

論文の内容の要旨

論文題目 急性リンパ性白血病における腫瘍由来循環 DNA の臨床的有用性の検討

氏名 小川 弥穂

【緒言】

急性リンパ性白血病(Acute Lymphoblastic Leukemia : ALL) は、リンパ球前駆細胞の分化に異常や停止が生じ、単クローン性に増殖をきたす腫瘍性疾患である。成人 ALL は長期生存率が 35～45%と予後不良で、唯一の根治術である同種造血幹細胞移植 (allogenic hematopoietic stem cell transplantation : allo-SCT) 施行後も、移植後再発などが原因で5年生存率は45%に留まる。allo-SCT 後の再発については、移植前後の微小残存病変(Minimal Residual Disease: MRD)測定が臨床転帰を予測する上で有用である。しかし、侵襲性、感度、適用、結果返却までの時間、コストなどの面で満足できる手法が未だ無い。

腫瘍由来循環 DNA(circulating tumor DNA :ctDNA)は、アポトーシスまたは壊死した腫瘍細胞から血中に放出される cell free DNA(cfDNA)である。腫瘍動態を即時に反映するため、腫瘍のリアルタイムスナップショットと考えられている。急性骨髄性白血病や悪性リンパ腫では Droplet digital PCR (ddPCR)を用いた連続的な ctDNA の測定により、ctDNA 変異アレル頻度(Variant Allele Frequency: VAF)が病態と連動して変化を示すことが報告されたが、急性リンパ性白血病(Acute Lymphoblastic Leukemia:ALL)における有用性を検討した報告は限られている。

【目的】

ALL に対する非侵襲的で高感度な MRD 評価方法を確立すること

【方法】

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」と「血液疾患の臨床ゲノム解析研究」(承認番号 : 26-112-270402/2020-1-0422)の範疇で行った。2008年2月から2017年12月までの間に東京大学医科学研究所附属病院にて同種造血幹細胞移植を施行し、腫瘍検体と血漿検体が保存されている ALL 患者 14 例を対象とした。同意取得後、患者の口腔粘膜細胞を採取し、検査の余剰献体として保存されている腫瘍検体(骨髄、リンパ節、末梢血検体)と血漿検体を収集した。検体収集後、血漿検体からは cfDNA を、他の検体からは各々 DNA を抽出し濃度を測定した。DNA 抽出後、まず口腔粘膜 DNA をコントロールとして腫瘍 DNA に対する全ゲノムシーケンセス (Whole Genome Sequence: WGS)を行い、ALL 発症要因と考えられるドライバー遺伝子変異を症例毎に同定した。続いて、cfDNA において各遺伝子変異を検出するための ddPCR アッセイを作

成した。作成した ddPCR アッセイを用いて同種造血幹細胞移植 3 ヶ月後までと再発時の ctDNA におけるドライバー遺伝子変異の VAF を測定し、同種造血幹細胞移植後 MRD の有無を判定した。予後解析として、Kaplan-Meier 法で同種造血幹細胞移植日からの累積再発率曲線を作成し、移植後 MRD 残存の有無による累積再発率の差を検証した。さらに、MRD 測定の結果について従来法との一致度を評価した。

【結果】

骨髄破壊的前処置による同種造血幹細胞移植を行った ALL 患者 14 例について、腫瘍検体と血漿検体を、診断時(腫瘍 14 検体、血漿 8 検体)、移植前処置開始前(血漿検体 4 検体)、移植後 1 ヶ月(腫瘍 10 検体、血漿 12 検体)、移植後 3 ヶ月(腫瘍 5 検体、血漿 10 検体)、再発時(血漿検体 6 検体)、その他の時点(腫瘍 35 検体、血漿 36 検体)で各々得られた。

まず、診断時の腫瘍 DNA で WGS を行い 14 症例中 12 症例(85.7%)でドライバー遺伝子変異を同定した。その内訳は、SNVs 及び Indels が 6 個(4 検体)、Fusions が 10 個であった。既存の染色体検査や遺伝子検査で同定されていた Fusions を 8 症例中 7 症例で同定し、さらに既存の検査で検出されていなかった Fusions として *ZNF384-EP300*、*ARID1B-ZNF384*、*RCS1-ABL1* 融合遺伝子を各々新たに同定した。移植日からの観察期間は中央値 56 ヶ月で、経過中に 7 症例が再発をきたし(以下、再発群)、5 症例が寛解を維持した(以下、寛解群)。

次に、12 症例のドライバー遺伝子変異について 16 組の ddPCR 解析用アッセイを作成した。作成したアッセイを検証するため WGS に使用した腫瘍検体の VAF を ddPCR で測定したところ、VAF は WGS と ddPCR で強い相関($R^2=0.78$, $p<0.0001$)を認めた。限界希釈法により測定した全てのアッセイの検出限界は 0.01%と高感度であった。

そして、再発群の cfDNA 検体を用いて腫瘍動態との関連を検証した。cfDNA の濃度は、移植前処置開始前に比して再発時に上昇を認めた。ddPCR で測定した ctDNA の VAF は、測定できた再発群 6 症例全てで再発時に 10 倍以上の上昇を認めた。

さらに、寛解群 5 症例と再発群 7 症例について診断時(S0)、移植後 1 ヶ月後(S1)、移植後 2 から 3 ヶ月後(S2)、再発時(SR)の ctDNA におけるドライバー遺伝子の VAF を測定した。寛解群は全ての症例で S2 までに ctDNA が陰性となるが、再発群では 7 症例 6 症例で S2 までの ctDNA が陽性となり、中央値 13.3 ヶ月(6.5-50.8 ヶ月)で再発した。

最後に、ctDNA の残存(ctDNA-positive: CP)及び骨髄中のドライバー遺伝子変異の残存(mutation-positive: MP)と予後との関連を、累積再発率曲線により分析した。移植 1 ヶ月後の ctDNA 残存(CP1)及び骨髄中ドライバー変異残存(MP1)、移植 2 から 3 ヶ月後の ctDNA 残存(CP2)及び骨髄中ドライバー変異残存(MP2)は各々有意に累積再発率に差を生じさせた(CP1: $p=0.0021$, CP2: $p=0.0021$, MP1: $p=0.0079$, MP2: $p=0.0101$)。

また、従来の MRD 検査法との比較では、移植 1 ヶ月後の ctDNA 残存の有無がキメリズム法での検査結果と高い相関を示した($\kappa=0.67$, $p=0.01$)。従来の検査法で使用する検体は骨髄液であるが、ctDNA に用いる検体は血清であることから、ctDNA は従来の検査法に匹敵し

MRD を検出できる非侵襲的な手法という点で有用であることが示された。

【考察】

本研究では、同種造血幹細胞移植を施行した ALL 症例に対して WGS による網羅的遺伝子解析を行い、14 症例中 12 症例(85.7%)と既報に遜色ない感度でドライバー変異を同定した。また、既存の検査法では検出されなかった融合遺伝子(*ARID1B-ZNF384*, *RCS1-ABL1*, *ZNF384-EP300*)を 3 例で検出したが、これらの臨床的意義が大きい遺伝子異常が従来の検査法では検出されないことから、ALL の診断における WGS の有効性が示唆された。

ドライバー遺伝子変異に対して作成した ddPCR アッセイの検証では、ddPCR 法が従来 MRD 検出に用いられる検査法と遜色のない感度であることが確認された。また、ddPCR 法は適用範囲も 86%と広く、従来法の課題である適用症例の限定や検出感度の問題を克服する点を明示した。

再発群の検体を用いた、cfDNA の経時的変化と腫瘍動態についての検証では、cfDNA の濃度変化や ctDNA におけるドライバー遺伝子変異の VAF の経時的変化が腫瘍量の増多と一致することを示した。ALL では、ctDNA と腫瘍動態の関連を検証する報告が限られており、加えて WGS により同定した融合遺伝子異常に対して ddPCR アッセイを作成し ctDNA の VAF 測定を行った報告は本研究以外にない。本研究において WGS で同定した融合遺伝子異常を含む変異遺伝子をターゲットとし ddPCR 法で ctDNA の VAF を測定することで、ALL の MRD 測定を定量的に行ったことは初めてであり重要である。

寛解群の検体も含めて行った移植 1 ヶ月後及び移植 2 から 3 ヶ月後の検体における ctDNA の VAF の測定では、移植後 3 ヶ月までの時点で寛解群の ctDNA は全例(5/5)が陰性となること、造血幹細胞移植後 3 ヶ月までの時点で ctDNA が残存している症例では有意に再発率が高いことを示した。MRD は白血病において長期予後を左右する重要な要素であり、MRD 陽性が再発を予測する指標となることは報告されているが、研究ごとに MRD 測定の手法や時期は異なる。ALL 移植後の MRD 残存に関する予後予測を行う報告はまだなく、本研究は ALL の造血幹細胞移植後再発に移植後 3 ヶ月までの ctDNA が有用であることを初めて示した。さらに、従来法との比較し ctDNA が従来の MRD 検査法に相関した結果を検出できる非侵襲的な手法であることが明示された。

【結論】

本研究では同種造血幹細胞移植を行った ALL 患者において ddPCR 法による ctDNA の VAF 測定結果が病態を反映することを明らかにした。また、移植後の ctDNA 残存の有無により MRD を評価し再発を予測できる可能性を示した。ctDNA を用いることで、非侵襲的で高感度かつ適用範囲の広い検査を実用化することが期待できる。