

機関番号：24303
 研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2008 ～ 2011
 課題番号：20390392
 研究課題名（和文）：中枢神経原発悪性リンパ腫に対するゲノム情報を基盤とした新たな診断学、治療学の展開
 研究課題名（英文）：Development of novel diagnostic and therapeutic strategies for primary central nervous system lymphomas based on genome-wide analysis
 研究代表者：
 山中 龍也（YAMANAKA RYUYA）
 京都府立医科大学・医学部・教授
 研究者番号：20323991

研究成果の概要（和文）：

中枢神経悪性リンパ腫（PCNSL）腫瘍組織から RNA/DNA を抽出し、GeneChip, SNP アレイ、miRNA 解析を行った。特に PCNSL 34 症例の GeneChip 解析（遺伝子発現解析）から患者の予後と関連する遺伝子 21 種類を統計学的方法を用いて選択し、それらの遺伝子の発現レベルから患者の予後予測式を考案した。さらに、これらの中から 3 種類の遺伝子産物に対する抗体を用いた免疫組織学的解析と年齢、KPS を用いた簡便法で予後が良く予測できることが判明した。SNP アレイ、miRNA 解析については各 29 例、30 例の解析が終了し、統計解析中である。今後、mRNA, SNP アレイ、miRNA 解析から統合的に遺伝子解析を進め、腫瘍の生物学的な特徴をパスウェイ解析を含めて検討の上、標的分子を絞り込み、創薬に向けた研究を進める予定である。この方法の開発により、予後不良症例群を選択して、より積極的な治療を行うことが可能となり、PCNSL 患者の予後の改善が期待できると考えられる。

研究成果の概要（英文）：

Better understanding of the underlying biology of primary central nervous system lymphomas (PCNSLs) is critical for the development of early detection strategies, molecular markers, and new therapeutics. This study aimed to define genes associated with survival of PCNSL patients. Expression profiling was performed on 34 PCNSLs. A gene classifier was developed using the random survival forests model. Based on this, Prognosis Prediction Score (PPS) using immunohistochemical analysis is also developed and validated in another data set with 38 PCNSLs. We identified 21 genes whose expressions were strongly and consistently related to patient survival. A PPS was developed for overall survival using a univariate Cox model. Survival analyses using the selected 21 gene classifiers revealed a prognostic value for high-dose methotrexate (HD-MTX) and HD-MTX containing polychemotherapy regimen-treated patients. PPS using immunohistochemical analysis is also significant in test and validation data set. The gene-based predictor was an independent prognostic factor in a multivariate model that included clinical risk stratification. We have identified gene expression signatures that can accurately predict survival in patients with PCNSL. These predictive genes should be useful as molecular biomarkers and could provide novel targets for therapeutic interventions.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
20年度	3,200,000	960,000	4,160,000
21年度	2,900,000	870,000	3,770,000
22年度	2,900,000	870,000	3,770,000
23年度	2,900,000	870,000	3,770,000
総計	11,900,000	3,570,000	15,470,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・脳神経外科学

キーワード：脳腫瘍、中枢神経原発悪性リンパ腫、遺伝子発現プロファイル、マイクロアレイ、分子標的療法、ゲノム創薬

1. 研究開始当初の背景

中枢神経原発悪性リンパ腫（PCNSL）は中枢神経系に原発する節外性非ホジキン型リンパ腫で、多くはB細胞リンパ腫である。PCNSLはあらゆる年齢層に発生するが、50-60歳代に好発し、その頻度は最近増加している。本邦では現在、High dose Methotrexate（HD-MTX）3.5 g/m²化学療法3コース後、全脳放射線治療（30-40 Gy）が広く行われている。その5年生存率は約30%、生存期間中央値は33-39.5か月とされている。

本治療法の問題点として整理してみると、

- （1）生存率の向上が見られたが、全身性非ホジキン病と比べ治療成績は不良である。
- （2）治療効果を予測するバイオマーカーがないため、画一的な治療が行われている。
- （3）副作用として晩発性の神経毒性がある。
- （4）多くは再発し治療抵抗性となり、新たな治療スケジュールの開発が待たれている。

