

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19H03122

研究課題名(和文)消化管の自己免疫性炎症疾患とT/NK細胞性リンパ腫の病理発生機構の解明

研究課題名(英文)Studies on the pathogenesis of autoimmune diseases and T/NK lymphoma in the intestines.

研究代表者

内田 和幸(Uchida, Kazuyuki)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・教授

研究者番号：10223554

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文):本研究により犬の慢性腸炎および本病態を背景とする消化管リンパ腫は、ヒトのセリアック病を背景とする腸症関連T細胞リンパ腫I型(EATL、Type 1)と類似した病理発生を示すことが示唆され、本研究の結果、犬の慢性腸炎状態では上皮内リンパ球はCD3+CD8+Granzyme(GZB)B+リンパ球およびCD3+CD8-GZB+リンパ球の両者が混在しているが、腫瘍化に従いCD3+CD8-GZB+細胞が優勢になり、このリンパ球が異型性を増して大細胞リンパ腫として増殖する段階においてもこの免疫表現型を維持していることが明らかになった。同細胞については未分化な細胞傷害性T細胞と予想された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、イヌおよびネコの慢性炎症から消化管T細胞性リンパ腫の関連性や、その主体となるリンパ球の免疫表現型を明らかにすることができ、それぞれの病態の臨床的挙動などの情報も提供することができた。これらの知見は小動物臨床分野に極めて有用なものである。さらにイヌの消化管T細胞性リンパ腫についてはヒトのセリアック病を背景とする腸症関連T細胞リンパ腫(EATL)のI型と非常に類似性の高い病理発生を有すると予想され、特に日本国内で飼育されている柴犬にこの病態が多く認められることから、本疾患の詳細な病態解明により、ヒトのセリアック病やこれに関連するリンパ腫の理解に大きく寄与できるものと期待される。

研究成果の概要(英文):This study revealed that the pathogenesis of canine chronic enteritis and intestinal T cell-lymphoma may similar to those of enteropathy-associated T-cell lymphoma type I (EATL type I) in humans Celiac disease. In the chronic intestinal inflammatory state in dogs, intraepithelial lymphocytes are composed of both CD3+CD8+Granzyme (GZB)B+ lymphocytes and CD3+CD8-GZB+lymphocytes, but CD3+CD8-Granzyme (GZB)B+ lymphocytes become predominant during tumorigenesis and maintain this immunophenotype even when these cells progress to large cell lymphomas. The lymphocytes are supposed to be undifferentiated or immature cytotoxic T cells. To know the detailed tumorigenesis of intestinal T cell lymphomas, further studies on the molecular and cytokine network of the proliferation of these lymphocytes will be needed.

研究分野：獣医病理学

キーワード：慢性腸炎 消化管リンパ腫 小細胞性リンパ腫 大細胞性リンパ腫 上皮内リンパ球 犬 猫 セリアック病

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

リンパ腫は、ヒトを含む多くの動物種に普遍的に認められる腫瘍であり、近年の研究により病型分類が治療反応や予後に大きく関与することが明らかにされている。また分子標的薬開発という観点からも、各分類における腫瘍細胞の分子生物学的特徴や発がんメカニズムを明確にすることは極めて重要である。多様なヒトのリンパ腫のなかで、慢性腸疾患に関連して発症する腸管症関連 T 細胞性リンパ腫 (EATL) は、極めてユニークな病理発生を持つ。その病理発生には慢性炎症性腸疾患が関与し、代表的なものにセリアック病がある。セリアック病患者では、小麦に含まれるグルテンの分解産物であるグリアジンとこの脱アミド化に関わる組織トランスグルタミナーゼ (tTG) に対する抗体が産生されるとともに T/NK 細胞が活性化して腸粘膜上皮傷害が生じる。ヒトの WHO 分類ではセリアック病を併発し、大型リンパ球を主体とする EATL を I 型、セリアック病と関連しない小型リンパ球を主体とする EATL を II 型と区別している。

