

GIT 保存液からの RNA 抽出

1. 凍結 GIT 保存液を溶解し、1/10 容の 2M 酢酸ナトリウム(pH4.0)を加える。
2. 1 容のフェノールを加え混和し、1/10 容のクロロフォルム/イソアミルアルコール(49:1)を加え混和したのち、15 分間氷上におく。
3. 4°Cで 30 分間遠沈し、上澄みに 1/2 容のイソプロパノールを加え、-20°Cで 1 時間以上おく。
4. 4°Cで 20 分間遠沈し、ペレを再度 GIT 液に溶解する。
5. 1 容のイソプロパノールを加え、-20°Cで 1 時間以上おく。
6. 4°Cで 10 分間遠沈してえられた RNA のペレを DEPCwater に溶解する。

*Lysis Buffer の組成

155mM NH₄Cl
10mM NH₄HCO₃
0.1mM EDTA

**GIT 液の組成

4M グアニジンチオシアン酸
25mM クエン酸ナトリウム(pH7.0)
0.5%サルコシル(N-ラウロイルサルコシナトリウム)

Chomczynski et al, Anal.Biochem.162:156,1987 を一部改変

他の施設に送付する場合、採取後 24 時間以内に到着するように、4°Cで保管し、可能な限り 4°Cで送付することが望ましい。DNA のみを利用する場合、骨髓や全血を常温で輸送しても抽出は可能であるが、高温と時間経過による quality の低下は避けられない。

2. 1. 2 試料の調整方法

1) 核酸の抽出と保存

はじめに骨髓あるいは末梢血から単核球を分離する。単核球分離には Ficoll (Lymphoprep など)を用いた比重遠心法が一般的だが、簡単に分離できる専用チューブも各社から販売されている。単核球層を PBS で洗浄した後に核酸の抽出を行う。核酸の抽出にはさまざまな方法が考案されているが、試薬の調整などで手間がかかることもあって、最近の論文では市販されている核酸抽出キット(カラム法)を用いたものが多くみられる。われわれの施設では、DNA 抽出、RNA 抽出とも、Qiagen 社のキットを使用している。特に RNA 抽出キット(RNeasy kit)は、収量はやや少ないものの純度は高く、特に RT-PCR で問題となる DNA の混入がほとんどないことが利点といえる。最近では、血液から単核球分離することなく核酸を直接抽出できるキットも販売されている。カラム法では、通常 10⁷個の血液細胞から DNA は 50~100 μg, 総 RNA は 10~20 μg 程度が回収できる(一旦凍結した細胞では収量は減る)。

DNA は TE (Tris-EDTA) 溶液に溶解して冷所保存(4°C), RNA は精製水に溶解して凍結保存(-20°C)する。保存の際の濃度は、PCR での使用を考えると DNA, RNA とも 100~500ng/μl が適当と考える。

2) cDNA の合成

Europe Against Cancer (EAC) Program が 2003 年に発表した、cDNA 合成の標準的プロトコールを図に示す¹⁾。これは、1 μg の総 RNA から MMLV 逆転写酵素(Reverse transcriptase)とランダムヘキサマーを用いて、RT-PCR にして 10 反応分の cDNA (1 回に 100ng 相当の総 RNA を使用する)を合成するものである。逆転写酵素は MMLV 以外にも数種類が市販されているが、酵素によって反応温度が異なるので注意を要する。また、逆転写反応のプライマーには、上記のランダムヘキサマー以外に、オリゴdT プライマーや PCR 特異的プライマー(後で使用される PCR のプライマーを流用する)を用いる方法がある。それぞれに一長一短があるが、汎用性という点からはランダムヘキサマーが優れている。

3) コントロール遺伝子

MRD の定量的解析のためには、対象となる検体から純度の高い核酸が確実に抽出できているかどうか

肝要である。DNA は安定性の高い分子であるため問題になることは少ないが、RNA の場合は検体採取から抽出・保存にいたる各ステップでRNAの変性が起こる可能性があり、このためには常にコントロール遺伝子を同時に増幅して、RNA の“integrity”を確認しつつアッセイを行う必要がある。また、対象遺伝子の発現量をコントロール遺伝子の発現量との比率で表現する場合もあり、コントロール遺伝子の設定は重要である。

コントロール遺伝子としては、以前は β -actin が頻用されていたが、細胞によって発現量が異なっていることや偽遺伝子の存在が明らかとなったため使用されなくなり²⁾、最近では、GAPDH, ABL, β -glucuronidase (GUS)などが主に利用されている。前述の EAC では、ABL を第一選択、GUS および β 2-microglobulin (β 2MG)を第二選択としている³⁾。ただし、ABL は非造血器腫瘍には使用できず、また β 2MGはRNAが変性しやすいともされており⁴⁾、注意を要する。

```
1. RT reaction3)
  1  $\mu$ g of total RNA in 10  $\mu$ l of H2O
  Incubate at 70°C for 10 min
  Cool on ice and add other reagents to a final volume of 20  $\mu$ l
  Reverse transcriptase (either MMLV or Superscript I or II): 100 U
  RT buffer (according to the RTase used)
  dNTP: 1 mM
  DTT: 10 mM
  Random hexamers: 25  $\mu$ M
  RNase inhibitor: 20 U
  Incubate subsequently at:      room temperature for 10 min
  42°C for 45 min
  99°C for 3 min
  Place the sample at 4°C after the RT step
  Dilute the final cDNA with 30  $\mu$ l of H2O
```

図 cDNA 合成の標準的方法(文献 1 より)

【文 献】

- 1) Gabert J et al: Standardization and quality control studies of ‘real-time’ quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia – A Europe Against Cancer Program. *Leukemia* 17: 2318, 2003
- 2) Lion T: Current recommendations for positive controls in RT-PCR assays. *Leukemia* 15: 1033, 2001
- 3) Beillard E et al. Evaluation of candidate control genes for diagnosis and residual disease detection in leukemic patients using ‘real-time’ quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RQ-PCR) – A Europe Against Cancer Program. *Leukemia* 17: 2474, 2003
- 4) van der Velden VHJ et al: Differential stability of control gene and fusion gene transcripts over time may hamper accurate quantification of minimal residual disease – a study within the Europe Against Cancer Program. *Leukemia* 18: 884, 2004

2. 1. 3 増幅の対象となる遺伝子について

1) キメラ遺伝子

(1) 概要

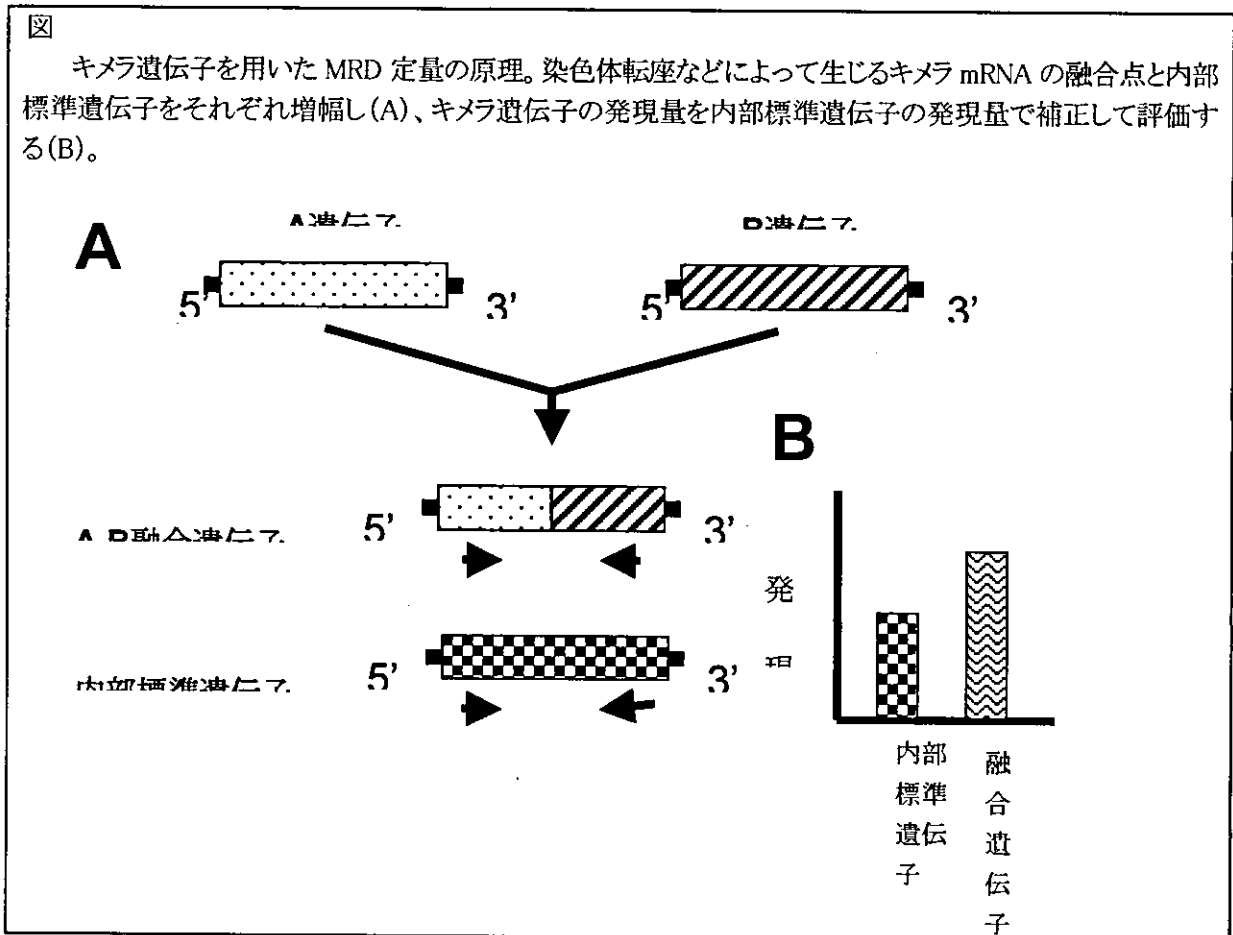
正常細胞中には存在せず白血病細胞中のみが存在するキメラ遺伝子は、以前からMRD解析の格好の対象として多くの研究者、臨床家によって解析が行われ、その結果が報告されてきた。しかし実際には後述するようないくつかの理由から、大規模な臨床研究の中ではキメラ遺伝子を用いたMRD解析はほとんど行われていない。

