

(特集：ワークショップ (第30回年次学術集会より))

## 造血器腫瘍における遺伝子検査の実際

丸岡 隼人

### Genetic testing for routine diagnostics of hematological malignancies

Hayato Maruoka

**Summary** The diagnosis of hematological malignancies has recently been made based on molecular characteristics as well as morphologic and phenotypic characteristics. Polymerase chain reaction (PCR)-based genetic testing is a routinely performed method not only in establishing the diagnosis and prognostic classification but also for monitoring measurable residual disease (MRD) in these diseases. The highly sensitive detection of MRD can assess the effectiveness of treatment and decide a therapeutic protocol, including hematopoietic stem cell transplantation. This article presents an update on the importance of genetic testing, detailing the advantages and disadvantages of each test when applicable.

**Key words:** Polymerase chain reaction, Diagnosis, Prognosis, Measurable residual disease, Hematological malignancies

#### I. はじめに

従来、造血器腫瘍の病型分類は形態学的検査を中心におこなわれていた。分子生物学的解析技術の進歩に伴い、近年ではフローサイトメトリー (flow cytometry, FCM) による細胞系統・分化レベルの同定や染色体・遺伝子異常などの結果を総合して病型分類がおこなわれるようになってきた<sup>1)</sup>。造血器腫瘍の臨床において、遺伝子検査は確定診断のみならず、予後分類や治療法の選択に必須となっている。また、測定可能残存病変 (measurable residual disease, MRD) による治療効果判定など、その役割は多岐に渡

っている。

現在、polymerase chain reaction (PCR) 法を応用した種々の遺伝子解析法が開発されており、本稿では実臨床の場で有用である遺伝子検査の項目と検出法について紹介する。

#### II. 免疫関連遺伝子再構成

悪性リンパ腫をはじめとするリンパ系腫瘍の診断は、病理組織学的検査やフローサイトメトリーを中心に行われるが、反応性病変との鑑別が困難なケースがある。また、針生検や内視鏡下生検などの微量検体においては、細胞が少な

神戸市立医療センター中央市民病院  
臨床検査技術部  
〒650-0047 兵庫県神戸市中央区港島南町2-1-1  
Tel: +81-78-302-4321  
E-mail: maruoka@kcho.jp

Department of Clinical Laboratory, Kobe City Medical  
Center General Hospital, Kobe, Japan.  
2-1-1 Minatojima-Minamimachi, Chuo-ku, Kobe,  
Hyogo 650-0047, Japan

いため正確な診断に苦慮することがある。免疫関連遺伝子再構成検査は、B細胞およびT細胞のクロナリティを証明する検査であり、確定診断および極少数の腫瘍細胞の検出に有力な情報を提供する。

免疫グロブリン重鎖 (immunoglobulin heavy chain, *IGH*) 遺伝子はすべての有核細胞に存在するが、正常の分化過程ではB細胞のみ遺伝子の組み替え (遺伝子再構成) が生じる。*IGH* 遺伝子はV/D/Jの3つの領域から構成されており、B細胞は分化の際にD領域とJ領域からそれぞれ1つのセグメントを選択して結合する (不完全型)。分化が進むと、さらにV領域から1つのセグメントが選択され結合する (完全型)。また、セグメントの結合部位には、遺伝子配列のバリエーションを増やすために、ランダムな塩基配列を付加することにより生じた配列 (N領域) が存在する。その結果、無数の遺伝子配列が生み出されることになる。この配列は個々のB細胞クローン毎に異なるが、腫瘍細胞では同じ配列となる (Fig. 1A)。

PCR法で*IGH*遺伝子の一部を増幅した後、モノクローナルバンドが検出されればクロナリティが証明される。B細胞のクロナリティ解析には*IGH* 遺伝子と免疫グロブリン軽鎖 (immunoglobulin light chain, *IGL*) 遺伝子を、T細胞のクロナリティ解析にはT細胞レセプター (T-cell receptor, TCR) のβ鎖 (*TCRB*) 遺伝子とγ鎖 (*TCRG*) 遺伝子を用いるが、特に幼若T細胞性腫瘍あるいはγδ型T細胞性腫瘍を疑う場合にはδ鎖 (*TCRD*) 遺伝子を対象とする。

PCR法を用いた方法は1990年台初頭に開発されているが、初期の検出法ではプライマーの数が限定されており、様々な腫瘍細胞由来の配列に対する相補性が確保できない為、偽陰性率が高いという欠点があった。また、モノクローナルなPCR産物とポリクローナルなPCR産物を正確に鑑別できず、偽陽性率が高いことも問題であった。2003年に従来のPCR法の欠点を軽減した方法としてBIOMED-2プロトコル<sup>2)</sup>が、2012年にEuroClonality/BIOMED-2ガイドライン<sup>3)</sup>が公開され、現在ではクロナリティ解析の標準法となっている。本プロトコルの特徴は3つあり、1つめはV領域の複数箇所にプライマーを設計し、somatic hypermutation (体細胞超

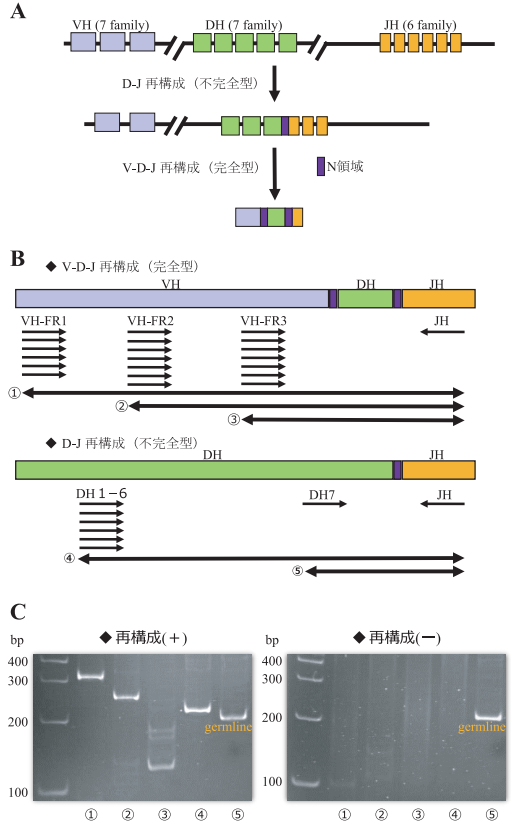


Fig. 1 *IGH*遺伝子再構成の検出  
 A) *IGH*遺伝子再構成のメカニズム  
 B) PCRに用いるプライマーの位置  
 C) ポリアクリルアミド電気泳動による検出  
*IGH*, immunoglobulin heavy chain; FR, framework

