

平成28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

- 事業名： (日本語) 革新的がん医療実用化研究事業
(英語) Practical Research for Innovative Cancer Control
- 研究開発課題名： (日本語) RNA絶対定量による微小環境解析に基づくびまん性大細胞型
B細胞性リンパ腫の層別化および新規治療法の開発
(英語) The exploration of new prognostic stratification and therapeutic
targets in diffuse large B-cell lymphoma by RNA expression analysis
of lymphoma microenvironment
- 研究開発担当者 (日本語) 大学院医学研究院 教授 赤司 浩一
所属 役職 氏名： (英語) Kyushu University, Professor Koichi Akashi
- 実施期間： 平成28年4月1日 ～ 平成29年3月31日
- 分担研究 (日本語) DLBCLにおける予後予測のための層別化キットの開発
開発課題名： (英語) Development of a new assay kit to predict survival in DLBCL
- 研究開発分担者 (日本語) 久留米大学病理学教室 教授 大島 孝一
所属 役職 氏名： (英語) Kurume University, Professor Koichi Ohshima
分担研究 (日本語) 中央病理診断、および蛋白発現解析
開発課題名： (英語) Central review of pathological diagnosis and protein expression
analysis in DLBCL
- 研究開発分担者 (日本語) 九州大学病院血液腫瘍心血管内科 講師 加藤 光次
所属 役職 氏名： (英語) Kyushu University Hospital, Lecturer Koji Kato
分担研究 (日本語) nCounter system(NCS)によるRNA発現解析および統計解析
開発課題名： (英語) RNA expression analysis by nCounter system and statistical analysis
in DLBCL

II. 成果の概要（総括研究報告）

（和文）

A. DLBCL 保存検体の RNA 絶対定量解析：

びまん性大細胞型 B 細胞性リンパ腫 (diffuse large B-cell lymphoma: DLBCL と略) 40 症例を対象に、新規核酸定量システム nCounter system (NCS) を用いた予備検討を実施、あわせて、RNA シークエンスを用いた網羅的トランスクリプトーム解析を新たに行った。予備検討で抽出されていた微小環境関連遺伝子に加えて、計 200 種類の予後を規定しうる遺伝子が抽出された。

これら 200 種類の予後規定候補遺伝子の validation として、中央病理診断された DLBCL 200 症例に対して、NCS を用いた RNA 定量解析を進めた。得られた RNA 定量データと臨床情報を照合、その発現レベルがより生存期間予測に寄与する可能性がある遺伝子を 30 個同定した。これらの予後規定遺伝子の多くは T 細胞関連遺伝子 (ICOS, IL-21, CD40LG, SLAMF1, CCR4) やマクロファージ関連遺伝子 (ITGAX) 等の微小環境因子であり、この結果は前年度に行った予備検討と一致した。さらに、新たな予後規定因子として long non-coding RNA (lncRNA) が同定された。

B. 予後予測遺伝子の決定とそのメカニズムの解明：

上記で同定された予後規定分子が、リンパ腫微小周囲環境を構成するどの細胞集団で発現しているかを検討するため、新規高感度シングルセル RNA 増幅システム C1 および、多重蛍光免疫染色を用いた組織サイトメトリー Mantra system を導入した。検討の結果、予後良好 DLBCL 患者群で抽出された予後規定分子の多くが、follicular helper T cell や CD68 陽性マクロファージ、FGFR1 陽性間質細胞で発現されており、これらの微小周囲環境の破綻が予後不良な臨床経過に深く関与している可能性が明らかになった。さらに、上記で検討した DLBCL の FFPE 検体から DNA を抽出、現在リンパ腫自体に存在するゲノム変異解析を行っている。これらの腫瘍細胞の遺伝子変異と NCS で得られた微小環境関連の遺伝子発現データをあわせて解析することで、遺伝子変異の蓄積を規定する微小環境側の因子を同定することを目指す。

本プロジェクトの目的は、DLBCL の予後規定因子の同定に加えて、治療標的候補を探索することにある。強力な予後規定因子として新たに同定された lncRNA については、その細胞生存や遺伝子発現に与える影響を調べるため、DLBCL のセルラインを用いた *in vitro* でのノックダウン・過剰発現の実験系の確立を行なっている。さらに、予後不良因子として抽出された分子に対する阻害剤を入手し、同薬剤の細胞増殖抑制効果を *in vitro* において確認した。今後、患者検体を免疫不全マウスに移植する *in vivo* 疾患モデル (Patient-derived xenograft) を用いて、その効果を検証する。

