

令和 3 年 6 月 8 日現在

機関番号：32610

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K10873

研究課題名(和文) 髄液由来腫瘍核酸解析による中枢神経系悪性リンパ腫に対する非侵襲的新規診断法の開発

研究課題名(英文) Development of non-invasive novel diagnostic methods for primary central nervous system lymphoma using liquid biopsy for nucleic acids derived from cerebrospinal fluid

研究代表者

塩川 芳昭 (Shiokawa, Yoshiaki)

杏林大学・医学部・教授

研究者番号：20245450

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、PCNSLで高頻度に変異がみられるMYD88、CD79B遺伝子変異を髄液中DNAより検出する診断法の確立を目指した。PCNSL 42例の髄液よりDNAを抽出し、digital PCR法を用いたMYD88遺伝子変異検出法の最適な検査条件を確立し、検査精度の検証を行った。至適量の髄液中DNAを用い、Target/Total value 0.25%をカットオフに定めるところ、感度 92.2%、特異度 100%と極めて高い検査精度が示された。CD79B遺伝子変異はqPCR法による診断法の開発を行っている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で定めた検査条件では、髄液中DNAに対するdigital PCR法を用いたMYD88 L265P変異検出法は非常に高い検査精度であった。MYD88変異またはCD79B変異を有する症例はPCNSL全体の約9割に上り(Nakamura T, Neuropathol Appl Neurobiol 42(3): 279-90, 2016)、本検査法の確立によりPCNSL患者の大半で生検術を回避できる可能性がある。迅速かつ低侵襲な確定診断の達成により、生検術困難な患者への適切な治療介入、身体的活動度の維持、QOL向上、ひいては現病の予後改善にも寄与することが期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to establish a diagnostic method for detecting MYD88 and CD79B mutations, which are frequently mutated in PCNSL, from DNA in CSF. DNA was extracted from the CSF of 42 PCNSL cases, the optimal test conditions for the MYD88 mutation detection using digital PCR were established, and the test accuracy was verified. When the Target/Total value of 0.25% was set as the cutoff using the optimum amount of DNA yield in CSF, the sensitivity was 92.2% and the specificity was 100%, showing extremely high test accuracy. For the CD79B mutation, we are developing a diagnostic method by the qPCR.

研究分野：脳神経外科学

キーワード：中枢神経系原発悪性リンパ腫 Liquid biopsy MYD88 CD79B

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

中枢神経系原発悪性リンパ腫 (Primary Central Nervous System Lymphoma: PCNSL) は、高齢者の原発性悪性脳腫瘍において、神経膠芽腫に次ぐ頻度の疾患である。現在の標準治療は、生検術による診断確定後の大量メトトレキサート基盤療法の薬物療法であるが、リンパ腫は他の脳腫瘍と比べ脳の深部に好発することが多く、時に手術難度が高く、診断不可 10%、出血や痙攣などの合併症率 8%、手術死亡率 1%と目的に比して高いリスクを伴う。こういった背景から、より低侵襲に PCNSL の診断を行うべく、髄液中 DNA を用いた液性診断 (liquid biopsy) の開発が強く求められている。PCNSL の特徴的な遺伝子変異のうち、MYD88 L265P 変異 (76-85%)、CD79B 変異 (83%) は特に高頻度であり、これらはいずれも NF- κ B の恒常的活性化をもたらす PCNSL におけるドライバー遺伝子変異である。PCNSL ではこれら MYD88、CD79B 変異のいずれかを有する症例は 92% に及び、さらにこれらの遺伝子変異は他の頭蓋内腫瘍病変では極めて稀であるため、これらの遺伝子変異を髄液中 cell-free DNA から検出することは PCNSL 診断の一助となる。本研究では、髄液 cell-free DNA を用いた特に MYD88、CD79B 変異を標的とする変異解析による PCNSL 診断のための非侵襲的検査開発を目標として研究を開始した。

