悪性リンパ腫における Cyclin D1の発現とその意義

—特に臨床病理学的腫瘍単位としてのマントル細胞リンパ腫と分子病理学的腫瘍単位である Cyclin D1過剰発現リンパ腫との関連について—

中村 栄男¹⁾, 瀬戸 加太²⁾, 谷田部 恭¹⁾
 黒田 裕行²⁾, 鏡味 良豊³⁾, 鈴木 律朗³⁾
 小椋美知則³⁾, 小島 勝⁴⁾, 本告 匡⁵⁾
 越川 卓¹⁾, 上田 龍三²⁾, 須知 泰山¹⁾

- 1) 愛知県がんセンター病院臨床検査部
- 2) 愛知県がんセンター研究所化学療法部
- 3) 愛知県がんセンター病院血液化学療法部
- 4) 足利赤十字病院臨床検査部
- 5) 北里研究所メディカルセンター病院病理部

Clinicopathologic study of malignant lymphoma immunohistochemically showing cyclin D1 protein overexpression with special reference to mantle cell lymphoma

Shigeo Nakamura¹⁾, Masao Seto²⁾, Yasushi Yatabe¹⁾, Hiroyuki Kuroda²⁾, Yoshitoyo Kagami³⁾, Ritsuro Suzuki³⁾, Michinori Ogura³⁾, Masaru Kojima⁴⁾, Tadashi Motoori⁵⁾, Takashi Koshikawa¹⁾, Ryuzo Ueda²⁾, Taizan Suchi¹⁾

- 1) Department of Pathology and Clinical Laboratories, Aichi Cancer Center Hospital
- 2) Laboratory of Chemotherapy, Aichi Cancer Center Research Institute
- 3) Department of Hematology and Chemotherapy, Aichi Cancer Center Hospital
- 4) Department of Pathology and Clinical Laboratories, Ashikaga Red Cross Hospital
- 5) Department of Pathology, Kitasato Institute Medical Center Hospital

The overexpression of PRAD1/cyclin D1 gene activated by the 11q13 translocation and its molecular counterpart BCL-1 rearrangement is frequently associated with mantle cell lymphomas (MCLs). We recently described that the positive nuclear staining observed with monoclonal antibody against a recombinant PRAD1/cyclin D1 product correlates with the mRNA overexpression in MCLs. In the present study, we have immunohistochemically examined the cyclin D1 protein in a large series of 295 lymphoproliferative disorders including 39 MCLs on paraffin sections. Based on the expression of cyclin D1 protein and CD5, and morphological features of the tumor cells, three groups of MCL-related lesions were identified among the B-cell lymphomas examined; 36 cases with cyclin D1 overexpression, 35 (97%) of which exhibited CD5-positivity and

MCL morphology often with naked germinal centers (Group A); 14 cases of CD5-positive lymphoma without cyclin D1, 10 of which showed the histology of diffuse large cell lymphoma with sparing of follicles (Group B); 6 cases of CD5-negative lymphomas without cyclin D1, but which were within the morphological boundaries described of MCL (Group C). The patients with Group A clinicopathologically constituted a very homogeneous group, their ages ranging from 46 to 81 (mean, 64 years of age), and the 5-year survival rate being 19%. Although several differences were noted in the histologic, phenotypic and genotypic pictures of each group, there was no significant difference in the clinical pictures among the three groups, and the patients with Group A and B had the similar survival curves. The BCL-2 protein was expressed in all cases of three groups, while most of the cases lacked p53 protein. These three groups sometimes overlapped their histologic and phenotypic spectrums, and it was difficult to distinguish one from the other on several occasions. We therefore propose that the immunolocalization of cyclin D1 protein is an essential marker for the definite diagnosis of MCL.

Key words : bcl-1 gene, PRAD1/cyclin D1, mantle cell lymphoma, monoclonal antibody, immunohistochemistry.

