

201020089A

厚生労働科学研究費補助金
がん臨床研究事業

小児急性骨髄性白血病（AML）に対する
標準的治療法の確立に関する研究
（H-22-がん臨床-一般-042）

平成22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 足立 壮一

平成23（2011）年 4月

厚生労働科学研究費補助金
がん臨床研究事業

小児急性骨髄性白血病（AML）に対する
標準的治療法の確立に関する研究
（H-22-がん臨床-一般-042）

平成22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 足立 壮一

平成23（2011）年 4月

目 次

I. 総括研究報告

| | |
|---------------------------------|--------|
| 小児急性骨髄性白血病(AML)の標準的治療法の確立に関する研究 | -----1 |
| 足立 壮一 | |

II. 分担研究報告

| | |
|---------------------------------------|-----|
| 1. 小児急性骨髄性白血病における遺伝子診断と分子モニタリングに関する研究 | --7 |
| 堀部 敬三 | |

| | |
|------------------------|---------|
| 2. 形態中央診断システムの構築に関する研究 | -----11 |
| 宮地 勇人 | |

| | |
|---------------------------|---------|
| 3. 小児造血器腫瘍臨床研究の質の向上に関する研究 | -----14 |
| 齋藤 明子 | |

| | |
|--|---------|
| 4. AML中央診断で明らかになった染色体検査とキメラ遺伝子検査の不一致例 および診断困難例の解析 | -----17 |
| 滝 智彦 | |

| | |
|---|---------|
| 5. ダウン症候群に発症した急性骨髄性白血病に対する標準的治療法の確立 に関する研究 | -----19 |
| 多賀 崇 工藤 寿子 | |

| | |
|--|--------|
| 6. 小児急性前骨髄性白血病(APL)に対する標準的治療法の確立に関する研究 | ----22 |
| 冨澤 大輔 | |

| | |
|---|---------|
| 7. フローサイトメトリー法による微小残存病変(MRD)検出システムの確立 に関する研究 | -----25 |
| 岩本 彰太郎 | |

| | |
|------------------|---------|
| III. 研究成果に関する一覧表 | -----27 |
|------------------|---------|

| | |
|-----------------|---------|
| IV. 研究成果の刊行物・別刷 | -----31 |
|-----------------|---------|

I. 総括研究報告

小児急性骨髄性白血病(AML)の標準的治療法の確立に関する研究

研究代表者 足立壮一 京都大学医学研究科人間健康科学系専攻

研究要旨 小児急性骨髄性白血病(AML)の標準的治療法を確立すべく、急性前骨髄球性白血病(APL)については「AML-P05 研究」、Down 症候群に発症した AML については「AML-D05 研究」を行い、その他の AML に対しては遺伝子染色体異常と初期治療反応性に基づいたリスク因子で層別化治療を行う臨床試験「AML-05 研究」を行い、いずれも予定登録症例数に到達して臨床試験を終了した。現在、再発および寛解導入不能 AML に対する治療研究「小児急性骨髄性白血病(AML)再発例および寛解導入不能例に対する Fludarabine を含む寛解導入療法の有効性と安全性を検討する多施設共同第Ⅱ相臨床試験 AML-R11」と「ダウン症候群に発症した小児急性骨髄性白血病に対する多施設共同研究 AML-D11」計画書を作成中である。また、AML-05 および AML-P05 の症例登録終了にともない次期臨床研究 AML-11, AML-P11 の検討も開始しており、平成 23 年度中にすべての次期臨床試験を開始予定である。また、一連の多施設共同臨床試験において形態中央診断を初めて導入することに成功した。形態中央診断は、診断の質を高めることで、リスク分類の層別化による治療成績の評価と各予後因子の意義の明確化について質の高い臨床研究に貢献することが期待される。今後、次次期臨床試験の層別化への導入を目的として、AML-05 臨床検体を用いて、遺伝子解析(c-Kit 変異、CEBP α 変異、NPM 変異、FLT3-ITD 等)結果と予後との相関を現在解析中である。

A. 研究目的

小児 AML の治療成績をさらに向上させ、治療毒性の軽減をはかるために小児白血病リンパ腫研究グループ(JPLSG)間の共同研究として全国規模の臨床試験を計画し標準的治療法の開発を目指す。質の高い診断のために形態中央診断、染色体検査、キメラ遺伝子検査、細胞表面マーカー検査、などの検査所見、臨床所見を総合して診断するシステムを確立する。将来的には、遺伝子変異や発現量、微小残存病変(MRD)を解析して治療層別化に用いる臨床試験を目指す。

B. 研究方法

日本小児白血病リンパ腫研究グループ(JPLSG)AML 委員会を中心に本邦のほぼすべての小児白血病治療施設が参加する以下の3つの臨床

試験を計画した。

1. 急性前骨髄球性白血病を対象とした「小児急性前骨髄球性白血病(APL)に対する多施設共同後期第Ⅱ相臨床試験実施計画書 AML-P05」平成 18 年 4 月 1 日から各施設の IRB/倫理委員会の承認を得た上で症例の登録が開始された。平成 23 年 3 月 31 日に症例登録終了した。

2. APL および Down 症候群に発症した AML を除く残りの de novo AML を対象とした「小児急性骨髄性白血病(AML)に対する多施設共同後期第Ⅱ相臨床試験実施計画書 AML-05」

平成 18 年 11 月 1 日から各施設の IRB/倫理委員会の承認を得た上で症例の登録が開始され、予定症例数に達したことから平成 22 年 12 月 31 日症例登録が終了した。484 例が登録され、リスク確定

症例では、低リスク群；129例、中間リスク群；188例、高リスク群；55例となっている。

3. Down 症候群に発症した AML を対象とした「ダウン症候群に発症した小児急性骨髄性白血病に対するリスク別多剤併用化学療法の後期第Ⅱ相臨床試験実施計画書 AML-D05」

平成 19 年 11 月 29 日、日本小児血液学会臨床研究審査検討委員会の承認を得た。平成 20 年 1 月 1 日から各施設の IRB/倫理委員会の承認を得た上で症例登録が開始され、予定症例数に達したことから平成 22 年 12 月 31 日症例登録が終了した。

