

令和 4 年 6 月 7 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K16918

研究課題名(和文) 眼内悪性リンパ腫の疾患特異的遺伝子に基づく最適化治療の開発

研究課題名(英文) Establishment of optimized therapy for disease-specific genes of intraocular malignant lymphoma

研究代表者

田岡 和城 (Taoka, Kazuki)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：30529178

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、眼内悪性リンパ腫の眼内液中の ctDNA によるがん補助診断法の開発を行ってきた。我々は、眼内悪性リンパ腫の原因遺伝子を同定し、眼内悪性リンパ腫は主に 4 つの特異的な遺伝子(MYD88, CD79B, X, Y)で 94% (46 例 / 49 例)は網羅された。眼内リンパ腫の検体は、非常に微量のサンプルであるが、微小な ctDNA を、バルブの中で特異的な 4 遺伝子を同時に前増幅させる手法(特許出願済み)によって、疾患特異的な 4 つの遺伝子(MYD88, CD79B, X, Y)が検出することを可能にした。特にCD79Bは、中枢再発のリスクが高く眼内リンパ腫の治療を考えるうえで重要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

眼内悪性リンパ腫は、診断の困難さや、治療の標準化もいまだできていない難治性希少疾患である。研究代表者は、眼内悪性リンパ腫の疾患特異的遺伝子の解析を行い、同定した。さらに、予後不良遺伝子を特定した。また、疾患特異的遺伝子を標的とした医師主導試験を現在、開始している。今後、このような希少疾患においても、診断の標準化、治療薬の開発、治療法の標準化に尽力していきたい。

研究成果の概要(英文)：We have developed a cancer adjuvant diagnostic method using ctDNA in intraocular fluid of intraocular malignant lymphomas. We identified the causative genes of intraocular malignant lymphoma, and 94% (46/49 cases) of intraocular malignant lymphomas were covered by four main specific genes (MYD88, CD79B, X, Y). Although intraocular lymphoma specimens are very small samples, the method of simultaneous pre-amplification of four specific genes in the valve (patent pending) of minute ctDNA made it possible to detect four disease-specific genes (MYD88, CD79B, X, and Y). CD79B is particularly important for the treatment of intraocular lymphoma due to its high risk of central recurrence.

研究分野：悪性リンパ腫

キーワード：眼内悪性リンパ腫 遺伝子

## 1. 研究開始当初の背景

眼内悪性リンパ腫は、脳に高率に再発し、5年生存率30%-40%の眼科疾患の中で最も生命予後の悪い腫瘍性疾患の一つである。いまだ、標準治療も確立されていない。これまで眼内悪性リンパ腫の診断は、組織生検が必須であり、また生検をしても採取検体量の問題から病理診断で確定出来るものは30-50%に過ぎない。したがって、診断そのものが困難であり、診断まで平均1年6月を要している。さらに、治療の反応性の評価においては、再度、生検することは眼に及ぼす侵襲性の問題から困難であった。また、希少疾患であるため、標準治療法も確立しておらず、治療法の確立が求められている。

## 2. 研究の目的

眼内悪性リンパ腫は、難治性の希少疾患であり診断や治療法の開発が進んでいないアンメットニーズの疾患である。これまで眼内悪性リンパ腫の診断は、組織生検が必須であり、また生検をしても採取検体量の問題から診断を確定することが困難である。また、治療反応性をみるのが、眼内所見や眼底写真などの画像で判定を行っているが、寛解や再発の診断がこれまでは困難であった。我々は、これらの問題を解決するために、眼内から採取されたリキッドバイオプシーによる微量な検体から疾患特異的な遺伝子を調べることで、診断や治療反応性のバイオマーカーとなりうることを目標とする。

## 3. 研究の方法

### 1) 硝子体液の検体処理とDNA抽出

眼内悪性リンパ腫と診断された患者\*の硝子体手術により得た硝子体液中に細胞を AllPrep DNA/RNA Micro Kit (QIAGEN, Valencia, CA, USA)を用いてDNA抽出した。

