

筑 波 大 学

博 士 （ 医 学 ） 学 位 論 文

悪性リンパ腫における血中循環細胞外遊離 DNA を
用いたゲノム解析に関する研究

2 0 1 9

筑波大学大学院博士課程人間総合科学研究科

末原 泰人

本論文は、以下の2つの論文の内容を再利用して作成した。

Liquid biopsy for the identification of intravascular large B-cell lymphoma

Yasuhito Suehara, Mamiko Sakata-Yanagimoto, Keiichiro Hattori, Toru Nanmoku,

Takayoshi Itoh, Daisuke Kaji, Go Yamamoto, Yoshiaki Abe, Kentaro Narita, Masami

Takeuchi, Kosei Matsue, Taiki Sato, Masayuki Noguchi, Naoko Baba, Tatsuhiro

Sakamoto, Manabu Kusakabe, Naoki Kurita, Takayasu Kato, Yasuhisa Yokoyama,

Hidekazu Nishikii, Naoshi Obara, Yuichi Hasegawa, and Shigeru Chiba. *Haematologica*.

2018;103(6):e241–244. doi:10.3324/haematol.2017.178830

Mutations found in cell-free DNAs of patients with malignant lymphoma at remission
can derive from clonal hematopoiesis

Yasuhito Suehara, Mamiko Sakata-Yanagimoto, Keiichiro Hattori, Manabu Kusakabe,

Toru Nanmoku, Taiki Sato, Masayuki Noguchi, and Shigeru Chiba. *Cancer Science*.

2019;110(10):3375-3381. doi: 10.1111/cas.14176.

目次

- 1 章. 序文
- 2 章. 血管内大細胞型 B 細胞リンパ腫を対象とした血中循環細胞外遊離 DNA の解析
 - 2.1. 背景と目的
 - 2.2. 材料と方法
 - 2.3. 結果
 - 2.4 考察
- 3 章. B 細胞リンパ腫を対象とした血中循環細胞外遊離 DNA の解析におけるクローン性造血の検出について
 - 3.1. 背景と目的
 - 3.2. 材料と方法
 - 3.3. 結果
 - 3.4 考察
- 4 章. 血管内大細胞型 B 細胞リンパ腫に対する血中循環細胞外遊離 DNA の解析の臨床応用の展望
- 5 章. 結語
- 6 章. 謝辞
- 7 章. 出典
- 8 章. 参考文献

略語集

CTCs: circulating tumor cells, 血中循環腫瘍細胞
ctDNA: circulating tumor derived DNA, 血中循環腫瘍 DNA
cfDNA: cell-free DNA, 血中循環細胞外遊離 DNA
tdDNA: tissue-derived DNA, 組織由来 DNA
dsDNA: double strand DNA, 二本鎖 DNA
MRD: minimal residual disease, 微小残存病変
IVLBCL: intravascular large B-cell lymphoma, 血管内大細胞型 B 細胞リンパ腫
FDG-PET/CT: ^{18}F -fluorodeoxyglucose positron emission tomography/ computed tomography, ^{18}F -2-デオキシ-2-フルオロ-D-グルコースを用いたポジトロン断層撮影
sIL2R: soluble interleukin-2 receptor, 可溶性 IL-2 レセプター受容体
R-CHOP: rituximab, cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone
ABC: activated B-cell, 活性化 B 細胞
GCB: germinal center B-cell, 胚中心 B 細胞
FFPE: formalin-fixed paraffin-embedded, ホルマリン固定パラフィン包埋切片
ionPGM: Ion Personal Genome Machine
BCR: B-cell receptor, B 細胞受容体
TLR: Toll-like receptor, Toll 様受容体
IL-1R: interleukin-1 receptor, インターロイキン 1 受容体
NF- κ B: Nuclear factor κ B, 核内因子 κ B
ddPCR: droplet digital PCR, ドロップレットデジタル PCR
SNV: single nucleotide variant, 一塩基置換
VAF: variant allele frequency, 変異アレル頻度
CHIP: clonal hematopoiesis of indeterminate potential, クローン性造血
WM: Waldenström macroglobulinemia, 原発性マクログロブリン血症
CLL: chronic lymphocytic leukemia, 慢性リンパ性白血病
SNP: single nucleotide polymorphism, 一塩基多型
CMR: complete metabolic response
FL: follicular lymphoma, 濾胞性リンパ腫
HL: Hodgkin lymphoma, ホジキンリンパ腫
ANKL: aggressive natural killer cell leukemia, アグレッシブ NK 細胞白血病
hGE: haploid genome equivalent
ABVD: doxorubicin, bleomycin, vinblastine, and dacarbazine
EBV: Epstein-Barr virus, Epstein-Barr ウイルス

1 章. 序文

近年、悪性腫瘍に対するリキッドバイオプシーに関する研究が進んでおり、その一部の技術はすでに実臨床への応用が行われている。リキッドバイオプシーとは、血液、尿、脳脊髄液などの体液を検体として、種々のバイオマーカーを検出及び解析する技術の総称である。そのバイオマーカーとは、血中循環腫瘍細胞（CTCs: circulating tumor cells）、40-100 nm の細胞外小胞であるエクソソームの内包物質（タンパク質や、mRNA, microRNA, long non-coding RNA など）、及び血中循環腫瘍 DNA（ctDNA: circulating tumor derived DNA）のいずれかを対象としたものに大別される¹。

リキッドバイオプシーにおいて、すでに臨床応用が進んでいるのは ctDNA を用いた解析である。ctDNA は血中循環細胞外遊離 DNA（cell-free DNA, cfDNA）の中で腫瘍細胞に由来した一分画である¹。In vitro での実験では、アポトーシス及びネクローシスした細胞をマクロファージが貪食することによりメディウム中の遊離 DNA が増加することから²、cfDNA はアポトーシスやネクローシスに由来するのではないかと考えられている。cfDNA のサイズは 143bp のピークと 166bp のピークが報告されており、それぞれヌクレオソームもしくはヌクレオソーム+リンカーヒストンに巻きついた DNA 長に一致することから、ヌクレオソーム単位で断片化していると考えられている^{3,4}。一方でエクソソーム中にも

double strand DNA (dsDNA)が含まれており、サイズは 2.5-10kb を超えるものもある^{5,6}。cfDNA の濃度について、測定方法をリアルタイム PCR や蛍光ベースの測定系の報告に限ると、健常人においては血漿由来 cfDNA 濃度が平均値 12 ng/ml (0.1-44 ng/ml)、血清由来 cfDNA 濃度が平均値 38 ng/ml (12.6-70 ng/ml)であった⁷。一方、がん患者では、血漿由来 cfDNA 濃度が平均値 159 ng/ml (10.6-819 ng/ml)、血清由来 cfDNA 濃度が平均値 400 ng/ml (36.9-1056 ng/ml)であった⁷。

血液中に核酸が循環していることはすでに 1948 年に報告されていたが⁸、悪性腫瘍への応用研究は 1994 年にがん患者の血漿検体から *KRAS/NRAS* 変異が検出されたことにより注目を集め始めた^{9,10}。腫瘍分野での応用のみならず、1997 年には母体血中に胎児由来 cfDNA が検出されることが報告され¹¹、無侵襲的出生前遺伝学的検査は本邦では臨床研究ならびに自費診療で行われている状況である。

臨床応用としては、非小細胞肺癌患者を対象とした血漿由来 ctDNA での EGFR 変異の検出が、コンパニオン診断薬であるコバス EGFR 変異検出キット v2.0 (<https://www.roche-ivd.jp/products/md/pdf/egfr01.pdf>) 等により、すでに保険診療で実施可能である。例えば *EGFR* c.2369 C>T, p.T790M 変異が検出された場合、第 1・2 世代 EGFR チロシンキナーゼインヒビター(TKI)に対し耐性を示すため、T790M 変異陽性例に有効な第 3 世代 EGFR-TKI (オシメルチニブ) への変更を

判断することができる。また、本邦での承認は下りていないが、Guardant 360 (Guardant health Inc.)は ctDNA を対象とした 73 遺伝子のパネル検査であり、国立がんセンターを中心に有用性評価のための試験が進行中である (UMIN000030496、UMIN000029315、UMIN000034394 など)。

ctDNA の解析の利点として、従来の生検に比べて侵襲性が低く、さらに、腫瘍のクローン不均一性をよりよく反映する可能性がある。また低侵襲性により経時的解析が容易であるため、クローン進化の観察や、治療抵抗性クローンおよび微小残存病変 (minimal residual disease, MRD) の検出という目的も想定される。さらに、固形腫瘍の早期診断に関する研究もなされているが、感度・特異度の点等で実臨床への応用には至っていない。

造血器腫瘍においては、白血病では腫瘍細胞へのアクセスが固形腫瘍より容易であることもあり、ctDNA の研究はあまり多くないが、悪性リンパ腫においては複数の先行研究がある。例えば、低悪性度 B 細胞リンパ腫のびまん性大細胞型 B 細胞性リンパ腫への組織学的形質転換は、予後や治療方針決定に影響を与えるため再発時には原則再生検が望ましいが、病変部位や病勢によっては難しいことがある。これに関して、ctDNA の解析により形質転換を予測できる可能性があり¹²、今後の検証によっては実地臨床に役立つかもしれない。

私は、悪性リンパ腫における cfDNA を用いたゲノム解析に関する 2 つの研究

を行なった。

1. 血管内大細胞型 B 細胞リンパ腫を対象とした cfDNA の解析
2. B 細胞リンパ腫を対象とした cfDNA の解析におけるクローン性造血の検出について

上記の 2 つの研究で扱った臨床検体は、筑波大学附属病院の倫理審査委員会で承認された「造血器腫瘍及び固形腫瘍におけるゲノム及びエピゲノム異常の網羅的解析(H24-75)」に基づいて、患者より書面での同意を得て研究に使用した。ただし、転医や死亡による診療終了等の事由により直接の同意取得が困難な場合には、別途「T 細胞リンパ腫発症機序の解明に関する研究（H24-74）」および「臨床経過が明らかになっている造血器腫瘍患者のゲノム解析(H28-263)」に基づいて、筑波大学血液内科ホームページに掲載した公開文書により拒否の機会を提供した上で、拒否の意思が示されなかった場合に用いた。血清及び血漿は臨床研究「つくば臨床検査教育・研究センター事業における診療検体の保管と共同研究での利用（H22-603）」に基づき利用同意を得て、すでに保管されている検体を使用した。血清・血漿についても、対象患者へ「造血器腫瘍及び固形腫瘍におけるゲノム及びエピゲノム異常の網羅的解析(H24-75)」の説明を行い、書面での同意取得を行なった。

2 章. 血管内大細胞型 B 細胞リンパ腫を対象とした血中循環細胞外遊離 DNA の解析

2.1. 背景と目的

血管内大細胞型 B 細胞リンパ腫 (Intravascular large B-cell lymphoma, IVLBCL) は全身の細小血管内に腫瘍細胞が増殖する、びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫 (diffuse large B-cell lymphoma, DLBCL) の稀な一亜型である¹³。頻度は悪性リンパ腫全体の 1%未満に過ぎない^{14,15}。旧来、IVLBCL は “malignant angioendotheliomatosis” もしくは “angioendotheliomatosis proliferans” という名称で呼ばれ、悪性リンパ腫とは認識されていなかったが、1986 年に 3 例の免疫染色の結果からリンパ系造血器腫瘍であることが Sheibani らにより提唱された¹⁶。

悪性リンパ腫でありながらリンパ節腫大や腫瘤形成が見られず、不明熱や原因不明の意識障害、呼吸不全等の多彩な症状で発症する。症候により 3 つの病型が認識されており、中枢神経、皮膚など特定の臓器に関連した症候が多い “classic form” と、多臓器不全、肝脾腫、汎血球減少が前面に出る “Asian variant”^{13,17,18}、さらに西洋諸国の女性に報告が多い、腫瘍が皮膚のみに限局して予後が良好な “Isolated cutaneous variant”^{17,19}。 “Asian variant” は当初アジアからの症例報告を中心に認識されていたが、その後西洋諸国での症例報告が出てきた

事から、近年は”Hemophagocytic syndrome-associated form”と称することもある

20-23。

IVLBCL の診断は、基本的には、細小血管内に増殖する B 細胞性の腫瘍細胞の増殖を組織学的に証明することでなされる。腫瘍が組織学的に血管内に存在するものの、末梢血塗抹標本で腫瘍細胞が確認される症例は 5-24%に過ぎないため^{17,18}、血液検査単独で診断されることは例外的にしかない。診断に至る状況としてはいくつかあるが、例えば事前に IVLBCL を疑わずに、臓器障害のある病変（例えば肝臓、腎臓など）を生検し、結果的に IVLBCL と診断される例がある。一方で、症候から IVLBCL を積極的に疑って診断を試みる場合は、一般的に骨髓生検、ランダム皮膚生検を行う。ランダム皮膚生検とは、肉眼的には大腿や腹部の、特に所見のない皮膚を 3-5 箇所生検する手技である。不明熱の症例に対して、特に所見のない皮膚を複数箇所生検し、2 例の IVLBCL を診断し得たとして、2003 年に初めて報告された²⁴。2007 年に Matsue らが 6 例の IVLBCL でのランダム皮膚生検の検討を報告し、その後広く普及するに至っている²⁵。ランダム皮膚生検と骨髓生検の診断感度は、症例ベースでそれぞれ 80%と 50-60%程度と報告されている^{26,27}。一方で、ランダム皮膚生検は IVLBCL にさほど有用でないという報告もある²⁸。病変が検出される深さを検討した研究では、真皮よりも皮下脂肪組織中間層での検出率が良いという報告²⁹や、病変の 37%は

皮膚表面から 5mm 以上深い位置に見つかるという報告³⁰があり、切除生検かパ
ンチ生検かによって、診断感度が異なる可能性はある。また、もし患者に老人
性血管腫があれば生検部位に含めると、診断感度が上がるという報告もある³¹⁻³⁴。

18F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography/ computed tomography

(FDG-PET/CT) による FDG 異常集積部位の生検も IVLBCL 診断に有用であるが、
偽陰性（生検陽性部位に FDG 異常集積を認めない）・偽陽性（FDG 異常集積部
位で生検により腫瘍を認めない）も報告されている³⁵。また、厳密に言えば、現
時点では FDG-PET/CT の不明熱および疑診の悪性腫瘍に対する保険適用はない。

かつては剖検での診断例が 50%を超える時代もあったが^{19,36}、現在では生前診
断の割合が増え 80%という報告³⁷もある。これは、疾患が広く認知されてきた
ことや、ランダム皮膚生検の普及や FDG-PET/CT 異常集積部位の生検等による
ものかもしれない。しかし、現在でも診断が難しい理由として、(1)悪性リンパ
腫ながら腫瘍形成をせず、症候が非特異的であり、鑑別にあげること自体が難
しい；(2)生検すべき部位が不明瞭であり、ランダム皮膚生検、骨髓生検の感度
はそれなりに高いが、初回生検陰性例では診断までに複数回の生検を要するこ
とがある、などが考えられる。

診断後の治療については、他の DLBCL と同様 R-CHOP (rituximab,
cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone) 療法が標準治療であり、

後方視解析において3年全生存率は60-81%である^{38,39}。この2報はR-CHOP療法を受けた集団を後方視解析しているため、当然ながら剖検診断例などは含まれていない。つまり、遅滞なく診断され治療に繋がれた症例では概ね他のDLBCLの治療成績と差がないとも言える。ただし、R-CHOP療法単独では中枢神経再発の割合が高いため⁴⁰、R-CHOP療法に大量メソトレキサート療法と抗がん剤髄腔内投与を加えた初期治療の第2相試験が行われ、フォローアップ期間中である。

以上よりIVLBCL診療の現状を考慮すると、症候からIVLBCLを鑑別に挙げられた場合に遅滞なく診断できることが重要であると考えられる。それを阻むのが、腫瘍の存在する部位がわかりにくく生検すべき部位が不明瞭な点であり、現状の診断方法は、「腫瘍がいると思われる」血管組織を比較的低侵襲に採取できる皮膚や骨髄を対象として生検している。一方、cfDNAを解析対象としたリキッドバイオプシーはどこから生検すべきかを検討する必要がなく、cfDNA解析をツールとして腫瘍細胞に由来するゲノム異常を検出できれば、診断の助けとなる可能性がある。しかし、研究開始時点ではIVLBCLのゲノム異常に関する既報が存在せず、cfDNA解析で検出すべき対象のゲノム異常が不明であった。

前述の通り、IVLBCLはDLBCLの一亜型である。DLBCLは悪性リンパ腫で

最も頻度が高い病型であるが、治療反応性や予後は一様ではなく、異質性のある診断カテゴリと考えられている。そのため、今日までに様々な亜分類が検討されてきた。マイクロアレイを用いた遺伝子発現プロファイリング (Gene expression profiling, GEP) の解析では、約 10% の分類不能型を除くと、DLBCL は活性化 B 細胞に近いパターンを示す Activated B-cell (ABC) タイプと胚中心 B 細胞に近いパターンを示す Germinal Center B-cell (GCB) タイプに分けられ、ABC タイプで予後が不良であることが報告された⁴¹。さらに、この GEP を予測する免疫染色アルゴリズムは複数あるが、広く用いられているのは Hans 分類であり、MUM1, CD10, BCL6 に対する免疫染色態度により GCB 型、non-GCB 型に分類することができるが、GEP の分類不能型を検出することはできない⁴²。IVLBCL においては、GEP は検討されていないが、Hans 分類では non-GCB 型がほとんどであることが知られている¹⁸。

DLBCL のゲノム異常はすでに網羅的に解析されている。前述の GEP の違いで頻度に差があるゲノム異常もあれば、共通するゲノム異常も報告されている。

ABC 型/non-GCB 型 DLBCL では、B 細胞受容体 (B-cell receptor, BCR) シグナルの恒常的な活性化⁴³、Toll 様受容体 (Toll-like receptor, TLR) ・インターロイキン 1 受容体 (IL-1R) 経路からのシグナル伝達に関わる制御因子の遺伝子異常による Nuclear factor κ B (NF- κ B) 経路の活性化が報告されている⁴³⁻⁴⁶。non-GCB 型が

多い IVLBCL にも同様のゲノム異常が見つかるのではないかと仮説を立てた。

本研究は、IVLBCL 患者を対象に、すでに DLBCL で既知のゲノム異常を検索し、cfDNA 解析による IVLBCL ゲノム異常の検出が診断補助ツールとなり得るかを検討する目的で行なった。

2.2. 材料と方法

2.2.1. 対象患者と対象臨床検体

IVLBCL の診断に至った病理検体、血清/血漿の保存検体のいずれかが入手可能である、2005 年 1 月から 2017 年 5 月の間に研究参加施設（筑波大学附属病院、JA とりで医療センター、亀田総合病院）で診断された 27 症例の IVLBCL 症例を対象に研究を行なった。IVLBCL の診断は、各施設の病理医の病理診断に基づいて行われた。この研究は、各施設の臨床研究倫理審査委員会で承認され、ヘルシンキ宣言に則って行われた。

臨床情報は診療録から以下の情報を取得した；年齢、性別、症候（発熱、倦怠感、意識障害、神経学的巣症状、咳の有無など）、脾腫の有無、酸素飽和度、血算（白血球数、ヘモグロビン値、血小板数）、生化学データ（可溶性インターロイキン 2 受容体（sIL2R）、LDH、アルブミン、CRP）、骨髄穿刺所見、病理所見（骨髄、皮膚、その他の部位）、18F-FDG-PET/CT の所見。血球貪食症候

群の有無については HLH-2004 診断基準⁴⁷に基づいて判断した。

臨床検体は、腫瘍細胞が病理学的に確認された生検病理検体（ホルマリン固定パラフィン包埋切片, FFPE）もしくは骨髓穿刺液を組織由来 DNA（tissue-derived DNA, tdDNA）を抽出する目的で使用した。血清及び血漿は、cfDNA を抽出する目的で化学療法開始前、化学療法後、寛解時、再発時など複数の検体を使用した。また、正常対照 DNA を抽出する目的で頬粘膜スワブを収集した。

2.2.2 免疫染色

BCL6, MUM1, CD10 の染色結果から Hans の分類を行なった。すでに実地診療で 3 つの染色が行われていた症例では病理レポートから染色結果を取得した。3 つの染色の一部または全てが行われていなかった症例では、ホルマリン固定パラフィン包埋切片（Formalin- fixed paraffin-embedded , FFPE）が入手可能な場合には、つくばヒト組織診断センター内の TRRC へ依頼して薄切および染色を行なった。30%以上の腫瘍細胞での染色陽性を持ってしてカットオフとし、染色性の強弱は問わなかった。判定は筑波大附属病院病理部（現：獨協医科大学埼玉医療センター病理診断科）佐藤泰樹博士に行なって頂いた。

2.2.3. DNA 抽出

tdDNAs として、病理学的にリンパ腫細胞が確認された FFPE 検体もしくは凍結保存骨髄検体から DNA を抽出した。FFPE 検体では GeneRead FFPE kit (Qiagen 社)を、凍結保存骨髄検体では Gentra Puregene Blood Kit (Qiagen 社)を用いて、それぞれのキットの推奨プロトコル通りに DNA 抽出を行なった。

類粘膜スワブおよび、病理学的にリンパ腫細胞が確認されなかった FFPE 検体から 正常対照 DNA を抽出した。前者では DNA mini kit (Qiagen 社)、後者では GeneRead FFPE kit (Qiagen 社)を用いた。FFPE 検体は 10 μ m の厚さで薄切し、3-4 枚を使用して DNA 抽出した。

cfDNA は様々なタイミングで採取した、血清もしくは血漿 1ml から、QIAamp circulating nucleic acid kit (Qiagen 社)を使用して抽出した。血液は血清分離チューブ、およびヘパリン加スピッツに採取され、1750 g、15 分、室温で遠心分離してそれぞれ血清・血漿を得た。血清・血漿は DNA 抽出までは-80 $^{\circ}$ Cで cryogenic tube に保管した。

抽出した DNA は Nanodrop (Thermo Fisher Scientific 社)および Qubit fluorometer (Thermo Fisher Scientific 社)で濃度測定を行なった。Qubit dsDNA High sensitivity kit を使用した。抽出した DNA は解析まで-20 $^{\circ}$ Cに保管した。

2.2.4. ターゲットアンプリコンシーケンス解析

次世代シーケンサーには、いくつかのプラットフォームがあるが、本研究では Ion Torrent 技術を採用した Ion Personal Genome Machine (ionPGM, ThermoFisher Scientific 社)を使用した。Ion Torrent の次世代シーケンサーのメカニズムは、dNTP がポリメラーゼにより DNA に取り込まれる過程でピロリン酸と水素イオンが放出され、その際にウェル内の pH が変化し、電界効果トランジスタ (ion-sensitive field-effect transistor, IFSET) が pH 変化を検出して化学情報をデジタル情報に変換するというものである (図 1)。

この点で、蛍光標識した dNTP について画像による認識で塩基配列データを得る Illumina 社の次世代シーケンサーとは仕組みが異なっており、比較的成本が安価である。チップ内に dNTP を各サイクル満たしては洗浄するため、 k 塩基のホモポリマーは電荷が k 倍として検出される。よって、長いホモポリマー配列 (例えば TTTTTTTT など) の挿入欠失のバリエーションコールにはエラーが起こりやすい特徴がある。

手順としては、ライブラリの調製、テンプレートの調製、シーケンシング、データの解析に大別される (図 2)。ライブラリ調整ではマルチプレックス PCR で得られたアンプリコンにサンプル識別のためのインデックスと、両端にアダプターをライゲーショニングし、可逆的固定法 (Solid Phase Reversible Immobilization)

テクノロジーを使用した Agencourt AMPure XP (BECKMAN COULTER 社) によりライブラリを精製する。テンプレート調整では、ライブラリフラグメント P1 アダプターを介して Ion Sphere 粒子に結合し、Ion Sphere 粒子上でエマルジョン PCR によりクローン増幅される。この Ion Sphere 粒子をイオン半導体チップにローディングし、前述のメカニズムでシーケンスが行われる。

ターゲットアンプリコンシーケンスの解析対象として、ABC 型 DLBCL での反復した変異が報告されている遺伝子を中心に 8 遺伝子 (*B2M*, *BTG2*, *CARD11*, *CD79B*, *MYD88*, *PIM1*, *PRDM1*, *TNFAIP3*) を過去の文献を参照し選択した(表 1)。

この 8 遺伝子のコーディングシーケンスを対象にした遺伝子パネルをウェブツールである Ion Ampliseq Designer (Thermo Fisher Scientific 社)を利用して設計した。遺伝子パネルは 162 のアンプリコンからなり、アンプリコンサイズは 125-175bp に分布するように設計し、ターゲット遺伝子パネル全体のサイズは 16.21 kb とした。短いアンプリコンサイズにした意図は、解析対象とする cfDNA のサイズ分布はヌクレオソーム単位で断片化し、一番短い分画は 143-166bp 前後であるためである。8 遺伝子のコーディングシーケンスに対して実際にデザインしたパネルがカバーした領域は 90.1%であった。

ライブラリ調製は Ion Ampliseq Library Kit 2.0 (Thermo Fisher Scientific 社)を用いた。マルチプレックス PCR は中央値 2.6 ng (0.57-3.0 ng)の DNA を使用して行

なった。cfDNA と正常対照 gDNA のカバレッジは 100×以上、組織由来 DNA のカバレッジは 500×以上を目標値にした。これは、事前の検討で変異アリル頻度は cfDNA の方が tdDNA より高いことが分かっていたためである。

