

論 文 要 旨

Possible role for external environmental stimuli in nasopharyngeal NK/T-cell lymphomas in the northeast of China with EBV infection-related autophagic cell death: A pathoepidemiological analysis

Epstein-Barr virus 関連自己食細胞死を示す
中国東北地方の鼻咽頭 NK/T 細胞性リンパ腫には
外部環境刺激の影響がある - 病理疫学的研究-

王 嘉

【序論および目的】

19 世紀末に壊疽性鼻炎と報告された鼻のリンパ腫は、その主なものが節外性 Natural Killer (NK)/T 細胞性リンパ腫 (NKTCL) であることが明らかにされている。

NKTCL は、アジア、特に中国に多く、WHO 分類によれば、CD56⁺ NK 細胞系列と CD56⁻ T 細胞系列の症例がある。NKTCL の発病には Epstein-Barr virus (EBV) の関与が示唆され、EBV の A 亜型が優勢なアジアでの EBV の Latent membrane protein-1 (LMP-1) への HLA-A*0201 拘束性細胞傷害性 T 細胞を有する人々が少ないことが、NKTCL のアジアでの多発の原因と考えられている。また、近年殺虫剤等の環境因子の悪性リンパ腫、NKTCL の発病への関与も示唆されている。NKTCL は特異な壊死を示すが、プログラム細胞死 (PCD) の分子病理学的検索は未だ充分には行なわれていない。

本研究は、中国東北地方の鼻咽頭リンパ腫について、EBV の関与、リンパ腫の形質、および、特徴的な壊死の機構について免疫組織化学的に明らかにすることを目的とした。

【材料および方法】

材料は、2001-2006 年に、中国医科大学（瀋陽市）で鼻咽頭リンパ腫と診断された 134 例の病理保存標本の切片である。この研究は、鹿児島大学大学院医歯学総合研究科の疫学研究の倫理委員会および、中国医科大学の国際共同研究の倫理審査で了解されている。

組織学的・免疫組織化学的に検索したリンパ腫は、WHO 分類にて再分類を行い、EBV 感染は EBER-1 ISH で検出した。リンパ腫細胞の PCD は、40 例で、アポトーシスのシグナル伝達とその抑制因子と自己食の分子機序を考察し、Flip、TIA-1、Bcl-2、AATF、survivin、cleaved caspase-3、Beclin-1、LC3 を抗原回復免疫染色で検索した。また、同症例で、壊死細胞残渣処理やリンパ腫共生間質細胞の観点から、CD204⁺ 大食細胞のリンパ腫の組織形成への関与を抗原回復免疫染色で検索した。

【結 果】

① CD3 ϵ ⁺ TIA1⁺ CD56⁺ survivin⁺リンパ腫細胞を示す NKTCL の 69 例 (51.5%) で、細胞性領域、変性細胞領域、壊死領域がみられ、壊死領域では裸核様細胞残渣が観察された。CD204⁺大食細胞は、NKTCL 細胞間に分布し、その細胞突起が網目構造を形成し、壊死領域では消失していた。5 例(3.7%) の早期の NKTCL (Early NKTCL) がみられ、survivin⁺リンパ腫細胞には CD3 ϵ ⁺ TIA1⁺細胞傷害性 T 細胞系列と CD3 ϵ ⁺ TIA1⁺ CD56⁺ NK 細胞系列の細胞が観察された。細胞傷害性 T 細胞リンパ腫 (Cytotoxic TML) は、9 例(6.7%) 見られ、粘膜付属リンパ組織 (MALT) 型リンパ腫との合併例 1 例も見られた。B 細胞性リンパ腫 (B-ML) では、7 例(5.2%) の CD5⁺ 瀰漫性大細胞性 B 細胞性リンパ腫 (DLBL) と 1 例の高悪性度 MALT 型と 17 例 (12.7%) の CD5⁻ DLB を認めた。リンパ腫以外に、9 例 (6.7%) の癌と 3 例 (2.2%) の炎症病変を認めた。

② リンパ腫患者の臨床病理学的特徴では、T 細胞と NK 細胞性リンパ腫 (T-ML) と NKTCL の男性優勢

の発病が、B-MLでの男女同数の発病が示され、40才以下での有意な少なさが見られ、T-MLとNKTCLは鼻腔に、B-MLとDLBLは咽頭に、有意に多い発病が見られた。

