

論文の内容の要旨

獣医学 専攻

平成16年度博士課程入学

氏 名 山崎 淳平

指導教員名 辻本 元

論文題目:

Investigation of Minimal Residual Disease (MRD) in Canine Lymphoma

(犬のリンパ腫における微小残存病変(MRD)の検討)

イヌのリンパ腫は発生頻度が高く、その症例のほとんどは致死的な経過を辿ることから、臨床的にきわめて重要な疾患である。症例の大部分は多剤併用化学療法により臨床的寛解に達することができるが、最終的には再発を免れない。これまで約 20 年間にわたって新たな化学療法プロトコールが検討されてきたが、1990 年代に導入されたシクロフォスファミド、ドキソルビシン、ビンクリスチンおよびプレドニゾロンを組み合わせた CHOP プロトコールで得られた成績を大幅に上回るプロトコールの報告はなく、従来の方法ではさらに治療成績を向上させるのには限界があるとの認識が一般的である。このような背景から、現在の治療法における限界をブレイクスルーするための方法として、これまでの多数の研究とは別の発想が必要であると考えた。そこで、本論文においては、再発時の腫瘍細胞の源となるが寛解時には一般的な方法では検出できない「残存した腫瘍細胞:微小残存病変 (Minimal Residual Disease: MRD)」に着目して一連の研究を行った。

MRD とは治療により寛解が得られた後に存在する腫瘍細胞のことを指す。しかし、この MRD はごく微量であるため、血液学的検査、組織学的検査、フローサイトメトリーといった通常の検査では検出することは困難である。これに対し、分子生物学的手法を用いた polymerase chain reaction (PCR) 法を利用することにより、寛解状態においても MRD を検出・定量可能であることがヒトのリンパ腫で示されている。ヒトのリンパ腫において、化学療法後の MRD レベルは再発までの期間と相関すること、また再発時の直前に MRD レベルが上昇することが報告されており、その

臨床的重要性が示唆されている。イヌのリンパ腫においても、MRD の分子生物学的検出を行うことにより、本疾患における腫瘍細胞の動態を正確に解明することが可能と考えられた。また、この MRD 測定の結果を利用することにより、再発の早期指標の提示や治療の客観的評価が可能となり、イヌのリンパ腫の治療成績を向上させ得ると考えた。

本論文における一連の研究は、イヌのリンパ腫における MRD の分子生物学的検出システムを構築し、その臨床的有用性を検討することを目的として行ったものである。第1章においては、イヌのリンパ腫由来細胞株を用い、MRD 定量システムに関して、その感度、特異性および症例特異的プライマー／プローブの設計法について検討した。第2章では、本システムを臨床例に応用し、末梢血中 MRD レベルと症状との関連を調べるとともに、寛解状態における MRD の存在を検証した。第3章では、第1章および第2章の成果に基づき、A. 多剤併用化学療法プロトコール中における MRD 動態、B. 多剤併用化学療法終了時における MRD レベルと再発までの期間の相関、C. MRD レベル解析の再発予測への応用、の3点に関する臨床的有用性について検討を行った

第1章:イヌのリンパ腫における MRD 定量システムの確立

MRD 定量には症例特異的プライマーおよびプローブの設計が必要であるため、イヌの T 細胞型リンパ腫由来細胞株 UL-1 を用いて、その設計法を検討するとともに、感度および特異性の検証を行った。まず、UL-1 細胞における T 細胞レセプター γ 鎖(TCR γ)の遺伝子断片を PCR によって増幅したところ、UL-1 細胞は再構成した TCR γ 遺伝子に関してクローナルな集団であることが示されたため、その配列を決定した。症例特異的なプライマーとプローブの設計には、得られた TCR γ 遺伝子配列の他にイヌゲノムデータベースにおける TCR γ 遺伝子近傍の配列を利用した。症例特異的プライマーを用いた PCR においては、正常犬の末梢血中単核球(PBMC)ゲノム DNA からの増幅は認められず、UL-1 細胞ゲノム DNA からの再構成済み TCR γ 遺伝子断片の増幅が確認された。次に、UL-1 細胞ゲノム DNA を正常犬 PBMC ゲノム DNA で段階希釈したものをサンプルとして用い、リアルタイム PCR により UL-1 細胞の TCR γ 遺伝子断片の定量を行ったところ、コピー数 10~100,000 のサンプルにおいて正確な定量結果が得られた。また、1 コピーのサンプルからは安定した増幅は得られなかったため、このシステムの感度は 10^{-4} であることが示された。

第2章:イヌのリンパ腫症例における末梢血中 MRD の検討

本章では、第1章において樹立した MRD 定量システムを臨床例において検証することを目的とし、イヌのリンパ腫7症例における末梢血中 MRD の解析を行った。まず、個々の症例のリンパ腫細胞から免疫グロブリン重鎖(IgH)遺伝子および TCR γ 遺伝子の再構成後の遺伝子断片を PCR によって増幅したところ、再構成した IgH 遺伝子についてクローナルな腫瘍細胞であることが示されたため、その配列を決定した。症例特異的プライマーとプローブの設計は、第1章と同じく個々の症例の IgH 遺伝子配列およびイヌゲノムデータベースにおける IgH 遺伝子近傍の配列情報を組

み合わせて行い、その特異性を確認したプライマー・プローブのセットをリアルタイム PCR に用いた。まず血液検査により末梢血液中に腫瘍細胞が確認される Stage V の症例において、通常の血液学的手法および本定量システムの結果を比較したところ、両方法によって得られた腫瘍細胞数はほぼ一致していることが確認された。そこで、リンパ腫症例においてその病状と末梢血中 MRD レベルとの関連を検討したところ、MRD レベルはリンパ節の腫大および縮小の経過とほぼ一致して増加・減少することが判明した。また臨床的に完全寛解の状態にあった症例における MRD レベルを測定したところ、いずれの症例においても 0.1~10 コピー/ μL (理論上、0.1~10 細胞/ μL) の MRD レベルが検出された。

第3章: イヌのリンパ腫症例における末梢血中 MRD 測定 of 臨床的有用性に関する検討

第1章において MRD 定量システムを確立し、第2章で本システムによる測定が臨床例に応用可能であることを確認したため、本章では、末梢血中 MRD 定量の臨床的有用性を検討することを目的とし、定量を行ったイヌのリンパ腫症例 26 例に関して、次の3点について検証した。

- A. 多剤併用化学療法プロトコール中における MRD 動態: 治療効果の判定における MRD レベルの有用性を検討するため、多剤併用化学療法により完全寛解に達した 7 症例における MRD レベルを経時的に測定した。リアルタイム PCR によって算出した末梢血腫瘍細胞数は、初診時において 10~>100 コピー/ μL であったが、プロトコール 9 週目までに約 0.1~1 コピー/ μL に減少し、その後 25 週目(最終週)まで維持されていた。最終週(寛解状態)における MRD レベルは初診時における末梢血中腫瘍細胞数と比較して有意に低い値であった。
- B. 多剤併用化学療法終了時における MRD レベルと再発までの期間の相関: 多剤併用化学療法の最終週における MRD レベルにより、その後の再発までの期間を予測可能であるかどうかを検討した。多剤併用化学療法により完全寛解に達した 17 症例の化学療法最終週における 20 サンプルの MRD レベルはその後の再発までの期間と負の相関を示した。そこで、これら症例を化学療法最終週における MRD レベルにより、>1 コピー/ μL 、0.1~1 コピー/ μL 、検出限界以下(分子生物学的寛解)の3群に分けたところ、再発までの期間に関してそれぞれの群の間に有意差が認められ、その中央値はそれぞれ 45, 190, 400 日であった。
- C. MRD レベル解析の再発予測への応用: MRD レベルの測定により、臨床的に確認される再発のポイントよりも早期に再発を検出できるかどうかをリンパ腫 2 症例について検討した。その結果、寛解時において末梢血液中 MRD レベル が 1 コピー/ μL 以上に上昇した場合もしくは分子生物学的寛解状態から逸脱した場合には、その後 1~3ヶ月以内に再発していることが明らかとなった。

本研究の成果により、イヌのリンパ腫に関するこれまでの概念とは異なり、完全寛解の状態においても末梢血液中に腫瘍細胞が残存していることが示された。また、MRD レベルはイヌのリンパ腫のあらゆる状態においてその病状と相関を示すことが明らかとなり、とくに寛解状態において

も腫瘍のわずかな進行度を評価できることが示された。今後、MRD レベルjの測定をイヌのリンパ腫の診療に応用することにより、次のような新規化学療法指針を提示できるものと考えられる。

- (1) MRD レベルの測定により、既存または新規の化学療法の有効性を短期間のうちに客観的に比較することが可能となる。
- (2) 化学療法終了時における MRD レベルの測定によって、その後の再発までの期間を予測することが可能となり、それに基づいた地固め療法の必要性を示唆することができる。
- (3) 分子生物学的再発は臨床的再発よりも早期に検出することが可能であり、それに基づいて早期に再寛解導入療法を開始することができる。

本論文の成果による MRD レベルの測定結果を基にした治療、つまり MRD-guided therapy はテーラーメイド型治療の方法論を提供するものであり、それに沿って個々の症例に最適な治療法を実施することにより、イヌのリンパ腫における治療成績が大幅に改善されるものと考えられる。