

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。

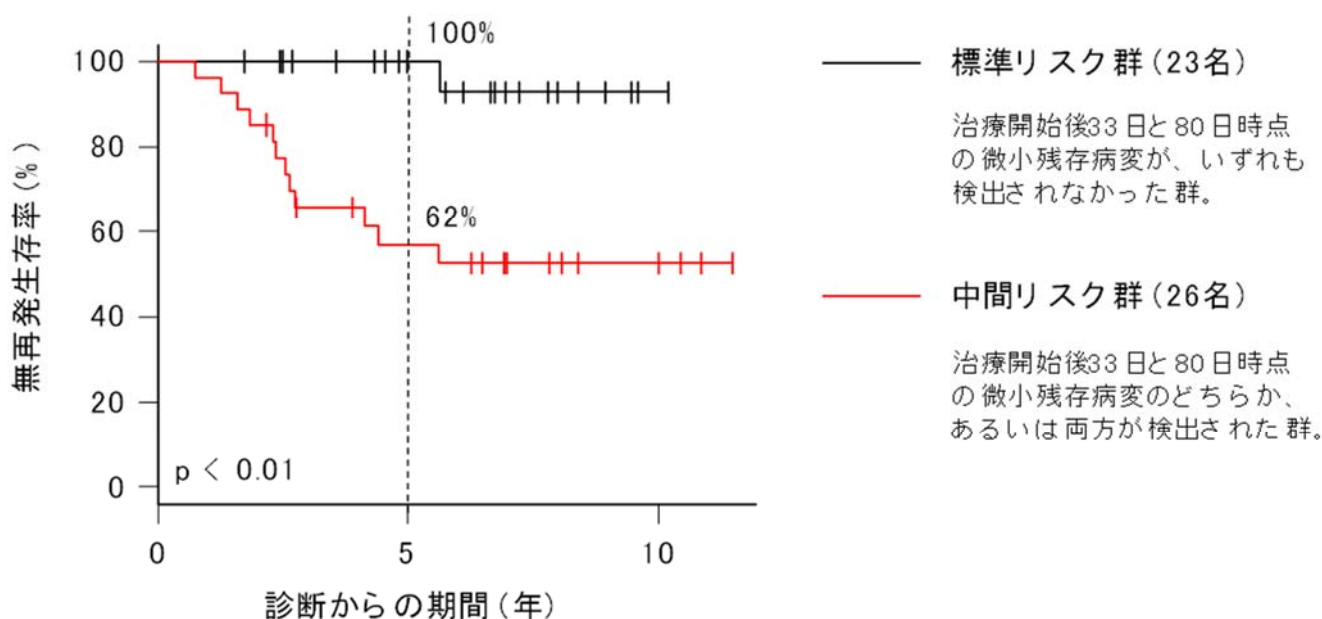


図1. 治療開始後33日と80日の微小残存病変に基づくリスク分類

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。

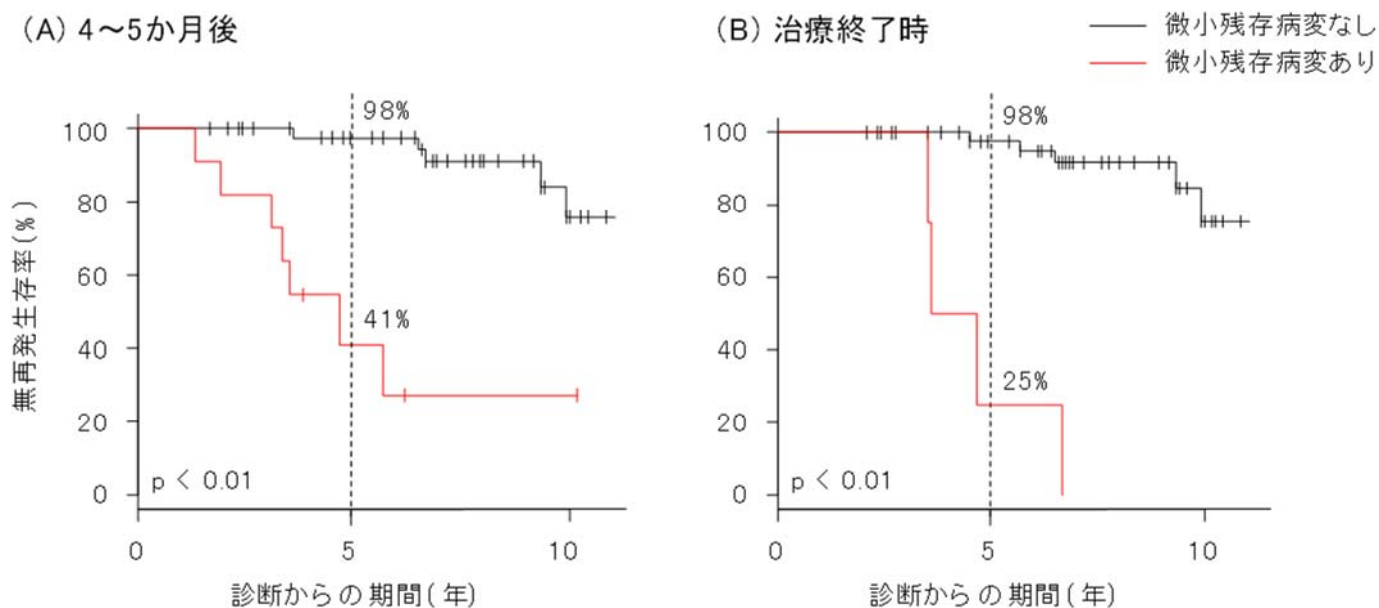


図 2. 治療開始後 4~5 か月と治療終了時の微小残存病変に基づく再発リスク
 治療後 4~5 か月(A)と治療終了時(B)について、微小残存病変が検出されない患者(黒線)と検出される患者(赤線)に分類し、再発なく生存した患者の割合(無再発生存率)を示す。

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

次世代シーケンスによる小児急性リンパ性白血病治療成績の改善

奥野友介（おくのゆうすけ）

名古屋大学医学部附属病院 先端医療・臨床研究支援センター 特任講師

yusukeo@med.nagoya-u.ac.jp

〒466-8560 愛知県名古屋市昭和区鶴舞町 65 番地 TEL 052-744-2298

<研究の背景>

小児急性リンパ性白血病 (acute lymphoblastic leukemia; ALL) は最も頻度の高い小児がんであり、日本では年間 500~600 人が発症します。ALL の治療成績は年々向上しており、生存率は 90% 近くに達していますが、再発をきたした症例などは予後不良です (Lancet 977, 2015)。結果として、ALL は小児がんの中における死因第一位となっています。

