

免疫・アレルギー科学総合研究センター ヒト疾患モデル研究ユニット)との共同研究を行い、診断時の患者検体を用いて乳児白血病細胞のソーティングおよび免疫不全マウスへの異種移植によるマウスモデルを作成し、乳児ALLにおける白血病幹細胞を同定し、その治療抵抗性の機序を明らかにする。

3. 次期臨床試験計画の立案 (国際共同研究)

乳児ALLの予後改善には将来的な新規薬剤の導入が必要不可欠であるが、希少疾患であることから、新規治療の有効性と安全性を検証するには国際共同研究を実施する必要がある。2012年12月以降、日本 (JPLSG)、米国 (Children's Oncology Group: COG)、欧州 (Interfant)の3臨床研究グループによる国際共同研究実現に向けて協議を継続している。

C. 研究結果

1. MLL03 臨床試験

2004年2月～2009年1月の間に計63例(適格62例)が登録された。2012年5月にデータの固定を行い、最終解析を実施した。プライマリーエンドポイントの18か月EFS 53.2% (95%CI, 40.1% - 64.6%)と、実施計画書で規定された閾値奏功割合(40%)を上回り、本試験治療の有効性が証明された。3年EFS 46.7%、3年OS 72.5%と、特にOSについて、過去の臨床試験と比較して良好な成績が得られた。現在、本結果について論文作成を行い、現在投稿中である。

2. MLL-10 臨床試験

2011年1月より試験が開始された。2014年1月時点で、117施設においてIRB承認が得られ、登録が54/70例(77%)と順調に症例集積が進んでいる。2013年11月に第5回定期モニタリングレポートを効果安全性評価委員会に提出し、研究継続可能と判定された。ただし、本試験において中間リスク群 (MLL 遺伝子再構成陽性例のうち、診断時日齢180日

以上で中枢神経浸潤陰性例)の症例集積が現時点で9例と伸び悩んでいることから、試験期間延長について検討している。

また、附随研究として実施している白血病幹細胞研究についても乳児ALLの白血病幹細胞の階層性について新たな知見が得られ、現在論文投稿中である。

3. 次期臨床試験計画の立案 (国際共同研究)

日本 (JPLSG)、米国 (Children's Oncology Group: COG)、欧州 (Interfant)の3臨床研究グループが共同することにより、年間約160例の乳児ALL症例が、MLL 遺伝子再構成陽性例については約120例の集積を見込むことができ、ランダム化比較試験による新規治療の有効性について評価できる。検証する新規薬剤としては、脱メチル化剤 (azacitidine) とヒストン脱アセチル化阻害剤 (vorinostat) の併用療法が第1候補となっている。今後、試験計画の細部を詰めていくと同時に、薬剤入手方法や国際共同研究実現のためのICH-GCP 準拠による臨床試験実施体制の整備等を進めていく。

D. 考察

本邦では、1990年代後半から乳児白血病に対する全国規模での共同研究が行われ、乳児白血病共同研究会のMLL96およびMLL98試験、JPLSG MLL03 試験の結果、MLL 遺伝子再構成陽性例に対しては寛解導入後早期に造血幹細胞移植を実施する治療戦略を、MLL 遺伝子再構成陰性例に対する効果的な化学療法レジメンを確立してきた。その結果、前者において40%のEFSを、後者に対しては90%を超えるEFSを達成した。しかしながら、MLL 遺伝子再構成陽性群の治療成績は未だ十分なものではなく、また移植に伴う晩期合併症の問題も無視できない。現在、MLL-10 臨床試験では、MLL 遺伝子再構成陽性群に対するより効果的な化学療法レジメンを確立すること、層別化によ

り同種造血幹細胞移植の適応を最小限にすること、MRD など新規予後因子についての検討、病態解明に向けた白血病幹細胞研究等を進めている。更に、予後不良な MLL 遺伝子再構成陽性例の治療成績改善には新規薬剤の導入が必要不可欠であり、米国や欧州との国際共同研究の実現により、新規治療法の有効性を明らかにし、乳児 ALL の更なる予後改善を目指す必要がある。

E. 結論

MLL03 臨床試験にて、MLL 遺伝子再構成陽性例に対する早期造血幹細胞移植の有用性が示されつつある。移植に伴う晩期合併症の軽減を含めた治療の適正化と更なる治療成績の向上を目指して、MLL-10 臨床試験が進行中である。更に、新規薬剤を導入した国際共同臨床試験の計画が進行中である。

F. 健康危険情報

特に重篤な副作用は報告されていない。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 高橋浩之, 盛武浩, 照井君典, 井上彰子, 落合秀匡, 金井理恵, 豊田秀実, 松野良介, 塩原正明, 中尾朋平, 富澤大輔, 多賀崇, 多和昭雄, 足立壮一. 小児急性前骨髄球性白血病に対する三酸化ヒ素による治療. 日本小児血液・がん学会雑誌. 2013; 50(1): 32-37.
- 2) Tomizawa D, Tawa A, Watanabe T, Moriya Saito A, Kudo K, Taga T, Iwamoto S, Shimada A, Terui K, Moritake H, Kinoshita A, Takahashi H, Nakayama H, Koh K, Kigasawa H, Kosaka Y, Miyachi H, Horibe K, Nakahata T, Adachi S. Excess

treatment reduction including anthracyclines results in higher incidence of relapse in core binding factor acute myeloid leukemia in children. *Leukemia* 2013; 27(12): 2413-6

- 3) Coenen EA, Zwaan CM, Reinhardt D, Harrison CJ, Haas OA, de Haas V, Mihál V, De Moerloose B, Jeison M, Rubnitz JE, Tomizawa D, Johnston D, Alonzo TA, Hasle H, Auvrignon A, Dworzak M, Pession A, van der Velden VH, Swansbury J, Wong KF, Terui K, Savasan S, Winstanley M, Vaitekeviciene G, Zimmermann M, Pieters R, van den Heuvel-Eibrink MM. Pediatric Acute Myeloid Leukemia with t(8;16)(p11;p13): a distinct clinical and biological entity, a collaborative study by the International-Berlin-Frankfurt-Münster AML-study group. *Blood* 2013; 122(15): 2704-13
- 4) Tomizawa D, Tawa A, Watanabe T, Moriya Saito A, Kudo K, Taga T, Iwamoto S, Shimada A, Terui K, Moritake H, Kinoshita A, Takahashi H, Nakayama H, Kiyokawa N, Isoyama K, Mizutani S, Hara J, Horibe K, Nakahata T, Adachi S. Appropriate dose reduction in induction therapy is essential for the treatment of infants with acute myeloid leukemia: A report from the Japanese Pediatric Leukemia/Lymphoma Study Group. *Int J Hematol* 2013; 98(5): 578-588

5) Kato M, Takahashi Y, Tomizawa D, Okamoto Y, Inagaki J, Koh K, Ogawa A, Okada K, Cho Y, Takita J, Goto H, Sakamaki H, Yabe H, Kawa K, Suzuki R, Kudo K, Kato K. Comparison of intravenous with oral busulfan in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation with myeloablative conditioning regimens for pediatric acute leukemia. *Biol Blood Marrow Transplant* 2013; 19(12): 1690-4

2. 学会発表

- 1) Shiba N, Yoshida K, Nagata Y, Kon A, Okuno Y, Shiraishi Y, Kato M, Park M-J, Ohki K, Takita J, Kanazawa T, Kudo K, Ito E, Sanada M, Tomizawa D, Tawa A, Adachi S, Miyano S, Ogawa S, Hayashi Y. Whole-exome resequencing identifies somatic mutations of BCOR and BCORL1 transcriptional corepressor genes and major cohesin complex component genes in pediatric acute myeloid leukemia. 55th Annual Meeting of the American Society of Hematology, New Orleans, USA, December 7-10, 2013.
- 2) Sano H, Ohki K, Park M-J, Hara Y, Shiba N, Tomizawa D, Taga T, Saito AM, Fujimoto J, Tawa A, Horibe K, Adachi S, Hayashi Y. CSF3R gene mutations in myeloid malignancy of childhood. 55th Annual Meeting of the American Society of Hematology, New Orleans, USA, December 7-10, 2013.
- 3) Ohki K, Park M-J, Sano H, Hara Y, Shiba N, Tomizawa D, Taga T, Saito AM, Fujimoto J, Tawa A, Horibe K, Adachi S,

Hayashi Y. Low frequency and poor prognosis of MLL-partial tandem duplications in pediatric acute myeloid leukemia using MLPA method: The Japanese Pediatric Leukemia/Lymphoma Study Group (JPLSG) AML-05 Trial. 55th Annual Meeting of the American Society of Hematology, New Orleans, USA, December 7-10, 2013.

