

## 学 位 論 文 の 要 旨

学位の種類	博 士	氏 名	石 井 秀 幸
<p style="text-align: center;">学 位 論 文 題 目</p> <p style="text-align: center;">Clinical Usefulness of Serum EBV DNA Levels of BamHI W and LMP1 for Nasal NK/T-Cell Lymphoma (鼻性NK/T細胞リンパ腫患者における血清中エプスタイン・バーウイルス BamHI W DNA およびLMP1 DNA値の臨床的有用性)</p> <p style="text-align: center;">共 著 者 名</p> <p style="text-align: center;">荻野 武、Christoph Berger、Nicole Köchli-Schmitz、長門 利純、高原 幹、David Nadal、 原 渕 保 明</p> <p style="text-align: center;">掲 載 雑 誌</p> <p style="text-align: center;">Journal of Medical Virology 79:562-572 (2007)</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硬口蓋といった頭頸部領域正中部に初発し壊死性肉芽腫性病変を主体とする NK 細胞または<math>\gamma</math> <math>\delta</math> 細胞由来の悪性リンパ腫である。本リンパ腫は病理組織学的に原発巣の著しい壊死形成と炎症細胞浸潤を認めることから診断が困難であり、急速に進行するため、非常に予後不良の疾患である。これまでの研究から本疾患の発症には Epstein-Barr virus (EBV) が関与していることが解明され、その本態も明らかになりつつある。EBV 関連腫瘍には本疾患以外にも上咽頭癌、ホジキン病などがあり、EBV 感染という特殊性を考慮した診断法が考案されている。その一つに、患者血清や擦過物などをサンプルとしたリアルタイム PCR 法による EBV DNA 定量があり、臨床応用に向けて腫瘍マーカーとしての有用性について検討した報告が散見される。しかし、本リンパ腫は比較的まれな疾患であり、症例数が少なく本リンパ腫単独で検討した報告は見られない。そこで我々は対象を鼻性 NK/T 細胞リンパ腫患者に絞り Bam HI W 領域のプライマーを用い、リアルタイム PCR 法によって鼻性 NK/T 細胞リンパ腫患者血清中の EBV DNA 量を測定した。ただし BamHI W 領域は EB ウイルスゲノム内に 11 個存在するため直接ウイルス量を評価しているとはいえないことから EBV ゲノム内に 1 個存在する LMP1 領域についても同様にリアルタイム PCR 法を用い評価した。また本リンパ腫において EBV DNA 量が高値となる原因について検討を行うため、我々は本リンパ腫患者組織において EBV 由来の指標である EBER、単独で EBV の再活性化を促しそのウイルス産生を亢進させる ZEBRA に注目しその発現を検討した。さらに EBV DNA 値と EBER、ZEBRA の発現の相関、EBV DNA 値と臨床経過、予後との相関について検討した。</p>			



## 対 象・方 法

### 1. 症 例 と 経 過

1990年から2003年にかけて旭川医科大学および札幌医科大学耳鼻咽喉科において鼻性NK/T細胞リンパ腫と診断された20症例(年齢28歳から71歳(中央値52.5歳)、男性14例、女性6例)を対象とした。臨床病期分類はAnn Arbor分類に基づいて行われた。

### 2. リアルタイム PCR 法

EBV DNA 量測定は治療前、治療中、治療後の血清について行われた。BamHI W 領域およびLMP1 領域におけるプライマーセットとTaqMan プローベを用いたリアルタイムPCR法で行った。また対照として健常人5名の血清を使用した。

### 3. In Situ ハイブリダイゼーション法と免疫組織学的染色

鼻腔生検組織のパラフィン包埋切片を用い酵素抗体法によりLMP1 および ZEBRA の発現を検討した。それぞれ50%、0.1%の陽性細胞が腫瘍切片に認められた場合に陽性と評価した。またEBER-RNAをプローベとしたIn Situ ハイブリダイゼーション法によりEBV-encoded small nuclear early region (EBER)を同定した。陽性細胞数は0.25mm<sup>2</sup>あたりの陽性細胞数を用い検討した。

### 4. 統計学的解析

2因子間の検討にはMann-Whitney U検定を行った。2因子の相関についてはSpearmanの相関係数を用いた。無病生存率および全生存率はKaplan-Meier法により解析を行った。予後因子についてはLog-rank testによりスクリーニングを行い、Cox比例ハザードモデルによる単変量・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

