

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 28 日現在

機関番号：14301  
 研究種目：挑戦的萌芽研究  
 研究期間：2011～2011  
 課題番号：23659296  
 研究課題名（和文）急性骨髄性白血病の微小残存病変検出システムの確立と白血病幹細胞の同定  
 研究課題名（英文）Establishment of detection system of MRD by FACS and analysis of leukemic stem cells in AML.  
 研究代表者 足立 壯一（ADACHI SOUICHI）  
 京都大学・医学研究科・教授  
 研究者番号：10273450

研究成果の概要（和文）：本研究では免疫学的手法（多次元フローサイトメトリー法）を用いて従来の顕微鏡による形態学的判定では同定できないレベルの急性骨髄性白血病（AML）の微小残存病変（MRD）を同定するという、臨床試験に直結する、新しい検査方法を開発することを旨とする。白血病細胞株の系で 16 種類の抗体を用いて、 $10^4$ 個に 1 個の MRD が検出可能な系を確立し、現在、小児 AML 臨床試験登録症例の細胞を用いて検討を開始した。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study is to establish new flowcytometric assay to detect minimal residual disease (MRD) of acute myeloid leukemia (AML) cells in children. We established this new assay system for sensitivity one cell in  $10^4$  cells by using 16 different antibodies. We started this assay for AML samples in JPLSG clinical trials.

交付決定額

(金額単位：円)

|       | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|-------|-----------|---------|-----------|
| 交付決定額 | 3,100,000 | 930,000 | 4,030,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：臨床血液学、急性骨髄性白血病、微小残存病変、フローサイトメトリー

1. 研究開始当初の背景

日本の小児急性骨髄性白血病（AML）の治療成績は世界のトップである（JCO, 27;4007, 2009）が予後因子の解析は遅れているのが現状である。

先進諸外国の白血病研究グループでは既に、治療早期における治療効果判定として従来の顕微鏡による形態学的判定では同定できないレベルの AML の微小残存病変（MRD）を免疫学的手法（多次元フローサイトメトリー法）で経時的・定量的に検出することに成功している。しかし、本邦ではこの方法によ

る MRD 定量化ができていないのが現状である。

2. 研究の目的

本研究では多次元フローサイトメトリー法を用いて従来の顕微鏡による形態学的判定では同定できないレベルの AML の MRD を同定するという、臨床試験に直結する、新しい検査方法を開発することを旨とする。

同時にすでに我々が確立している、免疫不全マウスの系を用いて MRD 分画における白血病幹細胞を同定し、幹細胞の機能解析を合わせて行う。白血病幹細胞の異常が原因と考

えられてきている AML の病因の決め手となる世界に先駆けての研究であり、本研究の実現により、小児 AML の治療成績の向上や新薬開発にもつながる。

### 3. 研究の方法

健康人骨髄細胞及び小児再発 AML 細胞を用いて、FITC/PE/PE-Cy7/PerCP/APC/APC-H7 で標識された 16 種類の抗体を組み合わせ、正常骨髄細胞と白血病細胞を区別できる抗体の組み合わせを症例ごとに決定する。MRD として検出されなかった症例がキメラ遺伝子陽性 (AML- ETO, MLL-AF4 etc.) 例に見られないかどうか (false negative 例の検討) を再発あるいは初発 AML 5 例で行う。

MRD 検出システム確立後は、小児再発 AML 患者検体 (JPLSG AML 再発プロトコール登録症例を含む) を用いて、MRD 検出と予後の相関関係を前方視的に検討すると共に、MRD 分画中の細胞を CD34+CD38+, CD34+CD38-, CD34- CD38+, CD34-CD38- に分離し、NOG マウスに移植することにより、白血病幹細胞の機能解析を行う。

