

診断困難な悪性リンパ腫病型における遺伝子異常を末梢血を用いて高感度に検出

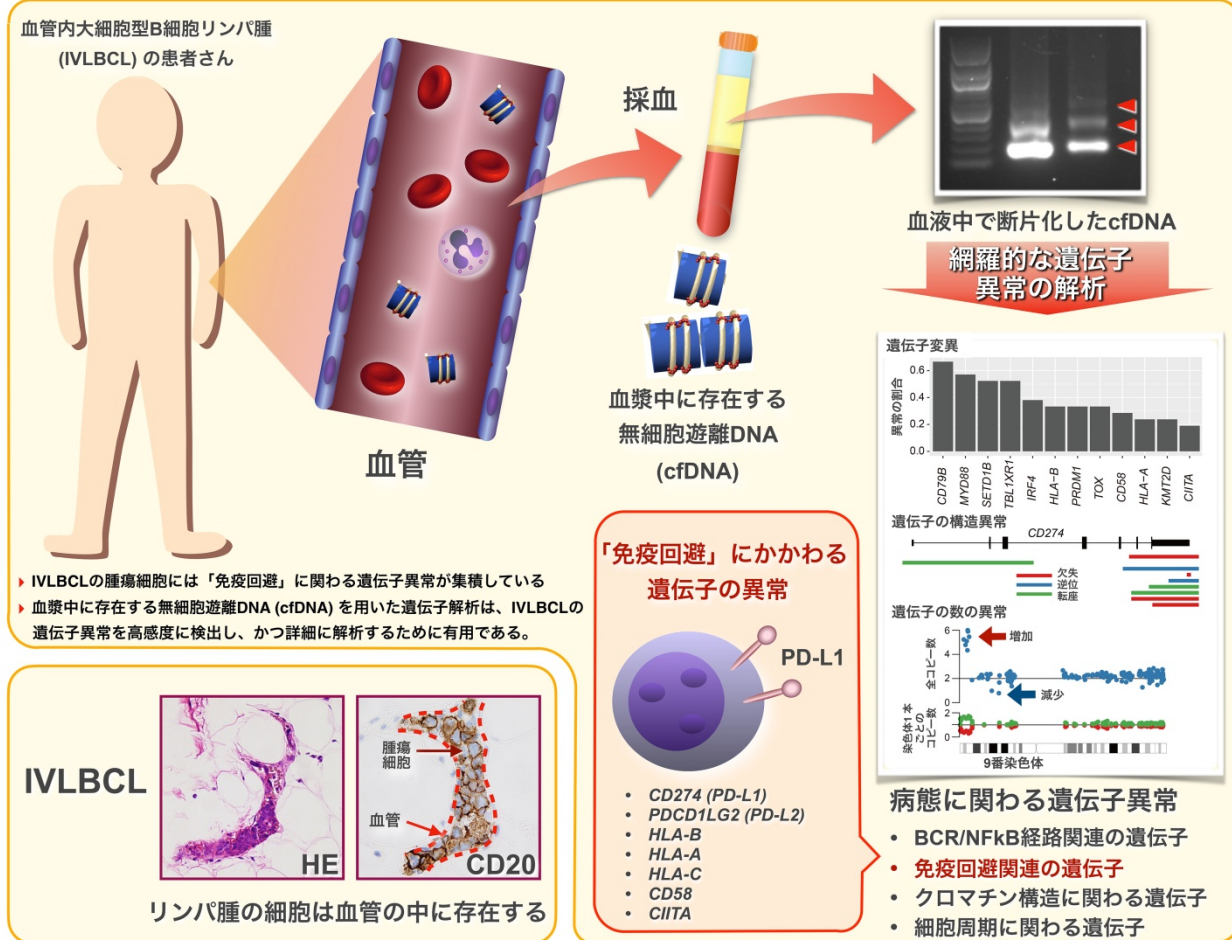
藤田医科大学医学部血液内科学の富田章裕教授、名古屋大学医学部附属病院血液内科の島田和之講師、同大学院医学系研究科血液・腫瘍内科学の清井仁教授、京都大学大学院医学研究科腫瘍生物学の小川誠司教授、吉田健一助教らの研究グループは、血管内大細胞型 B 細胞リンパ腫（IVLBCL）患者さんの血液中に存在するリンパ腫細胞由来のゲノムに着目して、同病型の詳細な遺伝子解析を行い、疾患を特徴付ける遺伝子異常を高感度に検出、同定することに成功しました。

