

「別紙 1」

論文の内容の要旨

論文題目 膿胸関連リンパ腫の臨床的・病理学的検討

指導教官 深山 正久 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 12 年 4 月入学

医学博士課程

病因・病理学専攻

氏名 大田泰徳

膿胸関連リンパ腫 (pyothorax associated lymphoma: PAL) は結核性の慢性膿胸に対する人工気胸術施行後、30 年程度経て膿胸腔より生じる稀な悪性リンパ腫である。海外からも散発的な報告例はあるがほとんどは本邦からの報告である。発症年齢は平均 64 歳、男女比は 12:1 程度で圧倒的に男性に多く、人工気胸術施行後平均 37 年程度 (全例 20 年以上) 経て発症している。ほとんどは B 細胞性リンパ腫であり、形態像としては diffuse large B cell lymphoma の形をとる。しかし少数例、T 細胞マーカーを発現するもの、T 細胞、B 細胞両方のマーカーを発現するもの、あるいは両方のマーカーが発現していないものなどが報告されている。

1993 年 Fukayama らにより EBV (Epstein-Barr virus) の感染が見られることが報告され、そしてその感染形式は LMP1, EBNA2 を発現する latency III タイプであることが示された。その後多くの症例で EBV 感染が報告され、その発症に EBV の関与が示唆されている。EBV の Terminal Repeat を用いた clonality 解析が行われ、腫瘍の多くは monoclonal であるが一部 oligoclonal なものも見られるという報告がされている。このことから PAL の腫瘍発生論として、まず膿胸腔内で oligoclonal な腫瘍が起り、その後 monoclonal な腫瘍が選択されるのではないかと仮説が提唱されている。PAL へのウイルス感染は上記 EBV の報告がそのほとんどであるが、一例、HHV8 (Human herpes virus 8) の感染がみられたという報告もみられる。悪性リンパ腫発症におけるウイルスの関与として近年 polyoma virus 属の SV40 が注目されている。

EBV の潜伏感染形式として latency III 形式をとるリンパ腫には移植後リンパ増殖性疾患や HIV-related lymphoma があげられる。Latency III タイプの感染形式において発現してくる EBNA2, 3 群などの蛋白は細胞障害性 T 細胞に認識され、排除されてしまうため、このタイプのリンパ腫を発症する患者は、通常全身性免疫不全状態を背景因子として持っている。PAL 患者の免疫監視機構が臓器移植患者や AIDS 患者のように系統的に破綻しているとは考えにくいにもかかわらず局所的免疫不全空間といえる膿胸腔を越えて腫瘍が全身に転移しうる。これは、PAL には、単に EBV が Latency III 型感染をきたしているだけにとどまらない、独自の生物学的特徴があるものと推察される。

PAL はこれまで数 100 例程度の報告しかないまれな疾患であるが、本邦においてはまだまだ日常の診療で遭遇しうる疾患である。確立された治療法はまだなく、外科的切除や放射線療法、化学療法などが各施設で行われているのが現状である。今回、これらのことを踏まえ、

以下のことを行った。

1. PALの多数例を全国調査により収集、解析し、病態及び治療成績について検討する。
2. PALに polyoma virus 属(BKV, JCV, SV40)の関与が認められるか否かを検討する。特に近年注目を集めている SV40 に関して検討する。
3. PALの B細胞性マーカー、T細胞性マーカーの発現様式について検討する。
4. 大部分の PALは B細胞性腫瘍であるので、免疫グロブリン重鎖遺伝子の体細胞突然変異の頻度を調べ、分化段階について検討する。
5. PALの腫瘍発生に関する仮説、すなわち oligoclonal な状態から次第に選択され monoclonal な状態へと進展するという仮説を分子生物学的に検証する。
6. 免疫不全がその発症に大きく関与していると考えられる二つの悪性リンパ腫、PALおよび HIV-related lymphoma について遺伝子発現解析を行い、両者の遺伝子発現の違いについて解析する。

#### 全国調査による局所療法の有効性に関する検討

アンケート調査を実施し、138例について臨床的データを解析することが出来た。PAL発症年齢は平均68歳(48-86)、男女比は7.1:1で膿胸発症日からPAL発症日までは平均44年であった。5年生存率は35%であった。外科的切除された症例は予後のよい傾向にあったが、統計学的有意差( $p < 0.05$ )はみられなかった。治療成績に影響を与える因子としては clinical stage, performance states, LDH上昇の有無、性別が挙げられた。人工気胸術施行の既往が明らかではない症例が14例(13%)あったが、人工気胸術施行症例と非施行症例でのPALにおける臨床的・病理学的特徴の差はみられなかった。

