

令和 6 年 6 月 24 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2023

課題番号：19K07863

研究課題名（和文）本邦CLLの病態解明に基づく簡便な新規診断法の確立

研究課題名（英文）Establishment of a novel diagnostic method based on the pathogenesis of CLL in Japan

研究代表者

瀧澤 淳（Takizawa, Jun）

新潟大学・医歯学系・准教授

研究者番号：70463990

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：日本人CLLを対象に行った前方視調査研究CLLRSG-01の結果、CLL 119例とCLL以外の成熟B細胞腫瘍 82例が集積された。診断には末梢血自然乾燥標本を用いた形態観察とフローサイトメトリーを用いた免疫形質確認が重要であるが、日本人症例は免疫形質が非典型である症例が欧米症例に比べて多いことが明らかになった。Matutes score 4点以上の典型例は生検組織を用いた免疫組織化学により全例がLEF1陽性であり、一部の表面形質非典型例の診断にLEF1の免疫組織化学が有用であることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

100例以上の日本人CLL患者を対象とした初めての前方視調査研究（CLLRSG-01研究）の最終解析の結果、欧米に比べ、免疫形質が非典型的な症例が多く、免疫グロブリン重鎖遺伝子変異例が多く、免疫グロブリン遺伝子の種類が異なることが明らかにされた。形態診断に際して、日本の塗抹標本作成方法が独特であり大型細胞として固定されるため、CLL以外の成熟B細胞腫瘍と診断される可能性があり、自然乾燥標本による形態観察が重要であることも明らかになり、今後の実地診療に大変有益な知見が得られたため、学術的・社会的な意義も大きいと考える。

研究成果の概要（英文）：The results of the prospective CLLRSG-01 study, conducted on Japanese patients with CLL, accumulated 119 patients with CLL and 82 with mature B-cell neoplasms other than CLL. For diagnosis, morphology using naturally air-dried peripheral blood smears and immunophenotypes using flow cytometry are important, but it has been revealed that Japanese patients are more likely to have atypical immunophenotypes than Western patients. All typical patients with a Matutes score of 4 or higher were LEF1 positive by immunohistochemistry using biopsy tissue, and LEF1 immunohistochemistry is useful for diagnosing some atypical immunophenotype patients.

研究分野：血液内科学

キーワード：CLL CLLRSG-01 LEF1 IGHV TP53

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

慢性リンパ性白血病 (chronic lymphocytic leukemia: CLL) は欧米で最も多い成人白血病であるが、本邦の頻度は約 1/10 と稀な疾患である。発症に人種差など遺伝的因子が想定されるが、その本態は解明されていない。臨床的には類縁疾患が多く、その鑑別に形態や免疫形質の確認だけでなく遺伝子解析や組織学的検討が必要であり難渋する症例も多い。形態診断に際しては、日本独特の強制乾燥塗抹標本を用いて行われてきたため、自然乾燥標本を用いる他国と細胞形態が違うものを診断している可能性が否めない。また日本人 CLL は形態的亜型分類による Atypical CLL の頻度が約 4 割を占め、欧米より頻度が高いとされてきたが、こちらも標本作成過程の違いが影響している可能性がある。

鈴宮、青木らにより日本で構築した新しい CLL 研究グループ (CLLRSG) に申請者は事務局として参加したが、まず欧米との形態観察を含め検査手法の確認を行うために、ウーン大学 Jäger 教授のグループと harmonization study を企画した。これは双方の CLL 患者 10 名ずつの血液検体を交換して、強制乾燥標本と自然乾燥標本による形態診断、フローサイトメトリー解析による表面形質、FISH 解析による染色体異常、IGHV 変異解析を行い、結果を比較する研究であり、その結果、双方の結果に概ね違いがないことが確認された。この結果確立された手法を用いて、本邦で初めての CLL および類縁疾患の多数例を対象にした前方視的調査研究 (CLLRSG-01) が行われ、2011 年から 2015 年に国内 47 施設から 200 例を超える CLL および類縁疾患が集積された。中間解析結果を 2015 年および 2017 年の国際 CLL ワークショップ (international workshop on CLL: iwCLL) で発表したが、最終解析は未実施であった。

