



Title	脾臓原発びまん性大細胞型B細胞性リンパ腫の臨床病理学的検討に関する研究
Author(s)	下埜, 城嗣
Description	配架番号 : 2350
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第12936号
Issue Date	2017-12-25
DOI	<a href="https://doi.org/10.14943/doctoral.k12936">https://doi.org/10.14943/doctoral.k12936</a>
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/88240">https://hdl.handle.net/2115/88240</a>
Type	doctoral thesis
File Information	Joji_Shimono.pdf



# 学位論文

脾臓原発びまん性大細胞型 B 細胞性リンパ腫の臨床病理  
学的検討に関する研究

(Clinicopathological studies of primary splenic diffuse  
large B-cell lymphoma)

2017 年 12 月

北海道大学

下埜 城嗣



# 学位論文

脾臓原発びまん性大細胞型 B 細胞性リンパ腫の臨床病理  
学的検討に関する研究

(Clinicopathological studies of primary splenic diffuse  
large B-cell lymphoma)

2017 年 12 月

北海道大学

下埜 城嗣

## 目次

発表論文目録および学会発表目録	1 項
略語表	2 項
緒言	3-4 項
第 1 章	
緒言	5 項
実験方法	6 項
実験結果	7 項
考察	8 項
第 2 章	
緒言	9 項
実験方法	10-11 項
実験結果	12-14 項
考察	15 項
第 3 章	
緒言	16 項
実験方法	17-19 項

実験結果 . . . . . 20-29 項

考察 . . . . . 30-31 項

総括および結論 . . . . . 32-34 項

謝辞 . . . . . 35 項

引用文献 . . . . . 36-48 項

## 発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した

1. Joji Shimono, Hiroaki Miyoshi, Junichi Kiyasu, Kensaku Sato, Tomohiko Kamimura, Tetsuya Eto, Takuto Miyagishima, Koji Nagafuji, Takanori Teshima, Koichi Ohshima.  
Clinicopathological analysis of primary splenic diffuse large B-cell lymphoma.  
British Journal of Haematology 178:719-27 (2017).
2. Joji Shimono, Hiroaki Miyoshi, Seto Masao, Takanori Teshima, Koichi Ohshima.  
Clinical features of diffuse large B-cell lymphoma with polyploidy.  
Pathol Int 67:17-23 (2017).
3. Joji Shimono, Hiroaki Miyoshi, Tomohiko Kamimura, Tetsuya Eto, Takuto Miyagishima, Yuya Sasaki, Daisuke Kurita, Keisuke Kawamoto, Koji Nagafuji, Masao Seto, Takanori Teshima, Koichi Ohshima.  
Clinicopathological features of primary splenic follicular lymphoma  
Annals of Hematology. In press.
4. Joji Shimono, Hiroaki Miyoshi, Noriaki Yoshida, Takeharu Kato, Kensaku Sato, Takeshi Sugio, Kohta Miyawaki, Daisuke Kurita, Yuya Sasaki, Keisuke Kawamoto, Yoshitaka Imaizumi, Koji Kato, Koji Nagafuji, Koichi Akashi, Masao Seto, Takanori Teshima, Koichi Ohshima.  
Analysis of GNA13 protein in follicular lymphoma and its association with poor prognosis  
American Journal of Surgical Pathology. In press.
5. Joji Shimono, Hiroaki Miyoshi, Fumiko Arakawa, Kensaku Sato, Takuya Furuta, Reiji Mutou, Eriko Yanagida, Yuya Sasaki, Daisuke Kurita, Keisuke Kawamoto, Koji Nagafuji, Koichi Ohshima.  
Prognostic factors for histiocytic and dendritic cell neoplasms  
Oncotarget. In press.

本研究の一部は以下の学会に発表した

1. 下埜城嗣、三好寛明、喜安純一、佐藤健作、上村智彦、衛藤徹也、宮城島拓人、長藤宏司、豊嶋崇徳、大島孝一

Clinicopathologic analysis of primary splenic diffuse large B-cell lymphoma  
第 79 回 日本血液学会, 2017 年 10 月 21 日 東京

## 略語表

本文中および図中で使用した略語は以下のとおりである。

AID	Activation induced cytidine deaminase
ATLL	Adult T-cell leukemia/lymphoma
CH	Chronic hepatitis
CLL/SLL	Chronic lymphocytic leukemia /Small cell lymphoma
COO	Cell of origin
CR	Complete remission
CTCL	Cutaneous T-cell lymphoma
DAA	Direct Acting Antivirals
GCB	Germinal center B-cell
DLBCL	Diffuse large B-cell lymphoma
FISH	Fluorescence in situ hybridization
FL	Follicular lymphoma
HCC	Hepatocellular carcinoma
HCL	Hairy cell leukemia
HCV	Hepatitis C virus
IPI	International Prognostic Index
LC	Liver cirrhosis
LDH	Lactate dehydrogenase
LPL	Lymphoplasmacytic lymphoma
MCL	Mantle cell lymphoma
NA	Not available
ND	Not detectable
OS	Overall survival
PD	Progressive disease
PFS	Progression free survival
PS	Performance status
SMZL	Splenic marginal zone lymphoma
SDRPL	Splenic diffuse red pulp small B-cell lymphoma
SVR	Sustained virological response
WHO	World Health Organization

## 緒言

悪性リンパ腫は血液悪性腫瘍の一つであり、成熟リンパ球から発生する悪性腫瘍である。日本において悪性リンパ腫に新規に罹患した患者は、2013年で25,761人とされている。罹患率は、1985年、1995年、2005年、2013年で人口10万人あたりそれぞれ5.5人、8.9人、13.3人、20.2人と、年々増加傾向にあるとされている。また、男女比は約3:2と男性に多く、65-74歳が発症のピークであるとされている<sup>1,2</sup>。

悪性リンパ腫はホジキンリンパ腫と非ホジキンリンパ腫の2つに大きく分類することができる<sup>3</sup>。日本において、ホジキンリンパ腫の頻度は5-10%程度であり非ホジキンリンパ腫の占める割合が多い。非ホジキンリンパ腫は、さらに組織学的にB細胞性リンパ腫とT/NK細胞性リンパ腫に分類され、頻度としてはB細胞性リンパ腫が大半を占める<sup>3</sup>。

悪性リンパ腫の浸潤様式としては、リンパ節やリンパ組織である脾臓、扁桃に病変を形成する節性浸潤と骨髄、肝臓、消化管、中枢神経などの節外臓器に浸潤する節外浸潤に大きく分けられる。これら浸潤臓器の違いによって治療反応性や予後に影響があるとされている<sup>4-16</sup>。

脾臓は体内で最も大きなリンパ組織の集合体である。脾臓の80-95%を占める白脾髄はリンパ組織として免疫に関与する。一方で脾臓の5-20%を占める赤脾髄は血液ろ過、異常な血球や老化した血球の除去などを行っている<sup>17,18</sup>。脾臓は悪性リンパ腫において頻度の高い浸潤臓器の一つであり、ほぼすべての組織型において浸潤を認めるとされている。しかし、脾臓病変のみを認めるprimary splenic lymphomaは非常にまれであるとされている<sup>19,20</sup>。

今回、申請者は第1章において日本におけるprimary splenic B-cell lymphomaの頻度の検討を行った。その中で最も頻度の多かったDiffuse large B-cell lymphoma (DLBCL)について、第2章ではcontrol症例と比較を行うことでprimary splenic DLBCLの臨床病理学的な特徴を明らかにした。具体的にはprimary splenic DLBCLの一つの特徴として、HCVの罹患率がcontrol症例に比べて高いことを見出した。そこで第3章では、HCV antibody positive primary splenic DLBCLの臨床病理学的な特徴ならびにHCVが直接的に腫瘍B細胞内に感染し、腫瘍形成に関わる可能性を検討するため、NS3の免疫染色、HCV-RNA in situ hybridization (ISH)、HCV RT-

PCR を行った。

## 第1章 日本における primary splenic B-cell lymphoma の検討

### 緒言

日本において B 細胞性リンパ腫は悪性リンパ腫の 70% を占めるリンパ腫である<sup>21,22</sup>。B 細胞性リンパ腫は多くの組織型が存在しており組織型ごとに悪性度が様々であり治療法も異なっている<sup>3,23,24,25,26</sup>。また B 細胞性リンパ腫は節性病変であるリンパ節病変のみならず、リンパ組織である脾臓さらには様々な節外病変を形成することが知られている<sup>3,27,28,29</sup>。

脾臓は体内で最も大きなリンパ組織の集合体である。脾臓の 80–95% を占める白脾髄はリンパ組織として免疫に関与する。一方で脾臓の 5–20% を占める赤脾髄は血液ろ過、異常な血球や老化した血球の除去などを行っている<sup>17,18</sup>。脾臓に浸潤した B 細胞性リンパ腫は大きく 2 つに分けられる。白脾髄を中心に病変を形成するパターンと、赤脾髄を中心に病変を形成するパターンでありこれらは悪性リンパ腫の組織型によって異なっていることがわかっている<sup>30</sup>。具体的には白脾髄を中心に病変を形成するリンパ腫として Splenic marginal zone lymphoma (SMZL)<sup>31,32</sup>、Follicular lymphoma (FL)<sup>33,34</sup>、一方で赤脾髄を中心に病変を形成するリンパ腫として Hairy cell leukemia (HCL)<sup>35,36</sup>、Splenic diffuse red pulp small B-cell lymphoma (SDRP)<sup>37,38</sup> が知られている。

現在までに primary splenic B-cell lymphoma の組織型の頻度や臨床病理学的な特徴についてはまとまった報告は少数のみである<sup>39</sup>。今回、申請者は 160 例の primary splenic B-cell lymphoma について詳細な組織型の頻度を確定するため検討を行った。

## 実験方法

### 1. 患者検体

久留米大学第二病理学講座において 2005 年から 2015 年に診断された 160 例の primary splenic B-cell lymphoma について検討した。

すべての症例の病理診断は 2 人の血液病理医が行い World Health Organization (WHO) 分類に従って診断を行った<sup>3</sup>。臨床情報については医療情報を参照した。患者検体ならびに臨床情報の使用に関してはヘルシンキ宣言に準拠して久留米大学の倫理委員会の承認を得て行った。

### 2. Primary splenic lymphoma の定義

Primary splenic lymphoma はこれまでに臨床的に以下に述べる 2 つのパターンがあるとされている<sup>30,40</sup>。一つ目は全身リンパ節腫脹を認めず脾臓病変と脾門部のリンパ節腫脹のみを認めるもの、二つ目は全身リンパ節腫脹を認めず脾臓病変に加えて骨髄、肝臓、末梢血のいずれか 1 つ以上に浸潤しているものである。本研究ではこれら 2 つのパターンを primary splenic B-cell lymphoma と定義して検討を行った。

## 実験結果

### 1. Primary splenic B-cell lymphoma の組織型ごとの頻度

Primary splenic B-cell lymphoma の頻度は DLBCL 41.2% (66/160)、SMZL 30.0% (48/160)、FL 10.6% (17/160)、MCL 6.3% (10/160)、LPL 3.1% (5/160)、HCL 3.1% (5/160)、SDRPL 3.1% (5/160)、CLL/SLL 1.3% (2/160)、unclassifiable 1.3% (2/160)であった。

## 考察

Primary splenic B-cell lymphoma の中で DLBCL, SMZL, FL という特定の組織型が全体の 83% を占めることを明らかにすることができた。特に DLBCL は、42% をしめ、primary splenic B-cell lymphoma の中心的な組織型であることを明らかにできた。

この結果を踏まえ、申請者は primary splenic DLBCL と、control DLBCL (すなわち primary splenic DLBCL 以外の DLBCL と診断された症例) との比較を行い、これらの疾患間の臨床病理学的な特徴の相違について、さらに検討を加えることにした。

## 第2章 Primary splenic diffuse large B-cell lymphoma の臨床病理学的検討

### 緒言

Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) は B 細胞性の悪性リンパ腫であり、非ホジキンリンパ腫の 30–40% を占め、悪性リンパ腫の中で最も頻度が高いリンパ腫である<sup>41</sup>。DLBCL は不均一な集団であるとされており腫瘍の発生源地により germinal center B-cell (GCB) と non-GCB の大きく 2 つに分類することができる<sup>42–46</sup>。また DLBCL は浸潤臓器の違いによって治療反応性や予後に影響があると報告されている。具体的には、ワルダイエル輪に発生する DLBCL は予後良好であり<sup>4</sup>、一方、精巣や乳房に発生する DLBCL は高率に中枢神経浸潤を引き起こし予後不良とされている<sup>5–16</sup>。

DLBCL の 40% は脾臓病変を伴うとされている<sup>47</sup>。一方、脾臓病変のみを認める primary splenic DLBCL は 1% 以下と非常にまれであるとされている<sup>19, 20</sup>。Primary splenic DLBCL における初発時の臨床病理学的な特徴として、腹痛 (81%)、PS が良好である、が過去に報告されているものの、少数症例での検討にとどまっている<sup>48, 49</sup>。さらには、primary splenic DLBCL とコントロール DLBCL (すなわち primary splenic DLBCL 以外の DLBCL と診断された症例) を比較した報告は、これまでない。

