

# 博士論文

次世代シーケンサーを用いた中枢神経系原発  
悪性リンパ腫の遺伝子変異プロファイルの解明

福村 知隆

## 目次

1. 要旨.....	2
2. 序文.....	3
3. 方法.....	8
4. 結果.....	16
5. 考察.....	53
6. 引用文献.....	59
7. 謝辞.....	68

## 1. 要旨

中枢神経系原発悪性リンパ腫（primary central nervous system lymphoma: PCNSL）は中枢神経系に限局する稀な悪性リンパ腫であり、病理学的にびまん性大細胞型 B 細胞性リンパ腫に分類されている。全ての中枢神経系腫瘍の 2-3% を占めており、平均生存期間は 2-4 年と極めて予後不良な疾患である。我々は 41 症例の PCNSL 腫瘍組織と末梢血単核球を用いて全エクソン解析を行い、さらに 30 症例の PCNSL 腫瘍組織を用いて mRNA 解析を行った。その結果 *MYD88* や *GNAI2* の変異、*PIMI* や *BTG2* の体細胞超変異、NF- $\kappa$ B 経路関連遺伝子の変異が高頻度に検出された。さらに *HLA-C* 遺伝子の変異が 14.6%で、染色体 7q35 のコピー数増大が 12.2%の頻度で検出され、これらの異常が PCNSL 患者の予後と密接に関連していることが示唆された。

## 2. 序文

悪性腫瘍は昭和 56 年以降日本人の死亡原因の第 1 位となっており、厚生労働省の発表によると平成 26 年においては悪性腫瘍による死亡率は全体の 28.9% を占めている。これはおよそ 3.5 人に 1 人が悪性腫瘍により死亡していることを示しており、第 2 位である心疾患が 15.5%、第 3 位である肺炎が 9.4%であることを考慮すると、悪性腫瘍に対する治療改善は日本人にとって極めて重要であり、緊急を要するものであるといえる。

悪性腫瘍の発生には遺伝子を構成する塩基の点突然変異、挿入・欠失、さらには遺伝子融合が深く関与することが知られている。その代表的なものとして、非小細胞肺癌での上皮成長因子受容体 (*EGFR*) 遺伝子の点突然変異 [1]、卵巣がんでの *TP53* 遺伝子の欠失 [2]、慢性骨髄性白血病での *BCR-ABL* [3]や非小細胞肺癌での *EML4-ALK* [4]などの遺伝子融合が挙げられる。*EGFR* 活性型変異陽性非小細胞肺癌に対する *EGFR* キナーゼ阻害薬ゲフィチニブ (商品名イレッサ) [5]や *BCR-ABL* 陽性慢性骨髄性白血病に対する *ABL* キナーゼ阻害薬イマチニブ (商品名グリベック) [6]、さらには *EML4-ALK* 陽性非小細胞肺癌に対する *ALK* 阻害薬クリゾチニブ (商品名ザーコリ) [7]などの治療薬がそれぞれのがん患者の無増悪生存期間・全生存期間を著明に改善したことから、発が

んに寄与する遺伝子異常を同定し、それらをターゲットとする「分子標的療法」  
ががん治療において極めて有効であると考えられる。

次世代シーケンサーの登場により旧来の DNA シーケンサーでは不可能であ  
った膨大なゲノム情報を短時間かつ安価に得ることが可能になった。実際、が  
んゲノムの体細胞変異を大規模にスクリーニングする **International Cancer  
Genome Consortium (ICGC)** が 2008 年に発足し、50 種類のがん種からそれぞれ  
500 検体の全ゲノムをシーケンスするプロジェクトが行われている。日本でもウ  
イルス感染を伴う肝臓がんの解析が割り当てられ、国立がん研究センターなど  
で研究が行われている [8]。また同様のプロジェクトとして米国の **The Cancer  
Genome Atlas (TCGA)** があり、20 種類以上のがん種から 500 検体をシーケンス  
するプロジェクトが行われている。さらに、ハーバード大学とマサチューセッ  
ツ工科大学が共同で運営している **Broad Institute** では 1000 種以上のがん細胞株  
から遺伝子変異、DNA コピー数、RNA 発現解析を行う **Cancer Cell Line  
Encyclopedia (CCLE)** が行われている。このように、現在世界中で様々ながん  
ゲノムシーケンスプロジェクトが行われており、発がんのメカニズム解明や治  
療ターゲットとなる遺伝子の探索が行われている。また、次世代シーケンサー  
はがんゲノムのシーケンス以外にも様々な目的で使用されており、遺伝子発現

解析や選択的スプライシングの定量化のための transcriptome sequencing、microRNA のプロファイリングのための small RNA sequencing、タンパクと DNA の相互作用のゲノムワイドマッピングのための chromatin immunoprecipitation-sequencing (ChIP-Seq) など多くの研究で利用されている [9]。

中枢神経系原発悪性リンパ腫 (primary central nervous system lymphoma: PCNSL) は、中枢神経系に限局する稀な非ホジキンリンパ腫であり、その多くが病理学的にびまん性大細胞型 B 細胞性リンパ腫 (diffuse large B-cell lymphoma: DLBCL) に分類されている [10]。PCNSL は全ての中中枢神経系腫瘍の 2-3% を占めており、平均生存期間は 2-4 年と極めて予後不良な疾患である [11]。好発年齢は 50-70 歳であり、その発生率は増加傾向にある [12]。発症に関与する因子としてエプスタイン・バーウイルス (Epstein-Barr virus: EBV) やエイズウイルス (human immunodeficiency virus: HIV) などのウイルス関連が知られているが、ウイルス感染によるものでない症例も多くあり、その発症原因は依然として不明のままである [13, 14]。また、頭蓋内にはリンパ節が存在しないにも関わらずリンパ腫が発生してしまうことから、PCNSL の発生が頭蓋内で生じているのか頭蓋外で発生したリンパ腫細胞が頭蓋内に侵入したものであるのかは依然として議論中である。治療面においては、全身性の DLBCL に対して通常用いられる

CHOP (シクロフォスファミド、ドキソルビシン、ビンクリスチン、プレドニゾン) 療法が PCNSL ではほとんど効果が得られない [15]。その原因として考えられるのは、それらの薬剤が血液脳関門を十分に通過できないためであると考えられる。そのため、PCNSL 患者に対しては高用量メトトレキサート (high-dose methotrexate: HDMTX) と全脳放射線療法 (whole brain radiotherapy: WBRT) が最も奏功する治療法として用いられている。しかしながら、この治療法は時に神経毒性等の強い副作用が現れることもあり、さらに再発もしばしば観察される [11, 16]。

このように PCNSL は極めて予後不良な疾患であるにもかかわらず、その発症頻度の低さや頭蓋内腫瘍による腫瘍組織入手の困難さから、その病態生理学的な解明が他の DLBCL に比べて立ち後れている。PCNSL 細胞における *BCL6* の過剰発現や多くの遺伝子で生じている異常な体細胞超変異 (aberrant somatic hypermutation: aSHM)、腫瘍細胞表面での免疫グロブリン M の発現といった事象は、PCNSL 細胞が B 細胞の最終分化前の胚中心後期の状態であることを示唆している [17]。最近報告された PCNSL における染色体のコピー数解析では高頻度に生じているコピー数異常が同定され、全エクソン解析では *MYD88*、*CD79B*、*ODZ4*、*TBL1XR1* らの遺伝子が頻繁に変異を起こしていることが明らかにされた

[18–20]。しかしながら、これらの報告は少数の症例による解析結果であることや正常部を用いずに腫瘍部のみで解析した際の結果であることから、PCNSL のゲノム異常の全体像を理解するためには不十分である。

以上のように PCNSL は極めて予後不良な疾患であるにも関わらず十分なゲノム解析が行われておらず、さらに有効な治療法も依然として確立されていない。従って、新たな分子標的療法の開発のためには PCNSL の発症原因を分子レベルで解明し、それら発がん原因を標的とした薬剤を開発することが最も重要であると言える。そこで本研究では、外科手術によって切除された 41 症例の PCNSL 腫瘍組織と末梢血単核球を用いて全エクソン解析および mRNA 解析を行うことにより、PCNSL のゲノム異常および発生メカニズムを解明すると共に、治療ターゲットとなりうる候補遺伝子の探索を行った。



### 3. 方法

#### 臨床検体

外科手術によって切除された PCNSL 腫瘍組織と同患者の末梢血単核球は東京大学、杏林大学、埼玉医科大学、国立がん研究センターから収集され、ゲノム解析はそれぞれの施設における遺伝子解析研究倫理審査委員会承認のもと行われた（承認番号 G3546-(21)）。臨床試料の研究利用については、それぞれの患者より書面でのインフォームドコンセントを得て行われた。

#### 免疫組織化学

PCNSL 細胞を Germinal center B cell (GCB) 型と non-germinal center B cell (non-GCB) 型に分類するため、Hans らが以前に提唱した方法を利用した [21]。簡潔に述べると、各症例の腫瘍組織のホルマリン固定した未染スライドを用いて CD10、BCL6、MUM1 の 3 種類の抗体の陽性の有無により判定を行った。CD10 陽性で GCB 型、CD10 陰性かつ BCL6 陰性で non-GCB 型と判定する。また、CD10 陰性で BCL6 陽性の場合、MUM1 陽性で non-GCB 型、MUM1 陰性で GCB 型と判定する。

## 全エクソン解析

各検体のゲノムDNAはQIAamp DNA Mini Kit (Qiagen) により抽出した。得られたゲノムDNAをアコースティックソルビライザーによって平均長200塩基対に断片化した後、NEBNext Ultra DNA Library Prep Kit for Illumina (New England BioLabs) を用いてライブラリーを作製し、全エクソン領域のみに純化するため SureSelect Human All Exon Kit (Agilent Technologies) を使用した。作製したライブラリーをペアエンド法により HiSeq2000 (Illumina) を用いて両末端から110塩基ずつシーケンスした。

HiSeq2000より得られた膨大な塩基配列情報の中から良質な情報のみを得るため、各塩基コールの質を表すQ値が20以上のリード配列のみを選び出し、さらにリード配列の重複を避けるためユニークリード配列を抽出した。その後、抽出された良質なリード配列をbowtie 2アルゴリズム

(<http://bowtie-bio.sourceforge.net/bowtie2/index.shtml>) を用いて参照ヒトゲノム配列 (hg19) にマッピングさせた。参照ヒトゲノム配列と一致しなかった塩基のうち (i) 1つのリード配列中に独立した不一致が3つ以上あるもの、(ii) ヒトの正常な遺伝子多様性に関して最も詳細なカタログを確立している"1000

genomes"データベース (<http://www.1000genomes.org>) または研究室独自に構築したデータベースの正常ヒトゲノム配列にて既に報告があるもの、(iii) 二本鎖のうちどちらか一方のみしか検出されないもの、に関しては生殖細胞系列多型または偽陽性と考え解析対象外とした。

体細胞変異は MuTect (<http://www.broadinstitute.org/cancer/cga/mutect>) と SomaticIndelDetector (<http://www.broadinstitute.org/cancer/cga/node/87>) によって検出され、遺伝子アノテーションは SnpEff (<http://snpeff.sourceforge.net>) によって行った。PCNSL における有意な遺伝子変異を同定するため MutSigCV (<https://www.broadinstitute.org/cancer/cga/mutsig>) による解析を行った。各腫瘍検体の腫瘍率およびコピー数解析は Karkinos (<http://sourceforge.net/projects/karkinos>) を用いて行った。

### **RNA-sequence (RNA-seq) 解析**

RNA抽出のために腫瘍組織をRLTバッファー (Qiagen) により可溶化し、RNeasy Mini kit (Qiagen) により純化した。その後、NEBNext Ultra Directional RNA Library Prep Kit (New England BioLabs) を用いてライブラリーを作製し、全エク

ソン解析と同様にHiSeq2000にてシーケンスした。各遺伝子の発現レベルはVST変換を用いてDESeq2アルゴリズム

(<http://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/DESeq2.html>) により算出した。

遺伝子融合はdeFuseパイプライン (<https://bitbucket.org/dranew/defuse>) によって検出した。Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) における遺伝子セットはGSEAウェブサイト (<http://www.broadinstitute.org/gsea/index.jsp>) から獲得し、登録されている全ての遺伝子セットに対して解析を行った。

### ***INO80-NUSAPI* 遺伝子融合の確認**

*INO80*と*NUSAPI*の融合点をまたぐようにプライマーを設計し、RT-PCR法により増幅した (PCRプライマー: 5'-gatttggtctatggcctcggag-3'および5'-gtgactaaagtgggatgacag-3')。その後、PCR産物の塩基配列をキャピラリーシーケンスにより確認した。

## Ion Torrentシーケンス

増幅したい領域に対するプライマーは Ion AmpliSeq Designer (<https://www.ampliseq.com/browse.action>) を利用して設計した。ライブラリー作製は Ion AmpliSeq Library Kit 2.0 (Thermo Fisher Scientific) のプロトコールに従って行った。テンプレート調製は Ion OneTouch 2 システムを用いて行い、Ion PGM (Thermo Fisher Scientific) を使用してシーケンスをした。変異解析は機器付属の Torrent Suite ソフトウェアを用いて行った。

## aSHM 標的遺伝子の解析

aSHM の標的となっている遺伝子を同定するため、Khodabakhshi らが構築した SHM indicator アルゴリズムを利用した [22, 23]。具体的には、各遺伝子の転写開始点から 2 キロベース (Kb) 以内の塩基配列を対象に (i) SHM ホットスポットモチーフ "WRCY" (ここで W はアデニン (A) またはチミン (T)、R は A またはグアニン (G)、Y はシトシン (C) または T を示す) 内での変異の割合、(ii) C:G サイトと A:T サイトでの変異の割合、(iii) 塩基転位変異と塩基転換変異の割合、に対してカイ二乗検定を行うことにより SHM indicator を算出した。

## 階層的クラスター分析

40 症例の全身性 DLBCL および 25 症例の natural killer/T-cell lymphoma (NKTCL) の体細胞変異情報は以前報告された論文から獲得した [24, 25]。NKTCL の体細胞変異に関してはミスセンス変異およびナンセンス変異のみを獲得できたため、PCNSL および全身性 DLBCL の体細胞変異もミスセンス変異およびナンセンス変異のみを利用した。3つの疾患から得られた体細胞変異情報を R ソフトウェア内のクラスター解析ツールに入力し、最も頻用されているウォード法を用いてクラスター分析を行った。

## 細胞株と培養

ヒト胎児腎由来細胞株 HEK293T (American Type Culture Collection: ATCC) は Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F12 (DMEM/F12) (Invitrogen) 培地に 10%ウシ胎児血清 (fetal calf serum: FCS) (Invitrogen)、2 mM L-グルタミン (Invitrogen)、100 units/ml ペニシリン (Invitrogen)、100 µg/ml ストレプトマイシン (Invitrogen) を加えた培養液で培養した。