（英文）

A. To determine new prognostic factors in patients with diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) by quantitative RNA analysis:

In the preliminary analysis of 40 patients with DLBCL by the nCounter system (NCS), we found that lymphoma microenvironment-related genes were highly associated with prognosis of DLBCL. To further evaluation, we performed RNA-sequencing (RNA-seq) for comprehensive transcriptome analysis and consequently about 200 candidate genes were detected.

To validate these candidate genes, we performed RNA expression analysis by the NCS in 200 patients with DLBCL. Among the 200 genes, 30 genes were associated with prognosis. Particularly, lymphoma microenvironment-related genes such as T-cell (ICOS, IL-21, CD40LG, SLAMF1, CCR4) and

macrophage (ITGAX) were highly associated with prognosis of DLBCL, which are in agreement with the results of the preliminary analysis. Several long non-coding RNA (lncRNA) were also identified as significant predictors for survival.

B. To identify new therapeutic targets in patients with DLBCL:

To investigate which cell subsets in lymphoma microenvironment are related to these prognostic genes, we used the C1 system for RNA analysis of single cell and the Mantra system for multiple immunochemical staining. In patients who had better survival, prognostic genes and proteins expressed on follicular helper T-cells, CD68-positive macrophages, and FGFR1-positive stromal cells. These data suggest that lymphoma microenvironment may play an important role in survival of patients with DLBCL. Further analysis of genome mutations in lymphoma cells by DNA-sequencing has been ongoing to clarify the relationship between lymphoma cells and lymphoma microenvironment cells.

In addition to determine new prognostic factors in DLBCL, the aim of the present study is to explore new therapeutic targets. We have advanced the present study how the candidate genes and lncRNA affect on differentiation and survival of lymphoma cell, and whether these genes are possible therapeutic targets as well as prognostic factors. Efficacy of inhibitors against these genes, on which expressed in DLBCL patients with poor prognosis, has been testing not only in vitro but also in vivo using patient-derived xenograft.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国際誌 16 件）

1. Sugio T, Kato K, Aoki T, Ohta T, Saito N, Yoshida S, Kawano I, Henzan H, Kadowaki M, Takase K, Muta T, Miyawaki K, Yamauchi T, Shima T, Takashima S, Mori Y, Yoshimoto G, Kamezaki K, Takenaka K, Iwasaki H, Ogawa R, Ohno Y, Eto T, Kamimura T, Miyamoto T, Akashi K. Mogamulizumab treatment prior to allogeneic hematopoietic stem cell transplantation induces severe acute graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2016; 22: 1608-14.
2. Yurino A, Takenaka K, Yamauchi T, Nunomura T, Uehara Y, Jinnouchi F, Miyawaki K, Kikushige Y, Kato K, Miyamoto T, Iwasaki H, Kunisaki Y, Akashi K. Enhanced Reconstitution of Human Erythropoiesis and Thrombopoiesis in an Immunodeficient Mouse Model with Kit (Wv) Mutations. *Stem Cell Reports*. 2016; 7: 425-38.
3. Miyoshi H, Kiyasu J, Kato T, Yoshida N, Shimono J, Yokoyama S, Taniguchi H, Sasaki Y, Kurita D, Kawamoto K, Kato K, Imaizumi Y, Seto M, Ohshima K. PD-L1 expression on neoplastic or stromal cell is respectively poor or good prognostic factor for adult T-cell leukemia/lymphoma. *Blood*. 2016; 128: 1374-81.
4. Fuji S, Inoue Y, Utsunomiya A, Moriuchi Y, Uchimaru K, Choi I, Otsuka E, Henzan H, Kato K, Tomoyose T, Yamamoto H, Kurosawa S, Matsuoka K, Yamaguchi T, Fukuda T. Pretransplant