4. 診断小委員会について

本研究では形態中央診断を行っており、それに遺伝子染色体検査の結果、表面マーカーの結果もあわせ WHO 分類に基づいて最終診断をおこなう診断小委員会を 2007 年 11 月 6 日に発足させた。

5. 小児造血器腫瘍臨床研究の質の向上に関する研究

独立行政法人国立病院機構名古屋医療センター臨床研究センター内に、特定非営利活動法人臨床研究支援機構(NPO OSCR)データセンターを設置し、名古屋医療センター臨床研究センター臨床研究企画室臨床疫学研究室と共同で、臨床研究の質確保を担当する。NPO OSCR でデータマネージャーを雇用し実務を担当させると共に、臨床疫学研究室の客員研究員として、臨床研究の質向上の為の方法論の研究を行わせることで育成を図る。これら一連の活動を通して、データセンターとしての標準化・効率化を図る。

6. 遺伝子診断と分子モニタリングに関する研究

AML-05, AML-P05 登録症例の診断時の骨髄液あるいは末梢血の有核細胞から RNA を抽出し、定量的 RT-PCR 法によって AML に代表的な 8 種類のキメラ遺伝子、*AML1-ETO*, *CBFβ-MYH11*, *MLL-AF6*, *MLL-AF9*, *MLL-ELL*, *TLS/FUS-ERG*, *PML-RAR α*, *NUP98-HOXA9* の測定を行った。また、AML-05,

AML-D05 登録症例の診断時の骨髄液あるいは末梢血の全血から抽出した DNA を用いて PCR 法で *FLT3-ITD* の解析を行った。陽性所見が得られた例については、バンドを切り出して塩基配列を決定して Tandem duplication の存在を確認した。

C. 研究結果

1. 「小児急性前骨髄球性白血病(APL)に対する多施設共同後期第Ⅱ相臨床試験 AML-P05」

本試験は症例登録数が予定より少なかったため登録期間の 2 年間延長を効果安全性評価委員会に申請し受理され、累積登録症例数は 46 例と登録期間延長後は予測どおり症例が登録された。

2. 「小児急性骨髄性白血病(AML)に対する多施設共同後期第Ⅱ相臨床試験実施計画書 AML-05」

平成 20 年 9 月 30 日の時点で、研究計画における必要症例数の決定基準とした低リスク群の症例数が登録期間内に必要症例数に達しないことが明らかとなったため、登録期間の延長を効果安全性評価委員会に申請し受理され、平成 22 年 12 月 31 日登録を終了した。

全登録症例数は 484 例でこの内リスクが確定した 338 例の内訳は低リスク群 129 例、中間リスク 188 例、高リスク 55 例であった。第 10 回定期モニタリングを平成 23 年 2 月 22 日に効果安全性評価委員会に提出した。

3. 「ダウン症候群に発症した小児急性骨髄性白血病に対するリスク別多剤併用化学療法の後期第Ⅱ相臨床試験実施計画書 AML-D05」

平成 20 年 1 月 1 日から登録を開始し平成 22 年 12 月 31 日登録を終了した。74 例が登録され、リスク確定例では標準リスク群 67 例、高リスク群 2 例である。第 6 回定期モニタリングを平成 23 年 2 月 15 日に効果安全性評価委員会に提出した。

4. 診断小委員会について

診断小委員会では中央診断に提出されたすべての症例の最終診断をおこなっているが、AML-05、

AML-P05、AML-D05 の3つの臨床試験における初発時の病型診断症例は、開始以来22年度までに、それぞれ総数 539、46、81 例であった。22年度の実績としては、以下のごとくである。

AML-05 は総件数 343 件で、内訳は BMA-1 102 件、BMA-2 107 件、BMA-3 106 件、再発 28 件であった。AML-P05 は総件数 31 件で、BMA-1 11 件、BMA-2 9 件、BMA-3 11 件、再発 0 件であった。AML-D05 は総件数 61 件で、内訳は BMA-1 29 件、BMA-2 25 件、BMA-3 5 件、BMA-4 1 件、再発 1 件であった。ここでは AML-05 症例 340 例の検討結果を以下に示す。166 例が AML with recurrent abnormalities で AML with t(8;21) 100 例、AML with inv(16) 23 例、AML with 11q23 49 例であり、AML with multilineage dysplasia が 31 例、AML not otherwise categorized が 145 例であった。AML-05 新規登録終了後、個々の病院では診断が難しい症例に絞って中央診断による診断支援を継続することとし、平成 23 年 1 月から開始した。診断困難例は、全 6 件で内訳は AML 5 例、RAEB 1 例であった (22年度は 3 件)。

また、5q-やモノソミー7のような染色体の構造異常や数的異常は、付加的な異常として腫瘍細胞の一部に存在することもある。このような場合の陽性の基準が現在は明確ではなく、正確な診断のためにはこれらの診断基準を整備する必要がある。

5. 小児造血器腫瘍臨床研究の質の向上に関する研究

臨床疫学研究室は OSCR データセンターと共同で JPLSG が企画・実施している AML 関連の臨床研究の質管理の実務・研究を担当している。

臨床研究不参加症例のその後の治療内容と臨床効果を把握することが出来れば、臨床研究に参加し、厳密な管理の下で規定の治療を受けた患者から得られた臨床研究結果の一般化の妥当性評価が可能となる。この点に着目し、当該領域の患者を網羅的に把握できる前向きコホート研究のシステムを確立するための実施計画書を作成し、日本小児

科学会による審査承認を得た。前述の如く、小児 AML 領域の臨床研究を行う上での問題は、疾患の稀少性にあり、この試みが、問題解決への第一歩となる。

6. 遺伝子診断と分子モニタリングに関する研究 (A) キメラ遺伝子スクリーニング

AML-P05 は、2006 年 4 月から 2011 年 3 月までに 44 例において PML-RAR α のスクリーニングが行われ、40 例が陽性、4 例が陰性であった。AML-05 は、2006 年 11 月から 2010 年 12 月までに 541 例で 8 種類のキメラ遺伝子スクリーニングが行われ、222 例にいずれかのキメラ遺伝子が検出された。その内訳は、AML1-ETO 128 例、CBF β -MYH11 33 例、MLL-AF6 2 例、MLL-AF9 38 例、MLL-ELL 9 例、TLS/FUS-ERG 7 例、PML-RAR α 7 例、NUP98-HOXA9 0 例であった。

