

## エイズ関連リンパ腫の病理診断と病態

研究分担者 片野晴隆（国立感染症研究所感染病理部 室長）

研究協力者 峰宗太郎、福本 瞳、佐藤由子、長谷川秀樹（国立感染症研究所感染病理部）比島恒和（がん・感染症センター都立駒込病院）大田泰徳（東京大学医科学研究所）

**研究要旨：**WHO 分類第 4 版に基づいた日本のエイズ関連リンパ腫の病理組織分類を英文誌へ発表すると共に、診断チャートの掲載を行い、正確な病理診断に寄与した。病理診断窓口を東京大学医科学研究所病院にて継続している。さらに HIV 感染者に発症した腹腔内・腸管原発の形質芽細胞リンパ腫 Plasmablastic lymphoma (PBL) の症例から、新たな細胞株 PBL-1 を樹立した。樹立した細胞株は IL-6 依存的増殖が認められ、CD20 (-)、CD38 (+)、CD138 (+)であり、PBL の免疫学的表現型を保っていた。EBV が持続感染しており、潜伏感染様式は latency I であった。これまで、PBL の細胞株樹立の報告はなく、PBL-1 は世界で初めての PBL の細胞株である。PBL-1 を詳細に解析することで、PBL における発癌機構とウイルスの動態を解明するだけでなく、新しい治療法の開発に繋がる知見が得られることが期待される。

### A. 研究目的

昨年までの本研究班の調査で、日本のエイズ関連リンパ腫の組織学的分類が明らかになってきた。WHO分類第4版に基づく分類では、最も頻度の高いエイズ関連リンパ腫の組織型は、びまん性大細胞性B細胞リンパ腫（diffuse large B cell lymphoma, DLBCL）であり、バーキットリンパ腫（Burkitt lymphoma, BL）、plasmablastic lymphoma (PBL)、primary effusion lymphoma (PEL)、ホジキンリンパ腫（Hodgkin lymphoma, HL）の順に頻度が高い。年代別に見ると近年はBLの増加が著しく、さらにはPBLの増加も目立つ。ART導入の有無ではART導入患者にHLの頻度が有意に高いことも明らかになった。

エイズ関連リンパ腫では、それぞれの病型としては病理組織学的に非典型例が多いため、その病理診断に苦慮する例も見られる。しかし、昨年来、当研究班で提唱する病理診断フローチャートが日本語、英語で公刊されたことで、多くの病理医の目に触れ、浸透し、その結果、当班にコンサルテーションされる例も減少している。本年度はエイズ関連リンパ腫の診断フローチャートをさらに普及させることと、病理診断のコンサルテーション窓口を開設することで、日本におけるエイズ関連リンパ腫の病理診断精度の向上を目指した。

エイズ関連リンパ腫の組織型の中にはほとんどエイズ患者にしか見られない、まれなリンパ腫も存在する。Human herpesvirus

8 (HHV-8/KSHV) が関連する PEL や HHV-8 関連多巣性キャスルマン病に合併する大型 B 細胞リンパ腫とともに EB ウイルス (EBV) が関連する PBL も、HIV 感染者以外ではほとんど見られない、まれなリンパ腫とされる。こうした、特殊なリンパ腫の発症機構は、現在でも多くの点が不明である。本年度、本分担研究では PBL の発症機構の解明に取り組んだ。PBL は B 細胞系のリンパ腫で、形質芽細胞 plasmablast が起源とされる。現在では日本のエイズ関連リンパ腫の約 10% に見られ、主に、同性間性的接触を持つ男性 HIV 感染者に発症する。口腔に発症するとされるが、食道などの上部消化管、肛門部、直腸、大腸などに発症するケースも報告されている。通常 EBV 陽性であり、EBV の潜伏感染様式は latency I とされる。Myc の転座はしばしば認められる。しかし、これまで、細胞株の樹立に成功した報告はなく、細胞そのものの生物学的な解析はなされていない。本年度は PBL 症例の一例から細胞株を樹立することに成功したことから、この細胞株を詳細に解析することで、PBL の発症機構の解明と新規治療法の検討を行うことを目指した。