テンプレート調整には Ion OneTouch 2 System を使用した。シーケンスでは DNA チップは ion318v2 チップを使用し、200base シーケンスを実行した。Torrent Suite version 5.2.2 (Thermo Fisher Scientific) ソフトウェアを使用してシグナル処理、塩基配列決定、参照ゲノム配列である hg19 へのアラインメント、SAM/BAM ファイルの生成、BAM ファイルの出力を行なった。cfDNA 検体の BAM ファイルと正常対照 gDNA 検体の BAM ファイル、tdDNA 検体の BAM ファイルと正常対照 gDNA 検体の BAM ファイルをペアとし、Ion Reporter Software version 5.6 (Thermo Fisher Scientific 社)の Tumor-Normal pair workflow を利用して解析した (図 3)。IVL23 については、正常対照 gDNA が得られなかったため、cfDNA 検体および tdDNA 検体それぞれに Single sample workflow を用いて解析した。バリエーションコールのためのフィルタリングは以下の基準を満たすものを変異候補として採用した ; (1) P 値 ≤ 0.000005 、(2) Allele read count ≥ 4 、(3) Variant allele frequency (VAF) $\geq 10\%$ 、(4) synonymous single nucleotide variant (SNV)を除外。(1) は cfDNA もしくは tdDNA と正常対照 DNA について、野生型アリルと変異アリルについての Fisher 検定の P 値の閾値に該当する。変異アリル頻度はダイレク

トシーケンスによる検証を行うために上記の閾値を採用した。変異のアノテーションも Ion Reporter Software version 5.6 上で行なった。フィルタリング後の変異について、ダイレクトシーケンス解析による検証を行なった。例えば、cfDNA で検出された変異候補がダイレクトシーケンス解析で確認された場合において、同一症例の tdDNA のターゲットアンプリコン解析において single sample workflow のフィルターを VAF \geq 1% に設定し、再度 tdDNA 検体でのバリエントコールを行なった（図 3）。逆に tdDNA で Tumor-Normal pair workflow により基準を満たすものがあれば、ダイレクトシーケンスでの検証を計画したが、実際に基準を満たすものはなかった。

また、経時的に得られた血漿/血清由来の cfDNA を試料とした変異解析では、上記のターゲットアンプリコンシーケンスで検出された変異のみを解析対象にした。それらを検出するプライマーを Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) と Primer-BLAST(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>)を利用して設計した（表 2）。KOD Plus Neo（TOYOBO）もしくは Amplitaq Gold 360 Master Mix (Thermo Fisher Scientific)で PCR を行なった。得られたアンプリコンを用いて、Ion Plus Fragment Library Kit (Thermo Fisher Scientific)を使用してライブラリを作製した。VAF \geq 1%のカットオフとし、それ以外のフィルタリングは前述のターゲットアンプリコンシーケンスと同様に解析を行なった。

2.2.5. ダイレクトシーケンス解析

ターゲットアンプリコンシーケンスで検出した変異について、ダイレクトシーケンス法による検証を行なった。プライマーは Primer3 と PrimerBLAST を利用して設計した。 KOD Plus Neo (TOYOBO) もしくは Amplitaq Gold 360 Master Mix (Thermo Fisher Scientific) を用いて PCR を行なった。使用した Primer を表 3 に示す。ExoSAP-IT で PCR 産物を純化し、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific) を使ってサイクルシーケンス を行い、ABI 3130xl genetic analyzer (Thermo Fisher Scientific) で解析を行なった。

2.2.6. ドロップレットデジタル PCR 解析

ドロップレットデジタル PCR (digital droplet PCR, ddPCR) は油中水滴の各パーティションに DNA サンプル・PCR 試薬・ターゲット検出のための蛍光プローブの混合物を分けて、ターゲット DNA サンプルは理想的には各油中水滴のパーティションに 0 か 1 分子、多くても数分子のターゲット DNA が入るように PCR 反応を行うため、それぞれのパーティションにターゲット配列が存在する・しないがデジタルに計測でき、高い感度で絶対定量が可能な実験系である。

c.794T>C (L265P) MYD88 変異を検出するため、プライマーとプローブがセット

になっている ddPCR, Mutation detection assay, Validated (FAM+HEX), Assay ID: dHsaMDS2516944 を使用した。蛍光色として、野生型アリル検出のプロープには HEX、変異型アリルの検出には FAM を用いている。DNA input は 1.5-10 ng とした。QX200 droplet digital PCR system (Bio-Rad)を用いてドロップレットの作製と蛍光検出を行なった。ドロップレット作製後の PCR のプロトコルは以下のように行なった。初期酵素活性化 ; 95°C 10 分、変性とアニーリング/エクステンション; 94°C 30 秒、56°C 1 分を 40 サイクル、酵素不活性化 ; 98°C 10 分、温度の上昇・下降スピードは増幅過程全体で 2°C/秒とした。結果の解析には QuantaSoft version 1.7.4. (Bio-Rad)を使用した。

c.794T>C (L265P) *MYD88* の定量限界 (limit of quantification, LOQ) は筑波大学血液内科研究室服部圭一朗博士が実施した段階希釈実験のデータを使用し、定量限界下限は 0.1%であった⁴⁸。

図 4 に解析例を示す。Non-template control (NTC), 変異ターゲットについての陰性コントロール(NC)および陽性コントロール(PC)から蛍光強度の閾値を決定して解析を行った。陰性コントロールと陽性コントロールはターゲットアンプリコンシーケンスで変異ステータス既知の検体を使用した。

ddPCR における変異の割合の指標である Fractional abundance は $(N_{mut}/(N_{mut}+N_{wt})) \times 100$ と定義した。Nmut は変異アリル陽性のドロップレット

イベント、Nwt は野生型アリのドロップレットイベント数である。

2.2.7. 統計解析

統計解析は EZR version 1.3.2.および R version 3.5.2.を使用して行なった。

cfDNA と tdDNA を比較対象としたターゲットアンプリコン解析における変異ア

リル頻度および ddPCR 解析における Fractional abundance の比較には Wilcoxon

の順位和検定 (Wilcoxon rank sum test) を行なった。血清-血漿ペア検体における

cfDNA の濃度及び変異アリル頻度の比較には Wilcoxon の符号順位検定

(Wilcoxon signed rank test) を行なった。*PIMI* 遺伝子が WRCY モチーフ、C:G 塩

基特異的 SNV にエンリッチされているかどうかは Fisher 正確検定を行なった。

全て両側検定で行い、P 値が 0.05 未満の場合に統計学的に有意差があるとした。

2.3. 結果

2.3.1.患者背景と臨床検体

27 症例の IVLBCL 患者が本研究の対象となった。患者背景を表 4 に示す。個々

の症例の情報は表 5 に示す。初回のランダム皮膚生検による診断率は 78.9%

(16/21)であった。初回ランダム皮膚生検が陰性で、2 回目のランダム皮膚生検で

診断を得られた症例が 1 症例あった。初回の骨髄生検による診断率は

48.1%(13/27)であったが、2回目以降の生検を加えた診断率は66.7%(18/27)であった。ランダム皮膚生検及び骨髄生検の感度は既報と大きく変わりなかったが、骨髄穿刺スメアの陽性率は既報より低かった²⁶。また、皮膚及び骨髄以外の生検部位での診断率は100%であるが、これらの部位はIVLBCLを疑った際にルーチンに生検する部位ではなく、腫瘍の存在を疑って積極的に生検を成された結果と推定された。FDG-PET/CTは14症例で実施されており11症例(78.6%)でFDG異常集積を認めた。また、ステロイドを含む治療をせずに自然な症状寛解を3症例が示した。しかし3症例全てで症状再燃を認めた。

腫瘍細胞を含む病理検体(ホルマリン固定パラフィン包埋切片, FFPE)もしくは腫瘍細胞を含む骨髄穿刺液は27症例中26症例で得られた(図5)。1症例では血清検体のみが得られた。腫瘍細胞を含む検体を得られた26症例のうち4症例で血清、5症例で血漿が得られた。その9症例のうち8症例において、正常対照DNAを頬粘膜スワブ、もしくは腫瘍が病理学的に存在しないと確認された生検組織から抽出した。ターゲットアンプリコンシーケンスで使用する化学療法開始前のcfDNAを抽出する血清・血漿について、8症例は初発時の検体、1症例(IVL5)は、初発時に化学療法を受け3年後に再度IVLBCLとして再発した際の検体を使用した。また、IVL4は初発時検体の血漿採取日の28日前からグルココルチコイドの投与を受けていた。他の症例は検体採取前にはいかなる治療

も受けていなかった。

5 症例からの 10 の血漿と 4 症例からの 28 の血清を用いて cfDNA を抽出した (表 6)。濃度は治療前検体に限ると中央値 211.7 ng/ml (範囲; 56.7-2900 ng/ml)、全ての検体の cfDNA 濃度については中央値 91.3 ng/ml (範囲; 19.1-2900 ng/ml) であった。

2.3.2. 免疫染色

27 症例のうち 21 症例で MUM1, CD10, BCL6 の染色が行われた。解析可能な症例全てにおいて Hans 分類で non-GCB に分類された (表 7)。

2.3.2. ターゲットシーケンス解析

腫瘍細胞を含む検体と血清もしくは血漿検体が得られた 9 症例を対象に、ターゲットアンプリコンシーケンス解析を行なった。カバレッジは cfDNA 検体で 100×以上が 78.3-88.8%、tdDNA 検体で 500×以上が 82.9-90.6%、正常対照 gDNA 検体で 100×以上が 83.1-91.5%以上であった (表 8)。

ターゲットシーケンス解析の結果、解析した 9 症例全てにおいて、*CD79B*, *MYD88*, *PIM1*, *PRDM1*, *BTG2* のいずれかの変異が少なくとも 1 つ認められた。9 症例における 8 遺伝子のターゲットアンプリコンシーケンス解析を行なった結

果、全ての症例で tdDNAs と cfDNAs の両方もしくは cfDNAs のみで、*CD79B*, *MYD88*, *PIM1*, *PRDM1*, *BTG2* の少なくともいずれか1つ以上の遺伝子変異を認めた (図 6、図 7、表 9)。これらはダイレクトシーケンスでも確認された (図 8)。

CD79B 変異は 6 症例 (66.7%) で認められ、変異は全てミスセンス変異

(p.Tyr196Cys, p.Tyr196His, p.Leu199Pro) であり、p.Tyr196 がホットスポットであった (図 9)。また、*MYD88* 変異は 5 症例 (55.6%) で認められ、その全てが c.794T>C, p.Leu265Pro であった (図 9)。6 症例 (66.7%) で *PIM1* のミスセンス変異を、4 症例 (44.4%) で *PRDM1* の 2 つのナンセンス変異と 2 つのミスセンス変異を、2 症例 (22.2%) で *BTG2* の 2 つのミスセンス変異を認めた (図 9)。

PIM1 変異は 1 症例あたり 1-4 の変異を認めた。活性化誘導シチジンデアミナーゼ (Activation-induced cytidine deaminase, AID) の本来の標的である IGV 以外に Off-target 作用で変異が起きることを aberrant somatic hypermutation (aSHM) というが、*PIM1* 変異は SHM が起こりやすい領域として知られる WRCY (W=A or T, R=A or G, Y=C or T) モチーフ及び C:G 塩基にエンリッチして認められ (表 10)、aberrant somatic hypermutation (aSHM) の関与が推定された。

cfDNA と tdDNA を比較すると、変異アリル頻度は cfDNA で有意に高かった (中央値 40.6 % vs. 1.5%; $P<0.001$) (図 10)。また cfDNA では 9 症例で 33 の変異が検出されたのに対し、tdDNA では 5 症例で 18 の変異が検出された。tdDNA で検

出された 18 の変異は全て cfDNA においても検出された (図 11)。一方、cfDNA で検出された 33 の変異のうち 15 の変異は tdDNA で検出されなかった (図 11)。

2.3.3. ドロップレットデジタル PCR 解析

27 症例から得られた cfDNA 及び tdDNA の両方を含む 46 検体についてデジタルドロップレット PCR を用いて *MYD88* c.794T>C, p.Leu265Pro 変異を解析したところ、27 症例中 16 症例 (59.3%) で変異を認めた (表 11)。cfDNA 検体では 10 検体中 5 検体 (50.0%) で L265P *MYD88* を認め、tdDNA 検体では 36 検体中 19 検体 (52.8%) で変異を認めた。いずれかの検体で *MYD88* 変異が陽性であった 16 症例の検体に関して、cfDNA での VAF は中央値 42.6% (範囲 26.7-81.3%)、tdDNA での VAF は中央値 3.6% (範囲 0.21%-34.8%)であった (図 12)。ターゲットアンプリコンシーケンス解析と ddPCR 解析の両方を行なった 9 症例について検討したところ、ターゲットシーケンス解析では IVL21 と IVL23 の皮膚検体から *MYD88* 変異を検出できていなかったが、ddPCR による解析ではそれぞれ fractional abundance 0.72%、0.82% で検出された (表 11)。

2.3.4. 時系列解析

治療により寛解が一度得られた後に再発をきたした 3 症例 (IVL1, IVL5, IVL6)

と初診から確定診断までに4ヶ月を要した1症例（IVL2）を対象に経時的に cfDNA を用いた変異解析を行なった。再発した3症例については、全ての症例で臨床的な再発診断に先立って cfDNA を試料とした変異解析で再発に先行したタイミングで変異を検出した（図 13-15）。再発部位は IVLBCL としての再発、盲腸、中枢神経の部位であった。IVLBCL として再発した IVL5 では、再発時の変異アリル頻度は平均 80.7%であった（*PRDM1*:77.4%, *CD79B*:84%）。一方、盲腸に節外性腫瘍として再発した IVL1 での変異アリル頻度は 14.3%、中枢神経再発をきたした IVL6 での変異アリル頻度は 1.3%であった。

また、初回の精査で骨髄生検及び FDG-PET/CT が陰性であった症例（IVL2）において、確定診断の約4ヶ月前の時点での cfDNA を試料とした *MYD88* p.Leu265Pro 変異解析で変異を検出した（図 16）。同タイミングでの骨髄液由来 tdDNA を試料とした解析では変異は検出されなかった。この症例では確定診断がつく前に無治療で一時的に症状の自然寛解を認めたが、その期間においてもアリル頻度が低いながら cfDNA の解析で *MYD88* 変異を認めた。確定診断後 R-CHOP 療法が行われ寛解が得られた後、再発なく経過したが、寛解後は cfDNA 中で *MYD88* 変異は検出されていない。

2.3.5. 血清検体と血漿検体の比較

同一症例の同じタイミングで採取した血清及び血漿の 6 ペアについて cfDNA を抽出したところ、血清で cfDNA 濃度が有意に高い一方（中央値、血清 198.3 ng/ml vs 血漿 78.2 ng/ml、図 17）、VAF は有意に低かった（中央値、血清 31.8% vs 血漿 50.8%、図 18）。

2.4 考察

8 遺伝子を対象にしたターゲットアンプリコンシーケンスの解析の結果、仮説の通り IVLBCL において BCR/TLR/IL-1R/NF- κ B シグナル経路に関わる遺伝子の変異が認められた。ホットスポットとしては L265P MYD88 の頻度が高く、59.3%(16/27)であった。この変異は 93-97%の原発性マクログロブリン血症（Waldenström macroglobulinemia, WM）^{49,50}、22-32.5% の ABC 型/non-GCB 型 DLBCL^{45,51,52}、慢性リンパ性白血病（chronic lymphocytic leukemia, CLL）全体の 2-5%、特に免疫グロブリン重鎖可変部変異陽性の症例⁵³で認めることが報告されている。これらに共通するのは、細胞起源が胚中心を出た後の B 細胞(post-GC)ということである。また、ABC 型/non-GCB 型 DLBCL の中でも、いわゆる sanctuary site と呼ばれる中枢神経や精巣などの節外性病変をもつ DLBCL で頻度が高い。具体的には中枢神経原発悪性リンパ腫（primary central nervous system lymphoma, PCNSL）で 40-79%^{54,55}、皮膚原発びまん性大細胞型 B 細胞リンパ

腫, 下肢型で 59%⁵⁶, 精巣原発 DLBCL で 68-82%^{57,58}, 乳房原発 DLBCL で 58%⁵⁹ などである。IVLBCL では中枢神経再発を来しやすい。類似した遺伝子発現プロファイルとゲノム異常の共有と関連があるのかもしれないが、現時点では推測の域を出ない。

MYD88 は、TLR からのシグナルを伝えるアダプタータンパク質であり、TIR ドメインを有する⁶⁰。通常はリガンドが TLR のロイシンリッチリピートを介して結合し、それにより TLR がホモダイマーもしくはヘテロダイマーを形成し、細胞内の TIR が近接して、MYD88 などの下流のアダプター分子がリクルートされる⁶⁰。MYD88 は転写因子 NF- κ B を活性化し、NF- κ B は炎症性サイトカインの遺伝子発現を誘導する。L265P はこの TIR ドメイン内の疎水性コアでの変異であり、L265P 変異体は IRAK1 および IRAK4 を含む複合体の会合を促進し、NF- κ B 経路、JAK/STAT3 活性化、IL-6, IL-10, インターフェロン β の分泌を促進し、細胞増殖を促進するとされている⁴⁵。

B 細胞特異的コンディショナル *Myd88*^{p.L252P} ノックインマウスモデル (*Myd88* p.L252P は *MYD88* p.L265P のオーソログ) では、ABC-DLBCL 様のリンパ増殖性疾患を示し、そのリンパ増殖性疾患においては NF- κ B p65 サブユニットが核に局在しており、NF- κ B 経路の恒常的な活性化が示された⁶¹。

CD79B 変異、とりわけ p.Tyr196 (Y196 *CD79B*) も本研究で反復性に変異が検出

された。しかしながら、*CD79B* 変異については、9 症例のみでしか検討していないため、その頻度としては *MYD88* と比較すると正確ではないかもしれない。*CD79B* 変異も既報では non-GCB 型/ABC 型で節外性の DLBCL において高い頻度で変異を認めることが報告されている。

Bruton's tyrosine kinase 阻害剤であるイブルチニブの反応性は *MYD88*, *CD79B* 変異のステータスにより奏効割合が異なることが報告されており⁶²、将来的に IVLBCL での使用が検討される場合、参考になるかもしれない。

PIMI は以前から DLBCL において aberrant somatic hypermutation のターゲットとして知られており、43%の DLBCL で変異が報告されている⁶³。本研究においても、*PIMI* は aSHM のターゲットであることが示唆された。

Schrader らは IVLBCL 生検検体の腫瘍細胞をマイクロダイセクション後に DNA 抽出し、*MYD88*、*CD79B*、*CD79A*、*CARD11*、*EZH2* を対象にターゲットシーケンス解析を行なった。その結果、*CD79B* 変異、*MYD88* 変異をそれぞれ 26% (6/23) , 44% (11/25) の症例で認め、*EZH2* 変異は 4% (1/25)、*CD79A* 変異、*CARD11* 変異は検出されなかったことを、本研究とほぼ同時期に発表した⁶⁴。Schrader らの報告は本研究と比較すると *CD79B* 変異、*MYD88* 変異の頻度がやや低い、患者背景についてステージ I E が全体の 38% (9/24)、皮膚限局型は 25% (6/24) であり、IVLBCL のサブタイプの違いに起因しているかもしれない。

また、cfDNA の変異アリル頻度は tdDNA と比較して有意に高かった。tdDNA で検出された変異は全て cfDNA でも確認された。また、45% (15/33) の遺伝子変異は tdDNA では検出されず、cfDNA のみで検出された。IVLBCL は DLBCL の一亜型であることは先に述べたが、DLBCL および中枢神経原発悪性リンパ腫 (Primary Central Nervous System Lymphoma, PCNSL) における cfDNA を解析対象とした研究のうち、本研究と同様に ionPGM を解析プラットフォームに使用した研究では、いずれも tdDNA は cfDNA よりも高い変異アリル頻度を示した (変異アリル頻度平均値 ; DLBCL において tdDNA 35% vs cfDNA 11%, PCNSL において tdDNA 47% vs cfDNA 4.7%)^{65,66}。また、tdDNA で検出された変異を cfDNA で検出できる感度は PCNSL で 32%, DLBCL で 85%, 本研究では 100%であった^{65,66}。IVLBCL は生検組織中の腫瘍細胞比率が低いことにより tdDNA の変異アリル頻度が低かったが、その一方で、IVLBCL 患者の cfDNA は腫瘍由来 DNA を得る材料として適しており、これは他のサブタイプの DLBCL と比較して特異であることがわかる。

血清と血漿のどちらがより良いかについては、特に変異アリル頻度が低いと予想される状況では血漿が良いと考えられる。血清検体を使用した場合、採血管内で凝固する際に循環白血球に由来するゲノム DNA がコンタミネーションすることにより、cfDNA 中の正常細胞由来の分画が増えて ctDNA が希釈されてし

まう⁶⁷。本研究での血清・血漿同時採取検体での検討においても血清由来 cfDNA で濃度が高い一方変異アリル頻度が低かった。

IVLBCL において L265P *MYD88* と Y196C/H *CD79B* の変異は高頻度に反復して認められ、cfDNA を用いた解析は検出感度が高いことから、診断補助への臨床応用が期待される。ただし、臨床応用を検討する上でいくつか注意すべき点を列挙すると(1)一塩基多型 (single nucleotide polymorphism, SNP) について、(2)クローン性造血、(3)変異の疾患特異性がある。

(1)SNP ; Y196C *CD79B*, Y196H *CD79B*, L199P *CD79B* のいずれも SNP は報告されておらず、SNP による偽陽性は考慮しなくて良い。しかし、L265P *MYD88* は rs387907272 として登録されており、1000 Genomes Project ではアリル頻度が C=0.0002、ExAC では C=0.00010 である。これは C/T 遺伝型保有者が 2500-5000 人に一人いることになる。ただし、1000Genomes project, ExAC 共にヨーロッパでの集団のみに C アリルが存在し、ヨーロッパの集団以外では C アリルは 0% である。また、東北メディカル・メガバンク機構 (Tohoku Medical Megabank Organization, ToMMo) の公開している SNP データベース 3.5KJPNv2 でも C アリルは検出されていない

(<https://jmorp.megabank.tohoku.ac.jp/201909/downloads/legacy/>)⁶⁸。CLL の地域による有病率の差を考慮すると、欧米では未診断の monoclonal B-cell lymphocytosis

の体細胞変異としての T>C が、多型として検出されている可能性もあるかもしれない。

(2)クローン性造血；血液細胞は健常人において主要な cfDNA の供給源である。詳しくは次章の「B 細胞性リンパ腫を対象とした cfDNA の解析におけるクローン性造血の検出について」で触れるが、造血器腫瘍の所見がない高齢者においても、血液悪性腫瘍、特に骨髄性腫瘍のドライバー遺伝子の変異が末梢血単核球分画に見つかることが相次いで報告され、クローン性造血(clonal hematopoiesis of indeterminate potential, CHIP または age-related clonal hematopoiesis, ARCH)と呼ばれている。これに関して、L265P *MYD88* と Y196C/H *CD79B* が CHIP 由来でないかという懸念がある。2 型糖尿病患者 17182 人を対象に CHIP を調べた研究、及び 12380 人のスウェーデン人（6245 人の健常人、4970 人の統合失調症患者、1165 人の双極性障害患者）を対象に CHIP を調べた研究、どちらの試験においても *CD79B* p.Y196C/H 及び L199P は検出されなかった。一方 L265P *MYD88* は 2/17182 人、1/12380 人で検出された。2728 人のがん患者を対象に CHIP を調べた研究ではいずれも検出されなかった⁶⁹。

(3)疾患特異性；既に述べたように、*CD79B* 変異は IVLBCL に疾患特異的ではなく、B 細胞性リンパ腫、とりわけ ABC タイプの節外性 DLBCL および一部の節性 DLBCL で変異を認める。L265P *MYD88* はそれに加えて 93-97%の WM に認

められる。他の DLBCL や WM はそもそも病歴や症候から IVLBCL と混同する恐れはないが、cfDNA で 2 遺伝子の変異を認めたからといって全例が IVLBCL というわけではない。

よって、(1)-(3)を考慮すると、少なくとも今後臨床応用を検討する場合は IVLBCL である検査前確率を見積もった上で cfDNA 解析を行う必要があると考えられる。

本研究は IVLBCL のゲノム異常を網羅的に解析したものではなく、その一部を明らかにしたに過ぎず、これらの遺伝子異常は他の ABC 型 DLBCL と共通したものであるため、IVLBCL の特異な解剖学的病変分布を説明し得ない。しかし、他の節外性 DLBCL と同様に BCR/TLR/IL-1R/NF- κ B シグナル経路に関わる遺伝子変異が多いことを初めて明らかにした。さらに、その病変分布から腫瘍細胞・腫瘍 DNA を得ることが難しい IVLBCL について、cfDNA 中には腫瘍 DNA が多く含まれることを示した。感度・特異度など検討すべきではあるものの、cfDNA 解析により L265P *MYD88* と Y196 C/H *CD79B* を検出することによる IVLBCL 診断補助の強力なツールを提案できたものと思われる。

3 章. B 細胞リンパ腫を対象とした血中循環細胞外遊離 DNA の解析におけるクローン性造血の検出について

3.1. 背景と目的

cfDNA 解析による ctDNA の検出は悪性リンパ腫を含む種々の悪性腫瘍で研究が行われており、非小細胞肺癌においては本邦においても保険診療で EGFR 変異を対象に解析することができる。低侵襲に腫瘍由来 DNA を解析できることから、MRD の評価や、薬剤耐性クローンの検出などに有効ではないかと目されている。

TP53 遺伝子は、腫瘍抑制遺伝子として有名だが、種々の固形腫瘍で変異を認め、悪性リンパ腫もその例に漏れない。新規診断された DLBCL で 17%⁷⁰、濾胞性リンパ腫 (follicular lymphoma, FL) で 5-12%⁷¹、ホジキンリンパ腫 (Hodgkin lymphoma, HL) で 9%⁷² と報告されている。R-CHOP 療法(rituximab, cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone)時代においても TP53 変異を有する症例の予後は不良であるとされ⁷³、またその頻度は再発難治性 DLBCL で高いと報告されている^{74,75}。同様に TP53 変異は、形質転換をきたしていない FL に比較して形質転換をきたした FL でより多く認められる⁷⁶。これ