マンツル細胞リンパ腫 (MCL) におけるサイクリン D1 (CCND1) の転座あるいは蛋白発現や、有毛細胞白血病 (HCL) における BRAF V600E 変異のような、疾患特異的な分子異常が CLL で長らく明らかになっておらず、診断確定の決め手を欠いていた。しかし、近年、病理組織検体を用いた免疫組織化学により、CLL 患者の 95% で Lymphoid-enhancer-binding factor 1 (LEF1) が陽性になることが報告され注目されている。しかし、本邦の CLL や類縁疾患の診断に有用であるか多数例の検討はされていない。

### 2. 研究の目的

(1) 国内希少疾患であるために、これまで多数例を対象にした日本人 CLL の研究を行うことが不可能であったが、今回 CLLRSG-01 研究により日本人 CLL 症例多数例を対象にして、他国と同じ自然乾燥標本を用いた国際基準による正確な形態診断を行い、日本人 CLL および類縁疾患の臨床的、形態学的 (Atypical CLL が多い?)、免疫形質、染色体異常、遺伝子異常について、海外と異なる特徴があるか明確にする。

(2) CLL と診断確定した症例と確定診断に至らなかった他の成熟 B 細胞腫瘍 (Others) の症例を比較検討して、簡便かつ正確な新しい CLL 診断システムの確立を目指す。特に Others の中で免疫形質のみが非典型で形態が CLL の範疇である症例を暫定的に low grade B-cell leukemia/lymphoma, not otherwise specified (LGBCL, NOS) と診断したが、これが本当に CLL と異なる疾患であるか特徴を明らかにする。

### 3. 研究の方法

(1) 国内多施設共同で行った CLL および類縁疾患を対象とした前方視的登録研究 (CLLRSG-01) の最終解析を行い、自然乾燥標本により形態的に CLL (Typical CLL と Atypical CLL) と CLL 以外の成熟 B 細胞腫瘍 (Others) に分類した。FCM 解析による免疫形質、染色体 FISH 解析、遺伝子解析 (IGHV 遺伝子変異)、LEF1 免疫組織化学を含めた病理組織診断を加えて、最終診断を行い日本人 CLL の特徴をまとめた。CLL は FAB 分類による形態的 Typical CLL と Atypical CLL の診断もを行い、両者の比較を行った。

(2) Others の中で WHO 分類 (改訂第 4 版) により他の成熟 B 細胞腫瘍のいずれか (PLL, HCL, HCL-v, MCL, SMZL, LPL など) の診断に至らなかったものを low grade B-cell leukemia/lymphoma, not otherwise specified (LGBCL, NOS) として、これらの症例についても FCM 解析による免疫形質、染色体 FISH 解析、遺伝子解析 (IGHV 遺伝子変異)、LEF1 の免疫組織化学を含めた病理組織診断の特徴をまとめて、比較検討を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) CLLRS-01 研究最終報告

CLLRS-01 登録例の最終解析に際して 201 例が検討対象となった。強制乾燥法で作成された末梢血塗抹標本により CLL 131 例、Others 70 例の診断となったが、自然乾燥標本により Others の 34 例が CLL と診断変更され、CLL 165 例、Others 36 例と形態診断された。免疫形質、FISH 解析、病理組織学的検討を加えた結果、CLL の 46 例が Others に診断変更され、最終的に CLL 119 例と Others 82 例とに診断された。Others 82 例は WHO 分類により、脾辺縁帯リンパ腫 (SMZL) 11 例、有毛細胞白血病バリエーション (HCL-v) 9 例、リンパ形質細胞性リンパ腫 (PLL) 5 例、MCL 5 例、前リンパ球性白血病 (LPL) 4 例、濾胞性リンパ腫 (FL) 3 例、脾びまん性赤脾髄小型 B 細胞リンパ腫 (SDRPL) 2 例、有毛細胞白血病 (HCL) 1 例と診断されたが、残り半数以上の 42 例は、どの WHO 病型とも診断できず、LGBCL, NOS となった。