近年獣医療においても内視鏡検査とリンパ球のクローナリティ検査が普及し、ヒトの EATL に類似する病態が犬や猫で報告されるようになってきたが、その背景病変としての炎症疾患との関連や詳細な病理発生は解明されていない。近年、申請者らの研究グループは、犬の慢性腸炎や EATL 様のリンパ腫の症例では、診断に関わらず TCR のクローナリティが高率に確認されるとともに、グリアジンおよび tTG に対する血中 IgA 抗体が高値を示すことを世界で初めて明らかにした。さらに、これらのリンパ腫の細胞表面抗原の検索により由来細胞を明確にするとともに、この EATL 様の T 細胞性リンパ腫がシバ犬に好発し、シバ犬と他犬種のリンパ腫では腫瘍細胞の表面抗原の特徴が異なることを既に明らかにしている (論文投稿中)。シバ犬は国内では過去 10 年間、常に上位 10 位内にランキングされている人気犬種であり (日本ケンネルクラブ公表データ)、近年海外でも飼育頭数が増加しつつあるため、本犬種に特異性の高い疾患の発生機序を明確にすることは極めて重要である。さらに比較病理学観点よりシバ犬の本病態は、ヒトのセリアック病と EATL のモデル疾患としての研究価値が非常に高いと考える。本研究は、自己免疫応答を背景とする慢性リンパ球性炎症とこれを背景として発生する消化管リンパ腫の病理発生を犬や猫などの疾患解析をもとに明らかにして、その知見をヒトの類似疾患の病態解明にも役立てることを目的とする。炎症で惹起されるリンパ球の反応性増殖と、低グレードリンパ腫と呼ばれる増殖細胞に形態的異常が乏しい腫瘍病態の相違を、病理学的ならびに分子生物学的に明確にすることは、分子標的薬等による治療方法の開発には必要不可欠である。本研究の成果は、特に小麦に含まれるグルテンに対する自己免疫応答よりリンパ腫を発症するヒトのセリアック病の病態解明やその治療法開発に多くの情報を提供しようと考えた。

## 2. 研究の目的

本研究では、申請者らが継続してこれまで明らかにした知見を背景に、犬の慢性炎症疾患とリンパ腫の病態解析を通じて、反応性の T/NK リンパ球の増殖病変を背景にリンパ腫が誘発される病理発生機序を解明することを第一の目的とする。本研究は、「リンパ球等の炎症細胞の反応性あるいは炎症時における調整されたいわゆる他律的増殖と、特定の細胞クローンの自律的増殖という腫瘍性増殖の究極的相違は何か?」という、すべての動物種で起こりえる極めて根本的な疾患のメカニズムを犬の慢性炎症性疾患とこれに随伴するリンパ腫の病態解明を通じて明らかにしようとした。本研究では、特に「犬のなかでシバ犬種には、セリアック病患者と共通する特定の遺伝的背景が存在し (例えばヒトにおける白血球型 HLA-DQ2 など)、グルテンを含む食餌の持続的給与により、血中にグリアジン抗体や tTG に対する自己抗体が産生されるとともに、消化管粘膜内の T/NK リンパ球が活性化して、強い粘膜傷害を伴う慢性腸炎が起こる。この炎症反応を背景病変として、反応性に増殖した T/NK 細胞の一部にがん関連遺伝子の異常が加わり、EATL type I を発症する」という仮説をたて、これを立証するためのデータを収集することとした。さらにこれまでの申請者らの研究により、犬にはヒトで新たに分類された、**Monomorphic epitheliotropic intestinal T-cell lymphoma (ME-ITL)** (単形性上皮向性腸管 T 細胞リンパ腫) あるいは、**Indolent T-cell lymphoproliferative disorder of the GI tract (ITLD)** (消化管緩慢性 T 細胞リンパ増殖異常症) に類似する小型リンパ球の単クローン性増殖を特徴とする病態が存在することも確認されているので、これらの小型リンパ球の増殖病変と EATL type 1 との関連性も本研究を通じて明らかにすることを目的に研究を遂行した。

## 3. 研究の方法

慢性腸炎および EATL 様 T 細胞性リンパ腫罹患シバ犬の白血球型 DLA 調査: セリアック病は HLA-DQ2 あるいは HLA-DQ8 の白血球型を持つ患者が多いことが疫学調査で明らかにされている。シバ犬の DLA を多症例の血液を用いて調査し、EATL 発症との相関や、特定の DLA 遺伝子の変異の有無を検証する。

イヌおよびネコの消化管における T/NK 細胞性リンパ腫の細分類と細胞種の特定: 近年ヒトの消化管原発の T/NK 細胞性リンパ腫は、EATL Type の他、**Monomorphic epitheliotropic intestinal T-cell**

lymphoma (ME-ITL)、Indolent T-cell lymphoproliferative disorder of the GI tract (ITLD)および末梢性 T 細胞性リンパ腫（細分類不能）に細分類された。これらの新しい分類における腫瘍細胞の表面抗原型とイヌの小細胞を主体とするリンパ腫の同異を明確にして、免疫組織化学的手法および新鮮組織を用いてフローサイトメトリー等により、炎症性リンパ球との鑑別が困難なこれらの病態における特異的な分子マーカーを探索する。