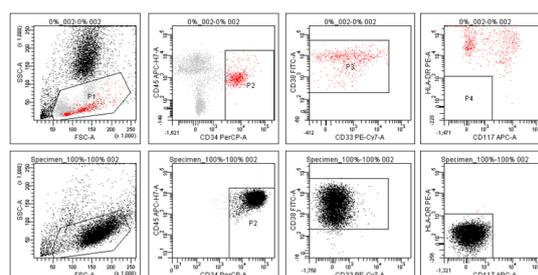
### 4. 研究成果

多次元 FACS 法を用い、FITC/PE/PE-Cy7/PerCP/APC/APC-H7 で標識された 16 種類の抗体

(CD4, 7, 11b, 13, 15, 19, 33, 34, 38, 41, 45, 56, 117, 133, HLD-DR, anti-NG2) を組み合わせ、正常骨髄細胞に混合した白血病細胞株を  $10^4$  個に 1 個の精度で同定可能であることを確認した (図 1)。 図 2 は小児再発 AML 細胞を用いて治療経過と MRD の推移を検討できた結果を示している。また、図 3 では AML-DS 症例の MRD 同定の実際を示している。すでに、再発及び de novo AML,

AML-DS 症例での MRD 検出システムの確立に成功したため、平成 24 年度中に開始される再発 AML に対する臨床試験 (AML-R11)、及び AML-DS に対する臨床試験 (AML-D11) において、三重大学と京都大学で中央診断施設として検査を施行する。また、次期 de novo AML に対する臨床試験 (AML-12) においても中央診断施設としてフローサイトメトリー法による MRD 測定を行うことが決定している。また白血病幹細胞の解析としては、今後、再発 AML, AML-DS 検体で検出した MRD 分画細胞を、免疫不全マウスで増殖し、抗癌剤感受性試験等、検討する。

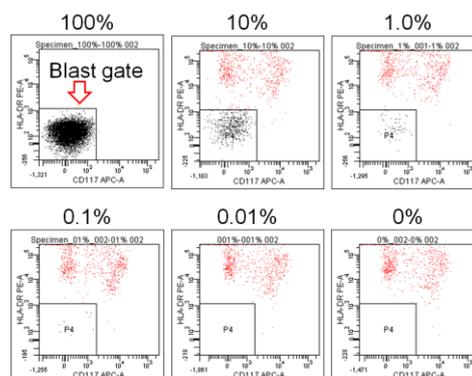
図 1 : 6 カラーフローサイトメトリー法による検出感度試験結果



検体; 健康人骨髄単核球  $10^6$  個に対して、白血病細胞株 (KG1a) が 0%, 0.01%, 0.1%, 1.0%, 10%, 100% の比率になるように混合した検体を用い、6 カラーフローサイトメトリー法で検出率を検討した。

