



眼窩領域に発生するB細胞性悪性リンパ腫における TCL1遺伝子発現の検討

中山, 伊知郎

(Citation)

神戸大学医学部紀要, 60(1):41-52

(Issue Date)

1999-06

(Resource Type)

departmental bulletin paper

(Version)

Version of Record

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/00042529>



眼窩領域に発生するB細胞性悪性リンパ腫における TCL1遺伝子発現の検討

中山 伊知郎

神戸大学大学院医学研究科病理学第二

(担当: 前田 盛教授)

連絡先: 650-0017 神戸市中央区楠町7-5-2

神戸大学医学部病理学第2講座 中山伊知郎

Tel:078-382-5111, Fax:078-362-0297

(平成11年1月26日受付)

要 約

TCL1 遺伝子は急性T細胞性白血病やT細胞性悪性リンパ腫の中で14q32.1領域に染色体転座を持つタイプで高率にその発現が見られる遺伝子で、114個のアミノ酸をコードし、主に細胞質内のミクロゾーム分画に14KDの蛋白として認められる。TCL1遺伝子は、正常組織ではT細胞やB細胞の分化・成熟段階で発現が知られ、その発現の亢進は白血病化に深い関わりを持つと考えられ、遺伝子機能については殆ど知られていない。今回、我々は眼窩領域に発生したB細胞性悪性リンパ腫の臨床・病理学的な特徴の一端を明らかにするため、TCL1蛋白に対するラビット抗血清を作成し、免疫組織染色を行うことにより、TCL1蛋白発現の検討を行った。

TCL1蛋白は、正常リンパ節では二次濾胞周囲のマントル層領域の小型リンパ球に高い発現を認めた。B細胞性リンパ腫では低悪性度群(MALT型・濾胞性・リンパ形質細胞型・びまん性小細胞型)の内、眼窩領域では90%、眼窩領域外では68%と高頻度に認められ、高悪性度群である眼窩領域外のびまん性大細胞性リンパ腫では17%と、殆ど発現を認めなかった。異型度の強い腫瘍性B細胞よりむしろ異型度の低いB細胞、特にMALTリンパ腫細胞で高い発現が認められたことからTCL1遺伝子がB細胞性リンパ腫の増殖や分化に関与している可能性が強く示唆された。

緒 言

染色体14q32.1領域とT細胞受容体遺伝子14q11領域との相互転座や腕内逆位は、後胸腺型T細胞性白

血病、成人T細胞性白血病、毛細血管拡張性失調症に続発するT細胞性増殖疾患に比較的高頻度に認められる^{1, 3, 4)}。その切断点から1994年Virgillio等によりTCL1遺伝子が分離された¹⁾。TCL1遺伝子はTCR遺伝子との相互転座を有するT細胞性白血病において遺伝子の脱調節からその発現の亢進が見られる症例が多い。また、TCL1に相同性を有する遺伝子として、毛細血管拡張性失調症に続発するT細胞性増殖疾患で、染色体転座t(X;14)(q28;q11)の切断点からクローニングされたmature T cell proliferation-1(MTCP1;stern et al., 1993) 遺伝子が知られている⁵⁾。TCL1とはアミノ酸配列で、61%の相同性を持ち、TCL1と同様リンパ球に特異的に発現し、リンパ球の腫瘍発生に関わると考えられている^{4, 5, 6)}。

TCL1遺伝子は、正常組織においては、IgM抗原を持つpre B cellやCD4 CD8胎児胸腺細胞に発現が認められる¹⁾。他の組織では、発現は認められず、114個のアミノ酸でコードされたTCL1蛋白は、主に細胞質内のミクロゾーム分画で14KDの蛋白として認められる²⁾。

最近では、マウスT細胞にTCL1遺伝子を過剰発現させることで、TCL1蛋白発現細胞の腫瘍性増殖が促されT細胞性白血病を誘発するに至る実験結果が報告されている^{7, 8)}。しかし、ヒトにおける悪性リンパ腫のTCL1 mRNA発現を検討すると、T細胞系細胞株よりB細胞系細胞株での発現が強いとの報告があり、B細胞性腫瘍発生に関わるTCL1遺伝子の役割も注目される。これらのことを基にして、今回我々は、眼窩領域に発生するB細胞系悪性リンパ腫に注目し、TCL1蛋白発現の意義を検討した。

キーワード: TCL1, Bcl2, B cell リンパ腫, REAL分類, 免疫組織染色

方 法

1) 細胞および培養条件:

実験にはB細胞性リンパ腫細胞株は林原生物化学研究所、藤崎細胞センターより供与された4種の細胞株(SKW-4, U-698-M, TANAKA, MANCA-2)を用いた。細胞は胎児ウシ血清 (FCS) を10%含むDulbecco's Eagle Modified Medium (DMEM) を5% CO₂下, 37°C加湿条件下で100mm培養皿を用い培養した。また, B細胞性悪性リンパ腫症例は神戸大学付属病院で外科的に切除, 生検された組織で, 通常の中性ホルマリン固定後, パラフィンに封入し, 薄切した切片を使用した。本研究ではLCA, L-26, UCHL-1抗体を用い免疫染色を行い, L-26陽性B細胞性リンパ腫症例のみを抽出した。症例は眼窩領域の悪性リンパ腫20例, 眼窩以外の悪性リンパ腫25例, 眼窩領域の反応性リンパ過形成5例である。

2) RNA抽出, RT-PCR反応, TCL1 cDNA断片の合成:

サブコンフルエントに増殖した細胞から全RNAをAGPC法で抽出・精製し, 100mmディッシュ2皿あたり40~80μgのtotal RNAを得た。その内, 3μgのRNAを取り, 50ngのランダムヘキサマーをプライマーと, M-MLV逆転写酵素でcDNAを合成した。TCL1プライマーをTable 1のように設計し, RT-PCRで得たcDNAを鋳型として, AmpliTaq DNAポリメラーゼを用いてTCL1cDNA断片を合成した (Fig2)。得られたDNA断片はアガロースゲルから回収した後, Tベクターにクローニングし, 精製した後, DNAオートシーケンサーを用いてcDNA断片の塩基配列を決定した (Fig1)。欠失や突然変異のないことを確認した後, 以下の実験に使用した。

3) 組み替えタンパク質の産生・精製と抗体の作成:

pBluescriptにRT-PCR産物であるTCL1 cDNAを2次クローニングした後, Pin Point Xavector (Promega) に組み込み, 大腸菌に組み替えタンパク質を産生させ, TCL1蛋白をキット添付マニュアルの記載に従って精製した。得られた蛋白は家兔皮下に

