

同意書

提出先:医療機関名 _____ 病院長 _____

患者氏名 _____

臨床研究名:「JCOG1114:初発中枢神経系原発悪性リンパ腫に対する照射前大量メトトレキサート療法+放射線治療と、照射前大量メトトレキサート療法+テモゾロミド併用放射線治療+テモゾロミド維持療法とのランダム化比較試験

説明内容:

- 1 はじめに(この研究は臨床試験であること)
- 2 この臨床試験の対象となる患者さんの病状と治療について
- 3 この臨床試験の意義
- 4 この臨床試験の治療法について
- 5 副作用について
- 6 臨床試験の流れ・スケジュール
- 7 治療の中止について
- 8 臨床試験の参加に伴って期待される利益と予想される不利益
- 9 この臨床試験の参加について
- 10 この臨床試験に参加しなかった場合の治療
- 11 費用について
- 12 補償について
- 13 この臨床試験の研究組織と研究費について
- 14 利益相反について
- 15 この臨床試験の倫理審査について
- 16 プライバシーの保護について(個人情報)
- 17 バイオバンクについて
- 18 データの二次利用について
- 19 この臨床試験に参加している間のお願い
- 20 どんなことでも質問してください(質問の自由)
- 21 担当医、相談窓口、研究代表者、研究事務局の連絡先

上記の臨床試験について、私が説明しました。

説明担当医 署名: _____

説明年月日: _____ 年 _____ 月 _____ 日

上記の臨床試験について、担当医から説明を受けよく理解しましたので、臨床試験に参加します。

本人 署名: _____

同意年月日: _____ 年 _____ 月 _____ 日

(代諾・代筆の場合)

代諾者・代筆者署名: _____

患者本人との関係: _____

別添資料：JCOG 研究における個人情報の取り扱いについて (一般向け「JCOG プライバシーポリシー」説明書)

【基本方針】

我々 JCOG (日本臨床腫瘍研究グループ) は、

すべてのがん患者さんに最善の治療法を提供すること

という基本理念のもと、がんに対する最善の治療法や診断方法、標準的治療法を確立するために臨床試験を中心とした研究活動を行っています。そしてこの研究活動では、患者さんの個人情報と診察の結果得られる診療情報を利用しています。

臨床試験は、治療法や診断法の評価を科学的・倫理的に行い、正しい結果を得てその結果を公表し、よりよい治療についての情報を医師や患者さんに広く提供することを目的としています。特に、がんの臨床試験において正しい結果を得るためには、参加いただく患者さんの経過などの情報を、診察を通じて、またはお電話などの方法で長期間にわたり確認することが必要です。そのためには患者さん個人を特定するための情報として個人情報は欠くことのできないものです。

JCOG が利用させていただく患者さんの個人情報はカルテ番号と生年月日を基本としていますので、これらの情報だけでは、おかけの病院のコンピューターや管理表を見ない限り、お名前や住所などを特定することはできませんのでご安心ください。JCOG では、お預かりする個人情報は個人の人格尊重の理念のもと、適切に保護され慎重に取り扱われるべき大切なプライバシーに関する情報であると認識し、これらの情報が JCOG 外に流出したり、目的外に利用されたりしないように保護するための方針として「JCOG プライバシーポリシー」を制定しています。本説明書は JCOG プライバシーポリシーについて、一般の方向けに要点をまとめたものです。より詳しくお知りになりたい方は、JCOG のホームページにて、JCOG プライバシーポリシーをご参照ください。

臨床試験へのご参加と、個人情報の利用につき、ご理解とご協力をお願いいたします。

【JCOG プライバシーポリシーのまとめ】

1. 個人情報は特定した目的、項目に限り適正に取得、利用します。
2. 取得した情報を用いて解析した臨床試験の結果は、論文や学会発表として公表されますが、公表される情報には個人を特定し得る情報は含まれませんのでご安心ください。
3. 取得した情報は万全な安全管理対策を講じ、適切に保護し慎重に取り扱います。
4. 個人が特定できる形での第三者への開示・提供は行いません。
5. JCOG が取得し管理している情報に関して、開示、訂正、削除、あるいは第三者への開示、提供の停止を希望される方は、担当医師までご相談ください。
6. 一般的な質問や苦情がある方は、郵送、ファックスあるいは電子メールにて、下記の問い合わせ窓口「JCOG プライバシー保護担当」までご連絡ください。

問い合わせ窓口： JCOG プライバシー保護担当 (JCOG データセンター内)
郵 送 先：〒104-0045 東京都中央区築地 5-1-1
ファックス：03-3542-3374
電子メール：JCOG_privacy@ml.jcog.jp
JCOG ホームページ： <http://www.jcog.jp/>

日本臨床腫瘍研究グループ/Japan Clinical Oncology Group (JCOG)
制定：2006年6月20日 改訂：2009年7月10日

中枢神経系原発悪性リンパ腫に対するテモゾロミドを用いた標準治療確立に関する研究

分担研究者 永根基雄 杏林大学医学部脳神経外科・教授

研究要旨

初発中枢神経系原発悪性リンパ腫に対するテモゾロミドを用いた治療の有効性と安全性を検証する第 III 相ランダム化臨床試験に参加し、適格患者を登録、治療を行うとともに、本疾患における臨床的・組織学的予後因子解析を行った

A. 研究目的

中枢神経系原発悪性リンパ腫（primary central nervous system lymphoma, PCNSL）に対するテモゾロミド（temozolomide, TMZ）を用いた標準治療の確立と PCNSL の予後を規定する臨床的・組織学的因子を検索する。

B. 研究方法

(1) 日本臨床腫瘍研究グループ（Japan Clinical Oncology Group, JCOG）の脳腫瘍グループ（JCOG BTSG）により策定された、PCNSL に対する TMZ を用いた標準治療の確立を目指した第 III 相ランダム化臨床試験（JCOG 1114 試験）の共同研究施設として参画し、対象となる患者から同意を得た後、プロトコールに則り治療を施行し、患者の追跡を行う。

(2) 杏林大学医学部附属病院で治療を受けた PCNSL 患者を対象に、患者背景の臨床的因子、腫瘍の病理組織学的因子を抽出し、治療後の無増悪生存期間および全生存期間との関連を解析し、予後に関与する因子の検討を行う。

（倫理面への配慮）

JCOG 1114 臨床試験プロトコールは杏林大学医学部臨床疫学研究審査委員会によって審議され承認済みである (1)。腫瘍標本（病理診断に使用後の残余標本）を用いての予後因子解析研究は杏林大学医学部倫理委員会によって審議され承認済みである (2)。患者には十分な説明を行い、同意を書面で得た後に研究参加していただく。

C. 研究成果

(1) 平成26年度は平成27年2月末までに2例の新規症例を登録した。1例目は平成26年10月9日に登録し、同年10月15日よりプロトコール治療が開始された。テモゾロミドを使用しない標準治療群 [大量メトトレキサート (HD-MTX) 療法と全脳照射 (WBRT) に割り当てられ、同年12月19日に治療が終了し、完全寛解が得られ現在観察中である。2例目は平成27年2月7日に登録され、同年2月10日よりプロトコール治療が開始され、初回治療後良好な部分奏効が認められた。いずれの患者も安全に治療が施行されている。

(2) 杏林大学医学部附属病院で治療を受け、組織学的解析が可能な残余標本がある41例を対象とした。主としてPCNSLに対する標準治療であるHD-MTX療法とWBRTが過半数の患者で施行されていた。無増悪生存期間（progression-free survival, PFS）の予後因子として病変数、特異的深部局在、地固め療法（大量cytarabine）、mismatch repair (MMR) 蛋白のMSH2発現等が多変量解析で抽出された。全生存期間（overall survival, OS）の予後因子としては特異的深部局在、MSH2発現が多変量解析で有意な因子であった。また、HD-MTX療法の耐性因子としてはMMR蛋白のPMS2およびB細胞subtype関連因子のFOXP1が有意な因子であった。

D. 考察

(1) 本臨床試験（JCOG 1114）は初発PCNSLの治療として、これまでのところ安全で適切な治療効果が得られている。しかし、試験が開始される手からの期間は短く、登録症例数も少ないことから、今後も引き続き慎重な経過観察が必要

中枢神経系原発悪性リンパ腫に対するテモゾロミドを用いた標準治療確立に関する研究

研究協力者 北中千史 山形大学医学部腫瘍分子医科学講座・教授

研究要旨

中枢神経系原発悪性リンパ腫(PCNSL)は全身性リンパ腫にもまして予後不良な悪性脳腫瘍であり、新規治療法の開発はもとより病態解明すら十分に進んでいない。そこで本委託業務ではPCNSL症例の遺伝子解析を通じて新たに発見されたGNAI2遺伝子変異の機能的解析を行った。その結果、新規同定された変異によってGNAI2のコードする三量体Gタンパク $G_{\alpha_{i2}}$ のアデニル酸シクラーゼ抑制機能が活性化している可能性が示された。この結果はPCNSLの発生維持に $G_{\alpha_{i2}}$ を介した細胞内シグナル伝達の変容が関与している可能性を示唆するものと考えられる。

