

論文の内容の要旨

論文題目： *FBXW7* and *NOTCH1* mutations in childhood T cell acute lymphoblastic leukemia and T cell non-Hodgkin's lymphoma

訳：T 細胞性小児造血器腫瘍における *FBXW7* と *NOTCH1* 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

2004年4月入学

医学博士課程

生殖・発達・加齢医学専攻

氏名 朴明子

小児急性リンパ性白血病(ALL)は、予後に応じた治療の層別化を行うことにより治療成績は向上してきた。ALL の治療は年代毎に改善され、その予後は 95%以上が寛解に至り、無病生存率は 75-90%に達する。T 細胞性 ALL (T-ALL) は小児 ALL の 10-15%を占めるが、B 前駆型 ALL に比べて予後不良な一群である。強化された多剤併用化学療法により、小児 T-ALL の無再発生存率は近年 60-85%にまで向上している。しかし、成人での治療成績は全般的にまだ低く、小児での治療成績も B 前駆細胞型 ALL に比べるとまだ満足できるものではない。

リスク因子の有無によって、小児 ALL を 3 段階（標準治療群、中間危険群、

高危険群)に分けて治療計画を設定することが標準的である。生物学的特徴と遺伝子染色体異常、治療反応性によりリスク分類し、予後良好と予想される患者群(低リスク群)、予後不良と予想される患者群(高リスク群)に層別化し、低リスク群には抗がん剤の副作用を軽減する方向で、高リスク群には治療のより強度を高めた治療を行うことが望まれるようになってきている。本研究の対象である T-ALL はその中でも最も予後不良である高危険群に当てはまる。T-ALL は治療成績の改善を目標として、より強力な治療が計画されが、同じ T-ALL の中にも極めて予後不良な一群が存在し、この群を層別化できる予後因子を明らかにすることが必要である。T-ALL では治療反応性以外の明らかな予後因子はなく、発症や進展に関与する遺伝子異常について解析を行い、臨床像との相関について検討を行うことは重要である。

2004年に Weng らによって T-ALL において 50%以上の頻度で *NOTCH1* 遺伝子変異を認めることが報告された。*NOTCH1* は細胞膜を 1 回貫通する受容体型タンパク質で、造血幹細胞からリンパ系幹細胞、さらに CD4/CD8 ダブル陽性細胞に至るまでの T リンパ球の分化に関与する。EGF-like domain を含む細胞外領域、PEST 領域を含む細胞内領域からなり、細胞外でヘテロ二量体を形成している。*NOTCH* シグナルはリガンドを発現する細胞と直接接することにより活性化され、細胞膜内で切断されて *NOTCH1* の細胞内領域が核内に移行し複合体を

形成し、シグナルを伝達し、標的遺伝子の転写活性を促進する。 γ セクレターゼはその細胞膜内の切断に関与している。

NOTCH1 遺伝子の変異は二量体形成(HD)ドメインと PEST ドメインのいずれか一方または両方にみられる。HD ドメインの変異によってアミノ酸の置換、欠失、挿入が生じると二量体形成が不安定になり、リガンド非依存性に切断が誘導され、NOTCH シグナルが恒常的に活性化される。一方、PEST ドメインの変異はフレームシフト変異やナンセンス変異で、その結果、PEST ドメインの C 末端部分が欠損する。NOTCH タンパクの分解を制御する領域である PEST ドメインが欠損することにより、活性化された NOTCH1 の分解が抑制され、その恒常的活性化が誘導される。

FBXW7(F-box and WD40 domain protein 7; FBW7, CDC4)は、もともとは線虫において NOTCH を負に制御するタンパク質として同定された。*FBXW7* は活性型 NOTCH1 の PEST ドメインに結合する。PEST ドメインは NOTCH1 の分解に重要な働きをしており、この部位への *FBXW7* の結合により NOTCH1 シグナルが調節されている。*FBXW7* の遺伝子変異は乳癌、卵巣癌、子宮癌、T-ALL でも変異が報告されている。また、*FBXW7* の遺伝子変異も、PEST ドメインの変異と同じように NOTCH1 の細胞内領域の分解を抑制し、その恒常的活性化を誘導する。

NOTCH1 と *FBXW7* 遺伝子の変異をもつ変異体は下流の NOTCH シグナルが恒常的に活性化され、細胞増殖能を獲得していることが報告されているが、高頻度で恒常的活性化を伴う *NOTCH1* と *FBXW7* の遺伝子異常が T-ALL の予後因子となるかどうかは明らかではない。今回の研究は、T-ALL の治療成績の向上に貢献することを目的とし、T-ALL において *NOTCH1* と *FBXW7* の遺伝子異常について解析を行い、その臨床的意義との相関について検討を行った。

対象は小児白血病研究会(JACLS)の登録症例で説明と同意を得て ALL-97 と NHL-T98 で治療が行われた T-ALL 計 55 例、T リンパ芽球性リンパ腫(T-NHL)14 例。方法は腫瘍細胞を含む骨髓血またはリンパ節の一部から DNA もしくは RNA を抽出、遺伝子特異的プライマーを設定し、PCR 法を用いて遺伝子増幅を行い、denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC)を用いてスクリーニングを行い、変異については直接塩基決定法を用いて変異を検出した。クローニングは TA クローニング法を用いた。検出された変異については臨床像との関係を比較検討した。

