



KR9700231

KAERI/RR-1648/96

Mantle cell lymphoma의 진단 및 bcl-1 유전자
재배열의 검출

Diagnosis of mantle cell lymphoma and detection
of bcl-1 gene rearrangement

研究機關

原子力病院

韓國原子力研究所

29-01

KAERI/RR-1648/96

Mantle cell lymphoma의 진단 및 bcl-1 유전자
재배열의 검출

Diagnosis of mantle cell lymphoma and detection
of bcl-1 gene rearrangement

研究機關
原子力病院

韓國原子力研究所

제 출 문

한국 원자력 연구소 소장 귀하

본 보고서를 "mantle cell lymphoma의 진단 및 bcl-1 유전자 재배열의 검출" 과제의 최종보고서로 제출합니다.

1996년 12월 31일

연구실명: 해부병리과

연구책임자: 이 승 숙

연 구 원: 조 경 자

연 구 원: 이 선 주

감수 위원: 류 성 렬

이 진 오

요 약 문

I. 제 목: Mantle cell lymphoma 의 진단 및 bcl-1 유전자 재배열의 검출

II. 연구의 목적 및 필요성

Mantle cell lymphoma (MCL)는 최근 특징적인 분자유전학적 특성을 가진 독특한 형태의 B-세포 림프종으로 분류되고 있다. 이는 NCI Working Formulation이나 Rappaport분류법으로는 정확하게 진단될 수 없으며 Kiel Classification으로는 centrocytic lymphoma에 속한다. 이는 병리학적으로나 임상적으로나 특별한 형태이므로 그 정확한 진단이 중요함에도 불구하고 현재 통상적으로 쓰이는 분류법으로나 진단방법으로는 진단에 도달하기가 어렵다. 더구나 우리나라에서는 이에 대한 연구 보고가 전무하여 그 빈도나 우리나라에서의 특징이 전혀 알려진 바 없다. 이에 우선 우리나라에서의 MCL의 질병빈도를 파악하고 이를 진단할 수 있는 기틀을 다지는 일이 급선무이며 이를 위하여 원자력병원에서 림프종으로 진단된 예들을 REAL classification에 근거하여 재분류하고 MCL에 관한 연구를 하고자 한다. 이는 한국에서는 첫 시도가 될 것으로 생각되며 이러한 결과는 환자의 치료에 직접적인 연관성을 갖고 환자진료의 질(質)을 높일수 있을 뿐만 아니라 림프종 연구에 중요한 시도가 될 것이다.

III. 연구의 내용 및 범위

원자력병원에서 1991년 부터 1995년 까지 진단된 371명의 림프종 환자를 대상으로 REAL classification에 의한 조직학적 재분류를 시도하였다. Low-grade B-cell lymphoma에 해당되는 예들에 대하여 T-cell(UCHL-1), B-cell(CD19, CD20), MT-1(CD43), CD5를 면역조직화학염색으로 확인 분류하고, MCL 예들에 대하여 cyclin D1을 면역조직화학염색으로 시도하는 한편 조직의 DNA를 추출하여 PCR로 bcl-1 gene rearrangement를 검사하여 비교분석함으로써 MCL 진단에 가장 쉽고 믿음만한 방법을 정립하여 향후 진단에 이용하고자 하였다. 또한 증례들의 임상기록지를 검토하여 예후와의 관련성을 분석하였다.

IV. 연구의 결과

REAL classification으로 분류했을때, diffuse large B-cell lymphoma가 51.7%로서 가장 많고 T-cell lymphoma 중에서 peripheral T-cell lymphoma, unspecified (10%)와 angiocentric lymphoma (7.5%)가 그 다음으로 높은 빈도를 나타냈다. 외국의 분포와는 대조적으로 nodal보다 extranodal lymphoma가 더 많았고 follicular lymphoma의 빈도가 매우 낮으며 (4.5%), low-grade lymphoma의 빈도가 낮아, 80% 이상이 intermediate-grade에 속한다. 우리나라 림프종은 대부분 intermediate grade에 속하므로 이 group에 대한 진단적 세분화가 더욱 요구되며 따라서 REAL classification이 유용한 경우가 많다.

Mantle cell lymphoma는 14예로서 전체의 3.8%를 차지하였고 병리학적 조직소견 중 다른 low-grade B-cell lymphoma와 비교하여 의미있는 차이를 보인 것은 mitoses로서 MCL에서는 평균 17/10HPF이며 small biopsy를 제외한 전 예에서 10/10HPF 이상이었다. CD5는, MCL에서는 7/8, SLL에서는 2/5에서 양성을 보였고, CD43은 각각 3예에서 양성이었다. 면역표지검사만으로는 MCL과 SLL의 감별이 어렵고, cyclinD1의 검출이 MCL 진단에 중요하다. PCR 방법 보다 cyclinD1 면역조직화학염색이 sensitivity가 높으며, 두 방법 모두 MCL진단에 specific하였다. (PCR 양성; 3/10, 면역조직화학염색 양성; 7/9)

Low-grade B-cell lymphoma 각각의 group간에는 생존율에 유의한 차이가 없었으나 ($p=0.12$), MCL과 나머지 low-grade B-cell lymphomas (SLL+MALT+LPL) 간에는 유의한 차이가 있으며 ($p=0.01$), MCL과 SLL간에도 유의한 차이를 나타냈다 ($p<0.05$).

V. 연구개발결과의 활용계획

1. 본 연구를 통해 lymphoma 의 새로운 분류법인 REAL classification을 도입하여, 현재까지 사용해온 NCI Working Formulation과 공존하여 진단에 사용하며 이를 위해 모든 림프종 예들에 대하여 몇가지 중요한 면역표지검사를 시행한다.
2. bcl-1 PCR 보다 간단하고 reproducible한 cyclinD1 면역조직화학염색이 실제 MCL을 진단하는데 더 유용하다는 결론에 도달하여, 실제 진단업무에 적용한다.
3. 이제까지는 통상적으로 쓰이지 않던 autoclave를 이용한 전처치 방법은 특히 CD5와 cyclinD1의 염색에 있어 좋은 결과를 가져왔으며, 앞으로 다른 어떤 연구에 있어서도 필요한 기술이 될 것이
4. 본 결과는 림프종연구의 기초자료로 이용될 것이다.

