

研 究 実 績 報 告 書

平成 25 年 4 月 23 日

財団法人愛知県がん研究振興会理事長 殿

主任研究者

所 属 愛知県がんセンター（研究所）・
遺伝子医療研究部

氏 名 片山 幸

平成 24 年度における研究成果を報告します。

1 研究課題名

(和 文)	初発時と再発時のゲノム異常の比較による、 再発 DLBCL 症例の特徴の検討
(英 文)	Characteristics of genomic aberrations of relapsed DLBCL; by array CGH for sequential sampling analysis

2 研究組織（分担研究者）

所 属	職 名	氏 名
愛知県がんセンター（研究所）・ 遺伝子医療研究部	主任研究員	片山 幸

研究実績報告

びまん性大細胞型B細胞性リンパ腫(以下 ; DLBCL)は、B細胞性リンパ腫のうち、4割を占める最大病型である。抗CD20抗体であるrituximabの導入により予後は大幅に改善されたものの、5年生存率は約55%にとどまっている。すなわち、再発し、治療不応性となる症例が半数近くを占める。これまで主任研究者らは、このDLBCLの初発時におけるゲノム異常に対する解析をアレイCGH(comparative Genomic Hybridization)法を用いて行い、疾患と関連する重要なゲノム異常とその責任遺伝子についての検討を行ってきた(文献1)。一方、主任研究者の所属する研究室には、これまで1,000例以上のゲノム異常解析の経験があり、また貴重な患者検体の蓄積がある。このため、今回の研究では、従来のDLBCL研究をさらに発展させるべく、初発及び再発の連続検体を用いて、ゲノム異常の継時的変化に対する検討を行った。

このため、まずゲノム異常解析方法の確立を行った。①これまでのDLBCLの解析に用いた2000プローブの載ったBacterial Artificial Chromosome (BAC)アレイグラスより、プローブ数が4万プローブと多いオリゴヌクレオチド (60 mer)が掲載されたアレイグラスを使用し、最終的に、より詳細かつ正確にゲノム異常領域の同定が可能である40万プローブの記載されたグラスを利用することに決定した。②これまでのBACアレイと比べて、今回用いたオリゴヌクレオチドアレイを用いた解析は、データの分散がより大きく、バックグラウンドが高い。この為ゲノム異常領域の同定を行うことが難しいことや(偽陰性)、逆にバックグラウンドを真のゲノム異常と誤って判定すること(偽陽性)がある。このため、バックグラウンドの補正方法を確立した。

解析方法の確立後、再発症例における詳細な検討を行った。①連続症例の比較から、ゲノム異常は一定ではなく、新たな異常が加わるだけではなく、今までの異常が消失してしまうことがすべての症例で見られ、クローナルエボリューションが起こっていることが示唆された。更に②共通するゲノム異常の検討から、再発症例に特徴的なゲノムプロファイルを得ることができたが、これはDLBCL(再発を含まない)のゲノムプロファイルとよく似ていた。更に再発症例で新たに加わったゲノム異常の検討を行い、DLBCLの発症及び再発に重要な役割を果たしていると考えられるゲノム異常領域を同定した。

再発DLBCLの連続病変のアレイCGHの解析から、DLBCLの初発・再発の経過中にゲノム異常の追加が起こる一方、これまであったゲノム異常も消失することが判明した。また、再発のゲノム異常というよりむしろ初発再発に共通して、DLBCLの発症に重要なゲノム異常が存在する事が判明した。今後、さらにこの領域の責任遺伝子を同定することで、今後の治療に役立てたいと考えている。

アレイ CGH によるゲノム異常領域の検出方法の確立① 40 万プローブ掲載のアレイの

使用

初発/再発/再再発検体をもつ DLBCL の 10 患者の 22 検体について、オリゴレイ CGH を行った。当初、4 万 4 千プローブ掲載されたアレイグラス (Agilent 社) を使用したが、一つ一つの掲載プローブ数に対しての variation が大きく、検出が困難であるゲノム異常がいくつか見られたため(図 1(上))、40 万プローブ掲載のアレイグラス (Agilent 社) を用いて解析を行うこととした(図 1(下))。

