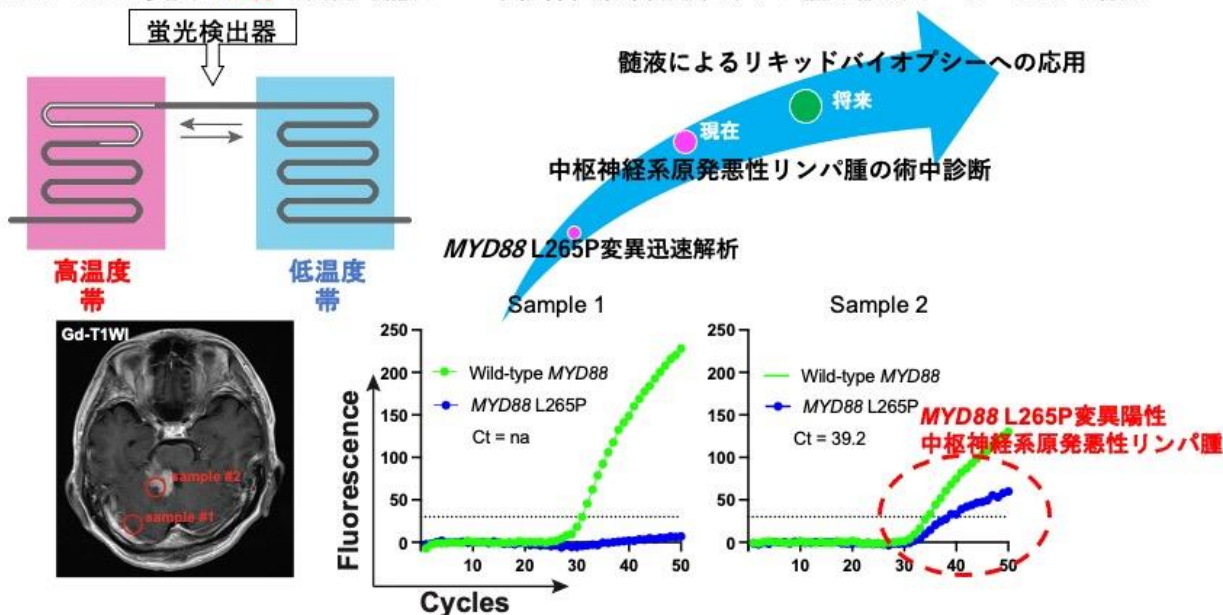


MYD88 L265P 変異迅速解析による中枢神経系原発悪性リンパ腫の正確、かつ迅速(15分)な診断の実現

マイクロ流路型遺伝子定量装置
MYD88 L265P 変異が15分で同定可能に

MYD88 L265P 変異：
中枢神経系原発悪性リンパ腫の診断マーカーとして有用



**MYD88 L265P 変異の迅速解析による
中枢神経系原発悪性リンパ腫の術中迅速診断法の確立
-手術室内 15 分で MYD88 L265P を同定できる迅速解析法の確立-**

名古屋大学大学院医学系研究科脳神経外科学の山口純矢 医員、大岡史治 講師、齋藤竜太 教授の研究グループは、中枢神経系原発悪性リンパ腫(PCNSL)*¹ に高頻度で見られる MYD88 L265P*² 変異の迅速解析法を確立し、約 15 分で同遺伝子異常を同定することが可能になりました。これにより、手術中の限られた時間内でも、採取した腫瘍組織から手術室内で MYD88 L265P 変異を同定することが可能になり、術中診病理断の精度の向上につながりました。