CLL 119 例は WHO 分類により、Typical CLL 90 例 (76%)、Atypical CLL 29 例 (24%) と分類された。Typical CLL と Atypical CLL について比較した結果、Atypical CLL に Matutes' score 4 と 5 の割合が低く、CD13 発現例が多く、CLL として非典型的な免疫形質を有する症例が多い傾向が認められた。しかし、臨床的背景や染色体・遺伝子異常は両群に大きな差は認められなかった。

CLL 全体として日本人患者は欧米と比較して、免疫表現型が非典型である症例が多く、免疫化学療法により予後良好とされている *IGHV* 遺伝子変異例が 80% と高頻度であることが明らかになった。また、使用される *IGHV* 遺伝子の種類として欧米症例の 10% 強に認められ高頻度である *IGHV* 1-69 の頻度が中国と同等に低いことが示され、東洋症例の特徴であることが示唆された (表 1)。

表1 *IGHV*で使される遺伝子の比較 (日本と他国)

	(No.)	IGHV Member (%)							発表年
		1-2	1-69	3-7	3-21	3-23	3-30	4-34	
UA	356	4.8	18.0	4.3	1.6	7.0	4.8	7.0	2005
Italy	1426	4.2	11.9	5.8	4.1	9.4	8.4	9.0	2008
Sweden	407	4.2	14.3	3.4	8.6	5.2	5.7	6.9	2004
England	159	6.3	11.3	5.0	5.7	8.2	8.8	6.9	2003
Iran	87	3.4	5.7	12.6	0.0	4.6	11.4	5.7	2009
China	65	0.0	1.5	4.6	3.0	7.7	6.2	12.3	2008
Japan (Gunma)	80	1.3	1.3	5.0	7.5	8.8	6.3	27.5	2009
<b>Japan (CLLRS-01)</b>	<b>92</b>	<b>1.1</b>	<b>1.1</b>	<b>4.3</b>	<b>1.1</b>	<b>12.0</b>	<b>15.2</b>	<b>9.8</b>	<b>2024</b>
Austria	80	6.3	10.0	6.3	8.8	5.0	5.0	7.5	2016

これらの結果をまとめて論文発表した

(Takizawa J, Suzuki R, Izutsu K, et al. Int J Hematol. 2024;119:686).

##### (2) CLL 症例と、鑑別が問題となる LGBCL, NOS 症例との比較検討

末梢血自然乾燥塗抹標本により確認した形態は CLL の範疇としか言えないが免疫形質が異なる (CD5 陰性または CD23 陰性) LGBCL, NOS は、CLL と鑑別が困難であり、本当に CLL と異なる疾患であるかを確認するために、CLLRS-01 研究の登録症例で検討した。

CLLRS-01 登録症例の中で骨髓あるいはリンパ節などの病変組織の病理未染標本が得られた

100例 (CLL : 65例、Others : 35例) を対象にした。CLL 65例中 50例 (77%) が LEF1 陽性であったが、Others 35例の中で WHO 分類により診断された大部分 (SMZL, HCL, HCL-v, PLL, FL) の症例 (29例) は LEF1 陰性であり、SDRPL の1例と LGBCL, NOS の5例のみが LEF1 陽性であった (表2)。