突然変異)の影響によるプライマーのミスアニールを軽減している。2つめはファミリー特異的プライマーを使用し、腫瘍細胞由来の配列とプライマーの相補性を高め、プライマーのミスアニールを軽減している。3つめはマルチプレックスPCRにより、チューブの本数を減らし、効率化と低コスト化を実現している (Fig. 1B)。サンプルから抽出したDNAを用いてマルチプレックスPCRを行い、PCR産物をポリアクリルアミドゲル電気泳動し、エチジウムブロマイドなどの染色剤を用いて染色をおこなう。想定される範囲内に明瞭なバンドが検出された場合に陽性と判定する (Fig. 1C)。検出感度の目安はおよそ1%であるが、腫瘍細胞由来の配列とプライマーとの相補性および背景に存在するポリ

クローナルなB細胞の影響により検出感度は一様ではない。また、腫瘍細胞由来の配列とプライマーとの相補性が低い場合、偽陰性となることがある。ウイルス感染などによりT細胞の免疫応答が増強している場合、あるいは高齢者や免疫不全患者などにおいてT細胞のレパートリーが減少している場合、TCR遺伝子のオリゴクローナルなバンドが検出されることがあり、陽性と判定される可能性（偽陽性）があるので結果の解釈は慎重におこなう。

### Ⅲ. 融合遺伝子

1990年台前半に、慢性骨髄性白血病（chronic myeloid leukemia, CML）における*BCR-ABL1* mRNAの検出法が開発されて以降、様々な融合遺伝子の検出系が確立され、本邦では1998年に造血器腫瘍核酸増幅同定検査として保険承認された。融合遺伝子の存在の証明は、単なる病型分類に留まらず、*BCR-ABL1* mRNAの検出はCMLやB細胞急性リンパ芽球性白血病（B-cell lymphoblastic leukemia, B-ALL）におけるチロシンキナーゼ阻害薬、*PML-RARA* mRNAの検出は急性前骨髄性白血病（acute promyelocytic leukemia, APL）におけるオールトランス型レチノイン酸や亜ヒ酸の適用の判断に必須となっている。

脱制御型の融合遺伝子を除き、融合遺伝子の多くはmRNAを対象とする。急性骨髄性白血病（acute myeloid leukemia, AML）の代表的な融合遺伝子の一つである*RUNXI-RUNXITI*遺伝子を例に説明すると、*RUNXI*と*RUNXITI*それぞれの遺伝子の切断点はイントロンに存在するが、個々の症例毎に切断箇所が異なり、DNAレベルでは融合箇所を含む領域をユニバーサルプライマーで増幅することが困難である。スプライシングによりイントロンが除去されたmRNAは配列が同一となり、ユニバーサルプライマーによる増幅が可能となる。また、融合遺伝子の量はDNAよりmRNAの方がはるかに多いため、検出感度が高い（Fig. 2A）。mRNAはPCR反応の鋳型とならないため、逆転写反応（reverse transcription, RT）にてcDNAに変換した後、PCR反応により増幅する。以前はPCR反応後の産物をアガロースゲル電気泳動し、エチジウムブロマイドなどの染色を用いて検出する定性法

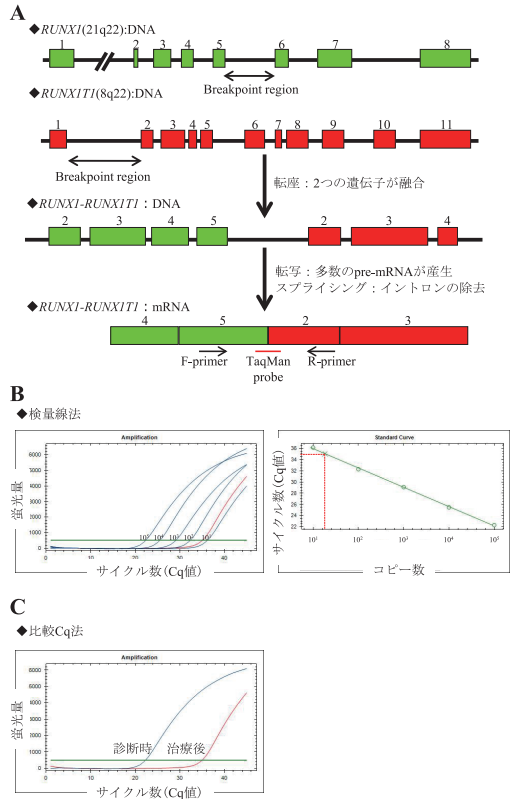


Fig. 2 融合遺伝子の検出

- A) *RUNXI-RUNXITI*融合遺伝子とプライマー・プローブの設定位置
- B) 検量線法による遺伝子定量
- C) 比較Cq法による遺伝子定量

が一般的であったが、近年ではリアルタイムPCRによる逆転写定量PCR（reverse-transcriptase quantitative PCR, RT-qPCR）法が主流となっている。

リアルタイムPCR法では増幅されたPCR産物由来の蛍光量を1サイクル毎に測定をおこない、横軸にサイクル数、縦軸に蛍光量をプロットする。蛍光量が既定値に達する時点のサイクル数（quantification cycle, Cq）を用いて遺伝子量を算出する。蛍光物質としてはインターカレーターやTaqManプローブが使用される。インターカレーターは2本鎖のDNAに結合すると蛍光を発する物質で、EvaGreenなどが用いられる。TaqManプローブはターゲット遺伝子の増幅用プライマー間の中間付近に結合するオリゴヌク

レオチドであり、その5'末端にはレポーター色素が、3'末端にはクエンチャーが結合している。レポーター色素とクエンチャーが近接している状態では、励起光を照射してもクエンチャーへの蛍光共鳴エネルギー移動によりレポーター色素は発光しない。鋳型DNAにプローブが結合し、さらにプライマーを起点とする塩基の伸長反応が開始されると、DNAポリメラーゼが有する5'→3'エキソヌクレアーゼ活性により、プローブは分解される。蛍光色素とクエンチャーが遊離することで、蛍光色素は蛍光を発する。

インターカレーター法は安価かつプローブの設計が不要であることから、測定系の構築は比較的容易であるが、ターゲット遺伝子以外の遺伝子が増幅された場合においても蛍光が検出されるので、特異性の面でTaqManプローブ法に劣る。実臨床で検査対象となる遺伝子の多くはTaqManプローブ法が用いられている。融合遺伝子検出用のプライマーおよびプローブの配列はEurope Against Cancer (EAC) から公開されている<sup>4)</sup>。

遺伝子定量解析は2つの方法があり<sup>5)</sup>、1つめは検量線法である。既知コピー数のDNA（標準物質）を複数用意し、それぞれのCq値を測定した後、横軸にコピー数、縦軸にCq値をプロットすることで検量線が作成される。そして、同時測定したサンプルのCq値を検量線の式に入力し、コピー数を算出する。実際には、測定に用いるRNAの質と量および逆転写効率を考慮する必要があり、リファレンス遺伝子の測定もおこない、ターゲット遺伝子のコピー数をリファレンス遺伝子のコピー数で除することにより、サンプル間で生じる誤差を補正する (Fig. 2B)。2つめの方法は比較Cq法であり、標準物質を使用せず2つのサンプル間の遺伝子量の違いを算出する方法である。診断時および治療後のサンプルそれぞれのターゲット遺伝子とリファレンス遺伝子のCq値を測定する (Fig. 2C)。解析対象の遺伝子の増幅効率が100%の場合、Cq値が1の違いは遺伝子量が2倍違うことを反映する。増幅効率が100%に満たない場合、増幅効率を加味したPfaffl法<sup>6)</sup>を用いる。検量線法のようにサンプルの測定毎に標準物質を測定する必要がなく、安価かつ簡便に遺伝子定量が可能であるが、転院患者など診断時のサンプルが

入手困難な場合は利用できない。融合遺伝子の定量的解析は後述するMRD解析において重要な役割を果たす。

#### IV. 遺伝子変異

造血器腫瘍の病型分類に用いられるWHO分類2017<sup>1)</sup>の特徴は、遺伝子異常に基づく診断基準の変更や新規病型の設定がおこなわれていることであり、今後益々遺伝子異常の検索は重要視されるものと予想される。

AMLにおいては、*NPM1*変異、両アレルの*CEBPA*変異および*RUNX1*変異を有するAMLなどが新規病型となった。European LeukemiaNet (ELN) の予後分類<sup>7)</sup>では、*TP53*変異、*RUNX1*変異および*ASXL1*変異などが予後不良群として分類された。従来、*FLT3-ITD* (internal tandem duplication) 変異は予後不良群とされてきたが、アレルバーデン (遺伝子変異割合) および*NPM1*変異の有無が予後を強く規定することが明らかとなった (Table 1)。骨髄増殖性腫瘍 (myeloproliferative neoplasms, MPN) においては、診断の大基準として従来の*JAK2*変異に加え、*CALR*変異と*MPL*変異が追加された。成熟リンパ系腫瘍では、リンパ形質細胞性リンパ腫 (lymphoplasmacytic lymphoma, LPL) の*MYD88 L265P*変異、有毛細胞白血病 (hairy cell leukemia, HCL) の*BRAF V600E*変異や血管免疫芽球性T細胞リンパ腫 (angioimmunoblastic T-cell lymphoma, AITL) の*RHOA G17V*変異などが診断に有用な遺伝子変異として注目されている。

サンガー法をベースとしたダイレクトシーケンシング法は、遺伝子変異の箇所や種類に関わらず適用可能な検出方法である<sup>8)</sup>。PCR反応で増幅したDNA断片を鋳型とし、プライマーを起点としてDNAポリメラーゼにより相補的DNAを合成する。基質としてデオキシリボヌクレオシド三リン酸 (dNTP) と4種類の蛍光色素で標識したジデオキシリボヌクレオシド三リン酸 (ddNTP) を用いる。dNTPを基質とした場合は伸長反応が継続するが、デオキシリボースの3'位がH基のddNTPを基質とした場合はその時点で伸長反応が停止する。最終的に1塩基の長さの異なるDNA断片が合成され、末端は蛍光色素で標識される。DNAシーケンサーにて電

Table 1 ELNによるAMLの予後分類 (文献7を引用改変)

リスク分類	遺伝子異常
良好	t(8;21)(q22;q22.1); <i>RUNX1-RUNX1T1</i> inv(16)(p13.1q22) or t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFB-MYH11</i> Mutated <i>NPM1</i> without <i>FLT3</i> -ITD or with <i>FLT3</i> -ITD low* Biallelic mutated <i>CEBPA</i>
中間	Mutated <i>NPM1</i> and <i>FLT3</i> -ITD high* Wild-type <i>NPM1</i> without <i>FLT3</i> -ITD or with <i>FLT3</i> -ITD low* (without adverse-risk genetic lesions) t(9;11)(p21.3;q23.3); <i>MLL3-KMT2A</i> Cytogenetic abnormalities not classified as favorable or adverse
不良	t(6;9)(p23;q34.1); <i>DEK-NUP214</i> t(v;11q23.3); <i>KMT2A</i> rearranged t(9;22)(q34.1;q11.2); <i>BCR-ABL1</i> inv(3)(q21.3q26.2) or t(3;3)(q21.3;q26.2); <i>GATA2, MECOM(EV11)</i> -5 or del(5q); -7; -17/abn(17p) Complex karyotype, monosomal karyotype Wild-type <i>NPM1</i> and <i>FLT3</i> -ITD high* Mutated <i>RUNX1</i> Mutated <i>ASXL1</i> Mutated <i>TP53</i>

\* low, アレル比(<0.5); high, アレル比(≥0.5)

ELN, European LeukemiaNet; AML, acute myeloid leukemia

気泳動すると、短いDNA断片から移動し、末端の蛍光を検出器にて読み取ることにより塩基配列を入手できる。ダイレクトシーケンス法の欠点として、複数遺伝子の変異あるいは1つの遺伝子の複数箇所の変異を検出する場合、コストと時間がかかる。また、検出感度は10%程度であり、腫瘍細胞比率が高いサンプルが必要となる。

ダイレクトシーケンス法の上記問題を解決する方法として、高分解能融解曲線解析 (high resolution melting analysis, HRMA) を用いた遺伝子変異スクリーニング法が注目されている<sup>9)</sup>。HRMAでは、二本鎖DNAに結合した状態でレーザーを照射すると蛍光を発するインターカラーターを用いる。解析対象箇所をPCR法にて増幅した後、温度を徐々に上昇させると、熱変性により二本鎖DNAは一本鎖に解離し、やがて消光する。熱変性の過程において蛍光をリアルタイムにモニタリングし、温度融解曲線を作成すると、野生型と変異型では温度融解曲線のパターンが異なる。野生型と温度融解曲線が異なる場合、何らかの遺伝子変異がある可能性が高い。HRMAによるスクリーニング法とダイレクトシーケンス法を組み合わせることにより、安価かつハイスループットな変異解析が可能となる (Fig. 3A)。特に、予後を強く規定する

*ASXL1*、*CEBPA*、*TP53*、*RUNX1*変異の検出は、治療戦略の決定に有力な情報を提供し、今後解析の重要性が高まるものと思われる。

挿入・重複・欠失など野生型と長さが異なる変異の検出においてはフラグメント解析が有効である。フラグメント解析は、5'末端に蛍光色素を標識したプライマーを用いてPCR反応をおこなった後、キャピラリー電気泳動にて蛍光を検出し、PCR産物の長さおよび産物量を測定する方法である。*FLT3*-ITD変異および*NPM1*変異はAMLの30%以上に認められる高頻度な遺伝子変異である。*FLT3*-ITDはエクソン14と15における一部の配列が繰り返される重複型変異、*NPM1*変異はエクソン12における4塩基挿入に伴うフレームシフト型の変異である。両者とも野生型と長さの異なる遺伝子変異であり、フラグメント解析により簡便に変異を検出できる。また、*FLT3*-ITDはアレルバーデンと*NPM1*変異の共存の有無が予後と強く関連しているが<sup>7,10,11)</sup>、ピークエリア値からアレルバーデンを算出することで、予後分類が可能となる (Fig. 3B)。

MPNにおける*JAK2* V617F変異など既知の箇所における1塩基変異の検出には種々の解析法があるが、アレル特異的PCR (allele-specific oligonucleotide PCR, ASO-PCR) 法が最も普及し

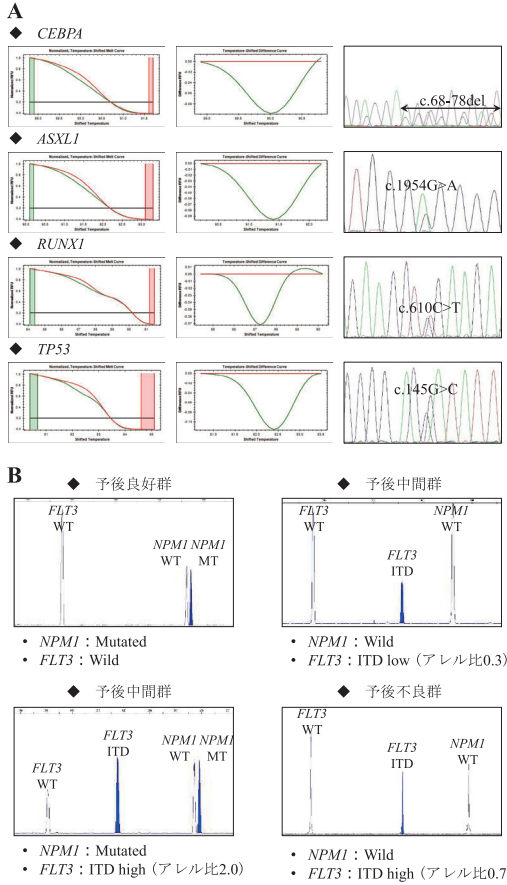


Fig. 3 遺伝子変異の検出  
 A) HRMAとダイレクトシーケンス法による種々の遺伝子変異の検出例  
 B) フラグメント解析による*FLT3*-ITD変異と*NPM1*変異の検出例と予後分類  
 HRMA, high resolution melting analysis

ている方法である。ASO-PCR法では、片方のプライマーの3'末端の塩基を変異配列と相補的になるように設計し、変異配列のみを増幅する<sup>12)</sup>。実際には3'末端のみのミスマッチでは野生型配列も増幅されるため、特異性を高めるために3'末端から3番目の塩基に人為的にミスマッチを加える。リアルタイムPCR法により、定量的に解析することも可能である。その他、プローブを用いた温度融解曲線解析、制限酵素断片長多型 (fragment length polymorphism, RFLP) 法などの方法があるが、近年、デジタルPCR (digital PCR, dPCR) 法が1塩基変異の高感度かつ定量的な解析法として注目されている<sup>13)</sup>。

dPCR法は検量線を使用せず、1分子のPCR増幅でDNAやmRNAの絶対定量を可能とする方法である。dPCR法にはチップ型とドロップレット型があり、チップ型のdPCRでは対象サンプルを各々独立した2万個のウェルに分配し、1ウェル毎にPCR反応をおこなう。エンドポイントでウェル毎にPCR増幅の有無を解析し、増幅があったウェルはターゲット分子が入ったポジティブ反応として、増幅がなかったウェルはターゲット分子が入っていなかったネガティブ反応として、その数を計算することでサンプル中のターゲット遺伝子のコピー数や存在比率を算出することができる。機器の普及が今後の課題ではあるが、サンプル中にごく僅かしか存在しない1塩基変異の検出において絶大な威力を発揮することが期待されている。

V. 移植後キメリズム解析

造血幹細胞移植は、通常の化学療法では完治が見込めない患者に対して有効な治療法であり、ドナー細胞がレシピエント細胞と完全に入れ替わることにより、移植は成功と判定される (完全生着)。ただし、ドナー細胞の生着遅延・生着不全に至るケースや早期再発するケースがあり、移植後のドナー細胞の生着度合を定期的にモニタリングすることは移植患者の予後を改善する上で極めて重要である。

造血幹細胞移植後のキメリズム解析は、短い塩基配列の繰り返し回数が個人間で異なる short tandem repeat (STR) 領域をターゲットとし、複数存在するSTRの中からドナーとレシピエントを明確に区別できるSTRを用いてドナー細胞の生着度を定量解析する<sup>14)</sup>。当院では、移植前に5カ所のSTR領域をマルチプレックスPCR法にて増幅し、両者の鑑別可能なSTRを検索している (Fig. 4A)。D4S2366やD16S539は同じ長さであり、両者の鑑別は不能であるが、一方D3S3045、D12S1064およびD17S1290は両アレルあるいは片アレルの長さが異なるので、両者の鑑別が可能である (Fig. 4B)。完全生着例では、day21においてドナー 100%であり、以降もドナーを維持していた。生着不全例では、day21においてドナー 72%とドナー優位であったが、day28においてドナーが16%と著明に低下し、

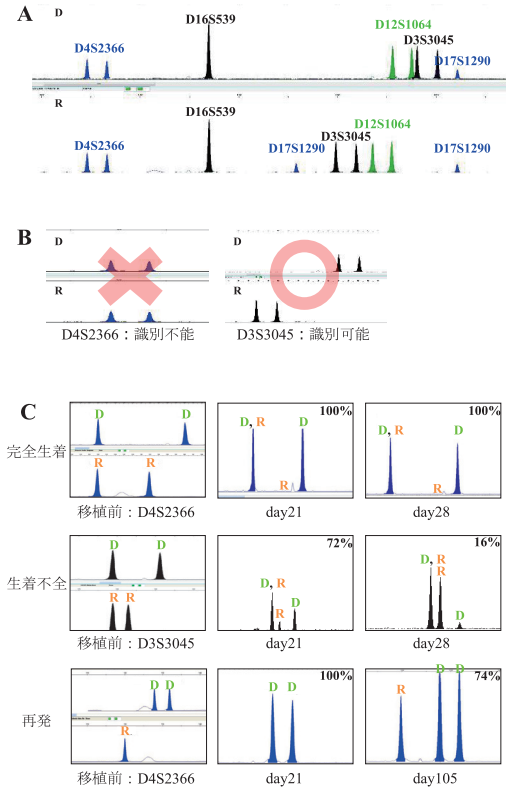


Fig. 4 造血幹細胞移植後のキメリズム解析  
 A) ドナーとレシピエントのSTRパターン例  
 B) 識別可能および識別不能なSTRパターン例  
 C) 移植後キメリズム解析例  
 STR, short tandem repeat

白血球の回復も認められないことから生着不全と診断された。再発例では、day21においてドナー 100%となり、以降ドナーを維持していたが、day105にドナーが74%と低下し、再発と診断された (Fig. 4C)。移植患者において、キメリズム解析によるモニタリングは臨床的に有用であるが、保険収載項目ではない。また、院内実施施設が限られており、今後の普及が望まれる。

## VI. 治療後のMRD評価

MRDとは光学顕微鏡下で確認できない極わずかな腫瘍細胞の残存状態である。同じ疾患群でも治療反応性が個々の症例で異なる。治療開始後、腫瘍量が著明に減少し、MRDの検出限

界以下に達する症例 (MRD陰性群) は再発リスクが低く、MRDの検出限界以下に達しない症例 (MRD陽性群) は再発リスクが高い。また、MRD陰性群の一部は、血液学的再発を来すことがあるが、MRDは再発に先立ち上昇しており、再発の早期発見においても重要な役割を果たしている (Fig. 5)。MRDが再発率や全生存率と強く関連することが多数報告されており、MRDは独立した予後因子として認識されている<sup>15-20)</sup>。造血器腫瘍の中で、急性リンパ芽球性白血病 (acute lymphoblastic leukemia, ALL) はMRDと治療に関する研究が最もおこなわれている疾患である。Campanaらは寛解導入後のMRDが高値かつ陽性が持続する場合は造血幹細胞移植を推奨し、一方高リスク群のBCR-ABL陽性ALLにおいて寛解導入療法後のMRDが陰性の場合、造血幹細胞移植よりチロシンキナーゼ阻害剤併用化学療法を優先することを推奨している<sup>19)</sup>。また、成人BCR-ABL陰性ALLにおいては、寛解導入療法後のMRDが高値 ( $\geq 10^{-3}$ ) の場合のみ、造血幹細胞移植による予後の改善が認められている<sup>20)</sup>。

MRD解析法として、RT-qPCR法、免疫関連遺伝子を対象とする定量ASO-PCR (ASO-qPCR) 法およびマルチパラメトリックフローサイトメトリー (multi-parametric FCM, MFCM) がある<sup>15,21-25)</sup>。それぞれの解析法の特徴をTable 2に示す。

