



Minimal residual disease detected by droplet digital PCR in peripheral blood stem cell grafts has a prognostic impact on high-risk neuroblastoma patients

二野, 菜々子

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2023-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第8592号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/0100482340>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



(課程博士関係)

学 位 論 文 の 内 容 要 旨

Minimal residual disease detected by droplet digital PCR
in peripheral blood stem cell grafts has a prognostic impact
on high-risk neuroblastoma patients

デジタル PCR で検出した末梢血幹細胞移植片の微小残存病変は
高リスク神経芽細胞腫患者の予後と関連する

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻

小 児 科 学

(指導教員： 野 津 寛 大 教授)

二 野 菜 々 子

【背景】

神経芽細胞腫(NB)は、小児で最も一般的な固形腫瘍の一つで、神経堤由来の交感神経副腎前駆細胞に由来し、自然退縮から悪性進行に至るまで極端な不均一性を示す。新たに診断された NB 患者の約半数は、高リスクに分類され、NB 患者は小児がん関連死亡の約 15%を占める。高リスク NB 患者は、導入療法、末梢血造血幹細胞(PBSC)移植併用大量化学療法、手術、放射線療法、免疫療法からなる標準レジメによって治療される。高リスクの NB 患者の 20%は、寛解導入療法に反応せず不応性または進行性の経過をとる。残りの患者は通常寛解導入療法中に寛解を達成するが、高リスク NB 患者の半数以上が再発し、長期生存率は約 50%でしかない。再発した NB 患者の長期生存率は 10%未満という悲惨な結果である。NB の再発は、治療後に残っている微小残病変(MRD)の再活性化によって起こると考えられている。現在、リアルタイム PCR(qPCR)やデジタル PCR(ddPCR)を用いて複数の神経芽腫関連 mRNA(NB-mRNAs)を定量する多くの MRD 解析系が報告されており、骨髓(BM)サンプルにおいては有意に予後と相関することが示されている。末梢血(PB)や末梢血造血幹細胞(PBSC)における MRD の意義はまだ不明である。高リスク NB 患者では、BM では腫瘍細胞が陽性であっても、PB では全くないか少ないため、BM 移植片よりも PBSC 移植片の方が腫瘍細胞の混入リスクが低いと考えられており、現在の高リスク NB 患者の大量化学療法後の自家移植では PBSC 移植片が用いられている。しかし、腫瘍細胞で汚染された PBSC 移植片の輸注が再発を引き起こし、高リスク NB 患者の転機に影響を与えるかどうかは相反する報告があり、明らかになっていない。

【目的】

高リスク NB 患者におけるデジタル PCR を用いた PBSC-MRD の臨床的意義を明らかにすること。

【患者と方法】

対象：高リスク NB 患者 20 名(COG リスク分類または INRG 病期分類で診断)

患者は、日本小児がん研究グループ神経芽腫委員会(JNBSG)の高リスク NB プロトコール(JN-H-07、JN-H-11、JN-H-15)に基づいて治療された。

期間：2011 年 6 月から 2018 年 1 月(観察期間 120 か月)

参加施設：兵庫県立こども病院、神戸大学医学部附属病院

PBSC 検体：20 検体(再発/再増大なし 9 検体/あり 11 検体)(3 or 4 回目の導入療法後に採取)

本研究は、書面でインフォームドコンセントを取得し、神戸大学大学院医学研究科と兵庫県立こども病院の倫理委員会で承認された。

解析方法：7NB-mRNAs ddPCR Assay (CRMP1、DBH、DDC、GAP43、ISL1、PHOX2B、TH mRNAs)

RNA の分離と cDNA の合成：TRIzol と RNA 精製キット(Life Technologies, Carlsbad, CA)を使用して PBSC サンプルから全 RNA を抽出した。Quantitect 逆転写キット(Qiagen, Valencia, CA, USA)を使用して 1 µg or 0.5 µg の全 RNA から cDNA を合成し使用するまでサンプルはすべて-80 度で保存した。7NB-mRNAs(CRMP1、DBH、DDC、GAP43、ISL1、PHOX2B、TH mRNAs)および参照遺伝子 mRNA(HPRT1)の発現量は、QX200 ddPCR システム (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) を用いて

計測した。ddPCR 分析は、デジタル MIQE ガイドラインに従って実施した。7NB-mRNA のレベル(結合シグネチャ)は、7つの相対コピー数(各 NB-mRNA のレベル)の加重合計として定義した。非 NB コントロール PB サンプルの 90 パーセンタイルの逆数を、各 NB-mRNA の重み付けに使用した。

統計分析：2つのサンプル母集団間の 7NB-mRNAs のレベルの違いは、マンホイットニーの U 検定で評価し、7NB-mRNAs のレベルと再発との関連は、ROC 分析で評価した。曲線下面積 (AUC) は、「低精度」0.50~0.69、「中精度」0.70~0.89、「高精度」0.90~1.00 と解釈した。EFS(診断日から再発/再増大まで)と OS(診断日から死亡日まで)は Kaplan-Meier 法と Log-rank 検定で評価した。P<0.05 を統計的に有意とした。

【結果】

本研究の高リスク NB 患者 20 名は、高リスク NB の典型的な特徴を持っていた。

50%が MYCN 増幅腫瘍で、95%が診断時に骨髄転移あり、80%が副腎腫瘍であった。観察期間の中央値は 47.5 か月(範囲：16-116 か月)であった。先行研究と一致して、PBSC 移植片の各 NB-mRNA のレベルは 45-75%(9-15/20)で、7NB-mRNAs のレベルは 100%(20/20)で検出され、個々の患者で大きく異なっていた。PBSC 移植片中の 7NB-mRNAs のレベルは、診断時の BM や PB サンプルほど高くはなかったが、11名の再発患者から採取された PBSC 移植片では、非再発患者から採取された PBSC 移植片よりも有意に高かった。7NB-mRNAs のレベルと再発について ROC 曲線をプロットすると、AUC は 0.768(>0.7、有意な精度)であり、PBSC 移植片中の 7NB-mRNAs のレベルが高いほど再発すると予測できた。次に、20名の高リスク NB 患者のコホート全体で Kaplan-Meier 曲線による生存分析を行い、3年の EFS と OS を推定すると、3年の EFS は 45.0% (95% CI:23.1-64.7%)、OS は 69.3% (95% CI:44.0-84.9%)であった。ROC 曲線から導出した 7NB-mRNAs のカットオフ値(7NB-mRNAs=3.5)に基づいて、PBSC 移植片の 7NB-mRNAs のレベルカットオフを設定すると、MRD が高い患者(7NB-mRNAs \geq 3.5, n=9) vs MRD が低い患者(7NB-mRNAs<3.5, n=11)の3年の EFS と OS は、11.1% (95% CI: 0.6-38.8%)と 55.6% (95% CI: 20.4-80.5%) vs 72.7% (95% CI: 37.1-90.3%)と 81.8% (95% CI: 44.7-95.1%) (EFS:p=0.0148、OS:p=0.18) となり、PBSC-MRD と EFS が有意に相関した。

【考察】

本研究では、PBSC 移植片 20 検体を用いて、ddPCR ベースの PBSC-MRD モニタリングを実施した。高リスク NB 患者では、PBSC-MRD と EFS が有意に相関し、PBSC-MRD が高いほど EFS が不良であることを明らかにした。我々が知る限り、本研究は高リスク NB 患者における ddPCR ベースの PBSC-MRD の予後予測能を実証した最初の研究である。

高リスク NB 患者の PBSC 検体における MRD の臨床的意義については、多くの報告がある。いずれの報告も qPCR 法で複数マーカーを用いた解析を行っており、PBSC 検体における MRD が患者アウトカムと相関するという報告と相関しないという報告の両方が示されている。

興味深いことに、同一の研究グループからの同じコホートを用いた最近の報告では、一般的に使用されるアドレナリン作動型の 5 マーカー (ADRN) NB-mRNA (CHRNA3、DBH、DDC、PHOX2B、または

TH mRNA) を用いて qPCR で検出した PBSC-MRD は患者アウトカムと関連しなかったが、新たに同定した間葉型マーカー (MES) NB-mRNA (POSTN または PRRX1mRNA) を用いて PBSC-MRD を検出すると、PBSC-MRD は患者のイベントフリー生存率 (EFS) および全生存期間 (OS) と有意に相関した。高リスク NB 患者における PBSC-MRD モニタリングに最適なマーカーおよび PCR 方法を決定するには、より大きなコホートを使用した検証が必要である。

【結論】

ddPCR を用いて高リスク NB 患者の PBSC 20 検体における 7NB-mRNAs-MRD を評価すると、PBSC-MRD と EFS は有意に相関した。

論文審査の結果の要旨			
受 付 番 号	甲 第 3257 号	氏 名	二野 菜々子
論 文 題 目 Title of Dissertation	デジタル PCR で検出した末梢血幹細胞移植片の微小残存病変は高リスク神経芽細胞腫患者の予後と関連する Minimal residual disease detected by droplet digital PCR in peripheral blood stem cell grafts has a prognostic impact on high-risk neuroblastoma patients		
審 査 委 員 Examiner	<div> <div>主 査 Chief Examiner</div> <div>副 査 Vice-examiner</div> <div>副 査 Vice-examiner</div> </div> <div> 南 博信 尾藤 祐子 松岡 広 </div>		

(要旨は1, 000字～2, 000字程度)

【背景・目的】

神経芽細胞腫(NB)の約半数は高リスクで、導入療法、末梢血造血幹細胞(PBSC)移植併用大量化学療法を含む集学的治療が行われる。高リスク患者は寛解を達成しても半数以上が再発し、その長期生存割合は 10%未満である。再発は微小残病変(MRD)が原因と考えられ、リアルタイム PCR(qPCR)やデジタル PCR (ddPCR)を用いて NB 関連 mRNA(NB-mRNAs)で解析した骨髓(BM)の MRD は予後と関連するが、末梢血(PB)や末梢血造血幹細胞(PBSC)の MRD の意義は不明である。高リスク NB 患者では BM に腫瘍細胞が残存していても PB には認めないことも多いため、高リスク NB 患者の大量化学療法併用自家移植では造血幹細胞のソースとして BM よりも PBSC が用いられる。しかし、PBSC 中の MRD と再発の関連解析には様々な方法が用いられ、相反する結果も報告されている。本研究では、ddPCR を用いて高リスク NB 患者の PBSC 中の MRD を測定し臨床的意義を評価した。

【対象と方法】

日本小児がん研究グループ神経芽腫委員会(JNBSG)の高リスク NB プロトコール(JN-H-07、JN-H-11、JN-H-15)で治療された高リスク NB 患者 20 名の導入療法後に採取した PBSC (再発/再増大なし 9 検体、あり 11 検体)から、全 RNA を抽出し cDNA を作成し、7NB-mRNAs (CRMP1、DBH、DDC、GAP43、ISL1、PHOX2B、TH mRNAs)および参照遺伝子 mRNA (HPRT1)の発現量を QX200 ddPCR でデジタル MIQE ガイドラインに従って分析した。

7NB-mRNA のレベルは、7つの各 NB-mRNA レベルの加重合計とし、非 NB コントロール PB の 90 パーセントイルの逆数を各 NB-mRNA の重み付けに使用した。母集団間の 7NB-mRNAs の差はマンホイットニーの U 検定で、7NB-mRNAs レベルと再発との関連は ROC 分析の曲線下面積 (AUC) で評価した。無イベント生存期間 (EFS、診断日から再発/再増大まで)と全生存期間 (OS、診断日から死亡日まで)はカプランマイヤー法とログランク検定で評価した。P<0.05 を統計的に有意とした。

【結果】

PBSC の各 NB-mRNA のレベルは 45-75% (9-15/20)で変動が大きかったが、7NB-mRNAs は 100% で検出された。11 名の再発患者の PBSC 中 7NB-mRNAs のレベルは非再発患者の PBSC よりも有意に高く、7NB-mRNAs のレベルが高いほど再発と相関した。7NB-mRNAs のレベルと再発の ROC 曲線の AUC は 0.768 であり、20 名の高リスク NB 患者全体での 3 年 EFS は 45.0% (95% CI: 23.1-64.7%)、OS は 69.3% (95% CI: 44.0-84.9%)であった。

ROC 曲線から設定した 7NB-mRNAs のカットオフ値(3.5)で 2 群に分けると、高値群(n=9) vs 低値群(n=11)の 3 年の EFS は 11.1% (95% CI: 0.6-38.8%) vs 72.7% (95% CI: 37.1-90.3%)で有意 (p=0.0148)に差があったが、3 年 OS は 55.6% (95% CI: 20.4-80.5%) vs 81.8% (95% CI: 44.7-95.1%)で差は有意でなかった (p=0.18)。

【考察】

本研究は高リスク NB 患者の PBSC を用いて、ddPCR で検出した MRD が EFS と有意に相関することを初めて示した。過去の研究では、PBSC における MRD と患者アウトカムの相関に関する結果は一定していない。最近の報告で、一般的に使用されるアドレナリン作動型の 5 マーカー (ADRN) NB-mRNA (CHRNA3、DBH、DDC、PHOX2B、または TH mRNA) を qPCR で検出した PBSC-MRD は患者アウトカムと相関しなかったが、同一研究グループの同一コホートを用いた解析では新たに同定した間葉型マーカー (MES) NB-mRNA (POSTN または PRRX1 mRNA) で PBSC-MRD を検出すると相関していた。高リスク NB 患者における PBSC-MRD モニタリングに最適なマーカーおよび PCR 方法を決定するには、さらなる検証が必要である。

【結論】

本研究は高感度の ddPCR で評価した高リスク NB 患者の PBSC における 7NB-mRNAs-MRD と EFS が有意に相関することを示した。別コホートなどで Validation は必要なものの、PBSC による大量化学療法併用自家移植を受ける患者の予後予測因子として臨床で使用する可能性を秘めたもので、重要な貢献をした価値ある研究であると認める。よって、本研究者は、博士 (医学) の学位を得る資格があると認める