6週間の間隔で3度免疫し, 抗血清を得た。IgG分画をProtein Aカラムで精製した後, 組み替え蛋白を産生しないバクテリアのライゼートで吸着し, 非特異的反応を除いたものを以下の免疫染色に用いた。

4) Western blotting法と免疫組織化学染色によるTCL1蛋白の検出:

SDS蛋白電気泳動は15%ポリアクリルアミドゲルで行った。サンプルは低張のライシスバッファー (50mM NaCl, 10mM Tris/HCL, pH7.4, 1mM EDTA, 1mM PMSF) で細胞質分画を可溶化し, 遠心により核・膜分画を除いた後, 等量のサンプルバッファー (63mM Tris/HCL, pH6.8, 10%グレセロール, 5%2-メルカプトエタノール, 0.025%ブロモフェノールブルー) を加え, 泳動した。泳動後はトリス・グリシン液中で, ニトロセルロース膜上に転写後, 抗体と反応させ, 反応物の検出は化学蛍光反応 (Enhanced chemiluminescent detection kit, アマシャム社) で行った (Fig4)。

免疫組織化学染色は2mmに薄切した切片に対しヒストファインストレプトアビジン・ビオチンキット (ニチレイ) を使用し, キットのプロトコールに従い実施した。

5) 免疫グロブリン遺伝子再構成の検出:

外科的に摘出した凍結標本からDNAを抽出し, サザンブロッティング法により遺伝子再構成バンドの有無を検討した。尚, この検査は全例SRL社に外注検査で依頼して行った。

6) 眼窩領域に発生したリンパ増殖性疾患の診断

眼窩領域に発生したリンパ増殖性疾患25例は反応性リンパ過形成5例と悪性リンパ腫20例に分類された。反応性リンパ過形成の診断には以下の特徴をその根拠とした。病理組織学上, 境界明瞭な胚中心の形成が認められ, 胚中心周囲に明瞭なマントル層の形成を見ることが。標本内に小型成熟リンパ球の他に形質細胞, 組織球, 好酸球等の多種類の細胞が散見されること。小型リンパ球ではUCHL-1陽性T細胞が優位であること。遺伝子診断で, 免疫グロブリン遺伝子に再構成バンドを認めないものである。又, 悪性リンパ腫の診断

Table1 Designation of oligodeoxynucleotides for RT-PCR

Genes	Primers	Deoxynucleotide sequences	Mer	Product
	F1	GCTCTGGCTCTTGCTTCTTAGG	22	499
	R1	TGGTGGAGAAGACACAGG	18	
	F2	TGTGTCTTCTCCACCACG	18	507
	R2	TGAGTCCTGAGCACAGATAAGG	22	

F, forward : R, reverse:

基準として、病理組織学上、明らかに核異型を持つ中～大型リンパ球を認めること、あるいは、小型リンパ球の増殖が主体の場合は免疫組織学的にL-26陽性B細胞が優位を占め、均一なびまん性増殖のパターンを形成すること。さらに、組織像の如何に関わらず、遺伝子診断で再構成バンドを認めるものである。臨床経過中に再発し、病変が両側性又は全身への拡がりを示したのもリンパ腫を強く疑う根拠とした。眼窩領域に発生するリンパ増殖性疾患には組織学的に反応性リンパ過形成か悪性リンパ腫かのどちらかとするにはきわめて困難な症例、異型リンパ増生症 (atypical lymphoid hyperplasia) がある。本研究では非定型リンパ過形成を免疫グロブリン遺伝子の再構成の有無により、反応性リンパ過形成と悪性リンパ腫に分けたが、Table3と4には非定型リンパ過形成とすべき形態学的所見を備えていることを明示した。

以上の基準のもとに眼窩領域に発生したリンパ増殖性疾患25例をTCL1蛋白の陽性率、組織型、分化度、ステージ分類、再発の有無、リンパ球増殖の様式 (結節性・びまん性)、リンパ濾胞の形成 (follicular co-

lonization)、形質細胞への分化 (plasmacytic differentiation) について検討した。また、TCL1蛋白の陽性率は、バックグラウンドに反応性のB細胞が多少は混入することも避けられないとして、悪性リンパ腫と考えられる領域 (反応性リンパ増生症の場合は領域全体) のリンパ球400個を計測し、25%以下の陽性率を示すものを (-)、20-50%の陽性の場合を (+)、50%異常を (++) の3段階とした。

結 果

1) RT-PCR反応によるTCL1cDNAの検出

ヒトB細胞性リンパ腫細胞4種 (SKW-4, U-698-M, TANAKA, MANCA-2) それぞれから得られた total mRNAから逆転写酵素を用いてcDNAを合成し、Fig1のように設計されたプライマーを用いてRT-PCR法を行った。4種類の細胞すべてにTCL1 mRNAの発現が認められた (Fig2)。PCRで増幅されたTCL1 cDNAはpBluescript SK⁺ベクターにクローニングし、DNAオートシーケンサーを用いて

Fig1 ヒト TCL1 cDNA の全塩基配列を示す。下線の部位に各プライマーを設定した。

```

cttgagagggc tctggctctt gcttcttaggcggcccgagg acgccatggc cagtgcccg      60
      F1
acactcggggg aggcagtcac cgaccacccg gaccgcctgt gggcctggga gaagttcgtg      120
tatttgacg agaagcagca cgcttggtg cccttaacca tcgagataaa ggatagggtta      180
cagttacggg tgctcttgcg tcgggaagac gtcgtcctgg ggaggcctat gacccccacc      240
cagataggcc caagcctgct gcctatcatg tggcagctctaccctgatgg acgataccga      300
tcctcagact ccagtttctg gcgcttagtg taccacatca agattgacgg cgtggaggac      360
atgcttctcg agctgctgcc agatgactga tgtatggtct tggcagcacc tgtctcctt      420
caccccaggg cctgagcctg gccagcctac aatggggatg ttgtgtttct gttcaccttc      480
gtttactatg cctgtgtctt ctccaccacg ctgggggtctg ggaggaatgg acagacagag      540
      R1/F2
gatgagctct acccagggcc tgcaggacct gcctgtagcc cactctgctc gccttagcac      600
taccactcct gccaaaggagg attccatttg gcagagcttc ttccagggtc ccagctatac      660
ctgtgctcgt gctttttctc gctggatgat ggtcttcagc ctctttctgt ccttctgtc      720
cctcacagca ctagtatttc atgttgacac ccactcagc tccgtgaact tgtgagaaca      780
cagccgattc acctgagcag gaccttgaa accctggacc agtggtctca catggtgcta      840
cgccgcattg taaacacgcc tgcaaacgct gctgcccgtt aaa cagcct gcaaacgctg      900
cctgcccgtt aacacgcctg caaacgctgc ctgccacac aggttcacgt gcagctcaag      960
gaaaggcctg aaaggagccc ttatctgtgc tcaggactca gaagcctctg ggtcagtggt      1020
      R2
ccacatcccg ggagcagca ggaggccagg ccggcgagcc ctgtggatga gccctcagaa      1080
cccttggtt gccacgtgg aaaagggata gaggttggtt tccccctt tatagatggt      1140
cacgcacctg ggtgttacia agttgtatgt ggcatgaata cttttgtaa tgattgatta      1200
aatgcaagat agtttatcta acttcgtcgc caatcagctt ctatccttga cttagattct      1260
gttgagagaga agtgagaata ggcagcccc aaataaaaaa tattcatgga aaaaaaaaaa      1320
aaaa
  
