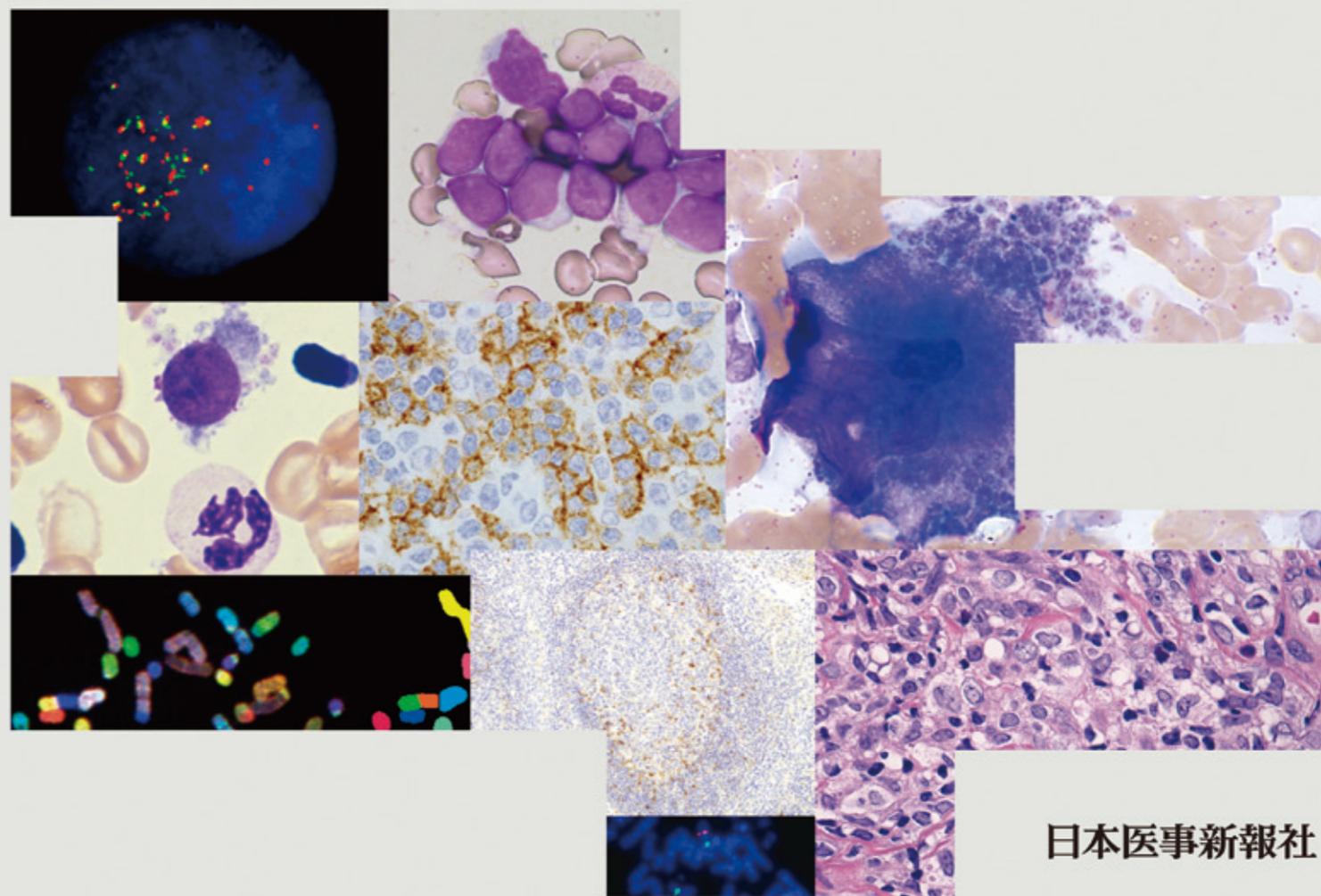


造血器腫瘍 アトラス

改訂
第5版

形態、免疫、染色体から分子細胞治療へ

編著 谷脇雅史 京都府立医科大学 名誉教授/分子診断・治療センター 特任教授
横田昇平 京都府立医科大学 血液・腫瘍内科学客員講師
黒田純也 京都府立医科大学 血液・腫瘍内科学講師



