

令和 5 年 6 月 30 日現在

機関番号：83904

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K16279

研究課題名(和文) クローン解析とゲノム解析に基づくホジキンリンパ腫細胞の起源探索

研究課題名(英文) Exploration of the origin of classic Hodgkin lymphoma cells by clonal and genetic analyses

研究代表者

鈴木 康裕 (SUZUKI, Yasuhiro)

独立行政法人国立病院機構(名古屋医療センター臨床研究センター)・その他部局等・医師

研究者番号：90898016

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：古典的ホジキンリンパ腫(cHL)は腫瘍細胞であるHodgkin/Reed-Sternberg細胞の割合が少ないこともあり、腫瘍の発症や進展のメカニズムはまだ十分には明らかにされていない。我々は、クローンが同一で共通のPD-L1異常をもつと考えられた同時期発症のcomposite lymphoma(cHLとNK/T細胞リンパ腫)や、同時期の別部位にcHLと濾胞性リンパ腫を認めた症例を経験した。本研究では、これらの症例を病理学的、分子遺伝学的に詳細に検討し、両腫瘍の関連性を追跡することにより、HRS細胞の腫瘍の起源ならびに進展の分子メカニズムの解析を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ホジキンリンパ腫とのまれなcomposite/synchronous lymphoma症例を詳細に解析し、両腫瘍の関連性を追跡することにより、HRS細胞の腫瘍の起源ならびに進展の分子メカニズムの解析を行った。これらのまれなリンパ腫の詳細な解析により、腫瘍の可塑性(plasticity)や細胞系統をまったく転化(transdifferentiation)に関する重要な知見を得ることができたことは学術的な意義があるものと考えられる。また、これらの知見はリンパ腫発症の病態解明のみならず、治療開発という点でも有用となる可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：In classic Hodgkin lymphoma (cHL), the mechanisms of tumor pathogenesis and progression are not fully elucidated. We experienced a case with composite lymphoma (cHL and NK/T cell lymphoma) with identical clones and common PD-L1 abnormality and another case with synchronous lymphoma (cHL and follicular lymphoma) with identical clones. In this study, we analyzed these cases in detail pathologically and molecular genetically, and evaluated the relationship among these tumors. By these analyses, we explored the molecular mechanisms about the tumor origin and progression of cHL cells.

研究分野：血液内科学

キーワード：composite lymphoma クローン解析 PD-L1 IgH::BCL2 plasticity

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

古典的ホジキンリンパ腫 (classic Hodgkin lymphoma ; cHL) は多彩な反応性細胞を背景に絶対数の少ない腫瘍細胞である Hodgkin/Reed-Sternberg (HRS) 細胞が増殖する像を特徴とするリンパ腫である。近年、ホジキンリンパ腫は PD-L1 異常による免疫逃避を基盤とする腫瘍であることが明らかにされてきている。PD-1 阻害薬 (ニボルマブ、ペンブロリズマブ) が著効するという基礎データや臨床試験結果に基づき、PD-1 阻害薬が臨床応用されている。

高感度 PCR 法や single cell レベルにおける遺伝子解析などにより腫瘍細胞である HRS 細胞の解析が行われてきているものの、その分子生物学的理解は他の造血器腫瘍に比べても不明な点が多い。HRS 細胞はどのような変異から始まり、どのような変異の蓄積で腫瘍化するのか、また、腫瘍細胞とそれを取り囲む免疫微小環境との関係についても十分には分かっていない。HRS 細胞の腫瘍割合が少ないこともあり、症例を集積して多数のホジキンリンパ腫のゲノム解析を実施することが困難であることがその要因の一つである。

一方、別のアプローチとして、composite lymphoma の症例や非ホジキンリンパ腫からホジキンリンパ腫へ進展した症例などユニークな症例を選択し、複数のクローンを追跡することにより、腫瘍の起源や変異の獲得の順番を類推する方法がある。これまでも非ホジキンリンパ腫からホジキンリンパ腫を発症した症例に対し、経時的に複数のクローンを追跡することにより HRS 細胞の起源ならびに発症に関わる解析結果が報告されている。

