

미만성대B세포림프종의 예후인자로서 생물학적 표지자의 중요성

충남대학교 의과대학 내과학교실¹, 병리학교실², 충남대학교 암공동연구소³

박상은¹ · 박수진¹ · 박남숙¹ · 천재민¹ · 박남환¹ · 양영준¹ · 윤각원¹
윤환중^{1,3} · 김진만^{2,3} · 조덕연^{1,3} · 김삼용^{1,3}

Prognostic Significance of Biomarkers of Diffuse Large B-cell Lymphomas

Sang-Eun Park, M.D.¹, Su-Jin Park, M.D.¹, Nam-Suk Park, M.D.¹, Jae-Min Chun, M.D.¹, Nam-Whan Park, M.D.¹,
Yung-Jun Yang, M.D.¹, Kak-Won Yun, M.D.¹, Hwan-Jung Yun, M.D.^{1,3}, Jin-Man Kim, M.D.^{2,3},
Deogyon Jo, M.D.^{1,3} and Samyong Kim, M.D.^{1,3}

Departments of ¹Internal Medicine, ²Pathology, College of Medicine, ³Cancer Research Institute, Chungnam National University, Daejeon, Korea

Background: Biomarkers of lymphomas identified by immunostaining of lymphoma tissues were recently found to have a prognostic value for diffuse large B-cell lymphoma (DLBL). Thus, it seems likely that the prognostic prediction of lymphomas might be improved by incorporating biological markers into well known prognostic systems.

Methods: To determine the clinical significance of the biological markers expressed in DLBL, 26 patients, with de novo DLBL, were retrospectively studied at the Chungnam National University Hospital. Archival specimens from the patients were stained with antibodies for the bcl-2, bcl-6, Ki-67, CD 10, IRF-4, Granzyme-B, MHC-II and p16 antigens. Two immunophenotypic patterns of DLBL were identified by the pattern of differentiation; the germinal center (GC, CD10±/Bcl-6+/IRF-4-)-like subgroup and the post germinal center (pGC, CD10±/bcl-6±/IRF4+)-like subgroup.

Results: The median age of the subjects was 56 years, ranging from 37 to 69. After a median follow up duration of 48 months, the median survival time was 44 month, ranging from 1~100 months. The five-year overall survival rate Using the Kaplan-Meier method was 32%. The only biomarker affecting the survival was bcl-2 ($P=0.009$). The survival of the GC-like subgroup was superior to that of the pGC-like subgroup, but without statistical significance ($P=0.064$). Among 18 patients with IPI scores 0~2, those expressing bcl-2 ($P=0.002$) and the pGC-like subgroup had a worse prognosis compared to the GC-like subgroup ($P=0.049$).

Conclusion: The prognostic assessment of DLBL patients might be improved by the addition of immunohistochemical profiles, especially for bcl-2, to the traditional IPI system. (*Korean J Hematol 2005;40:15-22.*)

Key Words: Diffuse large B-cell lymphoma, Bcl-2, Bcl-6, CD10, IRF-4, Germinal center subgroup

접수 : 2005년 1월 20일, 수정 : 2005년 2월 20일
승인 : 2005년 2월 23일
교신저자 : 김삼용, 대전광역시 중구 대사동 640번지
☎ 301-721, 충남대학교병원 내과
Tel: 042-220-7143, Fax: 042-257-5753
E-mail: frkim@cnu.ac.kr

본 연구는 2002년 충남대학교 자체 연구비의 지원에 의함.

Correspondence to : Samyong Kim, M.D.
Department of Internal Medicine, Chungnam National University
640 Daesa-dong, Jung-gu, Daejeon 301-721, Korea
Tel: +82-42-220-7143, Fax: +82-42-257-5753
E-mail: frkim@cnu.ac.kr

서론

미만성대B세포림프종(diffuse large B-cell lymphoma)은 가장 흔한 비호지킨림프종의 한 종류로서 서구에서는 약 1/3을 차지하며, 우리나라에서는 약 50%를 차지한다.^{1,2)} Working Formulation에서는 미만성대B세포림프종을 단일 질환으로 분류하고 있으나 면역학과 분자유전학의 발달에 따라 임상양상, 형태학 및 분자유전학적으로 다양한 질환군의 집합체임이 제기되었다.³⁾ Revised European-American Lymphoid (REAL) 분류와 World Health Organization (WHO) 분류에서는 미만성대B세포림프종의 생물학적 특성과 임상적 다양성이 반영되었다.^{4,5)} 비호지킨림프종에서는 병기가 호지킨병과 달리 예후 인자로서의 유용성이 적다. 따라서 병기만을 예후인자로 평가하는 한계를 극복하기 위해 1993년 International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factor Project에서는 환자의 예후에 관련되는 여러 인자들을 분석하여 국제예후지표(international prognostic index, 이하 IPI)로서 발표하였다. 그 후 IPI는 미만성대B세포림프종의 예후 평가에 유용함이 널리 인정되고 있다.⁶⁾ 미만성대B세포림프종은 약 40%에서 완치되나 나머지는 병의 진행으로 사망하게 된다.⁷⁾ IPI는 저위험군과 고위험군에 대해서는 예후를 잘 반영하지만, 미만성대B세포림프종의 50% 이상을 차지하는 저중등도 위험군, 고중등도 위험군의 예후예측은 정확하지 못하다는 단점이 있다.⁸⁾

