

原 著 節外性びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫における 免疫組織化学染色による MYC 蛋白発現の検討

佐々木陽平*¹⁾ 服部 憲路¹⁾ 上杉 由香¹⁾
中田 彩香¹⁾ 島田翔太郎¹⁾ 綿貫めぐみ¹⁾
藤原 峻¹⁾ 荒井 奈々¹⁾ 宇藤 唯¹⁾
村井 聡²⁾ 塩沢 英輔²⁾ 矢持 淑子²⁾
中牧 剛¹⁾

抄録：びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫 (Diffuse large B-cell lymphoma, DLBCL) は日本で最も頻度の高い B 細胞リンパ腫であるが、約 30% はリンパ節以外でリンパ系腫瘍細胞が増殖する節外性 DLBCL として発症する。節性 DLBCL と節外性リンパ腫の治療指針に明瞭な違いはない。われわれは節外性リンパ腫の層別化治療の構築を目的とし、MYC 蛋白を中心に免疫組織化学染色の観点から臨床的特徴を解析した。昭和大学病院で節外性 DLBCL と診断された症例の中で MYC 蛋白発現が検討可能な 63 例を対象とした。MYC の免疫組織化学染色を行い、低倍率視野でリンパ腫細胞の陽性率の最も高い部分を求め数値化し、MYC 蛋白の陽性細胞の割合が 40% 以上ならば高発現とし、40% 未満ならば低発現とした。節外部位は咽頭 / 扁桃が最も頻度が高く、次に胃が多く見られた。対象症例の中で 21 例 (33%) が MYC 蛋白高発現であった。症例の節外の初発部位の比較では、胸膜が MYC 蛋白高発現症例に有意に多かった ($p=0.042$)。MYC 蛋白高発現症例は低発現症例よりも、臨床病期および国際予後指標 (International Prognostic Index, IPI) が有意に高く (それぞれ $p < 0.0010$, $p < 0.0010$)、全生存期間は有意に短かった ($p=0.0017$)。MYC 蛋白発現率と年齢、白血球数、乳酸脱水素酵素、可溶性インターロイキン 2 レセプターおよび C 反応性蛋白との相関関係について解析し、乳酸脱水素酵素と正の相関関係を認めた ($r=0.30$, $p=0.019$)。MYC 蛋白発現率は IPI の high risk 群で有意に高かった ($p=0.020$)。免疫組織化学染色を用いた MYC 蛋白発現は節外性 DLBCL の治療予後に関連する指標となりうることを報告した。

キーワード：DLBCL, 節外, 免疫組織化学染色, MYC 蛋白

緒 言

悪性リンパ腫は、リンパ系腫瘍細胞が主にリンパ節で腫瘍を形成して増殖する疾患である。しかし、一部の症例ではリンパ節以外の臓器で腫瘍細胞が増殖する節外性病変を形成することがあり、その有無は悪性リンパ腫の病期診断や治療予後などに関連する重要な臨床因子の 1 つと考えられている。びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫 (Diffuse large B-cell lymphoma, DLBCL) は日本で最も頻度の高い B

細胞リンパ腫であるが、その約 30% はリンパ節以外に主たる病変を有する節外性 DLBCL として発症する¹⁾。節外性 DLBCL の主たる病変部位は多様である。しかし、中枢神経原発 DLBCL などを除いて、節性 DLBCL と節外性 DLBCL の間で診断・治療指針に明瞭な違いはない²⁾。多様な病態を示す節外性 DLBCL に対し、それらの病態に基づいた層別化治療を確立することは、その治療予後の改善に有用であることが期待される。

B 細胞リンパの中で、t (8 ; 14) (q24 ; q32) の

¹⁾ 昭和大学医学部内科学講座 (血液内科学部門)

²⁾ 昭和大学医学部臨床病理診断学講座

* 責任著者

〔受付：2020 年 10 月 27 日, 受理：2021 年 1 月 12 日〕

結果, MYC 遺伝子の切断を有する Burkitt リンパ腫は高悪性度リンパ腫として, 層別化された薬物療法が選択される³⁾. Burkitt リンパ腫の特異な治療反応性の分子基盤として driver gene の MYC 遺伝子異常が重要と考えられている⁴⁾. DLBCL においても MYC 遺伝子の切断を有する一群のリンパ腫は High-grade B-cell lymphoma として層別化治療の有用性が模索されている⁵⁾.

MYC 遺伝子の異常は結果として遺伝子産物 (MYC 蛋白) の発現・機能異常の原因となり, リンパ腫発症に重要な役割を示すことが推定され, MYC 蛋白の発現異常は MYC 遺伝子切断・増幅との関連で主として免疫組織化学染色 (immunohistochemistry, IHC) を用いて複数のグループで検討された^{6,7)}. しかし MYC 遺伝子のゲノム異常が結果として蛋白発現異常を生じているかは明らかとはなっていない. 現在, “MYC-driven B-cell lymphomas” はリンパ腫における MYC 遺伝子あるいは蛋白発現異常に着目した概念として提唱されている⁸⁾.

