

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06883

研究課題名(和文) 節外性NK/T細胞リンパ腫の分子サブタイプに対応する病理組織学的所見の解明

研究課題名(英文) Histopathologic Features Associated with Molecular Subtypes of Extranodal NK/T Cell Lymphoma

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)：節外性NK/T細胞リンパ腫(ENKTL)において、病理学的な予後因子は確立されていない。我々は組織学的に評価可能な予後因子の同定を試みた。ENKTL(n=71)について、遺伝子変異プロファイル、免疫組織化学によるMYC、pSTAT3、CD30の発現を評価した。STAT3変異陽性ENKTLは、pSTAT3およびCD30の高発現を示した。BCOR変異はMYCの高発現と関連していた。単変量解析ではステージ(2/3/4)、BCOR変異、TP53変異、MYC高発現、多変量解析ではステージ(2/3/4)とMYC高発現が予後不良因子であった。ENKTLのMYC高発現は病理学的予後不良因子である可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

節外性NK/T細胞リンパ腫は予後不良かつ希少なリンパ腫であり、病理学的に評価可能な予後因子の同定が求められています。本研究で、MYC蛋白を過剰に発現する節外性NK/T細胞リンパ腫は全生存期間が短く、遺伝子異常のパターンも異なることがわかりました。MYC蛋白の発現は免疫組織化学という方法で比較的簡便に調べることができ、実臨床ですぐに応用可能なバイオマーカーとして期待されます。

研究成果の概要(英文)：Background: Extranodal NK/T-cell lymphoma (ENKTL) is an Epstein-Barr virus-positive aggressive lymphoma. Pathological risk factors remain to be elucidated. We collected 71 ENKTLs. Immunohistochemistry (IHC) for MYC, pSTAT3, and CD30 was performed. Targeted sequencing for 29 genes was carried out in 67 ENKTLs. Median age was 66 (range, 6-100) years. Targeted sequencing identified mutations including STAT3 (27%), JAK3 (4%), KMT2D (19%), TP53 (13%), BCOR (10%), DDX3X (7%). STAT3 mutation was associated with higher pSTAT3 and CD30 expression by IHC. Univariate analysis showed that stage 2/3/4, BCOR and TP53 mutations, and high MYC expression were associated with reduced overall survival, and multivariate model identified stage 2/3/4, no treatment, and high MYC expression to be an independent prognostic factor. Collectively, high MYC protein expression is an independent adverse prognostic factor for patients with ENKTL.

研究分野：リンパ腫

キーワード：NK/T細胞リンパ腫 分子病理学 遺伝子異常 BCOR TP53 JAK/STAT

## 1. 研究開始当初の背景

人口の高齢化に伴って本邦におけるリンパ腫患者は増加しており、2017年には34,571人がリンパ腫を新たに発症し、12,473人が死亡している[国立がん研究センター<https://ganjoho.jp/>]. 節外性NK/T細胞リンパ腫・鼻型（Extranodal NK/T cell lymphoma, nasal type: ENKTL）は、鼻腔などの節外臓器を侵すEpstein-Barr virus陽性T/NK細胞リンパ腫の一型である. 特に進行期のENKTL患者の予後は一般的に不良であり、1年全生存率は55%である[Yamaguchi M et al. *J Clin Oncol.* 2011]. 一方で、SMILE療法などの多剤併用化学療法に反応し、長期寛解を得られる症例も存在する. したがって、ENKTLの予後を簡便かつ正確に推定し、適切な強度の治療を施すことは喫緊の課題である. 近年、Prognostic index for NK cell lymphoma (PINK)やPINK-E、PINK-Bなどの臨床情報にもとづいた予後指標が報告されているが、腫瘍そのものの遺伝子異常や蛋白発現パターンを反映した予後指標は確立されていない.

