

悪性リンパ腫における MALT1 と BCL10 蛋白の核内発現の意義

横尾 智子*

東邦大学医学部病理学講座

要約

目的：Extranodal marginal zone B-cell lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue (MALT リンパ腫), 濾胞性リンパ腫 (follicular lymphoma: FL), びまん性大細胞型リンパ腫 (diffuse large B-cell lymphoma: DLBCL), 末梢性 T 細胞性リンパ腫 (peripheral T-cell lymphoma: PTCL) の症例における MALT1 と B-cell lymphoma/leukemia 10 (BCL10) 蛋白の細胞内局在を解析する. さらに, 核内における MALT1 と BCL10 両分子の発現頻度や染色パターンを各種病型で比較検討し, 悪性リンパ腫 (malignant lymphoma: ML) 発症機構における MALT1 と BCL10 両分子の核内発現の意義を考察する.

対象および方法：正常リンパ装置 8 例および MALT リンパ腫 30 例, FL 25 例, DLBCL 44 例, PTCL 16 例における MALT1 と BCL10 蛋白の細胞内局在を蛍光二重染色で解析した. さらに ML 細胞株を用いてウェスタンブロット法を施行して細胞内局在における両蛋白の発現量を細胞レベルで検討した.

結果：MALT リンパ腫では両蛋白は細胞質のみで発現頻度が高かった. しかし FL や DLBCL では核と細胞質の両方で発現頻度が増加し, 特に DLBCL では形態学的に両蛋白が核内で粗大顆粒状を呈していた. しかし PTCL では核と細胞質ともに MALT1 蛋白の発現頻度が高度に減少していた. 培養細胞では DLBCL 細胞株において細胞内の BCL10 および nuclear factor-kappa B (NF- κ B) p-65 の有意な増加がみられ, 同時に核内でも BCL10 発現増加が確認された.

結論：MALT リンパ腫と比較して FL や DLBCL では MALT1 と BCL10 蛋白の核内発現が増加しており, 両蛋白の核内発現メカニズムとして従来提唱された MALT 関連染色体転座以外のメカニズムの関与が示唆された. ウェスタンブロット法による結果から, ML, 特に DLBCL における両分子の核内発現は余剰な細胞質内 BCL10 量を反映し, この余剰な細胞質内 BCL10 は NF- κ B 活性化の亢進に寄与していることが示唆された.

東邦医学会誌 59(5): 226-235, 2012

索引用語: 悪性リンパ腫, MALT1, BCL10, NF- κ B

Extranodal marginal zone B-cell lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue (MALT リンパ腫) は, 消化管, 唾液腺, 肺や胸腺における粘膜関連リンパ装置 (mucosa-associated lymphoid tissue: MALT) から発生する低悪性度 B 細胞性リンパ腫である. MALT1 遺伝子は MALT リンパ腫関連染色体転座 t (11; 18) (q21; q21) から単離され¹⁻⁵⁾, また B-cell lymphoma/leukemia 10 (BCL10) は MALT リンパ腫関連染色体点座 t (1; 14) (p22; q32) から単離された^{6, 7)}. 種々の外界刺激によってリンパ球増殖

を促進する nuclear factor-kappa B (NF- κ B) は野生型 BCL10 により活性化しアポトーシスを誘導する一方, BCL10 遺伝子変異では逆にアポトーシス活性が消失し腫瘍化に寄与すると考えられている⁸⁻¹⁰⁾. しかし MALT リンパ腫を含む種々の悪性リンパ腫 (malignant lymphoma: ML) における BCL10 遺伝子変異は 10% 以下であり ML 発症における BCL10 の機能的意義は不明である^{7, 9)}.

BCL10 蛋白は正常 B 細胞の細胞質に発現するが, その後 t (11; 18) (q21; q21) 型 MALT リンパ腫では BCL10

〒143-8540 東京都大田区大森西 5-21-16

*Corresponding Author: tel: 03 (3762) 4151

e-mail: tomotch-2531@br4.fiberbit.net

受付: 2012 年 6 月 27 日, 受理: 2012 年 8 月 10 日

東邦医学会雑誌 第 59 巻第 5 号, 2012 年 9 月 1 日

ISSN 0040-8670, CODEN: TOIZAG

Table 1 Clinical characteristics of materials

| Histology | No of cases | Sex (M:F) | Age range (Mean) | Site | | | | | | | | | | | |
|------------|-------------|-----------|------------------|---------|-------|-------|------|---------|---------|---------|-------------|------------|---------|--------|---------|
| | | | | Stomach | Colon | Liver | Lung | Thyroid | Tonsils | Parotid | Soft tissue | Lymph node | Gingiva | Others | Unknown |
| ML | 115 | 61:54 | | | | | | | | | | | | | |
| MALT | 30 | 9:21 | 36-83 (63.0) | 10 | 6 | 1 | 3 | 1 | 1 | 3 | 3 | | | 2 | |
| FL | 25 | 7:18 | 35-87 (66.2) | 1 | 1 | | | | | | 10 | 9 | | 2 | 2 |
| DLBCL | 44 | 34:10 | 15-87 (60.3) | 2 | | | | 1 | 1 | | 20 | 11 | 2 | 3 | 4 |
| PTCL | 16 | 11:5 | 39-95 (68.3) | | 1 | | | | 1 | | 7 | 4 | | 2 | 1 |
| Normal | 8 | | | | | | | | | | | | | | |
| Spleen | 3 | | | | | | | | | | | | | | |
| Lymph node | 3 | | | | | | | | | | | | | | |
| Tonsil | 2 | | | | | | | | | | | | | | |
| Total | 123 | | | | | | | | | | | | | | |

M: male, F: female, ML: malignant lymphoma, MALT: extranodal marginal zone B-cell lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue, DLBCL: diffuse large B-cell lymphoma, FL: follicular lymphoma, PTCL: peripheral T-cell lymphoma

核内発現症例が多く、上記の染色体点座に伴う BCL10 核内発現が悪性化に寄与することが示唆された^{4,10)}。最近では、MALT リンパ腫関連染色体転座を欠く natural killer T (NK/T) 細胞性リンパ腫でも BCL10 核内発現と同時に、NF- κ B p65 の核内発現も確認されたので、BCL10 核内発現は NF- κ B p65 と協調してリンパ腫発症に関与することを示唆した¹¹⁾。続けて、リンパ形質細胞性リンパ腫/Waldenström マクログロブリン血症 (lymphoplasmacytic lymphoma/Waldenström macroglobulinemia : LPL/WM) では核内における BCL10 発現があるものの NF- κ B p65 発現を欠くことが報告され、BCL10 核内発現性の意義が ML の病型により異なることを示した¹²⁾。BCL10 と MALT1 は細胞質では caspase recruitment domain-containing protein 1 (CARMA1)-BCL10-MALT1 シグナロソームを形成し、これが NF- κ B の活性化を誘導することが判明しているが^{13,14)}、種々の ML における MALT1 と BCL10 の挙動について報告がほとんどなく、また MALT1 の核内移行メカニズムも不明な点が多い^{15,16)}。その後 MALT1 と BCL10 の核内発現症例が MALT リンパ腫関連染色体転座を欠く ML 細胞でも報告され¹⁷⁻¹⁹⁾、MALT リンパ腫関連染色体転座以外のメカニズムによる MALT1 と BCL10 両分子の核内発現機構が示唆されてきた。

