

厚生労働科学研究委託費（革新的がん医療実用化研究事業）

委託業務成果報告

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フローサイトメトリー法による微小残存病変の診断の確立

担当責任者 出口隆生 三重大学医学部附属病院小児科 講師

研究要旨 小児急性リンパ性白血病（ALL）におけるフローサイトメトリー法を用いた微小残存病変（FCM-MRD）検出システムを確立するため、小児白血病治療研究において FCM-MRD の測定を行った。平成 27 年 1 月までに再発 B 前駆細胞性（BCP）ALL 全国共同臨床試験 ALL-R08 では 80 例、のべ約 400 ポイントで、乳児 ALL 臨床試験 MLL-10 では 68 例、のべ約 230 ポイントの測定を実施し、1 例のみ途中で測定不能となった症例を認めた。T 細胞性（T-）ALL および BCP-ALL の初発例に対する臨床試験 ALL-T11・ALL-B12 では 4 カラー法を改良した 6 カラー法を用いて解析を行い、平成 27 年 1 月までに各々 49 例・171 例、各々約 190 検体・約 680 検体の解析を行った。現在、順次解析中であり、今後 PCR とのデータ比較を行うことで相関を確認し、PCR 法が適用出来ない症例やポイントでの実施可能性を検討する。

A. 研究目的

小児 ALL 治療における最も強力な予後因子のひとつが微小残存病変（MRD）であることは、ドイツの BFM グループやアメリカの St. Jude 小児病院、イギリスの UKALL 等、欧米の治療研究により初発例・再発例で共に有用性が示されている。しかし我が国における小児 ALL 全国共同臨床試験では、未だ ALL 症例のごく一部で臨床応用が開始されたのみであった。

日本小児白血病リンパ腫研究グループ（JPLSG）を母体とした全国的規模での臨床研究・診断検討の普及により、平成 22 年度から JPLSG が主体となって小児白血病の包括的診断・検体保存に関する臨床研究が開始され、初期診断は体制がかなり整いつつあるものの、MRD 測定システムの確立は未だ十分ではなく、切迫した課題であった。

平成 21 年 6 月の小児再発 BCP-ALL 治療研究 ALL-R08 に引き続き、平成 23 年 3 月には乳児

ALL 臨床試験 MLL-10 が、平成 24 年 1 月には小児・若年 T-ALL 臨床試験 ALL-T11 が、平成 24 年 11 月から小児 BCP-ALL 全国共同治療研究 ALL-B12 が、平成 25 年から小児 Ph 染色体陽性 ALL 臨床試験 ALL-Ph13 が開始されてきた。これらの臨床試験では MRD を積極的に測定し、我が国のデータを蓄積させることで将来の臨床応用に備える目的がある。

MRD 測定にはフローサイトメトリー（FCM）と PCR による 2 つの方法があり、我々は FCM を用いた免疫学的手法の確立を目的としている。すでに平成 14 年度から FCM-MRD 研究の先駆者である St. Jude 小児病院の Dr. Campana らと協力し、予備的検討を行ってきた。これまで BCP および T 細胞性（T-）ALL の初発例・再発例を中心に基礎的検討を行った上で、平成 21 年度以降、前述の全国規模の小児白血病臨床試験の中で前向き研究を開始している。この分担研究は、我が国において全国規模での

FCM-MRD 測定を永続的な体制として確立するために必要な条件を明らかにすることが目的である。小児 ALL の大部分を占める BCP-ALL の臨床試験開始後は検体数が飛躍的に増加し、費用面、運用面での問題点が明らかになりつつあるが、今後、臨床成績との関連を明らかにして我が国における実施可能性を検討する。

B. 研究方法

平成21年6月から平成27年1月までの間に、三重大学医学部小児科・JPLSG/日本小児白血病研究会（JACLS）マーカー解析センターにて再発診断を行った ALL-R08 登録例 80 例と、平成23年1月から平成25年3月までに MLL-10 に登録された 68 例、ALL-T11 に登録された 49 例、ALL-B12 に登録された 171 例において、発症時（BMA1）、day 8 末梢血（PB）、day15 骨髄（BMA2）、寛解導入療法後（BMA3）、早期強化療法後（BMA4）の各ポイントについて FCM-MRD の測定を行った。

1. 検体送付施設はプロトコールに指定された検体依頼書を三重大学に事前に送付した上で、ヘパリン加骨髄（BM）もしくは PB を宅配便で送付した。

2. 送付された BM・PB は洗浄の後、細胞濃度を調整した上で全血法を用いた手法で JPLSG 診断パネルに基づいて白血病の病型診断を受けた。また同時に MRD 診断パネルに従って FCM-MRD 用検体を調製した。

3. 各々のプロトコールで規定された採取ポイントの BM・PB を用いて MRD を測定した。フォローアップ検体は単核球分離を行った後、細胞濃度を調整し、検体を調整した。

