

第二次審査（論文公開審査）結果の要旨

NPM1-mutation-based measurable residual disease assessment after completion of two courses of post-remission therapy is a valuable clinical predictor of the prognosis of acute myeloid leukemia

寛解後療法 2 回目終了時の *NPM1* 変異微小残存病変解析が急性骨髄性白血病の予後解析において臨床上有用である

日本医科大学大学院医学研究科 血液内科学分野
研究生 丸毛 淳史
International Journal of Hematology 掲載予定

本論文において申請者は、急性骨髄性白血病 (AML) における *NPM1* 変異による微小残存病変 (MRD) 解析の最適な測定時期とカットオフ値を明らかにすることを目的に計画した。

AML は様々な染色体異常・遺伝子異常が発症に関与する heterogenous な疾患である。同種造血幹細胞移植 (Allo HSCT) により AML の治療成績は向上したが、一方で Allo HSCT は治療関連死の割合が高いことから化学療法で治癒が望めない症例に限定しておこなう必要がある。現在では染色体異常や遺伝子異常による予後の層別化がおこなわれているが、不十分な面もあり MRD を測定し化学療法の反応性で Allo HSCT の適応を判断することも重要である。

NPM1 変異は核型正常 AML の約 50%と高率に認められ、exon12 に変異が集中し、TCTG、CCTG、CATG 変異とあわせると 90%を占める。また *NPM1* 変異陽性 AML は予後良好に定義されるが、再発が多く実臨床において Allo HSCT を行うべきか判断が難しいことがある。このため *NPM1* 変異を標的とした MRD 解析の臨床上の有用性が検討された。しかし、MRD を測定する至適な時期やカットオフ値が確立していないなどの問題点があるため、本研究では、*NPM1* 変異を標的とした MRD 解析の有用性を明らかにするために、その至適測定時期、カットオフ値、*NPM1* 変異陰性での再発の有無等の解析をおこなった。

2001 年 4 月から 2019 年 5 月までに日本医科大学付属病院およびその関連・協力施設において診断された *NPM1* 変異陽性 AML 症例のうち、観察期間が 2 年未満の症例、*NPM1*/TCTG、CATG、CCTG 変異以外の症例、一度も血液学的寛解に入らなかった症例を除いた 56 例を対象とした。寛解確認目的に骨髓穿刺を行うタイミング毎に骨髓液を採取した。

TCTG、CCTG、CATG 変異に対し特異的な Primer を作成し、real time PCR 法を用いて増幅したサンプルの定量値を internal control で割ることで *NPM1* 変異割合を定量化した。Plasmid

DNA サンプルを 5%から 0.001%まで希釈をおこなったところ、*NPM1*TCTG、CATG、CCTG 変異について 0.001%までの感度で測定する事ができた。

NPM1 変異陽性 AML56 例の年齢中央値は 54.5 歳 (17-79 歳)、核型正常が 48 例 (85.7%) とほとんどを占め、*FLT3*-ITD 陽性症例が 22 例 (39.3%)、*DNMT3A* 変異が 29 例 (53.7%) を占めていた。カットオフ値を決めるために ROC 曲線を描出し、感度、特異度、ROC 曲線下面積 (AUC) を解析した。寛解後療法 2 コース後に Cut off 値 0.010 で設定すると、AUC が 0.791 と最も高値であった (特異度 70.0%、感度 88.0%)。

算出したカットオフ値以上の症例を MRD high group、未満の症例を MRD low group と定義し、全生存期間 (OS) 及び非再発生存期間 (RFS) を比較した。寛解後療法 2 コース後において有意に MRD low group で OS が長く (MRD high group median: 486 days vs MRD low group median: Undefined, $P < 0.001$)、RFS も長かった (MRD high group median: 178 days vs MRD low group median: Undefined, $P < 0.001$)。他の測定時期においても同様の結果だった。

更に寛解後療法 2 コース後及び化学療法後において MRD が検出できなかった症例 (negative group) と検出できた症例 (positive group) で OS・RFS の比較を行った。化学療法終了後において有意に negative group で OS が長く (positive group median: 697 days vs negative group median: Undefined, $P = 0.002$)、RFS も長い傾向が見られた (positive group median: 415 days vs negative group median: Undefined, $P = 0.113$)。寛解後療法 2 コース後においても同様の結果だった。また、治療中一度も MRD 陰性化を認めなかった 11 例は全例 (100%) 再発していた。

今回解析した 56 例のうち 26 例が再発したが、再発し骨髄中の芽球が 5%以上にもかかわらず *NPM1*MRD のアレル比が 1%未満だった症例が 5 例存在した。初発時は全例正常核型であったが、再発時に評価できた 3 例中 2 例で染色体異常を認め、別クローンからの再発が疑われた。

NPM1 変異の MRD としての有用性を明らかにするために、MRD の至適測定時期とカットオフ値の解析をおこない、地固め 2 コース後が評価に適した時期である可能性を示した。また MRD を継続的に測定し、残存が僅かでもあると再発する可能性が高いことも示した。しかし、MRD 陰性化までの日数には幅があるためいつまで MRD を測定し、経過観察すべきかの判断が難しく、特定の時期に Cut off 値を用いて病勢を評価することも重要である。さらに、*NPM1* 変異 MRD の限界として再発時に MRD が消失する症例が存在するため注意が必要である。

二次審査においては、どのような症例で MRD を測定すべきか、ROC 曲線描出時に感度か特異度のどちらを優先すべきか、*NPM1* 遺伝子が AML の治療ターゲットとしてどうか、*FLT3*-ITD 他の併存遺伝子の影響を受けないか等と広く質疑応答が行われた。いずれも適切な回答がなされ、*NPM1* 変異の MRD としての有用性が示された。以上より本論文は学位論文として価値のあるものと認定した。