

してもよい。薬剤投与中に発熱などの有害反応が発現した場合には、点滴速度を遅くしたり一時的に中断したりして解熱薬の投与など支持療法を行なう。その後、有害反応の回復を待って投与速度を上げたり投与を再開したりする。重篤な有害反応を認めた場合には、ただちに投与を中止し、適切な処置（酸素吸入、昇圧薬、気管支拡張薬、副腎皮質ステロイドの投与など）を行なう。

## 4

### Rituximab 単剤治療

rituximab の臨床開発は、アメリカにおいてまず低悪性度 B 細胞リンパ腫を対象に進められた。アメリカで製造承認のために施行された試験は再発・再燃低悪性度 B 細胞リンパ腫を対象とするものである。375 mg/m<sup>2</sup> の週 1 回 4 週点滴投与が行なわれ、再発・再燃低悪性度 B 細胞リンパ腫 166 例中完全奏効 (complete response : CR) 割合 6%、部分奏効 (partial response : PR) 割合 42% で奏効割合は 48% で、効果持続期間の中央値は 13 ヶ月であった<sup>1)</sup>。わが国においても第 I 相試験<sup>2)</sup> に引き続いて再発・再燃低悪性度 B 細胞リンパ腫およびマントル細胞リンパ腫を対象とした単剤での第 II 相試験が 1997 年から 1999 年にかけて施行された<sup>3)</sup>。治療効果は低悪性度 B 細胞リンパ腫では適格症例 61 例中 CR 14 例、PR 23 例、奏効割合 60.7%、無増悪期間 (time to progression : TTP) の中央値が 245 日、マントル細胞リンパ腫では適格 13 例中 PR 6 例、奏効割合 46.2%、TTP 中央値が 111 日と良好な治療成績が示された。

本薬剤はマウス・ヒトキメラ型モノクローナル抗体であるため、マウスモノクローナル抗体と比較して HAMA、HACA が産生されにくく再投与が可能である<sup>4,5)</sup>。薬物有害反応は初回治療と大きな相違はなく、再投与における安全性は初回投与と大差はない。

## 5

### Rituximab と化学療法との併用

rituximab は薬物有害反応が重複しないため、化学療法との併用が可能であり高い治療効果が得られる。低悪性度 B 細胞リンパ腫に対して rituximab と cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, prednisolone (CHOP) 療法を併用した R-CHOP 療法により、40 例中 CR 22 例 (55%)、PR 16 例 (40%)、奏効割合 95% という良好な治療効果が報告された<sup>6)</sup>。わが国においても R-CHOP の至適投与スケジュールを検討する臨床試験が行なわれた。これは未治療進行期低悪性度 B 細胞リンパ腫を対象として、rituximab と CHOP の 6 コース同時投与法と CHOP 6 コース完了後に引き続いて rituximab を毎週 6 回投与する連続投与法を比較する第 II 相試験である<sup>7)</sup>。69 例が登録され、全奏効割合と CR 割合は同時投与群で 94% と 66%、連続投与群で 97% と 68% であり、共に高い抗腫瘍効果が認められた。

## 6

### 維持療法

rituximab による維持療法も、低悪性度 B 細胞リンパ腫に対する有効な治療方法となることが報告されている<sup>8)</sup>。現在わが国においては rituximab 維持療法の保険適用がないため、今後その承認が期待される。

## 7

### 微小残存病変消失効果と造血幹細胞移植への応用

rituximab は微小残存病変 (minimal residual disease : MRD) レベルで見えた場合に高い治療効果を示す。また MRD 消失効果は化学療法との併用によってさらに高められる。rituximab は高い

MRD 消失効果を示すため、*in vivo* purging 効果を利用する自己造血幹細胞移植への応用が試みられている。

## 8

### CD20 陰性化再発

rituximab 治療後の再発時に CD20 陰性化を示す症例が報告されており、rituximab 治療後の薬剤耐性機序を考えるうえで興味深い現象である<sup>9, 10)</sup>。rituximab 治療後の再発時には、可能な場合には積極的に再生検を行ない、CD20 発現について検討することが望まれる。

#### 参考文献

- 1) McLaughlin P, Grillo-Lopez AJ, Link BK et al: Rituximab chimeric anti-CD20 monoclonal antibody therapy for relapsed indolent lymphoma: half of patients respond to a four-dose treatment program. *J Clin Oncol* 16: 2825-2833, 1998
- 2) Tobinai K, Kobayashi Y, Narabayashi M et al: Feasibility and pharmacokinetic study of a chimeric anti-CD20 monoclonal antibody (IDEC-C2B8, rituximab) in relapsed B-cell lymphoma, The IDEC-C2B8 Study Group. *Ann Oncol* 9: 527-534, 1998
- 3) Igarashi T, Kobayashi Y, Ogura M et al: Factors affecting toxicity, response and progression-free survival in relapsed patients with indolent B-cell lymphoma and mantle cell lymphoma treated with rituximab; a Japanese phase II study. *Ann Oncol* 13: 928-943, 2002
- 4) Davis TA, Grillo-Lopez AJ, White CA et al: Rituximab anti-CD20 monoclonal antibody therapy in non-Hodgkin's lymphoma: safety and efficacy of re-treatment. *J Clin Oncol* 18: 3135-3143, 2000
- 5) Igarashi T, Ohtsu T, Fujii H et al: Re-treatment of relapsed indolent B-cell lymphoma with rituximab. *Int J Hematol* 73: 213-221, 2001
- 6) Czuczman MS, Grillo-Lopez AJ, White CA et al: Treatment of patients with low-grade B-cell lymphoma with the combination of chimeric anti-CD20 monoclonal antibody and CHOP chemotherapy. *J Clin Oncol* 17: 268-276, 1999
- 7) Ogura M, Morishima Y, Kagami Y et al: Randomized phase II study of concurrent and sequential rituximab and CHOP chemotherapy in untreated indolent B-cell lymphoma. *Cancer Sci* 97: 305-312, 2006
- 8) Hainsworth JD, Litchy S, Burris HA 3rd et al: Rituximab as first-line and maintenance therapy for patients with indolent non-hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol* 20: 4261-4267, 2002
- 9) Kinoshita T, Nagai H, Murate T et al: CD20-negative relapse in B-cell lymphoma after treatment with Rituximab. *J Clin Oncol* 16: 3916, 1998
- 10) Hiraga J, Tomita A, Sugimoto T et al: Down regulation of CD20 expression in B-cell lymphoma cells after treatment with rituximab-containing combination chemotherapies; its prevalence and clinical significance. *Blood* 113: 4885-4893, 2009

2

治療レジメンと治療  
遂行上の注意点

A. 非ホジキンリンパ腫

初回治療

1

CHOP 土 R 療法

POINT

- ☑ CHOP 療法は、非ホジキンリンパ腫に対する標準的な化学療法レジメンである。
- ☑ rituximab は、CD20 陽性の B 細胞非ホジキンリンパ腫に対してのみ使用する。
- ☑ 血液毒性が認められた場合は薬剤を減量することが一般的であるが、十分量の薬剤を投与することが望ましいと判断する場合は十分な支持療法のもとに通常量の薬剤を使用する。

② 治療スケジュール

1) 適応患者

1993 年にアメリカで行なわれた大規模な比較試験の結果が公表されて以来、中悪性度の非ホジキンリンパ腫に対する標準的な化学療法レジメンは、CHOP 療法であるとされてきた<sup>1)</sup>。

etoposide を加えた CHOEP 療法や、治療強度を高めた ACVBP 療法などが CHOP 療法に対し

てアドバンテージが認められたとする比較試験の結果も報告もされているが、毒性、効果対費用などの点から、現在でもやはり CHOP 療法が標準的なレジメンであると考えられている。抗 CD20 抗体である rituximab を CHOP 療法と組み合わせることで、非ホジキンリンパ腫の主な病型である CD20 陽性のびまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫 (DLBCL) の生存が CHOP 療法に対して 10~20% 程度の上乗せ効果が見込めることが証明されて以来<sup>2)</sup>、同病型に対する標準的治療は rituximab 併用の CHOP 療法 (R-CHOP 療法) であるとされている。よって CHOP 療法は、CD20 が陰性で CHOP 療法が標準的治療と考えられている組織型 (B 細胞性、T 細胞性を問わず CD20 が陰性である中悪性度リンパ腫) が、R-CHOP 療法は、CD20 陽性の B 細胞性の中悪性度リンパ腫が適応患者である。低悪性度 B 細胞リンパ腫やマントル細胞型リンパ腫などの標準的治療が明確でない例に対して R-CHOP 療法を行なう場合には、期待される利益と不利益を十分に吟味したうえでインフォームドコンセントを行なってから導入するべきである。

2) 治療レジメン

R-CHOP 療法の投与スケジュールを表 1 に示す。R-CHOP 療法は、CHOP 療法の各コースに、

表1 R-CHOP 療法治療スケジュール

薬剤	投与量	投与方法	投与日
rituximab	375 mg/m <sup>2</sup>	点滴静注	day 1
cyclophosphamide	750 mg/m <sup>2</sup>	点滴静注	day 1
doxorubicin	50 mg/m <sup>2</sup>	点滴静注	day 1
vincristine	1.4 mg/m <sup>2</sup> (最大: 2 mg/body)	点滴静注	day 1
prednisolone	100 mg/body	経口	day 1~5

増悪がない限り、3週ごとに計6~8コース繰り返す。

rituximab 375 mg/m<sup>2</sup> を1回ずつ併用したものである。rituximab をどのタイミングで併用するかであるが、厳密な決まりごとがあるわけではない。海外で行なわれた比較試験においては、CHOP 療法の day 1 に rituximab も投与し、それを3週ごとに6~8回繰り返すという投与方法が行なわれている<sup>2,3)</sup> が、最初に報告された、未治療の中悪性度リンパ腫に対する R-CHOP 療法の第Ⅱ相試験では、rituximab を day 1 に投与し、day 3 から CHOP 療法を開始するという投与方法であった<sup>4)</sup>。

rituximab の薬物動態は個人差が大きく、長い例では血中半減期が3週間以上であるともされているため、day 1 または day 3 に投与することで治療効果に大きな違いが生じるとは考えにくい。また、わが国と海外では rituximab の投与方法、施設事情などが異なっているため、施設の実情に合わせた投与方法で行なうべきであろう。なお、R-CHOP 療法に関する大規模な比較試験に ECOG で行なわれたものがあるが、そこで用いられた併用法は、rituximab 375 mg/m<sup>2</sup> を1コース目の CHOP 療法の day -7, -3 および 3, 5, 7 コース目の CHOP 療法の2日前に投与するというものであった。この試験は primary endpoint に差が認められないという結果であったのだが、その理由の1つとして、初回治療に用いられた rituximab の総投与量、pharmacokinetic model から推測される血中濃度のいずれもが先述の併用法よりも低いことが指摘されており、推奨される投与方法ではないと考えられる。