より有効で、副作用の少ない治療法を開発するためには、PCNSLに関する分子遺伝学的研究の進展が不可欠である。しかしながら、PCNSLは頻度の高い腫瘍ではなく、また生検術が行われるため十分量の臨床サンプルが得られないこともあり、臨床サンプルを用いたゲノム解析研究は国際的にも著しく遅れているのが現状である。我々は生検術を工夫し、ゲノム解析に必要なサンプル量を収集してきた。その結果、凍結臨床サンプル50例から精製したDNA/RNAを用いたゲノム解析を進めることができた。本研究はこの成果を基盤としてさらに発展させるものである。

2. 研究の目的

今回の研究では、HD-MTX療法を施行した

PCNSL腫瘍組織のゲノム解析を行うことにより（1）HD-MTXに感受性を示し、予後良好な腫瘍に高発現する遺伝子群を同定。（2）治療の標的となりうる遺伝子を選択し、診断および分子標的薬剤、抗体、siRNAなどの創薬に向けた研究を展開する。（3）PCNSLのMTXに対する耐性株を樹立し、薬剤耐性の分子機構について検討する。耐性克服による治療法の確立に向けた研究を展開する。などを目的とした

3. 研究の方法

PCNSL対象症例について臨床サンプルと臨床情報の収集を行った。すなわち、症例の年齢、性別、Karnofsky Performance Status（KPS）、画像所見、髄液所見、治療法、治療効果、副作用、転帰について詳細な検討を行った。PCNSLの凍結腫瘍組織からDNA/RNAを抽出し、GeneChip, SNPアレイ, miRNA解析を行い、統計解析を進め、特に患者の予後と関連する遺伝子を選択した。それらの遺伝子を標的とした創薬の取り組み、さらには新しい診断方法の開発に向けた研究を進めている。

以下にGeneChip遺伝子発現解析について述べる。2000年～2010年に外科的切除ないし生検術を受けた患者34人から、PCNSL標本を得た。患者の平均年齢は65.5歳（44-76歳）であり、男性19人、女性15人であった。手術前のKPSは、80以上が10人、60-70が16人、50以下が8人であった。病理組織学的には全て瀰漫性大細胞性Bリンパ腫であった。腫瘍の診断後に、患者は高用量メソトレキセート単独ないし高用量メソトレキセートを含む多剤併用化学療法による第一選択化学療法を受け、外照射療法（標準線量20-40 Gy）および再発時に多剤併用化学治療

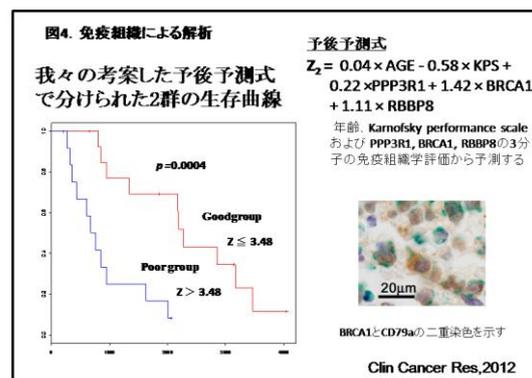
を受けた。初期治療および維持治療中の腫瘍の再発について、MRI または CT により観察した。全症例の 5 年生存率は 46.37%であった。摘出腫瘍から mRNA を抽出し、GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 Expression array (Affymetrix, Inc.) (約 47,000 遺伝子を含む) を用いて各 mRNA の発現量を測定した。これらの発現プロファイルと、追跡調査により得た各患者の術後の生存期間との相関を Random survival forest model を用いて統計学的に処理し、発現プロファイルと生存期間との間に強い相関を示す遺伝子を同定した。さらに、これらの遺伝子の発現値を用いた予後予測法を考案した。

4. 研究成果

PCNSL 3 4 症例の GeneChip 解析 (遺伝子発現解析) から患者の予後と相関する遺伝子 21 種類を統計学的方法を用いて選択し、それらの遺伝子の発現レベルから患者の予後予測式を考案した。高用量メソトレキセートにより治療された症例および高用量メソトレキセートを含む多剤併用化学療法により治療された症例に拘わらず 21 遺伝子のセットによって予後が良く予測可能であった。21 遺伝子を用いた予測式により分類された群の比較について、Kaplan-Meier 曲線を描くと Logrank 検定のための p 値 (p) は、 $p < 0.0001$ であった。この結果は、21 遺伝子予測式により予後を良く予測可能であるという事を示す。

