

主論文の要旨

**Clinical utility of next-generation  
sequencing-based minimal residual disease in  
paediatric B-cell acute lymphoblastic leukaemia**

〔 小児急性リンパ性白血病における次世代シーケンスを用いた  
微小残存病変の臨床的意義 〕

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻  
発育・加齢医学講座 小児科学分野

(指導：高橋 義行 教授)

関屋 由子

## 【緒言】

小児 B 細胞性急性リンパ性白血病 (B-cell acute lymphoblastic leukemia; B-ALL) の治療成績はこの 30 年間で目覚ましい発展を遂げ、全生存率は欧米では 90% に達した。この治療成績の向上に大きく貢献した要因の一つとして、治療中の微小残存病変 (minimal residual disease; MRD) に基づいたリスク層別化治療を導入し、治療強化を図ったことがあげられている。

現在、MRD の測定にはフローサイトメトリー (flow cytometry; FCM) や、リアルタイム定量 PCR (real-time quantitative polymerase chain reaction; RQ-PCR) が広く用いられている。これらの方法は正常細胞 10 万個あたりに 1 個の白血病細胞が存在する検体で MRD を測定することが可能 (感度  $10^{-5}$ ) である。しかし、FCM の実施には熟練した技術が必要となり、RQ-PCR は個々の患者によって測定条件を整えるため測定には 3-4 週間の時間を必要とするなど、改善が求められている。

近年、次世代シーケンス (next-generation sequencing; NGS) を用いてより簡便に、超高感度 ( $10^{-6}$ ) で MRD を測定する方法が報告された。しかしながら、この方法によって測定された MRD 結果の臨床的な有用性についての論文報告は少ない。我々は、同一プロトコールで治療された小児 B-ALL 患者において治療過程の複数の時点で NGS を用いて MRD を測定し、臨床的な有用性を検討した。

## 【方法】

2002 年 4 月から 2014 年 11 月までに日本小児白血病研究会 (JACLS) ALL-02 プロトコールで治療を受けた B-ALL 患者 79 名について検討を行った。治療開始後 33 日、80 日、4-5 か月後、並びに治療終了時点での患者の骨髄液検体を用いて MRD の測定を実施した。

初診時の検体を用いて *IgH*、および TCR $\gamma$  鎖の腫瘍細胞に特異的な相補鎖決定領域 3 (complementarity-determining region 3; CDR3) 配列を決定し、治療中の検体のゲノム DNA にこの配列が存在するかを NGS を用いて解析した。患者の骨髄液よりゲノム DNA を抽出し、免疫グロブリン重鎖遺伝子 (*IgH*) および T 細胞受容体遺伝子  $\gamma$  鎖 (TCR) を普遍的に増幅可能な複数のプライマーセットを使用し、PCR を用いて増幅した。この PCR 産物の 5' 末端に NGS でシーケンスするためのアダプターを付与する 2 回目の PCR 反応を実施した。最終産物を NGS でシーケンスし、腫瘍特異的な CDR3 配列の有無を解析した。

MRD の定量には腫瘍特異的 CDR3 配列が決定している患者以外の白血病細胞から抽出した DNA を比較対照として用いた。この比較対照 DNA を一定量各患者検体の PCR 反応に加え、各検体の NGS で得られた総リード数に含まれる対照 DNA の CDR3 配列リード数の比を基準として、患者 CDR3 配列リード数から患者の検体中の白血病細胞の頻度を計算した。

無再発生存率は Kaplan-Meier 曲線で推定し Logrank 検定で比較した。単変量解析および多変量解析は Cox 比例ハザード回帰で行った。

## 【結果】

0歳から15歳までの小児B-ALL患者79名について検討を行った。観察期間の中央値は6.4年(範囲0.1~12.4年)であり、19名が再発した。5年無再発生存率は72.9%、5年全生存率は96.2%であった。

正常細胞100万個に一定の割合で白血病細胞を加えたテストサンプルを用いて次世代シーケンサーでMRDを測定したところ、正常細胞100万個に白血病細胞を1個加えたサンプル(感度 $10^{-6}$ )でMRD陽性であることを確認した。また、15検体についてRQ-PCRとNGSの両方法を用いてMRDを測定したところ両者のMRD結果は相関性を示した。3検体でRQ-PCRではMRDが検出されず、NGSでMRD陽性( $10^{-5}$ 未満)であった。

79名の診断時検体を用い、IgH、TCR $\gamma$ 鎖のCDR3配列を解析したところ、72名(91%)で腫瘍特異的CDR3配列を決定できた。この72名について、治療中骨髄232検体のMRDを解析した。治療開始後33日で51%(28/55)、80日で25%(16/65)、4-5か月で19%(11/58)、並びに治療終了時で7.4%(4/54)がMRD陽性であった。この59例のMRD陽性例のうち32例が低陽性( $10^{-4}$ 未満)、27例が高陽性( $10^{-4}$ 以上)であった。

まず、治療開始後33日と80日とでMRD結果が得られた50例について解析を行った。両方の時点でMRDが陰性であった群をMRD標準リスク群(MRD Standard Risk; MRD-SR)、80日の時点でMRDが $10^{-3}$ 以上確認された群を高リスク群(MRD High Risk; MRD-HR)、それ以外を中間リスク群(MRD Intermediate Risk; MRD-IR)に分類した。高リスク群は今回の対象群では1例のみであり、解析から除外した。MRD陽性の閾値を検出感度 $10^{-4}$ 以上に限定して解析した場合、MRD-SR群は38例、MRD-IR群は11例であった(図1A)。5年無再発生存率はそれぞれ82.4%対68.6%で両者に統計学的な有意差は認められなかった。しかし、MRD陽性の閾値を検出感度 $10^{-4}$ 未満も含めて解析したところ、MRD-SR群は23例に減少し、MRD-IR群は26例と増加した(図1B)。5年無再発生存率はそれぞれ100%対61.7%で統計学的有意差を認めた( $p < 0.01$ )。

今回の対象患者について無再発生存率に関わる因子を統計学的に解析したところ、単変量解析、多変量解析ともに治療開始後80日、4-5か月、治療終了時のMRD陽性が再発の危険因子であることが示された。(表I, II, 図2)

## 【考察】

我々は正常細胞100万個に白血病細胞を一定の割合で加えたテストサンプルを用いてNGSによるMRD測定を行い、感度 $10^{-6}$ での検出が可能であることを示した。FCMやRQ-PCRの感度が好条件で $10^{-5}$ であることから、従来の方法より10倍以上高い感度での測定が可能となった。

治療開始後33日と80日のNGS-MRDの結果を解析し、両時点でのMRDがともに陰性である標準リスク群では5年無再発生存率が100%であるのに対し、中間リスク群では62%と有意に低く、治療開始後33日と80日のNGS-MRD陽性が再発のリス

ク因子であることを示した。

これまでの報告では B-ALL 治療後期での MRD 測定は、陽性例が少なく測定する意義に乏しいとされてきた。しかし、我々の研究において治療開始後 4-5 か月後と治療終了時点では、それぞれ 19% (11/58)、7.4%(3/54)で MRD が陽性であり、単変量解析、多変量解析ともに再発の予後予測因子であることを示した。これらの結果より、治療後期に NGS による高感度での MRD 測定には意義があると考えられた。

### 【結論】

小児 B-ALL の治療中に、高感度の NGS を用いて MRD を測定することで従来の方法より精度の高い予後予測が可能であることを示した。NGS-MRD によるリスク層別化により高リスクと判断された場合には、治療強度を増強する、造血幹細胞移植を実施する、あるいはキメラ抗原受容体導入 T 細胞 (CAR-T 細胞) 療法など新規治療法を導入することで ALL の治療成績が向上することが期待される。