

## 論文の内容の要旨

論文題目 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

氏名 中村 聡介

近年では、腫瘍由来循環 DNA (circulating tumor DNA: ctDNA) 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 (cell free DNA: cfDNA) 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。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。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、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と呼ばれている。造血器腫瘍においても悪性リンパ腫、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ふことが知られている。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になれば、より早くより簡便により頻回に微小残存病変 (minimal residual disease: MRD) のモニタリングを行うことが可能となると考えられる。中でも同種造血幹細胞移植 (allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: alloSCT) は急性骨髄性白血病 (acute myeloid leukemia: AML)、骨髄異形成症候群 (myelodysplastic syndromes: 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。

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。まず 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、および変異アレル頻度 (Variant allele frequency: VAF) 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。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 AML、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。

まず患者の同意取得後に、検体(骨髄液、末梢血、口腔粘膜、血清)を採取した。次に、検体から抽出したDNAを調整し、次世代シーケンス法(Next-generation sequencing: NGS)を用いて網羅的遺伝子解析を行った。シーケンスデータはスーパーコンピューターによるバイオインフォマティクス解析を行った。返却された遺伝子情報の結果をキュレーターである医師が参照し、症例毎に異なる発症に大きく影響したドライバー変異の絞り込みを行う。そしてそのドライバー変異を検出するためのアッセイを作成し、droplet digital PCR(ddPCR)法により、MRDの追跡を行った。

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)。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。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。

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。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。

次に骨髄破壊的前処置によるalloSCT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、移植後1ヶ月、移植後3ヶ月、その他のタイ

ミングのものを収集した。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。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。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。CP1 と MP1、CP3 と MP3 の一致度を  $\kappa$  係数により評価を行うと、いずれも相関が得られた。移植後の観察期間中 (中央値 32 ヶ月) に、51 例中 16 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 (cumulative incidence of relapse: CIR) が高く、全生存率 (overall survival: OS) が低かった。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。

次に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) を用いて、移植後 1 ヶ月 (MCP1) と 3 ヶ月 (MCP3) 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。そして CP と、MP、MCP の再発予測能の比較を行った。DeLong 法により、receiver operatorating 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。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。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。

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 PBMC を用いて、PBMC 中のドライバー変異の残存の有無 (mutation

persistence in the PBMC 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。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。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。

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法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。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、予後の改善にも繋がるであろう。