

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 18 日現在

機関番号：82612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791101

研究課題名(和文) 10カラーフローサイトメトリーを用いた造血細胞の分化抗原解析と白血病診断法確立

研究課題名(英文) 10 color flow cytometric analysis on normal and leukemic lymphoid cells

研究代表者

三春 晶嗣(Miharu, Masashi)

独立行政法人国立成育医療研究センター・その他部局等・研究員

研究者番号：60365319

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：10-カラーフローサイトメトリーを用いて、T細胞についてはCD45 / 7/ 5/ 2/ 1a/ 3/ 4/ 8/ 56/ 99、B細胞についてはCD45 / 19/ 10/ 34/ 20/ 38/ 58/ 44/ 45RA/ B-細胞以外の系統マーカーに対する抗体のカクテルの組み合わせによる、細胞系統特異的抗原と、分化段階に応じて発現が変化する抗原の同時検出により、非腫瘍性細胞と腫瘍性細胞を解析した結果、各分化段階の正常リンパ球の抗原発現の特徴と、リンパ系腫瘍の抗原発現様式との差が明らかになり、約9割の症例で微小残存白血病(MRD)検出が可能であった。

研究成果の概要(英文)：The clinical significance of minimal residual disease (MRD) in childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL) has been demonstrated. The most established method for MRD analysis is polymerase chain reaction assays based on the detection of clonal rearrangement of immunoglobulin and T-cell receptor genes. The flow cytometric detection of MRD, however, is also have several advantages, including simplicity of the method, low-cost, high-performance. The 3 or 4 color analysis employing multiple test tubes of the panel of antibodies is conventionally used for the detection of leukemia-associated immunophenotypes. Whereas we developed 10 color methods of MRD detection for both BCP-ALL and T-ALL. By using our methods, it will be able to take effect easily and exhibit high performance. Further investigations to put it to practical use is now underway.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：医療・福祉 医療・福祉 生体分子 免疫学 分類学

## 1. 研究開始当初の背景

(1)小児白血病の診断において、フローサイトメトリーによる細胞表面マーカー検査は、メイギムザ染色による細胞形態検査、細胞化学的検査、染色体検査あるいは PCR によるキメラ遺伝子検出等とともに、初期診断において非常に重要な役割を担う。特に急性リンパ性白血病 (ALL) の診断では、初期治療の層別化において、表面マーカーによるタイピングが必須であり、マーカーの発現パターンにより T-細胞性 ALL であることが明らかになった場合には、治療上のリスクファクターが高くなり、より強い治療が選択される。また、特定のマーカー抗原の発現はキメラ遺伝子の発現と関連し、bcr-abl と CD66c、MLL 関連キメラ遺伝子と 7.1 抗原等の関係が明らかにされており、いずれも治療予後が悪い亜群であることから、これらのマーカーが陽性となる症例では、染色体検査やキメラ遺伝子検出の結果により注意が必要である。さらに、近年ではマルチカラー染色によるフローサイトメトリー検査によって、治療開始後の MRD を検出して、治療予後を予測する試みがなされており、米国の St. Jude 小児病院では 4-カラー染色によって、抗原発現パターンや、特定の抗原の発現量の差から正常の B 前駆細胞と白血病細胞を区別して MRD を検出し、一定数以上の MRD が残存している場合は治療予後が悪くなるため、途中から治療法を強化する必要があることを示している。以上のように、フローサイトメトリーによる細胞表面マーカー検査は小児白血病の診療において欠くべからざるものと云える。

(2)一方、マーカー発現パターンと治療予後の関係についての報告も散見され、CD10、CD20 等の発現量や発現パターンが予後と関連することを示唆する報告等もあるものの、実際にこれらの所見が治療の層別化に用いられているケースはほとんどない。その理由としては、抗原の発現と予後との関係を考える場合に、単に陽性/陰性の判定のみではなく、発現量を定量的に捉える必要があるものの、表面マーカー発現の解析結果に定量性を持たせることは必ずしも容易ではないことが考えられる。定量的な解析を行うには、特定の限定された施設で、十分に精度管理された機器を用いて、一定の定められた測定方法によって評価するとともに、複数の抗原の発現の相互の関係に着目した詳細な解析が必要と考えられる。

