



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

의학박사학위논문

원발성중추신경계림프종의
유전학적 특성

2017년 8월

서울대학교 대학원
의학과 분자종양의학 전공
이정옥

국문 초록

원발성중추신경계림프종의 유전학적 특성

이정옥

서울대학교 대학원 의학과 분자종양의학

목적 : MYD88과 CD79B 돌연변이는 nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells (NF- κ B) 신호체계의 구조적 활성화 (constitutive activation)에 관여하며 림프종의 새로운 치료 표적으로 연구되고 있다. 원발성중추신경계림프종 (Primary Central Nervous System Lymphoma, PCNSL)의 MYD88 및 CD79B 돌연변이의 빈도를 확인하고, 전체 유전체 염기서열분석 (Whole genome sequencing, WGS)을 통해 PCNSL의 유전학적 특성을 규명하고자 한다.

방법 : 조직학적으로 PCNSL로 진단된 환자들 중 포르말린고정 파라핀포매 조직 검체가 있는 115명 환자군 (cohort A)에서 MYD88 TIR (Toll/IL-1 receptor) 도메인 중 exon 5와 CD79B ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation motif)의 exon 5의 돌연변이 확인을 위해 생어 염기서열 분석 (Sanger sequencing)을

했다. 그리고 신선동결조직이 있는 10명 (cohort B)에서 종양(뇌)과 말초혈액(대조군)의 WGS을 했고 sequencing 평균 depth는 종양은 64.2x, 말초혈액은 33.6x였다.

결과 : Cohort A 115명 중 MYD88 exon 5의 중합효소 연쇄 반응 (Polymerase Chain Reaction, PCR) 수행 및 판독이 가능했던 94명중 33명 (35.1%)에서 MYD88 L265P (CTG>CCG) 돌연변이가 있었다. CD79B exon 5의 PCR 수행 및 판독이 가능했던 113명중 25명 (22.1%)에서 CD79B 돌연변이가 있었고, 25개의 돌연변이는 Y196C (TAC>TGC, 8명), Y196H (TAC>CAC, 7명), Y196S (TAC>TCC, 5명), Y196N (TAC>AAC, 4명) 와 Y196F (TAC>TTC, 1명) 였다. MYD88 L265P 돌연변이가 있는 33명 중 13명에서 CD79B 돌연변이가 함께 있었다. 즉 MYD88 L265P 돌연변이 환자의 39.3%, CD79B 돌연변이 환자의 52.0%가 두 가지 돌연변이를 함께 가지고 있었다. Cohort B 10명의 WGS에서 체세포 돌연변이에 대한 Mutec2/MutSig 분석에서 통계학적으로 유의하게 ($q < 0.1$) 반복되는 변이 유전자들은 MYD88, POU2AF1, B3GNT8 였다. MYD88 돌연변이는 10명중 7명 (70%)에서 있었고, 이중 5명은 L265P였고, 나머지는 exon 4에 위치한 P258L (CCA>CTA), R231Q (CGG>CAG)였다. MYD88 P258L은 만성림프구성백혈병, 원발성유리체망막림프종에서의 보고에 이어 3번째이며, R231Q는 보고된 적이 없는 새로운 돌연변이였다. P258L와 R231Q은 Sanger sequencing으로 검증 (validation) 했다. CD79B 돌연변이는 7명 (70%)에서 있었고 5명에서 MYD88/CD79B 돌연변이가 함께 있었다. 최근에 발표된 4개의 PCNSL 전체 엑솜 염기서열분석법 (whole exome sequencing, WES) 연구결과에서 각 연구에서

30%이상의 빈도로 존재한 돌연변이 유전자 46개를 선별하여 cohort B에서 분석한 결과 30%이상의 빈도로 주요 3가지 변이 (non-synonymous single-nucleotide polymorphism (Nonsyn SNP), frameshift insertion/deletion (frameshift INDEL), exonic structural variation (exonic SV))가 있었던 유전자는 총 24개였고, 그 중 Nonsyn SNP가 30%이상에서 있었던 것은 MYD88, CD79B, PCLO, LRP1B, TENM4였다. 본 연구 포함 5개 중 3개 이상의 연구에서 PCNSL에서 공통적으로 반복되는 돌연변이 유전자는 MYD88, PIM1, IGLL5, TBL1XR1, BTG1, DUSP2, ETV6로 총 46개 유전자중 7개 (17%)였다. 중추신경계 편향성 (CNS tropism)과 관련한 유전자 분석에서 TENM4의 nonsyn SNP가 30%에서 있었고, SPP1(20%), SLC16A9 (20%), MDM2 (30%), YEATS4 (30%)에서 구조적 결손 (structural deletion) 이 존재했다. 10명 중 8명에서 OZD4, SPP1, SLC16A9, MDM2, YEATS4중 1개 이상에서 주요 변이가 존재했다.

결론 : MYD88와 CD79B의 돌연변이는 PCNSL의 특징적인 유전자 변이이다. MYD88에서 L265P뿐 아니라 P258L, R231Q의 존재를 확인했고 R231Q는 첫 번째 보고이다. TENM4의 돌연변이는 PCNSL의 중추신경계 편향성을 설명할 수 있는 기전 중 하나이다.

주요어 : 원발성중추신경계림프종, MYD88, CD79B, Whole genome sequencing, TENM4

학번 : 2009-31104

List of tables

Table 1. Clinical characterization of cohort A.....	13
Table 2. MYD88 L265P mutation according to DNA amount and the year of diagnosis	17
Table 3. Mutation load of 10 PCNSL patients.....	20
Table 4. Selected 46 genes detected in $\geq 30\%$ cases in previous WES studies on PCNSL.....	22
Table 5. Recurrent SHM-targets in PCNSL.....	28
Table 6. Most common genomic aberration	30
Table 7. Fusion genes.....	32
Table 8. Published studies on PCNSL.....	35

List of figures

Figure 1. MYD88 L265P mutation.....	14
Figure 2. CD79 mutation.....	15
Figure 3. Fifty genes by Mutec2/Mutsig analysis.....	21
Figure 4. Mutation profile of selected 46 genes.....	24
Figure 5. MYD88 P258L.....	25
Figure 6. MYD88 R231Q.....	26
Figure 7. Chromosome copy number analysis.....	29
Figure 8. Chromosomal rearrangement.....	31

목차

1. 서론.....	1
2. 연구대상 및 방법.....	5
3. 연구결과.....	11
4. 고찰.....	36
5. 참고문헌.....	42
외국어초록.....	48

1. 서론

원발성중추신경계림프종 (Primary Central Nervous System Lymphoma, PCNSL)은 전체 비호지킨림프종의 1-2%, 전체뇌종양의 3%를 차지하는 드문 질환이며, 95%이상이 조직학적으로 광범위큰B세포림프종 (Diffuse Large B-cell Lymphoma, DLBCL)으로 PCNSL은 중추신경계에 국한된 DLBCL로 정의된다 (1). 전신 (systemic) DLBCL에 비해 예후가 불량하여, 5년 생존율은 약 30-40%이다 (2). 1970년대 후반부터 고용량 methotrexate (MTX) 에 기반한 항암화학요법 및 방사선치료가 PCNSL치료의 근간이 되고 있으나 이러한 표준치료에 재발하거나 불응인 과반수 이상의 환자들을 위한 새로운 약제의 개발 및 치료전략이 필요하며 이를 위해 PCNSL의 생물학 및 유전학적 배경을 이해하는 것이 중요하다.

PCNSL은 발생빈도가 낮을 뿐 아니라 대부분 정위적 조직 생검 (stereotactic biopsy)를 통해 진단되므로 조직의 크기가 작고 연구를 위해 뇌조직을 추가로 획득하는 것은 어려운 일이기 때문에 PCNSL의 유전학적 연구를 수행하는 것에 제한이 있다. PCNSL은 activated B-cell-like DLBCL (ABC-DLBCL)의 면역표현형 (CD10+ (10-20%), IRF4/MUM1+ (90-100%))을 가지고, 면역글로블린 클래스전환 재조합 (immunoglobulin class switch recombination, IG CSR)이 제한적이며, nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells (NF- κ B) 경로가 활성화되어 있다는 점에서 ABC-DLBCL의 특징을 가지며, somatic hypermutation (SHM)및 aberrant SHM (aSHM)의 빈도가 높고 BCL6의 발현이 증가되어

있는 점에서는 germinal center DLBCL (GCB-DLBCL)의 특성도 함께 가지고 있다 (3, 4). 다양한 유전학적 및 후성유전학적 (epigenetic) 변이로 인해 B세포분화의 과정의 후반부에서 세포의 성숙과 분화가 멈추게 되며 IGM+CD20+BCL6+MUM1/IRF4+ 와 같은 특징적인 후반부 germinal center 출구의 B세포 (late GC exit B-cell) 표현형을 가지게 되는데 이는 BCL6과 다양한 유전간의 전위 (translocation), S μ 손실 (loss)로 인한 CSR의 제한, PRDM1돌연변이 등이 관여되는 것으로 알려져 있다 (5). PCNSL은 IGH와 BCL6의 SHM뿐 아니라 aSHM이 빈번하게 존재하여 종양유전자 (oncogene)와 종양억제유전자 (tumor suppressor gene)의 활성화 및 비활성화 시키는데 PAX5, RhoH/TTF, PIM1, MYC등이 대표적인 유전자들이다 (6). 또한 염색체 변이가 존재하는데 6p21, 6q21-6q25, 8q12.1-12.1, CDKN2A의 손실과 18q21, 10q23, 12번 염색체의 획득 (gain)이 빈번하다 (3, 4).

PCNSL에서 NF- κ B의 구조적 활성화 (constitutive activation)에 관련한 유전자변이에 관한 다양한 연구들이 있었다. Toll-like recept (TLR) 경로에 관여하는 MYD88, B세포 수용체 (B-cell receptor, BCR) 경로의 CD79B, SHIP, CBL, BLNK 및 BCR 경로의 표적인 BCL10/CARD11/MLAT1 (BCM) complex의 돌연변이가 PCNSL의 주요 체세포 돌연변이로 보고되었다 (7, 8).

MYD88 (Myeloid differentiation primary response gene 88)은 TLR 및 Interleukin 1 receptor (IL1R) 신호전달의 adaptor molecule로 TLR-3을 제외한 나머지 모든 TLR신호전달에서 그 역할을 한다. B세포의 TLR혹은 IL1R이 자극이 되면 IL1R과 IL1R associated kinase 4 (IRAK4)와 단백질복합체를 형성하고

IRAK1/IRAK2를 활성화시키며, 이어서 활성화된 Tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6)를 통해 NF- κ B가 활성화된다 (9, 10). Ngo등은 MYD88 L265P 돌연변이가 있는 경우 IRAK1 인산화와 NF- κ B가 지속적으로 활성화됨으로서 ABC-DLBCL세포가 생존한다는 것을 보여주었다 (11).

MYD88 L265P 돌연변이는 Waldenström's macroglobulinemia에서는 약 90%에서 존재하며, chronic lymphocytic leukemia (CLL), marginal zone lymphoma, gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma, IgM MGUS, ABC-DLBCL에서 각각 2.9-10%, 6.5%, 4%, 10%, 29%의 빈도로 보고되었다 (11, 12, 13, 14, 15). PCNSL 및 원발성고환림프종 (primary testicular lymphoma)과 같은 Immune-privileged sites의 DLBCL (IP-DLBCL)에서는 전신 (systemic) ABL-DLBCL에 비해 MYD88 L265P 돌연변이 빈도가 높다 (16). PCNSL의 MYD88 L265P 돌연변이는 33-94%로 연구들마다 다양한 빈도로 보고하고 있으며 (16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26), 현재까지 우리나라 PCNSL환자의 MYD88 및 CD79B 돌연변이 빈도에 대한 연구결과 보고는 없었다.