PCNSL は中枢神経系(脳、脊髄、目)に発生する節外リンパ腫のひとつで、稀な脳腫瘍ではありますが、高齢化に伴い、その発生数は近年増加しております。MYD88 L265P 変異は脳腫瘍においては、PCNSL に特異性が高く、高頻度に見られる遺伝子変異であり、診断マーカーとして有用性が報告されてきました。また、PCNSL は生検術で少量の腫瘍検体を採取して診断することが重要ですが、術中診断において組織所見単独では診断に苦慮する症例が経験されるため、補助診断法の必要性が指摘されてきました。しかしながら、従来の解析法では、遺伝子異常の同定に時間を要するため、MYD88 L265P 変異を手術中の診断マーカーとして利用することができませんでした。今回の研究グループが確立した解析システムは、マイクロ流路型サーマルサイクル技術を利用したリアルタイム PCR 法を解析基盤とし、従来の解析手法よりも大幅に解析時間が短縮され、手術中の限られた時間内に、高精度に MYD88 L265P 変異を同定することに成功し、術中診断の精度向上に有用でした。また、MYD88 L265P 変異は PCNSL の患者さんの髄液からも検出されることが報告されていましたが、本解析システムを用いて、髄液からも、MYD88 L265P 変異の迅速解析に成功しており、将来的には、髄液を用いて PCNSL を「手術をせずに」診断する、リキッドバイオプシー*³ への応用が期待されます。

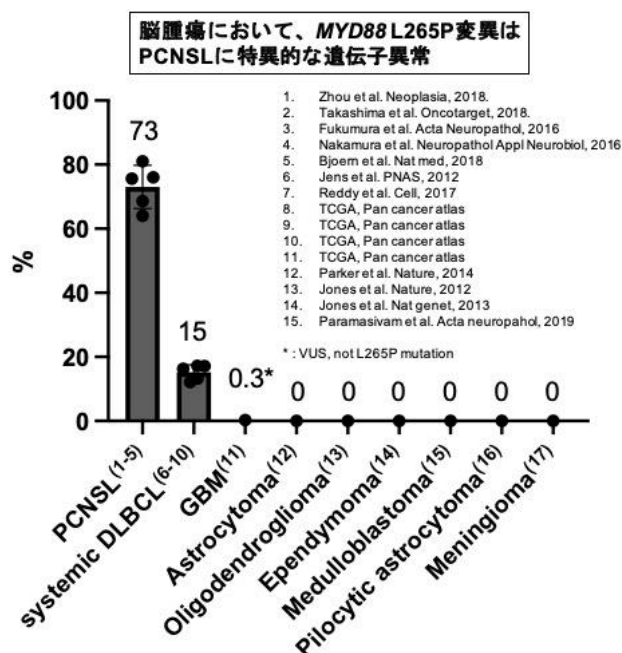
本研究成果は、2023 年 3月1日付で『Cancer Science』誌に掲載されました。

ポイント

- 中枢神経系悪性リンパ腫の診断に有用な遺伝子異常を約 15 分で判定することが可能になりました。
- 簡便な手技で解析できるため、手術室内でも解析でき手術中の迅速診断に非常に有効な技術です。
- 将来的には、髄液を用いたリキッドバイオプシーへの応用が期待されます。

1. 背景

中枢神経系原発悪性リンパ腫(PCNSL)は中枢神経系(脳、脊髄、目)に発生する節外リンパ腫のひとつで、稀な脳腫瘍ではありますが、高齢化に伴い、その発生数は近年増加しております。近年の網羅的遺伝子解析により、PCNSL でみられる遺伝子異常が明らかになり、*MYD88* L265P 変異はPCNSL の70-80%にみられ、また脳腫瘍においてはPCNSL に極めて特異性の高い遺伝子異常であることがわかり、PCNSL の診断マーカーとしての有効性が報告されるようになりました。PCNSL は化学療法、放射線治療に極めて感受性が高いため、手術でわずかな腫瘍検体を採取し PCNSL の診断がつけば、放射線化学療法を行うことが標準治療となっています。しかしながら、手術中の迅速病理診断では PCNSL の診断に苦慮する症例が経験されるため、正確な診断のための補助診断法が必要と考えられていました。*MYD88* L265P 変異は有用な診断マーカーですが、従来の解析手法は、解析に時間を要するため(数時間から数日)、手術中の補助診断には応用が困難でした。そこで本研究グループは、PCNSL の手術中の診断精度の向上を目的とした、*MYD88* L265P 変異の迅速解析法の開発に着手しました。



