

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 27 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24790341

研究課題名(和文) 中枢神経原発悪性リンパ腫の生物学的特性の解明と治療効果予測因子の同定

研究課題名(英文) Identification of biological characterization and predictive factors for therapeutic effect in primary diffuse large B-cell lymphoma of the central nervous system

研究代表者

畑中 佳奈子 (Kanakano, Hatanaka)

北海道大学・大学病院・助教

研究者番号：10399834

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、大量メソトレキセート/放射線併用療法をうけた中枢神経原発大細胞性B細胞性リンパ腫を対象とし、MGMT、CDKN2A、DAPK1、LINE1のプロモーター領域のメチル化状態を検討し臨床病理学的検討を行った。各遺伝子のメチル化割合はパイロシーケンス法により解析し、割合の中央値をカットオフとして2群化し、統計解析を行い、以下の点が明らかとなった：1) LINE1およびDAPK1の低メチル化は、生存期間の延長と関連していた。2) 治療効果との関連性では、CDKN2A及びDAPK1の低メチル化群の治療奏効率が高かった一方、LINE1とMGMTのメチル化状態では奏効率に差は認められなかった。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the methylation status of MGMT, CDKN2A, DAPK1 and LINE1 promoters, and the association with clinicopathological features, response to treatment and clinical outcome in primary diffuse large B-cell lymphoma of the central nervous system (PCNS-DLBCL) treated with high-dose methotrexate plus radiation therapy (HD-MTX + RT). Pyrosequencing was used to determine methylation rate of these genes, and statistical analysis was performed in groups dichotomized by median of these rates. We demonstrated that 1) LINE1 and DAPK1 hypomethylation could be useful predictors of favorable survival in patients with PCNS-DLBCL treated with HD-MTX+RT. 2) CDKN2A and DAPK1 hypomethylation may predict clinical response to HD-MTX treatment prior to RT, while there was no association between response to the treatment and methylation status of LINE1 and MGMT.

研究分野：臨床病理

キーワード：中枢神経 悪性リンパ腫

1. 研究開始当初の背景

中枢神経原発悪性リンパ腫は中枢神経に発生する悪性腫瘍の凡そ6%を占め、その組織亜型としてはびまん性大細胞性B細胞リンパ腫が大半を占める。もともと脳はリンパ系組織ではなく、中枢神経での悪性リンパ腫の発生源地に関しても未だ確立した見解はない。治療法の標準化は遅れているが、現在のところ、化学療法が第一選択であり、その後放射線療法を加えることも多い。この場合の生存期間の中央値は3年程度である。

中枢神経以外のびまん性大細胞性B細胞リンパ腫においては、臨床病期に加え、予後や治療効果予測に関する様々な研究が進んでいる。これらびまん性大細胞性B細胞リンパ腫は非ホジキンリンパ腫の30~40%を占める。急速に進行するリンパ腫ではあるが、化学療法に対する反応性は良好で、早期に適切な治療を行うことにより約半数は治癒可能となる。さらに近年、リツキマシブの登場により、完全奏効率や全生存期間の向上が認められている。

一方、中枢神経原発びまん性大細胞性B細胞リンパ腫は、症例集積が困難なため、その病態に関する研究はなかなか進まないのが現状である。治療においても脳血管閉塞による影響により、抗体治療薬であるリツキマシブや脳血管閉塞を通過しない薬剤を含む化学療法では有効性が認められないことが報告されてきており、中枢神経以外のびまん性大細胞性B細胞リンパ腫と全く異なる治療選択が必要とされる。放射線単独療法では、初期の治療効果はよいものの、長期的には再発率が高く長期生存が期待できない状況となっていた。こうした中、現在では脳血管閉塞を通過するメソトレキセートの大量化学療法が行われ、その後に放射線療法による全脳照射が比較的よい成績を上げている。しかし全脳への放射線療法は認知症など治療関連神経毒性の問題もあり、高齢者には放射線療法は施行しにくく、生存期間向上や治療による神経毒性の軽減が治療の課題となっている。