SUMMARY

I. Project Title

Diagnosis of mantle cell lymphoma and detection of bcl-1 gene rearrangement

II. Objectives and Importance of the Project

Recently mantle cell lymphoma (MCL) has been classified as a distinct clinicopathologic entity of B-cell lymphoma, associated with the overexpression of PRAD1/cyclinD1, 11q13 translocation and its molecular counterpart bcl-1 gene rearrangement. MCL is not readily classifiable by NCI working formulation, and belongs to centrocytic lymphoma by Kiel classification. Although the diagnosis of MCL is important to manage the MCL patients, conventional methods for lymphoma classification and routine immunohistochemistry cannot make an accurate diagnosis. Moreover, there has been no Korean report on MCL. We examined non-Hodgkin's lymphomas according to REAL classification and obtained the incidence of MCL. We tried to study clinicopathologic features and reliable diagnostic methods for MCL in Korea. It may be a first trial in Koreans. Our results may support the management of MCL patients and will be an meaningful trial to study lymphoma.

III. Scope and Contents of the Project

We reclassified a large series of 371 non-Hodgkin's lymphoma patients at Korea Cancer Center Hospital from 1991 to 1995, according to REAL classification. We classified the low-grade B-cell lymphoma cases by immunophenotypic study using UCHL-1, CD20, CD43, and CD5, and tried to compare cyclinD1 immunohistochemistry and PCR for bcl-1 gene rearrangement. By these methods we want to determine the easy and the most reliable diagnostic methods for MCL and apply this for routine diagnosis. We showed statistical significance of clinical outcome.

IV. Results of the Project

By REAL classification, diffuse large B-cell lymphoma was the most common type (51.8%) and was followed by peripheral T-cell lymphoma-undefined(10%) and angiocentric lymphoma(7.5%). In contrast with foreign reports, extranodal lymphoma was more common than nodal type in Korea. Incidence of low-grade lymphoma was low and majority (more than 80%) of Korean lymphoma belongs to intermediate grade. Therefore REAL classification may be useful in Korea.

MCL comprised 3.8% (14 cases) among non-Hodgkin's lymphoma. The most reliable histologic finding was mitosis in making a differential diagnosis from other low-grade B-cell lymphomas. Mitoses of MCL were 17/10HPF in average and all the cases showed more than 10/10HPF. CD5 were positive in 7/8 of MCL and 2/5 of SLL, and CD43 were positive in 3 cases of MCL and SLL, respectively. Immunophenotypic study alone cannot lead to a differential diagnosis between MCL and SLL, and the overexpression of cyclinD1 was the most important for diagnosis of MCL. Both immunohistochemistry for cyclinD1 and PCR for bcl-1 were specific for MCL, and immunohistochemistry was more sensitive than PCR.

Statistical analysis showed a different survival rate between MCL and the other low-grade B-cell lymphomas (SLL+MALT+LPL) and a difference between MCL and SLL. Immunohistochemical detection of cyclinD1 has a practical usefulness in making routine diagnosis of MCL. The initial accurate diagnosis of MCL will help clinicians make a proper management.

V. Proposal for Application

1. In addition to NCI Working Formulation, we will apply the REAL classification to make a routine diagnosis with immunophenotypic study.
2. We plan the application for immunohistochemical study for cyclinD1 to diagnostic practice, in the background of our results.
3. We can use the autoclave pretreatment method for immunohistochemical study for CD5, cyclinD1, and other difficult antibodies.
4. Our results of this project will serve important basic materials in studying lymphoma and MCL.

CONTENTS

Chapter 1	Introduction	1
Chapter 2	International and Domestic Situation of the Project	2
Chapter 3	Contents and Results of the Project	4
Chapter 4	Accomplishment of Objectives and External Contribution of the Project	12
Chapter 5	Proposal for application of the Project	13
Chapter 6	References	14

목 차

제 1 장	서 론	1
제 2 장	국내외 현황	2
제 3 장	연구내용 및 결과	4
제 4 장	연구개발목표 달성도 및 대외기여도	12
제 5 장	연구개발결과의 활용계획	13
제 6 장	참고문헌	14

제 1 장 서 론

Mantle cell lymphoma는 최근 특징적인 분자유전학적 특성을 가진 독특한 형태의 B-세포 림프종으로 분류되고 있다¹⁻⁶⁾. 이는 기존의 림프종의 분류법인 NCI Working Formulation이나 Rappaport 분류법으로는 정확하게 진단될 수 없으며 Kiel Classification으로는 centrocytic lymphoma에 속한다⁶⁾. Mantle cell lymphoma는 형태학적으로 intermediate differentiation의 lymphocytes로 구성되며, vaguely nodular 혹은 diffuse pattern을 취하고, mantle zone pattern, naked germinal center 등이 특징적인 조직소견으로 되어 있으며^{1,7)}, 면역표지상 CD5, IgM, IgD 등에 양성 반응을 보이며, CD10, CD23 음성인 특징을 가진다⁸⁻¹⁰⁾. 최근에 t(11;14)(q13,q32) trans- location 과 그 molecular counterpart인 bcl-1 gene rearrangement와의 연관이 알려졌고, 이로써 cyclin D1 mRNA와 단백질의 과발현을 종양에서 확인할 수 있게 되었다¹¹⁻¹⁶⁾. 이는 병리학적으로나 임상적으로나 특별한 형태의 림프종이므로 그 정확한 진단이 중요함에도 불구하고 현재 통상적으로 쓰이는 분류법으로나 진단방법으로는 진단에 도달하기가 어렵다⁶⁾. 더구나 우리나라에서는 이에 대한 연구보고가 전무하여 그 빈도나 우리나라에서의 특징이 전혀 알려진 바 없다. 외국에서는 mantle cell lymphoma의 진단 및 치료에 많은 노력을 기울여 새로운 치료를 시도하고 있고¹⁷⁾, 일반 병리진단에 11q13 translocation이나 bcl-1 gene rearrangement를 PCR의 방법으로 검사하는 기관도 있다. 이에 우선 우리나라에서의 mantle cell lymphoma의 질병빈도를 파악하고 이를 진단할 수 있는 기틀을 다지는 일이 필요하다고 생각되며, 이를 위하여 원자력병원에서 small cleaved cell type의 림프종으로 진단된 예들을 재검토하여 mantle cell lymphoma로 의심되는 예들을 찾고 이를 면역조직화학염색 및 PCR 등의 방법을 이용하여 확인하고자 한다. 또한 cyclin D1에 대한 면역조직화학염색과 bcl-1 gene에 대한 PCR의 결과를 비교하여 실제 진단에 이용할 수 있는 방법을 모색, 정착시키는 것이 이 연구 목적의 하나이다. 이에 최근 5년간 원자력병원에서 진단된 전체 림프종을 재검토하여 림프종의 새로운 분류체계를 적용, 각 조직학적 아형별 분포를 조사하고 이 가운데 mantle cell lymphoma의 빈도를 파악하고 그 임상적, 병리학적 특성을 규명하고자 한다. 이는 한국에서는 첫 시도가 될 것으로 생각되며 이러한 결과는 바로 환자의 치료에 직접적인 연관성을 갖고 환자진료의 질(質)을 높일수 있을 뿐만 아니라 림프종 연구에 중요한 시도가 될 것이다.

