



## Differential expression of minimal residual disease markers in peripheral blood and bone marrow samples from high-risk neuroblastoma patients

Yamamoto, Nobuyuki

---

(Degree)

博士（医学）

(Date of Degree)

2015-09-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第6517号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1006517>

※ 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。



## 学位論文の内容要旨

### Differential expression of minimal residual disease markers in peripheral blood and bone marrow samples from high-risk neuroblastoma patients

高リスク神経芽腫患者の末梢血と骨髄における  
微小残存病変マーカー発現の差異

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: 飯島 一誠 教授)

山本 賀之

#### 研究背景

神経芽腫は小児がん死亡の 15%を占める難治性固形がんで、高リスク群では半数以上の症例で再発を来し、その長期生存率は 40%に満たない。再発は、化学療法に抵抗性の微小残存病変(Minimal Residual Disease: MRD)の再活性化によって惹起されると考えられており、神経芽腫の病勢把握、治療効果判定には、MRD の正確な検出が必須である。これまでに定量的リアルタイム PCR を用いた多くの MRD 検出法が報告されているが、用いているマーカー自分が異なっており、臨床応用には至っていない。我々は先行研究として、これまでに報告された 11 の MRD マーカーを用いた MRD 検出法を報告した。

神経芽腫患者では、骨髄および末梢血検体における MRD の検出が報告されているが、それらが検出している細胞集団の特性についてはよくわかっていない。そこで本研究では、高リスク群神経芽腫患者より同時に採取した骨髄と末梢血検体における MRD マーカーの発現について検討を行った。

#### 対象と方法

2011 年 11 月から 2014 年 4 月までに神戸大学医学部附属病院小児科及び兵庫県立こども病院血液腫瘍内科で治療を行った高リスク群神経芽腫患者から、骨髄と末梢血検体を同日に採取し、MRD の解析を行った。検体の採取及び解析に当たり、保護者から書面で同意を得た。また、本研究は神戸大学大学院医学研究科倫理委員会の承認を得、同研究科臨床研究ガイドラインに沿って行った。

得られた検体から Total RNA を抽出し、1 $\mu$ g もしくは 0.5 $\mu$ g を錆型として RT-PCR 法により cDNA を作成した。得られた cDNA は希釈し、1 $\mu$ lあたり錆型 RNA 12.5ng から得られた cDNA を含むように調製した。調製した cDNA 検体 1 $\mu$ l を用いて、定量的リアルタイム PCR 法を施行し、11 の MRD マーカー(CHRNA3, CRMP1, DBH, DCX, DDC, GABRB3, GAP43, ISL1, KIF1A, PHOX2B, TH)の発現量解析を行った。 $\beta$ 2-ミクログロブリンを内因性コントロールとして、正常値を超えた場合を陽性とし、1 つ以上陽性となった場合を MRD(+)と定義した。

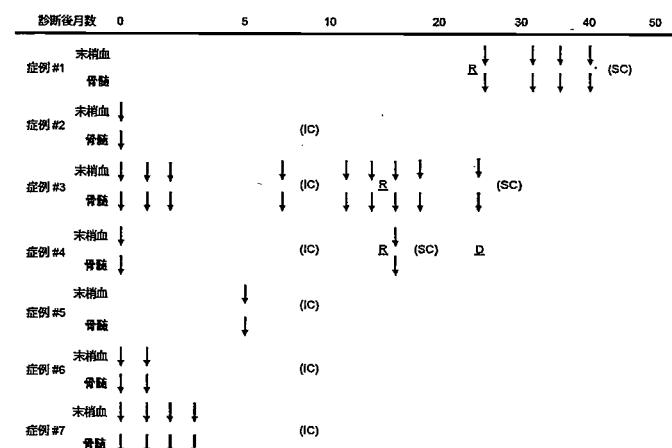
末梢血と骨髄において陽性となった MRD マーカー数の差を、 $\chi^2$  二乗検定を用いて統計学的に検討した。末梢血と骨髄における MRD マーカーの相関についてはスピアマンの順位相関係数を用いて検討した。検定には EZR を使用し、 $p < 0.05$  を有意差ありとした。

## 結果

対象期間の間に7例の高リスク神経芽腫患者から、23組の同日採取した末梢血及び骨髄検体を得た。患者背景についてTable1に、また検体採取のタイミングについてはFigure1に示す。2例は寛解導入療法終了後には採取しておらず、1例は再発後ののみの採取であった。すべての症例で日本神経芽腫治療研究会(Japan Neuroblastoma Study Group: JNBSG)の治療プロトコルに則って、症例No.1, No.3, No.4は再発し救援化学療法を施行した。経過観察期間の中央値は24か月であった。

症例	年齢	性別	原発部位	INSS ステージ	MYCN 増幅	フォロー 期間	転帰
#1	3歳	男	副腎	4	増幅なし	25-49ヶ月	再発後 生存
#2	4歳	男	副腎	3	増幅なし	0-29ヶ月	無再発 生存
#3	2歳	男	副腎	4	増幅あり	0-24ヶ月	再発後 生存
#4	3歳	女	副腎	4	増幅あり	0-24ヶ月	再発後 死亡
#5	5歳	男	後腹膜	4	増幅なし	0-17ヶ月	無再発 生存
#6	11ヶ月	男	副腎	4	増幅あり	0-9ヶ月	無再発 生存
#7	14ヶ月	男	副腎	4	増幅あり	0-7ヶ月	無再発 生存

Table 1 患者背景



(PB:末梢血、BM:骨髄、IC:寛解導入療法、R:再発、D:死亡、SC:救援化学療法)

Figure 1 末梢血・骨髄検体の採取時期

本研究で解析を行った11のMRDマーカーのうち、骨髄検体で陽性となったマーカーの個数と、末梢血検体で陽性となったマーカーの個数は一致しなかった。13例で骨髄検体での陽性数が多く、5例で末梢血検体での陽性数が多かった。骨髄と末梢血のMRD陽性検体数に有意差は認めなかった( $p=1.00$ )。

末梢血と骨髄検体でマーカーごとに陽性となった検体数をTable 4に示す。末梢血検体ではCRMP1とKIF1Aが感度の高いマーカーであったが、骨髄検体ではPHOX2BとDBHが感度の高いマーカーとなった。骨髄と末梢血間でマーカーの感度に有意な相関は認めなかった(Figure2,  $r=0.250$ ,  $p=0.459$ )。

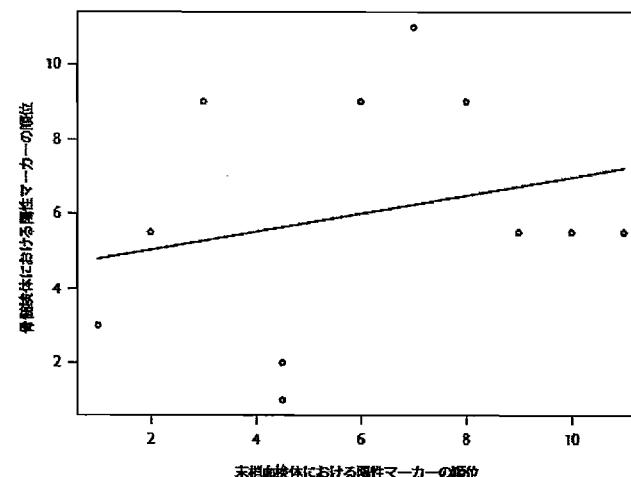


Figure 2 末梢血と骨髄検体におけるMRDマーカーの感度の相関  
感度の高い順に1-11まで順位付けをして示す。

検体組番号	陽性となったマーカーの数		MRDマーカー	末梢血検体	骨髄検体
	末梢血検体	骨髄検体			
1	1	3	CHRNA3	(+)	1
2	2	10		(-)	20
3	0	9	CRMP1	(+)	9
4	0	0		(-)	14
5	1	11	DBH	(+)	12
6	1	1		(-)	20
7	1	0	DCX	(+)	8
8	0	0		(-)	15
9	1	0	DDC	(+)	9
10	0	1		(-)	14
11	1	0	GABRB3	(+)	2
12	2	11		(-)	5
13	6	11	GAP43	(+)	18
14	2	11		(-)	15
15	1	1	ISL1	(+)	2
16	10	11		(-)	19
17	0	1	KIF1A	(+)	8
18	0	1		(-)	15
19	2	1	KIF1A	(+)	6
20	0	10		(-)	9
21	1	7	PHOX2B	(+)	17
22	1	0		(-)	14
23	0	0	TH	(+)	3
				(-)	13
				(+)	10
				(-)	20
				(+)	1
				(-)	22
				(+)	9
				(-)	14

Table 2 各検体で陽性となったマーカーの個数

Table 4 各 MRD マーカー陽性の検体数

## 考察

高リスク群の神経芽腫患者の治療成績向上のためには、MRD モニタリングによる病勢把握と治療効果判定が不可欠である。腫瘍が進行すると原発巣から腫瘍細胞が播種すると考えられてきたが、近年、明らかな原発巣を形成する以前から末梢血中を循環するもしくは骨髄中に浸潤する腫瘍細胞の存在が報告されている。神経芽腫患者の骨髄および末梢血検体における MRD の検出では、これらの腫瘍細胞の存在をみているのだと考えられる。

本研究では 7 人の高リスク神経芽腫患者から採取した 23 組の末梢血及び骨髄検体を用いて、11 の MRD マーカーの発現解析を行った。2 群間で MRD は陽性となった検体数に有意差はない、また MRD の感度に相関は認めなかった。

神経芽腫での MRD マーカーの発現に多様性があることから、その影響を最小限とするため、本研究では末梢血及び骨髄検体の採取を同時に施行した。そのような状況下でも MRD マーカーの感度は末梢血と骨髄で明らかに異なり、末梢血では KIF1A と DCX が、骨髄では PHOX2B と DBH が感度のよいマーカーとなった。DBH はこれまでに末梢血での MRD マーカーとして挙げられたことがあるが、今回の研究では骨髄検体における感度のよい MRD マーカーとなつた。

末梢血中を循環する腫瘍細胞(Circulating tumor cells : CTCs)と骨髄中に存在する腫瘍細胞(Disseminating tumor cells: DTCs)が MRD の本態を成すものと考えられ、その不一致は CTCs と DTCs の多様性を示すものと考えられる。未だ神経芽腫において CTCs を正確に単離する術は確立していないが、今回の研究により、末梢血及び骨髄検体における MRD 検出において、使用するマーカーの選択により注意を払う必要があることが明らかになった。

今回我々はこれまで報告された 11 のマーカーを用いて、高リスク神経芽腫から得た末梢血及び骨髄検体の解析を行った。両者においてマーカーの発現に有意な相関は無く、感度の高いマーカーは異なっていた。神経芽腫検体におけるより感度の高い MRD 検出系の確立のためには、新たな MRD マーカーの検索が必要であると考えられた。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第 2542 号	氏名	山本 暁之
論文題目 Title of Dissertation	高リスク神経芽腫患者の末梢血と骨髄における微小残存病変マーカー発現の差異 Differential expression of minimal residual disease markers in peripheral blood and bone marrow samples from high-risk neuroblastoma patients		
審査委員 Examiner	主査 <u>南博信</u> Chief Examiner 副査 <u>松下政志</u> Vice-examiner 副査 <u>平井みどり</u> Vice-examiner		

(要旨は1,000字~2,000字程度)

神経芽腫の再発は、化学療法に抵抗性の微小残存病変(Minimal Residual Disease: MRD)によると考えられ、MRD の正確な検出が臨床上重要である。これまでに多くの MRD 検出法が報告されているが、用いるマーカーが異なっており確立したものはない。神経芽腫患者では、骨髄および末梢血で MRD が検出されるが、その意義の差異は検討されていない。本研究では、高リスク群神経芽腫患者より同時に採取した骨髄と末梢血検体で MRD マーカーの発現の違いを検討した。

#### 【方法】

高リスク神経芽腫患者から骨髄と末梢血を同日に採取し MRD を解析した。抽出した RNA から作成した cDNA を用いて定量的リアルタイム PCR 法を施行し、11 の MRD マーカー(CHRNA3, CRMP1, DBH, DCX, DDC, GABRB3, GAP43, ISL1, KIF1A, PHOX2B, TH)の発現量を解析した。 $\beta$ 2-ミクログロブリンを内因性コントロールとして正常値を超えた検体を陽性とし、1 つ以上の検体で陽性となった場合を MRD 陽性と定義した。末梢血と骨髄で陽性となった MRD マーカー数を比較し相関を検討した。

#### 【結果】

日本神経芽腫治療研究会のプロトコルで治療を行った 7 例の高リスク神経芽腫患者から 23 組の末梢血・骨髄の検体を得た。11 の MRD マーカーのうち、骨髄検体で陽性となったマーカー数と末梢血検体で陽性となったマーカー数は一致しなかった。13 検体で骨髄での陽性数が多く、5 検体で末梢血での陽性数が多かった。骨髄と末梢血の MRD 陽性検体数に差はなかった( $p=1.00$ )。

マーカーごとに末梢血と骨髄検体で陽性数を検討した。末梢血検体では CRMP1 と KIF1A が感度の高いマーカーであったが、骨髄検体では PHOX2B と DBH の感度が高かった。骨髄と末梢血間で陽性となったマーカーに有意な相関は認めなかった( $r=0.250$ ,  $p=0.459$ )。

#### 【考察】

高リスク群の神経芽腫患者の治療成績を向上させるためには、MRD モニタリングによる病勢把握と治療効果判定が不可欠である。腫瘍が進行すると原発巣から腫瘍細胞が播種すると考えられてきたが、近年、明らかな原発巣を形成する前から末梢血中に Circulating tumor cells (CTCs) と骨髄中に Disseminating tumor cells (DTCs) が存在すると報告された。神経芽腫患者の骨髄および末梢血中の MRD は、これらの腫瘍細胞を検出していると考えられる。

本研究では同日に採取した末梢血と骨髄で MRD マーカーの発現を解析したが、両者で差を認めた。末梢血では KIF1A と CRMP1 が、骨髄では PHOX2B と DBH が感度の高いマーカーであった。しかし、MRD が陽性となった検体数に差を認めず、相関もなかった。これは CTCs と DTCs は特徴の異なる細胞であることを示唆する。

今回の研究により、末梢血及び骨髄検体における MRD の検出に際しては、使用するマーカーに一層の注意を払う必要があることが明らかになった。

#### 【結語】

本研究は高リスク神経芽腫患者の MRD マーカーを末梢血及び骨髄検体で同時に解析したもので、一定の知見を得た。今後、MRD マーカーを確立するために有用な情報を提供する業績であると認める。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。