

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：13501

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16554

研究課題名(和文) 前駆・早期病変の分子異常に注目した濾胞性リンパ腫の形成機構

研究課題名(英文) Molecular Pathogenesis of Follicular Lymphoma and its early/precursor lesions

研究代表者

大石 直輝(OISHI, Naoki)

山梨大学・大学院総合研究部・准教授

研究者番号：90623661

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)：リンパ節をスクリーニングした結果、本邦におけるISFNの頻度は約2%であることが明らかになった。ISFNの腫瘍細胞はFLと同様の免疫形質、BCL2遺伝子の再構成を伴っているものの、今回のようにスクリーニングで発見された病変、偶発的に発見された病変では、FLに進展するリスク低いと考えられた。ISFNはBCL2遺伝子の再構成に加え、FLに関連したいくつかの遺伝子異常がすでに生じていることがわかった。変異頻度としては、KMT2D、CREBBPの頻度が比較的高い。一方、FLで高頻度に認められるEZH2の変異は認められなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

濾胞性リンパ腫は本邦においても頻度の高いリンパ腫である。本研究では、濾胞性リンパ腫の前駆病変と考えられるin situ follicular neoplasm (ISFN)の特徴を解析した。本邦におけるISFNは、非リンパ腫患者の2.1%に認められ、濾胞性リンパ腫に類似した免疫形質を有することが明らかになった。一方、ISFNが単独で発見された場合、濾胞性リンパ腫に進展するリスクは低いと考えられた。濾胞性リンパ腫で認められる遺伝子異常の一部は、ISFNの段階から生じていることが示唆された。以上は、ISFNから濾胞性リンパ腫への進展を考察する上で、重要なデータである。

研究成果の概要(英文)：1) Lymph nodes (LNs) dissected for non-hematolymphoid malignancies were screened by immunohistochemistry (IHC) for BCL2. The incidence of in situ follicular neoplasm (ISFN) in Japan was 2.1%. 2) ISFN exhibited CD20+, CD10+, BCL6+, and BCL2+ by IHC, similar to follicular lymphoma (FL). All the patients with identified ISFNs developed no overt FL after median follow-up of 58 months. 3) In addition to BCL2 gene rearrangement, ISFN harbored some FL-associated gene mutations, including KMT2D and CREBBP. No EZH2 mutation was found.

研究分野：リンパ腫の病理学

キーワード：濾胞性リンパ腫 ISFN BCL2

1. 研究開始当初の背景

濾胞性リンパ腫(FL)は本邦における悪性リンパ腫の15~20%を占め、その患者数は近年さらに増加している [Chihara D et al. Br J Haematol. 2014]. 一般的にFLは緩徐な経過を示し、患者は比較的長期の生存が見込める一方、進行例は化学療法に抵抗性で治癒が困難である。病理学的には、胚中心の細胞に類似した形質をもつB細胞が濾胞状・結節状に増殖する腫瘍で、染色体転座t(14;18)(q32;q21)を介したBCL2遺伝子の異常発現を特徴とする。このt(14;18)を分化の初期に生じたB細胞はBCL2の作用でアポトーシスに抵抗性を示し、FLに進展すると考えられている。

一方で、t(14;18)によるアポトーシス抵抗性だけではB細胞がFLに進展しえないことも知られている。たとえば、t(14;18)をもつB細胞は健常者の末梢血やリンパ組織にも約70%の頻度で存在し、FL-like cell: FLLCと呼ばれる [Ohshima K et al. Virchows Arch. 2001]. また最近では、t(14;18)陽性のB細胞が胚中心に限局して増殖する*in situ* follicular neoplasm: ISFNが認識され、WHO分類にも収載された [Swerdlow SH et al. Blood. 2016]. ISFNの欧米における有病率は約3%で、多くが偶発的に発見される。興味深いことに、これらの前駆・早期病変がFLに進展するリスクは概して低く、FLLCで1%未満、ISFNでも10%未満である [Oishi N et al. Semin Diagn Pathol. 2017]. このことから、t(14;18)を有するB細胞はFLLC、ISFNを経るあいだに付加的な分子異常を獲得し、FLを形成すると考えられる。実際、FLはt(14;18)のほかにエピゲノム制御や免疫逃避などに関連したさまざまな異常を蓄積していることが近年の解析で示された [Huet S et al. Nat Rev Cancer. 2018].

しかしながら、t(14;18)を生じたB細胞がどの段階でどのような分子異常を獲得してFLを形成するに至るのかは未だ明らかになっていない。特にFLの前駆・早期病変と想定されるISFNの分子病理学的な形質は不明で、

- ① ISFNはt(14;18)のほかにどのような分子異常を獲得しているのか
- ② ISFNとFLは分子生物学的に異なる腫瘍なのか
- ③ 異なるとすれば、臨床像が大きく異なるISFNとFLはどのような分子形質で区別されるのかといった問題は解決されていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、FLの早期・前駆病変であるISFNの分子異常を解析し、t(14;18)を有する細胞がISFNを経てFLに進展する分子機構を明らかにすることである。また、その過程でISFNの有病率、FLへの進展率といった臨床像を本邦における最初のデータとして提示する。

3. 研究の方法

(1) ISFNのスクリーニング

2014年1月から2015年2月に山梨大学医学部附属病院で固形癌に対するリンパ節郭清を受けた患者を抽出し、対象とした。ホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 標本からヘマトキシリン・エオジン染色、BCL2蛋白に対する免疫組織化学染色をISFNのスクリーニングとしておこなった。BCL2を異常発現した胚中心が存在した場合、ISFNとして同定した。

(2) ISFNの臨床病理学的特徴の解析

同定したISFN各症例について、CD20, CD3, CD10, BCL6, BCL2の免疫組織化学染色をおこない、各種蛋白の発現を解析した。また、BCL2遺伝子に対するbreak-apart FISH (CytoCell BCL2 Breakapart)をおこない、BCL2遺伝子の再構成の有無を検討した。

(3) ISFNの遺伝子変異の解析

ISFNの各症例について、レーザーキャプチャー・マイクロダイセクションシステム (ArcturusXT™ LCM) をもちいて腫瘍性胚中心を選択的にサンプリングし、DNAを抽出した。抽出したDNAをCovaris M220で断片化し、insert DNAとした。xGen Prism Library Prep Kit (Integrated DNA Technologies) でライブラリ調整したのち、ハイブリダイゼーション・キャプチャー法 (xGen® Exome Research Panel v2) によりexomeを濃縮し、Illumina HiSeq X Tenでシーケンスをした。得られたリードデータをQC、トリミング後、hg19にマッピングした。FLで変異頻度の高いTNFRSF14, KMT2D, FOXO1, EP300, MEF2B, GNAI3, EZH2, CREBBPの各遺伝子について、minimum read length; 20, minimum coverage; 30, minimum count; 3, minimum frequency (%); 2.0を条件としてsingle nucleotide variant (SNV), insertion, deletionをcallした。

4. 研究成果

(1) 本邦におけるISFNの頻度

スクリーニング Table 1 に示すように、340人 (男性139人: 女性201人) から採取された1人あたり平均16.8個のリンパ節を対象とした。年齢中央値は67歳であった。BCL2に対する免疫組織化学染色の結果、2.1% (7/340) にISFNが認められた。

(2) 同定されたISFNの臨床病理学的特徴

- ① 同定されたISFN 7例の臨床病理学的特徴を Table 2 に示す。年齢の中央値 60歳 (範囲 45-80

歳), 男性 4 人 : 女性 3 人であった。経過観察期間の中央値 59 ヶ月 (範囲 47-68 ヶ月) で、いずれの症例でも FL への進展は認められなかった。

② ISFN の代表的組織像を Fig. 1 に示す。腫瘍性胚中心は FL と同様に、CD20 陽性、CD3 陰性、CD10 陽性、BCL6 陽性を示した。また、BCL2 は周囲の B 細胞、T 細胞よりも染色性が強く、高発現していると考えられた。BCL2 に対する FISH は ISFN 7 例中 4 例で可能であった。解析できた症例全例で BCL2 遺伝子の再構成が確認された。

(3) ISFN の遺伝子異常

ISFN 7 例中 5 例で遺伝子異常を解析でき、うち 4 例が少なくとも 1 つの遺伝子異常を伴っていた (Table 2)。ターゲットとした遺伝子のうち、最も高頻度に変異していたのは *KMT2D* で、3 例に変異が認められた。次いで *CREBBP* の変異が 2 例、*EP300*、*TNFRSF14* の変異がそれぞれ 1 例で同定された。

(4) 本研究の成果

① 本研究により、本邦における ISFN の頻度は約 2% であることが明らかになった。また、これまでの研究と比べて、本研究は最も多くの症例、リンパ節をスクリーニングしたものであり、貴重なデータベースと考えられる。

② ISFN の腫瘍細胞は FL と同様の免疫形質、BCL2 遺伝子の再構成を伴っているものの、今回のようにスクリーニングで発見された病変、偶発的に発見された病変では、FL に進展するリスク低いと考えられた。

③ ISFN は BCL2 遺伝子の再構成に加え、FL に関連したいくつかの遺伝子異常がすでに生じていることがわかった。変異頻度としては、*KMT2D*、*CREBBP* の頻度が比較的高い。一方、FL で高頻度に認められる *EZH2* の変異は認められなかった。

<引用文献>

- Chihara D, Ito H, Matsuda T, et al (2014) Differences in incidence and trends of haematological malignancies in Japan and the United States. *Br J Haematol* 164:536–45. <https://doi.org/10.1111/bjh.12659>
- Ohshima K, Kikuchi M, Kobari S, et al (1993) Amplified bcl-2/JH rearrangements in reactive lymphadenopathy. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 63:197–8
- Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, et al (2016) The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood* 127:2375–2390. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-01-643569>
- Oishi N, Montes-Moreno S, Feldman AL (2018) In situ neoplasia in lymph node pathology. *Semin Diagn Pathol* 35:76–83. <https://doi.org/10.1053/j.semdp.2017.11.001>
- Huet S, Sujobert P, Salles G (2018) From genetics to the clinic: a translational perspective on follicular lymphoma. *Nat Rev Cancer* 18:224–239. <https://doi.org/10.1038/nrc.2017.127>

Table 1. Characteristics of examined LNs

Individuals	340
Female: male	139: 201
Age, median (range)	67 (1-94)
Average LNs per individual	16.8
Average GCs per individual	10.8

LN, lymph node; GC, germinal center.

Table 2. Clinicopathologic and genetic characteristics of *in situ* follicular neoplasms (ISFNs) detected

Case No.	Age (years)	Sex	Associated malignancy	Follow-up			Development of overt FL	<i>BCL2</i> rearrangement by FISH	Variants detected
				No. of total LNs examined	No. of ISFN+ LNs	(months since LN dissection)			
1	45	F	Uterus, endometrioid adenocarcinoma of the uterine corpus	28	22	59	No	Positive	<i>KMT2D</i> p.Q4429X
<i>KMT2D</i> p.E1667X									
2	54	F	Pancreas, neuroendocrine tumor	4	4	68	No	Positive	None
3	56	M	Rectum, adenocarcinoma	12	4	62	No	Not available	Not available
4	60	M	Stomach, adenocarcinoma	34	17	68	No	Positive	<i>KMT2D</i> p.E1588G <i>CREBBP</i> p.A2066T
5	73	F	Cecum, adenocarcinoma	36	1	57	No	Not available	Not available
6	77	M	Cecum, adenocarcinoma	14	12	47	No	Not available	<i>CREBBP</i> p.K1141X <i>EP300</i> p.S1031I
7	80	M	Stomach, adenocarcinoma	12	9	48	No	Positive	<i>TNFRSF14</i> p.C135Y <i>KMT2D</i> p.G4099Dfs*21

