

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 23 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K15424

研究課題名(和文) IMP3を軸とした多重免疫染色を用いた血管内大細胞型B細胞リンパ腫の病理診断

研究課題名(英文) Pathological diagnosis of intravascular large B-cell lymphoma by multiple immunostainings focusing IMP3

研究代表者

藤本 正数 (Fujimoto, Masakazu)

京都大学・医学研究科・准教授

研究者番号：90573676

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)：88人の血管内大細胞型B細胞リンパ腫(IVL)患者から採取された病理標本152検体(IVL陽性111、陰性41)について、IMP3およびIMP3/PAX5の免疫染色を実施した。IVLまたは他のB細胞リンパ腫の既往のない非IVL患者38人から得られた病理標本40検体を陰性対照とした。IVL病理標本は全てIMP3陽性であった。さらに当初IVL陰性と診断されたIVL患者からの41検体中11検体がIMP3陽性であったが、陰性コントロール40検体のうち、IMP3陽性非胚中心B細胞は2検体のみであった($p=0.0131$)。IMP3の免疫組織化学はIVLの病理診断の補助となりうる事が確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

血管内大細胞型B細胞リンパ腫(intravascular large B-cell lymphoma; IVL)は生検組織中の腫瘍細胞量が限られ、特異的な診断マーカーにも乏しいことから、しばしば診断が難しい高悪性度リンパ腫である。申請者は癌胎児蛋白の一種であるinsulin-like growth factor II mRNA-binding protein 3 (IMP3)がIVLの腫瘍細胞に高頻度に発現している事を見出し、多施設から集積した多くのIVL症例を用いた後ろ向き研究にて免疫組織化学的手法を用いてIMP3の発現を解析し、IVLの病理診断におけるIMP3の有用性を証明した。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the utility of IMP3 immunohistochemistry for intravascular large B-cell lymphoma (IVL) diagnosis in various organs. Overall, 152 pathological specimens (111 positive and 41 negative for IVL) obtained from 88 patients with a diagnosis of IVL were stained for IMP3 and IMP3/PAX5. As negative controls, 40 pathology specimens from 38 patients with no history of IVL or other B-cell lymphomas were stained for IMP3. All mononuclear cells with cytoplasmic staining were considered positive for IMP3 expression, but expression restricted to germinal center B cells was excluded from evaluation. All 111 IVL pathological specimens were positive for IMP3 and IMP3/PAX5. In addition, 11 of the 41 specimens originally diagnosed as IVL-negative showed IMP3/PAX5 double-positive cells. However, of the 40 negative control samples, IMP3-positive nongerminal center B cells were detected in only 2 samples ($P = 0.0131$). IMP3 can be a helpful adjunct for IVL BCL diagnosis.

研究分野：病理診断

キーワード：IMP3 血管内大細胞型B細胞リンパ腫 多重免疫染色

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

リンパ腫の病理診断は、従来の形態診断、免疫組織化学に加え、フローサイトメトリーによる表面マーカー解析や遺伝子検査などの補助検査の有用性が高い。しかし、リンパ腫の組織型や発生部位によっては、十分な腫瘍細胞量が採取できないため、補助検査の有用性が限られる。血管内大細胞型B細胞リンパ腫 (intravascular large B-cell lymphoma; IVLBCL) はその様な補助検査の有用性が限られる節外リンパ腫の一型で、全身の細小血管内で選択的に増殖して腫瘍性病変を形成する。その確定診断は、組織中の血管内に大型Bリンパ球を同定する事でなされるが、生検組織中に腫瘍細胞が存在しても少ない事や挫滅などのアーチファクトの為に、量的あるいは質的に診断にしばしば難渋する事がある。Cell-free DNAを用いた遺伝子解析は、このような課題を解決するための大きな可能性を示している。同様に、IVLBCL診断における課題を克服するために、広く利用可能で一般的に使用されている診断マーカーの開発が望まれている。

2. 研究の目的

近年、癌胎児蛋白の一種であるinsulin-like growth factor II mRNA-binding protein 3 (IMP3) がリンパ腫の一部でも発現している事が報告されている。古典的なホジキンリンパ腫とほとんどの高悪性度非ホジキンB細胞リンパ腫でIMP3の発現が検出される事が知られており、特に腫瘍細胞数の少ない小さな生検標本において、これらのリンパ腫の有用なマーカーとしてIMP3が病理診断に有用である。過去に我々は、単一施設のコホートを用いて、皮膚生検でIMP3の免疫組織化学を行い、IMP3が皮膚生検におけるIVLBCLの高感度マーカーであることを見出した。今回の研究では、IVLBCLの診断が皮膚生検に限定されないことを考慮し、多施設コホートを用いて多数のIVLBCLを集積し、様々な臓器におけるIVLBCLの診断におけるIMP3の免疫組織化学の有用性を解析した。

