

- 57) Molrine DC. Recommendations for immunizations in stem cell transplantation. *Pediatr Transplant* 2003 ; 7 (Suppl 3) : 76-85.
- 58) 加藤剛二. 造血細胞移植後の予防接種. 血液・腫瘍科 2007 ; 54 : 286-293.
- 59) Ljungman P, Engelhard D, de la Camara R, et al. Vaccination of stem cell transplant recipients : recommendations of the Infectious Diseases Working Party of the EBMT. *Bone Marrow Transplant* 2005 ; 35 : 737-746.
- 60) Uderzo C, Pillon M, Corti P, et al. Impact of cumulative anthracycline dose, preparative regimen and chronic graft-versus-host disease on pulmonary and cardiac function in children 5 years after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation : a prospective evaluation on behalf of the EBMT Pediatric Diseases and Late Effects Working Parties. *Bone Marrow Transplant* 2007 ; 39 : 667-675.
- 61) Williams M. Gastrointestinal manifestations of graft-versus-host disease : diagnosis and management. *AACN Clin Issues* 1999 ; 10 : 500-506.
- 62) Mattano LA Jr. Strategic approaches to osteoporosis in transplantation. *Pediatr Transplant* 2004 ; 8 (Suppl 5) : 51-55.
- 63) Schulte CM, Beelen DW. Bone loss following hematopoietic stem cell transplantation : a long-term follow-up. *Blood* 2004 ; 103 : 3635-3643.
- 64) Carpenter PA, Hoffmeister P, Chesnut CH 3rd, et al. Bisphosphonate therapy for reduced bone mineral density in children with chronic graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant* 2007 ; 13 : 683-690.
- 65) Tauchmanova L, De Rosa G, Serio B, et al. Avascular necrosis in long-term survivors after allogeneic or autologous stem cell transplantation : a single center experience and a review. *Cancer* 2003 ; 97 : 2453-2461.
- 66) Kaste SC, Shidler TJ, Tong X, et al. Bone mineral density and osteonecrosis in survivors of childhood allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2004 ; 33 : 435-441.
- 67) Vowels M, Chan LL, Giri N, et al. Factors affecting hair regrowth after bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1993 ; 12 : 347-350.
- 68) Baker BW, Wilson CL, Davis AL, et al. Busulphan/cyclophosphamide conditioning for bone marrow transplantation may lead to failure of hair regrowth. *Bone Marrow Transplant* 1991 ; 7 : 43-47.
- 69) Socie G, Curtis RE, Deeg HJ, et al. New malignant diseases after allogeneic marrow transplantation for childhood acute leukemia. *J Clin Oncol* 2000 ; 18 : 348-357.
- 70) Kolb HJ, Socie G, Duell T, et al. Malignant neoplasms in long-term survivors of bone marrow transplantation. Late Effects Working Party of the European Cooperative Group for Blood and Marrow Transplantation and the European Late Effect Project Group. *Ann Intern Med* 1999 ; 131 : 738-744.
- 71) Baker KS, DeFoor TE, Burns LJ, et al. New malignancies after blood or marrow stem-cell transplantation in children and adults : incidence and risk factors. *J Clin Oncol* 2003 ; 21 : 1352-1358.
- 72) Bhatia S, Ramsay NK, Steinbuch M, et al. Malignant neoplasms following bone marrow transplantation. *Blood* 1996 ; 87 : 3633-3639.
- 73) Bhatia S, Louie AD, Bhatia R, et al. Solid cancers after bone marrow transplantation. *J Clin Oncol* 2001 ; 19 : 464-471.
- 74) Curtis RE, Rowlings PA, Deeg HJ, et al. Solid cancers after bone marrow transplantation. *N Engl J Med* 1997 ; 336 : 897-904.
- 75) Molassiotis A. Psychosocial transitions in the long-term survivors of bone marrow transplantation. *Eur J Cancer Care (Engl)* 1997 ; 6 : 100-107.
- 76) Andrykowski MA, Cordova MJ, Hann DM, et al. Patients' psychosocial concerns following stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1999 ; 24 : 1121-1129.
- 77) Ness KK, Bhatia S, Baker KS, et al. Performance limitations and participation restrictions among childhood cancer survivors treated with hematopoietic stem cell transplantation : the bone marrow transplant survivor study. *Arch Pediatr Adolesc Med* 2005 ; 159 : 706-713.
- 78) Prieto JM, Atala J, Blanch J, et al. Role of depression as a predictor of mortality among cancer patients after stem-cell transplantation. *J Clin Oncol* 2005 ; 23 : 6063-6071.
- 79) Molassiotis A, Morris PJ. Suicide and suicidal ideation after marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1997 ; 19 : 87-90.
- 80) Fromm K, Andrykowski MA, Hunt J. Positive and negative psychosocial sequelae of bone marrow transplantation : implications for quality of life assessment. *J Behav Med* 1996 ; 19 : 221-240.
- 81) Andrykowski MA, Bishop MM, Hahn EA, et al. Long-term health-related quality of life, growth, and spiritual well-being after hematopoietic stem-cell transplantation. *J Clin Oncol* 2005 ; 23 : 599-608.
- 82) Duell T, van Lint MT, Ljungman P, et al. Health and functional status of long-term survivors of bone marrow transplantation. EBMT Working Party on Late Effects and EULEP Study Group on Late Effects. European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Ann Intern Med* 1997 ; 126 : 184-192.
- 83) Socie G, Stone JV, Wingard JR, et al. Long-term survival and late deaths after allogeneic bone marrow transplantation. Late Effects Working Committee of the International Bone Marrow Transplant Registry. *N Engl J Med* 1999 ; 341 : 14-21.
- 84) Badell I, Igual L, Gomez P, et al. Quality of life in young adults having received a BMT during

- childhood : a GETMON study. Grupo Espanol de Trasplante de Medula Osea en el Nino. Bone Marrow Transplant 1998 ; 21(Suppl 2) : S68—S71.
- 85) Syrjala KL, Langer SL, Abrams JR, et al. Recovery and long-term function after hematopoietic cell transplantation for leukemia or lymphoma. *Jama* 2004 ; 291 : 2335—2343.
- 86) Christie D, Battin M, Leiper AD, et al. Neuropsychological and neurological outcome after relapse of lymphoblastic leukaemia. *Arch Dis Child* 1994 ; 70 : 275—280.
- 87) Phipps S, Dunavant M, Srivastava DK, et al. Cognitive and academic functioning in survivors of pediatric bone marrow transplantation. *J Clin Oncol* 2000 ; 18 : 1004—1011.
- 88) Kupst MJ, Penati B, Debban B, et al. Cognitive and psychosocial functioning of pediatric hematopoietic stem cell transplant patients : a prospective longitudinal study. *Bone Marrow Transplant* 2002 ; 30 : 609—617.
- 89) Nottoghem P, Soler C, Dellatolas G, et al. Neuropsychological outcome in long-term survivors of a childhood extracranial solid tumor who have undergone autologous bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2003 ; 31 : 599—606.
- 90) Rizzo JD, Wingard JR, Tichelli A, et al. Recommended screening and preventive practices for long-term survivors after hematopoietic cell transplantation : joint recommendations of the European Group for Blood and Marrow Transplantation, Center for International Blood and Marrow Transplant Research, and the American Society for Blood and Marrow Transplantation (EBMT / CIBMTR / ASBMT). *Bone Marrow Transplant* 2006 ; 37 : 249—261.

#### Late Effects of Stem Cell Transplantation Performed for Childhood Cancer

Yasushi Ishida

Department of Pediatrics, Ehime University Graduate School of Medicine  
(St. Luke's International Hospital)

By reviewing relevant English literature, I evaluated the major late effects of stem cell transplantation (SCT) performed for childhood cancer. The late effects were attributed to 2 major causes : conditioning treatment and chronic graft-versus-host disease (GVHD). Lung toxicity was found to be a common cause of morbidity and mortality after SCT. Many children developed endocrinological dysfunctions including growth hormone and thyroid hormone deficiencies. Infertility was observed in 98—99% of patients with SCT, because gonadal damage frequently occurs after conventional SCT for cancer. Secondary immunodeficiency was found to be persistent in all children with SCT ; therefore, post-transplantation reimmunization is indispensable (this recommendation has been presented). The cumulative probability of secondary solid tumors was estimated to be 11% at 15 years after SCT.

These results confirm the requirement of long-term follow-up of children with SCT. I have also explained the screening and preventive practices for long-term survivors after SCT that were recommended by the European Group for Blood and Marrow Transplantation, Center for International Blood and Marrow Transplant Research, and the American Society for Blood and Marrow Transplantation.

## 小児急性リンパ性白血病における Ig/TCR 遺伝子再構成を 利用した PCR による MRD 定量

堀 壽成<sup>1</sup>, 山田 朋美<sup>1</sup>, 山路 和孝<sup>1</sup>, 北川 好郎<sup>1</sup>,  
鶴澤 正仁<sup>1</sup>, 横田 昇平<sup>2</sup>

<sup>1</sup> 愛知医科大学医学部小児科, <sup>2</sup> 京都府立医科大学消化器・血液内科

### PCR Based MRD Quantification with Ig/TCR Gene Rearrangements on Childhood ALL

Toshinori HORI,<sup>1</sup> Tomomi YAMADA,<sup>1</sup> Kazutaka YAMAJI,<sup>1</sup> Yoshiro KITAGAWA,<sup>1</sup>  
Masahito TSURUSAWA<sup>1</sup> and Shouhei YOKOTA<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Department of Pediatrics, Aichi Medical School of Medicine

<sup>2</sup> Department of Hematology, Kyoto Prefectural University of Medicine

**Abstract** Polymerase chain reaction (PCR)-based minimal residual disease (MRD) quantification on childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL) is performed with immunoglobulin (Ig)/T-cell receptor (TCR) gene rearrangements by amplification of the clone-specific sequences of the junctional regions of the monoclonal rearrangements. This method has been developed and standardized in Europe, and become essential to large-sized multicenter clinical trials. As several studies have elucidated a strong correlation between the MRD levels at an early stage of therapy and clinical outcome on various cases, many trials have incorporated the stratification according to the amount of MRD. In Japan we have detected gene rearrangements of TCR $\gamma$ , TCR $\delta$ , Ig $\kappa$  and IgH with multiplex PCR and heteroduplex analysis and measured MRD levels by nested PCR in the Children's Cancer and Leukemia Study Group (CCLSG). Consequently we have conducted protocols with PCR-MRD-based stratification founded on the data from our retrospective study of MRD quantification. However our technique of detection of rearrangements and MRD quantification is not satisfactory, compared with the standard method of European countries. We are now trying to introduce these current methods such as real-time quantitative PCR (RQ-PCR) to achieve high enough quality to fulfill the global standard of PCR-based MRD quantification.