(2) 頻度

キメラ遺伝子を用いた MRD 解析の対象となるのは、当然のことながらキメラ遺伝子を形成するタイプに白血病に限られる。小児白血病の中でキメラ遺伝子を形成する割合は、B 前駆型 ALL の 40-50%、T-ALL の 10-25%、AML の 35-40% であり、これらが MRD 解析可能症例ということになる。

(3) 増幅部位と内部標準(図)

対象とするキメラ遺伝子により異なるが、それぞれのキメラ遺伝子の融合部位を増幅する。また、キメラ遺伝子を用いた MRD 解析では内部標準を置くことが必要で、しかもどの遺伝子を内部標準とするかが大きな問題である。



(4) 増幅方法

以前は限界希釈法による RT-PCR 法が用いられていたが、現在では RQ-RT-PCR 法がよく用いられており、キメラ遺伝子を用いた MRD 解析では特にこちらが推奨される。

キメラ遺伝子では RNA を用いて解析を行うことになるが、RNA は検体の採取方法、保存状態の影響を受けやすく、同量の RNA を用いたとしても RNA の質により同じ遺伝子でも発現量に変動が生じる。そのためどうしても内部標準による補正作業が必要である。半定量法ではこの補正が難しく、補正による誤差も大きくなってしまふ。

(5) 適応

前述したように小児白血病の中でキメラ遺伝子を形成する症例の割合は半数以下で、したがって全体の症例を対象とした MRD 解析は不可能である。現在のところ対象となりうるのは、後述する *MLL* 再構成陽性乳児 ALL のような、同じキメラ遺伝子を持つ中での MRD の予後に及ぼす影響を検討することなどに限られる。キメラ遺伝子の種類により同じ発現量であってもその意味するところは全く異なるので、同じ治療プロトコールないでのキメラ遺伝子ごとの詳細な検討が必要である。

(6) キメラ遺伝子を用いた MRD 測定方法の標準化

1999年に van Dongen らは、ヨーロッパ BIOMED-1 共同事業の中で、通常の RT-PCR 法を用いたキメラ遺伝子を用いた MRD の標準化を提案した¹⁾。ここでは小児の ALL, AML, CML でよくみられる9種類のキメラ転写産物を対象とした MRD を行うための、プライマーセットおよび PCR の反応条件が提案された。この時点ではまだ real-time PCR 法を用いた定量 PCR はまだ十分普及していなかったため、通常の PCR 法を用いて、限界希釈法を用いた半定量法が用いられていた。

その後 real-time PCR 法が急速に普及し、それに伴い、2003 年にはヨーロッパ対癌プログラム (Europe Against Cancer Program) の事業として、RQ-RT-PCR 法を用いた同じ9種類のキメラ mRNA についての標準化案が提唱された²⁾。さらに同時に内部標準遺伝子として用いるべき遺伝子の検討も行われた³⁾。従来内部標準としてよく用いられていた α -actin や GAPDH などが pseudogene の存在もあり内部標準としては適切ではなく、*ABL* 遺伝子が RQ-RT-PCR の内部標準として最も優れていることが示され、そのプライマー、プローブの配列および条件が明らかにされた。

本邦では、これまで次項に示す乳児白血病共同治療研究の中で行われている *MLL* キメラ遺伝子を用いた MRD 解析以外には、まとまった臨床研究の中で行われているキメラ遺伝子を用いた MRD 研究はない。今後キメラ遺伝子を用いた MRD 研究を行う場合には、他のグループによる結果との比較などを考えた場合、このように提唱された標準的な方法によってまず検証することが重要かもしれない。

【文献】

- 1) van Dongen JJ, et al. Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. Report of the BIOMED-1 Concerted Action: investigation of minimal residual disease in acute leukemia. *Leukemia* 13: 1901-1928, 1999
- 2) Gabert J, et al. Standardization and quality control studies of 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia - a Europe Against Cancer program. *Leukemia* 17: 2318-2357, 2003
- 3) Beillard E, et al. Evaluation of candidate control genes for diagnosis and residual disease detection in leukemic patients using 'real-time' quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RQ-PCR) - a Europe against cancer program. *Leukemia* 17: 2474-2486, 2003

2) *MLL* 遺伝子

(1) 概要

前述したように「乳児急性リンパ性白血病に対する早期同種造血幹細胞移植療法の有効性に関する後期第 II 相試験付随研究(MLL03)」の付随研究として、「real-time PCR 法を用いた *MLL* 遺伝子関連キメラ mRNA 定量による微小残存病変(MRD)解析」を行う。この MRD 研究では、発症時に multiplex RT-PCR を用いて *MLL* キメラ遺伝子のうちの頻度の高い4種類のキメラ mRNA の解析を行い、キメラ mRNA が同定できたものについてその後の MRD 解析を行う、という流れで行う。

(2) 頻度

MLL 遺伝子再構成は乳児 ALL の 70-80%、乳児 AML の 50-60%にみられるが、小児 ALL 全体では約 5%、小児 AML でも 10%以下と頻度は少ない。

(3) 方法

TaqMan プローブを用いた real-time quantitative (RQ)-RT-PCR 法を用いる。発症時は *MLL-AF4*, *MLL-AF6*, *MLL-AF9*, *MLL-ENL* の4種類のキメラ mRNA を同時に検出できるように multiplex で行い、キメラ mRNA が検出できた例に対してのその後の MRD 解析は、同定できた1種類のキメラ mRNA についてシングルで行う。Multiplex RQ-RT-PCR では複数のプライマーセットを用いるために、必ずしも個別のプライマーセットにとっては最適ではない条件で反応を行うことになるが、キメラ mRNA が同定できたあとはそれぞれのプライマーセットにとって最適な条件で PCR 反応を行うことが可能になり、MRD 解析の感度を上げることができる。

a) 解析する *MLL* キメラ遺伝子

MLL キメラ遺伝子はこれまでに 30 以上が同定されている。しかしこのうち多くはまれで、実際には頻度の高い少数のキメラ遺伝子を対象とすれば検出可能なほとんどの症例はカバーできると考えられる。MLL98 研究に登録された 44 例のうち t(4;11)が 27 例で 61%を占め、t(11;19)4例、t(9;11)3例を加えるとこの3つの染色体転座で全体の 77%を占める。

b) プライマーとプローブ

MLL キメラ遺伝子は alternative splicing により様々なタイプの転写産物を形成する(図)。これらを検出するため MLL のエクソン 9 (エクソンの番号は新しい nomenclature による)に共通のフォワードプライマーを設定し、その直下の同じエクソン 9 内に TaqMan プローブを設定した。相手遺伝子側の AF4, AF6, AF9, ENL にはこれまで報告された融合点をカバーできるようにプライマーを設定した。AF4と AF6には1種類ずつ、AF9と ENL ではキメラを形成する切断点が離れた2カ所存在するため、それぞれ2種類ずつの特異的なリバースプライマーを設定した。

(4) 問題点

現在設定しているプライマーセットでは、理論的にはこの4種類のキメラ遺伝子のこれまで知られているほとんどのキメラ mRNA が検出可能であるはずだが、実際の解析では染色体転座が検出されても、キメラ mRNA が同定できないことは珍しくない。その原因としては①既知のキメラ mRNA とは異なる箇所での融合が起こっている、②未知のキメラ遺伝子が形成されている、などが考えられ、MRD 追跡可能症例を増やすためにはこれらを正確に同定することが重要である。