そこで本章では、第 1 章において日本における primary splenic B-cell lymphoma の検討から最も頻度の多かった組織型である DLBCL についてコントロール DLBCL と臨床病理学的な比較と検討を行いその臨床病理学的特徴を明らかにした。

## 実験方法

### 1. 患者検体

久留米大学第二病理学講座において 2005 年から 2015 年に診断された 66 例の primary splenic Diffuse large B-cell lymphoma と 309 例のコントロール DLBCL を用いて検討した。コントロール DLBCL は以前の報告で用いた DLBCL 症例を用いて検討を行った<sup>50</sup>。すべての症例の病理診断は 2 人の血液病理医が行い World Health Organization (WHO) 分類に従って診断を行った<sup>3</sup>。臨床情報については医療情報を参照した。患者検体ならびに臨床情報の使用に関してはヘルシンキ宣言に準拠して久留米大学の倫理委員会の承認を得て行った。

### 2. HCV 感染の定義

HCV 陽性症例の定義は 2 次あるいは 3 次世代の immunoassay kit (Monolisa anti-HCV Plus, Sanifi Diagnostics Pasteur; and AxSYM HCV Version 3.0, Abbott Laboratories) を用いて HCV 抗体が陽性である症例を定義した。

### 3. 脾臓病変の定義

脾臓病変の有無については CT で結節を認める所見など画像上、リンパ腫の脾臓病変と考えられる症例を定義した。また CT 検査において長径 10 cm 以上を脾腫と定義した。脾臓の結節病変 (Splenic macronodular lesion) (図 1) は脾臓内に 3 cm 以上の結節を認めるものを定義した。

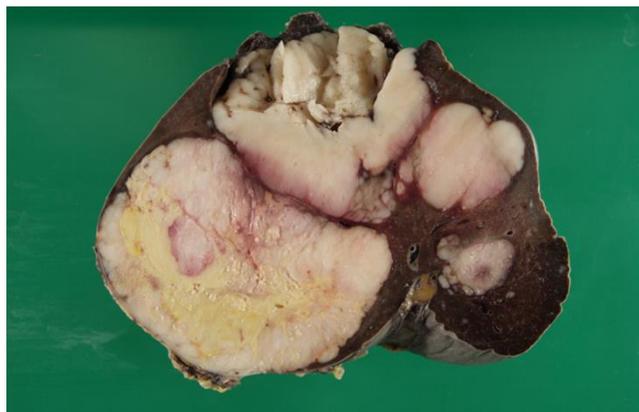


図 1 Primary splenic DLBCL の肉眼所見  
脾臓内に大小不同の白色の結節性病変 (splenic macronodular lesions) を複数認める。

#### 4. フローサイトメトリー解析

フローサイトメトリー解析は FACS-Calibur (Becton-Dickinson, Mountain View, CA, USA) と the Cell Quest software program (Becton-Dickinson) を用いて解析した。抗体は CD5 (T1) (Beckman Coulter)、CD10 (J5) (Beckman Coulter) を用いた。

#### 5. 免疫染色

ホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 検体を用いて Dako autostainer (Dakocytomation, Kyoto, Japan) で染色を行った。抗体は以下のものを使用した。CD5 (4C7) (Leica Microsystems)、CD10 (56C6) (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany)、CD20 (L-26) (Dakocytomation)、BCL2 (124) (Dakocytomation, Glostrup, Denmark)、BCL6 (P1F6) (Leica Microsystems)、MUM1 (MUM1p) (Dakocytomation) を用いた。腫瘍細胞の 30% 以上に陽性であった症例を陽性と定義した。CD5 陽性 DLBCL 症例においてはマントル細胞性リンパ腫の除外のため Cyclin D1 (SP4) (ThermoScientific, Runcorn, UK) の染色を行った。

#### 6. 統計解析

臨床病理学的な特徴の検討についてはカイニ乗検定あるいは Fisher の検定を行った。R-CHOP または R-CHOP like regimen を施行された症例のみで予後解析を行った。Overall survival (OS) と Progression-free survival (PFS) の生存曲線は カプランマイヤー法を用いて検討を行った。OS と PFS のエンドポイントはそれぞれ DLBCL の死亡、再発とした。生存曲線の比較に関しては log-rank test を用いて検討した。統計解析は JMP, version 10 (SAS institute, Tokyo, Japan) を使用して検討した。P-value of <0.05 を統計学的な有意差ありとして検討した。

## 実験結果

### 1. Primary splenic DLBCL 66 例と control DLBCL 309 例の比較

Primary splenic DLBCL 66 例と control DLBCL 309 例の比較を行った結果を Table1 に示す。

Primary splenic DLBCL は control DLBCL に比べて HCV 抗体が陽性の頻度が高い (Primary splenic DLBCL 21.8% vs control DLBCL 6%;  $P=0.002$ )、肝腫大が多い ( $P=0.04$ )、脾腫大が多い ( $P<0.0001$ )、骨髄浸潤が多い ( $P=0.004$ )、B 症状が多い ( $P=0.0003$ ) ことを明らかにした。Primary splenic DLBCL は control DLBCL に比べて Ann Arbor Stage 3 or 4 症例が少ない ( $P<0.0001$ )、節外浸潤が少ない ( $P=0.003$ ) ことがわかった。免疫染色の検討の結果、Primary splenic DLBCL は control DLBCL に比べて CD5 陽性率が高い ( $P=0.04$ )、CD10 陽性率が低い ( $P=0.04$ )、BCL2 陽性率が低い ( $P=0.03$ )、BCL6 陽性率が低い ( $P=0.003$ )、MUM1 陽性率が低い ( $P=0.03$ ) ことを示した。

表1 Primary splenic DLBCL と Control DLBCL の臨床病理学的検討

	Primary splenic DLBCL	Control DLBCL	P-value
Age>60y	84.8% (56/66)	75.7% (234/309)	0.11
Sex: Male/Female	41/25	169/140	0.27
Hepatitis C virus status	21.8% (12/55)	6.0% (9/150)	0.002
Hepatomegaly	12.5% (8/64)	5.2% (16/309)	0.04
Splenomegaly	98.4% (65/66)	14.2% (44/309)	<0.0001
Bone marrow involvement	25.0% (16/64)	10.4% (28/268)	0.004
Peripheral blood involvement	4.5% (3/72)	2.0% (6/303)	0.21*
Extranodal involvement	34.8% (23/66)	54.7% (169/309)	0.003
B symptoms	44.3% (27/61)	21.0% (65/308)	0.0003
Performance status, 2-4	43.8% (28/64)	63.9% (193/312)	0.003
Ann Arbor Stage 3 or 4	27.6% (21/76)	59.4% (164/276)	<0.0001
Elevated LDH level	71.9% (46/64)	63.5% (195/307)	0.20
IPI High int and High	38.1% (24/63)	48.3% (143/296)	0.14
Splenic macronodular lesions	57.4% (35/61)	56.3% (9/16)	0.94
Immunohistochemistry			
CD5 protein	30.3% (20/66)	18.6% (57/307)	0.04
CD10 protein	21.2% (14/63)	34.0% (105/309)	0.04
BCL2 protein	56.1% (37/66)	70.7% (174/246)	0.03
BCL6 protein	56.1% (37/66)	74.8% (231/309)	0.003
MUM1 protein	54.5% (36/66)	69.1% (208/301)	0.03
Cell of origin			
GCB type	39.4% (26/66)	42.7% (132/309)	0.62
Non-GCB type	60.6% (40/66)	57.3% (177/309)	
Types of initial therapy			
Chemotherapy	86.4% (46/53)	90.0% (278/309)	1.00
R-CHOP/R-CHOP like regimen	40	236	
Other	6	42	
Radiation therapy	0% (0/53)	22.7% (70/309)	<0.0001*

LDH, Lactate Dehydrogenase IPI, International Prognostic Index GCB, Germinal center B-cell like Diffuse large B-cell lymphoma  
R-CHOP, rituximab, cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine and prednisone. \* Fisher's exact test.

フォローアップ期間の中央値は primary splenic DLBCL は 40.0 ヶ月 (1.0-122.5 ヶ月)、control DLBCL は 36.8 ヶ月 (0.03-97.6 ヶ月) であった。Primary splenic DLBCL と control DLBCL の比較では OS に差は認められなかったものの ( $P=0.47$ )、PFS については primary splenic DLBCL は control DLBCL に比べて有意に良好であることがわかった ( $P=0.04$ ) (図 2)。

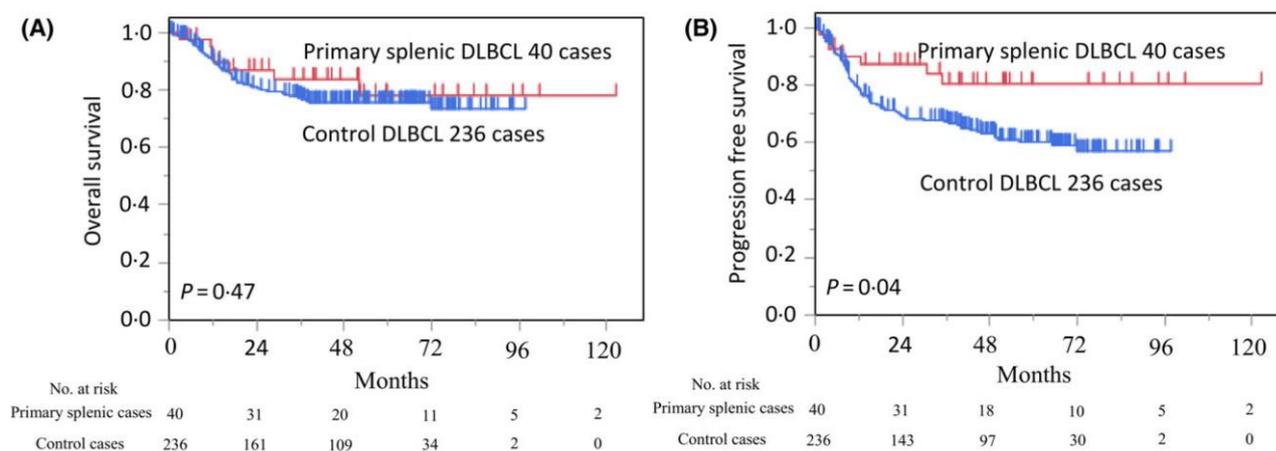


図 2 Primary splenic DLBCL と control DLBCL の OS と PFS の結果

(A) Primary splenic DLBCL と control DLBCL の比較では OS に差は認められなかった ( $P=0.47$ )

(B) Primary splenic DLBCL は control DLBCL に比べて PFS が良好であった ( $P=0.04$ )

## 考察

Primary splenic DLBCL は control DLBCL と比較し、さまざまな臨床的特徴を有していることを示すことができた。生存解析においては OS では差は認められなかったものの、PFS に関しては primary splenic DLBCL は control DLBCL に比べて有意に良好であることを明らかにすることができた。

Primary splenic DLBCL は control DLBCL と比べて有意に PFS が良好であった ( $P=0.04$ ) 原因については、様々な要因が関わっている可能性がある。Bailey らが行った 87 例の primary splenic DLBCL の検討では、脾摘された群は脾摘されなかった群に比べて PFS が良好であったと報告しており、この原因として脾摘による腫瘍量の減少が関係している可能性について指摘している<sup>49</sup>。また、脾摘による免疫状態の変化に関しても、現在までに様々な報告がある。具体的には、肝硬変、慢性肝炎、肝細胞癌の患者に対する脾摘により、末梢血中の NK 細胞の活性化や CD4/CD8 比の低下、IFN $\gamma$  の増加が見られるとの報告がある<sup>51-53</sup>。肝細胞癌に対して肝切除と同時に脾摘を行うことによって PFS が延長したと報告されており、この原因として脾摘による免疫機能の賦活化も一つの要因ではないかと考察されている<sup>54,55</sup>。このような知見を考慮に加えると、脾摘による腫瘍量の減少と免疫状態の変化が primary splenic DLBCL が control DLBCL より PFS が良好であった原因の一つであった可能性がある。

以上、本検討では、primary splenic DLBCL 66 例と control DLBCL 309 例の比較から、primary splenic DLBCL の臨床病理学的な特徴を明らかにした。特に重要な点として、primary splenic DLBCL は control DLBCL と比較して HCV に感染した症例が有意差をもって多いことが分かった。そこで primary splenic DLBCL を HCV antibody positive cases と negative cases に分けて詳細に解析し、HCV antibody positive primary splenic DLBCL における特徴的な病態の有無について追加検討を行うことにした。

### 第3章 HCV antibody positive primary splenic diffuse large B-cell lymphoma の臨床病理学的検討

#### 緒言

HCV は single strand RNA virus であり主に肝細胞、リンパ球に感染することがわかっている<sup>56</sup>。世界で 1.6 億人が感染していると考えられており Genotype は 1-6 まであり地域差が認められている<sup>57-59</sup>。HCV 感染が関与する疾患として慢性肝炎、肝硬変、肝細胞癌が有名であるが肝外病変として悪性リンパ腫、クリオグロブリン血症、慢性腎臓病、扁平苔癬、ポルフィリン症が報告されている<sup>60-68</sup>。

