

出國報告 (出國類別: 進修)

# **Clinicopathological and Molecular Features of Early Follicular Lymphoid Neoplasm**

服務機關: 國立臺灣大學醫學院附設醫院/病理部

姓名職稱: 尤善琦 主治醫師

派赴機構: 美國國家衛生研究院

出國期間: 民國 103 年 08 月 01 日至民國 104 年 07 月 31 日

報告日期: 民國 104 年 08 月 10 日

單位主管核章:

## 摘要

原位濾泡淋巴癌據信為濾泡淋巴癌之早期病變。職於美國國家衛生研究院血液病理團隊，進行原位濾泡淋巴癌之研究。研究材料係 Dr. Elaine S Jaffe 長年接受諮詢之臨床案例。我們經由雷射微解剖收集異常之淋巴濾泡，並抽取 DNA，並且針對有興趣的基因進行定序。此研究與德國圖賓根大學 Dr. Leticia Quintanilla-Martinez 合作，在德國進行定序。

除傳統雷射微解剖外，此行職亦從事新的微解剖技術之開發，成功使用脈衝光源對石蠟包埋組織標本做表達性微解剖。此技術之速度遠快於傳統方法，且設備成本相對低廉。

在美期間，職每日旁聽淋巴癌諮詢病例之判讀，有幸觀摩大量來自世界各地最艱澀之臨床病例。Dr. Jaffe 數十年來主導世界衛生組織淋巴癌分類系統，工作熱忱，為學勤勉，有機會近距離體驗其風範，畢生難忘。

# 目次

(一)目的	.....	4
(二)過程	.....	4
1. 原位濾泡淋巴癌	.....	4
2. 表達性微解剖	.....	6
3. 觀摩血液病理診斷	.....	6
(三)心得	.....	7
(四)建議事項	.....	7
(五)參考文獻	.....	8

## (一)目的

美國國家衛生研究院 Dr. Elaine S Jaffe 是世界血液病理之泰山北斗，長期主導世界衛生組織淋巴瘤分類系統。其高超的診斷能力，以及精確的研究眼光，從 1970 年代至今名聲不墜。此行旨在精進淋巴瘤的診斷能力，提升研究視野，近距離向大師學習，同時與優秀的同儕切磋琢磨，以期突破臺灣現狀，躋身世界主流。

## (二)過程

### 1. 原位濾泡淋巴癌 (Follicular lymphoma in situ, FLIS)

原位癌的概念在上皮腫瘤早已確立，但原位淋巴癌作為淋巴癌的早期或是癌前病變，則是相對較新的概念。傳統上淋巴細胞腫瘤形同惡性淋巴癌，不存在良性腫瘤與癌前病變。原位濾泡淋巴癌(FLIS)是目前少數被發現的原位淋巴癌，型態與反應性濾泡幾乎無異，然其染色強烈表達 BCL2 與 CD10。(Swerdlow, 2008)不像上皮細胞原位癌的高盛行率，FLIS 極為罕見，針對沒有淋巴癌病史的淋巴結切片全部做 BCL2 染色，也僅有 2.3%能發現 FLIS。(Henopp, 2011)因此目前尚無流行病學研究證明 FLIS 是濾泡淋巴癌的癌前病變。絕大多數有 FLIS 的病人，後來並沒有罹患淋巴癌。(Jegalian, 2011)

但其他間接的證據仍顯示 FLIS 很可能是濾泡性淋巴癌的早期或癌前病變 例如德國一團隊曾經報告一例濾泡淋巴癌與 FLIS 並存之個案，IGH PCR 與 FISH 顯示兩者應為同源，但濾泡淋巴癌較 FLIS 部分多了 BCL2 突變以及 array CGH 顯示的染色體異常。(Bonzheim, 2011) 另一義大利團隊報告一例瀰漫性大型 B 細胞淋巴癌與 FLIS 並存，兩者在染色體變化以及 IGH 和 BCL2/IGH PCR 都顯示為同源。(Carbone, 2012)

若從濾泡淋巴癌的病人族群做研究，回溯性將病人因其他原因切除的淋巴結做 BCL2 染色，則相對容易發現 FLIS。日本的研究從 150 名濾泡淋巴癌的病人中，找出 4 名在診斷淋巴癌之前曾經接受其他癌症手術，這 4 名病人的淋巴節廓清標本全部都有發現 FLIS。(Morita, 2015)英國也有類似的研究，從 1380 名淋巴濾泡癌的病人中，有 12 名在診斷淋巴癌之前曾經有其他淋巴結手術檢體，其中 10 名有 FLIS。(Teixeira Mendes, 2015)

由於 FLIS 十分罕見，且病變往往侷限於少數個濾泡，難以取得足夠的案例數，更難獲得足夠的核酸量，是分子研究的最大限制。目前最大的分子研究之一，將四例 FLIS 做 array CGH，案例就是來自美國國家研究院 Dr. Elaine S. Jaffe 的諮詢案例。(Mamessier,2014) 其發現整理於下表: (Mamessier,2014)

**Table 1.** Genomic alterations reported in FL (by UDS sequencing) compared with early FL precursors, including FLIS, PFL and DFL (by array CGH or Sanger sequencing), and respective frequencies.