MYC 蛋白の発現異常, 特に高発現は単独因子として評価された場合, 節性 DLBCL の治療予後への影響は限定的と報告された⁹⁾. 一方, 節外性 DLBCL で MYC 蛋白の発現異常に着目した文献上の報告は限られている. Magnoli らは MYC 蛋白の高発現は節外性 DLBCL で予後不良因子であると報告した¹⁰⁾. その報告で解析された節外性 DLBCL の初発部位は, 精巣と中枢神経系を合わせて 30% を占めるなど一般的な分布とは異なっている.

われわれは節外性 DLBCL を対象として “MYC-driven B-cell lymphomas” の評価を試みた. 節外性 DLBCL でリンパ腫細胞の MYC 発現異常を組み込んだ層別化治療の構築が可能であるかを知る目的で, 節外性 DLBCL における IHC を用いた MYC 蛋白発現とその病態を解析した.

研究方法

1. 対象

Ann Arbor 病期分類でのリンパ節¹¹⁾ 以外に初発部位を有する DLBCL を節外性 DLBCL とした. リンパ節以外でリンパ節領域区分とされたワルダイエル咽頭輪と脾臓に初発部位を有する DLBCL については, 節外性リンパ腫と扱うと報告する先行研究に準じて節外性 DLBCL とした^{12,13)}. WHO 分類 (2008

年)¹⁴⁾ に基づいて, 昭和大学病院で 2008 年から 2016 年までに DLBCL と組織診断された 275 例から節外性 DLBCL を 117 例抽出した. 臨床症状と CT 画像検査で, 節外が初発部位と考えられた症例は節外性 DLBCL とした¹⁾. 骨髄初発の DLBCL は骨髄生検で判断した. 複数に浸潤を認める症例は, 臨床症状に最も関連した臓器を初発部位とした. 治療予後の解析を行う本研究からは, 個別化された治療法が選択される中枢神経系原発悪性リンパ腫は対象から除外した. MYC 蛋白発現が検討できる, 診断時のホルマリン固定パラフィン包埋 (formalin-fixed paraffin-embedded, FFPE) 検体が保管されている 63 例を対象とした. 63 例の内訳は, 針生検などによる生検検体が 58 例, 腫瘍切除などによる外科的摘出検体が 5 例 (精巣 2 例, 甲状腺 1 例, 小腸 1 例, 骨 1 例) であった. 臨床所見は診療録から後方視的に解析した. 診断時の血液検査から白血球数 (White Blood Cell, WBC), 乳酸脱水素酵素 (Lactate Dehydrogenase, LDH), 可溶性インターロイキン 2 レセプター (soluble IL-2 receptor, sIL-2R), C 反応性蛋白 (C-reactive protein, CRP) を用いた. 年齢, WBC, LDH, sIL-2R, CRP はそれぞれ平均値±標準偏差で記した. 予後予測として国際予後指標 (International Prognostic Index, IPI) を用いて予後因子を算出した¹⁵⁾. 初発部位および器官別に MYC 蛋白高発現症例と低発現症例で分布の相違について比較した.

2. 免疫組織化学染色の解析

FFPE 組織切片を用いて, それぞれ MYC (clone Y69, 1 : 200; Abcam PLC, Cambridge, UK), BCL6 (clone PG-B6p, 1 : 50; Dako Cytomation A/S, Glostrup, Denmark), CD10 (clone 151.1, prediluted; Medical & Biological Laboratories, Nagoya, Japan), MUM-1 (clone MUM1p, 1 : 50; Dako Cytomation A/S, Glostrup, Denmark) の一次抗体と Envision™ (DAKO ChemoMate) を使用して IHC を行った. パラフィン切片を脱パラフィン処理後, 抗原賦活処理として, 抗原賦活化液 pH9 (ニチレイ) を用いて 98°C 40 分間マイクロウェーブ照射を行った. その後, 3% H₂O₂ で 5 分間反応させ内因性ペルオキシダーゼの除去を行い, 一次抗体を 4°C で一晩反応させた. ENVISION kit ポリマー試薬 (DAKO) と室温で 40 分間反応させた後, 3,3'-ジアミノベンジジ

ンで発色させ、ヘマトキシリン染色で核染色を行った。

細胞起源 (cell-of- origin, COO) の分類は CD10, MUM1, BCL6 の IHC を用いた “Hans の基準”¹⁶⁾ に従い germinal center B-cell-like (GCB) type と non-GCB type の subtype に分類した (Fig. 1). CD10 が陽性であれば MUM1 と BCL6 の陽性の有無に関わらず GCB type に分類した. CD10 陰性かつ BCL6 陽性の場合, MUM1 が陰性であれば GCB type とし, MUM1 が陽性の場合 non-GCB type と分類した. CD10, MUM1, BCL6 の蛋白発現の評価および COO の分類は診断時のものとした.