2. 研究の目的

髄液中 DNA を用いて、MYD88 変異、CD79B 変異検出による PCNSL liquid biopsy の検査条件を確立し、検査精度を検証することを目的とした。

3. 研究の方法

杏林大学医学部付属病院脳神経外科で生検術を行なった PCNSL 及び PCNSL 疑い患者の脳腫瘍、髄液のペア検体を前後方視的に収集した。可能な症例は血液サンプルも合わせて採取した。髄液 DNA は digital PCR 法で MYD88 遺伝子変異の解析を行い、残余 DNA が生じた場合にはパイロシーケンス法、Ion torrent multiplex PCR 法 (ThermoFisher) を用いて CD79B 変異や他の遺伝子変異解析も追加した。脳腫瘍 DNA はサンガーシーケンス解析またはパイロシーケンス法で MYD88 変異、CD79B 変異の解析を行い、髄液 DNA の解析結果との一致率を評価した。また、残余 DNA が生じた場合には Ion torrent multiplex 法で他の遺伝子変異解析を行った。本研究課題については杏林大学医学部倫理委員会で承認され、インフォームドコンセントの上文書による同意を取得し実施した。

4. 研究成果

杏林大学医学部付属病院脳神経外科で生検術を行なった PCNSL 及び PCNSL 疑い症例に対し、2017 年度から開始した髄液サンプルの収集に加え、過去に収集した髄液サンプルを使用した。

2017 年度は我々の先行研究での本邦における PCNSL 症例の網羅的解析の報告 (Fukumura K, Acta Neuropathol 131:865-875, 2016; Nakamura T, Neuropathol Appl Neurobiol 42(3):279-90, 2016) で特に高頻度に認められた変異、びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫 (Diffuse Large B cell lymphoma, DLBCL) における近年の網羅的解析の報告 (Reddy, Cell 171(2):481-494, 2017) において、予後との関連が認められ臨床的に重要と考えられた遺伝子変異を含めた PCNSL 遺伝子パネルを作成した。

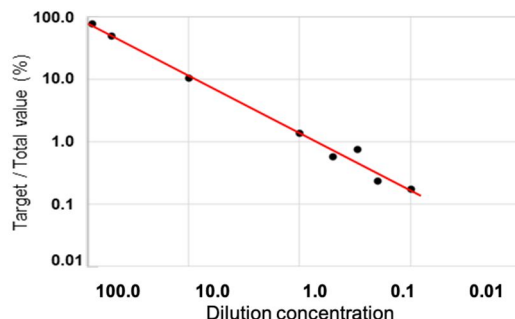
2018 年度は、前年度に作成した PCNSL 遺伝子パネルを用い、複数のリンパ腫細胞株由来 DNA、ならびに PCNSL 臨床検体および同一症例の末梢血由来 DNA を用いて Ion torrent multiplex PCR 法 (ThermoFisher) による変異解析の条件検討を行い、本研究で特に重視する MYD88、CD79B 変異をはじめとして、変異検出が問題なく可能である事を確認した。

2019~2020 年度は、収集した脳腫瘍-髄液ペア検体を用いて PCNSL liquid biopsy の条件検討、検査精度の検証を行なった。2020 年 5 月までに脳腫瘍-髄液ペア検体 42 例を対象とした。髄液採取量の中央値は 3 ml であり、保存髄液を 1,000 x g、4°C、10 min の条件で遠心分離し、沈殿分画より cellular DNA、上清より cell-free DNA(cfDNA)を抽出した。それぞれの抽出量中央値は 19.1 ng、29.0 ng であり、cfDNA の抽出量が有意に多く (p=0.02)、腫瘍由来 DNA 含有率も cellular DNA 5.1%、cfDNA 22.0%と cfDNA の方が有意に高く (p=0.03)、cfDNA の方が liquid biopsy の材料として適していると考えられた。

