

学位論文題名

フィラデルフィア染色体陽性急性リンパ性白血病に
関する細胞生物学的および分子遺伝学的研究

学位論文内容の要旨

I 目 的

染色体転座 $t(9;22)(q34;q11)$ により生じるフィラデルフィア染色体 (以下 Ph^1) は、慢性骨髄性白血病 (以下 CML) の約95%にみられる疾患特異性の高い染色体異常であるが、成人急性リンパ性白血病 (以下 ALL) の17~25%の症例にも認められる。 Ph^1 染色体の分子遺伝学的本態は、*ABL* 遺伝子が *BCR* 遺伝子と融合する結果、強いチロシンキナーゼ活性を獲得することが CML 発症に重要と考えられている。一方、 Ph^1 陽性 ALL では、その約半数の症例の切断点は CML でみられる切断部位 (*M-bcr*) の上流に生じていることが明らかにされている。しかし Ph^1 陽性 ALL と CML 急性転化との異同については、臨床病態のみならず、細胞生物学および分子遺伝学的にも不明の点が多い。本研究では Ph^1 陽性 ALL の疾患特異性を明確にすることを目的として、その細胞帰属、*BCR* 遺伝子上の切断点、および白血化における活性化癌原遺伝子、特に *ras* 遺伝子の関与につき検討した。

II 材料と方法

1. 症例および培養白血病細胞株の樹立:

北大第3内科で Ph^1 陽性 ALL と診断された11症例および、そのうちの2症例より Ph^1 陽性 ALL 細胞株 (TOM-1 および ALL-MIK 細胞株) を樹立し、それらを用いて検討した。

2. Ph^1 陽性 ALL 細胞の細胞形質と免疫グロブリン (Ig)、T細胞受容体 β 鎖 ($T\beta$) の遺伝子再構成の検討:

Ph^1 陽性 ALL 11症例および Ph^1 陽性 ALL 細胞株 2株につき、細胞化学的検討と表面形質の検索を行い、Ig および $T\beta$ 再構成の有無は、Southern blot 法により解析した。

3. Ph^1 陽性 ALL 細胞の *in vitro* 分化能の検討:

TOM-1, ALL-MIK の2細胞株を用い検討した。TPA10~100ng を添加して培養後、

plastic dish に対する付着能・latex 粒子の貧食能の変化につき検討した。

4. BCR 遺伝子の切断点の同定：

Ph⁺ 陽性 ALL 9 症例および細胞株 2 株につき検討した。M-bcr 内での再構成の検出には、3' bcr probe, 5' bcr probe を用い、BCR 遺伝子第 1 イントロン内での再構成の検出には、BB-1 および BB-2 probe を用いて検討した。さらに細胞株では、RT-PCR 法により切断点を検討した。

5. *in vitro* DNA transfection assay：

Ph⁺ 陽性 ALL 7 症例、細胞株 2 株につき検討した。NIH 3T3 fibroblast を受容細胞として、リン酸カルシウム共沈澱法により高分子 DNA 導入して検討した。

6. PCR と合成 oligonucleotide による *ras* 遺伝子の点突然変異検出法：

Ph⁺ 陽性 ALL 5 症例、細胞株 2 株につき検討し、Ph⁻ 陰性 ALL 15 症例の解析結果と比較検討した。N-ras, Ha-ras, Ki-ras の第 1・第 2 エクソンを増幅し得る primer と codon 12, 13, 61 の点突然変異を検出し得る probe を合成し、点突然変異の検出を行った。

III 結 果

1. Ph⁺ 陽性 ALL における細胞形質について：

11 症例中 2 例は、hybrid の形質を示した。リンパ芽球および骨髄芽球の増殖を示す hybrid lineage leukemia の Ig 重鎖遺伝子の再構成を検討したところ、両対立遺伝子の再構成を示した。

2. Ph⁺ 陽性 ALL 細胞の *in vitro* 分化能について：

TOM-1 細胞と ALL-MIK 細胞を用い、TPA 添加による *in vitro* における分化能を検討したところ、plastic dish に対する付着能・latex 粒子の貧食能を獲得した。 α -naphthyl butylate esterase 染色陽性となったことより、monocyte への分化能を保持することが示唆された。

3. Ph⁺ 陽性 ALL における BCR 遺伝子の切断点について：

Ph⁺ 陽性 ALL 9 症例のうち 4 例の白血病細胞では M-bcr 内での切断が確認された。さらに BB-1 probe, BB-2 probe により 1 例ずつ再構成が認められ、BCR 遺伝子第 1 イントロンでの切断と考えられたが、残りの 3 症例では、いずれの probe でも切断点は同定し得なかった。

