

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26461594

研究課題名(和文) 臨床検査応用を目指した小児慢性期CML に対するフローサイトメトリー法の開発

研究課題名(英文) Flow cytometric analysis to predict prognosis in children with chronic-phase CML treated with imatinib

研究代表者

嶋 晴子 (Shima, Haruko)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教

研究者番号：80424167

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：18歳未満の新規慢性期CMLを対象に、初発時およびTKI治療中の骨髄検体を用いてフローサイトメトリーで細胞表面マーカーを解析した。

診断時およびTKI開始後3か月時の骨髄検体に加え、TKI開始後3か月および18か月時のBCR-ABL/ABL比が得られた27例について解析した。その結果、初発時骨髄前駆細胞分画におけるGMP優位、およびTKI開始3か月時のLin-CD34+分画中cMpl+分画高値が小児慢性期CMLの新たな予後因子となる可能性が示唆された。フローサイトメトリーは簡便な検査法であり、広く活用されることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Chronic myeloid leukemia (CML) is a clonal myeloproliferative disorder of hematopoietic stem cells (HSCs). This study aimed to investigate novel prognostic factor of CML using flow cytometry. Bone marrow samples of newly diagnosed children with chronic-phase CML were obtained at diagnosis and after imatinib initiation and stained with anti-human CD34, CD38, CD123, CD45RA, cMpl, and lineage antibodies. Flow cytometric analysis revealed that granulocyte macrophage progenitor predominance in CML progenitors at diagnosis and cMpl elevated expression in bone marrow progenitors at 3 months may predict poor outcome in children with chronic-phase CML treated with imatinib. We recommend flow cytometric analysis of bone marrow in the early phase of treatment, as it is a convenient tool that may predict treatment response and CML management.

研究分野：小児血液腫瘍

キーワード：小児慢性骨髄性白血病 フローサイトメトリー チロシンキナーゼ阻害剤

## 1. 研究開始当初の背景

慢性骨髄性白血病 (CML) は小児白血病の 2 - 3% を占める稀な疾患である。チロシンキナーゼ阻害剤 (TKI) の導入により、小児 CML の治療成績は成人同様、飛躍的に向上した。我が国のデータでは、18 歳未満の小児 CML 166 例を対象とした 2007 年の全国調査で、初期治療としてイマチニブを投与された慢性期 76 例の検討では、5 年生存率は 92%、5 年無増悪生存率は 90.7% (移植時打ち切り 30 例) と良好であった。しかし、イマチニブや第 2 世代 TKI は病期の進行をおさえることはできても、CML 幹細胞が残存していると考えられ、多くの患者では長期 TKI 内服を余儀なくされている。特に小児においては長期 TKI 内服による合併症のひとつとして成長障害が明らかとなり、治癒症例においては TKI の早期中止が望まれる。

近年、成人 CML ではイマチニブによる長期 CMR 維持例に対するイマチニブ中止試験から、約 40% が中止後も CMR を維持することが示された。しかし、これまでのデータからは厳密に中止後再発リスクが低い群を抽出することは困難である。さらに、小児 CML においてはこれまで TKI 中止後も長期 CMR を維持した論文報告はなく、TKI を中止できる可能性はいまだ不明である。CML の根治に同種移植やドナーリンパ球輸注が有用であることから、CML 幹細胞の根絶には免疫学的機構が重要と考えられる。CML 特異的な細胞障害性 T リンパ球が TKI 中止後に増加するとの報告もあり、CMR 維持には免疫機構が関与している可能性がある。TKI 中止後無再発例の免疫学的特徴を見出すことも中止後再発リスクが低い群を抽出するうえで有用である。

## 2. 研究の目的

CML の TKI にたいする治療反応性予測因子を見出すこと、TKI 中止可能例を抽出することは、CML の根治のみならず、長期 TKI 療法に伴う合併症を回避する点においても非常に重要である。一般診療において汎用される検査法で検出できる小児 CML の予後因子を明らかにすることを本研究の第一の目的とする。

また、TKI 中止後長期の CMR 維持と NK 細胞や制御性 T 細胞による免疫機構との関連性、および TKI 中止後再発にかかわるリスク因子を明らかにすることを第二の目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) CML の予後因子の解明

日本小児白血病リンパ腫研究グループ (JPLSG) CML 委員会による『小児慢性期慢性骨髄性白血病に対する多施設共同観察研究 (CML-08)』に登録された 18 歳未満の新

