

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 18 日現在

機関番号：37104

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860285

研究課題名(和文)末梢性T細胞性リンパ腫, 非特異型は腫瘍性T細胞のサブタイプで細分類できるか?

研究課題名(英文)Classification of PTCL, NOS by subtype of neoplastic T-cell

研究代表者

三好 寛明(Miyoshi, Hiroaki)

久留米大学・医学部・助教

研究者番号：30647780

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：PTCL, NOSの症例に対して免疫染色を行い、腫瘍性T細胞の核内転写因子によってT細胞のサブタイプに分類し、統計学的に比較検討を行った。CD4陽性症例のうち、Th1タイプが18%、Th2タイプが72%、その他(Th17、Treg、Tfh)のタイプが9%であった。Th1タイプとTh2タイプの統計学的比較検討を行ったところ、節外病変ありの症例がTh1タイプで有意に多く、治療効果がCR(u)、形質細胞浸潤が高度の症例がTh1タイプで有意に少なかった。また、予後曲線ではTh1タイプがTh2タイプと比較して有意に予後不良であった。

研究成果の概要(英文)：We classified cases of PTCL, NOS by subtypes of T-cells according to immunohistochemical positivity in nuclear transcriptional factors in neoplastic cells and performed statistical analysis. Of CD4 positive cases, 18% cases were classified in Th1 type, 72% cases were done in Th2 type, and 9% cases were done in other types including Th17, Treg, and Tfh. Statistical comparison between cases of Th1 and Th2 showed that cases with extranodal lesion were observed in Th1 type more than in Th2 type, and that CR(u) accomplished by initial treatment, and plasma cell infiltration were observed in cases of Th1 less than in those of Th2. Moreover, cases of Th1 showed worse prognosis in overall survival than those of Th2.

研究分野：血液病理学

キーワード：T細胞性リンパ腫 末梢性T細胞性リンパ腫,非特異型 核内転写因子 免疫染色 臨床病理学

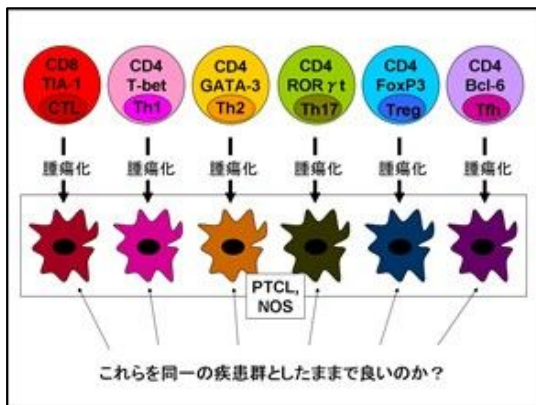
1. 研究開始当初の背景

悪性リンパ腫の WHO 分類(第 4 版)において B 細胞性リンパ腫と比較して、T 細胞性リンパ腫は臨床病理学的特徴に則した分類が依然として不十分である。特に、末梢性 T 細胞性リンパ腫, 非特異型(PTCL, NOS)の症例は除外診断によって診断が為されるという性質により混沌とした疾患群とされていた。



私たちはこれまでに末梢性 T 細胞性リンパ腫, 非特異型の亜型である濾胞タイプに関して血管免疫芽球 T 細胞性リンパ腫との共通点を見出していたものの、臨床病理学的特徴を考慮した細分類が必要であると思われた。

昨今、免疫学の進歩により T 細胞の詳細なサブタイプとそれらの機能に関する理解が進み、腫瘍性 T 細胞のサブタイプにより臨床的な特徴が異なる事が予想され、本研究を開始するに至った。



