

チロシンキナーゼ阻害薬による初発慢性骨髄性白血病症例の治療効果に影響しうる諸因子の解析と新たな微小残存病変評価法の開発

著者	津田 真由子
学位授与年月日	2015-09-25
URL	http://doi.org/10.15083/00073082

博士論文（要約）

論文題目 チロシンキナーゼ阻害薬による初発慢性骨髄性
白血病症例の治療効果に影響しうる諸因子の
解析と新たな微小残存病変評価法の開発

氏名 津田 真由子

目次

1. 要旨	3
2. 序文	4
3. 目的	18
4. 方法	20
5. 結果	34
6. 考察	57
7. 結論および今後の展望	63
8. 引用文献	65
9. 謝辞	78

1. 要旨

慢性骨髄性白血病(Chronic myeloid leukemia: CML)は、多能性造血幹細胞レベルの未熟血球に 9 番と 22 番染色体の長腕間相互転座が生じ、BCR-ABL 融合遺伝子の形成によって単クローン性の腫瘍性造血が認められる骨髄増殖性疾患である。

チロシンキナーゼ阻害薬(Tyrosine kinase inhibitor: TKI)の開発により CML の予後は劇的に改善された一方、TKI 治療に抵抗性を示す症例も依然存在する。これまで CML に対する TKI 治療の効果予測因子として確立されたものはなく、治療後の微小残存病変 (minimal residual disease: MRD) の評価法は既に標準化されているが、治癒を目標とする視点からは改善の余地がある。

今回私は、第 2 世代 TKI であるニロチニブの治療効果に影響しうる因子を検討し、また MRD を高感度で定量的に検出する新規方法を考案した。

2. 序文

CML の発症は、多能性造血幹細胞レベルの未熟血球で 9 番と 22 番染色体長腕間の相互転座 $t(9;22)(q34.1;q11.2)$ が起こり、Philadelphia (Ph) 染色体と呼ばれる 22 番染色体由来の小さな染色体を生じることが発端となる。9 q34.1 には ABL (Abelson murine leukemia viral oncogene homolog) 遺伝子、22q11.2 には BCR (Breakpoint cluster region) 遺伝子が局在しており、相互転座の結果 Ph 染色体上に BCR-ABL 融合遺伝子が形成される (図 1)。この融合遺伝子産物の N 末端側を構成する BCR 蛋白質は、coiled-coil 領域を介しオリゴマーを形成することが知られている。一方、C 末端側の ABL 蛋白質はチロシンキナーゼとして機能し、その酵素活性は自身の SH2/SH3 ドメインにより構造的に制御され、約 80 のアミノ酸残基からなる CAP ドメインによりその制御は安定化される [1-5]。BCR-ABL 融合蛋白質は BCR 蛋白質の coiled-coil 領域を介して 4 量体を形成することで、ABL 蛋白質の構造的な制御が解除されキナーゼ活性は恒常的となり [6-8] (図 2)、その結果細胞間相互作用とリン酸化カスケードを介して JAK-STAT 経路や MAP キナーゼ経路、PI3K-AKT 経路など様々な細胞内シグナル伝達経路に異常なシグナルが波及し、過剰な細胞増殖が惹起される。

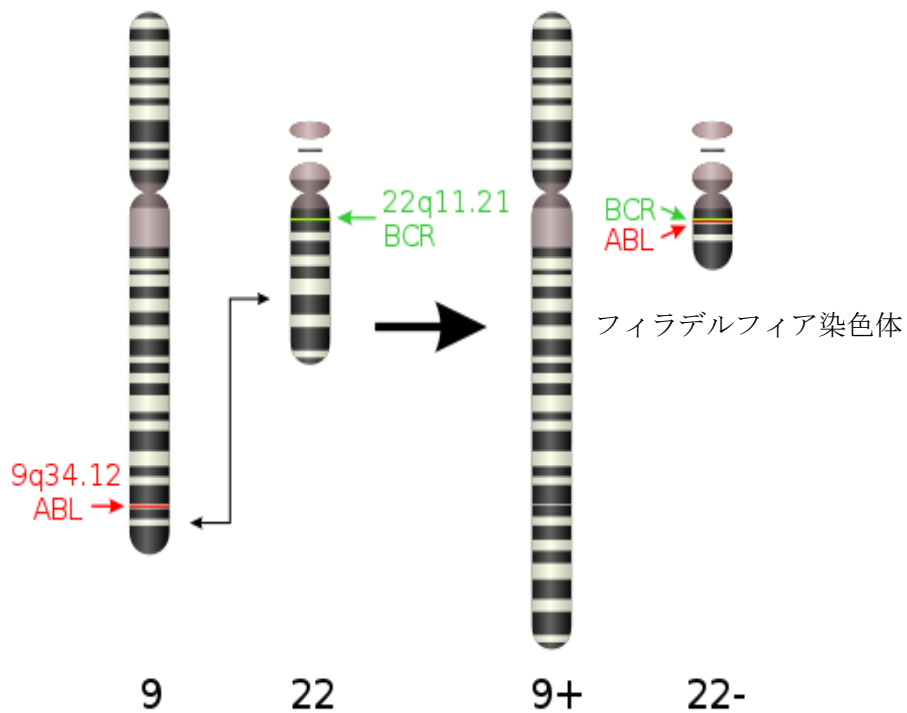
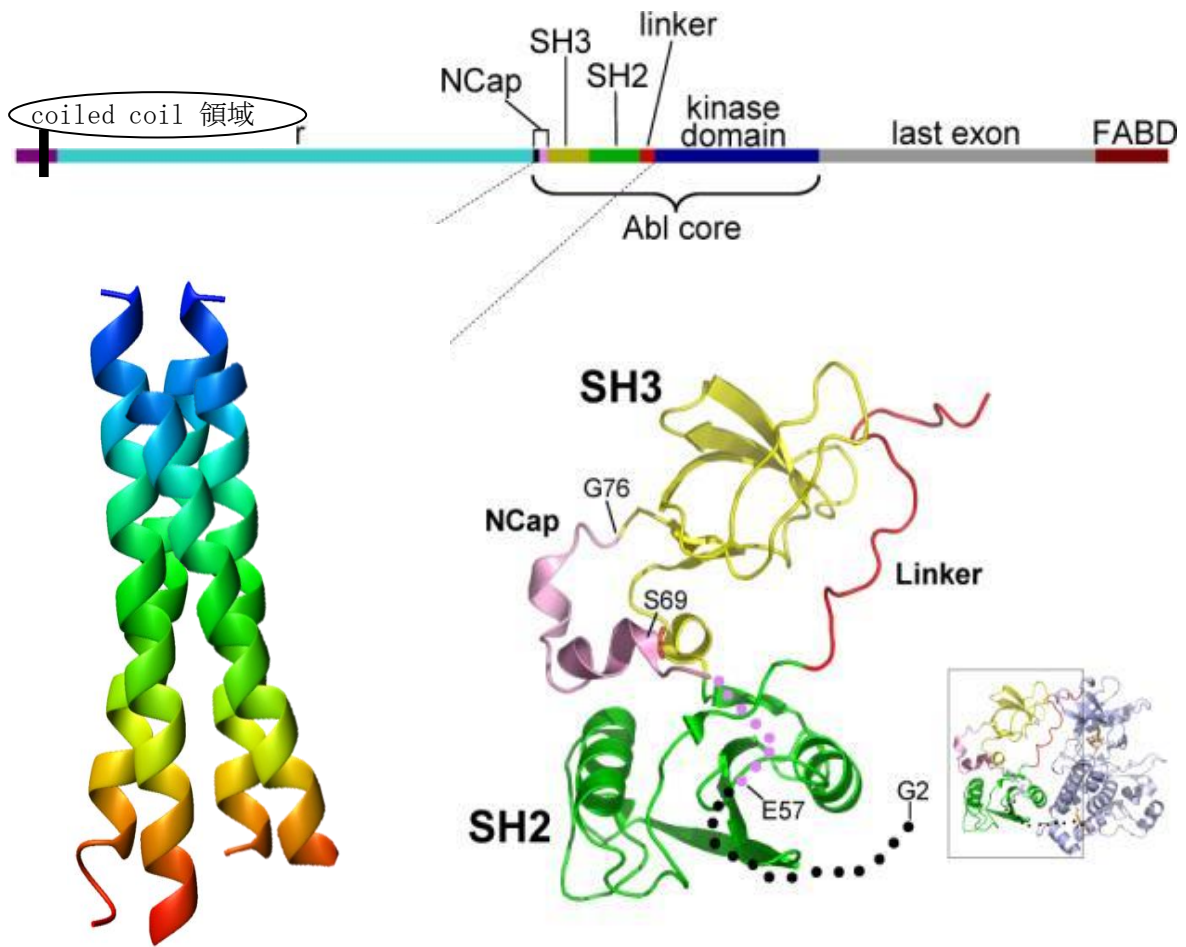


