

学内グラント 終了時報告書

平成19年度 学内グラント報告書

悪性リンパ腫の新規予後因子 nm23 に対する 分子標的治療法の開発

研究代表者 新津 望 (埼玉医科大学 国際医療センター 血液内科)

緒言

悪性リンパ腫の治療成績は向上し、Hodgkinリンパ腫では約80%の症例で治癒可能となってきた。そのため、不妊や二次性発癌といった晩期有害事象の発現をおさえるための治療法が選択されており、また、抗CD30抗体などの分子標的治療の開発が盛んに行なわれている。一方、非ホジキンリンパ腫はWHO分類により40種類以上に細分類されており、近年各々の病型に対する病型特異的治療が行なわれ、治療成績の改善が見られている。現在は、B細胞性リンパ腫に対しては抗CD20抗体であるrituximabの臨床応用により治療成績は改善したが、それでも約30%の症例では再発あるいは治療抵抗性を認め、高用量化学療法を併用した末梢血幹細胞移植、同種骨髄移植、ミニ移植などが必要となっている。また、リンパ腫患者は年々増加し、全腫瘍死亡率の第6-7位を占め、白血病の3倍の発生頻度とも言われている。また、高齢化社会を反映してリンパ腫患者の年齢中央値は60-65歳と言われ、高齢者に対する有害事象の少なく、より効果のある分子標的治療法の開発は急務である。近年腫瘍細胞の生物学的特性に基づく予後因子が明らかにされ、それによる予後の判定が行われ、個々の患者に最適と考えられる治療方法の選択が行われつつある。また、DNAマイクロアレーを用いた予後因子の検討が行われているが、DNAマイクロアレーは、高価であり、検査に時間がかかるため、治療前に行うことは難しく、臨床応用にはまだ時間がかかり、治療前に簡便に使用できる予後因子が臨床の場では重要である。また、分子標的療法による予後因子は一般的な化学療法による予後因子と異なる可能性が考えられる。

nm23遺伝子は、高転移性がん細胞において低い発現を示す転移抑制遺伝子として単離され、ヌクレオシド二リン酸キナーゼ活性及び白血病の分化誘導抑制因子活性などを示す多機能性蛋白である。nm23-H1

およびnm23-H2は88%のアミノ酸配列にホモロジーを持ち、これらは17q21染色体上に認められる。我々は、以前埼玉がんセンター研究所との共同研究で急性骨髄性白血病においてnm23-H1 mRNA発現レベルが高い程有意に予後不良であることを報告してきた。しかし、nm23-H1のmRNAレベルでの発現を検討することは時間および手間がかかり、治療開始前に予後予測し治療方法を検討することは難しい。特にリンパ腫では、リンパ節およびリンパ組織の再生検をすることは患者さんへの侵襲も大きく、ほとんど不可能である。そのため、我々は簡単に測定できる血清でのnm23の測定が可能かどうかを検討し、血中にnm23-H1蛋白が検出されることを見出し、少量の血清を短時間で定量的に測定できる系をELISA法で作成し報告してきた¹⁾。その結果、急性骨髄性白血病および悪性リンパ腫患者で正常対照に比し高値を示し、新しい優れた予後不良因子となることを明らかにし報告した^{2,3)}。その後、血清nm23-H1はindolentリンパ腫およびNK/T細胞性リンパ腫に対しても単独で有意な独立した予後因子であることを報告した^{4,5)}。また、細胞表面および細胞質内nm23についても検討し、血清nm23-H1とそれぞれが相関することを見いだした^{6,7)}。また、再発例に対する予後因子になるかどうかも検討し、再発あるいは難治性高齢者T細胞性リンパ腫における予後不良因子であることを報告した^{8,9)}。非ホジキンリンパ腫は節外性に発症することが約半数あり、それぞれの節外臓器によって予後が異なることより、臓器別の予後因子として細胞質内nm23を検討し、甲状腺では非胚中心型とは独立した予後不良因子になることを見いだした¹⁰⁾。しかし、いまだ悪性リンパ腫におけるnm23-H1の機能については不明な点が多い。そのため、今回は分子標的治療の標的分子の同定として、Hodgkinリンパ腫の病型別のnm23の発現と予後、および血清nm23値と細胞質内nm23の発現との相関について検討した。

