

氏名	末原 泰人		
学位の種類	博士（医学）		
学位記番号	博甲第 9562 号		
学位授与年月	令和2年3月25日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
審査研究科	人間総合科学研究科		
学位論文題目	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		
主査	筑波大学教授	博士（医学）	土屋 尚之
副査	筑波大学准教授	博士（医学）	坂東 裕子
副査	筑波大学准教授	博士（医学）	藤澤 康弘
副査	筑波大学助教	博士（医学）	宮寺 浩子

## 論文の内容の要旨

末原泰人氏の博士学位論文は、B細胞リンパ腫を対象とした血中循環細胞外遊離 DNA の検出とその意義について検討したものである。その要旨は以下のとおりである。

著者はまず、第1章「序文」において、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分画である血中循環腫瘍 DNA (circulating tumor derived DNA, ctDNA) が、腫瘍の予後予測や治療方針決定のための有用なバイオマーカーとして注目されており、これを検出する方法、すなわちリキッドバイオプシーが、特に生検が困難な部位に位置する腫瘍において低侵襲で試料が得られることから、近年、期待されていることを概説している。

続いて第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」において、著者は、血管内大細胞型 B 細胞リンパ腫 (intravascular large B-cell lymphoma, IVLBCL) はびまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫 (diffuse large B-cell lymphoma, DLBCL) の稀な一亜型でありながら、腫瘍を形成せず、細小血管内に腫瘍細胞が増殖するため、きわめて診断が困難な稀少疾患であること、現状での IVLBCL の一般的な診断法であるランダム皮膚生検や骨髄生検では、一部の症例において診断までに複数回の生検を要するなどの問題があること、cfDNA をターゲットとするリキッドバイオプシーは、この問題を解決できる可能性があるが、これまでに IVLBCL のゲノム異常に関する情報がないことから、本研究においてその解析を行ったことを述べている。

著者は、27例の IVLBCL 患者血清あるいは血漿由来の cfDNA および腫瘍細胞が確認された生検組織あるいは骨髄穿刺液から抽出された組織由来 DNA (tissue-derived DNA, tdDNA) を対象に、先行研究により DLBCL においてゲノム異常が見られた 8 遺伝子 (*B2M*, *BTG2*, *CARD1*, *CD79B*, *MYD88*, *PIM*, *TNFAIP3*) を候補遺伝子として、次世代シーケンサー IonPGM を用いて翻訳領域のターゲット・シーケンス解析を施行している。これら 27 例においては、初回ランダム皮膚生検による診断率は 78.9%、初回骨髄生検による診断率は 48.1%であったが、cfDNA、tdDNA 検体の両方が解析可能であった 9 例全例において、*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が検出された。うち、*CD79B* 変異は 6 症例 (66.7%) において検出され、p. Tyr196 が hotspot であった。*MYD88* 変異は 5 症例 (55.6%) において検出され、すべてが p. Leu265Pro であった。cfDNA と tdDNA を比較すると、変異アリル頻度 (variant allele frequency, VAF)、変異検出率ともに、cfDNA において有意に高かった。時系列解析では、再発が見られた 3 例全例において、臨床的な再発に先行して cfDNA において変異が検出されている。さらに、初回骨髄生検、FDG-PET/CT が陰性であった症例でも、臨床診断 4 ヶ月前の cfDNA において *MYD88* 変異が検出されたことも述べられている。

以上の結果から著者は、IVLBCL においては、他の節外性 DLBCL 同様、B 細胞受容体、Toll 様受容体、IL-1 受容体、NF- $\kappa$ B 経路に関連する遺伝子の変異が認められ、これらが分子標的となる可能性があると考えしている。さらに、cfDNA を用いた解析は検出感度が高く、診断補助の強力なツールとして臨床応用が期待されるが、その際に、一塩基多型、後述するクローン性造血 (clonal hematopoiesis of indeterminate potential, CHIP)、遺伝子変異の疾患特異性等を考慮し、IVLBCL の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察している。

