

20分指-6③ 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 名古屋大学 木下朝博

研究成果の要旨

IVLBCLやCD5陽性DLBCLなど難治性B細胞リンパ腫の予後がrituximab併用化学療法によって改善される一方、中枢神経再発は高率で低減できないことを明らかにした。Rituximab治療後のCD20陰性化再発が稀でなくepigeneticな機序が関わっていることを明らかにした。B-NHLのLOH解析からA20遺伝子を同定し、B-NHLの一部にA20両アレル不活性化を認め、悪性リンパ腫発症への関与を明らかにした。未治療限局期鼻NK/T細胞リンパ腫に対する放射線療法とDeVIC療法同時併用の臨床試験を論文報告した。十二指腸濾胞性リンパ腫がindolentな臨床像を示し、小腸に多発病変をきたす頻度が高いことを明らかにした。多発性骨髄腫におけるDCC遺伝子異常を明らかにした。ヒト免疫担当細胞移入ATL/NOGマウスモデルを確立し、キメラ型抗CCR4抗体の誘導するヒトADCCをマウスin vivoで再現するモデルを確立した。 $\gamma\delta$ T細胞リンパ腫がNK細胞に近い遺伝子発現プロフィールを示すことを明らかにした。

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
木下 朝博	名古屋大学大学院医学系研究科 准教授	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
飛内 賢正	国立がんセンター中央病院 部長	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
谷脇 雅史	京都府立医科大学 教授	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
吉野 正	岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 教授	難治性リンパ系腫瘍の分子病態に基づく病理発生機序の解明
山口 素子	三重大学医学部附属病院 講師	難治性リンパ系腫瘍の分子機序に基づく病態解明と治療法の開発
石田 高司	名古屋市立大学大学院医学研究科 講師	難治性リンパ系腫瘍の分子機序に基づく治療法の開発
加留部謙之輔	愛知県がんセンター 遺伝子医療研究部	NK/T細胞リンパ腫の分類と病因に関する研究

研究報告

A. 研究目的

本研究の目的は、B細胞リンパ腫における難治群の同定と有効な治療法の開発、予後不良なT/NK細胞腫瘍の分子病態解明と新たな治療標的の探索、新規治療方法の開発の推進である。

今年度の研究計画は、1) DLBCLの中の難治群の臨床病理学的、分子細胞生物学的な特徴の解明と rituximab併用化学療法の有用性に関する検討。2) Rituximab治療後のCD20陰性化の分子機序の解明と耐性克服に関する基礎的検討。4) 難治性リンパ系腫瘍の病態におけるepigeneticな変化に関する検討。5) 新たに特定された難治性リンパ腫疾患単位に関する臨床病理学的検討。6) SKY法、オリゴヌクレオチドアレイによる疾患特異的な染色体転座の同定と、転座切断点近傍の候補遺伝子の同定。7) リンパ腫モデルマウスを使用した抗CCR4抗体やrituximabによるADCC誘導活性の至適化の基礎的検討。8) 限局期鼻型NK/T細胞リンパ腫に対する局所放射線療法と化学療法併用の第I/II相試験、JCOG0211-DIの結果公表。

B. 研究方法

1) DLBCLの中の難治群 (Intravascular large B-cell lymphoma (IVLBCL)、CD5陽性DLBCLなど)の臨床病理学的、分子細胞生物学的な特徴を解明する。2) CD20陰性化によるB細胞リンパ腫のRituximab耐性化に関する基礎的・臨床的解析を行う。3) NK/T細胞リンパ腫に対する臨床試験、限局期例に対する局所放射線療法と化学療法併用の第I/II相試験(JCOG0211-DI)を行う。4) MALTリンパ腫、NK/Tリンパ腫、ATLL、十二指腸follicular lymphomaなどの新規あるいは難治性悪性リンパ腫疾患単位に関する臨床病理学的検討を行う。5) SKY法、オリゴヌクレオチドアレイにより悪性リンパ腫に特異的な染色体転座を同定する。6) 難治性リンパ系腫瘍に対する新規治療薬の基礎的検討を行う。