規慢性期 CML 49 例を対象に、初発時および TKI 開始後 29 日、3、6、12、18 か月の骨髓検体を用いてフローサイトメトリーによる細胞表面マーカー (CD34、CD38、CD123、CD45RA、cMpl、Lineage) をフローサイトメトリーで解析した。初発時検体では、骨髓幹前駆細胞分画 (Lin-CD34+) を CD123 および CD45RA で展開して得られた 3 分画 (CMP: 骨髓球系共通前駆細胞、GMP: 顆粒球単球系前駆細胞、MEP: 巨核球赤芽球系前駆細胞) の比率を検討した。また、Lin-CD34+CD38+ 分画における cMpl+ の比率にも着目した。近年、予後因子として注目されている TKI 開始 3 か月時の BCR-ABL/ABL 比 (BCR-ABL/ABL 比 10% で予後不良) を用いて治療反応性と細胞表面マーカーの関係を解析した。

### (2) CML 幹細胞制御機構と免疫機構との関連の解明

JPLSG による臨床試験の 1 つとして、TKI 投与により 2 年以上 CMR を維持している小児 CML 患者を対象に開始された『小児慢性骨髄性白血病に対するチロシンキナーゼ阻害薬中止試験 (STKIped-14)』を基盤とする。TKI 中止後 2 年間は定期的に末梢血 BCR-ABL/ABL 比または末梢血 Amp-CML 検査が行われ、CMR 維持率が判定される。この際、成人のイマチニブ中止試験から、小児においても TKI 中止後 CMR 維持群と再発群の 2 つに分かれることが予測される。CML 幹細胞の根絶には患者の免疫機構が重要とされる。TKI 中止後 CMR 維持群、つまり根治例においては、何らかの免疫機構が働くことで、CML 幹細胞が制御、根絶されている可能性が示唆される。そこで、STKIped-14 で定期的に採取される末梢血検体を用いて、免疫細胞のマーカー解析および NK 活性測定を行う。フローサイトメトリーでは、CD3、CD4、CD8、CD16、CD25、CD45、CD45RA、CD45RO、CD56、CD57、CD62L、FOXP3 抗体などをパネルとして利用し、TKI 中止後、CD4+ および CD8+ T 細胞、制御性 T 細胞、NK 細胞、NKT 細胞などの比率を定期的、継続的に解析し、CMR 維持群と再発群における違いを見出す。

## 4. 研究成果

### (1) CML の予後因子の解明

診断時および TKI 開始後 3 か月時の骨髓検体に加え、TKI 開始後 3 か月および 18 か月時の BCR-ABL/ABL 比が得られた 27 例について、解析した。

診断時 CMP/GMP/MEP の比率について MEP 優位 11 例、CMP 優位 11 例、GMP 優位 5 例であった。このうち、GMP 優位群は少数例ではあるが、他の 2 群に比し有意に 18 か月の BCR-ABL/ABL 比高値を示した。診断時 GMP 優位であることは治療反応性不良

を示唆する可能性が示された。(図 1a, b)

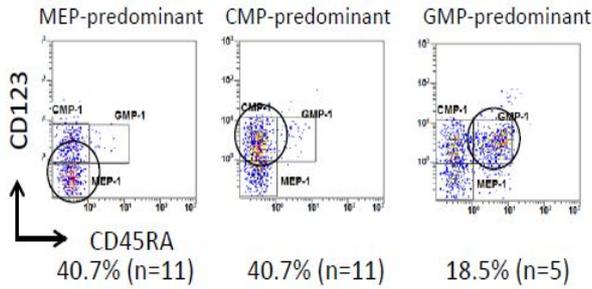


図 1a.

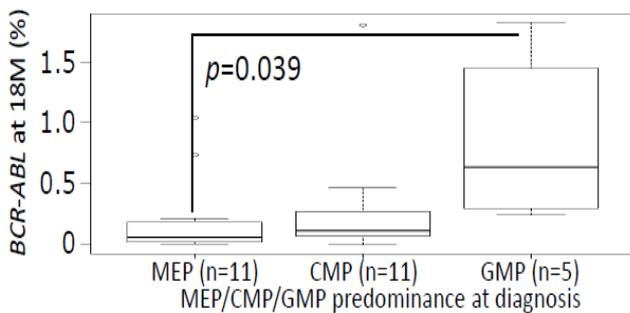


図 1b.

