

## 論文内容の要旨

論文題目

小児白血病における転座関連遺伝子とチロシンキナーゼ遺伝子の解析

指導教官 五十嵐隆 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 13 年 4 月 入学

医学博士課程

生殖・発達・加齢医学専攻

氏名 樋渡光輝

小児白血病、特に小児急性リンパ性白血病 (acute lymphoblastic leukemia: ALL) の治療成績は著しく向上したが、その中で染色体 11q23 転座により形成される *MLL* (Mixed Lineage Leukemia または Myeloid/Lymphoid Leukemia) 遺伝子再構成を有する ALL の予後はまだまだ不良である。N 末側の *MLL* 断片と C 末側の転座相手遺伝子産物断片が融合した異常な *MLL* 融合蛋白が生じ、このことが白血病の発症に深く関与している。これまで約 40 種類の転座相手遺伝子が同定されたが、これらの転座相手遺伝子全てに共通の構造はない。しかし、いくつかの相手遺伝子はその構造や機能が類似しており、しかもこれらが関与する白血病の病型はよく似ている。このことから相手遺伝子は白血病の性質を決める上で重要な働きをしていると考えられる。一方 *MLL* 融合遺伝子のみでは白血病化に十分ではないことがマウスを用いたさまざまな実験から明らかになり、白血病化にはさらに別の遺伝子変化 (2nd hit) が必要ではないかと考えられるようになってきた。その 2nd hit を起こす遺伝子の候補としてクラス 3 受容体型チロシンキナーゼ (RTK) が注目されている。クラス 3 RTK の 1 つである *c-KIT* の TK2 領域中の変異が急性骨髄性白血病 (acute myeloid leukemia: AML) では t(8;21) の約 40%、inv(16) の約 30% にみられ、消化管間葉系腫瘍の gastrointestinal stromal tumors (GIST) でも *c-KIT* の傍細胞膜貫通領域中の変異および、同じクラス 3 RTK に属す

る *platelet-derived growth factor receptor  $\alpha$*  (*PDGFRA*) の TK2 領域中の変異が認められる。

本研究で、私は染色体 11q23 の異常を持つ小児 ALL の解析を行った。症例は 2 歳女児で、B 前駆型 ALL と診断された。染色体分析では 47, XX, +X, t(2;11)(q11;q23) を認め、サザンブロット法により *MLL* 遺伝子の再構成を認めたことから、2q11 上における *MLL* の転座相手遺伝子の単離を試みた。2q11 には *AF4* や *AF5q31* と相同性の高い *LAF4* 遺伝子が座位しており、病型も *MLL-AF4* および *MLL-AF5q31* を有する白血病と同様に ALL であることより、この症例における *MLL* の相手遺伝子は *LAF4* である可能性を考えた。*MLL* のエクソン 5 にセンスプライマー (*ALL-5S*)、*LAF4* のエクソン 10 にアンチセンスプライマー (*LAF4-2AS*) を設定し、患者白血病細胞から抽出した RNA を用いて RT-PCR 法を行った。636bp の PCR 産物が検出され、シークエンスの結果、*MLL* のエクソン 8 に *LAF4* 遺伝子が融合していた。患者白血病細胞を用いた FISH 解析では der(2) および der(11) にスプリットした *LAF4* のシグナルを認めた。*LAF4* の切断点は *MLL-AF4* や *MLL-AF5q31* における *AF4* および *AF5q31* の切断点と相同性が高い部位であり、その結果形成される *MLL-LAF4*, *MLL-AF4*, *MLL-AF5q31* 融合蛋白は構造が類似しており、これら 3 つの融合蛋白は同様の機序で白血病化に関与する可能性が示唆された。しかし一方で *MLL-AF4* を有する ALL は CD10 陰性、CD19 陽性で、乳児に多く、また白血球増多が認められることが特徴で予後不良であり、これまで報告された *MLL-AF5q31* を有する症例もほぼ同様の臨床像、細胞学的特徴を示していたが、本症例は 2 歳発症で、芽球の表面マーカーは CD10 および CD19 陽性で *MLL* 遺伝子再構成を伴う ALL としては非典型例であった。

*LAF4* と *AF4* および *AF5q31* 遺伝子の発現をノーザンブロット法により正常ヒト成人および胎児組織で検討し、さらに RT-PCR 法により各種白血病細胞株および正常 B リンパ芽球細胞株で検討した。その結果、8.5kb の *LAF4* 遺伝子産物が成人の心臓、脳、胎盤に認められ、胎児では検討した全組織、特に脳で高発現を認めた。一方 *AF4* および *AF5q31* の発現は成人の心臓、膵臓、骨格筋、胎盤に等しく認め、脳では低発現だった。白血病細胞株における RT-PCR 法による検討では、ALL 細胞株全株、正常 B 細胞 5 株中 4 株 (80%)、AML 細胞株 7 株中 4 株 (57.1%)、CML 細胞株 5 株中 1 株に発現を認めた。*AF4* および *AF5q31* は全ての細胞株で同じように発現していた。*LAF4* の発現パターンは *AF4* および *AF5q31* とは一部異なり、正常 *LAF4* の機能は *AF4*, *AF5q31* とは異なっている可能性が示唆された。

次に私は二次的遺伝子変異の候補として構造および変異体の性状など類似点が多い *PDGFRA* および *c-KIT* 遺伝子に注目し、各種白血病細胞株、患者検体を用いて発現および変異の有無の検討を行った。114 例の小児 AML および 40 例の乳児 ALL、127 例の小児 ALL を用い、RT-PCR 法により発現の有無を検討した後、発現がみられた検体について直接塩基配列決定法で検討した。*PDGFRA* 遺伝子の発現は、細胞株 69 株中 28 株 (40.6%)、114 例の小児 AML 中 63 例 (55.3%)にみられ、その中で t(8;21)もしくは inv(16)を有する CBF 転座 16 症例中 14 例(82.4%)で他の核型よりも高頻度だった。FAB 分類による検討では M1 での発現頻度が他の FAB サブタイプよりも高かった。また乳児 ALL 40 例中 12 例 (30.0%)、小児 ALL 127 例中 38 例 (29.9%)に発現を認め、これらの頻度は従来の報告と同様であった。*c-KIT* 遺伝子の発現は、細胞株 69 株中 50 株 (72.5%)、小児 AML 114 例中 104 例(91.2%)にみられ、これらは従来の報告と同様であったが、乳児 ALL (40 例中 27 例、67.5%)や小児 ALL (127 例中 75 例、59.1%)における発現の頻度は従来の報告よりも高かった。*c-KIT* 遺伝子は B 細胞系 ALL での発現はなく B 細胞芽球の成熟には関与していないと報告されている。しかし、今回の発現の検討の結果、乳児および小児 ALL でも *c-KIT* 遺伝子が何らかの役割をしている可能性が示唆された。

*PDGFRA* の変異は 3 症例にみられた。13 歳男児で t(8;21) を持つ AML-M1 症例に TK2 領域中の N870S が、13 歳女児で inv(16)をもつ AML-M1 症例に TK2 領域中の F808L を認めた。また乳児 ALL でも生後 2 カ月で t(4;11)を持つ症例に Ig-5 領域に A509D を認めた。*c-KIT* の変異は t(8;21) を持つ 15 歳男児の AML-M2 症例の 1 例のみに TK2 領域中で D816V を認めた。AML における *PDGFRA* および *c-KIT* の変異はいずれも t(8;21)または inv(16)を有するいわゆる CBF 転座にみられたが、一方で FAB 分類では *PDGFRA* の変異をもつ 2 例が M1 であった。一般に t(8;21)の 80%が M2 で、inv(16)の 80%が M4Eo であり、*PDGFRA* の発現は FAB 分類 M1 で他のサブタイプより発現頻度は高く、染色体転座では CBF 転座に発現頻度が高かった。このことより *PDGFRA* の変異は FAB 分類 M1 と CBF 転座の両方に関連していることが示唆された。*c-KIT* では TK2 領域の変異によりリガンド非依存性にキナーゼ活性を獲得すると考えられている。さらに、Ig-5 領域中の変異体および傍細胞膜貫通領域中の変異体はいずれもリガンド非依存性にリン酸化が亢進する。今回同定した *PDGFRA* の変異領域は *c-KIT* の変異領域と相同性の高い領域で、活性についても同様な意義があることが示唆された。

*c-KIT* D816V は成人では t(8;21)-AML 症例の 40%、inv(16)-AML 症例の約 30% にみられる。近年、8 例の t(8;21)および 6 例の inv(16)を含む 91 例の小児 AML 患者で *c-KIT* 遺伝子の変異解析が行われたが *c-KIT* D816V 変異は 3%であり、t(8;21)-AML および inv(16)-AML 症例では変異を認めなかった。今回の結果と併せて考えると小児 AML では成人に比べて *c-KIT* の関与は少ないと考えられた。

BCR-ABLチロシンキナーゼを特異的に阻害する薬として開発されたイマチニブは、その後*c-KIT*やPDGFRAにも効果があることが明らかになったが、*c-KIT* やPDGFRAでは傍細胞膜貫通領域の変異が存在する腫瘍には感受性が認められるが、TK2領域の変異が存在する腫瘍には抵抗性である。今回、見出したAMLにおける変異はTK2領域にあるためイマチニブの感受性は低いと予想される。一方ALLで見出した変異はIg-5に認めた。GISTでは傍細胞膜貫通領域の変異およびIg-5領域の変異を持つ腫瘍の病理学的性状や予後に差がなく、これらの変異体の機能解析で同じ性状を示した。このことからIg-5領域の変異体も傍細胞膜貫通領域の変異体と類似の働きをする可能性があり、イマチニブに感受性を示す可能性のあることが示唆された。近年、PKC412などのTK2領域への分子標的薬が開発され、レセプター型チロシンキナーゼファミリー遺伝子の新たな変異同定は分子標的療法の進歩に貢献すると考えられる。