さらに ALL-MIK 細胞株および、Southern blot 法では切断点を同定し得なかった TOM-

1細胞株について、RT-PCRによりその切断部位を検討したところ、ALL-MIK、TOM-1いずれの細胞株でもP190^{bcr-abl}mRNAが確認された。

4. Ph⁺陽性 ALLにおける活性化癌原遺伝子の関与について：

in vitro DNA transfection assay の検討では、活性化癌原遺伝子は検出し得なかった。PCRによる *ras* 遺伝子の点突然変異検出では、Ph⁺陽性 ALL15症例中3例に *ras* 遺伝子の点突然変異が検出されたが、Ph⁺陽性 ALL 症例5例および細胞株2株のいずれでも、点突然変異は検出されなかった。

IV 考 案

Ph⁺陽性 ALLの細胞形質の検討では、pre-B細胞より未分化な段階での白血化と考えられ、9例中2例がhybridの形質を示した。そこでbiclonalの増殖を示したPh⁺陽性 ALL症例のIg重鎖遺伝子の再構成を検索したところ、両対立遺伝子の再構成を示したことから、同症例のlymphoidとmyeloidの特徴を有する白血病細胞は共通の前駆細胞に由来することが示唆された。さらにTOM-1細胞とALL-MIK細胞株の検討で、monocyteへの分化能を有していることより、Ph⁺陽性 ALLにおける細胞起源はpre-B細胞段階での白血化のみならず、monocyteへの分化能を保持するmultipotent stem cellである可能性が強く示唆された。

Ph⁺陽性 ALLのBCR遺伝子上の切断点の検討では、9症例中3例はSouthern blot法では、切断部位が同定し得なかったことから、*bcr-2*、*bcr-3*以外での切断が示唆された。TOM-1細胞はSouthern blotではBCR遺伝子上の切断点は不明であったが、RT-PCRによる検討でP190^{bcr-abl}mRNAが検出され、その切断点はBCR遺伝子第1イントロン内に存在していると考えられた。M-*bcr*非再構成Ph⁺陽性 ALL症例におけるBCR遺伝子上の切断点は、その第1イントロンにあることを支持した。

Ph⁺陽性 ALLの白血化に関与していると考えられる癌原遺伝子を*in vitro* DNA transfection assayにより検討したが、検出し得なかった。またPCRとoligonucleotideを用いた*ras*遺伝子の点突然変異検出法による検討では、Ph⁺陰性 ALLの一部の症例で白血病性増殖に*ras*遺伝子の点突然変異による活性化の関与が示唆されたが、Ph⁺陽性 ALLでは同様の関与は否定的であった。

V 結 語

1. Ph⁺陽性 ALLはlymphoidとmyeloidのhybridの形質を示す症例があり、Ph⁺陽性

ALL細胞はTPA添加により monocyte への分化能を有することから、Ph⁺陽性 ALL ではその細胞起源は multipotent stem cell の可能性が示唆された。

2. Ph⁺陽性 ALL における BCR 遺伝子上の切断点は、大部分の症例では M-bcr および BCR 遺伝子第1イントロン内の bcr-2, bcr-3 に存在するが、一部の症例ではそれ以外の部位の切断点が存在することが示唆された。

3. Ph⁺陽性 ALL の白血化における遺伝子学的機序は、bcr-abl 遺伝子以外の癌原遺伝子の関与については不明であり、今後の検討課題と考えられた。

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

相互転座により生じる Ph⁺染色体は、慢性骨髄性白血病（CML）にみられる疾患特異性の高い染色体異常であるが、成人急性リンパ性白血病（ALL）の20%にも認められる。Ph⁺染色体の本態は、ABL 遺伝子が BCR 遺伝子と融合することにより、強いチロシンキナーゼを獲得すると考えられている。一方、Ph⁺陽性 ALL では、その約半数の症例の切断点は、CML でみられる切断部位（M-bcr）の上流に生じている。しかし Ph⁺陽性 ALL と CML 急性転化との異同については、臨床病態のみならず、細胞生物学および分子遺伝学的にも不明の点が多い。本研究では Ph⁺陽性 ALL の疾患特異性を明確にすることを目的として、その細胞帰属、BCR 遺伝子上の切断点および白血化における活性化癌原遺伝子、特に ras 遺伝子の関与につき検討した。

II 材料と方法

1. 症例および培養白血病細胞株の樹立：北大第3内科で Ph⁺陽性 ALL と診断された11症例。そのうちの2症例より Ph⁺陽性 ALL 細胞株（TOM01細胞株、ALL-MIK細胞株）を樹立し、それらを用いて検討した。

