

令和 3 年 5 月 26 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K16186

研究課題名(和文) Ph+ALLにおけるBCR遺伝子切断点の意義

研究課題名(英文) Significance of BCR gene breakpoint in Ph + ALL

研究代表者

西脇 聡史 (NISHIWAKI, Satoshi)

名古屋大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：80753037

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：フィラデルフィア染色体陽性急性リンパ性白血病(Ph+ALL)のうち、白血病芽球以外の血球系統でBCR-ABL融合遺伝子発現がある多系統Ph発現(Multi-Ph)を59人中21人(36%)で認めた。Multi-Phでは、BCR-ABL融合遺伝子発現が多能性前駆細胞レベルで検出された。Multi-Phはmajor BCRに有意に多い結果ではあったが、完全には一致していなかった。IKZF1の欠失の解析ではMulti-Phに特徴的パターンは同定されなかった。一方、Multi-Phは無イベント生存と全生存に対する予後良好因子であることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

フィラデルフィア染色体陽性急性リンパ性白血病(Ph+ALL)においてBCR-ABL融合遺伝子が白血病芽球以外に発現している例が3分の1以上と一定の割合であることを示した。さらに、発現系統の違いが治療成績とも関連があり、BCR-ABL融合遺伝子が白血病芽球以外に発現していることが予後良好と関連することを示した。このことは、Ph+ALLにおける新たな予後因子としてBCR-ABL融合遺伝子の発現血球系統の違いが有用であることを示唆している。さらに背景にあると思われる遺伝子異常等の違いを明らかにすることでPh+ALLの層別化につながると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Multi-lineage BCR-ABL expression (Multi-Ph) was defined in 21 of 59 patients (36%). BCR breakpoint was major in 17 of 21 Multi-Ph (81%). In such patients, BCR-ABL was detected at the multipotent progenitor level. However, no IKZF1 deletion patterns that were specific for Multi-Ph were identified. On the other hand, better survival rates were observed in patients with Multi-Ph compared with survival rates in those with uni-lineage BCR-ABL expression. In multivariate analyses, Multi-Ph was identified as a good prognostic factor for both overall survival and event-free survival. We confirmed Multi-Ph in more than one-third of patients with Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. Although no specific molecular characteristics were identified, Multi-Ph was associated with better treatment outcomes.

研究分野：フィラデルフィア染色体陽性急性リンパ性白血病

キーワード：フィラデルフィア染色体陽性急性リンパ性白血病 BCR切断点 BCR-ABL融合遺伝子 血球系統

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

フィラデルフィア染色体陽性急性リンパ性白血病(Ph+ALL)は、9番染色体上のABLと22番染色体上のBCRの転座により、Ph染色体(BCR-ABLキメラ遺伝子)が形成されることで白血病化が引き起こされる予後不良の白血病として知られてきた。Ph染色体を標的とするチロシンキナーゼ阻害薬(TKI)の登場後、治療成績は改善しているが、依然として同種造血幹細胞移植が根治療法と考えられている。研究代表者らは、ALLの治療成績とリスク因子について検討してきた(Blood.2010;116:4368-75, Ann Oncol.2013;24:1594-602, Bone Marrow Transplant.2016;51:43-50)。また、BCR遺伝子の切断点の意義についても検討をすすめ、切断点による治療成績の違いにも着目してきた。

Ph染色体におけるBCR遺伝子の切断点は、エクソン12~16にあるMajor-BCR(M-BCR)とエクソン1~2にあるminor-BCR(m-BCR)の2つに大きく分けられる。Ph+ALLにおいては、m-BCRを2/3程度で認め、約1/3の症例ではM-BCRを認める。M-BCRは、慢性骨髄性白血病(CML)の大多数で認められることから、CMLの急性転化期(CML-BP)とde novoのPh+ALLの鑑別がしばしば問題となる。実臨床では、M-BCRを認めるが、CMLの慢性期(CML-CP)の状態をとらえられておらず、初発時に急性白血病となっている症例は、major Ph+ALLと診断されることが多い。

Ph+ALLではPh染色体異常が白血病化の原因と考えられている。一方、CMLは幹細胞レベルの異常であり、CML-CPの状態では芽球以外の正常血球にPh染色体を認め、二次的な異常が加わることで急性白血病化してCML-BPとなる。