2. 研究の目的

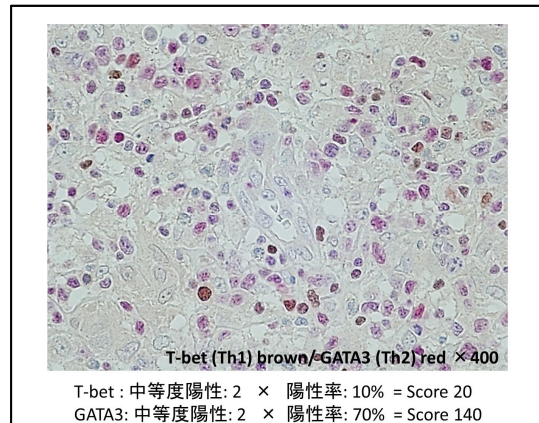
上記のような背景から、本研究では末梢性 T 細胞性リンパ腫, 非特異型を臨床的特徴や病理学的特徴をふまえて T 細胞のサブタイプ (Th1、Th2、Treg、Th17、Tfh) により細分類することを目的とした。

3. 研究の方法

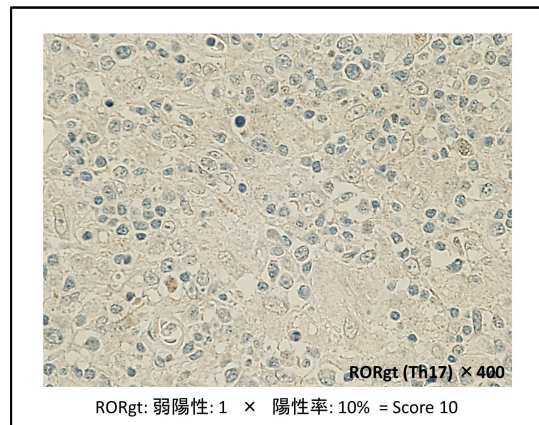
久留米大学医学部病理学講座および関連施設において診断された末梢性 T 細胞性リンパ腫, 非特異型の症例 75 例を対象として、CD4 の陽性症例に着目し、CD4 陽性 T 細胞の分化

に必要なとされている転写因子、T-bet(Th1)、GATA3(Th2)、Foxp3(Treg)、RORγt(Th17)、Bcl6(Tfh)の蛋白を同定する免疫染色を行い、腫瘍細胞の陽性率、陽性強度によりスコア化し、各症例を Th1、Th2、Treg、Th17、Tfh に分類した。スコア化は染色強度を陰性 0、弱陽性 1、中等度陽性 2、強陽性 3 とし、腫瘍細胞中の陽性率(%)と掛け算を行い、もっとも高いものに分類するという方法を取った。

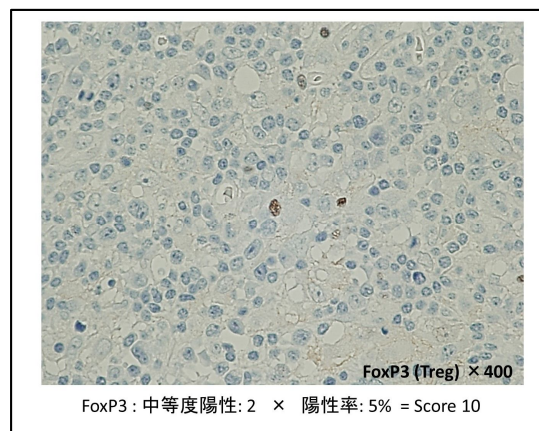
具体的なスコアリングの具体的な 1 例を以下に示す。



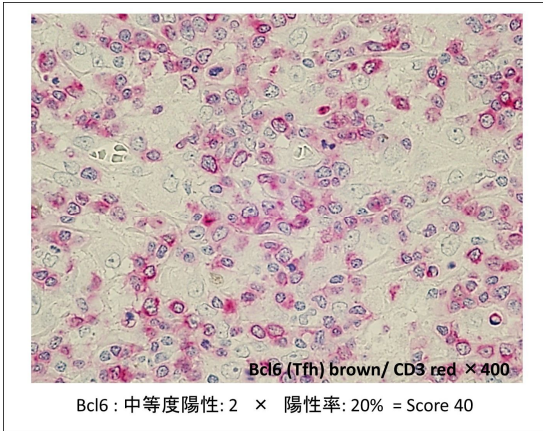
T-bet と GATA3 の免疫染色にてそれぞれ、Score 20、Score 140 と算出された。



