

主 論 文 要 旨

論文提出者氏名：

内田 晶子

専攻分野：内科学

コース：血液・腫瘍内科

指導教授：三浦 偉久男

主論文の題目：

Targeting BCL2 with Venetoclax is a Promising Therapeutic Strategy for “Double-Protein-Expression” Lymphoma with *MYC* and *BCL2* Rearrangements

(Venetoclaxによる BCL2 標的治療は *MYC* 及び *BCL2* 遺伝子再構成を持つ “double-protein-expression lymphoma” に対する有望な治療戦略である)

共著者：

Yasushi Isobe, Junko Asano, Yu Uemura, Masahiro Hoshikawa, Masayuki Takagi, Ikuo Miura

緒言

MYC と *BCL2* 遺伝子再構成を同時に持つ B 細胞腫瘍は “double-hit (DH) lymphoma” と呼ばれていたが、2017 年の WHO 分類で組織型にかかわらず high grade B-cell lymphoma with *MYC* and *BCL2* and/or *BCL6* rearrangements (DH-HGBL) と規定された。DH-HGBL のほとんどは *MYC* と *BCL2* を共発現する “double-protein-expression lymphoma (DH-DPL)” であり、その 70% 以上の組織型が diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) である。DH-DPL は germinal center B 細胞 (GCB) 型の遺伝子発現様式をとり、通常化学免疫療法では生存期間中央値が 1 年程度と極めて予後不良のため新規治療法の開発が急務である。そこで我々は *MYC* と *BCL2* ファミリー蛋白に着目し、新規治療法開発のための基礎的検討を行った。

方法・対象

2012～2018年に当科でWHO分類に基づきGCB型DLBCLと診断した症例を抽出し、fluorescence *in situ* hybridization (FISH) 法と免疫染色の結果からDH-HGBL、MYCとBCL2遺伝子再構成を同時に持たないがDPLとなるnon-DH DPL、その他のGCB型DLBCLに分類し、各群間のMYCとBCL2ファミリー蛋白(BCL2・MCL1・BIM・BAX)の発現率を比較検討した。Mann-Whitney UまたはStudent's t検定を行い、 $P < 0.05$ を有意とした。解析にはEZR(自治医科大学さいたま医療センター ver.1.33)を用いた。またGCB型DLBCL細胞株(Karpas 231, OCI-Ly8, BJAB, SU-DHL10)を用い、MYCの転写活性を抑制するBRD4阻害薬JQ-1、BCL2阻害薬venetoclax (VEN)、MCL1阻害薬S638545、BCL-xL阻害薬A1155463添加後の*in vitro*での増殖とアポトーシス変化を検討した(trypsin blue染色後の細胞数計測・annexin V/7-aminoactinomycin D染色後のflow cytometry)。さらにVEN添加による直接効果とBCL2ファミリー蛋白量の変化についてimmunoprecipitation (IP)・Western blot (WB)法で検討した。本研究は聖マリアンナ医科大学生命倫理委員会の承認を得て行われた(承認番号第4003号)。

結果

27例のGCB型DLBCLが抽出され、8例がDH-HGBL、5例がnon-DH DPLであった。MYCとBCL2の発現率はDH-HGBLでnon-DH DPLを含むその他のGCB型DLBCLと比べて高かったが(それぞれ $P=0.028$, $P=0.013$)、DH-HGBLとnon-DH DPLの間では差がなかった。BIM・BAXの発現率は3群間で差はなかったが、MCL1の発現率はDH-HGBLでnon-DH DPLを含むその他のGCB型DLBCLと比べて有意に低かった($P=0.005$)。このMCL1発現低下はnon-DH DPL群と比べても有意差が認められた($P=0.019$)。FISH法とWB法の結果から細胞株のうちKarpas231とOCI-Ly8がDH-DPL、BJABがnon-DH DPLであった。*In vitro*の薬剤感受性検討では、JQ-1はBJAB以外の細胞株で濃度依存性に細胞増殖を抑制したが、 $50 \mu\text{M}$ 24時間暴露でも十分にアポトーシスを誘導できなかった。一方、VENは低濃度でKarpas231・OCI-Ly8のみ細胞増殖を抑制し、 200 nM 24時間曝露で80%以上の細胞にアポトーシス変化を誘導した。DH-HGBL症例のDH-DPL細胞もVENにアポトーシス高感受性を示した。S63845はSU-DHL10のみアポトー

シスを誘導したものの、A1155463 は nM レベルではどの細胞株にもアポトーシスを誘導できなかった。2つの DH-DPL 細胞株で VEN は添加 3 時間の段階でリン酸化 BCL2 の割合低下と MCL1、更には BCL2 の脱リン酸化に関わる PP2A B56 α の蛋白量低下をもたらした。IP-WB 法では、VEN は 2 つの DH-DPL 細胞株で BCL2 と BIM の結合を阻害するだけでなく、BCL2 結合 PP2A B56 α の割合をも増加させた。

考察

DLBCL に対する VEN の臨床応用は効果にばらつきがあり開発が進んでいない。VEN 抵抗性の機序としてこれまでに BCL2 のリン酸化や MCL1 発現増強などが示されているが、我々は DH-DPL 細胞の生存が BCL2 に強く依存し、リン酸化 BCL2 割合や MCL1 の発現そのものが VEN によって減弱することを初めて示した。これは PP2A B56 α が VEN 添加で BCL2 へより結合して脱リン酸化することで消費され、MCL1 の脱リン酸化状態を維持できず、MCL1 が不安定となり分解されやすくなったことが原因と考えられる。

結論

BCL2 阻害薬である VEN は DH-DPL に対して有望な治療薬となりうる。