Targeted genes in FL	UDS alterations reported in FL Frequency in FL (%)	Effect (References)	CGH alterations reported in FL precursors Localized in an Amplified (A) / Lost (L) regions	Frequency in FL precursors (%) Mamessier et al. <sup>39</sup>
<i>BCL2</i>	85	<i>BCL2</i> overexpression by IGH/ <i>BCL2</i> translocation, <sup>46</sup> <i>BCL2</i> overexpression by IGH/ <i>BCL2</i> translocation <sup>21</sup>	A	58.5
<i>MLL2</i>	89	Histone modification <sup>47</sup>	A	8.5
<i>IGHV-IGLV</i>	79-100	N-glycosylation motifs <sup>48, 49</sup>		
<i>EPHA7</i>	70	Loss of tumor suppressor <sup>50</sup>		
<i>TNFRSF14</i>	<45	Unknown <sup>51, 52</sup>	L	40
<i>TNFRSF25</i>	25.5	Loss of tumor suppressor <sup>53, 54</sup>	L	33.5
<i>TP73</i>	25.5	Loss of tumor suppressor <sup>51</sup>	L	33.5
<i>BACH2</i>	<5	Oncogene, GC related gene <sup>55, 56</sup>	A	33.5
<i>CREBBP</i>	33	Histone modification <sup>57, 57</sup>		
<i>MEF2B</i>	15	Histone modification <sup>47</sup>		
<i>EP300</i>	9	Histone modification <sup>47, 57</sup>		
<i>EZH2</i>	27	Oncogenic H3K27me3, GC related gene <sup>45, 58, 59</sup>	A	8.5
<i>TNFAIP3/A20</i>	2-26	Loss of tumor suppressor <sup>26, 38, 61</sup>		
<i>FAS</i>	6	Decrease apoptosis <sup>62</sup>		
<i>EBF1</i>	nd	Oncogene, epigenetic modulator, GC related gene, <sup>63</sup> Oncogene, epigenetic modulator, GC related gene <sup>61</sup>	A	25.0
<i>RUNX1</i>	nd	Oncogene	A	16.5
<i>CARD11</i>	nd	Oncogene <sup>64</sup>	A	8.5
<i>PTEN</i>	<5	Loss of tumor suppressor <sup>65, 66</sup>	L	8.5
<i>BCL6</i>	6-14	<i>BCL6</i> overexpression by <i>BCL6</i> translocation, GC related gene <sup>67, 68</sup>		
<i>AFF3</i>	<5	Oncogene, GC related gene	A	50.0
<i>TP53</i>	<5	Loss of tumor suppressor <sup>69, 70</sup>		

職此次赴美，在美國國家衛生研究院主要進行的研究，就是將濾泡淋巴癌的早期病變做雷射微解剖，再抽取 DNA 進行次世代定序。Dr. Jaffe 收集的 FLIS 案例有數十例，可能是世界上數量最大的 FLIS 收藏。另有濾泡淋巴癌 partial involvement 數十例，以及與德國符茲堡大學合作取得的消化道濾泡淋巴癌。

實驗的材料是石蠟包埋的組織標本。將組織切在特殊的 PEN 玻片上，做蘇木紫染色，再使用 Leica LMD6500 系統做雷射微解剖。由於 FLIS 的型態與反應性濾泡無發區別，所以需要另做 *BCL2* 染色對照，以人工目視交互比對，將異常的濾泡以雷射切割收集。DNA 使用 Qiagen FFPE DNA kit 抽取，由 Qiacube 自動化機器操作。DNA 品質以 BIOMED-2 control size ladder PCR 評估。(Van Dongen, 2003)

此研究曾與多家機構討論合作，最後與德國圖賓根大學 Dr. Leticia Quintanilla -Martinez 合作，在德國進行定序。目前結果尚未整理發表。

## 2. 表達性微解剖 (Expression microdissection, XMD)

除了熟稔傳統的雷射微解剖技術，職更參與研發新的微解剖科技－表達性微解剖(XMD)。美國國家衛生研究院是微解剖技術的發源地，XMD 也是發源於此。XMD 是從免疫組織化學染色的切片擷取陽性的細胞的一種技術。實驗的步驟是將一片熱熔塑膠膜置於組織玻片上，給予光能，染色陽性的細胞因為顏色深，會吸收光能釋放熱能，將塑膠融化，細胞即黏附於塑膠膜上。(Hanson, 2011)

