

氏名	きむら しょういち 木村 翔一		
学位の種類	博士 (医学)		
報告番号	甲第 1972 号		
学位授与の日付	令和 5 年 3 月 16 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 (課程博士)		
学位論文題目	Programmed cell death - ligand 1 (PD - L1) ⁺ tumour cells and low - reacting programmed cell death 1 (PD1) ⁺ tumour - infiltrating lymphocytes predict poor prognosis in Epstein-Barr virus ⁺ diffuse large B - cell lymphoma (Epstein-Barr ウイルス陽性大細胞型 B 細胞リンパ腫における予後不良因子として PD-L1 陽性腫瘍細胞と少ない反応性 PD1 陽性腫瘍浸潤リンパ球が関与する)		
論文審査委員	(主 査) 福岡大学	教授	白澤 専二
	(副 査) 福岡大学	教授	廣松 賢治
	福岡大学	准教授	入江 真

内 容 の 要 旨

【目的】

Epstein-Barr virus-positive diffuse large B-cell lymphoma (=EBV+ DLBCL)は、主に特異的な免疫抑制のない高齢者に発症し、50 歳未満の患者にはあまりみられない (Oyama 2007)。また、EBV が関連しかつ類似した組織像を持つリンパ増殖性疾患として Methotrexate associated EBV+ B-cell lymphoproliferative disorders (= MTX+EBV+BLPDs)がある。

当教室の報告を含め、過去の報告では EBV+ DLBCL 患者は EBV-negative DLBCL 患者よりも予後不良であることが知られている。しかし、MTX+/EBV+ BLPD の多くは MTX 停止後に自然退縮することが知られている。多くの共通点、特にいずれも組織学的に壊死を伴う大型異型リンパ球の増殖と EBV 陽性腫瘍細胞の出現という共通した特徴を持ちながら予後が異なる点について着目した。

EBV の関連しない通常型の DLBCL では、program death ligand-1 (PD-L1) 陽性腫瘍細胞は予後不良因子、program death1 (PD1) 陽性腫瘍浸潤リンパ球 (Tumor infiltrate lymphocytes = TIL) は予後良好因子であることが知られている (Kiyasu J. 2015)。EBV+ DLBCL 患者では、高齢 (>70 歳)、B 症状、LDH 高値、非胚中心型、CD30、CMYC、BCL2、p53 の発現が予後不良因子であるとする報告がある (Ok CY. 2014)。また、EBV+

DLBCL の腫瘍細胞は PD-L1 を高頻度に発現しており、EBV nuclear antigen (EBNA) 2 は EBV 感染 B 細胞における PD-L1 発現をアップレギュレートするとされる。EBV+ DLBCL における PD-L1 陽性腫瘍細胞が予後不良の傾向を示すも有意ではなかった (Takahara T. 2020) とされ、これまで PD-L1 が EBV+DLBCL の明確な予後不良因子とする報告はない。本研究では、EBV+ DLBCL、MTX+/EBV+ BLPDs、EBV- negative non-GC subtype DLBCL 患者の臨床病理所見を比較し、EBV+ DLBCL 患者 38 人のタンパク質活性、核内転写物、抗アポトーシス因子、PD-L1/PD1 と予後への影響を検討した。

【対象と方法】

1994 年から 2019 年の期間で診断された、EBV+ DLBCL 38 例、MTX+/EBV+ BLPDs 43 例、これら 2 群と期間・年齢を揃えた EBV- negative non-GC subtype DLBCL と診断された 30 例を対象とした。

臨床項目として、Ann Arbor 分類、治療方針、全生存率を診療録から後方視的に検討した。組織学的所見に関しては、WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues, revised. 4th ed. に基づいて病理組織診断をおこなった。免疫組織学的所見に関しては、BCL2、BCL6、p53 は腫瘍細胞の 50%以上、CMYC では腫瘍細胞の 40%以上、その他の抗体では腫瘍細胞の 30%以上を陽性反応とした。非腫瘍細胞の PD-L1 染色強度は強拡大 1 視野で R0 (1%未満)、R1+ (1~5%)、R2+ (5~20%)、R3+ (20%以上) で評価した。PD-L1 の評価の際、腫瘍細胞/非腫瘍細胞の鑑別が困難な症例は、PAX5/PD-L1 の二重染色を行った。PD1+ TILs は R0 (陽性細胞なし/HPF)、R1+ (陽性細胞 10 個未満)、R2+ (陽性細胞 10~30 個)、R3+ (陽性細胞 30 個以上) と評価した。EBER in situ hybridization は大型の異型リンパ球 50%以上染色を陽性と判断した。これらの臨床項目および病理組織学的項目と EBV+DLBCL の予後との関連について検討を行った。統計に関しては、Fisher の正確検定、Spearman の順位相関係数、Kaplan-Meier 法を使用し解析を行った [Statistical analyses used JMP 10 (SAS Institute, Cary, NC, USA)]。