A. 研究目的

中枢神経系原発悪性リンパ腫(PCNSL)は中枢神経系に限局して発生する非ホジキンリンパ腫であり、その多くはびまん性大細胞型B細胞性リンパ腫(DLBCL)の組織型を示す。しかしながら発生臓器の特殊性により治療法の選択肢が限られてくることなどの理由からPCNSLは全身性DLBCLに比して明らかに予後不良であり、また、比較的稀な中枢神経腫瘍である点も有効な治療法の開発の遅れにつながっている。今後PCNSLの治療成績を向上させてゆく上でPCNSLの分子レベルでの病態理解が有用な情報を与えてくれるものと期待されているが、PCNSLの分子遺伝学的、分子生物学的解析に関する報告はいまだ限られている。

このような状況に鑑み本研究委託ではPCNSLに関する基礎的および臨床的諸課題を克服すべく種々の取り組みを行っているが、その一環としてPCNSLの遺伝子変異解析を行った。その結果、抑制性三量体Gタンパク α サブユニットの一つである $G_{\alpha_{i2}}$ をコードする遺伝子GNAI2に新規の点突然変異が見出された。そこで本業務分担項目では新規に見出された変異が $G_{\alpha_{i2}}$ の生化学的・細胞生物学的機能に及ぼす影響を明らかにしながら、PCNSLの病態におけるGNAI2変異の役割について検討を行うことを目的とした。

B. 研究方法

1) 野生型および変異GNAI2 cDNA 発現ベクターの確認：東京大学大学院医学系研究科生化学・分子生物学講座細胞情報学分野（間野博行教授）より供与を受けた野生型ならびに

変異GNAI2発現ベクター(pMXsベクターにGNAI2 cDNAをクローニングしたもの)が、細胞(HEK293細胞)への遺伝子導入により目的とする $G_{\alpha_{i2}}$ を細胞内で発現することを、遺伝子配列決定、リポフェクション法によるベクターの細胞内導入とそれに引き続くウエスタンブロット解析により確認した。

2) GNAI2変異が $G_{\alpha_{i2}}$ の生化学的機能に及ぼす影響の検討： $G_{\alpha_{i2}}$ の主たる機能であるアデニル酸シクラーゼ抑制機能にGNAI2変異が及ぼす影響を調べるため、各種GNAI2発現ベクターを細胞に遺伝子導入した後アデニル酸シクラーゼ活性化薬であるフォルスコリンで細胞を処理した。これらの細胞を用いて、同酵素の活性化指標の一つとして知られるリン酸化CREBの発現レベルをウエスタンブロット解析により検討した。

(倫理面への配慮)

本実験で使用したHEK293細胞はヒト胎児腎由来の細胞であるが、古くに樹立され今日分子細胞生物学的研究に広く用いられている古典的培養細胞株であり、本研究では非医療分野における使用であることから使用に際しての倫理審査は必要ないものと考えられる。

C. 研究成果

「研究目的」で述べたように本委託業務ではこの度PCNSL症例において新たに見出されたGNAI2遺伝子変異の機能的意義を明らかにすることを目的としている。そこで本業務ではGNAI2 cDNA発現ベクターを用いて細胞内に野生型ないし変異 $G_{\alpha_{i2}}$ を発現させ、その生化学

的、細胞生物学的機能を解析することを試みた。

今回解析に用いたのは GNAI2 の野生型、G45E 変異体、K271del 変異体、G204A 変異体、Q205L 変異体、の cDNA をほ乳動物細胞内遺伝子発現用ベクターである pMXs に組み込んだ GNAI2 cDNA 発現ベクターであり、いずれも「研究方法」に記載の通り東京大学間野研究室より供与を受けた。このうち G45E、K271del が新規同定された変異体であり、一方 G204A および Q205L はそれぞれ機能喪失性変異体、機能獲得性変異体であることが既に知られている変異体で、実験のコントロールとして用いた。

実験開始に先立ち、正しい GNAI2 cDNA が組み込まれているかを確認するため、上記5種の GNAI2 cDNA 全長にわたり塩基配列解析を行った。まず野生型 GNAI2 cDNA から得られた塩基配列情報を NCBI nucleotide data base の reference sequence と照合することにより、実験に用いようとしている野生型 GNAI2 cDNA に予期せぬ変異が存在しないことを確認した。次いで変異体については、それぞれの変異体の名称に相当する変異が入っていることならびにその他の予期せぬ変異が入っていないことを確認した。

上記により発現ベクターの authenticity が確認できたところで、引き続き細胞への遺伝子導入実験を行った。最初の目的は変異が $G_{\alpha 12}$ 機能に及ぼす影響を明らかにすることである。 $G_{\alpha 12}$ のアデニル酸シクラーゼ抑制機能はおおよそ細胞種の違いを超えて共通していると考えられることから、当初実験に用いる細胞は遺伝子導入効率を重視して選択することとし、結果として HEK293 細胞を用いた。

ところで細胞内発現させた野生型、各種変異体 $G_{\alpha 12}$ の機能解析を行うにあたっては、これらの $G_{\alpha 12}$ が細胞内に発現していることが前提条件となる。また実験結果の評価には各 $G_{\alpha 12}$ の発現レベルに関する情報も必要となる。そこで次に、遺伝子導入により発現させた各 $G_{\alpha 12}$ の発現をウエスタンブロット法により確認するとともにその発現レベルを半定量的に評価することを試みた。このため、市販の抗 $G_{\alpha 12}$ 抗体 (sc-7276, sc-13534、いずれも Santa Cruz 社) 2種類を用いて細胞内因性および遺伝子導入した $G_{\alpha 12}$ の検出を行った。その結果、 $G_{\alpha 12}$ の分子質量 (約 40 kDa) から予想される移動度を示すバンドとして、sc-7276 (ラビットポリクローナル抗体) を用いた場合は2本

のバンド (doublet) が認められたのに対し、sc-13534 (マウスモノクローナル抗体) では単一のバンドが認められた。これに対して我々は、sc-7276 により検出される doublet のうち上方のバンドが sc-13534 と同じ移動度を示していること、GNAI2 cDNA を導入した細胞ではこのバンドの濃度がコントロール細胞に比して高くなる傾向が明らかであったことから、sc-13534 が認識するバンドを $G_{\alpha 12}$ 由来のバンドと考えた。さらにこの点を確認するため GNAI2 に対する siRNA を細胞内に導入し GNAI2 ノックダウンが両抗体により認識されるバンドに与える影響を調べたところ、sc-13534 により認識されるバンドと、sc-7276 により認識される doublet のうち上方のバンドが減弱ないし消失した。以上の結果からウエスタンブロット解析において両抗体は確かに $G_{\alpha 12}$ を認識しているものと判断された。そこで次に遺伝子導入により発現させた外来性の野生型、各種変異体の発現レベルを sc-13534 を用いてウエスタンブロット解析したところ、野生型、G204A、Q205L は比較的高いレベルで、G45E、K271del は比較的低いレベルで、発現する傾向が繰り返し認められた。

ここまでの実験から、発現レベルの違いはあるものの野生型および各種変異体 $G_{\alpha 12}$ の細胞内発現を確認することができたので、次にこれらの $G_{\alpha 12}$ がアデニル酸シクラーゼに及ぼす影響を検討した。 $G_{\alpha 12}$ はアデニル酸シクラーゼ活性抑制作用を有するため、その機能を調べるためには細胞内のアデニル酸シクラーゼ活性を上昇させる必要がある。そこで予備実験として、アデニル酸シクラーゼ活性化薬であるフォルスコリンを用いて、実験に用いた HEK293 細胞内のアデニル酸シクラーゼを活性化できるフォルスコリン濃度を決定した。アデニル酸シクラーゼは ATP を基質として cAMP とピロリン酸を生じる反応を触媒する酵素であり、その酵素活性は cAMP 依存性キナーゼ PKA によるリン酸化の結果生じるリン酸化 CREB の発現レベルにより測定可能である (cAMP-PKA-CREB 経路の活性化状態によるアデニル酸シクラーゼ活性の評価)。そこで通常アデニル酸シクラーゼ刺激に用いられる濃度のフォルスコリン (10 microM) により細胞を処理した後、細胞内リン酸化 CREB の発現レベルをウエスタンブロット法により経時的に解析したところ、処理後 30 分をピークにリン酸化 CREB の発現上昇が確認できた。