HCV antibody positive DLBCL は比較的稀な病態ではあるが、特徴として肝臓、脾臓、胃などの節外病変を作りやすいことがわかっている<sup>69-71</sup>。加えて高齢、B 症状、LDH 高値、IPI 不良症例、1 臓器以上の節外浸潤が特徴として報告されている<sup>72-75</sup>。HCV 感染の有無で OS, PFS に影響は認められなかったとしている<sup>72</sup>。

第2章での検討から、primary splenic DLBCL は control DLBCL と比較して HCV に感染した症例が有意に多く、HCV が primary splenic DLBCL の病態形成に深く関わっている可能性が示された。そこで本章では、primary splenic DLBCL と control DLBCL (初発病変部位が脾臓ではない DLBCL。以下、DLBCL without primary splenic と表記する)に分けて、それぞれ HCV antibody positive cases と negative cases に分け、比較検討をおこなった。さらに、HCV antibody positive DLBCL において HCV が直接的に腫瘍 B 細胞内に感染し、腫瘍形成に関わる可能性を検討するため、NS3 の免疫染色、HCV-RNA in situ hybridization (ISH), HCV RT-PCR を行った。

## 実験方法

### 1. 患者検体

久留米大学第二病理学講座において 2005 年から 2015 年に診断された 12 例の HCV antibody positive primary splenic DLBCL と 25 例の HCV antibody positive DLBCL without primary splenic と 120 例の HCV antibody negative DLBCL を用いて検討した。すべての症例の病理診断は 2 人の血液病理医が行い World Health Organization (WHO) 分類に従って診断を行った<sup>3</sup>。臨床情報については医療情報を参照した。患者検体ならびに臨床情報の使用に関してはヘルシンキ宣言に準拠して久留米大学の倫理委員会の承認を得て行った

### 2. HCV 感染の定義

HCV 陽性症例の定義は 2 次あるいは 3 次世代の immunoassay kit (Monolisa anti-HCV Plus, Sanifi Diagnostics Pasteur; and AxSYM HCV Version 3.0, Abbott Laboratories) を用いて HCV 抗体が陽性である症例を定義した。HCV-RNA は quantitative real-time polymerase chain reaction (COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HCV test; Roche Molecular Systems, Pleasanton, CA, USA) を用いた。高ウイルス量の定義は HCV-RNA が  $\geq 5.0 \log \text{ IU/ml}$  とした<sup>76</sup>。Genotype は血清を使用して分類した<sup>77</sup>。

### 3. フローサイトメトリー解析

フローサイトメトリー解析は FACS-Calibur (Becton-Dickinson, Mountain View, CA, USA) と the Cell Quest software program (Becton-Dickinson) を用いて解析した。抗体は CD5 (T1) (Beckman Coulter, CA)、CD11c (BU15) (Beckman Coulter, CA) を用いた。

### 4. 免疫染色

ホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 検体を用いて Dako autostainer (Dakocytomation, Kyoto, Japan) で染色を行った。抗体は以下のものを使用した。CD5 (4C7) (Leica Microsystems)、CD10 (56C6) (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany)、CD20 (L-26) (Dakocytomation)、BCL2 (124) (Dakocytomation, Glostrup, Denmark)、BCL6 (P1F6) (Leica Microsystems)、MUM1 (MUM1p) (Dakocytomation)、NCL-HCV-NS3 (MMM33) (Leica Microsystems) を用いた。腫瘍細胞の 30% 以上に陽性であった症例を陽性と定義した。CD5 positive DLBCL 症例においてはマントル細

胞性リンパ腫の除外のため Cyclin D1(SP4) (ThermoScientific, Runcorn, UK) の染色を行った。

#### 5. Fluorescence in situ hybridization(FISH) analysis

ホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 検体を用いてFISH法を行った。

ProbeはVysis LSI *IGH-BCL2* Dual Color, Dual Fusion Translocation Probe (KBI-10755), Vysis LSI *BCL6* Break FISH probe (KBI-10730)用いて検討した。

#### 6. In Situ Hybridization for HCV RNA

HCV RNA in situ hybridizationはFFPE 検体からHCV 1b core probe を使用してRNAscope 2.0 HD detection kit (Advanced Cell Diagnostics, Hayward, CA, USA) を使用した。

#### 7. Tissue RT-PCR in HCV positive lymphoma

FFPE からRNAを採取するのに Recover All Total Nucleic Acid Isolation kit (Ambion, Foster City, CA)を使用した。採取したRNAからRandom hexmers primer (Invitrogen Carlsbad, CA)を用いてcDNAを作成した。

表2に示すプライマーを用いてRT-PCRを施行した後は3%アガロースゲルを用いて電気泳動を行った。Nested-PCRの期待されるDNA断片は107bpであった。 $\beta$ -actinをコントロールとして用いた。

表2 RT-PCRに使用したプライマーを以下に示す。

<b>Primer</b>	<b>Sequence (5'-3')</b>
1st PCR primer-Forward	CTGTGAGGAACTACTGTCTTCACGCA
1st PCR reverse-Reverse	TTCACGCAGAAAGCGTCTAGCCATG
2nd PCR primer-Forward	AATTCCGGTGTACTCACCGGTTCCG
2nd PCR primer-Reverse	GGTGTACTCACCGGTTCCGCAGAC

#### 8. 統計解析

臨床病理学的な特徴の検討についてはカイニ乗検定あるいはFisherの検定を行った。OSとPFSの生存曲線は Kaplan-Meier法を用いて検討を行った。OSとPFSのエンドポイントはそれぞれDLBCLの死亡、再発とした。生存曲線の比較に関してはlog-rank testを用いて検討した。統計解析はJMP,

version 10 (SAS institute, Tokyo, Japan)を使用して検討した。 P-value of  $<0.05$  を統計学的な有意差ありとして検討した。

## 実験結果

### 1. HCV antibody positive primary splenic DLBCL の臨床病理学的特徴

12例の HCV antibody positive primary splenic DLBCL を表3に示す。年齢中央値は 68.5 歳 (59-83 歳) であった。男女比は 7:5 であった。初診時の症状は B 症状が 8.3% (1/12)、上腹部違和感が 8.3% (1/12) でそれ以外は無症状であった 83.4% (10/12)。Splenic macronodular lesions は 91.7% (11/12) で認められた。また、cell of origin の検討では GCB type は 83.3% (10/12)、non-GCB type は 16.7% (2/12) で GCB type が多かった。FISH では *IGH-BCL2* の転座は 0% (0/12)、*BCL6* split は 41.7% (5/12) で認められた。初期治療として 9 例が R-CHOP 療法であった。1 例が Rituximab 単剤の治療であった。治療効果として 9 例が CR、1 例が PD であった。フォローアップ期間の中央値は 47.0 ヶ月 (4 ヶ月-94 ヶ月) であった。7 例が生存、4 例が死亡していた。死亡の原因として 1 例はリンパ腫、1 例は突然死、1 例は肝細胞癌の増悪、1 例は 2 次性骨髄異形成症候群であった。

表 3 HCV antibody positive primary splenic DLBCL の臨床病理学的

No.	Age	Sex	Primary symptoms	Splenic macronodular lesion	Infiltration site	PI	Immunohistochemistry					COO	FISH analysis		Initial therapy	Therapeutic effect	Follow up periods (Months)	Disease status
							CD5	CD10	CD20	BCL2	BCL6		MUM1	IGH/BCL2				
1	81	M	B symptoms	+	SP	High int	-	-	+	-	-	+	-	-	R-CHOP	CR	40	CR/Alive
2	66	M	-	+	SP	Low	-	+	+	-	-	+	-	+	R-CHOP	CR	52	CR/Dead
3	69	F	-	+	SP	Low int	-	+	+	-	-	-	-	-	R-CHOP	CR	53	CR/Alive
4	81	F	-	+	SP	Low int	-	-	+	+	-	-	-	-	R-CHOP	CR	37	CR/Alive
5	82	M	Abdominal discomfort	+	SP	Low int	-	+	-	+	-	-	-	+	Rituximab	CR	50	CR/Alive
6	60	M	-	+	SP	Low int	-	+	+	-	+	-	-	+	R-CHOP	CR	47	CR/Alive
7	76	M	-	+	SP	Low int	-	-	+	-	-	-	-	+	R-CHOP	CR	18	CR/Dead
8	66	F	-	+	SP	Low	-	-	+	+	-	-	-	+	R-CHOP	CR	94	CR/Dead
9	59	M	-	+	SP	Low	-	-	+	+	-	-	-	+	R-CHOP	CR	87	CR/Alive
10	60	M	-	+	SP	Low int	-	-	+	-	-	-	-	+	NA	NA	NA	NA
11	83	F	-	+	SP	Low int	-	+	+	+	+	-	-	+	No therapy	NA	4	CR/Alive
12	68	F	-	-	SP,BM	High int	+	+	+	+	+	+	-	-	R-CHOP	PD	29	PD/Dead

## 2. HCV antibody positive/ negative primary splenic DLBCL の臨床病理学的な特徴の比較

HCV antibody positive primary splenic DLBCL と HCV antibody negative primary splenic DLBCL の臨床病理学的特徴の結果を表 4 に示す。

HCV antibody positive primary splenic DLBCL は HCV antibody negative primary splenic DLBCL に比べて B 症状が少ない(P=0.009)、PS 2-4 が少ない(P=0.02)、Splenic macronodular lesions が多い(P=0.01)、GCB type が多い(P=0.002) ことがわかった。

表 4 HCV antibody positive primary splenic DLBCL と HCV antibody negative primary splenic DLBCL の臨床病理学的検討

	HCV antibody positive primary splenic DLBCL	HCV antibody negative primary splenic DLBCL	P-value
<b>Clinical information</b>			
Age median[range](years)	68.5 [59-83]	66.5 [27-84]	
Age> 60 y	91.7% (11/12)	73.9% (34/46)	0.26*
Sex: Male/Female	7/5	27/19	1.00*
Hepatomegaly	0% (0/12)	15.2% (7/46)	0.33*
Splenomegaly	100% (12/12)	97.8% (45/46)	1.00*
Bone marrow infiltration	8.3% (1/12)	29.5% (13/44)	0.26*
Peripheral blood infiltration	0% (0/12)	4.3% (2/46)	1.00*
Extranodal infiltration>1	0% (0/12)	19.6% (9/46)	0.18*
<b>B symptoms</b>	8.3% (1/12)	51.1% (23/45)	0.009*
Performance status>1	8.3% (1/12)	48.9% (22/45)	0.02*
Ann Arbor Stage 3 or 4	8.3% (1/12)	32.6% (15/46)	0.15*
Elevated LDH level	66.7% (8/12)	94.4% (34/46)	0.72*
IPI, High int or High risk	16.7% (2/12)	40.9% (18/44)	0.18*
Splenic macronodular lesions	91.7% (11/12)	50.0% (23/46)	0.01*
<b>Immunohistochemistry</b>			
CD5 expression	8.3% (1/12)	35.6% (16/45)	0.09*
CD10 expression	50.0% (6/12)	17.8% (8/45)	0.05
CD20 expression	100% (12/12)	100% (45/45)	1.00*
BCL2 expression	50.0% (6/12)	55.6% (25/45)	0.76
BCL6 expression	75.0% (9/12)	48.9% (22/45)	0.19*
MUM1 expression	41.7% (5/12)	55.6% (25/45)	0.52
<b>Cell of origin</b>			
GCB type	83.3% (10/12)	28.8% (13/45)	0.002*
Non-GCB type	16.7% (2/12)	71.2% (32/45)	

\*Fisher's exact test.

