

# 『悪性リンパ腫および固形癌における *CCR4* 遺伝子変異および *CCR4* 蛋白発現の臨床病理学的意義』に関する研究

名古屋市立大学大学院

臨床病態病理学 研究員

坂本 祐真

名古屋市立大学大学院

臨床病態病理学 教授

稲垣 宏

## 1. 研究の背景・目的

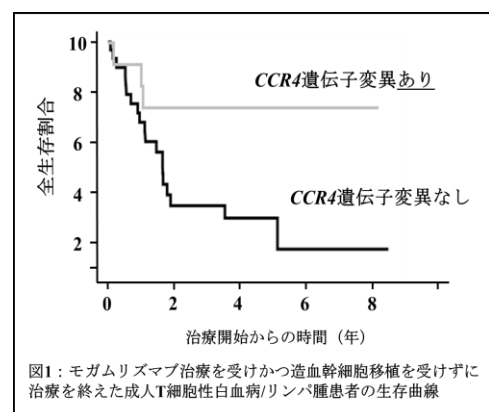
### 【背景】

悪性リンパ腫の中で、成人T細胞白血病/リンパ腫 (adult T-cell leukemia/lymphoma, ATL) は極めて予後不良な腫瘍の一つであり、今日においても有効な治療法が確立されていない。ATL細胞に発現する *CCR4* (C-C chemokine receptor type 4) に対する抗体治療薬としてモガムリズマブ (ポテリジオ®) が、本学を中心とする研究グループによって開発され、2012年より臨床現場で使用されている。<sup>[1]</sup> しかし、まだ歴史の浅い治療薬であることから、本治療薬に高い奏効率を示す患者の特徴や治療効果を予測するバイオマーカー等は明らかではない。

申請者らは2018年、ATLにおける *CCR4* 遺伝子変異と高いモガムリズマブ治療奏功との関連を世界に先立って報告した。<sup>[2]</sup> モガムリズマブ治療を受けた患者を対象とした後方視的解析の結果、*CCR4* 遺伝子変異を有するATL患者は、*CCR4* 変異を有さない患者と比較し、モガムリズマブの治療反応性が極めて良好 (5年生存率 73% vs 26%) であることを明らかにした (図1)。これにより、*CCR4* 遺伝子変異を有するATL患者は、造血幹細胞移植 (治療効果は高い反面、副作用が強い) を受けずとも、モガムリズマブ治療によって長期間にわたり腫瘍を抑え込める可能性が高いことが明らかになった。

### 【目的】

モガムリズマブは日本ではATLだけでなく、末梢性T細胞リンパ腫、非特定型 (PTCL-NOS)、血管免疫芽球性T細胞リンパ腫 (AITL) 等に対しても承認されている。<sup>[3]</sup> また、リンパ系腫瘍に留まらず、近年



では固形癌に対してもモガムリズマブ適応拡大の研究が進んでいる。

本研究を発展させるために、以下の4つの研究を実施する。

- ① ATL 以外の T 細胞性腫瘍における *CCR4* 遺伝子変異の意義の解明
- ② 種々の固形癌における *CCR4* 遺伝子変異および *CCR4* 蛋白発現の意義の解明
- ③ *In vitro* における *CCR4* 遺伝子変異によるモガムリズマブ作用増強の検討
- ④ *CCR4* 遺伝子変異の簡便なスクリーニング法の確立

## 2. 研究の対象ならびに方法

### ① ATL 以外の T 細胞性腫瘍における *CCR4* 遺伝子変異の意義の解明

種々の T 細胞性腫瘍 (225 例) を対象として、*CCR4* 遺伝子変異解析および免疫組織化学染色による *CCR4* 蛋白発現解析を行い、正確な頻度を明らかにするとともに、予後やその他の臨床病理学的因子との関連を検討する。

### ② 種々の固形癌における *CCR4* 遺伝子変異および *CCR4* 蛋白発現の意義の解明

種々の固形癌および上皮性腫瘍 (悪性黒色腫、胃癌、肺癌等) を対象として、*CCR4* 遺伝子変異解析および免疫組織化学染色による *CCR4* 蛋白発現解析を行う。

