

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 11 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15658

研究課題名(和文)メトトレキサート関連リンパ増殖性疾患の臨床病理学的特徴の確立

研究課題名(英文)Clinicopathologic features of methotrexate-associated lymphoproliferative disorders

研究代表者

栗田 大輔(Kurita, Daisuke)

京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・特定研究員

研究者番号：70790294

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：メトトレキサート関連リンパ増殖性疾患(MTX-LPD)は多彩な組織像を示す疾患群で診断基準は未確立だった。本研究ではMTX-LPDを6つの組織型に分類し、反応性型(RH)、多形型(Poly-LPD)、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫(DLBCL)型、ホジキンリンパ腫型(CHL)症例の臨床病理学的特徴を比較した結果、各組織型間で多数の特徴が異なっていた。またMTX中止後の無増悪生存期間は、RH、Poly-LPD、DLBCL、CHLの順に良好であり、各組織型で病勢予測因子を同定した。本研究よりMTX-LPDでは組織分類および組織型特異的因子がMTX中止後の病勢予測に有用であることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではこれまでにない多数のMTX-LPD症例を対象として組織分類を定義し、各組織分類に対応した特徴的な臨床所見および臨床経過予測因子を見出した。これによりMTX-LPD診断の均てん化を推進するとともに、組織診断に基づくMTX-LPDの治療法の確立へと繋げる。また本研究で確立したMTX-LPDの組織分類を元に遺伝子発現解析を進める事で、発症に関与する遺伝子異常を同定し、MTX-LPDを発症するリスク因子を特定される事が期待される。これはMTXを用いた治療に対しての新しいガイドライン、つまり自己免疫性疾患治療における新たな指針となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Methotrexate-associated lymphoproliferative disorders (MTX-LPDs) are disease, which exhibit various types of histology, and the definitive diagnostic criteria and histologic categories for MTX-LPDs are yet to be established. In this study, MTX-LPD lesions were classified into 4 diagnostic categories, and clinicopathologic features of reactive lymphoid hyperplasias (RHs), polymorphic LPDs (Poly-LPDs), diffuse large B-cell lymphomas (DLBCLs), and classic Hodgkin lymphomas (CHLs) were analyzed. Many features were significantly different among these histologic categories. After MTX withdrawal, progression-free survival (PFS) was the greatest for RH, followed by for Poly-LPD, DLBCL, and CHL. Furthermore, predictive factors for PFS were identified in each histologic category. Current results indicate that histologic categorization and histology-specific factors could be useful for predicting MTXLPD progression after MTX withdrawal.

研究分野：病理学、血液内科学

キーワード：リンパ増殖性疾患 悪性リンパ腫 臨床病理学的解 EBウイルス

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

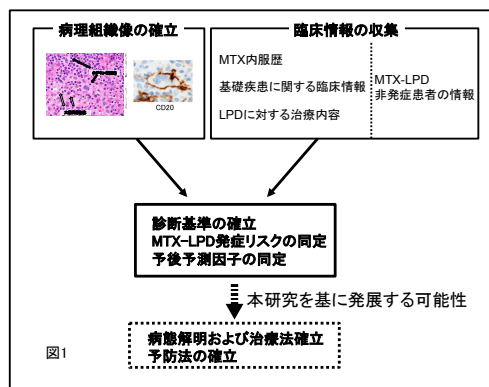
メトトレキサートは慢性関節リウマチの標準治療に用いられる免疫抑制剤の一つで、メトトレキサート関連リンパ増殖性疾患 (methotrexate-associated lymphoproliferative disorder: MTX-LPD) は WHO 分類では、免疫不全患者に発症する LPD の疾患単位の一つに含まれている。この MTX-LPD では高頻度に Epstein-Bar ウイルス (EBV) 感染細胞がみられ、EBV の再活性化が LPD 発症の主要因の一つに考えられている。一方、MTX-LPD の診断基準は基礎疾患に対する MTX 内服歴のみため、多彩な臨床病理組織像を示す不均一な疾患群であり、現在までに MTX-LPD の組織像に対する標準化された診断基準・治療法は確立されておらず、発症リスク因子についても不明な点が多かった。さらに一部の MTX-LPD 患者では MTX 内服中止のみで腫瘍が退縮する事が報告されているが、MTX-LPD の各組織像において明確な MTX 中止後の病勢予測因子は同定されていなかった。

