

림프절외 NK/T세포 림프종에서 Epstein-Barr Virus에 대한 연구

이화여자대학교 의과대학 병리학교실, 미생물학교실*
조 민 선 · 우 소 연*

= Abstract =

Analysis of EBV in Extranodal NK/T Cell Lymphoma

Min-Sun Cho · So-Youn Woo*

Department of Pathology, Microbiology,* College of Medicine, Ewha Womans University

Objectives : Epstein-Barr virus(EBV) is associated with development of various types of lymphoma, especially NK/T cell lymphoma. Recently, its subtypes and LMP-1, major oncoprotein of EBV, have been studied. We investigated the frequency of EBV, its subtypes, and LMP-1 status on the cases diagnosed at Ewha university hospital between 1993 and 2002.

Material and Methods : Sixteen cases of NK/T cell lymphomas were studied. In situ hybridization for EBER-1 mRNA and PCR for EBV subtypes and 30 base pair deletion of LMP-1 were done.

Results : All cases showed EBV positivity by EBER in situ hybridization. All cases contained Type A viruses and 10 cases(62.5%) revealed LMP-1 30bp deletion.

Conclusion : EBV act as a causative role in the development of NK/T cell lymphoma. The exact role of LMP-1 30bp deletion variant in the lymphomatogenesis should be studied with larger number of cases.

KEY WORDS : Epstein-Barr virus · Genotype · LMP-1 · NK/T cell lymphoma · Extranodal.

서 론

림프종은 그 아형에 따라 서양과 우리나라의 발생빈도가 다른데, 림프절 외 NK/T 세포 림프종은 대표적으로 서구보다 한국, 일본, 중국을 포함한 남동 아시아와 멕시코 및 페루에서 흔한 림프종이다. 한국에서 림프절 외 NK/T세포 림프종의 발생률은 전체 림프종 중에 8.7%로 비특이형 말초T세포 림프종이 9.4%인 것과 비교했을 때 비교적 흔함을 알 수 있다¹⁾. 이 질환은 임상 및 조직학

적으로 코, 부비동에 호발하고, 자연살해세포 및 세포독성 T세포 계열의 종양 세포가 혈관 중심으로 증식하고 괴사가 심하다는 특징을 가진다. 또한 대부분의 예가 EBV 양성이며, EBV는 림프종 발생 기전에서 중요한 역할을 한다²⁻⁵⁾.

EBV는 대표적인 종양관련 바이러스로서 NK/T세포 림프종 외에도 Burkitt 림프종⁶⁾, 호즈킨 림프종⁷⁾ 및 면역 결핍 및 이식 후 발생한 림프증식성 질환⁸⁾의 발생에 중요한 역할을 하며 그 기전에 대해 계속 연구가 진행되고 있다.

림프종에서 EBV의 아형 즉 A 및 B형과 EBV-LMP1에 대한 연구가 이루어지고 있는 바, 이화여대부속병원에서 지난 10년간 림프절 외 NK/T세포 림프종으로 진단된 16예에 대해 EBV의 양성율, 아형 및 EBV-LMP-1 유전자의 돌연변이에 대해 알아보았다.

대상 및 방법

1. 대상

이화여대부속 동대문 및 목동 병원에서 1993년부터 2003년까지 10년간 림프절 외 NK/T세포 림프종으로 진단된 16예를 대상으로 하였다. 분류는 2002년에 발표된 WHO 분류를 따랐다. 성별은 남자 8명, 여자 8명이었고 연령분포는 22세에서 82세(평균 45.3세)였다.

2. 조직학적 소견 검색

H-E염색 슬라이드를 관찰하고, 각 예의 파라핀 포매 조직을 이용하여 CD3, CD56, CD20에 대한 면역염색을 시행하였다.

3. EBER in situ hybridization

파라핀 포매 조직을 5 μ m로 절편 후 EBV-encoded RNA (EBER)에 대한 fluorescein-conjugated oligonucleotide probe(Novocastra)를 이용하여 권장하는 방법에 따라 in situ hybridization을 시행하였다.