### 3) 治療中の投与量・投与間隔の変更規準

rituximab に関しては、投与量を減らすことで有害事象の発現頻度が減るという事実はないため、投与量を変更する必要はないであろう。

CHOP 療法に関しては、以下の毒性が見られた場合には、薬剤の減量や中止を考慮する。どの

程度の量を減量するかは、個々の例に応じて決定すべきであろう。

#### ①血液毒性による減量

grade 3 以上の血小板減少が認められた場合、次コースの cyclophosphamide (CPA) と doxorubicin (DXR) の減量を考慮する。

#### ②感染による減量

「grade 3 の発熱性好中球減少」または「grade 3~4 の好中球減少を伴う感染」が認められた場合、次コースの CPA と DXR の減量を考慮する。しかし、薬剤の減量よりも十分量の薬剤を投与するほうが患者にとって利益になると判断された場合は、次コースからは G-CSF の予防的投与も考慮する<sup>5)</sup>。

#### ③肝障害による減量

総ビリルビン > 2.0 mg/dl の場合、DXR の減量を考慮する。肝障害が回復した場合、回復後の値が総ビリルビン ≤ 2.0 mg/dl であれば再増量も考慮する。

#### ④神経毒性による減量

grade 2 の神経障害 - 運動性、神経障害 - 知覚性が認められた場合は、vincristine (VCR) の減量を考慮する。grade 3 以上の神経障害 - 運動性、神経障害 - 知覚性が認められた場合は、VCR の中止を考慮すべきである。毒性が改善しても、再増量すべきではない。

#### ⑤イレウスまたは神経性便秘による減量

grade 2 のイレウスが認められた場合、VCR の減量を考慮する。grade 3 以上のイレウスが認められた場合、以後は VCR の中止を考慮すべきである。減量後に毒性の改善がみられても、再増量はすべきではない。

#### ⑥心毒性による減量

grade 2 以上の心臓 - 虚血 / 梗塞、心膜液 / 心膜炎、grade 3 以上の「心血管系 (不整脈)」の

## 240 Ⅲ. 悪性リンパ腫 - 治療の実際

いかなる不整脈、左室機能低下が認められた場合、以後はDXRの投与中止を考慮すべきである。

⑦胃、十二指腸潰瘍、糖尿病、精神症状による減量

ヒスタミンH<sub>2</sub>受容体拮抗薬あるいはプロトンポンプ阻害薬の予防投与の内服にもかかわらず、X線または内視鏡により胃・十二指腸潰瘍が確認された場合、インスリン治療が必要とされるような糖尿病が出現した場合、CHOP療法開始後、メジャーランキライザー、抗うつ薬・抗躁薬の投薬が必要になった場合には、以後はprednisolone (PSL)の投与中止を考慮すべきである。

⑧出血性膀胱炎による減量

grade 2以上の血尿が出現した場合、以後はCPAの投与中止を考慮すべきである。

次コースについては、表2の条件を開始の目安とする。

表2 次コース開始の条件

<ul style="list-style-type: none"> <li>・前コース開始日より3週間経過</li> <li>・白血球数 <math>\geq 3,000/\text{mm}^3</math></li> <li>・血小板数 <math>\geq 10 \times 10^4/\text{mm}^3</math></li> <li>・GOT <math>\leq</math> 施設基準値上限の5倍</li> <li>・GPT <math>\leq</math> 施設基準値上限の5倍</li> <li>・総ビリルビン値 <math>\leq 3.0 \text{ mg/dl}</math></li> <li>・血清クレアチニン <math>\leq 2.0 \text{ mg/dl}</math></li> <li>・grade 2以上の感染（「感染」カテゴリーのいずれかの有害事象：細菌感染症、ウイルス感染症を問わない）がない</li> </ul>
---

b 期待される治療効果—  
奏効割合および生存期間

1993年に公表された、アメリカで行なわれたCHOP療法と第2～3世代のレジメンを比較した大規模な比較試験では、CHOP療法の3年生存割合は54%と報告されている<sup>1)</sup>。DXRを含む化学療法レジメンで治療された、中～高悪性度リンパ腫に対する予後予測モデルであるIPIで層別化すると、low/low intermediate/high intermediate/high riskにおける5年全生存割合はそれぞれ73/51/43/26%とされており<sup>6)</sup>、CHOP療法で期待される生存は、組織型や予後因子に依存していることがわかる。フランスで行なわれた、高齢者のCD20陽性DLBCLを対象としたCHOP療法とR-CHOP療法の比較試験では、2年生存割合がそれぞれ57%と70%であったと報告されている<sup>2)</sup>。その後のフォローアップでも、観察期間中央値5年で生存割合がそれぞれ45%と58%と、R-CHOP療法の優位性は変わっていない。欧米を中心に、IPI low risk群の若年者のCD20陽性DLBCLを対象に行なわれたMInT trialについては「限局期中悪性度リンパ腫」(157頁)、「進行期中悪性度非ホジキンリンパ腫」(160頁)を参照とする。近年、rituximabを加えた治療による予後予測因子を検討したモデルとしてrevised IPIが提唱されたが、そこでは4年全生存割合が

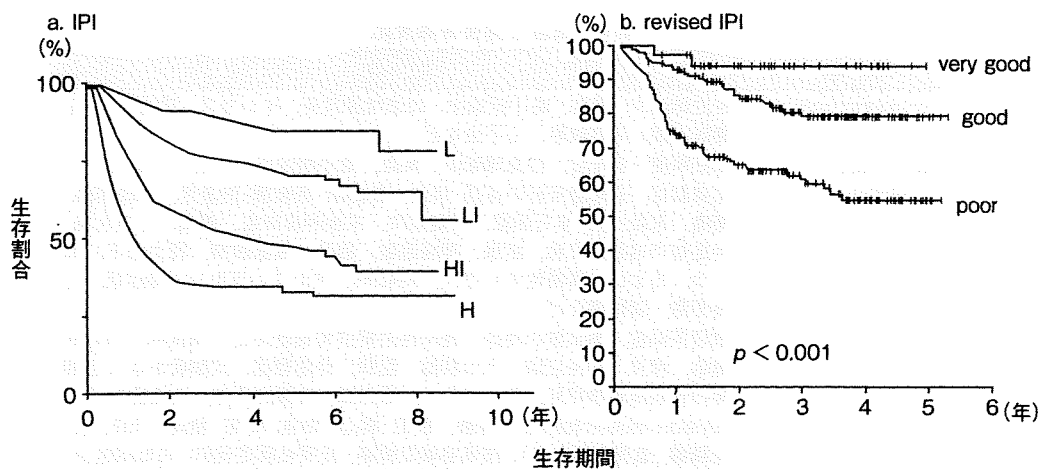


図1 IPIとrevised IPIによるリスク別の生存曲線

(文献7より引用)

very good 群で 94%, good 群で 79%, poor 群で 54%とされており<sup>7)</sup>(図 1), CD20 陽性 DLBCL では, rituximab を併用することで CHOP 療法に対して 10%以上の予後の改善が期待される。

## c 薬物有害反応とその対策

### 1) 薬物有害反応

アメリカで行なわれた大規模な比較試験において, CHOP 療法では grade 5 の有害事象が 1%, grade 4 または生命を脅かすような有害事象は 31%であったとされている<sup>1)</sup>。フランスで行なわれた CHOP 療法と R-CHOP 療法の比較試験にお

けるそれぞれの有害事象は, 表 3 の通りである。個々の薬剤における重篤な薬物有害反応を記す(表 4)。

### 2) その予防と対策

- ① ヘモグロビン < 8.0 g/dl の貧血に対しては輸血を考慮し, ヘモグロビン  $\geq$  8.0 g/dl に保つのが望ましい。
- ② 血小板数 <  $1 \times 10^4 / \text{mm}^3$  となったら, 適宜血小板輸血を行なう。
- ③ 上部消化管潰瘍の既往者など必要に応じて, ヒスタミン H<sub>2</sub> 受容体拮抗薬あるいはプロトンポンプ阻害薬の予防投与を併用する。

表 3 CHOP 療法または R-CHOP 療法で治療を受けた患者における非血液毒性

イベント	いかなる grade		grade 3 または 4	
	R-CHOP 療法	CHOP 療法	R-CHOP 療法	CHOP 療法
	最低 1 コース以上のイベントが認められた患者の割合 (%)			
発熱	64	59	2	5
感染	65	65	12	20
粘膜障害	27	31	3	2
肝毒性	46	46	3	5
心毒性	47	35	8	8
神経毒性	51	54	5	9
腎毒性	11	14	1	2
肺毒性	33	30	8	11
嘔気・嘔吐	42	48	4	8
便秘	38	41	2	5
脱毛	97	97	39	45
その他の毒性	84	80	20	25

(文献 2 より引用)

表 4 重篤な薬物有毒反応

薬剤	副作用
cyclophosphamide	白血球減少, 貧血, 血小板減少, 出血性膀胱炎, イレウス, 間質性肺炎, 肺線維症, 心筋障害, 心不全など
doxorubicin	心筋障害・心不全, 白血球減少, 貧血, 血小板減少, ショックなど
vincristine	知覚異常, 深部腱反射の減弱・消失, 筋萎縮・筋衰弱・筋疲労, 四肢疼痛, 顎痛, 運動失調・歩行困難, 知覚消失, 末梢神経障害, 筋痛, しびれ感, 手足首の弛緩, 背痛, 痙攣, 神経過敏, 錯乱・言語障害, 視力低下, 抑うつ, めまい, 麻痺性イレウス, SIADH, アナフィラキシー様症状, 心筋梗塞・脳梗塞など
prednisolone	誘発感染症, 感染症の増悪, 続発性副腎皮質機能不全, 糖尿病, 消化性潰瘍, 肺炎, 精神変調, うつ状態, 痙攣, 骨粗鬆症, 大腿骨および上腕骨の骨頭無菌性壊死, ミオパチー, 緑内障, 後嚢白内障, 血栓症など
rituximab	infusion-related toxicity (発熱, 悪寒, 悪心, 頭痛, 疼痛, 掻痒, 発疹, 咳, 虚脱感, 血管浮腫など), 腫瘍崩壊症候群, 皮膚粘膜症候群, 白血球減少, 好中球減少, 血小板減少, 心障害, 脳神経症状, 緑内障, B 型肝炎の急性増悪など

