

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：37104

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K16208

研究課題名(和文) HTLV-1キャリアおよび成人T細胞性白血病リンパ腫患者における病態進展の解明

研究課題名(英文) Elucidation of disease progression in HTLV-1 carriers and adult T-cell leukemia-lymphoma patients

研究代表者

山田 恭平 (Yamada, Kyohei)

久留米大学・医学部・助教

研究者番号：60838423

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：研究代表者らは、FFPE検体を用いてATLL症例におけるHTLV-1関連mRNAの発現をISH法で検討し、tax mRNA高発現と抗腫瘍免疫を含む臨床病理学的特徴とが関連し予後不良となること見出し論文化した。さらに、対象疾患を古典的Hodgkinリンパ腫類似のATLL、免疫抑制/不全状態のATLL、HTLV-1キャリアの反応性リンパ節炎に拡張し、症例の集積を行った。これらの症例についてもHTLV-1関連mRNAの発現をISH法で確認し、免疫染色やPCR法を行い、臨床病理学的特徴との関連を検討した。これらの成果について一部は学会発表を行っており、論文化する予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

成人T細胞性白血病・リンパ腫(ATLL)はHTLV-1の感染により発症する難治性の末梢性T細胞性リンパ腫である。ATLLは様々な組織像をとりうるため、他の末梢性T細胞性リンパ腫との組織学的鑑別が困難である。本研究により、ATLL症例のFFPE標本におけるHTLV-1関連mRNAの発現をin-situで解析することで、抗腫瘍免疫や予後を含む臨床病理学的特徴との関連を同定することが示された。本研究でATLLやHTLV-1キャリアのリンパ節炎における臨床病理組織学的特徴や宿主の免疫状態との関連を詳細に解析することで、ATLLやHTLV-1キャリアの診断や治療の層別化につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：By using in-situ hybridization of HTLV-1-associated mRNA in FFPE samples of ATLL patients, high expression of tax mRNA was significantly associated with clinicopathological characteristics including anti-tumor immunity and with poor prognosis in our previous study. Furthermore, we expanded the targets to include ATLL with classic Hodgkin lymphoma-like histological features, ATLL in immunosuppressed/insufficient status, and reactive lymphadenitis in HTLV-1 carriers. We accumulated these cases and performed in-situ analysis of HTLV-1-associated mRNA, immunohistochemistry and PCR. We examined the association with clinicopathological characteristics in these cases. We presented a part of the results at academic meeting. We will finish the analysis shortly and publish the results at academic journal.

研究分野：血液病理

キーワード：成人T細胞性白血病・リンパ腫 HTLV-1 Hodgkinリンパ腫 HBZ Tax 免疫不全 反応性リンパ節炎

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

成人 T 細胞性白血病・リンパ腫(ATLL)はレトロウイルスの一種である HTLV-1 の感染により発症する予後不良な末梢性 T 細胞性リンパ腫(PTCL)である。ATLL と診断を確定するにはサザンブロット法により HTLV-1 プロウイルスの monoclonal integration を証明する必要があるが、抗 HTLV-1 抗体陽性の PTCL でも ATLL と確定できない症例が少なからず存在する。HTLV-1 の感染から ATLL の発症までに至る病態には *HBZ* や *tax* といった HTLV-1 関連遺伝子の発現が深く関わっているが、ホルマリン固定により RNA に変性が加わるため、ホルマリン固定パラフィン包埋(FFPE)標本における HTLV-1 関連 mRNA 発現の解析はこれまで困難であった。そこで、HTLV-1 キャリアや ATLL 症例などにおける HTLV-1 関連 mRNA の発現を *in situ* hybridization 法で解析することで、キャリアから ATLL に至る病態を解明するとともに、診断や治療の層別化につなげることを目的とし、本研究を立案した。

### 2. 研究の目的

本研究では、HTLV-1 キャリアや ATLL 症例の FFPE 標本における HTLV-1 関連 mRNA の発現を ISH 法で解析することで、HTLV-1 感染細胞ならびに ATLL 細胞を病理組織学的に同定し、HTLV-1 関連 mRNA の発現と腫瘍免疫関連タンパクの発現や予後を含む臨床病理学的特徴との関連を明らかにすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### 概要