(3)本邦におけるフローサイトメトリー検査の現状は、主要なリファレンスラボラトリーや、大規模病院の検査室では CD45-ゲーティングを含む 3-カラー (CD45 は共通であるため、実質は 2-カラー) 解析が主流であり、単に陽性/陰性を判定するタイピングに終止している場合がほとんどである。これに対して、申請者らは、東京小児がん研究グループの ALL 治療研究における細胞表面マーカー検査の中央診断施設として、同グループ

参加施設で治療を受ける年間 200 例程度の ALL 症例全例のフローサイトメトリー検査を担当しており、中央診断開始当初より 4-カラー (あるいは CD45-gating を加えた 5-カラー) 解析を導入して、より多角的なマーカー解析を実施してきた。4-カラー解析では、各抗原の発現状況の相互関係を把握しやすいため、白血病症例の芽球がマーカー発現の観点からみると実はヘテロな集団であるということが如実に捉えられ、また、同じ病型の症例でも、各抗原の発現パターンや発現量が多様であることが明らかになってきた。

(4)近年、フローサイトメトリーのマルチカラー解析が著しく進歩し、現行では 9-カラー～12-カラーの解析が実施可能になりつつある。マルチカラー解析を行う利点としては、単純に一症例に対して測定するチューブの本数を減らせて検体を節約できるということのみではなく、多数の抗原を同時に検出することによって、抗原間の発現の関係をより詳細に知ることが可能となる。このことによって、白血病細胞の細胞表面抗原の発現状況をより正確に把握することができ、より詳細な定量的解析が可能となるものと期待される。特に、同じ病型の症例間や、正常発生母体の細胞との各抗原の発現量の違いについて、より綿密な比較ができるものと推測される。この解析は、表面マーカーの発現状況の違いと治療予後との関連性について、従来とは異なる新たな局面が明らかになる可能性があり、また、MRD 検出においてもより有用な検査手段となることが期待される。逆に、マルチカラー解析の欠点としては、特殊な蛍光色素で標識された抗体の市販品がまだ少ないために利用可能な抗体が限定されてしまいやすいこと、同時に染色する抗体の数が増えるほど、相互の蛍光補正が複雑となり、また抗体同士の競合が起こりやすくなることから、実際の検査実施に当たって、フローサイトメトリー検査に対する高度な専門的知識が必要となること、などの点が挙げられる。

## 2. 研究の目的

本研究では、小児白血病のマーカー検査に 10-カラー解析を導入し、より多角的かつ定量的なマーカー解析法の実現を試みた。抗体同士の競合回避や、抗原発現の相互関係の把握の観点から、詳細な検討によって、最適な抗体の組み合わせを決定し、この解析系を用いて実際に小児白血病症例多数例のマーカー解析を実施し、各抗原の発現様式と治療反応性について、抗原の発現量や、複数の抗原の発現パターンに基づくサブポピュレーションの比率等の面から、詳細な解析を行い、マーカー検査結果による治療予後判定法について検討した。さらに、10-カラー解析による微小残存白血病 (MRD) 検出法の確立についても検討した。

当該研究期間における具体的な到達目標を、10-カラー解析系の確立と、100 例以上の小

児白血病症例の解析による 10-カラー解析の有用性の確立とした。正常骨髄検体の解析とその結果との比較、MRD 検出に対する有用性の評価も行った。

### 3. 研究の方法

市販されている fluorescein isothiocyanate (FITC)、phycoerythrin (PE)、phycoerythrin-Texas Red (ECD)、PE-cyanin 5.5 (PC5.5)、PE-Cy7 (PC7)、allophycocyanin (APC)、APC-AlexaFluor700 (AF700)、APC-AlexaFluor750 (AF750)、Pacific Blue (PB) あるいは Brilliant Violet 421、および Krome Orange (KO) 標識抗体を組み合わせ、10 カラー染色を行い、Gallios (3 レザー 405nm/488nm/638nm、Beckman Coulter) により解析した。全血法により、 $1 \times 10^6$  の有核細胞をリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で洗浄して濃度調整した血液あるいは骨髄液を各チューブに添加し、室温 20 分反応後、赤血球溶解液で 2 回洗浄して、シース液に再浮遊させて測定に用いた。各解析では、 $1 \times 10^5$  イベントの測定を目標に、可能な限り多くの細胞を測定した。