Bruton's kinase (BTK) 는 BCR/TLR/NK- κ B 신호전달체계에 중요한 연결역할을 하는 티로신키나아제로 BCR에 의존성 (BCR-dependent 혹은 BCR signaling addicted)을 가지면서 NF- κ B가 활성화된 상태의 림프종에서 BTK 억제제는 새로운 표적치료제로 각광을 받고 있으며, 이러한 근거에서 CD79B 및 MYD88의 돌연변이 빈도가 높은 PCNSL에서의 그 효과가 우수할 것이 예상되며, 최근 1상 임상연구에서 PCNSL의 ibrutinib 단독치료에 대한 부분반응율이 77-83%로 CNS외 전신

ABC-DLBCL에 대해 높은 반응율을 보였으며 후속 임상연구들의 결과가 주목된다 (27, 28).

최근 PCNSL에 대한 전체 엑솜 염기서열분석법 (whole exome sequencing, WES) 연구들이 발표되었고 연구마다 주요 발암변이 유전자에 대한 보고가 차이가 있으나, 공통적으로 MYD88, CD79B, PIM1, IGLL5, TBLXR1 등이 대표적인 변이 유전자로 지목되었다. Chapuy등의 연구에서 PCNSL에서 약 50%에서 9p24.1/PD-L1/PD-L2의 유전자 복제수 변이 (Copy-number alteration, CNA)가 있었고 그 중 일부에서 PD-L1/PD-L2 전위가 확인하여 PCNSL에서의 PD1/PD-L1 억제제와 같은 면역항암제 치료가능성이 대두되었다 (18, 19, 20, 23). 현재까지 PCNSL의 전체 유전체 염기서열분석 (Whole genome sequencing, WGS)에 대한 연구는 없었다.

본 연구는 국내 단일기관 대규모 PCNSL 환자군에서의 MYD88 및 CD79B 돌연변이 빈도를 확인하고 추가적인 WGS분석을 통해 PCNSL의 유전학적 특성을 밝히고자 계획되었다.

2. 연구 대상 및 방법

가. 대상환자군과 조직검체

1) Cohort A

2002년 2월부터 2012년9월까지 서울대학교병원에서 조직학적으로 진단된 PCNSL 환자들 중 임상 및 병리학적 정보와 포르말린고정 파라핀포매 (FFPE, formalin-fixed paraffin-embedded) 조직 검체가 있는 115명의 환자군에서 생어 염기서열 분석 (Sanger sequencing)을 통해 MYD88 및 CD79B 돌연변이를 확인했다.

2) Cohort B

2010년 10월부터 2016년 5월까지 동기관에서 진단된 PCNSL 환자들 중 원발부위(뇌)의 신선동결조직이 있는 10명의 환자군에서 원발부위 조직과 말초혈액(대조군)의 전체 유전체 염기서열분석 (Whole genome sequencing, WGS)을 시행했다. Cohort B중 5명은 cohort A에 포함되어 있다.

나. MYD88 및 CD79B 돌연변이 분석 방법

Maxwell 16 FFPE Plus Tissue LEV DNA Purification kit (Promega, Madison, Wisconsin, USA)를 이용해 10 μ m 두께의 115개 FFPE 조직 (cohort A)에서 genomic DNA를 추출했다. MYD88 TIR (Toll/IL-1 receptor) 도메인 중 exon 5와 CD79B ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation motif)의 exon 5의 돌연변이 확인을 위한 중합효소 연쇄 반응 (Polymerase Chain

Reaction, PCR)을 위해 제작한 primer는 다음과 같았다.

MYD88 - F (5'- CTGGGGTTGAAGACTGGGCT -3')

MYD88 - R (5'- TTGGTGTAGTCGCAGACAGTGA -3')

CD79B - 5F1 (5'- GGGCTGGGGGACACTAACACTC -3')

CD79B - 5R (5'- TGGGTGCTCACCTACAGACCAC -3')

PCR은 EconoTaq PLUS GREEN 2X premix (Lucigen, Middleton, WI)를 이용했으며 38회(95도(30초), 60도(30초), 72도(30초) 반복하여 얻어진 산물(product)을 ABI3730 DNA analyzer (Applied Biosystems, Carlsbad, CA)를 이용해 Sanger sequencing을 진행했다.

다. Whole genome sequencing (WGS)

1) DNA library 구축 및 sequencing 확인

Cohort B 10명의 신선동결된 뇌(10개), 말초혈액(10개)으로부터 추출된 genomic DNA (1µg)을 Covaris S2(duty cycle 10%, intensity 5%, cycle/burst 00, time 60s)를 이용하여 300-400 base pair (bp)로 fragment를 만든 후 1.8X Agencourt AMPure XP beads첨가하여 purification과정을 거쳤다. 일정크기로 절개된 DNA를 End-repair, A-tailing과정을 거친 후 Illumina adapter를 T4 DNA ligase를 이용하여 tagging하였다. 이 library를 Phusion DNA polymerase로 10 cycles 증폭하고 정제한 후 Agilent의 Bioanalyzer를 이용하여 library의 크기를 확인하고 Invitrogen의 Quant-iT PicoGreen dsDNA assay kit으로 정량했다. 적절한 농도 (6-10 pmol)의 library를 flow cell에 적용 한 후 c-Bot시스템을

이용해 적당한 cluster수를 얻은 후 HiSeq 2000 (Illumina)을 이용하여 100bp의 길이로 양쪽 끝을 sequencing했다. Sequencing depth는 암조직은 60x, 말초혈액은 30x로 계획했다.

2) WGS 분석

총20개 샘플에서 추출한 DNA를 Hiseq-2000장비로 해독했다. 샘플 각각의 해독된 염기서열 미가공 데이터의 양과 기본 통계정보는 아래 표와 같다.

샘플	해독전체량 (bp)	%GC	%N	%Q20	%Q30
01PB	91,480,828,780	40.394	0.254	95.504	90.809
01TN	178,394,132,944	41.037	0.141	96.231	93.253
02PB	155,967,981,036	40.458	0.092	94.855	88.561
02TN	192,200,961,618	40.949	0.065	96.565	92.606
03PB	97,881,580,358	40.639	0.229	96.177	92.357
03TN	180,173,224,310	41.025	0.121	96.317	92.479
04PB	88,298,092,338	40.544	0.074	96.252	92.261
04TN	204,002,363,582	40.775	0.083	94.952	89.342
05PB	97,729,957,340	40.451	0.074	95.033	89.758
05TN	196,225,862,724	40.597	0.073	94.552	88.526
06PB	105,717,468,610	40.671	0.047	96.423	92.546
06TN	200,356,306,810	41.225	0.142	96.127	91.94
07PB	97,163,455,814	40.388	0.027	95.779	90.912
07TN	198,452,827,682	40.470	0.066	95.131	89.733
08PB	76,442,451,354	41.002	0.035	96.816	93.412
08TN	179,865,298,540	40.524	0.036	95.322	89.951
09PB	109,520,837,932	41.006	0.053	96.208	92.000
09TN	174,349,440,080	40.930	0.028	96.011	91.412
10PB	88,523,795,826	40.699	0.025	95.925	91.453
10TN	221,669,133,698	41.142	0.042	96.270	92.178

해독된 염기서열 미가공 데이터를 참조표준게놈 GRCh37 build75상에 Burrows-Wheeler Aligner (BWA) 프로그램을 이용해 정렬한 후 SAMtools (version 1.3.1)과 SAMBLASTER (version 0.1.24)를 이용해 sorting 및 duplication 제거과정을 진행했다. Genome Analysis Toolkit (GATK) (version 3.6)의 Base Quality Score Recalibration (BQSR)와 HaplotypeCaller 과정을 통해 생식세포변이 (germline variant)를 Mutec2로 체세포돌연변이 (somatic mutation) 찾았다. 추가적으로 종양순도가 낮아 제대로 발굴되지 못했을 변이들을 찾기 위해 자체 제작 스크립트를 이용해 다른 변이 집합을 생성했다. 자체 제작한 방법은 단일 염기 다형성만을 대상으로 하며, 전장 유전체 서열 정렬 결과에서 직접 정렬된 결과 서열과 참조표준게놈서열 간 차이로부터 변이 대립형질의 변이 염기의 개수와 빈도 (Variant Allele Frequency, VAF)를 이용해 발굴했다. 특정 위치에서 특정 변이를 지지하는 해독 서열의 수가 3개 이상이며 VAF가 0.5이상일 때 변이로 결정했다. 변이 주석 부여는 ANNOVAR 프로그램을 이용했다. 체세포 고도변이 (somatic hypermutation, SHM)은 유전자 길이와 핵산 복제 시간으로 조정된 유전자별 변이 개수를 1000 염기 당 변이량으로 변환하여 변이 빈도 개념으로 SHM을 찾았다. 구조적변이 (structural variation) 발굴에는 Delly2 프로그램을 사용했다. 유전자 복제수 변이 (copy number alteration)는 종양순도와 배체수 분석에서 실행한 Sequenza (version 2.1.2)함수 결과를 이용했다.

라. RNA sequencing (RNA seq)

1) RNA-seq library 구축 및 sequencing

Cohort B 10명의 신선동결된 뇌(10개)의 total RNA (1 µg)를 oligo(dT) beads (Dyna)로 두 번의 purification 과정을 거친 후 얻은 poly(A)+RNA를 template로 cDNA를 만들었다. mRNA를 Covaris으로 200-700 bp로 fragment를 만든 후 superscript III로 첫 번째 cDNA 합성, 그리고 E.coli DNA polymerase I으로 두 번째 cDNA를 합성함. 합성한 double strand cDNA library에 Illumina adapter oligo를 T4 DNA ligase를 이용하여 tagging 함. 이 library를 phusion polymerase로 12 cycles 증폭하고 정제했다. 정제된 library를 Agilent의 Bioanalyzer를 이용하여 library의 크기를 확인하고 Invitrogen의 Quant-iT picogreen dsDNA assay kit으로 정량한 후, 적절한 농도 (6-10 pmol)의 library를 flow cell에 적용 한 후 c-Bot으로 적당한 cluster수를 얻었다. HiSeq 2000 (Illumina)을 이용하여 100bp의 길이로 양쪽 끝을 sequencing하였다.

2) RNA-seq 분석

추출한 전사체를 Hiseq-2000장비로 해독했다. 샘플 각각의 해독된 염기서열 미가공 데이터의 양과 기본 통계정보는 아래표와 같다. 시퀀싱된 리드(read)를 HISAT2 (version 2.0.4)를 이용해 GRCh37 reference assembly에 alignment하고 StingTie (version 1.3.0)으로 TPM (transcripts per kilobase Million) 및 FPKM (fragments per kilobase million)를 계산하고 ballgown (version 2.6.0)를 통해 유전자발현분석 및 DEG (differential expression analysis)를 했다. TPM값으로 PCA (principal component analysis)를 수행했다.

융합유전자 (fusion gene) 후보는 deFuse (version 0.6.2)를 통해 찾았다.

샘플	해독전체량 (bp)	%GC	%N	%Q20	%Q30
01TN	13,335,260,886	49.956	0.053	94.029	85.951
02TN	11,045,145,678	49.931	0.027	95.824	90.424
03TN	10,372,856,146	50.701	0.005	97.077	92.239
04TN	12,558,975,290	50.269	0.034	96.189	90.606
05TN	11,413,303,000	50.400	0.021	96.488	91.162
06TN	11,405,870,814	50.195	0.013	96.459	91.469
07TN	11,503,662,246	50.588	0.022	96.337	90.991
08TN	12,007,750,418	50.488	0.022	96.545	91.259
09TN	12,126,975,464	50.805	0.026	95.732	90.233
10TN	11,222,573,186	50.800	0.022	96.489	90.906

3. 연구 결과

가. MYD88/CD79B 돌연변이

1) Cohort A (115명)의 임상정보

MYD88/CD79B 돌연변이 빈도 연구에 포함된 115명 환자들의 임상정보는 Table 1에 기술되어 있다. 환자들 나이의 중앙값은 61세였고, 62명 (53.9%)이 60세 이상이었다. IELSG (International Extranodal Lymphoma Study Group) 예후인자 정보가 있었던 89명중 13.5%, 59.5%, 27.0%가 각각 저, 중간, 고위험군에 속했다. 106명 (92%)가 진단 후 치료를 받았으며, 92명 (80%)는 고용량 MTX기반 항암치료를 받았고 그 중 69명은 전뇌방사선치료도 받았다. 14명은 초치료로 방사선치료를 받았다. 무진행생존율의 중앙값은 전체는 23.4개월 (범위 15.2-31.5개월)이었고, 고용량 MTX 초치료를 받은 92명에서는 25.3개월 (범위 18.7-31.8개월)이었다. MYD88/CD79B 돌연변이 유무에 따른 예후의 차이는 없었다.

