

研究マインド支援グラント 報告書

平成27年度 研究マインド支援グラント(若手)報告書

MYCのタンパク発現量を基軸とした高悪性度B細胞性リンパ腫の臨床病態の解明

研究代表者 菊地 淳(埼玉医科大学総合医療センター 病理部)

研究分担者 百瀬 修二¹⁾, 田丸 淳一¹⁾, 得平 道英²⁾

緒言

びまん性大細胞型B細胞リンパ腫(DLBCL)は悪性リンパ腫の中で最も多い疾患単位で、その実態は組織像、分子遺伝学ならびに臨床病理学的にきわめて多様である¹⁾。今日まで、この多様なDLBCLの亜分類が多くなされ、とりわけ遺伝子発現プロファイルを用いたGerminal center B-cell (GCB)とActivated B-cell (ABC)を正常対応細胞とする2つ亜型からなる分類は、現在では免疫組織化学染色(IHC)に応用され、広く用いられている^{2,3)}。一方、MYCが関与する転座はBurkittリンパ腫で古くから知られていたが、DLBCLの一部にもそうした症例が存在することが近年明らかとなってきた。さらに臨床病理学的解析からMYC転座を有する症例は、予後不良であるとする報告がある一方、そうでないとの報告もあり、今後の検討課題となっている⁴⁾。さらにMYC転座に加えてBCL2やBCL6転座を付加的に持ついわゆる“double hit lymphoma/triple hit lymphoma (DHL/THL)”と呼ばれる一群が存在し、既存の治療法に奏功せず、予後不良群としての認識が高まっている⁵⁾。MYCの発現に関しては、転座を基軸とするのか、あるいはタンパク発現を基軸とするのか、さらにタンパク発現を基軸とした場合、その陽性率のcut off値をどうするかといった問題が新たに生じ、より客観性のある定量法が求められている。タンパク発現の評価法として、現在、病理組織検体において3, 3'-diaminobenzidine (DAB)発色を用いたIHCが主流であるが、反応時間、温度、基質濃度などに酵素活性が影響され、染色結果のバラツキの原因となっており、ひいては観察者内あるいは観察者間の再現性など客観性の問題の原因ともなっている。

そこで我々は、コニカミノルタ株式会社によって開発された新規タンパク定量法である蛍光ナノ粒子を用いたPID (Phosphor Integrated Dot)法に着目した。PID法では、既存の蛍光色素と比較して10000倍の輝度を有し、また耐光性も10倍以上で、高輝度・高耐光性を有するという点が大きな特徴である⁶⁾。さらに既存のDAB発色では低発現群における定量的な問題が存在するが、本システムでは広い

ダイナミックレンジを示すため、低発現から高発現までの検出が可能となっている。こうした特性を踏まえると、既存のIHCでは検出されえなかった範囲を含め、タンパク発現をより定量的に測定できることが期待される。

材料と方法

1) 症例の抽出およびMYCに対する免疫組織化学染色

総合医療センター病理部で2002-2015年までに診断され保管しているR-CHOPが施行されたDLBCL症例を抽出し、年齢・予後などの臨床病理学的事項を踏まえたリストを作成し、その患者検体症例の初発時ホルマリン固定パラフィン包埋組織(FFPE)ブロックから組織マイクロアレイ(TMA)を作製した。このTMA検体を用いて、MYC(clone Y69, Rabbit monoclonal, Epitomics, Inc.)に対するIHCを行った。MYCのIHC-DAB発色による発現解析を独立した3人の病理医によって行い、乖離が生じた際にはマルチヘッド顕微鏡による討議と同意の後に、結果を算出した。現在標準となっているDAB発色によるMYCタンパク発現のカットオフ値は40%であるので、40%以上を陽性と判断した。その際、核内での強度は問わない。今回、40例のDLBCL症例にて臨床病理学的検討を行った。統計的解析には関してはEZRを用いて行った。

2) PID法を用いたMYCタンパク検出法の確立

MYCタンパクを強発現すると考えられる5つの異なるBurkittリンパ腫細胞株のタンパク発現をウェスタンブロットにて検討し、MYCの定量化を行った。次にこれらの細胞株を用いたCell blockを作成し、MYCのIHCのDAB発色(MYC-DAB)による結果とPID法(MYC-PID)による定量結果を解析した。さらに実際の組織検体としてヒト扁桃について検討し、あわせて当院のDLBCL40例についても検討を行った。

結果

1) PID法によるMYCタンパク発現定量系の確立

Burkittリンパ腫培養細胞株を用いてウェスタンブロットと同時にDAB発色によるIHC-DABにてMYCの発現について検討した。結果、MYCの発現はウェスタンブロットとIHC-DABで正の発現相関が認められた。さらに

1) 埼玉医科大学総合医療センター 病理部

2) 埼玉医科大学総合医療センター 血液内科

MYC-PIDの検討で、MYC-PIDの粒子数とウェスタンブロットの発現量に正の相関が認められた。

次にヒト扁桃でのMYC-DABとMYC-PIDの結果、ヒト組織においてもMYC-PIDはMYC-DABでの染色結果と良好な相関が認められた(図1)。以上、我々は蛍光ナノ粒子を用いたMYC-PIDの系を確立した。

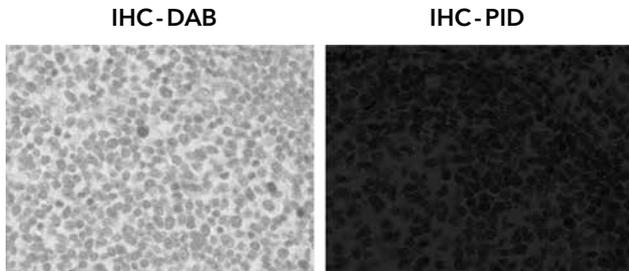


図1.

