

様 式 C - 19、F - 19、Z - 19 (共通)

科学研究費助成事業

研究成果報告書



平成 28 年 5 月 20 日現在

機関番号：13901

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26893107

研究課題名(和文)末梢血遊離DNA、FFPEを使ったリンパ腫遺伝子変異解析法の確立に関する研究

研究課題名(英文)Development of methods for genetic analysis of malignant lymphoma using cell free DNA from peripheral blood and FFPE DNA

研究代表者

入山 智沙子(IRIYAMA, Chisako)

名古屋大学・医学部附属病院・病院助教

研究者番号：40732631

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：びまん性大細胞型B細胞リンパ腫(DLBCL)において、血漿由来無細胞遊離核酸(cfDNA)は症例毎に濃度差があり(1mlあたり0.23ng～547ng)、治療に伴い変化した。cfDNAはラダー状であるが、PCRでは300から600bpsまでの増幅が可能であり、腫瘍特異的遺伝子異常が検出された。低侵襲で経時的な遺伝子解析のための遺伝子ソースとしての有用性が示唆された。ホルマリン固定標本由来(FFPE)DNAはスメア状であり、PCR困難な症例もあるが、十分な生検検体由来DNAが得られなかった症例でも後方視的な遺伝子解析を可能にした。

研究成果の概要(英文)：Analysis were performed using cell free DNA (cfDNA) from peripheral blood and DNA from formalin fixed paraffin embedded tissue (FFPE DNA) of patients with diffuse large B cell lymphoma (DLBCL). Concentration of cfDNA varied among patients (0.23 to 547 ng in 1ml plasma), and changed during chemotherapy. cfDNA was detected as ladder pattern. Amplification of 300 to 600 base pairs of PCR products was successfully performed using cfDNA. Genomic mutations which were detected in biopsy specimen can be detected in cfDNA. It is suggested that cfDNA can be alternative source for genetic analysis which can be obtained less invasively and frequently in order to detect genetic alteration time-dependently. FFPE DNA was detected as smear pattern and sometimes it was difficult to amplify DNA with PCR for some samples. However it enables us to analyze genetic abnormalities retrospectively for many cases whose fresh biopsy samples could not be acquired enough.

研究分野：血液内科学

キーワード：悪性リンパ腫 末梢血無細胞遊離DNA FFPE DNA 遺伝子変異解析

1. 研究開始当初の背景

近年、びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫 (DLBCL)における遺伝子異常が多数同定されており、その一部は、分子標的薬の治療効果との強い相関が示されている。治療成績を更に向上させるためには、今後の分子標的薬等を用いた臨床試験において、登録患者における遺伝子異常の情報を把握することが極めて重要な課題となる。しかしながら、現在の大抵の臨床試験実施施設において、生検検体から遺伝子解析に使用できる生の腫瘍細胞を十分に得ることは極めて困難である。今後の臨床試験において詳細な遺伝学的検討を行うためには、全ての症例において遺伝子解析に使用可能な、均質かつ良質な DNA、RNA ソースを確立することが急務と考えられた。

末梢血無細胞遊離 DNA (cfDNA) は血漿、血清中を流れる DNA であり、固形癌において腫瘍特異的遺伝子変異が検出されることが報告されており、腫瘍細胞由来の断片化した DNA と考えられている。ホルマリン固定標本由来 DNA (FFPE DNA) は後方視的な解析も可能とし、Tissue Micro Array を併用すればより腫瘍特異性の高い DNA を得られるというメリットもある。そのため、「末梢血無細胞遊離核酸」及び「ホルマリン固定標本由来 DNA」に注目し、これらを用いた腫瘍組織遺伝子の抽出法および解析法の確立を行うことが、今後の臨床試験に向けた簡便で安定した遺伝子検体収集の基盤を作る上で有意義であると考えられた。

2. 研究の目的

本研究においては、DLBCL における cfDNA、FFPE DNA の遺伝子解析への応用を目指し、以下を目的とした。

(1) DLBCL における cfDNA の性質を評価し、Sanger 法、Pyrosequence 法等の変異解析法につき、生検検体由来 DNA との効率の比較を行う

(2) cfDNA を用いて治療抵抗性に関わる遺伝子異常の検出と、経時的な変化について検討する

(3) FFPE DNA の性質を評価する

(4) FFPE DNA を用いて中枢神経浸潤に関わる遺伝子異常につき検討する

(5) cfRNA を抽出し、遺伝子発現解析が可能か検討する

3. 研究の方法

(1) 血漿由来 cfDNA の性状評価

DLBCL 症例 46 例の血漿を用い、cfDNA を QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit を用いて抽出し、アガロースゲル電気泳動を施行し、CS analyzer を用いた濃度測定を行う。12 例については化学療法前後の経時的な変化を確

