

令和 2 年 6 月 19 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16076

研究課題名（和文）医原性リンパ増殖性疾患の遺伝子変異解析による病態解明および治療反応性の予測

研究課題名（英文）OIIA-LPD and genetic alteration

研究代表者

日下部 学（Kusakabe, Manabu）

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：40804381

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：64例のOIIA-LPDを同定した。リンパ節生検での組織型、免疫抑制剤内服開始の契機となった自己免疫疾患、免疫抑制剤中止の有無、免疫抑制剤中止後の反応、化学療法の有無、化学療法への反応性、生命予後などの臨床情報を抽出し、解析した。組織型の割合は既報と同様にDLBCLが約半数、ホジキンリンパ腫が約1/3であった。シーケンス解析対象としての新鮮凍結結標本の全て、FFPE標本の約半数でゲノムDNAを抽出することが可能であった。リンパ系腫瘍関連412遺伝子を標的としたシーケンスライブラリを作製し、HiSeq 4000にてシーケンスを行なった。今後、シーケンス結果、臨床情報を用いて解析を行う予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

自己免疫疾患に罹患した患者の治療薬としてメソトレキセートなどの免疫抑制剤は広く用いられている。そのような免疫抑制剤を内服している患者の一部にリンパ増殖性疾患という悪性リンパ腫に類似した病態を示すことがある。本研究はそのようなリンパ増殖性疾患(OIIA-LPD)を対象として、その組織型や免疫抑制剤中止への反応、抗がん剤を用いた化学療法の必要性などの情報を収集した。また診断の根拠となった臨床検体を材料として遺伝子変異を解析した。これらの結果を統合することでOIIA-LPDの臨床像や病態を明らかにすることを目的とした。

研究成果の概要（英文）：We identified 64 cases of OIIA-LPD. Histological type in lymph node biopsy, autoimmune disease that triggered the initiation of oral administration of immunosuppressant, presence or absence of immunosuppressant, response after immunosuppressant discontinuation, presence or absence of chemotherapy, response to chemotherapy, and clinical information were extracted and analyzed. Similar to the previous report, about half of the histological types were DLBCL and about 1/3 were Hodgkin lymphoma. We were able to extract decent amount of genomic DNA from all of fresh frozen specimens and about half of the FFPE specimens for sequence analysis. A sequence library targeting the 412 gene associated with lymphoid tumor was prepared and sequenced with HiSeq 4000. In the future, we plan to analyze using sequence results and clinical information.

研究分野：血液内科学

キーワード：悪性リンパ腫 医原性リンパ増殖性疾患 次世代シーケンス 遺伝子変異

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

悪性リンパ腫は血液のがん(造血器腫瘍)のひとつである。悪性リンパ腫の診断、および分類は患者の腫大したリンパ節の生検(摘出標本)の病理学的所見によりなされ、古典的にはホジキンリンパ腫と非ホジキンリンパ腫に分類されてきた。現在では World Health Organization (WHO) 分類によりリンパ腫の疾患単位が定義されている。本研究は「免疫不全に関連するリンパ増殖性疾患」の細分類である「その他の医原性リンパ増殖性疾患」(Other iatrogenic immunodeficiency-associated lymphoproliferative disorder: OIIA-LPD)を研究対象とした。OIIA-LPD とは、原発性免疫不全、HIV ウイルス感染症、臓器移植の3者を除く免疫不全状態を背景として発症するリンパ増殖性疾患として定義される。関節リウマチなどに対する免疫抑制剤使用開始後、数年を経て発症することが知られているが、免疫抑制剤中止のみで軽快する症例と、抗がん剤治療による治療が必要な症例が存在する。しかしながらその理由は明らかでない。つまり、抗がん剤治療すべき“悪性腫瘍”であるのか、それとも抗がん剤治療の必要のない“免疫抑制に関連した病態”であるのかが臨床所見、病理学的診断だけでは明確に区別することができない。

