日 (ポスター発表)
 - 3) 山岸誠、中野和民、宇都宮與、山口一成、内丸薫、小川誠司、渡邊俊樹、「成人T細胞白血病から明らかになった新たなクロストーク：Polycomb-miR-31-NF- κ B経路の異常とがん」、平成24年度東京大学医科学研究所研究成果発表会、東京大学医科学研究所、2012年5月31日-6月1日 (ポスター発表)
 - 4) 矢持忠徳、守田洋平、矢持淑子、佐々木陽介、渡辺信和、Sanaz Firouzi、内丸薫、宇都宮與、渡邊俊樹、「成人T細胞性白血病における Tumor Initiating Cellの探索の試み」、第5回 HTLV-1研究会・シンポジウム、東京大学医科学研究所、2012年8月26日 (2012年8月25日-8月26日) (口演発表)
 - 5) 相良康子、井上由紀子、後藤信代、長野冬子、

- 入田和男、清川博之、矢持忠徳、渡邊俊樹、JSPFAD、「HTLV-1感染者における産生抗体の性状解析 -プロウイルス量との関連について」、第5回HTLV-1研究会・シンポジウム、東京大学医科学研究所、2012年8月26日（2012年8月25日-8月26日）（口演発表）
- 6) 武本重毅、Ratiorn Pornkuna、井上佳子、榮 達智、原田菜穂子、長倉祥一、日高道広、清川哲志、鶴澤耕治、守田和樹、芳賀克夫、岩永正子、相良康子、渡邊俊樹、河野文夫、「HTLV-1キャリアからATL発症・急性転化・治療経過におけるsCD30・sIL-2R変化とその役割」、第5回HTLV-1研究会・シンポジウム、東京大学医科学研究所、2012年8月26日（2012年8月25日-8月26日）（口演発表）
- 7) 永田安伸、佐藤亜以子、奥野友介、千葉健一、田中洋子、白石友一、吉田健一、真田 昌、宇都宮與、山口一成、大島孝一、宮野 悟、宮脇修一、渡邊俊樹、小川誠司、「全エクソン解析により明らかとなった成人T細胞性白血病におけるTET2変異」、第5回HTLV-1研究会・シンポジウム、東京大学医科学研究所、2012年8月26日（2012年8月25日-8月26日）（口演発表）
- 8) 笹島悟史、中野和民、内丸 薫、渡邊俊樹、「成人T細胞白血病(ATL)における新規TIAM2変異体の同定と遺伝子発現異常の解析」、第5回HTLV-1研究会・シンポジウム、東京大学医科学研究所、2012年8月26日（2012年8月25日-8月26日）（ポスター発表）
- 9) 横山弘一、中野和民、安東友美、大杉剛生、田中勇悦、渡邊俊樹、「HTLV-1 Rexの宿主T細胞におけるmRNA品質管理機構(NMD)の抑制と宿主細胞への影響」、第5回HTLV-1研究会・シンポジウム、東京大学医科学研究所、2012年8月26日（2012年8月25日-8月26日）（ポスター発表）
- 10) 藤川 大、山岸 誠、黒川直也、副島あい、石田尚臣、中野和民、渡邊俊樹、「HTLV-1タンパク質TaxとPolycombタンパク質との新規相互作用がT細胞に与える影響の解析」、第5回HTLV-1研究会・シンポジウム、東京大学医科学研究所、2012年8月26日（2012年8月25日-8月26日）（ポスター発表）
