

令和 6 年 6 月 18 日現在

機関番号：32610

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09136

研究課題名(和文) 脳悪性リンパ腫における髄液中DNAの特異的遺伝子変異検出による診断の前方視的検討

研究課題名(英文) A prospective study on the diagnosis of central nervous system lymphoma by the detection of specific genetic mutations in cerebrospinal fluid DNA

研究代表者

小林 啓一 (Kobayashi, Keiichi)

杏林大学・医学部・講師

研究者番号：70406990

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：高齢者に対して低侵襲かつ簡便にCNSLの診断を行うために、脳脊髄液を用いたCNSLの診断法を開発した。CNSLで90%以上に認められるMYD88遺伝子またはCD79B遺伝子の変異をマルチプレックスqPCRにより髄液から同時に検出できるBNA Clamp-quantitative PCR(BNA-qPCR)法を用いた検査法を開発した。段階希釈実験では、変異アリル頻度( variant allele frequency : VAF ) 0.5%以上でMYD88変異、CD79B変異が検出可能であることを確認した。同一症例の腫瘍と髄液で遺伝子解析結果を比較したところ、一致率は73.3%であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高齢者のCNSL疑いの症例に、手術による生検を行うことなく本検査によって診断を確定することができれば、高齢者の手術による合併症を減らし、ADLの向上も期待できる。

研究成果の概要(英文)：Central nervous system lymphoma (CNSL) is the second most common primary malignant brain tumors in elderly. In order to avoid risk of operation in elderly patients, we developed a simple and robust liquid biopsy method utilizing a BNA Clamp-quantitative PCR(BNA-qPCR) method using cell-free DNA (cfDNA) extracted from the cerebrospinal fluid (CSF). More than 90% of CNSL harbor mutations in either MYD88 or CD79B. This method enables detection of mutations in either MYD88 or CD79B in a single multiplex qPCR assay. In a dilution experiment, our assay detected mutations of the variant allele frequency of as low as 0.5%. The consistency of the mutations between the matched tumor and cfDNA from CSF was 73.3%. We will investigate the nature of inconsistencies and further improve the sensitivity and specificity of the assay with the aim to establish a clinically applicable test.

研究分野：悪性脳腫瘍の診断・治療

キーワード：中枢神経系悪性リンパ腫 リキッドバイオプシー マルチプレックスqPCR MYD88 CD79B

## 1. 研究開始当初の背景

中枢神経系悪性リンパ腫(central nervous system lymphoma, CNSL)は、本邦の高齢者原発性悪性脳腫瘍において第二位の発症頻度の疾患である。高齢化に伴い症例数は増加し、脳腫瘍全国集計調査報告における脳腫瘍全数に対する CNSL の割合は増加の一途を辿っている。PCNSL の予後規定因子として、治療開始前の performance status (PS)が良好であること(PS 2、Karnofsky PS (KPS) 70)が指摘されており、身体的活動度を低下させずに確定診断を得ることは、原病の治療において重要な意味を持つ。しかし、CNSL は他の脳腫瘍と比べ、脳室周囲や基底核など脳の深部に発生することが多いため、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。本疾患の好発年齢である高齢者は耐術能が低く、術後せん妄・廃用による ADL 低下も懸念されることから、現在の診断法は診療上の重要な課題となっている。

近年、低侵襲かつ簡便に CNSL の診断を行うべく、簡便に採取できる脳脊髄液(髄液)を用いた診断法(liquid biopsy)に注目が集まっている。CNSL に特徴的な遺伝子変異は複数報告されており、中でも B-cell receptor / Toll-like receptor / NF- $\kappa$ B シグナル経路に關与する MYD88 遺伝子と CD79B 遺伝子の変異は、特に高頻度に認められる。71 症例の PCNSL に対して遺伝子変異を調べた中村らの報告によると、MYD88 は 76%(54/71)、CD79B は 83%(59/71)に遺伝子変異が認められ、いずれかの変異を認める症例は全体の 92%(65/71)に上った。これらの遺伝子変異は、CNSL の鑑別疾患である膠芽腫や転移性脳腫瘍では極めて稀で、疾患特異性にも優れることから、診断のターゲットとして非常に有望である。CNSL の髄液中 DNA を対象にした digital PCR 法による MYD88 遺伝子変異検出は、腫瘍由来 DNA 含有率が 0.1%以下のサンプルであっても高感度に遺伝子変異が検出できることが国内外から報告されている。しかし、検査条件や遺伝子変異陽性の検査基準値が各文献で異なり、検査の再現、検査精度の検証が困難であった。そこで、我々は先行研究において CNSL digital PCR 法の条件を定め、検査精度を検証した。36 サンプルの脳腫瘍-髄液検体の検証の結果、至適 DNA 量、基準値を遵守した場合、感度 92.2%、特異度 100%、Area Under the Curve (AUC) 0.95 と非常に高い検査精度が得られ、liquid biopsy は手術に代替しうる診断法となる可能性が示唆された(Yamagishi Y. Cancer Science 2020)。

