

財団法人日中医学協会
2004年度共同研究等助成金－調査・共同研究－報告書

2005 年 3 月 3 日

財団法人 日 中 医 学 協 会 御中

貴財団より助成金を受領して行った研究テーマについて報告いたします。

添付資料： 研究報告書



受給者氏名： 瀬戸 加大

所属機関名： 愛知県がんセンター

所属部署： 遺伝子医療研究部 職名： 部長

〒 464-8681
所在地： 名古屋市千種区鹿子殿 1-1

電話： 052-762-6111 内線： 7080

1. 助成金額： 900,000 円

2. 研究テーマ

日本-中国における悪性リンパ腫の細胞遺伝学的比較研究

3. 成果の概要 (100字程度)

日本人濾胞性リンパ腫と CD10 陽性びまん性大細胞型 B 細胞性リンパ腫 (CD10+DLBCL) と中国人 DLBCL を CGH 法と組織 FISH 法で解析し、CD10+DLBCL は濾胞性リンパ腫とは異なる由来であることを明らかにした。

4. 研究組織

日本側研究者氏名： 瀬戸 加大 職名： 部長

所属機関： 愛知県がんセンター 部署： 遺伝子医療研究部

中国側研究者氏名： Zhang Xiaohua 職名： 講師

所属機関： 延安大学医学部 部署： 病理学教室

日本-中国における悪性リンパ腫の細胞遺伝学的比較研究

研究者氏名	瀬戸 加大
日本研究機関	愛知県がんセンター遺伝子医療研究部
中国共同研究機関	延安大学医学部病理学教室
中国研究者氏名	Zhang Xiaohua 講師
指導責任者 部長	瀬戸 加大
共同研究者氏名	田川博之、シバスンダラム・カルナン、 Jinfen Wang, Zinfen Gao

要旨

悪性リンパ腫は地理学的地域や人種により、病型ごとの発生頻度が異なる。この差異は、病理診断上の人的差異によるのか、真にリンパ腫の病型による発生頻度そのものが異なるのか明確ではなかった。近年、新 WHO 分類が導入され、日本、韓国から 3000 症例近くの報告がなされ、地域により、リンパ腫の病型による発症頻度が明らかに異なることが示された。新 WHO 分類は、さまざまな抗体、細胞遺伝学的解析、臨床病態などが取り入れられ、客観性が増したものの、これらの解析ができないところでは、比較研究することが困難である。本共同研究により、Zhang Xiaohua 博士に細胞遺伝学的手技、すなわち Comparative genomic hybridization (CGH) 法を取得してもらい、共同研究を進める基盤を作ることができた。それらの細胞遺伝学的手技を用いて、日本人濾胞性リンパ腫 (FL) と同じ分化段階の CD10+びまん性大細胞型 B 細胞性リンパ腫 (DLBCL) を CGH 解析ならびに、パラフィンブロックを用いた組織 FISH 法で解析したところ、両者には明確なゲノム異常の差があることを解明し、CD10+DLBCL は濾胞性リンパ腫から由来したものではないことを報告した。

Key Words: 悪性リンパ腫、CGH、Tissue FISH、濾胞性リンパ腫、びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫

緒言

悪性リンパ腫は地理学的地域や人種により、病型ごとの発生頻度が異なることが指摘されているが、この差異は、病理診断上の人的差異によるのか、真にリンパ腫の病型による発生頻度そのものが異なるのか明確ではなかった。近年、新 WHO 分類が導入され、日本、韓国から 3000 症例近くの報告がなされ、地域により、リンパ腫の病型による発症頻度が異なることが示されてきた。新 WHO 分類は、さまざまな抗体、細胞遺伝学的解析、臨床病態などが取り入れられ、客観性が増したものの、これらの解析ができないところでは、比較研究することが困難である。

また、悪性リンパ腫の中でも DLBCL は複数の疾患単位を含むことが明らかになっているものの、それらを区別するための優れた標準となるマーカーはない。DLBCL はこれまで細胞表面マーカーが有用であり、CD5 抗原を発現するグループ、CD10 抗原を発現するグループが異なる病態を取ることが我々のグループにより最初に報告され、その後、いくつかの大規模研究で確認されている (Seto M., Cancer Science, 2004)。

