

博士論文

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。

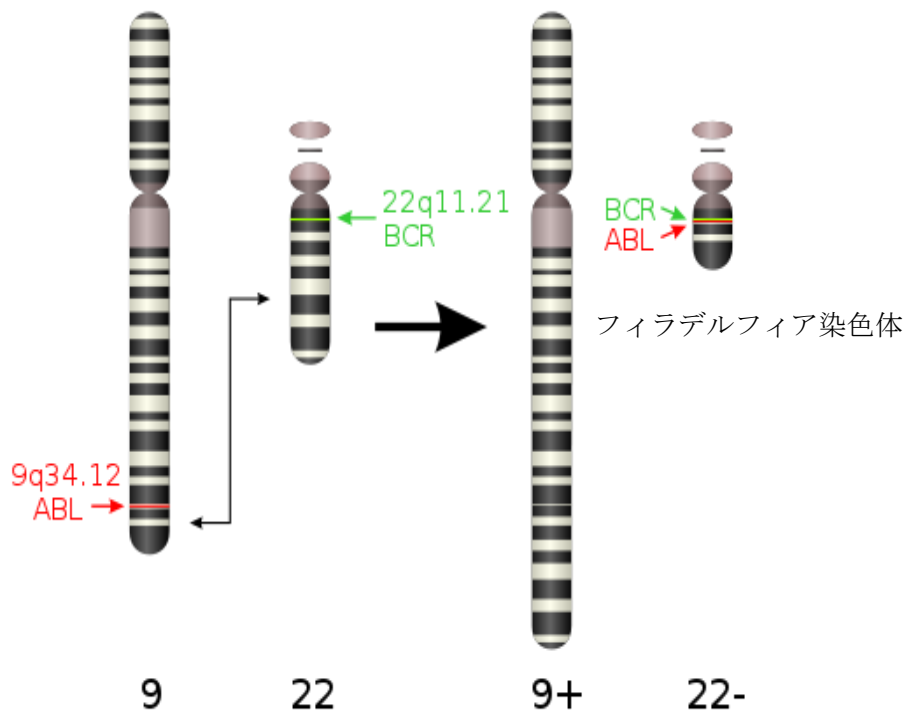
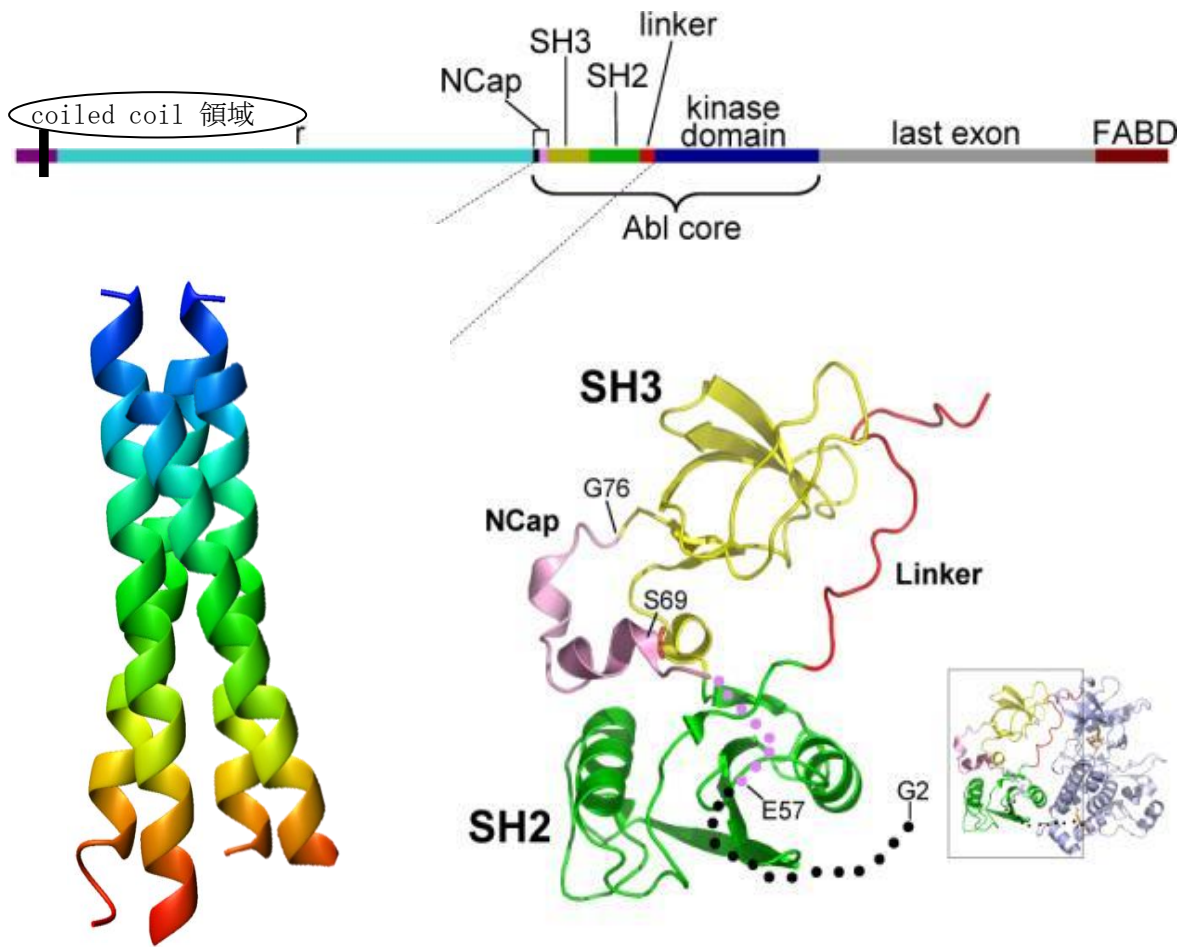


図 1 フィラデルフィア染色体と BCR-ABL 融合遺伝子の形成

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。

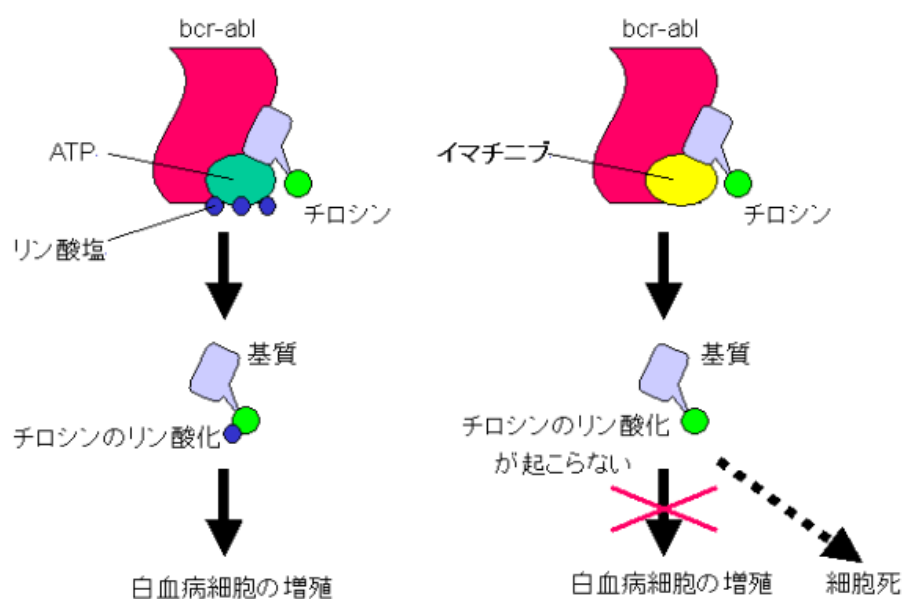


図 3 イマチニブの作用機序

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。

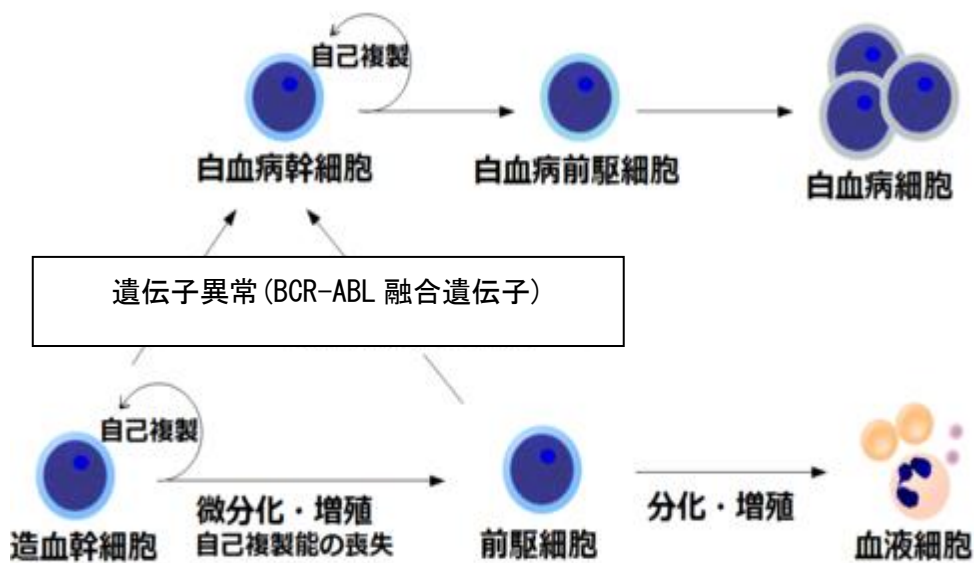


図 4 白血病幹細胞の成り立ち

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]。

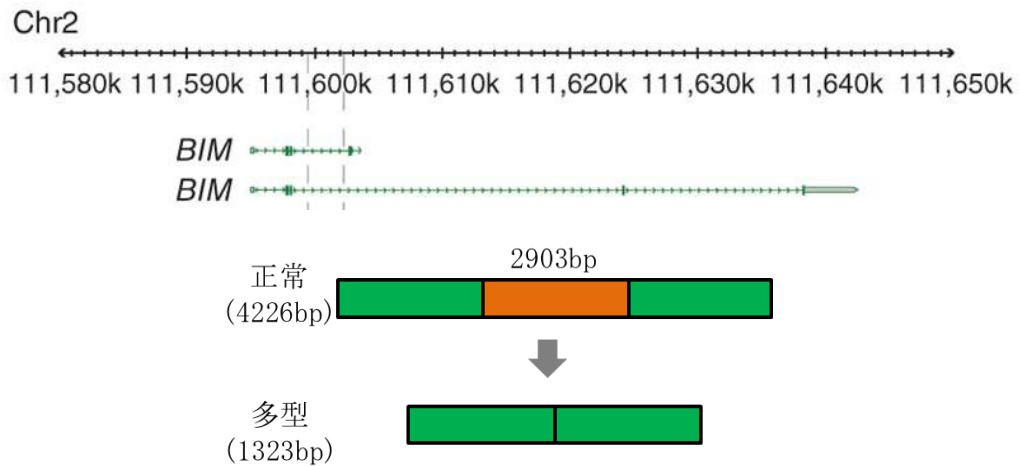


図 5 BIM 遺伝子の染色体上の位置

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。

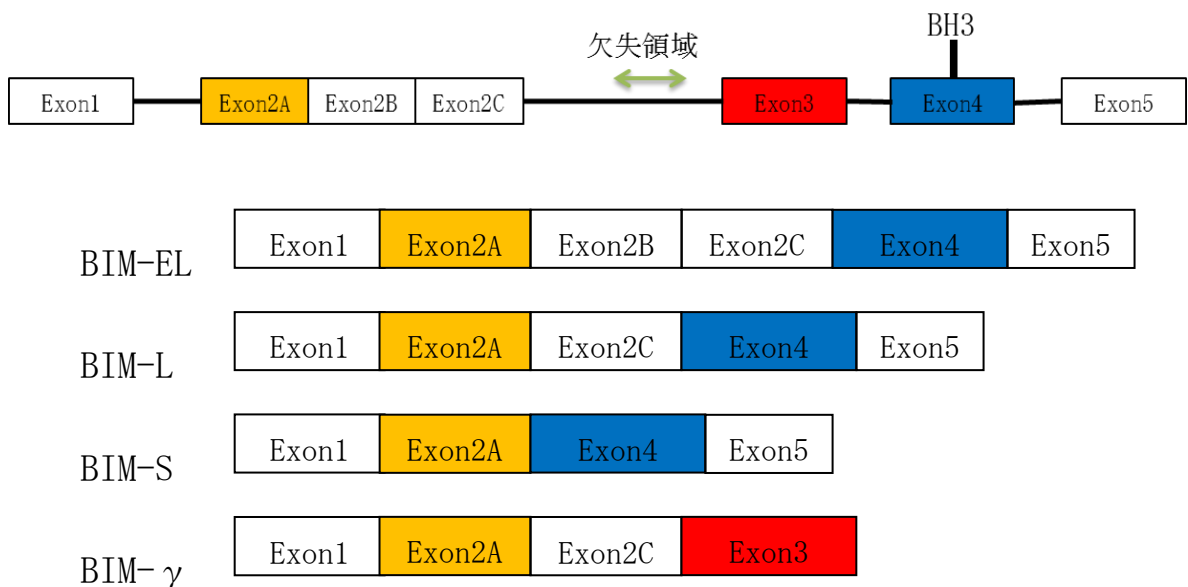


図 6 BIM 蛋白質のアイソフォーム

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/μL • 白血球数 < 10, 000/μL • 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*} ≤ 0.1%
MR4.0	BCR-ABL ^{IS*} ≤ 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*} ≤ 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

