

博士論文

造血器腫瘍における腫瘍由来循環 DNA の
臨床的有用性の検討

中村 聡介

目次

1. 要旨	6
2. 序文	7
3. 目的	15
4. 方法	17
5. 結果	28
6. 考察	68
7. 結論	74
8. 参考文献	75
9. 謝辞	90

略語一覽

AA	Amino acid
alloSCT	Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation
AML	Acute myeloid leukemia
AUC	Area under curve
Aza	5-azacytidine
B-ALL	B-cell acute lymphoblastic leukemia
B-NHL	B-cell non-Hodgkin lymphoma
cfDNA	Cell-free DNA
CHIP	Clonal hematopoiesis of indeterminate potential
CI	Confidence interval
CIR	Cumulative incidence of relapse
COSMIC	Catalogue of somatic mutation in cancer
CR	Complete remission
CT	Computed tomography
ctDNA	Circulating tumor DNA
CP	ctDNA positive

ddPCR	Droplet digital PCR
DTA	DNMT3A, TET2, ASXL1
ETP	Extra time points
FACS	Flowcytometry
FCP	Flowcytometry positive
FISH	Fluorescence in situ hybridization
FLC	Free light chain
ITD	Internal tandem duplication
MAF	Minor allele frequency
MCP	Mixed chimerism positive
MDS	Myelodysplastic syndromes
MM	Multiple myeloma
MP	Mutation positive
MP-PB	Mutation persistence in the PBMNC fraction
MRC	Myelodysplasia-related changes
MRD	Minimal residual disease
MRI	Magnetic resonance imaging
NA	Not available

NGS	Next-generation sequencing
OS	Overall survival
PBMNC	Peripheral blood mononuclear cell
PolyPhen-2	Polymorphism phenotyping v2
ROC Curve	Receiver operating characteristic curve
SD	Stable disease
SIFT	Sorting intolerant from tolerant
sIL2-R	Soluble IL-2 receptor
SNV	Single nucleotide variant
STR	Short tandem repeat
SV	Structural variant
TCGA	The cancer genome atlas
T-NHL	T-cell non-Hodgkin lymphoma
UPN	Unique patient number
VAF	Variant allele frequency
VGPR	Very good partial response

1. 要旨

腫瘍由来循環 DNA は非侵襲的で迅速なバイオマーカーとして注目されているが、造血器腫瘍においては限られた知見しか得られていない。その有用性を検証するため造血器腫瘍 17 例において腫瘍由来循環 DNA の測定を行った。腫瘍由来循環 DNA は臨床経過を反映しており、治療奏効後に再発した 8 例においては臨床的再発と比較し約 30 日早く再発を特定できた。次に造血幹細胞移植を行った骨髄系腫瘍 51 例に対して検討を行った。腫瘍由来循環 DNA が移植後 1 ヶ月、3 ヶ月に残存している症例は有意に再発率が高かった。腫瘍由来循環 DNA を用いた遺伝子検査は、従来の検査の非侵襲的な代替となり、再発予測に有用である可能性が示唆された。

2. 序文

がんのドライバー変異

がんは遺伝子の異常により発症する病気である。mRNA に転写され、遺伝形質を規定する領域が遺伝子と呼ばれる。さらにヒトゲノム上には約 2 万個の遺伝子があるとされており、それはゲノム中のわずか 3%程度の領域に過ぎない [1][2]。加齢や喫煙、放射線などの様々な要因により遺伝子変異はおこり、現在ではその遺伝子変異が蓄積することで正常な細胞ががん化する多段階発がん説が提唱されている [3]。そのため蓄積する遺伝子変異の中で、がんの病態に深く関わる変異を同定し解析することが、がんの診断、予後予測、治療方針の決定には極めて重要である。そして遺伝子変異には、生殖細胞系列変異と体細胞変異がある [4]。生殖細胞系列変異は親から受け継ぐ先天的な変異であり、体を構成するすべての細胞に見られる DNA の変異である。一方、体細胞変異はヒトが生きていく過程において後天的に獲得した DNA の変異である。これらの変異はそのがん化における役割からドライバー変異とパッセンジャー変異に区別される。

ドライバー変異とは、遺伝子異常ががん細胞の増殖や生存にアドバンテージを与える、すなわちがん化に直接かかわっている変異であり、パッセンジャー変異とは、がん化には関係していない変異のことである [1]。同じ診断名のがん患者であっても、そのドライバー変異は患者ごとに異なる。そのドライバー変異に対

応した予後の層別化や、ドライバー変異を標的とする分子標的薬のようなテーラーメイドの治療法を提供することは、的確医療と呼ばれ非常に注目されている[5][6]。

次世代シーケンス

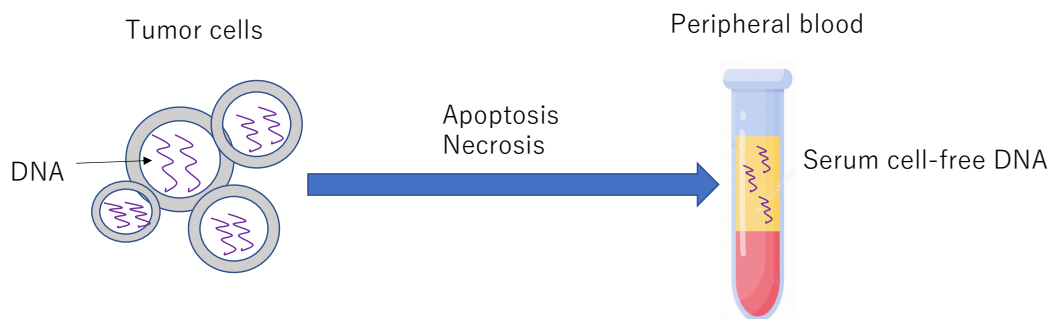
2007年に開発された次世代シーケンス技術(NGS: Next-generation sequencing)により、短時間で大量のDNA配列を電子情報化することが可能となり、網羅的な遺伝子解析にかかる費用が急激に低減化された[7]。またNGSの実用化により、多数の患者検体を用いてドライバー変異を網羅的に解析する研究シーケンスが多くのがん種で行われた。その結果多くのがん種でゲノム情報基盤が確立してきている[8]。それらの変異のリストはがんゲノムアトラス(TCGA: The cancer genome atlas)、国際がんゲノムコンソーシアム(ICGC: International cancer genome consortium)、がんにおける体細胞突然変異カタログ(COSMIC: Catalogue of somatic mutation in cancer)など公共のデータベースとして提供され、誰でも利用可能である。そして研究のみならず、NGSは臨床応用もされつつある。NGSの普及にあたり、臨床現場でも患者毎に異なるドライバー変異を特定し、治療方針に役立てることができるようになってきている[9]。

腫瘍由来循環 DNA

近年では、腫瘍由来循環 DNA(ctDNA: circulating tumor DNA)を用いた、非侵襲的で簡便な遺伝子検査が固形がんを中心に注目されている。ctDNA とは血漿中に遊離している細胞外遊離 DNA (cfDNA: cell-free DNA)のうち、特に腫瘍が壊死や細胞死を起こした際に放出される DNA 成分を指した呼称である[10][11]。がん患者の血漿中にはがん細胞に由来した ctDNA が存在していることは1970年代から知られていた[12]。そして近年になり、ctDNA は様々ながん種で遺伝子解析に応用されつつある[13][14]。採血で検体採取ができるため腫瘍病変部位の生検と比較して、低侵襲で頻回に検査を行うことができる利点から、ctDNA を用いた遺伝子解析は液体生検(Liquid biopsy)と呼ばれ、簡便で非侵襲に遺伝情報が利用可能となる。非小細胞肺癌ではすでに EGFR 阻害剤オシメルチニブの適応を判断するためのコンパニオン診断薬として、液体生検による EGFR 変異検出キットが薬事承認、保険適応されている[15]。造血器腫瘍においてもリンパ腫、骨髄腫などの疾患においては必ずしも末梢血中に腫瘍細胞が検出される訳ではなく、白血病においても骨髄と比較すると末梢血では遺伝子検査の検出感度が低くなってしまうことが知られている[16][17]。そのため造血器腫瘍においても、骨髄検査やリンパ節生検など侵襲を伴う検査の代わりに ctDNA を用いた遺伝子解析が臨床検査として将来社会実装される事が予想される[18]。それにより、より早

くより簡便に造血器腫瘍の診断や適切な分子標的薬の選択を行うことができるようになり、より頻回に微小残存病変(MRD: minimal residual disease:)のモニタリングを行うことが可能となると考えられる。

Figure 1. 腫瘍組織から放出される cell-free DNA の模式図



全身の細胞が壊死や細胞死を起こした際に、cell-free DNA (cfDNA) が血清や血漿中に放出される。cfDNA は 150-250 塩基程度に細かく断片化されている。cfDNA のなかでも、腫瘍由来のものを circulating tumor DNA と呼ぶ。

微小残存病変

分子生物学的な検査法の発達により、治療後に体内に残存する微小な腫瘍細胞 (MRD) の評価が可能となってきた。特に PCR 法による腫瘍特異的な遺伝子異常や、フローサイトメトリー法による腫瘍に特異的な細胞表面マーカーを用いて MRD を評価することが再発予測に有用とされている [19][20]。PCR 法では腫瘍細胞に特異的な遺伝子異常である *BCR-ABL* などの変異や [21]、リンパ系腫瘍では T 細胞受容体や免疫グロブリン重鎖の再構成を治療経過に沿って測定することが可能である [22]。またフローサイトメトリー法では腫瘍細胞に特徴的な細胞表面抗原の異常発現を組み合わせで判断し検出することができる。

特に同種造血幹細胞移植 (alloSCT: allogeneic hematopoietic stem cell transplantation) は抗腫瘍効果を高めるために大量の抗癌剤と全身放射線照射を移植前処置として使用し、腫瘍細胞のみならず患者の正常骨髄細胞も根絶し、その後に造血幹細胞を輸注し造血能を回復させる、造血器腫瘍に対して可能な最も強度の強い治療である [23][24]。そのため alloSCT 後の再発は克服すべき課題であり、MRD の評価が肝要となる [25]。現在では、ドナー由来の血液細胞と、レシピエント由来の血液細胞の割合を評価する、キメリズム法が MRD として用いられる。キメリズム法にも、個人に特異的な短い塩基配列の繰り返しを用いて識別する STR (short tandem repeat) 法と、ドナーとレシピエント

の性別が不一致の際に有用な性染色体の違いを用いた異性間 FISH (fluorescence in situ hybridization)法が存在する。STR 法は数塩基の繰り返し配列について、その繰り返し回数の違いを用いて PCR による増幅産物の長さの違いでドナーとレシピエントの細胞を識別する手法である[26]。また異性間 FISH 法は Y 染色体に特異的なプローブを用いて、染色体分析によりドナーとレシピエントの細胞を識別する[27]。これらの MRD の評価により再発予測や、治療方針の決定が行われているが、その感度は 1%程度であり、偽陽性や偽陰性の問題も指摘されており、より高精度に再発を予測するバイオマーカーが求められている[28]。

3. 目的

本研究の目的は、造血器腫瘍に対して ctDNA を用いた非侵襲的な遺伝子検査法を確立すること。そしてその再発予測における有用性を示すことである。

3-1 腫瘍由来循環 DNA を用いた造血器腫瘍の MRD 追跡の検討

ctDNA の有用性を検証するため、後方視的に 17 症例の様々な造血器腫瘍患者検体を解析した。ctDNA の検出、およびアレル頻度の測定により定量的な評価を行い、ドライバー変異の動態による再発予測を行った。この系を確立することによって、造血器腫瘍の治療後早期再発が可能となり、ctDNA は治療効果判定のバイオマーカーとなりうることを期待した。

3-2 腫瘍由来循環 DNA を用いた急性骨髄性白血病と骨髄異形成症候群の造血幹細胞移植後再発の予測

様々な造血器腫瘍症例で ctDNA の有用性を検証した後、alloSCT を行った 51 例の急性骨髄性白血病 (AML)、骨髄異形成症候群 (MDS) 症例で ctDNA を用いた再発予測を行った。alloSCT 後 1 ヶ月と 3 ヶ月の血清検体を用いて、ctDNA 検出の有無で再発率の検討を行った。alloSCT は AML、MDS に対して可能な最も治療強度の強い治療である。そのため移植後再発は克服すべき課題であり、再発予測を

可能とする非侵襲的で高感度なバイオマーカーが求められている。そこで ctDNA の有用性を検証するため、我々は alloSCT を行った 51 症例で後方視的な解析を行った。alloSCT 後 1 ヶ月と 3 ヶ月の血清検体を用いて、ctDNA 検出の有無で再発率の差を比較した。

4. 方法

4-1 インフォームドコンセントと検体採取

本研究は東京大学医科学研究所の倫理審査委員会の承認のもと、課題「血液疾患のゲノム解析」（承認番号：26-112-270402）の範疇で行われた。腫瘍検体、および血清検体は東京大学医科学研究所附属病院を受診された、同意を得られた造血器腫瘍症例から採取された。

4-2 患者検体からの DNA および cell-free DNA の抽出

患者検体からの DNA は Gentra Puregene Blood kit (Qiagen, Hilden, Germany)、血清検体からの cfDNA の抽出は 1500G x15 分の遠心分離により血球成分とデブリを除去し、Circulating Nucleic Acid kit (Qiagen) を用いて行った。DNA および cfDNA は Qubit dsDNA HS Assay kit (Life Technologies, California, USA) を用いて定量を行った。

4-3 次世代シーケンスによる網羅的遺伝子解析

ドライバー変異を特定するために、NGS を用いて腫瘍検体のパネル解析、もしくは全エクソン解析を行った。パネル解析については TruSight myeloid panel (Illumina, California, USA)、もしくは QIAseq targeted DNA panel (Qiagen)

を用いてライブラリ調整を行った。対象となる遺伝子を Table1 に示す。全エクソン解析については SureSelect XT Human All Exon V6 (Agilent Technologies, California, USA) を用いた。いずれも切断した DNA の両端にシーケンスプライマー配列を付加し、PCR でこの配列を増幅させる。PCR 産物は AMPure XP Beads (Beckman coulter, California, USA) を用いて精製し不要な成分を除去する。その後 Agilent 4200 Tapestation (Agilent) を使用して電気泳動で単一バンドが増幅されていることを確認した上で、ライブラリ数の均一化を付属のキットを用いて行った。作成したライブラリはパネル解析については Miseq Reagent Kit v3 (Illumina)、全エクソン解析については Nextseq 500/550 High Output Kit v2 (Illumina) を用いてシーケンスを行った。

Table 1a. TruSight myeloid panel に含まれるターゲット遺伝子の一覧

Gene	Target exon	Gene	Target exon
<i>ABL1</i>	4-6	<i>JAK3</i>	13
<i>ASXL1</i>	12	<i>KDM6A</i>	full
<i>ATRX</i>	8-10, 17-31	<i>KIT</i>	2, 8-11, 13, 17
<i>BCOR</i>	full	<i>KRAS</i>	2, 3
<i>BCORL1</i>	full	<i>MLL</i>	5-8
<i>BRAF</i>	15	<i>MPL</i>	10
<i>CALR</i>	9	<i>MYD88</i>	3-5
<i>CBL</i>	8, 9	<i>NOTCH1</i>	26-28, 34
<i>CBLB</i>	9, 10	<i>NPM1</i>	12
<i>CBLC</i>	9, 10	<i>NRAS</i>	2, 3
<i>CDKN2A</i>	full	<i>PDGFRA</i>	12, 14, 18
<i>CEBPA</i>	full	<i>PHF6</i>	full
<i>CSF3R</i>	14-17	<i>PTEN</i>	5, 7
<i>CUX1</i>	full	<i>PTPN11</i>	3, 13
<i>DNMT3A</i>	full	<i>RAD21</i>	full
<i>ETV6/TEL</i>	full	<i>RUNX1</i>	full
<i>EZH2</i>	full	<i>SETBP1</i>	4
<i>FBXW7</i>	9-11	<i>SF3B1</i>	13-16
<i>FLT3</i>	14, 15, 20	<i>SMC1A</i>	2, 11, 16, 17
<i>GATA1</i>	2	<i>SMC3</i>	10, 13, 19, 23, 25, 28
<i>GATA2</i>	2-6	<i>SRSF2</i>	1
<i>GNAS</i>	8, 9	<i>STAG2</i>	full
<i>HRAS</i>	2, 3	<i>TET2</i>	3-11
<i>IDH1</i>	4	<i>TP53</i>	2-11
<i>IDH2</i>	4	<i>U2AF1</i>	2, 6
<i>IKZF1</i>	full	<i>WT1</i>	7, 9
<i>JAK2</i>	12, 14	<i>ZRSR2</i>	full

Table 1b. QIAseq targeted DNA panel に含まれるターゲット遺伝子の一覧

<i>ABL1</i>	<i>FBXW7</i>	<i>P2RY2</i>
<i>ADA</i>	<i>FLRT2</i>	<i>PAX5</i>
<i>ANKRD26</i>	<i>FLT3</i>	<i>PCDHB1</i>
<i>ASXL1</i>	<i>GATA1</i>	<i>PDGFRA</i>
<i>ASXL2</i>	<i>GATA2</i>	<i>PHF6</i>
<i>ATM</i>	<i>GJB3</i>	<i>PML</i>
<i>ATRX</i>	<i>GNAS</i>	<i>PMS2</i>
<i>BCL6</i>	<i>HNRNPK</i>	<i>PRAMEF2</i>
<i>BCOR</i>	<i>HRAS</i>	<i>PRF1</i>
<i>BCORL1</i>	<i>IDH1</i>	<i>PRPF40B</i>
<i>BCR</i>	<i>IDH2</i>	<i>PRPF8</i>
<i>BIRC3</i>	<i>IKZF1</i>	<i>PTEN</i>
<i>BLM</i>	<i>IKZF3</i>	<i>PTPN11</i>
<i>BRAF</i>	<i>IL7R</i>	<i>RAD21</i>
<i>BRCA1</i>	<i>JAK1</i>	<i>RB1</i>
<i>BRCA2</i>	<i>JAK2</i>	<i>RELN</i>
<i>BRINP3</i>	<i>JAK3</i>	<i>RUNX1</i>
<i>C17orf97</i>	<i>KAT6A</i>	<i>SETBP1</i>
<i>CALR</i>	<i>KCNA4</i>	<i>SF1</i>
<i>CARD11</i>	<i>KCNK13</i>	<i>SF3A1</i>
<i>CBL</i>	<i>KDM6A</i>	<i>SF3B1</i>
<i>CBLB</i>	<i>KDR</i>	<i>SH2B3</i>
<i>CBLC</i>	<i>KIT</i>	<i>SH2D1A</i>
<i>CDKN2A</i>	<i>KLHDC8B</i>	<i>SMARCB1</i>
<i>CEBPA</i>	<i>KLHL6</i>	<i>SMC1A</i>
<i>CHEK2</i>	<i>KMT2A</i>	<i>SMC3</i>
<i>CREBBP</i>	<i>KMT2C</i>	<i>SRP72</i>
<i>CRLF2</i>	<i>KRAS</i>	<i>SRSF2</i>
<i>CSF1R</i>	<i>LRRC4</i>	<i>STAG2</i>
<i>CSF3R</i>	<i>LUC7L2</i>	<i>STAT3</i>
<i>CTCF</i>	<i>MAP2K1</i>	<i>STXBP2</i>
<i>CUX1</i>	<i>MLH1</i>	<i>SUZ12</i>
<i>DAXX</i>	<i>MPL</i>	<i>TAL1</i>
<i>DDX41</i>	<i>MSH2</i>	<i>TERC</i>
<i>DNM2</i>	<i>MSH6</i>	<i>TERT</i>
<i>DNMT1</i>	<i>MYC</i>	<i>TET2</i>
<i>DNMT3A</i>	<i>MYD88</i>	<i>TNFRSF13B</i>
<i>EED</i>	<i>NBN</i>	<i>TP53</i>
<i>EGFR</i>	<i>NF1</i>	<i>TPMT</i>
<i>ELANE</i>	<i>NOTCH1</i>	<i>TUBA3C</i>
<i>EP300</i>	<i>NPAT</i>	<i>U2AF1</i>
<i>ETNK1</i>	<i>NPM1</i>	<i>U2AF2</i>
<i>ETV6</i>	<i>NRAS</i>	<i>WAS</i>
<i>EZH2</i>	<i>NSD1</i>	<i>WRN</i>
<i>FAM154B</i>	<i>NTRK3</i>	<i>WT1</i>
<i>FAM47A</i>	<i>OR13H1</i>	<i>XPO1</i>
<i>FAS</i>	<i>OR8B12</i>	<i>ZRSR2</i>

