

# 悪性リンパ腫の診断・分類： double hit, double expression

## はじめに

悪性リンパ腫は、分類が、従来の 2008 年 WHO 分類から 2016 年 WHO 改訂 (1) により、さらに非常に複雑になっている。そのため、臨床医や病理医の先生がたから、このような複雑が必要であろうかと、疑問の声が上がっている。しかしながら、医療の進歩に従い、一般的な悪性腫瘍の中で、特に悪性リンパ腫の一部は治る (完治できる) ものとなってきた。しかしながら、治らない悪性リンパ腫があるのも事実である。そのため、悪性リンパ腫の理解・診断・分類は、予後を予測し、治療戦略を立てることに非常に重要である。今回特に double hit および double expression に焦点を当てて解説をする。



## 検査方法

これまで造血器腫瘍や固形腫瘍の診断には、細胞や組織の形態が決定的な役割を果たしてきたが、最近の分子生物学の進歩により、DNA、RNA、蛋白、機能解析レベルの検査法が飛躍的な進歩を遂げ、腫瘍細胞に特異的な変異を検出できるようになり、現在、古典的な病理形態診断に加えて、多数の分子生物学的解析法が出現している (図 1)。診断にあたり、数多くの検査項目から最も適した組み合わせを選び出し、迅速に診断にたどり着かなければならなくなっている。

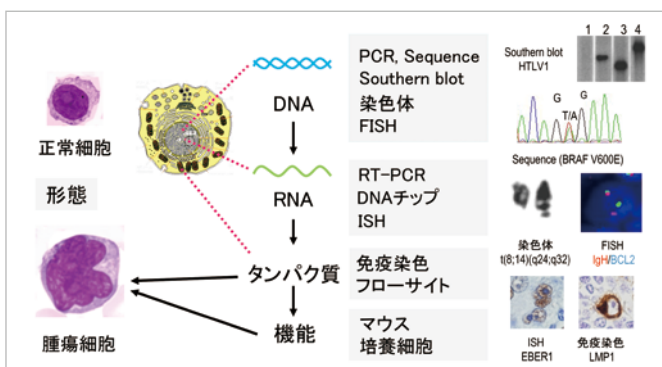


図 1：診断方法

### 1) 免疫染色、フローサイトメトリー

悪性リンパ腫の分類・診断の捉え方としては、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫を分類した上で、非ホジキンリンパ腫は、B 細胞性、T 細胞性 (NK 細胞性を含む) を考慮する必要がある。B 細胞のマーカーの代表的なものは CD19、CD20、CD23、CD10、 $\kappa$ 、 $\lambda$  など、T 細胞の代表的なものは CD2、CD3、CD4、CD5、CD7、CD8 など、NK 細胞は CD16、CD56 などが使用される (2)。ホルマリン固定材料を使用し

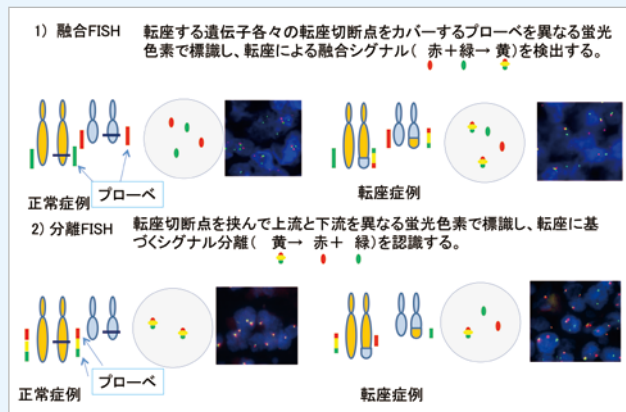
た免疫染色、特殊な抗体では、凍結材料を使用した免疫染色が必要となる。細胞浮遊液を用いたフローサイトメトリーは、短時間で、多数の表面形質を検出できるため、非常に有用である。また、組織での RNA の発現をみるため、*in situ* hybridization 法を行うこともある (図 1) (1, 2)。