2. 研究の目的

我々は、クローンが同一で共通の PD-L1 異常をもつと考えられた同時期発症の composite lymphoma (ホジキンリンパ腫と NK/T 細胞リンパ腫) を経験した。本研究では、この症例をホジキンリンパ腫発症モデルとして、病理学的な解析と分子遺伝学的な解析を詳細に行い、その解析結果を統合し、両腫瘍の関連性を追跡することにより、ホジキンリンパ腫の発症および進展に関わる分子遺伝学的メカニズムを明らかにすることを目的とする。また、別の composite lymphoma でも同様の解析を行うことで、未知な領域の多いホジキンリンパ腫の腫瘍の本体に迫ることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) クローンモデルの妥当性の検証とホジキンリンパ腫の founding 変異の探索

我々が経験した古典的ホジキンリンパ腫と NK/T 細胞リンパ腫を同時発症した composite lymphoma をもとに病理学的な解析と分子遺伝学的な解析を進めた。両腫瘍の関係性を示すものとして、クローン分岐モデル、クローン進化モデルの二つのモデルが想定された。クローン分岐モデルは、前リンパ腫クローンより腫瘍特異的変異を獲得し、それぞれの腫瘍に進展したモデルである。クローン進化モデルは、完成したホジキンリンパ腫からクローン進化した結果、NK/T 細胞リンパ腫に進展したというモデルである。腫瘍細胞の割合が多い NK/T 細胞リンパ腫において、腫瘍検体より抽出した DNA から悪性リンパ腫の発症に関連した標的遺伝子パネル (423 遺伝子) を用いて NGS による配列決定、解析を行った。ターゲットシーケンスにより得られたリード情報に対し、コピー数解析ソフトを用いてコピー数解析を行った。クローン解析は同様に免疫グロブリン、T 細胞受容体関連遺伝子のシーケンスを行うことで実施した。腫瘍細胞の割合が少ないホジキンリンパ腫においては、レーザーマイクロダイセクションによる HRS 細胞単一細胞由来の DNA を複数採取し、ゲノム解析をさらに追加で行うことでこれらのモデルの妥当性を検証することを試みた。FISH 法での腫瘍細胞の PD-L1 のコピー数解析の検討も行った。

(2) HRS 細胞の病理学的検討による HRS 細胞の lineage 検索

我々が経験した同時期発症の composite lymphoma では、片方の腫瘍が NK/T 細胞リンパ腫として発症していることから、一般的に B 細胞由来であることが報告されているホジキンリンパ腫との腫瘍の lineage が問題となる。HRS 細胞の lineage 検索のため、ホジキンリンパ腫のみならず、NK/T 細胞リンパ腫においても、PAX5・BOB1・OCT2 などの転写因子の免疫染色を施行した。さらなる病理学的検討として、PD-L1、EBER-ISH、細胞障害性分子 (GranzymeB、TIA-1、Perforin) などの免疫染色を施行した。

(3) ホジキンリンパ腫と別のリンパ腫の composite lymphoma の検証

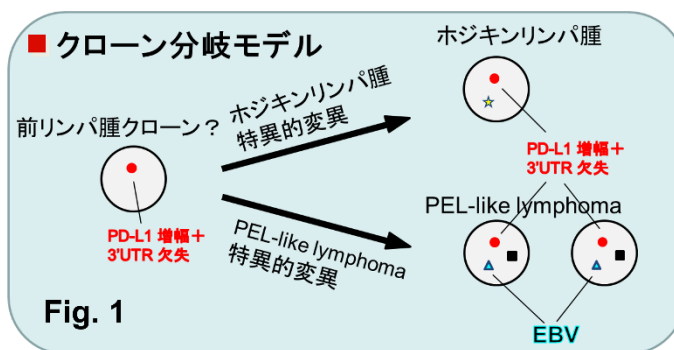
ホジキンリンパ腫と濾胞性リンパ腫の composite lymphoma である別の症例についても、同様にクローンモデルの検証や詳細な病理学的検討、分子遺伝学的検討を行った。

4. 研究成果

(1) クローンモデルの妥当性の検証とホジキンリンパ腫の founding 変異の探索

ホジキンリンパ腫と NK/T 細胞リンパ腫症例の病理学的検討を進めたところ、いずれも PAX5 は陰性であったが、BOB1・OCT2 が陽性であり、その起源は B 細胞由来と考えられた。NK/T 細胞リンパ腫と考えられた症例は胸水・心嚢水のみにもみられたことより PEL-like lymphoma と診断さ

