

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 26 日現在

機関番号：32644

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25860278

研究課題名(和文)腸管症型T細胞リンパ腫の臨床病理学的研究及び国際共同研究

研究課題名(英文)The clinicopathological and international joint research of enteropathy-associated T-cell lymphoma

研究代表者

富田 さくら (TOMITA, Sakura)

東海大学・医学部附属病院・臨床助手

研究者番号：20647507

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：消化管に発生する稀なT細胞リンパ腫である腸管症型T細胞リンパ腫(enteropathy-associated T-cell lymphoma: EATL)について、本邦での特徴を明らかにするためにFFPE(formalin-fixed paraffin-embedded tissue)を用いた解析を行った。

本邦のEATLは形態学的に腫瘍細胞の大きさにばらつきを認めるものの、CD8(+)/CD56(+を示し、またTCR(T-cell receptor) , TCR , TCR silentにかかわらず9q34の増幅が高頻度であるという点では均一な性質を示すことが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Enteropathy-associated T-cell lymphoma (EATL) is a rare primary T-cell lymphoma of the digestive tract. I aimed to clarify the characteristics of EATL in Japan using FFPE (formalin-fixed paraffin-embedded tissue).

EATL in Japan is characterized by medium to large sized cells with cytotoxic CD8(+)/CD56(+) immunophenotype and 9q34 gain irrespective of the cell origin of -T-cells, -T-cells and TCR silent cells.

研究分野：病理学

キーワード：EATL

1. 研究開始当初の背景

腸管症関連 T 細胞リンパ腫 (enteropathy-associated T-cell lymphoma: EATL) は消化管に発生する稀な T 細胞リンパ腫である。EATL はしばしば消化管穿孔で発症し、また小腸が好発部位であることから通常の内視鏡検査では発見しにくく、診断が遅れることが多い。さらに、EATL に対する効果的な治療法は未だ確立されておらず、予後不良である。EATL は臨床病理学的に Type I と Type II に分類され、Type I は celiac 病を基盤として発生すると考えられており、北欧で頻度が高い。一方、Type II は *de novo* に発生し、アジアを含む全世界で認められる。アジアではほとんど全ての EATL が Type II に分類されるが、その発生率の低さから病理学的機序や免疫組織学的特徴は未だ十分に解析されていない。EATL は病理組織学的に小型～中型のリンパ球様細胞のびまん性増生からなり、腺管上皮内に多数の腫瘍性 T 細胞を認める。この腺管上皮内 T リンパ球 (intraepithelial T-lymphocytes: IELs) は EATL の細胞起源と考えられ、正常では異物抗原からの防御やウイルスに感染した絨毛上皮の剥離・除去、あるいは上皮細胞のターンオーバーに重要な役割を果たしている。近年、ホルマリン固定パラフィン包埋組織 (formalin-fixed paraffin-embedded tissue: FFPE) に対する様々な抗体が開発されており、T 細胞ないし T 細胞腫瘍の研究の一助となっている。それ故、EATL の詳細な免疫組織学的解析を行うことが可能となってきた。さらに、array comparative genomic hybridization (アレイ CGH) 解析により欧米諸国の EATL に特徴的なゲノム変化が報告されている。

2. 研究の目的

本研究では本邦の EATL の臨床病理学的、免疫学的、遺伝学的特徴を明らかにするために EATL の FFPE を用いて、アレイ CGH および FISH によるゲノムプロファイルおよび免疫組織化学的形質を解析した。

3. 研究の方法

材料は国内で過去 (2000 年 4 月 1 日から 2012 年 3 月 31 日の 12 年間) に EATL と診断された、東海大学、岡山大学、神奈川県立がんセンターの 20 例を用いた。材料はいずれも FFPE 組織で、手術材料 15 例と腫瘍の生検材料 5 例である。

さらにスペインのバルセロナ大学より 8 例 (手術材料 4 例、生検材料 4 例) 提供を受け、6 例が解析可能であった。

(1) 組織学的評価

Hematoxylin-eosin (HE) 染色標本により、リンパ腫細胞の大きさ (小型、中型、大型)、

核の形状 (類円形あるいは不整形)、IELs の有無について評価を行った。

(2) *In Situ* Hybridization と免疫組織化学

EBV-Encoded RNA の *In Situ* Hybridization (EBER *in situ* hybridization) と、免疫組織化学 (CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD56, TIA-1, Granzyme B, TCR(T-cell receptor) - , TCR- , TNFRSF14, BTLA, Ki-67) を Leica BOND-MAX 全自動免疫染色装置と BOND Polymer Refine detection kit (DS9800) を使用して全例 (20 例) について行った。