そこで次に、上記の実験条件を用いてフォルスコリンにより活性化されたアデニル酸シクラーゼに対する各種 $G_{\alpha 12}$ の抑制作用の検討を以下のように行った。まず HEK293 細胞にコントロールの pMXs ベクター、野生型、G45E、K271del、G204A、Q205L の $G_{\alpha 12}$ を発現する pMXs ベクターを細胞内導入し、これまでの実験からベクター由来の $G_{\alpha 12}$ がすでに発現していると考えられる導入後 48 時間のタイミングでフォルスコリン刺激を与えた。予備実験でリン酸化 CREB 発現がピークとなったフォルスコリン処理 30 分後に細胞を回収し、ウェスタンブロット法によりリン酸化 CREB、総 CREB の発現レベルを検討した。リン酸化 CREB、総 CREB のバンドは濃度測定により定量化し、総 CREB 発現量で補正を行ったリン酸化 CREB 発現量(「リン酸化 CREB/総 CREB」)を算出した。さらにフォルスコリン刺激の有無で補正リン酸化 CREB 発現がどの程度変化するかを調べるため、フォルスコリン無しの状態に対するフォルスコリン有りの状態での補正リン酸化 CREB 発現の比を計算した。その結果、コントロールベクター導入細胞ではフォルスコリンにより補正後リン酸化 CREB 発現レベルは約 2.5 倍の上昇を示すことが明らかとなった。このようなフォルスコリンによる補正リン酸化 CREB 発現誘導に与える各種 $G_{\alpha 12}$ の影響を調べたところ、予想通り、非活性型とされる G204A 変異体は補正リン酸化 CREB 発現上昇を抑制せず、一方活性型とされる Q205L では顕著な抑制が認められた。野生型 $G_{\alpha 12}$ は両者の中間の効果を示した。これに対して G45E、K271del の両変異体は、それぞれ中等度(野生型と同等程度)、高度の補正リン酸化 CREB 発現抑制効果を示すことが明らかとなった。尚、この実験における実際の(細胞回収時の) $G_{\alpha 12}$ の発現レベルを sc-13534 を用いたウェスタンブロット解析で確認したところ、前述の通り野生型、G204A、Q205L は高い発現を示したのに対し、G45E、K271del は低レベルの発現にとどまっていた。

D. 考察

これまでの実験結果から明らかになったことは、

- 1) 実験に用いている GNAI2 の cDNA がそれぞれに与えられた名称通りの正しい野生型、変異体であること。
- 2) 実験に用いている抗体が細胞内 $G_{\alpha 12}$ を適

正に認識可能であること。

- 3) 今回実験に用いた HEK293 細胞では遺伝子導入した GNAI2 cDNA が $G_{\alpha 12}$ として細胞内に発現していること。
- 4) 同じ条件下での遺伝子導入でも変異体間で $G_{\alpha 12}$ の発現レベルに明らかな違いがあること(野生型、G204A、Q205L がほぼ同程度で高発現、G45E、K271del がほぼ同程度で低発現)。
- 5) 今回の実験に用いた野生型 $G_{\alpha 12}$ が今回の遺伝子導入実験条件下でフォルスコリンにより活性化された cAMP-PKA-CREB 経路に対して抑制作用を持つこと。
- 6) 前記野生型と同じ実験条件、同様の発現レベルにおいて、それぞれ非活性型、活性型の $G_{\alpha 12}$ として知られる G204A、Q205L 変異体がフォルスコリンにより活性化された cAMP-PKA-CREB 経路に対して前者が抑制作用をもたず、後者が野生型より強力な抑制作用をもつこと。
- 7) その同じ実験条件下で G45E、K271del の両変異体が cAMP-PKA-CREB 経路に対して抑制的に作用すること、また、その程度が G45E では野生型と同程度、K271del では活性型である Q205L と同程度であること。

上記 5)-7) の各種 $G_{\alpha 12}$ が cAMP-PKA-CREB 経路に及ぼす影響については今後さらに実験を繰り返すことで再現性を確認する必要があるものの、以上のこれまでに得られた結果からは G45E、K271del のいずれもが cAMP-PKA-CREB 経路に対して抑制的な機能を保持していることが示唆された。G45E の場合はその抑制の程度は野生型と同程度であったが、発現レベルを比較すると G45E のほうが明らかに低かったことから、G45E は野生型に比べて分子あたりの抑制能(比活性)が高い、すなわち $G_{\alpha 12}$ の活性型であるものと推察される。K271del については Q205L より低い発現レベルにもかかわらず同等の抑制効果を示していたことから、Q205L と同様以上に比活性の高い活性型変異体であると推察される。

尚、当面の課題として、なぜ G45E、K271del のタンパクレベルでの発現が他の変異体や野生型より低いのかを検討する必要があるものと考えられる。可能性としては、遺伝子導入効率自体の問題も考えられるが、GNAI2 が mRNA として細胞内に発現した後の mRNA 安定性、翻訳効率、タンパク質安定性の問題等も

考える。この点については RT-PCR 法等により GNAI2 cDNA 導入後の GNAI2 mRNA の発現レベルに関する検討を行うことで有用な情報が得られる可能性がある。

上記のごとく、今回の検討から新規に同定された変異体 G45E、K271del は活性型変異体である可能性が示唆されている。したがって PCNSL における GNAI2 変異は $G_{\alpha_{i2}}$ の機能獲得（活性化）を通じて PCNSL の発生や維持に関与している可能性が考えられる。尚、cAMP-PKA 経路はがんの発生や維持に重要な役割を果たしていると考えられている Raf-MEK-ERK 経路（いわゆる MAPK 経路）を抑制することが知られているが、例えば非機能性下垂体腺腫で見出された $G_{\alpha_{i2}}$ の Q205L 変異体は cAMP-PKA 経路抑制による MAPK 経路の「脱」抑制を通じて細胞の腫瘍化に貢献している可能性が指摘されている。従って今後 GNAI2 変異の腫瘍発生、維持における役割を明らかにするためには、野生型や各種変異体が MAPK 経路に及ぼす影響の検討が必要になってくると考えられる。また今回は研究の最初の段階であるため遺伝子導入効率を重視して HEK293 細胞を用いて実験を行ったが、今後はリンパ球ないしリンパ腫細胞（特に PCNSL 細胞）における $G_{\alpha_{i2}}$ の役割を明らかにする必要があるため、これら細胞への遺伝子導入実験を考慮したい。

E. 結論

今回の検討結果から、PCNSL において新規に見出された GNAI2 変異は $G_{\alpha_{i2}}$ を活性化させる機能的変異である可能性が示唆された。今後これら変異（G45E、K271del）の発現が細胞内の諸種のシグナル伝達にどのような影響を及ぼすかを明らかにするとともに、そういった変異によってもたらされた細胞内の変化が PCNSL の発生や維持にどのように関わっているのか、あるいは関わっていないのかについて検討を行う必要があると考えられる。

F. 健康危険情報

該当せず。

G. 研究発表

1. 論文発表

該当なし。

2. 学会発表

該当なし。

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

学会等発表実績

委託業務題目「中枢神経系原発悪性リンパ腫に対するテモゾロミドを用いた標準治療確立に関する」
 機関名 学校法人埼玉医科大学 埼玉医科大学医学部・教授 西川亮

1. 学会等における口頭・ポスター発表

発表した成果（発表題目、口頭・ポスター発表の別）	発表者氏名	発表した場所（学会等名）	発表した時期	国内・外の別
Prognostic factors for primary central nervous system lymphomas treated with high-dose methotrexate-based chemo-radiotherapy	Motoo Nagane, Jeunghun Lee, Yukiko Shishido-Hara, Kaori Suzuki, Saki Shimizu, Michiru Umino, Keiichi Kobayashi, Yoshiaki Shiokawa	The 20th International Conference on Brain Tumor Research and Therapy, Lake Tahoe, Nevada, U. S. A.	2014. 7. 23	国外
中枢神経系原発悪性リンパ腫：治療の進歩と展望。PCNSL－頭蓋内悪性リンパ腫	永根基雄	特別講演会。広島市	2014. 9. 26	国内
中枢神経系原発悪性リンパ腫における全エクソンシーケンスによる遺伝子異常解析	永根基雄, 福村知隆, 上野敏秀, 李政勲, 原由紀子, 三島一彦, 市村幸一, 武笠晃文, 成田善孝, 西川亮, 間野博行	第32回日本脳腫瘍学会学術集会, 舞浜市, 千葉県	2014. 12. 1	国内

2. 学会誌・雑誌等における論文掲載

掲載した論文（発表題目）	発表者氏名	発表した場所（学会誌・雑誌等名）	発表した時期	国内・外の別
高齢者中枢神経系原発悪性リンパ腫に対する大量methotrexate基盤初期治療の成績と展望	小林啓一, 永根基雄, 河合拓也, 野口明男, 塩川芳昭	Geriatric Neurosurgery	26:63-70, 2014	国内
Spectral-domain optical coherence tomography patterns in intraocular lymphoma	Keino H, Okada AA, Watanabe T, Echizen N, Inoue M, Takayama N	Ocular Immunology and Inflammation	in press	国外
脳神経外科医が解説する血液腫瘍：悪性リンパ腫 (Primary central nervous system lymphoma)	永根基雄	脳神経外科速報	24:658-668, 2014	国内

11. 高齢者中枢神経系原発悪性リンパ腫に対する 大量 methotrexate 規盤初期治療の成績と展望

Outcomes of elderly patients with primary central nervous system
lymphoma treated by high-dose methotrexate-based chemotherapy.

小林 啓一 永根 基雄 河合 拓也 野口 明男 塩川 芳昭

[Background] High-dose methotrexate (HD-MTX) monotherapy, the standard chemotherapy for primary CNS lymphoma (PCNSL), achieves CRs at only 20~30% despite a high initial response rate, necessitating full dose whole brain radiotherapy (WBRT), which may cause symptomatic neurotoxicity. Approximately 50% of all patients with PCNSL are aged >65 years; however, this group is relatively understudied, and, to the authors' knowledge, optimal treatment for older patients has not been well defined.

