

## Thesis

# 眼窩領域MALTリンパ腫の臨床病理学的検討とBCL10蛋白 およびAPI2-MALT1キメラ遺伝子発現について

埼玉医科大学総合医療センター病理部

(指導：糸山 進次教授)

安達 章子

眼窩領域悪性リンパ腫のうち、50-70%はMALTリンパ腫(extranodal marginal zone B-cell lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue)であり、低悪性度B細胞リンパ腫として特異的な臨床病理像を有する。近年MALTリンパ腫の染色体転座t(1;14)(p22;q32)から単離されたBCL10、およびt(11;18)(q21;q21)から単離されたAPI2-MALT1キメラ遺伝子発現が、その腫瘍発生に関与していることが示唆されている。本研究では眼窩領域リンパ増殖性疾患62症例を集積、臨床病理学的解析を行い、眼窩MALTリンパ腫におけるBCL10蛋白およびAPI2-MALT1キメラ遺伝子の発現について検討した。62症例中58症例は悪性リンパ腫、うち50症例はMALTリンパ腫であった。MALTリンパ腫は他のリンパ腫に比べて局在性の傾向があり、再発は16症例に認められたが、予後は概ね良好であった。免疫組織化学染色により、MALTリンパ腫のうち29症例(58%)にBCL10蛋白の核及び胞体への発現が認められ、BCL10核発現が眼窩領域MALTリンパ腫の腫瘍発育に関与していることが示唆された。BCL10核発現と臨床因子(年齢・性・発生部位・臨床病期・再発・再発までの期間)との間に関連性は認められなかった。また初発および再発MALTリンパ腫67検体のパラフィン切片からRNAを抽出し、multiplex RT-PCR法によるAPI2-MALT1キメラ遺伝子の検出を試みたが、発現は認められなかった。すなわち眼窩領域MALTリンパ腫においてはBCL10核発現とAPI2-MALT1キメラ遺伝子発現の関連性は見られず、両者の関連性が報告されている胃や肺MALTリンパ腫とは異なった結果であった。眼窩領域MALTリンパ腫における高頻度のBCL10核発現はAPI2-MALT1キメラ遺伝子以外の、未知の遺伝子変異の関与が示唆された。

## 緒言

眼窩領域悪性リンパ腫は節外性リンパ腫の約8%を占め、そのうち50-70%はextranodal marginal zone B-cell lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue(以下MALTリンパ腫)である<sup>1-3)</sup>。MALTリンパ腫は粘膜を介して外界と接する部位である消化管(胃・腸管)、唾液腺、気管支、肺や胸腺などに形成される粘膜関連リンパ組織(mucosa-associated lymphoid tissue:MALT)から発生する節外性リンパ腫で、低悪性度B細胞リンパ腫として特異的な臨床病理像を有する。発生部位としては上記の他に甲状腺、眼窩、乳腺、皮膚、膀胱などが報告されている。MALTリンパ腫の発生には慢性炎症(ヘリコバクター関連胃炎)や自己免疫疾患(橋本病、シェーグレン症候群)との

医学博士 乙第899号 平成15年10月24日(埼玉医科大学)

関連性が知られており、臨床的には限局性でindolentな経過を辿ることが多い<sup>4)</sup>。組織学的特徴としては、中型の胚中心細胞様細胞(centrocyte-like cell)および単球様B細胞(monocytoid B cell)が瀰漫性に増殖すること、リンパ腫細胞が腺上皮内に浸潤してこれを破壊(lymphoepithelial lesion:LEL)すること、反応性リンパ濾胞の胚中心内にリンパ腫細胞が入り込んで増殖すること(follicular colonization)、形質細胞への分化が認められることなどが挙げられる<sup>4)</sup>。近年MALTリンパ腫と、BCL10やAPI2-MALT1キメラ遺伝子など染色体異常による遺伝子発現との関連が注目されている<sup>5,6)</sup>。

BCL10はCARD(caspase recruitment domain)を含むapoptosis regulatory moleculeで低悪性度MALTリンパ腫の染色体転座t(1;14)(p22;q32)から単離された<sup>7,8)</sup>。Wild-type BCL10はcaspase-9の活性化あるいはnuclear

$\kappa$ B (NF $\kappa$ B) の弱い活性化により apoptosis を誘導, in-vitro では malignant transformation を抑制する<sup>7)</sup>. C末端が欠失した BCL10 mutants は in vitro で pro-apoptotic activity を失って悪性転化に関与すると言われているが, 実際の BCL10 mutation は MALT lymphoma の 6.5% , follicular lymphoma の 9.5% , DLBL の 4.5% にしか認められないことが報告されている<sup>9)</sup>. Ye H らの報告<sup>10)</sup>によると, BCL10 protein は正常リンパ装置では germinal center および marginal zone の B cell の細胞質に発現し, MALT lymphoma の 60% (24/40), follicular lymphoma の 10% (2/21), Nodal DLBL の 22% (4/18) の症例では腫瘍細胞の核および細胞質に BCL10 蛋白の発現が認められた. BCL10 核発現は腫瘍発育に関与していることが示唆されているが, その機序は明らかにされていない. また MALT lymphoma について BCL10 mutation と BCL10 蛋白の核発現は関連が見られず, BCL10 mutation がその発育や進行に必ずしも重要ではないことが報告されている<sup>11)</sup>.

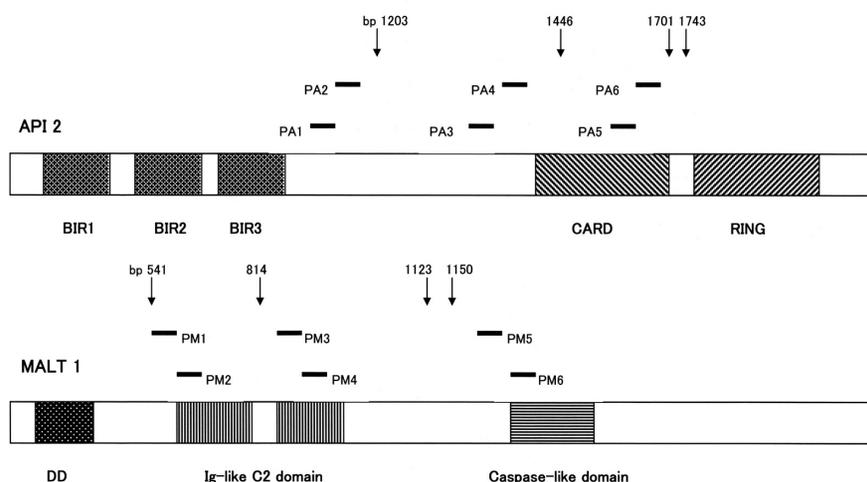
染色体転座 t(11;18)(q21;q21) は MALT lymphoma で比較的多く見られる<sup>11-21)</sup>. 11q21 から単離された API2 (apoptotic inhibitor 2) 遺伝子は IAP (inhibitor of apoptosis) family の一員であり caspase 阻害により apoptosis を抑制する. 18q21 から単離された MALT1 遺伝子は caspase-like protein を encode しているが, その機能は明らかではない<sup>22)</sup>. API2-MALT1 融合蛋白は NF $\kappa$ B を活性化し腫瘍細胞の apoptosis を抑制することが示唆されており, MALT リンパ腫を発生させると考えられている. API2-MALT1 キメラ遺伝子ではそれぞれの遺伝子に 4箇所 の切断点があり, 現在までに 8 種類の variant が報告されている<sup>19)</sup> (Fig. 1). この遺伝