**要旨** 小児急性リンパ性白血病 (ALL) では、腫瘍細胞の免疫グロブリン (Ig) と T 細胞受容体 (TCR) 遺伝子がモノクローナルに再構成していることを利用し、その症例特異的な塩基配列を PCR 増幅することで MRD 定量が行われている。この手法はヨーロッパを中心に開発と標準化が進み、大規模な臨床研究には不可欠な存在となっている。数多くの研究成果から、小児 ALL のさまざまな症例で治療早期の MRD レベルが予後と強い相関を示すことが明らかとなり、症例の層別化の新たな因子として治療への介入が試みられてきた。わが国でも小児がん白血病研究グループ (CCLSG) において TCR $\gamma$ , TCR $\delta$ , Ig $\kappa$ , IgH 遺伝子再構成をターゲットに nested PCR による定量が行われ、治療層別化に応用されてきたが、その再構成の検出や定量法については、RQ-PCR などのヨーロッパの標準的な手法と比較して、まだ満足なものとはいえない。現在われわれは、海外と同一基準の MRD 定量の精度管理を目指し、新たな取り組みを行っている。

**Key words:** acute lymphoblastic leukemia, minimal residual disease, Ig/TCR gene rearrangement RQ-PCR

別刷請求先: 〒480-1195 愛知県愛知郡長久手町岩作  
雁又 21 愛知医科大学医学部小児科 堀 壽成  
Reprint requests to Toshinori Hori, Department of  
Pediatrics, Aichi Medical School of Medicine, 21,  
Karimata, Yazako, Nagakute-cho, Aichi-gun, Aichi, 480-  
1195 Japan

### I. はじめに

近年、小児、成人を問わず、急性白血病の治療において微小残存病変 (minimal residual disease: MRD) の概念は必要不可欠なものとなり、さまざまな臨床の場で利用されている。現在、小児急性リンパ性白血病 (ALL) の



長期生存率は約 85% に達している<sup>12)</sup> が、従来の予後予測因子による層別化で標準危険群に属する症例でさえ 10~20% の再発の可能性があり、このような予後不良症例を抽出する目的から MRD 定量の研究が進められた。この方法は従来の光顕的な手法では同定不能なレベルの、治療開始後も体内に残存する腫瘍細胞量をより客観的かつ正確に推定するために、flow cytometry<sup>1)</sup> と polymerase chain reaction (PCR) を用いて行われてきた。とくに PCR は  $10^4$  から  $10^6$  に 1 個の感度で MRD の検出が可能で、染色体異常に伴う融合遺伝子の増幅が安定した MRD ターゲットとして臨床応用されてきたが、小児 ALL においては適応症例に限られていたため汎用性に問題があった。一方、ALL に代表されるリンパ系腫瘍は、免疫グロブリン (immunoglobulin: Ig) および T 細胞受容体 (T-cell receptor: TCR) 遺伝子の再構成が進行する過程で単クローン性に自律増殖して腫瘍化し、この再構成は recombinase と terminal deoxynucleotidyl transferase の働きによりクローン特異的な塩基配列をもつことが知られている<sup>13)</sup>。PCR による MRD 定量はこの特異的配列を利用して 1990 年代から試みられ、寛解導入療法、強化療法終了時の MRD レベルと再発率との相関が報告され<sup>14)</sup>、その後も数々の検討が加えられている。わが国でもその試みはなされたもののいまだ十分とはいえず、今後は全国レベルの臨床試験に耐えうる世界基準での定量の精度が求められると考えられる。本稿では、PCR による MRD 定量の国内外の変遷と現況、および今後の取り組みについて述べる。

## II. 小児 ALL 治療と PCR による MRD 定量

Berlin-Frankfurt-Münster (BFM) グループの van Dongen らは、小児 ALL 240 例を対象とした prospective な解析で、治療開始後 5 週と 12 週の骨髄 MRD レベルがいずれも陽性、陰性の 2 群間で 3 年再発率がそれぞれ 75%、2% と、有意に予後との相関がみられたと報告した<sup>15)</sup>。また、day15 における骨髄 MRD レベルの定量で、5 年生存率が  $10^{-3}$  以上で 65% であったのに対し、 $10^{-4}$  未満では 100% と、治療後早期の MRD と予後との相関も明らかとなった<sup>16)</sup>。さらに Willemse らは T-ALL 症例について解析し、precursor-B-ALL と比較して MRD レベルの減衰が遅いことから、T-ALL では MRD レベルがより強力な予後因子であることを報告している<sup>17)</sup>。以上のような PCR による MRD のデータの集積の結果、近年では ALL 治療研究において MRD による治療層別化が導入されている。Dana-Farber Cancer Institute (DFCI) からの報告では、DFCI ALL Consortium Protocol 95-01

の prospective な解析から、小児 precursor-B-ALL の 5 年再発率は寛解導入終了時の骨髄 MRD が  $10^{-3}$  未満の群で 12%、 $10^{-3}$  以上の群で 72% と有意差を認め、この  $10^{-3}$  が予後予測に最適な cut-off レベルであると述べられており<sup>18)</sup>、これをもとに  $10^{-3}$  以上の群の治療が強化された。また International-BFM-Study Group (I-BFM-SG) でも Associazione Italiana di Ematologia ed Oncologia Pediatrica (AIEOP)-BFM ALL 2000 において、治療開始後 5 週と 12 週の骨髄 MRD がともに陽性の症例を高危険群として治療を強化しているが、この根拠となったのは、I-BFM-SG MRD study 91 における標準危険群 (ともに  $10^{-4}$  未満)、高危険群 (ともに  $10^{-3}$  以上)、中間危険群 (その他) の 10 年 event free survival (EFS) がそれぞれ 0.93、0.16、0.74 というデータである<sup>19)</sup> (Fig. 1)。わが国でも CCLSG では、ALL2000MRD、ALL2004 の各治療研究で 12 週目の MRD レベルが  $10^{-3}$  以上の症例に対して、それ以降の治療を 1 ランク上の危険群の治療へ変更する形で治療強化を行っている<sup>14)</sup>。

以上のように、初発 ALL における PCR による MRD に関してさまざまな知見が得られている一方、再発 ALL や難治例に対する造血幹細胞移植 (SCT) 関連の報告も散見される。再発 ALL については、Ekert らが BFM グループの ALL-REZ BFM 90、95、96 研究における S2 群に関して、day36 の MRD 陰性例 16 例の 6 年 EFS が 0.86 であるのに対して、MRD 陽性例 10 例は 0 であったと報告しており、MRD 定量によって確認でき

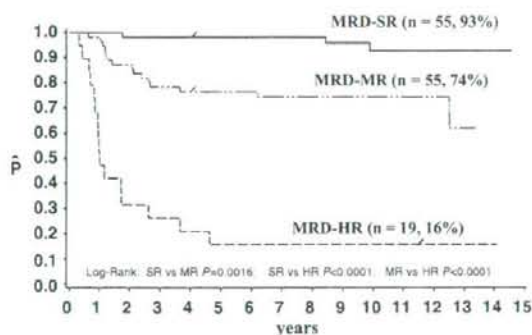


Fig. 1 10 years EFS of the I-BFM MRD study 91 (Flohr T, et al<sup>19)</sup>)

Patients in the standard risk group (MRD-SR) have MRD negativity at both time points 1 (5 weeks after the diagnosis) and 2 (12 weeks after the diagnosis). Patients in the high risk group (MRD-HR) have MRD levels  $\geq 10^{-3}$  at both time points. The remaining patients form the intermediate risk group (MRD-MR).

る早期の治療反応性が長期予後の予測因子であると述べている<sup>13)</sup>。また SCT については、BFM グループから難治性および再発 ALL に対する同種造血幹細胞移植前の骨髄 MRD レベルと予後との相関についての報告がなされている。Bader らの報告によると、MRD 陽性群、MRD 陰性群の 5 年 EFS がそれぞれ 0.32, 0.78<sup>14)</sup>、Sramkova らの報告によると、 $10^{-4}$  以上で MRD 陽性の症例 8 例は全例死亡であり、それに対して MRD 陰性の 17 例は、1 例の合併症死以外全例が無病生存で、いずれの報告も有意に移植前 MRD が強力な予後因子であることを証明している<sup>15)</sup>。

### III. わが国における PCR による MRD 定量

わが国の MRD 定量は、1990 年より横田らを中心に Children's Cancer and Leukemia Study Group (CCLSG) の参加施設にて開始され、Okamoto らが ALL911 研究における retrospective な解析で、治療開始後 12 週の骨髄 MRD レベルが  $10^{-4}$  以上の症例は有意に予後不良であったと報告しており、BFM をはじめとする海外の報告と同様の結果を示した<sup>16)</sup>。この結果を踏まえて、前述の如く 2000MRD 研究で prospective に検討が行われ、現行の 2004 研究へと続いている。その方法は multiplex PCR<sup>17)</sup> と heteroduplex analysis<sup>18)</sup> による Ig/TCR 遺伝子再構成の検出と、nested PCR<sup>19)</sup> による MRD 定量を基本としており、多施設共同研究による 2 週間での迅速定量に基づく上記のプロトコールの実施を可能とした<sup>20)</sup>。

### 1. Heteroduplex analysis による Ig/TCR 遺伝子再構成検出

初診時の患者骨髄液あるいは骨髄スミアより DNA を抽出し<sup>21)</sup>、TCR $\delta$ ,  $\gamma$  についてそれぞれ 6 種類、Ig $\kappa$  では 5 種類の再構成スクリーニングを（再構成検出不能の場合、後で IgH の再構成 6 種類を追加して）multiplex PCR にて行う<sup>18)</sup> (Fig. 2)。さらにこの PCR 産物について、ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (polyacrylamide gel electrophoresis: PAGE) にてクローン性の有無を判別し、得られた再構成バンドについて、その切断点周辺の遺伝子配列を解析して、症例特異的な配列を含む allele specific oligonucleotide (ASO) プライマーを設計、作成する (Fig. 3)。なお、multiplex PCR と heteroduplex analysis は standardized BIOMED-2 protocol<sup>22)</sup> に基づいて行われる。

### 2. Nested PCR による MRD 定量

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 (初診時 DNA の正常コントロール DNA による  $10^{-2}$  から  $10^{-5}$  までの希釈系列) とともにまったく同じ条件で PCR 増幅する。ここでは nested PCR を用い、これは外側の既存のプライマーセットおよび内側の germline プライマーと ASO プライマーでの 2 段階の PCR を行う方法である。陰性対象である buffy coat DNA でバンドがみられるまで増幅を行い、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し、検体のバンドと希釈系列の

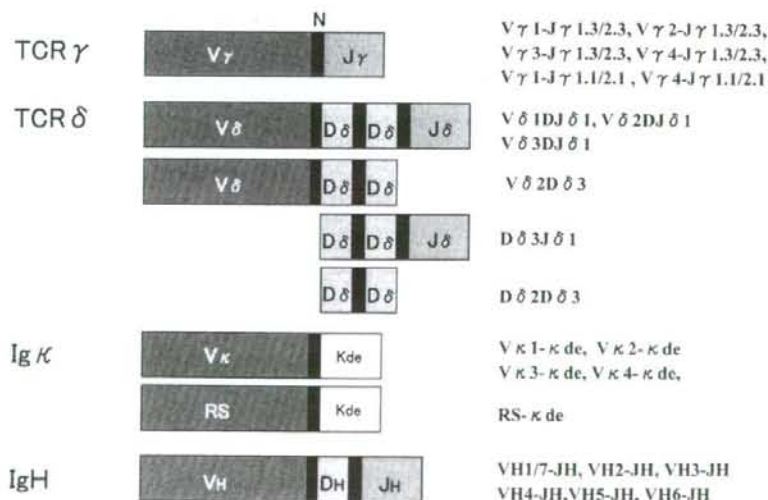


Fig. 2 Ig/TCR gene rearrangements detected in CCLSG  
N: nucleotides, kde:  $\kappa$  deleting element, RS: recombination signal sequence.



