

平成 30 年 6 月 24 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09473

研究課題名(和文) 悪性リンパ腫の経時的遺伝子変異解析による治療抵抗機序の同定と臨床試験への応用

研究課題名(英文) Longitudinal analyses of genetic alterations in malignant lymphoma using cell-free DNA: detection of refractory disease related abnormalities and application possibility in clinical trials.

研究代表者

富田 章裕 (Tomita, Akihiro)

藤田保健衛生大学・医学部・准教授

研究者番号：80378215

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：悪性リンパ腫(ML)の発症や進展、薬剤感受性などにおいて、遺伝子異常の蓄積が重要である。本研究では、ML患者の血漿中に存在する末梢血無細胞遊離DNA(cfDNA)に着目し、cfDNAと病勢との関連を経時的に検討し、また腫瘍特異的遺伝子異常の検出を行った。特に、腫瘍細胞の抽出が困難である血管内大細胞型B細胞リンパ腫のcfDNAを用いて網羅的解析を行い、疾患特異的な遺伝子異常を同定した。cfDNAを用いた遺伝子解析は、組織生検にて腫瘍組織を得ることが困難である症例においても腫瘍由来DNAの解析を可能とする方法であり、疾患の診断や標的治療薬感受性などを経時的に検討する方法論として有用と考えられる。

研究成果の概要(英文)：Accumulation of genetic mutations is critical for lymphomatogenesis, disease progression and sensitivity to targeting therapeutics in malignant lymphoma (ML). In this analysis, peripheral blood cell-free DNA (cfDNA) was longitudinally analyzed to reveal correlation with clinical features and to detect tumor specific genetic alterations. Especially in intravascular large B-cell lymphoma, those tumor cells are hardly obtained from biopsy sample, cfDNA was an alternative tumor DNA source to detect specific genetic alterations in comprehensive genetic analyses. Genetic analyses using cfDNA may become an alternative powerful strategy to detect tumor specific genetic abnormalities not only for diagnosis but also longitudinal analyses to predict sensitivity to molecular targeting drugs, even in patients whose tumor cells cannot be obtained easily during their clinical courses.

研究分野：血液腫瘍学

キーワード：悪性リンパ腫 B細胞リンパ腫 網羅的遺伝子変異解析 末梢血無細胞遊離DNA リキッドバイオプシー 血管内大細胞型

1. 研究開始当初の背景

網羅的遺伝子変異解析法の進歩により、悪性リンパ腫 (ML) に反復して蓄積する遺伝子異常が同定されるようになった。それらを背景とした分子標的薬の開発も進む一方で、変異の蓄積による治療抵抗性の獲得についても経験され、実臨床においても、個々の症例の臨床経過で変化する遺伝子異常プロファイルを経時的に検出することの重要性が認識されてきた。これまで ML における遺伝子変異解析は、診断時生検組織の残余検体を用いて行われており、採取量の問題から解析できる症例は極めて限られた。また経時的な検体採取は侵襲の問題から困難とされた。

本研究では、末梢血無細胞遊離 DNA (cfDNA) に着目し、種々の ML 病型における遺伝子変異の検出を行い、検体採取が困難な症例や経時的解析における有用性を検討し、実臨床における疾患診断や病勢進行の把握、臨床試験への応用の可能性について検討した。

2. 研究の目的

- (1) ML における cfDNA の臨床的意義の検討
- (2) cfDNA を用いた網羅的遺伝子変異解析による、ML 病型特異的な遺伝子異常の同定
- (3) cfDNA を用いた遺伝子異常の経時的解析
- (4) cfDNA を用いた変異解析の実臨床への応用を目指した臨床試験の発案

3. 研究の方法

- (1) 初発ML患者の腫瘍DNA (tDNA) とcfDNAのペア検体、および経時的末梢血検体の集積
- (2) cfDNA濃度、性状と臨床症状、検査データとの関連性の検討
- (3) Whole exome sequencing (WES) による cfDNA, tDNA を用いた変異遺伝子 allele frequency (VAF) の解析
- (4) 腫瘍細胞の採取困難な症例における cfDNAを用いた特異的遺伝子変異の同定と、その意義の検討
- (5) cfDNAを用いた症例特異的遺伝子変異の経時的解析