ALL の研究は日々進歩しています。最新の分子生物学的な検査を駆使すれば、ALL の中でも予後の悪いもの、あるいは特定の治療に反応するものを抽出し、最適な治療を選択できます。例えば、治療後もわずかに体内に残る腫瘍 (微小残存病変) が検出された患者に強い化学療法 (抗がん剤による治療) を行えば、予後が改善することが示されています (Lancet Oncol 465, 2015)。フィラデルフィア染色体を持つ ALL と類似の遺伝子発現を持つ ALL (Ph-like ALL) は予後不良ですが、分子標的薬のターゲットとなる活性化型チロシンキナーゼ変異を備えており、標的治療による予後改善が期待されます (N Engl J Med 1005, 2014)。しかしながら、現在の臨床においては、全例については微小残存病変の測定が行われていないなど、治療法の選択が不十分であると考えられます。

日本における ALL の治療成績を改善し、さらには新たな治療法を開発するという目的のためには、最新の検査が予後を改善するという根拠を揃え、それを臨床に応用していく必要があります。私たちの研究グループは、次世代シーケンサーという最新の遺伝子検査の機械を用いて、他の白血病・血液悪性疾患における研究 (Nat Genet 937, 2013、Nat Genet 1293, 2013、Leukemia 241, 2014) で実績を上げてきました。今回の研究の目的は、次世代シーケンサーを用いた ALL の分子生物学的な検査を実臨床に導入し、ALL 患者の予後を改善するために、基盤となるデータを構築し、結果に基づく臨床試験を開始していくことです。

