

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名 渡邊 潤
学位 博士 (医学)
学位記番号 新大院博 (医) 第 919 号
学位授与の日付 令和2年3月23日
学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当
博士論文名 High Detection Rate of MYD88 Mutations in Cerebrospinal Fluid From Patients With CNS Lymphomas
(CNS リンパ腫において MYD88 変異は髄液中に高頻度に検出できる。)

論文審査委員 主査 教授 小野寺 理
副査 教授 若井 俊文
副査 准教授 河内 泉

博士論文の要旨

【初めに】中枢神経原発悪性リンパ腫(PCNSL)は予後不良の脳腫瘍の1つであり、その発生頻度は近年上昇傾向にあり、原発性脳腫瘍の4%を占める(Behin A et al, 2003)。定位脳生検術や開頭脳腫瘍生検術が標準的な診断方法であるが、PCNSLは脳深部病変を形成することも多く、生検術による出血性合併症が重大な合併症に繋がることや、小さな病変では偽陰性などのサンプリングエラーも起こることが稀ではない。また急速に進行にするため、より安全、迅速に、信頼性のある診断方法が求められている。

中枢神経原発悪性リンパ腫(PCNSL)において網羅的な遺伝子解析が進み、Myeloid differentiation primary response gene(MYD 88)のmutationを高率に認め、driver mutationとして注目されている(Ngo VN et al, 2011)。この変異によりNF- κ B経路が恒常的活性化することによって腫瘍増殖・進展の中心的役割を果たしていると考えられている。さらに全身性リンパ腫と異なり、MYD88 mutationの変異の頻度は67.7-94.4%と高率であることが報告されている(Nakamura T et al, 2016)。

また近年、体液中に腫瘍がアポトーシスを起こすことで生じるcell free DNA(cfDNA)が微量に含まれることがわかってきており、低侵襲なmolecular diagnosisとして注目されているが、これまでPCNSLの髄液からの検討はされていないため、本研究ではCNS lymphoma症例の髄液からどの程度信頼性を持って検出可能かどうかの解析を行なった。

【方法】対象は新潟大学脳神経外科で加療を行なった20例のPCNSLと6例のsystemic lymphomaのCNS転移を認めた症例の計26例のCNS lymphomaとした。PCNSLの診断はWHO classificationに従いCD20陽性DLBCLという病理診断と全身病変の除外によりおこなった。髄液は全例腰椎穿刺より採取した。髄液1mlからMaxwell RSC cfDNA抽出キットを用いてcfDNA抽出を行った。続いてSanger sequenceとdigital droplet PCR(ddPCR)を組み合わせて、MYD88 mutationの検出を試みた。また生検を行い充分量の腫瘍組織が得られた21例からもFFPEからDNA抽出を行い、同様のDNA解析を行い、cfDNAの結果との比較を行った。

【結果】

1) Detection of MYD88 Mutation in cfDNA

1ml の CSF から平均 188.8(6-342) ng DNA の検出が可能であった。Sanger sequence と ddPCR を利用することで 76.9%(26 例中 20 例) で髄液から mutation の検出が可能であった。内訳では PCNSL では 80.9%(21 例中 17 例)、systemic lymphoma では 60.0%(5 例中 3 例) であった。MYD88 の変異は Exon5 における L265P 変異が最も多く 95%を占め、1 例が Exon3 における S219C の点突然変異であった。組織からの MYD88 mutation の評価が可能であった 21 例では MYD88 遺伝子解析結果は全例で cfDNA の結果と一致した。