最近、中国の研究グループによる遺伝子解析、遺伝子発現プロファイリングによって、ENKTLは、①TP53変異・JAK-STAT経路の活性化を特徴とする群 (TSIM)、②MGA変異・BRDTのLOHを特徴とする群 (MB)、③HDAC9・EP300・ARID1Aの変異を特徴とする群 (HEA)に大別され、その中で②MB群の予後が不良であることが示された [Xiong J et al. *Cancer Cell.* 2020]. この知見は、ENKTLが分子生物学的にはいくつかのサブタイプに分類でき、それぞれの分子病態に応じて治療を選択できる可能性を示している.

しかしながら、こうした遺伝子異常もしくは遺伝子発現プロファイリングによって分類されるENKTLの分子サブタイプと、申請者ら病理医が日常の組織診断で観察している所見との間には今なお大きな断絶がある. すなわち、①ENKTLのそれぞれの分子サブタイプに、組織形態学的に認識しうる特徴はあるのか、②それぞれの分子サブタイプに特徴的、かつ免疫組織化学で検出できる蛋白発現パターンは存在するのか、という点は未だ明らかになっていない.

## 2. 研究の目的

以上の背景をもとに、本研究では、①ENKTLの各分子サブタイプに特徴的な臨床像、病理組織学的所見を明らかにすること、②ENKTLの分子サブタイプを反映し、日常の病理診断に応用しうる免疫組織化学パネルを確立すること、を目的とした.

## 3. 研究の方法

### 1) 研究材料：

山梨大学、東海大学、愛知医科大学、Mayo Clinicで診断されたENKTL 71例について、臨床病理学的情報（年齢、性別、B症状の有無、LDH上昇の有無、鼻腔病変の有無、局所/遠隔LN浸潤の有無、病期、治療歴、全生存期間）を収集するとともに、ホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）標本からDNAを抽出した.

### 2) Targeted sequencing：

抽出したDNAからライブラリを調整した. 次に、T/NK細胞リンパ腫で変異頻度が高い29遺伝子（ARID1A, ASXL3, BCOR, CDKN2A, DDX3X, DNMT3A, ECSIT, EP300, FAT4, HDAC9, IDH1, IDH2, JAK1, JAK2, JAK3, KMT2C, KMT2D, MGA, MSN, NRAS, STAT1, STAT3, STAT5A, STAT5B, STAT6, TET1, TET2, TET3, TP53）をtargetとするパネルを作製し、hybridization captureによりtargeted sequencingをおこなった. Variant allele frequency (VAF) 5%をcutoffとしてsingle nucleotide variant (SNV) およびinsertion/deletion (InDel)をcallし、既知のsingle nucleotide polymorphism (SNP)を除外したのち、病的意義があると考えられるものを抽出した.

### 3) 免疫組織化学：

FPPE 組織切片について、リン酸化 STAT3 (Phospho-STAT3<sup>Tyr705</sup> : pSTAT3), MYC, CD30 に対する免疫組織化学をおこない、それぞれ陽性細胞比率 30%, 40%, 30%を cutoff として陽性・陰性を判定した。

#### 4. 研究成果

##### 1) 臨床的特徴：

ENKTL 71 例の年齢中央値は 66 歳 (範囲 6-100 歳), 男女比は 41 : 30 であった。B 症状, LDH 上昇はそれぞれ 36%, 64%の症例に認められた。鼻腔病変は約 70%の症例にみられた。25%の症例が stageIV であった。