[Patients and methods] Since 2000, 81 patients with PCNSL were treated in our institution. Forty-one patients were treated between 2008 and 2012 (second period). While 46 cases were treated by standard treatment with HD-MTX and RT (>24 Gy), 6 were treated with HD-MTX monotherapy alone, and 13 were treated with only RT. Among the entire cohort, 35 cases were aged >70 years (median age, 74; average, 75.5; median KPS, 60). Clinical outcomes were analyzed.

[Results] For the entire cohort, median progression-free survival (mPFS) was 14.8 months, median overall survival (mOS) was 32.7 months. For those treated in the second period, mPFS was 29.0 months and mOS has not yet been reached. Age lower than 70 was a favorable predictor of both PFS ($p=0.008$) and OS ($p=0.043$), as was $KPS \geq 70$ of OS ($p=0.001$). For those age 70 or higher ($n=35$), HD-MTX was given in 23 cases, RT in 30 cases, while RT was deferred in 2 cases and was never given in 3 cases. HD-MTX treatment was a favorable prognostic factor for PFS ($p=0.01$) and $KPS \geq 70$ for OS ($p=0.013$).

[Conclusions] Chemotherapy with HD-MTX may benefit elderly PCNSL patients, especially those in good performance status (PS). In our cohort, WBRT was delivered in most elderly patients, limiting the possibility of making any suggestions regarding the risks and benefits by WBRT. Currently, we have been applying multidrug chemotherapy consisting of rituximab, MTX, procarbazine, and vincristine, followed by HD-AraC (R-MPV-A), in the aim of achieving CR by the induction phase of chemotherapy so that consolidation WBRT can be deferred in elderly patients. Continued efforts should be made to verify the feasibility, safety, and efficacy of such a treatment strategy for elderly PCNSL patients.

目 的

中枢神経系原発悪性リンパ腫 (primary central nervous system lymphoma: PCNSL) は、依然予後が極めて不良な原発性悪性脳腫瘍である。PCNSL に対する標準的初期治療は、大量 methotrexate (HD-MTX) 療法基盤化学療法+全脳照射 (whole brain radiation therapy: WBRT) である。HD-MTX 初回投与後には高率に腫瘍縮小効果が認められるものの、その後の繰り返しの投与にもかかわらず完全寛解 (complete response: CR) が得られる率は2-3割に過ぎない。そのため、高齢者においてもWBRTを要することが多く、中枢神経障害予防や生存予後改善などが課題となっている。

一方で、標準的初期治療であるHD-MTX単独+WBRTのみでは長期間の病勢コントロールは望めず、早期再発率が高く、再発後の標準治療は確立していない。特に同疾患の特徴として高齢者に多いにもかかわらず、治療は全身状態や治療による白質脳症を考慮せざるを得ず、治療に困難を極める^{2,3)}。

今回、2000年以降に当院で導入したPCNSLに対する各初期治療法の成績を比較し、高齢者群においての特徴を抽出し、今後の治療戦略を検討した。

1. 対象・方法

2008年以降化学療法のみでCRに持ち込めた症例については地固めとして放射線照射を24Gyに減量したレジメンに切り替えたことから、2008年~2012年の間に杏林大学病院で治療した41例を対象とした。当施設におけるhistorical controlとして2000年4月~2012年12月の間に当施設で治療した81例を比較した。

初期治療の内訳は前期ではRT単独の場合には全脳照射 (WBRT) 30Gy + 局所照射 (LWRT) 16Gy、化学療法との併用の場合はHD-MTX療法は3,500mg/m²を隔週で3~5サイクル施行しRTへ、また高齢者に対してはHD-MTX療法3500mg/m²単独を4~6サイクル施行した。後期の治療においては2012年よりR-MPV療法 (Rituximab 375mg/m² (D1), HD-MTX 3500mg/m² (D2), vincristine (VCR)

2mg/m² (D2), procarbazine (PCZ) 100mg/m² (D2-8; 奇数回のみ) を5-7サイクル施行し、その後地固め療法としてHD-AraC 3mg/m²; 高齢者は1-2mg/m²) を2サイクル施行した (Table 1, 2)。

初期治療を治療効果判定には臨床症状の変化と造影MRIによる腫瘍体積の計測を行い評価した。

2. 結 果

2000年以降の全治療例81例の観察期間の中央値は13.3ヶ月 (0.4-86.9ヶ月) であった。PCNSLに対する標準治療のHD-MTX + RT (>24Gy) が46例と最も多く、照射単独は13例、HD-MTX療法単独は6例であった。HD-MTX + RT24Gyは8例であった。全症例の無増悪生存期間中央値 (median progression-free survival: mPFS) は14.8ヶ月、全生存期間中央値 (median overall survival: mOS) は32.7ヶ月であった。前期 (2000-2007年) のmPFSは8.8ヶ月、mOSは25.7ヶ月、後期 (2008-2012年) のmPFSは29.0ヶ月、mOSは未到達であり、時期による生存期間には有意差が認められた。ただし、後期の症例の多くは現時点でも観察中であり、イベントが不足しているため見かけの改善の可能性もあり、今後の追跡が必要である。予後因子としては年齢70歳未満でmPFS, mOSともに有意差があり (P=0.008, P=0.043)、KPS ≥ 70でmOSと有意差を認めた (P=0.001) (Table 1)。

また、70歳以上の35例に限った内訳は男性22例、女性13例、KPSの中央値は60、年齢の中央値は74歳、平均75.5歳であった。リンパ腫と診断確定されたものが24例、初期治療としてHD-MTX療法を施行したのが23例、初期治療で放射線照射単独もしくは化学療法に引き続いての照射のいずれかの放射線照射を施行したものが30例、初期治療で放射線を待機した症例が2例、放射線治療未施行は3例であった (Table 3, 5)。70歳以上の予後因子として初期治療でHD-MTX療法を施行した群でmPFS, に有意差があり (P=0.01)、KPS ≥ 70でmOSに有意差を認めた (P=0.013)。さらにこれを75歳以上の15例に限ると初期治療としてHD-MTX療法を施行したのが5例に留まり、初期治療で放射線照射を施行したものが15例中14例、放射線を待機した症例はなかった。

Table1-6 略語説明

RT: radiation therapy, HD-MTX: high dose methotrexate, R: Rituximab, M: methotrexate, P: procarbazine, V: vincristine, A: cytarabine, MSKCC: Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, KPS: Karnofsky Performance Status, mPFS: median progression-free survival, mOS: median overall survival, WBRT: whole brain radiation therapy, rd: reduction, CR: complete response, RPA: recursive partitioning analysis, res: response, PR: partial response, Tx: treatment, Ref: reference, IT: intrathecal chemotherapy, CN: lomustine, MCN: ranimustine, S: steroid, T: thiotepa, TM: temozolomide

Table 1 初発 PCNSL の症例数・初期治療結果

Regimen	N	mPFS	mOS	mPFS	+	-	log Rank
All	81	14.8	32.7	KPS≥70	16.7	12.5	P=0.319
2000~2007	40	8.8	25.7	(MSKCC RPA	7.0	19.1	12.4 P=0.364)
2008~	41	29.0	n.r.	Age<50	7.0	13.3	P=0.355
				Age<60	19.0	11.6	P=0.968
				Age<70	19.1	10.1	P=0.043
				Age<75	19.0	5.4	P=0.004
RT only	13	8.5	12.5				
HD-MTX + RT (>24Gy)	46	14.8	37.8	mOS	+	-	log Rank
HD-MTX only	6	19.0	26.3	KPS≥70	73.3	14.8	P=0.001
HD-MTX + RT 24Gy*	8	13.3	45.2	(MSKCC RPA	65.1	73.3	14.8 P=0.001)
R-MPV-A	2	n.d.	n.d.	Age<50	65.1	32.7	P=0.950
M-A	1	n.d.	n.d.	Age<60	33.7	30.3	P=0.920
				Age<70	45.2	14.8	P=0.008
MSKCC: R-MPV-A	52	39.6	79.2	Age<75	37.8	11.4	P=0.000
(pll)(presented@ASCO 12)							
*Include only cases who achieved CR after HD-MTX.							