- 11) 掛合綾香、深澤真澄、宇野雅哉、宇都宮與、渡邊俊樹、斉藤愛記、山岡昇司、「ユビキチン修飾酵素A20は成人T細胞白血病(ATL)細胞の生存に必要である」、第71回日本癌学会学術総会、札幌、2012年9月19日（2012年9月19日-9月21日）（口演発表）
- 12) 山本悠貴、大野(宮本)麻美子、渡邊俊樹、太田力、「一塩基多型によるDNA修復蛋白質の活性低下」、第71回日本癌学会学術総会、札幌、2012年9月19日（2012年9月19日-9月21日）（ポスター発表）
- 13) 矢持忠徳、守田陽平、矢持淑子、サナズ フィルジ、佐々木陽介、渡辺信和、内丸 薫、宇都宮與、渡邊俊樹、太田 力、「成人性T細胞性白血病におけるがん幹細胞の同定への試み」、第71回日本癌学会学術総会、札幌、2012年9月20日（2012年9月19日-9月21日）（ポスター発表）
- 14) 山岸誠、渡邊俊樹、「多機能性分子miR-31の発現低下とがん関連シグナル伝達」、第71回日本癌学会学術総会、札幌、2012年9月20日（2012年9月19日-9月21日）（口演発表）
- 15) 武本重毅、相良康子、渡邊俊樹、「成人T細胞白血病患者にみられる可溶性CD30上昇」、第71回日本癌学会学術総会、札幌、2012年9月21日（2012年9月19日-9月21日）（口演発表）
- 16) 永田安伸、真田 昌、吉田健一、白石友一、佐藤亜以子、宇都宮與、山口一成、大島孝一、宮脇修一、宮野 悟、渡邊俊樹、小川誠司、「全エクソン解析により明らかとなった成人T細胞性白血病におけるTET2変異」、第71回日本癌学会学術総会、札幌、2012年9月21日（2012年9月19日-9月21日）（口演発表）
- 17) Yamagishi M, Takahashi R, Nakano K, Asanuma S, Utsunomiya A, Yamaguchi K, Uchimarū K, Ogawa S, Watanabe T, “Molecular hallmarks of adult T cell leukemia: miRNA epigenetics and emerging signaling abnormalities”, 第74回日本血液学会学術集会、京都国際会議場、2012年10月19日（2012年10月19日-10月21日）（口演発表）
- 18) Takemoto S, Pornkuna R, Inoue Y, Sakai T, Harada N, Nagakura S, Hidaka M, Kiyokawa T, Uzawa K, Morita K, Haga Y, Iwanaga M, Sagara Y, Watanabe T, “Intervention in adult T-cell leukemia following soluble CD30 elevation”, 第74回日本血液学会学術集会、京都国際会議場、2012年10月19日（2012年10月19日-10月21日）（口演発表）
- 19) Togano T, Nakashima M, Watanabe M, Watanabe