4-1-1 対象患者

CML 診断時の幹細胞定量と BIM 遺伝子多型の解析は、下総血液研究会の多施設共同研究として実施されている「初発の慢性期慢性骨髄性白血病 (CML-CP) 患者を対象とし、早期の CMR 到達を目標としたニロチニブの至適投与法を検討する多施設共同第 II 相臨床試験 (N-road 試験)」の付随研究として行った (研究代表者：成田赤十字病院 脇田 久 医師)。また本研究において開示すべき利益相反はなかった。本臨床試験の対象 (適格基準) は、登録 6 ヶ月以内に診断され、TKI ならびにインターフェロン α 治療歴のない 16 歳以上の慢性期 CML 患者であり、スクリーニング検査と病歴聴取により重篤な合併症と肝腎等の機能障害を有する患者は除外された。登録症例数はニロチニブ投与開始後 24 ヶ月までの CMR 期待到達率を 30%、両側 α エラー 0.05、 β エラー 0.1 と設定する。帰無仮説の到達率 10% を基に検定を行うと評価必要症例数は 40 例となる。本試験の不適合例を約 20% と見込み、50 例と設定した。

本臨床試験の主要評価項目はニロチニブ投与開始後の CMR 到達率 (~24 ヶ月) であり、副次的評価項目として CMR 到達率 (~12、18 ヶ月)、MMR 到達率 (~12、18、24 ヶ月)、CCyR 到達率 (~6、12 ヶ月)、予後予測因子の探索であった。付随

研究用の検体は、各登録施設において診断時に採取した骨髄液 5ml を所定のヘパリン加チューブに移し、当研究室まで常温にて 24 時間以内に搬送された。

ニロチニブの投与方法は、300mg BID を 24 ヶ月継続し、治療効果不十分と判断された場合には 400mg BID へ増量とした。この投与方法はニロチニブとイマチニブとの有用性を比較した臨床試験[13]において、300mg BID 投与による治療効果は 400mg BID 投与とほぼ同等であったという結果に基づくものであり、また 300mg BID で治療効果不十分となった症例に 2nd 治療として 400mg BID として投与したところ CCyR および MMR 到達率の改善が認められたことを根拠とした [37]。

分子遺伝学的効果の評価は治療開始後 3 ヶ月毎に行い、RQ-PCR 法で測定した末梢血 BCR-ABL mRNA コピー数の結果を国際標準法に従って補正した数値を用いて評価した。

幹細胞定量を含む本臨床試験は東京大学医科学研究所治験審査委員会(承認番号：24-13)ならびに参加各施設 IRB での承認後に開始し、候補症例への説明と同意取得を文書にて行った。BIM 遺伝子多型解析は、東京大学医科学研究所ヒトゲノム倫理審査委員会(承認番号：26-4-0920)ならびに参加各施設 IRB での承認を経て、登録症例に対して文書による再同意を取得後に実施した。

4-1-2 CML 幹細胞の定量

CML 幹細胞定量は、CD34+細胞絶対数に CD34+細胞分画における CD38-細胞の比率と FISH 法にて判明した Ph 陽性率を掛け合わせることで算定した(図 7-8)。

CML 幹細胞数(/ μ l 骨髄液)

$$= \text{CD34+細胞数}(/\mu\text{l}) \times \text{CD38-細胞比率} \times \text{Ph 陽性率} (\%)$$

CD34+細胞の定量には BD Stem Cell Enumeration Kit (BD biosciences, San Jose, CA, USA) を使用した。骨髄液 100 μ l を BD Trucount tube (BD biosciences) に分取し、FITC 標識-抗ヒト CD45 モノクローナル抗体及び PE 標識-抗ヒト CD34 モノクローナル抗体で二重染色した後 BD FACS Canto™ II (BD Biosciences) にて CD34+細胞数を算出した。残りの骨髄液から Lymphoprep™ (コスモ・バイオ(株)、東京、日本) を用いて単核球を分離した後、Indirect CD34 MicroBead Kit (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) を用いて CD34+および CD34-細胞分画をそれぞれ回収し、使用するまで-80°Cにて凍結保存した。

フローサイトメトリーによる幹細胞分画のソーティングには、BD FACS Aria™ (BD Biosciences) を使用した。細胞標識に用いた抗ヒトモノクローナル抗体(いずれもマウス IgG1) は以下の通りである。PE 標識-抗 CD34 抗体(clone 581; BioLegend, San Diego, CA, USA)、APC 標識-抗ヒト CD38 抗体(clone HIT2; BioLegend)。CD34+生細胞中の CD38+/-各細胞分画をそれぞれ回収し、CD34+細胞

に占める CD38⁻細胞の比率を算出した。

分取した CD38^{+/-}細胞は遠心分離による上清除去後にリン酸緩衝生理食塩水 (phosphate-buffered saline: PBS) で懸濁し、SHANDON CYTOSPIN3 (Thermo Fisher Scientific、横浜、日本) を用いてスライド固定細胞数が $10^3 \sim 10^5$ になるように サイトスピン標本を作製した。サイトスピン標本は (株) LSI メディエンス (東京、日本) に送付して FISH 法による BCR-ABL 融合シグナルの検出を依頼し、CD34⁺ CD38[±]細胞における Ph 陽性率を測定した。

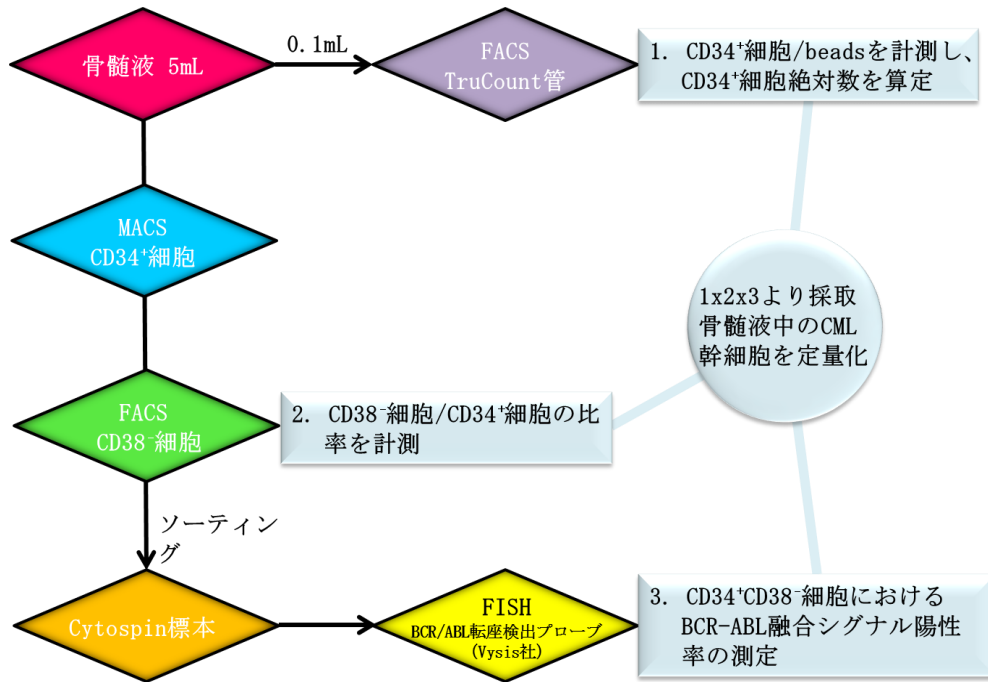


図 7 CML 幹細胞定量のアルゴリズム

CML 幹細胞数は、CD34+細胞絶対数に CD34+細胞分画における CD38-細胞の比率と FISH 法にて判明した Ph 陽性率を掛け合わせることで算定した。

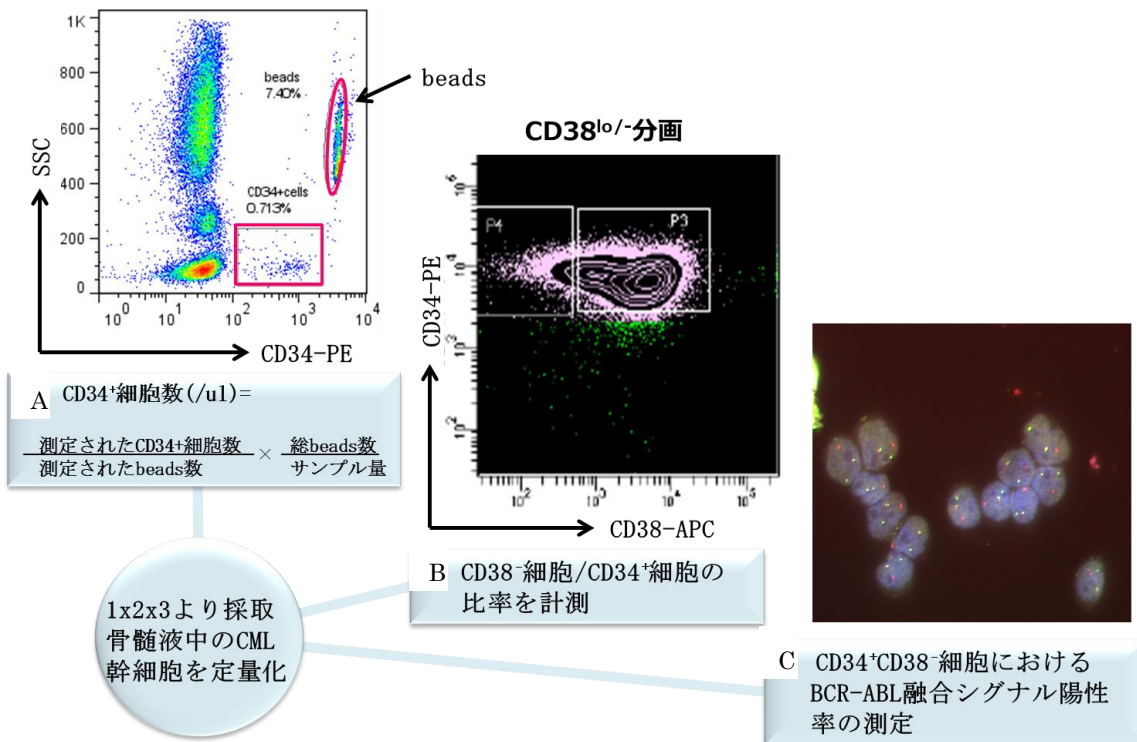


図 8 CML 幹細胞定量の実際の解析例

A:CD34+細胞の定量時の FACS 解析。B:CD34+細胞における CD38-陰性細胞の割合の計測。C:各 CD38±分画における Ph 陽性率の測定。

4-1-3 BIM 遺伝子多型の解析

診断時の患者骨髄液から回収し凍結保存していた CD34-細胞より抽出した DNA を使用した。100ng の DNA を鋳型に、TaKaRa LA Taq(タカラバイオ(株)、大津、日本)を用いて、後述のプライマーを使用し PCR を行った。PCR は、初期変性 96°C 30 秒の後、変性 94°C 15 秒、アニーリング及び伸長 68°C 8 分の条件で 35 サイクル繰り返し、最終伸長は 68°C 16 分を行った。増幅産物は電気泳動にかけて遺伝子多型の有無を確認した。

4-2 DNA-PCR による MRD 定量法の開発

4-2-1 対象患者

東京大学医科学研究所附属病院にて治療経過中の慢性期 CML 患者 4 名を対象とした。本研究計画はヒトゲノム倫理審査委員会(承認番号：24-27-0717)の承認を得た後、対象症例への説明と同意取得を文書にて行った。試料については、RQ-PCR 法による MRD 測定の検査目的で外来受診時あるいは入院中に採取した末梢血の残余検体から抽出し 4°C に保存していた DNA を解析に供した。

4-2-2 切断点の同定

患者特異的な PCR プライマーを設計するにあたり、まず Ph クローンが主体を占める時期の DNA を用いて BCR-ABL 融合遺伝子の切断点を同定した。CML の場合、BCR 遺伝子側の切断点のほとんど全てが M-bcr と呼称される exon 12~15 を含む 5.8 kb の領域に集中しており、特に intron 13 と 14 がその大半を占める (図 9)。ABL 遺伝子側の切断点は exon 2 の上流約 200kb の領域に分散しており、大多数の症例において BCR-ABL 融合遺伝子から転写される mRNA の融合パターンは、BCR exon 13 (B2) または exon 14 (B3) と ABL exon 2 (A2) が融合する B2A2、B3A2 のいずれかとなっている。そこで、以下の①または②の方法を用いて切断点の同定を試みた。

方法① キメラ RNA のパターンが B2A2 場合 HindIII、B3A2 の場合 BamHI+BglII で制限酵素処理後、セルフライゲーションさせた。生じた環状 DNA を鋳型として、B2A2 の場合 exon 13、B3A2 の場合 exon 14 のそれぞれ 5' 側に設定したプライマーセットを用いて inverse PCR を行った (図 10)。PCR 産物の電気泳動後、転座アレルに相当するバンドから FastGene Gel/PCR Extraction Kit (日本ジェネティクス (株)、東京) によって抽出した DNA をシーケンスすることによって切断点を決定した。

方法② Ross DM らの報告[38]に従って、BCR exon 13 と 14 にそれぞれ forward primer、ABL の 5' 上流から intron 3 の範囲に計 20 種類の reverse primer (図 11、表 4) を設定した。BCR 側の切断点 (B2A2/B3A2) に応じて選択した forward primer と 20 種類の reverse primer およびコントロールとして精製蒸留水を用い、計 21 の組み合わせで LA (:long and accurate)-PCR を行った。増幅産物の電気泳動後、いずれかのレーンで確認できたバンドから FastGene Gel/PCR Extraction Kit (日本ジェネティクス(株)、東京) によって抽出した DNA をシーケンスすることによって切断点を決定した。

