

令和 2 年 5 月 21 日現在

機関番号：32644

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15101

研究課題名(和文) 日本における節外性T細胞性リンパ腫の臨床病理学的、遺伝子的研究

研究課題名(英文) The clinicopathological and genomic research of extranodal T-cell lymphoma in Japan

研究代表者

富田 さくら (TOMITA, Sakura)

東海大学・医学部・助教

研究者番号：20647507

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)：消化管に発生する予後が著しく不良なT細胞性リンパ腫Monomorphic epitheliotropic intestinal T-cell lymphoma (MEITL) について、病理検体(formalin-fixed paraffin-embedded tissue, FFPE)を用いた遺伝子解析を行ったところ、本邦のMEITLはがん抑制遺伝子SETD2の変異あるいは欠失を示し、JAK/STAT経路に関わる遺伝子の異常も有することを明らかにした。これらの遺伝子異常がMEITLの腫瘍発生に関与している可能性も考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

節外性に発生するT細胞性リンパ腫はいずれもまれな悪性リンパ腫で、未だ不明な点が多く、確立された治療法はない。今回、MEITLの遺伝子異常を明らかにすることができ、SETD2やJAK/STAT経路の異常が腫瘍発生に関与する可能性が示唆された。これらの遺伝子異常に基づき、有効な治療法が開発されることが望まれる。

研究成果の概要(英文)：Monomorphic epitheliotropic intestinal T-cell lymphoma (MEITL) is a rare primary T-cell lymphoma of the digestive tract with poor prognosis. I aimed to clarify the genetic characteristics of MEITL in Japan using formalin-fixed paraffin-embedded tissue (FFPE). I demonstrated that mutations and/or loss of tumor suppressor gene SETD2 and mutations of genes associated with JAK/STAT pathway in MEITL. All these gene abnormalities might have pathogenic role of MEITL.

研究分野：病理学

キーワード：MEITL

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

節外性に発生する T 細胞性リンパ腫および NK 細胞性リンパ腫はいずれもまれな悪性リンパ腫で、鼻型節外性 NK/T 細胞性リンパ腫、肝脾型 T 細胞性リンパ腫、腸管症関連 T 細胞性リンパ腫、単形性上皮向性腸管 T 細胞性リンパ腫、皮下脂肪織炎様 T 細胞性リンパ腫などがある。免疫組織化学的に CD3(+), CD5(-), TIA-1(+) という共通の免疫形質をもつことがわかっているが、未だ不明な点が多い。いずれも予後不良であり、未だ確立された治療法はない。

これまでに、ホルマリン固定パラフィン包埋組織 (formalin-fixed paraffin-embedded tissue: FFPE) に対する様々なモノクローナルあるいはポリクローナル抗体が開発されてきた。CD3 や CD5 等の汎 T 細胞マーカーや、ヘルパー T 細胞、細胞障害性 T 細胞、さらに γ -T 細胞や δ -T 細胞のマーカーも用いることができ、T 細胞、NK 細胞、T および NK 細胞性腫瘍の研究の一助となっている。また、科学技術の進歩により FFPE を用いても FISH (fluorescence in situ hybridization) や targeted sequencing 等の遺伝子解析が可能になった。このような背景をふまえて、未だ不明な点の多い節外性 T および NK 細胞性リンパ腫を詳細に解析し、その特徴を解明することが本研究の核心である。

2. 研究の目的

私は今回の研究に先立ち、本邦の腸管症関連 T 細胞性リンパ腫 (enteropathy-associated T-cell lymphoma: EATL, 現在の分類では単形性上皮向性腸管 T 細胞性リンパ腫 (Monomorphic epitheliotropic intestinal T-cell lymphoma: MEITL) の FFPE を用いた genomic profiling、FISH および免疫組織化学による解析を行ってきた。EATL は欧州での発生率が高く、以前はグルテン不耐症であるセリアック病を基盤として発生する Type I と de novo に発生する Type II に分類され、両者の免疫形質やゲノムプロファイルは異なるとされていた。私の研究の結果、本邦の EATL は組織学的に Type I EATL に類似するが免疫形質は Type II に類似することが分かった。アレイ CGH では Type I と Type II に共通とされた 9q34 の gain を 75% と最も高頻度に認め、FISH でも同様の結果を得た。また、8q24 の gain を 25% の症例に認め、MYC 遺伝子の関与も疑われた¹。最新の WHO 分類 2017 では以上の結果が引用され、本邦の EATL を含む EATL Type II は MEITL と名称が変更され、EATL とは異なる疾患概念になった。