はじめに

マントル細胞リンパ腫 (mantle cell lymphoma, MCL と略) は正常リンパ濾胞マントル層細胞に相似した表現型 (CD5⁺, 10⁻, 20⁺) と共に高頻度に染色体転座 t (11; 14) (q13; q32) を示す B 細胞腫瘍であり, 近年, 明確な臨床病理学的腫瘍単位としての総括がなされたものである¹⁾. この染色体異常, 即ち 11q13 領域転座切断点は BCL1 と命名された. Seto らは同染色体転座を有する種々の cell line において PRAD1/Cyclin D1 遺伝子の過剰発現を報告し²⁾³⁾, BCL1 癌遺伝子の実体の本態が Cyclin D1 遺伝子の過剰発現であることを明らかにした. 現在, MCL を中心とする悪性リンパ腫において Cyclin D1 遺伝子異常および過剰発現に関する諸々のレベルでの知見が集積されつつある. 一方, MCL は中間型細胞に代表される特徴的な形態像を持つ CD5 陽性 B 細胞腫瘍として定義されてきたが, その臨床病理学的腫瘍単位としての範囲は必ずしも明確ではなく, また Cyclin D1 遺伝子過剰発現との関連において厳密な検証がなされたものではない.

今回, 我々は免疫組織学的に応用可能な Cyclin D1 蛋白質に対するモノクローナル抗体 (5D4) を樹立し⁴⁾, 本邦悪性リンパ腫症例における Cyclin D1 蛋白質過剰発現の有無について検討したので報告す

る. 本研究では分子病理学的腫瘍単位とも見做しうる Cyclin D1 蛋白質過剰発現リンパ腫の臨床病理像を明らかにすると共に, 同腫瘍とその周辺に位置する CD5 陽性 B 細胞リンパ腫あるいは形態学的に MCL に似たリンパ腫との関連についても系統的解析を試みた.

抗体の特異性および免疫組織化学的検討

得られた抗 Cyclin D1 モノクローナル抗体 (5D4) は標本の固定条件による抗体の染色特性を解析したところ, microwave oven heating 法でホルマリン固定パラフィン切片で明確に評価可能であった⁵⁾. 同抗体の特性を当初 Cyclin D1 の過剰発現が期待される MCL (CD5⁺, 10⁻, 20⁺) 19 例について解析した. その結果, 15 例 (79%) に陽性産物の核あるいは核と細胞質への局在が観察された. 核陽性 15 例中 3 例については染色体分析がなされており, 2 例が t (11; 14) (q13; q32), 1 例が t (11; 22) (q13; q11) であった. さらに, 11q13 領域に対する PRAD1 cDNA probe mixture, BCL-1MTC, p94PS probe を用いた Southern blot 解析では 19 例中 8 例 (42%) に DNA 再構成が検出され, これら 8 例全例が核陽性像を示した. PRAD1 cDNA probe を用いた Northern blot 解析では検索可能であった 15 例中 12 例 (80%) に PRAD1/Cyclin D1 mRNA の過剰発

Table 1 Summary of expression of PRAD1/cyclin D1 protein in malignant lymphomas and reactive hyperplasia (total 295 cases)

Staining Pattern	Nuclear	Cytoplasmic
Non-Hodgkin's lymphoma		
B lineage		
Follicular	0/25* (0%)	20/25 (80%)
Diffuse	36/181 (20%)	75/181 (41%)
T lineage	0/35 (0%)	13/35 (37%)
Hodgkin's disease	1/17 (6%)	10/17 (59%)
Reactive hyperplasia	0/37 (0%)	8/37 (22%)

* Cases positive/cases studied.

現が認められ、これら12例全例が同様に核陽性像を示した。同時に検索した MCL 以外のリンパ腫21例では核陽性所見あるいは PRAD1/Cyclin D1 mRNA の過剰発現は観察されなかった。以上より5D4抗体を用いた免疫組織染色により認められる陽性産物の核への細胞内局在は Cyclin D1 の過剰発現を意味するものと考えられた⁶⁾。最近, Gillett ら⁷⁾により報告された抗 Cyclin D1 モノクローナル抗体 (DCS-6) についてもパラフィン切片で検討を加えたが、5D4抗体で核陽性像を示した MCL 10例中1例のみに核陽性所見が得られた。