<結果 1：小児の難治性白血病を引き起こす MEF2D-BCL9 融合遺伝子を発見>

ALL の治療成績は向上を続けていますが、再発をきたした患者の予後は、依然として不良です。私たちの研究グループは、小児の再発、あるいは治療抵抗性の ALL を引き起こす遺伝子の異常を発見し、治療法の開発に結び付けるために、59 人の患者について次世代シーケンサーを用いた大規模な遺伝子解析を行いました。その結果、4 人の患者に、これまで報告のない MEF2D-BCL9 融合遺伝子が発見しました。この融合遺伝子が検出された患者の予後は、再発をきたした患者の中でも特に不良であり、全例が死亡していました。MEF2D-BCL9 融合遺伝子を ALL のモデル細胞に遺伝子導入すると、細胞の増殖が促進され、治療の鍵を握る副腎皮質ステロイド薬が効きにくくなりました。しかしその一方、ヒストン脱アセチル化酵素阻害薬や、プロテアソーム阻害薬といった、他のがん で実用化されている分子標的薬の効果が期待できることが示されました。

今回の研究成果は、米国臨床腫瘍学会 (American Society of Clinical Oncology) より発行されている科学誌『Journal of Clinical Oncology』に掲載されました。

1. 背景

ALLは様々な遺伝子の異常を伴って発症することが知られています。染色体が切断され、間違った形につながり合わせられることで2つの遺伝子が結合し、異常な機能を獲得する融合遺伝子もその一つです。融合遺伝子をターゲットとした治療薬が様々ながんにおいて開発されており、その有効性が報告されています。例えば、BCR-ABL1融合遺伝子を持つALLは、かつて非常に予後が悪いとされていましたが、チロシンキナーゼ阻害薬という、BCR-ABL1に特別に作用する薬（分子標的薬）の導入により、劇的に予後が改善しました。

近年飛躍的に進歩した遺伝子解析の方法を用いて、小児ALLにおける新しい遺伝子の異常を見つけることで、より適切な悪性度の決定（リスク層別化）、新しい薬剤の組み入れ、あるいは分子標的薬の開発が可能になり、さらなる治療成績の向上を目指すことができます。

2. 研究成果

本研究グループは、小児の再発、あるいは寛解導入治療に抵抗性のALLに関連する遺伝子の異常を発見するため、次世代シーケンサーという遺伝子解析装置を用いて、59例の患者で大規模な遺伝子解析（RNAシーケンス解析）を行いました。その結果、4例において、MEF2D遺伝子とBCL9遺伝子の異常な融合を検出しました（図1）。

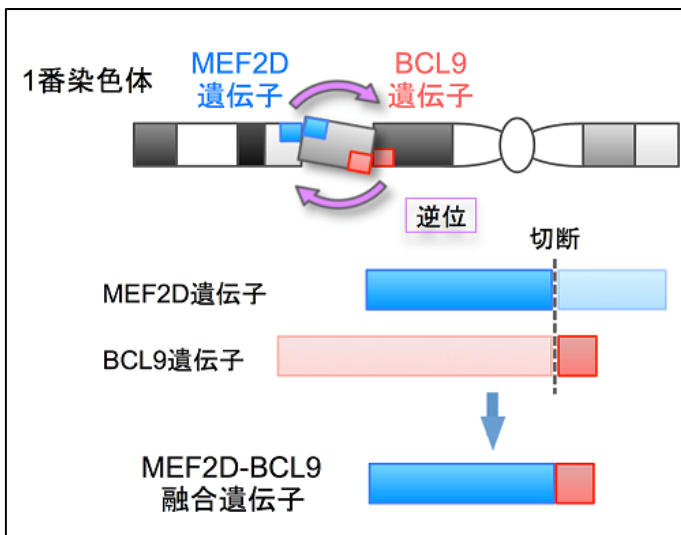


図1. MEF2D-BCL9 融合遺伝子

1番染色体のごく短い領域が切断され、逆向きにつながり合わせられる（逆位）ことにより、MEF2D-BCL9融合遺伝子が生じます。

この2つの遺伝子は1番染色体上の比較的近い場所に位置しており、ごく短い領域の染色体が切断され、逆向きにつながり合わせられる（逆位）ことにより、MEF2D-BCL9融合遺伝子が生じると考えられました。これは、従来のG-banding法など、病院で行われる遺伝子の検査では検出できない異常でした。