対象および方法

対象は、Hodgkinリンパ腫133例（うち結節性リンパ球優位型Hodgkinリンパ腫5例、古典的Hodgkinリンパ腫128例）であり、パラフィン切片に対する免疫組織化学染色（CD3, CD15, CD20, CD30, Ki-67, TIA-1, nm23-H1）を行った。Hodgkin-Reed-Sternberg細胞30個の染色態度を検討し、20個以上染色されている症例を陽性とした。また、血清nm23-H1は我々が確立したELISA法により測定した^{1,2)}。

結果

1) nm23-H1の免疫組織化学染色の結果

図1に示すように反応性リンパ節では、リンパ濾胞の胚中心領域、濾胞間領域、および髄索に着色がみられた。弱拡大では胚中心の中心芽細胞、濾胞間領域の大型リンパ球、および髄索の形質細胞にnm23-H1発現がみられ、マントル領域の細胞は陰性であった。一方、Hodgkinリンパ腫ではReed-Sternberg細胞およびHodgkin細胞に発現を認めた。表1に結節硬化型（NS）、混合細胞型（MC）、結節性リンパ球優位型Hodgkinリンパ腫（NLP）の各病型のCD15, CD30, CD20, Ki-67, EBER, TIA-1, nm23-H1の染色結果を示す。EBERはMCで有意に陽性率が高く、一方nm23-H1はMCでの陽性率が低かった。

2) nm23-H1と臨床的特徴との関係（表2）

nm23-H1発現は、International prognostic score (IPS)の因子が4つ以上（ $p=0.003$ ）、bulky mass有り（ $p=0.005$ ）、B症状あり（ $p=0.006$ ）で有意に高率であった。しかし、年齢、性別、血清LDH値、病期、

白血球数、血清アルブミン値、ヘモグロビン値とは相関を認めなかった。また、nm23-H1陽性例の完全奏功（CR）割合は57.3%であり、陰性例に比し有意に低率であった（ $p<0.019$ ）。

3) 血清nm23-H1と細胞質内nm23-H1の検討

細胞質内nm23-H1発現が陽性であった77例の血清nm23-H1値は 56.24 ± 27.52 ng/ml (mean \pm SD)であったが、細胞質内nm23-H1発現が陰性であった51例では血清nm23-H1は 22.56 ± 15.45 ng/mlであり、細胞質内nm23陽性例で有意に高値であった（ $p=0.0005$ ）（図2）。この結果から、血清nm23-H1はリンパ腫細胞から直接産生されている可能性が示唆された。

4) nm23-H1と予後

128例全症例の5年生存割合は85.1%、5年無増悪進行割合は77.6%であった。MCとNSで有意差を認めなかったが、TIA-1陽性例の5年無増悪生存割合は41.7%、陰性例のそれは83%と有意差を認めた（図3）。全症例に対する細胞質内nm23陽性例と陰性例の検討では、陽性例の5年無増悪生存割合は63.4%、陰性例は93.8%であった。また、MCに限って検討したが、陽性例の5年無増悪生存割合は36.1%、陰性例は88.1%であった。（図4）同様にNSに関して検討したが、nm23陽性例68.4%、陰性例86.1%であった。

血清nm23-H1に対する検討では、nm23-H1が80 ng/ml以上の31例の5年無増悪生存割合は49.8%、80 ng/ml未満の97例では94.1%と有意に血清nm23-H1が高値例で予後不良であった（ $p=0.0001$ ）。EBV陽性例と陰性例では生存期間に有意差を認めなかった。