- 4) Keino D, Kinoshita A, Tomizawa D, Takahashi H, Ida K, Kurosawa H, Koike K, Ota S, Iwasaki N, Fujimura J, Yuza Y, Kiyotani C, Yamamoto S, Osumi T, Ueda T, Mochizuki S, Isoyama K, Hanada R, Tawa A, Kikuchi A, Manabe A, Ohara A. Significance of minimal residual disease detected by multi-color flow cytometry in childhood acute myeloid leukemia with the intermedeate-risk cytogenetics and negative FMS-like tyrosine kinase 3 internal tandem duplication: A report of the Tokyo Children's Cancer Study Group. 55th Annual Meeting of the American Society of Hematology, New Orleans, USA, December 7-10, 2013.
- 5) Hara Y, Shiba N, Ohki K, Park M-J, Tomizawa D, Taga T, Saito AM, Fujimoto J, Arakawa H, Tawa A, Horibe K, Adachi S, Hayashi Y. Comprehensive fusion gene analysis of pediatric non-Down syndrome acute megakaryoblastic leukemia. 55th Annual Meeting of the American Society of Hematology, New Orleans, USA, December 7-10, 2013.
- 6) Kato M, Takahashi Y, Tomizawa D, Okamoto Y, Inagaki J, Koh K, Ogawa A, Okada K, Cho Y, Takita J, Goto H, Sakamaki H, Yabe H, Kawa K, Suzuki R, Kudo K, Kato K.

- Comparison of intravenous with oral busulfan in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation with myeloablative conditioning regimens for pediatric acute leukemia. 55th Annual Meeting of the American Society of Hematology, New Orleans, USA, December 7-10, 2013.
- 7) Shimada A, Yamashita Y, Tomizawa D, Tawa A, Watanabe T, Yokozawa T, Kudo K, Taga T, Iwamoto S, Terui K, Moritake H, Kinoshita A, Takahashi H, Nakayama H, Koh K, Goto H, Kosaka Y, Saito AM, Fujimoto J, Horibe K, Oki K, Hayashi Y, Adachi S. Poor prognosis with different induction rate was observed in children with acute myeloid leukemia and FLT3-ITD according to the ITD/WT allelic ratio: a result from the Japanese Pediatric Leukemia/Lymphoma Study Group. 55th Annual Meeting of the American Society of Hematology, New Orleans, USA, December 7-10, 2013.
- 8) 村松秀城, 坂口大俊, 富澤大輔, 岡本康裕, 井上雅美, 稲垣二郎, 気賀沢寿人, 加藤剛二, 矢部晋正, 河敬世, 熱田由子, 工藤寿子. t(8;21)および inv(16)を有する小児急性骨髄性白血病 175 例に対する造血幹細胞移植の成績. 第 35 回日本造血細胞移植学会総会, 2013 年 3 月 8 日, 金沢
- 9) 富澤大輔, 多和昭雄, 渡辺智之, 齋藤明子, 康勝好, 気賀沢寿人, 小阪嘉之, 堀部敬三, 中畑龍俊, 足立壮一. 小児急性骨髄性白血病の治療成績: JPLSG AML-05 臨床試験より. 第 116 回日本小児科学会学術集会, 2013 年 4 月 20 日, 広島
- 10) Tomizawa D, Saito M, Takahashi H, Fukushima T, Kiyokawa N, Koh K, Manabe A, Kikuchi A, Ohara A. Outcome of children older than 1 year with acute lymphoblastic leukemia and *MLL* gene rearrangement. 第 75 回日本血液学会総会, 2013 年 10 月 12 日, 札幌
- 11) Matsuo H, Kajihara M, Tomizawa D, Watanabe T, Saito AM, Fujimoto J, Horibe K, Tokumasu M, Itoh H, Nakayama H, Kinoshita A, Taga T, Tawa A, Taki T, Adachi S. Investigation of the clinical significance of CEBPA mutation in child AML; The JPLSG AML-05 study. 第 75 回日本血液学会総会, 2013 年 10 月 11 日, 札幌
- 12) Tokumasu M, Nagao M, Shimada A, Murata C, Ohki K, Hayashi Y, Saito A, Fujimoto J, Horibe K, Itoh H, Nakayama H, Kinoshita A, Tomizawa D, Taga T, Yamaguchi H, Tawa A, Heike T, Adachi S. Prognostic impact of *KIT* mutations in t(8;21) childhood AML: the JPLSG AML-05 trial. 第 75 回日本血液学会総会, 2013 年 10 月 11 日, 札幌
- 13) Hara Y, Shiba N, Ichikawa H, Taki T, Shimada A, Kudo K, Tomizawa D, Taga T, Adachi S, Arakawa H, Tawa T, Hayashi Y. *NUP98-NSD1* gene fusion is a strong poor prognostic factor in pediatric AML. 第 75 回日本血液学会総会, 2013 年 10 月 11 日, 札幌
- 14) Keino D, Kinoshita A, Tomizawa D, Takahashi H, Ida K, Kurosawa H, Koike K, Ota S, Yamamoto S, Kiyotani C, Yuza Y, Fujimura J, Iwasaki N, Osumi T, Ueda T, Mochizuki S, Isoyama K, Hanada R, Tawa A, Kikuchi A, Ohara A. Minimal residual disease in pediatric acute myeloid leukemia by multidimensional

- flow cytometry. 第75回日本血液学会総会, 2013年10月11日, 札幌
- 15) Takahashi H, Matsushita H, Kinoshita A, Taki T, Deguchi T, Kiyokawa N, Hashii Y, Hayashi Y, Tomizawa D, Taga T, Tawa A, Adachi S, Yabe M, Miyachi H. A diversity of cases in AML with promyelocytic differentiation; A report from JPLSG. 第75回日本血液学会総会, 2013年10月11日, 札幌
- 16) Kato M, Takahashi Y, Tomizawa D, Okamoto Y, Inagaki J, Koh K, Ogawa A, Okada K, Sakamaki H, Yabe H, Kawa K, Suzuki R, Kudo K, Kato K. Comparison of intravenous with oral busulfan in transplantation for pediatric acute leukemia. 第75回日本血液学会総会, 2013年10月13日, 札幌
- 17) Taga T, Saito AM, Kudo K, Tomizawa D, Terui K, Moritake H, Kinoshita A, Iwamoto S, Nakayama H, Takahashi H, Tawa A, Shimada A, Taki T, Kigasawa H, Koh K, Adachi S. Clinical characteristics and outcome of refractory/relapsed myeloid leukemia in children with Down syndrome. 第55回日本小児血液・がん学会学術集会, 2013年11月29日(プレナリー・セッション), 福岡
- 18) Ohki K, Sano H, Park M-J, Hara Y, Shiba N, Sotomatsu M, Tomizawa D, Taga T, Saito A, Fujimoto J, Tawa A, Horibe K, Adachi S, Hayashi Y. Low frequency and poor prognosis of MLL-partial tandem duplications in pediatric acute myeloid leukemia using MLPA method: the Japanese Pediatric Leukemia/Lymphoma Study Group (JPLSG) AML-05 trial. 第55回日本小児血液・がん学会学術集会, 2013年11月29日(ワークショップ), 福岡
- 19) Yabe M, Matsushita H, Kinoshita A, Tokumasu M, Shimada A, Taki T, Hayashi Y, Tomizawa D, Taga T, Tawa A, Adachi S, Miyachi H. Detection of the KIT mutation and treatment response of acute myeloid leukemia associated with mastocytosis: A retrospective study of JPLSG-AML05. 第55回日本小児血液・がん学会学術集会, 2013年11月29日(ワークショップ), 福岡
- 20) Kurosawa H, Sato Y, Okuya M, Fukushima K, Arisaka O, Park M-J, Matsui H, Inaba T, Inukai T, Fujimoto J, Tawa A, Tomizawa D, Taga T, Adachi S, Horibe K, Hayashi Y. Inhibitor of apoptosis proteins family genes expression in childhood AML. 第55回日本小児血液・がん学会学術集会, 2013年11月29日(ワークショップ), 福岡
- 21) Hara Y, Shiba N, Ohki K, Park M-J, Sotomatsu M, Tomizawa D, Taga T, Tawa A, Arakawa H, Adachi S, Hayashi Y. Comprehensive fusion gene analysis of non-Down syndrome acute megakaryoblastic leukemia. 第55回日本小児血液・がん学会学術集会, 2013年11月29日(ワークショップ), 福岡
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得
なし
 2. 実用新案
なし
 3. その他
なし