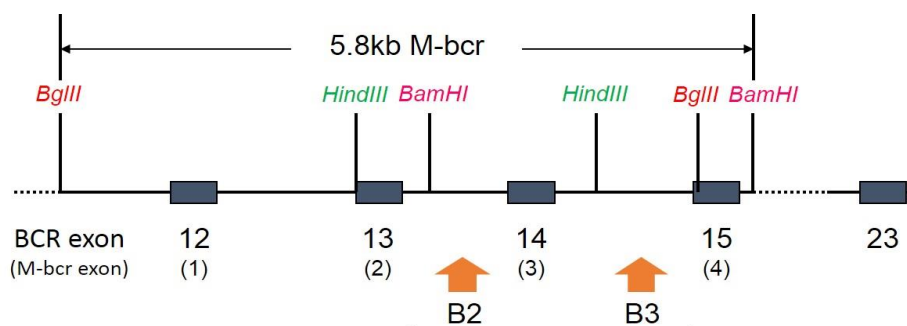


図 9 M-bcr の遺伝子構造

CML の場合 BCR 遺伝子側の切断点のほとんどは M-bcr と呼称される exon 12~15 を含む 5.8 kb の領域に集中している。

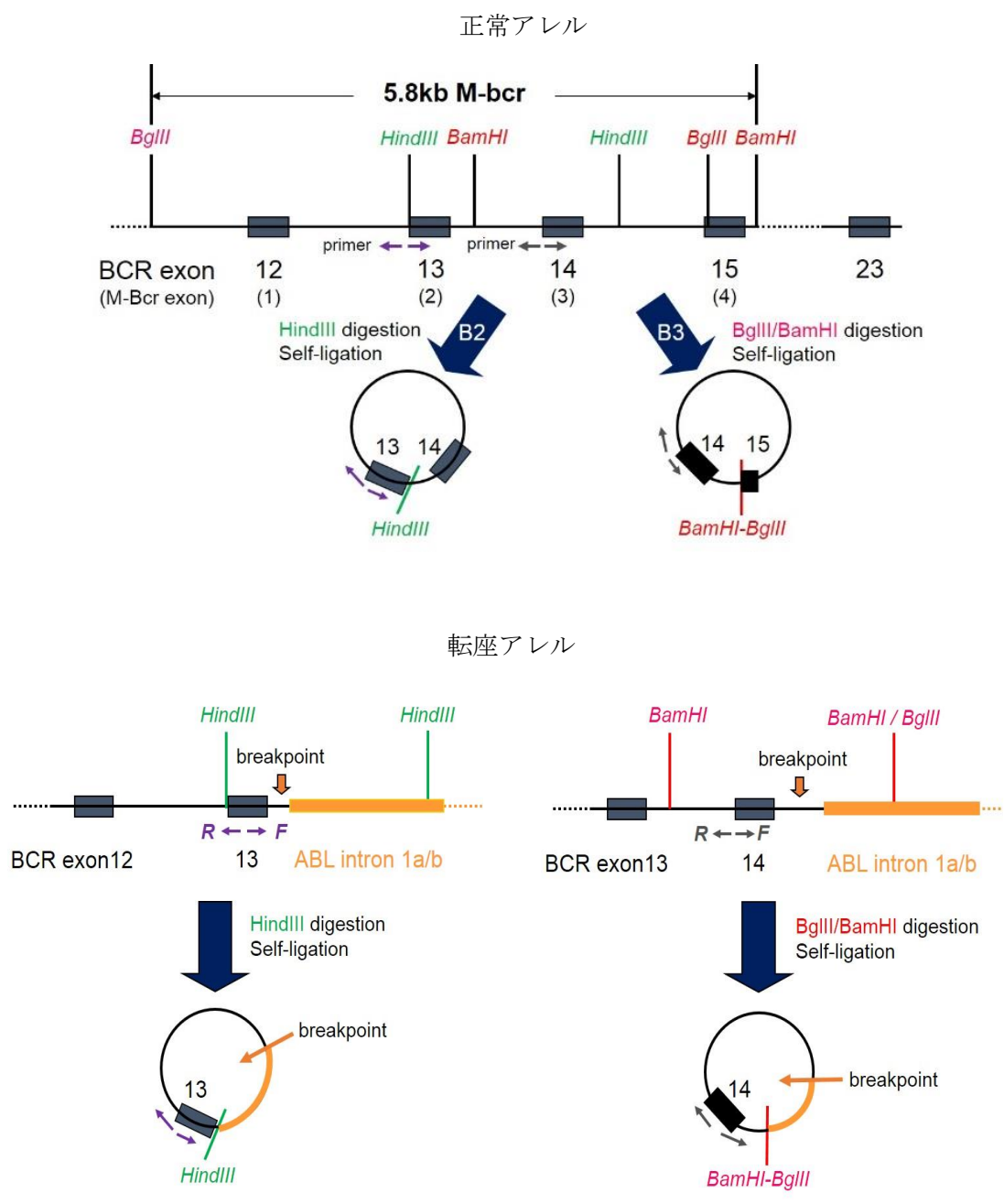


図 10 正常および転座アレルの inverse PCR

キメラ RNA パターンが B2A2 の場合 HindIII、B3A2 の場合 BamHI+BglIII で制限酵素処理した後、セルフライゲーションさせた。生じた環状 DNA を鋳型として、B2A2 の場合 exon 13、B3A2 の場合 exon 14 のそれぞれ 5' 側に設定したプライマーセットを用いて inverse PCR を行った

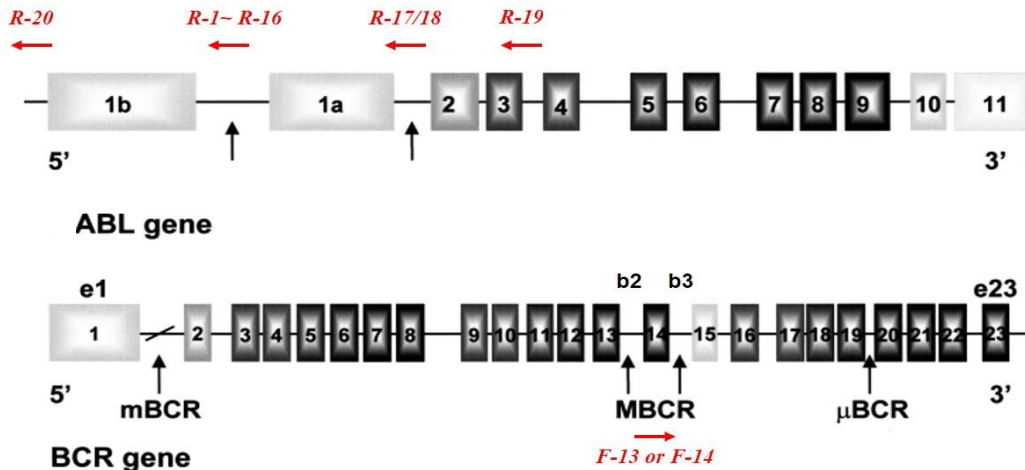


図 11 プライマーの位置の概略

BCR exon 13 と 14 にそれぞれ forward primer、ABL の 5' 上流から intron 3 の範囲に計 20 種類の reverse primer を設定した。

表 4 切断点決定用のプライマー一覧

Primer	Location	Orientation	Sequence (5' → 3')
R-1	ABL1 intron 1b	Reverse	<i>AAGCCACTGGCACACTTCATACG</i>
R-2	ABL1 intron 1b	Reverse	<i>GATCTGAAGCACAAGCACGGTTC</i>
R-3	ABL1 intron 1b	Reverse	<i>AGCCATAACCATTCTCCCAAGCA</i>
R-4	ABL1 intron 1b	Reverse	<i>AACACGGAGAAGTGGCAAACCTC</i>
R-5	ABL1 intron 1b	Reverse	<i>TGGACCAGGCTTTAGCCCTATCA</i>
R-6	ABL1 intron 1b	Reverse	<i>GGAACAGGAATCCTAATGGCCAAC</i>
R-7	ABL1 intron 1b	Reverse	<i>ACCAAAGCCTCCCCTTGACCTC</i>
R-8	ABL1 intron 1b	Reverse	<i>TAAGGCAGTTACCAGGAAGCATT</i>
R-9	ABL1 intron 1b	Reverse	<i>CCCGCAGTATCCCTCAAAATCAG</i>
R-10	ABL1 intron 1b	Reverse	<i>GGAAGGAGGAGGAAATGACAGCA</i>
R-11	ABL1 intron 1b	Reverse	<i>TCATGGAGAAAGGGGGAGAACTG</i>
R-12	ABL1 intron 1b	Reverse	<i>ACATGGGGCACAGTCTCTTGATG</i>
R-13	ABL1 intron 1b	Reverse	<i>ACATGAGGTTTGCAGAAGCACCA</i>
R-14	ABL1 intron 1b	Reverse	<i>AGGAATGGGTATGCTGGGGTTG</i>
R-15	ABL1 intron 1b	Reverse	<i>ACTGTTCACTAAGTGGCACTGTG</i>
R-16	ABL1 intron 1b	Reverse	<i>CCAGAAGAACACCCCAAGAAGGA</i>
R-17	ABL1 intron 1a	Reverse	<i>CATGATGTGCTTTGCAGGGTAGC</i>
R-18	ABL1 intron 1a	Reverse	<i>AAACATTCTGCCGCATCTGGATT</i>
R-19	ABL1 intron 3	Reverse	<i>ATGGAATGACTCCCACCTGAAAG</i>
R-20	ABL1 upstream	Reverse	<i>CAGATTCCAACCAAGCAAAAAGG</i>
F-13	BCR exon 13	Forward	<i>gcattccgctgaccatcaataaggaag</i>
F-14	BCR exon 14	Forward	<i>ggtttctgaatgtcatcgtccactc</i>

4-2-3 患者特異的なプライマー作成

シーケンスにより同定された切断点を跨ぐ約 100bp の領域を増幅するようなプライマーセットを設計した。Primer3(<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>)を設計ツールとして用い、得られたプライマーセットの特異性の確認には e-PCR(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/ercr/>)をマッピングツールとして用いた。レファレンス配列として BCR 遺伝子 intron 12 の 100bp 領域を設定し、これを増幅するプライマーセットも同様に設計した。

4-2-4 定量的リアルタイム PCR の条件

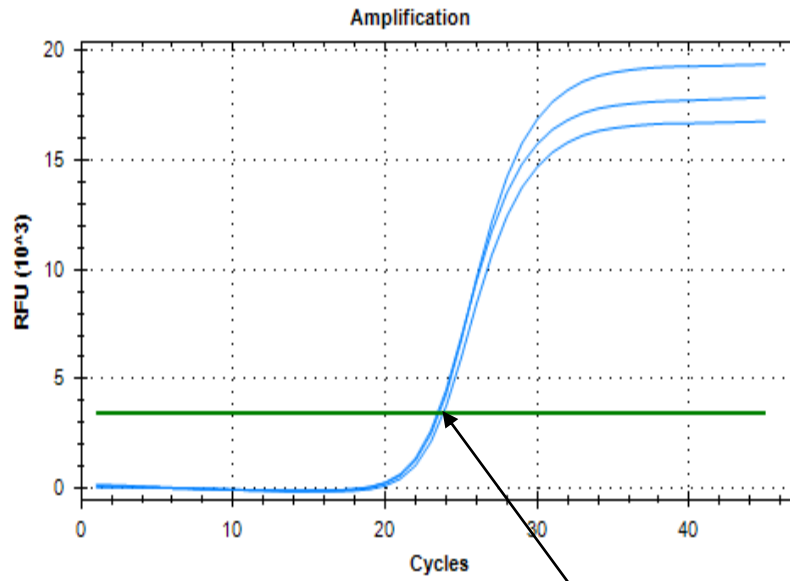
定量的リアルタイム PCR は、SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems、Foster City、CA、USA)を用いて行なった。PCR 産物増幅中の SYBR Green の蛍光は、ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems)を用いて可視化し測定した。

定量的リアルタイム PCR の反応条件は、初期変性 95°C 3 分の後、変性 95°C 10 秒、アニーリング (Pt1:58°C、Pt2:58°C、Pt3:57°C、BCR:60°C) 10 秒、伸長 95°C 30 秒を 45 サイクル行なった。

内部標準遺伝子には BCR を用いて、BCR-ABL の発現量は、

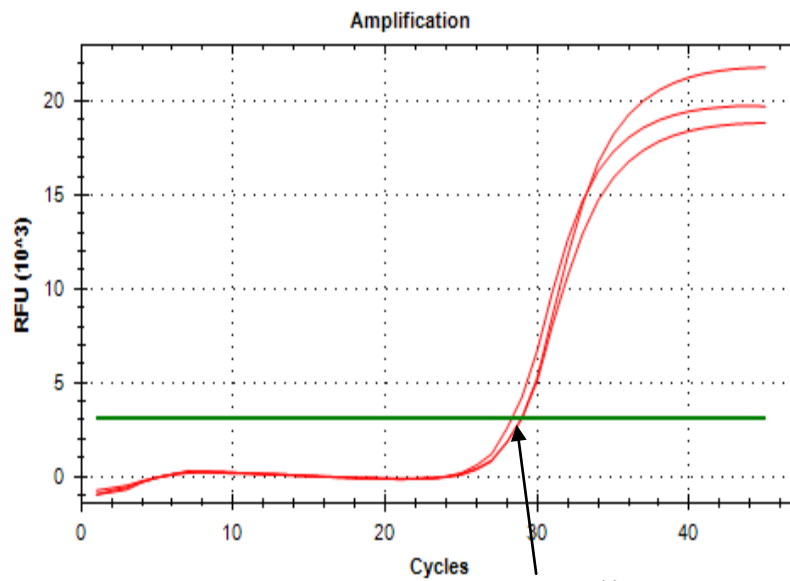
$$\text{BCR-ABL/BCR (\%)} = [1/2^{\{Cq \text{ 値 (BCR-ABL)} - Cq \text{ 値 (BCR)}\}}] * 100$$