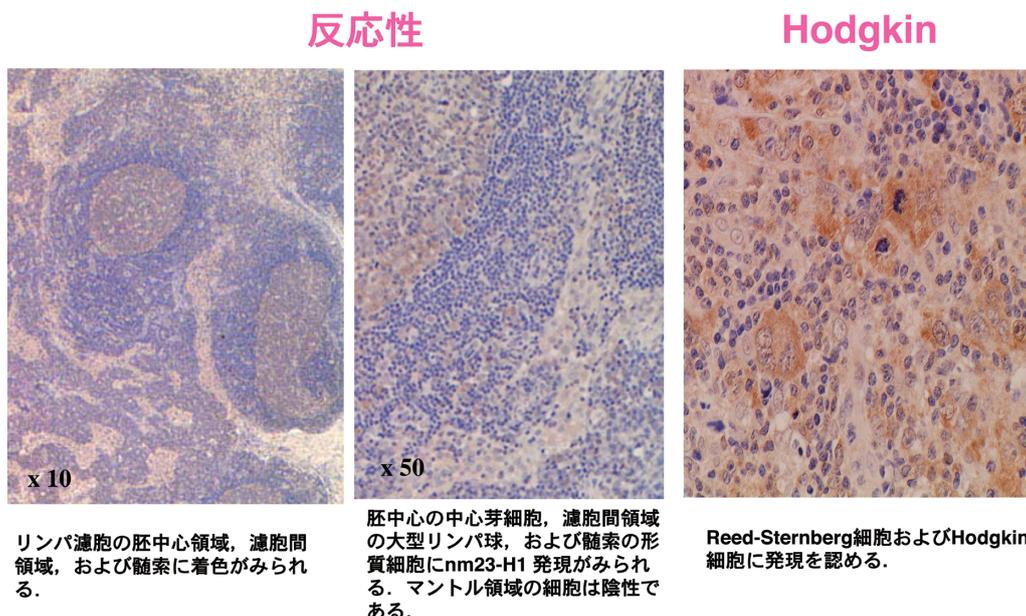


図 1. nm23-H1 immunostaining.

表 1. Immunohistochemistry of Hodgkin Lymphoma

	NS (n=87)	MC (n=41)	NLP(n=5)	P-Value
CD15	69(79%)	32(78%)	0(0%)	0.87
CD30	85 (98%)	40(98%)	0(0%)	0.96
CD20	9 (10%)	5(12%)	5 (100%)	0.75
Ki-67	81(93%)	38(93%)	4 (80%)	0.93
EBER	16 (18%)	28(68%)	0(0%)	<0.001
TIA-1	9 (10%)	5 (12%)	0(0%)	0.75
nm23-H1	64 (78%)	13(32%)	3(60%)	<0.001

NS; Nodular sclerosis, MC; Mixed cellularity, NLP; Nodular lymphocyte-predominant, p; Fisher's exact probability, NS vs.MC

表 2. nm23-H1 Levels and Clinicopathological Factors

Factors	No. of Patients(n=128)	nm23-H1		P-Value
		Positive (n=77)		
Age (yr)				
	≥ 45	67	40 (59.7%)	N.S.
	< 45	61	37 (60.7%)	
Gender				
	Male	84	53 (63.1%)	N.S.
	Female	44	24 (54.5%)	
Serum LDH level				
	Normal	56	36 (64.2%)	N.S.
	> Normal	72	41 (56.9%)	
Ann Arbor stage				
	I-III	104	61 (58.7%)	N.S.
	IV	24	16 (66.7%)	
WBC counts				
	≥ 15,000/ μ l	31	17 (54.8%)	N.S.
	< 15,000/ μ l	97	60 (59.4%)	
Serum albumin level				
	> 4g/dl	92	54 (58.7%)	N.S.
	"4g/dl	36	23 (63.9%)	
Hemoglobin level				
	> 10.5 g/dl	113	67 (59.3%)	N.S.
	"10.5g/dl	19	11 (57.9%)	
International prognostic score				
	0-3	107	61 (57%)	0.003
	≥ 4	21	16 (76.2%)	
Bulky mass				
	Absent	101	58 (55.2%)	0.005
	Present	27	20 (74.1%)	
B symptoms				
	Absent	77	40 (51.9%)	0.006
	Present	51	37 (72.5%)	
Therapeutic response				
	CR	117	67 (57.3%)	0.019
	Non-CR	11	10 (90.1%)	

Abbreviations : CR; complete remission, Mann-Whitney U-test

5) 単変量解析および多変量解析

無増悪生存に対する予後不良因子は、病期IV, performance status 2以上, 貧血, アルブミン低下, 45歳以上, TIA-1発現, nm23-H1発現であった。また, 有意な予後因子に対する多変量解析の結果ではTIA-1 (hazards ratio, 5.09, 95% CI, 1.85 to 7.25; p=0.0001) と nm23-H1 発現 (Hazards ratio, 3.31, 95% CI, 1.23 to 5.87; p=0.0032) が独立した予後因子となった。