MYC 蛋白発現については, 組織切片を用いて新たに IHC を実施した. 形態学的にはヘマトキシリン・エオジン染色標本とギムザ染色標本を用いて評価した. 低倍率視野でリンパ腫細胞の陽性率の最も高い部分を求め, 高倍率 (対物 40 倍) で 1 視野同一面積あたりのリンパ腫細胞全体における陽性細胞数の割合を算出し, 3 視野を数えて平均をとり, MYC 蛋白発現率として数値化した. MYC 蛋白発現率が 40% 以上であれば高発現と定義した¹⁷⁾. MYC 蛋白の発現強度は問わず陽性とした. 評価は血液病理を専門とする 2 名の病理医が行った.

3. 統計解析法

連続変数である MYC 蛋白発現率と年齢, WBC, LDH, sIL-2R, CRP 値の相関関係をそれぞれ Spearman の順位相関係数を用いて解析した. カテゴリー変数の差は Kruskal-Wallis 検定および Chi-square 検定を使用し, 連続変数の差は t 検定およ

び Mann-Whitney 検定を使用して解析した. 全生存期間 (Overall Survival, OS) は, 診断から死亡までの期間もしくは 2018 年 8 月 31 日までの期間として定義した. OS は Kaplan-Meier 法を使用して推定し, Log-rank 検定を使用して比較した. MYC 蛋白発現については年齢, 性別, COO の分類, 病期, IPI をカテゴリー変数として多重ロジスティックモデルを多変量解析に使用した. OS については MYC 蛋白発現, 年齢, 性別, COO の分類, 病期, IPI をカテゴリー変数として Cox モデルを多変量解析に使用した. 統計的有意水準は 5% (p 値 < 0.05) とした. 統計分析のソフトは GraphPad Prism 8.0.0 ソフトウェア (GraphPad Software, La Jolla, CA) および StatFlex 6.0 (Artech, Osaka, Japan) を使用した.

4. 倫理的配慮

本研究は昭和大学医学部の「ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理委員会」(承認番号 189 号) によって承認され, ヘルシンキ宣言の原則を遵守した.

結 果

1. MYC 蛋白発現と節外性 DLBCL の臨床病理学的特徴

典型的な MYC 蛋白高発現の患者を示す (Fig. 2). 発症平均年齢は 71 ± 12 歳, 男女比は 1.5 : 1 だった. MYC 蛋白高発現症例と低発現症例を比較した. MYC 蛋白高発現症例は 21 例 (33%) であり, 2 群間で年齢, 性別および COO 分類の分布に差を認めなかった. MYC 蛋白高発現症例は低発現症例と比

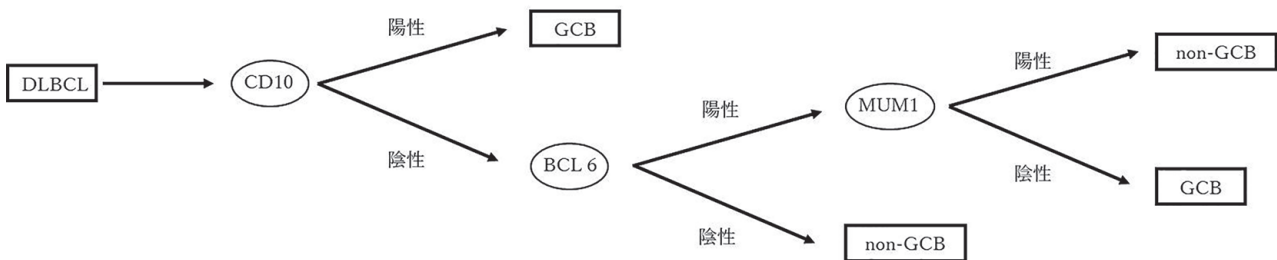


Fig. 1 Subtype classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry (Hans classifier)

DLBCL with high CD10 protein expression is classified into GCB. DLBCL with low CD10 and low BCL6 protein expression is classified into non-GCB. In the DLBCL with low CD10 and high BCL6 protein expression, DLBCL with high MUM-1 protein expression is classified into non-GCB, whereas low MUM-1 protein expression is classified into GCB.