3. 研究の方法

2001年から2022年の間に京都大学医学部附属病院を含む11施設で診断されたIVLBCL患者の陽性生検・陰性生検を検索した。対照として、京都大学医学部附属病院でIVLBCLを発症していない患者からの陰性生検も収集した；IVLBCLが最初に疑われた患者を対象とし、他のB細胞リンパ腫の患者は除外した。さらに、血管内NK/T細胞リンパ腫や反応性血管内リンパ球増殖のようなIVLBCLを組織学的に模倣する病変を陰性対照として集積した。臨床的および病理学的情報は、病理報告書および患者カルテから得た。本研究は、京都大学医学部附属病院の倫理審査 (承認コード: R3843) により承認され、ヘルシンキ宣言に従って実施された。

IMP3およびCD20の免疫染色は、4 μmの厚みのホルマリン固定・パラフィン包埋組織切片を用い、抗IMP3抗体 (クローン69.1、Agilent) および抗CD20抗体 (クローンL26、Agilent) を用いて、自動免疫組織化学染色装置BOND-RX (Leica Biosystems) を用いて行った。また、次の一次抗体を使用した免疫染色も行った: BCL6 (クローンG1191E/A8、Roche diagnostics)、CD3 (クローン2G6、Roche Diagnostics)、CD5 (クローンSP19、Roche Diagnostics)、CD10 (クローン56C6、Leica Biosystems)、MUM1 (クローンMUM1p、Agilent)。さらにEBER in situ hybridization (PB0589、Leica Biosystems) も一部の症例に行った。IMP3およびPAX5 (クローンEPR3730[2] Abcam) の二重染色もまた、IVLBCL患者の全病理標本およびIVLBCLでない患者の選択された標本について、前述と同様にBOND-RXを用いて実施した。

IVLBCLの組織学的診断は世界保健機関 (WHO) の基準に従って行われた。血管内リンパ腫細胞の

細胞学的異型は、ヘマトキシリン・エオジン（H&E）染色を用いて同定した。B細胞系譜を確認するためにCD20陽性である事を確認した。細胞質染色のあるすべての単核球をIMP3発現陽性とみなしたが、胚中心B細胞に限定されたIMP3発現は評価から除外した。非単核球、すなわち巨核球とグリア細胞におけるIMP3発現は陰性とみなされた。IMP3/PAX5二重染色は、細胞がPAX5の核染色とIMP3の細胞質染色の両方を示した場合に陽性とみなされた。IMP3の染色強度は、陰性、1+（弱い）、2+（中程度）、3+（強い）の3段階で評価した。2人の著者が共同でマルチヘッド顕微鏡を用いて症例を評価した。解釈が異なる症例は、コンセンサスが得られるまで議論された。2群間のカテゴリー変数は、GraphPad Prism（GraphPad software）を用いてFisher exact検定で比較した。結果は両側P値が<0.05のとき、有意とした。

4．研究成果

88人のIVLBCL患者から採取された病理標本152検体（IVLBCL陽性111、陰性41）について、IMP3およびIMP3/PAX5の免疫染色を実施した。IVLBCLまたは他のB細胞リンパ腫の既往のない非IVLBCL患者38人から得られた病理標本40検体を陰性対照とした（陰性対象の内訳は、悪性腫瘍が疑われた29例の良性病理標本31例、血管内および/またはリンパ管内にリンパ球増殖を伴う虫垂炎7例、血管内NK/T細胞リンパ腫2例）。結果的に、IVLBCLと診断された様々な臓器からの111の病理標本すべてにおいて、IMP3の発現は一貫してIVLBCL細胞に認められたが、陰性コントロール40検体のうち、IMP3陽性非胚中心B細胞は2検体のみで（ $p=0.0131$ ）、陰性コントロールではIVLBCLを疑う様なIMP3陽性細胞は血管内に認めなかった。なお、ほとんどのIVLBCLはH&E染色とCD20の免疫染色で診断可能であるが、当初陰性であった11の病理標本がIMP3の免疫染色でIVLBCL陽性と疑われ、これは陰性の生検の26.8%（11/41）、IVLBCL患者からの全生検の7.2%（11/152）に相当した。IMP3はCD20と併用することで、変形した腫瘍細胞を含む限られた数の腫瘍細胞を強調することができ、IVLBCLが疑われるがH&EやCD20では同定や確定ができない症例に有用である。ほとんどの場合、IMP3とPAX5の二重染色を行うことは、B細胞ではないIMP3陽性細胞の過大解釈を排除するために必要ではないが、腫瘍細胞が他の血球系細胞と混在している場合には、IMP3がIVLBCL細胞に染まっている事の確認に有用である。

以上より、IMP3の免疫組織化学が様々な臓器におけるIVLBCLの病理診断の補助となりうる事が確認された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------