表2 LEF1免疫組織化学の結果

Diagnosis	LEF1(+)	LEF1(-)	Total No.
CLL	50 ( 77)	15 ( 23)	65
Matutes' score 5	13 (100)	0 ( 0)	13
score 4	14 (100)	0 ( 0)	14
score 3	20 ( 61)	13 ( 39)	33
score 2	3 ( 60)	2 ( 40)	5
SMZL	0 ( 0)	7 (100)	7
HCL	0 ( 0)	5 (100)	5
HCL-v	0 ( 0)	3 (100)	3
B-PLL	0 ( 0)	2 (100)	2
SDRPL	1 (100)	0 ( 0)	1
FL	0 ( 0)	1 (100)	1
LGBCL, NOS	5 ( 31)	11 ( 69)	16

この中で、鑑別上重要である CLL 症例 (65例) と LGBCL, NOS 症例 (16例) の比較検討を行った。

CLL 症例の中で Matutes' score が4点または5点である免疫形質典型例 27例は全例 LEF1 陽性であった。しかし、Matutes' score が2点または3点の免疫形質非典型例 38例中、LEF1 陽性は23例 (61%) であり、15例 (39%) は LEF1 陰性であった。LEF1 陽性 CLL 50例と LEF1 陰性 CLL 15例について、臨床背景、自然乾燥塗抹標本による形態 (Typical CLL か Atypical CLL か)、免疫形質、染色体異常、遺伝子異常について比較を行った。免疫形質で、CD13 陽性、CD25 陽性、FMC7 陽性が LEF1 陰性例に多く、CD20 および CD22 弱発現例が LEF1 に少ない傾向が認められ、LEF1 陰性例は CLL として非典型的な免疫形質を有する例が多いことが示された。染色体 17p 欠失は LEF1 陽性例には全例認められなかったが、LEF1 陰性例の20%に認められ有意に頻度が高かった。それ以外は LEF1 陽性例と陰性例に有意な違いは認められなかった。

LGBCL, NOS 症例 16例の中で5例 (31%) が LEF1 陽性であり、CD5-または CD23-の症例の一部も CLL である可能性が示唆されたが、Matutes' score 3点以下の CLL 症例と同様に、これらが本当に CLL であるか明確にするためには、全ゲノム解析などの包括的な遺伝子研究が必要と考えられる。

以上から表面形質が典型である CLL 症例の診断確定に LEF1 が有用である可能性を見出し、2019年国際 CLL ワークショップ (iwCLL2019) で発表した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Takizawa Jun, Izutsu Koji, Nagai Hirokazu, Fukase Kenjiro, Nakamura Maki, Jinushi Masahisa, Suzumiya Junji	4. 巻 61
2. 論文標題 Real World Treatment Practices for Chronic Lymphocytic Leukemia in Japan: An Observational Database Research Study (CLIMBER-DBR)	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Clinical and Experimental Hematopathology	6. 最初と最後の頁 126 ~ 134
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3960/jslirt.20044	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 -
1. 著者名 Izutsu Koji, Suzumiya Junji, Takizawa Jun, Fukase Kenjiro, Nakamura Maki, Jinushi Masahisa, Nagai Hirokazu	4. 巻 61
2. 論文標題 Real World Treatment Practices for Mantle Cell Lymphoma in Japan: An Observational Database Research Study (CLIMBER-DBR)	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Clinical and Experimental Hematopathology	6. 最初と最後の頁 135 ~ 144
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3960/jslirt.20056	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 -
1. 著者名 瀧澤淳	4. 巻 79
2. 論文標題 慢性リンパ性白血病とその類縁疾患の予後予測因子	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 日本臨牀	6. 最初と最後の頁 1720~1724
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 -
1. 著者名 Suzumiya Junji, Takizawa Jun	4. 巻 111
2. 論文標題 Evolution in the management of chronic lymphocytic leukemia in Japan: should MRD negativity be the goal?	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Hematology	6. 最初と最後の頁 642 ~ 656
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12185-020-02867-0	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 -

1. 著者名 Suzuki T, Miyoshi H, Shimono J, Kawamoto K, Arakawa F, Furuta T, Yamada K, Yanagida E, Takeuchi M, Seto M, Sone H, Takizawa J, Ohshima K.	4. 巻 70
2. 論文標題 Clinicopathological analysis of splenic red pulp low-grade B-cell lymphoma.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pathology International	6. 最初と最後の頁 280 ~ 286
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/pin.12909.	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 -

