

Detection methods of minimal residual disease and their prognostic value in patients with malignant hematological diseases

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/44217

【総説】

造血器腫瘍における微小残存病変解析法とその臨床的意義

Detection methods of minimal residual disease and their prognostic value in patients with malignant hematological diseases

金沢大学医薬保健研究域医学系細胞移植学
高松博幸

はじめに

白血病, リンパ腫, 多発性骨髄腫などの造血器腫瘍の診療において, 微小残存病変 (minimal residual disease: MRD) 検出の重要性は以前から指摘されていたが, 近年の新規薬剤開発や造血細胞移植技術の進歩によって, MRDが極めて少なくなる症例が増加し, 予後が著明に改善してきている. このため, より高感度のMRD測定法の開発が期待されている (図1). 本稿では, MRD測定法として, マルチパラメーターフローサイトメトリー, PCR, 次世代シーケンサーについて, 当科での研究成果も含めて概説する.

MRD測定法

(1) マルチパラメーターフローサイトメトリー (multiparameter flow cytometry: MFC) 法

一般的には4カラー以上の蛍光色素で標識した抗体を用いて, 腫瘍特異的な表面形質を同定してMRDを検出する手法である. MFCによるMRD測定は, ①初発時検体で腫瘍細胞に特異的な表面形質パターンを検出し, ②フォローアップ検体で初診時と同様の表面形質を示す細胞集団を検出する, という2ステップで行っていく. 実際に使用される抗体パネルは疾患によって異なっている. MFCによるMRDの検出感度は 10^{-4} (10^4 個に1個の腫瘍細胞を検出) 程度といわれており, 次で説明するPCR法と比べて10-100倍感度が劣るとされているが, MFC法

は安価かつ迅速にMRDを検出できるため, 実際の臨床現場では非常に有用な検査法と考えられる. 反面, 初発診断時とは異なる表面形質パターンに変化して偽陰性となる可能性があり, MFC装置の精度管理維持やデータ解析に専門的知識を有する人員も必要になる.

(i) 白血病での臨床的意義

Inabaらは, 小児・思春期急性骨髄性白血病 (AML)203症例についてフォローアップ骨髄検体のMRDをMFCを用いて評価したところ, MFCでMRD陽性症例 ($\geq 0.1\%$) では有意に不良なevent-free survivalと高い再発率を示した ($P < 0.001$)¹⁾. また, Arakiらは, 同種造血幹細胞移植を受けたAML患者359人の移植前骨髄のMRDをMFCで評価したところ, 形態学的寛解状態でMRD陽性, 非寛解状態, MRD陰性症例の3年全生存率 (OS) は, 26%, 23%, 73% と有意差をもってMRD陰性症例のOSが良好であり ($P < 0.001$), MRD検査の重要性を示した²⁾. さらに, Sanchez-Garciaらは同種造血幹細胞移植を受けた成人・小児急性リンパ性白血病 (ALL) 102症例について移植時MRDをMFCで評価したところ, MRD陰性 ($< 0.01\%$, 72症例), MRD低値 (0.01-0.1%, 12症例), MRD高値 ($> 0.1\%$, 18症例) では3年OSが, 52.3%, 28.6%, 0%と層別化されることを示した³⁾.

(ii) 多発性骨髄腫での臨床的意義

International Myeloma Working Group (IMWG) のcriteriaでは, stringent complete response (sCR)に加えてMFCでMRDが検出されない場合をimmunophenotypic CR (iCR) と定義している. Rawstronらは, MRC Myeloma IXに登録した自家移植施行症例397例の移植後100日目の骨髄MRDをMFCで評価した. MRD陰性症例は陽性症例と比べて有意に良好な無増悪生存 (PFS) (中央値: 28.6ヶ月 vs 15.5ヶ月, $P < 0.001$) やOS (中央値: 80.6ヶ月 vs 59.0ヶ月, $P = 0.0183$)であった⁴⁾.