症例の原発部位は鼻腔17例(85%)、口蓋2例(10%)、上顎洞1例(5%)。臨床病期はI期15例(75%)、II期4例(20%)、IV期1例(5%)であった。治療は16例(80%)で放射線化学療法、3例で放射線療法単独、1例で化学療法単独で行なわれた。治療により14例(70%)が完全寛解に至り、うち4例(20%)は寛解後2-24ヵ月後(中央値7.5ヶ月)で再発死亡した。観察期間は8-124ヶ月であり中央値は34ヶ月である。5年無病生存率と5年全生存率はそれぞれ37.7%、46.0%であった。

### 2. 治療前血清 EBV DNA レベル

症例の治療前血清BamHI W DNAレベルは74.4 から 11,245 copies/ml (中央値は 349.9 copies/ml)に分布し、また血清LMP1 DNA レベルは測定限界以下( $< 4$  copies/ml)から310 copies/ml(中央値は55.57 copies/ml)に分布していた。一方健常人の測定値は測定限界以下であり、両者の間に顕著な有意差を認めた( $P=0.0006$ 、 $0.0039$ )。



### 3. 血清EBV DNAレベルと患者組織におけるEBV特異分子の発現および臨床像との関連

EBERの発現は20例全例で確認された。血清 Bam HI W DNAレベルと組織内 EBER陽性細胞数との間には正の相関が認められた( $r=0.53$ ,  $p=0.022$ )。血清 Bam HI W DNA、LMP1 DNAレベルはZEBRA陽性症例において有意に高値を示していた( $p=0.0081$ ,  $0.004$ )。B症状陽性の症例は陰性例と比較し有意に高値のBam HI W DNAレベルを示し( $p=0.015$ )、LDH高値( $>400$  IU/ml)の症例は有意に高値のLMP1 DNAレベルを示していた( $p=0.0037$ )。

### 4. 臨床経過と血清 EBV DNA レベル変化

治療後の経過観察が可能な症例は16症例であった。治療後、両血清EBV DNAレベルは有意に減少した( $p<0.0001$ )。しかし初期治療で両者のレベルが測定限界以下に至らぬ症例では再発を認めた。経過中の両者のレベルは必ずしも並行に推移しているわけではなかった。

### 5. 予後因子の検討

単変量・多変量解析により治療前BamHI W DNAレベル高値( $>700$  copies/ml)、血清LMP1 DNAレベル高値( $>40$  copies/ml)、B症状陽性、LDH高値( $>400$  IU/ml)、ZEBRA陽性が予後不良因子であった。治療後BamHI W DNAレベル20 copies/ml以上も予後不良因子であった。

さらに治療前血清EBV DNAレベル高値群(BamHI W DNA $>700$  copies/ml かつLMP1 DNA $>40$  copies/ml)と低値群(BamHI W DNA $\leq 700$  copies/mlかつ LMP1 DNA $\leq 40$  copies/ml)、それ以外の群の3群に分けて検討すると低値群は5年全生存率および無病生存率がそれぞれ100%、80%であり、一方高値群は0%であった。多変量解析において高値群は独立した予後不良因子であった(ハザード比5.23、95%信頼区間1.11-24.73、 $p=0.037$ )。

## 考 案

血清EBV DNAレベルが鼻性NK/T細胞リンパ腫症例で上昇するメカニズムはまだ判明していないが、少なくともEBVの溶解感染によるものと腫瘍細胞のアポトーシスによるものの2つの可能性がある。本研究においてEBER陽性細胞数は血清 Bam HI W DNAレベルと正の相関を示し、ZEBRA蛋白陽性症例は血清EBV DNAレベルが高値であった。ホジキン病にてZEBRA蛋白の上昇が血清EBV DNAレベルの高値となっている報告があることから、溶解感染周期に入ったリンパ腫細胞から放出されたウイルス産物が血清EBV DNAレベルの上昇に寄与していることが示唆された。

治療前後の血清 BamHI W DNA レベルと血清 LMP1 DNA レベルとはよく相関するが、治療中それらの推移は必ずしも並行しない。この理由については明白ではないが、症例を監視するに当たり血清 BamHI W DNA レベルだけでは不十分と考えられた。