- T, Horie R, Higashihara M, “Analysis of NF- κ B activation as a molecular target for the treatment of acute myeloid leukemia”, 第74回日本血液学会学術集会、京都国際会議場、2012年10月19日（2012年10月19日- 10月21日）（ポスター発表）
- 20) Yamagishi M, Katano H, Nakano K, Ota Y, Hishima T, Okada S, Watanabe T, “miRNA signature and its functional involvement in aggressiveness of diffuse large B cell lymphoma”, 第74回日本血液学会学術集会、京都国際会議場、2012年10月20日（2012年10月19日- 10月21日）（口演発表）
- 21) Asanuma S, Nakano K, Yamagishi M, Ogawa S, Yamaguchi K, Utsunomiya A, Watanabe T, “Aberrantly spliced Helios variants in ATL cells induce T cell proliferation”, 第74回日本血液学会学術集会、京都国際会議場、2012年10月20日（2012年10月19日- 10月21日）（ポスター発表）
- 22) Hiromichi Y, Ueno S, Tatetsu H, Niuro H, Hata H, Okada S, Watanabe T, Akashi K, Mitsuya H, Okuno Y, “PU. 1 is a potent tumor suppressor in classical Hodgkin lymphoma cells”, 第74回日本血液学会学術集会、京都国際会議場、2012年10月21日（2012年10月19日- 10月21日）（口演発表）
- 23) Horie R, Watanabe M, Itoh K, Togano T, Kadin ME, Watanabe T, Higashihara M, “Molecular mechanisms of CD30 overexpression in Hodgkin lymphoma and anaplastic large-cell lymphoma”, 第74回日本血液学会学術集会、京都国際会議場、2012年10月21日（2012年10月19日- 10月21日）（口演発表）
- 24) 松田有加、山岸誠、小林美栄、原 拓馬、石田尚臣、渡邊俊樹、「HIV-1潜伏化の成立と維持におけるPolycomb groupの機能解析」、第60回日本ウイルス学会学術集会、大阪国際会議場、2012年11月13日（2012年11月13日- 11月15日）（ポスター発表）
- 25) 小林美栄、山岸誠、松田有加、中野和民、矢持忠徳、石田尚臣、渡邊俊樹、「HIV-1由来 antisense RNAによるウイルス複製抑制メカニズムの解析」、第60回日本ウイルス学会学術集会、大阪国際会議場、2012年11月13日（2012年11月13日- 11月15日）（ポスター発表）
- 26) 藤川 大、山岸誠、黒川直也、副島あい、石田尚臣、中野和民、渡邊俊樹、「HTLV-1タンパク質TaxはPolycombタンパク質EZH2との相互作用を介してエピジェネティクスの脱制御を誘導する」、第60回日本ウイルス学会学術集会、大阪国際会議場、2012年11月14日（2012年11月13日- 11月15日）（口演発表）
- 27) 福田裕幸、日野原邦彦、島村徹平、渡邊俊樹、宮野悟、後藤典子、「ヒト乳がんにおいて Amphiregulin/EGFR経路はmammosphereの形成に寄与する」、第35回日本分子生物学会年会、福岡国際会議場、2012年12月11日（2012年12月11日- 12月14日）（ポスター発表）
- 28) 小林(石原)美栄、山岸誠、松田有加、中野和民、矢持忠徳、石田尚臣、渡邊俊樹、「HIV-1由来新規antisense RNA,ASP-Lはウイルスを制御する機能性RNAである」、第35回日本分子生物学会年会、福岡国際会議場、2012年12月12日（2012年12月11日- 12月14日）（ポスター発表）
- 29) 横山弘一、中野和民、安東友美、大杉剛生、田中勇悦、渡邊俊樹、「HTLV-1 Rexにおける mRNA品質管理機構(NMD)の抑制及び宿主T細胞への影響」、第35回日本分子生物学会年会、福岡国際会議場、2012年12月12日（2012年12月11日- 12月14日）（ポスター発表）
- 30) Firouzi S, Yamochi T, Lopez Y, Aoki S, Suzuki Y, Nakano K, Nakai K, Sugano S, Watanabe T, “Development of a New High-throughout Method to Investigate T-cell-clonality and Integration Site Preference among HTLV-1-infected Individuals”, 第35回日本分子生物学会年会、福岡国際会議場、2012年12月14日（2012年12月11日- 12月14日）（ポスター発表）
- （その他）
- 1) 渡邊俊樹、「HTLV-1による ATL 発症機構の解明を目指して」、文部科学省特別研究経費研究推進「ATL 対策宮崎モデルの確立に向けて」特別講演会、宮崎大学医学部、宮崎、2012年5月9日（招待講演）
- 2) 渡邊俊樹、「HTLV-1による ATL 発症機構の解明を目指して- 新規治療法開発への可能性」、平成 24 年度熊本大学名医に学ぶセミナー、熊本大学医学部、熊本、2012年5月30日（招待講演）
- 3) 渡邊俊樹、「日本における HTLV-1/ATL 研究、対策の歴史、現状」、第6回北里血液学セミナー、

