

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：33920

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K16204

研究課題名(和文) RNAscopeを用いた末梢性T細胞性リンパ腫、非特定型の微小環境解析

研究課題名(英文) Analysis of microenvironment of peripheral T-cell lymphoma, not otherwise specified

研究代表者

佐藤 啓 (Satou, Akira)

愛知医科大学・医学部・講師

研究者番号：40732699

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)：末梢性T細胞リンパ腫(PTCL)、非特定型のLymphoepithelioid typeはAngioimmunoblastic T-cell lymphoma with high content of epithelioid cellsに比べ予後良好であり、微小環境中の組織球の性質の違いが、予後の違いに関係していることが示唆された。またPTCLにおけるCD30免疫染色の均てん化に関する検討を行い、Ventana(OptiView)、Bond III(200-400倍希釈)、Dako Omnis(リンカーあり、100-200倍希釈)の条件でCD30の染色性、陽性率が同程度になることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

PTCL-NOSの稀な亜型であるLeLとAITL-EPIの予後、微小環境中の組織球の性質の違いを明らかにした。両者は組織学的に類似していることもあり、鑑別が問題となるが、診断時に両者を厳密に区別することが重要であり、またPTCLの微小環境が腫瘍の性質に影響を与えるということが分かった。CD30免疫染色はPTCL患者にBrentuximab vedotinの使用を決定する上でCD30免疫染色による検索は必須事項となっている。各社の自動免疫染色装置によるCD30免疫染色を均てん化することはPTCL患者におけるBrentuximab vedotinの適正使用に繋がることを期待される。

研究成果の概要(英文)：Due to the rarity and overlapping histological features, the boundary between angioimmunoblastic T-cell lymphoma with high content of epithelioid cells (AITL-EPI) and Lennert lymphoma (LeL) is still obscure. We performed comparative analysis and found that LeL had significantly better prognosis than AITL-EPI. We tested for CD68 and CD163 expression in these two entities; all of the tested cases expressed CD68 on epithelioid histiocytes, whereas CD163 expression was detected only in AITL-EPI. The frequency of CD163 positivity between AITL-EPI(33%) and LeL(0%) showed significant difference. These results suggest that M1 macrophage-rich tumor microenvironment contribute to the favorable prognosis of LeL. We also analyzed 60 cases of PTCLs for equalization of CD30 immunohistochemistry. We revealed that following conditions for each autostainer are suitable for equal CD30 immunohistochemistry: Ventana(OptiView)、Bond III(dilution 1:200-400)、Dako Omnis(with linker、dilution 1:100-200).

研究分野：人体病理学

キーワード：末梢性T細胞リンパ腫、非特定型 Lymphoepithelioid type 組織球 CD30免疫染色

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

末梢性 T 細胞性リンパ腫、非特定型 (PTCL-NOS) は末梢性 T 細胞性リンパ腫のうち、WHO 分類で明確な疾患単位として分類されている多くの PTCL のいずれにもあてはまらないものが、除外診断的に PTCL-NOS に分類される。それ故、PTCL-NOS は多様性を有する疾患単位であり、その病因および病態は未だ明らかにされていない部分が多い。またこれまで標準的な治療は確立されておらず、通常は CHOP 療法など多剤併用化学療法が行われるが、5 年生存率は 20 ~ 30% で予後不良な疾患である。

近年、種々のがんにおいて腫瘍細胞の性質だけでなく、腫瘍細胞周囲の微小環境もがんの生物学的特徴を決定する上で重要な役割を担っていることが明らかにされてきた。悪性リンパ腫においても、びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫 (DLBCL) やホジキンリンパ腫 (HL) といった欧米において頻度の高い病型では微小環境の解析が進められてきた。その結果、DLBCL や HL では微小環境が腫瘍性格や腫瘍の臨床病理学的特徴を決定する上で、強い影響を与えていることが解明された。一方、PTCL-NOS をはじめとする、日本を含むアジアで比較的頻度の高い T 細胞性リンパ腫においては、その微小環境の持つ役割は解析が進んでおらず、未だ明らかにされていない部分が多い。

