

悪性リンパ腫

鈴木孝世

悪性リンパ腫は疫学的・地理病理学的に多様性を有する疾患であり、高齢化が進むわが国における発生率は、欧米と同じく増加傾向にある。年間発症率は、人口10万当たり9で、年間約1万人が発症している（男女比：約5：4）。

悪性リンパ腫に対する治療研究の進歩はめざましく、病理診断技術や遺伝子解析技術の発展とともに、テーラーメイド治療が可能になりつつある時代である。と同時に、早期診断はより優れた治療成績に寄与する。

本章では、かかりつけ医/一般臨床医が施行する悪性リンパ腫診断の実際を中心に述べる。悪性リンパ腫に関するガイドライン/マニュアルとしては、「JCOG-LSGリンパ腫・骨髄腫臨床研究マニュアル第1版」がある。

概念・分類

悪性リンパ腫はリンパ系細胞の腫瘍の総称であり、ホジキンリンパ腫と非ホジキンリンパ腫に大別される。

1982年にWorking Formulation (WF) 分類が提唱され、悪性リンパ腫は病理形態学的に10種類の病型と、臨床予後との相関から低・中・高悪性度の3群のカテゴリーに分類された。“臨床予後”という臨床面が反映されていたが、基本的には従来の病理形態分類の域を超えなかった。また細胞生物学的認識が進むとともにWF分類は意義を失っていった。1992年、細胞生物学的解析と遺伝学的解析をふまえ、REAL分類が提唱された。現在、REAL分類の改訂版であるWHO分類により悪性リンパ腫を分類している。

病因

悪性リンパ腫の発症は、多くの他の癌と同じく、多段階発症と考えられている。病因については、以下のように遺伝的素因をはじめ多くの因子が候補に挙げられている。

①染色体異常：染色体相互転座によるリンパ球の腫瘍性増殖（14q32型転座 [1]）や、転座

によるキメラ遺伝子の発現による腫瘍性増殖が明らかになっている。

②ウイルス：有力な病因の1つであり、原因と同定されているものや、腫瘍内にゲノムを表現しているものなどがある。

（例）発症の原因となるウイルス

EBV：バーキットリンパ腫、膿胸関連リンパ腫（PAL）、鼻型NK/Tリンパ腫

HHV-8：原発性滲出性リンパ腫

HTLV-1：成人T細胞性白血病/リンパ腫（ATL）

③持続性慢性炎症：*Helicobacter pylori*感染症は胃MALTリンパ腫の主病因として認知されている。その他、シェーグレン症候群や橋本病に合併するリンパ腫などが知られている。

④免疫抑制状態：エイズ患者、移植患者、MTX治療後のリウマチ患者など免疫抑制状態から発症する悪性リンパ腫が報告されている。

診断

癌診療の基本は発症予防と早期発見である。悪性リンパ腫においては、一般臨床家は早期発見に努め、専門医に紹介しなければならない。ここでは悪性リンパ腫の早期発見に結びつく症状の解説を行い、次いでリンパ節触知に代表される基本的な診察技術、また紹介ま

で行っておくべき臨床検査を述べる。

(1) 発熱の有無

38℃より高い、原因不明の発熱の有無に留意しなければならない。「かぜも引いていないのに、このところ熱が続いています」という訴えは、悪性疾患の存在が強く疑われるからである。腫瘍細胞をサーベイランスする免疫担当細胞から産生されるサイトカイン（おもにはIL-1）に起因するものと考えられている。免疫不全・敗血症は否定的で、胸部写真に異常なく、甲状腺腫大も認めない（外来診療の場では原因不明の）発熱のみの場合、解熱薬（もちろん抗菌薬も）は処方せず、熱型の観察（起床時、午前、午後、眠前の4検）に努める。患者用熱型表は外来診察室に取り揃えておく必要がある。ただし再興感染症としての肺外結核症は常に念頭に置いておかねばならない。

(2) 寝汗

ここでの「寝汗」とは、寝具を替えなければならないような「ずぶ濡れ」になる夜間の発汗をいう。古い教科書には「盗汗」とあり、原因を自律神経の緊張異常としている。これもまた悪性腫瘍の存在が関与するものである。寝汗の訴えのみで受診される患者は少ないが、悪性リンパ腫を想起しなければならない。

(3) 予期しない体重減少

「ダイエットもしていないのに、また、食欲もそう減退していないのに、なぜか痩せてくるのです」という訴えは自覚症状のなかでも重要である。ここでいう体重減少とは、「過去6カ月間に起こる、普段の体重の10%を越す理由のつかない体重減少」である。悪液質という用語があるが、これは癌の末期に生じる食思減退と癌細胞の急峻な増殖とが相まって生じる体重減少であって、ここでの「予期しない体重減少」ではない。

以上述べた(1)～(3)はホジキン病の分類であるAnn Arbor分類で記載されている臨床

症状群であり、B症状（分類）と称する。これらの症状がない場合を、A分類という。同様の臨床病期であれば、B分類のほうが予後不良である。

(4) リンパ節触知について

簡単なようで難しいのが「全身リンパ節触知」である。紹介状に記載してあるリンパ節の位置、数、大きさ、性状は、実際に筆者が触知する所見と大きく異なる場合が少なくない。特に腋下リンパ節に関しては、腫大を見逃していたり、もとより触知しようとする努力さえなされていない。

「首にしこりがあります」「足の付け根が腫れています」という訴えの患者がみえたときは、訴えの局所のみならず、口腔内（できれば鼻腔内）ならびに全身のリンパ節を検索しなければならない。この場合、「全身を診る」ことに関して患者の承諾を得る必要がある。特に女性患者の場合、決して1人で診てはならない。看護師とともに患者を観察することに留意する。この際、腋下に関しては大胸筋内側に深く手を入れ、深在リンパ節腫大の有無を観察する。また、膝窩リンパ節の観察も逃してはならない。脾臓はリンパ組織であるので、腹部所見も十分にとる必要がある。

(5) リンパ節以外の観察

節外リンパ腫の存在に留意しなければならない。東洋人に好発する節外型NK/Tリンパ腫の鼻腔原発型は、急速に進展する予後不良のリンパ腫である。よって、その初期段階である鼻腔に限局している時期に早期発見することは重要である。鼻閉を訴える患者については直ちに耳鼻科へ紹介し、精査をする必要がある。また、T細胞性リンパ腫もわが国に多いリンパ腫である。膨隆性の皮疹を認めた場合、皮膚科専門医への紹介が急がれる。

(6) 紹介までに行っておくべき臨床検査

血液専門医に紹介するまでに施行しておく

ことが望ましい検査について述べる。紹介後、悪性リンパ節が疑われると、リンパ節生検を行う。このとき感染症の有無を問われるため、紹介状にB、C型肝炎検査、ならびに同意を得て施行したHIV検査結果を記載しておく。また、結果報告までに数日を要する腫瘍マーカー検査は前もって行っておくことが望まれる(可溶性IL-2受容体：sIL-2Rなど)。

なお、臨床病期決定検査であるCT検査やPET検査は専門医にて詳細に条件を決めて施行するため、患者の被曝を考慮に入れると、紹介する前に行うべき検査ではない。

治療

病型により治療法を選択する。治療方針の決定には、臨床病期と国際予後指標 (IPI) が重要である。最近注目されている病型別の治療法を挙げる。

(1) ホジキンリンパ腫

病期 I A、II A に対しては放射線療法が、進行期 HD に対しては ABVD 療法が標準的治療法となっている。

(2) 非ホジキンリンパ腫

びまん性大細胞型B細胞リンパ腫：限局期症例に対しては CHOP 療法 3 コース施行後に放射線療法を加える。進行期症例に対しては、CHOP 療法 8 コースが標準的治療法である。抗 CD20 キメラ抗体である リツキシマブ の併用効果は確立されており、限局期、進行期ともに併用療法が標準的治療法となりつつある。

濾胞性リンパ腫：“低悪性度”ではあるが、治療抵抗性で治癒しがたい疾患である。限局期症例に対しては放射線療法が標準的治療法である。進行期症例に対しては、CHOP 療法と

リツキシマブの併用が最も有用であると考えられている。

限局期鼻型NK/Tリンパ腫：アントラサイクリン系の薬剤を含む化学療法に後照射を加えた治療法は無効である。DeVIC 療法と照射療法の同時期併用療法が期待されている。

マントル細胞リンパ腫：AraC 大量を含む CHASE 療法に、リツキシマブを加えた CHASER 療法が良好な成績をあげている。

成人T細胞性白血病/リンパ腫：化学療法による治療に抵抗性である。Japan Clinical Oncology Group (JCOG)-LSG15 プロトコルにより、生存期間の延長が得られている。同種幹細胞移植が有用であるとの報告があり、多施設共同研究が計画されている。

経過・予後

悪性リンパ腫の細胞起源やその成因は多様性に富む。したがって共通の治療経過をとることはなく、予後のよいものからきわめて悪いものまでさまざまである。一定程度の治療効果が得られた場合(例えば完全寛解や部分寛解)、専門医は紹介元(かかりつけ医や地域一般病院医師)に逆紹介し、経過観察を依頼することになる。観察点はリンパ節再腫大の有無、B症状の有無であり、行うべき臨床検査は、LDH、sIL-2Rなどの腫瘍マーカーである。

かかりつけ医/一般臨床医の立場に立った、悪性リンパ腫の診断・治療の実際について述べた。学問の進歩とともに悪性リンパ腫の臨床病理診断法ならびに治療法は進展の一途をたどっているが、よりよい予後獲得のためには早期発見に勝るものはない。本章に述べた一般外来における診察技術を、第一線の医療活動に資していただければ幸いである。

[参考文献]

JCOG-LSGリンパ腫・骨髄腫臨床研究マニュアル 第1版. 長寿科学振興財団, 2003.

