

平成 28 年 11 月 18 日

## 小児急性リンパ性白血病における 超高感度な微小残存病変の検査法を確立

名古屋大学大学院医学系研究科（研究科長・高橋雅英）小児科学の小島勢二（こじませいじ）名誉教授、村松秀城（むらまつひでき）助教、関屋由子（せきやゆうこ）大学院生らの研究グループは、小児急性リンパ性白血病 (acute lymphoblastic leukemia; ALL) の重要な予後因子である微小残存病変 (minimal residual disease; MRD) を超高感度に測定する検査法を確立し、その臨床的意義を明らかにしました。

小児 ALL は、小児期において最も頻度が高い血液がんです。ALL では、さまざまな検査に基づいて、それぞれの患者の再発リスクの高さを推定し、それに応じた適切な強さの治療を行うことで、治療成績が向上します。治療をしても体内に残る白血病細胞を微小残存病変と呼びますが、これが検出される患者は再発のリスクが高いことが分かっています。従来、微小残存病変は定量 PCR 法等を用いて測定されていましたが、研究グループは、次世代シーケンサーという新たな機器を用いて、100 倍高い感度で微小残存病変を検査する方法を開発しました。

従来の方法では、細胞 1 万個に 1 個含まれる ( $10^{-4}$  レベルの) 白血病細胞を検出していましたが、新たな検査法では、100 万個に 1 個の ( $10^{-6}$  レベルの) 白血病細胞が検出できました。この方法で 72 人の小児 ALL 患者を検査したところ、治療開始後 33 日、80 日、4~5 か月後、治療終了時の超高感度微小残存病変が、強く予後を予測することが明らかになりました。

本研究結果から、次世代シーケンサーを用いた新しい微小残存病変の測定法は、従来の方法よりも正確に小児 ALL の予後を予測することがわかりました。この検査法を用いて、小児 ALL 患者の再発リスクを推定し、それに見合った適切な強さの治療を行うことで、治療成績がさらに高まることが期待されます。

本研究成果は、「British Journal of Haematology」（英国時間 2016 年 11 月 11 日付電子版）に掲載されました。また、本研究の一部は、日本対がん協会リレー・フォー・ライフ・ジャパン「プロジェクト未来」助成によってサポートされました。

# 小児急性リンパ性白血病における超高感度な微小残存病変の検査法を確立

## ポイント

- 小児急性リンパ性白血病において、治療開始後も体内にわずかに残っている白血病細胞（微小残存病変）を、従来法よりも高感度に検査できる方法を確立しました。
- 次世代シークエンサーを用いた新たな方法で微小残存病変を測定することで、従来の方法よりも高い精度で白血病の再発を予測することが可能となりました。
- この新たな方法を用いることで、患者ごとの正確な再発のリスクに基づいた、より適切な治療戦略の組み立てが可能になると期待されます。

## 1. 背景

急性リンパ性白血病（Acute lymphoblastic leukemia; ALL）は、小児期において最も頻度が高い血液がんです。日本では1年間に約600人の小児が新たに発症します。白血病の悪性度に基づいた適切な強度の治療（層別化治療）、複数の抗がん剤を組み合わせた多剤併用化学療法の実施、骨髄移植などの造血幹細胞移植の導入により治療成績は向上し、80～90%の患者において長期の生存が得られるようになりました。しかしながら、一旦再発した患者では、依然として予後は不良です。

治療をしても体内に残る白血病細胞を、微小残存病変(minimal residual disease; MRD)と呼びます。微小残存病変が検出される患者は再発のリスクが高いことが分かっており、治療強度の決定に最も強い影響を持つ指標の一つです。また、微小残存病変の有無に基づいて治療の強度を設定することで、治療成績が向上することも明らかになっています。

従来、微小残存病変の測定は定量PCR法やフローサイトメトリー法といった方法で行われていました。しかしながら、これらの方法は専門的な知識に加えて、多大な時間と労力を要します。そのため、日本では全例での微小残存病変の測定は行われていません。以前の基礎的な検討で、次世代シークエンサーという新たな機器を用いることで、より簡単に、従来の方法より10～100倍も少ない微小残存病変を測定できる可能性が示されています。すなわち、次世代シークエンサーを用いて微小残存病変を検出することで、個々の患者における白血病の悪性度や再発のリスクをより正確に予測できる可能性があります。

本研究グループは、次世代シークエンサーを用いて測定する超高感度微小残存病変の意義を明らかにするため、小児急性リンパ性白血病患者72名について検討を行いました。

## 2. 研究成果

本研究では、0歳から15歳の小児B細胞性急性リンパ性白血病患者72名について検討を行いました。観察期間の中央値は6.4年（範囲は0.1から12.4年）でした。治療開始後33日、80日、4～5か月後、治療終了時の4つの時点について、計232検体を解析しました。

次世代シークエンサーを用いた微小残存病変の測定性能を評価したところ、細胞100万個に1個だけ含まれる腫瘍を検出することができました( $10^{-6}$ レベル)。従来の方法では1