#### 全国調査による細胞表面マーカーの解析

病理標本を49症例について集めることが出来た。ほとんどの組織像は異型の強い大型リンパ球からなる diffuse large cell type であり、多核細胞を混じる症例も見られた。続いてB細胞系マーカーやT細胞系マーカー、EBV関連マーカーを免疫染色した。その結果B細胞系マーカーであるCD20陽性例は76%であり、18%の症例ではB、Tともに陰性であった。12例ほどT細胞系マーカーであるCD3陽性例がみられ、うち9例はB細胞系マーカーであるCD20も陽性であった。B細胞への分化に必須とされ極めて特異的とされるPAX5の発現が96%(47/49)の症例で確認でき、CD3陽性例は全例PAX5陽性であった。したがってPALの本態はB細胞性リンパ腫であり、PALにおけるT細胞系マーカーの発現は異常発現であると考えられる。CD5陽性例は一例もなく、通常の diffuse large B-cell lymphoma であればCD5陽性例が10%程度みられることと対照的であった。EBVに関しては90%の症例でEBNA2の発現がみられ、ほとんどが latency III 型のEBV潜伏感染をみることがわかった。

#### Polyoma virus (JCV, BKV, SV40) 感染の有無。

PCR法を用いてPAL7例及びその他一般のリンパ腫125例からDNAを抽出し、JCV, BKV, SV40のウイルス断片が検出されるか検討した。PALではこれら3種類のウイルスは検出されなかった。その他の悪性リンパ腫においても、SV40は検出されなかった。JCVは4例、BKVは1例で検出されたが、JCVに関して続いて行った免疫染色では腫瘍細胞に陽性所見を認めなかった。

免疫グロブリン重鎖遺伝子のシーケンス解析.

凍結検体 8 検体 7 症例について解析した. 7 検体について解析ができ, 3 検体は monoclonal, 4 検体は oligoclonal であった. monoclonal 3 例及び oligoclonal な 4 例のうちクローンが 3 つ以下にまとまっていた 2 例, 併せて 5 例について体細胞変異の割合を解析したところ 9.19(5.90-15.62) % であり, post Germinal Center 形質の B 細胞性リンパ腫であることが示された. 1 症例, 発症時期の違う 2 検体が採取されたものがあり, この検体解析においては初発時の解析では oligoclonal (18 クローン) であったものが半年後の採取検体では 2 クローンになっており, クローンの選択がみられた. PAL 腫瘍発生において, 膿胸腔内で oligoclonal な異常細胞の増生及び選択を経て, monoclonal な腫瘍へと進展していく過程を分子生物学的に検証しえた.

HIV-related lymphoma と PAL との遺伝子発現プロファイリング解析

10733 遺伝子からなるオリゴヌクレオチドアレイを用いて遺伝子発現プロファイリングを解析し, クラスターリングを行った. クラスターリングに大きく寄与した遺伝子群は主にリンパ球分化マーカーであり, PAL 4 症例は独立した一群を形成していた. PAL では B リンパ球系分化マーカーである胚中心で発現している遺伝子の発現が落ちていた. 逆に発現が亢進している遺伝子群としては細胞接着や糖・脂肪代謝系の遺伝子であった. Bcl-2 の過剰発現も見られ, これについては病理検体で 89% の陽性率が得られた.

サイトカイン・アポトーシス関連の遺伝子発現プロファイリングを検討したところ, IL17 及び IL17 受容体, 下流のシグナルである TRAF6 の上昇が見られ, アポトーシス関連の caspase 3, FADD の減少がみられた. PAL は NF- $\kappa$ B を介する増殖機構や抗アポトーシス機構が関与しているものと推察された.

以上, PAL 臨床データ 138 例, 病理検体 49 例という大規模な検討を行い, 以下のことを示した.

1. PAL の局所治療の有効性について, その傾向がみられることを示した. 治療成績に影響を与える因子としては性別, 診断時の Stage, LDH 上昇の有無であった.
2. PAL に polyoma virus 属(BKV, JCV, SV40)の関与はみられなかった. SV40 に関してはその他一般の悪性リンパ腫においてもその関与をみななかった. JCV は PCR でそのウイルス断片がみられたものの免疫染色での確認は出来なかった.
3. PAX5/BSAP の発現が 96% の症例で確認でき, 個々の症例が無秩序に発現するマーカーにかかわらず PAL の本態が B 細胞性リンパ腫であることを示した.
4. PAL は post GC タイプの B 細胞性リンパ腫であることを示した.
5. PAL が oligoclonal な段階から次第に選択されて monoclonal な段階にいたる腫瘍であることを分子生物学的に実証した.
6. PAL は遺伝子発現解析においてもまとまった群を形成していた. 少数例の解析ではあるが, PAL が特異な病型であることが示唆された.