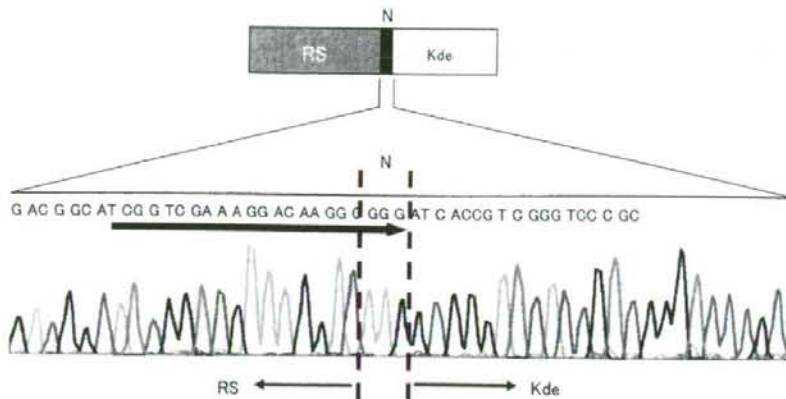


Fig. 3 Design of the allele specific oligonucleotide (ASO) primer of an example case with Ig  $\kappa$  gene rearrangement

The clone-specific sequence at the junctional region of the gene rearrangement is analyzed after detection of the monoclonal rearrangement by heteroduplex analysis. We found deletion of 3 nucleotides on RS and 3 nucleotides on kde, and insertion of 3 nucleotides between them. The ASO primer is designed on the position indicated by broad arrow.

信号強度を比較して MRD 量を測定する (Fig. 4).

#### IV. 海外における PCR による MRD 定量

BFM グループは 1993 年より、ヨーロッパの共同研究である BIOMED-1 Concerted Action にて、PCR による MRD 定量の国際的な標準化に取り組み、TCR $\delta$ 、TCR $\gamma$ 、Ig $\kappa$  および TAL-1 deletion の再構成増幅に必要な計 54 のプライマーと、1 症例あたり 25 のスクリーニング用 multiplex PCR のプロトコルが設定され、single あるいは nested PCR の後に放射性ラベリングした症例特異的 junctional region probe を用いた dot blot hybridization によって MRD のモニタリングを行う手法が開発された<sup>11)</sup>。これに続いて 1998 年から始まった BIOMED-2 Concerted Action では、PCR によるリンパ性腫瘍疾患のクロナリティ診断が体系化され、TCR $\delta$ 、TCR $\gamma$ 、Ig $\kappa$  に加えて IgH、Ig $\lambda$ 、TCR $\beta$  遺伝子の再構成がターゲットとなった。それに伴い、新たに増設されたプライマーでの効率的な multiplex PCR のシステムと反応条件および heteroduplex analysis の方法が標準化された<sup>12)</sup>。

一方定量法も、AIEOP-BFM ALL 2000 プロトコルにおける多施設共同の MRD 研究の遂行のため、参加施設間で格差のないデータ収集を目的として、I-BFM-SG の MRD 専門委員会においてその標準化が検討された。その結果、同委員会で real-time quantitative PCR (RQ-PCR) の開発が進められ、その再現性の確認と半定量法である、従来の dot blot hybridization とのデータの比較が行われた後<sup>13)</sup>、全面的に RQ-PCR へ移行が進められた。

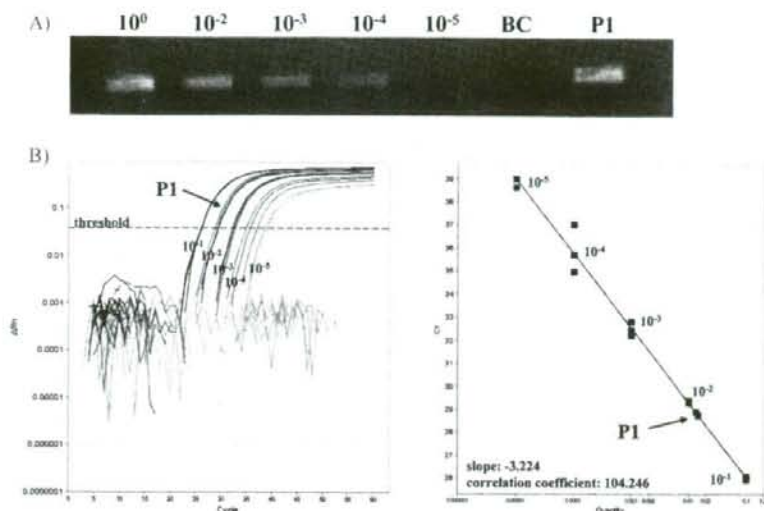
こうして施行された同プロトコルでは、再構成クローンの変化による MRD 定量の偽陰性を防ぐ目的で、原則として少なくとも 2 つの  $10^{-4}$  以下の感度をもつ再構成ターゲットが必要とされ、 $10^{-3}$  を cut-off として day33 と day78 の MRD レベルによってリスクグループの層別化を行っているが、最終的にこの層別化が可能であった症例は全体の 78%、1 つも再構成ターゲットが検出できなかった症例は 3%、逆に 2 個以上のターゲットが検出できた症例は 92%、検出できても感度が  $10^{-4}$  に達しなかった症例は 6%と報告されている<sup>11)</sup>。BFM グループの RQ-PCR については、2002 年に European Study Group on MRD detection in ALL (ESG-MRD-ALL) が設立され、定期的な精度管理、新たな技術の開発と評価およびデータ解釈のガイドライン作成にあたり、現在ヨーロッパをはじめとする国々の計 30 の研究施設が参加している<sup>14)</sup>。

また DFCI でも RQ-PCR による MRD 定量が行われ、TCR $\delta$ 、TCR $\gamma$ 、IgH 遺伝子再構成を対象としている。その再構成の検出条件は、 $10^{-3}$  以下の感度のものが 1 つ以上で、解析の結果、解析可能症例は全体の 65%、検出不能例が 13%、感度不足による除外例が 5%であったと報告されている<sup>15)</sup>。

#### V. わが国における新たな取り組み

##### 1. 遺伝子再構成スクリーニングの改良

AIEOP-BFM ALL2000 において、各 Ig/TCR 遺伝子再構成の検出頻度は、IgH、Ig $\kappa$ 、TCR $\gamma$ 、TCR $\delta$  の順に



**Fig. 4** Comparison of the data between nested PCR and RQ-PCR on a MRD-positive case in CCLSG  
 A: nested PCR. The bone marrow DNA sampled at diagnosis ( $10^0$ ) with the serially (with 10-fold dilution step,  $-10^{-2}$ - $10^{-5}$ ) diluted leukemic DNA of  $10^0$  in the BC (buffy coat) and the bone marrow DNA of the target sample (P1) were amplified with BC as a normal DNA control. We measured the MRD level of P1 as  $\geq 10^{-2}$  at the sensitivity of  $10^{-4}$ . B: RQ-PCR. The amplification plot of this assay is shown on the left and the standard curve on the right. These were analyzed by the Applied Biosystems StepOnePlus™ real time PCR system and the threshold of the amplification plot was 0.038613. The serial dilutions ranged from  $10^{-1}$  to  $10^{-5}$  and BC were tested in triplicate (BC was not amplified in all replicates). The data of the target sample (P1) are indicated by arrows on each figure. The quantitative range and the sensitivity of this assay were defined as  $10^{-3}$  and  $10^{-5}$  respectively, and the degree of the slope and correlation coefficient were in the acceptable range according to the guideline of ESG-MRD-ALL<sup>24</sup>. The MRD level of P1 was quantified as  $1.4 \times 10^{-2}$ , which was concordant with the result of nested PCR.

2,854例の precursor-B-ALL でそれぞれ 83%, 43%, 53%, 46%, 422例の T-ALL で 12%, 0%, 84%, 49%であった<sup>11)</sup>. このように、従来より ALL のタイプによって再構成の検出に差があることが示され<sup>25)</sup>, BFM グループ

ではそれぞれ別メニューでスクリーニングを効率的に行っている (Table 1). とくに precursor-B-ALL での IgH, T-ALL での TCR $\gamma$  は 90%以上の検出率を認めた報告もあり<sup>2,26)</sup>, われわれも表面形質に応じてこれらを優先的に

**Table 1** Ig/TCR gene rearrangements of precursor-B-ALL and T-ALL detected in Erasmus Medical Center in BFM group (courtesy of Prof. JJM van Dongen)

	Precursor-B-ALL		T-ALL	
TCR $\gamma$	V $\gamma$ 1-J $\gamma$ 1.1/2.1	V $\gamma$ 1-J $\gamma$ 1.3/2.3	V $\gamma$ 1-J $\gamma$ 1.1/2.1	V $\gamma$ 1-J $\gamma$ 1.3/2.3
	V $\gamma$ 2-J $\gamma$ 1.1/2.1	V $\gamma$ 2-J $\gamma$ 1.3/2.3	V $\gamma$ 2-J $\gamma$ 1.3/2.3	V $\gamma$ 3-J $\gamma$ 1.3/2.3
	V $\gamma$ 4-J $\gamma$ 1.1/2.1	V $\gamma$ 4-J $\gamma$ 1.3/2.3	V $\gamma$ 4-J $\gamma$ 1.3/2.3	
TCR $\delta$	V $\delta$ 2-D $\delta$ 3		V $\delta$ 1-DJ $\delta$ 1	V $\delta$ 2-D $\delta$ 3
	D $\delta$ 2-D $\delta$ 3		V $\delta$ 2-DJ $\delta$ 1	V $\delta$ 3-DJ $\delta$ 1
			D $\delta$ 2-D $\delta$ 3	D $\delta$ 2-J $\delta$ 1
TCR $\beta$	V $\beta$ -J $\beta$		V $\beta$ -J $\beta$	
	D $\beta$ -J $\beta$		D $\beta$ -J $\beta$	
Ig $\kappa$	V $\kappa$ 1- $\kappa$ de	V $\kappa$ 2- $\kappa$ de		
	V $\kappa$ 3- $\kappa$ de	V $\kappa$ 4- $\kappa$ de		
	RS- $\kappa$ de			
IgH	VH1~7-J		DH1~7-JH	
	DH1~7-JH			



増幅できるよう multiplex PCR のチューブの組み合わせを変更した。これに加えて、さらなる再構成ターゲットの検出率向上を目指して TCR $\beta$  遺伝子再構成のスクリーニングの導入を準備している。TCR $\beta$  の構造は他の遺伝子に比べて複雑で、PCR 増幅も困難であったが、BIOMED-2 Concerted Action にて V $\beta$  23 種、D $\beta$  2 種、J $\beta$  13 種のプライマーが設定され、3本のチューブで multiplex PCR を行うシステムが開発された<sup>20)</sup>。TCR $\beta$  は precursor-B-ALL で 35%、T-ALL で 92% の検出率が報告されており<sup>21,22)</sup>、とくに T-ALL の再構成検出不能症例に対して期待もたれる。