の計算式により算出した (図 12)。



Cq 値 : 23.58

A.BCR 遺伝子におけるリアルタイム PCR の増幅曲線



Cq 値 : 28.77

B.BCR-ABL 遺伝子におけるリアルタイム PCR の増幅曲線

図 12 実際のリアルタイム PCR の 1 例。A:BCR 遺伝子。B:BCR-ABL 遺伝子

$$\text{BCR-ABL/BCR (\%)} = 1/2^{(28.77-23.58)} * 100$$

$$\doteq 2.74 \%$$

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 $1\mu\text{g/ml}$ 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' -GGAAAAGGGGCTATTTCTGG-3'

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

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

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

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

BCR-F:5' -TCCCAGGGTTTCCTGTCATA-3'

BCR-R:5' -GGAAAAGGGGCTATTTCTGG-3'

5. 結果

5-1 新規 CML 患者における CML 幹細胞に関する解析

解析は 2012 年 8 月から 2015 年 3 月までに登録された 50 例を対象に行った。そのうち診断時 CML 幹細胞の定量を行えたものは 43 例であり、施行不可の原因として同意撤回が 2 例、骨髄採取不可が 1 例、骨髄採取後から検体搬送の際の不具合によるものが 2 例、回収された細胞が少なく評価不能であったものが 2 例であった。平成 27 年 3 月の時点でニロチニブ投与開始より 3 ヶ月経過したものが 39 例、6 ヶ月経過したものが 37 例、12 ヶ月経過したものが 30 例、18 ヶ月経過したものが 22 例、24 ヶ月経過したものが 7 例であった。

5-1-1 CD34+細胞と血液所見との相関

相関の解析にあたり、CD34+細胞数、Ph 陽性率及び CML 幹細胞数を多い群と少ない群の 2 群に分け比較する際、それぞれ平均値及び中央値を用いて分類した(図 13、15、17)。CD34+細胞数を平均値(5952/ μ L)を用いて 2 群に分けた場合(higher: H、lower: L)、白血球数(81.3 vs 23.4 /mL、 $p=0.026$)に有意差を認めた($p<0.05$)。一方中央値を用いて 2 群に分けた場合には有意差を認めた項目はなかった(表 5)。また CD34+細胞数と白血球数は正の相関を認めた($r=0.384$ 、 $p=0.012$) (図 14)。

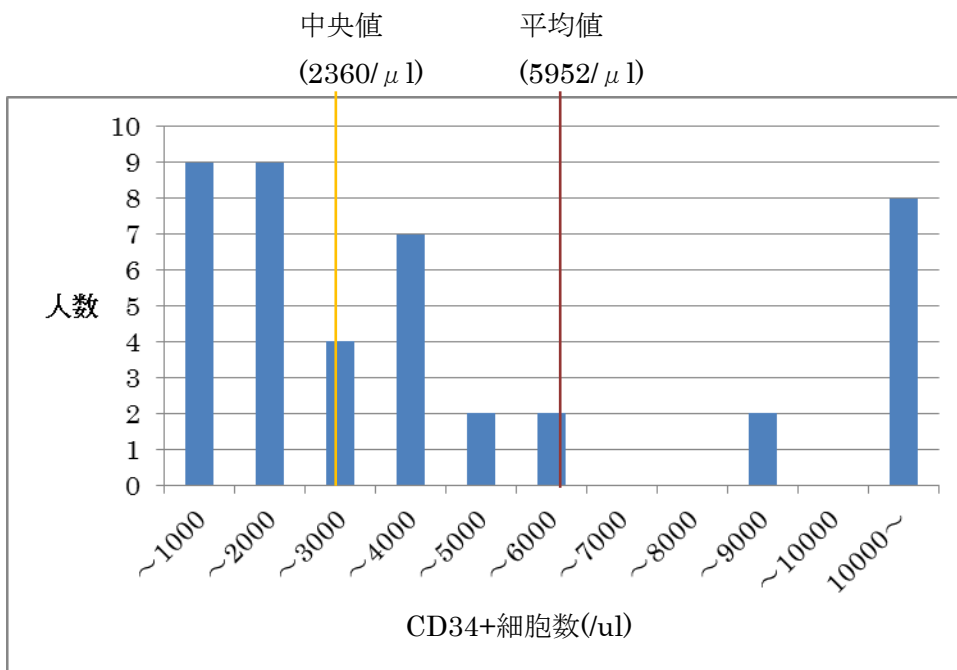


図 13 CD34+細胞における分布

CD34+細胞数は個々の患者により大きなばらつき (7~48930/μl) が見られたものの、その分布はおよそ平均値 (5952/μl) を境に少ない群と多い群に偏りが見られた。

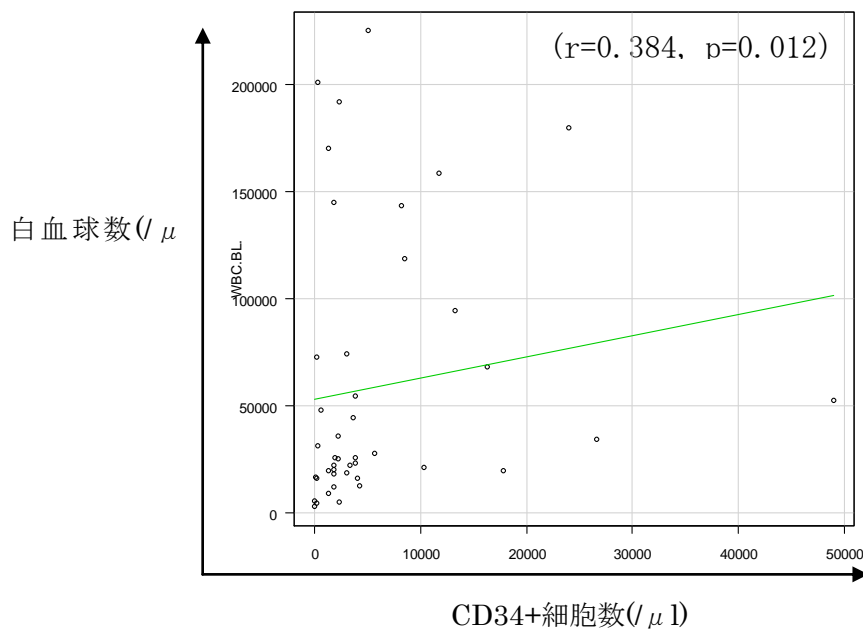


図 14 CD34+細胞数と白血球数との相関

CD34+細胞数と白血球数は正の相関が認められた ($r=0.384, p=0.012$)。

表 5 CD34+細胞数と血液所見における相違

	CD34+細胞数							
	平均値		P値	相関係数	中央値		P値	相関係数
	< 5952	≥ 5952			< 2360	≥ 2360		
	少:N=33	多:N=10	少:N=21	多:N=22				
age	50	52	0.565		48	59	0.836	
WBC	23440	81300	0.026	0.384	22440	39355	0.164	
RBC	432	404	0.262		410	430	0.697	
Hb	12.7	12.7	0.38		12.3	13.55	0.653	
Ht	41.8	40.2	0.615		38.8	42.35	0.585	
Plt	40.2	50.8	1		35.2	48.2	0.448	
Baso	7	8.5	0.535		6	7.5	0.305	
Eosino	3	2	0.292		2	3	0.872	
Stab	5	13	0.065		5	9.5	0.273	
Seg	50	44	0.412		50	45.5	0.61	
Lymph	13	8	0.061		14	8	0.394	
Mono	3	2.5	0.474		3	2	0.437	
Blast	1	1.5	0.365		1.5	1	1	
Pro	1	1	0.257		1	1	0.097	
Myelo	6.5	12.5	0.605		7	9	0.989	
Meta	3.5	6	0.071		3	5	0.249	
付加的染色体	3	2	1		1	4	0.362	
sokal score	0.73	0.68	0.561		0.7	0.72	0.932	
CD38+	98.8	98.6	0.249		98.8	98.65	0.422	
CD38-	96.9	98	0.163		97.1	97.6	0.715	

5-1-2 幹細胞分面の Ph 陽性率と血液所見との相関

FISH 法による Ph 陽性率は、CD34+CD38-細胞の分画が 97.3% (2-100%) であつたのに対し、CD34+CD38+細胞の分画は 98.8% (28.2-100%) であつた。CD34+CD38-細胞の分面の Ph 陽性率を平均値 (82.0%) で分類した場合、有意差を認めたものは、赤血球数 409 vs $475 \times 10^4 / \mu\text{L}$ 、 $p=0.005$)、Hb (11.9 vs 14.5 g/dL、 $p=0.001$)、Hct (38.8 vs 46.2%、 $p=0.007$)、%前骨髄球 (1% vs 2%、 $p=0.011$)、%骨髄球 (8% vs 4%、 $p=0.046$) および%後骨髄球 (5.5 vs 3.0%、 $p=0.048$) であつた。一方、中央値 (97.3%) で分けた場合、白血球数 (50.3 vs 20.3 /mL、 $p=0.044$)、赤血球数 (394 vs 460 $\times 10^4 / \mu\text{L}$ 、 $p=0.002$)、Hb (11.7 vs 14.2 g/dL、 $p=0.001$)、Hct (37.2 vs 44.5%、 $p=0.006$)、さらに%桿状好中球 (11.5 vs 4%、 $p=0.018$)、%分葉好中球 (44.0 vs 56.0%、 $p=0.032$) および%前骨髄球 (1.0 vs 1.5%、 $p=0.011$) で有意差が認められた (表 6)。Ph 陽性率と相関を認めたものは、正の相関が桿状好中球 ($r=0.3471$ 、 $p=0.023$) であり、負の相関を認めたものは赤血球数 ($r=-0.531$ 、 $p=0.0002$)、Hb ($r=-0.599$ 、 $p=2.29 \times 10^{-5}$) (図 16)、Ht ($r=-0.527$ 、 $p=0.003$)、%分葉好中球 ($r=-0.309$ 、 $p=0.044$) および%前骨髄球 ($r=-0.56$ 、 $p=0.019$) であつた。

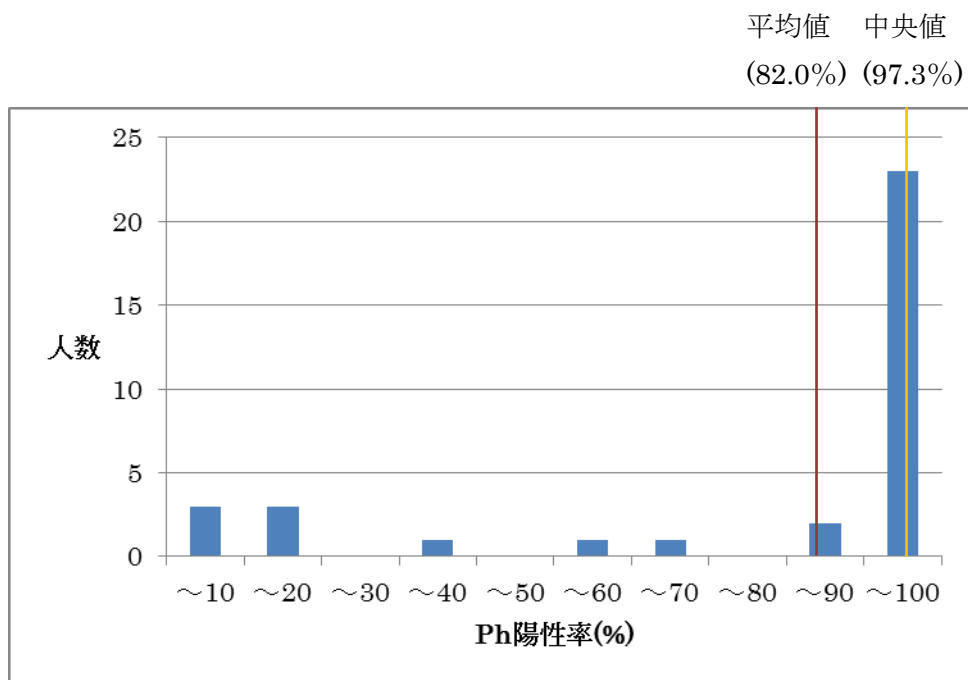


図 15 Ph 陽性率における分布

多くの症例が Ph 陽性率は 90%以上とであった一方、一部には著しく陽性率の低い症例も認められた。

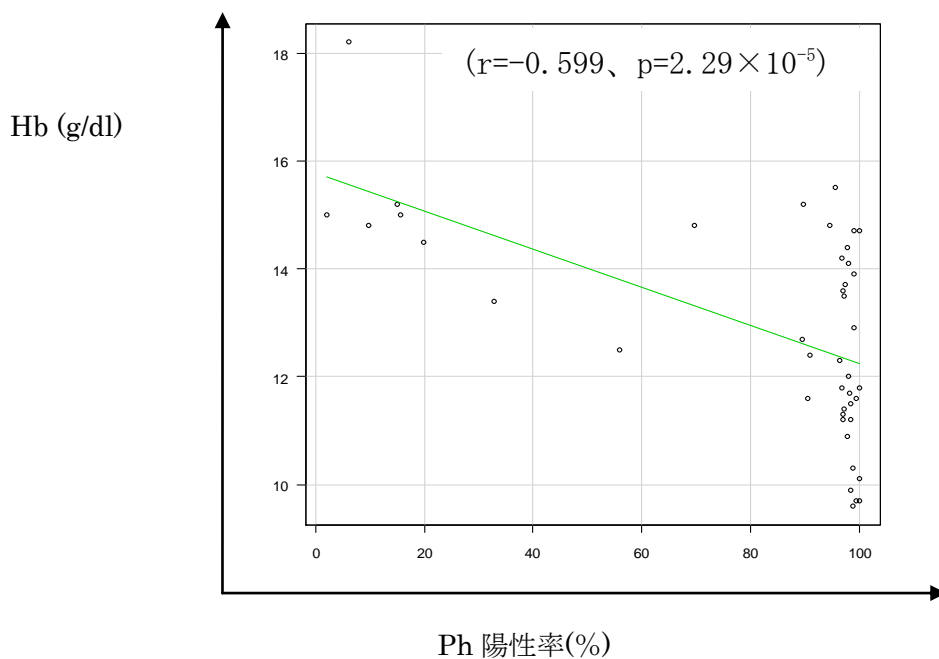


図 16 Ph 陽性率と Hb の相関

Ph 陽性率と Hb との間では比較的強い負の相関関係を認めた ($r=-0.599, p=2.29 \times 10^{-5}$)。

表 6 Ph 陽性率と血液所見における相違

	Ph陽性率							
	平均値		P値	相関係数	中央値		P値	相関係数
	< 82.1	≥ 82.1			< 97.3	≥ 97.3		
	少:N=9	多:N=34	少:N=21	多:N=22				
age	56	49.5	0.976		62	47	0.087	
WBC	18980	18698	0.092		20310	50330	0.044	0.256
RBC	475	409	0.005	-0.531	460	393.5	0.002	-0.531
Hb	14.5	11.9	0.0009	-0.599	14.2	11.7	0.001	-0.599
Ht	46.2	38.8	0.007	-0.527	44.5	37.2	0.006	-0.527
Plt	30.4	48.2	0.057		35.2	50.15	0.187	
Baso	7	7	0.589		7	7	0.99	
Eosino	3	2	0.37		3	2	0.287	
Stab	4	10	0.068		4	11.5	0.018	0.347
Seg	50	46	0.124		56	44	0.032	-0.309
Lymph	14	10	0.085		11	8	0.192	
Mono	5	2	0.025	-0.223	4	2.5	0.596	
Blast	1.8	1	0.589		1	2	0.365	
Pro	2	1	0.011	-0.56	1.5	1	0.011	-0.56
Myelo	4	8	0.046	0.199	4	8	0.301	
Meta	3	5.5	0.048	0.304	3	6	0.077	
付加的染色体	0	5	0.567		2	3	1	
sokal score	0.73	0.68	0.854		0.73	0.64	0.352	
CD34+細胞数	3332	2294	0.508		2241	3106	0.157	

