B 細胞性リンパ腫と免疫グロブリン遺伝子の somatic mutation

田丸 淳一¹⁾, 高橋 直樹²⁾, 磯部 公一³⁾
糸山 進次¹⁾

1) 埼玉医科大学総合医療センター病理

2) 千葉大学医学部耳鼻科

3) 千葉大学医学部放射線科

Somatic mutation in rearranged IgHV gene of B-NHLs

Jun-ichi Tamaru¹⁾, Naoki Takahashi²⁾,
Koichi Isobe³⁾, Shinji Itoyama¹⁾

1) Department of Pathology, Saitama Medical Center,
Saitama Medical School.

2) and 3) Department of Otorhinology and Radiology
Chiba University School of Medicine

Antibody molecules produced by B cells are engaged in the humoral immunity. Antibodies have molecular diversity to respond specifically to each of innumerable species of antigen. Antibody molecular diversity is the immediate result of immunoglobulin gene diversity which is formed by complicated processes including VDJ rearrangement and is thought to reflect differentiation status of B cells. Somatic mutation occurs in these immunoglobulin genes after main VDJ rearrangement and also plays an important role in further widening of molecular diversity.

In recent years, the significance of somatic mutation of immunoglobulin gene in B-cell differentiation process was made clear, and as the result, identification of the normal counterpart of tumor cells became possible on gene level studies, which had been judged mainly from histocytological and immunohistochemical studies.

はじめに

B 細胞は抗体分子を産生し、液性免疫にたずさわっている。この抗体分子はさまざまな抗原に対応すべく多様性を有することが知られており、免疫グロブリン遺伝子の VDJ 再構成をはじめとする遺伝子レベルでの出来事で、B 細胞の分化を反映している。再構成後の免疫グロブリン遺伝子に起こる体細胞突然変異 (somatic mutation : SM) も抗体分子の多様性の形成に重要な役割を演じている。近年、この SM と B 細胞の分化との関連性が明らかにされ、これまで細胞形態学的類似性や免疫形質の同一

性から推測されていた B 細胞性腫瘍の正常対応細胞の同定が遺伝子レベルで可能となった。

材料および方法

REAL 分類¹⁾にしたがって診断された各種 B 細胞性リンパ腫のホルマリン固定・パラフィン包埋材料から抽出した DNA を材料として、VH プライマーとしては FR2A、JH プライマーとしては LJH および VLJH を使い、semi-nested polymerase chain reaction (PCR) 法にて IgH 遺伝子を増幅した。増幅産物の一部をポリアクリルアミドゲル電気泳動に使用し、エチジウムブロマイド染色後、UV

表1 Patterns of Somatic Mutations of the VH Region Genes in the Various B Cell malignancies

	Number of studied cases with IgH-R	Number of cases with VH mutations	Number of somatic mutations	Mutation	
				Average frequency (range)	ongoing
B-CLL	6	0	0	0%	no
MCL	6	0 (1)	1	0% (0-1)	no
Burkitt's	8	8	57	4.9% (1-16)	no (?)
MALT	9	9	76	6.5% (1-16)	no (?)
FCL	8	8	138	11.8% (9-31)	yes
DL-B	8	8	162	13.9% (11-38)	no

下にてクロナリテーターの有無を判定した。IgH 遺伝子のクロナルな再構成を示した B-chronic lymphocytic leukemia (B-CLL) 6 例, mantle cell lymphoma (MCL) 6 例, Burkitt's lymphoma (BL) 8 例, mucosa-associated lymphoid tissue type lymphoma (MALT) 9 例, follicular center lymphoma (FCL) 8 例, diffuse large B-cell lymphoma (DL-B) 8 例それぞれについて, それらの増幅産物を FR2A, VLJH プライマーにて両方向に dyedexy terminator 法を用い, 自動 DNA シーケンサー (373A; Applied Biosystem) にて塩基配列を決定した。IgHV 領域の SM の検索のために GenBank に登録された germline シーケンスと比較した。ongoing mutation の検索には Clone Amp System (GIBCOBRL) にてサブクローニングを行い, 各クローンを SP6 および T7 プライマーにて両方向にシーケンスし, 各々の塩基配列を比較した²⁻⁴⁾。