子は特に肺 (44-62%)・胃 (12-48%) MALT リンパ腫に高頻度に検出されており, API2-MALT1 キメラ遺伝子または t(11;18)(q21;q21) が検出された胃 MALT リンパ腫は低悪性度, ヘリコバクター除菌療法抵抗性で進行期のものが多い傾向にある<sup>15-18, 40-44)</sup>.

胃や肺 MALT lymphoma において API2-MALT1 キメラ遺伝子を発現した例は BCL10 蛋白の核発現陽性例が多く, 胃 MALT lymphoma ではその進行期に関与していることが報告されている<sup>11, 25)</sup>. 本研究では 62 症例の眼窩領域リンパ増殖性疾患を集積, 臨床病理学的解析を行い, 眼窩領域 MALT リンパ腫における BCL10 蛋白および API2-MALT1 キメラ遺伝子の発現について検討した.

## 材料と方法

1986年から2001年に埼玉医科大学総合医療センターおよびさいたま赤十字病院にて, 眼窩領域リンパ増殖性疾患とされた 62 症例 82 検体を集積した. 検体は 10-20%ホルマリン固定, パラフィン包埋され, 2-3  $\mu$ m に薄切, ヘマトキシリン・エオジン染色 (以下 HE 染色) を施行した. HE 染色と免疫組織化学染色の所見を併せて病理診断を行った. 悪性リンパ腫の亜分類は新 WHO 分類<sup>26)</sup>に従った. 28 検体については新鮮凍結材料を用いてサザンブロット・ハイブリダイゼーション法 (以下サザンブロット法) により免疫グロブリン重鎖遺伝子の再構成が検討されている. 臨床情報は主治医およびカルテから得た. 臨床病期は Ann Arbor 分類<sup>27)</sup>に従い, 両側眼窩病変は stage I<sub>e</sub> とした. 病変部位の亜分類は Knowles らの報告<sup>28)</sup>を基に, 結膜・眼窩 (眼周囲軟部組織)・涙腺・涙嚢とした.



**Fig. 1.** Locations of API2 and MALT1 breakpoints and primers for multiplex RT-PCR assay. The arrows indicate the positions of API2 and MALT1 breakpoints previously reported. Numbering is in accordance with accession number L49432 for API2 and accession number AF130356 for MALT1. BIR: baculovirus AIP repeat, CARD: caspase recruitment domain, RING: really interesting new gene, DD: death domain.

### 免疫組織化学染色

3  $\mu$ mに薄切したパラフィン切片を用いてストレプトアビジン・ビオチン複合体法, 3-3'-diamino-benzidine-tetrahydrochloride (DAB) 発色による免疫組織化学染色を行った。使用した抗体および希釈倍率はTable 1のとおりである。免疫染色の実際は自動免疫染色装置(i 6000, Bio Genex, USA)によって行った。

### API2-MALT1キメラ遺伝子の検出

パラフィン切片からRNAを抽出し, Inagaki Hらが報告したmultiplex RT-PCR法<sup>19)</sup>に多少のmodificationを加え, API2-MALT1キメラ遺伝子の検出を行った。

#### 1) RNAの抽出

Paraffin Block RNA Isolation Kit (Ambion Inc., Austin, Texas, USA)を用いてパラフィン切片からtotal RNAを抽出した。20  $\mu$ m以下の厚さの腫瘍病変を掻き取り, tubeに入れ, 脱パラフィン後, 風乾させ, proteinase K (1 mg/ml)を加え45°Cで90分incubateした。Phenol/chloroformで抽出したRNAをisopropanolにて沈殿させ, -20°Cに1晩置いた。翌日遠心したペレットを75% ethanolで洗い, 風乾させ, diethylpyrocarbonate (DEPC)処理水30  $\mu$ lに溶解させた。

#### 2) Multiplex RT-PCR法

上記の方法にてDEPC処理水に溶解させたRNAのうち5  $\mu$ lを50°C・5分間加熱し, 氷上に置く。次に20  $\mu$ lの反応液を加える。反応液の内容は次のとおりである。RNase inhibitor (Promega corporation, Madison, WI, USA); 8.25U (0.25  $\mu$ l), Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (Life Technologies, USA); 50U, API2-MALT1キメラ遺伝子に対するprimer mix (PA1-PM2, PA3-PM4, およびPA5-PM6) 800  $\mu$ mol /L, Taq Gold DNA polymerase (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA); 1U, 15 mM of MgCl<sub>2</sub>を含む10X PCR buffer。PCR増幅装置

(GeneAmp PCR System 9700, PE Biosystem)のプログラムは以下のとおりである。initial RT stepとして37°C/30分incubate, reverse transcriptaseを失活させ更にDNA polymeraseをactivateさせるため94°C/12分, 最後にPCR(95°C/15秒, 50°C/30秒, 72°C/30秒)を35 cycles行った。First-round PCR産物4%を更にsecond-round multiplex nested PCRs (three parallel; second PCR-A (PA2, PM1, PM3, PM5), second PCR-B (PA4, PM1, PM3, PM5), second PCR-C (PA6, PM1, PM3, PM5))によってそれぞれ増幅させた。Cycle conditionは以下のとおりである。94°C/10分の後, 95°C/15秒, 55°C/30秒, 72°C/30秒を35 cycle行った。PCR産物は8%ポリアクリルアミドゲルで電気泳動を行い, エチジウムブロマイド染色後, UV光下で観察した。API2-MALT1キメラ遺伝子の陽性コントロールは肺および胃, 小腸MALTリンパ腫の組織を用いた。抽出したRNAが保持されているか確認するためinternal controlとして $\beta$  actin mRNA fragment (190 bp)のRT-PCRを同時に行った。1<sup>st</sup>-round RT-PCRに用いたprimer pairはAC1, AC2, nested PCRに用いたprimer pairはAC3, AC4である。各々のprimerの塩基配列はTable 2を参照。