らのことから、cfDNA 解析で *TP53* 変異を経時的に検出することは、予後予測に役立つ可能性がある。

近年、造血器腫瘍の所見がない集団においても、血液悪性腫瘍、特に骨髄性腫瘍のドライバー遺伝子の変異が末梢血単核球分画に見つかることが相次いで報告され、クローン性造血(clonal hematopoiesis of indeterminate potential, CHIP)と呼ばれている⁷⁷。高齢者ほどその頻度が高く、70代では約10%で認めるため age related clonal hematopoiesis (ARCH) と呼ばれることもある⁷⁸。この現象は、女性における X 染色体不活化(Lyonization)が片方のアリルに偏って起きている現象(X inactivation skewing, XIS)の発見に端を発する⁷⁹。2012年に XIS のある健康者の検体から、骨髄異形成症候群や急性骨髄性白血病のドライバー変異として知られる *TET2* 変異が検出された⁸⁰。さらに、2014年以降、複数の大規模なシーケンス解析による報告が相次いでなされ、CHIP は造血器腫瘍発症および全死亡のリスクが増加し（ハザード比 11.1-12.9）^{69,77,78}、さらに *TET2* 遺伝子の CHIP に関しては動脈硬化・心血管イベント発症リスクの増加にも関与していることが報告された⁸¹。

がん患者において cfDNA を抽出して解析する場合、腫瘍細胞由来の分画が ctDNA であり、cfDNA 全体の一部である。その他で主要な cfDNA の供給源として血液細胞が知られている⁸²⁻⁸⁴。よってクローン性造血がある場合に、これが

cfDNA 解析で検出される可能性がある」と推察される。cfDNA の解析で遺伝子変異が検出された場合に、大枠としては次の 3 つの分け方が考えられる。(1)腫瘍では反復して変異が報告されているが、CHIP としては頻度が低い遺伝子；(2)CHIP として反復して変異が報告されているが、腫瘍では変異の頻度が低い遺伝子；(3)腫瘍、CHIP どちらでも変異が認められることがある遺伝子。このうち(3)について、cfDNA 解析で検出された際に、その変異がどこに由来するのか検討し、その上で意義を解釈する必要があると考えられる。

本研究では、HL を含む B 細胞リンパ腫患者において、血清由来 cfDNA の遺伝子変異解析により CHIP 関連の遺伝子変異が検出された時に、その変異の由来を検討し、適切に解釈することを目的とする。

3.2. 材料と方法

3.2.1.対象患者と臨床検体

筑波大学附属病院において診療を受けた、B 細胞性リンパ腫（HL を含む）の診断を受け、治療により PET-CT による効果判定で complete metabolic response (CMR)が得られ、CMR 達成時の血清検体が入手可能である 75 症例を対象に研究を行なった。

この研究は、第 2 章と同様に筑波大学附属病院の臨床研究倫理審査委員会で

承認され、ヘルシンキ宣言に則って行われた。

臨床情報は診療録から以下の情報を取得した；年齢、性別、病理診断所見、骨髄穿刺所見、生化学データ（可溶性インターロイキン 2 受容体、LDH）
18F-FDG-PET/CT の所見、化学療法の内容、放射線治療の有無、二次発がんの有無。

臨床検体は、対象症例全例の CMR 達成時の血清検体を使用した。CMR 達成時の血清検体由来 cfDNA の解析において変異が検出された症例のみを対象に、診断時血清、腫瘍検体（FFPE）、診断時の骨髄単核球検体、CMR 時の骨髄単核球検体もしくは末梢血単核球を使用した。

3.2.2. 解析対象遺伝子の選定

解析対象遺伝子として *CD79B*, *MYD88*, *DNMT3A*, *TP53* の 4 遺伝子を採用した。
(1) *CD79B* と *MYD88* ; DLBCL でそれぞれ 14%、18% の頻度で検出される一方、CHIP としての変異検出は稀である。(2) *DNMT3A* ; CHIP で最も頻度が高く検出される一方、B 細胞性リンパ腫での変異検出は稀である。(3) *TP53* ; B 細胞性リンパ腫で変異が検出され、かつ CHIP としても変異が検出される。

3.2.3. DNA 抽出

血清からの cfDNA 抽出、FFPE 検体および凍結骨髄検体からの DNA 抽出は 2 章の方法と同様に行なった。

3.2.4. ターゲットアンプリコンシーケンス解析

2 章の研究と同様に ionPGM を用いたターゲットアンプリコンシーケンス解析を行なった。*TP53* と *DNMT3A* のコーディングシーケンスと 3'および 5'-UTR を対象にした遺伝子パネルを Ion Ampliseq Designer (Thermo Fisher Scientific 社)を利用して設計した。*DNMT3A* の遺伝子パネルは 75 のアンプリコン、アンプリコンサイズは 125-140bp に分布するように設計し、ターゲット遺伝子パネル全体のサイズは 6.09 kb とした。*TP53* の遺伝子パネルは 38 のアンプリコン、アンプリコンサイズは 125-140bp に分布するように設計し、ターゲット遺伝子パネル全体のサイズは 2.97 kb とした。ライブラリ作製とテンプレート調製は 2 章と同様に行なった。75 症例の CMR 時の血清から抽出した cfDNA を対象に、*TP53* と *DNMT3A* のシーケンスを行なった (図 19-Step 1)

Torrent Suite version 5.8. (Thermo Fisher Scientific) ソフトウェアを使用してシグナル処理、塩基配列決定、参照ゲノム配列である hg19 へのアラインメント、SAM/BAM ファイルの生成、BAM ファイルの出力を行なった。2 章とは異なり、バリエントコールは Torrent Suite ソフトウェアの Variant caller plugin を用いて次

の条件で実行して VCF ファイルを得た ; (1)変異アリル頻度 ≥ 0.02 、(2) Phred
クオリティスコア ≥ 6 , (3) カバレッジ ≥ 100 , (4) いずれのストランドにおい
てもカバレッジが ≥ 4 , (5)ストランドバイアス ≤ 0.95 , (6) コモンシグナルシフ
ト ≤ 0.12 。コモンシグナルシフトはホモポリマー配列の挿入欠失のバリエント
コールに関わるパラメーターである。変異のアノテーションは
wANNOVAR(<http://wannovar.wglab.org>)というウェブベースのアノテーションツ
ールにより VCF ファイルを解析して行なった。

イントロン及び UTR にある変異、Synonymous 変異, dbSNP にキュレーション
されかつ COSMIC (Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer,
<https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>) ID を持たず変異アリル頻度が 40.0-60.0% もしく
は 80.0-100.0% の変異はフィルタリングした。CMR 時の cfDNA で検出された
変異について、Primer3 と Primer-BLAST を利用してプライマー (表 12) をデザ
インし、同一症例の腫瘍由来 DNA、診断時の骨髓単核球由来 DNA, CMR 時の末
梢血もしくは骨髓単核球由来 DNA を対象に ionPGM プラットフォームでアンプ
リコンシーケンスを行なった (図 19-step2)。フィルタリングの条件は変異アリ
ル頻度 ≥ 0.01 以外は上述の解析と同様に行なった。全ての変異は IGV で目視し、
エラーと思われる変異は除外した。また、cfDNA で検出されるも腫瘍 DNA 及び
骨髓/末梢血単核球 DNA で検出されなかった変異は除外した。

3.2.5. ドロップレットデジタル PCR 解析

CMR を達成した 45 症例の DLBCL 症例のうち、治療前腫瘍検体が入手可能な 29 症例を対象に、腫瘍検体を用いてドロップレットデジタル PCR 解析により c.794T>C (L265P) *MYD88*、c.587A>G (Y196C) *CD79B*、c.586T>C (Y196H) *CD79B* 変異を解析した（図 20-step 1）。腫瘍で変異が検出された症例では、治療前血清、治療前骨髄単核球、CMR 時の血清を対象に同様の解析を行なった（図 20-step 2）。c.794T>C (L265P) *MYD88* の解析は 2 章の前述の方法と同様に行なった。c.587A>G (Y196C) *CD79B* の解析には ddPCR, Mutation detection assay, Validated (FAM+HEX), Assay ID:dHsaMDS717317229 を、c.586T>C (Y196H) *CD79B* の解析には ddPCR, Mutation detection assay, Validated (FAM+HEX), Assay ID:dHsaMDS540972798 を使用した。それぞれの *CD79B* 変異の LOQ を評価するため、NGS であらかじめ変異アリル頻度既知の臨床検体を用いて段階希釈により検討した（図 21、図 22）。その結果、Y196H *CD79B* の LOQ は 0.12%、Y196C *CD79B* の LOQ は 0.037% とした。

3.2.6. 統計解析

統計解析ソフトとして R version 3.5.2.を使用した。カテゴリカルデータは

Fisher 正確検定を、連続量の比較には Wilcoxon の順位和検定 (Wilcoxon rank sum test) を使用した。cfDNA、腫瘍、骨髓単核球/末梢血単核球検体間の VAF の比較には Kruskal-Wallis の一元配置分散分析 (Kruskal-Wallis one-way analysis of variance, Kruskal-Wallis ANOVA) を使用した。Kruskal-Wallis の一元配置分散分析で有意差を認めた場合、Bonferroni 法による事後分析を行なった。

3.3. 結果

3.3.1.患者背景

表 13 に患者背景を示す。年齢中央値は 65 歳 (範囲 25-89 歳) であった。リンパ腫の組織型は DLBCL が 45 症例 (60%)、FL が 20 症例 (26.7%)、HL が 4 症例 (5.3%)、それ以外の B 細胞性リンパ腫が 6 症例 (8%) であった。1 症例を除いた全ての症例が化学療法による治療を受けていた。43 (57.3%) が R-CHOP 療法、14 (18.7%) が R-bendamustine 療法、4 (5.3%) が ABVD (doxorubicin, bleomycin, vinblastine, and dacarbazine) 療法、2 (2.7%) がその他の化学療法 1 レジメン、11 (14.7%) がその他の化学療法 2 レジメン以上による治療を受けた。そのうち 11 症例が化学放射線療法を受けた。観察期間中央値 30.9 ヶ月 (範囲 6.3-82.6 ヶ月) で、1 症例が二次発がんとしてアグレッシブ NK 細胞白血病 (aggressive natural killer cell leukemia, ANKL) を発症した。

3.3.2. ターゲットアンプリコンシーケンス解析のクオリティ

TP53 のシーケンスの平均カバレッジは 8009, *DNMT3A* のシーケンスの平均カバレッジは 3783 であった。それぞれの変異特異的に設計したアンプリコンシーケンスの平均カバレッジは 58073 であった。500x 以上を達成領域は、シーケンス対象領域に占める 100%, 94.1%, 100% であった。

3.3.3 *TP53* と *DNMT3A* を対象としたターゲットアンプリコンシーケンス解析

2 つの *TP53* 変異 (2 つのミスセンス変異 ; p.A119D と p.C275Y) と 7 つの *DNMT3A* 変異 (4 つのミスセンス変異、2 つのナンセンス変異、1 つのフレームシフト欠失 ; 2 症例で p.W860R、p.V563M、p.R882H、p.E392*、p.W601*、p.E565fs) が CMR 時点での血清検体で検出された (表 14)。

これらの変異は全て、治療開始前の骨髄単核球もしくは CMR での骨髄単核球/末梢血単核球のいずれかに認められた。治療前の腫瘍検体が得られる 7 症例で、腫瘍検体でこれらの変異が認められるか解析したところ、5 つの *DNMT3A* 変異のうち 4 つが認められたが、2 つの *TP53* 変異は腫瘍検体では確認されなかった。しかしながら、腫瘍に検出された *DNMT3A* 変異においても、腫瘍での変異アリル頻度は血清及び骨髄単核球/末梢血単核球の変異アリル頻度と比較して有意に

低かった。変異アリル頻度中央値（範囲）は治療前の骨髄単核球/末梢血単核球検体で 6.1% (検出限界以下-13.8%)、治療前血清検体で 5.2% (検出限界以下-11.4%)、治療前の腫瘍検体で検出限界以下 (検出限界以下-1.6%)であった (Kruskal-Wallis の一元配置分散分析, $P=0.01$; Bonferroni 補正した Wilcoxon Wilcoxon の順位和検定, BMMCs vs 血清, $P=1.00$; BMMCs vs 腫瘍, $P=0.02$; 血清 vs 腫瘍, $P=0.03$; 図 23-A, 表 14)。

これらの結果は cfDNA で検出された遺伝子変異が腫瘍由来であるよりむしろクローン性造血由来であることを示唆した。さらに、次の 2 つの結果もこの仮説を支持した。

(1)CMR での血清中に *TP53* または *DNMT3A* 変異を認めた患者群は、そうでない患者群と比較して有意に年齢が高かった(中央値 73.0 vs. 63.5, $P=0.03$, 表 13)。これは、クローン性造血の頻度が高齢であるほど高くなる^{77,78,85,86} ことに合致する所見である。

(2) 変異アリル頻度中央値（範囲）は CMR での骨髄単核球/末梢血単核球検体で 4.6% (1.3-15.3%)、CMR での血清検体で 6.0% (3.2-23.8%)であった (図 23-B, 表 14)。

3.3.4. *MYD88* と *CD79B* を対象とした ddPCR 解析

さらに、PET-CT では検出できない MRD 由来の変異が血清中に検出されうるかを検討するため、DLBCL で変異が認められる *MYD88* p.L265P (L265P *MYD88*)、*CD79B* p.Y196C、*CD79B* p.Y196H (Y196C/H *CD79B*) 変異の解析を行なった。これらの変異はクローン性造血としては稀である。

29 症例中 6 症例の DLBCL で、腫瘍中に変異を検出した。5 症例で L265P *MYD88*, 1 症例で Y196C *CD79B*、2 症例で Y196H *CD79B* を認めた。これらの変異は治療前の血清由来 cfDNA でも検出されたが（図 24-A）、治療前骨髓単核球および CMR での血清由来 cfDNA では検出されなかった（図 24-A・B）。Fractional abundance の中央値（範囲）は、治療前骨髓単核球で検出限界以下、治療前血清由来 cfDNA で 7.4 (0.7-20.6) %、治療前腫瘍で 41.1 (20.5-82) %であった

（Kruskal-Wallis の一元配置分散分析, $P=0.0004$; Bonferroni 補正した Wilcoxon Wilcoxon の順位和検定, 治療前骨髓単核球 vs 治療前血清, $P=0.012$; 治療前骨髓単核球 vs 腫瘍, $P=0.0048$; 治療前血清 vs 腫瘍, $P=0.0093$; 図 24-A、表 15）。

血清中の変異アリル含有 cfDNA 量を定量化するため、cfDNA 濃度 (ng/mL) に変異アリル頻度を乗じたものを haploid genome equivalent (hGE) と定義する。*TP53* と *DNMT3A* の血清中の変異量の変化は、治療前検出限界以下で治療後に検出された W860R *DNMT3A* を除いて、1.15 log fold 内の変化であった（図 25）。一方、L265P *MYD88* と Y196C/H *CD79B* は全て 3 log fold 以上の減少を示し、CMR

では全て検出限界以下となった（図 26）。

3.3.5. 二次発がん症例で血清中に検出された *TP53* p.A119D 変異の経時的評価

DLBCL の 1 症例が二次発がんとして ANKL を発症したため、cfDNA の解析を時系列で示す（表 16）。CMR が得られた時点（治療開始 253 日）で *TP53* p.A119D 変異が検出されていたが、治療開始 962 日に DLBCL 再発の診断がなされ、再度化学療法により CMR が得られていた。第 1296 病日に ANKL を発症した。*TP53* p.A119D 変異の変異アリル頻度は骨髄単核球で 23.8%，末梢血単核球で 15.3% であった。一方、再発時の DLBCL 腫瘍検体での *TP53* p.A119D 変異の変異アリル頻度は 1.8% であり、ANKL 発症時の白血病細胞検体での *TP53* p.A119D 変異の変異アリル頻度は検出限界以下（< 1.0%）であった。また、全経過を通じて、血清中の *TP53* p.A119D 変異の haploid genome equivalent の変化は 1.3 log 内の変動におさまっていた。これらのことから、DLBCL および ANKL は *TP53* p.A119D 変異を有する血液細胞に由来しないと考えられた。

3.4. 考察

cfDNA を用いたゲノム解析は、低侵襲性や検体採取の簡便性を考慮すると治療経過中に経時的に行いやすく、治療抵抗性クローンや再発の早期発見に役立つ

可能性がある。しかしながら、本研究において、CMR 時の血清由来 cfDNA で検出された *TP53* 変異および *DNMT3A* 変異は、単核球では検出される一方、腫瘍中の変異アリル頻度が検出感度以下もしくは検出されても低く、これらのことから腫瘍の MRD ではなくクローン性造血に由来していると考えられた。クローン性造血に由来すると思われる *TP53* 変異が、cfDNA を用いたゲノム解析で 15%(5/33)の非小細胞肺癌患者に検出されたという報告がある⁸⁷。

また、腫瘍検体で低い変異アリル頻度ながら検出されたのは、腫瘍組織中に浸潤した非腫瘍細胞であるリンパ球などに由来する可能性がある。クローン性造血由来の変異が腫瘍で検出される事象は、正常対照コントロールを欠いた腫瘍のゲノム解析研究においても報告されている^{88,89}。

また CHIP と想定される *DNMT3A* 変異は 14%(7/49), *TP53* 変異は 2.7%(2/75)であり、本研究での CHIP の頻度は、リンパ腫患者を対象として変異アリル頻度のカットオフを 2%とした既報の頻度 (*DNMT3A* 49/401, 12.2%; *TP53* 19/401, 4.7%)⁹⁰と比較した場合、大きな差はなかった。

一方、cfDNA で検出された変異が CHIP に由来するという解釈について、いくつか反論を考えうる。一つ目の反論として、検出された *TP53* 変異が腫瘍由来の可能性がある。リンパ腫病変が複数ある場合に病変間の遺伝子変異に異質性があることは稀ではなく、生検部位では変異が検出されなかったが、他部位の

腫瘍には変異が見つかるかもしれない。しかしながら、(1)次世代シーケンサーよりも感度の高い ddPCR の系において、*CD79B* や *MYD88* の変異が検出されなかったため、CMR 時にそれより感度の低い NGS の系において MRD 由来の変異が検出される可能性が低い;(2)*MYD88* 変異や *CD79B* 変異が 6 症例において 3 log 以上の hGE の低下を示し検出感度以下となった、という二点について考えると、CMR の状況で cfDNA 中における変異 DNA 量に大きな変化がない *TP53* 変異が、FDG 集積を伴わない DLBCL の MRD に由来しているとは考えにくい。

二つ目の考えうる反論として、FDG 集積のない未診断の固形腫瘍が血清中の *TP53* 変異の由来となっている可能性である。これに関しても、仮に PET-CT で検出し得なかった固形腫瘍があったとして、ステージ 1 の固形腫瘍における ctDNA の変異アレル頻度中央値は 0.05%であったという報告がある⁹¹。ゆえに、本研究のターゲットアンプリコンシーケンスの検出感度下限が 1% であることを考慮すると、未診断のステージ 1 固形腫瘍に由来する変異が検出されている可能性は低いと推察される。

研究開始時点において、*DNMT3A* 変異は、CHIP で頻度が高く B 細胞性リンパ腫では稀な変異として解析対象に加えた。しかしながら、Epstein-Barr virus (EBV) positive DLBCL では反復して *DNMT3A* 変異を認めることが研究開始後に報告された⁹²。EBV-positive DLBCL は EBV が陽性の大型 B 細胞のクローン性増殖で

あり、形質芽細胞性リンパ腫などの特定の EBV 陽性のリンパ腫を除いた疾患群である⁹³。血管免疫芽球性 T 細胞性リンパ腫では、腫瘍における *DNMT3A* 変異や *TET2* 変異がクローン性造血に由来した多段階発がんの機序が示唆されているが⁹⁴、EBV-positive DLBCL の報告では末梢血単核球や骨髄単核球のシーケンスがなされていないため、同様の機序があるかどうかは不明である。以上から、他の DLBCL サブタイプとは異なり、EBV-positive DLBCL においては、cfDNA 中に *DNMT3A* が検出された場合、CHIP のみならずリンパ腫由来の変異である可能性も検討する必要がある。

David らは R-CHOP 療法 2 サイクル後に CMR を達成した患者群では ctDNA の 2.5 log hGE (haploid genome equivalent) 以上の減少を認めた一方、CMR を達成しなかった患者群では ctDNA は減少しなかったと報告した⁹⁵。本研究においても、診断時 cfDNA 中に検出された *MYD88* 変異および *CD79B* 変異は CMR 達成時に 3 log 以上の減少を示し、この既報と合致した結果であった。一方、cfDNA 中に検出された *TP53* と *DNMT3A* の変化量は、CMR 時になって初めて検出された *DNMT3A* W860R を除いて全て 1.3 log 以内であった。これらのことから、CMR 達成時においても cfDNA 中の変異量が安定もしくは増加している場合、その遺伝子変異が CHIP として頻度が高いものであれば、CHIP 由来の変異である可能性が高いと推察される。

CHIP を有するクローンの動態について、Wong らは自家造血幹細胞移植を受けた患者群において、変異アリル頻度が 2 倍以上になり統計学的に有意差がある場合をクローンサイズの増大ありと定義したところ、*DNMT3A* 変異のうち 33.3%、とりわけ R882H *DNMT3A* の全てがクローンサイズの増大を認めたと報告している⁹⁶。本研究においては検出された CHIP が 8 とそもそも数が少ないため意味のある結論を出すことは難しいが、*TP53* p.C275Y 変異がこの定義でクローンサイズ増大を満たすものの、7 つの *DNMT3A* 変異は p.R882H 変異も含めて化学療法後にクローンサイズは増大しなかった。

Coombs らは化学療法後のリンパ腫患者の自家末梢血幹細胞移植片中には、健常者と比較して高頻度に *PPM1D* 及び *TP53* のクローン性造血を認めた⁹⁷と報告しており、化学療法による選択圧で、クローンサイズが拡大することが推察される。しかし、本研究では、DLBCL 患者に見つかった *TP53* の CHIP のクローンサイズは骨髓中で見ると治療前から CMR 達成にかけてクローンサイズが拡大したものの、ANKL 発症時には縮小し検出限界以下となった。14 症例の ANKL の全エクソームシーケンス解析では 1 症例において *TP53* 変異が認められていたが⁹⁸、予想に反して ANKL は *TP53*-CHIP に由来したものではなかった。

TP53-CHIP の検出は治療関連骨髄性腫瘍のリスクであることが複数報告されているが^{97,99,100}、既報においてもいくつかの *TP53*-CHIP 自体は治療関連白血病の

創始クローンではなかった⁹⁹。よって、特定の **TP53-CHIP** の検出は将来の治療関連骨髄性腫瘍を予測するバイオマーカーかもしれないが、それ自体をモニタリングする意義はまだ明らかでない。

私は本研究を通して、B 細胞性リンパ腫においても cfDNA 解析による遺伝子変異検出の解釈には注意が必要であることを示した。本研究は、単純化のために CMR のタイミングで cfDNA 中の変異をスクリーニングすることにより、腫瘍由来の変異よりも CHIP 由来の変異が検出されやすい状況で実施した。このスクリーニング、すなわち cfDNA を用いた変異解析が診断時や再発難治の状況で行われれば、例えば **TP53** に着目すると腫瘍由来の変異と CHIP 由来の変異が混在して検出されるであろう（図 27）。そのような状況では、末梢血由来単核球も同時に変異解析を行なって CHIP である可能性を評価することで、cfDNA で検出される変異をより正確に解釈することができるだろう。

第4章. 血管内大細胞型B細胞リンパ腫に対する血中循環細胞外遊離 DNA 解析の臨床応用の展望

既に第2章において述べたが、IVLBCLの診断における問題点は(1)鑑別診断に挙げることが難しい、(2)鑑別診断に挙げて生検を行なっても腫瘍を検出できない事がある（ランダム皮膚生検、骨髄生検）の二点である。(1)に関して、sIL2R高値もIVLBCLを疑う一つの所見ではあるが、sIL2R値上昇は必ずしも悪性リンパ腫に特異的ではない。sIL2RはIL-2が結合した際にIL-2レセプターから解離した α 鎖に相当し、Tリンパ球活性化を反映する¹⁰¹。結核（特に粟粒結核）¹⁰²や、リンパ腫関連でない血球貪食症候群^{103,104}、マクロファージ活性化症候群¹⁰⁵、ウイルス感染症^{106,107}、敗血症¹⁰⁸、好酸球増加症候群¹⁰⁹、サルコイドーシス¹¹⁰などにおいてもsIL2R高値が報告されている。sIL2Rによるリンパ腫診断予測に関して受信者操作特性(receiver operating characteristic, ROC)解析でカットオフ値を検討した報告では、sIL2R 2000 U/mlで感度35%・特異度93%であった¹¹¹。この報告では低悪性度リンパ腫を含んでいるため、IVLBCLに対して使用する場合は感度がより高いと想定される。実際に第2章でのIVLBCL27症例で検討すると、5症例がsIL2R 2000 U/ml未満であり（表5）、感度は81%に相当する。診断できない際の顛末を考慮すると、sIL2R低値単独をもってしてIVLBCLの除外診断としないほうが良いだろう。また、稀なケースではあるが粟粒結核でsIL2R

19400U/ml という症例報告¹¹²もあることから、カットオフ値を上げてても特異度 100%にすることは困難である。sIL2R 高値があり初回のランダム皮膚生検・骨髄生検が陰性の際に、本来存在する腫瘍細胞を検出できなかったのか、非 IVLBCL 疾患で sIL-2R が高いのか、両方の可能性を検討する必要がある。これらの事を勘案すると、sIL2R は IVLBCL 診療である程度有用であるが、絶対的なものではない。

cfDNA 解析による L265P *MYD88* と Y196 C/H *CD79B* の検出は、SNP や CHIP としての頻度を考慮すると、非 B 細胞性リンパ腫と IVLBCL の鑑別において sIL2R より特異度の高い診断補助ツールとなる可能性がある。しかし、実臨床への応用のためには、実際に使用を想定する状況での感度・特異度を検討する必要がある。IVLBCL の罹患率を考慮すると前向き試験は困難であり、保存血清・血漿を使用した後方視解析が現実的である。IVLBCL 症例と感染症（特に肺外結核）、自己免疫性疾患・膠原病（例：血管炎症候群、成人 Still 病、不全型ベーチェット病、全身性エリテマトーデスなど）の患者の血清/血漿を対象に、*MYD88* 変異・*CD79B* 変異検出の感度・特異度の検討を行い、その結果次第では実臨床への応用が期待される。IVLBCL 症例の血清・血漿を多数収集することは難しく、代替指標として tdDNA を試料として ddPCR による変異解析を行い、変異検出の感度を推定するという検証方法も必要かもしれない。

5 章. 結語

IVLBCL のゲノム異常の一部を明らかにし、cfDNA を用いた変異解析が診断補助や病勢評価に有用である可能性を示した。一方で、cfDNA で検出されるのは腫瘍由来の体細胞変異のみならず、クローン性造血が検出されることもあり、その解釈には注意を要することを示した。

6 章. 謝辞

筑波大学医学医療系血液内科千葉滋博士（指導教員）、坂田（柳元）麻実子博士（副指導教員）の指導のもとに本研究を計画及び遂行した。ここに心より感謝の意を表する。

筑波大学医学医療系病理学研究室の野口雅之博士、佐藤泰樹博士には、病理標本の免疫染色および腫瘍細胞比率について診断を頂いた。心より感謝の意を表する。筑波大学医学医療系血液内科服部圭一朗博士にはターゲットアンプリコン解析やドロップレットデジタル PCR 解析において助言を賜った。心より感謝の意を表する。筑波大学血液内科研究室阪下由香利技術補佐員には、次世代シーケンサーIonPGM のテンプレート調整およびシーケンシングのランをして頂いた。感謝の意を表する。

7 章. 出典

本学位論文の作成においては、以下の 2 つの論文の内容を再利用した。前者は The Ferrata Stori Foundation の規定に従って、後者は WILEY の規定に従って再利用している。

Liquid biopsy for the identification of intravascular large B-cell lymphoma. Suehara Y, Sakata-Yanagimoto M, Hattori K, Nanmoku T, Itoh T, Kaji D, Yamamoto G, Abe Y, Narita K, Takeuchi M, Matsue K, Sato T, Noguchi M, Baba N, Sakamoto T, Kusakabe M, Kurita N, Kato T, Yokoyama Y, Nishikii H, Obara N, Hasegawa Y, Chiba S., Haematologica 2018,103(6):e241-e244. doi:10.3324/haematol.2017.178830

Mutations found in cell-free DNAs of patients with malignant lymphoma at remission can derive from clonal hematopoiesis. Suehara Y, Sakata-Yanagimoto M, Hattori K, Kusakabe M, Nanmoku T, Sato T, Noguchi M, Chiba S., Cancer Science 2019 Cancer Science. 2019;110(10):3375-3381. doi: 10.1111/cas.14176.