Cyclin D1 過剰発現リンパ腫の臨床病理学的検討—マントル細胞リンパ腫関連病変

1. MCL 関連病変の定義

上記知見を踏まえ、リンパ増殖性病変295例について5D4抗体による免疫組織化学的検討を試みた (Table 1)。陽性産物の核あるいは核と細胞質への局在がB細胞腫瘍36例に認められたが、他のリンパ腫、反応性病変では観察されなかった。また、検索症例中に CD5陽性であるが核陽性像の認められなかったB細胞リンパ腫14例、CD5陰性で核陽性像も認められないが形態学的に MCL に似たB細胞腫瘍6例が見い出された。これらの症例も含め MCL 関連病変としてA (Cyclin D1免疫染色における核陽性腫瘍; n=36), B (同核陰性だが CD5陽性腫瘍; n=14), C (同核陰性で CD5陰性だが形態学的に MCL に相似した腫瘍; n=6) の3群に分け検討した。3群の scheme を Table 2 に、また各群の臨床所見、組織学的所見、免疫学的表現型、腫瘍関連蛋白

Table 2 Mantle cell lymphoma (MCL)-related lesions

	cyclin D1 (+)	cyclin D1 (-)
CD5 (+)	A (n=32)	B (n=14)
CD5 (-)	A (n=1)	C (n=6)

A and C are within morphological boundaries previously described for MCL.

B is predominantly large cell lymphoma, but is phenotypically similar to MCL.

質の免疫組織学的検索のまとめを Table 3~6 に示す。

2. 臨床病理学的検討

A群すなわち核陽性像を示し Cyclin D1蛋白質過剰発現リンパ腫と考えられる症例の内訳は男性20例、女性16例、年齢は46~81歳(平均64)、臨床病期はII期7%, III期17%, IV期77%例で、経過中48%に節外臓器浸潤、骨髓浸潤の頻度は73%であった (Table 3)。病理組織学的に35例が MCL で、1例が immunocytoma と診断された。腫瘍細胞はびまん性あるいは結節様に増殖し (Fig. 1-a), 核の大きさは32例 (89%) が中間型から中細胞型に分類され (Fig. 1-b), 1例のみ大細胞型であった (Table 4)。11例 (31%) に正常マントル層が消失し萎縮した肺中心 (naked GCs) の残存が観察された (Fig. 1-c, 1-d)。経過中11例に再生検が施行され、大細胞転化を示したのは1例のみであり、同症例では naked GCs が

Table 3 Comparison of clinical features

Group	A	B	C
Total number	36	14	6
Age range(average)	46-81(64)	49-84(66)	53-69(59)
Male/female(ratio)	20/16(1.3)	5/9(0.6)	3/3(1.0)
Stage I/II	7%	7%	0%
III	17%	29%	33%
IV	77%	64%	67%
Bone marrow involv.	73%	73%	50%
Hepatosplenomegaly	67%	46%	50%
Extranodal involv.	48%	75%	50%
Survival 1year	69%	77%	100%
rate 3year	33%	55%	71%
5year	19%	44%	43%

常に認められた (Fig. 2-c)。表現型は新鮮材料で検索された33例中32例がCD5⁺, 20⁺, 1例のみCD5⁻, 20⁺であり, lambda 鎖が優位であった (Table 5)。腫瘍関連蛋白質の発現では Cyclin D1免疫染色での核陽性所見に加え (Fig. 2-c), 全例 bcl-2陽性であった (Fig. 2-d) (Table 6)。予後については 1, 3, 5 年生存率は各々69%, 33%, 19%であった (Fig. 3)。

B群およびC群はB群が女性優位であった以外にA群との間に臨床所見に大きな差異は認められなかった (Table 3)。病理学的にはB群14例中10例 (64%) がびまん性大細胞リンパ腫の組織像であり, これらの症例では naked GCs はなく正常マントル層を有するリンパ濾胞の残存が 4 例に観察された (Fig. 2-a, 2-b) (Table 4)。C群は中間-中細胞型で naked GCs あるいは硝子様沈着物 (hyalin deposit) を示し, 形態学的にA群に極めて相似していた (Fig. 2-d)。表現型はB群がCD5陽性で軽鎖に偏りはなく, 一方C群はCD5陰性で6例中5例 (83%) が kappa 鎖, 半数がIgGを発現していた (Table 5)。予後はA群とC群の間に差 ($P < 0.01$ by generalized Wilcoxon) を認めた以外に有意差は確認されなかった。B, C群についても免疫組織化学的に p53, bcl-2蛋白質の発現を検索したところ, bcl-2は検索した全例に陽性であり, p53陽性率は群に拘らず10%以下であった (Table 6)。比較のために検索

