

(別紙1)

## 総括研究報告書

課題番号：2019 - B15

課題名：フローサイトメトリーを用いた微小残存病変測定の実用化

主任研究者 (所属施設) 国立研究開発法人 国立成育医療研究センター  
(所属・職名 氏名) 小児がんセンター小児がん免疫診断科 出口 隆生

(研究成果の要約) 小児造血器腫瘍で最も強力な予後因子である微小残存病変 (MRD) は、欧米では PCR 法に加えてフローサイトメトリー (FCM) も利用されている。しかし FCM-MRD は保険診療上では MRD 測定法としては何ら評価されておらず、臨床での利用には様々な問題がある。今後、保険収載を目指すことが我が国の造血器腫瘍治療で必要である。主任研究者は現在、我が国での FCM-MRD 測定の大半を担っており、本研究により各々の臨床試験に対して系統的な介入を行うことと、最終的には保険収載による臨床検査化を目指すことができると考える。2020 年度は、再発急性リンパ性白血病 (ALL) や乳児 ALL といった先行研究の測定結果を解析して今後への問題点を明らかにするとともに、ダウン症 ALL 国際共同臨床試験 DS-ALL 2016、乳児 ALL、フィラデルフィア染色体陽性 (Ph+) ALL 等の臨床試験での測定を継続した。また再発 ALL や T 細胞性 (T-) ALL 等に対しても、FCM-MRD を包括的に管理することで次期臨床試験での実施へ向けて検討を行った。さらに急性骨髄性白血病 (AML) では院内症例についての測定を継続した。成育衛生検査センターの開設により、今年度から一部保険診療化により検査料の徴収を開始した。

### 1. 研究目的

研究室

本研究の目的 1) 我が国における FCM-MRD 測定環境を整備し、小児造血器腫瘍の治療へ MRD の適用を更に広げる。2) 欧米の FCM-MRD 測定体制を調査し、我が国での実施体制へのフィードバックを行う。3) 現在、FCM-MRD は保険診療上では何ら考慮されていない状況であるが、これまでに実施した測定結果を利用することで、PCR-MRD との相関や予後との関係を示すことで保険診療化への糸口を得る。

### 2. 研究組織

研究者 所属施設

出口 隆生 国立成育医療研究センター  
小児がんセンター小児がん免疫診断科

富澤 大輔 国立成育医療研究センター  
小児がんセンター血液腫瘍科

加藤 元博 国立成育医療研究センター  
小児がんセンター移植・細胞治療科 (現・  
小児がんゲノム診療科)

清河 信敬 国立成育医療研究センター  
研究所小児血液・腫瘍研究部

大木 健太郎 国立成育医療研究センター  
研究所小児血液・腫瘍研究部分子病理研

### 3. 研究成果

本年度の研究は以下のように実施した。

1) 先行研究の測定結果を用いた研究：データ固定が完了した再発 ALL 臨床試験 ALL-R08 および乳児 ALL 臨床試験 MLL-10 において検討を行った。MLL-10 では、各測定ポイントにおける予後データや PCR-MRD との相関について検討し、昨年度日本小児血液・がん学会およびアメリカ血液学会において報告を行った内容を元に Blood 誌へ投稿・掲載された。また ALL-R08 では、化学療法群での検討はすでに 2018 年の国際小児がん学会で発表を行ったが、移植群における意義をさらに調査中で、令和 3 年度での投稿を目指し、さらに解析を進めている。

2) 現在実施中の臨床試験：ダウン症 ALL 国際共同臨床試験 DS-ALL 2016 において測定を継続し、2021 年 3 月末までに 19 例・のべ 78 ポイントの測定を行った。なお、DS-ALL 2016 臨床試験は AMED 継続ができなかったため、本研究開発費で測定の実施を行っている。令和 3 年 3 月の St. Jude ViVA フォーラムにおいて、アジア共同臨床試験での

FCM-MRD 測定のもう一つの拠点であるシンガポールの Dr. Campana らと測定結果の検討および評価を行う予定であったが、COVID-19 の影響により中止となったため次年度以降での実施計画とした。乳児 ALL 臨床試験 MLL-17 では 2021 年 3 月末までに 26 例延べ 98 ポイントの測定を行った。また小児フィラデルフィア染色体陽性 ALL 臨床試験: ALL-Ph18 では、同じく 2021 年 3 月末までに 28 例・のべ 165 ポイントの測定を行った。なお前者の MLL-17 は AMED 単独での測定継続が困難であり、本研究開発費でも測定を支援している。また後者では 2021 年度の AMED 継続ができなかったため、現在保有する抗体試薬が不足する事態となった場合、本研究で測定を支援していくこととなる。

3) 今後実施予定の臨床試験での計画: ・ T-ALL 臨床試験: 先行研究である ALL-T11 での検討結果から、T-ALL における PCR-MRD での測定不能割合はおおよそ 4 分の 1、年間おおよそ 20 例程度と推定され、測定可否が判明するのは、寛解導入療法終了前であることが予想される。検討の結果、次期臨床試験 ALL-T19 では発症時のスクリーニングを全例にて施行し、PCR-MRD が測定不可と判明した場合、TP2 の測定を行って治療変更を行うこととした。従って発症時は年間 70~80 例程度、TP2 は 20 例程度での測定となると考えられる。なお令和 2 年度より AMED 早川班での分担研究者として測定の基礎検討を開始している。

・BCP-ALL 臨床試験: 先行研究である ALL-B12 の検討結果から、PCR-MRD の測定不能割合は約 5%、年間おおよそ 25 例程度と推定された。発症時のスクリーニングと day15 の測定を全例 (年間 500 例程度) で実施するためには費用面や測定体制面で現状では不十分であると考えられた。実際の治療プロトコルでの導入は困難であり、難治による脱落例を中心に、ブリナツモマブや CAR-T 両方などの新規治療実施例を対象に測定を実施する予定である。引き続き体制整備については検討を行っていく。

・AML 臨床試験: 次期臨床試験である AML-20 臨床試験では、先行研究に引き続き京都大学と三重大学が FCM-MRD の測定を担当することとなった。本研究では引き続き成育医

療研究センターの院内検査としての実施と難治例を中心に実施することとなった。現在、我が国で行われている AML の FCM-MRD と同様の抗体パネルを準備し、院内の AML 症例を中心として 2021 年 3 月末までに 37 例・のべ 120 ポイントでの測定を行った。

・リンパ腫臨床試験: 成育医療研究センター小児血液・腫瘍研究部で実施されている MRD (MDD) 測定の手法や結果を調査し、今後の測定方法や体制について検討した。

4) 初発時マーカー診断および分子・遺伝子診断との連携: 初発時マーカー診断のパネルの改定を計画し、また検査手法を FCM-MRD と可能な限り共通化することにより、スムーズな検査の実施と連携について検討した。また観察研究 ALL-18 を通して初発時分子・遺伝子診断による病型分類と FCM-MRD 測定可否を統合したデータベースを構築した。ALL-18 については 2019 年 4 月から 2020 年 3 月までに、小児 ALL の新規症例について観察研究 ALL-18 を実施し、登録された 636 例について検討を行った。545 例が BCP-ALL であり、高 2 倍体が 184 例 28.8%、hypodiploidy が 1 例 (0.2%)、ETV6-RUNX1 が 104 例 (16.3%)、TCF3-PBX1 35 例 (5.5%)、KMT2A fusions 20 例 (3.1%)、BCR-ABL1 19 例 (3.0%)、EBF1-PDGFRB 1 例 (0.2%)、CRLF2 fusions 21 例 (3.2%)、ZNF384 fusions 14 例 (2.2%)、MEF2D fusions 4 例 (0.6%)、PAX5 fusion 1 例 (0.2%)、TCF3-HLF 1 例 (0.2%) であった。62 例が T-ALL であり、STIL-TAL1 8 例 (1.3%)、SPI1 fusion 1 例 (0.2%)、 $\gamma$   $\delta$ -TCR+ALL 8 例 (1.3%)、ETP-ALL 8 例 (1.3%) であった。10 例は診断が困難であり、19 例は ALL 以外に診断された。細胞マーカー解析を行ったうち、ALL が疑われた症例 351 例についてマーカー診断、およびキメラ遺伝子についての検討を行った。内訳は、マーカー診断では、B 前駆細胞性 (BCP-) ALL 228 例、pre-B ALL 65 例、T-ALL 32 例、Mixed lineage leukemia 6 例、成熟 B-ALL 4 例、B-LBL 1 例、AML 10 例、固形腫瘍 2 例、不明 3 例であった。FCM-MRD は MEF2D や ZNF384 転座、CRLF2 転座を有する症例のうち、施設から希望のあった症例について実施した。

5) FCM-MRD の保険診療化の検討: 成育衛生検査センターの認可により、保険診療下での検査と診療報酬請求が可能となった。す

で院内検査においては、保険診療での実施としての手続きを行って来たが、2020年4月1日から院外からの依頼に関しても保険診療下での実施（造血器腫瘍細胞抗原検査：1,940点としての実施）を開始した。2020年度にはFCM-MRDとして合計835件の解析を行った。このうち、ALL Ph-18、ALL MLL-17、DS-ALL 2016、TAM-18等の臨床研究におけるMRD解析が299件であり、それ以外に臨床検査としてMRD解析を462件受託実施した。462件中392件が保険診療として診療報酬が稼働しており、FCM-MRD単独として700万円以上の収益を衛生検査センターにもたらすこととなった。現状で、国内発症の白血病等血液腫瘍の約9割に対して当センターで中央診断を行っていると考えられるが、当センターで実施している中央診断に対する国内の小児がん診療施設が求める診断の質について、当センターで実施しているレベルの診断への需要の高さが示された。先行した研究と合わせて、過去7年間の国内発症例の診断情報を収集し、現在、その診断情報のデータベース化および解析を進めており、国内における血液腫瘍の発症の実態の解明を目指している。稀少疾患については年単位の発症数にバラツキが認められるが、各年のデータの蓄積によって、これらの稀少疾患も含めて、血液腫瘍の発症実態を正確に把握できることが期待される。このデータは、今後集積される臨床情報と統合的に解析することにより、将来の各血液腫瘍疾患の治療研究立案に有用性が高い情報となり得る。また、得られた情報、関連

研究の成果、最近明らかになった知見をもとに、さらに臨床的に有用性の高い検査項目（抗体パネル、FCM-MRDとの連携も含む）の開発と改良を進めている。

また MLL-17 や ALL-Ph18 等の臨床試験における MRD 解析は 299 件であったが、それ以外に有料受託検査としての MRD 解析は 462 件あった。この受託件数の数字の高さは、小児がん医療における FCM-MRD の重要性やニーズの高さを如実に示しており、FCM-MRD を実施提供することが小児がん診療における当センターとしての重大な使命のひとつであると考えられた。取り分け近年実用化されたイノツズマブや CAR-T 細胞療法が実施された再発 ALL 症例では、頻回の MRD 測定が要求されるため院内・院外からの FCM-MRD 測定の需要が増している。今後、免疫学的な T 細胞反応性の評価（イノツズマブ）や CAR-T 細胞の残存評価を FCM-MRD 測定と同時に評価を行うことで、これらの治療への反応性を迅速に評価できることが期待された。

#### 4. 研究内容の倫理面への配慮

本研究で実施する研究は、小児造血器腫瘍における治療適正化に必要な情報を提供するものであり、患者への利益がある。検体の採取は通常の治療で実施される効果判定ポイントで同時に採取されるため、患者への負担は最小限である。また検体や臨床情報、検査結果の授受には、院内検査を除き全て匿名化 ID が用いられ、個人情報の保護が行われている。