

学位論文題名

慢性骨髄性白血病における急性転化の分子遺伝学的研究

学位論文内容の要旨

I. 緒 言

慢性骨髄性白血病（chronic myelogenous leukemia, CML）の95%以上の症例において染色体相互転座 $t(9;22)(q34;q11)$ に伴う疾患特異的染色体異常 Philadelphia 染色体（Ph¹）がみられる。22番染色体上に座位する bcr 遺伝子の切断部位に9番染色体から c-abl 癌原遺伝子が転座することにより bcr-abl 融合遺伝子が形成され、c-abl 遺伝子が活性化されることがその分子遺伝学的本態であることが明らかにされてきた。CML は数年に亘る慢性期を経て不可避的に急性転化（急転）に至るが、現在、急転の機序は明らかにされておらず、また、急転を予防する有効な治療法は確立されていない。CML の慢性期から急転への移行に関与する分子遺伝学的機序を解明することを目的として本研究を施行した。

II. 症例、材料と方法

症例と材料：当科及び関連病院における1982年より10年間の CML の延べ55症例を対象とした。Ficoll-Conray 比重遠沈法により骨髄血、末梢血の単核球を回収し、高分子 DNA や RNA を抽出し解析に供した。高分子 DNA はフェノール抽出法、RNA は guanidinium, thiocyanate-caesium chloride 法により抽出した。CML 急転由来培養白血病細胞株として、著者が樹立した MC3 細胞（non-lymphoid crisis）に加えて K562 細胞（erythroid crisis）、NALM-1 細胞（lymphoid crisis）を用いて解析した。

bcr-abl 遺伝子の再構成と発現：高分子 DNA を各種制限酵素にて切断後、サザンプロット法（以下サザン法と略）を施行した。major-breakpoint cluster region（M-bcr）内での再構成の検出には 3' bcr プローブと 5' bcr プローブを用いたサザン法を行い、bcr 遺伝子内における切断部位を推定した。更に、抽出 RNA より abl 遺伝子第2エクソンに対する antisense primer（3'-AGACTGAAACTCGGACTCCCAGAC-5'）を用い reverse transcriptase により cDNA を合成した後、bcr 第2エクソンに対する sense primer（5'

CTCCAGACTGTCCACAGCATTCCG 3') を加え reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) を施行し, abl 遺伝子と bcr 遺伝子の結合部位を検討した。bcr-abl mRNA の発現はノザン法とドットプロット法とにより解析した。

In vitro DNA transfection と PCR 法による transforming 遺伝子の検索: NIH 3T3 細胞を受容細胞とし, 白血病細胞由来高分子 DNA 60 μ g を燐酸カルシウム共沈法により導入し培養した。2-4 週後に focus 形成を算定した後, focus 形成 transformant 細胞を回収して培養した。transformant 細胞より抽出した高分子 DNA 中のヒト特異的 Alu 構造の存在をサザン法で確認したうえで既知の各種 oncogene プローブを用いたサザン法により transforming 遺伝子の同定を試みた。また, 点突然変異を検出し得る primer と oligonucleotide プローブを合成し PCR 法により ras 遺伝子と fms 遺伝子の点突然変異について検索した。

p53 遺伝子の構造, 発現異常の検討: p53 遺伝子の第 1 エクソンから 11 エクソンをカバーする PR 4-2 cDNA プローブ, 第 6 エクソンの対する Hu 2-6 プローブや 10-11 エクソンをカバーする Hu 7-1 プローブを用いてサザン法を施行した。サザン法は PR 4-2 cDNA プローブを用い施行した。

III. 結 果

1. bcr 遺伝子内切断点と急転との関連性: CML 50 症例の bcr 再構成をサザン法により検索した。2 症例を除き M-bcr の再構成が認められた。その内の 7 症例では M-bcr sequence の部分的欠失のため正確な切断部位は決定しえなかったが, 残り 41 症例における再構成部位は M-bcr に集中していた。更に, 32 症例において RT-PCR 法により bcr/abl transcript の結合部位について検索した。M-bcr 再構成を示さなかった 1 症例を除き, 全症例が abl 遺伝子エクソン 2 と M-bcr エクソン 2 (a 2-b 2) か bcr エクソン 3 (a 2-b 3) の結合に由来するシグナルを示した。慢性期症例と急転症例間には明らかな切断点の差異は認められず, 両期の bcr 再構成を検討し得た症例においても急転に伴う bcr 切断点の変化はみられなかった。

2. bcr-abl mRNA の発現: 慢性期と急転期の両期を比較, 検討し得た症例においては, 急転期では 8.5-kb bcr/abl 融合 mRNA の発現増強が認められた。ドットプロットによる検討では, 慢性期症例と比較して急転症例では bcr 遺伝子および abl 遺伝子の transcript はともに増幅傾向を示した。