6. 進行期びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫の 治療法は？

1 序論

1993 年、米国 Southwest Oncology Group (SWOG) と Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) によって実施された大規模な無作為化比較試験の結果が報告されて以来、進行期中～高悪性度非ホジキンリンパ腫 (aggressive non-Hodgkin's lymphoma: aggressive NHL) に対する標準的な化学療法は、CHOP 療法とされてきた¹⁾。しかし標準的治療といえども、aggressive NHL の予後因子である International Prognostic Index (IPI) において high risk とされる群では、5 年生存率は 30% 未満と必ずしも満足のものではなかった²⁾。しかし 90 年代後半になり、CD20 抗原を標的としたマウス/ヒトキメラ抗体であるリツキシマブが開発・実用化されてから、CD20 陽性の aggressive NHL の治療戦略は大きく変化した。単剤でも高い効果が認められていたリツキシマブは、従来の化学療法との併用によりさらなる効果が期待され、さまざまな検討が行われた。中でも、フランスの GELA グループで行われた高齢者の未治療進行期びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫 (diffuse large B-cell lymphoma: DLBCL) の患者を対象とした比較試験により、CHOP 療法にリツキシマブを併用した化学療法が有意差をもって CHOP 療法の生存割合を上回っていた³⁾ と報告されて以来、CD20 陽性の B 細胞リンパ腫に対してリツキシマブは不可欠な薬剤と考えられるようになった。本稿では、現在まで報告されているエビデンスを基に、現時点における進行期 DLBCL に対する標準治療が何であるかを検証する。

2 指針

CHOP 療法が標準的な化学療法であるとされているのは進行期 aggressive NHL であり、限局期の例や、低悪性度リンパ腫、バーキットリンパ腫およびリンパ芽球性リンパ腫などの組織型ではその限りではない。また、CD20 抗原の発現の有無はリツキシマブの適応となるか否かを決定する要素であり、必須である。リツキシマブを併用することでの上乗せ効果があったとしても、その基になる化学療法のさらなる改良はこれからも検討していかなければならない課題である。第 2～3 世代の化学療法が CHOP 療法を上回れなかった理由として、NHL に対する key drug の dose intensity が CHOP 療法よりも低かったことが原因の 1 つに考えられており、CHOP 療法でも十分な効果が得られていない IPI の high-intermediate および high risk 群に対しては、治療強度を高めた治療の適応についても検討する必要がある。よって、悪性リンパ腫が疑われる場合は、正確な診断のための病理組織診、全身の画像診断が必要である。そして、組織型、CD20 の発現の有無、IPI による予後因子によって層別化した治療戦略をとることが重要である。

3 エビデンス

1) Pfreundschuh M, et al (Blood. 2004; 104: 634-41)⁴⁾

目的: 高齢者の aggressive lymphoma に対して, CHOP 療法の治療間隔を短縮する, または etoposide を加えることが予後の改善につながるかどうかを検討する.

方法: 年齢 61 ~ 75 歳の未治療の aggressive NHL 患者 831 人が, 3 週毎の CHOP 療法 (CHOP-21) 群, CHOP-21 に etoposide を加えた (CHOEP-21) 群, CHOP 療法の治療間隔を 14 日間に短縮した (CHOP-14) 群または CHOEP-21 の治療間隔を 14 日間に短縮した (CHOEP-14) 群に無作為に割り付けられた. 各治療群は, LDH, 病期 III/IV 期, 巨大病変の有無により層別化され, 1:1:1:1 になるようにバランスが取られた. プライマリー・エンドポイントを event free survival (EFS) として比較された.

結果: 適格であった 689 人のうち, 178 人が CHOP-21 療法, 170 人が CHOEP-21 療法, 172 人が CHOP-14 療法, 169 人が CHOEP-14 療法それぞれ 6 コースで治療を受けた. CHOP-21 群を基準とした多変量解析で, CHOP-14 群のみが EFS および OS において CHOP-21 群を上回っていた (relative risk: 0.66p = 0.003, 0.58p < 0.001). etoposide の有無により血液毒性の頻度に差が認められたが, 2 週毎のレジメンと 3 週毎のレジメンで非血液毒性に差は認められなかった.

結論: 高齢者の aggressive NHL に対して, CHOP-14 は CHOP-21 より有益であった. etoposide を加えることは毒性の増強につながり, 有益ではなかった.

2) Pfreundschuh M, et al (Lancet Oncol. 2006; 7: 379-91)⁵⁾

目的: 予後良好な若年の DLBCL 患者を対象にリツキシマブを併用した CHOP 類似レジメンと, CHOP 類似レジメンを比較した.

方法: 18 カ国から登録された, 年齢 18 ~ 60 歳, age adjusted IPI で risk factor が 0 または 1, 病期: 巨大病変を有する I 期または II ~ IV 期の未治療の DLBCL の患者 824 人がリツキシマブ併用 CHOP 類似レジメン群または CHOP 類似レジメン群に割り付けられ, EFS をプライマリー・エンドポイントとして比較された.

結果: 413 人がリツキシマブ併用化学療法で 6 コース (CHOP: 199 人, CHOP + etoposide = CHOEP: 181 人), 410 人が化学療法単独で 6 コース (CHOP: 197 人, CHOEP: 180 人) の治療を受けた. 治療前に巨大病変を有していたまたは節外病変を有した例で, リツキシマブ併用化学療法群の 169 人および化学療法単独群の 159 人が治療後に放射線照射 30 ~ 40Gy を受けた. 観察期間の中央値 34 カ月で, 3 年の EFS はリツキシマブ併用群で 79%, 化学療法単独群で 59%と有意差が認められた (p < 0.0001). 3 年の progression free survival (PFS) は 85% vs 68% (p < 0.0001), 3 年 overall survival (OS) は 93% vs 84% (p = 0.0001), 寛解例における relapse free survival (RFS) は 94% vs 86% (p = 0.02) といずれもリツキシマブ併用群が上回っていた. 有害事象に

関しては、両群の間で差は認められなかった。多変量解析により、巨大病変の有無と IPI の risk factor の有無が予後因子にあげられた。

結論: 若年の予後良好な DLBCL 患者において、化学療法にリツキシマブ併用するレジメンは有効な治療であった。

3] Habermann TM, et al (J Clin Oncol. 2006; 24: 3121-7)⁶⁾

目的: 高齢者の DLBCL 患者において早期および晩期の治療効果を検討するために、寛解導入療法としての CHOP 療法におけるリツキシマブ併用の有無、リツキシマブによる維持療法の有無を比較した。

方法: 未治療、60 歳以上、病期: I ~ IV 期の DLBCL 患者 632 人が、6 ~ 8 コースの CHOP 療法単独群またはリツキシマブ併用の CHOP 療法 (R-CHOP 療法) 群へ無作為に割り付けられた。化学療法終了後に部分寛解以上の効果が得られた例では、無治療経過観察群またはリツキシマブによる維持療法を行う群へと 2 回目の割り付けが行われた。

結果: 267 人が R-CHOP 療法で、279 人が CHOP 療法により治療を受けた (86 人が事後不適格であった)。部分寛解以上の効果が得られた例のうち 174 人がリツキシマブによる維持療法を受け、178 人が無治療経過観察となった。観察期間中央値 3.5 年で、3 年の failure free survival (FFS) は R-CHOP 療法群で 53%、CHOP 療法群で 46% であった ($p = 0.04$)。OS はハザード比 0.83, $p = 0.18$ と、有意な差は認められなかった。維持療法の有無に関しては、維持療法を行うことで FFS は有意に延長したが (ハザード比 0.63, $p = 0.009$)、生存の延長には寄与しなかった (ハザード比 0.96, $p = 0.85$)。維持療法は、CHOP 療法後の FFS を延長した (ハザード比 0.45, $p = 0.004$) が、R-CHOP 療法後では FFS の改善は認められなかった (ハザード比 0.93, $p = 0.81$)。CHOP 療法後、R-CHOP 療法後にかかわらず、維持療法により OS の改善は認められなかった (それぞれ $p = 0.27, 0.48$)。

結論: 高齢者の DLBCL において、CHOP 療法に寛解導入療法または維持療法としてリツキシマブを加えることにより、FFS は改善した。R-CHOP 療法後では、維持療法による利益は証明されなかった。

4] Martelli M, et al (J Clin Oncol. 2003; 21: 1255-62)⁷⁾

目的: IPI の高危険群の aggressive NHL に対して、初回治療としての自家造血幹細胞移植併用の大量化学療法の有用性を検討する。

方法: 未治療、15 ~ 60 歳、病期: 巨大病変を有する I 期または II ~ IV 期、age-adjusted IPI で high intermediate または high risk の aggressive NHL 患者 150 人が、化学療法 (MACOP-B 療法) 群または化学療法 (治療期間を短縮した MACOP-B 療法) 後に自家造血幹細胞移植併用の大量化学療法 (carmustine, etoposide, cytarabine, cyclophosphamide) を行う群に無作為に割り付けられて