現在、CD10 陽性の DLBCL については、同じマーカーを有する濾胞性リンパ腫から進展して形成されたという考えと、濾胞性リンパ腫とはまったく異なるリンパ腫であるという考え方がある。これらを明らかにするためには、CGH 法や FISH 法を用いて、染色体転座の頻度ならびにゲノム異常様式を調べることで、明らかにできる可能性が高い。本研究は、この点を明らかにすることを目的として行ったが、同時に Zhang Xiaohua 博士にその手技を学んでもらい、今後、中国人悪性リンパ腫症例の解析をさらに進展させるための基盤を形成することを目的とした。

対象と方法

日本人濾胞性リンパ腫 40 症例、CD10+DLBCL 19 例を用いた。また、中国人 DLBCL 10 症例 (CD10 の情報なし) を、比較のため用いた。また、中国人病理組織の免疫染色性を確認するため、マントル細胞症例 2 例を用いて免疫染色を試

行した。日本人症例はすべて、初発時の検体を用いた。今回の調査研究で、細胞遺伝学的な手法や種々の抗体を用いて規定される新 WHO 分類は、中国では、ごく一部の専門病院でしか実施が困難であることが判明した。今回、日本人症例で細胞遺伝学的手法を用いて解析を進め、その後、中国人症例を検討した。日本人症例は CGH 法を施行できたが、中国人症例からは DNA が得られなかったため、Tissue FISH 法だけを施行した。

CGH 法と FISH 法の詳細については発表論文に記載してあるとおりである (Zhang ら, Cancer Science, 2004)。簡単に記載すると、CGH 法はリンパ腫由来の DNA を FITC、正常由来の DNA を Texas Red で標識し、等量混ぜて、スライドグラスに貼り付けられた正常男性染色体に反応させ、リンパ腫由来の DNA の増幅や欠失をコンピュータでスキャンし判定する。各染色体それぞれ、少なくとも 10 個以上のデータを集積する。組織 FISH は、パラフィン包埋切片 (6 μ m 厚) を脱パラフィン後、Proteinase K 処理後、通常の FISH 法と同様の処理をする。少なくとも各検体 200 個以上の細胞につきシグナルを数える。用いたプローブは、LSI IGH/BCL2 Dual Color, Dual Fusion Translocation probe (Vysis: http://www.vysis.com/LSIIGHBCL2DualColorDualFusionTranslocationProbe_4988.asp?bhcp=1) である。詳細な実験方法は、Vysis 社のプロトコールに従った。

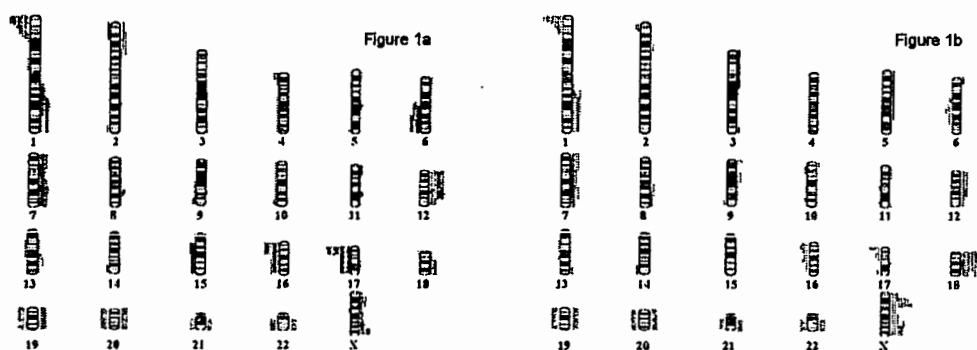
結果

1. CGH 解析の結果 (図 1)

濾胞性リンパ腫は CGH 法により、40 症例中 27 例でゲノム異常が認められたのに対し、CD10+DLBCL は 19 症例中 19 症例すべてに、ゲノム異常が認められた。異常の認められたものを図にまとめて示す (Figure 1a と 1b)。DLBCL 症例と濾胞性リンパ腫症例では、ゲノム異常の頻度と異常領域の場所が異なることが明らかになった。各領域について、有意差検定も行った (表 1)

2. 組織 FISH による BCL2 転座の頻度 (表 1)

BCL2 転座は CD10+DLBCL では組織 FISH が試行できた 17 例中 5 症例 (29%) に認められたが、濾胞性リンパ腫は 37 例中 27 症例 (73%) に BCL2 転座が認められ、両者の頻度に有意差 ($p=0.0035$) を認めた。10 症例の中国人検体では組織 FISH では、明確な結果が認められなかった。マンツル細胞リンパ腫 2 症例で cyclin D1 の免疫染色を試行したところ、明瞭な陽性反応が得られたので、組織の処理法に問題があるのではなく、切片の厚さ及びスライドグラスが無蛍光でないことが、組織 FISH 像が明瞭でない一因かもしれない。