RORγt の免疫染色にて Score 10 と算出された。



FoxP3 の免疫染色にて Score 10 と算出された。



Bcl6 は、B 細胞で陽性の細胞も存在することから、CD3(T 細胞のマーカー)と二重染色を行った。Bcl6 は Score 40 と算出された。

以上の結果から、T-bet(Th1)で Score 20、GATA3(Th2)で Score 140、RORgt(Th17)で Score 10、FoxP3(Treg)で Score 10、Bcl6(Tfh)で Score 40 であったため、本症例は GATA3 の Score が最も高い結果となり Th2 タイプの症例と分類された。

各症例について上記と同様の分類を行い、腫瘍性 T 細胞のサブタイプごとに臨床所見(発症年齢、性別、B-症状の有無、皮疹の有無、肝腫大の有無、脾腫の有無、免疫抑制剤使用歴の有無、自己免疫性疾患の既往の有無、パフォーマンスステータスが高いかどうか、リンパ節外病変の有無、骨髄浸潤の有無、末梢血浸潤の有無、臨床病期が進行しているかどうか、年齢補正された国際予後指標が高いかどうか、末梢性 T 細胞性リンパ腫における予後指標が高いかどうか、末梢血中の白血球の数、ヘモグロビンの値、血小板数、溶血性貧血の有無、LDH 上昇の有無、高ガンマグロブリン血症の有無、高カルシウム血症の有無、CRP 上昇の有無、自己抗体の有無、初回化学療法に対して完全寛解かどうか)と病理組織学的所見(腫瘍細胞が大型かどうか、腫瘍細胞に淡明な形態を有するかどうか、CD8 陽性かどうか、細胞障害性分子である TIA-1 が陽性かどうか、好中球浸潤が多いかどうか、好酸球浸潤が多いかどうか、形質細胞浸潤が多いかどうか銅貨、血管増生が多いかどうか)の評価を行った。比較的症例数の多かった Th1 と Th2 の 2 群に関して上記の項目および全死因死亡に関する予後曲線の比較検討も行った。

統計解析にはカイ 2 乗検定、t 検定、Kaplan-Meier 法、ログランクテストを用いた。

4. 研究成果

(1) 末梢性 T 細胞性リンパ腫、非特異型における各サブタイプの割合

本研究で検討を行った 75 例のうち、CD4 陰性症例が 10 例、CD4 陽性症例が 65 例であっ

た、65 例の CD4 陽性症例のうち、Th1 タイプの症例が 12 例(18%)、Th2 タイプの症例が 47 例(72%)、Th17 のタイプの症例が 2 例、Treg タイプの症例が 1 例、Tfh タイプの症例が 3 例であった(これら 3 タイプで 9%)。含まれた CD4 陽性症例のうち、Th1 タイプが 18%、Th2 タイプが 72%、その他(Th17、Treg、Tfh)のタイプが 9%であった。

(2) Th1 タイプと Th2 タイプの臨床所見に関する統計学的比較検討

結果 (臨床所見1)

