

主 論 文

Frequent *MYD88* L265P and *CD79B* Mutations in Primary Breast Diffuse Large B-cell lymphoma

(乳腺原発 DLBCL には *MYD88*L265P と *CD79B* の変異が高率に存在する)

【緒言】

乳腺原発びまん性大細胞性 B 細胞リンパ腫(PB-DLBCL)は非ホジキンリンパ腫の約 1%, 節外性リンパ腫の 3%と稀な疾患である。5 年生存率は 63%という報告があったが、リツキシマブの導入によって 5 年生存率が 87%まで改善したとの報告がある。PB-DLBCL では中枢神経への浸潤が 11.5%–13.3%と高率であり、時に致死的であるとされている。

Activated B-cell (ABC)-like DLBCL は NFκB の持続的な活性化を特徴としている。NFκB に関わる *MYD88*, *CD79B*, *CARD11*, *TNFAIP3 (A20)* といった遺伝子の変異が ABC-like DLBCL では報告されており、腫瘍化の一旦を担っていると考えられる。また、PB-DLBCL の 77%–95%は ABC-like DLBCL であるとの報告がある。

Myeloid differentiation factor 88 (MYD88) は Toll-like 受容体と interleukin-1 受容体の adaptor molecule である。*MYD88* L265P は ABC like-DLBCL (21.6%–31.2%)よりも B-cell (GCB)-like DLBCL (6%–9.7%)でより高率に検出されると報告されている。*MYD88* L265P は *MYD88* の変異の中で最もよく検出される。*MYD88*L265P は機能獲得型の変異であり、NFκB 経路を活性化させ、腫瘍細胞の生存につながる。

CD79B は B 細胞受容体のサブユニットであり、免疫受容活性化チロシンモチーフ(ITAM)を持っている。*CD79B* は NFκB 経路の上流にある。*MYD88*L265P と同様に、*CD79B* の変異も GCB-like DLBCL (1.6%–5.1%)においてより、ABC-like DLBCL (18%–23%)において高頻度である。*CD79B* の変異は ITAM の最初のチロシン(Y196) に最も多く見られる。また、機能獲得型の変異であり、NFκB 経路の活性化につながる。

PB-DLBCL では、ABC-like DLBCL が多いため、*MYD88* L265P と *CD79B* の変異が多いことが考えられる。しかし、稀な疾患であるため、我々の知る限り、遺伝子変異の検索は行われていない。我々は PB-DLBCL における *MYD88*L265P と *CD79B* の頻度とその臨床病理学的な因子についての検討を行った。

【材料と方法】

患者選別

乳腺に DLBCL を生じた 46 例において検討を行った。16 例は我々の施設のデータベースから抽出し、30 例は協力施設から提供いただいた(4 例は広島市民病院、4 例は香川労災病院、7 例は名古屋大学病院、5 例は福島医科大学、10 例は Chi-Mei Medical Center)。診断は現在の WHO 分類に従って行った。PB-DLBCL の定義は以前の基準に従って、乳腺と同側の腋窩リンパ節にまで病変が限局しており、リンパ腫の既往がないこと、とした。28 例(Patients No. 1–28)はこの基準を満たしており、他の症例とは分けて解析した。その他の 18 例 (Patients No. 29–46) はこの基準には満たないが、主病変は乳腺にあり、PB-DLBCL として臨床的に対応されている。これらの症例を“clinical breast DLBCL (CLB-DLBCL)”と名付けた。この群では、5 例において、乳腺以外の節外性病変があった。

DNA 抽出と polymerase chain reaction(PCR)

DNA extraction and Polymerase Chain Reaction

DNA の抽出は 10%ホルマリンで固定されたパラフィン包埋組織から QIAGEN DNeasy kit (QIAGEN, Venlo, Netherland) を用いて行った。

MYD88 は AmpliTaq Gold PCR Master MIX を使って semi-nested PCR で行った。

CD79B exon 5 の ITAM は KOD FX を用いて、PCR で増幅した。

サンガーシークエンス

PCR 産物は ExoSap で純化し、BigDye Terminator v3.1 cycle Sequencing Kit を用いて双方向にシークエンスを行った。

Allele-specific PCR

MYD88 L265P について、QuantStudio™ 3D Digital PCR Master Mix と StepOnePlus real time PCR system を用いて、Allele-specific (AS) PCR を行った。Primer は *MYD88* の 2 回目の PCR で用いたものと同じである。

免疫組織化学的染色および in situ ハイブリダイゼーション

10%ホルマリンで固定されたパラフィン包埋組織において Bond-Max Autostainer を使って免疫組織化学的染色を行った。カットオフ値は GCET1 と FOXP1 は 80%、MUM1・BCL6・CD10・BCL2 は 30%とした。c-MYC に関しては 3 人の血液病理医が全ての症例を評価し、カットオフを 70%とした。ABC-like DLBCL と GCB-like DLBCL の区別については Choi の algorithm に従った。Ki-67 標識率については強拡大 3 視野で計測し、平均値を計算した。EB ウイルスの感染の有無を調べるために、Epstein-Barr virus (EBV)-encoded small RNA 1 (EBER-1) probes を用いて染色を行った。