##### 2) 遺伝子異常と蛋白発現の関係：

Targeted sequencing の結果、79%の症例に合計 125 個の SNV/InDel が認められた (図 1)。

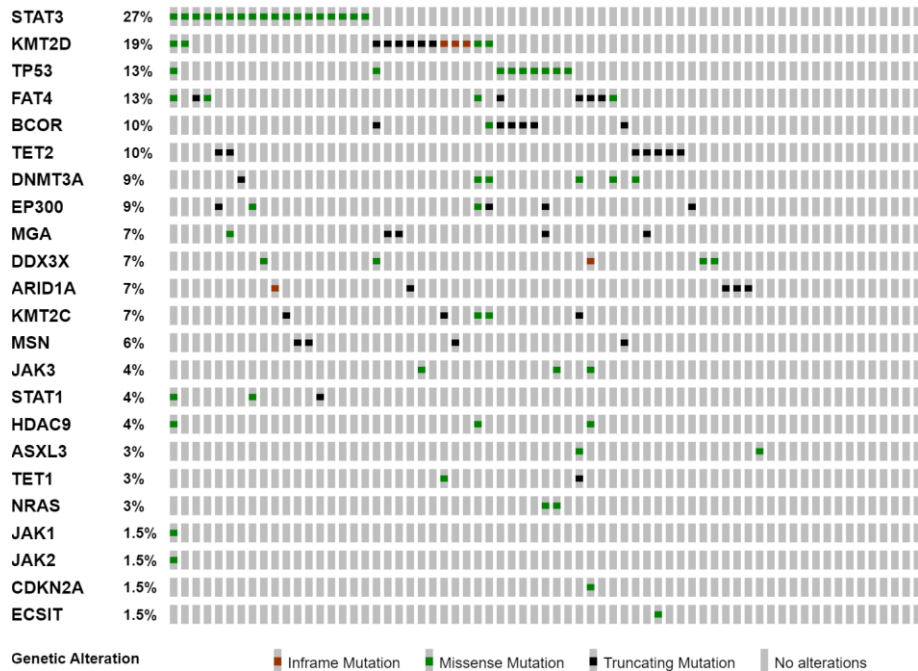
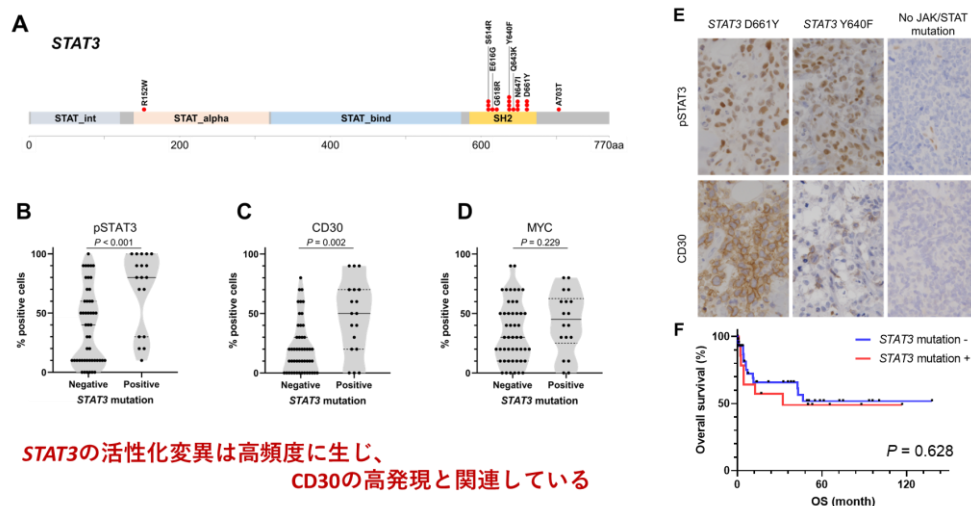


図 1. ENKTL における遺伝子異常

- i. *STAT3* の変異は ENKTL の 27%で生じており、変異は SH2 ドメインに集中した (図 2)。SH2 ドメイン以外に生じたもの (n=2) を含め、すべて機能獲得型変異として報告されているものであった。また、*STAT3* 変異陽性例は陰性例に対し、pSTAT3、CD30 の発現が有意に高かった。*STAT3* 変異の有無で患者の全生存期間に有意な差はなかった。



**STAT3の活性化変異は高頻度に生じ、  
CD30の高発現と関連している**

図 2. ENKTL における STAT3 変異

ii. BCL6 コリプレッサーをコードする *BCOR* 遺伝子の変異は 10%に生じていた。また *BCOR* 変異は *TP53* 変異と高頻度に共在することがわかった (図 3)。 *BCOR* 変異は同遺伝子全体に分布し、ほとんどが frameshift もしくは nonsense 変異であり、機能喪失型変異であることが示唆された (図 4)。 *BCOR* 遺伝子の異常は *MYC* の高発現と有意に関連していた。一方、 *BCOR* 変異と pSTAT3、CD30 の発現の間には、有意な相関はなかった。 *BCOR* 変異 ENKTL は *BCOR* 野生型 ENKTL に対して、全生存期間が有意に短縮していた。