我々の症例を Wright (Proc Natl Acad Sci USA 100: 9991-6, 2003) らに従い 44 遺伝子の遺伝子発現による 3 群分けを行った。GCB(Germinal center) type, ABC (Activated B cell) type が分けられる。しかしながら、これらの細胞起源による分類では予後との相関は認められなかった。

さらに、予後予測式を算出した方法で、臨



床データと免疫組織化学染色の結果を考慮に入れたより簡略化した予後予測式を考案した。

$$\cdot Z_2 = 0.04 \times \text{AGE} + 1 \times \text{DEEP.CONTACT} + 0.82 \times \text{PPP3R1} + 0.75 \times \text{BRCA1}$$

(ここで AGE は年齢値、DEEP. CONTACT とは深部病変があれば 1, なければ 0, PPP3R1, BRCA1 とは免疫組織化学染色で 1 ポイント以上なら 1, 0 ポイントなら 0)

$$Z_2 > 3.48 \Rightarrow \text{Poor 群}$$

$$Z_2 \leq 3.48 \Rightarrow \text{Good 群}$$

このルールに従って生存曲線を描いたものを図に示す。Z₂式でより簡易に予後良好群と不良群が分けられることがわかる。

以上から、メソトレキセート大量投与と放射線療法による通常の治療方針では予後が悪い(生存期間が短い)と予測される場合、さらに多くの抗癌剤を組み合わせる大量投与したり、造血幹細胞・骨髄細胞の移植を行うなどの治療法を選択することができるようになる(以上の結果は *Clin Cancer Res 2012* に発表した)。

SNP アレイ、miRNA 解析については各 29 例、30 例の解析が終了し、統計解析中である。今後、mRNA, SNP アレイ, miRNA 解析から統合的に遺伝子解析を検討し、腫瘍の生物学的な特徴をパスウェイ解析を含めて検討の上、標的分子を絞り込み、創薬に向けた研究を進める予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 15 件)

1. Kawaguchi A, Yamanaka R, 他 13 名, 最終著者: Gene expression signature-based prognostic risk score in patients with primary central nervous system lymphoma. *Clin Cancer Res* 18(20):5672-81, 2012. 査読有. doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-0596.
2. Kawaguchi A, Yamanaka R, 他 14 名 最終著者: Identification and Validation of a Gene Expression Signature That Predicts Outcome in Malignant Glioma Patients. *Int J Oncol* 40(3):721-30, 2012. 査読有. doi: 10.3892/ijo.2011.1240.
3. Komohara Y, Yamanaka R, 他 8 名 7 番目: M2 macrophage/microglial cells induce activation of stat3 in primary central nervous system lymphoma. *J Clin Exp Hematop* 51(2):93-9, 2011. 査読有
4. Noguchi M, Yamanaka R, 他 19 名 17 番目: Assessment of immunological biomarkers in patients with advanced cancer treated by personalized peptide vaccination. *Cancer Biol Ther* 10(12):1266-79, 2011. 査読有
5. Yamanaka R, Fukushige T, 他 4 名 1 番目: Characteristics of patients with brain metastases from lung cancer in a palliative care center. *Support Care Cancer* 19(4):467-73, 2011. 査読有. doi: 10.1007/s00520-010-0838-5.
6. Yamanaka R, Saya H: Molecular targeted therapies for glioma. *Ann Neurol* 66:717-29, 2009. 査読有. doi: 10.1002/ana.21793.
7. Yamanaka R: Dendritic cell and peptide based vaccination strategies for glioma. *Neurosurg Rev* 32: 265-73, 2009. 査読有. doi: 10.1007/s10143-009-0189-1
8. Yamanaka R: Management of refractory or relapsed primary central nervous system lymphoma. *Molecular Medicine Reports* 2: 879-85, 2009. 査読有. doi: 10.3892/mmr_00000186.
9. Yamanaka R: Medical management of brain metastases from lung cancer. *Oncol Rep* 22(6):1269-76, 2009. 査読有
10. Yamanaka R: Cellular and peptide based immunotherapeutic approaches for glioma. *Trends Mol Med* 14(5):228-35, 2008. 査読有. doi: 10.1016/j.molmed.2008.03.003.
11. Fukai J, Yamanaka R, Nishio K, 他 2 名 3 番目: EphA4 promotes cell proliferation and migration through a novel EphA4-FGFR1 signaling pathway in the human glioma U251 cell line. *Mol Cancer Ther* 7(9):2768-78, 2008. 査読有. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-07-2263.
12. Yamanaka R, 他 11 名 1 番目: Results of treatment of 112 cases of primary CNS lymphoma. *Jpn J Clin Oncol* 38(5): 373-80, 2008. 査読有. doi: 10.1093/jjco/hyn027.
13. Li J, Yamanaka R, 他 9 名 10 番目: Proteomic characterization of primary CNS diffuse large B-cell lymphomas. *J Neurosurg* 109(3):536-46, 2008. 査読有. doi: 10.3171/JNS/2008/109/9/0536.
14. Jin M, Yamanaka R, 他 7 名 5 番目: Identification of EphB6 variant-derived epitope peptides recognized by cytotoxic T-lymphocytes from HLA-A24⁺ malignant glioma patients. *Oncol Rep* 19(5):1277-83, 2008. 査読有
15. Jin M, Yamanaka R, 他 5 名 5 番目: EphB6 variant-derived peptides with the ability to induce glioma-reactive cytotoxic T lymphocytes in HLA-A2+ glioma patients. *Cancer Sci* 99(8):1656-62, 2008.