C. 研究成果

1) 難治性B細胞リンパ腫の治療研究
IVLBCLの多施設共同後方視的研究を行い、中枢神経

再発・進展が約25%と高率に認められること、中枢神経再発進展率はrituximabの導入前後で大きな差が無く、rituximabではIVLBCLの中枢神経再発・進展予防には十分な効果が得られないことを明らかにした(Lancet Oncol 2009, Cancer Sci, in press)。

CD5陽性DLBCL第三次研究 (n=337)により、CD5陽性DLBCLはrituximab併用化学療法により他の成熟B細胞腫瘍と同様に予後の改善が認められるものの、中枢神経系再発率は低減されていないことを明らかにして報告した(ASCO 2009)。

Rituximab併用化学療法後の再発・再燃時におけるCD20発現の後方視的検討により、再生検が行われた26.3%にCD20陰性化を認め本現象が比較的稀ではないことを明らかにした。またin vitroの検討によってエピジェネティックな機序が陰性化に関与していることを明らかにした(Blood 2009, BBRC 2009)。NOGマウスを用いたリンパ系腫瘍モデルを作製し、リツキシマブのADCCの感受性を規定する因子を明らかにした(Int J Cancer 2009)。

2) 難治性T/NK細胞リンパ腫の治療研究

限局期鼻腔NK/T-NHLに対する放射線治療とMDR非関連薬剤からなる化学療法の同時併用は安全かつ有効で、今後のNK/T-NHL治療研究の基礎となりうることを明らかにした(JCO 2009)。

NOGマウス及び患者由来のATL腫瘍細胞を用いて、NOG/ATLモデルマウスを作製した。ヒトautologous免疫担当細胞移入ATL/NOGマウスモデルを確立し、低フコースADCC増強抗体であるキメラ型抗CCR4抗体の誘導するヒトADCCを、マウスin vivoで再現するモデルを確立した(J Immunol 2009)。

抗CCR4抗体のトランスレーショナルリサーチを推進して臨床開発を行った。がんに対する治療抗体の治験が欧米諸国に先んじて日本で開始されたのは、低フコース型ヒト化CCR4抗体(KW-0761)が初であり、その後にも例がない。第I相臨床試験により、KW-0761の安全性を確認し、推奨投与量(1.0 mg/kg)を決定した(JCO2009)。この結果をうけ、現在再発ATL症例に対する第II相試験を実施中である。

ATLに対する併用化学療法の第III相試験JCOG9801のJCO論文公表などを踏まえて、国内外の研究者との複数回の検討を重ね、国際合意を論文公表した (JCO 2009)。

3) 難治性リンパ腫の病態研究

B-NHL 238検体のゲノム異常を解析し、各病型は特徴的なゲノムプロファイルを有し、コピー数増加や減少を示す領域に高率にNFkB経路制御に関わる遺伝子を同定した。6q23.3領域にMALTリンパ腫を中心とするLOHの高度な集積を確認し、NFkB経路のnegative regulator であるA20遺伝子を見いだした。B-NHLの10%、MALTリンパ腫では22%にA20両アレル不活性化を認め、B-NHL発症への関与が示唆された (Nature 2009)。

B細胞リンパ腫株と多発性骨髄腫(MM)株に共通するゲノム異常を18q21.1-q21.3のgainとして同定した。RT-PCRの解析で、B細胞リンパ腫株ではDCCの発現が消失するか非常に減弱していたが、MM細胞株では殆どに発現が認められた。またエクソン特異的なRT-PCR解析によって、MM細胞株においてエクソン1のみを欠く転写産物の存在が示唆され、異常DCC蛋白の発現が示唆された。

十二指腸原発濾胞性リンパ腫27名について臨床病理学的に検討した。FISHによるIGH/BCL2融合遺伝子解析で83% (20/24)が陽性だった。追跡期間中央値30.9ヶ月で全生存率100%。11人が無治療経過観察され、1年、2年、3年の無治療生存率はそれぞれ80%、60%、60%だった。本疾患は高率にt(14;18)陽性を示し、限局期、病理組織学的にlow grade、FLIPI low riskで、極めて患者な経過を示すものが大半であり、無治療経過観察は許容しうる治療選択肢と考えられた。現在多施設共同の後方視的研究として、ダブルバルーン内視鏡で全消化管検索を施行した約90例を含めた消化管濾胞性リンパ腫約150例についての後方視的な臨床病理学的検討を進めている。消化管濾胞性リンパ腫では十二指腸に病変を有するものが最も多く、次いで小腸に多くの病変が認められた。