結 果

表1に示されたごとく, B-CLL と MCL では再構成 IgH 遺伝子 V 領域に SM は認められなかったが, FCL や DL-B では, complimentary determining region (CDR)2 から framework region (FW)3 の領域にそれぞれ11.8%および13.9%の塩基置換を認め, SM は高度であった。一方, BL や MALT では CDR2 から FW3 の領域にそれぞれ 4.9%および6.9%で SM は中等度であった。

サブクローニングで全クローンに数塩基の置換が検出されるような明らかな ongoing mutation は FCL だけでみとめられた。

考 察

これまで悪性リンパ腫の正常対応細胞は, 細胞形態学的類似性, 免疫形質の同一性から推測されていたが, 近年の分子生物学の進歩およびその手技の発展にともない, 遺伝子レベルでの検索が可能となった。ドイツの免疫学者, Rajewsky らのグループは, 人のリンパ節の各部位からマイクロマニピュレーターを用いてリンパ球を一つずつピックアップし, それぞれのリンパ球の Ig 遺伝子を詳細に検索し, B 細胞の分化と抗体分子の多様性に一役を担っている Ig 遺伝子におこる SM の関係を明らかにした^{5,6)}。彼らの研究結果は, mantle zone のリンパ球にはその Ig 遺伝子に SM はまったく, あるいはほとんど認められないが, 二次濾胞胚中心の細胞では SM が認められ, light zone に存在する centrocyte には dark zone に存在する centroblast よりこの SM が高頻度であることを示した。そしてこれらの細胞には intraclonal diversity が認められ, 胚中心ではこの SM が継続していることを明らかにした。さらにこの環境を逸脱した memory B 細胞では, クラススイッチをおこした surface(s) IgM⁺/sIgD⁺ memory B 細胞がクラススイッチをおこしていない sIgM⁺/sIgD⁺ memory B 細胞の約2倍の SM をもつことが証明された。すなわち, 抗原刺激を受けていない pre-GC naive B 細胞には SM は認められず, 抗原刺激を受けた GC B 細胞および post-GC B 細胞は SM を有する。そして, GC B 細胞ではまず dark zone の centroblast が抗原刺激を受け, light zone の centrocyte に分化し, SM はこの胚中心の環境において継続し, intraclonal diversity が認められるのである (図1, 表2)。この正

图1 Somatic Mutation of IgH gene & B-cell Differentiation

表2 Relation of the Immunoglobulin V Gene Mutation Pattern to B Cell Differentiation Maturation

Cell type/ Differentiation stage	sIg	Mutation	
		Average frequency	ongoing
<i>Pre-GC compartment</i>			
<i>Pre-B cell</i>	—	none	no
<i>Immature B cell</i>	IgM high	none	no
<i>Peripheral blood naive B cell</i>	IgM & IgD high	none	no
<i>Follicle mantle cell</i>	IgM & IgD high	none	no
<i>GC compartment</i>			
<i>Centroblast (dark zone)</i>	— or IgM low	low to medium	yes
<i>Centrocyte (light zone)</i>	IgM or IgG or IgA or —	medium to high	yes
<i>Post-GC compartment</i>			
<i>Memory B cell without isotype switch</i>	IgM & IgD high or IgM high	low to medium	no
<i>Memory B cell with isotype switch</i>	IgG or IgA	medium to high	no
<i>Plasma (effector) cell</i>	— (cIg)	medium to high	no

常 B 細胞の分化とその Ig 遺伝子におこる SM との関連性が腫瘍細胞の正常対応細胞の同定にも有用である。

B-CLL や MCL ではその IgHV 遺伝子に SM は認められなかったが、FCL や DL-B では高度に SM を認め、BL や MALT では SM は中等度であった。そして、明らかな ongoing mutation は FCL だけで検出された。したがって、B-CLL, MCL の正常対応細胞は pre-GC naive B 細胞、FCL は GC B 細胞、そして DLB, BL, MALT は post-GC B 細胞であり、そのうち BL や MALT は腫瘍細胞のほとんどが sIgM⁺であり、SM も中等度であることよりクラススイッチをおこしていない memory B 細胞であると推測される。