図 1 フィラデルフィア染色体と BCR-ABL 融合遺伝子の形成

多能性造血幹細胞レベルの未熟血球に9番と22番染色体長腕間の相互転座 $t(9;22)(q34.1;q11.2)$ が起こり、Philadelphia (Ph) 染色体と呼ばれる22番染色体由来の小さな染色体を生じる。9 q34.1 には ABL (Abelson murine leukemia viral oncogene homolog) 遺伝子、22q11.2 には BCR (Breakpoint cluster region) 遺伝子が局在しており、相互転座の結果 Ph 染色体上に BCR-ABL 融合遺伝子が形成される。



Biochemistry. 47(21) : 5795-5803. 2008 より抜粋・改変

図 2 BCR-ABL 融合蛋白質の構造

チロシンキナーゼである ABL 蛋白質の活性は通常キナーゼドメインと CAP ドメイン、並びに SH2・SH3 ドメインとの分子内相互作用によって厳密に制御されている。BCR-ABL 融合蛋白質は、BCR 蛋白質の N 末端に位置する coiled-coil 領域を介して 4 量体を形成するためその制御が外れて、チロシンキナーゼの恒常的な活性化が起こる。

一般にチロシンキナーゼは、ATP 結合部位に結合した ATP の γ 位のリン酸基を基質蛋白質に転移する。第 1 世代 TKI のイマチニブは ABL キナーゼの ATP 結合部位に ATP と競合して結合することで基質のリン酸化に続くシグナル伝達を阻害する [9] (図 3)。ABL キナーゼ活性依存的に増殖している CML の腫瘍細胞集団 (Ph クローン) はその増殖シグナルを遮断される結果、アポトーシスによる細胞死へと選択的に誘導される。

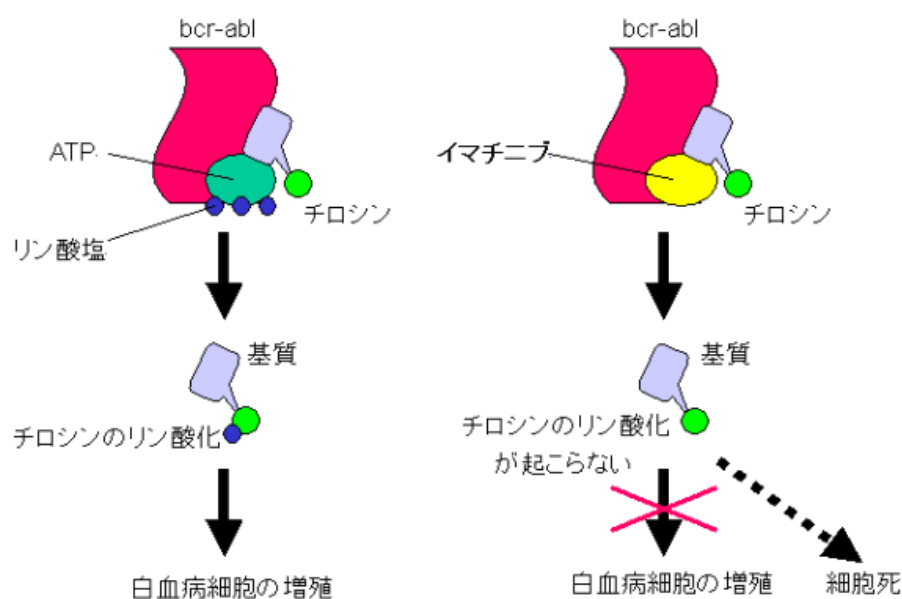


図 3 イマチニブの作用機序

イマチニブは ABL キナーゼの ATP 結合部位に ATP と競合して結合することで基質のリン酸化に続くシグナル伝達を阻害し、抗腫瘍効果を発揮する。

イマチニブは、今世紀初めの導入以来長期間にわたる臨床データが蓄積され、現在でも標準治療薬として使用されている。一方、治療の当初あるいは途中からイマチニブに抵抗性を示す症例が 15~20%存在し、このようなイマチニブ抵抗例や副作用で継続使用できない不耐容例には第 2 世代 TKI であるニロチニブまたはダサチニブ、ボスチニブが投与される[10]。ニロチニブはイマチニブと同様、BCR-ABL 融合蛋白質に ATP と競合的に結合することでキナーゼ活性を阻害するが、イマチニブより ABL キナーゼに対し高い親和性と選択性を有し、イマチニブ感受性の細胞株に対しては約 20~30 倍の阻害活性を示す[11-12]。日本人を含む国際共同第 III 相臨床試験 (ENESTND) では、慢性期 CML 患者を対象としてニロチニブ 300mg および 400mg 1 日 2 回投与 (BID) 群とイマチニブ 400mg 1 日 1 回投与 (QID) の 3 群間で、24 ヶ月時点での細胞遺伝学的完全寛解 (Complete Cytogenetic Response : CCyR) 到達率、分子遺伝学的大寛解 (Major Molecular Response : MMR) 到達率および分子遺伝学的完全寛解 (Complete Molecular Response : CMR) を比較検討している。結果は、ニロチニブ 300mg BID 群、ニロチニブ 400mg BID 群、イマチニブ 400mg QID 群の順に CCyR 到達率が 87%、85%、77%、MMR 到達率が 71%、67%、44%、CMR 到達率が 25%、19%、9%であり、イマチニブに対しニロチニブの効果が有意に優れていた ($p < 0.0001$) [13]。一方ダサチニブは、ATP 結合部位への結合様式がイマチニブとは異なり[14]、イマチニブ感

受性の細胞株に対する増殖阻害活性はイマチニブより約 325 倍高かった[12]。

未治療慢性期 CML 患者に対しダサチニブ 100mg QID とイマチニブ 400mg QID の有効性と安全性を比較した国際共同第Ⅲ相試験 (DASISION) では、24 ヶ月時点の CCyR 到達率および MMR 到達率、CMR 到達率は、ダサチニブ群、イマチニブ群でそれぞれ CCyR 到達率 86%、82%、MMR 到達率 64%、46%、CMR 到達率 17%、8%であり、イマチニブよりもダサチニブの方がより良好な治療効果を有している結果となった[15]。しかし現在までニロチニブとダサチニブの有効性を直接比較検討した報告はなく、それぞれの特徴 [16] (表 1) や患者の合併症・生活様式などを考慮して使い分けを行う。

表1 各TKIの特徴

	イマチニブ	ニロチニブ	ダサチニブ	ボスチニブ
阻害機序	ATP競合的阻害	ATP競合的阻害	ATP競合的阻害	ATP競合的阻害
イマチニブを対照としたABLに対する阻害効果	1倍	20~30倍	325倍	50~200倍
BCR-ABLへの結合	不活性型とのみ結合	不活性型とのみ結合	不活性型、活性型の両者に結合	記載なし
抵抗性の点突然変異	各種点突然変異に無効	T315I	T315I	T315I
阻害効果の特異性	PDGFR>c-Kit>ABL	ABL>PDGFR>c-Kit	Srcファミリー,Ephrinファミリー,PDGFR,c-Kit	Srcファミリーを阻害.PDGFR,c-Kitの阻害作用は極めて弱い
血中半減期	18時間	24時間	3.6時間	8.6時間
主な非血液毒性	皮疹 体液貯留 肝障害 筋痛または関節痛	QTc延長 アミラーゼ上昇 リパーゼ上昇 血糖値の上昇	QTc延長 胸水貯留 心嚢液貯留 消化管出血	下痢 皮疹 嘔吐 全身倦怠感
標準投与方法	CP:400~600mg,qd AP/BP,Ph+ALL:600mg,qd or 800mg,bid	CP/AP:400mg,bid	CP:100mg,qd AP/BP,Ph+ALL:70mg,bid	CP:500mg,qd
承認状況	CML-CP/AP/BP Ph+ALL	イマチニブ抵抗性・不耐容のCML-CP/AP/BP,難治性Ph+ALL	慢性期/移行期/急性転化期CML 難治性Ph+ALL	国内で第I/II相試験中

(血液専門医テキストより改変)

TKIにより劇的にCML患者の予後は改善された[13、15、17]ものの、依然一部にTKI抵抗例が認められており、その原因として以下のような機序が示唆されている[12、18-19](表2)。しかし、これらだけでは説明がつかない症例もあり、TKI抵抗性の原因が全て解明されたわけではない。

表2 TKI抵抗性を生じる要因

- 薬物体内動態や細胞内濃度の個人差
- BCR-ABL 遺伝子の増幅、あるいはBCR-ABL mRNAの過剰発現
- Abl キナーゼドメインのアミノ酸変異に伴うATP結合部位近傍の構造変化
- 付加的染色体異常あるいは他の遺伝子異常の合併
- 抗がん剤耐性獲得の共通メカニズムであるABCトランスポーターによる排泄更新
- 骨髄ニッチとの相互作用によるCML幹細胞のアポトーシス回避
- 服薬コンプライアンスの問題

CML 幹細胞は Ph 染色体陽性の CD34+CD38-細胞分画に存在することが知られており、正常造血同様のヒエラルキーの中でその頂点に位置し自己複製能と増殖能を有する（図 4）一方、TKI 治療に抵抗性を示す[20-27]。近年、診断時の CML 幹細胞はイマチニブとダサチニブを含む TKI による治療効果と相関し、CML 幹細胞が多い症例 (CD34+CD38-細胞分画における BCR-ABL 融合シグナル陽性率 > 79%) ほど CCyR および MMR の到達率が低くなるというデータが報告され[28]、TKI 治療の効果予測因子となる可能性が示唆された。

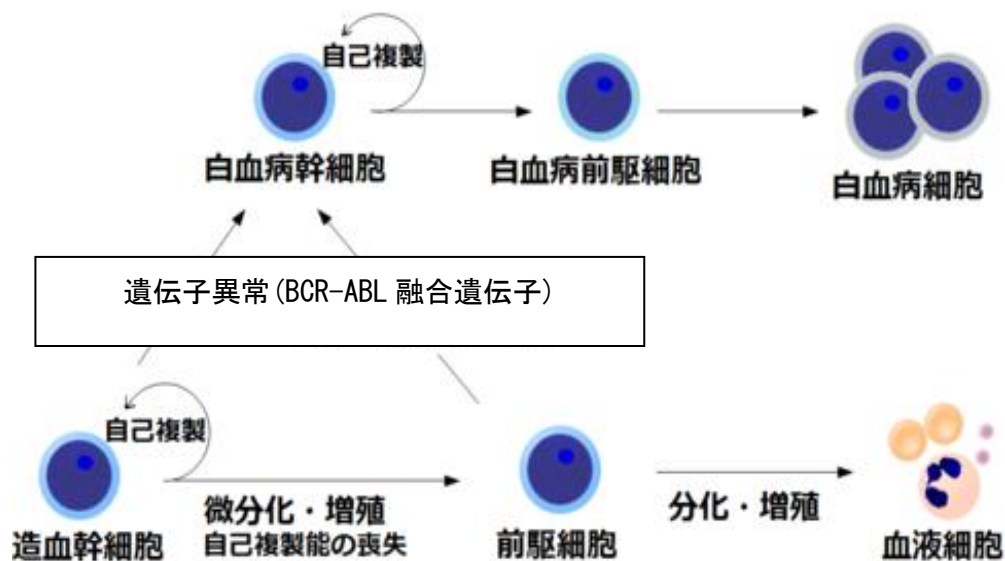


図 4 白血病幹細胞の成り立ち

造血幹細胞および前駆細胞に BCR-ABL 融合遺伝子による遺伝子異常が加わることで CML を発症する。

治療初期より TKI 抵抗性を示す原因のひとつとして、BIM の遺伝子多型が TKI 反応性に影響を及ぼすことも報告されている[29]。BIM 遺伝子は BCL211 とも言われ、その遺伝子産物、BIM 蛋白質は BCL2 ファミリーに属する BH3-only protein の 1 つである。BCL2 ファミリーはアポトーシス制御において重要な役割を担っており、アポトーシス誘導性と抵抗性という異なる機能を有する遺伝子を含むが、BIM はアポトーシス誘導遺伝子に属する。BIM 遺伝子は 2 番染色体上に存在し、第 2 イントロン内に 2903 bp を欠失した遺伝子多型が存在する(図 5)。この多型は人種差があり、アジア系の約 10%に存在するが、アングロサクソン系にはない[29]。これまで TKI を治療薬に用いる他の悪性腫瘍、とりわけ上皮成長因子受容体(Epidermal Growth Factor Receptor:EGFR)遺伝子変異を有した肺癌に対する治療効果と BIM の遺伝子多型に関する研究は多くなされており、遺伝子多型を有する症例の方が無増悪生存期間が短縮することが報告されている[29-30]。CML において BIM の遺伝子多型の有無と予後との相関を検討した報告は少ないものの、TKI による Ph クロンのアポトーシス誘導には BIM 蛋白質の発現上昇が必要であることが知られている[31-33]。また BIM 蛋白質には mRNA のスプライシングによりいくつかのアイソフォームが存在し、通常アポトーシスに必要な BH3 蛋白質をコードするエクソン 4 を含んだ BIM-EL、L、S の 3 つが大半を占めているが、欠失多型の症例ではエクソン 4 を含まない BIM- γ が主流

となっているため、TKI により ABL キナーゼ活性が抑制されても Ph クローンはアポトーシス抵抗性となるとされている [29]。

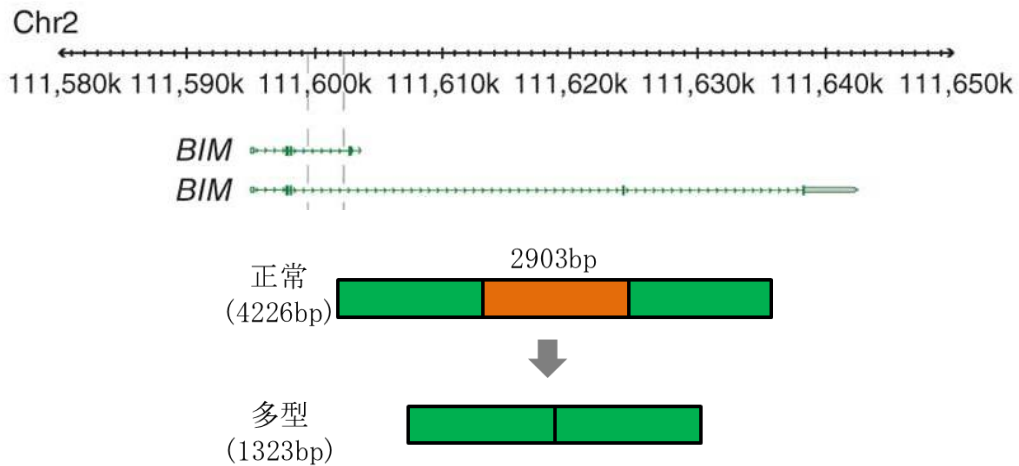


図 5 BIM 遺伝子の染色体上の位置

BIM 遺伝子は 2 番染色体上に存在し、遺伝子多型では第 2 イントロン内の 2903 bp を欠失している。

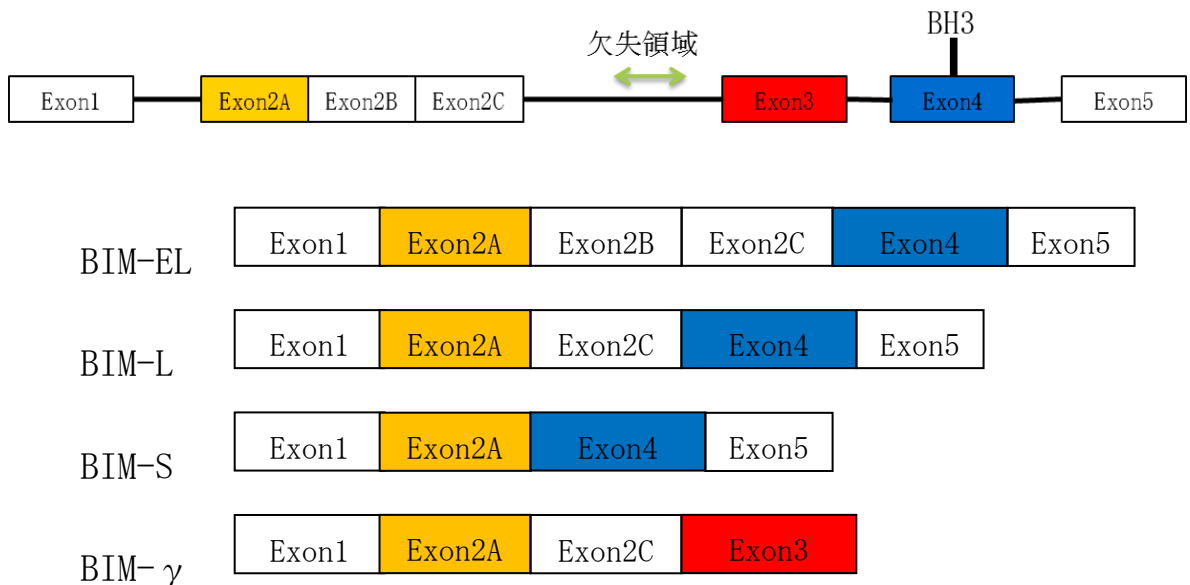


図 6 BIM 蛋白質のアイソフォーム

BIM 蛋白質にはいくつかのアイソフォームが存在するが、遺伝子多型の症例では Exon4 を含まない BIM- γ が主体となっている。

TKI 治療の効果は血液学的効果(Hematologic Response : HR)、細胞遺伝学的効果(Cytogenetic Response : CyR)、分子遺伝学的効果(Molecular Response : MR)の3段階の基準で評価する(表3)。CyR は分裂期骨髄細胞を用いた染色体検査以外に末梢血有核細胞を対象とする蛍光 in situ ハイブリダイゼーション法(fluorescence in situ hybridization : FISH) による BCR-ABL 融合シグナル陽性率(Ph 陽性率)(%)でも判定できる。MR は末梢血有核細胞から抽出した RNA を用いた定量的逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(RQ-PCR)法により判定する。BCR-ABL mRNA と ABL mRNA のコピー数の比率を計測し、国際標準法(International Scale: IS)に従って補正後 BCR-ABL^{IS} として表記する方法に統一されつつある。現行の治療ガイドラインでは、治療開始後3 カ月までに BCR/ABL^{IS} ≤10%または Partial CyR、6 カ月までに BCR-ABL^{IS} < 1%または CCyR、12 カ月までに MMR、それ以後は BCR/ABL^{IS} ≤0.1%を維持することが達成すべき基準となっている[34]。

治療効果の判定基準（表 3）

<血液学的効果(HR) >

<p>以下のすべての項目に該当した場合</p> <ul style="list-style-type: none"> • 血小板数 < 450, 000 / μ L • 白血球数 < 10, 000 / μ L • 白血球分画に幼稚顆粒球がみられず、かつ好塩基球比率 < 5% • 触知可能な脾腫なし

<細胞遺伝学的効果(CyR) >

	骨髄中の Ph 染色体陽性率 (%) または 末梢血中の BCR-ABL 陽性率 (%)
Major (MCyR)	0 ~ 35%
Complete (CCyR)	0%
Partial (PCyR)	1 ~ 35%
Minor CyR	36 ~ 65%
Minimal CyR	66 ~ 95%
No response	> 95%

<分子遺伝学的効果(MR) >

Major MR	BCR-ABL ^{IS*} \leq 0.1%
MR4.0	BCR-ABL ^{IS*} \leq 0.01% または ABL 遺伝子 cDNA > 10,000 コピー中未検出
MR4.5 (Complete MR:CMR)	BCR-ABL ^{IS*} \leq 0.0032% または ABL 遺伝子 cDNA > 32,000 コピー中未検出

近年、BCR-ABL 遺伝子が検出感度以下となる分子遺伝学的完全寛解 (CMR) に関する研究が多く行われており、MMR 到達群の中でも CMR 到達群の方が無再発生存率 (relapse-free survival: RFS) において優れており、また、より早期に MMR に到達した群の方が CMR を達成する率が高いことが報告された [35-36]。このことから血液中に残った微小残存病変 (Minimal Residual Disease : MRD) を測定することは必要不可欠であり、TKI 治療における最終目標となる無治療寛解を目指す上でも、より高感度な MRD の測定法が必要とされる。現在 MRD の評価方法として用いられている RQ-PCR 法は治療効果を判定する上で非常に有用であるものの、その材料として RNA を用いることから、安定性の面で結果に影響を及ぼす可能性がある。また検査は複数の操作手順から構成されており、最良の結果を得るためにはそれぞれの手順を至適条件で行う必要がある。機関別の測定データの差異をなくすべく、国際標準法 (IS) が定められているが、2015 年 4 月までこの検査は保険適応外であったことや検査の施行に要する血液量が多いこと、また偽陽性の可能性が少なからず存在することが難点であった。

以上のことから、今回私は未治療慢性期 CML 患者を対象として、ニロチニブによる治療効果に影響を及ぼしうる因子の検討およびより感度が高く、安定なデータを得られる MRD の評価方法を考案した。

3. 目的

診断時 CML 幹細胞量および BIM 遺伝子多型が初発慢性期 CML 患者におけるニロチニブによる治療効果に及ぼす影響の解析および、RQ-PCR 法による従来の測定方法よりも高感度な MRD の評価方法の開発を目的とした。

3-1 未治療慢性期 CML 患者を対象としたニロチニブによる治療効果に影響を及ぼす因子の解析

3-1-1 ニロチニブによる治療効果に CML 幹細胞の及ぼす影響の解析

診断時 CML 幹細胞量は、治療前の白血球数や赤血球数などの血液検査データならびに TKI による治療効果との間に相関があると報告されている[28]。そこで診断時の患者骨髄液を用いて CML 幹細胞の定量化を行い、CML 幹細胞数が診断時血液所見およびニロチニブによる治療効果に及ぼす影響について検討した。同様に、CML 幹細胞の算出に要する CD34+細胞数および CD34+CD38-細胞における Ph 陽性率と、診断時血液所見およびニロチニブによる治療効果との相関を解析した。

3-1-2 BIM 遺伝子多型の解析

対象患者における BIM 遺伝子多型の有無および遺伝子多型がニロチニブによる治療効果に及ぼす影響について検討した。

3-2 MRD の新たな評価方法の開発

TKI 等により治療中の 4 例の慢性期 CML 患者を対象に、RQ-PCR 法よりも高感度な MRD の評価方法を考案し、その有用性を検討した。

4. 方法

4-1 臨床試験の付随研究における解析

未公表(1年以内に出版予定)

4-2 DNA-PCR による MRD 定量法の開発

未公表(1年以内に出版予定)

4-3 DNA の抽出

全ての DNA は患者骨髄液及び末梢血あるいは細胞株より、DNeasy Blood & Tissue Kit(Qiagen、Hilden、Germany)を用いて抽出した。

4-4 電気泳動

分離用単体として 0.04M トリス酢酸と 0.001M EDTA を溶解したトリス酢酸溶液に 1%アガロースゲルを添加したものを、バッファーとして分離用単体に用いたものと同じトリス酢酸溶液を、分子量マーカーとして 1kb DNA Ladder RTU(GeneDirex)を使用し、PCR にて得られた増幅産物の電気泳動を行った。泳動後 1 μ g/ml の臭化エチジウムで染色した後 UV 照射装置にてバンドの確認を行った。

4-5 統計処理

すべての統計処理は EZR ソフトウェアをもとに Mann-Whitney U 検定を用いて解析を行い、P 値が 0.05 未満のものを有意と判定した。また相関係数(:R)には Spearman の順位相関相関係数を用いた。

4-6 プライマー塩基配列

BIM-F: 5-CATAAATACCACAGAGGCCACAG-3

BIM-R: 5-GCCTGAAGGTGCTGAGAAAGCATG-3

Pt. 1-F:5' -ACCACGGGACACCTCTGAC-3'

Pt. 1-R:5' -GCGCAATCAGAGAAGAAAATC-3'

Pt. 2-F:5' -TCCCAGGGTTTCCTGTCATA-3'

Pt. 2-R:5' -GGAAAAGGGGCTTATTTCTGG-3'

Pt. 3-F:5' -CCCAAACCAAACCTATTATTCA-3'

Pt. 3-R:5' -CAATTGTGGAGTTCATGAGATTA-3'

Pt. 4-F:5' -TTCACGCCAGACCACAATTA-3'

Pt. 4-R:5' -TTTCAACTACAAATGGAACATTCA-3'

BCR-F:5' -TCCCAGGGTTTCCTGTCATA-3'

BCR-R:5' -GGAAAAGGGGCTTATTTCTGG-3'

5 結果

未公表(1年以内に出版予定)

6 考察

未公表(1年以内に出版予定)

7 結論と今後の展望

これまで CML 幹細胞は診断時の白血球数や貧血と相関することが報告されており、本研究においても同様の結果が示された。一方、TKI による治療効果においては CML 幹細胞数による有意差は認められなかったものの、より細胞数の少ない症例の方が早期に MMR を達成する可能性が考えられた。

BIMの遺伝子多型によるTKI抵抗性の研究は他の悪性腫瘍においては研究が進められているが、CMLに関する報告は少ない。今回治療効果との相関は示すことができなかったが、今後の症例数の増加を待って再度解析し、TKIにおける抵抗性が示唆された場合には、治療方針を決定する上で重要な因子となる可能性があると考えられた。

今回考案した CML における MRD の評価方法は、その正確性及び感度の面から有用であると考えられた。また無治療寛解時や移植後のモニターおよび TKI 治

療患者における治療中止の判断としての有用性が示唆された。

また本研究は、ゲノム情報にもとづくオーダーメイド医療の一環として位置づけられ、従来法とは異なった特徴を有する **MRD** の評価方法の有用性を示すことによって、**CML** 治療への貢献が期待された。

8 引用文献

[1] Audrey Sirvent, Christine Benistant and Serge Roche. Cytoplasmic signalling by the c-Abl tyrosine kinase in normal and cancer cells. *Biol Cell*. 100(11):617-31. 2008.

[2] Daniela Barilá and Giulio Superti-Furga. An intramolecular SH3-domain interaction regulates c-Abl activity. *Nature Genetics*. 18:280-282. 1998.

[3] Bhushan Nagar, Oliver Hantschel, Matthew A. Young, Klaus Scheffzek, Darren Veach, William Bornmann, Bayard Clarkson, Giulio Superti-Furga and John Kuriyan. Structural Basis for the Autoinhibition of c-Abl Tyrosine Kinase. *Cell*. 112(6):859-71. 2003.

[4] Helma Pluk, Karel Dorey and Giulio Superti-Furga. Autoinhibition of c-Abl. *Cell*. 108(2):247-259. 2002.

[5] Shugui Chen, Teodora Pene Dumitrescu, Thomas E. Smithgall and John R. Engen. Abl N-Terminal Cap Stabilization of SH3 Domain Dynamics. *Biochemistry*. 47(21):5795-5803. 2008.

[6] Kristen M. Smith, Rinat Yacobi and Richard A. Van Etten. Autoinhibition of Bcr-Abl through Its SH3 Domain. *Molecular cell*. 12(1):27-27. 2003.

[7] JOHN R. McWHIRTER, DEBORA L. GALASSO and JEAN Y. J. WANG. A Coiled-Coil Oligomerization Domain of Bcr Is Essential for the Transforming Function of Bcr-Abl Oncoproteins. *Mol Cell Biol*. 13(12):7587-7595. 1993.

[8] Xun Zhao, Saghi Ghaffari, Harvey Lodish, Vladimir N. Malashkevich and Peter S. Kim. Structure of the Bcr-Abl oncoprotein oligomerization domain. *Nat Struct Biol*. 9(2):117-20. 2002.

[9] Brian J. Druker, Shu Tamura, Elisabeth Buchdunger, Sayuri Ohno, Gerald M. Segal, Shane Fanning, Jürg Zimmermann and Nicholas B. Lydon. Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. *Nat Med*. 2(5):561-6. 1996.

[10]NCCN ガイドライン 慢性骨髄性白血病 2014. 3 版

[11] E Weisberg, P Manley, J Mestan, S Cowan-Jacob, A Ray and J D Griffin.
AMN107 (nilotinib): a novel and selective inhibitor of BCR-ABL. Br J Cancer.
94(12):1765-9. 2006.

[12]Thomas O'Hare, Christopher A.Eide and Michael W.N.Deininger. Bcr-Abl
kinase domain mutations, drug resistance, and the road to a cure for chronic
myeloid leukemia. Blood. 110(7):2242-9. 2007.

[13] Hagop M Kantarjian, Andreas Hochhaus, Giuseppe Saglio, Carmino De
Souza, Ian W Flinn, Leif Stenke, Yeow-Tee Goh, Gianantonio Rosti, Hirohisa
Nakamae, Neil J Gallagher, Albert Hoenekopp, Rick E Blakesley, Richard
A Larson and Timothy P Hughes. Nilotinib versus imatinib for the treatment
of patients with newly diagnosed chronic phase, Philadelphia
chromosome-positive, chronic myeloid leukaemia: 24-month minimum
follow-up of the phase 3 randomised ENESTnd trial. Lancet Oncol.
12(9):841-851. 2011.

[14] John S.Tokarski, John A.Newitt, Chieh Ying J.Chang, Janet D.Cheng,
Michael Wittekind, Susan E.Kiefer, Kevin Kish, Francis Y.F.Lee, Robert

Borzillerri, Louis J. Lombardo, Dianlin Xie, Yaqun Zhang and Herbert E. Klei.

The structure of Dasatinib (BMS-354825) bound to activated ABL kinase domain elucidates its inhibitory activity against imatinib-resistant ABL mutants. *Cancer Res.* 66(11):5790-7. 2006.

[15] Hagop M. Kantarjian, Neil P. Shah, Jorge E. Cortes, Michele Baccarani, Mohan B. Agarwal, María Soledad Undurraga, Jianxiang Wang, Juan Julio Kassack Ipiña, Dong-Wook Kim, Michinori Ogura, Carolina Pavlovsky, Christian Junghanss, Jorge H Milone, Franck E. Nicolini, Tadeusz Robak, Jan Van Droogenbroeck, Edo Vellenga, M. Brigid Bradley-Garelik, Chao Zhu and Andreas Hochhaus. Dasatinib or imatinib in newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia: 2-year follow-up from a randomized phase 3 trial (DASISION). *Blood.* 119(5):1123-9. 2012.

[16] 血液専門医テキスト. 日本血液学会編. p213. 2011年.

[17] Brian J. Druker, François Guilhot, Stephen G. O'Brien, Insa Gathmann, Hagop Kantarjian, Norbert Gattermann, Michael W.N. Deininger, Richard T. Silver, John M. Goldman, Richard M. Stone, Francisco Cervantes, Andreas Hochhaus, Bayard L. Powell, Janice L. Gabrilove, Philippe Rousselot, Josy

Reiffers, Jan J. Cornelissen, Timothy Hughes, Hermine Agis, Thomas Fischer, Gregor Verhoef, John Shepherd, Giuseppe Saglio, Alois Gratwohl, Johan L. Nielsen, Jerald P. Radich, Bengt Simonsson, Kerry Taylor, Michele Baccarani, Charlene So, Laurie Letvak and Richard A. Larson. Five-Year Follow-up of Patients Receiving Imatinib for Chronic Myeloid Leukemia. *N Engl J Med.* 355:2408–2417. 2006

[18] Andreas Hochhaus, S Kreil, A S Corbin, P La Rosé, M C Müller, T Lahaye, B Hanfstein, C Schoch, N C P Cross, U Berger, H Gschaidmeier, Brian J Druker and R Hehlmann. Molecular and chromosomal mechanisms of resistance to imatinib (STI571) therapy. *Leukemia.* 16:2190–2196. 2002.