4. 研究成果

- (1) cfDNA 濃度と病型、臨床検査値との相関
びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫 (DLBCL)、血管内大細胞型 B 細胞リンパ腫 (IVLBCL)、ろ胞性リンパ腫 (FL) における cfDNA 濃度の比較解析では、DLBCL, IVLBCL における濃度は正常人コントロールおよび FL に比べ有意に高く、特に IVLBCL では DLBCL に比べても有意に高値であった (図 1A)。また、DLBCL における cfDNA 濃度は、血清 LDH 値、CRP に有意に相関し、また、骨髓浸潤 (-) の症例に比べ (+) の症例において有意に高値であった (Fig. 1B-D)。臨床病期、白血球数、可溶性 IL-2 受容体等との有意な相関は確認されなかった。

- (2) cfDNA 濃度の経時的解析

DLBCL および IVLBCL における cfDNA 濃度は、

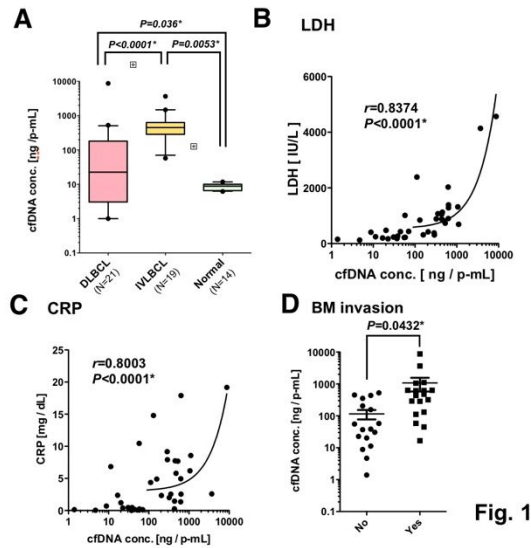


Fig. 1

初回化学療法施行直後より低下し、寛解症例

においては低値が維持された (Fig. 2AB)。一方、病勢進行を来した症例においては、濃度の再上昇が確認され、その傾向は LDH 値と概して相関することが確認された (Fig. 2C)。

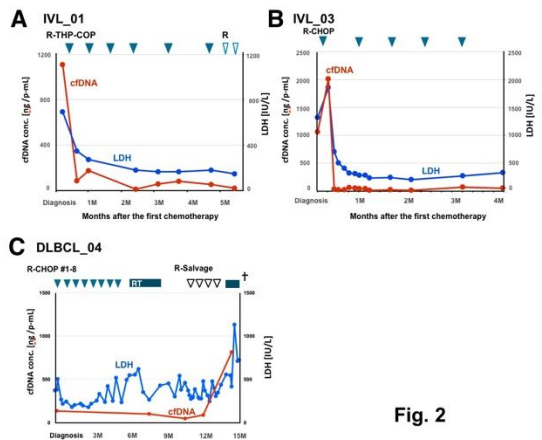


Fig. 2

- (3) cfDNA を用いた WES 解析

DLBCL および IVLBCL において、tDNA と cfDNA を用いて WES を施行した。IVLBCL の組織生検検体においては、腫瘍細胞の抽出が一般に困難であるため、骨髓浸潤をみとめ、フローサイト解析で腫瘍細胞の混入を 5% 以上に認める症例の骨髓単核球を用いて解析を行った。また、骨髓浸潤 (+) 骨髓単核球を免疫不全マウスに移植した Xenograft モデル (PDX モデル) から抽出した腫瘍細胞も用いて、比較解析を行った。DLBCL, IVLBCL とともに tDNA, cfDNA にて腫瘍特異的変異の同定が可能であった。それぞれの VAF は共に正の相関を示したが、cfDNA における VAF は tDNA に比べ概して高い傾向であり、特に IVLBCL における検出感度は、cfDNA において良好であった (Fig. 3AB)。WES で検出された主な変異について、Sanger 法にて validation を行った。

