

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いくものではなかった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・エンドポイントとして 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¹⁾。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



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（ドキソルビシン，ブレオマイシン，ピンブラスチン，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，ドキソルビシン，ピンクリスチン，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、プレドニゾロン；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

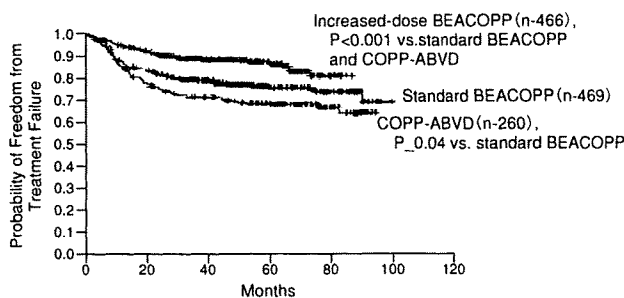
性で優れていることが RCT で示され³⁾、今日の標準的治療とされている。近年、ドイツの研究グループは薬剤総投与量の増加と投与期間の短縮を目的とした G-CSF (顆粒球コロニー刺激因子) 併用の増量 BEACOPP (ブレオマイシン、エトポシド、ドキソルビシン、シクロホスファミド、ビンクリスチン、プロカルバジン、プレドニゾロン) 療法と標準量 BEACOPP 療法、COPP (シクロホスファミド、ビンクリスチン、プロカルバジン、プレドニゾロン) -ABVD 交替療法の3群間 RCT を実施し、増量 BEACOPP 療法の生存割合が ABVD 療法を有意に上回ることを報告した (図1)⁴⁾。予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。

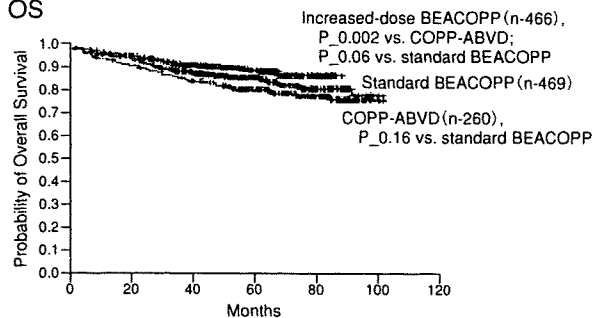
近年、B細胞リンパ腫に対して開発された抗 CD20モノクローナル抗体 (リツキシマブ) は単独でも高い奏効が得られ、CHOP 療法との併用によってさらに優れた奏効割合が示された⁵⁾。最近、ドイツ

A) FFT



Number at Risk	260	239	216	162	60	1
COPP-ABVD						
Standard BEACOPP	469	438	342	163	72	0
Increased-dose BEACOPP	466	442	352	153	21	0

B) OS



Number at Risk	260	239	216	162	60	1
COPP-ABVD						
Standard BEACOPP	469	438	342	163	72	0
Increased-dose BEACOPP	466	442	352	153	21	0

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)

