

報告書

平成17年度 丸木記念特別奨学研究費B 研究実績報告書

悪性リンパ腫における新規予後因子nm23の発現動態の検討

受賞者 新津 望 (埼玉医科大学血液内科)

1. はじめに

nm23 遺伝子は、癌の転移に関係する遺伝子変化を見いだす中で differential hybridization 法を用いて1988年 Steegらによって発見された¹⁾。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、最初のがん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、G 蛋白調節および微小管機能調節などの機能があることが判明した (図1)。埼玉がんセンターの角ら²⁾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 蛋白と同一のものであることを見出した。nm23 の主な生化学的機能は NDPK 活性であり、NDPK は生理的条件下では ATP を燐酸基供与体としてリボおよびデオキシリボ体 NDP から対応する NTP を生成し、それらは核酸の構成要素として、多糖類/磷脂質の前駆体の活性化因子として、さらに蛋白合成、微小管合成やシグナル伝達系における調節因子として広汎な生体反応に利用される。また、nm23 遺伝子は高等動物細胞のみならず原核細胞に至るまで広く生物界に分布しているハウスキーピング遺伝子であり、現在までにヒトでは8つの nm23 アイソフォーム (nm23-H1, nm23-H2, DR-nm23, nm23-H4, nm23-H5, nm23-H6, nm23-H7 および nm23-H8) が報告されている。しかし未だ nm23-H1, -H2 以外の遺伝子産物は本来の機能は明らかになっていない。nm23-H1 と nm23-H2 は第17染色体 (17q21) に位置し、88% の相同性を有する。これら2つのアイソフォームは5つのエクソンと4つのイントロンによって構成され、それぞれが同一染色体上でタンデムに配列している。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と、一方神経芽細胞腫、大腸癌、膵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。我々は、血清 nm23-H1 の ELISA 法による測定系を作成し³⁻⁵⁾、非ホジキンリンパ腫 (NHL) 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。今回は、血清、細胞表面、細胞質内 nm23-H1 と NHL との関係を検討し、予後との関係、および細胞内局在などを中心に検討した。

2. 血清 nm23-H1 と予後との関係

血清 nm23-H1 は、びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫 (DLBCL)、末梢 T 細胞性リンパ腫 (PTCL) および成人 T 細胞性白血病/リンパ腫 (ATLL) で正常対照 (3.89 ± 4.06 ng/mL) より有意に高値を示した。DLBCL および PTCL について生存率、progression-free survival (PFS) を検討したが、nm23-H1 が 80 ng/mL 以上の症例で 80 ng/mL 未満の症例に比し、有意に予後不良であった。また、現在非ホジキンリンパ腫の予後予測因子として広く使われている国際予後因子 (IPI) の4つのリスク群に分け検討したが、生存率、PFS 共にすべてのリスク

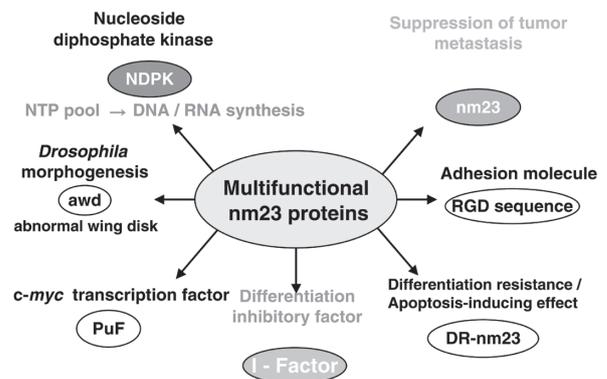


図1. nm23 遺伝子の多彩な機能。

群でnm23-H1高値群は予後不良であった(図2). このように血清nm23-H1が, 非ホジキンリンパ腫において新しい優れた予後不良因子となることを報告してきた³⁻⁵. 血清nm23-H1の長所としては, 1) nm23-H1は比較的安定な蛋白であるため, その血清レベルを容易に測定できる, 2) 少量の血清で短時間に測定可能であるため, 治療開始前に結果を得ることが出来る, 一方短所としては, 1) 溶血検体では測定値が高くなる可能性がある, 2) H1以外のnm23の予後因子としての関与は今のところ不明である, などが挙げられる.