続いて髄液より抽出した DNA を用いて、digital PCR 法による MYD88 L265P 変異検出法の条件検討、検査精度の検証を行なった。

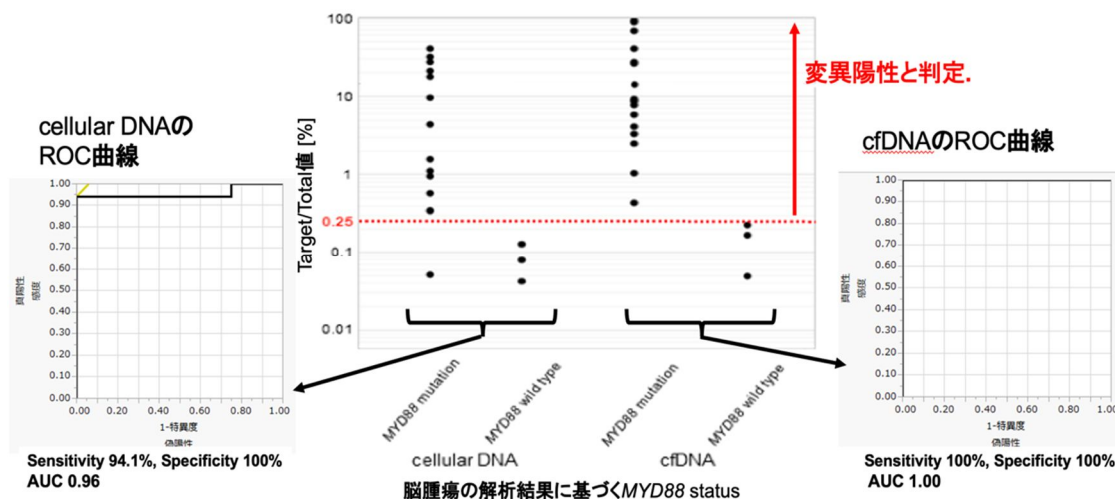
まず、パイロシーケンス法で MYD88 L265P 変異陽性と確認済の腫瘍 DNA を用いて、digital PCR 法で MYD88 L265P 変異の検出を行ったところ、全例 (5/5 例) で明らかな変異シグナルの cluster を確認でき、その Target/Total 中央値は 49.2% であった。また、MYD88 L265P 変異陽性の腫瘍 DNA と非 CNSL 患者の血液 DNA を混合した段階希釈実験では、希釈濃度と Target/Total 値に非常に強い線形相関 ($R^2=0.999$) が認められること、digital PCR 法は MYD88 L265P 変異を定性的かつ定量的に判定できる検査法であることを確認した (Figure 1)。Negative control では非 CNSL 患者 (high grade glioma ないし転移性脳腫瘍) の血液 DNA 20 サンプルを使用し digital PCR 法で解析を行ったところ、Target/Total の中央値は 0.04%、range は 0.0~0.21% であり、最大で 5 つの noise signal を認めた。この結果から、digital PCR 法による MYD88 L265P 変異判定の基準を (1) Target/Total 値 $\geq 0.25\%$ 、かつ、(2) mutation signal 6 つ以上確認できた場合に、MYD88 L265P 変異陽性と判定すると定めた。

Figure 1 段階希釈実験の結果



この条件で、cellular DNA、cfDNA を対象に digital PCR 法による MYD88 L265P 変異の判定を行ったところ、cellular DNA では感度 92.2%、特異度 100%、ROC 曲線の Area Under the Curve (AUC) は 0.95、cfDNA では感度、特異度ともに 100%、AUC 1.00 と極めて高い検査精度であった (Figure 2)。

Figure 2 髄液中 DNA を用いた digital PCR による MYD88 検出法の検査精度



2020 年度には、日本脳神経外科学会 第 79 回学術総会、第 38 回 日本脳腫瘍学会学術集会で研究成績を報告した。また、原著論文を執筆し、現在、Cancer Science 誌に投稿中である。