#### 統計学的解析

MALTリンパ腫とそれ以外のリンパ腫について, 性・平均年齢・病期期間の比較にはFisher検定を用いた。MALTリンパ腫についてBCL 10核発現の有無における平均年齢と再発までの期間の比較はt検定を用いた。その他の比較検討はYates補正を加えた $\chi^2$ 検定を用いた。

#### 結果

##### 病理組織像

62症例中58症例は悪性リンパ腫, 4症例は反応

Table 1. Antibodies used in immunohistochemistry

Antibody	clone	Source	Dilution	Pre-treatment
Anti-CD20	L26	DAKO Japan (Tokyo, Japan)	1:100	(-)
Anti-CD79a	JCB117	DAKO Japan	1:300	Heat retrieval
Anti-CD15	MMA	Becton Dickinson (San Jose, CA, USA)	1:50	Heat retrieval
Anti-CD21	1F8	DAKO Japan	1:100	Protease digestion
Anti-CD30	1G12	Novo Castra (Newcastle-upon-tyne, UK)	1:40	Heat retrieval
Anti-CD56	1B6	Novo Castra	1:50	Heat retrieval
Anti-IgA	CB1-10.4/B8	Nichirei (Tokyo, Japan)	Pre-diluted	Trypsin digestion
Anti-cyclin D1	AM29	Zymed (South San Francisco, Ca, USA)	Pre-diluted	Heat retrieval
Anti-BCL-2	124	DAKO Japan	1:100	Heat retrieval
Anti-BCL-10	151	Zymed	1:3200	Heat retrieval
Anti-CD3		DAKO Japan	1:100	Heat retrieval
Anti-IgG		DAKO Japan	1:4000	Heat retrieval
Anti-IgM		DAKO Japan	1:2000	Heat retrieval
Anti-IgD		DAKO Japan	1:500	Heat retrieval
Anti-kappa chain		DAKO Japan	1:20000	Heat retrieval
Anti-lambda chain		DAKO Japan	1:10000	Heat retrieval

性リンパ組織過形成 (reactive lymphoid hyperplasia: RLH) であった。反応性リンパ組織過形成には反応性リンパ濾胞形成と濾胞間領域の線維増生が認められ、免疫組織化学染色では、増殖するリンパ球はB細胞やT細胞が混在しており、全ての症例においてサザンブロット法による免疫グロブリン重鎖の再構成は認められなかった。58症例の悪性リンパ腫のうち、50症例はMALTリンパ腫、5症例は瀰漫性大細胞型B細胞リンパ腫 (diffuse large B cell lymphoma: DLBL) であった。MALTリンパ腫とHodgkin lymphomaの合併 (MALT+HL)、末梢型T細胞リンパ腫 (peripheral T

cell lymphoma: PTCL)、鼻型NK/T細胞リンパ腫 (extranodal NK-T cell lymphoma, nasal type: NK/T) がそれぞれ1症例ずつ認められた。MALTリンパ腫はCD20あるいはCD79a陽性の胚中心細胞あるいは単球様B細胞類似の小型から中型リンパ球のmonotonousな増殖より成り、follicular colonizationを伴っているところもあった。結膜や涙腺ではLELが散見された。免疫グロブリン重鎖または軽鎖のモノクローナルな発現 (IgM-lambda (3), IgM-kappa (2), Ig-lambda (1)) を伴った形質細胞への分化を認める症例があり、Dutcher小体が散見された。サザンブロット法による免疫グロブリン重鎖の再構成の検索は23症例のMALTリンパ腫に行われ、そのうち17症例に認められた。DLBLの5症例のうち、2症例にはMALTリンパ腫の成分が混在していた。

### 臨床像

男女比は30:32、年齢は26-92歳 (平均年齢: 60.7歳) であった。主訴は腫瘍触知あるいは腫脹 (46)、眼球突出 (7)、結膜充血 (6)、眼瞼下垂 (3)、流涙 (3)、複視 (1)、異物感 (1) であった。病期期間は51症例が調べられ、2週間から132ヶ月で平均期間は20.2ヶ月であった。病変部位は結膜 (29)、眼周囲軟部組織 (22)、涙腺 (10)、涙嚢 (1) であった。12症例は両側発生であった (Table 3)。

涙腺発症MALTリンパ腫2症例 (女性) は自己免疫疾患 (シェーグレン症候群、SLEと若年性慢性関節リウマチの合併) を有していた。

悪性リンパ腫58症例の臨床病期はstage I<sub>E</sub>が52症例、stage II<sub>E</sub>以上が6症例であった (Table 4)。また19症例 (うちMALTリンパ腫は16症例) に再発が認められ、殆どの症例は初発腫瘍と再発腫瘍は同じ組織型であった (Table 5)。

**Table 2.** Oligonucleotide Sequences of Primers

Primer	Sequence
PA1	ttcatcogtcaagttcaagc
PA2	agccagttaccctcatctac
PA3	ttactcaatgcagaagatga
PA4	gaaataagggaagaggagag
PA5	caagagaactgattgatacg
PA6	attgcagccactgtattcag
PM1	cagccaagactgcctttgac
PM2	ttgaacaaaaggatgtccag
PM3	ggcatcagcttttgggaagt
PM4	actgtaaaaccaatgtgctg
PM5	aaaggctggtcagttgtttg
PM6	ttcctatcaaaagggaacc
AC1	gagcaagagaggcatcct
AC2	cagtgttacggccagagg
AC3	tggagaaaatctggcaccac
AC4	gaggcgtacagggatagcac

PA1-6, AC1, AC3: sense primers.

PM1-6, AC2, AC4: antisense primers.

**Table 3.** Clinical features of ocular adnexal lymphoproliferative disorders

Histology	Number of cases	Gender M : F	Age (years) Range	Mean	Involved sites				Extraorbital involvement	Relapse	Death of lymphoma
					Con	Orbit	LG	LS			
ML	58	29 : 29	26-92	61.1	28	22	7	1	6	19	1 (15) <sup>†</sup>
MALT	50	25 : 25	26-83	59.6	24	19	7	0	3	16	0 (12) <sup>†</sup>
DLBL	5	3 : 2	71-92	78.6	2	3	0	0	2	1	0 (3) <sup>†</sup>
MALT+HL	1	1 : 0	72		1	0	0	0	0	1	0
PTCL	1	0 : 1	50		1	0	0	0	0	0	0
NK/T	1	0 : 1	50		0	0	0	1	1	1	1
RLH	4	1 : 3	28-70	54	1	0	3	0	1*	0	(1) <sup>†</sup>
Total	62	30 : 32	26-92	60.7	29	22	10	1	7	19	1 (16) <sup>†</sup>

ML; malignant lymphoma, MALT; extranodal marginal zone B-cell lymphoma, DLBL; diffuse large B cell lymphoma, MALT+HL; MALT lymphoma combined with Hodgkin lymphoma, PTCL; peripheral T cell lymphoma, unspecified, NK/T; extranodal NK-T cell lymphoma, nasal type, RLH; reactive lymphoid hyperplasia, M : F; Male : Female, Con; conjunctiva, LG; lacrimal gland, LS; lacrimal sac

\*The patient showed swelling of the submandibular gland on radiological study, but a biopsy was not done.