지난 10년간 미만성대B세포림프종의 생물학적 다양성에 대한 연구는 각종 단백 발현 및 분자적 수준에 맞추어 졌다. B세포의 분화 및 성숙의 각 단계에서 발현되는 특정 항원(bcl-6, CD10, IRF-4)들은 임상적 특징과 병리학적 특성을 나타내는 예후인자로 밝혀졌다.⁹⁻¹²⁾ 또한 세포사멸(bcl-2, Granzyme-B), 종양억제유전자(p16), 면역감시체계(MHC-II)에 관여하는 단백질들도 강력한 예후인자임이 밝혀졌다.¹³⁻²⁰⁾ Ki-67은 세포증식의 증가와 관계되어 나쁜 예후와 연관됨이 밝혀졌다.²¹⁾

최근 cDNA microarray를 이용하여 미만성대B세포림프종의 전체적인 유전자 발현 양상이 밝혀졌다. 이 결과에 따라 미만성대B세포림프종을 배중심 B세포양아형(germinal center-like subgroup, 이하 GC 아형)과 활성화 B-세포 아형(post-Germinal center like subgroup or activated B-cell subgroup, 이하 pGC 아형) 및 제3형으로 분류할 수 있으며, 이들은 임상적 양상과 예후에

서 차이를 나타낸다.^{22,23)} 면역염색을 이용하여 GC 아형과 pGC 아형을 구분하였을 때 예후와의 상관관계는 논란의 여지가 있다.²⁴⁾

본 연구에서는 미만성대B세포림프종의 예후에 영향을 갖는 생물학적 인자들을 확인하고 이를 IPI 체계에 부가함으로써 예후 예측이 향상되는가를 확인하고자 하였다.

대상 및 방법

1. 대상환자

1992년 9월부터 2000년 12월까지 충남대학교병원에 내원하여 조직학적으로 미만성대B세포림프종으로 진단을 받은 환자를 대상으로 하였다. 연령은 15세 이상으로, 심폐기능과 신장, 간기능이 정상이고, 림프종에 대한 화학요법을 시행 받은 환자를 대상으로 하였다. 이들의 조직 소견을 다시 평가하여 미만성대B세포림프종으로 확진된 환자의 조직표본을 얻어 면역조직화학염색을 시행하였다.

2. 치료방법

모든 환자에서 복합화학요법을 실시하였고, 화학요법은 doxorubicin을 포함하는 요법과 이를 포함하지 않는 요법으로 하였다. 필요에 따라 방사선 치료 및 수술을 병용하였다. 재발이나, 부분반응 또는 질병의 진행 시 구제항암화학요법(salvage chemotherapy)을 실시하였다.

3. 면역조직화학검사

각 증례당 파라핀 포매조직에서 얻은 4 μ m 두께의 절편을 슬라이드에 부착해 100% 크실렌에 두었다가 탈파라핀화한 후 100%, 90%, 75% 알코올로 단계적으로 함수화하였다. 3% 과산화수소에서 30분간 처리하여 내인성 과산화 효소의 작용을 억제시킨 뒤 Tris 완충 용액으로 3회 세척하고 citric acid 용액(pH 6.0)에 슬라이드를 넣고 극초단파로 처리하였다. 일차항체의 희석은 bcl-2 (DiNonA Inc., Korea)는 1 : 50, bcl-6 (DAKO Co., Denmark)는 1 : 20, Ki-67 (DiNonA Inc., Korea)은 1 : 100, CD10 (Novocastra Laboratoires Co., UK)은 1 : 100, IRF-4 (Santa Cruz biotechnology., UK)는 1 : 100, Granzyme-B (DAKO Co., Denmark)는 1 : 50, MHC-II (DAKO Co., Denmark)는 1 : 50, p16 (DAKO CO., Denmark)은 1 : 60으로 사용하였으며, 실온에서 1시간동안 처리한 후 Tris 용액으로 3회 세척하

고 이차항체(DAKO Co., Denmark)를 30분간 도포한 다음 Tris 완충용액으로 3회 세척하였다. 그 후 streptavidin-HRP (DAKO Co., Denmark)를 30분간 도포한 후 Tris 완충용액으로 3회 세척하고 DAB를 5분간 도포하여 발색한 다음 Mayer's hematoxylin으로 대조 염색하였다.