悪性リンパ腫は血液がんの中で最も高頻度に生じる病気で、多彩な病型を持つことが知られています。IVLBCL は、まれな悪性リンパ腫の一病型で、一般的な悪性リンパ腫とは異なり、リンパ節の腫れ（腫瘍）を形成せず、リンパ腫細胞が全身の細い血管の中で増えることを特徴としています。悪性リンパ腫の診断は、通常、腫瘍を手術で採取する「組織生検」により行われます。しかし、IVLBCL では、腫瘍が形成されないため、発熱や全身のだるさなどの症状から病気を疑った場合に、ランダムに皮膚や骨髄から組織を採取し、組織の中の血管内に少数のリンパ腫細胞を見つけることにより診断がつけられていました。また、採取した組織の中から十分なリンパ腫細胞を得られないことが、病気の原因を調べる研究の妨げとなっていました。

本研究では、IVLBCL 患者さんの血漿（血液の中の白血球、赤血球、血小板を含まない液体成分）中に、リンパ腫細胞から流出したゲノム（末梢血無細胞遊離DNA：cfDNA）が、健康な方および一般的な悪性リンパ腫の患者さんよりも高濃度で存在することを確認し、cfDNA を用いて詳細なゲノム解析（網羅的遺伝子解析）を行いました。検討された 18 名の IVLBCL 患者さんから得られた血漿全てにおいて、cfDNA を用いた網羅的遺伝子解析が可能でした。また、IVLBCL の大部分のリンパ腫細胞で認められる遺伝子異常が明らかとなったほか、IVLBCL において、がん細胞が免疫細胞からの攻撃を逃れる（免疫回避）ために重要とされる遺伝子異常を高頻度に認めることが明らかとなりました。患者さんの血液を用いて腫瘍の存在を検出する方法を「リキッドバイオプシー（液体生検）」と呼びますが、IVLBCL 患者さんの病気の診断および病気の原因を調べる研究のために、「リキッドバイオプシー」が特に有用であることが示されました。本研究の成果により、「リキッドバイオプシー」が、IVLBCL の診断を補助する手段として、今後の診療で応用されることが期待されます。また、IVLBCL における遺伝子異常の詳細が明らかとなったことで、新たな治療方法の開発に繋がることを期待されます。

本研究成果は、米国の学術ジャーナル「Blood」のオンライン版で、2020 年 12 月 24 日午前 8 時（日本時間 12 月 24 日午後 10 時）に公開されます。

図1 診断困難な悪性リンパ腫病型における遺伝子異常を末梢血を用いて高感度に検出



<研究成果のポイント>

- 本研究では、血管内大細胞型B細胞リンパ腫 (IVLBCL) の血漿 (血液の白血球、赤血球、血小板を含まない液体成分) 中に、リンパ腫細胞から流出する末梢血無細胞遊離 DNA (cell free DNA; cfDNA) が高い濃度で存在することを発見し、cfDNA を用いてリンパ腫細胞が持つ遺伝子異常を高感度に検出、かつ詳細に解析できることを証明しました。また、この方法を用いることで、IVLBCL の遺伝子異常の特徴を明らかにしました。(図1)
- IVLBCL の遺伝子異常は、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫 (DLBCL) の遺伝子異常に基づく分類の中の1つである「MCDタイプ」に類似し、さらに、IVLBCLにおいてPD-L1/PD-L2などの「免疫回避」に関わる遺伝子の異常が高頻度に認められることを明らかにしました。
- 本研究の結果は、IVLBCLにおける「リキッドバイオプシー」の有用性を明確に示しており、この手法を用いた遺伝子解析が、IVLBCLの診断や治療効果の調べる際に有効な補助手段となる可能性を示しています。また、IVLBCLの遺伝子異常の特徴を明らかにしたことは、将来の病気の原因を直接標的とした治療方法の開発に重要な知見を提供するものと考えられます。