제 2 장 국내의 현황

1. REAL classification

molecular biology의 발전으로 림프종의 새로운 entity가 속속 밝혀지면서, 1982년 제정되어 현재까지 쓰여온 the Working Formulation for clinical usage²¹⁾ 로는 새롭게 밝혀진 disease entity를 나타낼 수 없다는 문제점의 인식하에 미국 및 유럽의 hematopathologists들이 1993년 베를린에 모여 각 림프종의 실제 biology를 바탕으로 새로운 분류법을 제창하였고, 이를 REAL classification (Revised European-American Classification of Lymphoid Neoplasm)이라 하였다^{22,23)}. 이 새로운 분류법은 lymphoma의 biology를 바탕으로 개개의 고유질환을 인정하여 각각 다른 치료방침 및 예후 예측이 가능하다는 점에서 큰 장점을 가지나, 아직까지는 실제 진단에 제대로 사용되지 못하는 실정이며 각 disease entity 별 빈도나 임상적 결과가 정립되어 있지 못하다. 이에 최근 5년간 원자력병원에서 진단된 전체 림프종을 재검토하여 림프종의 새로운 분류체계를 적용, 각 조직학적 아형별 분포를 조사하고 이 가운데 mantle cell lymphoma의 빈도를 파악하고자 한다. 이는 한국에서 뿐 아니라 전세계적으로도 아직 결과가 발표된 바 없어 한국 림프종의 기본자료로서 의의가 있으리라 생각된다.

2. Mantle cell lymphoma

1970년대 중반, 미국의 Berard등¹⁸⁾은 비호지킨 림프종 가운데 well differentiated (small lymphocytic) 또는 poorly differentiated (small cleaved cell) lymphoma 의 어느 범주에도 잘 맞지 않는 비호지킨 림프종 그룹에 대하여 intermediate differentiation의 lymphocytic lymphoma라는 용어를 처음 사용하였고 이 때의 'intermediate' 라는 말은 종양의 조직학적 형태가 중간 (intermediate) 라는 의미로 사용되었다. 이와 때를 같이하여, 독일의 Lennert 등은 이와 비슷한 모양의 림프종에 대하여 'centrocytic lymphoma' 라는 용어를 사용하여 Kiel classification에 분류하였다^{19,20)}. 1980년대 초 Weisenburger 등²⁴⁾과 Palutke 등²⁵⁾은 mantle zone의 atypical small lymphoid cell의 증식을 mantle zone lymphoma라는 용어를 사용하여 기술하였으나, 이를 follicular lymphoma의 한 형태로 판단하였다. 그 후 1990년대 이후 molecular level에서의 연구가 진행되면서 이들이 기술한 위에 열거한 여러 가지 이름의 종양은 mantle zone의 림프구에서 기원한 종양으로 pseudofollicular

pattern을 보일 뿐 follicular lymphoma의 한 종류가 아님이 알려지고, 1992년에 비로서 consensus meeting에서 mantle cell lymphoma (MCL)라는 이름으로 통일되었다¹⁾. 그 이후 최근 3-4년간에 걸쳐 이 MCL의 면역표지상 특성과 t(11;14)(q13;q32) translocation 및 bcl-1 gene rearrangement와의 연관이 알려지게 되었다⁸⁻¹⁶⁾. 이 종양이 다른 diffuse small cleaved cell type에 비하여 예후가 나쁘다는 임상적 결과로 최근에 더욱 주목받게 되었다. 그러나 이의 진단에 필수적인 cyclin D1의 발현은 연구의 차원에서 이루어져 왔으며 최근 미국의 일부 지역에서는 PCR 등의 방법으로 실제 환자의 진단에 이용하기도 한다. 최근에 bcl-1 gene rearrangement를 single-step PCR로 시도하고 있으나, 현재까지는 hemi-nested PCR법이 가장 정확한 것으로 되어 있다. 최근 조직에서의 면역조직화학염색이 가능한 antibody가 상품화되기 시작했으나 이의 유용성 역시 아직 정착되지 못한 상태이다. 아직 PCR 방법과 면역조직화학염색법의 결과가 비교되어 있는 논문은 나와 있지 않다. 이의 비교로 면역조직화학염색의 안정성과 신뢰도가 인정되면 보다 손쉽게 일반 조직검사에서 활용, 환자에게 직접적인 도움을 줄 수 있을 것이다. 이에 연구자들은 이들 방법을 함께 적용하여 그 차이와 효과를 비교하고자 한다. 우리나라에서는 이에 대한 연구가 거의 없는 실정이며 더구나 면역조직화학염색의 결과는 세계적으로도 드물다^{26,27)}. 이에 원자력병원에서 진단된 림프종을 재검토하여 mantle cell lymphoma의 빈도를 파악하고 그 임상적, 병리학적 특성을 규명하고자 한다. 이는 한국에서는 첫 시도가 될 것으로 생각되며 이러한 결과는 바로 환자의 치료에 직접적인 연관성을 갖고 환자진료의 질(質)을 높일수 있을 뿐만 아니라 림프종 연구에 중요한 시도가 될 것이다.

제 3 장 연구내용 및 결과

제 1 절 연구 내용 및 연구 방법

1. 연구 내용 및 방법

가. 원자력병원에서 1991년 1월 부터 1995년 12월 까지의 최근 5년간 생검된 모든 비호지킨 림프종 환자의 중복검사를 제외한 371명을 대상으로 악성림프종의 새로운 분류법인 REAL classification을 적용, 재분류하여 한국인 림프종에서의 REAL classification에 따른 분포를 조사하였고, NCI Working Formulation과 비교하였다. REAL classification은 T-cell, B-cell 등 면역표지검사가 분류에 기본적으로 필요하므로 면역표지검사가 이루어지지 않았던 예들에 대하여 T-cell (UCL-1), B-cell (L26) 통상의 방법대로 면역조직화학염색을 실시하고 진단에 필요한 경우에 Ki-1(CD30), CD43, CD5, Leu M1 등을 면역조직화학염색하였다.