Major Ph+ALLと診断された患者の末梢血での好中球FISH検査及び骨髄の組織FISHによる予備検討では、全例で好中球にBCR-ABLキメラ遺伝子融合シグナルを検出した。好中球にシグナルを認めるということは、芽球以外にPh染色体が存在することを意味し、CML-BPであることを示唆する所見となる。Ph+ALLの分子遺伝学的背景として、転写因子であるIkarosをコードするIKZF1遺伝子の欠失が深く関与していることが明らかとされており、CML-CP、CML-BP、Ph+ALLにおいて欠失のパターンが違うことが示唆されている(Nature.2008;453:110)。しかし、BCR切断点とこれらの遺伝子変異のパターンとの関連は明らかとされていない。

2. 研究の目的

BCR切断点により異常が起こっている血球の分化段階が異なること、さらにPh+ALLの発生に深く関与しているIKZF1の遺伝子変異パターンの違いを明らかとすることで、単一疾患として認識されているPh+ALLの概念を分子遺伝学的に分ける指標を探求することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) BCR切断点による好中球FISH、組織FISH検査におけるPh染色体発現血球系統の違いの検討

初診時の末梢血検体を用いて、観察細胞を好中球を主体とする分葉核細胞とリンパ球を主体とする単核球細胞に大別し、BCR-ABL ESプローブを用いて、BCR-ABLキメラ遺伝子を融合シグナルとして検出する(検査と技術.2000;28:1343)。芽球は単核球細胞として識別されるため、分葉核細胞に融合シグナルを認めたものは、好中球FISH陽性と判定し、そのことは芽球以外の正常血球成分にも融合シグナルが入っていることを意味する。

初診時の骨髄クロット標本において、好中球FISHと同様の原理を用いてパラフィン切片上のBCR-ABLキメラ遺伝子融合シグナルを検出する(Mod Pathol.1994;7:565)。二重染色あるいは連続切片を用いることで、融合シグナルを認める血球系統を同定することが可能となる。これにより、好中球のみでなく、リンパ球系や巨核球系の融合シグナルの有無を確認できる。

(2) BCR切断点による各血球分画におけるBCR-ABLキメラ遺伝子発現の違いの解析

初診時の骨髄細胞をFACSAriaを用いてCD34+38-19-3- [hematopoietic stem cells (HSCs) and multipotent progenitor (MPP) cells], CD34+38+19-3- [myeloid and lymphoid progenitors (Pro)], CD34+19+20-3- [leukemia cells without CD20 coexpression; leukemia associated immunophenotype (LAIP) 20-], CD34+19+20+3- (leukemia cells with CD20 coexpression; LAIP 20+), CD34-19+20+ (mature B cells), CD34-19-20-3+ (mature T cells), CD34+19-13/33+10-16- (early myeloid compartment), CD34-19-13/33+10-16- (late myeloid compartment), CD34-19-13/33+10-16+ (mature myeloid compartment)に分取する(Blood.2017;130:2027-2031)。分取した各細胞において、major BCR-ABLまたはminor BCR-ABL mRNAを、RT-PCR法によって検出し、各血球系統におけるキメラ遺伝子の発現状態を明らかとする。

(3) BCR切断点によるIKZF1欠失パターンの違いの解析

IKZF1のエクソン0から7に特有のプライマーを用いてRT-PCRを行い、BCR切断点と欠失

のパターンを明らかとする(Nature.2008;453:110)。

(4) BCR 切断点の臨床成績への影響の検討

各症例における臨床データを収集する。寛解導入療法後の MRD 陽性率、生存率の BCR 切断点による違いを明らかとする。

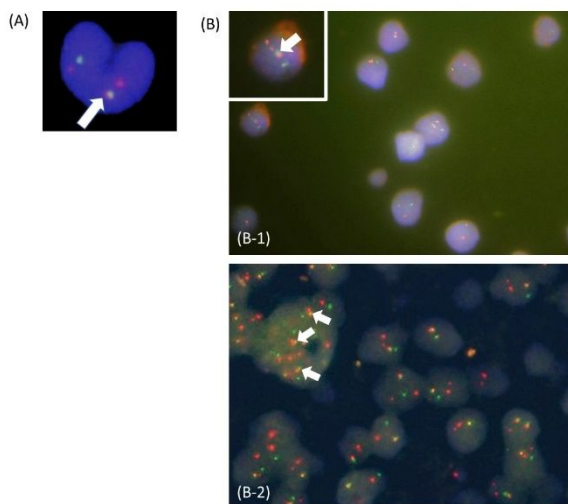
4. 研究成果

(1) 好中球 FISH は 14 例で分葉核陽性であり、BCR 切断点は、3 例(21%)で m-BCR、11 例(79%)で M-BCR であった。骨髓クロット標本の組織 FISH 検査では、9 例で芽球以外の血球に BCR-ABL 融合シグナルを認めた。BCR 切断点は、1 例(11%)で m-BCR、8 例(89%)で M-BCR であった。代表的な例を図 1 に示す。