## 2. RQ-PCR による定量法の導入

近年の技術開発と機器の普及により、Ig/TCR 遺伝子再構成を用いた MRD 定量の世界基準は半定量から RQ-PCR へと移行した。RQ-PCR は迅速性と定量性にすぐれ、段階希釈した既知量の DNA が一定の増幅産物量になるサイクル数から検量線を作成し、未知濃度のサンプルの増加曲線を検量線と比較することで、目的の DNA 量を測定する方法である。BFM グループを中心に行われている RQ-PCR は TaqMan プローブ法に基づき、5'末端を蛍光物質で、3'末端をクエンチャー物質で修飾した oligonucleotide (TaqMan プローブ) を用いる。この TaqMan プローブはアニーリングステップで鋳型 DNA に特異的にハイブリダイズし、クエンチャー物質の働きで蛍光の発生が抑制されているが、伸長反応ステップでのプロローブの分解に伴ってその抑制が解除されて蛍光が発せられ、これをカウントすることで DNA のコピー数を定量している<sup>23)</sup>。今後国内で ALL 関連の治療プロトコルに対する PCR-MRD 定量の導入が必要となった場合、その評価を確実なものとするためにも RQ-PCR への移行は不可欠である。現在われわれは前述の ESG-MRD-ALL のガイドライン<sup>24)</sup>に基づいて、従来法で定量済みの検体を解析するとともに、前方視的にも両法を併行して行いながら、双方のデータの整合性と再現性を確認している (Fig. 4)。同ガイドラインは experimental set up, quantitative range と sensitivity の定義、フォローアップ検体における MRD 陽性と陰性の定義、フォローアップ検体における MRD 定量が詳細に記載されており、多施設間におけるデータの解釈の統一を図っている。今後解析症例を蓄積し、諸外国と同一基準での MRD 定量の体制の確立が急務と考えられる。

## 引用文献

1) Shrappe M, Reiter A, Ludwig WD, et al: Improved outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia despite

reduced use of anthracycline and cranial radiotherapy: Results of trial ALL-BFM 90. *Blood* **95**: 3310-3322, 2000

- 2) Pui CH, Sandlund JT, Pei D, et al: Improved outcome for children with acute lymphoblastic leukemia: Results of Total Therapy Study XIII B at St. Jude Children's Research Hospital. *Blood* **104**: 2690-2696, 2004
- 3) Janossy G, Bollum FJ, Bradstock KF, et al: Terminal transferase-positive human bone marrow cells exhibit the antigenic phenotype of common acute lymphoblastic leukemia. *J Immunol* **123**: 1525-1529, 1979
- 4) van Dongen JJ, Wolvers-Tettero IL: Analysis of immunoglobulin and T-cell receptor genes. Part I: Basic and technical aspects. *Clin Chim Acta* **198**: 1-91, 1991
- 5) Cave H, Guidal C, Rohrlach P, et al: Prospective monitoring and quantitation of residual blasts in childhood acute lymphoblastic leukemia by polymerase chain reaction study of delta and gamma T-cell receptor genes. *Blood* **83**: 1892-1902, 1994
- 6) Brisco MJ, Condon J, Hughes E, et al: Outcome prediction in childhood acute lymphoblastic leukemia by molecular quantification of residual disease at the end of induction. *Lancet* **343**: 196-200, 1994
- 7) van Dongen JJ, Seriu T, Panzer-Grumayer ER, et al: Prognostic value of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia in childhood. *Lancet* **352**: 1731-1738, 1998
- 8) Panzer-Grumayer ER, Schneider M, Panzer S, et al: Rapid molecular response during early induction chemotherapy predicts a good outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* **95**: 790-794, 2000
- 9) Willems MJ, Seriu T, Hettlinger K, et al: Detection of minimal residual disease identifies differences in treatment response between T-ALL and precursor-B-ALL. *Blood* **99**: 4386-4393, 2002
- 10) Zhou J, Goldwasser MA, Li A, et al: Quantitative analysis of minimal residual disease predicts relapse in children with B-lineage acute lymphoblastic leukemia in DFCI ALL consortium protocol 95-01. *Blood* **110**: 1607-1611, 2007
- 11) Flohr T, Schrauder A, Cazzaniga G, et al: Minimal residual disease-directed risk stratification using real-time quantitative PCR analysis of immunoglobulin and T-cell receptor gene rearrangements in the international multicenter trial AIEOP-BFM ALL 2000 for childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* **22**: 771-782, 2008
- 12) 横田昇平, 岡本朋美, 鶴澤正仁: 急性白血病における微小残存病変診断とその臨床応用. *日小血会誌* **20**: 71-83, 2006
- 13) Ekert C, Biondi A, Seeger K, et al: Prognostic value of minimal residual disease in relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia. *Lancet* **358**: 1239-1241, 2001
- 14) Bader P, Hancock J, Kreyenberg H, et al: Minimal residual disease (MRD) status prior to allogeneic stem cell



- transplantation is a powerful predictor for post-transplant outcome in children with ALL. *Leukemia* **16**: 1668-1672, 2002
- 15) Sramkova L, Muzikova K, Fronkova E, et al: Detectable minimal residual disease before allogeneic hematopoietic stem cell transplantation predicts extremely poor prognosis in children with acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Blood Cancer* **48**: 93-100, 2007
  - 16) Okamoto T, Yokota S, Katano N, et al: Minimal residual disease in early phase of chemotherapy reflects poor outcome in children with acute lymphoblastic leukemia: A retrospective study by the Children's Cancer and Leukemia Study Group in Japan. *Leuk Lymphoma* **43**: 1001-1006, 2002
  - 17) Pongers-Willems MJ, Seriu T, Stolz F, 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 deletion as PCR targets: Report of the BIOMED-1 CONCERTED ACTION: Investigation of minimal residual disease in acute leukemia. *Leukemia* **13**: 110-118, 1999
  - 18) Langerak AW, Szczepanski T, Ban der Burg M, et al: Heteroduplex PCR analysis of rearranged T cell receptor genes for clonality assessment in suspect T cell proliferations. *Leukemia* **11**: 2192-2199, 1997
  - 19) Seriu T, Yokota S, Nakao M, 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**: 615-623, 1995
  - 20) 北川好郎: 分子生物学的手法を用いた小児急性リンパ性白血病の微小残存病変 (MRD) 量迅速測定法の治療への応用. *愛知医科大学医学雑誌* **34**: 71-80, 2006
  - 21) Yokota S, Hansen-Hagge TE, Ludwig WD, et al: Use of polymerase chain reactions to monitor minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia patients. *Blood* **77**: 331-339, 1991
  - 22) van Dongen JJ, Langerak AW, Bruggemann M, et al: Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinants in suspect lymphoproliferations: Report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia* **17**: 2257-2317, 2003
  - 23) van der Velden VH, Panzer-Grumayer ER, Cazzaniga G, et al: Optimization of PCR based minimal residual disease diagnostics for childhood acute lymphoblastic leukemia in a multi-center setting. *Leukemia* **21**: 706-713, 2007
  - 24) van der Velden VH, Cazzaniga G, Schrauder A, et al: Analysis of minimal residual disease by Ig/TCR gene rearrangements: Guideline for interpretation of real-time quantitative PCR data. *Leukemia* **21**: 604-611, 2007
  - 25) Szczepanski T, Flohr T, van der Velden VH, et al: Molecular monitoring of residual disease using antigen receptor genes in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Best Pract Res Clin Haematol* **15**: 37-57, 2002
  - 26) van der Velden VH, Szczepanski T, Wijkhuijs JM, et al: Age-related patterns of immunoglobulin and T-cell receptor gene rearrangements in precursor-B-ALL: Implications for detection of minimal residual disease. *Leukemia* **17**: 1834-1844, 2003
  - 27) van der Velden VH, Bruggemann M, Hoogeveen PG, et al: TCRB gene rearrangements in childhood and adult precursor-B-ALL: Frequency, applicability, as MRD-PCR target, and stability between diagnosis and relapse. *Leukemia* **18**: 1971-1980, 2004
  - 28) Bruggemann M, van der Velden VH, Raff T, et al: Rearranged T-cell receptor beta genes represent powerful targets for quantification of minimal residual disease in childhood and adult T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* **18**: 709-719, 2004
  - 29) Heid CA, Stevens J, Livak KJ, et al: Real-time quantitative PCR. *Genome Res* **6**: 986-994, 1996

# 小児白血病におけるフローサイトメトリーを用いた 微小残存病変の解析

出口 隆 生

三重大学大学院医学系研究科病態解明医学講座小児発達医学分野

Minimal Residual Disease Analyzed by Flow Cytometry

Takao DEGUCHI

Department of Pediatric and Developmental Science, Institute of Molecular and Experimental Medicine,  
Mie University Graduate School of Medicine

**Abstract** Minimal residual disease (MRD) during chemotherapy has been applied to evaluate the response to the treatment, which is one of the most powerful predictors of relapse. In many strategies of MRD measurements, immunological MRD by flow cytometry is a very practical and widely applicable tool for monitoring MRD in patients with childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL). This method is based on the identification of immunophenotypes expressed on only leukemic cells and not on normal hematopoietic cells in bone marrow or peripheral blood. It has already been reported that this method can identify 0.01% of leukemic cells, and is applicable to more than 90% of patients with childhood ALL. Because of a strong correlation between flow cytometric measurements of MRD during clinical remission and treatment outcome, recent treatment protocols in the United States or European countries have already applied MRD to choose the intensity of treatment protocols.

Nevertheless, clinical application of MRD is still limited in the treatment protocols of childhood ALL in Japan. It is unquestionable we have to choose appropriate treatments proportional to the individual risk of relapse, which is provided by the measurements of MRD, immediately in Japan.