日本医事新報社

B2 造血器腫瘍の診療における組織FISH法

松本洋典

1 はじめに

日常臨床では、造血器腫瘍の染色体分析法として、染色体分染法(G-染色法)やFISH (fluorescence *in situ* hybridization)法が広く行われている。染色体分染法は、すべての染色体を検索対象として、数的もしくは構造異常の検出に用いられる。一方、反復配列プローブや位置特異的プローブを用いたFISH法は、数的異常や転座、逆位、挿入、欠失などある特定の染色体、遺伝子異常の有無だけを検出するものである。

FISH法は、従来、カルノア固定した細胞標本に行われていたが、当科では特に造血器腫瘍のホルマリン固定、パラフィン包埋した病理組織標本切片に対してFISH法を応用し (tissue-FISH, 組織FISH法)¹⁾、報告してきた²⁻⁸⁾。

本項では組織FISH法の手順と、造血器腫瘍への応用について概説する。

2 組織FISH法の手順¹⁾

① 標本の作製

パラフィン包埋された組織ブロックを4~6 μ mで薄切し、湯伸ばしした後、シランコートされたスライドガラス上に展開する。標本がのったスライドガラスは37°Cで一晩乾燥させる。

② 検体の前処理

1. 100%キシレンに10分間ずつ3回浸透し脱パラフィン。
2. 100%, 85%, 70%エタノールに5分ずつ浸透し脱水後、蒸留水で5分間洗浄。

3. 0.2M HClに20分間浸透。
4. 蒸留水に浸透後、2 \times SSC/0.05% Tween 20で5分間洗浄。
5. 80°Cの2 \times SSCに20分間浸透。
6. 蒸留水で1分間洗浄後、2 \times SSC/0.05% Tween 20で5分間洗浄。
7. 37°Cの0.05mg/mL proteinase K/1 \times TEN bufferに5~15分間浸透。
8. 2 \times SSC/0.05% Tween 20で5分間洗浄。
9. 10%ホルマリンに10分間浸透。
10. 2 \times SSC/0.05% Tween 20で5分間洗浄。
11. 73°Cの変性溶液 (20 \times SSC 10mL, ホルムアミド 35mL, 蒸留水 5mL)に5分間浸透。
12. 70%, 85%, 100%エタノールに2分ずつ浸透し脱水後、風乾。

③ DNA プローブの処理

市販プローブの場合、遮光の上、プローブ 0.5 μ L/バッファー 7 μ L/蒸留水 2.5 μ Lを73°Cの恒温槽で5分、37°Cで20~30分処理。以後の処理はすべて遮光で行う。

④ ハイブリダイゼーション

1. プローブを②の風乾後の標本上に滴下し、プローブの乾燥を防止するため24 \times 24mmのカバーガラスで覆い、90°Cのホットプレートに10分間のせる。
2. 湿潤箱に入れ、42°Cで一晩インキュベートする。

⑤ 洗浄

1. 42°Cの2 \times SSCに10分間浸透。カバーガラスをつけたまま浸し、カバーガラスが自身の重さで滑り落ちるようにする。

2. 42°Cの50%ホルムアミド/2 \times SSCで5分間ずつ2回洗浄。
3. 42°Cの2 \times SSCで5分間洗浄。
4. 2 \times SSCで4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)を0.03 μ g/mLに調節し、37°Cで3分間浸透。
5. 蒸留水で速やかに洗浄後、暗所で風乾。
6. ベクタシールドでカバー。

⑥ 蛍光顕微鏡で観察, CCDカメラで撮影

3 組織FISH法の特徴

1. 組織内での腫瘍細胞の同定 (図1)

single cell preparationを用いた従来のFISH法では、染色体異常を有する腫瘍細胞が組織上にどのように位置するかの情報は得られなかった。一方、組

織FISH法ではDAPI染色像によって病理組織形態を観察することができる場合があり、その際には染色体異常を有する細胞の組織上での位置、局在の情報を得ることができる。また、ヘマトキシリン-エオジン (HE) 染色や免疫組織化学との対比も可能である²⁾。

2. 微小な検体での検討 (図2, 3)

