

論文の内容の要旨

氏名: PHAN THI XINH

クローン性の染色体異常、特に相互転座は特定の白血病病型と関連しており、このような相互転座を特定することは白血病の診断・分類、治療選択に有益である。最近、細胞遺伝学や分子生物学は益々進展しており、白血病を惹起する分子機序が明らかになってきている。白血病患者において付加的な染色体異常が発見されるということは病勢の増悪を伺わせるものである。例えば、慢性骨髄性白血病 (CML) での付加的フィラデルフィア染色体・8トリソミー・17番染色体長腕の同腕染色体・19トリソミー・21トリソミーの出現、又は、 $t(1;3)(p36;q21)$ 転座を持つ骨髄異形性症候群での5番染色体長腕欠失の出現は、これらの疾患が急性白血病への移行する際に、屢々、観察される。「ゲノム不安定性」により、DNAには突然変異・欠失・転座などが起こりがちであり、これはヒトの腫瘍において繰り返し論ぜられる主題である。

慢性骨髄性白血病の細胞遺伝学的特徴は相互転座である $t(9;22)$ 転座を持つことである。この転座により、Ph染色体、そして *BCR/ABL* 遺伝子が生成され、最終的にはキロシンキナーゼ活性を持つ *BCR/ABL* 蛋白が生成されるのである。慢性期の CML 患者はゲノム不安定性を示すことはないが、急性期患者では Ph 転座以外の付加的染色体異常の出現が屢々観察される。このような「核型進化」は CML の造血前駆細胞におけるゲノム不安定性を反映していると考えられている。ベトナム南部の CML 患者では他に比べて生存期間が短い (13.1 ± 11.6 ヶ月) ことが観察されているが、その原因は不明であり、血液腫瘍一般においてもこれまで分子細胞遺伝学的解析は行われていない。

本論文の第一部では、ベトナム南部における 47 人の CML 症例について、細胞遺伝学的・分子生物学的解析を行ったので、その結果を報告する。Ph染色体は 44 人 (93.6%) に検出された。3 症例は Ph(-)CML と診断されたが、その内、2 症例では RP-PCR で *BCR/ABL* mRNA が検出されたにも拘わらず、FISH では *BCR/ABL* 融合遺伝子は検出されず、2 種類のクローン (*BCR/ABL* 融合遺伝子を持つ少数クローンと *BCR/ABL* 融合遺伝子を持たない多数クローン) が存在している可能性が示唆された。残りの 1 症例は Ph(-)*BCR/ABL*(+)CML であった。驚くべきことに、17 症例 (36.2%) (11 症例は慢性期、2 症例は移行期、4 症例は診断時) では、Ph染色体以外に 13トリソミー、13部分トリソミー、1p異常 (特に 1p36異常)、3p異常、6p異常、7p異常、10p異常、11p異常を含む特異的な染色体異常が認められた。これらの異常は急性期に認められる所謂“付加的染色体異常”とは全く異なるものであった。FISHの結果、「der(9)欠失」は 11 症例で検出された。その中の 2 症例では、2 種類のクローン (①der(9)欠失を伴うクローン、②der(9)欠失を持たないクローン) が認められた。このことから、これまで、「der(9)欠失は Ph 転座出現時に同時に生じる」と考えられていたが、一部の症例では病期の進行に伴って出現する場合もあることが示唆された。これらの所見より、ベトナム南部の CML では、そもそも「ゲノム不安定性」が存在し、その為 Ph染色体以外の種々の染色体異常や複数のクローンが生じ、結果として病勢の急速な進行と生存期間の短縮がもたらされるのかもしれない。なぜ、「ゲノム不安定性」が存在するのかについては、今後、解明されなければならない。

前述のように、1p36 異常はベトナム南部の CML で高頻度に見られる染色体異常の一つであり、血液腫瘍や固形腫瘍を含む色々な腫瘍に関与していることが知られている。その中でも t(1;3)(p36;q21) 転座は最もよく認められる転座である。第二部では、t(1;3)(p36;q21) 転座をもつ 5 例の MDS/AML 症例について分子学的解析を行ったので報告する。

t(1;3) 転座白血病では、「RPN1 遺伝子プロモーター (位置: 3q21 バンド) により、MEL1 遺伝子 (位置: 1p36 バンド) の異所性発現が起こっていることが重要であり、病態と密接に関連している」と報告されている。さらに、MEL1 蛋白には MEL1 全長遺伝子の産物である 170 kD の MEL1 蛋白と PR ドメインを欠く短い MEL1 遺伝子産物である 150 kD の MEL1S 蛋白があるが、IL3 依存性のマウス骨髄性白血病株 L-G3 細胞に 170 kD MEL1 蛋白と 150 kD MEL1S 蛋白を過剰発現させたところ、170 kD MEL1 蛋白では起こらなかったが、150 kD MEL1S 蛋白の過剰発現の系では顆粒球への分化が抑制された。このことから 150 kD MEL1S 蛋白の発現が t(1;3) 転座白血病の病態と密接に関連していると報告されている。

