J-SKI付随研究１ 研究計画書

慢性骨髄性白血病患者に対するチロシンキナーゼ阻害薬中止後の無治療寛解維持を検討する日本国内多施設共同観察研究 [J-SKI] 附随研究

**慢性骨髄性白血病患者のチロシンキナーゼ阻害薬中止後における無治療寛解の維持機構解明を目指した変異BCR-ABLと宿主免疫応答の解析** [J-SKI付随研究１]

J-SKI付随研究代表者：髙橋直人

J-SKI付随研究事務局：

秋田大学大学院 医学系研究科 血液腎臓膠原病内科学講座

〒010-8543 秋田市本道１−１−１ TEL: 018-884-6111

[第１版]　2019年8月8日

1. 研究目的

慢性骨髄性白血病(CML)の患者でチロシンキナーゼ阻害薬(TKI)を中止した症例における無治療寛解（TFR）維持の機構を明らかにする。特に、一部の症例ではTFR期にBCR-ABLを検出しながらも明らかな再発を示さない状態（Fluctuate）が示されており、機能欠失型の変異BCR-ABLの存在と野生型BCR-ABLを排除する宿主免疫応答とを併せて解析することでFluctuateの機構解明を目指す。

1. 研究の背景と意義、及び科学的合理性の根拠

慢性期CMLの治療成績はチロシンキナーゼ阻害薬(TKI)の登場により飛躍的に向上した。IRIS試験のランドマーク解析などから、TKIによるCML治療において、より早期により深い腫瘍量の削減がCML治療に重要であることが示されている1-3)。それらに基づき、TKI治療開始後は定期的にIS-PCRを測定し、一定期間ごとの目標の腫瘍残存病変(MRD)量に到達できない場合は次世代TKIへの変更など、治療反応性に基づく層別化治療が提唱されている。

近年では長期TKI治療を受けた患者の約40-60%でTFRを維持できることが示されており4-7)、今後の治療目標としてTFRが捉えられてきつつある。TFRにチャレンジするための前提条件として、現在のところTKI治療期間や深い分子遺伝学的寛解(DMR)期間等が言われている。TKI中止後の分子遺伝学的再発の多くがTKI中止後6ヶ月以内に認められており、それらの多くはMRD陽性であったことから7)、より深い（できれば測定感度以下の）DMRを担保するものとしてTKI治療期間やDMR期間が設定されることには理解しやすい。しかし、一方で、TFR期にBCR-ABLを検出しながらもそれ以上の明らかな再発を示さず、TFRを維持できている患者が存在することも知られており、このような状態（Fluctuate）では、腫瘍細胞が明らかな増殖を示さずに存在し続けている。日本成人白血病治療共同研究グループ（JALSG）のJALSG-STIM213試験では、そのような患者が7.4%（68人中5人）存在していたが7)、MRDの閾値や再発の定義によっても異なるため、実際にはTKI中止患者のうち10-20%程度で存在するものと考えられる。

Fluctuateの機序については未だ明らかにされていないが、これまでの解析から、機能欠失型BCR-ABL変異体の存在が可能性の一つとして考えられる。BCR-ABL融合遺伝子のスプライシングバリアントであるBCR-ABLIns35bp変異体は、TKI長期投与後のMMR未達例において高頻度に検出されるBCR-ABL変異体である8)。これは、野生型BCR-ABLにABL遺伝子イントロン由来の35塩基が挿入された結果、チロシンキナーゼ領域が失われた機能欠失型のBCR-ABLタンパクが形成されてしまい、また同時にBCR-ABLT315Iに類似した立体構造の変化をきたすためにTKI抵抗性も獲得する。つまり、BCR-ABLIns35bp変異体はTKIで排除されずに残存しながらも腫瘍性増殖活性を示さない。実際、BCR-ABLIns35bp陽性症例は、TKI治療後にBCR-ABLが消失することも血液学的再発を来たすこともなく、MMRレベルを維持したまま経過することが示されている9)。IS-PCR法でのMRD評価では、検出感度を向上させるため、BCR-ABLの短い領域のみを効率的に増幅させる方法を用いており、野生型BCR-ABLとBCR-ABLIns35bpやBCR-ABLT315Iなどの変異BCR-ABLを区別して定量することができない。そのため、本研究ではそれらのBCR-ABL変異体を定量的に測定するため、次世代シークエンサー（NGS）を用いて解析することとした。