(B) FLT3-ITD スクリーニング

AML-P05 は、2008 年 4 月から 2011 年 3 月までに 34 例において FLT3-ITD のスクリーニングを行い、4 例が陽性であった。AML-05 は、2006 年 11 月から 2010 年 12 月までに 541 例で FLT3-ITD のスクリーニングが行われ、55 例が陽性であり、4 例が判定不能であった。AML-D05 は、2008 年 1 月から 2010 年 12 月までに 77 例で FLT3-ITD のスクリーニングが行われ、陽性例は 1 例のみであった。

7. 「小児急性骨髄性白血病(AML)再発例および寛解導入不能例に対する Fludarabine を含む寛解導入療法の有効性と安全性を検討する多施設共同第 II 相臨床試験 AML-R11」の計画進捗状況について

初回骨髄再発例ならびに寛解導入不能例を対象に、fludarabine, idarubicin による再寛解導入療法の有効性と安全性を検討する臨床試験を計画しプロトコールコンセプトを JPLSG プロトコールレビューワーキンググループに提出し承認が得られたので現在フルプロトコールを作成中である。

8. 現在進行中の臨床試験の症例登録終了にともなう次期臨床計画の進捗状況について

Down 症候群に発症した AML に対しては AML-D05 治療における MRD に基づくリスク層別の実施可能性について探索的な検討を行うことを目的として「ダウン症候群に発症した小児急性骨髄性白血病に対する多施設共同研究 AML-D11」のプロトコルコンセプトを JPLSG プロトコルレビューワーキンググループに提出し承認が得られたので、現在フルプロトコルを作成中である。

APL に対しては新規薬剤として arsenic trioxide(ATO)を初期治療に導入し、minimal residual disease(MRD)を治療介入に用いる臨床研究「AML-R11」のプロトコルコンセプトを作成中である。

また次期 de novo AML に対する臨床試験 AML-11 は寛解導入療法で現在の ECM 療法(Ara-C 持続)に対して治療成績の向上が Ara-C 大量療法を併用する治療法(HD-ECM)で得られるかどうか MRD をプライマリーエンドポイントとする臨床試験のプロトコルコンセプトを作成中である。

D. 考察

日本小児白血病リンパ腫研究グループ(JPLSG)AML 委員会を中心に本邦の主要な白血病研究グループが参加する「AML-P05」、「AML-05」、「AML-D05」の3つの臨床試験を計画し、日本小児血液学会臨床研究審査検討委員会で検討・承認され、各施設の IRB/倫理委員会の承認を得た上での症例登録が開始され、「AML-05」、「AML-D05」は平成 22 年 12 月 31 日に予定登録数に達し症例登録が終了、「AML-P05」も平成 23 年 3 月 31 日に症例登録終了した。

小児 AML の形態を含む系統だった中央診断のシステムは本邦初であり、新知見が得られつつあり、再発例を対象とした「AML-R11」研究は研究計画書作成中である。

「AML-P05」、「AML-05」、「AML-D05」の症例登録中止に伴い次期臨床試験の計画も順調に進捗している。

これらの臨床試験計画は JPLSG プロトコルレビューワーキンググループ、JPLSG データセンター等の全面的な協力を得て作成されたもので、「AML-P05」、「AML-05」、「AML-D05」の試験実施にあたっては有害事象、症例集積のモニタリングなど JPLSG データセンターが中心的役割を担っている。

「AML-P05」、「AML-05」、「AML-D05」の試験実施により、小児 AML に対するより安全でかつ有効な標準的治療法の確立に貢献するエビデンスが得られると考えている。現在計画中の「AML-R11」に関しては平成 23 年度前半には試験を開始する予定である。

E. 結論

「小児急性前骨髄球性白血病(APL)に対する多施設共同後期第 II 相臨床試験 AML-P05」、「小児急性骨髄性白血病(AML)に対する多施設共同後期第 II 相臨床試験 AML-05」、「ダウン症候群に発症した小児急性骨髄性白血病に対するリスク別多剤併用化学療法の後期第 II 相臨床試験実施計画書 AML-D05」の研究はいずれも順調に予定症例が登録され、登録終了した。「小児急性骨髄性白血病(AML)再発例および寛解導入不能例に対する Fludarabine を含む寛解導入療法の有効性と安全性を検討する多施設共同第 II 相臨床試験 AML-R11」も平成 23 年度前半には開始予定である。また次期臨床試験 AML-D11, AML-11, AML-P11 も順調に臨床試験が計画されており、いずれも平成 23 年度中には開始予定である。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Mizushima Y, Taki T, Shimada A, Yui M, Hiraumi Y, Matsubara H, Watanabe M, Watanabe K, Kamitsuji Y, Hayashi Y, Tsukimoto I, Kobayashi R, Horibe K, Tawa A, Nakahata T, Adachi S.

Prognostic significance of the BAALC isoform pattern and CEBPA mutations in pediatric acute myeloid leukemia with normal karyotype: a study by the Japanese Childhood AML Cooperative Study Group. *Int J Hematol* 91: 831-837, 2010

2) Fujino H, Fujita N, Hamamoto K, Oobu S, Kita M, Tanaka A, Matsubara H, Watanabe K, and Adachi S: Ring/marker chromosome derived from chromosome 7 in childhood acute megakaryoblastic leukemia with monosomy 7. *Int J Hematol* 2010, 92: 386-390

3) Kanezaki R, Toki T, Terui K, Xu G, Wang R, Shimada A, Hama A, Kanegane H, Kawakami K, Endo M, Hasegawa D, Kogawa K, Adachi S, Ikeda Y, Iwamoto S, Taga T, Kosaka Y, Kojima S, Hayashi Y, Ito E: Down syndrome and GATA1 mutations in transient abnormal myeloproliferative disorder: mutation classes correlate with progression to myeloid leukemia. *Blood* 2010 116: 4631-4638

