

日本医療研究開発機構 官民による若手研究者発掘支援事業  
事後評価報告書



## I 基本情報

補助事業課題名: (日本語) 急性骨髄性白血病における液体生検を用いた患者に優しく汎用性の高い革新的な個別化再発予測システムとその基本原理の研究開発

(プログラム名) (英語) Study of developing principal programs of customized liquid biopsy system with broad applicability and non-invasiveness for precise relapse prediction in acute myeloid leukemia

実施期間: 令和2年9月1日～令和4年3月31日(予定)

補助事業担当者 氏名: (日本語) 横山 和明

(英語) Kazuaki Yokoyama

補助事業担当者 所属機関・部署・役職:

(日本語) 国立大学法人東京大学 医科学研究所 附属病院 血液腫瘍内科 助教

(英語) Department of hematology/oncology, Research Hospital, The Institute of Medical Science, The University of Tokyo, Assistant Professor

## II 補助事業の概要

補助事業の成果およびその意義等

和文: 2 ページ以上

英文: 1 ページ程度

## (1) 研究開発の背景

急性骨髄性白血病 (acute myeloid leukemia: AML) は、発症原因となるドライバー変異蓄積により癌化した造血細胞が、骨髄でクローン性増殖をきたす癌である。化学療法や骨髄移植により大多数が寛解に至るが、再発が主な死因として克服すべき課題である。再発予測には、治療後の微小残存病変 (minimal residual disease: MRD) 検査法が有用であり、MRD 残存の有無に基づく層別化治療は、AML における標準治療の必須構成要素であり、本邦でも医療保険の対象である。しかし、上市されている、定量 PCR 法による AML の病型特異的な染色体転座に起因するキメラ遺伝子を検出する、定量 PCR 法による MRD 検査は、侵襲性の高い骨髄検査を必要とする、2 割にしか検査を適用できない、という致命的な問題がある。もし、骨髄の代わりに末梢血 (全血) を検体として用いると、骨髄より腫瘍細胞の割合が希釈される為に、MRD の検出感度が 1/10 以下となる事が判明しており、やはり MRD 検査としてそのまま全血を用いるのは実用的ではない。故に、患者に優しく汎用性の高い MRD 検査法が希求されている。

近年、固形癌や一部の血液癌において、一部のドライバー変異を血漿中の循環腫瘍 DNA としてデジタル PCR (dPCR) 等を用いて検出する液体生検が従来の生検に代わる侵襲性の低い、新規遺伝子変異検査法として注目されている。しかし、従来の液体生検で検出可能な変異は一部のホットスポット変異のみであり、適用例は限られる事から MRD 検査としては利用できなかった。そこで、横山は、従来の MRD 検査の限界を超え、全ての AML 患者、理論上は全癌腫において適用可能な、患者に優しい高精度な MRD 検査技術を開発する事を着想した。具体的には、全ゲノム解析を用いて、症例特異的なドライバー変異を同定し、0.01-0.04% の変異アレルを特異的に検出可能な dPCR アッセイを作成して、血漿中の循環腫瘍 DNA を治療後に高感度に追従可能な、新規の個別化 MRD 検査法を考案した (MyRD 法)。開発段階での後方視的検討 (n=51) では、MyRD 法は従来の骨髄を用いた手法と同等の再発予測性能を持ち、96% の例に適用可能であるという新規知見を見出した (横山ら Blood 2019)。さらに横山は、MyRD 法の臨床的有用性を検証するべく、AML、そして急性リンパ性白血病 (acute lymphoblastic leukemia: ALL) を対象とした多施設共同前方視観察研究を 2 研究開始した。本臨床研究の過程で、全ゲノム解析で得られる膨大な変異データからドライバー変異を選別する STEP や、MRD アッセイをデザインし、解析結果を判定する STEP を全て人手で行う事、は多大な労力を要する事を痛感し、この事が MyRD 法の臨床実装における bottle neck となると考えられた。以上の背景より、MyRD 法の臨床実装の為に、全ゲノム情報解析・個別化循環腫瘍 DNA 解析プログラムを主要構成要素とする複合医療機器として研究開発する必要性に思い至った。そこで、本研究では、AML において、患者に優しく汎用性の高い高感度な MRD 検査法として MyRD 法を複合医療機器として上市する目的で、その主要構成要素となるプログラムもしくはその基本原理を、実施中の臨床研究から収集した臨床試料を用いて研究開発する事を目的とする。

## (2) 研究開発の目標・ねらい

本研究では、前述の目的達成の為に、その主要構成要素の医療機器プログラムのコア技術として、全ゲノム情報解析システムと個別化循環腫瘍 DNA 解析システムの基本原理を開発する目的で、以下 1) -4) のプログラムやその基本原理を、本研究開発の目的に臨床研究から試料と解析データを収集しつつ、開発サポート機関による教育プログラムにより医療機器の研究開発の基礎フェーズでの知識を学びながら、順次研究開発する事を目標とする。

基本原理の開発を目指した研究開発項目は以下の通りである。

- 1) 全ゲノムシーケンス品質チェックプログラム (R2 年 2Q-R3 年 1Q) は、全ゲノム情報の品質管理を目的としたプログラムである。
- 2) ドライバー変異同定プログラム (R2 年 4Q-R3 年 3Q) は、全ゲノム解析のリード情報から、有害でない変異を自動フィルタリングし、個々の症例におけるドライバー変異や転座などの構造異常を同定するプログラムであ

る。

3) 変異特異的アッセイデザインプログラム (R3年1Q-4Q) は、2) で同定されたドライバー変異 (構造異常) から、申請者独自のアルゴリズムにより (横山ら Blood 2019)、1st hit となったドライバー変異 (構造異常) を推定し、それに対する特異的プローブとプライマー配列を自動でデザインするものである。

4) 個別化循環腫瘍 DNA 解析プログラム (R3年2Q-4Q) は、3) でデザインしたアッセイの品質管理を行い、MRD 検査結果 (陽性、陰性) の判定を行うプログラムである。

以上により、AML や ALL において個別化医療に資する患者に優しい MRD 検査法のコア技術となるプログラム医療機器のコンセプト決定を狙う。

### (3) 研究開発成果

#### (1). 全ゲノムシーケンス品質チェックプログラムの開発 (R2年2Q-R3年2Q)

R2 年度に 15 例の全ゲノム解析教師データを取得し、研究協力者と協働で全ゲノムシーケンス品質チェックプログラムの要求事項、具体的にはベースコールにおけるエラー率の予測指標である Phred クオリティスコアの、全塩基読み取りにおける、Q20 (1%のエラー率) や Q30 (0.1%のエラー率) で検出できた割合 (図 1)、リファレンスとなる標準ゲノムに mapping される割合の出力がなされる事、全ゲノム領域の平均読み取り深度の出力が為される事などの要求事項と洗い出しを実施した。その後試作プログラムのプロトタイプを作成した。R3 年度はさらに 25 例の全ゲノムシーケンス解析教師データを input データとして追加で取得し、R2 年度に開発した全ゲノムシーケンス品質チェックプログラムのプロトタイプのシステム実施と検証を繰り返し、プログラムの改善、要求事項の洗い直しを繰り返した。マイルストーン達成度は 100%であった。

#### (2) ドライバー変異同定プログラムの開発

R2 年度はドライバー変異同定プログラムの要求事項の洗い出しを実施し、試作プログラムのプロトタイプを作成し、システム実施を繰り返した。全ゲノム解析 (WGS) から出力された 5 万個の変異に通常であれば絞り込みを行うのに数ヶ月以上かかるところ、3 分以内に完了する事が可能であった。R3 年にはドライバー変異同定プログラムの補助プログラムについて特許出願・クレーム構成を作成し、知財化を進め、知財申請を行なった。マイルストーン達成度は 80%であった。