<背景>

IVLBCLは、一般的な悪性リンパ腫で認められるリンパ節腫大を形成せず、発熱や全身のだるさなど非特異的な症状により発症するため、血液専門医であってもしばしば診断が困難とされる悪性リンパ腫の一病型です。診断の遅れによる病気の進行が、患者さんの予後を不良とするため、早期診断を助けるための新たな病気の検出方法の確立が望まれてきました。また、これまで病気の原因となる遺伝子異常が十分に明らかにされておらず、病気の原因を直接標的にする新たな治療方法を考える上でも、病気をもたらす遺伝子異常の全体を明らかにする網羅的遺伝子解析が望まれてきました。

<研究手法・研究成果>

1) IVLBCL 患者さんの血液（血漿）中に、末梢血無細胞遊離 DNA（cfDNA）が通常よりも有意に高濃度に存在し、その量は患者さんにおける病気の状態を反映することを確認しました

18人のIVLBCL患者さんから採血を行い、血漿成分1mLから採取されるcfDNAは検討された8割以上の患者さんの血漿で100ng/mL以上の濃度でした。これは健康な方（数ng/mL）に比べて高く、また一般的な悪性リンパ腫（DLBCL）の患者さんと比べても高い値でした（図2A）。また、抗がん剤治療を実施したIVLBCL患者さんから、診療の経過とともにcfDNAを採取して、その濃度を測定したところ、病状に合わせてcfDNA濃度が変化することを確認しました。この濃度の変動は、悪性リンパ腫の病状を反映する指標の一つとして知られる血清LDH値と同様の変化を示すことを確認しました（図2B）。

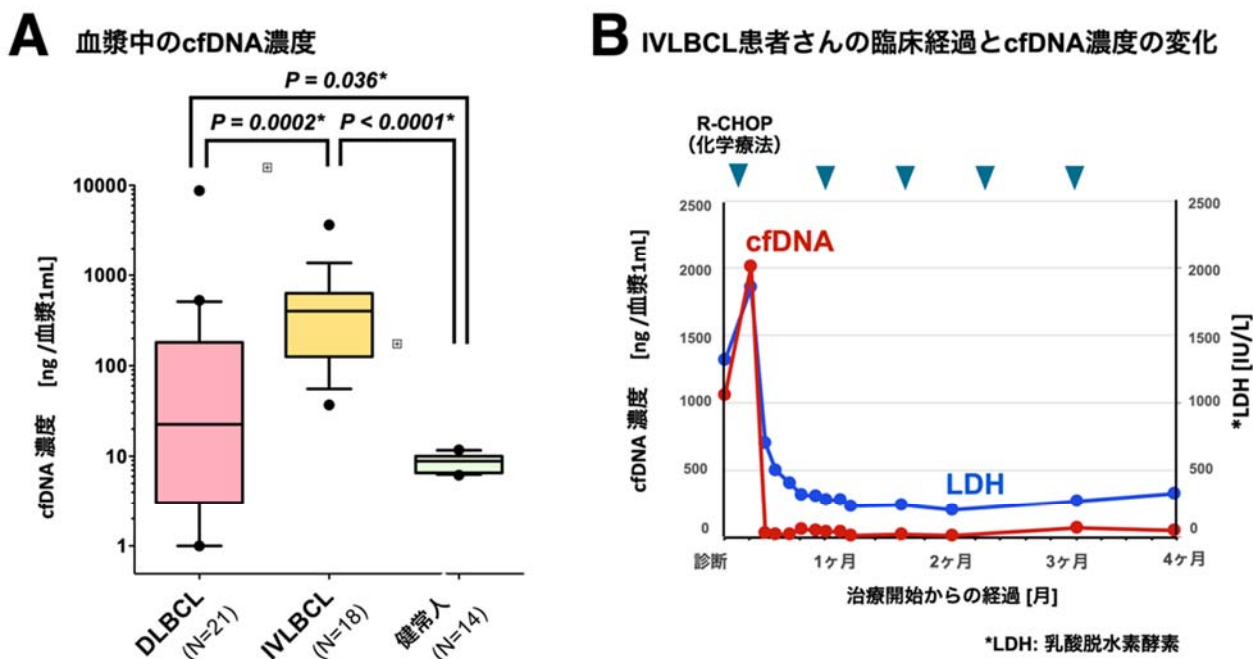


図2 IVLBCL患者さんにおける血漿中のcfDNA濃度

2) IVLBCL 患者さんから採取された cfDNA を用いて網羅的な遺伝子変異解析を行うことができることを確認し、cfDNA にリンパ腫細胞から流出したゲノム遺伝子が効率よく含まれることを確認しました