<白血病細胞株 (KG1a) の免疫学的特徴>

CD38 (FITC) HLA-DR (PE) / CD34 (PerCP) / CD33 (C



y7)/CD117(APC)/CD45(APC-H7)にて染色

上図の上段は、健常人検体を、下段は本細胞株のみの表現型を示す。右下のゲート領域の設定で、本細胞株が健常人と区別できる。

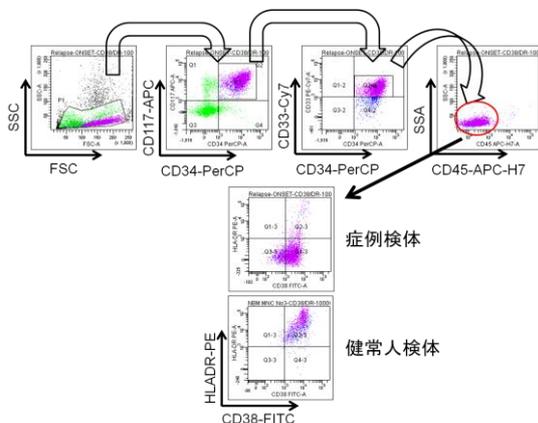
<検出感度>

混合検体を用い、実際の検出感度を検査したところ、0.1% (10<sup>4</sup>に1個) まで可能できた。

図2:6 カラーフローサイトメトリー法による再発 AML 症例の微小残存細胞 (MRD) 同定の実際

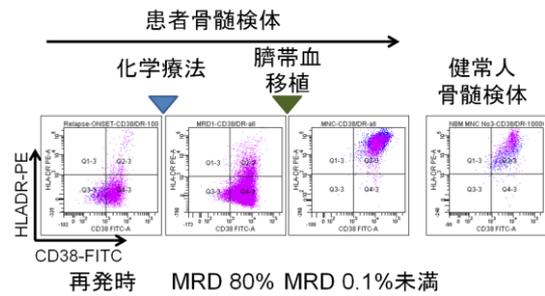
### 1) 症例毎の抗体セットの設定方法

フォローできた小児再発 AML の具体例を示す。まず、本例の免疫学的特徴は以下の様に検討する。すなわち、患者骨髄芽球細胞を CD38 (FITC) /HLA-DR (PE) /CD34 (PerCP) /CD33 (Cy7) /CD117 (APC) /CD45 (APC-H7) にて染色。芽球領域を gating (FSC/SSC) し、それを CD34/CD117 で展開→ダブルポジティブ細胞を gating し、CD34/CD33 で展開→さらにダブルポジティブ細胞を gating し、CD45 で展開



→最終、上記細胞群を CD38/HLA-DR で展開。これら 6 カラー解析から、本例の芽球の免疫学的特徴は、CD34, CD117, CD33, CD38 陽性、CD45, HLA-DR 陰性と判断され、図 2 下段の健常人検体では存在しえない領域にあることが分かる。この抗体セットを用いて、治療反応を評価していくことができる。

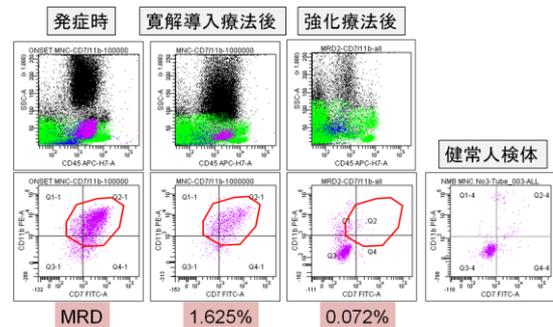
### 2) 治療経過と MRD の推移



1) での決定した抗体セットを用いて治療毎に MRD を追跡した。第一回目の化学療法に抵抗を示し、MRD 80%と残存。大量化学療法を用いた臍帯血移植後では、MRD は 0.1%未満と検出感度以下を示した。上図の右のドットは、健常人骨髄検体での発現型であり、臍帯血移植後の患者検体も同様の表現型を示しているのが分かる。

図3:6 カラーフローサイトメトリー法によるダウン症候群に合併した AML 症例の微小残存細胞 (MRD) 同定の実際

診断時検体を用い、健常人骨髄と区別可能な



抗体セットを決定した。本例では CD7 (FITC) /CD11b (PE) /CD34 (PerCP) /CD33 (Cy7) /CD117 (APC) /CD45 (APC-H7) が最適マーカーセットと判断した。

以下に、左から診断時、寛解導入療法後、強化療法後の MRD ドットと解析結果を示す。治療に順調に反応していることが分かる。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者に

は下線)

〔雑誌論文〕(計1件) Ohta H, Iwamoto S. et al.  
Flow cytometric analysis of de novo acute  
myeloid leukemia in childhood: report from the  
Japanese Pediatric Leukemia/ Lymphoma Study  
Group. Int J Haematol 査読有 93; 135-137,  
2011 DOI: 10.1007/s12185-010-0754-y

〔学会発表〕(計1件) 岩本彰太郎 FCM-MRD  
Study in Future AML Clinical Trials by JPL  
SG. Viva-Asia Working Group Meeting  
2012. 3. 1. Singapore

〔図書〕(計1件)  
足立 壯一 他 日本臨床社 造血器腫瘍  
学 基礎と臨床の最新研究動向 70 巻増刊  
号2 2012 665-668, 676-680

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://adachilab.web.fc2.com/index.html>

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者 足立 壯一

(ADACHI SOUICHI) 京都大学・医学研究科・  
教授

研究者番号：10273450

(2) 研究分担者 岩本 彰太郎

(IWAMOTO SHOUTAROU) 三重大学・医学部附  
属病院・助教

研究者番号：20456734

(3) 連携研究者 伊藤 洋志

(ITOU HIROSHI) 京都大学・医学研究科・助  
教

研究者番号：20362387