

令和 6 年 6 月 2 4 日現在

機関番号：12602

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20785

研究課題名（和文）網羅的遺伝子解析による原発性眼球内リンパ腫の新規バイオマーカー探索

研究課題名（英文）Search for novel biomarkers of primary vitreoretinal lymphoma by comprehensive genetic analysis

研究代表者

吉藤 康太（Yoshifuji, Kota）

東京医科歯科大学・東京医科歯科大学病院・助教

研究者番号：20830128

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000 円

研究成果の概要（和文）：本研究では、当院で診断および治療を行った36例のPVRL患者の診断時の硝子体検体を用いて網羅的遺伝子解析を行い、PVRLの遺伝子異常を明らかにした。本症例数は既報と比べても最多である。また、網羅的遺伝子異常の結果を用いて中枢神経進展に關与する遺伝子異常を探索し、初めてETV6欠失とPRDM1異常がPVRLの中枢神経進展に關与する遺伝子異常であることを同定した。さらに、これら2つの因子を用いて slow-、intermediate-、rapid-groupに分類し、中枢神経進展リスクモデルの構築に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、36例という既報と比較して最多のPVRL患者の診断時硝子体検体を用いて網羅的遺伝子解析を行い、PVRLの遺伝子異常を明らかにした。また、世界で初めてPVRLの中枢神経進展に關与する遺伝子異常としてETV6欠失とPRDM1異常を同定し、2つの遺伝子異常を用いて中枢神経進展リスクモデルの構築に成功した。今後別コホートでのバリデーションや、これらの遺伝子異常がどのようにPVRLの中枢神経進展に關与しているかの研究が必要であるが、今後これら2つの遺伝子異常をターゲットとした治療や、中枢神経進展リスクモデルを用いた層別化治療がPVRLの予後改善につながる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：We conducted a comprehensive genetic analysis using archived vitreous humor samples of 36 PVRL patients diagnosed and treated at our institution, and revealed the landscape of genetic alterations in PVRL. Notably, there were 36 participants in our study, which is more than previous genetic analyses of PVRL.

Our comprehensive genetic analysis identified ETV6 loss and PRDM1 alterations as candidate genetic risk factors related to CNS progression in PVRL.

Subsequently, we created a new model for CNS progression (slow-, intermediate-, rapid-group) using these two genetic risk factors.

研究分野：造血器腫瘍

キーワード：原発性眼球内リンパ腫 中枢神経進展 網羅的遺伝子解析

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19（共通）

1. 研究開始当初の背景

原発性眼球内リンパ腫（primary vitreoretinal lymphoma: PVRL）は、病変が眼球内に限局している稀なリンパ腫である。30 ヶ月以内に 56-90%と高率に中枢神経領域に伸展することが知られており、予後不良な疾患である。治療は、眼球内腫瘍細胞の根絶、および中枢神経領域への伸展の予防を目的とし、局所療法としてメソトレキセート（MTX）など抗がん剤の眼内注射や放射線治療、全身治療として大量 MTX（HD-MTX）療法を中心とした化学療法が現在行われているが、最適治療は定まっておらず、効果も不十分である。

我々は当施設眼科との共同研究として、PVRL 患者の 71%に *MYD88* L265P 変異を認める他、35%に *CD79B* Y196 変異を認め、*CD79B* Y196 変異を有する PVRL がより早期に中枢神経領域に進展する事を明らかにした(Yonese I, Eur J Haematol, 2019)。また、前方視的研究で MTX 硝子体注射と HD-MTX 療法を組み合わせた治療が、早期における PVRL の中枢神経領域進展を抑制する事を明らかにした(Akiyama H, Cancer Science, 2016、Takase H, Prog Retin Eye Res, 2022)。しかし、これらの治療介入を行っても、依然として最終的に約 7 割の症例で中枢神経領域への進展を来してしまうため、治療および予後予測のさらなる改善のためには、新たなバイオマーカーの探索と確立が望まれる。また、中枢神経領域に進展しない PVRL も存在するが、中枢神経領域進展に寄与している因子は不明である。