我々はこれまで研究結果からサイトカインが PTCL-NOS の腫瘍性格や臨床的特徴に影響を及ぼすと考えられ、特に腫瘍を取り巻く微小環境においてサイトカインの果たす役割は重要であると推測した。我々は RNAscope を用いて PTCL-NOS の微小環境におけるサイトカインの役割を明らかにすることで、PTCL-NOS の病因・病態解明につなげたいと考えた

2. 研究の目的

RNAscope を用いて PTCL-NOS の微小環境中のサイトカインを組織標本上で直接的に視覚的に捉え PTCL-NOS の微小環境におけるサイトカインの役割につき解析、検討することを当初の目的とした。そして微小環境中のサイトカインの多寡に基づいて PTCL-NOS の臨床病理学的解析を行い、PTCL-NOS の臨床病理学的特徴とサイトカインの間の相関性等につき検討することで、PTCL-NOS の病因・病態を明らかにしたいと考えた。

Lymphoepithelioid type (LeL) は PTCL-NOS の中で類上皮様組織球の高度な増生を伴う稀な亜型である。また組織学的に類似することから LeL と鑑別が問題となる組織型として Angioimmunoblastic T-cell lymphoma with high content of epithelioid cells (AITL-EPI) が挙げられる。いずれも稀な PTCL の亜型であることから、両者の区別は曖昧となっている。両者を比較する臨床病理学的検討を行うことで、両者の特徴を明らかにしたいと考えた。またその際に両者の微小環境中に豊富に存在する組織球の性質に違いがないかを明らかにしたいと考えた。

上記とは別テーマとして PTCL-NOS を含む PTCL における CD30 免疫染色の均てん化を目的として検討を行った。PTCL において、使用する自動染色装置の種類により CD30 免疫染色の結果に違いが生じることが分かった。PTCL における CD30 免疫染色は診断や治療において Brentuximab vedotin (BV) 導入を決定するうえで重要であり、均質化することが望まれる。一般的に広く普及している Bond III (Bond)、Dako Omnis (Dako)、Ventana BenchMark Ultra (Ventana) の三種の自動染色装置において装置間の染色均一化を目的とした検討を行った。

3. 研究の方法

過去に LeL と診断された 25 例、AITL と診断された 104 例の再評価を行い、LeL、AITL-EPI、通常型 AITL (nAITL)、分類不能型の 4 型に分類した。その後、LeL と AITL-EPI の臨床病理学的特徴を比較検討した。具体的にはそれぞれの症例の年齢、性別、臨床病期 (Ann Arbor stage)、B 症状の有無、詳細な浸潤部位、治療法、治療反応性、予後などの臨床情報ならびに EBV 陽性細胞の数等を調べ、両疾患群間で有意な差がないかを統計学的に解析した。また LeL と AITL-EPI に出現している類上皮組織球の性質に違いがないかを検討するために、PD-L1、CD68、CD163 免疫染色を行った。

PTCL-NOS を含む PTCL における CD30 免疫染色の均てん化を目的とした検討では、初めに Classic Hodgkin Lymphoma (CHL) 3 例、PTCL-NOS 1 例、扁桃炎 1 例をコントロールとして Bond、Dako、Ventana の自動染色装置の CD30 免疫染色時の条件検討を行った。その後、設定した条件下で各々の自動染色装置で PTCL 60 例 (PTCL-NOS 15 例、AITL 30 例、AITL 10 例、ALCL 5 例) における CD30 免疫染色の染色性の比較検討を行った。

