学位論文題名

Mixed-lineage leukemia with t(10;11)(p13;q21) :
An analysis of *AF10-CALM* and *CALM-AF10*
fusion mRNAs and clinical features

(t(10;11)(p13;q21) 転座を伴う mixed-lineage 急性白血病 :
AF10-CALM および *CALM-AF10* 融合遺伝子と臨床像の解析)

学位論文内容の要旨

白血病の過半数には染色体転座がみられる。10番染色体短腕(10p)と11番染色体長腕(11q)に切断点をもつ染色体相互転座の大部分は11q23 / MLL 遺伝子座と10p13/*AF10* 遺伝子座が関与する急性骨髄性白血病(t(10;11)(p13;q23)AML)が占めている。一方、MLL 遺伝子座の関与する t(10;11)(p13;q23)AML と、同じ10p と11qに切断点をもつ相互転座 t(10;11)(p13;q21)が白血病の一部に存在するが、染色体分析では、両者の鑑別はしばしば困難を伴う。最近、t(10;11)(p13;q21)の原因遺伝子として *AF10* と *CALM* が単離された。これまで報告された t(10;11)(p13;q21)転座型白血病で融合遺伝子の塩基配列が報告された症例は2例のみである。本研究は遺伝子レベルで t(10;11)(p13;q21)染色体相互転座を解析し、その結果に基づき診断した白血病の病型 (phenotype) を解明することにより、新しい白血病サブタイプの確立を目指したものである。

染色体分析により t(10;11)(p13;q21)の相互転座を持つ血液悪性腫瘍5例の骨髄及びリンパ節を用いて解析した。FISH 解析にて、4例に *CALM* 及び *AF10* の分離と融合を確認した。5検体及び細胞株 U937 (融合遺伝子が確認された株) の RT-PCR 解析にて、全ての検体に *CALM-AF10*・*AF10-CALM* 融合 mRNA を検出した。また、この PCR 産物のシーケンス解析を行ったところ、*AF10* 上に4つ、*CALM* 上に3つの異なる切断点を認めた。*AF10* はジンクフィンガードメインを有しているが、これら4つの切断点のうち、2つはジンクフィンガードメイン内に、2つはその下流に存在していた。ドメイン内に切断点をもつものは3検体に認められた。*AF10-CALM* 融合遺伝子解析で、1検体で *AF10* の、2検体で *CALM* のエクソンの一部が欠失(splice out)していた。様々な切断点の組み合わせにより、様々な融合遺伝子が形成されていたが、その融合遺伝子のタイプと病型との関係は明らかではなかった。

融合遺伝子の分析を行った5例と既報告6例の合わせて11例の細胞形態学と細胞化学、免疫学的細胞表面マーカー、臨床像の検討を行った。11例中4例が ALL

またはリンパ芽球性リンパ腫、6例がAML（うち、M0が2例、M1が2例、M5が2例）、顆粒球性肉腫が1例であった。細胞表面マーカーは9例で分析され、各々異なっていたが、全て mixed-lineage 抗原を示していた。更にこの9例のうち7例ではT-細胞抗原と骨髄球抗原が共存しており、そのうち4例に縦隔腫瘤を認めた。また、この11例の臨床像は、若年者に多く、縦隔腫瘍を伴うことが多く、予後不良であった。B-細胞抗原と骨髄球抗原を同時に発現する mixed-lineage 白血病として、t(9;22)転座型白血病と11q23/MLL転座型白血病が知られている。本研究ではT-細胞抗原と骨髄球抗原を同時に発現する mixed-lineage 白血病として、t(10;11)(p13;q21)転座型白血病が存在することを、初めて明らかにした。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小 林 邦 彦
副 査 教 授 今 村 雅 寛
副 査 教 授 細 川 真 澄 男

学 位 論 文 題 名

Mixed-lineage leukemia with t(10;11)(p13;q21) : An analysis of *AF10-CALM* and *CALM-AF10* fusion mRNAs and clinical features

(t (1 0 ; 1 1) (p 1 3 ; q 2 1) 転座を伴う mixed-lineage 急性白血病 :
AF10-CALM および *CALM-AF10* 融合遺伝子と臨床像の解析)

