

令和 4 年 5 月 27 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07774

研究課題名(和文) 難治性悪性リンパ腫の分子病態の解明と新規治療法の探索

研究課題名(英文) Elucidation of molecular biology and novel treatment strategy of malignant lymphomas

研究代表者

遠西 大輔(Ennishi, Daisuke)

岡山大学・大学病院・研究教授

研究者番号：20825096

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：びまん性大細胞型リンパ腫(DLBCL)のうち、Double-hit Lymphomaに特徴的な遺伝子発現プロファイルを持つサブタイプである“DHIT-like lymphoma”は、非常に予後不良なリンパ腫として知られている。本研究では1000例を超える世界最大規模の患者コホートと最先端遺伝子解析技術を用いて、その分子学的機序を明らかとし、免疫逃避機構や特有の細胞起源(胚中心のDark Zone由来)、またEZH2やCREBBPなどのエピゲノム遺伝子が高頻度に変異を起こしている事が明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

造血器腫瘍で最も患者数の多いDLBCLの中で、最近最も予後不良と報告されたDHIT-like lymphomaは、日本人コホートにおいても同様に予後不良である事が確認され、本邦においても早急に治療開発が必要である疾患群であることが改めて認識される結果となった。さらに、本研究における分子病態の解明により、治療標的としてBCL2阻害剤やEZH2阻害剤などのエピゲノム阻害剤の有効性が期待できることが示唆されたことから、今後は臨床開発に向けた基盤整備が要求される。

研究成果の概要(英文)：DHIT-like lymphoma is a subtype of diffuse large cell lymphomas (DLBCL), which have a gene expression profile characteristic of Double-hit Lymphoma with concurrent MYC and BCL2 translocation, is known as a lymphoma with a very poor prognosis. In this study, we used the largest patient cohort of more than 1000 DLBCL cases in Japan and state-of-the-art gene analysis technology to clarify its molecular mechanism. We identified that the immune escape mechanism and unique cell origin (derived from the germinal center Dark Zone) was a hallmark of molecular profiling of DHIT-like lymphoma. Furthermore, it was revealed that epigenetic genes such as EZH2 and CREBBP are frequently mutated in this subtype, suggesting the therapeutic targets of this disease.

研究分野：血液腫瘍内科

キーワード：悪性リンパ腫 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

MYC と BCL2 の転座を両方有するびまん性大細胞型リンパ腫(Diffuse Large B-cell lymphoma: DLBCL)である Double-hit Lymphoma(DHIT-lymphoma)は非常に予後不良なリンパ腫として知られているが、その分子病態はほとんど分かっていない。申請者らはこれまで、網羅的遺伝子解析を用いて、DLBCL のうち DHIT-lymphoma に特徴的な遺伝子発現プロファイルを持つサブタイプである “DHIT-like lymphoma” が存在する事を世界に先駆けて発見した(Ennishi D et al. J Clin Oncol 2019)。しかし、その臨床的意義や分子病態の全貌は明らかとなっていない。

2. 研究の目的

DLBCL は悪性リンパ腫の中で最も患者数が多く、その分子病態の解明は新規標的薬の開発と患者予後の層別化の為に必須である。中でも MYC と BCL2 の転座を両方有する DLBCL である Double-hit Lymphoma(DHIT-lymphoma)は5年生存率20%以下と非常に予後不良なリンパ腫として知られているが、その分子病態の探索の過程で発見された DHIT-like lymphoma の臨床的意義や分子病態は明らかとなっておらず、その全貌解明が急務である。本研究では次世代シーケンサーや遺伝子発現プロファイルなど網羅的遺伝子解析技術を用いて、DHIT-like lymphoma の臨床病態を広く一般化し、同時にその分子病態の解明を通して、新たな難治性悪性リンパ腫の分子病態と新しい治療戦略の糸口を探索する。