## 発現プラスミド作製

*IKBKB* の野生型相補的 DNA (complementary DNA: cDNA) はヒト脂肪肉腫

細胞株 SW872 (ATCC) から RT-PCR 法により増幅した (PCR プライマー: 5'-gacagagtttagcagcagatcag-3'および 5'-acatcatgaggcctgctccag-3')。得られた PCR 産物を pcDNA3 発現ベクター (Life Technologies) に組み込み、これを発現プラスミドとした。V203I 変異の cDNA は野生型の発現プラスミドを鋳型とし、QuikChange Site-Directed Mutagenesis kit (Stratagene) を用いて作製した (PCR プライマー : 5'-agaagtacacagtgaccatcgactactggagcttc-3' および 5'-gaagctccagtagtcgatggtcactgtgtacttct-3')。

#### ウエスタンブロット

HEK293T 細胞を 6 ウェルプレートに  $4.8 \times 10^5$  細胞/ウェルでまき、発現プラスミド (2500 ng) を Lipofectamine 3000 (Life Technologies) を用いて細胞に導入した。12 時間後細胞を回収し、NP-40 lysis buffer (50 mM Tris-HCl (pH 7.4)、150 mM NaCl、1 mM NaF、1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ 、1 mM PMSF、アプロチニン (セリンプロテアーゼ)、1% NP-40) で溶解した。細胞溶解物を 10%アクリルアミドゲルで電気泳動し、セミドライ方式でポリフッ化ビニリデン (PVDF) 疎水性メンブレン (Millipore) 上にブロットした。一次抗体として IKBKB 抗体 (sc-8014) と LMNB1/2 抗体 (C-20) を Santa Cruz Biotechnology から購入し、NFKBIA 抗体 (#9242)、リン酸化 NFKBIA 抗体 (#9246)、RELA 抗体 (#8242)、リン酸化 RELA 抗体 (#3036)、ACTB 抗体 (#4970) を Cell Signaling Technology から購入した。

また、二次抗体として Anti-rabbit IgG (#7074) および anti-mouse IgG (#7076) を Cell Signaling Technology から購入した。



## 4. 結果

### PCNSLの全エクソン解析

ヒトのゲノムは繰り返し配列やイントロン、エクソンで構成されており（図1）、半数体当たり約30億塩基対からなっている。HiSeq2000で得られる情報量は両末端から100塩基ずつシーケンスした場合、およそ6000億塩基対ほどである。従って、ゲノム全体を仮に100×の重複度（1つの塩基が何回読まれたかを表す）でシーケンスしたい場合、1ラン当たり2サンプルしか解析できない。近年、ゲノムシーケンスの高速化・低価格化が進んでいるとはいえ、全ての症例の全ゲノムを解析することは現時点では現実的な戦略ではないと考える。そこで、本研究ではゲノムの約1.5%を占め、実際にタンパクをコードするエクソンのみをAgilent Technologies社のSureSelectシステムを利用することにより純化し、集中的に解析することとした（図2）。

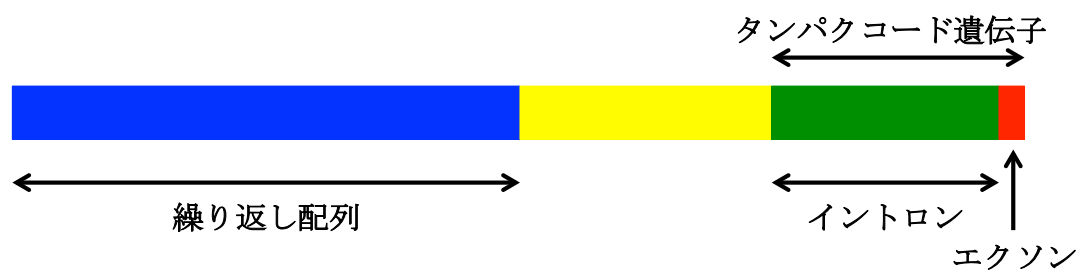
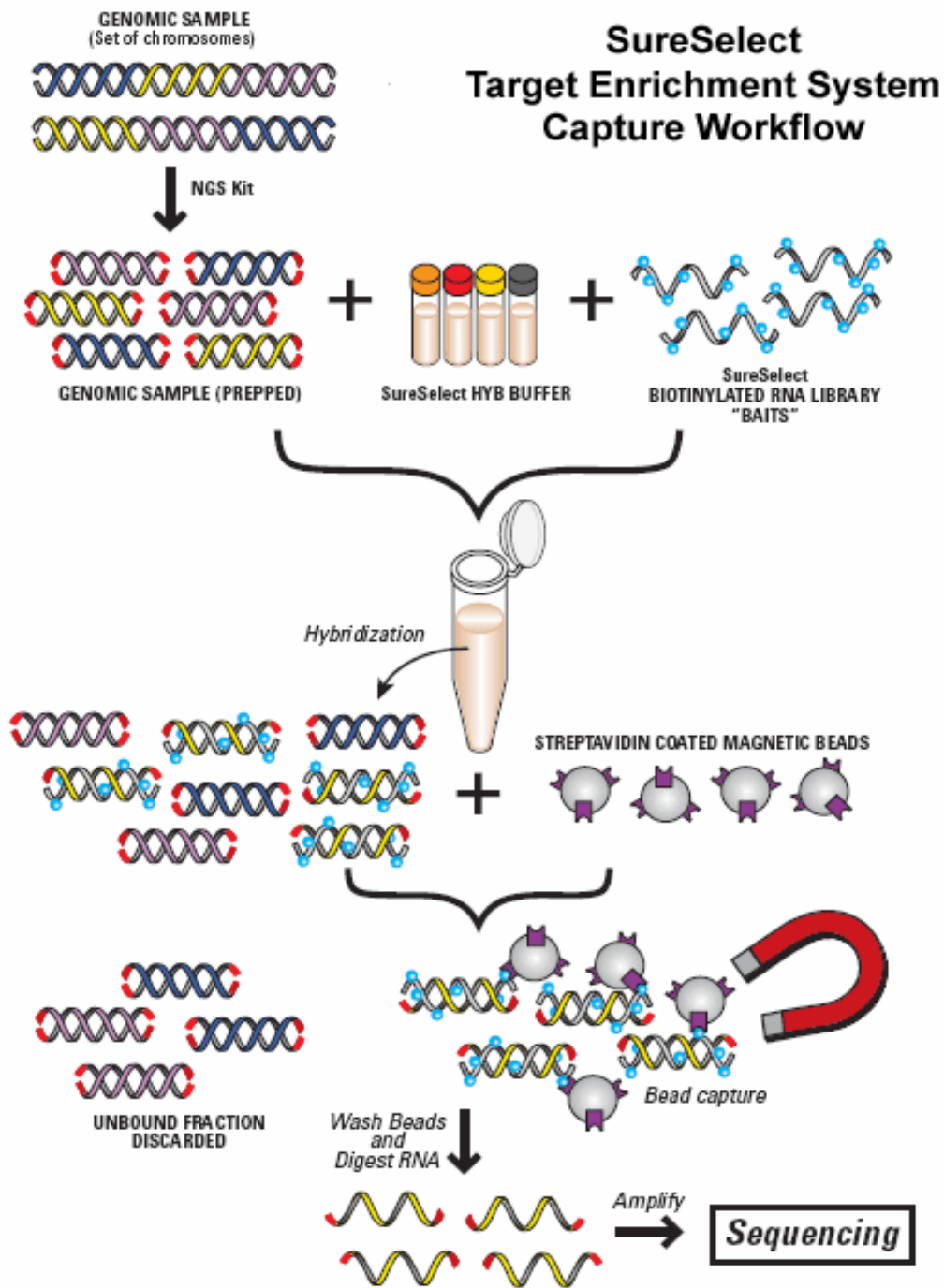


図1 ヒトゲノムの構造

ヒトゲノムの約半分の領域は繰り返し配列で占められており、タンパクコード遺伝子全体のサイズは約20%に過ぎない。しかもその中で実際に mRNA として転写されるエクソン領域はわずか1.5%ほどである。



(Agilent Technologies 社ホームページより抜粋)

**図 2 SureSelect システムによるシーケンスキャプチャー**

あらかじめキャプチャーしたい配列に対応する RNA プロブをビオチン化した状態で用意しておく。ゲノム DNA を断片化した後、熱変性し、上記 RNA プロブとハイブリダイズさせる。その後ストレプトアビジン結合磁気ビーズで RNA プロブ・DNA 断片複合体を純化する。

我々は外科手術により切除された41症例のPCNSL腫瘍組織と末梢血単核球を得ることができた。病理学的にPCNSLのおよそ90%はDLBCLに分類されるが、残り10%はバーキットリンパ腫やT細胞リンパ腫などに分類される [16]。本研究で収集されたPCNSLはすべてDLBCLと診断されたものであり、現在のWHO分類に従えば中枢神経系に局在する原発性DLBCLとなる。また、41症例のうち、39症例は未治療検体であり、2症例は再発検体である。さらに、全身性DLBCL細胞は分化段階での違いによりGCB型とnon-GCB型に分類されるため [26]、本検体においても免疫組織化学を用いて調べた。その結果7症例がGCB型であり、32症例がnon-GCB型であることが明らかとなった。EBV感染は全ての症例で陰性であった (表1)。

各症例の腫瘍組織および末梢血単核球から抽出されたゲノムDNAをSureSelectシステムによりエクソン領域のみに純化し、次世代シーケンサーHiSeq2000にて解析した。読み取り重複度の平均は腫瘍部で158x、末梢血単核球で81xであり、全エクソンの98%以上を網羅することに成功した。41症例のPCNSL解析で同定された計17,385種類の体細胞変異のうち、アミノ酸の置換をもたらす変異(非同義変異)の数は10,765(62%)であった。これはアミノ酸の置換をもたらさない変異(同義変異)のおよそ2.5倍に相当した(図3)。HiSeq2000

システムによって検出された体細胞変異が正確なものであるか確認するため、総計 84 変異を選び出し、Ion Torrent システムでシーケンスを行った。その結果、全ての変異が Ion Torrent においても検出され、HiSeq2000 による変異解析の結果が極めて良質なものであることが示された (表 2)。また、各腫瘍検体の腫瘍率を Karkinos アルゴリズム [27]を用いて算出した結果、平均腫瘍率は 69.0%であった (図 4)。

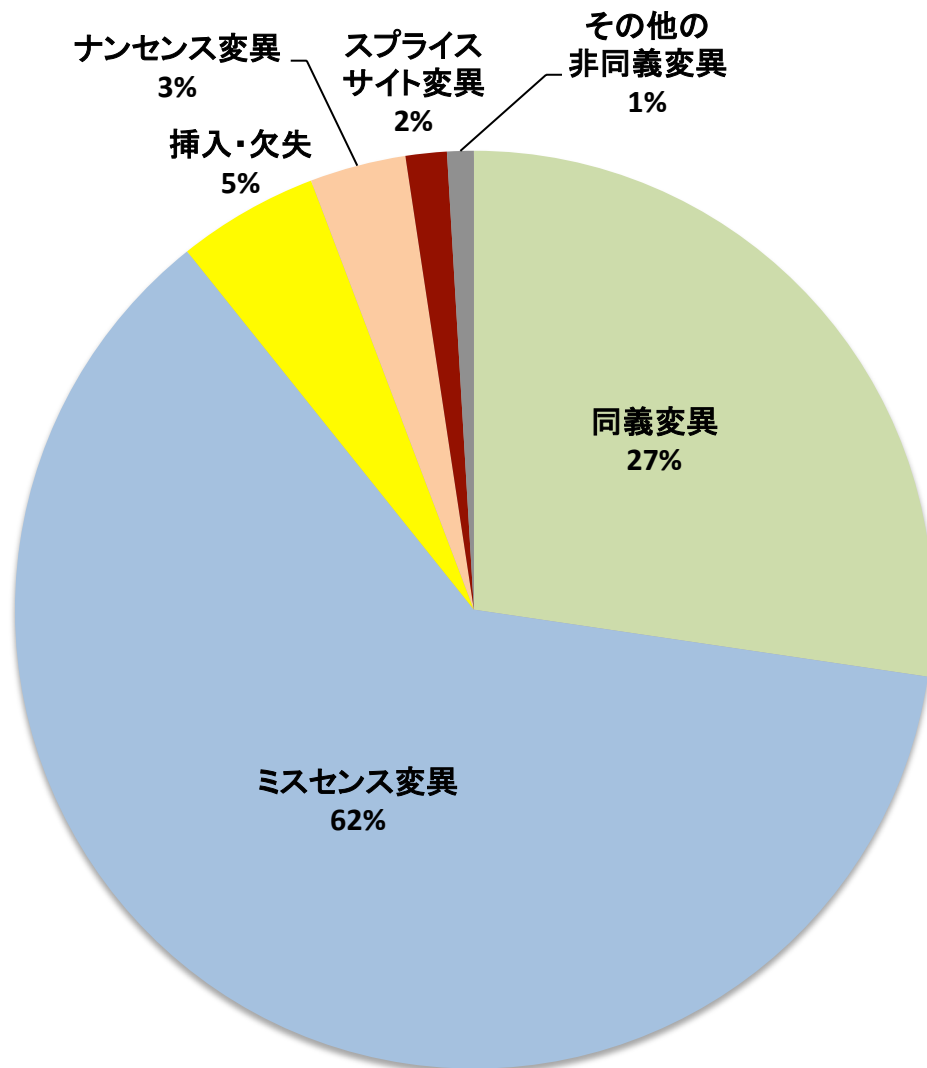
41 症例の PCNSL における非同義変異数の平均は 1 メガベース (Mb) あたり 3.2 であり、以前に報告された全身性 DLBCL の値と類似している [28, 29]。しかしながら、その体細胞変異数は症例間で大きく異なっている (図 5)。例えば、全症例における挿入・欠失の平均変異数は 0.2/Mb であるにもかかわらず、ID6 や ID41 の症例ではその変異数がそれぞれ 2.2/Mb、1.9/Mb と他の症例と比べて圧倒的に多い。一方、ID13 では同義・非同義変異数が 69.1/Mb であり、これは平均変異数の 15 倍以上である (同義・非同義変異の平均変異数は 4.5/Mb)。点突然変異数が増加する原因としては DNA ポリメラーゼである *POLE* の変異が、挿入・欠失の変異数が増加する原因としては DNA ミスマッチ修復 (mismatch repair: MMR) 機構に参与する MutS (*MSH2*, *MSH6*) または MutL (*MLH1*, *PMS2*) 複合体の変異が知られているため [30, 31]、それらの遺伝子における変異の有無

