

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24501340

研究課題名(和文) イマチニブ耐性慢性骨髄性白血病のBCR-ABL1遺伝子変異クローンの推移

研究課題名(英文) BCR-ABL1 mutations in patients with imatinib-resistant chronic myelogenous leukemia

研究代表者

小野 孝明 (ONO, TAKAAKI)

浜松医科大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：40402276

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：慢性骨髄性白血病(CML)25例に対して33検体でPCR-インベーター法とダイレクトシーケンス法を用いてBCR-ABL1の遺伝子変異解析を施行した。5例で変異が検出され、そのうちexon 8/9 35-bp insertion (135INS mutation)を未治療例 (n=1)とimatinib抵抗例 (n=2)で検出した。135INS mutationはimatinibに抵抗性を示すものの、nilotinibには良好な反応を示した。PCR-インベーター法は、BCR-ABL1遺伝子変異を検出するのに有用であるが、135INS mutationは検出できないため注意が必要である。

研究成果の概要(英文)：The association between BCR-ABL1 kinase domain mutation and therapeutic response was evaluated in patients with chronic myelogenous leukemia (CML) using both PCR-Invader assay and direct sequencing to establish standard method for screening of mutations. BCR-ABL1 KD mutations were detected in 1 patient of 19 newly diagnosed CML and 4 of 6 tyrosine kinase inhibitor (TKI) resistant CML. Among detected mutations, exon 8/9 35-bp insertion (BCR-ABL135INS mutation) was observed in 3 patients with newly diagnosed CML (n=1) or TKI resistant CML (n=2). Our result showed that CML with BCR-ABL135INS mutation had resistance for imatinib, while this mutation had favorable response to nilotinib. PCR-Invader assay is useful for screening of mutations, although we should be careful for the undetectability of BCR-ABL135INS mutation by using this assay.

研究分野：医歯薬学

キーワード：慢性骨髄性白血病 BCR-ABL1点突然変異 PCR-インベーター法 イマチニブ

1. 研究開始当初の背景

Philadelphia染色体(Ph染色体)は、慢性骨髄性白血病(Chronic myeloid leukemia; CML)の95%に認められ、imatinib(メシル酸イマチニブ、グリベック)は、CMLに対し優れた効果を示すことが知られている。CMLの標準的治療薬として用いられてきたimatinibであるが、慢性期CML患者の5年の無イベント生存率は83%であり、少なからずイマチニブ耐性症例が存在している。イマチニブ耐性の機序の多くはBCR-ABL1遺伝子の突然変異によると考えられている。現在、こうした変異を有するイマチニブ耐性CMLに対して有効性を示す新規チロシキナーゼ阻害薬(ニロチニブ、ダサチニブ)が使用可能となり、さらに2010年12月からニロチニブが、2011年1月からダサチニブが初発CMLに対しても使用可能となった。しかしながら、イマチニブに効果を認める患者は、現時点でも同薬を継続している例も多く、イマチニブ耐性例の変異解析は、依然として重要な課題である。一方で、CMLのBCR-ABL1KDの変異の検出には、主にダイレクトシーケンス法が用いられてきた。ダイレクトシーケンス法は、変異を生じる遺伝子領域の塩基置換をすべて検出し、未知の遺伝子変異にも対応できる利点があるが、変異クローンが全体の10%から20%存在しないと検出は困難である。事実、imatinib抵抗性の慢性骨髄性白血病におけるBCR-ABL1KD遺伝子変異の頻度やその臨床的意義は、検出に用いる検査方法の感度に依存しており報告により一定していない。我々は、イマチニブ抵抗性となったPh染色体陽性白血病におけるBCR-ABL1遺伝子変異をPCR-インベーター法を用いて検出し、予後の予測に有用であることを報告した。(Ono et al. Leukemia Research 35: 598-603, 2011)この際、PCR-インベーター法におけるBCR-ABL1の変異検出感度は1-5%であり、ダイレクトシーケンス法よりも優れていた。また、临床上、重要な25の変異においてはダイレクトシーケンス法でも確認したが、ダイレクトシーケンス法で検出された変異はすべて、PCR-インベーター法でも検出され、慢性骨髄性白血病慢性期において、予後を予測することができた。

以上より、imatinib抵抗性CMLにおけるBCR-ABL1遺伝子点突然変異の有無をインベーター法とダイレクトシーケンス法にて確認し、少なくともどちらかの方法で変異クローンが認められた場合、その推移を双方の方法で定時的に追っていくことは病