(3) アレイ CGH

未染スライドからマイクロダイセクションおよび DNA 抽出を行い、200bp 以上のゲノム断片が得られた 8 例について、アレイ CGH を施行した (SurePrint G3 Human aCGH Microarray 1M, Agilent Technologies, USA)。

(4) Fluorescence *in situ* hybridization (FISH)

アレイ CGH のコピー数増減の結果に基づいて、バイオマーカーとして関連が示唆された遺伝子を含む最小共通領域を検討した (1q21, 6q16, 7p22, 9q33, 9q34)。

FISH シグナルはそれぞれの症例につき少なくとも 100 細胞以上についてカウントし、非腫瘍性反応性リンパ組織 (扁桃とリンパ節) 10 例を陰性コントロールとして用いた。標的とした各領域のシグナル数増減の平均 + 2s.d. (2xSTD) を算出し、その値をカットオフ値として増幅ありもしくは欠損ありと決定した。

本研究は、東海大学医学部研究審査委員会により承認を受けた (12R084 号, 2012 年～)。

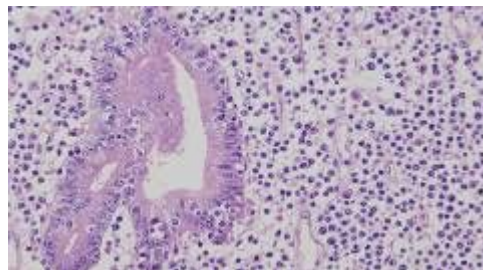
4. 研究成果

【結果】

(1) 組織像

解析した本邦の EATL の組織学的特徴として腫瘍細胞の大きさは中型～大型が 13 例 (65%)、小型～中型が 5 例 (25%)、中型が 2 例 (10%) であった。全ての症例に IELs の増加を認めた (図 1)。

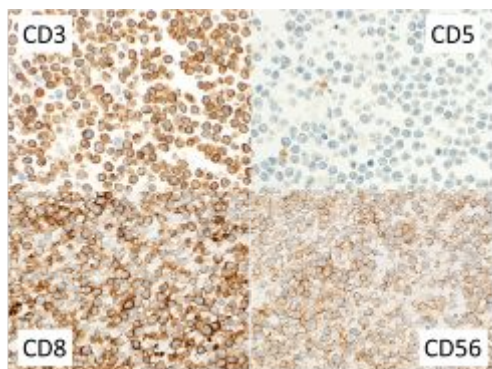
図 1. 中型～大型のリンパ腫細胞の増殖と IELs の増加



(2) 免疫組織化学

本邦の EATL の免疫表現型は CD2⁺ (60%)、CD3^ε⁺ (100%)、CD4⁺ (10%)、CD7⁺ (95%)、CD8⁺ (80%)、CD56⁺ (85%)、TIA-1⁺ (100%)、Granzyme B⁺ (25%)、TCR γ ⁺ (10%)、TCR β ⁺ (35%)、TCR δ ⁺ (50%) で、TCR がいずれも陰性であったのは 6 例 (30%) であった (図 2)。全ての症例が EBER 陰性を示した。

図 2. 本邦の EATL の代表的な免疫形質

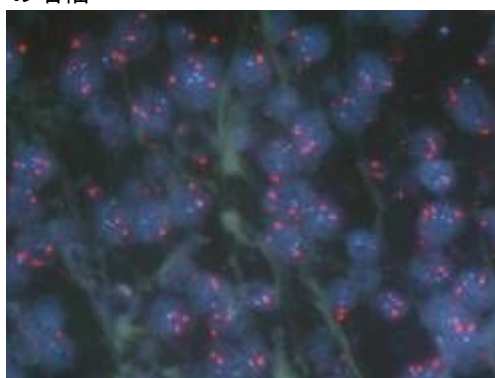


(3) アレイ CGH と FISH

本邦の EATL の遺伝学的特徴としては 1q32.3、4p15.1、5q34、7q34、8p11.23、9q22.31、9q33.2、9q34.13、12p13.31 の増幅と 7p14.1 の欠損を高頻度に認めた。5 つの領域 1q21.3 (*CKS1B*)、6q16.3 (*HACE1*)、7p22.3 (*MAFK*)、9q33.3 (*PPP6C*)、9q34.3 (*ASS1*, *CARD9*) に対する FISH では 15 例 (75%) に 9q34.3 の増幅を認め (図 3)、アレイ CGH と良く相関していた。