2.学会発表

1) Tomizawa D, Saito A, Taga T, Adachi S, Nakayama H, Moritake H, Azuma E, Kinoshita A, Takahashi H, Imaizumi M, Kudo K, Hama A, Tsurusawa M, Horibe K, Tawa A. AML committee, The Japanese Pediatric Leukemia & Lymphoma Study group: Unexpected high mortality rate due to acute respiratory distress syndrome among infants with AML enrolled on JPLSG AML-05 trial. 7th Bi-Annual Childhood Leukemia Symposium. Oct 4-6, 2010, Antalya

2) Tomizawa D, Saito A, Taga T, Adachi S, Nakayama H, Moritake H, Azuma E, Kinoshita A, Takahashi H, Imaizumi M, Kudo K, Hama A, Tsurusawa M, Horibe K, Tawa A: Unexpected high mortality rate due to acute respiratory distress syndrome among infants with AML enrolled on JPLSG AML-05 trial. 52nd Annual Meeting of the

American Society of Hematology. Dec 4-7, 2010, Orlando

3) 新里亜紀、足立壮一、五井理恵、田淵健； ALL,AML に対する HLA 一致同胞からの初回移植成績の解析—MBT と PBSCT の比較— 第 35 回京都造血幹細胞移植研究会 6 月

4) 足立壮一；再発 AML の治療戦略 第 13 回 JACLS セミナー 7 月

5) 富澤大輔、齋藤明子、多賀 崇、足立壮一、中山秀樹、盛武 浩、木下明俊、高橋浩之、工藤寿子、堀部敬三、多和昭雄；乳児急性骨髄性白血病における早期死亡例の検討:JPLSG AML-05 臨床試験からの報告. 第 52 回日本小児血液学会総会 2010 年 12 月

6) 伊藤雅文、木下明俊、多賀 崇、宮地勇人、滝智彦、高橋浩之、照井君典、清河信敬、出口隆生、林 泰秀、多和昭雄、太田秀明、足立壮一:ダウン症候群に発症する急性骨髄性白血病病理中央診断の解析. 第 52 回日本小児血液学会総会 2010 年 12 月 大阪

7) 納富誠司郎、松原 央、田中篤志、藤野寿典、平松英文、渡邊健一郎、足立壮一、平家俊男；小児悪性腫瘍に対する Methotrexate(MTX)髄腔内投与 2 4 時間後の血中濃度と肝障害の検討 第 52 回日本小児血液学会総会 2010 年 12 月 大阪

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案

該当なし

3. その他

該当なし

II. 分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金（がん臨床研究事業）
小児急性骨髄性白血病(AML)に対する標準的治療法の確立に関する研究
分担研究報告書

小児急性骨髄性白血病における遺伝子診断と分子モニタリングに関する研究
研究分担者 堀部敬三 国立病院機構名古屋医療センター臨床研究センター センター長

研究要旨 小児急性骨髄性白血病(AML)にみられる染色体異常で生じる8種類のキメラ遺伝子と予後不良因子であるFLT3-ITDの診断時スクリーニング検査を実施し、585例中262例(44.8%)でいずれかのキメラ遺伝子が同定された。AML1-ETOがもっとも高頻度で48.9%を占めた。ついで、PML-RAR α 17.9%、MLL-AF9が14.5%、CBF β -MYH11が12.6%と多かった。AMLの予後不良因子とされるFLT3-ITDのスクリーニングでは、AMLおよびAPLでは10%が陽性であったが、ダウン症に伴うAMLでは、1例のみ(1.3%)であった。AML1-ETO陽性AMLの治療後のMRD解析では、治療終了時点においても77.8%でMRDが検出された。

A. 研究目的

本研究は、小児急性骨髄性白血病(AML)にみられる染色体異常で生じるキメラ遺伝子を診断時にスクリーニングすることで染色体分析結果と比較し、その臨床的意義を検証するとともに、キメラ遺伝子陽性例について治療終了時点まで経時的にキメラ遺伝子の発現量を定量することで微小残存病変(MRD)の評価を行い、治療反応性の指標としての意義を検討する。また、予後に関連した遺伝子異常として知られるFLT3-Internal Tandem Duplication (ITD)のスクリーニング検査を実施し、治療介入による予後との関連を検証する。

B. 研究方法

対象は、日本小児白血病リンパ腫研究グループ(JPLSG)で実施されているAMLに対する臨床試験AML-05、Down症に伴うAMLに対する臨床試験AML-D05、急性前骨髄球性白血病に対する臨床試験AML-P05に登録予定とされたAML患者である。なお、Down症に伴うAML

は、FLT3-ITDのみスクリーニング検査を行った。

診断時の骨髄液あるいは末梢血の有核細胞からRNAを抽出し、定量的RT-PCR法によってAMLに代表的な8種類のキメラ遺伝子、AML1-ETO、CBF β -MYH11、MLL-AF6、MLL-AF9、MLL-ELL、TLS/FUS-ERG、PML-RAR α 、NUP98-HOXA9の測定を行った。治療後のMRD解析では、すべて骨髄液からRNAを抽出し、該当症例で陽性のキメラ遺伝子の発現を定量した。また、診断時の骨髄液あるいは末梢血の全血から抽出したDNAを用いてPCR法でFLT3-ITDの解析を行った。陽性所見が得られた例については、バンドを切り出して塩基配列を決定してTandem duplicationの存在を確認した。(倫理面への配慮)

本研究は、名古屋医療センターの臨床研究審査委員会およびJPLSGの研究審査委員会の承認を得て実施した。また、本研究は、臨床試験AML-05、AML-D05、AML-P05の一部であり、これらの臨床試験は日本小児血液学会臨床研究審査委員会、および参加施設の倫理審査委

員会の承認を得て行った。すべての検体は、文書によるインフォームドコンセントを得た後に収集された。また、検体提出、衆主においてすべて匿名化を行い、検体提供者の個人情報適切に保護して実施した。

C. 研究結果

1. キメラ遺伝子スクリーニング

AML-P05 は、2006 年 4 月から 2011 年 3 月までに 44 例において PML-RAR α のスクリーニングが行われ、40 例が陽性、4 例が陰性であった。AML-05 は、2006 年 11 月から 2010 年 12 月までに 541 例で 8 種類のキメラ遺伝子スクリーニングが行われ、222 例にいずれかのキメラ遺伝子が検出された。その内訳は、*AML1-ETO* 128 例、*CBF β -MYH11* 33 例、*MLL-AF6* 2 例、*MLL-AF9* 38 例、*MLL-ELL* 9 例、*TLS/FUS-ERG* 7 例、*PML-RAR α* 7 例、*NUP98-HOXA9* 0 例であった。

