

主論文の要旨

**Identification of the novel deletion-type *PML-RARA*
mutation associated with the retinoic acid resistance
in acute promyelocytic leukemia**

急性前骨髄球性白血病におけるレチノイン酸耐性関連
新規欠失型 *PML-RARA* 変異の同定

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻
病態内科学講座 血液・腫瘍内科学分野

(指導：清井 仁 教授)

服部 光

【緒言】

急性前骨髄球性白血病（APL）は染色体転座 $t(15;17)(q22;q21)$ を特徴とし、その結果 *PML-RARA* 融合転写産物が得られる。APL はトレチノイン（ATRA）、タミバロテンのレチノイン酸（RA）、亜ヒ酸（ATO）などの分子標的治療の導入により良好な治療成績が得られている。しかしながら、依然として再発・難治症例は存在し、なかには RA、ATO 不耐容もしくは耐性獲得により治療抵抗性となる症例も存在する。RA 耐性機序の一つとして、*PML-RARA* における RA 耐性遺伝子変異の獲得が挙げられ、従来報告されている RA 耐性変異の大部分は *PML-RARA* の点突然変異である。今回、我々は RA 治療に抵抗性を示した APL 症例より、*PML-RARA* の *RARA* 領域における新規の 7 アミノ酸欠失変異（p.K227_T233del）および点突然変異 p.R217S を同定した。しかし、これらの遺伝子変異の生物学的意義は明らかではない。本研究では、*PML-RARA* の *RARA* 領域における欠失変異の臨床的および生物学的意義について検討を行った。

【対象】

20 代女性。後頸部軟部肉腫にて化学療法中、血小板減少にて紹介。骨髄穿刺を行い、形態学的所見と骨髄細胞の *PML-RARA* 融合遺伝子検査陽性にて APL と診断。末梢血 WBC17,700/ μ l と高値のため ATRA にイダルビシンとシタラビン併用による寛解導入療法を行い、血液学的完全寛解を得た。後頸部軟部肉腫に対する化学療法で使用されたアントラサイクリン系薬剤の積算使用量を考慮して ATO による寛解後療法を行うも、Grade3 の皮膚知覚異常が出現し中止。ミトキサントロンとシタラビンによる寛解後化学療法にて分子学的寛解に到達するも、次コースのダウノルビシンとシタラビン併用療法後には *PML-RARA* mRNA コピー数の上昇を認め、分子学的再発と判断した。タミバロテンによる治療を開始するも筋肉痛にて中止。次いで、シタラビン大量療法が行われるも治療抵抗性を示し、アクラシノンとシタラビンに続き、臍帯血移植療法が行われた。一旦は分子学的寛解が得られたものの、移植後 90 日ほどで再度の分子学的再発をきたした (Fig1C)。本研究は名古屋大学医学部倫理委員会で承認された研究計画に基づき、研究対象者から文書によるインフォームドコンセントを得て、治療期間各段階における患者骨髄単核球および口腔粘膜スワブを収集し、APL 細胞における経時的な遺伝子変異解析を行った。

【結果】

分子学的再発時の骨髄細胞を用いて、*PML-RARA* 転写産物における薬剤耐性変異について解析を行ったところ、*PML-RARA* の *RARA* 領域における 7 アミノ酸欠失（p.K227_T233del）および点突然変異 p.R217S の 2 つの変異を同定した (Fig1A)。これらの変異アミノ酸残基は、融合タンパク質中の *RARA* 領域のリガンド結合ドメイン (LBD) に位置していた (Fig1B)。Target deep sequence により、同領域を含む *PML-RARA* 変異について経時的な検体を用いて遡及的に解析を行ったところ、タミバロテンによる再寛解導入療法後には、p.K227_T233del および p.R217S 変異は、それぞれ 8.7% お