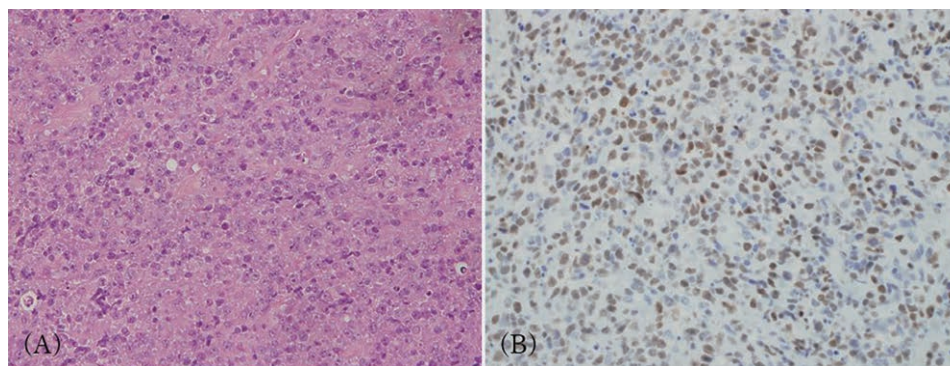


Fig. 2 Representative extranodal DLBCL case involved in thyroid. (A) Hematoxylin and eosin (HE) stain, (B) Immunohistochemistry stain of this case with high MYC protein expression (positive rate; 65%) (objective, 40×).

Table 1 Clinico-pathological features of 63 extranodal DLBCLs

Variable	All patients (n = 63)	MYC high (n = 21)	MYC low (n = 42)	<i>p</i> -value
Age, years	71±12	72±11	71±12	0.79
Gender				0.77
Male	38	13	25	
Female	25	8	17	
Stage				<0.0010
I - II	32	7	25	
III - IV	31	14	17	
IPI				<0.0010
Low (0-1)	17	5	12	
Intermediate (2-3)	26	4	22	
High (4-5)	20	12	8	
Histology				0.27
GCB	18	7	11	
non-GCB	42	13	29	
unknown	3	1	2	
WBC (/μl)	7,903±5,697	7,700±3,124	8,004±6,655	0.81
LDH (U/l)	401±456	556±637	323±313	0.13
sIL-2R (U/ml)	2,605±3,574	2,762±2,400	2,526±4,061	0.77
CRP (mg/dl)	2.64±3.45	2.56±3.09	2.68±3.69	0.89

GCB, Germinal center B-cell-like; IPI, international prognosis index. MYC high is the extranodal DLBCL with MYC positive cells more than 40%, whereas MYC low is those with MYC positive cells less than 40%.

p < 0.05 is considered as significant.

較して stage はⅢ-Ⅳ期が多く (*p* < 0.0010) IPI は MYC 蛋白高発現症例で有意に高かった (*p* < 0.0010). WBC, LDH, sIL-2R, CRP に関しては 2 群間に差を認めなかった (Table 1).

節外性 DLBCL の初発部位の分布を解析した. 咽頭 / 扁桃が最も頻度が高く, 次に胃が多かった. MYC 蛋白高発現および低発現症例で初発部位を比較したところ, MYC 蛋白高発現症例では胸膜が有

Table 2 Distribution of primary site in extranodal diffuse large B-cell lymphomas

Primary site	Total (n=63)	MYC high (n=21)	MYC low (n=42)	<i>p</i> -value
pharynx/tonsil	11	3	8	0.64
stomach	10	5	5	0.22
bone marrow	6	1	5	0.36
nose	4	3	1	0.068
small intestine	3	0	3	0.21
lung	3	1	2	0.99
skin	3	1	2	0.99
thyroid gland	3	1	2	0.99
adrenal	3	1	2	0.99
breast gland	3	0	3	0.21
bone	2	0	2	0.31
colon	2	1	1	0.61
spleen	2	1	1	0.61
pleural	2	2	0	0.042
testis	2	0	2	0.31
duodenum	2	1	1	0.61
paranasal sinus	1	0	1	0.48
orbital	1	0	1	0.48

MYC high is the extranodal DLBCL with MYC positive cells more than 40%, whereas MYC low is those with MYC positive cells less than 40%. $p < 0.05$ is considered as significant.

意に多かった ($p=0.042$) (Table 2).

対象 63 例の MYC 蛋白発現率と年齢, WBC, LDH, sIL-2R および CRP との相関関係について解析し, LDH のみ MYC 蛋白発現率と正の相関関係を認めた ($r=0.30$, $p=0.019$) (Table 3). また, stage, COO の分類, IPI によって群別し MYC 蛋白発現率について比較した. stage では I-II 期の MYC 蛋白発現率の平均値は $27 \pm 18\%$ で, III-IV 期の MYC 蛋白発現率の平均値は $35 \pm 21\%$ だったが有意差を認めなかった ($p=0.10$). GCB 群の MYC 蛋白発現の平均値は $30 \pm 23\%$ で, non-GCB 群の MYC 蛋白発現率の平均値は $31 \pm 17\%$ だったが有意差を認めなかった ($p=0.60$). IPI におけるそれぞれの MYC 蛋白発現率の平均値は low risk 群で $28 \pm 19\%$, intermediate risk 群で $24 \pm 16\%$, high risk 群で $41 \pm 20\%$ であり有意差を認め, high risk 群で MYC 蛋白発現率は高かった ($p=0.020$) (Fig. 3). 多重ロジスティックモデルによる多変量解析を行い, MYC 蛋白高発現症例は IPI で high risk であることと有意に関連があるこ

Table 3 Spearman's rank correlation coefficient analysis

parameters	<i>r</i>	<i>p</i>
Age	-0.050	0.68
WBC	0.11	0.40
LDH	0.30	0.019
sIL-2R	0.14	0.26
CRP	0.19	0.14

r, correlation coefficient.
Spearman's rank correlation coefficient analysis between MYC positive cells and clinical factors.