CD79B 遺伝子変異は、hot spot 内に複数の遺伝子変異が大きな偏りない頻度で存在するため、digital PCR 法に加え、quantitative PCR 法を用いた手法を検討している。株式会社 理研ジェネシス 遺伝子解析部開発課と共同で、CD79B 遺伝子変異の検査法を開発しており、今後、前方視的に収集した脳腫瘍-髄液ペア検体を用いて検証を行い、結果は国内外の学会および原著論文として報告予定である。

[主な発表論文等]

・雑誌論文 計 4 件

1. Sasaki N, Kobayashi K, Saito K, Shimizu S, Suzuki K, Lee J, Yamagishi Y, Shibahara J, Takayama N, Shiokawa Y, Nagane M. Consecutive single-institution case series of primary central nervous system lymphoma treated by R-MPV or high-dose methotrexate monotherapy. Jpn J Clin Oncol 50(9):999-1008, 2020. doi: 10.1093/jjco/hyaa073
2. Nagane M, Kobayashi K, Saito K, Shimada D, Matsumoto Y, Iijima S, Sasaki N, Yamagishi Y, Takayama N, Shiokawa Y. Multiagent immunochemotherapy, R-MPV-A, for patients with secondary central nervous system lymphoma. Neuro-Oncology Advances 1: ii32, 2019. 10.1093/oaajnl/vdz039.145
3. Lee J, Shishido-Hara Y, Suzuki K, Shimizu S, Kobayashi K, Kamma H, Shiokawa Y, Nagane M: Prognostic factors for primary central nervous system lymphomas treated with high-dose

methotrexate-based chemo-radiotherapy. *Jpn J Clin Oncol* 47(10):925-934, 2017. 2017 Oct 1, doi: 10.1093/jjco/hyx098.

4. Nakamura T, Yamashita S, Fukumura K, Tanaka K, Tamura K, Tateishi K, Kinoshita M, Fukushima S, Takami H, Fukuoka K, Yamazaki K, Matsushita Y, Ohno M, Miyakita Y, Shibui S, Kubo A, Shuto T, Kocalkowski S, Yamanaka S, Mukasa A, Sasayama T, Mishima K, Maehara T, Kawahara N, Nagane M, Narita Y, Mano H, Ushijima T, Ichimura K: Genome-wide DNA methylation profiling identifies primary central nervous system lymphomas as a distinct entity from systemic diffuse large B-cell lymphomas. *Acta Neuropathol* (Feb) 133(2):321-324, 2017. doi: 10.1007/s00401-016-1664-8. Epub 2017 Jan 5

[学会発表] 計 4 件

1. 山岸夢希、佐々木重嘉、松下裕子、清水早紀、齊藤邦昭、小林啓一、塩川芳昭、永根基雄、市村幸一. 中枢神経系悪性リンパ腫における髄液特異的遺伝子変異検出による液性診断の有用性. 日本脳神経外科学会 第 79 回学術総会, 2020 年
2. 山岸夢希、佐々木重嘉、松下裕子、清水早紀、齊藤邦昭、小林啓一、成田善孝、塩川芳昭、永根基雄、市村幸一. 中枢神経系悪性リンパ腫における髄液特異的遺伝子変異検出による液性診断の有用性. 第 38 回 日本脳神経外科学会学術集会, 2020 年
3. 永根基雄, 小林啓一, 齊藤邦昭, 島田大輔, 松本淑恵, 飯島昌平, 佐々木重嘉, 山岸夢希, 高山信之, 塩川芳昭. 二次性中枢神経系悪性リンパ腫に対する R-MPV-A 療法の治療成績. 第 37 回日本脳腫瘍学会学術集会, 2019 年
4. Motoo Nagane, Keiichi Kobayashi, Kuniaki Saito, Nobuyoshi Sasaki, Satoshi Kume, Yuki Yamagishi, Saki Shimizu, Kaori Suzuki, Yoshiaki Shiokawa. Efficacy and prognostic factors of combined immunochemotherapy R-MPV-A with reduced or deferred radiotherapy for patients with primary CNS lymphoma. 5th Quadrennial Meeting of the World Federation of Neuro-Oncology Societies (WFNOS), 2017

