

200711011A

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

多施設共同研究に登録された白血病の検体収集と

中央保存システムの確立に関する研究

平成19年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 直江 知樹

平成20（2008）年3月

厚生労働科学研究費補助金  
創薬基盤推進研究事業

多施設共同研究に登録された白血病の検体収集と  
中央保存システムの確立に関する研究

平成19年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 直江 知樹  
名古屋大学大学院医学系研究科 血液・腫瘍内科学

## 《目 次》

I. 研究組織 .....	3
II. 総括研究報告書 .....	7
直江 知樹           主任研究者	
III. 分担研究報告書	
1. 白血病検体の有用な保存・利用システムに関わる社会問題 .....	13
直江 知樹	
2. 急性骨髄性白血病における遺伝子異常による予後予測因子の解析 .....	15
麻生 範雄	
3. 提案研究の審査と遺伝子解析 .....	18
清井 仁	
4. 慢性骨髄性白血病における変異解析をモデルとした検体収集に付随する 倫理面の検討 .....	22
小林 幸夫	
5. PhALL 再発例における ABL 変異の後方視的解析に関するアンケート .....	25
矢ヶ崎 史治	
6. 検体収集より得られた白血病細胞の予後関連作用分子の選択 .....	27
竹下 明裕	
7. 新規 ABL チロシンキナーゼ阻害剤による難治性白血病薬剤耐性の克服の 研究 .....	29
田内 哲三	
8. 染色体のセントラルレビュー .....	32
滝 智彦	
IV. 研究成果の刊行に関する一覧表 .....	39

# I . 研 究 組 織

【多施設共同研究に登録された白血病の検体収集と  
中央保存システムの確立に関する研究】 平成 19 年度名簿

	氏 名	所 属 ・ 職 名
主任研究者	直江 知樹	名古屋大学大学院医学系研究科 教授
分担研究者	麻生 範雄	熊本大学大学院医学薬学研究部 准教授
	清井 仁	名古屋大学医学部附属病院 講師
	小林 幸夫	国立がんセンター中央病院 医長
	矢ヶ崎 史治	埼玉医科大学国際医療センター 講師
	竹下 明裕	浜松医科大学 准教授
	田内 哲三	東京医科大学医学部 講師
	滝 智彦	京都府立医科大学大学院医学研究科 講師

## Ⅱ. 総 括 研 究 報 告 書

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）  
総括研究報告書

「多施設共同研究に登録された白血病の検体収集と中央保存システムの確立」

主任研究者 直江 知樹 名古屋大学大学院医学系研究科 血液・腫瘍内科学 教授

研究要旨

多施設共同研究に登録し、同一プロトコールで治療された白血病患者コホートにおいて、白血病検体を逐次的に収集・保存・解析しうるシステムを構築することを目的とした。今年度は、①後方視的検体収集を進めるため、JALSG（成人白血病治療共同研究グループ）AML201研究に登録された症例の内、約200例の検体収集を開始した、②検体の中央保管や提案研究を倫理性・科学性・透明性を確保しつつ進めるための審査組織として、検体検査・付随研究委員会を設置し、3件の審査を行った。③前方視的検体収集を進めるため、プロトコール小委員会との連携を開始した。このような臨床情報と連結しうる白血病検体は、より正確な亜分類や予後予測ならびに最適な治療法の選択に資する検査法の開発に必須であり、また新規標的薬開発のためのバイオリソースとして活用されることが期待出来る。

A. 研究目的

白血病において明らかにされてきた病型特異的な染色体異常や、病態に関与している遺伝子異常の多くは白血病治療上の重要な予後因子でもあり、治療法の選択など臨床的にも重要な情報を与えてきた。しかし、EBMの確立に直結する、臨床情報との関連性を加味した上での網羅的かつ系統的な大規模解析は極めて不十分である。日本成人白血病治療共同研究グループ（JALSG）では、白血病の治療成績向上を目指した多施設共同臨床治療研究を推進し、これら疾患の治療指針を提唱してきたが、白血病細胞における遺伝子解析は、付随研究として個別に行われてきた。そのため、臨床研究登録症例の部分的な症例群での解析に留まるだけでなく、検体保存の中央化システムの構築がなされていないために、臨床検体の共有化ならびに遺伝子解析結果の蓄積が不十分であった。

本研究は、白血病に対する多施設共同治療研究登録症例において、病態に関与する遺伝子異常、発現状態を臨床的データとの関連性を考慮した中で網羅的に解析し、これら疾患群における分子病態に基づく細分化から最適な治療法の選択と治療成績の向上を目指すことを目的とする。そのため、治療研究登録全症例のDNA、RNAを中央保存化するシステムと遺伝子解析を前方視的ならびに後方視的に解析を行う上での倫理性を確保する審査システムの構築を行う。

B. 研究方法

DNA/RNA 中央保存システムの基盤整備と、後方視的検体収集を JALSG 運営委員会、検体研究・付

随研究委員会と協議の上推進する。

C. 研究結果

1. 検体収集

既に登録が終了しているJALSG AML-201臨床試験登録症例において、遺伝子解析ならびに検体保存に関する同意が得られ、初診時白血病細胞が保存されている症例のアンケート調査を実施した。その結果、約200例の検体収集が可能であることが明らかになった。

検体収集を効率的に行うための各施設へのインセンティブとして、白血病関連キメラ遺伝子スクリーニングを検査会社に委託し、同時にDNA/RNAの抽出を行い、匿名化の上中央保存するシステムが効率的に実施可能であることが確認された。本年度中に、約100例の検体収集が行われた。

2. 統一同意文書

今回実施されたアンケート調査により、遺伝子解析ならびに検体保存に関する同意書が整備されていない施設があることが明らかとなり、検体の中央保存化にむけた統一した説明・同意文書の作製が急務であることを認識し、その作製準備に着手した。

3. 前方視的検体収集

現在、JALSGで計画中の次期臨床研究において、前方視的検体収集と中央保存を研究計画書に盛り込むべく、プロトコール小委員会との連携を開始した。

4. 遺伝子解析研究提案

遺伝子解析に関する研究提案について、

JALSG検体研究・付随研究委員会と統一性をもって審議・承認を実施していく基本方針を確認し、JALSGの中での提案研究に際しては、残余検体の中央保存化を求めている。JALSG検体研究・付随研究委員会として3件の審議を行い、2件の承認を行った。