4-4 スーパーコンピューターを用いたデータ解析

NGSにより得られたデータは、PCRによる重複リードやクオリティの低いリードを除去した後に、human genome build 19をリファレンス配列としてマッピングを行った[29]。そしてANNORVARのデータベースをもとにアノテーションを行った。これらの作業は東京大学医科学研究所ヒトゲノム解析センターのスーパーコンピューターであるSHIROKANE3を用いて行った。一塩基置換 (single nucleotide variant: SNV)、挿入変異 (Insertion) や欠失変異 (Deletion) についてはGenomon2 (<http://genomon.hgc.jp/exome/en>)を用いて検出を行った。FLT3 internal tandem duplications (FLT3-ITD)のような構造異常 (Structural variant) の検出についてはGenomon-SV (<https://github.com/Genomon-Project/GenomonSV>)を用いた。変異の検出については、Minor allele frequency (MAF)が1%以上のものや、既知の病的でないSNVを複数のデータベースを参照し取り除いた。さらにアミノ酸置換を伴わない変異や、リードのクオリティの低い変異を除外した。その上で、COSMIC version 71 and 81 (<http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>)に登録のある変異や、造血器腫瘍関連遺伝子にあるInsertionやDeletionなどの有害な変異をドライバー変異として抽出した[30][31][32]。マッピングされたリードについては

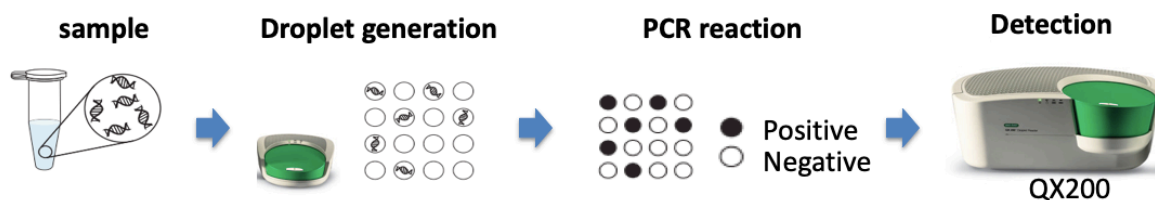
Integrative Genomics Viewer version 2.3.57

(<https://software.broadinstitute.org/software/igv/download>) を用いて確認した。

4-5 Droplet digital PCR

Droplet digital PCR (ddPCR)は第3世代のPCR法と呼ばれ、微量のDNAで高感度な遺伝子の検出が可能な手法として注目されている[33][34]。通常のPCR法では定性のみ、リアルタイムPCR法では検量線による相対定量しか行うことができない。ddPCR法は機器によってシステムに多少の差異があるものの、本研究ではQX200 droplet digital PCR system (Bio-Rad, California, USA) を使用しており、オイルを微小なドロップレットに分割して1区画ごとにPCR反応を行うことで、微小区画毎に陽性か陰性かを判定する絶対定量を可能とする手法である (Figure 2)。また限界希釈した検体であっても、微小区画ごとの分子数が2以上になることもあり、これを補正するために陽性ドロップレットと微小区画の数をポアソン分布に自動的に当てはめ算出している。

Figure 2. QX200 Droplet Digital PCR System の流れ



DNA 検体にプライマーと加水分解プローブを加えたサンプルは、オイルと圧力によって、何万個もの微小なドロップレットに分割され、1 区画に 1 分子が入るようになっている。そして 1 区画ごとに PCR 反応を行いエンドポイントまで増幅させる。PCR 産物は蛍光強度により陽性か陰性か判断され、ポアソン分布に基づく測定値の補正を経て絶対定量が行われる。

4-5-1 症例特異的な腫瘍由来循環 DNA の検出アッセイの作成

NGS で検出した症例特異的なドライバー変異を検出するための ddPCR アッセイを作成した。個々の症例において、変異配列を含む領域を増幅するプライマーと、変異配列と野生型配列のそれぞれに特異的な加水分解プローブをペアで作成した。配列のデザインは Primer Express version 5.0 (Applied Biosystems, California, USA) で行った。プローブは 3' 側に蛍光クエンチャーとして Black Hole Quencher® を用い、5' 側に蛍光色素として野生型に対しては 6-carboxy-2,4,4',5',7',7'-hexachlorofluorescein succinimidyl ester (HEX)、変異型に対しては 6-carboxyfluorescein (FAM) で標識したものをを用いた。アッセイの作成は以下の条件に基づいて行った。(1) PCR 産物の長さは 60-300 塩基とする。(2) プローブの長さは 40 塩基以下とする。(3) 二次構造や繰り返し配列の部位を避けること。(4) Primer Express version 5.0 による Penalty Score の低いものを選択すること。(5) MAF が 1%以上の既知の一塩基多型を含まないこと。本研究で作成した ddPCR アッセイの一覧を Table 2 に示す。

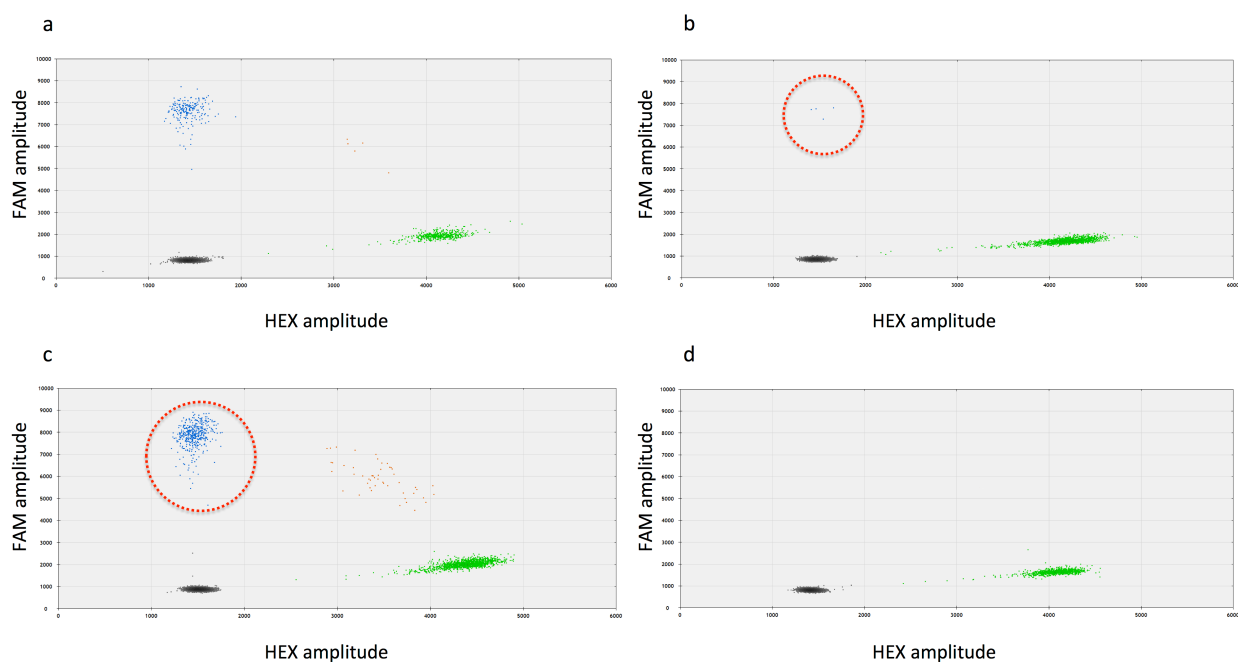
Table 2. 本研究で作成した ddPCR アッセイの一覧

Gene	Amino Acid Change	Chromosome	Position	Reference Allele	Variant Allele	Forward Primer	Reverse Primer	Wt1-type Probe	Mutant-specific Probe
ASXL1	V931L	20	31023038	A	-	AAGAGGAGTGGGAAAGGCTTT	CAGTGGGTGGAGGATGAGGTG	AGATGTGCTAATATGAGCCGGAGTTGC	AGATGTGCTAATGAGCCGGAGTTGC
ASXL1	L1096A	20	31023441	A	A	TGCGCATGAGTGGAGTCTCA	TGCGCATGAGTGGAGTCTCA	AGCTGTGCGAGGCGGGGGGGGG	AGCTGTGCGAGGCGGGGGGGGG
ASXL1	K1024X	20	31026115	G	AGG	AGCTGTGCGAGTGGAGTCTCA	TGCGCATGAGTGGAGTCTCA	CGGTGGCAAGCAATGAAACCCCAATT	CGGTGGCAAGCAATGAAACCCCAATT
ATRX	N238L	X	7840064	GT	T	TGCAATTTGTTGGCAAGAGTGA	CATTACCTGCTGAGAGTGG	TGGCAAAAGTCAAGAAATCAAGTTTCCAG	TGGCAAAAGTCAAGAAATCAAGTTTCCAG
B2M	G22X	15	45003808	C	-	GCGGAGGAAGGACGACGA	CGGGTGCTGCTGCTGCTGCTG	ASGCTATCCATCTCTACCCCT	CTATCTAGGACCCCTCCCG
BCOR	Q1986F	X	12915971	C	T	GAGGACGCTGCTGCTGCTG	TCTCATTTGCTGCTGCTGCTG	CAGCTGTGTGGTGGAGGGGTGG	ATGGCAATGTGGTGGAGGGGTGG
BCORL1	R129X	X	12915971	C	GCT	GAGGACGCTGCTGCTGCTG	TCTCATTTGCTGCTGCTGCTG	CCGCAAAAATGCGCTGGAGACACA	CCGCAAAAATGCGCTGGAGACACA
CBX1	V129X	19	33782851	G	GCT	AGGCTGTGGAGGGGCTGG	AGGCTGTGGAGGGGCTGG	AGGCTGTGGAGGGGCTGG	AGGCTGTGGAGGGGCTGG
CBX2	P194delHP	19	33782831	G	GGCGGGT	AGGCTGTGGAGGGGCTGG	AGGCTGTGGAGGGGCTGG	GGCGGGGCTGGAGGGGCTGG	GGCGGGGCTGGAGGGGCTGG
CEP350	K312X	1	38932116	T	A	TTACAGAGTCCCGCAAGCG	ACTCCAGCTCCCGCTCTTTC	ACTTCCAGAGTCCCGCTCTTTC	CTAGCGGCTGGGCTTAAGG
CSF3R	T61B	1	3853444	G	A	AAAGAGCCATCTGTCGGCAG	AAAGAGCCATCTGTCGGCAG	AAAGAGCCATCTGTCGGCAG	TCAGAGATCAAGGCTGAGCCTACTGTTG
CTCF	G11E	16	17649067	G	A	TGGAGAAAGCCCAATAACGA	ATTTTCAGAGCCCTGAAGTT	GGAAGCTCAAGCTTCTCAAGTACCTG	GGAAGCTCAAGCTTCTCAAGTACCTG
DNMT1	R82S	5	2542743	G	T	AGGCGCAATGTGTGGGGT	GGTGGGGCTGCTGCTGCTG	GCAATGTGATGCTGATAAGGGGGGGTGG	TGATGTGATGCTGATAAGGGGGGGTGG
DNMT2A	R192H	2	2542742	C	T	TGGGGCTGCTGCTGCTGCTG	GGTGGGGCTGCTGCTGCTG	TGCTGTGCTGCTGCTGCTGCTG	TGGGGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
DNMT2B	R192H	2	2542742	C	T	TGGGGCTGCTGCTGCTGCTG	GGTGGGGCTGCTGCTGCTG	TGCTGTGCTGCTGCTGCTGCTG	TGGGGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
DNMT3A	W16X	2	25462022	C	T	GAGTGGAGCTGACGCTG	GAGTGGAGCTGACGCTG	GGGCAAGCGCTCAT	TGGCAAGCTGCTCAT
DNMT3B	R189P	12	22718512	A	A	TGAGCTCTCTGCAACCG	TGAGCTCTCTGCAACCG	GGGCAAGCGCTCAT	TGGCAAGCTGCTCAT
DNMT3L	R418Q	12	12008959	A	A	TGAGCTCTCTGCAACCG	TGAGCTCTCTGCAACCG	GGGCAAGCGCTCAT	TGGCAAGCTGCTCAT
DNMT3O	D600H	12	28682826	C	-	GGCCATTGCATCTTCAACAAG	GGCCATTGCATCTTCAACAAG	GGGCAAGCGCTCAT	TGGCAAGCTGCTCAT
FLI1	D93Y	13	28592642	C	A	CAGATTTGGGCTGGAGAGATG	CAGATTTGGGCTGGAGAGATG	TGTCAGCGCCCTCTGAGATAATG	TGTCAGCGCCCTCTGAGATAATG
FLI1	D93Y	13	28592642	C	A	CAGATTTGGGCTGGAGAGATG	CAGATTTGGGCTGGAGAGATG	TGTCAGCGCCCTCTGAGATAATG	TGTCAGCGCCCTCTGAGATAATG
GATA2	K34T	3	12820758	A	T	GGCTTGGCTGCTGCTGCTG	GGCTTGGCTGCTGCTGCTG	AGGCTGTGGTGGAGGGGTGG	AGGCTGTGGTGGAGGGGTGG
GATA2	E37	3	12820133	T	T	GGCTTGGCTGCTGCTGCTG	GGCTTGGCTGCTGCTGCTG	AGGCTGTGGTGGAGGGGTGG	AGGCTGTGGTGGAGGGGTGG
IDH1	R132C	2	20911313	C	A	GGAAATTTGGGCACTGAA	TGAGTGGTGGTGGAGGGGTGG	CGCTTCTCTTCACTGCAAGTGGCC	TGATCTCTCTTCACTGCAAGTGGCC
IDH2	R140C	15	9051934	C	A	GGGCTCCCGCAACAGCT	TGTCGAAAGTCCCAATGGA	CGAAGAATGTCGGCTAGG	CGAAGAATGTCGGCTAGG
JAK3	A57V	19	17891719	C	T	GAGATGGGCTGAGCAAGTGG	AAAGAACCCAGGAGTGTGTGT	GTGATCAAGTGGTGGTGGAGGATG	GTGATCAAGTGGTGGTGGAGGATG
KIT	D916H	4	5599320	G	T	TGCTTCCTACTCATGCTCGA	TGCTTCCTACTCATGCTCGA	AGTGGGTGGTGGTGGTGGAGGATG	AGTGGGTGGTGGTGGTGGAGGATG
MTOR	CH21	12	4946954	GCT	-	TGGGGTGGTGGTGGTGGAG	TGGGGTGGTGGTGGTGGAG	AGTGGGTGGTGGTGGTGGAGGATG	AGTGGGTGGTGGTGGTGGAGGATG
MTOR	CH22	12	4946954	GCT	-	TGGGGTGGTGGTGGTGGAG	TGGGGTGGTGGTGGTGGAG	AGTGGGTGGTGGTGGTGGAGGATG	AGTGGGTGGTGGTGGTGGAGGATG
MYC	P15T	8	12870086	G	A	AGGCTGTGGTGGTGGTGGAG	AGGCTGTGGTGGTGGTGGAG	CGGCAAGCGCTCAT	TGGCAAGCTGCTCAT
MYD88	L265P	3	38182641	T	C	TTAGCTTCCAGCAAGCACTGA	TTAGCTTCCAGCAAGCACTGA	CGGCAAGCGCTCAT	TGGCAAGCTGCTCAT
NPM1	L297E	5	170637543	C	CTCTG	TTGATGCTATGAGTGTGGTTC	TTGATGCTATGAGTGTGGTTC	CGGCAAGCGCTCAT	TGGCAAGCTGCTCAT
NRAS	G12D	1	11525744	C	A	GTGGATGGTGTGGTGGTGGAG	GTGGATGGTGTGGTGGTGGAG	CGGCAAGCGCTCAT	TGGCAAGCTGCTCAT
NRAS	G12D	1	11525744	C	A	GTGGATGGTGTGGTGGTGGAG	GTGGATGGTGTGGTGGTGGAG	CGGCAAGCGCTCAT	TGGCAAGCTGCTCAT
NPM1	G60V	12	11288183	G	G	CGCTCTCTTCAATGACTATT	CGCTCTCTTCAATGACTATT	TGTCAGCGCCCTCTGAGATAATG	TGTCAGCGCCCTCTGAGATAATG
RAF217	H261E	8	117868917	T	TA	AATGGTGTGGTGGTGGTGGAG	AATGGTGTGGTGGTGGTGGAG	CGGCAAGCGCTCAT	TGGCAAGCTGCTCAT
RUNX1	S436L	21	36164567	G	GT	GAGGCTGGGCTGAGCAG	GAGGCTGGGCTGAGCAG	CGGCAAGCGCTCAT	TGGCAAGCTGCTCAT
SETD1	L277E	18	42466669	T	TTCTT	GTGGCAATGTGGTGGTGGAG	GTGGCAATGTGGTGGTGGAG	CGGCAAGCGCTCAT	TGGCAAGCTGCTCAT
SF3B1	K70E	2	18926524	T	A	AGCCAGCAATGGCCAAAG	AGCCAGCAATGGCCAAAG	CGGCAAGCGCTCAT	TGGCAAGCTGCTCAT
SF3B1	R65D	2	18927484	G	A	GGGCAAGGCTGAGCAAGGA	GGGCAAGGCTGAGCAAGGA	CGGCAAGCGCTCAT	TGGCAAGCTGCTCAT
SRSF2	W38K	12	11884773	G	G	GAGCTGGTGTGGTGGTGGAG	GAGCTGGTGTGGTGGTGGAG	CGGCAAGCGCTCAT	TGGCAAGCTGCTCAT
SRSF2	PHL	17	7472929	G	A	AAAGCCATCTCTCCAG	AAAGCCATCTCTCCAG	CGGCAAGCGCTCAT	TGGCAAGCTGCTCAT
SRSF2	PHH	17	7472929	G	G	GCTCCAGGCGGCTTCCAGT	GCTCCAGGCGGCTTCCAGT	CGGCAAGCGCTCAT	TGGCAAGCTGCTCAT
TAF2	S833L	X	12319775	CTAAAGTAC	-	AGATCCGCAATTTTACAGAACCA	AGATCCGCAATTTTACAGAACCA	CGGCAAGCGCTCAT	TGGCAAGCTGCTCAT
TEF2	M1769E	4	106189913	TG	-	TGATGGGAGGAGCTGAGATG	TGATGGGAGGAGCTGAGATG	CGGCAAGCGCTCAT	TGGCAAGCTGCTCAT
TP53	A130V	17	757828	G	A	AAATACTCCAGCCAAATTTCC	AAATACTCCAGCCAAATTTCC	CGGCAAGCGCTCAT	TGGCAAGCTGCTCAT
TP53	R174K	17	7578212	G	A	GAGAGCTGAGGGGGCTGCA	GAGAGCTGAGGGGGCTGCA	CGGCAAGCGCTCAT	TGGCAAGCTGCTCAT
TP53	R174H	17	7578406	G	A	TGGTGGAGTGGTGGTGGAG	TGGTGGAGTGGTGGTGGAG	CGGCAAGCGCTCAT	TGGCAAGCTGCTCAT
TP53	R180C	17	7578406	G	T	TGGTGGAGTGGTGGTGGAG	TGGTGGAGTGGTGGTGGAG	CGGCAAGCGCTCAT	TGGCAAGCTGCTCAT
TP53	E11Q	17	7578882	G	C	GTGCACTGCAATTTGCAAGTGC	GTGCACTGCAATTTGCAAGTGC	CGGCAAGCGCTCAT	TGGCAAGCTGCTCAT
TP53	H179Q	17	7578393	A	G	CCCTCTGCTCTCCAGCC	CCCTCTGCTCTCCAGCC	CGGCAAGCGCTCAT	TGGCAAGCTGCTCAT
USP4F1	S48F	21	4459446	G	A	GGAAAGAACCTGGCTAAAGC	GGAAAGAACCTGGCTAAAGC	CGGCAAGCGCTCAT	TGGCAAGCTGCTCAT
USP4F1	G84P	21	4454777	T	G	GACTGTGGTGGTGGTGGAG	GACTGTGGTGGTGGTGGAG	CGGCAAGCGCTCAT	TGGCAAGCTGCTCAT
USP4F1	R306K	11	32417912	C	T	TGGTGGAGTGGTGGTGGAG	TGGTGGAGTGGTGGTGGAG	CGGCAAGCGCTCAT	TGGCAAGCTGCTCAT
USP4F1	M31T	8	21883017	T	C	AAAGTATTTAAATTTGCTGCTTGG	AAAGTATTTAAATTTGCTGCTTGG	CGGCAAGCGCTCAT	TGGCAAGCTGCTCAT