近年、MEITL の欧州例においてがん抑制遺伝子である SETD2 の変異や、JAK-STAT 経路に関わる遺伝子の異常が高頻度とする報告がなされた^{2,3}。今回の研究では本邦の MEITL の遺伝子異常について解析し、欧州例との異同を明らかにすることが目的である。

3. 研究の方法

材料は本邦の MEITL 9 例の FFPE 組織で、いずれも手術材料である。

(1) Targeted next generation sequencing (NGS)

未染スライドからマイクロダイセクションおよび DNA 抽出を行い、T 細胞リンパ腫に関連する 26 遺伝子 (ARID1A, ATM, BCOR, CARD11, CCR4, CD28, CTNNA1, DDX3X, DNMT3A, FYN, IDH2, IRF4, JAK1, JAK3, KMT2D, PIK3CD, PLCG1, PRKCB, RHOA, SETD2, STAT3, STAT5B, TET2, TNFRSF1B, TP53, VAV1) を含むパネルを用いて targeted NGS を施行した (Illumina, Inc., San Diego, CA, USA)。

(2) 上記(1)で得られた結果を、我々が過去に報告した Oncogene analysis の結果¹と比較した。

(3) 免疫組織化学

SETD2 機能の有無を評価するために、methylated Histone H3 (tri methyl K36, H3K36me3, Abcam, ab9050) の抗体について、Leica BOND-MAX 全自動免疫染色装置を使用して免疫組織化学を行った。

4. 研究成果

【結果】

(1) Targeted NGS

SETD2 変異 (7 例, 78%), JAK1 変異 (4 例, 44%), JAK3 変異 (6 例, 67%), STAT5B 変異 (3 例, 33%) を認め、その他 TP53 変異 (2 例, 22%), PIK3CD 変異 (1 例, 11%), ATM 変異 (1 例, 11%) を検出した。

(2) Oncogene analysis との比較

我々の過去の報告¹から 7 例分のアレイ CGH 結果が得られた。

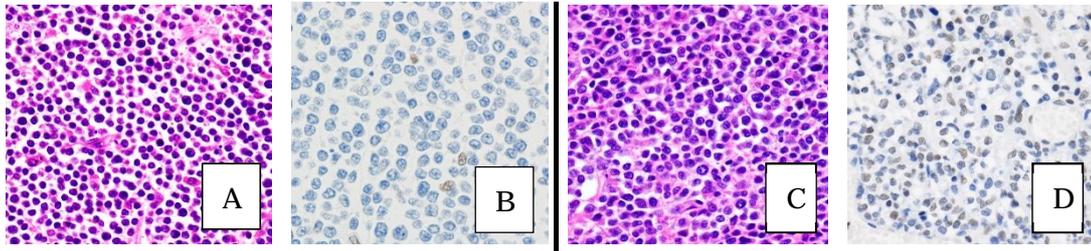
SETD2 遺伝子座 (3p21) の loss を 4 例 (57%) に認め、そのうち 2 例は上記(1)で SETD2 mutation (+)、2 例は mutation (-) であった。3p21 loss (-) の 3 例はいずれも SETD2 mutation (+) の症例であった。

その他、JAK1 遺伝子座 (1p31) gain を 1 例 (14%)、JAK3 遺伝子座 (19p13) gain を 0 例 (0%)、STAT5B 遺伝子座 (17q21) gain を 1 例 (14%) に検出した。これらの遺伝子座の loss はみられなかった。

(3) 免疫組織化学

H3K36me3 の免疫組織化学では 1 例のみ陽性、残る 8 例は陰性であった。Targeted NGS で *SETD2* 変異を認めた症例は全例陰性を示した (図 1)。