#### D. 健康危険情報

該当無し。

#### E. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1: Wakui M, Kuriyama K, Miyazaki Y, Hata T, Taniwaki M, Ohtake S, Sakamaki H, Miyawaki S, Naoe T, Ohno R, Tomonaga M. Diagnosis of acute myeloid leukemia according to the WHO classification in the Japan Adult Leukemia Study Group AML-97 protocol. *Int J Hematol.* 87:144-51, 2008.
  - 2: Yanada M, Takeuchi J, Sugiura I, Akiyama H, Usui N, Yagasaki F, Nishii K, Ueda Y, Takeuchi M, Miyawaki S, Maruta A, Narimatsu H, Miyazaki Y, Ohtake S, Jinnai I, Matsuo K, Naoe T, Ohno R; Japan Adult Leukemia Study Group. Karyotype at diagnosis is the major prognostic factor predicting relapse-free survival for patients with Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia treated with imatinib-combined chemotherapy. *Haematologica.* 93:287-90, 2008.
  - 3: Xu J, Suzuki M, Niwa Y, Hiraga J, Nagasaka T, Ito M, Nakamura S, Tomita A, Abe A, Kiyoi H, Kinoshita T, Naoe T. Clinical significance of nuclear non-phosphorylated beta-catenin in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome. *Br J Haematol.* 140:394-401, 2008.
  - 4: Asou N, Yanagida M, Huang L, Yamamoto M, Shigesada K, Mitsuya H, Ito Y, and Osato M. Concurrent transcriptional deregulation of AML1/RUNX1 and GATA factors by the *AML1-TRPS1* chimeric gene in t(8;21)(24;q22) acute myeloid leukemia. *Blood.* 109:4023-4027, 2007.
  - 5: Hama A, Yagasaki H, Takahashi Y, Matsumoto K, Kiyoi H, Kojima S. Mutations of JAK2, JAK3 and GATA1 in acute megakaryoblastic leukemia of Down syndrome. *Blood.* 111:2493-2494, 2008.
  - 6: Narimatsu H, Yokozawa T, Iida H, Tsuzuki M, Hayakawa M, Takeo T, Iino M, Ichihashi T, Kato C, Sawamoto A, Sao H, Yanada M, Emi N, Kiyoi H, Yamaguchi T, Naoe T, Suzuki R, Sugiura I. Clinical characteristics and outcomes in patients with t(8;21) acute myeloid leukemia in Japan. *Leukemia.* 22:432-434, 2008.
  - 7: Fusako Ohara, Yukio Kobayashi, et al. Abdominal Pain and Syndrome of Inappropriate Anti-diuretic Hormone Secretion (SIADH) as a Manifestation of Visceral Varicella-zoster Virus (VZV) Infection in a Patient with Non-Hodgkin Lymphoma *Am J Hematol* 82:414-418, 2007.
  - 8: Fujisawa S, Ohno R, Shigeno K, Sahara N, Nakamura S, Naito K, Kobayashi M, Shinjo K, Takehita A, Suzuki Y, Hashimoto H, Kinoshita K, Shimoya M, Kaise T, Ohnishi K. Pharmacokinetics of arsenic species in Japanese patients with relapsed or refractory acute promyelocytic leukemia treated with arsenic trioxide. *Cancer Chemother Pharmacol.* 59:485-93, 2007.
  - 9: Nunoda K, Tauchi T, et al. Identification and functional signature of genes regulated by structurally different the ABL kinase inhibitors. *Oncogene* 26:4179-4188, 2007.
  - 10: Shimizu D, Taki T, Utsunomiya A, Nakagawa H, Nomura K, Matsumoto Y, Nishida K, Horiike S, Taniwaki M. Detection of *NOTCH1* mutations in adult T-cell leukemia/lymphoma and peripheral T-cell lymphoma. *Int J Hematol* 85:212-218, 2007.
- ##### 2. 学会発表
- 1: Tomoki Naoe. 20<sup>th</sup> International Symposium of JALSG (President) Tokyo 2007. 7. 14
  - 2: 直江知樹 分子標的療法の現状と臨床検査. 第8回日本検査血液学会学術集会 福井 2007. 7. 21
  - 3: Tomoki Naoe. Tyrosine kinase inhibitors for acute leukemia. The 1<sup>st</sup> Korea-Japan symposium on AML, Pusan, Korea 2007. 9. 7
  - 4: Tomoki Naoe, Norio Asou, Katsuji Shinagawa, Rhuzo Ohno for the JALSG. APL studies in JALSG. 4th Asian Hematology Association, Beijing, China 2007. 10. 22
  - 5: Fan J, Asou N, Matsuoka M. Clustering of hypomethylated DNA regions associated with transcriptional changes in B-CLL. 第66回日本癌学会学術総会 横浜 2007. 10. 3-5
  - 6: Tomoko Nanri, Eisaku Iwanaga, Naofumi Ma



- tsuno, Toshiro Kawakita, Hitoshi Suzushima, Fumio Kawano, Hiroaki Mitsuya, and Norio Aso. A JAK2-V617F activating mutation in addition to C-KIT and FLT3 mutations is associated with clinical outcome in patients with t(8;21)(q22;q22) acute myeloid leukemia. 49<sup>th</sup> Annual Meeting of ASH Dec 8-11, 2007 Atlanta.
- 7: Shiotsu Y, Kiyoi H, Ozeki K, Umehara H, Shimizu M, Akinaga S, and Naoe T. KW-2449, a Novel Multi-Kinase Inhibitor Against FLT3, Abl, FGFR1 and Aurora, Suppresses the Growth of AML Both *In Vitro* and *In Vivo*. The American Society of Hematology 49th Annual Meeting, Atlanta USA, December 8-11, 2007.
- 8: 杉本匠, 富田章裕, 平賀潤二, 清井仁, 直江知樹. DNAメチル化酵素阻害剤による白血球分化抗原遺伝子発現の誘導. 第69回日本血液学会・第49回日本臨床血液学会総会 横浜 2007. 10. 11-13
- 9: Kobayashi Y, et al. Oligonucleotide Microarray Analysis of Ocular Adnexal MALT Lymphoma (OAL) using Oligonucleotide Microarray. 第66回日本癌学会学術総会 横浜 2007. 10. 3-5
- 10: Asakura Y, Kobayashi Y, et al. High frequency of loss of heterozygosity due to uniparental disomy or allele deletion of ocular adnexal MALT-type lymphoma. The American Society of Hematology 49th Annual Meeting, Atlanta USA, December 8-11, 2007.
- 11: Takeshita A, Shinjo K, Yamakage N, Ono T, Hirano I, Okinaka K, Matsui H, Nakamura S, Shigeno K, Maekawa M, Ohnishi K, Ohno R. Reduced effect of inotuzumab ozogamicin (CMC544) on P-glycoprotein positive malignant B cells and its restoration by multidrug resistance modifiers. Blood 2007; 110 (Suppl. 1): 702a. 49<sup>th</sup> Annual Meeting of American Society of Hematology. Atlanta, USA.
- 12: Tauchi T. Combined effect of a pan-aurora kinase inhibitor MK-0457 and dasatinib or vorinostat against T315I BCR-ABL. 第69回日本血液学会、第49回日本臨床血液学会合同シンポジウム.
- 13: Tauchi T, et al. Combined effect of a pan-aurora kinase inhibitor MK-0457 and dasatinib against T315I BCR-ABL: in vitro and in vivo studies. 49th Annual Meeting of American Society of Hematology.
- 14: Chinen Y, Taki T, Nishida K, Shimizu D, Okuda T, Yoshida N, Kobayashi C, Koike K, Tsuchida M, Hayashi Y, Taniwaki M. Cloning of AML1-LAF4 fusion gene in childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia with t(2;21)(q11;q22) by bubble PCR method for cDNA. 49th Annual Meeting of the American Society of Hematology, Atlanta, December 8-11, 2007
- 15: Myoung-ja Park, Tomohiko Taki, Megumi Oda, Keizo Horibe, Yasuhide Hayashi. Mutational analysis of NOTCH1 and cyclin related genes in childhood T cell acute lymphoblastic leukemia. 第66回日本癌学会総会、横浜、2007年10月3-5日
- F. 知的財産権の出願・登録状況  
(予定を含む)
1. 特許取得  
該当無し。
  2. 実用新案登録  
該当無し。
  3. その他  
なし。