考 察

nm23 遺伝子は, 1988年 Steegら¹¹⁾によりマウスメラノーマ細胞株において, 低転移性株で発現が高く, 高転移性株において逆にその発現が低下している遺伝

子として単離され, がん転移抑制遺伝子として報告された。その後この遺伝子産物は nucleoside diphosphate kinase (NDPK) 活性を有し, 増殖促進, 分化抑制, 転写調節, c-myc 転写活性 (PuF), ショウジョウバエの形態形成 (awd 遺伝子), 接着分子などの機能があることが判明した。また, nm23-H1の高発現が, 肺癌, 黒色種, 卵巣がん, 口腔がん, 直腸がんなどの11種類のがんで転移が抑制されることが知られている。これらの機序として, nm23-H1が過剰発現によりインスリン様成長因子 (IGF), 血小板由来成長因子 (PDGF), リゾフォスファチジル酸 (LPA) を含む血清由来の化学遊走物質ががん細胞の細胞運動能を無効にして, 転移と浸潤を減らすと考えられている¹²⁾。また, *in vitro* では nm23-H1は乳癌, 結腸がん, 前立腺がんなどのコ

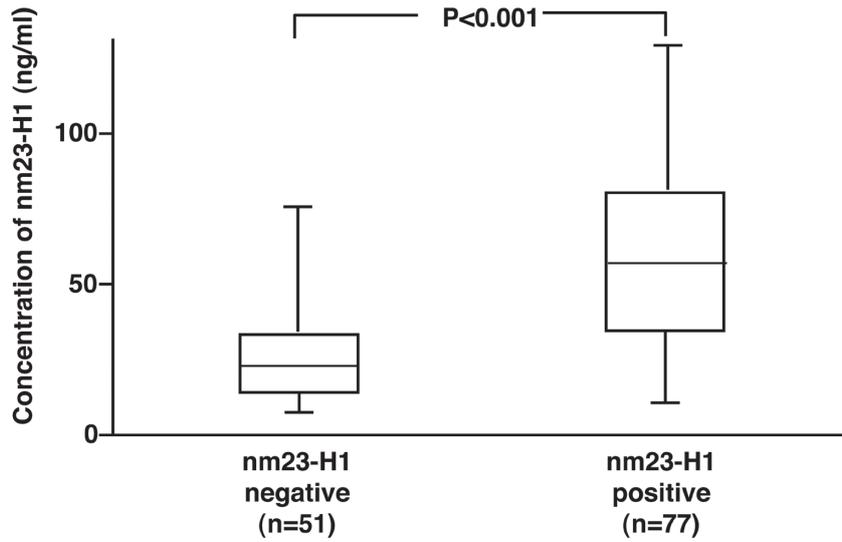


图 2. Relationship between the Serum nm23-H1 Level and Cytoplasmic nm23-H1 Expression.