を調べた。その結果、ID13 では *POLE* の変異が、ID6 と ID41 では MMR 機構関連遺伝子の変異がそれぞれ検出された (図 6)。

患者ID	年齢	性別	病理診断	治療の有無	導入化学療法	放射線治療	EBV感染	HIV感染	Hans分類
1	72	女性	DLBCL	なし	HDMTX	WBRT	(-)	未確定	GCB
2	74	男性	DLBCL	なし	HDMTX	(-)	(-)	未確定	GCB
3	46	男性	DLBCL	なし	HDMTX	WBRT	(-)	(-)	GCB
4	71	男性	DLBCL	なし	HDMTX	WBRT	(-)	(-)	GCB
5	76	男性	DLBCL	なし	HDMTX	(-)	(-)	(-)	GCB
6	68	女性	DLBCL	なし	HDMTX	WBRT	(-)	(-)	GCB
7	49	男性	DLBCL	なし	HDMTX	WBRT	(-)	(-)	GCB
8	58	男性	DLBCL	なし	HDMTX	WBRT	(-)	未確定	Non-GCB
9	70	男性	DLBCL	なし	HDMTX	(-)	(-)	未確定	Non-GCB
10	66	男性	DLBCL	なし	HDMTX	WBRT	(-)	未確定	Non-GCB
11	75	男性	DLBCL	なし	HDMTX	(-)	(-)	(-)	Non-GCB
12	72	男性	DLBCL	なし	HDMTX	WBRT	(-)	未確定	Non-GCB
13	74	男性	DLBCL	なし	HDMTX	(-)	(-)	未確定	Non-GCB
14	60	男性	DLBCL	なし	HDMTX	WBRT	(-)	(-)	Non-GCB
15	61	男性	DLBCL	なし	HDMTX	WBRT	(-)	未確定	Non-GCB
16	51	男性	DLBCL	なし	HDMTX	WBRT	(-)	(-)	Non-GCB
17	72	男性	DLBCL	なし	HDMTX	WBRT	(-)	(-)	Non-GCB
18	77	男性	DLBCL	なし	(-)	WBRT	(-)	未確定	Non-GCB
19	60	男性	DLBCL	なし	HDMTX	WBRT	(-)	(-)	Non-GCB
20	50	男性	DLBCL	なし	HDMTX	WBRT	(-)	(-)	Non-GCB
21	57	男性	DLBCL	なし	HDMTX	WBRT	(-)	(-)	Non-GCB
22	33	女性	DLBCL	なし	HDMTX	WBRT	(-)	(-)	Non-GCB
23	64	女性	DLBCL	なし	HDMTX	WBRT	(-)	(-)	Non-GCB
24	74	女性	DLBCL	なし	HDMTX	WBRT	(-)	(-)	Non-GCB
25	63	男性	DLBCL	なし	HDMTX	WBRT	(-)	(-)	Non-GCB
26	68	男性	DLBCL	なし	HDMTX	WBRT	(-)	(-)	Non-GCB
27	48	女性	DLBCL	なし	HDMTX	WBRT	(-)	(-)	Non-GCB
28	78	女性	DLBCL	なし	HDMTX	WBRT	(-)	(-)	Non-GCB
29	68	男性	DLBCL	なし	HDMTX	WBRT	(-)	(-)	Non-GCB
30	67	女性	DLBCL	なし	HDMTX	WBRT	(-)	(-)	Non-GCB
31	42	男性	DLBCL	なし	HDMTX	WBRT	(-)	(-)	Non-GCB
32	29	男性	DLBCL	なし	HDMTX	WBRT	(-)	(-)	Non-GCB
33	56	女性	DLBCL	なし	HDMTX	WBRT	(-)	(-)	Non-GCB
34	44	男性	DLBCL	なし	HDMTX	WBRT	(-)	(-)	Non-GCB
35	69	男性	DLBCL	なし	HDMTX	WBRT	(-)	(-)	Non-GCB
36	75	男性	DLBCL	なし	(-)	RT	(-)	(-)	Non-GCB
37	70	女性	DLBCL	なし	HDMTX	WBRT	(-)	(-)	Non-GCB
38	58	男性	DLBCL	なし	HDMTX	WBRT	(-)	(-)	Non-GCB
39	75	男性	DLBCL	なし	(-)	WBRT	(-)	(-)	Non-GCB
40	53	男性	DLBCL	HDMTX+WBRT	該当なし	該当なし	(-)	(-)	未確定
41	75	男性	DLBCL	SRS	該当なし	該当なし	(-)	(-)	未確定

表 1 PCNSL 患者の臨床情報

本研究における PCNSL 患者の臨床情報を示す。DLBCL; びまん性大細胞型 B 細胞性リンパ腫 (diffuse large B-cell lymphoma)、EBV; エプスタイン・バーウイルス (Epstein-Barr virus)、HIV; エイズウイルス (human immunodeficiency virus)、SRS; 定位手術的照射 (stereotactic radiosurgery)、RT; 放射線療法、GCB; germinal center B cell。



**図 3 PCNSL における体細胞変異の種類別割合**

次世代シーケンサーを用いて 41 症例の PCNSL 腫瘍組織および末梢血単核球の全エクソン領域における塩基配列情報を取得し、その塩基配列情報から質の良い情報のみを選び出した。体細胞変異を MuTect および SomaticIndelDetector により検出し、遺伝子変異を SnpEff により同定した。



遺伝子名	染色体番号	塩基番号	参照塩基	変異塩基	Ion Torrentにおける 変異の有無
<i>VWA1</i>	chr1	1374779	C	T	○
<i>PRKACB</i>	chr1	84668450	C	A	○
<i>TDRD5</i>	chr1	179587788	A	C	○
<i>LAMC1</i>	chr1	183086726	G	A	○
<i>BTG2</i>	chr1	203274762	C	T	○
<i>ESRRG</i>	chr1	216692520	A	T	○
<i>NID1</i>	chr1	236212060	G	A	○
<i>OR2T33</i>	chr1	248436212	C	T	○
<i>KLF6</i>	chr10	3827197	G	A	○
<i>PTEP</i>	chr10	16553198	G	C	○
<i>FAM160A2</i>	chr11	6236138	G	T	○
<i>MICAL2</i>	chr11	12241949	C	T	○
<i>ANO5</i>	chr11	22249110	C	A	○
<i>TRIM44</i>	chr11	35684966	G	A	○
<i>OR4A16</i>	chr11	55111427	C	A	○
<i>OR5T2</i>	chr11	56000036	C	A	○
<i>MS4A14</i>	chr11	60183797	T	G	○
<i>MYRF</i>	chr11	61548482	C	T	○
<i>NRXN2</i>	chr11	64453303	G	A	○
<i>KMT2D</i>	chr12	49420473	G	C	○
<i>PPFIA2</i>	chr12	81657028	T	C	○
<i>SH2B3</i>	chr12	111856107	C	T	○
<i>IRS2</i>	chr13	110436009	C	T	○
<i>MIA2</i>	chr14	39716532	C	T	○
<i>HERC2</i>	chr15	28511050	C	T	○
<i>INO80</i>	chr15	41364223	G	A	○
<i>WDR72</i>	chr15	53998227	T	A	○
<i>ARNT2</i>	chr15	80762624	C	G	○
<i>CBFA2T3</i>	chr16	88943625	C	T	○
<i>NF1</i>	chr17	29559879	G	A	○
<i>FHOD3</i>	chr18	34081918	C	T	○
<i>CIB3</i>	chr19	16275569	C	A	○
<i>RYR1</i>	chr19	38993531	C	T	○
<i>EFR3B</i>	chr2	25359459	A	G	○
<i>FAM179A</i>	chr2	29256387	G	A	○
<i>SLC1A4</i>	chr2	65216983	G	A	○
<i>TTN</i>	chr2	179610845	C	T	○
<i>PAR6B</i>	chr20	49354493	G	A	○
<i>IGLL5</i>	chr22	23230246	A	G	○
<i>IGLL5</i>	chr22	23230319	T	C	○
<i>IGLL5</i>	chr22	23235906	G	A	○
<i>IGLL5</i>	chr22	23235908	G	C	○
<i>L3MBTL2</i>	chr22	41620975	G	A	○

表 2 Ion Torrent シーケンスによる体細胞変異の確認

HiSeq2000 によって検出された体細胞変異の中から総計 84 変異を選び出し、Ion Torrent シーケンスによる確認を行った。

遺伝子名	染色体番号	塩基番号	参照塩基	変異塩基	Ion Torrentにおける 変異の有無
<i>GRM7</i>	chr3	7188232	C	A	○
<i>MYD88</i>	chr3	38182641	T	C	○
<i>CYP8B1</i>	chr3	42916608	C	T	○
<i>ATRIP</i>	chr3	48488275	G	A	○
<i>CLDND1</i>	chr3	98235922	G	A	○
<i>SEMA5B</i>	chr3	122630859	C	T	○
<i>SI</i>	chr3	164727180	A	G	○
<i>NLGN1</i>	chr3	173998632	G	A	○
<i>TBLIXR1</i>	chr3	176752067	T	C	○
<i>FAM13A</i>	chr4	89708979	G	T	○
<i>LRT3</i>	chr4	110791286	C	G	○
<i>ANKRD50</i>	chr4	125590927	C	A	○
<i>PCDH18</i>	chr4	138451379	C	A	○
<i>DNAH5</i>	chr5	13735328	G	C	○
<i>DNAH5</i>	chr5	13901672	G	T	○
<i>SLC1A3</i>	chr5	36677113	G	T	○
<i>OSMR</i>	chr5	38919081	C	G	○
<i>TMED9</i>	chr5	177019303	T	A	○
<i>FOXC1</i>	chr6	1610925	G	C	○
<i>FOXC1</i>	chr6	1611129	G	T	○
<i>FOXC1</i>	chr6	1612092	C	G	○
<i>HIST1H1E</i>	chr6	26156650	C	T	○
<i>HIST1H1E</i>	chr6	26156788	T	C	○
<i>HIST1H1E</i>	chr6	26156835	G	A	○
<i>PIM1</i>	chr6	37138242	G	C	○
<i>PIM1</i>	chr6	37138549	G	T	○
<i>PIM1</i>	chr6	37138553	G	C	○
<i>PIM1</i>	chr6	37138791	C	T	○
<i>PIM1</i>	chr6	37139042	G	A	○
<i>RUNX2</i>	chr6	45399607	C	T	○
<i>AVL9</i>	chr7	32612977	G	A	○
<i>SEMA3E</i>	chr7	83029512	C	T	○
<i>LRRD1</i>	chr7	91774339	T	C	○
<i>STAG3</i>	chr7	99798916	A	G	○
<i>TOX</i>	chr8	60031457	G	C	○
<i>CD274</i>	chr9	5463055	A	G	○
<i>IFNA7</i>	chr9	21202040	G	T	○
<i>RORB</i>	chr9	77286720	T	C	○
<i>IKBKAP</i>	chr9	111644424	C	A	○
<i>BRINP1</i>	chr9	121976285	G	T	○
<i>REXO4</i>	chr9	136278019	C	T	○
<i>DBH</i>	chr9	136505091	G	A	○
<i>TUBB4B</i>	chr9	140135855	C	T	○
<i>PIM2</i>	chrX	48775919	C	T	○

表 2 の続き

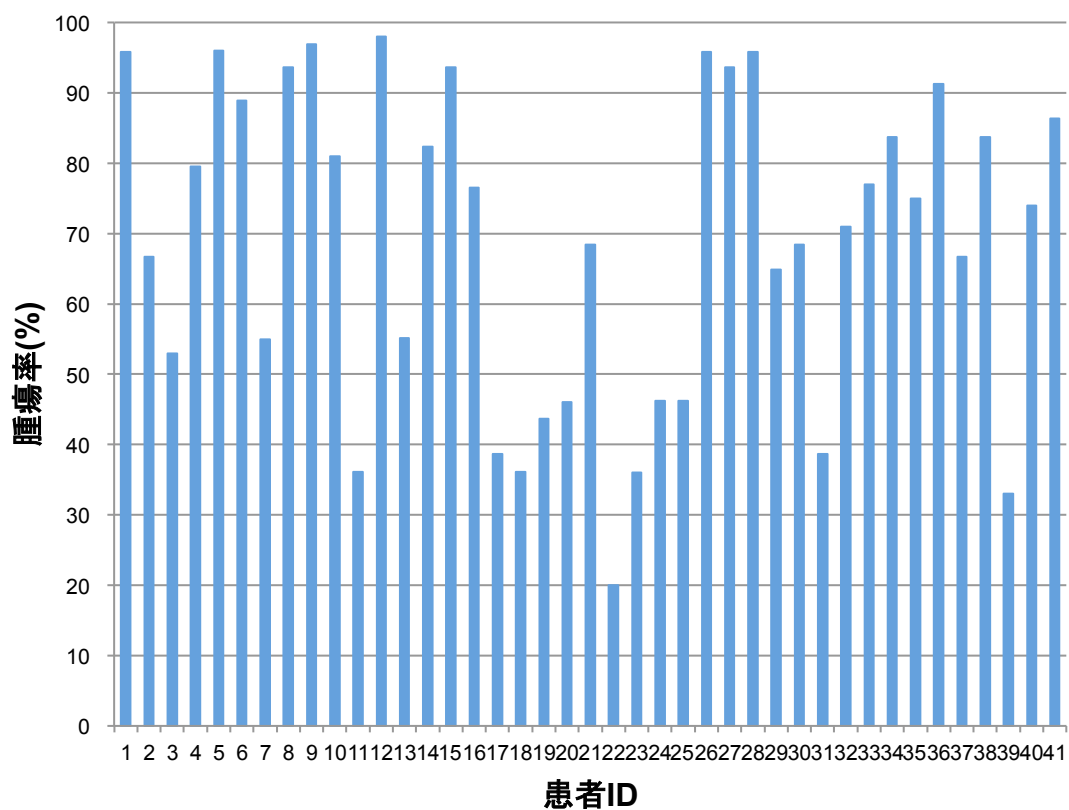


図 4 各 PCNSL 腫瘍検体の腫瘍率

PCNSL の腫瘍組織および末梢血単核球の全エクソンデータから Karkinos アルゴリズムを用いて各腫瘍検体の腫瘍率を算出した。平均腫瘍率は 69.0%であり、最小は 20.0%、最大は 98.0%であった。