近年全身性びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫(DLBCL)では次世代シーケンスによる網羅的遺伝子解析で多数の遺伝子異常が明らかになり、遺伝子異常に基づいた細分類化が試みられ(Chapuy B, Nat Med, 2018、Schmitz R, N Engl J Med, 2018)、今後の新規治療薬適応や予後層別化など臨床応用が期待されている。実際に、一サブタイプであり *MYD88* と *CD79B* の変異を認める MCD/C5 で BTK 阻害薬である Ibrutinib が著効することが示されている(Wilson WH, Cancer Cell, 2021)。これらの背景から、PVRL の検体を多数保有する当施設の利点を活かし、十分なサンプル数を用いた質の高い網羅的遺伝子解析を行うことで、この疾患の新たな治療標的、治療反応や中枢神経進展に寄与する遺伝子異常を探索する、という本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

本研究の目的は、網羅的遺伝子解析によって PVRL で反復して認められる遺伝子異常を明らかにし、新たなバイオマーカーを探索することである。また、中枢神経領域の進展に寄与する遺伝子異常を明らかにする。

3. 研究の方法

【患者】

2012 年 4 月から 2022 年 3 月までに当院で PVRL と診断され治療をし、診断時の硝子体検体が保存されている 36 例を対象とした。PVRL の定義は、病変が眼に限局しており、中枢病変や全身性の病変がない事とした。

【DNA 抽出および網羅的遺伝子解析】

硝子体検体からの DNA 抽出は EZ1 Virus Mini Kit v2.0(QIAGEN, Hilden, Germany)を用いて、脳ホルマリン固定パラフィン包埋(FFPE)検体からの DNA 抽出は QIAamp DNA FFPE Advanced Kit (QIAGEN)を用いて行った。抽出した DNA を用いて、36 例中 2 例は全エクソン

シーケンスを、残りの 34 例はアンブリコンシーケンスを実施した。アンブリコンシーケンスは、悪性リンパ腫で高頻度に異常が認められる 107 遺伝子をターゲットとしたカスタムパネルを作成し行った。シーケンスで得られたデータを、独自に構築したパイプラインを用いて遺伝子変異解析およびコピー数解析を実施した。

【統計解析】

カテゴリー変数解析には Fisher の正確検定を、連続変数解析には Mann-Whitney U 検定を用いた。中枢神経進展の累積発生率は死亡を競合イベントとして計算し、2 群間の差は Gray 検定を用いて解析した。多変量解析に用いた因子は、単変量解析で有意差を示した因子からステップワイズ AIC 法を用いて選択した。多変量解析は Fine and Gray 検定を用いて解析した。統計学的有意性は両側検定に基づいて $p < 0.05$ と定義した。

4. 研究成果

【患者背景】

網羅的遺伝子解析を実施した 36 例の追跡期間中央値は 29 ヶ月(範囲：2-119 ヶ月)であった。病変は、16 例が片側性、20 例が両側性であった。最初の眼症状出現から診断までの期間の中央値は 8 ヶ月(範囲：1-29 ヶ月)であった。細胞診、フローサイトメトリー解析、IGH 遺伝子再構成の陽性率はそれぞれ 42%、74%、80%であった。36 例全例が PVRL 診断後に MTX 硝子体注射を受け、その後 20 例が HD-MTX 療法を受けた。観察期間中 19 例に中枢神経進展が認められた。