- anti-CCR4 antibody mogamulizumab against ATLL is associated with significantly increased risks of severe and steroid-refractory GVHD, non-relapse mortality and overall mortality. *J Clin Oncol*. 2016; 34: 3426-33.
5. Daitoku S, Takenaka K, Yamauchi T, Yurino A, Jinnouchi F, Nunomura T, Eto T, Kamimura T, Higuchi M, Harada N, Saito N, Miyamoto T, Iwasaki H, Akashi K. Calreticulin mutation does not contribute to disease progression in essential thrombocythemia by inhibiting phagocytosis. *Exp Hematol*. 2016; 44: 817-25.
 6. Tominaga K, Shimamura T, Kimura N, Murayama T, Matsubara D, Kanauchi H, Niida A, Shimizu S, Nishioka K, Tsuji EI, Yano M, Sugano S, Shimono Y, Ishii H, Saya H, Mori M, Akashi K, Tada KI, Ogawa T, Tojo A, Miyano S, Gotoh N. Addiction to the IGF2-ID1-IGF2 circuit for maintenance of the breast cancer stem-like cells. *Oncogene*. 2016; 36: 1276-86.
 7. Tsuzuki H, Arinobu Y, Miyawaki K, Takaki A, Ota SI, Ota Y, Mitoma H, Akahoshi M, Mori Y, Iwasaki H, Niino H, Tsukamoto H, Akashi K. Functional interleukin-33 receptors are expressed in early progenitor stages of allergy-related granulocytes. *Immunology*. 2016; 150: 64-73.
 8. Hisamoto S, Shimoda S, Harada K, Iwasaka S, Onohara S, Chong Y, Nakamura M, Bekki Y, Yoshizumi T, Ikegami T, Maehara Y, He XS, Gershwin ME, Akashi K. Hydrophobic bile acids suppress expression of AE2 in biliary epithelial cells and induce bile duct inflammation in primary biliary cholangitis. *J Autoimmun*. 2016; 75: 150-60.
 9. Takenaka K, Shimoda K, Uchida N, Shimomura T, Nagafuji K, Kondo T, Shibayama H, Mori T, Usuki K, Azuma T, Tsutsumi Y, Tanaka J, Dairaku H, Matsuo K, Ozawa K, Kurokawa M, Arai S, Akashi K. Clinical features and outcomes of patients with primary myelofibrosis in Japan: report of a 17-year nationwide survey by the Idiopathic Disorders of Hematopoietic Organs Research Committee of Japan. *Int J Hematol* 2016; 105: 59-69.
 10. Shimoji S, Hashimoto D, Tsujigiwa H, Miyawaki K, Kato K, Takahashi S, Ogasawara R, Jiromaru T, Iwasaki H, Miyamoto T, Akashi K, Teshima T. Graft-versus-host disease targets ovary and causes female infertility in mice. *Blood*. 2017; 129: 1216-25.
 11. Kurita D, Miyoshi H, Yoshida N, Sasaki Y, Kato S, Niino D, Sugita Y, Hatta Y, Takei M, Makishima M, Ohshima K. A Clinicopathologic Study of Lennert Lymphoma and Possible Prognostic Factors: The Importance of Follicular Helper T-cell Markers and the Association With Angioimmunoblastic T-cell Lymphoma. *Am J Surg Pathol*. 2016; 40: 1249-60.
 12. Horlad H, Ohnishi K, Ma C, Fujiwara Y, Niino D, Ohshima K, Jinushi M, Matsuoka M, Takeya M, Komohara Y. TIM-3 expression in lymphoma cells predicts chemoresistance in patients with adult T-cell leukemia/lymphoma. *Oncol Lett*. 2016; 12: 1519-24.
 13. Kishimoto W, Nishikori M, Arima H, Miyoshi H, Sasaki Y, Kitawaki T, Shirakawa K, Kato T, Imaizumi Y, Ishikawa T, Ohno H, Haga H, Ohshima K, Takaori-Kondo A. Expression of Tim-1 in primary CNS lymphoma. *Cancer Med*. 2016; 5: 3235-45.
 14. Shimono J, Miyoshi H, Seto M, Teshima T, Ohshima K. Clinical features of diffuse large B-cell lymphoma with polyploidy. *Pathol Int*. 2017; 67: 17-23.