北里大学病院、相模原、2012年6月6日(招待講演)

- 4) 渡邊俊樹、「ATL細胞における Polycomb-miRNA-NF- κ B リンケージ新規治療法開発への新たな視点」、文部科学省新学術領域研究生命科学系3分野支援活動(がん、ゲノム、脳)合同シンポジウム、東京ステーションコンファレンス、2012年7月6日
- 5) 渡邊俊樹、「HTLV-1によるATL発症機構の解明の現状-新規治療法開発への試み」、第15回北海道ウイルス感染症セミナーの会、北海道大学学術交流会館、札幌、2012年9月1日(招待講演)
- 6) 渡邊俊樹、「成人T細胞白血病(ATL)における microRNA 発現異常とその意義」、平成24年度遺伝子病制御研究所研究集会、北海道大学医学部学友会館フラテ、札幌、2012年9月18日(招待講演)

H. 知的所有権の出願・取得状況(予定を含む)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし

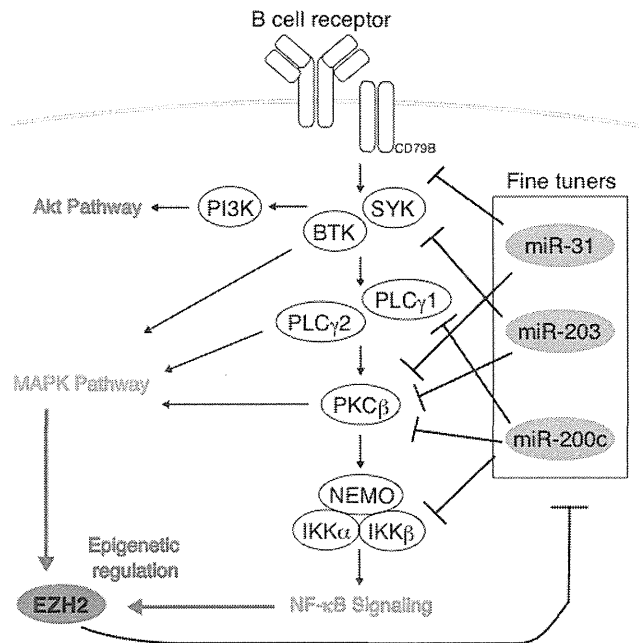


図 1. miRNA による BCR シグナルの新たな制御メカニズム

正常 B 細胞では、miR-200c、miR-203、miR-31 が複数の BCR シグナル経路因子を標的にすることによってシグナルのブレーキとして働いていると考えられる。エピジェネティックな異常によってこれらの miRNA の発現が抑制されると、BCR シグナルが慢性的に活性化する。また、これらの miRNA の発現抑制に寄与する EZH2 は BCR シグナルによって発現が誘導され、feed-forward loop によって異常なシグナルが維持されることが考えられる。

エイズリンパ腫の新たな病型分類法と新規病因の探索

－日本におけるエイズ関連リンパ腫の病理分類－

研究分担者：片野晴隆（国立感染症研究所感染病理部）

研究協力者、共同研究者等：大田泰徳（虎の門病院）、比島恒和、味澤篤、船田信顕、山田侑子、塩沢由美子（がん・感染症センター都立駒込病院）、望月眞（杏林大学）、峰宗太郎、田沼順子、萩原将太郎、岡慎一（国立国際医療研究センター）、児玉良典、矢嶋敬史郎、小泉祐介、上平朝子（国立病院機構大阪医療センター）、小柳津直樹、鯉淵智彦（東京大学医科学研究所病院）、森谷鈴子、横幕能行、小島勇貴、永井宏和（名古屋医療センター）、岡田誠治（熊本大学）

研究要旨：日本のエイズ患者剖検例の17%にはリンパ腫の合併が見られ、その多くは死因と関連している。97年のHAART導入以降もその頻度は減っておらず、リンパ腫はエイズの予後を左右する重要な合併症である。リンパ腫の病理分類は近年、改訂が繰り返され、エイズ関連リンパ腫の分類にも大きな変更が生じている。本研究では、日本のエイズ関連リンパ腫の臨床病理学的特徴を明らかにする目的で、昨年度に本研究班で提言したリンパ腫病理診断フローチャートに従い、日本の過去の症例をWHO分類第4版により病理組織学的に再分類した。207例を検討した結果、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、バーキットリンパ腫、plasmablastic lymphoma、primary effusion lymphoma、ホジキンリンパ腫の順に頻度が高いこと、バーキットリンパ腫が増加していること、ARTによりホジキンリンパ腫の頻度が増加していることなどが明らかになった。

A. 研究目的

エイズに合併する悪性腫瘍の中で、リンパ腫はカポジ肉腫と並んで頻度の高い疾患である。カポジ肉腫はKaposi's sarcoma associated herpesvirus (KSHV, HHV-8)が原因であり、近年はドキシルにARTを併用した化学療法が標準治療であり、カポジ肉腫が原因で死亡するエイズ患者は徐々に減少しつつある。一方、リンパ腫に関しては組織亜型が多彩であり、標準化した治療法はなく、予後も悪い。Epstein-Barr virus (EBV), KSHVが原因の症例も多いが、近年はウイルスが関連しない症例も多く、発症機構が明らかでない点も

治療法の開発を難しいものになっている。リンパ腫の臨床上の困難は診断にもある。リンパ腫の国際分類は近年、頻繁に改訂されており、2008年にWHOが提唱したリンパ腫の新しい組織分類（WHO分類第4版、新WHO分類）では、バーキットリンパ腫(Burkitt lymphoma, BL)の定義が変更されるなど、エイズ関連リンパ腫の診断に重要な変更点を含んでいる。度重なるリンパ腫病理分類の変更は、科学の進歩とその結果としての発症病理の解明を受けたものであるが、一方で、発症病理が明らかでないものを分類に持ち込んでいるものも見られ、不明確な記述と相まって、頻繁