3. 細胞表面nm23-H1

nm23の大部分は細胞質に存在し, 少数が細胞核, ミトコンドリア, 細胞膜にも結合している. 血清nm23-H1はリンパ腫細胞が直接産生しているかどうかは不明であるが, リンパ腫の予後を反映している事より病態に関与していると考えられる. そのため, 次にリンパ腫細胞表面のnm23-H1蛋白の臨床的意義を検討するためにフローサイトメトリー法により測定し, 血清中nm23-H1との関係, 予後などについて検討した⁶. 108例中28例(25.9%)に20%以上の細胞表面nm23-H1蛋白の発現を認め, 特にPTCL($26.9 \pm 21.02\%$; $p < 0.01$), extranodal NK/T cell lymphoma($46.04 \pm 37.77\%$; $p < 0.001$)で高い発現を認めた(表1). 細胞表面nm23-H1発現と血清nm23-H1との間に有意な相関を認めた($r = 0.531$, $p < 0.0001$)が, 細胞表面nm23-H1と血清LDH, 血清sIL-2Rの間には相関を認めなかった. また, 細胞表面nm23-H1発現レベルが高い症例では低い症例に比し生存率, PFSが有意に低率であった. 次に細胞表面nm23-H1と血清nm23-H1の組み合わせによる生存率を検討した. 細胞表面と血清nm23-H1共に低値(Group A: $n = 64$), 細胞表面あるいは血清nm23-H1のどちらかが高値(Group B: $n = 11$), 細胞表面と血清nm23-H1共に高値(Group

C: $n = 6$)の3群に分けて検討した. Group A, B, およびCの生存率はそれぞれ78.6, 49.7, 0%であり, Group Cが有意に予後不良であった($p = 0.0001$). 以上より, 細胞表面nm23-H1も血清nm23-H1同様NHLの治療戦略を考える上で, 有用な予後因子となりうる可能性が示唆された. しかし, nm23蛋白が細胞表面に発現する分子学的機序は未だ不明である. nm23にはインテグリンファミリーが認識するRGDシーケンスが認められており, nm23は接着リガンドとしての機能とともにサイトカイン様に分泌されて機能する可能性が示唆されている. また, 血清と細胞表面nm23-H1が相関していることより, 一部は細胞表面のnm23-H1が血清に認められている可能性が示唆された. また, 細胞表面に発現しているnm23-H1が, 全長なのか一部分なのか, またもし部分的ならどの部分が残っているのかが大変興味深く, 今後の検討の余地があると考えられる. また, 臨床的所見と細胞表面nm23-H1との検討では, 血清中nm23-H1の結果と同様に病期と相関していることにより, 細胞表面nm23-H1もリンパ腫の進展に関与している可能性が示唆された. また, 完全寛解となった症例では低発現であり, 治療の反応性にも関与していると考えられた.

4. 免疫組織染色による細胞質内nm23-H1発現の検討

上記のように血清および細胞表面nm23-H1がNHLの予後因子となることが示唆されたが, 未だ悪性リンパ腫における血中nm23-H1蛋白の機能については不明な点が多い. そのため, 悪性リンパ腫細胞におけるnm23-H1蛋白発現とその細胞内局在を明らかにし, 悪性リンパ腫におけるnm23-H1の機能を解析する必要がある. 最近その機能解析の一貫として, PTCL例の病理組織標本を使いnm23-H1の免疫組織化学的検索を行い^{7, 8}, 予後および血清nm23との関係を検討したため, 以下にその概略を述べる. 反

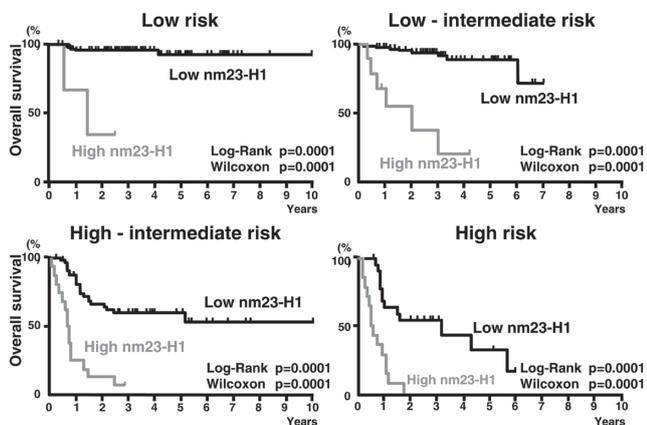


図2. びまん性大細胞型B細胞性リンパ腫における国際予後分類別の血清nm23-H1の生存曲線.