4. MRD 測定はセントジュード小児病院から報告された 4 カラー FCM-MRD 測定法を基にカスタマイズしたパネルを用い、最大 3 種類のサンプルで測定した。ALL-T11・B12 において

は 6 カラーによる改変法を用いて最大 2 種類のサンプルを用いて測定した。

6. 調整されたサンプルは BD Bioscience 社の FACS Calibur もしくは FACS Canto II FCM にてデータ収集を行い、MRD を解析した。

7. 解析された MRD の結果はデータベースに保存され、後の予後解析のために用いる予定である。ALL-R08 においてはすでに解析が終了した PCR-MRD との間で相関を検討された。

（倫理面への配慮）

すべての検体は各々の臨床試験によって番号化され、連結可能匿名化された状態で解析センターに送付された。臨床情報はデータセンターにて管理されている。

C. 研究結果

（1）PCR-MRD と結果を比較検討した ALL-R08 症例は 42 例であった。FCM-MRD は 0.00%～63.02%、PCR-MRD が 0.00%～88.00% (8.8×10^{-1}) であった。BMA3 における移植適応判定に用いるカットオフ 0.1% (1.0×10^{-3}) 未満の症例数は、FCM-MRD で 19 例、PCR-MRD で 19 例であった。カットオフ値を挟んで判定が異なったうちの 1 例は FCM が 0.08%、PCR が 0.10% (1.0×10^{-3}) であり、値は非常に近かった。もう一例は FCM-MRD が 19.3% であるにも関わらず、PCR-MRD は陰性を示した。BMA3 での診断一致率は約 89.5%、42 例全体での相関係数は 0.8203 であった。なお、PCR で陰性であった症例のうち 2 例で FCM 陽性を示す症例があり、今後予後解析により、それらの臨床的意義が検討される。

（2）FCM-MRD の測定上問題となった症例は、正常細胞と発現が近く、immunophenotypic shift を来した症例が 1 例、およびもともと正常と発現のほとんど変わらなかった 9 例

(MLL-10 4例、T-ALL 2例、BCP-ALL 3例)を除いた358例でMRDの評価可能であった。なお、検体作成不可能であった症例がのべ10検体以上存在し、それらは凍結や高温などの要因によって検体到着時、すでにダメージのあった症例のみであった。

(3)臨床経過との関係：ALL-R08でMRDのSerialな解析結果を症例毎に検討した。臨床最も重要と考えられるBMA3の測定を行った59例中、BMA3でMRDが陰性となった症例は17例あり、その中でBMA5の測定を行った12例全てがMRD陰性を維持していた。BMA3で移植適応とならない0.1%未満のMRDを検出した13例では、BMA5を測定した11例中10例がBMA5でMRDが陰性化した。しかしながらBMA3で0.1%から1%のMRDを検出した12例では、BMA5を測定した11例中4例のみがMRD陰性化したのみであった。またBMA3で1%以上のMRDを検出した17例では、BMA5を測定した11例中MRDが陰性化したのは2例のみであった。

(4)BCP-ALL、T-ALLにおいては現在解析が進行中であり、平成27年度中には解析を終了した上で、PCR-MRDとの比較検討が行われる予定である。

D. 考察

ALL-R08臨床試験において平成25年3月までにBMA3までの解析が終了している55例では、引き続き再発診断時の表現型が、正常Bリンパ球前駆細胞に近い白血病も含まれていたものの、治療早期(BMA2~BMA3)では免疫学的表現型が正常に近くても比較的容易に検出され、パイロット研究と同様の結果であった。MRD量が多めの1例で判定が難しかったが、PCR法の結果と比較することで、実際にはほとんど全てがMRD細胞であると確認できた。

臨床経過との関係では、化学療法群となる低

MRD症例は継続的にMRDが陰性化していることが確認できた。さらにはBMA3でMRDが陽性でも、その後MRDが陰性化する症例を認めた。これらの症例が造血細胞移植でレスキューされる症例(およそ20~30%)と一致するかどうかは非常に興味深く、最終的な予後との相関の解析が待たれる。

ALL-R08ではPCR-MRDとの相関を検討してきているが、一貫して良好であると考えられた。若干FCM-MRDが低い値を示す傾向があり、また2例において、PCRでは陰性、FCMでは陽性となる値を示した症例が存在したが、結果が全く乖離していることから、TCR/IgH再構成バンドがポリクローナルであり、PCRプライマーとして不適切なクローンを選択してしまった可能性が高いと考えられた。MLL-10臨床試験では、MLL遺伝子再構成を有する乳児白血病特有の表現型に合わせて、7.1(NG2)やCD133などの検査項目を加えて検討を行ったが、平成27年1月までに検討を行った42例のうち4例で正常BCPと同様の抗原発現パターンのため、MRDの評価が困難であった。核型の分析ではこれら4例はすべてt(9;11)転座を有したCD34陰性ALLであり、この疾病亜群におけるMRD測定の改良が必要と考えられた。