15. Satou A, Asano N, Kato S, Elsayed AA, Nakamura N, Miyoshi H, Ohshima K, Nakamura S. Prognostic Impact of MUM1/IRF4 Expression in Burkitt Lymphoma (BL): A Reappraisal of 88 BL Patients in Japan. Am J Surg Pathol. 2017; 41: 389-95.
16. Nguyen TB, Sakata-Yanagimoto M, Asabe Y, Matsubara D, Kano J, Yoshida K, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Miyano S, Izutsu K, Nakamura N, Takeuchi K, Miyoshi H, Ohshima K, Minowa T, Ogawa S, Noguchi M, Chiba S. Identification of cell-type-specific mutations in nodal T-cell lymphomas. Blood Cancer J. 2017; 7: e516.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. ヒト白血病幹細胞研究の進歩, 口頭, 赤司浩一, 第 51 回日本血液学会春季北海道地方会, 2016/4/9, 国内.
2. ヒト白血病幹細胞研究の進歩, 口頭, 赤司浩一, 第 20 回日本がん分子標的治療学会学術集会, 2016/5/31, 国内.
3. A TIM-3/Gal-9 autocrine stimulatory loop drives self-renewal of human myeloid leukemia stem cells and leukemic progression, 口頭, 赤司浩一, THE 41st NAITO CONFERENCE, 2016/7/6, 国内.
4. TIM-3 and Its Ligand, Galectin-9, Constitute an Autocrine Loop Universally Critical for Development of Human Myeloid Leukemia Stem Cells 口頭, 赤司浩一, JCA-AACR Special Joint Conference, 2016/7/14, 国内.
5. ヒト白血病幹細胞研究の進歩, 口頭, 赤司浩一, 第 26 回日本サイトメトリー学会学術集会, 2016/7/23, 国内.
6. TIM-3/Galectin-9 axis is a potential therapeutic target for human myeloid leukemia stem cells (ヒト白血病幹細胞研究の進歩), 口頭, 赤司浩一, 第 14 回日本臨床腫瘍学会学術集会, 2016/7/29, 国内.
7. 幹細胞コンセプト導入による造血器腫瘍根治への挑戦, 口頭, 赤司浩一, 第 17 回日本検査血液学会学術集会, 2016/8/6, 国内.
8. Targeting leukemic stem cells to cure AML patient, 口頭, 赤司浩一, The 14th National Congress of Hematology, 2016/10/28, 国外.
9. ヒト骨髄性白血病に共通する悪性幹細胞の自己再生メカニズム, 口頭, 赤司浩一, The 47th International Symposium of the Princess Takamatsu Cancer Research Fund, 2016/11/8, 国内.
10. Follicular helper T cell is a critical player in deciding prognosis of diffuse large B-cell lymphoma, 口頭, 宮脇恒太, 加藤光次, 大島孝一, 赤司浩一, 第 78 回日本血液学会学術集会, 2016/10/15, 国内.
11. Mogamulizumab use after allogeneic stem cell transplantation; Prospective observational study, 口頭, 加藤光次, 第 78 回日本血液学会学術集会, 2016/10/15, 国内.
12. Total metabolic tumor volume of FDG-PET prior to ASCT can predict the prognosis of aggressive NHL study, 口頭, 杉尾健志, 加藤光次, 赤司浩一, 第 78 回日本血液学会学術集会, 2016/10/15, 国内.

13. Delineation of Novel Subtypes Based on Microenvironment Immune Signature Integrating Genomic Alterations in Diffuse Large B-Cell Lymphoma Identifies New Relevant Pathways and Potential Therapeutic Targets, 口頭, Dlouhy I, Ohshima K, Kato K, Akashi K et al., 第 58 回アメリカ血液学会年次集会, 2016/12/3, 国外.
14. Delineation of Novel Subtypes Based on Microenvironment Immune Signature Provides Prognostic Stratification Strategy in Peripheral T-Cell Lymphoma, ポスター, Sugio T, Miyawaki K, Kato K, Miyoshi H, Ohshima K, Akashi K. 第 58 回アメリカ血液学会年次集会, 2016/12/5, 国外.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. 進化する造血器悪性腫瘍の治療:リンパ系腫瘍を中心に, 加藤光次, 第 74 回大阪薬科大学公開教育講座. 2016/11/19, 国内.

(4) 特許出願

該当なし