再発急性リンパ性白血病の標準的治療法の確立に関する研究

研究分担者 小川千登世 国立がん研究センター中央病院 小児腫瘍科 医長

研究要旨 本研究の目的は、再発急性リンパ性白血病(ALL)に対する化学療法、放射線療法、造血幹細胞移植を含む標準的治療法の開発である。小児再発 ALL 治療の実態を把握するため、全再発 ALL の前方視的観察を行う臨床研究 ALL-R08 を 2009 年 6 月 1 日より開始、この中で non-T-ALL の中間危険群 S2 に対しては ALL-REZ BFM95/96 を基本骨格とし、微小残存病変(MRD)による治療選択を組み込んだ臨床試験 ALL-R08-II を実施している。また、低危険群 S1 に対しては修正 ALL-REZ BFM95/96 プロトコールを推奨治療として提示している。ALL-R08 は 163 例が登録され 2013 年 10 月 31 日をもって予定通り登録終了となった。引き続き治療および観察継続中である。観察研究 ALL-R08-I においては 2013 年 6 月 30 日時点での登録データをもとに、高危険群 S3/4 群における治療および予後について探索的中間解析を実施した。臨床試験 ALL-R08-II においては今期も 2013 年 6 月 30 日および 12 月 31 日までの集積データの定期モニタリングにて、安全性を確認、有効性も想定範囲内であったため、現在も治療継続中である。プロトコール治療自体に関連する重篤な有害事象報告はない。また、並行して難治・再発 T-ALL に対するネララビンを組み込んだ多剤併用治療の第 I/II 相試験 ALL-RT11 を 2011 年 12 月 1 日より開始した。2014 年 2 月 28 日現在 Phase I のレベル 1 に 3 例が登録され、DLT なくレベル 2 へ進んだ。また、ALL-R08 終了後の国際共同研究 IntReALL2010 への参加にむけて研究計画書のプロトコールレビュー審査は終了し、小児血液・がん学会倫理委員会申請の準備中である。参加施設選定、およびデータ集積システム、国際共同試験としての有害事象報告体制の協議も終了し、システム構築に入っている。新薬導入や国際研究を含めたあらゆる治療戦略を視野に入れ、今後も更なる検討を重ねていく。

A. 研究目的

再発小児急性リンパ性白血病に対する標準的治療法を開発する。

B. 研究方法

本邦の過去の再発 ALL 治療成績の解析から導き出された①移植比率が高いにもかかわらず危険度の低い群(BFM-S1,S2)の予後が不良である、②特に中枢神経(CNS)再発の予後が不良である、③危険度の高い群(BFM-S3/4)の予後

は諸外国同様不良である、等の課題のうち、①、②を解決するため、本邦の再発 ALL 中間危険群 S2 を対象とした臨床試験 ALL-R08-II を実施する。これ以外の群に対しては前方視的観察研究 ALL-R08-I を行い、③の背景となる治療実態を正確に把握する。また、低危険群 S1 に対しては推奨治療を提示する。これらを全体として全再発 ALL に対する一つの臨床研究 ALL-R08 として計画、実施する。さらに、③群のうち、T-ALL に対してはネララビンを組み込んだ

多剤併用試験 ALL-RT11 を実施する。その他の高危険群に対しては新薬導入の検討を行う。

C. 研究結果

1. 2009年6月1日より患者登録を開始した ALL-R08 は2013年10月31日をもって登録を完了した。参加施設数 115 施設、登録患者数 163 (観察研究 R08-I : 82、臨床試験 R08-II : 81) 例であった。
2. non-T-ALL の中間危険群 S2 に対する臨床試験 ALL-R08-II は ALL-REZ BFM95/96 の治療を修正して適用し、寛解導入療法後も MRD が残存する例については、同種移植を行うことにより S2 の無イベント生存率(EFS)を過去の日本の治療による EFS より改善させるか、有効性と安全性を検証する試験である。試験は進行中であり、2013年10月31日の登録終了までに登録された、ALL-R08-II 症例数は 81 例である。最新の定期モニタリング(第8回、2013年6月30日現在)結果では、登録症例 77 例中 23 例が治療中である。今期、移植群の 1 例が移植終了、また、化学療法群の 2 例が維持療法を終了して治療完了した。累積では移植群で 16 例、化学療法群で 4 例が治療完了している。累積で 21 例がプロトコル治療中止となっており、主な中止理由は BMA5 の時点における非寛解、再々発、患者または主治医の申し出 (L-asparaginase に対する過敏症による多剤への変更) によるものであった。今期、プロトコル治療による重篤な有害事象はなかった。安全性、有効性は想定範囲内であり、効果安全性評価委員会において継続許可を得た。
3. 前方視的観察研究 ALL-R08-I も進行中であり、2013年10月31日の登録終了時の登録症例数は 82 例であった。2013年6月末日までに登録された標準危険群 S2 および高危険群 S3/4 群症例につき、治療内容および予

後について探索的中間解析を実施した。疾患群別の無イベント生存率[95%信頼区間: 95%CI] は、S2 (n=16)では 1年: 93.8% [63.2-99.1%]、2年: 59.1% [21.4-83.5%]、S3 (n=31)では 1年: 56.6% [36.9-72.3%]、2年: 46.3% [26.4- 64.1%]、3年: 34.7% [12.7- 58.2%]、S4 (n=22)では 1年: 27.4% [10.4- 47.7%]、2年: 21.9% [7.0- 41.9%]であった(p=0.011)。また、同全生存率[95%CI] は、S2 (n=16)では 1年、2年ともに 100%、S3 (n=31)では 1年: 76.0% [53.9- 88.6%]、2年: 60.4% [36.9- 77.5%]、3年: 60.4% [36.9- 77.5%]、S4 (n=22)では 1年: 55.0% [31.2- 73.6%]、2年: 32.1% [12.8-53.3%]であった(p=0.001)。S3/4 群の患者の第二寛解導入療法として ALL- REZ BFM 95/96 タイプの治療とその他の第二寛解導入療法での無イベント生存率と全生存率に差を認めなかった。

4. 高危険群のうち、T-ALL に対しては 2011年12月1日に「小児難治性 T 細胞性急性リンパ性白血病に対するネララビン、フルダラビン、エトポシドを用いた寛解導入療法 第 I/II 相臨床試験(ALL-RT11)」を開始し、第 I 相臨床試験の IRB 承認 14 施設、未承認 2 施設、第 II 相臨床試験の IRB 承認 31 施設、未承認 8 施設である。2014年2月28日現在、第 I 相試験レベル 1 に 3 例が登録され、DLT の発生はなかった。第 I 相試験の薬剤投与量レベル 1 の安全性が確認され、レベル 2 へと進んでいる。
5. ALL-R08 登録終了後に開始予定の次期試験、国際共同研究 IntReALL2010 の実施の詳細について、2013年5月に 24th Annual Meeting of the International BFM Study Group (キール)にて研究計画の最終調整を行い、また、ベルリン医科大学(Charite)内 I-BFM データセンターを訪問してのカンファレンスにより、データ集積システ

ムの運用方法とデータ移行の具体的方法、有害事象報告方法などについて協議を行い国際共同研究の異なるデータベースにおけるデータ集積方法を決定した。

また、Thalwil, Zurich, (Switzerland) での第 14 回 Interim Meeting of the Resistant Disease Committee of the I-BFM-SG にてヨーロッパ内外各国との議論を行い、IntReALL2010SR の開始時期決定、データベース間のデータ移行、モニタリング、賠償保険契約等、実施に関する具体的な準備を行った。高危険(HR)群については、ランダム化比較試験のレジメンを UK-R3 を標準治療とし、Bortezomib を追加した試験アームを設定すること、移植前処置前に新薬 Blinatumomab を試験治療として追加することを決定した。

D. 考察

2009 年 6 月に開始した臨床研究 ALL-R-08 には登録予定数の約 85% が登録され、治療中である。ALL-R08-II においては、97% の症例が集積され、BMA3 の MRD による層別化も順調に行われ、定期モニタリングによる安全性評価も特に問題ない。有効性は化学療法群の治療終了後の観察期間が必要であるため、現時点での評価は不十分であるが、予後の改善が期待できる。

今期は予後不良である S3/4 群の観察研究にて中間解析を行った。第二寛解導入割合は全体で 50%、18 ヶ月 EFS は、S3/4 とともに 30% 未満であったが、18 ヶ月 OS は S3 群では 83% であり、造血細胞移植による救済が推測された。また、再発・難治の T-ALL に対しても新規薬剤を導入した寛解導入療法試験 ALL-RT11 が開始され、難治 ALL への有効性評価が待たれる。有効性が期待されながら本邦では使用できない薬剤もいまだ多いが、今後は米国 TA-CL、ヨーロッパの ITCC などとも連携しつつ、共同研究の中で新規薬剤を導入した試験も実施するための体

制の整備を行っていく。具体的には、第 13 回 Interim Meeting of the Resistant Disease Committee of the I-BFM-SG にて希少疾患群や新規薬剤、治療に関する情報収集・提供を行うとともに、国際共同研究 IntReALL2010SR を 2013 年末あるいは 2014 年早々に開始する。より有効な治療の確立のための国際共同研究体制は整いつつある。

E. 結論

全再発 ALL の前方視的観察を行う臨床研究 ALL-R-08 を実施して、症例登録は完了した。この中で、non-T の中間危険群 S2 に対する MRD による治療選択を組み込んだ臨床試験 ALL-R08-II も行っており、観察期間終了を待って解析を行う。また、T-ALL に対する第 I/II 相臨床試験 ALL-RT11 は Phase I のレベル 1 を終了し、レベル 2 の症例継続中である。ボルテゾミブを組み込んだ新規寛解導入療法の第 1/2 相試験と、ALL-R08 終了後の次期国際共同研究 IntReALL2010 の準備も進んでいる。予後不良群に対しては新薬導入や国際研究を含めたあらゆる治療戦略を視野に入れ、今後も更なる検討を重ねていく。

F. 健康危険情報

H24 年度報告では本研究の臨床試験でプロトコール治療に関連して発症した感染症の治療中に、未報告の重篤な有害事象である横紋筋融解が発症し、当該症例は治療中止した。委員会にて詳細を検討した結果、感染症に続発した二次的なものであり、治療研究継続可能と判断し、効果安全性評価委員会に報告し承認を得た。本年度はプロトコール治療に関連する重篤な有害事象は発生していない。

G. 研究発表

1. 論文発表
なし

2. 学会発表

- 1) Ogawa C. Interim analysis of ALL-R08 ; safety data of S3/4 group in Japan. 14th Interim Meeting of the I-BFM Resistant Disease Committee, 7th-9th February 2014, Thalwil, Switzerland
- 2) 石田 悠志, 長谷川 大輔, 野崎 太希, 細谷 要介, 吉原 宏樹, 平林 真介, 神谷 尚宏, 熊本 忠史, 小川 千登世, 細谷 亮太, 森 慎一郎, 真部 淳 : 血球貪食症候群の経過中に中枢神経症状を呈した3例の画像的考察 ; 日本小児血液・がん学会学術集会 ; 2013年12月1日 ; 福岡. 日本小児血液・がん学会学術集会
- 3) 藁谷 朋子, 大原 喜裕, 小林 正悟, 赤井畑 美津子, 佐野 秀樹, 伊藤 正樹, 清水 裕史, 山下 方俊, 伊勢 一哉, 小川 千登世, 菊田 敦, 細矢 光亮 : 寛解導入療法中に接合菌感染による腸管穿孔を来した小児急性リンパ性白血病の1例 ; 日本小児血液・がん学会学術集会 ; 2013年11月30日 ; 福岡. 日本小児血液・がん学会学術集会
- 4) 赤井畑 美津子, 大原 喜裕, 藁谷 朋子, 小林 正悟, 佐野 秀樹, 細矢 光亮, 小川 千登世, 菊田 敦, 大戸 斉 : Bortezomib 併用化学療法で寛解導入し HLA 半合致移植を施行した小児再発急性リンパ性白

血病 ; 日本小児血液・がん学会学術集会 ; 2013年11月29日 ; 福岡. 日本小児血液・がん学会学術集会

- 5) 望月 慎史, 小川 千登世, 佐野 秀樹, 木下 明俊, 篠田 邦大, 宮下 恵実子, 今村 俊彦, 吉原 宏樹, 井口 晶裕, 吉田 咲子, 西川 拓朗, 西 眞範, 豊田 秀実, 熊本 忠史, 中村 和洋, 西内 律雄, 菊田 敦, 後藤 裕明, 足立 壮一, 水谷 修紀, JPLSG 再発 ALL 委員会 : 本邦におけるボルテゾミブ併用化学療法を行った小児再発難治性急性リンパ性白血病 24 例の後方視的検討 ; 日本小児血液・がん学会学術集会 ;
- 6) 大木 健太郎, 奥野 はるな, 柴 徳生, 金澤 崇, 朴 明子, 外松 学, 神谷 尚宏, 小川 千登世, 林 泰秀 : 再発後に MLL-AF4 陽性となった B 前駆型急性リンパ性白血病の1例 ; 2013年11月30日 ; 福岡. 日本小児血液・がん学会学術集会.

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

生労働科学研究費補助金（がん臨床研究事業）
分担研究報告書

難治性リンパ系腫瘍に対する分子 MRD 量に基づく治療法の開発研究

研究分担者 鶴澤 正仁 愛知医科大学先端医学研究センター 学長付き参与

研究要旨： 小児の急性リンパ性白血病(ALL) を代表とするリンパ系腫瘍の再発・難治例の生命予後は 50%以下と極めて不良である。この再発・難治例における治療反応性と予後は腫瘍クローンの生物学的特徴や骨髄の微小残存病変 (MRD) 量と関連が深い。従って、腫瘍のクロナリテイの変化の有無とサルベージ治療に対する反応、およびサルベージ治療後の MRD 量と予後の関連を明らかにすることは、難治・再発症例に対する有効な治療法開発のために極めて重要である。

この目的のために本研究では小児再発 ALL およびリンパ腫患者を対象として、初発時と再発時における腫瘍細胞のクロナリテイの解析、およびサルベージ治療後の骨髄 MRD 量を Ig/TCR 遺伝子再構成を利用した RQ-PCR による「分子 MRD 法」で定量的に測定し、治療反応性や再発予後との関連を明らかにする。

研究協力者

堀 壽成

愛知医科大学医学部小児科特任准教授

A. 研究目的

本研究の最終目的は、わが国の再発・難治性小児造血器腫瘍、特にリンパ系腫瘍に対して新たな治療計画を開発することにある。この目的のために治療前に再発難治性リンパ系腫瘍細胞の免疫受容体遺伝子 (Ig/TCR 遺伝子) 再構成を指標としたモノクロナリテイ検索を実施し、サルベージ治療に対する反応、およびサルベージ治療後の MRD 量と再発予後の関連を明らかにする。

B. 研究方法

1. MRD 遺伝子再構成ターゲットの検出：これまでわれわれは MRD 遺伝子再構成ターゲットの検出に、Ig/TCR 遺伝子のうち Ig κ 鎖、IgH 鎖、TCR γ 鎖、TCR δ 鎖、TCR β 鎖を用いてきたが、新たに IgH 鎖における DH-JH、さら

に SIL-TAL を追加し、再構成検出率の向上を図った。具体的にはそれぞれの遺伝子上に設定された複数のプライマーを用いて、遺伝子再構成のスクリーニング PCR を施行、heteroduplex analysis を施行してクロナリテイを確認し、得られた PCR 産物についてその塩基配列を解析した。

2. MRD 定量：従来われわれは上記の解析結果より、症例特異的な塩基配列から設計したプライマーを用いて半定量的な nestedPCR 法にを行ってきたが、さらなる高感度な定量と世界標準の定量精度の実現を目指し Taqman-probe 法による RQ-PCR を導入した。その過程において 2010 年に欧州の MRD 専門研究機関 (EuroMRD) への正式参加を承認され (アジアではシンガポールに次いで 2 番目、国内の研究施設では初)、定量技術の向上と精度管理を目的として、同機関主催による年 2 回の quality control round に参加している。本研究ではこのように国際的に標準化された MRD 定量法を用いて MRD 測定を実施した。

(倫理面への配慮)

本研究で行った臨床検体を用いた実験は、関連法規を遵守し、倫理委員会ならびに実施機関長の承認を経た上で、検体提供者への人権擁護、個人情報保護に細心の注意を払って実施した。

C. 研究結果

1. 対象：平成25年1月から12月において当施設では合計97例のJPLSG治療研究登録症例の骨髄・末血検体についてRQ-PCRによるIg/TCR遺伝子再構成を用いたMRD定量を施行した。その内訳はT-ALL (T-11)55例、再発ALL (R-08, RT-11) 22例、乳児白血病(MLL-10) 20例で、その年齢は1才未満21例、1-9才45例、10-15才24例、16才以上6例、不明が1例であった。ALLの表面形質別の内訳はBCP-ALLが21例、T-ALLが56例であった。再発ALLはBCP-ALLが20例、T-ALLが2例であった。
2. Ig/TCR遺伝子再構成スクリーニング：全症例のうち、検体不良・不足、対象外疾患、を除いた94例中、少なくとも1個の再構成を検出できた症例は76例(80.1%)であった。再構成検出が不可能であった18例の内訳は、乳児白血病2例、初発T-ALL12例、再発BCP-ALL4例であった。
3. RQ-PCRによるMRD定量：再構成スクリーニングにて再構成を検出した症例のうち、現時点では定量を行っていない乳児白血病症例、定量用のフォローアップ検体待ちの症例を除いた49例は全例でMRD定量が可能であった。その内訳は再発BCP-ALL16例、T-ALL33例で、再構成ターゲットはIgH10例(VH9例、DH1例)、Ig κ 3例、TCR γ 8例、TCR δ 15例、TCR β 10例、SIL-TAL3例であった。また定量感度は 10^{-5} が36例、 10^{-4} が12例、 $10^{-3.5}$ が1例、定量域は 10^{-5} が7例、 10^{-4} が28例、 $10^{-3.5}$ が11例、 10^{-3} が11例、 10^{-2} が1例であ

った。

D. 考察

今回T-11登録症例が順調に症例数を伸ばし、初発BCP-ALL症例が新規治療研究B-12に移行したことを反映して、対象症例の半数以上がT-ALLとなる特色を示した。このT-ALL症例の比率が昨年にも増して上昇したことより、腫瘍細胞のIg/TCR遺伝子再構成の検出率は80.1%と低下がみられ、その再構成検出の難しさの影響が表れた結果となった。

これは再構成検出不能例の66.7%がT-ALL症例であったことから裏付けられ、世界的にも未だ解決されていない問題であることから、今後の重要課題と考えられた。

また今回T-11の対象年齢が若年成人まで拡大されたことから、16才以上の症例の増加がみられ(6例中T-115例)、1例を除いてMRD定量を完了することができた。今後若年成人における本解析・治療の有効性を示す意味でも重要な結果と考えられた。

再構成検出においては、新規再構成ターゲットとして導入を試みてきたTCR β 、SIL-TALが定量を完了できたT-ALL症例の39.4%でみられたことはそれらの実用性の面で大変興味深い結果であり、昨年来述べてきた本研究の一つの成果と考えられた。

またMLL-10登録の乳児症例では再構成検出不能例は20例中わずか2例にとどまり、以前推測された乳児の特異性による再構成検出の困難さは否定された。

さらにRQ-PCRによるMRD定量感度については、再構成検出例の全例で定量が可能で、昨年を上回る73.5%が最も高感度である 10^{-5} を示し、1例を除く98%の症例で 10^{-4} 以下であったことから、定量の精度としては十分なレベルを保っていたと考えられ、前述のEuroMRDにおけるquality control roundの成果がみられている。しかし定量域について

は今後欧州との共同研究などで 10^{-4} レベルが必要とされるため、今回の $10^{-3.5}$ 以上の46.9%の症例については除外を余儀なくされると考えられる。しかもその約70%がT-ALLであることは、定量の面からもこの疾患のMRD 定量の難しさを示すものと考えられる。当然ながらこれらをカバーしていくことが最も重要と考えられるものの、現時点では技術的には困難と考えられ、その解釈と臨床上の取り扱いについて慎重な検討を要すると考えられる。以上を踏まえ、最終的には本研究の主眼である定量値と予後との相関についての検討のため、この定量精度の維持が当施設の責務と考える。

E. 結論

本年度われわれは、JPLSG 治療研究に登録された若年成人を含む各種ALL 97症例において、Ig/TCR 遺伝子再構成を用いたRQ-PCRによる高感度のMRD 定量精度を維持することができた。しかしT-ALL 症例の増加に伴う再構成検出率と定量域の低下については未だ検討の余地があるものと考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1、原著論文

①Tsurusawa M. et al. Improved treatment results of children with B-cell non-Hodgkin lymphoma:A report from the Japanese Pediatric Leukemia/Lymphoma Study group B-NHL03 study Pediatric Blood Cancer Epub ahead of print doi:10.1002/pbc.24975 2014

②Hyakuna N, Tsurusawa M, et al. Assessment of corticosteroid-induced osteonecrosis in children undergoing chemotherapy for acute lymphoblastic

leukemia : a report from the Japanese Childhood Cancer and Keukemia Study Group. J Pediatr Hematol Oncol 36:22-29. 2014

③鶴澤 正仁 小児ALLの病態と治療戦略臨床血液 54 2038-2046 2013

④鶴澤 正仁 小児リンパ腫の治療(思春期・若年成人も含めて) 臨床血液 54 1770-1779 2013

⑤Yamashita Y, Tsurusawa M, et al. IKZF1 and CRLF2 gene alterations correlate with poor prognosis in Japanese BCR-ABL1-negative high-risk B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. Pediatric Blood Cancer60 1587-1592 2013

⑥鶴澤 正仁 小児リンパ腫の治療(思春期・若年成人も含めて) 血液内科 66 138-145 2013

⑦堀 壽成 ALL の微小残存病変の評価と活用法 血液内科 68:210-219;2014

2、著書

なし

2. 学会発表

- 1) 堀 壽成、山田朋美、鶴澤正仁、横田昇平、渡辺 新、菊田 敦、浅見恵子
Reevaluation of MRD-unquantifiable cases in the CCLSG ALL2004 study by the RQ-PCR settings.
第55回日本小児血液・がん学会学術集会. 2013.11.29-12.1 福岡

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

小児造血器腫瘍に対する標準治療と診断確立のための研究
(急性リンパ性白血病におけるフローサイトメトリー法による微小残存病変の診断確立)

研究分担者 出口隆生 三重大学医学部附属病院小児科 講師

研究要旨 小児急性リンパ性白血病（ALL）におけるフローサイトメトリー法を用いた微小残存病変（FCM-MRD）検出システムを確立するため、小児白血病治療研究において FCM-MRD の測定を行ってきた。平成 26 年 3 月までに再発 B 前駆細胞性（BCP）ALL 全国共同臨床試験 ALL-R08 では 80 例、のべ約 400 ポイントで測定を行った。すべての症例で少なくとも BMA3 までの追跡が可能であった。乳児 ALL 臨床試験 MLL-10 では 58 例、のべ約 200 ポイントの測定を実施し、1 例のみ途中で測定不能となった症例を認めた。ALL-R08 臨床試験での PCR 法を用いた MRD（PCR-MRD）との相関係数は良好な値が持続した。T 細胞性（T-）ALL および BCP-ALL の初発例に対する臨床試験 ALL-T11・ALL-B12 では 4 カラー法を改良した 6 カラー法を用いて解析を行い、現在までに各々 32 例・112 例、および 121 検体・511 検体の解析を行った。

A. 研究目的

小児 ALL 治療における最も強力な予後因子のひとつが微小残存病変(MRD)であることは、ドイツの BFM グループやアメリカの St. Jude 小児病院、イギリスの UKALL 等、欧米の治療研究により初発例・再発例で共に有用性が示されている。しかし我が国における小児 ALL 全国共同臨床試験では、未だ ALL 症例のごく一部で臨床応用が開始されたのみである。

日本小児白血病リンパ腫研究グループ (JPLSG) を母体とした全国的規模での臨床研究・診断検討の普及により、平成 22 年度から JPLSG が主体となって小児白血病の包括的診断・検体保存に関する臨床研究が開始され、初期診断は体制がかなり整いつつあるものの、MRD 測定システムの確立は未だ十分ではなく、切迫した課題である。

平成 21 年 6 月の小児再発 BCP-ALL 治療研究 ALL-R08 に引き続き、平成 23 年 3 月には乳児

ALL 臨床試験 MLL-10 が、平成 24 年 1 月には小児・若年 T-ALL 臨床試験 ALL-T11 が、平成 24 年 11 月から小児 BCP-ALL 全国共同治療研究 ALL-B12 が開始された。これらの臨床試験では MRD を積極的に測定し、我が国のデータを蓄積させることで将来の臨床応用に備える目的がある。

MRD 測定にはフローサイトメトリー (FCM) と PCR による 2 つの方法があり、我々は FCM を用いた免疫学的手法の確立を目的としている。すでに平成 14 年度から FCM-MRD 研究の先駆者である St. Jude 小児病院の Dr. Campana らと協力し、予備的検討を行ってきた。これまで BCP および T 細胞性 (T-) ALL の初発例・再発例を中心に基礎的検討を行った上で、平成 21 年度以降、前述の全国規模の小児白血病臨床試験の中で前向き研究を開始している。この分担研究は、我が国において全国規模での FCM-MRD 測定を永続的な体制として確立す

るために必要な条件を明らかにすることが目的である。小児 ALL の大部分を占める BCP-ALL の臨床試験開始後は検体数が飛躍的に増加し、費用面、運用面で問題点が明らかになりつつあるが、今後、臨床成績との関連を明らかにして我が国における実施可能性を検討する。

B. 研究方法

平成 21 年 6 月から平成 26 年 3 月までの間に、三重大学医学部小児科・JPLSG/日本小児白血病研究会 (JACLS) マーカー解析センターにて再発診断を行った ALL-R08 登録例 80 例と、平成 23 年 1 月から平成 25 年 3 月までに MLL-10 に登録された 58 例、ALL-T11 に登録された 32 例、ALL-B12 に登録された 112 例において FCM-MRD の測定を行った。

1. 検体送付施設はプロトコールに指定された検体依頼書を三重大学に事前に送付した上で、ヘパリン加骨髄 (BM) もしくは末梢血 (PB) を宅配便で送付した。

2. 送付された BM・PB は洗浄の後、細胞濃度を調整した上で全血法を用いた手法で JPLSG 診断パネルに基づいて白血病の病型診断を受けた。また同時に MRD 診断パネルに従って FCM-MRD 用検体を調製した。

3. 各々のプロトコールで規定された採取ポイントの BM・PB を用いて MRD を測定した。フォローアップ検体は単核球分離を行った後、細胞濃度を調整し、検体を調整した。

4. MRD 測定はセントジュード小児病院から報告された 4 カラー FCM-MRD 測定法を基にカスタマイズしたパネルを用い、最大 3 種類のサンプルで測定した。ALL-T11・B12 においては 6 カラーによる改変法を用いて最大 2 種類のサンプルを用いて測定した。

6. 調整されたサンプルは BD Bioscience 社の FACS Calibur もしくは FACS Canto II FCM にてデータ収集を行い、MRD を解析した。

7. 解析された MRD の結果はデータベースに

保存され、後の予後解析のために用いる予定である。

8. ALL-R08 症例における FCM-MRD の結果を、平成 24 年 11 月までに解析が終了した PCR-MRD の BMA3 検体の結果と比較し、相関を調べた。

C. 研究結果

(1) PCR-MRD と結果を比較検討した ALL-R08 症例は 42 例であった。FCM-MRD は 0.00% ~ 63.02%、PCR-MRD が 0.00% ~ 88.00% (8.8×10^{-1}) であった。BMA3 における移植適応判定に用いるカットオフ 0.1% (1.0×10^{-3}) 未満の症例数は、FCM-MRD で 19 例、PCR-MRD で 19 例であった。カットオフ値を挟んで判定が異なったうちの 1 例は FCM が 0.08%、PCR が 0.10% (1.0×10^{-3}) であり、値は非常に近かった。もう一例は FCM-MRD が 19.3% であるにも関わらず、PCR-MRD は陰性を示した。BMA3 での診断一致率は約 89.5%、42 例全体での相関係数は 0.8203 であった。なお、PCR で陰性であった症例のうち 2 例で FCM 陽性を示す症例があり、今後予後解析により、それらの臨床的意義が検討される。

(2) FCM-MRD の測定上問題となった症例は、正常細胞と発現の近く、immunophenotypic shift を来した症例が 1 例、およびもともと正常と発現のほとんど変わらなかった 5 例 (MLL-10 3 例、T-ALL 2 例) の計 6 例を除いた 159 例で MRD の評価が可能であった。なお、検体作成不可能であった症例が全体で 5 例存在し、それらは凍結や高温などの要因によって検体到着時、すでにダメージのあった症例のみであった。

(3) 臨床経過との関係: ALL-R08 で MRD の Serial な解析結果を症例毎に検討した。臨床上最も重要と考えられる BMA3 の測定を行った 59 例中、BMA3 で MRD が陰性となった症例は 17 例あり、その中で BMA5 の測定を行った 12 例全てが MRD 陰性を維持していた。BMA3 で移植適

応とならない 0.1%未満の MRD を検出した 13 例では、BMA5 を測定した 11 例中 10 例が BMA5 で MRD が陰性化した。しかしながら BMA3 で 0.1%から 1%の MRD を検出した 12 例では、BMA5 を測定した 11 例中 4 例のみが MRD 陰性化したのみであった。また BMA3 で 1%以上の MRD を検出した 17 例では、BMA5 を測定した 11 例中 MRD が陰性化したのは 2 例のみであった。

D. 考察

ALL-R08 臨床試験において平成 25 年 3 月までに BMA3 までの解析が終了している 55 例では、引き続き再発診断時の表現型が、正常 B リンパ球前駆細胞に近い白血病も含まれていたものの、治療早期 (BMA2~BMA3) では免疫学的表現型が正常に近くても比較的容易に検出され、パイロット研究と同様の結果であった。MRD 量が多めの 1 例で判定が難しかったが、PCR 法の結果と比較することで、実際にはほとんど全てが MRD 細胞であると確認できた。臨床経過との関係では、化学療法群となる低 MRD 症例は継続的に MRD が陰性化していることが確認できた。さらには BMA3 で MRD が陽性でも、その後 MRD が陰性化する症例を認めた。これらの症例が造血細胞移植でレスキューされる症例 (およそ 20~30%) と一致するかどうかは非常に興味深く、最終的な予後との相関の解析が待たれる。

R08 では PCR-MRD との相関を検討してきているが、一貫して良好であると考えられた。若干 FCM-MRD が低い値を示す傾向があり、また 2 例において、PCR では陰性、FCM では陽性となる値を示した症例が存在したが、結果が全く乖離していることから、TCR/IgH 再構成バンドがポリクローナルであり、PCR プライマーとして不適切なクローンを選択してしまった可能性が高いと考えられた。MLL-10 臨床試験では、MLL 遺伝子再構成を有する乳児白血病特有の表現型に合わせて、7.1 (NG2) や

CD133 などの検査項目を加えて検討を行ったが、平成 25 年 3 月までに検討を行った 42 例のうち 3 例で正常 BCP と同様の抗原発現パターンのため、MRD の評価が困難であった。核型の分析ではこれら 3 例はすべて t(9;11)転座を有した CD34 陰性 ALL であり、この疾病亜群における MRD 測定の改良が必要と考えられた。

T-ALL では、TdT 陰性化による測定不能を避けるため、6-color 化および CD99 による検討を追加して解析を開始した。この 2 種の抗原解析でほとんどの症例は MRD フォローが可能であったが、2 例においてターゲットの設定が困難でありフォロー不可能と判断した。この 2 例はともに γ δ 型 T 細胞受容体が陽性である特殊なタイプで、乳児における t(9;11)転座同様、この疾病群における測定系の改良が必要と考えられた。

BCP-ALL では、4 カラーで検討していた CD38 と CD58 などの抗原を複数組み合わせることで、検討項目数を減らす試みを行ったが、現在まで全ての症例で解析は可能である。現在、T-ALL/BCP-ALL では、PCR-MRD との相関や他の検査施設との相関など QC 的な検討を行った上、予後との検討を行っていく予定である。

FCM-MRD の測定機器は年々改良が重ねられ、マルチカラー化が進んできたが、ここ数年は St. Jude 小児病院では ALL は 7 カラー、AML は 8 カラーでの検討が主体となっている。また I-BFM では EuroFlow コンソーシアムによって定められた 8 カラーパネルによって診断と MRD 評価を一体化させている。現在、三重大学小児科では 8 カラーパネルの導入準備中で有り、次年度以降は St. Jude 小児病院と同一のパネルを使用した解析を行うことで、治療の有用性が国際的に比較検討できるようになると考えられる。

現在、三重大学では診断検体も含め、年間

1,400 検体余りの FCM 解析を行っているが、今後、我が国の FCM-MRD 評価体系をどのように進めていくかは、医療を取り巻くインフラや診療報酬体系の改革も必要である。多次元フローサイトメトリーによる小児白血病診断や、FCM-MRD を保険収載された一般的な検査とまでするにはいまだいくつかの課題があるが、本研究によって確実に進捗を得られたと考える。

E. 結論

1. FCMを用いた MRD は、再発 ALL 臨床試験 ALL-R08 で、治療選択への評価ポイントである BMA3 では臨床試験に用いられている PCR-MRD と非常に高い相関を示した。

2. 従って再発 ALL における FCM-MRD 測定は PCR-MRD と同様に有用であることが我が国の再発例においても示唆された。

3. R08 臨床試験では、BMA3 で高い MRD を示しても、その後陰性化する症例を認め、それらが移植によって救済された例であるかを臨床的予後と検討する必要がある。

4. T-ALL・BCP-ALL における 6 color 解析の有用性が示され、全国規模で実施中である。

5. 平成 25 年度に ALL の FCM-MRD を 7/8 カラーパネル化への準備を終え、26 年度から徐々に移行の予定である。4/6 カラーで追跡が困難であった症例での改善が期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

(1) Asai D, Imamura T, Yamashita Y, Suenobu S, Saito A, Hasegawa D, Deguchi T, Hashii Y, Endo M, Hatakeyama N, Kawasaki H, Hori H, Horibe K, Yumura-Yagi K, Hara J, Watanabe A, Kikuta A, Oda M, Sato A.

Outcome of 82 patients with TCF3-PBX1 positive pediatric acute lymphoblastic leukemia treated with JACLS ALL02 protocol Cancer Med. in press.

(2) Qi L, Toyoda H, Shankar V, Sakurai N, Amano K, Kihira K, Iwasa T, Deguchi T, Hori H, Azuma E, Gabazza EC, Komada Y.

Heterogeneity of neuroblastoma cell lines in insulin-like growth factor 1 receptor/Akt pathway-mediated cell proliferative responses.

Cancer Sci. 2013 Sep;104(9):1162-71.

(3) Asai D, Imamura T, Suenobu S, Saito A, Hasegawa D, Deguchi T, Hashii Y, Matsumoto K, Kawasaki H, Hori H, Iguchi A, Kosaka Y, Kato K, Horibe K, Yumura-Yagi K, Hara J, Oda M.

IKZF1 deletion is associated with a poor outcome in pediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia in Japan.

Cancer Med. 2013 Jun;2(3):412-9.

(4) 岩本彰太郎、出口隆生

フローサイトメトリー法による小児急性白血病の微小残存病変の検出

医学のあゆみ. 2013 245(12): 1003-1009.

2. 学会発表

(1) 出口隆生、櫻井直人、清河信敬、堀部敬三、駒田美弘

小児急性白血病における 7.1 発現の意義

平成 25 年 11 月 29 日 第 55 回日本小児血液・がん学会学術集会

日本小児血液・がん学会誌 プログラム・総会号 p204, 2013

(2) 佐藤篤、井口晶裕、出口隆生、橋井佳子、松本公一、河崎裕英、齋藤明子、遠藤幹也、堀 浩樹、原 純一、八木啓子、堀部敬三、小田 慈

JACLS ALL02 プロトコール治療における再発

症例の検討

平成 25 年 11 月 29 日 第 55 回日本小児血液・
がん学会学術集会

日本小児血液・がん学会誌 プログラム・総会
号 p203, 2013

(3) 櫻井直人、中村晴奈、岩佐正、澤田博文、
豊田秀実、岩本彰太郎、小池勇樹、井上幹大、
内田恵一、出口隆生、平山雅浩、堀 浩樹、
東英一、駒田美弘

シスプラチン単独治療を行った先天性肝芽腫
の一例

平成 25 年 11 月 29 日 第 55 回日本小児血液・
がん学会学術集会

日本小児血液・がん学会誌 プログラム・総会
号 p269, 2013

(4) 岩本彰太郎、岩佐正、豊田秀実、内藺広
匡、森山貴也、貝沼圭吾、木平健太郎、出口
隆生、平山雅浩、東英一、堀 浩樹、駒田美
弘

フローサイトメトリー法で MRD をモニタリン
グできた再発 AML の 2 例

平成 25 年 12 月 1 日 第 55 回日本小児血液・
がん学会学術集会

日本小児血液・がん学会誌 プログラム・総会
号 p319, 2013

(5) 木平健太郎、岩佐正、豊田秀実、岩本彰
太郎、出口隆生、平山雅浩、堀 浩樹、東英
一、駒田美弘

再発 B 前駆細胞型急性リンパ性白血病の非寛
解期において造血細胞移植を施行した 4 例

平成 25 年 12 月 1 日 第 55 回日本小児血液・
がん学会学術集会

日本小児血液・がん学会誌 プログラム・総会
号 p334, 2013

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案

なし

3. その他

なし

急性リンパ性白血病治療研究における新規細胞分子診断法の臨床研究への応用

研究分担者 清河 信敬 独立行政法人 国立成育医療研究センター 部長

研究要旨 臨床研究への応用を目的とした小児急性リンパ芽球性白血病（ALL）の新規細胞分子診断法として B 前駆細胞性 ALL の治療抵抗性亜群である Ph-like ALL の細胞マーカーの特徴について検討した結果、CD66c が陽性である頻度が高いことが明らかとなった。既知のキメラ陰性の症例に関して、CD66c+で、Near-diploid の場合には、Ph-like ALL である可能性が、3~4 倍高くなり、骨髄単球系抗原あるいは T 細胞抗原陽性であれば、さらにその可能性は高くなると考えられる。しかし、この所見のみでの鑑別は困難であり、さらに他のマーカーや遺伝子検査との組み合わせが必要と考えられる。

A. 研究目的

小児造血器腫瘍は、化学療法等の治療の進歩により 80%を越える長期生存率が期待できるようになったが、20%は未だ難治例でその病態解明と治療法の確立が必要である。また、長期生存者では治療による性腺機能不全、二次がんなど晩期合併症が問題となっており、毒性を低減化した治療法の確立が求められる。2003年に既存の4つの小児がん研究グループの共同研究組織として日本小児白血病リンパ腫研究グループ（JPLSG）が設立され、データセンター、臨床試験運営体制、病理・免疫・分子の中央診断体制等の整備が行なわれてきた。この基盤のもとに、これまでに非ホジキンリンパ腫（NHL）、急性骨髄性白血病（AML）、乳児 ALL 等に対して 14 の臨床試験を行われ、平成 22 年度までに 10 の臨床試験が登録終了となっている他、7 つの試験で目標症例数の達成が見込まれている。そして、今回、最も頻度の高い ALL において初めて国内統一の臨床試験を平成 23 年度に開始され、続いてリンパ腫各病型、フィラデルフィア染色体（Ph1）陽性 ALL の新規臨床試験も開始される。その

他、これらの臨床試験実施にあたって造血細胞移植の標準治療の確立が図られているほか、QOL 評価の調査研究、長期フォローアップ指針策定等が行なわれ、小児造血器腫瘍全体の実態と長期予後を把握するために JPLSG 全施設の参加を得て疫学研究が実施されている。

上記の全体的な研究の進行の中で、本研究では、急性リンパ芽球性白血病（ALL）の治療に対して有用性の高い新規細胞分子診断法について検討を行い、臨床研究へ応用することを目的とする。新たな分子診断法の有用性について検証し、臨床応用を図ることによって、ALL の迅速かつ正確な診断や予後不良亜群の層別化を可能とする診断体制の整備に貢献し、ALL の長期生存率向上と晩期合併症の軽減に寄与することを目指す。

Ph1ALL は小児白血病の中で最も頻度が高い B 前駆細胞性（BCP-）ALL の亜群で、t(9;22)(q34;q11) の染色体異常に伴う bcr-abl キメラ遺伝子に起因した bcr-abl 蛋白を有する。Abl はチロシンキナーゼであり、bcr と融合することによって恒常的に活性化されることが発症や病態に関与していると考え

えられている。Ph1ALL は BCP-ALL の数%を占めるに過ぎないが、通常の ALL 治療では予後が非常に不良であること、imatinib を代表とするチロシンキナーゼ阻害剤 (TKI) が有効であることから、層別化して、特化した治療を行なうことで、予後向上が期待される。Ph1ALL の診断は、PCR による bcr-abl キメラ遺伝子の検出によるが、通常では結果の報告までに数日を有する。これに対して、昨年度は、フローサイトメトリーを用いたビーズアレイによって bcr-abl 蛋白を検出し、Ph1ALL を迅速に診断する法について検討を行なった。

一方、近年、bcr-abl キメラ遺伝子陰性であるものの、Ph1ALL に類似した発現遺伝子プロファイルを示し、同様に予後不良な亜群の存在が明らかになり、Ph-like ALL と呼ばれている。Ph-like ALL の一部は、bcr-以外の遺伝子を融合パートナーとする abl 関連キメラ遺伝子や、PDGFRB 等のその他のチロシンキナーゼを含む融合遺伝子を有し TKI が有効であることが明らかにされている。そこで、本年は、Ph-like ALL のマーカー発現の特徴について検討を行った。

B. 研究方法

成育医療研究センターで行っている小児白血病のマーカー中央診断の検査結果を用いて解析を行なった。マーカー中央診断は、骨髄あるいは末梢血検体に対して、全血法、直接法による蛍光標識抗体を用いた染色を行い、フローサイトメトリーにより解析を行なっている。発現率 20%以上を陽性と判定した。既知のキメラ遺伝子陰性の症例群に対して、別途行なっている網羅的遺伝子発現解析データに対する階層的クラスタリングおよび Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) による判定結果に基づいて、Ph-like ALL と非 Ph-like ALL に分類し、両者のマーカー検査の結果について比較解析を行なった。

(倫理面への配慮)

本研究で実施した、小児白血病の臨床検体に対するマーカー解析、遺伝子解析は、実施に際して当該倫理委員会および施設責任者の承認をすでに得ており、関連指針を遵守して実施した。また、個人情報保護法を遵守し、検体提供者への人権擁護や個人情報保護に最善、細心の注意を払って実施した。

C. 研究結果

網羅的発現遺伝子解析情報のある BCP-ALL 症例 696 例のうち、Ph-like ALL と判定された症例は 47 例 (6.8%) について検討した。全例、CD10+の common-ALL 型で、35 例 (74.5%) が CD66c 陽性であり、CRLF2 陽性が 13 例 (27.7%) であった。9 例 (19.1%) で CD13 あるいは CD33 の発現を認め、また CD27 陽性 17 例 (36.1%)、CD7 陽性 2 例 (4.3%) を含んでいた。

D. 考察

今回の検討結果から、Ph-like ALL は、表面マーカーの特徴も Ph1 ALL に類似している事が明らかとなった。CD66c 陽性例の割合が 74.5%と高いことが特徴的であるが、Ph1 ALL での CD66c 陽性例の割合 91.4%よりは低く、また、Hyperdiploid での同 66.9%よりは高かった。また、骨髄系抗原や CD27、T 細胞抗原を発現する症例が比較的多いことも、Ph1 ALL のマーカー所見の特徴に類似している。

Ph-like ALL のマーカー所見に基づく鑑別法について考えた場合、bcr-abl1 も含めた既知のキメラ陰性の症例に関して、CD66c+で、Near-diploid の場合には、Ph-like ALL である可能性が、3~4 倍高くなり、骨髄単球系抗原あるいは T 細胞抗原陽性であれば、さらにその可能性は高くなると考えられる。しかし、この所見のみで Ph-like ALL と非 Ph-like ALL を完全に区別する事は不可能である。また、

最も確実な Ph-like ALL のマーカー所見は CRLF2 の発現であるが、遺伝子発現と臨床情報との解析から、CRLF2 陽性例すべてが Ph-like ALL の形質を示す訳ではない可能性が示唆されている。さらに、頻度は低いものの、Hyperdiploid の症例の中にも Ph-like ALL の形質を示す症例が含まれる可能性も示唆されている。

以上より、マーカー所見のみでの Ph-like ALL の完全な鑑別は困難であり、他のマーカーや遺伝子検査との組み合わせが必要と考えられる。しかし、bcr-abl1 陰性かつ CD66c+、Near-diploid の BCP-ALL で、aberrant 抗原の発現を伴う場合には、Ph-like ALL である可能性が高いため、他の検査所見や、治療反応性を慎重に経過観察する必要があり、注意喚起という点で有用と考えられる。

E. 結論

Ph-like ALL のマーカー所見は、Ph1 ALL と類似している事が明らかとなった。マーカー所見のみでの Ph-like ALL の判定は困難であるが、ある程度の絞り込みは可能であり、検査所見や臨床経過について注意喚起が必要である。今後さらに検討を進め、他のマーカーを加える事で、マーカー所見による Ph-like ALL の判定法の確立を目指す。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Kiyokawa N, Iijima K, Tomita O, Miharuru M, Hasegawa D, Kobayashi K, Okita H, Kajiwaru M, Shimada H, Inukai T, Makimoto A, Fukushima T, Nanmoku T, Koh K, Manabe A, Kikuchi A, Sugita K,

Fujimoto J, Hayashi Y, Ohara A. Significance of CD66c expression in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Res.* 2014 Jan;38(1):42-8.

2) Masuzawa A, Kiyotani C, Osumi T, Shioda Y, Iijima K, Tomita O, Nakabayashi K, Oboki K, Yasuda K, Sakamoto H, Ichikawa H, Hata K, Yoshida T, Matsumoto K, Kiyokawa N, Mori T. Poor responses to tyrosine kinase inhibitors in a child with precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia with SNX2-ABL1 chimeric transcript. *Eur J Haematol.* (in press)

3) Tomita O, Iijima K, Ishibashi T, Osumi T, Kobayashi K, Okita H, Saito M, Mori T, Shimizu T, Kiyokawa N. Sensitivity of SNX2-ABL1 toward tyrosine kinase inhibitors distinct from that of BCR-ABL1. *Leuk Res.* (in press)

2. 学会発表

1) 清河信敬, 飯島一智, 富田理, 吉原宏樹, 三春晶嗣, 大隅朋生, 嶋田博之, 福島敬, 森鉄也, 斎藤正博, 康勝好, 真部淳, 菊地陽, 林泰秀, 小原明. 小児 Ph-like ALL のマーカー所見の検討. 第 23 回日本サイトメトリー学会学術集会, 東京, 6 月 22 日-23 日, 2013.

2) 三春晶嗣, 富田理, 石橋武士, 清河信敬. 10 カラーフローサイトメトリーによる T-ALL の MRD 検出. 第 23 回日本サイトメトリー学会学術集会, 東京, 6 月 22 日-23 日, 2013.

3) 富田理, 清河信敬, 三春晶嗣, 石橋武士, 大隅朋生, 嶋田博之, 福島敬, 森鉄也, 斎藤正博, 康勝好, 真部淳, 菊地陽, 林泰秀, 小原明. Cytometric Bead Array を用いた BCR-ABL1 蛋白検出の臨床的有用性. 第 23 回日本サイトメトリー学会学術集会, 東京, 6 月 22 日-23 日, 2013.

4) 牛腸義宏, 清河信敬, 富田理, 飯島一智,