- ④ 悪心・嘔吐に対しては、5-HT<sub>3</sub>受容体拮抗薬などの制吐薬やステロイドを適切かつ有効に用いる。
- ⑤ neutropenic fever の場合には、細菌学的検索用の検体を採取後、可及的速やかに適切かつ十分量の抗生物質を投与する。
- ⑥ rituximab によるインフュージョンリアクションに対しては、非ステロイド抗炎症薬、抗ヒスタミン薬などの前投薬を予防的に用いる。それでも症状が出現した場合には点滴を中断し、非ステロイド抗炎症薬、ステロイドや抗ヒスタミン薬を使用し、症状が消失した後、点滴速度を遅くして点滴を再開する。
- ⑦ rituximab によるリンパ球減少により *Pneumocystis jiroveci* による間質性肺炎が惹起される可能性があり、ST 合剤の予防的投与が推奨される。
- ⑧ 抗菌薬投与にても解熱をみない発熱時には間質性肺炎を疑い、ただちに胸部 X 線撮影、動脈血ガス分析を行ない、必要あれば胸部 CT 検査を行う。*Pneumocystis jiroveci* など起因微生物に対する治療を開始、あるいは薬剤性肺臓炎と診断した場合には、ステロイド投与を開始するなどの適切な処置を講じる。
- ⑨ rituximab による B 型肝炎ウイルスの再活性化については「肝炎ウイルスキャリアの対策」を参照とする。
- ⑩ G-CSF の使用について
- 予防投与：
    - ③ 初回コースからの予防的 G-CSF 投与は原則として行なわないが、65 歳以上の高齢者では初回コースからでも予防的使用を考慮する。
    - ④ 前コースにおいて好中球減少に伴う発熱の出現、あるいは遷延する好中球減少が次コース施行の妨げとなった場合には、次コースから予防的 G-CSF 投与を考慮する。
  - 治療的投与：
    - ③ 好中球減少があっても発熱がみられない患者に対しては、G-CSF の投与は行なわない。
    - ④ 肺炎、峰巣織炎、膿瘍、静脈洞炎、低血圧、多臓器不全（敗血症症候群）、真菌感染症などが存在する場合、あるいは好中球数 100/mm<sup>3</sup> 未満が存在する場合は G-CSF を抗生物

質と併用する。

- 投与期間：
 

通常は化学療法終了後 24~72 時間後より G-CSF の投与を開始し、白血球数が最低でも 2~3,000/mm<sup>3</sup> を越えるまでは継続する。

#### d 保険適用について

上述の CHOP 療法、R-CHOP 療法で使用される薬剤は保険適用のものであり、規定の量、回数内では特に問題はない。しかし、支持療法における抗 HBV 薬、G-CSF の予防的投与に関しては保険適用がないため、注意が必要である。

#### 参考文献

- 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* 328: 1002-1006, 1993
- 2) 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
- 3) 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* 7: 379-391, 2006
- 4) Vose JM, Link BK, Grossbard ML et al: Phase II study of rituximab in combination with chop chemotherapy in patients with previously untreated, aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol* 19: 389-97, 2001
- 5) Smith TJ, Khatcheressian J, Lyman GH et al: 2006 update of recommendations for the use of white blood cell growth factors; an evidence-based clinical practice guideline. *J Clin Oncol* 24: 3187-3205, 2006
- 6) A predictive model for aggressive non-Hodgkin's lymphoma. The International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project. *N Engl J Med* 329: 987-994, 1993
- 7) Sehn LH, Berry B, Chhanabhai M et al: The revised International Prognostic Index (R-IPI) is a better predictor of outcome than the standard IPI for patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP. *Blood* 109: 1857-1861, 2007

therapy plus rituximab compared with CHOP alone in elderly patients with diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med* 346: 235-242, 2002

- 5) 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
- 6) 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* 7: 379-391, 2006
- 7) Persky DO, Unger JM, Spier CM et al: Phase II study of rituximab plus three cycles of CHOP and involved-field radiotherapy for patients with limited-stage aggressive B-cell lymphoma; Southwest Oncology Group study 0014. *J Clin Oncol* 26: 2258-2263, 2008

## 2

### 進行期中悪性度 非ホジキンリンパ腫

#### POINT

- ☑ CD20 陽性の進行期 DLBCL に対する標準的治療は R-CHOP 療法である。
- ☑ T 細胞リンパ腫などの CD20 陰性の進行期中悪性度非ホジキンリンパ腫に対する治療で CHOP 療法にまさとされた治療レジメンは存在しない。
- ☑ 地固め療法としての自家末梢血幹細胞移植併用の大量化学療法は、IPI の高リスク群や T 細胞リンパ腫に対して有用である可能性があるが、試験的治療である。

#### a 標準的治療

##### 1) 標準的な化学療法レジメン

全身疾患である進行期中悪性度リンパ腫に対する治療の基本は、全身療法すなわち化学療法である。化学療法に高感受性である悪性リンパ腫に対して、これまでに薬剤耐性や薬剤の用量強度を考慮したさまざまな併用療法が考案されてきた。1970年代に開発された CHOP 療法に続いて、より多くの薬剤を組み合わせた第2～3世代と呼ばれるレジメンが開発され、すぐれた治療成績が報告されてきた。しかし1993年に、アメリカで施行された大規模な比較試験の結果、CHOP 療法を対照としてこれらの化学療法は、生存において CHOP 療法を凌駕しなかったことが報告された<sup>1)</sup>。治療効果が同等であっただけでなく、毒性やコスト面においては CHOP 療法がすぐれていたことから、この報告以降は、進行期中悪性度リンパ腫に対する標準的な化学療法レジメンは CHOP 療法であるとされた。これは2009年現在でも、おおむね変わらない事実として認識されている。



## 2) CD20 陽性 DLBCL に対する標準的治療

1990年代後半に入り、従来の抗癌剤とはまったく異なる作用機序を有する薬剤の開発が進んだ。B細胞リンパ腫細胞の大半に発現しているCD20抗原に対して特異的に結合するマウス/ヒトキメラ抗体である rituximab が、その代表である。この薬剤は、従来のアルキル化薬やトポイソメラーゼ阻害薬といった直接的な殺細胞効果により抗腫瘍効果を発揮する薬剤と異なり、主に補体依存性細胞介在性細胞障害反応や補体依存性細胞障害反応といった宿主の免疫を介した抗腫瘍効果を有する薬剤である。

rituximab は、開発治験の段階から単剤でも高い抗腫瘍効果が認められていたが、その作用機序から、毒性が増強することなく効果が高まることが期待され、従来の化学療法との併用法の開発も進められた。

rituximab を用いた大規模な比較試験は、2002年にフランスの GELA から報告されたものが最初のものである。ここでは、高齢者の CD20 陽性・未治療進行期びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫 (DLBCL) を対象に CHOP 療法と rituximab 併用の CHOP 療法 (R-CHOP 療法) の比較試験が行なわれ、2年無イベント生存割合 (event free survival : EFS), 2年全生存割合 (overall survival : OS) のいずれも R-CHOP 群がまさっていたと報告された<sup>2)</sup> (図1)。サブグループ解析でも、IPI の低リスク群のみでなく高リスク群でも R-CHOP 療法が生存において CHOP 療法群を上回っているという結果で、この試験の結果が B 細胞性の進行期中悪性度リンパ腫に対する現在の標準的治療のランドマークとなっている。

その他に化学療法と rituximab 併用の有無を検討した大規模な比較試験に、欧米を中心に行われた国際的な共同試験 (MInT trial) とアメリカの Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) で行なわれたものがある。前者は若年者の IPI で low risk の患者を対象としたもので、CHOP 療法類似レジメンにおける rituximab 併用の有無を比較したところ、3年の EFS が 79% vs 59%、3年の OS が 93% vs 84% と、いずれも有意に rituximab 併用群がまさっていたと報告された (131頁、第II章-5、図6参照)<sup>3)</sup>。

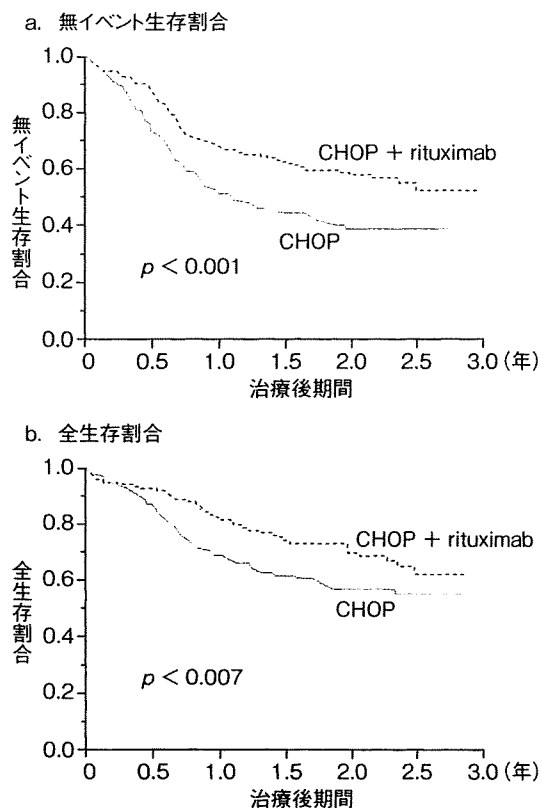


図1 CHOP療法とR-CHOP療法の比較試験における生存曲線

(文献2より引用)

後者の試験は GELA で行なわれた比較試験同様に、高齢者の進行期中悪性度リンパ腫患者を対象に初回 (期) 治療における rituximab 併用の有無の比較 (CHOP vs R-CHOP) および奏効に至った例では維持療法としての rituximab の有無を比較 (observation vs maintenance rituximab) するという  $2 \times 2$  の試験デザインであったのだが、初回 (期) 治療は rituximab 併用により failure free survival (FFS) は改善されたものの、OS の改善は認められなかったというものであった。しかし、二次的な解析では rituximab の併用により生存は改善しており<sup>4)</sup>、これらの結果からも rituximab を併用することの有用性は間違いないことが確認された。

