

【総説】

イヌのリンパ腫における微小残存病変 (MRD)

山崎 淳平¹⁾

1) 北海道大学大学院獣医学研究科 臨床分子生物学教室
(前・東京大学大学院農学生命科学研究科 獣医内科学教室)
(〒060-0818 北海道札幌市北区北18条西9丁目)

はじめに

現在の獣医臨床において、イヌのリンパ腫症例の大部分は近年の多剤併用化学療法の重点的な検討および発展により、臨床的寛解に達することができるようになり、その治療成績は比較的良好と言える。ところが、イヌのリンパ腫診療をする上で最大の問題は、寛解に達した症例がその後の再発を免れることができず、最終的には死に至るという事実である。現在までの約30年間、主にイヌのリンパ腫治療成績の向上を目的として、新規薬剤および化学療法プロトコルの検討を中心とする臨床研究が行われてきた。しかし、現在において最も優れたプロトコルの一つとして世界中で使用されている Wisconsin 大学で提案された多剤併用化学療法 (UW-25プロトコル)^[1]をもってしても、10年前の研究と比べ生存期間の中央値が1~2カ月程度長くなっているに過ぎない。したがって、これまでに行われてきたような化学療法プロトコルの改変および生存 (寛解) 期間の評価に依存するような研究だけではイヌのリンパ腫治療成績を大幅に向上させることはできないと考えるのが一般的な見方である。

このような背景から、現在のイヌのリンパ腫治療に対す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観点から研究を進めることが必要である。そこで注目したのが、再発の源となり、現在の一般的な診断技術においては検出できない残存した腫瘍細胞による微小残存病変 (Minimal Residual Disease: MRD) の概念である。この MRD を分子生物学的に詳細に解析することによって、これまで明らかではなかったイヌのリンパ腫における腫瘍細胞の動態が正確

に解明できると考えた。さらに、この MRD 解析研究により、再発の早期指標の提示や治療有効性の客観的評価が可能となり、イヌのリンパ腫治療成績そのものを向上させ得ると考えられる。本稿では、MRD の理論および概念、またこれまでに検討したイヌのリンパ腫において臨床的に有用であると考えられる部分の解説、そして今後の MRD 研究の方向性とその発展性について紹介する。

1. MRD の理論および概念

MRD とは、主に腫瘍に対する抗がん治療 (主に化学療法) 後の寛解時において、一般的な検査方法 (身体検査、血液検査、顕微鏡検査など) では検出することのできない残存した腫瘍細胞のことを指し、その後の再発という観点からすれば、腫瘍再形成の源となると考えられる残存腫瘍細胞集団のことを指す。よって、臨床上的イメージとしての MRD とは、臨床的な寛解状態においてわずかながら残存する (と考えられる) 腫瘍細胞のことである (図1の濃い背景部)。診療の過程を追いながら説明すると、初診時に多量に存在する腫瘍細胞は、寛解導入によってその数を減らした結果、臨床的には感知できない量にまで達し、その状態は臨床的寛解とみなされる。ところが寛解導入終了後しばらくすると (その時期的な差は症例によって異なるが) 腫瘍細胞数は増加に転じ、一般的検査においても感知可能なレベル (図1の白矢印) にまで到達した時点において臨床的に再発の診断がなされる。このような経過をたどるのがイヌのリンパ腫症例の一般的な例であるが、実は表面的な腫瘍の動態を見ているにすぎない。これらの経過のうち、破線矢印は寛解導入が不十分な症例 (例えば一時的な寛解導入状態) における残存腫瘍細胞数の推移のイメージを、また、

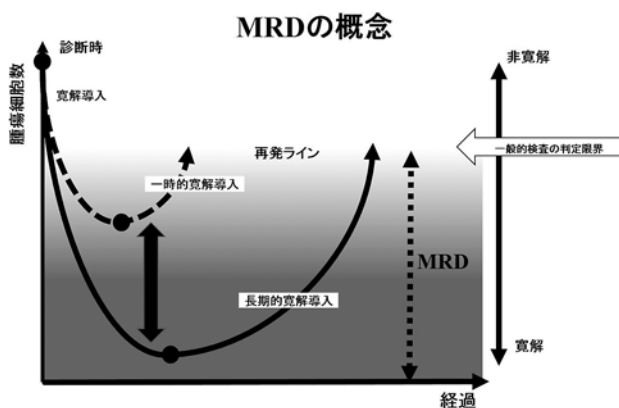


図1：微小残存病変（MRD）の概念

MRDとは臨床的な寛解状態における残存した腫瘍細胞のことを指す。破線矢印は寛解導入が不十分な症例における腫瘍細胞数の推移のイメージを、また、実線矢印は寛解導入が十分に行われた症例における腫瘍細胞数の推移を表している。

実線矢印は寛解導入が十分に行われた症例（長期寛解導入プロトコルなどで治療中）における残存腫瘍細胞数の推移のイメージを表している。いずれの場合も初回寛解導入後は临床上、表面的には寛解状態に達することができているため、症例間で違いを認めることはなく、再発するまでの間、病状の推察は一般的検査においては不可能である。ところが、理論的、概念的には寛解導入の深さによる違い（＝残存腫瘍細胞数の違い）が存在するはずであり、この違いの提示を可能とするものがMRDの検出・定量である。この例では、一時的寛解導入によって得られた最下点と長期的寛解導入によって得られた最下点の腫瘍細胞残存数における深度の違いを検出・定量することによって可視化することこそがMRDの本質的な理論である。この違いが実際に提示可能であれば、これまでまさにブラックボックスであったリンパ腫細胞の化学療法後の動態が正確に把握できることになり、既存または新規化学療法の有効性の客観的な比較および評価を行うことを通して、地固め療法の必要性の示唆、再発までの期間の予測、臨床的再発よりも早期に認められる分子生物学的再発を検出して、それに基づく早期のレスキュー療法を開始するなどに応用可能であると考えたため、イヌのリンパ腫の研究を開始した。

2. MRD 定量システムの確立

MRDの理論およびその可能性は上述の通りであるが、当然のことながら最大の問題はその検出・解析系の開発・確立である。先にあげたような理想的な臨床応用例を実現するためには、MRDを高感度で、なおかつ特異的に検出することが必要であるが、イヌのリンパ腫にお

る特異的な遺伝子変異や特異的抗原は未だ同定されていない。そこで、現在リンパ腫のクローナリティ検出に用いられている遺伝子再構成のメカニズム^[2]をもう一歩さらに応用することでイヌのリンパ腫におけるMRDの定量を実現化した。

リンパ球細胞における抗原レセプター遺伝子（B細胞では免疫グロブリン遺伝子、T細胞ではT細胞受容体遺伝子）は、多様に存在する抗原に対してそれぞれ特異的な結合をすることが必要である。これを可能にするものが遺伝子再構成と呼ばれる、生物学的に非常に洗練された免疫メカニズムである。つまり、この抗原レセプター遺伝子による抗原特異的結合のもととなる塩基配列は、個々のリンパ球に特異的であり、リンパ球由来腫瘍細胞であるリンパ腫の場合においては、リンパ腫細胞が遺伝子再構成を起こしてさえいれば、その塩基配列が個々のリンパ腫症例（細胞）特異的のマーカースとして利用可能であるはずである。この塩基配列を分子生物学的に解析し、応用することにより、本来であれば検出不可能であるような微量な腫瘍細胞を検出・定量が可能になる。

具体的には、リンパ腫診断時に採取した腫瘍細胞生検標本（リンパ節のFNAなど）からDNAを抽出し、遺伝子再構成を検出するPCRを行い、このPCR産物をさらに塩基配列解析することによって、個々の症例のリンパ腫細胞に特異的な配列を得る。次に、この塩基配列のうち最も特異性が高いとされるComplementarity Determining Region3（CDR3）の配列をターゲットにすることによって、個々の症例のリンパ腫細胞特異的PCRプライマーとプローブを設計する。最後に、これらを用いてMRD定量を行いたい時期、特に寛解時における末梢血液をサンプルとして用いて、末梢血液中に存在すると考えられるMRDを定量的PCRによって特異的に検出・定量する（図2）。

まずこの理論を実証するために、既に樹立されたリンパ腫細胞株を用いて、本定量システムの特異性および感度に関して検討を行った。

このリンパ腫細胞株を用いた検討によって、

① 遺伝子再構成の検出に用いるPCRから得られる塩基配列の一部を定量PCRプライマー・プローブの設計に用いることにより、混在する大多数のリンパ球ではなく、腫瘍細胞由来のPCR産物が特異的に検出可能であったこと

② 実際の症例サンプルを想定し、健常犬の末梢血と使用したリンパ腫細胞株を既知の細胞数（割合）で混ぜ、さらに階段希釈を行い本法による感度と定量性を確認し

MRD検出における遺伝子再構成の応用

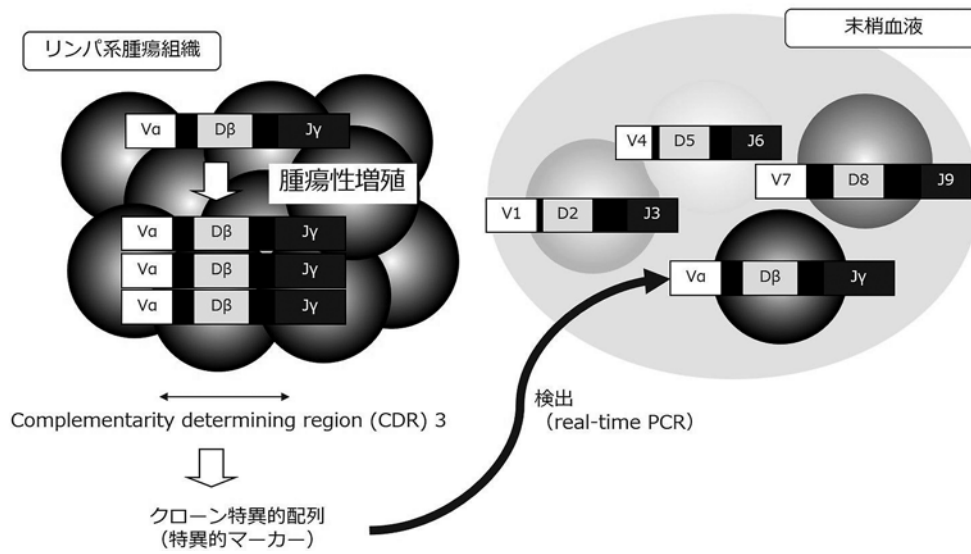


図 2：遺伝子再構成の MRD 定量への応用

腫瘍組織より採取したリンパ腫細胞集団サンプルより遺伝子再構成の原理を応用し、症例特異的な腫瘍細胞の塩基配列を同定、それを利用しリアルタイム PCR により末梢血中に存在する MRD を検出・定量する。

たところ、10,000個の末梢血単核球（リンパ系細胞および単球）の中から目的とする腫瘍細胞1個さえも特異的に検出し、またわずかな誤差で定量することが可能であった[3]。

遺伝子再構成の検出を報告した先行論文[2]においても感度についての検討がなされ、結果として1/100程度であったとされているが、当然のことながら本 MRD 定量システムの方がより高感度であり、なおかつゲル電気泳動上におけるバンドの確認といった定性的なものでなく、リアルタイム PCR を用いた定量的であることも重要な点としてあげられる。

3. MRD 定量システムの臨床への応用

確立したイヌの MRD 定量システムの有用性について、これまでに検討した臨床上有用であると思われるポイントについて以下述べる。

1) 病状の評価因子

実際のイヌのリンパ腫症例における末梢血液中 MRD の測定を行い、MRD レベルとリンパ腫の進行程度との関連を検討した[3]。化学療法によりリンパ節の腫大と縮小の経過が明らかであった症例（図 3 上段）についてそのリンパ節サイズ（破線）と MRD レベル（実線）との関連を検討したところ、リンパ節の腫大・縮小とともに MRD レベルも平行して増加・減少を示した。また臨床的に寛解が導入された症例（図 3 下段）における MRD

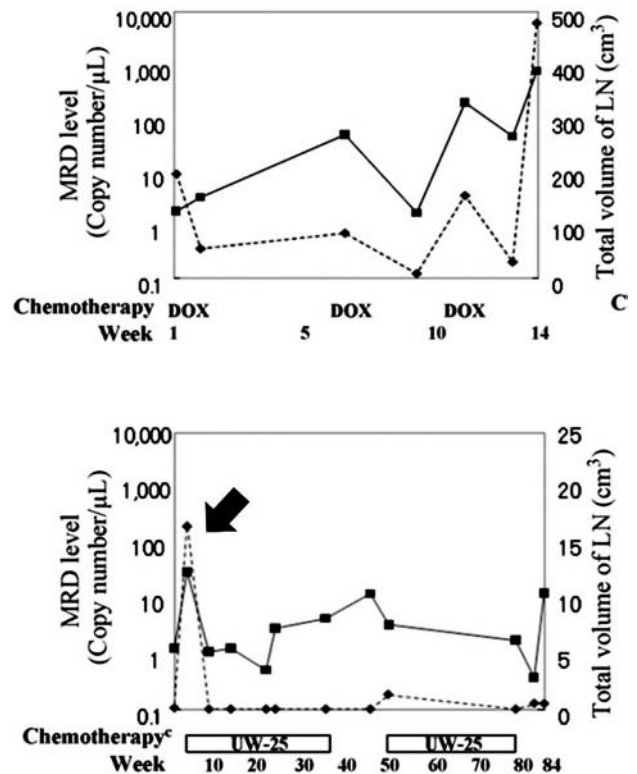


図 3：MRD レベルと臨床症状との関連

通常の検査方法である総リンパ節細胞の推移（破線）と MRD レベル（実線）との間に明らかな関連が見られる（上段の図、文献 3、Fig 5-A）。寛解時における MRD レベルと再発時における上昇（下段の図、文献 3、Fig 5-E）。寛解時においても検出可能な MRD レベル（実線）が存在する。また、臨床的再発時（総リンパ節サイズの上昇時）には MRD レベルもそれに伴って上昇している（矢印）。

レベルを経時的に測定したところ、完全寛解の状態においても0.1~10 copies/ μ L (理論上、1 copy は1つの細胞とほぼ同義)のMRDが検出された。また興味深いことに、MRDレベルは寛解時においては低く保たれていたが、再発時(黒矢印)に上昇していることが明瞭に示された。これらのことから、末梢血中におけるMRDレベルは通常行われるリンパ腫診療の際の進行程度の評価とよく一致し、しかも微量な腫瘍細胞の増減を評価可能であることを示している。1 μ L中の末梢血液の白血球のうち(正常範囲からするとおよそ10,000個)、0.1~10個の細胞が寛解時における残存したリンパ腫細胞であるという事実は当然のことながら一般的な診療においては確認することのできない、本定量システムによって始めて明かされた。

2) 治療効果の判定因子

図4は東京大学動物医療センターにおいてUW-25プロトコルによって治療を行い、4~25週後に寛解導入された7症例のMRDレベルを測定した^[4]。注目すべき点として、初診時においてMRDレベル(厳密には残存腫瘍細胞ではないが、広義のMRDレベル)はStage Vの症例だけではなく、全頭で10~>100 copies/ μ L存在していた。これは前項において、寛解時においてもMRDの検出が可能であったことと並び、「末梢血液中に腫瘍細胞が存在するのはStage Vのみである」というこれまでの概念を覆すものであり、MRDレベルの定量によって始めて客観的に明らかにすることができた典型的な事例である。また、これら症例におけるMRDレベルは、プロトコル9週目までに0.1~1 copy/ μ L程度に低下

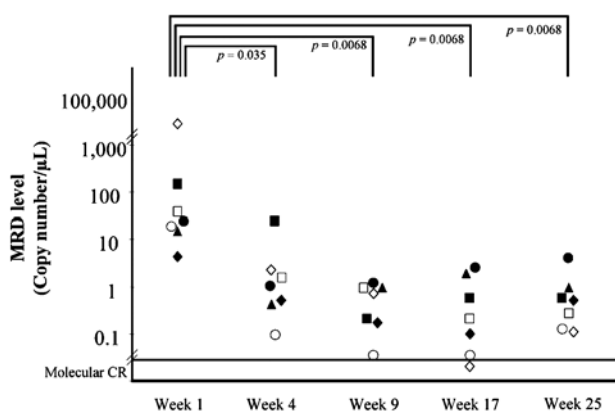


図4：UW-25プロトコル中のMRDレベルの推移(文献4、Fig. 1)

初診時(1週目)においても全頭で末梢血液中に腫瘍細胞が検出可能であった。MRDレベルは、プロトコルの進行に伴って初診時よりも減少し、25週目まで低く保たれていることがわかる。

し、その後25週目まで0.1~1 copy/ μ Lに維持されていた。このようなMRDレベルの寛解状態における推移は通常の診療においては推察することのできないものであり、リンパ腫細胞の動態に関して新たな知見をもたらすものと言える。またこの際、初診時のMRDレベルと4、9、17、25週目(寛解状態)のMRDレベルとの間にはそれぞれ有意差が存在し、MRDレベルが治療効果の判定因子となり得ることを示している。

3) 再発の予測因子

次にUW-25プロトコル終了時におけるMRDレベルとその後の再発までの期間との相関について検討した(図5)^[4]。その結果、プロトコル終了時におけるMRDレベルが低い症例ではその後の再発までの寛解期間が長く、逆にMRDレベルが高い症例では再発までの寛解期間が短いことが示された。また重要なことに、症例をプロトコル終了時におけるMRDレベルによって3群(MRDレベルが1 copy/ μ L以上の群、0.1~1 copies/ μ L群、検出限界以下の群)に分けたところ、再発までの期間の中央値はそれぞれ30日、190日、400日であり、群間に有意差が認められた(図6)^[4]。このことは現在の診療では予測できない「治療終了時の寛解状態における症例の予後判定」が可能であることを示唆している。その後の検討により、化学療法終了時まで待たずともUW-25プロトコル実施中の11週目という早い段階においてもその時点のMRDレベルが再発までの期間およびその後の生存期間にも相関があることが示された^[5]。今後、リンパ腫における個々のプロトコルにおいて、どの時点におけるMRDレベルを測定すること

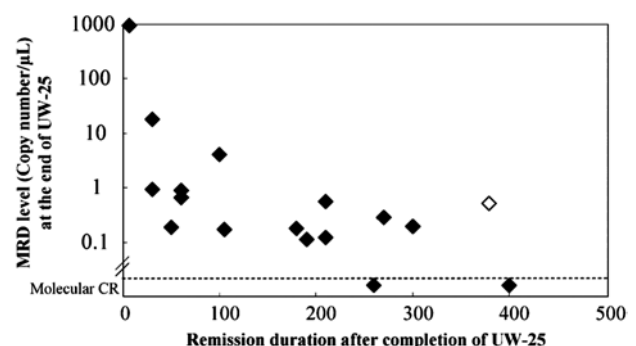


図5：17症例のUW-25プロトコル終了時におけるMRDレベルとその後の再発までの期間との相関(文献4、Fig. 2)