ところが、ここ数年の間に欧米の研究グループから同様の検索で、我々と異なった結果が報告された⁷⁻¹²⁾。それは BL や MALT でも FCL 同様に ongoing mutation がみられ、これらの正常対応細胞が post-GC memory B 細胞ではなく、GC B 細胞である可能性があるというものである。そこで我々はこれら亜型でみられる ongoing mutation の由来を現在検討中である。

共同研究者の高橋は、唾液腺原発 MALT 5 例について同様の検索をしたが、1 症例の 1/10 クローンに 1 塩基置換を認めただけで、明らかな ongoing mutation は検出できなかった。MALT ではしばしば非腫瘍性の反応性濾胞が形成され、その中に腫瘍細胞が浸潤するという現象を認める。Ig 遺伝子におこる SM はリンパ濾胞の胚中心の環境、すなわち抗原提示細胞と T 細胞との共同作業で生じると理解されており、我々はこの follicular colonization が ongoing mutation の起源である可能性を推定し、腫瘍組織中の colonization の部分とそれ以

外のびまん性増殖部分の腫瘍クローンを比較した。その結果、後者では ongoing mutation は検出されなかったが、colonization の部分から得られたクローンには付加的な塩基置換が認められ、MALT でみられる ongoing mutation は follicular colonization に由来する事を証明した¹³⁾。さらに、節外性組織・臓器に発生することが多いことより、MALT との関連性が問題となる BL では、腫瘍増殖部に抗原提示細胞である濾胞樹状細胞や T 細胞の介在はほとんどみられないびまん性増殖が特徴であるが、腫瘍浸潤部ではしばしば非腫瘍性のリンパ濾胞胚中心に腫瘍細胞が homing し、BL の腫瘍細胞の由来は GC B 細胞であると推測されている¹⁴⁾。この homing は MALT でみられる follicular colonization に類似した現象であることに着目し、BL の ongoing mutation について、現在検索をすすめている。

B-CLL では特殊な染色体異常を伴う型やクラススイッチをおこした型では SM を有するものが報告されていたが、さらに、sIgM⁺/sIgD⁺のクラススイッチをおこしていないものでも SM を有するものがみとめられている^{15,16)}。最近、Ig 遺伝子に SM を有し CD27 を発現している sIgM⁺/sIgD⁺ memory B 細胞の存在が報告されており¹⁷⁾、B-CLL の正常対応細胞に関しては heterogeneous であることが推測される。

Ig 遺伝子におこる SM と B 細胞の分化との関連が明らかになり、再構成 Ig 遺伝子の SM の検索が B 細胞性腫瘍の正常対応細胞の同定に広く用いられているが、検索が進むにつれ、例外的な症例も認められてきた。しかし、個々の症例の詳細な検索と正常細胞の分化・機能に関する研究の進歩によって、そのような症例の疑問も解決されてゆくであろう。

文 献

- 1) Harris NL, Jaffe ES, Stein H, Banks PM, Chan J, Cleary ML, Delsol G, De Wolf-Peeters C, Falini B, Gatter K, Grogan TM, Isaacson PG, Knowles DM, Mason DY, Mueller-Hermelink HK, Pileri S, Piris MA, Ralfkiaer E, Warnke R : A revised European-American classification of lymphoid neoplasms : A proposal from the international lymphoma study group. *Blood* 84 : 1361-1392 1994
- 2) Hummel M, Tamaru J, Kalvelage B, Stein H : Mantle cell (previously centrocytic) lymphomas express VH genes with no or very little somatic mutations like the physiological cells of the follicle mantle. *Blood* 84 : 403-407 1994
- 3) Tamaru J, Hummel M, Zemlin M, Kalvelage B, Stein S : Hodgkin's disease with a B-cell phenotype often shows a VDJ rearrangement and somatic mutations in the VH genes. *Blood*