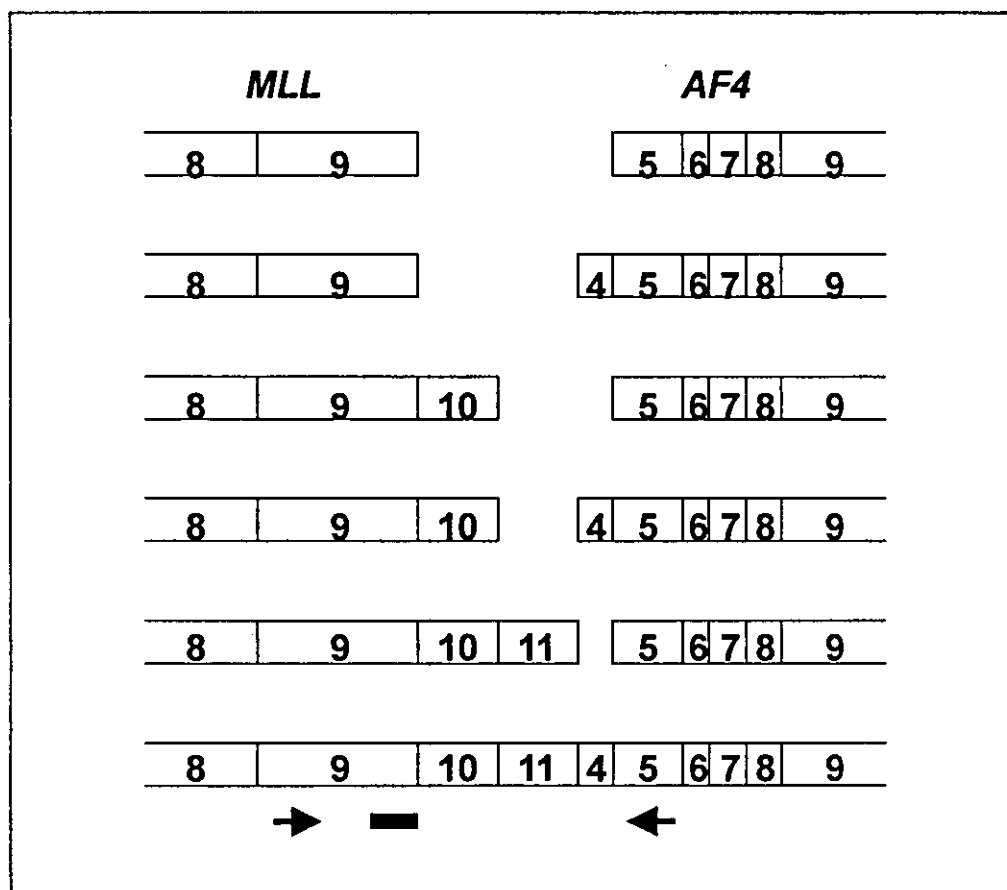


図 MLL-AF4 の代表的な6種類のキメラ mRNA の構造と RQ-RT-PCR に用いるプライマーとプローブ。
→:プライマー、-:TaqMan プローブ

3) TCR/Ig 遺伝子

リンパ球では免疫グロブリン(immunoglobulin, Ig)重鎖、軽鎖や T 細胞受容体(T-cell receptor; TCR) γ 、 δ 鎖の遺伝子が再構成をおこす。再構成は recombinase と terminal deoxynucleotidyl transferase(TdT)の働きで、多数の variable(V)、diversity(D)、joining(J)因子から 1 個ずつが選ばれ、VDJ の順で結合する形でおこる。このとき、各因子間の断端に数個の塩基の欠失がおこり、さらに数個—数十個のランダムな塩基挿入がおこるため、V-D、D-J 結合の継ぎ目部分にはクローンごとに異なる塩基配列が出現する¹⁾。多くのリンパ系腫瘍では再構成が進行する過程で腫瘍化しクローンを形成しているため、腫瘍全体が同じ塩基配列の再構成をもつこととなり、これを患者固有の腫瘍マーカーとして利用できる。急性リンパ性白血病では成人、小児を問わず大部分で TCR γ δ 、IgH、Ig κ いずれかの再構成を持つため、これらをマーカーとして MRD の定量ができる。

リンパ系腫瘍細胞では正常のリンパ球同様、免疫グロブリン(Ig)遺伝子や T 細胞受容体(TCR)遺伝子の遺伝子再構成がみられる。B 細胞系 ALL では IgH、TCR δ 、 γ 、 β 遺伝子の再構成はそれぞれ 95%、54%、55%、33%にみられる。T 細胞系の ALL ではこれらの比率は 14%、68%、91%、89%と報告されている¹⁾。これら遺伝子の構成成分である V、D、J 因子が再構成するさい、リコンビナーゼの作用で各因子の断端に数塩基の欠失と TdT(terminal deoxy nucleotidyl transferase) による塩基挿入がランダムにおこりクローン特異的な結合部塩基配列が生じる¹⁾。これら Ig 遺伝子や TCR 遺伝子の再構成をもつリンパ系腫瘍ではクローン特異的な塩基配列を PCR 増幅し MRD の診断が可能である。

(1) TCR δ ・ γ 鎖遺伝子再構成を利用した MRD の検出

TCR δ 鎖遺伝子は 14 番染色体長腕(14q11)に位置し、TCR α 鎖遺伝子の V 因子群、J 因子群にはさまれて存在する。また TCR δ 鎖は T 細胞の発生過程においては γ 鎖とともに α 鎖と β 鎖に先立ち遺伝子組み替えをおこし、それぞれ複合体を形成して T 細胞受容体として発現される。成熟 T 細胞の大多数の T 細胞受容体は α 鎖と β 鎖からなるヘテロダイマーであるが、リンパ節や末梢 T リンパ球の 5—10% に γ δ 型の T 細胞が存在している。TCR δ 鎖遺伝子は少なくとも 6 個の V 因子、3 個の D 因子、3 個の J 因子で構成されていて、正常 T 細胞における再構成は DD \rightarrow DDJ \rightarrow VDDJ の順におこり、このとき V 因子として V δ 1、V δ 2、J 因子として J δ 1 がもっぱら用いられる¹⁾。急性リンパ性白血病(ALL)では T 細胞性だけでなく、B 細胞性でもしばしば TCR δ 鎖再構成を認めるが、そのパターンは病型特異的で T-ALL では正常 T 細胞と同様に完全型の V δ 1-D-J δ 1、V δ 2-D-J δ 1 タイプの結合が併せて約 50%、nonT-ALL では不完全型の V δ 2-D δ 3 タイプの結合が約 50%に認められる(45,46,47)。このように TCR δ 鎖遺伝子は構成する V、D、J の各因子の数が少ないうえに、再構成のパターンは上に示した 3 タイプが圧倒的に多いため、少ない種類のプライマーで効率よく結合部の増幅が行える²⁾。

TCR γ 鎖遺伝子の構成は詳しく解析されており、14 個の V γ 、5 個の J γ 、2 個の C γ が 160kb の長さにわたり並んでいることが知られる。V γ は塩基配列の類似性から V γ I (9 個の V γ からなる)と V γ II—V γ IV (各 1 個の V γ) の 4 群に分類される。この中で ALL で再構成に用いられるのはほとんどが V γ I 群である(43)。TCR γ 鎖遺伝子は D 因子を持たないが、再構成に際し V-J 結合部に多様な塩基配列を生じるのでこれをクローナルマーカーとして利用することができる。d'Auriol ら³⁾は V γ 9 をターゲットとした PCR プライマーで増幅を行ない MRD が検出可能であることを示したが、V γ のコンセンサスプライマーを利用することでさらに多くの症例を対象とできるようになった。対象とする白血病細胞がクローナルな TCR γ や IgH 遺伝子再構成を持つか否かを知るためには従来サザン法で解析する必要があった。これに対し PCR 増幅した初診時 DNA をポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE)することでクローン性の有無を簡易に判別できる⁴⁾。

(2) IgH 遺伝子再構成を利用した MRD 診断

IgH 遺伝子の再構成のさい生じる塩基配列の一部、complementarity-determining region 3(CDR3)をクローナルマーカーとして利用できる。IgH 遺伝子は 14q32 に位置し 2500—3000kb にもおよぶ。JH 因子は 6 個だが VH 因子は 6 群約 200 個、DH 因子は約 30 個あり、TCR γ や δ とは対象的である。IgH 遺伝子は再構成し V-D-J が結合する。塩基配列の相似した FR1 や FR3 の部位にコンセンサスプライマーを設

けこれと6個のJH因子にほぼ共通な塩基配列を利用したコンセンサスプライマーを利用してCDR3領域を増幅する。さらに塩基配列を決定し、これに相当するオリゴヌクレオチドを合成して症例特異的プローブとして利用するか増幅用プライマーとして用いる。V-N-DもしくはD-N-Jの塩基配列が症例特異的であり両者ともに利用できる。前者の方がより変化に富んだ塩基配列を示すことが多いが経過中再構成を完了したV因子がさらに5'に位置するものと入れ替わる(V-V再構成)により消失することがあるのでもっぱらD-N-J部が使用される⁵⁾。しかしながらもし再構成したD,J因子が正常リンパ球に多い種類であるとプローブの感度が低くなる可能性がある。

TCR δ 、 γ 鎖やIgH鎖遺伝子の再構成を利用する方法はALLの大部分を対象にできるので臨床応用度が高い。しかしながらこれらの遺伝子が経過中再び再構成をおこし初診時に見られた再構成がなくなる症例も少なからず見受けられる^{6,7)}。したがって複数のマーカー(例IgHとTCR δ)を用いMRDの消長を観察することが望ましい。