【結果】

臨床所見 : 3 群間で年齢差は見られなかった。EBV+DLBCL では他の 2 群と比較し LDH、IL2R が有意に高く、進行期 (Ann arbor 分類 III/IV期) が有意に多かった。また、組織学的には EBV+DLBCL では大型腫瘍細胞の割合が高かった。

免疫組織化学的所見 : EBV+ DLBCL 群は、BCL2 : 17 例 (44.7%) 陽性、CMYC が 23 例 (60.5%) 陽性、p53 が 33 例 (86.8%) 陽性であり、MTX+/EBV+ BLPD 群より有意に高かった ($P < 0.05$)。さらに、EBV+ DLBCL 群は CD30 が 29 例 (76.3%) 陽性であり、これに対して GC subtype DLBCL では 6 例 (7%) の陽性だった ($P < 0.0001$)。EBV+ DLBCL 患者 ($n = 16$, 42.1%) は、非 GC サブタイプ DLBCL 患者 ($n = 5$, 16.7%、 $P = 0.024$) よりも有意に多く、PD-L1+腫瘍細胞は早期よりも進行期に多くみられた ($P = 0.048$)。EBV+ DLBCL 患者 25 人 (69.4%) は、反応性 PD1+腫瘍浸潤リンパ球 (TIL) が少なかったのに対

し、MTX+/EBV+ BLPD 患者 12 人 (37.5%) は少なかった (P=0.008)。

予後 : EBV+ DLBCL 群は、MTX+/EBV+ BLPD 群より有意に予後が悪かった (P = 0.0006)。EBV+ DLBCL 群の予後不良因子には、LDH 300 U/L 以上 (P = 0.006) と病期 III/IV (P = 0.047) があがった。免疫染色に関して、CD25、CD30、BCL2、CMYC、p53 の発現、および BCL2、CMYC、p53 の二重発現は、EBV+ DLBCL 群の予後に影響を与えなかった。しかし、PD-L1+腫瘍細胞 (P = 0.001) および低反応 PD1+TILs (P = 0.02) は予後不良因子であり、PD-L1+腫瘍細胞かつ低反応 PD1+TILs を満たす場合はさらに予後に関わった (P < 0.0001)。

MTX+/EBV+の BLPD 群については、CMYC 発現のみが有意に予後不良因子であり (P = 0.039)、臨床病期 III/IV の患者は、早期 I/II 期の患者より予後不良の傾向があった (P = 0.22)。非 GC サブタイプの DLBCL 患者 30 名では、CMYC+ (P = 0.047)、BCL2+/CMYC+ (P = 0.047)、BCL2+/CMYC+/p53+ (P = 0.001) 腫瘍細胞が予後不良と関連していた。PD-L1+ 腫瘍細胞、PD-L1+ 腫瘍細胞、R3+ PD-L1+ 非腫瘍細胞の組み合わせ、および反応する PD1+ TIL は、MTX+/EBV+BLPDs、EBV- negative non-GC subtype DLBCL 患者に予後を左右することはなかった。

【結論】

過去の報告と同様に EBV+ DLBCL 群および MTX+/EBV+ BLPD 群は、節外浸潤、非胚中心型、EBV latency type II/III が高頻度に認められた。EBV+ DLBCL 患者は MTX+/EBV+ BLPD 患者に比べ、進行期であった。さらに、BCL2、CMYC、p53、CD30 陽性率が高く、これらの蛋白が EBV+ DLBCL 腫瘍細胞の活性化と進行を促進すると考えられるが、予後因子として同定されなかった。EBV+ DLBCL 患者は MTX+/EBV+ BLPD 患者と比較して、PD-L1+ 腫瘍細胞が増加、PD1+ TILs が減少しており、いずれも EBV+DLBCL における予後不良因子であった。EBV+ DLBCL 患者では PD1+ TILs の阻害または消耗が起こり、それに伴う PD-L1/PD1 相互作用の低下が腫瘍の進行と予後不良に影響する可能性がある。

参考文献

- Oyama T, Yamamoto K, Asano N, et al. Age-related EBV-associated B-cell lymphoproliferative disorders constitute a distinct clinicopathologic group: a study of 96 patients. Clin Cancer Res. 2007;13:5124-32.
- Kiyasu J, Miyoshi H, Hirata A, et al. Expression of programmed cell death ligand 1 is associated with poor overall survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma. Blood. 2015;126:2193-201.
- Takahara T, Satou A, Ishikawa E, et al. Clinicopathological analysis of neoplastic PD-L1-positive EBV+ diffuse large B cell lymphoma, not otherwise specified, in a Japanese cohort. Virchows Arch. 2020

