

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24390347

研究課題名(和文) 脳悪性リンパ腫の全エクソンシーケンスを応用したゲノム創薬・バイオマーカー研究

研究課題名(英文) Development of molecular targeted therapy for primary central nervous system lymphomas

研究代表者

山中 龍也 (Ryuya, YAMANAKA)

京都府立医科大学・医学部・教授

研究者番号：20323991

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,000,000円

研究成果の概要(和文)：脳リンパ腫(PCNSL)35例について腫瘍組織と末梢血リンパ球を用いて、全エクソンシーケンスにて遺伝子変異を検討した。変異遺伝子はさらに90症例を用いてターゲットシーケンスを行った。(1) PCNSLは1症例あたり平均172個のnon-synonymous遺伝子変異を有し、全身性ABC-type DLBCLと比し均質的な遺伝子異常を示した。(2) ほとんどのPCNSLはNF- κ B/Toll-like receptor/BCR activityに関連する遺伝子変異を有していた。(3) 多くのPCNSLに免疫系の遺伝子異常が認められた。

研究成果の概要(英文)：To delineate the genetic basis of PCNSL pathogenesis, we performed a comprehensive genetic study. We first analyzed paired tumor/normal DNA from 35 PCNSL cases by whole-exome sequencing (WES). Significantly mutated genes identified by WES and previously known mutational targets in PCNSL and systemic DLBCL were further screened for mutations using SureSelect-based targeted deep sequencing (Agilent) in an extended cohort of PCNSL cases (N = 90). Copy number alterations (CNAs) have been also investigated using SNP array-karyotyping (N = 54).

WES, SNP array karyotyping and follow-up targeted sequencing of a large cohort of PCNSL cases revealed the genetic landscape of PCNSL, which were more homogeneous than that of systemic DLBCL, and thought to be involved in activation of constitutive NF- κ B/TLR/BCR signaling, escape from immunosurveillance, as well as highly frequent SHMs.

研究分野：脳神経外科学、臨床腫瘍学

キーワード：脳リンパ腫 ゲノム解析 エクソーム解析 分子標的療法

1. 研究開始当初の背景

中枢神経系原発悪性リンパ腫 (PCNSL) は中枢神経系に原発する節外性非ホジキン型リンパ腫で、多くは B 細胞リンパ腫である。PCNSL はあらゆる年齢層に発生するが、50-60 歳代に好発し、その頻度は最近増加している。本邦では現在、High dose Methotrexate (HD-MTX) 3.5 g/m² 化学療法 3 コース後、全脳放射線治療 (30-40 Gy) が広く行われている。その 5 年生存率は約 30%、生存期間中央値は 33-39.5 か月とされている。

本治療法の問題点として整理してみると、

- (1) 生存率の向上が見られたが、全身性非ホジキン病と比べ治療成績は不良である。
- (2) 治療効果を予測するバイオマーカーがないため、画一的な治療が行われている。
- (3) 多くは再発し治療抵抗性となり、新たな治療スケジュールの開発が待たれている。

より有効で、副作用の少ない治療法を開発するためには、PCNSL に関する分子遺伝学的研究の進展が不可欠である。しかしながら、PCNSL は頻度の高い腫瘍ではなく、また生検術が行われるため十分量の臨床サンプルが得られないこともあり、臨床サンプルを用いたゲノム解析研究は国際的にも著しく遅れているのが現状である。我々はゲノム解析に必要なサンプル量を収集してきた。その結果、凍結臨床サンプル 50 例から精製した DNA, RNA を用いたゲノム解析を進めることができた。本研究はこの成果を基盤とした研究を進展させるものである。

2. 研究の目的

- (1) MTX に対する耐性細胞株を樹立し、薬剤耐性の分子機構について検討する。耐性克服による治療法の確立に向けた研究を展開する。
- (2) 腫瘍組織と末梢血リンパ球を用い、遺伝子変異・再構成の異常を次世代シーケンサーを用いて全エクソンシーケンスを行い検討する。