3. 急性転化における発癌遺伝子の活性化: CML 慢性期 12 症例, 急転期 13 症例において in vitro DNA transfection を施行した。慢性期症例では 1 例のみが弱い focus 形成を示し,

transfection の過程で生じた活性化 hst 遺伝子が transformation に関与していることが示唆された。一方、急転期13症例の解析では2症例において活性化 transformnig 遺伝子が検出されたが、それらはサザンプロット assay では N-ras 遺伝子であることが推察された。更に、ras 遺伝子群と fms 遺伝子に関して PCR 法にて点突然変異の有無について検索した。fms 遺伝子の点突然変異は慢性期、急性期いずれの症例においても認められなかった。ras 遺伝子群の検討では、Ki-ras と Ha-ras 遺伝子の点突然変異はみられず、慢性期12症例中1症例と急転期19症例1症例で N-ras 遺伝子61番コドンのセカンドレターの点突然変異が検出された。

4. 癌抑制遺伝子 p53 の検討：慢性期11症例では p53 遺伝子の allelic な欠失や構造異常は検出されなかったが、急転期13症例中2症例に大規模な構造異常が認められた。更に p53 遺伝子 mRNA の発現について検討を加えた。慢性期8症例では発現異常はみられなかったが、急転移行期症例及び急転5症例中、リンパ球性急転症例を除く骨髄球性急転4症例と急転由来 K562 細胞では p53 mRNA は検出されなかった。また、サザン法により対立遺伝子欠損を伴う大規模な構造異常を示した CML 急転症例により樹立された培養細胞株 MC3 細胞においては、正常 2.8-kbp p53 mRNA と移動度の異なる異常な p53 mRNA が認められた。

IV. 考 察

CML の延べ55症例においてサザン法と RT-PCR にて bcr 遺伝子の切断部位を検索し急転との関連性について検討した。1症例を除き、CML の22番染色体 q11 の切断点は M-bcr 領域のエクソン2と3か4との間のいずれかのイントロンに存在すると考えられた。bcr 遺伝子の第1エクソンに由来するアミノ酸配列が abl 蛋白の SH2 領域との結合を介しチロシンキナーゼ領域を活性化する機序が明らかにされてきているとともに、bcr 遺伝子内切断点の差異に基づいて産生される P190 と P210^{bcr/abl} キナーゼが各々 ALL と CML という異なる白血病発症に関与するという事実は bcr と abl 遺伝子の結合様式が CML においてもその病態に関与する可能性を示唆するため、M-bcr 内切断点と CML の急転との関連性について検討した。M-bcr 内切断点と予後の間に関連性があるとする報告もみられるが、現在迄の著者の検討では、M-bcr 切断点と急転との関連性は明らかでなかった。しかし、bcr/abl mRNA の発現は慢性期症例に比較して急転症例で増幅しており、両期の bcr/ablmRNA を比較し得た症例においても急転期ではその発現の増強が認められた。従って、急転細胞は分化成熟能を有する慢性期細胞に比較して bcr/ablmRNA の発現が強いことが窺われた。

transforming 活性を有する癌原遺伝子の活性化が急転に関与するか否かについて in vitro

DNA transfection と PCR 法を用いて検討した。ras 遺伝子の点突然変異による活性化は MDS から急性白血病への移行に際し高頻度に検出されるが、CML 急転症例においては低頻度であり、諸家の報告と一致する結果であった。ヒト非リンパ性白血病や MDS の症例の約10%強に fms 遺伝子の変異が報告されているが、CML の慢性期や急転期ではいずれにおいても変異は認められなかった。一方、p53遺伝子はその正常機能の消失が細胞の癌化に関与する癌抑制遺伝子であるが、急転13症例中2症例に構造異常を認めるとともに、骨髄球性急転症例において高頻度に p53mRNA の発現消失がみられ、急転との関連性を示唆した。

V. 結 語

本研究の結果は、慢性期から非リンパ性急転への移行は P210^{bcr/abl} 発現の強い造血幹細胞クローンが漸次選択的に増加する過程であり、p53癌抑制遺伝子の機能喪失や、稀に、ras 遺伝子の点突然変異による活性化がこの過程に促進的に作用するという可能性の一つを示唆するものと考えられた。

