

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：82612

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670492

研究課題名(和文) 深々度シーケンスによる極微小残存病変測定法の確立

研究課題名(英文) Assessment of micro residual disease with ultra deep sequencing

## 研究代表者

加藤 元博 (Kato, Motohiro)

国立研究開発法人国立成育医療研究センター・その他部局等・その他

研究者番号：40708690

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：“予後予測因子による層別化治療”の精度をより向上させるために、従来手法に比べさらに鋭敏な極微小微量残存病変(micro residual disease: miRD)の測定系の確立を目的として研究を行った。まず、仮想的な腫瘍細胞で希釈系列を作成し、次世代シーケンサーで検出感度の検証を行ったところ、 $10^{-3}$ ～ $10^{-4}$ の感度で検出できた。実際に急性リンパ性白血病の治療経過中にランゲルハンス組織球症を発症した症例について治療中のmiRDを測定し、病状の動的な推移を把握することが可能であった。さらに、droplet digital PCRを用いても同様の感度と定量性でmiRDの検出が可能であった。

研究成果の概要(英文): To improve “stratification strategy based on prognostic factors”, we planned to establish detection system of micro residual disease (miRD) with higher sensitivity compared to standard methods. First, we assessed sensitivity using virtual tumor specimen with serial dilution by next generation sequencer, and  $10^{-3}$  to  $10^{-4}$  of miRD could be detected. Using this method, by obtaining miRD status, we could illustrate dynamic evolutionary process of a case with unique coincidence of ALL and LCH. Furthermore, we performed miRD detection using droplet digital PCR technology, and its sensitivity and quantitativity.

研究分野：小児血液・腫瘍学

キーワード：白血病 バイオマーカー

### 1. 研究開始当初の背景

“ 予後予測因子による層別化治療 ” は小児急性白血病の治療骨格の根幹をなす要素のひとつである。再発リスクに応じた強度の治療を行うことで、治療成績の向上が得られてきた。

小児急性白血病における予後予測因子として現在最も注目を集めているのは、治療開始後の寛解期検体に残存するわずかな白血病細胞 (= 微小残存病変、Minimal Residual Disease: MRD) の測定である。MRD 測定はより詳細に治療反応性を評価しうる尺度であり、治療経過中の MRD の多寡が再発リスクと極めて強く相関することが報告され、現行の小児白血病を対象とした臨床試験では、MRD 測定の結果を層別化因子として用いている。

### 2. 研究の目的

MRD の測定には「高い検出力」と「正確な定量性」が必須であり、主に定量 PCR やフローサイトメトリーなどの技術を用いて検出が行われている。一方で、次世代シーケンサー (大量並列型シーケンサー) は投入された DNA 断片を数千万回にわたり配列決定を行うことができるゲノム解析機器である。この次世代シーケンサーなどの高深度なゲノム解析機器を用いることにより、さらに鋭敏な感度をもってごく微量な残存病変 (micro residual disease: miRD) 測定が可能と考えられる。

そこで本研究では、正確な定量性を保ったまま、より鋭敏な感度で白血病細胞の残存を測定する方法として、次世代シーケンサーなどの解析技術を応用し、極めて深い読み取り回数 (depth) で腫瘍細胞特異的な変異 (腫瘍細胞の指紋: finger print) を標的としてより微小な残存病変を検出する「深々度シーケンスによる miRD 検出技術」の確立を試みる。

### 3. 研究の方法

#### (1) 希釈系列による検出感度の評価

まず腫瘍細胞に特異的な変異を、全エクソン解析で検出し、腫瘍細胞に特異的な変異の組み合わせを「腫瘍細胞の指紋 (finger print)」として用いて、白血病細胞と正常細胞とを区別する。

検出感度の評価のために、異なる 2 種類の末梢血リンパ球由来の EBV 不死化細胞株の一塩基多型 (SNP) を全ゲノム領域にわたってタイピングし、互いに異なるホモ多型の SNP を仮想的な変異と想定する。2 種類の細胞由来の DNA を混合して希釈系列を作り、仮想変異を標的として MRD 測定を行う。