認する。Biomed PCR 法による Multiplex PCR により、100、200、300、400、および 600bps の遺伝子増幅を施行し PCR の効率を確認する。

(2) DLBCL 症例における cfDNA を用いた遺伝子変異解析

生検検体由来 DNA において遺伝子変異が確認された症例において、*CD79B*、*MYD88*、*ID3* 遺伝子変異につきサンガー法による direct sequence を施行し比較する。

また、DLBCL 症例における再発難治、形質転換 DLBCL との関連が報告された *STAT6* の D409 置換を伴う変異につき¹⁾、46 例の DLBCL 症例の血漿由来 cfDNA を用いて、サンガー法による direct sequence を施行し、治療反応性との関連性を評価する。初診時検体 26 (GCB:12 (うち 2 例治療抵抗化) non GCB:12 (うち 1 例治療抵抗化) 末検:1、CD5 陽性:2 (うち 1 例治療抵抗化))、再発難治時検体 7 (GCB:1、non GCB:4、末検:2) 形質転換後 7 (GCB:5、non GCB:1、末検:1) EBV 陽性 DLBCL2、Double hit リンパ腫 3 を用いる。

(3) 脳脊髄液由来 cfDNA の性状評価

2 症例の脳脊髄液から cfDNA 抽出を抽出し、Biomed PCR 法による遺伝子増幅を施行する。1 例において、腫瘍生検検体で確認された *MYD88* 変異の存在割合を Pyrosequence 法を用いて確認する。

(4) FFPE DNA の性状評価

1994 年から 2014 年に採取された 19 例の検体について、QIAamp DNA FFPE Tissue Kit を用いて 10μm の FFPE スライスから DNA を抽出し、アガロースゲル電気泳動および Biomed PCR 法を施行し、経年変化や検体間の差を確認する。

(5) FFPE DNA を用いた CNS 浸潤に関わる遺伝子異常の解析

中枢神経 (CNS) 病変を持つ 11 例において FFPE DNA を用いて、*CARD11*、*CD79B*、*MYD88* 遺伝子変異解析をサンガー法により施行し、浸潤との関連性を評価する。

(6) cfRNA の性状評価

DLBCL 症例 1 例を含む 4 例の造血器腫瘍症例において、cfRNA を QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit を用いて抽出し、Biomed PCR 法による遺伝子増幅を確認する。また、RT-PCR 法にて *MYC*、*BCL2*、*BCL6* の発現を確認し、免疫染色の結果との相関を評価する。

4. 研究成果

(1) 血漿由来 cfDNA の性状評価

血漿由来 cfDNA の濃度は症例毎にばらつきがあり、血漿 1ml あたり 0.23ng ~ 547ng と約 3log の差があった。次に、12 例の cfDNA

について、化学療法前後の DNA 濃度変化を確認した。治療開始前に 1ml 血漿中 100ng を超える比較的高濃度であった 4 症例では、治療開始後の濃度は day3 頃から低下、あるいは著変なかったが、1ml 血漿中 20ng 未満の低濃度であった 8 症例では、day2 から day4 頃にかけて濃度の上昇を認め、10ng 未満の 7 例中 6 例で 10ng を超えた (図 1)。Biomed PCR を施行したところ、全例で 300bps までの増幅が可能であり、一部症例では 400-600bps の増幅が可能であった。

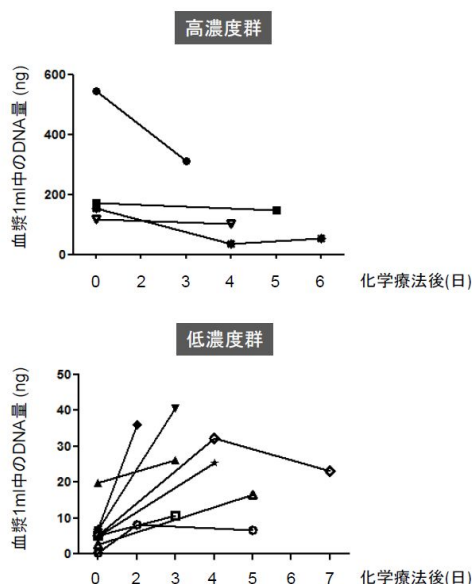


図1 化学療法前後のcfDNA濃度の変化

治療後の cfDNA 濃度の上昇は、治療早期には多数の腫瘍が崩壊することにより、細胞内から多くの DNA が流出することによるものである可能性が示唆された。低濃度の症例においても、治療後数日のタイミングで採血を行うことにより、遺伝子解析に応用できる検体が得られる可能性が高まると考えられた。