	CD4 positive						All cases
	CD4 negative	Th1 (T-bet)	Th2 (GATA3)	Th17 (RORgt)	Treg (FoxP3)	Tfh (Bcl6)	
Number of cases	10	12	47	2	1	3	75
Age, avg [range]	62.8 [43-75]	65.4 [42-76]	62.6 [4-86]	68.5 [64-73]	59	52.3 [38-63]	62.8 [4-86]
Sex, MF	6/4	10/2	28/19	2/0	0/1	2/1	48/27
Clinical Findings							
B-symptoms	3/6 (50.0%)	2/3 (66.7%)	10/25 (40.0%)	0/0	0/1 (0.0%)	1/2 (50.0%)	16/37 (43.2%)
Skin rash	1/6 (16.7%)	1/3 (33.3%)	4/25 (16.0%)	0/0	1/1 (100.0%)	0/2 (0.0%)	7/37 (18.9%)
Hepatomegaly	1/6 (16.7%)	1/3 (33.3%)	1/25 (4.0%)	0/0	0/1 (0.0%)	1/2 (50.0%)	4/37 (10.8%)
Splenomegaly	1/6 (16.7%)	0/3 (0.0%)	2/25 (8.0%)	0/0	0/1 (0.0%)	1/2 (100.0%)	4/37 (10.8%)
Immunosuppressive drug	0/6 (0%)	0/3 (0.0%)	0/25 (0.0%)	0/0	0/1 (0.0%)	0/2 (0.0%)	0/37 (0.0%)
Autoimmune disease	0/6 (0%)	0/3 (0.0%)	3/25 (12.0%)	0/0	0/1 (0.0%)	0/2 (0.0%)	3/37 (8.1%)

結果 (臨床所見2)

	CD4 positive						All cases
	CD4 negative	Th1 (T-bet)	Th2 (GATA3)	Th17 (RORgt)	Treg (FoxP3)	Tfh (Bcl6)	
Number of cases	10	12	47	2	1	3	75
Clinical Findings							
Performance status, 2-4	2/6 (33.3%)	2/3 (66.7%)	6/25 (24.0%)	0/0	0/1 (0.0%)	0/2 (0.0%)	10/37 (%)
Extranodal site involved	5/6 (83.3%)	3/3 (100.0%)	10/25 (40.0%) ^{††}	0/0	1/1 (100.0%)	0/2 (0.0%)	19/37 (51.4%)
Bone marrow	1/4 (25.0%)	0/3 (0.0%)	3/24 (12.5%)	0/0	0/1 (0.0%)	0/2 (0.0%)	4/34 (11.8%)
Peripheral blood involvement	2/6 (33.3%)	0/3 (0.0%)	5/25 (20.0%)	0/0	0/1 (0.0%)	0/2 (0.0%)	7/37 (18.9%)
Ann Arbor stage, III or IV	6/6 (100.0%)	3/3 (100.0%)	15/25 (60.0%) ^{††}	0/0	0/1 (0.0%)	2/2 (100.0%)	26/37 (70.3%)
AA-PI, HI or H	3/6 (50.0%)	2/3 (66.7%)	10/25 (40.0%)	0/0	1/1 (100.0%)	2/2 (100.0%)	18/37 (48.6%)
PIT, 3or4	2/6 40.0%	0/3 0.0%	12/24 50.0% ^{††}	0/0	0/1 0.0%	1/2 50.0%	15/35 42.9%

††, p<0.025; †, p<0.05; ‡, p<0.001

結果 (臨床所見3)

	CD4 positive						All cases
	CD4 negative	Th1 (T-bet)	Th2 (GATA3)	Th17 (RORgt)	Treg (FoxP3)	Tfh (Bcl6)	
Number of cases	10	12	47	2	1	3	75
Clinical Findings							
WBC (× 10 ³), avg	12.8	4.6	9.3	-	3.7	9.0	9.31
Hemoglobin, avg	13.0	12.5	12.0	-	13.8	13.8	12.3
Plate (× 10 ³), avg	191	174	208	-	203	198	202.2
Hemolytic anemia	1/6 (16.7%)	0/3 (0.0%)	0/25 (0.0%)	0/0	0/1 (0.0%)	0/2 (0.0%)	1/37 (2.7%)
Elevated LDH	3/6 (50.0%)	0/3 (0.0%)	12/25 (48.0%) ^{††}	0/0	1/1 (100.0%)	2/2 (100.0%)	18/37 (48.6%)
Hyper-gammaglobulinemia	1/5 (20.0%)	0/3 (0.0%)	6/22 (27.3%)	0/0	0/1 (0.0%)	1/2 (50.0%)	8/33 (24.2%)
Hypercalcemia	1/6 (16.7%)	0/3 (0.0%)	1/24 (4.2%)	0/0	0/1 (0.0%)	0/2 (0.0%)	2/36 (5.6%)
Elevated CRP	6/6 (100.0%)	2/3 (66.7%)	13/24 (54.2%)	0/0	0/1 (0.0%)	1/2 (50.0%)	22/36 (61.1%)
Autoantibody	0/1 (0.0%)	0/0	0/2 (0.0%)	0/0	0/0	0/1 (0.0%)	0/4 (0.0%)
CRU/1 rate	4/5 (80.0%)	0/3 (0.0%)	13/25 (52.0%) ^{††}	0/0	1/1 (100.0%)	1/2 (50.0%)	20/36 (55.6%)

