

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：24701

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20799

研究課題名（和文）リキッドバイオプシーを用いた濾胞性リンパ腫病勢進展の病態解明

研究課題名（英文）Pathogenesis Elucidation of Follicular Lymphoma Progression Using Liquid Biopsy

研究代表者

堀 善和（Hori, Yoshikazu）

和歌山県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：80963727

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）：濾胞性リンパ腫の形質転換に関連する遺伝子変異をリキッドバイオプシーを用いて検討した。

形質転換FLは腫瘍量で補正しても、抽出されるcfDNA量が有意に多かった。今回の検討では、cfDNA:82.8ngが形質転換を層別化する値として決定された。cfDNAを用いた次世代シーケンサーの解析では、TP53を除いた遺伝子変異割合は既報のFLの病変から抽出される遺伝子と同等であると判断した。一方で、TP53の変異は既報より明らかに多かった。興味深いことに、TP53の変異割合は、形質転換の有無で有意差は認められなかったが、VAFが形質転換FLで有意に多かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

血液検査を行うことで、濾胞性リンパ腫に関連する遺伝子変異が検討できる可能性が示唆された。また、TP53変異の変異割合と、抽出されるcfDNA量を検討することで潜在的に存在する予後不良な形質転換濾胞性リンパ腫の存在を確認できる可能性があることも判明した。また、遺伝子の解析によりTP53の変異割合の拡大が濾胞性リンパ腫の形質転換と重要な関連がある可能性が判明したことから、今後はより検討する症例数を増やしてTP53の変異と形質転換の関係性について検討していきたいと考えている。

研究成果の概要（英文）：We examined gene mutations associated with the transformation of follicular lymphoma (FL) using liquid biopsy. In transformed FL, the amount of cfDNA extracted was significantly higher even after adjusting for tumor burden. In this study, cfDNA at 82.8 ng was determined to be the value that stratified the transformation. Next-generation sequencing analysis using cfDNA revealed that the ratio of gene mutations, excluding TP53, was comparable to the genes extracted from previously reported FL lesions. On the other hand, TP53 mutations were significantly more frequent than previously reported. Interestingly, although there was no significant difference in the ratio of TP53 mutations between transformed and non-transformed cases, the VAF was significantly higher in transformed FL. This fact suggests that TP53 mutation-positive subclones exist in non-biopsied sites of FL from the time of diagnosis and that these subclones may increase as significant clones as transformation occurs.

研究分野：造血器腫瘍学

キーワード：濾胞性リンパ腫 形質転換 リキッドバイオプシー

1. 研究開始当初の背景

濾胞性リンパ腫は最も多い低悪性度リンパ腫である。腫瘍自体の自然史と新規薬剤の開発にともないその予後は20年にせまり延長している。しかし、一部の患者の予後は不良である。特に、診断後（または治療開始後）24ヶ月以内に再発した濾胞性リンパ腫の患者の予後は著しく不良である。濾胞性リンパ腫の診断には、生検による病理診断・悪性度評価が必須である。一方で濾胞性リンパ腫は診断時に半数以上の症例で診断時に進行期ある。従って、濾胞性リンパ腫の全病変を生検することが困難である事が多い。ベンダムスチンで治療され、早期に再発した患者の過半数は再発時に組織学的形質転換をきたしていたことが報告されていることから、我々は、濾胞性リンパ腫の早期再発には、組織学的生検では診断できない潜在的形質転換が関わっている可能性を考えた。この潜在的形質転換を解明するため、本研究ではリキッドバイオプシーを用いることを試みた。リキッドバイオプシーは、末梢血中に遊離する cell-free DNA(以下 cfDNA)中に存在する腫瘍由来の DNA を次世代シーケンサーを用いて検出する技術である。固形腫瘍領域で、幅広く検討されているが造血器腫瘍では今だ、十分な検討が行われていないことから、今回リキッドバイオプシーを用いて濾胞性リンパ腫の形質転換に関連する遺伝子変異を検出することを試みた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、リキッドバイオプシーを用いて潜在的に存在する形質転換濾胞性リンパ腫に関連する遺伝子変異を検出することである。すなわち、濾胞性リンパ腫の末梢血中から濾胞性リンパ腫の形質転換に関わる遺伝子変異を検出することを試みた。