【PVRL の遺伝子異常】

診断時の硝子体検体を用いて全エクソンシーケンス($n=2$)およびリンパ腫関連の 107 遺伝子を含むカスタムパネルを用いたアンブリコンシーケンス($n=34$)を行い、遺伝子変異およびコピー数異常を評価した。全エクソンシーケンスの coverage depth は 105.8 と 143.5 であり、アンブリコンシーケンスの平均 coverage depth は 621.8(74.77-1098)であった。1 検体は DNA の質が低く、コピー数異常を評価できなかった。36 検体中 31 検体で少なくとも 1 つ以上の遺伝子異常が検出され、1 症例あたりの遺伝子異常の数の中央値は 12(範囲：0-22)であった(図 1)。次に、主に認められた遺伝子異常を表 2 に示す。遺伝子異常が高頻度に認められた上位 3 遺伝子は、*CDKN2A*(25/36、69%)、*MYD88*(23/36、64%)、*CDKN2B*(21/36、58%)であった。25 例で認められた *CDKN2A* の遺伝子異常のうち、23 例で欠失が認められ、うち 2 例では変異も認められた。残り 2 例は変異のみ認められた。*MYD88* はすべて p.Leu265 の変異であった。*CDKN2B* はすべて欠失であった。その他反復して異常が認められた遺伝子として、*PRDM1*(47%)、*PIM1*(44%)、*ETV6*(42%)、*CD79B*(42%)、*IGLL5*(42%)が認められた。

図 1

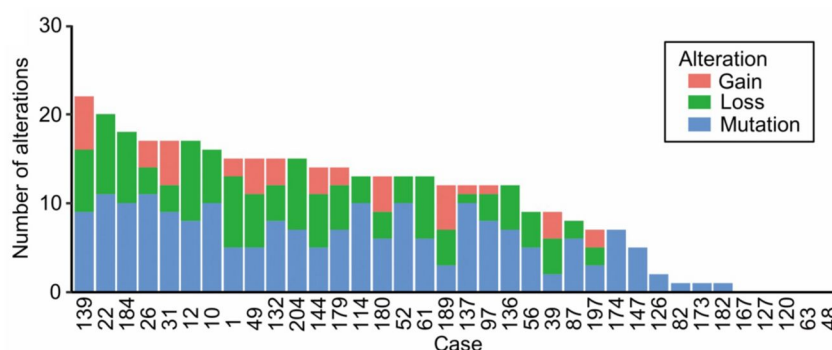
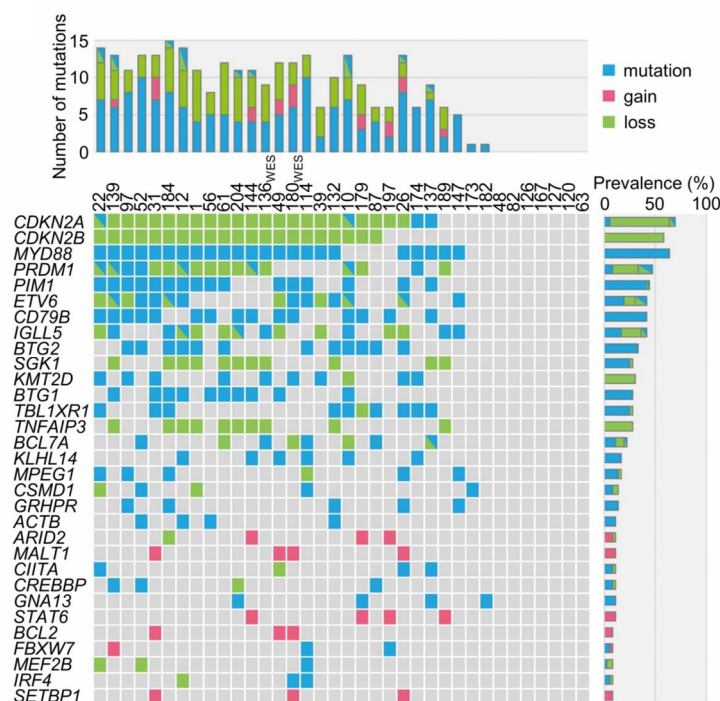


