

ラジオNIKKEI ■放送 毎週水曜日 21:00~21:15

小児科診療 UP-to-DATE

2016年3月16日放送

白血病における微小残存病変の臨床的意義

愛知医科大学 小児科
特任准教授 堀 壽成

悪性腫瘍の診療において、寛解に至った後もなお体内に残存する腫瘍細胞を、Minimal Residual Disease 以後 MRD と略しますが、日本語では微小残存病変と呼び、今日固形・血液腫瘍のいずれにおいても必要不可欠な概念として、臨床の現場で重要視されています。中でも白血病、特に急性リンパ性白血病（ALL）は予後評価の観点から、この MRD が最も体系的に活用されている分野と言われております。ALL における予後因子としましては、従来より診断時白血球数、年齢、あるいは免疫学的表現型などの芽球の生物学的特性が広く利用されてきましたが、近年新たな因子としてこの MRD が、治療反応性の指標として注目され、成人・小児を問わず多くの臨床研究によって、その独立した強力な予後予測におけるインパクトが証明されるに至りました。ALL の治療成績は近年めざましい向上を遂げ、小児においては長期無イベント生存率が約 80% にまで達していますが、その原動力のひとつに MRD による治療層別化が挙げられ、今日では世界各国の臨床試験における必須項目となっております。今回のお話の中では、免疫受容体遺伝子再構成を用いた MRD 測定を中心に、ALL における MRD 測定の臨床的意義について説明させて頂きたいと考えております。

通常 ALL の白血病細胞は、診断時、体内に約 10^{12} 乗個存在し、初期治療が奏功して顕微鏡的に骨髄から白血病細胞が一定量消失した、いわゆる寛解に入ってもなおその千分の一、すなわち約 10^9 乗のレベルで残存しているといわれております。つまりそれだけ多くの細胞が残っているにもかかわらず、従来の顕微鏡的なアプローチでは白血病細胞を確認できないわけであり

まして、当然その残存量の多寡によって再発のリスクが左右されることとなります。この肉眼的には検出不可能な白血病細胞が MRD にあたります。

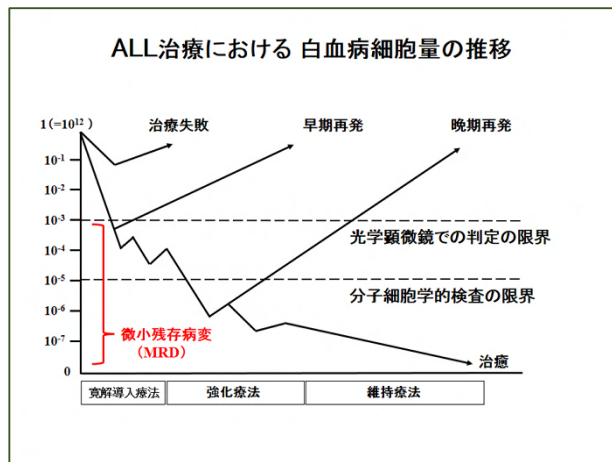
この MRD の測定には大きく分けて PCR と flow cytometry の 2 通りの方法があり、さらに PCR にはその標的が BCR-ABL を代表とするキメラ遺伝子か、あるいは免疫受容体遺伝子再構成かで、2 種類に分類されま

す。近年新たな技術も開発されつつありますが、現在広く用いられているこれら 3 つの測定方法には、それぞれ感度・利便性・経済性等の側面で長所・短所があり、なかでも汎用性の面から免疫受容体遺伝子再構成を用いた PCR、いわゆる PCR-MRD と、flow cytometry による

測定が世界的に普及しております。今回お話しいたします PCR-MRD は比較的高い感度を持ち、1990 年代よりヨーロッパを中心に研究・開発がすすめられてまいりました。現在ではより定量性に優れた real-time 定量的 PCR、いわゆる RQ-PCR が導入され、特異性と再現性が担保された解析方法を用いて、世界各国の研究施設で行われております。この方法に関しては、ヨーロッパ諸国を中心に、

