

博士（医学）川村孝仁

学位論文題名

びまん性大細胞型B細胞リンパ腫において
Chk2のタンパク発現低下は予後不良因子である

学位論文内容の要旨

【背景および目的】

びまん性大細胞型B細胞リンパ腫（Diffuse large B cell lymphoma : DLBCL）の治療方針は、1993年に提唱された International Prognostic Index (IPI) を基準に決定されることが多い。IPI基準に従って患者の層別化を行うことは予後の推定だけでなく適切な治療方針の決定に寄与する。しかしながら初回治療時より通常化学療法で治療抵抗性を示す例や、寛解後の早期再発例も存在し、これらの症例については、現時点では IPI とは異なった手法を用いて患者の層別化を行い、通常化学療法を行うことの適性を検証することが必要と考えられる。一方、近年、DNA 損傷時に細胞内で活性化される一連のシグナル伝達系が存在することが明らかにされ、チェックポイントと呼ばれている。チェックポイントシグナルは DNA が損傷を受けたときに活性化されるが、その下流の標的分子には p53, Cdc25A, C や BRCA1 等が存在し、細胞周期停止、DNA 損傷修復、アポトーシスに関与する。チェックポイントのシグナル伝達分子の一つに核内キナーゼ分子である CHK2 が存在するが、CHK2 は放射線照射や抗癌剤処理時に ataxiatelangiectasia mutated (ATM) 依存性に強く活性化されることが知られている。CHK2 は発癌への関与や癌の治療抵抗性に関与することが推定されてはいるが、これまで臨床検体を用いて CHK2 の発現の有無と抗癌剤や放射線治療の反応性、また予後との相関に関する検討は行われていない。そこで本研究では、DLBCL における CHK2 の発現を病理検体における免疫組織染色で検討し、CHK2 発現の有無と治療反応性、予後、IPI との関連について検討した。また、CHK2 発現低下を認めた検体では、CHK2 プロモーターのメチル化が関与するか否かについて検討した。

【方法および結果】

DLBCL 症例のうち、治療反応性、予後調査、IPI 評価、病理検体により CHK2 発現の評価できる 26 症例を本研究の対象とした。1. CHK2 安定発現株 KM-H2/T7-CHK2 の樹立：T7-CHK2 発現レトロウイルスベクターを作製し、

CHK2 が発現低下しているホジキン病由来細胞株 KM-H2 にレトロウイルスを感染し, CHK2 安定発現株 KM-H2/T7-CHK2 を樹立した. この KM-H2 と KM-H2/T7-CHK2 を抗 CHK2 抗体の評価及び, 免疫染色の陰性および陽性コントロールとして用いた. 2. 抗 CHK2 抗体の作成、評価：ヒト CHK2 の C 末端 24 アミノ酸配列を抗原とし, ウサギに免疫することで得られた抗血清を免疫原ペプチドによる affinity chromatography で精製して使用した. 作製した抗 CHK2 抗体は KM-H2 と KM-H2/T7-CHK2 によって, Western blotting 法と免疫染色法に使用可能であった. 3. 免疫染色：固定されたパラフィン包埋切片を脱パラフィン後, 0.1 mM EDTA (pH 8.0)による高圧加熱を行う heat-induced antigen retrieval 处理を行った後に, 自動免疫染色装置によって行った. KM-H2 はほとんど染色されないので比して, KM-H2/T7-CHK2 では核に CHK2 が染色された. DLBL 検体においても, 16 例で KM-H2/T7-CHK2 と同様に核への染色が観察された. 4. メチル化検出：リンパ腫組織からの genomic DNA の抽出は病理固定パラフィン切片を用い, DNeasy Tissue Kit (QIAGEN) を用いて行った. メチル化 DNA の検出には CpG Genome DNA Modification Kit (CHEMICON) を使用した. 肺癌でのメチル化が報告されている CHK2 プロモーター領域 (開始コドンより上流-615～-411) について検討した結果, DLBL 検体ではメチル化は認められなかった. 5. 臨床検討：CHK2 陽性群と陰性群に分け, 生存曲線を描き, Mann-Whitney U test にて検定したところ, $P < 0.001$ ($P = 0.0014$) と両群間に有意差を認め, CHK2 陽性群の 5 年生存率は 86%, 陰性群は 16% と推定された. 化学療法奏功率においては, Fisher's test を使用し, 検定したところ, CR 群と PR・others 群の比較では $P < 0.02$ ($P = 0.015$), CR・PR 群と others 群の比較では $P < 0.01$ ($P = 0.009$) と両群間で有意差を認めた.