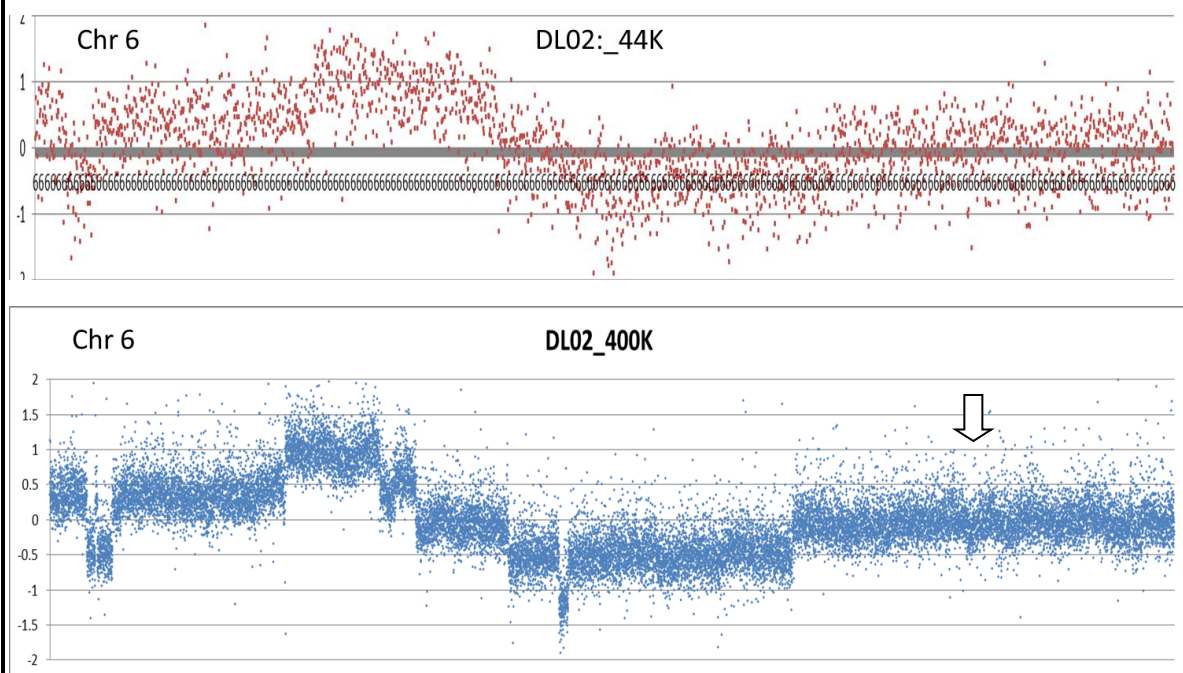


図 1: 同一検体における染色体 6 番のアレイ CGH の結果。(上) : 4 万 4 千プローブ掲載のグラスによる。(下) : 40 万プローブ掲載のアレイによる解析では、4 万 4 千プローブ掲載のアレイグラスと比べて、より詳細で正確なゲノム異常を同定可能であった。しかし基線の揺れ(矢印)が見られ、これらがゲノム異常によるものなのかバックグラウンドであるのか判定できない。X 軸: 6 番染色体 p から q までの位置。Y 軸: 正常に対する相対的な腫瘍 DNA 量($\log_2$ ratio)。0 より大きい場合、腫瘍 DNA の増幅が、0 より小さい場合、腫瘍 DNA の欠失が示唆される。

アレイ CGH によるゲノム異常領域の検出方法の確立② バックグラウンドの補正

図 1(下)で示したように、また図 2 (上)に示すように、40 万プローブ記載のアレイグラスに使用で、単独の染色体内においても詳細なゲノム異常を同定することが可能となった。ところが、理論上それぞれのゲノム異常領域および異常のないところで、 $\log_2$ ratio は一定の値を示すはずであるのに、実際には 0.2 程度までの分散を示し、更にはその中での波状の揺れが見られる(図 1(下))。このため、名古屋工業大学の竹内一郎准教

授と共同研究を行い、この波状の揺れを取り除くための解析ソフトウェアを開発したところ、揺れは消失し、ゲノム異常領域の同定が容易になった(図2)。現在、ソフトウェアの改善を行っている。