表1. 非Hodgkinリンパ腫における細胞表面nm23-H1の検討

| | No. of patients | Surface nm23-H1 (Mean±SD) % |
|-------------------------------------|-----------------|-----------------------------|
| B-cell neoplasms | | |
| B-cell chronic lymphocytic leukemia | 3 | 9.03 ± 7.70 |
| MALT-type lymphoma | 3 | 3.73 ± 1.87 |
| Mantle-cell lymphoma | 5 | 14.80 ± 5.56 |
| Follicular lymphoma | 13 | 4.79 ± 2.16 |
| Diffuse large B-cell lymphoma | 55 | 15.81 ± 11.96 |
| T- / NK-cell neoplasms | | |
| Peripheral T-cell lymphoma | 18 | 26.90 ± 21.02 * |
| Anaplastic large-cell lymphoma | 2 | 8.25 ± 0.50 |
| Extranodal NK- / T-cell lymphoma | 6 | 46.4 ± 37.77 *** |
| Adult T-cell lymphoma / leukemia | 3 | 20.77 ± 15.46 |
| Reactive hyperplasia | 7 | 2.96 ± 1.14 |

* : $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

応性リンパ節組織におけるnm23-H1発現は、リンパ濾胞の胚中心領域および拡大した濾胞間領域に着色がみられる。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。次に、T細胞性およびNK細胞性リンパ腫における細胞質内nm23-H1発現を検討した。対象は成人リンパ腫治療研究会に1997年から2002年までの間に連続的に登録された未治療NHL381例で、そのうちT/NK細胞性137例である。男性97例、女子40例、年齢中央値60歳であった。nm23-H1の発現は、免疫組織化学染色により検討した。その結果、137例中55例(36.5%)に陽性であり、病理組織型別の検討ではPTCL-非特定(PTCL-U)38.3%、未分化大細胞リンパ腫(ALCL)50%、血管免疫芽球性T細胞性リンパ腫(AILD)31.8%、NK細胞性リンパ腫57.1%、ATLL31.8%に陽性であった。T細胞性リンパ芽球性リンパ腫および皮膚T細胞性リンパ腫では、nm23-H1は全例陰性であった。これからの解析は、PTCL-U,ALCL,AILDの81例(以下PTCLとする)について検討した。年齢、PS、血清LDH値、病期およびIPIと、nm23-H1発現との間に相関を認めなかったが、bulky massを有する症例($p=0.046$)およびB症状を有する症例($p=0.039$)で、有意にnm23-H1発現が高率であった。また、81例中66例(81.5%)が完全寛解(CR)となったが、CRとなった症例のnm23-H1陽性率は33.4%、CRとならなかった症例の陽性率は60%であり、CRとならなかった症例で有意にnm23-H1陽性率が有意に高率であった($p=0.028$)。図3Aに示すように、細胞質内nm23-H1が陽性であった症例の4年生存率は21.9%、陰性であった症例のそれは83.9%と細胞質内nm23-H1が陽性であった症例は、有意に予後不良であった。また無病生存率(DFS)に関する検討では、nm23-H1陽性例の2年DFSは9.6%、陰性例は70%と有意に陽性例の方が予後不良であった(図3B)。次にnm23-H1と細胞障害性蛋白であるTIA-1を組み合わせ検討した。生存率は、nm23+/TIA-1+13.8%、nm23+/TIA-1-50%、nm23-/TIA-1+64.1%、nm23-/TIA-1-100%と両者が陽性の群が、どちらか一方が陽性の群より有意に予後不良であった(図4A)。

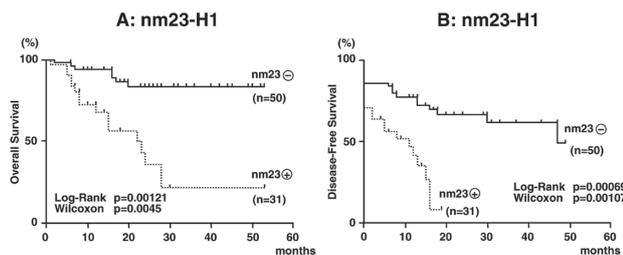


図3. 末梢T細胞性リンパ腫における細胞質内nm23-H1と予後との関係。

DFSも同様にnm23-H1とTIA-1の両者が陽性の群が、どちらか一方が陽性の群より有意に予後不良であった(図4B)。そのため、この2つのマーカーを組み合わせ予後を判定することは、治療戦略を考える上でも有用と考えられた。また、単変量解析では、年齢、PS、病期、IPI、TIA-1、細胞質内nm23-H1が有意な予後因子となり、それらの因子による多変量解析では細胞質内nm23-H1が有意な独立した予後因子となった。