**要 旨** 微小残存病変 (MRD) は、もっとも強力な予後因子の1つであり、治療反応性を評価するために利用されている。多くのMRD測定法の中で、フローサイトメトリーを用いた免疫学的MRDは、非常に簡便で、小児急性リンパ性白血病 (ALL) 患者では広くモニタリングに使用されている。この方法は、白血病細胞表面上にのみ存在する免疫学的表現型を同定することで、0.01%の感度をもち、90%以上の小児ALL患者に適用可能である。MRDの値と臨床予後の間には、強力な関係が存在することがすでに報告されており、欧米における多くの小児ALL治療プロトコールでは治療強度の決定に、この免疫学的MRDを実際に用いている。しかしながら、わが国におけるMRDの臨床応用はまだまだ限定的で、適切な治療強度の選択・治療の個別化のためには、わが国でも速やかにMRDの測定によるリスク分類が開始される必要があると考えられる。

*Key words:* minimal residual disease, flow cytometry, acute lymphoblastic leukemia

## I. はじめに

近年の小児白血病治療成績の向上にもっとも貢献した

別刷請求先: 〒514-8507 津市江戸橋2-174 三重大学医学部小児科 出口隆生

Reprint requests to Takao Deguchi, Department of Pediatric and Developmental Science, Institute of Molecular and Experimental Medicine, Mie University Graduate School of Medicine, 2-174, Edobashi, Tsu, 514-8507 Japan

要因は、予後因子抽出によるリスク分類と、再発リスクに応じた治療強度を選択する層別化である<sup>1)</sup>。すでに多くの臨床試験で年齢、診断時白血球数、免疫学的表現型、細胞遺伝学的性質などの臨床的、生物学的予後因子が明らかとなっている。これらの因子を組み合わせ、予後良好群にはより軽い治療を用いて晩期障害軽減を図り、予後不良群には強力な治療で予後の改善を図っている。しかし、これら治療開始前の因子のみでは予後予測は不十分であり、臨床的にもっとも強力な予後因子の1つである



「治療そのものへの反応性」も利用されてきている。実際、治療開始わずか1週間の末梢血中の芽球数<sup>21)</sup>や骨髓所見<sup>24)</sup>でさえも非常に強力な予後因子であり、すでに多くの臨床試験において治療選択に応用されている。

一般的に、小児急性リンパ性白血病(ALL)の発症時には $10^3$ 程度の白血病細胞が存在し、治療の進行に従って急速に、あるいはゆっくりと白血病細胞が減少する。結果的にはほとんどの症例では寛解に入るが、形態学的診断法ではせいぜい骨髓有核細胞の1%程度の白血病細胞しか識別できないため、形態学的寛解に至った時点でもまだ $10^6$ 程度の白血病細胞が体内に残存する。現在、種々の検査法で $10^4 \sim 10^5$ に1つの白血病細胞の存在を示すことが可能であるが、それらの手法で寛解と判断されてもなお $10^6$ 程度の白血病細胞が残存している可能性がある。この形態学的寛解と、免疫学的あるいは分子生物学的寛解との間が微小残存病変(minimal residual disease: MRD)である。再発時には、このMRDが消失する前に、あるいはいったん消失した後に再び検出されて再発に至ると考えられる<sup>25)</sup>。

MRD測定はすでに臨床応用が始まっており、BFMグループ<sup>26)</sup>やSt. Jude小児病院<sup>27,28)</sup>、わが国における小児白血病研究グループ(CCLSG)などの小児白血病治療研究では、MRD測定結果を患者の治療層別化に用いている。MRD検出は治療早期での介入以外にも、地固め療法・維持療法中のモニタリングでは再発予知に役立つ可能性があり、治療強化や早期の造血細胞移植への移行の助けとなりうる。あるいは自家造血幹細胞移植の際に、採取細胞中への腫瘍細胞混入の検出にも利用できる。この章ではフローサイトメトリー(FCM)によるMRDを中心に解説し、わが国における臨床試験での臨床応用について考察する。

## II. MRDの検出方法

MRD検出方法は大きく分けて、分子生物学的、免疫学的の2つがある。おもに前者はPCR法<sup>29)</sup>で、後者はFCMで検出される<sup>30,31)</sup>。PCR法では、T細胞受容体/免疫グロブリン遺伝子(TCR/Ig)再構成バンド検出のように、DNAそのものをターゲットにする場合と、融合遺伝子によるキメラ遺伝子mRNAをターゲットにする場合がある<sup>32)</sup>。近年では、real-time PCR法による定量的評価が広く応用されてきている<sup>33)</sup>。

転座遺伝子転写産物を用いたMRD検出は、感度が非常に高いこと、スプライシング後のmRNAがターゲットであるため1つのプライマーセットでほとんどの患者に対応可能であること、比較的速やかに結果を出せるこ

とが利点である。反面、転写産物量は細胞の状態で種々の値となるため、実際の細胞数とコピー数の間には必ずしも一定の相関はない。そのためMRDの定量性では不利であり、またmRNAを用いるため、検体提出や処理の際に変性のリスクが必ず存在し、偽陰性となる可能性を否定できない<sup>34)</sup>。

TCR/Ig再構成による方法は、検出感度が高く、ゲノムを直接測定することで細胞数とコピー数は常に一定の関係が存在するため、残存腫瘍細胞数と測定結果が相関する。しかし治療で細胞死をきたしても、DNAが完全に断片化しないと再構成遺伝子が検出される可能性があり、治療中、とりわけCCGでのday7や日本小児白血病研究会(JACLS)でのday15骨髓といった寛解導入相早期に採取されるサンプルの解析では、定量性に問題が生じる可能性がある。また複数の再構成バンドを示すオリゴクローナルな白血病が少なからず存在し、再構成バンドのフォロー数が少ないと、再発時にフォローされていないクローンが増殖して偽陰性となる。ほかにもTCR/Igは多型性に富んでおり、初発時のMRDフォロー項目決定にはいくつかのプライマーセットが必要となり、検査手法が改善されつつあるとはいえ、コスト・時間の面ではやはり若干不利である<sup>35)</sup>。

分子生物学的的手法と比べ、FCMを用いた免疫学的MRD検出法は、検査結果を得るまでの時間が短いこと、正確な定量性、治療途中のサンプルでもFSC/SSC Scatterゲートによって死細胞の除外が容易であることが利点である。すなわち寛解導入療法中の骨髓残存病変の評価にはTCR/IgよりFCM法が適しており、リアル解析によって腫瘍減少カーブを知ることでも可能で、治療のごく早期における層別化応用も可能となる<sup>36)</sup>。1検体当たりの費用も分子生物学的的手法に比べると比較的安価である。反面、免疫学的な表面形質が治療中や再発時に変化すると(immunophenotypic shift)検出率が低下する<sup>37)</sup>。また、相対的解析であるがゆえに高い検出感度を維持するためには、機器のメンテナンスや正常骨髓を用いたクオリティーチェックが重要となる。ほかにもMRD検出結果を得るための解析が複雑であることや、フローサイトメーターが同じ型式でも、機器そのものが異なれば、必ずしも同一のクオリティーですぐに結果を得られないことは不利な点である。

## III. FCMを用いたMRD検出の実際

免疫学的、すなわちFCMでのMRD検出には2つのステップが必要である。初発時検体で白血病細胞特有の発現パターンを見いだすことと、フォローアップ検体で





る。しかし B-lineage ALL では骨髄・末梢血間に相関は認められるものの、陽性率は骨髄が明らかに高く、MRD 陽性例の約 80% が骨髄のみで陽性であった。この違いは T-lineage と B-lineage ALL の生物学的特性の違いから生じると考えられ、T-lineage ALL の MRD は末梢血でもフォローアップが可能であるが、B-lineage ALL は骨髄で MRD を測定する必要がある<sup>19)</sup>。

正常 BCP は、ステロイドや化学療法剤へ強い感受性を有し、通常寛解導入療法中には白血球細胞と同様に、あるいはかえって速やかに骨髄中より消失する。そのため寛解導入療法中に regeneration をきたすことはないと考えられる。この性質を応用すれば、aberrant phenotype を有さない B-lineage ALL でも、4-color を用いずに CD19 と CD10 and/or CD34 のみの解析で簡便に寛解導入療法中の MRD を測定することが可能となる<sup>20)</sup>。

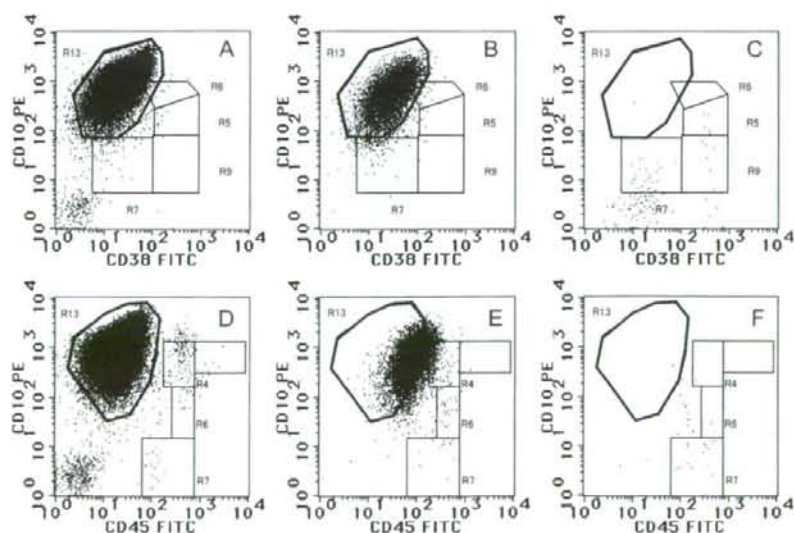
小児 ALL の再発例においても、FCM を用いた MRD についての報告はいまだに少ないものの、有用性が示されている<sup>21,22)</sup>。また、小児 ALL での FCM-MRD の臨床応用に比べ、急性骨髄性白血病 (AML) での利用はいまだに限定的で<sup>23,24)</sup>、報告も少ない。これは、AML では

染色体転座などの遺伝子異常の割合が高く、かつ臨床像とよく相関することに起因する。

#### IV. 三重大学における FCM を用いた MRD の検討

三重大学小児科は St. Jude 小児病院と協力し、平成 14 年以來 FCM による MRD のパイロットスタディーを行っている。おもに三重大学医学部附属病院小児科に入院し、同意が得られた症例について、初診時診断における余剰細胞数を用いて MRD 測定のための基礎的検討を行った。

まず検出感度の検討のため、正常骨髄単核球に MRD 測定可能な表面抗原発現と同様の形質を有する白血球細胞株を種々の割合に混入させ、白血球細胞株の検出限界を検討し、報告と同様に 0.01% の感度を得た。しかし、機器や送付された検体の状態によってはコンスタントにこの quality を維持できない可能性があり、実際にわれわれも研究室移転に伴ってフローサイトメーターのレーザー光軸が再調整され、機器の状態に変化が生じた結果、正常 B リンパ球前駆細胞ゲートから若干の逸脱が生じ、数例の正常骨髄検体を用いて修正する必要があった。と



**Fig. 1** Monitoring of MRD with anti-CD38 (upper panels) and anti-CD45 (lower panels) labeling. Bone marrow (BM) cells from a child with B-lineage ALL were studied at diagnosis (left panels), on the halfway (15th day, center panels), and at the end of remission-induction therapy (right panels). At the end of the therapy, the patient was in complete morphologic remission. Flow cytometric dot plots illustrate the expression of CD38 or 45, and CD10 on CD34+/CD19+ cells. In this patient, most CD19+ cells at diagnosis were CD34+, and indicated lower expression of CD38 (A) and CD45 (D). At the end of remission induction, CD19+CD34+CD10+CD38low (C) or CD19+CD34+CD10+CD45low (F) cells represented less than 0.01% of BM mononuclear cells, although these phenotypes were found in 32.5% (B) and 31.9% (E) of cells, indicative of MRD on the halfway of remission induction. It is of note that immunophenotypic modulation can be observed for CD45, but is not remarkable for CD38 in day 15 BM samples (B, E).