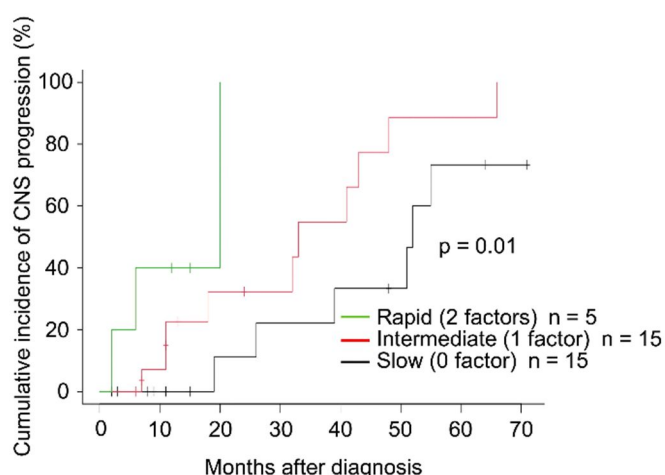
図 2



【PVRL の中枢神経進展に関与する遺伝子異常の同定および中枢神経進展リスクモデルの構築】
網羅的遺伝子解析の結果を元に、PVRL の中枢神経進展に関与する遺伝子異常を探索した。今回の 36 例での中枢神経進展の 5 年累積発生率は 78.3%であった。単変量解析により、*CD79B* 変異、*BTG1* 変異、*ETV6* 欠失、*PRDM1* 異常(変異および欠失)がリスク因子として抽出された。多変量解析に用いる因子は、これら 4 つの因子からステップワイズ AIC 法を用いて選択し、*CD79B* 変異は除外された。多変量解析の結果、*ETV6* 欠失と *PRDM1* 異常が PVRL の中枢神経進展に関与する遺伝子異常として同定された。遺伝子異常の数と中枢神経進展の関連は認めなかった。

図 3

次に、これら 2 つの因子を用いて PVRL の遺伝異常に基づく中枢神経進展リスクモデルを作成し、slow group (0 因子)、intermediate group (1 因子)、rapid group (2 因子)と定義した(図 3)。中枢神経進展までの期間の中央値は、3 群で有意に異なっていた(52 ヶ月 vs.33 ヶ月 vs.20 ヶ月)。

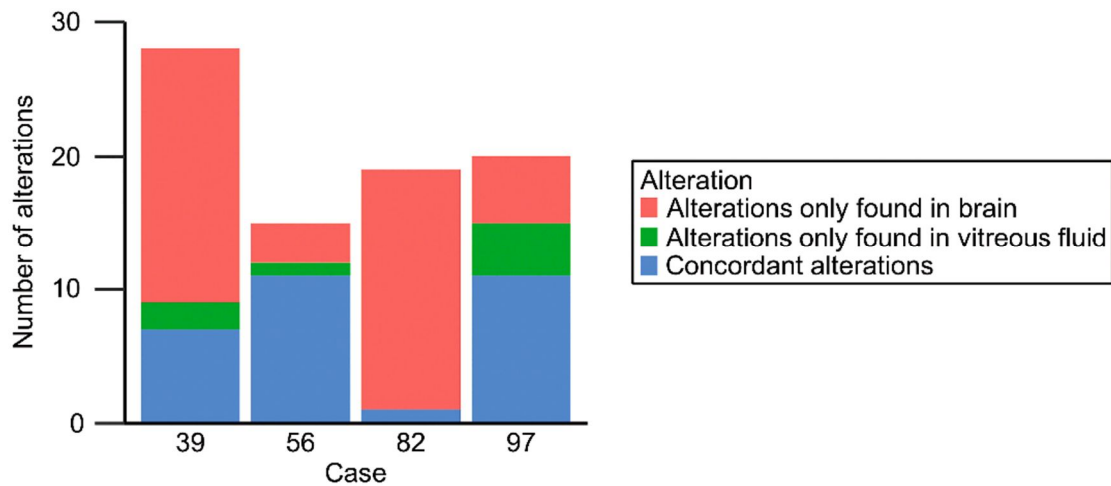


【診断時硝子体検体と中枢神経進展時の脳検体を用いた遺伝子異常の比較】

今回 36 例中 19 例で中枢神経進展を認め、うち 4 例は脳生検が実施された。4 例の患者の上記遺伝子異常に基づく中枢神経進展リスクモデルの group は、slow group 1 例、intermediate group 2 例、rapid group 1 例であった。診断時から中枢神経進展までの期間それぞれ 39 ヶ月(slow group)、11 ヶ月と 32 ヶ月(intermediate group)、20 ヶ月(rapid group)であった。診断時の硝子体検体と中枢神経進展時の脳生検検体の遺伝子異常を比較

するため、脳生検の FFPE 検体から DNA を抽出し、同様のカスタムパネルを用いてアンブリコンシーケンスを行った。4 例全例で少なくとも 1 つ以上の共通する遺伝子異常を認め、さらに脳生検検体では認められたが硝子体検体では認められなかった遺伝子異常を全例で認めた(図 4)。

図 4



以上より、本研究では 36 例という既報と比べて最も多い PVRL 症例で網羅的遺伝子解析を行い、PVRL の遺伝子異常を明らかにした。また、網羅的遺伝子異常の結果を用いて中枢神経進展に関与する遺伝子異常を探索し、初めて *ETV6* 欠失と *PRDM1* 異常が PVRL の中枢神経進展に関与する遺伝子異常であることを同定した。さらに、これら 2 つの因子を用いて遺伝子異常に基づく中枢神経進展リスクモデルの構築に成功した。本研究は、2024 年に *Haematologica* に採択された(Yoshifuji K, *Haematologica*, 2024)。

これら 2 つの遺伝子異常がどのように中枢神経進展に関与しているかや、別コホートでのバリデーションが必要であるが、2 つの遺伝子異常をターゲットとした治療や、中枢神経進展リスクモデルを用いた層別化治療が PVRL の予後改善につながる可能性がある。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1 . 著者名 Yoshifuji Kota, Sadato Daichi, Toya Takashi, Motomura Yotaro, Hiramata Chizuko, Takase Hiroshi, Yamamoto Kouhei, Harada Yuka, Mori Takehiko, Nagao Toshikage	4 . 巻 online ahead of print
2 . 論文標題 Impact of genetic alterations on central nervous system progression of primary vitreoretinal lymphoma	5 . 発行年 2024年
3 . 雑誌名 Haematologica	6 . 最初と最後の頁 online
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3324/haematol.2023.284953	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 Motomura Yotaro, Yoshifuji Kota, Tachibana Takayoshi, Takase Hiroshi, Arai Ayako, Tanaka Keisuke, Okada Keigo, Nogami Ayako, Umezawa Yoshihiro, Sakashita Chizuko, Yamamoto Masahide, Mori Takehiko, Nagao Toshikage	4 . 巻 204
2 . 論文標題 Clinical factors for central nervous system progression and survival in primary vitreoretinal lymphoma	5 . 発行年 2023年
3 . 雑誌名 British Journal of Haematology	6 . 最初と最後の頁 1279 ~ 1287
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/bjh.19266	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔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 吉藤康太、貞任大地、遠矢嵩、本村鷹多朗、高瀬博、原田結花、森毅彦、長尾俊景
2 . 発表標題 原発性眼球内リンパ腫の遺伝子異常は中枢神経浸潤リスクの層別化につながる
3 . 学会等名 第85回日本血液学会学術集会
4 . 発表年 2023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
研究協力者	貞任 大地 (Sadato Daichi)		
研究協力者	遠矢 嵩 (Toya Takashi)		
研究協力者	本村 鷹多朗 (Motomura Yotaro)		
研究協力者	高瀬 博 (Tokase Hiroshi)		
研究協力者	長尾 俊景 (Nagao Toshikage)		

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
---------	---------