

内 容 要 旨 目 次

主 論 文

A20 (TNFAIP3) Alterations in Primary Intestinal Diffuse Large B-cell Lymphoma
(消化管原発びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫における *A20 (TNFAIP3)* 遺伝子異常)

藤井将義, 高田尚良, Shih-Sung Chuang (莊世松), 高田 (宮田) 友子, 安藤 翠,
佐藤康晴, 吉野 正

Acta Medica Okayama (掲載予定)

主論文

A20 (TNFAIP3) Alterations in Primary Intestinal Diffuse Large B-cell Lymphoma (消化管原発びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫における *A20 (TNFAIP3)* 遺伝子異常)

[緒言]

胃腸 gastrointestinal (GI) tract は、節外性非ホジキンリンパ腫がもつとも高頻度に発生する部位である。胃腸に発生する悪性リンパ腫の主な亜型として、胃の粘膜関連リンパ組織 (MALT) リンパ腫 (46.2%)、十二指腸の濾胞性リンパ腫 (38%)、小腸および大腸のびまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫 (DLBCL) (41%) がある。小腸の DLBCL はまれな疾患であるが、時に腹痛、腸閉塞あるいは穿孔を引き起こす。我々は以前の研究で、消化管原発 DLBCL では胚中心 B 細胞 (Germinal-center B-cell-like; GCB) 型よりも活性化 B 細胞 (Activated B-cell-like; ABC) 型が優勢であったことに加えて、消化管穿孔が独立した不良予後因子の 1 つであることを明らかにした。

A20 は腫瘍壊死因子 α 誘導タンパク 3 (*TNFAIP3*) としても知られ、染色体 6q23 上に位置し、*A20* の他、*MALT1* や *CARD11* の癌遺伝子変異等のいくつかの遺伝子異常によって NF- κ B 経路の負の調節に働く。*A20 (TNFAIP3)* 欠損は、ABC 型の DLBCL、MALT リンパ腫、ホジキンリンパ腫および EBV 関連リンパ腫等のリンパ腫において報告されている。*A20* は二機能性酵素であり、ユビキチン化/脱ユビキチン化により TNFR1 シグナル伝達複合体の近位の必須メディエーターである受容体相互作用タンパク質 (RIP) を不活性化あるいは分解する。*A20* は、脱ユビキチン化によって toll-like 受容体により誘導される NF- κ B シグナルを阻害し、また MAP キナーゼシグナル伝達カスケードを調節する。さらに、*A20* は炎症反応抑制作用、抗アポトーシス因子作用等があり、免疫恒常性に影響する。

DLBCL のうち 20% が *A20* 遺伝子異常を有することがこれまで報告されているが、腸管 DLBCL における *A20* 変化の頻度およびその臨床病理学的意義は特徴付けられていない。本研究では、原発性腸管 DLBCL の 56 例における *A20* 欠損および *A20* タンパク発現を分析した。

[材料と方法]

対象および材料

本研究では外科的に切除された腸管 DLBCL 標本 (1990 年から 2012 年、台湾の Chi-Mei Foundation 病院および関連病院) を用いた。これらは Lu らの報告書で使用されたものと同じ症例である (Lu YH, et al. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2016 24 541-549)。消化管原発の採用基準として Ann Arbor システムの修正版である米国 Joint Committee on Cancer Staging Manual に従った。本研究では、他臓器原発からの進展症例を除外した。腸の部位は Koch らの基準 (十二指腸、小腸、回盲部、結腸および直腸) に従って分類した。DLBCL としての組織学的診断は、現在の世界保健機関 (WHO) 分類の基準に従った。

研究材料に 58 例ホルマリン固定パラフィン包埋組織 (FFPET) サンプルを使用し、そのうち 56 例が組織マイクロアレイ (TMA)、2 例が通常組織切片であった。

蛍光 in situ ハイブリダイゼーション (FISH) 解析

二色蛍光を用いた FISH によって、FFPET 上で A20 欠失を評価した (Vysis / Abbott Molecular Laboratories, Des Plaines, IL, USA)。オレンジ標識 A20 プローブ (BAC クローン RP11-783B20) および 6 番染色体 (CEP6) の緑標識セントロメアプローブを用い、2 つの内部陽性対照シグナル (CEP6) が存在する場合にのみスコアリングし、A20 および CEP6 のシグナル比を計算して A20 欠失の状態を評価した。DLBCL において、A20 ホモ欠失を決定するためのシグナル閾値は、20%～60% の範囲であり、A20 ヘテロ欠失では 60%～80% の範囲と記載されている。