【考察】

これまで, Western blotting 法, マイクロアレイや RT-PCR を用いての DLBL の予後との関連が強い遺伝子の発現解析と予後予測モデルの解析が行われているが, 免疫組織学的検討が可能な予後因子を同定できれば, 手技が簡便であることに加えて, 正常細胞と腫瘍細胞が混在するような検体においても検討が可能である. 今回, DLBL における CHK2 の発現を免疫組織学的手法にて検討し, その臨床的意義を検討したところ, CHK2 の発現低下を認める例においては化学療法奏功率, 累積生存率共に有意に低いことが明らかとなった. また IPI における同 risk 群の比較においても同様に CHK2 発現低下が予後不良因子であることが示され, 今後, CHK2 陰性 DLBL 患者における治療法の最適化についての検討が必要と考えられる.

【結語】

免疫組織学的検討による CHK2 の発現の有無は DLBL 患者における予後因子となり, 治療選択における患者層別化へ応用できる可能性が示唆された.

学位論文審査の要旨

主査教授 浅香正博

副査教授 武藤学

副査教授 今村雅寛

学位論文題名

びまん性大細胞型B細胞リンパ腫において Chk2のタンパク発現低下は予後不良因子である

びまん性大細胞型B細胞リンパ腫 (Diffuse large B cell lymphoma : DLBCL) の治療方針は、1993年に提唱された International Prognostic Index (IPI) を基準に決定されることが多い。IPI基準に従って患者の層別化を行うことは予後の推定だけでなく適切な治療方針の決定に寄与する。しかしながら初回治療時より通常化学療法で治療抵抗性を示す例や、覚解後の早期再発例も存在し、これらの症例については、現時点では IPI とは異なった手法を用いて患者の層別化を行い、通常化学療法を行うことの適性を検証することが必要と考えられる。一方、近年、DNA 損傷時に細胞内で活性化される一連のシグナル伝達系が存在することが明らかにされ、チェックポイントと呼ばれている。チェックポイントのシグナル伝達分子の一つに核内キナーゼ分子である CHK2 が存在するが、CHK2 は発癌への関与や癌の治療抵抗性に関与することが推定されてはいるが、これまで臨床検体を用いて CHK2 の発現の有無と抗癌剤や放射線治療の反応性、また予後との相関に関する検討は行われていない。そこで申請者の研究グループでは T7-CHK2 発現レトロウイルスベクターを作製し、ヒト CHK2 の C 末端 24 アミノ酸配列を抗原とし、ウサギに免疫することで得られた抗血清を免疫原ペプチドによる affinity chromatography で精製して作製した抗 CHK2 抗体を使用し、DLBCL における CHK2 の発現を病理検体における免疫組織染色で検討し、CHK2 発現の有無と治療反応性、予後、IPI との関連について検討した。その結果、CHK2 の発現低下を認める例においては化学療法奏功率、累積生存率共に有意に低いことが明らかとなった。また IPI における同 risk 群の比較においても同様に CHK2 発現低下が予後不良因子であることが示された。免疫組織学的検討による CHK2 の発現の有無は DLBCL 患者における予後因子となり、治療選択における患者層別化へ応用できる可能性が示唆された。

口頭発表に際し、副査の今村教授より、CHK2 の発現低下とメチル化、ヒス

トンのアセチル化の関与, p53 の関与, 遺伝子異常の頻度, IPI の Low risk (L) 群と Low intermediate risk(LI)群での生存率、加療奏功率の検討についての質問があった。これに対し、申請者はメチル化の関与はなく、ヒストンのアセチル化の関与もないと考えていること、p53 の関与はあるが頻度は明らかでないこと、IPI の L と LI の検討でも有意差が出ていると回答した。次いで、副査の武蔵教授から CHK 2 の発現低下の頻度は他の報告と比較してどうか、腫瘍増殖よりも治療反応性に関与するか、p53 やカスパーゼ 3 との関係についての質問があった。これに対し、申請者は他の 1 報告よりも本研究結果の方が CHK 2 の発現低下の頻度が高かったこと、腫瘍増殖への関与は明らかでないこと、p53 やカスパーゼ 3 との関係は検討していないと回答した。さらに、主査の浅香教授より、臨床病期Ⅲ期とⅣ期での生存率、加療奏功率の検討、肺癌、膀胱癌の免疫染色でも同様の結果が出るか否か、今後症例数を増やして検討するかの質問があった。これに対し、申請者は、臨床病期ⅢとⅣでは有意差が得られなかつたが、症例数が増えれば差ができる可能性があること、肺癌、膀胱癌では免疫染色のみの検討報告はあるが、臨床データーとの相関をみた研究がないこと、今後症例数を増やして検討した方がよいと回答した。

本研究は DLBCL における CHK2 の発現を病理検体における免疫組織染色で検討し、CHK2 発現の有無と治療反応性、予後、IPI との関連についてはじめて明らかにしたことであく評価された。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位も併せ博士（医学）の学位を受けるのに充分な資格を有するものと判定した。