ATLL 88 例について、FFPE 検体を用いて RNAscope による HTLV-1 関連 mRNA の発現を *in situ* で解析する。HTLV-1 関連 mRNA として、既報で知見が多数集積されている *HBZ* と *tax* を対象とする。また、古典的 Hodgkin リンパ腫(CHL)類似の形質を示す ATLL 11 例、免疫抑制剤投与ならびに臓器移植後発症の ATLL 6 例、HTLV-1 キャリアの反応性リンパ節炎 6 例についても同様の手法で HTLV-1 関連 mRNA の発現を解析する。さらに免疫組織化学や PCR 法を行い、臨床病理学的特徴との関連を検討する。

#### RNAscope による *in situ* での HTLV-1 関連 mRNA 発現の解析

FFPE 標本作製の過程で RNA は構造が変化し断片化などの変性が加わるため、従来の方法では FFPE 標本を用いて mRNA の発現を詳細に解析することは困難であった。また、*HBZ* は HTLV-1 感染細胞ならびに ATLL 細胞に普遍的に発現しているが、*tax* は免疫原性が高く ATLL 症例の大部分では発現が低下していることが知られていた。RNAscope [Advanced Cell diagnostics (ACD), Hayward, CA, U.S.A.] による ISH 法では、独自に設計されたプローブを用いることにより 1 シグナルが 1 コピーの mRNA 発現に対応している。シグナルはドット状となっているため、シグナルの同在を同定することや組織形態と比較検討することが可能であり、*tax* のような発現量の少ない mRNA でも FFPE 標本を用いて詳細に発現を解析することが可能である。

### 4. 研究成果

#### ATLL 88 例における HTLV-1 関連 mRNA の発現と臨床病理学的特徴との関連

ATLL 88 例について RNAscope による ISH 法を行い(図 1)、ATLL 細胞 1000 細胞あたりの *HBZ* および *tax* のシグナルの発現量を測定した。

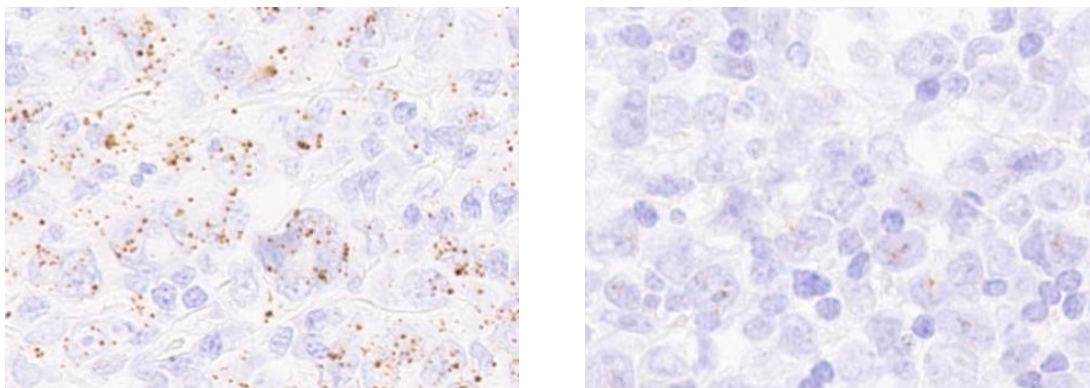


図 1. ISH の代表的画像(左: *HBZ*-ISH、右: *tax*-ISH)

すると、*tax* mRNA 発現が ATLL 細胞 1000 細胞あたり 400 以上と高い症例では、HLA class I や  $\beta 2$  ミクログロブリンの発現が有意に低下し、また有意に予後不良(Log-rank P=0.0499)であることが示された(図 2)。以上の成果を含めて論文化した。