```

RT-PCR による TCL1 cDNA の検出

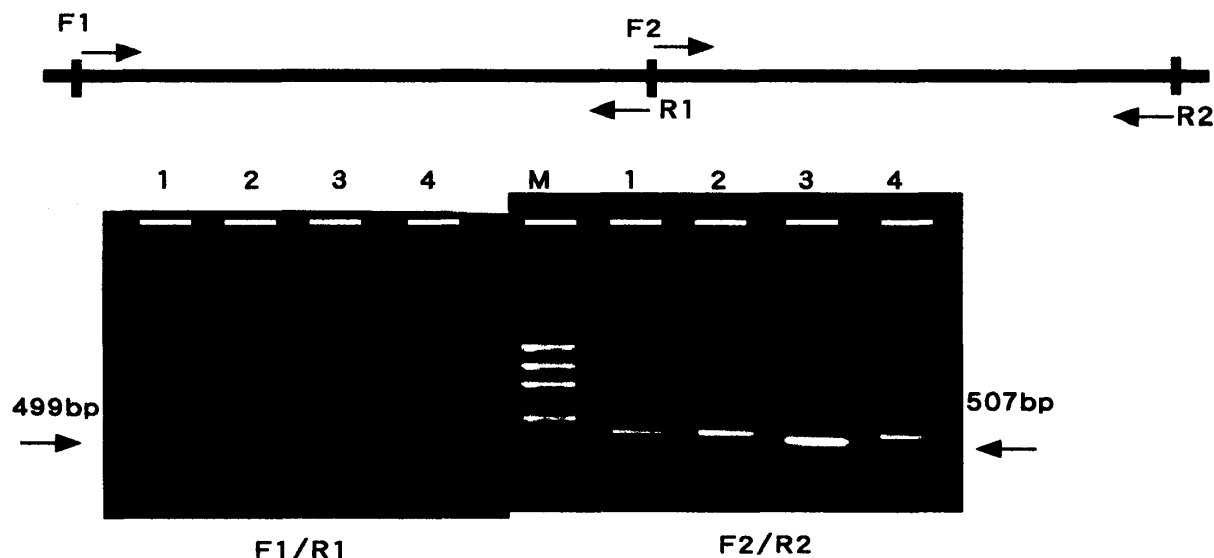


Fig 2

ヒト細胞性リンパ腫細胞株4種 (SKW-4, U-698-M, TANAKA, MANCA-2) の全mRNAにRT-PCR法を行いTCL1 cDNAを得た。PCR法により増幅されたcDNAを示す。用いたプライマーはTable1に示す。lane1 : SKW4細胞 lane2 : U-698-M細胞 lane3 : TANAKA細胞 lane4 : MANCA-2細胞

TCL1 cDNA断片であることをその塩基配列より確認した(Fig 1)。

2) Western blotting法によるTCL1蛋白の発現

PinPointXvector (Promega) に上記のpBluescript SK⁺ベクターを2次クローニングし, TCL1組み換えを大腸菌で発現させ, affinity columnで発現蛋白を精製後, 15%ポリアクリルアミドゲル上に泳動した。組み換え蛋白バンドを切り出し, 家兔皮下に6週間の間隔で3度免疫し, TCL1蛋白に対する抗血清を得た。抗血清は, 組み換え蛋白を産生しないバクテリアのライゼートで吸着し, 非特異的反応を除いた後, プロテインAセファロースカラムでIgG分画を精製し, 抗TCL1抗体とした。このとき, TCL1組み換え蛋白を含むバクテリアのライゼート処理により抗TCL1抗体の反応性が消失することを確認した。次に, pSecTagTMベクターに pBluescript SK⁺ベクターを2次クローニングし, 遺伝子導入したCOS7細胞にTCL1-MYCの融合蛋白を作製させ, 抗TCL1抗体の特異性を併せて確認した。(Fig3) COS7-pSecTag細胞ライゼートでは, 抗TCL1抗体, 抗MYC抗体共に2.5KDの融合蛋白と反応した(Fig3 lane4)。それに対し, 遺伝子導入を行わなかったCOS7細胞では, 抗TCL1抗MYCのいずれの抗体を用いても蛋白バンドの検出はできなかった。(Fig3 lane 1) pRc/CMVベクターを用いてCOS7細胞に一過性にTCL1蛋白を発現させた細胞や

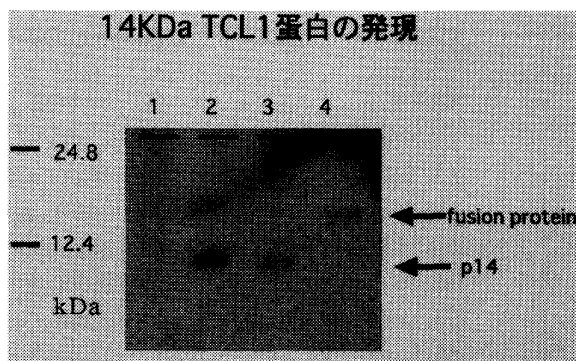


Fig 3

4種類の細胞でのTCL1蛋白の発現をWestern blotting法を用い検討した。COS7-pSecTag細胞ライゼートでは, 抗TCL1抗体, 抗MYC抗体共に2.5KDの融合蛋白と反応した (Fig 3 lane4)。遺伝子導入を行わなかったCOS7細胞では, 抗TCL1, 抗MYCのいずれの抗体を用いても蛋白バンドの検出はできなかった。(Fig 3 lane1) pRc/CMVベクターを用いてCOS7細胞に一過性にTCL1蛋白を発現させた細胞やB細胞性リンパ腫細胞株SKW-4で14KDのTCL1蛋白の発現を確認した (Fig 3 lane 2,3)。