4. 파라핀 포매 조직에서 DNA의 추출

파라핀 포매 조직을 블록의 크기가 작은 경우는 8 μ m의 두께로 5~6장, 블록의 크기가 큰 경우는 7 μ m 두께로 3~4장 박절하여 1.5ml 튜브에 담았다. xylene으로 파라핀을 제거한 후 proteinase K 400 μ g/ml이 섞인 용액을 가하고 55 $^{\circ}$ C에 모든 조직이 거의 녹을 때까지(대부분 24~48시간) 둔 후, SV PCR clean up system (Promega, Madison, WI, USA)를 이용하여 DNA 정제 후 PCR에 이용하였다.

5. EBV 아형(strain) 검사

EBV의 A형 및 B형은 EBV nuclear antigen(EBNA)-2 유전자에 대해 5'-AGGCTGCCACCCCTGAGGAT-3'와 5'-GCCACCTGGCAGCCCTAAAG-3'의 primers를 이용하여 검사하였다. PCR은 문헌에 기술된 바와 같이 시행하였는데, 250 μ M dNTP, 1.5mM

MgCl₂, 각 1 μ M 시발체, 1.25unit Taq polymerase를 포함하는 PCR 혼합액 24 μ l에 DNA를 1 μ l(총량 25 μ l)를 넣고 95 $^{\circ}$ C에서 5분간 변성시킨 후 94 $^{\circ}$ C 30초, 60 $^{\circ}$ C 30초, 72 $^{\circ}$ C 30초로 35회 반응시키고 72 $^{\circ}$ C에서 5분 연장하였다. 2% agarose gel에서 전기 영동하여 양성 띠를 확인하였다. A형 EBV에 대한 양성 대조군으로 Raji DNA를 이용하였다. A형 EBV는 168염기쌍이고 B형 EBV는 184염기쌍이다.

6) EBV-LMP1 유전자 결손 검사

LMP1의 carboxy-end 유전자 부분에 대해 문헌에 기술된 primers, 즉 5'-CGGAAGAGGTGAAAACAAA-3'과 5'-GCCACCTGGCAGCCCTAAAG-3'를 이용하여 결손 여부를 검사하였다. PCR 조건은 위와 동일하다. Wild type 대조군으로 Raji DNA를 이용하였고, 전기영동에서 증폭 산물이 161염기쌍이면 wild type이고 131염기쌍인 경우 결손이 있다고 판정하였다.

결 과

전체적인 결과는 Table 1에 요약되어 있다.

1. 병리조직학적인 소견 검색

발생 부위는 코, 구인두 및 비 인두에서 15예가 발생하였고 1예는 상완의 피하종괴로서 발견되었다. 2예는 병의 경과 도중 위 점막 및 위벽을 침범하였다. 모든 예에서 중앙성 비정형 림프구는 CD3에 대해 세포질에 염색되었고, CD56에 대해서는 세포막에 양성반응을 보였다.

2. EBER in situ hybridization

모든 예가 (100%)가 양성 반응을 보였다.

3. EBV subtyping and LMP-1 30염기쌍 결손 검사

모든 예가 Raji cell line과 동일한 크기의 168염기쌍의 양성 밴드를 보여주어 A아형이었다. LMP-1의 30염기쌍 결손은 전체 16예 중 10예(62.5%)에서 있었고 나머지 6예는 wild type이었다(Fig. 1).