正常の免疫組織系には自然免疫系と獲得免疫系があ

る。発現解析を用いて、T/NK細胞腫瘍を分類したところ、正常 $\gamma\delta$ T細胞および腫瘍性 $\gamma\delta$ T細胞株はNK細胞に近い発現パターンを示した。自然免疫に関与する遺伝子群の発現解析では、NK細胞リンパ腫・ $\gamma\delta$ T細胞リンパ腫の臨床材料において有意に高い発現を示した。これらの結果はT/NK細胞リンパ腫の新たな分類の可能性を示すものと考えられた。

D. 倫理面への配慮

ヘルシンキ宣言などヒトを対象とした医学研究に関する国際的倫理規準に従って研究を実施した。治療研究については、参加施設の倫理審査委員会の審査・承認を得た。

E. 研究成果の刊行発表

外国語論文

- 1) Shimada K, Kinoshita T, et al. Central nervous system involvement in intravascular large B-cell lymphoma: A retrospective analysis of 109 patients. *Cancer Sci*, in press.
- 2) Sugimoto T, Kinoshita T, et al., Escape mechanisms from antibody therapy to lymphoma cells: downregulation of CD20 mRNA by recruitment of the HDAC complex and not by DNA methylation. *Biochem Biophys Res Commun*. 390: 48-53, 2009.
- 3) Hiraga J, Kinoshita T, et al. Down-regulation of CD20 expression in B-cell lymphoma cells after treatment with rituximab-containing combination chemotherapies: its prevalence and clinical significance. *Blood*. 2009; 113: 4885-4893.
- 4) Shimada K, Kinoshita T, et al. Presentation and management of intravascular large B-cell lymphoma. *Lancet Oncol*. 2009; 10: 895-902.

- 5) Yamaguchi M, Tobinai K, Kinoshita T, et al. Phase I/II Study of Concurrent Chemoradiotherapy for Localized Nasal Natural Killer/T-Cell Lymphoma: Japan Clinical Oncology Group Study JCOG0211. *J Clin Oncol* 2009;27:5594-600.
- 6) Asano N, Kinoshita T, et al., Age-related Epstein-Barr virus (EBV)-associated B-cell lymphoproliferative disorders: comparison with EBV-positive classic Hodgkin lymphoma in elderly patients. *Blood*. 113: 2629-2636, 2009.
- 7) Itoh K, Kinoshita T, Tobinai K, et al.: Prognostic analysis and a new risk model for Hodgkin lymphoma in Japan. *Int J Hematol* 2010 Mar 3. [Epub ahead of print]
- 8) Watanabe T, Kinoshita T, Yamaguchi M, Tobinai K, et al.: Pretreatment serum total protein is a significant prognostic factor to predict outcome of peripheral T/NK-cell lymphoma patients as well as histologic subtype. *Leuk Lymphoma*. 2010 [Epub ahead of print]
- 9) Suzumiya J, Karube K, Tobinai K, et al. The international prognostic index predicts outcome in aggressive adult T-cell leukemia/lymphoma: analysis of 126 patients from the International Peripheral T-cell Lymphoma Project. *Ann Oncol* 2009;20:715-21.
- 10) Tsukasaki K, Tobinai K, et al. Definition, prognostic factors, treatment and response criteria of adult T-cell leukemia-lymphoma: a proposal from an international consensus meeting. *J Clin Oncol* 2009;27:453-9.
- 11) Kato M, Tobinai K, Yoshino T, et al. Frequent inactivation of A20 in B-cell lymphomas. *Nature* 2009;459(7247):712-6.
- 12) Miyazaki K, Yamaguchi M, et al. Gene expression profiling of peripheral T-cell lymphoma including $\gamma\delta$ T-cell lymphoma. *Blood* 2009;113:1071-4.
- 13) Ito A, Ishida T, et al. Defucosylated anti-CCR4 monoclonal antibody exerts potent ADCC against primary ATLL Cells mediated by autologous human immune cells in NOD/Shi-scid, IL-2Rgamma(null) mice in vivo. *J Immunol*. 2009; 183: 4782-91.
- 14) Inagaki A, Ishida T, et al. Expression of the ULBP ligands for NKG2D by B-NHL cells plays an important role in determining their susceptibility to rituximab-induced ADCC. *Int J Cancer*. 2009; 125: 212-21.
- 15) Yamamoto K, Tobinai K, Ishida T, et al.: Phase I study of KW-0761, a defucosylated humanized anti-CCR4 antibody, in relapsed patients with adult T-cell leukemia-lymphoma and peripheral T-cell lymphoma. *J Clin Oncol* 2010;28:1591-8.
- 16) Mori M, Tobinai K, et al.: An indolent course and high incidence of t(14;18) in primary duodenal follicular lymphoma. *Ann Oncol* 2009, doi:10.1093/annonc/mdp557.
- 17) Miyagi-Maeshima A, Tobinai K, et al.: Histologic and immunophenotypic changes in 59 cases of B-cell non-Hodgkin lymphoma after rituximab therapy. *Cancer Sci* 2009;100:54-61.
- 18) Tsukasaki K, Tobinai K, et al.: Definition, prognostic factors, treatment and response criteria of adult T-cell leukemia-lymphoma: a proposal from an international consensus meeting. *J Clin Oncol* 2009;27:453-9.
- 19) Miyagi-Maeshima A, Tobinai K, et al.: Nine