4. 염색결과 판정

Bcl-2와 bcl-6, CD10 및 MHC-II 단백질의 발현은 종양 세포의 세포질 또는 핵에 분명하게 적갈색으로 염색된 세포의 수가 5% 이상인 경우를 양성으로 하였다. Ki-67 표지지수는 종양 내에서 염색된 세포의 밀도가 높은 3~5개의 400배 시야에서 1,000개의 종양 세포 가운데 핵 내에 명확한 적갈색 과립이 있는 세포수를 세어 백분율을 구하였다. IRF-4는 종양세포에서 세포질에도 적갈색으로 염색이 되나, 핵 내에서 분명하게 적갈색으로 염색된 세포의 수가 경우가 20% 이상인 경우를 양성으로 하였다. Granzyme-B는 세포질의 과립이 갈색으로 염색되는 것을 양성으로 하였고, 10% 이상 25% 미만으로 염색될 경우 1양성, 25% 이상 50% 미만으로 염색된 경우 2양성, 50% 이상 염색되었을 경우 3양성으로 하였다. p16 단백질의 발현은 종양세포의 핵에 확실하게 염색된 경우를 양성으로 판정하였고 종양 세포의 대부분에서 핵에 염색이 되지 않은 경우를 음성으로 판독하였다. Bcl-6가 양성이고, CD10이 양성이나 음성, IRF-4가 음성인 경우를 GC 아형으로 분류하였고, bcl-6가 양성이나 음성이고, CD10이 양성이나 음성이며, IRF-4가 양성인 경우를 pGC 아형으로 분류하였다. 조직소견은 병리전문의 1인이 검증하였다.

5. 통계학적 분석

생존기간의 중앙치는 Kaplan-Meier법에 따라 구하였고, 생존기간에 영향을 미치는 예후인자의 비교는 log-rank test를 이용하였다. Cox regression model을 이용하여 독립예후인자를 분석하였고, 사망에 대한 각 독립 예후인자의 상대위험도를 구하였다.

결 과

1. 치료 전 환자의 특성

연령분포는 37세에서 69세로 중앙치는 56세였으며, 남자는 17예(65.4%)였다. IPI점수는 0, 1, 2, 3, 4와 확인 불가능한 경우가 각각 5예(19.2%), 7예(27.0%), 6예(23.1%), 3예(11.5%), 4예(15.2%), 1예(4.0%)였다(Table 1).

Table 1. The clinical characteristics and factors affecting survival in DLBL patients (No.=26)

Characteristics	No. of patients (%)	Median survival (month)	P value
Age (yrs)			0.378
Median (range)	56 (37 ~ 69)	51	
<60	17 (65.4)	18	
≥60	9 (34.6)		
Sex			0.794
Male	17 (65.4)	44	
Female	9 (34.6)	20	
Stage			0.001
I	2 (7.7)	Not reached	
II	11 (42.3)	Not reached	
III	5 (19.2)	51	
IV	8 (30.8)	10	
B symptom			0.002
Yes	5 (19.2)	10	
No	21 (80.8)	51	
Serum LDH level			0.003
Elevated	11 (42.3)	11	
Normal	14 (53.8)	57	
Unknown	1 (3.9)	7	
Bulky mass			0.001
Yes	5 (19.2)	7	
No	20 (76.9)	51	
Unknown	1 (3.9)	3	
Performance (ECOG)			0.048
0	2 (7.7)	20	
1	18 (69.2)	51	
2	5 (19.2)	11	
3	1 (3.9)	10	
Number of extranodal lesion			0.005
0, 1	17 (65.4)	57	
1 >	9 (34.6)	11	
International prognostic index score			<0.001
0	5 (19.2)	Not reached	
1	7 (27.0)	50	
2	6 (23.1)	24	
3	3 (11.5)	18	
4	4 (15.2)	4	
Unknown	1 (4.0)	7	

Abbreviations: DLBL, diffuse large B-cell lymphoma; No., number; LDH, lactic dehydrogenase.

Table 2. The biologic characteristics and markers affecting survival in DLBL patients (No.=26)

Characteristics	No. of patients (%)	Median survival (month)	P value
Bcl-2			0.009
Positive	17 (65.4)	20	
Negative	9 (34.6)	Not reached	
Bcl-6			0.425
Positive	20 (76.9)	24	
Negative	6 (23.1)	18	
Ki-67			0.859
< 60	9 (34.6)	44	
≥ 60	17 (65.4)	20	
CD10			0.552
Positive	5 (19.2)	Not reached	
Negative	21 (80.8)	24	
IRF-4			0.184
Positive	8 (30.8)	20	
Negative	18 (69.2)	51	
Granzyme-B			0.533
1+	17 (65.4)	50	
2+	5 (19.2)	18	
3+	4 (15.4)	11	
MHC-II			0.447
Positive	23 (88.5)	44	
Negative	3 (11.5)	10	
p16			0.372
Positive	4 (15.4)	44	
Negative	22 (84.6)	20	
Subgroup			0.064*
GC group	14 (53.8)	51	
pGC group	7 (27.0)	20	
Undifferentiated	5 (19.2)		

*The undifferentiated subgroup was excluded.