に変わる分類は診断実務上、多少の混乱を招いているを言わざるを得ない。さらに、エイズ関連リンパ腫にはそれぞれの組織型で非典型像を示す症例が少なくなく、例えば、エイズ患者に発症するBLには典型的なstarry sky像を示さない症例も数多く存在する。また、plasmablastic lymphoma (PBL) や primary effusion lymphoma (PEL) など、ほとんどエイズ患者にしか見られないリンパ腫も存在する。昨年度の本研究班では、多数のエイズ関連リンパ腫症例を擁するエイズ拠点病院の症例を持ち寄り、リンパ腫病理の専門家を含む、複数施設の病理医が供覧する検討会を開催し、得られた所見から、共通項と思われる事象を抽出し、エイズ関連リンパ腫の病理診断フローチャートを含むリンパ腫病理診断のガイドラインとなるものを作成、出版した。このガイドラインの普及により、施設間での診断の違いが極力、小さいものになっていくことが期待されている。本年度は、このフローチャートに従い、日本の過去の症例を、複数のエイズ拠点病院の病理医で供覧、検討し、WHO分類第4版により病理組織学的に再分類した。これまでも、日本のエイズ関連リンパ腫の臨床病理統計調査は何回も行われているが、WHO分類第4版による調査はなく、また、200例以上の症例を集めた調査は初めてである。日本のエイズ関連リンパ腫の病理分類が明らかになれば、この結果は、病態、病理に応じた治療方針の決定に重要な資料になるばかりではなく、個々の症例の発症病理の研究に必要な情報が提供されることが期待される。

本年度の研究班では、これと同時に、日本病理学会の剖検輯報に登録されている日本全国のエイズ剖検例におけるリンパ腫の頻度を調査した。剖検例はいわば治療が功を奏さなかった症例であるが、そのうちのリンパ腫の発症頻度を知ることは、エイズ患者におけるリンパ腫の発症、転機と死因との関連を考える上で参考となるはずである。

B. 研究方法

1. 症例

東京、および、名古屋、大阪の主要エイズ拠点病院の5院から、HIV陽性患者に発症したリンパ腫症例の生検、または、剖検の病理組織標本を検討した。

2. 病理学的検索

症例ごとにヘマトキシリンエオジン染色、免疫染色等を供覧した。免疫染色ではCD3, CD10, CD15, CD20, CD30, CD38, CD79a, CD138, Bcl2, Bcl6, EBV LMP1, HHV8 LANA1, lambda, kappa, cIgM, MIB1などを検出した。EBVの感染はEBERのIn situ hybridizationで検索した。そのほか、必要に応じて、myc遺伝子の再構成の有無を検査した。

3. 検討方法

各症例につき、複数施設の病理医がディスカッション顕微鏡、および大型画面モニターにより供覧した。必要に応じ、臨床情報を追加した。

4. エイズ剖検例におけるリンパ腫の発症頻度

日本病理学会の剖検輯報データベースに登録されている剖検データからエイズ剖検例を抽出した。抽出したデータからリンパ腫の記載がある症例を検討した。

(倫理面への配慮)

本研究計画は国立感染症研究所、および、試料を提供した各院の倫理委員会の承認を得た(国立感染症研究所 ヒトを対象とする医学倫理委員会 承認番号344)。なお、各症例に対する標本の作製、染色は診断の過程で行われた。すべての症例は連結可能匿名化検体として扱った。日本病理学会の剖検輯報データベースの利用は利用計画申請につき、同学会の剖検情報委員会の審査の上、データベースの検索が行われた。登録されたデータはすべて連結不可能匿名化されており、研究者が個人情報を入力することはできない。

C. 研究結果

1. リンパ腫の病理分類

HIV陽性患者に合併した207例のリンパ腫の病理標本を検討した(図1)。104例はdiffuse large B-cell lymphoma (DLBCL)に分類され、57例がBLであった。そのほかの症例はPBLが16例、PELが9例、ホジキンリンパ腫が8例、large B-cell lymphoma arising HHV-8-associated multicentric Castleman's disease (LBL-HHV-8-MCD)が2例、その他のリンパ腫が11例であった。DLBCLはCD10, BCL-6, MUN-1の発現から、さらにgerminal center (GC) type 17例、Non-GC type 55例に