††, p<0.05; †, p<0.001

臨床所見においては節外病変がある症例が Th1 タイプで有意に多く、初回化学療法の治療効果が完全寛解の症例が Th1 タイプで有意に少なかった。

(3) Th1 タイプと Th2 タイプの病理所見に関する統計学的比較検討

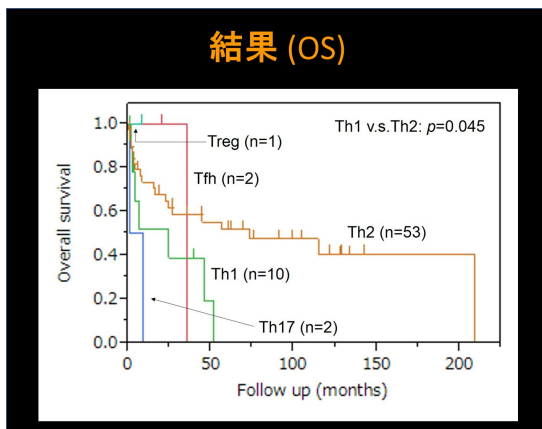
結果 (病理所見)

	CD4 positive						All cases
	CD4 negative	Th1 (T-bet)	Th2 (GATA3)	Th17 (RORgt)	Treg (FoxP3)	Tfh (Bcl6)	
Number of cases	10	12	47	2	1	3	75
Pathological Findings							
Cell size, large	6/10 (60.0%)	3/12 (25.0%)	21/47 (44.7%)	0/2 (0.0%)	1/1 (100.0%)	3/3 (100.0%)	34/75 (45.3%)
Clear cell >= 30%	7/10 (70.0%)	4/12 (33.3%)	25/47 (53.2%)	2/2 (100.0%)	1/1 (100.0%)	2/3 (66.7%)	44/75 (58.7%)
CD4 positive	4/10 (40.0%)	2/12 (16.7%)	7/47 (14.9%)	0/2 (0.0%)	0/1 (0.0%)	0/3 (0.0%)	13/75 (17.3%)
TfH positive	7/10 (70.0%)	2/12 (16.7%)	10/47 (21.3%)	0/2 (0.0%)	0/1 (0.0%)	1/2 (50.0%)	20/75 (26.7%)
Neutrophil > 1 (/10HPF)	7/10 (70.0%)	6/12 (50.0%)	25/47 (53.2%)	0/2 (0.0%)	0/1 (0.0%)	0/3 (0.0%)	38/75 (50.7%)
Eosinophil > 1 (/10HPF)	6/10 (60.0%)	3/12 (25.0%)	22/47 (46.8%)	2/2 (100.0%)	1/1 (100.0%)	1/3 (33.3%)	35/75 (46.7%)
Plasma cell > 5 (/10HPF)	4/10 (40.0%)	2/12 (16.7%)	20/47 (42.6%)	1/2 (50.0%)	1/1 (100.0%)	1/3 (33.3%)	32/75 (42.7%)
Vascular proliferation < 10 (/10HPF)	8/10 (80.0%)	8/12 (66.7%)	38/47 (80.8%)	2/2 (100.0%)	1/1 (100.0%)	3/3 (100.0%)	60/75 (80.0%)