脚注: CD10+DLBCL 19 症例 (1a) と濾胞性リンパ腫 40 症例 (1b) のまとめ。各染色体の左にあるバーは DNA 欠失領域を示し、右側のバーは DNA 増幅領域を示す。

表 1. t(14;18) 転座と CGH 法による DLBCL と濾胞性リンパ腫の比較

Chromosomal aberration	CD10+DLBCL	Follicular lymphoma	P
Gains			
1q	6/19 (31%)	4/40 (17%)	
2p	3/19 (16%)	1/40 (2%)	
7q	7/19 (36%)	5/40 (13%)	0.0417
8q	3/19 (16%)	2/40 (5%)	
9p	1/19 (5%)	4/40 (10%)	
11q	3/19 (16%)	1/40 (2%)	
12	10/19 (52%)	3/40 (7%)	0.0002
13q	3/19 (16%)	1/40 (2%)	
18	4/19 (21%)	10/40 (25%)	
xp11-p21	4/19 (21%)	13/40 (32%)	
Xq25-qter	5/19 (26%)	9/40 (22%)	
Losses			
1p	12/19 (63%)	10/40 (25%)	0.0086
4p	3/19 (16%)	0/40 (0%)	
6q	7/19 (36%)	4/40 (10%)	0.0277
15q	3/19 (16%)	0/40 (0%)	
16p	9/19 (47%)	4/40 (10%)	0.0023
16q	5/19 (26%)	3/40 (7%)	
17p	16/19 (84%)	7/40 (17%)	0.0001
17q	7/19 (36%)	3/40 (7%)	0.0089
t(14;18)	5/17 (29%)	27/37 (73%)	0.0035

DLBCL, diffuse large B-cell lymphoma

考察

悪性リンパ腫はこれまで、種々の分類法が用いられてきた。それぞれの分類法には優れた面と十分でない面が存在し、実際、ヨーロッパとアメリカでは用いられてきた分類が異なっていた。近年、アメリカとヨーロッパを中心とする病理学者たちによる新たな分類 (REAL 分類) が提唱され、それが新 WHO 分類へと発展した。この新しい分類法は、いろいろな情報、すなわち、病理組織学、免疫組織学、細胞遺伝学、臨床病態などを総合的に判断し、分類するものである。この分類法は、多くの賛同が得られ、日本や韓国から大規模な解析結果が報告され、全世界的に受け入れられている。しかし、分類法としては優れていても、実践できるかどうかということになれば、一定の規模以上の医療機関でなければできない項目を多く含んでいる。染色体転座の解析法である FISH や CGH 法は有力な補助診断の一つであるが、すべての医療機関で行うことは難しい。日本では、複数の臨床検査会社で試行可能であるが、中国においては、FISH や CGH 法のような臨床検査を行う会社が全土的にはまだ普及するにいたっていないようである。これら種々の検査法の中で、組織 FISH 法は、試薬とプローブさえ入手すれば、比較的簡単に確立することのできる手法である。また、従来の病理組織診断に用いるホルマリン固定パラフィン包埋切片を用いて試行できることが大きな特徴の一つである。

Zhang らは、CGH 法と組織 FISH 法を用いて、濾胞性リンパ腫とそれから由来すると考えられていた CD10+DLBCL が、遺伝子異常の観点からみると、異なった遺伝子変化により発生する、異なった種類の悪性リンパ腫であることを明確にし論文報告した (Zhang et al., 2004)。本共同研究の大きな成果の一つである。この手法により、同様に中国人症例を 50 例程度解析することで、人種差、地域差の問題についても明らかにすることができると考えている。また、北京大学医学部病理学教室や山西省がんセンターにおける議論では、新 WHO 分類がなかなか普及していない点について、理解することができた。実際、山西省がんセンター病理学部長の Wang 教授は、自ら検体を持って外国 (南カリフォルニア大学) に出かけ、必要な免疫染色を行っている。外国と匹敵する検査が行われている北京大学では、新 WHO 分類が用いられているが、選択された症例があつまるので、悪性リンパ腫の病型の調査には適当ではない。その点では、山西省がんセンターは悪性リンパ腫症例数も年間 300 症例近くあるので、サイズも妥当であり、現在、Wang 教授が免疫組織学的研究を自検例で進めていることは、きわめて重要で悪性リンパ腫研究にとっては意義が高い。同様のそのような機関からの複数の報告を待ちたい。