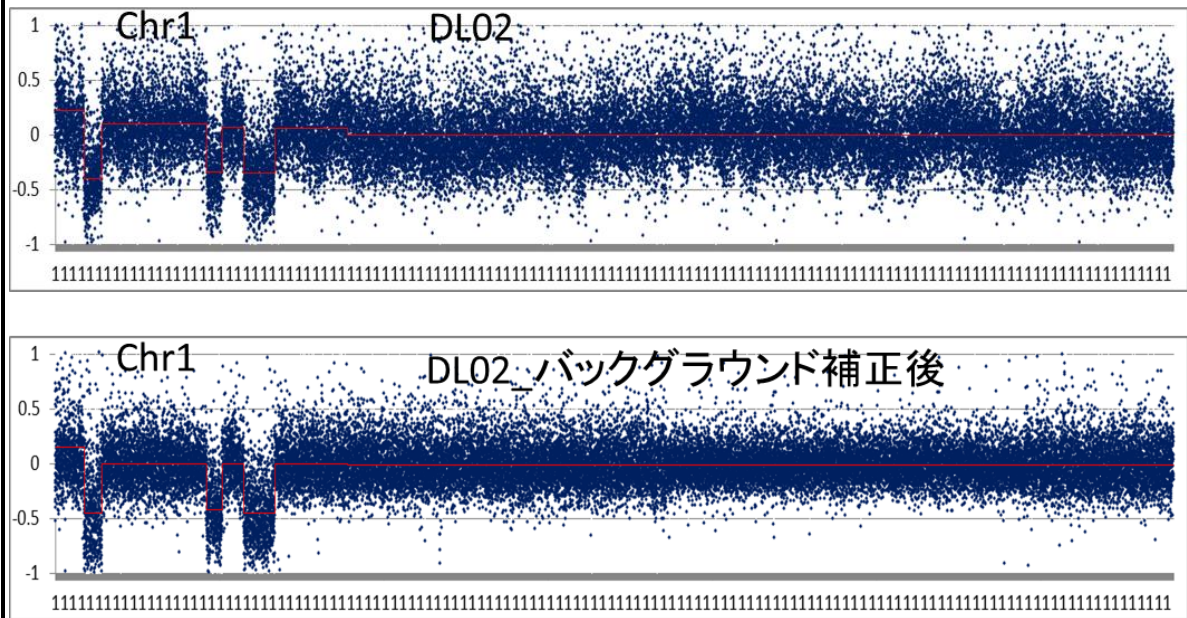


図2: バックグラウンド補正前(上)と補正後(下)のアレイ CGH 結果。補正後、分散の幅は大きく変わらないが、(上)にあった波状の基線の揺れが消失し、ゲノム異常領域と正常領域が明確に区別できるようになった。

連続病変におけるゲノム異常の変化の一例を図3に示す。ここで見られるようにすべての症例で、再発前と再発時で多くのゲノム異常については共通していたが、これまであったゲノム異常領域が消え、新たなゲノム異常が加わっていて、腫瘍クローンの進化(クローナル・エボリューション)が起こっていることが判明した。

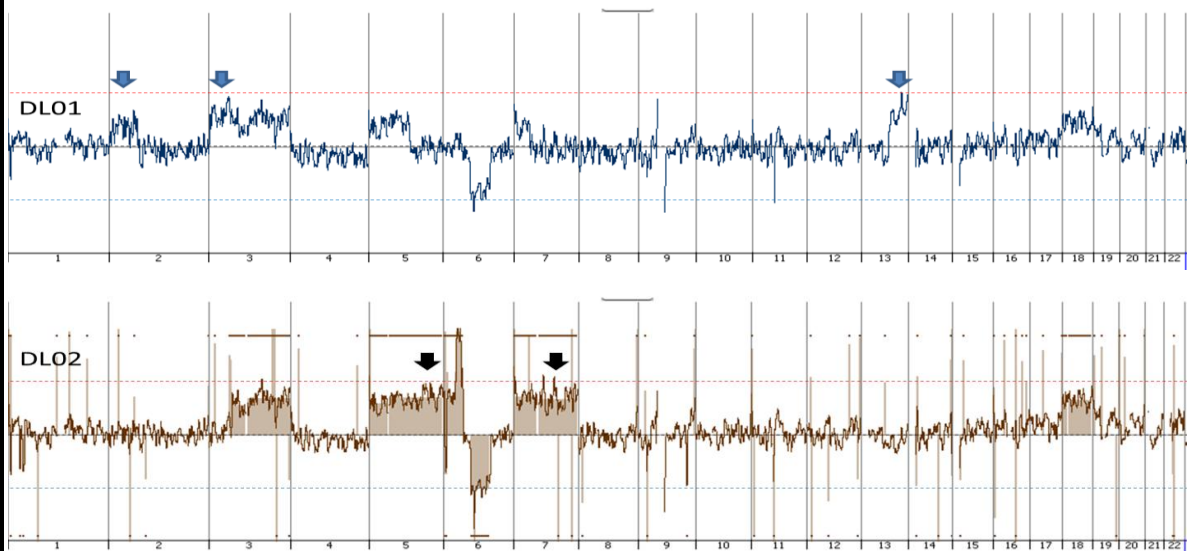


図3:初発時(上)と再発時(下)におけるアレイ CGH の変化。ゲノム異常の多くは共通していたが、初発時に見られたゲノム異常のいくつかは消失し(上、青い矢印)、再発時に新たなゲノム異常が加わっている(下、黒い矢印)X 軸:1 番から 22 番染色体の位置。Y 軸:正常に対する相対的な腫瘍 DNA 量(log2 ratio)。