HCV antibody positive/ negative primary splenic DLBCL において OS, PFS ともに有意差は認められなかった(図 3)。

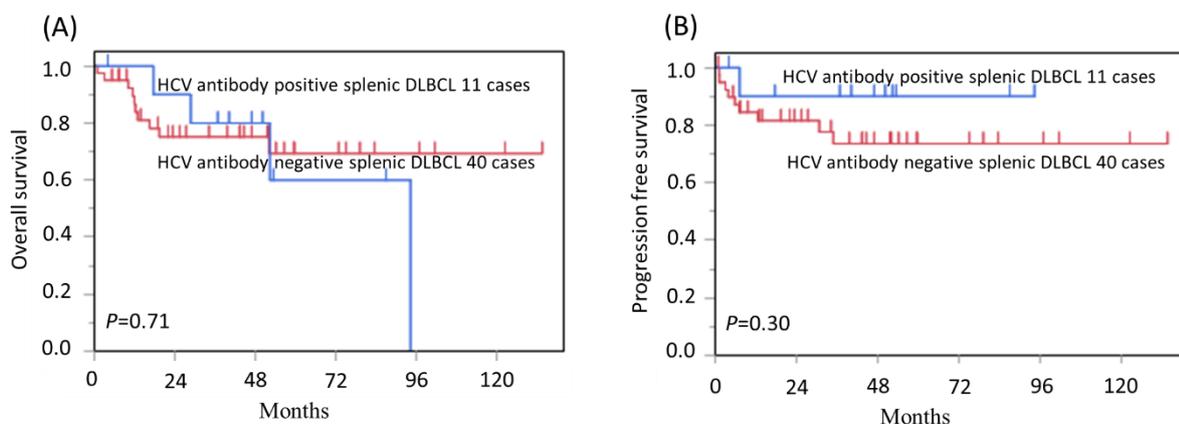


図 3 HCV antibody positive primary splenic DLBCL と HCV antibody negative primary splenic DLBCL の OS と PFS の結果

(A) HCV antibody positive splenic DLBCL と HCV antibody negative splenic DLBCL の比較では OS に差は認められなかった ( $P=0.71$ )。

(B) HCV antibody positive splenic DLBCL と HCV antibody negative splenic DLBCL の比較では PFS に差は認められなかった ( $P=0.30$ )。

### 3. HCV antibody positive/ negative DLBCL without primary splenic の臨床病理学的な特徴の比較

HCV antibody positive DLBCL without primary splenic と HCV antibody negative DLBCL without primary splenic 症例の臨床病理学的特徴を表 5 に示す。

HCV antibody positive DLBCL without primary splenic は HCV antibody negative DLBCL without primary splenic DLBCL に比べて CD10 陽性症例が少ない ( $P=0.01$ )、 Non-GCB type が多い ( $P=0.04$ ) ことがわかった。

表5 HCV antibody positive DLBCL without primary splenic と HCV antibody negative DLBCL without primary splenic の臨床病理学的検討

	HCV antibody positive DLBCL without primary splenic	HCV antibody negative DLBCL without primary splenic	P-value
<b>Clinical information</b>			
Age median[range](years)	73 [49-88]	70.5 [21-90]	
Age> 60 y	88.0% (22/25)	76.7% (92/120)	0.29
Sex: Male/Female	9/16	69/51	0.55
Bone marrow infiltration	8.3% (2/24)	9.3% (10/107)	1.00*
Peripheral blood infiltration	4.0% (1/25)	1.7% (2/120)	0.44*
Extranodal infiltration>1	20.0% (5/25)	22.5% (27/120)	0.78
B symptoms	24.0% (6/25)	19.2% (23/120)	0.59
Performance status>1	24.0% (6/25)	33.6% (39/116)	0.34
Ann Arbor Stage 3 or 4	64.0% (16/25)	52.6% (60/114)	0.30
Elevated LDH level	64.0% (16/25)	59.7% (71/119)	0.69
IPI, High int or High risk	56.0% (14/25)	54.5% (60/110)	0.90
<b>Infiltration site</b>			
Liver	8.0% (2/25)	2.5% (3/120)	0.21*
Spleen	20.0% (5/25)	10.0% (12/120)	0.18
Stomach	20.0% (5/25)	10.0% (12/120)	0.18
<b>Immunohistochemistry</b>			
CD5 expression	15.8% (3/19)	15.1% (18/119)	1.00*
CD10 expression	9.9% (2/22)	35.8% (43/120)	0.01*
CD20 expression	100% (25/25)	100% (120/120)	1.00*
BCL2 expression	45.5% (15/22)	66.7% (48/72)	0.89
BCL6 expression	59.1% (13/22)	79.2% (95/120)	0.04
MUM1 expression	59.1% (13/22)	65.0% (78/120)	0.60
<b>Cell of origin</b>			
GCB type	22.7% (5/22)	46.7% (56/120)	0.04
Non-GCB type	77.3% (17/22)	53.3% (64/120)	

\*Fisher's exact test.

HCV antibody positive, HCV antibody negative DLBCL without primary splenic の OS, PFS に有意差は認められなかった(図 4)。

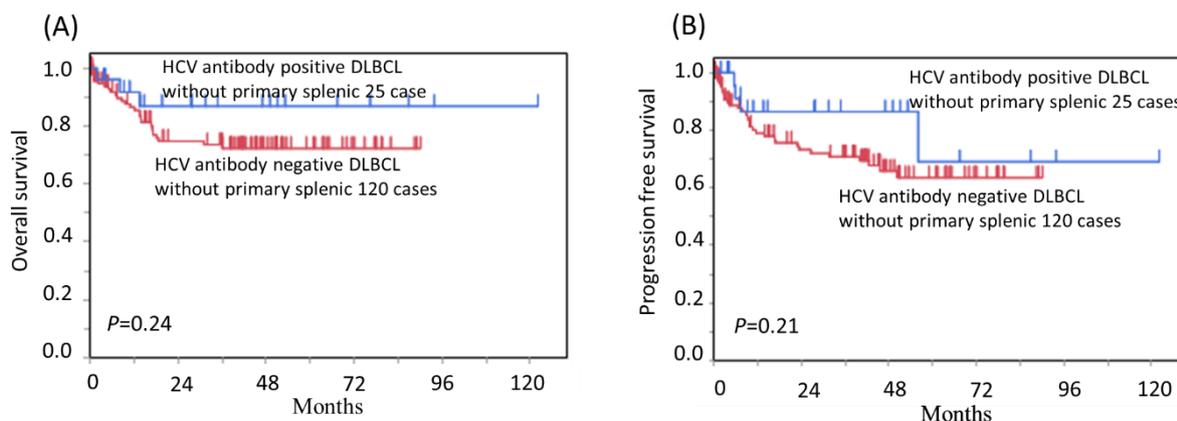


図 4 HCV antibody positive DLBCL without primary splenic と HCV antibody negative DLBCL without primary splenic の OS と PFS の結果

(A) HCV antibody positive DLBCL without primary splenic と HCV antibody negative DLBCL without primary splenic の比較では OS に差は認められなかった ( $P=0.24$ )。

(B) HCV antibody positive DLBCL without primary splenic と HCV antibody negative DLBCL without primary splenic の比較では PFS に差は認められなかった ( $P=0.21$ )。

#### 4. HCV antibody positive DLBCL のジェノタイプとウイルス量 (表 6)

Genotype1b は HCV antibody positive DLBCL 全体では 90.5% (19/21) であった。Primary splenic DLBCL においては 87.5% (7/8)、HCV positive DLBCL without primary splenic においては 92.3% (12/13) であった ( $P=1.00$ )。Genotype2a は HCV antibody positive DLBCL 全体では 9.5% (2/21) であり Primary splenic DLBCL においては 12.5% (1/8)、HCV antibody positive DLBCL without primary splenic においては 7.7% (1/13) であった ( $P=1.00$ )。高ウイルス量は HCV antibody positive DLBCL 全体では 83.3% (20/24) であり、Primary splenic DLBCL においては 66.7% (6/9)、HCV antibody positive DLBCL without primary splenic においては 93.3% (14/15) であった ( $P=0.13$ )。

表 6 HCV antibody positive DLBCL における肝炎の状態, HCV ウイルス量と NS3 免疫染色の結果

No.	Liver status	Cryoglobulinemia	HCV genotype and viral load		NS3 immunostaining
			Genotype	RNA virus (log IU/ml)	
Primary splenic DLBCL case 1	LC	-	1b	2.4	-
Primary splenic DLBCL case 2	CH	-	NA	3.1	+
Primary splenic DLBCL case 3	Normal	-	2a	6.7	NA
Primary splenic DLBCL case 4	LC/HCC	-	1b	3.7	-
Primary splenic DLBCL case 5	CH	-	1b	6.6	-
Primary splenic DLBCL case 6	CH	-	NA	NA	-
Primary splenic DLBCL case 7	CH	-	NA	NA	-
Primary splenic DLBCL case 8	CH	-	1b	6.9	+
Primary splenic DLBCL case 9	CH	-	1b	6.6	-
Primary splenic DLBCL case 10	CH	-	1b	6.5	+
Primary splenic DLBCL case 11	LC/HCC	-	1b	6.6	-
Primary splenic DLBCL case 12	LC	-	NA	NA	+
DLBCL without primary splenic case 1	CH	-	1b	5.8	-
DLBCL without primary splenic case 2	CH	-	1b	6.5	-
DLBCL without primary splenic case 3	CH	-	NA	NA	-
DLBCL without primary splenic case 4	CH	-	1b	6.4	+
DLBCL without primary splenic case 5	CH	-	1b	7.1	-
DLBCL without primary splenic case 6	CH	-	2a	5.3	-
DLBCL without primary splenic case 7	CH	-	1b	6.5	-
DLBCL without primary splenic case 8	CH	-	NA	ND	-
DLBCL without primary splenic case 9	LC/HCC	-	1b	7	-
DLBCL without primary splenic case 10	CH	-	1b	6.4	-
DLBCL without primary splenic case 11	Normal	-	NA	NA	-
DLBCL without primary splenic case 12	LC/HCC	-	1b	5.8	-
DLBCL without primary splenic case 13	CH	-	1b	6.9	-
DLBCL without primary splenic case 14	CH	-	NA	7.7	-
DLBCL without primary splenic case 15	CH	-	1b	6.4	-
DLBCL without primary splenic case 16	CH	-	NA	ND	+
DLBCL without primary splenic case 17	CH	-	2a	5.9	-
DLBCL without primary splenic case 18	LC	-	NA	NA	-
DLBCL without primary splenic case 19	CH/HCC	-	1b	ND(SVR)	+
DLBCL without primary splenic case 20	Normal	-	NA	ND	NA
DLBCL without primary splenic case 21	CH	-	1b	6.2	-
DLBCL without primary splenic case 22	LC	-	NA	NA	-
DLBCL without primary splenic case 23	LC	-	NA	NA	-
DLBCL without primary splenic case 24	NA	-	NA	NA	-
DLBCL without primary splenic case 25	CH/HCC	-	NA	5.7	-

## 5. 腫瘍組織における HCV の検出について(表 7)

(1)HCV antibody positive diffuse large B-cell lymphoma における NS3 の免疫染色の結果

NS3 陽性を認めた症例(図 5)は 20.6% (7/34)に認められ、Primary splenic DLBCL においては 4 例(40.0%:4/10)、 HCV antibody positive DLBCL without primary splenic においては 3 例(12.5%:3/24)であった(P=0.16)。

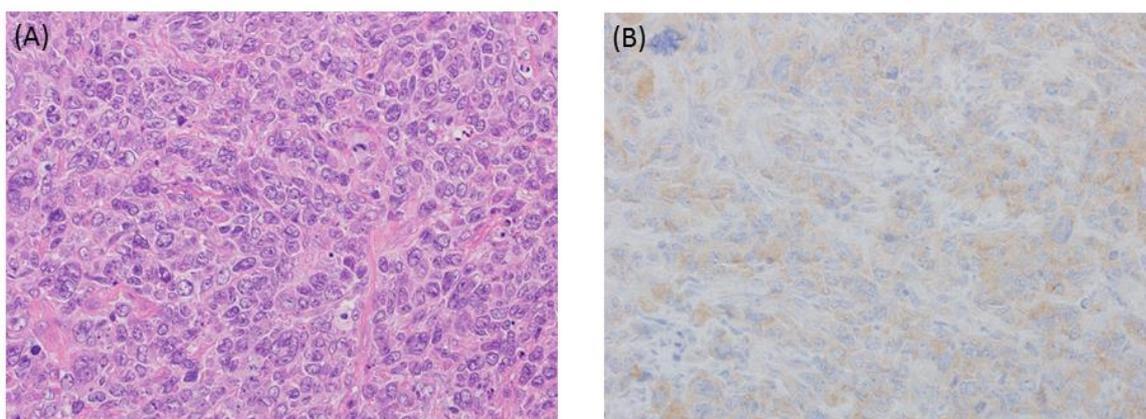


図 5 HCV antibody positive DLBCL 症例の組織像

(A)核小体明瞭な大型の異型細胞がびまん性に浸潤している所見を認めた(HE X200)。

(B)NS3 免疫染色：腫瘍細胞の細胞質に NS3 陽性を認めた(X200)。

(2) HCV-RNA in situ hybridization (ISH)の結果

DLBCL の腫瘍細胞に HCV-RNA in situ が陽性であった症例(図 6)は 16.7% (1/6)、陰性であった症例は 83.3% (5/6)であった。

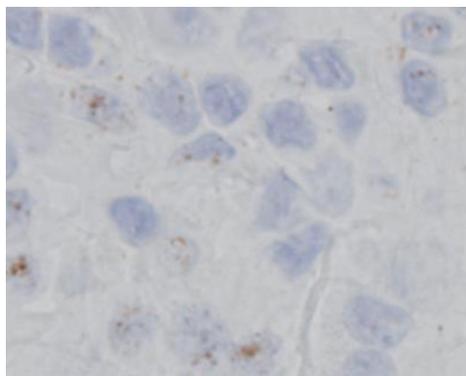


図 6 HCV antibody positive DLBCL における HCV-RNA in situ の結果  
HCV-RNA in situ を行ったところ DLBCL の腫瘍細胞内に HCV を認めた。

(3) HCV antibody positive DLBCL における組織中の HCV RT-PCR の結果 (図 7)