## 2) 染色体解析、Fluorescence *in situ* hybridization (FISH)

リンパ腫で、重要な染色体異常としては、転座が多く、1) パーキットリンパ腫の c-MYC 遺伝子に関連した t(8;14) (q24;q32)、t(2;8) (p12;q24)、t(8;22) (q24;q11)、2) 濾胞性リンパ腫の

BCL-2 遺伝子に関連した t(14;18) (q32;q21)、3) マントル細胞リンパ腫のサイクリン D1 遺伝子に関連した t(11;14) (q13;q32)、4) 未分化大細胞型リンパ腫 (ALK 陽性) の anaplastic lymphoma kinase (ALK) 遺伝子に関連した t(2;5) (q23;q35) などが挙げられる (1, 2, 3, 4)。また、細胞分裂像がうまく解析できない場合は、FISH 法によって、転座、遺伝子の増幅、欠損を確認することができる。FISH 法の検体には、末梢血液、骨髓液、リンパ節細胞などを直接固定または、短時間培養した後に固定したものをを用いていたが、最近では、ホルマリン固定パラフィン包埋の病理検体でも可能になった (図 1)。

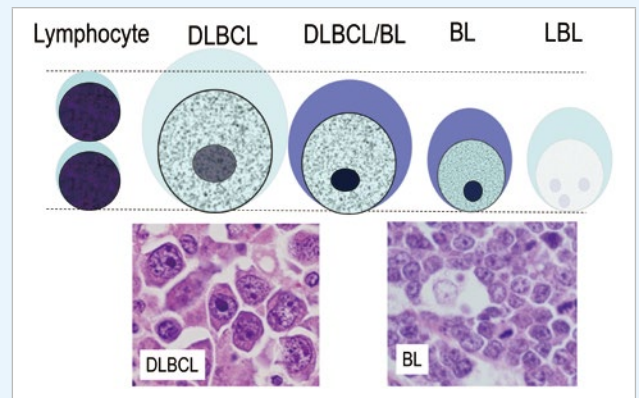
**メモ 1: Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) のプローベ**  
 転座切断点を確認するため FISH プローベには、融合遺伝子で確認するプローベとスプリットで確認するプローベがある。たとえば、パーキットリンパ腫の染色体転座には、t(8;14) (q24;q32) の c-MYC/IgH 転座、t(2;8) (p12;q24) の c-MYC/IgL 転座、t(8;22) (q24;q11) の c-MYC/IgL の 3 種類が知られているが、c-MYC の転座切断点の上流、下流にプローベを設定する (メモ 2 図) とスプリット信号として c-MYC の転座があることが、確認できるが、転座相手が IgH、IgL かを同定することは困難で、転座相手の確認には融合遺伝子で確認する必要があるが、3 回の FISH が必要となるため、スクリーニングとしてはスプリットを確認することが容易である。