【文献】

- 1) van Dongen JJ, et al. Analysis of immunoglobulin and T cell receptor genes. Part II: Possibilities and limitations in the diagnosis and management of lymphoproliferative diseases and related disorders. Clin Chim Acta. 198(1-2):93-174, 1991
- 2) Yokota S, et al. Use of polymerase chain reactions to monitor minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia patients. Blood. 77(2):331-9, 1991
- 3) D'Auriol L, et al. In vitro amplification of T cell gamma gene rearrangements: A new tool for the assessment of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemias. Leukemia 3:155-8, 1989
- 4) Bourgooin A, et al: Nonradioactive detection of clonal T-cell receptor gene rearrangements in lymphoid neoplasms. Proc Natl Acad Sci USA 87:8536-40, 1990
- 5) Yamada M, et al: Detection of minimal residual disease in hematopoietic malignancies of the B-cell lineage by using third-complementarity-determining region(CDR-III)-specific probes. Proc Natl Acad Sci USA 86:5123-5, 1989
- 6) Steward CG, et al. Third complementarity determining region (CDR 3) sequence analysis in childhood B-lineage acute lymphoblastic leukemia: implications for the design of oligonucleotide probes for use in monitoring minimal residual disease. Leukemia 6:1213-9, 1992
- 7) Beishuizen A, et al: Analysis of Ig and T-cell receptor genes in 40 childhood acute lymphoblastic leukemias at subsequent relapse: implications for the detection of minimal residual disease by polymerase chain reaction analysis. Blood 83:2238-47, 1994

4) WT-1遺伝子

WT1 (Wilms' tumor-1)は、当初ウィルムス腫瘍における癌抑制遺伝子として同定された転写因子をコードする遺伝子であり、正常成人組織での発現は泌尿生殖器系を除くと造血幹細胞で低レベルに発現が認められるのみである。1994年、SugiyamaらはAML, ALL, CML-BCの白血病細胞においてWT1の高発現がみられることを報告した^{1,2)}。その後の解析により、WT1の高発現した白血病は独立した予後不良因子であること、また経時的に発現量を観察することで普遍的なMRDのターゲット("panleukemic MRD marker")となり得ることが明らかとなった^{3,4)}。

WT1のmRNAは10個のexonからなり、exon5やexon10の欠失したいくつかのsplice variantが報告されている。このためRQ-PCRのプライマーやプローブはexon6/7, 7/8, 10などに設定されている(表)。WT1の発現量は、コピー数/ μ g-RNA, コントロール遺伝子(ABL, GUSなど)との比率, WT1高発現細胞株であるK562での発現量との比率, などによって表される。K562での発現量はおよそ 1×10^6 コピー/ μ g-RNAに相当する(BML資料)。各種白血病におけるWT1の発現は、一般にALLよりはAMLの方が高く、AMLの中では特にFAB;M3で高い(M5で低いとの報告もある)。ALLではt(9;22)やt(4;11)で高く、t(1;19)では低い⁵⁾。また、CMLではCPでは低く、AP, BCと進展するに従って高発現となる¹⁾。MDSでも同様にRA, RAEB, overt leukemiaの順に高発現となる。

表:WT1 の RQ-PCR に用いられる primer および probe の塩基配列

Author	sequence	position	ref
Ogawa H et al	forward 5'-GATAACCACACAACGCCCATC-3'	exon 6/7	4)
	reverse 5'-CACACGTTCGCACATCCTGAAT-3'		
	probe 5'-ACACCGTTCGCTGTGTATTCTGTATTGG-3'		
Cilloni D et al	forward 5'-CAGGCTGCAATAAGAGATATTTTAAGCT-3'	exon7/8	5)
	reverse 5'-GAAGTCACACTGGTATGGTTTCTCA-3'		
	probe 5'-CTTACAGATGCACAGCAGGAAGCACACTG-3'		
Barragan E et al	forward 5'-AGCTGTTCGGTGGCCAAGTTGTC-3'	exon 10	8)
	reverse 5'-TGCCTGGGACACTGAACGGTC-3'		
	probe 5'-ACCCCTCAAAGCGCCAGCTGGAGT-3'		

小児白血病におけるWT1の解析についての報告は多くはないが、AML、ALLともに成人白血病と同様の比率でWT1の発現が見られ、また小児の正常骨髄や末梢血、臍帯血でも成人の正常血液細胞と同様にWT1の発現はみられないか非常に低いレベルであるとされている^{6,7)}。

WT1によるMRD解析の最大の利点は、1セットのプライマーとプローブですべてのタイプの白血病での解析が行えることである。一方、欠点としては、正常細胞での弱い発現がバックグラウンドとして存在すること、また化学療法により白血病細胞での発現量に変化する可能性があることがあげられる。このため、個々の症例での結果の解釈には注意が必要である。

【文献】

- 1)Inoue K et al: WT1 as a new prognostic factor and a new marker for the detection of minimal residual disease in acute leukemia. *Blood* 84: 3071-9, 1994
- 2)Inoue K et al: Long-term follow up of minimal residual disease in leukemia patients by monitoring WT1 (Wilms tumor gene) expression levels. *Blood* 88: 2267-78, 1996
- 3)Menssen HD et al: Wilms tumor gene (WT1) expression as a panleukemic marker. *Int J Hematol* 76: 103-9, 2002
- 4)Ogawa H et al: The usefulness of monitoring WT1 gene transcripts for the prediction and management of relapse following allogeneic stem cell transplantation in acute type leukemia. *Blood* 101: 1698-704, 2003
- 5)Cilloni D et al: Quantitative assessment of WT1 expression by real time quantitative PCR may be a useful tool for monitoring minimal residual disease acute leukemia patients. *Leukemia* 16: 2115-21, 2002
- 6)Niegemann E et al: WT1 gene expression in childhood leukemias. *Acta Haematol* 102: 72-6, 1999
- 7)Trka J et al: Real-time quantitative PCR detection of WT1 gene expression in children with AML: prognostic significance, correlation with disease status and residual disease detection by flow cytometry. *Leukemia* 16: 1381-9, 2002
- 8)Barragan E et al: Prognostic implications of Wilms' tumor gene (WT1) expression in patients with de novo acute myeloid leukemia. *Haematologica* 89: 926-33, 2004

2. 1. 4 定量法について

1) 2段階増幅によるMRD定量

Heteroduplex Analysis による TCR/Ig 遺伝子再構成スクリーニング

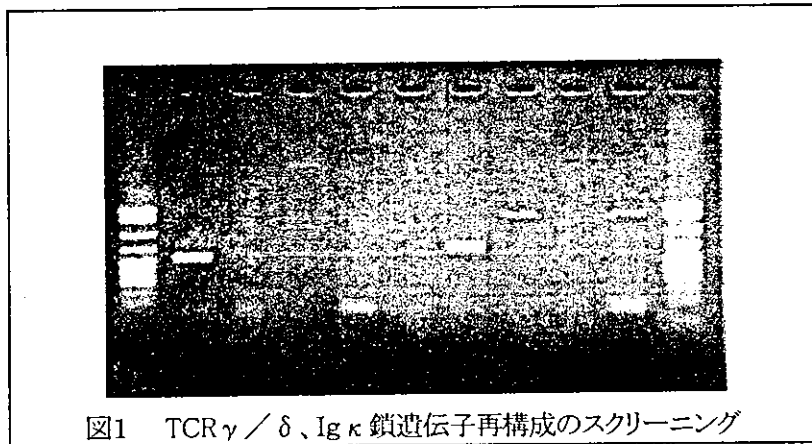
初診時の患者骨髄液あるいは骨髄スマア(腫瘍細胞を60%以上含む場合は末梢血でも可)より標準的な方法¹⁾²⁾でDNAを抽出し、まず TCR δ、γ および Ig κ 鎖遺伝子の再構成についてPCR法を用いて検索を行う。TCR δ、γ 鎖遺伝子についてはそれぞれ6種類、Ig κ 鎖遺伝子では5種類(表1)の再構成のスクリーニングを Multiplex PCR 法³⁾⁴⁾にて行い、すでに報告されているプライマー¹⁾²⁾³⁾⁵⁾⁶⁾を用いて、1チューブ内で

2種類の反応を行うことにより、計9本のチューブで1検体分を処理する。

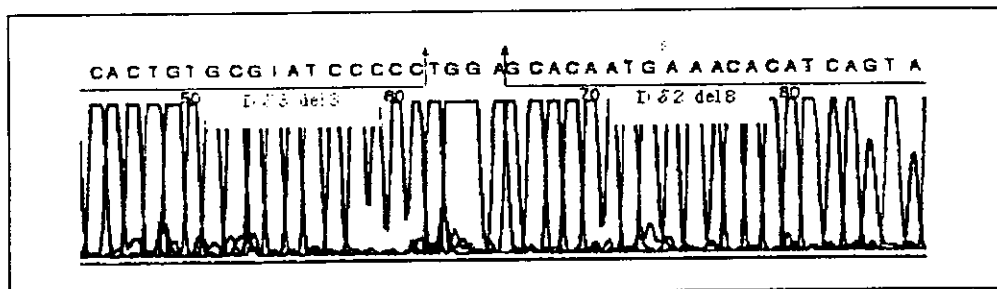
表1

TCR δ 鎖遺伝子 (6 種類)	TCR γ 鎖遺伝子 (6 種類)
V δ 1-DJ δ 1, V δ 2-DJ δ 1	V γ 1-J γ 1.3/2.3, V γ 2-J γ 1.3/2.3
V δ 3-DJ δ 1, D δ 3-J δ 1	V γ 3-J γ 1.3/2.3, V γ 4-J γ 1.3/2.3
V δ 2-D δ 3, D δ 2-D δ 3	V γ 1-J γ 1.1/2.1, V γ 4-J γ 1.1/2.1
Ig κ 鎖遺伝子 (5 種類)	Ig H 鎖遺伝子 (6 種類)
V κ 1- κ de, V κ 2- κ de	VH1/7-JH, VH2-JH, VH3-JH,
V κ 3- κ de, V κ 4- κ de	VH4-JH, VH5-JH, VH6-JH
RS- κ de	