8 章. 参考文献

1. Speicher MR, Pantel K. Tumor signatures in the blood. *Nat Biotechnol.* 2014;32(5):441-443. doi:10.1038/nbt.2897
2. Choi J-J, Reich CF, Pisetsky DS. The role of macrophages in the in vitro generation of extracellular DNA from apoptotic and necrotic cells. *Immunology.* 2005;115(1):55-62. doi:10.1111/j.1365-2567.2005.02130.x
3. Fan HC, Blumenfeld YJ, Chitkara U, Hudgins L, Quake SR. Noninvasive diagnosis of fetal aneuploidy by shotgun sequencing DNA from maternal blood. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(42):16266-16271. doi:10.1073/pnas.0808319105
4. Lo YMD, Chan KCA, Sun H, et al. Maternal plasma DNA sequencing reveals the genome-wide genetic and mutational profile of the fetus. *Sci Transl Med.* 2010;2(61):61ra91. doi:10.1126/scitranslmed.3001720
5. Thakur BK, Zhang H, Becker A, et al. Double-stranded DNA in exosomes: a novel biomarker in cancer detection. *Cell Res.* 2014;24(6):766-769. doi:10.1038/cr.2014.44
6. Kahlert C, Melo SA, Protopopov A, et al. Identification of double-stranded genomic DNA spanning all chromosomes with mutated KRAS and p53 DNA in

- the serum exosomes of patients with pancreatic cancer. *J Biol Chem*. 2014;289(7):3869-3875. doi:10.1074/jbc.C113.532267
7. Fleischhacker M, Schmidt B. Circulating nucleic acids (CNAs) and cancer—A survey. *Biochim Biophys Acta - Rev Cancer*. 2007;1775(1):181-232. doi:10.1016/j.bbcan.2006.10.001
 8. Mandel P, Metais P. Les acides nucléiques du plasma sanguin chez l'homme. *C R Seances Soc Biol Fil*. 1948;142(3-4):241-243.
 9. Sorenson GD, Pribish DM, Valone FH, Memoli VA, Bzik DJ, Yao SL. Soluble normal and mutated DNA sequences from single-copy genes in human blood. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 1994;3(1):67-71.
 10. Vasioukhin V, Anker P, Maurice P, Lyautey J, Lederrey C, Stroun M. Point mutations of the N-ras gene in the blood plasma DNA of patients with myelodysplastic syndrome or acute myelogenous leukaemia. *Br J Haematol*. 1994;86(4):774-779. doi:10.1111/j.1365-2141.1994.tb04828.x
 11. Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF, et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet*. 1997;350(9076):485-487. doi:10.1016/S0140-6736(97)02174-0
 12. Scherer F, Kurtz DM, Newman AM, et al. Distinct biological subtypes and

- patterns of genome evolution in lymphoma revealed by circulating tumor DNA.
Sci Transl Med. 2016;8(364):364ra155. doi:10.1126/scitranslmed.aai8545
13. Nakamura S, Ponzoni M, Campo E. Intravascular large B-cell lymphoma. In:
Swerdlow S, Campo E, Harris N, et al., eds. *WHO Classification of Tumours of
Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Revised 4th Ed.* Lyon, France: IARC;
2017:317-318.
 14. Chihara T, Wada N, Ikeda J, et al. Frequency of intravascular large B-cell
lymphoma in Japan: study of the Osaka Lymphoma Study Group. *J Hematol
Oncol.* 2011;4:14. doi:10.1186/1756-8722-4-14
 15. Sukpanichnant S, Visuthisakchai S. Intravascular lymphomatosis: a study of 20
cases in thailand and a review of the literature. *Clin Lymphoma Myeloma.*
2006;6(4):319-328. doi:10.3816/CLM.2006.n.007
 16. Sheibani K, Battifora H, Winberg CD, et al. Further evidence that malignant
angioendotheliomatosis is an angiotropic large-cell lymphoma. *N Engl J Med.*
1986;314(15):943-948. doi:10.1056/NEJM198604103141502
 17. Ferreri AJ, Campo E, Seymour JF, et al. Intravascular lymphoma: clinical
presentation, natural history, management and prognostic factors in a series of 38
cases, with special emphasis on the “cutaneous variant.” *Br J Haematol.*

- 2004;127(2):173-183. doi:10.1111/j.1365-2141.2004.05177.x
18. Murase T, Yamaguchi M, Suzuki R, et al. Intravascular large B-cell lymphoma (IVLBCL): A clinicopathologic study of 96 cases with special reference to the immunophenotypic heterogeneity of CD5. *Blood*. 2007;109(2):478-485. doi:10.1182/blood-2006-01-021253
 19. Ponzoni M, Ferreri AJM. Intravascular lymphoma: a neoplasm of ‘homeless’ lymphocytes? *Hematol Oncol*. 2006;24(3):105-112. doi:10.1002/hon.776
 20. Dufau JP, Le Tourneau A, Molina T, et al. Intravascular large B-cell lymphoma with bone marrow involvement at presentation and haemophagocytic syndrome: two Western cases in favour of a specific variant. *Histopathology*. 2000;37(6):509-512. doi:10.1046/j.1365-2559.2000.00980.x
 21. Terrier B, Aouba A, Vasiliu V, et al. Intravascular lymphoma associated with haemophagocytic syndrome: a very rare entity in western countries. *Eur J Haematol*. 2005;75(4):341-345. doi:10.1111/j.1600-0609.2005.00519.x
 22. Geyer H, Karlin N, Palen B, Mesa R. Asian-variant intravascular lymphoma in the African race. *Rare Tumors*. 2012;4(1):e10. doi:10.4081/rt.2012.e10
 23. Fung K-M, Chakrabarty JH, Kern WF, Magharyous H, Gehrs BC, Li S. Intravascular large B-cell lymphoma with hemophagocytic syndrome (Asian

- variant) in a Caucasian Patient. *Int J Clin Exp Pathol*. 2012;5(5):448.
24. Gill S, Melosky B, Haley L, ChanYan C. Use of random skin biopsy to diagnose intravascular lymphoma presenting as fever of unknown origin. *Am J Med*. 2003;114(1):56-58. doi:10.1016/S0002-9343(02)01378-5
25. Asada N, Odawara J, Kimura S, et al. Use of random skin biopsy for diagnosis of intravascular large B-cell lymphoma. *Mayo Clin Proc*. 2007;82(12):1525-1527.
26. Matsue K, Asada N, Odawara J, et al. Random skin biopsy and bone marrow biopsy for diagnosis of intravascular large B cell lymphoma. *Ann Hematol*. 2011;90(4):417-421. doi:10.1007/s00277-010-1101-3
27. Matsue K, Abe Y, Kitadate A, et al. Sensitivity and specificity of incisional random skin biopsy for diagnosis of intravascular large B-cell lymphoma. *Blood*. 2019;133(11):blood-2018-11-887570. doi:10.1182/blood-2018-11-887570
28. Cho HG, Sheu SL, Kuo KY, et al. Limited role of random skin biopsy in the diagnosis of intravascular lymphoma in adult patients with hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Acta Haematol*. 2017;138(1):33-38. doi:10.1159/000476027
29. Maekawa T, Komine M, Murata S, Fukushima N, Ohtsuki M. Random skin biopsy of patients with intravascular large B-cell lymphoma associated with thrombocytopenia and coagulation abnormalities: Proposal of a modified biopsy

- method. *J Dermatol.* 2015;42(3):318-321. doi:10.1111/1346-8138.12756
30. Enzan N, Kitadate A, Tanaka A, Matsue K. Incisional random skin biopsy, not punch biopsy, is an appropriate method for diagnosis of intravascular large B-cell lymphoma: a clinicopathological study of 25 patients. *Br J Dermatol.* 2019;181(1):200-201. doi:10.1111/bjd.17603
31. Ishida M, Hotta M, Hodohara K, Okabe H. A case of intravascular large B-cell lymphoma colonizing in senile hemangioma. *J Cutan Pathol.* 2011;38(2):251-253. doi:10.1111/j.1600-0560.2010.01633.x
32. Ishida M, Hodohara K, Yoshida T, Okabe H. Intravascular large B-cell lymphoma colonizing in senile hemangioma: a case report and proposal of possible diagnostic strategy for intravascular lymphoma. *Pathol Int.* 2011;61(9):555-557. doi:10.1111/j.1440-1827.2011.02697.x
33. Adachi Y, Kosami K, Mizuta N, et al. Benefits of skin biopsy of senile hemangioma in intravascular large B-cell lymphoma: A case report and review of the literature. *Oncol Lett.* 2014;7(6):2003-2006. doi:10.3892/ol.2014.2017
34. Sakurai T, Wakida K, Takahashi T, Ishida K, Iwata H, Nishida H. Usefulness of senile hemangioma biopsy for diagnosis of intravascular large B-cell lymphoma: A report of two cases and a literature review. *J Neurol Sci.* 2017;373:52-54.

doi:10.1016/J.JNS.2016.12.026

35. Shimada K, Kosugi H, Shimada S, et al. Evaluation of organ involvement in intravascular large B-cell lymphoma by 18F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography. *Int J Hematol*. 2008;88(2):149-153.

doi:10.1007/s12185-008-0102-7
36. Domizio P, Hall PA, Cotter F, et al. Angiotropic large cell lymphoma (ALCL): Morphological, immunohistochemical and genotypic studies with analysis of previous reports. *Hematol Oncol*. 1989;7(3):195-206.

doi:10.1002/hon.2900070303
37. Brunet V, Marouan S, Routy JP, et al. Retrospective study of intravascular large B-cell lymphoma cases diagnosed in Quebec: A retrospective study of 29 case reports. *Medicine (Baltimore)*. 2017;96(5):e5985.

doi:10.1097/MD.0000000000005985
38. Ferreri AJM, Dognini GP, Bairey O, et al. The addition of rituximab to anthracycline-based chemotherapy significantly improves outcome in 'Western' patients with intravascular large B-cell lymphoma. *Br J Haematol*. 2008;143(2):253-257. doi:10.1111/j.1365-2141.2008.07338.x
39. Shimada K, Matsue K, Yamamoto K, et al. Retrospective analysis of

- intravascular large B-cell lymphoma treated with rituximab-containing chemotherapy as reported by the IVL Study Group in Japan. *J Clin Oncol*. 2008;26(19):3189-3195. doi:10.1200/JCO.2007.15.4278
40. Shimada K, Murase T, Matsue K, et al. Central nervous system involvement in intravascular large B-cell lymphoma: A retrospective analysis of 109 patients. *Cancer Sci*. 2010;101(6):1480-1486. doi:10.1111/j.1349-7006.2010.01555.x
41. Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature*. 2000;403(6769):503-511. doi:10.1038/35000501
42. Hans CP, Weisenburger DD, Greiner TC, et al. Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Neoplasia*. 2004;103(1):275-282. doi:10.1182/blood-2003-05-1545.
43. Davis RE, Ngo VN, Lenz G, et al. Chronic active B-cell-receptor signalling in diffuse large B-cell lymphoma. *Nature*. 2010;463(7277):88-92. doi:10.1038/nature08638
44. Lenz G, Davis RE, Ngo VN, et al. Oncogenic CARD11 mutations in human diffuse large B cell lymphoma. *Science*. 2008;319(5870):1676-1679.

doi:10.1126/science.1153629

45. Ngo VN, Young RM, Schmitz R, et al. Oncogenically active MYD88 mutations in human lymphoma. *Nature*. 2011;470(7332):115-119. doi:10.1038/nature09671
46. Compagno M, Lim WK, Grunn A, et al. Mutations of multiple genes cause deregulation of NF-kappaB in diffuse large B-cell lymphoma. *Nature*. 2009;459(7247):717-721. doi:10.1038/nature07968
47. Henter JI, Horne A, Arico M, et al. HLH-2004: Diagnostic and therapeutic guidelines for hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Pediatr Blood Cancer*. 2007;48(2):124-131. doi:10.1002/pbc.21039
48. Hattori K, Sakata-Yanagimoto M, Suehara Y, et al. Clinical significance of disease-specific MYD88 mutations in circulating DNA in primary central nervous system lymphoma. *Cancer Sci*. 2018;109(1):225-230. doi:10.1111/cas.13450
49. Treon SP, Xu L, Yang G, et al. MYD88 L265P somatic mutation in Waldenstrom's macroglobulinemia. *N Engl J Med*. 2012;367(9):826-833. doi:10.1056/NEJMoa1200710
50. Xu L, Hunter ZR, Yang G, et al. M monoclonal gammopathy, and other B-cell lymphoproliferative disorders using conventional and quantitative allele-specific polymerase chain reaction. *Blood*. 2013;121(11):2051-2058.

- doi:10.1182/blood-2012-09-454355.
51. Kim Y, Ju H, Kim DH, et al. CD79B and MYD88 mutations in diffuse large B-cell lymphoma. *Hum Pathol*. 2014;45(3):556-564.
doi:10.1016/j.humpath.2013.10.023
52. Kraan W, Horlings HM, van Keimpema M, et al. High prevalence of oncogenic MYD88 and CD79B mutations in diffuse large B-cell lymphomas presenting at immune-privileged sites. *Blood Cancer J*. 2013;3:e139. doi:10.1038/bcj.2013.28
53. Baliakas P, Hadzidimitriou A, Agathangelidis A, et al. Prognostic relevance of MYD88 mutations in CLL: the jury is still out. *Blood*. 2015;126(8):1043-1044.
doi:10.1182/blood-2015-05-648634
54. Braggio E, Van Wier S, Ojha J, et al. Genome-wide analysis uncovers novel recurrent alterations in primary central nervous system lymphomas. *Clin Cancer Res*. 2015;21(17):3986-3994. doi:10.1158/1078-0432.ccr-14-2116
55. Yamada S, Ishida Y, Matsuno A, Yamazaki K. Primary diffuse large B-cell lymphomas of central nervous system exhibit remarkably high prevalence of oncogenic MYD88 and CD79B mutations. *Leuk Lymphoma*. 2015;56(7):2141-2145. doi:10.3109/10428194.2014.979413
56. Pham-Ledard A, Beylot-Barry M, Barbe C, et al. High frequency and clinical

- prognostic value of MYD88 L265P mutation in primary cutaneous diffuse large B-cell lymphoma, leg-type. *JAMA Dermatol.* 2014;150(11):1173-1179.
doi:10.1001/jamadermatol.2014.821
57. Oishi N, Kondo T, Nakazawa T, et al. High prevalence of the MYD88 mutation in testicular lymphoma: Immunohistochemical and genetic analyses. *Pathol Int.* 2015;65(10):528-535. doi:10.1111/pin.12336
 58. Kraan W, Van Keimpema M, Horlings HM, et al. High prevalence of oncogenic MYD88 and CD79B mutations in primary testicular diffuse large B-cell lymphoma. *Leukemia.* 2014;28(3):719-720. doi:10.1038/leu.2013.348
 59. Taniguchi K, Takata K, Chuang SS, et al. Frequent MYD88 L265P and CD79B mutations in primary breast diffuse large B-cell lymphoma. *Am J Surg Pathol.* 2016;40(3):324-334. doi:10.1097/pas.0000000000000592
 60. O'Neill LAJ, Bowie AG. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol.* 2007;7(5):353-364.
doi:10.1038/nri2079
 61. Knittel G, Liedgens P, Korovkina D, et al. B-cell-specific conditional expression of Myd88p.L252P leads to the development of diffuse large B-cell lymphoma in mice. *Blood.* 2016;127(22):2732-2741. doi:10.1182/blood-2015-11-684183

62. Wilson WH, Young RM, Schmitz R, et al. Targeting B cell receptor signaling with ibrutinib in diffuse large B cell lymphoma. *Nat Med.* 2015;21(8):922-926. doi:10.1038/nm.3884
63. The P-GFPI, Pasqualucci L, Neumeister P, et al. Hypermutation of multiple proto-oncogenes in B-cell diffuse large-cell lymphomas. *Nature.* 2001;412(6844):341-346. doi:10.1038/35085588
64. Schrader AMRR, Jansen PM, Willemze R, et al. High prevalence of MYD88 and CD79B mutations in intravascular large B-cell lymphoma. *Blood.* 2018;131(18):2086-2089. doi:10.1182/blood-2017-12-822817
65. Bohers E, Viailly PJ, Dubois S, et al. Somatic mutations of cell-free circulating DNA detected by next-generation sequencing reflect the genetic changes in both germinal center B-cell-like and activated B-cell-like diffuse large B-cell lymphomas at the time of diagnosis. *Haematologica.* 2015;100(7):e280-4. doi:10.3324/haematol.2015.123612
66. Fontanilles M, Marguet F, Bohers É, et al. Non-invasive detection of somatic mutations using next-generation sequencing in primary central nervous system lymphoma. *Oncotarget.* 2017;8(29):48157-48168. doi:10.18632/oncotarget.18325

67. El Messaoudi S, Rolet F, Mouliere F, Thierry AR. Circulating cell free DNA: Preanalytical considerations. *Clin Chim Acta*. 2013;424:222-230. doi:10.1016/j.cca.2013.05.022
68. Tadaka S, Katsuoka F, Ueki M, et al. 3.5KJPNv2: an allele frequency panel of 3552 Japanese individuals including the X chromosome. *Hum Genome Var*. 2019;6(1):28. doi:10.1038/s41439-019-0059-5
69. Xie M, Lu C, Wang J, et al. Age-related mutations associated with clonal hematopoietic expansion and malignancies. *Nat Med*. 2014;20(12):1472-1478. doi:10.1038/nm.3733
70. Karube K, Enjuanes A, Dlouhy I, et al. Integrating genomic alterations in diffuse large B-cell lymphoma identifies new relevant pathways and potential therapeutic targets. *Leukemia*. 2018;32(3):675-684. doi:10.1038/leu.2017.251
71. Zamò A, Pischmarov J, Schlesner M, et al. Differences between BCL2-break positive and negative follicular lymphoma unraveled by whole-exome sequencing. *Leukemia*. 2018;32(3):685-693. doi:10.1038/leu.2017.270
72. Tiacci E, Ladewig E, Schiavoni G, et al. Pervasive mutations of JAK-STAT pathway genes in classical Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2018;131(22):2454-2465. doi:10.1182/blood-2017-11-814913

73. Xu-Monette ZY, Wu L, Visco C, et al. Mutational profile and prognostic significance of TP53 in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with R-CHOP: report from an International DLBCL Rituximab-CHOP Consortium Program Study. *Blood*. 2012;120(19):3986-3996.
doi:10.1182/blood-2012-05-433334
74. Morin RD, Assouline S, Alcaide M, et al. Genetic landscapes of relapsed and refractory diffuse large B-cell lymphomas. *Clin Cancer Res*. 2016;22(9):2290-2300. doi:10.1158/1078-0432.CCR-15-2123
75. Greenawalt DM, Liang WS, Saif S, et al. Comparative analysis of primary *versus* relapse/refractory DLBCL identifies shifts in mutation spectrum. *Oncotarget*. 2017;8(59):99237-99244. doi:10.18632/oncotarget.18502
76. Kridel R, Chan FC, Mottok A, et al. Histological transformation and progression in follicular lymphoma: a clonal evolution study. Mardis ER, ed. *PLoS Med*. 2016;13(12):1-25. doi:10.1371/journal.pmed.1002197
77. Genovese G, Kähler AK, Handsaker RE, et al. Clonal hematopoiesis and blood-cancer risk inferred from blood DNA sequence. *N Engl J Med*. 2014;371(26):2477-2487. doi:10.1056/NEJMoa1409405
78. Jaiswal S, Fontanillas P, Flannick J, et al. Age-related clonal hematopoiesis

- associated with adverse outcomes. *N Engl J Med*. 2014;371(26):2488-2498.
doi:10.1056/NEJMoa1408617
79. Busque L, Mio R, Mattioli J, et al. Nonrandom X-inactivation patterns in normal females: lyonization ratios vary with age. *Blood*. 1996;88(1):59-65.
<http://www.bloodjournal.org/content/88/1/59.abstract>.
 80. Busque L, Patel JP, Figueroa ME, et al. Recurrent somatic TET2 mutations in normal elderly individuals with clonal hematopoiesis. *Nat Genet*. 2012;44(11):1179-1181. doi:10.1038/ng.2413
 81. Jaiswal S, Natarajan P, Silver AJ, et al. Clonal hematopoiesis and risk of atherosclerotic cardiovascular disease. *N Engl J Med*. 2017;377(2):111-121.
doi:10.1056/NEJMoa1701719
 82. Lui YYN, Chik K-W, Chiu RWK, Ho C-Y, Lam CWK, Lo YMD. Predominant hematopoietic origin of cell-free DNA in plasma and serum after sex-mismatched bone marrow transplantation. *Clin Chem*. 2002;48(3):421-427.
 83. Xia L, Li Z, Zhou B, et al. Statistical analysis of mutant allele frequency level of circulating cell-free DNA and blood cells in healthy individuals. *Sci Rep*. 2017;7(1):1-7. doi:10.1038/s41598-017-06106-1
 84. Moss J, Magenheimer J, Neiman D, et al. Comprehensive human cell-type

- methylation atlas reveals origins of circulating cell-free DNA in health and disease. *Nat Commun.* 2018;9(1):5068. doi:10.1038/s41467-018-07466-6
85. Acuna-Hidalgo R, Sengul H, Steehouwer M, et al. Ultra-sensitive sequencing identifies high prevalence of clonal hematopoiesis-associated mutations throughout adult life. *Am J Hum Genet.* 2017;101(1):50-64. doi:10.1016/j.ajhg.2017.05.013
86. Zink F, Stacey SN, Norddahl GL, et al. Clonal hematopoiesis, with and without candidate driver mutations, is common in the elderly. *Blood.* 2017;130(6):742-752. doi:10.1182/blood-2017-02-769869
87. Hu Y, Ulrich BC, Supplee J, et al. False-positive plasma genotyping due to clonal hematopoiesis. *Clin Cancer Res.* 2018;24(18):4437-4443. doi:10.1158/1078-0432.CCR-18-0143
88. Ptashkin RN, Mandelker DL, Coombs CC, et al. Prevalence of clonal hematopoiesis mutations in tumor-only clinical genomic profiling of solid tumors. *JAMA Oncol.* 2018;4(11):1589-1593. doi:10.1001/jamaoncol.2018.2297
89. Bolton KL, Gillis NK, Coombs CC, et al. Managing clonal hematopoiesis in patients with solid tumors. *J Clin Oncol.* 2019;37(1):7-11. doi:10.1200/JCO.18.00331.