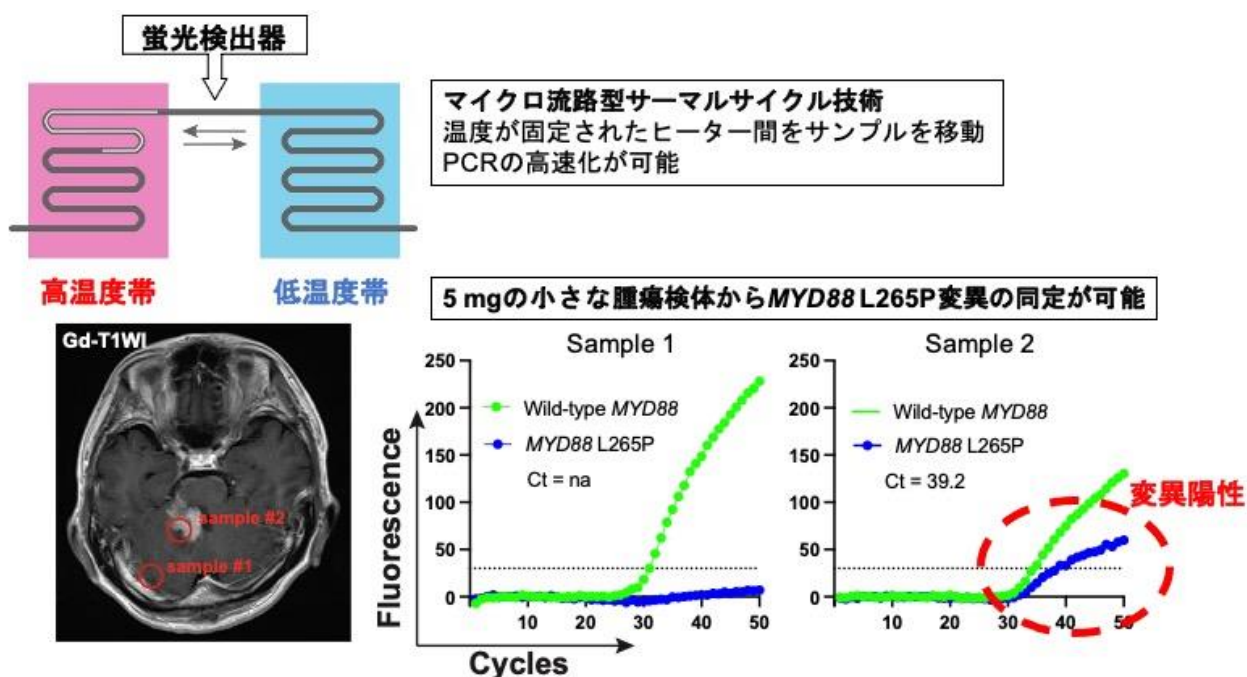
2. 研究成果

マイクロ流路型サーマルサイクル技術を使用したリアルタイム PCR 法を解析基盤として、*MYD88* L265P 変異の迅速解析システムを確立し、約 15 分(DNA 抽出も含めて検体採取から約 20 分)で同遺伝子変異の判定が可能になりました。これまでの解析手法では早くても3-4時間を必要とした解析時間が、大幅に短縮されました。腫瘍検体を用いた解析では、検体の変異含有率(VAF: variant allele frequency)が重要ではありますが、*MYD88* L265P 変異の検出限界を検証するため、*MYD88* L265P 変異、または野生型を含むプラスミドの希釈系列を用いて解析を行いました。結果、本解析システムでは、5%と VAF の低い検体からも解析が可能であることがわかりました。18 例の PCNSL 症例のホルマリン固定パラフィン包埋切片から測定した VAF の中央値は 40.1%であり、5%という検出域値は手術検体の解析にあたり十分であることが確認できました。また、実際に必要な手術検体の量を検証するため、異なる質量(1 mg、5 mg、25 mg)の腫瘍検体を解析したとこ

