

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 11 日現在

機関番号：33920

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22591170

研究課題名（和文） 小児急性白血病における微小残存病変測定法の確立と臨床応用に関する研究

研究課題名（英文） STUDY OF MINIMAL RESIDUAL DISEASE MEASUREMENTS AND CLINICAL APPLICATION IN PEDIATRIC ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA

研究代表者

鶴澤 正仁 (TSURUSAWA MASAHIRO)

愛知医科大学・医学部・教授

研究者番号：90172064

研究成果の概要（和文）：われわれは、小児リンパ性白血病（ALL）をはじめとするリンパ系腫瘍における微小残存病変（MRD）定量技術の改善のため、年間 100～150 の症例について Ig/TCR 再構成検出方法の標準化と RQ-PCR の導入した新たな解析を行い、再構成検出率の向上と高感度な MRD 定量を達成した。また、全国規模の再発 ALL 臨床研究において、その臨床的意義を明らかにするため、これらの成果を用いて定量を続行している。

研究成果の概要（英文）：In order to improve PCR-based MRD diagnostics using IgG/TCR genes in childhood ALL, we have measured MRD levels of bone marrow samples obtained from 100-150 patients/year with ALL, and we achieved a high frequency and sensitivities of Ig and TCR gene rearrangements as MRD PCR targets in childhood ALL. Our next study is to clarify the clinical implication of MRD levels in patients with relapsed ALL.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-------------|-------------|-------------|
| 2010 年度 | 1,900,000 円 | 570,000 円 | 2,470,000 円 |
| 2011 年度 | 1,100,000 円 | 330,000 円 | 1,430,000 円 |
| 2012 年度 | 500,000 円 | 150,000 円 | 650,000 円 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,500,000 円 | 1,050,000 円 | 4,550,000 円 |

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：小児白血病、微小残存病変、免疫関連遺伝子再構成、再発白血病

1. 研究開始当初の背景

小児 ALL は治療開始前の臨床・生物学的予後因子に基づいた層別化治療の実施により治療成績が改善されたが依然として約 20% は再発している。1990 年代に開発された骨髄微小残存病変 (MRD) 量の測定は初期治療開始後に骨髄に残存する白血病細胞の免疫関連遺伝子 (Ig・TCR) 再構成パターンを分子マーカーとして患者毎の残存腫瘍量をモニタリングすることが可能である。近年の小児

ALL 臨床試験の結果から、この骨髄 MRD 量はこれまでの予後因子に比べてより重要な再発予測因子であり、今後の小児 ALL の治療戦略に必須な検査である。

2. 研究の目的

本研究の目的は以下の 3 つである。

- (1) MRD 検出率の向上
- (2) 定量的 MRD 測定法の確立

- (3) 再発 ALL の MRD 量測定 of 臨床的意義を明らかにする。

3. 研究の方法

- (1) Ig/TCR 再構成検出率の向上： 体系化されたリンパ系腫瘍のクロナリティ診断に基づいて、再構成スクリーニング方法を世界標準化することにより再構成検出率の向上を目指す。
- (2) 定量的 MRD 測定法の確立： EuroMRD のガイドラインに基づいて、MRD を RQ-PCR 法で定量的に解析するとともに、同研究会への参加資格を取得することにより、年 2 回の Quality Control Round に参加する。
- (3) 日本小児白血病・リンパ腫研究グループ (JPLSG) の「小児の再発 ALL 患者に対する治療研究」の MRD 中央診断施設として再発 ALL の MRD 測定を実施して MRD 量の臨床的意義を明らかにする。

4. 研究成果

平成 22~24 年度における当施設での RQ-PCR による MRD 解析の症例数は 411 例で、そのうち ALL は 360 例 (87.6%)、その他乳児白血病 47 例 (11.4%)、NHL3 例 (0.7%)、CML1 例 (0.2%) であった。ALL 症例の内訳は初発例 253 例、再発 106 例、不明 1 例、また表面形質別の内訳は、BCP269 例 (初発 173 例、再発 96 例)、T81 例 (初発 77 例、再発 4 例)、不明 2 例 (すべて初発) であった。症例の年齢は、1 才未満 46 例、1~9 才 254 例、10~15 才 88 例、16 才以上 21 例、不明が 2 例であった。Ig/TCR 遺伝子再構成スクリーニングの結果は、再構成検出例が 325 例、検出不能例が 36 例、スクリーニング未実施例 (検体不足など) 50 例で、再構成検出率は 90% であった。検出された再構成の総数は 971 で、そのうち IgH が最多で 315、TCR γ 243、TCR δ 163、TCR β 133、Ig κ 112、Sil-Tal5 という結果であった。また再構成検出例のうち、MRD 定量が完了した

症例は 242 例で MRD 定量率は 97.6% であった。定量完了例のターゲットに使用した再構成の内訳は IgH 125、TCR γ 30、TCR δ 36、TCR β 24、Ig κ 23、Sil-Tal4 で、定量感度は 10^{-5} が 173 例、 10^{-4} が 62 例、 $10^{-3.5}$ が 7 例で 10^{-4} 以下の症例は 97.1% であった。

以上のように目的 (1) に対しては、TCR β をはじめとする新規再構成ターゲットの追加や Heteroduplex analysis の徹底といった、再構成スクリーニング方法の世界標準化により、再構成検出率は 90% と本研究以前と比較して約 10% の向上が認められ、ヨーロッパの研究グループの報告と同等の水準まで引き上げることができた。また目的 (2) についても RQ-PCR の導入によって 97.1% が 10^{-4} 以下という高感度の定量を実現し、その過程において 2010 年には EuroMRD に正式参加を承認され、その Quality Control Round によって定期的な定量技術の精度管理を行っている。現在上記の成果をもって目的 (3) の再発 ALL における MRD 定量を施行しており、今後の治療成績との照合により、その臨床的意義を明らかにしていく方針である。

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 11 件)

1. 原著論文

- ① 鶴澤正仁、堀壽成、微小残存腫瘍量測定とその意義。日本臨床。2012;70 巻 別冊 2 号:731-736.
- ② 鶴澤正仁 思春期・小児 ALL の標準治療と最近の研究動向。臨床血液、査読有、2011、52 巻 1585-1593.
- ③ Iwamoto S, Deguchi T, Ohta H, Kiyokawa N, Tsurusawa M, Yamada T, Takase K, Fujimoto J, Hanada R, Hori H, Horibe K, Komada Y., Flow cytometric analysis of de novo acute lymphoblastic leukemia in childhood: report from the Japanese Pediatric Leukemia/Lymphoma Study Group. Int J

- Hematol、査読有、2011;94:185-192.
- ④ Shimomura Y, Baba R, Watanabe A, Horikoshi Y, Asami K, Hyakuna N, Iwai A, Matsushita T, Yamaji K, Hori T, Tsurusawa M; Japanese Childhood Cancer and Leukemia Study Group (JCCLSG). Assessment of late cardiotoxicity of pirarubicin (THP) in children with acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Blood Cancer*、査読有、2011 ;57:461-466.
- ⑤ Yamaji K, Okamoto T, Yokota S, Watanabe A, Horikoshi Y, Asami K, Kikuta A, Hyakuna N, Saikawa Y, Ueyama J, Watanabe T, Okada M, Taga T, Kanegane H, Kogawa K, Chin M, Iwai A, Matsushita T, Shimomura Y, Hori T, Tsurusawa M; Japanese Childhood Cancer Leukemia Study Group. Minimal residual disease-based augmented therapy in childhood acute lymphoblastic leukemia: a report from the Japanese Childhood Cancer and Leukemia Study Group. *Pediatr Blood Cancer*. 査読有、2010;55:1287-1295
- ⑥ Tsurusawa M, Shimomura Y, Asami K, Kikuta A, Watanabe A, Horikoshi Y, Matsushita T, Kanegane H, Ohta S, Iwai A, Mugishima H, Koizumi S; Japanese Childhood Cancer and Leukemia Study Group. Long-term results of the Japanese childhood cancer and leukemia study group studies 811, 841, 874, and 911 on childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemi*、査読有、2010;24:335-344

[学会発表] (計7件)

- ① 堀 壽成, 山田朋美, 山路和孝, 鶴澤正仁, 横田昇平, 渡辺 新, 菊田 敦, 浅見恵子. CCLAG ALL2004 登録症例のPCR-MRD 定量における nested PCR と RQ-PCR による定量値の比較. 第54回日本小児血液・がん学会学術集会. 2012. 11. 30. 横浜
- ② 堀 壽成, 山田朋美, 山路和孝, 横田昇平, 渡辺 新, 菊田 敦, 浅見恵子. 鶴澤正仁. CCLSGALL2004 研究における Ig/Tc 遺伝子再構成のパターンと RQPCR-MRD への適応性 第52回日本小児血液学会総会 2010年12月

[図書] (計5件)

- ① 堀 壽成. PCRによるMRD測定. 堀部敬三, 鶴澤正仁編. 小児造血器腫瘍の診断の手引き. 東京:日本医学館. 2012 47-51.
- ② 鶴澤正仁 小児ALL治療でのMRD測定の役割は何か 34-35頁「小児白血病リンパ腫の診療ガイドライン

2011年版」編集責任者・日本小児血液学会編 金原出版

[産業財産権]

○出願状況 (計0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況 (計0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]

ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鶴澤正仁 (TSURUSAWA MASAHIRO)
愛知医科大学・医学部・教授
研究者番号: 90172064

(2) 研究分担者

堀 壽成 (HORI TOSHINORI)
愛知医科大学・医学部・准教授
研究者番号: 20308943

(3) 研究分担者

堀部 敬三 (HORIBE KEIZOU)
独立行政法人国立病院機構名古屋医療センター・臨床研究センター・センター長
研究者番号: 30209308