したリンパ節原発びまん性B細胞性大細胞型リンパ腫 (CD5およびCD10陰性) では bcl-2, p53の陽性率は各々65%, 53%であった。

考 察

Cyclin D1の発現の有無とMCLの診断を巡り少なからぬ議論があるが, 分子病理学的腫瘍単位である Cyclin D1蛋白質過剰発現リンパ腫 (A群) はMCLを中心とした極めてhomogeneousな一群を形成することを明らかにした。近年, mRNA レベルでの解析からみた Cyclin D1過剰発現リンパ腫に関する幾つかの検討がほぼ同じ結論に達しているが⁽⁸⁾, 今後方法の簡便性および生物学的機能への直接的関与という観点から見て5D4抗体を用いた免疫組織化学的評価が一般的に受け入れられるものと期待される。一方, CD5陽性でCyclin D1過剰発現のないB細胞性非ホジキンリンパ腫 (B群) は大細胞型リンパ腫が主体であった。これらの症例はA群に代表されるマントル細胞リンパ腫 (MCL) と予後を含む臨床所見, 免疫学的表現型に差はないが, naked GCs とは異なる残存リンパ濾胞に代表される形態学的特徴およびCyclin D1蛋白質の関与がないという分子病理学的特性, またMCLの大細胞転化が稀であるという点に鑑みMCLとは異なる腫瘍と考えられた。これらの特性に加え, bcl-2, p53の発現頻度が通常の節性大細胞型リンパ腫とも異なり, 特異

Fig. 1 マントル細胞リンパ腫 (A群)

a. 腫瘍細胞は結節様構造を形成し増殖する。(HE, x75) b. 核にくびれを有する中間型細胞からなる極めて単調な構成を示す。(HE, x450) c. 抗 Cyclin D1 抗体による免疫染色。核陽性所見と共に正常マントル層が消失し萎縮した肺中心 (naked GCs) (写真下) の残存が観察される。(x450) d. 抗 bcl-2抗体による免疫染色。腫瘍細胞は陽性であるが, naked GCs (写真下) の部分は陰性である。(x450)

Fig. 2 a, b Cyclin D1免疫染色で核陰性であった CD5陽性びまん性大細胞型リンパ腫 (B群)

- a. naked GCs とは異なる正常マントル層を有するリンパ濾胞 (写真中央) の残存が観察される。(HE, x150)
- b. 腫瘍細胞は大型水泡状核を有する。(HE, x450)
- c 経過中に大細胞転化を示したマントル細胞リンパ腫 (A群)。naked GCs (写真下) の残存が認められる。(HE, x450)
- d CyclinD1免疫染色で核陰性かつ CD5陰性だが形態学的に MCL に似たリンパ腫 (C群)。(HE, x450)

Table 4 Comparison of morphologic features

Group	A	B	C
Total number	36	14	6
Pattern			
Diffuse	42%	64%	50%
Vaguely nodular	58%	36%	50%
Residual naked GCs*	31%	7%	33%
Residual follicles	0%	28%	0%
Hyalin deposits	58%	7%	67%
Nuclear size			
Intermediate	47%	0%	17%
Medium	42%	21%	83%
Medium to large	8%	14%	0%
Large	3%	64%	0%

* GCs, germinal centers.

Table 5 Comparison of phenotypic features

Group	A	B	C
Cyclin D1	+	—	—
CD5	97%	100%	0%
IgM	94%	92%	67%
IgD	42%	42%	33%
IgG	32%	17%	50%
IgA	6%	17%	0%
kappa	33%	46%	83%
lambda	67%	54%	17%
CD10	3%	7%	0%
CD19	96%	77%	83%
CD20	100%	100%	100%
CD21	80%	71%	100%
CD22	69%	71%	75%
CD38	46%	42%	50%

Table 6 Comparison of immunohistologic features

Group	A	B	C	DL*
Case no. examined	23	13	6	17
Cyclin D1 protein	+	—	—	—
CD5	+	+	—	—
Anti-bcl-2 protein	100%	100%	100%	65%
Anti-p53 protein	4%	8%	0%	53%
Anti-Rb protein	87%	88%	ND**	100%

*DL, Node-based diffuse large cell lymphoma (CD5⁺, 10⁺, 20⁺).