免疫組織化学的解析

免疫組織化学 (IHC) 的染色は、自動 Bond Max 自動染色装置 (Leica Biosystems, Melbourne, Australia) および Ventana XT 自動染色装置 (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ) を用いて行った。この研究で用いた一次抗体のクローンおよび希釈率は以下の通りである: A20 (EPR2663, [1:100], Epitomics, Burlingame, CA), CD20 (L26, [1:200], Novocastra Laboratories, Newcastle Upon Tyne, UK), CD10 (56C6, [1:50], Novocastra), BCL6 (D8, [1:250], Santa Cruz, CA), MUM1 (MUM1p, [1:50], Dako, Glostrup, Denmark), BCL2 (Bcl-2, [1:40], Dako), c-MYC (9E10, [1:50], Santa Cruz)。

既存の報告と同様、腫瘍細胞のうち A20 に 20% 以上の染色性を示す例を陽性とした。

統計解析

全生存期間 (OS) は、診断日から何らかの原因による死亡日までの期間を測定した。症例のデータ不足により、無イベント生存率 (EFS) はデータが得られなかった。Kaplan-Meier 法により生存曲線を作成し、対数検定によりその値を比較した。フィッシャーの厳密検定またはカイ 2 乗検定により、p 値が 0.05 未満を有意と考えた。

[結果]

患者

58 例のうち、男性 29 例 (56%)、女性 23 例 (44%) の計 52 例の臨床データが入手可能であった。年齢の中央値は 64 歳 (range 23～87 歳)、腫瘍の大きさは平均 8.4 cm (range 2.4～16 cm) であった。最多の部位は回盲部 (39 例、75%)、次いで小腸 (空腸および回腸、7 例、13.5%) であった。その他、小腸および結腸に存在する例、十二指腸、小腸および回盲に存在する例、腫瘍多発例 (多数部位に存在) があった。経過観察期間の中央値は 21 ヶ月 (範囲、0.2～210 ヶ月) であった。

免疫組織化学

免疫組織化学的所見は 52 例で評価可能であり、cell-of-origin は Hans のアルゴリズムを用いて決定した。GCB 型は 16 例 (31%)、非 GCB 型は 36 例 (69%) であった。回盲部例は、小腸症例と比較して BCL6 ($p = 0.027$) および MUM1 ($p = 0.0001$) の陽性率が有意に高かった。BCL2 陽性例は 52 例 (73%)、MYC 陽性例は 13 例 (26%) であった。BCL2 および MYC 二重発現 DLBCL 症例は 6 例 (12%) であった。

A20欠失の評価

52例中47例でFISHシグナルが評価可能であった。47例中6例(13%)がA20ヘテロ接合欠損を有していたが、ホモ接合欠損は認められなかった。6例(男性4例、女性2例)の年齢中央値は63歳(51~81歳)であった。最も頻繁に関与する部位は、回腸領域(4例、67%)であり、平均腫瘍径は8.2cmであった。穿孔は2例(33%)で検出され、両症例とも診断より7ヵ月以内に死亡した。経過観察期間の中央値は9ヵ月で、4例(67%)が死亡した。単変量解析では、OSを含むA20ヘテロ欠失例と非欠失例との間に有意差はなかった($p = 0.63$)。

免疫組織化学(IHC)的所見と臨床病理学的特徴および予後との相関

A20の免疫組織化学的分析では、52例のうち46例が評価可能であり、42例(91%)が陽性、残りの4例(9%)が陰性であった。A20ヘテロ欠失を示した6例すべてがA20 IHC陽性であった。

A20ヘテロ欠失を示した6例のうち5例は非GCB型、1例はGCB型であった。A20 IHC陰性4例(男性2人、女性2人)の年齢中央値は63歳(61~83歳)であった。回盲部(3例、75%)が最多であり、平均腫瘍径は7.0cmであった。これらの4人の患者のうち、追跡期間中央値57ヵ月で腸の穿孔または死亡はなかった。A20 IHC陰性例のうち2例は非GCB型、2例はGCB型であった。

