

令和 3 年 6 月 6 日現在

機関番号：33916

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K15402

研究課題名(和文) 不明熱患者に対するリキッド・バイオプシーを用いた悪性リンパ腫診断の確立

研究課題名(英文) Liquid Biopsy for the Diagnosis of Malignant Lymphoma in Patients with Fever of Unknown Origin

研究代表者

岡本 晃直 (Akinao, Okamoto)

藤田医科大学・医学部・講師

研究者番号：80775049

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：診断困難なリンパ腫は、不明熱の原因疾患として極めて大きな集団である。我々は血漿中の細胞遊離DNA(cfDNA)に着目し、droplet digital PCR、次世代シーケンサーを利用するLiquid biopsyにより、血管内大細胞型B細胞リンパ腫に特異的なMYD88、CD79bの変異、B細胞/T細胞受容体遺伝子再構成及び、網羅的遺伝子変異を解析することで高精度に診断できる方法を見いだした。現在この方法の実臨床における精度、有効性を検証するために、新たに前向き多施設共同臨床研究「LILY4 STUDY(UMIN000040061)」を開始している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、診断困難なリンパ腫を採血のみで診断で診断および、診断補助ができる可能性が高まった。その結果、不明熱により、原因不明で亡くなる患者さんが減少する可能性がある。また、本研究が確立した検査は、感度・特異度ともに極めて高い。その結果、リンパ腫外の疾患の可能性が相対的に高まるため、主として膠原病などのリンパ腫外の患者に対する治療方針の決定にも極めて有用である。また、高齢者、中枢、腹腔内病変など、手術が困難である患者に対しても応用できる可能性が示唆される。

研究成果の概要(英文)：Lymphomas, which are difficult to diagnose, are an extremely large group of diseases that cause fever of unknown origin. We focused on cell free DNA (cfDNA) in plasma and found a method for highly accurate diagnosis by analyzing MYD88 and CD79b mutations specific to intravascular large B-cell lymphoma, B cell/T cell receptor gene rearrangements, and comprehensive gene mutations by liquid biopsy using droplet digital PCR and next-generation sequencers. In order to verify the accuracy and efficacy of this method in clinical practice, we have started a new prospective multicenter clinical study, LILY4 STUDY (UMIN000040061).

研究分野：Hematology

キーワード：Liquid biopsy Oncology cell free DNA Lymphoma

## 1. 研究開始当初の背景

血液悪性腫瘍の診断には、組織の「生検」による病理診断により、リンパ節などの組織における悪性リンパ腫細胞の増殖を同定することが必須である。そのため、血管内を主に増殖していく「血管内大細胞型リンパ腫(IVLBCL)」の様な、一部の「生検困難なリンパ腫に関しては診断確定ができず、治療介入が遅れてしまうことが、臨床ではしばしば経験される。

「不明熱」は、古典的には3週間以上継続する入院精査しても診断がつかない病態と定義される。疫学的な報告は少ないが、「不明熱」患者は自己免疫性疾患、感染症、悪性リンパ腫が鑑別の上位であるとされ、CTを代表する画像診断や各種の自己抗体の測定が可能となった現在においても、診断不可能な症例は数多く存在し、むしろ診断技術が向上したがゆえに、「不明熱」と診断された患者では最終診断が未確定で死亡する症例割合は増加している(Bleeker-Rovers CP et al. *Medicine*. 2007;86(1):26)。これは、現在行われている画像診断、血液検査、病理診断の限界を示唆しており、より高感度・高特異度の不明熱の鑑別に有効な診断手法の確立が必要とされていた。

一方で、次世代シーケンサー(NGS)の発達により、悪性リンパ腫の分子病態が明らかになるとともに、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫の特殊病型であるIVLBCLにおいても、その遺伝学的背景が明らかになってきた。我々の予備研究においても、IVLBCLにおいては、MYD88及び、CD79bの変異が明確に多いことが分かっていた。さらに、この変異はそれぞれ、L265P及び、Y196の点突然変異である事から、droplet digital PCR(ddPCR)による高感度かつ、安価な解析により検討可能であると考えられた。また、腫瘍性の証明においては、他の固形腫瘍と異なり、悪性リンパ腫においては、B細胞受容体及びT細胞受容体の再構成を証明することが極めて重要とされている。通常診療においては、フローサイトメトリーや、PCR法、サザンブロットング法などが用いられているが、それぞれ感度の問題や非特異的な反応が多いという問題が存在していた。これらの問題をNGSを用いることで、より高感度・高特異度にて解決できる可能性を考えた。この方法は、急性リンパ性白血病においては、腫瘍細胞を対象としては確立していたが、cfDNAを対象としては検討されたいなかったため、この方法がcfDNAにおいても有効に働くかを検討する必要があった。