スクリーニングで行われるPCRは、100ngの患者DNA、200mMのdNTP、20pmolのforwardおよびreverseオリゴヌクレオチドプライマー、10mMのTris-HCl pH8.0、30mMのMgCl₂、50mMのKClおよび1UのTaqDNAポリメラーゼ(宝酒造)から成る各チューブ70 μ lの反応液を調整し、陽性コントロール(アルブミン)とともにペルチエ素子型サーマルサイクラー(PCR Express、Thermo Hybaid社など)で行われる。その反応プログラムは、94 $^{\circ}$ Cdenature5分の後、94 $^{\circ}$ C30秒、56 $^{\circ}$ C1分、72 $^{\circ}$ C1分のamplificationを35サイクル行い、最終サイクルの後72 $^{\circ}$ C10分間のextensionを加えている。このPCR産物はheteroduplex formationを誘導するため94 $^{\circ}$ C5分のdenatureと60分間かけての室温までの冷却を必要とする。その後1 \times Tris-boric acid-EDTAバッファー中で6%ポリアクリルアミドゲルによる電気泳動を行い、明瞭なバンドをもつものを再構成ありと判断する(図1)。



もしも再構成バンドが検出されない場合はIgH鎖遺伝子の再構成6種類について同様の手順で再度スクリーニングを行う(表1)。再構成バンドが認められた場合2%アガロースゲルで泳動した後QIAXIIキット(Quiagen社)を用いて再構成遺伝子のDNAを精製し、その切断点周辺の遺伝子配列をdideoxynucleotide法を用いてオートシーケンサーで解析する。この結果から症例特異的な配列を含むASOプライマーを設計、作成する(図2)。



ASO プライマーを用いた nested PCR 法による MRD 定量

十分な感度の MRD の定量を行うには、前述の ASO プライマーを用いた two-step(nested)PCR 法が必要である⁷⁾。定量のため採取した骨髄 DNA を、初診時の DNA、半定量用の対象 DNA とともに全く同じ条件で PCR 増幅する。半定量用の対象は、初診時 DNA を健常人ボランティア7人分の末梢血 buffy coat DNA に 10^{-2} から 10^{-5} までの濃度となるよう段階希釈したものである。ここでは、まず 1st PCR であらかじめ再構成ごとに設定された外側のプライマーで PCR 増幅し、その PCR 産物を 100 倍希釈したものを $1\mu\text{l}$ を内側の germline プライマーと症例特異的プライマー (IgH 鎖では 3', 5' とともに症例特異的プライマー) で 2nd PCR を行う (図3)。

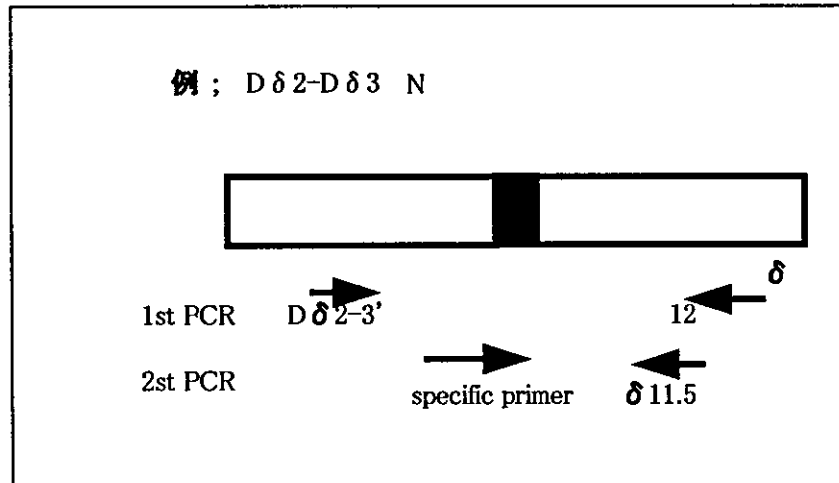


図3

2nd PCR では 10 サイクルでいったん反応を止めて 2% アガロースゲルで泳動後、その後 2 サイクルずつ反応させてその都度泳動し結果を判定する。陰性対象である buffy coat DNA でバンドがみられるまで増幅を追加し、これが増幅されない最後のサイクルでバンドがみえている希釈系列をもって検出感度とする。検体のバンドと希釈系列の信号強度を比較して MRD の定量を行う (図4)。

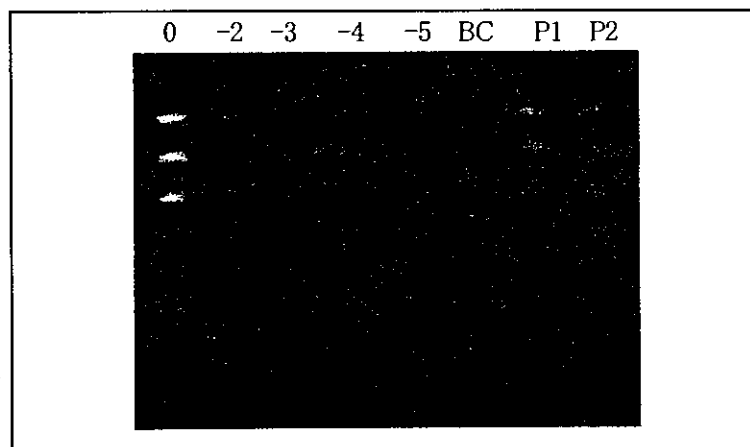


図4

例えば、図4では buffy coat では増幅バンドがみえない状態で、希釈系列 10^{-5} までのバンドが認められるので、この症例特異的プライマーは 10^{-5} の感度をもつと判定できる。治療後の検体 (P1, P2) を見ると、希釈系列の 10^{-2} と同じサイクルでバンドが出現し、同じ強度であるので、両者の定量結果は 10^{-2} と判定した。

小児 ALL の場合、骨髄 MRD で初期治療効果を判定し、治療介入するのに最低限必要な定量感度は 10^{-3} でよいと考えられる。なぜなら 10^{-3} を cut-off 値としても陽性群、陰性群で予後に有意な差が認められるからである。

【文献】

- 1)Yokota S et al: Use of polymerase chain reactions to monitor minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia patients. Blood 77:331-9,1991
- 2)Grunewald K et al: Molecular genetic analysis of DNA obtained from fixed ,air dried or paraffin embedded sources. Ann.Hematol.62:108-14,1991
- 3)Pongers-Willemsse M J et al: Primers and protocols for standardized detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia using immunoglobulin and T cell receptor gene rearrangements and TAL1 deletions as PCR targets: report of the BIOMED-1 CONCERTED ACTION :investigation of minimal residual disease in acute leukemia. Leukemia 13:110-8,1999
- 4)Hettinger K et al: Multiplex PCR for TCR delta rearrangements :a rapid and specific approach for the detection and identification of immature and mature rearrangement in ALL .Br.J.Haematol.102:1050-4,1998
- 5)Beishuizen A et al: Heterogeneity in junctional regions of immunoglobulin kappa deleting element rearrangements in B cell leukemias : a new molecular target for detection of minimal residual disease. Leukemia 11:2200-7,1997
- 6)Seriu T et al: Improved detection of minimal residual leukemia through modifications of polymerase chain reaction analysis based on clonospecific T cell receptor junctions. Leukemia 9:316-20,1995
- 7)Seriu T et al. Prospective monitoring of minimal residual disease during the course of chemotherapy in patients with acute lymphoblastic leukemia, and detection of contaminating tumor cells in peripheral blood stem cells for auto transplantation. Leukemia 9:615-23,1995

2) real-time quantitative-PCR法を用いたMRD定量

微小残存病の定量に real-time PCR (RQ-PCR)法が用いられるようになって久しい。当初, かなり高額であった real-time PCR 装置も各社から様々のタイプのものが販売され, 1千万円を下回る価格設定で汎用機器となりつつある。本稿では, Applied Biosystems 社の real-time PCR systemとTaqMan probe® を用いたMRDの解析方法を概説する。造血器腫瘍の解析には, 標的遺伝子ごとに primer/probe のデザイン・解析方法の工夫が凝らされているが, 本稿ではALL症例におけるIgH遺伝子の再構成領域を標的とした, allele-specific oligonucleotide (ASO) RQ-PCR法を例にして説明する。