他方で、BCR-ABLIns35bp変異体を有する症例では野生型BCR-ABLの出現も十分発生し得る状況にある。TFR中の野生型BCR-ABLの発生や増殖においては、宿主の抗腫瘍免疫応答による腫瘍細胞排除の可能性も検討されている。これまでのTKI中止試験においても、TKI中止前のNK細胞数が再発率との関連を示唆する報告もある10-12)。特にCD16陽性の細胞傷害活性の高いNK細胞数とTKI中止後の非再発群との関連が示され10-12)、NK細胞が多いことで分子遺伝学再発が抑制されている可能性も示唆される。しかし、TKI中止6ヶ月以内の早期再発とそれ以降の後期再発とで分けてみると、NK細胞との関連を示したのは早期再発のみで11)、後期再発あるいはFluctuateしているような症例においては、他の免疫学的機序の存在も考えられる。TKI自身の免疫応答に対する作用についても、CML発症時とTKI長期投与後とで異なる可能性も言われ13)、さらにTKI中止後のTFR期における免疫応答については、ほとんど解析が進んでいないのが現状である。本研究では、T細胞を始めとする各免疫細胞の表現型をフローサイトメトリー（FCM）を用いて解析することで、TKI中止後の宿主免疫応答の一部を評価する。

本附随研究では、BCR-ABL変異体と宿主免疫応答とを併せて解析することで、TFRの維持機構、特にFluctuateの機構解明を目指す。

1. 研究対象

J-SKI研究に登録された患者のうち、下記の患者

・新規にTKIを中止する患者

・過去にTKIを中止し、J-SKI登録時にFluctuateの状態\*である患者

（＊Fluctuateとは、IS-PCRでMMR未満（0.1%未満）のBCR-ABLがTKI中止後少なくとも一年以上の間に複数回検出されるがMMRを失っていない状態とする。なお、IS-PCRの推移等によって、上記にあっても次項の解析が実施されないことがある。）

1. 研究方法

TKI中止時、中止後1ヶ月、3ヶ月、6ヶ月、12ヶ月、（以後任意の時点）で採取される血液検体を使用する。すでにTFR維持中の患者についてはJ-SKI登録時から任意の時点の血液検体を使用する。IS-PCRの採血と同日にヘパリン血20mlを採血する。検体は全血のまま、J-SKI症例登録番号と採血時点（中止Xヶ月）のみを記載し研究代表施設である秋田大学へクール宅急便で適切に輸送され、解析に用いられる（解析の詳細については下記参照）。最終的にこれらの解析データとJ-SKI観察研究の臨床情報とをあわせ、TFR維持に関与する因子について

解析する。

1)NGSを用いた変異BCR-ABLの解析

検体は秋田大学研究室で直ちに単核球細胞に分離され、その一部をRNA抽出用試薬にて冷凍保存(-80℃)する。NGS解析は複数検体単位で受託機関に依頼する。受託機関では、長鎖nested PCR法を用いたBCR-ABL領域の増幅と次世代シークエンサーによるdeep sequenceを行い、BCR-ABL Ins35bpとBCR-ABLチロシンキナーゼ領域の点突然変異等を定量測定する。

2)FCMを用いた宿主免疫応答の解析

検体は秋田大学研究室で直ちに単核球細胞に分離され、凍結（液体窒素）保存後、または直ちにマルチカラーフローサイトメトリーで測定する。測定項目としては、T細胞、B細胞、NK細胞などの免疫細胞表面マーカーと、それらの分化マーカー、活性化マーカー、その他免疫関連分子などの発現である。得られた測定データもとに専用ソフトウェアで陽性率や発現強度などについて解析する。

1. 一次解析結果の提供

最終的な統計学的解析前の一次解析結果（NGS、FCM）については、研究対象者の病態理解に役立つ可能性があり、それぞれ解析実施後（NGSは約1年後、FCMは約2ヶ月後を想定）に同意取得医師へ提供する。

1. 研究の期間

倫理委員会承認日から2029年9月30日まで。

1. 研究における医学倫理的配慮について

## 7.1　研究対象となる個人の人件の擁護

本研究に関係する全ての研究者は研究計画書および以下のものに従って実施する：

・世界医師会ヘルシンキ宣言

・人を対象とする医学系研究に関する倫理指針

・個人情報保護に関する法律

##

## 7.2　研究によって生ずる個人への利益、不利益並びに危険性

本付随研究で得られた成果により、将来的に研究対象者および他のCML患者に有益な情報をもたらされる可能性がある。また、将来のCML治療の進歩に有益となる可能性がある。