<sup>†</sup> Number of cases who dropped out of follow-up.

治療は限局性の悪性リンパ腫には切除のみあるいはプレドニン内服、局所放射線療法が、進行性あるいは再発には全身化学療法が施行される傾向にあった (Table 6). 反応性リンパ組織過形成に対しては経過観察 (2), PSL内服 (2) が行われた。

予後観察 (平均期間: 31.1 ヶ月) ができた46症例中、原病による死亡はNK/Tリンパ腫1例のみであった。

MALTリンパ腫とそれ以外のリンパ腫 (DLBL, MALT+HL, PTCL, NK/T) について臨床所見を比較したところ、MALTリンパ腫は局在性の傾向 ( $P < 0.05$ ) が認められたが、性・平均年齢・病期期間・発生部位・再発の有無に統計学的に有意差は認められなかった。

**Table 4.** Subtypes of malignant lymphoma and clinical stage

Subtype	Total (n=58)	Stage I <sub>E</sub> (n=52)	Stage II <sub>E</sub> (n=1)	Stage III <sub>E</sub> (n=4)	Stage IV <sub>E</sub> (n=1)
MALT	50	47(8)*		2	1
DLBL	5	3(1)*		2	
MALT+HL	1	1			
PTCL	1	1			
NK/T	1		1		

MALT; extranodal marginal zone B-cell lymphoma, DLBL; diffuse large B cell lymphoma, MALT+HL; MALT lymphoma combined with Hodgkin lymphoma, PTCL; peripheral T cell lymphoma, unspecified, NK/T; extranodal NK-T cell lymphoma, nasal type.

\*Number of patients with only bilateral ocular adnexal disease.

**BCL10蛋白発現**

MALTリンパ腫50症例中、29症例 (58%) にBCL10蛋白の核及び胞体への発現が認められた。残りの悪性リンパ腫、反応性リンパ組織過形成の症例にはBCL10蛋白発現は胞体のみで核発現は認められなかった (Fig. 2, Table 7). MALTリンパ腫において、BCL10核発現の症例と胞体のみでの発現の症例について、性・平均年齢・発生部位・臨床病期・再発について比較検討したが、統計学的に有意差は認められなかった (Table 8).

**API2-MALT1キメラ遺伝子の発現**

初発および再発腫瘍79検体 (MALTリンパ腫67検体, DLBL6検体, Hodgkinリンパ腫とMALTリンパ腫の合併2検体, RLH4検体) のパラフィン切片からRNAを抽出した。β actinの発現は69検体 (MALTリンパ腫は58検体) に認められたが、API2-MALT1キメラ遺伝子の検出は認められなかった (Fig. 3).

**考 察**

本研究では眼窩領域リンパ増殖性疾患を病理組織学的に検討したが、しばしば反応性リンパ組織過形成とMALTリンパ腫の鑑別が難しいことがあった。MALTリンパ腫は進行が遅く、予後良好のことが多いため、臨床学的にも両者の鑑別が難しい。サザンブロット法やPCR法などの遺伝子解析はリンパ増殖性疾患における反応性病変と腫瘍性病変の鑑別に有用であるが、

**Table 5.** Patients with recurrence of malignant lymphoma

Case No.	Age (years)	Sex	Primary tumor	Primary site	Clinical stage	Treatment	Time of recurrence (months)	Recurrent tumor	Site of recurrence	Re-treatment	Status at last follow up
1	59	M	MALT	R-Con	I	Excision	16	MALT	R-Con	Excision	Alive
2	77	F	MALT	L-Orbit	I	Excision	29	MALT	L-Orbit	Rad	CR
3	59	M	MALT	R-Con	I	Excision	5	MALT	R-Con	Excision	Alive
4	56	F	MALT	R-Orbit	I	Excision	7	MALT	R-Orbit	Excision	CR
5	38	M	MALT	L-Con	I	Chemo	23	MALT*	L-Con		Lost to follow up
6	65	F	MALT	R-Con	I	Excision	7	MALT*	R-Con	No therapy	Alive
7	74	F	MALT	L-Orbit	I	PSL	7	MALT	L-Orbit	Rad	Alive
8	51	M	MALT	R-Con	I	Excision	114	MALT	R-Con	PSL	Alive
9	67	M	MALT	R-Orbit	I	PSL+Rad	12	MALT*	R-Orbit	Rad	CR
10	48	F	MALT	B-Orbit	I	L-Excision	24	MALT	R-Orbit	PSL+Rad	CR
11	26	F	MALT	R-Con	I	Excision	11	MALT	R-Con	PSL	Lost to follow up
12	72	M	MALT+HL	L-Con	I	Excision	17	MALT+HL	L-Con	Rad	PR
13	52	F	MALT	R-LG	I	PSL	13	MALT	L-LG	PSL	CR
14	28	F	MALT	L-Con	I	Rad	10	MALT	R-Con	Rad	CR
15	76	F	MALT	B-Con	I	Excision	40	MALT	Cheek, forehead		Lost to follow up
16	59	F	MALT	R-LG	I	Excision	15	MALT	B-parotid gland	Chemo	PR
17	61	M	MALT	R-LG	I	PSL	60	MALT	B-Orbit, mediastinal LN	Chemo	PR
18	50	F	NK-T	R-LS	II	Chemo	2	NK-T	R-LS	Chemo	Dead of lymphoma
19	77	M	DLBL	B-Orbit	I	PSL	26	Plasma cell-dominant	cervical LN	Excision	PR

M; Male, F; Female, MALT; extranodal marginal zone B-cell lymphoma, MALT+HL; MALT lymphoma combined with Hodgkin lymphoma, NK/T; extranodal NK-T cell lymphoma, nasal type, DLBL; diffuse large B cell lymphoma, Con; conjunctiva, LG; lacrimal gland, LS; lacrimal sac

R:right side, L:left side, Rad: radiation, Chemo: chemotherapy, CR: complete remission, PR: partial remission.