しかし、ゲノムレベルでの 1p36 や 3q21 切断点は正確には同定されておらず、150 kD MEL1S 蛋白や 170 kD MEL1 蛋白の性状も十分には理解されていない。そこで、私は BAC/PAC クローンを用いた FISH により、t(1;3) 転座を持つ 5 症例で両転座切断点の同定を行ない、2 症例では MEL1 遺伝子産物の性状解析も行った。

その結果、1p36 切断点は 200 kb に及ぶ 3 箇所の切断点集中部位 (breakpoint cluster region: BR) に集積していた。即ち、①BR-1 (RP1-163G9 に含まれる MEL1 遺伝子の第一イントロン内で 70 kb の範囲)、②BR-2 (MEL1 遺伝子の 5' 側で RP5-907A6 に含まれる 29 kb の範囲) と ③BR-3 (BR-1 と BR-2 の間で 68.5 kb の範囲) である。一方、3q21 切断点は 1 箇所に集中していた。即ち、RPN1 遺伝子のセントロメア側で RP11-475N22 に含まれる 108.9 kb の範囲である。この中には GR6 遺伝子と GATA2 遺伝子のプロモーターが含まれている。5 症例のうち、2 症例 (患者 1 と患者 2) の 1p36 切断点は MEL1 遺伝子の第一イントロン内であった。

患者 1 と患者 3 では RT-PCR とシーケンス解析を行った結果、MEL1 全長 mRNA の他に、数種類の「短い MEL1 mRNA」が見つかった。これらの短い MEL1 mRNA では、スプライシングによる数個のエクソン欠失、PR ドメインの欠失、MEL1 遺伝子の 3' 部分にある数個のジンクフィンガードメインの欠失などが認められた。以前に発表された論文では、「MEL1 遺伝子の異所性発現や 150 kD MEL1S 蛋白の発現が本転座型白血病の病態と密接に関連している」とされていたが、私は「MEL1 遺伝子は正常人骨髄細胞や CD34 陽性細胞、末梢血でも発現している」ことを見出した (他の研究者からも同様の報告有り)。さらに、調べた 2 症例 (患者 1 と患者 3) では MEL1 mRNA と MEL1S mRNA の両方が発現していたが、正常人の骨髄細胞との比較では、MEL1S mRNA ではなく、MEL1 mRNA の方が、より多く発現していることを見出した。

興味深いことに、3' RACE と 5' RACE を用いて検索したところ、初めて、MEL1 遺伝子のパートナー遺伝子を発見した。即ち、4 症例で合計 10 個のパートナー遺伝子を釣り上げた。これらのパートナ

[別紙 1]

一遺伝子は *MEL1* 遺伝子第一イントロン内に 1p36 切断点を持つ (つまり、*MEL1* 融合遺伝子の存在が予想される) 2 症例 (患者 1 と患者 5: 患者 1 では *CKS2* 遺伝子(9q22) と *C21orf70* 遺伝子(21q22.3)、患者 5 では *NKTR* 遺伝子(3p23-21) と *BANP* 遺伝子(16q24)) ばかりではなく、*MEL1* 遺伝子の 5'側に 1p36 切断点を持つ (つまり、*MEL1* 融合遺伝子は形成されないことが予想される) 2 症例 (患者 3 と患者 4: 患者 3 では新規遺伝子(1p36), *PTMA* 遺伝子(2q35), *HOXA9* 遺伝子(7p15) と *KIAA0711* (8p23.3)、患者 4 では *HMGB1* 遺伝子(13q12) と *SERF2* 遺伝子(15q15.3)) でも検出された。さらに驚くべきことには、これらのパートナー遺伝子のゲノム上の位置は、全て、転座先のバンド: 3q21 ではなかった。これらの所見から、ここに観察された *MEL1* 融合遺伝子形成の機序は従来の染色体転座によるものではなく、別の機序であることが示唆される。

これらの所見を総合すると、*MEL1* 遺伝子の異所性発現や 150kD *MEL1S* 蛋白の発現は t(1;3)転座白血病の病態に関与している主要因ではなく、むしろ、*MEL1* 融合遺伝子産物や短い *MEL1* 蛋白の方が密接に関連していると考えられる。