



|              |  |
|--------------|--|
| Title        | 末梢血のmulticolor flowcytometryとliquid biopsyによるcell-free DNAのRHOAG17V変異解析を組み合わせた血管免疫芽球性T細胞リンパ腫解析法の確立 および ホジキンリンパ腫細胞株(AM-HLH)の樹立  |
| Author(s)    | 林田, 雅彦   |
| Citation     | 大阪大学, 2022, 博士論文   |
| Version Type |  |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/89462">https://hdl.handle.net/11094/89462</a>  |
| rights       |  |
| Note         | やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、<a href=" <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> ">大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。 |

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

## 論文内容の要旨

|  |  |
|--|--|
| 氏名 ( 林田 雅彦 )   |  |
| 論文題名   | 末梢血のmulticolor flowcytometryとliquid biopsyによるcell-free DNAの <i>RHOA</i> <sup>G17V</sup> 変異解析を組み合わせた血管免疫芽球性T細胞リンパ腫解析法の確立 および ホジキンリンパ腫細胞株(AM-HLH)の樹立 |
| 論文内容の要旨  |  |
| <p>血管免疫芽球性T細胞リンパ腫 (AITL) の診断は、腫瘍細胞が少なく反応性の炎症組織やホジキンリンパ腫 (HL) との鑑別がしばしば困難である。病理組織診断には生検組織が必要であり、生検困難例や節外性の組織では診断に苦慮する。そこで我々は、AITLの補助診断を目的に細胞を高精度に分画することができるマルチカラー・フローサイトメトリー (M-FCM) と<i>RHOA</i>遺伝子変異解析のための高感度なallele specific-PCR法を構築し、末梢血白血球および血漿cell free DNA (cf-DNA) を用いたLiquid biopsyを確立した。</p> <p>20例の解析では、M-FCMにより全例で循環腫瘍細胞を検出でき、末梢血白血球に占めるリンパ腫細胞は0.01～18.22% (中央値0.26%)、絶対数は0.5～1491.6 個/<math>\mu</math>L (同29.3個) であった。cfDNAによる<i>RHOA</i>変異は14例 (70%)、<i>IDH2</i>変異は3例 (15%) (<i>RHOA</i>変異と重複) で認め、これらの結果はリンパ節、末梢血、骨髄、腹水などと一致したことから、末梢血のM-FCMとリキッドバイオシーであるcfDNAの<i>RHOA</i><sup>G17V</sup>変異解析の組み合わせは、AITLの非侵襲的な迅速診断法として有用と考えられた。</p> <p>一方、HLは、腫瘍細胞の特異な形態で特徴づけられ、病型診断は確立されているものの病変組織に占める腫瘍細胞が少ないとことから、細胞株は系統や起源、発症のメカニズムの解明、抗がん剤のスクリーニングに有用なツールである。我々はEBウイルス (EBV) 陽性結節硬化型HL患者の胸水から細胞株 (AM-HLH) を樹立した。その免疫表現型はCD30<sup>+</sup>、CD15<sup>-</sup>、CD2、CD38、CD40、CD45RO、CD71、CD86、CD122、HLA-DRを高発現し、抗原受容体遺伝子解析では免疫グロブリンκ鎖遺伝子の再構成を認めた。染色体数は近3倍体で多数の数的・構造異常を認め、multicolor-FISHで19、20、21番染色体から形成されるder(21)マーカー染色体を認めた。In situ hybridizationではEBER陽性、RT-PCRでLMP1、LMP2、EBNA1、EBNA2の転写産物を検出した。サザンプロットによるEBVのクロナリティ解析では、高分子量のバンドを3本認め、患者胸水の解析結果と一致した。EBVゲノムプローブによるEBV-FISHでは、der(21)マーカー染色体の20番染色体成分上の3ヶ所にシグナルが集積していた。培養上清中のサイトカインの測定では、IL-10と微量のIL-17Aを認め、PMA刺激によって顕著に増加した。AM-HLH細胞はEBV陽性HL発症におけるサイトカインの役割を明らかにする上で有用であると考えられた。</p> |  |

## 論文審査の結果の要旨及び担当者

|          |    |    |      |
|----------|----|----|------|
| 氏名(林田雅彦) |    |    |      |
| (職)      |    | 氏名 |      |
| 論文審査担当者  | 主査 | 教授 | 渡邊幹夫 |
|          | 副査 | 教授 | 山本浩文 |
|          | 副査 | 教授 | 尾路祐介 |

## 論文審査の結果の要旨

血管免疫芽球性T細胞リンパ腫(AITL)の診断は、腫瘍細胞が少なく反応性の炎症組織やホジキンリンパ腫(HL)との鑑別がしばしば困難である。病理組織診断にはリンパ節生検が必要であり、生検困難例や非節性病変では診断に苦慮する。そこで本論文では、AITLの補助診断を目的に高精度の細胞分画が可能なマルチカラー・フローサイトメトリー(M-FCM)と*RHOA*<sup>G17V</sup>遺伝子変異解析のための高感度なallele specific-PCR法を確立し、末梢血白血球および血漿cell-free DNA(cf-DNA)を用いたliquid biopsyの開発を行った。20例の解析では、M-FCMにより全例で循環腫瘍細胞を検出でき、末梢血白血球に占めるリンパ腫細胞は0.01～18.22% (同0.26%)、絶対数は0.5～1491.6 個/μL (同29.3個) であった。cf-DNAによる*RHOA*<sup>G17V</sup>変異は14例(70%)で認め、これらの結果はリンパ節、末梢血、骨髄、腹水などと一致した。

一方、HLは、腫瘍細胞の特異な形態で特徴づけられ病型診断はほぼ確立されているものの病変組織に占める腫瘍細胞が少なく、細胞系統や起源、発症のメカニズムの解明に細胞株は有用なツールである。本論文ではEBウイルス(EBV)陽性結節硬化型HL患者の胸水から細胞株(AM-HLH)を樹立している。その免疫形質はCD30<sup>+</sup>、CD15<sup>-</sup>で、CD2、CD38、CD40、CD45RO、CD71、CD86、CD122、HLA-DRを高発現し、抗原受容体遺伝子解析では免疫グロブリンκ鎖遺伝子の再構成を認めた。染色体数は近3倍体で多数の数的・構造異常を認め、multicolor-FISHで19、20、21番染色体から形成されるder(21)マーカー染色体を認めた。In situ hybridizationでEBER陽性、RT-PCRでLMP1、LMP2、EBNA1、EBNA2の転写産物を検出した。サザンブロットによるEBVのクロナリティ解析では、高分子量のバンドを3本認め、患者胸水の解析結果と一致した。EBVゲノムプローブによるEBV-FISHでは、der(21)マーカー染色体の20番染色体成分上に多数のシグナルが集積していた。培養上清中のサイトカインの測定では、IL-10と微量のIL-17Aを認め、PMA刺激によって顕著に増加した。このようにAM-HLH細胞株はEBV陽性HL発症におけるサイトカインの役割を明らかにする上で有用であると考えられた。

このように、本論文はリンパ腫特にAITLの診断について新たな臨床検査上のアプローチを確立し、またHL症例における免疫動態を明らかにし将来の臨床検査開発の基盤データとなる研究であり、博士(保健学)の学位授与に値するものと考える。