態の観察と治療方針の決定、さらにBCR-ABL1遺伝子変異を有するクローン解析方法の標準化確立のために重要であると考えられる。

2. 研究の目的

Imatinib抵抗性CMLにおけるBCR-ABL1遺伝子点突然変異の有無をインベーター法とダイレクトシーケンス法にて確認し、少なくともどちらかの方法で変異クローンが認められた場合は、そのクローンの推移を双方の方法で定時的に追跡し、治療効果と相関するか確認する。同時に、感度の異なる2つのBCR-ABL1遺伝子点突然変異検出方法における検出頻度の差異と治療効果の相関を比較する。これらの結果をもとに、imatinib抵抗性CMLにおける治療変更の選択に関わるBCR-ABL1遺伝子点突然変異クローン検出方法の標準化確立を目指す。

3. 研究の方法

1. 研究参加同意の得られたCML患者の骨髄もしくは末梢血からQIAamp RNAeasy kit (QIAGEN, Hilden, Germany)を用いてRNAを抽出する。SuperScript II c-DNA Synthesis Kit(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)を用い、1µgのRNAからc-DNAを合成する。
2. ABL1KDを含んだ1617bpのプライマーを作成し、PCRでBCR-ABL1遺伝子を増幅する。
3. 临床上重要な既知の25のBCR-ABL1KD変異(M244V, L248V/R, G250E, Q252H/R, Y253F/H, E255K/V, E279K, F311L, T315A/I, F317L, M351T, F359I/V, V379I, L387M, H396P/R, S417Y, E459K and F486S)についてインベーター法を用いて検出する。(Yamamoto M, et al, Int J Hematol. 2009;89:482-8)
4. それぞれの遺伝子変異の検出に用いるprimary probeとInvader oligoは、Invader technology creator (TWT, Madison, WI, USA)を用いて設定されるが、これは、既に論文化されているimatinib耐性Ph染色体陽性白血病におけるBCR-ABL1KD遺伝子変異を解析した我々の報告(Ono T et al. Leukemia Research 35: 598-603, 2011)で報告されている。Invader technology creatorは、上記、前研究の際と同様にBML社の機器を使用する。

5. 2nd-TKI の使用上、重要と考えられる変異(dasatinib において IC50>3nM の変異: Q252H, E255K, E255V, V299L, F317L, F317V, T315A, nilotinib において IC50>150nM の変異: Y253H, E255K, E255V, F359V, 両剤 に対して 不応:T315I) が PCR-インベーター法で検出された場合、ダイレクトシーケンス法でも確認する。
6. その後の治療として nilotinib, dasatinib もしくは同種造血細胞移植を選択後、変異の有無にかかわらず、18ヶ月まで、3ヶ月ごとに変異解析をインベーター法で行う。これにより変異クローンの推移や新たな変異の出現がないかどうかを確認し、分子細胞学的治療効果と相関するかどうか解析する。

4. 研究成果

初年度から、本研究にエントリー可能な imatinib 抵抗性 CML 患者を関連施設含め検索したが、当初予想されたよりも imatinib 抵抗性 CML は、すでに第2世代チロシンキナーゼ阻害剤(2ndTKI)に治療を変更されており、患者のリクルートが困難であった。また研究開始前に初発 CML の治療選択が imatinib から 2nd TKI である nilotinib, dasatinib に変化したことが、患者のリクルートをさらに困難とした。このため平成25年度から研究の対象を 2nd TKI に抵抗性を示す CML 症例や初発 CML にも対象を広げ、*BCR-ABL1* 遺伝子変異解析を施行することとした。最終年度までに、25名の CML 症例の 33検体で PCR-インベーター法とダイレクトシーケンス法を用いて *BCR-ABL1* 遺伝子変異解析を施行した。

CML 患者の内訳は、未治療 CML 19例、TKI 抵抗性 CML 6例(imatinib n=3, nilotinib n=1, dasatinib n=1, bosutinib n=1)であった。そのうち、未治療 CML 1例、TKI 抵抗性 CML 4例で *BCR-ABL1* 遺伝子変異を認めた。遺伝子変異の詳細は、exon 8/9 35-bp insertion (*BCR-ABL1*^{T315I} mutation) を未治療 CML (n=1), imatinib 抵抗性 CML (n=2)