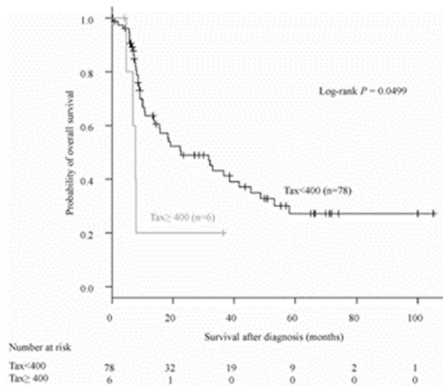


図 1 . *tax* 発現と全生存率との関連

古典的 Hodgkin リンパ腫類似の形質を示す ATLL 11 例における HTLV-1 関連 mRNA の発現と臨床病理学的特徴との関連

11 例中 9 例において、Hodgkin 様巨細胞に *HBZ*-ISH 陽性であったが、*tax*-ISH は全例陰性であった。7 例では PAX5 陽性で CHL と同様 B 細胞由来であることが示唆されたが、4 例では由来が不明であった。背景の細胞にも *HBZ*-ISH 陽性で形態異常がみられ、全例で PCR 法にて TCR $\gamma$  の再構成を認めた。以上の成果の一部を学会で報告した。引き続き論文化する予定である。

免疫抑制剤投与ならびに臓器移植後発症の ATLL 6 例における HTLV-1 関連 mRNA の発現と臨床病理学的特徴との関連

*HBZ* および *tax* mRNA の発現は と同様の分布であった。 で用いた症例と比較すると、PD-1 陽性 TIL 数が有意に増加していた。以上の成果の一部を学会で報告した。引き続き論文化する予定である。

HTLV-1 キャリアの反応性リンパ節炎 6 例

*HBZ* mRNA の発現は の症例よりも有意に低下していたが、リンパ球を含む細胞にシグナルの発現を認め、リンパ球の形態異常を認めた。一方、*tax* mRNA の発現はほぼみられなかった。以上を含めた成果を論文化する予定である。

まとめ

ATLL 症例の FFPE 標本を用いて *HBZ* や *tax* といった HTLV-1 関連 mRNA の発現を *in situ* で解析することで、抗腫瘍免疫や予後を含む臨床病理学的特徴の差異を同定しうることが示された。本研究で ATLL や キャリアの症例における HTLV-1 関連 mRNA の発現の重要性が明らかとなり、ATLL や キャリアの診断・治療の層別化につながることを期待される。

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 0件）

|  |                         |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Yamada Kyohei, Miyoshi Hiroaki, Yoshida Noriaki, Shimono Joji, Sato Kensaku, Nakashima Kazutaka, Takeuchi Mai, Arakawa Fumiko, Asano Naoko, Yanagida Eriko, Seto Masao, Ohshima Koichi | 4. 巻<br>34              |
| 2. 論文標題<br>Human T-cell lymphotropic virus HBZ and tax mRNA expression are associated with specific clinicopathological features in adult T-cell leukemia/lymphoma                               | 5. 発行年<br>2020年         |
| 3. 雑誌名<br>Modern Pathology   | 6. 最初と最後の頁<br>314 ~ 326 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1038/s41379-020-00654-0  | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>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<br>-               |

〔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<br>山田恭平、三好寛明、柳田恵理子、竹内真衣、島崎裕正、高野桂、瀬戸加大、大島孝一      |
| 2. 発表標題<br>古典的Hodgkinリンパ腫に類似した形質を示す成人T細胞性白血病・リンパ腫16例の検討 |
| 3. 学会等名<br>第7回日本HTLV-1学会学術集会                            |
| 4. 発表年<br>2021年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>山田恭平、三好寛明、柳田恵理子、竹内真衣、島崎裕正、高野桂、瀬戸加大、大島孝一    |
| 2. 発表標題<br>移植後および医原性を含む免疫不全症例に発症した成人T細胞性白血病・リンパ腫8例の検討 |
| 3. 学会等名<br>第7回日本HTLV-1学会学術集会                          |
| 4. 発表年<br>2021年                                       |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(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 |
|---------|---------|
|---------|---------|