スペインの症例でも 9q34 の FISH を施行したが、増幅はみられなかった (0/6 例)。

図 3. FISH における 9q34 (水色シグナル) の増幅



【考察】

EATL Type I と Type II では組織像が異なり、欧米諸国では Type II EATL は小型から中型の腫瘍細胞が特徴的とされるが、我々が検討した本邦の症例は中型から大型の腫瘍細胞の増殖を示すものが多かった。腫瘍細胞の大きさのバリエーションがアジアの EATL の特徴である可能性がある。本邦の EATL 症例は celiac 病

の病歴はなく、腫瘍細胞は CD8⁺/CD56⁺ の細胞障害性リンパ球としての表現型を有し、IELs の増加を伴っていた。我々の症例では celiac 病の病歴を認めず、本邦の EATL には欧米例とは異なる免疫学的背景が存在する可能性が考えられた。

本邦の EATL は TCR 陽性を示す症例が多く (10/20, 50%)、6 例は TCR α および TCR β のいずれも陰性で、Type II EATL は $\gamma\delta$ 型の TCR を発現するという WHO 分類の記載とは異なっていた。アジアの EATL における TCR の発現については様々な報告があり、未だ controversial である。

本研究では、Type II EATL は、TCR の発現 ($\gamma\delta$, silent) のいずれにおいても 9q34 の増幅を認めること、さらにこれまで Type I に特異的な異常とさえしているものの一部 (1q と 5q の増幅) も Type II に認められることを明らかにした。

スペインの症例では 9q34 の増幅を確認できず、国外における EATL のゲノムプロファイルに heterogeneity がみられる可能性も考えられた。

【結論】

Type II EATL の腫瘍発生の誘因となる免疫学的機序は未だ不明であるが、本邦の EATL のゲノムプロファイルは多くの領域でのコピー数増減によって特徴づけられ、欧米の EATL Type I と Type II のいずれにもみられるとされる 9q34 の増幅が $\gamma\delta$ -T 細胞由来あるいは $\gamma\delta$ -T 細胞由来に関わらず、高頻度であった。

本邦の EATL は形態学的に腫瘍細胞の大きさにばらつきがみられるものの、免疫組織化学で CD8(+)/CD56(+) を示し、また TCR γ , TCR β , TCR silent にかかわらず 9q34 の増幅が高頻度であるという点では均一な性質を示した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Sakura Tomita, Yara Y Kikuti, 他 10 名: Genomic and immunohistochemical profiles of enteropathy-associated T-cell lymphoma in Japan. Mod Pathol. 2015; 28 (10): 1286-1296. DOI: 10.1038/modpathol.2015.85. 査読有

〔学会発表〕(計 3 件)

Sakura Tomita, Yara Y Kikuti, 他 6 名: GENOMIC AND IMMUNOHISTOCHEMICAL PROFILES OF ENTEROPATHY-ASSOCIATED T-CELL LYMPHOMA IN JAPAN. The 9th Asia

Pacific IAP Congress, Brisbane
Convention & Exhibition
Centre(Brisbane, Australia), 2015.6.5
富田さくら, Joaquim Carreras, 他7名:
腸管症型 T 細胞リンパ腫の免疫組織化学
および遺伝子学的研究. 第 54 回日本リ
ンパ網内系学会総会, 山形国際ホテル
(山形県, 山形市), 2014.6.20-21
富田さくら, Joaquim Carreras, 他3名:
腸管症型 T 細胞リンパ腫の免疫組織化学
および遺伝子学的研究. 第 102 回日本病
理学会総会, ロイトン札幌(北海道, 札
幌市), 2013.6.8

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

富田 さくら (TOMITA, Sakura)
東海大学・医学部・臨床助手
研究者番号: 20647507