

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
次世代シーケンサーを用いた急性リンパ性白血病の微小残存病変(MRD)の解析

担当責任者 東京医科歯科大学 発生発達病態学分野 高木正稔

研究要旨

白血病微小残存病変 MRD は治療法を選択するうえで非常に重要な情報となる、現在までフローサイトメトリーや PCR を用いた方法が行われてきたが、現在の解析方法は検出感度、手技の煩雑さから、満足すべき検査方法とはなっていない。本研究では次世代シーケンサーを用いた MRD 測定方法を確立する。

A. 研究目的

白血病微小残存病変 MRD は治療法を選択するうえで非常に重要な情報となる、現在までフローサイトメトリーや PCR を用いた方法が行われてきたが、現在の解析方法は検出感度、手技の煩雑さから、満足すべき検査方法とはなっていない。表 1 にこれまで行われている MRD 解析方法の比較をまとめる。

表 1

方法	感度	利点	弱点
Flow cytometry	10^{-4} ～ 10^{-5}	簡単、早い	発現している抗原によりできないことがある、スタンダードがない
RQ-PCR Ig/TCR	10^{-4} ～ 10^{-5}	豊富な経験があるQCのスタンダードがある	手間がかかる
RQ-PCR Fusion mRNA	10^{-4} ～ 10^{-5}	簡単	mRNA の判断なので、本当に MRD を反映しているのか？

PCR and NGS	10^{-5} ～ 10^{-6} ??	比較的簡単	コストパフォーマンスが悪い？
-------------	-----------------------------------	-------	----------------

本研究では次世代シーケンサーを用いた MRD 測定方法を確立し、その有用性を臨床検体を用いて解析する。

B. 研究方法

1、骨髄サンプルより、ゲノム DNA を調整し、IGH および TCR の遺伝子領域を次世代シーケンス様にアダプター配列を付加した共通および領域特異的プライマーを用いて増幅し、次世代シーケンサーを用いて解析する。

2、白血病細胞を正常骨髄と希釈系列を作成し混和し、最小検出限界を測定する。

3、臨床検体を用い、初発時、寛解導入療法中、寛解導入療法終了後の検体を解析する。

（倫理面への配慮）

ヒト検体を扱う研究であり、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針、臨床研究に関する倫理指針を遵守し、研究計画「課題番号：194 次世代シーケンサーを用いた微小残存病変

(MRD)解析技術の確立」として学内倫理委員会承認を得た。

C. 研究結果

臨床研究計画を策定し、研究計画「課題番号：194 次世代シーケンサーを用いた微小残存病変(MRD)解析技術の確立」として学内倫理委員会承認を得た。

次世代シーケンサーを用いた MRD 解析がどの程度の感度で白血病細胞を検出できるか、正常骨髄と希釈系列を作成し混和し、最小検出限界を測定する。研究計画に同意の得られた検体を用いて、初診時に得られた B 前駆細胞型急性リンパ性白血病細胞を正常骨髄と表 2 の割合で混和し、そこからゲノム DNA を抽出し、次世代シーケンサーを用いた解析を開始した。

表 2

leukemic cell (number)	WT cell (number)
1x10 ⁷	0
1x10 ⁶	9x10 ⁶
1x10 ⁵	9.9x10 ⁶
1x10 ⁴	1x10 ⁷
1000	1x10 ⁷
100	1x10 ⁷
10	1x10 ⁷
1	1x10 ⁷
0	1x10 ⁷

研究計画に同意の得られた 3 症例での初診時、および、寛解導入療法中、寛解導入療法終了後の骨髄単核球からゲノム DNA を抽出し、次世代シーケンサーを用いた解析を開始した。

D. 考察

次世代シーケンサーを用いた MRD 解析は比較的簡単に行えると考えられるまた、しかし解析にかかる費用が高額なことが問題点と考え

られる。今後の研究で、コストに見合う有用性、利便性であるか検討していく。

E. 結論

次世代シーケンサーを用いた MRD 解析開始した。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他