4-5-2 Droplet digital PCR を用いた腫瘍由来循環 DNA の測定

ddPCR による ctDNA の検出には、QX200 Droplet Digital PCR システム (Bio-Rad) を用いた。ドロップレットの作成には QX200 Droplet Generator システム (Bio-Rad) を使用し、試薬は Droplet Generator Oil for Probes (Bio-Rad) を用いた。PCR 反応には 10ng の DNA を使用し、試薬は ddPCR Supermix for Probes (Bio-Rad) を用いた。PCR 反応は 95°C 10 分による初期変性の後、94°C 10 秒の変性と 60°C 1 分のアニーリングを 40 サイクル行い、98°C 10 分の伸張反応を行った。また全ての解析には Positive Control, 健康人の cfDNA を用いた Negative Control, DNA を含まない No Template Control をおいた。得られたデータの解析は QuantaSoft version 1.6 (Bio-Rad) を使用した。代表的な測定結果を Figure 3 に示す。

Figure 3. Droplet Digital PCR 解析の具体例



unique patient number 29 の *DNMT3A* p. R882H 変異のモニタリング結果を例として示す。緑色のドロップレットは野生型の分子を含み、青色のドロップレットは *DNMT3A* p. R882H 変異を含んでいる。診断時の cell-free DNA は *DNMT3A* p. R882H 変異を含んでいた (a)。そして移植後 1 ヶ月の血液学的寛解時にも変異が 0.15% 残存していた (赤枠) (b)。そして再発時には 27.9% まで再増加していた (c)。また変異を含むドロップレットは、ネガティブコントロールである健康人の末梢血 DNA からは検出せず偽陽性がないことを確認している (d)。

5. 結果

5-1 造血器腫瘍症例 17 例の解析

5-1-1 ddPCR と NGS により測定した遺伝子変異の変異アレル頻度に有意差はなかった

まず治療後に寛解が得られた 17 症例の造血器腫瘍症例を対象として、ctDNA の解析を行った。症例は 8 例の AML、3 例の多発性骨髄腫、2 例の B 細胞性悪性リンパ腫、2 例の MDS、1 例の B 細胞性急性リンパ性白血病、1 例の T 細胞性悪性リンパ腫を含んでいた。NGS を用いて 17 症例全例で、計 19 のドライバー変異を検出することができた。経過中に 8 例が再発をきたし（以下、再発群）、9 例は寛解を維持していた（以下、寛解群）。症例の詳細を Table3、4 に示す。

次に NGS で検出したドライバー変異を検出するための ddPCR アッセイを作成した。アッセイの検証のため、同一の診断時サンプルを用いて NGS と ddPCR により同一の遺伝子異常の検出を行った。NGS と ddPCR の結果は変異アレル頻度 (Variant allele frequency : VAF) を用いて比較し、17 検体中の 19 遺伝子異常において強く相関していた ($r^2 = 0.945$ 、 $p < 0.0001$ 、T 検定) (Figure 3)。またアッセイの検出限界を限界希釈法により測定し[35]、平均 0.04%であり、既報と遜色のない結果が得られていることを確認した[36][37]。

Table 3. 寛解後に再発をきたした8例の詳細

Patient ID	Diagnosis	Age	Sex	Gene	AA change	Outcome at last follow up	Days to cfDNA-based relapse	Days to conventional biomarker-based relapse	Diagnostic test received	Days to imaging-based relapse	Imaging received
UPN 1	AML with MRC	65	W	<i>STAG2</i>	p.S633fs	CR	-91	-22	FACS (Bone marrow aspirate)		
UPN 2	T-NHL	44	M	<i>JAK3</i>	p.A573V	CR	-49	-9	FACS (Tumor biopsy)	-22	CT
				<i>NRAS</i>	p.Q61H						
UPN 4	MM	59	W	<i>KRAS</i>	p.G12D	Dead	-96	-20	Free light chain	-20	CT
UPN 5	B-ALL	61	M	<i>TP53</i>	p.H179Q	SD	-32	-12	FACS (Tumor biopsy)	-24	MRI
UPN 7	MM	52	M	<i>NRAS</i>	p.Q61H	Dead	-4	0	Free light chain		
UPN 8	AML with MRC	65	M	<i>TP53</i>	p.R158G	CR	-33	-26	FACS (Bone marrow aspirate)		
UPN 11	AML	53	M	<i>DNMT3A</i>	p.R882H	Dead	-37	-2	FACS (Bone marrow aspirate)		
UPN 12	AML with MRC	63	W	<i>NPM1</i>	p.L287fs	Dead	-129	-10	FACS (Bone marrow aspirate)		

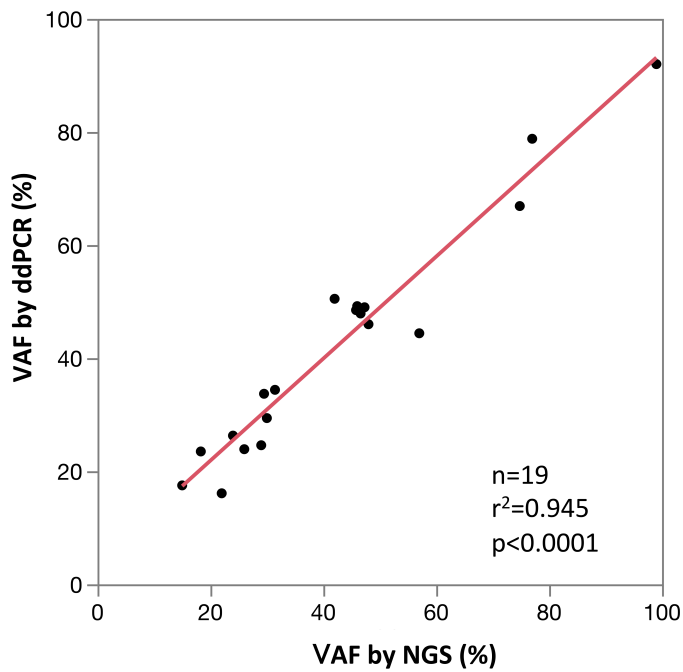
UPN: unique patient number, AA: amino acid, AML with MRC: acute myeloid leukemia with myelodysplasia-related changes, T-NHL: T-cell non-Hodgkin lymphoma, MM: multiple myeloma, B-ALL: B-cell acute lymphoblastic leukemia, CR: complete remission, SD: stable disease, FACS: flow cytometry, sIL2-R: soluble IL-2 receptor, CT: computed tomography, MRI: magnetic resonance imaging

Table 4. 寛解を維持した9例の詳細

ID	Diagnosis	Age at therapy initiation	Sex	Gene	AA change	Outcome at last follow up	Days of last follow up by cfDNA from initial therapy	Days of last follow up by conventional biomarkers from initial therapy	Diagnostic test received
UPN 3	AML with MRC	35	W	<i>GATA2</i>	p.T387_E391delinsK	CR	109	59	FACS (Bone marrow aspirate)
UPN 6	MM	76	W	<i>NRAS</i>	p.G13D	VGPR	1421	1392	Free light chain
UPN 9	B-NHL	52	M	<i>MYD88</i>	p.L265P	CR	149	169	sIL2-R
UPN 10	B-NHL	53	M	<i>B2M</i>	p.Q22X	CR	87	140	sIL2-R
UPN 13	MDS	58	M	<i>SF3B1</i>	p.K700E	CR	1355	879	FACS (Bone marrow aspirate)
UPN 14	AML with MRC	65	W	<i>SF3B1</i>	p.K700E	CR	459	187	FACS (Bone marrow aspirate)
UPN 15	MDS	63	M	<i>U2AF1</i>	p.S34F	CR	182	119	(Bone marrow aspirate)
UPN 16	AML	64	W	<i>NPM1</i>	p.L287fs	CR	332	342	FACS (Bone marrow aspirate)
UPN 17	AML with MRC	36	W	<i>NRAS</i>	p.G12D	CR	558	127	FACS (Bone marrow aspirate)
				<i>GATA2</i>	p.A364T				

UPN: unique patient number, *AA*: amino acid, *AML with MRC*: acute myeloid leukemia with myelodysplasia-related changes, *MM*: multiple myeloma, *B-NHL*: B-cell non-Hodgkin lymphoma, *MDS*: myelodysplastic syndrome, *CR*: complete remission, *VGPR*: very good partial response, *FACS*: flow cytometry, *sIL2-R*: soluble IL-2 receptor

Figure 3. NGS と ddPCR を用いた変異アレル頻度の比較



次世代シーケンス法 (NGS) と droplet digital PCR (ddPCR) 法による、同一検体を用いた変異アレル頻度 (VAF) の測定結果を示す。NGS と ddPCR による結果は強く相関していた。

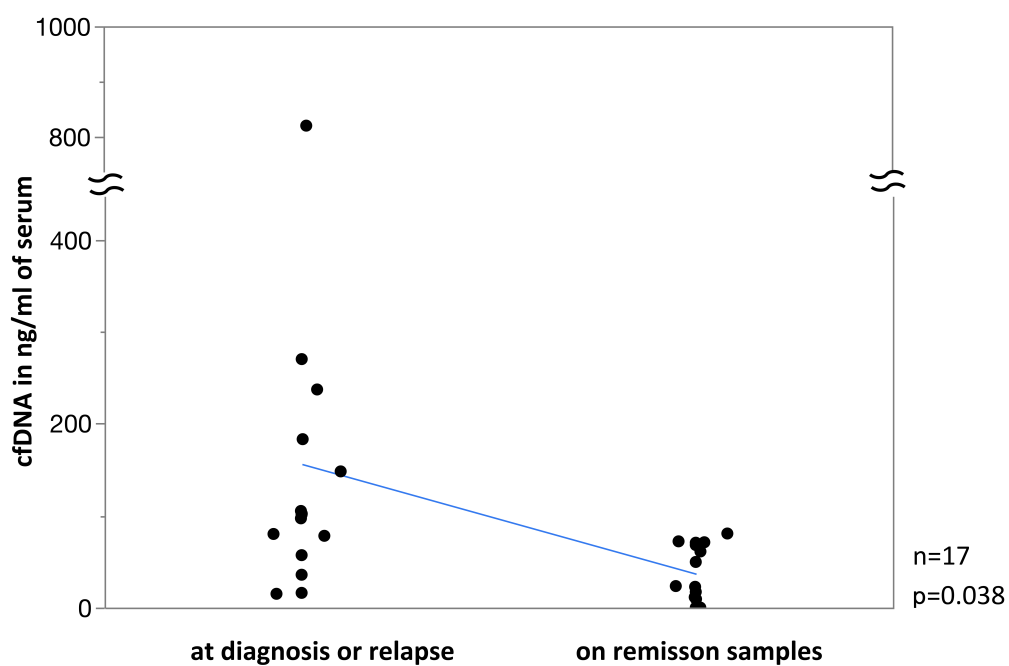
5-1-2 治療後に ctDNA が上昇した症例は全例が再発した

まず 1mL の血清から抽出される cfDNA の収量を測定し、診断時と寛解時の差を比較した。過去の報告と同様に[38][39]、cfDNA の量は診断時のほうが寛解時と比較して有意に多く、腫瘍量を反映している可能性が示唆された（平均：156 対 37 ng/mL、 $p=0.038$ 、T 検定）（Figure 4）。

次に症例ごとに設計したドライバー変異を検出する ddPCR アッセイを用いて、ctDNA の測定を行った。そして予想通り、診断時にすべての症例で ctDNA を検出することができた。そして治療経過に即して、ctDNA は治療反応性を反映していることがわかった。代表的な結果を Figure 5, 6 に示す。17 例中 3 例は、寛解期にも ctDNA が検出された。そして再発群の 8 症例は初期治療後（中央値 297 日）に血液学的再発を来した。寛解群の 9 症例は初期治療後の観察期間中（中央値 332 日）血液学的寛解を維持していた。

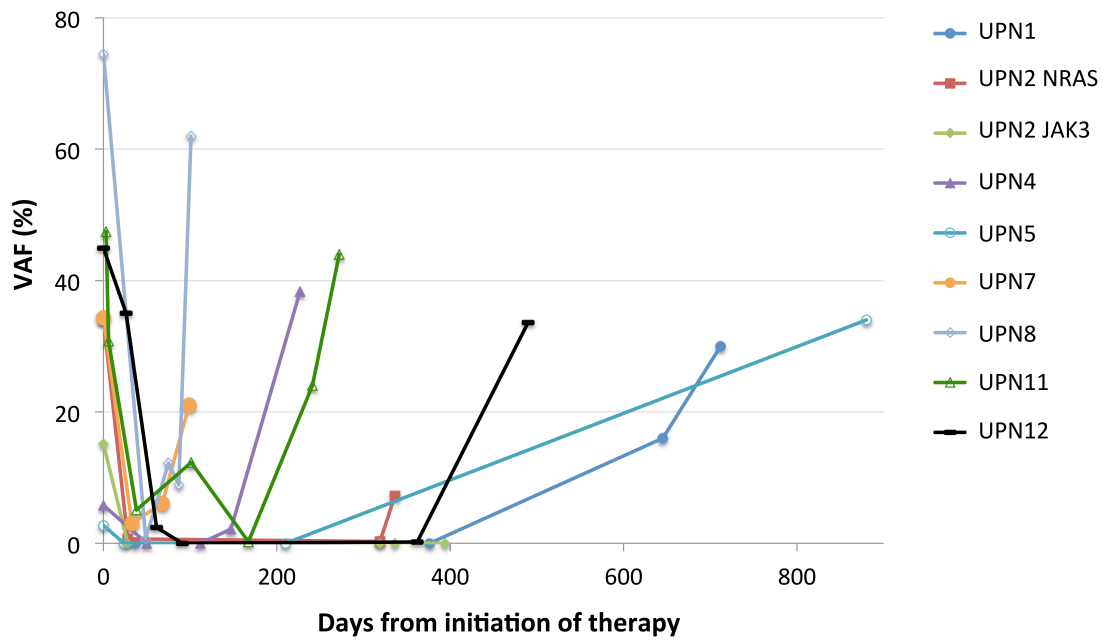
さらに再発群の症例は全例が、ctDNA 陰性から陽性になるか、もしくは ctDNA の VAF が 2 倍以上に上昇していた（ctDNA increased 群）。対称的に寛解群では全例で ctDNA 陰性を維持しているか、VAF が 2 倍以上の上昇なく推移していた（ctDNA stable 群）。最終的に ctDNA increased 群は有意に高い再発率を示した（累積 2 年再発率：ctDNA increased 群 87.5% 対 ctDNA stable 群 0%、 $p=0.0115$ ）（Figure 7）。

Figure 4. 診断時と寛解時の cfDNA の収量の比較



1mL の血清から抽出される cell-free DNA (cfDNA) の収量を病期で分けて比較を行った。診断時や再発時の cfDNA の収量は、寛解時よりも有意に多く病勢を反映している可能性が示唆された。

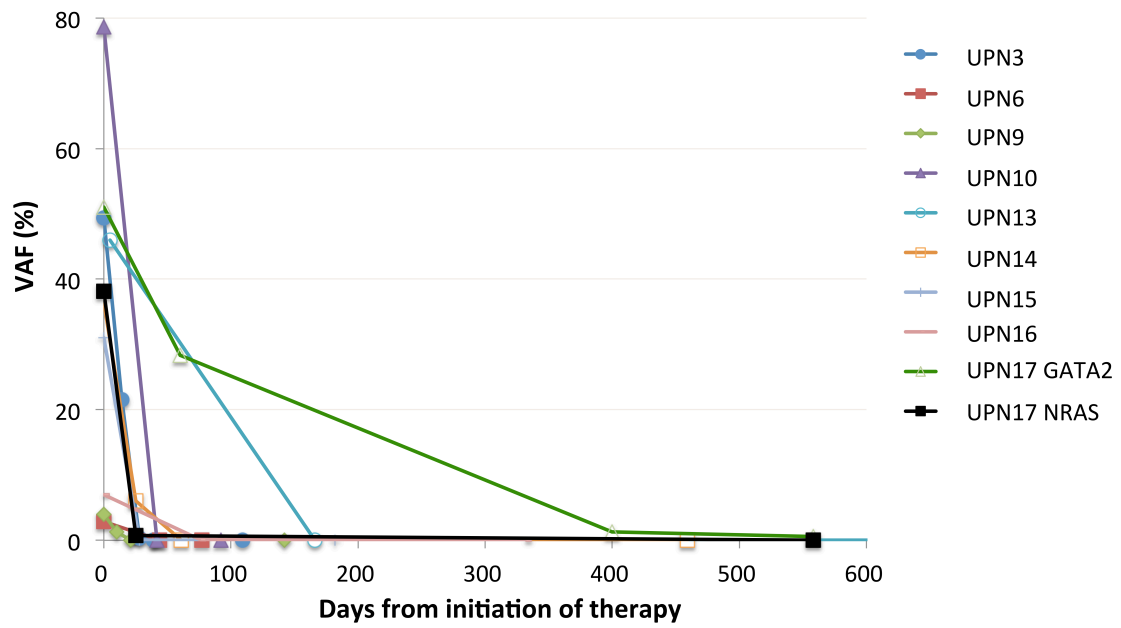
Figure 5. 再発群における ctDNA 追跡の結果



再発群のドライバー変異による ctDNA の測定結果を示す。測定には droplet digital PCR 法を用いた。

UPN: unique patient number, VAF: variant allele frequency

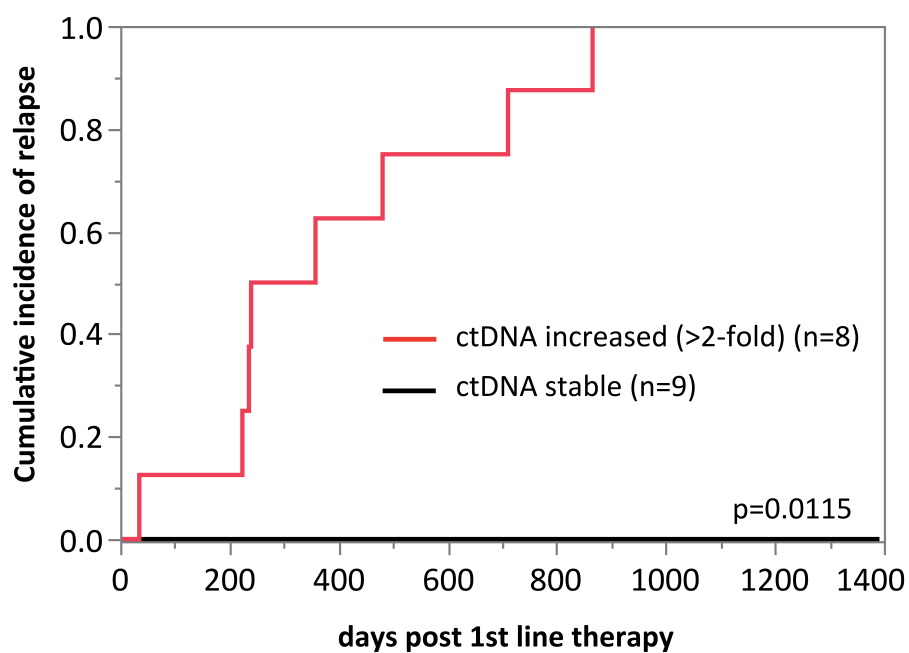
Figure 6. 寛解群における ctDNA 追跡の結果



寛解群のドライバー変異による ctDNA の測定結果を示す。測定には droplet digital PCR 法を用いた。

UPN: unique patient number, VAF: variant allele frequency

Figure 7. ctDNA increased 群と ctDNA stable 群における累積再発率の比較



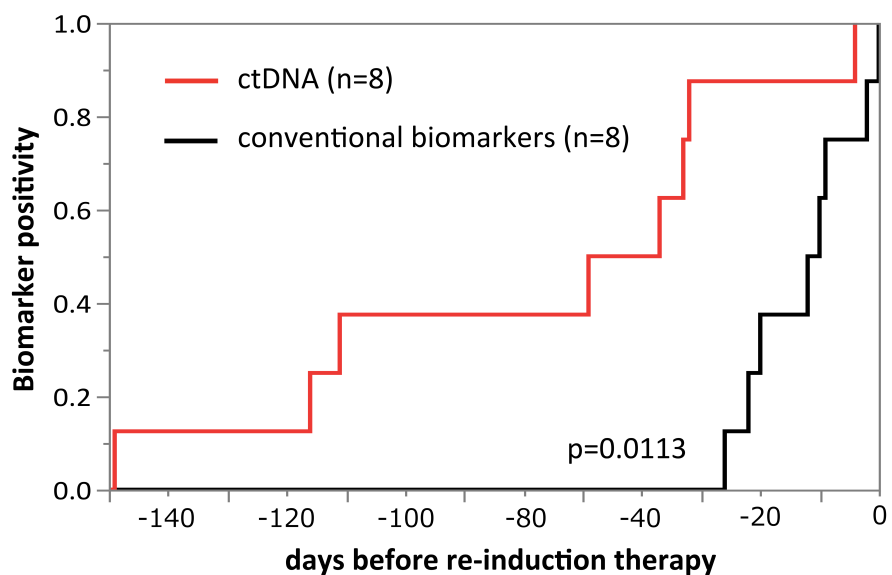
Circulating tumor DNA (ctDNA) increased 群と stable 群の再発率の比較を行

い、ctDNA increased 群は有意に高い再発率を示した。

5-1-3 ctDNAは従来のバイオマーカーより早期に再発を特定した

次に再発群の症例において ctDNA を用いた分子学的再発と、臨床的再発による再発診断日の比較を行った。分子学的再発については ctDNA の VAF が 2 倍以上に上昇したタイミングを用いた。臨床的再発については臨床現場で用いる従来のバイオマーカーを用いた（例：急性骨髄性白血病のフローサイトメトリー法、多発性骨髄腫の血清中免疫グロブリン遊離軽鎖（FLC: Free Light Chain））（Table 3, 4）。ctDNA を用いた分子学的再発は、従来法と比較して中央値 30 日（範囲 4-119 日）早く、再発を特定することができた。（Figure 8）

Figure 8. ctDNA と従来のバイオマーカーによる再発特定日の比較と使用したバイオマーカーの一覧



Patient ID	Conventional biomarkers
UPN1	FACS (Bone marrow aspirate)
UPN2	FACS (Tumor biopsy)
UPN4	Free light chain
UPN5	FACS (Tumor biopsy)
UPN7	Free light chain
UPN8	FACS (Bone marrow aspirate)
UPN11	FACS (Bone marrow aspirate)
UPN12	FACS (Bone marrow aspirate)

Circulating tumor DNA (ctDNA)を用いた分子学的再発と、従来のバイオマーカーによる臨床的再発の再発特定日の比較を行った。ctDNAを用いた分子学的再発は、従来法と比較して中央値30日（範囲4-119日）早く、再発を特定することができた。

5-2 造血幹細胞移植を行った 51 例の AML と MDS の解析

5-2-1 血清検体は骨髄検体の非侵襲的な代替となる可能性がある

次に本研究では骨髄破壊的前処置による造血幹細胞移植を行った AML および MDS 患者を対象として解析を行った。腫瘍（骨髄または末梢血）、および血清は診断時（腫瘍 53 検体、血清 53 検体）、移植後 1 ヶ月（骨髄 38 検体、血清 47 検体）、移植後 3 ヶ月（骨髄 26 検体、血清 44 検体）、その他のタイミング（血清 106 検体）のものを収集した。53 症例を対象として NGS によるドライバー変異のスクリーニングを行い、51 例でドライバー変異を検出することができた。この 51 例で検出した変異の中から ddPCR 法に適した変異を抽出し、57 の ddPCR アッセイを作成し解析を行った。ctDNA 解析に用いた遺伝子変異の一覧を Table 5 に示す。

症例は 51 例中、15 例が de novo AML、22 例が二次性 AML、そして 14 例が骨髄異形成症候群であった。年齢の中央値は 53 歳 (17-68 歳) で、25 症例は移植時非寛解であった。47 症例において幹細胞ソースはで臍帯血であった (Table 6)。

Table 5. circulating tumor DNA 検出に用いた遺伝子変異の一覧

ID	Gene	Amino Acid Change	Chromosome	Position	Reference Allele	Variant Allele	COSMIC ID	PolyPhen-2(score)	SIFT(score)
1	DNMT3A	R882H	2	25457242	C	T	COSM52944	Possibly damaging(0.651)	Deleterious(0.03)
2	STAG2	S633fs	X	123197775	CTAAAACTTAC	-	-	-	-
3	SRSF2	P95H	17	74732959	G	T	COSM211504	Probably damaging(1)	Deleterious(0.02)
4	SF3B1	K700E	2	198266834	T	C	COSM84677	Probably damaging(1)	Deleterious(0)
5	WT1	R380fs	11	32417912	-	GTACAAGAGT	-	-	-
6	SH2B3	E288fs	12	111884773	-	C	-	-	-
7	NRAS	G12D	1	115258747	C	T	COSM564	Benign(0.372)	Deleterious(0)
7	GATA2	A364T	3	128200715	C	T	-	Possibly damaging(0.751)	Deleterious(0.04)
8	NPM1	L287fs	5	170837543	C	CTCTG	COSM158604	-	-
8	DNMT3A	W795X	2	25462022	C	T	-	-	Tolerated(1)
9	CEBPA	P23fs	19	33793252	C	CG	COSM18922	-	-
10	SF3B1	K700E	2	198266834	T	C	COSM84677	Probably damaging(1)	Deleterious(0)
11	IDH1	R132C	2	209113113	G	A	COSM28747	Benign(0.259)	Deleterious(0)
12	TP53	R175H	17	7578406	C	T	COSM3355994	Probably damaging(1)	Deleterious(0)
13	U2AF1	S34F	21	44524456	G	A	COSM166866	Probably damaging(1)	Deleterious(0)
14	U2AF1	S34F	21	44524456	G	A	COSM166866	Probably damaging(1)	Deleterious(0)
14	BCORL1	R1299X	X	129159171	C	T	-	-	Tolerated(0.73)
14	GATA2	L321H	3	128202758	A	T	COSM255200	Probably damaging(1)	Deleterious(0)
15	IDH2	R140Q	15	90631934	C	T	COSM41590	Probably damaging(1)	Deleterious(0)
15	DNMT3A	R882C	2	25457243	G	A	COSM53042	Probably damaging(1)	Deleterious(0)
15	NPM1	L287fs	5	170837543	C	CTCTG	COSM158604	-	-
16	GATA2	E387-M391del	3	128200133	TCCTTCTTCATGG	T	-	-	-
17	FLT3	D600delinsDFYVDFREYEYD	13	28608256	-	TCATATTCATATTCTCTGA AATCAACGTAGAAG	-	-	-
17	DNMT3A	R882C	2	25457243	-	A	COSM53042	Probably damaging(1)	Deleterious(0)
18	NPM1	L287fs	5	170837543	C	CTCTG	COSM158604	-	-
18	MYC	P75T	8	128750686	C	A	COSM3316884	Probably damaging(1)	Deleterious(0)
19	NPM1	L287fs	5	170837543	C	CTCTG	COSM158604	-	-
20	NRAS	G12D	1	115258747	C	T	COSM564	Benign(0.372)	Deleterious(0)
21	TP53	R337C	17	7574018	G	A	COSM117591	Possibly damaging(0.696)	Deleterious(0)
22	TP53	R158G	17	7578458	G	C	COSM318151	Probably damaging(1)	Deleterious(0)
22	TP53	E11Q	17	7579882	C	G	COSM327260	Probably damaging(0.999)	Deleterious(0.03)
23	SF3B1	K700E	2	198266834	T	C	COSM84677	Probably damaging(1)	Deleterious(0)
24	U2AF1	Q84P	21	44514777	T	G	COSM1318797	Possibly damaging(0.701)	Deleterious(0)
25	ATRX	N228fs	X	76940064	GT	G	-	-	-
25	SETBP1	L227fs	18	42456669	T	TTCTT	-	-	-
26	CEBPA	P197delinsHPP	19	33792731	G	GGCGGGT	-	-	-
27	DDX41	C264Y	5	176939370	C	T	-	Probably damaging(0.999)	Deleterious(0)
28	ASXL1	G642fs	20	31033441	A	AG	COSM1411076	-	-
29	DNMT3A	R882H	2	25457242	C	T	COSM52944	Possibly damaging(0.651)	Deleterious(0.03)
29	RUNX1	S436fs	21	36164567	G	GT	-	-	-
30	NRAS	G12D	1	115258747	C	T	COSM564	Benign(0.372)	Deleterious(0)
30	U2AF1	S34F	21	44524456	G	A	COSM166866	Probably damaging(1)	Deleterious(0)
31	CEBPA	V314delinsKV	19	33792381	C	CCTT	COSM18099	-	-
32	NRAS	G13D	1	115258744	C	A	COSM573	Benign(0.434)	Deleterious(0.03)
33	SH2B3	W364X	12	111885203	G	A	-	-	Tolerated(1)
34	ASXL1	L1009fs	20	31023541	-	ACGG	-	-	-
35	TET2	M1749fs	4	106196913	TG	T	-	-	-
35	SF3B1	R625C	2	198267484	G	A	COSM110696	Probably damaging(1)	Deleterious(0)
36	ASXL1	K1034X	20	31023615	A	T	-	-	Tolerated(1)
37	KIT	D816H	4	55599320	G	C	COSM1311	Possibly damaging(0.842)	Deleterious(0.01)
38	PTPN11	G60V	12	112888163	G	T	COSM13028	Probably damaging(1)	Deleterious(0)
39	ETV6	R418G	12	12038959	A	G	COSM1318051	Probably damaging(1)	Deleterious(0)
39	RAD21	H261fs	8	117868917	T	TA	-	-	-
40	CSF3R	K812X	1	36932116	T	A	COSM6022453	-	Tolerated(0.3)
40	CSF3R	T618I	1	36933434	G	A	COSM1737962	Probably damaging(1)	Tolerated(0.06)
40	DNMT3A	R882H	2	25457242	C	T	COSM52944	Possibly damaging(0.651)	Deleterious(0.03)
41	CTCF	G111E	16	67645067	G	A	-	Probably damaging(1)	Tolerated(0.1)
42	TP53	R174X	17	7578212	G	A	COSM99618	-	Tolerated(1)
43	ETNK1	T139P	12	22778512	A	C	-	Probably damaging(0.962)	Tolerated(0.16)
44	SRSF2	P95L	17	74732959	G	A	COSM146288	Possibly damaging(0.753)	Tolerated(0.1)
45	KMT2D	S2592fs	12	49433779	T	-	-	-	-
46	DNMT3A	R882S	2	25457243	G	T	COSM87001	Probably damaging(0.993)	Deleterious(0)
47	BCOR	Q1396fs	X	39921532	G	-	-	-	-
48	TP53	A150V	17	7578283	G	A	COSM44349	Probably damaging(0.998)	Deleterious(0.03)
48	WT1	R130Q	11	32417913	C	T	COSM28974	Probably damaging(0.995)	Tolerated(0.12)
49	XPO7	M751T	8	21853017	T	C	-	Benign(0)	Tolerated(0.56)
49	KMT2D	Q4221_L4222del	12	49425824	GCT	-	-	-	-
50	FLT3	D835Y	13	28592642	C	A	COSM783	Probably damaging(0.999)	Deleterious(0)
51	ASXL1	V841fs	20	31023038	A	-	-	-	-

-: not applicable, COSMIC ID: Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer

identifier, PolyPhen-2: Polymorphism Phenotyping v2, SIFT: Sorting

Intolerant From Tolerant, UPN: unique patient number

Table 6. 臨床情報のまとめ

Baseline characteristics	N	%
Total	51	100
Age, years; median (range)	53	(17-68)
Male	29	56.9
Diagnosis		
AML	37	72.5
<i>de novo</i> AML	15	29.4
secondary AML	22	43.1
MDS	14	27.5
Stem cell source		
Bone marrow	4	7.8
Cord blood	47	92.2
Disease status at alloSCT		
CR	8	15.7
Relapse or Refractory	25	49.0
No previous treatment	18	35.3
Cytogenetics		
Normal karyotype	19	37.3
Aberrant karyotype	32	62.7
-7/del7q	8	15.7
+8	7	13.7
Complex karyotype	15	29.4
Relapsed patients after alloSCT	16	31.4
Median follow-up, months (range)	32	(4-102)

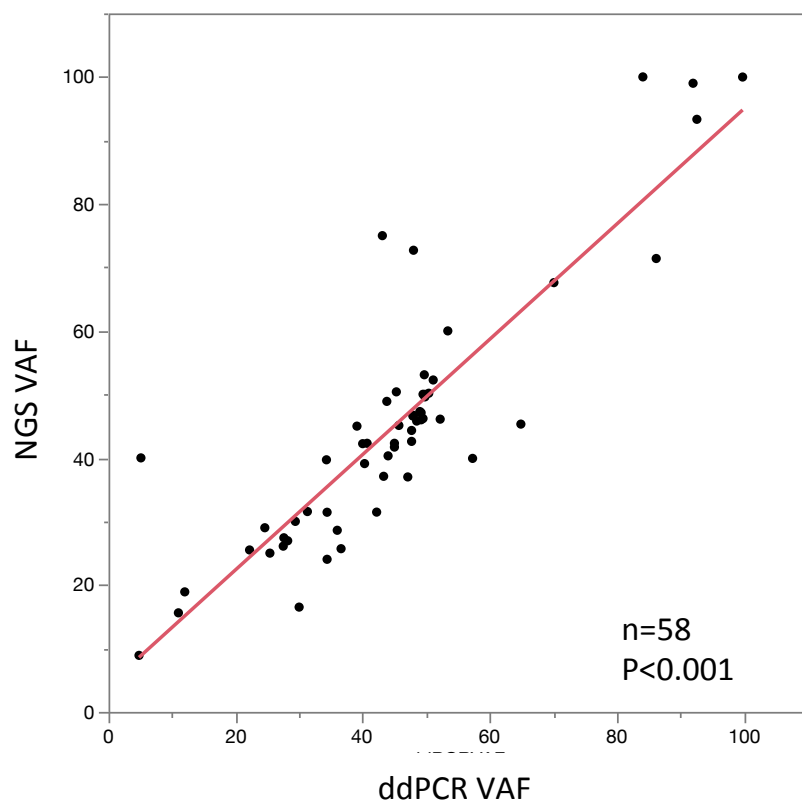
AML: acute myeloid leukemia, *MDS*: myelodysplastic syndrome, *alloSCT*: allogeneic hematopoietic stem cell transplantation, *CR*: complete remission

まず NGS で特定したドライバー変異を検出するための ddPCR アッセイの作成を行った。確認のために同一腫瘍検体を用いて NGS と ddPCR を用いて測定した VAF を比較した。利用可能な 45 検体、58 遺伝子異常において NGS と ddPCR を用いて測定した VAF は強く相関していた ($R^2 = 0.78$ 、 $p < 0.0001$ 、T 検定)

(Figure 9)。このことにより NGS と ddPCR による遺伝子変異の測定結果に有意差はないことが示された。

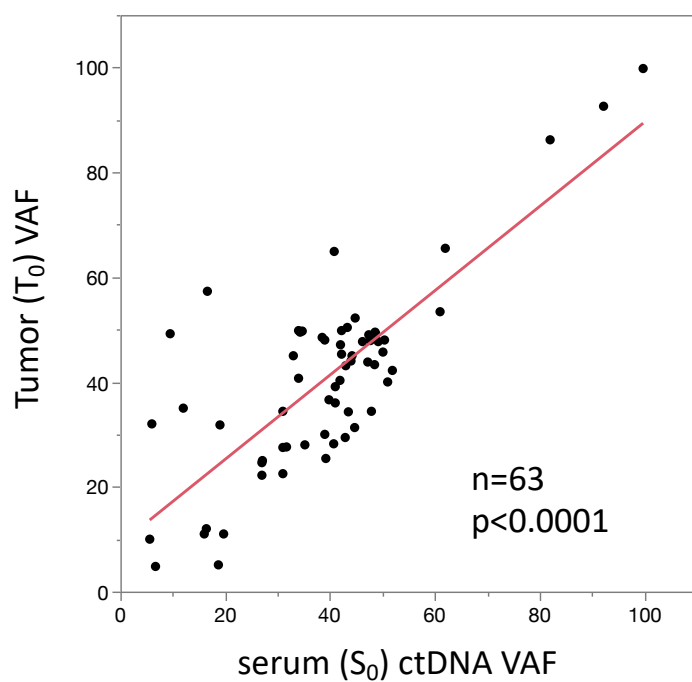
そして次に ctDNA が従来の骨髄検査の非侵襲的な代替となることを検証するため、診断時の骨髄検体 (T_0) と、診断時の血清 cfDNA (S_0) を用いて、利用可能な 47 検体、63 遺伝子異常に対して ddPCR によるドライバー変異の VAF の比較を行った。予想通り、 T_0 で検出した全てのドライバー変異を S_0 でも検出することができた。さらに検出した変異の VAF は T_0 と S_0 で有意に相関があることが判明した ($R^2 = 0.67$ 、 $p < 0.0001$ 、T 検定) (Figure 10)。

Figure 9. NGS と ddPCR により測定した VAF の比較



次世代シーケンス法 (NGS) と droplet digital PCR (ddPCR) 法による、同一検体を用いた変異アレル頻度 (VAF) の測定結果を示す。NGS と ddPCR による結果は強く相関していた。

Figure 10. 診断時の骨髄検体と血清検体で計測した遺伝子異常の VAF の比較



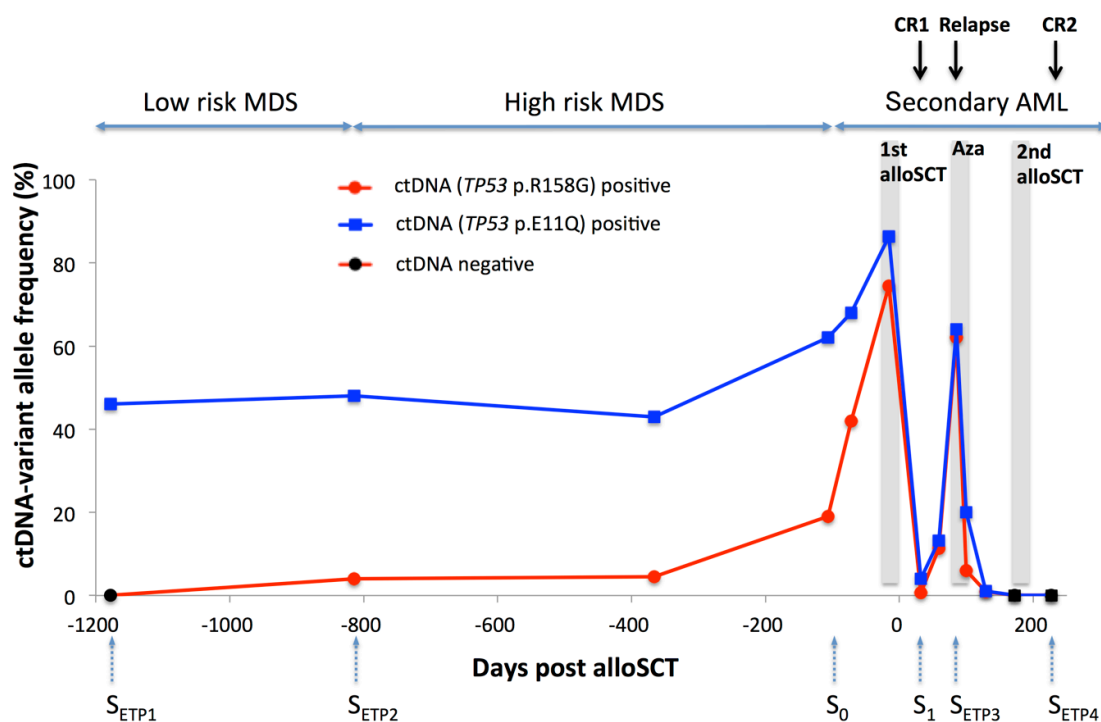
droplet digital PCR (ddPCR)法による、診断時の骨髄検体 (T₀)と血清検体 (S₀)を用いた circulating tumor DNA (ctDNA)の変異アレル頻度 (VAF)の測定結果を示す。T₀とS₀から検出されるVAFは強く相関していた。

5-2-2 ctDNA はクローン動態を反映していた

次に ctDNA を時系列で追跡し、腫瘍のクローン動態を反映していることを検証した。ID22 の二次性 AML の症例では、MDS の時期から *TP53* p. E11Q の変異を founder 変異として認めた。一方で *TP53* p. R158G の変異は二次的な変異として、low risk MDS から high risk MDS に移行する際に出現し、白血病への進展に並行してクローンが拡大していた (Figure 11)。

一方で ID7 の AML の症例では、診断時に *GATA2* p. A364T の変異を founder 変異として検出した。*NRAS* p. G12D の変異も検出したが、再発時には *NRAS* 変異のみ脱落していた (Figure 12)。これは二次的な変異であったため、*NRAS* 変異を持つクローンは、移植の選択圧により根絶されたためと考えられた。このように ctDNA は白血病の分子学的基盤の動態を鋭敏に反映していた。

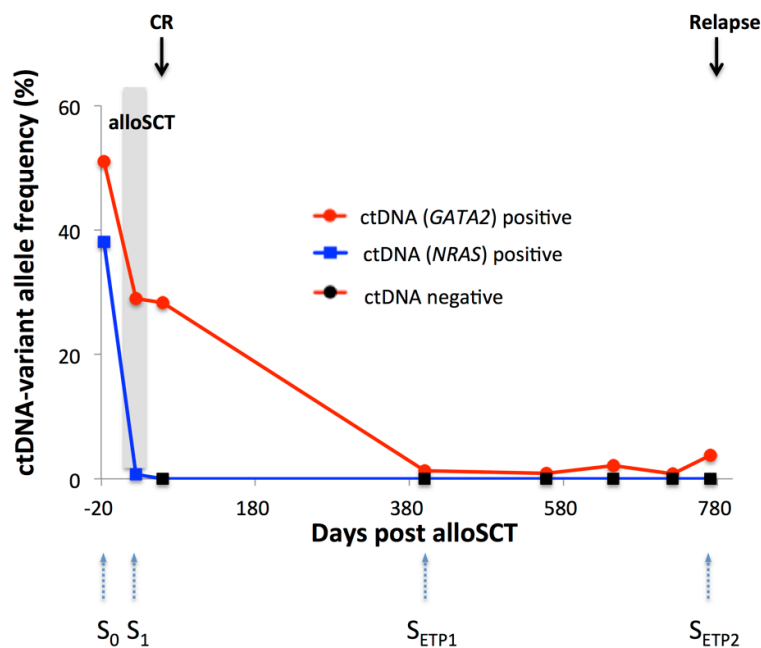
Figure 11. ID22 の circulating tumor DNA の測定結果



TP53 p. E11Q 変異のみを low-risk MDS の S_{ETP1} で検出した。high-risk MDS に進展した S_{ETP2} では *TP53* p. R158G 変異を p. E11Q よりも低い VAF で検出した。AML への進展に伴い両者の VAF は上昇し、初回移植後に VAF は減少したが S₁ ではまだ検出され、S_{ETP3} の再発時に再増加していた。2 度目の移植後 S_{ETP4} のには両者とも検出されなくなっていた。

S₀: AML の診断時、S_i: 骨髄移植後 1 ヶ月の寛解期、*extra time points (ETP)*: low-risk MDS 期 (S_{ETP1})、high-risk MDS 期 (S_{ETP2})、初回移植後再発時 (S_{ETP3})、再移植後寛解期 (S_{ETP4})、*Aza*: 5-azacytidine、*CR1*: 1st complete remission、*CR2*: 2nd complete remission

Figure 12. ID7 の circulating tumor DNA の測定結果



GATA2 p. A364T と *NRAS* p. G12D の変異を診断時 (S₀) に検出した。骨髄移植後 1 ヶ月 (S₁) には両者の変異の VAF は減少し、S_{ETP1} には *NRAS* の変異は検出されなくなった。一方で、*GATA2* の変異は残存していた。血液学的再発時 (S_{ETP2}) には *GATA2* 変異のみの変異アレル頻度が上昇していた。

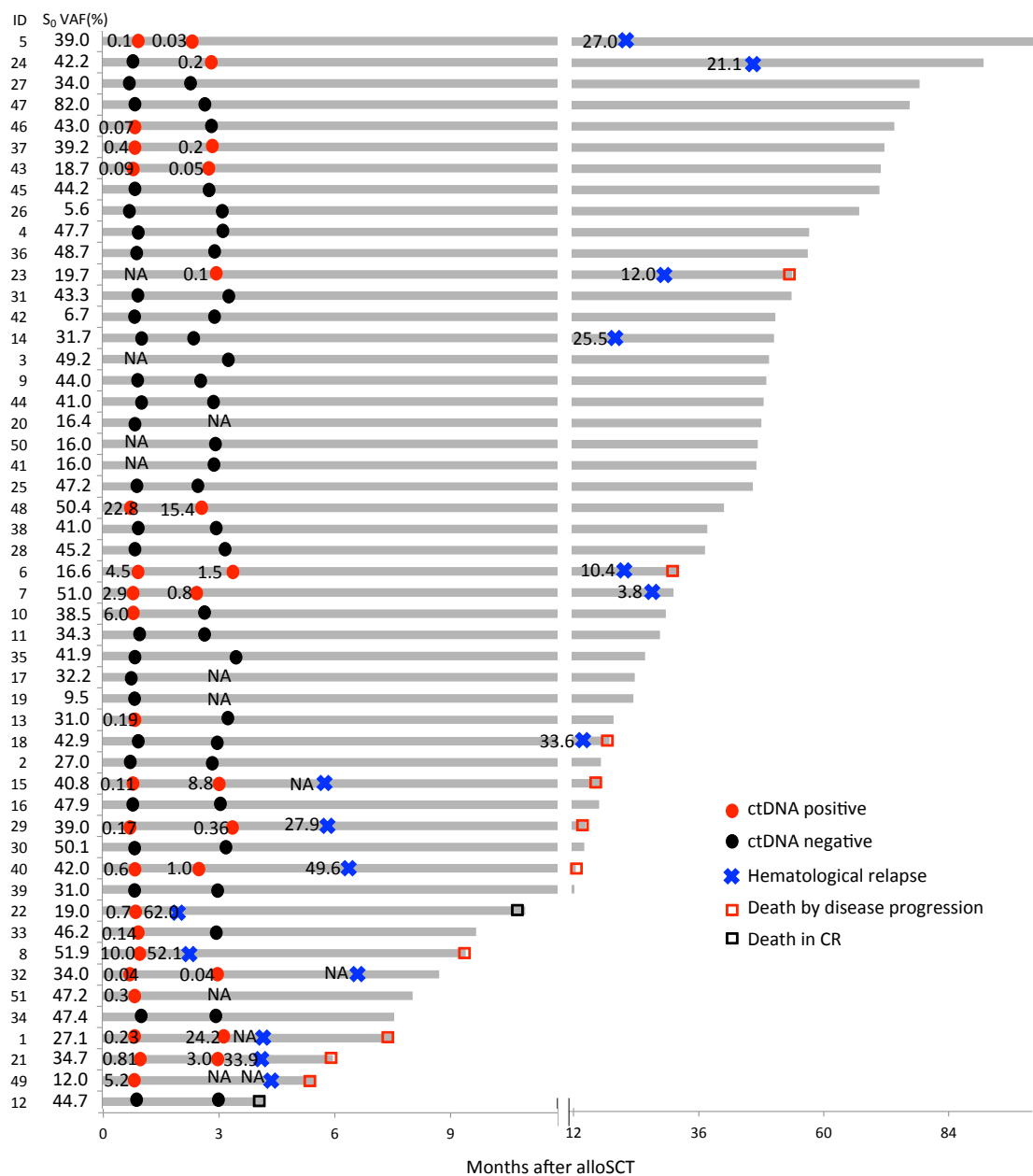
CR: complete remission

5-2-3 造血幹細胞移植後に ctDNA が残存している症例は再発率が高い

次に ctDNA の残存 (ctDNA-positive: CP) と、骨髄中のドライバー変異の残存 (mutation-positive: MP) による予後の検討を行った。検体はそれぞれ移植後 1 ヶ月 (CP1 または MP1) と 3 ヶ月 (CP3 または MP3) のものを用いた。ctDNA 測定の結果を swim lane プロットで Figure 13 に示す。CP1 と MP1、CP3 と MP3 の一致度を κ 係数 により評価を行うと ($\kappa < 0.40$, poor concordance; $\kappa = 0.41-0.75$, moderate concordance; $\kappa > 0.75$, good concordance)、いずれも相関が得られた (CP1 and MP1 = 0.66, ; CP3 and MP3 = 1.0) (Table 7)。

移植後の観察期間中 (中央値 32 ヶ月) に、51 例中例が再発した。再発までの期間の中央値は 7 ヶ月 (1.9 - 53.6 ヶ月) であった。予想通り、ctDNA や骨髄中のドライバー変異が残存している症例は、有意に累積再発率 (CIR: cumulative incidence of relapse) が高く、全生存率 (OS: overall survival) が低かった。移植後 1 ヶ月時点の CIR と OS の結果を Figure 14 に、3 ヶ月時点の結果を Figure 15 に示す。以上から、血清を用いた ctDNA による評価は、骨髄検査の非侵襲的な代替となる可能性が示唆された。

Figure 13. circulating tumor DNA 測定の結果のまとめ



CR: complete remission; NA: not available

Table 7. 造血幹細胞移植後1ヶ月、3ヶ月時点の ctDNA と骨髄中の遺伝子異常、フローサイトメトリー法、キメリズム法の結果の相関

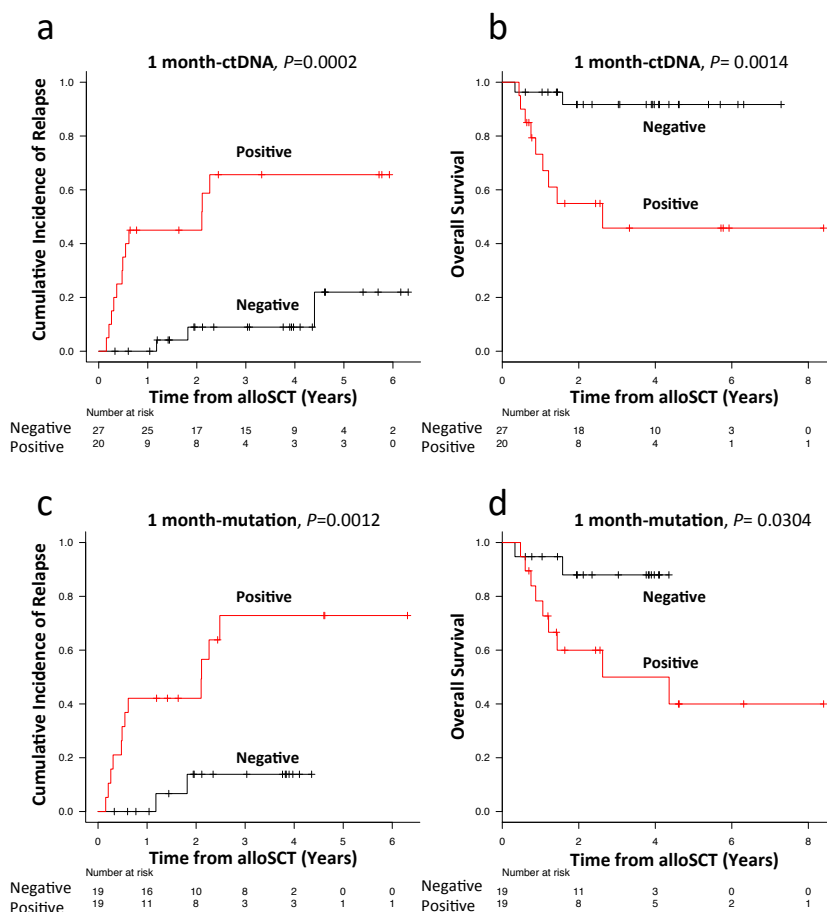
MRD at 1 month	Positive	Negative	Positive	Negative	Positive	Negative	Positive	Negative
serum ctDNA	serum ctDNA		Mutation		Flow cytometry		Mixed chimerism	
Positive	20	0	13	1	4	13	8	9
Negative	0	27	5	16	7	18	3	22
<i>P</i> value	-		< .0001		1		0.0289	
<i>kappa</i> (range)	-		0.66 (0.41-0.90)		-0.04 (-0.33-0.23)		0.37 (0.09-0.65)	

MRD at 3 months	Positive	Negative	Positive	Negative	Positive	Negative	Positive	Negative
serum ctDNA	serum ctDNA		Mutation		Flow cytometry		Mixed chimerism	
Positive	14	0	5	0	3	6	3	6
Negative	0	30	0	19	15	10	1	24
<i>P</i> value	-		< .0001		0.2497		0.048	
<i>kappa</i> (range)	-		1.00 (1.00-1.00)		-0.20 (-0.48-0.08)		0.36 (0.00-0.71)	

MRD: minimal residual disease, *ctDNA*: circulating tumor DNA, *P* value:

Fisher の正確検定による有意確率, *kappa*: Cohen の κ 係数による一致度

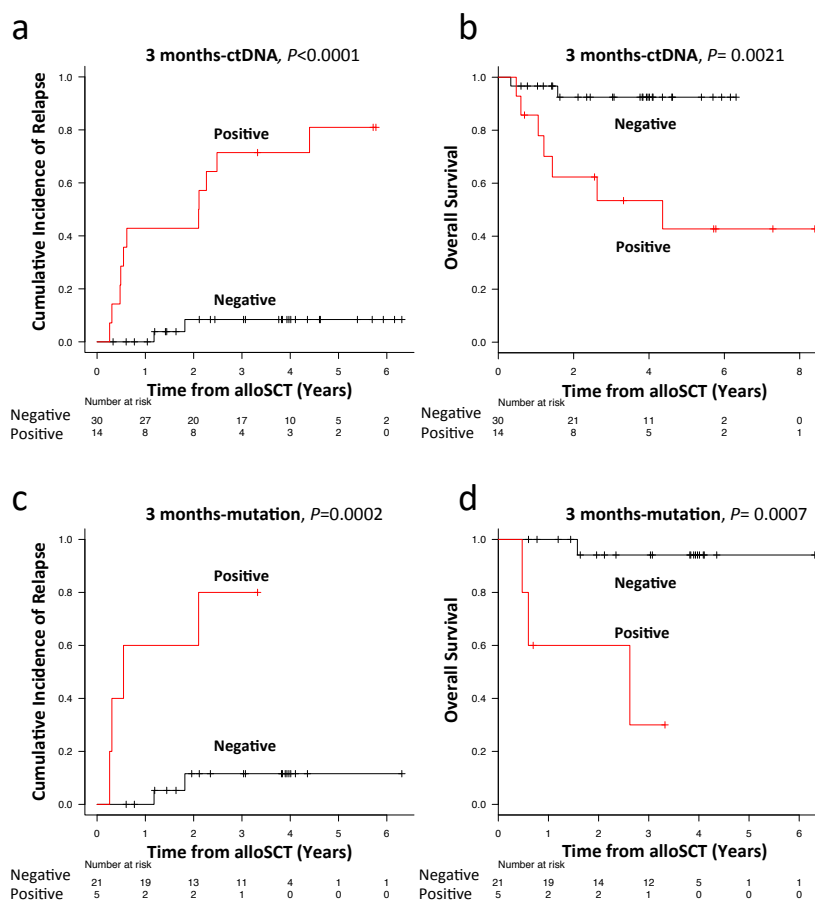
Figure 14. 造血幹細胞移植後1ヶ月時点の ctDNA と骨髄中遺伝子異常の残存の有無による再発率と生存率の検討



骨髄移植後1ヶ月時点で ctDNA が残存している症例 (CP1) は有意に再発率が高く (a)、生存率が低かった (b)。骨髄中に遺伝子異常が残存している症例 (MP1) も、同様に有意に再発率が高く (c)、生存率が低かった (d)。

3年累積再発率 [3年全生存率]: CP1 対 non-CP1, 65.6 [45.8%] 対 9.0 [91.7%], $P = 0.0002$ [0.0014], MP1 対 non-MP1, 72.9 [50.0%] 対 13.8 [88.0%], $P = 0.0012$ [0.0304];

Figure 15. 造血幹細胞移植後 3 ヶ月時点の ctDNA と骨髄中遺伝子異常の残存の有無による再発率と生存率の検討

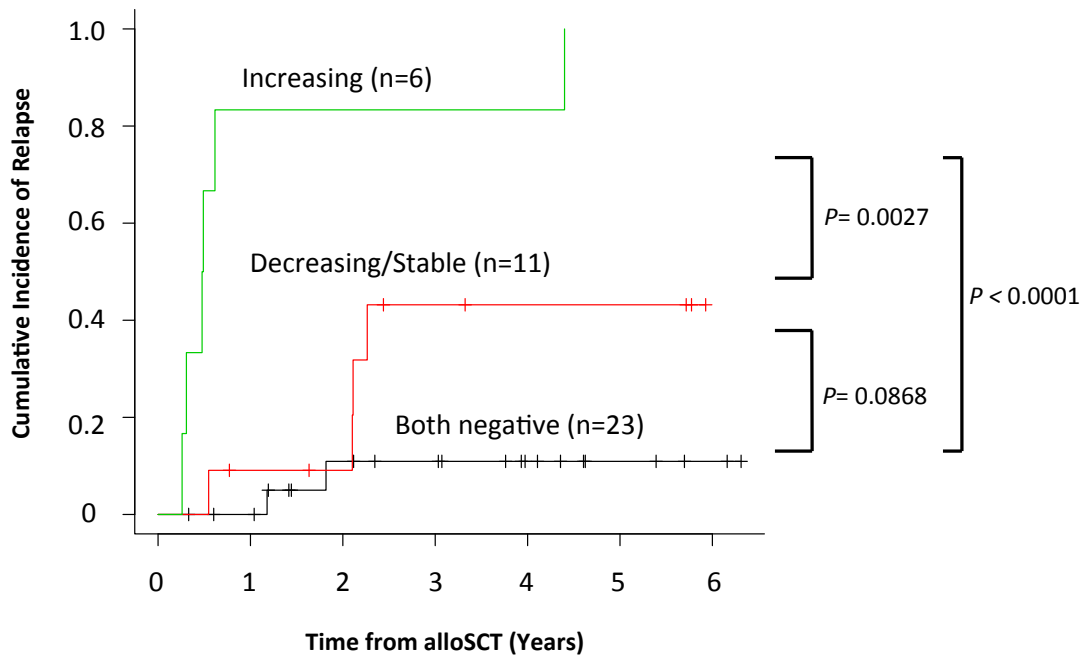


骨髄移植後 3 ヶ月時点で ctDNA が残存している症例 (CP3) は有意に再発率が高く (a)、生存率が低かった (b)。骨髄中に遺伝子異常が残存している症例 (MP3) も、同様に有意に再発率が高く (c)、生存率が低かった (d)。

3 年累積再発率 [3 年全生存率]: CP3 対 non-CP3, 71.4 [53.4%] 対 8.4 [92.5%], $P = 0.0001$ [0.0021], MP3 対 non-MP3, 80.0 [30.0%] 対 11.6 [94.1%], $P = 0.0002$ [0.0007];

5-2-4 造血幹細胞移植後 ctDNA が上昇傾向にある症例は有意に再発率が高い
さらに ctDNA の動態により再発の可能性が高い症例を推定するため、移植後 1
ヶ月、3 ヶ月の両方の検体が利用可能であった 40 症例について検討を行った。
ctDNA が移植後 1 ヶ月から 3 ヶ月にかけて、陰性から陽性に転じた症例、または
VAF が 1.5 倍以上の上昇を認めた症例を” increasing” 群(n = 6)、ともに ctDNA
を検出しなかった症例を” both negative” 群(n = 23)、いずれにも属さない陽
性から陰性に転じたか、VAF が減少したか変化のなかった症例
を” decreasing/stable” 群(n = 11)と分類し解析を行った。
結果として、increasing 群は decreasing/stable 群、both negative 群と比較
して有意に再発率が高かった(それぞれ $p=0.0027$ 、 $p=0.0096$)。また有意差は認
めなかったものの、decreasing/stable 群も both negative 群と比較すると再発
のリスクが高い可能性が示された(Figure 16)。これらの結果により、実臨床で
も時系列に沿った複数回の評価による、ctDNA 動態の解析により、さらに高精度
に再発を予測できる可能性が示された。

Figure 16. 造血幹細胞移植後1ヶ月から3ヶ月時点にかけての ctDNA の動態による再発率の検討

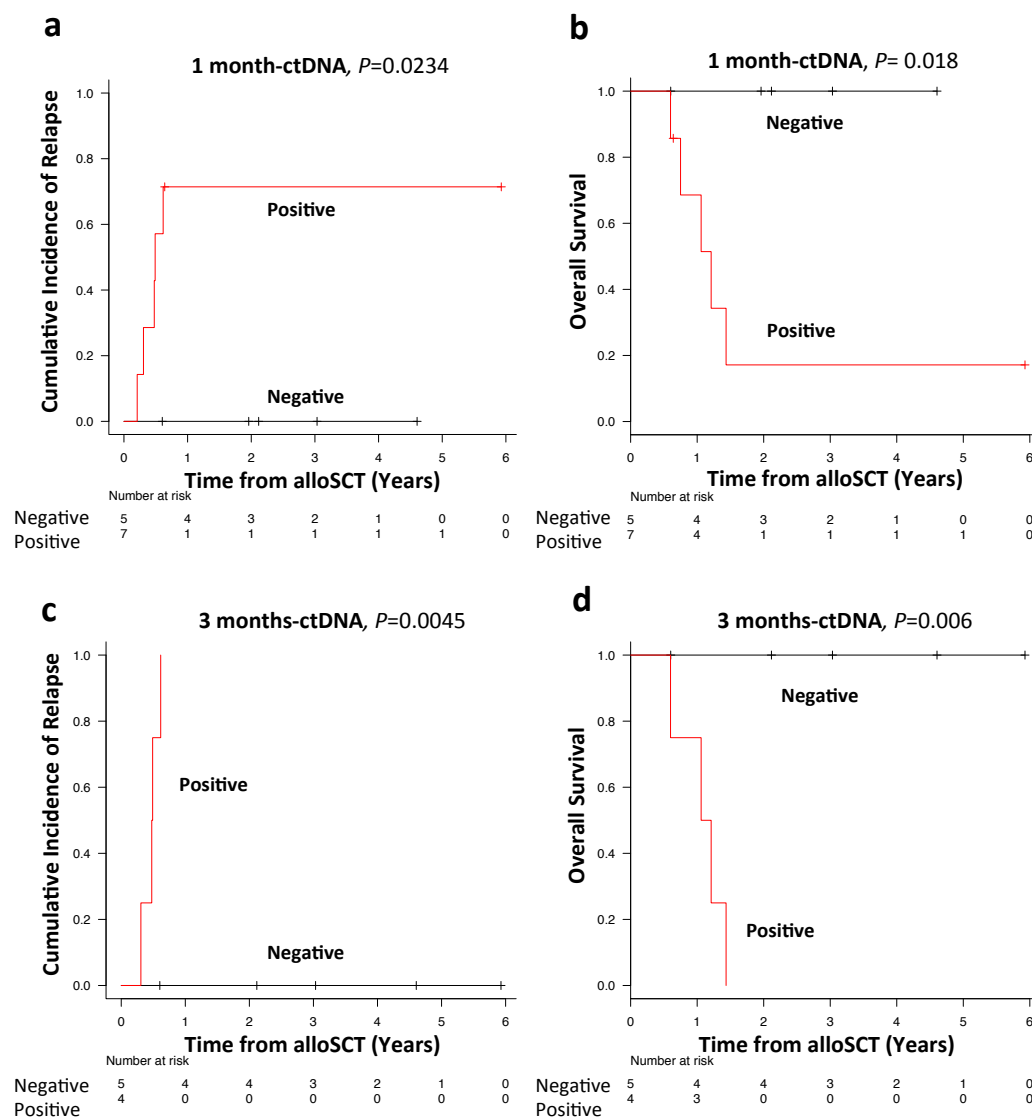


変異アレル頻度が 1.5 倍以上の上昇を認めた” increasing” 群は、decreasing/stable 群、both negative 群と比較して有意に再発率が高かった。

5-2-5 DNMT3A、TET2、ASXL1 変異の残存も再発に影響していた

さらに近年では *DNMT3A*、*TET2*、*ASXL1* (DTA) 遺伝子の変異は clonal hematopoiesis of indeterminate potential (CHIP) に関連することが知られており、健常な高齢者でも検出される。そして AML の化学療法後に CHIP 変異が残存しても、再発には影響しないという報告がでてきている [40] [41]。これを検証するため、DTA 遺伝子を対象とする ddPCR アッセイを用いて解析した 12 例の検討を行った。結果として DTA 遺伝子異常をもとにした ctDNA の残存も、同じく再発や OS に悪影響を与える可能性が示唆された (Figure 17)。

Figure 17. *DNMT3A*, *TET2*, *ASXL1* の変異に限定した ctDNA の残存による再発率と生存率の検討

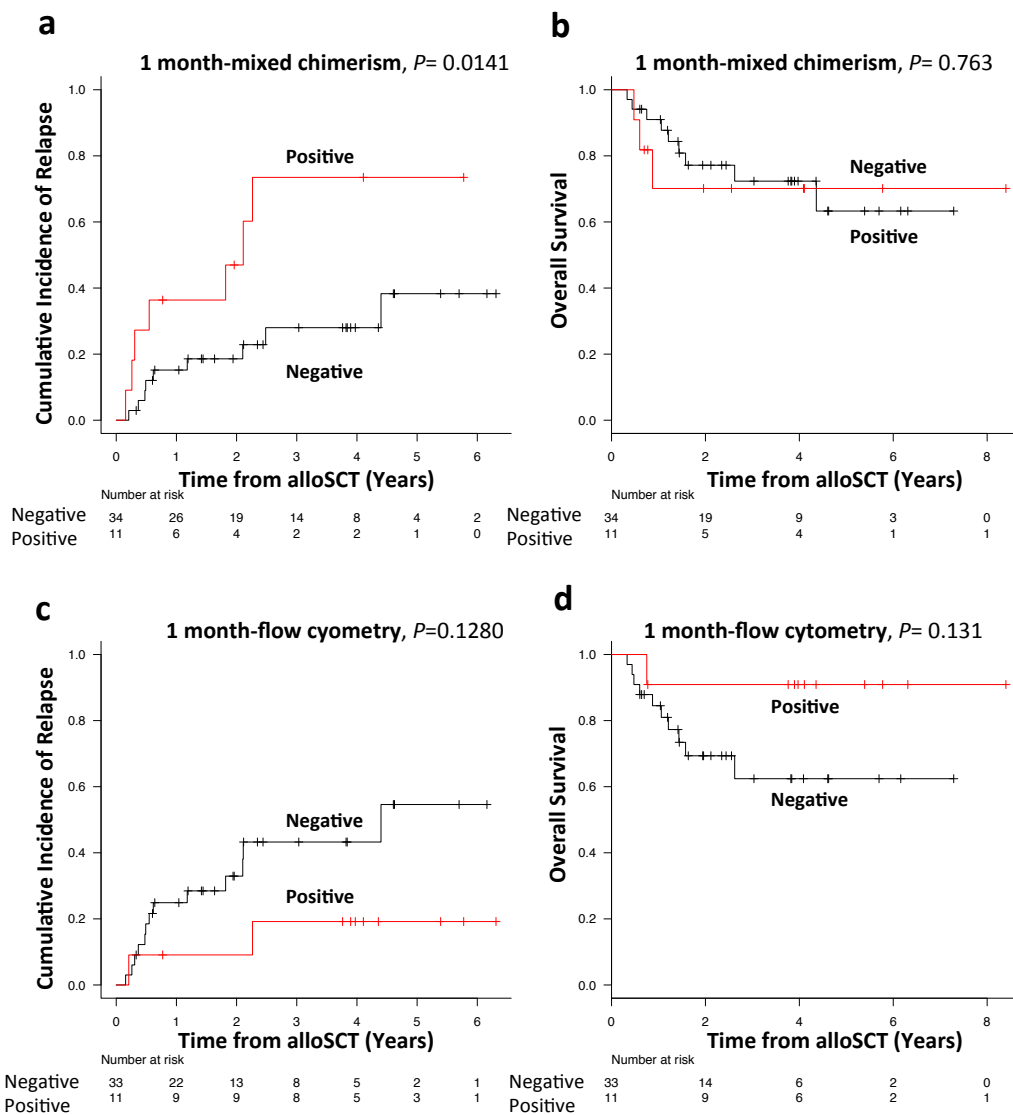


DNMT3A, *TET2*, *ASXL1* (DTA) の遺伝子異常をもとにした骨髄移植後 1 ヶ月の ctDNA の残存の有無による累積再発率(a)と全生存率(b)。同じく 3 ヶ月時点の累積再発率(c)と全生存率(d)。DTA 遺伝子の異常をもとにした ctDNA の残存も、再発や生存に悪影響を与える可能性が示唆された

5-2-6 従来のキメリズム法も再発を予測可能であった

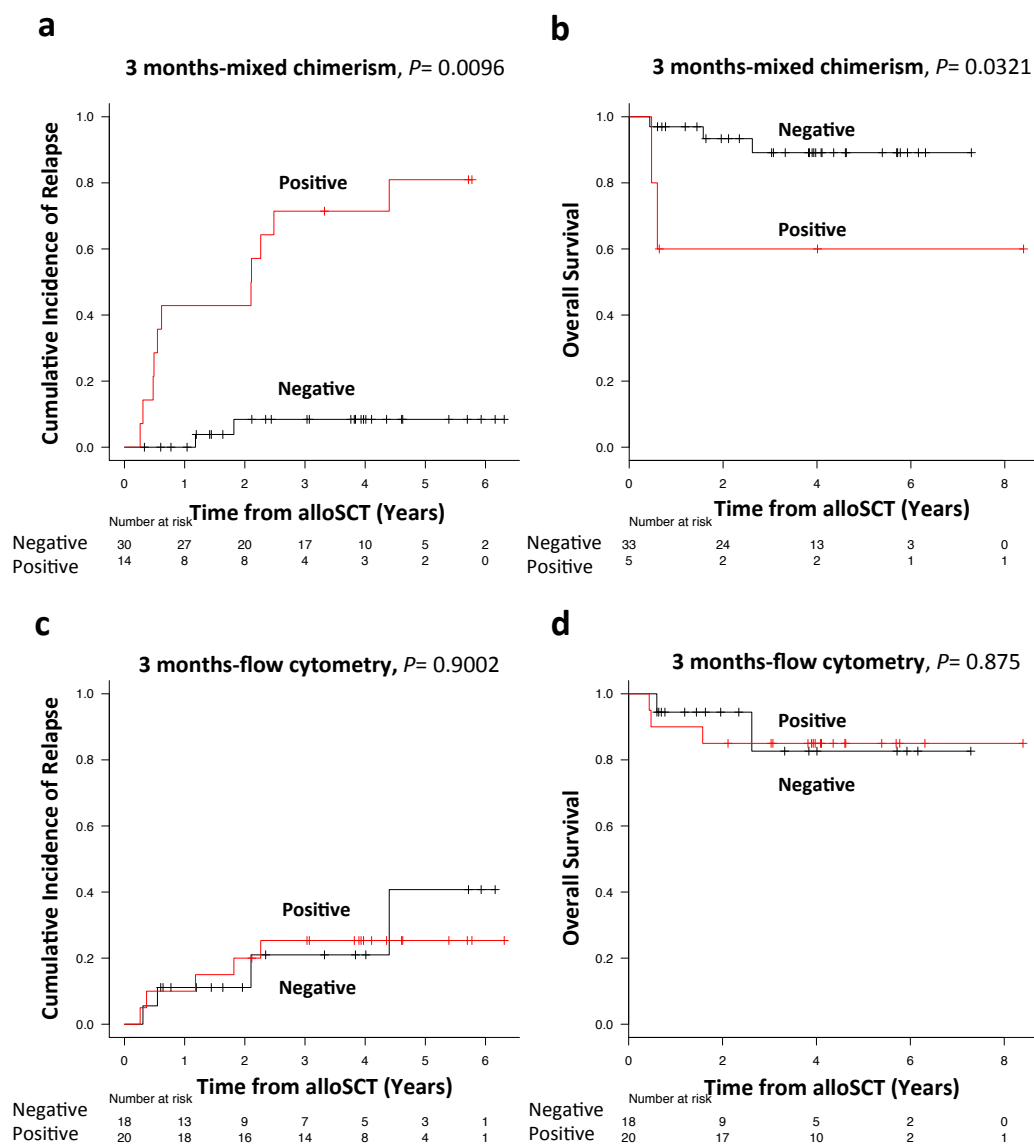
実臨床で使用されている従来のバイオマーカーである、骨髄検体によるキメリズム法、フローサイトメトリー法による再発予測能の評価を行った。キメリズム法による混合キメラ (mixed chimerism positive: MCP)、フローサイトメトリー法による腫瘍クローン検出 (flowcytometry positive: FCP) を用いて、移植後 1 ヶ月 (MCP1 または FCP1) と 3 ヶ月 (MCP3 または FCP3) の結果で解析を行った。そして MCP1 と MCP3 はともに再発に影響し、MCP3 は OS にも関連していた (3 年 CIR [3 年 OS]: MCP1 対 non-MCP1, 72.0 [70.1%] 対 26.5 [72.3%], $P = 0.00141$ [0.7630]; MCP3 対 non-MCP3, 70.0 [60.0%] 対 9.3 [89.1%], $P = 0.0096$ [0.0321]) (Figure 18、19)。一方で FCP1 と FCP3 は再発や OS との関連がなかった。また、既存の予後不良因子での検討も行ったが、同じく再発や OS との明らかな相関は見いだせなかった (Table 8)。

Figure 18. 造血幹細胞移植後 1 ヶ月時点のキメリズム法とフローサイトメトリー法による再発率と生存率の検討



骨髓移植後 1 ヶ月時点でキメリズム法が陽性の症例は有意に再発率が高かったが (a)、生存率に有意差はなかった (b)。フローサイトメトリー法が陽性の症例では、再発率 (c)、生存率 (d) とともに有意差はなかった。

Figure 19. 造血幹細胞移植後 3 ヶ月時点のキメリズム法とフローサイトメトリー法による再発率と生存率の検討



骨髄移植後 3 ヶ月時点でキメリズム法が陽性の症例は有意に再発率が高く

(a)、生存率も低かった (b)。フローサイトメトリー法が陽性の症例では、再

発率 (c)、生存率 (d)ともに有意差はなかった。

Table 8. バイオマーカーや予後不良因子による再発と死亡リスクの検討

Variables	Sample source	Method	Positive, N(%)	Relapse			Death		
				HR	95%CI	P value	HR	95%CI	P value
MRD persistence at 1 month									
ctDNA	Serum	ddPCR	20/47(42.6)	7.89	2.22-28.10	0.0014**	8.24	1.77-38.37	0.0072**
Mutation	BM	ddPCR	19/38(50.0)	8.03	1.79-35.96	0.0065**	4.75	1.00-22.45	0.0494*
Mixed chimerism	BM	PCR/FISH	11/45(24.4)	3.25	1.20-8.80	0.0202*	1.22	0.33-4.53	0.7631
Flow cytometry	BM	Flow cytometry	11/44(25.0)	0.33	0.07-1.48	0.1475	0.23	0.03-1.83	0.1650
MRD persistence at 3 month									
ctDNA	Serum	ddPCR	14/44(31.8)	15.04	3.33-67.96	0.0004**	8.04	1.66-38.88	0.0095**
Mutation	BM	ddPCR	5/26(19.2)	13.03	2.36-72.04	0.0032**	17.66	1.81-172.20	0.0135*
Mixed chimerism	BM	PCR/FISH	5/38(13.2)	6.22	1.47-26.26	0.0129*	5.78	0.95-35.06	0.0577
Flow cytometry	BM	Flow cytometry	20/38(52.6)	0.91	0.25-3.45	0.9005	1.16	0.19-7.03	0.8751
ctDNA kinetics									
Increasing	Serum	ddPCR	6/40(15.0)	28.47	5.59-145.00	0.0001**	17.35	3.21-93.68	0.0009**
Decreasing/Stable	Serum	ddPCR	11/40(27.5)	4.15	0.76-22.65	0.0868	1.04	0.09-11.44	0.977
Both negative	Serum	ddPCR	23/40(57.5)	1.00			1.00		
Adverse prognostic variables									
Complex karyotype	BM	G-BAND	15/51(29.4)	2.41	0.90-6.46	0.0794	1.73	0.53-5.52	0.3575
-7/del7q karyotype	BM	FISH/G-BAND	8/51(15.7)	0.67	0.15-2.97	0.6010	1.05	0.23-4.82	0.9494
FLT3-ITD	BM/PB	PCR/NGS	12/51(23.5)	2.47	0.89-6.85	0.0813	2.69	0.84-8.58	0.0953
TP53 mutation	BM/PB	NGS	6/51(11.8)	2.28	0.65-8.05	0.1999	3.27	0.88-12.12	0.0761
RAS pathway mutation	BM/PB	NGS	19/51(37.3)	2.59	0.96-6.99	0.0605	1.84	0.59-5.74	0.2911
Age >65			8/51(15.7)	1.21	0.27-5.39	0.8040	2.81	0.74-10.75	0.1308
Male			29/51(56.9)	0.69	0.26-1.85	0.4601	0.68	0.22-2.11	0.5037
Relapsed- or Refractory-disease at alloSCT			25/51(49.0)	1.91	0.71-5.63	0.2049	3.23	0.96-14.55	0.0584

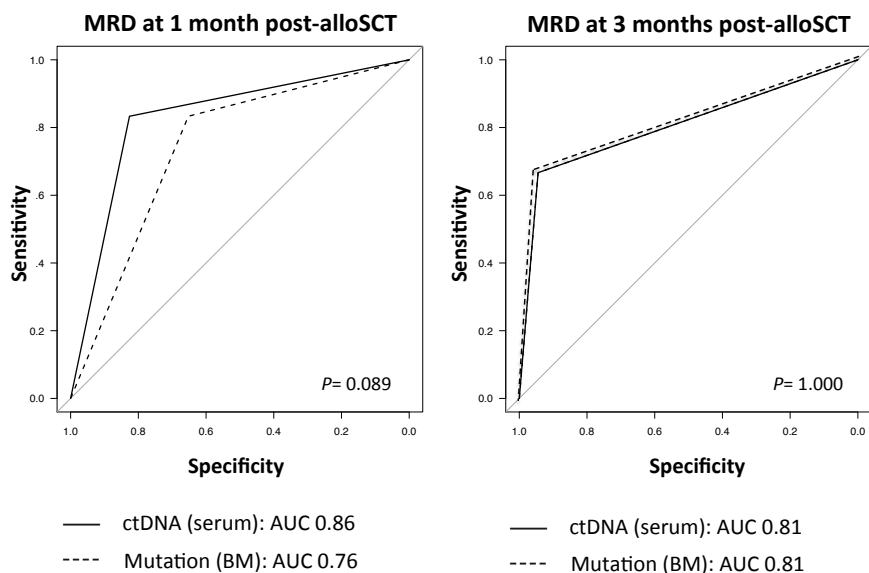
CI: confidence interval, FISH: fluorescence in situ hybridization

*P < 0.05, **P < 0.01

5-2-7 ctDNAは従来のバイオマーカーに匹敵する精度で再発を予測できた

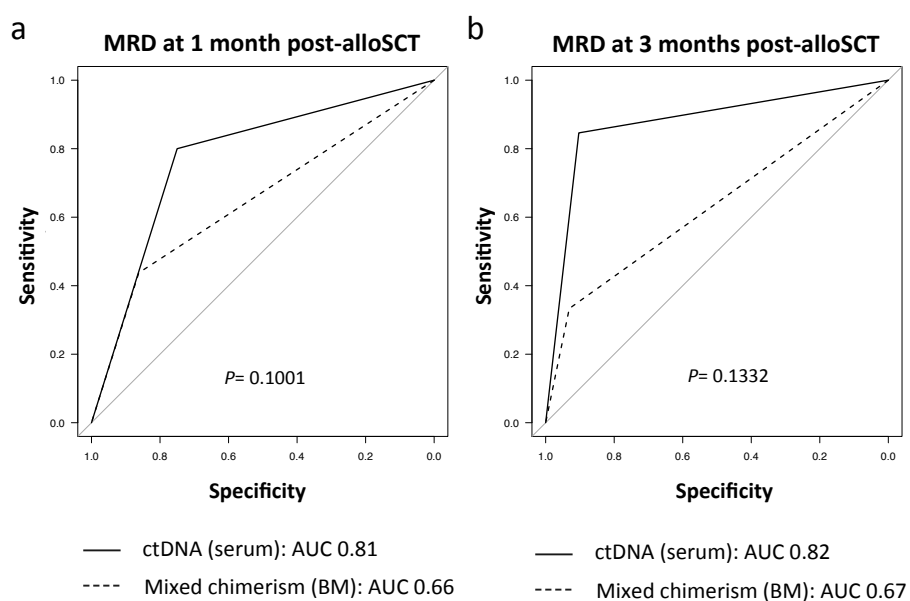
次に CP と、MP、MCP の再発予測能の比較を行った。Cox 解析ではこれらの相関のある変数を扱うには不適であり、DeLong 法により、receiver operating characteristic 曲線 (ROC 曲線) の area under curve (AUC) を用いて再発の診断能を比較した。結果として、CP と MP、また CP と MCP を比較したところ有意な差は認めなかった (Figure 20、21)。さらに CP1 と CP3 を比較すると、CP3 の方が再発や生存を予測する精度が高かった (Figure 22)。これらの結果から非侵襲的な ctDNA を用いた検査は、従来の骨髄検体による遺伝子検査やキメリズム法と同等に、AML や MDS の移植後再発のリスクが高い症例を特定できる可能性が示唆された。

Figure 20. ROC 曲線による ctDNA と骨髓中の遺伝子異常の残存による再発予測能の比較



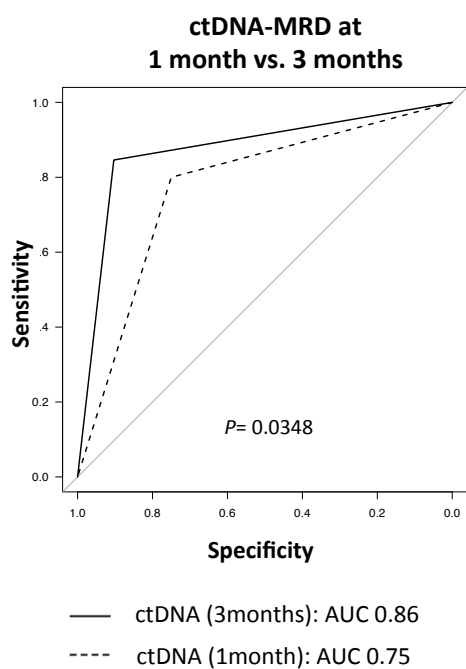
DeLong 法により、receiver operating characteristic 曲線 (ROC 曲線) の area under curve (AUC) を用いて再発の診断能を比較した。造血幹細胞移植後 1 ヶ月、3 ヶ月時点において ctDNA と骨髓中の遺伝子異常の残存による再発予測能に有意差は認めなかった。

Figure 21. ROC 曲線による ctDNA とキメリズム法による再発予測能の比較



DeLong 法により、receiver operating characteristic 曲線 (ROC 曲線) の area under curve (AUC) を用いて再発の診断能を比較した。造血幹細胞移植後 1 ヶ月、3 ヶ月時点において ctDNA とキメリズム法による再発予測能に有意差は認めなかった。

Figure 22. ROC 曲線による造血幹細胞移植後 1 ヶ月、3 ヶ月時点の ctDNA による再発予測能の比較



DeLong 法により、receiver operating characteristic 曲線 (ROC 曲線) の area under curve (AUC) を用いて再発の診断能を比較した。造血幹細胞移植後 1 ヶ月、3 ヶ月時点の ctDNA を比較すると、3 ヶ月時点のほうが有意に再発予測能が高かった。

5-2-8 ctDNAは末梢血単核球よりも再発予測能が優れている可能性がある

以上より血清中の ctDNA を用いた検査は、骨髄検査の非侵襲的な代替となると考えられる。しかし、末梢血単核球(peripheral blood mononuclear cell: PBMNC) と比して利点があるのかという疑問が残る。そこで9 症例から移植後1 ヶ月と3 ヶ月時点の11 検体の PBMNC を用いて、PBMNC 中のドライバー変異の残存の有無(mutation persistence in the PBMNC fraction: MP-PB)と、CP との比較を行った。

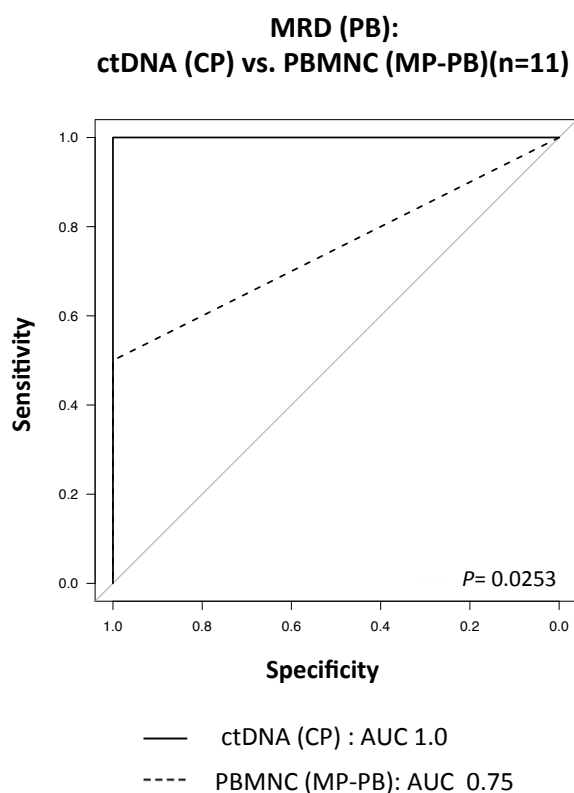
11 検体中、8 検体において CP と MP-PB の結果は一致していた(Table 9)。さらに再発予測能を ROC 曲線により比較すると、CP の方が優れていた($p = 0.0253$) (Figure 23)。これらの結果より、血清中の ctDNA を用いた遺伝子検査は、末梢血を用いた遺伝子検査より感度が高い可能性が示唆された。

Table 9. ctDNA と末梢血中の遺伝子異常の測定結果の比較

ID	Timing	ctDNA status (CP)	PB mutation status (MP-PB)	PB white-cell count ($\times 10^2 / \mu\text{L}$)	Hematological relapse post-alloSCT
1	3 months	Positive (0.23%)	Positive (0.4%)	26.7	yes
21	1 month	Positive (0.81%)	Positive (1.2%)	7.8	yes
22	1 month	Positive (0.7%)	Positive (0.44)	19.4	yes
29	1 month	Positive (0.17%)	Negative	3.7	yes
30	3 months	Negative	Negative	36.1	no
32	1 month	Positive (0.04%)	Negative	9.3	yes
32	3 months	Positive (0.04%)	Negative	16.8	yes
33	3 months	Negative	Negative	16.9	no
34	1 month	Negative	Negative	23.3	no
34	3 months	Negative	Negative	40.9	no
39	1 month	Negative	Negative	18.8	no

ctDNA: circulating tumor DNA, *PB*: peripheral blood

Figure 23. ROC 曲線による ctDNA 法と末梢血中の遺伝子異常の残存による再発予測能の比較



DeLong 法により、receiver operating characteristic 曲線 (ROC 曲線) の area under curve (AUC) を用いて再発の診断能を比較した。ctDNA 法と末梢血中の遺伝子異常の残存を比較すると、ctDNA のほうが有意に再発予測能が高かった。

MRD: minimal residual disease, *PB*: peripheral blood, *ctDNA*: circulating tumor DNA, *MP*: mutation persistence

6. 考察

本研究により造血器腫瘍患者に、非侵襲的に遺伝子検査を提供することが可能となり、ctDNA は病態を高精度に反映している可能性が示唆された。我々はまず NGS により腫瘍検体の網羅的遺伝子解析を行い症例ごとにドライバー変異を特定し、その変異を検出するための ddPCR アッセイを作成した。17 症例の造血器腫瘍患者検体の解析では、診断時血清から全例で ctDNA を検出することができた。さらに VAF は臨床経過を反映し、従来のバイオマーカーや画像検査の結果と矛盾なく推移していた。さらに再発群の症例は全例で ctDNA の VAF が上昇傾向にあった。そして従来のバイオマーカーと比較して、平均 30 日早く再発を特定することができた。

7 例の多発性骨髄腫症例で ctDNA を用いて解析した既報では、ctDNA は sFLC のような血清学的バイオマーカーと並行して推移していた[38]。本研究結果と同じように、4 症例では従来のバイオマーカーに先行して ctDNA は変化していた。また 11 症例の悪性リンパ腫症例の報告では、ctDNA は 8 症例において画像検査よりも早く再発を検出することができており、本研究と同様の結果である[42]。現在では、フローサイトメトリー法や PCR 法、FISH 法などによる検査などが造血器腫瘍のバイオマーカーとして広く用いられている。ctDNA による検査はフローサイトメトリー法と同じく 17 例全例に適応することができ、PCR 法や FISH 法

(23.5%: 4/17 症例)よりも多くの症例に適応することができた。さらに作成した ddPCR アッセイの検出限界の中央値は 0.04%であり、フローサイトメトリー法 (0.1%) [43]や FISH 法(1%) [44]よりも感度が高く、従来の PCR 法 (0.01-0.04%) に匹敵する可能性がある[36]。このように ctDNA を用いた遺伝子検査は、適応できる症例が多く、高感度なバイオマーカーとして実臨床で有用な可能性が示された。

そして次に 51 症例の骨髄移植を行った AML と MDS 患者の解析を行い、骨髄移植後の ctDNA の残存の有無による再発予測を行った。骨髄移植後 1 ヶ月、3 ヶ月時点で ctDNA が残存している症例は、検出しなかった症例と比較して有意に再発率、死亡率が高かった。さらに骨髄移植後 1 ヶ月から 3 ヶ月時点で ctDNA の VAF が上昇している症例は、特に再発率が高かった。そして ctDNA を用いた検査結果は、骨髄中のドライバー変異の残存と相関した結果が得られた。血清中 ctDNA を用いた遺伝子検査は、AML と MDS 症例の骨髄移植後再発予測に有用であった。

既報によると骨髄移植後の PB を用いた MRD の有用性に関するデータは乏しく、予後に関する影響についてもはっきりとわかっていない[45]。これは PB を用いた遺伝子検査の感度が BM よりも 1-log10 オーダー低いためと考えられる[16]。そのため、本研究により ddPCR 法による血清を使用した再発予測能の比較で、非侵襲的に BM と遜色ない結果が得られたということは重要である。

また NGS 法を用いても MRD 解析を行うことは可能であるが、ddPCR 法の方が結果報告までの時間が極めて早く、定期的な測定に適している[46]。さらに ddPCR 法は NGS 法と比較してコストも安い(ddPCR 法 約\$10/検体、ddPCR アッセイ作成 約\$200/アッセイ；NGS 法(パネル解析) 約\$350/検体)。一方で ddPCR 法はドライバー変異ごとにアッセイの作成が必要なため手間がかかり、複数の遺伝子異常を網羅的に解析することはできない。

また本研究と同様に、いくつかの報告で ctDNA による遺伝子検査が BM による MRD 解析の代替となる可能性が示されている。とくに MDS においては、少ない症例数ではあるが化学療法後の再発予測に ctDNA が有用であるという報告もある[47]。しかし骨髄移植後の再発予測についての検討はまだなく、本研究は初めて AML と MDS の骨髄移植後再発に ctDNA が有用であることを示した。

そして ctDNA はリアルタイムなクローン動態の変化を反映している可能性も示された。5-2-2 に示したように、本研究の ID7 や ID22 が代表的な症例である。特に ID7 のように、再発時に骨髄移植の選択圧によりクローンの脱落を示す症例では単一遺伝子異常によるモニターでは、偽陰性となる可能性がある。さらに ID22 のように、経過中に病勢の進行や再発に関わる新しく遺伝子異常が加わった症例もあり、このような症例も単一の遺伝子異常のみの評価では病態を正確に把握できない可能性が高い。そのため、複数の遺伝子異常を用いての

ctDNA の測定が重要だと考えられる。さらに病態の変化があった場合や再発時は、NGS による網羅的遺伝子解析を組み合わせることで検査の精度を上げることができるであろう。

さらに 5-2-8 に示したように、本研究では血清を用いた ctDNA 検査は PBMNC を使用するよりも再発予測に有用な可能性が DeLong 試験により示唆された。症例数は少ないものの、2 症例において ctDNA のほうが PBMNC よりも有用であった。これは重度な血球減少を伴う MDS 症例でも ctDNA と BM は同等の VAF を示すという報告があり [47]、おそらく alloSCT 後には深刻な血球減少が継続しているため、PBMNC による遺伝子検査は感度が低くなることが予想された。

また本研究結果は、AML と MDS の過去の報告とは異なる点もいくつかある。第一に 5-2-6 に示したとおり、従来は AML や MDS 症例で予後不良とされている非寛解状態での移植や、治療抵抗性に関わる遺伝子異常が、本研究のコホートでは再発に影響しなかったことが挙げられる [48] [49] [50]。この差はこれらの予後不良因子を持つ症例が少なかったことに由来すると考えられた。第二に、5-2-6 の通り骨髄検体のフローサイトメトリー法が再発予測に有用ではなかったことが挙げられる。これは商業用のフローサイトメトリーのアッセイの感度が限られているためと考えられる。最大 3 色による腫瘍関連免疫抗原の評価と、最大 10000 細胞の評価しかできないため、その感度が 0.5-1%に限られている。

第三に 5-2-5 に示したように、近年の報告では CHIP 変異と関連の深い DTA の変異は治療後に残存していても再発に寄与しない可能性が示唆されている [40][41]。DTA 変異の残存も再発に影響するという報告もあるものの [51]、DTA 変異を除いて寛解期の BM 検体を用いて MRD 解析を行うことで予後予測の精度が向上することが示されている。一方で本研究結果では、DTA 変異を伴う ctDNA が残存する症例も有意に再発や死亡率が高いことが示された。この差はおそらく既報は化学療法後のデータだが、本研究では骨髄破壊的前処置による骨髄移植後のデータでありレシピエントの造血も根絶しているためと考えられた。化学療法後の場合は、前白血病段階のクローンも DTA 変異を含むことが有り、再発に寄与しなかった可能性が考えられる。

また本研究にはいくつかの限界が存在する。まず本研究では骨髄移植後 3 ヶ月時点での ctDNA の残存の有無が再発に大きく影響していたが、3 ヶ月が最も有用なタイミングなのかは未だ不明である。後方視的な解析のためそれ以降の検体が解析困難であったため、さらに長期間のフォローアップを行った研究が望まれる。次に本研究では症例毎に ddPCR アッセイの作成を行っており、実際に臨床応用する際は手間がかかる作業である。さらに本研究では症例数の少なさからか、従来の子後不良因子等のサブグループ解析の結果が既報と一致していない。また、健常人や良性腫瘍からも遺伝子異常が検出されることがあり

ctDNA が偽陽性となる可能性もある。さらに ctDNA の量は患者間で大きな差があることが知られており、十分な量の ctDNA が血清から抽出できない症例が存在することも知られている。そして固形癌では腫瘍が局所に限局している時などは、ctDNA が検出されない症例があることが知られている。[52]このような問題を克服するため、さらに大きいコホートでの研究が望まれる。

7. 結論

本研究では造血器腫瘍患者において ddPCR 法による ctDNA の測定が、再発予測や病態のモニタリングに有用であった。そして ctDNA は従来のバイオマーカーよりも非侵襲的で早期に再発を診断できる可能性を示した。

さらに AML と MDS 患者において ctDNA を用いた遺伝子検査は骨髄検査と遜色がなく、骨髄移植後再発の予測に極めて有用であった。これを実証するために引き続き前方視的に、さらに大きいコホートでの解析を予定している。

本研究で得られた知見が、ctDNA 検査の臨床応用への基盤となることを切に願う。そして造血器腫瘍の早期再発診断が進み、将来の再発リスクが高い症例を特定することができれば、予後の改善にも貢献できるであろう。

8. 参考文献

- [1] Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, Devon K, Dewar K, Doyle M, FitzHugh W, Funke R, Gage D, Harris K, Heaford A, Howland J, Kann L, Lehoczky J, LeVine R, McEwan P, McKernan K, Meldrim J, Mesirov JP, Miranda C, Morris W, Naylor J, Raymond C, Rosetti M, Santos R, Sheridan A, Sougnez C, Stange-Thomann Y, Stojanovic N, Subramanian A, Wyman D, Rogers J, Sulston J, Ainscough R, Beck S, Bentley D, Burton J, Clee C, Carter N, Coulson A, Deadman R, Deloukas P, Dunham A, Dunham I, Durbin R, French L, Grafham D, Gregory S, Hubbard T, Humphray S, Hunt A, Jones M, Lloyd C, McMurray A, Matthews L, Mercer S, Milne S, Mullikin JC, Mungall A, Plumb R, Ross M, Shownkeen R, Sims S, Waterston RH, Wilson RK, Hillier LW, McPherson JD, Marra MA, Mardis ER, Fulton LA, Chinwalla AT, Pepin KH, Gish WR, Chissoe SL, Wendl MC, Delehaunty KD, Miner TL, Delehaunty A, Kramer JB, Cook LL, Fulton RS, Johnson DL, Minx PJ, Clifton SW, Hawkins T, Branscomb E, Predki P, Richardson P, Wenning S, Slezak T, Doggett N, Cheng JF, Olsen A, Lucas S, Elkin C, Uberbacher E, Frazier M, Gibbs RA, Muzny DM, Scherer SE, Bouck JB, Sodergren EJ, Worley KC, Rives CM, Gorrell JH, Metzker ML, Naylor SL, Kucherlapati RS, Nelson DL, Weinstock GM, Sakaki Y,

Fujiyama A, Hattori M, Yada T, Toyoda A, Itoh T, Kawagoe C, Watanabe H,
Totoki Y, Taylor T, Weissenbach J, Heilig R, Saurin W, Artiguenave F, Brottier P,
Bruls T, Pelletier E, Robert C, Wincker P, Smith DR, Doucette-Stamm L,
Rubenfield M, Weinstock K, Lee HM, Dubois J, Rosenthal A, Platzer M,
Nyakatura G, Taudien S, Rump A, Yang H, Yu J, Wang J, Huang G, Gu J, Hood
L, Rowen L, Madan A, Qin S, Davis RW, Federspiel NA, Abola AP, Proctor MJ,
Myers RM, Schmutz J, Dickson M, Grimwood J, Cox DR, Olson MV, Kaul R,
Raymond C, Shimizu N, Kawasaki K, Minoshima S, Evans GA, Athanasiou M,
Schultz R, Roe BA, Chen F, Pan H, Ramser J, Lehrach H, Reinhardt R,
McCombie WR, de la Bastide M, Dedhia N, Blöcker H, Hornischer K, Nordsiek
G, Agarwala R, Aravind L, Bailey JA, Bateman A, Batzoglou S, Birney E, Bork
P, Brown DG, Burge CB, Cerutti L, Chen HC, Church D, Clamp M, Copley RR,
Doerks T, Eddy SR, Eichler EE, Furey TS, Galagan J, Gilbert JG, Harmon C,
Hayashizaki Y, Haussler D, Hermjakob H, Hokamp K, Jang W, Johnson LS,
Jones TA, Kasif S, Kasprzyk A, Kennedy S, Kent WJ, Kitts P, Koonin EV, Korf I,
Kulp D, Lancet D, Lowe TM, McLysaght A, Mikkelsen T, Moran JV, Mulder N,
Pollara VJ, Ponting CP, Schuler G, Schultz J, Slater G, Smit AF, Stupka E,
Szustakowki J, Thierry-Mieg D, Thierry-Mieg J, Wagner L, Wallis J, Wheeler R,

- Williams A, Wolf YI, Wolfe KH, Yang SP, Yeh RF, Collins F, Guyer MS, Peterson J, Felsenfeld A, Wetterstrand KA, Patrinos A, Morgan MJ, de Jong P, Catanese JJ, Osoegawa K, Shizuya H, Choi S, Chen YJ, Szustakowki J, International Human Genome Sequencing Consortium., “Initial sequencing and analysis of the human genome.” *Nature*, vol. 409, no. 6822, pp. 860–921, 2001.
- [2] Dancey JE, Bedard PL, Onetto N, Hudson TJ, “The genetic basis for cancer treatment decisions.” *Cell*, vol. 148, no. 3, pp. 409–420, 2012.
- [3] Vogelstein B, Kinzler KW, “The Path to Cancer --Three Strikes and You’re Out.” *N. Engl. J. Med.*, vol. 373, no. 20, pp. 1895–1898, 2015.
- [4] Walsh MF, Ritter DI, Kesserwan C, Sonkin D, Chakravarty D, Chao E, Ghosh R, Kemel Y, Wu G, Lee K, Kulkarni S, Hedges D, Mandelker D, Ceyhan-Birsoy O, Luo M, Drazer M, Zhang L, Offit K, Plon SE, “Integrating somatic variant data and biomarkers for germline variant classification in cancer predisposition genes.” *Hum. Mutat.*, vol. 39, no. 11, pp. 1542–1552, 2018.
- [5] König IR, Fuchs O, Hansen G, von Mutius E, Kopp MV, “What is precision medicine?” *Eur. Respir. J.*, vol. 50, no. 4, 1700391, 2017.
- [6] Beckmann JS, Lew D, “Reconciling evidence-based medicine and precision medicine in the era of big data: challenges and opportunities.” *Genome Med.*,

- vol. 8, no. 1, pp. 134-145, 2016.
- [7] Yohe S, Thyagarajan B, “Review of Clinical Next-Generation Sequencing.”
Arch. Pathol. Lab. Med., vol. 141, no. 11, pp. 1544–1557, 2017.
- [8] Morganti S, Tarantino P, Ferraro E, D'Amico P, Viale G, Trapani D, Duso BA,
Curigliano G, “Complexity of genome sequencing and reporting: Next generation
sequencing (NGS) technologies and implementation of precision medicine in real
life.” Crit. Rev. Oncol. Hematol., vol. 133, pp. 171–182, 2019.
- [9] Li MM, Datto M, Duncavage EJ, Kulkarni S, Lindeman NI, Roy S, Tsimberidou
AM, Vnencak-Jones CL, Wolff DJ, Younes A, Nikiforova MN, “Standards and
Guidelines for the Interpretation and Reporting of Sequence Variants in Cancer A
Joint Consensus Recommendation of the Association for Molecular Pathology ,
American Society of Clinical Oncology , and College of American Pathologists.”
J. Mol. Diagnostics, vol. 19, no. 1, pp. 4–23, 2017.
- [10] Wan JCM, Massie C, Garcia-Corbacho J, Mouliere F, Brenton JD, Caldas C,
Pacey S, Baird R, Rosenfeld N, “Liquid biopsies come of age: towards
implementation of circulating tumour DNA.” Nat. Rev. Cancer, vol. 17, no. 4, pp.
223–238, 2017.
- [11] Stroun M, Anker P, Maurice P, Lyautey J, Lederrey C, Beljanski M, “Neoplastic

- characteristics of the DNA found in the plasma of cancer patients.” *Oncology*, vol. 46, no. 5, pp. 318–322, 1989.
- [12] Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM, Yaros MJ, “Free DNA in the Serum of Cancer Patients and the Effect of Therapy Free DNA in the Serum of Cancer Patients and the Effect of Therapy.” *Cancer Res*, vol. 37, no. 3. pp. 646–650, 1977.
- [13] Sato KA, Hachiya T, Iwaya T, Kume K, Matsuo T, Kawasaki K, Abiko Y, Akasaka R, Matsumoto T, Otsuka K, Nishizuka SS, “Individualized mutation detection in circulating tumor DNA for monitoring colorectal tumor burden using a cancer-associated gene sequencing panel.” *PLoS One*, vol. 11, no. 1, pp. 1–15, 2016.
- [14] Diehl F, Schmidt K, Choti MA, Romans K, Goodman S, Li M, Thornton K, Agrawal N, Sokoll L, Szabo SA, Kinzler KW, Vogelstein B, Diaz LA Jr, “Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics.” *Nat. Med.*, vol. 14, no. 9, pp. 985–990, 2008.
- [15] Li C, Jia R, Liu H, Zhang B, Wang C, “EGFR T790M detection and osimertinib treatment response evaluation by liquid biopsy in lung adenocarcinoma patients with acquired resistance to first generation EGFR tyrosine kinase inhibitors.” *Diagn. Pathol.*, vol. 13, no. 1, pp. 49-55, 2018.

- [16] Shayegi N, Kramer M, Bornhäuser M, Schaich M, Schetelig J, Platzbecker U, Röllig C, Heiderich C, Landt O, Ehninger G, Thiede C; Study Alliance Leukemia (SAL), “The level of residual disease based on mutant NPM1 is an independent prognostic factor for relapse and survival in AML.” *Blood*, vol. 122, no. 1, pp. 83–92, 2013.
- [17] Zeijlemaker W, Kelder A, Oussoren-Brockhoff YJ, Scholten WJ, Snel AN, Veldhuizen D, Cloos J, Ossenkoppele GJ, Schuurhuis GJ, “Peripheral blood minimal residual disease may replace bone marrow minimal residual disease as an immunophenotypic biomarker for impending relapse in acute myeloid leukemia.” *Leukemia*, vol. 30, no. 3, pp. 708–715, 2016.
- [18] Hocking J, Mithraprabhu S, Kalf A, Spencer A, “Liquid biopsies for liquid tumors: emerging potential of circulating free nucleic acid evaluation for the management of hematologic malignancies.” *Cancer Biol. Med.*, vol. 13, no. 2, pp. 215–25, 2016.
- [19] Campana D, Leung W, “Clinical significance of minimal residual disease in patients with acute leukaemia undergoing haematopoietic stem cell transplantation,” *Br. J. Haematol.*, vol. 162, no. 2, pp. 147–161, 2013.
- [20] Hantel A, Stock W, Kosuri S, “Molecular Minimal Residual Disease Testing in

- Acute Myeloid Leukemia: A Review for the Practicing Clinician.," Clin. Lymphoma. Myeloma Leuk., vol. 18, no. 10, pp. 636–647, 2018.
- [21] Luu MH, Press RD, "BCR-ABL PCR testing in chronic myelogenous leukemia: molecular diagnosis for targeted cancer therapy and monitoring." Expert Rev. Mol. Diagn., vol. 13, no. 7, pp. 749–762, 2013.
- [22] van Dongen JJ, Langerak AW, Brüggemann M, Evans PA, Hummel M, Lavender FL, Delabesse E, Davi F, Schuurin E, García-Sanz R, van Krieken JH, Droese J, González D, Bastard C, White HE, Spaargaren M, González M, Parreira A, Smith JL, Morgan GJ, Kneba M, Macintyre EA, "Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936.," Leukemia, vol. 17, no. 12, pp. 2257–2317, 2003.
- [23] Phillips GL, "Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) for high-risk acute myeloid leukemia (AML)/myelodysplastic syndrome (MDS): how can we improve outcomes in the near future?" Leuk Res, vol. 36, no. 12, pp. 1490–1495, 2012.
- [24] Araki D, Wood BL, Othus M, Radich JP, Halpern AB, Zhou Y, Mielcarek M,

- Estey EH, Appelbaum FR, Walter RB, “Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation for Acute Myeloid Leukemia: Time to Move Toward a Minimal Residual Disease–Based Definition of Complete Remission?” *J. Clin. Oncol.*, pp. 329-336, 2015.
- [25] Mo XD, Lv M, Huang XJ, “Preventing relapse after haematopoietic stem cell transplantation for acute leukaemia: the role of post-transplantation minimal residual disease (MRD) monitoring and MRD-directed intervention.” *British Journal of Haematology*, vol. 179, no. 2. pp. 184–197, 2017.
- [26] Thiede C, Florek M, Bornhäuser M, Ritter M, Mohr B, Brendel C, Ehninger G, Neubauer A, “Rapid quantification of mixed chimerism using multiplex amplification of short tandem repeat markers and fluorescence detection.” *Bone Marrow Transplant.*, vol. 23, no. 10, pp. 1055–1060, 1999.
- [27] Martin P, “Documentation of Engraftment and Characterization of Chimerism After Hematopoietic Cell Transplantation: Stem Cell Transplantation.” In *hematopoietic cell transplantation*. 5th ed, Wiley Blackwell; vol. 22, pp. 272-280, 2016.
- [28] Antin JH, Childs R, Filipovich AH, Giralto S, Mackinnon S, Spitzer T, Weisdorf D, “Establishment of complete and mixed donor chimerism after allogeneic

- lymphohematopoietic transplantation: recommendations from a workshop at the 2001 Tandem Meetings of the International Bone Marrow Transplant Registry and the American Society of Blood an,” *Biol. Blood Marrow Transplant.*, vol. 7, no. 9, pp. 473–485, 2001.
- [29] Li J, Batcha AM, Grüning B, Mansmann UR, “An NGS Workflow Blueprint for DNA Sequencing Data and Its Application in Individualized Molecular Oncology.” *Cancer Inform.*, vol. 14 , pp. 87–107, 2015.
- [30] Riva L, Luzi L, Pelicci PG, “Genomics of Acute Myeloid Leukemia: The Next Generation.” *Frontiers in Oncology*, vol. 2. pp. 40-52, 2012.
- [31] Papaemmanuil E, Gerstung M, Bullinger L, Gaidzik VI, Paschka P, Roberts ND, Potter NE, Heuser M, Thol F, Bolli N, Gundem G, Van Loo P, Martincorena I, Ganly P, Mudie L, McLaren S, O'Meara S, Raine K, Jones DR, Teague JW, Butler AP, Greaves MF, Ganser A, Döhner K, Schlenk RF, Döhner H, Campbell PJ, “Genomic Classification and Prognosis in Acute Myeloid Leukemia.” *N. Engl. J. Med.*, vol. 374, no. 23, pp. 2209–2221, 2016.
- [32] Greif PA, Eck SH, Konstandin NP, Benet-Pagès A, Ksienzyk B, Dufour A, Vetter AT, Popp HD, Lorenz-Depiereux B, Meitinger T, Bohlander SK, Strom TM, “Identification of recurring tumor-specific somatic mutations in acute myeloid

- leukemia by transcriptome sequencing.” *Leukemia*, vol. 25, p. 821-828, 2011.
- [33] Vogelstein B, Kinzler KW, “Digital PCR.” *Proc Natl Acad Sci*, vol. 96, pp. 9236–9241, 1999.
- [34] Quan PL, Sauzade M, Brouzes E, “dPCR: A Technology Review,” *Sensors*, vol. 18, no. 4, pp. 1271-1298, 2018.
- [35] Milbury CA, Zhong Q, Lin J, Williams M, Olson J, Link DR, Hutchison B, “Determining lower limits of detection of digital PCR assays for cancer-related gene mutations.” *Biomol. Detect. Quantif*, vol. 1, no. 1, pp. 8–22, 2014.
- [36] Waterhouse M, Follo M, Pfeifer D, von Bubnoff N, Duyster J, Bertz H, Finke J, “Sensitive and accurate quantification of JAK2 V617F mutation in chronic myeloproliferative neoplasms by droplet digital PCR.” *Ann. Hematol*, vol. 95, no. 5, pp. 739–744, 2016.
- [37] Diaz LA Jr, Bardelli A, “Liquid Biopsies : Genotyping Circulating Tumor DNA.” *J. Clin. Oncol.*, vol. 32, no. 6, pp. 579-586, 2017.
- [38] Mithraprabhu S, Khong T, Ramachandran M, Chow A, Klarica D, Mai L, Walsh S, Broemeling D, Marziali A, Wiggin M, Hocking J, Kalff A Durie B, Spencer A, “Circulating tumour DNA analysis demonstrates spatial mutational heterogeneity that coincides with disease relapse in myeloma.” *Leukemia*, vol. 31, no.8, pp.

1695-1705, 2016.

- [39] Bettegowda C, Sausen M, Leary RJ, Kinde I, Wang Y, Agrawal N, Bartlett BR, Wang H, Luber B, Alani RM, Antonarakis ES, Azad NS, Bardelli A, Brem H, Cameron JL, Lee CC, Fecher LA, Gallia GL, Gibbs P, Le D, Giuntoli RL, Goggins M, Hogarty MD, Holdhoff M, Hong SM, Jiao Y, Juhl HH, Kim JJ, Siravegna G, Laheru DA, Lauricella C, Lim M, Lipson EJ, Marie SK, Netto GJ, Oliner KS, Olivi A, Olsson L, Riggins GJ, Sartore-Bianchi A, Schmidt K, Shih IM, Oba-Shinjo SM, Siena S, Theodorescu D, Tie J, Harkins TT, Veronese S, Wang TL, Weingart JD, Wolfgang CL, Wood LD, Xing D, Hruban RH, Wu J, Allen PJ, Schmidt CM, Choti MA, Velculescu VE, Kinzler KW, Vogelstein B, Papadopoulos N, Diaz LA Jr, "Detection of Circulating Tumor DNA in Early- and Late-Stage Human Malignancies." *Sci. Transl. Med.*, vol. 6, no. 224, pp. 224-237, 2014.
- [40] Gaidzik VI, Weber D, Paschka P, Kaumanns A, Krieger S, Corbacioglu A, Krönke J, Kapp-Schwoerer S, Krämer D, Horst HA, Schmidt-Wolf I, Held G, Kündgen A, Ringhoffer M, Götze K, Kindler T, Fiedler W, Wattad M, Schlenk RF, Bullinger L, Teleanu V, Schlegelberger B, Thol F, Heuser M, Ganser A, Döhner H, Döhner K; German-Austrian Acute Myeloid Leukemia Study Group

(AMLSG)., “DNMT3A mutant transcript levels persist in remission and do not predict outcome in patients with acute myeloid leukemia.” *Leukemia*, vol. 32, pp. 30-37, 2017.

[41] Jongen-Lavrencic M, Grob T, Hanekamp D, Kavelaars FG, Al Hinai A, Zeilemaker A, Erpelinck-Verschueren CAJ, Gradowska PL, Meijer R, Cloos J, Biemond BJ, Graux C, van Marwijk Kooy M, Manz MG, Pabst T, Passweg JR, Havelange V, Ossenkoppele GJ, Sanders MA, Schuurhuis GJ, Löwenberg B, Valk PJM, “Molecular Minimal Residual Disease in Acute Myeloid Leukemia.” *N. Engl. J. Med.*, vol. 378, no. 13, pp. 1189–1199, 2018.

[42] Scherer F, Kurtz DM, Newman AM, Stehr H, Craig AF, Esfahani MS, Lovejoy AF, Chabon JJ, Klass DM, Liu CL, Zhou L, Glover C, Visser BC, Poultsides GA, Advani RH, Maeda LS, Gupta NK, Levy R, Ohgami RS, Kunder CA, Diehn M, Alizadeh AA, “Distinct biological subtypes and patterns of genome evolution in lymphoma revealed by circulating tumor DNA.” *Sci. Transl. Med.*, vol. 8, no. 364, pp. 1–12, 2016.

[43] Wood BL, Arroz M, Barnett D, DiGiuseppe J, Greig B, Kussick SJ, Oldaker T, Shenkin M, Stone E, Wallace P, “2006 Bethesda International Consensus Recommendations on the Immunophenotypic Analysis of Hematolymphoid

- Neoplasia by Flow Cytometry: Optimal Reagents and Reporting for the Flow Cytometric Diagnosis of Hematopoietic Neoplasia,” *Cytometry. B. Clin. Cytom.*, vol. 72, pp. 14-22, 2007.
- [44] Chase A, Grand F, Zhang JG, Blackett N, Goldman J, Gordon M, “Factors Influencing the False Positive and Negative Rates of BCR-ABL Fluorescence In Situ Hybridization.” *Genes. Chromosomes Cancer*, vol. 253, pp. 246–253, 1997.
- [45] Balsat M, Renneville A, Thomas X, de Botton S, Caillot D, Marceau A, Lemasle E, Marolleau JP, Nibourel O, Berthon C, Raffoux E, Pigneux A, Rodriguez C, Vey N, Cayuela JM, Hayette S, Braun T, Coudé MM, Terre C, Celli-Lebras K, Dombret H, Preudhomme C, Boissel N, “Postinduction minimal residual disease predicts outcome and benefit from allogeneic stem cell transplantation in acute myeloid leukemia with NPM1 mutation: A study by the acute leukemia French association group.” *J. Clin. Oncol.*, vol. 35, no. 2, pp. 185–193, 2017.
- [46] Siravegna G, Marsoni S, Siena S, Bardelli A, “Integrating liquid biopsies into the management of cancer.” *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, vol. 14, no. 9, pp. 531-548, 2017.
- [47] Yeh P, Dickinson M, Ftouni S, Hunter T, Sinha D, Wong SQ, Agarwal R, Vedururu R, Doig K, Fong CY, Blombery P, Westerman D, Dawson MA, Dawson SJ, “Molecular disease monitoring using circulating tumor DNA in

- myelodysplastic syndromes.” *Blood*, vol. 129, no. 12, pp. 1685–1690, 2017.
- [48] Walter RB, Gyurkocza B, Storer BE, Godwin CD, Pagel JM, Buckley SA, Sorrow ML, Wood BL, Storb R, Appelbaum FR, Sandmaier BM, “Comparison of minimal residual disease as outcome predictor for AML patients in first complete remission undergoing myeloablative or nonmyeloablative allogeneic hematopoietic cell transplantation,” *Leukemia*, vol. 29, no. 1, pp. 137–144, 2015.
- [49] Venton G, Courtier F, Charbonnier A, D'incan E, Saillard C, Mohty B, Mozziconacci MJ, Birnbaum D, Murati A, Vey N, Rey J, “Impact of gene mutations on treatment response and prognosis of acute myeloid leukemia secondary to myeloproliferative neoplasms.” *Am. J. Hematol.*, vol. 93, no. 3, pp. 330–338, 2018.
- [50] Lim SJ, Lim MJ, Raptis A, Hou JZ, Farah R, Marks SM, Im A, Dorritie K, Sehgal A, Agha M, Felgar R, Lim SH, “Inferior outcome after allogeneic transplant in first remission in high-risk AML patients who required more than two cycles of induction therapy.” *Am. J. Hematol.*, vol. 90, no. 8, pp. 715–718, 2015.
- [51] Rothenberg-Thurley M, Amler S, Goerlich D, Köhnke T, Konstandin NP, Schneider S, Sauerland MC, Herold T, Hubmann M, Ksienzyk B, Zellmeier E,

Bohlander SK, Subklewe M, Faldum A, Hiddemann W, Braess J, Spiekermann K, Metzeler KH, “Persistence of pre-leukemic clones during first remission and risk of relapse in acute myeloid leukemia.” *Leukemia*, vol. 32, no. 7, pp. 1598–1608, 2018.

[52] Fiala C, Diamandis EP. “Utility of circulating tumor DNA in cancer diagnostics with emphasis on early detection”. *BMC Med*, vol. 16, no .1, pp. 166-176, 2018

9. 謝辞

本稿を終えるにあたり、東京大学医科学研究所 先端医療研究センター 分子療法分野 東條有伸教授には指導教官としてご指導およびご鞭撻を賜りました。ここに改めて心より厚くお礼申し上げます。

実験を行うにあたり、親身なご指導、ご助言を賜りました東京大学医科学研究所 附属病院 血液腫瘍内科 横山和明先生に心から感謝申し上げます。東京大学医科学研究所附属病院 ゲノム診療部 遊佐希さま、東京大学医科学研究所 先端医療研究センター 分子療法分野 近藤幹也先生、小川弥穂先生、武井智美先生、伊藤美香さま、小林麻子さまには実験におけるテクニカルサポートを頂きました。東京大学医科学研究所 ヒトゲノム解析センター DNA 情報解析分野 宮野悟先生、山口類先生、清水英悟さま、東京大学医科学研究所 ヒトゲノム解析センター ヘルスインテリジェンスセンター 健康医療データサイエンス分野 井元清哉先生、笠島理加先生には次世代シーケンスにおけるデータ解析でご支援を賜りました。東京大学医科学研究所附属病院 血液腫瘍内科 高橋聡先生、加藤せい子先生、小沼貴晶先生、磯部優理先生には診療情報および腫瘍検体をご提供いただきました。東京大学医科学研究所附属病院 セルプロセッシング輸血部 長村登紀子先生、和田結花さまには貴重な血清検体を譲渡いただきました。

そして末筆になりましたが本研究にご協力いただいた全ての患者様に、心より厚く感謝いたします。本研究は国立研究開発法人科学技術振興機構革新的イノベーション創出プログラム、厚生労働省からの研究助成を受け行われました。ご支援に感謝いたします。