고 찰

본 원에서 진단된 16예의 림프절 외 NK/T 세포 림프종에서 EBER in situ hybridization으로 모두 EBV 감염

Table 1. EBV status in NK/T cell lymphoma

Case No.	병리번호	발생부위	성별	나이	CD56	EBER ISH	EBV subtype	LMP-1
1	S02-9892	Upper arm	F	59	p	p	A	del
2	S93-1020	Nasopharynx	M	44	p	p	A	del
3	S94-3496	Nose	M	34	p	p	A	WT
4	S95-1595	Nose	M	38	p	p	A	del
5	S97-4411	Nose	M	33	p	p	A	del
6	S97-7752	Nose	M	31	p	p	A	WT
7	S97-9375	Nose	F	67	p	p	A	del
8	S98-2242	Nose	F	22	p	p	A	WT
9	S98-3123	Nose	F	40	p	p	A	del
10	S02-10122	Nose	F	70	p	p	A	del
11	S02-12331	Nose	M	44	p	p	A	WT
12	S02-4219	Nose	F	44	p	p	A	del
13	S02-8066	Nasopharynx	F	42	p	p	A	WT
14	S03-12977	Nose	M	52	p	p	A	del
15	S03-6697	Nose	F	82	p	p	A	del
16	S03-6999	Nose	M	23	p	p	A	WT

ISH : in situ hybridization, M : 남자, F : 여자, p : positive, del : deletion variants, WT : wild type

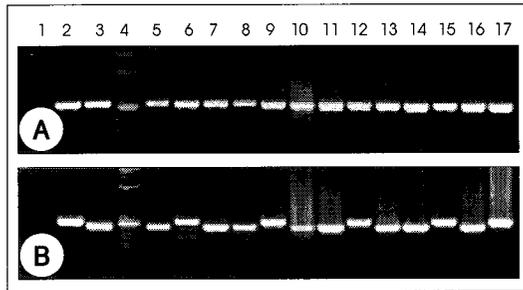


Fig. 1. EBV typing. (A) Lane 1 : Negative control, Lane 2 : Raji cell line, EBV type A, Lane 3 & Lane 5-17 : Cases 1-14, Lane 4 : Molecular weight marker, (B) Lane 1 : Negative control, Lane 2 : Raji cell line, LMP-1 wild type, Lane 3 : Case 1, LMP-1 deletion variant, Lane 4 : molecular weight marker, Lane 5-17 : Case 2-14.

을 확인할 수 있었고, 이들은 모두 A 아형이었고, LMP-1은 결손형이 더 많아 62.5%였다.

허 등은 코형 NK/T 세포 림프종에서 95%의 EBV 양성률을 보고하였고⁹⁾, 김 등은 82%의 양성률을 보고하였다¹⁰⁾. 본 원의 EBV 양성률이 높은 것은 EBV가 음성인 경우 비특이형 말초형 T세포 림프종에 포함시켜 연구에서 제외하였기 때문이다.

최근에 EBV의 아형에 대한 관심이 높아지고 있는데 이것은 아형에 따라 생물학적인 기능이 다를 것으로 여겨지기 때문이다. 기본적으로 EBNA-2와 EBNA-3 유전자의 open reading frames의 차이에 따라 A와 B 아

형으로 구분하며¹¹⁾¹²⁾, 이 둘은 지역적인 분포가 다르고¹³⁾, A 아형이 B 아형보다 형질 전환하는 능력이 더 강하다고 보고되었다¹⁴⁾. 김 등은 NK/T세포 림프종 23예중 18예가 A 아형이었고 이 경우 정중 생존기간이 더 짧은 경향을 보여주었다고 보고하였다¹⁰⁾. 그러나 아프리카와 뉴기니아에는 B 아형이 우세한데 반해¹⁵⁾¹⁶⁾, 서구, 일본, 중국, 멕시코 등의 정상인은 주로 A 아형을 가진다고 보고되었고¹⁷⁾¹⁸⁾, 김 등도 정상 편도선에서 증폭된 EBV의 81%가 A 아형이라고 보고한 바⁹⁾, 단순히 지역적인 특성을 반영하는 것일 수도 있다.