消化管病変の生検検体や針生検検体では染色体検査は困難であることが多いが、組織FISH法はこのような微小な検体にも適用可能である^{1, 3-7)}。

3. 古い病理組織標本への適用

DNAは安定な物質であり、数年前に作成されたパラフィン包埋組織ブロックであっても、薄切切片を作製することにより組織FISH法の適用が可能である²⁾。

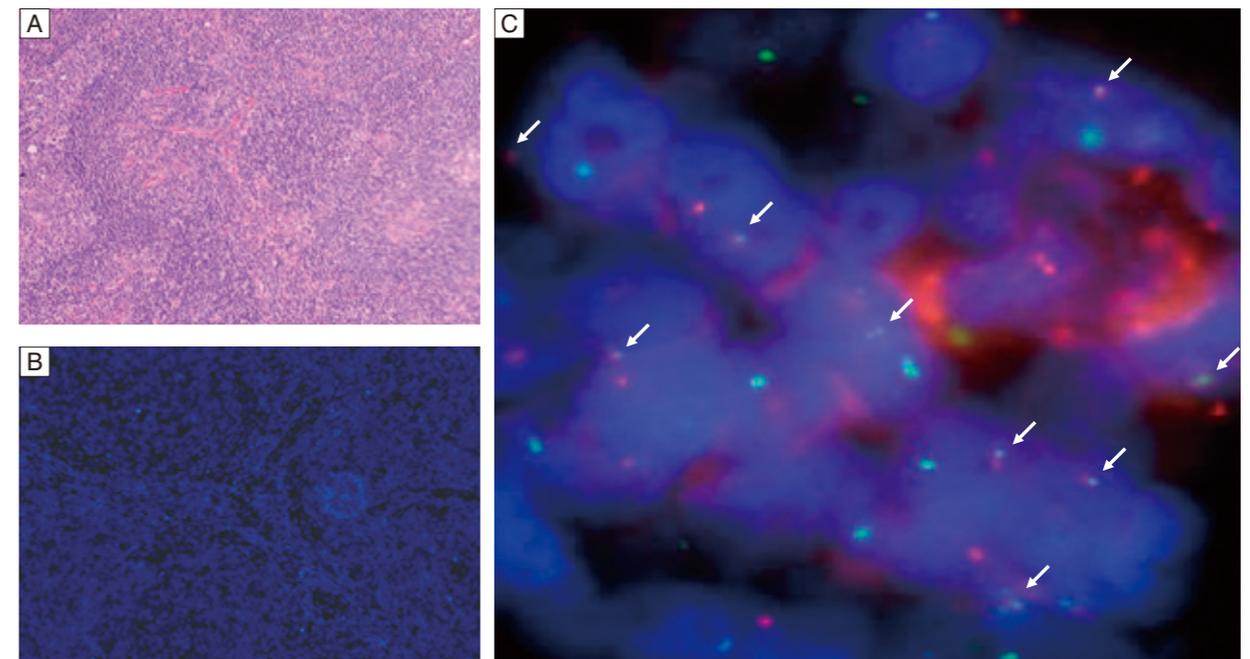


図1 ▶ 濾胞性リンパ腫症例のリンパ節生検像

HE染色 (A) で認められる濾胞構造がDAPI染色 (B) でも確認できる。組織FISH法 (C) では濾胞内の腫瘍細胞に14q32上のIGH (SpectrumGreen)と18q21上のBCL2 (SpectrumOrange)の融合シグナルを認める (LSI BCL2/IGH Dual-Color, Dual-Fusion Translocation Probe, Vysis)