## 2. 研究の目的

(1)不明熱患者から、血液を分析することによってリンパ腫の診断を行うこと、もしくはリンパ腫の補助診断となる方法を確立する事。

(2)非腫瘍の腫瘍由来の遺伝子が混入している検体(血液・髄液等)で、今まで以上に高感度、高特異度で検討可能な方法を確立する事。

## 3. 研究の方法

「リンパ腫の事前確立が高い不明熱患者」の血漿中の細胞遊離DNA(cfDNA)から、B細胞リンパ腫のクローナリティを証明することができれば、より低侵襲な早期診断が可能であり、結果的に治療介入が可能となり救命へ結び付くのではないかと考えた。

実際の不明熱患者のcfDNAを用いて、生検困難なリンパ腫患者を鑑別する方法を確立するために、予備実験としてIVLBCLと言われる生検困難なリンパ腫の保存血漿を用いて、高感度、高特異度な検査系を検討した。具体的には、ddPCRを用いて、



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Kanda Y1, Kimura S, Iino M, Fukuda T, Sakaida E, Oyake T, Yamaguchi H, Fujiwara SI, Jo Y, Okamoto A, Fujita H, Takamatsu Y, Saburi Y, Matsumura I, Yamanouchi J, Shiratori S, Gotoh M, Nakamura S, Tamura K	4. 巻 Epub
2. 論文標題 D-Index-Guided Early Antifungal Therapy Versus Empiric Antifungal Therapy for Persistent Febrile Neutropenia: A Randomized Controlled Noninferiority Trial.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Clin Oncol.	6. 最初と最後の頁 Epub
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1200/JCO.19.01916.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Daroontum T, Kohno K, Inaguma Y, Okamoto A, Okamoto M, Kimura Y, Nagahama M, Sakakibara A, Satou A, Nakamura S.	4. 巻 69(1)
2. 論文標題 Epstein-Barr virus (EBV)-positive diffuse large B-cell lymphoma arising in patient with a history of EBV-positive mucocutaneous ulcer and EBV-positive nodal polymorphous B-lymphoproliferative disorder	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Pathol Int.	6. 最初と最後の頁 37-41
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/pin.12738.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 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.	4. 巻 108
2. 論文標題 Rearrangement of VPS13B, a causative gene of Cohen syndrome, in a case of RUNX1-RUNX1T1 leukemia with t(8;12;21).	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International journal of hematology	6. 最初と最後の頁 208-212
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12185-017-2387-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Higuchi H, Yamakawa N, Imadome KI, Yahata T, Kotaki R, Ogata J, Kakizaki M, Fujita K, Lu J, Yokoyama K, Okuyama K, Sato A, Takamatsu M, Kurosaki N, Alba SM, Azhim A, Horie R, Watanabe T, Kitamura T, Ando K, Kashiwagi T, Matsui T, Okamoto A, Handa H, Kuroda M, Nakamura N, Kotani A	4. 巻 131
2. 論文標題 Role of exosomes as a proinflammatory mediator in the development of EBV-associated lymphoma.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Blood	6. 最初と最後の頁 2552-2567
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1182/blood-2017-07-794529	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Daroontum T, Kohno K, Inaguma Y, Okamoto A, Okamoto M, Kimura Y, Nagahama M, Sakakibara A, Satou A, Nakamura S	4. 巻 69
2. 論文標題 Epstein-Barr virus (EBV)-positive diffuse large B-cell lymphoma arising in patient with a history of EBV-positive mucocutaneous ulcer and EBV-positive nodal polymorphous B-lymphoproliferative disorder	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Pathology International	6. 最初と最後の頁 37-41
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/pin.12738	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件(うち招待講演 0件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 岡本晃直, 入山智沙子, 稲熊容子, 岡本昌隆, 富田章裕
2. 発表標題 中枢浸潤リンパ腫において, 髄液中可溶性IL-2Rは上昇する
3. 学会等名 日本リンパ網内系学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 齋藤聡一郎, 入山智沙子, 村手健一郎, 武藤多津郎, 佐藤あかね, 神原彩那, 岡本晃直, 稲熊容子, 岡部麻子, 山田勢至, 浦野誠, 金田典雄, 恵美宜彦, 岡本昌隆, 富田章裕
2. 発表標題 髄液のフローサイトメトリーおよび遺伝子検査が診断に有用であった脊髄B細胞性悪性リンパ腫の一例
3. 学会等名 日本リンパ網内系学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Akinao Okamoto, Yoshinobu Kanda, Shun-ichi Kimura, Tatsuo Oyake, and Kazuo Tamura
2. 発表標題 Detailed Assessment of Blood Culture and Clinical Factors in Febrile Neutropenia Patients with High-Risk Hematological Malignancy in Japan: A Subgroup Analysis of the Cedmic Trial
3. 学会等名 62nd ASH Annual Meeting and Exposition (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------