BCR-ABL/ABL 比 10% (n=11) と < 10% (n=16) の 2 群で細胞表面マーカーの違いを検討した。両群間で初発時および 3 か月時における Lin-CD34+ 分画、CMP/GMP/MEP の比率に差は見られなかったが、3 か月時の Lin-CD34+ 分画中 cMpl+ 分画の比率は BCR-ABL/ABL 比と高い相関を示した。(図 2)

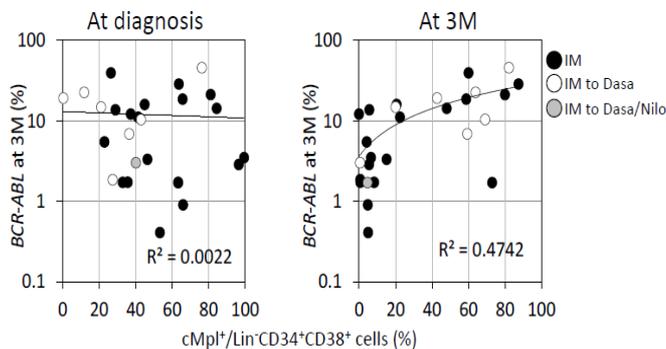
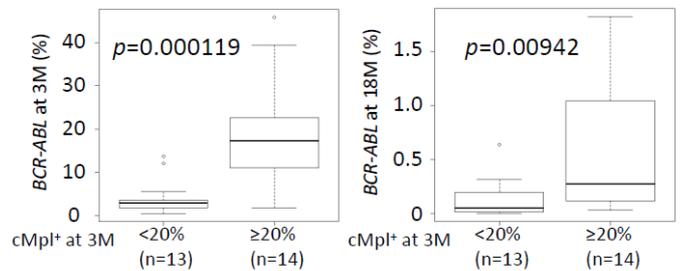


図 2.

黒丸：イマチニブ治療症例、白丸：イマチニブで治療開始されダサチニブに変更された症例、灰丸：イマチニブで治療開始され、ダサチニブ、その後ニロチニブに変更された症例

3 か月時 Lin-CD34+分画中 cMpl+分画の比率の中央値は 20%であったため、Lin-CD34+cMpl+分画の比率が 20% (n=14) と <20% (n=13) の 2 群に分け、3 か月時および 18 か月時の BCR-ABL/ABL 比を比較した。前群では 3 か月時および 18 か月時の BCR-ABL/ABL 比はそれぞれ 15.97%、0.298%、後群で 2.856%、0.048%であり、cMpl+ 分画の比率 20% 群で有意に BCR-ABL/ABL 比が高いことが示された ( $p < 0.01$ )。初発時 cMpl+分画の比率と 3 か月時および 18 か月時の BCR-ABL/ABL 比に相関はなかった。(図 3)

図 3.



以上より、初発時骨髓前駆細胞分画における GMP 優位、および TKI 開始 3 か月時の Lin-CD34+分画中 cMpl+分画高値が小児慢性期 CML の新たな予後因子となる可能性が示唆された。フローサイトメトリーは簡便な検査法であり、広く活用されることが期待される。

## (2) CML 幹細胞制御機構と免疫機構との関連の解明

長期 CMR 維持症例を対象に TKI 中止後の末梢血中の免疫細胞の推移をフローサイトメトリー解析する予定であったが、基盤となる小児 CML を対象とした TKI 中止試験である『小児慢性骨髄性白血病に対するチロシinkinase 阻害薬中止試験 (STKIped-14)』の開始が予定よりも遅延した。研究期間内に 22 症例が登録され、規定されたポイントでの末梢血は採取されフローサイトメトリー検査をおこなったが、研究期間中に新たな知見を見出すことは困難であった。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Shima H, Kiyokawa N, Miharuru M, Tanizawa A, Kurosawa H, Watanabe A, Ito M, Tono C, Yuza Y, Muramatsu H, Hotta N, Okada M, Hamamoto K, Kajiwararu R, Saito AM, Horibe K, Mizutani S, Adachi S, Ishii E, Shimada H.

Flow cytometric analysis as an additional predictive tool of treatment response in children with chronic-phase chronic myeloid leukemia treated with imatinib. *Pediatr Blood Cancer*. 2017 Sep;64(9). doi: 10.1002/pbc.26478.

〔学会発表〕(計 1 件)

嶋 晴子、清河信敬、谷澤昭彦、黒澤秀光、渡辺輝浩、伊藤正樹、遠野千佳子、湯坐有希、村松秀城、堀田紀子、岡田正樹、嶋田博之 .  
小児慢性期 CML における治療反応性予測因子としての細胞表面マーカー解析 .  
第 56 回日本小児血液・がん学会学術集会  
2014 年 .

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

嶋 晴子 ( SHIMA, Haruko )  
慶應義塾大学・医学部 ( 信濃町 )・助教  
研究者番号 : 80424167

### (2)研究分担者

嶋田 博之 ( SHIMADA, Hiroyuki )  
慶應義塾大学・医学部 ( 信濃町 )・講師  
研究者番号 : 80265868

### (3)連携研究者

清河 信敬 ( KIYOKAWA, Nobutaka )  
国立研究開発法人国立成育医療研究センター・小児血液・腫瘍研究部・部長  
研究者番号 : 60195401