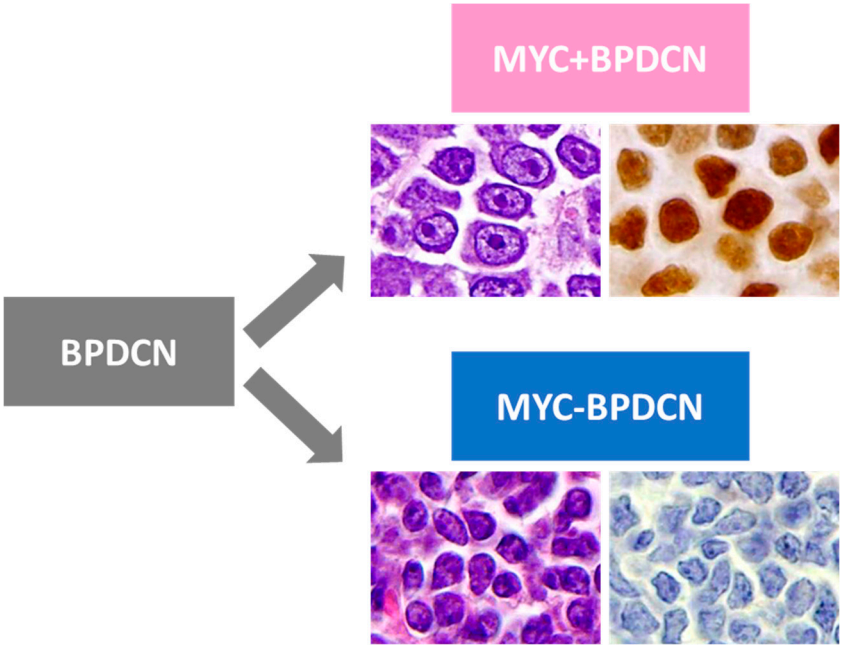
224　MYC陽性BPDCN：疾患概念の提唱と病態解明・治療法開発	坂本　佳奈

【目的】芽球性形質細胞様樹状細胞腫瘍（blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm：BPDCN）は、未分化な形質細胞様樹状細胞由来とされる稀な造血器腫瘍である。典型的には皮膚病変で発症し、当初は化学療法に反応することが多いものの早期に再発、白血化し、生存期間中央値が 10〜20 か月程度の予後不良な疾患である。疾患概念確立の遅れと疾患の稀少性により診断は容易でなく、実地診療において急性骨髄性白血病など他の造血器腫瘍との鑑別がしばしば困難となる。標準治療は定まっておらず、前述のごとく予後不良な疾患であるため、分子病態の理解および分子標的の同定が強く求められている。我々は、BPDCN と診断／疑診された症例の検体・臨床情報を収集し、厳密な病理組織学的検討により急性骨髄性白血病等の混在を排し、その結果選別された 118 例の BPDCN 症例群の病理学的解析により、BPDCN が、MYC の遺伝子再構成と発現異常を認める MYC^+ BPDCN（約 1／3）と、それらを認めない MYC^- BPDCN（約 2／3）に層別化されることを突き止めた。BPDCN が MYC 異常の有無により別個の疾患概念として分類されるべきなのか検討するため、一層の症例集積とゼノグラフトモデルの構築等を通じて、BPDCN の病態解明・治療法開発の基盤づくりを目指した。

【方法】協力機関各施設で BPDCN と診断、あるいは疑診された症例について、厳密な病理組織学的評価により BPDCN の診断確認を行い、非 BPDCN 症例を除外した。免疫染色、FISH 法を用いて MYC^+ BPDCN と MYC^- BPDCN に分類した。これらの症例について、条件の整った検体が得られた場合、ゼノグラフトモデルの作製を試みた。

【結果】稀少疾患である BPDCN の症例集積につながるシステムを整備し、症例集積を進めた。収集した症例について、MYC 異常の有無を含む詳細な臨床病理学的解析を行った。ゼノグラフトモデルを作製し、今後の BPDCN の病態解明、ひいては治療法開発の基盤を築いた。

