

氏 名	坂 本 佳 奈
学 位 の 種 類	博士（医学）
学 位 記 番 号	甲第 505 号
学位授与年月日	平成 28 年 3 月 22 日
学位授与の要件	自治医科大学学位規定第 4 条第 2 項該当
学 位 論 文 名	希少造血器系腫瘍の分子病理学的検討
論 文 審 査 委 員	(委員長) 教 授 岩 本 禎 彦 (委 員) 教 授 山 形 崇 倫 講 師 卜 部 匡 司

論文内容の要旨

1 研究目的

造血器系腫瘍の分子病態についての検討は、検体を比較的入手・解析しやすかったことなどから他臓器腫瘍に先駆けて進められてきた。慢性骨髄性白血病における *BCR-ABL* 融合遺伝子の同定は造血器系腫瘍に限らずがん研究全体に大きなインパクトを与え、分子標的治療薬開発の幕開けを告げた。分子病態の理解が進むとともに、造血器系腫瘍の分類はそれに基づいたものに変化しつつある。そのような状況下で、近年、種々の希少造血器系腫瘍が新たな独立した疾患概念として確立されている。例として、ALK 陽性大細胞型 B 細胞性リンパ腫（ALK-positive large B-cell lymphoma: ALK+LBCL）、芽球性形質細胞様樹状細胞腫瘍（blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm: BPDCN）が挙げられる。共にアグレッシブな経過をとる予後不良な悪性疾患であり、有効な治療法の開発のために分子病理学的理解が求められているが、その希少性と疾患概念の確立の遅れ等から診断および治療に資する知見が不十分である。よって今回、これら 2 つの希少造血器系腫瘍における予後予測因子や分子標的の同定を目的として、細胞形態、免疫学的マーカー発現、体細胞性遺伝子異常などの解析を行うこととした。

2 研究方法

それぞれの疾患の希少性や検体入手可能性等を鑑み、ALK+LBCL については 1 例の詳細な検討と既報告例の包括的な検討を、BPDCN については nation-wide に検体を集積して検討を行った。

ALK+LBCL :

ALK 融合遺伝子が関与する腫瘍においては ALK に対する免疫染色の染色パターンが転座のパートナー遺伝子を示唆するが、我々は ALK+LBCL ではこれまでに報告されていない染色パターンを示す症例を経験した。この症例の検体において、5'-RACE（5'-rapid amplification of complementary DNA ends）法や蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション（fluorescence *in situ* hybridization; FISH）法を用いて ALK 融合パートナーの同定を試みた。また、現在までに英文で報告されている ALK+LBCL 全例について文献から情報を抽出し、免疫学的マーカー所見の系統的な評価等を行った。臨床的項目についても情報を収集し、予後予測因子について検討した。

BPDCN :

国内多施設に協力を求め、各施設で BPDCN と診断された症例を収集した。腫瘍組織のホルマ

リン固定パラフィン包埋検体（未染標本）を主な試料として収集し、厳格な診断基準の下に他疾患の可能性を組織病理学的に除外した上で診断を再検討し、適格症例のみを用いて、細胞形態、免疫形質、FISH 解析による染色体異常について詳細に検討した。また、臨床情報についても調査票を用いて収集し、統計学的な解析を行った。

3 研究成果

ALK+LBCL :

ALK 免疫染色で非典型的な染色性を示した自験例については、ALK+LBCL では初の報告となる EML4-ALK 陽性症例であることが 5'-RACE 法により示され、FISH 解析等により確認された。現在までの ALK+LBCL の報告例としては 112 例が同定された。ALK 免疫染色結果について検討したところ、granular cytoplasmic (GCS) パターン (94 例) と non-GCS パターン (13 例) に分類された。ALK 免疫染色パターンと生存期間が判明した成人例 64 例について生存期間の解析を行ったところ、non-GCS パターンを示す症例群は GCS パターンを示す症例群に比して有意に生存期間が短かった ($P = 0.031$)。この差は悪性リンパ腫における確立された予後因子である年齢と臨床病期で調整した後も有意であった (ハザード比 5.08, 95%信頼区間: 1.88–13.7, $P = 0.0013$)。また、既報告例の免疫組織学的マーカー所見の網羅的な検討により、ALK+LBCL が B 細胞性リンパ腫としては極めて非典型的な免疫形質をもつことが確認された。

BPDCN :

全国 54 施設から 147 例が集積され、うち 111 例を BPDCN が本研究の適格条件をみたした。今回の基準においては BPDCN と診断されなかった 36 例は other 症例群とした。BPDCN と診断された症例は、男性 95 例、女性 16 例と男性が多く、年齢中央値は 70 歳で高齢者が中心であった。初発時病変部位は、皮膚が最も多く 102 例 (94%) でみられ、骨髄病変は 58 例 (64%) で認め、37 例 (39%) で末梢血浸潤がみられた。治療法はリンパ腫レジメンを用いた化学療法が最も多かったが、症例により様々であった。造血幹細胞移植が行われた症例は有意に生存期間が長かった。免疫学的マーカー所見に関しては網羅的に結果を集積した。また、FISH 解析、免疫染色等によりこの疾患の病態に関わると考えられる分子を同定した。その異常の有無により、細胞形態学的な差異が認められ、臨床的にも初発時年齢や、皮膚病変の性状や分布に有意差が認められたが、生存期間に有意差は認められなかった。

