

Title	Predictability of the response to tyrosine kinase inhibitors via in vitro analysis of Bcr-Ab1 phosphorylation
Author(s)	柴田, 大
Citation	大阪大学, 2011, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/58174">https://hdl.handle.net/11094/58174</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	しばた まさる 柴田 大
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 24390 号
学位授与年月日	平成23年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科内科系臨床医学専攻
学位論文名	Predictability of the response to tyrosine kinase inhibitors via <i>in vitro</i> analysis of Bcr-Ab1 phosphorylation (Bcr-Ab1のリン酸化によるCML患者のチロシンキナーゼ阻害剤に対する反応性の予測)
論文審査委員	(主査) 教授 金倉 譲 (副査) 教授 野口眞三郎 教授 下村伊一郎

## 論文内容の要旨

### [目的]

慢性骨髄性白血病(CML)の治療は、その原因となるチロシンキナーゼBcr-Ab1のキナーゼ活性を抑制するチロシンキナーゼ阻害剤(TKI)イマチニブの開発により、革命的な進歩を遂げた。しかし、その一方で、イマチニブに対して耐性を示す症例や不耐用の症例も認めており、その克服のため、第二・第三世代のTKIが開発され、イマチニブ耐性症例に対するセカンドTKIとして既に広く導入されている。これらのTKIはイマチニブ耐性例に対して極めて高い有効性を示しており、イマチニブに代わり第一選択薬としての効果も期待されている。このように薬剤選択肢が広がるなかで、より早期により有効な治療法を選択することが重要な課題となっている。申請者は、各症例の各治療薬に対する反応性を*in vitro*で予測する手段の確立を目的として本研究を計画した。

### [方法ならびに成績]

同意を得た31例の初発又はイマチニブ既治療の慢性期CML患者より末梢血の提供を受けた。提供検体から全白血球分画を抽出し、イマチニブ、ニロチニブ、及びダサチニブ存在下で5時間培養した後、細胞の溶出サンプルを用いてWesternblot法を行い、Bcr-Ab1の標的分子であるCrklのリン酸化を評価した。薬剤の濃度は、推奨用量内服後の最高血中濃度からそれぞれ5 $\mu$ L, 5 $\mu$ L, 0.1 $\mu$ Lとした。また、*in vitro*での反応性を定量化するために、バンドの濃さをデンスイトメトリーで評価し、(TKI存在下でのリン酸化(P-)Crkl/Crkl)/(TKI非存在下でのP-Crkl/Crkl)をresidual index(RI)と定義した。

3症例のイマチニブに対するRIをそれぞれ3回のWesternblot法により求めたところ、誤差は5%以内にとどまり、再現性のあるデータが得られることを確認した。次に、31症例につきイマチニブに対するRIを算出

し、初発症例15例とイマチニブ既治療抵抗症例14例とを比較したところ、RI中央値はそれぞれ4.2%と34.2%で有意差を認めた。さらに初発例の75 percentileとイマチニブ抵抗例の25 percentileがそれぞれ10.5%と18%であったことより10%を反応性の指標とした。

次に経過中2回の検体採取ができた2症例で臨床経過との比較を行った。イマチニブ治療を開始し、6ヶ月後に治療抵抗性と判定され、ダサチニブ治療で細胞遺伝学的寛解となった症例では、イマチニブ開始前とダサチニブ変更前の両方の検体とともにダサチニブでのみRIが10%未満となっていた。また、すでにイマチニブ抵抗性でダサチニブ、ニロチニブにより治療され、不耐用で十分な効果が得られなかった症例では、ダサチニブ導入時には3剤ともにRI 10%以上であり、ニロチニブに変更時にはダサチニブでのみRI 10%未満となっていたが、新たにLynのリン酸化を認めた。

次に、3剤それぞれにつき治療開始前のRIとその後の治療反応性との相関を検討した。イマチニブ治療前に検体を得た15症例において、治療後にoptimal responseが得られた症例13例と得られなかった症例2例のRI中央値は、それぞれ4.2%と43.2%であり、ニロチニブにおいては、それぞれ4例ずつのRI中央値が3.5%と31.2%とともに有意差を認めた。また、ダサチニブでは、少数例ながら、3例の反応例全てにおいてRIが2%以下であり、抵抗例1例のRIは92%であった。これらの結果をRI=10%で分けると、イマチニブ反応性の特異度が77%、感度が100%であり、ニロチニブ、ダサチニブにおいては特異度、感度ともに100%であった。

一方、イマチニブ抵抗性の主な原因のひとつであるBcr-Ab1の点突然変異は、それぞれのTKIに対する反応性をIC50として詳細に検討され、治療効果予測因子として用いられている。本研究において4例の点突然変異を持つ症例を認めたが、3例では報告されている予後と一致していた。さらにF317Lを持つ残りの1例は、報告されている予後に反してニロチニブに対するRIが高値であったが、その後の臨床経過でニロチニブ抵抗性であることが判明し、RIにより点突然変異による予測よりもさらに臨床経過に合致する結果が得られた。

### [総括]

Westernblot法を用いてそれぞれのCML患者のTKIに対する治療反応性を*in vitro*で予測する検査系を確立した。本研究に用いた系は、特にイマチニブ抵抗例において臨床経過と極めて高い相関を示し、現在予後因子として用いられているBcr-Ab1の点突然変異の検索に比べて、より感度が高く、臨床経過とのより高い相関を持つことが示唆され、今後、すでに用いられている予後因子と併せて評価することにより、さらに有効な薬剤選択の指標となり得ることが示された。

## 論文審査の結果の要旨

慢性骨髄性白血病(CML)の治療は、その原因となるBcr-Ab1のキナーゼ活性を抑制するチロシンキナーゼ阻害剤(TKI)イマチニブの開発により、画期的な進歩を遂げた。その一方でイマチニブに対して耐性を示す症例も認めており、その耐性を克服するために第二世代、第三世代のTKIが続々と開発されているが、治療の選択肢が拡大する中で、新たに薬剤選択の指標の確立が求められている。申請者は、CML慢性期31例の末梢白血球をイマチニブ、ニロチニブ、ダサチニブの存在下で培養した後、Bcr-Ab1の下流分子Crklのリン酸化をWesternblot法で解析し、その結果をresidual index (RI)として数値化し、患者のその後の臨床経過との比較検討を行った。その結果、それぞれのTKIに対しRIと臨床経過との強い相関を認め、RIは薬剤反応性予測の有効な指標となり得ることを示した。本研究は、

CMLの病態解明に迫ると同時に、今後の治療戦略に新たな道を開くものであり、学位に値する。