BPDCN の MYC 異常による層別化



224. MYC 陽性 BPDCN：疾患概念の提唱と病態解明・治療法開発

坂本　佳奈

がん研究会 がん研究所 分子標的病理プロジェクト 病理部

Key words：芽球性形質細胞様樹状細胞腫瘍，BPDCN，MYC，FISH

緒　言

芽球性形質細胞様樹状細胞腫瘍（blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm：BPDCN）は、未分化な形質細胞様樹状細胞（plasmacytoid dendritic cell：pDC）由来とされる稀な造血器腫瘍である。典型的には皮膚病変で発症し、当初は化学療法に反応することが多いものの早期に再発、白血化し、生存期間中央値が 10～20 か月程度の予後不良な疾患である。1994 年に CD4 と CD56 が陽性で T 細胞性マーカーが陰性の皮膚リンパ腫として報告され［1］、以後、様々な名称で散発的に症例報告等がなされていた［2］。1999 年にこの疾患の腫瘍細胞が pDC と同様に CD123 陽性であることが報告されたが［3］、一方では NK 細胞由来と考えられ、WHO 分類第 3 版では blastic NK-cell lymphoma と呼称された。その後、pDC 由来の腫瘍であることを支持する報告が続き［4，5］、WHO 分類第 4 版（2008 年公刊）では BPDCN という名称で急性骨髄性白血病（acute myeloid leukemia：AML）関連腫瘍に含まれる独立した疾患概念として掲載された。WHO 分類改訂第 4 版（2017 年公刊）では、AML 関連腫瘍から独立し単独のカテゴリーとなっている［6］。疾患概念確立の遅れと疾患の稀少性により診断は容易でなく、実地診療において他の造血器腫瘍（特に AML）との鑑別がしばしば困難となる。標準治療は定まっておらず、前述のごとく予後不良な疾患であるため、分子病態の理解および分子標的の同定が強く求められている。

病態については、array CGH 等により *CDKN2A／CDKN2B*、*RB1* など複数のがん抑制遺伝子の欠失が示されてきた［7］。最近では、次世代シークエンサーを用いた解析により、*TET2* や *ASXL1* などの epigenetic pathway 関連遺伝子の変異、*NRAS* 変異等が報告されている［8］。しかし、BPDCN において臨床的意義を示されたゲノム異常はなく、治療標的あるいはバイオマーカーとなる異常は同定されてこなかった。

上記の状況を踏まえ、我々は、この稀少疾患の研究に不可欠な多施設との協力体制を新規に構築し、各施設で BPDCN と診断／疑診された症例の検体・臨床情報を収集した。厳密な病理組織学的検討により AML 等の混在を排し、その結果選別された 118 例の BPDCN 症例群の病理学的解析により、BPDCN が、MYC の遺伝子再構成と発現異常を認める MYC^+ BPDCN（約 1／3）と、それらを認めない MYC^- BPDCN（約 2／3）に層別化されることを突き止めた。また、前者は特異な細胞形態（免疫芽球様型）、後者は通常の細胞形態（標準型）を呈することも明らかにした。MYC^+ BPDCN と MYC^- BPDCN は臨床的にも発症年齢や皮膚病変の特徴が異なり、MYC^+ BPDCN はより予後不良であった。さらに、MYC^+ BPDCN 細胞株と MYC^- BPDCN 細胞株の遺伝子発現プロファイルを比較すると、MYC はその差異をもたらす代表的な分子の一つであった。また、*MYC* をノックダウンすると MYC^+ BPDCN 細胞株の生存性が抑制され、その生存に MYC が重要な役割を果たしていることが示唆された。薬剤感受性実験では、MYC を間接的に抑制する BET 阻害薬等が MYC^- BPDCN 細胞株に比し MYC^+ BPDCN 細胞株の増殖を強く抑制することを見出した［9］。これらの知見から、MYC 異常をバイオマーカーとして BPDCN の治療戦略が将来的に異なる可能性が示唆された。