りわけ B-lineage ALL での MRD 測定は、T-lineage と異なって、完全な isotype control を設定しえない相対的な発現の高低を利用する測定のため、測定 quality 維持がとくに重要であると考えられる。現在もわれわれは St. Jude 小児病院と白血病細胞のみならず、正常骨髄の測定データをも送付して、定期的に quality control や測定結果について助言を得ている。

次に実際の検討結果を示す。Fig. 1 は B-lineage ALL で、day15, day33 の双方の MRD 測定を実施し、白血病細胞のクリアランスが不良であった症例を示す。この症例では白血病細胞はおもに CD19 陽性 CD10 陽性 CD34 陽性の分画に存在し、その多くが CD38 (上段) あるいは CD45 (下段) の発現が低く、左のドットプロットで太い枠に示すゲート内に腫瘍細胞が存在している。細い実線のゲートは正常 B リンパ球前駆細胞が存在する位置であるが、day33 (右側) のように regeneration 途中の骨髄では必ずしもその中のみ細胞は存在しない。ともに day15 (中央) には多くの腫瘍細胞が存在していたが、day33 には完全に消失し、ともに MRD 陰性と判断された。注目すべき点として、CD38 は治療中 (day15) 骨

髄でも抗原の発現性には変化がなかったが、CD45 は day15 骨髄での発現は初発時より若干高くなっており、治療に伴う immunophenotypic shift を認めている。このように、治療により発現性に变化が生じる抗原で解析を行う場合にはとくに注意が必要である。

次に T-lineage ALL で治療への反応が不良であった症例を示す。Fig. 2 上段左に示すように、白血病細胞は主として cCD3 陽性 CD19/33/HLA-DR 陰性で、CD5 と TdT は陽性 (上段中央) である。day33 のドットプロット右上の領域には若干のドットが存在する (下段右) が、これは非特異的の反応であり、アイソタイプコントロール検体と比較し補正されている。T-ALL は多くの症例で測定が簡便で、また早期再発が多いことからフローサイトメーターにおける MRD 測定は非常に有用である。継続的フォローを実施した症例の中には、治療継続中に MRD の出現を認めて再発が予知できた症例も存在した。反面、再発時に TdT が陰性となった症例も存在した。寛解導入療法終了後の MRD 継続的フォローの有用性及費用対効果は、今後さらに検討されるべき課題である。

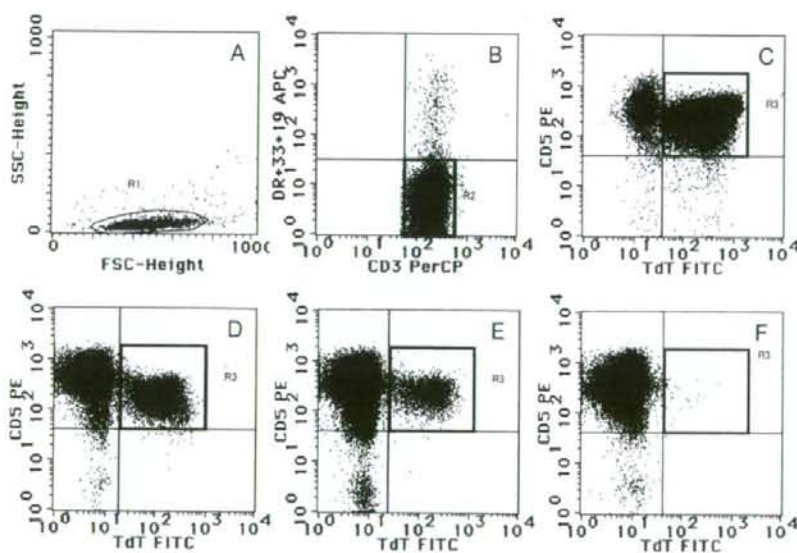


Fig. 2 Monitoring of MRD in the BM cells from a child with T-lineage ALL.

A-C: dot plots with BM cells at diagnosis. A: FSC/SSC scatter dot plot, B: dot plot with anti-CD3 and anti-HLA-DR/CD33/CD19 staining. C: dot plot with anti-TdT and anti-CD5 staining with the cells gated at the dot plot B. In this patient, most T-ALL cells at diagnosis were negative for HLA-DR but expressed cCD3 (B), TdT and CD5 (C). The results of MRD analysis were indicated with peripheral blood sample (10th day, D), BM cells (15th day, E), and at the end of remission-induction therapy (F). At the end of the therapy, the patient was in complete morphologic remission. Flow cytometric dot plots illustrate the expression of anti-TdT and CD5 on cCD3+, HLA-DR-/CD19-/CD33- cells. At the end of remission induction, T-ALL-phenotype cells represented less than 0.01% of BM mononuclear cells (F), although these phenotypes were found to be 8.14% (D) and 1.90% (E) of cells, indicative of MRD halfway through remission induction.



## V. おわりに

FCMによるMRD測定は、とりわけ米国で臨床応用が進んでいる。主たる要因はPCR法と比較しての費用対効果であろうが、米国での寛解導入相治療は一般的にBFMスタイルのプロトコールに比べて治療強度が弱く、MRD測定を用いた治療反応性の評価が容易であるという推測もできる。実際、JACLSプロトコールのday15骨髄で解析を行うと、有核細胞数がきわめて少なく、単核球による解析では解析抗原数に強い制限が生じてくる。JACLSのように強化された寛解導入療法でも、St. Jude小児病院と同様に患者予後を反映したMRD測定が可能か、さらなる検討が必要である。

また、MRDで患者を層別化した場合、MRDによるリスク分類は初発時リスク分類からすれば一種の「intent to treat」に相当し、単にMRD陰性群の臨床予後が良好でも、全体の治療成績改善には寄与していない可能性もある。臨床試験全体の成績、あるいは初発時リスク分類の成績が改善しているかなど、注意深い解析が必要となることを付言したい。

わが国の小児白血病共同治療研究でMRD測定を臨床応用するには、いまだ多くの面で問題が山積みである。とりわけ医療現場や臨床試験でのインフラや財政基盤の貧弱さは、この分野での医療の発展を大きく妨げており、小児ALL臨床研究でもっとも大きな割合を占めるB-precursor ALLでMRDによる層別化を用いようとするならば、TCR/IgHのPCR法のみならずFCMによるMRD研究でさえ、現時点ではその実行可能性に疑問符が付く。MRDを用いたエビデンスの証明と、JPLSGを母体とした全国レベルでの共同研究の発展が、わが国の小児白血病臨床研究のさらなるレベルアップを生み出していくよう期待する。

## 引用文献

- 1) Pui CH, Campana D, Evans WE: Childhood acute lymphoblastic leukaemia: Current status and future perspectives. *Lancet Oncol* 2: 597-607, 2001
- 2) Dordelmann M, Reiter A, Borkhardt A, et al: Prednisone response is the strongest predictor of treatment outcome in infant acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 94: 1209-1217, 1999
- 3) Gajjar A, Ribeiro R, Hancock ML, et al: Persistence of circulating blasts after 1 week of multiagent chemotherapy confers a poor prognosis in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 86: 1292-1295, 1995
- 4) Schrappe M, Arico M, Harbott J, et al: Philadelphia chromosome-positive (Ph<sup>+</sup>) childhood acute lymphoblastic leukemia: Good initial steroid response allows early prediction of a favorable treatment outcome. *Blood* 92: 2730-2741, 1998
- 5) Schrappe M, Reiter A, Ludwig WD, et al: Improved outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia despite reduced use of anthracyclines and cranial radiotherapy: Results of trial ALL-BFM 90. German-Austrian-Swiss ALL-BFM Study Group. *Blood* 95: 3310-3322, 2000
- 6) Lilleyman JS, Gibson BE, Stevens RF, et al: Clearance of marrow infiltration after 1 week of therapy for childhood lymphoblastic leukaemia: Clinical importance and the effect of daunorubicin. The Medical Research Council's Working Party on Childhood Leukaemia. *Br J Haematol* 97: 603-606, 1997
- 7) Campana D, Coustan-Smith E: Detection of minimal residual disease in acute leukemia by flow cytometry. *Cytometry* 38: 139-152, 1999
- 8) Campana D: Determination of minimal residual disease in leukaemia patients. *Br J Haematol* 121: 823-838, 2003
- 9) van Dongen JJ, Seriu T, Panzer-Grumayer ER, et al: Prognostic value of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukaemia in childhood. *Lancet* 352: 1731-1738, 1998
- 10) Flohr T, Schrauder A, Cazzaniga G, et al: Minimal residual disease-directed risk stratification using real-time quantitative PCR analysis of immunoglobulin and T-cell receptor gene rearrangements in the international multicenter trial AIEOP-BFM ALL 2000 for childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 22: 771-782, 2008
- 11) Biondi A, Valsecchi MG, Seriu T, et al: Molecular detection of minimal residual disease is a strong predictive factor of relapse in childhood B-lineage acute lymphoblastic leukemia with medium risk features. A case control study of the International BFM study group. *Leukemia* 14: 1939-1943, 2000
- 12) Coustan-Smith E, Sancho J, Behm FG, et al: Prognostic importance of measuring early clearance of leukemic cells by flow cytometry in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 100: 52-58, 2002
- 13) Coustan-Smith E, Sancho J, Hancock ML, et al: Use of peripheral blood instead of bone marrow to monitor residual disease in children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 100: 2399-2402, 2002
- 14) Pui CH, Campana D: New definition of remission in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 14: 783-785, 2000
- 15) Coustan-Smith E, Sancho J, Hancock ML, et al: Clinical importance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 96: 2691-2696, 2000
- 16) Dworzak MN, Froschl G, Printz D, et al: Prognostic significance and modalities of flow cytometric minimal residual disease detection in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 99: 1952-1958, 2002

- 17) Zuna J, Hrusak O, Kalinova M, et al: TEL/AML1 positivity in childhood ALL: Average or better prognosis? Czech Paediatric Haematology Working Group. *Leukemia* **13**: 22-24, 1999
- 18) Cazzaniga G, Lanciotti M, Rossi V, et al: Prospective molecular monitoring of BCR/ABL transcript in children with Ph<sup>+</sup> acute lymphoblastic leukaemia unravels differences in treatment response. *Br J Haematol* **119**: 445-453, 2002
- 19) Campana D, Coustan-Smith E: Advances in the immunological monitoring of childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol* **15**: 1-19, 2002
- 20) Gaipa G, Basso G, Maglia O, et al: Drug-induced immunophenotypic modulation in childhood ALL: Implications for minimal residual disease detection. *Leukemia* **19**: 49-56, 2005
- 21) Gaipa G, Basso G, Aliprandi S, et al: Prednisone induces immunophenotypic modulation of CD10 and CD34 in nonapoptotic B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia cells. *Cytometry B Clin Cytom* **74**: 150-155, 2008
- 22) Chen JS, Coustan-Smith E, Suzuki T, et al: Identification of novel markers for monitoring minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia. *Blood* **97**: 2115-2120, 2001
- 23) Dworzak MN, Froschl G, Printz D, et al: CD99 expression in T-lineage ALL: Implications for flow cytometric detection of minimal residual disease. *Leukemia* **18**: 703-708, 2004
- 24) Coustan-Smith E, Ribeiro RC, Stow P, et al: A simplified flow cytometric assay identifies children with acute lymphoblastic leukemia who have a superior clinical outcome. *Blood* **108**: 97-102, 2006
- 25) Coustan-Smith E, Gajjar A, Hijiya N, et al: Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia after first relapse. *Leukemia* **18**: 499-504, 2004
- 26) Langebrake C, Brinkmann I, Teigler-Schlegel A, et al: Immunophenotypic differences between diagnosis and relapse in childhood AML: Implications for MRD monitoring. *Cytometry B Clin Cytom* **63**: 1-9, 2005
- 27) Coustan-Smith E, Ribeiro RC, Rubnitz JE, et al: Clinical significance of residual disease during treatment in childhood acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol* **123**: 243-252, 2003
- 28) Langebrake C, Creutzig U, Dworzak M, et al: Residual disease monitoring in childhood acute myeloid leukemia by multiparameter flow cytometry: The MRD-AML-BFM Study Group. *J Clin Oncol* **24**: 3686-3692, 2006