†, p<0.048

病理所見においては形質細胞浸潤が高度の症例が Th1 タイプで有意に少なかった。

(4) Th1 タイプと Th2 タイプの全死因死亡に関する統計学的比較検討



全死因死亡に関する予後曲線の統計学的比較検討では Th1 タイプが Th2 タイプと比較して有意に予後不良であった(p=0.045)。

今回の検討では CD4 陽性の PTCL, NOS の症例において腫瘍細胞を核内転写因子により分類したところ Th1, Th2, Th17, Treg, Tfh のサブタイプに分かれる症例が一定数みられた。また、Th1 と Th2 の比較検討では予後を含むいくつかの臨床病理学的特徴において統計学的な有意差がみられた。

本研究により腫瘍細胞の T-cell の核内転写因子により臨床病理学的特徴が異なる可能性が示唆された。今後、これらのサブタイプに関する遺伝子および mRNA レベルでの差異を検討していきたい。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 4 件)

Ng SB, Ohshima K, Selvarajan V, Huang G, Choo SN, Miyoshi H, Wang S, Chua HC, Yeoh AE, Quah TC, Koh LP, Tan PL, Chng WJ: Prognostic implication of morphology, cyclinE2 and proliferation in EBV-associated T/NK lymphoproliferative disease in non-immunocompromised hosts. *Orphanet J Rare Dis* (査読あり), 9:165, 2014. DOI: 10.1186/s13023-014-0165-x.

Ng SB, Ohshima K, Selvarajan V, Huang G, Choo SN, Miyoshi H, Shimizu N, Reghunathan R, Chua HC, Yeoh AE, Quah TC, Koh LP, Tan PL, Chng WJ: Epstein-Barr virus-associated T/natural killer-cell lymphoproliferative disorder in children and young adults has similar molecular signature to extranodal nasal natural killer/T-cell lymphoma but

shows distinctive stem cell-like phenotype, *Leuk Lymphoma* (査読あり), 21: 1-8, 2014 [Epub ahead of print].
Guo Y, Arakawa F, Miyoshi H, Niino D, Kawano R, Ohshima K: Activated janus kinase 3 expression not by activating mutations identified in natural killer/T-cell lymphoma. *Pathol Int* (査読あり), 64: 263-6, 2014. DOI: 10.1111/pin.12166.
Ohshima K, Niino D, Miyoshi H: Peripheral T/NK cell lymphoma: current understanding and future perspectives. *Rinsho Ketsueki* (査読あり), 55: 418-27, 2014.

[学会発表](計 4 件)

三好寛明, 大島孝一. PTCL, NOS, T-zone variant に関する臨床病理学的検討. 厚生労働省班会議「成人固形がんに対する標準療法確立のための基盤研究班」の「難治性リンパ腫小班(木下小班)」。2014.11.29. 名古屋(名古屋大学医学部)。

三好寛明. なぜ私は病理医を目指し病理学研究に携わろうと考えたのか. 第103回日本病理学会総会オープンフォーラム. 2014.4.26. 広島(広島国際会議場)。

三好寛明, 大島孝一. Peripheral T-cell lymphoma, not otherwise specified の T-cell subtype による臨床病理学的検討. 厚生労働省班会議「成人固形がんに対する標準療法確立のための基盤研究班」の「難治性リンパ腫小班(木下小班)」。2013.11.13. 名古屋(名古屋大学医学部)。

三好寛明, 佐藤健作, 木村芳三, 喜安純一, 吉田真紀, 市川理子, 石橋千直, 郭英, 中島慎治, 河野理子, 新野大介, 杉田保雄, 大島孝一. 末梢性 T 細胞性リンパ腫, 非特異型の T 細胞サブタイプによる臨床病理学的検討. 第102回日本病理学会総会 2013.6.6. 札幌(ロイトン札幌)。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三好 寛明 (Miyoshi, Hiroaki)

久留米大学医学部助教

研究者番号: 30647780