メモ 1: FISH 法による染色体転座の検索

**メモ 3: 4 型 (DLBCL、DLBCL/BL、BL、LBL) のリンパ腫の細胞形態、組織像、免疫染色性の違い (図、表) (文献 1 よりまとめる)**

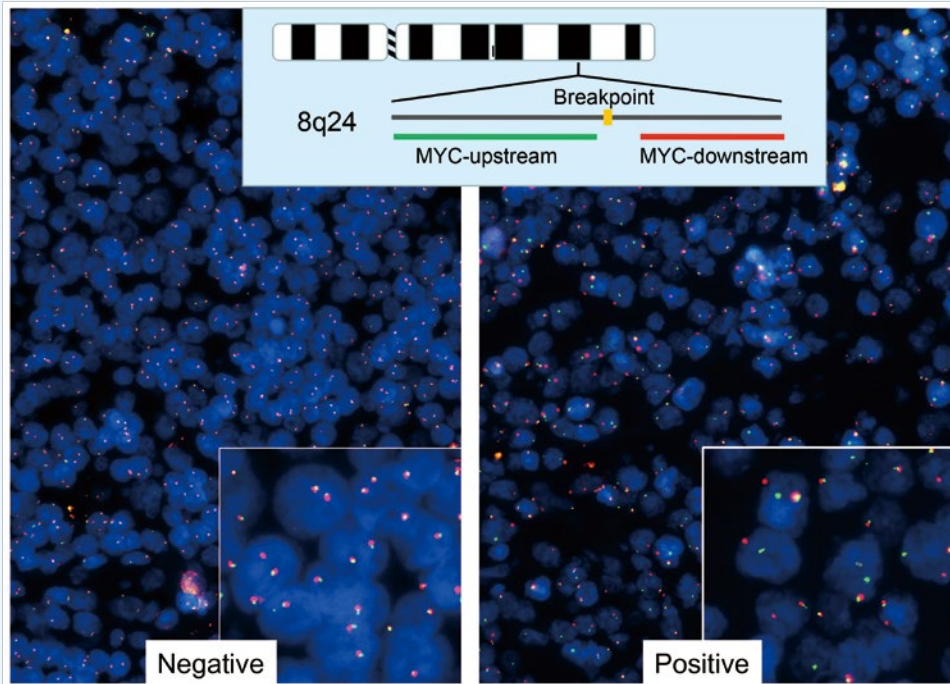
- 1) びまん性大細胞型 B 細胞性リンパ腫 (Diffuse large B-cell lymphoma, DLBCL)
- 2) BL と DLBCL との中間的な特徴を呈する B 細胞性リンパ腫 (B-cell lymphoma, unclassifiable, with features intermediate between diffuse large B-cell lymphoma and Burkitt lymphoma, DLBCL/BL)
- 3) パーキットリンパ腫 (Burkitt lymphoma, BL)
- 4) リンパ芽球型リンパ腫 (Lymphoblastic lymphoma, LBL)



メモ 3 図: リンパ腫の細胞シェーマ

メモ 3 表: リンパ腫の細胞の違い

Distinguishment of Morphologic and immunophenotypic type in 4 groups		DLBCL	DLBCL/BL	Burkitt (BL)	Lymphoblastic (LBL)
Morphology	Cell-size	Large (twice of lymphocytes)	small/medium-sized or mixture of large	small/medium-sized	small/medium-sized
	Nuclei	oval/round/varied	oval/round/varied	round	oval/round
	nucleoli	medium-sized/large/varied central/paracentral	medium-sized/large/varied paracentral basophilic	medium-sized paracentral basophilic	indistinct/multiple
	Chromatin	coarse/fine	finely clumped	finely clumped	dispersed/condensed
	Cytoplasm	amphophilic/basophilic scanty/abundant	basophilic scanty	basophilic scanty	light-blue/bluish grey scanty
	Growth pattern	diffuse/partial involvement	diffuse monotonous	diffuse monotonous cohesive	lipid vacuoles diffuse
	Mitotic features	sometimes	numerous	numerous	sometimes/numerous
Immunophenotype	Starry-sky	rare	frequent	frequent	focal
	Apoptosis	rare	frequent	frequent	focal
	TdT	-	-	-	+
	CD10	-/+	+-	+	+
	Bcl6	-/+	+-	+	-
	CCDN1	-+	-	-	-
	Bcl2	-/+	-+	-	-/+
Ki67 >90%/homogenous	rare	common	always	common	
Ki67 <90%/heterogeneous	common	sometimes	No	rare	



メモ 2 図：MYC スプリットプローブ

#### メモ 2：ダコ Omnis による自動 FISH

見本として c-MYC のスプリット信号を提示する。ダコ Omnis の FISH における特徴として、ホルムアミドは発がん性、催奇形性、環境に対する悪影響などが指摘されており、なおかつプローブのハイブリ効率はそこまで高くなかったため、替わる物質としてエチレンカーボネートという物質を使用することで、毒性や環境への悪影響を防ぐだけでなく、DNA の開裂効率が高まるとともに、プローブのハイブリ効率が上がるという結果が得られ、15 分から 60 分程度でハイブリができるようになってきている。

文献：Matthiesen SH, Hansen CM. Fast and non-toxic *in situ* hybridization without blocking of repetitive sequences. *PLoS One*. 2012;7(7):e40675.