나. REAL classification에 의한 진단 중에서 통상적인 방법으로는 진단에 이르기 어려운 mantle cell lymphoma의 임상적, 병리조직학적 및 면역학적 특성과 cyclin D1의 발현정도를 조사하고 임상적 특징과 예후연관성을 조사하였다. Cyclin D1의 발현은 cyclin D1 항체 (Neomarker, USA)를 이용한 면역조직화학염색과 bcl-1 MTC primer:5'-CCTCTCTCCAA ATTCCTG-3', JH primer: 5'-GGA CTCACCTGAGGAGACGGTGACC-3'을 사용하여 PCR방법으로 이들의 결과를 비교하였다. 면역조직화학염색은 파라핀포매조직에 적용하였으며, 0.01M citrate buffer에 담구어 microwave 또는 autoclave로 전처리하여 실시하였다. 또한 mantle cell lymphoma와 감별진단을 요하는 다른 low grade B-cell lymphoma (small lymphocytic lymphoma, immunocytoma, MALT lymphoma)예들에 대해서도 이를 실시, 그 결과를 비교하였다.

다. 각 예들의 병록지 검토를 통해 생존률과 median survival rate를 product-limit survival estimate, log-rank test로 구하였다.

제 2 절 연구 결과

1.. 비호지킨 림프종의 조직학적 아형 및 위치에 따른 분류

Table 1. REAL classification에 따른 분포 및 MCL의 빈도 (KCCH, 1991-1995)

B-CELL NEOPLASMS (71.4%)

I. Precursor B-cell neoplasm: B-ALL/LBL

II. Peripheral B-cell neoplasms

1. B-cell CLL/SLL	7 (1.9%)
2. Lymphoplasmacytoid lymphoma (Immunocytoma)	10 (2.7%)
3. Mantle cell lymphoma	14 (3.8%)
4. Follicular center cell lymphoma	16 (4.3%)
5. Marginal zone B-cell lymphoma (including MALT lymphoma)	15 (40%)
6. Splenic marginal zone lymphoma	0
7. Hairy cell leukemia	0
8. <i>Plasmacytoma/Plasma cell myeloma</i>	(28)
9. Diffuse large B-cell lymphoma	192 (51.7%)
10. Burkitt's lymphoma	6 (1.6%)
11. High-grade B-cell lymphoma, Burkitt-like	5 (1.3%)

T-CELL and NK-CELL NEOPLASMS (25.3%)

I. Precursor T-cell neoplasm: T-ALL/LBL

II. Peripheral T-cell and NK-cell neoplasms

1. T-cell chronic lymphocytic leukemia	0
2. Large granular lymphocytic leukemia	1 (0.3%)
3. Mycosis fungoides/Sezary syndrome	1 (0.3%)
4. Peripheral T-cell lymphoma, unspecified	38 (10%)
: medium-sized cell	13 (3.5%)
mixed, medium and large cell	14 (3.8%)
large cell	9 (2.4%)
(Subcutaneous panniculitic T-cell lymphoma)	2 (0.5%)
5. Angioimmunoblastic T-cell lymphoma	3 (0.8%)
6. Angiocentric lymphoma	28 (7.5%)
7. Intestinal T-cell lymphoma	1 (0.3%)
8. Adult T-cell lymphoma/leukemia	1 (0.3%)
9. Anaplastic large cell lymphoma (ALCL) CD30+, T and null-cell types	3 (0.8%)
10. Anaplastic large cell lymphoma, Hodgkin-like	2 (0.5%)

UNCLASSIFIED (3.2%)

Table 2. NCI Working Formulation에 따른 분포 및 미국과의 비교

Histological type	KCCH(%)	USA(1992)
Low-grade		
A. ML, small lymphocytic	4.6	14
B. ML, follicular, predominantly small cleaved cell	0.8	5
C. ML, follicular, mixed, small cleaved and large cell	0.5	12
Intermediate-grade		
D. ML, follicular, predominantly large cell	3.2	15
E. ML, diffuse, small cleaved cell	12.7	6
F. ML, diffuse, mixed small and large cell	19.2	6
G. ML, diffuse, large cell	45.6	22
High-grade		
H. ML, large cell, immunoblastic	6.5	15
I. ML, lymphoblastic	4.3	2
J. ML, small noncleaved cell	2.2	3

Table 3. 위치에 따른 분포 (1991-1995, KCCH)

Lymph node	42.3 %	Nasal cavity	3.8 %	Chest wall	1.1 %
Tonsil	12.1 %	Soft tissue	3.0 %	Mediastinum	0.8 %
Stomach	11.9 %	Brain	3.0 %	Salivary	0.8 %
Nasopharynx		Bone	2.2 %	Thyroid	0.5 %
Oropharynx	4.9 %	Oral cavity	2.4 %	(Esophagus, breast,	
Palate		Orbit	1.6 %	endometrium, pancreas)	
Colon & ileum	4.1 %	Retroperitoneum, abdomen & omentum	1.6 %		

가. REAL classification에 의하면 diffuse large B-cell lymphoma가 51.7%로서 가장 많고 T-cell lymphoma 중에서 peripheral T-cell lymphoma, unspecified (10%)와 angiocentric lymphoma (7.5%)가 그 다음으로 높은 빈도를 나타내며, angiocentric lymphoma의 빈도가 높은 것은 upper respiratory tract의 extranodal lymphoma가 상대적으로 많은 것과 연관하며, Epstein-Barr virus infection과의 연관성이 있으리라 추정된다.

나. 외국의 분포와는 대조적으로 nodal보다 extranodal lymphoma가 더 많았고, 이는 과거 한국인 림프종 연구와 일치하는 결과이다. Extranodal site로서 가장 흔한 곳은 tonsil이며, GI tract와 upper respiratory tract가 extranodal lymphoma

의 약 3분의 2를 차지하였다.

다. 미국 등 서양에 비해 follicular lymphoma의 빈도가 매우 낮으며 (4.5%), low-grade lymphoma의 빈도가 낮아, 80% 이상이 intermediate-grade에 속한다. 우리나라의 림프종은 대부분이 intermediate-grade에 속하므로 이 group에 대한 진단적 세분화가 더욱 요구되며 따라서 REAL classification이 유용한 경우가 많다.

라. Mantle cell lymphoma는 14예로서 전체의 3.8%를 차지하였고 이는 서양이나 일본의 경우보다 낮으리라 생각된다..

마. 서양에 비해 T-cell lymphoma의 비율이 높다. (KCCH; 25.3%, USA; 12.5%)

바. 서양에 비해 low-grade B-cell lymphoma의 빈도가 낮다.

2.. Mantle cell lymphoma(MCL)의 진단 및 Low grade B-cell lymphoma의 감별진단

가. 조직학적 소견

병리학적 조직소견 중 다른 low-grade B-cell lymphoma와 비교하여 의미있는 차이를 보인것은 mitoses로서 MCL에서는 평균 17/10HPF이며 small biopsy를 제외한 전 예에서 10/10HPF 이상이었다. 이에 반해 그밖의 low-grade B-cell lymphoma는 평균 10/10HPF 미만이었다. 면역표지검사를 통해 다른 low-grade B-cell lymphoma와의 감별이 어느 정도 가능하나, small lymphocytic lymphoma (SLL)와의 감별이 어렵다. 본 예들에서의 조직소견의 차이를 Table 4에 표시하였다. Mantle cell lymphoma의 조직소견의 특징은 Figure 1에 나타나 있다.