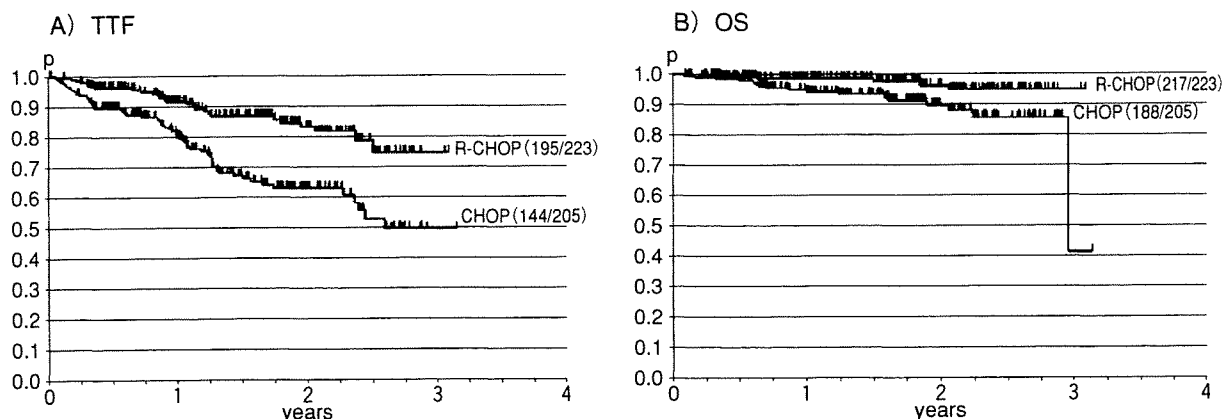


図 2

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

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

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援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援化学療法継続群の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援療法で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法と位置づけられている。なお、救援療法、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

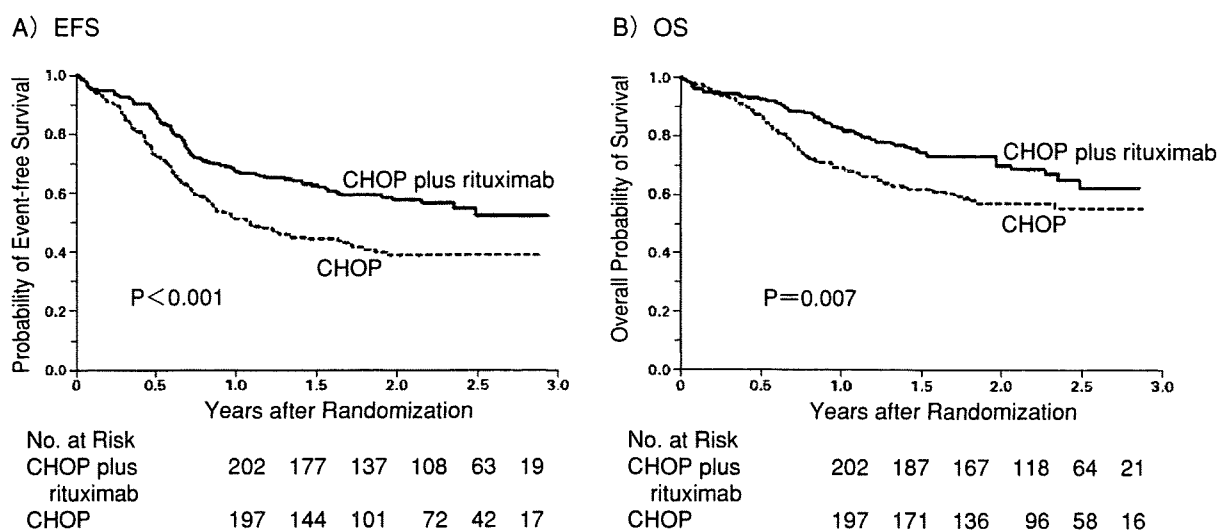


図3

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 iburitomomab 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

Original Article

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@nnh.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'-CGACCCTCCCGTCAATTGTT-3'; exon1 reverse, id4EX1R, 5'-TACCCTCCAACCACCGCAC-3'; exon2 forward, id4EX2F, 5'-TGATTTCCGAGGACAATCC 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

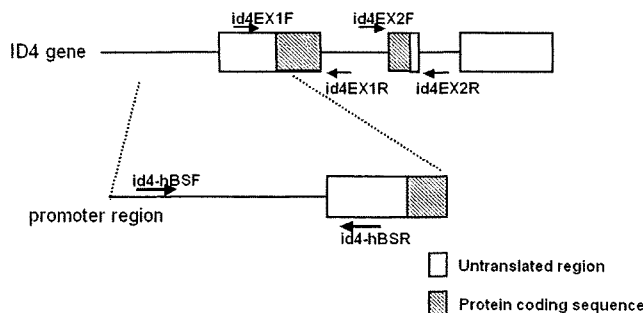


Fig. 1. Genomic structure of the *ID4* gene and locations of primers used in this study. The *ID4* gene has three exons. Open rectangles indicate non-coding regions and shaded rectangles indicate coding regions of *ID4*.