(3) SNP アレイデータ等を統合したシステムバイオロジーの観点から統合的に解析することにより、PCNSL の情報伝達系の異常を系統的に明らかにする。

(4) 以上から治療標的となりうる遺伝子を選択し、分子標的薬剤・抗体・アプタマー・microRNA などの創薬に向けた研究を展開する。

3. 研究の方法

35 例について腫瘍組織と末梢血リンパ球を用いて、遺伝子変異・再構成の異常について、全エクソンシーケンスを illumina HiSeq2000 次世代シーケンサーを用いて検討した。変異遺伝子についてはさらに 90 症例を用いてターゲットシーケンスを行った。さらに、54 例については SNP アレイを用いた解析を施行した。

また、脳リンパ腫細胞株 HKBML と TK 細胞を用いて MTX 共存下で 6 か月培養することにより、MTX 耐性細胞株を樹立した。

4. 研究成果

(1) PCNSL は 1 症例あたり平均 172 個の non-synonymous 遺伝子変異を有し、全身性 ABC-type DLBCL に似たパターンであるが、より均質的な遺伝子異常を示した。

(2) ほとんどの PCNSL は NF- κ B/Toll-like receptor (TLR)/BCR activity に関連する遺伝子変異、コピー数異常を有していた。

(3) 多くの PCNSL に免疫系の遺伝子異常が認められた。全身性の ABC-type DLBCL と比し、HLA class I 遺伝子 (*HLA-B*, *HLA-A*) に高頻度の変異が認められた。PCNSL の発症に免疫監視機構からの逃避の重要性を示唆する所見である。

(4) histone/chromatin 制御に関連する遺伝子変異、B 細胞分化に関連する遺伝子変異、G protein/RHO signaling に関連する遺伝子変異を認めた。

(5) 細胞増殖・細胞死・B 細胞分化に関与

する遺伝子に non-immunoglobulin gene somatic hypermutations (SHMs)を認めた。
(6) MTX 耐性細胞株の遺伝子発現については今後の解析の予定である。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 11 件)

1. Yamanaka R, Morii K, Shinbo Y, Sano M, Homma J, Tsuchiya N, Yajima N, Tsukamoto Y, Ogura R, Natsumeda M, Aoki H, Akiyama K, Saitoh T, Tamura T, Hondoh H, Kawaguchi A, Takahashi H, and Fujii Y : Late relapse of primary central nervous system lymphoma. *Leukemia Lymphoma* (In press) (査読有)
2. Yamanaka R, Hayano A: Secondary glioma following acute lymphocytic leukemia: Therapeutic implications. *Neurosurg Rev* 2016 May 10. [Epub ahead of print] (査読有)
3. Nakajima S, Morii K, Takahashi H, Fujii Y, Yamanaka R: Prognostic significance of S-phase fractions in peritumoral invading zone analyzed by laser scanning cytometry in patients with high-grade glioma (preliminary study). *ONCOLOGY LETTERS* 11:2106-2110,2016. (査読有)
4. Hasegawa M, Hayano A, Kawaguchi A and Yamanaka R: Assessment of autonomic nervous system function in nursing students using an autonomic reflex orthostatic test by heart rate spectral analysis. *Biomedical Reports* 3:831-834,2015. (査読有)
5. Koyama-Nasu R, Hayashi T, Nasu-Nishimura Y, Akiyama T and Yamanaka R: Thr160 of Axin1 is critical for the formation and function of the β -catenin destruction complex. *Biochemical biophysical Res Comm* 459(3):411-415, 2015. (査読有)
6. Yamanaka R, Hayano A: Experiences and

prospective expectations for glioma immunotherapeutic approaches. In Lois A. Lampson(ed.), *Immunotherapy for tumors in the brain: insights from-and for-other tumor sites*. *Front Oncol.* 4:355, 2014. (査読有)

7. Iwadate Y, Suganami A, Ikegami S, Shinozaki N, Matsutani T, Tamura Y, Saeki N, Yamanaka R: Non-deep-seated primary CNS lymphoma - therapeutic responses and a molecular signature *J Neurooncol* 117(2):261-268, 2014. (査読有)
8. Kon T, Natsumeda M, Takahashi H, Taki T, Fujii Y, Yamanaka R: Radiation-Induced Glioblastoma Following Radiotherapy for Pituitary Adenomas: Marked Response to Chemotherapy. *J Neurol Neurophysiol* 4:155,2013.doi:10.4172/2155-9562.1000155. (査読有)
9. Takahashi R, Ishibashi Y, Hiraoka K, Matsueda S, Kawano K, Kawahara A, Kage M, Ohshima K, Yamanaka R, Shichijo S, Shirouzu K, Itoh K, Sasada T. Phase II study of personalized peptide vaccination for refractory bone and soft tissue sarcoma patients. *Cancer Sci* 104(10):1285-1294, 2013. (査読有)
10. Kawaguchi A, Yajima N, Tsuchiya N, Homma J, Sano M, Natsumeda M, Takahashi H, Fujii Y, Kakuma T, Yamanaka R: Gene expression signature-based prognostic risk score in patients with glioblastoma. *Cancer Sci* 104(9):1205-1210,2013. (査読有)
11. Kawaguchi A, Iwadate Y, Komohara Y, Sano M, Kajiwara K, Yajima N, Tsuchiya N, Homma J, Aoki H, Kobayashi T, Sakai Y, Hondoh