4. 研究成果

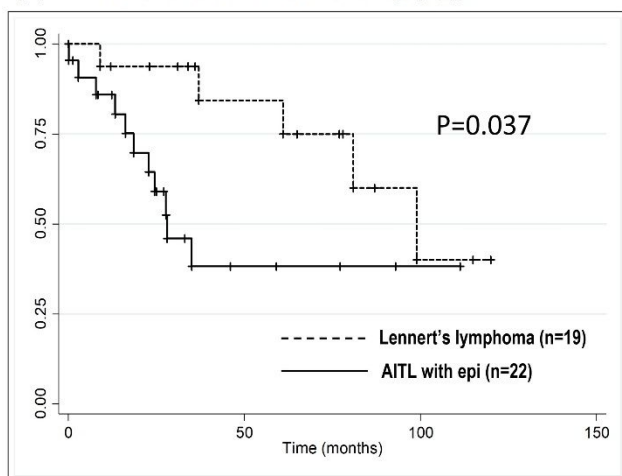
(1) 過去に LeL と診断された 25 例、AITL と診断された 104 例の再評価を行った。25 例の LeL のうち 19 例が LeL、4 例が AITL-EPI、2 例が分類不能型に分類された。分類不能型とした 2 例は高度の類上皮反応を伴い、Follicular helper T-cell (Tfh) および Cytotoxic marker の両方に陽性を示した症例である。104 例の AITL のうち 18 例が AITL-EPI、86 例が nAITL に分類された。最終的に各型の症例数は順に LeL (n=19)、AITL-EPI (n=22)、nAITL (n=86)、分類不能型 (n=2) であった。AITL-EPI (n=22) と LeL (n=19) の臨床病理学的特徴を比較検討したところ、LeL は CD8、

TIA-1 陽性率が有意に高く、CD4 陽性率が有意に低かった。また背景に EBV 陽性細胞が存在する頻度は AITL-EPI が有意に高かった(表 1)。また 両者の全生存曲線を比較したところ、AITL-EPI は LeL に比べて有意に予後不良であった。(図 1)

表1 LeLおよびAITL-EPIの比較検討

Variable	AITL with epi (n=22)	Lennert's lymphoma (n=19)	P
Age (median[range])	72 (32-86)	63 (43-80)	0.15
Sex, male	12/22 (55%)	8/19 (37%)	0.35
Extranodal >1	2/21 (9.5%)	1/16 (6.3%)	1.0
Stage III/IV	16/21 (76%)	9/15 (60%)	0.47
B symptoms	9/21 (43%)	2/16 (13%)	0.071
PS>1	3/17 (18%)	0/12 (0%)	0.25
Immunohistochemistry			
CD4	21/22 (91%)	6/19 (32%)	<0.0010
CD8	0/22 (0%)	8/19 (42%)	0.005
TIA-1	0/22 (0%)	15/19 (79%)	<0.0010
PD-L1 (Epi*)	18/18 (100%)	16/16 (100%)	1.0
CD68 (Epi*)	15/15 (100%)	17/17 (100%)	1.0
CD163 (Epi*)	5/15 (33%)	0/17 (0%)	0.010
EBER in background	16/21 (76%)	6/18 (33%)	0.0070

図 1 LeLおよびAITL-EPIの全生存曲線



(2)AITL-EPI と LeL に出現している類上皮組織球の性質に違いが無いかを検討するために、PD-L1、CD68、CD163 免疫染色を行った。その結果、PD-L1 および CD68 は全ての症例の類上皮組織球に陽性を示したが、CD163 は AITL-EPI 症例の類上皮組織球のみに陽性を示し、陽性率は AITL-EPI (33%, 5/15)の方が LeL (0%, 0/17)に比べ有意に高かった (表 1)。つまり、AITL-EPI では類上皮組織球が M2 macrophage である症例が一定数含まれるのに対し、LeL ではすべて M1 macrophage であった。

以上より AITL-EPI と LeL では臨床的そして病理学的に有意な違いが見られた。従って、Tfh および Cytotoxic marker 両方の免疫染色を行い、両者を区別することは臨床的にも意義がある。また両者の予後の違いは類上皮組織球の性質に起因している可能性が示唆された。

(3)Bond、Dako、Ventana の三種の自動染色装置において装置間の CD30 免疫染色の均一化を目的として、まずは CHL3 例、PTCL-NOS1 例、扁桃炎 1 例をコントロールとして各自動染色装置の CD30 免疫染色時の条件検討を行った。まずは表 2 に示した、実際の施設で行われている条件で染色性に違いがあるか検討した。その結果、Dako では染色強度、陽性率が共に低いことが分かった。その後、抗体の希釈倍率変更、Dako による染色時のリンカー追加等の条件変更を行って検討した結果、表 3 で示す条件で CD30 免疫染色を行うと Bond および Dako は Ventana と同等の染色強度、陽性率を示すことが分かった。