骨髄への病気の広がりが確認されている患者さんの骨髄検体から得られたゲノム DNA と、同じ患者さんから得られた cfDNA を用いて、網羅的に遺伝子変異解析（全エクソン解析）を行ったところ、cfDNA に IVLBCL において骨髄検体よりも高い割合で変異が同定されたことから、cfDNA に

は IVLBCL のリンパ腫細胞から流出した DNA が効率よく濃縮して含まれていることが確認され（図 3A）、またそれにより多くの遺伝子変異が cfDNA を用いて検出することが可能になりました（図 3B）。

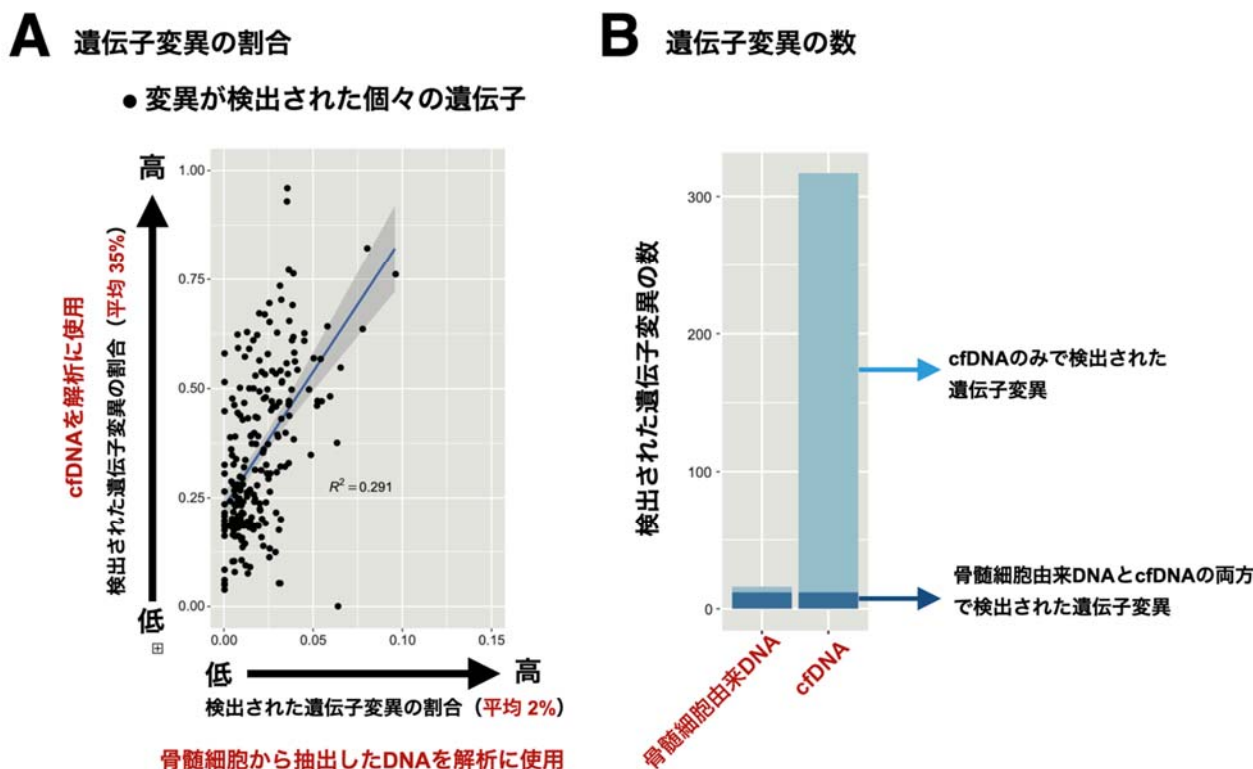


図 3 骨髄にリンパ腫細胞の浸潤を認めるIVLBCL患者さんにおける骨髄細胞由来DNAとcfDNAとの比較

(A) cfDNAと骨髄細胞由来DNAの両方で検出された遺伝子変異について、変異を検出した割合は、cfDNAでより高い傾向にある。(B) 検出された遺伝子変異の数の比較。cfDNAを用いることでより多くの遺伝子変異を検出することができた。

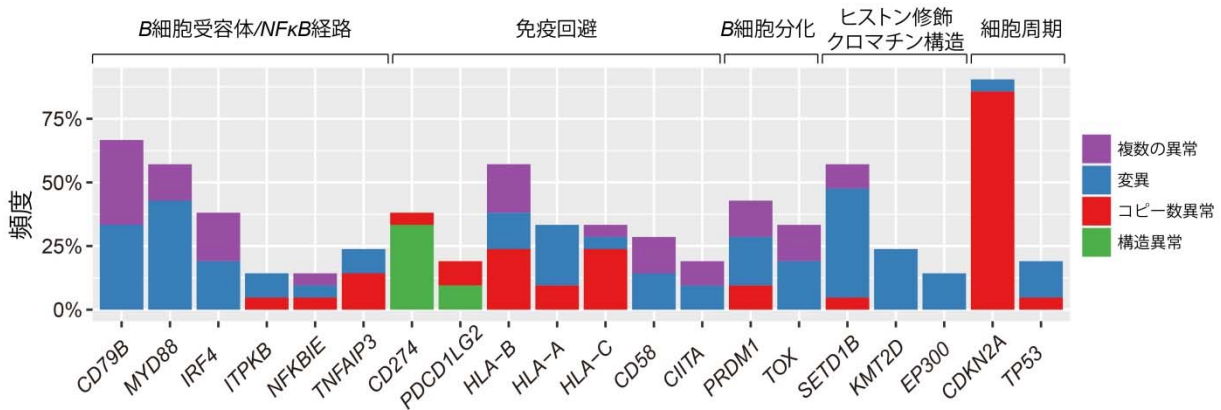
3) IVLBCL に認められる遺伝子異常を明らかにしました。特に「免疫回避」に関する遺伝子異常が高頻度に認められることは、IVLBCL の特徴と考えられました。

cfDNA を用いた解析により検出された遺伝子異常の中には、「B 細胞受容体/NF κ B 経路」に関わる遺伝子 (*CD79B*, *MYD88* など)、「免疫回避」に関わる遺伝子 (*PD-L1 (CD274)*, *PD-L2 (PDCD1LG2)* など)、「ヒストン修飾やクロマチン構造」に関わる遺伝子 (*SETD1B*, *KMT2D* など) や「細胞周期」にかかわる遺伝子 (*CDKN2A*, *TP53* など) などが含まれていました。また、その他にも染色体のコピー数異常や構造異常が多数検出されました(図 4A)。

特に *PD-L1* 遺伝子を標的とする構造異常を高頻度に認め (図 4B)、この構造異常により PD-L1 蛋白の高発現により免疫回避をきたしている可能性を示しました(図 4C)。

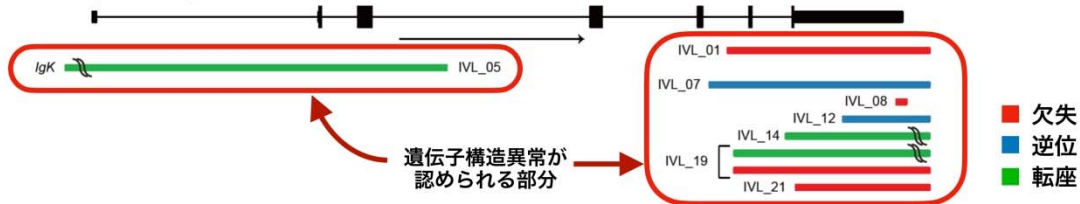
IVLBCL に認められる遺伝子異常の組み合わせ (プロファイル) が、びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫の遺伝子異常による分類の亜型の一つである「MCD タイプ」に類似することを確認しました。