### ③ *In vitro* における *CCR4* 遺伝子変異によるモガムリズマブ作用増強の検討

細胞膜に局在がある *CCR4* は本来、自身の不活性化のために蛋白内在化機序を有しているが、それが *CCR4* 遺伝子変異により阻害されることが報告されている。その結果、細胞膜 *CCR4* を認識するモガムリズマブの抗体依存性細胞障害 (ADCC) 作用が増強すると申請者らは考察しているが、*in vitro* においてまだ実証されていない。本研究では、*CCR4* 遺伝子変異を有する ATL 細胞株と有さない ATL 細胞株を対象として、モガムリズマブによる NK 細胞による細胞障害作用に差があるか、Annexin-V を用いた ADCC 活性測定により比較する。

### ④ *CCR4* 遺伝子変異の簡便なスクリーニング法の確立

*CCR4* 蛋白 N 末端、C 末端側を認識する抗体をそれぞれ用いた免疫組織化学染色を施行し、*CCR4* N 末端および C 末端発現の臨床病理学的意義や *CCR4* 遺伝子変異との関係を明らかにする。

## 3. 研究結果

### ① ATL 以外の T 細胞性腫瘍における *CCR4* 遺伝子変異の意義の解明

ATL (n=52)、Tリンパ芽球性白血病/リンパ腫 (T-LBL, n=13)、菌状糸肉症 (MF, n=13)、PTCL-NOS (n=53)、AITL (n=59)、ALK陽性未分化大細胞型リンパ腫 (ALCL, n=8)、ALK陰性ALCL (n=14) および節外性NK/T細胞リンパ腫 (ENKTCL, n=13) の合計 225 例を対象として、CCR4 遺伝子変異解析および CCR4 蛋白発現解析を行った。その結果、CCR4 蛋白発現はATL の 48/52 (92%)、非ATL 症例の 58/174 (33%) において陽性であった。CCR4 遺伝子変異はATL の 17/52 (33%)、非ATL 症例の 6/174 (3.4%) において認めた。 CCR4 蛋白発現、遺伝子変異ともに、ATL と比較して非ATL 症例群では統計学的有意差を持って低頻度であった (ともに  $P < 0.0001$ 、表 1)。

表1. 種々のT細胞性腫瘍におけるCCR4蛋白発現とCCR4遺伝子変異

Tumor type	n	CCR4 protein expression			Genomic CCR4 mutations		
		Pos	Neg	p	Pos	Neg	p
T-LBL	13	0	13		1	12	
MF	13	13	0		0	13	
PTCL-NOS	53	21	32		4	49	
AITL	59	23	36		1	58	
ALCL (ALK+)	8	0	8		0	8	
ALCL (ALK-)	14	1	13		0	14	
ENKTCL	13	0	13		0	13	
non-ATL	173	58	115	<0.0001	6	167	<0.0001
ATL	52	48	4		17	35	
Total	225	106	119		23	202	

T-LBL, T-lymphoblastic lymphoma; tMF, transformed mycosis fungoides; PTCL-NOS, peripheral T-cell lymphoma, not otherwise specified; AITL, angioimmunoblastic T-cell lymphoma; ALCL, anaplastic large cell lymphoma; ENKTCL, extranodal NK/T-cell lymphoma; and ATL, adult T-cell leukemia/lymphoma

次に、CCR4 発現と CCR4 遺伝子変異の関係を検討した。変異を有するATL 症例 (17 例) は全て CCR4 発現が陽性であった。しかしながら、変異を有する非ATL 症例 (6 例) については、1 例のみ CCR4 発現陽性で、残りの 5 例は陰性であった (表 2)。