とが示唆された (Relative risk : 8.8 ; 95% CI : 1.3-58 ; $p=0.024$) (Table 4).

2. MYC 蛋白発現と節外性 DLBCL の臨床転帰
追跡期間の中央値は 840 日 (6-3,766 日) だった.
60 人の患者 (95%) が初回治療に R-CHOP 療法

節外性 DLBCL と MYC 蛋白

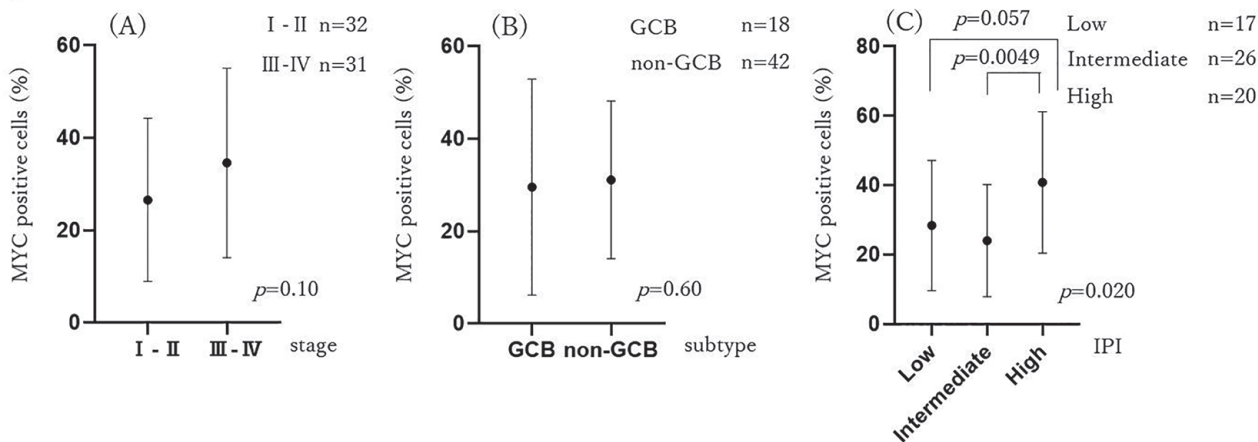


Fig. 3 Relationship between percentage of MYC positive cells and clinical stage (I-II, III-IV) (A), GCB and non-GCB subtype (B) and international prognostic index (IPI) (C). (A) There were no significant differences between percentage of MYC positive cells and clinical stage ($p=0.10$). (B) There were no significant differences between percentage of MYC positive cells and GCB and non-GCB subtype ($p=0.60$). (C) The percentage of MYC positive cells of extranodal DLBCL with high IPI was significantly higher than that with intermediate ($p=0.0049$).

Table 4 Risk factors for high MYC protein expression using multiple logistic regression analysis

factors	<i>p</i>	Relative risk	95%CI
Age > 60	0.15	0.31	0.060-1.6
Male	0.81	1.2	0.33 -4.1
GCB	0.79	1.2	0.32 -4.4
stage \geq III	0.76	0.76	0.13 -4.5
IPI high	0.024	8.8	1.3 -58

GCB, Germinal center B-cell-like; stage \geq III, stage III or IV (Ann Arbor staging system); IPI high, international prognosis index high risk.

high MYC protein expression is the extranodal DLBCL with MYC positive cells more than 40%.

Multiple logistic regression analysis between high MYC protein expression and clinical factors.

(rituximab, cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, prednisone) や R-CHOP 療法に準ずる治療を受けていた。

MYC 蛋白発現の OS に及ぼす影響を解析した。MYC 蛋白高発現症例の OS の中央値は 486 日であり MYC 蛋白低発現症例の OS の中央値は 1,208 日であった。MYC 蛋白高発現症例は有意に OS の短縮を認めた (HR : 2.7 ; 95%CI : 1.0-6.8 ; $p=0.017$) (Fig. 4)。Cox モデルによる多変量解析を行い MYC 蛋白の高発現が節外性 DLBCL の予後不良因子であった (HR : 2.8 ; 95%CI : 1.0-7.9 ; $p=0.047$) (Table 5)。