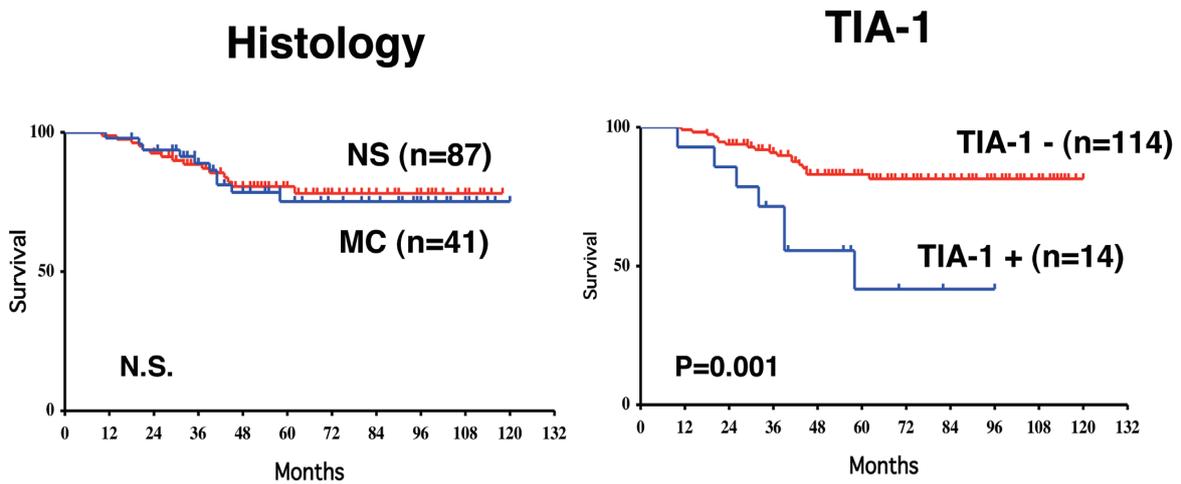


图 3. Progression-Free Survival Curve of Patients with Classical Hodgkin Lymphoma according to the Histology or TIA-1.

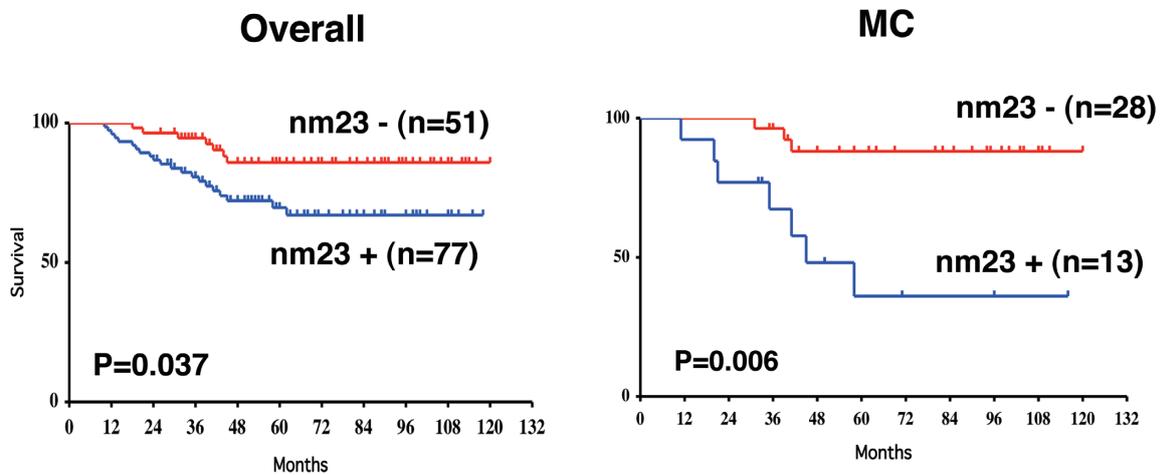


图 4. Progression-Free Survival Curve of Patients with Classical Hodgkin Lymphoma according to the Cytoplasmic nm23-H1.

ロニー形成を抑制する。最近、nm23-H1下流分子が、乳癌細胞の転移を抑制することが報告されている。また、nm23-H1ファミリーのシグナル伝達経路の報告もあり、グリセルアルデヒド3リン酸塩脱水素酵素、Hsc70、テロメア、ROR(レチノイン酸関連オーハン受容体)、Rad、Ras関連GTPaseなどのいろいろな細胞内蛋白との関連が報告されている¹³⁾。このようにnm23-H1に関するいろいろな機序が徐々に解明されつつあるが、未だ不明な点が多い。近年、いろいろな癌において免疫組織染色によるnm23の発現と予後との検討が行われている。悪性黒色腫、乳癌、胃癌などでは、nm23の発現と患者の生存率との間に有意な逆相関を認めたが、一方神経芽細胞腫、大腸癌、膀胱癌では病期進行とともにむしろ発現が増強し予後不良となることが報告されている。埼玉県立がんセンター角ら¹⁴⁾は、マウスの分化抵抗性骨髄性白血病細胞(M1細胞)の培養上清中から分化誘導抑制因子(inhibitory factor; I-factor)を検出し、M1細胞の分化能を制御する重要な因子として精製し、それがnm23蛋白と同一ものであることを見出した。そのため、我々は白血病やリンパ腫などの造血器腫瘍に対するnm23の意義に着目し、現在予後因子としての意義の検討や分子標的治療への応用を検討している。