5-1-3 CML 幹細胞と血液所見との相関

CML 幹細胞数を平均値(562/ μ L)で2群に分けた場合、白血球数(94.5 vs 22.9 /mL、 $p=0.009$)で有意差が認められた。中央値(256/ μ L)で分けた場合には白血球数(94.5 vs 22.9 /mL、 $p=0.009$)、赤血球数(407 vs 472 $\times 10^4$ / μ L、 $p=0.046$)、Hb(11.7 vs 14.2g/dL、 $p=0.004$)、Hct(38.8 vs 44.5%、 $p=0.017$)、%桿状好中球分画(11.5 vs 4.0%、 $p=0.028$)、%リンパ球分画(8.0 vs 14.0%、 $p=0.014$)、%前骨髄球(1 vs 1.5%、 $p=0.011$)および%後骨髄球(7.3 vs 5.0%、 $p=0.047$)で有意差を認めた(表7)。白血球数はCML 幹細胞数と正の相関($r=0.435$ 、 $p=0.003$)を認め、赤血球数($r=-0.312$ 、 $p=0.042$)、Hb($r=-0.33$ 、 $p=0.031$)および%前骨髄球($r=-0.485$ 、 $p=0.049$)と負の相関を認めた(図18)。

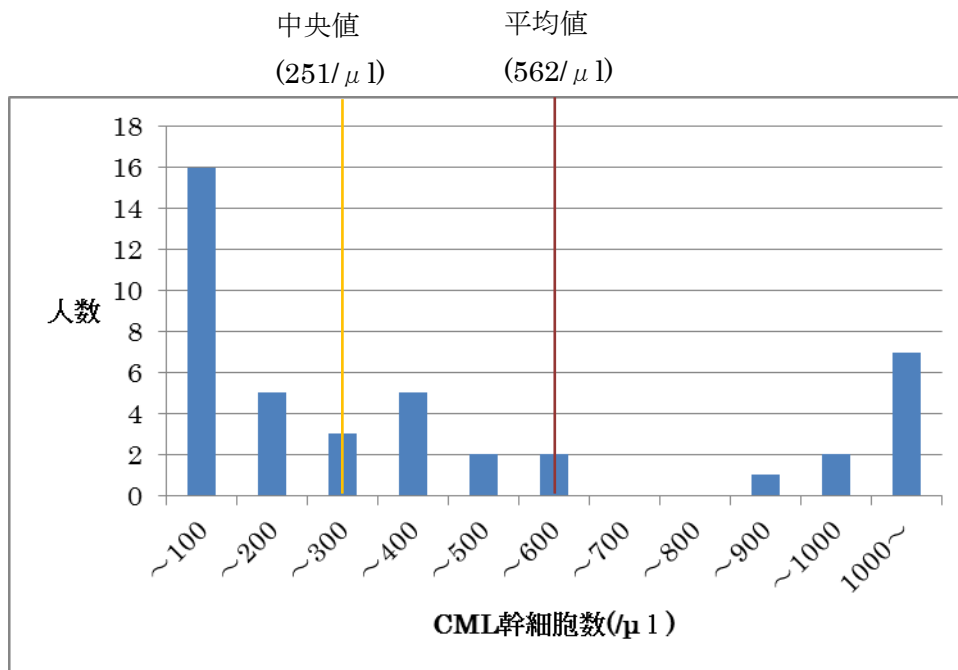


図 17 CML 幹細胞数における分布

CML 幹細胞数は個々の患者間で大きなばらつき (2~4028/μl) が見られた。

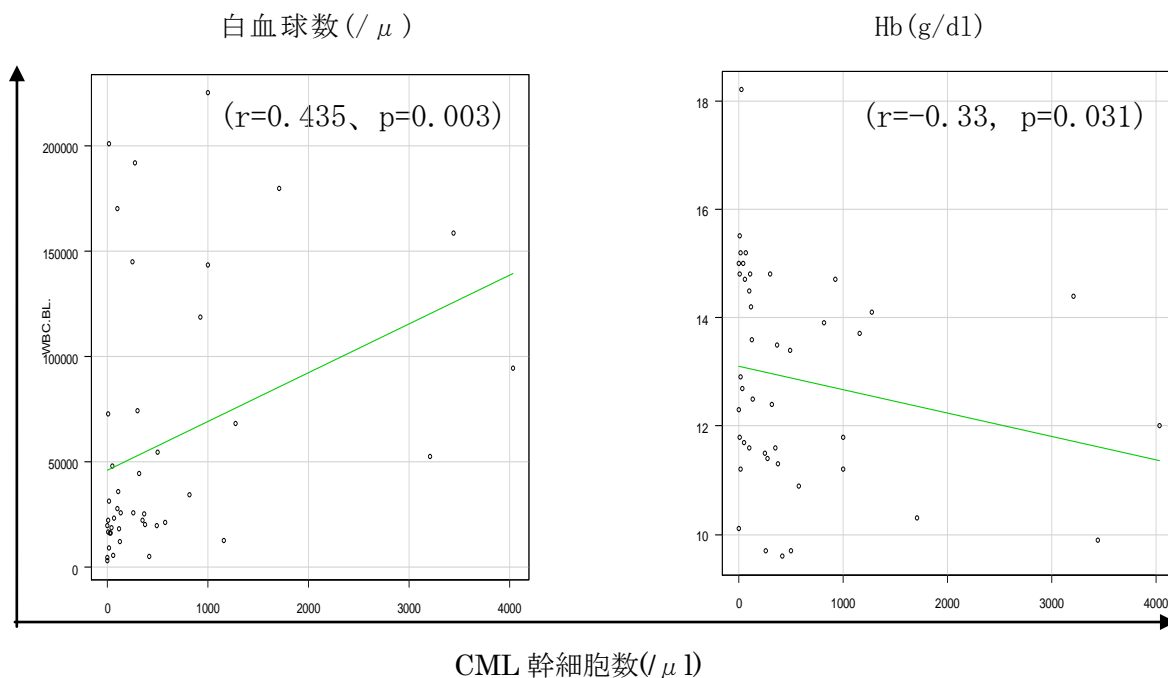


図 18 CML 幹細胞数と白血球及び Hb の相関

CML 幹細胞数と相関関係を認めた項目のうち、白血球数 (r=0.435、p=0.003) や Hb (r=-0.33、p=0.031) と相関を認めた。

表 7 CML 幹細胞数と血液所見における相違

	Ph細胞数							
	平均値		P値	相関係数	中央値		P値	相関係数
	< 562	≥ 562			< 251	≥ 251		
	少:N=32	多:N=11	少:N=22	多:N=21				
age	50	42	0.337		56	48	0.422	
WBC	22940	94450	0.009	0.435	19670	53720	0.008	0.435
RBC	430	412	0.351		471	401	0.002	-0.311
Hb	12.8	12	0.358		14.2	11.7	0.004	-0.33
Ht	41.55	41.2	0.597		44.5	38.75	0.015	-0.248
Plt	33.7	53.7	0.356		36.2	48.2	0.555	
Baso	7	8	0.417		7	8	0.347	
Eosino	2.5	2	0.799		2	2.5	0.902	
Stab	4.5	14	0.294		4	11.5	0.028	0.309
Seg	50	44	0.126		50	45.5	0.3	
Lymph	12	8	0.058		14	8	0.014	-0.418
Mono	3	2	0.344		6	3.8	0.126	
Blast	1	2	0.238		1	2	0.086	
Pro	1	1	0.197		1.5	1	0.011	-0.484
Myelo	6	15	0.354		4	10	0.201	
Meta	3.5	6	0.096		5	7.3	0.047	0.296
付加的染色体	2	3	0.096		1	4	0.185	
sokal score	0.73	0.64	0.353		0.73	0.64	0.375	

5-1-4 治療効果との相関

CD34+細胞数、幹細胞分画の Ph 陽性率および CML 幹細胞数をそれぞれ平均値および中央値で 2 群に分けた場合、いずれの治療チェックポイントでも BCR-ABL^{IS} の値に有意差は認められなかった(表 8)。

ニロチニブ投与により MMR を達成した全体の症例数はそれぞれ、治療開始 3 ヶ月後で 23%(9/39 例)、6 ヶ月後で 68%(25/37 例)、12 ヶ月後で 67%(20/30 例)、18 ヶ月後で 86%(19/22 例)、24 ヶ月後で 100%(7/7 例)あった。CML 幹細胞数を中央値で分けた場合の比較(H vs L)では、治療開始 3 ヶ月後に MMR を達成した割合は 14%(3/21 例) vs 33%(6/18 例)、6 ヶ月後が 53%(10/19 例) vs 39%(7/18 例)、12 ヶ月後が 0%(0/17 例) vs 8%(1/13 例)、18 ヶ月後が 7%(1/15 例) vs 0%(0/7 例)、24 ヶ月後ではどちらの群でも見られなかった。MMR 累積達成率は、3 ヶ月時点で 14%(3/21 例) vs 33%(6/18 例)、6 ヶ月時点で 63%(12/19 例) vs 72%(13/18 例)、12 ヶ月時点で 71%(12/17 例) vs 62%(8/13 例)、18 ヶ月時点で 87%(13/15 例 vs 86%(6/7 例))、24 ヶ月時点で 100%(5/5 例) vs 100%(2/2 例)であり、両群で有意差は認められなかった(図 19-20)。

MR^{4.0} を達成した全体の症例数はそれぞれ、3 ヶ月時点で 10%(4/39 例)、6 ヶ月時点で 49%(18/37 例)、12 ヶ月時点で 60%(18/30 例)、18 ヶ月時点で 77%(17/22 例)、24 ヶ月時点で 100%(7/7 例)であった。中央値で分けた場合の比較(H vs L)

では、MR^{4.0}の達成に要した期間において、3ヶ月時点が5%(1/21例) vs 17%(3/18例)、6ヶ月時点が42%(8/19例) vs 39%(7/18例)、12ヶ月時点が17%(3/17例) vs 8%(1/13例)、18ヶ月時点が13%(2/15例) vs 0%(0/7例)、24ヶ月時点ではどちらの群でも見られなかった。また累積到達率は3ヶ月時点で5%(1/21例) vs 17%(3/18例)、6ヶ月時点で42%(8/19例) vs 56%(10/18例)、12ヶ月時点で59%(10/17例) vs 62%(8/13例)、18ヶ月時点で73%(11/15例) vs 86%(6/7例)、24ヶ月時点で100%(5/5例) vs 100%(2/2例)であり、有意差は認められなかった(図 21-22)。

CMRの全体での達成率はそれぞれ、3ヶ月時点で8%(3/39例)、6ヶ月時点で27%(10/37例)、12ヶ月時点で33%(10/30例)30例中10例、18ヶ月時点45%(10/22例)、24ヶ月時点で71%(5/7例)であった。中央値で分けた場合(H vs L)、CMRの達成に要した期間においては、3ヶ月時点で5%(1/21例) vs 11%(2/18例)、6ヶ月時点で16%(3/19例) vs 28%(5/18例)、12ヶ月時点で6%(1/17例) vs 8%(1/13例)、18ヶ月時点で13%(2/15例) vs 0%(0/7例)、24ヶ月時点で40%(2/5例) vs 0%(0/2例)であった。累積到達率にいたっては3ヶ月時点で5%(1/21例) vs 11%(2/18例)、6ヶ月時点で16%(3/19例) vs 39%(7/18例)、12ヶ月時点で24%(4/17例) vs 46%(6/13例)、18ヶ月時点で40%(6/15例) vs 57%(4/7例)、24ヶ月時点で80%(4/5例) vs 50%(1/2例)であり、明らかな有意差は認められなかった(図

23-24)。

MMR、MR^{4.0}、CMR それぞれを達成した症例に限って検討した場合、達成期間においては、CML 幹細胞の少ない群の方が 3 ヶ月時点で MMR および MR^{4.0} 達成した割合は多く、またより早期に CMR に到達する可能性が示唆されたが明らかな有意差は認められなかった(図 25)。