2. Ph⁺陽性 ALL 細胞の細胞形質の検討：Ph⁺陽性 ALL11例、細胞株2株の細胞化学的検

討と表面形質とを検索した。免疫グロブリン (Ig), T細胞受容体 β 鎖 (TCR- β) 遺伝子再構成を Southern blot で解析した。

3. Ph⁺ 陽性 ALL 細胞の *in vitro* 分化能の検討: 2細胞株を用い検討した。TPA (12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate) 10~100ng を添加し培養後, 細胞形質の変化につき検討した。

4. BCR 遺伝子の切断点の同定: Ph⁺ 陽性 ALL 9例, 細胞株2株を Southern blot で検討した。M-*bcr* 内の再構成の検出は, 3' *bcr*, -5' *bcr* probe を用い, BCR 遺伝子第1イントロン内の検出は, BB-1, BB-2 probe を用いた。さらに細胞株では, RT-PCR 法により切断点を検討した。

5. *in vitro* DNA transfection assay: Ph⁺ 陽性 ALL 7症例, 細胞株2株を検討した。NIH 3T3 fibroblast を受容細胞とし, リン酸カルシウム共沈澱法により高分子 DNA を導入して検討した。

6. PCR による *ras* 遺伝子の点突然変異検出法: Ph⁺ 陽性 ALL 5例, 細胞株2株, Ph⁺ 陰性 ALL 15例につき検討した。N-*ras*, Ha-*ras*, Ki-*ras* の第1, 第2エクソンを増幅し得る primer と, codon12, 13, 61の点突然変異を検出し得る probe を合成して検討した。

III 結 果

1. Ph⁺ 陽性 ALL 11症例中9例の細胞形質は, common ALL で, 全例 IgH 鎖遺伝子の再構成を認めたが, L鎖遺伝子の再構成は認められなかった。

2. 11症例中2例は hybrid leukemia で, リンパ芽球および骨髄芽球の増殖を示す hybrid 症例の IgH 鎖遺伝子は, 両対立遺伝子の再構成を示し, 胚細胞型のバンドは認められなかった。

3. Ph⁺ 陽性 ALL 細胞株 (TOM-1, ALL-MIK) は, TPA 添加により plastic dish に対する付着能と latex 粒子の貪食能とを獲得した。

4. Southern blot の検討では, Ph⁺ 陽性 ALL 9症例中4例ではM-*bcr* 内での切断が確認され, さらに BB-1 probe, BB-2 probe により1例ずつ再構成が認められた。しかし, 残りの3症例では, 切断点は不明であった。

5. RT-PCR の検討により, Southern blot 法では切断点が不明な TOM-1細胞で, P190^{*bcr-abl*} mRNA が確認された。

6. Ph⁺ 陽性 ALL における活性化癌原遺伝子の関与について, *in vitro* DNA transfection assay により検討したが検出されなかった。

7. PCR による *ras* 遺伝子の点突然変異検出では Ph⁺ 陰性 ALL の20%に点突然変異が検出されたが、Ph⁺ 陽性 ALL では検出されなかった。

IV 考案ならびに結語

1. Ph⁺ 陽性 ALL の細胞形質の検討では、pre-B 細胞段階での白血化と考えられたが、11 例中 2 例は hybrid の形質を示した。

2. リンパ芽球と骨髄芽球の増殖を示した hybrid leukemia の IgH 鎖遺伝子の検討により、両芽球は共通の前駆細胞に由来することが示唆された。

3. 一部の Ph⁺ 陽性 ALL 細胞は、monocyte への分化能を有しており、その細胞起源は、multipotent stem cell である可能性が示唆された。

4. Ph⁺ 陽性 ALL 9 症例の *BCR* 遺伝子の切断点の検討で、3 例では切断部位の同定はし得ず、*M-bcr*, *bcr-2*, *bcr-3* 以外での切断が示唆された。

5. Southern blot で *BCR* 遺伝子上の切断点不明な TOM-1 細胞で、RT-PCR により P190^{*bcr-abl*} mRNA が検出され、*M-bcr* 非再構成 Ph⁺ 陽性 ALL 症例の切断点は *BCR* 遺伝子第 1 イントロンにあることが支持された。

6. *in vitro* DNA transfection assay では Ph⁺ 陽性 ALL における *bcr-abl* 以外の癌遺伝子の関与は不明であった。

7. Ph⁺ 陽性 ALL 白血化において、*ras* 遺伝子の点突然変異による活性化の関与は否定的であった。

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。