この試験におけるもう1つの検討事項である維持療法としての rituximab の有用性については、初回治療が CHOP 療法単独で行なわれた場合には維持療法を行うことで FFS が改善されたが、

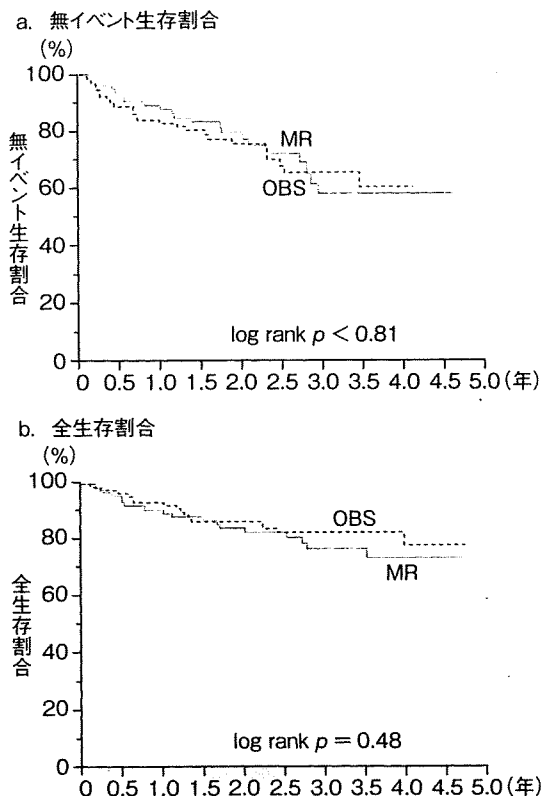


図2 R-CHOP療法後のrituximabによる維持療法の有無における生存曲線  
OBS: observation, MR: maintenance rituximab  
(文献4より引用)

それ以外の状況 (CHOP療法後に維持療法を併用した場合のOS, R-CHOP療法後に維持療法を行った場合のFFSとOS) では生存の改善は認められなかった (図2)。これらの比較試験の結果から、CD20陽性DLBCLに対する標準的治療はR-CHOP療法による初回治療であり、rituximabによる維持療法は不要とされている。

### 3) CD20陽性DLBCL以外の進行期中悪性度リンパ腫に対する標準的治療

DLBCLは、中悪性度リンパ腫の7~8割を占めている。そのDLBCLの9割以上はCD20を発現しており、進行期中悪性度リンパ腫において大規模な比較試験から得られたエビデンスのほとんどはCD20陽性DLBCLに対するものとオーバーラップしていることとなり、それ以外の病型に対してはレベルの高いエビデンスが存在しないのが

現状である。

CD20陰性の中悪性度リンパ腫の主な組織型には、peripheral T-cell lymphoma, not otherwise specified (PTCL-NOS, 末梢性T細胞リンパ腫・非特異型), angioimmunoblastic T-cell lymphoma (AITL, 免疫芽球性T細胞リンパ腫), anaplastic large cell lymphoma (ALCL, 異型大細胞リンパ腫) といったT細胞リンパ腫が含まれている。一部の例外を除いて、一般的にT細胞リンパ腫はB細胞リンパ腫よりも予後不良とされている。

国際的に行なわれたPTCLに関する後方視的な解析でも、T細胞リンパ腫の約45%を占めるPTCL-NOSとAITLで、5年OSがそれぞれ32%であり、全体で見ても、たとえIPIのlow risk群であってもDLBCLと比べると予後不良であった<sup>5)</sup>。T細胞リンパ腫の12%程度を占めるALCLは、anaplastic lymphoma kinase (ALK) 蛋白の過剰発現の有無によりALK陽性とALK陰性の2つに分けられる。この分類は病理組織学的な分類だけでなく、好発年齢や予後といった臨床的な分類の意味ももっている。

先述のT細胞リンパ腫に関する国際的な解析では、ALK陽性例と陰性例では、年齢中央値が34歳 vs 58歳、5年OSが70% vs 49%と、陰性例のほうが高齢者に多く予後不良であることも示されている<sup>6)</sup>。CHOP療法が進行期中悪性度リンパ腫の標準的治療であると結論づけた比較試験の結果より、これらの対象に対してもCHOP療法が行なわれることが多い。しかし、この解析ではPTCL-NOSとAITLに対する治療にkey drugであるアントラサイクリン系の薬剤を用いても生存に寄与しないことも報告されている (図3)。その一方で、CHOP療法よりも強力な多剤併用療法を行なってもこれらの病型の予後は改善しないという後方視的な報告もある<sup>7)</sup> (図4)。結局、CD20陽性DLBCL以外の進行期中悪性度リンパ腫に対する標準的治療は、CHOP療法以上に有用であると証明された治療はないというのが現状である。なお、中悪性度リンパ腫の予後予測モデルには通常はIPIが用いられているが、PTCLに特化した予後予測モデル (Prognostic Index for PTCL: PIT) がイタリアのグループより提唱さ

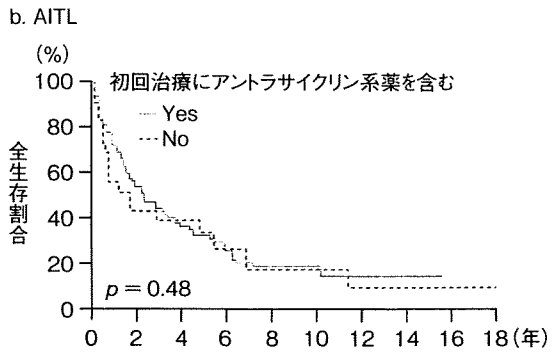
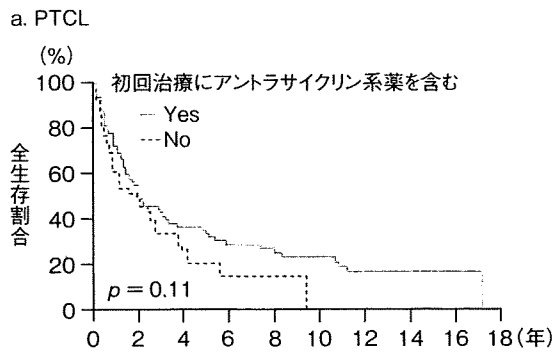


図3 アントラサイクリン系薬の有無による生存曲線

(文献6より引用)

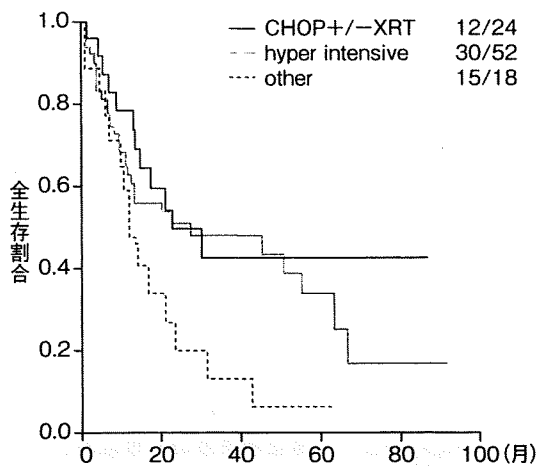


図4 MD Anderson Cancer Centerで行われたT細胞リンパ腫に対するCHOP療法または強力な治療による生存曲線

(文献7より引用)

れている。

年齢, performance status, LDH 高値, 骨髄浸潤の有無の4つの因子で4群に分けると, 5年と10年のOSがそれぞれ group 1(予後不良因子: 0)で62.3%と54.9%, group 2(予後不良因子: 1)で52.9%と38.8%, group 3(予後不良因子: 2)で32.9%と18.0%, group 4(予後不良因子: 3~4)で18.3%と12.6%と層別化することができる<sup>8)</sup>(図5)。現在, この予後予測モデルを用いて治療が層別化されることはないが, 前向きな臨床試験による治療開発への応用が期待される。

## b 試験的治療

### 1) 地固め療法としての自家造血幹細胞移植併用の大量化学療法

CHOP療法は標準的な化学療法レジメンであるが, IPIのhigh intermediate~high risk例や大多数のPTCLに対しては3割程度しか長期予後が期待できない。そのため, 予後不良と考えられる中悪性度リンパ腫に対しては, 可能であるならば治癒を目指した強力な治療を行なうべきという考え方がある。その代表的な治療法が, 自家造血幹細胞移植を併用した大量化学療法である。これまでに初回治療としての通常量の化学療法と大量化学療法の比較試験がいくつか報告されている。

GELAで行なわれた, ACVBP療法で奏効が得られた後に通常量の化学療法による地固め療法または自家造血幹細胞移植併用の大量化学療法を行なうという比較試験で, IPI全リスクを対象とした比較では両群に差はないもののhigh intermediate~high risk例では5年EFSで59% vs 39%, 5年OSで65% vs 52%と有意に大量化学療法群がまさっていた<sup>9)</sup>という報告がされたが, その一方で, 同グループでその後に行なわれた, 最初からhigh intermediate~high risk群を対象としてACVBP療法と大量化学療法を比較した試験では, 5年OSで60% vs 46%と大量化学療法よりもACVBP療法群の方がまさっていたとも報告されている<sup>10)</sup>。

この2つの試験の結果の違いに関してであるが, 前者の試験が行なわれたのはIPIが公表され

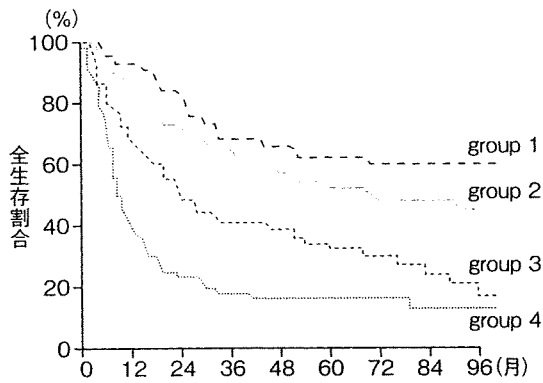


図5 PITによる因子数別の生存曲線

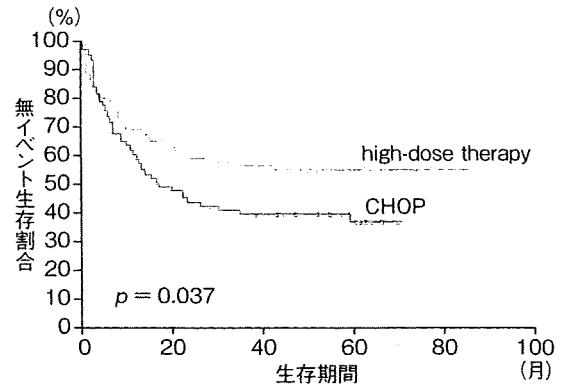
(文献8より引用)