RT-qPCR法は全般的に高感度であり、さらに標的遺伝子が安定かつ短時間で結果が得られることからMRDの主流な方法の一つである。AMLにおけるMRDマーカーとして、一般的にはRUNX1-RUNX1T1 mRNAなどの融合遺伝子やWT1 mRNAなどが用いられる<sup>15-16)</sup>。ただし、融合遺伝子を有する症例やWT1 mRNAが高発現している症例に限定されるため、適用範囲が狭い。近年、AMLで高頻度に認められる変異NPM1 mRNAを標的とすることで、多くのAML症例においてMRD検出が可能となっており、さらにMRDの有無が予後を強く規定していることが報告されている<sup>17)</sup>。NPM1変異は複数のパターンが報告されており、ユニバーサルプライマーではMRD解析は実施できない。実際には、診断時にフラグメント解析を用いてNPM1遺伝子の変異の有無をスクリーニングする。変異が

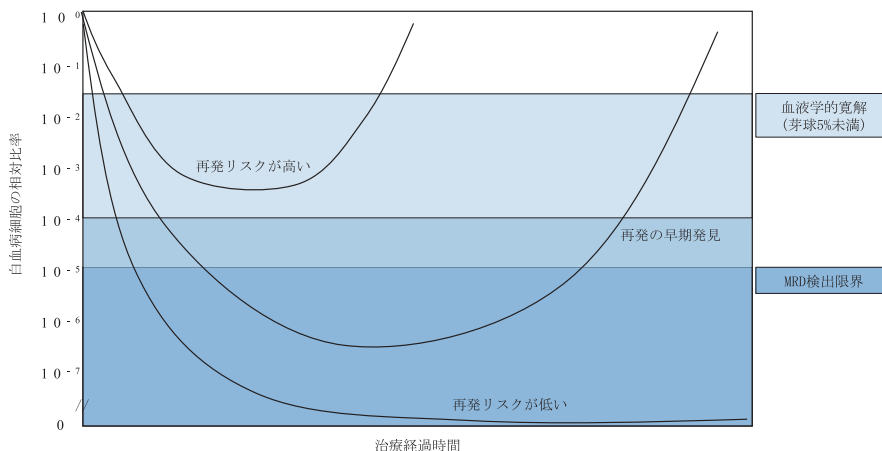


Fig. 5 MRDと再発の関係  
MRD, measurable residual disease

Table 2 MRD検出法の比較

	RT-qPCR	ASO-qPCR	MFCM
ターゲット	融合遺伝子 変異 <i>NPM1</i> 遺伝子 <i>WT1</i> 遺伝子	免疫グロブリン遺伝子 T細胞レセプター遺伝子	腫瘍細胞
検出感度	10 <sup>-4</sup> ~10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-4</sup> ~10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-3</sup> ~10 <sup>-5</sup>
メリット	標的遺伝子が安定 報告日数：1~2日 標準化された方法(EAC)	標準化された方法(EuroMRD) リンパ系腫瘍に適用可	ほぼ全ての症例に適用可 報告日数：1~2日 標準化された方法(EuroFlow)
デメリット	適応症例が限定的	個々の症例毎にプライマーの設計が必要 Clonal evolutionにより偽陰性の可能性あり	担当者の習熟度に依存 Clonal evolutionにより偽陰性の可能性あり

MRD, measurable residual disease; RT-qPCR, reverse-transcriptase quantitative PCR; ASO-qPCR, allele-specific quantitative PCR; MFCM, multi-parametric flow cytometry; EAC, Europe against cancer

存在する場合、ダイレクトシーケンスにて挿入された配列を確認する。変異の95%をTCTG、CATG、CCTGの3種類が占めているため、それぞれに特異的なプライマーを用いることで、変異*NPM1* mRNAのみを効率よく増幅する。フラグメント解析の検出感度は10<sup>-2</sup>程度であるが、アレル特異的RT-qPCR (ASO-RT-qPCR) により、10<sup>-6</sup>の高感度検出が可能となる (Fig. 6)。

免疫関連遺伝子を対象としたASO-qPCRはEuroMRDが提唱する標準化された方法<sup>23-24)</sup>であり、検出感度が高く、リンパ系腫瘍全般に適用可能な方法である。ただし、個々の症例毎に免疫関連遺伝子の配列を解析し、特異的なプライマーを設計する必要があるので高度な技術が要求される。本邦では骨髓微小残存病変量測定として保険収載されている。検査センターにて受

託可能であり、どの施設においても利用可能であるが、現時点ではALLのみが対象となっている。

MFCMは異常抗原発現を腫瘍細胞の目印とすることで、ほぼ全ての症例で適用可能であることが大きなメリットである。近年、B-ALLおよび形質細胞骨髄腫 (plasma cell myeloma, PCM) において、10<sup>-5</sup>の検出感度を有する次世代フロー (next generation flow, NGF) がEuroFlowから提唱されており、PCR法と同等の検出感度を達成している<sup>22,25)</sup>。現在PCMのMRD解析は検査センターにて受託可能となっている。

MRD検出法は、測定対象や方法により検出感度が著しく異なるため、個々の症例毎に最適なMRD検出法を選択することが重要である。



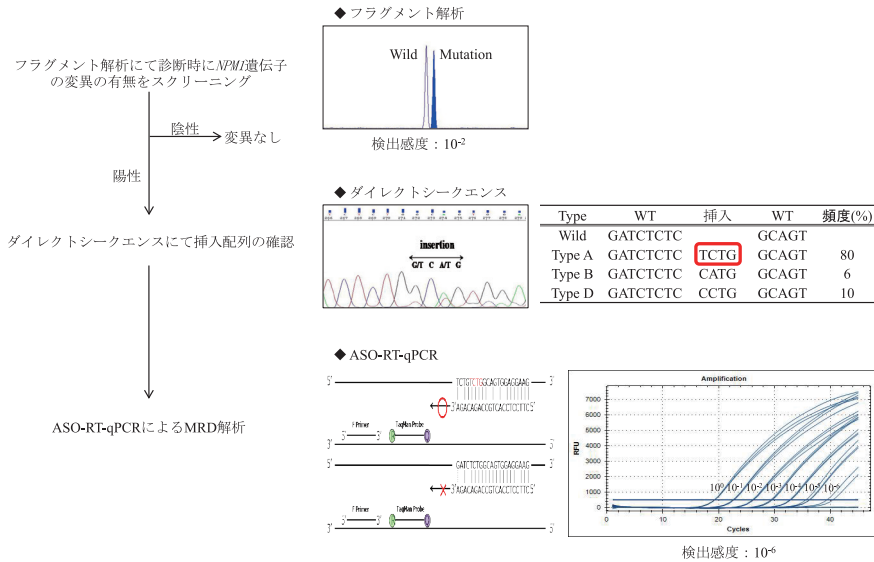


Fig. 6 変異NPM1遺伝子のMRD解析の手順  
ASO-RT-qPCR, allele-specific oligonucleotide reverse-transcriptase quantitative PCR;  
MRD, measurable residual disease

## VII. 最後に

新規遺伝子異常の発見や遺伝子解析法の進歩により、造血器腫瘍における遺伝子検査の果たすべき役割は益々大きくなっている。遺伝子検査には様々な方法があり、その性能は一様ではない。遺伝子検査の担当者は、解析対象とする遺伝子に応じて最適解析法を用いること、またそれぞれの検査法の性能を十分に把握した上で臨床側に検査結果を報告しなければならない。

本論文内容に関する著者の利益相反：なし

### 文献

- 1) Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Arber DA, Hasserjian RP, Le Beau MM, Orazi A, Siebert R: WHO Classification Tumors of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Revised 4th Edition. IARC, Lyon, 2017.
- 2) van Dongen JJ, Langerak AW, Brüggemann M, Evans PA, Hummel M, Lavender FL, Delabesse E, Davi F, Schuurin E, García-Sanz R, van Krieken JH, Droese J, González D, Bastard C, White HE, Spaargaren M, González M, Parreira A, Smith JL, Morgan GJ, Kneba M, Macintyre EA. Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: Report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia*, 17: 2257-2317, 2003.
- 3) Langerak AW, Groenen PJ, Brüggemann M, Beldjord K, Bellan C, Bonello L, Boone E, Carter GI, Catherwood M, Davi F, Delfau-Larue MH, Diss T, Evans PA, Gameiro P, Garcia Sanz R, Gonzalez D, Grand D, Håkansson A, Hummel M, Liu H, Lombardia L, Macintyre EA, Milner BJ, Montes-Moreno S, Schuurin E, Spaargaren M, Hodges E, van Dongen JJ: Euro-Clonality/BIOMED-2 guidelines for interpretation and reporting of Ig/TCR clonality testing in suspected lymphoproliferations. *Leukemia*, 26: 2159-2171, 2012.
- 4) Gabert J, Beillard E, van der Velden VH, Bi W, Grimwade D, Pallisgaard N, Barbany G, Cazzaniga G, Cayuela JM, Cavé H, Pane F, Aerts JL, De Micheli D, Thirion X, Pradel V, González M, Viehmann S, Malec M, Saglio G, van Dongen JJ: Standardization and quality control studies of real-time quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia - A Europe Against Cancer Program. *Leukemia*, 17: 2318-2357, 2003.
- 5) Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley

- GL, Vandesompele J, Wittwer CT: The MIQE guidelines: Minimal information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem*, 55: 611-622, 2009.
- 6) Pfaffl MW: A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29: 2002-2007, 2001.
  - 7) Döhner H, Estey E, Grimwade D, Amadori S, Appelbaum FR, Büchner T, Dombret H, Ebert BL, Fenau P, Larson RA, Levine RL, Lo-Coco F, Naoe T, Niederwieser D, Ossenkoppele GJ, Sanz M, Sierra J, Tallman MS, Tien HF, Wei AH, Lowenberg B, Bloomfield CD: Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood*, 129: 424-447, 2017.
  - 8) Sanger F, Nicklen S, Coulson AR: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 74: 5463-5467, 1977.
  - 9) Vossen RHAM, Emmelien A, Roos A, den Dunnen JT: High Resolution Melting Analysis (HRMA) – more than just sequence variant screening. *Hum Mutat*, 30: 860-866, 2009.
  - 10) Pratcorona M, Brunet S, Nomdedéu J, Ribera JM, Tormo M, Duarte R, Escoda L, Guàrdia R, Queipo de Llano MP, Salamero O, Bargay J, Pedro C, Martí JM, Torrebadei M, Díaz-Beyá M, Camós M, Colomer D, Hoyos M, Sierra J, Esteve J: Favorable outcome of patients with acute myeloid leukemia harboring a low-allelic burden FLT3-ITD mutation and concomitant NPM1 mutation: relevance to post-remission therapy. *Blood*, 121: 2734-2738, 2013.
  - 11) Döhner K, Thiede C, Jahn N, Panina E, Gambietz A, Larson RA, Prior TW, Marcucci G, Jones D, Krauter J, Heuser M, Voso MT, Ottone T, Nomdedeu JF, Mandrekar SJ, Klisovic RB, Wei AH, Sierra J, Sanz MA, Brandwein JM, de Witte T, Jansen JH, Niederwieser D, Appelbaum FR, Medeiros BC, Tallman MS, Schlenk RF, Ganser A, Serve H, Ehninger G, Amadori S, Gathmann I, Benner A, Pallaud C, Stone RM, Döhner H, Bloomfield CD: Impact of NPM1/FLT3-ITD genotypes defined by the 2017 European LeukemiaNet in patients with acute myeloid leukemia. *Blood*, 135: 371-380, 2020.
  - 12) Wu DY, Ugozzoli L, Pal BK, Wallace RB: Allele-specific enzymatic amplification of  $\beta$ -globin genomic DNA for diagnosis of sickle cell anemia. *Proc Natl Acad Sci USA*, 86: 2757-2760, 1989.
  - 13) Hindson BJ, Ness KD, Masquelier DA, Belgrader P, Heredia NJ, Makarewicz AJ, Bright IJ, Lucero MY, Hiddessen AL, Legler TC, Kitano TK, Hodel MR, Petersen JF, Wyatt PW, Steenblock ER, Shar PH, Bousse LJ, Troup CB, Mellen JC, Whittmann DK, Erndt NG, Cauley TH, Koehler RT, So AP, Dube S, Rose KA, Montesclaros L, Wang S, Stumbo DP, Hodges SP, Romine S, Milanovich FP, White HE, Regan JF, Karlin-Neumann GA, Hindson CM, Saxonov S, Colston BW: High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number. *Anal Chem*, 83: 8604-8610, 2011.
  - 14) Schraml E, Daxberger H, Watzinger F, Lion T: Quantitative analysis of chimerism after allogeneic stem cell transplantation by PCR amplification of microsatellite markers and capillary electrophoresis with fluorescence detection: the Vienna experience. *Leukemia*, 17: 224-227, 2003.
  - 15) Shuurhuis GJ, Heuser M, Freeman S, Béné MC, Buccisano F, Cloos J, Grimwade D, Haferlach T, Hills RK, Hourigan CS, Jorgensen JL, Kern W, Lacombe F, Maurillo L, Preudhomme C, van der Reijden BA, Thiede C, Venditti A, Vyas P, Wood BL, Walter RB, Döhner K, Roboz GJ, Ossenkoppele GJ: Minimal/measurable residual disease in AML: a consensus document from the European LeukemiaNet MRD Working Party. *Blood*, 131: 1275-1291, 2018.
  - 16) Ommen HB. Monitoring minimal residual disease in acute myeloid leukaemia: a review of the current evolving strategies. *Ther Adv Hematol*, 7: 3-16, 2016.
  - 17) Ivey A, Hills RK, Simpson MA, Jovanovic JV, Gilkes A, Grech A, Patel Y, Bhudia N, Farah H, Mason J, Wall K, Akiki S, Griffiths M, Solomon E, McCaughan F, Linch DC, Gale RE, Vyas P, freeman SD, Russell N, Burnett AK, Grimwade D. Assessment of minimal residual disease in standard risk AML. *N Engl J Med*, 374: 422-433, 2016.
  - 18) Berry DA, Zhou S, Higley H, Mukundan L, Fu S, Reaman GH, Wood BL, Kelloff GJ, Jessup JM, Radich JP: Association of minimal residual disease with clinical outcome in pediatric and adult acute lymphoblastic leukemia: a meta-analysis. *JAMA oncol*, 3: e170580, 2017.
  - 19) Campana D, Pui CH: Minimal residual disease-guided therapy in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 129: 1913-1918, 2017.
  - 20) Dhédin N, Huynh A, Maury S, Tabrizi R, Beldjord K, Asnafi V, Thomas X, Chevallier P, Nguyen S, Coiteux V, Bourhis JH, Hichri Y, Escoffre-Barbe M, Reman O, Graux C, Chalandon Y, Blaise D, Schanz U, Lhéritier V, Cahn JY, Dombret H, Ifrah N: Role of allogeneic stem cell transplantation in adult patients with Ph-negative acute lymphoblastic leukemia. *Blood*,

- 125: 2486-2496, 2015.
- 21) Van Dongen JJ, van der Velden VH, Brüggemann M, Orfao A: Minimal residual disease diagnostics in acute lymphoblastic leukemia: need for sensitive, fast, and standardized technologies. *Blood*, 125: 3996-4009, 2015.
  - 22) Theunissen P, Mejstrikova E, Sedek L, van der Sluijs-Gelling AJ, Gaipa G, Bartels M, da Costa ES, Kotrová M, Novakova M, Sonneveld E, Buracchi C, Bonaccorso P, Oliveira E, Marvelde JG, Szczepanski T, Lhermitte L, Hrusak O, Lecrevisse Q, Grigore GE, Froňková E, Trka J, Brüggemann M, Orfao A, van Dongen JJ, van der Velden VH: Standardized flow cytometry for highly sensitive MRD measurements in B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 129: 347-357, 2017.
  - 23) van der Velden VH, Panzer-Grümayer ER, Cazzaniga G, Flohr T, Sutton R, Schrauder A, Basso G, Schrappe M, Wijkhuijs JM, Konrad M, Bartram CR, Masera G, Biondi A, van Dongen JJ: Optimization of PCR-based minimal residual disease diagnostics for childhood acute lymphoblastic leukemia in a multi-center setting. *Leukemia*, 21: 706-713, 2007.
  - 24) van der Velden VH, Cazzaniga G, Schrauder A, Hancock J, Bader P, Panzer-Grümayer ER, Flohr T, Sutton R, Cave H, Madsen HO, Cayuela JM, Trka J, Eckert C, Oroni L, zur Stadt U, Beldjord K, Raff T, van der Schoot CE, van Dongen JJ: Analysis of minimal residual disease by Ig/TCR gene rearrangements: guidelines for interpretation of real-time quantitative PCR data. *Leukemia*, 21: 604-611, 2007.
  - 25) Flores-Montero J, Sanoja-Flores L, Paiva B, Puig N, García-Sánchez O, Böttcher S, van der Velden VH, Pérez-Morán JJ, Vidriales MB, García-Sanz R, Jimenez C, González M, Martínez-López J, Corral-Mateos A, Grigore GE, Fluxá R, Pontes R, Caetano J, Sedek L, Cañizo MCD, Bladé A, García-Mateo A, Labrador J, Leoz P, Aguilera-Sanz C, San-Miguel J, Mateos MV, Durie B, van Dongen JJ, Orfao A: Next generation flow for highly sensitive and standardized detection of minimal residual disease in multiple myeloma. *Leukemia*, 31: 2094-2103, 2017.