B細胞性リンパ腫細胞株SKW-4で14KDのTCL1蛋白の発現を確認した(Fig3 lane 2, 3)。

3) 正常リンパ組織及び脾臓におけるTCL1蛋白の発現

非腫瘍性のリンパ節組織として5例の胃癌郭清リン

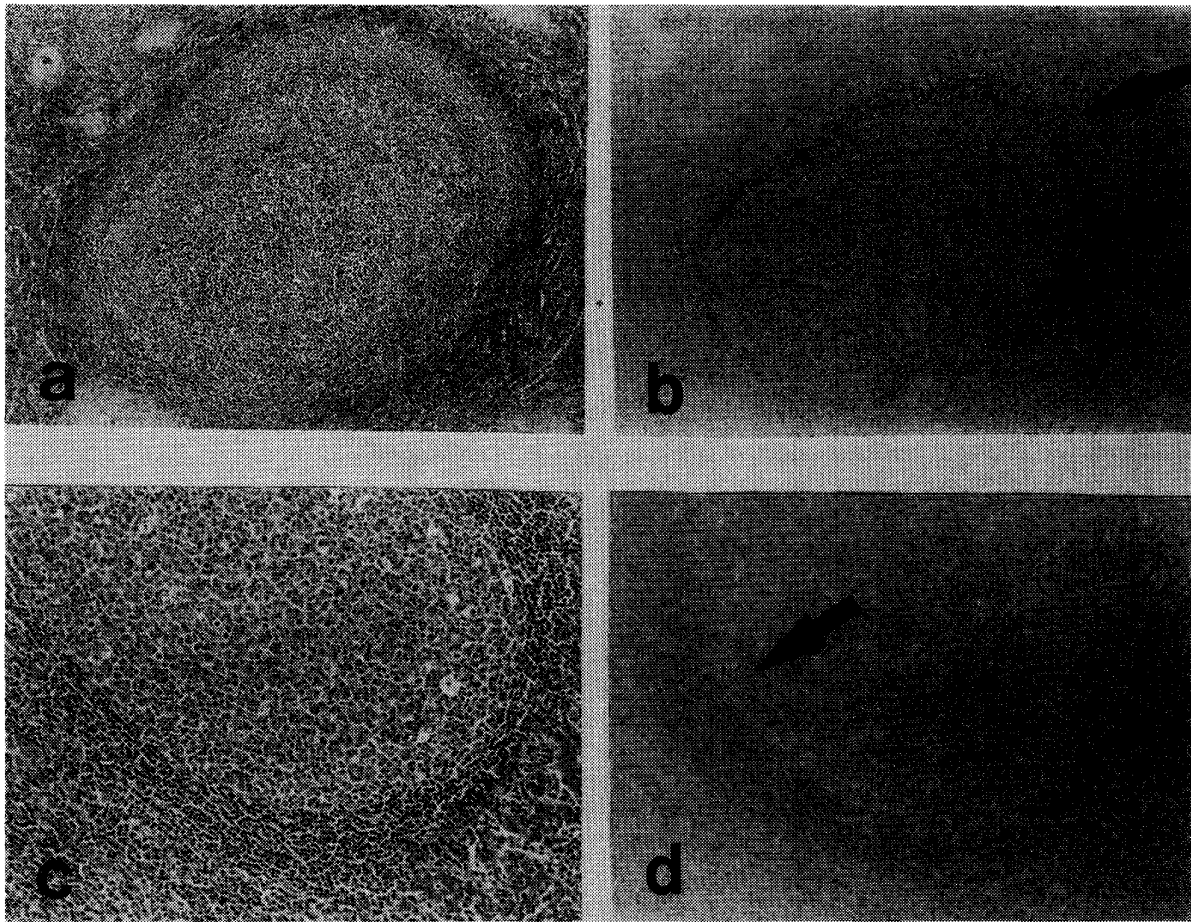


Fig 4

肥大扁桃組織でTCL1蛋白の局在を検討した。リンパ節は軽度に腫大し、リンパ節濾胞の過形成を伴っていた (Fig 4c H.E.染色x10)。TCL1蛋白は増生した二次濾胞周囲のマントル層が強く染色された (Fig 4b黒矢印 TCL1染色x10)。脾臓でのTCL1蛋白の発現はマントル層を構成するリンパ球のみに陽性で、辺縁帯にあるリンパ球は陰性であった (Fig 4a H.E.染色x4 ; 4bTcl1染色x4黒矢印)。

パ節5切片でTCL1蛋白の局在を検討した。癌細胞の転移のないリンパ節はいずれも軽度に腫大し、リンパ節濾胞の過形成を伴っていたが、TCL1蛋白は一次濾胞を構成する小型リンパ球や二次濾胞における胚中心周囲のマントル層を形成する小型リンパ球に陽性に染色された。また、節外性リンパ組織でTCL1蛋白の局在を、扁桃腺炎患者3例から得られた肥大扁桃腺組織及び外科的に摘出された1例で検討した (Fig4c)。扁桃では増生した二次濾胞周囲のマントル層が強く染色された (Fig 4d)。脾臓ではマントル層及び辺縁帯を明瞭に構成される部分において、TCL1蛋白はマントル層を構成するリンパ球のみに陽性で、辺縁帯にあるリンパ球は陰性であった (Fig 4 a, b)。

4) 悪性リンパ腫でのTCL1蛋白の発現

悪性リンパ腫におけるTCL1蛋白の発現を眼窩領域と眼窩領域以外に発生するものに分け検討を行った。TCL1蛋白陽性細胞の分布は反応性リンパ過形成で

は、リンパ濾胞周囲のマントル層内に限局して陽性細胞が認められるのに比し、悪性リンパ腫ではびまん性増殖パターンでは腫瘍細胞と考えられる小型リンパ球 (small lymphocytic proliferations) の多くが染色された (Fig 5c)。しかし、このびまん性増殖型にしばしば出現するやや幼弱で中型～大型リンパ球を混えた腫瘍細胞の集簇果 (small germinal center-like structure) ではTCL1蛋白の発現は見られなかった。 (Fig 5d)。結節型では濾胞様構造の中心に大型異型細胞を伴った病変があり (Fig 5e), TCL1蛋白はこの大型リンパ球を含む多くの細胞で陽性であった (Fig 5f)。この所見は、反応性に増生した二次濾胞では認められない所見であった。眼窩領域に発生したB細胞性悪性リンパ腫20例の病理組織診断の内訳は、大半がMALT型リンパ腫で14例を占め、その他は濾胞性リンパ腫3例、リンパ形質細胞性リンパ腫2例、マントル細胞性リンパ腫1例であった。発生部位は結