本付随研究により、研究対象者に生じる肉体的負担並びにリスクはない。また、情報漏洩によるプライバシー侵害のリスクを最小とするための最大限の努力が行われる。

7.3　医学上の貢献の予測

TFRの成功は、今後のTKI治療が長期的に不要となる可能性を示しており、患者個人のみならず社会的な医療費の軽減に寄与する可能性がある。本研究成果により、より安全に、またより効率的にTKIの成功を導くことが期待される。

## 7.4　研究の対象となる個人及び代諾者に同意を得る方法

研究についての説明を所定の同意説明文書を用いて行い、患者が研究の内容を十分に理解したことを確認の上で、本附随研究への参加について文書による同意を得る。患者が未成年者（満20歳に達しない者）の場合、患者および代諾者（親権者、もしくはそれに準じる者で患者の最善の利益を図りうる者）に対して同意説明文書を用いて説明し、患者および代諾者から研究の参加について文書による同意を得る。

7.5　同意説明文書の内容

1. J-SKI研究の付随研究の依頼
2. 付随研究の実地と必要性について
3. 研究の目的・背景・意義
4. 研究の方法
5. 研究よって予想される利益と不利益
6. 研究の実施期間
7. 研究への参加と同意撤回の自由について
8. 研究を中止する場合の対応
9. 個人情報やプライバシーの保護について
10. 研究の資金源と利益相反
11. 検体の保存について
12. 結果の公表と知的所有権について
13. 研究組織
14. この研究の倫理審査について
15. 質問の自由と相談窓口について

##

## 7.6　患者の秘密保護

本研究実施に関わる者は、患者のプライバシーおよび個人情報の保護に十分に配慮する。本研究で得られた患者データは本研究の目的以外には使用しない。なお、研究結果を公表する際も患者を特定できる情報は使用しない。

本研究はJ-SKI研究の附随研究であり、本研究に参加する患者はJ-SKI登録番号を付与され、本体研究・附随研究ともに登録番号を用いて識別される。したがって個人情報は適切に匿名化される。

本研究における匿名化された個人情報は、情報管理者である医師 吉岡智子（秋田大学医学部 血液腎臓膠原病内科 講師）が外部から閲覧不能なコンピュータで管理し、個人情報は厳重に守られる。

1. プロトコールの遵守

本研究に参加する研究者は、患者の安全と人権を損なわない限りにおいて本研究実施計画書を遵守する。

1. 倫理審査委員会の承認

9.1　研究参加開始時の承認

本研究への参加に際しては、各施設の倫理審査委員会で本研究への参加が承認されなければならない。

9.2　承認の年次更新

本研究に関する各施設倫理審査委員会の審査・承認の年次更新については各参加施設の規定に従う。

1. 健康被害に対する補償

本研究では、被験者に対する研究目的の侵襲は採血量の増加のみであり、本研究に直接起因する健康被害が発生する可能性は極めて低いと考えられる。そのため、本研究において特別な補償はない。健康被害が発生した場合には、通常の診療における健康被害に対する治療と同様に適切な治療を行う。

1. 研究費とその由来

国立研究開発法人日本医療研究開発機構 革新的がん医療実用化研究事業『チロシンキナーゼ阻害薬による慢性骨髄性白血病の治癒を目指した研究』（班長：松村到）の研究費および秋田大学血液腎臓膠原病内科の奨学寄付金を用いる。

1. 利益相反の有無

利益相反（conflict of interest）とは、研究成果に影響するような利害関係を指し、金銭および個人の関係を含む。利益相反申請等の取り扱いに関する事項は各施設の規準に委ねる。本研究には研究結果に影響を及ぼす利益相反はない。

1. 研究に係る試料・情報等の保管および廃棄の方法

本研究に用いた検体は、解析開始まで研究事務局において適切に保管される。解析には全検体を用いるため、残余検体は生じない。J-SKI研究で得られた臨床情報・データに関しては、J-SKI研究プロトコールに記載の通り適切に保管および廃棄される。