分類可能であった。組織別の EBV 陽性率ではホジキンリンパ腫, PBL が高率に EBV 陽性であった(図 2)。発症時 CD4 数は BL とホジキンリンパ腫が DLBCL や PBL、PEL よりも有意に高値であった。また ART との関連では、ART を受けていた患者に発症したリンパ腫症例のほうが、ART を受けていなかった患者に発症したリンパ腫例に比べ、EBV 陽性例は少なく、予後が良い。ホジキンリンパ腫では 75% の症例が ART の投与をホジキンリンパ腫では全例が EBV 陽性であった。EBV 陽性例は一般に CD4 値が低い。KSHV は PEL と LBL-HHV8-MCD が全例陽性であった。DLBCL 全体の 1 年生存率は 5 割を切るが、GC type での 1 年生存率は 8 割であるのに対し、non-GC type は 4 割である。また、non-GC type DLBCL は 8 割が EBV 陽性であり、EBV 陽性 non-GC type DLBCL の予後が DLBCL 全体の予後に大きく関連している。BL は 98 年以降の症例に多く見られ、その多くの症例は CD4 が 200 を超えて発症し、1 年生存率は約 7 割である。BL における EBV 陽性率は 3 割であるが、ART を導入していない症例でやや EBV 陽性率が高い傾向にある。PEL と LBL-HHV8-MCD の 1 年後死亡率は、それぞれ、66%、100%であ

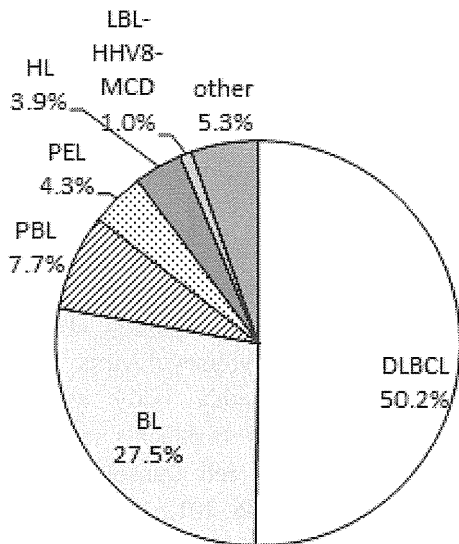


図 1 : 日本におけるエイズ関連リンパ腫の組織型

207 例の検討の結果。各組織型が占める割合を示す。DLBCL: diffuse large B-cell lymphoma, BL: Burkitt lymphoma, PBL: plasmablastic lymphoma, PEL (primary effusion lymphoma), HL: Hodgkin lymphoma, LBL-HHV8-MCD: large B-cell lymphoma arising HHV-8-associated multicentric Castleman's disease.

り、HHV-8 関連リンパ腫は極めて予後が悪いことが示された。ホジキンリンパ腫は ART が入り、CD4 数が比較的高値で発症することが特徴であり、ART 治療中の発症に注意が必要である。

2. 日本のエイズ剖検例におけるリンパ腫の発症頻度

剖検輯報データベースには 1974 年から 2009 年分までで 1,011 施設、約 106 万の剖検データが集積されていた。そのうち、エイズ剖検例は 828 例であり、平均年齢は 45 歳、男性が 94% を占めた。リンパ腫の頻度は 17% であり、これは、すべての登録された合併症の中で肺炎、CMV 感染症、PCP に次ぐ頻度であった。リンパ腫以外の悪性腫瘍では、カポジ肉腫が 9.3% であり、肺癌、肝癌、胃癌、白血病など、頻度は低いものの、エイズ指標疾患以外の悪性腫瘍の発症も見られた。リンパ腫の発症頻度は ART が導入された 1997 年前後と比較すると、1997 年までが 15.3%、1998 年以降が 18.7% と暫増傾向にあるが、統計学的な有意差はなかった。