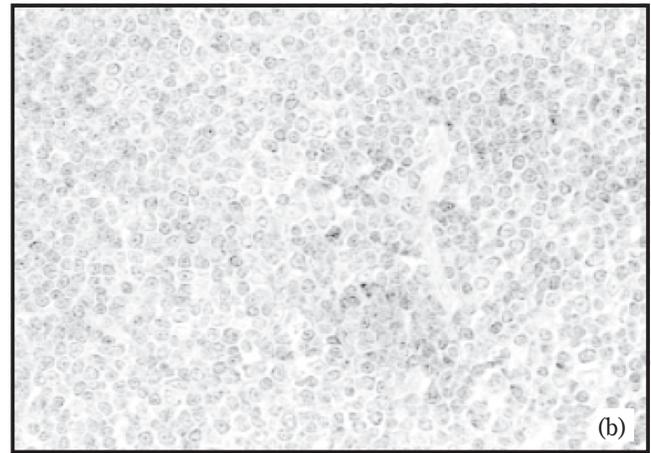
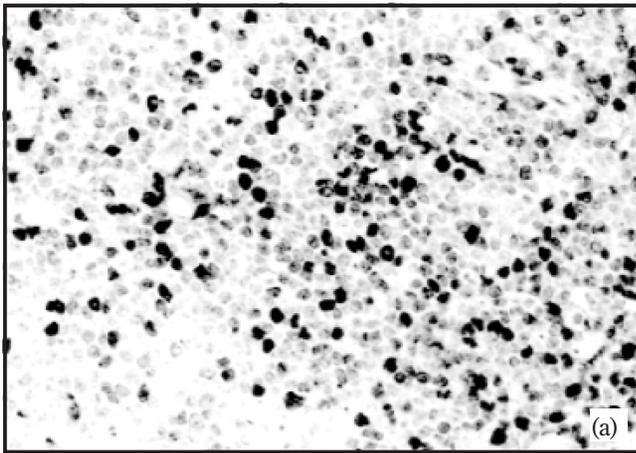
\*We did not biopsy the recurrent tumor, but it was clinically diagnosed as MALT lymphoma.

**Table 6.** Initial treatment of ocular adnexal lymphomas

Treatment	Total (n=57)	Stage I <sub>E</sub> (n=52)	Stage II <sub>E</sub> (n=1)	Stage III <sub>E</sub> (n=3)*	Stage IV <sub>E</sub> (n=1)
Excision(observation)	26	26			
PSL	10	10			
Localized radiation	11	11			
PSL+localized radiation	3	3			
Systemic chemotherapy	7	2	1	3	1

\* One patient with DLBCL of 4 patients who had stage III<sub>E</sub> disease was lost to follow-up.

PSL; Predonisolone



**Fig. 2 .** BCL 10 expression in MALT lymphoma by immunohistochemical staining. (a) Lymphoma cells show predominantly aberrant nuclear expression(x100). (b) Lymphoma cells show only cytoplasmic expression(x100).

**Table 7.** BCL 10 expression in ocular adnexal lymphoproliferative disorders

Histology	Number of cases	BCL 10 expression	
		cytoplasmic	nuclear(>10%)
MALT	29	+	+
	21	+	-
DLBCL	5	+	-
MALT+HL	1	+	-
PTCL	1	+	-
NK/T	1	+	-
RLH	4	+	-

MALT; extranodal marginal zone B-cell lymphoma, DLBL; diffuse large B cell lymphoma, MALT+HL; MALT lymphoma combined with Hodgkin lymphoma, PTCL; peripheral T cell lymphoma, unspecified, NK/T; extranodal NK-T cell lymphoma, nasal type, RLH; reactive lymphoid hyperplasia.

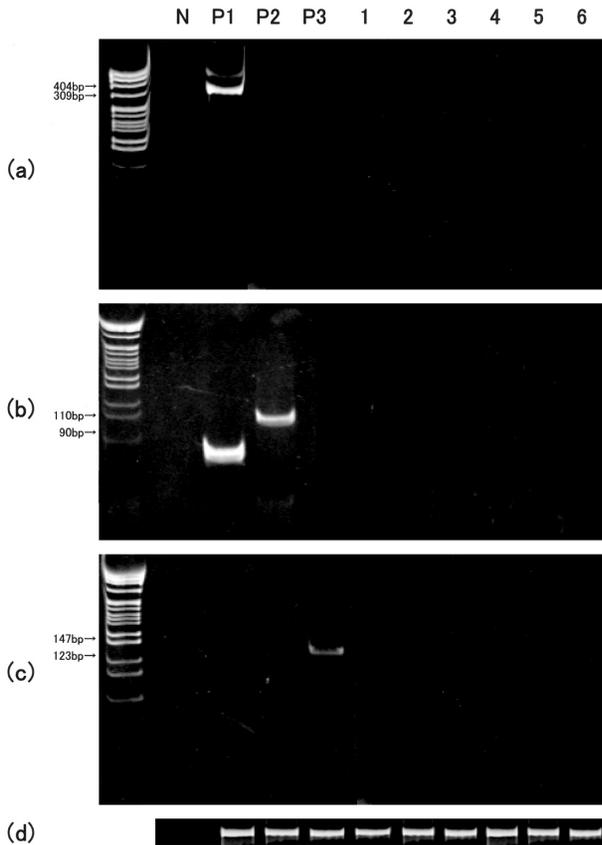
**Table 8.** Comparison of nuclear and cytoplasmic BCL 10 expression in MALT lymphoma

Clinical parameters		BCL 10 expression		P
		nuclear (n=29)	cytoplasmic (n=21)	
Age (years)	mean	59.4	59.9	NS*
	(range)	(28-89)	(38-79)	
Gender	male	12	13	NS†
	female	17	8	
Site	Con (24)	13	11	NS†
	Orbit (19)	13	6	
	LG (7)	3	4	
Extraorbital involvement (3)		1	2	NS†
Relapse(16)		8	8	NS†
Time of recurrence (month)	mean	22.3	14.8	NS*
	(range)	(7-65)	(5-29)	

NS; not significant, Con; conjunctiva, LG; lacrimal gland

\* Based on the Student's t test.

† Based on the Pearson  $\chi^2$  statistic with Yates' correction.



**Fig. 3.** Multiplex reverse transcriptase-PCR assay for the API2-MALT1 fusion transcript. (a) second PCR-A. (b) second PCR-B. (c) second PCR-C. lane N: no template RNA. lanes P1: the positive control (pulmonary MALT lymphoma) showing about 320 bp in second PCR-A and about 90 bp in second PCR-B. lane P2: the positive control (pulmonary MALT lymphoma) with breakpoint A1446 to M1123 (107 bp) in second PCR-B. lane P3: the positive control (pulmonary MALT lymphoma) with breakpoint A1701 to M1123 (125 bp) in second PCR-C. lane 1-6: Ocular adnexal MALT lymphomas in which API2-MALT1 fusion was not detected. The  $\beta$ -actin transcript (190 bp) was amplified in these cases indicating the adequate quality of RNA (d).