### Ⅲ. 分 担 研 究 報 告 書

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）  
分担研究報告書

「白血病検体の有用な保存・利用システムに関わる社会的問題」

分担研究者 直江 知樹 名古屋大学大学院医学系研究科 血液・腫瘍内科学 教授

研究要旨

白血病は比較的稀な悪性腫瘍であるが、腫瘍細胞の採取が容易でDNA/RNAはもちろん、生きた細胞を超低温下で保存するという特徴がある。また白血病は分子病態の解明が進んでおり、予後や治療法に関与する分子マーカーが数多く明らかになってきた。さらに新規薬剤開発のバイオリソースとして、白血病細胞の必要性が高まってきている。そこで本研究では、多施設からの白血病検体を速やかに保存・管理し、有益な利用を図ることを目的として研究を開始した。本分担研究では、倫理性・透明性を確保しつつ科学的な研究を進めるための社会的基盤について検討をおこない、そのシステムを構築した。

A. 研究目的

多施設からの白血病検体を速やかに保存・管理し、有益な利用を図るシステムをJapan Adult Leukemia Study Groupを背景として構築する。またそのための倫理性・透明性を確保しつつ科学的な研究を進めるための社会的基盤について整備する。

B. C. 研究方法と結果

白血病における多施設共同研究機構 Japan Adult Leukemia Study Group に臨床検体・付随研究委員会を設けて、白血病検体の収集・保存・利用に関する諸問題を検討した。分担研究者自身は、日本学術会議血液・造血分科会、JALSG 国際シンポジウム、日韓白血病シンポジウム、LeukemiaNet による AML 治療ガイドライン作成などに参加し、臨床検体の利用の円滑化を図るための議論を行った。そして研究班として以下のような意見にまとめることができた。一部は日本学術会議からの提言としてもまとまる予定であり、重複するかもしれない。

- 1) 白血病は比較的稀な悪性腫瘍で、科学的な臨床研究のためには多施設共同研究が必須である。
- 2) 白血病は腫瘍細胞の採取が容易でDNA/RNAはもちろん、生きた細胞を超低温下で保存するという特徴がある。また分子病態の解明が進んでおり、予後や治療法に関与する分子マーカーが数多く明らかになってきた。白血病検体保存はさらに新規薬剤開発におけるバイオリソースとしての白血病細胞も注目されている。
- 3) 研究に用いられる解析技術は年々高度に専門化している。このような解析は適切な技

術と設備を持ち、集約化された中央解析施設で行うことが望ましい。ドイツの白血病グループは中央解析施設を用いて、10000以上の遺伝子解析データを発表し、世界の研究をリードしている。わが国では検査会社なども巻き込んだ日本型の検体の輸送・保管・検査システムを構築する必要がある。残余検体を集積することは最も現実的であろう。

- 4) これらを実現するため、共同臨床研究における施設間での検体の共有・中央保管の重要性を、まず研究者自身が率先認識する必要がある。

臨床検体の共有や包括的同意を円滑に進めるには、学会や倫理委員会が積極的にリードして社会の環境整備を行うことが重要である。今後円滑な検体利用を進める一方、外部委員を含む倫理委員会での透明性の高い検討や、より一層の情報発信を行うべきであろう。多施設間での体系的な検体保存システムや臨床情報データベースは恒久的な事業として整備することが望まれる。

D. 健康危険情報

特になし。

E. 研究発表

1. 論文発表

1: Wakui M, Kuriyama K, Miyazaki Y, Hata T, Taniwaki M, Ohtake S, Sakamaki H, Miyawaki S, Naoe T, Ohno R, Tomonaga M.

- Diagnosis of acute myeloid leukemia according to the WHO classification in the Japan Adult Leukemia Study Group AML-97 protocol. *Int J Hematol.* 87:144-51, 2008.
- 2: Yanada M, Takeuchi J, Sugiura I, Akiyama H, Usui N, Yagasaki F, Nishii K, Ueda Y, Takeuchi M, Miyawaki S, Maruta A, Narimatsu H, Miyazaki Y, Ohtake S, Jinnai I, Matsuo K, Naoe T, Ohno R; Japan Adult Leukemia Study Group. Karyotype at diagnosis is the major prognostic factor predicting relapse-free survival for patients with Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia treated with imatinib-combined chemotherapy. *Haematologica.* 93:287-90, 2008.
- 3: Xu J, Suzuki M, Niwa Y, Hiraga J, Nagasaka T, Ito M, Nakamura S, Tomita A, Abe A, Kiyoi H, Kinoshita T, Naoe T. Clinical significance of nuclear non-phosphorylated beta-catenin in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome. *Br J Haematol.* 140:394-401, 2008.
- 4: Akao Y, Nakagawa Y, Kitade Y, Kinoshita T, Naoe T. Downregulation of microRNAs-143 and -145 in B-cell malignancies. *Cancer Sci.* 98:1914-20, 2007.
- 5: Zembutsu H, Yanada M, Hishida A, Katagiri T, Tsuruo T, Sugiura I, Takeuchi J, Usui N, Naoe T, Nakamura Y, Ohno R. Prediction of risk of disease recurrence by genome-wide cDNA microarray analysis in patients with Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia treated with imatinib-combined chemotherapy. *Int J Oncol.* 31:313-22, 2007.
- 6: Hiraga J, Katsumi A, Iwasaki T, Abe A, Kiyoi H, Matsushita T, Kinoshita T, Naoe T. Prognostic analysis of aberrant somatic hypermutation of RhoH gene in diffuse large B cell lymphoma. *Leukemia.* 21:1846-7, 2007.
- 7: Asou N, Kishimoto Y, Kiyoi H, Okada M, Kawai Y, Tsuzuki M, Horikawa K, Matsuda M, Shinagawa K, Kobayashi T, Ohtake S, Nishimura M, Takahashi M, Yagasaki F, Takeshita A, Kimura Y, Iwanaga M, Naoe T, Ohno R; Japan Adult Leukemia Study Group. A randomized study with or without intensified maintenance chemotherapy in patients with acute promyelocytic leukemia who have become negative for PML-RARalpha transcript after consolidation therapy: the Japan Adult Leukemia Study Group (JALSG) APL97 study. *Blood.* 110:59-66, 2007.
- 8: Kiyoi H, Yamaji S, Kojima S, Naoe T. JAK3 mutations occur in acute megakaryoblastic leukemia both in Down syndrome children and non-Down syndrome adults. *Leukemia.* 21:574-6, 2007.
2. 学会発表  
Tomoki Naoe. 20<sup>th</sup> International Symposium of JALSG (President) Tokyo 2007. 7. 14  
直江知樹 分子標的療法の現状と臨床検査. 第8回日本検査血液学会学術集会 福井 2007. 7. 21  
Tomoki Naoe. Tyrosine kinase inhibitors for acute leukemia. The 1<sup>st</sup> Korea-Japan symposium on AML, Pusan, Korea 2007. 9. 7  
Tomoki Naoe, Norio Asou, Katsuji Shinagawa, Rhuzo Ohno for the JALSG. APL studies in JALSG. 4th Asian Hematology Association, Beijing, China 2007. 10. 22
- F. 知的財産権の出願・登録状況  
(予定を含む)
1. 特許取得  
特になし
  2. 実用新案登録  
特になし
  3. その他  
特になし