A IVLBCL患者さんに認める遺伝子異常



B PD-L1遺伝子の構造異常

PD-L1 (CD274) 遺伝子



C PD-L1遺伝子の構造異常とPD-L1蛋白発現の亢進

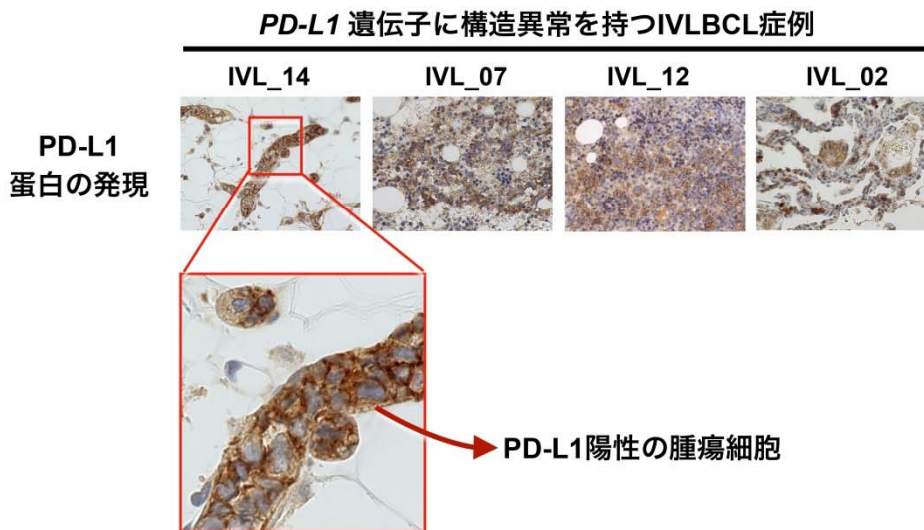


図4 IVLBCL患者さんに認められる遺伝子異常とPD-L1蛋白の発現

(A) IVLBCL患者さんに認められる遺伝子異常を、機能別に分けて示す。異常をもつ患者さんの割合を頻度 (%) として示す。(B) PD-L1 遺伝子に認められる構造異常。遺伝子の一部が欠失する、他の遺伝子と融合する (転座) などの異常をみとめる。(C) PD-L1 遺伝子に構造異常を持つ症例では、PD-L1 蛋白の発現が亢進する。

<今後の展開>

本研究では、cfDNA を用いて IVLBCL の腫瘍細胞がもつ遺伝子異常を高感度に検出、そして詳細に解析することが可能であることを示しました。

IVLBCL は実際の診療において、しばしば診断が困難であるため、cfDNA を用いた遺伝子解析が、病気の診断における補助的な手段として応用されることが期待されます。また、採血により cfDNA を調べることが出来ることは、骨髄検査や組織生検に比べて患者さんに負担の少ない方法であることも利点の一つです。この検査を経時的に行うことにより、病気の有無を現在よりも早い段階で発見できる可能性があり、今後の診療への応用が期待されます。また、病気の遺伝子異常の特徴を明らかにすることは、病気の詳しい理解に役立つばかりでなく、遺伝子の異常を直接標的とする治療法の開発を含め、新たな治療方法の考案に欠かせない情報となります。今回の研究で示された IVLBCL における「免疫回避」との関連は、既に本邦で診療に使われている抗 PD-1/PD-L1 抗体医薬（ニボルマブ、ペムブロリズマブなど）の治療への応用に繋がる可能性があり、将来の検討課題となると考えられます。

<用語解説>

(1) 血管内大細胞型 B 細胞リンパ腫 (IVLBCL)

悪性リンパ腫の一病型です。IVLBCL では、腫瘍の細胞が主に細い血管の中に存在するため、病気の初期段階では、一般的な悪性リンパ腫の症状であるリンパ節腫脹（腫瘍）を認めません。発熱、全身のだるさ、息切れなどの症状で発症し、病気に特徴的な症状がないため、一般の悪性リンパ腫に比べて診断が困難です。かつては以下に示すびまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫 (DLBCL) の一亜型と考えられていましたが、2008 年以降は、ひとつの独立した病型として考えられるようになりました。

(2) びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫 (DLBCL)

悪性リンパ腫の中でも最も頻度が高い病型で、全体の 4 割程を占めます。抗がん剤と抗体治療薬の組み合わせ（免疫化学療法）で、6 割程度の患者さんに治癒を期待することができます。DLBCL は、発生する部位や分子背景の違いなどから、現在では更に細かく分類がされており、その違いごとに異なる治療方針が考案されています。

