

氏名	服部 圭一朗		
学位の種類	博士（医学）		
学位記番号	博甲第 9192 号		
学位授与年月	平成 31年 3月 25日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
審査研究科	人間総合科学研究科		
学位論文題目	中枢神経原発悪性リンパ腫における遺伝子変異解析の臨床的意義		
主査	筑波大学教授	博士（医学）	土屋 尚之
副査	筑波大学教授	博士（医学）	小田 竜也
副査	筑波大学准教授	博士（医学）	坂下 信悟
副査	筑波大学講師	博士（医学）	小島 崇宏

論文の内容の要旨

服部圭一朗氏の博士学位論文は、中枢神経原発悪性リンパ腫における遺伝子変異解析を用いてその臨床的意義と腫瘍発生過程を検討した3つの研究に基づいて構成されている。その要旨は以下のとおりである。

著者はまず、第1章において、中枢神経原発悪性リンパ腫(PCNSL)に関する臨床的事項と研究の現状を概説している。PCNSLとは、中枢神経系に局限して発症するびまん性大細胞性B細胞リンパ腫(DLBCL)の特殊亜型の1つであること、画像診断上、膠芽腫や多発性硬化症との鑑別が困難で、現状では、開頭生検や穿頭生検による病理組織診断のみが標準的診断法であること、予後不良であるにもかかわらず、全身性DLBCLと比較すると予後予測モデルや有効な治療法の確立が遅れていることを述べている。

次に著者は、DLBCLは遺伝子発現パターンにより胚中心B細胞型(GCB type)とそれ以外のnon-GCB typeに分類され、non-GCB typeの方が予後不良であること、GCB typeにはヒストン修飾酵素などエピゲノム関連遺伝子が、non-GCB typeにはNF- κ Bシグナル伝達経路関連遺伝子に高頻度に変異が認められること、PCNSLではnon-GCB typeが66-90%を占め、NF- κ Bシグナル伝達経路関連遺伝子変異の頻度が高いとの報告があるが、腫瘍組織入手の困難さ等により、ゲノム解析が十分行われていないことを述べている。

以上の背景のもとに、著者は次世代シーケンサー(NGS)を用いてPCNSL腫瘍組織等のゲノム解析を行い、1)高頻度に認められる遺伝子変異を同定し、臨床経過との関連について解析すること、2)血中遊離DNA(cell-free DNA)の変異解析の有用性を検討すること、3)中枢神経外に再発した症例について、原発と再発病変の比較を行い、再発形式やPCNSLの起源について検討することを目的に、本研究を施行したと述べている。本研究は、筑波大学附属病院における研究倫理審査委員会の承認を受けた研究計画に従い、患者の同意を得て施行されている。

第2章において、著者は、PCNSLの変異解析と、臨床経過との関連の解析について述べている。本研究では、高齢者プロトコールによる治療を受けた高齢患者群のみを対象に、全42症例の組織を免疫染色によりGCB type(7例)とnon-GCB type(35例)に分類している。先行研究に基づき、PCNSLにおいて変異が多い12遺伝子を選択し、腫瘍組織から抽出したDNAを用いてIonPGMを用いたターゲットリシーケンスを行い、アミノ酸置換を伴う体細胞変異を抽出し、サンガーシーケンス法にて変異を確認したのち、臨床経過との関連を解析している。42症例中38症例(90.4%)において1種類以上の変異が検出され、特にB細胞シグナル伝達経路、NF- κ Bシグナル伝達経路関連遺伝子、なかでもMYD88のホットスポット部位であり、NF- κ Bの構成的活性化を誘導するL265P変異が、高頻度(67%)に検出されている。著者はさらに、予後との関連を多変量Cox回帰分析を用いて解析し、全生存期間(OS)とMYD88L265P変異(ハザード比(HR) 2.903、P=0.047)および意識障害(HR 4.729、P=0.0072)、無増悪生存期間(PFS)とMYD88L265P(HR 2.770、P=0.0303)との有意な関連を検出している。以上の結果から、著者は、MYD88変異情報と臨床パラメータとを組み合わせることで、PCNSLの予後アルゴリズムを構築しうる可能性、先行研究においてMYD88変異陽性のnon-GCB-DLBCLにおける有効性が報告されているibrutinibがPCNSLの治療上有用である可能性を考察している。