1. 著者名 瀧澤 淳	4. 巻 78
2. 論文標題 慢性リンパ性白血病および類縁疾患の病因・病態と治療	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日本臨牀 増刊号 造血器腫瘍学(第2 版)	6. 最初と最後の頁 499 ~ 504
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 Izutsu Koji, Kinoshita Tomohiro, Takizawa Jun, Fukuhara Suguru, Yamamoto Go, Ohashi Yasuo, Suzumiya Junji, Tobinai Kensei	4. 巻 51
2. 論文標題 A phase II Japanese trial of fludarabine, cyclophosphamide and rituximab for previously untreated chronic lymphocytic leukemia	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Clinical Oncology	6. 最初と最後の頁 408 ~ 415
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jjco/hyaa215	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 -

1. 著者名 Takizawa Jun, Suzuki Ritsuro, Izutsu Koji, Kiguchi Toru, Asaoku Hideki, Saburi Yoshio, Masunari Taro, Utsunomiya Atae, Takeuchi Kengo, Nakamura Naoya, Ohshima Koichi, Gruber Michaela, J?ger Ulrich, Aoki Sadao, Suzumiya Junji	4. 巻 119
2. 論文標題 Characteristics of chronic lymphocytic leukemia in Japan: Comprehensive analysis of the CLLRSG-01 study	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 International Journal of Hematology	6. 最初と最後の頁 686 ~ 696
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12185-024-03741-z	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 該当する

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Jun Takizawa, Ritsuro Suzuki, Go Yamamoto, Toru Kiguchi, Atae Utsunomiya, Hideki Asaoku, Eiichi Ohtsuka, Kengo Takeuchi, Koji Izutsu, Naoya Nakamura, Koichi Ohshima, Sadao Aoki, Junji Suzumiya.
2. 発表標題 Prognosis of Chronic Lymphocytic Leukaemia in Japanese Patients: Results from the CLLRSG-01 Study.
3. 学会等名 XIX iwCLL (International Workshop on CLL). (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 瀧澤 淳
2. 発表標題 低分子阻害薬(BTK阻害薬, BCL-2阻害薬)を用いたCLLに対する最新治療.
3. 学会等名 第61回日本リンパ網内系学会総会. (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takizawa J, Suzuki R, Kawamoto K, Suzuki T, Kiguchi T, Masunari T, Utsunomiya A, Saburi Y, Murakami J, Kitazume K, Suzuki Y, Takeuchi K, Nakamura N, Ohshima K, Suzumiya J
2. 発表標題 Expression of LEF1 in Japanese cases of CLL (CLLRSG-01 study).
3. 学会等名 XVIII iwCLL (international Workshop on CLL) meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Jun Takizawa, Ritsuro Suzuki, Atae Utsunomiya, Kengo Takeuchi, Koji Izutsu, Naoya Nakamura, Koichi Ohshima, Sadao Aoki, Junji Suzumiya.
2. 発表標題 Significance of sIL-2R and LD in predicting time to first treatment in Japanese CLL patients with early asymptomatic disease.
3. 学会等名 XX iwCLL (International Workshop on CLL). (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 瀧澤 淳
2. 発表標題 未治療CLLに対する新規治療戦略
3. 学会等名 第63回日本リンパ網内系学会学術集会・総会（招待講演）
4. 発表年 2023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
研究分担者	曾根 博仁 (Sone Hirohito) (30312846)	新潟大学・医歯学系・教授  (13101)	
研究分担者	大島 孝一 (Ohshima Koichi) (50203766)	久留米大学・医学部・教授  (37104)	
研究分担者	河本 啓介 (Kawamoto Keisuke) (60791481)	久留米大学・医学部・助教  (37104)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------