

## 主論文の要旨

*De novo* diffuse large B-cell lymphoma with a CD20 immunohistochemistry-positive and flow cytometry-negative phenotype: Molecular mechanisms and correlation with rituximab sensitivity

〔CD20 免疫染色陽性、フローサイトメトリー陰性の表現型を示す、初発びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫：分子メカニズムとリツキシマブ感受性との関連〕

名古屋大学大学院医学系研究科 分子総合医学専攻  
病態内科学講座 血液・腫瘍内科学分野

(指導：室原 豊明 教授)

徳永 隆之

## 【背景】

リツキシマブは CD20 表面抗原に対するマウス-ヒトキメラ型モノクローナル抗体治療薬である。CD20 陽性 B 細胞性リンパ腫(BCL)に対するリツキシマブ併用化学療法の有効性が確認される一方で、リツキシマブ治療に抵抗性を示す症例も経験されている。

CD20 蛋白は pre-B 細胞から成熟 B 細胞に至るまでの B 細胞に特異的に発現する表面抗原で、90%以上の BCL に発現しているが、初発の BCL において、CD20 の発現異常を認める症例が存在し、リツキシマブ治療抵抗性との関連が示唆されている。これまでに、リツキシマブ治療を含む併用化学療法後に CD20 蛋白発現が低下し、CD20 免疫染色 (IHC) 陰性、フローサイト解析 (FCM) 陰性となり、リツキシマブ治療抵抗性となる患者が報告されている。一方、初発のびまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫 (DLBCL) の中に CD20 蛋白の発現が IHC 陽性、FCM 陰性を示す症例も経験されているが、その分子生物学的背景、予後やリツキシマブ治療に対する感受性などの臨床的意義については、これまでに明らかにされていない。

## 【目的】

CD20 IHC(+)/FCM(-)を示す初発 DLBCL の発生頻度および予後との関連性を検討する。また、本表現型がリツキシマブ耐性に関与するかどうかについて、分子生物学的に検討する。

## 【方法】

IHC(+)/FCM(-)の表現形を示す DLBCL 患者より得られたリンパ節生検材料より全細胞溶解液(蛋白)、全 RNA を抽出し、半定量的、定量的 RT-PCR、ウェスタンブロット法を用いて、*MS4A1* (*CD20*) 遺伝子発現、蛋白発現を確認した。また、ゲノム遺伝子を用いて、*MS4A1* 遺伝子のプロモーター及びコーディング部分の遺伝子変異解析を行った。さらに、生検時に採取されたリンパ腫生細胞を用いて、リツキシマブ結合量の定量及び補体依存性細胞傷害活性 (CDC) を、蛍光標識リツキシマブを用いた FCM 解析と *in vitro* CDC アッセイにより検討した。

また、名古屋大学医学部附属病院において初発の DLBCL と診断され治療を受けた 106 症例における CD20 IHC(+)/FCM(-)を示す症例の発生頻度と、全生存率 (OS)、無増悪生存率 (PFS) などの予後についての後方視的解析を行った。

## 【結果】

名古屋大学医学部附属病院において治療を受けた初発 DLBCL 患者 106 人のうち、IHC と FCM 解析を施行された患者は 37 人であった。そのうち、CD20 IHC(+)/FCM(+)患者は 29 症例 (78%)、IHC(+)/FCM(-)患者は 8 症例 (22%) であった。患者背景を **Table 1** に示す。IHC(+)/FCM(-)を示す代表的患者の IHC 及び FCM 解析結果を **Fig. 1** に示す。本表現型を示す DLBCL 患者 12 症例における遺伝子配列の検討では、*CD20* 遺伝子のコーディング配列やプロモーター領域 (転写開始点から上流 1000bp) 配列に、明らかな変異

は確認されなかった(**Table 2**)。

半定量的 RT-PCR では、*CD20* mRNA の発現は陽性コントロールに比べ概して低いことを確認した(**Fig. 2a**)。定量的 RT-PCR 法では、*CD20* mRNA の発現は陽性コントロールに比べ有意に低く(**Fig. 2b**,  $p=0.0005$ )、陰性コントロールに比べ有意に高いことを確認した。また、リツキシマブ使用後に *CD20* が陰性化した症例から樹立された細胞株 RRBL1 及び WILL2 における *CD20* mRNA 発現に比べると、10 倍程度高いことが確認された(**Fig. 2b**, IHC(-)/FCM(-))。ウェスタンブロット法における蛋白発現解析では、*CD20* 蛋白の発現は陽性コントロールに比べ低く、ほとんどの症例で検出されなかった(**Fig. 2c**)。

通常の FCM 解析において用いられる B1 抗体を使用した FCM 解析では、*CD20* IHC(+)/FCM(-)を示す細胞における *CD20* 平均蛍光強度(MFI) は陽性コントロールに比べて優位に低かった(**Fig. 3a**,  $p=0.03$ )。一方、蛍光標識リツキシマブを用いた FCM 解析においては、MFI 値は陽性コントロールに比べて低い傾向であったが有意差は確認されず(**Fig. 3b**,  $p=0.25$ )、抗体の認識率が B1 抗体に比べてより高ことが示された。また、リンパ腫生細胞とリツキシマブを用いた *in vitro* CDC アッセイでは、*CD20* IHC(+)/FCM(-)を示す細胞は、IHC(+)/FCM(+)を示す細胞に比べて、リツキシマブ誘導性 CDC 活性が優位に低いことが示された(**Fig. 4a-c**)。

初発 DLBCL 106 症例における予後解析を **Fig. 5** に示す。全症例における 3 年 OS は 77.0%、PFS は 65.2%であった(**Fig. 5a, b**)。*CD20* IHC(+)/FCM(+)患者と IHC(+)/FCM(-)患者において、OS に有意な差は確認されなかった(**Fig. 5e**,  $p=0.664$ )。

#### 【考察】

*CD20* mRNA 発現量の低下が IHC(+)/FCM(-)の表現型に関与している可能性が示唆された。全細胞溶解液を用いたウェスタンブロット法においても *CD20* 蛋白の発現低下が確認された。FCM 解析陰性は単なる *CD20* の内在化による表現型の変化ではないことが示唆された。リツキシマブを用いた FCM 解析と *in vitro* CDC アッセイの結果から、MFI が低い症例ほどリツキシマブに対する感受性が低い傾向が示唆され、リツキシマブ抵抗性との関連が示唆された。しかし、リツキシマブと腫瘍細胞の結合が確認され、リツキシマブの殺細胞効果が部分的にでも確認されたこと、またこれら症例における予後解析で有意な予後不良が確認されなかったことから、本表現型を示す腫瘍に対するリツキシマブの使用は、臨床現場において必ずしも否定されるべきものではないということが示唆された。このことは、リツキシマブに対する部分的な耐性化を併用化学療法が救済している可能性や、リツキシマブによる抗体依存性細胞介在性細胞傷害活性(ADCC) がより有効に機能している可能性などを示唆する所見と推測される。

また、FCM 解析において B1 抗体に比べリツキシマブにおける *CD20* 認識率が高い可能性が示唆された。リツキシマブ治療を前提とする現在においては、標識リツキシマブを用いた FCM 解析が臨床的に有用である可能性が示唆された。

**【結論】**

- (1) CD20 IHC(+)/FCM(-)の表現型の分子生物学的背景に、*CD20* mRNA 発現の低下が関与している可能性が示唆された
- (2) これらの症例に対する初回治療への反応性は概して良好であり、明らかな予後との関連性は確認されなかった。
- (3) 本表現型を示す腫瘍に対して、リツキシマブによる細胞傷害活性が部分的に発揮される可能性が示され、CD20 IHC(+)であれば、臨床的にリツキシマブの使用は推奨されるものと考えられる。