BPDCN が MYC 異常の有無により別個の疾患概念として分類されるべきなのか ――この命題について検討するため、一層の症例集積を目指しシステムを整備し、症例集積を進めた。収集した症例について、MYC 異常の有無を含む詳細な臨床病理学的解析を行った。また、この稀少疾患のゼノグラフトモデルの構築にも取り組み、今後の BPDCN の病態解明、ひいては治療法開発の基盤を築いた。

方　法

1. 症例収集

協力機関各施設で BPDCN あるいは以前の診断名である blastic NK-cell lymphoma と診断、あるいは疑診された症例について、未染色標本、新鮮／凍結検体、臨床情報を収集した。収集した症例について、免疫染色および蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション（fluorescence *in situ* hybridization：FISH）法を用いて、BPDCN の診断確認を行い、非 BPDCN 症例を除外した。

2. 細胞形態評価、免疫染色、FISH

1〜4 μm 厚にスライスしたホルマリン固定パラフィン包埋検体未染色切片に対し、HE 染色、免疫染色（各種 pDC マーカー、MYC 等）および FISH 法を行った。腫瘍細胞の形態を評価し、中等大の不整形核と少量から中等量の細胞質を持ち、核小体は不明瞭、または 1 つ〜数個の小さなものがみられる標準型 BPDCN（classic BPDCN）と、類円形空胞状の核、好塩基性で中等量の細胞質と光輝性の大きな中心性核小体を 1 つ持つ、免疫芽球（immunoblast）に似た“immunoblastoid cell”を主体とする免疫芽球様型 BPDCN（immunoblastoid BPDCN）に分類した［9］。FISH 法については、8q24 に遺伝子座を持つ *MYC* に対し、Bacterial artificial chromosome（BAC）クローンから作製した DNA プローブを用いた［9］。ハイブリダイズさせたスライドは、4', 6-diamidino-2-phenylindole（DAPI）で対比染色を行い、蛍光顕微鏡 BX51（Olympus）を用いて観察した。MYC 免疫染色、*MYC* split FISH 解析がともに陽性であった場合に MYC^+ BPDCN、ともに陰性であった場合に MYC^- BPDCN として、分類した。

3. ゼノグラフトモデル作製

質・量ともに十分な新鮮検体が得られた場合、ゼノグラフトモデルの作製を試みた。免疫不全マウスに、臨床検体から分離した腫瘍細胞を移植した。その後増殖した腫瘍の検体を採取し、免疫染色、FISH 解析を行った。また、マウスから採取した脾臓の細胞を、抗ヒト CD45 抗体、抗マウス CD45 抗体、Fixable Viability Dye eFluor 780（Thermo Fisher Scientific）で染色し、BD FACSMelody セルソーター（BD Biosciences）を用いてフローサイトメトリー解析を行った。

結果および考察

1. 症例集積と MYC 異常の有無による分類

本邦での新規患者が年間平均 20 例未満の稀少疾患であるため、症例の集積は非常に困難であった。一方、前述のごとく実臨床において正確に診断することが容易でないことは、各機関で BPDCN と診断／疑診された症例 154 例中、詳細な病理組織学的評価により BPDCN と確定できたのが 118 例にすぎなかったことからも示されていた［9］。そこで、研究の紹介・症例収集と並行し、診断未確定症例の診断コンサルテーションも請け負うことで研究のみならず診療に資することも目指し、ホームページ（https://bpdcn.jp/）を開設した（図 1）。このような試みを通じて研究協力機関は増加し、収集された BPDCN と診断または疑診された症例は 267 例（累積）であった。このうち 200 例で BPDCN の診断を確定した。うち MYC 異常の有無が評価可能であったのは 191 例であった。これらのうち、65 例（34%）が MYC^+ BPDCN、106 例（55%）が MYC^- BPDCN と診断された。細胞形態と MYC 異常の間にみられる遺伝子型－表現型相関も確認された。BPDCN における MYC^+ BPDCN と MYC^- BPDCN の占める割合は、症例数が増加しても同様であり、1／3 以上の症例で MYC 異常がみられることが明らかになった。また、稀少疾患の研究においてまず大きな障壁となる症例集積のための体制を整えることができ、今後の研究発展の基盤が整備されたと考える。