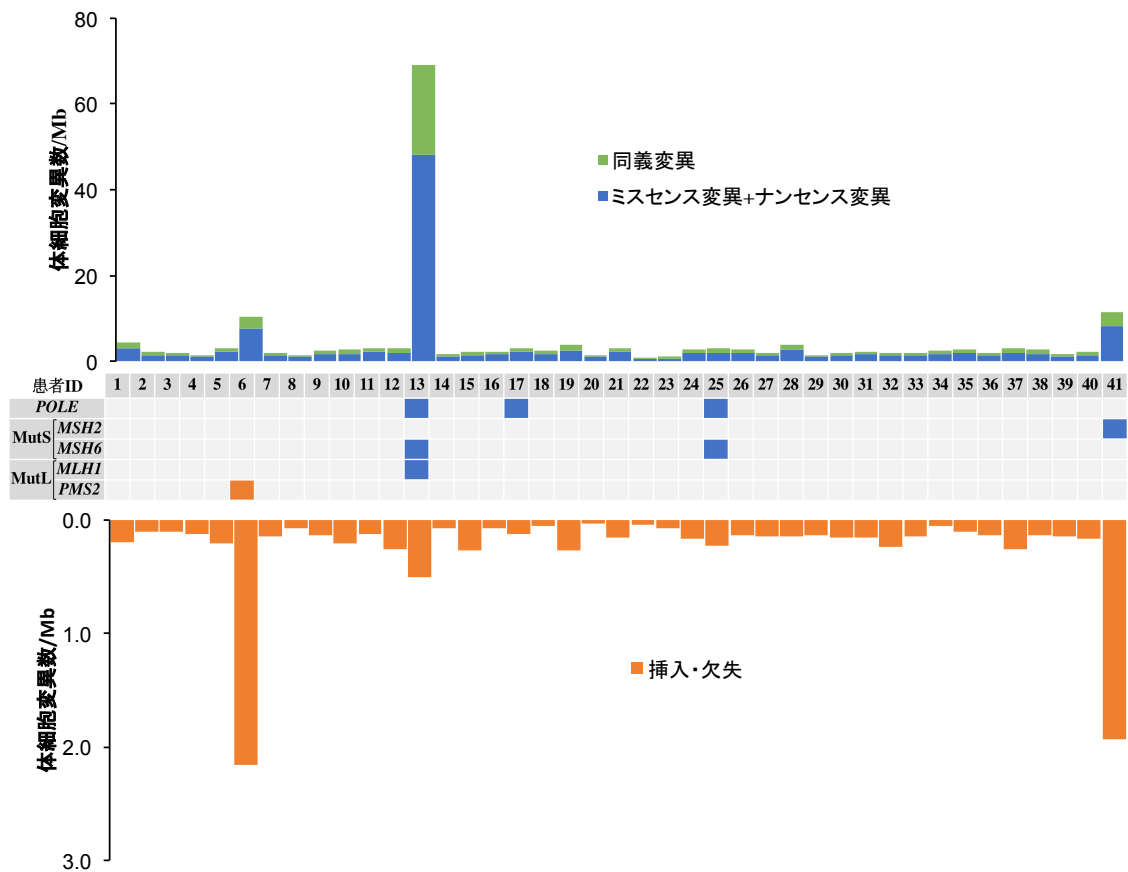


図 5 各 PCNSL 症例における体細胞変異数

上段には各症例における同義・非同義変異の Mb あたりの体細胞変異数、中段には患者 ID、DNA ポリメラーゼである *POLE* や MMR 機構に関与する MutS (*MSH2*、*MSH6*) または MutL (*MLH1*、*PMS2*) 複合体の変異の有無、下段には挿入・欠失の Mb あたりの体細胞変異数を示す。

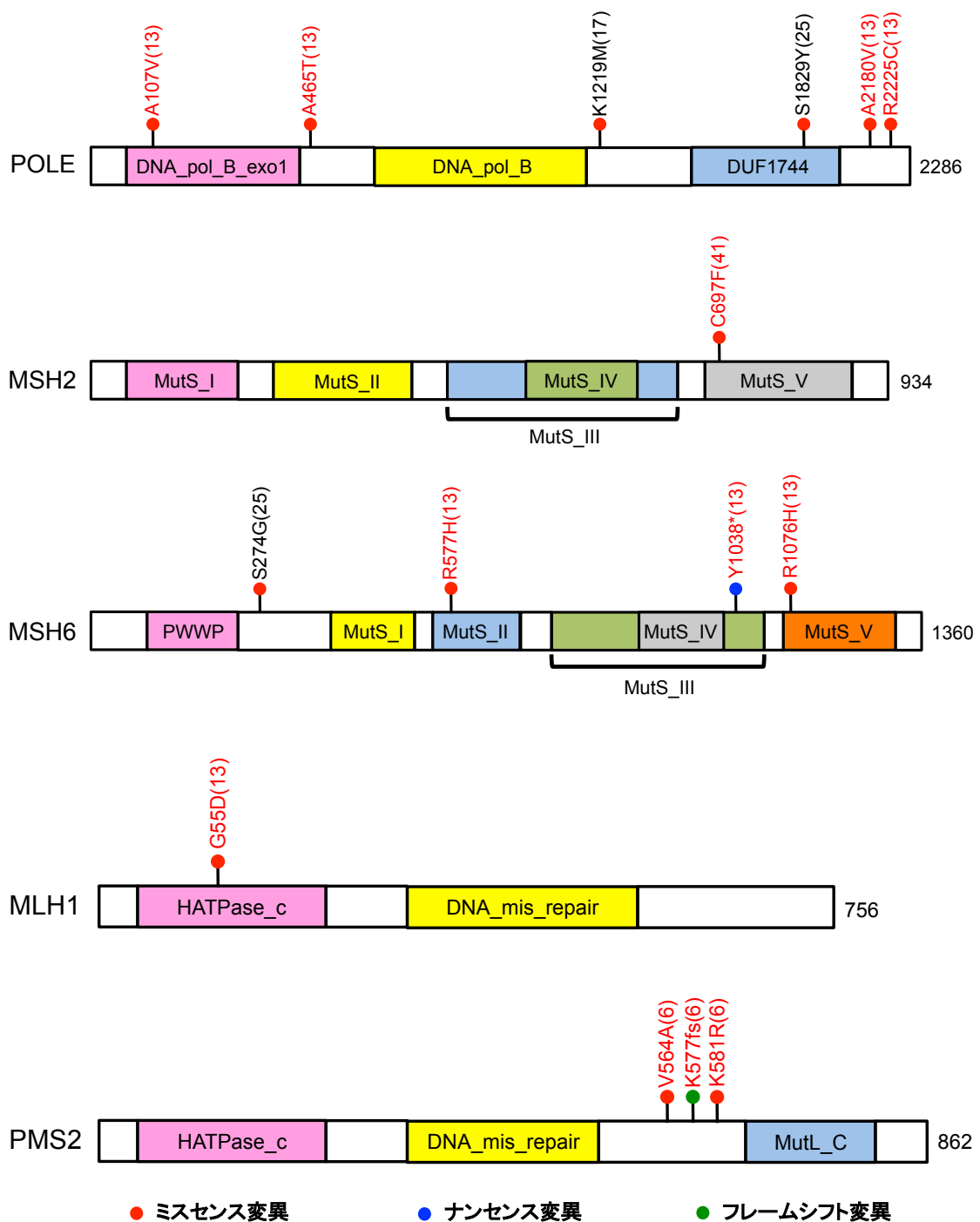


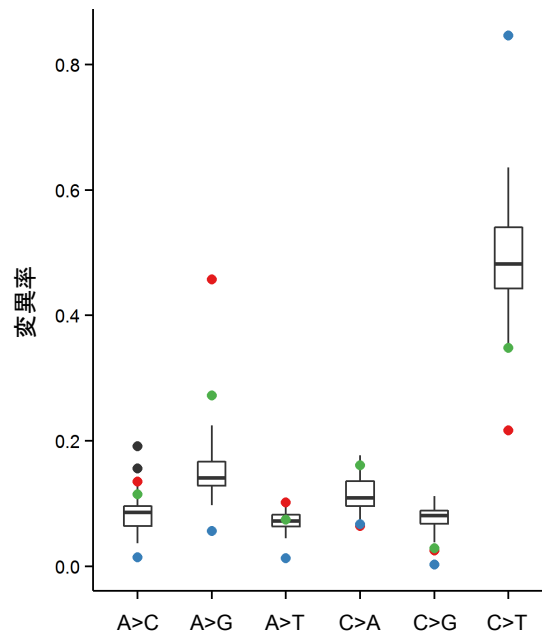
図 6 POLE および MMR 機構関連遺伝子のタンパク構造および変異箇所  
 POLE と MMR 機構関連遺伝子である MSH2、MSH6、MLH1、PMS2 のタンパク構造および PCNSL で同定された各遺伝子の変異箇所を示す。カッコ内の数字は患者 ID を表し、赤字は体細胞変異数の増大が認められた症例にて同定された変異であることを示す。各タンパク構造の右の数字は全アミノ酸数を示す。

## PCNSL における aSHM 標的遺伝子の同定

B 細胞の重要な役割として免疫反応における抗体産生がある。抗体は多様な抗原に適応するため、そのアミノ酸配列を多彩に変化する必要がある。免疫反応中、B 細胞は胚中心を形成し、免疫グロブリン遺伝子に様々な点突然変異を引き起こす。この現象を SHM といい、この反応は活性化誘導シチジンデアミナーゼ (activation-induced cytidine deaminase: AID) によって誘導される [32, 33]。この AID は DNA 中の C からアミノ基を取り除きウラシル (U) にする酵素である。我々は PCNSL 細胞における SHM の影響を調べるため、塩基置換パターンについて解析を行った。その結果、多くの症例において C から T に置換する変異の割合が半分以上を占め、特に GCG の配列において顕著であった (図 7)。この結果は、PCNSL のゲノム変異において SHM の機構が大きな影響を及ぼしていることを示唆している。本来、SHM は免疫グロブリン遺伝子のみで生じるのだが、DLBCL やバーキットリンパ腫では免疫グロブリン遺伝子以外の遺伝子においても SHM が生じていることが知られている [34]。この現象を aSHM と呼び、リンパ腫発生に大きく寄与していると考えられている [35]。PCNSL の遺伝子変異解析においても DLBCL と同様に、個々の症例において免疫グロブリン遺伝子以外の多数の遺伝子に変異を複数獲得していることから、本疾患もまた

その発生には aSHM が寄与していると考えられる。そこで我々は、PCNSL において aSHM の標的となっている遺伝子を同定する事を試みた。SHM の特徴としては、転写開始点から 2Kb 以内に変異を生じやすいこと、特定の塩基配列中で変異が生じやすいこと（ホットスポットモチーフ）、C から T への変異が多いことなどが挙げられる [33]。そこで我々はこれらの条件を統計学的に処理する SHM indicator アルゴリズムを用いて PCNSL における aSHM 標的遺伝子を予測した。その結果、総計 76 種類の aSHM 標的遺伝子候補を同定することができた (SHM indicator <0.05) (図 8)。驚くべき事に、全身性 DLBCL での *PIM1* の体細胞変異の頻度は 10-30%ほどであるにもかかわらず [22, 28]、PCNSL においては全症例 (100%) で検出された。さらに *BTG2* の体細胞変異も 92.7% と非常に高頻度で検出された。一方、全身性 DLBCL では高頻度で aSHM の標的となっている *RHOH* や *BCL6* [34] は、PCNSL においては aSHM 標的遺伝子として同定されなかった。

A



B

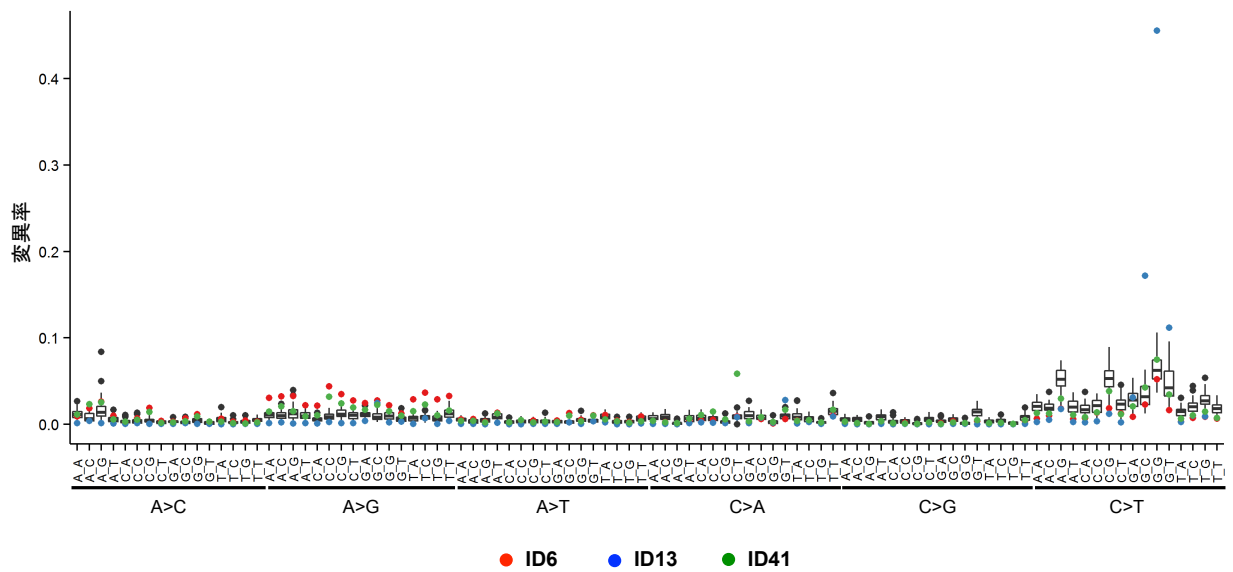


図7 PCNSLの塩基置換パターン

A. 1塩基に対する塩基置換パターンの割合。

B. 3塩基配列に対する塩基置換パターンの割合。



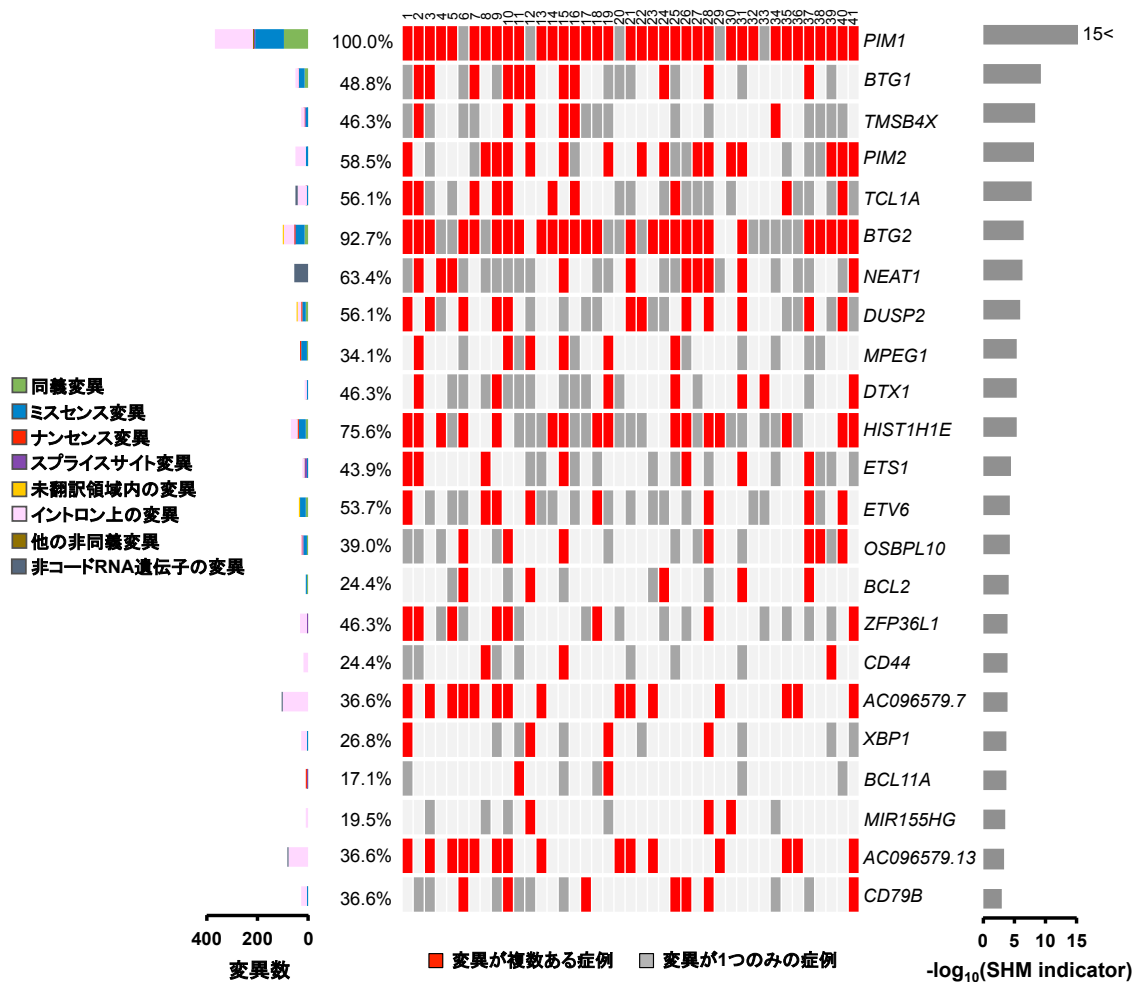


図 8 PCNSL における aSHM 標的遺伝子の同定

SHM indicator を昇順に並べた際の、上位 23 遺伝子を示す。個々の症例において各遺伝子の転写開始点から 2Kb 以内に変異を複数有する症例を赤で、1 つのみ有する症例を濃灰色で示す。左のヒストグラムは変異の種類に応じて色分けした各遺伝子の変異の総数を示し、その隣には変異を有する症例の割合を記載する。