今回、中国人症例 10 症例について、組織 FISH 解析を行ったにもかかわらず、明瞭な結果が得られなかったのは、残念であったが、その原因は組織の固定法や保存状態などの根本的なところにあるのではなく、切片の厚さを変え、組織 FISH 用のスライドグラスを用いることで改善が期待できる。マントル細胞リンパ腫の免疫組織法で、明瞭な染色結果が得られたので、固定法などには問題なく、十分な検討ができることを意味している。

悪性リンパ腫のゲノム異常の検査には、ごく最近確立された array CGH 法という方法があり、我々の研究室で安定した結果が得られ始めている (Ota et al., 2004; Tagawa et al., 2004; Tagawa et al., 2005)。これらの技術は、現在、質のよい DNA を用いてしか実行されていないが、将来、病理組織由来の DNA を用いても、そのような検討ができるようにする必要がある。すなわち、病理組織用の組織片から抽出した array CGH 法を試みる時期が来つつあるのかもしれない。

診断技術や診断方法は次々と新しく導入されているが、悪性リンパ腫にとって病理診断はきわめて重要な診断的役割を果たしている。従来の病理組織学だけではなく、次々と導入される新たな抗体による免疫組織学的検査を取り入れる必要があるものの、試薬や抗体があれば比較的容易に導入できること、かつ、場所を変えても、十分に検査を行うことができることが明らかとなった。次の段階として、中国人血液病理学者が日本人あるいは欧米の血液病理学者と連携し、中国人悪性リンパ腫の新 WHO 分類による悪性リンパ腫像を明らかにしてほしいと願っている。また、実際にそのような試みが山西省がんセンターの Jifen Wang 教授により試み始められているのは特記すべきことである。今後は病理診断の確定した症例について、本研究のような細胞遺伝学的比較研究を進めていく必要があると考えている。また、悪性リンパ腫の地域集積性を考えると、中国の広大さとその膨大な人口を考えると、国内でも地理的に異なった地域にある研究機関との共同研究が今後必要となってくると考えている。

謝辞

本研究は日中医学協会助成金の補助をうけて行われたものである。北京大学医学部 Zifen Gao 教授の教室員の方々には中国滞在中に大変お世話になった。ここに感謝申し上げます。北京大学医学部特別招請講演、第二回太原国際リンパ腫研究会では、数多くの聴衆の先生方による熱心な討議に大変励まされた。また、延安大学医学部での講義にも多くの聴衆の方々にきていただけたことを感謝します。

参考文献

1. Seto, M.: Genetic and epigenetic factors involved in B-cell lymphomagenesis. *Cancer Sci.*, 95: 704-710, 2004.
2. Zhang, X., Karman, S., Tagawa, H., Suzuki, R., Tsuzuki, S., Hosokawa, Y., Morishima, Y., Nakamura, S., Seto, M.: Comparison of genetic aberrations in CD10⁺ diffused large B-cell lymphoma and follicular lymphoma by comparative genomic hybridization and tissue-fluorescence in situ hybridization. *Cancer Sci.*, 95: 809-814, 2004.
3. Ota, A., Tagawa, H., Karman, S., Suzuki, Y., Karpas, S., Kira, S., Yoshida, Y., Seto, M.: Identification and Characterization of

A Novel Gene, C13orf25, as A Target for 13q31-q32 Amplification in Malignant Lymphoma Cancer Res., 64: 3084-3095, 2004.

4. Tagawa, H., Tsuzuki, S., Suzuki, R., Karnan, S., Ota, A., Matsuo, K., Yamaguchi, M., Morishima, Y., Nakamura, S., Seto, M.: Gnome-Wide Array-based Comparative Genomic Hybridization of Diffuse Large B-Cell Lymphoma: Comparison between CD5-Positive and CD5-Negative Cases. Cancer Res., 64: 5948-5955, 2004.
5. Tagawa, H., Karnan, S., Suzuki, R., Matsuo, K., Zhang, X., Ota, A., Morishima, Y., Nakamura, S., Seto, M.: Genome-wide array-based CGH for mantle cell lymphoma: Identification of homozygous deletions of the proapoptotic gene BIM. Oncogene, 2005, in press.

注) 北京大学医学部特別講演、第二回太原国際悪性リンパ腫シンポジウム、延安大学医学部講義(2004年、5月18-22日)で本研究の一部を発表した。また、本原稿の主要なデータは論文および総説の一部として発表した(Seto M., Cancer Sci., 95: 704-710, 2004; Zhang et al., Cancer Sci., 95: 809-814, 2004)。