(図 1) 末梢血好中球 FISH と骨髓組織 FISH

(A) 末梢血好中球 FISH、(B) 骨髓組織 FISH (B-1) MPO 陽性骨髓球における融合シグナル、(B-2) 巨核球における融合シグナル

白矢印：BCR-ABL 融合シグナル、赤シグナル：ABL プローブ、緑シグナル：BCR プローブ



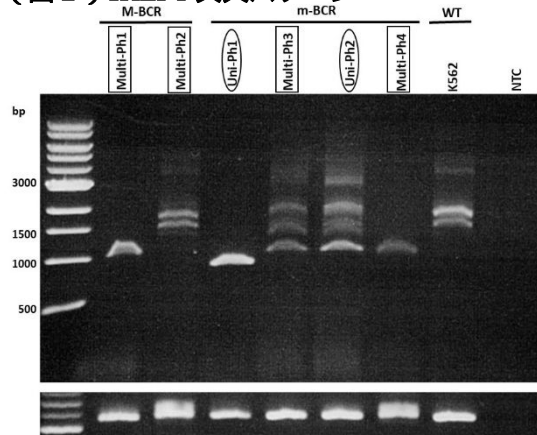
(2) 初診時の骨髓細胞を分画に分けて RT-PCR を実施したところ、4 例で、多能性前駆細胞(MPP)レベルで BCR-ABL が陽性となった。BCR 切断点は、2 例(50%)で m-BCR、2 例(50%)で M-BCR であった。

末梢血好中球 FISH、骨髓組織 FISH、分画ごとの RT-PCR のいずれかで、白血病芽球以外の血球系統に BCR-ABL 融合遺伝子発現をみとめたものを多系統 Ph 発現(Multi-Ph)、白血病芽球のみに BCR-ABL 融合遺伝子発現がみられたものを単系統 Ph 発現(Uni-Ph)として以後の解析を行った。Multi-Ph は M-BCR で有意に多く認められたものの、m-BCR の一部でも確認され、BCR 切断点とは完全に一致しなかった。白血病の発生過程においては BCR-ABL 融合遺伝子発現がある血球系統の違いがより重要と考えられた。

(3) IKZF1 欠失パターンを 6 例 (Uni-Ph2 例、Multi-Ph4 例) で検討したが、Multi-Ph に特徴的な欠失パターンはみられなかった (図 2)。

Multi-Ph のうち 3 例において IKZF1 欠失が MPP レベルで確認され、BCR-ABL 遺伝子発現レベルとの一貫性が確認された。

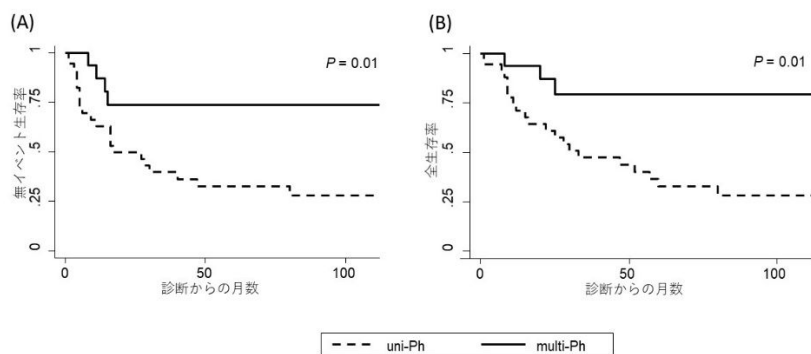
(図 2) IKZF1 欠失パターン



(4) 無イベント生存率、全生存率ともに Multi-Ph で Uni-Ph よりよい結果であった(4年無イベント生存率: 74% vs. 33%, $P=0.01$ 、4年全生存率: 79% vs. 44%, $P=0.01$ 、(図3))。しかし、初回寛解導入療法後の分子遺伝学的完全寛解率は、Multi-Ph で Uni-Ph より低かった(11% vs. 56%, $P=0.003$)。2例の Multi-Ph では、血液学的完全寛解確認時の骨髓組織 FISH で白血病芽球以外に BCR-ABL 融合シグナルを認めた。多変量解析では、Multi-Ph は、無イベント生存および全生存における予後良好因子であった。