本検討にて血清 Bam HI W DNA レベルと血清 LMP1 DNA レベルが本リンパ腫の病勢を反映する非常に有効な腫瘍マーカーであることが示された。特に治療後における Bam HI W DNA レベルは治療効果を示す指標となり追加治療の必要性を判断する材料になるものと考ええる。また血清 Bam HI W DNA レベルと血清 LMP1 DNA レベルは生存率と関連し本疾患の予後予測因子となりうることが示唆された。今回の研究で重要なことは治療後の血清 BamHI W DNA レベルの維持が予後不良の経過になることと関連している点である。このような症例については画像検査等で完全寛解と診断されても追加の治療が必要であろう。



## 結 論

1. 鼻性 NK/T 細胞リンパ腫 20 症例の経過中の血清 Bam HI W DNA レベルと血清 LMP1 DNA レベルを測定して臨床的有用性を検討した。
2. 治療前の本リンパ腫症例の血清 Bam HI W DNA レベルと血清 LMP1 DNA レベルは健常人と比べ有意に上昇していた。
3. 治療後の本リンパ腫症例の血清 Bam HI W DNA レベルは治療前と比較して有意に低下していた。
4. 本リンパ腫症例の予後因子として治療前 BamHI W DNA レベル高値(>700 copies/ml)、血清 LMP1 DNA レベル高値(>40 copies/ml)、B 症状陽性、LDH 高値(>400 IU/ml)、ZEBRA 陽性があげられた。
5. 本リンパ腫症例の治療後血清 Bam HI W DNA レベルは残存腫瘍を反映すると考えられた。
6. 経過中、本リンパ腫症例の血清 Bam HI W DNA レベルと血清 LMP1 DNA レベルの推移は必ずしも並行しなかった。
7. 治療前の血清 Bam HI W DNA レベルと血清 LMP1 DNA レベルの測定は本リンパ腫患者における予後推測、治療効果を検討する上で独立した有用なマーカーであることが示唆された。

## 引 用 文 献

1. Harabuchi Y, Yamanaka N, Kataura A, Imai S, Kinoshita T, Mizuno F, Osato T.  
Epstein-Barr virus in nasal T-cell lymphomas in patients with lethal midline granuloma.  
Lancet 335:128-130 (1990)
2. Berger C, Day P, Meier G, Zingg W, Bossart W, Nadal D.  
Dynamics of Epstein-Barr virus DNA levels in serum during EBV associated disease.  
J Med Virol 64: 505-512 (2001)
3. Zhang Y, Ohyashiki JH, Takaku T, Shimizu N, Ohyashiki K.  
Transcriptional profiling of Epstein-Barr virus (EBV) genes and host cellular genes in nasal NK/T-cell lymphoma and chronic active EBV infection.  
Br J Cancer 94: 599-608 (2006)



## 参 考 論 文

1. Nagamine M, Takahara M, Kishibe K, Nagato T, Ishii H, Bandoh N, Ogino T, Harabuchi Y  
Sequence variations of Epstein-Barr virus LMP1 gene in nasal NK/T-cell lymphoma  
Virus Genes 34: 47-54 (2007)
2. Nagato N, Kobayashi H, Kishibe K, Takahara M, Ogino T, Ishii H, Oikawa K, Aoki N, Sato K, Kimura S, Shimizu N, Tateno M, Harabuchi Y  
Expression of Interleukin-9 in Nasal Natural Killer/T-Cell Lymphoma Cell Lines and Patients  
Clin Cancer Res: 11, 8250-8257 (2005)
3. Ogino T, Shigyo H, Ishii H, Katayama A, Miyokawa N, Harabuchi Y, Ferrone S  
HLA Class I Antigen Down-regulation in Primary Laryngeal Squamous Cell Carcinoma Lesions as a Poor Prognostic Marker  
Cancer Res: 66, 9281-9289 (2006)
4. Ogino T, Moriai S, Ishida Y, Ishii H, Katayama A, Miyokawa N, Harabuchi Y, Ferrone S  
Association of immunoescape mechanisms with Epstein-Barr virus infection in nasopharyngeal carcinoma  
Int. J. Cancer: 120, 2401-2410 (2007)



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	石井 秀幸
<p>審査委員長 立 野 正 敏 ㊞</p> <p>審査委員 三代川 斉 之 ㊞</p> <p>審査委員 鳥 本 悦 宏 ㊞</p> <p>審査委員 原 湊 保 明 ㊞</p>			
<p>学 位 論 文 題 目</p> <p>Clinical Usefulness of Serum EBV DNA Levels of BamHI W and LMP1 for Nasal NK/T-Cell Lymphoma (鼻性NK/T細胞リンパ腫患者における血清中エプスタイン・バーウイルス BamHI W DNA およびLMP1 DNA値の臨床的有用性)</p> <p>鼻性 NK/T 細胞リンパ腫は、鼻腔や咽頭などの顔面正中部に初発し、急速に進行する予後の極めて不良な NK 細胞または <math>\gamma</math> <math>\delta</math> T細胞起源のリンパ腫である。組織学的には破壊性の壊死性肉芽腫性病変を主体とするため、組織診断が困難であった。そこで簡便で診断に役立ち、臨床経過を追える腫瘍マーカーの検討が求められていた。これまでの研究から本疾患の発症には Epstein-Barr virus (EBV) が関与していることが解明され、その本態も明らかになりつつある。EBV 関連腫瘍には患者血清や擦過物などをサンプルとしたリアルタイム PCR 法による EBV DNA 定量があり、臨床応用に向けて腫瘍マーカーとしての有用性について検討した報告が散見される。しかし、本リンパ腫は比較的まれな疾患であり、症例数が少なく本リンパ腫単独で検討した報告は見られない。本論文は鼻性 NK/T 細胞リンパ腫患者の血清を用いてリアルタイム PCR 法による EBV DNA 量を 2 種類 (Bam HI W DNA 量、LMP1 DNA 量) 測定し、臨床応用に向けて腫瘍マーカーとしての有用性について検討し、その臨床的意義について考察したものである。</p> <p>はじめに、本疾患患者20例の治療前血清中のEBV DNA量を測定したところ、患者血清中のEBV DNA量はいずれも高値であり、健常人では測定限界以下であった。</p> <p>次に臨床経過に伴う患者血清中の EBV DNA 量の推移について検討したところ、治療に従い減少し、再発すると再上昇を認めた。測定限界まで下がりきらない症例では、完全寛解後再燃がみられた。Bam HI W DNA 量とLMP1 DNA 量は多くの症例で経過と共に平行して</p>			



推移していたが、必ずしも平行しない症例も認められた。

治療前および治療後の血清中 EBV DNA 量と患者予後の相関を検討したところ、治療前血清中 EBV DNA 量が高値の症例は低値の症例と比較して予後不良の経過を辿っていた。また治療後血清中 EBV DNA 量が高値の症例は低値の症例と比較して、予後不良の経過を辿っていた。さらに測定した 2 種類の治療前血清中 EBV DNA 量が必ずしも平行に推移するとは限らない点から両者を組み合わせて検討したところ、両者とも高値の症例はいずれも低値の症例と比較して予後不良の経過を辿っていた。Kaplan-Meier 法と単変量解析を用いて各種因子との関連を検討したところ、B 症状、LDH 高値、ZEBRA 発現陽性、治療前血清中 EBV DNA 量高値の症例では無病生存率が低下していた。

最後に、患者組織を用いて in-situ ハイブリダイゼーション法により EBER を同定し単位面積あたりの染色細胞数と治療前血清中の EBV DNA 量を比較したところ、両者の間には正の相関が認められた。また、患者組織中の ZEBRA 蛋白を免疫組織で検出し、検討したところ、ZEBRA 蛋白陽性患者は ZEBRA 蛋白陰性患者より治療前血清中の EBV DNA 量が高値であった。これより、ZEBRA 蛋白を介した EB ウイルス再活性化が EBV DNA 量高値の要因になっている可能性が示唆された。

本研究の結果より、鼻性 NK/T 細胞リンパ腫において血清中 EBV DNA 量は患者予後や治療経過を推定することができる有用な腫瘍マーカーになりうることを示唆された。さらに追加治療の必要性を検討するに当たり、治療後血清中 EBV DNA 量測定はこれまでの画像評価と比べても重要であると考えられた。

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、本論文は既に2007年のJournal of Medical Virology誌に掲載済みである。