このように MALT1 と BCL10 は MALT リンパ腫以外の ML でも核内発現し、しかも一部の病型では悪性度と相関することから、両蛋白の核内発現は腫瘍化への関与が示唆されてきた。しかし病型の異なる ML における両分子の細胞内局在の比較検討はほとんど行われていない。今回われわれは MALT リンパ腫 30 例、濾胞性リンパ腫 (follicular lymphoma : FL) 25 例、びまん性大細胞型リンパ腫 (diffuse large B cell lymphoma : DLBCL) 44 例、末梢

性 T 細胞リンパ腫 (peripheral T-cell lymphoma : PTCL) 16 例における核と細胞質における両分子の発現性を比較検討し、各病型のリンパ腫細胞における両蛋白の局在観察からリンパ腫発症機構における BCL10 と MALT1 蛋白の核内発現の意義を検討した。

材料と方法

1. 検体と細胞

2008~2010 年に東邦大学医療センター大森病院と平塚市民病院にて診断のため採取された正常リンパ装置 8 例、ML 検体 115 例の病理診断後の余剰検体を解析に用いた。これらの組織型分類は MALT リンパ腫 30 症例、FL 25 症例、DLBCL 44 症例、PTCL 16 症例である (Table 1)。組織型分類は『WHO による血液学及びリンパ組織におけるクラス分類』²⁰⁾に基づき、hematoxylin and eosin (HE) 染色による組織診断、CD20, CD79 α , CD10, CD30, CD3 [以上、Dako Denmark A/S (Dako), Glostrup, Denmark] 抗体による免疫染色と臨床病理学的見地から総合的に判定した。また正常リンパ装置としては HE 染色で確認された非病変部の扁桃、リンパ節、脾を用いた。

細胞レベルにおける蛋白発現解析には、市販の培養細胞株 CA46 Burkitt リンパ腫 [DS ファーマバイオメディカル (株), 大阪], CCRF-SB 急性リンパ性白血病・B 細胞型 [(財) ヒューマンサイエンス振興財団ヒューマンサイエンス研究資源バンク (ヒューマンサイエンス), 大阪], TK びまん性大細胞型リンパ腫 (ヒューマンサイエンス), T 細胞性リンパ腫 (ヒューマンサイエンス), HD-70 ホジキンリンパ腫 (ヒューマンサイエンス), CCRF-CEM 急性リンパ性白血病・T 細胞型 (ヒューマンサイエンス) を使用した。

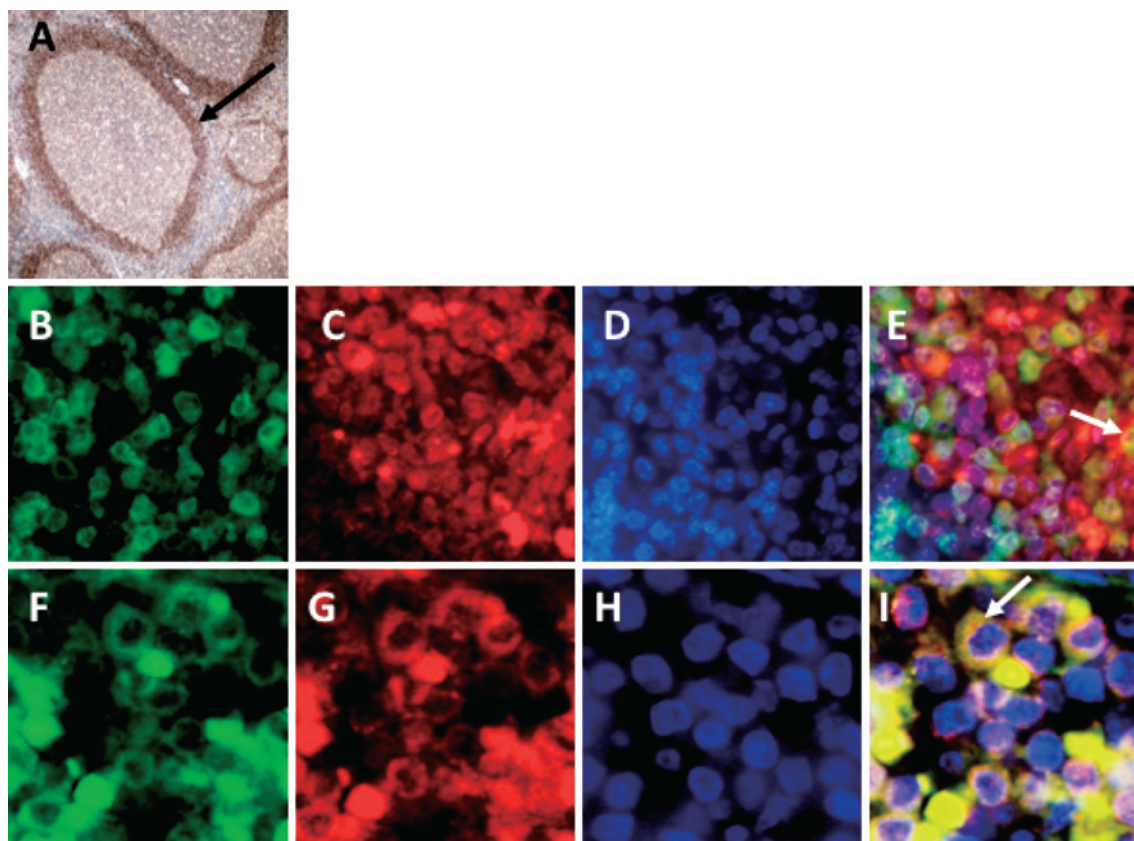


Fig. 1 Expression of MALT1 and BCL10 proteins in normal lymphoid tissues.

A: MALT1 expression in the marginal zone of normal lymph nodes. B, C, D, E: MALT1 expression in CD79 α -positive B lymphocytes. Positive staining for CD79 α (B), MALT1 (C), and DAPI (D) is indicated by green, red, and blue fluorescence, respectively. A merged image (E) shows CD79 α and MALT1 colocalization, indicated by yellow fluorescence, in the cytoplasm of positive cells (arrow). F, G, H, I: MALT1 and BCL10 expression is confined to the cytoplasm. Positive staining with BCL10 (F), MALT1 (G), and DAPI (H) is indicated by green, red, and blue fluorescence, respectively. A merged image (I) shows MALT1 and BCL10 colocalization, indicated by yellow fluorescence, in the cytoplasm of positive cells (arrow).