Table 4. Comparison of pathologic findings of MCL vs. SLL

Histological features	MCL(%)	SLL(%)
Growth pattern <i>diffuse</i>	6 (43)	6 (86)
<i>nodular+diffuse</i>	8 (57)	1 (14)
Germinal center	4 (30)	2 (15)
Mantle zone pattern	2 (15)	0
Nuclear size <i>small</i>	3 (21)	5 (83)
<i>intermediate</i>	11 (79)	1 (17)
Mitoses > 10/10 HPF	14 (100)	0
mean	17/10HPF	4/10HPF

나. 면역표지검사 및 cyclin D1의 검출(Table 5 & Table 6)

- 면역표지검사상, 아래에 열거한 감별을 요하는 low-grade B-cell lymphoma는 모두 UCHL-1 (pan T-cell marker)에 음성이며, L26 (pan B-cell marker)에 양성을 보이는 예들을 대상으로 하였다. CD5는 T-cell marker를 알려져 있으나, mantle cell lymphoma와 small lymphocytic lymphoma의 일부에서도 양성으로 반응하는 것으로 알려져 있다. 본 예들에서는 MCL에서는 7/8, SLL에서는 2/5에서 양성을 보였고, CD43은 각각 3예에서 양성이었다. 면역표지검사만으로는 MCL과 SLL의 감별이 어렵고, cyclin D1의 검출이 MCL 진단에 중요하다.

- PCR 방법 보다 cyclin D1 면역조직화학염색이 sensitivity가 높고, 두 방법 모두 MCL진단에 specific하다. (PCR 양성; 3/10, 면역조직화학염색 양성; 7/9, Figure 2 & Figure 3) 파라핀 포매조직에서의 bcl-1 PCR방법이 안정화되어 전 예에서 가능하게 되면 그 양성률에 변화가 생길 가능성이 있다.

Table 5. Immunophenotypes of various B-lymphocytic lymphomas and MCL

Diagnosis	Total No.	CD5	CD43	L26	UCHL-1
Mantle cell lymphoma	14	7/8	3/10	14/14	0/14
B-cell CLL/SLL	7	2/5	3/5	7/7	0/7
Lymphoplasmacytoid lymphoma	10	0/6	0/6	10/10	0/10
MALT lymphoma	15	0/8	1/10	15/15	0/15

Table 6. Expression of Cyclin D1

Diagnosis	Total No.	PCR detectable JH/bcl-1 MTC ¹⁾	Cyclin D1 IHC ²⁾
Mantle cell lymphoma(MCL)	14	3/10	7/9
B-cell CLL/SLL	7	0/5	0/5
Lymphoplasmacytoid lymphoma	10	0/5	0/6
MALT lymphoma	15	0/5	0/7

¹⁾ : formalin-fixed paraffin-embedded tissue 이용, bcl-1 MTC primer: 5'-CCTCTCTCCAA ATTCCTG-3', JH primer: 5'-GGACTCACCTGAGGAGACGGTGACC-3'

²⁾ : Cyclin D1 (Neomarker, USA) in paraffin tissue with microwave pretreatment in 0.01M citrate buffer, ICH: immunohistochemical staining

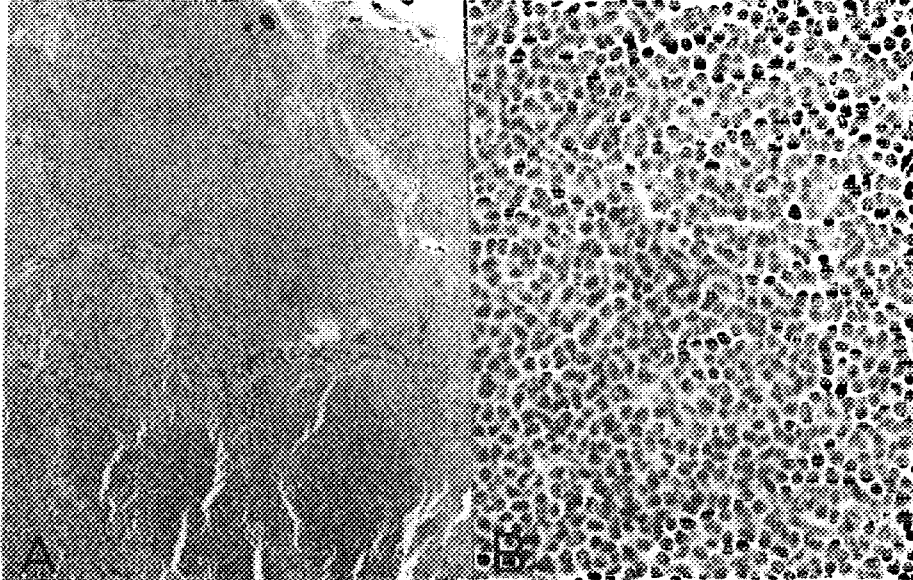


Figure 1. Mantle cell lymphoma.

A: Low power view of vague nodular pattern,

B: Monotonous population of lymphocytes of intermediate differentiation

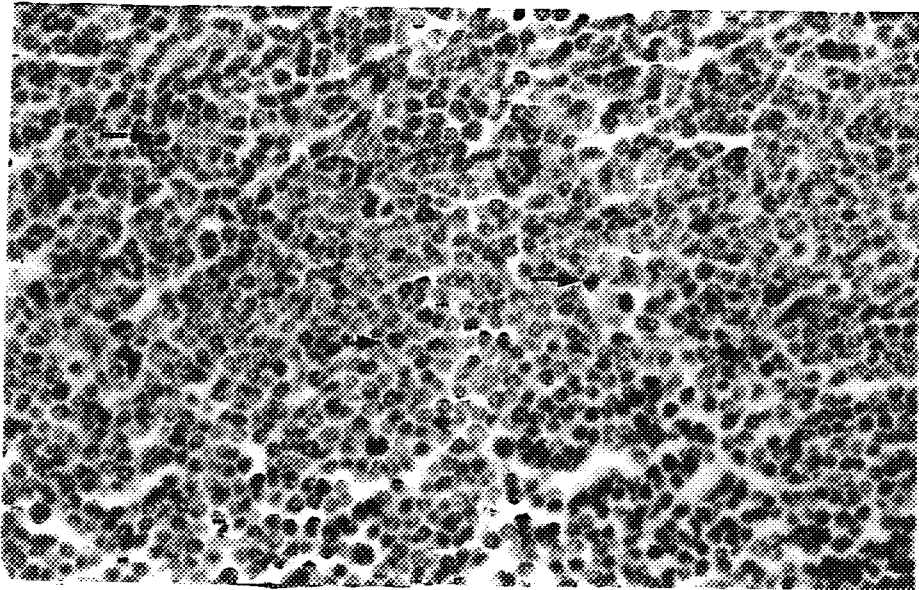


Figure 2. Immunohistochemical study for cyclinD1 protein. Note positive nuclear staining (arrows).