(2) DLBCL 症例における cfDNA を用いた遺伝子変異解析

遺伝子変異解析時のプライマーについては、上記 Biomed PCR の結果から、300bps 弱の短い PCR 産物を増幅するものを設定した。サンガー法による direct sequence を *CD79B* (261bps)、*MYD88* (274bps)、*ID3* (203、286bps) 遺伝子について施行することが可能であった。しかし、一部に生検検体で認められた変異が検出困難な症例もあり、より高感度な検出方法の検討が必要であると考えられた。

STAT6 の D409 置換を伴う変異の解析では、cfDNA 濃度低値の 1 例を除く 45 例で解析可能であり、初発 GCB1 例、治療抵抗 non GCB1 例で *STAT6* 変異を認めた。治療抵抗例では経時的に *STAT6* 変異割合の増加を確認し、同変異は腫瘍組織由来 DNA でも確認された (図 2)。

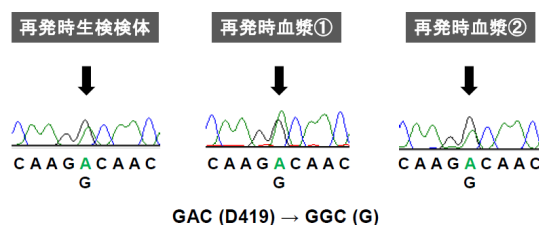


図2 血漿由来cfDNAを用いた経時的なSTAT6遺伝子変異解析

STAT6 変異は、既報では初発例の 4%、再発難治 GCB の 36% で報告されており、経時的な解析により再発や難治例の早期発見に繋がる可能性が示唆された。一方で、既報と比較し変異頻度が低いことから、検出感度の問題も示唆される。遺伝子異常出現のタイミングや感度など、さらに症例を蓄積し検討していく必要があると考えられる。また、単一遺伝子のみでの検討では限界があり、治療抵抗性に関わる複数の遺伝子を対象としたターゲットシーケンス等の応用により、より鋭敏に再発難治例を検出できるようにすることが今後の課題である。再生検困難時等、付加的な遺伝子異常を解析する際等には有用な遺伝子ソースとなり得ると考えられる。

(3) 脳脊髄液由来 cfDNA の性状評価

2 例の脳脊髄液 (CSF) から cfDNA を抽出したところ、1ml あたり 12.2μg、1.3μg の DNA を抽出可能であった。同検体を用い Biomed PCR を施行し、400 ~ 600bps の DNA 増幅が可能であった。腫瘍生検検体で検出された *MYD88* L265P 変異を認めた 1 例においては、CSF 由来 cfDNA においても同様の変異を確認することが可能であった (図 3)。

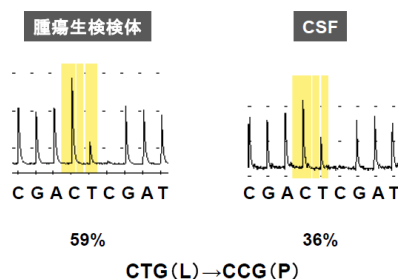


図3 MYD88変異の腫瘍生検検体とCSF由来cfDNAでの比較

中枢神経病変については侵襲性的の問題から生検困難な場合がしばしば経験される。さらに症例数を増やし、リンパ腫浸潤例および感染等のその他の疾患の場合との比較が必要である。リンパ腫浸潤例における特徴を解明し、効率的な遺伝子解析法を確立することにより、中枢神経病変の鑑別、診断、中枢神経浸潤のリスク評価などに際し有用な方法となる可能性が示唆された。

(4) FFPE DNA の性状評価

FFPE DNA についてアガロースゲル電気泳動を施行した場合、どの検体もスミア状に分散されていたが、採取された年代の古い検体においてはより短い塩基長のものが増加し

ている傾向が認められた。また、Biomed PCR 法で Multiplex PCR を施行すると、増幅される塩基長は 100bps 程度から 300bps 程度と検体毎にばらつきを認め、検体が新しい方が増幅効率が良い傾向を認めた。しかしながら、20 年以上前に作成された FFPE 検体であっても DNA は抽出、増幅可能であった。

同じ濃度の生細胞株から抽出した DNA を用いた PCR と比較した場合、全量 20 μ l での PCR を施行した際、細胞株由来 DNA は鋳型 DNA が 0.4ng でも 400-600bps と比較的長鎖の増幅が可能であるが、FFPE DNA では 10ng 程度から長鎖の増幅効率が低下しており、DNA 濃度のみならず質の検討も重要であることが示唆された (図 4)。