## B. 研究方法

### 1. 細胞培養

患者腹水を遠心し、リンパ腫細胞を RPMI1640 / 10%FBS で培養を行った。初代培養ではさまざまな増殖因子やサイトカインを添加し、定期的に生細胞数を計測した。また、細胞の限界希釈を行い、単一クローンを樹立した。

### 2. 表面抗原の検索

細胞の表面抗原の検索はフローサイトメトリーと蛍光免疫染色により行った。

### 3. EBV の解析

EBV の潜伏感染タンパク、および、遺伝子を免疫組織化学、及び、*in situ* hybridization で検索した。

(倫理面に対する配慮)

ヒト検体を用いた研究は国立感染症研究所 ヒトを対象とする医学倫理委員会の承認を得た(承認番号 512)。

## C. 研究結果

### 1. 日本におけるエイズ関連リンパ腫の病理診断

日本のエイズ関連リンパ腫症例を WHO 分類第 4 版に基づき、病理組織分類を行った結果を、調査研究の過程で作成した病理診断フローチャートと共に国際英文誌へ掲載した(Ota et al. Cancer Med 2014)。また、国内のエイズ関連リンパ腫のための病理診断窓口を東京大学医科学研究所病院(研究協力者:大田泰徳)にて継続している。今年度のコンサルテーション症例はなく、病理診断フローチャートが浸透していることが推察された。

### 2. PBL 細胞株の樹立と解析

#### (1) 患者

50 歳代の HIV 患者の腹水からリンパ腫細胞が検出された。腫瘍細胞は形質芽細胞類似の大型細胞であり、免疫組織化学的に腫瘍細胞は CD20 (-), CD3 (-), CD38 (+), CD138 (+), HHV-8-LANA-1 (-), LMP1(-), EBNA2(-)で、EBER-ish は陽性であった。以上の所見から、PBL と診断された。EBV は real-time PCR で約 1.2 copies/cell が検出された。

#### (2) 細胞株の樹立

リンパ腫細胞を含む腹水から細胞株を樹立した。得られた細胞株 PBL-1 はギムザ染色で、比較的大型で、明瞭な核小体とクロマチンの核膜周辺への集積、細胞質には明らかな核周明庭が見られた(図 1)。フローサイトメトリーによる表面マーカーの検索では PBL-1 は CD20 (-)、CD38 (+)、CD138 (+)であり、PBL の免疫学的表現型を保っていた(表 1)。EBV が持続感染しており、定量的 PCR によるコピー数の検索では EBV は細胞 1 個当たり、約 1.2 コピーのウイルス量が存在

する。ウイルス遺伝子の発現は EBER(+), LMP1(-), LMP2A (-), EBNA2 (-) であることから、PBL-1 の EBV 潜伏感染様式は latency I であった。染色体数は 70 本程度に増加しており、多くの染色体異常があることが推定された。染色体検査では c-Myc の遺伝子再構成が認められ、BCL-2, BCL-6 などの遺伝子再構成は認められなかった。

### (3) 細胞株の増殖とサイトカイン

患者腹水、及び、培養上清中のサイトカイン量を測定したところ、IL-6 が高値を示したほか、IL-8, MIP-1a, IP-10 などが高値であった。PBL-1 は IL-6 依存的増殖が認められ、conditioned medium の状態で培養上清中に高濃度の IL-6 を保つか、培養上清中に IL-6 を添加することが増殖には必要であった。培養上清への IL-6 の添加を中止すると細胞の生存率は急激に低下した。他のサイトカイン (IL-8, MIP-1a, IP-10 など) の添加は細胞の生存率に影響を与えず、z-VAD-FMK などのアポトーシス阻害剤も生存率に影響しなかった。

## D. 考察

PBL は EBV 関連腫瘍でありながら、その発症と EBV との関連、特異な発症部位、染色体転座との関連などについて、多くの点が不明である。PBL は B 細胞性リンパ腫でありながら、CD20 陰性であり、CD138, CD38 以外のマーカーはほとんど陽性にならない。PBL の起源とされる plasmablast が CD20 陰性、CD38 陽性、CD138 陽性の表現型であり、こうした特殊な表現型と細胞の形態的特徴から plasmablast が起源とされている(図 2)。しかし、このような特殊な表面抗原の発現パターンが、これまでの PBL の診断を困難にしており、過去の症例では DLBCL に分類されているものも少なくない。PBL が明確に定義付けされたのは WHO 第 4 版からであるが、過去の症例

をたどると明らかに PBL に該当する症例が存在することから、昔からエイズ関連リンパ腫の一部を占めていたリンパ腫亜型と考えられる。免疫グロブリンの産生が行われていることが想像されるが、ある特定のイムノグロブリンが産生されるかどうか、特定の抗原を認識するものであるかなどの情報はない。われわれの樹立した PBL-1 はクローンとして Ig 遺伝子のクローニングが可能である。さらに、細胞株の樹立は治療法の選択にも有用であり、さまざまな治療薬の試験管内実験に活用することができる。PBL 以外の EBV latency I のリンパ腫には BL があるが、BL とは c-Myc の転座を伴う点など、共通点も多い。さらにはウイルスの存在形態についても episomal な状態で存在するか、integration しているかも、今後の調査で明らかにすべき点である。

これまで、PBL の細胞株樹立の報告はなく、今回、樹立した細胞株 PBL-1 を用いて PBL における発癌とウイルスの動態の詳細な解析を進める予定である。

## E. 結論

WHO 分類第 4 版に基づいた日本のエイズ関連リンパ腫の病理組織分類を英文誌へ発表した。病理診断窓口を東京大学医科学研究所病院にて継続した。さらに世界で初めての PBL の細胞株 PBL-1 を樹立し、現在解析中である。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- (1) Katano H, Hishima T, Mochizuki M, Kodama Y, Oyaizu N, Ota Y, Mine S, Igari T, Ajisawa A, Teruya K, Tanuma J, Kikuchi Y, Uehira T, Shirasaka T, Koibuchi T, Iwamoto A, Oka S, Hasegawa H, Okada S, Yasuoka A: The prevalence of opportunistic infections and malignancies in autopsied patients with human immunodeficiency virus

infection in Japan. **BMC Infect Dis** 2014. 14:229.

- (2) Yamada M, Katano H, Yotsumoto M, Hashimoto H, Muramatsu T, Shiotsuka M, Fukutake K, Kuroda M: Unique expression pattern of viral proteins in human herpesvirus 8-positive plasmablastic lymphoma: a case report. **Int J Clin Exp Pathol** 2014. 7:6415-6418.
- (3) Goto H, Kudo E, Kariya R, Taura M, Katano H, Okada S: Targeting VEGF and interleukin-6 for controlling malignant effusion of primary effusion lymphoma. **J Cancer Res Clin Oncol** 2015. 141:465-474.

## 2 . 学会発表

- (1) 片野晴隆、比島恒和、望月 眞、児玉良典、小柳津直樹、大田泰徳、峰宗太郎、猪狩 亨、味澤 篤、照屋勝治、田沼順子、菊池 嘉、岡 慎一、上平朝子、白阪琢磨、鯉淵智彦、岩本愛吉、長谷川秀樹、岡田誠治、安岡 彰. HIV 感染者の剖検例における日和見感染症と腫瘍の頻度. 第 28 回 日本エイズ学会学術集会総会 大阪 2014.12.3 .