CNSL の liquid biopsy における検査精度の向上のためには MYD88 と併せて CD79B 変異検出が望まれる。しかし、CD79B 遺伝子変異は hot spot 内に限っても 10 種類以上の遺伝子変異が存在し、digital PCR で遺伝子変異を解析するには髄液 DNA 量が不足するという問題があった。この問題を克服するために、野生型遺伝子と強固に結合し PCR による増幅を抑制することにより、変異型のみを増幅検出する手法である BNA Clamp-quantitative PCR(BNA-qPCR)法を用いることで、CD79B 遺伝子変異の検出を試みることにした。本研究は、髄液 DNA を用いた MYD88, CD79B 遺伝子変異を digital PCR 法、BNA-qPCR 法により検出する CNSL 液性診断法を開発することを目的とし研究を開始した。

## 2. 研究の目的

CNSL の特異的遺伝子変異である MYD88 遺伝子変異、CD79B 遺伝子変異を、digital PCR 法、BNA Clamp-quantitative PCR(BNA-qPCR)法により検出する CNSL 診断法を開発し、臨床応用へつなげることを目的とする。

## 3. 研究の方法

先行研究で用いた髄液、脳腫瘍ペア検体を用い、BNA-qPCR 法による MYD88、CD79B 遺伝子変異の検出法を開発し、検査条件の設定、検査精度の検証を行う。

また、杏林大学脳神経外科および協力施設における CNSL および CNSL 疑い患者の髄液、脳腫瘍ペアを前方視的に収集する。可能な症例は血液サンプルもあわせて収集する。

腫瘍 DNA は Sanger sequencing、Pyro sequencing により MYD88、CD79B 遺伝子変異の解析を行い、余剰 DNA が生じた場合は Ion Torrent multiplex PCR 法(ThermoFisher)を用いて他遺伝子変異解析も追加する。髄液 DNA は digital PCR 法で MYD88 遺伝子変異の解析を行い、BNA-qPCR 法で MYD88、CD79B 遺伝子変異の解析を行い、脳腫瘍解析結果との一致率を評価する。余剰 DNA が生じた場合は、腫瘍 DNA と同様に他遺伝子の解析も行う。

## 4. 研究成果

利権ジェネシス株式会社 遺伝子解析部開発課とともに、MYD88 L265P 遺伝子変異、CD79B 遺伝子変異の hot spot (c. 586 - 591) をターゲットとした野生型 BNAclamp、PCR probe を作成し、MYD88、CD79B 遺伝子変異を 1 つの反応系で検出できるマルチプレックス qPCR 系を開発した。検出目標とする各種遺伝子変異を導入としたプラスミドを用いた検証実験では開発した実験系で MYD88 変異、CD79B 変異を検出することができた。また、段階希釈実験では、変異アリル頻度 (variant allele frequency : VAF) 0.5%以上で MYD88 変異、CD79B 変異が検出可能であり、臨床上実現可能な実験条件で遺伝子変異が検出可能であることを確認した。

先行研究で用いた髄液-脳腫瘍ペア残余検体 15 例を用いた検証実験を行ったところ、腫瘍・髄液の遺伝子解析結果の一致率は 73.3% ( 11 例 / 15 例 ) であった。