3. 研究の方法

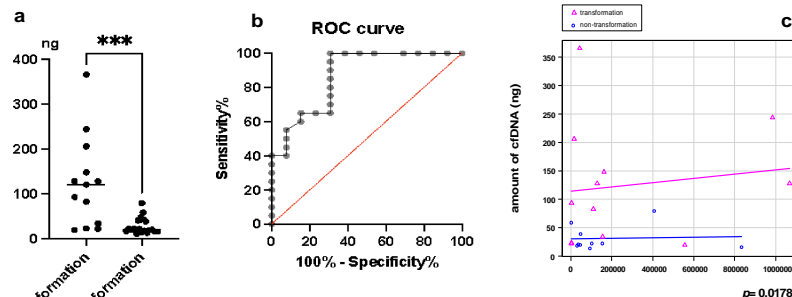
本研究では、同意が得られた患者検体から

- (1) cfDNA を抽出する
- (2) 抽出した cfDNA の濃度を測定する
- (3) cfDNA から次世代シーケンサーを用いて、遺伝子変異を抽出する
- (4) 抽出可能な検体に関して、FFPE から次世代シーケンサーを用いて遺伝子変異を検出する
- (5) 患者情報、cfDNA 情報、FFPE から抽出された遺伝子情報を統合することで cfDNA から検出された遺伝子変異が形質転換を説明可能か検討する

4. 研究成果

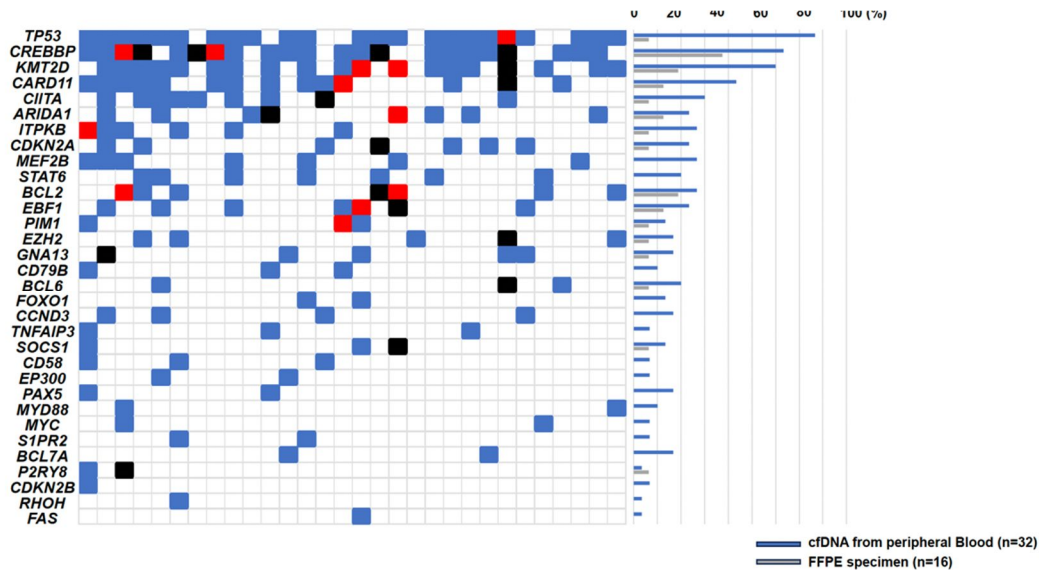
(1) 患者検体採取と cfDNA の抽出

同意の得られた33人の患者から cfDNA を抽出した。8人が組織学的に形質転換 FL で5人が臨床的形質転換 FL であり、13人を形質転換 FL、20人を非形質転換 FL として解析を行った。cfDNA の抽出量の中央値は形質転換 FL:120.8ng、非形質転換 FL:21.1ng であり、有意に形質転換 FL で抽出される cfDNA 量が有意に多かった(右図 a)。ROC 曲線を用いて形質転換 FL と非形質転換 FL を層別化する cfDNA 量を検討した結果、82.8ng が特異度 1.0、感度 0.692 で決定された(右図 b)。cfDNA は腫瘍の増殖速度が早い場合、末梢血中に遊離する腫瘍由来の DNA が多いためと考えられたが、形質転換濾胞性リンパ腫の方が腫瘍量が多いことが影響している可能性も考慮されたため、cfDNA の検体採取時の+/-3ヶ月に PET/CT を撮影されていた22症例に関して Metabolic Tumor Volume(MTV)で cfDNA 量の補正を行った。MTV による腫瘍量を考慮しても、形質転換 FL で有意に cfDNA 量が多かった(右図 c)。そのため、形質転換 FL は有意に非形質転換 FL よりも抽出される cfDNA 量が多いことが判明した。