Table 2 初発 PCNSL 当施設初期治療法の変遷

1. RT単独: 全脳30Gy + 局所10-16Gy
2. HD-MTX+WBRT(総線量≥40Gy):
3.5g/m² × 3 (~5) cycles → RT
3. HD-MTX単独: 4 - 8 cycles (地面めなし)
4. HD-MTX+rdWBRT(24Gy): (2008以降)
6 cycles → If CR, 24Gy
5. R-MPV-A: (2012以降)
Rituximab (D1), HD-MTX (D2), VCR (D2),
PCZ (D1-7)(on odd cycles), q2w × 5-7 cycles
→WBRT (24 or 46Gy)→HD-AraC × 2

(Table 4, 5, Fig. 1). 75歳以上の予後因子は症例数が少なく、抽出されなかった。

3. 考 察

PCNSL に対する HD-MTX 療法と全脳照射を含む放射線治療の発達により、その生存期間中央値は 33-39 ヶ月にまで延長してきた⁴⁾。しかし、現

在の PCNSL の標準治療の問題点としては、放射線照射により腫瘍が消失したとしても、白質脳症などの遅発性脳障害を生じることが多く、QOL は著しく低下することである⁵⁾。晩発性神経障害の病態については不明な点もまだ多く、有効な治療法はない。白質病変と認知障害、歩行障害や意識障害を生じ、進行性に発症から 1 年で約半数が

Table 3 70歳以上35例の概要

	中央値	平均値		2	3
KPS	60	-	MSKCC RPA	12	23
Age	74	75.5	(KPS 70s)	12	23)
	+	-		+	-
男性	22(M)	13(F)	MTX Bestres.CR+PR	17	5
Operation	22	13	MTX Lastres.CR+PR	13	9
診断確定	24	11	放射線照射	30	5
病巣数1病変	22	13	全脳照射 \leq 30Gy	25	4
治療前steroid	13	22	放射線照射待機	2	33
初期治療MTX	23	12	MTX以外のTx	1	34
MTX cycle# 2<	17	18	地固めAraC	0	34

Table 4 75歳以上15例の概要

	中央値	平均値		2	3
KPS	50	-	MSKCC RPA	4	11
Age	81	80.6	(KPS 70s)	4	11)
	+	-		+	-
男性	9(M)	6(F)	MTX Bestres.CR+PR	3	2
Operation	5	10	MTX Lastres.CR+PR	3	2
診断確定	7	8	放射線照射	14	1
病巣数1病変	11	4	全脳照射 \leq 30Gy	11	1
治療前steroid	5	10	放射線照射待機	0	15
初期治療MTX	5	10	MTX以外のTx	0	15
MTX cycle# 2<	3	12	地固めAraC	0	14
			MTX後再発	1	6

死亡すると言われ、特に60歳以上の高齢者と放射線治療の既往が危険因子となっている⁹⁾、神経毒性の回避の試みとして、Freilichらは照射を行わず、HD-MTXをベースとした化学療法のみを行い、奏効割合92%、mOSが30.5ヶ月という成績を報告した⁷⁾。化学療法のみで治療した方が高次機能障害の頻度が少なかったという後ろ向き観察研究の報告もある⁸⁾ (Table 6)。このことから、HD-MTXが奏効し、CRとなる症例では、HD-MTX療法を3サイクルで終了せず回数を増加することで地固め効果を期待し、RTを待機する治療戦略が考えられる。再発が認められた時点でRTを加えた化学放射線療法を施行することで、放射線脳障害の発症を遅らせ、更にsalvage治療

のintensityをRTの追加により上げることで、OSの延長効果を期待する方法である。当施設では、この仮説のもと放射線照射の待機効果を検討し発表したが、結果はRT待機群でのmOSが26.3ヶ月、RT非待機群では32.8ヶ月と、放射線治療待機HD-MTX療法継続によるOSの延長効果は認められなかった⁹⁾。同様に、HD-MTX単独療法のみでは効果が不十分であることを示唆する報告もあり、ドイツのグループは8g/m²の超HD-MTX療法を繰り返す方法について探索的な試験を行ったが、生存期間等が不良なためにこの試験は中止となった¹⁰⁾。化学療法でCRが得られなければ、急速に腫瘍の増悪が生じ、予後は不良となることから、その際には高齢者といえどもsalvage療法と

Table 5 高齢者の PFS/OS 解析

70歳以上				75歳以上			
mPFS	+	-	log Rank	mPFS	+	-	log Rank
KPS≥70	8.5	10.5	P=0.568	KPS≥70	5.4	12.5	P=0.553
(MSKCC RPA	2: 8.5	3: 10.5	P=0.568)	(MSKCC RPA	2: 5.4	3: 12.5	P=0.553)
男性	8.7	21.4	P=0.675	男性	5.4	8.5	P=0.864
手術	10.5	7.0	P=0.477	手術	14.8	5.2	P=0.089
診断確定	10.5	7.0	P=0.750	診断確定	14.8	5.4	P=0.248
病変1個	8.8	10.1	P=0.735	病変1個	8.5	1.6	P=0.266
初期MTX	13.3	5.4	P=0.010	初期MTX	14.7	5.4	P=0.136
mOS	+	-	log Rank	mOS	+	-	log Rank
KPS≥70	29.0	12.5	P=0.013	KPS≥70	29.0	4.9	P=0.077
(MSKCC RPA	2: 29.0	3: 12.5	P=0.013)	(MSKCC RPA	2: 29.0	3: 4.9	P=0.077)
男性	13.3	26.7	P=0.782	男性	11.4	29.0	P=0.527
手術	20.9	11.4	P=0.394	手術	14.8	4.9	P=0.515
診断確定	20.9	11.4	P=0.656	診断確定	14.8	11.4	P=0.941
病変1個	14.8	13.3	P=0.960	病変1個	12.5	4.9	P=0.370
初期MTX	20.9	11.4	P=0.214	初期MTX	14.8	11.4	P=0.689

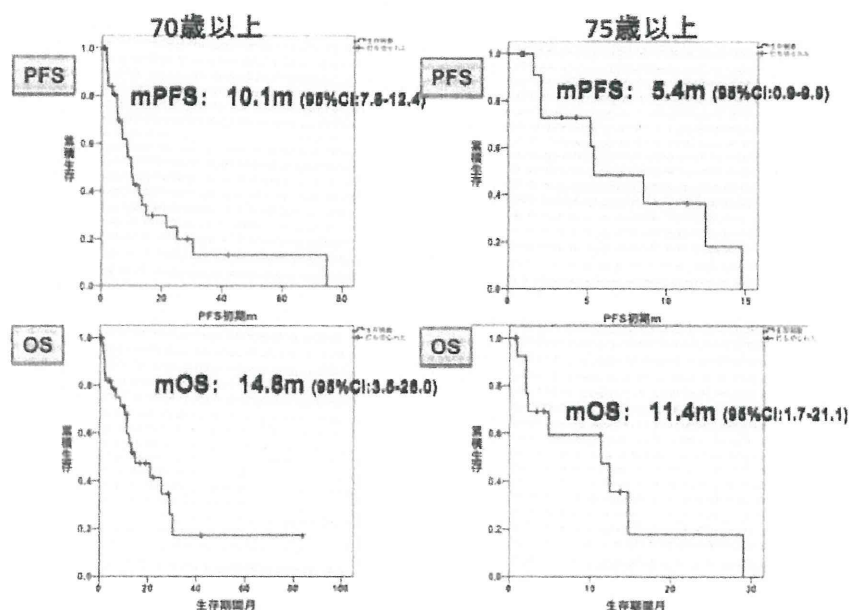


Fig. 1 高齢者の生存期間 (mPFS, mOS)

して放射線照射が必要となる。

しかし、十分な奏効を示す導入化学療法が施行できれば、地固め照射の線量を減量することで、再発のリスクを低下するとともに、放射線神

経障害リスクを軽減することが期待される。Shahらは導入化学療法をHD-MTXを含む多剤併用療法 (R-MPV療法) を用いて施行し、CRとなった後に reduced dose whole brain radiation therapy

Table 6 高齢者中枢神経系リンパ腫に対する治療動向

Ref.	N	Median age (range)	MTX (g/m ²)	other drugs	IT	WBRT	PFS (months)	OS (months)	Neurotoxicity
Omuro, JNO 07	23	68(60-79)	3	TM	no	no	8	35	0
Ng, Neuro-oncol 00	10	73(66-75)	8	-	no	no	18	36	0
Abrey, JCO 00	22	70(54-89)	3.5	V, P	yes	no	-	33	5
	12	67(60-72)	3.5	V, P	yes	yes	-	32	83
Freilich, Neurology 96	13	76(54-89)	1-3.5	A, V, P, T	yes	no	-	31	0
Hoang-Xuan JCO 03	50	72(60-81)	1	CN, P, S	yes	no	7	14	8
Lillerhaus, Ann Oncol 08	30	70(57-79)	3	CN, P	no	no	6	15	7
Taaka, Int J Hematol 10	17	67(58-78)	1	MCN, P, S	yes	no	20	36	0

Ferrerri AJ, Blood Jul 21;118.2011改変

(rdWBRT) 23.4Gy を行い、HD-AraC 療法にて地固め療法を行った結果、PFS 40 ヶ月であったと報告している¹¹⁾。このように、初期治療時に多剤併用の治療強度をあげた導入化学療法に引き続いて、低線量照射 (rdWBRT, WB24Gy 程度) を行うことで、再発予防の強化及び神経毒性の軽減を期待すると同時に、再発時の追加照射の余地を残すことが可能であることが示唆された。

Memorial Sloan-Kettering Cancer Center (MSKCC) のグループによる 338 名の初発 PCNSL 症例における多変量解析の結果、予後因子として年齢と KPS (Karnofsky Performance Status) のみが抽出された⁹⁾。年齢については cut point analysis が行われ 50 歳が予後の境界であることが示された。彼らは次に RPA (recursive partitioning analysis) 解析を行い、class 1: 年齢 50 歳以下、class 2: 年齢 51 歳以上かつ KPS 70 以上、class 3: 年齢 51 歳以上かつ KPS 70 未満、の 3 群の分類が予後に関連することを示した。この RPA によるクラス分類は validation set として Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) の臨床試験に登録された 194 名を用いて解析され、同様に有意に予後に関連することが確認された。しかし、PCNSL 症例の多くが高齢者であることを考えれば、

