

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23380182

研究課題名(和文) 犬のリンパ腫における微小残存病変モニタリングシステムの臨床的有用性

研究課題名(英文) Clinical application of the minimal residual disease monitoring in canine lymphoma

研究代表者

辻本 元 (Tsuji moto, Hajime)

東京大学・農学生命科学研究科・教授

研究者番号：60163804

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,000,000円、(間接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：犬のリンパ腫を標準的な化学療法で治療した場合、中央生存期間1年という治療成績の壁が存在する。本研究では、化学療法後の微小残存病変(Minimal residual disease, MRD)をリアルタイムPCRによって定量し、化学療法の有効性を評価した。その結果、各薬剤の投与後のMRDレベルによる用量変更、プロトコール実施中のMRDレベルによる地固め療法の実施、および完全寛解時のMRD測定による早期介入療法の必要性といった改良案を提示することができた。これら成果は、犬のリンパ腫治療の進歩につながるだけでなく、人の非ホジキンリンパ腫治療のモデル系としての有用性を示唆するものと考えている。

研究成果の概要(英文)：Overall survival durations after standard chemotherapies have been reported as long as 1 year. In the present study, we assessed the efficacy of the chemotherapeutic protocols objectively by quantification of the minimal residual disease, MRD, after chemotherapy with real-time PCR. Through the results of MRD monitoring, we could propose several strategies to improve the chemotherapeutic protocols such as dose change of the drugs, requirement of the consolidation chemotherapy, and the necessity of the early re-induction chemotherapy during complete remission. The present studies were conceivably very helpful to improve the chemotherapeutic modalities for canine lymphoma as well as indicative of the usefulness of canine lymphoma as an animal model for human non-Hodgkin lymphoma.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学 臨床獣医学

キーワード：動物 犬 リンパ腫 微小残存病変

1. 研究開始当初の背景

リンパ腫は犬において最も発生頻度の高い悪性腫瘍の一つであり、抗がん剤を用いた化学療法に対する感受性が高いことから、動物病院におけるリンパ腫化学療法の機会が増えている。

1993年にCHOP療法(シクロフォスファミド、ドキシソルビシン、ビンクリスチン、およびプレドニゾロンを組み合わせた多剤併用療法)が犬のリンパ腫に導入されたが、その後の研究にもかかわらず、長年の間、生存期間“約1年”という治療成績の壁を超えられないのが現状である。

抗腫瘍療法を行った後に、臨床的には検出は難しいが、体内に残存している腫瘍細胞を微小残存病変(minimal residual disease, MRD)と呼ぶ。人においては、MRDが化学療法終了時における効果判定に利用され始めている。しかし、MRD測定に基づいた治療(MRD-guided therapy)に関しては、人のリンパ造血系腫瘍においてもまだ一般化されておらず、さらなる研究が必要とされている。

リンパ系細胞のクローン性を検出するため、犬において抗原レセプター遺伝子再構成をPCRによって検出するシステム(PCR for antigen receptor rearrangements, PARR)が開発された。しかし、MRDを検出するためには、より高感度で特異性の高いプライマーを設計する必要がある。そこで、我々は犬のリンパ腫細胞のMRD定量システムを開発した(Yamazaki *et al.*, 2008)。本研究では我々が開発した犬リンパ腫MRDモニタリングシステムを用い、化学療法による腫瘍細胞減少効果を客観的に評価することにより、現行化学療法の改良および新規治療法の開発を目的として研究を進めることとした。

2. 研究の目的

本研究は、MRDモニタリングシステムによって化学療法による腫瘍細胞減少効果を評価することにより、現行化学療法の改良および

新規治療法の開発を行うことを目的とする。MRDモニタリングシステムは化学療法の有効性を客観的に評価する分子生物学的パラメータを提供するものであり、しかもその結果は再発/死亡までの期間を待つことなくリアルタイムに得られることから、リンパ腫治療のブレイクスルーにつながるものと考えている。