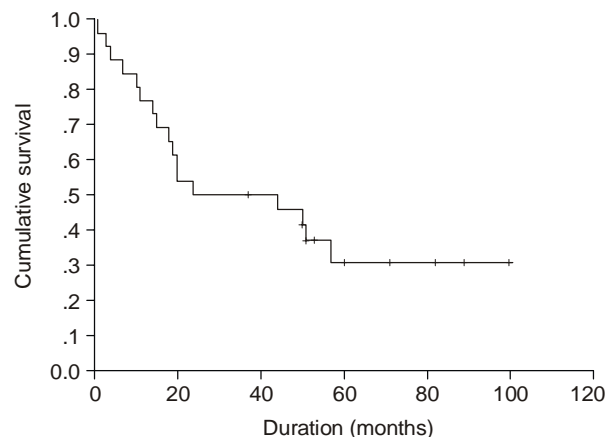
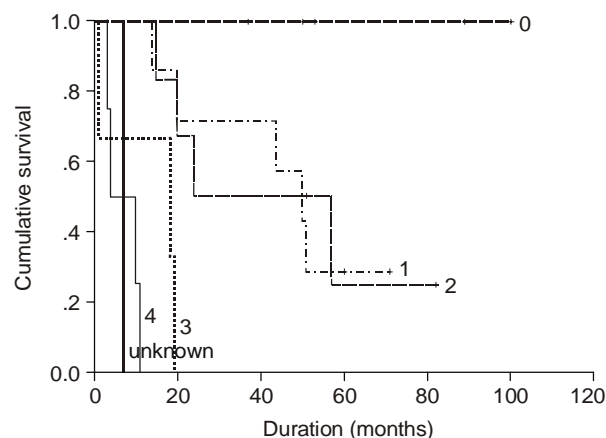
Abbreviations: GC group, germinal center-like subgroup; pGC group, postgerminal center-like subgroup.

2. 면역조직화학검사 결과

Bcl-2는 양성인 17예(65.4%)였다. 전체 26명의 환자를 bcl-6와 IRF-4를 이용하여 GC 아형과 pGC 아형으로 분류하면 GC 아형은 14예(53.8%), pGC 아형은 7예(27.0%), 분류 불가능한 경우가 5예(19.2%)였다(Table 2).

3. 임상적 예후인자에 따른 생존기간의 차이

평균 48개월 동안 추적한 결과 생존 기간의 범위는 1~100+개월이었다. Kaplan-Meier법에 의한 5년 누적

**Fig. 1.** Kaplan Meier survival curve of diffuse large B-cell lymphoma.**Fig. 2.** Kaplan Meier survival curve according to IPI score ($P < 0.001$).

생존율은 32%이었고, 중앙생존기간은 44개월이었다 (Fig. 1). 각종 인자에 따른 예후 연관성을 분석하였다 (Table 1). IPI 점수가 0인 군에서는 중앙생존기간에 도달하지 않았고, IPI 점수가 1, 2, 3, 4 및 확인 불가능한 군에서는 각각 50개월, 24개월, 18개월, 4개월, 7개월로 중앙생존기간에 유의한 차이가 있었다($P < 0.001$, Fig. 2).

4. 면역조직화학염색

Bcl-2가 음성인 경우 중앙생존기간에 도달하지 않았고, 양성인 경우는 20개월로 유의한 생존기간의 차이가 있었다($P=0.009$, Fig. 3). Bcl-6, Ki-67, CD10, IRF-4, Granzyme-B, MHC-II와 p16의 발현에 따른 생존기간의 차이는 없었다(Table 2). GC 아형과 pGC 아형의 중앙생존기간은 각각 51개월과 20개월로 임상적으로 예후와 관련성이 있을 것으로 생각하나 통계학적 유의성

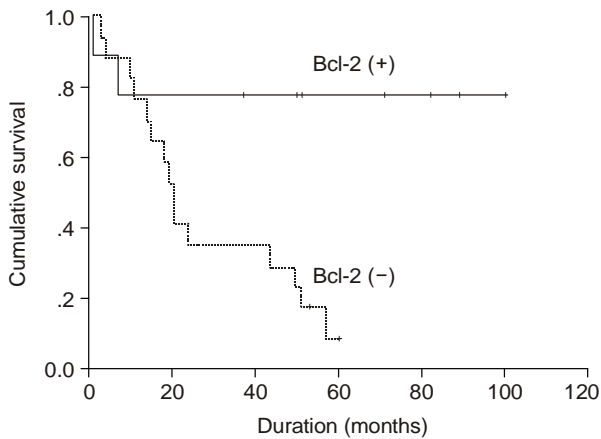


Fig. 3. Kaplan Meier survival curve according to bcl-2 ($P=0.009$).