84 : 708-715 1994

- 4) Tamaru J, Hummel M, Marafioti T, Kalvelage B, Leoncini L, Minacci C, Tosi P, Wright D, Stein H : Burkitt & rsquo ; s lymphomas express VH genes with a moderate number of antigen-selected somatic mutations. *Am J Pathol* 147 : 1398-1407 1995
- 5) Kueppers R, Zhao M, Hansmann M-L, Rajewsky K : Tracing B cell development in human garminal centers by molecular analysis of single cell picked from histologic sections. *EMBO J* 12 : 4955-4967 1993
- 6) Klein U, Kueppers R, Rajewsky K : Human IgM⁺ IgD⁺ B cells, the major B cell subset in the peripheral blood, express V & kappa ; genes with no or little somatic mutation throughout life. *Eur J Immunol* 23 : 3272-3277 1993
- 7) Du M, Diss TC, Xu C, Peng H, Isaacson PG, Pan L : Ongoing mutation in MALT lymphoma immunoglobulin gene suggests that antigen stimulation plays a role in the clonal expansion. *Leukemia* 10 : 1190-1197 1996
- 8) Qin Y, Greiner A, Hallas C, Haedicke W, Mueller-Hermelink HK. Intracлонаl offspring expansion of gastric low-grade MALT-type lymphoma : evidence for the role of antigen-driven high-affinity mutation in lymphoma-genesis. *Lab Invest* 76 : 477-85 1997
- 9) Hallas C, Greiner A, Peters K, Mueller- Hermelink HK : Immunoglobulin VH genes of high-grade mucosa-associated lymphoid tissue lymphomas show a high load of somatic mutations and evidence of antigen-dependent affinity maturation. *Lab Invest* 78 : 277-287 1998
- 10) Thiede C, Alpen B, Morgner A, Schmidt M, Ritter M, Ehninger G, Stolte M, Bayerdorffer E, Neubauer A, Ongoing somatic mutations and clonal expansions after cure of *Helicobacter pylori* infection in gastric mucosa-associated lymphoid tissue B-cell lymphoma. *J Clin Oncol* 16 : 3822-3831
- 11) Bahler DW, Miklos JA, Swerdlow SH : Ongoing Ig gene hypermutation in salivary gland mucosa-associated lymphoid tissue-type lymphomas. *Blood* 89 : 3335-3344 1997
- 12) Chapman CJ, Zhau JX, Gregory C, Rickinson AB, Stevenson FK : VH and VL gene analysis in sporadic Burkitt & rsquo ; s lymphoma shows somatic hypermutation, intracлонаl heterogeneity, and a role for antigen selection. *Blood* 88 : 3562-3568 1996
- 13) 高橋直樹, 田丸淳一, 今野昭義, 三方淳男 : 唾液腺原発 MALT type lymphoma における免疫グロブリン遺伝子の検索. *日本病理学会会誌* 87 : 307 1998
- 14) Mann RB, Jaffe ES, Braylan RC, Nanba K, Frank MM, Ziegler JL, Berard CW. Non-endemic Burkitts' lymphoma. A B-cell tumor related to germinal centers. *New Engl J Med* 295 : 685-691 1976
- 15) Oscier DG, Thompsett A, Zhu D, Stevenson FK. Differential rates of somatic hypermutation in V(H) genes among subsets of chronic lymphocytic leukemia defined by chromosomal abnormalities. *Blood* 89 : 4153-4160 1997
- 16) Fais F, Ghiotto F, Hashimoto S, Sellars B, Valetto A, Allen SL, Schulman P, Vinciguerra VP, Rai K, Rassenti LZ, Kipps TJ, Dighiero G, Schroeder HWJr, Ferrarini M, Chiorazzi N. Chronic lymphocytic leukemia B cells express restricted sets of mutated and unmutated antigen receptors. *J Clin Invest* 102 : 1515-1525 1998
- 17) Klein U, Rajewsky K, Kueppers R : Human immunoglobulin(Ig)M+IgD+ peripheral blood B cells expressing the CD27 cell surface antigen carry somatically mutated variable region genes : CD27 as a general marker for somatically mutated (memory) B cells. *J Exp Med* 188 : 1679-1689 1998