CML 幹細胞数を平均値で 2 群に分けて解析した結果、いずれのチェックポイントにおける MMR、MR^{4.0}、CMR 各到達率も多い群と少ない群で有意差は認められなかった。

表 8 CD34 陽性細胞数、Ph 陽性率および CML 幹細胞数におけるニロチニブによる治療効果の比較

CD34 陽性細胞数

	平均値		P 値	中央値		P 値
	N=33	N=10		N=21	N=22	
診断時	64	77.66	0.059	64.44	68.85	0.838
3ヶ月	0.3122	0.7016	0.531	0.486	0.2781	0.565
6ヶ月	0.0092	0.0131	0.603	0.0218	0.0075	0.488
12ヶ月	0.0046	0.0087	0.575	0.0054	0.0067	0.816
18ヶ月	0.0033	0.0046	1	0.0032	0.0046	0.416
24ヶ月	0.0032	0.0032	1	0.0041	0.0032	0.35

Ph 陽性率

	平均値		P 値	中央値		P 値
	N=9	N=34		N=21	N=22	
診断時	64.03	68.83	0.353	64.44	69.37	0.463
3ヶ月	0.1647	0.4351	0.207	0.2881	0.401	0.347
6ヶ月	0.0131	0.0092	1	0.0089	0.022	0.396
12ヶ月	0.005	0.0063	0.937	0.0039	0.0106	0.433
18ヶ月	0.0046	0.0033	0.869	0.0033	0.0049	0.469
24ヶ月	0.0032	0.0032	0.469	0.0032	0.0032	0.826

CML 幹細胞数

	平均値		P 値	中央値		P 値
	N=32	N=11		N=22	N=21	
診断時	64.97	69.38	0.651	64.05	69.37	0.283
3ヶ月	0.3161	0.316	0.913	0.352	0.3122	0.833
6ヶ月	0.0173	0.0082	0.972	0.0091	0.173	0.579
12ヶ月	0.0067	0.0063	0.969	0.0061	0.0102	0.753
18ヶ月	0.0052	0.0102	0.58	0.0038	0.0071	0.701
24ヶ月	0.0037	0.0041	0.971	0.0032	0.0041	0.657

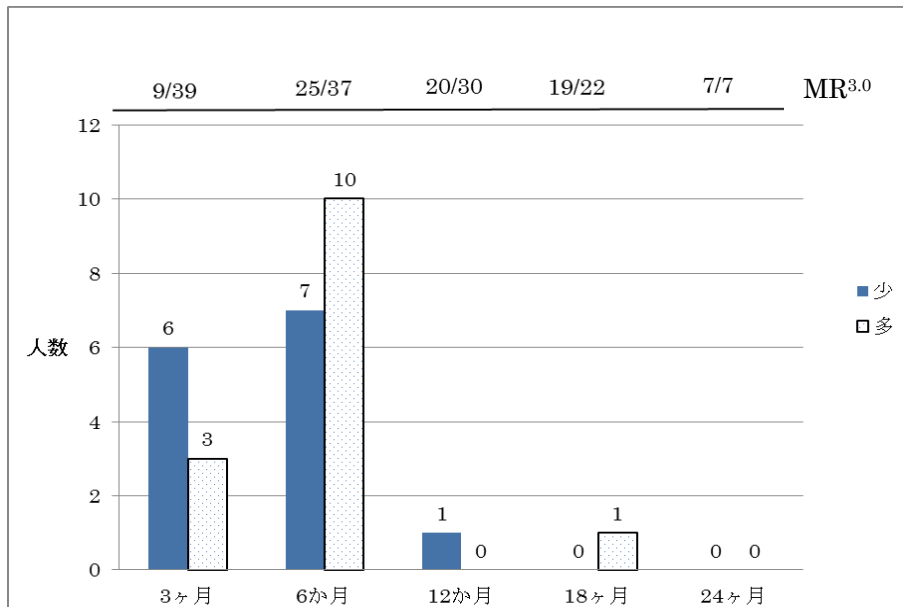


図 19 MMR 達成に要した期間

MMR の達成に要した期間の比較(H vs L)では、3ヶ月時点で14%(3/21例) vs 33%(6/18例)、6ヶ月時点で53%(10/19例) vs 39%(7/18例)、12ヶ月時点で0%(0/17例) vs 8%(1/13例)、18ヶ月時点で7%(1/15例) vs 0%(0/7例)、24ヶ月時点ではどちらの群でも見られなかった。

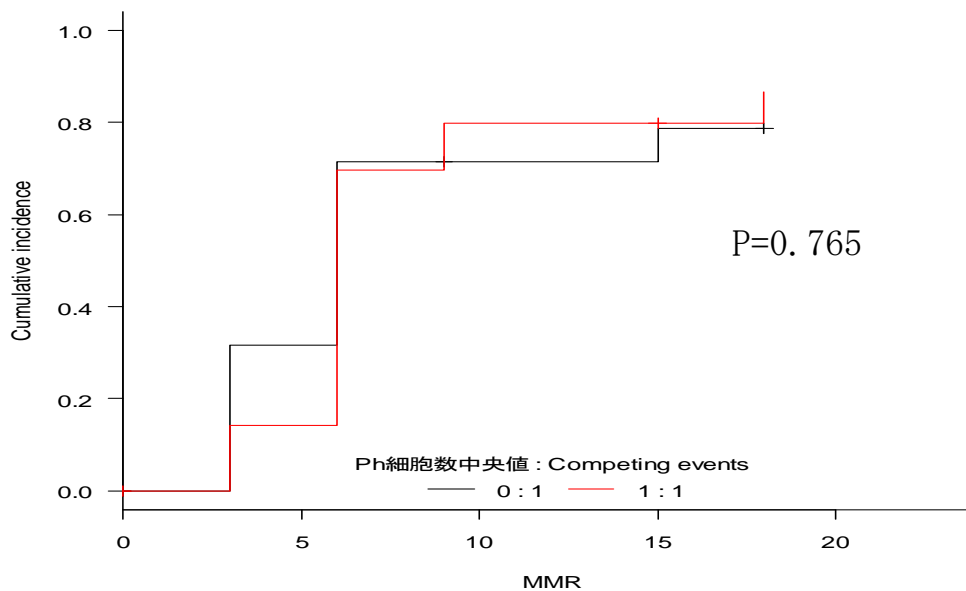


図 20 MMR 累積到達率

MMR の累積到達率(H vs L)は、3ヶ月時点で14%(3/21例) vs 33%(6/18例)、6ヶ月時点で63%(12/19例) vs 72%(13/18例)、12ヶ月時点で71%(12/17例) vs 62%(8/13例)、18ヶ月時点で87%(13/15例) vs 86%(6/7例)、24ヶ月時点で100%(5/5例) vs 100%(2/2例)であった。

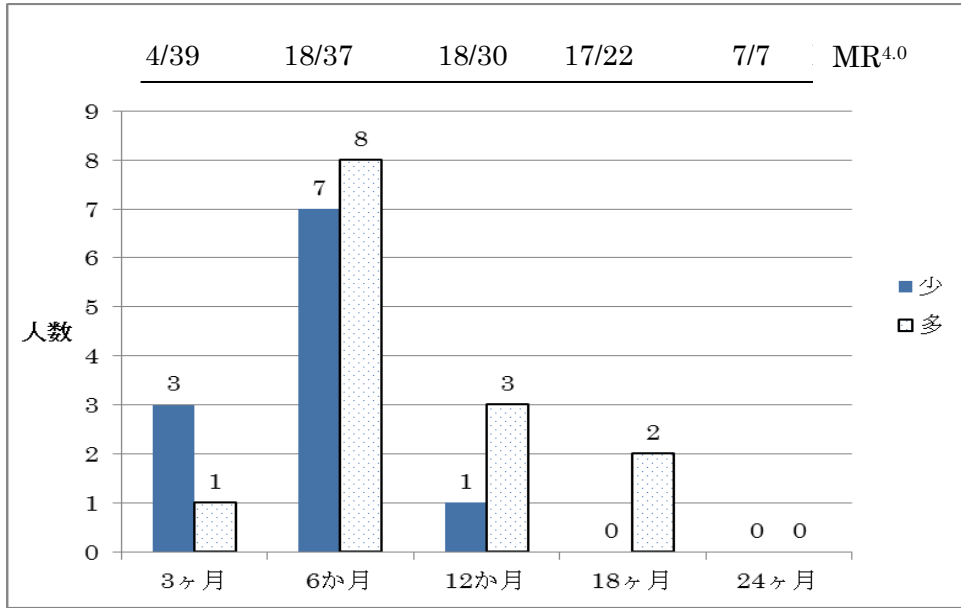


図 21 MR^{4.0}達成に要した期間

MR^{4.0}の達成に要した期間 (H vs L)は 5%(1/21 例) vs 17%(3/18 例)、6ヶ月時点で 42%(8/19 例) vs 39%(7/18 例)、12ヶ月時点で 17%(3/17 例) vs 8%(1/13 例)、18ヶ月時点で 13%(2/15 例) vs 0%(0/7 例)、24ヶ月時点ではどちらの群でも見られなかった。

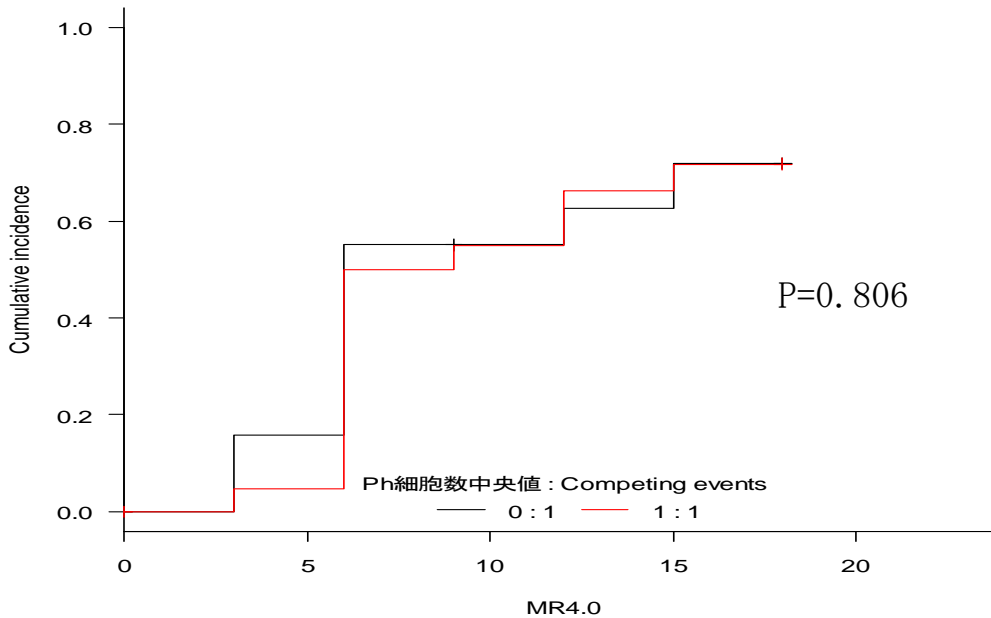


図 22 MR^{4.0}累積到達率

MR^{4.0}の累積到達率(H vs L)は、3ヶ月時点で 5%(1/21 例) vs 17%(3/18 例)、6ヶ月時点で 42%(8/19 例) vs 56%(10/18 例)、12ヶ月時点で 59%(10/17 例) vs 62%(8/13 例)、18ヶ月時点で 73%(11/15 例) vs 86%(6/7 例)、24ヶ月時点で 100%(5/5 例)vs 100%(2/2 例)であった。

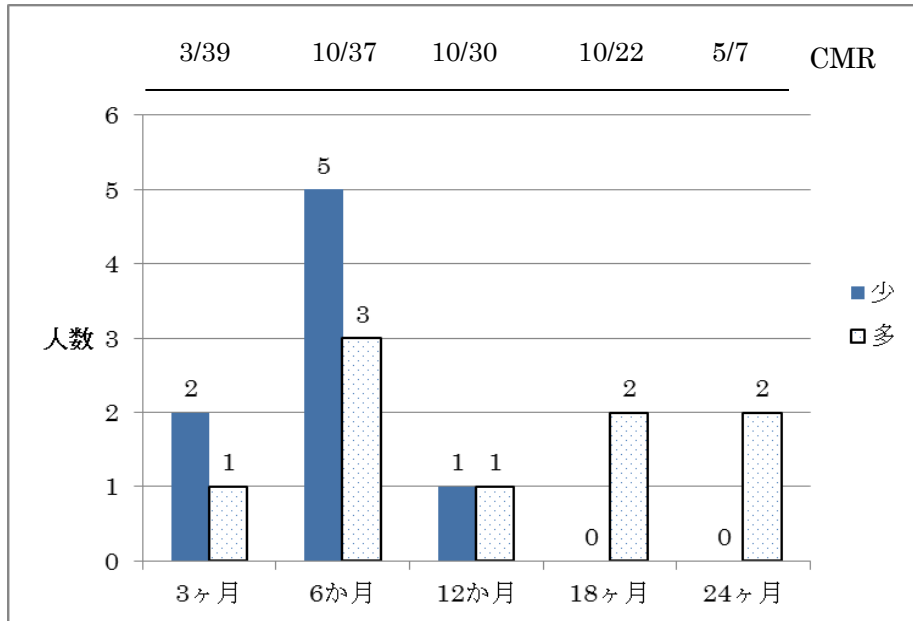


図 23 CMR の達成に要した期間

CMR の達成に要した期間(H vs L)は、3 ヶ月時点で 5%(1/21 例) vs 11%(2/18 例)、6 ヶ月時点で 16%(3/19 例) vs 28%(5/18 例)、12 ヶ月時点で 6%(1/17 例) vs 8%(1/13 例)、18 ヶ月時点で 13%(2/15 例) vs 0%(0/7 例)、24 ヶ月時点で 40%(2/5 例) vs 0%(0/2 例)であった