▼表1 続き

病型	頻度	発生母地 (細胞起源ならびに分子生物学的特徴)
粘膜関連リンパ組織型辺縁帯B細胞リンパ腫 (extranodal marginal zone B-cell lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue)	8.5%	post-GC細胞, 辺縁帯B細胞
節性辺縁帯B細胞リンパ腫 (nodal marginal zone B-cell lymphoma) 小児節性濾胞辺縁帯リンパ腫 (pediatric nodal marginal zone lymphoma)*	1.0%	post-GC細胞, 辺縁帯B細胞
濾胞性リンパ腫 (follicular lymphoma) <i>in situ</i> 濾胞性腫瘍 (<i>in situ</i> follicular neoplasia)* 十二指腸型濾胞性リンパ腫 (duodenal-type follicular lymphoma)*	6.7%	濾胞中心細胞
小児型濾胞性リンパ腫 (pediatric-type follicular lymphoma)*		BCL-2蛋白の発現はみられないことが多い
<i>IRF4</i> 再構成を伴う大細胞型B細胞リンパ腫 (large B-cell lymphoma with <i>IRF4</i> rearrangement)*		GC細胞 <i>IG/IRF4</i> 再構成, <i>BCL-6</i> 再構成。しかし <i>BCL-2</i> 再構成はない。 <i>IRF4/MUM1</i> の強い発現
原発性皮膚濾胞中心リンパ腫 (primary cutaneous follicle center lymphoma)		濾胞中心細胞由来B細胞
マンテル細胞リンパ腫 (mantle cell lymphoma) <i>in situ</i> マンテル細胞腫瘍 (mantle cell neoplasia)*	2.8%	マンテル層内側の細胞
びまん性大細胞型B細胞リンパ腫, 非特異型 (DLBCL, NOS) 濾胞中心細胞型 (germinal center B-cell type)* 活性化B細胞型 (activated B-cell type)*	33.3%#	GCB細胞/post-GC (活性化) B細胞 non-GC型の30%では <i>MYD88L265P</i> 変異がみられる
T細胞組織球豊富型大細胞型B細胞リンパ腫 (T cell/histiocyte-rich large B-cell lymphoma)		GCB細胞
中枢神経原発DLBCL (primary DLBCL of CNS)		活性化B細胞
皮膚原発DLBCL, 足型 (primary cutaneous DLBCL, leg type)		post-GCB細胞
EBV陽性DLBCL, 非特定 (EBV positive DLBCL, NOS) EBV ⁺ mucocutaneous ulcer*		EBVにより形質転換した成熟B細胞
慢性炎症関連びまん性大細胞型B細胞リンパ腫 (DLBCL associated with chronic inflammation) リンパ腫様肉芽腫症 (lymphomatoid granulomatosis)	0.3%	EBVにより形質転換したlate/post-GCB細胞 EBVにより形質転換した成熟B細胞
原発性縦隔大細胞型B細胞リンパ腫 (primary mediastinal (thymic) large B-cell lymphoma)	0.3%	胸腺髄質ステロイドB細胞 (AID ⁺)
血管内大細胞型B細胞リンパ腫 (intravascular large B-cell lymphoma)	0.1%	形質転換した成熟B細胞
ALK陽性大細胞型B細胞リンパ腫 (ALK positive large B-cell lymphoma)		形質細胞へ分化を示すpost-GCB細胞
形質細胞芽性リンパ腫 (plasmablastic lymphoma)		形質芽球, 形質細胞へ分化した芽球性B細胞
HHV8関連多中心性キャスルマン病起因大細胞型B細胞リンパ腫 (large B-cell lymphoma arising in HHV8-associated multicentric Castleman disease)		naive B細胞
原発性滲出液リンパ腫 (primary effusion lymphoma; PEL)		post-GCB細胞
HHV8陽性DLBCL, 非特定 (HHV8 positive DLBCL, NOS)*		

▼表1 続き

病型	頻度	発生母地 (細胞起源ならびに分子生物学的特徴)
バーキットリンパ腫 (Burkitt lymphoma; BL)	1.0%	GCB細胞/post-GCB細胞。 <i>TCF3</i> または <i>ID3</i> 変異が sporadic/immunodeficiency related type の70%にみられる
11q染色体異常を伴うバーキット様リンパ腫 (Burkitt-like lymphoma with 11q aberration)*		
high grade B-cell lymphoma, with <i>MYC</i> and <i>BCL-2</i> and/or <i>BCL-6</i> rearrangements*		
high grade B-cell lymphoma, NOS*		
DLBCLと古典的ホジキンリンパ腫の中間型特徴を有する分類不能B細胞リンパ腫 (B-cell lymphoma, unclassifiable, with features intermediate between diffuse large B-cell lymphoma and classical HL)		縦隔に生じる場合は胸腺B細胞類似B細胞。その他の部位は様々な分化段階のB細胞
成熟T細胞およびNK細胞腫瘍 (mature T-cell and NK-cell neoplasms)	24.9%	
T細胞前リンパ球性白血病 (T-cell prolymphocytic leukemia)	1.7%	成熟 (post thymic) T細胞, 胸腺皮質T細胞と末梢血T細胞の中間の分化段階
T細胞大顆粒リンパ球性白血病 (T-cell large granular lymphocytic leukemia)		多くはCD8陽性T細胞, 一部γδT細胞
慢性NK細胞増加症 (chronic lymphoproliferative disorders of NK cells)		成熟NK細胞
アグレッシブNK細胞白血病 (aggressive NK-cell leukemia)		成熟NK細胞
小児全身性EBV陽性T細胞性リンパ増殖症 (systemic EBV ⁺ T-cell lymphoma of childhood)		多くは細胞傷害性CD8陽性T細胞, または活性化CD4陽性T細胞
種痘様水疱症様リンパ腫 (hydroa vacciforme-like lymphoma)		皮膚親和性細胞傷害性T細胞, 稀にNK細胞
成人T細胞白血病/リンパ腫 (adult T-cell leukemia/lymphoma)	7.5%	CD4陽性T細胞, 特にregulatory T細胞
節外性鼻型NK/T細胞リンパ腫 (extra nodal NK/T-cell lymphoma, nasal type)	2.6%	活性化NK細胞, 稀に細胞傷害性T細胞
monomorphic epitheliotropic intestinal T-cell lymphoma*		
indolent T-cell lymphoproliferative disorder of the GI tract*		
腸管症型T細胞リンパ腫 (enteropathy-type T-cell lymphoma)	0.3%	腸管上皮内T細胞
肝脾T細胞リンパ腫 (hepatosplenic T-cell lymphoma)		自然免疫系成熟γδ, 稀にαβ細胞傷害性T細胞
皮下脂肪組織炎様T細胞リンパ腫 (subcutaneous panniculitis-like T-cell lymphoma)		成熟細胞傷害性αβT細胞
菌状息肉症 (mycosis fungoides)	1.2%	成熟皮膚親和性CD4陽性T細胞
セザリ-症候群 (Sézary syndrome)		成熟皮膚親和性CD4陽性T細胞
原発性皮膚CD30陽性T細胞リンパ増殖異常症 (primary cutaneous CD30 positive T-cell lymphoproliferative disorders)	0.3%	活性化皮膚親和性T細胞
皮膚原発γδT細胞リンパ腫 (primary cutaneous gamma-delta T-cell lymphoma)		細胞傷害性機能を有する成熟γδT細胞
皮膚原発CD8陽性進行性表皮向性細胞傷害性T細胞リンパ腫 (primary cutaneous CD8-positive aggressive epidermotropic cytotoxic T-cell lymphoma)		皮膚親和性CD8陽性細胞傷害性αβT細胞

実際にはこれらの特徴が混じり合った中間的な形態を持つものが多く、これらの特徴をスコア化することにより分類が行われていた。しかし、これらの形態的な特徴は、L3にパーキット型ALLが多いという以外は、細胞表面抗原による分類とも、白血病細胞の持つ遺伝子異常の種類とも、あるいは臨床病態ともほとんど相関を持たず、形態の分類という以上の意味を持たない。また、L3に多く認められるパーキット型ALLは、現在ではパーキットリンパ腫の白血化ととらえられており、悪性リンパ腫に分類されている。したがって、細胞形態によるB-ALLとT-ALLの鑑別、あるいはBCR-ABLなどの特定の遺伝子異常を持つALLを鑑別することは困難である。

4 分類

ALLの分類で汎用されるのは、芽球の細胞表面抗原による分類とWHO分類である。細胞表面抗原による分類では、B-ALLでは通常HLA-DR, CD19, CD79aが陽性で、これをCD10, 細胞内μ鎖, 細胞表面IgMの発現などの発現状態によりpro-B ALL (early precursor-B-ALL), common ALL, pre-B ALLに分類する。terminal doxytransferase (TdT)は原則陽性となる(表2)。MLL再構成を伴うB-ALLはpro-B-ALLの形質を示し、E2A-PBX1を伴うB-ALLはpre-B-ALLの形質を示すのが特徴的である(表1)。

WHO分類は現在の造血器腫瘍分類の標準であり、白血病、悪性リンパ腫などを含めた造血器腫瘍全体

表1 ▶ WHO分類における反復性遺伝子異常を伴うB-ALL/LBL

	染色体異常	表面抗原*1	分子病態*2
BCR-ABL1を伴うB-ALL/LBL	t(9;22)(q34;q11.2)	CD19 ⁺ , CD10 ⁺ , CD13 ⁺ , CD33 ⁺	ABLキナーゼの恒常的活性化による細胞増殖刺激
MLL再構成を伴うB-ALL/LBL	t(v;11q23)	CD19 ⁺ , CD10 ⁻	MLL融合蛋白によるヒストンメチル化の異常による遺伝子発現の変化
TEL-AML1を伴うB-ALL/LBL	t(12;21)(p13;q22)	CD19 ⁺ , CD10 ⁺ , CD34 ⁺ , CD20 ⁻	転写因子AML1(造血系分化を抑制)の阻害による分化障害
高二倍体性B-ALL/LBL	染色体数50~66		
低二倍体性B-ALL/LBL	染色体数<45*3		
IL-3-IgHを伴うB-ALL/LBL	t(5;14)(q31;q32)	CD19 ⁺ , CD10 ⁺	
E2A-PBX1を伴うB-ALL/LBL	t(1;19)(q23;p13.3)	CD19 ⁺ , CD10 ⁺ , Cμ ⁺	転写因子PBX1とE2A(Bリンパ球分化を制御)の異常による分化障害

*1 典型的な場合, *2 判明している主なもの, *3 典型的には45未満

表2 ▶ 細胞表面抗原によるB-ALLの分類

細胞表面抗原	CD19	CD79a	CD10	CD20	Cμ	Smlg	TdT
pro-B ALL	+	+	-	-	-	-	+
common ALL	+	+	+	+/-	-	-	+
pre-B ALL	+	+	+	+	+	-	+

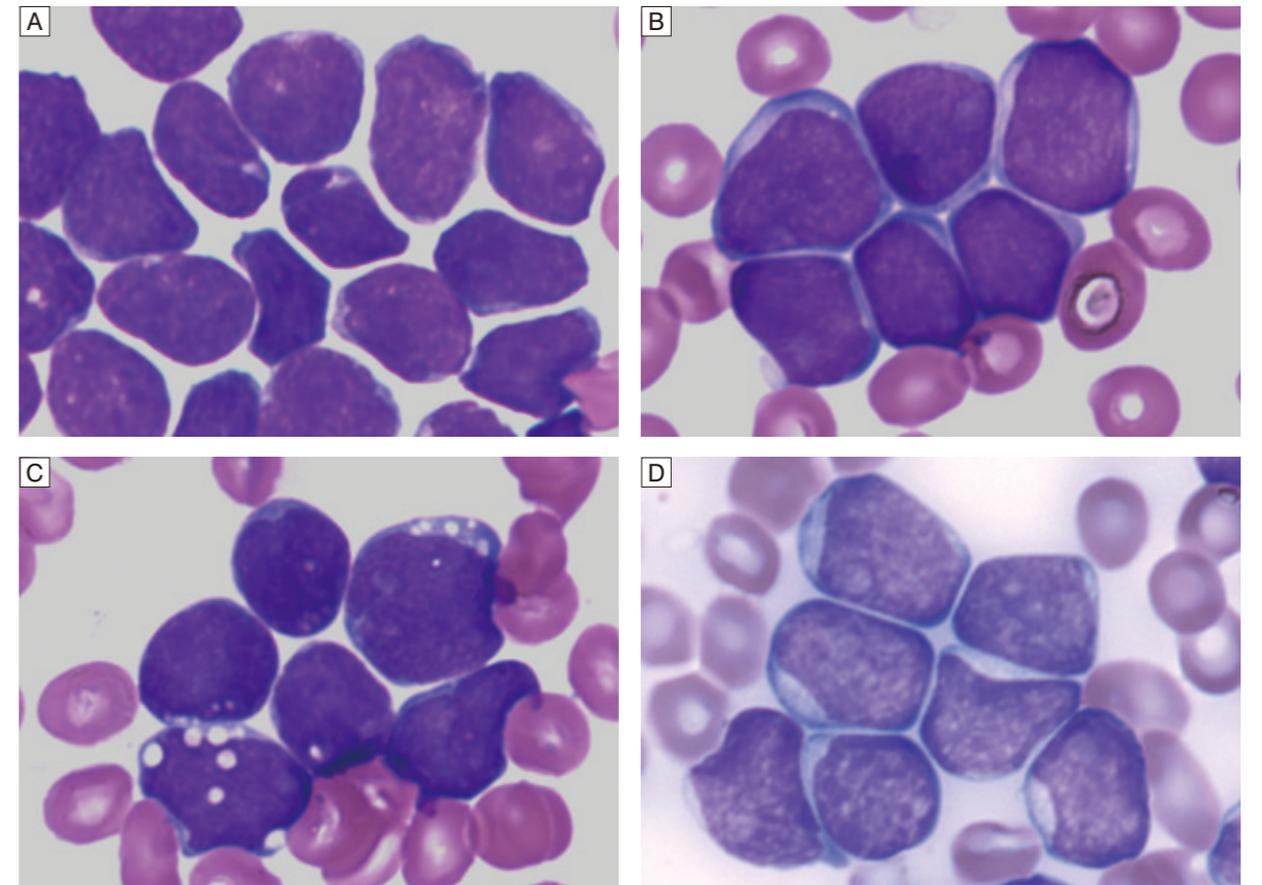


図1 ▶ B-ALLの骨髄像

A: 細胞は小型で大きさは均一。N/C比が高く、細胞質はほとんど認められない。核小体は不明瞭
B: 細胞は小～中型で大きさが不均一。N/C比は比較的 low, 細胞質は好塩基性。核小体が明瞭
C: 細胞は中～大型で不均一。細胞質は好塩基性で空胞を持つものもある。核小体は不明瞭なものと同様に明瞭なものも混在
D: Bと同一症例のMPO染色