2) Comparison of Sanger Sequencing and ddPCR

続いて Sanger Sequencing と ddPCR の比較を行なった。Sanger Sequencing では 10 例で overlapping peak の検出不能な症例や判断困難な症例であり、ddPCR 法ではこの 10 例中 4 例に MYD88 変異の検出が可能であった。この ddPCR のみで検出できた群は Sanger Sequencing 単独で検出できた群と比較すると、優位を持って cfDNA 量が少なかった ($P = .029$)。また cfDNA 濃度と関連する因子として画像上の髄膜播種が分かり、髄膜播種を認める症例では優位さを持って高い cfDNA 濃度を認めた ($p = .023$)。腫瘍のサイズ、髄液中のタンパク濃度、髄液中のアルブミン濃度は cfDNA 濃度と関連したが、相関係数は低かった (R value, 0.443 to 0.502)。cfDNA の安定性を検討するために、 -80 度で凍結保存するまでの時間の検討を行なった。髄液採取後に、plain tube に 4°C 、2 時間保存したところ採取可能な cfDNA の濃度は迅速に処置したものと比較すると約 1/3 まで減少していた。

【考察】

CNS lymphoma の髄液 1ml から cfDNA の抽出、高率に mutation の検出が可能であった。21 例の十分量の組織採取可能な症例における FFPE の結果とは 100%結果が一致した。今回の結果からは Sanger sequence と ddPCR を組み合わせて適切な cfDNA の処理を行うことが重要であることがわかった。

本検討における CNS lymphoma の MYD88 mutation の髄液からの検出率は 76.9%であり、既報の血液からの検出率 (32~57.1%) よりも高い検出率が得られた。また ddPCR は Sanger sequence と比較するとおよそ 100 倍の検出力を認め、特に cfDNA 量の少ない症例で有効であり、特に脳幹部病変や造影されない症例であった。一方で髄膜播種を伴う症例では cfDNA 量は十分量の DNA が採取可能であり、Sanger sequence でも十分検出可能であった。Sanger sequence では同一プライマーで hot spot 近くの rare mutation も同時に検出可能であることから、本検討では最初に Sanger sequence でスクリーニングを行い、続いて ddPCR の確認を行なった。

また DNA を利用した体液診断では十分量の cfDNA を得ることが重要である。Fontanilles らは 1ml の血漿から平均 64ng/mL の DNA が検出できたと報告しており、この量は我々の検出量のおよそ 1/8 の量であり、ddPCR の解析でも平均の fractional abundance が 4.7%と 28.5%と低い値であった (Fontanilles M et al, 2017)。このことは CNS lymphoma では髄液が血液よりも腫瘍由来の DNA を高濃度で含んでいることを示す。

MYD88 mutation は現行の多剤併用療法における予後不良のマーカーであるが、ブルトン型チロシンキナーゼ阻害薬は MYD88 mutation 変異を持つ DLBCL、PCNSL に有効であることが報告 (Grommes C et al, 2017) されており、将来の分子標的薬の時代には予後良好因子となる可能性もあり、今後は、組織診断困難例の診断、治療反応性の評価、モニタリングなどに役立つ可能性がある。

審査結果の要旨

中枢神経原発悪性リンパ腫(PCNSL)では、Myeloid differentiation primary response gene(MYD88)の変異を高率に認める。申請者はPCNSL例の髄液1mlからcell free DNA(cfDNA)を抽出しサンガー法とdigital

droplet PCR (ddPCR)にて変異の有無を解析した。また、その結果を生検腫瘍組織からの結果と比較した。髄液 1ml 由来の cfDNA を用いて、サンガー法と ddPCR をによって、76.9%で変異の検出が可能であった。内訳は 1 例の S219C を除き、検出できた全例 (95%) が L265P 変異であった。全例で髄液由来の cfDNA と組織由来の DNA の結果が一致した。サンガー法で検出できなかった 10 例中 4 例は、ddPCR 法で検出可能であった。サンガー法に比して ddPCR は約 100 倍の検出力を認めた。申請者は、PCNSL の髄液 1ml から、高率に MYD88 変異を検出していることを見出した。本方法は、組織診断困難な PCNSL 例の診断、PCNSL の治療反応性の評価、モニタリングなどに有用となる可能性がある。この点に学位論文としての価値を認める。