

## 学 位 論 文 の 要 旨

学位の種類	博士	氏名	高原 幹
<p>学 位 論 文 題 目</p> <p>p53, N- and K-ras, and <math>\beta</math>-catenin gene mutations and prognostic factors in nasal NK/T-cell lymphoma from Hokkaido, Japan</p> <p>(北海道における鼻性NK/T細胞リンパ腫のp53, N-ras, K-ras, <math>\beta</math>-catenin 遺伝子変異と予後因子の検討)</p> <p>共著者名 岸部 幹、坂東 伸幸、野中 聡、原渕保明</p> <p>掲載雑誌名 Human Pathology. 2004 (in press)</p> <p style="text-align: center;">研究目的</p> <p>鼻性NK/T細胞リンパ腫は、鼻腔や咽頭に初発し、顔面正中部に沿って進行する破壊性、壊死性の肉芽腫性病変を主体とする疾患である。以前は進行性鼻壊疽などと呼ばれていたが、最近の研究によりそれがNK細胞あるいは<math>\gamma\delta</math>T細胞由来のリンパ腫であり、その発症にEBウイルスが深く関与している<sup>1)</sup>ことが解明されている。このリンパ腫の特徴として、局所での破壊性浸潤、肺、皮膚、消化管などの他臓器への転移が高頻度に出現するため予後が極めて不良であること<sup>2)</sup>が挙げられる。しかし、周囲に炎症細胞を伴いながらびまん性に浸潤する腫瘍特性から、腫瘍細胞のみを選択する事が困難であり、遺伝子学的な解析はあまり行われていないのが現状である。</p> <p>我々はこの予後不良なリンパ腫の根本的な特性を理解するため、臨床的、組織学的、免疫組織学的検討を行い、さらに遺伝子学的検討としてレーザーマイクロダイセクション法を用いて腫瘍細胞を選択し、最も代表的な癌関連遺伝子p53, N, K-ras, <math>\beta</math>-cateninについてその発現、変異等を解析した。さらに上記にて得られた因子と予後との相関を調べることにより、臨床経過を規定する予後因子を検討した。</p> <p style="text-align: center;">対象と方法</p> <p>1. 対象</p> <p>1976年から2000年まで旭川医科大学耳鼻咽喉科・頭頸部外科、札幌医科大学耳鼻咽喉科で診断、治療を行い、検討可能であった鼻性NK/T細胞リンパ腫32例(男性18例、女性14例、中央値51歳)を対象とした。</p>			

## 2. 臨床的検討

全症例に対して個々の患者のカルテを参考に病変部位、治療前の血清 LDH 値、Ann.Arbor の病期分類、全身症状 (B 症状)、治療経過に関して後向き調査をおこなった。

## 3. (免疫) 組織学的解析

治療前に原発部位での生検組織におけるホルマリン固定パラフィン包埋切片を材料にして、HE 染色により Working Formulation (WF) 分類を行い、壊死組織、腫瘍細胞の血管壁内浸潤の有無を検討した。また同様の材料にて、CD20, CD3, CD43, CD56 などの表面抗原や EB ウイルスの癌原性蛋白である LMP 1、癌関連蛋白とされる p53、 $\beta$ -catenin を免疫組織学的に検討した。方法として、脱パラフィン、内因性ペルオキシダーゼの阻害後、一次抗体を 4°C で一晩反応させた。さらにペルオキシダーゼ標識ポリマー試薬で反応させ、DAB で発色した。判定基準について、CD 抗原は腫瘍細胞の 70% 以上が、LMP 1 は 50% 以上が染色されていたものを陽性とした。p53 蛋白は腫瘍細胞の 10% 以上の核が濃染していたものを陽性とし、 $\beta$ -catenin は腫瘍細胞の 30% 以上が染色されていたものを陽性とした。

## 4. in situ hybridization

同様のホルマリン固定パラフィン包埋切片を材料にして、EBER-RNA をプローベとした in situ hybridization を行った。脱パラフィン、蛋白融解処理後 EBER-RNA プローベを組織切片と反応させた。さらにアルカリフォスファターゼ標識抗 FITC 抗体にて反応させ、BCIP/NBT にて発色した。

## 5. p53, N-ras, K-ras, $\beta$ -catenin 遺伝子変異

上記のパラフィン切片を CD56 にて免疫染色した後、Laser-capture microdissection system を用いて腫瘍細胞のみを採取し、蛋白融解処理後 DNA を抽出した。それを鋳型として p53 遺伝子ではエクソン 5 から 9 まで、N-ras, K-ras ではエクソン 1 と 2、 $\beta$ -catenin ではエクソン 3 にてプライマーをそれぞれ設定し、PCR 法で増幅した。次に PCR で得られた増幅産物の塩基配列をダイレクトシーケンス法で決定し、遺伝子変異およびアミノ酸変異の有無を解析した。

## 6. 統計解析

2 因子間の検定には Mann-Whitney U 検定、カイ 2 乗検定または Fisher exact test を用いた。補正生存率 (cause-specific survival) について Kaplan-Meier 法による解析と cox 比例ハザードモデルによる単変量解析と多変量解析を行った。いずれも  $p < 0.05$  を有意とした。

# 結 果

## 1. 臨床像

32 例中 31 例 (98%) が病変部位として鼻腔が含まれており、Ann. Arbor の病期分類ではステージ I が 22 例 (69%) と過半数を占めていた。血清 LDH 値は 163 IU/L から 1837 IU/L までに分布し、中央値は 375 IU/L であった。全身症状 (B 症状) は 18 例 (56%) に認められた。治療経過としては 16 例 (50%) が治療中に腫瘍の全身播種のため死亡し、5 例は治療により一時寛解したものの再発により死亡した。3 年生存率は 27% であった。

## 2. 組織学、免疫組織化学、in situ hybridization による検討結果

全ての切片において、大小不同の核を有する多型性の腫瘍細胞が周囲の炎症細胞と混在する polymorphic reticulosis の組織像を呈していた。壊死組織は全例 (100%) に認められ、血管壁内浸潤は 25 例 (78%) に認められた。WF 分類では、多型性で大型の腫瘍細胞が優位の diffuse large cell,

immunoblastoid polymorphous (LIP) type が 15 例 (47%) であり、大型と小型の腫瘍細胞が混在する diffuse mixed (DM) small and large cell type は 17 例 (53%) であった。表面抗原の解析では CD20 の発現は 1 例も認められず (0%)、CD56 は全例 (100%) に認められた。CD3 は 18 例 (56%) に認められ、CD43 は 31 (96%) に認められた。in situ hybridization による EBER-RNA の核内発現は 31 例 (97%) に認められ、その 31 例中、EB ウイルス由来癌抗原である LMP1 は 15 例 (48%) に認められた。

### 3. p53 過剰発現と遺伝子変異

32 例中、18 例 (56%) に p53 の過剰発現を認めた。また、32 例中 6 例 (19%) に p53 遺伝子変異を認めた。いずれも点突然変異であり、遺伝子変異部位はエクソン 7 が 3 例 (50%)、エクソン 8 が 2 例 (33%)、エクソン 9 が 1 例 (17%) であった。変異様式は transition が 1 例 (17%)、transversion は 5 例 (83%) であり、全変異が非 CpG 部位に存在していた。また、6 例中 2 例 (33%) はアミノ酸の変化を伴わないサイレント変異であった。ミスセンス変異を認めた残りの 4 例中、全例に p53 過剰発現を認めたが、両者の有意な相関は認められなかった。

### 4. N,K-ras 遺伝子変異

32 例中 1 例 (3%) に N-ras、K-ras 両遺伝子の変異を認めた。両遺伝子ともに、遺伝子変異部位はエクソン 1 のコドン 13 番目であり、変異様式は transition であった。

### 5. $\beta$ -catenin 過剰発現と遺伝子変異

32 例中、4 例 (13%) に  $\beta$ -catenin の過剰発現を認めた。また 32 例中 5 例 (16%) に合計 8 部位の  $\beta$ -catenin 遺伝子変異を認めた。8 変異中 4 例 (50%) はアミノ酸の変化を伴わないサイレント変異であった。ミスセンス変異を認めた 2 例中、全例に  $\beta$ -catenin 過剰発現を認めたが、両者の有意な相関は認められなかった。

### 6. 予後因子の検討

Kaplan-Meier 法、単変量、多変量解析による予後因子の検討を行った所、p53 ミスセンス変異群、高血清 LDH 群、WF 分類による LIP type が独立した予後不良因子であった。その内、p53 ミスセンス変異が最も独立した予後因子であることが判明した (ハザード比 7.604, 95%信頼区間 1.992-29.028 p=0.003)。

## 考 察

以前より、悪性リンパ腫において p53 を初めとした癌関連遺伝子の異常や癌関連蛋白の発現に関する報告が数多くなされている。しかし、本疾患では正常炎症細胞と腫瘍細胞が混在しているため、腫瘍遺伝子のみを抽出する事が難しく、遺伝子学的検討はあまり進んでいず、数少ない報告はあっても、この難点は克服されずにいた。今回 Laser-capture microdissection system を用いることによって、信頼性の高い腫瘍遺伝子の変異率や変異様式を得ることが可能であったと考えられた。

鼻性 NK/T 細胞リンパ腫における p53 遺伝子変異の報告として、Li ら<sup>3)</sup> は中国、日本各地域での本疾患患者 42 例中 20 例 (48%) に認めたと報告している。その検討によれば地域によって p53 遺伝子変異頻度が異なり、大坂府では 22%であったと報告している。本研究の検討では 19%であり、北海道においても同様の頻度であるといえる。変異様式については大阪府、北海道では 80%以上が非 CpG 部位の transeversion 型であったが、中国、沖縄では CpG 部位の transition 型が多く認められていた。したがって、鼻性 NK/T 細胞リンパ腫における p53 遺伝子変異は頻度だけではなく、変異様式も地域によって

異なる可能性が考えられた。

悪性リンパ腫において ras 遺伝子の変異は少ないとされていたが、最近甲状腺悪性リンパ腫、AIDS 関連リンパ腫など特殊なリンパ腫において、高頻度の変異が認められる事が報告された。本研究では、1 例のみの変異に留まり、本疾患における ras 遺伝子変異の関与は少ないと考えられた。

$\beta$ -catenin は p53、ras とは全く異なった伝達系で働く癌遺伝子として最近注目されている遺伝子である。大腸癌にて変異が高頻度に認められるが、悪性リンパ腫でも副腎 B 細胞リンパ腫などで変異症例が報告されている。今回の検討でも 5 例に変異が認められ、本疾患においても稀な変異でない事が示された。

予後因子について解析したところ、p53 ミスセンス変異、高血清 LDH 値、および WF 分類での LIP type が独立した予後不良因子であり、その中でも p53 ミスセンス変異が最も独立した因子である事が示された。このことから p53 遺伝子異常が腫瘍の悪性度の変化に関与している事が推測された。これまでに本疾患にて予後因子を検討した報告はいくつか認められるが、検討項目がそれぞれの報告で事なり、鼻性以外の NK/T 細胞リンパ腫を含めて検討した報告が主であるため、一致した見解は見られていなかった。今回の検討によって治療前の血清 LDH 値、生検組織における WF 分類や p53 遺伝子異常を解析することによって予後を推測できることが示唆された。これらの情報は今後、患者個人の癌の生物学的特性に合わせたオーダーメイド治療を開発する上で、極めて有用であると考えられた。

## 結 論

1. 鼻性 NK/T 細胞リンパ腫 32 例について臨床的、組織学的、免疫組織化学的、ウイルス学的、遺伝子学的解析を行い、予後との相関を検討した。
2. 臨床的解析結果では、血清 LDH 値は 163 IU/L から 1837 IU/L までに分布し Ann. Arbor の病期分類ではステージ I が 69%と過半数を占めていた。3 年生存率は 27%であった。
3. 組織学的、免疫組織化学的解析結果では、WF 分類にて LIP type に 15 例 (47%) が分類された。CD56 は 100%に、CD3 は 56%に、CD43 は 96%に認められた。EBER-RNA は 97%に認められ、その 31 例中 LMP1 は 48%に認められた。
4. 遺伝子学的解析結果では p53 蛋白過剰発現は 56%、遺伝子変異は 19%に認められ、N、K-ras 遺伝子変異は 3%に認められた。 $\beta$ -catenin 過剰発現は 13%、遺伝子変異は 16%に認められた。
5. 予後因子について解析したところ、p53 ミスセンス変異、高血清 LDH 値、および WF 分類での LIP type が独立した予後不良因子であり、その内、p53 ミスセンス変異が最も独立した因子であった。
6. 今回の検討によって治療前の血清 LDH 値、生検組織における WF 分類や p53 遺伝子異常を解析することによって予後を推測できる可能性が示唆された。




## 引用論文

- 1) Harabuchi Y, Yamanaka N, Kataura A, Imai S, Kinoshita T, Mizuno F, et al. Epstein-Barr virus in nasal T-cell lymphomas in patients with lethal midline granuloma. *Lancet* 335, 128-130, 1990
- 2) Harabuchi Y, Imai S, Wakashima J, Hirao M, Kataura A, Osato T, et al. Nasal T-cell lymphoma causally associated with Epstein-Barr virus: clinicopathologic, phenotypic, and genotypic studies. *Cancer* 77, 2137-2149, 1996
- 3) Li T, Hongyo T, Syaifudin M, Nomura T, Dong Z, Shingu N, et al. Mutations of the p53 gene in nasal NK/T-cell lymphoma. *Lab Invest* 80, 493-499, 2000

## 参考論文

- 1) Bandoh N, Hayashi T, Kishibe K, Takahara M, Imada M, Nonaka S, Harabuchi Y. Prognostic value of p53 mutations, bax, and spontaneous apoptosis in maxillary sinus squamous cell carcinoma, *Cancer* 94(7), 1968-80, 2002
- 2) 坂東伸幸、小林吉史、荻野武、高原幹、野中聡、原渕保明、三代川齊之.  
鼻性NK/T細胞リンパ腫の臨床的検討. *耳喉頭頸*72. 880-886. 2000
- 3) 高原 幹、岸部 幹、野澤 はやぶさ、石田 芳也、柳内 充、片山 昭広、今田 正信、林 達哉、原渕 保明. 掌蹠膿疱症扁桃でのホーミングケモカインの検討. *口咽科*14(3). 299-304. 2002
- 4) 高原 幹、坂東 伸幸、今田 正信、林 達哉、野中 聡、原渕 保明.  
乾癬における扁桃摘出術の有効性と扁桃の免疫組織学的検索. *日耳鼻*104(11). 1065-1070. 2001
- 5) 高原 幹、野澤 はやぶさ、岸部 幹、原渕 保明.  
掌蹠膿疱症の発症病態と扁桃摘出術の有用性. *口咽科*15(3). 277-283. 2003

## 学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士 (医学)	氏 名	高 原 幹
<p>審査委員長 <u>小川 隆洋</u> </p> <p>審査委員 <u>高後 裕</u> </p> <p>審査委員 <u>原 潤保明</u> </p>			
<p>学 位 論 文 題 目</p> <p>p53, N- and K-ras, and <math>\beta</math>-catenin gene mutations and prognostic factors in nasal NK/T-cell lymphoma from Hokkaido, Japan (北海道における鼻性 NK/T 細胞リンパ腫の p53, N-ras, K-ras, <math>\beta</math>-catenin 遺伝子変異と予後因子の検討)</p>			
<p>鼻性 NK/T 細胞リンパ腫は鼻腔や咽頭に初発する非常に予後の悪い悪性腫瘍である。本論文は、本疾患において癌関連遺伝子の発現および変異を解析し、それらの特徴と臨床的および組織学的特徴との関連性、さらに患者の予後との関連を検討したものである。</p> <p>はじめに代表的な癌関連遺伝子である p53、N-ras、K-ras、<math>\beta</math>-catenin 蛋白の過剰発現と遺伝子変異を解析した。過剰発現においては免疫染色にて、遺伝子変異においては癌巣を laser-capture microdissection 法にて摘出し、DNA を抽出後、PCR 法にて得られた遺伝子産物をダイレクトシーケンス法にて解析した。その結果、32 例中 18 例 (56%) に p53 過剰発現を認め、4 例 (13%) に <math>\beta</math>-catenin 過剰発現を認めた。また 32 例中 6 例 (19%) に p53 遺伝子変異を、1 例 (3%) に ras 遺伝子変異を、5 例 (16%) に <math>\beta</math>-catenin 遺伝子変異を認めた。いずれも点突然変異であり、サイレント変異は p53 遺伝子変異 6 例中 2 例に、<math>\beta</math>-catenin 遺伝子変異 5 例中 3 例に認められた。p53 遺伝子変異の頻度と変異形式について過去の報告と比較、検討したところ、鼻性 NK/T 細胞リンパ腫における p53 遺伝子変異は頻度だけではなく、変異様式も地域、人種によって異なる可能性が示唆された。</p>			

次に、鼻性 NK/T 細胞リンパ腫 32 例の臨床像について検討したところ、血清 LDH 値の高値、全身症状を有することが本疾患の特徴であり、3 年生存率は 27%であった。また、病理組織学的には WF 分類では、LIP type に 47%が、DM type に 53%が分類された。表面抗原の解析では、CD56 は全例、CD3 は 56%に認められた。*in situ* hybridization による EBER-RNA 発現は 97%に認められ、そのうち、EB ウイルス由来癌原蛋白である LMP1 は 48%に認められた。

Kaplan-Meier 法、単変量、多変量解析を用いて予後検討を行ったところ、p53 ミスセンス変異例、高血清 LDH 例、および WF 分類での LIP type 例が独立した予後不良因子であった。また、その 3 因子の中で p53 ミスセンス変異例が最も独立した予後因子であることが判明した。以上より、p53 遺伝子変異は腫瘍自体が持つ悪性度の変化に関与している可能性が示唆された。

本研究は、多数の鼻性 NK/T 細胞リンパ腫症例をもとにして臨床的、組織学的、免疫組織化学的、遺伝子学的な側面を詳細に検討した報告である。得られた成績は今後、個々の癌の生物学的特性に合わせたオーダーメイド治療を開発する上で示唆に富む所見を与えている。また、論文提出者に対する試問審査においても、適切かつ論理的回答がなされ、関連分野に関する十分な知識を有していることが認められた。

以上の内容から、本審査委員会は本論文が医学博士の学位論文として値するものであると判定した。尚、本論文は 2004 年の Human Pathology 誌に掲載予定である。