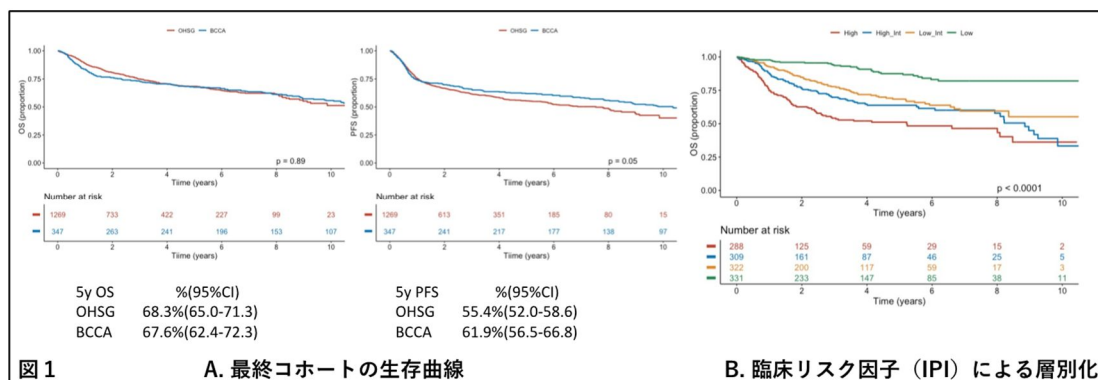
3. 研究の方法

1) DHIT-like lymphoma の同定と NanoString の有用性の検証: DHIT-like lymphoma の疾患概念が、地域、人種に依存しない事を検証するため、本邦において臨床情報と病理サンプルが得られる DLBCL 症例を集積し(日本コホート)、アジア人における DHIT-like lymphoma の臨床病態を検証する。まず、岡山大学血液研究グループから提供された DLBCL 約1,000例からパラフィン検体を収集し、RNA の抽出を行い日本コホートとする。一方、DHIT-like lymphoma プローブセットとして20-30遺伝子を選択し、これを日本コホートに適用し、DHIT-like lymphoma を含めた日本コホートにおける細胞起源の同定を行う。

2) DHIT-like lymphoma の分子病態の解明: DHIT-lymphoma は DLBCL 中の約5-10%を占めるが、そのほとんどが GCB-DLBCL である事がこれまでの研究で分かってきた。一方、DHIT-lymphoma の分子病態に関する報告は未だされておらず、治療標的となる遺伝子異常の解明が強く望まれている。今回、日本コホートで想定された DHIT-like lymphoma を対象に、次世代シーケンサーを用いたターゲットシーケンスを行い、DHIT-like lymphoma で高頻度に現れる遺伝子異常を突き止める。

4. 研究成果

1) 研究期間内に1,388検体を収集し、そのうち核酸が抽出できた1,274症例で解析コホートを構築した。まず、このコホート(Okayama Hematology Study Group; OHSG コホート)の臨床学的特性を確認したところ、生存期間は既報の北米(BCCA)でのRCHOPを施行したDLBCLとほぼ同様であり(5年全生存率(OS);68% vs 68%)、また臨床的バイオマーカーであるIPIが有意に予後と相関した($P < 0.0001$)(図1)。このことから、一般的なDLBCLの臨床学的特性を備えているコホートであると判断し、各種マルチオミクス解析を進めた。

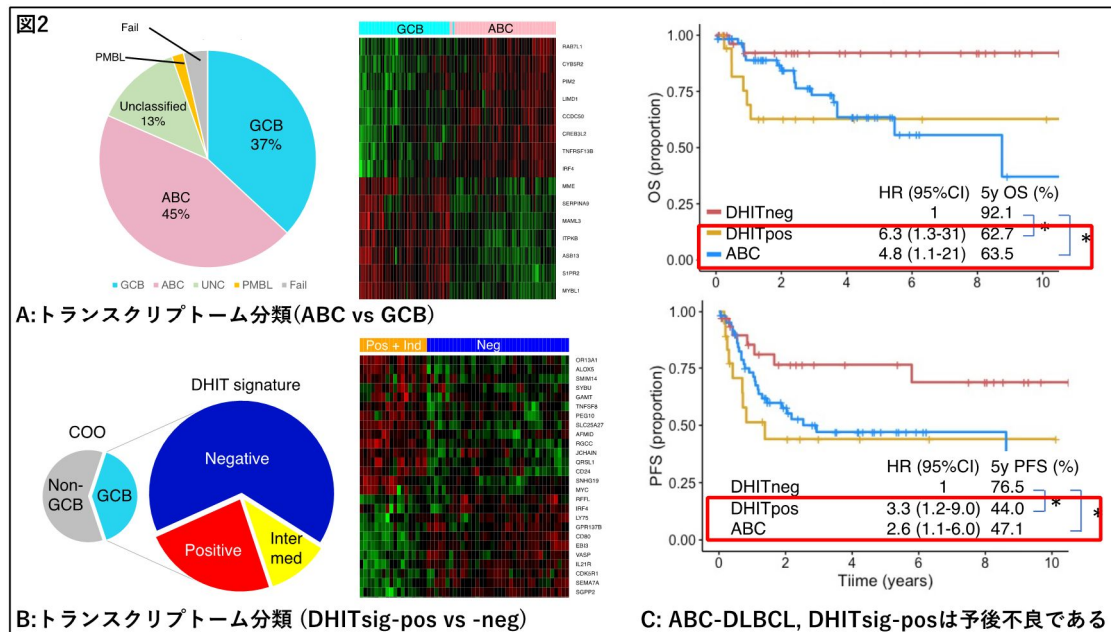


2) 核酸抽出: 初回治療としてRCHOP療法を実施されたコホートから収集された1,388検体を用いて、MaxWellを用いて核酸(RNA, DNA)の抽出を行った。その結果、RNAが20ng/uI以上抽出できた1,274例を最終コホートとし、以下のマルチオミクス解析を実施した。

