

論文の内容の要旨

論文題目 慢性骨髄性白血病における血中循環腫瘍 DNA を用いた
全エクソームシーケンスの臨床的有用性の検討

氏名 武井 智美

【諸言】

慢性骨髄性白血病 (chronic myeloid leukemia: CML) は相互転座 t(9;22)(q34;q11)により *BCR-ABL1* 融合遺伝子が形成され、恒常的活性型チロシンキナーゼとして造血細胞に過剰な増殖をもたらす疾患であり、慢性期 (chronic phase: CP)、移行期 (accelerated phase: AP)、急性転化期 (blast phase: BP) の3つの病期に分類される。CML はチロシンキナーゼ阻害剤 (tyrosine kinase inhibitor: TKI) の登場により劇的に予後が改善したが、依然治療抵抗性となり病勢が進行する患者が存在する。TKI 治療抵抗性の主要原因として *ABL1* キナーゼドメイン変異が知られており、従来 Sanger 法による *ABL1* キナーゼドメイン変異の検索が行われているが、検索する遺伝子変異が *ABL1* 遺伝子に限定しており、検出感度も低い事が問題となる。また、治療抵抗性に関わる *ABL1* 変異以外のがん関連遺伝子変異も報告されているが、未だ明らかになっていない事も多い。そのため、治療抵抗性となった場合、検出感度の高い次世代シーケンサー (next generation sequencer :NGS) による *ABL1* キナーゼドメイン変異や、その他のがん関連遺伝子変異の検索が推奨されており、包括的な遺伝子変異検索と、知見の集積が望まれている。さらに、診断時や治療抵抗性となった際には骨髄検査を行う事が推奨されており、NGS による評価にも末梢血検体よりも骨髄検体の方が適しているという報告もあるが、骨髄検査は末梢血採血よりも侵襲性が高くなる。特に進行期 CML において骨髄が dry tap の場合は、より侵襲性の高い骨髄生検を行う必要があり、さらに骨髄生検では採取可能な検体量も限られる。

血中循環腫瘍 DNA (circulating tumor DNA: ctDNA) は、末梢血の血漿中に存在する、腫瘍細胞が壊死や細胞死をする事により放出される細胞外遊離 DNA である。低侵襲で包括的な遺伝子解析ができるバイオマーカーとして様々ながん腫で用いられ始めており、造血器腫瘍でも有用性が報告されているが、CML における有用性を検討した報告は存在しない。

【目的】 CML の遺伝子解析における ctDNA の有用性の検証

【方法】

本研究は、東京大学医科学研究所の倫理審査委員会承認のもと、課題「血液疾患のゲノム解析」と「血液疾患の臨床ゲノム解析研究」(承認番号: 26-112-270402/2020-1-0422) の範疇で行い、2006年6月から2020年1月の間に東京大学医科学研究所附属病院を受診し、腫瘍検体(骨髄、髄外腫瘍)と、同時期に採取した血漿もしくは血清検体が存在する

CML 患者 13 例を対象とした。骨髓検体、腫瘍検体、末梢血検体、血漿・血清検体の余剰検体から DNA を抽出し、腫瘍 DNA、ctDNA それぞれの全エクソームシーケンス

(whole exome sequencing: WES) を行って、CML の進行に関連すると考えられるがん関連遺伝子変異を同定し、腫瘍検体と対応する ctDNA で解析結果を比較検討した。予後解析は、解析を行なった検体を採取した時期からの全生存率 (overall survival: OS) と、無増悪生存率 (progression-free survival: PFS) の生存曲線を作成した。

【結果】

CML 患者 13 例 (CP 6 例、AP 1 例、BP 6 例) から、腫瘍検体として、骨髓 13 検体、髄外腫瘍 1 検体、末梢血 1 検体を得ることができ、腫瘍検体と同時期に採取した ctDNA 14 検体とともに解析した。始めに骨髓 13 検体と、対応する ctDNA 13 検体の結果を比較した。骨髓検体から *ABL1* キナーゼドメイン変異を 3 検体、*ASXL1* 変異を 5 検体、*SETD2* 変異を 1 検体で認め、合計 9 の遺伝子変異を検出した。これら 9 の遺伝子変異は、全て対応する同時期に採取した ctDNA から検出し、変異遺伝子の variant allele frequency (VAF) に強い相関関係を認めた ($R^2 = 0.812752$)。

また症例 10 において、ctDNA からは *TP53* c.856_860delinsAAGA (p.Glu286Serfs*2) 変異を認めたが、骨髓生検ホルマリン固定パラフィン包埋 (formalin-fixed paraffin-embedded: FFPE) 検体では検出しなかった。この変異に対する droplet digital PCR (ddPCR) アッセイを作成し解析したところ、骨髓検体にも同変異の存在を確認した。

次に、髄外腫瘍病変に対する ctDNA の有用性の検討を行った。症例 13 は allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (alloSCT) 後に右硬膜に髄外再発した症例であり、髄外腫瘍生検検体と、同時期に採取した末梢血、血漿検体からそれぞれ DNA を抽出し、解析を行った。解析の結果、髄外腫瘍生検検体から *ABL1*、*WT1*、*IKZF1*、*GATA2* の 4 変異を検出したが、これらの変異は末梢血、ctDNA からは検出できなかった。

また、*ABL1* キナーゼドメイン変異を含むがん関連遺伝子変異と臨床経過の関連を検討したところ、がん関連遺伝子変異を認めた 6 症例において、TKI 治療を行っているにも関わらず 4 症例は alloSCT 後に再発し、3 症例は死亡していた。これに対し、*BCR-ABL1* 融合遺伝子以外にがん関連遺伝子変異を認めなかった 7 症例は、BP 発症 3 例、治療抵抗性症例が 2 例含まれているにも関わらず全症例が生存しており、そのうち BP 発症 2 例を含む 4 症例では、分子遺伝子学的大寛解を達成していた。*ABL1* 変異、それ以外のがん関連遺伝子変異の有無、WES を施行した検体を採取した時点での臨床病期による OS、PFS の解析を行ったところ、OS の比較では遺伝子変異の有無、臨床病期による比較で共に有意差は認めなかった。一方 PFS の比較では、*ABL1* 変異を持つ症例は持たない症例と比べ有意に PFS が低下していた ($p = 0.012$)。*ABL1* 以外のがん関連遺伝子を持つ症例は、持たない症例と比較し、OS と同様に有意差は認めなかった。また、検体を採取した時点での臨床病期による PFS の比較では、有意差は認めなかったものの、plot 上は進行期症例よりもむしろ CP 症例の方が低い傾向を認めた。

【考察】

本研究では、骨髄検体から検出した *ABL1* 変異を含む 9 のがん関連遺伝子変異は、全て対応する ctDNA から検出しており、検出した変異遺伝子の VAF は強い相関関係を認め、同等の VAF で検出可能であった。この結果から、ctDNA を用いたがん関連遺伝子変異解析は、CML においても骨髄検体と同等の結果を得られる事が示唆された。

骨髄生検 FFPE 検体を使用した症例 10 については、WES の結果、*TP53* 変異を骨髄検体では検出せず、ctDNA のみで検出したが、同変異の ddPCR アッセイを作成し解析を行った結果、骨髄にも同変異が存在している事を確認した。これは骨髄生検 FFPE から抽出した DNA が、WES 解析を行うにはクオリティが低く、変異を検出できなかったと考えられた。進行期 CML では骨髄が dry tap となり骨髄生検が必要となる事も少なくなく、通常の骨髄穿刺による骨髄液吸引による検体採取よりも採取量や DNA の収量が限られるため、WES 解析を行う為に必要な検体量を確保する事が難しいと考えられる。このような例では、ctDNA を骨髄の代替として解析に用いる事で、非侵襲的により高いクオリティで包括的な遺伝子変異解析を行う事ができる可能性が示唆された。

一方で中枢神経髄外腫瘍として CML が再発した症例 13 については、髄外腫瘍生検検体から 4 変異を検出したが、対応する ctDNA、末梢血からは同変異を検出できなかった。この原因として、脳血液関門のため血漿からは解析に必要な量の ctDNA を検出できなかったと考えられ、今後脳脊髄液由来の ctDNA による解析の検討を行う必要があると考えられる。

本研究で検出した *ABL1* 変異を含むがん関連遺伝子変異は、CML で報告されている変異であり、既報と矛盾しなかった。がん関連遺伝子変異を認めた症例は、alloSCT 後再発、死亡等予後不良な経過を辿っており、反対に *BCR-ABL1* 融合遺伝子以外にがん関連遺伝子変異を認めなかった 7 症例は、進行期、治療抵抗性症例を含んでいたが全例生存し、過半数で分子遺伝子学的寛解を達成していた。*ABL1* 変異の有無、*ABL1* 以外のがん関連遺伝子の有無、WES を施行した検体を採取した時点での臨床病期による OS の比較では、遺伝子変異を持つ症例、進行期の症例で、plot 上は OS が低くなる傾向を認めたが、有意差は認めなかった。一方 PFS の比較において、*ABL1* 変異を持つ症例は、変異を持たない症例と比較し有意に PFS が低かった。*ABL1* 以外のがん関連遺伝子を持つ症例は plot 上 PFS が低くなる傾向を認めたが、有意差は認めなかった。また、検体を採取した時点での臨床病期による PFS の比較では、plot 上は進行期症例よりもむしろ CP 症例の方が低い傾向を認めた。この事から、NGS 施行時の *ABL1* 変異の有無は、臨床病期よりも予後の推測において優れている可能性が示唆されるが、本研究では *ABL1* 変異を持つ症例数が少なく、検体採取時期も症例により異なるため、更なる検討が必要である。*ABL1* 以外のがん関連遺伝子変異についても、症例数が不足していたため有意差を検出できなかった可能性が高く、*ABL1* キナーゼドメイン変異以外のがん関連遺伝子変異を含めた包括的な遺伝子解析を行い、症例を蓄積する必要があると考えられる。また、CML において、*ABL1* キ

ナーゼドメイン変異以外のがん関連遺伝子変異が、予後や TKI 治療抵抗性にどのように影響をもたらすのか、はっきりとした知見はまだ得られていない。本研究の結果、ctDNA を用いた WES による解析は骨髄検体と比べて遜色のない結果が得られており、本来では骨髄検査を行わないタイミングでも、採血で得られる ctDNA を骨髄の代替として遺伝子変異解析を行う事で、治療経過中のより詳細な遺伝子変異変化やクローン変化を観察でき、予後や治療抵抗性等に関する知見を重ねる事が可能となると考えられた。

【結論】

本研究では、CML 患者の骨髄・腫瘍検体と ctDNA を用いて WES 解析を行い、*ABL1* キナーゼドメイン変異を含むがん関連遺伝子の有無を比較検討したところ、同等の解析結果を得た。この事から、ctDNA を用いる事で、非侵襲的に、骨髄検体を用いた際と同等の包括的な遺伝子解析が可能となる事が示唆された。特に進行期 CML において、骨髄が dry tap のため骨髄生検が必要となる際には、検体量が限られる事から、ctDNA を骨髄の代替として用いる事も可能であると考えられた。また、CML の予後予測や、治療戦略、遺伝子変異の意義についての知見の蓄積においても非侵襲的に繰り返し検体が得られる事から、ctDNA による解析は有用である事が示唆された。