2) MYD88/CD79B 돌연변이 빈도

전체 115명중 110명에서 MYD88 exon5 PCR이 가능했으나, 이중 16개의 sequencing은 결과 판독이 불가능하였다. 돌연변이 유무에 대한 판단이 가능했던 94명중 33명 (35.1%)에서 MYD88 exon5의 codon265의 CTG>CCG, 즉 MYD88 L265P 돌연변이가 있었다 (Figure 1). 113명에서 CD79B exon5 PCR이 가능했고, 25명 (22.1%)에서 CD79B의 ITAM 도메인의 돌연변이가 있었다. 25개의 돌연변이는 Y196C (TAC>TGC, 8명), Y196H (TAC>CAC, 7명), Y196S (TAC>TCC, 5명), Y196N (TAC>AAC, 4명) 와 Y196F

(TAC>TTC, 1명) 였다 (Figure 2). MYD88 L265P 돌연변이가 있는 33명 중 13명에서 CD79B 돌연변이가 함께 있었다. 즉 MYD88 L265P 돌연변이 환자의 39.3%, CD79B 돌연변이 환자의 52.0%가 두가지 돌연변이를 함께 가지고 있었다 ($P = .019$, χ^2 test).

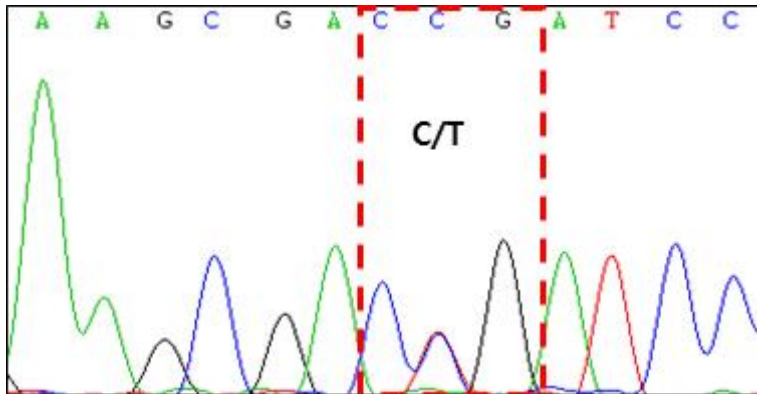
FFPE검체의 보관기간 및 검체의 DNA양에 따른 MYD88 L265P 돌연변이 빈도에 대한 분석결과 DNA양이 50ng이상과 미만의 경우 sequencing 실패율이 각각 6.8%, 25.4%로 50ng미만의 경우 sequencing실패율이 높았고, 분석 가능한 케이스 중 MYD88 L265P 돌연변이 빈도는 50ng이상의 경우는 43.9%, 50ng미만의 경우는 28.3% 였다. 2008년 이후의 검체가 이전의 환자들에 비해 평균 DNA양이 96.6ng (표준편차 254.6)대 237.7ng (표준편차 500.8)으로 DNA양이 적었고, 50ng이상의 비율도 33.8% 대 44.0%로 적었다. 2008년 이후 환자들의 sequencing 실패율이 20%로 2008년 이전 환자들의 16%에 비해 많았고, 분석 가능한 케이스 중 MYD88 L265P 돌연변이 비율이 28.8% 대 42.9%로 2008년 이후 환자들의 돌연변이 빈도가 낮았다 (Table 2)

Table 1. Clinical characterization of cohort A (N = 115)

factor		N	%
Age, median(range)		61 (23-82)	
	≤60	53	46.1
	>60	62	53.9
Sex	male	70	60.9
	female	45	39.1
Performans status	ECOG 0-1	56	48.7
	ECOG 2-4	59	51.3
LDH	normal	69	60.0
	increased	38	33.0
	not assessed	8	7.0
CSF protein	high	54	47.0
	not assessed	24	20.9
Deep lesions	yes	83	72.2
	no	32	27.8
Number of lesions	multiple	76	66.1
	single	39	33.9
IELSG risk score	low	12	10.4
	intermediate	53	46.2
	high	24	20.9
	not assessed	26	22.6
Cell of origin	ABC	49	42.6
	GCB	7	6.1
	not assessed	59	51.3
Treatment, first line	HDMTX-based	92	80.0
	HDMTX only	23	
	HDMTX->WBRT	69	
	WBRT	14	12.2
	Supportive care only	9	7.8

Figure 1. MYD88 L265P mutation.

a. CNS#6, MYD88 L265P (CTG>CCG)



b. CNS#48, MYD88 L265P (CTG>CCG)

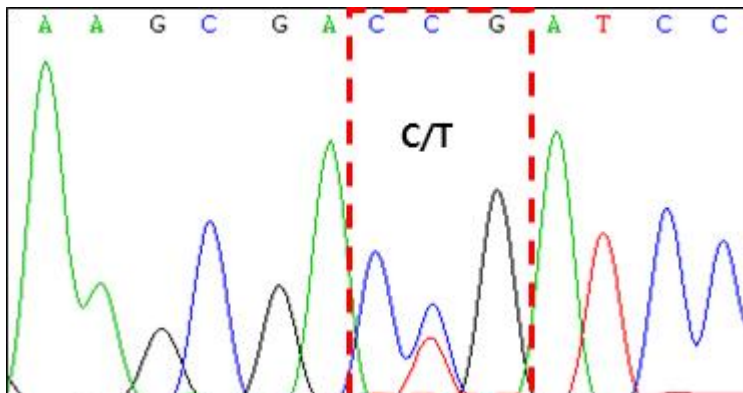
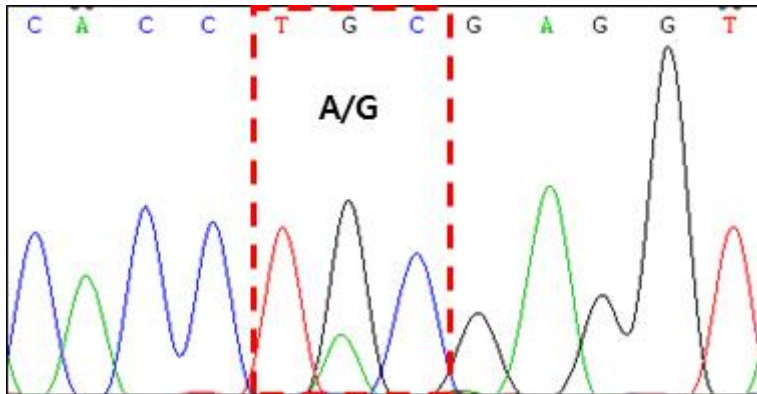


Figure 2. CD79B mutation

a. CNS#7, CD79B Y196C (TAC>TGC)



b. CNS#12, CD79B Y196H (TAC>CAC)

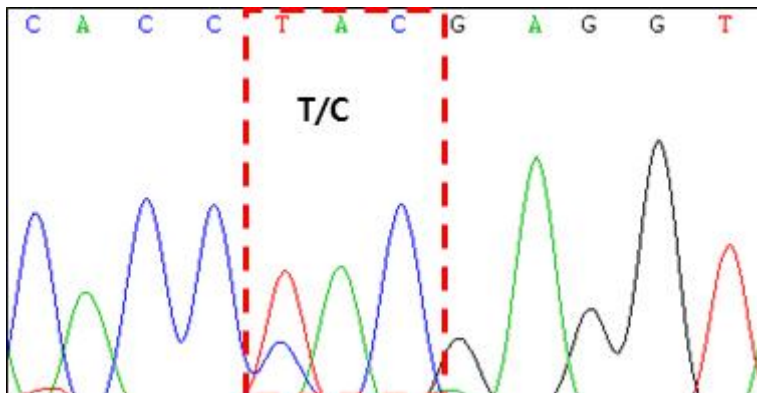
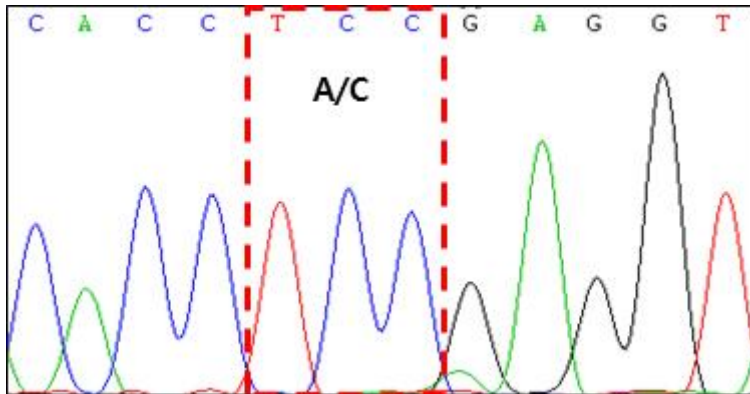


Figure 2. CD79B mutation (continued)

c. CNS#108, CD79B Y196S (TAC>TCC)



d. CNS#49, CD79B Y196N (TAC>AAC)

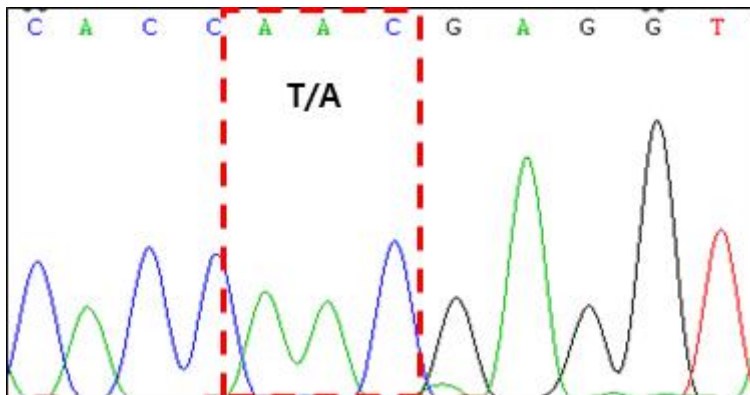


Table 2. MYD88 L265P mutation according to DNA amount and the year of diagnosis

			MYD88 L265P (N=33)	MYD88 WILD (N=61)	Unread -able (N=21)	P- val
DNA amount	<50ng	N	15	38	18	
	(N=71)	%	21.1	53.5	25.4	
		%	28.3	71.7	-	
	≥ 50ng	N	18	23	3	
	(N=44)	%	40.9	52.3	6.8	0.012
		%	43.9	56.1	-	0.116
Year of diagnosis	before	N	18	24	8	
	2008	%	36.0	48.0	16.0	
	(N=50)	%	42.9	57.1	-	
	after	N	15	37	13	0.314
	2008	%	23.1	56.9	20.0	0.157
	(N=65)	%	28.8	71.2	-	

나. Whole genome sequencing (WGS)결과

1) Mutation Load

Sequencing depth는 림프종 조직 (01TN ~ 10TN)은 평균 64.2x (표준편차 4.9x, 범위 58.1-73.9x)였고, 대조군(말초혈액, 01PB~10PB) 평균 33.6x (표준편차 7.2x, 범위 25.5x~52.0x)였다. Cellularity는 01TN (16%), 02TN (76%), 03TN (88%), 04TN (80%), 05TN(57%), 06TN (86%), 07TN(45%), 08TN (94%), 09TN (48%), 10TN(83%) 였다. 샘플별 mutation load는 Table 3에 요약되어 있다.