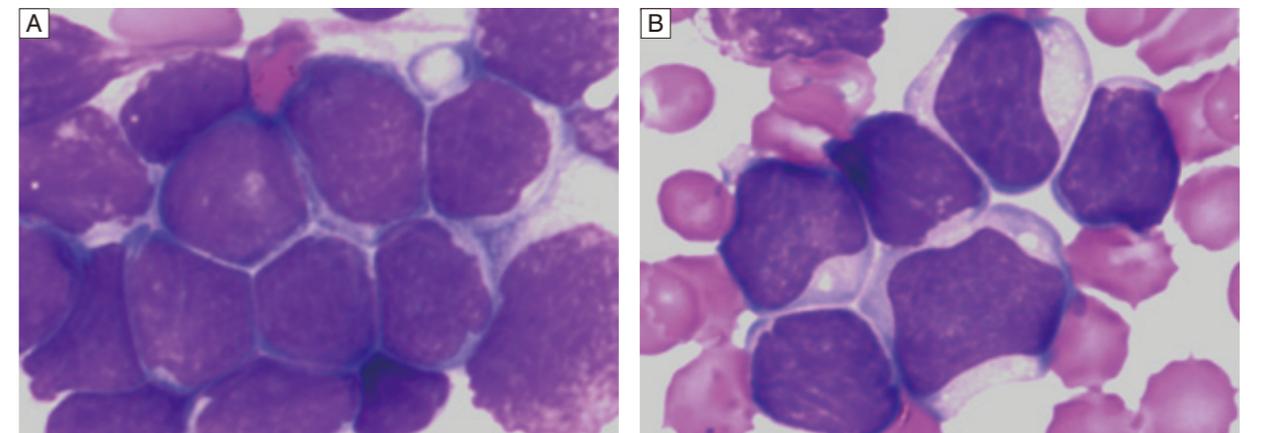


図2 ▶ BCR-ABL陽性ALLの骨髄像

A: 細胞は中～大型でN/C比はやや低く、細胞質は好塩基性。核小体は明瞭
B: 細胞は小～大型で大きさが不均一。N/C比が低いものも多く、核は不整形で細胞質は灰白色。核小体は不明瞭なものが多い

D

急性白血病に対する同種造血幹細胞移植

—戸辰夫, 大島久美

1 はじめに

近年における様々な分子標的薬や抗体医薬品の開発にもかかわらず急性白血病に対する化学療法の成績は劇的な向上を認めるには至っていない。一方で、中高年期人口の増加に伴い、急性白血病の発症者数は経年的に増加しており、急性白血病を根治に導きうる治療法として、あらためて同種造血幹細胞移植 (allogeneic hematopoietic cell transplantation; allo-HCT) の役割が見直されている。移植前処置と幹細胞ソースの多様化に伴い、現在ではほぼすべての症例に対して必要であれば移植を考慮することが可能となっており、最近のわが国では、急性骨髄性白血病 (acute myeloid leukemia; AML) および急性リンパ性白血病 (acute lymphoblastic leukemia; ALL) に対して、それぞれ年間1,100件および500件前後のallo-HCTが行われている。

本項では主に成人のAMLおよびALLに対するallo-HCTにおける未解決の課題とその解決に向けた展望をいくつかのクリニカルクエストの形で概観する。なお、適切な幹細胞ソースの選択基準や小児の急性白血病に対するallo-HCTの意義については他項を参照されたい。

2 初回寛解期急性白血病に対する移植適応はどのように決定すべきか?

急性白血病に対する移植適応を検討する際には、白血病自体の生物学的特徴だけでなく、患者自身の身体的因子や社会的背景の十分な評価が重要であり、前者は主に再発死亡のリスク、後者は非再発死亡のリス

クに強く関連している。特に、初回寛解期 (CR1) での移植の実施にあたっては、現在の医学的水準ではその対象者から化学療法で治癒している症例を除外することが困難であるため、できる限り治療関連死亡のリスクを最小化する努力が必要であり、適切な移植適応の判断にはしばしば困難が伴う。