れた。縦隔リンパ節病変（ホジキンリンパ腫）と胸水病変（PEL-like lymphoma）との関係性を評価するために、分子遺伝学的検討を行った。ターゲットシーケンスによる解析では、胸水検体（PEL-like lymphoma）で、PD-L1 増幅と 3' -UTR 欠失ならびに、*STAT3*、*CREBBP*、*KRAS* などの遺伝子変異を認め、これらの異常は縦隔リンパ節でも認められた。胸水検体（PEL-like lymphoma）では、免疫グロブリン、T 細胞受容体関連遺伝子の再構成を認め（IGHD6-25-IGHJ4, TRBD2*01-TRBJ2-7）、同様の再構成は縦隔リンパ節（ホジキンリンパ腫）でも認められ、同一クローン由来の可能性が示唆された。レーザーマイクロダイセクションによるホジキンリンパ腫単一細胞由来の DNA 解析を試みたが、NGS 解析にふさわしい DNA の質と量が得られなかった。そのため、これまでの PEL-like lymphoma 検体での NGS 解析結果をふまえ、FISH 法によるアプローチに変更したところ、ホジキンリンパ腫と PEL-like lymphoma 両病変の腫瘍細胞に PD-L1 の増幅と PD-L1 3' 側の遺伝子領域の欠失の両異常が確認された。本症例では縦隔リンパ節と胸水・心嚢水は異なる病理診断であったが、詳細な病理学的・分子遺伝学的検討にて、両病変は同一クローン由来であり、EBV 感染がクローン進展の一つのメカニズムと考えられた。同時発症したリンパ腫症例の解釈モデルとして、ほぼ同時期に発症したという点、EBV 感染は縦隔リンパ節の腫瘍細胞には認めず、胸水の腫瘍細胞にのみ認めたとこの点を考慮して、クローン分岐モデルの可能性を高く考えている（Fig. 1）。

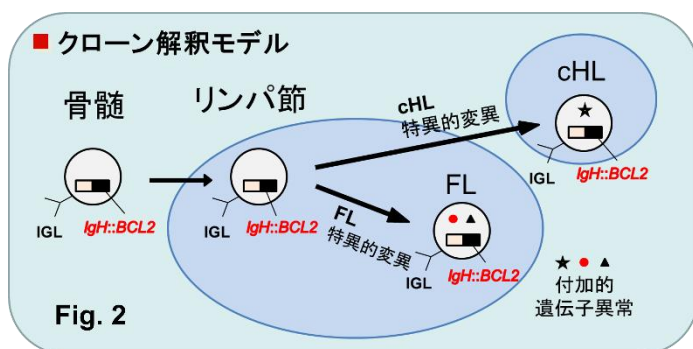


(2) HRS 細胞の病理学的検討による HRS 細胞の lineage 検索

ホジキンリンパ腫と NK/T 細胞リンパ腫症例の病理学的検討を進めたところ、いずれも PAX5 は陰性であったが、BOB1・OCT2 が陽性であり、その起源は B 細胞由来と考えられた。NK/T 細胞リンパ腫と考えられた症例は胸水・心嚢水のみにもみられたことより PEL-like lymphoma と診断された。縦隔リンパ節生検・胸水病変ともに、CD3⁻、CD4⁻、CD5⁻、CD8⁻、CD20⁻、PAX5⁻、BOB1⁺、OCT2⁺、CD30⁺、CD56⁻、PD-L1⁺ であったが、胸水の異型細胞でのみ EBER と GranzymeB が陽性であった。

(3) ホジキンリンパ腫と別のリンパ腫の composite lymphoma の検証

ホジキンリンパ腫と濾胞性リンパ腫が同時期に別部位に発症した別の症例を認め、クローンモデルの検証や詳細な病理学的検討、分子遺伝学的検討を行った。同症例では、右耳下腺腫脹を認め、右耳下腺生検では、リンパ球豊富型古典的ホジキンリンパ腫（Lymphocyte rich classic Hodgkin lymphoma）の病理診断が得られた。右鼠径リンパ節腫大も認め、鼠径リンパ節生検が施行され、濾胞性リンパ腫（Follicular lymphoma, grade1）の病理診断が得られた。右耳下腺（ホジキンリンパ腫）と右鼠径リンパ節（濾胞性リンパ腫）の関係性を検討したところ、鼠径リンパ節検体（濾胞性リンパ腫）では、IgLV1-51-J3 の再構成を認め、これらの再構成は右耳下腺（ホジキンリンパ腫）、骨髓、末梢血検体でも認められ、同一クローン由来である可能性が示唆された。ターゲットシーケンスによる解析では、鼠径リンパ節検体（濾胞性リンパ腫）で IgH::BCL2 転座を認め、同異常は耳下腺検体（ホジキンリンパ腫）でも認められた。耳下腺検体（ホジキンリンパ腫）では、*NOTCH1* の遺伝子変異が VAF : 0.037 で認められ、鼠径リンパ節検体（濾胞性リンパ腫）では、*KMT2D*、*CREBBP*、*ATP6V1B2* などの遺伝子変異が認められた。両検体を用いた FISH 解析では、両病変の腫瘍細胞で PD-L1 の増幅は認めず、BCL2 転座が認められた。ホジキンリンパ腫と濾胞性リンパ腫の同時発症を認めた本症例の解析では、BCL2 異常が関連するホジキンリンパ腫と考えられた。両病変の関係性として、骨髓で免疫グロブリン再構成と IgH::BCL2 異常を獲得し、その後、それぞれに特異的な遺伝子変異を獲得した結果、ホジキンリンパ腫と濾胞性リンパ腫が発症した可能性が考えられた（Fig. 2）。