本研究では、Hodgkinリンパ腫の病理組織標本を用い、免疫組織化学的検討を行った。細胞質内nm23-H1発現と血清nm23-H1値が相関していることより、血清nm23-H1の一部はリンパ腫細胞が直接産生している可能性が示唆された。また、細胞質内nm23-H1発現は、血清nm23-H1と同様に重要な予後因子であり、治療戦略を考える上でも有用であることが示唆された。

我々は以前、血清nm23-H1のELISA法による測定系を作成し^{1,2)}、非ホジキンリンパ腫および急性骨髄性白血病の予後因子となることを見いだした。血清nm23-H1は、正常対照に比し悪性リンパ腫で高値を示し、特に末梢性T細胞性リンパ腫(peripheral T-cell lymphoma; PTCL)および成人T細胞白血病/リンパ腫で高値を示した。aggressive lymphomaにおいてnm23-H1高値群と低値群に分けて全生存割合、無増悪生存割合について検討したが、nm23-H1高値群では低値群に比し有意に予後不良であった³⁾。様々な非ホジキンリンパ腫の病型に対して血清nm23-H1高値例が予後不良因子となり、リンパ腫では腫瘍細胞の増殖に関与している可能性が示唆された。

本研究では、Hodgkinリンパ腫に対する血清nm23-H1を測定し、血清nm23-H1高値症例では有意に予後不良であり、特にMC群での予後不良因子となることが示唆された。血清nm23-H1は少量の血清で簡単に測定できるが、細胞質内nm23-H1はリンパ腫の診断時の免疫染色と同時にこなえるメリットがある。nm23-H1発現

は血清nm23-H1と同様に重要な予後因子であり、治療戦略を考える上で有用であることが示唆された。

文 献

- 1) Niitsu N, Okabe-Kado J, Kasukabe T, Yamamoto-Yamaguchi Y, Umeda M, Honma Y: Prognostic Implications of the Differentiation Inhibitory Factor nm23-H1 Protein in the Plasma of Aggressive Non-Hodgkin's Lymphoma. *Blood* 1999;94:3541-50.
- 2) Niitsu N, Okabe-Kado J, Nakayama M, Wakimoto N, Sakashita A, Maseki N, Motoyoshi K, Umeda M, Honma Y: Plasma levels of the differentiation inhibitory factor nm23-H1 protein and their clinical implications in acute myelogenous leukemia. *Blood* 2000;96:1080-6.
- 3) Niitsu N, Okabe-Kado J, Okamoto M, Takagi T, Yoshida T, Aoki S, Hirano M, Honma Y: Serum nm23-H1 protein as a prognostic factor in aggressive non-Hodgkin lymphoma. *Blood* 2001;97:1202-10.
- 4) Niitsu N, Okamoto M, Okabe-Kado J, Takagi T, Yoshida T, Aoki S, Honma Y, Hirano M: Serum nm23-H1 protein as a prognostic factor for indolent non-Hodgkin's lymphoma. *Leukemia*. 2001;15:832-9.
- 5) Niitsu N, Okamoto M, Honma Y, Nakamine H, Tamaru JI, Nakamura S, Yoshino T, Higashihara M, Hirano M, Okabe-Kado J: Serum levels of the nm23-H1 protein and their clinical implication in extranodal NK/T-cell lymphoma. *Leukemia*. 2003;17:987-990.
- 6) Niitsu N, Honma Y, Iijima K, Takagi T, Higashihara M, Sawada U, Okabe-Kado J: Clinical significance of nm23-H1 proteins expressed on cell surface in non-Hodgkin's lymphoma. *Leukemia* 2003;17:196-202.
- 7) Niitsu N, Nakamine H, Okamoto M, Akamatsu H, Higashihara M, Honma Y, Okabe-Kado J, Hirano M: Clinical Significance of Intracytoplasmic nm23-H1 Expression in Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Clin Cancer Res*. 2004;10:2482-90.
- 8) Niitsu N, Nakamine H, Okamoto M, Akamatsu H, Honma Y, Higashihara M, Okabe-Kado J, Hirano M: Expression of nm23-H1 is associated with poor prognosis in peripheral T-cell lymphoma. *Br J Haematol* 2003;123:621-30.
- 9) Niitsu N, Kohori M, Higashihara M, Bessho M: Phase II study of the irinotecan (CPT-11), mitoxantrone and dexamethasone regimen in elderly patients with relapsed or refractory peripheral T-cell lymphoma. *Cancer Sci*. 2007;98:109-12.
- 10) Niitsu N, Okamoto M, Nakamura N, Nakamine H, Bessho M, Hirano M: Clinicopathologic correlations