#### (2) 白血病患者の動的な病態評価

変異を標的として、白血病患者の治療中の時系列に従って採取された骨髓血を用いて miRD 測定を行い、腫瘍細胞の動的な変化を把

握する。

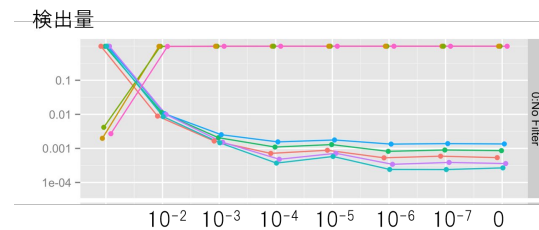
#### (3) ddPCR を用いた miRD 検出

より高いスループットの検出系とするために、droplet digital PCR を用い、同様に腫瘍細胞に特異的な変異を標的として検出を試みる。上記(1)の希釈系列を用いて感度の検証を行って定量性を確認したうえで、臨床検体の時系列の検体を用いて解析を行う。

### 4. 研究成果

#### (1) 希釈系列による検出感度の評価

匿名化した異なる 2 人の末梢血から樹立した EBV 不死化リンパ球から DNA を抽出し、Affymetrix GeneChip を用いて全ゲノム領域の SNP をタイピングし、その中からランダムに 8 か所の「互いに異なるホモ SNP」を抽出した。DNA を混合して希釈系列を  $10^{-7}$  まで作成し、次世代シーケンサーを用いて、高深度で読み取りを行った。結果、平均 Depth 50 万と極めて深い深度での読み取りが行われ、ホモ SNP 個所を標的として希釈系列のサンプルで腫瘍細胞の定量を行ったところ、図 1 に示すように、 $10^{-3} \sim 10^{-4}$  までは精度高く検出が可能であった。



(図 1 希釈系列での検出感度確認)

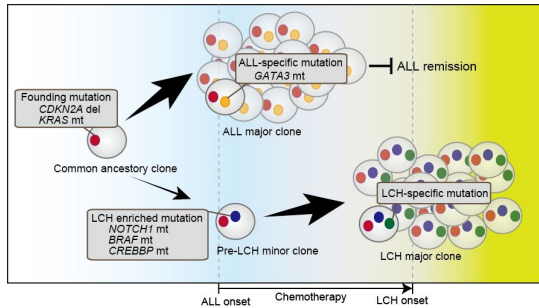
しかし、 $10^{-5}$  を超えると検出が困難となることが示された。次世代シーケンサーの読み取り過程でのエラーが原因と考えられ、duplicate read のみを対象とする、投入前の増幅回数を減らす、などの修正でより高解像度に腫瘍細胞が検出可能であることが推測された。

#### (2) 白血病患者の動的な病態評価

$10^{-3} \sim 10^{-4}$  の精度で腫瘍細胞が検出可能であることが確認されたため、実際の臨床検体を用いて解析を行った。従来用いられている Ig/TCR などを標的とした MRD 測定と異なり、腫瘍細胞のクローン構造を区別しつつ残存病変を検出することができるため、その点にを応用するため、急性リンパ性白血病 (ALL) 患者で、治療中にランゲルハンス組織球症 (LCH) を発症した患者を対象として解析を行った。

この検討で確認された ALL と LCH の動的な病態の経過を図 2 に示す。miRD を用い、ALL 細胞と LCH 細胞を区別して検出することで、LCH 発症時にみられる細胞が、治療による二次的な発症したのではなく、ALL 診断時からすでにごくわずかに存在することが分かった

(Kato M et al. Br J Haematol 2015)

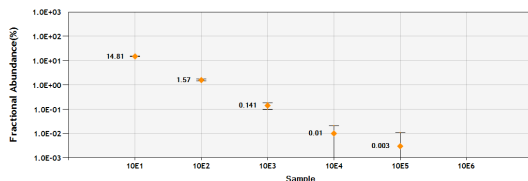


(図2 ALLとLCHの動的変化)

### (3) ddPCRを用いたmiRD検出

次世代シーケンサーによるmiRD検出が可能であり、病態の把握にも有用であることが示されたが、時間や費用の点でより高い効率での解析系を確立することを目指し、droplet digital PCR (ddPCR)を用いてmiRD検出系を評価した。

同様に、希釈系列を用いた検出結果を図3に示す。変異の検出にはTaqMan probeを用い、仮想腫瘍細胞と仮想正常細胞を区別して検出をし、腫瘍細胞割合を算出した。