[19] D Bixby and M Talpaz. Seeking the causes and solutions to imatinib-resistance in chronic myeloid leukemia. *Leukemia.* 25:7–22. 2011.

[20] Dominique Bonnet, John E Dick. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med.* 3(7):730–737. 1997.

[21] I SlomaX, Jiang, A C Eaves and C J Eaves. Insights into the stem cells of chronic myeloid leukemia. *Leukemia.* 24(11):1823–33. 2010.

[22]W Eisterer, X Jiang, O Christ, H Glimm, K H Lee, E Pang, K Lambie, G Shaw, T L Holyoake, A L Petzer, C Auevarakul, M J Barnett, C J Eaves and A C Eaves. Different subsets of primary chronic myeloid leukemia stem cells engraft immunodeficient mice and produce a model of the human disease. *Leukemia*. 19(3):435-41. 2005.

[23]Susan M. Graham, Heather G. Jørgensen, Elaine Allan, Charlie Pearson, Michael J. Alcorn, Linda Richmond and Tessa L. Holyoake. Primitive, quiescent, Philadelphia-positive stem cells from patients with chronic myeloid leukemia are insensitive to STI571 in vitro. *Blood*. 99(1):319-25. 2002.

[24]Mhairi Copland, Ashley Hamilton, Lucy J. Elrick, Janet W. Baird, Elaine K. Allan, Niove Jordanides, Martin Barow, Joanne C. Mountford and Tessa L. Holyoake. Dasatinib (BMS-354825) targets an earlier progenitor population than imatinib in primary CML but does not eliminate the quiescent fraction. *Blood*. 107(11):4532-9. 2006.

[25] X Jiang, Y Zhao, C Smith, M Gasparetto, A Turhan, A Eaves, and C Eaves. Chronic myeloid leukemia stem cells possess multiple unique features of resistance to BCR-ABL targeted therapies. *Leukemia*. 21:926-935. 2007.

[26] Amie S. Corbin, Anupriya Agarwal, Marc Loriaux, Jorge Cortes, Michael W. Deininger and Brian J. Druker. Human chronic myeloid leukemia stem cells are insensitive to imatinib despite inhibition of BCR-ABL activity. *J Clin Invest*. 121(1):396-409. 2011.

[27] Ashley Hamilton, G. Vignir Helgason¹, Mirle Schemionek, Bin Zhang, Svetlana Myssina, Elaine K. Allan, Franck E. Nicolini, Carsten Müller-Tidow, Ravi Bhatia, Valerie G. Brunton, Steffen Koschmieder and Tessa L. Holyoake. Chronic myeloid leukemia stem cells are not dependent on Bcr-Abl kinase activity for their survival. *Blood*. 119(6):1501-10. 2012

[28] S Mustjoki, J Richter, G Barbany, H Ehrencrona, T Fioretos, T Gedde-Dahl, B T Gjertsen, R Hovland, S Hernesniemi, D Josefsen, P Koskenvesa, I Dybedal, B Markevärn, T Olofsson, U Olsson-Strömberg, K Rapakko, S Thunberg, L Stenke, B Simonsson, K Porkka and H Hjorth-Hansen. Impact of malignant stem cell burden on therapy outcome

in newly diagnosed chronic myeloid leukemia patients. *Leukemia*.27:

1520-1526. 2013.

[29] King Pan Ng, Axel M Hillmer, Charles T H Chuah, Wen Chun Juan, Tun Kiat Ko, Audrey S M Teo, Pramila N Ariyaratne, Naoto Takahashi, Kenichi Sawada, Yao Fei, Sheila Soh, Wah Heng Lee, John W J Huang, John C Allen Jr, Xing Yi Woo, Niranjan Nagarajan, Vikrant Kumar, Anbupalam Thalamuthu, Wan Ting Poh, Ai Leen Ang, Hae Tha Mya, Gee Fung How, Li Yi Yang, Liang Piu Koh, Balram Chowbay, Chia-Tien Chang, Veera S Nadarajan, Wee Joo Chng, Hein Than, Lay Cheng Lim, Yeow Tee Goh, Shenli Zhang, Dianne Poh, Patrick Tan, Ju-Ee Seet, Mei-Kim Ang, Noan-Minh Chau, Quan-Sing Ng, Daniel S W Tan, Manabu Soda, Kazutoshi Isobe, Markus M Nöthen, Tien Y Wong, Atif Shahab, Xiaoan Ruan, Valère Cacheux-Rataboul, Wing-Kin Sung, Eng Huat Tan, Yasushi Yatabe, Hiroyuki Mano, Ross A Soo, Tan Min Chin, Wan-Teck Lim, Yijun Ruan and S Tiong Ong. A common BIM deletion polymorphism mediates intrinsic resistance and inferior responses to tyrosine kinase inhibitors in cancer. *Nat Med*. 18(4):521-8. 2012.

[30] Mingchuan Zhao, Yishi Zhang, Weijing Cai, Jiayu Li, Fei Zhou and Ningning Cheng, Ruixin Ren, Chao Zhao, Xuefei Li, Shengxiang Ren, Caicun

Zhou and Fred R. Hirsch. The Bim Deletion Polymorphism Clinical Profile and its Relation With Tyrosine Kinase Inhibitor Resistance in Chinese Patients With Non-Small Cell Lung Cancer. *Cancer*. 120(15):2299–2307. 2014.

[31]Junya Kuroda, Hamsa Puthalakath, Mark S. Cragg, Priscilla N. Kelly, Philippe Bouillet, David C. S. Huang, Shinya Kimura, Oliver G. Ottmann, Brian J. Druker, Andreas Villunger, Andrew W. Roberts and Andreas Strasser. Bim and Bad mediate imatinib-induced killing of Bcr/Abl⁺ leukemic cells, and resistance due to their loss is overcome by a BH3 mimetic. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103(40):14907–12 2006.

[32]Karl J. Aichberger, Matthias Mayerhofer, Maria-Theresa Krauth, Anja Vales, Rudin Kondo, Sophia Derdak, Winfried F. Pickl, Edgar Selzer, Michael Deininger, Brian J. Druker, Christian Sillaber, Harald Esterbauer and Peter Valent. Low-Level Expression of Proapoptotic Bcl-2-Interacting Mediator in Leukemic Cells in Patients with Chronic Myeloid Leukemia: Role of BCR/ABL, Characterization of Underlying Signaling Pathways, and Reexpression by Novel Pharmacologic Compounds. *Cancer Res*. 65(20):9436–44. 2005

[33] Ryoko Kuribara, Hiroaki Honda, Hirotaka Matsui, Tetsuharu Shinjyo,

Takeshi Inukai, Kanji Sugita, Shinpei Nakazawa, Hisamaru Hirai, Keiya Ozawa and Toshiya Inaba. Roles of Bim in Apoptosis of Normal and Bcr-Abl-Expressing Hematopoietic Progenitors. *Mol Cell Biol.* 24(14):6172-83. 2004.

[34] European Leukemia Net 2013 年版

[35] Richard D.Press, Chad Galderisi, Rui Yang, Carole Rempfer, Stephanie G.Willis, Michael J.Mauro, Brian J.Druker and Michael W.N.Deininger. A Half-Log Increase in BCR-ABL RNA Predicts a Higher Risk of Relapse in Patients with Chronic Myeloid Leukemia with an Imatinib-Induced Complete Cytogenetic Response. *Clin Cancer Res.* 13(20):6136-43. 2007.

[36]Rüdiger Hehlmann, Martin C.Müller, Michael Lauseker, Benjamin Hanfstein, Alice Fabarius, Annette Schreiber, Ulrike Proetel, Nadine Pletsch, Markus Pfirrmann, Claudia Haferlach, Susanne Schnittger, Hermann Einsele, Jolanta Dengler, Christiane Falge, Lothar Kanz, Andreas Neubauer, Michael Kneba, Frank Stegelmann, Michael Pfreundschuh, Cornelius F.Waller, Karsten Spiekermann, Gabriela M.Baerlocher, Gerhard Ehninger, Dominik Heim, Hermann Heimpel, Christoph Nerl, Stefan W.Krause, Dieter K.Hossfeld, Hans-Jochem Kolb, Joerg Hasford, Susanne Saußebele and Andreas Hochhaus. Deep

Molecular Response Is Reached by the Majority of Patients Treated With Imatinib, Predicts Survival, and Is Achieved More Quickly by Optimized High-Dose Imatinib: Results From the Randomized CML-Study IV. *J Clin Oncol.* 32(5):415-23. 2014.

[37] Timothy P. Hughes, Andreas Hochhaus, Hagop M. Kantarjian, Francisco Cervantes, François Guilhot, Dietger Niederwieser, Philipp D. le Coutre, Gianantonio Rosti, Gert Ossenkoppele, Clarisse Lobo, Hirohiko Shibayama, Xiaolin Fan, Hans D. Menssen, Charisse Kemp, Richard A. Larson, and Giuseppe Saglio. Safety and efficacy of switching to nilotinib 400 mg twice daily for patients with chronic myeloid leukemia in chronic phase with suboptimal response or failure on front-line imatinib or nilotinib 300 mg twice daily. *Haematologica.* 99(7):1204-1211. 2014.

[38] D M Ross, S Branford, J F Seymour, A P Schwarzer, C Arthur, P A Bartley C Slader, C Field, P Dangl, R J Filshie, A K Mills, A P Grigg, J V Melo and T P Hughes. Patients with chronic myeloid leukemia who maintain a complete molecular response after stopping imatinib treatment have evidence of persistent leukemia by DNA PCR. *Leukemia.* 24:1719-24. 2010.

[39] Timothy Hughes, Michael Deininger, Andreas Hochhaus, Susan Branford,

Jerald Radich, Jaspal Kaeda, Michele Baccarani, Jorge Cortes, Nicholas C.P. Cross, Brian J. Druker, Jean Gabert, David Grimwade, Rüdiger Hehlmann, Suzanne Kamel-Reid, Jeffrey H. Lipton, Janina Longtine, Giovanni Martinelli, Giuseppe Saglio, Simona Soverini, Wendy Stock and John M. Goldman. Monitoring CML patients responding to treatment with tyrosine kinase inhibitors: review and recommendations for harmonizing current methodology for detecting BCR-ABL transcripts and kinase domain mutations and for expressing results. *Blood*. 108(1):28-37. 2006.

[40] Tim P. Hughes, Jaspal Kaeda, Susan Branford, Zbigniew Rudzki, Andreas Hochhaus, Martee L. Hensley, Insa Gathmann, Ann E. Bolton, Iris C. van Hoomissen, John M. Goldman and Jerald P Radich. Frequency of major molecular responses to imatinib or interferon alfa plus cytarabine in newly diagnosed chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 349(15):1423-32. 2003.

[41] VHJ van der Velden, G Cazzaniga, A Schrauder, J Hancock, P Bader, ER Panzer-Grumayer, T Flohr, R Sutton, H Cave, HO Madsen, JM Cayuela, J Trka, C Eckert, L Foroni, U zur Stadt, K Beldjord, T Raff, CE van der Schoot and JJM van Dongen. Analysis of minimal residual disease by Ig/TCR gene rearrangements: guidelines for interpretation of real-time quantitative

PCR data. *Leukemia*. 21:604-611. 2007.

[42] A. Kolenova, I. Hikkel, D. Ilencikova, M. Hikkelova, D. Sejnova, E. Kaiserova, A. Cizmar, J. Puskacova, E. Bubanska, I. Oravkinova and M. Gencik. Minimal residual disease detection using real-time quantitative PCR analysis of immunoglobulin and T-cell receptor gene rearrangements in the non-MRD-based ALL IC-BFM 2002 protocol for childhood ALL: Slovak experience. *Neoplasma*. 57(6):552-561. 2010.

9. 謝辞

本研究にあたり、東京大学医科学研究所 先端医療研究センター 分子療法分野 東條有伸教授には、指導教官としてご指導およびご鞭撻を頂きました。ここに改めて心より感謝の意を表明いたします。

また、共同研究者として多大なるお力添えを頂きました東京慈恵会医科大学 附属柏病院 腫瘍・血液内科 西脇嘉一先生、伊勢赤十字病院 血液・感染症内科 玉木茂久先生、大森赤十字病院 血液内科 久武純一先生、群馬県立がんセンター 血液内科 五十嵐忠彦先生、日立総合病院 血液内科 品川篤司先生、千葉県がんセンター 腫瘍血液内科 菅原武明先生、成田赤十字病院 血液腫瘍科 脇田久先生、済生会習志野病院 血液内科 藤川一壽先生、順天堂大学附属浦安病院 血液内科 杉元啓二先生、千葉労災病院 腫瘍血液内科 原暁先生、土浦共同病院 血液内科 清水誠一先生、国立病院機構仙台医療セ

ンター 血液内科 横山寿行先生、山口大学医学部附属病院 血液内科 湯尻俊昭先生、東京大学医科学研究所附属病院 血液内科 川俣豊隆先生、東京大学医科学研究所 先端医療研究センター 分子療法分野 高橋圭介さまにも、ここに深く感謝の意を表します。

東京大学医科学研究所 先端医療研究センター 分子療法分野 Chanda Bidisha さま、同 小林真之先生、同附属病院 セルプロセッシング・輸血部 山本由紀さまには本研究を進めるにあたり多くの貴重なご意見やご協力を頂きましたことに誠に感謝申し上げます。

