

厚生労働科学研究費補助金（がん臨床研究事業）
分担研究報告書

骨髄異形性症候群の Azacitidine 耐性機序をもたらす遺伝子異常に関する研究

研究分担者 南谷泰仁 東京大学医学系研究科

研究要旨

骨髄異形性症候群に対する有効な治療法として近年では Azacitidine 療法が選択肢として挙げられるが、その治療効果は永続的ではなく、治療経過中に必ず耐性クローンの出現が認められる。そこで我々は Azacitidine 療法中に耐性を獲得する機序の解明を目的として、病勢増悪が認められた患者検体で次世代シーケンサーを用いた全エクソームシーケンスを施行した。その結果、複数の遺伝子異常を抽出することができ、それらは耐性機序としての既報にない遺伝子異常であった。結果として、初回治療抵抗例と治療経過中の耐性獲得例では、耐性機序が異なる可能性が示唆された。

A. 研究目的

Azacitidine は当初、殺細胞作用を有するシチジンヌクレオシドアナログとして開発されたが、後に低用量での脱メチル化作用による抗腫瘍効果が注目され、大規模臨床試験で高リスク骨髄異形性症候群(MDS)に対して初めて延命効果が確認された薬剤として高リスク MDS の標準的治療に位置付けられた (Fenaux P, et al. Lancet Oncol 2009;10::223)。しかしその効果は一時的で、再増悪や急性骨髄性白血病への進行が高頻度に認められるため、耐性獲得機序の解明は喫緊の課題である。

今までに Azacitidine 耐性機序として、薬剤代謝に関係するウリジンシトシンキナーゼの欠損 (Grant S, et al. Cancer Res 1984;44:5505)、シトシンデアミナーゼの高発現(Mahfouz R, et al. Clin Cancer Res 2013;19:938)や BCL2L10 の過剰発現(Tomas C, et al. Oncotarget 2012;3:490)などが報告されている。また初回投与時に Azacitidine 耐性を認める遺伝子異常としては p53, TET2/IDH1/IDH2, SF3B1, U2AF1/2 などが挙げられている (Husseinadeh D, et al. ASH abstracts 2012;120:1698)。しかしこれらの報告は cell line

を用いた in vitro での検討であったり、Azacitidine 投与中の耐性機序獲得を説明しきれないなどの問題点があった。

そこで我々は Azacitidine 療法への耐性因子を網羅的に解明するため、患者検体を用いた次世代シーケンサーを用いた全エクソームシーケンス (WES)を施行した。

B. 研究方法

当院で MDS に対して Azacitidine 療法を施行され、奏効が得られた後に、病勢増悪もしくは急性白血病への進展が認められた患者を対象とした。また奏効評価に関しては International Working Group の効果判定基準に従い、完全寛解、部分寛解、骨髄完全寛解もしくは病勢の安定と血液学的改善が得られたものを Azacitidine 奏効例とした。対象となった MDS 患者の骨髄検査の際に保存された単核球を用い、Ion Torrent 社の Ion Proton で WES を施行した。WES は治療前、奏効中、病勢増悪後の時点での検体に関してそれぞれ行い、コントロール検体としては骨髄血中の T 細胞を使用し、病勢増悪後に新規出現もしくは増加傾向を認める遺伝子異常を確認した。

(倫理面への配慮)

本研究は死亡症例を含む後方視的な研究であり、対象症例となる患者自身への説明は不可能である。しかし、検査施行時および治療開始時に本人および家族に対して、検査所見の研究的使用に対する同意を取得している。また本研究は後方視的研究のため、研究参加者に新たに生じる危険はないと考えられる。

C. 研究結果

対象となった4症例のWESを施行し、それぞれの結果に対してIon Proton 付属のVariant Caller で変異解析を行った。結果、minimal coverage が10以上、minimal variant allele frequency(VAF) が2%以上の条件において、Azacitidine 療法の経過で増加傾向を示す遺伝子が各々5,000-10,000個認められた。さらにコントロール検体のWES結果から絞り込みを行い、VAF 30%以上の新出変異もしくは増加傾向を示す遺伝子97個、VAF 20%以上の新出変異遺伝子87個を抽出した。これらをサンガ-シーケンスによりValidationし、計14個の新規出現もしくは増加傾向を示す遺伝子異常を同定した。またこれらの中には、今までAzacitidine療法の耐性機序として報告されている遺伝子異常は認められなかった。

D. 考察

Azacitidine 療法に対する耐性機序に関しては研究目的の項に述べたような要因が指摘されているが、今回の研究結果では既報にない遺伝子異常を抽出することができた。特に腫瘍に起因する遺伝子異常としてはp53やTETなどの遺伝子異常が挙げられているが(Husseinadeh D, et al. ASH abstracts 2012;120:1698)、これらの遺伝子異常が認められないことから、初回治療からのAzacitidine療法抵抗例とAzacitidine療法治療中の耐性獲得例では耐性機序が異なっている可能性が示唆される。

E. 結論

MDSに対するAzacitidine療法耐性獲得機序の探索として4症例においてWESを施行し、現在、14個の遺伝子異常を抽出することができた。今後は更なる遺伝子異常の抽出を続行し、認められた遺

伝子異常に関して細胞株などを用いた機能解析を進める方針である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- Nakazaki K, Nannya Y, Kurokawa M. Distribution of serum erythropoietin levels in lower risk myelodysplastic syndrome cases with anemia. Int J Hematol. 2014;99(1):53-6.
- Kobayashi T, Ichikawa M, Nannya Y, Kurokawa M. The effect of decreased-dose idarubicin for elderly patients with acute myeloid leukemia. Jpn J Clin Oncol. 2013;43(10):1047-51.
- Iizuka H, Yoshimi A, Yamamoto G, Masuda A, Nannya Y, Ichikawa M, Yatomi Y, Kurokawa M. Effective azacitidine treatment for myelodysplastic syndrome transformed from essential thrombocythemia. Rinsho Ketsueki. 2013;54(5):468-72.

2. 学会発表

- 中崎久美、南谷泰仁、黒川峰夫 Outcome of off-guideline treatments for severe aplastic anemia: A single center study 第75回日本血液学会学術集会 札幌 2013.10.12-14
- 小林隆、南谷泰仁、市川幹、小原尚恵、小船雅義、原田浩徳、米村雄士、松田晃、川端浩、遠山薫、宮崎泰司、黒川峰夫 A nationwide survey of hypoplastic myelodysplastic syndrome (A multicenter retrospective study) 第75回日本血液学会学術集会 札幌 2013.10.12-14

G. 知的財産の出願・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