表2

	クローン	希釈倍率	リンカー
Dako Omnis	Ber-H2	60倍	-
Bond III	Ber-H2	120倍	+
OptiView	Ber-H2	希釈済み	+

表3

	抗体濃度	リンカー
Bond III	200、400倍希釈	+
Dako Omnis	100、200倍希釈	+
Ventana	希釈済み	+

(4)表3の条件下で各々の自動染色装置で PTCL60 例 (PTCL-NOS15 例、ATLL30 例、AITL10 例、ALCL5 例) における CD30 免疫染色の染色性の比較検討を行った。その結果、腫瘍における CD30 陽性の cut-off line を 10%とした場合、Ventana と比較した際の三装置の判定一致率は表4の様になり、高い一致率であった。以上より CD30 免疫染色に関して、Ventana(希釈済抗体、OptiView 使用)、Bond III(抗体 200-400 倍希釈)、Dako Omnis(リンカーあり、抗体 100-200 倍希釈)が同程度の染色性となることが分かった。

表4

Ventanaと比較した陰性陽性一致率 (Cut-off 10%)

	Bond III x200 and Dako Omnis x100	Bond III x200 and Dako Omnis x200	Bond III x400 and Dako Omnis x100	Bond III x400 and Dako Omnis x200
ATLL	97%	87%	97%	87%
PTCL-NOS	93%	93%	100%	100%
AITL	90%	90%	90%	90%
ALCL	100%	100%	100%	100%
ALL	95%	90%	97%	92%

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Satou Akira, Nakamura Shigeo	4. 巻 10
2. 論文標題 EBV positive B cell lymphomas and lymphoproliferative disorders: Review from the perspective of immune escape and immunodeficiency	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Medicine	6. 最初と最後の頁 6777 ~ 6785
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cam4.4198	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Morichika Kazuho, Karube Kennosuke, Sakihama Shugo, Watanabe Risa, Kawaki Mamoru, Nishi Yukiko, Nakachi Sawako, Okamoto Shiki, Takahara Taishi, Satou Akira, Shimada Satoko, Shimada Kazuyuki, Tsuzuki Toyonori, Fukushima Takuya, Morishima Satoko, Masuzaki Hiroaki	4. 巻 45
2. 論文標題 The Positivity of Phosphorylated STAT3 Is a Novel Marker for Favorable Prognosis in Germinal Center B-Cell Type of Diffuse Large B-Cell Lymphoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 American Journal of Surgical Pathology	6. 最初と最後の頁 832 ~ 840
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/PAS.0000000000001691	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 Satou Akira, Banno Shogo, Kohno Kei, Takahara Taishi, Takahashi Emiko, Nobata Hironobu, Iwagaito Shiho, Watanabe Daisuke, Hanamura Ichiro, Takami Akiyoshi, Ito Yasuhiko, Nakamura Shigeo, Tsuzuki Toyonori	4. 巻 -
2. 論文標題 Primary cutaneous methotrexate-associated B-cell lymphoproliferative disorders other than EBV-positive mucocutaneous ulcer: clinical, pathological, and immunophenotypic features	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pathology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.pathol.2020.10.019	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 Satou Akira, Takahara Taishi, Tsuzuki Toyonori	4. 巻 12
2. 論文標題 Pathological and Molecular Features of Nodal Peripheral T-Cell Lymphomas	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Diagnostics	6. 最初と最後の頁 2001 ~ 2001
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/diagnostics12082001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Takahara Taishi、Satou Akira、Tsuzuki Toyonori、Nakamura Shigeo	4. 巻 12
2. 論文標題 Hodgkin Lymphoma: Biology and Differential Diagnostic Problem	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Diagnostics	6. 最初と最後の頁 1507 ~ 1507
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/diagnostics12061507	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	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 0件)

1. 発表者名 佐藤啓
2. 発表標題 Angioimmunoblastic T-cell lymphoma with High Content of Epithelioid Cells および Lennert Lymphoma の臨床病理学的検討
3. 学会等名 第67回日本病理学会秋期特別総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 関雅文
2. 発表標題 CD30 免疫組織化学染色の自動免疫染色機器間における均一化
3. 学会等名 第112回日本病理学会総会
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

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
---------	---------