

【要約】

**Genetic subtype classification using a simplified algorithm and
mutational characteristics of diffuse large B-cell lymphoma
in a Japanese cohort**

(びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫の遺伝子変異解析に基づく簡易
アルゴリズムを用いたサブタイプ分類および日本人における特徴)

千葉大学大学院医学薬学府

先端医学薬学専攻

(主任： 横手 幸太郎 教授)

三科 達三

【目的】びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫 (DLBCL) は、悪性リンパ腫の中で最も発症頻度が高く、非ホジキンリンパ腫 4 分の 1 程度を占める。抗 CD20 抗体薬であるリツキシマブの開発により、標準化学療法である R-CHOP 療法で 60%程度の長期生存が望めるようになったが、その後 10 年以上標準治療は変わらず、結果として治療成績の改善も得られていない。主な理由として、DLBCL が非常に多様性に富む疾患であることがあげられる。WHO 分類 2017 では 13 のサブタイプが定義されているが、多くの症例が「分類不能型」と診断される。これらを細分化する分類としてマイクロアレイによる遺伝子発現の網羅的解析を基にした cell-of-origin 分類があり、実臨床においては前述の分類をより簡素化し CD10、BCL6、MUM-1 の免疫組織学的検討に基づいて GCB 型と non-GCB 型に分類する Hans アルゴリズムが頻用される。しかし、これらの分類が治療方針の決定に用いられることはなく、臨床的に有用な分類は未だ確立していない。

近年の次世代シーケンサーの普及により、網羅的遺伝子変異・発現解析結果に基づく分子遺伝学的分類が複数の研究グループから報告された。特に、MYD88, NOTCH2, BCL2, SGK1 遺伝子関連の 4 つの分子遺伝学的サブタイプはすべてのグループから共通して報告されている。それぞれの分子遺伝学的サブタイプは異なる生存率を示し予後予測として有用であり、さらに異なる pathway に関連し分子標的薬の治療ターゲットとしても期待されている。これらの分子遺伝学的分類は DLBCL における新たな分類として有望であるが、問題点として、いずれも機械学習をベースにした複雑な分類手法を用いており実臨床への応用が困難であること、診断過程で得ることが可能なホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 標本を用いた解析が少ないこと、日本人コホートの遺伝子変異解析の報告が限られていることが挙げられる。そこで、本研究は、臨床応用を見据えた簡便な手法による分子遺伝学的分類の確立、および日本人 DLBCL の遺伝学的特徴の解明を目的とした。

【方法】2013 年～2018 年の間に千葉大学医学部附属病院で DLBCL またはその亜型と診断された症例を対象とし、診断過程で得たホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 標本を用いた。CD10, BCL6, MUM1 の免疫組織学的検討をもとに、Hans アルゴリズムを用いて Cell-of-origin を GCB 型と non-GCB 型に分類した。また fluorescence in situ hybridization (FISH) 法を用いて BCL2, BCL6, MYC の再構成の有無を検討した。遺伝子変異解析については、ターゲットキャプチャー法によるターゲットシーケンスを行い、144 遺伝子について変異解析を行った。分子遺伝学的サブタイプは、機械学習を用いずに実臨床にそのまま用いることのできる簡易アルゴリズムを作成して分類した。

既報をもとに MYD88, NOTCH2, BCL2, SGK1 の 4 つのサブタイプに特異的かつ頻度の高い 23 遺伝子を抽出し、FISH 法とターゲットシーケンス法による遺伝子の再構成および変異の結果をもとにそれぞれのサブタイプに分類した。いずれのサブタイプにも分類されない症例は”not elsewhere classified (NEC) group”と定義した。

【結果・考察】 2013 年～2018 年の間に DLBCL と診断された 234 例のうち、予後情報を得られ、FFPE 検体から十分量の DNA を抽出してターゲットシーケンスを施行できた 177 例を解析対象とした。177 例のうち 19 例については、凍結保存検体も利用可能であった。年齢中央値は 69 歳（18-92 歳）、ステージIII/IVの進行期症例は 56%、国際予後スコア（IPI）に偏りは見られなかった。Cell-of-origin は non-GCB type が 58%とやや多く、FISH 法による BCL2, BCL6, MYC 遺伝子の再構成を有する割合はいずれも既報と同程度であった。87%の症例が初回治療に対して奏功が得られた。生存期間中央値は 2.9 年、5 年無増悪生存率（PFS）は 54%、5 年全生存率（OS）は 71%であった。総じて一般的な DLBCL コホートと考えられた。