2. 研究の目的

現在、悪性リンパ腫では組織型に沿った遺伝子異常解析がなされ、それに沿う分子標的薬、また標準的治療が確立されつつある。本研究では MTX-LPD の臨床病理組織像を詳細に検討し、特徴的な組織像に対応した臨床所見を見出し、MTX-LPD の診断基準を確立する。さらに臨床経過予測因子を同定し、MTX-LPD の標準治療法の確立および発症リスク因子の同定へとつなげる事を目的とした。

3. 研究の方法

MTX-LPD の診断基準の作成および発症リスクの同定のため **A. 詳細な分子病理学的検討による MTX-LPD 病理診断基準の均てん化**、**B. 基礎疾患診療内容を含めた臨床情報の収集**、**C. 情報の統合 (図 1)** を実施した。具体的には分子病理学的検討ではホルマリン固定パラフィン包埋切片を用いて①組織学的検討②免疫組織学的検討③組織中の EBV 感染細胞の同定 (免疫染色および RNA in situ (EBER)) を行なった。免疫組織学検討においては、客観的および再現性高い解析を実施するために、画像解析ソフトを用いて各組織学的特徴を定量化して解析した。さらに臨床情報と統合し、MTX-LPD の組織分類を確立し、各組織分類における予後予測因子を同定した。



4. 研究成果

組織学的特徴より MTX-LPD の 219 症例を reactive lymphoid hyperplasias (RHs: 反応型), polymorphic LPDs (Poly-LPDs: 多形型), B/T-cell non-Hodgkin lymphomas (B/T-NHLs: B/T 細胞非ホジキンリンパ腫型), classic Hodgkin lymphomas (CHL: ホジキンリンパ腫型) の 4 つの組織型に分類し、さらに非ホジキンリンパ腫型を diffuse large B-cell lymphomas (DLBCLs: びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫型), indolent B-cell lymphomas (低悪性度 B 細胞リンパ腫型), peripheral T-cell lymphomas (PTCLs: 末梢性 T 細胞リンパ腫型) に亜分類した。全症例の MTX 内服期間中央値は 4.3 年で、節外性病変を 48% (103/214) 認めた。そして頻度の高い RH (n=30)、Poly-LPD (n=33)、DLBCLs (n=106)、CHL (n=26) 症例を対象として臨床病理学的特徴を解析した。

臨床学的特徴では RH は Poly-LPD に比べて有意に若齢 ($P=0.028$) で、MTX 内服期間が短く ($P=0.026$)、節性病変を多く有していた ($P=0.044$)。一方 DLBCL は Poly-LPD に比べて有意に節外性病変 ($P=0.0007$) および LDH の増加 ($P=0.014$) を認めた。CHL で Poly-LPD に比べて節制病変が多い傾向であった ($P=0.09$)。RH, Poly-LPD, DLBCLs, CHL の MTX 中止後の病変退縮までの期間中央値は各々 10.4, 3.0, 4.2, 2.7 ヶ月であった。

病理学的特徴について RH ではその大多数の症例でリンパ構造が保たれ、壊死は認めず、形質細胞の浸潤を Poly-LPD より認め ($P < 0.0001$)、一方で Hodgkin Reed-Sternberg (HRS)-like cells ($P = 0.008$)、肉芽種性 ($P = 0.026$) は有意に低かった。

Poly-LPD (図 2) では大多数の症例でリンパ節および節外病変で構造が破壊され、24% (8/33) の症例で広範囲の壊死を認めた。上皮性病変 7 例全例で EBV 陽性粘膜皮膚潰瘍 (EBV-positive mucocutaneous ulcer (EBV-MCU)) を認め

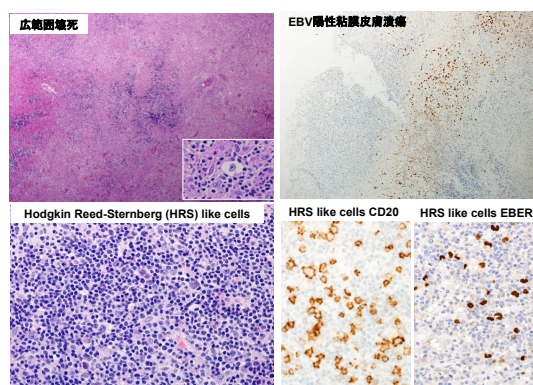


図2 Polymorphic LPDs (多形型)の組織像

た。半数の症例で顕著な核小体または多核を有する HRS 様細胞を認め、多くは CD20 陽性(62%)、CD15 陰性、EBER 陽性(93%)であった。CHL と比べて Poly-LPD では壊死(P=0.0021)認め、一方、形質細胞浸潤(P=0.015)、好酸球浸潤(P=0.047)および HRS or HRS like cell 周囲のロゼット形成(P=0.0063)は CHL で有意に多く認めた。