#### (3) 変異特異的アッセイデザインプログラムの開発

R3 年から基本構成要素の変異特異的アッセイデザインプログラムの要求事項の洗い出しを完了した。試作プログラムのプロトタイプを作成し、システム実施を行なった。出力結果の確認を繰り返した。また、個別化検査試薬作成において鍵を握る primer/probe デザイン法に関する知財の FTO 調査を行なった上で、デジタル PCR による高感度モニタリングに必要なプライマーセットの設計方法について知財申請を行なった。マイルストーン達成度は 85%であった。

#### 4) 個別化循環腫瘍 DNA 解析プログラムの開発

令和 3 年度は、教師データとして 40 例の MRD 測定データを取得した。マイルストーン達成度は 85%であった。

### (4) 期待できる成果

以上、研究開発項目 1)-4) の成果が着実に得られた。また、AML や ALL において個別化医療に資する患者に優しい MRD 検査法のコア技術となるプログラム医療機器のコンセプト決定が行えた。これにより、全ゲノム解析で急性白血病患者の原因遺伝子変異を正確に同定し、患者ごとに異なる原因遺伝子変異情報をもとに最適な治療方針・治療法を決定することが可能になると考えられる。また、患者ごとに異なる原因遺伝子変異に合わせた個別化検査薬を作製し、従来の骨髄検査に代わり、血液検査で原因遺伝子変異を高精度に検査を行うことができ、再発ハイリスク例を同定し、造血幹細胞移植の適応の精密な決定が可能となる。さらに、白血病だけでなく、固形がん、他の希少疾患や遺伝病などへの技術の応用による波及効果が期待できる。

## 1. Project title

Study of developing principal programs of customized liquid biopsy system with broad applicability and non-invasiveness for precise relapse prediction in acute myeloid leukemia

## 2. Principal investigator

● Name Kazuaki Yokoyama

## 3. Project Abstract

Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (alloSCT) is the only curative option for patients with high risk or refractory acute myeloid leukemia (AML) or acute lymphoblastic leukemia (ALL).

Relapse is the main event of therapeutic failure for patients with acute myeloid leukemia (AML) and acute lymphoblastic leukemia (ALL). Hence, a reliable biomarker for assessment of minimal residual disease (MRD) post-therapy or allo-SCT is required for earlier therapeutic intervention in patients with impending relapse. Despite demonstrated utilities, conventional methods for MRD testing using invasive bone marrow (BM) sampling post therapy in patients with AML have serious limitations in its non-invasiveness and limited applicability.

Recently, liquid biopsy (LB) using detection of tumor-derived fragmentary DNA, circulating tumor DNA (ctDNA), in plasma represents one of the most sensitive and noninvasive biomarkers in solid cancers and in a few hematological malignancies. However, conventional LB methods mainly target hotspot mutation for the purpose of their sensitive monitoring. Therefore, clinical applicability of LB has been also limited to date. It remains to be elucidated whether LB post-therapy could identify patients at high risk for relapse in AML.

To extend applicability of LB and to investigate whether LB post-therapy could identify patients at high risk for relapse in AML, we recently developed sensitive LB method targeting driver mutation in whole genomic region (customized LB). Using customized LB, we found that LB accurately predicted relapse post therapy in retrospective AML cohort. To validate this promising result, we are now performing multi-center prospective observational study.

Based on these backgrounds, the main aim of the present study is to investigate and to develop principal programs of customized LB system as a combination medical device. We plan to develop the following core 4 programs for this purpose in two years. 1) QC checker of whole genome sequence; 2) Identifier of driver mutation by whole genome sequence; 3) Assay designer for driver mutation; 4) ctDNA analysis system.

From 2021 to 2022, by achieving milestones, we have developed the three of four component programs of customized LB system.

By these programs, our customized LB system will come true and this will allow for rapid clinical decision-making of alloSCT and, ultimately, subsequent risk adapted therapeutic interventions post-therapy in AML and ALL. Additionally, we are certain that our customized LB system could theoretically be applicable for MRD monitoring post therapy in patients with solid tumors with any driver mutations or structural variants in whole genomic regions.