H, Fujii Y, Kakuma T, Yamanaka R: Gene expression signature-based prognostic risk score in patients with primary central nervous system lymphoma. Clin Cancer Res 18(20):5672-5681,2012. (査読有)

12. Kawaguchi A, Yajima N, Komohara Y, Aoki H, Tsuchiya N, Homma J, Sano M, Natsumeda M, Uzuka T, Saitoh A, Takahashi H, Sakai Y, Takahashi H, Fujii Y, Kakuma T, Yamanaka R: Identification and Validation of a Gene Expression Signature That Predicts Outcome in Malignant Glioma Patients. Int J Oncol 40(3):721-730,2012. doi: 10.3892/ijo.2011.1240. Epub 2011 Oct 21. (査読有)

〔学会発表〕(計 10 件)

1. Yoshida K, Nakamoto-Matsubara R, Chiba K, Okuno Y, Kakiuchi N, Shiraishi Y, Sato Y, Suzuki H, Yoshizato T, Shiozawa Y, Keisuke Kataoka K, Ueno H, Takeda J, Nagata Y, Tanaka H, Iwadate Y, Hondoh H, Fukai J, Kajiwara K, Ideguchi M, Komohara Y, Fujii Y, Kohriyama S, Nitta M, Muragaki Y, Sakata-Yanagimoto M, Suzuki S, Shiina T, Miyano S, Chiba S, Yamanaka R and Ogawa S. Genetic Basis of Primary Central Nervous System Lymphoma. 57th ASH Annual Meeting and Exposition. Orlando, FL, December 5-8, 2015.

2. 田村沙織, 光木幸子, 山中龍也, 阪口晃一, 黒星晴夫, 中西正芳, 栗生宜明, 村山康利: 外来化学療法を受けるがん患者の就労の有無による気がかりの相違, 第 53 回日本癌治療学会学術集会, 京都, 10 月 29 日-31 日, 2015.

3. Yoshida K, Nakamoto-Matsubara R, Chiba K, Kakiuchi N, Okuno Y, Shiraishi Y, Sato Y, Kataoka K, Nagata Y, Sanada M, Tanaka H, Iwadate Y, Hondoh H, Fukai J, Kajiwara K, Fujii Y, Sakata-Yanagimoto M, Miyano S,

Chiba S, Yamanaka R, Ogawa S: Genetic basis of primary central nervous system lymphoma. 13-ICML - 13th INTERNATIONAL CONFERENCE ON MALIGNANT LYMPHOMA, Lugano, Switzerland, June 17-20, 2015.

4. 田村裕, 菅波晃子, 池上史郎, 篠崎夏樹, 松谷智郎, 佐伯直勝, 山中龍也, 岩立康男: 中枢神経原発悪性リンパ腫の予後に関与するマイクロRNAの探索, 第73回日本癌学会学術集会, 横浜, 9月25日-27日, 2014.

5. 山中龍也, 川口淳, 岩立康男, 菰原義弘, 梶原浩司, 藤井幸彦: 中枢神経原発悪性リンパ腫患者の予後予測方法の探索, 第73回日本癌学会学術集会, 横浜, 9月25日-27日, 2014.

6. 山中龍也, 川口淳, 岩立康男, 菰原義弘, 梶原浩司, 藤井幸彦: 中枢神経原発悪性リンパ腫患者の予後予測方法の探索, 第 12 回日本臨床腫瘍学会学術集会, 福岡, 7月17日-19日, 2014.