[図書] なし

[産業財産権] なし

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Sasaki N, Kobayashi K, Saito K, Shimizu S, Suzuki K, Lee J, Yamagishi Y, Shibahara J, Takayama N, Shiokawa Y, Nagane M	4. 巻 inpress
2. 論文標題 Consecutive single-institution case series of primary central nervous system lymphoma treated by R-MPV or high-dose methotrexate monotherapy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Jpn J Clin Oncol	6. 最初と最後の頁 1-11
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jjco/hyaa073	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 Nagane M, Kobayashi K, Saito K, Shimada D, Matsumoto Y, Iijima S, Sasaki N, Yamagishi Y, Takayama N, Shiokawa Y	4. 巻 1
2. 論文標題 Multiagent immunochemotherapy, R-MPV-A, for patients with secondary central nervous system lymphoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neuro-Oncology Advances	6. 最初と最後の頁 ii32
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/oaajnl/vdz039.145	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 Nakamura T, Yamashita S, Fukumura K, Nagane M, Narita Y, Mano H, Ushijima T, Ichimura K, et al.	4. 巻 133
2. 論文標題 Genome-wide DNA methylation profiling identifies primary central nervous system lymphoma as a distinct entity different from systemic diffuse large B-cell lymphoma	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Acta Neuropathologica	6. 最初と最後の頁 321 ~ 324
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00401-016-1664-8	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 Lee Jeunghun, Shishido-Hara Yukiko, Suzuki Kaori, Shimizu Saki, Kobayashi Keiichi, Kamma Hiroshi, Shiokawa Yoshiaki, Nagane Motoo	4. 巻 47
2. 論文標題 Prognostic factors for primary central nervous system lymphomas treated with high-dose methotrexate-based chemo-radiotherapy	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Clinical Oncology	6. 最初と最後の頁 925 ~ 934
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jjco/hyx098	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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 永根基雄, 小林啓一, 齊藤邦昭, 島田大輔, 松本淑恵, 飯島昌平, 佐々木重嘉, 山岸夢希, 高山信之, 塩川芳昭
2. 発表標題 二次性中枢神経系悪性リンパ腫に対するR-MPV-A療法の治療成績
3. 学会等名 第37回日本脳腫瘍学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Motoo Nagane, Keiichi Kobayashi, Kuniaki Saito, Nobuyoshi Sasaki, Satoshi Kume, Yuki Yamagishi, Saki Shimizu, Kaori Suzuki, Yoshiaki Shiokawa
2. 発表標題 Efficacy and prognostic factors of combined immunochemotherapy R-MPV-A with reduced or deferred radiotherapy for patients with primary CNS lymphoma
3. 学会等名 5th Quadrennial Meeting of the World Federation of Neuro-Oncology Societies (WFNOS) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 山岸夢希, 佐々木重嘉, 松下裕子, 清水早紀, 齊藤邦昭, 小林啓一, 成田善孝, 塩川芳昭, 永根基雄, 市村幸一
2. 発表標題 中枢神経系悪性リンパ腫における髄液特異的遺伝子変異検出による液性診断の有用性
3. 学会等名 第38回 日本脳神経外科学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山岸夢希, 佐々木重嘉, 松下裕子, 清水早紀, 齊藤邦昭, 小林啓一, 塩川芳昭, 永根基雄, 市村幸一
2. 発表標題 中枢神経系悪性リンパ腫における髄液特異的遺伝子変異検出による液性診断の有用性
3. 学会等名 日本脳神経外科学会 第79回学術総会
4. 発表年 2020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 分担者	市村 幸一 (Ichimura Koichi) (40231146)	国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所・分野長 (82606)	

	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
連携 研究者	永根 基雄 (Nagane Motoo) (60327468)	杏林大学・医学部・教授 (32610)	
連携 研究者	佐々木 重嘉 (Sasaki Nobuyoshi) (20894504)	杏林大学・医学部・助教(任期制) (32610)	

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