る前であったため、対象が同グループの基準による予後不良因子 (ECOG の performance status が2~4, 節外病変が2つ以上, 骨髄または中枢神経浸潤を有する, バーキットリンパ腫またはリンパ芽球性リンパ腫) を1つ以上有する例であったのだが, それを試験終了後に公表された IPI を用いて解析したところ high intermediate~high risk に相当する例において大量化学療法の有用性が示されたという, サブグループ解析のような結果であったことが影響している可能性がある。

その他にイタリアのグループからは, IPI の high intermediate~high risk 例を対象に MACOP-B 療法を行なう群と治療期間を短縮した MACOP-B 療法の後に大量化学療法を行なう群との比較試験が報告されているが, そこでも両群に生存で差はなかったとされている<sup>11)</sup>。しかし, これらの試験では大量化学療法前の初回治療の強度が, 対象となる通常量の化学療法群と比較して十分ではなかったこと, 通常量の化学療法群の治療レジメンが現在の標準的な治療と考えられているものとは異なっていることなどから, 大量化学療法の意義を否定するものではなかったとも考えられている。

その後, 標準的な化学療法レジメンである CHOP 療法を対象として大量化学療法の有用性を検討した比較試験がフランスの Groupe Ouest-Est des Leucemies et des Autres Maladies du Sang (GOELAMS) で行なわれ, そこでは統計学的な有意差こそ認められなかったものの5年

a. 全登録例における EFS



b. IPI high intermediate risk における EFS

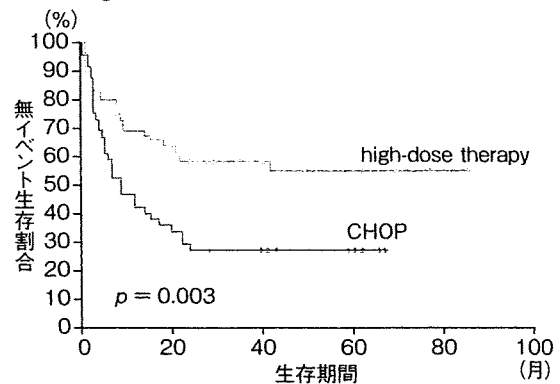


図6 CHOP 療法と大量化学療法の比較試験における生存曲線

(文献12より引用)

OS は71% vs 56%と大量化学療法群が良好であり, 5年 EFS においては55% vs 37%と有意に大量化学療法群がまさっていたこと, なかでも high intermediate risk 例では5年 EFS が28% vs 56%, 5年 OS が44% vs 74%と著大な差が認められたことが報告され (図6)<sup>12)</sup>, CHOP 療法では治療効果が十分でない対象に対しては大量化学療法が有用である可能性が示された。しかし, この試験は 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~low intermediate risk という, 通常では初回治療後の奏効例のように地固め療法としての大量化学療法の適応としないような例も対象に含めており (試験に登録された例の約半数が IPI low~low inter-

mediate risk であった。high intermediate risk 例では大量化学療法群がまさっていたが、low～low intermediate risk 例では EFS、OS と両群の間に差は認められなかった。結果の解釈には注意が必要であり、この結果だけで大量化学療法が CHOP 療法にまさると結論づけることはできないと考えられている。

B 細胞リンパ腫よりも予後不良である PTCL に対しても、初回治療から大量化学療法を導入することが検討されてきた。対象患者の少なさのため比較試験が成立困難であり、前向きな臨床試験は第Ⅱ相試験しかないのだが、その有用性を示唆する報告がある。ヨーロッパのグループから、PTCL と AITL 患者を対象とした地固め療法としての大量化学療法の第Ⅱ相試験が報告されている。そこでは、未治療の PTCL 患者に対して用量を高めた CHOP 療法 (Mega CHOP) で初回治療を行ない、部分奏効以上の効果が得られた場合に自家造血幹細胞移植併用の大量化学療法が行なわれたが、大量化学療法後の完全奏効割合は 89% で、大量化学療法が行なわれた例 (全体の 76%) の 2 年 OS が 84%、PFS が 56%、DFS が 63% という良好な結果であった<sup>13)</sup>。未治療の AITL 患者に対して行なわれた試験では 3 年 OS が 60%、PFS が 55% という結果であり、同様に大量化学療法の有用性が示唆された<sup>13)</sup>。しかし、別のグループから報告された試験では、全体の 4 年の PFS が 30%、OS が 39% と決して良好な結果ではないだけでなく、大量化学療法が行なえなかった例と行なえなかった例とで予後に違いはなく、PTCL に対する地固め療法としての大量化学療法にはまだ議論の余地があるとされている<sup>14)</sup>。

前述の報告では、PIT の group 3～4 という予後不良例が 19% であったのに対して、この報告では group 3～4 が約半数も含まれていたという患者背景の違いが結果の違いに反映された可能性があるが、T 細胞リンパ腫に対する地固め療法としての大量化学療法の位置づけは B 細胞リンパ腫に対するものよりもさらに不明瞭である。

このように、地固め療法としての大量化学療法は有望な治療法であるが、現在も検討中の試験的治療なのである。なお、IPI low～low intermediate risk に対しては CD20 陽性であるならば

R-CHOP 療法で約 80% 以上の長期生存が期待できるため、適切に計画された臨床試験に登録する以外の状況で R-CHOP 療法以外の治療を選択する理由はない。

## 2) その他の試験的治療

### a) 新規薬剤の応用

近年の分子標的薬の進歩により、中悪性度非ホジキンリンパ腫の初回治療にも新規薬剤が応用されるようになってきている。PTCL の約半数に発現している CD52 に対するモノクローナル抗体である alemtuzumab と CHOP 療法の併用療法がイタリアのグループより報告されている。24 人の未治療の CD52 陽性の PTCL 患者に対して CHOP 療法 8 コースと alemtuzumab 4～8 回の併用療法を行なったところ、71% の完全奏効割合が認められたとされている<sup>15)</sup>。しかし高い奏効割合の一方で、grade 4 の感染症として侵襲性アスペルギルス症、JC ウイルス脳炎、ブドウ球菌による敗血症、溶連菌による敗血症、ニューモシチス肺炎を合併したことも報告されており、一般的に行なわれる治療になりうるかは疑問である。

DLBCL に対する新規治療としては、ヒト化 CD22 抗体である epratuzumab と R-CHOP 療法の併用の第Ⅰ相試験が報告されている。そこでは、未治療の DLBCL 患者に対する初回治療で 87% の奏効割合、2 年 PFS が 86%、OS が 86% と、良好な成績であったとされている<sup>16)</sup>。

ほかには、vascular endothelial growth factor (VEGF、血管内皮細胞増殖因子) に対するヒト化モノクローナル抗体である bevacizumab と R-CHOP 療法の併用の試験で、未治療の DLBCL 患者に対して奏効割合が 85%、1 年 PFS が 77% という成績が報告されている<sup>17)</sup>。これらの併用療法が、効果や費用の点から R-CHOP 療法に替わる治療となるかどうかはこれから検証されていくのだろうが、これからの治療の進歩の展望に期待が高まる。

### b) Rituximab の急速投与

R-CHOP 療法は B 細胞リンパ腫の標準的治療である。悪性リンパ腫は年々発症頻度が増加しており、R-CHOP 療法の施行頻度もますます高まっていくものと考えられる。近年の急速な癌治療の環境整備により、抗癌化学療法は入院必須の治療

から外来でも可能な治療へと変化してきている。

標準的な投与方法では rituximab と CHOP 療法はそれぞれ 3~4 時間の点滴時間を必要とするため、外来で行なう場合、頻回な通院や設備の長時間の占有が余儀なくされる。外来化学療法の必要性が高まっている現在、これらの問題は軽視できない要素である。これに対し、カナダの British Columbia のグループは rituximab の急速投与を行ない、その安全性を報告した。rituximab を総量 250 ml になるように溶解し、最初の 30 分で 20%、その後 60 分で残りの総量を投与するという方法で投与したところ、grade 3 以上の輸注関連の有害事象が 1 件も認められなかったのみでなく、その他の軽度な有害事象も増加しなかった (corticosteroid を含んだ化学療法との併用時した患者が 150 人、維持療法として rituximab を投与した患者が 56 人)<sup>18)</sup>。

その報告は、これまで 1,200 人以上の患者が同方法により治療され、治療資源の活用が有用であったと結ばれている。もちろん安易に模倣すべき方法ではないが、近年の外来化学療法の事情を考慮すると、今後このような治療研究も必要となるだろう。

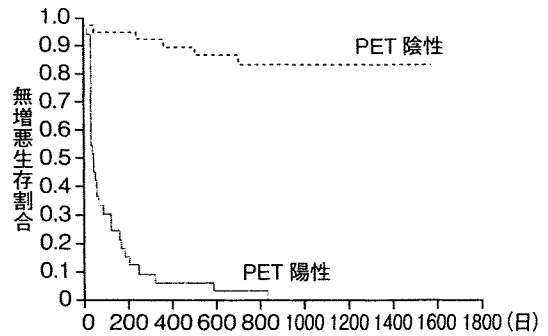
### c) PET の応用

近年、悪性リンパ腫の評価に PET が用いられるようになった。その感度の高さから、通常は治療前の病期決定や治療の効果判定に用いられるのだが、治療の途中で PET を行ない、治療の反応性を評価する研究も行なわれている。

Spaepen らは 70 人中悪性度非ホジキンリンパ腫患者に対して治療を行ない、3 コース後に PET を評価したところ、その時点で PET が陽性であったのが 33 人、陰性であったのが 37 人であり、陽性だった例では 1 人も長期奏効が見られなかったのに対して、陰性だった例は 31 人で奏効を維持しており、多変量解析では治療途中での PET 陽性/陰性は IPI よりも強い予後因子であったと報告した<sup>19)</sup> (図 7)。この報告から、治療途中の PET は予後予測の方法の 1 つとして有用であるだけでなく、その結果により地固め療法としての大量化学療法の導入することや、治療を短縮し抗腫瘍薬の総投与量を減量するなど、治療の層別化に利用することの可能性も示唆された。