2. *FLT3*-ITD スクリーニング

AML-P05 は、2008 年 4 月から 2011 年 3 月までに 34 例において *FLT3*-ITD のスクリーニングを行い、4 例が陽性であった。AML-05 は、2006 年 11 月から 2010 年 12 月までに 541 例で *FLT3*-ITD のスクリーニングが行われ、55 例が陽性であり、4 例が判定不能であった。AML-D05 は、2008 年 1 月から 2010 年 12 月までに 77 例で *FLT3*-ITD のスクリーニングが行われ、陽性例は 1 例のみであった。

3. キメラ遺伝子を用いた MRD 解析

治療後のキメラ遺伝子の経時的なモニタリングを行う MRD 解析には診断時陽性例 213 例のうち 83 例が登録され、332 検体の解析を行った。内訳は、*AML1-ETO* 53 例、*CBF β -MYH11* 10 例、*MLL-AF6* 1 例、*MLL-AF9* 12 例、*MLL-ELL* 4 例、*TLS/FUS-ERG* 3 例、*PML-RAR α* 20 例であった。Point 4 もしくは point 5

までの経時的な検討が可能であった症例は、59 例であった。そのうち、最も症例数の多い *AML1-ETO* について検討した。診断時の RNA1 μ g あたりの *AML1-ETO* 発現量は中央値で 3.3×10^5 コピー（範囲； $3.3 \times 10^5 \sim 3.3 \times 10^5$ コピー、 $n=30$ ）であったが、寛解導入 1 コース後では、中央値で 3.3×10^5 コピー（範囲； $3.3 \times 10^5 \sim 3.3 \times 10^5$ コピー、 $n=30$ ）、寛解導入 2 コース後では、中央値で 3.3×10^5 コピー（範囲； $3.3 \times 10^5 \sim 3.3 \times 10^5$ コピー、 $n=30$ ）、強化療法 1 コース後では、中央値で 3.3×10^5 コピー（範囲； $3.3 \times 10^5 \sim 3.3 \times 10^5$ コピー、 $n=30$ ）、強化療法 2 コース後では、中央値で 3.3×10^5 コピー（範囲； $3.3 \times 10^5 \sim 3.3 \times 10^5$ コピー、 $n=30$ ）、強化療法 3 コース後では、中央値で 3.3×10^5 コピー（範囲； $3.3 \times 10^5 \sim 3.3 \times 10^5$ コピー、 $n=30$ ）であった。寛解導入 1 コースの MRD は治療前に比して約 2 log 減少しているが、症例間での差が大きかった。寛解導入 2 コース以降の MRD の減少は緩徐であった。治療終了時点で MRD が検出感度以下であった症例は、36 例中 8 例のみであった。

D. 考察

小児 AML にみられる染色体異常で生じる 8 種類のキメラ遺伝子を AML-05 および AML-P05 臨床試験参加予定症例において診断時にスクリーニングした。その結果、合わせて 585 例中 262 例 (44.8%) でいずれかのキメラ遺伝子が同定された。*AML1-ETO* がもっとも高頻度で 48.9% を占めた。ついで、*PML-RAR α* 17.9%、*MLL-AF9* が 14.5%、*CBF β -MYH11* が 12.6% と多かった。*NUP98-HOXA9* はスクリーニングした 541 例中 1 例も認められず、スクリーニングの意義が乏しいと思われた。*PML-RAR α* は、APL と臨床診断された 44 例中 4 例が陰性であり、一方、AML でスクリーニングされた 541 例中 7 例で陽性例が認められ、形態診断だけ

でなく、キメラ遺伝子スクリーニングによる分子診断の必要性が再認識された。

予後不良因子として AML-05 臨床試験において造血幹細胞移植の適応とされる *FLT3*-ITD のスクリーニングでは、55 例 (10.2%) が陽性であり、これまでの小児例の報告の頻度と同等であった。AML-P05 臨床試験においても頻度は 11.8% と同程度であった。一方、ダウン症に伴う AML では、1 例のみ (1.3%) であり、スクリーニングの有用性は乏しいかもしれない。

治療後のキメラ遺伝子の経時的な MRD 解析では、最も症例数の多い *AML1-ETO* について検討した。これまでの報告のごとく、寛解導入 1 コース後のキメラ遺伝子発現量の減少は見られるものの多くの症例で残存し、治療終了時点においても 77.8% で MRD が検出され、その臨床的有用性には限界があると考えられた。

E. 結論

小児 AML にみられる染色体異常で生じる 8 種類のキメラ遺伝子と予後不良因子である *FLT3*-ITD の診断時スクリーニング検査を実施し、44.8% でいずれかのキメラ遺伝子が同定され、AML 病型および予後予測の迅速診断に貢献した。スクリーニングすべき遺伝子異常については見直しが必要かもしれない。キメラ遺伝子の MRD 解析の有用性については、さらに検証を要する。

F. 健康危険情報

本研究による直接的な健康被害はない。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Mizushima Y, Taki T, Shimada A, Yui Y, Hiraumi Y, Matsubara H, Watanabe M, Watanabe K, Kamitsuji Y, Hayashi Y, Tsukimoto I, Kobayashi R, Horibe K, Tawa

A, Nakahata T, Adachi S. Prognostic significance of the BAALC isoform pattern and CEBPA mutations in pediatric acute myeloid leukemia with normal karyotype: a study by the Japanese Childhood AML Cooperative Study Group. *Int J Hematol.* 2010 Jun;91(5):831-7.

2. Imaizumi M, Tawa A, Hanada R, Tsuchida M, Tabuchi K, Kigasawa H, Kobayashi R, Morimoto A, Nakayama H, Hamamoto K, Kudo K, Yabe H, Horibe K, Tsuchiya S, Tsukimoto I. Prospective study of a therapeutic regimen with all-trans retinoic acid and anthracyclines in combination of cytarabine in children with acute promyelocytic leukaemia: the Japanese childhood acute myeloid leukaemia cooperative study. *Br J Haematol.* 2011 Jan;152:89-98.

3. Ohta H, Iwamoto S, Kiyokawa N, Tsurusawa M, Deguchi T, Takase K, Fujimoto J, Horibe K, Komada Y. Flow cytometric analysis of de novo acute myeloid leukemia in childhood: report from the Japanese Pediatric Leukemia/Lymphoma Study Group. *Int J Hematol.* 2011 Jan;93(1):135-7.

4. Watanabe N, Takahashi Y, Matsumoto K, Hama A, Muramatsu H, Doisaki S, Horibe K, Kato K, Kojima S. Prognostic factors for outcomes of pediatric patients with refractory or relapsed acute leukemia undergoing allogeneic progenitor cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2010 Jul 29. [Epub ahead of print]

2. 学会発表

1. 富澤大輔 齋藤明子 多賀 崇 足立壮

- 一 中山秀樹 盛武 浩 木下明俊 高橋浩之 工藤寿子 堀部敬三 多和昭雄
乳児急性骨髄性白血病における早期死亡例の検討：JPLSG AML-05 臨床試験からの報告 第 52 回日本小児血液学会総会 2010.12.18 大阪
2. 渡邊修大 高橋義行 松本公一 濱 麻人 村松秀城 工藤寿子 堀部敬三 加藤剛二 小島勢二 小児急性骨髄性白血病第一寛解期に対する造血幹細胞移植の予後因子の解析 第 52 回日本小児血液学会総会 2010.12.19 大阪
3. 渡邊修大 高橋義行 松本公一 工藤寿子 加藤剛二 堀部敬三 小島勢二 高リスク小児血液腫瘍性疾患に対する同種

骨髄移植-MEL+TBI vs BU+MEL+TBI の比較
BU+MEL+TBI compared with MEL+TBI before allogeneic stem cell transplantation for advanced hematological malignancies 第33回日本造血細胞移植学会総会 2011.3.9 愛媛

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
該当なし
2. 実用新案
該当なし
3. その他
該当なし

厚生労働科学研究費補助金（がん臨床研究事業）
小児急性骨髄性白血病(AML)に対する標準的治療法の確立に関する研究
分担研究報告書

形態中央診断システムの構築に関する研究

研究分担者 宮地 勇人 東海大学医学部基盤診療学系 教授

研究要旨

本研究では、小児急性骨髄性白血病（AML）に対する標準的治療法の確立を目指す多施設共同臨床試験において形態中央診断システムを構築し、運用することを目的とした。多施設共同臨床試験の内訳は、AML-05「小児急性骨髄性白血病（AML）に対する多施設共同後期第 II 相臨床試験」、AML-P05「小児急性前骨髄急性白血病（APL）に対する多施設共同後期第 II 相臨床試験」、AML-D05「ダウン症候群に発症した小児急性骨髄急性白血病に対するリスク別多剤併用化学療法の後期第 II 相臨床試験」である。形態中央診断は各プロトコールに従い、初発未治療 BMA-1、寛解導入療法 1 後の BMA-2、寛解導入療法 2 後の BMA-3 および再発時の骨髄および末梢血塗抹標本にて実施した。AML-05、AML-P05、AML-D05 の 3 つの臨床試験において、初発時の病型診断症例は、開始以来それぞれ総数 539、46、81 例で、22 年度は BMA-1/-2/-3 の総件数が 343、31、61 件であった。初発時の病型診断は FAB 分類に加え、形態検査所見で該当する WHO 分類（第 3 版）を併記した。以上、一連の多施設共同臨床試験において形態中央診断を初めて導入することに成功した。形態中央診断は、診断の質を高めることで、リスク分類の層別化による治療成績の評価と各予後因子の意義の明確化について質の高い臨床研究に貢献することが期待される。

A. 研究目的

本研究では、小児急性骨髄性白血病（AML）に対する標準的治療法の確立を目指す多施設共同臨床試験において形態中央診断システムを構築し、運用することを目的とした。

B. 研究方法

AML の形態中央診断は、東海大学医学部基盤診療学系臨床検査学（責任者：宮地勇人）に於いて行った。多施設共同臨床試験の内訳は、AML-05「小児急性骨髄性白血病（AML）に対する多施設共同後期第 II 相臨床試験」、AML-P05「小児急性前骨髄急性白血病（APL）に対する多施設共同後期第 II 相臨床試験」、AML-D05「ダウン症候群に

発症した小児急性骨髄急性白血病に対するリスク別多剤併用化学療法の後期第 II 相臨床試験」である。

形態中央診断の対象は、初発未治療 BMA-1、寛解導入療法 1 後の BMA-2、寛解導入療法 2 後の BMA-3 および再発時の骨髄および末梢血塗抹標本にて実施した。

初発時の病型診断は FAB 分類に加え、形態検査所見で該当する WHO 分類（第 3 版）を併記した。完全寛解、骨髄再発の定義は、各プロトコールにしたがった。

（倫理面への配慮）

本研究は、小児血液学会及び小児白血病リンパ腫研究グループの倫理委員会の提唱するガイド

ラインに沿って、施設の倫理委員会で承認された臨床試験として行った。検体使用や取扱いは、「日本小児白血病リンパ腫研究グループ保存検体の収集・保存と分譲に関する規約」にしたがった。ヘルシンキ宣言を遵守し、検体は個人情報保護のため連結不可能匿名化を図った。

C. 研究結果

形態中央診断の実施は、各施設から実施施設に送付された未染の末梢血および骨髄塗抹標本について、まず、標本は、染色（普通、ペロキシダーゼ、エステラーゼ）後に、臨床検査技師による細胞カウントを行った。続いて、検査専門医／血液専門医による形態診断と報告書作成を行った。

AML-05、AML-P05、AML-D05 の3つの臨床試験における初発時の病型診断症例は、開始以来22年度までに、それぞれ総数539、46、81例であった。22年度の実績としては、以下のごとくである。

AML-05は総件数343件で、内訳はBMA-1 102件、BMA-2 107件、BMA-3 106件、再発28件であった。AML-P05は総件数31件で、BMA-1 11件、BMA-2 9件、BMA-3 11件、再発0件であった。AML-D05は総件数61件で、内訳はBMA-1 29件、BMA-2 25件、BMA-3 5件、BMA-4 1件、再発1件であった。

登録症例数は、集積予定症例数の目標に達成したため、AML-05とAML-P05は平成22年12月31日、AML-D05は平成23年3月31日にて、新規登録は終了となった。AML-05新規登録終了後、個々の病院では診断が難しい症例に絞って中央診断による診断支援を継続することとし、平成23年1月から開始した。診断困難例は、全6件で内訳はAML 5例、RAEB 1例であった（22年度は3件）。

形態中央診断の運用過程で発生した課題として、不適切な標本の提出（EDTA使用、乾燥不良

で細胞萎縮等）、不適切な標本提出方法（BMA-2、BMA-3において、末梢血標本が未送付、または好中球回復不十分であるため、「寛解判定不能」となる）が見られた。これらについては、是正のための通知を行い、改善が見られた。検体提出時の情報不足でPOX陰性（M5a, M6, M7相当等）時は形態診断のみでは診断が困難な場合に時に遭遇した。このため、各施設からの標本提出時に、施設におけるAMLの診断根拠に関する情報提供を記載することとした。

最終診断は、AML診断小委員会にて、形態中央診断を踏まえて、染色体検査、キメラ遺伝子検査、細胞表面マーカー検査などの他の検査所見を総合して検討、議論の上確定した。

D. 結論

小児急性骨髄性白血病（AML）に対する標準的治療法の確立を目指す多施設共同臨床試験において形態中央診断システムを初めて導入することに成功した。初発時の病型診断はFAB分類に加え、形態検査所見で該当するWHO分類（3版）を併記した。最終診断は、AML診断小委員会にて、形態中央診断を踏まえて、染色体検査、キメラ遺伝子検査、細胞表面マーカー検査などの他の検査所見を総合して検討、議論の上確定した。

E. 考察

初発時の病型診断はFAB分類に加え、形態検査所見で該当するWHO分類（3版）を併記した。急性白血病のFAB分類は、どの施設においても実施可能な形態診断に基づく。一方、新WHO分類は、分子病態の解明と臨床的意義の明確化を踏まえ、形態、免疫形質とともに染色体・遺伝子異常に基づき体系化されている。WHO分類は、治療予後を反映する病型情報を提供するものの、迅速性や簡便性等の点で必ずしも実用的でない。初発未治療（BMA-1）の形態中央診断は、免疫形

質、染色体検査やキメラ遺伝子検査の結果が不明の段階であり、WHO 分類の病型は暫定的である。形態中央診断は、WHO 分類における血液形態検査の意義を認識した上で行った。最終診断は、AML 診断小委員会にて、形態中央診断を踏まえて、染色体検査、キメラ遺伝子検査、細胞表面マーカー検査などの他の検査所見、臨床所見を総合して検討、議論の上確定した。形態中央診断は、診断の質を高めることで、リスク分類の層別化による治療成績の評価と各予後因子の意義の明確化に関して質の高い臨床研究に貢献することと期待される。

G. 研究発表

1. Muguruma Y, Matsushita H, Yahata T, Shizu Yumino S, Tanaka Y, Miyachi H, Ogawa Y, Kawada H, Ito M, Ando K. Establishment of xenograft model of human myelodysplastic syndromes. *Haematologica* 96: 543-551, 2011
2. Matsushita H, Gondo K, Tanaka Y, Miyachi H. "Triage" of lymphoid malignancies in the peripheral blood using the Extended Immunofluorescent Application of the CELL-DYN Sapphire automated hematology analyzer. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 49: 933-935, 2011

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得
予定なし
2. 実用新案登録
予定なし
3. その他
予定なし

平成 22 年度 厚生労働科学研究費補助金(がん臨床研究事業)
小児急性骨髄性白血病(AML)に対する標準的治療法の確立に関する研究
分担研究報告書

小児造血器腫瘍臨床研究の質の向上に関する研究

研究分担者 齋藤明子 独立行政法人国立病院機構名古屋医療センター臨床研究センター
臨床研究企画部 臨床疫学研究室 室長

研究要旨 小児急性骨髄性白血病(AML)の診療の質を向上させる目的で、病態解明の為の研究や、新治療法・標準的治療法開発を目的とした臨床研究は必要不可欠である。2002 年に発足した日本小児白血病リンパ腫研究グループ内で行われる AML 関連の臨床研究の質を確保する目的で、独立行政法人国立病院機構名古屋医療センター臨床研究センター疫学研究室は、特定非営利活動法人臨床研究支援機構と連携して、各種臨床研究のデータ管理の実務と方法論の研究を実施している。平成 22 年度は、AML 関連の 3 臨床試験、2 観察研究などの質管理の実務を担当し、その標準化・効率化を図るための研究活動を実施してきた。平成 21 年度 4 月より施行となった「臨床研究に関する倫理指針」に従い、臨床研究に関連するデータの取扱いに関する手順を個人情報保護ポリシーとして作成し整備した。又、当該稀少疾患領域におけるエビデンスの創生に必要な“網羅的把握による疫学研究の発展”を実現する為の実施計画書を作成し、開始した。今後も継続して当該領域のデータ管理の基盤整備に努める。

A. 研究目的

小児造血器腫瘍性疾患のうち、小児急性骨髄性白血病(AML)の病態解明を目的とした各種研究、新治療法・標準的治療法開発を目的とした臨床研究、及び疫学研究は、当該領域の診療の質を向上させる上で必要不可欠である。この実現を目的として 2002 年に設立された日本小児白血病リンパ腫研究グループが企画・実施する各種臨床研究の質管理の担当部門として、研究協力を行う。すなわち臨床研究より得られる結果の質を確保する為、中央データセンターとして臨床研究の企画から結果公表に至る一連の作業を監視し、正確な情報発信を適時に行うことにより、科学的なエビデンスの創生に努めることが我々の使命である。臨床試験のような特殊な実験環境下で得られる研究の結果を、より広い患者集団