(図3) 生存曲線

(A)無イベント生存率、(B)全生存率



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Nishiwaki S, Kim JH, Ito M, Maeda M, Okuno Y, Koyama D, Ozawa Y, Gunji M, Osaki M, Kitamura K, Ushijima Y, Ishikawa Y, Miyamura K, Sugiura I, Kiyoi H	4. 巻 10
2. 論文標題 Multi-Lineage BCR-ABL Expression in Philadelphia Chromosome-Positive Acute Lymphoblastic Leukemia Is Associated With Improved Prognosis but No Specific Molecular Features	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Oncology	6. 最初と最後の頁 586567
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fonc.2020.586567	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Nishiwaki S, Mizuta S, Ohashi K, Fukuda T, Uchida N, Tachibana T, Onizuka M, Ozawa Y, Onishi Y, Takahashi S, Eto T, Nakamae H, Tanaka J, Ichinohe T, Atsuta Y, Kako S	4. 巻 94
2. 論文標題 Different impact of BCR-ABL transcripts on allogeneic hematopoietic cell transplantation from different graft sources for Ph+ALL with minimal residual disease.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 American Journal of Hematology	6. 最初と最後の頁 E301-E305
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/ajh.25612	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nishiwaki S, Miyamura K, Kanda Y, Takanashi M, Uchida N, Fukuda T, Ikegame K, Ohashi K, Eto T, Ozawa Y, Shiratori S, Iwato K, Matsuoka KI, Hidaka M, Ichinohe T, Atsuta Y, Koderu Y, Okamoto S	4. 巻 55
2. 論文標題 A consideration for efficient unrelated hematopoietic stem cell source acquisition-from an experience of Japan.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bone Marrow Transplantation	6. 最初と最後の頁 657-660
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41409-019-0542-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Akahoshi Y, Nishiwaki S, Mizuta S, Ohashi K, Uchida N, Tanaka M, Fukuda T, Ozawa Y, Takahashi S, Onizuka M, Shiratori S, Nakamae H, Kanda Y, Ichinohe T, Atsuta Y, Kako S	4. 巻 110
2. 論文標題 Tyrosine kinase inhibitor prophylaxis after transplant for Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 3255-3266
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.14167	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Nishiwaki S, Tanaka H, Kojima H, Okamoto S	4. 巻 54
2. 論文標題 Availability of HLA-allele-matched unrelated donors: estimation from haplotype frequency in the Japanese population.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Bone Marrow Transplantation	6. 最初と最後の頁 300-303
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41409-018-0263-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Goto T, Murata M, Terakura S, Nishida T, Adachi Y, Ushijima Y, Shimada K, Ishikawa Y, Hayakawa F, Nishio N, Nishiwaki S, Hirakawa A, Kato K, Takahashi Y, Kiyoi H	4. 巻 97
2. 論文標題 Phase I study of cord blood transplantation with intrabone marrow injection of mesenchymal stem cells: A clinical study protocol	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Medicine	6. 最初と最後の頁 e0449
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/MD.0000000000010449	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Harada Y, Nishiwaki S, Sugimoto T, Onodera K, Goto T, Sato T, Kamoshita S, Kawashima N, Seto A, Okuno S, Yamamoto S, Iwasaki T, Ozawa Y, Miyamura K, Akatsuka Y, Sugiura I	4. 巻 96
2. 論文標題 Successful treatment with allogeneic stem cell transplantation followed by DLI and TKIs for e6a2 BCR-ABL-positive acute myeloid leukaemia: A case report and literature review.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Medicine	6. 最初と最後の頁 e9160
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/MD.0000000000009160.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nishiwaki S, Sugiura I, Miyata Y, Saito S, Sawa M, Nishida T, Miyamura K, Kuwatsuka Y, Kohno A, Yuge M, Kasai M, Iida H, Kurahashi S, Osaki M, Goto T, Terakura S, Murata M, Nishikawa H, Kiyoi H	4. 巻 96