それらの症例は予後が相対的に不良な RPA class 2, 3 に分類されるため、これらの群に属する患者群の成績を上げなければ、PCNSL の治療成績の向上には繋がらないものと考えられる。

今回の我々の結果では 70 歳以上の高齢者において、初期治療に HD-MTX 療法を行った症例で PFS, OS の延長を認め、KPS \geq 70 の症例で OS の延長を見た。また 75 歳以上では初期治療に HD-MTX 療法を行えた症例で PFS が、KPS \geq 70 で OS の延長する傾向がみられた。この結果は、HD-MTX 療法を行うことのできる全身状態等の条件を満たす症例であるというバイアスが明らかに含まれているものの、Ney らも年齢 70 歳未満で OS の延長効果¹²⁾ を報告している。Welch らも 80 歳以上の超高齢者に対して、HD-MTX 回数 \geq 5 で OS の延長を認め、しかもクレアチニンクリアランスの低い患者においても繰り返し施行できた¹³⁾ と報告しており、高齢者においても、HD-MTX 療法を施行できることが、予後の改善に関連する可能性が示唆される。

また今回の治療内容では、75 歳以上の高齢者では HD-MTX 療法の腎毒性や骨髄抑制、全身状態への影響を考慮して、むしろ初期治療に HD-MTX 療法を行わず、全脳照射 (\leq 30Gy) を行う

傾向が認められた。本来高齢者に対しては、放射線照射による遅発性脳障害を回避なり軽減することが望まれるところであるが、高齢者の HD-MTX 療法の毒性を過大評価し、照射優先の方針としていたことが、75 歳以上の症例での予後が不良であった原因とも考えられる。初期治療に HD-MTX 療法を行えた症例で PFS の延長する傾向があることから、今後は PS の良い高齢者に対しては、積極的に HD-MTX 療法を施行することを考慮すべきと考えられる。

近年さらなる予後の改善を目指して、HD-MTX 療法に他の抗がん剤を併用した治療が試みられ、現在も種々の臨床試験が進行中である。RTOG は HD-MTX 療法と放射線治療に VCR, PCZ を加え、さらに MTX 髄腔内投与を併用する方法を試みたが、生存期間中央値は 37 ヶ月であり、重篤な神経毒性が 15% に認められている (RTOG9310)¹⁴⁾。HD-MTX と放射線照射に teniposide, carmustine, さらに MTX と Ara-C の髄腔内投与を加えた治療での mOS が 46 ヶ月という報告もあるが、この化学療法によると考えられる治療関連死を 10% に認め、一般化されるには至っていない (EORTC20962)¹⁵⁾。HD-MTX 療法と放射線治療の後に HD-AraC を地固め療法として加える方法は、mOS が 51 ヶ月と報告されているが、30% の患者で神経毒性が報告されているため、十分に適応と有害事象の評価を行ったうえで施行されるべきである¹⁶⁾。

上記のように、Shah らは Rituximab に HD-MTX, VCR, PCZ, HD-AraC を加えた多剤併用免疫化学療法 (R-MPV-A 療法) を行い、mOS が 6.6 年 (60 歳以上で 5.5 年)、mPFS が 3.3 年 (60 歳以上 1.4 年)、導入化学療法にて CR 率 79% と極めて良好な成績を報告した。また R-MPV 療法で CR となった症例では、23.4Gy の減量 WBRT を施行し、HD-AraC での地固め療法を行うことで、mPFS 7.7 年、5 年生存割合 81% と、長期の病勢制御と同時に、中枢神経毒性を減少させた¹⁷⁾。これは今後の期待すべき治療法のひとつである。

4. 結 論

PCNSL に対する導入療法として、初期の HD-MTX 単独療法および WBRT から、その後の WBRT 待機・減量照射療法 (rdWBRT) を経て、現在多剤併用免疫化学療法及び rdWBRT レジメンを施行中である。今後このレジメンにおける長期的治療効果および毒性の評価が重要な課題である。特に神経毒性の評価については、Fazekas scale を用いた MRI 画像による白質脳症の評価や、神経認知機能の評価が必要である。また当施設においては超高齢者 (80 歳以上) の症例における HD-MTX 療法の治療経験はないが、超高齢者や KPS<70 の予後不良群における治療レジメンの検討が急がれる。これらの Clinical Questions を多施設共同臨床試験により解明していくことが重要である。

文 献

- 1) 大西丘倫, 吉峰俊樹. CNS リンパ腫に対する治療の進歩 -Methotrexate 大量療法より-, 脳外誌: 10: 135-41, 2001
- 2) Blay JY, Conroy T, Chevreau C, Thyss A, Quesnel N, Eghbali H, et al. High-dose methotrexate for the treatment of primary cerebral lymphomas: analysis of survival and late neurologic toxicity in a retrospective series. *J Clin Oncol.* 16 (3) : 864-71, 1998
- 3) O'Brien P, Roos D, Pratt G, Liew K, Barton M, Poulsen M, et al. Phase II multicenter study of brief single-agent methotrexate followed by irradiation in primary CNS lymphoma. *J Clin Oncol.* 18 (3) : 519-26, 2000
- 4) Abrey LE, Ben-Porat L, Panageas KS, Yahalom J, Berkey B, Curran W, et al. Primary central nervous system lymphoma: the Memorial Sloan-Kettering Cancer Center prognostic model. *J Clin Oncol.* 24 (36) : 5711-5, 2006
- 5) Ferreri AJ. How I treat primary CNS lymphoma. *Blood.* 118 (3) : 510-22, 2011
- 6) Omuro AM, Ben-Porat LS, Panageas KS, Kim AK, Correa DD, Yahalom J, et al. Delayed

- neurotoxicity in primary central nervous system lymphoma. *Archives of neurology*. 62 (10) : 1595-600, 2005
- 7) Freilich RJ, Delattre JY, Monjour A, DeAngelis LM. Chemotherapy without radiation therapy as initial treatment for primary CNS lymphoma in older patients. *Neurology*. 46 (2) : 435-9, 1996
 - 8) Correa DD, DeAngelis LM, Shi W, Thaler H, Glass A, Abrey LE. Cognitive functions in survivors of primary central nervous system lymphoma. *Neurology*. 62 (4) : 548-55, 2004
 - 9) Kobayashi KN, M.: Shiokawa, Y. High-dose methotrexate therapy with radiotherapy deferment for the central nervous system lymphoma. *Neuro-Oncology (tokyo)* . 18: 36-9. 2008
 - 10) Herrlinger U, Schabet M, Brugger W, Kortmann RD, Kuker W, Deckert M, et al. German Cancer Society Neuro-Oncology Working Group NOA-03 multicenter trial of single-agent high-dose methotrexate for primary central nervous system lymphoma. *Annals of neurology*. 51 (2) : 247-52, 2002
 - 11) Shah GD, Yahalom J, Correa DD, Lai RK, Raizer JJ, Schiff D, et al. Combined immunochemotherapy with reduced whole-brain radiotherapy for newly diagnosed primary CNS lymphoma. *J Clin Oncol*. 25 (30) : 4730-5, 2007
 - 12) Ney DE, Reiner AS, Panageas KS, Brown HS, DeAngelis LM, Abrey LE. Characteristics and outcomes of elderly patients with primary central nervous system lymphoma: the Memorial Sloan-Kettering Cancer Center experience. *Cancer*. 116 (19) : 4605-12, 2010
 - 13) Welch MR, Omuro A, DeAngelis LM. Outcomes of the oldest patients with primary CNS lymphoma treated at Memorial Sloan-Kettering Cancer Center. *Neuro-oncology*. 14 (10) : 1304-11, 2012
 - 14) DeAngelis LM, Seiferheld W, Schold SC, Fisher B, Schultz CJ. Combination chemotherapy and radiotherapy for primary central nervous system lymphoma: Radiation Therapy Oncology Group Study 93-10. *J Clin Oncol*. 20 (24) : 4643-8, 2002
 - 15) Poortmans PM, Kluin-Nelemans HC, Haaxma-Reiche H, Van't Veer M, Hansen M, Soubeyran P, et al. High-dose methotrexate-based chemotherapy followed by consolidating radiotherapy in non-AIDS-related primary central nervous system lymphoma: European Organization for Research and Treatment of Cancer Lymphoma Group Phase II Trial 20962. *J Clin Oncol*. 21 (24) : 4483-8, 2003
 - 16) Gavrilovic IT, Hormigo A, Yahalom J, DeAngelis LM, Abrey LE. 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 (28) : 4570-4, 2006
 - 17) Khan RB, Shi W, Thaler HT, DeAngelis LM, Abrey LE. Is intrathecal methotrexate necessary in the treatment of primary CNS lymphoma? *J Neurooncol*. 58 (2) : 175-8, 2002

ORIGINAL ARTICLE

Spectral-domain Optical Coherence Tomography Patterns in Intraocular Lymphoma

Hiroshi Keino, MD¹, Annabelle A. Okada, MD¹, Takayo Watanabe, MD¹, Nariaki Echizen, MD², Makoto Inoue, MD¹, Nobuyuki Takayama, MD³, and Motoo Nagane, MD⁴

¹Department of Ophthalmology, Kyorin University School of Medicine, Tokyo, Japan, ²Department of Ophthalmology, St Lukes International Hospital, Tokyo, Japan, ³Second Department of Internal Medicine, Kyorin University School of Medicine, Tokyo, Japan, and ⁴Department of Neurosurgery, Kyorin University School of Medicine, Tokyo, Japan

ABSTRACT

Purpose: To examine spectral-domain optical coherence tomography (SD-OCT) patterns in intraocular lymphoma (IOL).