## 細胞形態

細胞 / 核の大きさは、DLBCL は大型 (組織球の核あるいは小リンパ球の核の 2 倍またはそれ以上の核) で、BL、LBL は小型中型で、DLBCL/BL はその中間であるが、DLBCL、DLBCL/BL は多様である。また核小体は、DLBCL では明瞭で、1 個から複数個の大型のものが中央に位置することが多いが、BL は中型で、好塩基性で、LBL は不明瞭で、多数みられる。DLBCL/BL は DLBCL と BL の間である。クロマチンは、DLBCL は粗く、BL は繊細で塊状で、LBL は細顆粒状で分散する傾向にある (1, 5、メモ 3 図)。

## 組織像

発育傾向は、どれもびまん性であるが、BL でやや集塊形成がみられやすい。Starry-Sky 像やアポトーシス像は BL、LBL で見られることが多い。DLBCL/BL は、DLBCL と BL と間で、特徴的なものはない (メモ 3 図)。

## 免疫染色

LBL は TdT 陽性で、その他の型は陰性である。一般的に Ki67 が 90% 以上になることは DLBCL では少ないが、その他の型で良くみられ、BL では全例で見られる。また BL では CD10 陽性、BCL2 陰性である (1, 5、メモ 3 表)。

## 狭義の高悪性 B 細胞性リンパ腫

今回の WHO 分類では、狭義の高悪性 B 細胞性リンパ腫 (High grade B-cell lymphoma, HGBCL) として、遺伝子を基本として A) MYC と BCL2 (もしくは BCL6) の再構成を伴う高悪性度 B 細胞リンパ腫、B) 高悪性度 B 細胞リンパ腫非特異型が、DLBCL/BL の削除されて、分類されている (1)。

### 【A】 MYC と BCL2 もしくは BCL6 の再構成を伴う高悪性度 B 細胞リンパ腫 High-grade B-cell lymphoma with MYC and BCL2 and/or BCL6. rearrangements (Double hit lymphoma, DL)

#### 1) 定義

MYC 転座に加え BCL2 転座かつ / または BCL6 転座を持つすべての高悪性度 B 細胞リンパ腫

#### 2) 補足説明

8q24 の MYC 転座に加えて 18q21 の BCL2 転座かつ / または 3q27 の BCL6 転座を有する成熟 B 細胞リンパ腫で、以前は double-hit として分類されていた intermediate DLBCL/BL の症例、Double-hit を有する blastoid な症例、形態的に DLBCL の像を呈するが転座を有する症例が含まれる (図 2)。