MYC, BCL2, and BCL6 の蛍光 insitu ハイブリダイゼーション(FISH)

免疫染色で BCL6 陽性となった症例について、BCL6 の転座を調べるために FISH を行った。ハイブリダイザーを用いて 73°C 3 分で変性を行った後、ハイブリダイゼーションを 37°C で 48 時間で行った。MYC と BCL2 の転座を調べるために、Agilent FISH General Purpose Reagents を用いて、IQ-FISH を行った。

作製したスライドは KEYENCE:BZ-X700 fluorescence microscope で観察を行った。

統計解析

Statcel を用いてカイ二乗検定およびフィッシャーの正確確率検定を行った。SPSS version 14.0J を用いて、生存曲線を作成した。 $P < 0.05$ を統計学的に有意とした。

【結果】

乳腺 DLBCL の患者の特徴、組織学的、免疫組織化学的特徴

46 例の乳腺 DLBCL のうち、28 例が PB-DLBCL の基準を満たし、残りの 18 例が CLB-DLBCL に分類された。フォローアップのデータは 43 例で得られた。追跡期間中央は 30.8 (0.97–173.8) ヶ月であった。全ての患者は女性であり、平均年齢は 62.8 (30–87) 歳であった。PB-DLBCL では、Choi の algorithm によると 16 例(16/27; 59.3%)が ABC-like phenotype であり、11 例(11/27; 40.7%)が GCB-like phenotype を示す。CLB-DLBCL では Choi の algorithm によると、15 例(15/18; 83.3%)が ABC-like phenotype であり、3 例(3/18; 16.7%)が GCB-like phenotype である。PB-DLBCL のマーカーの陽性率は以下の通りである。MUM1 18/27 (66.7%); CD5 7/27(25.9%); c-MYC 5/27 (18.5%); BCL2 21/28 (75%); BCL6 12/25 (48 %)。Ki-67 標識率の平均は 55.5% (19.5%–86.3%)であった。CLB-DLBCL を含め全例で EBER-1 ISH は陰性であった。Patient No. 20 は小範囲で low grade B-cell (mucosa-associated lymphoid tissue) lymphoma のコンポーネントを認めた。

乳腺 DLBCL における *MYD88* L265P と *CD79B*(exon 5)変異の検出

DNA ダイレクトシーケンスにより、*MYD88* L265P は 46 例中 27 例(58.7%)に検出された。*MYD88* L265P を持つ 25 例では、 $\Delta Ct \leq 1$ となり、1 例は $\Delta Ct = 1.64$ となった。もう 1 例は AS-PCR で増幅が得られなかった。ダイレクトシーケンスで *MYD88* が wild-type であった 19 例中、14 例で $\Delta Ct > 1$ であった。残りの 5 例では増幅が得られなかった。ゆえに、AS-PCR の結果は $\Delta Ct \leq 1$ をカットオフとすると、感度 92.6%、特異度 100%でサンガーシーケンスの結果と一致するという結果になった。

次に *CD79B* の変異を調べて。46 例中 33 例で *CD79B* の増幅が得られた。11 例(33.3%) は *CD79B* mutation があり、9 例(27.3%)は non-synonymous mutation であった。11 例中 7 例(63.6%)は ITAM の最初のチロシンに変異を持っていた 5 例は synonymous mutation であった。その他に T195N, E197stop, R199K, A202V, R241S があつた。4 例(Patients No. 5, 22, 35, 46) は複数の変異を持っていた。PB-DLBCL の 28 例では、*MYD88* L265P は 16/28 (57.1%)、*CD79B* 変異は 9/23 (39.1%) であつた。CLB-DLBCL の 18 例では、*MYD88* L265P は 11/18 (61.1%)、*CD79B* は 2/10 (20%)であつた。

MYD88 L265P および CD79B 変異と c-MYC および BCL2 の免疫染色の臨床病理学的重要性

MYD88 L265P および CD79B の non-synonymous mutation と有意に関連する因子は見られなかった。しかし、MYD88 L265P を持つ例は CD5 陰性となり、腫瘍径が 5 cm を超える傾向にあり、CD79B non-synonymous mutation を持つ例では、MUM1 が陽性となり、Ki-67 標識率が 40% を超える傾向にあった。

PB-DLBCL における全生存(OS)曲線と無再発生存(PFS)曲線を作成した。MYD88 L265P の有無は OS および PFS に寄与しなかった(OS, $P=0.937$ and PFS, $P=0.642$)。C-MYC, BCL2 および c-MYC/BCL2 共陽性であることも有意な予後因子にならなかった。全ての症例における OS 曲線と PFS 曲線は Supplementary Figure 1 に示した。C-MYC 陽性例および c-MYC と BCL2 どちらも陽性となる症例は有意に PFS が不良であったが、($P=0.026$ と $P=0.013$) OS に有意差はなかった($P=0.985$ と $P=0.909$)。