この融合遺伝子をもつ白血病は、思春期（10歳以降）の発症、B前駆細胞性に分類される免疫表現型、空胞を多く有する特異な形態（図2）、従来の抗がん剤治療が効きにくく治療中に再発する、などの点で共通していました。結果として、MEF2D-BCL9融合遺伝子が検出された4例の患者は、全例が死亡していました。また、それぞれの遺伝子の使われ方の特徴（発現プロファイル）も他のALLとは全く異なりました。すなわち、MEF2D-BCL9融合遺伝子は、小児ALLの新たな一群を特徴づけるものと考えられました。この融合遺伝子は診断時点から検出でき、加えて細胞のがん化の原因となる他の遺伝子異常が検出されなかったため、この融合遺伝子は白血病を発症する引き金であると考えられます。

MEF2D-BCL9融合遺伝子の機能を解析するため、ALLのモデルとなる細胞（細胞株）にこの融合遺伝子を導入する実験を行いました。その結果、この融合遺伝子を持った細胞は増殖が速くなるとともに、ALL治療のカギとなる副腎皮質ステロイド薬が効きにくくなることが分かりました。その一方で、薬剤感受性試験の結果からは、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤やプロテアソーム阻害剤など、すでに他のがん、あるいは他の白血病では実用化されている分子標的薬の効果が期待できることが示されました。

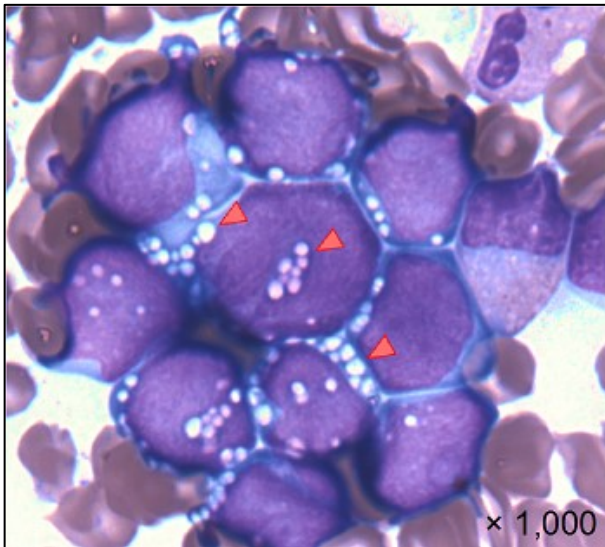


図2. MEF2D-BCL9 融合遺伝子をもつ白血病細胞

典型的な B 前駆細胞性 ALL とは異なり、細胞が大きく、細胞質の青味が強く、白く抜けた空胞 (Δ) を多くもつ特異な形態を示します。

3. 今後の展開

今回の研究により発見され、その機能が明らかとなった MEF2D-BCL9 融合遺伝子は、分子マーカーとしてリスク層別化や治療効果の判定に早期の実用化が可能と考えられます。また、この融合遺伝子を持つ白血病に対しての、分子標的薬を組み入れた新しい治療方針の策定や、この融合遺伝子を標的とした新薬開発へ応用研究を進めることにより、小児 ALL の治療成績の向上を期待できます (図3)。

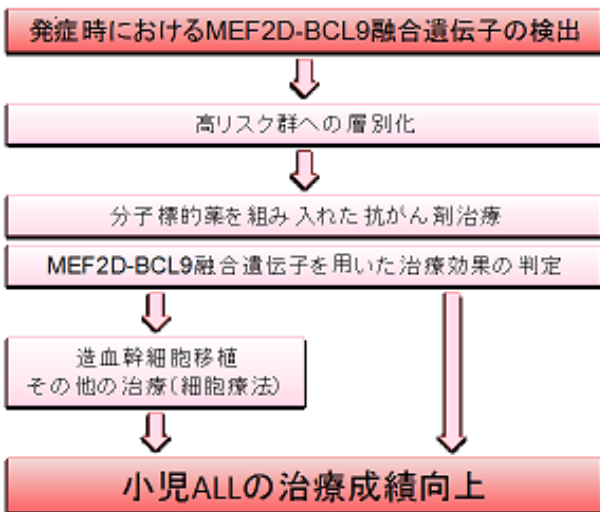


図3. 今後の治療戦略

MEF2D-BCL9 融合遺伝子をリスク層別化や治療効果の判定に利用するとともに、分子標的薬を組み入れた新しい治療を行うことで治療成績の改善を期待できます。

<結果2：小児 ALL における超高感度な微小残存病変の検査法を確立>

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 ALL の患者は再発の可能性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、私たちのグループは、次世代シーケンサーという新たな機器を用いて、最大で 100 倍高い感度で微小残存病変を検査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。新たな方法で 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、強く再発を予測することが明らかになりました。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。