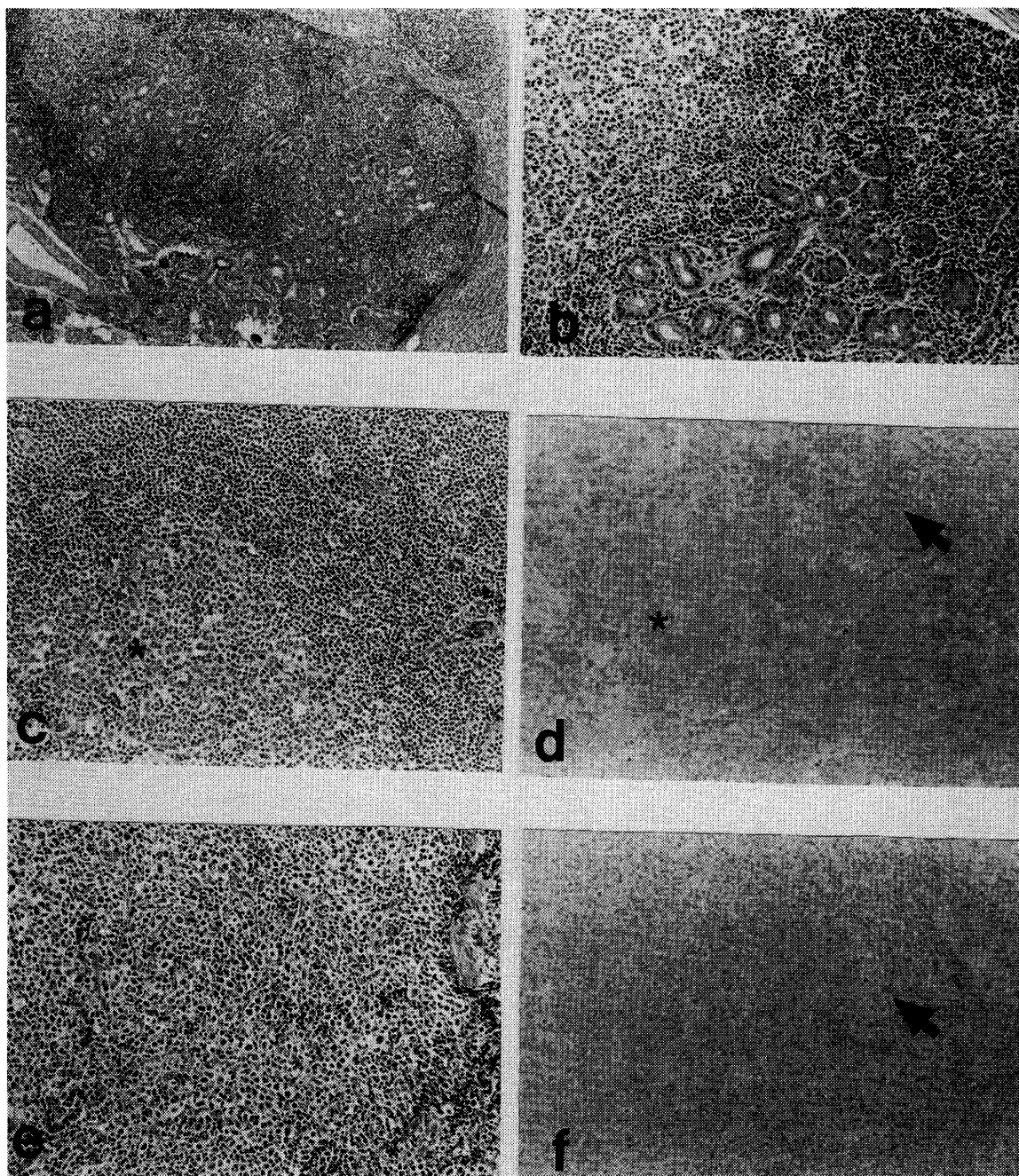


Fig 5

節外性悪性リンパ腫におけるTCL1蛋白の局在

涙腺組織へのびまん性浸潤LEL (lympho-epithelial lesion) を示すMALT型悪性リンパ腫症例 (case 5)。(Fig5a ; H.E.染色x4 5b ; H.E.染色x10)。びまん性増殖型では、増殖した小型リンパ球の中にやや幼弱で中型～大型リンパ球を混えた腫瘍細胞の集簇巣 (small germinal center-like structure) が認められる (case 8) (Fig 5c ; H.E.染色x10 星印)。TCL1蛋白は小型リンパ球に主に発現していた (Fig5d ; TCL1染色x10 黒矢印)。small germinal center-like structure内の中型～大型リンパ球には、TCL1蛋白の発現は見られなかった (Fig5d ; TCL1染色x10 星印)。結節型にはリンパ濾胞様構造が拡大し、大型異型細胞を伴った病変が出現する (Fig5e ; H.E.染色x20)。TCL1蛋白は大型リンパ球を含む多くの細胞で陽性である (Fig 5f ; TCL1染色x20 黒矢印)。

Table 2

眼窩領域のリンパ増殖性疾患（25例）の内訳

反応性リンパ過形成	5例
濾胞性リンパ腫	3例
リンパ形質細胞性	2例
マントル細胞性	1例
MALT 型リンパ腫	14例

眼窩領域での発生部位の内訳

結膜	5例
涙腺	2例
眼窩内	13例

組織像

結節性病変	17例
びまん性病変	8例

膜由来が5例、涙腺由来2例、眼窩内が13例である（table2～4）。TCL1蛋白の発現率は、20例中18例（90%）の腫瘍組織に陽性で、結節性またはびまん性に増殖する病変における差は認められなかった。組織診断時の Ann-Arber分類ではstage I が12例、stage IIが5例、stage IVが3例で、stage I の12例で陽性率は83%、stage II以上の8例の陽性率は100%であり、有意差は認められなかった。尚、その後の臨床経過は不明の2例を除き、全18例は生存中であつた。（Table 4）。

一方の眼窩領域での反応性リンパ過形成および非定型リンパ過形成であるが、反応性リンパ過形成5例中4例、非定型リンパ過形成7例中7例でTCL1蛋白の発現が見られ、悪性リンパ腫との差は認められなかった（Table 3, 4）。

