

令和 5 年 5 月 24 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07416

研究課題名（和文）再発DLBCLの遺伝子学的解析、同一患者の初発腫瘍と再発腫瘍を比較する

研究課題名（英文）Genetic analysis of initial and recurrent DLBCLs

研究代表者

中村 直哉（Nakamura, Naoya）

東海大学・医学部・教授

研究者番号：50227922

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）：びまん性大細胞型B細胞リンパ腫（DLBCL）の23例、初発時と再発時計46サンプルを用いてIGHを解析し、真のDLBCL再発が9例、真の再発ではない新規DLBCL発生11例、比較できなかったもの3例であった。さらに全サンプルの病理標本（FFPE）からRNAを抽出し、Gene expression profilingを行い、全サンプルの解析、初発と再発で同じB細胞クローンと同定できた9例の解析いずれもVolcano plots法を用い、それぞれに優位に高い遺伝子群があり、同じクローンが再発するときに特徴的な遺伝子発現パターンを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで明らかになっていなかった、再発びまん性大細胞型B細胞リンパ腫（DLBCL）の疑問、初発B細胞クローンが再発するのか、初発とは異なる新たなB細胞クローンが腫瘍化するのか、また、同じクローンで再発する場合、どのようなメカニズムがあるか、に新たな知見を得、DLBCLの腫瘍発生メカニズムの解明がさらに進むものと期待できる。この結果は、再発DLBCLの治療、薬剤の選択、治療方針の決定に大きな影響を及ぼす可能性がある。さらに、DLBCL全体の予後改善をもたらす可能性があり、がん患者さんの予後の改善、QOLの向上を望むことができる。

研究成果の概要（英文）：A total of 23 cases (46 samples including initial and recurrent samples) of Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) were analyzed by molecular techniques. PCR and Sanger sequencing of immunoglobulin heavy chain gene variable region and CDR regions showed 9 cases with same B-cell clone, 11 cases with different clones and 3 cases with undetermined origin. Gene expression profiling (GEP) was analyzed in all samples and showed high expression genes in initial samples and recurrent samples in all cases, respectively. GEP in 9 cases with same clone showed high expression genes in initial samples and recurrent samples, respectively. Those genes were specific for true recurrent samples of DLBCL. Therefore, we demonstrated important genes in recurrent DLBCL.

研究分野：人体病理学

キーワード：DLBCL IGH Gene expression

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫 (Diffuse large B-cell lymphoma, DLBCL) は悪性リンパ腫のおよそ 40%を占める最も頻度の高いリンパ腫亜型である。診断と治療方法は確立されており、摘出された腫大リンパ節もしくは腫瘍、病変部位に病理組織学的に大型リンパ球のびまん性増生があり、免疫組織化学もしくは Flowcytometry で CD20 などの B 細胞マーカーの陽性像を確認する。治療は分子標的薬である抗 CD20 抗体薬と多剤併用化学療法を組み合わせた R-CHOP 療法を第 1 選択とすることが多い。初回治療で多くの患者さんが緩解を得、5 年生存率は 70%程度とされ、治療成績が格段に向上したリンパ腫の亜型といえる。一方、DLBCL のほぼ 1/3 は再発を経験し、難治となる場合もある。初発 DLBCL の遺伝子学的性状は詳しく解析されているが、再発 DLBCL の遺伝子学的検討報告はほとんどない。さらに、再発 DLBCL が初発 DLBCL と同じ B 細胞クローン (真の再発) かどうか、ほとんど調べられていない。

一方、近年の科学技術の急速な発展により、病理検体 (ホルマリン固定パラフィン包埋材料、formalin-fixed paraffin-embedded tissue, FFPE) から網羅的遺伝子解析が可能になり、次世代シーケンサーによるゲノム解析 (targeted NGS)、遺伝子増幅と欠失 (copy number alteration)、遺伝子発現ファイリング (gene expression profiling) ができるようになった。

2. 研究の目的

DLBCL の再発に関するこれまでに明らかにされていない学術的疑問を明らかにする。

- (1) 治療修飾を受けた DLBCL の再発において、再発 DLBCL は初発 DLBCL と同じ B 細胞クローンなのか
- (2) 同じ B 細胞クローンに由来する場合、遺伝子異常と遺伝子発現パターンは同じなのか、変化しているのか
- (3) 一方異なる場合、再発 DLBCL の遺伝子異常と発現パターンは通常の初発 DLBCL と同じなのか

3. 研究の方法

症例募集：東海大学病院において DLBCL と診断され患者さんの中から、初発時と再発時、複数のリンパ節もしくは腫瘍が生検された、23 例 46 サンプルを抽出した。

臨床的解析：臨床情報について、初発時及び再発時の年齢、性別、再発までの期間、治療内容、臨床病期、LDH、IL-2R などを調べる。

病理組織学的解析：DLBCL の形態、免疫形質 (CD3, CD5, CD10, CD20, BCL2, BCL6, MUM1, MIB1, MYC, EBER) の結果を確認する。不足しているデータについて免疫組織化学を行う。

免疫グロブリン遺伝子解析：初発、再発 DLBCL の FFPE から抽出した DNA を用いて Immunoglobulin heavy chain gene (IGH) を PCR 増幅、Sanger sequence を行い、B 細胞クローンの比較を行う。