近年、造血器腫瘍がない集団においても、血液細胞からドライバー遺伝子変異が見つかることが報告され、CHIP と呼ばれる。著者は、血液細胞が主要な cfDNA 供給源であり、cfDNA 解析時に CHIP が検出される可能性があることを指摘した上で、cfDNA 解析で検出される遺伝子変異のデータを解釈するための基礎的検討として、第 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」の研究を行っている。

本研究において、著者は、B 細胞リンパ腫の診断を受け、治療により complete metabolic response (CMR) 達成が得られた 75 症例を対象に、DLBCL で変異が検出される *CD79B* と *MYD88*、CHIP で最も高頻度で検出される *DNMT3A*、いずれにおいても変異が検出される *TP53* のターゲット・シーケンス解析を、血清 cfDNA、腫瘍組織、末梢血および骨髄単核球由来 DNA において施行している。2 個の *TP53* 変異と 7 個の *DNMT3A* 変異が CMR 時点での血清で検出され、これらはすべて、治療開始前の骨髄単核球もしくは CMR 時の骨髄あるいは末梢血単核球のいずれかに検出されたが、腫瘍では検出感度以下であるか、検出された場合も、VAF は有意に低かった。以上により著者は、これらの変異は腫瘍由来ではなく、CHIP 由来であろうと結論している。

次に著者は、droplet digital PCR (ddPCR) を用い、DLBCL 29 例の解析を行っている。cfDNA 中の変異アリルの治療前後の変化に関しては、腫瘍由来と考えられる *MYD88*、*CD79B* では 3 log fold 以上の減少を示し、CMR 時には検出限界以下となったのに対し、CHIP 由来と考えられる *TP53*、*DNMT3A* では 1.15 log fold 内の変化であった。

以上の結果から著者は、*TP53*など腫瘍とCHIPの両方で変異が検出されうる遺伝子の場合、cfDNAではこれらが混在する状況となり、解釈に注意が必要となること、その際には、末梢血由来単核球も同時に変異解析を行い、CHIPである可能性を評価することにより、より正確な解釈が可能となるであろうと考察している。

以上の結果を踏まえ、著者は第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」において、IVLBCL診療におけるcfDNA解析の意義と展望について、現在バイオマーカーとして用いられている可溶性IL-2受容体より特異度の高い診断補助ツールとなる可能性があること、そのためには、感染症、自己免疫疾患なども解析対象に含めた上で、cfDNAによる*MYD88*、*CD79B*変異の感度・特異度の検討を進めることが必要であろうと考察している。

## 審査の結果の要旨

### (批評)

血中循環細胞外遊離DNA(cfDNA)を対象とするリキッドバイオプシーは、特に腫瘍性疾患の診療において注目を集めているが、本研究は、B細胞リンパ腫診療におけるcfDNA解析の意義について、詳細な検討を加えた2つの研究を中心に構成されている。第1の研究は、診断が困難な稀少疾患である血管内大細胞型B細胞リンパ腫(IVLBCL)において、cfDNA解析が有力な補助診断となり得ることを強く示唆するもので、高い臨床的意義を有するとともに、将来的な分子標的候補をも示した、重要な研究とすることができる。本研究では、先行研究から示された8個の候補遺伝子に関する解析であるが、今後、エクソーム解析や全ゲノムシーケンスなどの網羅的解析法を用いることにより、さらに有用な知見が得られることが期待される。第2の研究は、cfDNA解析において、腫瘍由来の変異と非腫瘍細胞のクローン性造血由来の変異が混在することから、その解釈に注意が必要であることを示した、リキッドバイオプシーの実用化に向けた貴重な提言とすることができる。いずれも多くのデータと十分な背景知識に基づく考察が含まれており、質の高い学位論文として、高く評価される。

令和元年12月23日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもと論文について説明を求め、関連事項について質疑応答を行い、最終試験を行った。その結果、審査委員全員が合格と判定した。

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