4 考察

ALK+LBCL :

EML4-ALK 陽性例の報告により、悪性リンパ腫における ALK 融合パートナー遺伝子の多様性がさらに広がった。既報告例を用いた検討では ALK+LBCL で ALK 免疫染色パターンが予後因子となりうることを示したが、ALK 免疫染色パターンが ALK 融合パートナー遺伝子と関連することを鑑みると、ALK+LBCL において ALK 融合パートナー遺伝子の違いが臨床的に意義を持つ可能性が示唆されたといえる。ただし、実験的なデータや他の ALK 関連腫瘍での後方視的研究の結果を考え合わせると、ALK+LBCL でみられた GCS 群と non-GCS 群の予後の違いは、CLTC-ALK の比較的弱い腫瘍原性と GCS 群における CLTC-ALK 症例の多さを反映している可能性も考えられた。ALK 関連腫瘍においては ALK が腫瘍化に影響する強力なドライバーであり、ALK 阻害薬の

有効性も示されていることから、”ALKoma”という包括的な概念も提唱されている。本研究の結果を踏まえた今後の課題としては、ALK+LBCL で認められた ALK 免疫染色パターンによる予後の差異が、ALKoma 全体に敷衍し他の ALK 関連腫瘍でも認められるのか、また、ALK 融合パートナーの違いに帰着されるのかという点などがあげられる。

BPDCN :

免疫学的マーカーの詳細な検討により、本疾患の正診に有用なデータが提供できた。新たに同定された分子と臨床的予後との関連については、標準治療が定まっておらず治療が症例によって様々であったことなどが影響し、本質的な評価ができていない可能性がある。免疫学的マーカー所見のいっそうの検討や遺伝子変異プロファイルの検討を行うことにより議論の深化が期待される。今回同定された分子が治療ターゲットとなりうるかも、今後の臨床的検討課題としたい。

5 結論

希少造血器腫瘍の中から ALK+LBCL と BPDCN を取り上げた。ALK+LBCL については、同疾患で新規となる ALK 融合パートナーを RACE 法および FISH 解析により同定した。また、現在までに報告されている全例について詳細に検討し、ALK 免疫染色パターンが予後因子となる可能性を示した。BPDCN については、既報告と比較して最大となる 111 例の症例を 54 施設より集積し、免疫学的マーカーについても厳格に評価を行った。前向き研究を行うことが非常に難しいことを鑑みると、後方視的研究とはいえ両希少疾患における病態理解、診断、そして治療について有用な知見を提供できたと考える。

論文審査の結果の要旨

論文は、2 種類の希少造血器系腫瘍に注目し、その分子病態解明を目的に、分子生物学と病理学的手法を駆使して分析した内容に詳細な文献的考察を加えてまとめられていた。前半部分は、ALK 陽性大細胞型 B 細胞性リンパ腫の自験例における ALK 免疫染色の特異的な染色性に着目し、FISH 解析と 5'RACE 解析を実施。その結果、悪性リンパ腫のドライバー遺伝子候補として初めて EML4-ALK 融合遺伝子を International Journal of Hematology に発表した。また、ALK 陽性大細胞型 B 細胞性リンパ腫 112 例を文献的にまとめ、ALK 染色性の違いにより有意な生存期間の差が認められることを明らかにするとともに、この予後の違いは、ALK の融合パートナー遺伝子の違いによってもたらされた可能性を示した。後半部分は、芽球性形質細胞様樹状細胞腫瘍を国内の多くの造血器腫瘍治療グループと共同研究を構築し、111 例の症例を収集した。収集した症例に詳細な病理学的解析を行うことによって、その分子病態の一部を明らかにした。これらの発見は、ALK 阻害薬の使用など、治療戦略にも影響を与える可能性のある重要な発見であったと考えられた。論文には、その体裁に若干の不備が認められ、それらに修正を求めたが、審査委員会は全員一致でこれを博士論文として十分な内容であると判定した。

最終試験の結果の要旨

発表は、論文内容に添って、2 種類の希少造血器系腫瘍について紹介した。それぞれの疾患の詳細な背景、研究デザイン、研究試料の収集、実験方法、そしてその成績が丁寧かつ明快に説明が行われた。また、発表後の質問に対しても適切に応答し、当該分野に対する深い見識を示した。

発表には、知財に関わる内容が含まれていたことから、自ら制限しなければならない不自由さがあったものの、発見した事実を十分にアピールできていた。これらの発表と質疑応答に対し、審査委員は満場一致で合格と判定した。