眼窩領域以外に発生した悪性リンパ腫30例についてもTCL1蛋白の発現を検討した。

Tabel 4 眼窩領域悪性リンパ腫の一覧

症例	性別	年齢	部位	組織像	分化度	colo	plas	Re	TCL1	stage	再発	status	観察期間
1	M	74	Cj/L	MALT/Nod	well	(+)	(+)	N.T.	±	I	(-)	AWND	14M
2	M	63	Cj/R	Fol/Nod	poor	(-)	(-)	N.T.	++	IV	(-)	AWD	14M
3	F	56	Cj/R	MALT/Nod	well	(+)	(+)	N.T.	+	I	(-)	AWND	15M
4*	F	68	Cj/L	MALT/Nod	well	(-)	(+)	(+)	+	I	(-)	AWD	1M
5*	F	41	LG/B	MALT/Nod	int	(+)	(-)	(+)	++	I	(+)	AWD	35M
6	F	38	LG/R	MALT/Dif	well	(-)	(-)	(+)	+	I	(+)	AWD	44M
7	M	62	Or/L	MALT/Dif	well	(-)	(-)	(+)	++	II	(-)	AWD	12M
8	M	64	Or/R	MALT/Dif	well	(+)	(-)	(+)	++	I	(-)	AWD	20M
9*	F	47	Or/B	MALT/Dif	well	(-)	(+)	(+)	+	II		U.N.	U.N.
10	F	66	Or/R	MALT/Nod	well	(+)	(-)	N.T.	+	I	(-)	AWND	26M
11	M	67	Or/R	MALT/Dif	well	(+)	(-)	(+)	+	I	(-)	AWND	21M
12*	M	50	Or/B	MALT/Nod	well	(+)	(+)	(+)	+	I	(+)	AWD	22M
13*	F	54	Or/B	MALT/Nod	well	(+)	(+)	(+)	+	II	(+)	AWD	151M
14	M	77	Or/R	MALT/Nod	well	(+)	(+)	(+)	-	I	(-)	AWD	10M
15	F	75	Or/L	Fol/Nod	poor	(-)	(-)	(+)	+	IV	(-)	AWD	6M
16*	M	62	Or/B	MALT/Nod	well	(+)	(+)	N.T.	++	I	(-)	AWD	27M
17	F	67	Or/L	LP/Dif	well	(+)	(+)	N.T.	++	II	(-)	AWD	17M
18	M	61	Or/L	LP/Dif	well	(+)	(+)	N.T.	+	I	(-)	AWD	59M
19	F	65	Cj/L	Fol/Nod	well	(+)	(-)	N.T.	++	IV	(+)	AWD	U.N.
20	M	57	Or/L	MCL/Nod	int	(+)	(-)	(+)	++	II	(-)	AWD	8M

colo ; follicular colonization

plas ; plasmacytic differentiation

Re ; B cell rearrangement

Cj ; conjunctiva

LG ; lacrimal gland

Or ; orbita

B ; bilateral

MALT ; MALT lymphoma

LP ; lymphoplasmacytoid type

Fol ; follicular lymphoma

MCL ; mantle cell lymphoma

Nod ; nodular type

Dif ; diffuse type

well ; well differentiated

int ; intermediately differentiated

poor ; poorly differentiated

N.T. ; not tested

U.N. ; unknown

AWND ; alive with no disease AWD ; alive with disease

* ; atypical lymphoid hyperplasia

Tabel 3 眼窩領域の反応性リンパ増殖性疾患の一覧

症例	性別	年齢	部位	組織像	colo	plasma	Re	TCL1	再発	status	観察期間
1	F	36	Cj/L	RLH/Nod	(-)	(-)	(-)	++	(-)	AWD	3M
2	F	37	LG/L	RLH/Nod	(-)	(+)	(-)	+	(-)	AWD	12M
3	F	65	Or/L	PT/Nod	(-)	(+)	(-)	++	(-)	AWD	17M
4	F	57	Or/L	RLH/Nod	(+)	(+)	(-)	-	(-)	AWD	U.N.
5 *	F	51	Cj/B	RLH/Dif	(-)	(-)	(-)	++	(+)	AWD	26M

Cj ; conjunctiva LG ; lacrimal gland B ; bilateral

RLH ; reactive lymphoid hyperplasia PT ; pseudotumor

Nod ; nodular type Dif ; diffuse type

colo ; colonization plasma ; plasmacytic differentiation

AWD ; alive with disease U.N. ; unknown

* ; atypical lymphoid hyperplasia

その病理組織分類の内訳は、濾胞性リンパ腫8例、マントル細胞性リンパ腫2例、リンパ形質細胞性リンパ腫2例、びまん性小細胞リンパ腫2例、MALTリンパ腫5例、高悪性度群であるびまん性大細胞性B細胞リンパ腫11例である(table 5)。TCL1蛋白の発現率は、マントル細胞性リンパ腫で2例中2例(100%)、眼窩領域以外のMALTリンパ腫で5例中3例(60%)、濾胞性リンパ腫8例中5例(62.5%)と、低悪性度悪性リンパ腫19例中16例(84%)という高い発現率を示した。これに対し、高悪性度リンパ腫のびまん性大細胞性B細胞リンパ腫では11例中2例(18.2%)と比べて低い発現率であった。これらの結果からTCL1蛋白は低悪性度B細胞性リンパ腫で高頻度に、高悪性度リンパ腫であるびまん性B細胞性リンパ腫ではきわめて低頻度しか発現しないことが明らかとなった。しかし、眼窩領域のリンパ増殖性疾患として悪性リンパ

腫と並んで発生頻度の高い反応性リンパ過形成や非定型リンパ過形成でもTCL1蛋白の発現は高い頻度で認められ、TCL1蛋白の所見から悪性リンパ腫と反応性リンパ過形成や非定型リンパ過形成を鑑別することはできなかった。

考 察

リンパ節、扁桃組織や脾臓の非腫瘍病変でのTCL1蛋白発現の免疫組織学的検討では一次濾胞の構成細胞や二次濾胞胚中心周囲のマントル層を構成する小型リンパ球で強く染色された。これらの小型リンパ球は末梢型の再循環B細胞と考えられ、その膜性状はsIgM⁺, sIgD⁺, CD5⁺, CD21⁺とされる。TCL1蛋白はこの段階に機能分化したB細胞で生理的に発現していると考えられる。一方、メモリーB細胞と呼ばれる免疫グロブリン鎖のV-D-J領域の再構成が終了したと考えられる小型リンパ球はマントル層の外側に濾胞周辺帯(又は辺縁帯marginal zone)を形成するが、TCL1蛋白の発現は認められなかった。このように正常組織ではTCL1蛋白はきわめて特異性の高い局在を示した。この結果はTCL1蛋白発現がBリンパ球の分化マーカーとなる可能性を示すものである。ところが、B細胞性悪性リンパ腫の部位別・タイプ別の検討からではTCL1蛋白の発現はマントル細胞リンパ腫を始めとして、MALT型リンパ腫、濾胞型リンパ腫等の低悪性度群に属する様々な悪性リンパ腫で高い発現が認められる。これらの腫瘍細胞の膜性状は正常組織との対比からマントル細胞リンパ腫ではsIgM⁺, CD5⁺, CD23⁺, CD10^{-/+}, MALT型リンパ腫ではsIgM⁺, sIgD⁺, CD5⁻, CD23^{-/+}, CD43^{-/+}, 又、濾胞性リンパ腫ではsIgM⁺, CD5⁻, CD10⁺, CD23⁻とそれぞれ異なった機能分化を遂げた細胞と考えられている

Table 5

悪性リンパ腫におけるTCL1蛋白の発現

眼窩領域の悪性リンパ腫(20例)

疾患	症例数	TCL1蛋白陽性率
濾胞性リンパ腫	3例	100%
リンパ形質細胞性	2例	100%
マントル細胞性	1例	100%
MALTリンパ腫	14例	93%

眼窩領域以外での悪性リンパ腫(30例)

濾胞性リンパ腫	8例	62.5%
マントル細胞性	2例	100%
リンパ形質細胞性	2例	50%
びまん性小細胞性	2例	100%
MALTリンパ腫	5例	60%
びまん性大細胞性	11例	18.2%

(REAL分類)。このことからTCL1蛋白が直ちにB細胞のマーカーであることはできない。しかし、腫瘍細胞では、特に低悪性度群のB細胞性悪性リンパ腫においては腫瘍細胞のすべてが均一な表面の膜性状を示す場合はまれで、多方面への分化傾向があることが明らかにされており、MALT型リンパ腫でもマントル細胞への分化を部分的に示す場合が指摘されている^{11,15)}。悪性リンパ腫細胞でTCL1蛋白陽性を示すものは小型リンパ球が多い点やびまん性増殖型にしばしば出現する幼弱で中型～大型リンパ球から成る腫瘍細胞の集簇巣 (small germinal center-like structure) にTCL1蛋白の発現は見られない所見 (Fig5 c,d) は特徴的である。このリンパ球の集簇巣はマントル細胞リンパ腫やMALT型リンパ腫における腫瘍細胞の増殖の中心と考えられ¹⁶⁾、TCL1蛋白の発現はこの増殖中心から少し周囲の小型リンパ球で多く、TCL1蛋白の発現がある方向への分化を示すB細胞におこる可能性を示している。

眼窩領域に発生するリンパ増殖性疾患は悪性リンパ腫の他に反応性リンパ過形成や非定型リンパ過形成と呼ばれる疾患があり、悪性リンパ腫の頻度が最も高い。臨床的に低悪性度のものが多く、生命予後は一般に良好である。病理組織学的にはその多くがB細胞由来で、異型の乏しい小型リンパ球を主体にした病変を形成し、形質細胞への分化を伴うことも多い。細胞増殖のパターンにはびまん性と結節性に増殖する型があり、悪性リンパ腫ではびまん型が多いとされる。結節性にリンパ球が集簇した増殖パターンは反応性リンパ過形成でもよく見られる所見で¹⁶⁾、悪性リンパ腫との鑑別が困難とされる。本研究では免疫グロブリン遺伝子の再構成を診断基準の1つに加え、異常のあるものは悪性リンパ腫に加えた (Table4)。眼窩領域に好発する反応性リンパ増生症や異型リンパ増生症は従来から長期観察中に悪性リンパ腫へ移行する症例や免疫グロブリン遺伝子の再構成が報告されており²¹⁾、症例によって腫瘍性の性格が指摘される場合がしばしばみられる²⁰⁾。非定型リンパ過形成が腫瘍性格を持つか否かは議論のあるところであるが、このような境界病変に対し1983年 Isaacson等は粘膜に対する外来抗原刺激依存性に発生するMucosa-associated lymphoid tissue (MALT) 型リンパ腫を提唱し、以来その概念は消化管をはじめ、気管支、甲状腺、眼窩などに拡大され、同様の病変の報告が行われている。眼窩領域ではCALT (conjunctiva-associated lymphoid tissue) と呼ばれる組織がこれに相当するとされ、眼窩領域のMALT型リンパ腫の診断名は1990年代になるとその報告数が急増している^{13,14)}。本研究においても20例の眼窩領域の悪性リン

パ腫中MALT型と考えられた症例は14例を数える。その内6例は非定型リンパ過形成とされたもので、免疫グロブリン遺伝子の再構成を持つゆえに悪性リンパ腫とされた症例である (Table4)。消化管、特に胃に発生するMALT型リンパ腫はヘリコバクター・ピロリ菌の持続感染による慢性炎症刺激が腫瘍発生に大きく関与するとされるが¹⁸⁾、眼窩領域のMALT型リンパ腫の発生要因は、しかし、現在まで明らかではない。耳下腺や甲状腺ではそれぞれシェーグレン症候群、橋本病といった自己免疫性疾患に伴う場合がよく知られている¹⁹⁾。組織学的に涙腺は耳下腺と同一の構造を示し、シェーグレン症候群でも侵されることの多い器官である点は眼窩領域のリンパ腫の発生に自己免疫疾患を始めとする何らかの免疫異常が関与している可能性は大いに考えられる。いずれにしてもCALTや涙腺組織に何らかの慢性炎症刺激が加わって発生することは他部位のMALT型リンパ腫と同様であろう。今後の検討すべきことがらの1つである。TCL1蛋白の発現が眼窩領域に発生するリンパ増殖性疾患である悪性リンパ腫、反応性リンパ過形成、非定型リンパ過形成のいずれにおいても高く、これらの中で差が認められなかった。TCL1蛋白の発現からこれらを鑑別することはできなかった点はTCL1蛋白の発現がこれらの疾患に共通した何か特異な生理学的機能を担っている可能性が示唆される。

正常リンパ濾胞ではマントル層の小型リンパ球に見られるTCL1蛋白が低悪性度B細胞性リンパ腫群では組織型の違いをこえて広く見られる点はTCL1蛋白の発現が単にB細胞分化のマーカーであるというよりTCL1蛋白が持つ生物学的機能に関心が向かう。この点に関して、T細胞性白血病発生との関連を指摘したマウスでの実験的研究がある。TCL1遺伝子をT細胞のみに持続的に発現するようにp56^{lck}プロモーター遺伝子に操作が加えられたトランスジェニック・マウスが作成された。このマウスではリンパ球 (T細胞) に過剰増殖がおこり、その長期観察例では白血病化する固体も現れたという⁷⁾。このことからTCL1遺伝子が直接リンパ球を白血病化させる遺伝子とは云えないが、リンパ球の増殖に関して大いに促進的に作用する遺伝子であることを示している。本研究ではB細胞性悪性リンパ腫においてTCL1遺伝子が広く発現していることを示したが、同様の機能を担っている可能性がある。したがって、本研究はTCL1遺伝子の発現を通じたB細胞性悪性リンパ腫の発生やB細胞分化を考える重要なきっかけを与えるものと考えられる。

謝 辞

稿を終えるに当たり、御指導、御校閲を賜りました
前田 盛教授並びに山本 節教授に心から謝意を表
します。また、研究遂行にあたり直接指導を頂きました
神戸大学第二病理学教室 村尾眞一助教授に深く感謝
の意を表します。

