

令和 2 年 7 月 14 日現在

機関番号：34401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10880

研究課題名(和文) 脳原発悪性リンパ腫におけるMTX単独療法に対する感受性バイオマーカーの探索

研究課題名(英文) Search for biomarkers of sensitivity to MTX monotherapy in primary central nervous system lymphoma

研究代表者

野々口 直助 (Nonoguchi, Naosuke)

大阪医科大学・医学部・講師

研究者番号：70388263

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：中枢神経原発悪性リンパ腫(PCNSL)に対する初期治療において、メソトレキセート大量療法(HD-MTX)によってCRが得られた症例群(CR群)とHD-MTXへの反応が乏しく同治療を終了した時点でPDと判定されてWBRTを実施した症例群(PD群)を対象に、両者を区別するためのバイオマーカーの探索を行った。両群での頻度に有意差のある遺伝子変異として、BTG2(B-Cell Translocation Gene 2)のmissense mutationがPD群に特徴的に認められた。また両群の遺伝子発現の比較では、12種類の遺伝子において発現量に有意な群間差が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

PCNSLの再発率は依然高く、最終的には腫瘍死あるいは遅発性治療関連中枢神経毒性(白質脳症)による高次脳機能の低下を余儀なくされる症例は多く、脳機能を良好に維持しつつ治癒に至る症例の割合は非常に少ないのが現状である。本研究ではHD-MTX療法後に、CRとなる症例とPDとなる症例を区別するための臨床的バイオマーカーとしてBTG2の変異を見出した。HD-MTXに高い感受性を示す症例では「脳機能の維持(白質脳症発症リスクの低減)」という観点から、WBRTを長期間に渡って待機できることの臨床的意義は大きく、本バイオマーカーは存命中の患者さんの良好なADL・QOLの維持に貢献できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：In the initial treatment of primary central nervous system lymphoma (PCNSL), the patients with PCNSL were divided into two groups; high-dose methotrexate therapy (HD-MTX) resulted in CR (CR group) and the response to HD-MTX were determined to be PD and underwent WBRT at the end of the same treatment (PD group). We searched for biomarkers to distinguish between the two groups. BTG2 (B-Cell Translocation Gene 2) missense mutation was characteristic of the PD group. A comprehensive analysis of the gene expression between the two groups found 12 genes which were significantly altered in CR group, compared to PD group.

研究分野：脳神経外科学

キーワード：PCNSL methotrexate monotherapy complete remission BTG2 mutation BCL6 ILDR2 biomarker

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

中枢神経原発リンパ腫(Primary central nervous system lymphoma:以下 PCNSL と表記)は中枢神経系に局限した節外性リンパ腫で、50歳以上の中高齢者に好発する悪性脳腫瘍であり、近年その罹病率は緩やかに上昇している。PCNSLの95%がnon-Hodgkin diffuse large B-cell lymphomaで、同疾患に対する現行の標準的治療法は、ロイコボリン救援療法を前提としたメソトレキサート大量化学療法(High dose methotrexate:以下 HD-MTX と表記)を実施し、その後全脳に30~40 Gy(1回線量:1.8~2.0 Gy)の放射線治療(whole brain radiation therapy:以下 WBRT と表記)を実施するものである。HD-MTXを安全に実施可能な治療プロコールの確立によって、PCNSL患者の生命予後はHD-MTXの導入以前と比べると劇的に改善しており、多くの報告において生存期間中央値は3年前後にまで伸びている。ただし上記初期治療に対する奏功率は70~80%程度と比較的良好であるが、PCNSLの再発率は依然高く、最終的には腫瘍死あるいは遅発性治療関連中枢神経毒性(白質脳症)による高次脳機能の低下を余儀なくされる症例は多く、脳機能を良好に維持しつつ治癒に至る症例の割合は非常に少ないのが現状である。(Glass J et al. J Neurosurg. 1994, O'Brien PC et al. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2006., Hiraga S et al. J Neurosurg 1999)