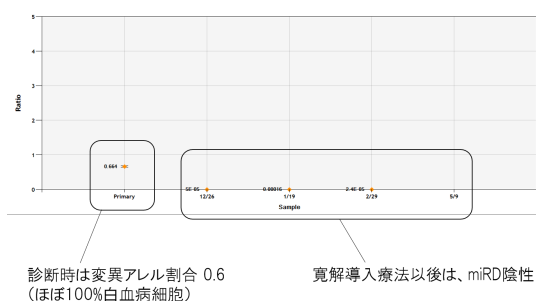


(図3 ddPCRによるmiRD検出)

ddPCRでは、~2万個のdropletから変異を抽出するために、理論的な最高感度は $5 \times 10^{-5}$ であるが、ほぼそれと等しい $10^{-4}$ の割合は正確に検出可能であった。

ddPCRは測定開始から1日で結果が得られ、臨床に応用するにはより実行可能性が高いと考えられた。

ddPCRでの検出が可能であることを踏まえ、急性骨髄性白血病の症例の治療の経過におけるmiRDの検出を行った結果を図4に示す。



(図4 急性骨髄性白血病患者のmiRD)

診断時は腫瘍細胞をほぼ100%として検出している一方で、寛解導入終了後はmiRD検出でも陰性化していることを確認できた。急性骨髄性白血病では、従来のIg/TCRを標

的としたPCR-MRDでは検出が困難であるため、ddPCRを用いたmiRD測定は層別化に有用である可能性が想定される。急性骨髄性白血病の症例でmiRDを測定し、陽性群の予後が不良であるかどうかについて、さらに多数の症例で検討を進めていくことが必要である。

### 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5件)

1. Kato M, Seki M, Yoshida K, Sato Y, Oyama R, Arakawa Y, Kishimoto H, Taki T, Akiyama M, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Mitsuiki N, Kajiwara M, Mizutani S, Sanada M, Miyano S, Ogawa S, Koh K, Takita J. Genomic analysis of clonal origin of Langerhans cell histiocytosis following acute lymphoblastic leukemia. Br J Haematol 2015 Nov 5 [Epub ahead of print]

2. Kato M, Ishida H, Koh K, Inagaki J, Kato K, Goto H, Kaneko T, Cho Y, Hashii Y, Kurosawa H, Takita J, Hamamoto K, Inoue M, Sawada A, Suzuki R, Kato K. Comparison of chemotherapeutic agents as a myeloablative conditioning with TBI for pediatric ALL: a study from the pediatric ALL working group of the JSHCT. Pediatr Blood Cancer 62:883-9, 2015

3. Kato M, Manabe A, Saito M Akiko, Koh K, Inukai T, Ogawa C, Goto H, Tsuchida M, Ohara A. Outcome of pediatric acute lymphoblastic leukemia with very late relapse: a retrospective analysis of the Tokyo Children's Cancer Study Group (TCCSG). Int J Hematol 101:52-7, 2015

4. Kato M, Hasegawa D, Koh K, Kato K, Takita J, Inagaki J, Yabe H, Goto H, Adachi S, Hayakawa A, Takeshita Y, Sawada A, Atsuta Y, Kato K. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for infants acute lymphoblastic leukemia with KMT2A (MLL) rearrangements: a retrospective study from the pediatric acute lymphoblastic leukemia working group of the Japan Society for Hematopoietic Cell Transplantation. Br J Haematol 168:564-70, 2015

5. Kato M, Imamura T, Manabe A, Hashii Y, Koh K, Sato A, Takahashi H, Hori H, Taki T, Inoue M, Hayashi Y, Horibe K, Tsuchida M, Kojima S, Oda M, Ohara A. Prognostic impact of gained chromosomes in high-hyperdiploid childhood acute lymphoblastic leukemia: a collaborative

retrospective study of the Tokyo Children's Cancer Study Group (TCCSG) and Japan Association of Childhood Leukemia Study (JACLS). Br J Haematol 166:295-298, 2014

〔学会発表〕(計 1 件)

1. Motohiro Kato, Atsushi Manabe, Sae Ishimaru, Masafumi Seki, Kenichi Yoshida, Yusuke Sato, Daisuke Tomizawa, Daisuke Hasegawa, Takeshi Inukai, Yuki Arakawa, Takahiro Aoki, Mayuko Okuya, Kioyohiko Kaizu, Keisuke Kato, Yuichi Taneyama, Seishi Ogawa, Katsuyoshi Koh, Masahiro Tsuchida and Akira Ohara. Optimal duration of maintenance therapy for pediatric leukemia. Annual Meeting of the American Society of Clinical Oncology 2016

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

加藤 元博 (Kato, Motohiro)

国立成育医療研究センター・小児血液・腫瘍研究部・医長

研究者番号：40708690

### (2)研究分担者

なし

### (3)連携研究者

滝田 順子 (Takita, Junko)

東京大学・小児科・准教授

研究者番号：00359621