ALL 症例の、初発時、治療経過中 (day-8 末梢血、day-15, day-29, day-43 等の定期的な骨髄検査) の検体につき、経過を追って ALL 細胞の割合を測定した。また、T-ALL や AML、あるいは結果的に浸潤がなかったリンパ腫の骨髄検体等に含まれる正常の前駆 B 細胞を対照として、その解析結果を BCP-ALL の解析結果と比較して、MRD を検出することが可能か否か検討した。

本研究で解析を行なった小児 ALL の臨床検体は、東京小児がん治療研究グループの治療研究に登録された患児から採取され、本人あるいはその保護者から、成育医療センター研究所で白血病の検査をすることについてのインフォームドコンセントを得た上で、連結可能匿名化された状態で送付されるものであり、個人情報はいっさい付いてこない。また、成育医療センター研究所で検査を行うことについては、当該研究施設の倫理委員会の承認済みである。

### 4. 研究成果

入手可能な範囲で、種々の抗体の組み合わせについて検討し、解析用として蛍光補正が可能であること、測定上問題となる抗体相互の競合は生じないことを確認した。また、Pacific Blue と同等の蛍光特性を有する Brilliant Violet を比較し、後者の方がより強い蛍光強度を得ることができる点で優れていることを示した。B 前駆/B 細胞の分化過程を解析するためのパネルとして、種々の組み合わせについて検討した結果、細胞系統に対する抗体のカクテル CD45/CD19/CD10/CD34/CD20 の組み合わせが優れており、これらの抗体に関しては、最近開発された蛍光色素で、市販抗体のラインナップが少ないものを優先的に割

り当て、一般的な FITC、PE、APC 等の標識を腫瘍性細胞と正常細胞を区別するための抗原に割り当てた。腫瘍性細胞と正常細胞細胞との間で発現量に差が認められると報告されている抗原について検討した結果、CD44/CD45RA /CD38/CD58 の組み合わせが最も有用であることが明らかになった。正常の B 前駆/B 細胞は分化段階に応じて、常に一定の抗原発現量を示したが、腫瘍性の B 前駆細胞 (白血病、リンパ腫) の場合は、CD44/CD45RA/CD38/CD58 のうち、いずれかの発現量が正常と大きく異なる場合が多く、約 9 割の症例で正常の B 前駆細胞と区別可能であり、微少残存病変 (MRD) 検出に有用であることが明らかとなった。特に、CD58 と CD38 の組み合わせでのサイトグラム表示が、もっとも明確に正常細胞と腫瘍細胞を区別可能であった。上記で区別できない白血病症例についてさらに検討し、CD72/73/86/200、および CD123/133/27 の 2 つのパネルを併用する事で、その約半数は白血病細胞を正常細胞から区別可能である事が明らかになり、この 3 つのパネルによりほとんどの B 前駆細胞性白血病の症例に対して MRD 検出が可能と考えられた。

一方、腫瘍性の B 前駆細胞に CD13、CD33、CD65、CD15、CD66c 等の異所性の抗原 (骨髄系抗原等) の発現を認める場合があり、症例に応じて適宜異常発現している抗原を組み合わせることによって MRD の指標として有用と考えられるが、実際に多くの白血病症例で検討した結果、これらの抗原は必ずしもすべての芽球に均一に発現しているわけではないため、活用できる症例は限定されることが明らかとなった。

T 細胞についても、同様な検討を行った。正常および腫瘍性の種々の分化段階の抗体カクテル CD45 / 7 / 5 / 2 / 1a / 3 / 4 / 8 / 56 / 99 を用いて解析を行ない、分化の過程において、CD5 の発現が陰性～強陽性に、逆に CD99 の発現が強陽性～弱陽性に変化し、特に腫瘍細胞でその傾向が著しいことから、両者の組み合わせによって腫瘍細胞と正常細胞を区別できる可能性が示された。これに、CD4, 8, 1a, 3 の発現と、症例に応じて適宜異常発現している抗原を組み合わせることで、ほとんどの症例で微少残存病変 (MRD) の検出が可能と考えられた。正常検体に含まれる NK 細胞は CD7, 2 あるいは 5 陽性かつ CD3 陰性であり、未分化型の T 細胞性白血病との鑑別が必要となるため、そのマーカーであると CD56 をパネルに加えておく必要があることが明らかになった。

本研究の成果は、単に白血病診断法の改善にとどまらず、個々の症例の白血病芽球の多様性について 10-カラー解析を用いて明らかにすることにより、今後、白血病幹細胞研究への応用も期待される。また、治療開始後の MRD 検出は、従来の予後予測因子とは全く独立したもっとも信頼性の高い治療層別化

因子である可能性が示唆されているが、フローサイトメトリーによる MRD 検出は従来の PCR 法よりも簡便でコストパフォーマンスにも優れている点から、今後の MRD 検査の主流となる可能性がある。これに対して、10-カラー解析は、より正確かつ明瞭に MRD を検出できる検査方法としても期待が持てる。さらに、10-カラー解析による小児白血病マーカーの解析結果を、正常骨髄細胞のマーカー発現様式と比較していくことによって、造血細胞の分化過程における抗原発現変化をより詳細に明らかにできるものと期待され、その成果は造血細胞分化機構の研究にも有用である。

#### 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 4 件)

Kiyokawa N, Iijima K, Tomita O, Miharu M, Hasegawa D, Kobayashi K, Okita H, Kajiwara M, Shimada H, Inukai T, Makimoto A, Fukushima T, Nanmoku T, Koh K, Manabe A, Kikuchi A, Sugita K, Fujimoto J, Hayashi Y, Ohara A. Significance of CD66c expression in childhood acute lymphoblastic leukemia. . Leuk Res. 2014 Jan;38(1):42-8.

Osumi T, Miharu M, Saji H, Kusunoki Y, Kojima H, Nakamura J, Shimada H. Nonsense mutation in HLA-B\*40:02 in a case with acquired aplastic anaemia: a possible origin of clonal escape from autoimmune insult. Br J Haematol. 2013 Sep;162(5):706-7.

三春晶嗣, 清河信敬, 小林 健一郎, 大喜多肇, 飯島一智, 森鉄也, 齋藤正博, 福島敬, 康勝好, 真部淳, 菊地陽, 林泰秀, 小原明. 小児白血病 MRD 検出における 10 カラーフローサイトメトリーの有用性. Cytometry Research 2013 Sep;23(2):7-14.

Yamada H, Iijima K, Tomita O, Taguchi T, Miharu M, Kobayashi K, Okita H, Saito M, Shimizu T, Kiyokawa N. Effects of insulin-like growth factor-1 on B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. Int J Hematol. 2013 Jan;97(1):73-82.

[学会発表](計 13 件)

三春晶嗣, 富田理, 石橋武士, 清河信敬. 10 カラーフローサイトメトリーによる T-ALL の MRD 検出. 第 23 回日本サイトメトリー学会学術集会, 東京, 6 月 22 日-23 日, 2013.

富田理, 清河信敬, 三春晶嗣, 石橋武士, 大隅朋生, 嶋田博之, 福島敬, 森鉄也,

齋藤正博, 康勝好, 真部淳, 菊地陽, 林泰秀, 小原明. Cytometric Bead Array を用いた BCR-ABL1 蛋白検出の臨床的有用性. 第 23 回日本サイトメトリー学会学術集会, 東京, 6 月 22 日-23 日, 2013. 清河信敬, 飯島一智, 富田理, 吉原宏樹, 三春晶嗣, 大隅朋生, 嶋田博之, 福島敬, 森鉄也, 齋藤正博, 康勝好, 真部淳, 菊地陽, 林泰秀, 小原明. 小児 Ph-like ALL のマーカー所見の検討. 第 23 回日本サイトメトリー学会学術集会, 東京, 6 月 22 日-23 日, 2013.

大隅朋生, 三春晶嗣, 増澤亜紀, 山崎文登, 弦間友紀, 宇野光昭, 塩田曜子, 寺島慶太, 清谷知賀子, 木澤洋恵, 吉村稔, 中澤温子, 福島敬, 松本公一, 清河信敬, 森鉄也. 小児白血病に対するフローサイトメトリーを用いた MRD 検出の試み. 第 55 回日本小児血液・がん学会学術集会 福岡, 11 月 29 日~12 月 1 日, 2013. 嶋靖子, 清河信敬, 谷澤昭彦, 三春晶嗣, 黒澤秀光, 渡辺輝浩, 伊藤正樹, 遠野千佳子, 湯坐有希, 堀田紀子, 村松秀城, 岡田雅彦, 梶原良介, 後藤裕明, 齋藤明子, 足立壮一, 堀部敬三, 水谷修紀, 嶋田博之. 小児慢性期 CML におけるフローサイトメトリーを用いた細胞表面マーカー解析の意義. 第 55 回日本小児血液・がん学会学術集会, 福岡, 11 月 29 日~12 月 1 日, 2013.

三春晶嗣, 清河信敬, 小林健一郎, 大喜多肇, 飯島一智, 森鉄也, 齋藤正博, 福島敬, 康勝好, 真部淳, 菊地陽, 林泰秀, 小原明. 小児白血病 MRD 検出における 10 カラーフローサイトメトリーの有用性. 第 22 回日本サイトメトリー学会学術集会 大阪, 6 月 29 日-30 日, 2012. 富田理, 三春晶嗣, 飯島一智, 橋本互, 小林健一郎, 大喜多肇, 清河信敬. 白血病診断におけるフローサイトメトリーによるミエロペルオキシダーゼ測定条件の検討. 第 22 回日本サイトメトリー学会学術集会 大阪, 6 月 29 日-30 日, 2012.

富田理, 三春晶嗣, 飯島一智, 小林健一郎, 大喜多肇, 金子英雄, 清河信敬. Bloom 症候群簡易スクリーニング法としての末梢血白血球 Bloom 蛋白検出の試み. 第 22 回日本サイトメトリー学会学術集会 大阪, 6 月 29 日-30 日, 2012. 清河信敬, 福島敬, 小林健一郎, 三春晶嗣, 大喜多肇, 飯島一智, 森鉄也, 齋藤正博, 康勝好, 真部淳, 菊地陽, 林泰秀, 小原明. 小児リンパ芽球性白血病のキメラ遺伝子、細胞マーカーと遺伝子発現プロファイルの特徴. 第 22 回日本サイトメトリー学会学術集会, 大阪, 6 月 29 日-30 日, 2012.

Gene expression profile related to prognosis of childhood ALL without

fusion genes . 飯島一智, 長谷川大輔, 清河信敬, 小林健一郎, 大喜多肇, 三春晶嗣, 森鉄也, 福島敬, 齋藤正博, 康勝好, 花田良二, 土田昌宏, 真部淳, 菊地陽, 藤本純一郎, 林泰秀, 小原明 . 第 74 回日本血液学会学術集会, 京都, 10 月 19 日-21 日, 2012 .

山田浩之, 飯島一智, 小林健一郎, 田口智子, 三春晶嗣, 齋藤正博, 大喜多肇, 清水俊明, 清河信敬 . IGF-1 は B 前駆細胞性 ALL 細胞の Dexamethasone 誘導性アポトーシスを抑制する . 第 54 回日本小児血液・がん学会学術集会, 横浜, 11 月 30 日 ~ 12 月 2 日, 2012 .

富田理, 清河信敬, 三春晶嗣, 小林健一郎, 大喜多肇, 長谷川大輔, 嶋田博之, 森鉄也, 福島敬, 齋藤正博, 犬飼岳史, 康勝好, 杉田完爾, 花田良二, 土田昌宏, 真部淳, 菊地陽, 藤本純一郎, 林泰秀, 小原明 . CD66c 陽性小児急性リンパ芽球性白血病の特徴 . 第 54 回日本小児血液・がん学会学術集会, 横浜, 11 月 30 日 ~ 12 月 2 日, 2012 .

嶋晴子, 三春晶嗣, 清河信敬, 黒澤秀光, 渡辺輝浩, 伊藤正樹, 堀田紀子, 遠野千佳子, 村松秀城, 岡田雅彦, 鶴澤正仁, 堀部敬三, 谷澤昭彦, 嶋田博之 . 小児慢性期慢性骨髄性白血病(CML)におけるフローサイトメトリーを用いたマーカー解析の有用性の検討 . 第 54 回日本小児血液・がん学会学術集会, 横浜, 11 月 30 日 ~ 12 月 2 日, 2012 .

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

該当無し

取得状況 (計 0 件)

該当無し

〔その他〕

ホームページ等

該当無し

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

三春 晶嗣 (MIHARU, Masashi)

研究者番号 : 60365319