T-ALLでは、TdT陰性化による測定不能を避けるため、6-color化およびCD99による検討を追加して解析を開始した。この2種の抗原解析でほとんどの症例はMRDフォローが可能であったが、2例においてターゲットの設定が困難でありフォロー不可能と判断した。この2例はともに $\gamma\delta$ 型T細胞受容体が陽性である特殊なタイプで、乳児におけるt(9;11)転座同様、この疾病群における測定系の改良が必要と考えられた。

BCP-ALLでは、4カラーで検討していたCD38とCD58などの抗原を複数組み合わせることで、

検討項目数を減らす試みを行ったが、正常と表現型が似た症例の 3 例で継続的フォローが困難であった。

現在、T-ALL/BCP-ALL では、PCR-MRD との相関や他の検査施設との相関など QC 的な検討を行った上、予後との検討を行っていく予定である。

FCM-MRD の測定機器は年々改良が重ねられ、マルチカラー化が進んできたが、ここ数年は St. Jude 小児病院では ALL は 7 カラー、AML は 8 カラーでの検討が主体となっている。また I-BFM では EuroFlow コンソーシアムによって定められた 8 カラーパネルによって診断と MRD 評価を一体化させている。現在、三重大学小児科では BCP-ALL では 7 カラー、T-ALL では 8 カラーの St. Jude 小児病院と同一のパネルを使用した解析の準備を終え、平成 27 年度中には移行予定である。

2014 年中に三重大学では診断検体も含め、年間 1,400 検体余りの FCM 解析を行っているが、今後、我が国の FCM-MRD 評価体系をどのように進めていくかは、医療を取り巻くインフラや診療報酬体系の改革も必要である。多次元フローサイトメトリーによる小児白血病診断や、FCM-MRD を保険収載された一般的な検査とまでするにはいまだいくつかの課題があるが、本研究によって確実に進捗を得られたと考える。

E. 結論

1. FCM を用いた MRD は、再発 ALL 臨床試験 ALL-R08 で、治療選択への評価ポイントである BMA3 では臨床試験に用いられている PCR-MRD と非常に高い相関を示した。

2. 従って再発 ALL における FCM-MRD 測定は PCR-MRD と同様に有用であることが我が国の再発例においても示唆された。

3. R08 臨床試験では、BMA3 で高い MRD を示しても、その後陰性化する症例を認め、それら

が移植によって救済された例であるかを臨床的予後と検討する必要がある。

4. T-ALL・BCP-ALL における 6 color 解析の有用性が示され、全国規模で実施中である。

5. 平成 25 年度に ALL の FCM-MRD を 7/8 カラーパネル化への準備を終え、27 年度から変更予定である。4/6 カラーで追跡が困難であった症例での改善が期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Yano M, Imamura T, Asai D, Moriya-Saito A, Suenobu S, Hasegawa D, Deguchi T, Hashii Y, Kawasaki H, Hori H, Kosaka Y, Kato K, Horibe K, Yumura-Yagi K, Hara J, Matsumoto K, Kiyokawa N, Oda M, Sato A; Japan Association of Childhood Leukemia Study. An overall characterization of pediatric acute lymphoblastic leukemia with 2 overexpression. *Genes Chromosomes Cancer*. 2014, 53(10): 815-823.

2. Kobayashi R, Takimoto T, Nakazawa A, Fujita N, Akazai A, Yamato K, Yazaki M, Deguchi T, Hashii Y, Kato K, Hatakeyama N, Horibe K, Hori H, Oda M; Lymphoma Committee, Japanese Association of Childhood Leukemia Study.

Inferior outcomes of stage III T lymphoblastic lymphoma relative to stage IV lymphoma and T-acute lymphoblastic leukemia: long-term comparison of outcomes in the JACLS NHL T-98 and ALL T-97 protocols. *Int J Hematol*. 2014, 99(6): 743-749.

3. Asai D, Imamura T, Yamashita Y, Suenobu

S, Moriya-Saito A, Hasegawa D, Deguchi T, Hashii Y, Endo M, Hatakeyama N, Kawasaki H, Horii H, Horibe K, Yumura-Yagi K, Hara J, Watanabe A, Kikuta A, Oda M, Sato A; Japan Association of Childhood Leukemia Study (JACLS) & Children's Cancer and Leukemia Study Group (CCLSG).

Outcome of TCF3-PBX1 positive pediatric acute lymphoblastic leukemia patients in Japan: a collaborative study of Japan Association of Childhood Leukemia Study (JACLS) and Children's Cancer and Leukemia Study Group (CCLSG).

Cancer Med. 2014, 3(3): 623-631.

2. 学会発表

1. Relationship between Immunophenotype and Clinical Manifestations in Infant.

Takao Deguchi, Daisuke Tomizawa, Nobutaka Kiyokawa, Keizo Horibe, Yoshihiro Komada
第56回日本小児血液・がん学会学術集会（岡山），2014年11月29日

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