プロトコル終了時におけるMRDレベルが低い症例ではその後の再発までの寛解期間が長く、逆にMRDレベルが高い症例では再発までの寛解期間が短いことが示された。白表示はその時点における追跡調査にて再発が認められなかった症例。

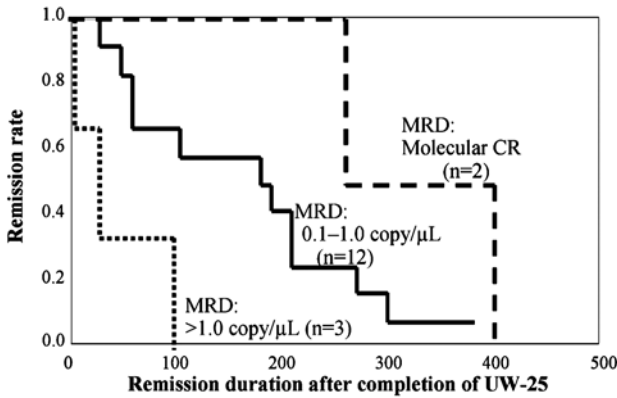


図6：UW-25プロトコル終了時において異なるMRDレベルを示した症例群における寛解期間（Kaplan-Meier法）(文献4、Fig. 3)

UW-25プロトコル終了時におけるMRDレベルにより3群に症例を振りわけたところ、高MRDレベル群（点線）、中MRDレベル群（実線）、低MRDレベル群（破線）では治療終了後から再発までの期間に関し有意な差が認められた。

が予後判定する上でベストであるのかを検討していく必要があると思われるが、この際、症例の予後判定の確かさだけでなく、臨床上の便宜性（早期のMRDレベル定量の方がより簡便かつ適用可能症例が多い）なども考慮しながら決定していくことが重要である。また、MRDレベルを利用した再発予測の別の側面の検討として、化学療法終了時に寛解状態に至り、その後の経過が良好な症例に関して経時的にMRDレベルの定量を行ったところ、臨床的な再発確認よりも早期にMRDレベルの上昇が検出され、より早期の再発確認が可能であることも徐々に明らかになりつつある^[6]。この結果はMRDレベルの経時的な定量により個々の症例をフォローアップすることで通常の診療における再発確認よりも早期に（分子生物学的）再発を発見することができることを示唆している。

4. まとめと今後の方向性

MRD定量システム確立後、さまざまな側面からの臨床的応用について検討を行ったことによってその有用性の実証された。具体的には、MRDレベルの評価により、

- ① 既存または新規の化学療法の有効性の客観的な比較評価
- ② 化学療法終了時または早期のある時期のMRDレベル測定による、再発までの期間の予測
- ③ 臨床的再発よりも早期に認められる分子生物学的再発の検出

などが実際に可能であることが確認された^[3-7]。検査費用、技術面、適応疾患などにおける未解決点も残っ

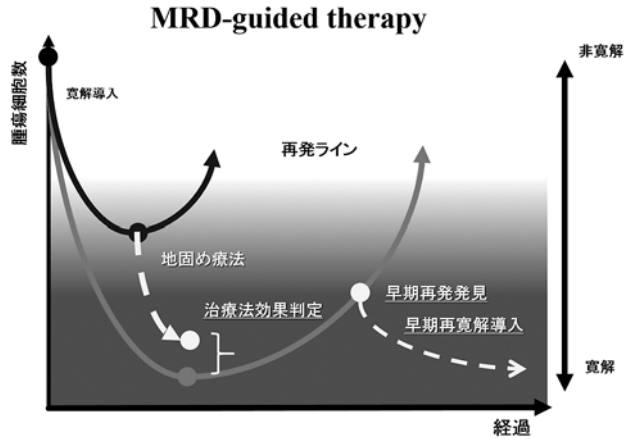


図7：MRD-guided therapyの概略

MRDレベルによる、化学療法の有効性の客観的な評価による地固め療法の決定、または分子生物学的再発の早期検出とそれに対する早期再寛解導入の決定を行う。

ているが今後のMRD研究の方向性として、本質的にイヌのリンパ腫という疾患に対するブレイクスルーを実現するためには、これらMRDレベルに基づいた治療（MRD-guided therapy）をprospective studyとして検討していくことが次なるステップであり、イヌのリンパ腫の治療成績を向上するという最終目的の達成のために必要である。MRD-guided therapyとは、一般的な検査および概念によるものでなく、あくまでMRD定量システムの結果を踏まえた治療方針を策定するといった、これまでにない新規化学療法指針であり、個々の症例に対するテーラーメイド型治療の方法論をイヌのリンパ腫治療に導入するものである。具体的には、化学療法終了時におけるMRDレベルによる治療効果判定とさらなる地固め療法実行の決定や、再発直前のMRDレベルの上昇をマーカーとした（例え肉眼的に再発兆候を示してなくとも）早期の再発診断とそれに基づいた早期のレスキュー療法を行うといった、いわば本定量システムへの信頼を基盤とした積極的な治療指針であると言える（図7）。この指針に沿って個々の症例に適応させた治療（テーラーメイド型治療）を実施することにより、イヌのリンパ腫全体における治療成績の向上に貢献できるものと考えられる。

将来的に、MRD定量システムは、ワンポイントの遺伝子診断よりも継続的な臨床的管理に重要な情報を提供してくれることから、将来的には臨床現場に普及していくものと考えており、その結果として、イヌのリンパ腫の全体的な治療成績向上が達成されることが最も望まれるところである。

引用文献

- [1] Garrett LD, Thamm DH, Chun R, Dudley R, Vail DM : Evaluation of a 6-month chemotherapy protocol with no maintenance therapy for dogs with lymphoma, *J Vet Intern Med*, 16 : 704-709 (2002)
- [2] Burnett RC, Vernau W, Modiano JF, Olver CS, Moore PF, Avery AC : Diagnosis of canine lymphoid neoplasia using clonal rearrangements of antigen receptor genes. *Vet Pathol*, 40 : 32-41 (2003)
- [3] Yamazaki J, Baba K, Goto-Koshino Y, Setoguchi-Mukai A, Fujino Y, Ohno K, Tsujimoto H : Quantitative assessment of minimal residual disease (MRD) in canine lymphoma by using real-time polymerase chain reaction. *Vet Immunol Immunopathol*, 126 : 321-331 (2008)
- [4] Yamazaki J, Takahashi M, Setoguchi A, Fujino Y, Ohno K, Tsujimoto H : Monitoring of minimal residual disease (MRD) after multidrug chemotherapy and its correlation to outcome in dogs with lymphoma : a proof-of-concept pilot study. *J Vet Intern Med*, 24 : 897-903 (2010)
- [5] Sato M, Yamazaki J, Goto-Koshino Y, Takahashi M, Fujino Y, Ohno K, Tsujimoto H : The prognostic significance of minimal residual disease in the early phases of chemotherapy in dogs with high-grade B-cell lymphoma. *Vet J*, 195 : 319-324 (2013)
- [6] Sato M, Yamazaki J, Goto-Koshino Y, Takahashi M, Fujino Y, Ohno K, Tsujimoto H : Increase in minimal residual disease in peripheral blood before clinical relapse in dogs with lymphoma that achieved complete remission after chemotherapy. *J Vet Intern Med*, 25 : 292-296 (2011)
- [7] Yamazaki J, Sato M, Goto-Koshino Y, Setoguchi A, Takahashi M, Baba K, Fujino Y, Ohno K, Tsujimoto H : Clinical significance of minimal residual disease (MRD) monitoring in canine lymphoma. *Veterinary Cancer Society Member News*, 2011 Summer, (2011)