現在は、中間解析の結果を踏まえ、髄液-脳腫瘍の遺伝子解析結果が不一致であった原因の調査、カットオフ値の再検討を行うことで、検査精度の向上や検査条件の確立、検査限界について探索する。また、計画中の前方視的研究を開始し、数百例程度を目標に髄液-脳腫瘍検体を収集し、杏林大学病理学教室 市村研究室で cfDNA の抽出、digital PCR 法、BNA-qPCR 法による MYD88、CD79B 遺伝子変異検出の検査精度を検証する。残余 DNA が生じた場合は、Pyrosequencing や Ion S5 システムを用いた CNSL パネルで標的シーケンスを行い、他の遺伝子変異の解析も試みる予定である。また、臨床情報と遺伝子解析データをあわせて検証し、統計学的解析により、liquid biopsy に適する症例の特徴や疾患予後に関する遺伝子学的特徴の検索、バイオマーカーの探索も予定している。これらの結果は、各種学会や英文原著論文で発表する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 1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 永根基雄	4. 巻 63
2. 論文標題 中枢神経系原発悪性リンパ腫の病態と治療開発：最近の動向と展望	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 臨床血液	6. 最初と最後の頁 1145-1156
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.11406/rinketsu.63.1145	査読の有無 無
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 山岸夢希, 佐々木重嘉, 齊藤邦昭, 小林啓一, 中富浩文, 近藤聡英, 塩川芳昭, 成田善孝, 市村幸一, 永根基雄	4. 巻 39 Suppl
2. 論文標題 脳腫瘍のsurrogate marker中枢神経系リンパ腫のサロゲートマーカーとしての髄液中MYD88変異検出の意義	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Brain Tumor Pathology	6. 最初と最後の頁 63
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 Yamagishi Y, Sasaki N, Nakano Y, Matushita Y, Omura T, Shimizu S, Saito K, Kobayashi K, Narita Y, Kondo A, Shiokawa Y, Nagane M, Ichimura K	4. 巻 112
2. 論文標題 Liquid biopsy of cerebrospinal fluid for MYD88 L265P mutation is useful for diagnosis of central nervous system lymphoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Sci	6. 最初と最後の頁 4702-4710
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.15133	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9件（うち招待講演 4件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 永根基雄
2. 発表標題 中枢神経系原発悪性リンパ腫治療の課題と展望
3. 学会等名 第40回 日本脳腫瘍学会 学術集会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 永根基雄
2. 発表標題 中枢神経系悪性腫瘍
3. 学会等名 第60回 日本癌治療学会 学術総会 教育セッション7 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 永根基雄
2. 発表標題 中枢神経系原発悪性リンパ腫の病態と治療開発：最近の動向と展望
3. 学会等名 第84回日本血液学会学術総会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山岸夢希, 佐々木重嘉, 清水早紀, 松下裕子, 齊藤邦昭, 小林啓一, 中富浩文, 近藤聡英, 塩川芳昭, 成田善孝, 市村幸一, 永根基雄
2. 発表標題 中枢神経系リンパ腫のサロゲートマーカーとしての髄液中MYD88変異検出の意義
3. 学会等名 第40回日本脳腫瘍病理学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山岸夢希, 佐々木重嘉, 清水早紀, 松下裕子, 齊藤邦昭, 小林啓一, 中富浩文, 塩川芳昭, 成田善孝, 市村幸一, 永根基雄
2. 発表標題 髄液中MYD88検出による中枢神経系悪性リンパ腫のサロゲートマーカーとしての有用性
3. 学会等名 第20回日本臨床腫瘍学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Motoo Nagane, Yuki Yamagishi, Nobuyoshi Sasaki, Saki Shimizu, Yuko Matsushita, Kuniaki Saito, Keiichi Kobayashi, Hirofumi Nakatomi, Yoshiaki Shiokawa, Yoshitaka Narita, Koichi Ichimura
2. 発表標題 Clinical applicability of digital PCR-based liquid biopsy for detecting MYD88 L265P mutation in cerebrospinal fluid in patients with primary CNS lymphoma
3. 学会等名 International Conference of Brain Tumor Research and Therapy 2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 永根基雄、山岸夢希、小林啓一、他
2. 発表標題 脳脊髄液による中枢神経系リンパ腫の診断
3. 学会等名 第6回Liquid Biopsy研究会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山岸夢希、佐々木重嘉、小林啓一、市村幸一、永根基雄、他
2. 発表標題 中枢神経系原発悪性リンパ腫に対するMYD88変異検出による髄液liquid biopsy
3. 学会等名 第39回日本脳腫瘍学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山岸夢希、佐々木重嘉、清水早紀、齊藤邦昭、小林啓一、中富浩文、塩川芳昭、成田善孝、市村幸一、永根基雄
2. 発表標題 PCNSL生検困難例の特徴とliquid biopsyの適応における有用性と課題
3. 学会等名 第41回日本脳腫瘍病理学会学術集会
4. 発表年 2023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	佐々木 重嘉  (Sasaki Nobuyoshi)  (20894504)	杏林大学・医学部・助教   (32610)	
研究分担者	市村 幸一  (Ichimura Koichi)  (40231146)	順天堂大学・医学部・特任教授   (32620)	
研究分担者	永根 基雄  (Nagane Motoo)  (60327468)	杏林大学・医学部・教授   (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
---------	---------