万個に1個( $10^{-4}$ レベル)、条件が揃っても10万個に1個( $10^{-5}$ レベル)の検出が限界であり、10~100倍高感度であるといえます。従来の方法(定量PCR法)と次世代シーケンサーを用いた方法の両方で同じ検体を測定し、従来の方法では検出できない微小残存病変を次世代シーケンサーで検出できることも確認しました。

まず、治療開始後33日と80日の結果を解析しました。この2つの時点において微小残存病変が検出されない患者を標準リスク群と分類し、どちらか、あるいは両方の時点で検出される患者を中間リスク群と分類しました。その結果、標準リスク群では5年後まで再発なく生存できる確率(無再発生存率)が100%であるのに対し、中間リスク群では62%と、明らかな違いを認めました(図1)。これは、33日と80日の微小残存病変が、将来の再発や死亡のリスクを予測していることや、これに基づいて治療法を強化するといった判断が可能であることを示しています。

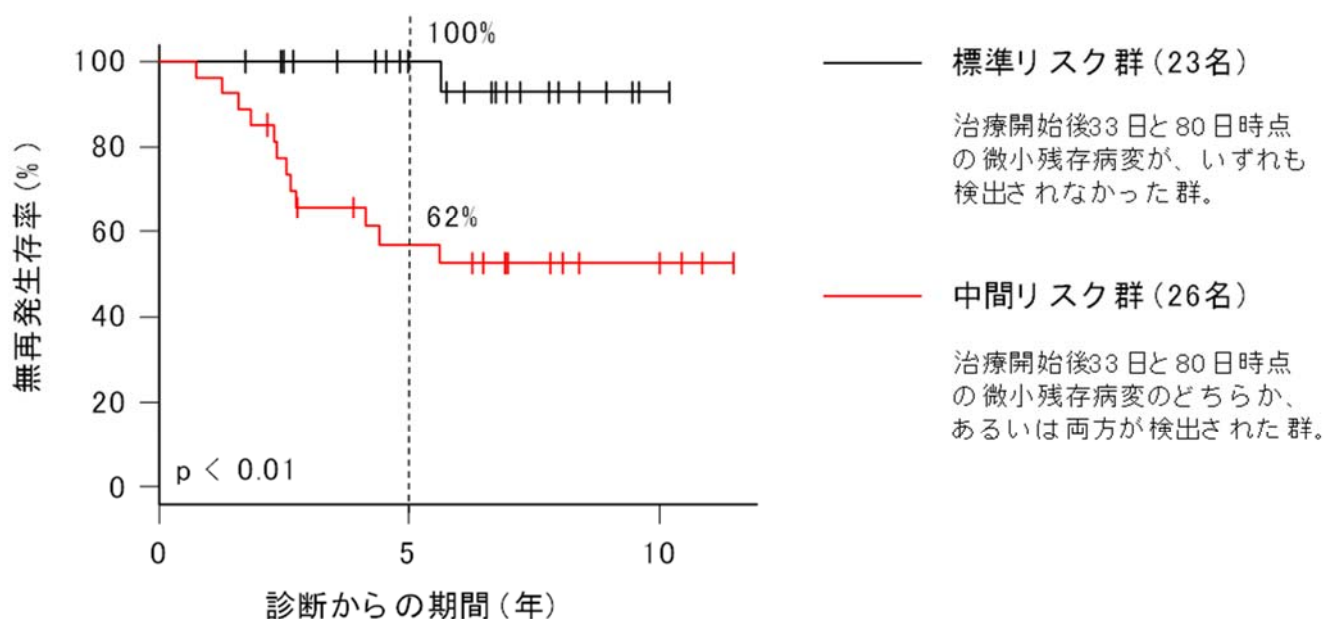
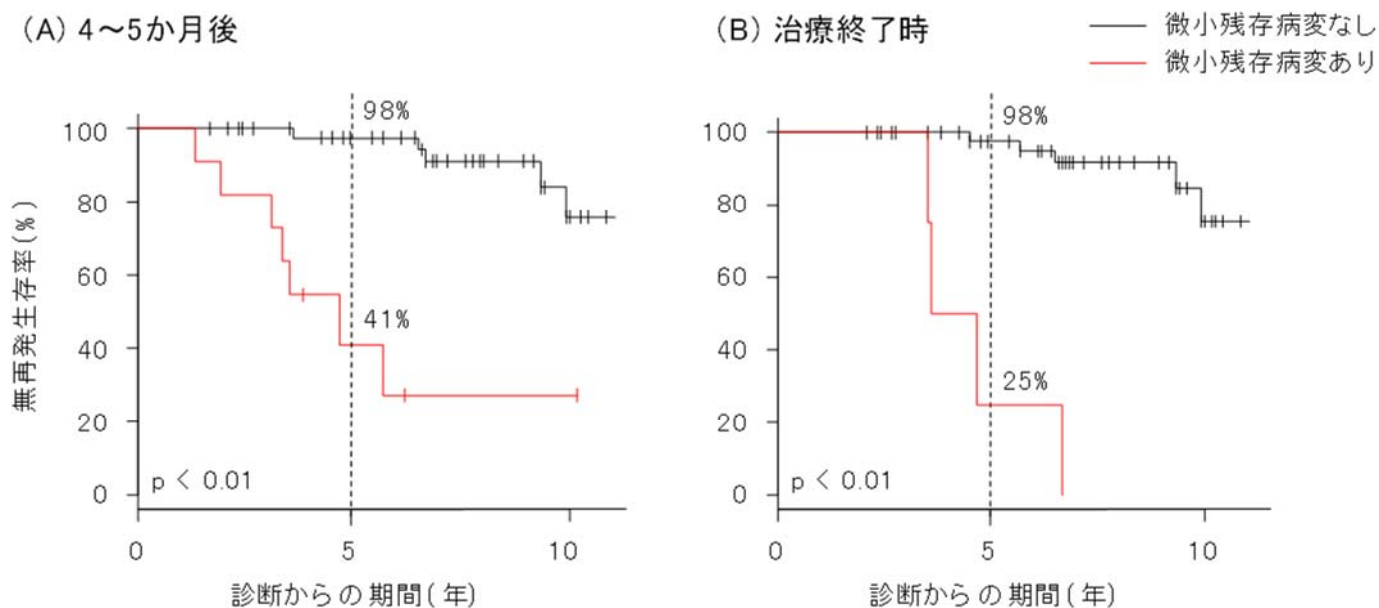