DLBCLs (図3)では多くの症例で構造が破壊され、トランスフォームした B 細胞のモノクローナル増殖を認めた。壊死を 34% (36/105)認め、EBER は 45% (48/106)陽性だった。DLBCLs はさらに DLBCL-not-otherwise-specified (NOS) (n=88), T-cell/histiocyte-rich large B-cell lymphoma (THRLBCL)-like lesions (n=11) gray zone lymphoma (GZL) (n=6), lymphomatoid granulomatosis (LYG) (n=1)に分類した。THRLBCL-like lesions では DLBCL-NOS に比べて広範囲の壊死(P=0.038)、形質細胞浸潤(P=0.035)、HRS cells (P=0.009)、EBER 陽性率(P=0.002)を有意に多く認めた。

CHL では 23 例(88%)が混合細胞型 3 例が結節硬化型に分類された。全ての症例は CD20 陰性、CD30 陽性で半数が CD15 陽性であった。LMP-1(69%)および EBER(77%)の陽性率が高い一方で EBNA は全て陰性であった。

EBER の定量的発現解析では(図4)RH と Poly-LPD 間において、EBER 陽性率(>1 cells/mm²)に有意差は認めなかったものの(P=0.171)、EBER 陽性細胞数は有意に Poly-LPD が多かった(P=0.0038)。一方で DLBCLs と CHL では EBER 陽性率(≥5%)では CHL が有意に高かったが(P=0.0017)、EBER 陽性症例における腫瘍細胞の EBER 陽性率の中央値は 2 群間で有意差を認めなかった(P=0.52)。

生存および予後予測因子解析では、MTX 中止後から化学療法開始時および原病死亡・関連死亡時までの無増悪生存期間(Progression-free survival: PFS)と定義し解析した結果、RH, Poly-LPD, DLBCL, CHL 症例の順に予後良好であった(図5)。一方、全生存期間(Overall survival: OS)はいずれの組織型間で有意差を認めなかった。

Poly-LPD の PFS では好酸球浸潤をより多く認めた症例では PFS が予後不良(P=0.032)で、一方で 70 歳以上では予後良好(P=0.025)であった。単変量解析においても好酸球浸潤(P=0.036)、70 歳以上(P=0.007)および広範囲の壊死(P=0.044)PFS の予後因子として同定された。

DLBCLs の PFS では多変量解析において International Prognostic Index(IPI: 国際予後指標) HI/H risk (P=0.025) および EBER 陽性 (P=0.016)が予後因子として同定され、さらに IPI および EBER 陽性を組み合わせて生存解析を行なった結果、EBER 陽性患者で IPI (L/LI) risk を有する症例が EBER 陽性+IPI HI/H risk および EBER