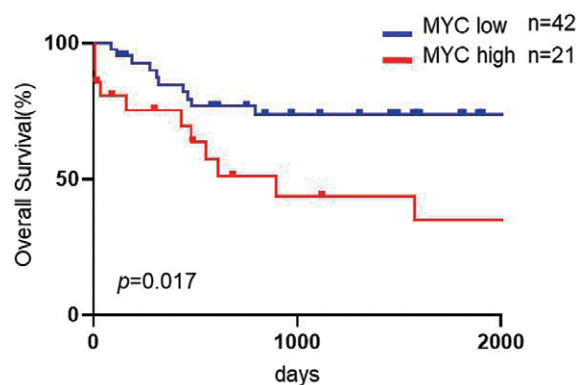


Fig. 4 Kaplan-Meier analysis of overall survival (OS) according to the immunohistochemical expression of MYC protein. OS was compared between two groups with MYC high ($\geq 40\%$ of MYC positive cells) and with MYC low ($\leq 40\%$ of MYC positive cells) and with OS was significantly shorter in extranodal DLBCL with MYC high ($p=0.017$).

考 察

“MYC-driven B-cell lymphoma”はその病因に MYC の活性化が推定されるリンパ腫を総称する概念として提唱された¹⁸⁾。MYC 蛋白の高発現を伴う一群の高悪性度リンパ腫を抽出し、層別化治療を確立することが目標と考えられる。DLBCL では MYC 蛋白の高発現は 33%と報告され、そのみの発現

Table 5 Cox proportional hazards model for overall survival

Comparison	<i>p</i>	Hazard Ratio	95% CI
MYC protein	0.047	2.8	1.0 -7.9
Age >60	0.058	7.5	0.93-60
Male	0.78	0.88	0.36-2.1
GCB	0.14	0.44	0.15-1.3
stage ≥ III	0.43	1.7	0.47-5.9
IPI high	0.76	1.2	0.34-4.4

GCB, Germinal center B-cell-like; stage ≥ III, stage III or IV (Ann Arbor staging system); IPI high, international prognosis index high risk.

MYC protein is the extranodal DLBCL with MYC positive cells more than 40%.

Cox proportional hazard analysis between overall survival, MYC protein and clinical factors.

では予後因子には影響はないとされている¹⁹⁾.

本研究は節外性 DLBCL の病態と MYC 蛋白発現との関連を知る目的で抗 MYC 抗体 (Y69) を用い病理組織標本を IHC で検討した。MYC 蛋白は 21/69 症例 (33%) で高発現しており、血清 LDH 値の増加、進行した臨床病期との関連を認めた。また、MYC 蛋白高発現は DLBCL に対する標準化学療法である R-CHOP 療法後の治療予後にも関連する予後不良因子であった。

Magnoli らは節外性 DLBCL について MYC の IHC からその病態解析し、その高発現が予後不良因子であることを報告している¹⁰⁾。節外性 DLBCL は病変部位により病態に差があることは知られている。扁桃や胃を病変部位とする節外性 DLBCL は予後良好と言われ、一方で中枢神経を病変とする節外性 DLBCL は予後不良である²⁰⁾。Magnoli らの解析対象となった節外性 DLBCL は、扁桃が 0%、精巣が 19%、中枢神経リンパ腫が 12% であるのに対し、本研究ではそれぞれ扁桃が 17%、精巣が 3%、中枢神経リンパ腫は除外しており病変部位に明瞭な差異があるにも関わらず、いずれの研究においても MYC 蛋白の高発現が予後不良因子と抽出された。IHC による MYC 蛋白の高発現は節外性 DLBCL においては、病変部位に関わらず予後不良であるという細胞生物学的特徴であり、またその層別化治療を考える上で有用な指標となる可能性がある。本研究で MYC 蛋白の高発現と IPI が high risk であることと有意に関連があること、MYC 蛋白発現率と IPI の

項目である LDH に正の相関関係があることを示した。LDH は嫌氣的解糖系代謝の酵素であり、悪性腫瘍細胞内で上昇していることは知られている²¹⁾。悪性腫瘍で認められる LDH の上昇は、腫瘍細胞からの逸脱酵素として、腫瘍細胞の代謝や細胞回転、腫瘍量が増加に関連すると推定されているが、腫瘍細胞の帰属などとの関係は不明の部分が多い。Liu らは非ホジキンリンパ腫における MYC 遺伝子異常と LDH の上昇の関連性を報告しており²²⁾、“MYC-driven B-cell lymphoma” の代謝異常や細胞増殖などがその要因の可能性もある。節外性 DLBCL において MYC 蛋白発現が単独で予後不良因子と成り得るか、MYC 蛋白高発現を示す節外性リンパ腫が “MYC-driven B-cell lymphoma” として予後不良な臨床病態を示すのか、今後の研究課題であると考えられる。

Burkitt リンパ腫は染色体 8q24 と MYC の切断が明瞭な病態であり、治療法選択の根拠とされる。一方 “MYC-driven B-cell lymphoma” では層別化治療は確立されてはいない。MYC 遺伝子異常以外の複数の MYC の活性化機序が存在することは明らかで^{23,24)}、また活性化の病態の評価も単一ではない^{25,26)}。MYC 蛋白の IHC は Y69 単クローン抗体開発以後、比較的簡便な方法として MYC の活性化を知る目的で広く用いられている。FFPE 標本で多数例の解析が可能である利点がある反面、その意義づけの客観的評価もいまだ検討課題といえる^{7,8)}。