2) 체세포 돌연변이 (somatic mutation)

PCNSL의 반복되는 체세포 돌연변이에 대한 Mutec2/MutSig 분석에서 상위 50개 유전자중 통계학적으로 유의하게 ($q < 0.1$) 반복되는 변이 유전자들은 MYD88, POU2AF1, B3GNT8 였다 (Figure 3). POU2AF1과 B3GNT8의 경우 각각 70%, 40%에서 돌연변이가 확인되었으나 모두 synonymous single nucleotide polymorphism (Syn SNP)였다. 샘플 수 10개이고 일부 tumor(01TN, 07TN, 09TN)들의 낮은 cellularity로 인해 통계적으로 유의성을 가지는 driver mutation을 발굴하는 것이 어려울 것으로 판단되어, 최근에 발표된 대표적인 4개의 PCNSL의 WES연구 (18, 19, 20, 23) 결과를 분석하여 각 연구에서 최소 30%이상의 빈도로 확인된 체세포 돌연변이 유전자 46개를 선별하여 (Table 4) cohort B 10명에서 해당 유전자들의 돌연변이 유무를 분석했다 (Figure 4, Table 4). Figure 4의 유전자 배열은 non-synonymous

single-nucleotide polymorphism (Nonsyn SNP), frameshift insertion/deletion (frameshift INDEL), exonic structural variation (exonic SV), intronic SV, in-frame INDEL, syn SNP 순으로 각각 x32, x16, x8, x4, x2, x1의 가중치를 부여하여 중요도가 높은 순으로 배열된 것이며, 46개 후보 유전자중에서 cohort B에서도 주요 3가지 변이 (Nonsyn SNP, frameshift INDEL, Exonic SV)가 30%이상의 빈도에서 있었던 유전자는 총 24개였다. Nonsyn SNP가 30%이상에서 있었던 유전자는 24개중 5개 (MYD88, CD79B, PCLO, LRP1B, TENM4)였다. MYD88 돌연변이가 70%로 가장 높은 빈도로 나타났으며, 이 중 5개는 기존에 알려진 L265P 변이였고, 나머지 2개 (05TN, 08TN)는 다른 변이였는데, 05TN은 exon5의 P258L (CCA>CTA) 이었고 (Figure 5), 08TN은 R231Q (CGG>CAG)였다 (Figure 6). MYD88 P258L는 현재까지 2개 연구에서 보고되었으며, R231Q는 현재까지 보고된 적이 없는 변이였다. P258L은 cohort A의 CNS#126 (05TN) FFPE에서, R231Q는 동일 fresh tissue조직 (08TN)에서 Sanger sequencing으로 validation했다. CD79B 돌연변이는 Mutec2를 통해 50%에서 확인되었고, 이 중 4가지는 기존에 알려진 Y196N, Y196S, Y196D, Y196C였고, 나머지 하나는 T60M이었다. 자체제작(in-house)한 방법을 통해 확인 시 05TN (Y196N), 07TN (Y196S)도 추가로 CD79B의 돌연변이가 확인되어 CD79B 돌연변이 비율은 70%였고, MYD88/CD79B 변이가 함께 있는 비율은 50%였다. TENM4(ODZ4)는 30%에서 Nonsyn SNP가 있었고, 모두 T1867G였다.

Table 3. Mutation load of 10 PCNSL patients

Type	subtype	01TN	02TN	03TN	04TN	05TN	06TN	06TL	07TN	08TN	09TN	10TN
SNV	syn	6,766	22,861	28,053	52,321	17,353	24,148	26,029	15,534	17,568	16,826	20,154
	nonsyn	35	148	143	327	128	132	137	86	155	115	118
Insertion	non-frame shift	463	1,457	1,393	2,995	945	1,144	596	540	824	1,081	818
	frameshift	0	0	0	8	1	3	3	2	1	1	2
	SV	13	7	10	9	5	4	4	6	3	2	2
Deletion	non-frame shift	8,751	3,176	2,254	9,737	1,645	2,252	1,255	968	1,546	1,850	2,556
	frameshift	4	6	4	11	6	5	4	1	4	2	4
	SV	188	153	229	383	192	173	173	176	188	222	151
Translocation	SV	163	217	178	248	186	244	191	180	170	192	157

Figure 3. Fifty genes by MuTect2/MuSig analysis

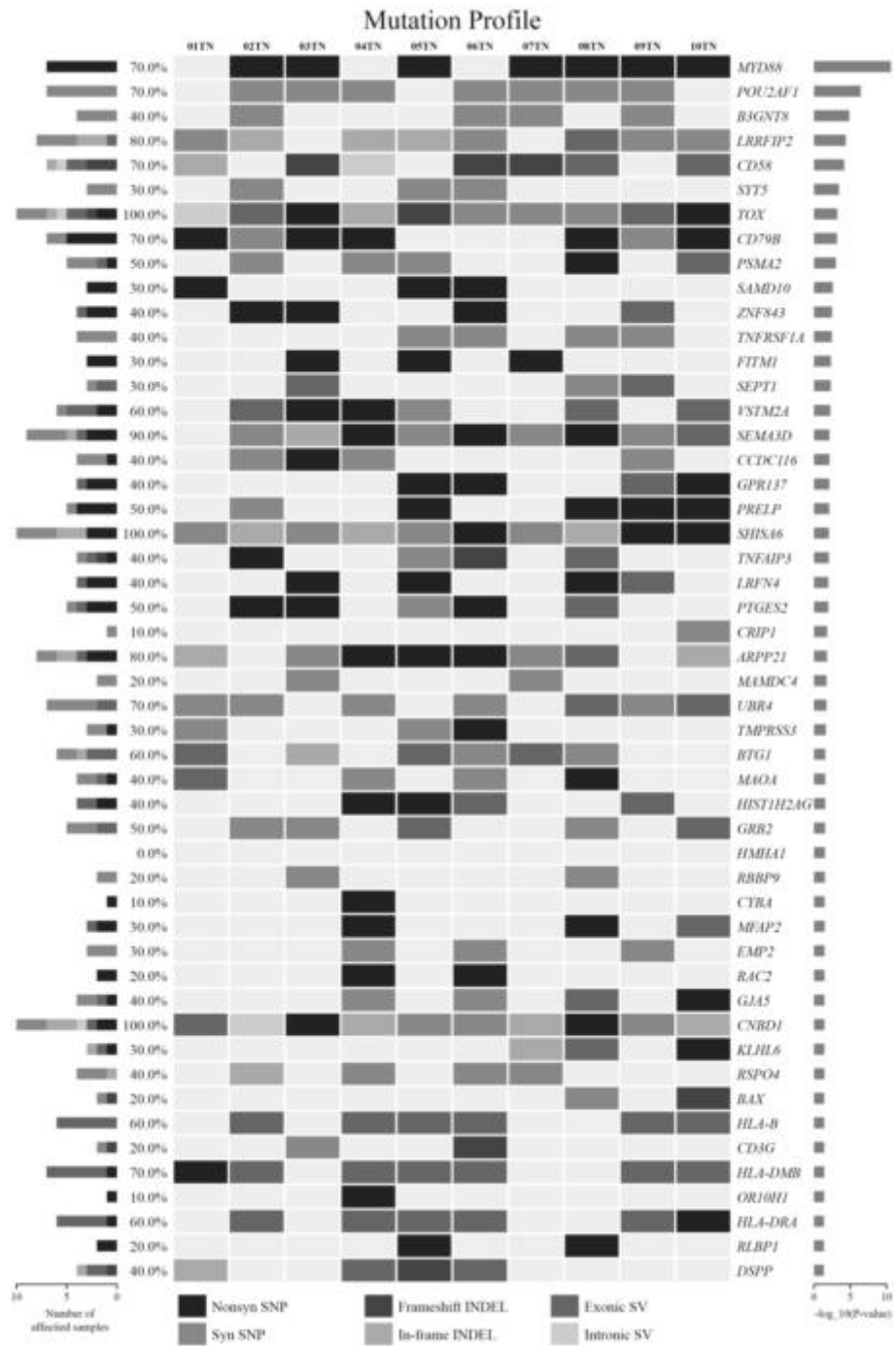


Table 4. Selected 46 genes detected in $\geq 30\%$ cases in previous WES studies on PCNSL

	Vater (23)	Bruno (18)	Fukum mura (20)	Chapuy (19)	Current study
1 MYD88	o	o	o	o	o
2 CD79B	o	o	o	o	o
3 PIM1	o	o	o	o	o
4 IGLL5	o	o		o	o
5 TBLXR1		o	o	o	
6 BTG1			o	o	o
7 DUSP2	o		o		o
8 ETV6		o	o		o
9 MPEP1	o		o		
10 OSBPL10	o		o		
11 APC2	o				
12 BAHCC1	o				
13 BTG2			o		
14 CARD11				o	
15 CCND3	o				o
16 CPEB2	o				
17 CSMD3		o			
18 DNAH7	o				o
19 DPYS	o				
20 DTX1			o		
21 ETS1			o		
22 FAM38A	o				
23 FAT4	o				o
24 HEATR7B2	o				
25 HIST1H1E			o		o
26 HIST1H2AC		o			o
27 IFR4				o	
28 KLHL14				o	
29 KMT2D			o		o
30 LRP1B	o				o
31 MUC16	o				
32 NEAT1			o		

Table 4. Selected 46 genes detected in $\geq 30\%$ cases in previous WES studies on PCNSL (continued)

	Vater (23)	Bruno (18)	Fukum mura (20)	Chapuy (19)	Current study
33 TENM4	o				o
34 PBMUCL1	o				o
35 PCLO	o				o
36 PIM2			o		o
37 PTPN23	o				
38 SUSD2	o				o
39 TCHH	o				o
40 TCL1A			o		
41 TMSB4X			o		
42 TOX			o		o
43 TTN	o				o
44 ZAN	o				o
45 ZFP36L1			o		
46 ZNF804A	o				o