治療が行われた。大量化学療法群では、寛解導入療法により minor response 以上の効果が得られた場合に大量化学療法が施行される計画であった。

結果: 各々 75 人が化学療法単独または大量化学療法で治療された。寛解導入療法により、化学療法群の 89%、大量化学療法群の 94% で部分寛解以上の効果が得られた。大量化学療法群の 60% (45 人) で実際に大量化学療法が行われた。完全寛解率は化学療法群で 68%、大量化学療法群で 76% と、差は認められなかった ($p > 0.10$)。観察期間中央値 24 カ月で、5 年の OS は化学療法群で 65%、大量化学療法群で 64% と、差は認められなかった ($p = 0.95$)。5 年の RFS および PFS でも、それぞれ 65% vs 77% ($p = 0.22$)、49% vs 61% ($p = 0.21$) と差は認められなかった。

結論: IPI で高危険群の aggressive NHL 患者に対する自家造血幹細胞移植併用の大量化学療法は、通常量の化学療法に対する優位性が示されなかった。

5] Milpied N, et al (N Engl J Med. 2004; 350: 1287-95)⁸⁾

目的: 進行期 aggressive NHL に対する治療として、CHOP 療法と自家造血幹細胞移植併用の大量化学療法を比較する。

方法: 未治療、15 ~ 60 歳、病期: 腹部に巨大病変を有する II 期または III ~ IV 期、age-adjusted IPI で low, low intermediate, high intermediate risk の aggressive NHL 患者 207 人が、CHOP 療法 8 コース群または短期間の化学療法の後に自家造血幹細胞移植併用の大量化学療法で治療を行う群へと無作為に割り付けられた。大量化学療法は、寛解導入療法で部分寛解以上の効果が得られた場合に大量化学療法が施行される計画であった。

結果: 99 人が CHOP 療法 8 コースで、98 人が短期間の化学療法 (cyclophosphamide, epirubicin, vindesine, prednisone: CEEP 2 コース) の後に自家造血幹細胞移植併用の大量化学療法 (methotrexate, cytarabine の併用療法の後に carmustine, etoposide, cytarabine, melphalan を投与) で治療を受けた (10 人が事後不適格であった)。CHOP 療法群の 78% および大量化学療法群の 85% が治療を完遂できた。治療を完遂できなかった理由の大部分は、効果が得られなかったまたは増悪によるものであった (CHOP 療法群: 27%, 大量化学療法群: 13%)。各治療の完全寛解率は、CHOP 療法群が 57%、大量化学療法群で 76% であった ($p = 0.37$)。5 年の EFS は、CHOP 療法群が $37 \pm 5\%$ 、大量化学療法群が $55 \pm 5\%$ と有意な差が認められた。5 年の OS は、CHOP 療法群が $56 \pm 5\%$ 、大量化学療法群が $71 \pm 5\%$ と大量化学療法群が良好な傾向があったが、有意な差は認められなかった ($p = 0.076$)。age-adjusted IPI で high-intermediate risk 群に関しては、EFS が $28.6 \pm 6\%$ vs $56 \pm 7\%$ 、OS が $44 \pm 7\%$ vs $74 \pm 6\%$ と、有意な差をもって大量化学療法群が勝っていた (それぞれ $n = 49, 56$, $p = 0.003, 0.001$)。low および low intermediate risk 群では、EFS と OS の療法で両群に差は認められなかった。

結論：進行期の aggressive NHL に対して，自家造血幹細胞移植併用の大量化学療法は CHOP 療法よりも有効であった。

4 根拠となった臨床研究の問題点と限界

CHOP 療法における key drug の dose intensity を高める方法の一つとして，治療間隔を 3 週から 2 週に短縮した dose-dense therapy があるのだが，それが有用である可能性がエビデンス 1] で指摘された。しかし 1] は，2 週と 3 週のレジメンの比較および etoposide の有無を比較するという，2 × 2 の factorial design として計画された試験であり，直接 4 群を比較するというデザインではなかった。当初のデザインによる解析では，2 週と 3 週のレジメンの間に有意な差は認められなかったことにも注意が必要である。また，同様のデザインで 60 歳未満の若年者を対象とした試験では CHOEP-21 が有用であったとされており⁹⁾，一貫した傾向が認められていない。これらのことから，dose-dense therapy や etoposide を加えて治療強度を高めたレジメンが CHOP 療法よりも有用である可能性はあるものの，CHOP 療法に取って代わるほどのインパクトはないと考えられる。

エビデンス 2]，3] は化学療法にリツキシマブを加えることの有用性を検討した比較試験である。3] では OS に関してはリツキシマブ併用療法の優位性は示されなかったのだが，その理由としては，①試験デザインが，寛解導入療法におけるリツキシマブの有無および寛解後の維持療法としてのリツキシマブの有無を比較するという 2 × 2 の fractional design であり，寛解導入療法におけるリツキシマブの意義が薄まってしまったこと，② GELA グループで用いられたリツキシマブ併用療法と異なりリツキシマブの使用回数が 4 ～ 5 回と少なかったため，CHOP 療法と併用されたリツキシマブの濃度が低かった可能性があることが考えられる。しかし，GELA グループによる比較試験とエビデンス 3] の結果を併せて考えると，化学療法にリツキシマブを加えることの意義は疑いようがないであろう。

化学療法の適切なコース数に関してであるが，GELA グループで行われたリツキシマブ併用療法は 8 コースであったのに対して，エビデンス 2] における治療は 6 コースとなっている。その後同グループを中心に行われた比較試験では，リツキシマブ併用化学療法において 3 週間隔と 2 週間隔および総コース数 6 コースと 8 コースの比較が行われたが，中間解析ではいずれの比較でも差はないとされている。2] 中のサブグループ解析でも，リツキシマブを併用すると CHOP-21 と CHOEP-21 の差がなくなったとされており¹⁰⁾，それらをもって筆者は，リツキシマブをコース数や etoposide の有無の違いを埋める「equalizer」と評している。しかし 2] では，プロトコール規定通りに治療が行われたのなら約半数で化学療法後に放射線照射が行われているはずであり，「6 コースの治療で十分」とすることは早計であろう。

維持療法におけるリツキシマブに関しては，エビデンス 3] では有用性が見出されなかった。近年，indolent NHL においては維持療法の有用性を指摘する報告がいくつかされているが，この違いは何によるのだろうか？これは，従来の化学療法では微少残存病変を根絶することが不可能と考えられていた indolent NHL と，寛解導入療法がうまくいけば従来の化学療法でも治癒が期待できる aggressive NHL との疾患の性質による差ではないかと考えるが，先述の通り，試験デザインにより有用性が示されなかった可能性もある。しかし現在，維持療法の有用

性を示唆するエビデンスは存在しないため、aggressive NHL に対して維持療法を行う妥当性はない。

エビデンス 4]、5]は、第1寛解期における治療化学療法の有用性について検討した比較試験である。4]では大量化学療法の有用性が示されなかったのだが、その原因として、コースを短縮した治療が寛解導入療法としては十分ではなく、早期の増悪により大量化学療法に進めなかったことがあげられている。用いられている化学療法も、両群とも MACOP-B 療法と現在の標準とされている化学療法ではないため、この結果のみで第1寛解期における大量化学療法の意義を否定することはできないであろう。一方、5]は標準的な化学療法である CHOP 療法と比較して大量化学療法の優位性が示された試験である。しかし、「IPI の high risk 群を CHOP 療法の適応とすることは倫理的ではない」として対象から除外している一方で、IPI の low risk という、通常では第1寛解期における大量化学療法の適応とはならないような例も対象とされており、結果をそのまま鵜呑みにすることはできないだろう（サブグループ解析では、IPI の low ~ low intermediate risk 群において、生存に関する差は認められなかった）。

5 本邦の患者に適応する際の問題点

わが国では、Japan Clinical Oncology Group により CHOP 療法と bi-weekly CHOP 療法 (= CHOP-14) の比較試験が行われたが、そこでは bi-weekly CHOP の CHOP 療法に対する優位性は認められなかった。エビデンス 1]との結果の違いの理由は不明であるが、寛解導入療法として CHOP-14 を選択する場合は、十分なインフォームドコンセントと臨床試験の管理下で行うなどの科学的な妥当性が必要であろう。

6 コメント

現存するエビデンスから考えられる進行期びまん性大細胞型 B 細胞性リンパ腫の標準的な治療法は、十分な回数のリツキシマブを併用した CHOP 療法すなわち GELA グループが採用した R-CHOP 療法と考えられる。コース数に関しては、患者の全身状態、病勢や毒性に応じて 6 ~ 8 コース行うべきであろう。IPI で高危険群に対しては、自家造血幹細胞移植併用の大量化学療法の位置づけは現時点でもまだ明確ではない。R-CHOP 療法により CHOP 療法よりも予後の改善は期待できるが、それでも 5 年の OS は 50 % 強と十分ではない¹¹⁾。やはり「適切に計画された臨床試験」で引き続き検討していかなければならない課題であろう。

■文献■

- 1) Fisher RI, Gaynor ER, Dahlborg S, et al. Comparison of a standard regimen (CHOP) with three intensive chemotherapy regimens for advanced non-Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med.* 1993; 328: 1002-6.
- 2) A predictive model for aggressive non-Hodgkin's lymphoma. The International non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project. *N Engl J Med.* 1993; 329: 987-94.
- 3) Coiffier B, Lepage E, Briere J, et al. CHOP chemotherapy plus rituximab compared with CHOP alone in elderly patients with diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med.* 2002; 346: 235-42.
- 4) Pfreundschuh M, Trumper L, Kloess M, et al. Two-weekly or 3-weekly CHOP