## PCNSL における発がん関連遺伝子の予測

次に我々は膨大に検出された体細胞変異の中から PCNSL の発生に寄与する遺伝子変異の同定を試みるため、MutSigCV アルゴリズム [29]による解析を行った。MutSigCV とは Mutation Significance Covariates の略であり、予想される偶然に生じる変異（バックグラウンド変異）よりも有意に変異率が増加している遺伝子を同定するための解析ツールである。このアルゴリズムの中にはバックグラウンド変異率の上昇に寄与する DNA の複製時間やクロマチン状態、転写活性情報等が遺伝子ごとにデータベース化されており、それらと同定された遺伝子変異情報を組み合わせることにより、疾患にとって意義ある遺伝子を同定することができる。この MutSigCV アルゴリズムによる解析を行った結果、aSHM 標的遺伝子を除いた 15 種類の発がん関連遺伝子候補が選び出された ( $q$  値  $<0.1$ ) (図 9)。これらの遺伝子の多くは以前に PCNSL や全身性 DLBCL で報告されているが [24, 28, 36]、未だ報告がなされていない新規の遺伝子も検出された。

*MYD88* (NM\_002468) の体細胞変異は PCNSL において高頻度で検出された (75.6%)。特に 978 番目の T が C に置換し、対応する 265 番目のコドンがロイシン (L) からプロリン (P) に変化する変異 (L265P 変異) が顕著であった (図 10)。一方、全身性 DLBCL では *MYD88* 変異は 10-20%ほどの頻度である [28]。

興味深いことに、NF-κB 経路関連遺伝子の変異が aSHM 標的遺伝子や発がん関連遺伝子候補の中に多数含まれていた（例として、*PIMI*、*BTG2*、*CD44*、*XBPI*、*CD79B*、*MYD88* が挙げられる）。このように、PCNSL では同一症例内で NF-κB 経路関連遺伝子の変異が複数同定されていることから、NF-κB 経路の異常がその発生に何らかの影響を及ぼしていると考えられる。また、免疫反応関連遺伝子、細胞周期関連遺伝子、エピジェネティクス関連遺伝子の変異においては相互排他性が認められた（図 11）。しかしながらこれらの遺伝子変異の症例間での有意な偏りは認められなかった。

次に我々は、MutSigCV アルゴリズムによって同定された発がん関連遺伝子の変異の有無と無増悪生存期間との関連について調べた。その結果、*HLA-C* の変異を有する症例では変異を有しない症例に比べて無増悪生存期間がより短いことが明らかになった（ $P=0.0262$ 、ログランク検定）（図 12）。

また、発がんにおいて染色体のコピー数異常も重要であることが知られているため [37, 38]、我々は PCNSL 腫瘍組織における染色体のコピー数変化を全エクソン解析のデータから推測した。その結果、1q、7、12、18q におけるコピー数増加と 6q におけるコピー数減少が高頻度で認められた（図 13）。さらに *HLA* 遺伝子座に対応する 6p21-22 の局所的な欠失が観察され、これは以前の報告と一

致する [18]。この高頻度に生じている *HLA* 遺伝子座の欠失や *HLA-C* 変異による無増悪生存期間の短縮といった事象は、*HLA* による免疫監視機構の破綻が PCNSL の発展に大きく寄与していることを示唆している。また、6q と 9p の片親性ダイソミーも高頻度で検出された。

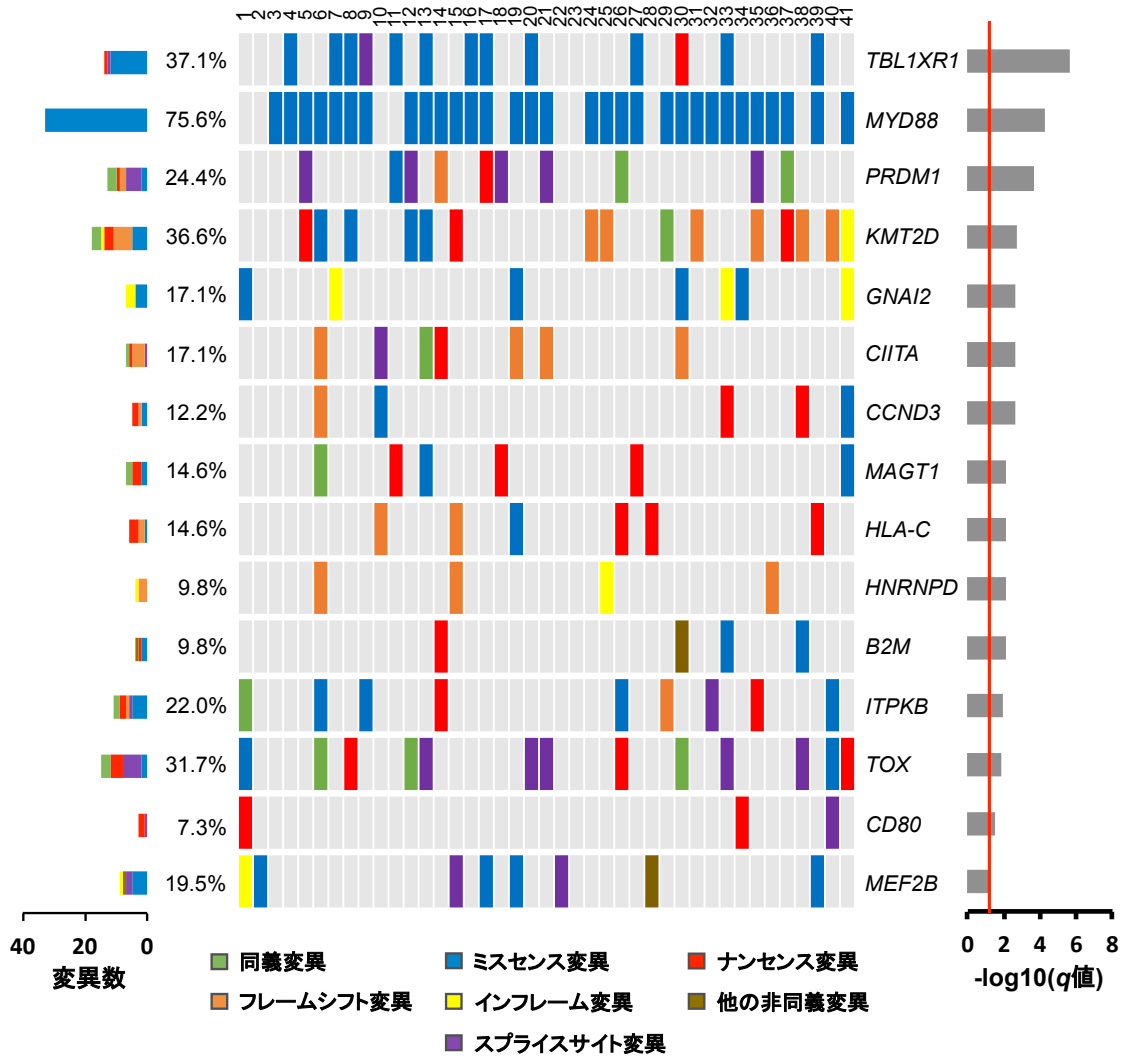


図 9 PCNSL における発がん関連遺伝子の予測

MutSigCV アルゴリズムを用いて PCNSL における発がん関連遺伝子候補を選び出した。各症例における 15 種類の発がん関連遺伝子候補の変異を種類別に色分けして示した (aSHM 標的遺伝子は除く)。右のヒストグラムは MutSigCV によって算出された各遺伝子における  $q$  値を示している。左のヒストグラムとパーセンテージは図 8 と同様である。

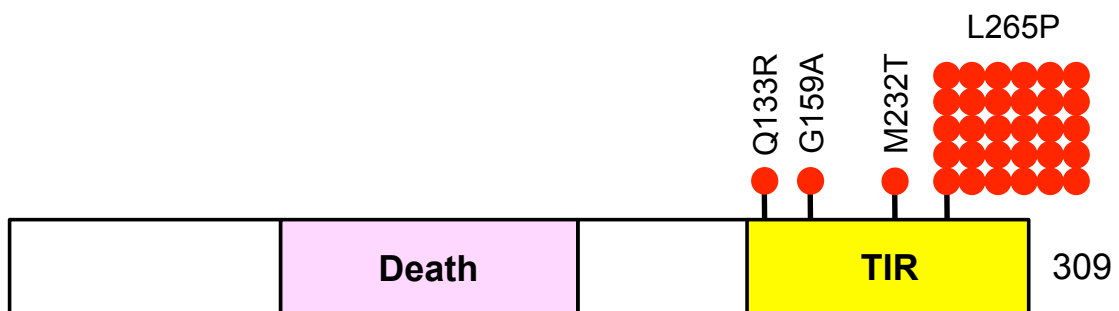


図 10 MYD88 のタンパク構造と変異箇所

MYD88 のタンパク構造と PCNSL で同定された変異の箇所を症例数と共に示す。MYD88 は Death ドメインと TIR (Toll/interleukin-1 receptor) ドメインに分かれており、同定された変異は全て TIR ドメイン内であった。右の数字はアミノ酸の総数を示す。

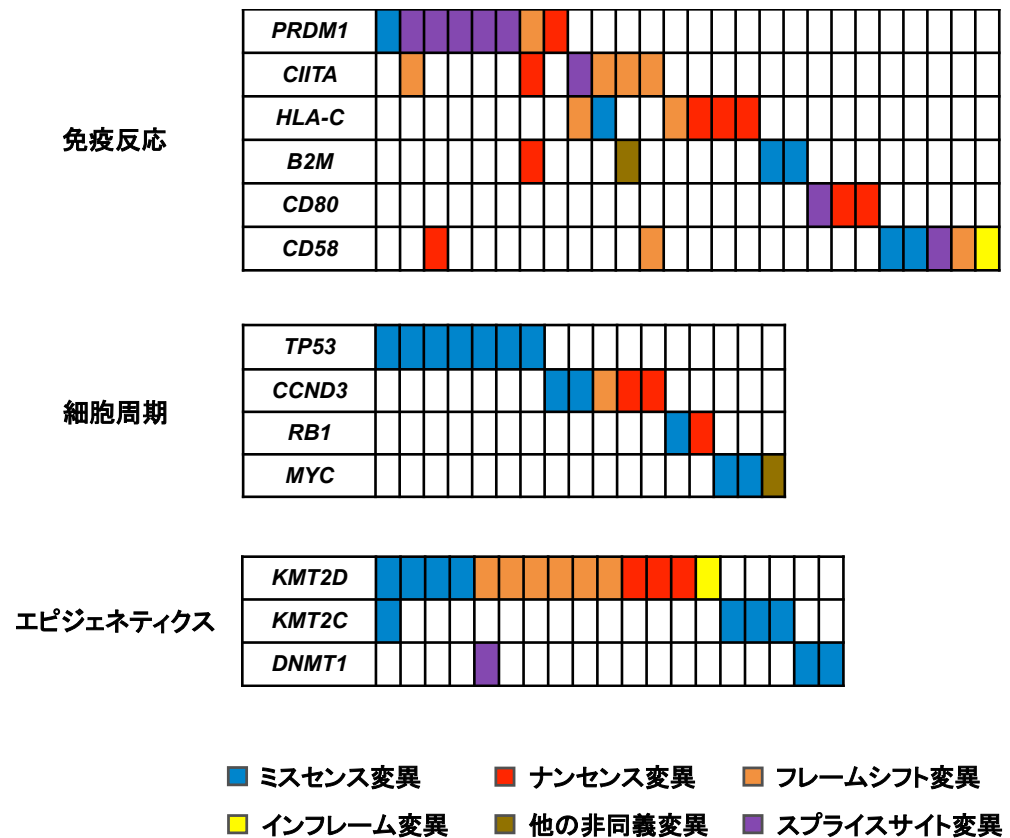


図 11 PCNSL における免疫反応関連遺伝子、細胞周期関連遺伝子、エピジェネティクス関連遺伝子の変異の相互排他性  
各遺伝子の個々の症例における変異の種類を色付けして示す。

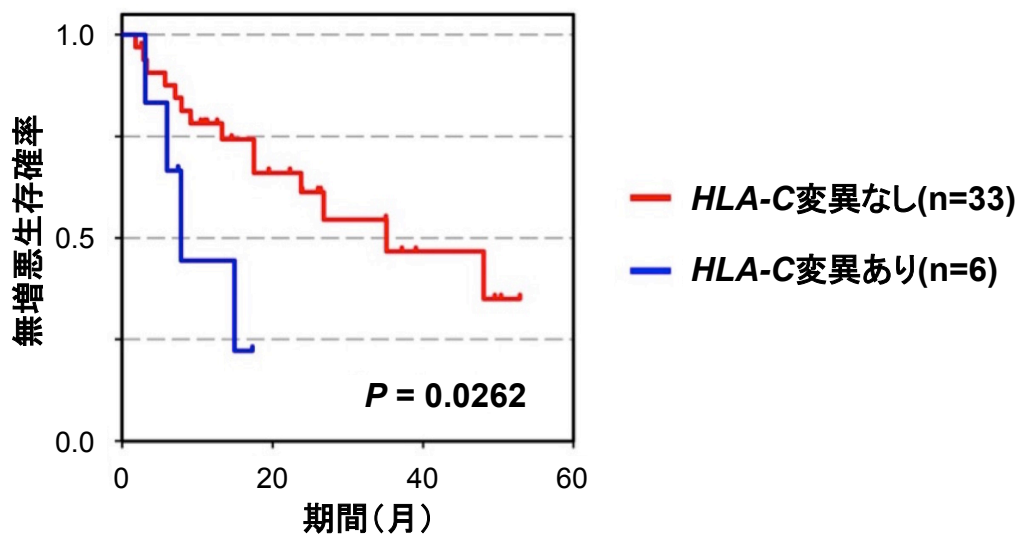


図 12 HLA-C 変異による無増悪生存期間への影響

PCNSL 患者における HLA-C 変異の有無による無増悪生存期間への影響を Kaplan-Meier 法により検証した。二群間比較における P 値はログランク検定により算出した。