③EBV感染とリンパ腫と癌の関係では、cytotoxic TMLの多くはEBV⁺症例であり、Early NKTCLでは少数の大小のEBER-1⁺リンパ腫細胞核を認め、少数のNKTCLでは少数のリンパ腫細胞のみがEBER-1⁺であり、EBV⁺高悪性度 MALT型と同様に、リンパ腫形成に伴うEBV感染の拡大が示唆された。3例のEBV⁺B-MLは鼻腔に見られた。EBV⁺癌は咽頭にも見られた。

④リンパ腫組織の循環傷害による変性が5例のT-MLと4例のB-MLで見られたが、5例のCytotoxic TMLと56例のNKTCLの有意に多数例で特異な壊死が見られた。1例のEBV⁺CD5⁺DLBLも、同様の特異な壊死病巣を示した。CD204⁺大食細胞は、NKTCLに有意に多数介在し、壊死領域には介在せずに、NKTCLの共生大食細胞であることが示唆された。リンパ腫細胞はsurvivinを強く発現し、cleaved caspase-3⁺アポトーシス細胞が無かった。EBV⁺NKTCLはEBV⁺DLBLより有意で著しいBcl-2の発現低下を示し、Flip発現は全リンパ腫で低く、ATFF発現例はなく、Bcl-2のEBV⁺症例での低下でも、survivinの発現でリンパ腫細胞のアポトーシスは抑制されていた。一方、NKTCLの細胞性領域で、自己食空胞核形成に関与するBeclin-1のCytotoxic TMLよりも有意に高い発現が見られ、細胞変性領域では発現低下が見られた。自己食空胞伸長と融合に関与するLC3は全リンパ腫の細胞質に高発現し、EBV⁺のNKTCLとCytotoxic TMLで、粗大顆粒状LC3陽性像が、EBV⁺NKTCLよりも有意に高頻度で観察され、リンパ腫細胞の核がLC3で有意により高頻度に染色され、EBV関連の自己食の亢進が示唆された。

⑤鼻リンパ腫に併存する微小上皮病変が、T-MLの26例とB-MLの7例で見られ、11例の病変は、下方増殖、異常角化を示し、survivin陽性である微小扁平上皮癌であった。この微小扁平上皮癌は、T-ML、特に、NKTCLとの優位な併存を示した。この11例の微小扁平上皮癌はEBV⁺T-MLに見られたが、その2例でEBER-1⁺リンパ腫細胞と近接して存在する一部の細胞のみがEBV感染を示し、1例はコイロサイト変化を示した。また、この癌への浸潤した小リンパ腫細胞はCD3ε⁺ないしCD56⁺であった。また、上皮下のリンパ腫の周辺部分には、EBER-1⁺小型リンパ腫細胞を認め、その組織形成はEarly NKTCLとは異なっていた。また、少数例のリンパ腫組織を蓋う未熟な再生上皮に、survivin⁺組織幹細胞を認めた。

【結論及び考察】

この研究は、腫瘍細胞に発現するsurvivin⁺と云う形質で、Early NKTCLに細胞障害性T細胞系列とNK細胞系列のリンパ腫細胞を同定した。更に、このsurvivin⁺と云う形質はEBV感染拡大よりも先行し、リンパ腫細胞におけるEBV感染拡大は腫瘍性特徴であることが確認された。EBV⁺リンパ腫におけるEBVリンパ腫細胞領域は、最初に発生したリンパ腫の組織形成を示すことが示唆された。

NKTCLは慢性活動性EBV感染症(CAEBV)に発生したリンパ腫であると考えられる報告もあるが、この研究が検索した中国東北地方にはCAEBVの発症が報告されておらず、検索した鼻咽頭リンパ腫は鼻咽頭に限局した症例であった。

NKTCLとCytotoxic TMLは特異な壊死を示し、EBV⁺症例ではBcl-2とFlipの発現が抑制され、cleaved caspase-3陽性アポトーシス細胞を示さないことから、NKTCL細胞株の検索による報告と異なり、生体内のNKTCL細胞ではアポトーシス以外のPCDの存在が示唆された。この研究は、NKTCL等で、自己食空胞核形成に関与するBeclin-1と自己食空胞伸長等に関与するLC3の高発現と、壊死領域でのLC3による裸核様細胞残渣の標識を見出し、NKTCLでの特異な壊死は自己食細胞死の亢進であり、LC3による核標識は自己食細胞死の指標であることが示唆された。

従来、NKTCLに併存する上皮病変は、上皮腫様過形成とされていたが、この研究はこの病変がsurvivin陽性であることからEBV⁺微小扁平上皮癌であることを見出した。