3. 研究の方法

(1) 定量的PCRを用いた各種抗癌剤のリンパ腫細胞減少効果の比較：犬のリンパ腫に対して広く用いられているウィスコンシン大学多剤併用化学療法(UW-25)プロトコールは、ビンクリスチン(VCR)、シクロフォスファミド(CPA)、およびドキシソルビシン(DXR)の3剤を1-2週おきに交互に使用するプロトコールである。しかし多くの症例では、治療開始後短期間のうちに完全寛解が得られるため、各抗癌剤の効果を確認できずに治療を継続しているのが現状である。すなわち、これら3剤がどの程度腫瘍細胞を減少させているかどうかは不明であった。そこで、本研究では、症例毎に設計したリアルタイムPCR系によって各抗癌剤の投与前後における腫瘍細胞数(治療後においてはMRDと呼ばれる)を定量することにより、それぞれの抗癌剤投与による腫瘍細胞減少効果を比較したいと考えた。ここでは、UW-25プロトコールによって治療を行ったリンパ腫の犬29症例を対象とし、その末梢血液サンプルを検査材料に用いて解析を行った。

(2) リンパ腫に対する多剤併用化学療法プロトコールの早期段階におけるMRDレベルの予後に与える影響：以前の私達の研究により、犬のリンパ腫における多剤併用化学療法終了時のMRDは、その後の再発までの期間と逆相関することが明らかとなっている。しかし、犬リンパ腫症例においては、化学療法プロトコールを予定通り最後まで終了で

きる症例は約半数に過ぎない。そこで本研究では、化学療法プロトコルの早期段階における MRD 測定の有用性について検討した。ここでは、犬リンパ腫治療に用いられている代表的なプロトコルである UW-25 で治療したリンパ腫 36 症例を対象とした。診断時の腫瘍細胞数および UW-25 第 6 週目、UW-25 第 11 週目の末梢血中 MRD を、各症例の腫瘍細胞に特異的なプライマーとプローブを設計し、リアルタイム PCR で定量した。これら MRD レベルがに与える影響を無進行生存期間を変数とした Kaplan-Meier 法によって解析した。

(3) MRD モニタリングによるリンパ腫の

早期再発予測：犬のリンパ腫においては、多剤併用化学療法プロトコルによって完全寛解して MRD が低レベルになっても、その後、ほとんどの症例では一定期間の後に再発が認められることにより、十分な寛解期間が得られない。そこで本研究では、MRD モニタリングの早期再発予測における有用性を検討した。犬リンパ腫症例で UW-25 プロトコルによる化学療法終了後に完全寛解に達している 20 症例を対象とし、その後の末梢血液中の MRD レベルを 4 週おきにモニタリングした。また、4 週おきにモニタリングにおいて MRD レベルの上昇が認められた場合には、その後のモニタリング間隔を 2 週おきに短縮して検討した。

4. 研究成果

(1) **定量的 PCR を用いた各種抗癌剤の腫瘍細胞減少効果の比較：**UW-25 プロトコルによって治療を行ったリンパ腫の犬 29 症例について解析したところ、UW-25 の第 1-4 週における各薬剤の腫瘍細胞を減少させる頻度は、VCR で 100% (29/29), CPA で 51.7% (15/29), DXR で 96.3% (26/2)であり、CPA は

他の 2 剤に比べて有意に腫瘍細胞を減少させる頻度が低かった($P < 0.0005$)。初回 CPA 投与後に腫瘍細胞が減少した群(CPA 奏効群)と減少しなかった群(CPA 無効群)との間には体重に関して有意な差が認められた(CPA 奏効群-23.5 kg, CPA 無効群-9.0 kg) ($P < 0.01$)。また、CPA 奏効群は無効群に比べて無進行生存期間が有意に長かった(CPA 奏効群の中央値-305 日, CPA 無効群の中央値-95 日) ($P < 0.01$)。一方、第 6-9 週における各薬剤の腫瘍細胞を減少させる頻度は、VCR で 19.2% (5/26), CPA で 25.0% (5/20), DXR で 73.7% (14/19)であった。VCR の腫瘍細胞を減少させる頻度は、第 1-4 週よりも第 6-9 週において有意に低かった($P < 0.0001$)。第 6-9 週において DXR の腫瘍細胞減少頻度は他の 2 剤に比べて有意に高かった ($P < 0.01$)。