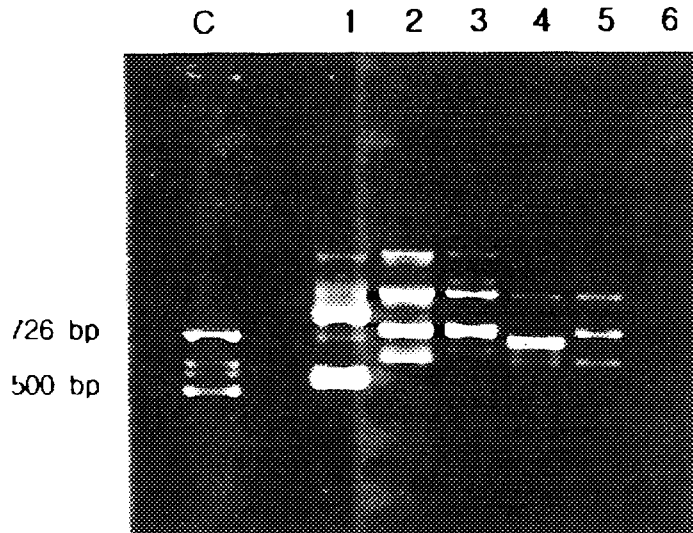


Figure 3. Polymerase chain reaction for bcl-1 gene rearrangement. Lane 1 and lane 4 showed positive band at 726 bp.

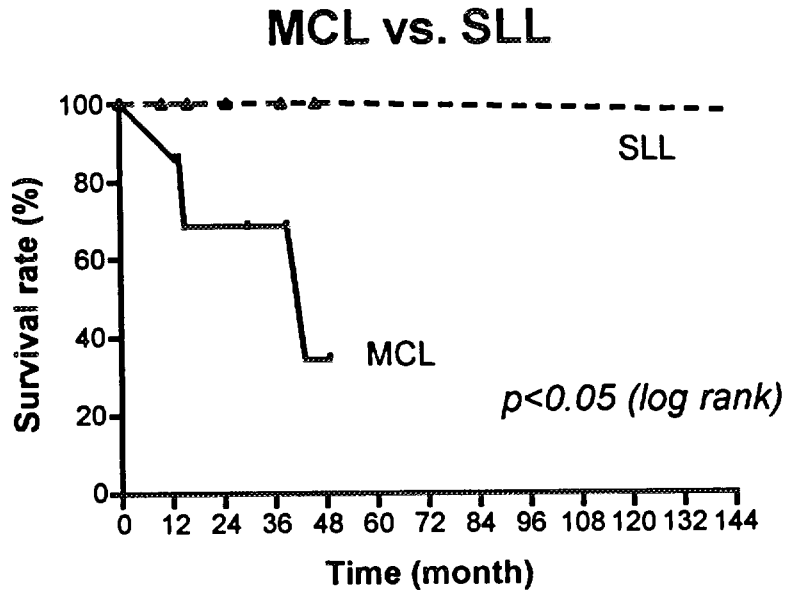


Figure 4. Survival curve of MCL vs. SLL

다. 임상 결과

1) MCL의 연령분포는 52-70세이며, 평균연령은 60세, 남녀비는 2:1이다

2) Log-rank test for survival rate

- Low-grade B-cell lymphoma 각각의 group간에는 생존율에 유의한 차이가 없었다. ($p=0.12$)
- MCL과 나머지 low-grade B-cell lymphomas (SLL+MALT+LPL) 간에는 유의한 차이가 있는 것으로 나타났으나 ($p=0.01$), 각 group의 증례수가 적다는 문제점을 안고 있다.
- 조직소견 및 면역표지검사상 감별이 어려웠던 MCL과 SLL간에는 유의한 차이를 나타냈다 ($p<0.05$, Figure 4). 이는 MCL이, 예후에 있어, 다른 low-grade B-cell lymphoma와 차이를 나타내므로 진단을 달리해야하는 중요한 이유를 제공한다.
- MCL의 median survival time은 43개월로 나타났다.

제 4 장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도

첫째, 림프종의 새로운 분류법인 REAL classification (1994)을 적용하여 분포를 파악하였으며, 이러한 시도는 전세계적으로 아직 발표된 바 없다. REAL classification에 의한 한국인 림프종의 특성을 파악할 수 있는 기초자료로서의 의의가 크며, 이러한 새로운 분류법의 임상적 유용성을 평가하기 위한 여러시도의 기본 발판 구실을 할 수 있다는 점이 중요하다고 생각된다. 이 기초자료는 다른 연구에서도 기본적으로 이루어져야 하므로 REAL classification에 새로 도입된 disease entity에 관한 임상적 및 병리학적 특성의 연구에 필요하며 림프종 연구의 여러 분야에서 기본 자료로서 이용될 것이다.

둘째, Mantle cell lymphoma는 병리학적, 임상적으로 다른 림프종과는 다른 특징을 가지는 하나의 disease entity로서, 이는 감별을 요하는 다른 low-grade B-cell lymphoma에 비하여 예후가 나쁘며 그 경과도 특이하여 처음부터 치료를 달리해야 하므로 이의 올바른 진단은 환자의 치료 및 예후예측에 매우 중요하다. 원자력 병원에서 5년간의 림프종 환자 371명 가운데 14명이 mantle cell lymphoma였고 이들의 조직학적, 면역표지학적, 세포생물학적 및 임상적 특성을 연구 분석하고 감별을 요하는 질환들과 비교하였다. 아직 한국에서는 mantle cell lymphoma에 관한 임상적-병리학적 연구가 이루어진 바가 없으므로 한국에서의 mantle cell lymphoma 연구에 기초 자료가 될 것이며, 본 연구는 mantle cell lymphoma를 진단하는 데 이용할 수 있는 방법들을 비교검토하여 현실적 유용성을 확인하였고 이를 환자의 진단에 직접 사용할 수 있게 되었다는 점에서 의의가 있다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