EBV⁺NKTCLでのEBV⁺survivin⁺微小扁平上皮癌とEBV⁺survivin⁺小リンパ腫細胞領域の存在は、鼻咽頭への環境因子の影響下に発生した微小扁平上皮癌への免疫反応の中に、survivin⁺NKTCLリンパ腫が発生し、EBV感染拡大によるリンパ腫形成の進行を示唆した。

論文審査の要旨

報告番号	総研第 58 号		学位申請者	王 嘉
審査委員	主査	秋山 伸一	学位	博士 (医学)
	副査	米澤 傑	副査	出雲 周二
	副査	河野 嘉文	副査	金蔵 拓郎

Possible role for external environmental stimuli in nasopharyngeal NK/T-cell lymphomas in the northeast of China with EBV infection-related autophagic cell death: A pathoepidemiological analysis

(Epstein-Barr virus 関連自己貪食細胞死を示す中国東北地方の鼻咽頭 NK/T 細胞性リンパ腫には外部環境刺激の影響がある 一病理疫学的研究一)

鼻咽頭リンパ腫、特に、鼻型 Natural Killer (NK)/T 細胞性リンパ腫 (NKTCL)は、アジアに多く、特異な壊死を示すが、その多発地域での詳細な発病状況等の検索も、特異な壊死の病理学的な詳細な検討も報告されていない。その発病には、Epstein-Barr virus (EBV)感染の関与が報告される一方、近年、殺虫剤等の環境因子の関与が疫学的に示唆されている。そこで学位申請者らは、NKTCL の多発地域の 134 例の鼻咽頭リンパ腫を病理免疫組織化学的に再検討し、EBV 感染を EBER-1 in-situ hybridization (ISH)で検出し、鼻咽頭リンパ腫とその関連病変の発病状況と EBV 感染の実際を明らかにすると共に、十分な数の変性傾向を示さないリンパ腫細胞が観察可能な 40 例で programmed cell death (PCD)を免疫組織化学的に検討した。

その結果、本研究では以下の知見が明らかにされた。

- 1) T 細胞性/NK 細胞性のリンパ腫(T-ML)には、69 例 (51.5%)の NKTCL、9 例 (6.7%)の細胞傷害性 T 細胞リンパ腫 (Cytotoxic TML)、5 例 (3.7%)の survivin⁺ TIA1⁺ CD56⁺ のリンパ腫細胞を示す早期の NKTCL (Early NKTCL)等が見られた。B 細胞性リンパ腫(B-ML)では、17 例 (12.7%)の CD5⁺ 瀰漫性大細胞性 B 細胞性リンパ腫 (DLBL)と 7 例 (5.2%)の CD5⁺DLBL が見られた。その他に、9 例 (6.7%) の癌も見られた。NKTCL では男性優勢の発病、B-ML では 40 才以下での発病が有意に低かった。T-ML と NKTCL は鼻腔に、B-ML と DLBL は咽頭に、それぞれ有意な発病を示した。
- 2) 多数の T-ML および NKTCL で、EBER-1⁺リンパ腫細胞が見られた。しかし、すべてのリンパ腫細胞が EBER-1⁺の症例から全く EBER-1⁺リンパ腫細胞を認めない症例まで観察された。このことは、survivin⁺リンパ腫細胞の出現以降に EBV 感染が成立し、リンパ腫の進展に伴い EBER-1⁺リンパ腫細胞が拡大して来ること (腫瘍性の EBV 感染拡大) を示唆した。
- 3) 特異な壊死を示す EBV 感染 NKTCL では、Bcl-2 の有意な発現低下が見られるも、強発現している survivin がアポトーシスを抑制しており、その特異な壊死はアポトーシスによるものではないことが示された。自己貪食関連分子である Beclin-1 は、変性壊死を認めない NKTCL の領域で有意に高い発現を示し、変性領域で発現低下を示した。もう一つの自己貪食関連分子の LC3 は、変性領域で粗大顆粒状陽性像を有意に高頻度にし、裸核様細胞残渣を伴う壊死領域で核染色像を示した。これらから、NKTCL の特異な壊死は自己貪食細胞死によるものであることが示唆された。
- 4) T-ML の 26 例と B-ML の 7 例で微小上皮病変の併存が見られた。その中の 11 例の survivin⁺ EBER-1⁺ 微小扁平上皮癌は、EBV 感染 NKTCL に見られ、EBV 感染に先行する環境因子の存在を示唆した。