動物の EATLL Type I 様リンパ腫と慢性炎症時のリンパ球における遺伝子発現およびサイトカイン発現の相違：炎症性疾患と消化管リンパ腫における遺伝子の動態の相違を明確にするために、レーザーマイクロディセクション法により炎症時のリンパ球と腫瘍性リンパ球の mRNA や DNA を検証して、それぞれの T/NK リンパ球のがん関連遺伝子 (c-myc、P53、Bcl-2 等) の発現状態や変異の有無、あるいは薬剤治療抵抗性に関与する遺伝子 (p-GP 等) の過剰発現や変異の有無を検証する。また慢性腸炎と小細胞性消化管リンパ腫および大細胞性リンパ腫における局所でのサイトカイン発現の相違について検証する。

#### 4. 研究成果

本研究の初年度に柴犬の DLA 型と慢性腸炎や消化管リンパ腫発症との相関を検証した。その結果、日本国内で飼育されている柴犬の DLA 型は著しくバリエーションに乏しく、慢性腸炎や消化管リンパ腫と関連する DLA 型を特定することは非常に困難であることが判明した。このため柴犬の遺伝的背景については、本犬種にみられる慢性腸炎あるいはリンパ腫の分子学的背景を検証することを優先することとした。

#### 犬の消化管 T 細胞リンパ腫の病理学的特徴

犬の腸管リンパ腫については犬の T/NK 細胞性貫壁性リンパ腫 61 例の全層生検材料を用いて、細胞形態に従い大細胞型(LCL)と小細胞型(SCL)に大別し免疫組織学的に検証した。本研究の結果、LCL の多くは Granzyme B 陽性かつ CD56 陰性で、Cytotoxic T 細胞または  $\gamma \delta$  T 細胞の性質を示し、組織像とあわせヒトの WHO 分類における EATL Type 1 あるいは PTCL-NOS に相当すると考えられた。また、一部の LCL で CD30 の発現が認められ、これらは退形成性大細胞性リンパ腫(ALCL)に相当すると考えられた。一方 SCL は一定の免疫組織学的特徴に乏しく PTCL-NOS 以上の特定は困難であったが、病理学的に LCL やヒトの EATL と異なる病態であることが示された。この研究成果は *Veterinary Pathology* 誌に公表した (公表論文 3)。一方小細胞性リンパ腫 (SCL) は一定の免疫組織学的特徴に乏しく PTCL-NOS 以上の特定は困難であったが、病理学的に LCL とは明確に異なる病態であることが示唆された。さらに慢性腸炎の際にみられる上皮内リンパ球の増加と消化管 T 細胞リンパ腫の CD3+CD8-Granzyme B+ という共通の免疫表現型を示すことを明確にして、これらの病態がヒトのセリアック病患者にみられる腸症関連 T 細胞性リンパ腫 (EATL) と類似することを明らかにした (下図 1)。この内容についても 2022 年に *Veterinary Pathology* 誌に公表した。またこの上皮内リンパ球の増加が慢性腸炎や SCL の予後因子として重要であることを臨床との共同研究により明らかにして、その内容を公表した。

イヌの慢性腸炎と T 細胞性リンパ腫の上皮内リンパ球の免疫表現型が CD3+CD8-Granzyme B+ という細胞表現型を有し、リンパ腫として増殖する場合にも、この表現型のリンパ球が主体であることを示した。本年度はこれらの T/NK 細胞機能の活性化に関与するサイトカインの発現と STAT 経路の活性化について検証した。その結果、 $IFN\gamma$  と IL21 が慢性腸炎における上皮内リンパ球の活性化に寄与していると考えられた。特に  $IFN\gamma$  の発現量は絨毛の pSTAT1 陽性率と正の相関を示したことから、上皮内リンパ球や腫瘍細胞由来の  $IFN\gamma$  が粘膜上皮に作用し、粘膜傷害を引き起こす可能性が示唆された。また、腫瘍細胞で STAT1 と STAT3 の活性化が認められたことから、JAK/STAT 経路の機能亢進が ITCL の発生に関与している可能性が示唆された。現在これらの結果を学術論文としてとりまとめを行っている。