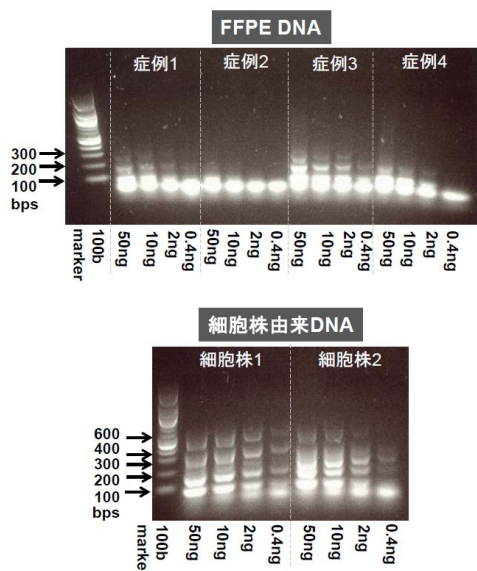


図4 PCR効率のFFPE DNAと細胞株由来DNAの比較

1 枚の FFPE スライスから得られる DNA 量は検体の大きさに左右され、針生検等の微小検体を用いた場合は 50ng から 165ng と少量となるが DNA を抽出することは可能であった。

(5) FFPE DNA を用いた CNS 浸潤に関わる遺伝子異常の解析

FFPE 由来 DNA を用いた解析では、中枢神経病変を認めたびまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫 (DLBCL) 症例のホルマリン固定標本から DNA を抽出し、*CARD11*、*CD79B*、*MYD88* の変異解析を施行した。初発時から浸潤を認めた 3 例、再発時浸潤を認めた 6 例、中枢神経原発 B 細胞リンパ腫 (PCNSL) 2 例について解析した。*CARD11* 変異は PCNSL の 1 例で Coiled coil domain 内に検出されたが、DNA の質の問題で 4 例において部分的に解析困難であった。また *CD79B* ITAM の変異は 2 例 (再発時浸潤例:1、PCNSL:1 例) *MYD88* L265P 置換を伴う変異は 6 例 (初診時浸潤例:2、再発時浸潤例:3、PCNSL:1) で認められ、3 例では homozygous の異常を認めた。

以前当院で施行した 85 例の DLBCL 症例の生検検体由来 DNA を用いた変異解析とあわ

せると、中枢神経病変は *CARD11* 変異型 5 例中 4 例、野生型 80 例中 13 例、*CD79B* 変異型 8 例中 5 例、野生型 85 例中 22 例、*MYD88* 変異型 15 例中 9 例、野生型 80 例中 17 例であった。*CARD11* ($p<0.0001$)、*CD79B* ($p=0.033$)、*MYD88* ($p=0.043$) の 3 つの遺伝子とも変異と中枢神経病変との有意な関連が示唆された (図 5)。

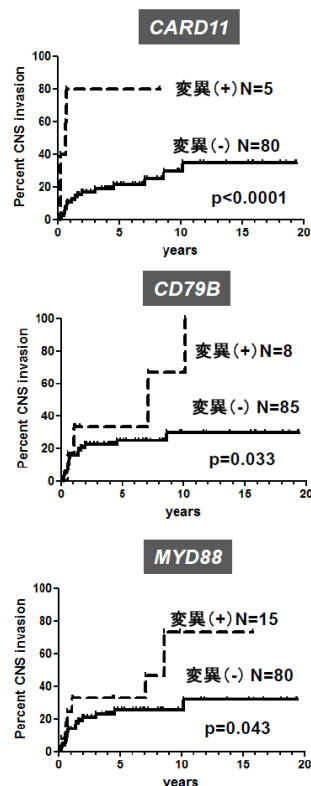


図5 遺伝子変異と中枢神経病変の関連

(6) cfRNA の性状評価

cfRNA は血漿 1ml あたり 100 から 780ng 抽出可能であった。Double hit リンパ腫において重要とされる *MYC*、*BCL2*、*BCL6* の発現について、DLBCL の 1 例において cfRNA を用いて RT-PCR を施行したところ、免疫染色で発現を認める *BCL6* のバンドが確認された。

初診時および経時的な cfRNA の発現パターンの変化を観察することにより、予後や治療反応性等のマーカーとして利用できる可能性が示唆された。

<引用文献>

1) Morin RD et al. Genetic Landscapes of Relapsed and Refractory Diffuse Large B-Cell Lymphomas. Clin Cancer Res. 2016; 22: 2290-300.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計1件)

1. 入山智沙子、富田章裕 B細胞刺激シグナルと標的治療の開発 腫瘍内科 2014; 14: 563-570. (査読無)

〔学会発表〕(計1件)

1. 入山智沙子、島田和之、青木智広、鈴木康裕、坂本明彦、村田誠、富田章裕、清井仁 腫瘍細胞とリツキシマブとの結合にもかかわらず ADCC / CDC 抵抗性を示したびまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫とバーキットリンパ腫の中間型の一例 第4回日本血液学会東海地方会 2015年04月25日 ウィンク愛知 愛知県名古屋市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

入山 智沙子 (IRIYAMA Chisako)
名古屋大学・医学部附属病院・病院助教
研究者番号: 40732631

(2) 研究分担者

なし