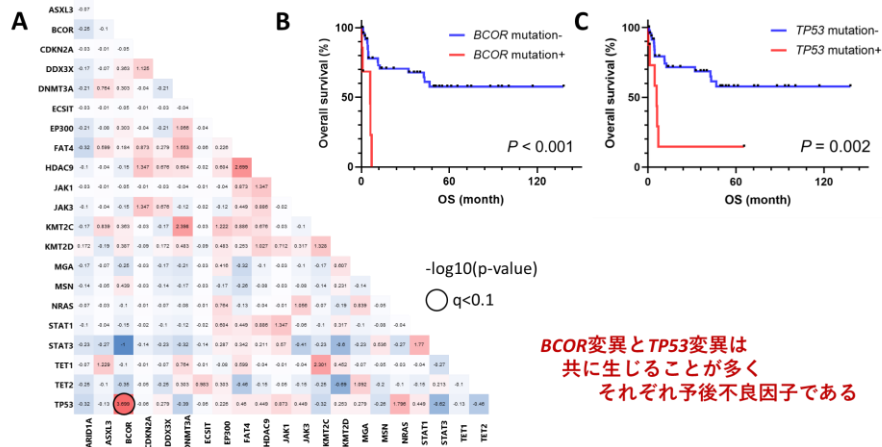


図 3. ENKTL における *BCOR* 変異と *TP53* 変異の関係

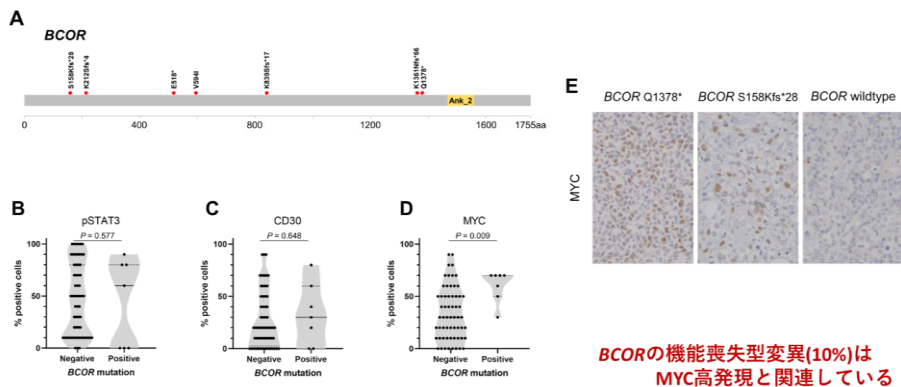


図 4. ENKTL における *BCOR* 変異

### 3) 予後因子の同定:

臨床病理学的因子, targeted sequencing, 免疫組織化学でえられた各種パラメーターをもとに、単変量および多変量解析をおこない、ENKTL 患者の死亡リスクに相関する因子を検討した。単変量解析では臨床病期 (stage II-IV), *BCOR* 変異, *TP53* 変異, *MYC* 陽性が死亡リスクと関連していた。一方、多変量解析では臨床病期 (stage II-IV)、*MYC* 陽性が ENKTL 患者の死亡リスク増加に寄与していた一方、現在推奨されている anthracycline-free の化学療法/放射線療法は死亡リスクの減少に寄与していた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計30件（うち査読付論文 30件／うち国際共著 8件／うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Feldman Andrew L., Oishi Naoki, Ketterling Rhett P., Ansell Stephen M., Shi Min, Dasari Surendra	4. 巻 46
2. 論文標題 Immunohistochemical Approach to Genetic Subtyping of Anaplastic Large Cell Lymphoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 American Journal of Surgical Pathology	6. 最初と最後の頁 1490 ~ 1499
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/PAS.0000000000001941	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 該当する
1. 著者名 Oishi Naoki, Satou Akira, Miyaoka Masashi, Kawashima Ichiro, Segawa Takahiro, Miyake Kunio, Mochizuki Kunio, Kirito Keita, Feldman Andrew L., Nakamura Naoya, Kondo Tetsuo	4. 巻 7
2. 論文標題 Genetic and immunohistochemical profiling of NK/T-cell lymphomas reveals prognostically relevant BCOR-MYC association	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Blood Advances	6. 最初と最後の頁 178 ~ 189
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1182/bloodadvances.2022007541	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 該当する
1. 著者名 Oishi Naoki, Feldman Andrew L.	4. 巻 81
2. 論文標題 CA9 expression in breast implant associated anaplastic large cell lymphoma presenting in a lymph node	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Histopathology	6. 最初と最後の頁 270 ~ 272
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/his.14666	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 該当する
1. 著者名 Oishi Naoki, Segawa Takahiro, Miyake Kunio, Mochizuki Kunio, Kondo Tetsuo	4. 巻 80
2. 論文標題 Incidence, clinicopathological features and genetics of in situ follicular neoplasia: a comprehensive screening study in a Japanese cohort	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Histopathology	6. 最初と最後の頁 820 ~ 826
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/his.14617	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 Oishi Naoki, Feldman Andrew L.	4. 巻 -
2. 論文標題 CA9 expression in breast implant associated anaplastic large cell lymphoma presenting in a lymph node	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Histopathology	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/his.14666	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 該当する

