

審査の結果の要旨

氏名 小川 弥穂

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。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が測定法に課題が多い。

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為、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、ALL における有用性を検討した報告は限られる。

著者らは 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を目的に本研究を行った。その手法は、ALL 同種造血幹細胞移植施行患者 14 例を対象として検体を収集し、全ゲノムシーケンス (Whole Genome Sequence: WGS)によるドライバー遺伝子変異の同定を行い、症例毎にドライバー遺伝子変異を検出する ddPCR アッセイを作成し、ddPCR を用いて同種造血幹細胞移植後及び再発時の 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 の有無を判定するというものであった。また、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、MRD 測定の結果について従来法との一致度を評価した。

その結果、まず診断時の腫瘍 DNA の WGS により 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。既存の検査で検出されていなかった Fusions として *ZNF384-EP300*、*ARID1B-ZNF384*、*RCSD1-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 か月で、経過中に 7 症例が再発をきたし(再発群)、5 症例が寛解を維持した(寛解群)。

次に、12 症例のドライバー遺伝子変異について作成した 16 組の ddPCR 解析用アッセイを用いて 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。なお、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ところ、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、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 か月後(S1)、移植後 2-3 か月後(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 症例中 6 症例で S2 までの ctDNA が陽性となり、中央値 13.3 か月(6.5-50.8 か月)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 か月後の ctDNA 残存(CP1)及び骨髄中ドライバー変異残存(MP1)、移植 2-3 か月後の 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 か月後の 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。

本研究では、ALL の診断における WGS の有効性を示唆した。また、ドライバー遺伝子変異に対して作成した ddPCR アッセイは、従来 MRD 検出に用いられる検査法と遜色のない感度であり、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。

ctDNA の経時的変化と腫瘍動態についての検証では、ctDNA 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。

移植後の検体における ctDNA の VAF の測定では、移植後 3 か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 か月までの時点で 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。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 か月までの 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。

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し、移植後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社会実装することが期待できる。

よって本論文は博士（医学）の学位請求論文として合格と認められる。