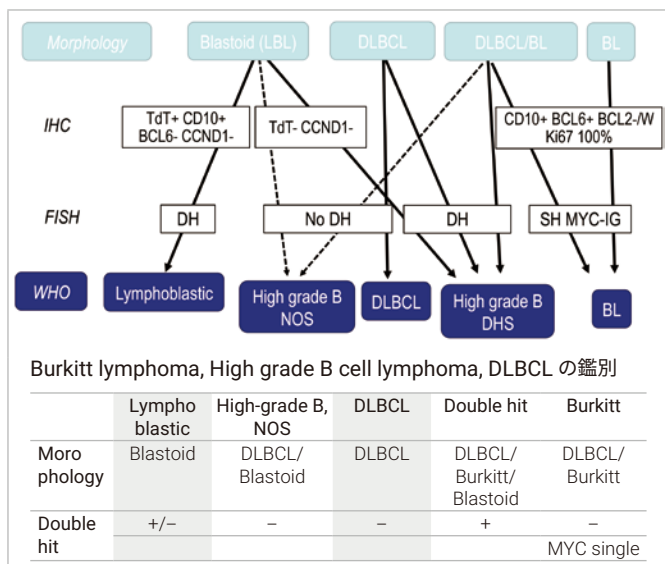


図2：High grade B-cell lymphoma の診断アルゴリズム、BL との鑑別

### 3) 除外項目

- (a) BCL2 転座と BCL6 転座のみの場合、MYC 転座と BCL2 や BCL6 以外の転座の場合、Double-hit という用語は使用せず、この category からは除外される。
- (b) Follicular lymphoma (FL) が既往にある症例、B-LBL、NOS の症例はこの category に入らない。また、完全な結節構造を形成する FL Grade3B は double hit でもコメント付きで FL と診断するとされている。FL の一部に double hit の DLBCL の成分があれば、“FL and HGBL with MYC and BCL2 and/or BCL6 rearrangements” と診断を行い、予後に影響を与えることを考えると HGBL with MYC and BCL2 and/or BCL6 rearrangements の病理所見はコメントの中に記載する必要がある。
- (c) MYC、BCL2、BCL6 の転座は FISH などの細胞遺伝学、分子生物学的な方法で検討されるべきで、copy-number gain/amplification あるいは somatic mutation のみでは不十分であり、こういった症例も double hit lymphoma 同様 aggressive な経過をたどるがこのカテゴリーに入れるには証拠が不十分であるとされる (1)。

### 4) 組織像

- (a) DLBCL、NOS の形態が約半数で、増殖形態は完全に diffuse。種々の程度の Starry-sky macrophage が時に focal に存在することがある。核分裂像や apoptosis 像の数は非常に様々でいくつかの症例では核分裂像の数が少なく、Ki-67 の index も低いことがある。DLBCL と区別不可能であるため、FISH などを使用して double hit かどうかの検索をすべての DLBCL、NOS で行うべきである。

(b) DLBCL/BL の形態は半数以下で、この組織形態を有する約 50% の症例が double hit を有する。中型から大型の細胞のびまん性の増殖がみられ、小型リンパ球はほとんどみられず、間質反応はみられない。多くの細胞分裂像、明らかな apoptosis 像を伴って Starry-sky マクロファージが一般的にみられる。細胞形態は様々である。BL に非常に似ている症例では BL の診断は非典型的な臨床所見、免疫形質、molecular genetic findings により除外される。

(c) Blastoid な細胞形態は、少数例で、中型の細胞で小型の centroblast にしばしば類似する。核小体は目立たずクロマチンは細顆粒状である。細胞は小さな細胞質の縁取りを有する。Lymphoblasts に非常に似ているため B-LBL の除外のため TdT を全例に対して行うべきである。Mantle cell lymphoma (MCL) の blastoid variant はこれらの特徴を多く有しているので cyclin D1 の免染も行うべきである。これらの腫瘍細胞は CD10 陽性かつ BCL6 陽性の mature B-cell である (1)。

### 5) 免疫学的所見

CD10 および BCL6 発現はこれらの大部分にみられる (75-90%)。IRF4/MUM1 は約 20% の症例に発現がみられる。BL における BCL2 陰性もしくは弱陽性と比較して BCL2 の breakpoint (18q21) を持つほとんどすべての症例で BCL2 が細胞質に強陽性となる。Ki-67 の免疫染色は様々な結果を示す。まとめると MYC、BCL2、BCL6、Ki-67 の免染はあまり意味がなく、BL、MCL との鑑別を確実にこなうことが重要である。

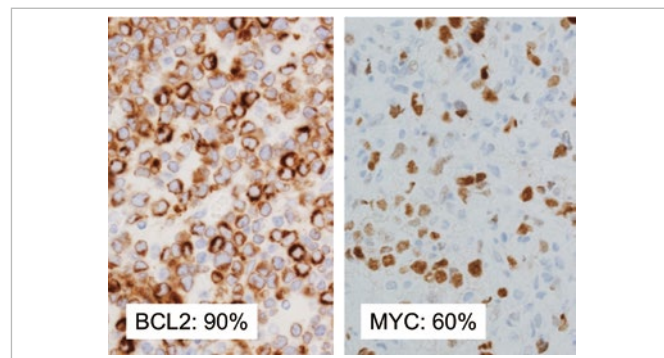


図3：DLBCL における BCL2 と MYC の免疫染色

## **【B】高悪性度 B 細胞リンパ腫 非特異型** **High-grade B-cell lymphoma NOS, HGCL NOS**

### **1) 定義**

Double hit lymphoma の定義を満たさない(DL の遺伝子異常がない)高悪性度 B 細胞リンパ腫

### **2) 組織像**

DLBCL/BL、DLBCL NOS、Blastoid (LBL) の組織像があり多彩である(図 2)。形態的に DLBCL の特徴を示す症例はたとえば高い増殖能を示す部分があっても除外すべきとされている。