今回の研究成果は、欧州血液学会議 (European Hematology Association) より発行されている科学誌『British Journal of Haematology』に掲載されました。

1. 背景

ALL の診療においては、様々な指標に基づいて、患者ごとに白血病細胞の悪性度を決定して、それに応じた強さの治療をすることが、治療成績を改善させます。治療をしても体内にわずかに残る白血病細胞を微小残存病変 (minimal residual disease) と呼びます。これは、顕微鏡など、一般的な病院の設備では見つけれない程度に少ないものを指す言葉です。微小残存病変が検出される患者は再発の可能性が高いことが分かっていますので、微小残存病変は治療強度の決定に最も強い影響を持つ指標の一つです。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。また、以前の研究で、次世代シーケンサーという新たな遺伝子解析の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、次世代シーケ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、次世代シーケ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 ALL 患者について検討を行いました。

2. 研究成果

今回の研究では、0 歳から 15 歳の小児 B 細胞性 ALL 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。

次世代シーケ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。

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。

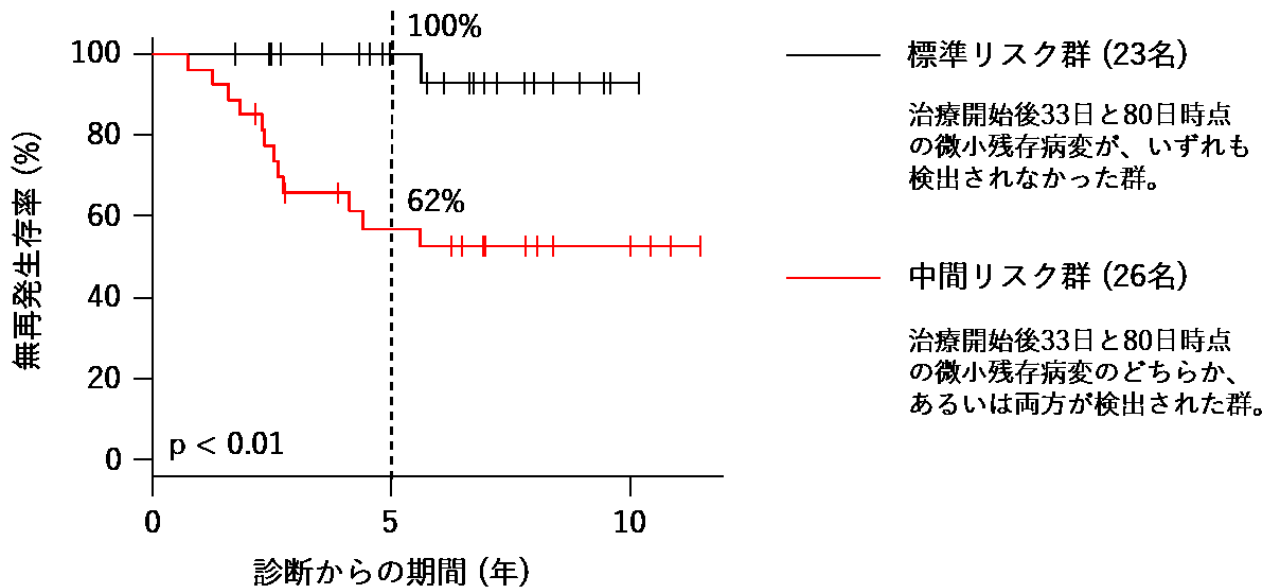


図1. 治療開始後33日と80日の微小残存病変に基づくリスク分類

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。

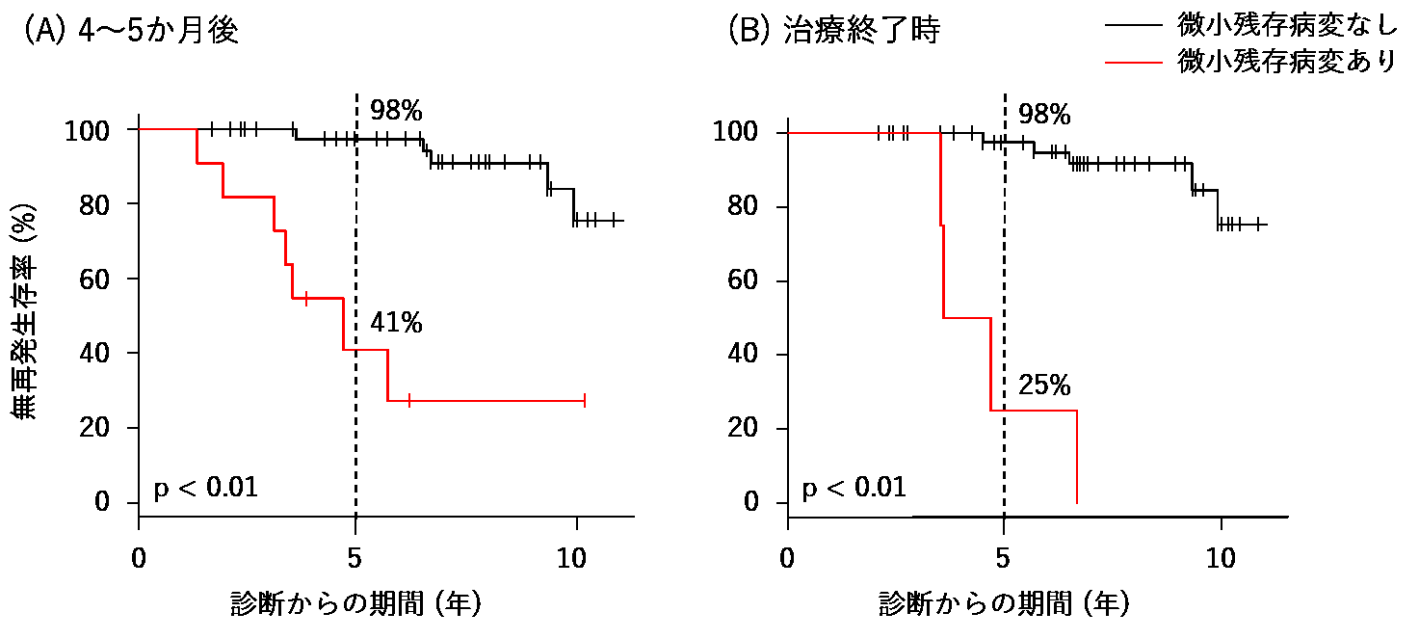