Figure 4. Mutation profile of selected 46 genes

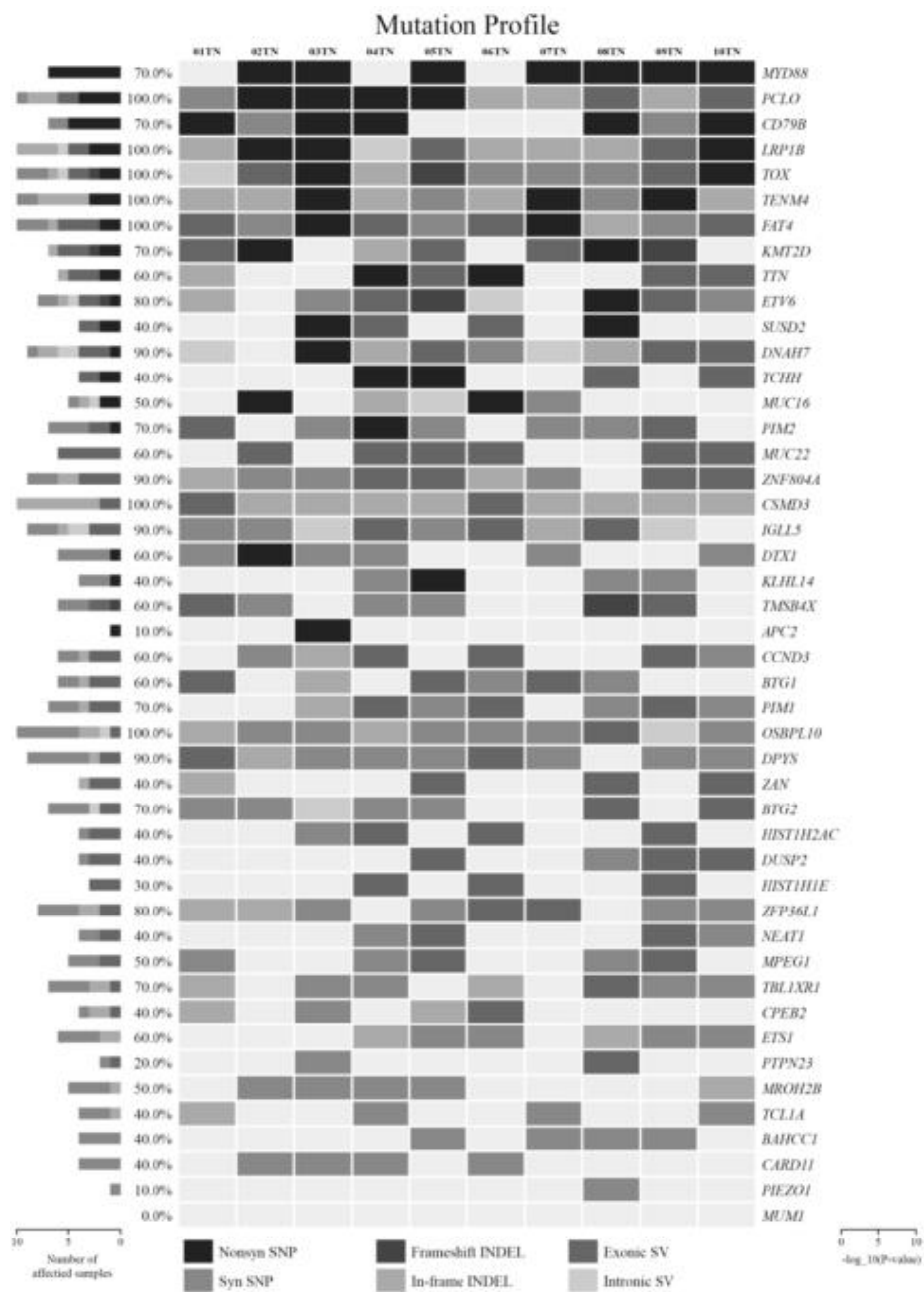
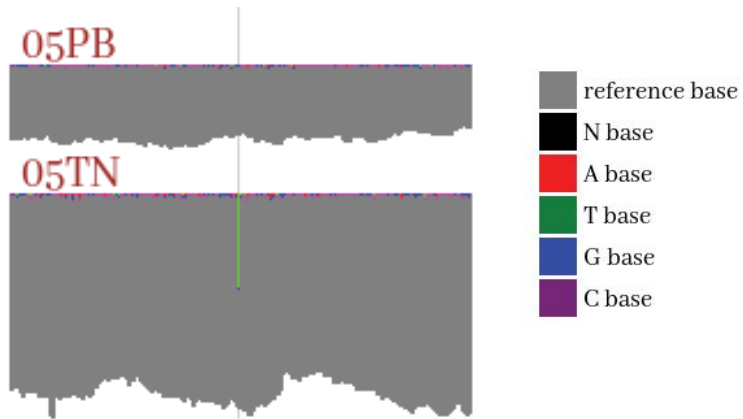


Figure 5. MYD88 P258L

a. MYD88 P258L (05TN), CCA>CTA



b. MYD88 P258L (CNS#126): validation (Sanger sequencing)

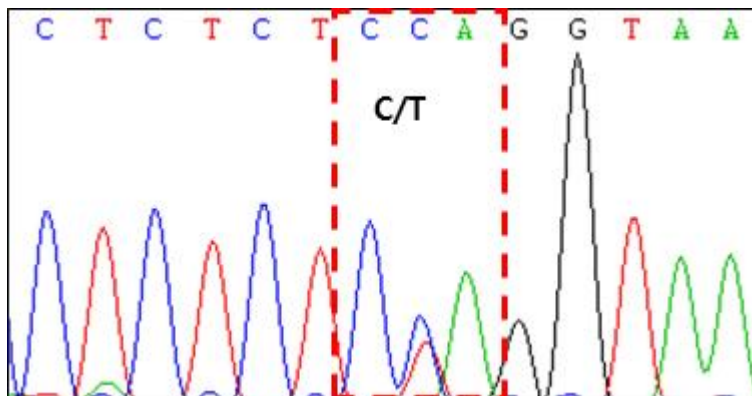
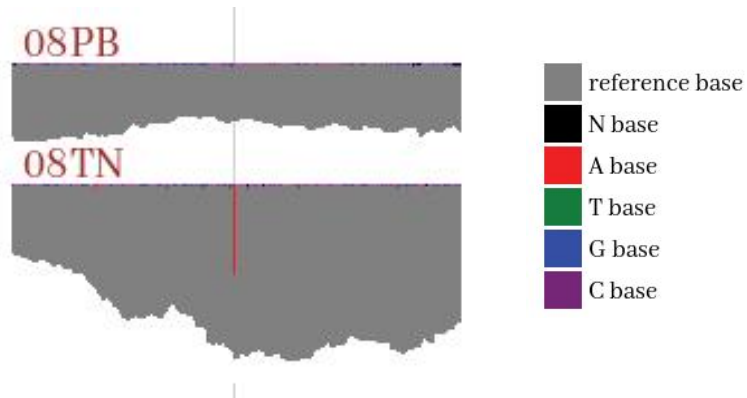
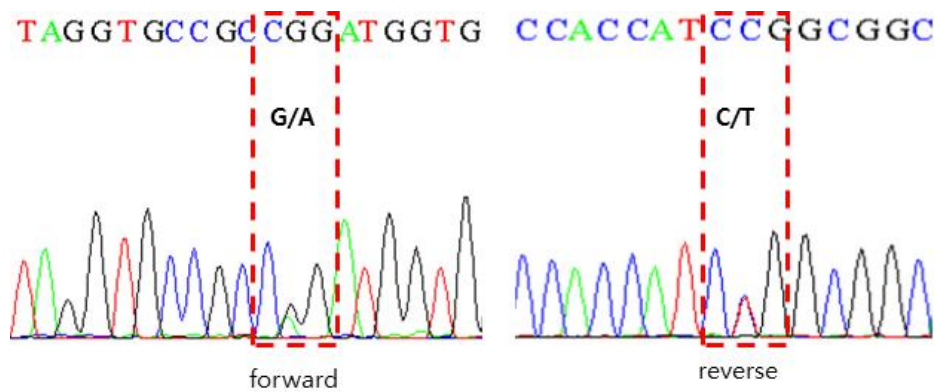


Figure 6. MYD88 R231Q

a. MYD88 R231Q (08TN), CGG>CAG



b. MYD8 R231Q (08TN): validation (Sanger sequencing)



3) aberrant somatic hypermutation (aSHM)

Khodabakhshi 등이 발표한 algorithm에 따라 SHM indicator를 분석하여 aSHM의 유전자를 발굴했다 (Table 5)(29). SHM indicator가 <0.1이 유전자는 총 11개 (AICDA, C1orf186, ARHGAP25, PIM2, DTX1, RHOH, AFF3, XBP1, IL16, CD79B, BCL6) 였다.

4) Chromosome copy number analysis 및 structural variation

30%이상의 빈도로 copy number의 gain 및 loss가 있었던 cytoband에 대한 분석결과 1q, 2q, 3p, 6p, 9p, 9q, 11q, 12, 15q, 19q에 frequent gain이 있었고, 2p, 6p, 6q, 8p, 9p, 16p, 17p, 19p에 frequent loss가 확인되었다 (Figure 7, Table 6) Delly분석을 통해 structural variation INDEL을 분석한 결과 50%이상의 빈도에서 deletion이 있었던 gene은 총 113개였고, CDKN2A del은 70%에서 높은 빈도로 있었고, 그 외 HLA-DR, HLA-C, TDG, NBPF9, NBPF20, NBPF25P, PTPRN2, MIR7641-2, LOC100996724, PDE4DIP, RNU6-2, CDKN2A, CDKN2B가 70-80%에서 del이 있음을 확인했다. PD-L1/2가 주변영역인 9p23~9p24 영역에서 반복되는 전위(translocation)이 관찰되었다 (Figure 8).

6) RNA seq

deFuse를 통해 확인된 융합유전자 (fusion gene)의 샘플별 결과는 Table 7에 있다.

Table 5. Recurrent SHM-targets in PCNSL

Gene names	SHM indicator	Total SNVs	Mutated Samples	Transition/Transversion (P-value)	Motif Bias (P-value)	C:G over A:T (P-value)
AICDA	0.015515	11	3	3.33 (0.0149866)	1.60 (0.0402477)	12.00 (0.00619195)
C1orf186	0.020192	10	7	1.40 (0.184925)	5.00 (0.00273875)	11.00 (0.0162539)
ARHGAP25	0.026876	9	5	1.75 (0.173468)	4.50 (0.00761004)	10.00 (0.0147059)
PIM2	0.031350	12	6	2.50 (0.0497664)	1.80 (0.0180374)	6.00 (0.0343249)
DTX1	0.036085	8	4	2.33 (0.0659674)	4.00 (0.00505051)	4.00 (0.141026)
RHOH	0.043961	19	7	2.50 (0.0108549)	0.91 (0.0852234)	2.50 (0.0918358)
AFF3	0.047914	8	5	4.00 (0.0202797)	1.00 (0.141026)	9.00 (0.0384615)
XBP1	0.068589	12	6	3.67 (0.0180374)	0.75 (0.185355)	3.67 (0.0965137)
IL16	0.070434	7	4	3.50 (0.0512821)	2.00 (0.0512821)	3.50 (0.132867)
CD79B	0.076131	6	4	3.00 (0.121212)	3.00 (0.0400433)	7.00 (0.0909091)
BCL6	0.095099	13	4	2.75 (0.02359)	0.50 (0.32236)	2.75 (0.113097)
RUBCNL	0.166065	11	5	2.25 (0.0430545)	0.62 (0.317559)	1.60 (0.334961)
IGLL5	0.206666	7	5	0.80 (0.5)	1.25 (0.132867)	3.50 (0.132867)
GRHPR	0.231438	6	4	1.00 (0.5)	1.00 (0.272727)	7.00 (0.0909091)
BTG2	0.258057	6	5	1.67 (0.28355)	1.67 (0.121212)	1.67 (0.5)
BIRC3	0.411991	7	5	0.80 (0.5)	0.80 (0.27972)	1.25 (0.5)