査読有. doi: 10.1111/j.1349-7006.2008.00866.x.

〔学会発表〕(計 17 件)

1. 山中龍也, 川口淳, 他: 悪性神経膠腫患者の予後を予測する遺伝子群の探索, 第 71 回日本癌学会学術集会, 札幌, 9 月 19 日-21 日, 2012
2. 山中龍也, 川口淳, 他: 悪性神経膠腫患者の予後を予測する遺伝子群の探索, 第 10 回日本臨床腫瘍学会学術集会, 大阪, 7 月 26 日-28 日, 2012
3. 山中龍也: (招待講演) 「脳腫瘍の免疫アップデート」脳腫瘍レビュー' 11. 東京, 7 月 2 日, 2011
4. 近 貴志, 山中龍也, 他: 下垂体腺腫に対する照射 22 年後に meningioma, 30 年後に glioma を発症した 1 例, 第 52 回日本神経病理学会総会学術研究会, 京都, 6 月 2 日-4 日, 2011
5. 山中龍也: (招待講演) 悪性脳腫瘍に対する免疫療法. 「公開セッション: 悪性脳腫瘍治療の最前線」第 28 回日本脳腫瘍学会学術集会, 軽井沢, 11 月 28-30 日, 2010
6. Yamanaka R, Ikenaka K, et al.: Isolation and Characterization of an *N*-Linked Oligosaccharide That Is Increased in Glioblastoma Tissue and Cell Line. The 3rd Quadrennial Meeting of the World Federation of Neuro-Oncology, Yokohama, May 11-14, 2009
7. 山中龍也, 他: 当院緩和ケア病棟における肺癌脳転移 55 症例の臨床的検討, 第 14 回日本緩和医療学会学術大会, 大阪, 6 月 19 日-20 日, 2009
8. 山中龍也, 福重哲志: 当院緩和ケア病棟における肺癌脳転移症例の臨床的検討, 第 7 回日本臨床腫瘍学会, 名古屋, 3 月 20 日-21

日, 2009

9. 山中龍也, 西尾和人, 他: 包括的遺伝子発現情報を基にした悪性神経膠腫患者の予後を予測する遺伝子の探索, 第 6 回日本臨床腫瘍学会, 福岡, 3 月 20 日-21 日, 2008
10. 山中龍也, 池中一裕, 他: (ワークショップ) 高速液体クロマトグラフィーを用いた神経膠芽腫組織内 *N*-結合型糖タンパク質糖鎖の分離・解析, 第 67 回日本癌学会学術総会, 名古屋, 10 月 28 日-10 月 30 日, 2008
11. Noguchi M, Yamanaka R, et al.: Immunologic and clinical effects of personalized selection of peptide vaccines in HLA-A2 positive patients with advanced cancer. The 44nd Meeting of the American Society of Clinical Oncology, Chicago, May 30- June 3, 2008
12. 山中龍也, 西尾和人, 他: 包括的遺伝子発現情報を基にした悪性神経膠腫患者の予後を予測する遺伝子の探索, 第 46 回日本癌治療学会総会, 名古屋, 10 月 30 日-11 月 1 日, 2008
13. 近 貴志, 山中龍也, 他: 下垂体腺腫に対する照射 22 年後に meningioma, 30 年後に glioma を発症した 1 例、第 26 回日本脳腫瘍学会, 松山, 11 月 30 日-12 月 1 日, 2008
14. 山中龍也: (シンポジウム) 脳神経外科における臨床腫瘍認定医の育成プログラム-がん薬物療法専門医・癌治療認定医の立場からの専門医教育, 第 67 回日本脳神経外科学会総会, 盛岡, 10 月 18 日-20 日, 2008