本研究で得られたデータの二次利用は行わない。なお、個々の症例における担当医による利用はその限りではない。

1. モニタリングと監査

モニタリングはJ-SKI研究データセンターによる中央モニタリングが行われており、本付随研究に関しては、別個にモニタリングおよび監査を行う予定はない。

1. 研究成果の発表

本研究の成果は国際・国内学会発表および論文発表を予定している。その際、個人を識別できる情報は公開しない。また、本研究結果が直接診療に影響を与えることはないと考えられるので、個々の患者および担当医師に結果を報告することはしない。

1. 研究組織

16.1　研究実施責任者および研究実施施設、研究事務局

髙橋 直人

秋田大学医学部 血液腎膠原病内科

〒010-8543 秋田市本道１－１－１

TEL：018-884-6111

Fax：018-836-2613

E-mail：naotot@doc.med.akita-u.ac.jp

16.2　研究分担者

・藤岡 優樹（秋田大学医学部 血液腎膠原病内科）

　FCM解析の実施を行う。

・湯田 淳一朗（国立がん研究センター東病院 血液・腫瘍科）

 NGS解析の指導・助言を行う。

・南 陽介（国立がん研究センター東病院 血液・腫瘍科）

　研究全体に対する助言を行う。

16.3　参加施設

J-SKI研究に参加する施設で、本附随研究について倫理委員会の承認が得られた施設。

1. 参考文献
2. Druker BJ, et al. Five-year follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia. N Engl J Med. 2006 ; 355 （23） : 2408-17.
3. Huges TP, et al. Long-term prognostic significance of early molecular response to imatinib in newly diagnosed chronic myeloid leukemia : an analysis from the International Randomized Study of Interferon and STI571 （IRIS）. Blood. 2010 ; 116 （19） : 3758-65.
4. Deininger M, et al. International randomized study of interferon vs STI571 （IRIS） 8-year follow-up : sustained survival and low risk for progression or events in patients with newly diagnosed chronic myeloid leukemia in chronic phase （CML-CP） treated with imatinib. Blood. 2009 ; 114 : abstract #1126.
5. Mahon FX, et al. Discontinuation of imatinib in patients with chronic myeloid leukaemia who have maintained complete molecular remission for at least 2 years : the prospective, multicentre Stop Imatinib （STIM） trial. Lancet Oncol. 2010 ; 11 （11） : 1029-35.
6. Rousselot P, et al. Loss of major molecular response as a trigger for restarting tyrosine kinase inhibitor therapy in patients with chronic-phase chronic myelogenous leukemia who have stopped imatinib after durable undetectable disease. J Clin Oncol. 2014 ; 32 （5） : 424-30.
7. Ross DM, et al. Safety and efficacy of imatinib cessation for CML patients with stable undetectable minimal residual disease : results from the TWISTER study. Blood. 2013 ; 122 （4） : 515-22.
8. Takahashi N, et al. Deeper molecular response is a predictive factor for treatment-free remission after imatinib discontinuation in patients with chronic phase chronic myeloid leukemia : the JALSG-STIM213 study. Int J Hematol. 2018 ; 107 （2） : 185-93.
9. Lee T-S, Ma W, Zhang X, et al. BCR-ABL alternative splicing as a common mechanism for imatinib resistance: evidence from molecular dynamics simulations. Molecular Cancer Therapeutics. 2008 ; 7 (12) : 3834–3841.
10. Yuda J, Miyamoto T, Odawara J, et al. Persistence detection of alternatively Spliced BCR-ABL variant results in a failure to achieve deep molecular response. Cancer Sci. 2017 ; 108 （11） : 2204-2212.
11. Imagawa J, Tanaka H, Okada M, et al. Discontinuation of dasatinib in patients with chronic myeloid leukaemia who have maintained deep molecular response for longer than 1 year (DADI trial): a multicentre phase 2 trial. Lancet Haematol. 2015 ; 2 （12） : e528-535.
12. Ilander M, Olssin-Stromberg U, Schlums H, et al. N Increased proportion of mature NK cells is associated with successful imatinib discontinuation in chronic myeloid leukemia. Leukemia. 2017 ; 31 （5） : 1108-1116.
13. Rea D, Henry G, Khanznader Z, et al. Natural killer-cell counts are associated with molecular relapse-free survival after imatinib discontinuation in chronic myeloid leukemia: the IMMUNOSTIM study. Haematologica. 2017 ; 102 （8） : 1368-1377.
14. Fujioka Y, Nishikawa H. The crosstalk of CML and the immune system. Ketsuekinaika. 2019 ; 78 （5） : 100-110.