- Montes-moreno S, Odqvist L, Diaz-perez JA, et al. EBV-positive diffuse large B-cell lymphoma of the elderly is an aggressive post-germinal center B-cell neoplasm characterized by prominent nuclear factor- κ B activation. *Mod Pathol.* 2012;25:968–82.
- Ok CY, Li L, Xu-monette ZY, et al. Prevalence and clinical implications of Epstein-Barr virus infection in de novo diffuse large B-cell lymphoma in western countries. *Clin Cancer Res.* 2014;20:2338–49.

審査の結果の要旨

本論文は de novo に発症する Epstein-Barr ウイルス陽性びまん性大細胞 B リンパ腫 (EBV⁺ DLBCL) 患者の予後解析において、免疫組織化学による腫瘍免疫応答に関わる Program cell death ligand 1 (PD-L1) 陽性腫瘍細胞と PD1 陽性腫瘍浸潤リンパ球 (TILs) が予後と相関することを示した初めての論文である。また、EBV⁺ DLBCL、関節リウマチ (RA) 患者にみられるメソトレキセート関連 EBV 陽性 B リンパ増殖性疾患 (MTX⁺/EBV⁺ BLPDs)、EBV 陰性 DLBCL、非胚中心型 (EBV(-) DLBCL, nonGC) 患者の臨床病理学的な差異を示し、EBV⁺ DLBCL 患者の特徴を明確化した論文である。

1. 斬新さ

EBV⁺ DLBCL 38 例において、血清 LDH 値や臨床病期と共に免疫組織化学的に癌の免疫逃避に関わる PD-L1、PD1 陽性細胞の反応が予後不良因子である事を示した初めての論文である。免疫組織化学でより正確な予後の情報が得られたことは、臨床的に有用であると考えられる。また、EBV⁺ DLBCL は特異的な免疫抑制状態にない高齢者に発症する疾患であり、MTX⁺/EBV⁺ BLPDs、EBV(-) DLBCL, nonGC といった組織形態学、形質的な類似点が多い腫瘍間での臨床病理学的な比較を行っている。

2. 重要性

EBV⁺ DLBCL 患者の診断基準に関して、EBER in situ hybridization 陽性率 50%以上とし、その基準に従って症例が抽出され検討がされている。その中で PD-L1 と PD1 の免疫組織化学での反応が予後因子として有用であることを示したことは、EBV⁺ DLBCL における局所の腫瘍免疫応答を知る上で重要な知見と考えられる。

3. 研究方法の正確性

患者は三施設で集積され、臨床病理学的に診断がなされ、その診療録を参考に検討が

されている。EBV⁺ DLBCL 患者の診断基準を明確し、多方面での予後因子の検討が行われている。PD-L1、PD1 の免疫組織化学は既に文献的に報告され確立された方法で、コントロール検体と共に自動免疫染色装置で施行されている。染色方法のカットオフ値は過去の文献に基づき設定しており、妥当と判断される。

4. 表現の明確さ

本論文は英語論文であり、既に Clinical and Experimental Medicine に掲載された。本雑誌による専門性の高い複数の査読者による厳密な査読を経て、目的、方法、結果、考察が簡潔かつ明瞭に記載されている。

5. 主な質疑応答

Q1: 対象が 3 群 (EBV⁺ DLBCL、MTX⁺/EBV⁺ BLPDs、EBV(-)DLBCL, nonGC) であることが解釈を難しくしている。MTX⁺/EBV⁺ BLPDs 群との比較は必要だったのか?

A1: DLBCL 様の形態を呈し、EBER 陽性であるという点で EBV⁺ DLBCL、MTX⁺/EBV⁺ BLPDs は共通している。病理組織形態学的な類似点を持つ 2 群の比較検討は重要であると考え、今回検討している。

Q2: 過去の報告では EBV⁺ DLBCL 群と EBV(-) DLBCL 群の予後に差があると背景で述べたが、今回は 2 群で差がなかった。その理由は何か?

A2: EBV(-) DLBCL 群では nonGC 型と比較し GC 型は予後良好である。今回、一般的な EBV⁺ DLBCL の形質 (nonGC 型) と合わせるために、EBV(-) DLBCL 群を nonGC 型のみに絞り抽出した。形質を nonGC 型に絞ったため GC 型を含んだ場合の EBV(-) DLBCL 全体よりも予後が不良となったことが原因である。

Q3: DLBCL における EBV⁺ DLBCL 群の割合は? 人種間の差はあるのか?