2. 研究の目的

本研究では中枢神経という特殊な部位に生じる悪性リンパ腫に着目し、(1)その生物学的特性を探り、(2)臨床病理学的な検討を

加えて予後不良因子を見出し、(3)さらに既存の他の中枢神経悪性腫瘍に用いられている治療薬導入を病理学的な観点から検討し、新規治療ターゲット因子を見出すことを目的とした。

3. 研究の方法

中枢神経原発びまん性大細胞性B細胞リンパ腫を対象に検討した。

(1) 免疫組織化学解析

手術により得られた検体のホルマリン固定パラフィン包埋検体を用いて、免疫組織化学を行い、解析を行った。

(2) DNAメチル化解析

ホルマリン固定パラフィン包埋検体からDNA抽出後、パイサルファイト処理を行い、パイロシーケンス法にて *LINE1*, *MGMT*, *CDKN2A*, *DAPK1* 遺伝子のメチル化状態に関して解析を行った。また、*MGMT* に関しては、メチル化特異的PCR法と免疫組織化学にてもメチル化解析を行った。

(3) 統計解析

奏効率の群間比較については、2検定を、生存分析ではKaplan-Meier法およびlogrank検定を用いた単変量解析を用いた。p値は0.05未満をもって有意とした。

4. 研究成果

(1) 結果

28症例に関して解析を行った。解析症例の年齢中央値は62歳であり、男女比は13:15であった。免疫組織化学にて、DLBCLの細分類を行ったところ、胚中心型は5例、活性型(非胚中心型)が23例であった。全例EBウイルスの感染は認めなかった。増殖能を示すKi-67標識率は高く、中央値は95%であった。治療効果との関連性に関する解析では、*LINE1*, *CDKN2A*, *DAPK1*, *MGMT* のメチル化の程度をパイロシーケンス法にて解析後、中央値にて2群に分け、予後や治療効果との関連性に関して解析を行った。*CDKN2A* 及び *DAPK1* の低メチル化群では、大量メソトレキセートと放射線治療の奏効率が共に100%であったのに対し、高メチル化群の奏効率は共に45%と、高メチル化群で優位に低下した(共に $p=0.006$)。生存期間解析では、*DAPK1* の低メチル化群で有意な無増悪生存期間の延長がみられ(logrank, $p=0.027$: 図1)、また *LINE1*

の低メチル化群で有意な全生存期間の延長が認められた (logrank, $p=0.017$: 図2)。

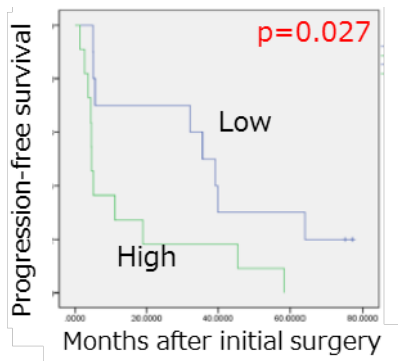


図1 *DAPK1* プロモーター高および低メチル化群における無増悪生存期間のKaplan-Meier 曲線

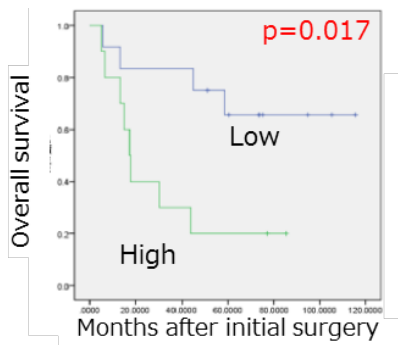


図2 *LINE1* プロモーター高および低メチル化群における全生存期間のKaplan-Meier 曲線

MGMT に関しては、パイロシーケンス法では有意差がみられなかったものの、低メチル化群で全生存期間の延長が見られる傾向が認められた。メチル化特異的 PCR による解析では、低メチル化群で無増悪生存期間と全生存期間の延長が認められ (logrank, $p=0.011$, $p=0.031$) 免疫組織化学でも、*MGMT* 陽性群で全生存期間の延長が認められた (logrank, $p=0.035$)

以上、本結果からは、大量メソトレキセートと放射線治療における効果予測には *DAPK1*, *CDKN2A*, *LINE1* などの遺伝子プロモーターのメチル化状態の把握が有用である可能性が示唆された。

(2) 考察

LINE1 はレトロポゾン的一种であり、通常、*LINE1* は高メチル化状態にあるが、複数の腫瘍でがん化に伴い *LINE1* のメチル化が低下することが報告されている。これはメチル化が低くなることで、*LINE1* の発現が活性化し、

ゲノムの不安定化につながると考えられている。ただし、悪性リンパ腫における *LINE1* の検討報告は未だない。今回の結果である、治療後の中枢神経原発びまん性大細胞性 B 細胞リンパ腫において、低メチル化群での有意な全生存期間の延長が認められた点に関しては、その原因の解明までには至らなかったが、全メチル化状態を反映すると考えられている *LINE1* のメチル化が低下することで、ゲノムが不安定化し、結果として治療に奏効したとも考えられる。

DAPK1 はアポトーシスの促進に関与すると考えられ、また *CDKN2A* はがん抑制遺伝子の一つとして知られている。*DAPK1* や *CDKN2A* は高メチル化が予後不良因子となることが報告されているが、*CDKN2A* に関しては必ずしも予後不良因子ではないとの報告もある。今回の結果は治療後の症例において予後不良因子となる可能性が示唆された。治療後の症例において得られた結果であり、これらのメチル化状態は治療後の予後予測と関連する可能性が考えられる。

MGMT は脳神経膠腫におけるテモゾロマイドの治療効果予測因子として、近年脚光を浴びている。今回の結果では、びまん性大細胞性 B 細胞リンパ腫における *MGMT* の低メチル化群は予後の延長に寄与する可能性が見出された。*LINE1* のメチル化と相関関係が見られており、*MGMT* のメチル化は、全メチル化状態を反映する *LINE1* のメチル化状態の一部を反映している可能性が考えられた。*MGMT* のメチル化解析において、メチル化特異的 PCR や免疫組織化学では、全生存期間もしくは無増悪生存期間で有意差が認められたものの、パイロシーケンス法による検討では、有意差は認められなかったが、これは既報告にもあるように検討方法による違いが反映しているものと考えられた。

以上、本検討は、現在の標準治療をうけた中枢神経原発びまん性大細胞性 B 細胞性リンパ腫において、これらの遺伝子のプロモーター領域のメチル化を検討することにより、治療効果予測因子となりうる可能性を示した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

1. Hatanaka KC、Hatanaka Y、Fujii K、Kobayashi H、Kannno H、Nishihara、Mitsuhashi T、Tanaka S、Matsuno Y、Predictive value of MGMT promoter and LINE-1 methylation status in primary central nervous system diffuse large B-cell lymphoma treated with high-dose MTX and radiotherapy、2015 年 3 月 21 日 - 3 月 27 日、United States and Canadian Academy of Pathology、Hynes Convention Center (Boston, USA)
2. 畑中佳奈子、畑中豊、藤井恭子、小林浩之、菅野宏美、西原広史、田中伸哉、三橋智子、松野吉宏、中枢神経系原発びまん性大細胞型 B 細胞性リンパ腫における DNA メチレーションの意義に関する検討、2014 年 5 月 23 日 - 5 月 24 日、第 32 回日本脳腫瘍病理学会学術集会、あわぎんホール(徳島市)
3. 畑中佳奈子、畑中豊、小林浩之、菅野宏美、西原広史、田中伸哉、三橋智子、松野吉宏、中枢神経系原発びまん性大細胞型 B 細胞性リンパ腫における DNA メチル化に関する検討、第 103 回日本病理学会総会、2014 年 4 月 24 日 - 4 月 26 日、広島国際会議場(広島市)

6. 研究組織

(1)研究代表者

畑中 佳奈子 (KANAKO HATANAKA)
北海道大学・北海道大学病院・助教
研究者番号：10399834

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

松野 吉宏 (YOSHIHIRO MATSUNO)
北海道大学・北海道大学病院・教授
研究者番号：00199829

畑中 豊 (YUTAKA HATANAKA)
北海道大学・北海道大学病院・特任講師
研究者番号：30589924

小林 浩之 (HIROYUKI KOBAYASHI)
北海道大学・大学院医学研究科・講師
研究者番号：70374478