Methods: Records of 13 patients (21 eyes) with IOL were retrospectively reviewed. SD-OCT was evaluated at initial visit and during follow-up.

Results: SD-OCT images at initial visit demonstrated disruption of the ellipsoid zone (8 eyes, 38.1%) and hyperreflective nodules at the retinal pigment epithelium (RPE) level (5 eyes, 23.8%). During follow-up, disruption of the ellipsoid zone (10 eyes, 47.6%) and hyperreflective nodules at the RPE level (7 eyes, 33.3%) were noted. In 5 eyes showing hyperreflective nodules at the RPE level, the hyperreflective nodules were reduced after treatment with intravitreal methotrexate.

Conclusions: Hyperreflective nodules in the outer retina and disruption of the ellipsoid zone were observed in nearly one-half of patients with IOL over time. SD-OCT may allow for early detection of small macular abnormalities and aid in monitoring of treatment efficacy in this disease.

Keywords: Intraocular lymphoma, spectral domain optical coherence tomography

Intraocular lymphoma (IOL) is usually a non-Hodgkin lymphoma and represents a subset of primary central nervous system (CNS) lymphoma.^{1,2} IOL is estimated to represent 1% of all non-Hodgkin lymphomas, 1% of intracranial tumors, and 1% of intraocular inflammation.^{3,4} IOL usually manifests as a vitreoretinal lymphoma involving the retinal pigment epithelium (RPE) and the vitreous, rather than the uvea.^{1,5} IOL due to metastasis of non-CNS lymphoma is rare. Since 60–90% of patients with primary IOL develop CNS lymphoma, a disease with poor survival prognosis, examination techniques that assist in early diagnosis of IOL have the potential to

improve overall patient survival.^{1,2,6} However, early diagnosis is difficult due to the clinical appearance of IOL being indistinguishable from many types of posterior and intermediate uveitis.^{7,8}

Findings on fluorescein angiography (FA), indocyanine green angiography, and optical coherence tomography (OCT) are currently being analyzed for their utility in assisting in the diagnosis of IOL.⁹ Several investigators have reported hyperreflective signals in the form of nodules or bands at or above the RPE level in patients with active IOL by spectral domain (SD)-OCT,^{10–12} although such data have been limited to a small number of cases. The aim of the

Received 3 October 2014; revised 10 December 2014; accepted 22 December 2014; published online 2 March 2015

Correspondence: Annabelle A. Okada, MD, Department of Ophthalmology, Kyorin University School of Medicine, 6-20-2 Shinkawa, Mitaka, Tokyo, Japan 181-8611. E-mail: aokada@eye-center.org

present study was to delineate patterns of SD-OCT abnormalities in the macula of patients with IOL. Our data demonstrated hyperreflective signals at the outer retina and disruption of the ellipsoid zone in close to one-half of patients with IOL over time. We believe that SD-OCT images have the potential for early detection of small lymphomatous lesions and other abnormalities in the macula not visible by routine funduscopy in IOL patients. Furthermore, SD-OCT eventually may prove useful in our attempts to monitor ocular treatment and may improve the prognosis of this disease.

METHODS

We performed a retrospective review of the medical records of all patients with IOL who presented to the Ocular Inflammation Service at the Kyorin Eye Center, Kyorin University Hospital in Tokyo, Japan, between April 2007 and December 2013. Thirteen patients (21 eyes) with IOL who had SD-OCT images of adequate quality available for analysis at both initial and follow-up visits were identified and included in this study. The data collected included information on demographics, laterality, diagnostic interventions, clinical activity, ophthalmoscopic findings, color fundus photography, and SD-OCT images (Cirrus HD, Carl Zeiss Meditec, Dublin, CA or Spectralis, Heidelberg Engineering, Germany). This study was conducted in accordance with the tenets of the Declaration of Helsinki and was approved by the Research Ethics Committee of Kyorin University Hospital.

The diagnosis of IOL was based on vitreous and/or brain biopsy results in all patients. All vitreous biopsy samples underwent cytological examination, measurements of interleukin (IL)-10 and IL-6, and in 4 patients polymerase chain reaction (PCR) testing to assess for IgH gene rearrangement.^{2,6} Active IOL was defined as the presence of vitreous cells and/or clinically visible mass or infiltrations on ophthalmoscopic examination. Vitreous cells, retinal infiltrations, and areas of chorioretinal atrophy were also assessed by color fundus photography. SD-OCT images were evaluated for presence of epiretinal membrane, macular edema, hyperreflective nodules, hyperreflective bands, disruption of the ellipsoid zone, and separation of the RPE from Bruch's membrane in the macula. Fluorescein angiography and fundus autofluorescence imaging were performed in selected patients.

RESULTS

Table 1 summarizes the demographics and clinical features of the 13 patients included in this study.

Biopsy of the vitreous only was performed in 5 patients, biopsy of the vitreous and the brain in 2 patients, and biopsy of the brain only in 6 patients. Seven patients had CNS lymphoma at initial visit. Five patients were judged to have unilateral IOL disease and 8 patients were judged to have bilateral IOL disease. Three patients had primary IOL, that is, IOL without involvement of the CNS or other organs. The remaining 10 patients had both IOL and CNS lymphoma at last follow-up visit. The mean duration of ophthalmological follow-up for all patients was 20.8 months (range, 6–56 months).

Of 7 eyes of 7 patients who underwent vitreous biopsy, 4 eyes had cytology results positive for malignancy, and all 7 eyes had an IL-10/IL-6 ratio of greater than 1.0. All 4 eyes from which vitreous biopsy samples were submitted for PCR studies were positive for IgH gene rearrangements.

Of the 13 patients, 8 patients were treated with high-dose systemic methotrexate alone, and 4 patients were treated with high-dose systemic methotrexate combined with rituximab. One patient (patient 3) was of advanced aged (85 years), and declined both systemic and local therapy. Ten patients received radiotherapy to the brain, but radiation treatment to the eyes was not performed.

Table 2 summarizes the ocular findings of all 21 eyes involved with IOL at the initial patient visit. Anterior chamber cells (9 eyes, 42.9%; 6 patients, 46.2%), keratic precipitates (4 eyes, 19.0%; 3 patients, 23.1%), vitreous cells (17 eyes, 80.9%; 11 patients, 84.6%), and subretinal infiltrates (7 eyes, 33.3%; 7 patients, 53.8%) were the most common findings at presentation.

SD-OCT scans of all 21 involved eyes at the initial patient visit were assessed. As shown in Table 3, disruption of the ellipsoid zone (8 eyes, 38.1%; 6 patients, 46.2%) and hyperreflective nodules at the RPE level (5 eyes, 23.8%; 5 patients, 38.5%) were the most common findings at presentation. Other findings were epiretinal membrane (4 eyes, 19.0%; 2 patients, 15.4%), macular edema (2 eyes, 9.5%; 2 patients, 15.4%), and hyperreflective bands above the RPE level (1 eye, 4.8%; 1 patient, 7.7%). Separation of RPE from Bruch's membrane in the macular area was not observed in any eyes at presentation. The percentages of these SD-OCT abnormalities increased slightly over time. As shown in Table 3, SD-OCT images of these 21 involved eyes during follow-up showed disruption of the ellipsoid zone (10 eyes, 47.6%; 7 patients, 53.8%) and hyperreflective nodules at the RPE level (7 eyes, 33.3%; 6 patients, 46.2%) in a slightly higher percentage of patients. Epiretinal membrane (4 eyes, 19.0%; 2 patients, 15.4%) and hyperreflective bands above the RPE level (1 eye, 4.8%; 1 patient, 7.7%) were also observed. Finally, separation of RPE from Bruch's membrane in the macular area was

TABLE 1. Diagnosis and treatment in 13 patients with intraocular lymphoma.

Patient	Gender	Age	Eye	Method of diagnosis	Papanicolaou classification ^c	IL-6 (pg/ml) ^c	IL-10 (pg/ml) ^c	IgH gene rearrangement ^c	Chemotherapy	MTX intravitreal injection
1	M	77	OD	Vitreous biopsy	IV	30	3410	ND	MTX, R	ND
2	F	55	OU	Vitreous biopsy	IV	32	1950	Positive	MTX, R	Yes
3	F	85	OU	Vitreous biopsy	V	104	3780	Positive	ND	ND
4	M	65	OU	Brain biopsy ^a	ND	ND	ND	ND	MTX	ND
5	M	62	OU	Brain biopsy ^b	ND	ND	ND	ND	MTX	Yes
6	M	61	OU	Brain biopsy ^a	ND	ND	ND	ND	MTX, R	Yes
7	F	64	OD	Brain biopsy ^a	ND	ND	ND	ND	MTX	Yes
8	M	71	OU	Brain ^a and vitreous biopsy	II	205	1640	ND	MTX	ND
9	F	70	OU	Vitreous biopsy	IV	96	5490	Positive	MTX	Yes
10	F	50	OD	Brain biopsy ^a	ND	ND	ND	ND	MTX, R	Yes
11	F	32	OD	Brain biopsy ^a	ND	ND	ND	ND	MTX	Yes
12	M	45	OU	Vitreous biopsy	III	394	1630	Positive	MTX	Yes
13	M	73	OD	Brain ^a and vitreous biopsy	I	604	15200	ND	MTX	Yes

M: male, F: female, OD: oculus dexter, OS: oculus sinister, IL: interleukin, ND: not done, IgH: immunoglobulin heavy chain, MTX: methotrexate, R: rituximab.