学位論文審査の要旨

主 査	教 授	宮 崎	保
副 査	教 授	葛 巻	暹
副 査	教 授	柿 沼	光 明

I 研究目的

慢性骨髄白血病 (chronic myelogenous leukemia, CML) は数年に亘る慢性期を経て急性転化に至る。CML 急性転化に関与する分子遺伝学的機序を解明することを目的として、Ph¹ 染色体異常に伴って形成される bcr/abl 遺伝子の解析に加えて、その他の癌遺伝子及び癌抑制遺伝子の関与の可能性について解析した。

II 対象及び方法

1. 対象症例

1982年から1992年までの CML55症例を対象とし、白血病細胞より高分子 DNA と RNA を抽

出し解析した。また、一部の実験においては培養白血病細胞株を用いて解析した。

2. bcr/abl 遺伝子の再構成と発現

高分子 DNA を各種制限酵素にて切断後、bcr 遺伝子内再構成を検出し得る各種 DNA プローブを用いサザンプロットを施行した。更に、抽出 RNA より abl 遺伝子第 2 エクソンに対する antisense primer を用い reverse transcriptase により cDNA を合成した後、bcr 第 2 エクソンに対する sense primer を加え、polimerase chain reaction (RT-PCR) を施行し、abl 遺伝子と bcr 遺伝子との結合部位を検討した。bcr/ablmRNA の発現はノザン法とドットプロット法により検索した。

3. transforming 活性を有する癌遺伝子の検討

in vitro DNA transfection 法は NIH 3 T 3 細胞を受容細胞とし磷酸カルシウム共沈法により施行した。ras 遺伝子群 (N-, Ha-, Ki-) 及び fms 遺伝子のコドン 969 と 301 の点突然変異について PCR 法により検討した。

4. p 53 遺伝子の構造、発現異常の検討

p 53 遺伝子の各部位に対する DNA プローブを用いてサザンプロット、ノザンプロットを施行した。

III 結 果

1. bcr 遺伝子切断部位と急性転化

CML50 症例の bcr 再構成をサザン法により検索した。2 症例を除き major breakpoint cluster region (M-bcr) における再構成が認められた。RT-PCR による 23 症例の検討では 1 症例を除き M-bcr 内エクソン 2 かエクソン 3 と abl 遺伝子エクソン 2 との結合に由来するシグナルが認められた。しかし、慢性期症例と急性期症例間には M-bcr 切断部位の差異はみられなかった。

2. bcr/ablmRNA の発現

慢性期と急性期の両期について検討比較し得た症例においては、急転期で 8.5-kb bcr/abl 融合 mRNA の発現増強がみられた。ドットプロットによる検討では、急転症例では bcr 及び abl 遺伝子の transcript はともに増幅していた。

3. 急性転化における発癌遺伝子の活性化

in vivo DNA transfection assay では急転期 13 症例中 2 症例で transforming 活性を有する遺伝子が検出され、それらは活性化 N-ras 遺伝子であった。PCR 法による検討では fms 遺伝

子のコドン969と301の点突然変異は検出されなかったが、慢性期12症例中1症例と急転19症例中1症例でN-ras 遺伝子61番コドン第2塩基の点突然変異が検出された。

4. 癌抑制遺伝子p53の検討

慢性期症例ではp53遺伝子の対立遺伝子欠損や構造異常は検出されなかったが、急転13症例中2症例に大規模な構造異常が認められた。p53mRNAの発現は慢性期症例、リンパ球性急転症例及びPh⁺陽性ALL細胞では異常を認めなかったが、急転移行期1症例、非リンパ球性急転4症例及び赤芽球性急転由来K562細胞ではp53mRNAは検出されなかった。サザン法により対立遺伝子欠損を伴う大規模な構造を示した急転症例より樹立されたMC3細胞株においては正常2.8-kb p53mRNAと移動度の異なる異常なmRNAが認められた。

IV 要約及び考察

本研究を通して以下の点が明らかになった。

1. CMLにおけるbcr遺伝子の切断部位はM-bcr領域に集中していたが、慢性期と急転期症例の間にはその相違はみられなかった。

2. bcr/abl mRNAの発現は慢性期に比較して、急転期で増強していた。

3. 急転に伴うras遺伝子の点突然変異による活性化は稀であり、また一方、fms遺伝子の点突然変異もみられなかった。

4. 急転13症例中、2症例でp53遺伝子の大規模な構造異常が検出されるとともに、非リンパ球性急転症例ではp53mRNAの著明な発現減少を主とする異常がみられた。

以上の結果より、CMLにおける非リンパ球性急性転化への移行はbcr/abl遺伝子発現の強いPh⁺クローンが選択的に漸増する過程であり、p53癌抑制遺伝子の異常や稀にras癌遺伝子等の活性化が急転への過程に促進的に作用する可能性のひとつとして示唆された。

以上により、本研究は博士(医学)の学位論文として妥当なものと判断される。