High-grade B-cell lymphoma は、WHO 分類 (2017) で MYC 遺伝子に加え BCL2 や BCL6 遺伝子異常を伴う病態として提起された概念である²⁷⁾。MYC の異常の臨床的重要性は併存する分子異常と合わせて評価すべきであり、本研究で得られた結果もその視点での更なる評価を行うことが望まれる。

節外性 DLBCL の初発部位と MYC 蛋白発現に着目すると、本研究では胸膜を初発部位とした節外性 DLBCL は MYC 蛋白高発現症例が多かった。しかし、それぞれの初発部位での症例数は限られている。また、単一施設での後方視的研究であり患者情報に選択バイアスや情報バイアスが生じている可能性がある。節外性 DLBCL での初発部位の相違が MYC 蛋白発現に関わる重要な因子であるかは、今後大規模な症例解析を待つ必要があると考えられる。

悪性リンパ腫は造血器悪性腫瘍の中で最多であ

り、高頻度に節外性病変を伴う DLBCL はその中心をなす病型である。節外性リンパ腫では、包括的な解析に可能な十分量の腫瘍組織やリンパ腫細胞が得られない症例も多い。FFPE 標本を対象とした MYC 蛋白の IHC の汎用性は今後も高まることが予想される。

われわれは MYC 蛋白の IHC を用いて外性 DLBCL での MYC oncoprotein の活性化の評価を試みた。その結果、節外性 DLBCL の約 30% を、MYC-IHC の高発現を伴う従来の標準的免疫化学療法では予後不良な "MYC-driven B-cell lymphoma" として抽出した。MYC の IHC は節外性 DLBCL の層別化治療の構築にも用いられ得る実際的で有用な予後指標であると考えられた。

謝辞 昭和大学医学部臨床病理診断学講座研究補助員 佐々木陽介様には、組織切片を用いた免疫組織化学染色においてご協力を頂きました。心より感謝申し上げます。

利益相反

本研究に開示すべき利益相反はない。

文 献

- 1) Lopez-Guillermo A, Colomo L, Jimenez M, *et al.* Diffuse large B-cell lymphoma: clinical and biological characterization and outcome according to the nodal or extranodal primary origin. *J Clin Oncol.* 2005;23:2797-2804.
- 2) Liu Y, Barta SK. Diffuse large B-cell lymphoma: 2019 update on diagnosis, risk stratification, and treatment. *Am J Hematol.* 2019;94:604-616.
- 3) Magrath I, Adde M, Shad A, *et al.* Adults and children with small non-cleaved-cell lymphoma have a similar excellent outcome when treated with the same chemotherapy regimen. *J Clin Oncol.* 1996;14:925-934.
- 4) Schmitz R, Ceribelli M, Pittaluga S, *et al.* Oncogenic mechanisms in Burkitt lymphoma. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2014;4:a014282. (accessed 2020 Nov 23) <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3904095/pdf/cshperspectmed-MYC-a014282.pdf>
- 5) Kluin PM, Harris NL, Stein H, *et al.* High-grade B-cell lymphoma. In *Swerdlow SH. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. rev 4th ed.* Lyon: IARC; 2017. pp335-341.
- 6) Kluk MJ, Chapuy B, Sinha P, *et al.* Immunohistochemical detection of MYC-driven diffuse large B-

- cell lymphomas. *PLoS One.* 2012;7:e33813. (accessed 2020 Nov 23) <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3325231/pdf/pone.0033813.pdf>
- 7) Bigras G, Dong WF, Canil S, *et al.* New MYC IHC classifier integrating quantitative architecture parameters to predict MYC gene translocation in diffuse large B-cell lymphoma. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2018;26:54-63.
- 8) Kluk MJ, Ho C, Yu H, *et al.* MYC immunohistochemistry to identify MYC-driven B-cell lymphomas in clinical practice. *Am J Clin Pathol.* 2016;145:166-179.
- 9) Johnson NA, Slack GW, Savage KJ, *et al.* 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;30:3452-3459.
- 10) Magnoli F, Bernasconi B, Vivian L, *et al.* Primary extranodal diffuse large B-cell lymphomas: many sites, many entities? Clinico-pathological, immunohistochemical and cytogenetic study of 106 cases. *Cancer Genet.* 2018;228-229:28-40.
- 11) Carbone PP, Kaplan HS, Musshoff K, *et al.* Report of the committee on Hodgkin's disease staging classification. *Cancer Res.* 1971;31:1860-1861.
- 12) John PG, Nishitha MR, Michael EW. Management of extranodal lymphomas. In *Greer JP. Wintrobe's clinical hematology. 13th ed.* Philadelphia, Pa: Lippincott Williams & Wilkins; 2013. pp1866-1868.
- 13) Olszewski AJ, Winer ES, Castillo JJ. Improved survival with rituximab-based chemoimmunotherapy in older patients with extranodal diffuse large B-cell lymphoma. *Leuk Res.* 2014;38:866-873.
- 14) Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, *et al.* WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. 4th ed. Lyon: IARC; 2008.
- 15) International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project. A predictive model for aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med.* 1993;329:987-994.
- 16) Hans CP, Weisenburger DD, Greiner TC, *et al.* Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood.* 2004;103:275-282.
- 17) Green TM, Young KH, Visco C, *et al.* 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;30:3460–3467.
- 18) Ott G, Rosenwald A, Campo E. Understanding MYC-driven aggressive B-cell lymphomas: pathogenesis and classification. *Blood.* 2013;122:3884–3891.
 - 19) Johnson NA, Slack GW, Savage KJ, *et al.* 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;30:3452–3459.
 - 20) Yao S, Li J, Yao Z, *et al.* Extranodal involvement in young patients with diffuse large B-cell lymphoma: distribution, prognostic value and treatment options. *Chin J Cancer Res.* 2017;29:57–65.
 - 21) Serganova I, Rizwan A, Ni X, *et al.* Metabolic imaging: a link between lactate dehydrogenase A, lactate, and tumor phenotype. *Clin Cancer Res.* 2011;17:6250–6261.
 - 22) Liu QH, Li XD, Song MY, *et al.* Association between C-myc and K-ras gene polymorphisms and non-Hodgkin lymphoma. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2020;24:4396–4403.
 - 23) Leucci E, Cocco M, Onnis A, *et al.* MYC translocation-negative classical Burkitt lymphoma cases: an alternative pathogenetic mechanism involving miRNA deregulation. *J Pathol.* 2008;216:440–450.
 - 24) Chung EY, Psathas JN, Yu D, *et al.* CD19 is a major B cell receptor-independent activator of MYC-driven B-lymphomagenesis. *J Clin Invest.* 2012;122:2257–2266.
 - 25) Cai Q, Medeiros LJ, Xu X, *et al.* MYC-driven aggressive B-cell lymphomas: biology, entity, differential diagnosis and clinical management. *Oncotarget.* 2015;6:38591–38616.
 - 26) Jung M, Russell AJ, Liu B, *et al.* A Myc activity signature predicts poor clinical outcomes in Myc-associated cancers. *Cancer Res.* 2017;77:971–981.
 - 27) Ok CY, Medeiros LJ. High-grade B-cell lymphoma: a term re-purposed in the revised WHO classification. *Pathology.* 2020;52:68–77.

Evaluation of MYC protein expression using immunohistochemistry in
extranodal Diffuse large B-cell lymphoma

Yohei Sasaki^{*1)}, Norimichi Hattori¹⁾, Yuka Uesugi¹⁾,
Ayaka Nakata¹⁾, Shotaro Shimada¹⁾, Megumi Watanuki¹⁾,
Shun Fujiwara¹⁾, Nana Arai¹⁾, Yui Uto¹⁾,
So Murai²⁾, Eisuke Shiozawa²⁾, Toshiko Yamochi²⁾
and Tsuyoshi Nakamaki¹⁾

Abstract — Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) is the most common B-cell lymphoma. Extranodal DLBCL has a primary site, except for the lymph node, which accounts for 30% of DLBCL and needs risk stratification for treatment planning. In 63 extranodal DLBCL patients, MYC protein expression was analyzed using immunohistochemistry and compared with the clinical features of those patients to construct a stratified treatment for extranodal DLBCL. The results revealed that > 40% of MYC-positive cells were defined as high MYC protein expression, and < 40% of MYC-positive cells were defined as low MYC protein expression. The most frequent extranodal sites were the pharynx or tonsils, followed by the stomach. MYC protein expression occurred in 21 (33%) patients. The pleura was a significantly more common site for extranodal DLBCL with high MYC protein expression at the primary sites than for DLBCL with low MYC protein expression ($p=0.042$). Patients with high MYC protein expression exhibited significantly higher stage and international prognostic index and shorter overall survival than other patients ($p < 0.0010$, $p < 0.0010$, and $p=0.0017$, respectively). The percentage of MYC-positive cells was correlated with increased serum lactate dehydrogenase ($r=0.30$, $p=0.019$) and significantly associated with increased international prognostic index ($p=0.020$). We suggest that MYC protein expression is the prognostic marker in extranodal DLBCL.

Key words: DLBCL, extranodal, immunohistochemistry, MYC protein

[Received October 27, 2020 : Accepted January 12, 2021]

¹⁾Department of Medicine, Division of Hematology, Showa University School of Medicine

²⁾Department of Pathology and Laboratory Medicine, Showa University School of Medicine

* To whom corresponding should be addressed