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 Shimada Kazuyuki, Yoshida Kenichi, Suzuki Yasuhiro, Iriyama Chisako, Inoue Yoshikage, Sanada Masashi, Kataoka Keisuke, Yuge Masaaki, Takagi Yusuke, Kusumoto Shigeru, Masaki Yasufumi, Ito Takahiko, Inagaki Yuichiro, Okamoto Akinao, Kuwatsuka Yachiyo, Nakatochi Masahiro, Shimada Satoko, Miyoshi Hiroaki et al.	4. 巻 137
2. 論文標題 Frequent genetic alterations in immune checkpoint-related genes in intravascular large B-cell lymphoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Blood	6. 最初と最後の頁 1491 ~ 1502
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1182/blood.2020007245	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5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 鈴木康裕、安田貴彦、佐藤啓、坂田征士、竹内賢吾、市原周、西村理恵子、眞田昌、中村栄男、飯田浩充、永井宏和
2. 発表標題 PD-L1増幅と3' -UTR欠失の両異常を有し、ホジキンリンパ腫からPEL-like lymphomaへのクローン進展が疑われた一例
3. 学会等名 第62回 日本リンパ網内系学会学術集会・総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Shinichi Makita, Shigeru Kusumoto, Akiko Miyagi Maeshima, Hiroya Hashimoto, Hideki Tsujimura, Toshiki Uchida, Hiroaki Inoue, Eiichi Ohtsuka, Mitsutoshi Kurosawa, Nobuyuki Takayama, Eiju Negoro, Yasuhiro Suzuki et al.
2. 発表標題 Clinical Outcomes of Elderly Patients with Advanced-Stage Classic Hodgkin Lymphoma Who Received an ABVD Regimen: A Multi-Center Retrospective Study in Japan (HORIZON study)
3. 学会等名 63rd ASH Annual Meeting and Exposition (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鈴木康裕、中別府聖一郎、安田貴彦、佐藤啓、山田朋美、眞田昌、飯田浩充、大塚眞紀、永井宏和
2. 発表標題 同時期の別部位にホジキンリンパ腫と濾胞性リンパ腫を併発した一例
3. 学会等名 第63回 日本リンパ網内系学会学術集会・総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Shigeru Kusumoto, Wataru Munakata, Ryunosuke Machida, Takashi Terauchi, Hiroaki Onaya, Masahiko Oguchi, Shinsuke Iida, Kisato Nosaka, Yasuhiro Suzuki, Yasuhiko Harada, Kana Miyazaki, et al.
2. 発表標題 Interim PET-guided ABVD or ABVD/escalated BEACOPP for newly diagnosed advanced-stage classic Hodgkin lymphoma (JCOG1305, INNOVATE-HL study)
3. 学会等名 64th ASH Annual Meeting and Exposition (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Akinao Okamoto, Masashi Sanada, Takahiko Yasuda, Seiichi Kato, Akira Sato, Kosei Matsue, Hiroki Hosoi, Masahiro Yoshida, Satsuki Murakami, Eisei Kondo, Yasufumi Masaki, Yasuhiro Suzuki, Kana Miyazaki, et al.
2. 発表標題 Prospective Study on the Usefulness of Liquid Biopsy in Patients with Unknown Fever Suspected of Malignant Lymphoma
3. 学会等名 64th ASH Annual Meeting and Exposition (国際学会)
4. 発表年 2022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
---------	---------