- (4) IVLBCL における特異的遺伝子異常の同定
IVLBCL (N=21) より抽出された cfDNA を用いて WES を施行し、反復して認められる遺伝子

異常を同定した。活性型 B 細胞様 DLBCL において変異が集積する NF B 経路関連因子にお

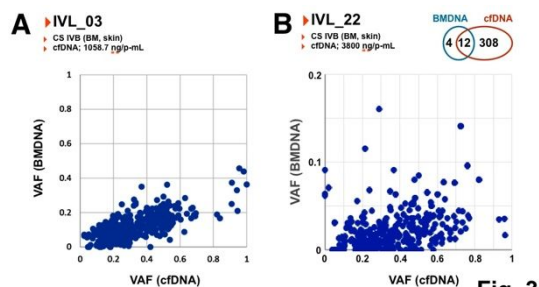


Fig. 3

ける変異が IVLBCL においても集積することが確認され、特に *MYD88*, *CD79B* 変異(それぞれ 57%, 67%)およびそれらの重複 (43%) が特徴的であった。また、*PIM1*, *IgL5* の somatic hypermutation、*CDKN2A* 欠失、エピゲノム・転写調節関連因子の変異に加え、免疫回避に関連する因子における変異が蓄積することが確認された。また、免疫回避関連因子の遺伝子座における構造異常(SV)についても検出された。

(5) IVLBCL において検出された遺伝子異常の意義の検討

特定の免疫回避関連因子に対する 3 種類の抗体を用いた免疫組織染色では、異常に見合うパターンでの蛋白発現が確認され、実際の症例において免疫回避関連因子変異や SV が蛋白発現異常に強く関与していることが示唆された。本異常は DLBCL における頻度に比べ高いことから IVLBCL の病態に関わる可能性が推測された。

(6) cfDNA を用いた特定遺伝子変異の経時的解析

IVLBCL 患者の初発時に採取された cfDNA のうち、*MYD88*, *CD79B* に変異を保有する症例 3 症例より経時的に採取された検体を用いて Sanger sequence を行い、微少残存病変の検出を試みた。初発時に認められた変異は、寛解到達時には検出されず、MRD 検出への応用が可能と考えられた。リアルタイム PCR、デジタル PCR による検出感度の向上および実臨床における意義について、引き続き検討中である。

(7) cfDNA を用いた遺伝子変異解析の実臨床への応用

IVLBCL の腫瘍細胞は血管内にとどまり腫瘍を形成しないことから、発症初期における疾患の診断が極めて困難である。今回の検討で、IVLBCL から採取された cfDNA は全症例において WES で腫瘍特異的変異を検出可能であった。この結果を踏まえ、不明熱などを示し ML も鑑別にあがる症例から前向きに cfDNA を採取し、B 細胞のクロナリティーや DLBCL, IVLBCL に反復する遺伝子異常を検出する臨床試験について、現在検討中である。

これまでに、IVLBCL における特異的な遺伝子異常の同定は報告されておらず、本研究で

cfDNA を用いて WES を行うことにより、初めて実現された。本方法を用いた IVLBCL の早期診断は、現在の臓器生検やランダム皮膚生検による診断法に変わる、安全でかつ鋭敏な方法として、今後の実臨床に役立つものと考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 17 件)

1. Partial restoration of CD20 protein expression and rituximab sensitivity after treatment with azacitidine in CD20-negative transformed diffuse large B cell lymphoma after using rituximab. Hiraga J, Tomita A, Suzuki N, Takagi Y, Narita M, Kagami Y. *Ann Hematol.* **2018**. doi: 10.1007/s00277-018-3354-1. (査読あり)
2. Intratumoral evaluation of 3D microvasculature and nanoparticle distribution using a gadolinium-dendron modified nano-liposomal contrast agent with magnetic resonance micro-imaging. Nitta N, Takakusagi Y, Kokuryo D, Shibata S, Tomita A, Higashi T, Aoki I, Harada M. *Nanomedicine.* **2018**;14(4):1315-1324. doi: 10.1016/j.nano.2018.03.006. (査読あり)
3. Rearrangement of VPS13B, a causative gene of Cohen syndrome, in a case of RUNX1-RUNX1T1 leukemia with t(8;12;21). Abe A, Yamamoto Y, Katsumi A, Okamoto A, Tokuda M, Inaguma Y, Yamamoto K, Yanada M, Kanie T, Tomita A, Akatsuka Y, Okamoto M, Kameyama T, Mayeda A, Emi N. *Int J Hematol.* **2017** Dec 20. doi: 10.1007/s12185-017-2387-x. (査読あり)
4. Altered EZH2 splicing and expression is associated with impaired histone H3 lysine 27 tri-Methylation in myelodysplastic syndrome. Shirahata-Adachi M, Iriyama C, Tomita A, Suzuki Y, Shimada K, Kiyoi H. *Leuk Res.* **2017** Dec;63:90-97. doi:10.1016/j.leukres.2017.10.01 (査読あり)
5. A nationwide survey of hypoplastic myelodysplastic syndrome (a multicenter retrospective study). Kobayashi T, Tomita A (47名中6番目); for National Research Group on Idiopathic Bone Marrow Failure Syndromes. *Am J Hematol.* **2017** Dec;92(12):1324-1332. doi: 10.1002/ajh.24905. (査読あり)
6. Phase 2 Study of the Efficacy and Safety of Pembrolizumab for Relapsed/Refractory Classical Hodgkin Lymphoma. Chen R, Zinzani PL, Fanale MA, Armand P, Johnson NA, Brice P, Radford J, Ribrag V, Molin D, Vassilakopoulos TP, Tomita A, von Tresckow B, Shipp MA, Zhang Y, Ricart AD, Balakumaran A, Moskowitz CH; KEYNOTE-087 investigators. *J Clin Oncol.*

- 2017, Apr 25. doi:10.1200/JCO.2016.72.1316. (査読あり)
7. Emetine elicits apoptosis of intractable B-cell lymphoma cells with MYC rearrangement through inhibition of glycolytic metabolism. Aoki T, Shimada K, Sakamoto A, Sugimoto K, Morishita T, Kojima Y, Shimada S, Kato S, Iriyama C, Kuno S, Harada Y, **Tomita A**, Hayakawa F, Kiyoi H. *Oncotarget*. 2016 Dec 31. doi: 10.18632/oncotarget.14393. doi: 10.18632/oncotarget.14393. (査読あり)
 8. Genetic and Epigenetic Modulation of CD20 Expression in B-Cell Malignancies: Molecular Mechanisms and Significance to Rituximab Resistance. **Tomita A**. *J Clin Exp Hematop*. 2016;56(2):89-99. (査読あり)
 9. Japanese phase II study of rituximab maintenance for untreated indolent B-cell non-Hodgkin lymphoma with high tumor burden. Igarashi T, Ogura M, Itoh K, Taniwaki M, Ando K, Kuroda Y, Yamamoto K, Uike N, **Tomita A**, Nagai H, Kurosawa M, Mori S, Nawano S, Terauchi T, Ohashi Y, Tobinai K. *Int J Hematol*. 2016;104(6):700-708. (査読あり)
 10. SPIB is a novel prognostic factor in diffuse large B-cell lymphoma that mediates apoptosis via the PI3K-AKT pathway. Takagi Y, Shimada K, Shimada S, Sakamoto A, Naoe T, Nakamura S, Hayakawa F, **Tomita A**, Kiyoi H. *Cancer Sci*. 2016;107(9):1270-80. doi: 10.1111/cas.13001. (査読あり)
 11. Peripheral blood cell-free DNA is an alternative tumor DNA source reflecting disease status in myelodysplastic syndromes. Suzuki Y, **Tomita A**, Nakamura F, Iriyama C, Shirahata-Adachi M, Shimada K, Akashi A, Ishikawa Y, Kaneda N, Kiyoi H. *Cancer Sci*. 2016 Sep;107(9):1329-37. doi: 10.1111/cas.12994. (査読あり)
 12. Live-cell single-molecule imaging of the cytokine receptor MPL for analysis of dynamic Dimerization. Akihiko Sakamoto, Takashi Tsukamoto, Yuji Furutani, Yuki Sudo, Kazuyuki Shimada, **Akihiro Tomita**, Hitoshi Kiyoi, Takashi Kato, and Takashi Funatsu. *J Mol Cell Biol*. 2016;8(6):553-555. (査読あり)
 13. Development and analysis of patient derived xenograft mouse models in intravascular large B-cell lymphoma. Kazuyuki Shimada, **Akihiro Tomita** (18名中17番目). *Leukemia*. 2016;30(7):1568-79. (査読あり)
 14. Nodular lymphocyte predominant Hodgkin lymphoma: Clinicopathological study of 25 cases from Japan with a reappraisal of tissue associated macrophages. Eladl AE, Satou A, Elsayed AA, Suzuki Y, Shimizu-Kohno K, Kato S, **Tomita A**, Kinoshita T, Nakamura S, Asano N. *Pathol Int*. 2015 Dec;65(12):652-60. doi: 10.1111/pin.12357. (査読あり)
 15. Discovery of a drug targeting microenvironmental support for lymphoma cells by screening using patient-derived xenograft cells. Sugimoto K, Hayakawa F, Shimada S, Morishita T, Shimada K, Katakai T, **Tomita A**, Kiyoi H, Naoe T. *Sci Rep*. 2015 Aug 17;5:13054. doi: 10.1038/srep13054. (査読あり)
 16. Monitoring of Hepatitis B Virus (HBV) DNA and Risk of HBV Reactivation in B-cell Lymphoma: A prospective observational study. Kusumoto S, **Tomita A** (35名中27番目). *Clin Infect Dis*. 2015 Sep 1;61(5):719-29. doi: 10.1093/cid/civ344 (査読あり)
 17. Successful treatment of refractory cold hemagglutininemia in MYD88 L265P mutation-negative Waldenström's macroglobulinemia with bortezomib. Izumi M, Tsunemine H, Suzuki Y, **Tomita A**, Kusumoto T, Kodaka T, Itoh K, Takahashi T. *Int J Hematol*. 2015 Aug;102(2):238-43. doi: 10.1007/s12185-015-1775-3. (査読あり)
- [学会発表](計 16 件)
1. **Akihiro Tomita**, (筆頭、他18名). Detection of Recurrent Genetic Mutations in Intravascular Large B-Cell Lymphoma By Comprehensive Genetic Analyses Using Peripheral Blood Circulating Cell-Free DNA. 59th Annual meeting of American Society of Hematology(国際学会). 2017年
 2. **冨田章裕**. 成人リンパ腫領域におけるデータストレージ構築とクリニカルシークエンス. 国立がん研究センターがん研究開発費 29-A-3「成人固形がんに対する標準治療確立のための基盤研究」班(大江班)、「難治性リンパ腫小班」(山口小班) 班会議. 2017年
 3. **Akihiro Tomita**. Peripheral blood circulating cell-free DNA (PBcfDNA) - an alternative tumor DNA source in malignant lymphoma. 第57回日本リンパ網内系学会総会(招待講演). 2017年
 4. **冨田章裕**. リンパ腫の臨床現場で遺伝子変異解析を行うことの意義. 第3回リンパ腫分子病態研究会(招待講演). 2017年
 5. **Akihiro Tomita**, et. al. 再発又は難治性古典的ホジキンリンパ腫患者を対象とした MK-3475 の第 2 相試験. 第79回日本血液学会学術集会. 2017年
 6. Craig H Moskowitz, **Akihiro Tomita** (17名中10番目). Pembrolizumab in Relapsed/Refractory Classical

- Hodgkin Lymphoma: Primary End Point Analysis of the Phase 2 Keynote-087 Study. **American Society of Hematology, 58th Annual Meeting & Exposition(国際学会)**. 2016年.
7. Tomohiro Aoki, **Akihiro Tomita** (15名中13番目). Emetine Elicits Apoptosis of Intractable B-Cell Lymphoma Cells with MYC Rearrangement through Inhibition of Glycolytic Metabolism. **American Society of Hematology, 58th Annual Meeting & Exposition(国際学会)**. 2016年
 8. 岡本晃直、**冨田章裕**(11名中3番目). Relationship between tissue EBV-DNA copy number and pathological classification/subtypes in LPDs. **第78回日本血液学会学術集会**. 2016年.
 9. 伊藤佳織、**冨田章裕** (15名中12番目). Possibility of retreatment with bendamustine-rituximab in relapsed/refractory mantle cell lymphoma. **第78回日本血液学会学術集会**. 2016年.
 10. 安部明弘、**冨田章裕** (16名中11番目). Transcriptional activation of PDGFRA and GSX2 by ETV6 translocation in a case of AML with t(4;12). **第78回日本血液学会学術集会**. 2016年.
 11. 青木智広、島田和之、坂本明彦、森下喬允、原田靖彦、入山智沙子、早川文彦、**冨田章裕**、清井仁. Discovering the novel drug targeting tumor-microenvironment for intractable lymphoma. **第78回日本血液学会学術集会**. 2016年.
 12. **Akihiro Tomita**(筆頭、他9名). Utilization of Peripheral Blood Cell-Free DNA in Myelodysplastic Syndromes: Clinical and Molecular Characteristics and Utilization for Genetic Analyses Using Conventional and Next-Generation Strategies. **The American Society of Hematology, 57th Annual Meeting.**(国際学会). 2015年
 13. Yasuhiro Suzuki, **Akihiro Tomita** (8名中2番目). Clinical and Molecular Significance of Peripheral Blood Cell-Free DNA in Myelodysplastic Syndromes. **JSH International Symposium, (国際学会)**. 2015年
 14. **冨田章裕**. MDS における遺伝子異常とその臨床的意義 - 分子異常によって引き起こされる多彩な臨床所見 - **第77回日本血液学会総会 (コーポレートセミナー)(招待講演)**. 2015年
 15. **冨田章裕**. 悪性リンパ腫における治療抵抗性メカニズムとその克服について. **日本リンパ網内系学会第4回リンパ腫スキルアップセミナー(コーポレートセミナー)(招待講演)**. 2015年
 16. **冨田章裕**. Genetic analyses using peripheral blood cell-free DNA in DLBCL. **第55回日本リンパ網内系学会総会 (シンポジウム、英語)(招待講演)**. 2015年
- 〔図書〕(計14件)
1. **冨田章裕**、造血器腫瘍診療ガイドライン 2018年度版(第2版)、金原出版、2018、in press
 2. **冨田章裕**、今日の治療指針2017、医学書院、2017、
 3. **冨田章裕**、EBM血液疾患の治療2017-2018、2017、541
 4. **冨田章裕**、血液疾患最新の治療2017-2019、南江堂、2017、370
 5. **冨田章裕**、血液科 研修ノート、2017、560
 6. **冨田章裕**、造血器腫瘍アトラス第5版、日本医事新報社、2016、863
 7. **冨田章裕**、今日の治療指針 2017年版、医学書院、2016
 8. **冨田章裕**、IMiDs 基礎と臨床2015、メディカルレビュー社、2015、234
 9. **冨田章裕**、日本臨牀 増刊号「リンパ腫学」、日本臨牀社、2015、695
 10. **冨田章裕**、悪性リンパ腫治療マニュアル改訂第4版、南江堂、2015、325
 11. **冨田章裕**、白血病・リンパ腫 薬物療法ハンドブック、南江堂、2015、560
 12. **冨田章裕**、血液疾患 診断・治療指針、中山書店、2015、560
 13. **冨田章裕**、白血病診療Q&A 一つ上を行く診療の実践、中外医学社、2015、280
 14. **冨田章裕**、EBMがん化学療法・分子標的治療法、中外医学社、2015、713
- 〔産業財産権〕該当無し
〔その他〕該当なし
6. 研究組織
- (1)研究代表者
冨田 章裕 (TOMITA, Akihiro)
藤田保健衛生大学・医学部・血液内科学・准教授
研究者番号：80378215
 - (2)研究分担者
該当無し
 - (3)連携研究者
吉田 健一 (YOSHIDA, Kenichi)

京都大学・医学部・腫瘍生物学講座

研究者番号：50738226

(4)研究協力者

該当無し