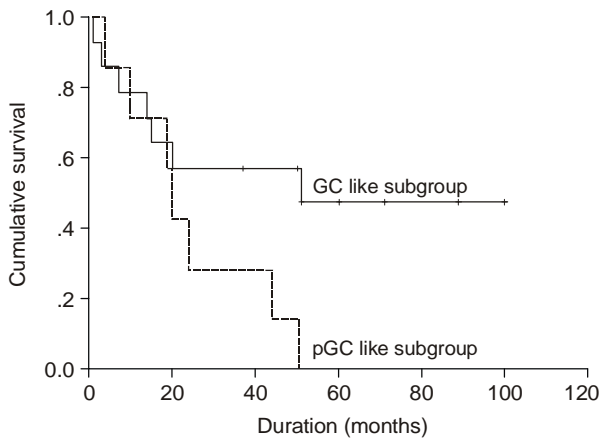


Fig. 4. Kaplan Meier survival curve according to GC-like subgroup and pGC-like subgroup ($P=0.064$). The undifferentiated subgroup was excluded.

은 없었다($P=0.064$, Fig. 4).

5. 저위험 및 저중등도 위험군(IPI 점수 0~2)에서의 생물학적 표지의 발현

IPI 점수가 0~2인 환자군에서 생물학적 표지의 발현에 따른 예후를 분석하였다. Bcl-2 양성(11예, 61.1%)인 군과 음성(7예, 38.9%)인 군의 중앙생존기간은 각각 44개월과 미도달로 유의한 생존기간의 차이를 보였다($P=0.002$, Fig. 5). Bcl-6, Ki-67, CD10, IRF-4, Granzyme-B, MHC-II와 p16의 발현에 따른 생존기간의 차이는 없었다(Table 3). pGC 아형(4예, 22.2%)은 중앙생존기간이 24개월이었고, GC 아형(11예, 61.1%)은 중앙생존기간에 도달하지 않았다($P=0.049$, Fig. 6). 각종 예후인자들의 다변량 분석을 시도한 결과 bcl-2

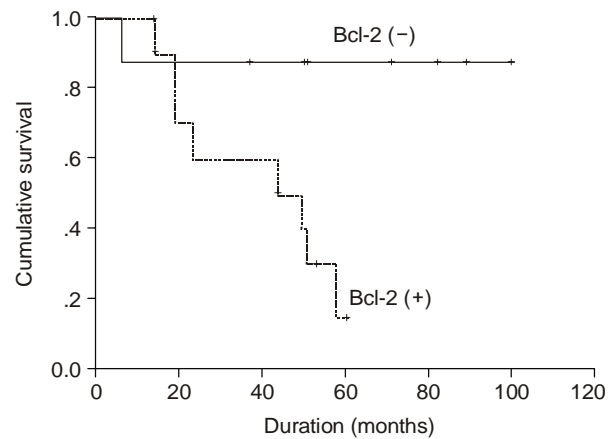


Fig. 5. Kaplan Meier survival curve according to bcl-2 in patients with IPI score 0~2 ($P=0.002$).

Table 3. The biologic characteristics and markers affecting survival in DLBL patients with IPI score 0~2 (No.=18)

Characteristics	No. of patients (%)	Median survival (month)	P value
Bcl-2			0.002
Positive	11 (61.1)	44	
Negative	7 (38.9)	Not reached	
Bcl-6			0.370
Positive	15 (83.3)	51	
Negative	3 (16.7)	Not reached	
Ki-67			0.352
< 60	7 (38.9)	51	
≥ 60	11 (61.1)	Not reached	
CD 10			0.169
Positive	3 (16.7)	Not reached	
Negative	15 (83.3)	51	
IRF-4			0.101
Positive	5 (27.8)	44	
Negative	13 (72.2)	Not reached	
Granzyme B			0.381
1+	14 (77.8)	51	
2+	2 (11.1)	15	
3+	2 (11.1)	Not reached	
MHC-II			0.418
Positive	17 (94.4)	57	
Negative	1 (5.6)	Not reached	
p16			0.448
Positive	3 (16.7)	Not reached	
Negative	15 (83.3)	57	
Subgroup*			0.049
GC	11 (61.1)	Not reached	
pGC	4 (22.2)	24	

*The undifferentiated subgroup was excluded.

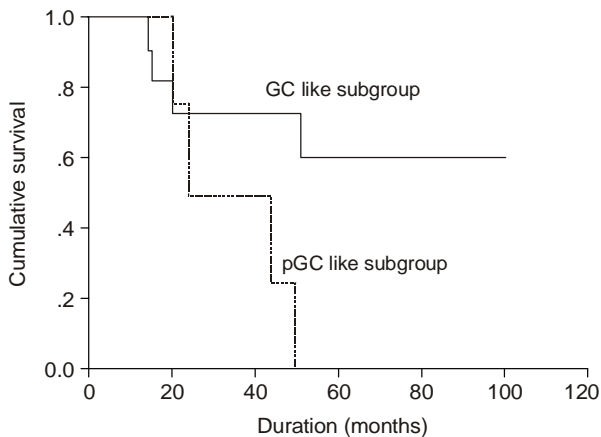


Fig. 6. Kaplan Meier survival curve according to GC-like subgroup or pGC-like subgroup in patients with IPI score 0~2 ($P=0.049$). The undifferentiated subgroup was excluded.