図 1. 作成したホームページ

作成したホームページのトップページ画像。疾患の説明、研究紹介、診断コンサルテーションの受付等を行う。

2. ゼノグラフトモデルの構築

患者由来新鮮腫瘍検体を免疫不全マウスに移植し、一定期間経過後に腫瘍の出現・増大をみた 1 例を示す。この腫瘍を採取しホルマリン固定パラフィン包埋検体を作製した。免疫染色を行ったところ、CD123、TCL1、BDCA2／CD303 等の pDC マーカーが陽性かつ、MYC 免疫染色陽性、*MYC* split FISH 陽性であり、MYC^{+} BPDCN の腫瘍組織であることが確認された（図 2）。

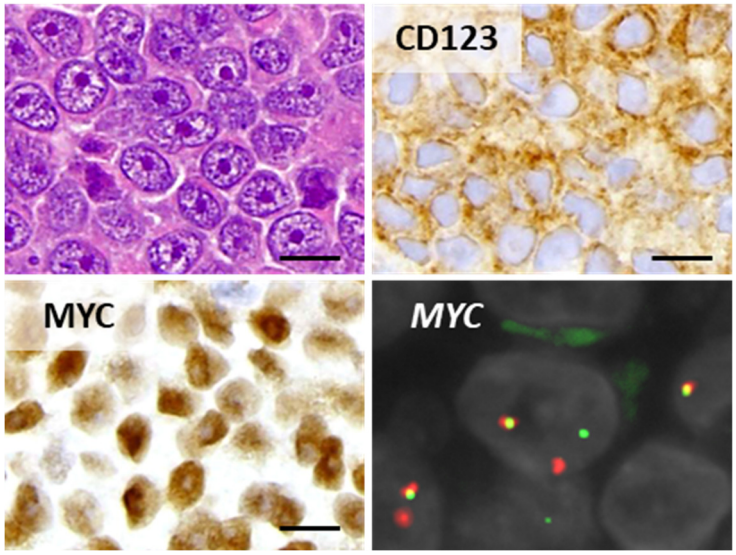


図 2. ゼノグラフトモデル

患者検体同様に腫瘍細胞形態は免疫芽球様型であり、免疫染色で CD123 陽性、MYC 陽性であった。*MYC* split FISH 解析でも split 陽性が確認された（スケールバー：20 μm）。

次に、患者腫瘍細胞を免疫不全マウスに移植後、一定期間経過後に採取したマウス脾臓細胞のフローサイトメトリー解析の結果の 1 例を示す。ヒト CD45 陽性細胞が解析可能な生細胞群の 97.8%を占めていた（図 3）。また、免疫染色により、CD123、TCL1、BDCA2／CD303 等の pDC マーカーが陽性であり、BPDCN 細胞であることが確認された。

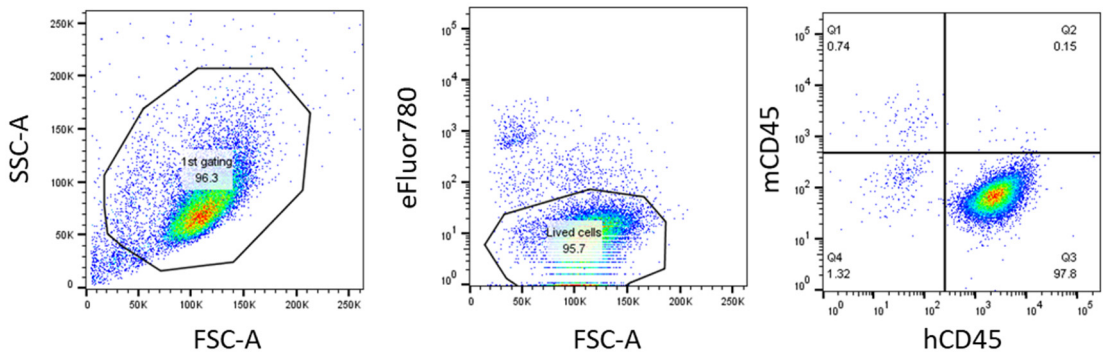


図 3. マウス脾臓細胞のフローサイトメトリー解析
eFluor780 陰性の細胞群（lived cells）の 97.8%は、human CD45 陽性、mouse CD45 陰性であった。