9 例の HCV antibody positive DLBCL (HCV antibody positive primary splenic DLBCL が 4 例, HCV antibody positive DLBCL without primary splenic が 4 例) に対して RT-PCR を行った。検討に用いた組織は脾臓が 5 例、リンパ節が 4 例であった。腫瘍組織に HCV-RNA を認めた症例は 22.9% (2/9)、認めなかった症例は 77.8% (7/9)であった。

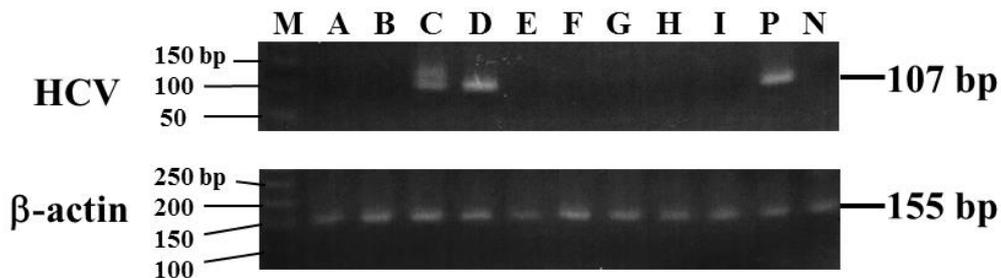


図 7 HCV RT-PCR の結果

HCV antibody positive DLBCL 9 例に対して HCV RT-PCR を行った結果、2 例 (No. C, D) に陽性を認めた。

No.	Case	Peripheral blood		Tissue		NS3 immunostaining	RNA in situ hybridization
		Genotype	HCV-RNA (logIU/ml)	Sample	Tissue RT-PCR		
A	Primary splenic DLBCL case 2	NA	3.1	Spleen	-	+	NA
B	Primary splenic DLBCL case 4	1b	3.7	Spleen	-	-	-
C	Primary splenic DLBCL case 8	1b	6.9	Spleen	+	+	+
D	Primary splenic DLBCL case 10	1b	6.5	Spleen	+	+	-
E	DLBCL without primary splenic case 4	1b	6.4	Spleen	-	+	-
F	DLBCL without primary splenic case 6	2a	5.3	Lymph node	-	-	NA
G	DLBCL without primary splenic case 10	1b	6.4	Lymph node	-	-	-
H	DLBCL without primary splenic case 14	NA	7.7	Lymph node	-	-	NA
I	DLBCL without primary splenic case 15	1b	6.4	Lymph node	-	-	-
P	Positive control	1b	6.4	Liver	+	+	+
N	Negative control	-	-	Spleen	-	-	ND

表 7 HCV antibody positive DLBCL における genotype、 ウイルス量、 RT-PCR、 NS3 免疫染色、 HCV-RNA in situ の結果

## 考察

12例の HCV antibody positive primary splenic DLBCL は比較的無症候性に発見され、PS が良好な症例が多く、肉眼的には Splenic macronodular lesions を認めることが多く、cell of origin は GCB type が多いことを明らかにした。これに対し、HCV antibody positive DLBCL without primary splenic 症例においては non GCB type が多く、両者の分子病態は全く異なる可能性を示すことができた。NS3 の免疫染色、HCV-RNA ISH、HCV RT-PCR の解析から、いくつかの症例においては、リンパ腫細胞内に HCV が存在することが確認できた。

B 細胞に HCV 全長を発現するトランスジェニックマウスを用いた検討では生後 600 日以内に 25% に DLBCL が発生したと報告している<sup>78</sup>。これらの検体を用いた microarray 遺伝子発現解析では *c-FOS*、*A20*、*C3*、*LTβR* などの alternative and canonical NFκB pathway に関与する遺伝子の発現異常を認めたとしている<sup>79</sup>。NFκB の亢進は non-GCB type の分子生物学的な特徴であり、本研究で見出した HCV antibody positive DLBCL without primary splenic に non-GCB type が多くみられるという所見に矛盾しない。しかし、一方で、HCV antibody positive primary splenic DLBCL においては、同じく HCV 感染を有するにもかかわらず、cell of origin は GCB type が有意であるという事実から考えるに、HCV 感染は顕在化した腫瘍形質の維持に関わっているよりは、むしろ B-cell lymphoma の initiation に関わっているのかもしれない。腫瘍形成過程の進展に伴い、付加的な遺伝子<sup>80,81</sup> 及びエピゲノム異常<sup>82,83</sup> が積み重なる上で、GCB type 腫瘍と non-GCB type の腫瘍が分かれていくと考えれば、本研究で見出した知見に矛盾しない。

HCV が B-cell lymphoma の initiation に関わっているという仮説は、本研究での NS3 の免疫染色、HCV-RNA ISH、HCV RT-PCR の検出結果とも矛盾しない。一部の症例においては腫瘍細胞内に HCV の存在を確認できたが、一方で多くの症例ではそれらを確認できなかった。興味深いことに、HCV は一過性の感染であっても B 細胞に遺伝子変異を引きおこし、リンパ腫形成の一因になる可能性が指摘されている<sup>84</sup>。具体的には in vitro の実験系において HCV の感染が AID や DNA の 2 本鎖切断を誘導することによって *TP53*、*BCL6*、*CTNNB1*、*IGH* などのさまざまな遺伝子の変異を上昇させるとしている<sup>84</sup>。実際に、HCV 関連の肝細胞癌においても腫瘍組織は非腫瘍組織に比べてウイルス複製やウイルス量が著明に減少しており<sup>85</sup>、HCV 感染は腫瘍化の初

期段階において重要ではあるが、腫瘍維持へは必ずしも貢献しているとは限らない。本研究において腫瘍細胞内に HCV の存在を確認できなかった症例においても、その一部には細胞内 HCV が lymphoma initiation に働いたものの、その後に腫瘍形質が進展する中で、なんらかの理由で細胞内から失われた可能性がある。別の可能性として、HCV による B 細胞への直接感染ではなく、慢性的な抗原刺激がリンパ腫の形成に関与する場合<sup>86-88</sup>も否定はできず、今後、両方の可能性を視野に入れた検討が必要である。

Primary splenic DLBCL においては control DLBCL に比して HCV の感染率が高い<sup>89</sup>(第 2 章)という事実を踏まえると、その理由についていくつかの可能性が考えられる。1) HCV は spleen resident B-cell に感染する可能性が高く、そこで lymphoma initiation に働く。2) HCV はどの B-cell にも同じように感染できるが、spleen resident B-cell に感染した場合に lymphoma 形成へ initiation できる確率が高い。3) HCV に感染した B 細胞は spleen へ局在する確率の高い細胞形質をとる。これらは独立した可能性ではなく、それぞれが相補的に関与している可能性もある。

いずれの可能性にしても脾臓という局在性が HCV の lymphoma initiation に深く関わっていると考えられる。実際、申請者は primary splenic B-cell lymphoma の中で第 3 番目に高頻度に認めた病理組織型である primary splenic FL(第 1 章)においても、HCV 感染率が 23.5%(4/17)と高いことを見出した<sup>90</sup>。さらに、興味深いことには、HCV antibody positive primary splenic FL の 70.6% (12/17)に Splenic macronodular lesions を認めた。これは primary splenic DLBCL と共通した腫瘍形態である(第 2 章)。本研究によって明らかにされたこれらの事実は、HCV が感染した B 細胞の脾臓局在と関連しながら lymphoma initiation に働き、HCV に感染した B 細胞の lymphoma development に一定の貢献をしていることを強く示唆していると考えた。

## 総括および結論

### ① 新知見を箇条書きにする

(1) 160例の脾臓B細胞性リンパ腫の組織型と頻度はDLBCL 41.2% (66/160)、SMZL 30.0% (48/160)、FL 10.6% (17/160)、MCL 6.3% (10/160)、LPL 3.1% (5/160)、HCL 3.1% (5/160)、SDRPL 3.1% (5/160)、CLL/SLL 1.3% (2/160)、unclassifiable 1.3% (2/160)であった。

(2) Primary splenic DLBCLはcontrol DLBCLに比べてHCV感染が多かった。

(3) Primary splenic DLBCLはcontrol DLBCLに比べてPFSが良好であった。

(4) HCV antibody positive primary splenic DLBCLはHCV antibody negative primary splenic DLBCLに比べてGCB typeが多い。一方でHCV antibody positive DLBCL without primary splenicはnon-GCB typeが多かった。

(5) HCV antibody positive DLBCLにおいてHCVのRT-PCR、HCV RNA-ISH、NS3の免疫染色を行い一部の症例の腫瘍細胞内にHCVの存在を証明した。

### ② 新知見の意義

(1) 多数例 (160例) の脾臓B細胞性リンパ腫の組織型と頻度を世界で初めて報告した。

(2) HCV感染はB細胞リンパ腫細胞の脾臓局在と何らかの関係性がある可能性を指摘した。

(3) Primary splenic DLBCL症例はその他のDLBCLに比べて再発しにくいという臨床的な特徴を提示することができた。

(4) HCV感染B細胞は両 cell of origin (GCB及びnon-GCB type)を示すDLBCLへ進展できることから、HCV感染はリンパ腫のinitiationに関与している可能性を指摘できた。

(5) HCV antibody positive DLBCLの一部の症例においては腫瘍細胞にHCVの感染を認めた。腫瘍細胞にHCVを認めることはHCVがリンパ腫形成に何らかの役割を果たしている可能性が考えられた。一方、HCVを認めない症例も多数存在することから、HCVがlymphoma initiationに働いたものの、腫瘍形質が進展する過程で細胞内から失われる可能性を見出した。

③ 本研究で得られた新知見から今後どのような研究が展開されていくか  
HCV感染(メモリー)B細胞の生体内局在を検討し、脾臓への集積が起こりやすくなるのか、さらに、リンパ腫の発症率を上げるのかという機能的実験へ発展させていく。また、このモデルはprimary splenic DLBCLの分子病態を

さらに詳細に解析するツールになり得る可能性を秘めている。

#### ④ 今後の課題

HCVはRNAウイルスであり肝細胞やB細胞などのリンパ球に感染することが分かっている<sup>56</sup>ものの、EBV・HTLV-1のようにウイルスが直接ゲノムに取り込まれるわけではなく、腫瘍化の機序が異なる可能性がある。今回、免疫染色で検討したNS3は非構造たんぱくの一つでありHCVにとって重要な役割を果たすと考えられている<sup>91,92</sup>。NS3の働きとして細胞内のインターフェロンシグナル伝達を阻害することで宿主の自然免疫を阻害する作用を有している<sup>93-98</sup>。またNS3は宿主p53たんぱくと結合しp53依存性アポトーシスやp21転写活性を抑制することが知られており<sup>99-101</sup>in vitroにおいて培養細胞にcell transformationを引き起こすことが知られている<sup>101</sup>。また悪性リンパ腫においてはNS3がB cell signaling pathwayの活性化を引き起こすことが報告されている<sup>102</sup>。HCVにおけるリンパ腫発症のinitiationも、NS3のoncogenicな機能が関与しているのかもしれない。近年、HCVに対する治療法が大きく変化している<sup>103</sup>。従来までのインターフェロンを中心とした抗ウイルス療法ではSVR率が40-50%程度であったのに対して近年登場したDirect Acting Antivirals (DAA)をベースにしたインターフェロンフリーの治療法によりSVR率が90%程度まで上昇することがわかっている<sup>103</sup>。このDAAの標的の一つにNS3/4プロテアーゼ阻害剤が含まれている。具体的にはTelaprevir<sup>104-106</sup>、Simeprevir<sup>107,108</sup>、Asunaprevir<sup>109,110</sup>などである。HCV antibody positive B細胞性リンパ腫において抗ウイルス療法のみでリンパ腫が縮小、消失するという報告が多く存在する<sup>111-116</sup>。具体的にはSMZLに対してインターフェロンを中心とした治療を行うことでリンパ腫が縮小するという報告があり、SMZLにおいてはHCVがlymphomagenesisに大きく関与している可能性が報告されている<sup>111</sup>。しかし以後の報告ではSMZL以外のlow grade B-cell lymphomaにおいてもHCV eradication therapyは一定の割合で効果がある症例が存在することが報告されている<sup>112-114</sup>。以前の報告ではIFNを中心としたHCV eradication therapyの報告がほとんどであったが、近年ではDAAでも同様にリンパ腫が縮小するという報告が多い<sup>115,116</sup>。しかし現在までにHCV antibody positive B-cell lymphomaに対してHCV eradication therapyが有効な症例を選別する分子マーカーなどの検討はなされていない。この観点から、我々が今回明らかにしたNS3陽性リンパ腫症例において、NS3/4プロテアーゼ阻害剤を含んだDAAが効果を認めるかどうかは興味深い。リンパ腫細胞内NS3発現が治療選択に影響を与える因子になりうるのかどうか、今後、臨床的な検討が望まれる。また今

回は NS3 のみ検討であったが DAA の中に NS5A の阻害剤も存在することから、リンパ腫細胞内 NS5A 免疫染色に関しても、今後の検討に値すると考えている。