第3章においては、著者は、PCNSLにおけるcell-free DNAを用いたMYD88変異解析の臨床的意義に関する検討結果を述べている。PCNSLの生検診断はきわめて困難であること、PCNSLではMYD88L265P変異が高率に検出されるのに対し、この変異は非血液学的脳腫瘍では検出されないことから、血清中のcell-free DNAにおいてMYD88L265Pの検出が可能であれば、診断上の有用性が期待される。著者は、本研究において、PCNSL 14例の血清を対象に、droplet digital PCR (ddPCR)を用い、NGSによるアンプリコンシーケンス法を対照として、その感度を検討し、ddPCRの定量感度限界は0.024%、検出感度の限界は0.0059%と判定しており、アンプリコンシーケンスの定量感度限界、検出感度限界である1.51%よりも良好であることを観察している。

今回解析された14例の腫瘍組織由来DNAでは、ddPCR、アンプリコンシーケンスいずれも全例でMYD88L265P変異が検出されている。診断時血清中のcell-free DNAのddPCRによる解析では、8例(57.1%)でMYD88L265Pが検出されているが、アンプリコンシーケンスでは検出されていない。また、治療前のcell-free DNAからMYD88L265P変異が検出された症例も、治療後は、現病の状態にかかわらず、cell-free DNAから変異は検出されなかった。以上の結果から、著者は、ddPCRアッセイが血清中cell-free DNA中の変異を検出する上で信頼できる方法であり、少数の変異コピーを検出する際にアンプリコンシーケンスよりも有用性が高く、PCNSLの非侵襲的診断の有用な方法となる可能性があること、一方で、治療経過のモニタリングには適用できない可能性があることを考察している。

PCNSLの再発例の7%未満では中枢神経外の再発が起こると報告されている。著者は第4章において、まず、中枢神経外の再発を経験した5例のPCNSL患者を対象に、原発性腫瘍と再発性腫瘍の変異解析により、共通前駆細胞(CPC)が存在する可能性を検討している。著者は、先行研究に基づき、34遺伝子をターゲットとしたリシーケンスを行い、全5ペアの初発および中枢神経外再発腫瘍において、合計11遺伝子の16変異が、初発時と再発時に共通していた一方、6遺伝子における45変異は原発病変に特異的、6遺伝子における52変異は中枢神経外再発腫瘍に特異的であることを観察し、再発腫瘍が残存初発腫瘍から直接進展したのではなく、初発腫瘍より変異が少ないCPCから発生していることを示唆する知見であると考察している。次に著者は、B細胞の分化段階におけるCPCの位置づけを確認するため、3症例において、原発腫瘍と再発腫瘍において免疫グロブリンH鎖再構成を比較している。1症例では原発腫瘍と再発腫瘍が同一のクローンであるが、2症例では、原発腫瘍はポリクローナルであるが再発腫瘍はモノクローナルであり、VH遺伝子ファミリーも原発腫瘍と異なることが観察されている。以上の結果から、PCNSLは、症例によって、IgH再構成後の段階でCPCからの分岐が起こっている場合と、IgH再構成前にCPCからの分岐が起きたと思われる場合があると考察している。

著者は最後に、治療前の骨髄単核細胞(BMMNC)の解析が可能であった23例におけるMYD88変異を検討し、病理学的診断では骨髄のリンパ腫浸潤が見られなかったにもかかわらず、9例において変異が認められたことを観察しており、CPCが骨髄内に存在する可能性を支持する知見であると考察してい

る。

以上に基づき、著者は、第5章において、本研究から、*MYD88*変異解析がPCNSLの血清診断、予後判定、発症機序の研究に寄与することが明らかになったと総括している。

審査の結果の要旨

(批評)

本研究において、服部氏は、予後不良の稀少疾患であり、これまで十分解析されてこなかったPCNSLを対象に、NGSやddPCRという最先端の遺伝子解析技術を駆使し、*MYD88*L265P変異検出が予後予測アルゴリズムの構築やliquid biopsyとして診断に応用しうる可能性を示唆する知見を得るとともに、PCNSLの前駆細胞が骨髄内に存在するという、腫瘍の発生起源に迫る基礎的知見をも見出している。学位論文には十分なデータが含まれ、個々の研究の意義も深く考察されている。PCNSLが稀少疾患であるためにサンプルサイズが小さく、実用化までには今後の確認が必要であるが、今後この研究を発展させていく必要性を示す強い根拠となる一連の研究であり、高く評価される。

平成31年1月21日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもと論文について説明を求め、関連事項について質疑応答を行い、最終試験を行った。その結果、審査委員全員が合格と判定した。

よって、著者は博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認める。