LMP-1은 EBV가 종양세포로 형질 전환시키는데 중요한 역할을 하는 유전자로 알려져 있다. nude mice에서 종양 형성과 사람 B 세포의 DNA합성 유도 및 immortalized state의 개시와 유지에 중요한 역할을 함이 밝혀져 있다²⁰⁾. 최근에 carboxy end 쪽에 30개 염기쌍의 결손 돌연변이가 있는 LMP-1을 SCID mice에 투여하였을 때 더욱 종양이 잘 발생한다고 보고되었다²¹⁾. Knecht 등은 LMP-1의 30bp 결손 돌연변이가 있는 호즈킨 림프종의 경우 임상경과가 더 나쁘다고 보고하였다²²⁾. 그러나 김 등은 나쁜 예후와 상관없이 없었다고 보고하였고, 본 예의 경우는 수가 적어 비교하기가 어려웠으나 진단 후 단시일 내에 사망한 3예가 모두 LMP-1의 30bp 결손 돌연변이가 있었다.

이에 본원에서 림프절의 NK/T세포 림프종으로 진단된

16예에 대해 EBV의 아형과 EBV-LMP-1 유전자의 변이 여부에 대해 연구해 보았다.

요 약

목 적 :

NK/T 세포 림프종의 발생은 EBV와 연관되어 있으며, EBV 아형과 LMP-1 유전자의 30염기쌍 결손 돌연변이가 EBV의 종양유발성과 관련 있다는 연구 결과가 있는 바, 본원에서 NK/T 세포 림프종으로 진단된 예를 대상으로 이에 대해 알아보고자 하였다.

대상과 방법 :

본원에서 진단된 NK/T세포 림프종 16예를 대상으로 EBER-1 in situ hybridization으로 EBV 양성율을 검사하고, PCR방법을 통해 EBV아형과 결손 돌연변이 유무를 관찰하였다.

결 과 :

16예 모두 EBER-1 in situ hybridization에서 양성 반응을 보였다. EBV는 모두 A 아형이었고 LMP-1의 30염기쌍 결손은 전체 16예 중 10예(62.5%)에서 있었고 나머지 6예는 wild type이었다.

결 론 :

본원에서 진단된 NK/T세포 림프종 모든 예에서 EBV를 발견할 수 있었으며, EBV는 모두 A아형이었다. LMP-1 결손 돌연변이는 62.5%에서 관찰되었으며 예후와의 연관성은 보다 많은 예에 대한 연구를 통해 밝혀져야 할 것이다.

중심 단어 : 림프종 · NK/T세포 · Epstein-Barr virus · 유전형 · LMP-1.

References

- 1) Ko YH, Kim CW, Park CS, Jang HK, Lee SS, Kim SH, et al : REAL classification of malignant lymphoma in Republic of Korea : Incidence of recently recognized entities and changes in clinicopathologic features. *Cancer* 1998 ; 83 : 806-812
- 2) Chiang AK, Chan AC, Srivastava G, Ho FC : Nasal T/natural killer (NK)-cell lymphomas are derived from Epstein-Barr virus-infected cytotoxic lymphocytes of both NK- and T-cell lineage. *Int J Cancer* 1997 ; 73 :