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）  
分担研究報告書

「急性骨髄性白血病における遺伝子異常による予後予測因子の解析」  
分担研究者 麻生範雄 熊本大学大学院医学薬学研究部血液内科学 准教授

研究要旨

急性骨髄性白血病は種々の染色体転座や遺伝子変異などによる複数の遺伝子異常を基盤に発症し、病態や治療反応性が異なることが明らかにされつつある、しかしながら、まだ遺伝子異常が明らかでない病型も多く、その解析は重要な課題である。本年度は自施設の白血病症例138例におけるFLT3、CEBPAおよびNPM1遺伝子変異と予後との関係を検索した。いずれも正常染色体例に多い遺伝子変異で予後予測に有用性が示された。さらに、急性骨髄性白血病で最も頻度が高いt(8;21)染色体転座例において二次的遺伝子変異としてC-KITやFLT3の他にJAK2変異が他の病型より多く、予後予測因子であることを明らかにした。今後はこれらの知見をJALSGにおいて収集した同一治療プロトコール登録例の検体を用いて検証し、予後予測因子としての意義を確立する。また、検体収集システムの確立、整備を進めることにより質の高い臨床研究の推進をサポートする。

A. 研究目的

白血病において明らかにされてきた病型特異的な染色体異常や、病態に関与している遺伝子異常の多くは白血病治療上の重要な予後因子でもあり、治療法の選択など臨床的にも重要な情報を与えてきた。しかし、EBMの確立に直結する、臨床情報との関連性を加味した上での網羅的かつ系統的な大規模解析は極めて不十分である。日本成人白血病治療共同研究グループ（JALSG）では、白血病の治療成績向上を目指した多施設共同臨床治療研究を推進し、これら疾患の治療指針を提唱してきたが、白血病細胞における遺伝子解析は、付随研究として個別に行われてきた。そのため、臨床研究登録症例の部分的な症例群での解析に留まるだけでなく、検体保存の中央化システムの構築がなされていないために、臨床検体の共有化ならびに遺伝子解析結果の蓄積が不十分であった。

本研究は、白血病に対する多施設共同治療研究登録症例において、病態に関与する遺伝子異常、発現状態を臨床的データとの関連性を考慮した中で網羅的に解析し、これら疾患群における分子病態に基づく細分化から最適な治療法の選択と治療成績の向上を目指すことを目的とする。そのため、治療研究登録全症例のDNA、RNAを中央保存化するシステムと遺伝子解析を前方視的ならびに後方視的に解析を行う上での倫理性を確保する審査システムの構築を行う。

B. 研究方法

DNA/RNA 中央保存システムの基盤整備と、後方視的な検体収集を JALSG 運営委員会、検体研究・付随研究委員会と協議の上推進する。

C. 研究結果

1. 検体収集

既に登録が終了しているJALSG AML-201臨床試験登録症例において、遺伝子解析ならびに検体保存に関する同意が得られ、初診時白血病細胞が保存されている症例のアンケート調査を実施した。その結果、約200例の検体収集が可能であることが明らかになった。

検体収集を効率的に行うための各施設へのインセンティブとして、白血病関連キメラ遺伝子スクリーニングを検査会社に委託し、同時にDNA/RNAの抽出を行い、匿名化の上中央保存するシステムが効率的に実施可能であることが確認された。本年度中に、約100例の検体収集が行われた。

2. 統一同意文書

今回実施されたアンケート調査により、遺伝子解析ならびに検体保存に関する同意書が整備されていない施設があることが明らかとなり、検体の中央保存化にむけた統一した説明・同意文書の作製が急務であることを認識し、その作製準備に着手した。

3. 前方視的検体収集

現在、JALSGで計画中の次期臨床研究におい

て、前方視的検体収集と中央保存を研究計画書に盛り込むべく、プロトコール小委員会との連携を開始した。

#### 4. 遺伝子解析研究提案

遺伝子解析に関する研究提案について、JALSG検体研究・付随研究委員会と統一性をもって審議・承認を実施していく基本方針を確認し、JALSGの中での提案研究に際しては、残余検体の中央保存化を求めている。JALSG検体研究・付随研究委員会として3件の審議を行い、2件の承認を行った。

#### D. 健康危険情報

該当無し。

#### E. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Asou N, Yanagida M, Huang L, Yamamoto M, Shigesada K, Mitsuya H, Ito Y, and Osato M. Concurrent transcriptional deregulation of AML1/RUNX1 and GATA factors by the *AML1-TRPS1* chimeric gene in t(8;21)(24;q22) acute myeloid leukemia. *Blood* 2007;109: 4023-4027.

2) Asou N, Kishimoto Y, Kiyoi H, Okada M, Kawai Y, Tsuzuki M, Horikawa K, Matsuda M, Shinagawa K, Kobayashi T, Ohtake S, Nishimura M, Takahashi M, Yagasak F, Takeshita A, Kimura Y, Iwanaga M, Naoe T, and Ohno R for the Japan Adult Leukemia Study Group. A randomized study with or without intensified maintenance chemotherapy in patients with acute promyelocytic leukemia who have become negative for PML-RAR $\alpha$  transcript after consolidation therapy: The Japan Adult Leukemia Study Group (JALSG) APL97 study. *Blood* 2007;110:59-66.

3) Asou N, Izuno Y, Okubo T, Ide K, Ueno H, Kawakita M, Mitsuya H, Hata H. Oral melphalan, dexamethasone and thalidomide for the treatment of refractory multiple myeloma. *Int J Hematol* 2007;86:69-71.

##### 2. 学会発表

1) Fan J, Asou N, Matsuoka M. Clustering of hypomethylated DNA regions associated with transcriptional changes in B-CLL. 第66回日本癌学会学術総会 2007年10月3日-5日横浜、プログラム149ページ

2) Sonoki T, Akasaka T, Siebert R, Dyer M, Asou N. MicroRNA125b-1 is a recurrent target gene of IgH alterations in precursor B-acute lymph

oblastic leukemia. 第66回日本癌学会学術総会 2007年10月3日-5日横浜

3) Jo A, Tsukimoto I, Ishii E, Asou N, Igarashi T, Hayashi Y, Ichikawa H. Age-associated difference in gene expression of myelomonocytic and MLL-rearranged AML. 第66回日本癌学会学術総会 2007年10月3日-5日横浜

4) 麻生範雄、南里知子、山内慶子、河北敏郎、岩永栄作、堀川健太郎、満屋裕明 APLの治療から5年後に発症したt(5;12)陽性慢性骨髄単球性白血病 第69回日本血液学会総会、第49回日本臨床血液学会総会 2007年10月11-13日横浜 *臨床血液* 2007;48:1117

5) 岩永栄作、南里知子、河北敏郎、松野直史、満屋裕明、麻生範雄 急性骨髄性白血病におけるFLT3、CEBPA、NPM1遺伝子変異 第69回日本血液学会総会、第49回日本臨床血液学会総会 2007年10月11-13日横浜 *臨床血液* 2007;48:861

6) 松野文彦、立津央、高津典孝、星乃光有、宮家宏定、中村美紀、原田菜穂子、野坂生郷、堀川健太郎、畑裕之、満屋裕明、麻生範雄 Rituximab治療後のあけ性リンパ腫における治療関連AML 第69回日本血液学会総会、第49回日本臨床血液学会総会 2007年10月11-13日横浜 *臨床血液* 2007;48:994

7) 河野和、中村美紀、岩永栄作、門野裕加里、南里知子、河北敏郎、星乃光有、堀川健太郎、畑裕之、満屋裕明、麻生範雄 *Stat5b-RAR $\alpha$* 融合遺伝子を認めたAPL 第69回日本血液学会総会、第49回日本臨床血液学会総会 2007年10月11-13日横浜 *臨床血液* 2007;48:1032

8) 山田恭裕、渡邊祐子、野坂生郷、立津央、堀川健太郎、麻生範雄、満屋裕明、伊藤清治、佐々木裕、日高道広 L-アスパラギナーゼによる重症急性膵炎より回復し、同種骨髄移植を施行したALL 第69回日本血液学会総会、第49回日本臨床血液学会総会 2007年10月11-13日横浜 *臨床血液* 2007;48:1111

9) 河北敏郎、堀川健太郎、西本英史、米村雄士、畑裕之、麻生範雄、川口辰哉、満屋裕明 間接リュウマチ経過中に好中球減少を呈した $\gamma\delta$ T細胞増多症 第69回日本血液学会総会、第49回日本臨床血液学会総会 2007年10月11-13日横浜 *臨床血液* 2007;48:1200

10) 南里知子、藤江里美、山田恭裕、岩永栄作、堀川健太郎、満屋裕明、麻生範雄 ミカファンゲンによる血管内溶血発作 第69回日本血液学会総会、第49回日本臨床血液学会総会 2007年

10月11- 13日横浜 臨床血液 2007;48:1205

11) Tomoko Nanri, Eisaku Iwanaga, Naofumi Matsuno, Toshiro Kawakita, Hitoshi Suzushima, Fumio Kawano, Hiroaki Mitsuya, and Norio Asou. A JAK2-V617F activating mutation in addition to C-KIT and FLT3 mutations is associated with clinical outcome in patients with t(8;21)(q22;q22); acute myeloid leukemia. 49<sup>th</sup> Annual Meeting of ASH Dec 8-11, 2007 Atlanta, Blood 110:1022A, 2007

12) Aoi Jo, Ichiro Tsukimoto, Eiichi Ishii, Norio Asou, Takashi Igarashi, Yasuhide Hayashi, Hitoshi Ichikawa. Age-associated difference in gene expression of pediatric myelo-monocytic and *MLL*-rearranged AML. 49<sup>th</sup> Annual Meeting of ASH Dec 8-11, 2007 Atlanta, Blood 110:930A, 2007

F. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

「提案研究の審査と遺伝子解析」

分担研究者 清井 仁 名古屋大学 医学部附属病院難治感染症部 講師

研究要旨

白血病の病態に関与する分子群の遺伝子変異、発現変化を臨床的データとの関連性を考慮しつつ網羅的に解析し、白血病の分子病態に基づく細分化から最適な治療法の選択と治療成績の向上を目的として、本年度は急性骨髄性白血病におけるFLT3、NPM1、cKIT、N-RAS、TP53、AML1、C/EBPA、MLL-PTD 遺伝子変異の解析を行い、染色体核型とあわせてWHO分類別にみた遺伝子変異の特徴と臨床的予後との関係を検討した。この解析により、(1)従来、予後良好とされるCBF-AMLにおいてもFLT3またはKIT 遺伝子変異を有する症例は極めて予後不良であること、(2)AML not otherwise categorized群においては、C/EBPAとFLT3遺伝子変異の有無により長期予後を層別化できること、(3)予後不良とされるAML with multilineage dysplasia群においても、染色体正常かつ、FLT3、NPM1、KIT、AML1、C/EBPA、p53、N-RAS、MLL遺伝子変異を有しない一群(Genetically normal)はAMLの平均的予後が得られることを明らかにした。これら遺伝子変異については、本研究事業で集積される検体の基礎データとして重要である。

A. 研究目的

白血病において明らかにされてきた病型特異的な染色体異常や、病態に関与している遺伝子異常の多くは白血病治療上の重要な予後因子でもあり、治療法の選択など臨床的にも重要な情報を与えてきた。しかし、EBMの確立に直結する、臨床情報との関連性を加味した上での網羅的かつ系統的な大規模解析は極めて不十分である。日本成人白血病治療共同研究グループ（JALSG）では、白血病の治療成績向上を目指した多施設共同臨床治療研究を推進し、これら疾患の治療指針を提唱してきたが、白血病細胞における遺伝子解析は、付随研究として個別に行われてきた。そのため、臨床研究登録症例の部分的な症例群での解析に留まるだけでなく、検体保存の中央化システムの構築がなされていないために、臨床検体の共有化ならびに遺伝子解析結果の蓄積が不十分であった。

本研究は、白血病に対する多施設共同治療研究登録症例において、病態に関与する遺伝子異常、発現状態を臨床的データとの関連性を考慮した中で網羅的に解析し、これら疾患群における分子病態に基づく細分化から最適な治療法の選択と治療成績の向上を目指すことを目的とする。

B. 研究方法

148 例の成人急性骨髄性白血病（AML）（Recurrent genetic abnormality：38 例、Multilineage dysplasia：33 例、Therapy-related：6 例、Not otherwise categorized：71 例）を対象に、FLT3、cKIT、NPM1、N-RAS、TP53、C/EBPA、AML1、MLL-PTD 遺伝子変異の解析を行い、これら遺伝子変異の頻度、重複