MALT: extranodal marginal zone B-cell lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue, BCL10: B-cell lymphoma/leukemia 10, DAPI: 4', 6-diamidino-2-phenylindole

なお本研究は東邦大学医学部倫理委員会の承認を得ている (承認番号 20004)。

2. 免疫組織化学

1) 酵素抗体法

10%ホルマリン固定後のパラフィンブロックから3 μ mに薄切したパラフィン切片を脱パラフィン後、抗原賦活化液 pH9.0〔株〕ニチレイバイオサイエンス (ニチレイ, 東京) で浸漬後、圧力鍋 (高圧) で加熱処理し、標識ストレプトアビジン・ビオチン (labeled streptavidin biotinylated antibody: LSAB法, DAKO) とヒストファインシンブルステイン (ニチレイ) で反応させ3,3'-diaminobenzidine-tetrahydrochloride (DAB, DAKO) で発色した。使用した一次抗体は抗BCL10 (DAKO), 抗MALT1 [Abcam plc. (Abcam), Cambridge, UK], 抗CD20, CD79 α , CD10, CD30, CD3抗体 (以上 Dako) であった。

2) 蛍光抗体法

10%ホルマリン固定後のパラフィンブロックから3 μ mに薄切したパラフィン切片を脱パラフィン後、抗原賦活化液 pH9.0 に浸漬し圧力鍋 (高圧) で加熱処理をおこなった。その後MALT1とBCL10抗体を同時に4 $^{\circ}$ Cで一昼夜反応させ、洗浄後二次抗体を反応させてからfluorescein isothiocyanate [FITC, Vector Laboratories, Inc. (Vector), Burlingame, CA, USA)]とTexas red avidine D (Vector) でラベルして蛍光顕微鏡 [オリンパス (株), 東京] で観察した。使用した抗体は抗BCL10 (DAKO), 抗MALT1 (Abcam), 抗マウス・ビオチン化抗体, 抗ウサギ・ビオチン化抗体, Texas red avidine D, FITC avidine D (以上 Vector) であった。

3. ウエスタンブロット法

遠心回収後の培養細胞を2 \times sodium dodecyl sulfate

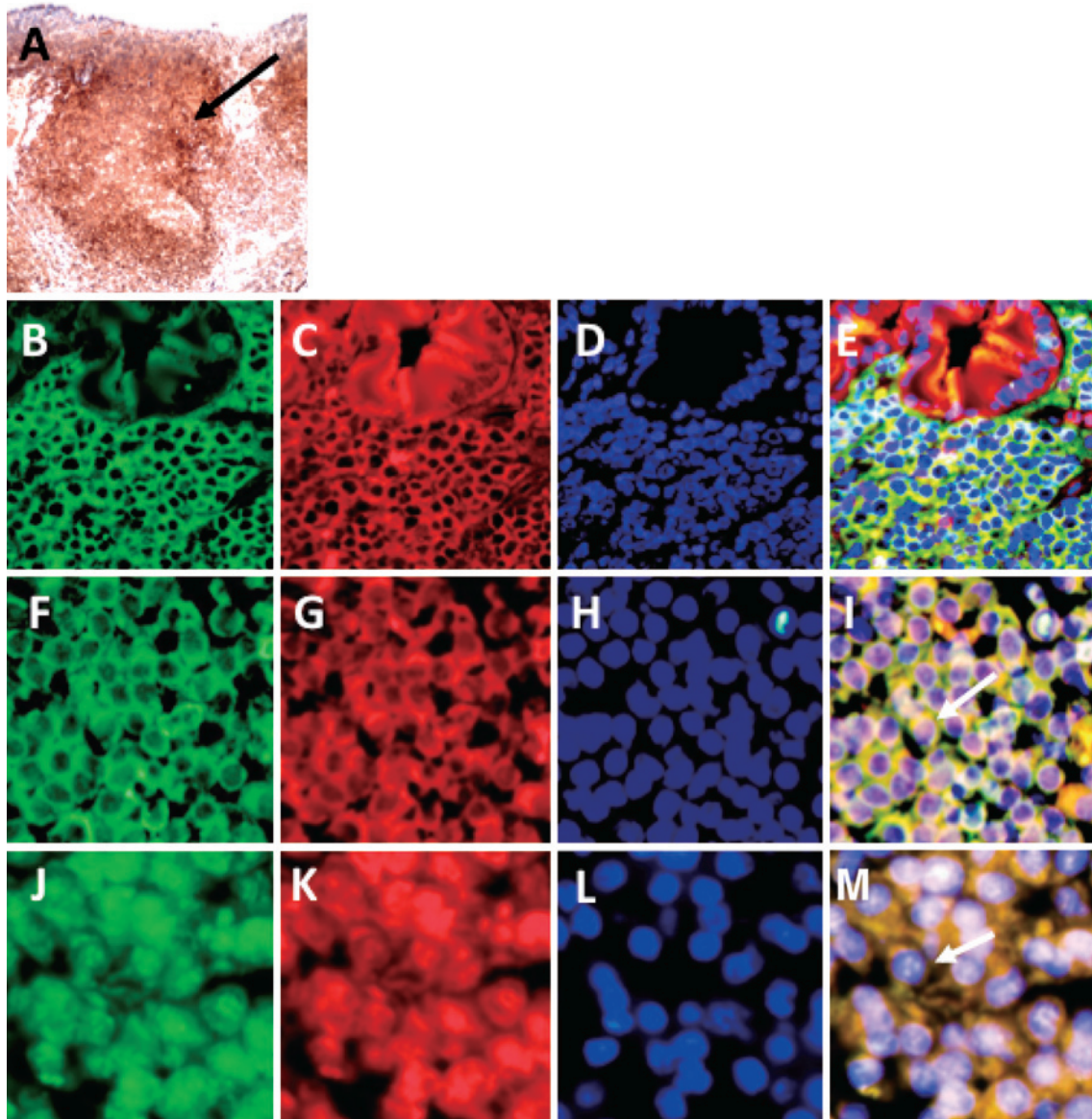


Fig. 2 Expression of MALT1 and BCL10 proteins in MALT lymphoma cells.