FISH 解析：MYC, BCL2, BCL6 それぞれの break apart probe を用い、FFPE で FISH を行い、MYC, BCL2, BCL6 遺伝子再構成の有無を解析する。

Gene expression profiling 解析：nCounter system により、遺伝子発現を網羅的に解析する。

4. 研究成果

(1) IGH-PCR の結果

IGH 可変領域 (IGHV) および IGH-CDR3 領域の解析を行い、経時的に行われた DLBCL の B 細胞クローンが同一であるもの (真の DLBCL 再発) 9 例、異なるもの (真の再発ではない新規 DLBCL 発生) 11 例、比較できなかったもの 3 例であった。

(2) nCounter の結果

全サンプルの FFPE から RNA を抽出し、730 遺伝子を網羅する nCounter pan Cancer immune profiling panel を用いて、Gene expression profiling (GEP) を行った。

<全サンプルの解析>

Volcano plots 法を用いると、初発サンプルで、ATG16L1, ATM, MAP2K2, TGFB1, CCR7, CD5, TCF7, IKBKG, PIN1, IRF3 が有意に高く、再発サンプルで、CCL27 (Chemokines and receptors), YTHDF2 (Humoral immune response), MAPK8 (Innate immune response), PSMB7 (Antigen processing and presentation) が優位に高かった (図 1)。

<初発と再発で同じ B 細胞クローンと同定できた 9 例の解析>

初発サンプルで、ATM (Cell Type specific, DNA damage checkpoint, Induction of apoptosis), BIRC5 (G2 phase and G2/M transition) が優位に高く、再発サンプルで、ATF2 (Innate immune response) を始めとする 14 遺伝子が高かった。全サンプル解析と共通の遺伝子はなく、同じクローンが再発するときに特徴的な遺伝子発現パターンを見出したと考える (図 2)。

図 1 ALL CASES

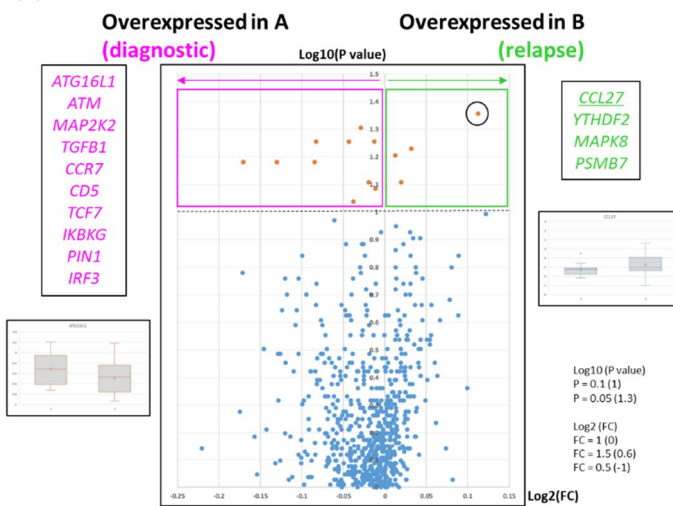
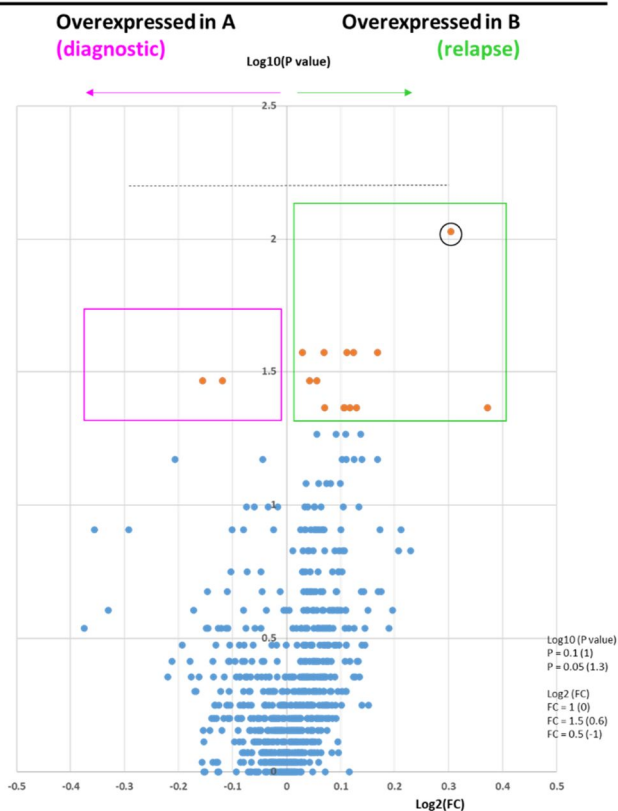


図 2 CLONAL cases (n = 9)



(3) FISHの結果

MYC, BCL2, BCL6 split signal probe を用い、全サンプルに FISH を行ったところ、High grade B-cell lymphoma with MYC/BCL2/BCL6-rearrangements に相当するような、複数の遺伝子再構成を示すサンプルはなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------