性と染色体核型との相関性を WHO 分類別に解析するとともに、長期予後との相関性について解析を行った。

C. 研究結果

今回解析した症例群においては、59%の症例でいずれかの遺伝子変異の存在が認められ、FLT3 遺伝子変異(24%)、NPM1 遺伝子変異(20%)、C/EBPA 遺伝子変異(11%)が高頻度であった。WHO 分類別にみると、Recurrent genetic abnormality 群では、FLT3 遺伝子変異(16%)、cKIT 遺伝子変異(11%)が高頻度に認められたが、NPM1、C/EBPA 遺伝子変異は認められなかった。Not otherwise categorized 群においては、全ての遺伝子変異が認められたが、中でもFLT3 遺伝子変異(30%)、NPM1 遺伝子変異(23%)、C/EBPA 遺伝子変異(17%)が高頻度であった。Multilineage dysplasia 群においては、TP53 遺伝子変異(24%)、NPM1 遺伝子変異(39%)、C/EBPA 遺伝子変異(15%)、FLT3 遺伝子変異(21%)が高頻度に認められ、33 例中25例(61%)の症例においてcKITを除く何ら

表1

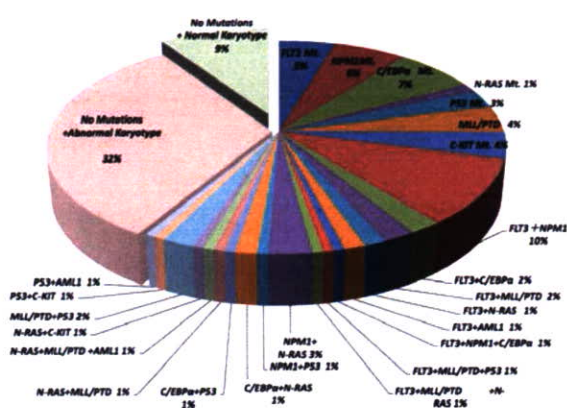
	N	FLT3 Mt.	NPM1 Mt.	C/EBPA Mt.	cKIT Mt.	p53 Mt.	N-RAS Mt.	AML1 Mt.	MLL PTD
Recurrent genetic abnormalities	38	6 (16%)	-	-	4 (11%)	1 (3%)	1 (3%)	-	3 (8%)
Not otherwise categorized	71	21 (30%)	16 (23%)	12 (17%)	4 (6%)	1 (1%)	7 (10%)	2 (3%)	5 (7%)
Multilineage dysplasia	33	7 (21%)	13 (39%)	5 (15%)	-	8 (24%)	3 (9%)	1 (6%)	4 (12%)
Therapy related	6	1 (17%)	1 (17%)	-	-	1 (17%)	2 (33%)	1 (17%)	2 (33%)
Total	148	35 (24%)	30 (20%)	17 (11%)	8 (5%)	11 (7%)	13 (9%)	4 (3%)	14 (9%)



かの遺伝子変異が存在し、染色体核型も正常で、これら遺伝子変異を有しない症例は4例(12%)に過ぎなかった。特に、TP53遺伝子変異の存在はこのカテゴリーに特徴的であり、中でも染色体複雑核型を持つ症例に特異的に存在することが明らかになった(表1)。

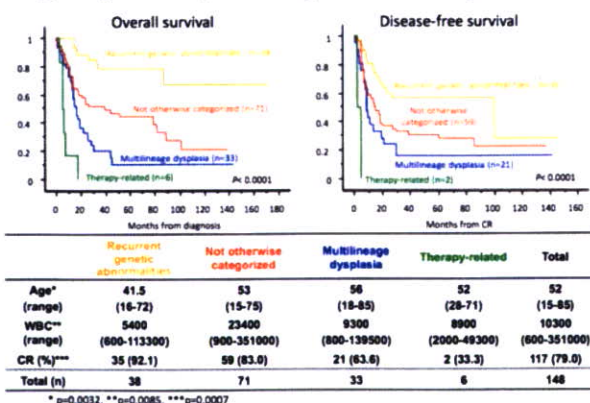
今回解析した遺伝子変異が単独で存在する症例は30%であったが、29%の症例においては、2種類以上の遺伝子変異が重複して認められた。一方、41%の症例で、これら遺伝子変異は認められなかったが、32%の症例は、何らかの染色体異常を有しており、正常染色体核型でこれら遺伝子変異を有しない症例は僅か9%であった(図1)。

図1. Genetic alterations in adult AML



長期予後に関しては、WHO分類はAMLの予後を層別化する上で有用であることが示されたが(図2)、今回の遺伝子変異解析により、個々のカテゴリーにおいて更に細分化可能であることが示された。Recurrent genetic abnormality群では、FLT3遺伝子変

図2. Prognostic analysis according to the WHO-classification



異またはcKIT遺伝子変異を有する症例は、両者ともに変異を有しない症例に比較して予後不良であった。Not otherwise categorized群においては、FLT3遺伝子変異の存在が予後不良因子として、C/EBPA遺伝子変異の存在が予後良好因子として抽出されたが、これら両者の遺伝子変異を有しない症例群の予後は、今回解析した遺伝子群の変異では細分化はできな

った。Multilineage dysplasia群においては、TP53遺伝子変異が予後不良因子として抽出されたが、染色体核型及び遺伝子変異に基づき更に詳細な細分化を試みたところ、染色体複雑核型または何らかの遺伝子変異を有する症例は予後不良であるが、染色体正常核型でいずれの遺伝子変異も有しない症例はAMLの平均的予後と同等の予後が期待できることが明らかになった。

網羅的な遺伝子変異の解析を行うことによりAMLの分子基盤に基づく層別化が可能であるだけでなく、臨床的長期予後においてもWHO分類の細分化が可能であることが明らかにされた。また、形態学的診断に基づくMultilineage dysplasia群においても、染色体複雑核型とTP53遺伝子変異の存在により他のAMLと区別が可能であり、分子基盤の相違を明確にできる可能性が示唆された。

今後、本研究課題において収集される検体の遺伝子学的背景として、これら遺伝子変異の解析が重要であると思われる。

#### D. 健康危険情報

該当無し。

#### E. 研究発表

##### 1. 論文発表

- ① Hama A, Yagasaki H, Takahashi Y, Matsumoto K, Kiyoi H, Kojima S. Mutations of JAK2, JAK3 and GATA1 in acute megakaryoblastic leukemia of Down syndrome. *Blood*. 2008; 111: 2493-2494.
- ② Narimatsu H, Yokozawa T, Iida H, Tsuzuki M, Hayakawa M, Takeo T, Iino M, Ichihashi T, Kato C, Sawamoto A, Sao H, Yanada M, Emi N, Kiyoi H, Yamaguchi T, Naoe T, Suzuki R, Sugiura I. Clinical characteristics and outcomes in patients with t(8;21) acute myeloid leukemia in Japan. *Leukemia*. 2008; 22: 428-432.
- ③ Xu J, Suzuki M, Niwa Y, Hiraga J, Nagasaka T, Ito M, Nakamura S, Tomita A, Abe A, Kiyoi H, Kinoshita T, Naoe T. Clinical significance of nuclear non-phosphorylated beta-catenin in acute myeloid leukaemia and myelodysplastic syndrome. *Br J Haematol*. 2008; 140: 394-401.
- ④ Kajiguchi T, Chung EJ, Lee S, Stine A, Kiyoi H, Naoe T, Levis MJ, Neckers L, Trepel JB. FLT3 regulates beta-catenin tyrosine phosphorylation, nuclear localization, and transcriptional activity in acute myeloid leukemia cells. *Leukemia*. 2007; 21:2476-2484.
- ⑤ Narimatsu H, Emi N, Kohno A, Iwai M, Yanada M, Yokozawa T, Saito S, Shimada K, Kiyoi H, Naoe T, Yamamoto K, Morishita Y. High incidence of secondary failure of platelet recovery after autologous and syngeneic

peripheral blood stem cell transplantation in acute promyelocytic leukemia. *Bone Marrow Transplant.* 2007; 40:773-778.