へ適用することの妥当性を評価する為には、必要な臨床研究への参加の有無によらず、当該領域の患者集団の臨床経過を網羅的に把握し、患者集団の違いによる効果・安全性の比較が必要不可欠であることから、当該領域のより広い患者集団を対象とした前向きコホート調査の為の基盤整備に努める必要性もあるため、体制整備も行う。

B. 研究方法

1. 独立行政法人国立病院機構名古屋医療センター臨床研究センター内に、特定非営利活動法人臨床研究支援機構(NPO OSCR)データセンターを設置し、名古屋医療センター臨床研究センター 臨床研究企画室 臨床疫学研究室と共同で、臨床研究の質確保を担当する。NPO OSCR

でデータマネージャーを雇用し実務を担当させると共に、臨床疫学研究室の客員研究員として、臨床研究の質向上の為の方法論の研究を行わせることで育成を図る。これら一連の活動を通して、データセンターとしての標準化・効率化を図る。

2. データ管理部門として、患者の個人情報及び診療情報の保護に関するポリシーを遵守した活動を行うとともに、関係者への個人情報保護に関する啓蒙をはかる。
3. JPLSG の各種委員会(AML 治療研究委員会、診断委員会、効果安全性評価委員会、監査委員会、事務局、外部検査部門)などの連携が効率的かつ円滑に行われるよう、システムの有機的整備を行う。
4. 稀少疾患であるという小児造血器腫瘍領域の特殊性、急激な少子化、及び治療成績向上を目指した層別化治療の発展に伴い、少ない症例数での臨床研究を実行可能にするためのデザインの工夫が必要不可欠であることから、統計学的方法論の研究や疫学研究の開発を行う。

(倫理面への配慮)

昨年度、臨床研究に関する倫理指針の施行に従い、データセンター業務運用に必要な患者の個人情報及び診療情報の保護方針をまとめ、ポリシーとして成文化した。本年度も継続して、倫理指針及び個人情報保護ポリシーを遵守した活動を行うことで倫理面への配慮をはかる。

C. 研究結果

1. 臨床研究の質確保

データ管理担当者として、AML 関連の 3 つの臨床試験について、症例登録、進捗管理、

定期的なデータクリーニング、安全性情報管理業務などを実施した。又、AML の新規の 2 つの臨床研究について、研究開始に先立ち、実施計画書/同意説明文書作成支援、データ管理計画作成、オンライン登録システム確立、臨床研究開始説明会実施、及びデータベース構築によるデータ管理システム確立に向けての作業を遂行中である。

2. 観察研究の質確保

AML 治療研究委員会を中心として、AML 再発例に関する調査研究や支持療法に関する観察研究などが計画・実施された。データ管理担当者として調査実施に関わる必要情報の提供から、計画書及び調査票などの作成支援を行った。調査結果の解析も担当した。

3. 個人情報保護ポリシーの作成

JPLSG の各種 AML 関連の臨床研究のデータ管理を担当する上で、患者の個人情報及び診療情報の漏洩、混交、紛失、盗用などを防ぐ為のセキュリティ確保の方針、患者情報の不正流出の防止策、不要となった情報の取り扱い、開示の方法、研究に関わる側の情報の取り扱いなどについて具体的の方針を定め、「個人情報保護方針」を作成し、関係者への周知・徹底を図った。

4. 臨床研究デザインの工夫及び疫学研究の開発

当該グループは研究開始当初より、臨床研究への症例登録手続きに先立ち、JPLSG 登録を行ってきた。これは主として、研究グループが診断技術向上と標準化を目指した中央診断施設への一貫した検体搬送システムを確立する意図に基づいていた。JPLSG 登録症例の中には、臨床研究の候補者であっても細かい対象に関する規定への抵触などの理由で臨床研究に参加しない症例が存在する。臨床

研究不参加症例のその後の治療内容と臨床効果を把握することが出来れば、臨床研究に参加し、厳密な管理の下で規定の治療を受けた患者から得られた臨床研究結果の一般化の妥当性評価が可能となる。この点に着目し、当該領域の患者を網羅的に把握できる前向きコホート研究のシステムを確立するための実施計画書を作成し、日本小児科学会による審査承認を得た。前述の如く、小児AML領域の臨床研究を行う上での問題は、疾患の稀少性にあり、この試みが、問題解決への第一歩となる。

D. 考察

稀少な小児AML疾患領域の診療の質向上を目指した病態研究や治療開発研究は、将来ある小児の福祉向上に必要不可欠であるものの、市場が小さい上に治療に伴う毒性が強いことから、営利を目的とする企業が扱い難い領域であることも事実で、医師主導の研究に頼らざるを得ない。当該領域のデータセンターが設立して7年経過し、担当する臨床研究数も着実に増加してきている。国内には、日本臨床腫瘍研究グループ(Japan Clinical Oncology Group; JCOG)のような歴史ある臨床研究グループを支えるデータセンターが存在し、我々の良きrole modelとなっている。しかしJCOGデータセンター業務との決定的な違いは、“稀少疾患領域であること”、“小児という成長過程にある患者集団を対象としていることより、投薬量は時間と共に変化し、妊育性も含めた広い毒性評価を長期的に観察する必要があること”、“固形がんのような局所治療が主となることはなく、常に全身性疾患としての長期的な全身治療が必要になる”ことなどである。必然的に、調査は複雑化・煩雑化

する。参加施設側の臨床研究支援体制は未だ十分とはいえず、少ない小児科医師が多忙な臨床業務の傍ら、複雑な研究を行っている実情がある。その為、登録、中央診断・検査、症例経過報告などの手順は、なるべく簡便で、標準化されていることが望ましい。JPLSG疫学研究の開始により、臨床研究のリクルートの問題や長期フォローアップとの連携が整理できるのではないかと考えている。各種委員会の業務を中央データセンターとしてサポートする作業も含めて、実務経験を重ね、データの質を落とさずに業務の簡略化・標準化を図るよう、今後も引き続き地道な努力が必要であると考えている。

E. 結論

臨床疫学研究室はOSCRデータセンターと共同でJPLSGが企画・実施しているAML関連の臨床研究の質管理の実務・研究を担当している。臨床研究支援体制整備はまだ開発途上であり、効率化・標準化を図るための地道な努力を継続して行っていく。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表、2. 学会発表等

該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得、2. 実用新案、3. その他

該当なし