- chemotherapy with or without etoposide for the treatment of elderly patients with aggressive lymphomas: results of the NHL-B2 trial of the DSHNHL. *Blood*. 2004; 104: 634-41.
- 5) Pfreundschuh M, Trumper L, Osterborg A, et al. CHOP-like chemotherapy plus rituximab versus CHOP-like chemotherapy alone in young patients with good-prognosis diffuse large-B-cell lymphoma: a randomised controlled trial by the MabThera International Trial (MInT) Group. *Lancet Oncol*. 2006; 7: 379-91.
 - 6) Habermann TM, Weller EA, Morrison VA, et al. Rituximab-CHOP versus CHOP alone or with maintenance rituximab in older patients with diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol*. 2006; 24: 3121-7.
 - 7) Martelli M, Gherlinzoni F, De Renzo A, et al. Early autologous stem-cell transplantation versus conventional chemotherapy as front-line therapy in high-risk, aggressive non-Hodgkin's lymphoma: an Italian multicenter randomized trial. *J Clin Oncol*. 2003; 21: 1255-62.
 - 8) Milpied N, Deconinck E, Gaillard F, et al. Initial treatment of aggressive lymphoma with high-dose chemotherapy and autologous stem-cell support. *N Engl J Med*. 2004; 350: 1287-95.
 - 9) Pfreundschuh M, Trumper L, Kloess M, et al. Two-weekly or 3-weekly CHOP chemotherapy with or without etoposide for the treatment of young patients with good-prognosis (normal LDH) aggressive lymphomas: results of the NHL-B1 trial of the DSHNHL. *Blood*. 2004; 104: 626-33.
 - 10) Pfreundschuh M, Kloess M, Schmits R, et al. Six, not eight cycles of bi-weekly CHOP with rituximab (R-CHOP-14) is the preferred treatment for elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL): results of the RICOVER-60 trial of the German High-Grade Non-Hodgkin Lymphoma Study Group (DSHNHL). *Blood*. 2005; 106: 9 (abstr).
 - 11) Sehn LH, Berry B, Chhanabhai M, et al. Revised International Prognostic Index (R-IPI) is a better predictor of outcome than the Standard IPI for patients with DLBCL treated with R-CHOP. *Blood*. 2007; 109: 1857-61.

〈大間知 謙〉

悪性リンパ腫に対する標準的治療の動向

堀田 知光

IRYO Vol. 61 No. 1 (5-10) 2007

要旨

悪性リンパ腫は化学療法や放射線治療がよく奏効する高感受性悪性腫瘍に位置づけられ、がん化学療法の中で治療体系がもっとも整備され、主な病型について組織学的悪性度やリスクグループに則した標準的治療が確立している。こうした治療法の向上は生存率をエンドポイント（主要評価項目）としたランダム化比較試験 randomized controlled trial (RCT) を含む科学的に適正な臨床試験の積み重ねによってもたらされたものである。今日の標準的治療は、ホジキンリンパ腫の限局期に対しては短期化学療法に続く病巣部放射線治療であり、進展期には ABVD（ドキシソルピシン，プレオマイシン，ビンブラスチン，デキサメタゾン）療法である。ろ胞性リンパ腫を中心とする低悪性度 B 細胞リンパ腫には最近まで生存の延長をもたらす治療法はなかったが、CD20 抗原に対するモノクローナル抗体であるリツキシマブは化学療法との併用によって疾患の自然史を変えつつある。わが国の悪性リンパ腫の約 40% を占めるび慢性大細胞型 B 細胞リンパ腫の限局期症例はリスク因子を持たない場合は CHOP（シクロホスファミド，ドキシソルピシン，ビンクリスチン，プレドニゾロン）療法による短期化学療法に続く病巣部放射線治療である。進行期症例には最近、リツキシマブと CHOP との併用療法（R-CHOP）が標準的治療として確立した。中高悪性度リンパ腫の再発における救援化学療法有効例には自家造血幹細胞移植 autologous hematopoietic stem cell transplantation (AH SCT) 併用の大量化学療法が標準的治療と位置づけられている。近年の細胞遺伝学や分子病態研究の進歩により新規の抗体療法や分子標的治療薬の開発が急速に進みつつある。より有効で安全な新規治療が適切な臨床試験によって新たな標準的治療として確立することが望まれる。

キーワード 標準的治療，悪性リンパ腫，ランダム化比較試験，多施設共同研究

はじめに

悪性リンパ腫は、かつては予後不良の悪性腫瘍であったが、過去 40 年間の治療法の進歩、すなわち化学療法や放射線治療、免疫療法、造血幹細胞移植などの集学的治療により、過半数に治癒が期待できる

ようになった。そして現在では、悪性リンパ腫は薬物療法や放射線治療で治癒可能な疾患として高感受性悪性腫瘍と呼ばれ、主要な病型については標準的治療法が確立している。こうした治療成績の向上と標準的治療の確立は、生存率をエンドポイント（主要評価項目）とした RCT を含む科学的に適正な臨

国立病院機構名古屋医療センター

別刷請求先：堀田知光 国立病院機構名古屋医療センター 院長 〒460-0001 名古屋市中区三の丸 4-1-1
(平成 18 年 9 月 20 日受付，平成 18 年 11 月 17 日受理)

Current Advance in Standard Care for Malignant Lymphoma
Tomomitsu Hotta

Key Words : standard therapy, lymphoma, randomized controlled trial, co-operative study

床試験の積み重ねによってもたらされたものである。本稿では悪性リンパ腫のわが国における代表的な病型について標準的治療の動向を紹介する。

ホジキンリンパ腫 Hodgkin lymphoma (HL)

HLの多くはリンパ節に発生し、病変はリンパの流れに沿って近接するリンパ節に及ぶため、病変の広がりや程度、すなわち病期が治療選択の基本となる。近年、独立した予後因子として血清アルブミン、ヘモグロビン値、性別、病期、年齢、白血球数およびリンパ球数が特定され、これら7項目を組み合わせた国際予後スコア international prognostic score (IPS) に基づくリスク群に対応した治療法の開発が進められつつある。

1) 限局期 HL

限局期 HL (病期 IA, IIA) 症例に対する放射線治療の長期成績は20年生存割合が68%、20年無再発生存割合が75%と良好である。しかし近年、短期の化学療法と病巣に限局した放射線治療の併用 combined modality treatment (CMT) が放射線治療単独と同等以上の生存割合と晩発毒性の軽減をもたらすことから、早期 HL に対する標準的治療法は CMT に移行してきている¹⁾²⁾。

2) 進展期 HL

進展期 HL に対してかつて MOPP (ナイトロジェンマスタード、ビンクリスチン、プロカルバジン、プレドニゾン；わが国ではナイトロジェンマスタードが未承認のため代替薬としてシクロホスファミドを用いる) 療法が一般的に行われてきたが、1993年に ABVD 療法が、MOPP 療法より生存割合、毒

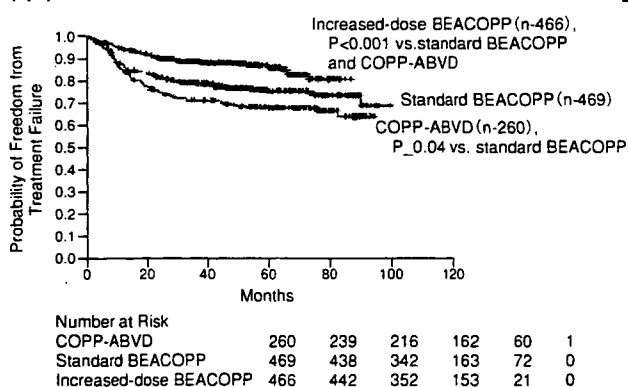
性で優れていることが RCT で示され³⁾、今日の標準的治療とされている。近年、ドイツの研究グループは薬剤総投与量の増加と投与期間の短縮を目的とした G-CSF (顆粒球コロニー刺激因子) 併用の増量 BEACOPP (ブレオマイシン、エトポシド、ドキソルビシン、シクロホスファミド、ビンクリスチン、プロカルバジン、プレドニゾン) 療法と標準量 BEACOPP 療法、COPP (シクロホスファミド、ビンクリスチン、プロカルバジン、プレドニゾン) -ABVD 交替療法の3群間 RCT を実施し、増量 BEACOPP 療法の生存割合が ABVD 療法を有意に上回ることを報告した (図1)⁴⁾。予後不良群に対する有効な治療法と期待されるが、遅発毒性などの懸念があり、まだ標準的治療としてのコンセンサスは形成されていない。

ろ胞性リンパ腫 follicular lymphoma (FL)

ろ胞性リンパ腫は組織学的に悪性度を grade 1 から3までに区分し、grade 1, 2 は低悪性度、grade 3 は中悪性度リンパ腫として取り扱われる。Grade 1-2 症例の生存期間の中央値は7-10年と長く、リンパ腫に特有の症状が出現するまで無治療で観察 (watch & wait) しても生存に不利はないとされてきた。一方、病勢進行に際して化学療法を行っても、いったん奏効するが再発を繰り返し、長期的な予後は良好とはいえない。