Figure 7. chromosome copy number analysis

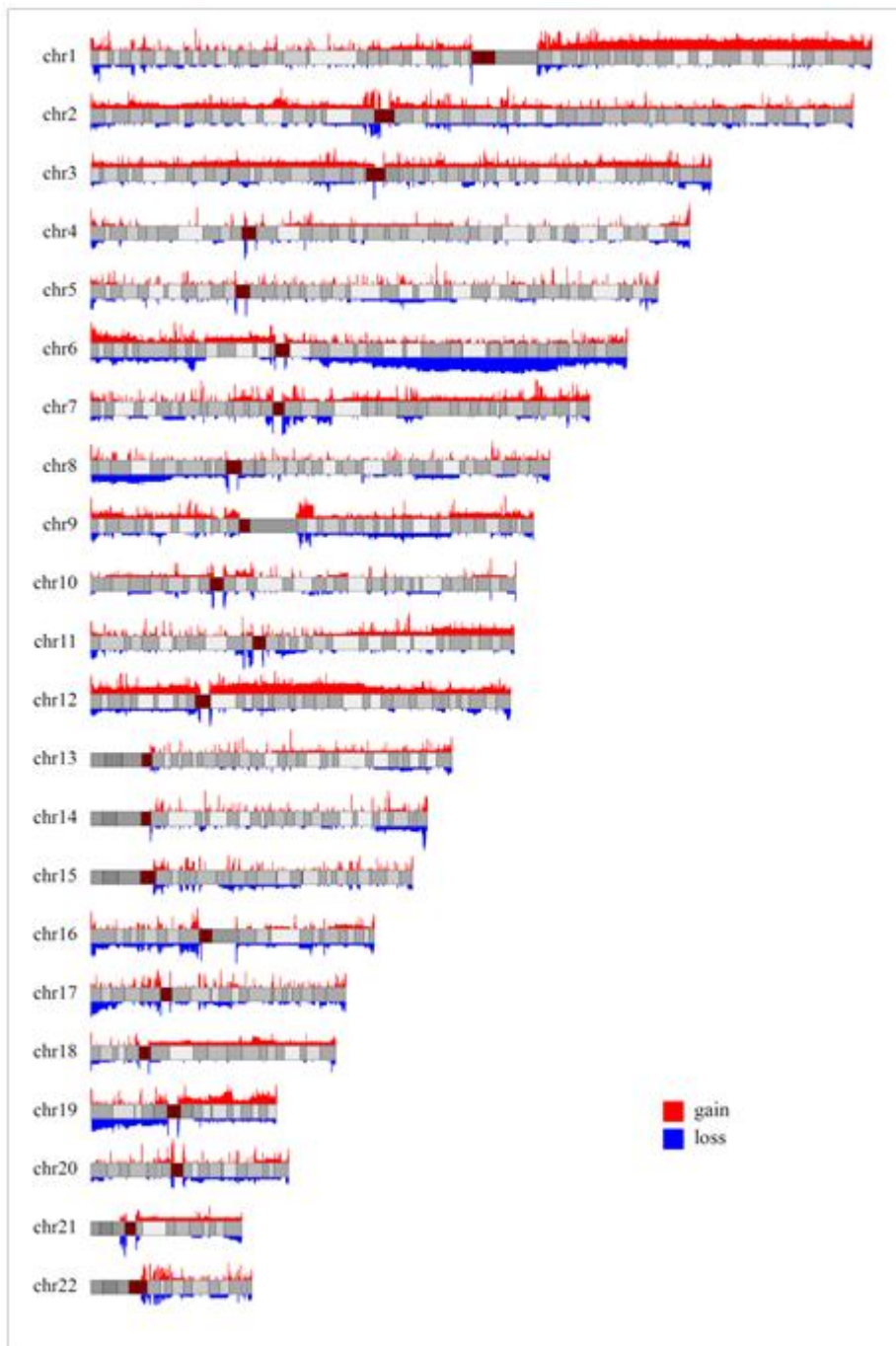


Table 6. Most common genomic aberration

	Size (Mbp)	Position (Mbp)	PCNSL (n=10)
Loss			
2p11.1	2.8	90.5 - 93.3	4(40%)
6p21.32-p21.33	3.1	30.4 - 33.5	3(30%)
6q14.2-q27	87.2	83.9 - 171.1	4(40%)
8p22-q23.2	99.4	12.7 - 112.1	3(30%)
9p24.3	2.2	0 - 2.2	3(30%)
16p11.2	6.5	28.1 - 34.6	3(30%)
16p13.11	2.0	14.8 - 16.8	3(30%)
17p13.2-p13.3	6.5	0 - 6.5	4(40%)
19p13.11-p13.3	20.0	0 - 20.0	3(30%)
Gain			
1q24.2-q44	82.1	167.2 - 249.3	3(30%)
2q12.2	1.5	106.0 - 107.5	3(30%)
3p21.31-p21.33	6.9	43.7 - 50.6	3(30%)
6p12.2	1.1	51.8 - 52.9	3(30%)
6p21.32	1.4	32.1 - 33.5	3(30%)
6p23-p25.3	15.2	0 - 15.2	3(30%)
9p11.2	3.7	43.6 - 47.3	3(30%)
9q13-q21.11	6.3	65.9 - 72.2	5(50%)
11q23.2	2.0	112.5 - 114.5	3(30%)
12	133.9	0 - 133.9	4(40%)
15q13.2	0.9	30.3 - 31.2	6(60%)
19q12-q13	30.5	28.6 - 59.1	4(40%)

Figure 8. chromosome rearrangement

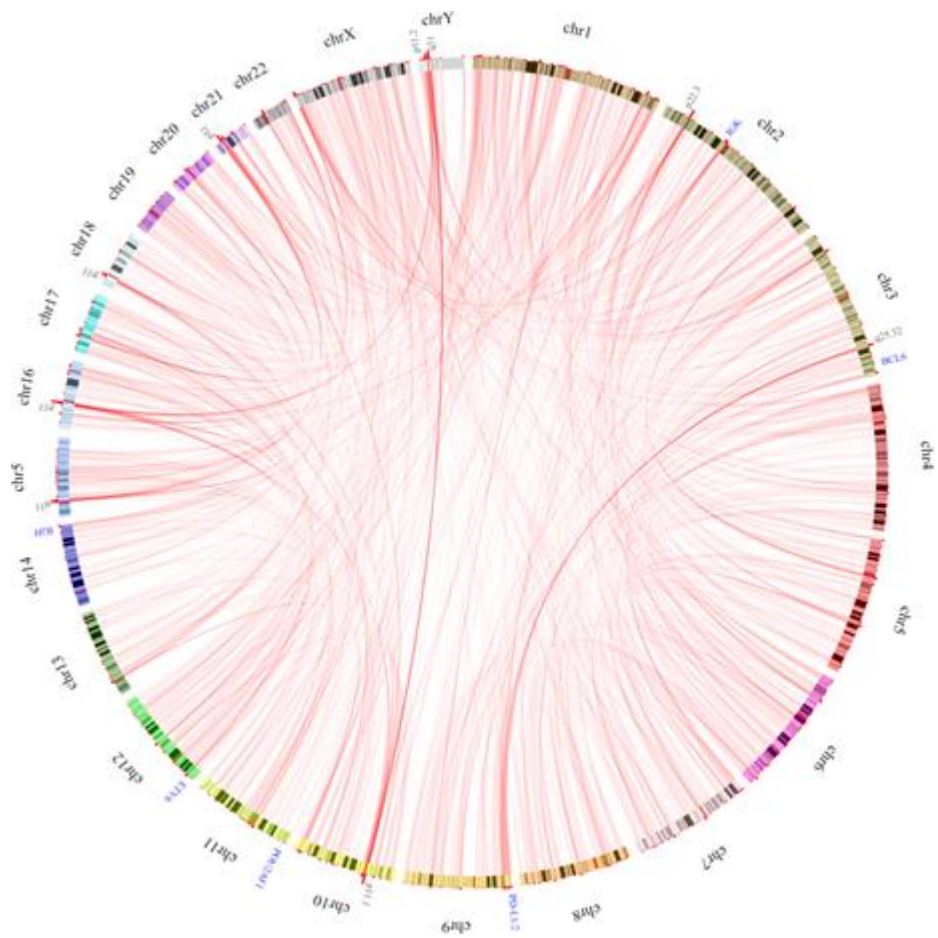


Table 7. Fusion genes

Fusion	Count	01 TN	02 TN	03 TN	04 TN	05 TN	06 TN	07 TN	08 TN	09 TN	10 TN
AC005244.2-LINC00670	2		0	0	1	0	0	0	1	0	0
ENSG00000231486-IGKV5-2	2		1	0	0	0	0	0	0	1	0
AC005358.1-ELAC2	1		0	0	0	0	0	0	0	1	0
AC069208.1-SOX5	1		0	0	1	0	0	0	0	0	0
AC090193.2-FGFR1	1		0	0	0	0	1	0	0	0	0
AC093827.1-DGKI	1		1	0	0	0	0	0	0	0	0
AC114492.1-FOXJ3	1		0	0	1	0	0	0	0	0	0
AC137549.1-EPB41L4A	1		0	0	1	0	0	0	0	0	0
AC138035.1-AL645608.3	1		0	0	0	0	1	0	0	0	0
AL161788.1-PTPRD	1		0	0	1	0	0	0	0	0	0
AL162427.1-CYP4F22	1		0	0	0	0	0	0	1	0	0
ANKRD44-NPM1P46	1		0	0	0	0	0	0	1	0	0
ATP6V1E1-MICAL3	1		0	0	0	0	1	0	0	0	0
BCL10-IGHJ6	1		0	0	1	0	0	0	0	0	0
BCL6-LPP	1		0	0	0	0	0	0	0	0	1
BRD4-FAM129C	1		0	0	0	0	0	0	1	0	0
C19orf66-DNMT1	1		0	1	0	0	0	0	0	0	0
CAD-SLC5A6	1		0	0	0	1	0	0	0	0	0

Table 7. Fusion genes (continued)

Fusion	Count	01 TN	02 TN	03 TN	04 TN	05 TN	06 TN	07 TN	08 TN	09 TN	10 TN
CCDC88C-TTC7B	1		0	0	0	0	0	0	1	0	0
CCND3-TRERF1	1		0	0	1	0	0	0	0	0	0
CD58-MAN1C1	1		0	0	0	0	1	0	0	0	0
CD58-RANGAP1	1		0	0	1	0	0	0	0	0	0
CDC25C-VDAC1	1		0	0	0	0	0	0	0	1	0
CNGB3-CPNE3	1		0	0	0	0	1	0	0	0	0
CREB3L2-MTPN	1		0	1	0	0	0	0	0	0	0
ELAC2-MYOCD	1		0	0	0	0	0	0	0	1	0
ENSG00000163486-ENSG00000236933	1		0	0	0	0	0	0	0	1	0
ENSG00000231486-IGKV4-1	1		1	0	0	0	0	0	0	0	0
ENSG00000252918-PRDM1	1		0	0	0	0	1	0	0	0	0
ERMP1-PDCD1LG2	1		0	0	0	1	0	0	0	0	0
FOXJ3-HIVEP3	1		0	0	1	0	0	0	0	0	0
GCFC2-TET3	1		0	0	0	0	0	0	0	1	0
GNAS-KLHL6	1		1	0	0	0	0	0	0	0	0
GPR79-INSL6	1		0	0	1	0	0	0	0	0	0
HLA-DPB2-PSMB8-AS1	1		0	0	0	0	0	0	0	1	0
ICAM1-RN7SL5P	1		0	0	0	0	0	0	0	1	0

Table 7. Fusion genes (continued)

Fusion	Count	01 TN	02 TN	03 TN	04 TN	05 TN	06 TN	07 TN	08 TN	09 TN	10 TN
IGHA1-IGHG1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
IGHA2-IGHD3-9	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
IGHD3-9-IGHG1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
IGHG2-IGHG4	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
IGSF3-RANGAP1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
INTS3-OSBPL10	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
LINC-PINT-PDCD1LG2	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
MIR1208-ZFAT	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
MIR5680-NCALD	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
NCALD-RRM2B	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
NCBP3-UBE2G1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
NCOA3-SULF2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
NEIL3-UBE2J1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
POPDC3-PRDM1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
RNU6-1013P-TAPBP	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
RPL39-SOWAHD	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
VPS13A-VPS13A-AS1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0

Table 8. Published studies on PCNSL

Author	Methods	Tissue	N	MYD88 mutation	CD79B mutation
Chapuy, US/Netherlands (19)	WES	fresh	14	86% (all L265P)	64%
Fukumura, Japan (20)	WES	fresh	41	85% (L265P 83%)	NA
Bruno, France (18)	WES(9) Sanger sequencing(28)	fresh(34) FFPE(3)	37	38% (all L265P)	30%
Vater, Germany (23)	WES	fresh	9	33%	44%
Braggio, US (17)	WES	fresh(7) FFPE(3)	10	70% (L265P 50%)	40%
Nakamura, Japan (25)	amplicon sequencing	fresh(48) FFPE(23)	71	76% (L265P 70%)	80%
Hattori, Japan (26)	amplicon sequencing	NA	42	67% (all L265P)	43%
Yamada, Japan (24)	Sanger sequencing	FFPE	18	94% (all L265P)	61%
Montesinos-Rongen, German (22)	Sanger sequencing	fresh	14	50% (all L265P)	NA
Gonzalez-Agular, France (21)	WES(4) sanger sequencing(25)	fresh	29	38% (all L265P)	NA
Kraan, Netherlands (16)	Sanger sequencing	FFPE	20	75%	75%