- of stage IE/IIIE primary thyroid diffuse large B-cell lymphoma. *Ann Oncol.* 2007;18:1203-8.
- 11) Steeg PS, Bevilacqua G, Kopper L, et al: Evidence for a novel gene associated with low tumor metastatic potential. *J Natl Cancer Inst* 1988;80:200.
 - 12) Horak CE, Lee JH, Elkahloun AG, et al. Nm23-H1 suppresses tumor cell motility by down-regulating the lysophosphatidic acid receptor EDG2. *Cancer Res.* 2007;67:7238.
 - 13) Seong HA, Jung H, Ha H. NM23-H1 tumor suppressor physically interacts with serine-threonine kinase receptor-associated protein, a transforming growth factor-beta (TGF-beta) receptor-interacting protein, and negatively regulates TGF-beta signaling. *J Biol Chem.* 2007;282:12075.
 - 14) Okabe-Kado J, Kasukabe T, Honma Y, et al. Purification of a factor inhibiting differentiation from conditioned medium of nondifferentiating mouse myeloid leukemia cells. *J Biol Chem.*1988; 263:10994.

研究成果リスト

論文

- 1) Niitsu N, Okamoto M, Nakamine H, Hirano M. Clinicopathologic features and treatment outcome of primary breast diffuse large B-cell lymphoma. *Leuk Res.* 2008;32:1837-41.
- 2) Niitsu N, Nakamine H, Okamoto M, Tamaru J, Hirano M. A clinicopathological study of nm23-H1 expression in classical Hodgkin lymphoma. *Ann Oncol.*2008;19:1941-6.
- 3) Niitsu N, Okamoto M, Miura I, Hirano M. Clinical significance of 8q24/c-MYC translocation in diffuse large B-cell lymphoma. *Cancer Sci.* 2008 Nov 25. [Epub ahead of print]
- 4) Niitsu N, Okamoto M, Miura I, Hirano M. Clinical features and prognosis of de novo diffuse large B-cell lymphoma with t(14;18) and 8q24/c-MYC translocations. : *Leukemia.* 2009 Jan 8[Epub ahead of print]

学会発表

- 1) N Niitsu, M Okamoto, I Miura, M Hirano, Clinical features and prognosis of diffuse large B-cell lymphoma with t(14;18) and 8q24 translocations. 10th International Conference on Malignant Lymphoma. 2008.6. Lugano, Switzerland.
- 2) N Niitsu, M Okamoto, M Bessho, I Miura Clinical features and prognosis of diffuse large B-cell lymphoma with t(14;18) and 8q24/c-MYC translocation. *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)*, Nov 2008.
- 3) 新津望, 岡本昌隆, 萩原由貴, 田苗健, 田丸淳一, 中峯寛和, 中村直哉, 平野正美. 乳腺原発びまん性大細胞型B細胞性リンパ腫30例の臨床病理学的検討. 第45回癌治療学会総会. 2007.10. 京都.
- 4) 新津望, 岡本昌隆, 萩原由貴, 田苗健, 中峯寛和, 角純子, 平野正美. Hodgkinリンパ腫における細胞質内nm23-H1の検討. 第105回日本内科学会講演会. 2008.4. 東京.
- 5) N Niitsu, M Okamoto, H Nakamine, J-I Tamaru, T Yoshino, M Hirano. A clinicopathological study of nm23-H1 expression in classical Hodgkin lymphoma. 第67回日本癌治療学会学術総会. 名古屋2008.10.
- 6) 新津望, 萩原由貴, 田苗健, 岡本昌隆, 田丸淳一, 吉野正, 中峯寛和. 末梢性T細胞リンパ腫における細胞質内nm23-H1の臨床的意義. 第46回日本癌治療学会総会. 名古屋2008.10.