## **DLBCL における double expresser (MYC/BCL2) (DE) と double hit (MYC/BCL2) (DH) の関連および予後**

Double hit (DH) において、R-CHOP 療法はもとより(6, 7, 8)、CODOX-M/IVAC、hyperCVAD 療法など強力な化学療法をおこなってもきわめて予後不良であることが報告されている(9, 10)。また、MYC/BCL2 の両者同時発現(double expresser, DE)も、R-CHOP 療法で治療を受けた場合、予後不良とされている。しかしながら、DH は DLBCL の 2-6% で、DE の 17-34% と比較すると非常に少数であるため、臨床応用には不向きとされている。DE の検討において MYC、BCL2 の抗体の種類や、陽性基準の陽性率は論文によって異なり、課題とされている。文献 6 では、発現陽性基準は、MYC  $\geq$  40% が陽性、BCL2  $\geq$  70% が陽性、文献 7 では、発現陽性基準は、MYC  $\geq$  40% が陽性、BCL2  $\geq$  50% が陽性、文献 8 では、発現陽性基準は、MYC  $\geq$  40% が陽性、BCL2  $\geq$  70% が陽性と定義されている。Clark Schneider らの、これまでの論文を加味した DE の陽性率のカットオフの検索においては、IPI と関連なく、MYC  $\geq$  40% が陽性、BCL2  $\geq$  50% が陽性、特に MYC  $\geq$  40% が陽性、BCL2  $\geq$  70% だと極端に予後が短くなっている(11)。また、DE は、non-GC に多いが、GC、Non-GC に左右されず予後不良因子であったが報告されている(6, 7, 8 図 3)。

## 悪性リンパ腫診断に有用な免疫染色

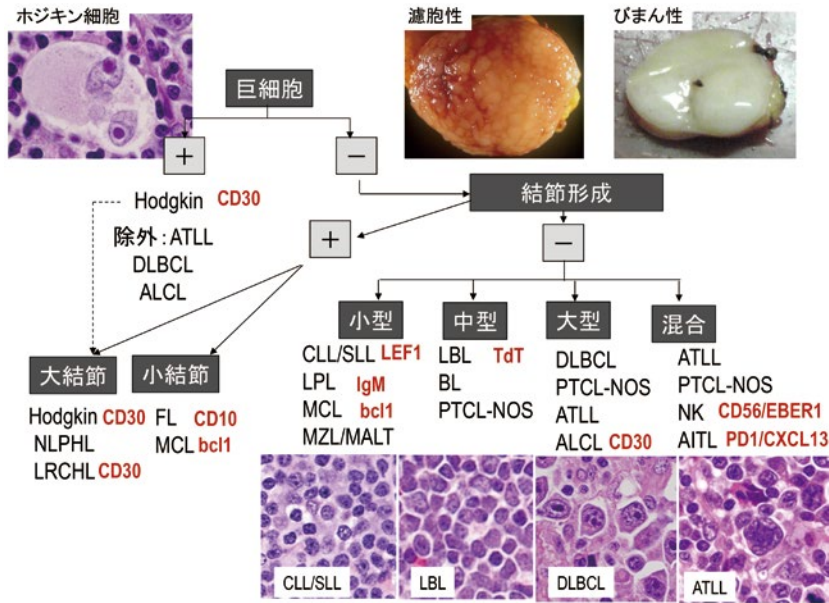
悪性リンパ腫の分類は、形態分類を主体とし、免疫染色、染色体、遺伝子の特徴に立脚した分類を行っている。これは、発生分化および分子生物学的観点から、リンパ腫を疾患単位に列挙し分類し、治療に有用な分類を試みているためである。この背景には、従来の形態診断のみでは、分類不能であったが、その後の免疫染色、染色体検査法、遺伝子解析法の進歩により、独立疾患として認識できるようになった疾患単位の出現がある。とはいえ、診断の第一歩は、形態診断によることが多い。コラム図1で示すように、まずは、ホジキンリンパ腫に見られる巨細胞の有無、次に結節性病変か、びまん性病変か、さらに細胞の大きさが、形態診断には、ポイントとなる。