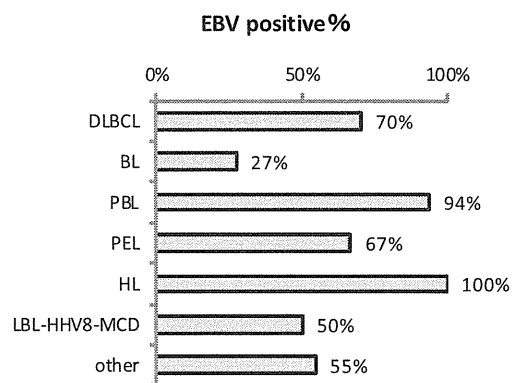


図 2 : 各組織型における EBV 陽性率の違い

EBV の陽性率を各組織型ごとに示した。EBV の判定は EBER の in situ hybridization による。

D. 考察

過去の日本におけるエイズ関連リンパ腫の臨床病理疫学調査は2006年に比島らにより発表された86例の解析がある(*Microbes Infect* 2006;8:1301-7)。当時の結論はDLBCLがエイズ関連リンパ腫7割以上を占め、EBV陽性率がARTの導入後は減少しているとするものであった。今回の解析では200例を超えるエイズ関連リンパ腫症例を解析することができ、近年の傾向を正しく反映した結果が得られたものと考えられる。

ART導入後のEBV陽性率の減少やART導入後のリンパ腫の病理組織が多彩になってきているという結果は2006年時の調査と同様である。2006年調査との違いはリンパ腫の病理分類そのものが2008年にWHO分類第4版が出版され、大きく変化したことがあげられる。特に重要な点はBLの取り扱いである。エイズ関連リンパ腫ではしばしば、BLとDLBCLの鑑別が問題となる。BLの定義はWHO分類第3版ではc-myc転座、組織形態、細胞の表現形など厳密に定義され、非定型例はatypical Burkittとしてsubcategoryに分類された。しかし、WHO分類第4版ではatypical Burkittは削除され、DLBCLとBLの中間と読める、intermediate BL/DLBCL (正式名称はB-cell lymphoma, unclassifiable, with features intermediate between diffuse large B-cell lymphoma and Burkitt lymphoma) という分類ができるなどの変更が加えられた。しかし、このintermediate BL/DLBCLはDLBCLとBLの中間的性格を示すリンパ腫という意味ではなく、実際にはdouble hit, triple hitのリンパ腫が適用され、これまでのatypical BurkittはBLに分類されることとなった。本研究では前年度に述べたように、starry skyなどの典型的なBLの組織像を示さなくとも、免疫染色の結果がBLのそれと一致し、c-mycの転座が証明された症例はBLの範疇に含めた。結果、以前はDLBCLとしていた症例の何例かはBLに分類され、BLの全体に占める割合は増加し、欧米で報告されている比率に近づいてきている。

DLBCLでは、脳原発リンパ腫が減少し、EBV陽性例も減少していることが改めて明らかにされている。EBV陽性Non-GC typeのDLBCLが減少している反面、BLとの鑑別が困難なDLBCLが増加している印象があり、今後、注意が必要である。近年の米国からの報

告ではGC-typeとnon-GC typeのDLBCLでは、予後は変わらないとする報告があるが、日本のデータでは明らかにnon-GC typeが予後不良であり、日本のDLBCLではnon-GC typeが多いことが、エイズ関連リンパ腫全体の予後を悪いものになっている。欧米との差異は、どのような因子によるものなのか、今後、治療などの臨床的な検討が必要であろう。

E. 結論

日本のエイズ関連リンパ腫の臨床病理学的特徴を明らかにする目的で、日本の過去の症例207例をWHO分類第4版により病理組織学的に再分類した。その結果、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、バーキットリンパ腫、plasmablastic lymphoma, primary effusion lymphoma, ホジキンリンパ腫の順に頻度が高いこと、BLが増加していること、ARTによりホジキンリンパ腫の頻度が増加していることなどが明らかになった。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

論文発表

1. Shimodaira K, Okubo Y, Ochiai E, Nakayama H, Katano H, Wakayama M, Shinozaki M, Ishiwatari T, Sasai D, Tochigi N, Nemoto T, Saji T, Kamei K, Shibuya K: Gene expression analysis of a murine model with pulmonary vascular remodeling compared to end-stage IPAH lungs. *Respir Res* 13:103, 2012.
2. Ogawa-Goto K, Ueno T, Oshima K, Yamamoto H, Sasaki J, Fujita K, Sata T, Taniguchi S, Kanda Y, Katano H: Detection of active human cytomegalovirus by the promyelocytic leukemia body assay in cultures of PBMCs from patients undergoing hematopoietic stem cell transplantation. *J Med Virol* 84:479-486, 2012.
3. Nakano K*, Katano H*, Tadagaki K, Sato Y, Ohsaki E, Mori Y, Yamanishi K, Ueda K: Novel monoclonal antibodies for identification of multicentric Castleman's disease; Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-encoded vMIP-I and vMIP-II. *Virology* 425:95-102, 2012. (*equal

contribution)