表2. CCR4 遺伝子変異陽性の非ATL症例 (n=6) の臨床病理学的特徴

Case No.	Subtype	Age/Sex	HTLV-1	Ann Arbor stage	Treg phenotype	Treatment	Response	Outcome (Follow-up, month)	CCR4 mutations		CCR4 expression
									genomic DNA	Transcript	
1	T-LBL	17/M	-	IV	No	LSG16	CR	DOD (11)	Q336*	WT	-
2	PTCL-NOS	70/M	-	II	No	CHOP	CR	Alive (147)	C329*	WT	-
3	PTCL-NOS	65/M	-	III	No	CHOP	NR	DOD (6.8)	C329*	WT	-
4	PTCL-NOS	52/F	-	II	No	CHOP	CR	DOD (15)	C329*	WT	-
5	PTCL-NOS	38/M	-	II	No	CHOP	CR	DOD (1.7)	C329*	WT	-
6	AITL	73/M	-	IV	No	CHOP	SD	DOD (3.7)	Y347*	Y347*	+

Treg, regulatory T cell; T-LBL, T-lymphoblastic lymphoma; PTCL-NOS, peripheral T-cell lymphoma, not otherwise specified; AITL, angioimmunoblastic T-cell lymphoma; LSG16, VEPA-L/DCMP and CCMOL/HSCT; CHOP, cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone; DOD, died of disease; NR, no response; SD, stable disease; and WT, wild type.

本研究は、以下の内容で *International Journal of Hematology* に掲載された。

Sakamoto Y, Fujii K, Murase S, Nakano S, Masaki A, Murase T, Kusumoto S, Iida S, Utsunomiya A, Ueda R, Ishida T, Inagaki H. CCR4 is rarely expressed in CCR4-mutated T/NK-cell lymphomas other than adult T-cell leukemia/lymphoma. *Int J Hematol.* 2019;110:389-392.

## ② 種々の固形癌における CCR4 遺伝子変異および CCR4 蛋白発現の意義の解明

予備実験的として、CCR4 発現を一部の症例において認めることが報告されている悪性黒色腫 (n=10)、胃癌 (n=10)、大腸癌 (n=10)、肺腺癌 (n=10)、肝細胞癌 (n=10)、腎細胞癌 (n=10)、乳癌 (n=10)、食道癌、唾液腺癌などの頭頸部癌 (n=30) の合計 100 例を対象として、CCR4 遺伝子変異解析および CCR4 蛋白発現解析を行った。その結果、CCR4 発現は悪

性黒色腫の 8/10 (80%) において認めましたが、その他の腫瘍においては認めなかった。*CCR4* 遺伝子変異はいずれの腫瘍においても残念ながら認めなかった。

### ③ *In vitro*における *CCR4* 遺伝子変異によるモガムリズマブ作用増強の検討

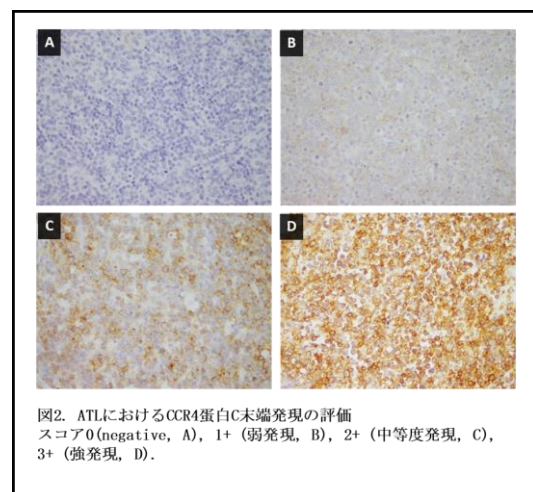
*CCR4* 遺伝子変異の有無により、モガムリズマブによる ADCC 活性に差がみられるかどうか、ATL 細胞株を用いた *in vitro* の実験を実施中である。本実験は現在進行中であり、早急な論文化を目指している。

### ④ *CCR4* 遺伝子変異の簡便なスクリーニング法の確立

*CCR4* 遺伝子変異の有無が既知である ATL 症例 92 例を対象として、*CCR4* 蛋白 N 末端、C 末端側を認識する抗体をそれぞれ用いた免疫組織化学染色を施行し、それらの意義を検討した。*CCR4* 蛋白 N 末端、C 末端発現ともに図 2 に示すように、発現強度を 4 段階に評価した。発現スコア 0、1+および 2+を弱発現、3+を強発現とした。