学会発表 他省略

〔図書〕(計 6 件)

1. Yamanaka R: Primary Central Nervous System Lymphoma Recent advance on clinical research. In Terry Lichtor

- (ed.), Brain Tumors. INTECH, (in press)
2. 山中龍也, 他: 脳腫瘍. 中川和彦, 西尾和人編, 分子標的薬-がんから他疾患までの治療をめざして. 日本臨床社, 東京, 421-7, 2012.
3. Yamanaka R, Kajiwara K: Dendritic cell vaccine. pp.187-200. In Yamanaka R (ed.), Glioma: Immunotherapeutic approaches. Landes Bioscience/Springer, Austin, Texas, 2012
4. Yamanaka R: Medical management of brain metastases from lung cancer. pp. 253-66, In Ana Lucia Abujamra(ed.), Brain Tumors / Current and emerging therapeutic strategies. INTECH, 2011.
5. Yamanaka R: Immunotherapeutic approach for malignant glioma by alpha viruses as positive strand RNA viruses. pp.125-40, In Erdmann VA, et al. (eds.), Therapeutic ribonucleic acids in brain tumors. Springer, 2009.
6. Yamanaka R: Alpha Viruses. pp 217-28, In Harrington KJ, et al. (eds.), Viral therapy of cancer. Wiley, London, 2008.

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

名称: 中枢神経原発悪性リンパ腫患者の予後予測方法. 発明者: 山中龍也, 川口淳, 他.
権利者: 京都府公立大学法人, 千葉大学, 新潟大学, 久留米大学, 山口大学. 種類: 特願 2011-154664. 出願年月日: 平成 23 年 7 月 13 日.
国内外の別: 国内, 国外申請中

名称: 悪性神経膠腫患者の予後予測方法. 発明者: 山中龍也, 川口淳, 他. 権利者: 久留米大学 種類: 特願 2010-084929. 出願年月日: 平成 22 年 4 月 1 日. 国内外の別: 国内

○取得状況 (計 4 件)

名称: 医薬組成物. 発明者: 山中龍也, 池前一裕, 他. 権利者: 新潟大学, 国立共同研究機構. 種類: 特許第 5558577 号. 取得年月日: 平成 24 年 12 月 21 日. 国内外の別: 国内

名称: HLA-A24 分子結合性 KIF 由来ペプチド. 発明者: 伊東恭悟, 山中龍也, 他. 権利者: 久留米大学. 種類: 特許第 5065273 号. 取得年月日: 平成 24 年 8 月 17 日. 国内外の別: 国内

名称: 脳腫瘍の検出方法及びそれに用いる脳腫瘍の検出物質. 発明者: 山中龍也, 池前一裕, 他. 権利者: 新潟大学, 国立共同研究機構. 種類: 特許第 4852703 号. 取得年月日: 平成 23 年 11 月 4 日. 国内外の別: 国内

名称: 神経膠腫細胞株 U251 の増殖能抑制剤及び浸潤能抑制剤. 発明者: 山中龍也, 他. 権利者: 新潟大学. 種類: 特許第 4474551 号. 取得年月日: 平成 22 年 3 月 19 日. 国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山中 龍也 (YAMANAKA RYUYA)
京都府立医科大学・医学部・教授
研究者番号: 20323991

(2) 研究分担者

西尾 和人 (NISHIO KAZUTO)
近畿大学・医学部・教授
研究者番号: 10208134
池中 一裕 (IKENAKA KAZUHIRO)
自然科学研究機構・生理学研究所・教授
研究者番号: 00144527

(3) 連携研究者

川口 淳 (Kawaguchi Atsushi)
久留米大学・バイオ統計センター・講師
研究者番号: 60389319