本研究により、犬のリンパ腫治療として UW-25 で用いられている CPA 投与量 (250 mg/m²)は不十分である可能性が示され、それはとくに大型犬において問題となるものと考えられた。また、プロトコルが進むにつれて VCR の腫瘍細胞減少効果は低くなることから、本剤はおもに初期治療に使用すべきものと考えられた。一方、DXR は UW-25 プロトコルのいずれの時期においても一貫して優れた腫瘍細胞減少効果を示したことから、犬のリンパ腫に対する化学療法において中心的な薬剤として使用すべきと考えられた。本研究の成果は、MRD 測定を多剤併用化学療法の改良に利用できる実例として評価できるものと考えられた。

(2) **多剤併用化学療法プロトコルの早期段階における MRD レベルの予後に与える影響：**UW-25 プロトコルの第 11 週目に測定を行った 31 症例のうち、17 症例では MRD が検出限界レベル以上 (MRD⁺, 11 -

2555 コピー/ 10^5 末梢血単核球)であり、14 症例では MRD が検出限界レベル未満 (MRD⁻) であった。これら 31 症例のうち 29 症例は臨床的に完全寛解に達していた。MRD⁻症例の無進行生存期間は MRD⁺症例のものに比べて有意に長かった(無進行生存期間中央値:MRD⁻, 337 日;MRD⁺, 196 日)($P=0.0002$)。しかし、診断時における末梢血液中の腫瘍細胞数および第 6 週目の MRD レベルによって症例群を層別化した場合には、各群の間に無進行生存期間の差は認められなかった。これらの結果から、UW-25 第 11 週目の MRD レベルは予後予測因子となりうる事が明らかとなった。

(3) MRD モニタリングによるリンパ腫の

早期再発予測：完全寛解に達した犬のリンパ腫 20 症例において、末梢血液中の MRD レベルを定期的にモニタリングしたところ、再発が認められた 15 症例のうち、14 症例において臨床的な再発の前から MRD レベルの上昇が認められることが明らかとなった。これら再発が認められた症例において、MRD レベルの上昇から再発までの期間の中央値は 42 日(0-63 日)であった。一方、観察期間内において再発が認められなかった 5 症例においては MRD レベルの上昇は認められなかった。以上の結果から、治療終了後の MRD レベルのモニタリングにより、再発予測が可能であることが明らかとなった。

以上のような MRD の臨床的有用性を検討した一連の研究成果により、犬におけるリンパ腫治療成績向上のため、次のような新規化学療法指針を提示できるものと考えられた。第一に、多剤併用化学療法の早期段階における MRD レベル測定により、治療反応性を客観的に評価することが可能となり、それに基

づいた地固め療法の必要性を示唆することができる。次に、各抗癌剤の投与前後における MRD レベルを測定することにより、化学療法プロトコルを改良する方針が得られ、より効果的なプロトコルを開発することが可能となる。最後に、MRD 上昇による早期再発予測を可能とし、それに基づいて早期再寛解導入療法を開始することができる。

本研究の成果は、MRD レベルの測定結果を基にした治療、つまり MRD-guided therapy を可能とするものであり、これはテーラーメイド型治療の方法論につながるものである。これら一連の研究成果は、化学療法の発展のために客観的評価法を導入したものとして意義あるものと考えており、犬のリンパ腫における化学療法の進歩につながるだけでなく、犬のリンパ腫を人のリンパ腫治療の動物モデルとしても活用できる可能性を示唆するものと考えている。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 6 件)

- ① Fujiwara-Igarashi, A., Goto-Koshino, Y., Sato, M., Maeda, S., Igarashi, H., Takahashi, M., Fujino, Y., Ohno, K. and Tsujimoto, H. Prognostic significance of the expression levels of the *p16*, *p15*, and *p14* genes in dogs with high-grade lymphoma. *Vet. J.* 199:236-244 (2014). doi:10.1016/j.tvjl.2013.11.004
- ② Umeki, S., Ema, Y., Suzuki, R., Kubo, M., Hayashi, T., Okamura, Y., Yamazaki, J., Tsujimoto, H., Tani, K., Hiraoka, H., Okuda, M. and Mizuno, T. Establishment of five canine lymphoma cell lines and tumor formation in a xenotransplantation model. *J. Vet Med. Sci.* 75:467-474 (2013). doi:10.1292/jvms.12-0448
- ③ Sato, M., Yamazaki, J., Goto-Koshino, Y., Takahashi, M., Fujino, Y., Ohno, K. and Tsujimoto, H. The prognostic significance

of minimal residual disease in the early phases of chemotherapy in dogs with high-grade B-cell lymphoma. *Vet. J.* 195:319-324 (2013).

