

別紙 1 - 1

論文審査の結果の要旨および担当者

報告番号	※	甲	第	号
------	---	---	---	---

氏 名 服部 光

論 文 題 目

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)

論文審査担当者

名古屋大学教授

主 査 委員

木 村



名古屋大学教授

委員

高 橋



名古屋大学教授

委員

中 村



名古屋大学教授

指導教授

清 井



論文審査の結果の要旨

別紙 1-2

今回、レチノイン酸 (RA) 治療に抵抗性を示した急性前骨髄性白血病 (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、その臨床的および生物学的意義を変異 *PML-RARA* 形質導入した細胞株を作成し検討を行った。*in vitro* での検討において欠失型変異を導入した細胞株は、RA 処理による分化マーカーの発現、NBT 還元試験、PML-Nuclear body の形成に抵抗性を示し、実際の患者 APL 細胞を用いた検討においても同様であったことから、*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。

本研究に対し、以下の点を議論した。

1. 30 人のレチノイン酸もしくは亜ヒ酸耐性患者において *PML-RARA* 変異を調査した 2015 年の中国の論文においてリガンド結合ドメインに in-flame の欠失変異が見つかった患者が 1 例、8 名の再発 APL 患者の *PML-RARA* 変異を調査した 2009 年のアメリカの論文において同じくリガンド結合ドメインに 3 アミノ酸の欠失変異をもつ患者が 1 例報告されているが、いずれも *in vitro* における解析は行われていない。また、本邦からは現在まで報告されていない。

2. 次世代シーケンサーによる *PML-RARA* の deep sequence において、診断時の骨髄細胞では変異は検出されなかったが、分子生物学的再発時に点突然変異および欠失型変異が出現、mRNA コピー数の増大とともにその比率も増大した。すなわち以上の結果より初診時に存在した minor clone ではなく 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。

3. 患者検 APL 細胞より抽出した mRNA より cDNA を作成、1stPCR にて検出領域 300bp 程度を増幅し、2ndPCR にてインデックスを付与するためのアダプタ配列を付与、最終的に各検体が 2pM ずつになるようにプールした。結果として、各検体とも総リード数が 30,000 リード以上を担保することができた。また、最小検出感度を算出するために野生型と点突然変異および欠失型変異の *PML-RARA* のプラスミドを変異比率がそれぞれ 1,10,25,50,75,90,100% となるように混合したものを測定した。その結果より変異比率が 1% までは当測定系において検出できることを確認した。

本研究は、再発・難治性の APL 患者の治療戦略において、重要な知見を提供した。

以上の理由により、本研究は博士 (医学) の学位を授与するに相応しい価値を有するものと評価した。

試験の結果の要旨および担当者

報告番号	※ 甲 第	号	氏 名	服部 光
試験担当者	主査	木村 宏	副査 ₁	高橋 義行
	副査 ₂	中村 孝	指導教授	清井 仁

(試験の結果の要旨)

主論文についてその内容を詳細に検討し、次の問題について試験を実施した。

1. 欠失型PML-RARA変異の検出頻度について
2. 欠失型PML-RARA変異の出現メカニズムについて
3. 確立したdeep-sequence測定系の基本的性能について

以上の試験の結果、本人は深い学識と判断力ならびに考察力を有するとともに、血液・腫瘍内科学一般における知識も十分具備していることを認め、学位審査委員合議の上、合格と判断した。