4. 고찰

본 연구에서는 MYD88 L265P 돌연변이는 cohort A (115명)에서는 35.1% (분석가능한 94명중 33명), cohort B (10명)에서 50%였다. Cohort B에서 05TN과 08TN에서 P258L, R231Q의 MYD88 돌연변이가 각각 확인되어 cohort B의 MYD88 돌연변이 전체 빈도는 70%였다. PCNSL의 MYD88 L265P 돌연변이 빈도는 연구들마다 33%-94%로 차이가 있는데, 분석에 포함된 환자 수, 조직검체의 종류 및 분석방법에 있어 연구 간의 차이가 있다 (Table 8). 20명이상의 PCNSL 환자들이 포함된 연구들에서도 그 빈도는 38-85%로 연구간 차이가 있는데, 이중 일본의 3개의 연구에서 MYD88 L265P 돌연변이 빈도는 67-85%로 높았고 모두 exome sequencing을 했다. 이 중 Nakamura 등은 현재까지 발표된 연구 중 가장 대규모인 71명에서 targeted amplicon sequencing을 통해 MYD88 L265P 돌연변이 빈도를 70%로 보고했고, Hattori는 같은 방법으로 67%, Fukumura는 WES을 통해 83%로 보고했다 (20, 25, 26). 50% 이하의 빈도로 보고된 경우는 프랑스와 독일의 연구로 33-50% 였다. 프랑스의 Bruno등은 WES와 Sanger sequencing를 통해 37명 중 38%에서 Gonzalez-Aguilar 등도 같은 방법으로 29명 중 38%의 MYD88 L265P 돌연변이 빈도를 보고했다 (18, 21). 현재까지의 연구들의 결과에서 신선 동결 조직 대 FFPE, exome sequencing 대 Sanger sequencing에 따른 MYD88 L265P 돌연변이 빈도의 일관된 유의한 차이를 찾을 수는 없었다. 이러한 방법과 재료측면에서의 유의한 차이 없이 일본과 유럽의 연구에서 PCNSL환자의 MYD88 L265P 돌연변이 빈도에서 차이가 있는데

인종간의 차이가 존재하는 것인지 혹은 다른 관련인자가 있는지를 설명하기는 어렵다. 최근 Staudt 등이 일본, 미국, 유럽의 PCNSL의 6개의 exome sequencing 연구들에 대한 메타분석을 시행했는데 이 보고에서 MYD88 L265P 돌연변이의 빈도는 53%였다 (27).

본 연구에서는 cohort A에서는 MYD88 L265P 돌연변이가 35.1%로 다른 연구들에 비해 낮았고, cohort B에서는 70% (L265P만은 50%)로 두 cohort간의 차이가 컸다. Cohort A는 FFPE로 Sanger sequencing을 했고, B는 신선동결조직에서 WGS를 한 것이기는 하나 앞서의 연구들에서 보여준 바와 같이 이러한 방법자체만으로는 빈도의 차이를 명확히 설명할 수는 없어, FFPE조직의 보관상태 및 DNA양 등 샘플의 질적인 인자가 변이를 찾는 데 영향을 미칠 수 있을 거라는 가정 하에 조직검사를 한 시기와 DNA양 두 가지 요인에 따라 빈도의 차이를 확인했다. 115개 샘플 중 71(61.7%)가 DNA양이 50ng 미만이었다. DNA양이 50ng 미만의 경우 25.4%(18/71)에서 sequencing을 실패했고, MYD88 L265P 돌연변이 빈도는 28.3% (15/53)인 반면, 50ng 이상의 경우는 3명(6.8%)에서만 sequencing이 불가능했고, MYD88 L265P 돌연변이 빈도는 43.9% (18/41)로 이 결과는 cohort B의 L265P만의 빈도 50%와 유의한 차이가 없음을 확인했다. 2008년 이전의 오래된 조직에서 빈도가 낮을 거라는 예상과 달리 2008년 이후 환자들의 조직이 이전의 조직에 비해 DNA양이 더 적었고 sequencing 실패율이 높고 L265P 빈도도 더 낮았다. 즉 시간보다는 보관된 샘플의 DNA의 양 등의 질적인 측면이 검사결과에 영향을 미칠 수 있음을 시사한다. 현재까지 국내에는 DLBCL의 MYD88 돌연변이에 2개의 연구가 있었으며 PCNSL에 국한한 연구는

없었다. Kim 등이 187개의 DLBCL 조직에서 MYD88 L265P 돌연변이는 19.3% (ABC-DLBCL, 21.6%; GCB-DLBCL, 14%)로 보고했고, 이 연구에는 12개의 PCNSL이 포함되어 있었고 이중 단지 1개 (8%)에서 MYD88 L265P 돌연변이가 있었다 (30). Choi등의 연구에서는 124개의 DLBCL 조직에서 L265P mutation은 6.5%(8/124)로 보고했고 이 연구에는 PCNSL환자는 포함되지 않았다 (31).

본 연구에서는 cohort B에서 L265P외 2가지 MYD88 돌연변이 (P258L, R231Q)를 확인할 수 있었고, 모두 Sanger sequencing으로 validation되었다. P258의 경우는 현재까지 2개의 연구에서 각 1명씩 보고되었는데, 91명의 CLL에서 9 (10%)의 MYD88 돌연변이 중 한명에서 Vitreoretinal B-cell lymphoma 29명중 20명 (69%)의 MYD88 돌연변이 중 1명에서 확인되었다 (15, 32). PCNSL에서 L265P외 Q113R, G159A, Q143E, M232T 변이가 보고된 바는 있으나 (17, 20, 25), P258L는 첫 번째 보고이다. MYD88 R231Q는 이전에 보고된 적이 없는 새로운 돌연변이로 MYD88 TIR domain에 위치하고 있어 MYD88의 gain of function 변이일 것으로 예상되나 이 변이가 NF- κ B활성화에 역할을 하는지에 대해서는 추가연구가 필요하다. PCNSL에서 L265P 이외의 돌연변이도 존재할 가능성이 있다는 것을 염두 해 두어야 하며 특히 BTK 억제제나 IRAK1/4 억제제와 MYD88 돌연변이가 있는 환자들을 대상으로 하는 표적치료제치료를 계획할 때는 이러한 가능성을 고려해야겠다.

MuTect2/MuSig분석에서 통계학적으로 p/q value를 만족하는 상위 50개 유전자중 q value < 0.1의 유전자는 MYD88, POU2AF1, B3GNT8였고, B3GNT8은 glycosylation에 중요한 효소로서

신경교종세포에서 정상 뇌조직에 비해 높게 발현이 되고, 과발현되는 경우 metastatic potential을 증가시킨다는 세포주 실험결과가 있었고 (33), 대장암에서 5-FU항암제의 약제내성과 관련이 있다는 연구결과가 있었으나 (34), 림프종에 대해서는 연구된 바가 없으며, 본 연구에서 대조군의 정상 뇌조직이 없어 과발현 여부를 확인할 수는 없었다. POU2AF1은 최근연구에서 POU2AF1유전자의 3'-untranslated region의 germline 돌연변이가 림프종 발생과 관련이 있다는 보고는 있으나 (35), 림프종에서의 POU2AF1의 변이가 어떠한 기능을 하는지는 알려져 있지 않다. MuTect2/MuSig분석의 상위 50개 유전자중 3명 (30%)이상에서 Non-syn SNP가 존재했던 유전자들은 총 12개이며 이중 다른 연구들에서도 주요 변이로 제시되었던 것은 MYD88과 C79B뿐이었고 나머지 유전자들에 대해서는 그 기능적인 의미는 밝힐 수 없었다. 최근에 발표된 PCNSL의 4개의 WES연구들 (18, 19, 20, 23)에서 30%이상의 빈도의 변이를 가지는 46개 유전자를 선별하여 본 WGS연구 10명에서 MuTec분석 결과 24개 유전자에서 30%이상의 빈도의 주요변이가 확인되었고 본 연구에서는 주요변이에 Nonsyn SNP, frameshift INDEL, Exonic SV를 포함했다. 각 연구마다 주요유전자변이 선정방식에 있어 차이가 있었으나, Non-syn SNP만으로 국한했을 때 본 연구 환자군에서 30%이상에서 해당변이가 있었던 유전자는 MYD88, CD79B, PCLO, LRP1B, TENM4(ODZ4) 5개였다. ODZ4는 그 돌연변이는 양극성장애(bipolar disorder) 발생의 위험인자로 밝혀져 있으며, teneurin transmembrane protein 4 (TENM4)를 encoding하고 TENM4는 뇌의 oligodendrocyte와 neuron에 높게 발현된다 (36,

37). PCNSL에서는 Vater 등의 연구에서 OZD4의 protein coding 변이가 약 44% (4/9)에서 처음으로 확인되었고 (23), 이는 PCNSL의 CNS tropism을 설명하는 유전자의 하나로 제안되었다. 다른 PCNSL연구들에서는 재현되지는 않았으며, 본 연구에서는 30%에서 TENM4의 nonsyn SNP가 존재함을 확인했고 모두 T1867G였다. PCNSL의 CNS tropism과 관련해 SPP1 (osteopontin), MAG, SLC16A9, MDM2, YEATS4 등이 제시된 바가 있었고, Lim의 연구에서는 CNS와 non-CNS에서의 gene expression의 비교를 통해 SPP1과 MAG가 주요 유전자임을 밝혔다 (38). 본 연구에서는 대조군과의 비교분석은 가능하지 않았고, SPP1, SLC16A9, MDM2, YEATS4에서 Delly분석을 통해 각각 20, 20, 30, 30%의 빈도로 해당유전자의 deletion이 존재함을 확인할 수 있었고, 10명의 환자 중 02TN와 10TN 2명을 제외하고 OZD4, SPP1, SLC16A9, MDM2, YEATS4중 1개 이상의 유전자에서 변이가 확인되었고, 02TN은 전신재발을 한 환자였다. 하지만 이 유전자들의 deletion이 해당 유전자 발현 미치는 영향과 기능에 대해서는 확인된 바가 없어 이에 대한 추가연구가 필요하다. 앞서 46개 후보 유전자중에서 본 연구 포함 5개의 연구에서 공통적인 돌연변이유전자는 MYD88, CD79B, PIM1이었고, 5개의 연구에서 3개이상의 연구에서 공통적인 결과를 보이는 유전자에는 IGLL5, TBL1XR1, BTG1, DUSP2, ETV6가 포함되어, 총 46개 후보 유전자중 17%만이 과반이상의 연구에서 재현된다는 것을 확인했다. 각 연구에서 반복적으로 나타나는 특징적인 변이가 상이하다는 것은 전신 DLBCL연구들에서도 마찬가지인데 공통적으로 확인되는 유전자변이는 전체의 약 10-20%에 해당되는 것으로 알려져 있다

(39). 본 연구는 PCNSL에서의 첫번째 WGS연구로 WES에서는 확인하기 어려운 splicing site mutation, copy number, structural mutation에 대한 분석이 가능하고 intron과 intergenic 영역에 대한 변이를 밝힐 수 있다는 장점이 있다. 제한점은 WES 연구에 비해 coverage depth가 낮아 frequency가 낮은 SNP발굴에 있어 위음성의 가능성이 있을 가능성이 있고 본 연구와 같이 샘플수가 10개로 작은 경우 통계적인 유의성을 가지는 nonsyn SNP및 sSHM관련 유전자들을 발굴하는데 한계가 있었다. 향후 RNA-seq을 통해 정상 뇌조직 혹은 전신 DLBCL과 같은 대조군을 포함한 추가연구를 함으로써 PCNSL에서의 병태생리학적 특성을 밝힐수 있을 것으로 기대한다.