A20欠失6例、A20 IHC陰性4例、残り41例の間で臨床病理学的要因は有意差がなかったが、これはおそらく前二者のサンプルサイズが小さすぎたためであろう。

[考察]

我々は、原発性腸管DLBCL症例を用いたA20欠失およびA20タンパク質発現を検討した。*CARD11*および*MYD88*突然変異はA20を含むNF- κ B経路の変化に関与し、これらは非GCB型DLBCLにおいて頻繁である。我々は、52例のうち6例(13%)がA20ヘテロ欠損を示したが、これらのすべての症例はA20蛋白発現陽性であった。一方、52例のうち4例はA20蛋白発現陰性であったが、A20欠失は認められなかった。これらは、A20欠失が必ずしもA20蛋白発現低下を引き起こすとは限らないことを示している。A20欠失のみならず、A20プロモーター部位の過剰メチル化もまたA20の発現低下に寄与し得ることも報告されているため、A20非欠失かつA20 IHC陰性の4例では、IHC陰性はプロモーターの過剰メチル化によって引き起こされた可能性がある。

我々は、ヘテロ欠失によるA20ハプロ不全のみでも、B細胞リンパ腫においてリンパ腫発生の誘因となりうる仮説を主張する。HonmaらはABC型DLBCLおよびマントル細胞リンパ腫において、A20ホモ欠失だけでなくヘテロ欠失においてもA20不活化がしばしば見られ、A20の部分的なノックダウンでもEB-LCL (Epstein Barr virus lymphoblastoid cell line)におけるアポトーシス耐性およびコロニー形成能力増加を示したことを発表した。このHonmaらの結果は我々の仮説を支持する結果である。

我々はまた、A20ヘテロ欠失だけでなく、ABC型DLBCLにしばしば見出される*CARD11*および*MYD88*のような機能獲得変異もリンパ腫発生に影響を及ぼし得ると推測した。WolfmumらはA20ハプロ不全マウスではアテローム性動脈硬化症に関連するNF- κ B標的遺伝子の発現が増加し、アテローム性動脈硬化症が増加したことから、A20はNF- κ Bを負に調節していると報告した。この結果は、A20とNF- κ Bの関係を裏付ける可能性がある。

本研究では FISH と IHC の結果に不一致点があるが、我々は FISH 解析が免疫組織化学的解析と比較して *A20* 遺伝子の状態を判定する良い方法であると推測している。*A20* について最初に免疫組織化学所見を報告したのは Giulino らであるが、彼らは *A20* 両アレル変異例 (1 例) が *A20* IHC 陰性であったのに対し、*A20* 変異および/または片アレル欠失例では *A20* IHC で反応性を保持していることを報告した。

網羅的遺伝子発現解析に基づいて、DLBCL は GCB 型あるいは非 GCB 型に細分されるが、GCB 型と非 GCB 型との間に有意な予後の違いがある。したがって、日常的な DLBCL の診療において、免疫組織化学によって cell-of-origin (細胞起源) を分類することが重要である。原発性胃腸管 DLBCL では、non-GCB 型の頻度は、小腸で 6%~14%、結腸で 57% であると報告されている。本研究では、症例の 70% は非 GCB 型であった。この有病率が比較的高いことは、この研究において回盲部例の割合が高いことを示しているが、他の遺伝子要因も含んでいる可能性がある。

以前の報告では、穿孔、高いパフォーマンスステータス (PS2 以上)、および補助化学療法を志向していないことが原発性腸管 DLBCL の独立した不良予後因子であると報告した。我々はさらに、腫瘍径 > 8cm は新たな独立予後不良因子であることを示した ($p=0.03$, 95%CI:1.11-8.34)。Lugano 分類においても腸のリンパ腫では進行度分類に腫瘍径は採用されておらず、われわれが知る限り、腸管 DLBCL の腫瘍径が予後の独立した予測因子であるという研究は今までにない。

【結論】

原発性腸管 DLBCL において、腫瘍径は新たな独立予後不良因子であった。原発性腸管 DLBCL では他の解剖学的部位の DLBCL よりも *A20* 異常が優勢ではなかった。また、*A20* 遺伝子欠失とタンパク発現に不一致が見られた。*A20* 変異は臨床病理学的特徴との有意差が見られなかったが、原発性腸管 DLBCL における *A20* および他の NF- κ B コンポーネントの関連についてさらなる研究が必要である。