本研究ではMALTリンパ腫23例中6例(26.1%)にはサザンブロット法による免疫グロブリン重鎖再構成が認められなかった。すなわちリンパ増殖性疾患の診断には病理組織像、免疫組織化学染色、遺伝子解析等を包括して検討しなければならない。反応性リンパ組織過形成と診断された症例の一部が最終的に悪性リンパ腫に発展したという報告もあるので<sup>28, 29)</sup>、反応性リンパ組織過形成とされた全ての症例についても今後臨床的に経過観察を続ける必要がある。

様々な臓器から発生するMALTリンパ腫の大部分は緩徐な臨床経過を辿り、局在性のことが多い。実際我々の研究においてもMALTリンパ腫の平均病悩期間

は非MALTリンパ腫の2倍以上長く、他部位への浸潤は少なかった。また再発はするものの、MALTリンパ腫での死亡例は認められなかった。これらの事実は眼窩領域MALTリンパ腫の臨床的特徴を反映している。

胃MALTリンパ腫では低悪性度のものが高悪性度のものに転化することが示唆されている<sup>30-33)</sup>。最近の報告によると胃原発MALTリンパ腫のうち17-71%は高悪性度であり、高悪性度MALTリンパ腫は低悪性度MALTリンパ腫に比べて進行が早く、予後が悪い傾向がある<sup>31, 34-37)</sup>。低悪性度の成分が高悪性度の成分に転化する機序はいまだ明らかにされていないが、胃MALTリンパ腫においてはp53変異やc-mycのような様々な遺伝子変異が加わることによって起こることが示唆されている<sup>38, 39)</sup>。新WHO分類では高悪性度MALTリンパ腫は瀰漫性大細胞Bリンパ腫に分類されている<sup>26)</sup>。本研究においては2例のみが瀰漫性大細胞Bリンパ腫の一部に低悪性度MALTリンパ腫の成分が認められ、これらの症例は低悪性度MALTリンパ腫の成分が瀰漫性大細胞Bリンパ腫(高悪性度)の成分に転化したことが示唆される。このように眼窩領域MALTリンパ腫においては、胃MALTリンパ腫に比べて高悪性度への転化の頻度が少ないという事実は眼窩領域における環境が高悪性度へ転化することができるような付加的な遺伝子変異を獲得しにくいことを示唆していると考えられる。それゆえに眼窩MALTリンパ腫は進行が遅く予後良好なのかも知れない。

BCL10の核発現は眼窩領域MALTリンパ腫の58%に認められたが、この頻度は胃や肺MALTリンパ腫の報告例(41-60%)とほぼ同様である<sup>10, 11, 25, 40)</sup>。BCL10の核発現はmalignant B cell、特にMALT lymphomaに高率に認められることより、BCL10蛋白の核発現は眼窩領域においてもMALT lymphomaの腫瘍発育に関与していることが考えられる。

胃MALTリンパ腫ではBCL10核発現を有する症例は臨床病期が進んでいる傾向が認められるとの報告があるが<sup>10, 11)</sup>、眼窩領域MALTリンパ腫ではBCL10核発現と臨床因子(年齢・性・発生部位・臨床病期・再発・再発までの期間)との間に関連性は認められなかった。

既報告では肺や消化管MALTリンパ腫においてそれぞれ44-62%、12-48%のAPI2-MALT1キメラ遺伝子発現が認められているが<sup>15-18, 40-44)</sup>、本研究では眼窩領域MALTリンパ腫に同遺伝子の発現は認められなかった。API2-MALT1キメラ遺伝子の発現は低悪性度MALTリンパ腫の腫瘍発生に関連があると言われており、胃MALTリンパ腫においてはヘリコバクターピロリ除菌抵抗性の症例に高発現している。一方過去の報告では甲状腺や唾液腺、眼窩領域MALTリンパ腫において同遺伝子発現はまれと言われている<sup>13, 42)</sup>。本研究において採取した検体の86.5%はRNAの $\beta$ -actinが

保持されており, API2-MALT1キメラ遺伝子陽性コントロールは6症例(胃1, 肺4, 小腸1)施行されていることより, technicalな面において大きな問題はないと思われる. しかしながらパラフィン切片を用いたRT-PCRは, primerの設定上すべてのAPI2-MALT1キメラ遺伝子のうち7%は検出できないので<sup>41)</sup>, 我々の結果が全てを反映しているとは言えない.

近年Streubel等はFISH法により肝・皮膚・唾液腺・眼窩領域MALT lymphoma 12例にt(14;18)(q32;q21)を検出, 免疫グロブリン重鎖遺伝子とMALT1遺伝子との再構成が認められると報告した<sup>45)</sup>. これらのMALTリンパ腫はRT-PCRによりAPI2-MALT1キメラ遺伝子は検出されず, 反対にAPI2-MALT1キメラ遺伝子が検出された32例の肺・消化管・甲状腺・乳腺MALTリンパ腫にはt(14;18)(q32;q21)は検出されなかった. すなわちMALTリンパ腫には発生臓器によって様々な種類の遺伝子変異が関与していることが示唆される.

またt(11;18)(q21;q21)のないMALT lymphomaの一部に18, 3, 7 trisomyなど他の染色体異常を認めたとの報告もあり<sup>46)</sup>, MALT lymphomaの発生機序の多様性が示唆される.

前述の通り本研究でにおいてBCL10核発現は眼窩領域MALTリンパ腫の58%に認められたが, API2-MALT1キメラ遺伝子は検出されなかった. すなわち眼窩領域MALTリンパ腫においてはBCL10核発現とAPI2-MALT1キメラ遺伝子発現の関連性は見られなかった. これに反して胃や肺MALTリンパ腫においてBCL10核発現はAPI2-MALT1キメラ遺伝子の存在と高い関連性があり, 腫瘍活性をもたらすことが示唆されている<sup>21, 23, 25, 40)</sup>. Lucas等の報告によるとBCL10-MALT1 complexとAPI2-MALT1融合蛋白が共通の経路を介してNF $\kappa$ Bを活性化, 腫瘍細胞のapoptosisを抑制することが示唆されているが, BCL10とAPI2-MALT1融合蛋白の直接的な相互作用がBCL10の核発現をもたらすかどうかは現在のところ明らかにされていない<sup>23)</sup>. 実際API2-MALT1キメラ遺伝子の発現がない胃や肺MALTリンパ腫の症例にBCL10核発現が見られるものもある<sup>11, 25, 40)</sup>. 近年Li Cらによって, 本研究と同様に, 皮膚marginal zone lymphomaの24症例中11症例(45.8%)にBCL10核発現が認められたが, API2-MALT1キメラ遺伝子は検出されなかったと報告された<sup>47)</sup>. BCL10核発現がありAPI2-MALT1遺伝子発現がないこれらの症例においては, BCL10核発現がBCL10とAPI2-MALT1融合蛋白の直接的な相互作用に基づいていない可能性が示唆される. 眼窩領域MALTリンパ腫における高頻度のBCL10核発現は未知の遺伝子変異が関与しているかもしれないが, 今後の検索が待たれるところである.