(3) ゲノムおよび DNA (デオキシリボ核酸)

ヒトの身体を形作る細胞ひとつひとつには、それぞれ 1 セットの遺伝情報が含まれています。「DNA」はその情報のもととなる物質で、これが長くつながり、二重らせん構造をとっています。DNA のうちタンパク質を作るための遺伝情報をもったものを「遺伝子」、また DNA が高次構造をとったものを「染色体」と呼びます。そして、遺伝子の情報全体を指して「ゲノム」と呼びます。悪性リンパ腫を含めた悪性腫瘍の原因は、遺伝子の異常がいくつか積み重なることであることがわかってきており、疾患ごとに異常が起こる遺伝子の種類や場所が異なります。

(4) 末梢血無細胞遊離 DNA (cell free DNA: cfDNA)

通常、DNA は細胞の末梢血のなかの液体成分（血漿、血清）の中に、切れて短くなったゲノム DNA (cfDNA) が流れています。これは、身体の中の壊れた組織、細胞などから流れ出してくると考えられていますが、一部の悪性腫瘍の患者さんにおいては、がん細胞が壊れ

るなどして流出したがん細胞由来の DNA が正常の DNA に混ざって血液中に存在することが知られています。

(5) リキッドバイオプシー (液体生検)

患者さんの血液やそのほかの体液を用いて、がんの検出や診断を行う新たな方法です。現在固形癌の分野においては、既に臨床応用が始まっています。本研究では、cfDNA を用いて遺伝子変異の解析を行い、cfDNA の中に存在する腫瘍由来の DNA を検出することで、身体の中に存在する腫瘍の検出や特徴の解析を行っています。

(6) LDH (乳酸脱 수소 酵素)

LDH は肝臓の細胞や血液細胞に含まれる酵素のひとつです。血清中の LDH 値は肝臓や血液の疾患で上昇することがあり、病気の程度としばしば相関します。悪性リンパ腫においては、病状が悪化している際に上昇を認め、病気の予後因子のひとつとなっています。病勢を反映する因子のことを、疾患の「バイオマーカー」と呼びますが、血清 LDH 値はリンパ腫の病勢を反映するバイオマーカーのひとつとされています。

(7) 網羅的遺伝子解析

次世代シーケンサーという新たな手法を用いて遺伝子異常を一度に大量に検出する方法です。全ゲノム解析ほか、本研究で行った全エクソン解析 (ゲノムの中でも特に重要なタンパクをコードするエクソンのみに注目して解析する方法)、遺伝子パネル解析 (疾患に特に重要と考えられる遺伝子に更に絞って解析を行う方法) などがあります。

(8) 免疫回避

ヒトの身体の中では、種々の免疫細胞が存在し、自分とは異なる「異物」が体内に入ると、それを排除するように働きます。「がん細胞」は、もとは正常であった自分の細胞が「遺伝子異常」などによって後天的に変化したものです。変化してしまった細胞は、通常は免疫力によって排除されますが、一部のがん細胞では、免疫細胞からの攻撃を逃れるための蛋白質 (PD-L1, PD-L2 など) を細胞表面に発現して、免疫細胞からの攻撃を逃れて生存しています。これを「免疫回避」と呼び、がんの病態を理解する上で重要な現象のひとつと考えられています。

(9) MCD タイプ

DLBCL には多数の亜型を含んでいることが以前より指摘されており、近年それらの亜分類を遺伝子異常のパターンによって分類する試みがされています。2018 年に Schmitz らは、遺伝子異常のパターンから DLBCL の一部を 4 つの病型に分類し、*CD79B* と *MYD88* の遺伝子変異を重複してもつ一亜型を MCD タイプとして分類しました。MCD タイプは、他のタイプに比べて比較的予後が不良の傾向であり、中枢神経原発リンパ腫、精巣原発リンパ腫、乳腺原発リンパ腫などは、いずれもこの亜型に分類される可能性が高いとされています。

<文献情報>

■タイトル

Frequent Genetic Alterations in Immune Checkpoint-Related Genes in Intravascular Large B-Cell Lymphoma