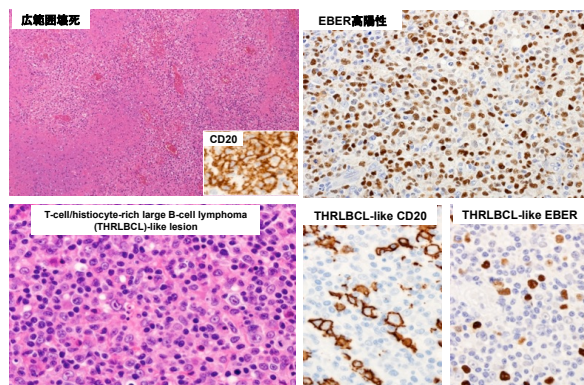


図3 Diffuse large B-cell lymphomas (びまん性大細胞型B細胞リンパ腫型)の組織像

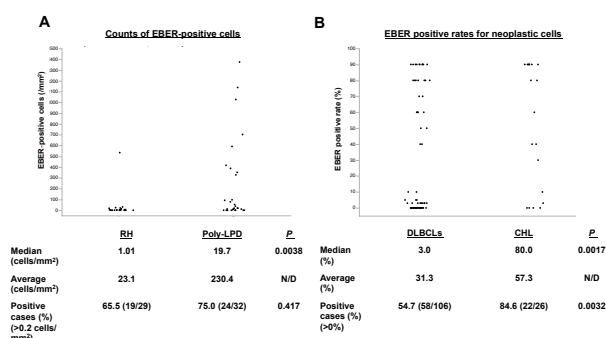


図4 MTX-LPDの各組織分類におけるEpstein-Barr virus-encoded RNA (EBER)の陽性細胞数および陽性率

MTX-LPDの組織分類はMTX中止後の病勢予測に有効である

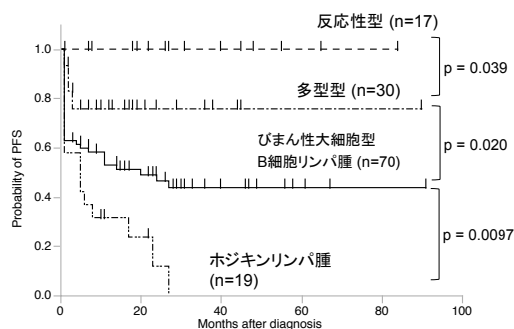


図5 MTX中止後、化学療法開始・死亡時まで無増悪生存期間

EBERおよび国際予後指標がDLBCLsのMTX中止後の病勢予測に有効である

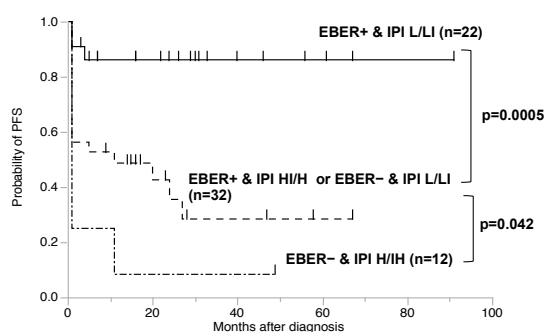


図6 DLBCLsのMTX中止後、化学療法開始・死亡時まで無増悪生存期間

陰性+IPI HI/H risk 症例に比べて有意に PFS が予後良好であった (図 6)。DLBCLs の OS では多変量解析にて B 症状 (P=0.048) および IPI HI/H risk (P=0.017) が予後因子として同定され、生存解析においても B 症状+ IPI HI/H risk を有する症例は予後不良であった (P<0.0001)。DLBCLs の亜分類では PFS・OS いずれも有意差を認めなかった。

CHL の PFS では形質細胞浸潤を示す症例が予後不良 (P = 0.002)、であり単変量解析でも形質細胞浸潤が予後因子として同定された (P = 0.011)。一方で OS では多変量解析で B 症状が予後不良因子として同定された (P= 0.045)。

これらの結果より、本研究で確立した MTX-LPD の組織分類では各組織型間で多数の特徴が有意に異なっており、また MTX-LPD では組織分類および組織型特異的因子が MTX 中止後の病勢予測に有効である事が示された。今後は MTX-LPD 診断の均てん化を推進するとともに、組織診断に基づく MTX-LPD の治療法の確立へつなげる。また本研究で確立した MTX-LPD の組織分類を元に遺伝子発現解析を進める事で、発症に関与する遺伝子異常を同定し、MTX-LPD を発症するリスク因子を同定される事が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kurita Daisuke, Miyoshi Hiroaki, Ichikawa Ayako, Kato Koji, Imaizumi Yoshitaka, Seki Ritsuko, Sato Kensaku, Sasaki Yuya, Kawamoto Keisuke, Shimono Joji, Yamada Kyohei, Muto Reiji, Kizaki Masahiro, Nagafuji Koji, Tamaru Jun-ichi, Tokuhira Michihide, Ohshima Koichi	4. 巻 43
2. 論文標題 Methotrexate-associated Lymphoproliferative Disorders in Patients With Rheumatoid Arthritis: Clinicopathologic Features and Prognostic Factors	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The American Journal of Surgical Pathology	6. 最初と最後の頁 869-884
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/PAS.0000000000001271	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 栗田大輔, 三好寛明, 市川理子, 山田恭平, 武藤礼治, 佐々木裕哉, 河本啓介, 田丸淳一, 得平道英, 大島孝一
2. 発表標題 慢性関節リウマチに発症するメトトレキサート関連リンパ増殖性疾患の臨床病理学的解析：組織学的分類および予後予測因子の提唱
3. 学会等名 第58回日本リンパ網内系学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Daisuke Kurita, Hiroaki Miyoshi, Ayako Ichikawa, Yuya Sasaki, Keisuke Kawamoto, Joji Shimono, Masao Matsuoka, Masahiro Kizaki, Masao Seto, Jun-ichi Tamaru, Michihide Tokuhira and Koichi Ohshima
2. 発表標題 Clinicopathological Study of Methotrexate-Associated Lymphoproliferative Disorders in Rheumatoid Arthritis Patients: Histological Classification and Predictive Factors for Disease Progression
3. 学会等名 The 59th ASH Annual Meeting & Exposition (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----