図2. 治療開始後4~5か月と治療終了時の微小残存病変に基づく再発リスク

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

今回の研究により、小児 ALL 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・人力的な労力も少なく、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。

<今後の予定>

私たちの病院(名古屋大学医学部附属病院)では、病院を受診するすべての小児 ALL 患者について、大規模な遺伝子解析による治療標的の発見と、治療中の微小残存病変の測定を行う臨床研究を開始しています。MEF2D-BCL9 融合遺伝子に対する治療法の開発も進めています。これらの取り組みが、目の前の小児 ALL 患者の予後を改善し、将来の小児 ALL 患者の治療法を開発していくことにつながるものと期待されます。

<論文発表>

1. Kyogo Suzuki, Yusuke Okuno, Nozomu Kawashima, Hideki Muramatsu, Tatsuya Okuno, Xinan Wang, Shinsuke Kataoka, Yuko Sekiya, Motoharu Hamada, Norihiro Murakami, Daiei Kojima, Kotaro Narita, Atsushi Narita, Hirotohi Sakaguchi, Kimiyoshi Sakaguchi, Nao Yoshida, Nobuhiro Nishio, Asahito Hama, Yoshiyuki Takahashi, Kazuko Kudo, Koji Kato, and Seiji Kojima.

MEF2D-BCL9 fusion gene is associated with high-risk acute B-cell precursor lymphoblastic leukemia in adolescents.

Journal of Clinical Oncology

(米国東部標準時間 2016 年 8 月 8 日付の電子版に掲載)

2. 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 日付の電子版に掲載)