そのような観点から、最近ELN (European Leukemia Net) は、CR1のAMLに対する移植適応に関して、表1のような統合的評価システムを提唱している^{1, 2)}。この評価システムでは、まずAMLとしての生物学的なリスクを白血病細胞が有する染色体核型と遺伝子異常に基づきgood, intermediate, poor, very poorの4段階に分類し、それに並行してEBMT (European Group for Blood and Marrow Transplantation) スコアとHCT-CI (hematopoietic cell transplantation-specific comorbidity index) を用いて非再発死亡のリスクを同様に4段階に評価する。そして、それらを用いてallo-HCTを行った場合の生存率を推定し、化学療法または自家移植を行った場合よりも10%程度の上乗せが期待できる場合、CR1でのallo-HCTの積極的な適応と判断しようとするものである。近年AMLにおいては次世代シーケンサー (next generation sequencing; NGS) によるゲノム解析がほぼ終了し、遺伝子レベルでの病型分類が進んでいることをふまえ、このELNの評価システムでは、従来の染色体異常に基づくリスク分類を一部踏襲しながら、比較的良好な予後に関連する遺伝子としてNPM1とCEBPA、予後不良に関連する遺伝子としてFLT3, EVI1, RUNX1, ASXL1, TP53を組み込んだ新たな病型の層別化が採用されて

表1 ▶ ELNによるCR1のAMLに対する移植適応決定のための統合的リスク評価システム

リスクグループ	診断時およびCR到達時のリスク評価		地固め治療法別の再発リスク		非再発死亡の予測スコア		
	病型	2サイクル治療終了後のMRD	化学療法または自家移植 (%)	同種移植 (%)	EBMT スコア	HCT-CI スコア	NRM (%)
good	<ul style="list-style-type: none"> t(8;21)/AML1-ETOでWBC ≤ 20,000/μL inv16/t(16;16)/CBFB-MYH11 CEBPAの両アレル変異 FLT3-ITD変異陰性でNPM1変異陽性 	+または-	35~40	15~20	NA	NA	10~15
intermediate	<ul style="list-style-type: none"> 正常核型(-X-Y含む)かつWBC ≤ 100,000/μLかつCRe t(8;21)/AML1-ETOでWBC > 20,000/μLあるいはKIT変異陽性 	-	50~55	20~25	≤2	≤2	<20~25
poor	<ul style="list-style-type: none"> 正常核型(-X-Y含む)かつWBC ≤ 100,000/μLかつCRe t(8;21)/AML1-ETOでWBC > 20,000/μL (KIT変異陽性・陰性) 	+ +	70~80	30~40	≤3~4	≤3~4	<30
	<ul style="list-style-type: none"> 正常核型(-X-Y含む)かつWBC ≤ 100,000/μLかつnot CRe 正常核型(-X-Y含む)かつWBC > 100,000/μL CBF・MK・3q26関連以外の異常核型でEvi-1発現亢進なし 	+または-					
very poor	<ul style="list-style-type: none"> MK 3q26関連異常 CBF以外の異常核型でEvi-1発現亢進あり CBF以外の異常核型でp53, RUNX1, ASXL1いずれかの変異あるいはFLT3-ITDの両アレル変異 (FLT3-ITD/FLT3wt比 > 0.6) あり 	+または-	>90	40~50	≤5	≤5	<40

WBC:white blood cell count, CEBPA:gene encoding CCAAT/enhancer binding protein alpha, FLT3:gene encoding fms-like tyrosine kinase receptor 3, ITD:internal tandem duplication, NPM1:gene encoding nucleophosmin, CRe; complete remission after one cycle of induction therapy, CBF;core binding factor, MK;monosomal karyotype, Evi-1; MDS1 and EVI1 complex locus protein, MRD:minimal residual disease, EBMT;European Group for Blood and Marrow Transplantation, NA:not advocated, HCT-CI;hematopoietic cell transplantation-specific comorbidity index, NRM;non-relapse mortality

注:正常核型にはX染色体あるいはY染色体の単独欠損例も含む

(文献2より引用改変)

いる。また、特筆すべきこととして、これまで通常CR1ではallo-HCTの適応とならない病型とされてきたt(8;21)転座関連AMLに関しても、初診時の白血球数(20,000/μL以上)、KIT遺伝子変異の有無、化学療法2サイクル終了時の微小残存病変 (minimal residual disease; MRD) の有無に基づき、再発リス

クを3段階に評価している点が挙げられる。

ALLに関しては、十分にコンセンサスの得られている移植適応の評価システムは公表されていないが、表2に示すような予後不良因子が提唱されている^{3, 4)}。B細胞前駆細胞型ALL (B-cell precursor ALL; BCP-ALL) における予後不良因子としてのIKZF1遺伝子変