2) DLBCLのMYC-PID法によるMYCタンパク定量化の結果

DLBCLにおけるMYC-DAB法とMYC-PID法におけるタンパク発現の定量法と予後に対する影響について検討した。

現在標準となっているIHCにおけるMYC-DABのカットオフ値は40%で、これを基準に当院のDLBCL40例について検討した。その結果、DLBCLにおいてMYC-DABでの陽性と陰性群において予後に有意な相関はみられなかった。一方、同症例においてPIDによるMYCの定量結果では、カットオフ値を3.4とした場合、その3.4以上の群は3.4未満の群と比べて有意に予後不良であった($p < 0.05$)。

考 察

DAB発色を用いたIHCはタンパク発現の評価法として主流である一方、酵素反応によって色素沈着を検出するため、反応時間や温度、基質濃度などに染色性が依存し、定量性や再現性などの問題がある。

悪性リンパ腫の中でもっとも頻度の高い疾患単位であるDLBCLはヘテロな疾患群であり、今日まで種々のバイオマーカーの検索がなされてきた。2000年以降、遺伝子発現プロファイルから見出されたGCBとABCの亜型は分子病態、遺伝子異常などの違いがみられ、今日でも予後階層化の分類の一つとして定着している。この分類はさらにIHCでも一般化されCD10, BCL6, MUM1の3つの抗体を用いたGCB, non-GCBの亜分類がなされている。しかしながらGCBとnon-GCBでの分類は必ずしも予後と相関しないとの指摘もなされ⁷⁾、治療層別化をするまでには至っていない。

FISHの普及はDLBCLにおけるMYC転座症例群の抽出を可能にし、それらが予後不良であることを示す報告が相次いでなされた⁸⁾。WHO分類の次版ではMYCおよびBCL2とBCL6の両方かいずれかに転座を有する症例がHigh grade B-cell lymphoma, with MYC and BCL2 and/or BCL6 rearrangementとなり、MYC単独陽性例などを含めた

高悪性度B細胞リンパ腫がHigh grade B-cell lymphoma, NOSに分類されることが予想されるが⁹⁾、MYCを基軸としたDLBCLを含むB細胞リンパ腫の分類においてMYCの発現を再現的に定量することは、病理診断はもとより臨床病態ならびに治療層別化等を鑑みた際に重要である。

今回われわれは蛍光ナノ粒子を用いたPID法によるMYCのタンパク発現の客観的定量法を構築し、さらに本院でDLBCLと診断されR-CHOP療法で治療された40例に対してPID法によるMYCの発現と予後に対する影響を検討した。その結果、既存のDAB発色では見出しえなかった予後不良群をPID法で抽出できた意義は大きいものと考えられる。

MYCはもともと転写因子であり、MYCのタンパク発現量が下流の応答遺伝子群の制御に大きく関わり、とりわけMYCが増殖などのがん遺伝子として機能することを想定した場合にMYCタンパク量をその腫瘍の一定領域で定量することは重要であると考えられる。このことを踏まえ、MYCを基軸とした腫瘍の生物活性をみるには、その発現をある一定領域での平均値として測定することがより理に適っている。従って今回のPIDによる結果も、標本上の病変部における一定領域のMYCタンパクの定量を行うが腫瘍の悪性度を反映することを示す結果と考えられた。今後より多くの症例かつ多施設での検討を行い、再現性をみる必要はあるが、今回の結果はMYCの発現量を定量することで治療の階層化を含めた臨床病理学的意義を見出したものと考えられた。

引用文献

- 1) WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon France: IARC; 2008: 233-44.
- 2) Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, Ma C, Lossos IS, Rosenwald A, et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* 2000; 403: 503-11.
- 3) Hans CP, Weisenburger DD, Greiner TC, Gascoyne RD, Delabie J, Ott G, et al. Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood* 2004 103: 275-82.
- 4) Cai Q, Medeiros LJ, Xu X, Young KH. MYC-driven aggressive B-cell lymphomas: biology, entity, differential diagnosis and clinical management. *Oncotarget* 2015 Nov 17; 6(36): 38591-616.
- 5) Abramson JS. The Spectrum of Double Hit Lymphomas. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2016 Dec; 30(6): 1239-49.
- 6) KONICA MINOLTA TECHNOLOGY REPORT, 2014(11): 68-72.
- 7) Gutiérrez-García G, Cardesa-Salzmann T, Climent F, González-Barca E, Mercadal S, Mate JL, et al.

Gene-expression profiling and not immunophenotypic algorithms predicts prognosis in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with immunochemotherapy. *Blood* 2011; 117(18): 4836-43.

- 8) Copie-Bergman C, Cuillière-Dartigues P, Baia M, Briere J, Delarue R, Canioni D, Salles G, Parrens M, et al. MYC-IG rearrangements are negative predictors of survival in DLBCL patients treated with immunochemotherapy: a GELA/LYSA study. *Blood* 2015 Nov 26; 126(22): 2466-74.
- 9) Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, Harris NL, Stein H,

Siebert R, et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood* 2016 May 19; 127(20): 2375-90.

研究成果リスト

学会発表

- 1) 百瀬修二, 菊地 淳, 高柳奈津子, 田丸淳一, 蛍光ナノ粒子を用いたMYCタンパク発現検出系の構築とその臨床病理学的意義, シンポジウム: ナノ科学が拓く病理の明るい未来, 第105回日本病理学会総会, 平成28年5月, 仙台