本研究結果は、HCV 感染 B 細胞と脾臓局在との関連性を示唆するものであった。その結果、脾臓という臓器局在性の元、HCV 感染が lymphoma initiation に深くかかわっている可能性が示唆された。現在までに臓器特異的な相関に関して有名な因子としてケモカインがあげられる。例えば ATLL、CTCL においては CCR4 ケモカインレセプターの発現は皮膚などの臓器特異的なホーミングに関与し、腫瘍形質に寄与していると考えられている<sup>117,118</sup>。今後、HCV antibody positive splenic DLBCL におけるケモカインレセプター発現の検討、さらに、B 細胞への HCV 感染が ectopic なケモカインレセプター発現をもたらすのか否か、分子生物学的なアプローチを含めた包括的な解析から、一層の primary splenic DLBCL の分子病態理解の発展が期待される。

## 謝辞

本研究を遂行するにあたり、親切丁寧な御指導、御鞭撻を賜りました北海道大学大学院医学研究院内科系部門内科学分野血液内科学教室主任教授 豊嶋崇徳先生に謹んで感謝の意を表します。

また、本研究を行うにあたり、環境を与えて頂き親身な御指導、貴重なご助言を賜りました久留米大学医学部病理学講座主任教授 大島孝一先生、客員教授 瀬戸加大先生、講師 三好寛明先生に心から感謝申し上げます。

また、本研究を行うにあたり臨床検体並びに臨床情報のご提供を頂きました、久留米大学医学部内科学講座血液・腫瘍内科部門教授 長藤宏司先生、九州大学医学部第一内科教授 赤司浩一先生、講師 加藤光次先生、助教 宮脇恒太先生、杉尾健志先生、釧路労災病院血液内科部長 宮城島拓人先生、浜の町病院血液内科部長 衛藤徹也先生、原三信病院血液内科部長 上村智彦先生、飯塚病院血液内科 喜安純一先生をはじめとした多くの施設の先生方にご協力いただき皆様に深く感謝申し上げます。

## 引用文献

1. 独立行政法人国立がん研究センターがん対策情報センター がん情報サービス ganjoho.jp <http://ganjoho.jp/public/statistics/index.html>
2. 日本血液学会 造血腫瘍診療ガイドライン [http://www.jshem.or.jp/gui-hemali/2\\_soron.html](http://www.jshem.or.jp/gui-hemali/2_soron.html)
3. Swerdlow, SH., Campo, E., Harris, NL., Jaffe, ES, Pileri, SA, Srein, H., Thiele, J & Vardiman, JW. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, 4<sup>th</sup> edn. IARC, Lyon, France (2008).
4. Takahashi, H., Tomita, N., Yokoyama, M., Tsunoda, S., Yano, T., Murayama, K., Hashimoto, C., Tamura, K., Sato, K. & Ishigatsubo, Y. Prognostic impact of extranodal involvement in diffuse large B-cell lymphoma in the rituximab era. *Cancer*, 118, 4166-4172 (2012).
5. Castillo, J.J., Winer, E.S. & Olszewski, A.J. Sites of extranodal involvement are prognostic in patients with diffuse large B-cell lymphoma in the rituximab era: an analysis of the Surveillance, Epidemiology and End Results database. *Am J Hematol*, 89, 310-314 (2014).
6. Zhang, N., Cao, C., Zhu, Y., Liu, P., Liu, L., Lu, K., Luo, J. & Zhou, N. Primary breast diffuse large B-cell lymphoma in the era of rituximab. *Oncotargets Ther*, 9, 6093-6097 (2016).
7. Hosein, P.J., Maragulia, J.C., Salzberg, M.P., Press, O.W., Habermann, T.M., Vose, J.M., Bast, M., Advani, R.H., Tibshirani, R., Evens, A.M., Islam, N., Leonard, J.P., Martin, P., Zelenetz, A.D. & Lossos, I.S. A multicentre study of primary breast diffuse large B-cell lymphoma in the rituximab era. *Br J Haematol*, 165, 358-363 (2014).
8. Guirguis, H.R., Cheung, M.C., Mahrous, M., Piliotis, E., Berinstein, N., Imrie, K.R., Zhang, L. & Buckstein, R. Impact of central nervous system (CNS) prophylaxis on the incidence and risk factors for CNS relapse in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated in the rituximab era: a single centre experience and review of the literature. *Br J Haematol*, 159, 39-49 (2012).
9. Tai, W.M., Chung, J., Tang, P.L., Koo, Y.X., Hou, X., Tay, K.W., Quek, R., Tao, M. & Lim, S.T. Central nervous system (CNS) relapse in diffuse large B cell lymphoma (DLBCL): pre- and post-rituximab. *Ann Hematol*, 90, 809-818 (2011).
10. Yhim, H.Y., Kim, J.S., Kang, H.J., Kim, S.J., Kim, W.S., Choi, C.W., Eom,

- H.S., Kim, J.A., Lee, J.H., Won, J.H., Shim, H., Huh, J., Lee, D.H., Suh, C. & Kwak, J.Y. Matched-pair analysis comparing the outcomes of primary breast and nodal diffuse large B-cell lymphoma in patients treated with rituximab plus chemotherapy. *Int J Cancer*, 131, 235-243 (2012).
11. Kridel, R., Telio, D., Villa, D., Sehn, L.H., Gerrie, A.S., Shenkier, T., Klasa, R., Slack, G.W., Tan, K., Gascoyne, R.D., Connors, J.M. & Savage, K.J. Diffuse large B-cell lymphoma with testicular involvement: outcome and risk of CNS relapse in the rituximab era. *Br J Haematol*, 176, 210-221 (2017).
  12. Oishi, N., Kondo, T., Nakazawa, T., Mochizuki, K., Tanioka, F., Oyama, T., Yamamoto, T., Iizuka, J., Tanabe, K., Shibata, N., Kirito, K. & Katoh, R. High prevalence of the MYD88 mutation in testicular lymphoma: Immunohistochemical and genetic analyses. *Pathol Int*, 65, 528-535 (2015).
  13. Taniguchi, K., Takata, K., Chuang, S.S., Miyata-Takata, T., Sato, Y., Satou, A., Hashimoto, Y., Tamura, M., Nagakita, K., Ohnishi, N., Noujima-Harada, M., Tabata, T., Kikuti, Y.Y., Maeda, Y., Nakamura, N., Tanimoto, M. & Yoshino, T. Frequent MYD88 L265P and CD79B Mutations in Primary Breast Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Am J Surg Pathol*, 40, 324-334 (2016).
  14. Kraan, W., Horlings, H.M., van Keimpema, M., Schilder-Tol, E.J., Oud, M.E., Scheepstra, C., Kluin, P.M., Kersten, M.J., Spaargaren, M. & Pals, S.T. High prevalence of oncogenic MYD88 and CD79B mutations in diffuse large B-cell lymphomas presenting at immune-privileged sites. *Blood Cancer J*, 3, e139 (2013).
  15. Wang, C., Wang, H., Wang, Q. & Shi, B. Primary testicular lymphoma: experience with 13 cases and literature review. *Int J Hematol*, 97, 240-245 (2013).
  16. Zucca, E., Conconi, A., Mughal, T.I., Sarris, A.H., Seymour, J.F., Vitolo, U., Klasa, R., Ozsahin, M., Mead, G.M., Gianni, M.A., Cortelazzo, S., Ferreri, A.J., Ambrosetti, A., Martelli, M., Thiéblemont, C., Moreno, H.G., Pinotti, G., Martinelli, G., Mozzana, R., Grisanti, S., Provencio, M., Balzarotti, M., Laveder, F., Oltean, G., Callea, V., Roy, P., Cavalli, F., Gospodarowicz, M.K. & Group, I.E.L.S. Patterns of outcome and prognostic factors in primary large-cell lymphoma of the testis in a survey by the International Extranodal Lymphoma Study Group. *J Clin Oncol*, 21, 20-27 (2003).

17. van Krieken, J.H. & te Velde, J. Normal histology of the human spleen. *Am J Surg Pathol*, 12, 777-785 (1988).
18. Kraus, M.D. Splenic histology and histopathology: an update. *Semin Diagn Pathol*, 20, 84-93 (2003).
19. Ahmann, D.L., Kiely, J.M., Harrison, E.G. & Payne, W.S. Malignant lymphoma of the spleen. A review of 49 cases in which the diagnosis was made at splenectomy. *Cancer*, 19, 461-469 (1966).
20. Grosskreutz, C., Troy, K. & Cuttner, J. Primary splenic lymphoma: report of 10 cases using the REAL classification. *Cancer Invest*, 20, 749-753 (2002).
21. Aoki, R., Karube, K., Sugita, Y., Nomura, Y., Shimizu, K., Kimura, Y., Hashikawa, K., Suefuji, N., Kikuchi, M. & Ohshima, K. Distribution of malignant lymphoma in Japan: analysis of 2260 cases, 2001-2006. *Pathol Int*, 58, 174-182 (2008).
22. The world health organization classification of malignant lymphomas in japan: incidence of recently recognized entities. Lymphoma Study Group of Japanese Pathologists. *Pathol Int*, 50, 696-702 (2000).
23. Freedman, A. Follicular lymphoma: 2015 update on diagnosis and management. *Am J Hematol*, 90, 1171-1178 (2015).
24. Vose, J.M. Mantle cell lymphoma: 2017 update on diagnosis, risk-stratification, and clinical management. *Am J Hematol*, 92, 806-813 (2017).
25. Chaganti, S., Illidge, T., Barrington, S., McKay, P., Linton, K., Cwynarski, K., McMillan, A., Davies, A., Stern, S., Peggs, K. & Haematology, B.C.f.S.i. Guidelines for the management of diffuse large B-cell lymphoma. *Br J Haematol*, 174, 43-56 (2016).
26. Chiappella, A., Castellino, A., Nicolosi, M., Santambrogio, E. & Vitolo, U. Diffuse Large B-cell Lymphoma in the elderly: standard treatment and new perspectives. *Expert Rev Hematol*, 10, 289-297 (2017).
27. Wotherspoon, A.C. Extranodal and splenic small B-cell lymphoma. *Mod Pathol*, 26 Suppl 1, S29-41(2013).
28. Zucca, E. & Bertoni, F. The spectrum of MALT lymphoma at different sites: biological and therapeutic relevance. *Blood*, 127, 2082-2092 (2016).
29. Vannata, B. & Zucca, E. Primary extranodal B-cell lymphoma: current concepts and treatment strategies. *Chin Clin Oncol*, 4, 10 (2015).
30. Iannitto, E. & Tripodo, C. How I diagnose and treat splenic lymphomas.

- Blood*, 117, 2585-2595 (2011).
31. Dogan, A. & Isaacson, P.G. Splenic marginal zone lymphoma. *Semin Diagn Pathol*, 20, 121-127 (2003).
  32. Piris, M.A., Onaindía, A. & Mollejo, M. Splenic marginal zone lymphoma. *Best Pract Res Clin Haematol*, 30, 56-64 (2017).
  33. Mollejo, M., Rodríguez-Pinilla, M.S., Montes-Moreno, S., Algara, P., Dogan, A., Cigudosa, J.C., Juarez, R., Flores, T., Forteza, J., Arribas, A. & Piris, M.A. Splenic follicular lymphoma: clinicopathologic characteristics of a series of 32 cases. *Am J Surg Pathol*, 33, 730-738 (2009).
  34. Howard, M.T., Dufresne, S., Swerdlow, S.H. & Cook, J.R. Follicular lymphoma of the spleen: multiparameter analysis of 16 cases. *Am J Clin Pathol*, 131, 656-662 (2009).
  35. Ya-In, C., Brandwein, J., Pantalony, D. & Chang, H. Hairy cell leukemia variant with features of intrasinusoidal bone marrow involvement. *Arch Pathol Lab Med*, 129, 395-398 (2005).
  36. Cortazar, J.M., DeAngelo, D.J., Pinkus, G.S. & Morgan, E.A. Morphological and immunophenotypical features of hairy cell leukaemia involving lymph nodes and extranodal tissues. *Histopathology*, 71, 112-124 (2017).
  37. Traverse-Glehen, A., Baseggio, L., Salles, G., Coiffier, B., Felman, P. & Berger, F. Splenic diffuse red pulp small-B cell lymphoma: toward the emergence of a new lymphoma entity. *Discov Med*, 13, 253-265 (2012).
  38. Julhakyan, H.L., Al-Radi, L.S., Moiseeva, T.N., Danishyan, K.I., Kovrigina, A.M., Glebova, S.M., Lugovskaya, S.A., Dvirnik, V.N., Khvastunova, A.N., Yakutik, I.A. & Savchenko, V.G. A Single-center Experience in Splenic Diffuse Red Pulp Lymphoma Diagnosis. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*, 16 Suppl, S166-169 (2016).
  39. Shimizu-Kohno, K., Kimura, Y., Kiyasu, J., Miyoshi, H., Yoshida, M., Ichikawa, R., Niino, D. & Ohshima, K. Malignant lymphoma of the spleen in Japan: a clinicopathological analysis of 115 cases. *Pathol Int*, 62, 577-582 (2012).
  40. Skarin, A.T., Davey, F.R. & Moloney, W.C. Lymphosarcoma of the spleen. Results of diagnostic splenectomy in 11 patients. *Arch Intern Med*, 127, 259-265 (1971).
  41. Coiffier, B. Diffuse large cell lymphoma. *Curr Opin Oncol*, 13, 325-334 (2001).