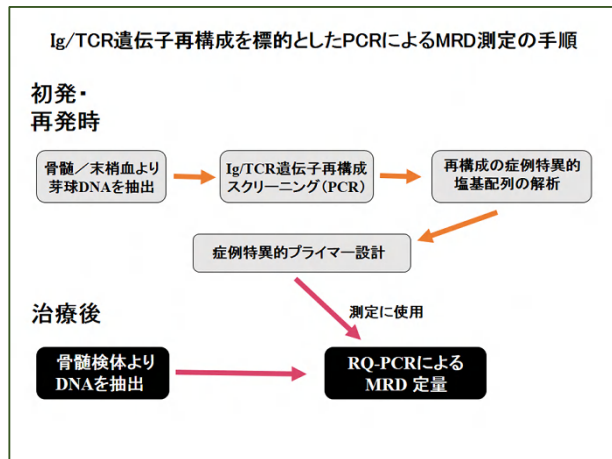
アジア、アメリカの研究施設も参加する MRD の専門研究機関、EuroMRD が、毎年精度管理ラウンドと呼ばれる研究会を開催し、同一検体の解析結果を一同に会して確認することで、測定技術の標準化を図るとい、他に類を見ない世界的な取り組みがなされており、日本からもわれわれを含む 2 施設が参加資格を取得しております。

さてこの PCR-MRD の具体的な測定方法ですが、まず最初に ALL 診断時の白血病細胞から抽出した DNA を用いて、その細胞特有の遺伝子再構成を検出します。この遺伝子が先ほどから申し上げております免疫受容体遺伝子、いわゆる immunoglobulin/T cell receptor 遺伝子です。この遺伝子は、生体内

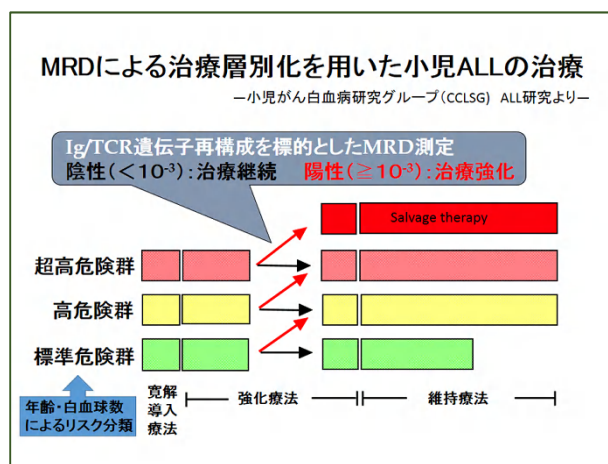


ALLにおけるMRD測定技術の比較

	Ig/TCR遺伝子再構成を標的としたPCR	キメラ遺伝子(BCR-ABL)を標的としたPCR	Flow cytometry (3-4カラー解析)
感度	10 ⁻⁴ - 10 ⁻⁵	10 ⁻⁴ - 10 ⁻⁶	10 ⁻³ - 10 ⁻⁴
適応	全症例の90-95%	Ph陽性ALLのみ (小児ALLの5-8%)	全症例の90-95%
長所	・高感度 ・世界的な標準化あり ・適応症例が多い ・検体(DNA)が安定	・高感度 ・迅速 ・安価	・迅速 ・機器の汎用性に富む ・付加的な細胞情報が得られる
短所	・時間・労力がかかる ・熟練した技術が必要 ・費用が高額 ・芽球クローンの変化による偽陰性の恐れあり	・適応症例に限られる ・検体(RNA)が不安定	・感度が比較的低い ・表面形質の変化による偽陰性の恐れあり



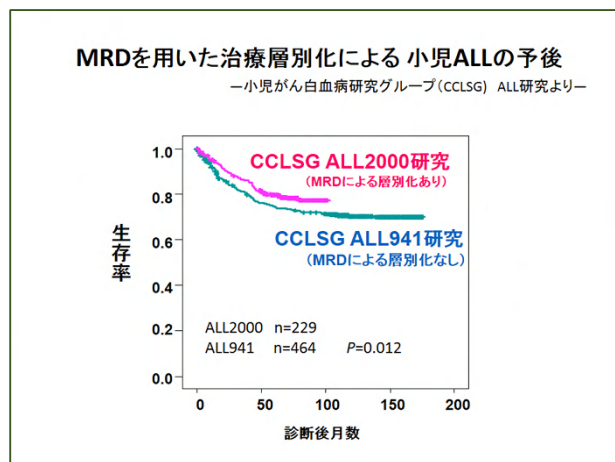
でのリンパ系組織の成熟に伴って、複雑に再構成を繰り返し、様々な外敵に対応できる多様性を獲得しますが、何らかのタイミングである細胞が腫瘍化し、その DNA が複製されて増殖することになります。したがって、その白血病細胞には、その細胞・その症例特異的な塩基配列が存在し、これを手掛かりに肉眼的には確認できない腫瘍細胞の残存を、PCR による増幅で検出していくのが、PCR-MRD の基本的な考え方です。再構成のパターンはすでに広く知られておりまして、IgH、IgK、TCR δ 、TCR γ 、TCR β 、TAL1 の遺伝子について、スクリーニングの PCR を行い、その塩基配列を同定して、症例特異的なプライマーを設計いたします。ここまでで、PCR-MRD の準備段階が終了いたします。次の段階は実際の化学療法が進んで、寛解の状態を達成してからになります。微小残存病変の言葉通り、分子レベルのわずかな白血病細胞が対象ですので、あくまでも寛解状態にあることが測定の大原則となります。この寛解期の骨髓検体中の白血病細胞の特異的な塩基配列を、さきほど設計しました症例特異的なプライマーを用いた RQ-PCR で、定量的に検出いたします。その測定は、絶対的な物差しにあたるものはありませんので、いわゆる相対定量にあたり、診断時の白血病細胞が何分の一に減少したかを表すこととなります。実際には千分の一を 10 のマイナス 3 乗、一万分の一をマイナス 4 乗といった形で表現します。