## 166 Ⅲ. 悪性リンパ腫—治療の実際

a. 無増悪生存割合



b. 全生存割合

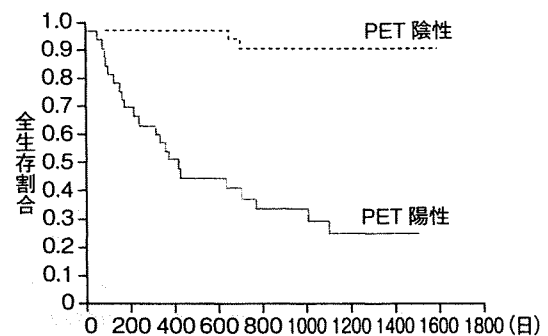


図 7 治療途中の PET 陽性/陰性別による生存曲線 (文献 19 より引用)

近年の学会では治療途中の PET に関する前向きな臨床試験が報告がされるようになってきているが、実地臨床において治療途中の PET の結果により戦略を変更するような治療を行なうには時期尚早である。

### 参考文献

- 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* 328: 1002-1006, 1993
- 2) 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
- 3) 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* 7: 379-

- 391, 2006
- 4) 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
  - 5) Armitage J, Vose J, Weisenburger D: International peripheral T-cell and natural killer/T-cell lymphoma study: pathology findings and clinical outcomes. *J Clin Oncol* 26: 4124-4130, 2008
  - 6) Savage KJ, Harris NL, Vose JM et al: ALK- anaplastic large-cell lymphoma is clinically and immunophenotypically different from both ALK+ ALCL and peripheral T-cell lymphoma, not otherwise specified; report from the International Peripheral T-Cell Lymphoma Project. *Blood* 111: 5496-5504, 2008
  - 7) Escalon MP, Liu NS, Yang Y et al: Prognostic factors and treatment of patients with T-cell non-Hodgkin lymphoma: the M. D. Anderson Cancer Center experience. *Cancer* 103: 2091-2098, 2005
  - 8) Gallamini A, Stelitano C, Calvi R et al: Peripheral T-cell lymphoma unspecified (PTCL-U) ; a new prognostic model from a retrospective multicentric clinical study. *Blood* 103: 2474-2479, 2004
  - 9) Haioun C, Lepage E, Gisselbrecht C et al: Benefit of autologous bone marrow transplantation over sequential chemotherapy in poor-risk aggressive non-Hodgkin's lymphoma; updated results of the prospective study LNH87-2. Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte. *J Clin Oncol* 15: 1131-1137, 1997
  - 10) Gisselbrecht C, Lepage E, Molina T et al: Shortened first-line high-dose chemotherapy for patients with poor-prognosis aggressive lymphoma. *J Clin Oncol* 20: 2472-2479, 2002
  - 11) 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* 21: 1255-1262, 2003
  - 12) 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* 350: 1287-1295, 2004
  - 13) Rodriguez J, Conde E, Gutierrez A et al: Frontline autologous stem cell transplantation in high-risk peripheral T-cell lymphoma; a prospective study from The Gel-Tamo Study Group. *Eur J Haematol* 79: 32-38, 2007
  - 14) Mercadal S, Briones J, Xicoy B et al: Intensive chemotherapy (high-dose CHOP/ESHAP regimen) followed by autologous stem-cell transplantation in previously untreated patients with peripheral T-cell lymphoma. *Ann Oncol* 19: 958-963, 2008
  - 15) Gallamini A, Zaja F, Patti C et al: Alemtuzumab (Campath-1H) and CHOP chemotherapy as first-line treatment of peripheral T-cell lymphoma; results of a GITIL (Gruppo Italiano Terapie Innovative nei Linfomi) prospective multicenter trial. *Blood* 110: 2316-2323, 2007
  - 16) Micallef IN, Kahl BS, Maurer MJ et al: A pilot study of epratuzumab and rituximab in combination with cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone chemotherapy in patients with previously untreated, diffuse large B-cell lymphoma. *Cancer* 107: 2826-2832, 2006
  - 17) Ganjoo KN, An CS, Robertson MJ et al: Rituximab, bevacizumab and CHOP (RA-CHOP) in untreated diffuse large B-cell lymphoma: safety, biomarker and pharmacokinetic analysis. *Leuk Lymphoma* 47: 998-1005, 2006
  - 18) Sehn LH, Donaldson J, Filewich A et al: Rapid infusion rituximab in combination with corticosteroid-containing chemotherapy or as maintenance therapy is well tolerated and can safely be delivered in the community setting. *Blood* 109: 4171-4173, 2007
  - 19) Spaepen K, Stroobants S, Dupont P et al: Early restaging positron emission tomography with (18)F-fluorodeoxyglucose predicts outcome in patients with aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *Ann Oncol* 13: 1356-1363, 2002



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

# Leukemia Research

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/leukres](http://www.elsevier.com/locate/leukres)



## Aberrant DNA methylation of the *p57KIP2* gene is a sensitive biomarker for detecting minimal residual disease in diffuse large B cell lymphoma

Kazumi Hagiwara<sup>a</sup>, Yinghua Li<sup>a,b</sup>, Tomohiro Kinoshita<sup>c</sup>, Shinji Kunishima<sup>a</sup>, Haruhiko Ohashi<sup>a</sup>, Tomomitsu Hotta<sup>a</sup>, Hirokazu Nagai<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Clinical Research Centre, National Hospital Organization, Nagoya Medical Center, 4-1-1 Sannomaru, Naka-ku, Nagoya 460-0001, Japan

<sup>b</sup> Department of Hematology, First Clinical College of Harbin Medical University, Harbin, China

<sup>c</sup> Department of Hematology and Oncology, Nagoya University Graduate School of Medicine, Nagoya, Japan





## Aberrant DNA methylation of the *p57KIP2* gene is a sensitive biomarker for detecting minimal residual disease in diffuse large B cell lymphoma

Kazumi Hagiwara<sup>a</sup>, Yinghua Li<sup>a,b</sup>, Tomohiro Kinoshita<sup>c</sup>, Shinji Kunishima<sup>a</sup>, Haruhiko Ohashi<sup>a</sup>, Tomomitsu Hotta<sup>a</sup>, Hirokazu Nagai<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Clinical Research Centre, National Hospital Organization, Nagoya Medical Center, 4-1-1 Sannomaru, Naka-ku, Nagoya 460-0001, Japan

<sup>b</sup> Department of Hematology, First Clinical College of Harbin Medical University, Harbin, China

<sup>c</sup> Department of Hematology and Oncology, Nagoya University Graduate School of Medicine, Nagoya, Japan

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 14 February 2009

Received in revised form 22 June 2009

Accepted 24 June 2009

Available online 18 July 2009

#### Keywords:

DLBCL

MRD

Methylation

*p57KIP2* gene

### ABSTRACT

The detection of minimal residual disease (MRD) in bone marrow is very important in the clinical management of malignant lymphoma. So far, the assessment of MRD in cases of diffuse large B cell lymphoma (DLBCL) has had some technical limitations, such as requiring patient-specific primers and complicated experimental steps. To resolve these problems, we applied a tumor-specific epigenetic alteration of the *p57KIP2* gene as a biomarker for detecting MRD in DLBCL. The methylation of the *p57KIP2* gene was analyzed in 63 cases of DLBCL by methylation-specific real-time quantitative PCR. Methylation of the *p57KIP2* gene was detected in 53 (84.1%) of these 63 cases of DLBCL. We could detect one *p57KIP2* gene-methylated cell among 10,000 unmethylated cells by the serial dilution experiment. This sensitivity is proved to be equivalent to that of detection of *bcl2/IgH* rearrangement by real-time quantitative PCR. This sensitivity could be converted to the detection of two methylated genomes per reaction. Using clinical material, the same results were confirmed. In this study, we established a convenient and universal method for detecting MRD in DLBCL. This technique is applicable for over 80% of patients with DLBCL. This could promote systemic MRD studies in the area of DLBCL.

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

The t(14;18)(q32;q21) translocation, which causes a *bcl2/IgH* gene rearrangement [1], is a characteristic chromosomal abnormality found mainly in B cell lymphomas and its detection and quantification is useful for monitoring minimal residual disease (MRD) in the bone marrow of follicular lymphoma cases [2–5]. However, in diffuse large B cell lymphoma (DLBCL), the frequency of this rearrangement is relatively low [6,7]. The most widely used method for detecting MRD in DLBCL is to identify the clonal B cells with an *IgH* variable region (VH) sequence similar to that of the original lymphoma lesion; this method was originally established to detect MRD in B-cell leukemia [8–10]. This technique is available for about 70% of DLBCL cases. The DNA sequence of the VH region for each patient is required and VH sequence-specific original primers must be designed. For real-time quantitative polymerase chain reaction (RQ-PCR), several probes are also required [10]. Thus, a universal and conventional method for detecting MRD in DLBCL is eagerly awaited.

Generally, malignancies have specific genetic or epigenetic alterations of oncogenes or tumor suppressor genes, absent in normal tissues. Several kinds of tumor suppressor genes were inactivated by aberrant DNA methylation in lymphoid malignancies [11,12]. Such DNA methylation has been used to detect malignant cells in many kinds of tumors. This concept was also applied to the RQ-PCR technique [13]. Quantitative analysis using methylation-specific RQ-PCR (MS-RQ-PCR) was able to detect minimal tumor cell contamination in blood plasma or urine in breast cancer, hepatocellular carcinoma, and prostate cancer [14–16], suggesting that the method is sufficiently sensitive and specific to detect several copies of a tumor genome. MS-RQ-PCR has already been used to detect MRD in acute myeloid leukemia [17].

The *p57KIP2* gene is a cyclin-dependent kinase inhibitor in the kinase-interacting protein (KIP) family. In particular, the *p57KIP2* gene is located at chromosome 11p15.5, a region implicated in sporadic cancers, including those of the breast [18], liver [19], and bladder [20]. We previously revealed that the promoter region of the *p57KIP2* gene is frequently methylated in B cell lymphomas [21]. The *p57KIP2* gene has been reported to be inactivated by DNA methylation in acute lymphocytic leukemia [22] and lung cancer [23]. The frequent inactivation and other aspects of this gene function suggest that *p57KIP2* gene is a strong candidate for a tumor

\* Corresponding author. Fax: +81 52 951 9075.

E-mail address: [nagaih@nnh.hosp.go.jp](mailto:nagaih@nnh.hosp.go.jp) (H. Nagai).

**Table 1**  
Primers and probes sequences used in this study.

Gene	Primer name	Sequence (5'→3')
$\beta$ -Actin	mACTB-U	TGGTGATGGAGGAGTTTAGTAAGT
	mACTB-L	AACCAATAAAACCTACTCTCCCTTAA
	Probe	FAM-ACCACCACCCAACACACAATAACAAACACA-TAMRA
p57KIP2	mp57-U	CGTATAAAGGGGGCGTAGGC
	mp57-L	CGCCTATCTCGTCCGAAGG
	Probe	FAM-TTGGCGCTTTTATAGGTTAAGTGCCTGT-TAMRA
BCL2-MBR	MBR	TTTAGAGAGTTCCTTACGTGGC
	JH	ACTCACCTGAGGAGACGGTGAC
	Probe	FAM-TTTCACACACAGACCCAGAGCC-TAMRA
BCL2-internal	BCL2-R1	GCAATTCGGCATTTAATTCATGG
	BCL2-R2	GAAACAGGCCACCTAAAGCAAC
	Probe	FAM-TCCAGATGGCAAATGACCAGCAGA-TAMRA

suppressor gene in DLBCL. Therefore, the aberrant DNA methylation of the *p57KIP2* gene could be a good biomarker for DLBCL.

We investigated the possibility of *p57KIP2* gene promoter methylation for MRD detection in B cell lymphoma, especially in DLBCL. A sensitive and specific method for detecting MRD in DLBCL using MS-RQ-PCR of the *p57KIP2* gene was established. This is a conventional procedure requiring just one set of common primers and one probe and is applicable for about 84% of patients with DLBCL.

## 2. Materials and methods

### 2.1. DNA preparation from clinical samples and cell lines

Genomic DNA was isolated by the standard method of proteinase K digestion and phenol–chloroform extraction. We examined the DNA from 63 biopsied lymph nodes of patients with DLBCL at the time of initial diagnosis, peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of 54 healthy volunteers, and bone marrow mononuclear cells (BMMNCs) of 14 non-malignant hematologic diseases (aplastic anemia and idiopathic thrombocytopenic purpura). Informed consent was obtained from all patients and healthy subjects. For the determination of the detection limit, we used two cell lines that have fully methylated and unmethylated *p57KIP2* promoters: SU-DHL-6 and K562, respectively.

### 2.2. Bisulfite modification

For the methylation analysis, genomic DNA extracted from clinical samples and cell lines was processed for bisulfite modification using a Methylamp™ DNA Modification Kit (Epigentek, New York, NY) according to the manufacturer's protocol. The bisulfite-modified DNA was stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until use.

### 2.3. Primers and probes

The sequences of primers and probes used for real-time PCR are shown in Table 1. For the MS-RQ-PCR to analyze *p57KIP2* gene methylation, two sets of PCR primers and probes, designed specifically for the bisulfite-modified DNA sequences, were used as described [24]: a set representing fully methylated DNA for the promoter of the *p57KIP2* gene and an internal reference set for  $\beta$ -actin to normalize for input DNA. For the RQ-PCR to detect the major breakpoint region (MBR) of *bcl2/IgH* translocation, two additional sets of PCR primers and probes were used as described [5]: one set that amplifies the MBR region in *bcl-2* and a reference set that amplifies the *bcl-2* sequence as an internal control. The primers were obtained from SIGMA Genosys Japan (Hokkaido, Japan). The probes, labeled with FAM at the 5' end and the quencher TAMRA at the 3' end, were obtained from Applied Biosystems (Foster City, CA, USA).

### 2.4. Real-time methylation-specific PCR for methylation of the *p57KIP2* promoter

Bisulfite-modified DNA was used as a template for fluorescence-based real-time PCR. The final volume for each PCR reaction was 25  $\mu\text{l}$ , containing 400 nM of each primer, 200 nM of probe, 0.75 U of Platinum Taq polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA), 200  $\mu\text{M}$  each of dNTPs, 2.5 mM (*p57KIP2* promoter) or 4.5 mM ( $\beta$ -actin) of  $\text{MgCl}_2$ , and 50 nM of ROX reference dye (Invitrogen). The reaction conditions were as follows:  $95^{\circ}\text{C}$  for 5 min, followed by 45 cycles of  $95^{\circ}\text{C}$  for 15 s and  $60^{\circ}\text{C}$  for 1 min. The reactions were carried out in a 96-well reaction plate in a 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems).

### 2.5. Real-time PCR for *bcl-2/IgH* MBR translocation

Genomic DNA was used as a template for fluorescence-based real-time PCR. The reaction mixture contained 400 nM (MBR) or 100 nM (internal *bcl-2*) of each

primer, 250 nM (MBR) or 150 nM (internal *bcl-2*) of probe, and TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems). The reaction conditions were as follows:  $50^{\circ}\text{C}$  for 2 min,  $95^{\circ}\text{C}$  for 5 min, followed by 45 cycles of  $95^{\circ}\text{C}$  for 15 s, and  $60^{\circ}\text{C}$  for 1 min. The reactions were carried out in a 96-well reaction plate in a 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems).

### 2.6. Sensitivity of real-time PCR assay

SU-DHL-6 DNA was serially diluted in 10-fold increments up to  $1:10^5$  with K562 DNA. The SU-DHL-6 cell line has a fully methylated promoter region of *p57KIP2* and MBR translocation, while the K562 cell line is unmethylated and negative for translocation. For real-time methylation-specific PCR, the diluted DNA was modified with sodium bisulfite and then used as a template. For MBR real-time PCR, the diluted DNA was used without bisulfite modification. A conversion factor of 6.6 pg of DNA per diploid cell was used for expressing quantitative results in genome-equivalents [25]. One genome-equivalent was defined as the amount of a particular target sequence in a single reference cell.

### 2.7. Clinical characteristics of patients with DLBCL

The clinical parameters consisting international prognostic index (IPI) [26] of 63 DLBCL patients analyzed were collected. The difference of these parameters between *p57KIP2* methylated and non-methylated patients were evaluated using the Mann–Whitney *U*-test for continuous variables and the  $\chi^2$ -test for categorical variables.

## 3. Results

### 3.1. *p57KIP2* gene promoter methylation in DLBCL

We examined 63 biopsied lymph nodes from patients with primary DLBCL at the time of diagnosis for *p57KIP2* DNA methylation by MS-RQ-PCR. Methylation of the *p57KIP2* gene was detected in 53 (84.1%) of these samples. The quantification was performed by comparison with the SU-DHL-6 cell line, which is fully methylated in the *p57KIP2* gene. The calculated amount of methylated *p57KIP2* gene was distributed from one to 1/64 fold of the SU-DHL-6 cell line among patients. Representative amplification plots of MS-RQ-PCR are shown in Fig. 1. We also analyzed PBMCs from 54 healthy volunteers and BMMNCs from 14 non-malignant hematologic diseases, and the methylated *p57KIP2* gene was undetected (data not shown).

We compared the clinical variables consisting IPI and IPI itself between 53 methylated and 10 unmethylated patients, but statistical differences were not observed (Table 2).

### 3.2. Detection of the rearrangement of *bcl2/IgH* (MBR) by RQ-PCR in DLBCL

All 63 biopsied lymph nodes were subjected to the analysis of *bcl2/IgH* rearrangement by RQ-PCR. Seven (11.1%) of the 63 patients with DLBCL showed this rearrangement. This ratio was slightly

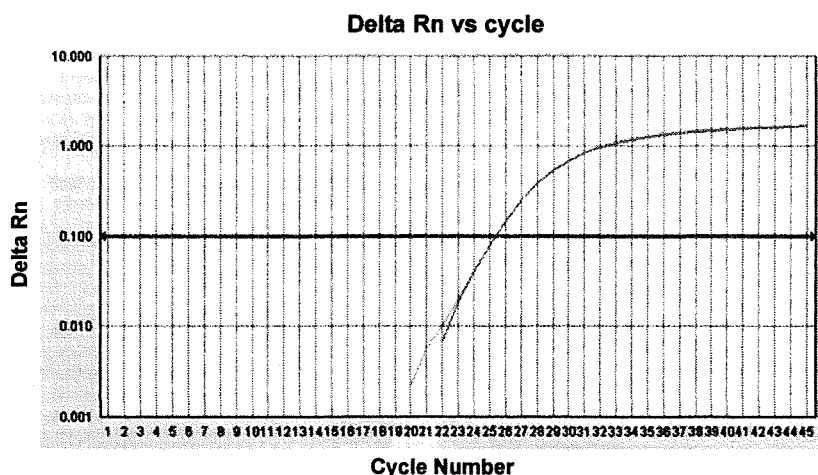


Fig. 1. A representative amplification plot for the p57KIP2 gene MS-RQ-PCR analysis of a DLBCL DNA sample. X-axis, the cycle number of quantitative PCR; Y-axis,  $\Delta Rn$ , the fluorescence intensity over the background.

Table 2  
IPI score of DLBCL patients (n = 63).

	IPI				p
	L	LI	HI	H	
p57KIP2 methylation					
+(n = 53)	22	15	9	7	p = 0.836 <sup>a</sup>
-(n = 10)	4	2	3	1	

L: low risk; LI: low intermediate risk; HI: high intermediate risk; H: high risk.

<sup>a</sup> Mann-Whitney U-test.

lower than that of a previous report [27]. All of these seven patients also had p57KIP2 methylation.

3.3. The sensitivity of MS-RQ-PCR for the p57KIP2 gene

We performed a dilution experiment using cell line DNA to determine the detection limit of the real-time PCR assay. We prepared serial dilutions of SU-DHL-6 with K562 DNA. SU-DHL-6 DNA has a fully methylated p57KIP2 gene promoter and MBR translocation, while K562 has an unmethylated promoter and is negative for translocation. This serial dilution was prepared for the real-time

PCR to detect both p57KIP2 gene methylation and MBR translocation. All of the samples contained approximately equal amounts of DNA, as was evident from the overlapping  $\beta$ -actin and BCL2-internal curves (data not shown). For the MS-RQ-PCR of the p57KIP2 gene and the RQ-PCR of the bcl2/IgH rearrangement, the first input DNA used as a template was approximately 112.5 ng and 100 ng, respectively. The target DNA could be detected at a dilution of  $10^{-4}$  in both reactions (Fig. 2). This sensitivity corresponds to 1.7 genome-equivalents and 1.5 genome-equivalents, respectively. Considering the loss of DNA during the bisulfite modification, the real input DNA was less than the calculated amount.

The sensitivity was also examined using a bone marrow sample of DLBCL that showed both bcl2/IgH rearrangement and p57KIP2 gene methylation in the primary lymphoma lesion. The lymphoma cell invasion of bone marrow of this patient was negative by microscopic examination and flow cytometric analysis. We could detect bcl2/IgH rearrangement and p57KIP2 gene methylation by RQ-PCR in the bone marrow of this patient. The calculated percentage of lymphoma cell contamination in the bone marrow was 0.1% based on bcl2/IgH rearrangement and 0.09% based on p57KIP2 gene methylation. The bone marrow DNA of this patient was serially diluted and subjected to MS-RQ-PCR of p57KIP2 and RQ-PCR of bcl2/IgH MBR rearrangement. We found similar sensitivity for the detection

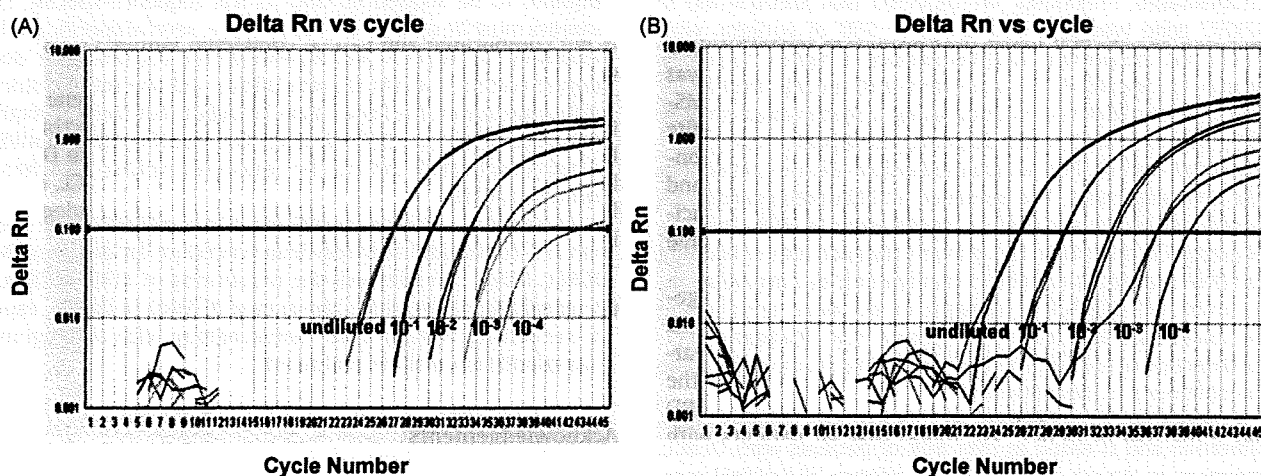
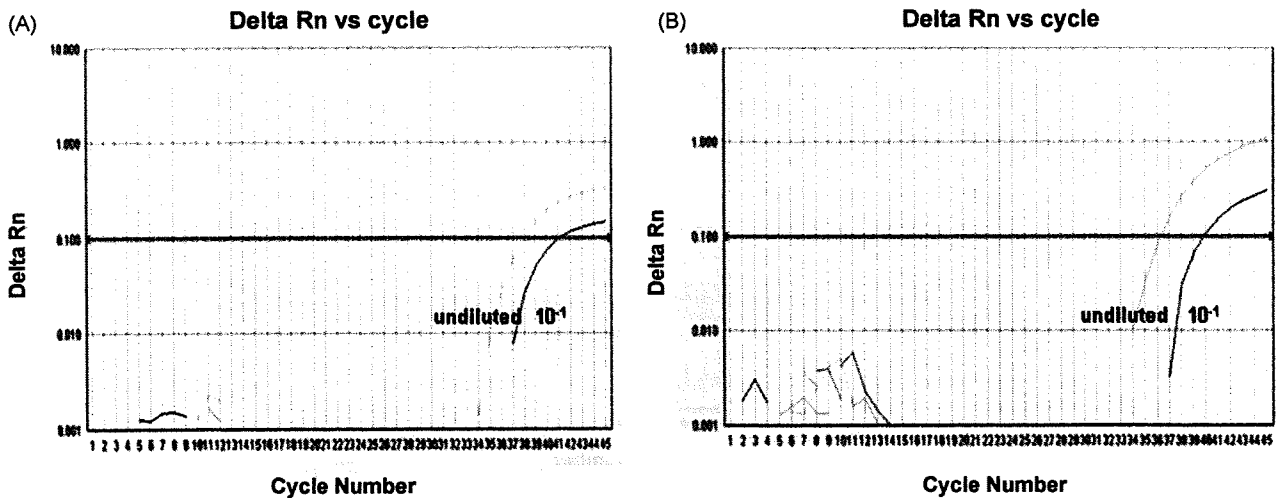


Fig. 2. A comparison of detection sensitivities between the MS-RQ-PCR analysis of p57KIP2 gene and RQ-PCR of major breakpoint region (MBR) of bcl2/IgH translocation. The genomic DNA of SU-DHL-6 (fully methylated p57KIP2 gene and carrying bcl2/IgH translocation) was serially diluted by the genomic DNA of K562 (absence of p57KIP2 gene methylation and bcl2/IgH translocation). (A) The amplification plot for p57KIP2 gene MS-RQ-PCR. (B) The amplification plot of bcl2/IgH translocation RQ-PCR. The target DNA was detected at a dilution of  $10^{-4}$  in both reactions. X-axis, the cycle number of quantitative PCR; Y-axis,  $\Delta Rn$ , the fluorescence intensity over the background.



**Fig. 3.** The detection of MRD in bone marrow of a DLBCL patient with methylated *p57KIP2* gene and *bcl2/IgH* translocation. (A) The amplification plot for *p57KIP2* gene MS-RQ-PCR. (B) The amplification plot of *bcl2/IgH* translocation RQ-PCR. The percentages of the lymphoma cell bone marrow contamination were calculated as 0.09% and 0.1% by each method at undiluted condition, respectively. The target DNA was detected at a dilution of  $10^{-1}$  in both reactions. X-axis, the cycle number of quantitative PCR; Y-axis,  $\Delta Rn$ , the fluorescence intensity over the background.

of lymphoma cell contamination in bone marrow by MS-RQ-PCR of *p57KIP2* (0.015%) compared to RQ-PCR of *bcl2/IgH* MBR rearrangement (0.01%) in clinical material (Fig. 3). Two genomes per reaction could be detected by both methods.

#### 4. Discussion

Aberrant DNA methylation of a tumor suppressor gene is a tumor-specific biomarker and has been used to detect minimal tumor contamination.

In this study, the high frequency of methylation of the *p57KIP2* gene in DLBCL and the sufficient sensitivity for detecting MRD by MS-RQ-PCR of the *p57KIP2* gene was demonstrated. The *p57KIP2* methylation status did not affect the prognostic variables in DLBCL patients. This biomarker might be universal for DLBCL. We could not detect the methylated DNA fragments from 68 non-malignant subjects; therefore the low possibility of false positive was demonstrated. Previously, we reported that methylation of the *p57KIP2* gene was observed about in 55% of patients with DLBCL [21], but the present analysis showed a higher frequency. Methylation-specific RQ-PCR is a sensitive and specific method for detecting aberrant DNA methylation using a methylation-specific probe. Our previous method for detecting methylation was classical methylation-specific PCR, which used primers to anneal bisulfite modified DNA sequences. The presence of DNA methylation was determined just by the successful amplification by PCR. The MS-RQ-PCR method in this study uses primers that will anneal bisulfite modified DNA sequences and detect methylation by a methylation-specific probe. MS-RQ-PCR is thought to be more specific and sensitive than classical methylation-specific PCR. The higher incidence of detection of *p57KIP2* methylation in this study might come from the difference in the methods.

The methylation of the *p57KIP2* gene is a tumor-specific epigenetic alteration and is found in over 80% of patients with DLBCL. This frequency is almost equal to the incidence of *bcl2/IgH* rearrangement in follicular lymphoma. Thus, the methylation of the *p57KIP2* gene could be a very good biomarker for detecting MRD in the bone marrow of DLBCL. We found that all patients with DLBCL with *bcl2/IgH* rearrangement had *p57KIP2* DNA methylation; therefore, the combination of these two markers will not expand the applicability for MRD of DLBCL. The sensitivity for detecting *p57KIP2* methylation by MS-RQ-PCR and *bcl2/IgH* MBR rearrangement was compared. Both markers were equivalent in sensitivity

for the detection of MRD. We could detect two copies of the *p57KIP2* methylated genome per reaction with 25 ng input DNA. This could be converted to a sensitivity for the detection of one lymphoma cell out of 10,000 unaffected cells. This ability for MRD analysis by *p57KIP2* methylation was also demonstrated in clinical samples. This sensitivity is thought to be sufficient for the clinical use in the detection of MRD in lymphoma.

So far, convenient and general methods for examining MRD in DLBCL have not been established. In follicular lymphoma, *bcl2/IgH* rearrangement has been utilized for MRD analysis because of the very high occurrence of this genomic alteration in this type of lymphoma. However, the rearrangement of *bcl2/IgH* is not especially frequent in DLBCL, with a range of 12–30% [27]. The identification of the clonal B cell with a *IgH* variable region (VH) sequence similar to that of the original lymphoma lesion was applied for the detection of MRD in DLBCL. This technique is appropriate about for 70% of patients with DLBCL. The VH region of each patient is required to be sequenced and its VH sequence-specific original primers must be designed. Furthermore, several specific probes are necessary for RQ-PCR. MS-RQ-PCR of the *p57KIP2* gene does not require patient-specific manipulations and one set of primers and probes are applicable for all cases of DLBCL that show aberrant DNA methylation of the *p57KIP2* gene. The bisulfite DNA modification is not complicated and can be completed within 1 h when using commercial kits.

As shown in this study, MS-RQ-PCR of *p57KIP2* gene methylation is a convenient and universal procedure for detecting MRD in DLBCL. Using this method, the monitoring of MRD in DLBCL will be generalized; therefore, the survey of MRD in DLBCL, especially in the setting of high-dose chemotherapy with autologous stem transplantation, will be promoted.

#### Conflicts of interest

There are no conflicts of interest.

#### Acknowledgements

This work was supported by grants to H.N. from the Japan Society for the Promotion of Science (nos. 16590970 and 19591150) and the Ministry of Health, Labor and Welfare (Grant-in-Aid for Cancer Research 15-11), Japan.