また、OIIA-LPD の病理組織型はその頻度の高いものから順にびまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫(約 60%)、ホジキンリンパ腫(約 15%)、末梢性 T 細胞リンパ腫(約 3%)と報告されている。免疫抑制療法中止への反応性は病理組織型に依存するという報告がなされているが、組織型ごとに治療反応性、予後が異なるのかについては大規模なコホートでの研究は行われておらず、結論は得られていない(引用文献 1)。また、組織型他に、OIIA-LPD での Epstein-Barr ウイルス (EBV) の病態進展への関係についても同様にこれまで解析は十分なされていない。移植後リンパ増殖性疾患では免疫抑制に関与した EBV 再活性化が病態の進展に関与することは証明されており、OIIA-LPD でも同様の関連がないか明らかにしたい。

一方で、次世代シーケンサー(Next Generation Sequencing: NGS)の登場により、臨床検体を材料とした疾患ごとの遺伝子変異の検出が急速に進んでいる。悪性リンパ腫の中でもリンパ形質細胞性リンパ腫など、疾患特異的な遺伝子変異が明らかになったリンパ腫がある一方で、OIIA-LPD はその組織型が均一でないこと、症例数が限られていることなどから十分な解析が未だなされていないのが現状である。

2. 研究の目的

本研究では OIIA-LPD の遺伝子変異を NGS により検出することで、症例ごとに免疫抑制剤の中止のみで対応可能なのか、抗がん剤治療が必要であるのか、を明らかにすることを目的とした。また、治療反応性だけでなく、治療標的となる遺伝子変異をあわせて検出することによって抗がん剤治療が必要な場合であっても治療効果の高い薬剤、治療法を選択する上で有益な情報を提供することを目指した。

これまでの臨床検体を材料とした NGS による遺伝子変異の研究は、病理組織型ごとに疾患単位を NGS により遺伝子変異で再定義するものであった。本研究の独自性は、病理組織型でなく、OIIA-LPD という臨床経過で定義される疾患概念に NGS による遺伝子変異による解析を行い、治療反応性を予見可能にすることである。研究代表者は OIIA-LPD の診療に関わる臨床医でもあることから、臨床情報、治療反応性、遺伝子変異を総合的に解析することで新たな知見を創造することができる。共同研究先施設ふくめ十分な臨床情報を伴う多数例の検体を解析することにより新規の知見につながる研究である。

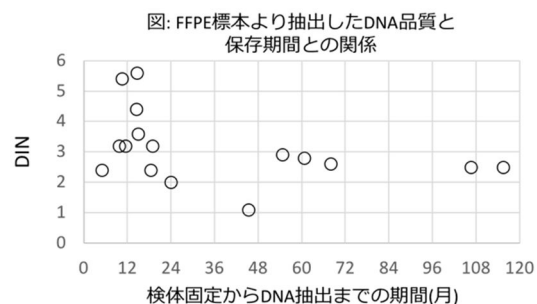
3. 研究の方法

筑波大学附属病院および共同研究先である虎の門病院にて OIIA-LPD と病理診断された臨床検体を材料とし、NGS を用いた遺伝子解析を行った。目標症例数を 200 例としたが 2019 年度末までの症例数は約 70 例であった。患者ごとの診療情報、検査値、治療反応性、化学療法実施の有無などについて、収集した。ホルマリン固定された病理標本または新鮮凍結保存された生検組織から DNA を抽出した。リンパ系腫瘍において変異を持つ遺伝子を含め 412 の遺伝子、蛋白質コード領域をシーケンスの対象領域とした。アジレント社の HaloPlex HS 標的遺伝子カスタムパネルを用いて NGS 解析用のライブラリ調整を行った。調整されたシーケンスライブラリは NGS を用いて DNA 配列情報に変換され、専用のソフトウェアを用いることで各症例に対応する遺伝子変異リストを作成し、解析を行うこととした。

4. 研究成果

(1) FFPE 検体からの解析可能 DNA の抽出

診断に用いた新鮮凍結標本または FFPE 固定標本から NGS 解析のためのゲノム DNA 抽出を完了した。収集した FFPE 標本より DNA 抽出を行なったところ(n=16)、検体採取から2年以内の場合、DNA の品質を示す DNA integrity number (DIN)は良好に保たれていることがわかった(右図)。FFPE 標本から抽出した DNA においても NGS 解析の実現可能であることが示唆された。一方で FFPE 標本のうち、CT ガイド