よび 9.1%で認められ、血液学的再発時には、それぞれ 37.7%および 56.2%に増加していた(Fig1C,D)。

次に RA 感受性に対するこれらの変異の影響を決定するために、変異 PML-RARA を HL-60 細胞に形質導入した(Fig2A)。変異 PML-RARA 導入は細胞の増殖には影響を及ぼさなかった(Fig2B)。これらの変異型 PML-RARA 発現細胞を ATRA およびタミバロテンによる好中球分化マーカーCD11bの発現レベルをフローサイトメトリーによって測定して RA によって誘導される分化能を評価した。ATRA 処理細胞後の CD11b の平均蛍光強度(MFI)の無治療細胞との相対比は、野生型 PML-RARA、p.R217S、del p.K227-T233、各遺伝子導入細胞において 1.68、1.91、1.04 であり、del p.K227-T233 を導入した HL-60 細胞のみにおいて有意に低く ($P < 0.05$) (Fig2C)、タミバロテンでも同様の傾向を示した(Fig2D)。次に、Nitroblue Tetrazolium (NBT) 試験を用いてこれらの変異体を導入した細胞における RA 誘導分化能を評価した。野生型 PML-RARA、p.R217S、および del p.K227-T233 導入細胞における ATRA およびタミバロテン処理後の NBT 試験陽性率は、ATRA では 8.7%、6.7%、2.0%、タミバロテンではそれぞれ 10.0%、9.7%、3.3%となり、ATRA およびタミバロテン処理によって、del p.K227-T233 導入細胞は、野生型 PML-RARA 導入細胞よりも有意に低い NBT 試験陽性率を示した(Fig2E)。これらより、LBD における欠失型 del p.K227-T233 変異が RA による分化に抵抗性を示す一方で、p.R217S 変異は RA 感受性に影響を及ぼさないことが示された。

RA は APL 細胞において PML-RARA 融合タンパク質を分解し、PML-Nuclear body(NB)の再構成を誘導することが知られている。そこで、変異 PML-RARA 導入株における RA による PML-NB の形成について検討を行った。野生型 PML-RARA および変異型 PML-RARA 導入細胞における RA 処理時の PML-RARA 蛋白発現についてウエスタンブロット法にて確認したところ、野生型 PML-RARA、p.R217S 変異導入細胞では、ATRA およびタミバロテン処理により PML-RARA 蛋白の発現が減少したが、del p.K227-T233 導入細胞では PML-RARA 蛋白発現は不変であった(Fig3A)。また、免疫蛍光染色法でも PML-NB の形成の検討を行ったところ、del p.K227-T233 導入細胞では、RA 処理後も PML-NB が形成されなかった(Fig3B)。

さらに、診断時および del p.K227-T233 変異が全ての APL 細胞で認められた病期の細胞を用いて同様の解析を行った。診断時細胞では、ATRA およびタミバロテン処理の後に PML-NB の形成が観察されたが、APL 細胞全てが del p.K227-T233 を有する段階では、RA 処理においても PML のびまん性分布は変わらず、PML-NB 形成は認められなかった(Fig4)。これらの結果より、del p.K227-T233 欠失変異が実際の患者細胞においても APL 細胞における RA 抵抗性と深く関連したことが示された。

【考察】

本研究では PML-RARA における欠失型変異が RA 療法に対する抵抗性と深く関連していることが示された。RA や ATO 療法後の PML-RARA 変異は、APL の進行、および RA もしくは ATO に対する抵抗性と関連する事が複数報告されている。既に報告され

ている *PML-RARA* の *RARA* 領域の変異は、ほとんどが点突然変異で *LBD* 内に位置していた。本研究で同定された欠失変異は、*RA* 結合に決定的に重要であると考えられる *RARA* の *LBD* 中の 7 個のアミノ酸の喪失をもたらし、*RA* 抵抗性を示した。一方、同時に同定された、*p.R217S* 変異は、*PML-RARA* の *RARA* 領域内のコドン 217 の変異は、*LBD* のわずか外側に位置し、*in vitro* での検討では *RA* に対する感受性に影響はみられなかった。今回、同定した *PML-RARA* 変異は、次世代シーケンサーによる *PML-RARA* の *deep sequence* 診断時の骨髄細胞でこれらの変異は検出されず、*ATRA* による治療中に獲得され、*タミバロテン* 治療によって選択されたと考える。これらの結果は、*del p.K227-T233* 欠失変異が *RA* 治療中の疾患進行とより密接に関連していたことを示している。*PML-RARA* における薬剤耐性変異は難治性 *APL* 患者に高頻度に発生し、これらの難治性 *APL* における治療戦略を決定するには、その治療期間にかかわらず *PML-RARA* 薬剤耐性変異のスクリーニングが必要である。

【結語】

欠失型 *PML-RARA* 変異が *RA* の分化誘導作用に抵抗性であることを *in vitro* において示した。患者検体での解析からも、この欠失型変異が *RA* 治療中の疾患の進行と密接に関連していると考えられる。