5. 非ホジキンリンパ腫の層別化治療に対するnm23-H1の有用性の検討

今までは初発例を対象に予後因子の検討を行ってきた。本年度は、65歳から79歳までの再発性、難治性び慢性大細胞型B細胞リンパ腫に対して、リツキシマブ併用化学療法を行ない、治療前後で血清nm23-H1値を測定した⁹⁾。治療前血清nm23-H1が高値であった症例で、有意に予後不良であった。また、治療前の血清nm23-H1は、 39.4 ± 41.3 ng/mlと増加していたが、CR例では全例感度以下となった。このため、血清nm23-H1はリツキシマブ併用化学療法に関しても予後因子となる可能性が示唆された。また、CRとなった症例はすみやかに血清nm23-H1値が低下し、CRとならなかった症例では低下を認めなかった。また、再発の予知にも使用できると考えられた。

おわりに

非ホジキンリンパ腫の治療方法は、病理組織型により細分化されてきている。また、同じ組織型の中でも「不均一」な病態を予後が異なることがわかってきた。そのため、予後因子別に治療戦略を決定する必要がある。今回の検討で、血清、細胞表面nm23-H1に加えて、細胞質内nm23-H1もNHLに対する有意な予後因子であることが判明した。免疫染色によるnm23-H1蛋白の検討は比較的簡便に短時間で行うことが出来、またリンパ節のなま検体がなくとも検討できるため、リンパ腫の診断を行うと同時に全症例で検索が可能である。そのため、血清保存やリンパ組織の再生検なども必要がない。しかし、陽性・陰性という定性的な判定

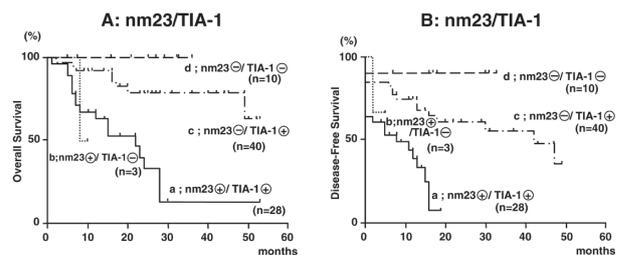


図4. 末梢T細胞性リンパ腫における細胞質内nm23-H1とTIA-1と予後との関係。

しか行えなく、経過を観察することは難しい。よって、血清の採取可能な症例は血清 nm23-H1 を測定し、今後は細胞表面および細胞質内 nm23-H1 を組み合わせることにより、より有用な予後因子を検討すると共に、nm23-H1 のリンパ腫細胞における局在、機能などを検討し、nm23 過剰発現を標的とした新しい治療方法の開発への発展が期待される。

文 献

- 1) 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.
- 2) 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.
- 3) Niitsu N, Okabe-Kado J, Nakayama M, et al. Plasma levels of the differentiation inhibitory factor nm23-H1 protein and their clinical implications in acute myelogenous leukemia *Blood* 2000;96:1080-6.
- 4) Niitsu N, Okamoto M, Okabe-Kado J, et al. Serum nm23-H1 protein as a prognostic factor for indolent non-Hodgkin's lymphoma. *Leukemia*.2001;15:832-9.
- 5) Niitsu N, Okabe-Kado J, Okamoto M, et al. Serum nm23-H1 protein as a prognostic factor in aggressive non-Hodgkin lymphoma. *Blood* 2001;97:1202-10.
- 6) Niitsu N, Honma Y, Iijima K, et al. 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, et al. Expression of nm23-H1 is associated with poor prognosis in peripheral T-cell lymphoma. *Br J Haematol* 2003;123:621-30.
- 8) Niitsu N, Nakamine H, Okamoto M, et al. Clinical Significance of Intracytoplasmic nm23-H1 Expression in Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Clin Cancer Res* 2004;10:2482-90.
- 9) Niitsu N, Kohuri M, Higashihara M, Bessho M. Phase II study of the CPT-11, mitoxantrone and dexamethasone regimen in combination with rituximab in elderly patients with relapsed DLBCL. *Cancer Society* 2006;97:933-7.