(2) Polymerase chain reaction (PCR) 法

PCR法は標的DNA断片を酵素反応によって短時間に数十万倍に増幅する方法である. これまでにも, 造血器腫瘍のMRDの検出に広く臨床応用されている. この原理を応用した技術として逆転写酵素によってmRNAからcDNAを作製し, これを鋳型DNAとして増幅して標的mRNAを検出するRT-PCR (reverse transcriptase -PCR)

MRD測定の意義: CRの新たな定義

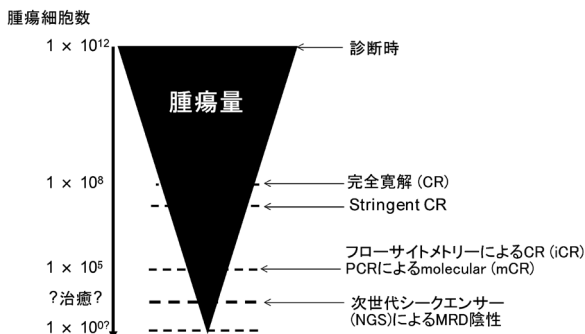


図1. 微小残存病変 (minimal residual disease: MRD) 検出法と腫瘍量

法がある。白血病細胞内の標的DNAと比べて標的 mRNAは通常コピー数が多いため、RT-PCR法の最大感度は 10^6 (10^6 個に1個の腫瘍細胞を検出)を達成でき、ごく微量のMRD検出が可能となった⁹⁾。また、前記したPCR法では定性、半定量の評価しかできなかったが、リアルタイム定量PCRを使用することでMRDの定量が可能となった。さらに最近、リアルタイムPCRで使用される検量線の必要ないデジタルPCRもMRD測定に応用されている。その測定では、サンプルを多くの反応ウエルに分割してPCRをおこない、ターゲット遺伝子を含むウエルはPCR増幅によって陽性ウエルとして、ターゲット遺伝子を含まないウエルは陰性ウエルとしてカウントできる。デジタルPCRは陽性ウエル(陽性比率)をカウントするので、リファレンスもしくはスタンダードサンプルとの比較を必要としない、直接的な絶対定量を可能とする点が優れている。

(i) キメラ遺伝子を用いる方法

急性前骨髄球性白血病(APL)ではPML-RAR α キメラ遺伝子検出によってMRDを評価している。Santamariaらは、145人のAPL患者のMRDをPML-RAR α キメラ遺伝子を用いてリアルタイムPCRで定量した。維持療法終了時点で、10コピーを超えるPML-RAR α キメラ遺伝子が検出された場合は全例(n=7)が再発したのに対し、1コピー未満の症例(n=62)では一例も血液学的に再発しなかった⁹⁾。また、AMLの中で頻度が高く予後良好とされているcore binding factor (CBF)白血病(t(8; 21)およびinv(16))のMRDをリアルタイムRT-PCRで検出検討した報告でも、MRD陰性患者26人のうち2人のみが再発したのに対して、MRD陽性患者11人のうち10人は再発をきたした⁷⁾。さらに、BCR-ABL1に対するチロシンキナーゼ阻害薬の開発により、深い寛解が達成できるようになった慢性骨髄性白血病(CML)についても、リアルタイムPCRによるMRD検出の意義が報告されている。最近、EtienneらはComplete Cytogenetic Response (CCyR)達成例をさらに深い分子遺伝学的寛解達成の有無により、①Major Molecular Response (MMR)未達成群(CCyR+MMR-)、②MMR達成/MR^{4.5}未達成群(CCyR+MMR+MR^{4.5}-)、③MMR達成/MR^{4.5}達成群(CCyR+MMR+MR^{4.5}+)に分けてevent-free survival (EFS)を解析した結果、MMR達成群(157例)のなかでも、MR^{4.5}を達成した群(65例)では、EFSが有意に延長することを示した⁸⁾。なお、MR^{4.5}とはInternational Scale (IS)-PCR法にて白血病細胞数が0.0032%まで減少することを示している。

(ii) WT1 遺伝子を用いる方法

Wilm's tumor gene (WT1)は80%以上のAMLで過剰発現しているため、前記したキメラ遺伝子を標的としたPCR法によるMRD検出の代替法になり得ることが報告されている。小児AML46症例について骨髄WT-1遺伝子の過剰発現を解析したところ、寛解導入療法後WT-1陽性は独立した再発(P=0.002)及び死亡リスク(P=0.02)で、