FBXW7 遺伝子の変異は T-ALL 新鮮検体 55 例中 8 例(14.6%)、T-NHL 14 例中 3 例(21.4%)に認めた。*NOTCH1* 遺伝子の変異は T-ALL 新鮮検体 55 例中 17 例(30.9%)、T-NHL 14 例中 6 例(42.9%)に認めた。*NOTCH1* と *FBXW7* 遺伝子いずれかの変異は T-ALL 新鮮検体 55 例中 22 例(40.0%)、T-NHL14 例中 7 例(50.0%)に

認めた。 *FBWX7* 遺伝子の異常はミスセンス変異が 9 例、その他 31bp の挿入変異、1 塩基欠損変異、挿入欠失変異を認めた。7 例のミスセンス変異の部位は 465 と 479 番目のアルギニンにおける変異であり、この部位は種を超えて保存されている領域である。今回の解析で検出した 3 例の挿入および欠失変異はこれまでに報告されていない新規のものであった。

NOTCH1 遺伝子の変異は HD ドメイン 16 例(66.7%)、PEST ドメイン 8 例(33.3%) に認めた。うち 17 (70.9%)の変異は挿入および欠失変異であり、5 つのミスセンス変異を認めた。また、*NOTCH1* 遺伝子の C5097 にアミノ酸置換を伴わない C/T の 1 塩基置換を 69 例中 63 例(91.3%)に認めた。

性別、年齢、縦隔腫瘍と *NOTCH1* および *FBXW7* 遺伝子の変異との相関について解析を行ったが、有意な差は認められなかった。しかし、*NOTCH1* 遺伝子の変異をもつ群には再発例を認めなかった。また、*FBXW7* 遺伝子の異常を認める T-ALL および T-NHL に染色体異常を伴う症例はなかった(T-ALL: $p=0.031$, T-NHL: $p=0.217$)。

NOTCH1 遺伝子変異陽性 T-ALL の 5 年無病生存率は 100% で、変異陰性例での 65.8% に比べて有意に予後良好であった($p=0.008$)。 *FBXW7* 遺伝子変異については 5 年無病生存率に有意な差は認めなかった (変異陽性例 87.5%, 変異陰性例 74.5%, $p=0.40$)。この傾向は *NOTCH1* と *FBXW7* のそれぞれ単独の変異の有無で

比較したときよりも、両者のいずれかの変異を有する場合といずれの変異も有さない場合を比較したときの方が顕著であった（変異陽性例 95.5%，変異陰性例 63.6%， $p=0.007$ ）。

今回の解析の結果、これまで報告がなかったが T-NHL においても T-ALL と同じく高頻度に *NOTCH1* もしくは *FBXW7* 遺伝子の異常を認めることが明らかになった。

NOTCH1 と *FBXW7* 遺伝子と予後との相関については、これまでに相反する報告がなされている。Zhu らは 77 例の成人(24 例)および小児(53 例)の TALL 症例を解析し、小児および成人のいずれにおいても *NOTCH1* 変異陽性例は変異陰性例に比べて予後不良の傾向であることを報告している。一方 Breit らは、ALL-BFM2000 プロトコールで治療された 157 例の小児例を解析し、82 例(52.2%)に *NOTCH1* 遺伝子変異を認め、*NOTCH1* 変異陽性例はプレドニン反応性が良好でその予後も良好であったとしている。(4 年無病生存率；変異あり 90%、変異なし 71%， $p=0.008$)。

NOTCH1 遺伝子の変異は予後良好群と相関しているとの報告や予後不良群と相関しているとの報告があり、未だ予後因子としての意義は明らかではない。同じ遺伝子変異におけるこのような相違の原因については、民族による遺伝的背景の違いが関与している可能性も考えられる。また、治療に用いた薬剤の種

類や量、使い方などの違いや、それぞれのグループごとに異なる治療内容が影響している可能性が示唆されるが、現時点では明らかではない。

FBXW7 遺伝子で新たに見いだされたアミノ酸置換を伴う遺伝子異常(T-ALL 32) については、V627は*FBXW7*の7番目のβシート構造部位に位置しており、8番目のβシート構造部位の遺伝子異常がT-ALLですでに報告されている。また、同様にT-NHL61に認めたフレームシフトを伴う遺伝子異常は子宮癌で報告されており、*FBXW7*の構造上の異常を来すと考えられる。

T-ALLではT細胞受容体との転座を有する染色体異常を多く認めるが、今回の解析では*FBXW7*遺伝子の異常を認める症例では染色体異常を認めなかった。大腸癌において*FBXW7*遺伝子異常と染色体不安定性との関連についての報告があるが、臨床的な意義については不明である。T-ALLにおいて、マイクロアレイ解析で発現パターンによる予後の相違が報告されており、*FBXW7*遺伝子異常を持つ症例と染色体異常を持つ症例では遺伝子発現や分子生物学的特徴が違う可能性が考えられる。

T-ALLは予後不良な疾患であるが、今回の解析の結果、*NOTCH1*遺伝子変異をもつ群は再発がなく、*NOTCH1*と*FBXW7*遺伝子のいずれかに変異をもつ群は予後良好因子である可能性が示唆された。