

令和 3 年 5 月 24 日現在

機関番号：83901

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16597

研究課題名(和文)免疫微小環境解析による加齢性EBV関連B細胞リンパ増殖異常症の病因・病態解明

研究課題名(英文)Clinicopathological analysis of EBV-positive B-cell lymphoproliferative disorders especially addressed on microenvironmental immune cell signatures

研究代表者

加藤 省一 (Kato, Seiichi)

愛知県がんセンター(研究所)・個別化医療TR分野・研究員

研究者番号：30584669

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)：加齢性Epstein-Barr virus (EBV) 関連B細胞リンパ増殖異常症(EBVBLPD)について、その免疫微小環境プロファイルの特徴を抽出するため、デジタルカウント遺伝子発現解析(nCounter)にて、医原性免疫不全関連のEBVBLPD(I-EBVLPD)のうちメソトレキサートの投与歴がありその休薬のみで自然寛解した症例群と比較検討した。クラスタリング解析では両症例は混在し独立したクラスターを形成しなかったため、免疫微小環境プロファイル上は両者は類似している可能性等が示唆された。ただ両症例群で2倍以上有意に発現量に差のあった遺伝子がいくつか見つかったためさらに検討する必要がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

加齢性EBV関連B細胞リンパ増殖異常症(AR-EBVLPD)は予後不良であるが発症メカニズムは不明である。我々はEBVLPDではあるもののメソトレキサートの投与歴がありその休薬のみにより自然寛解した医原性免疫不全関連EBVBLPDと、その免疫微小環境プロファイルを比較検討した。不十分な症例数であるがクラスタリング解析では両症例は混在し独立したクラスターを形成せず、免疫微小環境プロファイル上は両疾患類似している可能性等が示唆された。ただ両症例群で2倍以上有意に発現量に差のあった遺伝子がいくつか見つかり、AR-EBVLPDを特徴づける分子機構を反映している可能性があり、さらなる解析が必要である。

研究成果の概要(英文)：In order to clarify the characteristics of the microenvironmental profile of age-related EBV-associated B-cell lymphoproliferative disorders (EBVBLPD), nCounter analysis was performed to compare the immune microenvironmental expression profile of cases of age-related EBVBLPD with that of methotrexate(MTX)-related EBVLPD cases showing spontaneous remission by MTX withdrawal.

In the clustering analysis, both cases were mixed and did not form independent clusters, suggesting that they may be similar in terms of immune microenvironment profile. However, some genes whose expression levels were significantly different by more than 2 times were found, further investigation is required.

研究分野：悪性リンパ腫

キーワード：Epstein-Barr virus (EBV) 加齢性EBV関連B細胞リンパ増殖異常症 医原性免疫不全関連リンパ増殖異常症 免疫微小環境

## 1. 研究開始当初の背景

加齢性 EBV 関連 B 細胞リンパ増殖異常症 (age related EBV+ B-lymphoproliferative disorder [AR-EBVLPD]) は、原発性、HIV 感染症、移植後、その他の医原性 (メトトレキサート [MTX] 等) の免疫機能不全状態や先行する悪性リンパ腫のない 50 歳以上の患者において発症する EBV 関連リンパ増殖異常症 (EBVLPD) である。改訂 WHO 分類では EBV 陽性 diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) 非特定型として登録されている。一方、免疫不全関連リンパ増殖異常症 (免疫不全関連 LPD) としては移植後 LPD などの医原性免疫不全関連 LPD が WHO 分類に記載されている。移植後 LPD の多くの症例は EBV 陽性であり、また MTX などによる、その他の医原性免疫不全関連 LPD でも半数以上の症例で EBV が陽性である。医原性免疫不全関連 LPD では種々の免疫抑制剤が病因となるが、AR-EBVLPD では病因として免疫老化・加齢に伴う免疫不全が推定されているものの、その発症メカニズムについてはほとんど検証されていない。

MTX 関連 LPD などの医原性免疫不全関連 LPD ではしばしば免疫抑制剤の休薬のみで寛解する。休薬後に寛解する症例では EBER 陽性率が高く反応性組織様形態が多いなどの特徴が知られているが、その分子病態に関してはほとんど検討されていない。特に発現プロファイルについては検討されることがない。

Microsatellite instability-High (MSI-H) に該当するか否かは抗 PD-1 抗体療法の治療効果予測に有用であり、実際に MSI-H を示す腫瘍は抗 PD-1 抗体薬である Pembrolizumab の保険適応となっている。移植後 LPD では MSI-H を示す症例が、免疫不全の背景のない悪性リンパ腫より有意に多いことが報告されており、AR-EBVLPD においても MSI-H を示す症例があるかもしれない。

## 2. 研究の目的

本研究では「AR-EBVLPD が、免疫老化・加齢に伴う免疫不全を背景として発症しているか」という仮説を検証する一つの方法として、免疫微小環境に注目して解析する。そこで、AR-EBVLPD が、MTX などによる医原性免疫不全関連 EBVLPD (iatrogenic EBVLPD [I-EBVLPD]) のうち MTX の休薬のみで病変が消滅した症例と免疫微小環境に違いがあるかを検討する。上記の検討より、AR-EBVLPD の免疫微小環境が他の免疫不全関連 EBVLPD とどのように異なるのか、AR-EBVLPD の病態理解、病因の推定の手がかりとなるような分子メカニズムの抽出を試みる。

本研究では、AR-EBVLPD において MSI-H に該当する症例がないかについても検討する。また AR-EBVLPD やその対照群である I-EBVLPD、EBV 陰性 DLBCL における免疫微小環境と病態の関係について、臨床病理学的解析を行う。

## 3. 研究の方法

AR-EBVLPD、またコントロールとして MTX 関連 EBVLPD (MTX-EBVLPD) のうち MTX の休薬のみで寛解した症例について、PanCancer Immune Profiling for Human 遺伝子発現パネルを用いて免疫環境関連 mRNA の発現プロファイルをデジタルカウント遺伝子発現解析 (nCounter [NanoString Technologies 社]) にて比較検討した。

MSI-High は mismatch repair (MMR) 遺伝子がコードしているタンパクの免疫染色とよく関連することが知られている。AR-EBVLPD 症例における MSI 不安定性の検索のために、MMR 蛋白である MSH6、PMS2 の免疫染色をスクリーニング検査として行った。

AR-EBVLPD やその対照群である I-EBVLPD、EBV 陰性 DLBCL における免疫微小環境と病態の関係について、PD-L1 発現を中心に臨床病理学的解析を行った。

## 4. 研究成果

(1) AR-EBVLPD と MTX-EBVLPD のうちその休薬のみにより自然寛解した症例について nCounter の PanCancer Immune Profiling for Human 遺伝子発現パネル (NanoString Technologies) を用いて免疫微小環境に注目した mRNA 発現プロファイルを比較検討した。まず質の高い mRNA を得られた 12 症例 (AR-EBVLPD 7 症例、MTX-EBVLPD 5 症例) について検討した。クラスタリング解析では両症例は混在し、独立したクラスターを形成しなかったため発現免疫微小環境プロファイル上は両者は類似している可能性が示唆された (図 1 参照)。ただ両症例群で 2 倍以上有意に発現量に差のあった遺伝子がいくつか見つかったため (図 2 参照)、さらに検討を進めている。なお図 2 の Scatter Plot は遺伝子発現を Log2 に変換したものである。図中の 3 本の緑の直線は左から順に、2 倍変動、 $Y=X$  (変動なし)、0.5 倍変動を意味する。

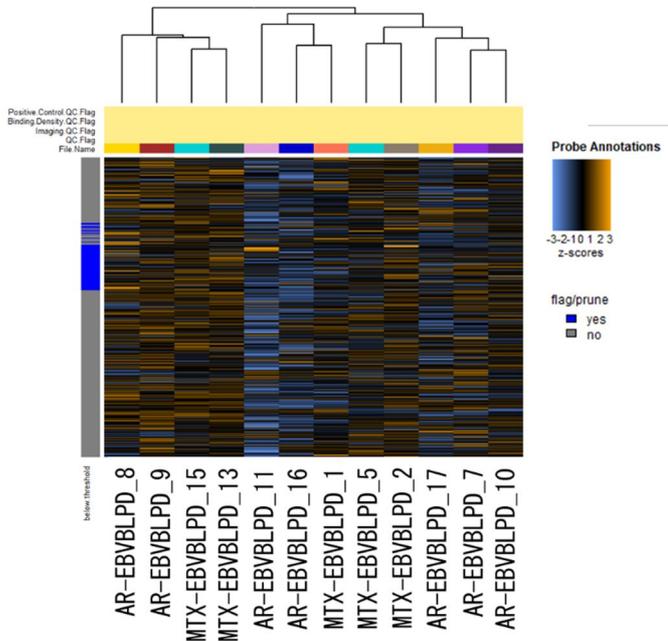


図1

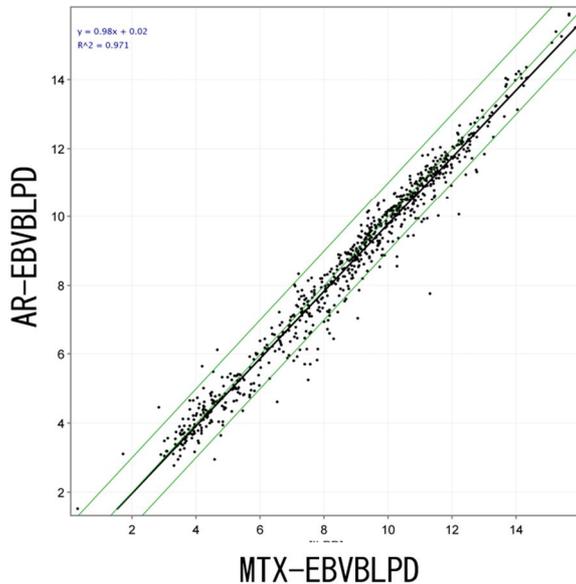


図2

(2) AR-EBVLPD 症例における MSI 不安定性の検索のために、MSH6、PMS2 の免疫染色をスクリーニング検査として行ったが解析した 13 例いずれも MSH6、PMS2 タンパク質の発現に異常はなく、MSI-High は示唆されなかった。

(3) 加齢性 EBVBLPD の対照群の一つである EBV 陰性 DLBCL における免疫微小環境の臨床病理学的意義について解析した。EBV 陰性腸管原発 DLBCL40 症例において、微小環境構成免疫細胞における PD-L1 蛋白の陽性率が高いほど、有意に予後良好であった(全生存期間、 $P = 0.0024$ 、[図 3 参照]、*J Gastroenterol.* 2020;55:39-50)。図中の miPD-L1low は微小環境構成免疫細胞における PD-L1 陽性率 5%未満、miPD-L1int は 5-40%、miPD-L1high は 40%以上である。PD-L1 蛋白の発現は免疫染色にて clone SP142 を用いて検討した。

また中枢神経原発 DLBCL (EBV 陰性) 38 症例についても同様に解析したところ、微小環境構成免疫細胞における PD-L1 蛋白の陽性率が高いほど、有意に予後良好であった(全生存期間、 $P=0.009$ 、[図 4 参照]、*Neuropathology* 2021;41,99-108)。

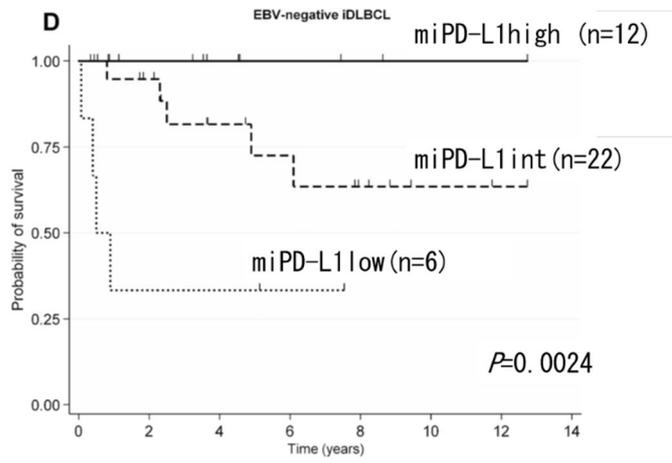


図3

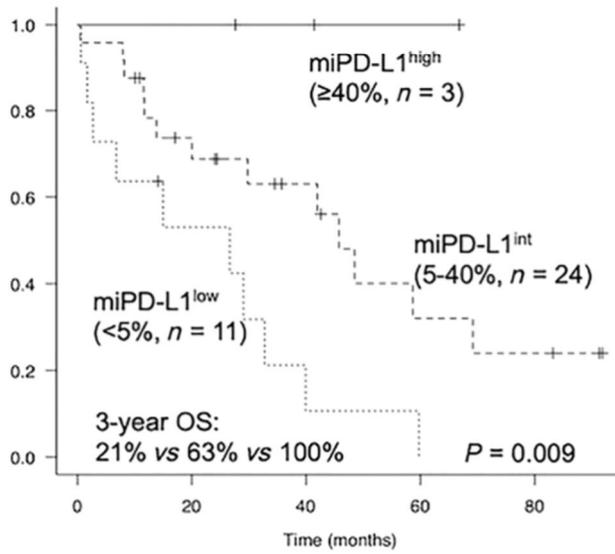


図4

以上、AR-EBVLPD の分子病態に関する解析はまだ半ばであり、引き続き検討していく必要がある。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5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 Tsuyuki Yuta, Ishikawa Eri, Kohno Kei, Shimada Kazuyuki, Ohka Fumiharu, Suzuki Yuka, Mabuchi Seiyō, Satou Akira, Takahara Taishi, Kato Seiichi, Miyagi Shohei, Ozawa Hiroyuki, Kawano Tasuku, Takagi Yusuke, Hiraga Junji, Wakabayashi Toshihiko, Nakamura Shigeo	4. 巻 41
2. 論文標題 Expression of programmed cell death ligand 1 by immune cells in the microenvironment is a favorable prognostic factor for primary diffuse large B cell lymphoma of the central nervous system	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neuropathology	6. 最初と最後の頁 99 ~ 108
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/neup.12705	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 Miyagi Shouhei, Ishikawa Eri, Nakamura Masanao, Shimada Kazuyuki, Yamamura Takeshi, Furukawa Kazuhiro, Tanaka Tsutomu, Mabuchi Seiyō, Tsuyuki Yuta, Kohno Kei, Sakakibara Ayako, Satou Akira, Kato Seiichi, Fujishiro Mitsuhiro, Nakamura Shigeo	4. 巻 44
2. 論文標題 Reappraisal of Primary Epstein-Barr Virus (EBV)-positive Diffuse Large B-Cell Lymphoma of the Gastrointestinal Tract	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 American Journal of Surgical Pathology	6. 最初と最後の頁 1173 ~ 1183
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1097/PAS.0000000000001499	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 Takahara Taishi, Satou Akira, Ishikawa Eri, Kohno Kei, Kato Seiichi, Suzuki Yuka, Takahashi Emiko, Ohashi Akiko, Asano Naoko, Tsuzuki Toyonori, Nakamura Shigeo	4. 巻 478
2. 論文標題 Clinicopathological analysis of neoplastic PD-L1-positive EBV+ diffuse large B cell lymphoma, not otherwise specified, in a Japanese cohort	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Virchows Archiv	6. 最初と最後の頁 541 ~ 552
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00428-020-02901-w	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 Kohno Kei, Suzuki Yuka, Elsayed Ahmed A, Sakakibara Ayako, Takahara Taishi, Satou Akira, Kato Seiichi, Nakamura Shigeo, Asano Naoko	4. 巻 153
2. 論文標題 Immunohistochemical Assessment of the Diagnostic Utility of PD-L1 (Clone SP142) for Methotrexate-Associated Lymphoproliferative Disorders With an Emphasis of Neoplastic PD-L1 (Clone SP142)?Positive Classic Hodgkin Lymphoma Type	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 American Journal of Clinical Pathology	6. 最初と最後の頁 571 ~ 582
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/ajcp/aqz198	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 Ishikawa Eri, Nakamura Masanao, Shimada Kazuyuki, Tanaka Tsutomu, Satou Akira, Kohno Kei, Sakakibara Ayako, Furukawa Kazuhiro, Yamamura Takeshi, Miyahara Ryoji, Nakamura Shigeo, Kato Seiichi, Fujishiro Mitsuhiro	4. 巻 55
2. 論文標題 Prognostic impact of PD-L1 expression in primary gastric and intestinal diffuse large B-cell lymphoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 39 ~ 50
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00535-019-01616-3	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1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 加藤省一
2. 発表標題 EBV関連リンパ増殖異常症の鑑別と病理 B細胞リンパ増殖性疾患を中心に
3. 学会等名 第23回日本血液病理研究会
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
---------	---------