90. Gibson CJ, Lindsley RC, Tchekmedyian V, et al. Clonal hematopoiesis associated with adverse outcomes after autologous stem-cell transplantation for lymphoma. *J Clin Oncol*. 2017;35(14):1598-1605. doi:10.1200/JCO.2016.71.6712
91. Cohen JD, Li L, Wang Y, et al. Detection and localization of surgically resectable cancers with a multi-analyte blood test. *Science*. 2018;359(6378):926-930. doi:10.1126/science.aar3247
92. Kataoka K, Miyoshi H, Sakata S, et al. Frequent structural variations involving programmed death ligands in Epstein-Barr virus-associated lymphomas. *Leukemia*. 2019;33(7):1687-1699. doi:10.1038/s41375-019-0380-5
93. Castillo JJ, Beltran BE, Miranda RN, Young KH, Chavez JC, Sotomayor EM. EBV-positive diffuse large B-cell lymphoma, not otherwise specified: 2018 update on diagnosis, risk-stratification and management. *Am J Hematol*. 2018;93(7):953-962. doi:10.1002/ajh.25112
94. Sakata-Yanagimoto M, Enami T, Yoshida K, et al. Somatic RHOA mutation in angioimmunoblastic T cell lymphoma. *Nat Genet*. 2014;46(2):171-175. doi:10.1038/ng.2872
95. Kurtz DM, Scherer F, Jin MC, et al. Circulating tumor DNA measurements as

- early outcome predictors in diffuse large B-cell Lymphoma. *J Clin Oncol*. 2018;36(28):2845-2853. doi:10.1200/JCO.2018.78.5246
96. Wong TN, Miller CA, Jotte MRM, et al. Cellular stressors contribute to the expansion of hematopoietic clones of varying leukemic potential. *Nat Commun*. 2018;9(1):455. doi:10.1038/s41467-018-02858-0
 97. Coombs CC, Zehir A, Devlin SM, et al. Therapy-related clonal hematopoiesis in patients with non-hematologic cancers is common and associated with adverse clinical outcomes. *Cell Stem Cell*. 2017;21(3):374-382.e4. doi:10.1016/j.stem.2017.07.010
 98. Dufva O, Kankainen M, Kelkka T, et al. Aggressive natural killer-cell leukemia mutational landscape and drug profiling highlight JAK-STAT signaling as therapeutic target. *Nat Commun*. 2018;9(1):1567. doi:10.1038/s41467-018-03987-2
 99. Takahashi K, Wang F, Kantarjian H, et al. Preleukaemic clonal haemopoiesis and risk of therapy-related myeloid neoplasms : a case-control study. *Lancet Oncol*. 2017;18(1):100-111. doi:10.1016/S1470-2045(16)30626-X
 100. Gillis NK, Ball M, Zhang Q, et al. Clonal haemopoiesis and therapy-related myeloid malignancies in elderly patients: a proof-of-concept, case-control study.

Lancet Oncol. 2017;18(1):112-121. doi:10.1016/S1470-2045(16)30627-1

101. Rubin LA, Nelson DL. The soluble interleukin-2 receptor: Biology, function, and clinical application. *Ann Intern Med.* 1990;113(8):619-627.

doi:10.7326/0003-4819-113-8-619
102. Takahashi S, Setoguchi Y, Nukiwa T, Kira S. Soluble interleukin-2 receptor in sera of patients with pulmonary tuberculosis. *Chest.* 1991;99(2):310-314.

doi:10.1378/chest.99.2.310
103. Ramos-Casals M, Brito-Zerón P, López-Guillermo A, Khamashta MA, Bosch X. Adult haemophagocytic syndrome. *Lancet.* 2014:1503-1516.

doi:10.1016/S0140-6736(13)61048-X
104. Hayden A, Lin M, Park S, et al. Soluble interleukin-2 receptor is a sensitive diagnostic test in adult HLH. *Blood Adv.* 2017;1(26):2529-2534.

doi:10.1182/bloodadvances.2017012310
105. Crayne CB, Albeituni S, Nichols KE, Cron RQ. The immunology of macrophage activation syndrome. *Front Immunol.* 2019;10:119.

doi:10.3389/fimmu.2019.00119
106. Kurane I, Innis BL, Nimmannitya S, et al. Activation of T lymphocytes in dengue virus infections: High levels of soluble interleukin 2 receptor, soluble CD4,

- soluble CD8, interleukin 2, and interferon- γ in sera of children with dengue. *J Clin Invest*. 1991;88(5):1473-1480. doi:10.1172/JCI115457
107. Monsalve-De Castillo F, Romero TA, Estévez J, et al. Concentrations of cytokines, soluble interleukin-2 receptor, and soluble cd30 in sera of patients with hepatitis b virus infection during acute and convalescent phases. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2002;9(6):1372-1375. doi:10.1128/CDLI.9.6.1372-1375.2002
 108. Delogu G, Casula MA, Mancini P, Tellan G, Signore L. Serum neopterin and soluble interleukin-2 receptor for prediction of a shock state in gram-negative sepsis. *J Crit Care*. 1995;10(2):64-71. doi:10.1016/0883-9441(95)90018-7
 109. Prin L, Plumas J, Gruart V, et al. Elevated serum levels of soluble interleukin-2 receptor: a marker of disease activity in the hypereosinophilic syndrome. *Blood*. 1991;78(10):2626-2632. doi:10.1182/blood.V78.10.2626.bloodjournal78102626
 110. Grutters JC, Fellrath JM, Mulder L, Janssen R, Van Den Bosch JMM, Van Velzen-Blad H. Serum soluble interleukin-2 receptor measurement in patients with sarcoidosis: A clinical evaluation. *Chest*. 2003;124(1):186-195. doi:10.1378/chest.124.1.186
 111. Murakami J, Arita K, Wada A, et al. Serum soluble interleukin-2 receptor levels for screening for malignant lymphomas and differential diagnosis from other

conditions. *Mol Clin Oncol*. September 2019. doi:10.3892/mco.2019.1922

112. Kaiume H, Sumi M, Sato K, et al. Miliary tuberculosis with markedly elevated soluble interleukin-2 receptor levels mimicking intravascular large B-cell lymphoma. *Rinsho Ketsueki*. 2019;60(3):203-208. doi:10.11406/rinketsu.60.203

表 1. ターゲットアンプリコンシーケンスで解析した 8 遺伝子

表 2. 時系列解析で用いたプライマー

表 3. ダイレクトシーケンスで使したプライマー

表 4. 患者背景

表 5. 27 症例の詳細な患者背景

表 6. 血清・血漿検体の cfDNA 濃度

表 7. 免疫染色の結果

表 8. 9 症例の各サンプルのカバレッジ

表 9. ターゲットアンプリコンシーケンスで得られた変異のリスト

表 10. *PIMI* 変異のパターンについて

表 11. ddPCR による *MYD88*:c.794T>C, p.Leu265Pro 変異解析の結果

表 12. 各 *DNMT3A*・*TP53* 変異検出のためのプライマー

表 13. 患者背景

表 14. CMR 時の血清で検出された変異のリスト

表 15. びまん性大細胞 B 細胞リンパ腫の腫瘍検体で検出された *MYD88*, *CD79B*
変異のリスト

表 16. アグレッシブ NK 細胞白血病を発症した症例の血清中で検出された *TP53*
p.A119D 変異の経時的解析

図 1. ionPGM のチップの模式図

図 2. ionPGM によるターゲットアンプリコンシーケンスのワークフロー

図 3. ターゲットアンプリコン解析の解析ワークフロー

図 4. デジタル PCR の 1dimensional plot の一例

図 5. 27 症例の解析の概要

図 6. 9 症例における 8 遺伝子のターゲットシーケンス

図 7. ターゲットアンプリコンシーケンスによる IVL2 の *MYD88*:c. 794T>C, p. Leu265Pro 変異の検出

図 8. ダイレクトシーケンスによる *MYD88*:c. 794T>C, p. Leu265Pro 変異の確認

図 9. 各変異とモチーフの位置関係

図 10. ターゲットアンプリコンシーケンスにより血中循環細胞外遊離 DNA と組織由来 DNA で検出された変異の変異アリル頻度の比較

図 11. ターゲットアンプリコンシーケンスにより血中循環細胞外遊離 DNA と組織由来 DNA で検出された変異のベン図

図 12. ドロップレットデジタル PCR により血中循環細胞外遊離 DNA と組織由来 DNA で検出された *MYD88* 変異の変異アリル頻度の比較

図 13. 再発例 (IVL1) での経時的な cfDNA の解析

図 14. 再発例 (IVL5) での経時的な cfDNA の解析

- 図 15. 再発例 (IVL6) での経時的な cfDNA の解析
- 図 16. 初回骨髄生検陰性例 (IVL2) での経時的な cfDNA の解析
- 図 17. 対応する血清・血漿由来 cfDNA の濃度の比較
- 図 18. 対応する血清・血漿由来 cfDNA の変異アリル頻度の比較
- 図 19. *TP53* 変異と *DNMT3A* 変異の解析の流れ
- 図 20. *MYD88* 変異と *CD79B* 変異の解析の流れ
- 図 21. ドロップレットデジタル PCR での *CD79B* p. Y196H 定量限界の評価
- 図 22. ドロップレットデジタル PCR での *CD79B* p. Y196C 定量限界の評価
- 図 23. 腫瘍、血清、骨髄および末梢血単核球間での *TP53* 変異、*DNMT3A* 変異の
変異アリル頻度の比較
- 図 24. 腫瘍、血清、骨髄および末梢血単核球間での *MYD88* 変異、*CD79B* 変異の
変異アリル頻度の比較
- 図 25. 治療前後での血清中の *TP53*、*DNMT3A* 変異濃度の推移
- 図 26. 治療前後での血清中の *MYD88*、*CD79B* 変異濃度の推移
- 図 27. びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫およびクローン性造血で検出される遺
伝子変異に関するベン図

Gene	Transcript reference	Location	References
<i>B2M</i>	NM_004048	15q21-q22.2	Challa-Malladi, Cancer Cell, 2011; Morin, Nature, 2011
<i>BTG2</i>	NM_006763	1q32	Morin, Nature, 2011
<i>CARD11</i>	NM_032415	7p22	Lenz, Science, 2008; Davis, Nature, 2010
<i>CD79B</i>	NM_000626	17q23	Davis, Nature, 2010
<i>MYD88</i>	NM_002468	3p22	Ngo, Nature, 2011
<i>PIM1</i>	NM_002648	6p21.2	Pasqualucci, Nature, 2001
<i>PRDM1</i>	NM_1198	6q21-q22.1	Pasqualucci, JEM, 2006
<i>TNFAIP3</i>	NM_001270507	6q23	Compagno, Nature, 2009

表 1. ターゲットアンプリコンシーケンスで解析した 8 遺伝子

Name		Sequence (5'-3')
MYD88_2	Forward	ACTGGGCTTGTCCCACCAT
	Reverse	TCGCAGACAGTGATGAACCT
CD79B_1	Forward	GCAGCGTCACTATGTCCTCA
	Reverse	CTGAGTCCTCGGGGTCAGT
CD79B_3	Forward	CCAACCACACCAGCAGATAG
	Reverse	CCCCAGGATGACAGCAAG
PIM1_2-4	Forward	GGAGCCCTGCAAGAGGAG
	Reverse	GCGATTGAGGTCGATAAGGA
PRDM1_2-1	Forward	AGCCCAAAGCTACCTCAGC
	Reverse	GCAAACGTTGCATTCGTACT
PRDM1_5-11	Forward	TTTTTCCTGTTTAGGTTATTGGAGTGA
	Reverse	TAACATTTAATGGGTCTGAAGAAATTTCCCTTA
PRDM1_6-9	Forward	ACTCTGCCCAAAGAATGTCC
	Reverse	GGGCTCCCACGTCTTCTAA

表 2. 時系列解析で用いたプライマー

Name		Sequence (5'-3')
MYD88_4	Forward	TGCCAGGGGTACTTAGATGG
	Reverse	GCGAGTCCAGAACCAAGATT
CD79B_9	Forward	CCAACCACACCAGCAGATAG
	Reverse	GCTGTTCTTGCAGAATGCAC
CD79B_11	Forward	GGTGCTCACCTACAGACCACT
	Reverse	TGGGGGACACTAACACTCTG
BTG2_1	Forward	GCCAGGGTAACGCTGTCTT
	Reverse	CTCACCTGTGAGTGCCTCCT
PRDM1_2-5	Forward	TGAAGGACAAGGCCTGTAGC
	Reverse	GCAAACGTTGCATTTCGTA
PRDM1_3-2	Forward	CAACACTTGAGTCTTGGAGCAG
	Reverse	CCAGAAAATACTGCGCACCT
PRDM1_5-14	Forward	TCCTGTTTAGGTTATTGGAGTGA
	Reverse	GGGGATGCTGGATACTTATGG
PRDM1_6-12	Forward	TTCAGCACAAACACAGAGCA
	Reverse	GTCTCTCGATCCCGTAGGC
TNFAIP3_1	Forward	AGAAATGGCAGGAAAACAGC
	Reverse	AAGGGCTCATAGGCTTCTCC
PIM1_long1	Forward	CACTGAGTCCCCGTGCTT
	Reverse	ACTCACCAGCTCTCCCCAGT
PIM1_long3	Forward	TCATTAGGCTCCTGGACTGG
	Reverse	TCACCATCGAAGTCCGTGTA
PIM1_long4	Forward	TCCACTCTCCTTAGCCCAGA
	Reverse	CCCCTGATGATCTCTTCGTC
PIM1_long5	Forward	GCTGAAAGCAGACTGGAGGA
	Reverse	GGCAGGAGAACATCTTGCA
PIM1_long6	Forward	CATCAAACACGTGGAGAAGG
	Reverse	TTCCGTGATGAAGTCGAAGA

表 3. ダイレクトシーケンスで使ったプライマー

	Parameter value
No. of patients	27
Median age, years (range)	71 (28-88)
Male sex, n (%)	10 (37.0)
Symptom, n (%)	
Fever	23 (85.2)
Neurological	11 (40.7)
Respiratory	4 (14.8)
Gastro-intestinal	3 (11.1)
Clinical course, n (%)	
Primary progressive	24 (88.9)
Relapsing-remitting episode prior to diagnosis	3 (11.1)
Tissue biopsy/aspiration, proven/performed (%)	
Random skin biopsy	17/21 (81.0) [†]
Bone marrow biopsy	18/27 (66.7) [‡]
Other biopsies	10/10 (100.0) [*]
Bone marrow aspiration	10/25 (40.0)
FDG PET/CT	
Positive, n (%)	11 (78.6)
Negative, n (%)	3 (21.4)
Hemophagocytic Lymphohistiocytosis, n (%)	12 (44.4)
non-GCB by Hans classification, n (%)	21 (100.0)
Abnormalities in blood cell counts, n (%)	
Leukocytopenia [§]	7 (25.9)
Anemia [¶]	18 (66.7)
Thrombocytopenia ^{††}	12 (44.4)
Laboratory data, median (range)	
Lactate dehydrogenase [U/l]	699 (223-5199)
Soluble interleukin 2 receptor [U/ml]	5090 (595-25012)
C-reactive protein [mg/dl]	7.7 (0.03-23)
Albumin [g/dl]	2.4 (1.3-3.7)

表 4. 患者背景

[†]16/21 (76.2 %) は初回のランダム皮膚生検で診断された. [‡]13/27 (48.1 %) は初回の骨髓生検で診断された. ^{*} 16 箇所 of 生検のうち、13 箇所 with 陽性. [§]白血球数 < 4000/ μ L. [¶]ヘモグロビン値 < 11g/dl. ^{††}血小板数 < 10×10^4 / μ L. FDG PET/CT, ¹⁸F-2-デオキシ-2-フルオロ-D-グルコースを用いたポジトロン断層撮影; GCB, 胚中心 B 細胞

ID	IVL1	IVL2	IVL3	IVL4	IVL5	IVL6	IVL7
Age, Sex	38, F	55, F	62, M	71, M	74, F	63, F	74, F
Fever	+	+	+	+	+	+	-
Neurological symptoms	-	-	-	-	-	-	convulsion, left motor hemiparesis
Other symptoms	-	fatigue, appetite loss	fatigue, appetite loss	-	-	-	-
Oxygen Saturation (%)	98	94	89	96	95	96	98
Leukocytopenia [†]	+	+	-	-	-	-	-
Anemia [‡]	+	+	-	+	+	+	+
Thrombocytopenia [*]	-	-	+	+	+	-	-
Splenomegaly	+	+	+	+	+	+	-
Lactate dehydrogenase [U/l]	1707	632	1638	721	917	1104	377
Soluble interleukin 2 receptor [U/ml]	6860	8320	1510	7480	8700	6020	595
C-reactive protein [mg/dl]	18	5.4	3.77	6.2	10.3	7.7	0.03
Albumin [g/dl]	2.6	2.2	3.5	1.7	2	2.2	3.7
Bone marrow aspiration	+	(-)→(+)	(-)→(+)	-	-	-	-
Bone marrow biopsy	-	(-)→(+)	(-)→(+)	+	+	-	-
Random skin biopsy	+	NA→(+)	+	-	+	+	+
Other biopsy-proven site	breast (+, relapse)	NA	NA	NA	NA	kidney (+), liver (+)	NA
18F-fluorodeoxyglucose-positron emission tomography/computed tomography	BM, subcutaneo us tissue (left abdominal wall and left breast), uterus	negative	spleen	NA	BM, liver	BM, kidney, liver	NA
Hemophagocytic Lymphohistiocytosis [§]	-	-	-	-	+	+	-
Spontaneous regression episode prior to diagnosis	-	+	-	-	-	-	-

表 5. 27 症例の詳細な患者背景

† 白血球数 < 4000/ μ L; ‡ ヘモグロビン値 < 11g/dl; * 血小板数 < 10×10^4 / μ L; § 血球貪食症候群

の診断は HLH 2004 criteria に基づいている; F, 女性 (female); M, 男性 (Male); NA, 検体

なし (not available); BM, 骨髄 (bone marrow); LN, リンパ節 (lymph node); CNS, 中枢神

経 (central nervous system); +, 陽性 (positive); -, 陰性 (negative); (-)→(+), 初回の生検・

骨髄穿刺が陰性で 2 回目が陽性

IVL8	IVL9	IVL10	IVL11	IVL13	IVL15	IVL16	IVL17	IVL18	IVL19
33, M	28, F	76, M	63, F	74, M	65, M	79, F	71, F	46, F	62, F
+	+	-	-	+	+	+	+	-	+
-	convulsion, hemiplegia, loss of consciousness	gait disturbance, impaired speech	-	loss of consciousness	gait disturbance, cauda equina syndrome	-	-	-	loss of consciousness
cough	-	-	abdominal pain, hemato- chezia	-	-	-	fatigue, appetite loss	incidental	-
97	97	97	99	86	92	95	96	98	95
-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
+	-	-	-	+	-	+	-	+	+
-	-	-	-	+	-	+	+	-	-
+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
644	425	542	555	1255	1044	875	490	268	316
2920	3200	3500	718	2800	1740	22100	13883	5090	4205
23	5.36	0.03	2.35	10.04	14.36	15.86	1.16	3.32	22.02
2.4	2.4	3.3	3.7	1.8	2.3	1.3	2.9	3	1.9
-	-	NA	-	+	-	+	dry tap	-	(-)->(+))
-	-	+	-	+	-	+	+	-	(-)->(+))
+	-	+	NA	NA	+	NA	NA	NA	NA
lung (+), liver (-), spleen (-)	brain (+), liver (-)	NA	mesentery (+)	NA	NA	liver (+)	NA	uterus (+), lung (+)	brain (+)
lungs	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
+	-	-	-	+	-	+	+	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

表 5. 27 症例の詳細な患者背景 (続き)

IVL20	IVL21	IVL22	IVL23	IVL24	IVL25	IVL26	IVL27	IVL28	IVL29
74, M	76, F	61, M	72, F	74, F	71, F	88, M	57, F	61, F	81, M
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
-	-	convulsion	-	confusion	confusion	gait disturbance	-	-	loss of consciousness
cough, dyspnea	fatigue, appetite loss	-	cough	appetite loss	dyspnea	-	diarrhea, arthralgia	arthralgia	fatigue
94	NA	NA	93	87	NA	NA	95	91	98
+	+	-	-	-	-	+	-	-	+
-	+	+	+	+	+	-	-	+	+
-	+	-	-	+	+	-	+	+	+
+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
1764	223	341	699	1205	773	381	1090	5199	511
2870	10200	1433	4739	5234	8924	2679	25012	10769	8998
3.8	10.2	0.7	10.01	13.88	9.55	2.9	20.65	22.47	4.39
3.4	1.4	1.7	2.1	2.9	2	3	2.5	2.3	2.6
-	-	-	+	+	-	(-)→(-)	+	-	+
(-)→(+)	+	+	+	+	-	(-)→(+)	+	+	+
-	+	+	+	+	+	(-)→(+)	+	-	+
lung (+)	NA	NA	heart (+), mediastinal LN (+)	NA	NA	NA	NA	NA	NA
negative	NA	adrenal glands	heart, lungs, adrenal glands, mediastinal LN	liver, spleen	lungs	negative	BM, liver, spleen	BM, liver, dura mater	BM, sternal bone, rib, spleen
-	+	-	-	-	+	+	+	+	+
+	-	-	-	-	-	+	-	-	-

表 5. 27 症例の詳細な患者背景（続き）

	ID	Event	Sample collection (counted from the day of diagnosis)	Prior chemotherapy	Prior glucocorticoid	Concentration (ng/ml)	Sample
Samples for targeted sequencing (8 genes)	IVL2	Diagnosis	day 0	no	no	147	plasma
	IVL3	Diagnosis	day 0	no	no	2900	plasma
	IVL4	Diagnosis	day 0	no	yes (since 28 days before)	179	plasma
	IVL5	Relapse (IVLBCL)	day1022	yes (3 years ago)	yes (3 years ago)	157	plasma
	IVL6	Diagnosis	day 0	no	no	56.7	plasma
	IVL21	Diagnosis	day 0	no	no	211.7	serum
	IVL23	Diagnosis	day 0	no	no	666.7	serum
	IVL24	Diagnosis	day 0	no	no	2170	serum
	IVL25	Diagnosis	day 0	no	no	422.5	serum
Samples for longitudinal analysis/ Samples for comparative analysis of serum and plasma	IVL1	Complete remission	day 496	yes	yes	30.7	serum
	IVL1	Regular visits	day 852	yes	yes	67.5	serum
	IVL1	Regular visits	day 908	yes	yes	79.5	serum
	IVL1	Regular visits	day 971	yes	yes	69.5	serum
	IVL1	Regular visits	day 999	yes	yes	88	serum
	IVL1	Relapse (cecum)	day 1033	yes	yes	88.5	serum
	IVL2	Before diagnosis	day -117	no	no	189	serum
	IVL2	Before diagnosis	day -101	no	no	68	serum
	IVL2	Before diagnosis	day -84	no	no	19.1	serum
	IVL2	Before diagnosis	day -7	no	no	185.5	serum
	IVL2	Before diagnosis	day -7	no	no	73.2	plasma
	IVL2	Before diagnosis	day -3	no	no	169	serum
	IVL2	Before diagnosis	day -3	no	no	83.1	plasma
	IVL2	Diagnosis	day 0	no	no	515	serum
	IVL2	Complete remission	day 168	yes	yes	22.25	serum
	IVL2	Regular visits	day 512	yes	yes	25.2	serum
	IVL4	Before diagnosis	day -5	no	yes (since 23 days before)	207.5	serum
	IVL4	Before diagnosis	day -5	no	yes (since 23 days before)	58.1	plasma
	IVL4	Before diagnosis	day -3	no	yes (since 25 days before)	189	serum
	IVL4	Before diagnosis	day -3	no	yes (since 25 days before)	70.6	plasma
	IVL5	Complete remission	day 742	yes	yes	80	serum
	IVL5	Regular visits	day 805	yes	yes	44.15	serum
	IVL5	Regular visits	day 944	yes	yes	490	serum
	IVL5	Relapse (IVLBCL)	day 1005	yes	yes	423	serum
	IVL5	Relapse (IVLBCL)	day 1005	yes	yes	295	plasma
	IVL6	Regular visits	day 208	yes	yes	81.5	serum
	IVL6	Regular visits	day 271	yes	yes	116.5	serum
	IVL6	Regular visits	day 341	yes	yes	89	serum
	IVL6	Relapse (CNS)	day 393	yes	yes	93.5	serum
A sample for droplet digital PCR	IVL22	Diagnosis	day 0	no	no	492.5	serum

表 6. 血清・血漿検体の cfDNA 濃度

IVLBCL, 血管内大細胞型 B 細胞リンパ腫 (intravascular large B-cell lymphoma) ; CNS, 中枢神経 (central nervous system)

ID	Specimen	Immunohistochemistry			Hans classification
		CD10	BCL6	MUM1	
IVL1	breast	-	-	+	non-GCB
IVL2	skin	-	-	+	non-GCB
IVL3	skin	NA	NA	NA	NA
IVL4	skin	NA	NA	NA	NA
IVL5	skin	-	NA	+	non-GCB
IVL6	skin	-	-	+	non-GCB
IVL7	skin	-	+	+	non-GCB
IVL8	lung	-	+	+	non-GCB
IVL9	brain	-	+	+	non-GCB
IVL10	skin	-	+	+	non-GCB
IVL11	mesentery	-	-	+	non-GCB
IVL13	bone marrow clot	NA	NA	NA	NA
IVL15	skin	-	+	+	non-GCB
IVL16	bone marrow clot	-	+	+	non-GCB
IVL17	bone marrow	-	+	+	non-GCB
IVL18	lung	-	-	+	non-GCB
IVL19	brain	-	+	+	non-GCB
IVL20	lung	-	+	+	non-GCB
IVL21	bone marrow	-	+	+	non-GCB
IVL22	skin	NA	+	+	NA
IVL23	skin	-	-	NA	non-GCB
IVL24	skin	-	+	+	non-GCB
IVL25	skin	-	+	+	non-GCB
IVL26	skin/bone marrow	NA	NA	NA	NA
IVL27	bone marrow	-	NA	+	non-GCB
IVL28	lung	-	+	+	non-GCB
IVL29	skin	NA	NA	NA	NA

表 7. 免疫染色の結果

NA, 検体なし (not available) ; -, 陰性 (negative) ; +, 陽性 (positive) ; non-GCB, 非胚中心 B 細胞 (non-Germinal center B type) .