5年OSはWT-1陽性では74%、陰性では0%であった⁹⁾。また、成人AMLについても寛解導入療法後に骨髄WT-1陰性例ではOSとEFSの改善がみられ、さらに解析された44例のうちWT-1レベルの上昇がみられた16例では中央値38日で早期に再発が認められた¹⁰⁾。このようにWT-1検出の有用性が報告されているが、未だ世界的に標準化されたWT-1測定系とはなっておらず、その標準化が今後必要になる。

(iii) 免疫グロブリン/T細胞受容体遺伝子再構成を用いる方法

本法では、遺伝子再構成によって多様性のみられる免疫グロブリン(Ig)やT細胞受容体(TCR)に症例特異的プライマーを設計し、そのプライマーを用いたPCR検査によって、MRDを検出する(図2)。この検査法でのMRD検出感度は 10^{-4} - 10^{-5} といわれている。B細胞性腫瘍の大部分にIg遺伝子の再構成が、T細胞性腫瘍の大部分とB細胞性腫瘍の一部にTCRの再構成が認められる。急性リンパ性白血病(ALL)に関しては本法による多くの検討が行われている。BassanらはNILG-ALL 09/00プロトコールに登録された成人ALL 112症例の骨髄MRDの有用性を地固め療法終了時に評価した。MRD陰性58症例と陽性例54症例の5年OSはそれぞれ75%、33%(P=0.001)であった。種々のリスク因子の中でMRDが再発に対する最も有意なリスク因子であった¹¹⁾。

一方、深い寛解達成が困難であった多発性骨髄腫(MM)では本法による検討があまり行われてこなかった。しかし、最近の新規薬剤を用いて寛解導入療法、自家末梢血幹細胞移植、地固め療法、維持療法を行っていく治療法でもかなりの症例でmolecular CR (mCR)が達成され、そのようなmCR症例では長期間の生存の可能性が示されている。Ladettoらは、自家移植後にCRもしくはVGPRが達成されたMM 31症例に対してボルテゾミブ、サリドマイド、デキサメタゾンの3剤併用の地固め療法を4コース行ったところ、地固め療法前にはmCRが1例(3%)であったのが、地固め療法後には6例(19%)となり、mCRが達成された場合にはPFSが100%(観察期間中央値42ヶ月)で

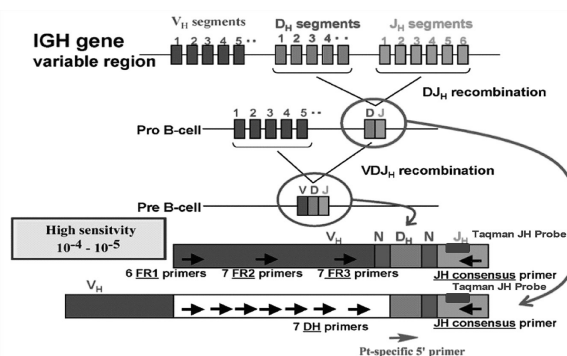


図2. 症例特異的 (allele-specific oligonucleotide-polymerase chain reaction (ASO)) 定量PCRによる微小残存病変 (MRD) 検出のためのプライマーとプローブの設計

あったと報告した。しかし、その後のフォローアップデータが最近報告されたが、その後にmCRを達成した1症例を含むmCR達成7症例のうち再発しなかった症例は3症例に過ぎず、自家移植後の地固め療法のみでは長期間の分子寛解の維持が困難であることが示唆された¹²⁾。

我々は、①MM症例の骨髄塗抹標本や骨髄生検標本から抽出したDNAを用いることにより、症例特異的組換えIgH PCR用のプライマーが設計できること(50症例の64%で可能)と、②そのプライマーを用いたMRDの検出感度が 10^{-4} - 10^{-5} であることを明らかにした。このプライマーを用いて22症例の自家移植片中のMRDを検査したところ、MRD陽性移植片を用いた8症例と比較して、MRD陰性移植片を用いた14症例ではPFSが有意に良好であった($P=0.012$)。さらに、移植後にmCRを達成した4症例では観察期間中央値3.9年でのPFSが100%であり、長期間の無増悪生存が達成できることを明らかにした¹³⁾。また、前記したデジタルPCRによるIgH-based MRDの定量的報告¹⁴⁾もあり、今後の応用が期待される。

(3) 次世代シーケンサー法 (next-generation sequencing: NGS)