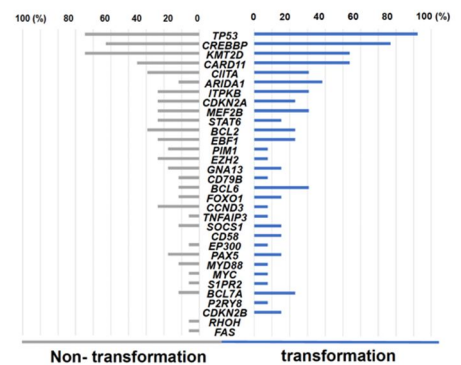


(2) 次世代シーケンサーによる解析

cfDNA でターゲットシーケンスが可能であった30例と、16例のFFPEの遺伝子変異結果を比較した。(下図)。cfDNAでは、CREBBP:60%, KMT2D:60%, CARD11:43%, CIITA:26%, ARID1A:23%, MEF2B:23%, STAT6:23%, ITPKB:20%, CDKN2A:20%, BCL2:20%で検出され、この結果はFLのFFPEで検討されている遺伝子変異割合と違いはなく、FLのcfDNAからも十分な遺伝子変異の検出が可能であることが示唆された。興味深いことに、TP53の変異がcfDNA中の76%の症例で検出されており、こちらは既報のFFPEの検討と比較して非常に変異割合が高いことが判明した(下図)。



FFPE から検出された遺伝子変異割合は、既報との差異は認められなかった。興味深いことに、FFPE から検出された遺伝子変異数より cfDNA から検出された遺伝子変異数が多く、cfDNA の検討により一つの生検病変からでは検討できないサブクローンの病変由来の遺伝子変異を検出できる可能性が示唆された。次に、非形質転換 FL と形質転換 FL とで cfDNA から検出された遺伝子変異割合を比較した。その結果、各遺伝子変異割合に関して、形質転換と非形質転換 FL の比較で有意差は認められなかった(右図)。次に既報と比較して cfDNA によって最も変異が認められた TP53 に関して検討した。

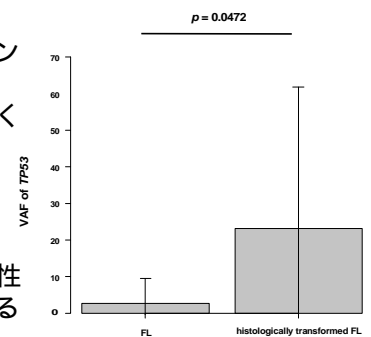
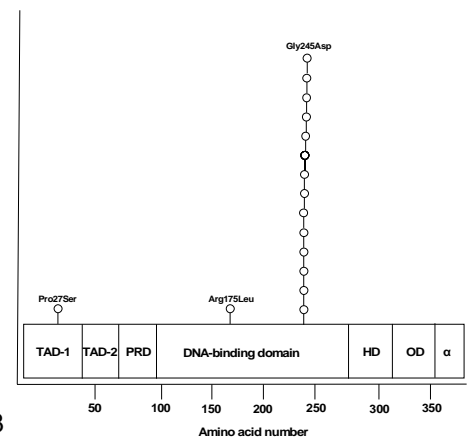


(3) cfDNA による TP53 の変異割合の検討

TP53 のアミノ酸置換位置を検討したところ、cfDNA におけるアミノ酸置換位置には hot spot があることが示唆された。(右図) また、TP53 の Variant Allele Frequency (VAF) を組織学的形質転換 FL と FL の 2 群に分けて検討したところ、組織学的形質転換 FL で有意に TP53 の VAF が増加していることが判明した。FL、臨床的形質転換 FL、組織学的 FL の 3 群に分けて、TP53 の VAF を検討した場合は、VAF の中央値が FL < 臨床的形質転換 FL < 組織学的 FL で増加しているものの統計学的有意差は認められなかった。

(4) 考察

濾胞性リンパ腫の形質転換に関連する遺伝子変異を cfDNA を用いて我々が知る限り世界で初めて検討した。形質転換 FL は腫瘍量で補正しても、抽出される cfDNA 量が有意に多かった。今回の検討では、cfDNA:82.8ng が形質転換を層別化する値として決定された。cfDNA を用いた次世代シーケンサーの解析では、TP53 を除いた遺伝子変異割合は既報の FL の病変から抽出される遺伝子と同等であると判断した。一方で、TP53 の変異は既報より明らかに多かった。興味深いことに、TP53 の変異割合は、形質転換の有無で有意差は認められなかったが、VAF が形質転換 FL で有意に多かった。この事実は、濾胞性リンパ腫は診断直後から TP53 変異陽性のサブクローンが非生検部位に存在し、そのサブクローンが形質転換を来すにつれ、有意クローンとして増加していく可能性が示唆された。近年、FL の病変の検討においても次世代シーケンサーを用いて DEEP sequence を行った場合、FFPE 病変からも既報より多くの TP53 変異が検出されており、TP53 変異陽性の群の治療成績は不良であったことが明らかになっている。我々の検討も加味した場合、TP53 変異は FL の形質転換および治療抵抗性に関して重要な機能を果たしている可能性が考えられた。今後は FL と TP53 の関連に関して、症例数を増やしさらなる検討を加えたいと考えている。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Tane Misato, Kosako Hideki, Hosoi Hiroki, Furuya Yoshiaki, Hori Yoshikazu, Yamashita Yusuke, Murata Shogo, Mushino Toshiki, Sonoki Takashi	4. 巻 119
2. 論文標題 Aortitis after switching short-acting granulocyte colony-stimulating factors in a lymphoma patient with HLA-B52	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 International Journal of Hematology	6. 最初と最後の頁 608～612
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12185-024-03744-w	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 -