Identifier	target region coverage		
	$\geq \times 100$ in cfDNA (%)	$\geq \times 500$ in tdDNA (%)	$\geq \times 100$ in normal gDNA (%)
IVL2	83.8	85.13	89.14
IVL3	86	86.54	83.14
IVL4	85.38	86.4	89.03
IVL5	86.55	87.97	89.62
IVL6	88.21	87.69	88.98
IVL21	87.63	90.47	91.54
IVL23	88.45	90.6	NA
IVL24	88.81	89.51	91.03
IVL25	78.26	82.88	90.27

表 8. 9 症例の各サンプルのカバレッジ

target region coverage , 解析対象領域のカバレッジ; cfDNA, 血中循環細胞外遊離 DNA (cell-

free DNA) ; tdDNA, 組織由来 DNA (tissue-derived DNA) ; normal gDNA, 正常対照 DNA

(genomic DNA) ; NA, 検体なし (not available)

Position (hg19)	variant classification	VAF_ cfDNA (%)	VAF_ tdDNA (%)	genes	Ref.	Var.	COSMIC	dbSNP	Exon	cDNA change	Protein change	coverage cfDNA	coverage tdDNA	ID
chr3:38182641	nonsynonymous SNV	46.18	5.2	MYD88	T	C	COSM85940	rs387907272	5	c.794T>C	p.Leu265Pro	1047	3526	IVL2
chr6:106553712	Stop gain	54.82	2.6	PRDM1	C	A	-	-	5	c.1677C>A	p.Tyr559Ter	197	2269	IVL2
chr6:37138644	nonsynonymous SNV	41.53	6.5	PIM1	G	A	-	-	2	c.178G>A	p.Asp60Asn	118	356	IVL2
chr6:37138925	nonsynonymous SNV	41.07	2.4	PIM1	G	A	-	-	4	c.265G>A	p.Glu89Lys	56	352	IVL2
chr6:37139110	nonframeshift substitution	52.83	4	PIM1	GG	AA	-	-	4	c.450_451GG>AA	p.Val151Met	265	2768	IVL2
chr1:203274762	nonsynonymous SNV	14.15	no call	BTG2	C	G	-	-	1	c.28C>G	p.Leu10Val	424	3010	IVL21
chr3:38182641	nonsynonymous SNV	26.73	no call	MYD88	T	C	COSM85940	rs387907272	5	c.794T>C	p.Leu265Pro	549	9372	IVL21
chr6:37138761	nonsynonymous SNV	20.61	no call	PIM1	C	A	-	-	3	c.194C>A	p.Ala65Asp	427	2248	IVL21
chr6:37139045	nonsynonymous SNV	45.45	no call	PIM1	C	T	-	-	4	c.385C>T	p.Leu129Phe	11	1950	IVL21
chr6:37139098	nonsynonymous SNV	12.35	no call	PIM1	C	A	-	-	4	c.438C>A	p.Ser146Arg	429	5174	IVL21
chr6:37140800	nonsynonymous SNV	21.44	no call	PIM1	G	A	-	-	5	c.636G>A	p.Trp212Ter	1617	14392	IVL21
chr17:62006799	nonsynonymous SNV	70.96	no call	CD79B	A	G	COSM220734	-	5	c.586T>C	p.Tyr196His	834	5101	IVL23
chr3:38182641	nonsynonymous SNV	70.18	no call	MYD88	T	C	COSM85940	rs387907272	5	c.794T>C	p.Leu265Pro	1054	9814	IVL23
chr6:37138804	nonsynonymous SNV	45.08	no call	PIM1	G	C	COSM220741	-	3	c.237G>C	p.Glu79Asp	578	4193	IVL23
chr6:37138950	nonsynonymous SNV	19.12	no call	PIM1	G	A	COSM220740	rs562319987	4	c.290G>A	p.Ser97Asn	68	1069	IVL23
chr1:203274817	nonsynonymous SNV	18.66	6.4	BTG2	G	A	COSM5946364	rs55906353	1	c.83G>A	p.Gly28Asp	418	4139	IVL24
chr17:62006799	nonsynonymous SNV	22.72	5.7	CD79B	A	G	COSM220734	-	5	c.586T>C	p.Tyr196His	625	5994	IVL24
chr3:38182641	nonsynonymous SNV	31.24	7.8	MYD88	T	C	COSM85940	rs387907272	5	c.794T>C	p.Leu265Pro	813	10142	IVL24
chr6:37138804	nonsynonymous SNV	28.34	5.9	PIM1	G	C	COSM220741	-	3	c.237G>C	p.Glu79Asp	437	3871	IVL24
chr6:37138955	nonsynonymous SNV	33.09	8.9	PIM1	G	A	-	-	4	c.295G>A	p.Gly99Ser	136	940	IVL24
chr6:37139097	nonsynonymous SNV	20.82	4.8	PIM1	G	A	-	-	4	c.437G>A	p.Ser146Asn	293	4082	IVL24
chr6:37139150	nonsynonymous SNV	41.3	9.6	PIM1	C	T	COSM220738	-	4	c.490C>T	p.Leu164Phe	293	4089	IVL24
chr17:62006799	nonsynonymous SNV	50	3.3	CD79B	A	G	COSM220734	-	5	c.586T>C	p.Tyr196His	322	1287	IVL25
chr3:38182641	nonsynonymous SNV	49.07	1.3	MYD88	T	C	COSM85940	rs387907272	5	c.794T>C	p.Leu265Pro	222	1899	IVL25
chr6:106554273	nonsynonymous SNV	38.1	no call	PRDM1	C	T	-	-	6	c.1801C>T	p.Arg601Trp	735	2745	IVL3
chr17:62006798	nonsynonymous SNV	40.57	no call	CD79B	T	C	COSM220736	-	5	c.587A>G	p.Tyr196Cys	838	3440	IVL4
chr6:37138805	nonsynonymous SNV	38.5	no call	PIM1	C	A	COSM5948425	-	3	c.238C>A	p.Leu80Met	813	3607	IVL4
chr17:62006798	nonsynonymous SNV	84.03	4.6	CD79B	T	C	COSM220736	-	5	c.587A>G	p.Tyr196Cys	744	2108	IVL5
chr6:106543541	nonsynonymous SNV	77.41	3.7	PRDM1	C	A	-	-	3	c.343C>A	p.Pro115Thr	239	3107	IVL5
chr17:62006680	nonsynonymous SNV	53.35	1.5	CD79B	A	G	COSM1737940	-	6	c.596T>C	p.Leu199Pro	1015	3457	IVL6
chr6:106552836	Stop gain	41.2	1.9	PRDM1	C	A	-	-	5	c.801C>A	p.Tyr267Ter	267	2472	IVL6
chr6:37138805	nonsynonymous SNV	34.36	no call	PIM1	C	G	-	-	3	c.238C>G	p.Leu80Val	806	2350	IVL6
chr6:37139111	nonsynonymous SNV	27.44	no call	PIM1	G	C	-	-	4	c.451G>C	p.Val151Leu	696	2758	IVL6

表 9. ターゲットアンプリコンシーケンスで得られた変異のリスト

VAF, 変異アリル頻度 (Variant allele frequencies); SNV, 一塩基置換 (single nucleotide variation); MNV, 多塩基置換 (multiple nucleotide variation); Ref., 参照アリル (Reference allele); Var., 変異アリル (Variant allele); cfDNA, 血中循環細胞外遊離 DNA (cell-free DNA); tdDNA, 組織由来 DNA (tissue-derived DNA)

Mutation enrichment in WRCY (P value)	Mutation enrichment in transition (P value)	Mutation enrichment in C:G (P value)
3.18 (0.0005)	1.29 (0.285)	1.68 (0.0004)

表 10. *PIM1* 変異のパターンについて

WRCY, W は A または T, R は A または G, Y は C または T を示す.

Identifier	MYD88 L265P fractional abundance (%)			
	BM	Serum/plasma	Skin	others
IVL1	ND	NA	0.68	NA
IVL2	1.74	42.58	5.01	NA
IVL3	ND	ND	ND	NA
IVL4	ND	ND	ND	NA
IVL5	ND	ND	NA	NA
IVL6	ND	ND	NA	NA
IVL7	ND	NA	ND	NA
IVL8	ND	NA	ND	ND
IVL9	NA	NA	NA	4.68
IVL10	ND	NA	ND	NA
IVL11	NA	NA	NA	9.09
IVL13	ND	NA	NA	NA
IVL15	NA	NA	ND	NA
IVL16	13.28	NA	NA	NA
IVL17	14.51	NA	NA	NA
IVL18	NA	NA	NA	34.76
IVL19	NA	NA	NA	2.58
IVL20	NA	NA	NA	10.04
IVL21	NA	34.92	0.72	NA
IVL22	NA	ND	NA	NA
IVL23	0.61	81.33	0.82	NA
IVL24	11.81	26.69	7.64	NA
IVL25	NA	60.98	2.03	NA
IVL26	0.21	NA	NA	NA
IVL27	ND	NA	NA	NA
IVL28	9.31	NA	NA	NA
IVL29	NA	NA	0.34	NA

表 11. ddPCR による MYD88:c. 794T>C, p. Leu265Pro 変異解析の結果 (N=27)

NA, 検体なし (not available) ; ND, 検出限界以下 (not detected) ; BM, 骨髄 (bone marrow)

Target	Forward primer	Reverse primer	Amplicon length
<i>DNMT3A</i> p.E392*	TCAATCATGGGCTTG TTCTG	GAAGCTGTTCCCGGT GTG	81
<i>DNMT3A</i> p.V563M	CCGCACATGTAGCA GTTCC	CTGCTCACTGGGTCTC CTTC	116
<i>DNMT3A</i> p.E565fs	CCGCACATGTAGCA GTTCC	CTGCTCACTGGGTCTC CTTC	116
<i>DNMT3A</i> p.W601*	TGGTTATTAGCGAAG AACATCTG	GGGCACAAGGGTACC TACG	80
<i>DNMT3A</i> p.W860R	CGGGTACCTTTCCAT TTCAG	AGGGCAAAGACCAGC ATTTT	80
<i>DNMT3A</i> p.R882H	GAAGAGGTGGCGGA TGACT	CAGGGTATTTGGTTTC CCAGT	112
<i>TP53</i> p. A119D	ACTGACCGTGCAAGT CACAG	ACCTACCAGGGCAGC TACG	78
<i>TP53</i> p. C275Y	GCGGAGATTCTCTTC CTCTG	CTACTGGGACGGAAC AGCTT	81

表 12. 各 *DNMT3A*・*TP53* 変異検出のためのプライマー

	Liquid biopsy at complete metabolic response		P value
	Negative	Positive	
No. of patients	66	9	
Median age, years(range)	63.5 (25-89)	73 (65-78)	0.03
Male sex, n (%)	36 (54.5)	7 (77.8)	0.29
Histological diagnosis, n(%)			0.45
Diffuse large B-cell lymphoma	37 (56.1)	8 (88.9)	
Follicular lymphoma	19 (28.8)	1 (11.1)	
Other B-cell lymphomas	6 (9.1)	0 (0.0)	
Hodgkin lymphoma	4 (6.1)	0 (0.0)	
Advanced clinical stage, n (%)	38 (57.6)	5 (55.6)	1.00
Bone marrow invasion, n (%)	11 (16.7)	0 (0.0)	0.34
Lactate dehydrogenase above the upper normal limit, n (%)	39 (59.1)	6 (66.7)	0.35
Chemotherapy, n (%)			0.72
R-CHOP	36 (54.5)	7 (77.8)	
R-Bendamustine	12 (18.2)	2 (22.2)	
ABVD	4 (6.1)	0 (0.0)	
Others	2 (4.1)	0 (0.0)	
More than 2 regimens	11 (16.2)	0 (0.0)	
Never (Radiation alone)	1 (1.3)	0 (0.0)	
Radiation therapy, n (%)	9 (13.6)	2 (22.2)	0.61
Median follow-up, months (range)	31.3 (6.3-82.6)	25.6 (14.1-48.2)	0.65
Secondary malignancies, n (%)			0.12
Aggressive NK cell leukemia	0 (0.0)	1 (11.1)	

表 13. 患者背景

CHOP, シクロホスファミド、ドキソルビシン、ビンクリスチン、プレドニゾロン (cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisolone) ; ABVD, ドキソルビシン、ブレオマイシン、ビンブラスチン、ダカルバジン (doxorubicin, bleomycin, vinblastine, dacarbazine) ; R, リツキシマブ (rituximab)

UPN	Variant	VAFs (%)						Tumor purity (%)	Histology
		Before therapy			After therapy, at CMR				
		BMMCs	Serum	Tumor	PBMCs/ BMMCs	Serum	Tumor		
D34	<i>TP53</i> p.A119D	13.8	7.6	ND	15.3	23.8	CMR	85	DLBCL
D10	<i>TP53</i> p.C275Y	ND	1.1	ND	3.9	3.2	CMR	75	DLBCL
D25	<i>DNMT3A</i> p.W860R	7.9	11.4	(1.1, ND, ND) [†]	11.4	12.8	CMR	30, 60, 70 [†]	DLBCL
D9	<i>DNMT3A</i> p.E392*	2.7	3.2	1	1.3	4.3	CMR	40	DLBCL
D42	<i>DNMT3A</i> p.E565fs	10.2	7.9	1.6	5.2	6	CMR	85	DLBCL
D35	<i>DNMT3A</i> p.W860R	2.6	ND	ND	NA	3.2	CMR	80	DLBCL
C7	<i>DNMT3A</i> p.R882H	NA	6.5	1.4	3.5	3.5	CMR	85	DLBCL
C2	<i>DNMT3A</i> p.W601*	7.2	5.2	NA	7	7.2	CMR	NA	FL
E13	<i>DNMT3A</i> p.V563M	4.9	4.2	NA	3.9	8.6	CMR	NA	DLBCL

表 14. CMR 時の血清で検出された変異のリスト

† 重複がんの症例であり、早期胃がん (gastric adenocarcinoma)、直腸がん (rectal adenocarcinoma)、びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫 (DLBCL) のデータを示す。

VAF, 変異アリル頻度 (variant allele frequencies) ; DLBCL, びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫 (diffuse large B-cell lymphoma) ; FL, 濾胞性リンパ腫 (follicular lymphoma) ; CMR, complete metabolic response; BMMCs, 骨髄単核球 (bone marrow mononuclear cells) ; PBMCs, 末梢血単核球 (peripheral blood mononuclear cells) ; NA, 検体なし (not available) ; ND, 検出感度以下 (not detectable)

UPN	Variant	Fractional abundance (%)					Histology
		Before therapy			After therapy, at CMR		
		BMMCs	Serum	Tumor	Serum	Tumor	
D32	<i>MYD88</i> p.L265P	ND	1	20.5	ND	CMR	DLBCL
D40	<i>MYD88</i> p.L265P	ND	0.7	32	ND	CMR	DLBCL
D33	<i>MYD88</i> p.L265P	NA	18	40.7	ND	CMR	DLBCL
D42	<i>MYD88</i> p.L265P	ND	7.4	47.5	ND	CMR	DLBCL
E35	<i>MYD88</i> p.L265P	ND	NA	82	ND	CMR	DLBCL
D33	<i>CD79B</i> p.Y196C	NA	20.6	65.9	ND	CMR	DLBCL
E41	<i>CD79B</i> p.Y196H	ND	NA	27.5	ND	CMR	DLBCL
E35	<i>CD79B</i> p.Y196H	ND	NA	41.5	ND	CMR	DLBCL

表 15. びまん性大細胞 B 細胞リンパ腫の腫瘍検体で検出された *MYD88*, *CD79B* 変異のリスト

DLBCL, びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫 (diffuse large B-cell lymphoma) ; CMR, complete

metabolic response; BMMCs, 骨髄単核球 (bone marrow mononuclear cells) ; NA, 検体なし

(not available) ; ND, 検出限界以下 (not detectable)

	Before therapy	After therapy (CMR)	Relapse of DLBCL	After therapy (2 nd CMR)	Diagnosis of ANKL
Concentration of <i>TP53</i> p.A119D mutation in serum [hGE/ml]	1.1 x 10 ⁵	9.6 x 10 ⁴	NA	NA	2.1 x 10 ⁶
VAF_Serum (%)	7.6	23.8	NA	NA	3
VAF_DLBCCL (%)	ND	NA	1.8	NA	NA
VAF_PBMCs/BMMCs (%)	13.8 [†]	NA	23.8 [†]	15.3	NA [‡]
VAF_ANKL (%)	NA	NA	NA	NA	ND (611/66086 reads)

表 16. アグレッシブ NK 細胞白血病を発症した症例の血清中で検出された TP53

p. A119D 変異の経時的解析

†これらのサンプルではリンパ腫の骨髄浸潤を認めなかった. ‡アグレッシブ NK 細胞白血病

の診断時には、末梢血細胞および骨髄細胞はほとんど全て白血病細胞で占められていた.

VAF, 変異アリル頻度 (variant allele frequency) ; CMR, complete metabolic response; DLBCL,

びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫 (diffuse large b-cell lymphoma) ; ANKL, アグレッシブ

NK 細胞白血病 (aggressive NK-cell leukemia) ; PBMCs, 末梢血単核球 (peripheral blood

mononuclear cells) ; BMMCs, 骨髄単核球 (bone marrow mononuclear cells) ; NA, not

available; ND, 検出限界以下 (not detectable)

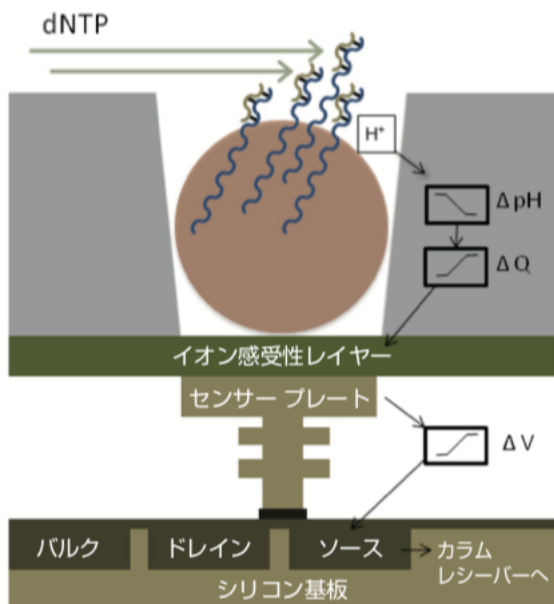


図 1. IonPGM のチップの模式図

(<https://www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/Documents/PDFs/jp/materials/appnote-ion006.pdf>)

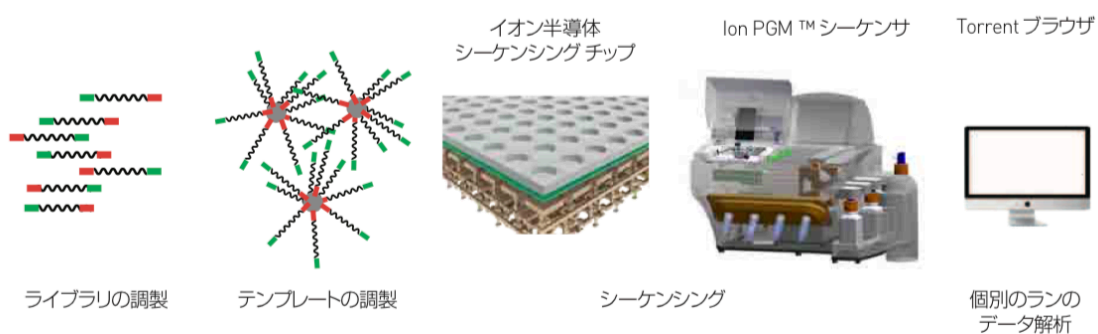


図 2. ionPGM によるターゲットアンプリコンシーケンスのワークフロー

(<https://www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/Documents/PDFs/jp/materials/appnote-ion006.pdf>)

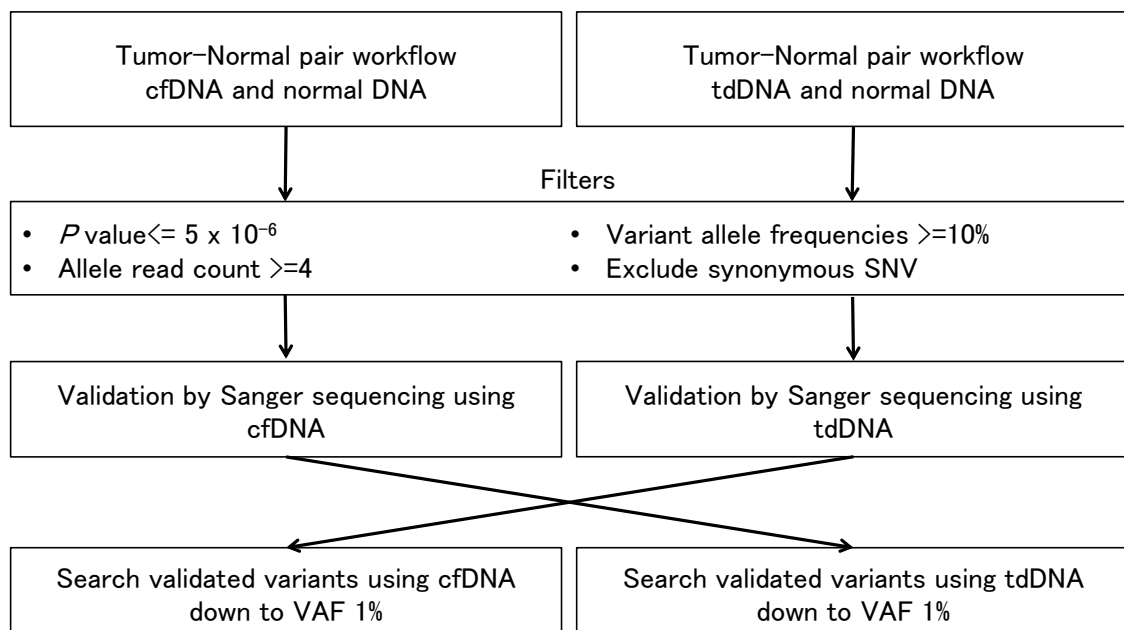


図 3. ターゲットアンプリコン解析の解析ワークフロー

cfDNA, 血中循環細胞外遊離 DNA (cell-free DNA) ; tdDNA, 組織由来 DNA (tissue derived DNA) ; SNV, 一塩基置換 (single nucleotide variant) ; VAF, 変異アレル頻度 (Variant allele frequencies)

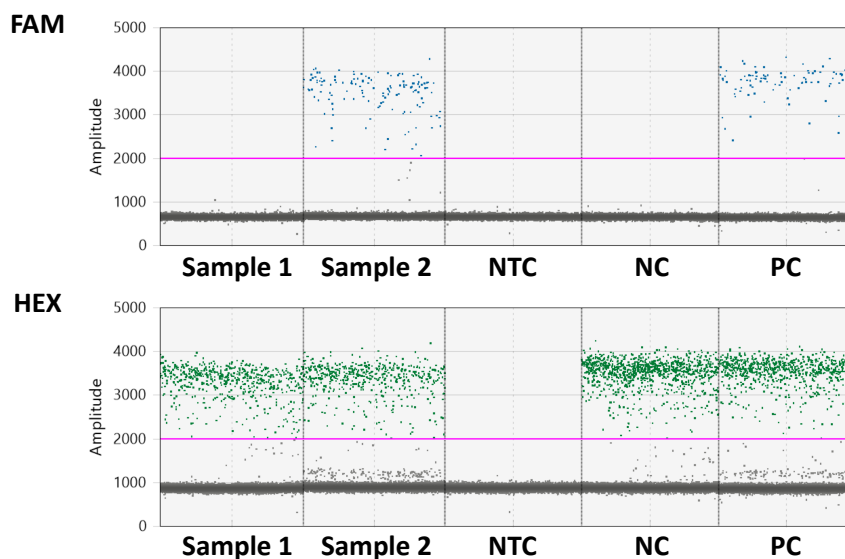


図 4. デジタル PCR の 1dimensional plot の一例

NTC, テンプレートなしコントロール (non template control) ; NC, 変異アレルの陰性コントロール (negative control) ; PC, 変異アレルの陽性コントロール (positive control)

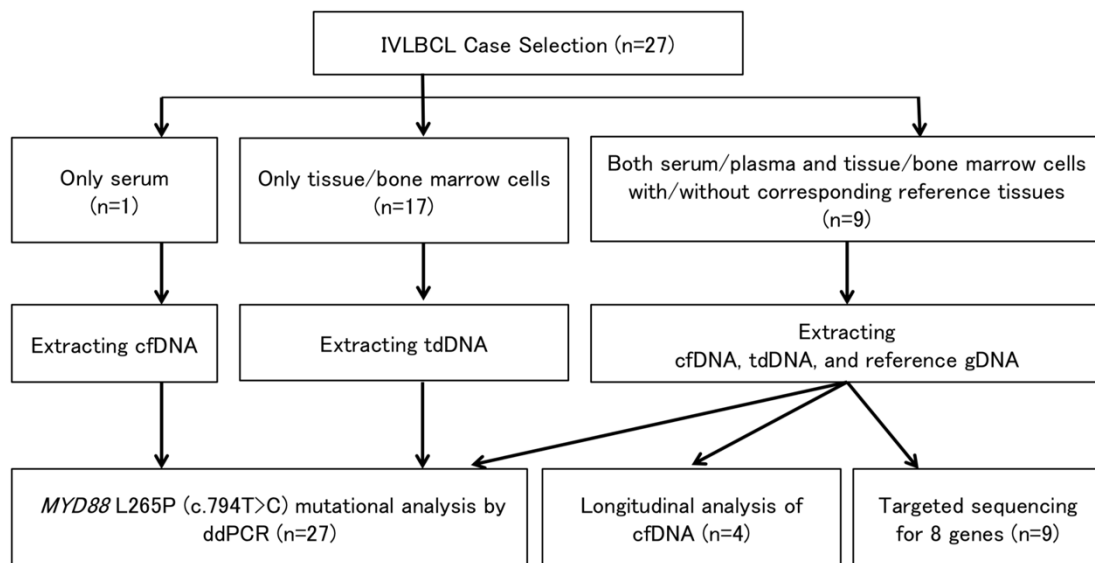


図 5. 27 症例の解析の概要

IVLBCL, 血管内大細胞型 B 細胞リンパ腫 (intravascular large B-cell lymphoma) ; cfDNA, 血中循環細胞外遊離 DNA (cell-free DNA) ; tdDNA, 組織由来 DNA (tissue-derived DNA) ; reference gDNA, 正常対照ゲノム DNA; ddPCR, ドロップレットデジタル PCR (droplet digital PCR)