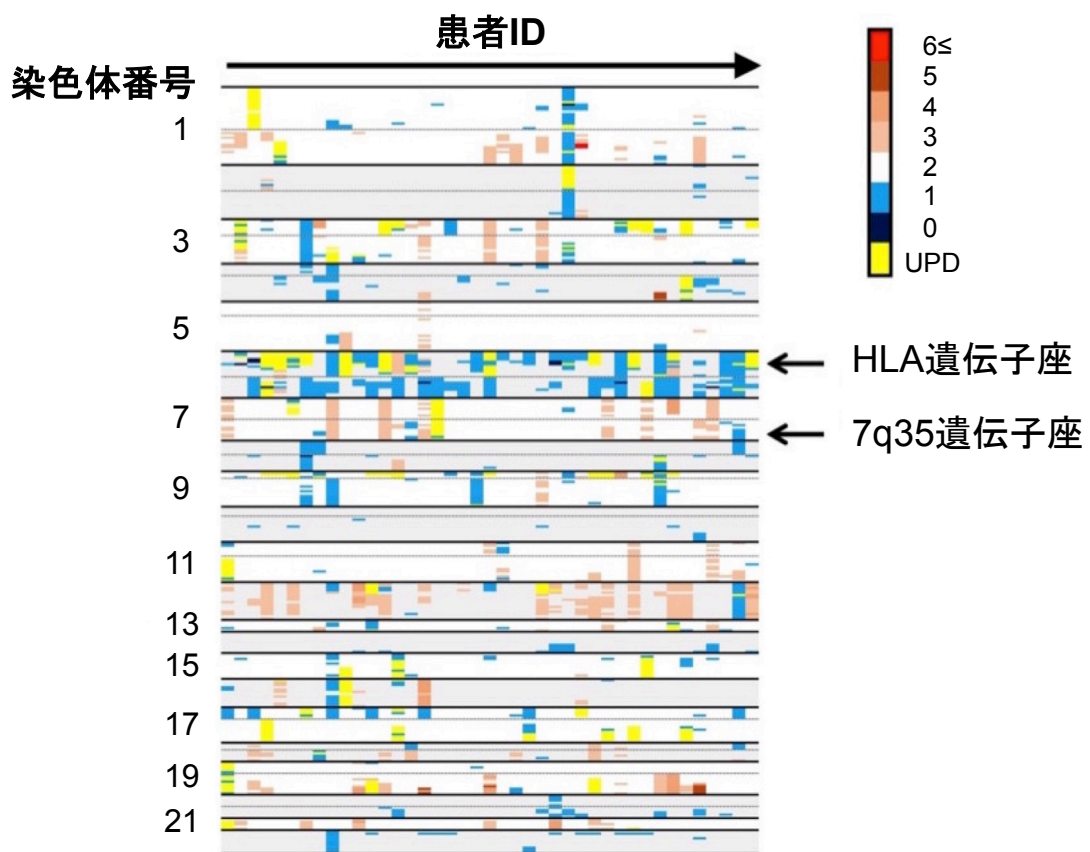


図 13 PCNSL における染色体のコピー数異常

各 PCNSL 症例（左から右）におけるコピー数の状態を 1 から 22 の染色体ごと（上から下）に色分けして示す。また、*HLA* と染色体 7q35 の遺伝子座の位置を右に示す。UPD: 片親性ダイソミー（uniparental disomy）。

## PCNSLのmRNA解析

全エクソン解析を行った41症例のうち、30症例からRNAを抽出することができたため、我々はこれらのRNAを用いてHiSeq2000によるシーケンス(RNA-seq)を行った。その結果、1症例あたり総計 $29.1 \pm 5.5$  (平均  $\pm$  SD) ギガベースの塩基配列情報を得ることができた。さらにRNA-seqによって得られた遺伝子の発現情報を用いて、特定の遺伝子セットの発現とPCNSL患者の予後との関連について検証を行った。GSEA内にある全ての遺伝子セットに対して解析を行った結果、原発性免疫不全症、ヌクレアーゼ活性、デオキシリボヌクレアーゼ活性のそれぞれに関連する遺伝子セットの発現が予後良好群で有意に増加していることが明らかになった。一方、染色体7q35 (CHR7Q35) に位置する遺伝子セットの発現は予後不良群で有意に増加していた(図14、表3)。この7q35遺伝子セットの中には全身性DLBCLでも変異が報告されている*EZH2*が含まれていた[28]。注目すべきは、7q35遺伝子座はコピー数の増加も認められている点である(図13)。これらの結果はこの遺伝子座に位置する遺伝子の活性化がPCNSLの増悪に直結していることを示唆している。さらにRNA-seqのデータから遺伝子融合を探索したところ、1つの症例で*INO80*と*NUSAP1*の融合

が検出され、同一検体でのキャピラリーシーケンスでも融合が確認された（図  
15）。

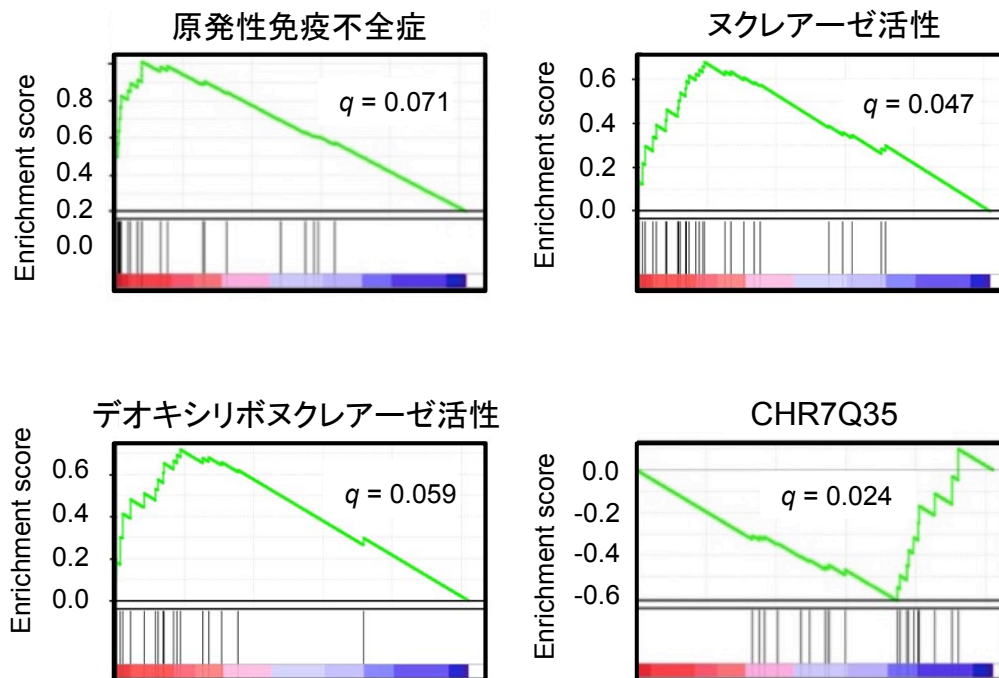


図 14 遺伝子発現と予後との関連

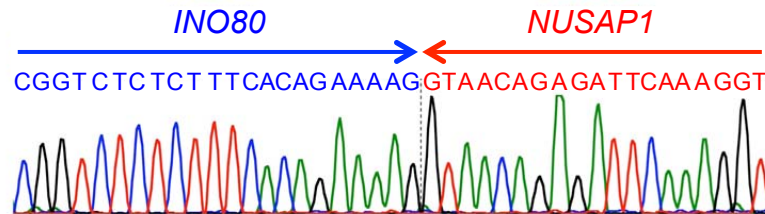
RNA-seq より得られた遺伝子の発現情報から GSEA を用いて予後との関連を検証した。その結果、「原発性免疫不全症」、「ヌクレアーゼ活性」、「デオキシリボヌクレアーゼ活性」それぞれに関連する遺伝子の発現が予後良好群にて有意に増加していた。一方、「CHR7Q35」に位置する遺伝子群の遺伝子発現は予後不良群にて有意に増加していた。それぞれの解析における偽陽性率 ( $q$ ) を各図の中に示す。

原発性免疫不全症 関連遺伝子	ヌクレアーゼ活性 関連遺伝子	デオキシリボヌク レアーゼ活性関連 遺伝子	CHR7Q35に位置 する遺伝子
ADA	ANG	APEX1	ABCB8
AICDA	APEX1	APTX	ABCF2
AIRE	APTX	DFFA	ACCN3
BLNK	DBR1	DFFB	AKR1B1
BTK	DFFA	DNASE1L1	ARHGEF35
CD19	DFFB	DNASE1L2	ASB10
CD3D	DICER1	DNASE1L3	C7orf29
CD3E	DNASE1L1	DNASE2	CHRM2
CD4	DNASE1L2	ERCC1	CNTNAP2
CD40	DNASE1L3	ERCC4	CTAGE15P
CD40LG	DNASE2	ERCC5	CTAGE4
CD79A	ENPP2	EXO1	EZH2
CD8A	ENPP3	FEN1	FAM115A
CD8B	ERCC1	ISG20	FAM115B
CIITA	ERCC4	MAP1S	FAM115C
DCLRE1C	ERCC5	MBD4	FAM115D
ICOS	ERJ1	MRE11A	FASTK
IGLL1	ERN2	NME1	GLC1F
IKBKG	EXO1	OGG1	GPDS1
IL2RG	EXOSC2	RAD50	GSTK1
IL7R	EXOSC7	TREX1	KCNH2
JAK3	FEN1	TREX2	LOC285965
LCK	ISG20		LOC442744
PTPRC	MAP1S		LOC643308
RAG1	MBD4		LOC728377
RAG2	MRE11A		LOC728466
RFX5	N4BP2		NOBOX
RFXANK	NME1		NOS3
RFXAP	NTHL1		NPM1P12
TAP1	OGG1		OR10AC1P
TAP2	PGAP1		OR2A1
TNFRSF13B	POP1		OR2A12
TNFRSF13C	POP4		OR2A13P
UNG	POP7		OR2A14
ZAP70	PPP1R8		OR2A15P
	RAD1		OR2A2
	RAD50		OR2A20P
	RAD9A		OR2A25
	REXO2		OR2A3P
	RNASE1		OR2A41P
	RNASE2		OR2A42
	RNASE3		OR2A5
	RNASE6		OR2A7
	RNASE7		OR2A9P
	RNASE8		OR2AO1P
	RNASEH1		OR2F1
	RNASEH2A		OR2R1P
	RPP30		OR9P1P
	RPP38		PDIA4
	RPP40		PRKAG2
	TP53		RPL26P22
	TREX1		RPL26P24
	TREX2		SLC4A2
	WRN		SMARCD3
	XRN2		TAS2R60
			ZNF282
			ZNF398

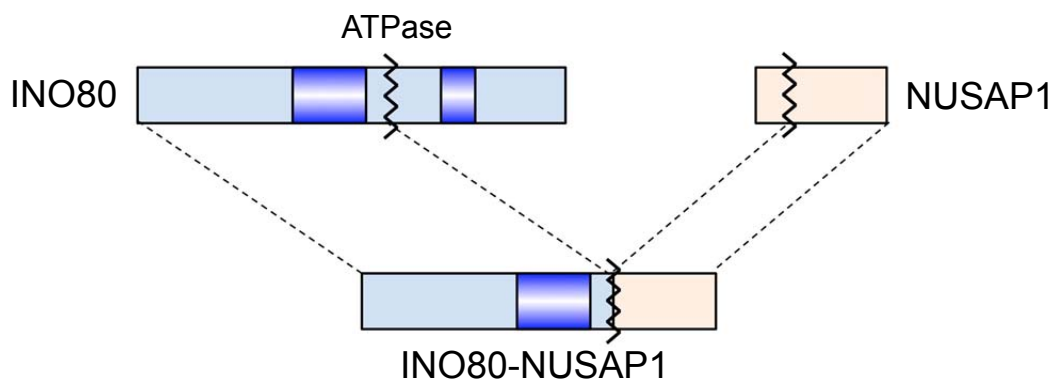
表 3 原発性免疫不全症関連、ヌクレアーゼ活性関連、デオキシリボヌク  
レアーゼ活性関連および染色体 7Q35 に位置する遺伝子の一覧

図 14 の解析で使った遺伝子群を示す。

A



B



### 図 15 *INO80-NUSAP1* 遺伝子融合の検出

A. *INO80* と *NUSAP1* の融合点をまたぐようにプライマーを設計し、RT-PCR 法により増幅した。得られた PCR 産物の塩基配列をキャピラリーシーケンスにより確認した。

B. *INO80-NUSAP1* のタンパク構造。融合の結果生じる mRNA は *INO80* のアミノ末端部分と *NUSAP1* のカルボキシル末端部分を含むタンパクを生成する。

## 複数の症例で同定される同一アミノ酸置換による遺伝子変異の解析

我々は次に、41 症例の PCNSL から検出された体細胞変異のうち、複数の症例で同定された同一アミノ酸置換による遺伝子変異についての検証を行った

(表 4)。これらの遺伝子変異の中には TP53 (R175H) や *PRDM1* のスプライスサイト変異など全身性 DLBCL においても検出されているものが含まれていた [39, 40]。

興味深いことに、*GNAI2* (NM\_002070) では 271 番目のアミノ酸であるリジン (K) を欠失する変異 (K271del 変異) が 3 症例、45 番目のアミノ酸であるグリシン (G) がグルタミン酸 (E) に置換する変異 (G45E 変異) が 2 症例で検出された。さらに I56T 変異と G203R 変異も他の症例で検出されており、この遺伝子の変異は PCNSL において 17.1% で生じていることが明らかになった。*GNAI2* は G タンパクの  $\alpha$  サブユニット遺伝子であり、アデニル酸シクラーゼを抑制する機能を持っている [41]。この遺伝子の変異は副腎皮質がんや卵巣がんでも検出されており、これらの変異による発がん能も報告されている [42, 43]。さらに興味深いことに、PCNSL で同定された変異のうち I56T 変異以外は、発がん能が報告されている変異と同様に GTP 結合領域に集中していた (図 16)。これらの所見は、PCNSL で同定された変異もまた発がん能を有しており、PCNSL の発生に

寄与する可能性を示唆している。

さらに我々は同じく複数症例で検出されている *IKBKB* (V203I) についても検証を行った。*IKBKB* は NF- $\kappa$ B 経路関連遺伝子であり、I $\kappa$ B kinase (IKK) 複合体のサブユニットである。*IKBKB* の活性化は NF- $\kappa$ B (NFKB1 と RELA の複合体) を抑制している NFKBIA (I $\kappa$ B $\alpha$ とも呼ばれる) をリン酸化し、ユビキチン化経路により NFKBIA を崩壊させる。その結果、NF- $\kappa$ B は核内に入り込むことが可能となり、その転写活性機能を発揮させる [44]。そこで我々は *IKBKB*