## 謝 辞

本稿を終えるにあたり, 御指導, 御校閲を賜りました埼玉医科大学総合医療センター病理部 糸山進次教授に深謝いたします. また本研究を直接御指導いただきました埼玉医科大学総合医療センター病理部 田丸淳一助教授, 検体を提供していただきましたたま赤十字病院病理部 兼子耕先生に心より感謝いたします. 最後に埼玉医科大学総合医療センター病理部教室員・臨床検査技師の皆様に厚く御礼申し上げます.

## 引用文献

- 1) Coupland SE, Krause L, Dlecluse H-J, Anagnostopoulos I, Foss HD, Hummel M, et al. Lymphoproliferative lesions of the ocular adnexa analysis of 112 cases. *Ophthalmology* 1998; 105:1430-41.
- 2) Johnson TE, Tse DT, Byrne GE Jr, Restrepo A, Whitcomb CC, Voigt W, et al. Ocular-adnexal lymphoid tumors: A clinicopathologic and molecular genetic study of 77 patients. *Ophthalm Plast Reconstr Surg* 1999;15:171-9.
- 3) White WL, Ferry JA, Harris NL, Grove AS Jr. A clinicopathologic study with identification of lymphomas of mucosa-associated lymphoid tissue type. *Ophthalmology* 1995;102:1994-2006.
- 4) Isaacson PG. Mucosa-Associated Lymphoid Tissue Lymphoma. *Semin Hematol* 1999;36:139-47.
- 5) Sanchez-Beato M, Sanchez-Aguilera A, Piris MA. Cell cycle deregulation in B-cell lymphomas. *Blood* 2003;101:1220-35.
- 6) Vega F, Medeiros LJ. Marginal-zone B-cell lymphoma of extranodal mucosa-associated lymphoid tissue type: molecular genetics provides new insights into pathogenesis. *Adv Anat Pathol* 2001;8:313-26.
- 7) Willis TG, Jadayel DM, Du MQ, Peng H, Perry AR, Abdul-Rauf M, et al. Bcl 10 is involved in t(1;14)(p22;q32) of MALT B cell lymphoma and mutated multiple tumor types. *Cell* 1999;96:35-45.
- 8) Zhang Q, Siebert R, Yan M, Hinzmann B, Cui X, Xue L, et al. Inactivating mutation and overexpression of BCL10, a caspase recruitment domain-containing gene, in MALT lymphoma with t(1;14)(p22;q32). *Nat Genet* 1999;22:63-8.
- 9) Du MQ, Peng H, Liu H, Hamoudi RA, Diss TC, Willis TG, et al. BCL10 gene mutation in lymphoma. *Blood* 2000;95:3885-90.
- 10) Ye H, Dogan A, Karran L, Willis TG, Chen L,

- Wlodarska I, et al. BCL10 expression in normal and neoplastic lymphoid tissue: nuclear localization in MALT lymphoma. *Am J Pathol* 2000;157:1147-54.
- 11) Liu H, Ye H, Dogan A, Ranaldi R, Hamoudi RA, Bearzi I, et al. T(11;18)(q21;q21) is associated with advanced mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma that expresses nuclear BCL10. *Blood* 2001;98:1182-7.
- 12) Auer IA, Gascoyne RD, Connors JM, Cotter FE, Greiner TC, Sanger WG, et al. t(11;18)(q21;q21) is the most common translocation in MALT lymphomas. *Ann Oncol* 1997;8:979-85.
- 13) Ott G, Katzenberger T, Greiner A, Kalla J, Rosenwald A, Heinrich U, et al. The t(11;18)(q21;q21) chromosome translocation is a frequent and specific aberration in low-grade but not high-grade malignant non-Hodgkin's lymphomas of the mucosa-associated lymphoid tissue(MALT-) type. *Cancer Res* 1997;57:3944-8.
- 14) Dierlamm J, Baens M, Wlodarska I, Stefanova-Ouzounova M, Hernandez JM, Hossfeld DK, et al. The apoptosis inhibitor gene API2 and a novel 18q gene, MLT, are recurrently rearranged in the t(11;18)(q21;q21) associated with mucosa-associated lymphoid tissue lymphomas. *Blood* 1999;93:3601-9.
- 15) Rosenwald A, Ott G, Stilgenbauer S, Kalla J, Brecht M, Katzenberger T, et al. Exclusive detection of the t(11;18)(q21;q21) in extranodal marginal zone B cell lymphomas(MZBL) of MALT type in contrast to other MZBL and extranodal large B cell lymphomas. *Am J Pathol* 1999;155:1817-21.
- 16) Dierlamm J, Baens M, Stefanova-Ouzounova M, Hinz K, Wlodarska I, Maes B, et al. Detection of t(11;18)(q21;q21) by interphase fluorescence in situ hybridization using API2 and MLT specific probes. *Blood* 2000;96:2215-8.
- 17) Remstein ED, James CD, Kurtin PJ. Incidence and subtype specificity of API2-MALT1 fusion translocations in extranodal, nodal, and splenic marginal zone lymphomas. *Am J Pathol* 2000;156:1183-8.
- 18) Baens M, Maes B, Steyls A, Geboes K, Marynen P, Wolf-Peeters CD. The product of the t(11;18), an API2-MLT fusion, marks nearly half of gastric MALT type lymphomas without large cell proliferation. *Am J Pathol* 2000;156:1433-9.
- 19) Inagaki H, Okabe M, Seto M, Nakamura S, Ueda R, Eimoto T. API2-MALT1 fusion transcripts involved in mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *Am J Pathol* 2001;158:699-706.
- 20) Yonezumi M, Suzuki R, Suzuki H, Yoshino T, Oshima K, Hosokawa Y, et al. Detection of API2-MALT1 chimaeric gene in extranodal and nodal marginal zone B-cell lymphoma by reverse transcription polymerase chain reaction(PCR) and genomic long and accurate PCR analyses. *Br J Haematol* 2001;115:588-94.
- 21) Levine EG, Arthur DC, Machnicki J, Frizzera G, Hurd D, Peterson B, et al. Four new recurring translocations in non-Hodgkin lymphoma. *Blood* 1989;74:1796-800.
- 22) Uren GA, O'Rourke K, Aravind LA, Pisabarro MT, Seshagiri S, Koonin E, et al. Identification of paracaspases and metacaspases: two ancient families of caspase-like proteins, one of which plays a key role in MALT Lymphoma. *Mol Cell* 2000;6:961-7.
- 23) Lucas PC, Yonezumi M, Inohara N, McAllister-Lucas LM, Abazeed ME, Chen FF, et al. Bcl10 and MALT1, independent targets of chromosomal translocation in malt lymphoma, cooperate in a novel NF-kappa B signaling pathway. *J Biol Chem* 2001;276:19012-9.
- 24) Stoffel A, Le Beau MM. The API2/MALT1 fusion product may lead to germinal center B cell lymphomas by suppression of apoptosis. *Hum Hered* 2001;51:1-7.
- 25) Maes B, Demunter A, Peeters B, Wolf-Peeters CD. BCL10 mutation does not represent an important pathogenic mechanism in gastric MALT-type lymphoma, and the presence of the API2-MLT fusion is associated with aberrant nuclear BCL10 expression. *Blood* 2002;99:1398-404.
- 26) Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW. World Health Organization Classification of Tumours Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon: IARC Press; 2001.
- 27) Carbone PP, Kaplan HS, Musshoff K, Smithers DW, Tubiana M. Report of the committee on Hodgkin's disease staging classification. *Cancer Res* 1971;31:1860-1.
- 28) Knowles DM, Jakobiec FA, McNally L, Burke JC. Lymphoid hyperplasia and malignant lymphoma occurring in the ocular adnexa(orbit, conjunctiva, and eyelids): a prospective multiparametric analysis of 108 cases during 1977 to 1987. *Hum Pathol* 1990;21:959-73.
- 29) Mannami T, Yoshino T, Oshima K, Takase S, Kondo E, Ohara N, et al. Clinical, histopathological,