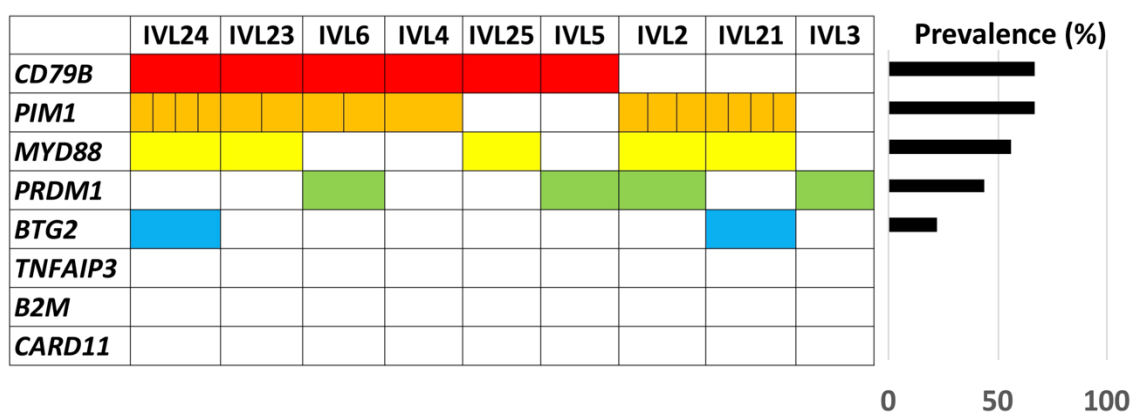


図 6. 9 症例における 8 遺伝子のターゲットシーケンス

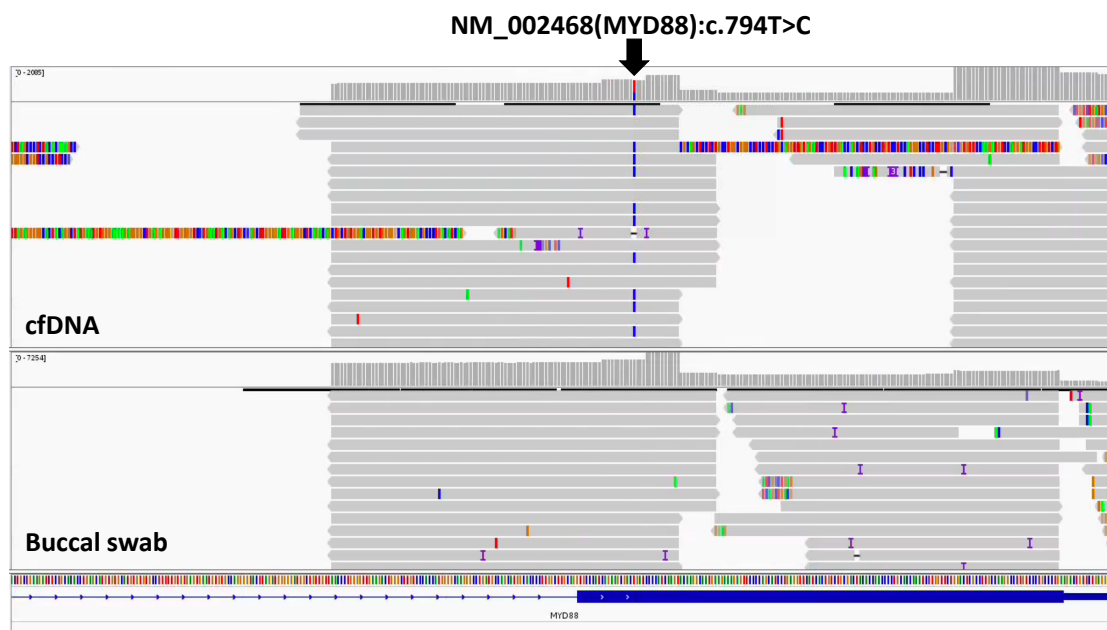


図 7. ターゲットアンプリコンシーケンスによる IVL2 の MYD88:c. 794T>C,

p. Leu265Pro 変異の検出

cfDNA, 血中循環細胞外遊離 DNA(cell-free DNA)

NM_002468(MYD88):c.794T>C

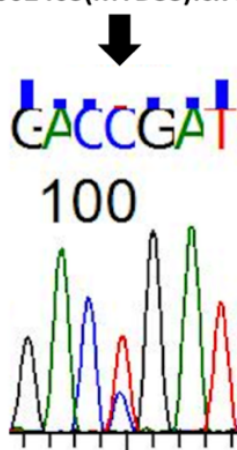


図 8. ダイレクトシーケンスによる MYD88:c. 794T>C, p. Leu265Pro 変異の確認

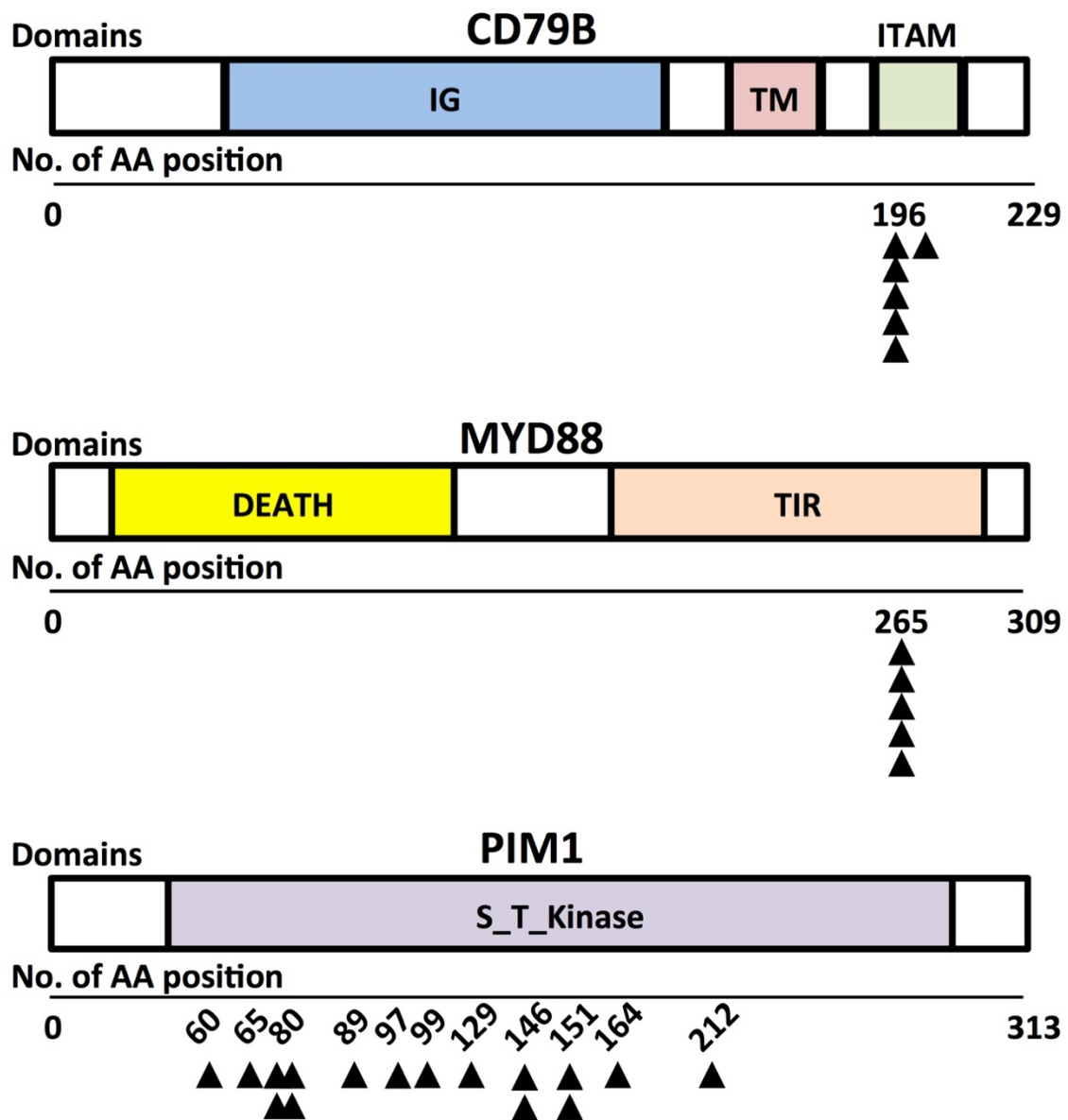
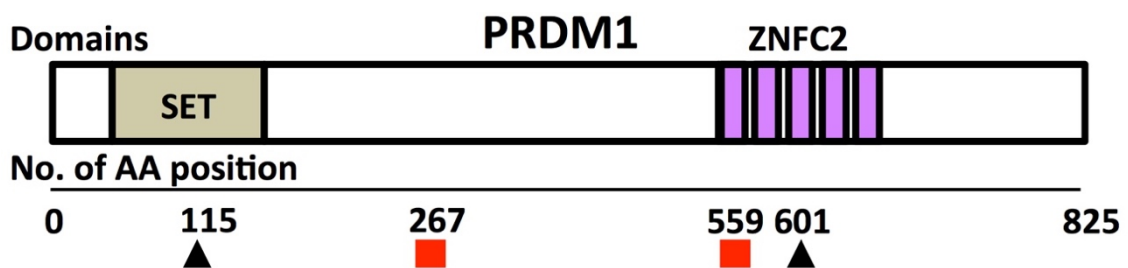
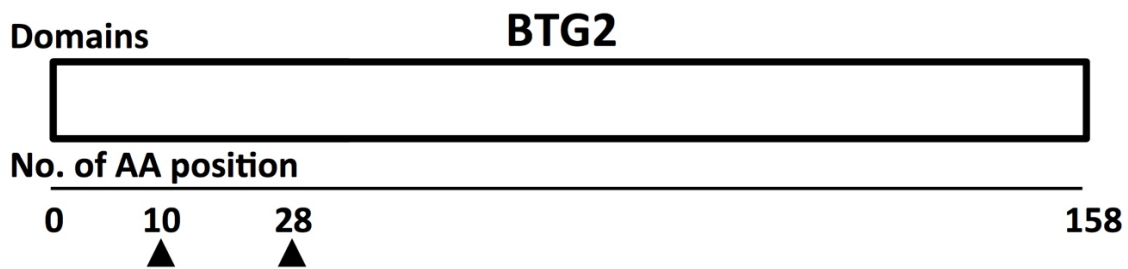


図 9. 各変異とモチーフの位置関係



- Immunoglobulin
 - Transmembrane domain
 - Immunoreceptor tyrosine-based activation motif
 - Death domain
 - Toll-interleukin1-resistance
 - Serine/Threonine protein kinases, catalytic domain
 - SET (Su(var)3-9, Enhancer-of-zeste, Trithorax) domain
 - Zinc finger C2H2-type
- ▲ Missense mutation

■ Nonsense mutation

図 9. 各変異とモチーフの位置関係 (続き)

AA, アミノ酸 (amino acid)

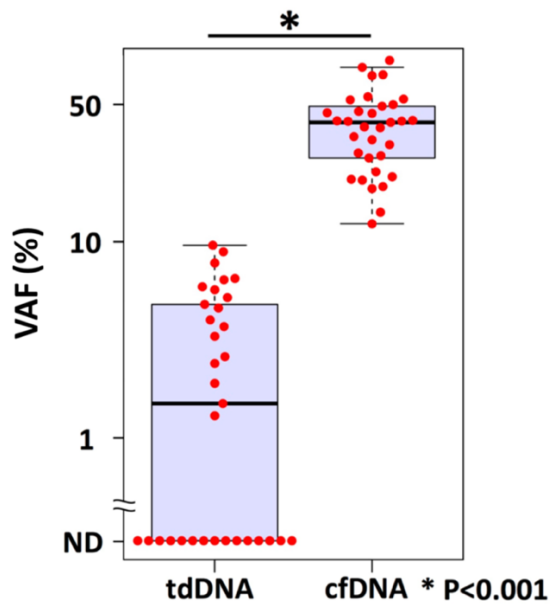


図 10. ターゲットアンプリコンシーケンス解析により血中循環細胞外遊離 DNA と組織由来 DNA で検出された変異の変異アリル頻度の比較

VAF, 変異アリル頻度 (variant allele frequencies) ; ND, 検出感度以下 (not detected) ; tdDNA, 組織由来 DNA (tissue derived DNA) ; cfDNA, 血中遊離循環細胞外 DNA (cell-free DNA)

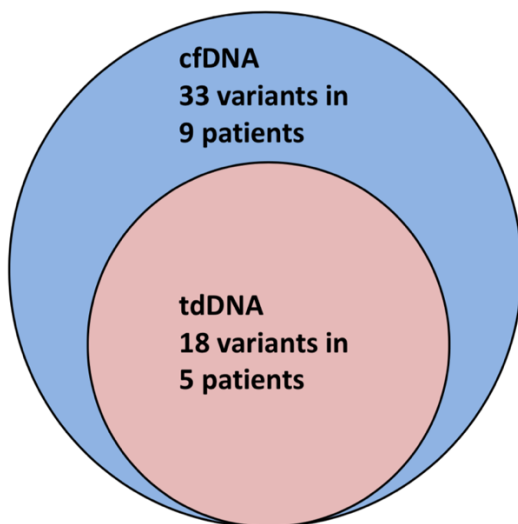


図 11. ターゲットアンプリコンシーケンス解析により血中循環細胞外遊離 DNA と組織由来 DNA で検出された変異のベン図

tdDNA, 組織由来 DNA (tissue derived DNA) ; cfDNA, 血中遊離循環細胞外 DNA (cell-free DNA)

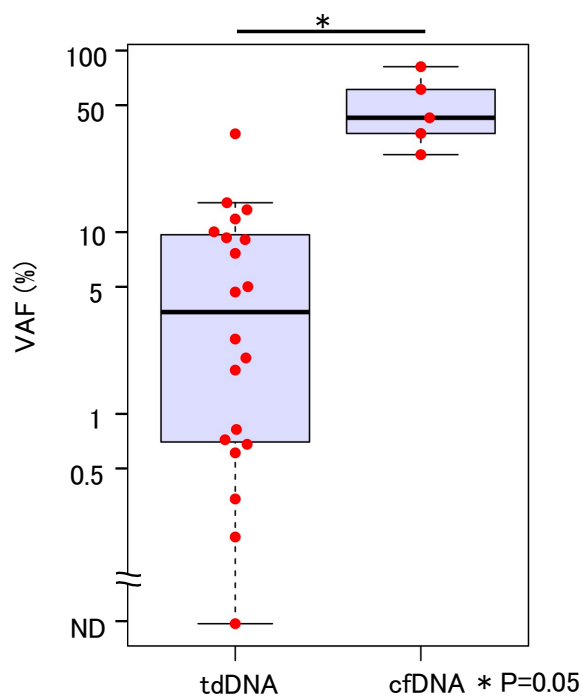


図 12. ドロップレットデジタル PCR により血中循環細胞外遊離 DNA と組織由来

DNA で検出された *MYD88* 変異の変異アレル頻度の比較

VAF, 変異アレル頻度 (variant allele frequencies) ; ND, 検出感度以下 (not detected) ;
tdDNA, 組織由来 DNA (tissue derived DNA) ; cfDNA, 血中遊離循環細胞外 DNA (cell-free DNA)

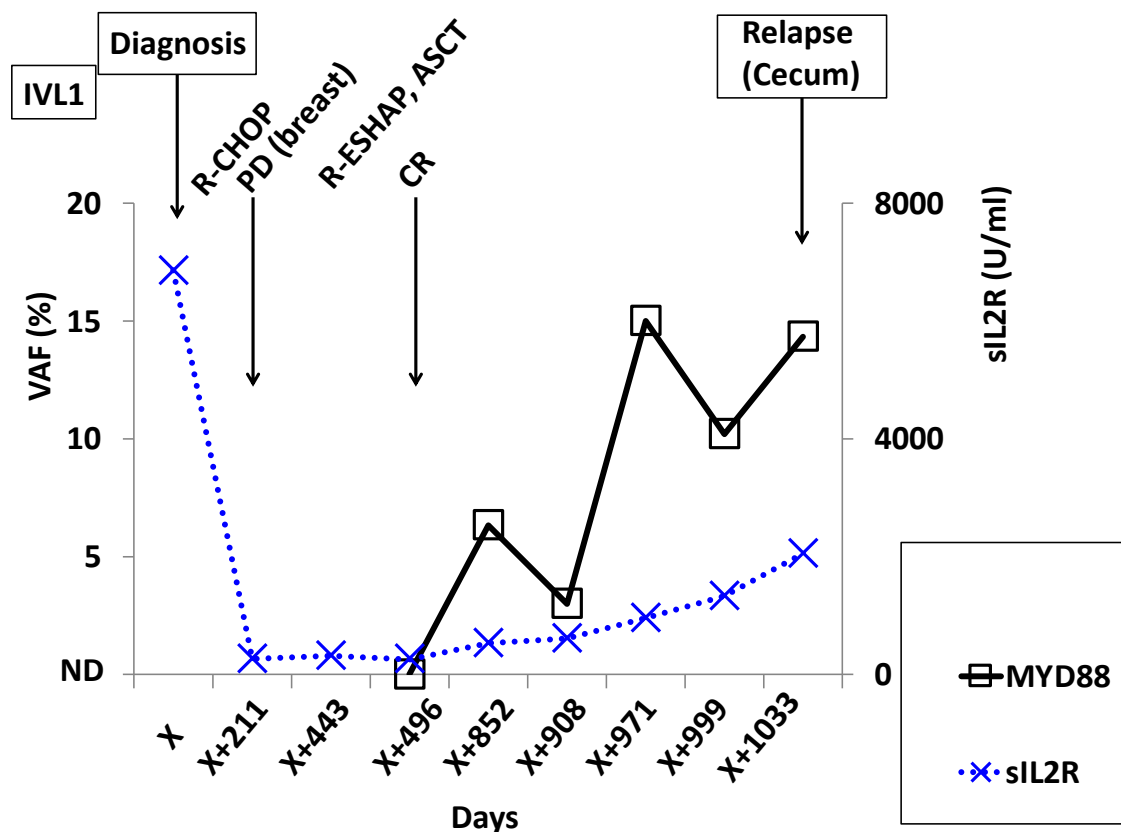


図 13. 再発例 (IVL1) での経時的な cfDNA の解析

□ は血中循環遊離細胞外 DNA 中の *MYD88* 変異アレル頻度を表す；青い X 印は sIL2R 値を示す。VAF, 変異アレル頻度 (Variant allele frequencies) ; BM, 骨髄 (Bone marrow) ; sIL2R, 可溶性インターロイキン 2 受容体 (soluble interleukin-2 receptor) ; R-CHOP, リツキシマブ、シクロホスファミド、ドキシソルビシン、ビンクリスチン、プレドニゾロン (rituximab, cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, prednisone) ; PD, 進行 (progressive disease) ; R-ESHAP, リツキシマブ、エトポシド、シタラビン、シスプラチン、メチルプレドニゾロン (rituximab, etoposide, cytarabine, cisplatin, and methylprednisolone) ; ASCT, 自家移植 (autologous stem cell transplantation) ; CR, 完全奏功 (complete response) ; ND, 検出感度以下 (Not detected)

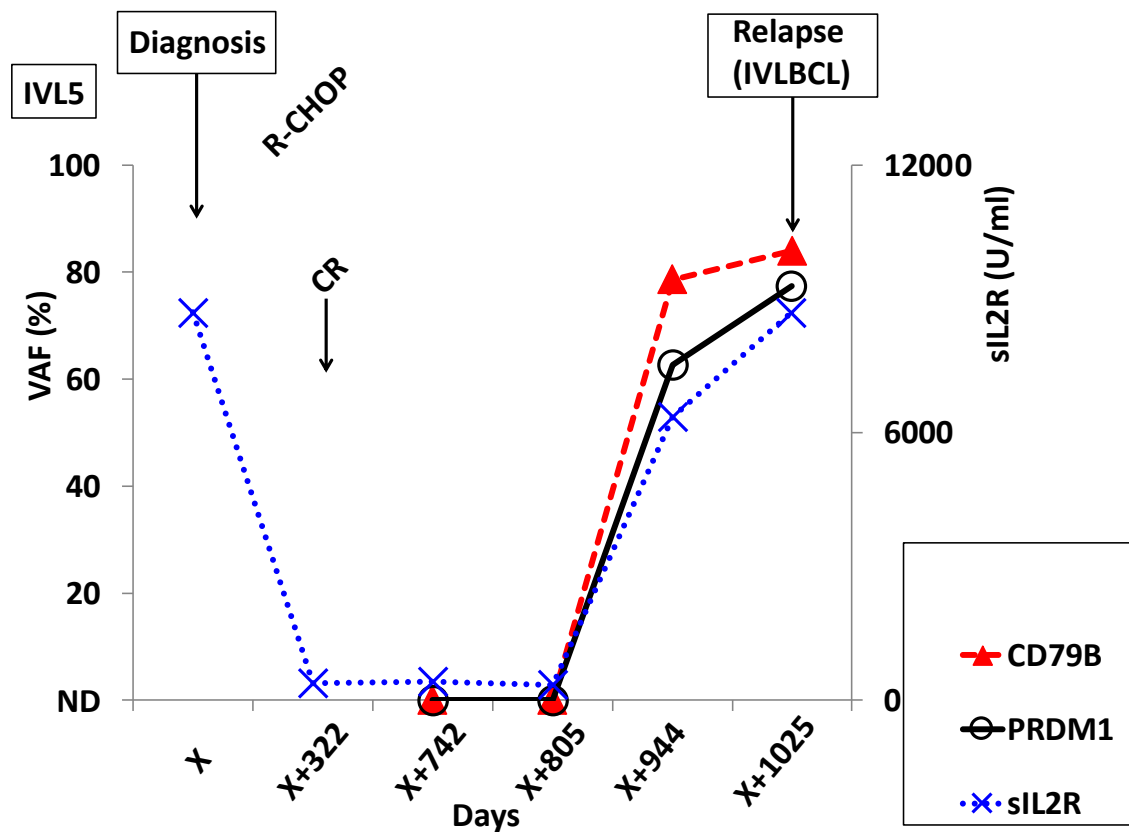


図 14. 再発例 (IVL5) での経時的な cfDNA の解析

○ は血中循環遊離細胞外 DNA 中の *PRDM1* 変異アレル頻度を表す; 赤△は 血中循環遊離細胞外 DNA 中の Y196C *CD79B* 変異アレル頻度を表す; 青い X 印は sIL2R 値を示す. VAF, 変異アレル頻度 (Variant allele frequencies); sIL2R, 可溶性インターロイキン 2 受容体 (soluble interleukin-2 receptor); R-CHOP, リツキシマブ、シクロホスファミド、ドキソルビシン、ビンクリスチン、プレドニゾロン (rituximab, cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, prednisone); CR, 完全奏功 (complete response); IVLBCL, 血管内大細胞型 Bs 細胞リンパ腫 (intravascular large B-cell lymphoma); ND, 検出感度以下 (Not detected)

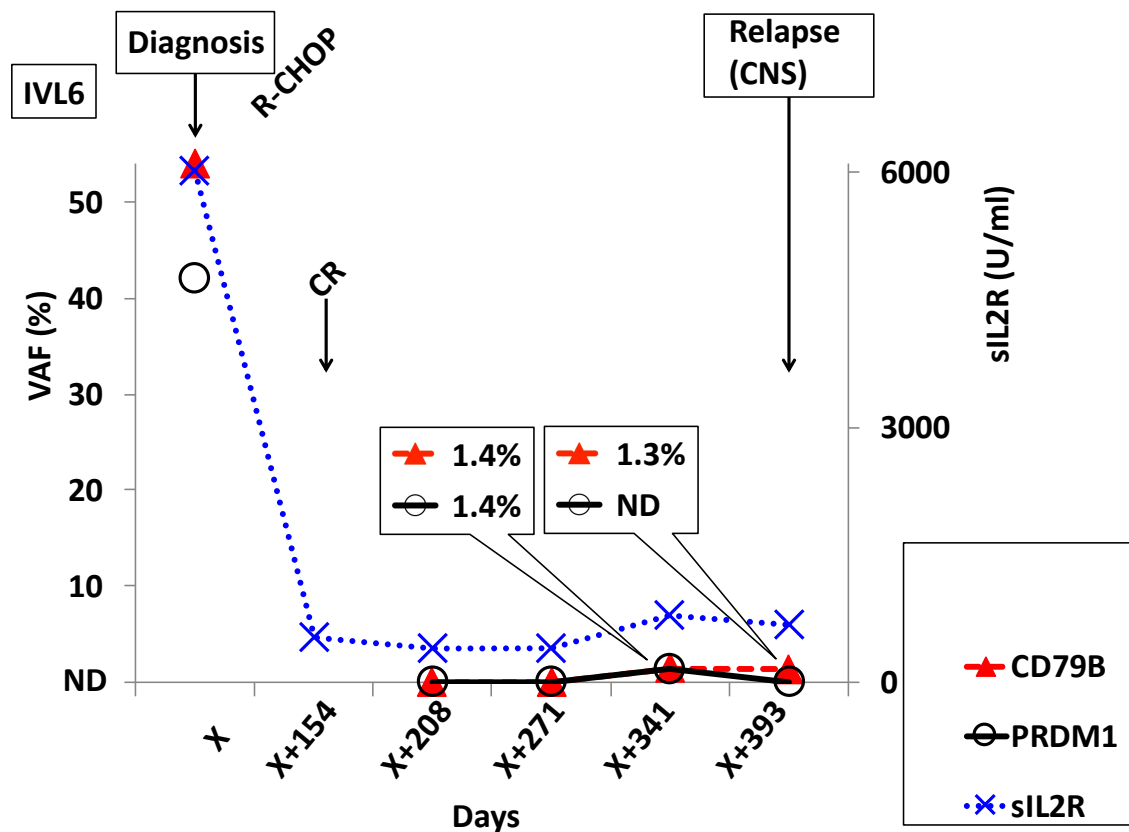


図 15. 再発例 (IVL6) での経時的な cfDNA の解析

○ は血中循環遊離細胞外 DNA 中の *PRDM1* 変異アレル頻度を表す；赤△は 血中循環遊離細胞外 DNA 中の L199P *CD79B* 変異アレル頻度を表す；青い X 印は sIL2R 値を示す。VAF, 変異アレル頻度 (Variant allele frequencies) ; sIL2R, 可溶性インターロイキン 2 受容体 (soluble interleukin-2 receptor) ; R-CHOP, リツキシマブ、シクロホスファミド、ドキソルビシン、ビンクリスチン、プレドニゾロン (rituximab, cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, prednisone) ; CR, 完全奏功 (complete response) ; CNS, 中枢神経 (central nervous system) ; ND, 検出感度以下 (Not detected)