본 연구는 PCNSL환자에서 MYD88/CD79B 돌연변이의 빈도를 확인한 대규모 환자군 연구로 국내에서 PCNSL 환자만을 대상으로 한 MYD88/CD79B 돌연변이 빈도에 대한 첫 보고이다. 또한 PCNSL에서의 첫 번째 WGS 연구이다. MYD88와 CD79B는 PCNSL의 특징적인 유전자변이로 MYD88에서 대부분이 L265P이나 P258L과 R231Q 돌연변이의 존재를 확인했다. 본 WGS연구에서 확인된 TENM4 돌연변이 및 SPP1, SLC16A9, MDM2, YEATS4의 구조적결손 등의 결과가 CNS tropism 등 PCNSL의 발병기전 및 유전학적 특성을 규명할 수 있는 후속 연구의 기반이 될 것이다.

5. 참고문헌

1. Kluin P, Deckert M, J F: Primay diffuse large B-cell lymphoma of the CNS. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues:240-1, 2008
2. Gavrilovic IT, Hormigo A, Yahalom J, et al: Long-term follow-up of high-dose methotrexate-based therapy with and without whole brain irradiation for newly diagnosed primary CNS lymphoma. J Clin Oncol 24:4570-4, 2006
3. Deckert M, Montesinos-Rongen M, Brunn A, et al: Systems biology of primary CNS lymphoma: from genetic aberrations to modeling in mice. Acta Neuropathol 127:175-88, 2014
4. Montesinos-Rongen M, Siebert R, Deckert M: Primary lymphoma of the central nervous system: just DLBCL or not? Blood 113:7-10, 2009
5. Courts C, Montesinos-Rongen M, Brunn A, et al: Recurrent inactivation of the PRDM1 gene in primary central nervous system lymphoma. J Neuropathol Exp Neurol 67:720-7, 2008
6. Montesinos-Rongen M, Van Roost D, Schaller C, et al: Primary diffuse large B-cell lymphomas of the central nervous system are targeted by aberrant somatic hypermutation. Blood 103:1869-75, 2004
7. Montesinos-Rongen M, Schafer E, Siebert R, et al: Genes regulating the B cell receptor pathway are recurrently mutated in primary central nervous system lymphoma. Acta Neuropathol

124:905–6, 2012

8. Montesinos-Rongen M, Schmitz R, Brunn A, et al: Mutations of CARD11 but not TNFAIP3 may activate the NF- κ B pathway in primary CNS lymphoma. *Acta Neuropathol* 120:529–35, 2010

9. Lin SC, Lo YC, Wu H: Helical assembly in the MyD88-IRAK4-IRAK2 complex in TLR/IL-1R signalling. *Nature* 465:885–90, 2010

10. Kawagoe T, Sato S, Matsushita K, et al: Sequential control of Toll-like receptor-dependent responses by IRAK1 and IRAK2. *Nat Immunol* 9:684–91, 2008

11. Ngo VN, Young RM, Schmitz R, et al: Oncogenically active MYD88 mutations in human lymphoma. *Nature* 470:115–9, 2011

12. Gachard N, Parrens M, Soubeyran I, et al: IGHV gene features and MYD88 L265P mutation separate the three marginal zone lymphoma entities and Waldenstrom macroglobulinemia /lymphoplasmacytic lymphomas. *Leukemia* 27:183–9, 2013

13. Li ZM, Rinaldi A, Cavalli A, et al: MYD88 somatic mutations in MALT lymphomas. *Br J Haematol* 158:662–4, 2012

14. Treon SP, Xu L, Yang G, et al: MYD88 L265P somatic mutation in Waldenstrom's macroglobulinemia. *N Engl J Med* 367:826–33, 2012

15. Wang L, Lawrence MS, Wan Y, et al: SF3B1 and other novel cancer genes in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 365:2497–506, 2011

16. Kraan W, Horlings HM, van Keimpema M, et al: High prevalence of oncogenic MYD88 and CD79B mutations in diffuse large B-cell lymphomas presenting at immune-privileged sites. *Blood Cancer J* 3:e139, 2013
17. Braggio E, Van Wier S, Ojha J, et al: Genome-Wide Analysis Uncovers Novel Recurrent Alterations in Primary Central Nervous System Lymphomas. *Clin Cancer Res* 21:3986-94, 2015
18. Bruno A, Boisselier B, Labreche K, et al: Mutational analysis of primary central nervous system lymphoma. *Oncotarget* 5:5065-75, 2014
19. Chapuy B, Roemer MG, Stewart C, et al: Targetable genetic features of primary testicular and primary central nervous system lymphomas. *Blood* 127:869-81, 2016
20. Fukumura K, Kawazu M, Kojima S, et al: Genomic characterization of primary central nervous system lymphoma. *Acta Neuropathol* 131:865-75, 2016
21. Gonzalez-Aguilar A, Idbaih A, Boisselier B, et al: Recurrent mutations of MYD88 and TBL1XR1 in primary central nervous system lymphomas. *Clin Cancer Res* 18:5203-11, 2012
22. Montesinos-Rongen M, Godlewska E, Brunn A, et al: Activating L265P mutations of the MYD88 gene are common in primary central nervous system lymphoma. *Acta Neuropathol* 122:791-2, 2011
23. 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* 29:677–85, 2015

24. Yamada S, Ishida Y, Matsuno A, et al: Primary diffuse large B-cell lymphomas of central nervous system exhibit remarkably high prevalence of oncogenic MYD88 and CD79B mutations. *Leuk Lymphoma* 56:2141–5, 2015

25. Nakamura T, Tateishi K, Niwa T, et al: Recurrent mutations of CD79B and MYD88 are the hallmark of primary central nervous system lymphomas. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 2015

26. Hattori K, Sakata-Yanagimoto M, Okoshi Y, et al: MYD88 (L265P) mutation is associated with an unfavourable outcome of primary central nervous system lymphoma. *Br J Haematol* 177:492–494, 2017

27. Lionakis MS, Dunleavy K, Roschewski M, et al: Inhibition of B Cell Receptor Signaling by Ibrutinib in Primary CNS Lymphoma. *Cancer Cell* 31:833–843 e5, 2017

28. Grommes C, Pastore A, Palaskas N, et al: Ibrutinib Unmasks Critical Role of Bruton Tyrosine Kinase in Primary CNS Lymphoma. *Cancer Discov*, 2017

29. Khodabakhshi AH, Morin RD, Fejes AP, et al: Recurrent targets of aberrant somatic hypermutation in lymphoma. *Oncotarget* 3:1308–19, 2012

30. Kim Y, Ju H, Kim DH, et al: CD79B and MYD88 mutations in diffuse large B-cell lymphoma. *Hum Pathol* 45:556–64, 2014

31. Choi JW, Kim Y, Lee JH, et al: MYD88 expression and

- L265P mutation in diffuse large B-cell lymphoma. *Hum Pathol* 44:1375–81, 2013
32. Bonzheim I, Giese S, Deuter C, et al: High frequency of MYD88 mutations in vitreoretinal B-cell lymphoma: a valuable tool to improve diagnostic yield of vitreous aspirates. *Blood* 126:76–9, 2015
33. Liu J, Shen L, Yang L, et al: High expression of beta3GnT8 is associated with the metastatic potential of human glioma. *Int J Mol Med* 33:1459–68, 2014
34. Shen L, Yu M, Xu X, et al: Knockdown of beta3GnT8 reverses 5-fluorouracil resistance in human colorectal cancer cells via inhibition the biosynthesis of polylactosamine-type N-glycans. *Int J Oncol* 45:2560–8, 2014
35. Zhai K, Chang J, Hu J, et al: Germline variation in the 3'-untranslated region of the POU2AF1 gene is associated with susceptibility to lymphoma. *Mol Carcinog*, 2017
36. Kenzelmann-Broz D, Tucker RP, Leachman NT, et al: The expression of teneurin-4 in the avian embryo: potential roles in patterning of the limb and nervous system. *Int J Dev Biol* 54:1509–16, 2010
37. Muhleisen TW, Leber M, Schulze TG, et al: Genome-wide association study reveals two new risk loci for bipolar disorder. *Nat Commun* 5:3339, 2014
38. Lim DH, Kim WS, Kim SJ, et al: Microarray Gene-expression Profiling Analysis Comparing PCNSL and

Non-CNS Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Anticancer Res* 35:3333-40, 2015

39. Dobashi A: Molecular Pathogenesis of Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *J Clin Exp Hematop* 56:71-78, 2016

Abstract

Genetic characterization of primary central nervous system lymphoma

Jeong-Ok Lee

Molecular and Clinical Oncology

The Graduate School

Seoul National University

Purpose : Mutations of MYD88 and CD79B lead to constitutional activation of nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells (NF- κ B) pathway and have recently been found as potential therapeutic targets in lymphoma treatment. This study was aimed to examine the prevalence of MYD88 and CD79B mutation in a cohort of Korean primary central nervous system lymphoma (PCNSL) and characterize the genetic features of PCNSL with whole genome sequencing (WGS).

Methods : A total of 115 newly diagnosed PCNSL cases (cohort A) were included based on the availability of tumor DNA from formalin-fixed paraffin-embedded specimens. Sanger sequencing was performed to identify mutations in exon 5 of MYD88 TIR (Toll/IL-1 receptor) domain and exon 5 of CD79B immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM) in cohort

A. In addition, we conducted WGS to an average coverage of 64.2x of fresh frozen tumor and 33.6x of paired normal peripheral blood (control) in 10 PCNSL cases (cohort B).

Results : Among 115 cases (cohort A), the polymerase chain reaction (PCR) and/or sequencing for MYD88 and CD79B failed in 21 and 2 cases respectively, leaving 94 and 113 cases for analysis on MYD88 and CD79B mutation status. MYD88 mutation was found in 33 cases (35.1%), all of which was L265P (CTG>CCG) substitutions. CD79B mutation was found in 25 cases (22.1%) including Y196C (TAC>TGC, 8 cases), Y196H (TAC>CAC, 7 cases), Y196S (TAC>TCC, 5 cases), Y196N (TAC>AAC, 4 cases) and Y196F (TAC>TTC, 1 case). The MYD88 L265P mutation coexisted with CD79B mutation in 13 cases, which corresponded to 39.3% of MYD88 L265P mutations and 52.0% of CD79B mutations. In cohort 2, Mutec2/MutSig analysis identified 3 genes including MYD88, POU2AF1, B3GNT8 for driver genes of with a q value of <0.1. Somatic mutations in MYD88 were found in 7 cases (70%) including L265P (5 cases) and P258L (CCA>CTA, 1 case) and R231Q (CGG>CAG, 1 case). Both P258L and R231Q substitutions in exon 4 of MYD88 could be verified by Sanger sequencing. To our knowledge, only 2 other cases with P258L have been reported in chronic lymphocytic leukemia and primary vitreoretinal lymphoma and R231Q substitution was novel mutation in this study. CD79B mutation was found in 7 cases (70%) and CD79B and MYD88

mutations were coincident in 50% of cases. We selected 46 recurrent mutated genes found in at least 30% of cases in four published whole exome sequencing (WES) studies in PCNSL. In cohort B, 24 of 46 candidate genes were identified to be mutated in at least 30% including non-synonymous single-nucleotide polymorphism (Nonsyn SNP), frameshift insertion/deletion (frameshift INDEL), exonic structural variation (exonic SV). Among 24 genes, MYD88, CD79B, PCLO, LRP1B and TENM4 had Nonsyn SNP in at least 30%. Only 17% gene overlap was found between 5 studies including above mentioned 4 WES and current WGS, which were MYD88, PIM1, IGLL5, TBL1XR1, BTG1, DUSP2 and ETV6. Nonsyn SNP in TENM4 were found in 3 cases (30%). Structural deletions SPPI1, SLC16A9, MDM2 and YEATS4 were found in 2 (20%), 2 (20%), 3 (30%) and 3 cases (30%), respectively.

Conclusions : Activating mutations in MYD88 and CD79B were characteristic and important in drivers in PCNSL. Other than L265P substitution, P258L and R231Q substitution were identified and R231Q was the first reported case. Recurrent mutation in TENM4 was found which may be a role in CNS tropism of PCNSL.

Keywords : Primary central nervous system lymphoma, MYD88, CD79B, Whole genome sequencing, TENM4

Student Number : 2009-31104