Short communication

Mutations of *GATA1*, *FLT3*, *MLL*-partial tandem duplication, *NRAS*, and *RUNX1* genes are not found in a 7-year-old Down syndrome patient with acute myeloid leukemia (FAB-M2) having a good prognosis

Machiko Kawamura<sup>a,\*</sup>, Hidefumi Kaku<sup>a</sup>, Takeshi Taketani<sup>b</sup>, Tomohiko Taki<sup>c</sup>, Akira Shimada<sup>d</sup>, Yasuhide Hayashi<sup>d</sup>

<sup>a</sup>Department of Pediatrics, Tokyo Metropolitan Komagome Hospital, 3-18-22 Honkomagome, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8677, Japan

<sup>b</sup>Department of Pediatrics, Shimane University, Faculty of Medicine, Izumo, Shimane, Japan

<sup>c</sup>Department of Molecular Laboratory Medicine, Kyoto Prefectural University of Medicine Graduate School of Medical Science, Kyoto, Japan

<sup>d</sup>Department of Hematology/Oncology, Gunma Children's Medical Center, Shibukawa, Gunma, Japan

Received 20 May 2007; accepted 25 September 2007

Abstract

The prognosis of leukemia developed in Down syndrome (DS) patients has improved markedly. Most DS leukemia occurs before 3 years of age and is classified as acute megakaryocytic leukemia (AMKL). Mutations in the *GATA1* gene have been found in almost all DS patients with AMKL. In contrast, it has been shown that occurrence of DS acute myeloid leukemia (DS-AML) after 3 years of age may indicate a higher risk for a poor prognosis, but its frequency is very low. Age is one of the significant prognostic indicators in DS-AML. The prognostic factor of gene alterations has not been reported in older DS-AML patients. We here describe the case of a 7-year-old DS boy with AML-M2, who had no history of transient abnormal myelopoiesis or any clinical poor prognostic factors, such as high white blood cell counts or extramedullary infiltration. We molecularly analyzed the *GATA1*, *FLT3*, *MLL*-partial tandem duplication, *NRAS*, and *RUNX1* (previously *AML1*) genes and did not detect any alterations. The patient has lived for more than 5 years after treatment on the AML99-Down protocol in Japan. This suggests that a patient lacking these genes alterations might belong to a subgroup of older DS-AML patients with good prognosis. Accumulation of more data on older pediatric DS-AML patients is needed. © 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Children with Down syndrome (DS) have a ~20-fold higher incidence of leukemia than do unaffected children. Most DS leukemia is diagnosed as acute megakaryocytic leukemia (AMKL), which occurs before 3 years of age, and the prognosis has markedly improved [1–3]. Infants with DS and transient abnormal myelopoiesis are at high risk for later development of AMKL, usually by 3 years of age. Recently, it has been reported that mutations of *GATA1* are present in virtually all cases of DS acute myeloid leukemia (DS-AML) [4,5]. The same mutations are seen in transient abnormal myelopoiesis cases as well [5].

Furthermore, in paired samples from transient abnormal myelopoiesis and AMKL in the same children, identical *GATA1* mutations were found [4–6], suggesting that DS with transient abnormal myelopoiesis and AMKL are within a biologically homogeneous group. *GATA1* mutation is a very early event in the development of DS-AMKL and in the process of multistep leukemogenesis [4,7].

On the other hand, DS-AML occurring after the age of 3 years may be completely different from that occurring before the age of 3 years, and may instead be biologically similar to de novo AML in non-DS patients. Multivariate analysis of data showed that children with DS aged  $\geq 2$  years at diagnosis had an increased risk of relapse after treatment [2]. There has been no good classification of DS-AML patients between the age of 2 and 4 years. Classification of the biological differences would probably be more useful than a better age cut.

\* Corresponding author. Tel.: +81-3-3823-2101; fax: +81-3-3824-1552.

E-mail address: m.kawamura@cick.jp (M. Kawamura).



Here we describe the case of a 7-year-old boy with DS-AML who lacked mutations of *GATA1*, *FLT3*, *MLL*-partial tandem duplication (PTD), *NRAS*, and *RUNX1* (previously *AML1*) genes. The prognostic factors for DS-AML, particularly in older children, are still unknown. The present case supports the hypothesis that DS-AML patients who do not have alteration of these genes have a good prognosis.

## 2. Case report

A 7-year-old boy with DS presenting with a persistent fever was admitted to our hospital because of anemia and thrombocytopenia. On admission, he had a pale face and systemic petechiae and purpuras. No cervical lymphadenopathy or hepatomegaly was noted. Blood testing revealed a white blood cell count of  $7,500/\mu\text{L}$  with 9% myeloblasts, 8% segmented neutrophils, 15% monocytes, 49% lymphocytes, and 6% blasts, a hemoglobin concentration of 6.1 g/dL, and a platelet count of  $41.2 \times 10^4/\mu\text{L}$ . Bone marrow examination revealed 66% blasts (Fig. 1a) with 39.2% monocytoid blasts and 18.8% myeloblastic cells with Auer bodies (Fig. 1b) and azurophilic granules. The diagnosis of AML-M2 was made according to the morphological and immunophenotypic criteria of the French–American–British (FAB) classification in combination with other laboratory data.

Even though the differential count showed a predominance of monocytic cells, myeloblasts (15.2%) and myeloblastic cells (18.8%) were 34% of total. These cells were positive for peroxidase staining (73.5%), and both nonspecific (5.8%) and specific (55%) esterase staining. Nonspecific esterase-positive cells were <20% among blasts, which matches the criteria of FAB-M2. Immunophenotypic analysis of CD45+ cells showed the presence of CD13 (56.8%), CD33 (86%), CD38 (95.2%), and HLA-DR (26.7%) antigens and the absence of CD34 (2.7%),

CD11b (11.7%), and CD14 (0.6%). CD11b and CD14 presented on monocytes were negative in this patient. Cytogenetic analysis demonstrated the 47,XY,+21c karyotype in 20 bone marrow cells.

The serum and urine lysozyme level has been used as an aid in distinguishing AML with maturation (FAB-M2) from acute myelomonocytic leukemia (M4). In this patient, the count of monocytes in peripheral blood was  $1,125/\mu\text{L}$ , which is less than the  $5,000/\mu\text{L}$  of the FAB-M2 criteria. The serum lysozyme level was 25  $\mu\text{g/mL}$  (normal range, 5–10  $\mu\text{g/mL}$ ) and the urine lysozyme level was 0  $\mu\text{g/mL}$ . The level of lysozyme of this patient in peripheral blood was less than threefold of the normal range. Collectively, these data led us to diagnose this patient with AML-M2.

The patient was treated on the Japanese Childhood AML Cooperative Study Group Protocol for DS patients (AML99-Down protocol), which consists of pirarubicin (THP-ADR) (25  $\text{mg/m}^2$  on days 1 and 2), etoposide (150  $\text{mg/m}^2$  on days 3–5), and cytosine arabinoside (Ara-C) (100  $\text{mg/m}^2$  on days 1–7) at five cycles every month [8,9]. No prophylaxis for the central nervous system was performed.

On the first cycle of chemotherapy, he had severe mucositis and high fever for 5 weeks. On the second cycle, he had high fever during therapy. We considered this fever a side effect of Ara-C, and therefore methylprednisolone was given for 30 minutes prior to drip infusion of Ara-C. The patient obtained complete remission after the first cycle of chemotherapy and has continued in complete remission for 5 years without any recurrence.

## 3. Analysis of *GATA1*, *FLT3*, *MLL*, *NRAS*, and *RUNX1* genes

Written informed consent was obtained from the parents of the patient. RNA extracted from his bone marrow cells at

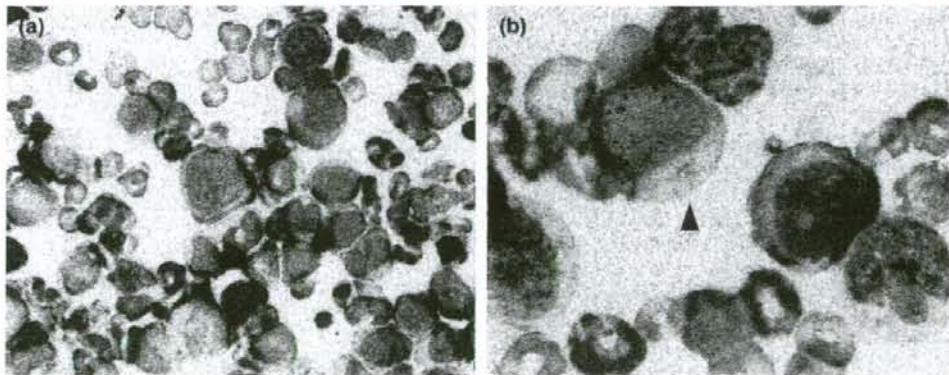


Fig. 1. Initial bone marrow smear at diagnosis. (a) Bone marrow aspirate showing hypercellularity (Giemsa staining). (b) Leukemic cells with Auer bodies (arrowhead).

diagnosis was reverse transcribed to cDNA and alterations of *GATA1*, *FLT3*, *MLL-PTD*, *NRAS*, and *RUNX1* genes were examined as previously described [10–13]. Briefly, mutational analysis of *GATA1* within exon 2, where there are hot spots, was performed with reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) followed by direct sequencing [11]. Point mutations of *FLT3*-D835/I836 were examined with restriction fragment length polymorphism (RFLP)-PCR [12] and *FLT3*-internal tandem duplication (ITD) was analyzed with RT-PCR [11,13]. *MLL-PTD* was examined with simple first-round RT-PCR using the primer pair located between exon 9 and exon 4 [14]. Mutation of *NRAS* and *RUNX1* genes was examined with PCR-single strand conformation polymorphism analysis (SSCP) and direct sequencing [15].

#### 4. Discussion

Lange et al. [16] studied 1,206 children with AML, including 118 (9.8%) DS patients. Among these, >95% of AML patients with DS were <5 years old. FAB-M7 (AMKL) was found in 62%, and FAB-M1 or M2 in 10%. Children under 2 years ( $n = 94$ ) treated on Children's Cancer Group (CCG) studies 2861 and 2891 had a 6-year EFS of 86%; those aged 2–4 years ( $n = 58$ ), 70%; and those older than 4 years ( $n = 9$ ), 28%. Outcome of children with DS-AML is excellent with standard induction therapy, but declines with increasing age; this report, however, gives no information about patients >4 years old [16].