- 332-338
- 3) Harris NL, Jaffe ES, Stein H, Banks PM, Chan JK, Cleary ML, et al : A revised European-American classification of lymphoid neoplasms : a proposal from International Lymphoma Study Group. *Blood* 1994 ; 84 : 1361-1392
- 4) Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW : *Extranodal NK/T-cell lymphoma, nasal type. World Health Organization Classification of Tumours Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, France, IARC, 2001 : 204-207*
- 5) Arber DA, Weiss LM, Albuja PF, Chen Y-Y, Jaffe ES : Nasal lymphomas in Peru : High incidence of T-cell immunophenotype and Epstein-Barr virus infection. *Am J Surg Pathol* 1993 ; 17 : 659-665
- 6) Anwar N, Kingma DW, Boch AR, Mourad M, Raffeld M, Magrath I, et al : Investigation of Epstein-Barr viral sequences in 41 cases of Burkitt's lymphomas from Egypt : epidemiological correlations. *Cancer Mol Biol* 1994 ; 1 : 213-222
- 7) Arber DA, Weiss LM, Albuja PF, Chen Y-Y, Jaffe ES : Nasal lymphomas in Peru : High incidence of T-cell immunophenotype and Epstein-Barr virus infection. *Am J Surg Pathol* 1993 ; 17 : 659-665
- 8) Boyle MJ, Sewell WA, Sculley TB, Apolloni A, Turner JJ, Swanson CE, et al : Subtypes of Epstein-Barr virus in human immunodeficiency virus-associated non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 1991 ; 78 : 3004-3011
- 9) Huh J, Cho K, Heo DS, Kim JE, Kim CW : Detection of Epstein-Barr virus in Korean peripheral T-cell lymphoma. *Am J Hematol* 1999 ; 60 : 205-214
- 10) Kim JE, Kim YA, Jeon YK, Park SS, Heo DS, Kim CW : Comparative analysis of NK/T-cell lymphoma and peripheral T-cell lymphoma in Korea : Clinicopathological correlations and analysis of EBV strain type and 30-bp deletion variant LMP1. *Pathol Int* 2003 ; 53 : 735-743
- 11) Frank D, Ceserman E, Liu YF, Michler Re Knowles DM : Post-transplantation lymphoproliferative disorders frequently contain type A and not type B Epstein-Barr virus. *Blood* 1995 ; 85 : 1396-1403
- 12) Kyaw MT, Hurren L, Evans L, Moss DJ, Cooper DA, Benson E : Expression of B-type Epstein-Barr virus-associated non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 1993 ; 78 : 3004-3011
- 13) Gratama JW, Ernberg I : Molecular epidemiology of Epstein-Barr virus infection. *Adv Cancer Res* 1995 ; 67 :

- 14) Rickinson AB, Young LS, Rowe M : *Influence of the Epstein-Barr virus nuclear antigen EBNA2 on the growth phenotype of virus-transformed B cells. J Virol* 1987 ; 61 : 1310-1317
- 15) Burrows JM, Khanna R, Sculley TB, Alpers MP, Moss DJ, Burrows SR : *Identification of a naturally recombinant Epstein-Barr virus isolate from New Guinea that encodes both type 1 and type 2 nuclear antigen sequences. J Virol* 1996 ; 70 : 4829-4833
- 16) Dirnhofer S, Angeles-Angeles A, Ortiz-Hidalgo C, Reyes E, Gredler E, Krugmann J, et al : *High prevalence of a 30-base pair deletion in the Epstein-Barr virus (EBV) latent membrane protein 1 gene and of strain type B EBV in Mexican classical Hodgkin's disease and reactive lymphoid tissue. Hum Pathol* 1999 ; 30 : 781-787
- 17) Suzumiya J, Ohshima K, Takeshita M, Kanda M, Kawasaki C, Kimura N, et al : *Nasal lymphoma in Japan. A high prevalence of Epstein-Barr virus type A and deletion within the latent membrane protein gene. Leuk Lymphoma* 1999 ; 35 : 567-578
- 18) Chiang AK, Wong KY, Liang AC, Srivastava G : *Comparative analysis of Epstein-Barr virus gene polymorphism in nasal T/NK-cell lymphomas and normal nasal tissues : implications of viral strain selection in malignancy. Int J Cancer* 1999 ; 80 : 356-364
- 19) Kim I, Park ER, Park SH, Lin Z, Kim YS : *Characteristics of Epstein-Barr virus isolated from the malignant lymphomas in Korea. J Med Virol* 2002 ; 67 : 59-66
- 20) Wang D, Liebowitz D, Kieff E : *An EBV membrane protein expressed in immortalized lymphocytes transforms established rodent cells. Cell* 1985 ; 43 : 831-840
- 21) Henderson S, Rowe M, Gregory C, Croom-Carter D, Wang F, Longnecker R, et al : *Induction of bcl-2 expression by Epstein-Barr virus latent membrane protein LMP-1 protects infected B-cells from programmed cell death. Cell* 1991 ; 65 : 1107-1115
- 22) Knecht H, Bachmann E, Brousset P, Sandvej K, Nadal D, Bachmann F, et al : *Deletions within the LMP1 oncogene of Epstein-Barr virus are clustered in Hodgkin's disease and identical to those observed in nasopharyngeal carcinoma. Blood* 1993 ; 82 : 2937-2942