下針生検検体などでは検体量が限られ、充分量の DNA を獲得できなかった。

(2) O1IA-LPD の組織型と臨床像

各症例について免疫抑制剤内服の契機となった自己免疫疾患、免疫抑制剤の種類、予後、組織型などの臨床情報を抽出し、解析を行った。その結果、組織型については既報と同様にびまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫が約半数、ついでホジキンリンパ腫の頻度が高かった。しかしながら末梢性 T 細胞リンパ腫の頻度については筑波大学附属病院と虎の門病院とでその頻度に違いを認めため、病理組織診断の不一致が考えられた。セントラルレビューの必要性を認識し、筑波大学附属病院症例、虎の門病院症例をあわせて同一の病理診断医に依頼し、診断確認を行い数例において組織型に違いがあることがわかった。

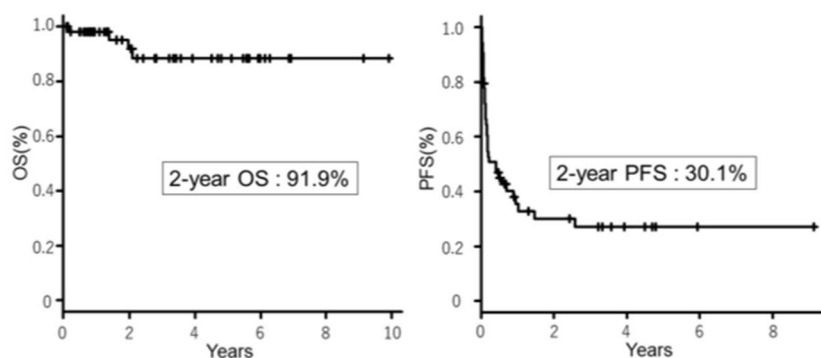
(3) O1IA-LPD 20 例での解析

2018 年度に約 20 症例のライブラリ調整を行い、NextSeq500 でシーケンスしたところ、全シーケンスリードのうち 95%以上が標的領域にマップされることを確認できた。2019 年度にさらに約 30 症例のライブラリ調整を行い、現時点で MiSeq での QC に問題ないことを確認している。

(4) O1IA-LPD の臨床像

本研究での O1IA-LPD 54 例の解析結果を 2019 年 12 月に開催されたアメリカ血液学会にて発表した(引用文献 2)。免疫抑制剤の中止により約 60%の症例で腫瘍退縮が得られており、全生存率(2年)は 91%、無増悪生存率(2年)は 30%であった。(下図参照)

<https://doi.org/10.1182/blood-2019-127521>



(5) HiSeq でのシーケンス

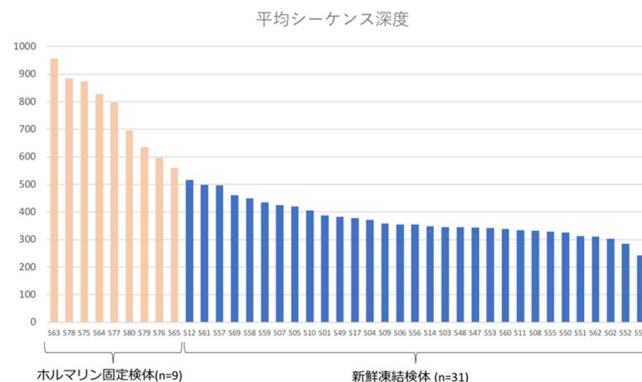
ホルマリン固定検体、新鮮凍結検体、計 40 症例の検体を材料としてライブラリ作製を行い、HiSeq にてシーケンスを行なった。予定していた(変異を検出するのに十分な)500x 以上のシーケンス深度を達成できたことを確認できた(右図)。