図1. 治療開始後33日と80日の微小残存病変に基づくリスク分類

治療後33日と80日の微小残存病変に基づいて、患者を標準リスク群(23名)と中間リスク群(26名)に分類した。横軸が診断からの期間(単位:年)、縦軸が再発なく生存した患者の割合(無再発生存率、単位:%)を示す。

次に、治療開始後4~5か月後と、治療終了時(多くの患者では治療開始後24カ月に相当)の結果を解析しました(図2)。これらの時点は、多くの治療が行われた後であり、従来の方法では微小残存病変がほとんど検出されないとされています。しかしながら、今回の研究では、この2つの時点について、それぞれ58名中11名(19%)、54名中4名(7.4%)で微小残存病変が検出されました。それぞれの時点について、微小残存病変が検出されない患者が5年間再発せず生存できる確率は98%であったのに対し、4~5か月後に検出された患者では41%、治療終了時に検出された患者では25%と、明らかな違いを認めました。特に、治療終了時に微小残存病変が検出された患者は、最終的には全員が再発していました。これらの結果は、4~5か月後や治療終了時にも次世代シーケンサーを用いれば微小残存病変が検出でき、それが再発をかなり強く予測するというを示しています。



**図 2. 治療開始後 4~5 か月と治療終了時の微小残存病変に基づく再発リスク**  
 治療後 4~5 か月(A)と治療終了時(B)について、微小残存病変が検出されない患者(黒線)と検出される患者(赤線)に分類し、再発なく生存した患者の割合(無再発生存率)を示す。

### 3. 今後の展開

本研究により、小児急性リンパ性白血病の治療中に超高感度微小残存病変を測定することで、従来の方法より精度の高い予後の予測ができることが示されました。次世代シーケンサーを用いた方法は従来の方法と比べて時間的・人間的な労力も少なく、この評価方法が本邦において導入されることが望まれます。今後は、治療中に超高感度微小残存病変が検出される患者に対し、治療強度を増強する、造血幹細胞移植(骨髄移植)を行う、あるいはキメラ抗原受容体導入 T 細胞(CAR-T 細胞)療法をはじめとする新規治療法を導入するなど、新たな治療戦略を立てることで治療成績がさらに向上すると期待されます。

### 4. 用語説明

- ・シーケンサー：DNA などの塩基配列を読み取る装置。
- ・次世代シーケンサー：従来の蛍光キャピラリーシーケンサーである「第 1 世代シーケンサー」と対比させて使われる用語。DNA 断片を並列して解析し、既存のゲノム配置と比較して再構築する手法を用いており、従来のシーケンサーに比べ、大量の塩基配列を低コストで迅速に解析可能。

#### 4. 発表雑誌

Yuko Sekiya, Yinyan Xu, Hideki Muramatsu, Yusuke Okuno, Atsushi Narita, Kyogo Suzuki, Xinan Wang, Nozomu Kawashima, Hirotohi Sakaguchi, Nao Yoshida, Asahito Hama, Yoshiyuki Takahashi, Koji Kato, and Seiji Kojima. **Clinical utility of next-generation sequencing-based minimal residual disease in pediatric B-cell acute lymphoblastic leukemia.** *British Journal of Haematology*. (英国時間 2016年11月11日10時付電子版に掲載)

English ver.

[http://www.med.nagoya-u.ac.jp/english01/dbps\\_data/material/nu\\_medical\\_en/res/all\\_20161118en.pdf](http://www.med.nagoya-u.ac.jp/english01/dbps_data/material/nu_medical_en/res/all_20161118en.pdf)