### 2) 変異遺伝子及び解析箇所の選定

本研究では、いくつかの眼内悪性リンパ腫の候補遺伝子(*MYD88*など)及び変異箇所を選定し、4遺伝子9箇所はすべて一塩基置換である。

### 3) プライマー及びプローブ作成

*MYD88* L265P 以外の4遺伝子8箇所のプローブ及びプライマー配列は、Custom TaqMan® Assay Design Tool (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)を用いて合成した。*MYD88* L265P のプローブ及びプライマーは、中枢性悪性リンパ腫の*MYD88* L265P 検出を行った既報と同じ配列を設計した。

### 4) Digital PCR 解析

前増幅し生成したアンプリコンを鋳型として、以下のようにドロップレットを作製後、Digital PCR 解析を行い、蛍光強度を読み取り解析した。

### 5) 臨床経過データと遺伝子変異の関連性を検討し、予後因子となる遺伝子を解析する。

眼内悪性リンパ腫を遺伝子プロファイリングによって分類し、subtype や病理学的特徴との関連、さらにその後の治療反応性、再発率、生命予後などとの関連性を解析する。治療反応性や予

後に関与する遺伝子を解析し同定する。遺伝子プロファイリングによる、層別化治療の基盤を作る。

#### 4 . 研究成果

眼内悪性リンパ腫は、5 年生存率 30%であり、眼疾患の中で最も生命予後の悪い難治性疾患であり、原因も不明であり標準治療は世界的に確立されていないアンメット・メディカル・ニーズの疾患であった。我々は、眼内悪性リンパ腫の眼内液中の ctDNA によるがん補助診断法の開発を行ってきた。我々は、眼内悪性リンパ腫の原因遺伝子を同定し、眼内悪性リンパ腫は主に4 つの特異的な遺伝子(MYD88,CD79B,X,Y)で 94% (46 例 / 49 例) は網羅された。眼内リンパ腫の検体は、非常に微量のサンプルであるが、微小な ctDNA を、バルブの中で特異的な4 遺伝子を同時に増幅させる手法によって、疾患特異的な4 つの遺伝子 (MYD88,CD79B,X,Y)が検出することを可能にした。特に CD79B は、中枢再発のリスクが高く眼内リンパ腫の治療を考えるうえで重要である。BTK 阻害剤は、MYD88、CD79B 遺伝子の下流のシグナルを阻害する。また、BTK 阻害剤は、血液脳関門透過性が良好で治療候補薬であることが分かった。MYD88 および CD79B 遺伝子変異は、Toll 様受容体を介して、ブルトンキナーゼカスケードを活性化させることが分かった。ブルトンキナーゼカスケードの特異的な阻害剤であり、かつ中枢への移行性のより阻害剤として、Bruton 型チロシンキナーゼ阻害剤 (BTK 阻害剤) のチラブルチニブを候補薬剤とした。(特許出願番号 : 62/785732) 現在、原発性眼内悪性リンパ腫に対する ONO-4059 (ブルトンキナーゼ阻害剤) の医師主導による多施設共同第 Ⅱ 相二重盲検比較試験 (2021 年 2 月開始 2025 年 3 月終了) を行っている。眼内悪性リンパ腫の再発抑制を目的とした BTK 阻害薬の医師主導試験を国内の 12 大学病院のオールジャパン体制で行っている。

眼内悪性リンパ腫は、診断の困難さや、治療の標準化もいまだできていない難治性希少疾患である。研究代表者は、眼内悪性リンパ腫の疾患特異的遺伝子の解析を行い、同定した。さらに、予後不良遺伝子を特定した。また、疾患特異的遺伝子を標的とした医師主導試験を現在、開始している。今後、このような希少疾患においても、診断の標準化、治療薬の開発、治療法の標準化に尽力していきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Taoka Kazuki
2. 発表標題 Advantage of multimodality therapy and the effect of gene mutations for vitreoretinal lymphoma
3. 学会等名 血液学会総会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 米国出願番号 62/785732	発明者 2018	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、62/785732	出願年 2018年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔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
---------	---------