Although white blood cell count at diagnosis is a significant predictor of outcome in non-DS AML, this is not the case for either DS or antecedent myelodysplastic syndrome patients. Extramedullary infiltration, which includes tumor nodules, skin infiltration, meningeal infiltration, gingival infiltration, or hepatosplenomegaly, has been discussed as a prognostic factor and is generally thought to indicate poor outcome in non-DS AML [8].

Monosomy 7 (–7) or deletion of the long arm of chromosome 7 [del(7q)] is found in only 4–5% of pediatric patients with AML. Although, cytogenetically, –7 is generally associated with a dismal prognosis in AML, even this may not be as unfavorable in those with DS [17]. Our patient did not have an acquired chromosomal abnormality in addition to trisomy 21 at diagnosis. Having no additional chromosomal abnormalities, including absence of –7, might be one of the good prognostic factors.

Our patient had no prior history of transient abnormal myelopoiesis or of the *GATA1* mutation in leukemic cells. In this respect, the leukemogenesis of this patient may differ from that typical of DS-AMKL patients <3 years old. DS-AMKL patients >3 years old at diagnosis often show the absence of a prior history of transient abnormal myelopoiesis. An age of >3 years at diagnosis may indicate only a different biological origin from those with a prior history of transient abnormal myelopoiesis and the *GATA1* mutation. In other

words, there may be age-related biologic differences in the nature of AML in DS patients. We suggest that a better way to predict their prognosis would be by analyzing for the presence or absence of *GATA1* mutations and screening for the groups with good prognosis, rather than by the age at diagnosis, because the *GATA1* mutations are tightly associated with AMKL in DS patients, who are mostly younger children and have a good prognosis [1].

There is little clinical and genetic information on older pediatric patients with DS-AML with a poor prognosis. AML-M7 with *GATA1* mutations has a good prognosis among DS patients. This patient was 7 years old and his prognosis was good, suggesting that leukemogenesis in this case was not due to *GATA1* mutation.

DS-AML in older pediatric patients is considered to be similar to de novo non-DS AML. We therefore analyzed the same genetic prognostic factors in this patient as have been reported in de novo pediatric AML. There are no large studies of the genetic prognostic factors associated with older pediatric DS-AML, however, which made it difficult to compare the incidence of those mutations between non-DS AML and DS-AML among children. Particularly for older children with DS-AML, more accumulation of data is needed.

We examined ITD and D835/I836 mutations of *FLT3*. The prevalence and prognostic significance of these features are unknown in DS-AML. *FLT3*-ITD occurs in ~30% of adult AML patients and ~20% of pediatric AML patients [18–21]. *FLT3*-ITD is considered to predict poor prognosis in adult and pediatric AML patients [19,22–24]. On the other hand, ~10% of adult and pediatric AML patients have *FLT3*-D835/I836 mutations. AML patients with *FLT3*-D835/I836 mutations tend to have a poor prognosis as adults, but not as children [25,26]. Alterations of *FLT3* were not detected in the present patient. Given that this case was considered to be the same as de novo AML in a non-DS patient, the absence of *FLT3* alterations suggests a good prognosis.

We analyzed other possible prognostic factors, such as *MLL-PTD*, *NRAS*, and *RUNX1* mutations. *MLL-PTD* was detected in ~10% of AML patients with normal karyotype and in 90% of AML patients exhibiting trisomy 11 as the sole chromosome abnormality. The *MLL-PTD* was reported to be a subgroup of patients with an unfavorable prognosis in adult AML [14]. In a study of the Japanese Childhood AML Cooperative study group, AML patients with *MLL-PTD* comprised 13.3% and correlated with poor prognosis [21]. The prognostic impact of *NRAS* mutations, reported in 11–30% of AML patients, is still under discussion [27,28]. As for *RUNX1* mutation, we have reported that the mutations in pediatric hematologic malignancies are infrequent, but may be related to AML-M0, acquired trisomy 21, and leukemic transformation [10]. Furthermore, non-constitutional chromosome 21 in the leukemic clone may also lead to an unfavorable prognosis. No mutations of these genes were found in our patient, suggesting a good prognosis.



Table 1

Frequency of Down syndrome acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome patients in published studies, including pediatric patients older than 4 years

Study group	Accrual period, mo/yr	DS-AML/AML patients, no./no. (%)	DS-AML patients >4 yr old, no.	References
POG8498	July 1984–July 1989	12/285 (4.2)	0	Ravindranath et al., 1992 [29]
Nagoya	Sept. 1986–Aug. 1992	9/NI	0	Kojima et al., 2000 [1]
NOPHO84/NOPHO88	July 1984–Dec. 1992	23/223 (10.3)	2	Lie et al., 1996 [30]
BFM 87/BFM 93	July 1987–Dec. 1994	40/633 (6.3)	3	Creutzig et al., 1996 [31]
CCG 2861/2891	Mar. 1988–Oct. 1995	118/1206 (9.8)	3	Lange et al., 1998 [16]
Japan AT group/Down	Sept. 1987–Aug. 1997	33/NI	0	Kojima et al., 2000 [1]
CCG 2891	Oct. 1989–Oct. 1999	161/1108 (14.5)	9 <sup>a</sup>	Gamis et al., 2003 [2]
AML99	Jan. 2000–Dec. /2003	66/418 (15.8)	2	Kobayashi et al., 2006 [8]

Abbreviations: DS-AML/MDS, Down syndrome acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome; NI, no information.

<sup>a</sup> Nine patients are older than 5 years; data are shown separately for patients aged 2–5 years and older than 5 years.

Table 1 presents the frequency of DS-AML/MDS in children >4 years old from previous reports [1,2,8,16,29–31]. In BFM 87/BFM93, there were three such patients among 40 patients with DS-AML [31]. These three patients were 12, 15, and 16 years old at diagnosis, their FAB classification was M0, M2, and M4, and their white blood cell count at diagnosis was 2,600/ $\mu$ L, 22,600/ $\mu$ L, and 1,400/ $\mu$ L, respectively. The 12-year-old girl died from sepsis after four weeks of consolidation therapy; the other two patients were not treated [31]. In the CCG-2861 and CCG-2891 studies, three patients were reported to be >5 years old [16], two of whom died of disease and one from toxicity. On the AML99-Down protocol, there were two patients >4 years old (one being the present patient) [8]. A 4-year-old boy with AML FAB-M5a who failed to obtain complete remission after two courses of induction therapy and received cord blood stem cell transplantation was, at writing, still alive [32].

To date, there are only a few individual case reports of children >4 years old [32,33]. For DS patients, immunologic disorders, congenital heart disease, and other factors possibly caused disease-related and treatment-related mortality. Considering the high incidence of therapy-related mortality, overtreatment should be avoided.

No alterations in *GATA1*, *FLT3*, *MLL-PTD*, *NRAS*, or *RUNX1* were found in our patient, suggesting that he belongs to a subgroup, among older DS-AML patients, with good prognosis. Because the prognostic factors for DS-AML are still unknown, particularly in older children, further data accumulation is needed.

## Acknowledgments

Gracious thanks are due to Janet E. Lewis of the University of Wisconsin–Madison for preparing the manuscript.

## References

- [1] Kojima S, Sako M, Kato K, Hosoi G, Sato T, Ohara A, Koike K, Okimoto Y, Nishimura S, Akiyama Y, Yoshikawa T, Ishii E, Okamura J, Yazaki M, Hayashi Y, Eguchi M, Tsukimoto I, Ueda K. An effective chemotherapeutic regimen for acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome in children with Down's syndrome. *Leukemia* 2000;14:786–91.
- [2] Gamis AS, Woods WG, Alonzo TA, Buxton A, Lange B, Barnard DR, Gold S, Smith FO. Children's Cancer Group Study 2891. Increased age at diagnosis has a significantly negative effect on outcome in children with Down syndrome and acute myeloid leukemia: a report from the Children's Cancer Group Study 2891. *J Clin Oncol* 2003;21:3415–22.
- [3] Fong CT, Brodeur GM. Down's syndrome and leukemia: epidemiology, genetics, cytogenetics and mechanisms of leukemogenesis. *Cancer Genet Cytogenet* 1987;28:55–76.
- [4] Wechsler J, Greene M, McDevitt MA, Anastasi J, Karp JE, Le Beau MM, Crispino JD. Acquired mutations in *GATA1* in the megakaryoblastic leukemia of Down syndrome. *Nat Genet* 2002;32:148–52.
- [5] Hitzler JK, Cheung J, Li Y, Scherer SW, Zipursky A. *GATA1* mutations in transient leukemia and acute megakaryoblastic leukemia of Down syndrome. *Blood* 2003;101:4301–4.
- [6] Groet J, McElwaine S, Spinelli M, Rinaldi A, Burtcher I, Mulligan C, Mensah A, Cavani S, Dagna-Bricarelli F, Basso G, Cotter FE, Nizetic D. Acquired mutations in *GATA1* in neonates with Down's syndrome with transient myeloid disorder. *Lancet* 2003;361:1617–20.
- [7] Shimada A, Xu G, Toki T, Kimura H, Hayashi Y, Ito E. Fetal origin of the *GATA1* mutation in identical twins with transient myeloproliferative disorder and acute megakaryoblastic leukemia accompanying Down syndrome. *Blood* 2004;103:366.
- [8] Kobayashi R, Tawa A, Hanada R, Horibe K, Tsuchida M, Tsukimoto I. Japanese childhood AML cooperative study group. Extramedullary infiltration at diagnosis and prognosis in children with acute myelogenous leukemia. *Pediatr Blood Cancer* 2007;48:392–8.
- [9] Tsukimoto I, Tawa A, Hanada R, Tabuchi K, Kigasawa H, Tsuchiya S, Tsuchida M, Yabe H, Nakayama H, Kudo K, Kobayashi R, Hamamoto K, Imaizumi M, Morimoto M, Horibe K. Excellent outcome of risk stratified treatment for childhood acute myeloid leukemia-AML99 trial [Abstract]. *Blood* 2005;106:889.
- [10] Taketani T, Taki T, Takita J, Tsuchida M, Hanada R, Hongo T, Kaneko T, Manabe A, Ida K, Hayashi Y. *AML1/RUNX1* mutations are infrequent, but related to AML-M0, acquired trisomy 21, and leukemic transformation in pediatric hematologic malignancies. *Genes Chromosomes Cancer* 2003;38:1–7.
- [11] Xu G, Nagano M, Kanezaki R, Toki T, Hayashi Y, Taketani T, Taki T, Mitui T, Koike K, Kato K, Imaizumi M, Sekine I, Ikeda Y, Hanada R, Sako M, Kudo K, Kojima S, Ohneda O, Yamamoto M, Ito E. Frequent mutations in the *GATA1* gene in the transient myeloproliferative disorder of Down syndrome. *Blood* 2003;102:2960–8.
- [12] Taketani T, Taki T, Sugita K, Furuichi Y, Ishii E, Hanada R, Tsuchida M, Ida K, Hayashi Y. *FLT3* mutations in the activation loop