で、Y253H 変異を nilotinib 抵抗性 CML で、T315I 変異を bosutinib 抵抗性 CML において、それぞれ検出した。Y253H と T315I 変異については、PCR-インベーター法とダイレクトシーケンス法にてともに検出された。Y253H 変異を認めた nilotinib 抵抗性 CML は dasatinib へ変更したところ、6ヶ月で分子遺伝学的効果が得られ、PCR-インベーター法とダイレクトシーケンス法ともに Y253H 変異クローンは効果とともに消失した。T315I 変異を認めた CML は同種造血幹細胞移植を施行し、T315I 変異クローンの消失を認めた。*BCR-ABL1*^{T315I} mutation は、インベーター法では検出不可能な *BCR-ABL1* 遺伝子変異である。未治療 CML の 1例で初発時に *BCR-ABL1*^{T315I} mutation を認めたが、nilotinib を投与開始し、3ヶ月後には complete cytogenetic response に到達し、同時に *BCR-ABL1*^{T315I} mutation は消失した。*BCR-ABL1*^{T315I} mutation を認めた 2例も imatinib から nilotinib へ治療方法を変更し、ともに major molecular response が得られ、*BCR-ABL1*^{T315I} mutation は検出できなくなった。これらのことから、*BCR-ABL1*^{T315I} mutation を有する CML は、imatinib に抵抗性を示すものの、nilotinib により十分な治療効果を望める可能性が示された。また、PCR-インベーター法は、ダイレクトシーケンス法と同様に、*BCR-ABL1* 遺伝子変異を検出するのに有用であるが、*BCR-ABL1*^{T315I} mutation は、検出できないため、これに関しては注意が必要であると考えられた。今回の研究においては、十分な登録症例を確保できなかったため、従来目的であった PCR-インベーター法とダイレクトシーケンス法の検出頻度の差異と治療効果の相関を十分に比較することはできなかった。今後、2ndTKI 抵抗例に対象を変更し、データを集積していく予定

である。また最終年度の研究成果に関しては、2015年10月16-18日に金沢で開催される第77回日本血液学会総会に「The impact of the *BCR-ABL1* mutation with exon 8/9 35-bp insertion at diagnosis in chronic myeloid leukemia」の演題で登録し、発表を予定している。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計2件)

Ono T, Takeshita A, Kishimoto Y, Kiyoi H, Okada M, Yamauchi T, Tsuzuki M, Horikawa K, Matsuda M, Shinagawa K, Monma F, Ohtake S, Nakaseko C, Takahashi M, Kimura Y, Fujita H, Iwanaga M, Asou N, Ohnishi K, Naoe T; Japan Adult Leukemia Study Group. Long-term outcome and prognostic factors of elderly patients with acute promyelocytic leukemia. *Cancer Science*. 103(11):1974-8, 2012.

Ono T, Takeshita A, Kishimoto Y, Kiyoi H, Okada M, Yamauchi T, Emi N, Horikawa K, Matsuda M, Shinagawa K, Monma F, Ohtake S, Nakaseko C, Takahashi M, Kimura Y, Iwanaga M, Asou N, Naoe T; The Japan Adult Leukemia Study Group. Expression of CD56 is an unfavorable prognostic factor for acute promyelocytic leukemia with higher initial white blood cell counts. *Cancer Science*. 105(1):97-104, 2014

〔学会発表〕(計1件)

Ono T, Takeshita A, Kishimoto Y, Kiyoi H, Okada M, Yamauchi T, Tsuzuki M, Horikawa K, Matsuda M, Shinagawa K, Monma F, Ohtake S, Nakaseko C, Takahashi M, Yagasaki F, Kimura Y, Fujita H, Iwanaga M, Asou N, Ohnishi K, Naoe T: Long-Term Outcome Of Acute Promyelocytic Leukemia (APL) With Lower Initial Leukocyte Counts By Using All-Trans Retinoic Acid (ATRA) Alone For Remission Induction Therapy: Japan Adult Leukemia Study Group (JALSG) APL97 Study. 55th Annual Meeting of American Society of Hematology New Orleans, LA, USA. December 19, 2013.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小野 孝明 (ONO TAKAAKI)
浜松医科大学・医学部附属病院・助教
研究者番号: 40402276

(2) 研究分担者

大西 一功 (OHNISHI KAZUNORI)
浜松医科大学・医学部附属病院・教授
研究者番号: 80252170

(3) 連携研究者

()

研究者番号: