

学 位 論 文 要 旨

氏 名 横 山 真 喜



論 文 題 目

CD109, a negative regulator of TGF- β signaling, is a putative risk marker in diffuse large
B-cell lymphoma

(CD109 はびまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫の予後予測因子である)

指 導 教 授 承 認 印

鈴木隆浩



CD109, a negative regulator of TGF- β signaling, is a putative risk marker in diffuse large B-cell lymphoma

(CD109 はびまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫の予後予測因子である)

氏 名 横 山 真 喜

(以下要旨本文)

【背景と目的】

CD109 は細胞表面に存在する GPI (glycosylphosphatidylinositol) アンカー型糖タンパク質で、 $\alpha 2$ マクログロブリン/C3, C4, C5 ファミリーに属している。CD109 は正常細胞では乳腺・唾液腺の筋上皮細胞、気管支上皮の基底細胞など、限られた細胞でのみ発現を認めるのに対して、肺や食道などの扁平上皮癌をはじめ、種々の悪性腫瘍で高発現が認められている。また、CD109 は TGF- β シグナルの抑制因子としての機能を持つことが明らかになっており、この TGF β シグナルは発癌メカニズムに関与することから CD109 発現と腫瘍の発生、進展との関連が注目されている。CD109 は当初、急性白血病細胞株の細胞膜表面抗原として報告され、その後、造血幹細胞の表面マーカーとして研究されてきたが、造血系腫瘍における CD109 の役割はほとんど解明されていない。

びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫(DLBCL)は成人の非ホジキンリンパ腫の 40-50% を占める最も頻度の高い疾患である。DLBCL をはじめとする中悪性度非ホジキンリンパ腫の標準治療としてリツキシマブが導入されてから治療成績は飛躍的に向上したものの、依然として再発・難治症例も 40% 近く存在し、これらを層別化しうる予後因子が探索されている。従来の予後予測モデルである R-IPI はリツキシマブ併用の DLBCL 症例を 3 群に層別化することができるが、一番予後不良の群である poor 群においても 4 年全生存率は 55% であり、予後不良群のより細かな層別化が課題となっている。免疫染色により non-GCB type と GCB type に分類する Hans algorithm においては GCB type は IPI とは独立した予後良好因子であることが示されていたが、リツキシマブ併用症例ではその有用性が失われつつある。従って、リツキシマブ時代における DLBCL の新たな予後因子の確立が求められている。

本研究では DLBCL における CD109 の発現・予後解析を行い、予後不良群を層別化する新たな予後因子としての可能性につき検討した。また、造血系腫瘍細胞株での CD109 発現の検討と B 細胞腫瘍細胞株における CD109 発現の TGF- β シグナルへの影響の検討を行った。

【対象と方法】

【免疫染色】

2005 年から 2012 年の間に北里大学病院で初発 DLBCL と診断され、R-CHOP 療法が施

行された 84 症例の生検・手術検体のホルマリン固定パラフィン包埋切片を用いて CD109 免疫染色を施行し、また患者の臨床病理学的情報を用いて解析を行った。

CD109 の発現強度は、陽性コントロールとして血管内皮細胞を基準として、腫瘍細胞において血管内皮細胞と同等以上の発現を認めるものを発現強度 2、血管内皮細胞よりも発現が弱いものを発現強度 1、陰性のものを発現強度 0 と評価した。

【統計解析】

CD109 の発現と臨床病理学的因子の統計学的有意差検定は Fisher の直接確率検定で解析した。生存率は Kaplan-Meier 法で算出し、Log-rank 法で有意差検定を行った。いずれの検定も、 $p < 0.05$ をもって有意差ありと判定した。

【結果】

造血系腫瘍細胞株 12 種類につき western blotting で CD109 の発現を検討し 6 細胞で CD109 の発現を認めた。このうち 2 つが B 細胞腫瘍の細胞株だった。正常 B リンパ球では CD109 の発現を認めないことから B 細胞腫瘍での CD109 発現に注目し、B 細胞腫瘍の中でも頻度の高い DLBCL の細胞株 4 種で CD109 の発現を確認したところ、発現量は様々だがすべての細胞株で CD109 の発現が確認された。そこで DLBCL の患者組織検体を用いた検討を行うことにした。

DLBCL84 症例の発症年齢の中央値は 64 歳(19-84 歳)で、男性 47 名で女性は 37 名だった。56 症例が節性病変で 28 症例が節外性病変である。R-IPI により 2 群に分類すると、41 症例は R-IPI-Good (R-IPI スコア: 0-2)で、43 症例が R-IPI-Poor (R-IPI スコア: 3-5)であり、両群間で全生存率に有意差を認めた [$P = 0.02$, Hazard Ratio (HR) 2.61, 95% confident interval (95% CI) 1.21-5.93]。Hans 分類では GCB type が 38 症例、non-GCB type が 46 症例で、2 群間における全生存率に有意差は認められなかった [$P = 0.97$, HR 1.01, 95% CI 0.46-2.25]。

