

小児造血器腫瘍（リンパ系腫瘍）に対する標準治療確立のための研究
急性リンパ性白血病における遺伝子増幅法による微小残存病変の診断の確立

担当責任者 堀 壽成 愛知医科大学小児科 准教授（特任）

研究要旨

小児急性リンパ性白血病（ALL）の治療成績は近年めざましい向上を遂げ、長期無イベント生存率が約 80%まで達したが、その主たる要因に微小残存病変（Minimal Residual Disease: MRD）の定量値による治療層別化が挙げられる。本研究は、わが国の本疾患における診断・治療に必要な、質の高い MRD に関する情報を供給し得る分子生物学的診断システムを確立するため、遺伝子増幅法による免疫受容体遺伝子再構成を用いた MRD 定量を世界標準レベルの精度で行い、その際検出される遺伝子再構成の検出率および RQ-PCR への適応性に関する評価を行うものである。

A. 研究目的

本研究は、わが国の小児における急性リンパ性白血病における、免疫受容体遺伝子再構成を用いた遺伝子増幅法による微小残存病変(MRD)定量により、本疾患の各サブタイプの治療研究における診断・治療に必要な質の高い情報を供給し得る分子生物学的診断システムを確立することを目的とする。

B. 研究方法

小児急性リンパ性白血病の初診時白血病細胞より DNA を抽出し、Ig/TCR 遺伝子の既知の遺伝子再構成について PCR を用いて増幅、得られた産物のクロナリティを heteroduplex analysis にて確認後、モノクローナルと判断された産物のシークエンス解析を行い、データベースとの比較により特異的と確認できた配列を元に症例特異的プライマーを設計する。これを用いて、治療後寛解と判断された骨髄検体の DNA を

RQ-PCR にて増幅し、MRD を定量する。また、本法については欧州 BFM グループの専門研究機関(EuroMRD)の Quality Control Round に毎年参加して、定量精度の維持とさらなる定量技術の改善を試みる。

(倫理面への配慮)

本研究で行った臨床検体を用いた実験は、関連法規を遵守し、倫理委員会ならびに実施機関長の承認を経た上で、検体提供者への人権擁護、個人情報保護に細心の注意を払って実施した。

C. 研究結果

平成 26 年 4 月から 27 年 1 月において、当施設では合計 86 例の JPLSG 治療研究登録症例の骨髄・末血検体について RQ-PCR による Ig/TCR 遺伝子再構成を用いた MRD 定量を施行した。その内訳は、T-ALL (T-11) 69 例（若年成人 11 例を含む）、乳児白血病

(MLL) 16例、再発 ALL (IntReALL) 1例で、その解析状況は、定量完了 36例、定量不能 27例 (再構成検出不能 23例、定量感度不足 4例)、定量用検体待ち (再構成スクリーニング完了) 23例であった。検出された再構成は計 118で、その内訳は IgH 17、TCR γ 39、TCR δ 21、TCR β 35、SiI-TAL 6であった。また定量完了例において、その定量感度は全例で 10 の-4 乗以下を示し、10 の-4 乗 14例、10 の-5 乗 22例であった。

D. 考察

本年度われわれは JPLSG における ALL の治療研究に基づいて、T-ALL、乳児白血病、再発 ALL のそれぞれについて MRD 定量を行った。定量用検体が提出された症例では、全例で定められた期間内に結果を得ることが可能で、プロトコルの運用に支障ないことが確認できた。また、必要とされる 10 の-3 乗以下の定量感度を全例でクリアし、その定量精度にも問題ないものと考えられた。しかしながら再構成の検出頻度は全体で 73.3%で、その内訳は T-ALL で 77.0%で従来のレベル、MLL では 64.7%と低い傾向がみられ、研究全体でのより詳細な検討が必要と考えられた。今後の解析症例の蓄積と EuroMRD への参加による、定量水準の維持と改善の必要性が示唆された。

E. 結論

本年度われわれは JPLSG における ALL の治療研究に基づいて MRD 定量を行い、治療研究計画の遂行に必要な水準の MRD 情報を遅滞なく供給でき得ることを確認した。しかし、特に乳児白血病における遺伝子再構成検出頻度の低値が課題と考えられ、精度管理とともにその改善が求められる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) ALL の微小残存病変の評価と活用法
堀壽成. 血液内科 68:210-219. 2014

2. 学会発表

1) Applicability of Ig/TCR gene rearrangements for RQ-PCR based MRD quantification in adult ALL.

堀壽成、山田朋美、横田昇平、鶴澤正仁、渡辺新、菊田敦. 第 76 回日本血液学会学術集会.

2) Analysis of MRD time-point in the CCLSG ALL2004 study. 堀壽成、山田朋美、横田昇平、鶴澤正仁、渡辺新、菊田敦.

第 56 回日本小児血液・がん学会学術集会.

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