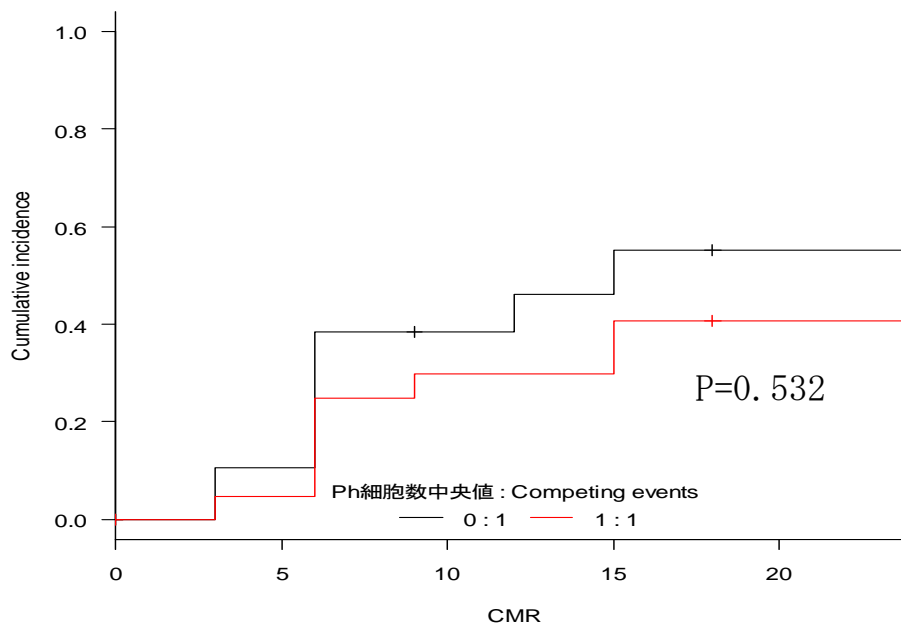


図 24 CMR 累積到達率

CMR 累積到達率 (H vs L)は、3 ヶ月時点で 5%(1/21 例) vs 11%(2/18 例)、6 ヶ月時点で 16%(3/19 例) vs 39%(7/18 例)、12 ヶ月時点で 24%(4/17 例) vs 46%(6/13 例)、18 ヶ月時点で 40%(6/15 例) vs 57%(4/7 例)、24 ヶ月時点で 80%(4/5 例) vs 50%(1/2 例)であった

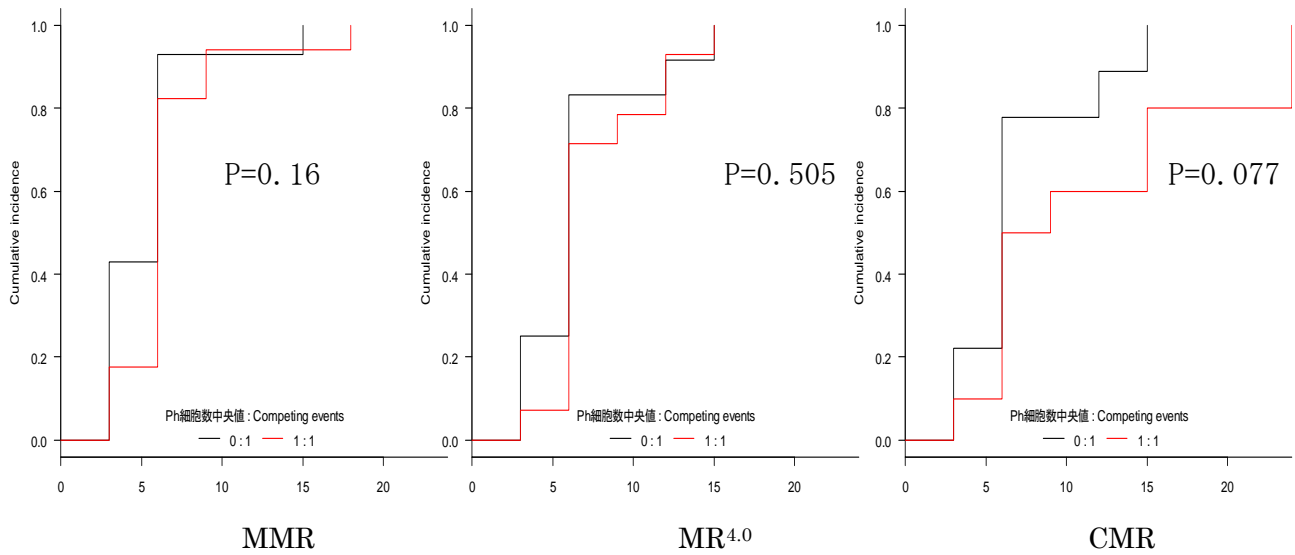


図 25 MMR、MR^{4.0}、CMR 到達症例における累積到達率

CML 幹細胞数の少ない群の方が MMR および MR^{4.0}において 3 ヶ月時点で達成した割合は多く、またより早期に CMR に到達する可能性が示唆されたものの、明らかな有意差は認められなかった。

5-1-5 BIMについて

BIMの遺伝子多型がTKI感受性に影響を及ぼすことが報告されている[29]ことから、今回N-road試験登録症例のうち同意が得られた12例に対し、BIMの遺伝子多型の有無を検討した。陰性コントロールと陽性コントロールにはそれぞれK562細胞株とKCL22細胞株を用いた[29]。解析した12例のうち、2例にBIM遺伝子のヘテロの欠失多型が認められた(図26)。

ニコチンブによる治療効果との相関の解析を試みたが、症例数が少なかったことからいずれのチェックポイントでも有意差は認められなかった。

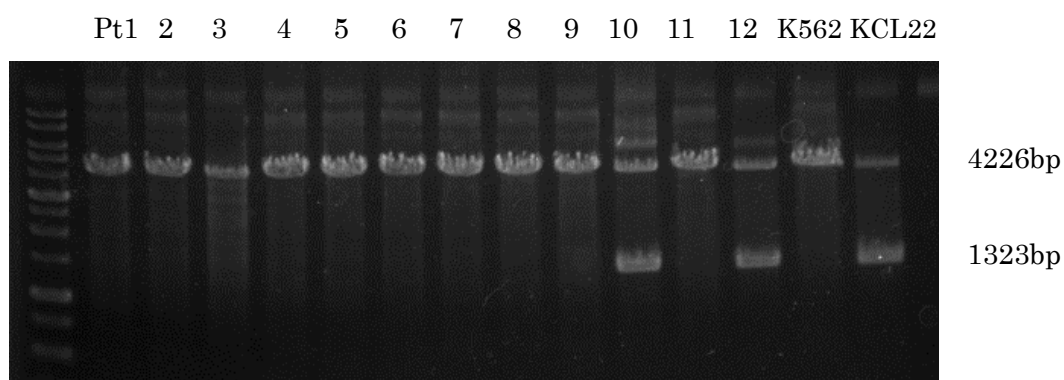


図26 各患者及び細胞株における遺伝子多型の有無
解析した12例のうち、2例にBIM遺伝子のヘテロでの欠失が認められた

5-2 MRD について

5-2-1 対象患者

解析した 4 例の治療内容は、Pt. 1 が第 2 世代 TKI 継続、Pt. 2 が抵抗性のため各 TKI 使用後ハイドロキシウレアへ変更、Pt. 3 が抵抗性のため第 3 世代 TKI から同種造血幹細胞移植、Pt. 4 が第 2 世代 TKI 継続であった。

5-2-2 切断点の同定

各患者の末梢血より抽出した DNA を用いて方法①または方法②により BCR-ABL 融合遺伝子の切断点をシーケンス解析にて同定した。その際使用した各々のプライマーは以下のとおりである (表 9)。シーケンス結果をもとにプライマーを下線部に設定した (黒 : BCR、赤 : ABL) (表 10)。

表 9 シーケンシングに使用したプライマー

	キメラ RNA パターン	プライマー
Pt. 1	B3A2 (Exon14)	F-14
Pt. 2	B2A2 (Exon13)	F-13
Pt. 3	B3A2 (Exon14)	F-14
Pt. 4	B3A2 (Exon14)	F-14

表 10 各症例におけるシーケンスの結果

Pt1

GAGGAGGGTTGCAGCGGCCGAGCCAGGGTCTCCACCCAGGAAGGACTAATCGGGCAGGGTGTGGGGAAAC

AGGGAGGTTGTTCAGATGACCACGGGACACCTCTGACCCTGGCCGCTGTGGAGTGGGTTTTATCAGCTTC

CATACCCAAACAGAAATACCCTTAAGGATTTTCTTCTCTGATTGCGCTAAATCTATAGGTTTCTTTGATC

CTAGAAATGAATAATAGAATATAAAGAATT

Pt2

ATCAATAAGGaAGGTGGGCCCCCGTTCCGTGTACAGGGCACCTGCAGGGAGGGCAGGCAGCTAGCCT

GAAGGCTGATCCCCCTTCCTGTTAGCACTTTTGATGGGACTAGTGGACTCCTGAGCTCAGGCCAGGCAA

TCTGCCTGCCTCAGCCTCCCAATGTTCTAGGGTACAGGCATGAGCTACTGTGCCTGGCCCAGTTAGTGAT

TTTTAAATTGTAGTTCCTTAAATGAGTATT

Pt3

CCTTGCCTCCCTGTTACCTTTCTTTCTATCTCTTCCTTGCCCCGTGCACTCAACCTTGCATCCCCAAACC

AAACCTATTATTCATGGACCCCAAACTTGTTCCTCTTATGTCCTGTCCCTTTGAAATCTGACATTTTTTT

AATCTCATGAACTCCACAATTGTCTGATTATTAAGTCCTGCTTACTTGACTGTGACTAAAATTCTACTT

TCAGAAGAGTAGAATGTACCCCTACCAAAT

Pt4

AATTCCACAGAGCGGGCAGGGGCATCGCATGAGGTGCTGGTGTTCACGCCAGACCACAATTAGGTGTTTA

ATTTTTAAAAAGAAAGTTACAACCTTTTTTTTTTATTTTTATTTCTTCTGTAAAATTTTCAGTCTTCTGAC

ATTTTCCTAAACTAATTTTATGGCCCAGCATATAACCTGTCTTAGTGAATGTTCCATTTGTAGTTGAAAA

AAGTTTGTGTTGTTGCATGTAGTTTTCTAT

5-2-3 リアルタイム PCR

治療経過中に採取・保存された患者 DNA を使用し、それぞれ前述のプライマーを用いてリアルタイム PCR を行い、その経時的変化を解析した。Pt. 1 においては設計したプライマーでの至適条件の設定が困難で、電気泳動時の PCR 産物のバンドが単一でなかったため、Pt. 2~4 の 3 例の解析を行った。またそれらの結果(DNA 法)と RQ-PCR 法による従来の方法(mRNA 法)による結果と比較検討した(図 27-29)。グラフは横軸に観察期間、縦軸に BCR-ABL/BCR または ABL (%) の定量値を対数表示したものとした。

Pt. 2 の場合、すでに CyR のレベルで効果不十分であったことから、mRNA 法による測定は 1 ポイントのみの施行であった。そのため DNA 法との比較は困難であった。Pt. 3 の場合、全体の経過では DNA 法と mRNA 法とでほぼ同様の結果が得られた。しかし、造血幹細胞移植後の検査では mRNA 法では PCR での増幅が確認

されなかった一方、DNA 法では MRD を検出することができた。P. 4 の場合、DNA 法と mRNA 法とでは BCR-ABL 遺伝子量の変化は同様の傾向を示し、経時的変化に相関が認められた (R=1)。

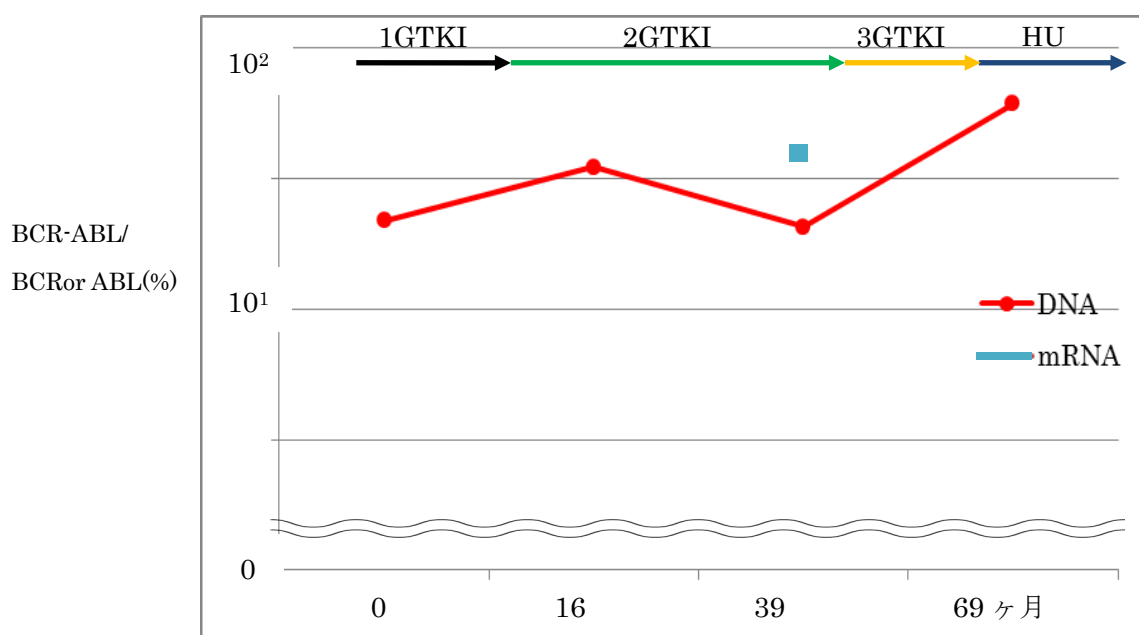


図 27 Pt. 2 における BCR-ABL 遺伝子量の経時的変化

グラフは横軸に月日、縦軸に BCR-ABL/BCR (%) を対数表示したものとした。Pt. 2 の場合、すでに CyR のレベルで効果不十分であったことから、mRNA 法での定量は 1 ポイントのみの施行であった。

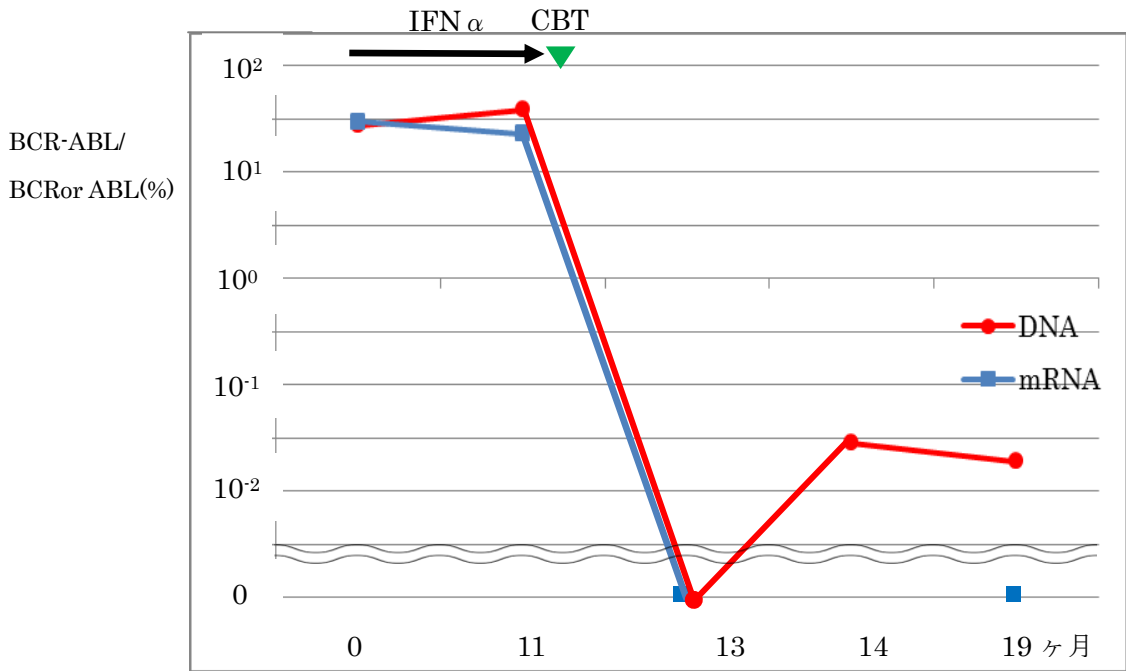


図 28 Pt. 3 における BCR-ABL 発現量の経時的変化

14 ヶ月時の検査は mRNA 法による測定は行われなかったが、およそ DNA 法とで同様の結果となった。19 ヶ月時の検査では mRNA 法では PCR での増幅が確認されなかったが、DNA 法では検出可能であった。

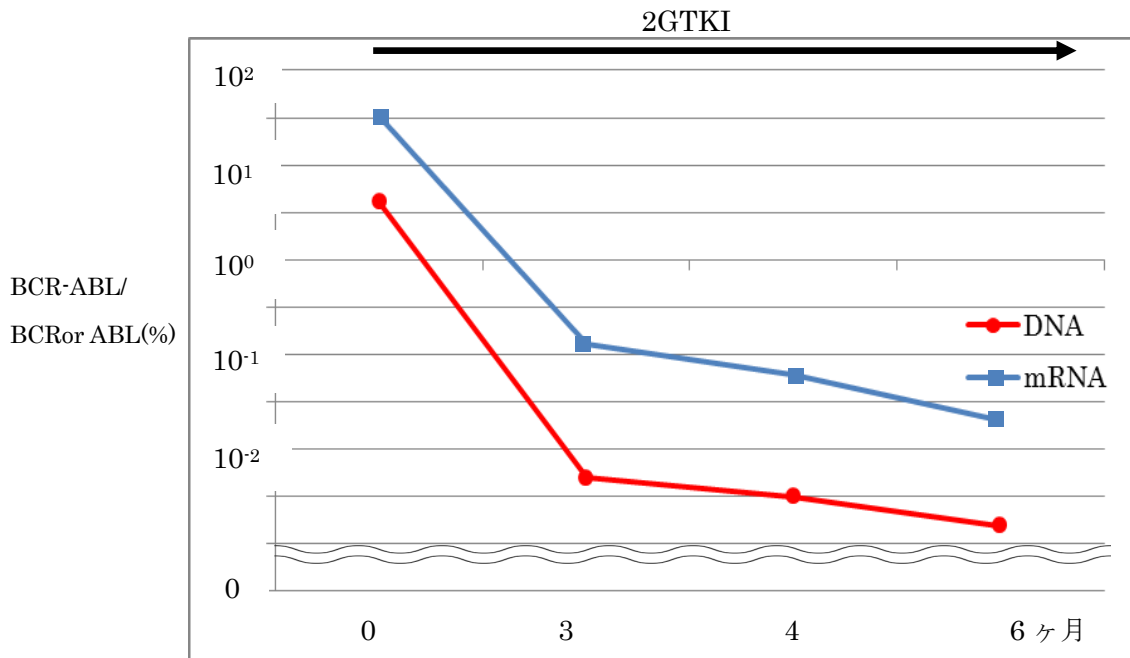


図 29 Pt. 4 における BCR-ABL 発現量の経時的変化

Pt. 4 の場合、DNA 法および mRNA 法とで同様の経時的変化を示した。

6 考察

診断時の CML 幹細胞は診断時の白血球数や貧血等の血液所見および TKI による治療効果と相関することが報告されている [28]。そこで今回私は CML 幹細胞を中心として、ニロチニブを用いた初発慢性期 CML 患者に対する治療効果に影響を及ぼしうる因子の解析および血液所見との相関を検討した。その際、各因子を 2 分するにあたり平均値及び中央値を用いた理由として、いずれの因子の分布も一様ではなく、概して 2 峰性となっており (図 13、15、17)、平均値を用いることで、それぞれの群の特徴を表すことができると考えたからである。

CD34+細胞と血液所見との相関において、2 群に分けた際平均値 ($5952/\mu\text{l}$) を用いた場合のみ有意差が認められた理由として、CD34+細胞数は個々の患者により大きなばらつき ($7\sim 48930/\mu\text{l}$) が見られたものの、その分布はおよそ平均値を境に少ない群と多い群に偏っており (図 13)、中央値 ($2360/\mu\text{l}$) で分けた場合よりも各々の群の特徴を有効に表すことができたからと考えられた。

Ph 陽性率においては Hb と比較的強い相関関係が認められ、Ph 陽性率が高い症例ほどより重度の貧血となる傾向が見られた。このことは Ph 陽性率が低い症例は正常な骨髄幹細胞が多く残存していることを意味し、そのため貧血は認められないか、もしくは軽微となったと考えられた。2 群に分けて解析した結果では、有意差が認められた項目は平均値 (82%) で分けた場合、白血球数、赤血球数、

Hb、Hct および各成熟段階の白血球分画であり、中央値(97.3%)で分けた場合にはそこへ白血球数が加わったが、平均値及び中央値で分類したそれぞれの結果に大きな相違は見られなかった。その理由として、CD34+細胞数同様、分布にはばらつきが見られたものの(2~100%)、多くの症例が90%を超えており、平均値と中央値どちらで分類しても各群の特徴としてはそれぞれ大きな違いがなかったと考えられた。

また CML 幹細胞数は症例間で大きな差が見られたが、BCR-ABL^{IS}(%)や soca1 score 等との相関は認められず、予後や病態との関係は現在までのところ不明であり、今後の解析を待つ必要が考えられた。また CML 幹細胞数を平均値(562/ μ l)で分けた場合、血液所見において有意差が認められた項目は白血球数のみであったが、中央値(251/ μ l)で分けた場合、赤血球数や Hb、Hct、各成熟段階の白血球分画で有意差が認められた。これは平均値で分けた場合は Ph 陽性率での結果と同様の傾向を示しており、一方中央値で分けた場合は CD34+細胞数での結果に相似していた。このような違いが生じた原因として、今回の結果では大半の症例が Ph 陽性率が90%を超えており、概ねほぼ一律とみなすことができる。そうすると CML 幹細胞数はその算出の方法上 CD34+細胞数の影響を大きく受けるため、CML 幹細胞数における結果は CD34+細胞数における結果と同様の傾向を示したことが考えられた。しかし、CML 幹細胞数を中央値で分けた場合、細胞数の

少ない群に Ph 陽性率の低い症例が集まっているため、Ph 陽性率の影響が大きくなり、Ph 陽性率における結果に相似したものと考えられた。

12 ヶ月時点での MMR 到達率、CMR 到達率は 67%(20/30 例)、33%(10/30 例)であり、24 ヶ月時点ではそれぞれ 100%(7/7 例)、71%(5/7 例)であった。この結果は、ニロチニブおよびイマチニブを用いた第Ⅲ相比較試験での治療成績[13]より良好なものであったが、実際のニロチニブ投与量は服薬コンプライアンスや治療反応性および副反応に応じた投与量の増減等により同等とは考えにくく、また本臨床試験においては全観察期間が終了していないことから一概には比較できず今後更なる解析が必要と考えられた。

CML 幹細胞数とニロチニブによる治療効果に相関は認められず、これはイマチニブおよびダサチニブを使用した過去の報告[28]とは異なる結果であった。この理由として、ひとつにはニロチニブは CML 幹細胞数に影響されない、一定の有効性を有する可能性が考えられた。また別の理由として、イマチニブおよびダサチニブを用いた研究では CD34+CD38-細胞における Ph 陽性率(%)と治療効果との相関を解析しており、そのため CML 幹細胞数(/ μ l)を用いた本研究とは異なった結果となった可能性が考えられた。

一方、CML 幹細胞数を中央値で 2 群に分けた場合、3 ヶ月時点での MMR、MR^{4.0}、CMR の達成に要した期間は多い群と少ない群でそれぞれ MMR が 14%(3/21 例)およ

び 33% (6/18 例)、MR^{4.0} が 5% (1/21 例) および 17% (3/18 例)、CMR が 5% (1/21 例) および 11% (2/18 例) であり、累積到達率には両群の間で明らかな有意差は認められなかったものの、CMR を達成した症例においては CML 幹細胞の少ない症例の方がより早期に達成する可能性が示唆され、CML 幹細胞の多い症例にいたってはより注意深く治療効果を見ていく必要も考えられた。

BIM の遺伝子多型は東洋人に特異的であり、その割合はおよそ 10% とされている [29] が、本研究においても解析された症例数は 12 例と少ないもののそのうちの 17% (2/12 例) に認められ、大きな違いは見られなかった。治療効果との相関においては同症例数の少なさが原因により明らかにすることができなかつたため、今後症例数の増加を待って再度解析する必要があると考えられた。

MRD の評価方法で用いる内部標準遺伝子は、BCR-ABL 遺伝子と発現レベルや安定性が類似しており、プライマーがクロスしないこと等が条件とされ、ABL、BCR、 β -glucuronidase (GUSB) の 3 遺伝子が推奨されている [37]。IRIS 試験では BCR が用いられており [40]、今回は BCR を採用した。

今回解析可能であった 3 症例のうち Pt.2 においては mRNA 法による結果が 1 点であったことから DNA 法との経時的変化の比較はできなかつた。Pt.3 および Pt.4 においては DNA 法と mRNA 法による結果ではほぼ同様の傾向が認められ、DNA 法は正確性を備えたものであると考えられた。また Pt.3 の場合、mRNA 法で

は検出できなかった時点があったことに対し、DNA 法では検出が可能であったことから、感度においても優れていると考えられた。

BCR、ABL 両遺伝子は血球の分化段階や分化系列によらず造血系においては広範に発現することが知られているが、その発現制御には不明な点が多く、分化段階や分化系列等によって個々の細胞における発現レベルは均一ではないと思われる。従って、mRNA 法による結果は残存する Ph クローンの量を必ずしも反映しない。また、転写活性が抑制されている状態では CML 細胞が残存していても、それを検出することは困難と考えられる。Pt. 3 においては mRNA 法で検出できなかった時点は造血幹細胞移植後間もない状況であったことがその原因として考えられた。

Pt. 2 および Pt. 4 において DNA 法と mRNA 法との測定値に差が認められたが、その理由として患者毎に設計したプライマーによる増幅効率の違いが考えられ、感度に与える影響について今後検討していく必要があると考えられた。

以上のことから、今回考案した DNA 法は検討および改善の余地があるものの、転写活性に関わらず、血中に CML 細胞が残存していれば安定してその存在を検出することが可能であり、造血幹細胞移植後の再発の評価や、CMR 到達後において TKI の中止のモニターとして有用となる可能性が示唆された。

また mRNA 法では複数の操作手順を経て測定されるため、偽陽性となるリスク

が少なからず残る一方、DNA 法においては患者特異的なプライマーを用いるためその可能性は低くなるメリットがある。DNA 法は、BCR-ABL 遺伝子の切断点を患者毎に同定する必要があり、その点において開始時は mRNA 法より時間を要するデメリットはあるものの、一度切断点を同定し必要なプライマーが設計されれば、治療開始後の測定に至っては簡便であると考えられた。小児急性リンパ性白血病においては DNA 法を用いた MRD の測定結果に基づくリスク別の治療法の決定は欧米ではすでに標準となっており [41-42]、今後症例数を増やした更なる解析により、CML においても DNA 法を用いたより高感度な MRD の評価法の臨床への導入が期待される。

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 Rouselot, 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 Sloma, X 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, Niranjana 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 Saußeke 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] DM 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。