まず、FFPE 検体と凍結保存検体の両方が利用可能な 19 例においてシーケンス結果を比較した。同定された変異について FFPE 検体と凍結保存検体のすべての組み合わせを Jaccard 係数で比較した結果、同一の症例において高い係数を示し、1 検体あたりの変異数を比較したところ、FFPE 検体と凍結保存検体に明らかな差はなかった（ $p = 0.32$ ）。以上より、FFPE 検体と凍結保存検体でシーケンスの結果は同等であることを確認した。

前述の手法を用いて本研究コホートを分類したところ、65%の症例で遺伝学的サブタイプが同定された。特に MYD88 は 27%と既報の欧米コホートに比べて高頻度であった。また、各サブタイプと cell-of-origin の関連については、MYD88, NOTCH2 で non-GCB 型が多く、BCL2, SGK1 で GCB 型が多く、既報と同様の傾向を示した。

次に、簡易アルゴリズムの妥当性を検証した。米国国立がん研究所(NCI)から報告された分類ツールである LymphGen を用いて本研究コホートの解析を行ったところ、簡易アルゴリズムとの全体のサブタイプ一致率は 80%と良好であり、サブタイプごとの一致率もおおむね 80%であった。さらに、簡易アルゴリズムと LymphGen を用いて既報の UK コホートデータの再解析をしたところ、両者のサブタイプ的一致率は 81%であった。以上から簡易アルゴリズムの妥当性を確認した。

簡易アルゴリズムにより分類された結果を用いて Kaplan-Meier 曲線による生存解析を行ったところ、本研究コホートにおける PFS は、SGK1 が良

好、BCL2, NOTCH2 が中間、MYD88 が不良な傾向であった (4-way, $p = 0.096$)。特に MYD88 は他の 3 群と比べて有意に予後不良であった ($p = 0.016$)。UK コホートにおいても 4 群の PFS は同様の傾向を示し、統計学的有意差を認めた (4-way, $p < 0.0001$)。

日本人 DLBCL の遺伝学的特徴に焦点をあてて更なる解析を行った。本研究コホートでは、MYD88 サブタイプ関連の遺伝子変異が高頻度にみられ (*PIMI*: 45.2%, *MYD88*^{L265P}: 28.2%, *CD79B*: 23.1%)、*OSBPL10* 変異を 26.5% と欧米の既報に比べ高頻度に認めた点が特徴的であった。*OSBPL10* 変異の存在は、DLBCL の予後不良因子である MYD88 サブタイプと中枢神経浸潤に有意に関連がみられた。興味深いのは、これら 2 つの予後不良因子を有さない DLBCL122 例においては、*OSBPL10* 変異の存在はむしろ予後良好に寄与する傾向があった ($p = 0.07$)。*OSBPL10* は DLBCL において二面的な特徴をもつ可能性が示唆された。

次に、予後不良な亜型として日本から多く報告されている CD5 陽性 DLBCL 29 例について解析した。遺伝学的サブタイプをみると、CD5 陽性群は 52%が MYD88 に分類され、CD5 陰性群の 22%に比べ明らかに高頻度であった。また、CD5 陽性群では *CD58* の機能喪失型変異 (frameshift/nonsense 変異) を遺伝学的サブタイプと関係なく高頻度に認めた。*CD58* の機能喪失型変異は DLBCL 腫瘍細胞の免疫逃避に関与し予後不良に寄与することが知られている。これらのことより、CD5 陽性 DLBCL が予後不良である理由として、MYD88 サブタイプおよび *CD58* の機能喪失型変異が関連している可能性が示唆された。

最後に、同じく日本から報告の多いメソトレキセート関連リンパ増殖性疾患 (MTX-LPD) 14 例について解析した。MTX-LPD は、一部の症例においては MTX の中断のみで腫瘍が縮小することが特徴的である。MTX の中断で腫瘍が縮小した 6 例と比較して、追加の化学療法を要した 8 例においては、1 検体当たりの遺伝子変異数が明らかに多く、ほとんどの症例が遺伝学的サブタイプに分類された。MTX-LPD のうち追加の化学療法を必要とする一群は、遺伝学的背景が *de novo* DLBCL に類似する可能性が示唆された。

【結論】 DLBCL を分子遺伝学的に分類するために、本研究で考案したターゲットシーケンスと FISH 法を併用した簡易アルゴリズムは、実臨床において有用であることが示された。また、日本人 DLBCL に特徴的な遺伝子変異を同定した。