白質脳症は病理組織学的に脱髄とグリオシスが主体を成し、大脳の白質に海綿状態(spongiosis)と表現される菲薄化が広範囲に生じる病態であり、特にPCNSL症例の半数を占める60歳以上の患者では、HD-MTXとWBRTを併用することで白質脳症に伴う高次脳機能障害発症のリスクは上昇することが知られている。PCNSL患者のautopsy標本での検討によれば、白質の病理学的変化は放射線照射後の比較的早期から既に起こり始めており、それが数ヶ月~数年かけて進行し、その病理組織学的重篤度はMRI T2強調画像で大脳白質に見られる高信号変化の程度と相関することが知られている(Neurology 62(3):451-6,2004)。大脳の広範囲に渡る進行性の脱髄は認知機能の低下やパーキンソンニズムといった形で症候化し、存命中の患者にQOL/ADLの低下をもたらすことになる。しかしながらPCNSLに対する初期治療において、WBRTを減量もしくは待機する方針で治療を行うことの臨床的有用性を示すエビデンスは確立されておらず、そのため本邦の「脳腫瘍診療ガイドライン」ではPCNSLの初期治療に関して、

- ✓ 「初発PCNSLでは化学療法弾得治療によってCRが得られた場合、WBRTを省略することは治療選択肢の一つではあるが、PFSが短くなる可能性がある。」(推奨グレードC2:科学的根拠がなく、行わないように勧められる)
- ✓ 「遅発性中枢神経障害の発生を軽減するため、高齢者における初発時の治療として、化学療法後にCRとなった症例については、WBRTを減量ないし待機とした治療法を考慮する。」(推奨グレードC1:科学的根拠はないが、行うように勧められる)

との記載されている。

実際、WBRTを保留し、HD-MTX単独で初期治療を行った結果、PFSが30ヶ月を超える症例が少ないうちながらも存在することは事実であり、これらHD-MTXに高い感受性を示す症例では「脳機能の維持」という観点から、WBRTを長期間に渡って待機できることの臨床的意義は大きいと考えられる。

2. 研究の目的

もしHD-MTXのみで長期間CRを維持できるPCNSL症例を事前に予測し、個々の患者に対して最適なオーダーメイド医療を提供するための分子マーカーが判明すれば、初期治療におけるWBRTの実施を留保し再発時の治療のために温存するという選択肢が生まれる可能性があり、それは初期治療完遂後の無再発生存期間における患者さんのADL/QOLの維持に貢献できる。そこで我々はHD-MTX感受性バイオマーカーを同定することを目的として以下の研究を行った。

3. 研究の方法

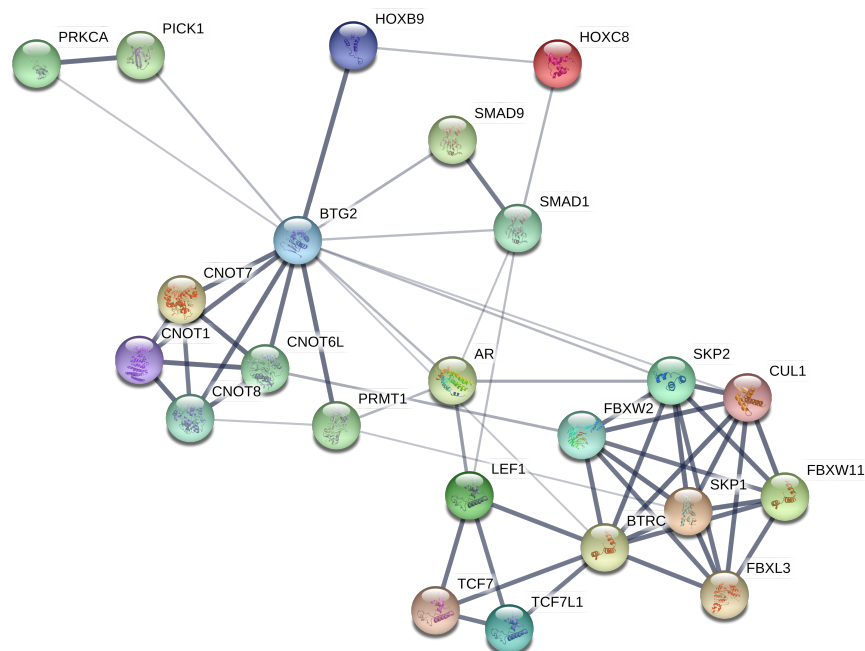
PCNSL 患者の手術摘出腫瘍検体から抽出した腫瘍 DNA/RNA (cDNA) サンプルのうち、HD-MTX 療法によって CR が得られた患者群(以下「CR 群」と表記): 5 症例、および HD-MTX 療法への反応が乏しく同治療を 3 回終了した時点で PD と判定されて WBRT を実施した患者群(以下「PD 群」と表記): 7 症例を対象とし、CR 群に特異的なバイオマーカーの探索する目的で DNA-sequencing ならびに cDNA microarray を実施した。エキソン領域における non-silent mutation (deletion, missense mutation, frame-shift, truncation) および UTR 領域における変異を対象として解析を行い、CR 群と PD 群とで発現頻度に有意な差を認める変異を抽出し、Sanger sequence にて validation を行った。各検体の網羅的な遺伝子発現についてマイクロアレイを用いて定量し、normalization を行った後に両群間で発現に統計学的な有意差を認める遺伝子を抽出した。

4. 研究成果

各標本あたり平均約 41 個 (40.7 ± 17.8 , Mean \pm SD) の non-silent mutation が検出され、このうち recurrent な mutation のみを対象に Sanger sequencing で validation を実施した。その結果、変異の存在が診断精度 70% 以上で CR 症例を PD 群と区別できる遺伝子変異は BTG2 (B-Cell Translocation Gene 2) のエキソン領域における missense mutation のみであった。UTR region に recurrent な変異 (>50%) は見つからなかった。

BTG2 は 1q32.1 (chr1:203,305,491-203,309,602; GRCh38/hg38) に locus を置く遺伝子長: 4,112 bases の protein-coding gene で、“BTG Anti-Proliferation Factor 2” あるいは “NGF-Inducible Anti-Proliferative Protein PC3” とも呼ばれる ‘BTG/Tob family’ に属する遺伝子である。細胞分裂の G1 期から S 期への移行を調節するがん抑制遺伝子として知られ、神経前駆細胞の分化や神経軸索の伸長を促進することが報告されている。(S Miyata et al. Neurosci Lett. 2008;14:445(2):162-5.) BTG2 は p53 の標的遺伝子との報告もあり、DNA ダメージの修復や apoptosis の抑制に関わるとされる。(J P Rouault et al. Nat Genet. 1996;14(4):482-6., U Cortes et al. Mol Carcinog. 2000;27(2):57-64.) またレチノイン酸による乳がん細胞の増殖抑制において、レチノイン酸受容体シグナルの標的分子であることが報告されている。(Donato LJ et al. Cancer Res. 2007 Jan 15;67(2):609-15.)

下図は BTG2 との関与が報告される遺伝子を図示したものである。(STRING, String consortium, Swiss institute of bioinformatics, Switzerland; <https://version11.string-db.org>)



これによると CNOT family, SMAD1/9, HOXB9 等が BTG2 との機能関連の高い分子として提示されているが、実際、BTG2 は hCAF1 and hPOP2 を介して CNOT に作用することで細胞分裂に抑制することが報告されている。(Morel AP et al. Journal of Cell Science 2003;116: 2929-2936) また Diffuse Large B cell Lymphoma (DLBCL) では TGF β -S1PR2 signaling axis が抑制されていることが示唆されているが、SMAD family はこのシグナルの重要な構成要素である。(Stelling A et al. Blood 2018;131 (20): 2235-2246.) また BTG2 は HOXB9 と相互作用することで、その転写因子活性を増強させることが知られている。(J Biol Chem. 2000 Jan 7;275(1):147-53.) 従って、PCNSL における BTG2 の missense mutation は細胞増殖活性を高める方向に作用することが示唆され、これが HD-MTX に対する治療抵抗性に関与している可能性がある。

そこで、これまでに MTX に対する薬剤耐性との関連が報告されている遺伝子である multidrug resistance gene 1 (ABCB1), Inosine Monophosphate Dehydrogenase (IMPDH1) および dihydrofolate reductase 1 (DHFR) の発現と、BTG2 の遺伝子発現の相関の有無を調べてみたが、ABCB1, IMPDH1, DHFR のいずれも、BTG2 と有意な発現相関は見られなかった (Spearman's correlation; p-value: r=0.089; p=0.76, r=-0.14; p=0.55, r=0.035; p=0.83)。

次に microarray の結果より、CR 群と PD 群の 2 群間で発現量に有意な差を認める遺伝子の抽出を行った。Bonferroni 補正を行うと 2 群間で有意差のある遺伝子は認めなかったが、Holm 法によって多重比較の補正を行った場合には、下表に示す 12 種類の遺伝子において発現量に有意な群間差が見られた。このうち CR 群において有意な高発現を示したのは ABR, CSDA, B3GALT6, FRRS1, ATXN3, GYS2 の 6 遺伝子で、逆に CR 群において有意な低発現を示したのは BCL6, CDC23, BGLAP, HELLS, EHD2, ILDR2 の 6 つの遺伝子であった。