(V203I) による NF- $\kappa$ B 経路への影響を生物学的実験により検証した。その結果、*IKBKB* (V203I) は野生型と比較して著明に NFKBIA をリン酸化し、NF- $\kappa$ B が核内に誘導されることが明らかになった (図 17)。



症例数	遺伝子名	アミノ酸変化	染色体番号	塩基番号	参照塩基	変異塩基	変異の種類	SHM indicator
30	MYD88	L265P	3	38182641	T	C	ミスセンス	1
4	TOX		8	60031444	C	T	スプライスサイト	0.112065796
3	GNAI2	K271del	3	50294455	CAAG	C	インフレーム	
2	EIF3I	S94L	1	32691802	C	T	ミスセンス	
2	AVPR1A	A252V	12	63543862	G	A	ミスセンス	0.693361274
2	BCL7A		12	122460090	G	C	スプライスサイト	0.101759275
2	BCL7A		12	122460090	G	A	スプライスサイト	0.101759275
2	FAM194B	E136K	13	46170735	C	T	ミスセンス	
2	IGHD6-6	E1D	14	106376284	C	G	ミスセンス	0.283374272
2	FOXC2	A218V	16	86601594	C	T	ミスセンス	0.063967394
2	TP53	R175H	17	7578406	C	T	ミスセンス	
2	CCDC151	A484T	19	11532485	C	T	ミスセンス	
2	OR10H2	R53C	19	15839010	C	T	ミスセンス	0.214184393
2	ZNF536	R205C	19	30935082	C	T	ミスセンス	
2	FAM110C	A254T	2	45626	C	T	ミスセンス	0.115580752
2	TMEM150A	A168T	2	85826720	C	T	ミスセンス	
2	ZEB2		2	145274844	C	T	スプライスサイト	0.523135234
2	GPR35	R123H	2	241569737	G	A	ミスセンス	
2	C20orf96		20	271225	T	TTA	スプライスサイト	
2	SHANK3	L1224fs	22	51159932	T	TG	フレームシフト	
2	GNAI2	G45E	3	50289547	G	A	ミスセンス	
2	CD80	E181X	3	119256143	C	A	ナンセンス	
2	PDCD10	S71fs	3	167414853	CT	C	フレームシフト	
2	NR3C1	Y332X	5	142779409	G	C	ナンセンス	
2	FOXC1	S82T	6	1610925	G	C	ミスセンス	0.055782632
2	HIST1H1C	P118A	6	26056305	G	C	ミスセンス	0.12751374
2	HLA-A	G50D	6	29910609	G	A	ミスセンス	0.513722083
2	CCND3	Q276X	6	41903731	G	A	ナンセンス	0.274377244
2	PRDM1		6	106536325	G	A	スプライスサイト	0.253625394
2	CARD11	G123S	7	2984163	C	T	ミスセンス	
2	IKBKB	V203I	8	42166458	G	A	ミスセンス	
2	TOX	K34N	8	60031445	C	A	ミスセンス	0.112065796
2	TOX	Y30X	8	60031457	G	C	ナンセンス	0.112065796
2	WWP1	R845X	8	87473486	C	T	ナンセンス	

表 4 複数の PCNSL 症例で同定された同一アミノ酸置換による遺伝子変異

41 症例の PCNSL から検出された体細胞変異のうち複数の症例で同定された同一アミノ酸置換による遺伝子変異を示した (aSHM 標的遺伝子は除く)。

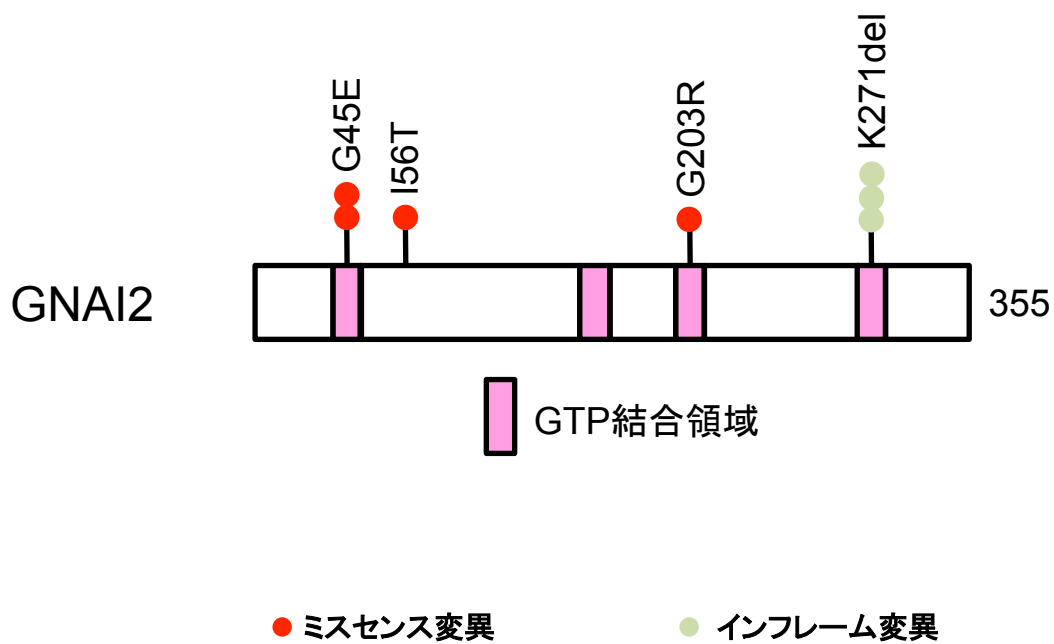
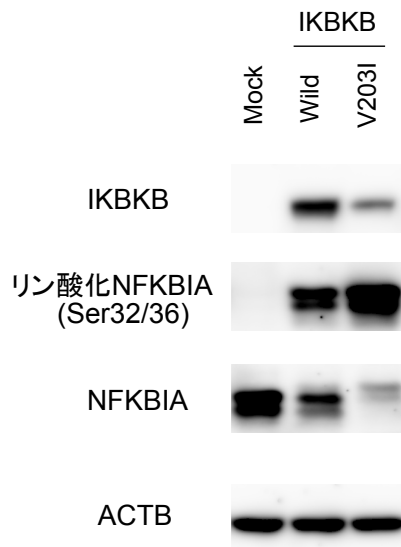


図 16 GNAI2 のタンパク構造と変異箇所

GNAI2 のタンパク構造と PCNSL で同定された変異の箇所を症例数と共に示す。GNAI2 は 4 つの GTP 結合領域を持っており、PCNSL で同定された変異のうち I56T 変異以外はすべて GTP 結合領域内である。右の数字はアミノ酸の総数を示す。

A



B

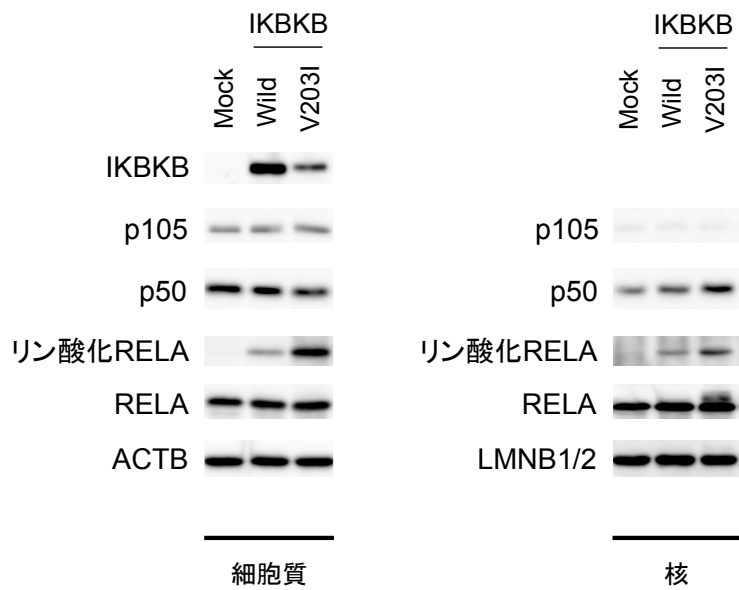


図 17 IKBKB (V203I) の機能解析

A. HEK293T 細胞に IKBKB の野生型 (Wild) または V203I 変異の発現プラスミドあるいは空ベクター (Mock) を導入し、示された抗体にてウェスタンブロットを行った。

B. A と同様に発現プラスミドあるいは空ベクターを HEK293T 細胞に導入し、細胞質分画と核分画に分けた後、示された抗体にてウェスタンブロットを行った。

## PCNSL と全身性 DLBCL の遺伝子変異プロファイルの比較

最後に我々は PCNSL の遺伝子変異プロファイルと全身性 DLBCL の遺伝子変異プロファイルが類似しているのかについて検討した。PCNSL は形態学的に全身性 DLBCL と区別することができないにもかかわらず、その予後は全身性 DLBCL よりも不良である [45]。そこで「変異」という観点から両者を比較するため、本研究で得られた PCNSL の体細胞変異情報と、以前に報告された全身性 DLBCL および NKTCL の体細胞変異情報を用いて階層的クラスタ分析を行った (図 18)。その結果、PCNSL の遺伝子変異プロファイルは全身性 DLBCL や NKTCL とは異なったクラスターを形成することが明らかとなり、PCNSL は独自の遺伝子変異プロファイルを有していることが示唆された。

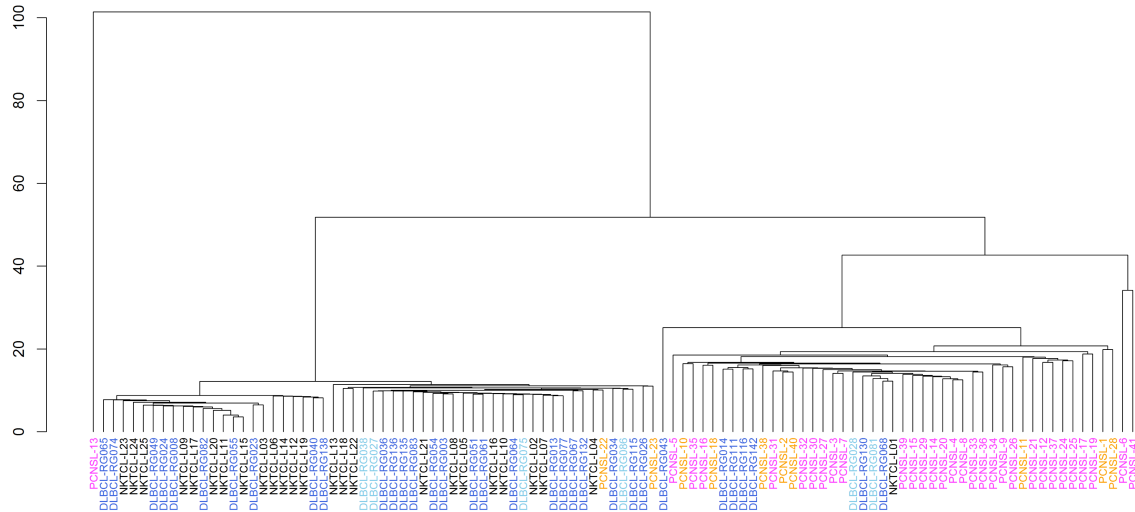


図 18 PCNSL と全身性 DLBCL の遺伝子変異プロファイルによる階層的クラスタ分析

本研究で得られた PCNSL (n = 41) の遺伝子変異プロファイルと以前に報告された全身性 DLBCL (n = 40) および NKTCL (n = 25) の遺伝子変異プロファイルをクラスタ分析した。その結果、2つの大きなクラスターに分かれ、一つはほとんどが PCNSL 症例、もう一方は全身性 DLBCL および NKTCL の症例で占められていた。PCNSL において *MYD88* 変異が高頻度に検出されたため、変異の有無によって色を区別した。*MYD88* 変異陽性の全身性 DLBCL は *MYD88* 変異陽性の PCNSL と同じクラスターを形成しなかった。PCNSL における *MYD88* 変異陽性症例を紅紫色、陰性症例をオレンジ色で、全身性 DLBCL における *MYD88* 変異陽性症例を淡青色、陰性症例を濃青色で、NKTCL の症例を黒色で示す。

## 5. 考察

本研究では PCNSL の発生原因を分子レベルで解明するため、全エクソン解析および mRNA 解析を行った。全エクソン解析では総計 17,385 の体細胞変異を検出することができた。しかしながら、次世代シーケンサーによる変異コールにおいて注意しなければならないのはシーケンスライブラリー調整時やシーケンスラン中に固有の変異（偽陽性）が低頻度で生じてしまう可能性があることである。そこで本解析では HiSeq2000 システムとは全く異なった原理によりシーケンスを行うことができる Ion Torrent システムを用いて HiSeq2000 システムにより同定された体細胞変異の確認実験を行った。HiSeq2000 システムは蛍光標識した dNTP を取り込ませ、それを蛍光顕微鏡により解析することでシーケンスを行うのに対し、Ion Torrent システムは DNA ポリメラーゼによって各塩基が取り込まれる際に放出される水素イオン（pH 変化）を検出することによりシーケンスを行う。我々はこの 2 つのシーケンス技術を利用することにより本解析により同定された体細胞変異コールが非常に正確なものであることを立証した。

PCNSL における平均体細胞変異数は以前に報告された全身性 DLBCL の値と近似したものであったが、各症例における変異獲得数には大きな違いが認められた。我々はその原因として変異数を増加させることが知られている DNA ポ

リメラーゼ遺伝子や MMR 機構関連遺伝子の変異に着目した。DNA ポリメラーゼである *POLE* や *POLD1* の変異は大腸がんや子宮内膜がんで検出されており、DNA 複製中の誤りを校正するエキソヌクレアーゼドメイン内で変異を生じると変異獲得数が増加することが知られている [30, 46]。実際、本研究では *POLE* の変異が総計 3 症例で検出されたが、変異獲得数の増大が確認されたのはエキソヌクレアーゼドメイン内に変異を生じている 1 症例のみであった (図 5、6)。

また、MMR 機構関連の遺伝子変異も遺伝性の大腸がんや子宮内膜がんで検出されている [47, 48]。これらの遺伝子変異はがん細胞のマイクロサテライト不安定性に寄与し、挿入・欠失数が増大することが知られている [31]。このマイクロサテライト不安定性は発がんや予後に関連することが知られているため [49]、PCNSL においても極めて重要であると考えられる。本研究ではこれらの遺伝子変異の頻度は 9.76% (4/41 症例) であったが、PCNSL における正確な頻度や予後との関連を解析するためには、さらに多くの症例数を用いて調べる必要がある。

PCNSL の初期発生が中枢神経系内で生じているのか、それとも中枢神経系外で生じたものが侵入してきたのかは未だ議論中である。PCNSL 細胞の全身への分布があまり観察されないことから、中枢神経系内のリンパ球から発展した