- ⑥ Imagama S, Abe A, Suzuki M, Hayakawa F, Katsumi A, Emi N, Kiyoi H, Naoe T. LRP16 is fused to RUNX1 in monocytic leukemia cell line with t(11;21)(q13;q22). *Eur J Haematol.* 2007; 79: 25-31.
- ⑦ Kiyoi H, Shiotsu Y, Ozeki K, Yamaji S, Kosugi H, Umehara H, Arai H, Ishii K, Akinaga S, Naoe T. A novel FLT3 inhibitor FI-700 selectively suppress the growth of leukemia cells with FLT3 mutations. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 4575-4582.
- ⑧ Tomita A, Hiraga J, Kiyoi H, Ninomiya M, Sugimoto T, Ito M, Kinoshita T, Naoe T. Epigenetic regulation of CD20 protein expression in a novel B-cell lymphoma cell line, RRBL1, established from a patient treated repeatedly with Rituximab-containing chemotherapy. *Int J Hematol.* 2007; 86: 49-57.
- ⑨ Mizutani E, Narimatsu H, Murata M, Tomita A, Kiyoi H, Naoe T. Successful second cord blood transplantation using fludarabine and cyclophosphamide as a preparative regimen for graft rejection following reduced-intensity cord blood transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2007; 40: 85-87.
- ⑩ Hiraga J, Katsumi A, Iwasaki T, Abe A, Kiyoi H, Matsushita T, Kinoshita T, Naoe T. Prognostic analysis of aberrant somatic hypermutation of RhoH gene in diffuse large B cell lymphoma. *Leukemia.* 2007 Apr 19; [Epub ahead of print].
- ⑪ Asou N, Kishimoto Y, Kiyoi H, Okada M, Kawai Y, Tsuzuki M, Horikawa K, Matsuda M, Shinagawa K, Kobayashi T, Ohtake S, Nishimura M, Takahashi M, Yagasaki F, Takeshita A, Kimura Y, Iwanaga M, Naoe T, Ohno R. A randomized study with or without intensified maintenance chemotherapy in patients with acute promyelocytic leukemia who have become negative for PML-RAR{alpha} transcript after consolidation therapy: The Japan Adult Leukemia Study Group (JALSG) APL97 study. *Blood.* 2007; 110: 59-66.
- ⑫ Kiyoi H, Yamaji S, Kojima, Naoe T. JAK3 mutations occur in acute megakaryoblastic leukemia both in Down syndrome children and non-Down syndrome adults. *Leukemia.* 2007; 21: 574-576.
- ⑬ Okamoto M, Hayakawa F, Miyata Y, Watamoto K, Emi N, Abe A, Kiyoi H, Towatari M, Naoe T. Lyn is an important component of the signal transduction pathway specific to FLT3/ITD and can be a therapeutic target in the treatment of AML with FLT3/ITD. *Leukemia.* 2007; 21: 403-410.

## 2. 学会発表

- ① Shiotsu Y, Kiyoi H, Ozeki K, Umehara H, Shimizu M, Akinaga S, and Naoe T. KW-2449, a Novel Multi-Kinase Inhibitor Against FLT3, Abl, FGFR1 and Aurora, Suppresses the Growth of AML Both *In Vitro* and *In Vivo*. The American Society of Hematology 49th Annual Meeting, Atlanta USA, December 8-11, 2007.
- ② Tomita A, Hiraga J, Kiyoi H, Kinoshita T, and Naoe T. Epigenetic Regulation of CD20 Protein Expression in B-Cell Lymphoma Cells after Rituximab-Containing Chemotherapy. The American Society of Hematology 49th Annual Meeting, Atlanta USA, December 8-11, 2007.
- ③ Sato T, Toki T, Kanazaki R, Xu G, Terui K, Kamio T, Kojima S, Kiyoi H, Mano H, and Ito E. Activating JAK3 Mutations in Transient Myeloproliferative Disorder and Acute Megakaryoblastic Leukemia Accompanying Down Syndrome. The American Society of Hematology 49th Annual Meeting, Atlanta USA, December 8-11, 2007.
- ④ 杉本匠, 富田章裕, 平賀潤二, 清井仁, 直江知樹. DNAメチル化酵素阻害剤による白血球分化抗原遺伝子発現の誘導. 第69回日本血液学会・第49回日本臨床血液学会総会 横浜 2007.10.11-13
- ⑤ 水谷絵美, 富田章裕, 清井仁, 直江知樹. PML-RAR $\alpha$ に結合する転写抑制因子複合体に対する機能阻害に着目した分子標的治療の可能性. 第69回日本血液学会・第49回日本臨床血液学会総会 横浜 2007.10.11-13
- ⑥ 王静文, 安部明弘, 谷崎亮平, 野村由佳, 鈴木百子, 伊藤守, 清井仁, 直江知樹. NOGマウスへの白血病移植(5) イマチニズ耐性慢性骨髄性白血病急性転化細胞の異種移植. 第69回日本血液学会・第49回日本臨床血液学会総会 横浜 2007.10.11-13
- ⑦ 谷崎亮平, 勝見章, 石川裕一, 小林美希, 岩崎年宏, 安部明弘, 清井仁, 松下正, 小島勢二, 直江知樹. 白血病におけるRas活性化因子SOS1の遺伝子解析. 第69回日本血液学会・第49回日本臨床血液学会総会 横浜 2007.10.11-13
- ⑧ 岩崎年宏, 勝見章, 谷崎亮平, 小林美希, 尾関和貴, 安部明弘, 清井仁, 松下正, 小嶋哲人, 直江知樹. 急性骨髄性白血病におけるRhoHの生物学的意義. 第69回日本血液学会・第49回日本臨床血液学会総会 横浜 2007.10.11-13
- ⑨ 安部明弘, 南陽介, 早川文彦, 北村邦朗, 野村由佳, 鈴木百子, 村田誠, 勝見章, 清井仁, Jamieson Catriona Hm, Jean Wang Yj, 直江知樹. 慢性骨髄性白血病における造血幹細胞・前駆細胞分画の解析 イマチ