A3: DLBCL の形態を呈するものの中では 5-6%といわれており、東南アジアでの報告が多い。

Q4: EBV⁺ DLBCL を発症する原因はわかっているか?

A4: WHO の成書では明確な原因については「不明」とされている。また、加齢による免疫低下により、EBV 感染細胞に対する特異免疫が低下し、EBV⁺ DLBCL を発症する可能性について言及されている。

Q5: MTX⁺/EBV⁺ BLPDs はなぜ起こるのか？

A5: RA 患者に対する MTX 治療投与に伴う免疫抑制による EBV⁺ B 細胞の増殖が原因と考える。RA の背景がある状態でさらに MTX を使うことで、LPDs が起こっているという認識が重要である。

Q6: EBV⁺ DLBCL の症例は EBV 感染の既往があるのか？

A6: いずれもかなり以前の既往が推測され、今回再活性状態として EBV⁺ DLBCL を呈していると考ええる。

Q7: 慢性活動性 EBV 感染症 (CAEBV) や伝染性単核球症が過去にあった人は、EBV⁺ DLBCL になりやすいのか？EBV⁺ DLBCL 発症を予測することは可能か？

A7: 今回の EBV⁺ DLBCL 群 38 例には、CAEBV の既往を持つ症例は認めなかった。CAEBV は T/NK 細胞への EBV 感染を認める点や明確な腫瘍性増殖ではない点など、EBV⁺ DLBCL との違いがある。EBV⁺ DLBCL 発症の予測に関しては現時点では困難と考える。

Q8: EBV⁺ DLBCL 群の予後因子について、多変量で抽出された項目はないか？

A8: 症例数が少ないため安定した多変量解析は困難であると判断し多変量解析は行っておらず、単変量解析のみでの結果をお示ししている。

Q9: PD-L1 の発現は EBV とどう関係するのか？

A9: EBV 陽性腫瘍細胞は LMP1、EBNA2 を介して PD-L1 発現を増強させる事は過去に報告があり、かつ本検討においても EBNA2 と PD-L1 は相関を認めた。他の PD-L1 発現に関する因子として WNT signal の可能性を考えている。WNT signal は EBV (-) DLBCL と比較した際の EBV⁺ DLBCL の特徴であるとする報告があり、かつ WNT signal と PD-L1 発現が関連する報告があるためである。今回、RNA など sequence は確認できていない。

Q10: Covid19 は高齢者で増悪しやすい。その理由として、加齢により常時軽度の炎症が慢性的に起こっており、Covid19 感染によりサイトカインストームが起こることが報告されている。同じようなことが EBV⁺ DLBCL でも起こっているのではないか？

A10: 高齢者に起こるという点で共通点があり、その可能性はあるかもしれない。

Q11: EBV⁺ DLBCL 群に対する PD-L1/PD1 経路に免疫チェックポイント阻害薬は効果があると考えるか？

A11: 効果がある可能性があるがはっきり言えない。実際に EBV⁺ DLBCL 群に対して抗 PD1 抗体を使用した報告がある。その報告は、DLBCL の標準治療の効果が乏しく、かつ骨髄移植の適応の無かった症例に限られており、さらに抗 PD1 抗体単剤での使用であった。その他薬剤との併用、投与タイミングなどの使用方法を含めて EBV⁺ DLBCL 群に対する有用性を検討する必要がある段階と考える。

Q12: EBV⁺ DLBCL 群と同様に、EBV(-) DLBCL 群は PD1⁺ TIL の低反応がある。これは腫瘍細胞の PD-L1 以外の何かに関連しているのではないか？

A12: EBV(-) DLBCL, nonGC 群における PD1⁺ TIL の低反応の原因に関しては不明である。より多くの症例で検討が必要な点である。

Q13: EBV(-) DLBCL, nonGC 群で PD-L1、PD1 は予後に関わったか？

A13: 今回の検討においては予後に関わらなかった。

Q14: CD30 について、EBV(-) DLBCL, nonGC 群と比較し EBV⁺ DLBCL 群で陽性率が高い。この点について、さらに詳しく聞きたい。

A14: CD30 の普段の機能に関しては不明なことが多い。未分化大細胞リンパ腫など予後不良なリンパ腫に出てくるマーカーである。EBV⁺ DLBCL 群においては EBER 陽性の大型腫瘍細胞に一致して CD30 は陽性であり、EBV⁺ DLBCL において重要なマーカーであると考えられる。

本論文は、内容の斬新さ、重要性、研究方法の正確性、表現の明確さおよび質疑応答の結果を踏まえ、審査員全員での討議の結果、学位論文に値し、学位申請者についても学位授与に値すると評価された。