結果として、*CCR4* 蛋白 C 末端において強発現を示す症例を約 40%において認め、また *CCR4* 遺伝子変異と有意に相関関係にあった。*CCR4* 蛋白 C 末端発現とモガムリズマブ投与を受けた ATL 患者の予後との関連を検討したところ、C 末端発現が強発現を示す症例群は、弱発現を示す症例群と比較して、有意に生存率が不良であった。

(現在論文投稿中であるため、細かいデータや図表の提示は控えさせていただきます。)



## 4. 考察

①-④の研究は、申請者らが以前発表した、ATL で見られた *CCR4* 遺伝子変異とモガムリズマブ高感受性の強い関連が端緒となって研究をスタートさせた。

ATL では *CCR4* 遺伝子変異および *CCR4* 蛋白発現は、それぞれ 33%および 92%と高頻度に認めただのに対して、非 ATL 症例ではそれぞれ 3.4%および 33%と低頻度であった。また、*CCR4* 遺伝子変異を有する非 ATL 症例 (6 例) の 5/6 (83%)は *CCR4* 発現陰性であった。さらに、*CCR4* 遺伝子変異(+)*CCR4* 発現(-)のこれら 5 症例の mRNA における *CCR4* 遺伝子変異を解析したところ、genomic DNA において認めた *CCR4* 遺伝子変異は認めなかった。これは、*CCR4* 遺伝子の転写活性が inactive であることを示唆しており、*CCR4* 蛋白発現が陰性であった

ことをサポートする結果である。非 ATL 症例における *CCR4* 遺伝子変異、*CCR4* 発現および両者の関連は、ATL におけるそれとは大きく異なる可能性がある。

遺伝子検査は手技が煩雑であることに加えて解析に時間を要することやコスト面が問題として挙げられる。従って、臨床病理学的应用を目指すためにも簡便なスクリーニング法の確立が必要である。申請者の検討では、*CCR4* 蛋白 C 末端における弱発現は、*CCR4* 遺伝子変異と有意に相関し、モガムリズマブ投与を受けた ATL 患者における予後不良因子であることが明らかとなった。*CCR4* 蛋白 C 末端に対する免疫組織化学染色の *CCR4* 遺伝子変異の検出感度および特異度は約 90%および 60%であった。感度だけで見ればスクリーニング法としては十分であるが、より良い評価法の検討が必要であると考えられる。

今後は、現在研究を進めている *CCR4* 遺伝子変異によるモガムリズマブ高感受性をもたらす機序の解明や、より多くの ATL 症例を対象とした大規模研究の実施を計画している。

## 5. 文献

- [1] Ishii T, Ishida T, Utsunomiya A, et al. Defucosylated humanized anti-*CCR4* monoclonal antibody KW-0761 as a novel immunotherapeutic agent for adult T-cell leukemia/lymphoma. *Clin Cancer Res*. 2010;16:1520-1531.
- [2] Sakamoto Y, Ishida T, Masaki A, et al. *CCR4* mutations associated with superior outcome of adult T-cell leukemia/lymphoma under mogamulizumab treatment. *Blood*. 2018;132:758-761.
- [3] Ogura M, Ishida T, Hatake K, et al. Multicenter phase II study of mogamulizumab (KW-0761), a defucosylated anti-*CCR4* chemokine receptor 4 antibody, in patients with relapsed peripheral T-cell lymphoma and cutaneous T-cell lymphoma. *J Clin Oncol*. 2014;32:1157-1163.

## 6. 論文発表

Sakamoto Y, Fujii K, Murase S, Nakano S, Masaki A, Murase T, Kusumoto S, Iida S, Utsunomiya A, Ueda R, Ishida T, Inagaki H. *CCR4* is rarely expressed in *CCR4*-mutated T/NK-cell lymphomas other than adult T-cell leukemia/lymphoma. *Int J Hematol*. 2019;110:389-392.

その他の研究については、現在進行中または論文投稿中である。