MYC, BCL2, and BCL6 の FISH の結果

免疫染色で BCL6 陽性であった症例について BCL6 の FISH を行った。21 例中 5 例に BCL6 の転座を認めた。これらは、すべて CLB-DLBCL であった。MYC もしくは BCL2 の転座を持つ症例はなかった。2 例(Patient No.26 と No.39)が BCL2 遺伝子の増幅を示した。

[考察]

近年、MYD88 L265P と CD79B の変異による NFκB 経路の持続的な活性化がリンパ腫の発生として注目されている。これらの変異は ABC-like DLBCL で高頻度に検出される (21.6%–29% と 18%–23%)。また、これらの変異は中枢神経原発 DLBCL や精巣原発 DLBCL のように ABC-like phenotype の多い節外性 DLBCL で多く検出される。PB-DLBCL は稀な疾患のため、分子的な検索の報告は少ないが、ABC-like phenotype が多いため、PB-DLBCL は MYD88 L265P と CD79B の変異が多いと考えられた。

この研究では MYD88 L265P と CD79B の変異が乳腺の DLBCL においてそれぞれ 58.7%、33.3% と高率であった。PB-DLBCL の 28 例に限っても MYD88 L265P は 57.1%、CD79B 変異は 39.1% と高率であった。BCL2, BCL6, MYC 転座を持つ PB-DLBCL はなかった。BCL6 変異を持つ 5 例は全て CLB-DLBCL であった。その上、EBER ISH は全例で陰性であった。この結果は MYD88 L265P と CD79B 変異が PB-DLBCL の発生の初期に関わっていることが示唆される。CD5 の陽性率はこれらのリンパ腫で多く検出される。この度の研究でも CD5 は PB-DLBCL において 25.9% と高率であった。慢性リンパ性白血病/小リンパ球性リンパ腫(CLL/SLL)の既往のある症例はなかったため、これらの CD5 陽性例は全て、de novo CD5-positive DLBCL と考えられる。生存率は以前の報告と変わらず、CD5 陽性であることも予後不良因子とはならなかった。

MYD88 L265P と CD79B 変異は機能獲得変異であり、p65-NFκB の核内移行を促進し、細胞の不死化につながる。Fernandez-Rodriguez らは、MYD88 L265P は DLBCL の独立した予後因子となると報告しているが、この研究では、節性および節外性の症例を含んでおり、それぞれについて解析を行っていない。その他の研究では、MYD88 L265P は予後に関連せず、免疫組織学的染色によって評価した MYD88 蛋白の発現が予後に影響するとしている。MYD88 L265P が予後因子になることについて同意は少ない。

この研究では、28 例が PB-DLBCL の従来基準を満たした。その他の 18 例は CLB-DLBCL とした。5 例は節外性病変(卵巣, 中枢神経, 骨髄, 脾臓)があり、13 例は同側の腋窩リンパ節以外のリンパ節病変があった。我々はこれら 2 つのグループを別々に解析した。しかし、これらの 2 つのグループで MYD88 L265P の頻度に差はなかった(57.1% vs. 61.1%)。そのうえ、PB-DLBCL と同様に CLB-DLBCL の 83.3% (15/18)が ABC-like DLBCL に分類された。以上より、CLB-DLBCL は PB-DLBCL と同様の性質を持つと考えられる。

*MYD88*L265P と *CD79B* 変異は乳腺の DLBCL の予後因子とはならないかもしれないが、これらの変異を有する腫瘍は分子標的薬の対象となるかもしれない。Waldenström macroglobulinemia では、*MYD88*L265P が Bruton tyrosine kinase (BTK) を活性化し、腫瘍細胞の不活化につながっており、BTK 阻害薬は腫瘍細胞の衰退に関わると報告されている。Protein kinase C (PKC) は *CD79B* 変異を介して NF κ B 経路の活性化に関わっている。*In vitro* では、*CD79B* を持つ腫瘍細胞は PKC に感受性があるとの報告がある。そのようにして、BTK 阻害薬と PKC 阻害薬が PB-DLBCL の治療の選択肢となる可能性がある。

AS-PCR のカットオフについては、この研究では、 $\Delta Ct \leq 1$ とした。この条件では、AS-PCR の結果はサンガーシーケンスの結果と高い感度および特異度で一致する。以前の報告では、カットオフ値は $\Delta Ct < 10$ に設定されているが、その研究では、TaqMan allele-specific custom probe kit を使い、異なる条件下で、異なるサーマルサイクラーを使って検討している。ゆえにカットオフ値を正確に比較することはできない。どちらの条件にしる、AS-PCR は *MYD88*L265P を検出するのに有用であると考えられる。

[結論]

MYD88 L265P と *CD79B* の変異は PB-DLBCL で高頻度に検出され、乳腺原発 DLBCL の発生に関わっていることが示唆される。