最近、NGSをPCR法と組み合わせることで、MRDを検出する新規の検査法が発表された。具体的には、検体から抽出したDNAの症例特異領域(IgH-VJ/DJ領域、IgK領域)をコンセンサスプライマーを用いたPCRで増幅し、次にPCR産物にタグ配列を付加し、更にタグ配列を認識するプライマーを用いてもう一度PCRで増幅する。そのPCR産物の塩基配列を次世代シーケンサーを用いて高速に 10^6 回以上シーケンスすることによって、わずかに含まれるクローナルな配列を検出する測定系である(図3、文献¹⁵⁾図1より改変引用)。この検査法では、症例特異的PCRプライマーの設計が不要なために、MRDを安価かつ迅速に 10^{-6} レベルまで検出できるとされている¹⁵⁾⁻¹⁶⁾。

Ladettoらは3種類のB細胞性悪性腫瘍の検体を用いて、MRDに関してNGSとリアルタイム定量PCRを比較検討した。ALL 15症例のフォローアップ26検体を解析したところ、20検体(77%)で両測定法の一致をみた。再発検体での大きな不一致は、リアルタイム定量PCRで検出不能なclonal evolutionによって生じていたが、NGSではその変異クローンを検出できていた¹⁶⁾。また、Martinez-Lopezらは、CR達成MM 62症例の骨髄MRDをNGSを用いて解析したところ、MRD陰性26症例はMRD陽性36症例と比べて有意に良好なtime to progression (TTP)が達成されていた(中央値131 vs 35 months; $P=0.0009$)。また、NGSによるMRDはMFCやASO-PCRと良く相関したが、NGSでMRD陰性(MRD^{NGS}(-))症例は、MFCでMRD陰性であるがNGSではMRD陽性(MRD^{MFC}(-)MRD^{NGS}(+))症例と比べて良好なTTPを示し(中央値not reached vs 50 months; $P=0.05$)、さらにMRD^{MFC}(+)MRD^{NGS}(-)の5症例からの再発は1症例にすぎなかった。以上から、MFCと比べてNGSによるMRD検出はより正確に予後を予測でき

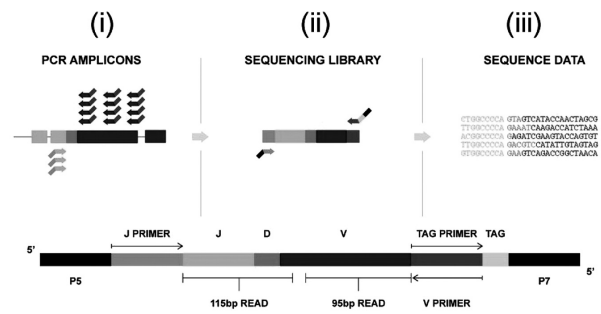


図3. 次世代シーケンサーを用いた微小残存病変 (MRD) 定量 (i) 検体から抽出したDNAの症例特異領域 (IgH-VJ/DJ 領域, IgK 領域) をコンセンサスプライマーを用いたPCRで増幅し, (ii) 次にPCR産物にタグ配列を付加し, 更にタグ配列を認識するプライマーを用いてもう一度PCRで増幅する. (iii) そのPCR産物の塩基配列を次世代シーケンサーを用いて高速に 10^6 回以上シーケンスすることによって, わずかに含まれるクローナルな配列を検出してMRDを定量する。

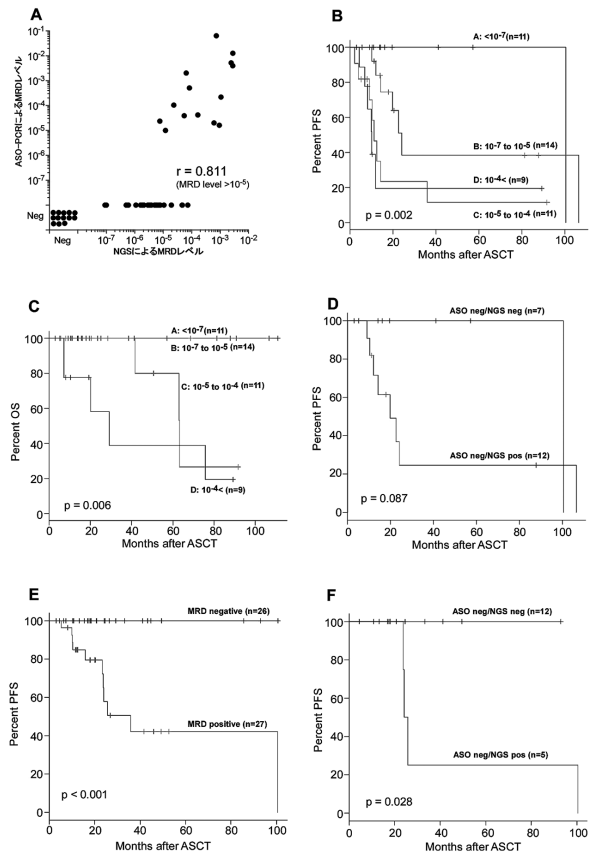


図4. 多発性骨髄腫症例における微小残存病変 (MRD) 検査の重要性: (A) allele-specific oligonucleotide-polymerase chain reaction (ASO)-PCR法と次世代シーケンサー (NGS) によるMRD検出の比較. (B) NGSによる自家移植片MRDレベルとprogression-free survival (PFS), および(C) overall survival (OS). (D) NGSおよびASO-PCRによる自家移植片MRD陰性(MRD^{NGS}(-)MRD^{ASO}(-))症例(n=7)とNGSによる自家移植片MRD陽性かつASO-PCRによるMRD陰性(MRD^{NGS}(+)MRD^{ASO}(-))症例(n=12)でのPFS比較. (E) NGSによる自家移植後骨髄MRDレベルとPFS. (F) NGSおよびASO-PCRによる骨髄MRD陰性(MRD^{NGS}(-)MRD^{ASO}(-))症例(n=12)とNGSによる骨髄MRD陽性かつASO-PCRによるMRD陰性(MRD^{NGS}(+)MRD^{ASO}(-))症例(n=5)でのPFS比較。

ることが示唆された¹⁷⁾。但し、この検討では十分な量のDNAが得られなかったためにMRDのカットオフ値が 10^5 と低感度であり、NGSで検出できる 10^6 レベルでのMRD評価をできなかった点が問題と考えられる。

我々は、自家移植を施行し部分寛解(PR)以上の治療効果の得られたMM 119症例の自家移植片/骨髄について骨髄腫細胞のクロナリティを検出したところ、NGSでは119症例中111症例(93%)、ASO-PCRでは109症例中79症例(72%)でクロナリティが検出された。自家移植片について、NGSでは98症例中70症例(71%)でMRD陽性であったが、ASO-PCRでは69症例中28症例(41%)でMRD陽性にすぎなかった。また、MRD検出に関して、 10^5 以上ではASO-PCR法とNGS法との間には比較的強い相関が見られたが、十分量のDNAが検査された場合にはNGS法のMRD検出感度は 10^6 以上とPCR法の 10^5 よりも高感度であった(図4A)。

自家移植後に地固め・維持療法が施行されなかった45症例の自家移植片MRDレベルでPFS(図4B)とOS(図4C)を解析したところ、明確な層別化が可能であることがわかった。さらに、NGSおよびASO-PCRによる自家移植片MRD陰性(MRD^{NGS}(-)MRD^{ASO}(-))7症例(group 1)と、NGSによる自家移植片MRD陽性かつASO-PCRによるMRD陰性(MRD^{NGS}(+)MRD^{ASO}(-))12症例(group 2)とをPFSに関して比較したところ、group 1はgroup 2に比べて良好なPFSの傾向であり(P=0.087)、ASO-PCR陰性であってもNGS陽性の症例では早期に再発がみられた(図4D)。また、自家移植後の骨髄MRDを解析したところ、NGSで陰性となった26症例は、100%のPFSを達成していたため、自家移植後に骨髄MRDが陰性となった症例では、長期間の無増悪生存(治癒)が期待できると考えられる(図4E)。さらに、自家移植後にNGSおよびASO-PCRによる骨髄MRD陰性(MRD^{NGS}(-)MRD^{ASO}(-))12症例(group 3)と、NGSによる骨髄MRD陽性かつASO-PCRによるMRD陰性(MRD^{NGS}(+)MRD^{ASO}(-))5症例(group 4)を比較したところ、group 3はgroup 4と比べて有意差を