42. Rossi, D. & Gaidano, G. Molecular heterogeneity of diffuse large B-cell lymphoma: implications for disease management and prognosis. *Hematology*, 7, 239-252 (2002).
43. Sjö, L.D., Poulsen, C.B., Hansen, M., Møller, M.B. & Ralfkiaer, E. Profiling of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry: identification of prognostic subgroups. *Eur J Haematol*, 79, 501-507 (2007).
44. Hans, C.P., Weisenburger, D.D., Greiner, T.C., Gascoyne, R.D., Delabie, J., Ott, G., Müller-Hermelink, H.K., Campo, E., Braziel, R.M., Jaffe, E.S., Pan, Z., Farinha, P., Smith, L.M., Falini, B., Banham, A.H., Rosenwald, A., Staudt, L.M., Connors, J.M., Armitage, J.O. & Chan, W.C. Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood*, 103, 275-282 (2004).
45. Muris, J.J., Meijer, C.J., Vos, W., van Krieken, J.H., Jiwa, N.M., Ossenkoppele, G.J. & Oudejans, J.J. Immunohistochemical profiling based on Bcl-2, CD10 and MUM1 expression improves risk stratification in patients with primary nodal diffuse large B cell lymphoma. *J Pathol*, 208, 714-723 (2006).
46. Colomo, L., López-Guillermo, A., Perales, M., Rives, S., Martínez, A., Bosch, F., Colomer, D., Falini, B., Montserrat, E. & Campo, E. Clinical impact of the differentiation profile assessed by immunophenotyping in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*, 101, 78-84 (2003).
47. Kashimura, M., Murayama, K. & Kojima, M. Primary hepatic and hepatosplenic diffuse large B-cell lymphomas with intrasinusoidal and interstitial lymphomatous infiltration. *Int J Surg Pathol*, 21, 531-534 (2013).
48. Mollejo, M., Algara, P., Mateo, M.S., Menárguez, J., Pascual, E., Fresno, M.F., Camacho, F.I. & Piris, M.A. Large B-cell lymphoma presenting in the spleen: identification of different clinicopathologic conditions. *Am J Surg Pathol*, 27, 895-902 (2003).
49. Bairey, O., Shvidel, L., Perry, C., Dann, E.J., Ruchlemer, R., Tadmor, T. & Goldschmidt, N. Characteristics of primary splenic diffuse large B-cell lymphoma and role of splenectomy in improving survival. *Cancer*, 121, 2909-2916 (2015).
50. Kiyasu, J., Miyoshi, H., Hirata, A., Arakawa, F., Ichikawa, A., Niino, D., Sugita, Y., Yufu, Y., Choi, I., Abe, Y., Uike, N., Nagafuji, K., Okamura, T., Akashi, K., Takayanagi, R., Shiratsuchi, M. & Ohshima, K. Expression

- of programmed cell death ligand 1 is associated with poor overall survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*, 126, 2193-2201 (2015).
51. Cao, Z.X., Chen, X.P. & Wu, Z.D. Changes of immune function in patients with liver cirrhosis after splenectomy combined with resection of hepatocellular carcinoma. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 2, 562-565 (2003).
  52. Sekiguchi, T., Nagamine, T., Takagi, H. & Mori, M. Reduction of virus burden-induced splenectomy in patients with liver cirrhosis related to hepatitis C virus infection. *World J Gastroenterol*, 12, 2089-2094 (2006).
  53. Nomura, Y., Kage, M., Ogata, T., Kondou, R., Kinoshita, H., Ohshima, K. & Yano, H. Influence of splenectomy in patients with liver cirrhosis and hypersplenism. *Hepatol Res*, 44, E100-109 (2014).
  54. Li, W., Shen, S.Q., Wu, S.M., Chen, Z.B., Hu, C. & Yan, R.C. Simultaneous hepatectomy and splenectomy versus hepatectomy alone for hepatocellular carcinoma complicated by hypersplenism: a meta-analysis. *Oncotargets Ther*, 8, 2129-2137 (2015).
  55. Zhang, X.Y., Li, C., Wen, T.F., Yan, L.N., Li, B., Yang, J.Y., Wang, W.T. & Jiang, L. Synchronous splenectomy and hepatectomy for patients with hepatocellular carcinoma and hypersplenism: A case-control study. *World J Gastroenterol*, 21, 2358-2366 (2015).
  56. Douam, F., Bobay, L.M., Maurin, G., Fresquet, J., Calland, N., Maise, C., Durand, T., Cosset, F.L., Féray, C. & Lavillette, D. Specialization of Hepatitis C Virus Envelope Glycoproteins for B Lymphocytes in Chronically Infected Patients. *J Virol*, 90, 992-1008 (2015).
  57. Vermehren, J. & Sarrazin, C. New HCV therapies on the horizon. *Clin Microbiol Infect*, 17, 122-134 (2011).
  58. Collaborators, P.O.H. Global prevalence and genotype distribution of hepatitis C virus infection in 2015: a modelling study. *Lancet Gastroenterol Hepatol*, 2, 161-176 (2017).
  59. Petruzzello, A., Marigliano, S., Loquercio, G., Cozzolino, A. & Cacciapuoti, C. Global epidemiology of hepatitis C virus infection: An update of the distribution and circulation of hepatitis C virus genotypes. *World J Gastroenterol*, 22, 7824-7840 (2016).
  60. Cacoub, P., Desbois, A.C., Isnard-Bagnis, C., Rocatello, D. & Ferri, C.

- Hepatitis C virus infection and chronic kidney disease: Time for reappraisal. *J Hepatol*, 65, S82-94 (2016).
61. Esmat, S., Elgendy, D., Ali, M., El-Nabarawy, E.A., Mahmoud, S.B. & Shaker, O. Prevalence of photosensitivity in chronic hepatitis C virus patients and its relation to serum and urinary porphyrins. *Liver Int*, 34, 1033-1039 (2014).
  62. Singal, A.K., Venkata, K.V.R., Jampana, S., Islam, F.U. & Anderson, K.E. Hepatitis C Treatment in Patients With Porphyria Cutanea Tarda. *Am J Med Sci*, 353, 523-528 (2017).
  63. Pinelli, S., Basile, S., Benedetti Panici, P., D'Erme, A.M., Romanelli, M., Plotti, F. & Salerno, M.G. Association between HCV infection and cutaneous-mucosal lichen planus: an update. *Eur J Dermatol*, 27, 329-331 (2017).
  64. Younossi, Z., Park, H., Henry, L., Adeyemi, A. & Stepanova, M. Extrahepatic Manifestations of Hepatitis C: A Meta-analysis of Prevalence, Quality of Life, and Economic Burden. *Gastroenterology*, 150, 1599-1608 (2016).
  65. Lin, M.S., Chen, T.H., Lin, W.Y., Liu, C.H., Hsieh, Y.Y., Chiu, W.N., Chang, C.H., Chen, M.Y., Chung, C.M. & Lin, Y.S. Add-on neurological benefits of antiviral therapy in HCV patients with chronic kidney disease - a nationwide cohort study. *BMC Gastroenterol*, 17, 99 (2017).
  66. Ladino, M., Pedraza, F. & Roth, D. Opportunities for treatment of the hepatitis C virus-infected patient with chronic kidney disease. *World J Hepatol*, 9, 833-839 (2017).
  67. Polo, M.L. & Laufer, N. Extrahepatic manifestations of HCV: the role of direct acting antivirals. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 15, 737-746 (2017).
  68. Emery, J.S., Kuczynski, M., La, D., Almarzooqi, S., Kowgier, M., Shah, H., Wong, D., Janssen, H.L.A. & Feld, J.J. Efficacy and Safety of Direct Acting Antivirals for the Treatment of Mixed Cryoglobulinemia. *Am J Gastroenterol*, 112, 1298-1308 (2017).
  69. Takeshita, M., Sakai, H., Okamura, S., Higaki, K., Oshiro, Y., Uike, N., Yamamoto, I., Shimamatsu, K. & Muranaka, T. Prevalence of hepatitis C virus infection in cases of B-cell lymphoma in Japan. *Histopathology*, 48, 189-198 (2006).
  70. De Renzo, A., Perna, F., Persico, M., Notaro, R., Mainolfi, C., de Sio, I., Ciancia, G., Picardi, M., Del Vecchio, L., Pane, F. & Rotoli, B.

- Excellent prognosis and prevalence of HCV infection of primary hepatic and splenic non-Hodgkin's lymphoma. *Eur J Haematol*, 81, 51-57 (2008).
71. Cocco, P., Piras, G., Monne, M., Uras, A., Gabbas, A., Ennas, M.G., Palmas, A., Murineddu, M., Collu, S., Melis, M., Rais, M., Todde, P., Cabras, M.G., Angelucci, E., Massarelli, G. & Nieters, A. Risk of malignant lymphoma following viral hepatitis infection. *Int J Hematol*, 87, 474-483 (2008).
  72. Ennishi, D., Maeda, Y., Niitsu, N., Kojima, M., Izutsu, K., Takizawa, J., Kusumoto, S., Okamoto, M., Yokoyama, M., Takamatsu, Y., Sunami, K., Miyata, A., Murayama, K., Sakai, A., Matsumoto, M., Shinagawa, K., Takaki, A., Matsuo, K., Kinoshita, T. & Tanimoto, M. Hepatic toxicity and prognosis in hepatitis C virus-infected patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab-containing chemotherapy regimens: a Japanese multicenter analysis. *Blood*, 116, 5119-5125 (2010).
  73. Dlouhy, I., Torrente, M., Lens, S., Rovira, J., Magnano, L., Giné, E., Delgado, J., Balagué, O., Martínez, A., Campo, E., Forns, X., Sánchez-Tapias, J.M. & López-Guillermo, A. Clinico-biological characteristics and outcome of hepatitis C virus-positive patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with immunochemotherapy. *Ann Hematol*, 96, 405-410 (2017).
  74. Park, B.B., Kim, J.S., Lee, Y.Y., Kang, H.J., Ryoo, B.Y., Kang, J.H., Kim, H.Y., Kim, B.S., Oh, S.Y., Kwon, H.C., Won, J.H., Kim, K., Park, K., Suh, C. & Kim, W.S. Clinical characteristics and outcome for hepatitis C virus-positive diffuse large B-cell lymphoma. *Leuk Lymphoma*, 49, 88-94 (2008).
  75. Besson, C., Canioni, D., Lepage, E., Pol, S., Morel, P., Lederlin, P., Van Hoof, A., Tilly, H., Gaulard, P., Coiffier, B., Gisselbrecht, C., Brousse, N., Reyes, F., Hermine, O. & Programs, G.d.E.d.L.d.l.A. Characteristics and outcome of diffuse large B-cell lymphoma in hepatitis C virus-positive patients in LNH 93 and LNH 98 Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte programs. *J Clin Oncol*, 24, 953-960 (2006).
  76. Masaki, N., Yamagiwa, Y., Shimbo, T., Murata, K., Korenaga, M., Kanto, T., Mizokami, M. & Database, p.m.c.t.t.J.I. Regional disparities in interferon therapy for chronic hepatitis C in Japan: a nationwide retrospective cohort study. *BMC Public Health*, 15, 566 (2015).
  77. Ohno, O., Mizokami, M., Wu, R.R., Saleh, M.G., Ohba, K., Orito, E., Mukaide, M., Williams, R. & Lau, J.Y. New hepatitis C virus (HCV) genotyping system that allows for identification of HCV genotypes 1a, 1b, 2a, 2b, 3a, 3b, 4,