ニブ治療後のBCR-ABLの残存. 第69回日本血液学会・第49回日本臨床血液学会総会 横浜 2007.10.11-13

B細胞性悪性リンパ腫細胞におけるCD20陰転化機序の分子生物学的解析. 第66回日本癌学会学術総会 横浜 2007.10.3-5

- ⑩ 梶口智弘, 清井仁, 直江知樹, Trepel Jane B., Nackers Len. 造血器腫瘍における受容体チロシンキナーゼとWnt/beta-cateninシグナルの関係. 第69回日本血液学会・第49回日本臨床血液学会総会 横浜 2007.10.11-13
- ⑪ 小澤幸泰, 清井仁, List Alan, 直江知樹. AMLにおけるSrc Family Kinasesの恒常的活性化とその下流シグナルの解析. 第69回日本血液学会・第49回日本臨床血液学会総会 横浜 2007.10.11-13
- ⑫ 富田章裕, 平賀潤二, 清井仁, 木下朝博, 直江知樹. Rituximab使用後CD20陰転化B細胞性悪性リンパ腫細胞におけるCD20陰転化機序の分子生物学的解析. 第69回日本血液学会・第49回日本臨床血液学会総会 横浜 2007.10.11-13
- ⑬ 濱麻人, 谷ヶ崎博, 村松秀城, 西尾信博, 吉田奈央, 高橋義行, 清井仁, 小島勢二. 小児急性巨核芽球性白血病におけるGATA1変異. 第69回日本血液学会・第49回日本臨床血液学会総会 横浜 2007.10.11-13
- ⑭ 勝見章, 岩崎年宏, 谷崎亮平, 小林美希, 安部明弘, 清井仁, 松下正, 直江知樹. 急性白血病におけるFLT3とインテグリンシグナル伝達系のクロストーク. 第69回日本血液学会・第49回日本臨床血液学会総会 横浜 2007.10.11-13
- ⑮ 石川裕一, 清井仁, 尾関和貴, 鈴木達也, 村田誠, 宮崎泰司, 栗山一孝, 朝永万左男, 宮脇修一, 直江知樹. WHO分類に基づく急性骨髄性白血病における網羅的遺伝子変異の解析. 第69回日本血液学会・第49回日本臨床血液学会総会 横浜 2007.10.11-13
- ⑯ 安部明弘, 南陽介, 勝見章, 清井仁, 直江知樹. 慢性骨髄性白血病急性転化における造血幹細胞と前駆細胞の解析. 第66回日本癌学会学術総会 横浜 2007.10.3-5
- ⑰ 石川裕一, 清井仁, 直江知樹. 白血病におけるN末欠損WT1転写産物発現の検討. 第66回日本癌学会学術総会 横浜 2007.10.3-5
- ⑱ 勝見章, 清井仁, 安部明弘, 直江知樹. 急性骨髄性白血病におけるRhoH発現. 第66回日本癌学会学術総会 横浜 2007.10.3-5
- ⑲ 清井仁, 直江知樹. 新規FLT3キナーゼ阻害剤の開発. 第66回日本癌学会学術総会 横浜 2007.10.3-5
- ⑳ 富田章裕, 平賀潤二, 清井仁, 伊藤雅文, 木下朝博, 直江知樹. Rituximab使用後CD20陰転化

F. 知的財産権の出願・登録状況  
(予定を含む)

1. 特許取得  
該当無し。
2. 実用新案登録  
該当無し。
3. その他

「慢性骨髄性白血病における変異解析をモデルとした検体収集に付随する倫理面の検討」  
分担研究者 小林幸夫 国立がんセンター中央病院 臨床検査部 医長

研究要旨

慢性骨髄性白血病におけるABL遺伝子の変異解析を行った。既報の直接塩基配列決定に加えて、あらかじめ設定した25の変異部位があると増幅されて検出されるようなパネルを用いて、invader法により検討した。この方法で増幅された検体は実際の塩基配列の変異と一致していた。近年、ABL変異解析は薬剤の感受性試験として重要となっている。分子標的薬が特定の変異がある場合に耐性克服剤として使用可能であるため薬剤の適格性を決定する重要な要素となっている。研究目的と実地臨床目的の検査とが峻別しがたく不安定な位値付けである。今回は包括的同意が得られていた検体を用いて倫理委員会で審査されて承認された臨床研究の枠組みの中で行ったが、将来的には患者に対する恩恵が得られる研究的検査である。方法論の確立には包括的同意が得られた検体での検討が必須である。

A. 研究目的

慢性骨髄性白血病は分子標的薬である *imatinib* が出現して治療が変貌した。慢性骨髄性白血病が疑われる場合には *bcr/abl* 遺伝子のキメラの存在を確認し、陽性樽ことが判明した時点で *imatinib* が使用される。治療過程ではこのキメラ遺伝子の定量を行いながらモニタリングを行い、耐性例に対しては増量、新規薬剤の使用を考える。

当院では院内に臨床遺伝子解析施設を拡充してきており、診断、検査モニタリングの一環として役立たせてきたが、近年、*imatinib* 耐性慢性骨髄性白血病に対して米国で *nilotinib*、*dasatinib* が米国で承認された。二者ともに慢性骨髄性白血病で生じる ABL 遺伝子の点突然変異のある細胞にも殺細胞効果があることが *in vitro* で示されたため、*imatinib* 耐性の慢性骨髄性白血病患者での臨床開発がされることとなった。耐性度は変異有無およびその部位により予想されるため、この変異解析はこれら新規薬剤の候補者を捜す手段となると同時に、感受性試験として成立する。

本研究は、慢性骨髄性白血病に対する多施設共同治療研究登録症例において、病態に関与する遺伝子異常、発現状態を臨床的データとの関連性を考慮した中で網羅的に解析し、これら疾患群における分子病態に基づく細分化から最適な治療法の選択と治療成績の向上を目指すことを目的とする。そのため、簡便かつ、迅速な検査システムを構築し、後方視的に解析を行う方法を模索する。その際、倫理性についての問題点を取り上げ、普遍化する方法を考察する。

B. 研究方法

CML の分子標的薬であるイマチニブに対して耐性を示す、ABL 遺伝子キナーゼ領域の遺伝子変異として 25 種類を選択し、それらの変異を一括して定性的にスクリーニング解析できる検査方法の確立を目的とした。正常 ABL 遺伝子の mRNA を増やすことなく、BCR/ABL キメラ mRNA のみを RT-PCR 法により増幅させ、その希釈産物を鋳型にしてインベーター法により変異解析を行うことを基本とするが、通常の BCR/ABL キメラ mRNA 定量検査と異なり、ABL のキナーゼ領域を全て含む、約 1,600bp の長い cDNA を増幅させるために RT-PCR 効率の向上が求められる。また、変異 DNA と正常 DNA の混在 PCR 産物から高感度に一塩基置換の変異を検出するために、他の同目的の検査 (HBV ゲノタイプ) で経験と実績のあるインベーター法を本検査にも採用した。感度の評価は、各変異を人工的に組み込んだプラスミド DNA を用いて行った。基本的性能が確認された後に、実用性検証を目的として、国立がんセンター中央病院において、CML イマチニブ治療患者の中で治療抵抗性を示した数名の患者検体を実際に測定し、狙いとする遺伝子変異が検出されるかどうかを検討した。この研究を遂行するにあたり、当院倫理委員会に諮り、同意取得の必要性などにつき検討した。

C. 研究結果

1. 検査法

BCR/ABL キメラ mRNA 約 1,600bp の効率的増