## G . 知的財産権の出願・登録状況

### 1 . 特許取得

なし。

### 2 . 実用新案登録

なし。

### 3 . その他

なし。

	CD20	CD38	CD138
初発 PBL	-	+	+
株化細胞 PBL1	-	+	+
LCL (Control)	+	+	-

表 1 . 初発腫瘍細胞と株化細胞 の 細胞表面マーカーの比較。PBL-1 の表現型は初発 PBL と同様であり、LCL の表現型とは明らかに異なる。

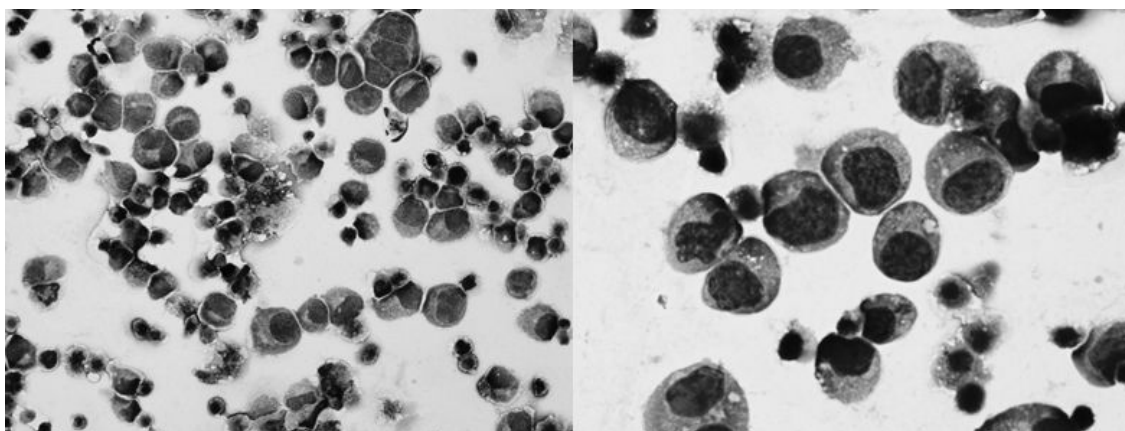


図 1 . PBL-1 のギムザ染色。弱拡（左）と強拡（右）。偏在した核には明瞭な核小体がみられ、細胞質には核周明庭がみられる。

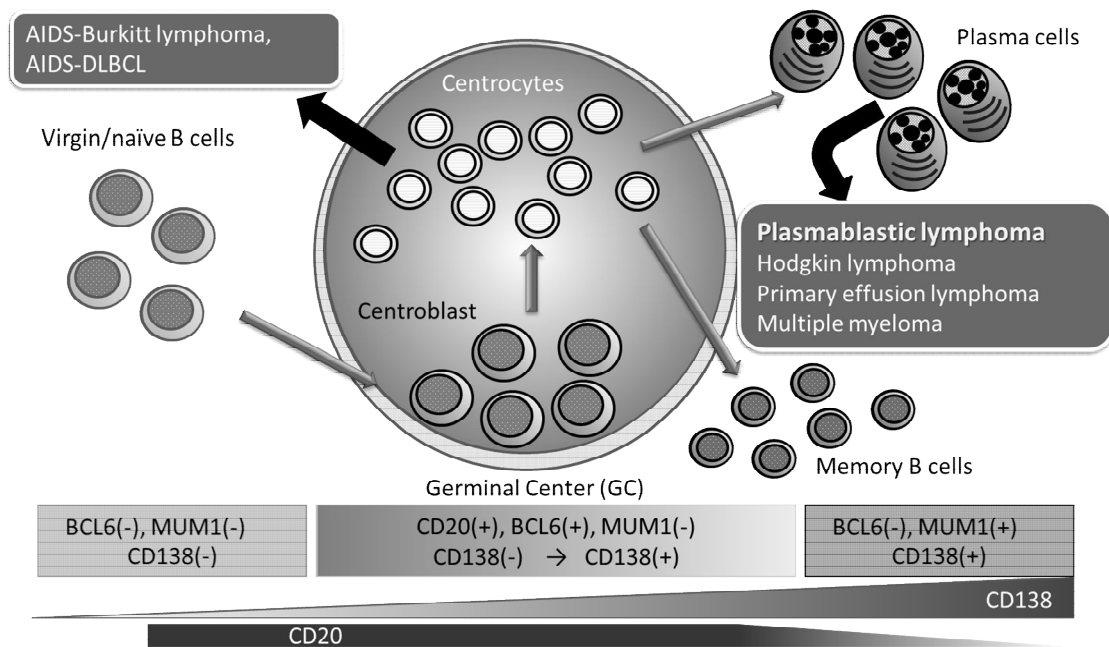


図2 .B細胞性悪性リンパ腫の由来細胞。下部には表面マーカーの発現パターンを示す。PBLは post-germinal center B cell のうち plasma cell に分化する細胞の一部が腫瘍化したものと考えられる。