- 5a, and 6a. *J Clin Microbiol*, 35, 201-207 (1997).
78. Kasama, Y., Sekiguchi, S., Saito, M., Tanaka, K., Satoh, M., Kuwahara, K., Sakaguchi, N., Takeya, M., Hiasa, Y., Kohara, M. & Tsukiyama-Kohara, K. Persistent expression of the full genome of hepatitis C virus in B cells induces spontaneous development of B-cell lymphomas in vivo. *Blood*, 116, 4926-4933 (2010).
79. Kasama, Y., Mizukami, T., Kusunoki, H., Peveling-Oberhag, J., Nishito, Y., Ozawa, M., Kohara, M., Mizuochi, T. & Tsukiyama-Kohara, K. B-cell-intrinsic hepatitis C virus expression leads to B-cell-lymphomagenesis and induction of NF- $\kappa$ B signalling. *PLoS One*, 9, e91373 (2014).
80. Shimono, J., Miyoshi, H., Seto, M., Teshima, T. & Ohshima, K. Clinical features of diffuse large B-cell lymphoma with polyploidy. *Pathol Int*, 67, 17-23 (2017).
81. Suguro, M., Yoshida, N., Umino, A., Kato, H., Tagawa, H., Nakagawa, M., Fukuhara, N., Karnan, S., Takeuchi, I., Hocking, T.D., Arita, K., Karube, K., Tsuzuki, S., Nakamura, S., Kinoshita, T. & Seto, M. Clonal heterogeneity of lymphoid malignancies correlates with poor prognosis. *Cancer Sci*, 105, 897-904 (2014).
82. Jiang, Y., Dominguez, P.M. & Melnick, A.M. The many layers of epigenetic dysfunction in B-cell lymphomas. *Curr Opin Hematol*, 23, 377-384 (2016).
83. Hopp, L., Nersisyan, L., Löffler-Wirth, H., Arakelyan, A. & Binder, H. Epigenetic Heterogeneity of B-Cell Lymphoma: Chromatin Modifiers. *Genes (Basel)*, 6, 1076-1112 (2015).
84. Machida, K., Cheng, K.T., Sung, V.M., Shimodaira, S., Lindsay, K.L., Levine, A.M., Lai, M.Y. & Lai, M.M. Hepatitis C virus induces a mutator phenotype: enhanced mutations of immunoglobulin and protooncogenes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 4262-4267 (2004).
85. Harouaka, D., Engle, R.E., Wollenberg, K., Diaz, G., Tice, A.B., Zamboni, F., Govindarajan, S., Alter, H., Kleiner, D.E. & Farci, P. Diminished viral replication and compartmentalization of hepatitis C virus in hepatocellular carcinoma tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 113, 1375-1380 (2016).
86. Mihăilă, R.G. Hepatitis C virus - associated B cell non-Hodgkin's lymphoma. *World J Gastroenterol*, 22, 6214-6223 (2016).
87. Suarez, F., Lortholary, O., Hermine, O. & Lecuit, M. Infection-associated

- lymphomas derived from marginal zone B cells: a model of antigen-driven lymphoproliferation. *Blood*, 107, 3034-3044 (2006).
88. Forghieri, F., Luppi, M., Barozzi, P., Maffei, R., Potenza, L., Narni, F. & Marasca, R. Pathogenetic mechanisms of hepatitis C virus-induced B-cell lymphomagenesis. *Clin Dev Immunol*, 2012, 807351 (2012).
89. Shimono, J., Miyoshi, H., Kiyasu, J., Sato, K., Kamimura, T., Eto, T., Miyagishima, T., Nagafuji, K., Teshima, T. & Ohshima, K. Clinicopathological analysis of primary splenic diffuse large B-cell lymphoma. *Br J Haematol*, 178, 719-727 (2017).
90. Shimono, J., Miyoshi, H., Kamimura, T., Eto, T., Miyagishima, T., Sasaki, Y., Kurita, D., Kawamoto, K., Nagafuji, K., Seto, M., Teshima, T. & Ohshima, K. Clinicopathological features of primary splenic follicular lymphoma. *Ann Hematol* in press (2017).
91. Miyanari, Y., Hijikata, M., Yamaji, M., Hosaka, M., Takahashi, H. & Shimotohno, K. Hepatitis C virus non-structural proteins in the probable membranous compartment function in viral genome replication. *J Biol Chem*, 278, 50301-50308 (2003).
92. Li, K., Foy, E., Ferreon, J.C., Nakamura, M., Ferreon, A.C., Ikeda, M., Ray, S.C., Gale, M. & Lemon, S.M. Immune evasion by hepatitis C virus NS3/4A protease-mediated cleavage of the Toll-like receptor 3 adaptor protein TRIF. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 2992-2997 (2005).
93. Foy, E., Li, K., Wang, C., Sumpter, R., Ikeda, M., Lemon, S.M. & Gale, M. Regulation of interferon regulatory factor-3 by the hepatitis C virus serine protease. *Science*, 300, 1145-1148 (2003).
94. Meylan, E., Curran, J., Hofmann, K., Moradpour, D., Binder, M., Bartenschlager, R. & Tschopp, J. Cardif is an adaptor protein in the RIG-I antiviral pathway and is targeted by hepatitis C virus. *Nature*, 437, 1167-1172 (2005).
95. Evans, J.D. & Seeger, C. Cardif: a protein central to innate immunity is inactivated by the HCV NS3 serine protease. *Hepatology*, 43, 615-617 (2006).
96. Grandvaux, N., Servant, M.J., tenOever, B., Sen, G.C., Balachandran, S., Barber, G.N., Lin, R. & Hiscott, J. Transcriptional profiling of interferon regulatory factor 3 target genes: direct involvement in the regulation of interferon-stimulated genes. *J Virol*, 76, 5532-5539 (2002).
97. Nakaya, T., Sato, M., Hata, N., Asagiri, M., Suemori, H., Noguchi, S.,

- Tanaka, N. & Taniguchi, T. Gene induction pathways mediated by distinct IRFs during viral infection. *Biochem Biophys Res Commun*, 283, 1150-1156 (2001).
98. Ishido, S. & Hotta, H. Complex formation of the nonstructural protein 3 of hepatitis C virus with the p53 tumor suppressor. *FEBS Lett*, 438, 258-262 (1998).
99. Deng, L., Nagano-Fujii, M., Tanaka, M., Nomura-Takigawa, Y., Ikeda, M., Kato, N., Sada, K. & Hotta, H. NS3 protein of Hepatitis C virus associates with the tumour suppressor p53 and inhibits its function in an NS3 sequence-dependent manner. *J Gen Virol*, 87, 1703-1713 (2006).
100. Kwun, H.J., Jung, E.Y., Ahn, J.Y., Lee, M.N. & Jang, K.L. p53-dependent transcriptional repression of p21(waf1) by hepatitis C virus NS3. *J Gen Virol*, 82, 2235-2241 (2001).
101. Sakamuro, D., Furukawa, T. & Takegami, T. Hepatitis C virus nonstructural protein NS3 transforms NIH 3T3 cells. *J Virol*, 69, 3893-3896 (1995).
102. Dai, B., Chen, A.Y., Corkum, C.P., Peroutka, R.J., Landon, A., Houg, S., Muniandy, P.A., Zhang, Y., Lehrmann, E., Mazan-Mamczarz, K., Steinhardt, J., Shlyak, M., Chen, Q.C., Becker, K.G., Livak, F., Michalak, T.I., Talwani, R. & Gartenhaus, R.B. Hepatitis C virus upregulates B-cell receptor signaling: a novel mechanism for HCV-associated B-cell lymphoproliferative disorders. *Oncogene*, 35, 2979-2990 (2016).
103. Hajarizadeh, B., Grebely, J., Martinello, M., Matthews, G.V., Lloyd, A.R. & Dore, G.J. Hepatitis C treatment as prevention: evidence, feasibility, and challenges. *Lancet Gastroenterol Hepatol*, 1, 317-327 (2016).
104. Hézode, C., Forestier, N., Dusheiko, G., Ferenci, P., Pol, S., Goeser, T., Bronowicki, J.P., Bourlière, M., Gharakhanian, S., Bengtsson, L., McNair, L., George, S., Kieffer, T., Kwong, A., Kauffman, R.S., Alam, J., Pawlotsky, J.M., Zeuzem, S. & Team, P.S. Telaprevir and peginterferon with or without ribavirin for chronic HCV infection. *N Engl J Med*, 360, 1839-1850 (2009).
105. McHutchison, J.G., Everson, G.T., Gordon, S.C., Jacobson, I.M., Sulkowski, M., Kauffman, R., McNair, L., Alam, J., Muir, A.J. & Team, P.S. Telaprevir with peginterferon and ribavirin for chronic HCV genotype 1

- infection. *N Engl J Med*, 360, 1827-1838 (2009).
106. McHutchison, J.G., Manns, M.P., Muir, A.J., Terrault, N.A., Jacobson, I.M., Afdhal, N.H., Heathcote, E.J., Zeuzem, S., Reesink, H.W., Garg, J., Bsharat, M., George, S., Kauffman, R.S., Adda, N., Di Bisceglie, A.M. & Team, P.S. Telaprevir for previously treated chronic HCV infection. *N Engl J Med*, 362, 1292-1303 (2010).
107. Izumi, N., Hayashi, N., Kumada, H., Okanou, T., Tsubouchi, H., Yatsushashi, H., Kato, M., Ki, R., Komada, Y., Seto, C. & Goto, S. Once-daily simeprevir with peginterferon and ribavirin for treatment-experienced HCV genotype 1-infected patients in Japan: the CONCERTO-2 and CONCERTO-3 studies. *J Gastroenterol*, 49, 941-953 (2014).
108. Manns, M.P., Fried, M.W., Zeuzem, S., Jacobson, I.M., Forns, X., Poordad, F., Peeters, M., Fu, M., Lenz, O., Ouwerkerk-Mahadevan, S., Jessner, W., Scott, J.A., Kalmeijer, R., De La Rosa, G., Sinha, R. & Beumont-Mauviel, M. Simeprevir with peginterferon/ribavirin for treatment of chronic hepatitis C virus genotype 1 infection: pooled safety analysis from Phase IIb and III studies. *J Viral Hepat*, 22, 366-375 (2015).
109. Karino, Y., Toyota, J., Ikeda, K., Suzuki, F., Chayama, K., Kawakami, Y., Ishikawa, H., Watanabe, H., Hernandez, D., Yu, F., McPhee, F. & Kumada, H. Characterization of virologic escape in hepatitis C virus genotype 1b patients treated with the direct-acting antivirals daclatasvir and asunaprevir. *J Hepatol*, 58, 646-654 (2013).
110. McPhee, F., Hernandez, D., Yu, F., Ueland, J., Monikowski, A., Carifa, A., Falk, P., Wang, C., Fridell, R., Eley, T., Zhou, N. & Gardiner, D. Resistance analysis of hepatitis C virus genotype 1 prior treatment null responders receiving daclatasvir and asunaprevir. *Hepatology*, 58, 902-911 (2013).
111. Hermine, O., Lefrère, F., Bronowicki, J.P., Mariette, X., Jondeau, K., Eclache-Saudreau, V., Delmas, B., Valensi, F., Cacoub, P., Brechot, C., Varet, B. & Troussard, X. Regression of splenic lymphoma with villous lymphocytes after treatment of hepatitis C virus infection. *N Engl J Med*, 347, 89-94 (2002).
112. Michot, J.M., Canioni, D., Driss, H., Alric, L., Cacoub, P., Suarez, F., Sibon, D., Thieblemont, C., Dupuis, J., Terrier, B., Feray, C., Tilly, H., Pol, S., Leblond, V., Settegrana, C., Rabiega, P., Barthe, Y., Hendel-

- Chavez, H., Nguyen-Khac, F., Merle-Béral, H., Berger, F., Molina, T., Charlotte, F., Carrat, F., Davi, F., Hermine, O., Besson, C. & Group, A.H.-L.-C.S. Antiviral therapy is associated with a better survival in patients with hepatitis C virus and B-cell non-Hodgkin lymphomas, ANRS HC-13 lympho-C study. *Am J Hematol*, 90, 197-203 (2015).
113. Vallisa, D., Bernuzzi, P., Arcaini, L., Sacchi, S., Callea, V., Marasca, R., Lazzaro, A., Trabacchi, E., Anselmi, E., Arcari, A.L., Moroni, C., Bertè, R., Lazzarino, M. & Cavanna, L. Role of anti-hepatitis C virus (HCV) treatment in HCV-related, low-grade, B-cell, non-Hodgkin's lymphoma: a multicenter Italian experience. *J Clin Oncol*, 23, 468-473 (2005).
114. Maciocia, N., O'Brien, A. & Ardeshtna, K. Remission of Follicular Lymphoma after Treatment for Hepatitis C Virus Infection. *N Engl J Med*, 375, 1699-1701 (2016).
115. Sultanik, P., Klotz, C., Brault, P., Pol, S. & Mallet, V. Regression of an HCV-associated disseminated marginal zone lymphoma under IFN-free antiviral treatment. *Blood*, 125, 2446-2447 (2015).
116. Carrier, P., Jaccard, A., Jacques, J., Tabouret, T., Debette-Gratien, M., Abraham, J., Mesturoux, L., Marquet, P., Alain, S., Sautereau, D., Essig, M. & Loustaud-Ratti, V. HCV-associated B-cell non-Hodgkin lymphomas and new direct antiviral agents. *Liver Int*, 35, 2222-2227 (2015).
117. Nakagawa, M., Schmitz, R., Xiao, W., Goldman, C.K., Xu, W., Yang, Y., Yu, X., Waldmann, T.A. & Staudt, L.M. Gain-of-function CCR4 mutations in adult T cell leukemia/lymphoma. *J Exp Med*, 211, 2497-2505 (2014).
118. Yoshida, N., Miyoshi, H., Kato, T., Sakata-Yanagimoto, M., Niino, D., Taniguchi, H., Moriuchi, Y., Miyahara, M., Kurita, D., Sasaki, Y., Shimono, J., Kawamoto, K., Utsunomiya, A., Imaizumi, Y., Seto, M. & Ohshima, K. CCR4 frameshift mutation identifies a distinct group of adult T cell leukaemia/lymphoma with poor prognosis. *J Pathol*, 238, 621-626 (2016).