職根據原有之實驗步驟進行改良，簡化不必要的步驟，並且克服原本不適用的多種限制。除了免疫組織化學染色外，也將用途擴展於原位雜交。

## 3. 觀摩血液病理診斷

美國國家衛生研究院下轄多個機構，病理實驗室隸屬於國家癌症研究院，Dr. Jaffe 任職於此單位，工作內容只包含解剖病理。血液病理的骨髓診斷，則由隸屬於臨床中心的實驗診斷部負責。病理實驗室的血液病理部門有兩名主治醫師，Dr. Jaffe 以及 Dr. Stefania Pittaluga，主要的工作內容是各地寄來的血液病理諮詢，以及少量院內病理檢體。由於只看一般病理醫師看不懂片子，許多罕見的診斷在此都十分常見。血液病理診斷十分仰賴分子病理的協助。每周有分子病理討論會，整合型態與分子結果。

### (三) 心得

此行一方面精進了淋巴癌的型態學判讀，一方面也對淋巴癌的分佈特性有了更深入的了解。Dr. Jaffe 雖然年事已高，卻仍然極端勤勉，對診斷工作認真，對新知好學不倦，隨時充滿熱情；對於死板的政府規定總是充滿耐性，對於下屬總是有包容的修養。見賢思齊，希望我也能夠享受為學與工作之樂，直到她這種年紀。

美國的血液病理，通常是病理醫師掌握整合各種診斷工具，做出整體判斷。臺灣則是診斷工具分散於不同單位，往往不是病理醫師可以全盤掌握。所以臺灣的血液病理醫師即使接受過美國訓練，回臺灣也難發揮。但 Dr. Jaffe 只看諮詢案例，只有蠟塊可以做診斷，對其他診斷工具的依賴度小；她的工作方式，特別值得我們學習，因為我們比較可能在臺灣複製她的成功經驗。

美國國家衛生研究院是聯邦政府單位，屬於研究機構。以醫療的觀點而言，管理缺乏效率。院內只有臨床實驗病人，所以住院醫師的訓練也較不全面。相較之下，臺大醫院的訓練，臨床服務的基本功扎實，行政管理的概念也很先進。我們雖然要學習別人的優點，也無須妄自菲薄。臺大醫院可能沒有那麼充沛的研究經費，但我們有自己的強項。透過觀察他人，我們可以更清晰的了解自己，思考摸索出自己的成功之道。

### (四) 建議事項

美國國家衛生研究院經常有全院性的演講活動，邀請世界各地頂尖的研究者講述自己的研究，讓人永遠不乏腦力激盪的機會，也激勵研究者的熱忱與野心。臺灣當然沒有那麼多的頂尖科學家，但是我們也應該多邀請國內外學者演講，擴展同仁的視野。

英文的出版業比較發達，很多醫學相關的科普書籍，或者科學家的傳記或訪談，可以引發思考，讓人獲得啟示，順便還可以練習英文閱讀。這些英文書籍在臺灣購買不易，圖書館也很少收藏，希望我們的醫圖選購圖書的時候，能夠採購一些非教科書的英文好書，對於學生與醫師都會有幫助。一本好書的力量，可能改變一個人的一生。

## (五) 參考文獻

Bonzheim, I. et al., 2011. A unique case of follicular lymphoma provides insights to the clonal evolution from follicular. *Blood*, 118(12), pp.3442–3444.

Carbone, A. et al., 2012. A unique case of extranodal DLBCL sharing genetic abnormalities with a synchronous ileal lymphoma exhibiting immunoarchitectural features of in situ follicular lymphoma. *American Journal of Hematology*, 87(12), pp.134–135.

Van Dongen, J.J.M. et al., 2003. Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia*, 17(12), pp.2257–2317.

Hanson, J.C. et al., 2011. Expression microdissection adapted to commercial laser dissection instruments. *Nature protocols*, 6(4), pp.457–67.

Henopp, T. et al., 2011. Prevalence of follicular lymphoma in situ in consecutively analysed reactive lymph nodes. *Histopathology*, 59(1), pp.139–142.

Jegalian, A.G. et al., 2011. Follicular lymphoma in situ: Clinical implications and comparisons with partial involvement by follicular lymphoma. *Blood*, 118(11), pp.2976–2984.

Mamessier, E., Song, J.Y., et al., 2014a. Early lesions of follicular lymphoma: a genetic perspective. *Haematologica*, 99(3), pp.481–8.

Mamessier, E., Broussais-Guillaumot, F., et al., 2014. Nature and importance of follicular lymphoma precursors. *Haematologica*, 99(5), pp.802–10.

Morita, K. et al., 2015. A retrospective study of patients with follicular lymphoma (FL): identification of in situ FL or FL-like B cells of uncertain significance in lymph nodes resected at the time of previous surgery for carcinomas. *Journal of clinical pathology*, 68(7), pp.541–6.

Swerdlow, S.H. et al. eds., 2008. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues 4th ed., Lyon: International Agency for Research on Cancer.

Teixeira Mendes, L.S. & Wotherspoon, A., 2015. The relationship between overt and in situ lymphoma: a retrospective study of follicular and mantle cell lymphoma cases. *Histopathology*.