7. 山中龍也, 川口淳, 藤井幸彦, 角間辰行: 悪性星細胞腫瘍患者の予後予測方法の探索, 第 72 回日本癌学会学術集会, 横浜, 10 月 3 日-5 日, 2013.

8. 山中龍也, 川口淳, 藤井幸彦, 角間辰行: 悪性星細胞腫瘍患者の予後予測方法の探索, 第 11 回日本臨床腫瘍学会学術集会, 仙台, 8月29日-31日, 2013.

9. 山中龍也, 楠本華織, 川口淳, 青木洋, 藤井幸彦: 悪性神経膠腫患者の予後を予測する遺伝子群の探索, 第 71 回日本癌学会学術集会, 札幌, 9月19日-21日, 2012.

10. 山中龍也, 川口淳, 角間辰行, 酒井ゆうこ, 藤井幸彦: 悪性神経膠腫患者の予後を予測する遺伝子群の探索, 第 10 回日本臨床腫瘍学会学術集会, 大阪, 7月26日-28日, 2012.

〔図書〕(計 6 件)

1. Kanayama T, Hayano A, Yamanaka R: MICRORNAs REGULATION AND PRIMARY CENTRAL NERVOUS SYSTEM LYMPHOMA. In Yamanaka R (ed.), Primary Central Nervous System Lymphoma (PCNSL): Incidence, Management and Outcomes, Nova

Science Publishers, NY, in press. (査読有)

2. Yamanaka R: SALVAGE THERAPY FOR PRIMARY CENTRAL NERVOUS SYSTEM LYMPHOMA. In Yamanaka R (ed.), Primary Central Nervous System Lymphoma (PCNSL): Incidence, Management and Outcomes, Nova Science Publishers, NY, in press. (査読有)

3. Yamanaka R, Yoshioka S, Fujimoto S, Iwawaki Y: LONG-TERM OUTCOME AND SUPPORTIVE CARE IN PATIENTS WITH PRIMARY CENTRAL NERVOUS SYSTEM LYMPHOMA. In Yamanaka R (ed.), Primary Central Nervous System Lymphoma (PCNSL): Incidence, Management and Outcomes, Nova Science Publishers, NY, in press. (査読有)

4. Yamanaka R, Hayano A: Radiation-induced glioma., pp 129-141, In Terry Lichtor (ed.), Molecular Considerations and Evolving Surgical Management Issues in the Treatment of Patients with a Brain Tumor, INTECH, 2015. (査読有)

5. Yamanaka R: Primary Central Nervous System Lymphoma- Recent advance on clinical research. pp 461-470, In Terry Lichtor (ed.), Brain Tumors. INTECH, 2013. (査読有)

6. Yamanaka R, Kajiwar K: Dendritic cell vaccine. pp 187-200. In Yamanaka R (ed.), Glioma: Immunotherapeutic approaches. Landes Bioscience, Austin, Texas, 2012. (査読有)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

1. 発明の名称; 悪性神経膠腫 Grade4 患者の予後予測方法及びキット

出願: 平成 25 年 6 月 13 日

特願 2013 - 124686

発明者; 山中龍也, 藤井幸彦, 角間辰之, 川口淳

権利者: 新潟大学, 久留米大学, 京都府立医

科大学

取得状況 (計 2 件)

1. 発明の名称; HLA-A24 分子結合性 KIF 由来ペプチド.

特許第 5065273 号

登録日平成 24 年 8 月 17 日

発明者; 伊東恭悟, 山中龍也, 原田 守

権利者: 久留米大学

2. 発明の名称; 医薬組成物

特許第 5158577 号

登録日平成 24 年 12 月 21 日

発明者: 山中龍也, 土屋尚人, 池中的一裕

権利者: 新潟大学, 生理学研究所

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.f.kpu-m.ac.jp/c/kouza/igaku/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山中 龍也 (Ryuya YAMANAKA)

京都府立医科大学・医学部・教授

研究者番号: 20323991

(2) 研究分担者

池中 一裕 (Kazuhiro IKENAKA)

生理学研究所・分子神経生理部門・教授

研究者番号: 00144527

川口 淳 (Atsush KAWAGUCHI)

佐賀大学・医学部・教授

研究者番号: 6038919

早野 あづさ (Azusa HAYANO)

京都府立医科大学・医学研究科・博士研究員

員

研究者番号: 10379018