

論文名 : High detection rate of MYD88 mutations in cerebrospinal fluid from patients with CNS lymphomas.

新潟大学大学院医歯学総合研究科

氏名 渡邊 潤

【背景】

中枢神経原発悪性リンパ腫(PCNSL; primary central nervous system lymphoma)は予後不良の悪性脳腫瘍の1つである。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、現状では生検術による出血性合併症などの重大な合併症が生じることや、小さな病変では偽陰性と判断することが稀ではなく、安全で信頼性の高い診断方法の開発が望まれていた。

【目的】

近年 CNS Lymphoma では、腫瘍増生の driver mutation として Myeloid differentiation primary response gene (*MYD 88*)の mutation が注目されている。一方、腫瘍がアポトーシスを起こすことで生じる cell free DNA (cfDNA)が体液中に微量に含まれることがわかってきており、低侵襲な体液診断として注目されているが、これまで CNS Lymphoma の髄液からの検討はされて来なかった。そこで本研究は、CNS Lymphoma 症例の髄液から cfDNA を抽出し、Sanger 法と digital droplet PCR (ddPCR) による *MYD 88* 変異を解析することを目的とした。

【方法】

対象は新潟大学脳神経外科で生検術を施行した 20 例の PCNSL と 6 例の systemic lymphoma の中枢神経転移を認めた症例の計 26 例の CNS lymphoma とした。CNS lymphoma の診断は、全身病変の除外の上、WHO 分類に従った CD20 陽性の DLBCL という病理診断により行った。髄液は、全例腰椎穿刺で採取し、Maxwell RSC cfDNA 抽出キットを用いて採取した髄液 1ml から cfDNA を抽出し、Sanger 法と digital droplet PCR (ddPCR) の二通りの方法で *MYD88* 変異の検出を検証した。さらに生検術で腫瘍組織が得られた 21 例からホルマリン固定パラフィン包埋組織(FFPE)からも DNA 抽出し、同様に *MYD88* 変異の有無を検出し、cfDNA の結果と比較検討した。

【結果】

1) cfDNA における *MYD88* 変異解析

髄液 1ml から平均 188.8 (6-342) ng DNA の検出が可能であった。Sanger 法と ddPCR を利用することで、26 例中 20 例 (76.9%) で髄液から *MYD88* 変異の検出が可能であった。内訳は、PCNSL では 21 例中 17 例 (80.9%)、systemic lymphoma 中枢神経転移

では5例中3例(60.0%)であった。*MYD88* 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* 変異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) Sanger 法及び ddPCR の比較

Sanger 法と ddPCR の検出結果を比較すると、Sanger 法では10例で変異ピークが検出不能または判断困難であり、ddPCR 法ではこの10例中4例で *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 法で検出しえた群と比較すると、有意に cfDNA 量が少なかった ($p = 0.029$)。また、cfDNA 濃度と関連する因子として画像上の髄膜播種が挙げられた ($p = 0.023$)。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 値 0.443–0.502)。また髄液採取後の cfDNA の安定性は、髄液採取後に滅菌スピッツに 4°C、2 時間保存した後に -80°C に保存したものは、採取後すぐに -80°C に保存したものと比較すると DNA 量は約 1/3 まで減少していた。

【考察】

今回の検討から Sanger 法と ddPCR を組み合わせて *MYD88* を検出することと、迅速に髄液を保存したもののから cfDNA を抽出することが重要であることとわかった。

本検討における CNS lymphoma の *MYD88* 変異の、髄液 cfDNA 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 法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、脳幹部病変や造影されない症例でも検出可能であった。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 法でも *MYD88* 変異が検出可能であった。

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 1 ml 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 の解析でも平均のバリエーション対立遺伝子頻度(VAF)も 4.7%と低い値であった (Fontanilles *et al.*, *Oncotarget*, 2017)。このことは CNS lymphoma では髄液に血液よりも腫瘍由来の DNA を高濃度で含んでいることが示唆された。

【結論】

PCNSL では、十分量の cfDNA を得るため、髄液を迅速に処理した上で、Sanger 法と ddPCR を組み合わせることで *MYD88* 変異が検出できるため、将来の体液診断法として有望である。