

学位請求論文の内容の要旨

論文提出者氏名	腫瘍制御領域腫瘍標的分子制御学教育研究分野 氏名 佐藤次生
<p>(論文題目)</p> <p>Tumor Microenvironment and RIG-I Signaling Molecules in Epstein Barr Virus-positive and -negative Classical Hodgkin Lymphoma of the Elderly (EBV 陽性及び陰性の高齢者古典的ホジキンリンパ腫における腫瘍微小環境と RIG-I 関連分子の発現について)</p>	
<p>(内容の要旨：和文で 2,000 字程度)</p> <p>古典的ホジキンリンパ腫 (CHL)は、リンパ球、組織球、好酸球などの多数の炎症細胞を背景とする腫瘍微小環境 (tumor microenvironment, TME) に、少数の Hodgkin/Reed-Sternberg (HRS)細胞が存在する特徴的な組織像を示す。CHL の発症年齢は若年と高齢の二峰性を示し、また患者の約半数で Epstein-Barr virus (EBV)の感染を認める。このことは、年齢や EBV 感染が CHL の病態形成に関与している可能性を示唆する。特に、EBV 陽性の高齢者の CHL は予後不良とされるが¹⁾、そのメカニズムは十分に解明されていない。CHL における TME の形成には、細胞傷害性の GranzymeB (GrB)陽性細胞や免疫抑制性の FOXP3 陽性細胞が重要な役割を持つと考えられている。また、EBV 感染により HRS 細胞内でのケモカイン CCL20 の産生亢進による FOXP3 陽性細胞の誘導の可能性も少数例で報告されている²⁾。しかしながら、年齢や EBV 感染の有無で TME におけるこれらの細胞構成がいかに異なるかは十分検討されていない。そこで今回我々は、EBV 陽性の高齢者 CHL において、TME 中の GrB 陽性細胞と FOXP3 陽性細胞の細胞構成を、形態計測法を用いて EBV 陰性例と比較検討した。さらに、HRS 細胞内における自然免疫関連分子 RIG-Iとそのシグナル経路の分子発現、CCL20 の発現を検討し、EBV 感染の有無が TME の構成細胞にどのように影響するかを検討した。</p> <p>検討症例は 50 歳以上の CHL 17 例を対象とした。CHL の診断は 2010 年の WHO 分類に準拠し、3 人の病理医で行った。EBV 感染の検索は、EBER の in situ hybridization と LMP1 の免疫染色で判定し、EBV 陽性は 10 例、陰性は 7 例であった。TME の細胞構成について、FOXP3、GrB に対する抗体と HRS 細胞のマーカーとして CD30 に対する抗体を用いて免疫三重染色を実施し、高倍率 10 視野における HRS 細胞あたりの FOXP3 と GrB 陽性細胞数を算定し、FOXP3/GrB 比を求めた。HRS 細胞内の分子発現について、RIG-I、その下流の活性化シグナルとしてのリン酸化 (p)IRF3 及びインターフェロン (IFN)β の発現をみた。さらに CCL20 の発現を CD30 と共に免疫二重染色を実施し、その</p>	

陽性度について半定量的に評価した。CCL20の陽性強度は、HRS細胞内に陽性を示した陽性細胞数が10%以下を陰性でスコア0とし、10%以上見られた場合、染色強度の発現によって弱陽性をスコア1、中等度をスコア2、高発現をスコア3とした。各群の結果を平均値±標準誤差で示し、各群間の有意差検定はMann-Whitney検定及び χ^2 検定を用いて行った。

その結果、HRS細胞あたりのTMEのFOXP3陽性細胞数は、EBV陽性群ではHRS細胞あたり 9.3 ± 2.0 個、EBV陰性群は 3.9 ± 0.9 個で、EBV陽性群で有意に大であった($p < 0.01$)。HRS細胞あたりのGrB陽性細胞数は、EBV陽性群で 9.3 ± 3.7 個、EBV陰性群で 11.8 ± 1.0 個であり、EBV陽性群で有意に少なかった($p < 0.05$)。FOXP3/GrB比は、EBV陽性群では 1.7 ± 0.4 、EBV陰性群では 0.4 ± 0.1 で、EBV陽性群で有意に大であった($p < 0.01$)。HRS細胞内におけるRIG-Iと関連分子の発現については、EBV陰性群では全例で陰性であった。一方、EBV陽性群では、HRS細胞内に10例全例でRIG-Iの高発現を見たが、p-IRF3の核陽性像はなく、IFN β の発現も見られなかった。CCL20の発現強度は、EBV陽性群では 2.9 ± 0.1 、EBV陰性群では 0.9 ± 0.1 で、EBV陽性群で有意に高発現であった($p < 0.01$)。予後については、経過が追えた1~10年以内で、EBV陽性群では6例中3例で再発を認めた。EBV陰性群4例のうち1例ではCHLの進行により死亡したが、3例は無病生存で、再発は認められていない。

これまで、CHLのTMEの細胞構成について年齢とEBV感染を考慮した報告は少なく、小児CHLにおいてEBV陽性例では細胞傷害性T細胞を多く認めたと報告されているのみである³⁾。高齢者CHLにおけるEBV陽性例でのTMEの細胞構成についてはこれまで検討されていない。今回の検討により、高齢者CHLのEBV陽性例のTMEではFOXP3陽性細胞が多くGrB陽性細胞が少ない結果が得られた。すなわち、細胞傷害性機構が局所的に抑制された細胞構成のTMEとなっていることが示された。また、EBV陽性のHRS細胞内ではRIG-Iの発現は高いにも関わらず、下流のシグナル経路の分子の活性化が見られないことも明らかとなった。一方、EBV陽性HRS細胞では、CCL20の高発現を認めた。これまでの研究から、HRS細胞内ではCD30をはじめとする腫瘍関連抗原等の刺激によりNF- κ Bが恒常的に亢進し、種々のサイトカインやケモカインが産生されることが知られている。すなわち、HRS細胞は炎症性のTMEを保持すると共に宿主の局所免疫による排除を回避する能力があると考えられてきた⁴⁾。

今回の観察で見られたEBV陽性高齢者でのHRS細胞内のRIG-I経路の抑制とCCL20の発現亢進の特徴は、TMEにおける局所的な細胞傷害性機構の抑制を示すものかも知れない。また、このような病理学的な特徴が、EBV陽性高齢者CHLの高い再発率と関連

する可能性も考えられた。今後症例数の集積と臨床経過の追試による確認が必要と考えられた。

文献

- 1) Jarrett RF, Stark GL, White J, Angus B, Alexander FE, Krajewski AS, et al. Impact of tumor Epstein-Barr virus status on presenting features and outcome in age-defined subgroups of patients with classic Hodgkin lymphoma: a population-based study. *Blood*. 2005;106:2444-51.
- 2) Baumforth KR, Birgersdotter A, Reynolds GM, Wei W, Kapatai G, Flavell JR, et al. Expression of the Epstein-Barr virus-encoded Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 in Hodgkin's lymphoma cells mediates Up-regulation of CCL20 and the migration of regulatory T cells. *Am. J. Pathol.* 2008;173:195-204.
- 3) Barros MH, Vera-Lozada G, Soares FA, Niedobitek G, Hassan R. Tumor microenvironment composition in pediatric classical Hodgkin lymphoma is modulated by age and Epstein-Barr virus infection. *Int. J. Cancer.* 2012;131:1142-52.
- 4) Kuppers R, Engert A, Hansmann ML. Hodgkin lymphoma. *J. Clin. Invest.* 2012;122:3439-47.

※1 乙の場合、〇〇領域〇〇教育研究分野にかえて、所属の〇〇講座を記入すること。

※2 論文題目が英文の場合は（ ）内に和訳を付記すること。