A: MALT1 expression in lymphoid follicles of MALT lymphoma (arrow). B, C, D, E: Coexpression of MALT1 and BCL10 in MALT lymphoma cells. Positive staining with BCL10 (B), MALT1 (C), and DAPI (D) is indicated by green, red, and blue fluorescence, respectively. A merged image (E) shows MALT1 and BCL10 colocalization, indicated by yellow fluorescence, confined to the cytoplasm of positive cells. F, G, H, I, J, K, L, M: Coexpression of MALT1 and BCL10 in the nucleus and cytoplasm. Positive staining with BCL10 (F, J), MALT1 (G, K), and DAPI (H, L) is indicated by green, red, and blue fluorescence, respectively. Merged images (I, M) show MALT1 and BCL10 colocalization, identified by yellow fluorescence, in the nucleus and cytoplasm. Nuclear staining in I and M shows homogeneous staining (arrow) and spotty staining of irregularly shaped granules (arrow) positive for both proteins, respectively.

MALT: extranodal marginal zone B-cell lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue, BCL10: B-cell lymphoma/leukemia 10, DAPI: 4', 6-diamidino-2-phenylindole.

(SDS)処理バッファー[0.5M トリス-HCl(pH6.8), 1%SDS, 20% グリセリン, 1%2-メルカプトエタノール] 95℃ で1分間熱処理し, 10% SDS ゲル [マルチゲル®II ミニ; コスモ・バイオ (株), 東京] で 80~120V で流動した. その

後型通りにブロッティングし, メンブランに転写された蛋白をアルカリフォスファターゼ標識抗マウス Ig [Cell Signaling Technology Inc. (CST), Danvers, MA, USA], アルカリフォスファターゼ標識抗ウサギ Ig (CST) を用い

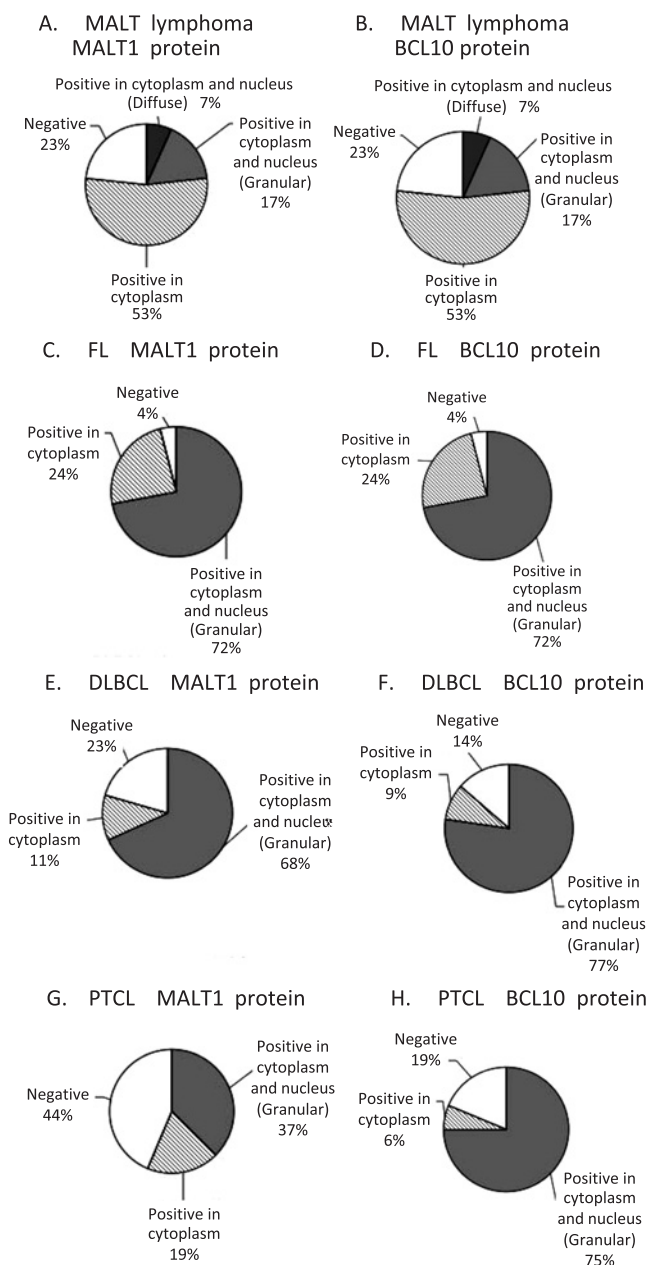


Fig. 3 Comparison of numbers of lymphoma cells positive for MALT1 and BCL10 among samples of MALT lymphoma, FL, DLBCL, and PTCL.

Pie charts show the numbers of cells positive for MALT1 and BCL10 in the cytoplasm and nucleus for each type of lymphoma. MALT: extranodal marginal zone B-cell lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue, FL: follicular lymphoma, DLBCL: diffuse large B-cell lymphoma, PTCL: peripheral T-cell lymphoma

てアルカリフォスファターゼ法で検出した。使用した抗体は抗BCL10, 抗MALT1, 抗NF- κ B p65 (CST)²¹⁾, 抗CARMA1 (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA), 抗 β アクチン (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA) であった。

4. 統計学的解析

ウェスタンブロット法で検出された蛋白バンドをスキャナーで取り込みデジタル化し、その画像をImage J (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA: <http://imagej.nih.gov/ij/>) で定量化した。その定量化された発現量をStat View (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) を用いた analysis of variance (ANOVA) 法による解析後、Bonferroni 法を適用し、 p -value<0.05 を有意差と判定した。

結 果

1. 正常リンパ装置における MALT1 と BCL10 蛋白の発現性

正常リンパ節における MALT1 蛋白はリンパ濾胞辺縁帯に発現し (Fig. 1A), CD79 α との二重染色からリンパ濾胞辺縁帯の B 細胞に発現していることが確認できた (Fig. 1B, C, D, E)。正常扁桃でもリンパ濾胞辺縁帯の B 細胞に強く発現していた。したがって本抗体で認識される MALT1 蛋白は MALT リンパ腫発症母地である濾胞辺縁帯に強い反応性を示していることが確認できた。BCL10 は従来の報告と同様に^{6,8)}、濾胞胚中心細胞と濾胞辺縁帯細胞に強く発現し、暗殺細胞にも軽度の発現がみられた。免疫組織化学染色では両蛋白ともに細胞質主体の発現性を示し、さらに蛍光二重染色にて両蛋白の細胞内局在を検討した。その結果、MALT1 と BCL10 の両蛋白ともに細胞質に局限した発現性が確認された (Fig. 1F, G, H, I)。