4. Nakajima N, Sato Y, Katano H, Hasegawa H, Kumasaka T, Hata S, Tanaka S, Amano T, Kasai T, Chong JM, Iiduka T, Nakazato I, Hino Y, Hamamatsu A, Horiguchi H, Tanaka T, Hasagawa A, Kanaya Y, Oku R, Oya T, Sata T: Histopathological and immunohistochemical findings of 20 autopsy cases with 2009 H1N1 virus infection. *Mod Pathol* 25:1-13, 2012.
5. Katano H, Sato S, Sekizuka T, Kinumaki A, Fukumoto H, Sato Y, Hasegawa H, Morikawa S, Saijo M, Mizutani T, Kuroda M: Pathogenic characterization of a cervical lymph node derived from a patient with Kawasaki disease. *Int J Clin Exp Pathol* 5:814-823, 2012.
6. Kamiyama T, Ohshima N, Satoh H, Fukumoto H, Katano H, Imakado S: Metachronous merkel cell carcinoma on both cheeks. *Acta Derm Venereol* 92:54-56, 2012.
7. Goto H, Kariya R, Shimamoto M, Kudo E, Taura M, Katano H, Okada S: Antitumor effect of berberine against primary effusion lymphoma via inhibition of NF-kappaB pathway. *Cancer Sci* 103:775-781, 2012.
8. Ablordey A, Amisshah DA, Aboagye IF, Hatano B, Yamazaki T, Sata T, Ishikawa K, Katano H: Detection of *Mycobacterium ulcerans* by the loop mediated isothermal amplification method. *PLoS Negl Trop Dis* 6:e1590, 2012.
9. 大田泰徳、比島恒和、望月 眞、児玉良典、片野晴隆: カレントトピック エイズ関連リンパ腫の病理診断. *病理と臨床* 2012, 30: 195-203.
10. 片野晴隆、佐藤由子、佐多徹太郎、長谷川秀樹: 病原体の同定. *病理解剖マニュアル 病理と臨床* 2012, 30: 269-277.
11. 片野晴隆: ヒトヘルペスウイルス 8 とカポジ肉腫. *感染症* 2012, 42: 38-43

12. 片野晴隆 「臓器移植患者における感染病理学的診断」臓器移植患者の予後および QOL の向上のための真菌やウイルス感染症の予防・診断・治療に関する研究班 編集 臓器移植患者におけるヘルペスウイルス感染症の診断・治療・予防マニュアル p73-83. 2012.3

学会発表

1. 片野晴隆、比島恒和、佐藤由子、長谷川秀樹. EBV 関連腫瘍における EBV がコードする miRNA の発現. 第 101 回 日本病理学会総会. 東京. 2012.4.
2. 片野晴隆、坂本康太、関塚剛、佐藤由子、長谷川秀樹、黒田誠: KSHV 関連疾患におけるウイルス miRNA の発現. 第 9 回 EBウイルス研究会. 鳥取(2012.7)
3. Katano H, Sakamoto K, Sekizuka T, Sato Y, Hasegawa H, Kuroda M. Expression profiles of KSHV-encoded miRNAs in KSHV-associated diseases 2012 International Congress on Oncogenic Herpesviruses and Associated Diseases. Philadelphia, July, 2012
4. Sakamoto K, Hishima T, Sato Y, Hasegawa H, Katano H. Expression profiles of Epstein-Barr virus (EBV)-encoded miRNAs in EBV-associated lymphomas. International Herpesvirus Workshop 2012, August 2012.
5. 菅野 隆行、長谷川 秀樹、片野晴隆. KSHV 細胞間感染のメカニズムの探索. 第 60 回 日本ウイルス学会学術集会. 2012.11.
6. 片野晴隆. エイズ剖検例における日和見感染症と腫瘍の実態. 第 26 回 日本エイズ学会学術集会総会 横浜 2012.11.

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし