科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 元年 6月19日現在

機関番号: 32206

研究種目: 基盤研究(C)(一般)

研究期間: 2016~2018

課題番号: 16K09865

研究課題名(和文)悪性リンパ腫でのエピジェネティクス関連遺伝子異常とNFkBシグナルとの関係

研究課題名(英文)Relationship between NfkB signaling and epigeneteic signaling in malignant lymphoma.

研究代表者

小林 幸夫 (Kobayashi, Yukio)

国際医療福祉大学・医学部・教授

研究者番号:50240734

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文): 限局期DLBCLで診断後5年以降に再発した21例でターゲットシークエンスを行なった。解析できた計18例のうち、9対ではMYD88、CD79B、RHOA、TNFRSF14、PIM、MLL2、CREBBP、PRDM1、MEF2Bが共通で、初発時のみ、再発時のみに遺伝子変異が加わっていた。他の9対では、免疫グロブリンの共通の再構成にもかかわらず、共通の遺伝子変異がなく、パネルに含まれていなかった「ドライバー」遺伝子の変異を検出出来なかったことが考えられた。CD79bとMYD88のいずれかあるいは、両方の変異がありMCDに合致した。晩期再発限局期DLBCLの特徴と考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義 悪性リンパ腫の検体で実用上、問題なく遺伝子検査ができる系を確立した。悪性リンパ腫では、個々の遺伝子変 異に応じた治療薬が1:1で見つかるわけではない。しかし、悪性リンパ腫の発症に関する遺伝子群(パスウェイ)がわかってきており、そのパスウェイごとには、阻害剤が発見されてきている。 この研究は、将来的には、個別化治療の元になり、より副作用がない、より効果のある治療薬が選択できる元となると考えられる。事実、限局性の病変で、長年の後に再発している例では、将来はそのパスウェイに応じた治療薬で維持療法を行うようになるかもしれない。

研究成果の概要(英文): We performed target sequences of 18 pairs of primary and relapsed DLBCL cases. Among them, 9 pairs had common mutations in MYD88, CD79B, RHOA, TNFRSF14, PIM,MLL2, CREBBP, PRDM1, MEF2B genes.Some common characteristics might be shared in a subgroup of pts with limited-stage DLBCL who developed LR; they had non-GCB type, mutation in both or either of CD79B and MYD88 and specific extranodal diseases. Especially, at least four pts were considered to have MCD type with co-mutation of CD79B and MYD88.

The mechanisms of localized relapse(LR) were considered heterogeneous. In addition to the well-known mechanism of relapse with indolent BCL components, acquiring functions associated with immune evasion were speculated in limited pts. Immunodeficiency by aging might also be associated with LR because median age at LR was 71 years, relatively old. Other mechanisms of LR, such as gene alteration involving other than PD-L1 must exist although not revealed in our study.

研究分野: 血液腫瘍学

キーワード: BCR NFkB target sequence

様 式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19(共通)

1.研究開始当初の背景

(1) A20, CARD11, MyD88, CD79a/b, Blimp1 などの NF B 関連遺伝子とエピジェネティクス関連遺伝子の MLL2, E2HA, CEREBBP, EP300 変異を解析するターゲットシークエンスのパネルを作成する。

MLL2, EZH2, JMDJC2 遺伝子の機能異常を有する例では、その異常有無がメチルトランスフェラーゼの阻害剤のバイオマーカーとなり得る。CEREBBP, EP300 遺伝子異常は HDAC 阻害剤の有効性の効果予測因子となるかどうかも in vitro で検討する。

(2) あらたな疾患単位を確立する。MALT リンパ腫、ホジキンリンパ腫、縦隔原発びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫では、第 9 番染色体短腕の増幅 (JMJD2C) と第 6 番染色体長腕の欠失 (A20)が多いが、これらの3者の共通の分子病態基盤がもしあれば、病型分類の洗練、再編成へとつながる。

2. 研究の目的

大細胞型 B 細胞リンパ腫で NF B 遺伝子異常がエピジェネティクス関連遺伝子のコントロール下にあるかどうかを調べるのが当初の目的であったが、研究開始時に想定していた NFkB が活性化していることがわかっている MALT リンパ腫、ホジキンリンパ腫、縦隔原発リンパ腫は、症例数は少なく、大きな残余検体も少なかった。そこで、対象を変更し、DLBCL の中で、NFkB シグナルが関係しているタイプを対象とした。リンパ腫で NFKB 関連の遺伝子を含む100 程度の遺伝子のターゲットシークエンスの系を立ち上げ、DLBCL で検討した。

3.研究の方法

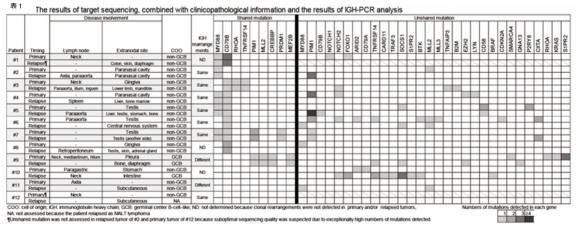
悪性リンパ腫で、ターゲットシークエンスを行った。既知の変異が知られている約 100 の遺伝子で次世代シークエンサーMiniSeq (イルミナ社製)を使用して全ゲノムシークエンスを行う。データ解析は国際医療福祉大学ゲノム医学研究所の独自の解析パイプラインを用いて、1 塩基変異、挿入・欠失、コピー数変化、大規模な構造変異など網羅的に解析する。また、CLC Genomics Workbench(キアゲン)を用いて、前段階で行ったターゲットシークエンスとの比較を行い、6 個の同定済み遺伝子変異以外のバイオマーカー候補となりうる遺伝子変異を抽出した。

4. 研究成果

(1) 限局期 DLBCL の再発機序の検討

ターゲットシークエンスの系を確立した。凍結および、FFPE 蒐集検体から DNA を抽出して、標的遺伝子を濃縮した後に、MiniSeq でエキソン配列を調べ、変異有無を判読した。当初、NFkB pathway の効率に活性化している MALT リンパ腫、縦隔大細胞型 B 細胞リンパ腫、ホジキンリンパ腫を中心的に検討する予定であったが、これらの検体は少量かつ少数しか保管されておらず、DLBCL に広げて検討した。

限局期 de novo DLBCL と診断された 339 人のうち、診断後 5 年以降に再発した (late relapse)



21 人とし、免疫染色を行った。PD-L1 と PAX5 の 2 重染色、MYC、PD-1、CD163、cell of origin の決定を行った。初発時の免疫染色による cell of origin は non-GCB type が 70%であった。進行期かつ複数の節外病変を有するパターンでの late relapse が特徴的であった。21 人中 2 人は low-grade B-cell lymphoma (濾胞性リンパ腫、MALT リンパ腫) として、1 人は DLBCL と low-grade B-cell lymphoma (濾胞性リンパ腫) との composite の組織型で再発していた(表 1)。 興味深い点は late relapse 時に 2 人が腫瘍に PD-L1 陽性 (初発時は陰性) を示し、そのうち 1 人は FISH で 9p24 の gain を認めたことである。また、5 人が late relapse 時に MYC の陽性化を認め、全員が stage IV 期で再発していた。ターゲットシークエンスは、計 18 の対検体で解析可能であった。そのうち、9 対では MYD88, CD79B, RHOA, TNFRSF14, PIM, MLL2, CREBBP, PRDM1, MEF2B が

共通で、初発時のみ、再発時のみに遺伝子変異が加わっていた。他の9対では、免疫グロブリンの共通再構成を見つけられたにもかかわらず、共通の遺伝子変異がなく、パネルに含まれていなかった「ドライバー」遺伝子の変異を検出出来なかったことが考えられた。 late relapse は不均一であり、多くは non-GCB タイプで、サブクローンによる。CD79b と MYD88 のいずれかあるいは、両方の変異があり、Schmitzらが提唱する MCD に合致した。晩期再発限局期 DLBCL の特徴と考えられた。PDL1 の発現高値が再発時に認められた例1例があり、免疫機序の破綻が再発に関係している可能性が示唆された(文献2)。

(2) Grey Tymphoma の腫瘍細胞の免疫系細胞表面マーカーと周囲環境および、末梢血免疫細胞との予後に関する報告

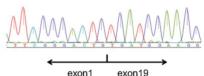
Class IITA 遺伝子あるいは、PDL1、L2 遺伝子の発現及び、転座 data の有無をホジキンリンパ腫、縦隔 B 細胞リンパ腫、その中間型灰色リンパ腫で検討した。既報と異なり日本人では Class IIITA 遺伝子の転座による失活は少なく、ホジキンリンパ腫では、PDL1 の発現が高く、縦隔 B 細胞リンパ腫では PDL2 が高く、PDL1、L2 の発現は相互排他的であった。 灰色リンパ腫では,縦隔 B 細胞リンパ腫のパターンであった。 ホジキンリンパ腫ではその半数が陰性調節遺伝子である TNFAIP3 遺伝子が変異あるいは,欠失を生じている。 周囲の浸潤細胞との関係では CD25 陽性細胞でみた Treg 細胞,CD68 陽性細胞,PD1 陽性細胞はそれぞれ,半数のホジキンリンパ腫で認めたがこれらの関係ははっきりしなかった(文献 3)。

(3) ALK 陽性未分化大細胞型リンパ腫での ALK 遺伝子の部分欠失

この一連の悪性リンパ腫のゲノム解析の過程で、ALK 遺伝子部分欠失変異のある DLBCL が 1 例

みつかった。1 例の ALK 陽性未分化大細胞リンパ腫でエクソン2 から 18 までのスキッピングがあることが判明した。検体で、ALK 遺伝子の両端を認識する probeを用いて FISH 法を行うと 5 'のみの欠失を生じていることが判明した(図 1)。 Western blot 解析で ALK産物は、正常の 220kD より、小さい 100kD であった。Tagman 法でゲノムの定量化を行い、エクソン 2 から





17 あたりの欠失を想定し、エクソン 1 と 19 とで PCR を行うと欠失していることが確認された。 欠失した ALK 遺伝子を NIH3T3 細胞に導入することにより造腫瘍性を確認し、さらに恒常的に下流の ALK, STAT3 のリン酸化を認めたため、あらたな、ALK 遺伝子の活性化であると結論した(文献 4)。

(4) t(11;18)translocation 型 MALT リンパ腫では、alternative pathway のため、CD40を介した IgM 高値が出現する?

106 例の MALT リンパ腫中 t (11;18) translocation を 26 例が有していた。その臨床的特徴を転座を有しないものと比較した。IgM 高値が高く (p=0.008) 一部ではさらに class switch を起こしていた。このような現象は t (11;18) に固有のものであり、t (11;18) の API-MAT 遺伝子産物が下流の CD40 遺伝子を活性化していることを想定した。CD40 は NFkB pathway では、alternative pathway だけを使用しているので、API-1/MLT 遺伝子産物は alternative pathway を活性化しているとすると説明しやすい(文献 1)。

5 . 主な発表論文等

- (1) Toyoda K, Maeshima AM, <u>Nomoto J</u>, Suzuki T, Yuda S, Yamauchi N, Taniguchi H, Makita S, <u>Fukuhara S</u>, <u>Munakata W</u>, Maruyama D, Tobinai K, <u>Kobayashi Y</u>. Mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma with t(11;18)(q21;q21) translocation: long-term follow-up results. Ann Hematol. 2019 [Epub ahead of print]
- (2) Suzuki T, Fukuhara S, Nomoto, J Yamashita S, Maeshima AM, Ito Y, Hatta S, Yuda S, Makita S, Munakata W, Suzuki T, Maruyama D, Taniguchi H, Ushijima T, Izutu K, Tobinai K, **Kobayashi Y**. Genomics of limited-stage diffuse large B-cell lymphoma developing late relapse: analysis of gene alternations in paired primary and late-relapsed tumors by target sequencing. Blood 2018 132:1571
- (3) Tanaka Y, Maeshima AM, <u>Nomoto J</u>, Makita S, <u>Fukuhara S, Munakata W</u>, Maruyama D, Tobinai, K, <u>Kobayashi Y</u>. Expression pattern of PD-L1 and PD-L2 in classical Hodgkin lymphoma, primary mediastinal large B-cell lymphoma, and gray zone lymphoma. Eur J Haematol. 100(5):511-7, 2018.
- (4) <u>Fukuhara S</u>, <u>Nomoto J</u>, Kim SW, Taniguchi H, Miyagi Maeshima A, Tobinai K, <u>Kobayashi Y</u>. Partial deletion of the ALK gene in ALK-positive anaplastic large cell lymphoma. Hematol Oncol. $36(1):150-8,\ 2018$.

[雑誌論文](計 24件)

[学会発表](計 39 件)

〔図書〕(計 5 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称: 発明者: 権利者: 種類: 番号: 出願年: 国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称: 発明者: 権利者: 種類: 番号: 取得年: 国内外の別:

〔その他〕 ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名:野本 順子

ローマ字氏名: Junko NOMOTO

所属研究機関名:国立研究開発法人国立がん研究センター

部局名:中央病院 職名:研究員

研究者番号(8桁): 30601322

研究分担者氏名:福原 傑

ローマ字氏名: Suguru, FUKUHARA

所属研究機関名:国立研究開発法人国立がん研究センター

部局名:中央病院

職名:医員

研究者番号(8桁):70445295

研究分担者氏名:棟方 理

ローマ字氏名: Wataru MUNAKATA

所属研究機関名:国立研究開発法人国立がん研究センター

部局名:中央病院

職名:医員

研究者番号(8桁):80601319

研究分担者氏名:前島 亜希子

ローマ字氏名: Akiko MAESHIMA

所属研究機関名:国立研究開発法人国立がん研究センター

部局名:中央病院

職名:医員

研究者番号(8桁):90342906

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。