2. 悪性リンパ腫 (ML) 細胞における MALT1 と BCL10 蛋白の発現性

1) MALT リンパ腫

一般に MALT リンパ腫の増殖様式には、びまん性増殖様式と反応性リンパ濾胞にリンパ腫細胞が増殖する follicular colonization 様式がみられる^{3,9,22)}。今回の免疫組織化学では MALT1 蛋白はびまん性増殖部よりも follicular colonization 部で強く発現していた (Fig. 2A)。蛍光二重染色による MALT1 と BCL10 蛋白の細胞内局在観察から、全症例で MALT1 蛋白と BCL10 蛋白の局在部位は完全に一致していた (Fig. 3A, B)。MALT リンパ腫症例 30 例のうち両蛋白の発現症例は 23 例 (76.7%) であり、両蛋白の発現がない症例は 7 例 (23.3%) であった。全症例のうち、核と細胞質ともに発現している症例が 7 例 (23.3%) であり、細胞質のみ (Fig. 2B, C, D, E) の発現症例は 16 例 (53.4%)、核のみの発現例はなかった。細胞質の発現性は全例がびまん性に発現し、核ではびまん性の発現症例 (Fig. 2F, G, H, I) が 2 例 (6.7%) と粗大顆粒状の発現症例 (Fig. 2J, K, L, M) が 5 例 (16.6%) であった。

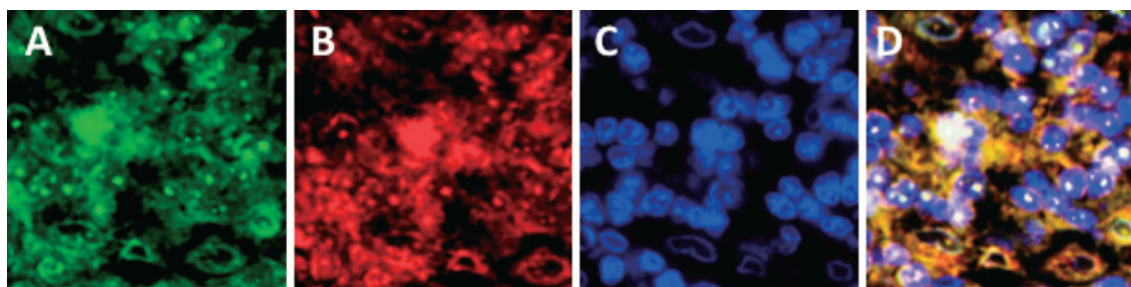


Fig. 4 Coexpression of MALT1 and BCL10 in the nucleus and cytoplasm of diffuse large B-cell lymphoma cells. Positive staining with BCL10 (A), MALT1 (B), and DAPI (C) is indicated by green, red, and blue fluorescence, respectively. A merged image (D) shows MALT1 and BCL10 colocalization, indicated by yellow fluorescence, in the nucleus and cytoplasm. Nuclear staining in D shows irregularly shaped large granules positive for both proteins.

MALT: extranodal marginal zone B-cell lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue, BCL10: B-cell lymphoma/leukemia 10, DAPI: 4', 6-diamidino-2-phenylidole.

2) 濾胞性リンパ腫 (FL)

FLではMALT1蛋白は胚中心部に強く発現していた。MALTリンパ腫と同様、FLにおいてもMALT1蛋白とBCL10蛋白の発現局在は完全に一致していた (Fig. 3C, D)。両蛋白の発現症例は24例 (96.0%)であり、両蛋白の発現がない症例は1例であった。全症例のうち核と細胞質ともに発現する症例が18例 (72.0%)でありMALTリンパ腫症例より明らかに増加しており、細胞質のみ発現する症例が6例 (24.0%)、核のみの発現症例はなかった。全症例において両蛋白が細胞質でびまん性に発現し、核ではすべて粗大顆粒状に発現していた。

3) びまん性大細胞型リンパ腫 (DLBCL) 細胞

FLに比較してDLBCLでは、BCL10蛋白とMALT1蛋白が弱くびまん性に発現していた。両者の蛋白の局在は44例中39例 (89.6%)で一致し、残りの5例は異なる発現様式を示し (Fig. 3E, F)、全例が細胞質のびまん性発現性と核の粗大顆粒状発現性を示していた (Fig. 4A, B, C, D)。DLBCL 44例のうちMALT1蛋白発現症例は35例 (79.5%)であり、核と細胞質ともに発現している症例が30例 (68.2%)でありMALTリンパ腫症例より明らかに増加しており、細胞質のみの発現症例が5例 (11.3%)であり、核のみの発現症例はなかった。細胞質ではびまん性の発現症例が全例であり、核は全例が粗大顆粒状の発現性であった。BCL10蛋白の発現症例は38例 (86.4%)であり、核と細胞質両者の発現症例は34例 (77.3%)でありMALTリンパ腫症例より明らかに増加しており、細胞質のみの発現症例が4例 (9.1%)、核のみの発現症例はなかった。

4) 末梢性T細胞リンパ腫 (PTCL) 細胞

PTCL 16例中、両蛋白の局在は16例中12例 (75.0%)で一致しており、残りの4例は異なる発現様式を示していた (Fig. 3G, H)。うちMALT1蛋白発現症例は9例 (56.3%)であり他のMLに比べて減少し、核と細胞質ともに発現

する症例は6例 (37.5%)であり、細胞質のみの発現症例は3例 (18.8%)、核のみの発現症例はなかった。これに対してBCL10蛋白の発現症例はMALT1蛋白発現症例より増加し13例 (81.3%)であり、核と細胞質ともに発現する症例は12例 (75.0%)であり、細胞質のみの発現症例が1例 (6.3%)、核のみの発現症例はなかった。両蛋白ともに全例が細胞質のびまん性発現と核の粗大顆粒状発現性を示していた。

3. 培養細胞を用いた MALT1, BCL10, NF- κ B p-65, CARMA1 蛋白の細胞質内の発現性

培養のML細胞および急性リンパ球性白血病細胞の細胞レベルにおけるMALT1, BCL10, NF- κ B p-65, CARMA1蛋白の発現量をウエスタンブロット法で検索した (Fig. 5A)。細胞全体におけるMALT1蛋白の発現量は、CCRF-SB急性リンパ性白血病細胞・B細胞型とTK大細胞型B細胞性リンパ腫細胞で高く、TK細胞ではCCRF-SB細胞を除くすべての腫瘍細胞に対し有意に増加していた (Fig. 5C)。BCL10とNF- κ B p-65はTKびまん性大細胞型リンパ腫細胞で発現量が最も高く、特に後者は他の腫瘍細胞より有意に増加していた (Fig. 5D, E)。CARMA1はCCRF-CEM急性リンパ性白血病細胞・T細胞型とCA46 Burkittリンパ腫細胞で発現量が高かった (Fig. 5B)。核分画における発現量はすべての細胞でMALT1蛋白発現が確認でき、特にBCL10蛋白の発現はTKびまん性大細胞型リンパ腫細胞で強い発現がみられた (Fig. 5F)。