1. 본 연구를 통해 lymphoma 의 새로운 분류법을 확립하고, 진단에 일관성을 습득함으로써 앞으로 림프종의 진단에 REAL classification을 도입하여, 현재까지 사용해온 the Working Formulation for clinical usage와 공존하여 사용한다. Conference 등 임상 의사들과의 communication을 통해서 환자의 진료에 가장 적합한 치료방법을 시도할 수 있게 된다. 림프종 분야에 있어서 선도적인 역할을 할 수 있으리라 기대된다.
2. 일반 진단에 REAL classification을 사용하기 위하여 모든 림프종 예들에 대하여 몇가지 중요한 면역표지검사를 시행하고, mantle cell lymphoma의 진단시 cyclin D1의 면역염색도 함께 실시한다. 이번 연구를 통해 통상의 면역조직화학염색으로는 잘 되지 않았던 CD5, CD43 및 cyclin D1의 염색방법을 여러 가지로 시도하여 정착시킬 수 있었다. 이제까지는 통상적으로 쓰이지 않던 autoclave를 이용한 전처리 방법은 특히 CD5와 cyclin D1의 염색에 있어 좋은 결과를 가져왔으며, 앞으로 다른 어떤 연구에 있어서도 필요한 기술이 될 것이다. 이러한 검사들은 정확한 진단을 통해 환자의 진료에 도움을 줄 수 있을 뿐 아니라 병원 수입면에 있어서도 역할을 기대할 수 있다. 원자력 병원이 암전문 병원임을 고려할 때 암의 각 분야에 있어서의 정확하고 specific한 진단은 필수불가결의 요건이며, 병원의 위상을 유지 발전시키는 데에도 중요한 기여를 하리라고 본다.
3. Mantle cell lymphoma에서의 PCR방법을 통한 bcl-1의 발현과 면역조직화학염색을 통한 cyclin D1의 발현을 비교함으로써 많은 노력과 시간을 요하는 PCR보다 간단하고 reproducible한 cyclin D1 면역조직화학염색이 실제 mantle cell lymphoma를 진단하는데 더 유용성이 높다는 결론에 도달하였다. 따라서 시간적으로나, 비용면에서나 경제적인 방법을 택할 수 있는 근거를 마련하는 계기가 되었다. 앞으로 현실적으로 일반 진단업무에 이용하여 많은 도움을 받게될 것이다.

제 6 장 참고문헌

1. Banks PM, Chan J, Cleary ML, et al: Mantle cell lymphoma: A proposal for unification of morphologic, immunologic, and molecular data. *Am J Surg Pathol* 16:637, 1992
2. Zucca E, Stein H, Coiffier B: European Lymphoma Task Force (ELTF): Report of the workshop on mantle cell lymphoma (MCL). *Ann Oncol* 5:507, 1994
3. Segal GH, Masih AS, Fox AC, et al: CD5-expressing B-cell non-Hodgkin's lymphoma with bcl-1 gene rearrangement have a relatively homogeneous immunophenotype and are associated with an overall poor prognosis. *Blood* 85:1570, 1995
4. Pittaluga S, Wlodaaarska I, Stul MS, et al: Mantle cell lymphoma: A clinicopathologic study of 55 cases. *Histopathology* 26:17, 1995
5. Yang WI, Zukerberg LR, Motokura T, et al: Cyclin D1 (bcl-1, PRAD1) protein expression in low-grade B-cell lymphomas and reactive hyperplasia. *Am J Pathol* 103:756, 1995
6. Weisenburger DD, Armitage JO: Mantle cell lymphoma—An entity comes of age. *Blood* 87:4483, 1996
7. Perry A, Bast MA, Armitage JO, et al: Diffuse intermediate lymphocytic lymphoma: A clinicopathologic study and comparison with small lymphocytic lymphoma and diffuse small cleaved cell lymphoma. *Cancer* 66:1995-2000, 1990
8. Doraman DM, Pinkus GS: Distinction between small lymphocytic and mantle cell lymphoma by immunoreactivity for CD23. *Mod pathol* 7:326-31, 1994
9. Zukerberg LR, Medeiros LJ, Ferry JA, et al: Diffuse low-grade B-cell lymphomas. Four clinically distinct subtypes defined by a combination of morphologic and immunophenotypic features. *Am J Clin Pathol* 100:373-85, 1993

10. Kilo MN, Dorfman, DM: The utility of flow cytometric immunophenotypic analysis in the distinction of small lymphocytic lymphoma/chronic lymphocytic leukemia from mantle cell lymphoma . *Am J Clin Pathol* 105:451-7, 1996
11. Komatsu H, Yoshida K, Seto M, et al: Overexpression of PRAD1 in a mantle zone lymphoma patients with a t(11;22) (q13;q11) translocation. *Br J Haematol* 85:427-9, 1993
12. Komatsu H, Yoshida K, Seto M, et al: A variant chromosome translocation at 11q13 identifying PRAD1/cyclin D1 as the BCL-1 gene. *Blood* 84:1226-31, 1994
13. Motokura T, Arnold A: Cyclin D and oncogenesis. *Curr Opin Genet Dev* 3:5-10, 1993
14. Raffeld M, Sander CA, Yano T, Jaffe ES: Mantle cell lymphoma: an update. *Leukemia Lymphoma* 8:161-6, 1992
15. Seto S, Yamamoto K, Iida S, et al: Gene rearrangement and overexpression of PRAD1 in lymphoid malignancy with t(11;14) q13;q32) translocation. *Oncogene* 7:1401-6, 1992
16. Withers DA, Harvey RC, Faust JB, Melnyk T, Carey K, Meeker TC: Characterization of a candidate bcl-1 gene. *Mol Cell Biol* 11:4846-53, 1991
17. Teodorovic BI, Pittaluga S, Kluin-Nelemans JC, et al: Efficacy of Four different regimens in 64 mantle cell lymphoma cases: Clinicopathologic comparison with 498 other non-Hodgkin's lymphoma subtypes. *J Clin Oncol* 13:2819-26, 1995
18. Berard CW, Dorfman RF: Histopathology of malignant lymphomas. *Clin Haematol* 3:39, 1974
19. Lennert K, Stein H, Kaiserling E: Cytological and functional criteria for the classification of malignant lymphomata. *Br J Cancer* 31:29, 1975
20. Tolksdorf G, Stein H, Lennert K: Morphological and immunological definition of a malignant lymphoma derived from germinal center cells with cleaved nuclei (centrocytes). *Br J Cancer* 41:168, 1980