(1) プライマー・プローブのデザイン

IgH ASO strategyでは, コスト削減のために共通プローブをIgH鎖のVあるいはJ領域に設定する(図1)。プローブの塩基配列は我々の論文を参考にされたい¹⁻⁷⁾。次に junctional region に腫瘍細胞のDNAのみを特異的に増幅させるプライマーを設定する。この時, 腫瘍細胞の塩基配列をシークエンスする必要がある。我々はFR1c/VLJH/LJHあるいはFR2a/VLJH/LJHの2組のプライマー³⁾を用いてIgH遺伝子のVDJ領域を増幅し, TA-cloning後, 塩基配列を決定している。モノクロナリティーがある場合には, 30個中20個程度が同じ塩基配列を示す。Web site (http://www.dnaplot.de/input/human_v.html)上でVDJおよび junctional regionの塩基配列を決定し, Primer Express Software (ABI)でプライマーをデザインする。シークエンスの際に用いたプラスミドはRQ-PCR時の標準物として用いる。プローブにはFAMラベリングをおこなっている。

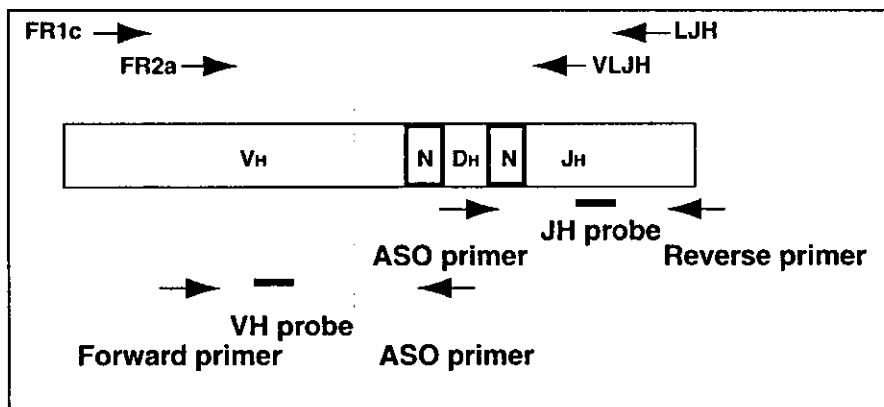


図1: IgH 遺伝子の増幅と RQ-PCR 解析に使用した primer/probe set の位置関係

(2) RQ-PCR 反応

定量 PCR の標準曲線(図2)の作成には、シーケンスの際に用いたプラスミド DNA を段階希釈し 2×10^7 ~2 コピーの希釈液を準備する。プラスミド DNA は安定した PCR 効率が得られること、再発時に凍結・融解を繰り返しても安定しても使える利点がある。

内部標準には GAPDH を使う。GAPDH は ABI 社から販売されているが、高価なので同じ物を合成して使っている。陰性コントロールは蒸留水、健常ボランティアから得られた正常骨髄を必ず入れる。PCR 反応液の組成、PCR 条件については論文を参照されて欲しい¹⁻⁷⁾。

(3) データー解析

RQ-PCR 法の感度はせいぜい 10^5 個に1個の腫瘍細胞の検出が限界である。これは PCR 反応液に入れることの可能な genomic DNA 量が 1・g 程であることに起因する。この DNA 量は 10^5 ~ 10^6 個の細胞量に相当し、この限界をうち破れないことが感度の限界となっている。IgH/GAPDH のコピー数を計算し、初診時の値からの reduction の比率を報告している(図2)。

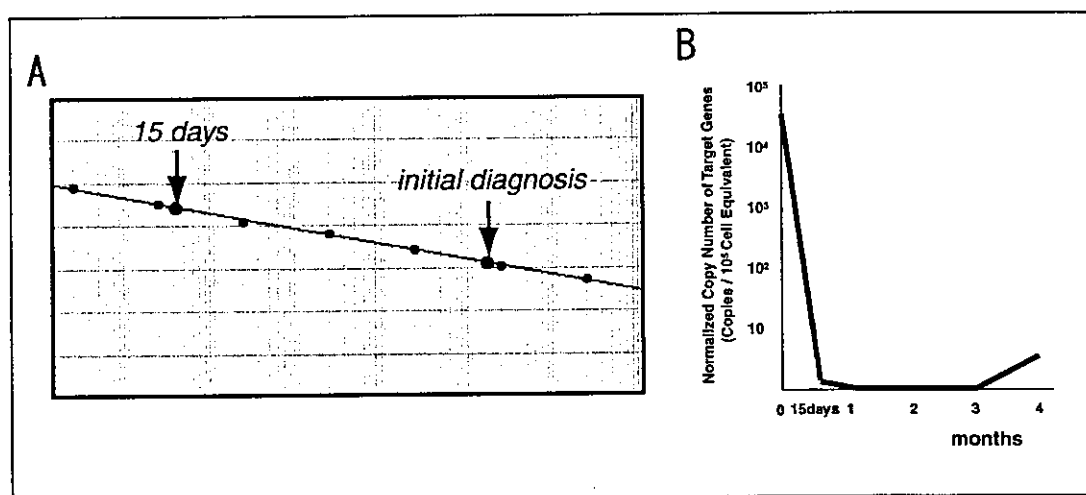


図2: 解析症例の標準曲線(A)とMRDのモニターリング結果(B)

(4) 問題点

本法はDNAサンプルを用いる点や外部標準にプラスミドDNAを用いるので、サンプル/標準物の変性による解析精度の低下を防ぐことができ、標準化し易い方法である。しかし、クローニング・シーケンスに経費と手間がかかり、解析センターあるいは検査会社によって多検体を処理し、解析の効率化を計る必要がある。

【文献】

- 1) Tarusawa M et al: Quantitative assessment of minimal residual disease in childhood lymphoid malignancies using an allele-specific oligonucleotide real-time quantitative polymerase chain reaction. *Int J Hematol* 75:166-73, 2002
- 2) Yashima A et al: Quantitative assessment of contaminating tumor cells in autologous peripheral blood stem cells of B-cell non-Hodgkin lymphomas using immunoglobulin heavy chain gene allele-specific oligonucleotide real-time quantitative-polymerase chain reaction. *Leuk Res* 27:925-34, 2003
- 3) Uchiyama M et al: Consensus primers for detecting monoclonal immunoglobulin heavy chain rearrangement in B cell lymphomas. *J Clin Pathol* 56: 778-9, 2003
- 4) Uchiyama M et al: Development of consensus fluorogenically labeled probes of the immunoglobulin heavy-chain gene for detecting minimal residual disease in B-cell non-Hodgkin lymphomas. *Cancer Sci* 94: 877-85, 2003
- 5) Uchiyama M et al: Development of immunoglobulin variable heavy chain gene consensus probes with conjugated 3' minor groove binder groups for monitoring minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *J Clin Pathol* 56: 952-5, 2003
- 6) Uchiyama M et al: Short consensus probes with 3'-minor groove binder of the immunoglobulin heavy-chain gene

for real-time quantitative PCR in B-cell non-Hodgkin lymphomas. Lab Invest 84: 932-6, 2004
7) Uchiyama M et al: Consensus JH gene probes with conjugated 3'-minor groove binder for monitoring minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia. J Mol Diagn 7: 121-6, 2005

2. 2 multi-color FCMを用いた細胞免疫学的定量法

1) 検体の採取、運搬、保存について

(1) 検体採取

一般的には骨髄液を用いた解析が基本である。とりわけ B-precursor ALL では残存芽球の末梢血中への出現レベルが低く、骨髄での解析は必須である。しかしながら T-ALL においては骨髄と末梢血の間には MRD 出現レベルに差がないとの報告もあり、末梢血を用いた解析で代用され得る可能性がある¹⁾。その他、末梢血を用いた解析は I-BFM Study においては day 8 末梢血による PGR/PPR 判定にも利用されている。検体の採取時期は各々の治療プロトコルに合致したポイントを設定することが望ましく、通常は発症時、寛解導入療法中、寛解導入療法終了後、強化療法終了後などに解析が行なわれている。ただし、それぞれの Time point で定量される MRD の検出レベルは各々の治療プロトコルの強度に完全に依存するため、MRD 定量を risk adopted therapy へ応用するためには、分子学的 MRD 同様に MRD の検出レベルと臨床予後に関する基礎的データの事前収集が不可欠である。以下、St.Jude 小児病院の Campana らと¹⁻³⁾、I-BFM の Doworzak ら⁴⁻⁶⁾によって報告されている採取ポイントを例として示す。

St.Jude (TT XIII): Onset, day 19, end of induction, week 14, week 32

BFM (AIEOP-BFM-ALL 2000): Onset, day 15, day 33, day 52, day 78 (骨髄)

Onset, day 8, day 15, day 22, day 33, day 52 (末梢血)

検体はヘパリン加骨髄もしくは末梢血を採取する。相対的比率のみでなく絶対数を定量するためには採取された骨髄・末梢血の有核細胞数を測定しておく必要がある⁶⁾。

(2) 検体の運搬

他施設共同研究によって MRD の評価を行う場合、検査センターへの検体運搬が必要となってくる。通常は常温 (18-20°C) での送付が良いが、宅配便を用いた検体送付の際には夏季における搬送中の高温環境が問題となることがしばしばであり、クール便の利用もやむを得ない。低温での検体運搬による細胞表面抗原の発現の変化についての検討は少ないが、多くの抗原においては軽微である場合が多いと考えられている。採取から解析までの時間は 24 時間以内が望ましいが、36-48 時間でも多くの場合は解析可能である。