考 察

Ye et al.の報告によれば、MALTリンパ腫における染色体非転座群ではMALT1とBCL10蛋白はともに細胞質内に発現し、t (11; 18) (q21; q21)ではMALT1は細胞質内、BCL10は核内、t (1; 14) (p22; q32)ではMALT1は細胞質内、BCL10は核内、t (14; 18) (q32; q21)では

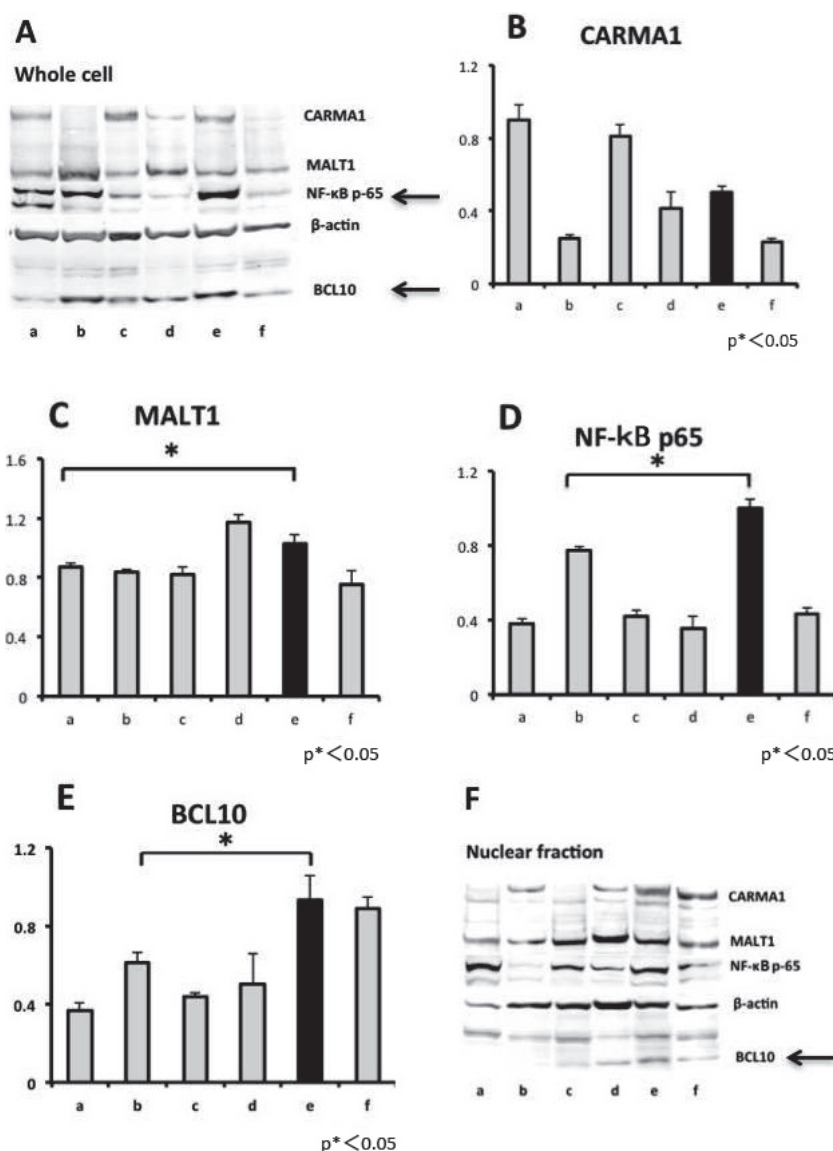


Fig. 5 Western blot analysis of MALT1, BCL10, CARMA1, and NF-κB p65 protein expression in cultured lymphoma cells.

A, B, C, D, E: Western blot analysis in whole-cell lysates NF-κB p65, BCL10 (arrow). Bars represent densitometric analyses of the ratio of CARMA1 (B), MALT1 (C), NF-κB p65 (D), and BCL10 (E) to β-actin, in independent experiments. Results are presented as mean ± SEM ($p^* < 0.05$). F: Western blot analysis of MALT1, BCL10, CARMA1, and NF-κB p65 protein expression in the nuclear fraction BCL10 (arrow). a: CCRF-CEM acute lymphoblastic leukemia cells (T cells), b: HD-70 Hodgkin lymphoma cells, c: CA46 Burkitt lymphoma cells, d: CCRF-SB acute lymphoblastic leukemia cells (B cells), e: TK diffuse large B-cell lymphoma cells, f: A4/Fuk T-cell lymphoma cells.

CARMA1: caspase recruitment domain-containing protein 1, MALT: extranodal marginal zone B-cell lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue, NF-κB: nuclear factor-kappa B, BCL10: B-cell lymphoma/leukemia 10

ともに細胞質内の発現性が認められた^{3, 8, 23, 24)}。他の報告でもほぼ同様の結果が認められ、MALT リンパ腫関連染色体転座に起因する両蛋白の細胞内局在変化と考えられ

た^{9, 22)}。またこれは MALT1 と BCL10 蛋白の細胞内局在パターンから MALT リンパ腫関連染色体の転座パターンの判定可能なことを示唆した。しかしながら本研究における

両蛋白の細胞内局在観察では、正常リンパ節のリンパ球細胞質に局限した MALT1 と BCL10 蛋白が FL や DLBCL では細胞質と核の両者に発現が増加していた。培養細胞における細胞質分画における発現量を検討すると、培養 DLBCL 細胞では細胞内の BCL10 蛋白と NF- κ B p-65 の有意な発現増加がみられ、同時に核内でも BCL10 蛋白の発現増加が確認された。このことから一部の ML、特に DLBCL における MALT1 と BCL10 の核内発現症例は、細胞質内の余剰な BCL10 蛋白量を示すと同時に、この余剰な BCL10 蛋白は NF- κ B 活性化の亢進に寄与することが示唆された。

従来の報告と同様、MALT リンパ腫では MALT1 と BCL10 両蛋白の核内発現が確認され、今回、従来の報告にあった核内のみの発現症例は確認できなかった。これまでの検索による酵素抗体法で検出されなかった細胞質内の発現性が、感度の高い蛍光染色法を実施したことで検出可能になったものと考えられる。また、新たに検出された染色パターンとして MALT リンパ腫の核内における BCL10 蛋白のびまん性または顆粒状発現性が判明した。現在までの報告では、BCL10 の核内発現が、MALT リンパ腫関連染色体転座を欠く NK/T 細胞性リンパ腫や非腫瘍性病変である原発性シェーグレン症候群の浸潤リンパ球においても確認された^{10, 25)}。本研究においては FL、DLBCL、PTCL でも MALT1 および BCL10 の核内発現が確認された。これらの結果を考慮すると、BCL10 蛋白の核内発現が MALT リンパ腫関連の染色体転座に起因するという従来の説に加えて、MALT リンパ腫関連染色体転座以外の核内発現機構が関与していると考えられた。