1. 著者名 Morimoto Masaya, Yokoya Yuma, Yoshida Kikuaki, Kosako Hideki, Hori Yoshikazu, Mushino Toshiki, Tamura Shinobu, Ito Reiko, Koyamada Ryosuke, Yamashita Takuya, Mori Shinichiro, Mori Nobuyoshi, Ohde Sachiko	4. 巻 16
2. 論文標題 Predictive Model for Occurrence of Febrile Neutropenia after Chemotherapy in Patients with Diffuse Large B-Cell Lymphoma: A Multicenter, Retrospective, Observational Study	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Hematology Reports	6. 最初と最後の頁 76～88
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/hematolrep16010008	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 -

1. 著者名 Hosoi Hiroki, Nakajima Shiho, Tsujimoto Hiroshi, Murata Shogo, Hori Yoshikazu, Kuriyama Kodai, Mushino Toshiki, Matsunami Misako, Nishikawa Akinori, Kounami Shinji, Hanaoka Nobuyoshi, Sonoki Takashi	4. 巻 119
2. 論文標題 Comparison of two apheresis systems for granulocyte collection without hydroxyethyl starch	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Vox Sanguinis	6. 最初と最後の頁 62～69
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/vox.13558	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 -

1. 著者名 Hosoi Hiroki, Tabata Shotaro, Kosako Hideki, Hori Yoshikazu, Okamura Tadashi, Yamashita Yusuke, Fujimoto Kota, Kajioka Daiki, Suzuki Kentaro, Osato Motomi, Yamada Gen, Sonoki Takashi	4. 巻 21
2. 論文標題 IGLL5 controlled by super-enhancer affects cell survival and MYC expression in mature B-cell lymphoma	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Leukemia Research Reports	6. 最初と最後の頁 100451～100451
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.lrr.2024.100451	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 -

1. 著者名 岡村 雅、山下 友佑、蒸野 寿紀、細井 裕樹、園木 孝志、村田 祥吾、宮本 恭兵、太根 美聡、岡部 友香、武田 里美、田畑 翔太朗、小浴 秀樹、堀 善和	4. 巻 65
2. 論文標題 寛解導入療法中に静脈-静脈体外式膜型人工肺によりcapillary leak syndromeから回復した急性骨髄性白血病	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 臨床血液	6. 最初と最後の頁 169～174
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.11406/rinketsu.65.169	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 -

1. 著者名 Hosoi Hiroki, Hori Yoshikazu, Fukutsuka Katsuhiko, Osuga Mitsuo, Koh Yasuhiro, Mushino Toshiki, Hanaoka Nobuyoshi, Yamamoto Nobuyuki, Ohno Hitoshi, Sonoki Takashi	4. 巻 Online ahead of print
2. 論文標題 Detection of the JAK2 V617F Mutation in Urinary Cell-free DNA in Patients with Myeloproliferative Neoplasms.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Internal Medicine	6. 最初と最後の頁 2837-23
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2169/internalmedicine.2837-23	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 -

1. 著者名 Hosoi Hiroki, Okamura Tadashi, Fukai Junya, Hori Yoshikazu, Murata Shogo, Mushino Toshiki, Nakao Naoyuki, Sonoki Takashi	4. 巻 26
2. 論文標題 Comparison of the outcomes of patients with primary central nervous system lymphoma between the neurosurgery and hematology/oncology departments based on the relative dose intensity of methotrexate	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Oncology Letters	6. 最初と最後の頁 eCollection
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/ol.2023.14056	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 -

1. 著者名 細井 裕樹、蒸野 寿紀、村田 祥吾、西川 彰則、宮本 勝一、伊東 秀文、園木 孝志、太根 美聡、小浴 秀樹、榊 絢朱、和田 嘉允、中山 宜昭、弘井 孝幸、堀 善和、山下 友佑	4. 巻 64
2. 論文標題 同種骨髄移植後の慢性移植片対宿主病治療中にEBVおよびCMV再活性化に伴い発症したギラン・バレー症候群	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 臨床血液	6. 最初と最後の頁 1280～1285
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.11406/rinketsu.64.1280	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 堀善和
2．発表標題 血漿中のcfDNA量は、濾胞性リンパ腫の形質転換を予測しうる
3．学会等名 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
--	---------------------------	-----------------------	----

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