ろ、最低 5mg の検体量があれば解析が可能であることがわかりました。

術前に PCNSL が強く疑われた 10 症例を含む、悪性脳腫瘍患者 24 症例の手術中に、*MYD88* L265P の迅速解析を行いました。*MYD88* L265P 変異陽性だった 8 例は、いずれもその後の病理診断で PCNSL の診断となり、*MYD88* L265P 変異陰性だった 16 例のうち 2 例が PCNSL の診断となり、14 例は膠芽腫、転移性脳腫瘍、星細胞腫、乏突起膠腫でありました。すべての症例で、術後に行った高感度検出法である droplet digital PCR の結果と、術中解析の結果は一致しており、本解析手法は実際の手術中迅速解析においても、精度の高い判定が可能であることがわかりました。

さらに、PCNSL を疑われた 2 症例から採取した髄液から、cell free DNA (cfDNA) を回収し、本解析手法で同様の解析を行ったところ、手術検体と同様に、*MYD88* L265P 変異の同定が可能でありました。



髄液からの *MYD88* L265P 変異の同定は、PCNSL のリキッドバイオプシーにつながる可能性があります。

3. 今後の展開

PCNSL の術中診断は判断に苦慮する症例があること、判断がつかない時に繰り返し検体を採取することは脳出血などの術中合併症につながる可能性があります。本研究の成果は、PCNSL の術中診断の補助診断法として有用であり、正確、かつ安全な PCNSL の生検術を可能にします。また、PCNSL は高齢者に多く、また解剖学的に生検が困難な部位に発生することも多く、手術をせずに診断する方法の確立が求められますが、本研究の成果は、将来的には髄液を用いたリキッドバイオプシーへの展開が可能であると考えています。

4. 用語説明

*1) 中枢神経系原発悪性リンパ腫:免疫を担うリンパ球のひとつである B 細胞から発生する腫瘍。なかでも中枢神経系(脳、脊髄、目)に限局して発生したものを中枢神経系原発悪性リンパ腫(PCNSL)とよび、悪性脳腫瘍のうちの 3%ほどを占める。高齢者の発生が多い。

*2) *MYD88* L265P 変異:リンパ球系の疾患で認める遺伝子異常であり、特に PCNSL で高頻度に見られ、70-80%で陽性となる。*MYD88* L265P は PCNSL の発生に重要な役割を果たすと考えられるが、詳細については明らかになっていない。予後に影響は与えないが、診断マーカーとしての有用性が報告されている。

*3) リキッドバイオプシー:血液、尿、髄液など体液のサンプルに含まれる DNA を対象に遺伝子解析を行い、診断、治療法の選択、治療効果の予測などを行う手法をいう。

5. 発表雑誌

掲雑誌名:Cancer Science

論文タイトル:Rapid Detection of the *MYD88* L265P Mutation for Pre- and Intra-operative Diagnosis of Primary Central Nervous System Lymphoma

著者:

Junya Yamaguchi¹, Fumiharu Ohka¹, Yotaro Kitano², Sachi Maeda¹, Kazuya Motomura¹, Kosuke Aoki¹, Kazuhito Takeuchi¹, Yuichi Nagata¹, Hikaru Hattori³, Takashi Tsujiuchi⁴, Ayako Motomura⁴, Tomohide Nishikawa¹, Yuji Kibe¹, Keiko Shinjo⁵, Yutaka Kondo⁵, Ryuta Saito¹

所属:

1. Department of Neurosurgery, Nagoya University Graduate School of Medicine, 65 Tsurumai-cho, Showa-ku, Nagoya 466-8550, Japan
2. Department of Neurosurgery, Mie University Graduate School of Medicine, 2-174 Edobashi, Tsu, 514-8507, Japan
3. Department of Medical Genomics Center, Nagoya University Hospital, 65 Tsurumai-cho, Showa-ku, Nagoya 466-8550, Japan
4. Department of Neurosurgery, Daido Hospital, 9 Hokusui-cho, Minami-ku, Nagoya 457-8511, Japan
5. Division of Cancer Biology, Nagoya University Graduate School of Medicine, 65 Tsurumai-cho, Showa-ku, Nagoya 466-8550, Japan

DOI: 10.1111/cas.15762

English ver.

https://www.med.nagoya-u.ac.jp/medical_E/research/pdf/Can_230303en.pdf