リンパ腫は、大きく、ホジキンリンパ腫(HL) (CD30 陽性)と非ホジキンリンパ腫に分かれる。さらに非ホジキンリンパ腫は、発生分化により、前駆型(TdT 陽性)と末梢型に分かれる。さらに免疫染色法により、各々は、B細胞型(CD20 陽性)、T細胞型(CD3 陽性)〔分化型の場合はNK細胞(CD56 陽性、EBER1 陽性)を含む〕に分けられる。さらに、末梢型B細胞性のものは、形態に加え、臨牀像、免疫染色、染色体、

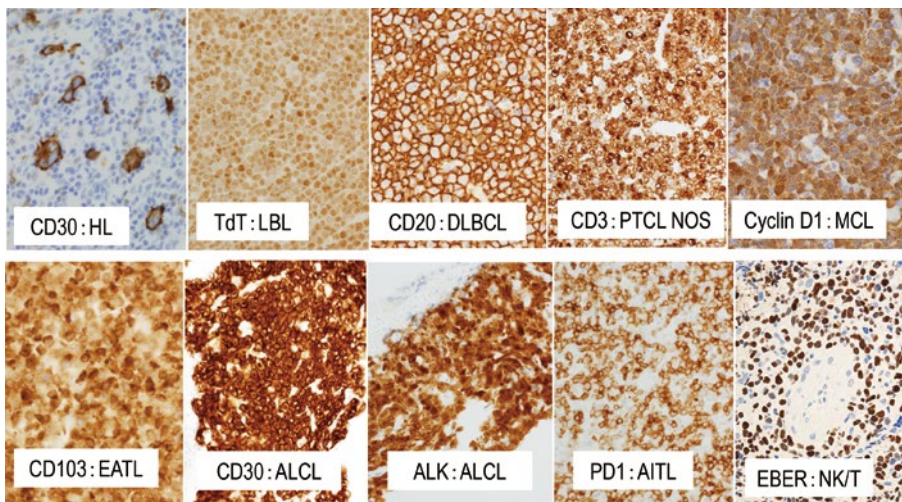
遺伝子解析が加味され、分子生物学的観点から、疾患単位が列挙されている。分化段階による分類が試みられている。たとえば、形態的に濾胞様構造がみられ、汎B細胞マーカーのCD20 陽性で、胚中心マーカーのCD10, bcl6 陽性であると、濾胞中心由来が考えられ、濾胞性リンパ腫の診断となる。CD20 陰性で、CD138/38 が陽性になると形質細胞由来となる。一方、末梢型のT、NK細胞リンパ腫は、形態的にも小細胞、大細胞、未分化大細胞と多岐であり、免疫表現型、遺伝子型においても疾患単位は、多岐であり、Bリンパ腫とは異なり、むしろ疾患単位というより症候群に留まっている。

特異的な抗体として、マンツル細胞リンパ腫(MCL)はCyclinD1 陽性、ヘアリー細胞白血病(HCL)や腸症型T細胞リンパ腫(EATL)はCD103 陽性、小型細胞リンパ腫(SLL/CLL)はLEF1 陽性、未分化大細胞性リンパ腫(ALCL)はCD30 陽性で、特にALK 陽性・陰性で分類される。また、血管免疫芽球形T細胞リンパ腫(AITL)はfhT由来でCD10, CXCL13, PD-1 が陽性のことが多い。NK/T細胞リンパ腫はCD56 陽性でEBウイルスのEBER1 (*in situ hybridization*) 陽性となる。