■ 発表雑誌名

Blood

■ 著者

Kazuyuki Shimada^{1,2,28}, Kenichi Yoshida^{3,28}, Yasuhiro Suzuki^{1,4}, Chisako Iriyama^{1,5}, Yoshikage Inoue^{3,6}, Masashi Sanada⁷, Keisuke Kataoka^{3,8}, Masaaki Yuge⁹, Yusuke Takagi^{10,11}, Shigeru Kusumoto¹², Yasufumi Masaki¹³, Takahiko Ito¹⁴, Yuichiro Inagaki¹⁵, Akinao Okamoto⁵, Yachiyo Kuwatsuka¹⁶, Masahiro Nakatochi¹⁷, Satoko Shimada¹⁸, Hiroaki Miyoshi¹⁹, Yuichi Shiraishi²⁰, Kenichi Chiba²⁰, Hiroko Tanaka²¹, Satoru Miyano^{21,22}, Yusuke Shiozawa²³, Yasuhito Nannya³, Asako Okabe²⁴, Kei Kohno^{18,19}, Yoshiko Atsuta²⁵, Koichi Ohshima¹⁹, Shigeo Nakamura¹⁸, Seishi Ogawa^{3,26,27,29*}, Akihiro Tomita^{1,5*}, and Hitoshi Kiyoi^{1,29}

■ 所属

1. Department of Hematology and Oncology, Nagoya University Graduate School of Medicine, Nagoya, Japan
2. Institute for Advanced Research, Nagoya University, Nagoya, Japan
3. Department of Pathology and Tumor Biology, Graduate School of Medicine, Kyoto University, Kyoto, Japan
4. Department of Hematology, National Hospital Organization Nagoya Medical Center, Nagoya, Japan
5. Department of Hematology, Fujita Health University School of Medicine, Toyoake, Japan
6. Department of Surgery, Graduate School of Medicine, Kyoto University, Kyoto, Japan
7. Clinical Research Center, National Hospital Organization Nagoya Medical Center, Nagoya, Japan
8. Division of Molecular Oncology, National Cancer Center Research Institute, Tokyo, Japan
9. Department of Hematology, Ichinomiya Municipal Hospital, Ichinomiya, Japan
10. Department of Hematology, Toyota Kosei Hospital, Toyota, Japan
11. Department of Hematology, Ogaki Municipal Hospital, Ogaki, Japan
12. Department of Hematology and Oncology, Nagoya City University Graduate School of Medical Science, Nagoya, Japan
13. Department of Hematology and Immunology, Kanazawa Medical University, Uchinada, Japan
14. Department of Hematology, JCHO Kani Tono Hospital, Kani, Japan
15. Department of Hematology and Oncology, Anjo Kosei Hospital, Anjo, Japan
16. Department of Advanced Medicine, Nagoya University Hospital, Nagoya, Japan.
17. Public Health Informatics Unit, Department of Integrated Health Sciences, Nagoya University Graduate School of Medicine, Nagoya, Japan.
18. Department of Pathology and Laboratory Medicine, Nagoya University Hospital, Nagoya, Japan
19. Department of Pathology, School of Medicine, Kurume University, Kurume, Fukuoka, Japan.
20. Division of Cellular Signaling, National Cancer Center Research Institute, Tokyo, Japan
21. Laboratory of DNA Information Analysis, Human Genome Center, Institute of Medical Science, The University of Tokyo, Tokyo, Japan
22. Laboratory of Sequence Analysis, Human Genome Centre, Institute of Medical Science, The University of Tokyo, Tokyo, Japan.
23. Department of Pediatrics, Graduate School of Medicine, The University of Tokyo, Tokyo,

Japan

24. Department of Pathology, Fujita Health University School of Medicine, Toyoake, Japan
25. Japanese Data Center for Hematopoietic Cell Transplantation, Nagoya, Japan.
26. Department of Medicine, Center for Hematology and Regenerative Medicine, Karolinska Institute, Stockholm, Sweden
27. Institute for the Advanced Study of Human Biology (WPI-ASHBi), Kyoto University, Kyoto, Japan.
28. These authors contributed equally to this work.
29. These authors equally supervised this work.

DOI : <https://doi.org/10.1182/blood.2020007245>

English ver.

https://www.med.nagoya-u.ac.jp/medical_E/research/pdf/Blo_201225en.pdf