以上の結果より、申請者らは、中国で多発している鼻咽頭リンパ腫の多くは、鼻咽頭に限局した NKTCL であることを明らかにし、この NKTCL は、少数ながらも EBV 感染を認めないものから多数の EBV 感染を示す例が存在し、EBV 感染 NKTCL 症例の中には survivin⁺ EBER-1⁺リンパ腫細胞も混在し、survivin⁺ EBER-1⁺微小扁平上皮癌を併存することから、NKTCL 発病への環境因子の存在を示唆した。また、申請者らは、NKTCL の特異な壊死が、自己貪食細胞死によるものであることを免疫組織化学的に明らかにした。

本研究は、鼻咽頭リンパ腫の多発地域で実際の発病状況を病理疫学的に報告し、NKTCL の発病には EBV 感染以外の環境因子の存在が示唆され、その特異な壊死が自己貪食細胞死によるものであることを報告し、非常に興味深い。よって本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判定した。

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 5 8 号		学位申請者	王 嘉
審査委員	主査	秋山 伸一	学位	博士 (医学)
	副査	米澤 傑	副査	出雲 周二
	副査	河野 嘉文	副査	金蔵 拓郎

主査および副査の5名は、平成21年2月9日、学位申請者 王 嘉君に面接し、学位申請論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。

質問1) 全体の症例 134 例から、どのような理由で 40 例の変性壊死の免疫組織化学的検索症例を選択したか？

(回答) 十分に変性壊死を示さないリンパ腫組織を検索出来る症例で、症例数の少ない亜型は可能な限り多くの症例を、多数である NK/T 細胞性リンパ腫症例を 20 例前後でと云う、統計・推計学で用いる症例数比率等の微調整を最も頻度の高い亜型で行なうと云う手法に準じて、選択した。この選択された症例での検索では、症例数と免疫染色の評価スコアの平均と標準偏差を用いて、F 検定と t 検定を行なった。十分な症例数のない亜型の検索データは参考として検討した。

質問2) NK/T 細胞性リンパ腫の壊死周囲の細胞は変性細胞としての特徴のみを示したか？

(回答) 細胞性領域、変性領域、壊死領域に分けて検索し、自己貪食細胞死も、傾向としては、壊死領域に向って進行しており、それ以外の特徴は見られなかった。

質問3) Survivin の発現と EBV 感染の関係を、Survivin 陽性の腫瘍細胞出現が EBER-1 陽性腫瘍細胞の出現よりも早いと考えて良いのか？

(回答) 検索症例で、Survivin⁺腫瘍細胞が EBER-1⁺腫瘍細胞よりも、広い領域に分布し、細胞数も多く、Survivin⁺腫瘍細胞出現が EBER-1⁺腫瘍細胞の出現よりも早いと考えるのは妥当と思われる。また、同一症例内の Survivin⁺ EBER-1⁺腫瘍細胞は、Survivin⁺ EBER-1⁺腫瘍細胞よりも小型であり、Survivin⁺ EBER-1⁺腫瘍細胞では EBV による発癌プロモーション効果が発現していると考えられる。

質問4) Survivin 陽性の非腫瘍細胞は、組織幹細胞と考えて良いか？

(回答) Survivin 陽性細胞は、胎児組織細胞、骨髄組織細胞と癌細胞と報告されている。私たちは、鼻咽頭の扁平上皮の中で、その組織幹細胞と考えられる細胞が Survivin 陽性であることを見出した。他の組織の幹細胞が Survivin 陽性か否かは今後検索する必要がある。

質問5) HLA-A*0201 の人口は、中国東北地方では、本当に少ないのか？

(回答) 実際に検索した資料がない。但し、EBV 関連腫瘍の多さから考えて、必ずしも、LMP-1 への HLA-A*0201 拘束性細胞傷害性 T 細胞の有無が、EBV 関連腫瘍の発生に直接関係しているとは考え難く、今後の中国での HLA の研究の進展を待ちたい。

質問6) LC3 のコントロール染色はどのようにして行なったか？

(回答) 抗 LC3 抗体で LC3-I と-II を標識できる抗体を、ウエスタンブロットで選択し、ヒト壊死性リンパ節炎の標本で、適切な抗原回復法を選択することで、コントロール染色条件とした。真の LC3 陰性ヒト細胞性組織は得られないので、Beclin-1 との対比染色を考慮した。