図 1. MEITL の Hematoxylin-eosin (HE) 像と H3K36me3 の免疫組織化学



A,B: *SETD2* 変異(+), loss(-)の症例。リンパ腫は H3K36me3 陰性を示す。
C,D: *SETD2* 変異(-), loss(+)の症例。リンパ腫は H3K36me3 陽性を示す。

【考察】

SETD2 はヒストンのメチル化に関与し、転写開始に関わるがん抑制遺伝子の一つである。*SETD2* はヒストン H3 の 36 番目のリジン残基を特異的にトリメチル化する酵素である。*SETD2* 遺伝子の異常はいくつかの上皮性悪性腫瘍や Hepatosplenic T-cell lymphoma などでも変異が確認されている。

欧州の MEITL において *SETD2* の機能喪失型変異が特徴的とされ、Roberti らは 14/15 例(93%)に mutation や loss を²、Moffitt らは 16/23(70%)の症例で mutation を認めたと報告している³。また、JAK/STAT 経路の遺伝子異常も高頻度に見られ、*STAT5B*, *JAK1*, *JAK3*, *SOCS1*, *SH2B3* などの遺伝子変異が指摘されている^{2,3}。

今回、本邦の MEITL でも *SETD2* の mutation を高頻度に認め (7/9, 78%)、変異のない 2 例にも 3p21 (*SETD2*) loss を確認した。さらに、全例で JAK/STAT 経路に関連した遺伝子のいずれかに変異を認めた。欧州からの報告では特に *STAT5B* 変異の頻度が高いとされるが (60-63%)^{2,3}、本邦の症例では *JAK3* 変異が *SETD2* 変異に次いで高頻度であるという点が特徴的であった。

【結論】

MEITL の欧州例と本邦例では共通の遺伝子異常を示すことが示唆され、*SETD2* や JAK/STAT 経路の異常が腫瘍発生に関与している可能性がある。

< 引用文献 >

- Tomita S, Kikuti YY, Carreras J, Kojima M, Ando K, Takasaki H, Sakai R, Takata K, Yoshino T, Bea S, Campo E, Nakamura N. Genomic and Immunohistochemical Profiles of Enteropathy-Associated T-cell Lymphoma in Japan. *Mod Pathol*. 2015;28:1286-96
- Roberti A, Dobay MP, Bisig B, Vallois D, Boéchat C, Lanitis E, Bouchindhomme B, Parrens MC, Bossard C, Quintanilla-Martinez L, Missiaglia E, Gaulard P, de Leval L. Type II enteropathy-associated T-cell lymphoma features a unique genomic profile with highly recurrent *SETD2* alterations. *Nat Commun*. 2016;7:12602.
- Moffitt AB, Ondrejka SL, McKinney M, Rempel RE, Goodlad JR, Teh CH, Leppa S, Mannisto S, Kovanen PE, Tse E, Au-Yeung RKH, Kwong YL, Srivastava G, Iqbal J, Yu J, Naresh K, Villa D, Gascoyne RD, Said J, Czader MB, Chadburn A, Richards KL, Rajagopalan D, Davis NS, Smith EC, Palus BC, Tzeng TJ, Healy JA, Lugar PL, Datta J, Love C, Levy S, Dunson DB, Zhuang Y, Hsi ED, Dave SS. Enteropathy-associated T cell lymphoma subtypes are characterized by loss of function of *SETD2*. *J Exp Med*. 2017;214:1371-1386

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 1件）

1. 著者名 Sakura Tomita	4. 巻 69(2)
2. 論文標題 Monomorphic epitheliotropic intestinal T-cell lymphoma with T-cell receptor (TCR) of silent phenotype shows rearrangement of TCR or TCR gene.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Pathology International	6. 最初と最後の頁 117-118
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/pin.12748	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 富田さくら
2. 発表標題 T-cell receptor silent phenotypeを示すMonomorphic epitheliotropic intestinal T-cell lymphomaの免疫組織化学的、遺伝子学的研究
3. 学会等名 日本リンパ網内系学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 富田さくら
2. 発表標題 Monomorphic epitheliotropic intestinal T-cell lymphomaにおける遺伝子変異解析
3. 学会等名 日本リンパ網内系学会
4. 発表年 2019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
---------------------------	-----------------------	----