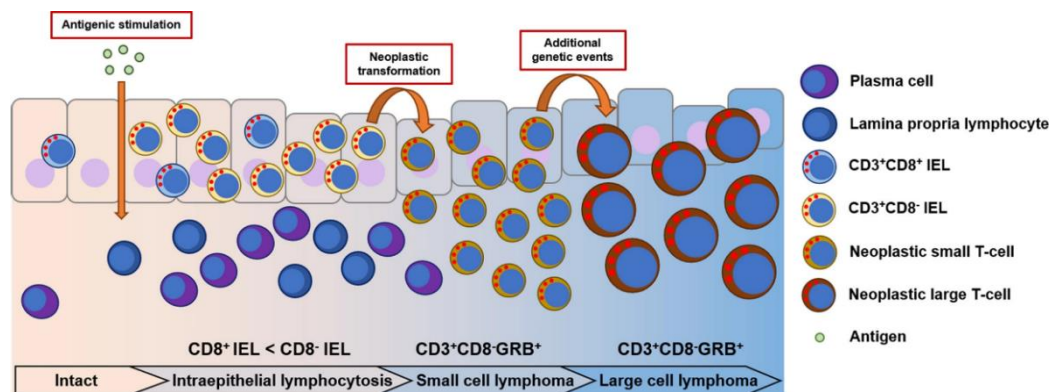


図 1. 犬の慢性腸炎、小細胞リンパ腫、大細胞リンパ腫の免疫表現型

## ネコの消化管 T 細胞性リンパ腫

内視鏡検査で消化管リンパ腫と病理診断した猫 50 症例の小腸のサンプルを用い上皮傷害、絨毛萎縮およびリンパ球の上皮向性を評価した。また、CD3, CD8, Granzyme B, CD79 $\alpha$  の免疫染色を実施し細胞表現型を検討した。その結果、猫の SCL の多くは組織傷害が極めて軽度であり、Feline intestinal T cell lymphocytosis: FIL などの新しい疾患分類が必要と思われた。また FIL および小腸 T 細胞性リンパ腫のリンパ球は主に CD8 陽性で、上皮向性や Granzyme B 陽性の割合は FIL、SCL、LCL の順に高く、特に SCL や LCL などのリンパ腫では活性化した細胞傷害性 T 細胞が上皮細胞を傷害するものと考えられた。さらにネコの慢性腸炎と消化管 T 細胞性リンパ腫については、上皮傷害のメカニズムについて検討し、上皮傷害が、これらのネコの消化管疾患における重要な予後因子であることを明らかにして学術雑誌に公表した (図 2)。

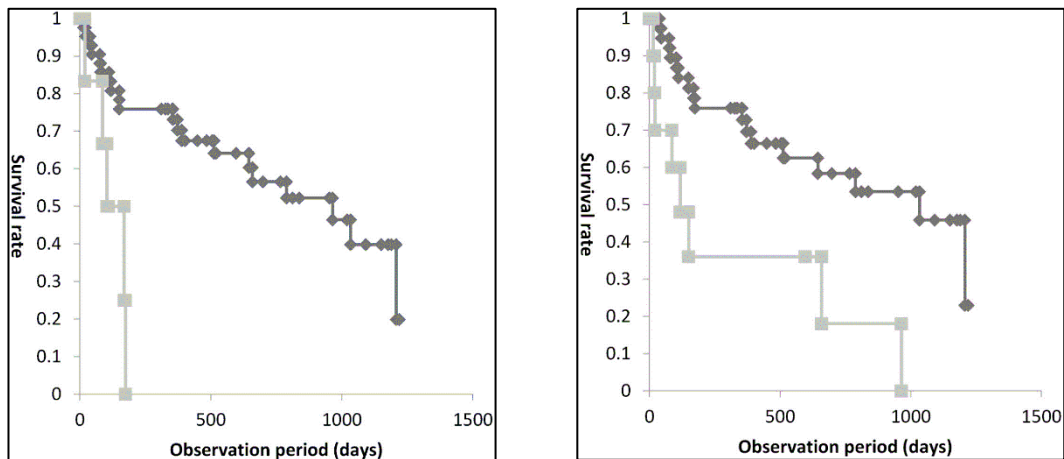


図 2. ネコの細胞傷害性顆粒 (Granzyme B 左, TIA-1 右) 陽性リンパ腫 (黒) と陰性リンパ腫 (灰色) の生存曲線

この粘膜上皮傷害の病理発生機構については、増殖 T 細胞によるアポトーシス誘導は殆ど認められず、むしろ粘膜上皮や同部に分布する基底膜がリンパ球の増殖による物理的傷害により、粘膜上皮脱落に至るものと推測された。この結果については現在論文として公表を準備している。さらにネコの慢性腸炎と消化管 T 細胞性リンパ腫については、イヌの同様病変と比較して、病理組織学的所見が単一かつ単純であることに注目し、Google Cloud Auto ML Vision(Auto ML)により、ETCL の鑑別、予後不良因子の検出およびクローナリティの予測を目的とした自動機械学習システムを開発した。