今回の検索では、DLBCL は MALT リンパ腫と FL と比較して核における MALT1 と BCL10 の両者の発現症例が多く、両蛋白の核内発現率の増加が認められた。逆に細胞質のみの両蛋白の発現頻度は MALT リンパ腫に最も高く、続いて FL に高く、DLBCL では極めて低かった。これは BCL10 の核内移行が DLBCL で最も多く、MALT リンパ腫で少ないことを示す。概して ML 病型と予後の関係は、DLBCL に比べて MALT リンパ腫は進行が緩徐であることが知られている^{9, 22, 26)}。これらの所見から BCL10 核内移行は DLBCL の造腫瘍性亢進に寄与していることが示唆された。また、PTCL に関しては近年 Briones et al. や Shen et al. の報告によれば、本来は B 細胞で検出された BCL10 蛋白発現が、T 細胞でも確認されている^{7, 10, 11, 27, 28)}。今回の結果からも BCL10 蛋白の発現については 81.0% の陽性率であり、細胞質のみ (6.0%) に比べ核と細胞質両方 (75.0%) に多く発現されるという DLBCL と類似の結果が得られた。さらに PTCL における MALT1 蛋白については他の組織型に比較して全体の発現率は低いことが判明した。これらの結果から PTCL においても BCL10 が

CARMA1 と MALT1 とのシグナロソーム形成への関与が想定されるが、今回検索した PTCL においては MALT1 蛋白の発現が他のリンパ腫より低いことから、PTCL におけるシグナロソーム形成の量的あるいは質的な異常が示唆された。今後 PTCL におけるシグナロソーム形成異常の詳細な検索が必要と考えられた。

従来提唱された BCL10 蛋白の細胞内移送説^{13, 16)}によれば、正常リンパ球では BCL10 が核内から核外へ移行することで BCL10 の細胞質局在が観察されると考えられてきた。これに対して t (11; 18) (q21; q21) あるいは t (1; 14) (p22; q32) の染色体転座を有する MALT リンパ腫ではこれらの遺伝子変異により BCL10 の輸送不全や BCL10 過剰産生が生じることで核外への移行が不十分になり核内に BCL10 が蓄積すると推察された^{3, 16, 23, 29, 30)}。しかし今回の結果から MALT リンパ腫関連染色体転座の頻度が極めて少ない FL や DLBCL でも BCL10 の核内発現症例が多く確認されたので、上記の染色体転座以外の機序が BCL10 核内発現に関与していることが示唆された。最近の説では CARMA1-BCL10-MALT1 シグナロソームが細胞質で十分量形成されると、シグナロソーム形成で余った BCL10 は細胞質から核内に移行することが提唱されている¹³⁻¹⁵⁾。このことは、BCL10 の核内移行はシグナロソーム形成で余剰な細胞質内の BCL10 量を反映し、この余剰な細胞質の BCL10 量は十分量のシグナロソーム形成を示していると考えられる。また一方、CARMA1-BCL10-MALT1 シグナロソームは NF- κ B の活性を誘導することが判明している。このことから上記で示した余剰な細胞質内 BCL10 量に裏付けられた十分量のシグナロソーム形成は、NF- κ B シグナル伝達亢進による腫瘍化機構に関与している可能性が考えられる。今回の検索では DLBCL 細胞株 (TK 細胞株) において細胞内の NF- κ B と BCL10 発現量が有意に高く、しかも核内の BCL10 発現性も高いことが確認された。今回は技術的な問題から、DLBCL 症例組織検体における NF- κ B p65 発現性は判定できなかったが、今回の培養細胞の解析結果から ML、特に DLBCL 群における MALT1 と BCL10 の核内発現症例は、上記の機序により NF- κ B の活性が亢進している可能性が考えられた。

東邦大学医学部病理学講座の技術員である佐藤月子さんと円谷佳代さんに技術的なご指導をいただき、深く御礼申し上げます。また、悪性リンパ腫検体の病理診断に多大なご助言を頂戴しました東邦大学医学部病院病理学講座に感謝いたします。

文 献

- 1) Auer IA, Gascoyne RD, Connors JM, et al: t (11; 18) (q21; q21) is the most common translocation in MALT lymphomas. *Ann Oncol* 8: 979-985, 1997