ゲノム異常領域の検討② 共通するゲノム異常の検討

全ての症例におけるゲノム異常を図3に示す。再発症例に対する特徴的なゲノムプロファイルを見出すことができたが、DLBCL のゲノム異常とよく似たパターンを示した。一方、再発症例で新たに出現したゲノム異常領域についての検討を行ったところ、7q の頻度が高かった。ここは再発前からすでに増幅している症例も多く、DLBCL の発症、再発に重要な遺伝子異常であると考えられた。ここには、M16804、TARP、BC017861、TYW1 等の遺伝子が存在しており、これらのうちどれかが DLBCL の発症と関する責任遺伝子である可能性があり、今後検討する必要がある。

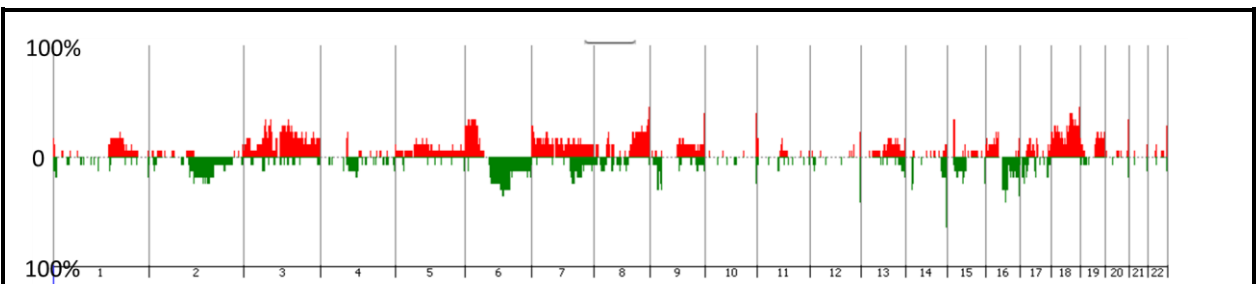


図 4:すべての再発症例におけるゲノム異常の割合。染色体 3 番、6p、7 番、8q、18 番の増幅(赤)が見られた。一方 2q、6q、9p の欠失が見られ(緑)、再発症例に特徴的なゲノム異常プロファイルを示すことができた。このプロファイルは DLBCL の初診時のゲノム異常とよく似ていた。X 軸:1 番から 22 番染色体の位置を示す。Y 軸:ゲノム異常を示す割合。基線より上が増幅を示す症例の割合(赤)、下が欠損を示す症例の割合を示す(緑)。

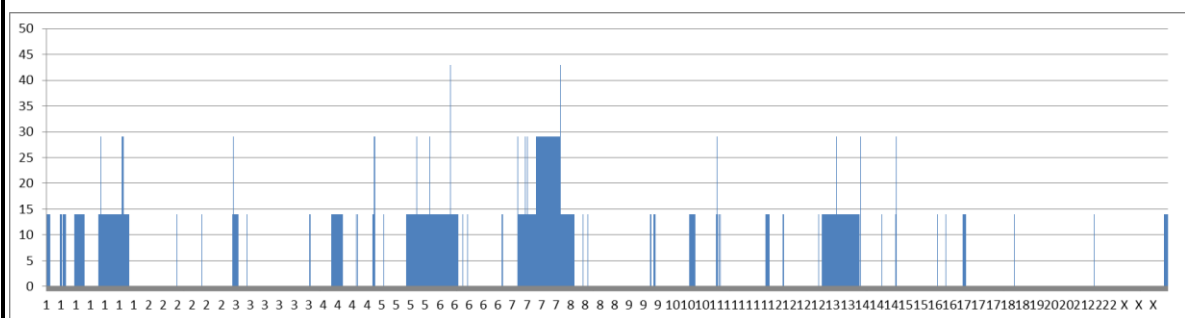


図 5:再発症例に新たに見いだされたゲノム異常の割合。7q において新たに増幅異常が加わる症例があり、また初診時より異常である症例も多く、DLBCL の発症及び再発に重要な染色体領域であると考えられた。X 軸:1 番から 22 番染色体の位置を示す。Y 軸:再発症例において新たにゲノム異常が加わる割合。

文献

Liu F, Yoshida N, Suguro M, Kato H, Karube K, Arita K, Yamamoto K, Tsuzuki S, Oshima K, Seto M.: Clonal heterogeneity of mantle cell lymphoma revealed by array comparative genomic hybridization. Eur J Haematol., 90: 51-58, 2012. (PMID: 23110670)

Karube K, Tsuzuki S, Yoshida N, Arita K, Kato H, Katayama M, Ko Y-H, Ohshima K, Nakamura S, Kinoshita T, Seto M.: Comprehensive gene expression profiles of NK cell neoplasms identify vorinostat as an effective drug candidate. Cancer Letter, 333: 47-55. 2013. (PMID: 23348693)