

博士(医学) 小野孝明

### 論文題目

*BCR-ABL1* mutations in patients with imatinib-resistant Philadelphia chromosome-positive leukemia by use of the PCR-Invader assay

(イマチニブ耐性フィラデルフィア染色体陽性白血病患者における PCR インベーター法を用いた *BCR-ABL1* 遺伝子変異)

### 論文の内容の要旨

[はじめに]

慢性骨髄性白血病 (Chronic myelogenous leukemia; CML)の治療はチロシンキナーゼ阻害薬であるイマチニブの導入により大きく進歩した。しかしながら、イマチニブにより治療された CML の累積再発率は 60 ヶ月で 17%と報告されている。

イマチニブに耐性を示す最も重要な原因は *BCR-ABL1* キナーゼドメインの点突然変異であるが、その検出頻度は解析法の感度にも依存し、一般的に用いられるダイレクトシーケンス法は感度に限界がある。本研究では、ダイレクトシーケンス法より高感度である PCR インベーター法を用いた。

一方、ATP phosphate-binding loop (P-loop)部位 (AA245-AA255)の変異はイマチニブに対する感受性低下と、T315I 変異はイマチニブと第 2 世代チロシンキナーゼ阻害薬双方への感受性低下と関係する。P-loop 部位の変異や T315I 変異を有する CML 患者の予後は報告により異なる。

本研究では、本邦におけるイマチニブ耐性フィラデルフィア染色体陽性 (Ph<sup>+</sup>)白血病の *BCR-ABL1* 点突然変異の頻度とその種類、変異が臨床的特徴と予後に与える影響を検討した。

[患者ならびに方法]

2007 年 1 月から 2009 年 7 月の間に、イマチニブを少なくとも 6 ヶ月間投与されたが耐性となった Ph<sup>+</sup>白血病患者 60 人が登録された。このうち 29 人が CML 慢性期、2 人が移行期、12 人が急性転化期、17 人が Ph<sup>+</sup>急性リンパ性白血病(acute lymphoblastic leukemia; ALL)であった。

患者から採取した末梢血もしくは骨髄液から RNA を抽出し、RT-PCR 法により *BCR-ABL1* 遺伝子転写産物を増幅した。その後、PCR 産物を用いてインベーターアッセイを行い、*BCR-ABL1* 配列中の 25 種類の遺伝子変異 (M244V、L248V/R、G250E、Q252H/R、Y253F/H、E255K/V、E279K、F311L、T315I/A、F317L、M351T、F359I/V、V379I、L387M、H396R/P、S417Y、E459K、F486S) の有無を検討した。T315I 変異もしくは P-loop 部位の変異が検出された場合はダイレクトシーケンス法も追加した。

続いて、変異の有無による患者背景を病期別に解析した。全生存期間 (イマチニブ開始からすべての死亡までの期間)、無増悪生存期間 (イマチニブ開始から疾患進行もしくは死亡まで) を変異の有無と種類により比較した。

[結果]

CML 慢性期 29 人中 14 人 (48%)、CML 移行期と急性転化期 14 人中 7 人 (50%)、Ph<sup>+</sup>ALL

17人中7人(53%)に変異が検出された。CML慢性期患者14人で15の変異が検出された。その内訳はP-loop部位が6(40%)、非P-loop部位が6(40%)、T315I変異が3(20%)であった。CML移行期と急性転化期7人の患者で9の変異が検出された。その内訳はP-loop部位が3(33%)、非P-loop部位が1(11%)、T315I変異が5(56%)であった。Ph<sup>+</sup>ALL9人で11の変異が検出された。その内訳はP-loop部位が7(64%)、T315I変異が4(36%)であった。PCRインベーター法でP-loop部位の変異もしくはT315I変異が検出された24検体をダイレクトシーケンス法で解析したところ、インベーター法でT315I変異が検出されたCML急性転化期1人は、ダイレクトシーケンス法ではT315I変異が検出できなかった。CML慢性期の患者でSokalスコアが高い患者は、中間もしくは低い患者より高頻度に変異が検出された。CMLの移行期と急性転化期、Ph<sup>+</sup>ALLでは、患者背景と変異の検出に明らかな相関は認めなかった。