参考文献

- 1 Virgilio, L., Narducci, M. G., Isobe, M. G., Bilips L. G., Cooper, M. D., Croce, C. M. and Russo, G. Identification of the TCL1 gene involved in T-cell malignancies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91 : 12530-34, 1994
- 2 Fu, T., Virgilio, L., Narducci, L., Facchiano, A., Russo, G. and Croce, C. M. Characterization and Localization of the TCL1 Oncogene Product. *Cancer Research*, 54 : 6297-6301, 1994
- 3 Narducci, M. G., Virgilio, L., Isobe, M., Stoppacciaro, M., Elli, R., Fiorili, M., Carbonari, M., Antonelli, A., Chessa, L., Croce, C. M., and Russo, G. TCL1 oncogene activation in preleukemic T cells from a case of ataxia-telangiectasia. *Blood*, 86, 6 : 2358-2364, 1995
- 4 Thick, J., Metcalfe, J. A., Mark, Y. F., Beatty, D., Minegishi, M., Dyer, M. J. S., Lucas, G. and Taylor, A. M. R. Expression of either the TCL1 oncogene, or transcripts from its homologue MTCP1/c6. 1B, in leukaemic and non-leukaemic T cells from ataxia-telangiectasia patients. *Oncogene* 12 : 379-386, 1996
- 5 Stern, M. H., Soulier, J., Rosenzweig, M., Nakahara, K., Klain, N. C., Aurias, A., Sigaux, F. and Kirsch, I. R. MTCP1 : a novel gene on the human chromosome Xq28 translocated to the T cell receptor α/δ locus in mature T cell proliferations. *Oncogene* 8 : 2475-2483, 1993
- 6 Madani, A., Choukroun, V., Soulier, J., Cacheux, V., Claisse, J. F., Valensi, F., Daliphard, S., Cazin, B., Lexy, V., Leblond, V., Daniel, M. T., Sigaux, F. and Stern, M. H. Expression of p13 MTCP1 is restricted to mature T cell proliferations with t (X:14) translocations. *Blood*, 87, 5 : 1923-1927, 1996
- 7 Virgilio, L., Lazzeri, C., Bichi, R., Nibu, K., Narducci, M. G., Russo, M. G., Rothstein, J. L. and Croce, C. M. Deregulated expression of TCL1 causes T cell leukemia in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95 : 3885-3889, 1998
- 8 Narducci, M. G., Virgilio, L., Engiles, J. B., Buchberg, A. M., Billips, L., Facchiano, A. Croce, C. M., Russo, G. and Rothstein, J. L. The murine Tcl1 oncogene : embryonic and lymphoid cell expression. *Oncogene*, 15 : 919-26, 1997
- 9 Narducci, M. G., Stoppacciaro, A., Imada, K., Uchiyama, T., Virgililo, L., Lazzeri, C., Croce, C. M. and Russo, G. TCL1 is overexpressed in patients affected by Adult T-cell Leukemias. *Cancer Research*, 57 : 5452-56, 1997
- 10 Wotherspoon, A. C., Hardman, S. and Isaacson, P. G. Mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) in the human conjunctiva. *Journal of Pathology*, 174 : 33-37, 1994
- 11 Schmid, U., Cogliatti, S. B., Diss, T. C. and Isaacson, P. G. Monocytoid/marginal zone B cell differentiation in follicle centre cell lymphoma. *Histopathology*, 29 : 201-208, 1996
- 12 Franklin, R. M. and Remus, L. E. Conjunctival-associated Lymphoid Tissue : Evidence for a role in the secretory Immune System. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 25 : 181-187, 1984
- 13 White, W. L., Ferry, L. A., Harris, N. L. and Grove, A. S. Jr. Ocular Adnexal lymphoma. *Ophthalmology*, 102 : 1994-2006, 1995
- 14 Coupland, S. E., Krause, L., Delecluse, H. J., Anagnostopoulos, I., Foss, H. D., Hummel, M., Bornfeld, N., Lee, W. R. and Lesions of the Ocular Adnexa. *Ophthalmology*, 105 : 1430-1441, 1998
- 15 Nathwani, B. N., Hernandez, A. M., Deol, I. and Taylor, C. R. Marginal zone B cell

- lymphoma : An Appraisal. Human Pathology, 28 : 42-46, 1997
- 16 Rosai, L.: Ackerman's Surgical Pathology, Mosby, 1996
 - 17 Isaacson., P., Wright, D. H. Malignant Lymphoma of mucosa associated lymphoid tissue : A distinctive type of B cell lymphoma. Cancer, 52 : 1410-1416, 1983
 - 18 Wotherspoon. A. C., Ortiz-Hidalgo, C., Falzon, M. R., and Isaacson, P. G. Helicobacter pylori-associated gastritis and primary B cell gastric lymphoma. Lancet, 338 : 1175-1176, 1991
 - 19 Hyjek, E., Isaacson, P. G. Primary B cell lymphoma of the thyroid and its relationship to Hashimoto's thyroiditis. Human Pathology, 19, 11 : 1315-1326, 1988
 - 20 Mclean, I. W., Burnier, M. N., Zimmerman, L. E. and Jacobiec. F. A. Atlas of Tumor Pathology (AFIP) Tumors of the Eye and Ocular Adnexa.: 263-282, 1994
 - 21 Knowles, D. M., Athan, E., Ubrico, A. Extranodal noncutaneous lymphoid hyperplasia represent a continuous spectrum of B cell neoplasia : demonstrated by molecular genetic analysis. Blood, 73 : 1635-1645, 1989

Expression of TCL1 oncogene in Orbital B cell lymphoma

ICHIRO NAKAYAMA

2nd Department of Pathology (Director : Prof. Sakan Maeda),
Kobe University, School of Medicine

Abstract : The TCL1 gene is localized near break point of chromosome 14q32.1, which is often involved in acute T cell leukemias and T cell non-Hodgkin lymphomas. The TCL1 gene is also expressed normal precursor T and B cells, and B-cell lymphoma cell lines. In our present study, we investigated expression of the TCL-1 protein in various types of B cell lymphomas according to the REAL classification. Paraffin-embedded lymphoma specimen (n=38) were subjected to TCL1 immunohistochemistry on tissue sections, and positive one was scored using a three-tiered scale: -/+ , <25% cells; + , 25-50% cells; and ++ , >50% cells. The TCL-1 protein was mostly expressed in low grade B-cell lymphomas raised from the orbita (18/20, 90%) and from others (13/19, 68%) including MALT type lymphoma in the stomach, follicular lymphoma, lymphoplasmacytic lymphomas, and mantle cell lymphoma, but not in high grade diffuse large B cell lymphomas (17%, 2/11). These data suggest that expression of TCL1 gene characterizes low grade B-cell lymphomas, and might be crucial for developing lymphomagenesis.