3) トランスクリプトーム解析: 上記で得られたRNAを用いて「DLBCL90」を用いたトランスクリプトーム解析を実施した。その結果、ABC-DLBCL, GCB-DLBCL, PMBCL-like, Unclassがそれぞれ、45%、37%、5%、13%であった。これまでの欧米人における報告では、ABC-DLBCLとGCB-DLBCLの比率が約30%、60%とGCB-DLBCLの比率が多い事が知られていたが、本研究では、ABC-DLBCL

の比率が高いことが示された(図2)。最近の小規模の報告(100例)でも同様の結果が得られていることから(Haematologica 2021)悪性リンパ腫の人種差による生物学的・臨床的意義を考える上で非常に重要な知見である。また既報通り、ABC-DLBCLの予後はGCB-DLBCLに比較し有意に不良であった(5y-PFS, 47% vs 64%; $P < 0.001$)。

一方、GCB-DLBCLは、DHITsig-pos(DHIT-like)(30%)とDHITsig-neg(non-DHIT-like)(70%)に更に分類され、またDHIT-like群はnon-DHIT-like群に比較し有意に予後不良であった(5y-PFS, 44% vs 76%; $P < 0.001$)。これにより、先行研究で提唱したDHIT-like DLBCLは、アジア人における大規模コホートにおいても同様に予後不良であることが確認された(図2)。



4) マルチオミクス解析による DHIT-like lymphoma の病態解明

まず ABC-DLBCL と DHIT-like-DLBCL について 50 遺伝子パネルに基づくターゲット・シーケンズを実施し、既報に基づき遺伝子的分類を行った。その結果、ABC-DLBCL においては、MCD, BN2, N1 がそれぞれ、58%、30%、12%であった。一方、ABC-DLBCL 内に予後不良である MCD グループと予後良好である BN2 グループが存在することが明らかとなった (5y-PFS 42% vs 63% $p=0.03$)。この結果、DLBCL90+50 遺伝子パネルは、従来の COO 分類と比較し、より正確に DLBCL 患者の予後層別を可能となったことから、マルチオミクス・バイオマーカーとして、今後の臨床試験で検証する予定である。特に「ABC-MCD グループ」は、MYC, BCL2 の遺伝子発現が増加しており、予後不良性の生物学的メカニズムであることが考えられた。

さらに、DHIT-like グループは、大規模サンプルのマルチオミクス解析の結果、まず遺伝子発現パターンとして、細胞起源が胚中心の Dark Zone (DZ) にある事が明らかとなった。これまで DHIT-like DLBCL の細胞起源は DZ 由来であることが予想されていたが、今回の大規模解析の結果でより明確となった事になる。また、細胞代謝に関わる遺伝子発現も上昇しており、腫瘍細胞の増殖が早いことを示唆している。さらに、免疫微小環境の観点から、MHC-I, MHC-II の遺伝子発現が低下していた事から、免疫逃避機構も獲得していることが考えられ、本疾患群の予後不良性を裏付ける生物学的機序が明らかとなった。

また、上記の遺伝子発現解析に加えて、遺伝子変異解析の結果、DHIT-like 症例では、MYC, BCL2 だけでなく、EZH2 や CREBBP などのエピゲノム遺伝子も高頻度に変異を起こしている事が明らかとなった。一方で、MYD88 や TNFAIP3 など ABC-DLBCL に変異が起こりやすい遺伝子は、DHIT-like ではほとんど異常は見られなかった。このことから、同様に予後不良群である ABC-DLBCL とは異なる生物学的背景を持つことが推察される。また、治療標的として BCL2 阻害剤や EZH2 阻害剤などのエピゲノム阻害剤の有効性が期待できることを示唆している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 遠西大輔
2. 発表標題 Recent advances in molecular pathophysiology of DLBCL
3. 学会等名 第82回日本血液学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 遠西大輔
2. 発表標題 DLBCLの遺伝子異常に基づく分類と層別化治療の可能性
3. 学会等名 第81回日本血液学会学術集会（招待講演）
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
研究分担者	前田 嘉信 (Maeda Yoshinobu) (60403474)	岡山大学・医歯薬学域・教授 (15301)	

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