質問7) 中国では、鼻咽頭リンパ腫での NK/T 細胞性リンパ腫の比率が高いのか、あるいは、絶対症例数が多いのか？

(回答) 中国では、NK/T 細胞性リンパ腫が多いと報告されて来ているが、鼻咽頭リンパ腫としての報告は我々が調べた結果は、比率は不明であるが症例は多いようである。

質問 8) 中国東北地方では、鼻型 NK/T 細胞性リンパ腫の皮膚例は多数観察されるのか？

(回答) 現在、検索した所では、皮膚の例は非常に少ない。しかし、香港等では従来から皮膚症例の報告があり、中国内でも、地域差があるのではないかと考えている。

質問 9) 血管中心性リンパ腫は観察されたのか？

(回答) 血管中心性リンパ腫は Jaffe ES により提唱された概念です。血管中心性のリンパ腫細胞の分布は、その一つとされた鼻 NK/T 細胞性リンパ腫では、変性ないし壊死傾向を示す領域では確かに認める。しかし、それはリンパ腫組織の変性傾向の一つ所見であり、鼻 NK/T 細胞性リンパ腫の変性ないし壊死傾向を示さずにリンパ腫細胞に富む領域ではそれは観察されないことから、現在、血管中心性のリンパ腫細胞の分布は鼻 NK/T 細胞性リンパ腫の特徴的な所見とは考えられていない。

質問 10) 蚊アレルギーや慢性活動性 EBV 感染症を背景として、鼻 NK/T 細胞性リンパ腫は発病しているのか？

(回答) 現在の情報では、この検索地域（中国東北地方）では、蚊アレルギーや慢性活動性 EBV 感染症の診断例がない。今後の検索課題と考えられる。

質問 11) Autophagic cell death (自己食細胞死) と Necrosis (壊死) と云う異なる細胞死の形態を決める要因は何か？

(回答) 一般に、悪性度の高いリンパ腫等では、微小血栓による梗塞病変が壊死病変を示し、その周囲の拡張した血管にフィブリン血栓等を認める。この場合には、壊死病変は好酸性の壊死した細胞残渣を示す凝固壊死である。しかし、自己食細胞死では、細胞質の極端な減少による裸核様の細胞残渣を好酸性の凝固壊死の中に認める。従って、自己食細胞死と壊死を決める要因は、細胞死と循環障害である。

質問 12) 自己食の現象は、リンパ腫に特徴的なものか？

(回答) 自己食機能は、どの細胞も有する生理的な機能であり、一般に、癌細胞では、自己食機能は亢進していると云われている。私達は、未だ系統的に悪性腫瘍に於ける自己食の解析を行なっておらず、今後、この私たちの開発した免疫組織化学的自己食細胞死の解析方法を用いて、系統的に悪性腫瘍に於ける自己食の解析を行ないたい。

質問 13) 自己食は、悪性腫瘍の予後に影響を与えるか？

(回答) まだ、私たちは、その検討は行なっていません。ただし、現在、自己食細胞死が生じる過程を検索中であり、その結果では、自己食空胞リソゾームの機能不全により自己食細胞死が生じているようですので、個々の癌細胞におけるリソゾームの予備能が癌細胞の予後に影響する可能性があると考えている。

質問 14) Bcl-2 以外の自己食の抑制因子はあるのか？

(回答) 抗飢餓因子（細胞の栄養因子）と Bcl-X_L がある。

質問 15) 自己食の無い腫瘍細胞での Beclin-1 の発現はどのようなものか？

(回答) この研究では、検索した症例全ての腫瘍細胞は自己食を示した。今後の検索が必要だが、Beclin-1 と LC3 の発現の解離が生じた腫瘍細胞を観察出来るのであれば、その細胞では Beclin-1 複合体以外の分子等による自己食空胞核形成が生じたものと考えられる。今後、検索を続けたい。

質問 16) マクロファージの染色に CD204 を用いた理由は何か？

(回答) 予備検索にて、CD204 陽性マクロファージの NK/T 細胞性リンパ腫と Cytotoxic T 細胞性リンパ腫における特異な分布が観察され、更に、壊死傾向の強いこれらのリンパ腫では、リンパ腫の微小環境（細胞外液領域）の壊死物質の除去細胞（スカベンジャー）の検討が必要になったからである。因に、その他の T 細胞系のリンパ腫では、thymidine phosphorylase 陽性樹状細胞が同様の分布をすることが明らかになっている。

以上の結果から、5名の審査委員は申請者が大学院博士課程修了者としての学力・識見を有しているものと認め、博士（医学）の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。