

# 小児白血病における微小残存病変 (MRD)

多賀 崇

滋賀医科大学小児科：滋賀県大津市瀬田月輪町（〒520-2192）

## 講演要旨

近年、小児白血病は、最も頻度の高い急性リンパ性白血病 (ALL) を中心に、多くが治癒を目指せるようになってきている。その一方で、再発難治例も少なからず存在し、これらを早期に見出し、予想される予後に応じた層別化治療を行うことが重要である。治療層別化因子としては、白血病の病型、遺伝子異常などに加え、治療反応性が用いられているが、近年その治療反応性の評価指標として注目されているのが、微小残存病変 (以下、MRD) である。MRD は、形態学的寛解時に“寛解の深さ”を測るもので、測定方法としてはマルチカラーフローサイトメトリー (FCM) 法、キメラ遺伝子あるいは白血病細胞特異的異常に基づく PCR 法によるものが主流である。小児白血病治療の歴史的変遷を提示しながら、MRD 研究の現状、将来などについて講演する。

## 白血病の微小残存病変 (MRD)

健常な状態では、骨髓には  $10^{12}$  個の細胞があるとされ、白血病初診時にはこのほぼすべての細胞が白血病細胞で置換されている。従来、白血病の治療効果判定は、末梢血および骨髓血の塗抹標本を光学顕微鏡を用いた観察によって行われ、白血病細胞が十分減少し、正常造血が回復すると血液学的寛解 (hematological complete remission : CR) と表現される。しかしながら、急性リンパ性白血病 (ALL) においては、初回寛解導入療法で血液学的寛解に至った時点でも  $10^{10}$  個の白血病細胞が存在するとされるが、光学顕微鏡による白血病細胞の検出感度はせいぜい  $10^{-2}$  程度であり、 $10^{10}$  個以下に減少した白血病細胞を評価することはできない。この血液学的寛解時に残存している病変を微小残存病変 (Minimal Residual Disease : 以下、MRD) と呼ぶ。最近では測定可能残存病変 (Measurable Residual Disease) と呼ぶことが推奨されている。また、MRD レベルで白血病細胞が検出できなくなったものを immunophenotypic CR や molecular CR と呼び、

新たな寛解の定義になりつつある。

## MRD の測定方法

### 1. FCM-MRD

文字どおり、フローサイトメトリー (FCM) を用いて MRD を測定する方法である。白血病細胞の表面抗原の表現型に基づき、マルチパラメーターで白血病細胞を検出する。汎用性が高く、短時間で解析が可能である。一方、すべての白血病細胞が異常な表現型を示すわけではないこと、再発や病気の進展などにより表現型が変化すること、PCR 法より感度が低いこと、測定にあたっては専門性、経験が必要なことが問題点である。測定感度は 6 カラーまでの解析では  $10^{-3} \sim 10^{-4}$  未満で、EuroFlow コンソーシアムによる多次元 FCM を用いた 8 カラーパネルでは、 $10^{-4} \sim 10^{-5}$  レベルである。

### 2. Molecular-MRD

白血病細胞特異的な DNA やキメラ mRNA を

PCRで検出し、測定する方法である。ALLにおいては、TCRおよびIg遺伝子の再構成を利用して診断時の白血病細胞から遺伝子再構成の特異的な配列を同定(再構成スクリーニング)し、これをもとにクローン特異的(Allele-Specific Oligonucleotide: 以下、ASO)プライマーを作成し、治療後検体でReal-time Quantitative PCR (RQ-PCR)を行い、MRDを測定する方法が汎用されている。再構成スクリーニングは、欧州の国際共同研究株式会社 Biomedical Solutionsで確立された *IgH*, *Igk*, *TCR $\delta$* , *TCR $\gamma$* , *TCR $\beta$* , *TAL1* の各遺伝子群についてPCRを行うことで、90～95%の症例をカバーしている。また、RQ-PCRによる測定とその結果の解釈は、BFMグループのMRD研究の専門機関EuroMRDのガイドラインによって詳細に規定され、標準化が達成されている。検出感度は $10^{-4}$ 以上、最大 $10^{-5}$ と報告されている。手技が複雑で解析に時間を要することが欠点である。本邦では2019年保険収載され、初診時を除く2ポイントで測定が可能となった。近年、High-Throughput Sequencing (以下、HTS)により、診断時の白血病細胞からIg/TCR遺伝子断片の塩基配列を網羅的に解析し、ALLに特異的な配列を含むすべてのクローナルな遺伝子再構成を同定した後、同じくHTSによって治療後の検体の塩基配列からMRDを検出する方法も開発されている。その検出感度は $10^{-6}$ に達し、さらにすべての白血病細胞の再構成を同時に検出することで、従来法の課題であったクローナルエボリューションにより経過観察

中にMRDが偽陰性になるという問題がクリアされる。また、ASOプライマー設計不要などの利点も備え、将来的に現行のMRD測定法にとってかわる可能性がある。

AMLにおいては、全体の25～30%、正常核型の45～60%に変異が見られる核小体蛋白質、Nucleophosmin (NPM1)の変異転写産物のRQ-PCRによる測定がMRDとして用いられている。また、非特異的ではあるがWT1遺伝子のmRNA定量も保険収載され汎用性が高いことから用いられている。

キメラ遺伝子を用いたMRD測定はALLにおいてはフィラデルフィア染色体陽性ALLの*BCR-ABL*、乳児ALLの*MLL-AF4*など、AMLにおいてはCBF白血病の*RUNX1-RUNX1T1*, *CBFB-MYH11*, *APL*の*PML-RARA*などをターゲットとして行われている。費用・手技・解析時間の点で優れ、測定感度も $10^{-4}$ ～ $10^{-6}$ と高感度である。一方、RNAを用いるため不安定であること、コンタミネーションの問題があり取り扱いに注意が必要なこと、多くが保険収載され検査会社で測定可能であるが標準化がなされておらず、検査会社間での感度の違いの可能性があることが問題である。

#### 参考文献

- 1) 多賀崇. 急性白血病におけるMRD. 日本臨牀. 2020; 78(3): 447-451.