(3) 検体の保存

解析は基本的には新鮮検体を用いて行なわれるため、凍結保存された検体による解析は報告されていない。

2) 試料の調整方法

免疫学的 MRD を利用する治療研究グループからの試料調整についての詳細な報告はなく、従って統一された手法は存在していない。そのため各々の解析方法は各施設によって異なっているのが現状である。サンプル調整の手法は抗体の反応性に直接影響を与えるため、同じ CD 抗原をターゲットにしても必ずしも同様の結果が得られるとは限らない。サンプル調整は St.Jude 小児病院ではあらかじめ比重遠心法によって分離された単核球を用いているが、I-BFM のグループでは骨髄・末梢血ともに全血法を用いた調整法を用いている。MRD を相対的頻度として解析する場合にはどちらの方法でも最終的な意義においては大した相違はないが、MRD の絶対頻度を解析に用いる場合には全血法による解析が必須である。全血法による解析では溶血試薬の使用が必須であるが、溶血試薬の種類は解析結果に影響を与え得るため、異なる調整法を用いた結果同士の比較には十分な注意が必要と考えられる。また、St.Jude 小児病院のグループでは、細胞表面抗原以外にもいくつかの細胞内抗原をも MRD 解析パネルに加えている²⁾ため (2-2-3 参照)、細胞内抗

原の染色も必要となる。細胞内抗原を用いた免疫学的 MRD 解析は、細胞固定・浸透化試薬による細胞破壊、抗原性や蛍光発色の変化が生じるため、細胞表面抗原との結果の比較には注意が必要(2-2-3 参照)である。そのため St.Jude 小児病院では自家調製された細胞固定・浸透化試薬を用いることで FSC-SSC dot plot パターンに対する影響が少なくされている。また一般的に細胞質内抗原の検出には細胞表面抗原以上に抗体クローンの選択が重要である。サンプルチューブ毎に必要な細胞数は MRD の解析レベルによって異なるが、一般的には $1-5 \times 10^6$ /tube での調整により 10^4 レベルでの検出が可能である。反応させる抗体量は蛍光発色に影響を与えるため、抗体使用量は事前に十分なタイトレーションを用いて決定されるべきである。

以下、St.Jude 小児病院における検体調整の概略を示す。

1. 比重遠心法による単核球分離・再浮遊
2. primary panel を用いた解析抗原の決定
3. 10^6 /tube でのサンプル分注
4. IgG を用いた Fc blocking
5. 細胞表面抗原に対する抗体との反応
6. 洗浄・パラホルムアルデヒド液による再浮遊・解析
(細胞表面抗原解析の場合)
洗浄・細胞固定・浸透化
7. 細胞質内抗原に対する抗体との反応
8. 洗浄・パラホルムアルデヒド液による再浮遊・解析
(細胞質内抗原解析の場合)

3) 抗体パネルと定量の実際

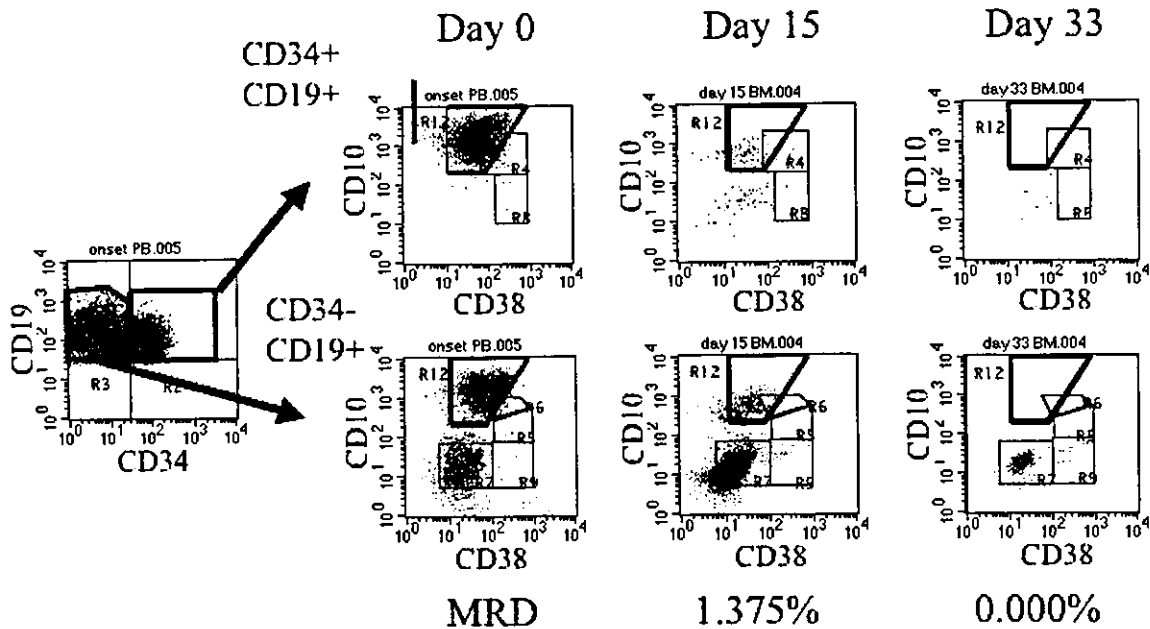
表 1 に St.Jude 小児病院²⁾と I-BFM における解析パネル⁶⁾を示す。いずれの場合も 4 カラー解析を用いており、triple-backbone と target antigen という組み合わせが基本である。target antigen には aberrant phenotype (CD66c など)も存在するが、多くは over or under expression phenotype (CD58, CD38, CD45 など)が主体である。

Table 1 MRD-Monoclonal Antibody panels for ALL

St. Jude CRH				I-BFM			
<i>B-precursor</i>				<i>B-precursor</i>			
CD58	CD10	CD34	CD19	CD20	CD10	CD34	CD19
CD38	CD10	CD34	CD19	CD58	CD10	CD34	CD19
CD45	CD10	CD34	CD19	CD10	CD34	CD34	CD19
CD22	CD10	CD34	CD19	CD10	CD11a	CD34	CD19
CD21	CD10	CD34	CD19	CD10	CD38	CD34	CD19
CD13	CD10	CD34	CD19	CD10·20	CD38	CD34	CD19
CD33	CD10	CD34	CD19	CD15	CD34	CD34	CD19
CD15	CD10	CD34	CD19	CD65	CD34	CD34	CD19
CD65	CD10	CD34	CD19				
CD66c	CD10	CD34	CD19	<i>T-lineage</i>			
IgM	CD10	CD34	CD19	CD99	CD7	sCD3	CD5
7.1	CD10	CD34	CD19	CD99	CD7	sCD3	cCD3
TdT	CD10	CD34	CD19	TdT	CD7	sCD3	cCD3
cμ	CD10	CD34	CD19				
<i>T-lineage</i>							
TdT	CD5	cCD3	CD19·33·DR				
CD34	CD5	cCD3	CD19·33·DR				

実際に解析・定量を行なうには原則としてまず初発時検体を用いての MRD target gate の設定が必要である。しかしながら解析結果が蓄積されることでパターン分析が可能となり、初発時の解析なくともある程度の解析は可能になる。フォローアップサンプルでの MRD target gate 中に存在する abnormal population をカウントすることで MRD の定量が行なわれる。図 1 に解析を行なったサンプルとその結果を示す。

Fig.1 MRD monitoring with flowcytometric analysis



フローサイトメトリーによる MRD 解析はその迅速性・サンプル調整の簡便性とは裏腹に解析は複雑であり決して容易ではない。多くのサンプル解析による経験が解析には必要となる。主たる原因の一つとしてフローサイトメーターその物が相対的解析機器であることが挙げられる。蛍光発色の検出には当然レーザー光による励起が必要であるが、レーザー光軸のずれやレーザーの劣化、フローセルへの蛋白付着などに伴い、各々のチャンネルの蛍光強度には差違が生じてくる。すなわち日常におけるフローサイトメーターの維持管理や Quality check の他、正常骨髄やフォローアップ検体を用いた Normal B-cell progenitor の表面抗原発現強度のチェックが必要となってくる。第二の原因として、抗体の選択による抗原への結合性・蛍光発色性が異なることであり、また抗体の劣化に伴う蛍光発色の減弱(とりわけ PerCP は顕著である)も大きな問題となってくる。また第三の原因として immunophenotypic shift の存在が挙げられる。狭義の immunophenotypic shift は再発時の表現形が初発時に異なることであり、フローサイトメトリーによる MRD 解析の重要な問題の一つである。そのため CD34 陽性・陰性両方の Blast を解析する必要性が考えられている。また近年、治療に伴う leukemic blast の表面抗原発現性の変化も報告されている。実際、発症時 CD45 陰性の ALL において、ステロイド治療中に blast の CD45 expression が upregulation されることはしばしば経験する⁴⁾。また細胞表面抗原と細胞質内抗原の双方について同一のカットオフラインを使用する際には、細胞質内染色のための細胞固定・浸透化に伴って生じた細胞破壊による loss を補正する必要が生じる。

欧米とは異なり、我が国において免疫学的 MRD を用いて治療のリスク変更を行なう試みは未だ実現されていない。そのため我が国で免疫学的 MRD を包括的に測定している施設は未だにないといっても過言ではない。三重大学医学部小児科においては現在 St. Jude 小児病院方式の MRD 測定が行われており、我が国