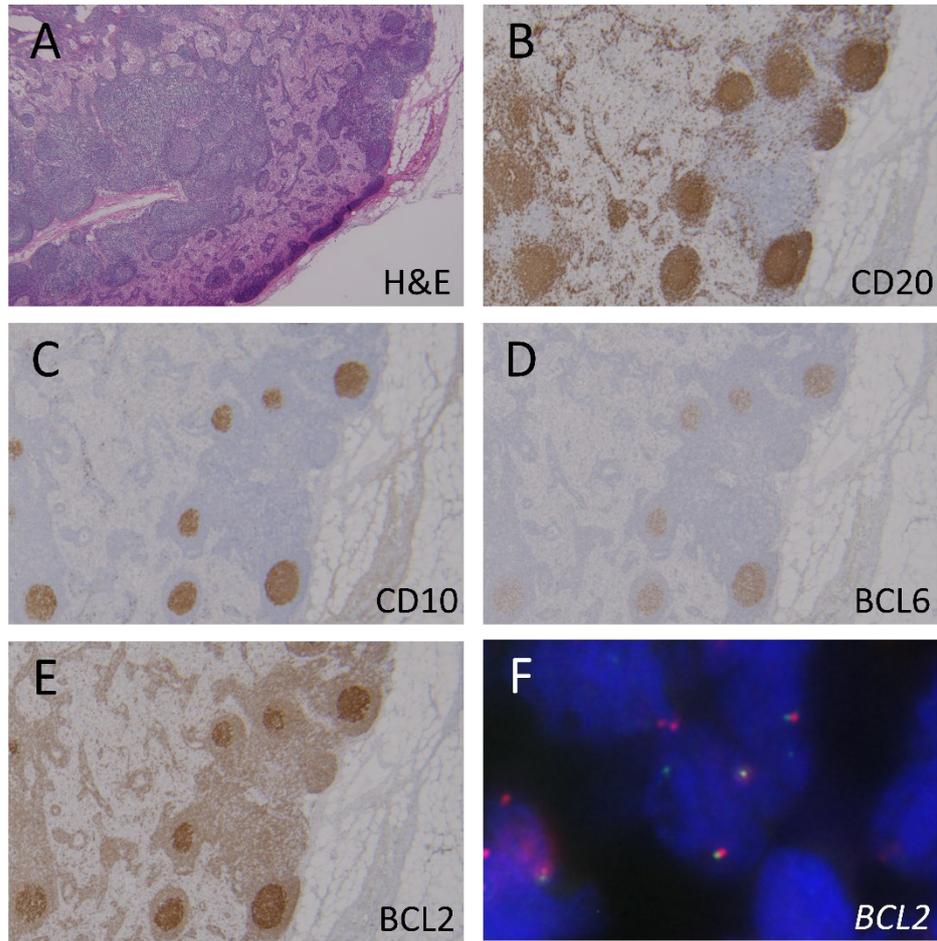


Fig. 1 Representative histopathology of ISFN (Case 2). Lymphoid follicles exhibited reactive-like appearance with distinct mantle zones (A). These follicles are positive for CD20 (B), CD10 (C), and BCL6 (D) and aberrantly expressed BCL2 (E). Break-apart fluorescence *in situ* hybridization (FISH) identified *BCL2* rearrangement in the lesion.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 0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 Oishi Naoki, Hundal Tanya, Phillips Jessica L., ら	4. 巻 -
2. 論文標題 Molecular profiling reveals a hypoxia signature in breast implant-associated anaplastic large cell lymphoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Haematologica	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） 10.3324/haematol.2019.245860	査読の有無 無
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 Oishi Naoki, Inoue Tomohiro, Odate Toru, Mochizuki Kunio, Ohashi Kenichi, Kirito Keita, Kondo Tetsuo	4. 巻 -
2. 論文標題 Composite monoclonal B cell lymphocytosis and MYD88 L265P positive lymphoplasmacytic lymphoma in a patient with IgM light chain amyloidosis: Case report	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pathology International	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） 10.1111/pin.12937	査読の有無 無
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 Hu Guangzhen, Phillips Jessica L., Dasari Surendra, Jacobs Hailey K., Luchtel Rebecca A., Oishi Naoki, Hundal Tanya, Ahmed Nada H., Satou Akira, Epstein Alan L., Bennani N. Nora, Nowakowski Grzegorz S., Murray Joseph A., Feldman Andrew L.	4. 巻 34
2. 論文標題 Targetability of STAT3-JAK2 fusions: implications for T-cell lymphoproliferative disorders of the gastrointestinal tract	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Leukemia	6. 最初と最後の頁 1467 ~ 1471
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41375-019-0678-3	査読の有無 無
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 Odate Toru, Vuong Huy Gia, Mochizuki Kunio, Oishi Naoki, Kondo Tetsuo	4. 巻 72
2. 論文標題 Assessment of peritoneal elastic laminal invasion improves survival stratification of pT3 and pT4a colorectal cancer: a meta-analysis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Pathology	6. 最初と最後の頁 736 ~ 740
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1136/jclinpath-2019-206056	査読の有無 無
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 Wang Jieying, Kondo Tetsuo, Nakazawa Tadao, Oishi Naoki, Mochizuki Kunio, Katoh Ryohei	4. 巻 475
2. 論文標題 Constitutional abnormality of nuclear membrane proteins in small cell lung carcinoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Virchows Archiv	6. 最初と最後の頁 407 ~ 414
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00428-019-02597-7	査読の有無 無
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 Luchtel Rebecca A., Zimmermann Michael T., Hu Guangzhen, ら	4. 巻 133
2. 論文標題 Recurrent MSCE116K mutations in ALK-negative anaplastic large cell lymphoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Blood	6. 最初と最後の頁 2776 ~ 2789
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1182/blood.2019000626	査読の有無 無
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 Oishi Naoki, Sartori Valinotti Julio C., Bennani N. Nora, Wada David A., He Rong, Cappel Mark A., Feldman Andrew L.	4. 巻 46
2. 論文標題 Cutaneous lesions of angioimmunoblastic T cell lymphoma: Clinical, pathological, and immunophenotypic features	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Cutaneous Pathology	6. 最初と最後の頁 637 ~ 644
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cup.13475	査読の有無 無
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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大石 直輝, 望月 邦夫, 近藤 哲夫
2. 発表標題 日本におけるin situ follicular neoplasm(ISFN)の頻度と臨床病理
3. 学会等名 日本リンパ網内系学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大石 直輝, 望月 邦夫, 近藤 哲夫
2. 発表標題 In Situ Follicular Neoplasm in Japan: Lower Incidence than in Western Countries
3. 学会等名 日本病理学会
4. 発表年 2020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
---------	---------