- and immunogenetic analysis of ocular adnexal lymphoproliferative disorders: Characterization of MALT lymphoma and reactive lymphoid hyperplasia. *Mod Pathol* 2001;14:641-9.
- 30) Chan JKC, Ng CS, Isaacson PG. Relationship between high-grade lymphoma and low grade B-cell mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma (MALToma) of the stomach. *Am J Pathol* 1990;136:1153-64.
- 31) Ranaldi R, Goteri G, Baccarini MG, Mannello B, Beardi I. A clinicopathological study of 152 surgically treated primary gastric lymphomas with survival analysis of 109 high grade tumours. *J Clin Pathol* 2002;55:346-51.
- 32) Montalban C, Manzanal A, Castrillo JM, Escribano L, Bellas C. Low grade gastric B-cell MALT lymphoma progressing into high grade lymphoma. Clonal identity of the two stages of the tumour, unusual bone involvement and leukaemic dissemination. *Histopathology* 1995;27:89-91.
- 33) Peng HZ, Du MQ, Diss TC, Isaacson PG, Pan L. Genetic evidence for a clonal link between low and high-grade components in gastric MALT B-cell lymphoma. *Histopathology* 1997;30:425-9.
- 34) Hatano B, Ohshima K, Tsuchiya T, Yamaguchi T, Kawasaki C. Clinicopathological features of gastric B-cell lymphoma; A series of 317 cases. *Pathol Int* 2002;52:677-82.
- 35) Yoshino T, Omonishi K, Kobayashi K, Mannami T, Okada H, Mizuno M, et al. Clinicopathological features of gastric mucosa associated lymphoid tissue (MALT) lymphomas: high grade transformation and comparison with diffuse large B cell lymphomas without MALT lymphoma features. *J Clin Pathol* 2000;53:187-90.
- 36) Hoeve MA, Gisbertz IAM, Schouten HC, Schuurung E, Bot FJ, Hermans J, et al. Gastric low-grade MALT lymphoma, high-grade MALT lymphoma and diffuse large B cell lymphoma show different frequencies of trisomy. *Leukemia* 1999; 13:799-807.
- 37) Nakamura S, Yao T, Aoyagi K, Iida M, Fujishima M, Tsuneyoshi M. Helicobacter pylori and primary gastric lymphoma. *Cancer* 1997;79:3-11.
- 38) Du MQ, Peng HZ, Singh N, Isaacson PG, Pan LX. The accumulation of p53 abnormality is associated with progression of mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *Blood* 1995;86:4587-93.
- 39) Peng HZ, Diss TC, Isaacson PG, Pan LX. C-myc gene abnormalities in mucosa associated lymphoid tissue (MALT) lymphomas. *J Pathol* 1997;181:381-6.
- 40) Okabe M, Inagaki H, Ohshima K, Yoshino T, Li C, Eimoto T, et al. API2-MALT1 fusion defines a distinctive clinicopathologic subtype in pulmonary extranodal marginal zone B-cell lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue. *Am J Pathol* 2003;162:1113-22.
- 41) Liu H, Ye H, Ruskone-Fourmestraux A, John DD, Pileri S, Thiede C, et al. T(11;18) is a marker for all stage gastric MALT lymphomas that will not respond to H. pylori eradication. *Gastroenterology* 2002;122:1286-94.
- 42) Kobayashi Y, Nakata M, Maekawa M, Takahashi M, Fujii H, Matsuno Y, et al. Detection of t(11;18) in MALT-type lymphoma with dual-color fluorescence in situ hybridization and reverse transcriptase-polymerase chain reaction analysis. *Diag Mol Pathol* 2001;10:207-13.
- 43) Motegi M, Yonezumi M, Suzuki H, Suzuki R, Hosokawa Y, Hosaka S, et al. API2-MALT1 API2-MALT1 chimeric transcripts involved in mucosa-associated lymphoid tissue type lymphoma predict heterogeneous products. *Am J Pathol* 2000; 156:807-12.
- 44) Kalla J, Stilgenbauer S, Schaffner C, Wolf S, Ott G, Greiner A, et al. Heterogeneity of the API2-MALT1 gene rearrangement in MALT-type lymphoma. *Leukemia* 2000;14:1967-74.
- 45) Streubel B, Lamprecht A, Dierlamm J, Cerroni L, Stolte M, Ott G, et al. T(14;18)(q32;q21) involving IGH and MALT1 is a frequent chromosomal aberration in MALT lymphoma. *Blood* 2003;101: 2335-9.
- 46) Remstein ED, Kurtin PJ, James CD, Wang X-Y, Meyer RG, Dewald GW. Mucosa-associated lymphoid tissue lymphomas with t(11;18)(q21;q21) and mucosa-associated lymphoid tissue lymphomas with aneuploidy develop along different pathogenetic pathways. *Am J Pathol* 2002;161:63-71.
- 47) Li C, Inagaki H, Kuo T, Hu S, Okabe M, Eimoto T. Primary cutaneous marginal zone B-cell lymphoma. *Am J Surg Pathol* 2003;27:1061-9.
- 48) Adachi A, Tamaru J, Kaneko K, Kuroda H, Miura I, Kojima T, et al. No evidence of a correlation between BCL10 expression and API2-MALT1 gene rearrangement in ocular adnexal MALT lymphoma. *Pathol Int* 2004;54:16-25.