このように、診断時の白血病細胞が何分の一に減少したかを表すこととなります。実際には千分の一を 10 のマイナス 3 乗、一万分の一をマイナス 4 乗といった形で表現します。

こうして定量された MRD の値が ALL の予後にどのように関連しているか、そしてどのように臨床の場で応用されているかが、本日のお話の中心となる、MRD の臨床的意義であります。MRD は、簡単に申しますと、治療によってどれだけ白血病細胞を減らせたかを表す値ですから、冒頭で申しましたように、治療の反応性を反映しております。その治療早期の MRD レベルと予後との強い相関が 1998 年にオランダのグループによって報告され、これは現在でも、MRD における最も重要な研究のひとつとされております。その後、様々な側面から解析が進められました結果、MRD は ALL における予後予測因子のゴールドスタンダードとして、その重要性が認識されることとなりました。近年のヨーロッパにおける大規模な臨床研究でも、3,184 例の小児 ALL を対象に、治療開始後 33 日と 78 日の 2 つの Time Point における骨髓 MRD レベルを用いて症例を層別化したところ、両ポイントとも MRD 陽性のハイリスク群と両ポイントとも陰性のローリスク群では 5 年無イベント生存率がそれぞれ 92.3% と 50.1% とその予後に有意差を認め、重ねてその予後因子としての有用性が証明されております。また、わが国でもわれわれが所属する小児がん・白血病研究グループにおいて同様のエビデンスが示され、さらに ALL2000 研究においては、治療開始後 12 週の MRD レベル 10^{-3} をカットオフとして、MRD 陽性群に対する治療強化を主眼

とした試みを行った結果、治療成績の向上が示されました。またこれとは対照的に、イギリスのグループからは MRD 低リスク群の治療コースを減らす試みの報告がなされ、寛解導入後の MRD 低レベル症例に対する治療軽減の可能性を示しています。また、再発症例、造血幹細胞移植症例でもそれぞれ研究が進み、初発例とは異なるカットオフレベルによる、治療層別化の治療研究が行われています。



このように、ALL の治療において極めて重要な意味を持つ MRD ですが、いくつかの注意点・問題点がございます。まず第一に、最大の弱点ともいえるのが、免疫受容体遺伝子の再構成が検出できない症例が約 20%存在する点であります。全ての工程の基本ともいえる症例特異的プライマーが設計できないため、この症例については測定が不可能となってしまいます。現在では前に申しあげました flow cytometry による測定を組み合わせることで、測定不能症例をカバーする取り組みがなされています。次に挙げられますのは経済的な問題です。他の測定法に比べて高価であるにもかかわらず、残念ながら未だ保険適応外の検査のため、現在は先進医療の枠組みで各医療機関との契約のもとその経費を賄っております。今後症例数を積み重ねることで保険収載を達成したいと考えております。またその運用におきまして、MRD レベルを治療方針の決定に使用する場合は、対象とする病型、行っている治療プロトコール、測定方法、測定ポイントおよびカットオフレベルによって、エビデンスが異なるため、それぞれのファクターを十分に考慮する必要があります。

現在これらを踏まえて、PCR-MRD は日本小児がん研究グループにおける数々の ALL の治療研究の中央検査項目として組み込まれ、2 か所の研究室で全国の症例の解析を行っております。世界に発信できるエビデンスの創出を支えるとともに、次世代シーケンサー等による新たな MRD 測定法の研究開発も視野に入れて、さらなる ALL の治療成績向上に貢献できれば幸いです。

「小児科診療 UP-to-DATE」

<http://medical.radionikkei.jp/uptodate/>