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 GATTTTT-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-

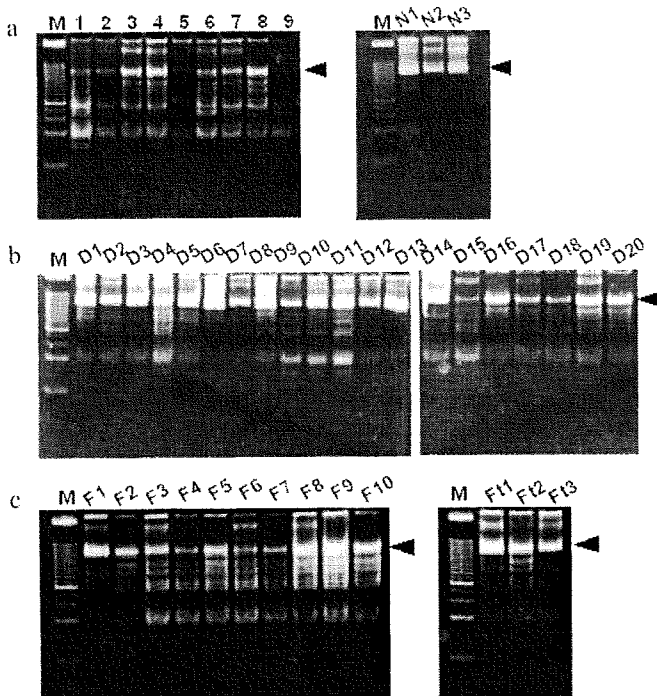


Fig. 2. Methylation analysis by COBRA of the 5' promoter region of the *ID4* gene in lymphoid cell lines and primary lymphomas. PCR products were digested with a restriction enzyme (*Bst*UI) that cleaves CpG sites retained after bisulfite treatment because of methylation. The arrow indicates PCR products 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 PBMNCs. 1: NAMALWA, 2: RAJI, 3: DAUDI, 4: HS-SULTAN, 5: IM-9, 6: THP-6, 7: BALL-1, 8: JURKAT, 9: RAMOS, N1: normal PBMNC 1, N2: normal PBMNC 2, N3: normal PBMNC 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

Remission of lymphoma after withdrawal of methotrexate in rheumatoid arthritis: Relationship with type of latent Epstein-Barr virus infection

Takuya Miyazaki,^{1*} Katsumichi Fujimaki,¹ Yukari Shirasugi,² Fumiaki Yoshida,² Manabu Ohsaka,³ Koji Miyazaki,³ Etsuko Yamazaki,⁴ Rika Sakai,⁴ Jun-ichi Tamaru,⁵ Kenji Kishi,² Heiwa Kanamori,¹ Masaaki Higashihara,³ Tomomitsu Hotta,² and Yoshiaki Ishigatsubo¹

¹ Department of Internal Medicine and Clinical Immunology, Yokohama City University Graduate School of Medicine, Kanagawa, Japan

² Department of Hematology, Tokai University School of Medicine, Kanagawa, Japan

³ Department of Hematology, Kitasato University School of Medicine, Kanagawa, Japan

⁴ Department of Hematology and Immunology, Fujisawa City Hospital, Kanagawa, Japan

⁵ Department of Pathology, Saitama Medical Center, Saitama, Japan

Rheumatoid arthritis (RA) is associated with an increased risk of developing lymphoma. Although the pathogenesis is still unclear, the increased risk appears to be related to the high inflammatory activity of RA, immunosuppressive agents, or Epstein-Barr virus (EBV) infection. We investigated the relationship between EBV latent infection and methotrexate (MTX)-associated lymphoma in RA patients. Nine patients were diagnosed with non-Hodgkin's lymphoma (NHL) during MTX treatment for RA in a multicenter study. The pathologic findings were consistent with diffuse large B-cell lymphoma in 8 patients and peripheral T-cell lymphoma, unspecified in 1. EBV infection was detected in 3 patients by *in situ* hybridization. Among all 9 patients who were initially treated by MTX withdrawal alone, 2 obtained spontaneous complete response (CR), 1 had partial response, 2 had stable disease (SD), and 4 had progressive disease. Both patients who had a CR and 1 who had SD were positive for EBV. Further examination of the latent EBV infection patterns revealed that 2 patients who obtained a CR had latency Type III, and the other with SD had latency Type II. These results demonstrate that immunodeficiency caused by MTX treatment is associated with the development of EBV-related NHL in RA patients. In patients who were treated by MTX for RA and developed NHL, remission can be observed following MTX withdrawal especially in NHL with latency Type III EBV infection. The analysis of EBV infection, including the latency types, is useful to decide the optimum therapeutic strategy. *Am. J. Hematol.* 82:1106–1109, 2007. © 2007 Wiley-Liss, Inc.

Introduction

It is well known that rheumatoid arthritis (RA) is associated with an increased risk of developing lymphoma [1–3]. According to recent epidemiologic studies, the relative risk of developing lymphoma is estimated to be two-times higher in patients with RA or rheumatologic diseases, and the increased risk is greater for Hodgkin lymphoma (HL) than for non-Hodgkin's lymphoma (NHL) [1–5]. Although the pathogenesis of RA-associated lymphoma is still unclear, it is speculated that the increased risk is related to the high inflammatory activity of rheumatologic disease, immunosuppressive agents, or Epstein-Barr virus (EBV) infection [1–16].

Methotrexate (MTX) is currently the most widely used disease-modifying anti-rheumatic drug. Lymphoma has been reported to be a complication of long-term, low-dose MTX treatment. In 1993, Kamel et al. [6] reported that two patients taking MTX for rheumatologic disease who developed lymphoma had a complete regression after withdrawal of MTX alone. Other studies also showed that some MTX-associated lymphomas in RA patients regressed after the withdrawal of MTX alone and do not require treatment with chemotherapy and/or radiation [5,7,11,17–19]. These observations suggest that immunosuppression by MTX may affect development of lymphoma in RA patients, although it is not clear that MTX treatment causes a higher risk of lymphoma than other anti-rheumatoid agents.

Furthermore, EBV infection is often detected in RA-related lymphoma [5,7,9,19–22]. It has been suspected that

latent EBV infection may participate in development of lymphoma in RA patients, like EBV-associated B-cell lymphoproliferative disorders occurring in immunosuppressed patients [23,24]. EBV-positive malignancies are associated with the virus's latent cycle, and three different types of EBV latency have been characterized [2,25–27]. Latency Type III EBV infection is usually expressed in lymphoproliferative disorders arising in an immunocompromised host with impaired T-cell immunosurveillance. However, the relationship between the MTX-associated lymphoma in RA patients and the type of EBV latent infection is not yet established. In this study, we investigated the clinical characteristics of lymphomas developing in RA patients receiving MTX and evaluated the association between the pattern of latent EBV infection and the response to MTX withdrawal.

Contract grant sponsor: Yokohama Foundation for the Advancement of Medical Science.

*Correspondence to: Takuya Miyazaki, MD, Department of Internal Medicine and Clinical Immunology, Yokohama City University Graduate School of Medicine, 3–9 Fukuura, Kanazawa-ku, Yokohama 236-0004, Japan.
E-mail: miyazaki_takuya@ybb.ne.jp

Received for publication 18 January 2007; Revised 15 April 2007; Accepted 25 April 2007

Am. J. Hematol. 82:1106–1109, 2007.

Published online 25 July 2007 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).

DOI: 10.1002/ajh.21003

© 2007 Wiley-Liss, Inc.