における多施設共同研究に適合したカスタマイズが検討されている。

【文献】

- 1) Coustan-Smith E et al: Use of peripheral blood instead of bone marrow to monitor residual disease in children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 100:2399-402, 2002
- 2) Coustan-Smith E et al: Clinical importance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 96:2691-6, 2000
- 3) Coustan-Smith E et al: Prognostic importance of measuring early clearance of leukemic cells by flow cytometry in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 100:52-8, 2002
- 4) Gaipa G et al: Drug-induced immunophenotypic modulation in childhood ALL: implications for minimal residual disease detection. *Leukemia*. 19:49-56, 2005
- 5) Dworzak MN et al: CD99 expression in T-lineage ALL: implications for flow cytometric detection of minimal residual disease. *Leukemia*. 18:703-8, 2004
- 6) Dworzak MN et al: Prognostic significance and modalities of flow cytometric minimal residual disease detection in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 99:1952-8, 2002

「臨床試験実施計画書ダイジェスト版」

Japanese Pediatric Leukemia/Lymphoma Study Group (JPLSG)

日本小児白血病リンパ腫研究グループ

乳児白血病委員会

乳児急性リンパ性白血病に対する 早期同種造血幹細胞移植療法の 有効性に関する後期第Ⅱ相試験実施計画書

MLL03 ダイジェスト版

厚生労働科学研究費補助金 効果的医療技術の確立推進臨床研究事業「小児造血器腫瘍の標準的治療法の確立に関する研究」班

厚生労働省がん研究助成金「小児の難治性白血病、二次性白血病の治療に関する研究」班

厚生労働科学研究費補助金ヒトゲノム・再生医療等研究事業「臍帯血を用いた造血細胞移植の確立に関する研究」班

研究代表者/研究事務局

代表者名：石井 榮一

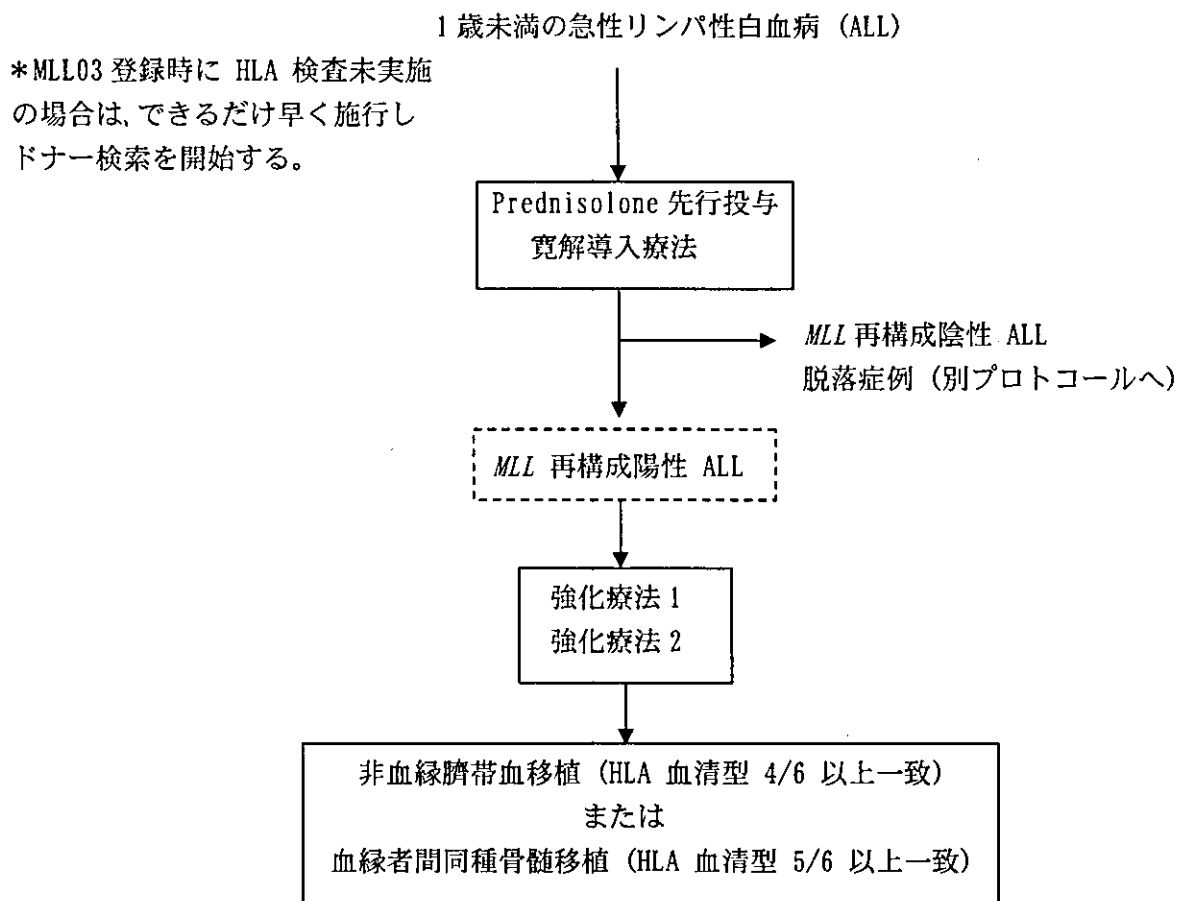
所属機関：佐賀大学医学部小児科

2002年 6月 22日	計画書第1案作成
2002年 12月 5日	計画書第2案作成
2003年 6月 4日	計画書第3案作成
2003年 8月 30日	計画書第4案作成
2003年 9月 30日	第1回日本小児血液学会臨床研究審査検討委員会審査
2003年 11月 14日	計画書第5案作成
2003年 12月 2日	第2回日本小児血液学会臨床研究審査検討委員会審査
2004年 1月 2日	計画書第6案作成
2004年 1月 27日	日本小児血液学会臨床研究審査検討委員会承認

本ダイジェスト版による治療は行わないようにお願い致します。
IRBまたは倫理委員会の提出用ではございません。

0. 概要

0.1. シェーマ



0.2. 目的とエンドポイント

<目的>

白血病細胞に *MLL* 遺伝子再構成をもつ乳児期発症の ALL において、通常の化学療法に加え寛解導入療法終了後4ヶ月以内に同種造血幹細胞移植を施行した場合の有効性を評価する。

<エンドポイント>

Primary endpoint

MLL 再構成陽性乳児 ALL に対する化学療法と早期同種造血幹細胞移植による診断後 18 ヶ月無イベント生存率

Secondary endpoints

- (1) 寛解導入療法による完全寛解導入率
- (2) 移植前処置開始前の完全寛解率
- (3) 移植前化学療法の有害事象発生割合
- (4) 移植後の急性および遅発性有害事象発生割合、晩期合併症発生割合
- (5) 移植後生着率と生着までの日数
- (6) 3年生存率と無イベント生存率
- (7) 移植関連死亡率
- (8) prednisolone 反応性による3年生存率と無イベント生存率の比較

0.3. 対象症例

- (1) 在胎週数 37 週以上で出生し、診断時年齢が 1 歳未満である
- (2) 骨髄または末梢血にて形態学的に ALL と診断されている
- (3) サザン法にて *MLL* 再構成陽性と診断されている
- (4) 以下の移植片のいずれかが寛解導入療法終了後 4 ヶ月以内に移植可能である
 - ・ 血清型 5/6 以上 HLA 一致の同意の取れた血縁者
 - ・ 血清型 4/6 以上 HLA 一致非血縁臍帯血
- (5) 治療遂行に支障をきたす重大な合併症がない
- (6) Prednisolone 以外の前治療がない
- (7) インフォームドコンセントが代諾者から文書で得られている

*本試験では寛解導入療法終了後 4 ヶ月以内の早期造血幹細胞移植の有効性・安全性の評価を目的としているため、非血縁骨髄移植は実行可能性・一般化可能性から除外している。

0.4. 治療計画概要

レジメンは原則 MLL98 を踏襲、なお 1 週間のステロイド先行投与を行う

- (1) 寛解導入療法：プレドニゾロン(PSL) 先行投与、デキサメタゾン(DEX)、ビンクリスチン(VCR)、ドキシソルピシン(DXR)シタラビン(Ara-C)、シクロホスファミド(CPA)、エトポシド(VP-16)メトトレキサート(MTX)、シタラビン(Ara-C)、ヒドロコルチゾン(HDC)による 3 剤髄注
- (2) 強化療法 1：ミトキサントロン(MIT)、ペブシド(VP-16)、大量シタラビン(HD-Ara-C)、3 剤髄注
- (3) 強化療法 2：ビンクリスチン(VCR)、大量メトトレキサート(HD-MTX)、大量シタラビン(HD-Ara-C)、3 剤髄注
- (4) 移植前処置：busulfan (BU) 試験投与（この薬物動態 (PK) に基づいて以下の投与量を決定する）BU (PK に基づく至適量) 経口 4 分割、エトポシド(VP-16)点滴静注、シクロホスファミド(CPA)点滴静注、1 日 1 回、造血幹細胞移植(HSCT) GVHD 予防：CSA + short-term MTX、または FK506 + short-term MTX

0.5. 予定登録数と研究期間

目標登録数：55 例

登録期間：2004年2月1日～2008年1月31日

追跡期間：2011年1月31日まで（登録期間終了後 3 年）

総研究期間：7 年