**ND, not done.

な一群を形成するよう思われた。その腫瘍細胞起源については Cyclin D1蛋白質の過剰発現以外の分子機構でマントル層細胞から由来したのか、あるいは de novo 的な Richter 症候群とも見做し得るのか⁹⁾等の幾つかの可能性が推測されたが、その本態及び臨床病理的意義については今後の検討課題であろう。CD5陰性で Cyclin D1過剰発現もなく形態学的 MCL に相似したリンパ腫 (C 群) はその表現型から marginal zone lymphoma との関連性が示唆されたが¹⁰⁾、その本態についても現段階ではなお種々の問題を残すといわざるを得ないように思われる。

以上, Cyclin D1蛋白質過剰発現リンパ腫 (A 群)

が極めて特徴的な形態像, 臨床所見, 表現型を備えた腫瘍単位を形成し, パラフィン切片での免疫組織学的検索に応用可能なモノクローナル抗体の開発により同腫瘍の診断が日常診療的に可能であるとい得るよう思われる。それと同時に本研究では同腫瘍の周辺に位置し今後問題となるであろうと推測され, それ自体別個の腫瘍単位を形成する可能性のあるリンパ腫群の存在とその概要を明らかにした。

結 語

免疫組織学的にパラフィン切片に応用可能なモノクローナル抗体の樹立により Cyclin D1蛋白質過剰

Fig. 3 マントル細胞リンパ腫関連病変各群 (A, B, C群) の予後曲線

発現リンパ腫の診断は routine work で可能となったが、その周辺に位置し今後問題となるであろうと思われる腫瘍群について言及した。

謝 辞

本研究は鬼頭邦吉、小池考一 (愛知県がんセンタ

一病院)、尾山 淳 (県立愛知病院)、鈴木久三 (岡崎市民病院)、南 三郎 (名古屋第一赤十字病院)、岡本昌隆 (藤田保健衛生大学) の各位の協力による。なお研究の一部は文部省科学研究費、厚生省がん研究助成金、大幸財団学術研究助成金によった。

文

- 1) Banks PM, Chan J, Cleary ML et al. Mantle cell lymphoma: a proposal for unification of morphologic, immunologic, and molecular data. *Am J Surg Pathol* 16: 637-640 1992
- 2) Seto M, Yamamoto K, Iida S et al. Gene rearrangement and overexpression of PRAD1 in lymphoid malignancy with the t(11;14) (q13;q23) translocation. *Oncogene* 7: 1401-1406 1992
- 3) Komatsu H, Iida S, Yamamoto K et al. A variant chromosome translocation at 11q13 identifying PRAD1/cyclin D1 at the BCL-1 gene. *Blood* 84: 1226-1231 1994
- 4) Banno S, Yoshikawa K, Nakamura S et al. Monoclonal antibody against PRAD1/cyclin D1 stains nuclei of tumor cells with translocation or amplification at BCL-1 locus. *Jpn J Cancer Res* 85: 918-926 1994

献

- 5) Nakamura S, Seto M, Banno S et al. Immunohistochemical analysis of cyclin D1 protein in hematopoietic neoplasms with special reference to mantle cell lymphoma. *Jpn J Cancer Res* 85: 1270-1279 1994
- 6) Kuroda H, Komatsu H, Nakamura S et al. The positive nuclear staining observed with monoclonal antibody against PRAD/cyclin D1 correlates with mRNA expression in mantle cell lymphoma. *Jpn J Cancer Res* 1995 in press
- 7) Gillett C, Fantl V, Smith R et al. Amplification and overexpression of cyclin D1 on breast cancer detected by immunohistochemical staining. *Cancer Res* 54: 1812-1817 1994
- 8) de Boer CJ, van Krieken JHJM, Kluin-Nelemans HC, Kluin PM, Schuurin E. Cyclin D1 messenger RNA overexpression as a marker

- for mantle cell lymphoma. *Oncogene* 10:1833-1840 1995
- 9) Matolcsy A, Chadburn A, Knowles DM. Phenotypic and molecular characterization of de novo CD5 positive diffuse large B cell lymphoma. *Mod Pathol* 81:116A 1995
- 10) Harris NL, Jaffe ES, Stein H et al. A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the international lymphoma study group. *Blood* 84:1361-1392 1994