白血病の過半数には染色体転座がみられる。10番染色体短腕(10p)と11番染色体長腕(11q)に切断点をもつ染色体相互転座の大部分は11q23 / MLL 遺伝子座と10p13/AF10 遺伝子座が関与する急性骨髄性白血病(t(10;11)(p13;q23)AML)が占めている。一方、MLL 遺伝子座の関与する t(10;11)(p13;q23)AML と、同じ10p と11qに切断点をもつ相互転座 t(10;11)(p13;q21)が白血病の一部に存在するが、染色体分析では、両者の鑑別はしばしば困難を伴う。最近、t(10;11)(p13;q21)の原因遺伝子として *AF10* と *CALM* の融合遺伝子が単離された。これまで報告された t(10;11)(p13;q21)転座型白血病で融合遺伝子の塩基配列が報告された症例は2例のみである。本研究は遺伝子レベルで t(10;11)(p13;q21)染色体相互転座を解析し、その結果に基づき診断した白血病の病型 (phenotype) を解明することにより、新しい白血病サブタイプの確立を目指したものである。

染色体分析により t(10;11)(p13;q21)の相互転座を持つ血液悪性腫瘍5例の骨髓及びリンパ節を用いて解析した。FISH 解析にて、*CALM* 及び *AF10* の分離と融合を確認した。5検体及び細胞株 U937 (融合遺伝子が確認された株) の RT-PCR 解析にて、全ての検体に *CALM-AF10* ・ *AF10-CALM* 融合 mRNA を検出した。また、この PCR 産物のシーケンス解析を行ったところ、*AF10* 上に4つ、*CALM* 上に3つの異なる切断点を認めた。*AF10* はジンクフィンガードメインを有しているが、*AF10* の4つの切断点のうち、2つはジンクフィンガードメイン内に、2つはその下流に存在していた。ドメイン内に切断点をもつものは3検体に認められた。*AF10-CALM* 融合遺伝子解析で、1検体で *AF10* の、2検体で *CALM* のエクソンの一部が欠失(splice out)していた。様々な切断点の組み合わせにより、様々な融合遺伝子が形成されていた

が、その融合遺伝子のタイプと病型との関係は明らかではなかった。

融合遺伝子の分析を行った 5 例と既報告 6 例の合わせて 11 例の細胞形態学と細胞化学、免疫学的細胞表面マーカー、臨床像の検討を行った。11 例中 4 例が ALL またはリンパ芽球性リンパ腫、6 例が AML（うち、M0 が 2 例、M1 が 2 例、M5 が 2 例）、顆粒球性肉腫が 1 例であった。細胞表面マーカーは 9 例で分析され、各々異なっていたが、全て mixed-lineage 抗原を示していた。更にこの 9 例のうち 7 例では T-細胞抗原と骨髄球抗原が共存しており、そのうち 4 例に縦隔腫瘤を認めた。また、この 11 例の臨床像は、若年者に多く、縦隔腫瘍を伴うことが多く、予後不良であった。B-細胞抗原と骨髄球抗原を同時に発現する mixed-lineage 白血病として、t(9;22)転座型白血病と 11q23 / MLL 転座型白血病が知られている。本研究では T-細胞抗原と骨髄球抗原を同時に発現する mixed-lineage 白血病として、t(10;11)(p13;q21)転座型白血病が存在することを、初めて明らかにした。

公開発表に際して、副査の今村雅寛教授から、CALM-AF10 融合と MLL-AF10 融合での病態等における差について、細胞分化と融合遺伝子との関連について、融合蛋白の機能について、AF10-CALM 融合遺伝子における CALM 遺伝子下流の MLL 遺伝子の発現の可能性について、また、副査の細川真澄男教授から、融合蛋白の活性について、他の転座型白血病との病態の差について、臨床的な面からこの転座を推測できる可能性について等の質問があった。最後に主査の小林邦彦教授から、この転座（融合遺伝子）を同定することの臨床上の重要性について、またその簡便な同定法としての FISH 法の有効性について質問があった。申請者は何れの質問に対しても、自らの実験結果と文献を引用して、適切に回答した。

本論文は、AF10-CALM 融合遺伝子を持つ転座型白血病が、T 細胞抗原と骨髄球抗原を同時に発現する mixed-lineage を示す予後不良の疾患を示すことを明らかにした点で高く評価され、今後の臨床応用が期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。