CML慢性期では、変異を有する群で有さない群と比較して明らかに無増悪生存期間が不良であった。P-loop部位に変異を有する群は、他の部位に変異を有する群や変異を有さない群と比較して、明らかに無増悪生存期間が不良であった。一方で、変異の有無や種類は全生存期間に影響を与えなかった。CML移行期、急性転化期の患者で、変異を有した患者の全生存期間は、変異を有さない患者より有意に不良であった。P-loop部位の変異とT315I変異を有する群で、明らかに全生存期間が劣っていた。Ph<sup>+</sup>ALLでは、変異の有無や種類は全生存期間に影響を与えなかった。

#### [考察]

本研究において解析されたイマチニブ耐性Ph<sup>+</sup>白血病における変異の頻度は先行する報告と同頻度であり、PCRインベーター法が変異のスクリーニングとして有用な手法であることを明確にした。

点突然変異の検出と関連する患者背景としてCML診断からイマチニブ投与まで6ヶ月以上要した患者やSokalスコアが高いといった因子が報告されているが、今回の研究では、Sokalスコアが高い患者で有意に変異の検出頻度が高かった。

我々の研究では、P-loop部位に変異を有するCML慢性期患者は、有意に無増悪生存期間が不良であった。P-loop変異を有する患者の予後は、先行する報告でも一定の見解が得られておらず、さらに多数例の前向き研究が必要であると考えられる。

T315I変異を有するCML慢性期患者では有さない群と生存期間に差を認めなかったが、移行期、急性転化期では、T315I変異を有する群で全生存期間が不良であった。これらの結果から、T315I変異を有する患者の予後は、疾患の進行度に影響するものと考えられる。

#### [結論]

イマチニブ耐性Ph<sup>+</sup>白血病患者におけるBCR-ABL1点突然変異のモニタリングは予後予測に有益であり、第二世代チロシンキナーゼ阻害薬や同種造血幹細胞移植の適応を決定するのに重要である。

PCRインベーター法は、点突然変異のスクリーニングとして有用な手法であることが示された。

### 論文審査の結果の要旨

慢性骨髄性白血病 (CML)の治療でチロシンキナーゼ阻害薬(TKI)のイマチニブに耐性を示す原因として *BCR-ABL1* キナーゼドメインの点突然変異が重要であるが、その検出は従来のダイレクトシーケンス法では感度に限界がある。一方、ATP phosphate-binding loop (P-loop)部位の変異はイマチニブの感受性低下と、T315I 変異はイマチニブと第2世代 TKI 双方への感受性低下と関係する。そこで、申請者はダイレクトシーケンス法より高感度のPCR-インバーダー法を用いて、本邦におけるイマチニブ耐性フィラデルフィア染色体陽性白血病の *BCR-ABL1* 点突然変異の頻度と種類ならびに変異が臨床的特徴と予後に与える影響を検討した。

その結果、全国より 60 例が登録され、変異の頻度は先行する研究報告と同程度で、PCR-インバーダー法の変異のスクリーニングとしての有用性が確認された。なお、PCR-インバーダー法で P-loop 部位または T315I の変異が検出された 24 検体をダイレクトシーケンス法で解析すると、CML 急性転化期の 1 例の T315I 変異が検出できなかった。CML 慢性期で Sokal スコアの高スコア群は、中間または低スコア群より高頻度に変異が検出された。CML 慢性期で変異を有する群と P-loop 部位に変異を有する群の無増悪生存期間が有意に不良であり、また CML 移行期、急性転化期で T315I 変異を有する群の全生存期間が不良であった。

審査委員会では、イマチニブ耐性フィラデルフィア染色体陽性白血病における *BCR-ABL1* 点突然変異のモニタリングが予後予測因子となり、第二世代 TKI や同種造血幹細胞移植の適応決定に有用であること、ならびに PCR-インバーダー法の点突然変異スクリーニングにおける有用性を示した点を高く評価した。

以上により、本論文は博士(医学)の学位の授与にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者 主査 大園 誠一郎  
副査 峯田 周幸 副査 中村 利夫