もって良好なPFSであった(図4F)。以上から、ASO-PCRでのMRD検出は不十分であり、NGSによる極めて深いレベルでのMRD評価が長期間の無増悪生存(治癒)を予測するために重要であることが示された¹⁹⁾。

最近、NGSによる高感度なMRD検出能力を用いれば、末梢血や血漿中のMRD検出も可能であることが示されている。Roschewskiらは6ヶ月以上寛解が得られたびまん性大細胞型B細胞リンパ腫101症例の血清中MRDをNGSを用いてモニタリングした。5年EFSはMRD陰性群が陽性群に比べて有意に良好な結果となった(45.9% vs 83.0%, P<0.0001)²⁰⁾。

MRD検出法の比較(表1)

MFC法では、検査が可能な患者の割合が90%以上と高く、費用・迅速性の点でPCR法より優れているが、4カラー以上のMFCでは検査の標準化が困難なために、限られた施設でしか施行できず、さらに初発診断時とは異なる表面形質パターンに変化して偽陰性となる可能性も指摘されている。また、MFC法と比較してPCR法は高感度であるが、CDRIII領域のシークエンシング、プライマーの設計には技術、時間と比較的高額な費用がかかる。さらにこれまでの報告では、プライマー設計の成功率は30-80%程度とされている。一方、最近開発された次世代シークエンサー法は、前記したようなPCR法の問題点をすべて克服し、最も高感度であるため、今後のMRD検出では主流になるように思われるが、高感度を達成するためには十分な量のDNAが必要である。また、特に骨髄腫については骨髄中の病変が不均一に分布するため、一回の骨髄穿刺では偽陰性になるという問題がある。このため、骨髄検体を使用する場合にはMRD検出に限界があることを認識し、PET、CT、MRIなどの画像診断も併せて施行していく必要がある。

おわりに

今後は、造血器腫瘍のCR症例をMRD検査によって層別化していくことが予後予測のために必須と思われる。

表1. 多発性骨髄腫での微小残存病変(MRD)測定法

	MFC (≥4-color)	ASO-PCR	NGS
使用可能患者(%)	~100%	~80%	90%~
感度	$10^4 \sim 10^5$	$10^4 \sim 10^6$	$10^6 \sim$
再現性	高い	高い	未報告
初診時検体の必要性	重要であるが必須ではない	必須	必須
MRD検体	細胞	細胞、DNA	細胞、DNA
症例特異的試薬の必要性	無	有	無
Clonal evolution時のMRD検出	可能	不可能	可能
検査時間	2-3時間	≥5日間(follow-up), 3-4週間 (ASO-PCRプライマー設計)	≥7日間
検査可能施設	中等度	中等度	極めて限定
標準化	進行中(EuroFlow/IMF)	有(EuroMRD)	未報告
コスト	安価	高額	現在高額だが、今後安価になる可能性あり

MFC, multiparameter flow cytometry; ASO-PCR, allele-specific oligonucleotide-polymerase chain reaction; NGS, Next-generation sequencing; MRD, minimal residual disease; IMF, International Myeloma Foundation

とくに、慢性骨髄性白血病や多発性骨髄腫では極めて高感度な検出系でMRDが陰性化した場合には、維持療法を中止しても増悪・再発症例は限られているため、MRD陰性症例での維持療法中止試験も臨床研究として行われていくと思われる。

謝 辞

本稿で紹介させていただきました研究は、LSI メディエンス株式会社 小川義康先生、米国 Adaptive Biotechnologies 社 Malek Faham 博士と、著者の属する金沢大学医薬保健研究域医学系細胞移植学（血液・呼吸器内科）中尾眞二教授らの共同研究の成果です。また、執筆の機会を与えてくださいました金沢大学十全医学会誌編集委員長の井関尚一教授ならびに関係の方々には厚く御礼申し上げます。

参 考 文 献

- 1) Inaba H, Coustan-Smith E, Cao X, et al: Comparative analysis of different approaches to measure treatment response in acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol* 30:3625-32, 2012
- 2) Araki D, Wood BL, Othus M, et al: Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation for Acute Myeloid Leukemia: Time to Move Toward a Minimal Residual Disease-Based Definition of Complete Remission? *J Clin Oncol*, 2015
- 3) Sanchez-Garcia J, Serrano J, Serrano-Lopez J, et al: Quantification of minimal residual disease levels by flow cytometry at time of transplant predicts outcome after myeloablative allogeneic transplantation in ALL. *Bone Marrow Transplant* 48:396-402, 2013
- 4) Rawstron AC, Child JA, de Tute RM, et al: Minimal residual disease assessed by multiparameter flow cytometry in multiple myeloma: impact on outcome in the Medical Research Council Myeloma IX Study. *J Clin Oncol* 31:2540-7, 2013
- 5) Voena C, Ladetto M, Astolfi M, et al: A novel nested-PCR strategy for the detection of rearranged immunoglobulin heavy-chain genes in B cell tumors. *Leukemia* 11:1793-8, 1997
- 6) Santamaria C, Chillon MC, Fernandez C, et al: Using quantification of the PML-RARalpha transcript to stratify the risk of relapse in patients with acute promyelocytic leukemia. *Haematologica* 92:315-22, 2007
- 7) Krauter J, Gorlich K, Ottmann O, et al: Prognostic value of minimal residual disease quantification by real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction in patients with core binding factor leukemias. *J Clin Oncol* 21:4413-22, 2003
- 8) Etienne G, Dulucq S, Nicolini FE, et al: Achieving deeper molecular response is associated with a better clinical outcome in chronic myeloid leukemia patients on imatinib front-line therapy. *Haematologica* 99:458-64, 2014
- 9) Lapillonne H, Renneville A, Auvrignon A, et al: High WT1 expression after induction therapy predicts high risk of relapse and death in pediatric acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol* 24:1507-15, 2006
- 10) Weisser M, Kern W, Rauhut S, et al: Prognostic impact of RT-PCR-based quantification of WT1 gene expression during MRD monitoring of acute myeloid leukemia. *Leukemia* 19:1416-23, 2005
- 11) Bassan R, Spinelli O, Oldani E, et al: Improved risk classification for risk-specific therapy based on the molecular study of minimal residual disease (MRD) in adult acute lymphoblastic leukemia (ALL). *Blood* 113:4153-62, 2009
- 12) Ferrero S, Ladetto M, Drandi D, et al: Long-term results of the GIMEMA VEL-03-096 trial in MM patients receiving VTD consolidation after ASCT: MRD kinetics' impact on survival. *Leukemia* 29:689-95, 2015
- 13) Takamatsu H, Ogawa Y, Kobayashi N, et al: Detection of minimal residual disease in patients with multiple myeloma using clonotype-specific PCR primers designed from DNA extracted from archival bone marrow slides. *Exp Hematol* 41:894-902, 2013
- 14) Wee R, Takamatsu H, Murata R, et al: A Comparison of Minimal Residual Disease Detection Among ASO-PCR, Dd-PCR and Deep-Sequencing in Patients with Multiple Myeloma Who Underwent Autologous Stem Cell Transplantation. *Blood (ASH Annual Meeting Abstract #1782)*, 2015
- 15) Faham M, Zheng J, Moorhead M, et al: Deep-sequencing approach for minimal residual disease detection in acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 120:5173-80, 2012
- 16) Ladetto M, Bruggemann M, Monitillo L, et al: Next-generation sequencing and real-time quantitative PCR for minimal residual disease detection in B-cell disorders. *Leukemia* 28:1299-307, 2014
- 17) Martinez-Lopez J, Lahuerta JJ, Pepin F, et al: Prognostic value of deep sequencing method for minimal residual disease detection in multiple myeloma. *Blood* 123:3073-9, 2014
- 18) Logan AC, Vashi N, Faham M, et al: Immunoglobulin and T cell receptor gene high-throughput sequencing quantifies minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia and predicts post-transplantation relapse and survival. *Biol Blood Marrow Transplant* 20:1307-13, 2014
- 19) Takamatsu H, Murata R, Zheng J, et al: Prognostic Value of Sequencing-Based Minimal Residual Disease Detection in Patients with Multiple Myeloma Who Underwent Autologous Stem Cell Transplantation. *Blood (ASH Annual Meeting Abstract #1788)*, 2015
- 20) Roschewski M, Dunleavy K, Pittaluga S, et al: Circulating tumour DNA and CT monitoring in patients with untreated diffuse large B-cell lymphoma: a correlative biomarker study. *Lancet Oncol* 16:541-9, 2015