(6) 今後について

本研究にて O1IA-LPD のうち、組織型が DLBCL である症例のシーケンスにて検出された遺伝子変異として、エピゲノム関連因子である CREBBP、EP300 や KMT2D の変異、B 細胞性悪性リンパ腫の発生に関わる GNA13 などがあり、de novo DLBCL の既報の解析結果と矛盾しない結果であった。ライブラリ調整、HiSeq シーケンスの完了した O1IA-LPD には複数の組織型が含まれることになり、組織型別の遺伝子変異を検出することが期待される。本研究により得られる結果から免疫抑制剤中止のみで対応可能なのか、抗がん剤治療が必要であるのかといった治療方針決定を補助する情報を提供することを目指す。また、各症例での治療標的となりうる遺伝子変異を検出し、治療効果の高い薬剤の選択を可能にしたい。O1IA-LPD 症例の収集、病理組織検体の収集やシーケンスライブラリ調整に時間がかかり、2019 年度中にシーケンス結果の解析まで完了できていない。すでにライブラリ調整、HiSeq を用いたシーケンスを完了した。今後、その結果をもとに研究計画当初より予定していた解析をすすめ、論文化を目指してゆく。

<引用文献>

1. Gion Y, Iwaki N, Takata K, et al. Clinicopathological analysis of methotrexate-associated lymphoproliferative disorders: Comparison of diffuse large B-cell lymphoma and classical Hodgkin lymphoma types. *Cancer Sci.* 2017;108(6):1271-1280.
2. Kaji D, Kusakabe M, Sakata-Yanagimoto M, et al. Clinicopathological Analysis of "Other Iatrogenic Immunodeficiency-Associated Lymphoproliferative Disorders" Reveals a Favorable Outcome Independent of the Effectiveness of Methotrexate Discontinuation in Autoimmune Disease Patients. *Blood* (2019) 134 (Supplement_1): 4128.