上記のように作製されたゼノグラフトモデルは、いまだ不明な点の多い BPDCN の病態解明および薬剤反応性解析等への基盤となると考えられる。予後不良疾患である BPDCN に有効な治療法の開発への寄与が期待される。

共同研究者・謝辞

本研究のご指導をいただいた、がん研究会がん研究所分子標的病理プロジェクト・病理部の竹内賢吾部長に感謝申し上げます。また、がん研究会がん化学療法センター基礎研究部の片山量平部長、試料・情報を提供いただいた多数の協力機関の先生方、そして本研究に対しご支援を賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝いたします。

文　献

1) Adachi M, Maeda K, Takekawa M, Hinoda Y, Imai K, Sugiyama S, et al. High expression of CD56 (N-CAM) in a patient with cutaneous CD4-positive lymphoma. Am J Hematol. 1994;47(4):278-82. PMID: 7526680 DOI: 10.1002/ajh.2830470406..
2) Petrella T, Dalac S, Maynadie M, Mugneret F, Thomine E, Courville P, et al. CD4+ CD56+ cutaneous neoplasms: a distinct hematological entity? Groupe Francais d'Etude des Lymphomes Cutanes (GFELC). Am J Surg Pathol. 1999;23(2):137-46. PMID: 9989839 DOI: 10.1097/00000478-199902000-00001.
3) Lucio P, Parreira A, Orfao A. CD123hi dendritic cell lymphoma: an unusual case of non-Hodgkin lymphoma. Ann Intern Med. 1999;131(7):549-50. PMID: 10507983 DOI: 10.7326/0003-4819-131-7-199910050-00035.
4) Petrella T, Meijer CJ, Dalac S, Willemze R, Maynadie M, Machet L, et al. TCL1 and CLA expression in agranular CD4/CD56 hematodermic neoplasms (blastic NK-cell lymphomas) and leukemia cutis. Am J Clin Pathol. 2004;122(2):307-13. PMID: 15323148 DOI: 10.1309/0QPP-AVTU-PCV9-UCLV.
5) Chaperot L, Perrot I, Jacob MC, Blanchard D, Salaun V, Deneys V, et al. Leukemic plasmacytoid dendritic cells share phenotypic and functional features with their normal counterparts. Eur J Immunol. 2004;34(2):418-26. PMID: 14768046 DOI: 10.1002/eji.200324531.
6) Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, et al. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Revised 4th ed. Lyon: IARC; 2017.

7) Lucioni M, Novara F, Fiandrino G, Riboni R, Fanoni D, Arra M, et al. Twenty-one cases of blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm: focus on biallelic locus 9p21.3 deletion. Blood. 2011;118(17):4591-4. PMID: 21900200 DOI: 10.1182/blood-2011-03-337501.

8) Stenzinger A, Endris V, Pfarr N, Andrulis M, Johrens K, Klauschen F, et al. Targeted ultra-deep sequencing reveals recurrent and mutually exclusive mutations of cancer genes in blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm. Oncotarget. 2014;5(15):6404-13. PMID: 25115387 DOI: 10.18632/oncotarget.2223

9) Sakamoto K, Katayama R, Asaka R, Sakata S, Baba S, Nakasone H, et al. Recurrent 8q24 rearrangement in blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm: association with immunoblastoid cytomorphology, MYC expression, and drug response. Leukemia.2018 Dec;32(12):2590-2603. PMID: 29795241 DOI: 10.1038/s41375-018-0154-5.