21. Non-Hodgkin's lymphoma pathologic classification project: National Cancer Institute sponsored study of classifications of non-Hodgkin's lymphomas: Summary and description of a Working Formulation for clinical usage. *Cancer* 49:2112, 1982
22. Harris NL, Jaffe ES, Stein H, et al: A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: A proposal from the international lymphoma study group. *Blood* 84:1361-92, 1994
23. Chan JKC, Banks PM, Cleary ML: A revised European-American classification of lymphoid neoplasms proposed by the international lymphoma study group: A summary version. *Am J Clin Pathol* 103:543-60, 1995
24. Weisenburger DD, Kim H, Rappaport H: Mantle-zone lymphoma. A follicular variant of intermediate lymphocytic lymphoma. *Cancer* 49:1429, 1982
25. Palutke M, Eisenberg L, Mirchandani T, Tabaczka P, Husain M: Malignant of small cleaved lymphocytes of the follicular mantle zone. *Blood* 59:317, 1992
26. Kuroda H, Komatsu H, Nakamura S: The positive nuclear staining observed with monoclonal antibody against PRAD1/Cyclin D1 correlates with mRNA expression in mantle cell lymphoma. *Jpn J Cancer Res* 86:890-8, 1995
27. Yatabe Y, Nakamura S, Seto M, et al. Clinicopathologic study of PRAD1/Cyclin D1 overexpressing lymphoma with special reference to mantle cell lymphoma: A distinct molecular pathologic entity. *Am J Surg Pathol* 20:1110-1122, 1996.

BIBLIOGRAPHIC INFORMATION SHEET

Performing Org. Report No.		Sponsoring Org. Report No.		Standard Report No.		INIS Subject Code	
KAERI/RR-1648/96							
Title/Subtitle		Diagnosis of mantle cell lymphoma and detection of bcl-1 gene rearrangement					
Project Manager and Dept.			Seung-Sook Lee (Dept. of Anatomic Pathology)				
Researcher and Dept.			Kyung-Ja Cho (Dept. of Anatomic Pathology) Sun-Joo Lee (Laboratory of Experimental Pathology)				
Pub. Place	Seoul	Pub. Org.	KOCH, KAERI		Pub. Date	Dec. 31, 1996	
Page	23	Fig. and Tab.	Yes(0), No()		Size	26 cm	
Note							
Classified	Open(0), Outside(), Class			Report Type	Research Report		
Sponsoring Org.				Contract No.	No		
Abstract (About 300 Words)		<p>We reclassified a large series of non-Hogkin's lymphoma diagnosed at Korea Cancer Center Hospital from 1991 to 1995, according to REAL classification, and compared the efficacy of immunohistochemical study for cyclin D1 protein and PCR for bcl-1 gene rearrangement to diagnose mantle cell lymphoma (MCL). By REAL classification, 7%, diffuse large B-cell lymphoma was the most common type (51.8%) and was followed by peripheral T-cell lymphoma-undefined(10%) and angiocentric lymphoma(7.5%). The most reliable histologic finding was mitosis to make a differential diagnosis. Mitoses of MCL were 17/10HPF in average and all the cases showed more than 10/10HPF. Immunophenotypic study alone cannot lead to a differential diagnosis between MCL and SLL, and the overexpression of cyclin D1 was the most important for diagnosis of MCL. Both immunohistochemistry for cyclin D1 and PCR for bcl-1 were specific for MCL and immunohistochemistry was more sensitive than PCR. Statistical analysis showed a different survival rate between MCL and the other low-grade B-cell lymphomas (SLL+MALT+LPL) and a difference between MCL and SLL. Immunohistochemical detection of cyclin D1 has a practical usefulness in making routine diagnosis of MCL. The initial accurate diagnosis of MCL will help clinicians make a proper management.</p>					
Subject Keywords (About 10 Words)		Mantle cell Lymphoma, bcl-1, cyclin D1 immunohistochemistry, PCR					

서 지 정 보 양 식

수행기관보고서번호	위탁기관보고서번호	표준보고서번호	INIS 주제 코드
KAERI/RR- 1648/96			
제목 / 부제	Mantle cell lymphoma의 진단 및 bcl-1 유전자 재배열의 검출		
연구책임자 및 부서명	이 승 숙 (해부병리과)		
연구자 및 부서명	조경자(해부병리과), 이선주(실험병리연구실)		
발행지	서울	발행기관	한국원자력연구소 부설 원자력병원
		발행일	1996. 12. 31
페이지	23	도표	유(0), 무()
		크기	26 cm
참고사항	'96 원자력 병원 기본연구과제		
비밀여부	공개(0), 대외비(), 급비밀	보고서종류	연구보고서
연구위탁기관		계약 번호	
초록 (300단어 내외)	<p>원자력병원에서 1991년 부터 1995년 까지 5년간 진단된 림프종을 대상으로 REAL classification를 적용하여 재분류하고 그 중 low-grade B-cell lymphoma중에서 mantle cell lymphoma를 진단하는 방법을 비교검토하였다. REAL classification상 diffuse large B-cell lymphoma (51.8%)가 가장 많고 peripheral T-cell lymphoma, unspecified (10%), angiocentric lymphoma (7.5%)의 순이었다. 조직소견상 다른 low-grade B-cell lymphoma와 비교하여 차이를 보인것은 mitoses로서 평균 17/10HPF이며 전 예에서 10/10HPF이상이었다. 면역표지검사만으로는 MCL과 SLL의 감별이 어렵고, cyclin D1의 검출이 MCL의 진단에 중요하다. bcl-1 PCR보다 cyclin D1 immunohistochemistry가 sensitivity가 더 높고 (PCR양성: 3/10, 면역염색 양성: 7/9), 두 방법 모두 specificity가 높다. MCL과 나머지 low-grade B-cell lymphoma (SLL+MALT+LPL) 간에 유의한 생존률의 차이를 나타냈고 (p=0.01), MCL과 SLL간에도 유의한 차이를 나타냈다(p<0.05). Cyclin D1 면역조직화학염색은 일반 조직진단업무 시 진단에 실질적으로 유용하며 MCL의 정확한 진단은 환자진료에 중요한 역할을 하게 되리라 생각된다.</p>		
주제명 키워드 (10단어 내외)	mantle cell lymphoma, bcl-1, cyclin D1, 면역조직화학염색, PCR		

주 의

1. 이 보고서는 과학기술처에서 시행한 기관고유사업의 연구 보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 과학기술처에서 시행한 특정연구개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.

Mantle cell lymphoma의 진단 및 bcl-1 유전자 재배열의 검출

1996年 12月 26日 印刷

1996年 12月 30日 發行

發行人 김 성 년

發行處 韓國 原子力 研究所

大田廣域市 儒城區 德津洞 150

印刷所 東 和 社

• 믿는마음 지킨약속 다져가는 신뢰사회