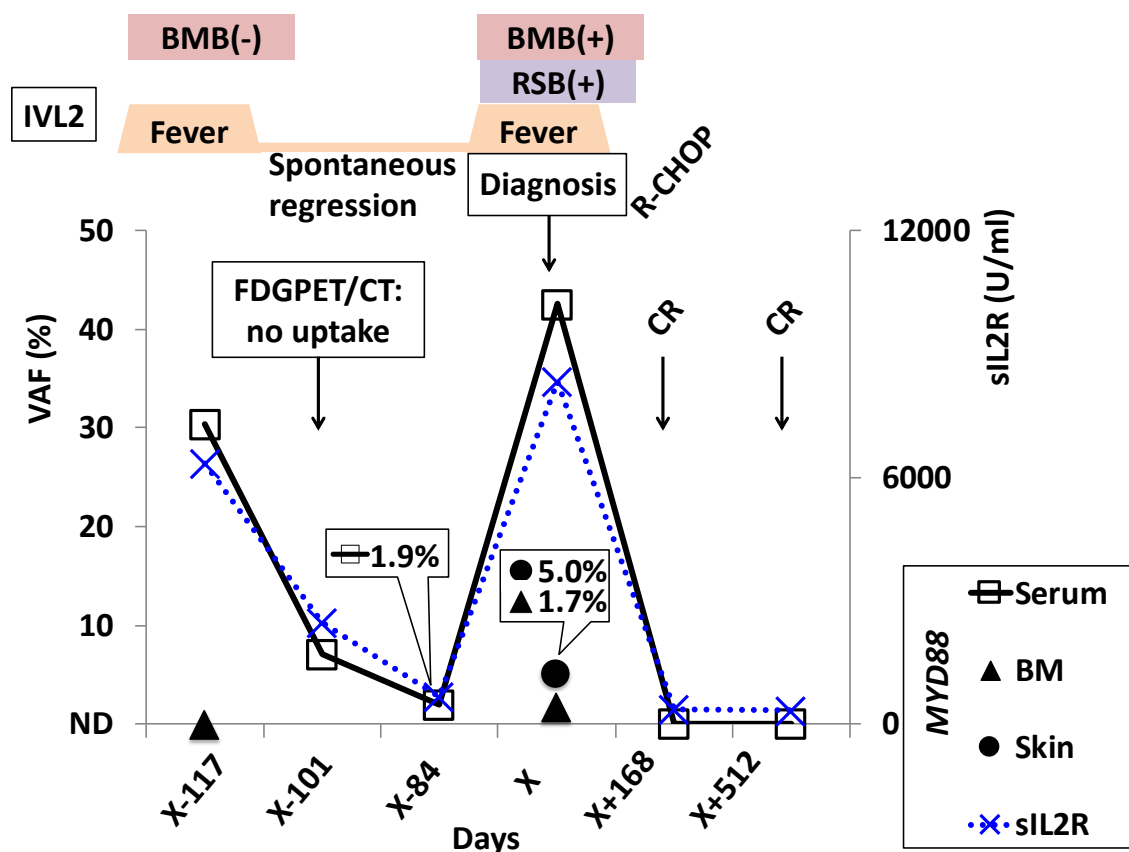
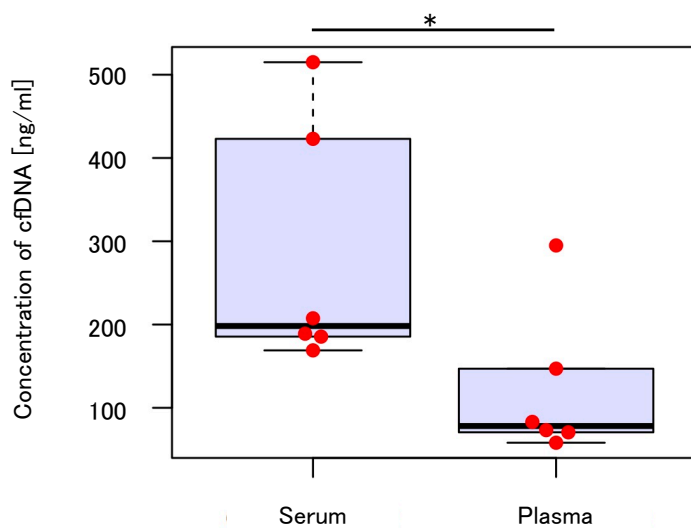


図 16. 初回骨髄生検陰性例 (IVL2) での経時的な cfDNA の解析

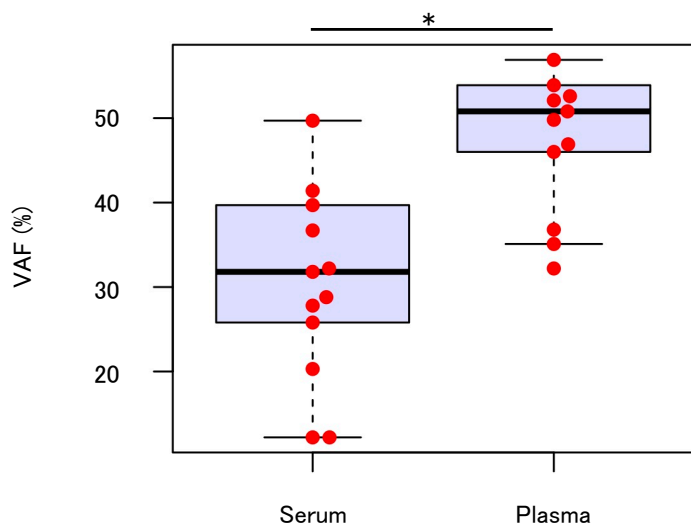
L265P MYD88 変異は確定診断 4 ヶ月前の血清で検出可能であった。□ は血中循環遊離細胞外 DNA 中の MYD88 変異アリル頻度を表す；▲ は組織由来 DNA (骨髄穿刺液由来) 中の MYD88 変異アリル頻度を表す；● は組織由来 (皮膚ホルマリン固定パラフィン包埋切片由来) DNA 中の MYD88 変異アリル頻度を表す；青い X 印は sIL2R 値を示す。VAF, 変異アリル頻度 (Variant allele frequencies) ; BM, 骨髄 (Bone marrow) ; sIL2R, 可溶性インターロイキン 2 受容体 (soluble interleukin-2 receptor) ; BMB, 骨髄生検 (bone marrow biopsy) ; RSB, ランダム皮膚生検 (random skin biopsy) ; FDG PET/CT, ^{18}F -2-デオキシ-2-フルオロ-D-グルコースを用いたポジトロン断層撮影 (18F-fluorodesoxyglucose positron emission tomography/ computed tomography) ; R-CHOP, リツキシマブ、シクロホスファミド、ドキソルビシン、ビンクリスチン、プレドニゾロン (rituximab, cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, prednisone) ; CR, 完全奏功 (complete response) ; ND, 検出感度以下 (Not detected)



* P=0.016

図 17. 対応する血清・血漿由来 cfDNA の濃度の比較

cfDNA, 血中循環細胞外遊離 DNA (cell-free DNA)



* P=0.0002

図 18. 対応する血清・血漿由来 cfDNA の変異アリル頻度の比較

VAF, 変異アリル頻度 (variant allele frequency)

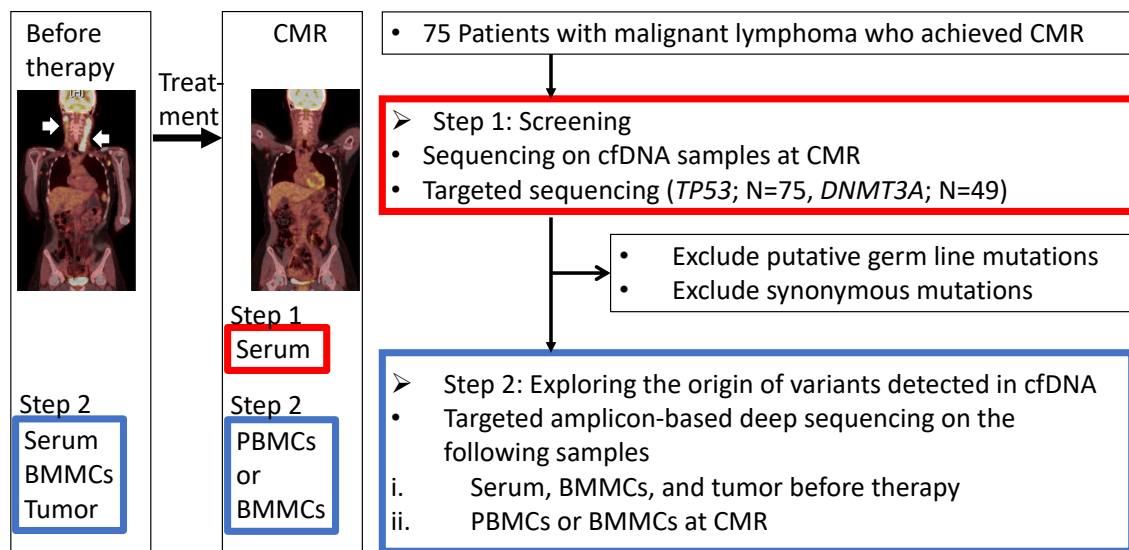


図 19. *TP53* 変異と *DNMT3A* 変異の解析の流れ

白矢印は ^{18}F -FDG 集積部位. CMR, complete metabolic response; cfDNA, 血中循環細胞外遊離 DNA (cell-free DNA); BMMCs, 骨髄単核球 (bone marrow mononuclear cells); PBMCs, 末梢血単核球 (peripheral blood mononuclear cells)

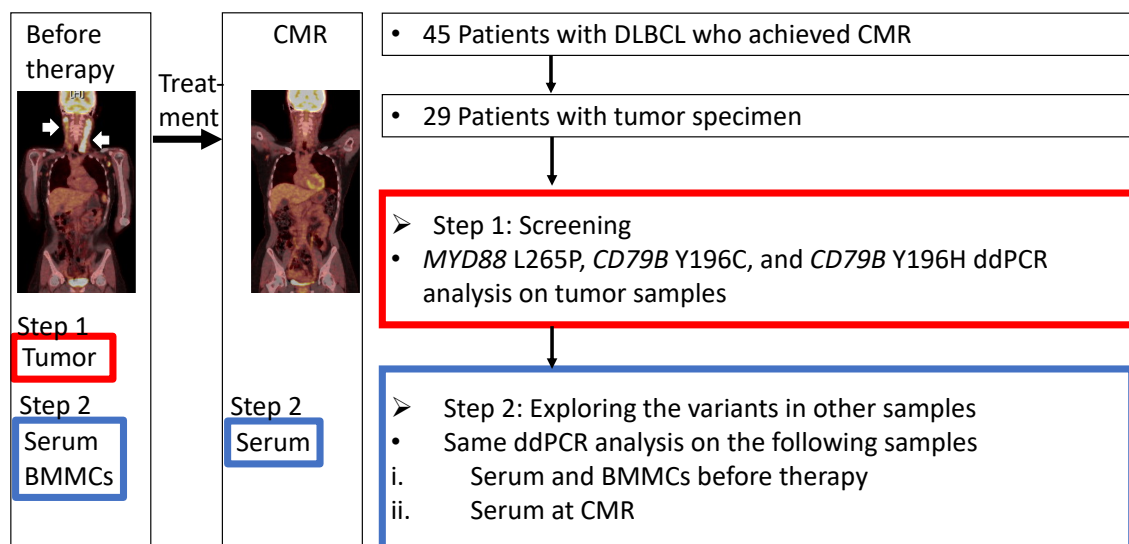


図 20. *MYD88* 変異と *CD79B* 変異の解析の流れ

白矢印は ^{18}F -FDG 集積部位. CMR, complete metabolic response; ddPCR, ドロップレットデジタル PCR (droplet digital PCR); BMMCs, 骨髄単核球 (bone marrow mononuclear cells)

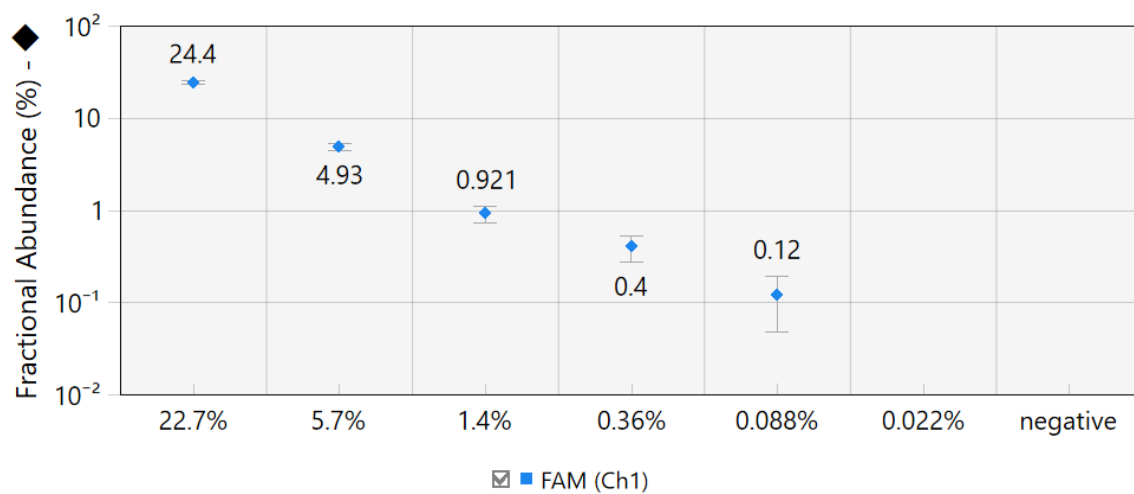


図 21. ドロップレットデジタル PCR での *CD79B* p. Y196H 定量限界の評価

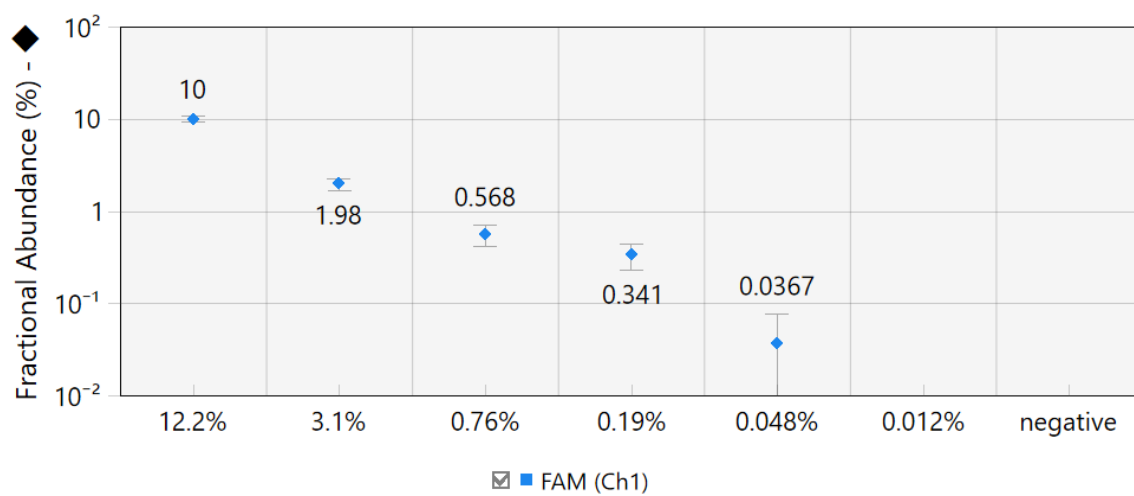


図 22. ドロップレットデジタル PCR での *CD79B* p. Y196C 定量限界の評価

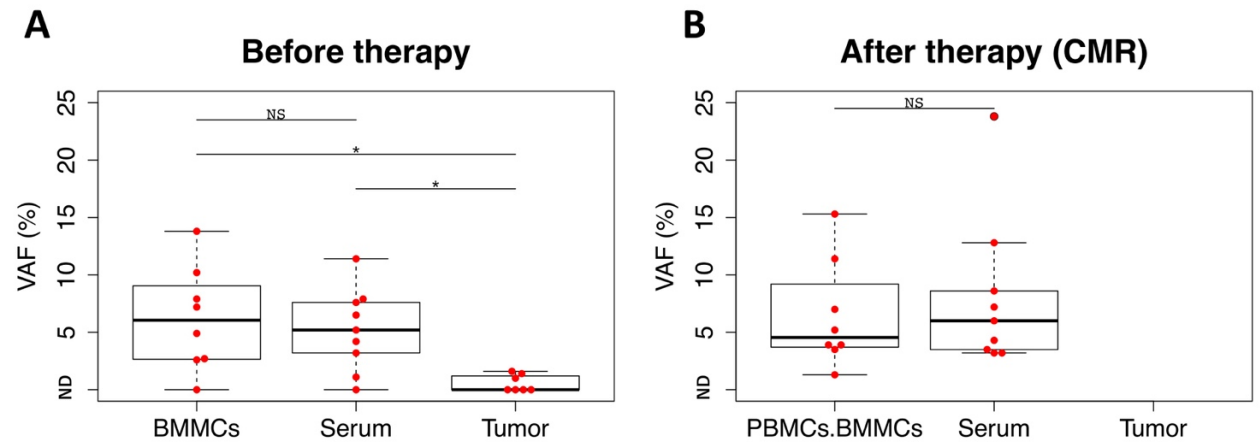


図 23. 腫瘍、血清、骨髄および末梢血単核球間での *TP53* 変異、*DNMT3A* 変異の変異アリル頻度の比較

(A)治療前、(B)complete metabolic response 時。BMMC, 骨髄単核球 (bone marrow mononuclear cells) ; PBMCs, 末梢血単核球 (peripheral blood mononuclear cells) ; ND, 検出感度以下 (not detected)

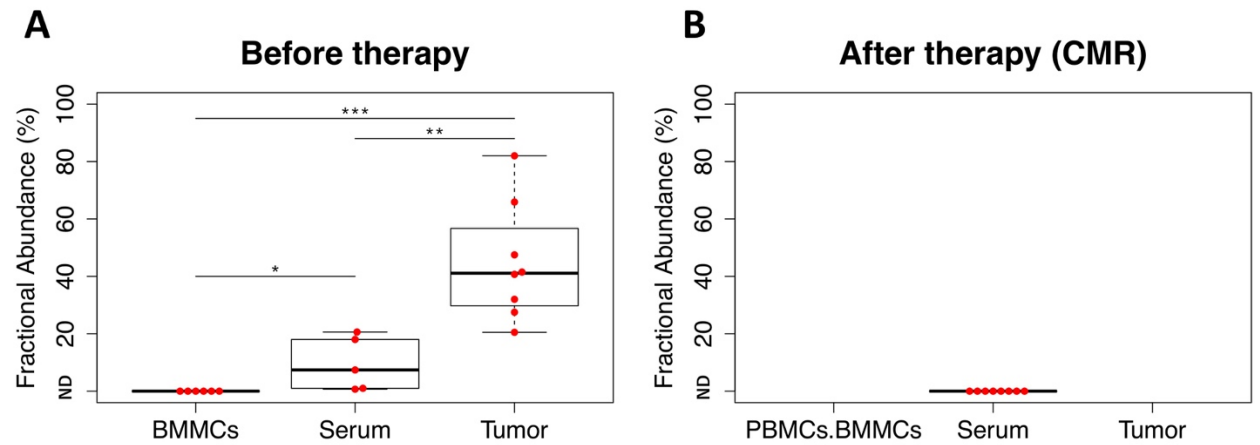


図 24. 腫瘍、血清、骨髄および末梢血単核球間での *MYD88* 変異、*CD79B* 変異の変異アリル頻度の比較

(A)治療前、(B)complete metabolic response 時。BMMC, 骨髄単核球 (bone marrow mononuclear cells) ; PBMCs, 末梢血単核球 (peripheral blood mononuclear cells) ; ND, 検出感度以下 (not detected)

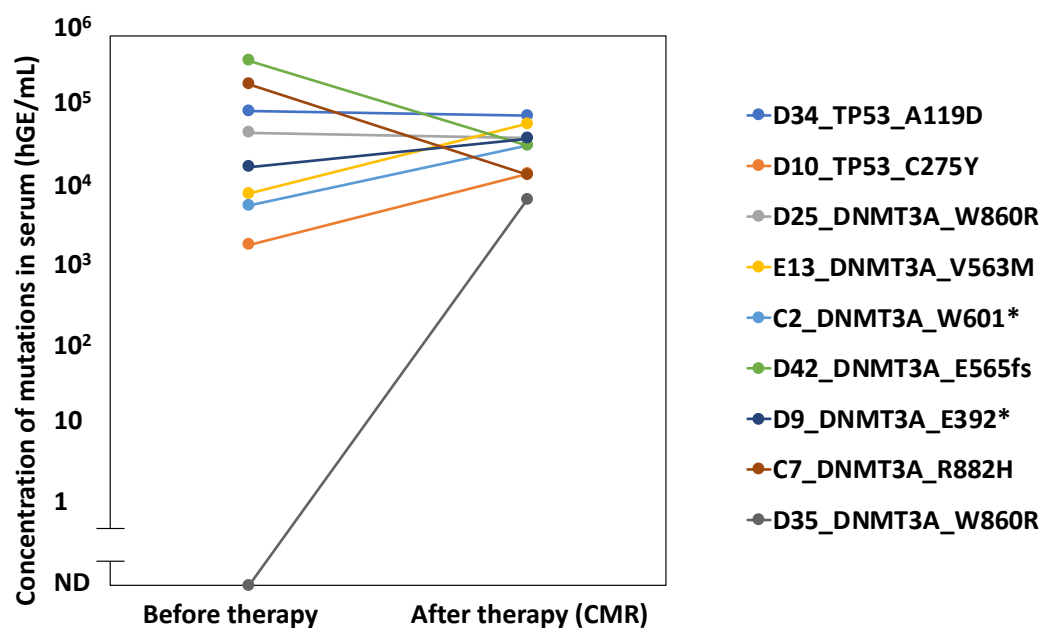


図 25. 治療前後での血清中の *TP53*、*DNMT3A* 変異濃度の推移

CMR, complete metabolic response; ND, 検出感度以下 (not detected) ; hGE, haploid genome equivalent

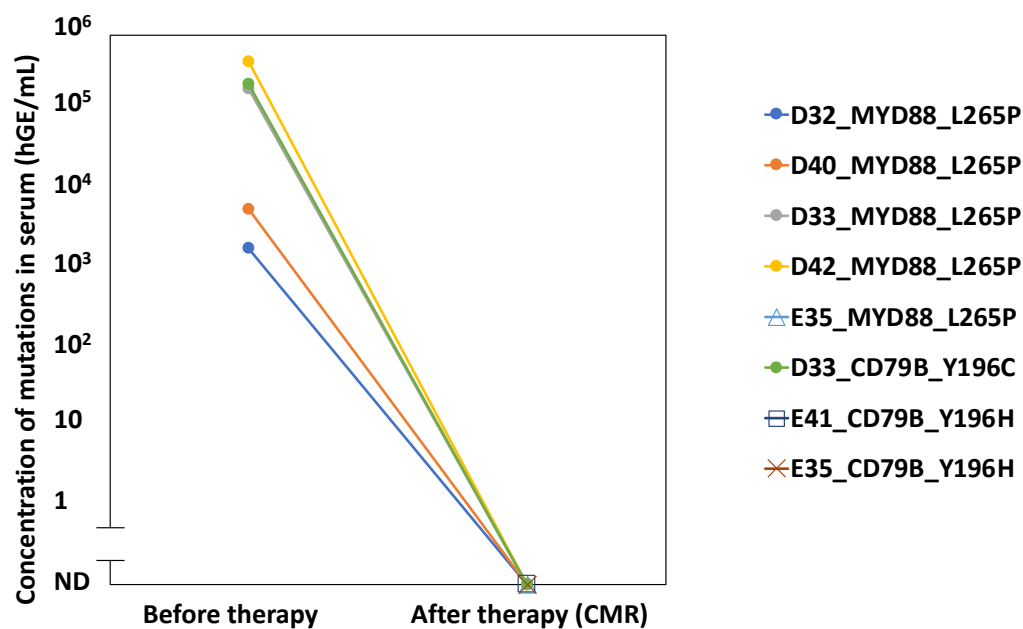


図 26. 治療前後での血清中の *MYD88*、*CD79B* 変異濃度の推移

CMR, complete metabolic response; ND, 検出感度以下 (not detected) ; hGE, haploid genome equivalent

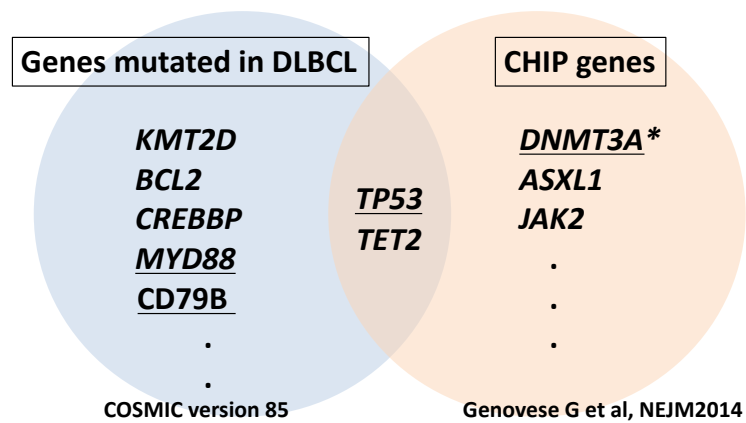


図 27. びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫およびクローン性造血で検出される遺伝子変異に関するベン図

CHIP, クローン性造血 (Clonal hematopoiesis of indeterminate potential)