^aThe diagnosis of primary central nervous system lymphoma precedes the diagnosis of intraocular lymphoma in these patients. Ocular involvement was diagnosed based on clinical findings alone.

^bPrimary intraocular lymphoma was suspected based on the ocular findings before the diagnosis of central nervous system lymphoma.

^cThese examinations were performed using vitreous samples.

TABLE 2. Ophthalmic findings of intraocular lymphoma at initial visit.

Ophthalmic findings	eyes (%) (n = 21)	patients (%) (n = 13)
Anterior chamber cells	9 (42.9)	6 (46.2)
Keratic precipitates	4 (19.0)	3 (23.1)
Intraocular pressure elevation	2 (9.5)	1 (7.7)
Vitreous cells	17 (80.9)	11 (84.6)
Subretinal infiltrations	7 (33.3)	7 (53.8)
Retinal hemorrhage	2 (9.5)	2 (15.4)
Retinal vasculitis	2 (9.5)	2 (15.4)
Epimacular membrane	3 (14.3)	2 (15.4)

observed (3 eyes, 14.3%; 3 patients, 23.1%), all in eyes that did not show this finding at presentation.

Eleven eyes of 9 patients received intravitreal injections of methotrexate, with no serious side effects observed related to this treatment. Five eyes of 5 patients received the methotrexate injections specifically for the finding of small subretinal whitish nodules observed by funduscopy that were believed to represent small collections of lymphomatous cells. These nodules corresponded to hyperreflective signals observed by SD-OCT at the level of the RPE, and this was reduced in all 5 eyes. The disruptions in the ellipsoid zone also improved in 3 of the 5 eyes, and the best-corrected visual acuity improved in 4 of the 5 eyes at 1 month following the first intravitreal methotrexate. The mean number injections performed was 5.6 (range 4–7).

Figure 1 shows best-corrected visual acuities for the IOL-involved eyes over time. The percentage of eyes

TABLE 3. SD-OCT findings of 13 patients with intraocular lymphoma at initial visit and during follow-up.

SD-OCT findings	Initial visit		Follow-up periods	
	eyes (%)	patients (%)	eyes (%)	patients (%)
Macular edema	2 (9.5)	2 (15.4)	0 (0)	0 (0)
Epiretinal membrane	4 (19.0)	2 (15.4)	4 (19.0)	2 (15.4)
Separation of RPE from Bruch's membrane	0 (0)	0 (0)	3 (14.3)	3 (23.1)
Disruption of ellipsoid zone	8 (38.1)	6 (46.2)	10 (47.6)	7 (53.8)
Hyper-reflective bands above the RPE level	1 (4.8)	1 (7.7)	1 (4.8)	1 (7.7)
Hyper-reflective nodules at the RPE level	5 (23.8)	5 (38.5)	7 (33.3)	6 (46.2)

SD-OCT: spectral-domain optical coherence tomography, RPE: retinal pigment epithelium.

with a best-corrected visual acuity of 0.5 or better was relatively stable over the follow-up period.

REPRESENTATIVE CASE REPORT

A 70-year-old woman (Table 1, patient 9) presented complaining of blurred vision in her right eye of 6 months' duration. The best-corrected visual acuity was 0.5 in the right eye and 0.7 in the left eye, and ophthalmic examination revealed anterior chamber cells in the right eye, diffuse vitreous cells and haze in both eyes, and white subretinal nodular infiltrations in the posterior fundus in the right eye. SD-OCT

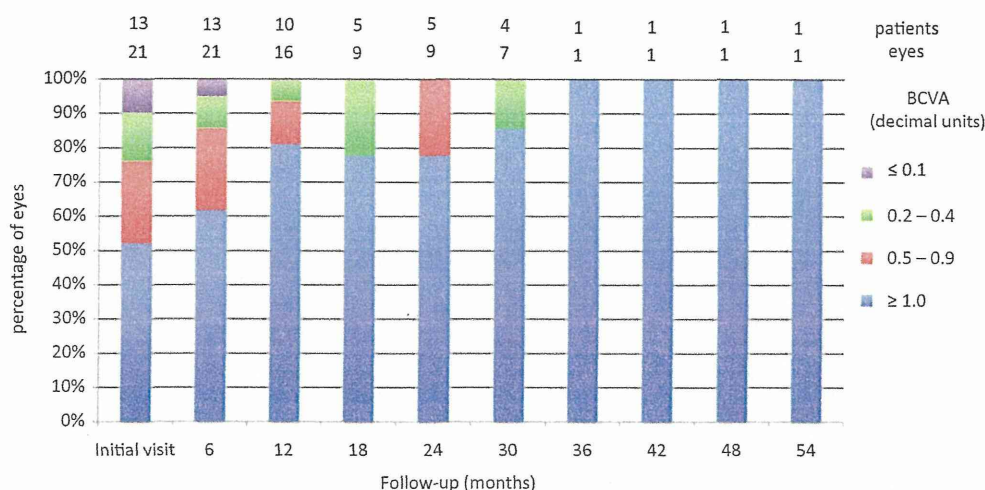


FIGURE 1. Best-corrected visual acuity at regular follow-up intervals in 13 patients with intraocular lymphoma.

examination showed disruption of the ellipsoid zone and hyperreflective bands and hyperreflective nodules at and above the RPE level in the right eye. Magnetic resonance imaging (MRI) of the brain was unremarkable, but subsequent biopsy of the vitreous revealed Papanicolaou class IV lymphocytes by cytology and an IL-10/IL-6 ratio of 57.0. The diagnosis of primary IOL was made, and the patient was treated with high-dose systemic methotrexate. SD-OCT examination 1 month later showed reduction in the hyperreflective bands and nodules above the RPE level as well as restoration of the ellipsoid zone (Figure 2A, B).

Two months later, the patient complained of further reduction in vision in her right eye. The best-corrected visual acuity in the right eye was found to be 0.2, and funduscopy revealed multiple white subretinal infiltrations in the posterior fundus of that eye, and SD-OCT showed hyperreflective nodules at the RPE level with disruption of the ellipsoid zone (Figure 2C). Intravitreal injection of methotrexate over 1 month, was performed for presumed recurrence of IOL. After three injections, the hyperreflective nodules at the RPE level by SD-OCT decreased and the best-corrected visual acuity increased to 1.0 (Figure 2D). Thereafter, the patient experienced further recurrences of retinal infiltrates, two more in the right eye and one in the left eye; each recurrence was successfully managed with additional intravitreal methotrexate injections. The patient has survived with a total follow-up of 32 months, with no involvement of the CNS. The right eye has remained recurrence-free 20 months after the 6th intravitreal methotrexate injection.

DISCUSSION

In the present study, we evaluated SD-OCT findings in patients with IOL in an attempt to identify patterns

that would be useful for the diagnosis and/or management of this disease. In agreement with previous reports,^{1,2,10–12} SD-OCT images in our patients revealed hyperreflective nodules or bands above or at the level of the RPE, and separation of RPE from Bruch's membrane. However, our most common SD-OCT finding was abnormality of the ellipsoid zone; this was observed both at the initial visit and during the follow-up period in 38 and 48% of eyes, respectively. This finding has also been demonstrated in a report by Egawa et al. in which the disruption of the ellipsoid zone was observed in 3 patients with IOL.¹³

Several investigators have shown hyperautofluorescent spots in eyes with active IOL by fundus autofluorescence (FAF), hypothesizing that areas of lymphomatous infiltration in the sub-RPE space can alter RPE metabolism, leading to this finding.^{10,11} A correlation between hyperautofluorescent spots on FAF and hyperreflective spots on OCT has also been noted.^{10,11} As shown in Table 4 and in the representative case illustrated in Figure 2, intravitreal injections of methotrexate reduced the hyperreflective nodules at the RPE level and improved the disruption in the ellipsoid zone. Therefore, it is possible that lymphomatous infiltration into the RPE may be contributing to RPE dysfunction, leading to photoreceptor outer segment abnormalities.

Whitcup et al. have previously demonstrated in autopsied eyes that lymphoma cells in primary IOL typically reside between the RPE and Bruch's membrane.¹⁴ In the present study, although separation of RPE from Bruch's membrane in the macular area was not seen at presentation, 3 of 13 patients (23.1%) subsequently developed this finding during follow-up. In these 3 patients, hyperreflective signals at the RPE levels were observed before the development of separation of RPE from Bruch's membrane. In addition, some patients showed hyperreflective bands above the RPE. Using a murine model of primary IOL,