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10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 Kurita Naoki, Sakamoto Tatsuhiro, Kato Takayasu, Kusakabe Manabu, Yokoyama Yasuhisa, Nishikii Hidekazu, Sakata-Yanagimoto Mamiko, Obara Naoshi, Hasegawa Yuichi, Chiba Shigeru	4. 巻 173
2. 論文標題 The prognosis of disseminated intravascular coagulation associated with hematologic malignancy and its response to recombinant human thrombomodulin	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Thrombosis Research	6. 最初と最後の頁 57～64
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.thromres.2018.11.014	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 Miki Kosuke, Obara Naoshi, Makishima Kenichi, Sakamoto Tatsuhiro, Kusakabe Manabu, Kato Takayasu, Kurita Naoki, Nishikii Hidekazu, Yokoyama Yasuhisa, Sakata-Yanagimoto Mamiko, Hasegawa Yuichi, Chiba Shigeru	4. 巻 2018
2. 論文標題 An Unprecedented Case of p190 BCR-ABL Chronic Myeloid Leukemia Diagnosed during Treatment for Multiple Myeloma: A Case Report and Review of the Literature	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Case Reports in Hematology	6. 最初と最後の頁 1～5
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1155/2018/7863943	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 Makishima Kenichi, Obara Naoshi, Ishitsuka Kantaro, Sukegawa Shinichiro, Suma Sakurako, Kiyoki Yusuke, Baba Naoko, Sakamoto Tatsuhiro, Kato Takayasu, Kusakabe Manabu, Nishikii Hidekazu, Kurita Naoki, Yokoyama Yasuhisa, Sakata-Yanagimoto Mamiko, Hasegawa Yuichi, Chiba Shigeru	4. 巻 98
2. 論文標題 High efficacy of eculizumab treatment for fulminant hemolytic anemia in primary cold agglutinin disease	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Annals of Hematology	6. 最初と最後の頁 1031～1032
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00277-018-3521-4	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 Nishikii Hidekazu, Kurita Naoki, Shinagawa Atsushi, Sakamoto Tatsuhiro, Kusakabe Manabu, Yokoyama Yasuhisa, Kato Takayasu, Sakata-Yanagimoto Mamiko, Obara Naoshi, Hasegawa Yuichi, Nakamura Naoya, Chiba Shigeru	4. 巻 2019
2. 論文標題 Durable Leukemic Remission and Autologous Marrow Recovery with Random Chromosomal Abnormalities after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Chronic Lymphocytic Leukemia	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Case Reports in Hematology	6. 最初と最後の頁 1~5
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1155/2019/9710790	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 Hattori Keiichiro, Sakata-Yanagimoto Mamiko, Kusakabe Manabu, Nanmoku Toru, Suehara Yasuhito, Matsuoka Ryota, Noguchi Masayuki, Yokoyama Yasuhisa, Kato Takayasu, Kurita Naoki, Nishikii Hidekazu, Obara Naoshi, Takano Shingo, Ishikawa Eiichi, Matsumura Akira, Muratani Masafumi, Hasegawa Yuichi, Chiba Shigeru	4. 巻 110
2. 論文標題 Genetic evidence implies that primary and relapsed tumors arise from common precursor cells in primary central nervous system lymphoma	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 401~407
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.13848	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 錦井 秀和、栗田 尚樹、日下部 学、横山 泰久、加藤 貴康、坂田 (柳元) 麻実子、小原 直、長谷川 雄一、千葉 滋	4. 巻 60
2. 論文標題 維持透析患者の開心術前後にロミプロスチムで治療した特発性血小板減少性紫斑病	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 臨床血液	6. 最初と最後の頁 28~32
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11406/rinketsu.60.28	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 Suma Sakurako, Sakata-Yanagimoto Mamiko, Nguyen Tran B., Hattori Keiichiro, Sato Taiki, Noguchi Masayuki, Nannya Yasuhito, Ogawa Seishi, Watanabe Rei, Fujimoto Manabu, Nakamura Naoya, Kusakabe Manabu, Nishikii Hidekazu, Kato Takayasu, Chiba Shigeru	4. 巻 108
2. 論文標題 Blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm arising from clonal hematopoiesis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Journal of Hematology	6. 最初と最後の頁 447~451
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12185-018-2461-z	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 Suehara Y, Sakata-Yanagimoto M, Hattori K, Nanmoku T, Itoh T, Kaji D, Yamamoto G, Abe Y, Narita K, Takeuchi M, Matsue K, Sato T, Noguchi M, Baba N, Sakamoto T, Kusakabe M, Kurita N, Kato T, Yokoyama Y, Nishikii H, Obara N, Hasegawa Y, Chiba S	4. 巻 103
2. 論文標題 Liquid biopsy for the identification of intravascular large B-cell lymphoma	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Haematologica	6. 最初と最後の頁 e241 ~ e244
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3324/haematol.2017.178830	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 Tanzima Nuhath Sharna, Sakata-Yanagimoto Mamiko, Komori Daisuke, Hattori Keiichiro, Suehara Yasuhito, Fukumoto Kota, Fujisawa Manabu, Kusakabe Manabu, Matsue Kosei, Wakamatsu Hirotake, Shimadzu Mitsunobu, Chiba Shigeru	4. 巻 109
2. 論文標題 Droplet digital polymerase chain reaction assay and peptide nucleic acid-locked nucleic acid clamp method for RHOA mutation detection in angioimmunoblastic T-cell lymphoma	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 1682 ~ 1689
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.13557	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 助川 慎一郎、横山 泰久、錦井 秀和、加藤 貴康、日下部 学、栗田 尚樹、小原 直、長谷川 雄一、千葉 滋、坂田 (柳元) 麻実子、松岡 亮太、百瀬 春佳、清木 祐介、野口 雅之、中村 直哉、渡辺 玲、藤本 学	4. 巻 59
2. 論文標題 アザシチジンが有効であった慢性骨髄単球性白血病合併の芽球性形質細胞様樹状細胞腫瘍	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 臨床血液	6. 最初と最後の頁 2567 ~ 2573
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11406/rinketsu.59.2567	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 1件)

1. 発表者名 Daisuke Kaji, Manabu Kusakabe, Mamiko Sakata-Yanagimoto, Yasuhito Suehara, Keiichiro Hattori, Yasunori Ota, Mitsuhiro Yuasa, Kosei Kageyama, Yuki Taya, Shinsuke Takagi, Hisashi Yamamoto, Yuki Asano-Mori, Naoyuki Uchida, Atsushi Wake, Shuichi Taniguchi, Go Yamamoto, Shigeru Chiba,
2. 発表標題 Clinicopathological Analysis of "Other Iatrogenic Immunodeficiency-Associated Lymphoproliferative Disorders" Reveals a Favorable Outcome Independent of the Effectiveness of Methotrexate Discontinuation in Autoimmune Disease Patients
3. 学会等名 61st ASH Annual Meeting and Exposition, American Society of Hematology (国際学会)
4. 発表年 2019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
--	---------------------------	-----------------------	----