コラム図1：リンパ腫の形態 / 免疫染色



コラム図2：悪性リンパ腫診断に有用な免疫染色および *In situ hybridization*



## 文献

- 1) Swerdlow SH, et al. World Health Organization Classification of Tumors: Tumors of Haematopoietic and lymphoid tissues. *International Agency for Research on Cancer (IARC) Press*, Lyon France 2017.
- 2) Jaffe ES, et al. Hematopathology. Second edition *Elsevier* Philadelphia 2017
- 3) 磯部泰司 三浦偉久男：染色体・遺伝子検査：日本臨床 72: 418-429, 2014
- 4) 大島孝一：悪性リンパ腫：検査方法、診断、分類、コンパニオン診断まで *SRL 宝函* 2017 37(2) 11-21
- 5) Swerdlow SH, Campo E, Harris NL et al. (eds) WHO classification of tumor, Tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon 2008.
- 6) Green TM, Young KH, Visco C, Xu-Monette ZY, Orazi A, Go RS, Nielsen O, Gadeberg OV, Mourits-Andersen T, Frederiksen M, Pedersen LM, Møller MB. Immunohistochemical double-hit score is a strong predictor of outcome in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab plus cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone. *J Clin Oncol.* 2012 30:3460-7.
- 7) Johnson NA, Slack GW, Savage KJ, Connors JM, Ben-Neriah S, Rogic S, Scott DW, Tan KL, Steidl C, Sehn LH, Chan WC, Iqbal J, Meyer PN, Lenz G, Wright G, Rimsza LM, Valentino C, Brunhoeber P, Grogan TM, Brazier RM, Cook JR, Tubbs RR, Weisenburger DD, Campo E, Rosenwald A, Ott G, Delabie J, Holcroft C, Jaffe ES, Staudt LM, Gascoyne RD. Concurrent expression of MYC and BCL2 in diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab plus cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone. *J Clin Oncol.* 2012 30:3452-9.
- 8) Hu S, Xu-Monette ZY, Tzankov A, Green T, Wu L, Balasubramanyam A, Liu WM, Visco C, Li Y, Miranda RN, Montes-Moreno S, Dybkaer K, Chiu A, Orazi A, Zu Y, Bhagat G, Richards KL, Hsi ED, Choi WW, Zhao X, van Krieken JH, Huang Q, Huh J, Ai W, Ponzoni M, Ferreri AJ, Zhou F, Slack GW, Gascoyne RD, Tu M, Variakojis D, Chen W, Go RS, Piris MA, Møller MB, Medeiros LJ, Young KH. MYC/BCL2 protein coexpression contributes to the inferior survival of activated B-cell subtype of diffuse large B-cell lymphoma and demonstrates high-risk gene expression signatures: a report from The International DLBCL Rituximab-CHOP Consortium Program. *Blood.* 2013 121:4021-31
- 9) Tomita N, Tokunaka M, Nakamura N, Takeuchi K, Koike J, Motomura S, Miyamoto K, Kikuchi A, Hyo R, Yakushijin Y, Masaki Y, Fujii S, Hayashi T, Ishigatsubo Y, Miura I. Clinicopathological features of lymphoma/leukemia patients carrying both BCL2 and MYC translocations. *Haematologica.* 2009 94:935-43.
- 10) Maruyama D, Watanabe T, Maeshima AM, Nomoto J, Taniguchi H, Azuma T, Mori M, Munakata W, Kim SW, Kobayashi Y, Matsuno Y, Tobinai K. Modified cyclophosphamide, vincristine, doxorubicin, and methotrexate (CODOX-M)/ifosfamide, etoposide, and cytarabine (IVAC) therapy with or without rituximab in Japanese adult patients with Burkitt lymphoma (BL) and B cell lymphoma, unclassifiable, with features intermediate between diffuse large B cell lymphoma and BL. *Int J Hematol.* 2010 92:732-43.
- 11) Clark Schneider KM, Banks PM, Collie AM, Lanigan CP, Manilich E, Durkin LM, Hill BT, Hsi ED. Dual expression of MYC and BCL2 proteins predicts worse outcomes in diffuse large B-cell lymphoma. *Leuk Lymphoma.* 2015 23:1-9

# Trusted Answers. Together.

© Agilent Technologies, Inc. 2019

本書の一部または全部を画面による事前の許可なしに複製、改変、翻訳することは、著作権法で認められている場合を除き、法律で禁止されています。

掲載内容は2019年9月現在のものです。掲載内容は予告なく変わる場合がございます。

P190167

**アジレント・テクノロジー株式会社**  
www.agilent.com

＜芝浦オフィス＞  
〒108-0023  
東京都港区芝浦四丁目16番36号  
住友芝浦ビル

Tel : 03-5232-9970  
Fax : 03-5232-9969