ものと考えられることも可能である。しかしながら、塩基置換パターンや SHM indicator による解析から PCNSL 細胞において aSHM が生じていることが明らかになった (図 7、8)。通常、SHM は二次リンパ組織内で形成される胚中心で AID により引き起こされる [33]。つまりこれは、PCNSL 細胞が二次リンパ組織を通過していたことを意味しており、PCNSL の初期発生は中枢神経系外であることが予想される。

aSHM の解析では *PIMI* や *BTG2* の変異が顕著に認められた。*PIMI* は *MYC* と協調してリンパ腫発生に寄与する発がん遺伝子 [50, 51] であり、*PIMI* の SHM は全身性 DLBCL においても 10-30% の頻度で検出されている [22, 28]。SHM は転写開始点から 2Kb 以内に多数の変異を獲得することや標的遺伝子の転座がしばしば観察されることから、SHM による発がん遺伝子の活性化は 5' 未翻訳領域の異常による転写促進や他の染色体への転座によるものとの仮説があり、*PIMI* も同様であると考えられている [33, 34, 45]。しかしながら、我々の全エクソン解析において *PIMI* は同一症例内で複数の非同義変異を生じている点や RNA-seq の結果からは *PIMI* の転座が確認されなかった点から、PCNSL において *PIMI* はがん抑制遺伝子として機能しているのではないかと推測される。一方、*BTG2* は細胞増殖抑制やアポトーシス誘導などの機能によりがん抑制遺伝子と



して知られている [52]。 *BTG2* の体細胞変異は全身性 DLBCL では約 50%の頻度であることから [22]、PCNSL における 92.7%は非常に高頻度であるといえる。以上の結果より、PCNSL ではこれらの遺伝子の SHM がその発生に大きく寄与していることが示唆され、その発生メカニズムの解明が今後期待される。

MutSigCV アルゴリズムを用いた発がん関連遺伝子候補の解析では 15 種類の遺伝子を選び出すことができた。その中には *TBLIXR1* や *MYD88* など PCNSL で以前に同定されていた遺伝子 [18]や、*PRDM1* や *KMT2D* など全身性 DLBCL で同定されていた遺伝子 [40, 53]が多くを占めていた。しかしながら、そのような既知の遺伝子の中で *GNAI2* は未だ報告されていない遺伝子であった。興味深いことに、*GNAI2* の 2 種類の変異 (K271del 変異と G45E 変異) は複数の症例で検出され、さらに 1 つの変異 (I56T 変異) 以外は全て GTP 結合領域内に集中していた (図 16) 。これは、PCNSL において *GNAI2* の変異が極めて重要である可能性があることを示唆している。また、複数の症例で同定された同一アミノ酸置換による遺伝子変異解析では、*IKKB* (V203I) が検出され、機能解析の結果から活性型変異であることが立証された (図 17) 。リンパ球系の悪性腫瘍では NF- $\kappa$ B 経路の恒常的活性化がしばしば認められ [54]、本研究においても *MYD88* や *CD79B*、*CARD11* などの NF- $\kappa$ B 経路関連遺伝子の変異が数多く同定さ

れた。これらの結果は本疾患において NF-κB 経路がいかに重要であるかをより強固に示すことになる。また、免疫関連・細胞周期関連・エピジェネティクス関連遺伝子の変異においては相互排他性が認められた事から、本疾患においてこれらの経路も重要であることが示唆された。しかしながら NF-κB 経路関連遺伝子の変異においては有意な相互排他性が認められなかった。NF-κB 経路関連遺伝子の変異は同一症例内で複数検出されていることから、本疾患の発生・発展のためには複数の NF-κB 経路関連遺伝子変異による NF-κB のより強い転写活性化が必要であることが予想される。

全身性 DLBCL 細胞はその分化段階の違いにより GCB 型と non-GCB 型に分類され、それぞれ独自の遺伝子変異プロファイルを有することが知られている。例えば、GCB 型では *PTEN* や *GNAI3* の変異、*IGH* と *BCL2* の遺伝子融合が顕著に認められるのに対し、non-GCB 型では *MYD88* や *PIMI*、*PRDMI* の変異が顕著に認められる [22, 26, 55, 56]。しかしながら、本解析ではこれらの遺伝子変異は GCB 型と non-GCB 型の間において顕著な違いは認められなかった。この結果から PCNSL においては細胞の分化段階に関わらず極めて均質な遺伝子変異プロファイルを有していることが示唆された。

以上のように、PCNSLは *MYD88* や *GNAI2* の変異、*PIM1* や *BTG2* の aSHM、NF- $\kappa$ B 経路の異常など多くの因子が絡み合った結果生じた疾患であると予想される。従って、本疾患の治療にはこれらの因子を丹念に改善していくような治療戦略が必要であると考えられ、本研究の結果を基に新たな治療法が確立されることが望まれる。

## 6. 参考文献

1. Kobayashi S, Boggon TJ, Dayaram T et al. EGFR mutation and resistance of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N. Engl. J. Med.* 2005; 352(8):786–92.
2. Sood AK, Skilling JS, Buller RE. Ovarian cancer genomic instability correlates with p53 frameshift mutations. *Cancer Res*, 57(6):1047–9, 1997.
3. Cross NCP, Daley GQ, Green AR et al. BCR-ABL1-positive CML and BCR-ABL1-negative chronic myeloproliferative disorders: some common and contrasting features. *Leukemia*, 22(11):1975–89, 2008.
4. Soda M, Choi YL, Enomoto M et al. Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature*, 448(7153):561–566, 2007.
5. Mok TS, Wu Y-L, Thongprasert S et al. Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. *N. Engl. J. Med*, 361(10):947–57, 2009.
6. Druker BJ, Guilhot F, O'Brien SG et al. Five-year follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med*, 355(23):2408–17, 2006.
7. Kwak EL, Bang Y-J, Camidge DR et al. Anaplastic lymphoma kinase inhibition

- in non-small-cell lung cancer. *N. Engl. J. Med*, 363(18):1693–703, 2010.
8. Fujimoto A, Totoki Y, Abe T et al. Whole-genome sequencing of liver cancers identifies etiological influences on mutation patterns and recurrent mutations in chromatin regulators. *Nat. Genet*, 44(7):760–4, 2012.
  9. Shendure J, Ji H. Next-generation DNA sequencing. *Nat. Biotechnol*, 26(10):1135–45, 2008.
  10. Villano JL, Koshy M, Shaikh H et al. Age, gender, and racial differences in incidence and survival in primary CNS lymphoma. *Br. J. Cancer*, 105(9):1414–8, 2011.
  11. Korfel A, Schlegel U. Diagnosis and treatment of primary CNS lymphoma. *Nat. Rev. Neurol*, 9(6):317–27, 2013.
  12. Schlegel U. Primary CNS lymphoma. *Ther. Adv. Neurol. Disord*, 2(2):93–104, 2009.
  13. Utsuki S, Oka H, Miyajima Y et al. Epstein-Barr virus (EBV)-associated primary central nervous system lymphoma: is incidence of EBV expression associated with median survival time? *Brain Tumor Pathol*, 28(2):145–9, 2011.

14. Dunleavy K, Wilson WH. How I treat HIV-associated lymphoma. *Blood*, 119(14):3245–55, 2012.
15. Ferreri AJM. How I treat primary CNS lymphoma. *Blood* 2011; 118(3):510–22.
16. Batchelor T, Loeffler JS. Primary CNS lymphoma. *J. Clin. Oncol.*; 24(8):1281–8, 2006.
17. Deckert M, Montesinos-Rongen M, Brunn A, Siebert R. Systems biology of primary CNS lymphoma: from genetic aberrations to modeling in mice. *Acta Neuropathol*, 127(2):175–88, 2014.
18. Gonzalez-Aguilar A, Idbaih A, Boisselier B et al. Recurrent mutations of MYD88 and TBL1XR1 in primary central nervous system lymphomas. *Clin. Cancer Res*, 18(19):5203–11, 2012.
19. Bruno A, Boisselier B, Labreche K et al. Mutational analysis of primary central nervous system lymphoma. *Oncotarget*, 5(13):5065–75, 2014.
20. Vater I, Montesinos-Rongen M, Schlesner M et al. The mutational pattern of primary lymphoma of the central nervous system determined by whole-exome sequencing. *Leukemia*, 29(3):677–85, 2015.

21. Hans CP, Weisenburger DD, Greiner TC et al. Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood*, 103(1):275–82, 2004.
22. Khodabakhshi AH, Morin RD, Fejes AP et al. Recurrent targets of aberrant somatic hypermutation in lymphoma. *Oncotarget*, 3(11):1308–19, 2012.
23. Okosun J, Bödör C, Wang J et al. Integrated genomic analysis identifies recurrent mutations and evolution patterns driving the initiation and progression of follicular lymphoma. *Nat. Genet*, 46(2):176–81, 2014.
24. Morin RD, Mungall K, Pleasance E et al. Mutational and structural analysis of diffuse large B-cell lymphoma using whole-genome sequencing. *Blood*, 122(7):1256–65, 2013.
25. Jiang L, Gu Z-H, Yan Z-X et al. Exome sequencing identifies somatic mutations of DDX3X in natural killer/T-cell lymphoma. *Nat. Genet*, 47(9):1061–6, 2015.
26. Sehn LH, Gascoyne RD. Diffuse large B-cell lymphoma: optimizing outcome in the context of clinical and biologic heterogeneity. *Blood*, 125(1):22–32, 2015.
27. Kakiuchi M, Nishizawa T, Ueda H et al. Recurrent gain-of-function mutations of

- RHOA in diffuse-type gastric carcinoma. *Nat. Genet*, 46(6):583–7, 2014.
28. Lohr JG, Stojanov P, Lawrence MS et al. Discovery and prioritization of somatic mutations in diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) by whole-exome sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, 109(10):3879–84, 2012.
  29. Lawrence MS, Stojanov P, Polak P et al. Mutational heterogeneity in cancer and the search for new cancer-associated genes. *Nature*, 499(7457):214–8, 2013.
  30. Palles C, Cazier J-B, Howarth KM et al. Germline mutations affecting the proofreading domains of POLE and POLD1 predispose to colorectal adenomas and carcinomas. *Nat. Genet*, 45(2):136–44, 2013.
  31. Kim T-M, Laird PW, Park PJ. The landscape of microsatellite instability in colorectal and endometrial cancer genomes. *Cell*, 155(4):858–68, 2013.
  32. Liu M, Duke JL, Richter DJ et al. Two levels of protection for the B cell genome during somatic hypermutation. *Nature*, 451(7180):841–5, 2008.
  33. Odegard VH, Schatz DG. Targeting of somatic hypermutation. *Nat. Rev. Immunol*, 6(8):573–83, 2006.
  34. Pasqualucci L, Neumeister P, Goossens T et al. Hypermutation of multiple



- proto-oncogenes in B-cell diffuse large-cell lymphomas. *Nature*, 412(6844):341–6, 2001.
35. Chiorazzi N. Aberrant somatic hypermutation and lymphomagenesis. *Blood*, 102(5):1564–a–1565, 2003.
36. Zhang J, Grubor V, Love CL et al. Genetic heterogeneity of diffuse large B-cell lymphoma. *Proc. Natl. Acad. Sci*, 110(4):1398–1403, 2013.
37. Zack TI, Schumacher SE, Carter SL et al. Pan-cancer patterns of somatic copy number alteration. *Nat. Genet*, 45(10):1134–1140, 2013.
38. Hastings PJ, Lupski JR, Rosenberg SM, Ira G. Mechanisms of change in gene copy number. *Nat. Rev. Genet*, 10(8):551–64, 2009.
39. Xu-Monette ZY, Wu L, Visco C et al. Mutational profile and prognostic significance of TP53 in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with R-CHOP: report from an International DLBCL Rituximab-CHOP Consortium Program Study. *Blood*, 120(19):3986–96, 2012.
40. Pasqualucci L, Compagno M, Houldsorth J et al. Inactivation of the PRDM1/BLIMP1 gene in diffuse large B cell lymphoma. *J. Exp. Med*,

- 203(2):311–7, 2006.
41. Wong YH, Federman A, Pace AM et al. Mutant  $\alpha$  subunits of Gi2 inhibit cyclic AMP accumulation. *Nature*, 351(6321):63–65, 1991.
  42. Lyons J, Landis CA, Harsh G et al. Two G protein oncogenes in human endocrine tumors. *Science*, 249(4969):655–9, 1990.
  43. Gupta SK, Gallego C, Lowndes JM et al. Analysis of the fibroblast transformation potential of GTPase-deficient gip2 oncogenes. *Mol. Cell. Biol*, 12(1):190–7, 1992.
  44. Richmond A. NF- $\kappa$ B, chemokine gene transcription and tumour growth. *Nat. Rev. Immunol*, 2(9):664–674, 2002.
  45. Montesinos-Rongen M, Siebert R, Deckert M. Primary lymphoma of the central nervous system: just DLBCL or not? *Blood*, 113(1):7–10, 2009.
  46. Church DN, Briggs SEW, Palles C et al. DNA polymerase  $\epsilon$  and  $\delta$  exonuclease domain mutations in endometrial cancer. *Hum. Mol. Genet*, 22(14):2820–8, 2013.
  47. Peltomaki P. Deficient DNA mismatch repair: a common etiologic factor for

- colon cancer. *Hum. Mol. Genet*, 10(7):735–740, 2001.
48. Wang Y, Wang Y, Li J et al. Lynch syndrome related endometrial cancer: clinical significance beyond the endometrium. *J. Hematol. Oncol*, 6(1):22, 2013.
49. Grady WM, Carethers JM. Genomic and epigenetic instability in colorectal cancer pathogenesis. *Gastroenterology*, 135(4):1079–99, 2008.
50. Naud J-F, Eilers M. PIM1 and MYC: a changing relationship? *Nat. Cell Biol*, 9(8):873–5, 2007.
51. van Lohuizen M, Verbeek S, Krimpenfort P et al. Predisposition to lymphomagenesis in pim-1 transgenic mice: cooperation with c-myc and N-myc in murine leukemia virus-induced tumors. *Cell*, 56(4):673–82, 1989.
52. Mao B, Zhang Z, Wang G. BTG2: a rising star of tumor suppressors (review). *Int. J. Oncol*, 46(2):459–64, 2015.
53. Pasqualucci L, Trifonov V, Fabbri G et al. Analysis of the coding genome of diffuse large B-cell lymphoma. *Nat. Genet*, 43(9):830–7, 2011.
54. Jost PJ, Ruland J. Aberrant NF-kappaB signaling in lymphoma: mechanisms, consequences, and therapeutic implications. *Blood*, 109(7):2700–7, 2007.

55. Ngo VN, Young RM, Schmitz R et al. Oncogenically active MYD88 mutations in human lymphoma. *Nature*, 470(7332):115–119, 2010.
56. Muppidi JR, Schmitz R, Green JA et al. Loss of signalling via G $\alpha$ 13 in germinal centre B-cell-derived lymphoma. *Nature*, 516(7530):254–8, 2014.

## 7. 謝辞

本研究を行うにあたりまして指導教員となってくださりました東京大学大学院医学系研究科 細胞情報学講座 間野博行教授に深謝致します。また、本研究の実験手法をご指導してくださりました東京大学大学院医学系研究科 細胞情報学講座 山下義博准教授、ゲノム医学講座 崔永林特任准教授、河津正人特任講師に深謝致します。