この 84 症例と正常リンパ節 6 症例につき CD109 免疫染色を行ったところ、腫瘍細胞では細胞質および細胞膜に染色が認められ、一方正常リンパ節では胚中心の細胞を含め、いずれも陰性だった。染色強度については前述のとおり評価し、11 症例は染色強度 0、20 症例は染色強度 1、53 症例は染色強度 2 との結果だった。これらを染色強度により 2 群に分類し、染色強度 0, 1 の 31 症例 (37%)を CD109-low 群、染色強度 2 の 53 症例 (63%)を CD109-high 群とした。CD109 発現と有意な相関を認める臨床病理学的因子はなかった。

次に全生存率について Kaplan-Meier 法で算出し Log-rank 検定で統計的有意差検定を行ったところ、CD109-high 群と CD109-low 群間に統計学的有意差は認められなかった [$P = 0.17$, HR 1.80, 95% CI 0.79-3.93]。しかし、CD109-high 群は初期での死亡例が多いことに着目し、1 年生存率について Kaplan-Meier 法で評価すると、CD109-high 群は有意に 1 年生存率が低いことが明らかとなり [$P = 0.01$, HR 8.70, 95% CI 1.39-12.1]、2 年生存率についても CD109-high 群の生存率が低い傾向が認められた [$P = 0.054$, HR 2.53, 95% CI 0.99-5.27]。DLBCL における代表的な予後予測モデルである R-IPI や Hans 分類は、本研究のコホートでは 1 年生存率や 2 年生存率といった早期死亡を来す予後不良群の抽出をす

ることはできず、この点で CD109 は DLBCL において早期死亡を来す予後不良群を抽出する予後因子となる可能性があると考ええる。

さらに、CD109 発現と R-IPI スコアを組み合わせることで評価したところ、R-IPI-poor 群の中で CD109-high のサブグループは、その他のサブグループと比べて特に予後不良であることがわかった。CD109 発現の評価により R-IPI 単独での予後不良群の層別化と比べてより予後不良な一群の抽出が可能になると考える。

これまでの報告で CD109 は TGF- β シグナルを負に制御することが明らかになっているが、B 細胞腫瘍における CD109 と TGF- β シグナルの関係性はどうか。我々は B リンパ芽球性リンパ腫／白血病の細胞株である Nalm6 を用いて CD109 ノックダウン細胞を作成し、TGF- β 1 で刺激し TGF- β シグナルの下流にある Smad2 のリン酸化の経時的変化を western blotting で評価した。CD109 ノックダウン細胞では TGF- β 1 で刺激した 6 時間後、8 時間後まで Smad2 のリン酸化が確認でき、コントロール細胞に比べてシグナルが遅延していることが明らかになった。これにより CD109 は Nalm6 においても TGF- β シグナルを負に制御することが確認された。

【考察】

本研究において、正常リンパ球では CD109 の発現は認めなかったが DLBCL では 63% の症例で CD109 高発現を認めた。CD109-high 群は全生存率において統計的有意差は得られなかったが、1 年生存率は有意に低く、CD109 は DLBCL において早期死亡を来す予後不良群を層別化しうる予後因子である可能性が示唆された。さらに R-IPI スコアと CD109 発現を組み合わせることで評価したところ、R-IPI-poor かつ CD109-high のサブグループの全生存率がその他のグループと比べ有意に低いことが判明した。CD109 発現を評価することにより、従来の R-IPI 単独での予後予測よりもさらに詳細なリスク評価が可能と考える。

CD109 高発現が腫瘍の発生や進展に影響を与えるメカニズムの一つとして、TGF- β シグナルを負に制御する機能が考えられる。TGF- β は細胞増殖、細胞死、線維化、免疫調節など様々な生理作用を持ち、腫瘍促進的にも抑制的にも作用する多機能なサイトカインであるが、B 細胞腫瘍において TGF- β は腫瘍増殖を抑制することが知られており、DLBCL において TGF- β 受容体 II の高発現が予後良好因子となるとの報告もある。我々は B 細胞腫瘍細胞株においても CD109 が TGF- β シグナルを負に制御することを確認したが、CD109 が TGF- β シグナルを減弱し、悪性リンパ腫の腫瘍増殖が制御不能となった結果、予後不良の臨床症状を来す可能性が示唆された。

【結語】

CD109 高発現は DLBCL において早期死亡を来す予後不良群を抽出する予後因子であり、また R-IPI と組み合わせることで、よりハイリスクな一群の抽出が可能となる。