1. 著者名 Kawashima Ichiro, Oishi Naoki, Kasai Kazunari, Inoue Tomohiro, Hosokawa Eriko, Nakadate Ayato, Matsuura Minori, Kumagai Takuma, Koshiishi Megumi, Yamamoto Takeo, Nakajima Kei, Tanaka Masaru, Kondo Tetsuo, Kirito Keita	4. 巻 480
2. 論文標題 Transdifferentiation of mantle cell lymphoma into sarcoma with limited neuromuscular differentiation after conventional chemotherapy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Virchows Archiv	6. 最初と最後の頁 1101 ~ 1105
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00428-021-03148-9	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 Oishi Naoki, Ahmed Reham, Feldman Andrew L.	4. 巻 18
2. 論文標題 Updates in the Classification of T-cell Lymphomas and Lymphoproliferative Disorders	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Current Hematologic Malignancy Reports	6. 最初と最後の頁 252 ~ 263
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11899-023-00712-9	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 該当する

1. 著者名 Oishi Naoki	4. 巻 63
2. 論文標題 Precursory or early lesions of follicular lymphoma: clinical features, pathology, and genetics	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Clinical and Experimental Hematopathology	6. 最初と最後の頁 65 ~ 72
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3960/jslRt.23010	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 Oishi Naoki, Feldman Andrew L.	4. 巻 16
2. 論文標題 Current Concepts in Nodal Peripheral T-Cell Lymphomas	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Surgical Pathology Clinics	6. 最初と最後の頁 267 ~ 285
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.path.2023.01.011	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 該当する

1. 著者名 Le Minh-Khang, Oishi Naoki, Satou Akira, Miyaoka Masashi, Kawashima Ichiro, Mochizuki Kunio, Kirito Keita, Feldman Andrew L., Nakamura Naoya, Kondo Tetsuo	4. 巻 143
2. 論文標題 Molecular and clinicopathological features of granzyme B-negative extranodal NK/T-cell lymphoma	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Human Pathology	6. 最初と最後の頁 10 ~ 16
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.humpath.2023.11.005	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 該当する

〔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 大石 直輝, 佐藤 啓, 宮岡 雅, 川島 一郎, 瀬川 高弘, 三宅 邦夫, 望月 邦夫, 桐戸 敬太, Feldman Andrew L., 中村 直哉, 近藤 哲夫
2. 発表標題 Genetic and immunohistochemical profiling of extranodal NK/T-cell lymphoma revealed prognostic significance of high MYC expression
3. 学会等名 日本リンパ網内系学会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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			
米国	Mayo Clinic			