本研究と関連して、ネコの皮膚・皮下組織のリンパ腫や肝細胞向性リンパ腫の免疫表現型の検討が実施され、ネコの皮膚リンパ腫には、CD56 を発現し TNK 細胞としての性格を示すものが比較的多く認められることが明らかになった。本内容についてはポスター発表としてもその結果を公開した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Kojima K, Chambers JK, Ii T, Nibe K, Mizuno T, Uchida K.	4. 巻 58(6)
2. 論文標題 Histopathological features and immunophenotyping of canine transmural gastrointestinal lymphoma using full-thickness biopsy samples.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Vet Pathol.	6. 最初と最後の頁 1033-1043.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/03009858211030523. Epub 2021 Jul 20.	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 Kojima K, Chambers JK, Nakashima K, Goto-Koshino Y, Uchida K.	4. 巻 59(2)
2. 論文標題 Immunophenotyping of intraepithelial lymphocytes in canine chronic enteropathy and intestinal T-cell lymphoma using endoscopic samples.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Vet Pathol.	6. 最初と最後の頁 227-235.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/03009858211057220. Epub 2021 Nov 18.	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 Hirabayashi M, Chambers JK, Sugawara M, Ohmi A, Tsujimoto H, Nakayama H, Uchida K.	4. 巻 11
2. 論文標題 Blastic natural killer cell lymphoma/leukaemia in a cat.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 JFMS Open Rep.	6. 最初と最後の頁 :5(2)
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/2055116919863080.	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 Ii T, Chambers JK, Segawa K, Uchida K.	4. 巻 -
2. 論文標題 Hepatosplenic T-cell lymphoma with hepatocytotropism in a cat.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 JFMS Open Rep.	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) 10.1177/20551169211005914	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 Ii T, Chambers JK, Nakashima K, Goto-Koshino Y, Mizuno T, Uchida K.	4. 巻 -
2. 論文標題 Intraepithelial cytotoxic lymphocytes are associated with a poor prognosis in feline intestinal T-cell lymphoma.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Vet Pathol.	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) 10.1177/03009858221120010.	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 Nakashima K, Matsumoto I, Goto-Koshino Y, Hiyoshi-Kanemoto S, Kojima K, Chambers JK, Takeuchi Y, Tsujimoto H, Tomiyasu H, Uchida K.	4. 巻 11
2. 論文標題 Prognostic value of increased intraepithelial lymphocytes and lymphocytic clonality in dogs with chronic enteropathy or small-cell lymphoma.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Vet J.	6. 最初と最後の頁 296-297
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.tvjl.2023.105993	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6件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 岩崎新也、チェンバース ジェームズ、来田千晶、内田和幸
2. 発表標題 猫の皮膚血管向性リンパ腫 (NK/T細胞リンパ腫) の病理学的研究
3. 学会等名 第9回日本獣医病理学専門家協会学術集会 (北海道大学)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小島一優、チェンバース ジェームズ、中島 亘、後藤裕子、水野拓也、内田和幸
2. 発表標題 犬の慢性腸炎における上皮内リンパ球と腸管型T細胞リンパ腫の免疫組織化学的解析
3. 学会等名 第164回日本獣医学会学術集会 (酪農学園大学)
4. 発表年 2021年 ~ 2022年

1. 発表者名 小島一優、チェンバースジェームズ、内田和幸
2. 発表標題 犬の小腸における貫壁性T細胞リンパ腫の病理組織学的および免疫組織学的解析
3. 学会等名 日本獣医学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 伊井 辰仁、チェンバース ジェームズ、中島 亘、畝山 瑞穂、平林 美幸、水野 拓也、内田 和幸
2. 発表標題 猫の小腸におけるTリンパ球増殖性疾患の病理組織学的検討
3. 学会等名 日本獣病理学専門家協会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 内田和幸
2. 発表標題 犬のリンパ腫up-date
3. 学会等名 獣医内科学アカデミー（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kazuyuki Uchida
2. 発表標題 Pathology of Canine Gastrointestinal Lymphomas (small cell and large cell types)
3. 学会等名 世界獣医がん学会（コロナウイルス感染症のため中止）（招待講演）（国際学会）
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
研究 分担 者	チェンパース ジェームズ  (Chambers James)  (00621682)	東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・助教    (12601)	

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