doi:10.1016/j.tvjl.2012.07.013

- ④ Sato, M., Goto-Koshino, Y., Kanemoto, H., Mochizuki, H., Takahashi, M., Fujino, Y., Ohno, K. and Tsujimoto, H. Evaluation of prognostic significance of *BCL6* gene expression in canine high-grade B-cell lymphoma. *Vet. J.* 191:108-114 (2012). doi: 10.1016/j.tvjl.2010.12.006
- ⑤ Sato, M., Yamazaki, J., Goto-Koshino, Y., Takahashi, M., Fujino, Y., Ohno, K. and Tsujimoto, H. Increase in minimal residual disease (MRD) in peripheral blood before clinical relapse in dogs with lymphoma that achieved complete remission after chemotherapy. *J. Vet. Intern. Med.* 25:292-296 (2011). doi: 10.1111/j.1939-1676.2010.0675.x
- ⑥ Sato, M., Yamazaki, J., Goto-Koshino, Y., Takahashi, M., Fujino, Y., Ohno, K. and Tsujimoto, H. Evaluation of cytoreductive efficacy of vincristine, cyclophosphamide, and doxorubicin in dogs with lymphoma by measuring the number of neoplastic lymphoid cells with real-time polymerase chain reaction. *J. Vet. Intern. Med.* 25:285-291 (2011). doi:10.1111/j.1939-1676.2011.0686.x

[学会発表] (計6件)

- ① 水田賢司、高橋雅、藤野泰人、日吉沙綾、福島建次郎、金本英之、大野耕一、坪井誠也、内田和幸、辻本元: 犬の辺縁帯リンパ腫(marginal zone lymphoma)9頭における臨床的・臨床病理学的特徴、第10回日本獣医がん学会、2014年1月25日、大阪
- ② Hiyoshi, S., Uchida, K., Nakashima, K., Fukushima, K., Kanemoto, H., Goto, Y.,

Fujino, Y., Ohno, K. and Tsujimoto, H.

GeneScanning analysis of antigen receptor gene rearrangement in the intestinal endoscopic biopsy specimens and its application to the diagnosis of small cell lymphoma in dogs. The Asian Meeting of

Animal Medicine Specialties (AMAMS) 2013, 2013年12月14日, ボゴール, インドネシア

- ③ 日吉沙綾、後藤裕子、佐藤雅彦、高橋雅、藤野泰人、大野耕一、辻本元: 犬のリンパ腫におけるGeneScanningを用いた微小残存病変検出に関する研究、第9回日本獣医内科学アカデミー学術大会、2013年2月23日、横浜
- ④ 水谷格之、後藤裕子、内田和幸、高橋雅、藤野泰人、大野耕一、辻本元: 犬のT-zoneリンパ腫16例における臨床的・臨床病理学的特徴、第9回日本獣医内科学アカデミー学術大会、2013年2月23日、横浜
- ⑤ 辻本元: 医学から学ぶイヌのリンパ腫治療、日本獣医内科学アカデミー／日本獣医臨床病理学会2011年大会(招待講演)、2012年2月18日、横浜
- ⑥ 辻本元: 特徴的な細胞形態を示す新しいタイプの犬のリンパ腫 -Mott cell リンパ腫-、第13回日本臨床獣医学フォーラム年次大会(招待講演)、2011年9月17日、東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

辻本元 (TSUJIMOTO, Hajime)
東京大学・大学院農学生命科学研究科・教授
研究者番号: 60163804

(2) 研究分担者

大野耕一 (OHNO, Koichi)
東京大学・大学院農学生命科学研究科・准教授
研究者番号: 90294660

藤野泰人 (FUJINO, Yasuhito)
東京大学・大学院農学生命科学研究科・助教
研究者番号: 70401180

(3) 連携研究者

西村 亮平 (NISHIMURA, Ryohei)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・教授

研究者番号：80172708

内田 和幸 (UCHIDA, Kazuyuki)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・准教授

研究者番号：10223554