- cases of secondary CD5-positive diffuse large B-cell lymphoma not due to transformation of chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma (Richter syndrome). *Am J Clin Pathol* 2009;131:339-46.
- 20) Nakahata S, Taniwaki M, et al. Alteration of enhancer of polycomb 1 at 10p11.2 is one of the genetic events leading to development of adult T-cell leukemia/lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer*. 2009;48:768-776
- 21) Matsumoto Y, Taniwaki M, et al. Expression of master regulators of helper T-cell differentiation in peripheral T-cell lymphoma, not otherwise specified, by immunohistochemical analysis. *Am J Clin Pathol*. 133(2):281-290, 2010
- 22) Sato Y, Yoshino T, et al. Patients with localized primary non-tonsillar oral diffuse large B-cell lymphoma exhibit favorable prognosis despite a non-germinal center B-cell-like phenotype. *Cancer Sci* 100(1):42-46, 2009
- 23) Hagiwara M, Yoshino T, et al. Primary cutaneous T-cell lymphoma of unspecified type with cytotoxic phenotype: Clinicopathological analysis of 27 patients. *Cancer Sci* 100(1):33-41, 2009
- 24) Nishimori H, Yoshino T, et al. The effect of adding rituximab to CHOP-based therapy on clinical outcomes for Japanese patients with diffuse large B-cell lymphoma: a propensity score matching analysis. *Int J Hematol* 89(3):326-331, 2009
- 25) Takata K, Yoshino T et al. Duodenal and nodal follicular lymphomas are distinct: the former lacks activation-induced cytidine deaminase and follicular dendritic cells despite ongoing somatic hypermutations. *Mod Pathol* 22(7): 940-949, 2009
- 26) Kondo T, Yoshino T, et al. Accumulation of aberrant CpG hypermethylation by Helicobacter pylori infection promotes development and progression of gastric MALT lymphoma. *Int J Oncol* 35(3): 547-557, 2009
- 27) Ishii T, Ishida T, et al. Defucosylated humanized anti-CCR4 monoclonal antibody KW-0761 as a novel immunotherapeutic agent for adult T-cell leukemia/lymphoma. *Clin Cancer Res* 2010;16:1520-31.
- 28) Ito A, Ishida T, et al. Defucosylated anti-CCR4 monoclonal antibody exerts potent ADCC against primary ATLL cells mediated by autologous human immune cells in NOD/Shi-scid, IL-2R gamma(null) mice in vivo. *J Immunol* 2009;183:4782-91.
- 29) Inagaki A, Ishida T, et al. Expression of the ULBP ligands for NKG2D by B-NHL cells plays an important role in determining their susceptibility to rituximab-induced ADCC. *Int J Cancer* 2009;125:212-21.
- 30) Kimura Y, Karube K et al. Mantle cell lymphoma shows three morphological evolutions of classical, intermediate, and aggressive forms, which occur in parallel with increased labeling index of cyclin D1 and Ki-67. *Cancer Sci*. 2010 Mar; 101(3): 806-14.