- 2) Gallardo F, Bellosillo B, Espinet B, et al.: Aberrant nuclear BCL10 expression and lack of t (11 ; 18) (q21 ; q21) in primary cutaneous marginal zone B-cell lymphoma. *Hum Pathol* **37**: 867-873, 2006
- 3) Izumiyama K, Nakagawa M, Yonezumi M, et al.: Stability and subcellular localization of API2-MALT1 chimeric protein involved in t (11 ; 18) (q21 ; q21) MALT lymphoma. *Oncogene* **22**: 8085-8092, 2003
- 4) Liu H, Ye H, Dogan A, et al.: T (11 ; 18) (q21 ; q21) is associated with advanced mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma that expresses nuclear BCL10. *Blood* **98**: 1182-1187, 2001
- 5) Liu H, Hamoudi RA, Ye H, et al.: t (11 ; 18) (q21 ; q21) of mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma results from illegitimate non-homologous end joining following double strand breaks. *Br J Haematol* **125**: 318-329, 2004
- 6) Du MQ, Peng H, Liu H, et al.: BCL10 gene mutation in lymphoma. *Blood* **95**: 3885-3890, 2000
- 7) Ye H, Dogan A, Karran L, et al.: BCL10 expression in normal and neoplastic lymphoid tissue. Nuclear localization in MALT lymphoma. *Am J Pathol* **157**: 1147-1154, 2000
- 8) Nakamura K, Senda T, Sato K, et al.: Accumulation of BCL10 at the perinuclear region is required for the BCL10-mediated nuclear factor-kappa B activation. *Pathobiology* **72**: 191-202, 2005
- 9) Sagaert X, Laurent M, Baens M, et al.: MALT1 and BCL10 aberrations in MALT lymphomas and their effect on the expression of BCL10 in the tumour cells. *Mod Pathol* **19**: 225-232, 2006
- 10) Shen L, Liang AC, Lu L, et al.: Aberrant BCL10 nuclear expression in nasal NK/T-cell lymphoma. *Blood* **102**: 1553-1554, 2003
- 11) Briones J, Moga E, Espinosa I, et al.: Bcl-10 protein highly correlates with the expression of phosphorylated p65 NF-κB in peripheral T-cell lymphomas and is associated with clinical outcome. *Histopathology* **54**: 478-485, 2009
- 12) Merzianu M, Jiang L, Lin P, et al.: Nuclear BCL-10 expression is common in lymphoplasmacytic lymphoma/Waldenström macroglobulinemia and does not correlate with p65 NF-κB activation. *Mod Pathol* **19**: 891-898, 2006
- 13) Chan KK, Shen L, Au WY, et al.: Interleukin-2 induces NF-κB activation through BCL10 and affects its subcellular localization in natural killer lymphoma cells. *J Pathol* **221**: 164-174, 2010
- 14) Thome M: CARMA1, BCL-10 and MALT1 in lymphocyte development and activation. *Nat Rev Immunol* **4**: 348-359, 2004
- 15) Du MQ: MALT lymphoma: Many roads lead to nuclear factor-κB activation. *Histopathology* **58**: 26-38, 2011
- 16) Nakagawa M, Hosokawa Y, Yonezumi M, et al.: MALT1 contains nuclear export signals and regulates cytoplasmic localization of BCL10. *Blood* **106**: 4210-4216, 2005
- 17) Sagaert X, De Wolf-Peters C, Noels H, et al.: The pathogenesis of MALT lymphomas: Where do we stand? *Leukemia* **21**: 389-396, 2007
- 18) Ott G, Katzenberger T, Greiner A, et al.: The t (11 ; 18) (q21 ; q21) chromosome translocation is a frequent and specific aberration in low-grade but not high-grade malignant non-Hodgkin's lymphomas of the mucosa-associated lymphoid tissue (MALT-) type. *Cancer Res* **57**: 3944-3948, 1997
- 19) Rosenwald A, Ott G, Stilgenbauer S, et al.: Exclusive detection of the t (11 ; 18) (q21 ; q21) in extranodal marginal zone B cell lymphomas (MZBL) of MALT type in contrast to other MZBL and extranodal large B cell lymphomas. *Am J Pathol* **155**: 1817-1821, 1999
- 20) 吉野 正 : 節外性濾胞辺縁帯リンパ腫 (MALT リンパ腫), 最新・悪性リンパ腫アトラス (菊池昌弘, 森 茂郎編) p130-136. 文光堂, 東京, 2004
- 21) Talwalkar SS, Valbuena JR, Abruzzo LV, et al.: MALT1 gene rearrangements and NF-κB activation involving p65 and p50 are absent or rare in primary MALT lymphomas of the breast. *Mod Pathol* **19**: 1402-1408, 2006
- 22) Ye H, Gong L, Liu H, et al.: MALT lymphoma with t (14 ; 18) (q32 ; q21)/IGH-MALT1 is characterized by strong cytoplasmic MALT1 and BCL10 expression. *J Pathol* **205**: 293-301, 2005
- 23) Ye H, Gong L, Liu H, et al.: Strong BCL10 nuclear expression identifies gastric MALT lymphomas that do not respond to *H. pylori* eradication. *Gut* **55**: 137-138, 2006
- 24) Ho L, Davis RE, Conne B, et al.: MALT1 and the API2-MALT1 fusion act between CD40 and IKK and confer NF-κB-dependent proliferative advantage and resistance against FAS-induced cell death in B cells. *Blood* **105**: 2891-2899, 2005
- 25) Gatumu MK, Jonsson MV, Øijordsbakken G, et al.: Nuclear BCL10 in primary Sjögren's syndrome. *J Oral Pathol Med* **38**: 501-507, 2009
- 26) Nakamura S, Nakamura S, Matsumoto T, et al.: Overexpression of caspase recruitment domain (CARD) membrane-associated guanylate kinase 1 (CARMA1) and CARD9 in primary gastric B-cell lymphoma. *Cancer* **104**: 1885-1893, 2005
- 27) Coornaert B, Baens M, Heynink K, et al.: T cell antigen receptor stimulation induces MALT1 paracaspase-mediated cleavage of the NF-κB inhibitor A20. *Nat Immunol* **9**: 263-271, 2008
- 28) Rebeaud F, Hailfinger S, Posevitz-Fejfar A, et al.: The proteolytic activity of the paracaspase MALT1 is key in T cell activation. *Nat Immunol* **9**: 272-281, 2008
- 29) Ye H, Liu H, Attygalle A, et al.: Variable frequencies of t (11 ; 18) (q21 ; q21) in MALT lymphomas of different sites: Significant association with CagA strains of *H. pylori* in gastric MALT lymphoma. *Blood* **102**: 1012-1018, 2003
- 30) Liu H, Ye H, Ruskone-Fourmestreaux A, et al.: T (11 ; 18) is a marker for all stage gastric MALT lymphomas that will not respond to *H. pylori* eradication. *Gastroenterology* **122**: 1286-1294, 2002

Aberrant Nuclear Expression of MALT1 and BCL10 in Malignant Lymphoma Cells

Tomoko Yokoo

Department of Pathology, School of Medicine, Faculty of Medicine, Toho University

ABSTRACT

Background: Nuclear expression of MALT1 and B-cell lymphoma/leukemia 10 (BCL10) was identified in extranodal marginal zone B-cell lymphoma of mucosa-associated tissue (MALT lymphoma) associated with translocation of t (1; 14) or (11; 18). Recently, aberrant nuclear expression of BCL10 was found in a subset of malignant lymphoma not including MALT lymphomas. However, the significance of nuclear expression of these 2 proteins in the pathogenesis of lymphoma cells remains to be elucidated.

Methods: Subcellular localization of the MALT1 and BCL10 proteins was examined in various types of lymphoma cells, including 30 cases of MALT lymphoma, 25 cases of follicular lymphoma (FL), 44 cases of diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL), and 16 cases of peripheral T-cell lymphoma (PTCL). We also assessed protein levels of MALT1, BCL10, CARMA1, and NF- κ B p65 in whole-cell and nuclear fractions of cultured lymphoma cells.

Results: Nuclear and cytoplasmic expression of MALT1 and BCL10 was identified in MALT lymphoma, DLBCL, and FL, and the number of cases that were positive for both proteins was markedly higher for DLBCL and FL than for MALT lymphoma. DLBCL and FL displayed spotty nuclear staining with irregularly shaped granules that were positive for both proteins. Cultured DLBCL cells had significantly increased expressions of MALT1, BCL10, and NF- κ B p65 in whole-cell lysate and markedly increased BCL10 expression in nuclear fractions.

Conclusions: The marked difference between DLBCL and MALT lymphoma in positive rates of MALT1 and BCL10 nuclear expression indicates that there is no significant correlation between the nuclear expressions of these proteins and MALT lymphoma-associated translocation. The positive relationship in BCL10 expression between whole-cell and nuclear fractions of cultured DLBCL cells suggests that BCL10 nuclear expression is mediated by its level in cytoplasm. This might represent the activation status of NF- κ B, which is mediated by the formation of the CARMA1-BCL10-MALT1 signalosome.

J Med Soc Toho 59 (5): 226–235, 2012

KEYWORDS: malignant lymphoma, MALT1, BCL10, NF- κ B