近年、B細胞リンパ腫に対して開発された抗 CD 20モノクローナル抗体 (リツキシマブ) は単独でも高い奏効が得られ、CHOP 療法との併用によってさらに優れた奏効割合が示された⁵⁾。最近、ドイツ

A) FFT



B) OS

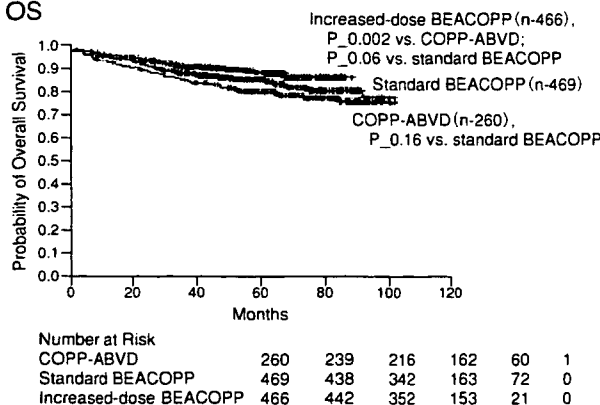


図1

進行期ホジキンリンパ腫に対する COPP-ABVD 交替療法、標準量 BEACOPP 療法および増量 BEACOPP 療法の3群間でのランダム化比較試験における A) 治療成功期間 freedom from treatment failure (FFT) および B) 全生存期間 overall survival (OS) の分布 (文献4より引用)

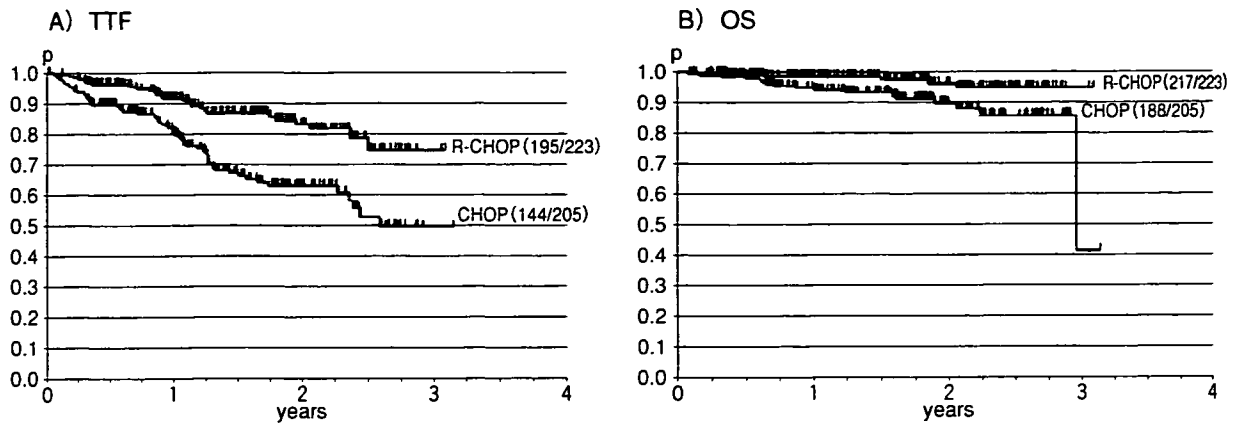


図 2

進行期ろ胞性リンパ腫に対する CHOP 療法と R-CHOP 療法のランダム化比較試験における
 A) 治療成功期間 time to treatment failure (TTF) と B) 全生存期間 overall survival (OS)
 の分布 (文献 5 より引用)

の研究グループは CHOP 療法単独と R-CHOP 療法の大規模な RCT を施行した⁶⁾。その結果、R-CHOP 療法群が治療成功期間 time to treatment failure (TTF) ($P < 0.001$), 全生存割合 overall survival (OS) ($p = 0.016$) のいずれにおいても上回り、毒性の増加は認められなかった (図 2)。また、欧州の多施設共同研究グループはリツキシマブの維持療法についての RCT の成績を報告した⁷⁾。再発・治療抵抗性 FL 患者を対象に CHOP または R-CHOP 療法群に割り付け、完全奏効 complete response (CR) もしくは部分奏効 partial response (PR) が得られた場合はさらにリツキシマブによる維持療法群と無治療観察群に割り付けられた。最初のランダム化からの無増悪生存 progression-free survival (PFS) は CHOP 群 20 カ月に対して R-CHOP 群は 33 カ月 ($p = 0.0003$)、2 回目のランダム化からの PFS は無治療観察群の 15 カ月に対して維持療法群は 52 カ月に延長していた ($p < 0.0001$)。こうした成績により、生存期間の有意の延長をもたらす治療法のなかった FL に対してリツキシマブを含む免疫化学療法が標準的治療と認識されつつある。

近年、抗 CD20 抗体に放射性同位元素を標識した放射線免疫療法薬 (イブリツモマブ、トシツモマブ) が低悪性度 B 細胞リンパ腫に対して優れた腫瘍縮小効果を示すことが報告されている。Witzig らが行ったイブリツモマブとリツキシマブのランダム割り付け試験での奏効割合 (CR+PR) はイブリツモマブ群が 80%、リツキシマブ群が 56% と良好であった⁸⁾。Kaminski らもトシツモマブを用いて同様に優れた腫瘍縮小効果を報告している⁹⁾。放射線免疫療法は

再発・治療抵抗性の低悪性度 B 細胞リンパ腫の中心的な治療薬となるものと考えられる。

び慢性大細胞型 B 細胞リンパ腫 diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL)

DLBCL は中高悪性度非ホジキンリンパ腫の中心的病型で、わが国の悪性リンパ腫の約 40% を占める。年齢、血清 LDH 値、performance status (PS)、臨床病期および節外病変数の 5 項目を指標とした国際予後指標 international prognostic index (IPI) 提唱され、リスクに応じた治療法の選択が行われる。

1) 限局期 DLBCL

限局期 (I 期, および巨大病変のない II 期) の中高悪性度リンパ腫に対しては CHOP 療法 3 コース後に病巣部放射線治療が CHOP 療法 8 コースとの RCT で優れ、標準的治療と認識されてきた¹⁰⁾。しかし、最近報告されたこの研究の長期追跡結果によると PFS は 7 年、OS は 9 年で逆転していた¹¹⁾。この結果からリスク因子のない限局期症例には CHOP 療法 3 コースと病巣部放射線治療が引き続き標準的治療であるが、リスク因子をもつ場合は新たな治療アプローチが必要と考えられ、現在リツキシマブの併用に関する臨床試験が進行中である。

2) 進行期 DLBCL

1970 年代に開発された CHOP 療法は中高悪性度リンパ腫に対してはじめて治癒をもたらした治療法として第一世代化学療法と呼ばれる。その後、非交差耐性の薬剤の併用や治療強度を高めた第二、第三世代と呼ばれる化学療法が相次いで開発された。し

しかし、CHOP療法と代表的な第二・第三世代化学療法との4群間のRCTの成績が1993年に公表され、CHOP療法は3年OSが約40%と同等であり、毒性がより低いことが判明した¹²⁾。これによってCHOP療法は進行期中高悪性度リンパ腫に対する最良 (best available) 治療と再認識され、最近まで標準的治療の座を保ってきた。そして、近年のリツキシマブの導入はDLBCLの標準的治療を30年ぶりに更新するものとなった。その根拠となったのは2002年にフランスのGELA (Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte) が報告した61-80歳の高齢者進行期DLBCLを対象とするR-CHOP療法とCHOP療法とのRCTである。2年無イベント生存割合 event-free survival (EFS) はそれぞれ57%と38%、1年OSは70%と57% (P=0.007) とR-CHOP群が勝っていた (図3)¹³⁾。最近報告されたECOG (Eastern Cooperative Oncology Group) が行ったRCTにおいても同様の成績が確認された¹⁴⁾。本試験では奏効例に対してリツキシマブ維持療法の有無のRCTが行われ、先行治療がCHOPの場合にのみ維持療法の効果が得られた。一方、60歳未満の低リスク若年者DLBCLに対して行われたドイツのRCTにおいてもリツキシマブ併用化学療法の優位性が示された¹⁵⁾。こうして、今日ではR-CHOP療法は全年齢層の進行期DLBCLに対する標準的治療と認識されている。

DLBCLの高リスク群に対するCHOP療法もしく

はR-CHOP療法の治療成績は長期的には不良であるため、AH SCTを併用する大量化学療法の試みが精力的に展開されている。しかし、これまでの成績を総合すると十分な化学療法を完了した上での大量療法は期待できるが、短期の寛解導入後の有用性は否定的である。再発の中高悪性度リンパ腫に対して救済化学療法が奏効した症例を対象としたAH SCT併用大量化学療法群と救済化学療法継続群のRCTでの5年OSはそれぞれ53%と32%でAH SCT群が優れていることが報告された¹⁶⁾。これによりAH SCTを併用する大量化学療法は再発後の救済療法でPR以上の奏効が確認される感受性例に対する標準的治療と位置づけられている。なお、救済療法、大量化学療法ともに確立したレジメンはない。

おわりに

悪性リンパ腫は治療体系がもっとも整備され、疾患単位のおもなものについて組織学的悪性度やリスクグループに則した標準的治療が確立している腫瘍である。標準的治療が確立してきた背景には欧米を中心とした多施設共同研究グループによるRCTを含む科学的に適切な臨床試験によって検証が行われてきた歴史がある。多くのエビデンスを提供してきた欧米の臨床試験研究グループは1950年代から1960年代に設立されており、いずれもデータ管理や品質保証としての独立した統計センターを備え、プロト

