

## 論文の内容の要旨

論文題目 Proposed Model of Blast Crisis of Chronic Myeloid Leukemia as a DNA Repair Disorder

和訳 慢性骨髄性白血病の急性転化の基盤としての DNA 修復異常

指導教官 渋谷正史 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成12年4月 入学

医学博士 課程

病因病理学 専攻

氏名 李光

ヒト慢性骨髄性白血病(CML)は多能性幹細胞の悪性化によって起こり、臨床的に顆粒球の著しい過剰産生が見られる。ほとんどすべて(90%以上)の患者において、染色体を分析するとフィラデルフィア染色体(Ph)を証明できる。この染色体は、癌遺伝子 *c-abl* を含む第9番染色体が一部の *bcr* 遺伝子の存在する第22番染色体へ転座することによって形成される。その結果、二つの遺伝子が融合し、その産物である BCR/ABL 融合蛋白が産生される。*bcr/abl* 融合遺伝子は慢性骨髄性白血病の原因遺伝子とされている。慢性骨髄性白血病患者は、数年にわたる慢性期には社会生活を送ることも可能であるが、数年後に急性転化という極めて治療抵抗性の急性白血病類似状態が必然的に到来する。*bcr/abl* は弱い遺伝子で、慢性期は真の悪性転化の準備期、すなわち前癌状態であると議論されることもある。急性転化の最大の特徴はゲノムの不安定性である。こうした患者の80%では、転化の過程に伴って、ゲノムの変異がしばしばみられる。そのうち、有名なものは N-Ras、p53、Rb、p16、c-Myc、AML-1 などである。急性転化後、患者の生存期間は顕著に短縮する。

現在、慢性骨髄性白血病に対する治療方法は大きく二つに分けられている。第一は、細胞の内因性の BCR/ABL 異常蛋白の水準をコントロールする戦略である。この目的を達成するのに、antisense や Ribozyme や Geldanamycin analogues などが利用されている。第二は、BCR/ABL のチロシンキナーゼの活性を抑制するという戦略である。この目的を達成するのに、ABL のキナーゼドメインに

対する高い親和性を持つたくさんの化合物が開発された。そのうちもっとも効果が高く、副作用の軽い imatinib(STI571)が臨床実験を通過し、現在広範囲で利用されている。しかしながら、一時寛解後、抵抗性があらわれ、再び悪化するケースは多くある。その原因を究明するのを目的とした研究によると、BCR/ABL のキナーゼドメインに現在 13 種の変異が見い出された。こうした変異によって、imatinib は ABL のキナーゼ活性を抑制できなくなり、従って薬効が失われることになる。さらに、今年の BLOOD 誌の報告で、初めて imatinib 治療を受けていない患者から、こういった BCR/ABL のキナーゼドメインの変異を見つけた。

以上のことは、BCR/ABL と慢性骨髄性白血病におけるゲノム不安定性との関わりを強く示唆している。しかしながら、これを統一的に十分説明する分子生物学的根拠は確立されていない。

我々は以前 BCR/ABL の DBL 相同性ドメインが、B 群色素性乾皮症の責任蛋白 XPB と相互作用することを報告した。XPB は、DNA 修復及び転写に重要な基本転写因子 TFIIF の構成員である。紫外線による DNA 修復障害を有するhamster-27-1 細胞は XPB の発現でこの修復障害を復元できるが、恒常的活性化型 BCR/ABL の同時発現でこの復元効果が抑制される。同様の生物学的現象は紫外線以外に DNA 損傷性抗腫瘍剤 cisplatin でも確認された。こうした DNA 修復異常に立脚した急性転化の *in vitro* モデルを樹立したことを背景に、これらの事実を説明する分子生物学的事象を抽出することを目的に、研究を行った。

まず、この系における 4 種の細胞(CHO-9, 27-1, 27-1/XPB and 27-1/XPB+p210BCR/ABL)を用い、この系で見られた DNA 修復障害とその復元と関連する遺伝子を選出するために、Differential Display でスグリンニングを行った。さらに、得られた遺伝子プールから、実際に DNA 修復障害とその復元と関連する遺伝子を抽出するため、この系を確立した際に用いた Survival Assay という方法に戻り、個々の遺伝子について Assay を行った。その結果、核内 DNA 結合蛋白である C1D 遺伝子は 27-1 細胞において、XPB の発現で復元した DNA 修復に対する BCR/ABL の抑制効果を抑制したことから、候補として浮上した。実際、修復正常である CHO-9 細胞と XPB の発現で修復復元できた 27-1/XPB 細胞に対し、siRNA で C1D 遺伝子を Knockdown することによって、2 種の細胞の DNA 修復をある程度まで抑制できた。以上のことから、C1D 遺伝子は DNA

修復に関わる重要な遺伝子であることが明らかとなった。

また、XPB は C1D 遺伝子の転写を誘導し、そして C1D 蛋白を紫外線によって誘導される分解作用から守り、これらの機構で C1D を一定の量に保持させ、DNA 修復を共に実行することが分かった。尚、BCR/ABL は DH ドメインを通して XPB と結合することにより、その修復活性を抑制し、同時に XPB の C1D に対する保護作用も抑制し、その結果細胞の修復能力を低下させるということが、XPB と結合しない BCR/ABL の DBL 変異型を用いた対照実験で明らかとなった。

以上、今回の実験により、我々は、DNA 修復異常に立脚した急性転化の *in vitro* モデルを確立し、単に急性転化のメカニズムを理解することに留まらず、現在話題になっているチロシンキナーゼ阻害薬とは異なる新たな治療法開拓の基盤を築く方向性を示した。