단백발현이 양성인 경우(상대위험도=21.711, 95% CI=1.812~260.122, $P=0.015$)와 IPI점수(상대위험도= 2.381, 95% CI=1.530~3.706, $P<0.001$)가 생존기간에 유의한 독립인자였다(Table 4).

고 찰

Bcl-2는 림프종의 t(14;18)(q32;q21)의 전좌(translocation)부위에서 발견되었다.¹³⁾ Bcl-2는 세포 자멸사를 억제하여 암성 변화를 유발하게 된다.¹⁴⁾ 또한 항암제의 내성 발현에도 관계되어 bcl-2가 과도하게 발현되면 나쁜 예후를 나타내게 된다.¹⁵⁾ Olivier 등은 고도의 비호지킨림프종에서 bcl-2가 발현이 된 경우 무병 생존기간이 짧다는 사실을 발표하였다.¹⁶⁾ Rituximab은 bcl-2가 과발현된 DLBL에서 효과적이었다. 이에 rituximab이 bcl-2의 과발현을 억제하여 항암제 저항성을 극복하도록 도와주는 가능성이 제시되었다.²⁵⁾ 본 연구에서는 전체 환자군 및 저위험군과 저중등도 위험군에서도 bcl-2가 과발현된 경우 예후가 좋지 않았다. 따라서 임상적으로 좋은 예후가 기대되어도 bcl-2가 과발현된 경우 rituximab을 투여하여야 할 것으로 생각한다.

Bcl-6는 비호지킨림프종에서 3q27의 염색체 전좌(translocation)부위에서 확인되었다. 이러한 전위는 다른 염색체로부터 bcl-6를 담당(coding)하는 부위(domain)에 다양한 배열을 배치함으로써 bcl-6의 발현을 억제하게 된다. Bcl-6는 POZ/zinc finger단백을 생산하여 전사억제물질로서 작용하게 된다. Bcl-6는 배중심(germinal center) 내의 B세포와 CD4+ T세포에서 정

Table 4. Multivariate analysis by Cox's regression in overall patients

Characteristics	Relative risk (95% CI)	P value
IPI score	2.381 (1.530~3.706)	<0.001
Bcl-2	21.711 (1.812~260.122)	0.015
GC subgroup	1.715 (0.588~5.004)	0.323

상적으로 발현되고, 배중심형성의 조절에 관여한다.⁹⁾ Bcl-6유전자의 변이는 B세포의 분화를 억제하여 림프종으로의 발전에 기여하게 된다. Lossos 등은 anthracycline를 포함하는 복합화학요법을 실시한 22명의 미만성대B세포림프종에서 bcl-6 단백질의 발현이 있는 경우 중앙 총생존기간이 14년으로 발현이 낮은 경우 2년에 비해 예후가 좋다고 하였다.⁹⁾

Ki-67은 bcl-6, CD10과 함께 세포자멸사 및 증식의 증가와 관계하며, 60% 이상 발현시 나쁜 예후가 나타남이 밝혀졌다.²¹⁾

CD10은 중성 엔도펩티다아제(neutral endopeptidase) 기능을 가진 세포 표면 당단백이다. CD10의 발현은 혈액림프 계열의 암종의 진단과 예후 평가에 중요하다. 미만성대B세포림프종에서 CD10의 발현이 과도하면 예후가 좋지 않음이 밝혀지고 있다. Xu 등은 53명의 미만성대B세포림프종에서 CD10이 양성인 경우에 완전 관해율이 유의하게 낮음을 발표하였다.¹⁰⁾

IRF-4 (interferon regulatory factor-4)는 인터페론 조절 인자(interferon regulatory factor)로 인터페론과 다른 cytokine 유전자의 발현을 조절하는 인자이다. 정상 B세포에서 발현되고, 맨틀세포(mantle cell)에서는 발현되지 않으며, IRF (-) mice에서 혈청 면역글로불린이 없다는 점을 고려할 때 IRF-4는 B세포 분화의 마지막 단계에 관여한다고 보인다.¹¹⁾ 따라서, pGC 아형 미만성대B세포림프종의 구별에 중요한 역할을 한다.¹²⁾

Granzyme-B는 자연살해세포(natural killer cell)와 세포독성T세포(cytotoxic T-cell)에서 분비되어 표적세포(target cell)의 DNA를 분절시켜 세포 자멸사를 유발한다. Granzyme-B의 결핍은 세포 자연사를 억제하여 암성 변화가 유도된다. Berge 등은 림프절미분화대세포림프종(nodal anaplastic large cell lymphoma)에서 Granzyme-B가 적을 때 생존율이 유의하게 낮음을 보고하였다.¹⁹⁾

종양침윤T-세포(tumor infiltrating T-cell, T-TILs)는 미만성대B세포림프종에서 면역감시체계로 작용한다. 진단시 조직검사서 T-TILs가 적으면 무재발 생존기

간이 짧게 나타난다. 특정항원 에피토프(specific antigenic epitopes)의 제시(presentation)에 중요한 MHC-II의 발현이 감소되면 T-TILs를 조직 침윤도 감소되어 무 재발 생존기간이 짧아지게 된다.²⁰⁾

p16은 p21, p27과 더불어 cyclin-dependent kinase inhibitors (CKIs)로서 세포 주기 중 G1기에서 S기로의 진행에 관여하는 종양억제 유전자이다.¹⁷⁾ 저등급 림프종에서보다 고등급 림프종에서 높은 빈도로 관찰되고 있어 림프종의 악성 변환에 관여하는 것으로 알려져 있다.¹⁸⁾ p16 단백질발현이 적은 경우 수술, 방사선치료 및 항암요법에 대한 반응이 낮고, 짧은 생존율을 나타내게 된다.

Alizadeh 등은 미만성대B세포림프종의 cDNA microarray를 이용하여 GC 아형, pGC 아형과 제3형으로 분류하였다.²²⁾ Rosenwald 등은 미만성대B세포림프종의 cDNA microarray를 이용하여 5가지 표현형으로 분류하였는데 이는 배중심 B세포 표현형, 증식 표현형, MHC-II 표현형, 림프절 표현형, BMP-6 표현형이다.²³⁾ 배중심 B세포 표현형은 GC 아형, pGC 아형 그리고 제3형으로 분류하였고, doxorubicin을 포함하는 복합화학요법 이후 5년 생존율이 각각 60%, 35%, 39%로 GC 아형에서 생존율이 높았다.²³⁾ Colomo 등은 bcl-6, CD10, IRF-4 및 CD138을 이용하여 CD10양성 GC 아형, CD10 음성 GC 아형, pGC 아형과 plasmablastic 아형으로 분류하였고, 예후와의 연관성에 대해 분석한 결과 통계학적 유의성은 없었으나 CD10 양성 GC 아형에서 예후가 좋을 것으로 기대하였다.²⁴⁾

본 연구에서는 DLBL의 예후 인자로서 국제예후지표가 중요함을 확인할 수 있었다. 그 외 면역화학염색법을 이용하여 bcl-2가 전체환자군 및 저위험군과 저중등도 위험군에서 유의한 생물학적 지표임을 확인하였다($P=0.009$). Bcl-6, CD10, IRF-4를 이용하여 GC 아형과 pGC 아형으로 분류하였을 때 저위험군과 저중등도 위험군에서 생존기간의 차이를 확인하였다($P=0.049$). 앞으로 cDNA microarray를 이용한 종양세포에서의 유전자 발현양상과 면역조직화학검사 결과의 비교 및 보완적인 연구가 필요하다고 생각한다.

요 약

배경: 악성림프종의 예후 예측에 있어서 널리 쓰이고 있는 국제예후지표(이하 IPI)의 유용성은 인정되고 있지만 이와 함께 림프종의 생물학적 특성을 분석한다면 예후 예측의 정확도가 높아질 것으로 기대한다.

방법: 미만성대B세포림프종에서 생물학적 인자가 예후에 미치는 영향을 확인하기 위해, 미만성대B세포림프종으로 조직학적으로 확진된 환자 중 면역화학염색이 가능한 환자를 대상으로 하였다. Bcl-2, bcl-6, Ki-67, CD10, IRF-4, Granzyme-B, MHC-II과 p16에 대한 항체를 이용하여 면역화학염색을 시행하여 발현여부에 따른 생존기간의 차이를 분석하였다. 면역화학염색의 양상에 따라 배중심 B세포양 아형(Germinal center-like subgroup, 이하 GC 아형; CD10±/Bcl-6+/IRF-4-)과 활성화 B-세포 아형(post-Germinal center like or activated B-cell subgroup, 이하 pGC 아형; CD10±/bcl-6±/IRF4+)으로 분류하여 생존기간을 분석하였다.

결과: 연령분포는 37세에서 69세로 중앙치는 56세였다. 평균 48개월 동안 추적한 결과 생존기간은 1~100+개월에 분포하였고, Kaplan-Meier법에 의한 5년 누적 생존율은 32%였고, 중앙생존기간은 44개월이었다. 진단시 병기, 'B' 증상, 혈청 LDH 농도, 거대종양유무, ECOG수행능력점수, 림프절의 병변의 수, IPI점수가 통계학적으로 의미있는 임상적 예후 인자였다. 생물학적 표지자중에서 bcl-2만이 통계학적으로 유의한 예후의 차이가 있었고($P=0.009$), GC 아형은 pGC 아형에 비해 생존기간은 길었으나, 통계학적 유의성은 없었다($P=0.064$). 동일한 IPI점수 0~2점(저위험군과 저중등도 위험군)인 18명의 환자에서 bcl-2의 발현여부에 따라 생존기간에 유의한 차이를 보였고($P=0.002$), GC 아형이 pGC 아형에 비해 생존기간의 통계학적 차이가 유의하게 있었다($P=0.049$).