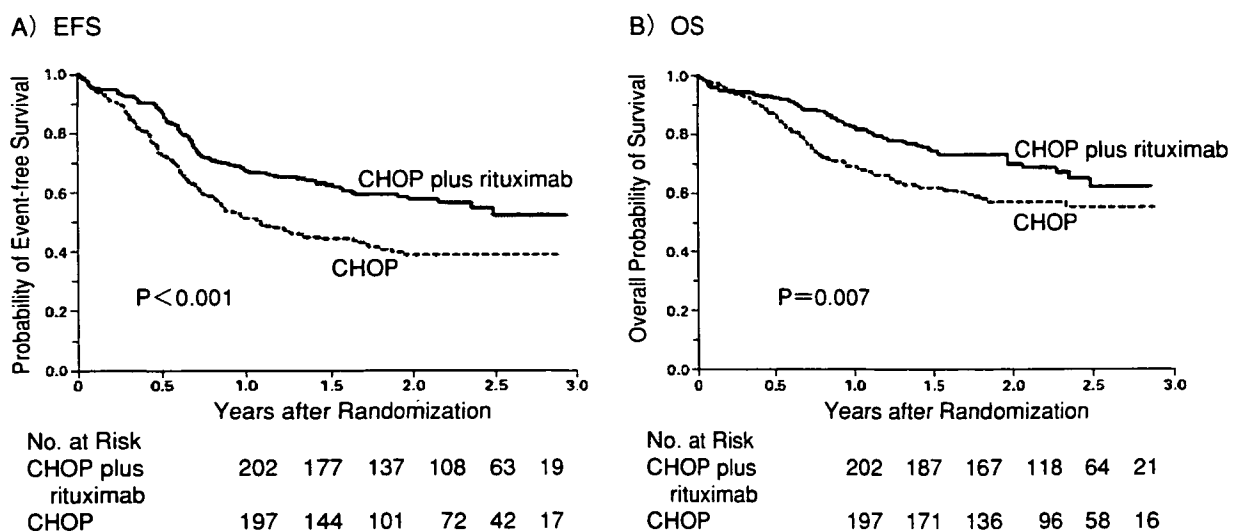


図3

高齢者び慢性大細胞型B細胞リンパ腫に対するCHOP療法とR-CHOP療法のランダム化比較試験におけるA) 無イベント生存期間 event-free survival (EFS) とB) 全生存期間 overall survival (OS) の分布 (文献13より引用)

コール審査, 独立モニタリング, 監査など臨床試験の質を確保するための研究体制が整備されている。わが国では歴史的に臨床試験の位置付けが低く, 本格的な臨床試験研究グループの育成は大幅に遅れ, ようやく1990年に Japan Clinical Oncology Group (JCOG) がデータセンターを備えた最初の本格的な臨床試験研究グループとして創立した。欧米とは30年以上の開きがある。また欧米では新薬の開発のための治験と研究者主導の臨床試験には区別はなく Good Clinical Practice (GCP) の規制のもとにあり, 治療法開発および標準的治療法確立のための臨床試験と日常診療とは厳密に区別されている。一方, わが国では GCP 対応は治験に対してのみ求められ, 医師が行う臨床試験は規制外である。そのため臨床試験と日常診療との区別さえも曖昧な「治療研究」が蔓延しているのが現状である。近年, 治験の空洞化や evidence based medicine (EBM) の必要性から臨床試験への認識が高まりつつあり, わが国も2001年度から厚生科学研究費補助金 (21世紀型医療開拓推進研究事業) として臨床試験研究に対して大型の研究費の投入を開始した。また GCP に準拠した研究者主導の臨床試験によって得られた結果によって新薬の承認や適応拡大を可能にする方針を検討している。こうした動きの中でわが国から EBM に貢献する臨床のエビデンスの発信が求められている。

【文献】

- 1) Engert A, Schiller P, Josting A et al: Involved-field radiotherapy is equally effective and less toxic compared with extended-field radiotherapy after four cycles of chemotherapy in patients with early-stage unfavorable Hodgkin's lymphoma: results of the HD8 trial of the German Hodgkin's Lymphoma Study Group. *J Clin Oncol* 21: 3601-3608, 2003
- 2) Straus DJ, Portilock CS, Qin J et al: Results of a prospective randomized clinical trial of doxorubicin, bleomycin, vinblastine and dacarbazine (ABVD) followed by radiation therapy (RT) versus ABVD alone for stage I, II, and IIIA nonbulky Hodgkin's disease. *Blood* 104: 3483-3489, 2004
- 3) Canellos GP, Anderson JR, Propert KJ et al: Chemotherapy of advanced Hodgkin's disease with MOPP, ABVD, or MOPP alternating with ABVD. *N Engl J Med* 327: 1478-1484, 1992
- 4) Diehl V, Franklin J, Pfreundschuh M et al: Standard and increased-dose BEACOPP chemotherapy compared with COPP-ABVD for advanced Hodgkin's disease. *N Engl J Med* 348: 2386-2395, 2003
- 5) Czuczman MS, Grillo-Lopez AJ, White CA et al: Treatment of patients with low-grade B-cell lymphoma with the combination of chimeric anti-CD 20 monoclonal antibody and CHOP chemotherapy. *J Clin Oncol* 17: 268-276, 1999
- 6) Hiddemann W, Kneba M, Dreyling M et al: Frontline therapy with rituximab added to the combination of cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine and prednisone (CHOP) significantly improves the outcome for patients with advanced-stage follicular lymphoma compared with therapy with CHOP alone: results of a prospective randomized study of the German Low-grade Lymphoma Study Group. *Blood* 106: 3725-3732, 2005
- 7) Van Oers MHJ, Klasa R, Marcus RE et al: Rituximab maintenance improves clinical outcome of relapse/resistant follicular non-Hodgkin's lymphoma, both in patients with and without rituximab during induction: results of a prospective randomized phase III intergroup trial. *Blood* first edition paper, published online July 27, 2006
- 8) Witzig TE, Gordon LI, Cabanillas F et al: Randomized controlled trial of yttrium-90-labeled iburimumab tiuxetan radioimmunotherapy versus rituximab immunotherapy for patients with relapsed or refractory low-grade, follicular, or transformed B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol* 20: 2453-2463, 2002
- 9) Kaminski MS, Zelenetz AD, Press OW et al: Reporting outcome I, 131 tositumomab for chemotherapy-refractory low-grade or transformed low-grade B-cell non-Hodgkin's lymphomas. *J Clin Oncol* 19: 3918-3928, 2001
- 10) Miller TP, Dahlberg S, Cassady JR et al: Chemotherapy alone compared with chemotherapy plus radiotherapy for localized intermediate- and high-grade non-Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med* 339: 21-26, 1998
- 11) Miller TP, Leblanc M, Spier C et al: CHOP alone

- compared to CHOP plus radiotherapy for early stage aggressive non-Hodgkin's lymphomas: update of the Southwest Oncology Group (SWOG) randomized trial. *Blood* 97 : abst #3024, 2001
- 12) Fisher RI, Gaynor ER, Dahlberg S et al: Comparison of a standard regimen (CHOP) with three intensive chemotherapy regimens for advanced non-Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med* 328 : 1002-1006, 1993
 - 13) Coiffier B, Lepage E, Briere J et al: CHOP chemotherapy plus rituximab compared with CHOP alone in elderly patients with diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med* 346 : 235-242, 2002
 - 14) Habermann TM, Weller EA, Morrison VA et al: Rituximab-CHOP versus CHOP alone or with maintenance rituximab in older patients with diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol* 24 : 3121-3127, 2006
 - 15) Pfreundschuh MG, Trumper L, Ma D et al: Randomized intergroup trial of first treatment for patients <= 60 years with diffuse large B-cell non-Hodgkin's lymphoma (DLBCL) with a CHOP-like regimen with or without the anti-CD20 antibody rituximab-early stopping after the first interim analysis. *J Clin Oncol* 23 : 556 abst # 6500, 2004
 - 16) Philip T, Guglielmi C, Hagenbeek A et al: Autologous bone marrow transplantation as compared with salvage chemotherapy in relapses of chemotherapy-sensitive non-Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med* 333 : 1540-1545, 1995

Frequent DNA Methylation but not Mutation of the *ID4* Gene in Malignant Lymphoma

Kazumi Hagiwara, Hirokazu Nagai, Yinghua Li, Haruhiko Ohashi, Tomomitsu Hotta and Hidehiko Saito

ID4 is a member of the inhibitor of DNA binding (ID) family, and inhibits the binding of basic helix-loop-helix transcription factors to DNA. In some malignant tumors, *ID4* is inactivated by promoter hypermethylation, and is thought to be a candidate tumor suppressor gene (TSG). We have found that the promoter region of the *ID4* gene is frequently methylated in lymphoid cell lines (100%, 9/9), primary diffuse large B-cell lymphoma (95%, 19/20), and follicular lymphoma (100%, 10/10). Somatic mutation of the *ID4* gene was also examined, and no mutations were found. These findings suggest that the *ID4* gene might be inactivated by DNA hypermethylation, and may function as a TSG in malignant lymphoma. [*J Clin Exp Hematopathol* 47(1): 15-18, 2007]

Keywords: lymphoma, *ID4*, tumor suppressor gene, DNA methylation, combined bisulfite restriction analysis

INTRODUCTION

Lymphomas are malignancies that originate in the lymphoid tissues. Lymphomas are further classified into two major subtypes, Hodgkin lymphoma and non-Hodgkin's lymphoma. Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) and follicular lymphoma (FL) are two major subtypes of non-Hodgkin's lymphoma. FL is characterized by an indolent course with frequent relapses. Ultimately, FL can become resistant to chemotherapy or enter a more aggressive phase of the disease in the form of DLBCL, and patients succumb to their disease. Similar to other types of cancer, the pathogenesis of DLBCL and FL represent a multistep process that involves accumulation of multiple genetic and molecular lesions leading to the selection of a malignant clone^{1,2}. In lymphomas, a major step in such processes is the deregulation of oncogenes. Oncogenes sometimes lie close to chromosomal breakpoints and become deregulated or mutated. In malignant lymphomas, several genes, such as *Cyclin D1*³, *BCL2*⁴, and *BCL6*⁵, are often affected by specific chromosomal translocations. Important genetic events other than the

activation of oncogenes include the alteration of tumor suppressor genes (TSGs). To date, numerous TSG mutations have been reported in lymphoid malignancies, and the clinical importance of such mutations has also been shown by many groups^{6,7}.

Aberrant CpG methylation in the 5' promoter regions of genes is an epigenetic phenomenon that is the major mechanism for TSG silencing in many cancers^{8,9}. Recently, a global assessment of DNA methylation in a mouse model of T/natural killer acute lymphoblastic leukemia was reported¹⁰. According to this report, *ID4* gene expression was silenced by promoter methylation in human acute and chronic leukemia, and the gene was identified as a putative tumor suppressor¹⁰. *ID4* is a member of the family of inhibitor of DNA binding (ID) helix-loop-helix proteins; ID proteins function as dominant negative regulators of basic helix-loop-helix transcription factors¹¹. Promoter methylation and transcriptional silencing of the *ID4* gene has been reported in gastric cancers¹², colorectal cancers¹³, and breast cancers¹⁴. In addition, the frequency of *ID4* hypermethylation correlates with lymph node metastasis in breast cancer; therefore, *ID4* silencing might prove useful as a genetic marker to predict early metastasis¹⁴. However, there are few reports describing *ID4* status in malignant lymphoma and information about *ID4* function, expression, and regulation of tumor progression is very limited. The *ID4* gene is located on chromosome 6p23-p22.3¹⁵, where we have observed loss of heterozygosity in malignant lymphoma¹⁶. These findings have prompted us to investigate whether *ID4* is a TSG for malignant lymphoma.

Received : Aug 5, 2006

Revised : Nov 13, 2006

Accepted : Nov 30, 2006

Clinical Research Center for Blood Diseases, National Hospital Organization Nagoya Medical Center, Nagoya, Japan

Address Correspondence and reprint requests to Hirokazu Nagai, Clinical Research Center for Blood Diseases, National Hospital Organization Nagoya Medical Center, 4-1-1, Sannomaru, Naka-ku, Nagoya, Japan

E-mail : nagaih@nhh.hosp.go.jp

MATERIALS AND METHODS

Samples and DNA preparation

DNA was isolated from the biopsied lymph nodes of 20 patients with DLBCL, 10 patients with FL, 3 patients with transformed FL, peripheral blood mononuclear cells (PBMNCs) of 3 healthy volunteers, and 9 lymphoid cell lines (NAMALWA, RAJI, RAMOS, DAUDI, HS-SULTAN, IM-9, THP-6, BALL-1, and JURKAT) by proteinase K digestion followed by phenol-chloroform extraction. Informed consent was obtained from all patients.

Direct sequencing of the *ID4* gene

We amplified each of the 2 exons, including the exon/intron boundaries, of the *ID4* gene by polymerase chain reaction (PCR) using the following primers: exon1 forward, id4EX1F, 5'-CGACCCCTCCCGTCAATTGTT-3'; exon1 reverse, id4EX1R, 5'-TACCCTCCAACCACCGCAC-3'; exon2 forward, id4EX2F, 5'-TGATTTCGAGGACAATCC A-3'; exon2 reverse, id4EX2R, 5'-GGAGTTTGCTCTCAG AAACG-3' (Fig. 1). Conditions for PCR were as follows: initial denaturing for 5 min at 95°C followed by 35 or 40 cycles of denaturing for 30 sec at 95°C, annealing for 30 sec at 64°C (exon1) or 56°C (exon2), and extension for 45 sec (exon1) or 30 sec (exon2) at 72°C. Each PCR was "hot-started" and the products were separated on 2% agarose gels and visualized by ethidium bromide staining.

The PCR products were collected and purified with SUPREC-EZ (TaKaRa, Kyoto, Japan) and resuspended in 10 μ l of H₂O. Cycle sequencing reactions were performed with a BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (PE Applied Biosystems, Warrington, UK) using forward or reverse PCR primers, according to the manufacturer's protocol. The sequencing products were precipitated with NaOAc (pH5.2), EDTA, and cold ethanol, washed once, dried and

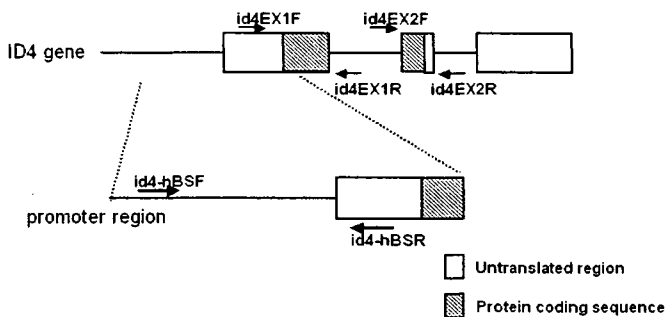


Fig. 1. Genomic structure of the *ID4* gene and locations of primers used in this study. The *ID4* gene has three exons. Open rectangles indicate non-coding regions and shaded rectangles indicate coding regions of *ID4*.

resuspended in 20 μ l of Hi-Di-Formamide (PE Applied Biosystems). The sequencing products were analyzed using an ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Combined bisulfite restriction analysis (COBRA)

We modified 1 μ g genomic DNA from cell lines and clinical samples with sodium bisulfite using a DNA modification kit (BisulFast Methylated DNA Detection Kit; TOYOBO, Osaka, Japan), according to the manufacturer's protocol. Modified DNAs were amplified with the following primers: forward, id4-hBSF, 5'-ATTGGTTGGTTATTTA GATTTT-3', and reverse, id4-hBSR, 5'-CTTCCCTCACT AATCCTATAA-3' (Fig. 1). Dr. Christoph Plass (The Ohio State University) kindly informed us regarding use of these sequences for COBRA⁹. The PCR amplification was done in a 20 μ l reaction volume with 2 μ l of template for 40 cycles of 95°C for 30 sec, 56°C for 30 sec and 72°C for 30 sec. We purified the PCR products with SUPREC-EZ (TaKaRa), and digested them for 4hr at 60°C with *Bst*UI (New England Biolabs, Beverly, MA, USA), a restriction enzyme that digests CpG sequences retained after the bisulfite treatment due to methylation. Digested products were subjected to electrophoresis in 10% polyacrylamide gels and were visualized by ethidium bromide staining.

RESULTS

Absence of mutations in the *ID4* gene in lymphoma samples

We first examined whether lymphomas contain mutations within the *ID4* coding region. Nine lymphoid cell lines and 33 clinical samples (20 DLBCLs, 10 FLs, and 3 transformed FLs) were analyzed. Two exons of the *ID4* gene were amplified by PCR and directly sequenced. We did not find any mutations within the coding region in the tested samples (data not shown).

Methylation of the *ID4* gene by COBRA

Because *ID4* expression is suppressed in various tumors by DNA methylation, we examined the frequency of *ID4* promoter methylation in our samples by combined bisulfite restriction analysis (COBRA) using PCR primers localized in the promoter regions of the *ID4* gene. The frequency of *ID4* promoter methylation was 100% in lymphoid cell lines (Fig. 2a), 95% in DLBCL samples (Fig. 2b), and 100% in FL and transformed FL samples (Fig. 2c). In addition, we analyzed 3 normal samples as a negative control and found only low amounts of methylation. We had biopsied one case of transformed FL at both the indolent (Fig. 2c, F9) and aggres-

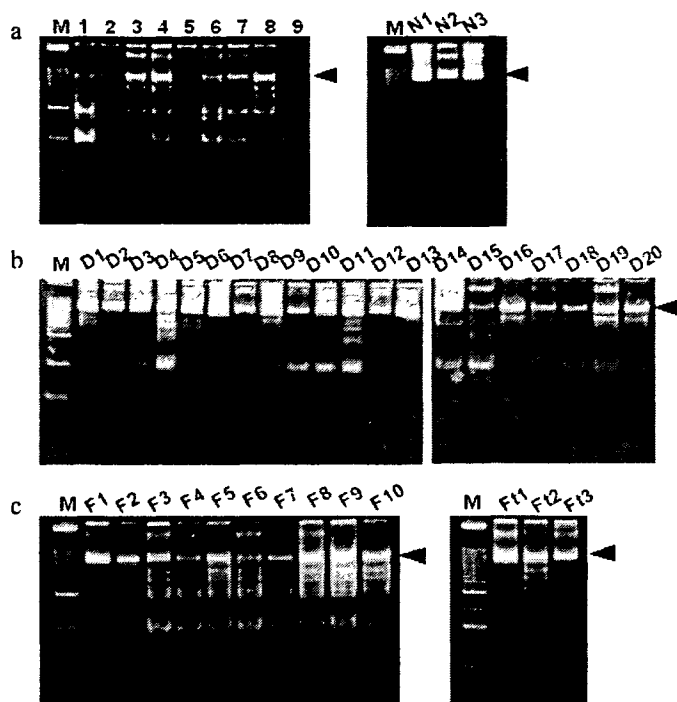


Fig. 2. Methylation analysis by COBRA of the 5' promoter region of the *ID4* gene in lymphoid cell lines and primary lymphomas. PCR products were digested with a restriction enzyme (*Bst*UI) that cleaves CpG sites retained after bisulfite treatment because of methylation. The arrow indicates PCR products before enzyme digestion (342bp). Digested fragments correspond to methylated DNA. Methylated fragments were detected in all samples except D12. (a) Lymphoid cell lines and normal PBMCs. 1: NAMALWA, 2: RAJI, 3: DAUDI, 4: HS-SULTAN, 5: IM-9, 6: THP-6, 7: BALL-1, 8: JURKAT, 9: RAMOS, N1: normal PBMC 1, N2: normal PBMC 2, N3: normal PBMC 3. (b) D1~D20: DLBCL. (c) F1~F10: FL, Ft1~Ft3: transformed FL. M: 25bp DNA ladder.

sive clinical stages (Fig. 2c, Ft2); the COBRA patterns (band size and band intensity) of these two samples were almost identical (Fig. 2c). Our findings indicate that the *ID4* gene was methylated and might be inactivated in almost all malignant lymphomas analyzed here and that the frequency of DNA methylation of the *ID4* gene did not differ between aggressive lymphomas (DLBCL and transformed FL) and indolent lymphomas (FL).

DISCUSSION

In this study, we analyzed the DNA sequence and methylation status of the *ID4* gene, and showed that *ID4* has no mutations but has a high frequency of promoter methylation in lymphoid cell lines and primary lymphoma cells.

Generally, aberrant methylation of CpG islands correlates with loss of gene expression, and such DNA methylation provides an alternative mechanism to gene deletion or muta-

tion for the loss of tumor suppressor function¹⁷⁻¹⁹. In malignant lymphoma, the *p16^{INK4a}* and *p15^{INK4b}* tumor suppressor genes, which encode cyclin dependent kinase (CDK) inhibitors, have been reported to be frequently methylated¹⁹. In addition, we have observed gene inactivation and DNA hypermethylation of *p57^{KIP2}*, another type of CDK inhibitor, in B cell malignancies at high frequency⁹. Therefore, TSG inactivation by DNA methylation is a major mechanism of lymphoma development and progression. *ID4* has recently been identified as a putative TSG, and its expression is silenced by promoter methylation in human leukemia¹⁰. Decreased levels of *ID4* mRNA expression in other tumor types have been tightly correlated to promoter methylation¹²⁻¹⁴. In colorectal cancer, the frequency of hypermethylation of the *ID4* gene has been reported to be higher in primary and metastatic cancer than adenoma, and silencing of *ID4* gene expression is thought to be associated with unfavorable prognosis¹³. Here we have investigated *ID4* in lymphoma, and found that there were no somatic mutations in the tested samples, but, as in other hematological malignancies (chronic lymphocytic leukemia and acute myeloid leukemia) very high frequency of hypermethylation was found. These observations suggest that the *ID4* gene may be inactivated by DNA hypermethylation and is a candidate tumor suppressor in malignant lymphoma. The frequency of hypermethylation of the *ID4* gene did not differ among DLBCL, FL, and transformed FL. Samples from one FL case (F9) before and after aggressive transformation showed very similar DNA methylation status in both clinical stages. Thus, the methylation of the *ID4* gene in this patient might not have altered after disease progression.

We observed methylation of the *ID4* gene in IM-9 cells, which are EBV transformed B cells. This finding is interesting in the context of immortalization by EBV infection and DNA methylation of cellular genes. The hypermethylation of the *ID4* gene was thought to be a common molecular marker of malignant lymphoma, but not to be an indicator of disease progression. Indeed, any correlation between lymphomagenesis and *ID4* gene methylation remained to be examined.

In conclusion, hypermethylation of the *ID4* promoter is frequently found in B cell lymphoma, and the *ID4* gene is a candidate tumor suppressor for FL and DLBCL.

ACKNOWLEDGMENT

This work was supported by a Grant-in-Aid for Cancer Research (15-11) from the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan.

REFERENCES

- 1 Lossos IS: Molecular pathogenesis of diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol* 23: 6351-6357, 2005
- 2 de Jong D: Molecular pathogenesis of follicular lymphoma: A

- cross talk of genetic and immunologic factors. *J Clin Oncol* 23 : 6358-6363, 2005
- 3 Motokura T, Bloom T, Kim HG, Juppner H, Ruderman JV, Kronenberg HM, Arnold A : A novel cyclin encoded by a bcl1-linked candidate oncogene. *Nature* 350 : 512-515, 1991
 - 4 Tsujimoto Y, Cossman J, Jaffe E, Croce CM : Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science* 228 : 1440-1443, 1985
 - 5 Baron BW, Nucifora G, McCabe N, Espinosa R 3rd, Le Beau MM, McKeithan TW : Identification of the gene associated with the recurring chromosomal translocations t (3 ; 14) (q27 ; q32) and t (3 ; 22) (q27 ; q11) in B-cell lymphomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 90 : 5262-5266, 1993
 - 6 Ichikawa A, Kinoshita T, Watanabe T, Kato H, Nagai H, Tsushita K, Saito H, Hotta T : Mutations of the p53 gene as a prognostic factor in aggressive B-cell lymphoma. *N Eng J Med* 337 : 529-534, 1997
 - 7 Nagai H, Kinoshita T, Ichikawa A, Murate T : Malignant lymphoma and tumor suppressor genes. *J Clin Exp Hematopathol* 42 : 11-24, 2002
 - 8 Jones PA, Baylin SB : The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet* 3 : 415-428, 2002
 - 9 Li Y, Nagai H, Ohno T, Yuge M, Hatano S, Ito E, Mori N, Saito H, Kinoshita T : Aberrant DNA methylation of p57^{KIP2} gene in the promoter region in lymphoid malignancies of B-cell phenotype. *Blood* 100 : 2572-2577, 2002
 - 10 Yu L, Liu C, Vandeusen J, Becknell B, Dai Z, Wu YZ, Raval A, Liu TH, Ding W, Mao C, Liu S, Smith LT, Lee S, Rassenti L, Marcucci G, Byrd J, Caligiuri MA, Plass C : Global assessment of promoter methylation in a mouse model of cancer identifies *ID4* as a putative tumor-suppressor gene in human leukemia. *Nat Genet* 37 : 265-274, 2005
 - 11 Massari ME, Murre C : Helix-loop-helix proteins : regulators of transcription in eukaryotic organisms. *Mol Cell Biol* 20 : 429-440, 2000
 - 12 Chan AS, Tsui WY, Chen X, Chu KM, Chan TL, Chan AS, Li R, So S, Yuen ST, Leung SY : Downregulation of ID4 by promoter hypermethylation in gastric adenocarcinoma. *Oncogene* 22 : 6946-6953, 2003
 - 13 Umetani N, Takeuchi H, Fujimoto A, Shinozaki M, Bilchik AJ, Hoon DS : Epigenetic inactivation of ID4 in colorectal carcinomas correlates with poor differentiation and unfavorable prognosis. *Clin Cancer Res* 10 : 7475-7483, 2004
 - 14 Umetani N, Mori T, Koyanagi K, Shinozaki M, Kim J, Giuliano AE, Hoon DS : Aberrant hypermethylation of ID4 gene promoter region increases risk of lymph node metastasis in T1 breast cancer. *Oncogene* 24 : 4721-4727, 2005
 - 15 Rigolet M, Rich T, Gross-Morand MS, Molina-Gomes D, Viegas-Pequignot E, Junien C : cDNA cloning, tissue distribution and chromosomal localization of the human ID4 gene. *DNA Res* 5 : 309-313, 1998
 - 16 Nagai H, Kinoshita T, Suzuki H, Hatano S, Murate T, Saito H : Identification and mapping of novel tumor suppressor loci on 6p in diffuse large B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer* 25 : 277-283, 1999
 - 17 Esteller M, Herman JG : Cancer as an epigenetic disease : DNA methylation and chromatin alterations in human tumors. *J Pathol* 196 : 1-7, 2002
 - 18 Herman JG, Baylin SB : Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med* 349 : 2042-2054, 2003
 - 19 Baylin SB, Esteller M, Rountree MR, Bachman KE, Schuebel K, Herman JG : Aberrant patterns of DNA methylation, chromatin formation and gene expression in cancer. *Hum Mol Genet* 10 : 687-692, 2001
 - 20 Baur AS, Shaw P, Burri N, Delacretaz F, Bosman FT, Chaubert P : Frequent methylation silencing of p15^{INK4b} (MTS2) and p16^{INK4a} (MTS1) in B-cell and T-cell lymphomas. *Blood* 94 : 1773-1781, 1999