

論文の内容の要旨

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

[序文] 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で 9 番と 22 番染色体の長腕間相互転座が起こり、特徴的なフィラデルフィア(Ph)染色体が生じることで発症する腫瘍性増殖疾患である。Ph 染色体上に BCR-ABL 融合遺伝子が形成され、その産物である活性化チロシンキナーゼが細胞内の様々なシグナル伝達経路を刺激して無秩序な血球産生が誘導される。現在の標準治療であるチロシンキナーゼ阻害薬(Tyrosine kinase inhibitor: TKI)の登場により予後は劇的に改善されたが、一部に TKI 治療抵抗性を示す症例が存在し、これまで TKI 治療の効果予測因子として確立されたものはない。CML 幹細胞は Ph+CD34+CD38-の細胞分画に存在し、TKI 治療に抵抗性を示すことが知られている。診断時の CML 幹細胞量はイマチニブとダサチニブを含む TKI の治療効果に影響するというデータが近年報告された。一方、TKI 抵抗性に関連する別の因子として BIM の遺伝子多型が知られている。BIM 遺伝子産物は BCL2 ファミリーに属する BH3-only protein であり、アポトーシス誘発機能を有するが、欠失型の遺伝子多型がアジア系の約 10%に存在する。この欠失多型では BIM 蛋白質の発現が低下し、TKI によるアポトーシスに抵抗性となるとされる。TKI の治療効果は微小残存病変 (Minimal Residual Disease : MRD) を反映する末梢血 BCR-ABL mRNA 量の測定により評価されており、イマチニブ以降この数値が治療前の 0.1%未満に減少した分子遺伝学的大寛解(Major Molecular Response: MMR)を専ら実診療での到達目標としてきた。第 2 世代 TKI の台頭により、数値が検出限界以下となる分子遺伝学的完全寛解(Complete Molecular Response: CMR)を治療目標と見なすようにシフトしつつあり、MRD の正確な評価は不可欠となっている。現在 MRD の評価に用いられている RQ-PCR 法は非常に有用であるものの、試料となる RNA の品質次第で結果に影響がでるリスクがある。また、複数の操作手順を至適条件で行う必要があり、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、検査に要する血液量が多いことが難点である。

したがって、安定かつ高感度な MRD 測定用に新たな方法を開発する余地がある。

[目的] 初発慢性期 CML 患者を対象に、CML 幹細胞と診断時の血液検査との相関およびニロチニブによる治療効果に影響しうる因子の検討および解析した。また、新たな MRD の評価

方法として、TKI を含めた各種薬剤による治療中の CML 患者を対象に、患者特異的なプライマーを作成し、DNA を用いた定量的リアルタイム PCR 法を用いた方法を考案した。

[方法] CML 幹細胞の定量および BIM の解析には、初発慢性期 CML 患者を対象としてニロチニブを投与する N-road 臨床試験に登録された症例を対象とした。CML 幹細胞数は CD34+細胞数に、CD34+細胞における CD38-細胞の比率及び同分画における Ph 陽性率をかけ合わせることで算出し、その多少に応じて分けた 2 群間で治療効果における比較検討を行った。また CD34+細胞数や Ph 陽性率および CML 幹細胞数と診断時の血液所見との相関を解析した。BIM 遺伝子については、患者 DNA を鋳型に PCR を施行後その増幅産物の電気泳動にて遺伝子多型の有無を確認した。MRD の評価方法には抗がん剤や TKI または造血幹細胞移植による治療がなされている CML 患者 4 症例を対象とした。始めに BCR-ABL 融合遺伝子の切断点をシーケンス解析にて同定し、その結果をもとに切断点を含むよう患者特異的なプライマーを作成した。DNA を材料に BCR を内部標準遺伝子として相対的な定量的リアルタイム PCR を行い、治療経過中の BCR-ABL 遺伝子量の経時的変化を解析した。また従来法との結果と比較し、その正確性や感度を検討した。

[結果] 新規 CML 患者における CML 幹細胞に関する解析は 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 幹細胞の定量は行えたものは 43 例であり、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。相関を解析するにあたり、CD34+細胞数、Ph 陽性率及び CML 幹細胞数を、それぞれ平均値及び中央値を用いて多い群と少ない群の 2 群に分類した。CD34+細胞数を中央値で分けた場合有意差を認めた項目はなかったが、平均値を用いた場合 CD34+細胞数の多い群の方が有意に白血球数は増加していた。Ph 陽性率を平均値で分類した場合、有意差を認めたものは、赤血球数、Hb、Hct 等であり、中央値で分けた場合も同様の傾向が認められ、中でも Hb とは強い負の相関関係が見られた。CML 幹細胞数を平均値で分けた場合、白血球数にのみ有意差が認められたが、中央値で分けた場合には白血球数以外に、赤血球数、Hb、Hct 等で有意差を認めた。治療効果にいたっては CD34+細胞数、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分けた場合、いずれの時点でも BCR-ABL^{IS} の値に有意差は認められなかった。MMR を達成した全体の症例数はそれぞれ、3 ヶ月時点で 23%、6 ヶ月時点で 68%、12 ヶ月時点で 67%、18 ヶ月時点で 86%、24 ヶ月時点で 100%であった。中央値で分けた場合の比較(多 vs 少)では、MMR を達成した割合は、3 ヶ月時点で 14% vs 33%、6 ヶ月時点で 63% vs 72%、12 ヶ月時点で 71% vs 62%、18 ヶ月時点で 87% vs 86%、24 ヶ月時点で 100% vs 100%であった。CML 幹細胞を平均値で分けて解析

した結果では、いずれの時点でも 2 群間でほぼ同様の結果であった。BIM の遺伝子多型の解析は、同意が得られた 12 例に対し施行し、うち 2 例に BIM 遺伝子のヘテロでの欠失が認められた。ニロチニブによる治療効果との相関の解析も試みたがいずれの時点でも有意差は認められなかった。MRD 解析においては、解析した 4 例中 1 例は患者特異的なプライマーの設定条件が定まらず解析困難であった。また 1 例は従来法での定量は 1 時点のみの施行であったため今回の DNA を用いた方法との比較は困難であった。残り 2 例については従来法と今回の方法とで同様の経時的変化が認められ、そのうちの 1 例においては従来法では PCR での増幅が確認されなかった時点があったことに対し、今回の方法では検出が可能であった。

[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 治療における予後と相関することが報告されているが、今回 CML 幹細胞以外にも、定量する際に用いた、CD34+細胞数および Ph 陽性率との相関も同様に解析した。Ph 陽性率は Hb と比較的強い相関関係が認められ、Ph 陽性率が高い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、そのため貧血は軽微となったと考えられた。また CML 幹細胞数を平均値および中央値で分けた場合の結果に違いが生じた原因として、今回の結果ではほとんどの症例で 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、平均値で分けた場合のように、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すことになるが、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たため、Ph 陽性率の影響が大きくなり Ph 陽性率での結果に相似したものと考えられた。治療効果については 12 ヶ月時点での MMR 到達率、CMR 到達率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上記比較試験と同等と一概には言えず、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今後更なる解析する必要があると考えられた。一方 CML 幹細胞数の多い群と少ない群との比較で治療効果に有意差は認められず、MMR、MR^{4.0}、CMR の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 の遺伝子多型は本研究において 17%にみられ、治療効果との相関においては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った。MRD 解析においては、比較検討が可能であった 2 例において従来法による結果とほぼ同

様の傾向が認められ、今回考案した DNA を用いた MRD の評価方法は正確性を備えた方法と考えられた。またそのうち 1 例では、従来法では検出できなかった時点があったことに対し、今回の方法は検出が可能でありその感度においても優れていると考えられた。従来法では mRNA の転写活性が抑制されている状態では検出が困難である一方、今回考案した方法は DNA を材料としていることから転写活性の如何に関わらず、CML 細胞が血中に存在していれば安定して検出が可能であると考えられた。

[結論]CML 幹細胞数は診断時の白血球数や貧血と相関が認められた。ニロチニブによる治療効果においては CML 幹細胞数の多少で有意差は認められなかったが、CMR を達成した症例に着目した場合 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た。BIM の遺伝子多型とニロチニブでの治療効果における解析は症例数の少なさから明らかにすることはできなかったが、今後再度解析する必要があると考えられた。今回考案した MRD の評価方法は、その正確性及び感度の面からもその有用性が示され、その性質上、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も有用である可能性が考えられた。