결론: 미만성대B세포림프종에서 임상적 예후인자인 국제예후지표에 추가적으로 bcl-2를 포함한 생물학적 인자들의 발현 조사는 예후 예측에 도움이 될 수 있을 것이다.

참 고 문 헌

- 1) The Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project: A clinical evaluation of the International Lymphoma Study Group classification of non-Hodgkin's lymphoma. Blood 1997;89:3909-18.
- 2) Hahn JS, Ko YW, Min YH, et al. Statistical analysis of malignant lymphoma in Korea. Korean J Hematol 1995;30:197-214.
- 3) Pasqualucci L, Neumeister P, Goossens T, et al. Hypermutation of multiple protooncogenes in B-cell diffuse large-cell lymphomas. Nature 2001;412:341-6.

- 4) 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* 1994;84:1361-92.
- 5) Gatter KC, Warnke RA. Diffuse large B-cell lymphoma. In: Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW, eds. WHO Classification of tumors. Pathology and genetics of tumors of haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer (IARC) Press, 2001:171-4.
- 6) The International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project: a predictive model for aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med* 1993;329:987-94.
- 7) 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.
- 8) Fisher RI, Miller TP, O'Connor OA. Diffuse aggressive lymphoma. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2004;221-36.
- 9) Lossos IS, Jones CD, Warnke R, et al. Expression of a single gene, bcl-6, strongly predicts survival in patient with diffuse large B cell lymphoma. *Blood* 2001;98:945-51.
- 10) Xu Y, McKenna RW, Kroft SH. Comparison of multiparameter flow cytometry with cluster analysis and immunohistochemistry for the detection of CD 10 in diffuse large B-Cell lymphomas. *Mod Pathol* 2002;15:413-9.
- 11) Mittrucker HW, Matsuyama T, Grossman A, et al. Requirement for the transcription factor LSIRF/IRF4 for mature B and T lymphocyte function. *Science* 1997;275:540-3.
- 12) Falini B, Fizzotti M, Pucciarini A, et al. A monoclonal antibody (MUM1p) detects expression of the MUM1/IRF4 protein in a subset of germinal center B cells, plasma cells, and activated T cells. *Blood* 1999;95:2084-92.
- 13) Tsujimoto Y, Gorham J, Cossman J, Jaffe E, Croce CM. The t(14;18) chromosome translocation involved in B-cell neoplasms result from mistakes in VDJ joining. *Science* 1999;229:1390-3.
- 14) Korsmeyer SJ. Bcl-2 initiates a new category of oncogenes: regulators of cell death. *Blood* 1992;80:879-86.
- 15) Miyashita T, Reed JC. Bcl-2 oncoprotein blocks chemotherapy-induced apoptosis in a human leukemia cell line. *Blood* 1993;81:151-7.
- 16) Hermine O, Haioun C, Lepage E, et al. Prognostic significance of bcl-2 protein expression in aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 1996;87:265-72.
- 17) Serrano M, Hannon GJ, Beach D. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature* 1993;366:704-7.
- 18) Villuendas R, Sanchez-Beato M, Martinez JC, et al. Loss of p16/INK4A protein expression in non-Hodgkin's lymphomas is a frequent finding associated with tumor progression. *Am J Pathol* 1993;153:887-97.
- 19) Bladergroen BA, Meijer CJ, ten Berge RL, et al. Expression of the granzyme B inhibitor, protease inhibitor 9, by tumor cells in patients with non-Hodgkin and Hodgkin lymphoma: novel protective mechanism for tumor cells to circumvent the immune system? *Blood* 2002;99:232-7.
- 20) Momburg F, Herrmann B, Moldenhauer G, Moller P. B-cell lymphomas of high grade malignancy frequently lack HLA-DR, -DP and -DQ antigens and associated in variant chain. *Int J Cancer* 1987;40:598-603.
- 21) Grogan TM, Lippman SM, Spier CM, et al. Independent prognostic significance of a nuclear proliferation antigen in diffuse large cell lymphomas as determined by the monoclonal antibody Ki-67. *Blood* 1987;71:1157-60.
- 22) Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* 2000;403:503-11.
- 23) Rosenwald A, Wright G, Chan WC, et al. Lymphoma/Leukemia Molecular Profiling Project: the use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med* 2002;346:1937-47.
- 24) Colomo L, Lopez-Guillermo A, Perales M, et al. Clinical impact of the differentiation profile assessed by immunophenotyping in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 2003;10:78-84.
- 25) Mounier N, Briere J, Gisselbrecht C, et al. Rituximab plus CHOP (R-CHOP) overcomes bcl-2--associated resistance to chemotherapy in elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL). *Blood* 2003;101:4279-84.