2. 論文標題 Efficacy and safety of autologous peripheral blood stem cell transplantation for Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia: A study protocol for a multicenter exploratory prospective study (Auto-Ph17 study).	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Medicine	6. 最初と最後の頁 e9568
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/MD.0000000000009568.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nishiwaki S, Okuno S, Suzuki K, Kurahashi S, Sugiura I	4. 巻 17
2. 論文標題 Impact of Synchronous Multiple Primary Malignant Tumors on Newly Diagnosed Hematological Malignancies.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Clinical lymphoma, myeloma & leukemia	6. 最初と最後の頁 e79-e85
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.clml.2017.09.006.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Koyama D, Nishiwaki S, Harada Y, Yamamoto S, Kurahashi S, Sugimoto T, Iwasaki T, Sugiura I	4. 巻 47
2. 論文標題 Effective chemomobilization with etoposide and cytarabine (EC regimen) in lymphoma patients: a single-center, retrospective, observational study.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Clinical Oncology	6. 最初と最後の頁 820-825
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jjco/hyx076	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kawashima N, Terakura S, Nishiwaki S, Koyama D, Ozawa Y, Ito M, Miyamura K	4. 巻 52
2. 論文標題 Increase of bone marrow macrophages and CD8+ T lymphocytes predict graft failure after allogeneic bone marrow or cord blood transplantation.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Bone Marrow Transplantation	6. 最初と最後の頁 1164-1170
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/bmt.2017.58	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Satoshi Nishiwaki, Shuichi Mizuta, Kazuteru Ohashi, Takahiro Fukuda, Naoyuki Uchida, Heiwa Kanamori, Makoto Onizuka, Yukiyasu Ozawa, Junji Tanaka, Tatsuo Ichinohe, Yoshiko Atsuta, Shinichi Kako
2. 発表標題 DIFFERENT IMPACT OF BCR BREAKPOINT ON THE OUTCOME OF ALLOGENEIC HEMATOPOIETIC CELL TRANSPLANTATION FROM DIFFERENT GRAFT SOURCE FOR PH+ALL IN THE ERA OF TKI
3. 学会等名 24th Congress of the European Hematology Association (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Satoshi Nishiwaki, Shuichi Mizuta, Kazuteru Ohashi, Takahiro Fukuda, Naoyuki Uchida, Heiwa Kanamori, Makoto Onizuka, Yukiyasu Ozawa, Junji Tanaka, Tatsuo Ichinohe, Yoshiko Atsuta, Shinichi Kako
2. 発表標題 TKI時代のPh+ALLに対する同種移植においてBCR切断点の影響が非血縁者間移植ソースにより異なる
3. 学会等名 第81回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西脇聡史、宮村耕一、神田善伸、高梨美乃子、内田直之、福田隆浩、池亀和博、大橋一輝、衛藤徹也、小澤幸泰、一戸辰夫、熱田由子、岡本真一郎
2. 発表標題 移植実績に基づく同種造血幹細胞移植細胞ソースの入手に関する検証
3. 学会等名 第41回日本造血細胞移植学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nishiwaki S, Okuno S, Suzuki K, Kurahashi S, Sugiura I
2. 発表標題 Prognostic impact of synchronous multiple primary malignant tumors on newly diagnosed hematological malignancies.
3. 学会等名 ESMO Asia 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 西脇 聡史
2. 発表標題 名古屋大学医学部附属病院における患者申出療養～「チオテパを用いた自家末梢血幹細胞移植療法」の経験を中心に
3. 学会等名 第15回日本臨床腫瘍学会学術集会(招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 西脇 聡史、奥野真吾、鈴木弘太郎、倉橋信悟、杉浦勇
2. 発表標題 新規悪性リンパ腫患者における診断時重複癌の予後への影響の検討
3. 学会等名 第15回日本臨床腫瘍学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 西脇 聡史
2. 発表標題 研究者が特定臨床研究を立ち上げる意欲を高めるための病院としての取り組み
3. 学会等名 ARO協議会 第5回学術集会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 西脇 聡史、宮村耕一、神田善伸、高梨美乃子、内田直之、福田隆浩、大橋一輝、小川啓恭、衛藤徹也、小澤幸泰、一戸辰夫、熱田由子、岡本真一郎
2. 発表標題 移植実績をもとにした最適なドナープール数を検証するための推計モデルの検討
3. 学会等名 第40回日本造血細胞移植学会総会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------