American Journal of Hematology

1106

<http://www3.interscience.wiley.com/cgi-bin/jhome/35105>

TABLE I. Characteristics of the 9 RA Patients With NHL Taking MTX

Patient no.	Age/sex	Pathology	Primary location	Clinical stage	Duration of RA (m)	Duration of MTX (m)	Total MTX dose (mg)	Other RA treatment	CRP (mg/dl)	RF (IU/ml)
1	68/F	DLBCL	Nodal	II	88	88	1511	P, Bu	1.2	20
2	70/F	DLBCL	Nodal	I	231	99	2250	P	1.09	9
3	69/F	DLBCL	Extranodal	II	144	34	1020	P, Bu, Sa	0.92	757
4	53/F	DLBCL	Nodal	II	19	9	256	P	3.88	14
5	55/M	DLBCL	Nodal	IV	40	38	984	P	0.18	114
6	66/F	DLBCL	Nodal	III	161	77	420	P	0.6	117
7	69/M	DLBCL	Extranodal	IV	25	25	600	Bu	0.1	2.5
8	68/F	DLBCL	Nodal	III	139	114	1127	P, Mi, G	5.83	24
9	77/M	PTCL-u	Nodal	III	24	22	368	-	2.7	4.2

DLBCL, diffuse large B-cell lymphoma; PTCL-u, peripheral T-cell lymphoma, unspecified; P, prednisolone; Bu, bucillamine; Sa, salazosulapyridine; Mi, mizoribine; G, gold; CRP, C-reactive protein; RF, rheumatoid factor; m, month.

Results

Patient characteristics

The clinical characteristics of the lymphomas that developed in the RA patients taking MTX are summarized in Table I. At the time of lymphoma diagnosis, the median age was 68 years (range 53–77). According to the WHO classification, 8 patients had diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) and 1 had peripheral T-cell lymphoma, unspecified. Monoclonal proliferation of lymphoma cells were confirmed in all patients. Their clinical stages were distributed as follows: 1 patient had Stage I, 3 had Stage II, 3 had Stage III, and 2 had Stage IV disease. At diagnosis, 2 patients (22%) had extranodal lesions, including 1 gastrointestinal, 1 tonsillar. The median duration from the start of MTX treatment to the diagnosis of NHL was 38 months (range 9–114), and the median total dose of MTX at the diagnosis of NHL was 984 mg (range 256–2,250). Eight patients received other anti-rheumatoid agents in combination with MTX. In particular, prednisolone was used for 7 patients. Rheumatoid factor was positive in 6 patients and C-reactive protein level was elevated in 7 patients at the time of diagnosis for NHL. The duration of RA ranged from 19 to 231 months. Three patients were positive for EBV infection detected by in situ hybridization.

Clinical outcome and EBV infection

The response to therapy is summarized in Table II. All patients were initially managed by withdrawal of MTX. Among the 3 patients with EBV infection, 2 patients with DLBCL obtained a complete response (CR) of their NHL. The time from the MTX withdrawal to CR was 6 and 2 months, respectively. These patients are still alive in CR without additional chemotherapy for 109 and 18 months, respectively (Table II). One patient with stable disease (SD) was positive for EBER1. She obtained a CR following chemotherapy and is alive in CR at 26 months of follow-up. In an analysis of the latent EBV infection pattern, 2 patients with DLBCL who had a CR were categorized as having latency Type III, and 1 with DLBCL in the tonsil who had a SD was defined as having latency Type II (Table II).

On the other hand, among the 6 patients without EBV infection who were managed by MTX withdrawal, 1 patient obtained partial response, 1 had SD, and 4 experienced progressive disease. These patients subsequently received chemotherapy with or without radiotherapy.

Discussion

We analyzed the characteristics of 9 patients with RA who developed NHL while receiving MTX and examined the efficacy of MTX withdrawal and its association with the

type of EBV latent infection. To our knowledge, this is the first report of RA patients who developed NHL and had the Type III latency EBV infection seen in the immunocompromised host.

Lymphoma often develops in RA patients, but its pathogenesis has not yet been fully elucidated. Previous studies have suggested that high and long-standing inflammatory activity in RA, by itself, contributes to the development of lymphoma [1,4,8]. Recently, Baecklund et al. [28] identified 378 cases with RA developed lymphoma in Sweden. They found that RA patients with high cumulative disease activity, rather than its treatment, had a dramatically increased risk of developing lymphoma. Although our analysis contained patients who had RA of long duration and/or high RA disease activity, e.g., patients 2, 3, and 8, there was no obvious association with RA disease activity and lymphoma development. Our study also showed lymphoma development even in patients with a short duration of RA and/or low RA disease activity. In this study, DLBCL accounted for 89% of the cases. The high proportion of DLBCL is in accordance with previous reports on the development of lymphoma in RA patients [2,8,9,20]. In a prospective study by Mariette et al. [5], HL was found at a higher rate in RA patients taking MTX compared with the rate in a French population. In contrast, no patient developed HL in our study. This may be related to the fact that the frequency of HL in Japan is less than 10% of all lymphomas [29,30].

In this study, it is noteworthy that both patients who obtained a CR of their NHL after the withdrawal of MTX were positive for EBV. In previous studies, EBV infection has been detected in 12–44% of the lymphomas in RA patients [5,7,9,19,21,28]. These studies suggest that EBV infection may play a role in the development of these lymphomas. However, it is not evident whether EBV itself increases the risk of lymphoma development. In this study, EBV was detected in 3 patients (22%), 2 of whom had a CR of their NHL after the withdrawal of MTX. Mariette et al. [5] reported that 2 of the 3 patients who achieved a CR were positive for EBV. Salloum et al. [7] also reported that 5 of the 6 who had a CR were positive for EBV. Taken together, our results strengthen the concept that EBV-positive lymphoma in RA has a strong tendency to undergo a spontaneous remission after the withdrawal of MTX, although it is also true that there are some EBV-negative lymphomas which regress after MTX withdrawal [5,7,31,32].

Recently, it has been reported that EBV-associated tumors, such as lymphoma, nasopharyngeal carcinoma, and gastric carcinoma, express a variety of EBV latent genes [25–27]. By investigating EBV latent infection patterns, the immunodeficiency state of the lymphoma can be shown more clearly. Therefore, we analyzed the latency of

TABLE II. Response to MTX Withdrawal and Latency of EBV Infection

Patient no.	Effect of MTX withdrawal	Time to CR after MTX withdrawal (m)	Next treatment	Outcome	Follow-up time (m)	EBER1	LMP1	EBNA2	Latency type
1	CR	6	—	Alive in CR	109	+	+	+	III
2	CR	2	—	Alive in CR	18	+	+	+	III
3	SD	—	R-CHOP	Alive in CR	26	+	+	—	II
4	PD	—	R-CHOP	Alive in PR	9	—	NT	NT	NA
5	PD	—	VAD, CHOP-like, IF-RT, auto-PBSCT	Alive in CR	58	—	NT	NT	NA
6	PD	—	CHOP	Alive in CR	43	—	NT	NT	NA
7	PR	—	CHOP, IF-RT	Alive in CR	37	—	NT	NT	NA
8	SD	—	CyclOBEAP	Alive in CRu	3	—	NT	NT	NA
9	PD	—	CHOP	Death with infection	5	—	NT	NT	NA

CR, complete response; SD, stable disease; PD, progressive disease; PR, partial response; CRu, complete response unconfirmed; R, Rituximab; CHOP, cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisolone; VAD, vincristine, doxorubicin, and dexamethazone; IF-RT, involved field-radiation therapy; PBSCT, peripheral blood stem cell transplantation; CyclOBEAP, CHOP-like+etoposide and bleomycin; EBER1, EBV-encoded RNA transcript 1; EBNA2, Epstein-Barr nuclear antigen 2; LMP1, latent membrane protein 1; NT, not tested; NA, not available; m, month.

EBV-positive lymphomas in 3 patients. One patient was categorized as having latency Type II and the other 2 patients as latency Type III. Latency Type III indicates an immunodeficiency state and is associated with lymphoproliferative disorders arising in immunocompromised patients or post-transplant patients. It is believed that the EBV-associated tumors develop following the proliferation of latently EBV-infected B cells, which causes the suppression of the immunosurveillance system by cytotoxic T lymphocytes [3,25,26]. This phenomenon of latent EBV infection and immunosuppressive condition in RA patients developing lymphoma is very similar to post-transplant lymphoproliferative disorder. In our 2 patients having latency Type III, the immune surveillance system essentially might be abolished by the activity of MTX, allowing the EBV-infected B cells to grow aberrantly. It is also assumed that the withdrawal of MTX allowed the immune system to recover, resulting in complete regression of the lymphomas, although we did not examine the reconstitution of EBV-specific immunity in this study. Thus, our results strongly suggest that the immunodeficiency state itself is associated with the development of NHL, and the immunosuppression caused by MTX has an effect on the development and regression of NHL, especially in the latency Type III group of patients. In agreement with this hypothesis, a recent study has shown that MTX may induce EBV replication while producing immunosuppression [33].

Latency Type II EBV infection is generally observed in HL and nasopharyngeal lymphoma occurring in the immunocompetent host [2,20,27]. We confirmed that the patient with DLBCL in the tonsil had the latency Type II EBV infection in this study. The patient showed a SD after the withdrawal of MTX. It was considered that the infection of EBV influenced the pathogenesis of lymphoma development in the case, but MTX treatment for RA did not affect on the tumor progression. Therefore, there was no effect of MTX withdrawal in the patient.

Materials and Methods

Patients

We investigated the cases of NHL that developed in RA patients taking MTX in four hospitals in Kanagawa, Japan. A retrospective evaluation was conducted for the 9 patients who developed NHL from June 1995 to December 2004. The date of last observation was July 31, 2005. All lymphomas were classified according to the WHO classification [34]. An international workshop to standardize the response criteria for NHL was used to assess the effectiveness of treatment [35]. All

patients fulfilled the 1987 American College of Rheumatology criteria for RA [36].

Immunohistochemical staining

Immunohistochemical analyses of formalin-fixed, paraffin-embedded sections of neoplastic tissues were performed during the diagnostic work-up, using a panel of monoclonal antibodies to Epstein-Barr nuclear antigen 2 (EBNA2) (PE2, DakoCytomation, Glostrup, Denmark) and latent membrane protein 1 (LMP1) (CS.1-4, DakoCytomation). The heat antigen retrieval method was employed with different retrieval buffers depending on the antibody used, according to manufacturer's instructions. For CD20, CD45, and CD45RO, the heat antigen retrieval method was not used. To detect, a peroxidase-labelled streptavidin-biotin complex system (BioGenex, San Ramon, CA) was employed. Immunostaining was carried out with an automated immunostainer (i 6,000, BioGenex). Tissue sections were tested for the presence of EBV by *in situ* hybridization for EBV-encoded RNA transcript 1 (EBER1) using the REMBRANT detection kit (Pan Path, Amsterdam, The Netherlands). The definition of EBV infection latency employed in this study is as follows: latency Type I, characterized by the expression of the EBER1 message alone; latency Type II, characterized by the expression of EBER1 and LMP1; and latency Type III, characterized by the expression of EBER1, LMP1, and EBNA2.

Conclusion

Our results suggest that immunodeficiency caused by MTX treatment is associated with the development of EBV-related NHL in RA patients. In patients who were treated by MTX for RA and developed NHL, remission can be observed following MTX withdrawal especially in NHL with latency Type III EBV infection. Therefore, the analysis of EBV infection, including the latency types, is useful to decide the optimum therapeutic strategy in this setting. Further studies on a larger scale are required to clarify the role of EBV infection and MTX treatment in RA patients who develop lymphoma.

Acknowledgments

Authors thank Drs. Kengo Takeuchi, Shigeki Motomura, Shin Fujisawa, Hiroyuki Fujita, Naoto Tomita, Hideyuki Koharazawa, Takayoshi Tachibana, Eri Tanaka, Shigeki Watanabe, and all members of the Hematology Group of Yokohama City University and the Meeting of Young Hematologists in Kanagawa.

References

1. Wolfe F, Michaud K. Lymphoma in rheumatoid arthritis: The effect of methotrexate and anti-tumor necrosis factor therapy in 18,572 patients. *Arthritis Rheum* 2004;50:1740-1751.
2. Callan MFC. Epstein-Barr virus, arthritis, and the development of lymphoma in arthritis patients. *Curr Opin Rheumatol* 2004;16:399-405.