	Gene name	Entrez gene ID	Fold change (CR/PD ratio)	t-test p-value	t-test p-value (Holm's correction)
1	ABR	29	1.86	0.00026	0.00026
2	CSDA	8531	2.07	0.00049	0.00097
3	B3GALT6	126792	2.31	0.00121	0.00364
4	BCL6	604	0.34	0.00157	0.00630
5	FRRS1	391059	2.23	0.00172	0.00858
6	CDC23	8697	0.56	0.00187	0.01121
7	BGLAP	632	0.51	0.00188	0.01319
8	HELLS	3070	0.42	0.00197	0.01575
9	EHD2	30846	0.50	0.00217	0.01954
10	ATXN3	4287	1.32	0.00275	0.02750
11	GYS2	2998	5.18	0.00289	0.03182
12	ILDR2	387597	0.12	0.00304	0.03643

これら 12 遺伝子の中に MTX の治療感受性との関連が報告されている遺伝子は含まれていないが、PD 群と比較して CR 群の発現比が最も低かった“ILDR2” (Immunoglobulin Like Domain Containing Receptor 2) は T 細胞活性化のプライミング段階を抑制的に制御することが知られている分子で、固形

がんに対する治療薬として、同分子に対する中和抗体の開発が勧められている。また CR 群における発現比が有意に低かった“BCL6” (B-cell lymphoma 6) も、DLBCL の pro-oncogene と認識されている遺伝子であり、B 細胞の増殖を促進し DNA のダメージの修復に関与すると共に、B 細胞の分化を抑制する可能性が示されている。(Cerchietti L et al. Expert Rev Hematol. 2013; 6(4): 343-345.) これらの遺伝子は HD-MTX 療法に対する PCNSL の感受性に直接的に関与する分子ではないかもしれないが、PCNSL の治療耐性を推し量る新しいバイオマーカーとして利用できる可能性がある。今回の解析ではこれら12種類の遺伝子の分子機能に影響を与えるような recurrent な変異は見つかっていないが、PCNSL 患者の初期治療後の予後に有意な影響を与えている可能性があり、今後更に研究を進めたいと考えている。

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 0件）

1. 著者名 Furuse Motomasa, Kuwabara Hiroko, Ikeda Naokado, Hattori Yasuhiko, Ichikawa Tomotsugu, Kagawa Naoki, Kikuta Kenichiro, Tamai Sho, Nakada Mitsutoshi, Wakabayashi Toshihiko, Wanibuchi Masahiko, Kuroiwa Toshihiko, Hirose Yoshinobu, Miyatake Shin-Ichi	4. 巻 20
2. 論文標題 PD-L1 and PD-L2 expression in the tumor microenvironment including peritumoral tissue in primary central nervous system lymphoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BMC Cancer	6. 最初と最後の頁 epub
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1186/s12885-020-06755-y	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 FURUSE Motomasa, NONOGUCHI Naosuke, OMURA Naoki, SHIRAHATA Mitsuaki, IWASAKI Koichi, INUI Toshio, KUROIWA Toshihiko, KUWABARA Hiroko, MIYATAKE Shin-Ichi	4. 巻 57
2. 論文標題 Immunotherapy of Nivolumab with Dendritic Cell Vaccination Is Effective against Intractable Recurrent Primary Central Nervous System Lymphoma: A Case Report	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Neurologia medico-chirurgica	6. 最初と最後の頁 191 ~ 197
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2176/nmc.cr.2016-0330	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0件

〔図書〕 計1件

1. 著者名 端和夫・三國信啓 編（分担共著：野々口直助）	4. 発行年 2019年
2. 出版社 丸善出版	5. 総ページ数 1041
3. 書名 脳神経外科臨床マニュアル（42章 中枢神経系原発悪性リンパ腫の診断と治療）	

〔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	奥崎 大介 (Okuzaki Daisuke) (00346131)	大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・特任准教授 (常勤) (14401)	
研究分担者	池田 直廉 (Ikeda Naokado) (50434775)	大阪医科大学・医学部・講師 (34401)	
研究分担者	古瀬 元雅 (Furuse Motomasa) (70340560)	大阪医科大学・医学部・准教授 (34401)	