Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2026-11-26

骨髄性白血病の発症、進展についての分子生物学的研究（研究）

中川, 俊太郎

(Citation)
神戸大学医学部神緑会学術誌,8:100-106

(Issue Date)
1992-06

(Resource Type)
departmental bulletin paper

(Version)
Version of Record

(JaLCDOI)
https://doi.org/10.24546/81007237

(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/81007237

KOBE UNIVERSITY

研　究——

骨髄性白血病の発症，進展についての分子生物学的研究

兵庫県立成人病センター血液内科　　中　川　俊太郎

1．はじめに

白血病の病因はPh[1]染色体，15：17転座や8：21転座に代表されるように以前から染色体分析を通じて研究されてきた．最近の分子生物学の進歩によりこれらの染色体異常の切断点が詳細に分析され，癌遺伝子や増殖因子等の遺伝子との関連において研究されるようになりその病態が明らかになりつつある．

たとえば，慢性骨髄性白血病（CML）におけるPh[1]染色体では，9q34のABL癌遺伝子が22q11のbreakpoint cluster region（BCR）に転座することにより形成される新たなchimeric BCR/ABLmRNAが白血病の発症に関与していることが知られるようになった[1]．

一方ras遺伝子群が細胞の分化，増殖，癌化に重要な役割を果たしていることがよく知られている[2)3)]．DNAトランスフェクション法の確立により，ヒトにおいても，コドン12，13，61の点突然変異によるras遺伝子ファミリーの活性化が，大腸癌や肺癌など多くの腫瘍と関係があるとされている[4]．骨髄異形成症候群（MDS）や急性骨髄性白血病（AML）においても，ras遺伝子群の突然変異が報告されているが[5]，AMLや多能性造血幹細胞に由来する異常クローンが出現する疾患で前白血病的性格を持つとされるMDSの発生にどのように関与しているかはまだ明らかではない．以前より，染色体の欠失が癌化と密接に関連する網膜芽細胞腫やWILMS腫瘍などの例から癌抑制遺伝子の概念が提唱されていたが，網膜芽細胞腫の原因遺伝子（RB遺伝子）がクローニングされ，網膜芽細胞腫以外の癌の発生にも関与していることが知られるようになった[6)7)]．さらに最近の知見として17番染色体短腕（17p）に存在するp53遺伝子が癌抑制遺伝子として作用していることが大腸癌などで知られるようになり，癌遺伝子と癌抑制遺伝子の両方が発癌に関与している可能性が示唆されている[8]．

MDSの20－40％が急性白血病化するといわれている．そしてこの白血病化には新たな附加的遺伝子異常を伴うことが多いとされている．我々は実際の患者でこれら癌遺伝子や癌抑制遺伝子がMDSやAMLの発症，進展にどのように関与しているかを更に詳細に解析するため，1987年に兵庫県立成人病センター内科に血液内科部門が新設されて以来5年間に診断した163

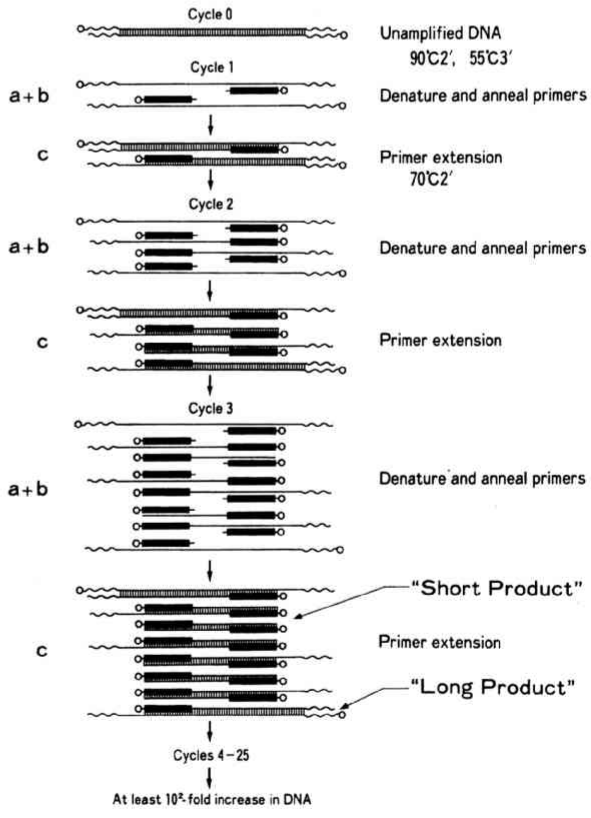

図1　polymerase chain reaction（PCR）法の原理

例に及ぶ造血器腫瘍について，微量の検体から分子レベルの解析が可能となる polymerase chain reaction（PCR）法（図1）を用いて以下の研究を行った．この中にはp53癌抑制遺伝子の関与を示す症例も認められた．ras 癌遺伝子やp53癌抑制遺伝子の解析は MDS や AML の発症，進展のメカニズムの理解だけでなく，骨髄性白血病のクローナルな進展の機序を理解する上でも重要なものと思われる。

2．ras 遺伝子突然変異の検出

成人病センターで診断した患者163人から通常の診断用に採取した骨髄やリンパ節の一部よりフェノール・クロロホルム抽出法により DNA を抽出した．白血病患者は French-American-British (FAB) 分類によって診断した．N-ras のコドン12，K-ras のコドン12，N-ras コドン61の点突然変異の陽性コントロールとしてヒト卵巣固形腫瘍細胞 PA-1，ヒト大腸癌細胞 SW480およびヒト骨髄性白血病細胞 HL-60をそれぞれ使用した．

PCR による分析のために，コドン12および，13を含む N-ras 遺伝子の101塩基対（bp）領域を増幅するプライマー，5'-dCTGGTGTGAAATGACTGAGT-3'と5'-dCATCTACAAAGTGGTTCTGG-3'，コドン12を含む K-ras 遺伝子の118bp 領域を増幅するプライマー，5'-dGGCCTGCTGAAAATGACTGA-3'，と5'-dTTGTTGGATCATATTTCGTCC-3'，およびコドン61を含む N-ras 遺伝子の110bp の領域を増幅するプライマー 5'-dGTTATAGATGGTGAAACCTG-3'，と5'-ACACAGAGGAAGCCTTCGCC-3'，を Applied Biosystem 社（Foster CITY, CA）のモデル380A 合成機で合成した[9]．

検体から抽出した DNA は Taq ポリメラーゼの存在下で目的とする ras 遺伝子のコドンの上流と下流の塩基配列と相補的な100ng のプライマーと反応させた．サーマルサイクラー（Cetus 社）を用いて，1分間94℃で変性し，2分間60℃でアニーリング，3分間72℃で伸長を行い，この過程を30サイクル繰り返した．PCR で増幅した DNA をナイロンフィルターに転写した後，32P-ATP で標識されたオリゴヌクレオチドプローブとハイブリダイズさせ，これよりオートラジオグラムを得た．

本法の感度は，既知の ras 突然変異を持つ培養細胞株 DNA と正常ヒト胎盤 DNA を用い，系列希釈して検証した．系列希釈した DNA を PCR で増幅し，オリゴヌクレオチドプローブとハイブリダイズさせた．われわれの条件では細胞群の1％に起こった突然変異が検出可能であった．代表的な患者サンプルと陽性，陰性コントロールを図2に示した．ras 遺伝子の突然変異は，MDS20例中4例（20％），AML77例中15例（19.4％）に検出された（表1）[9]．

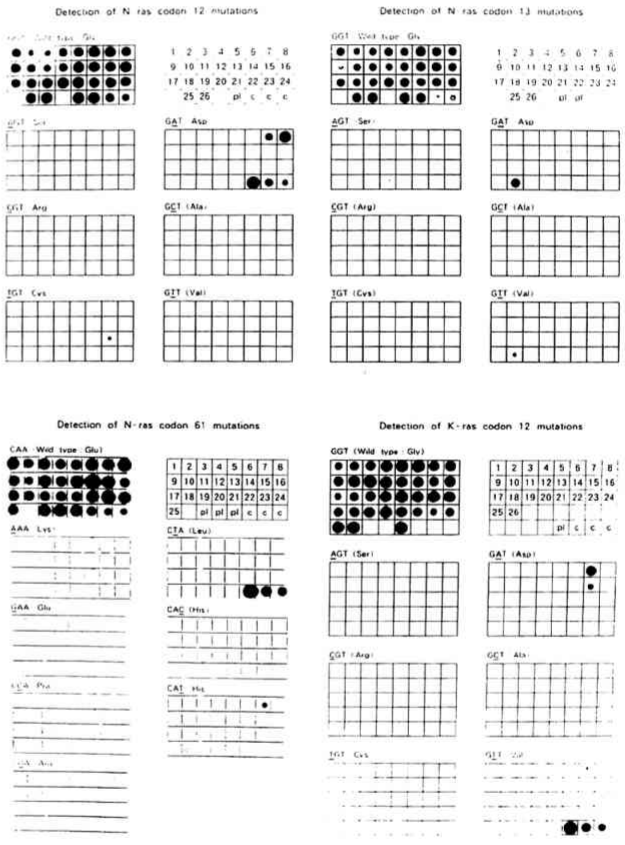

図2　症例（1～26）における N-ras コドン12，13，61および K-ras コドン12の突然変異を分析したドットブロットハイブリダゼーション

表1　MDSおよびAMLにおけるras遺伝子突然変異

		症例数	突然変異	出現率
MDS	RA	10	0	
	RARs	1	0	
	RAEB	3	2	
	RAEB-t	1	1	
	CMMoL	5	1	
小計		20	4	20.0%
AML	M1	47	7	
	M2			
	M3	11	2	
	M4	8	2	
	M5	10	4	
	M6	1	0	
小計		77	15	19.5%
合計		97	19	19.6%

RA：不応性貧血(refractory anemia)
RARS：鉄芽球性貧血(RA with ringed sideroblasts)
RAEB：芽球増加併うRA(RA with excess of blast)
RAEB-t：形質転化したRAEB(RAEB in transformation)
CMMoL：慢性骨髄単球性白血病(chronic myelomonocytic leukemia)

表2　血液疾患におけるras遺伝子突然変異の頻度

	症例数	点突然変異症例
CML　CP　5	8	0
BC　3		
ALL	16	0
multiple myeloma(MM)	12	3
malignant lymphoma	7	0
Non-Hodgkin(ML)		
acute T cell leukemia(ALL)	8	0
normal	7	0
polycythemia	2	0
myelofibrosis	2	0
aplastic anemia	3	0
essential thrombocythemia	1	0
immunoblastid lymphoadenopathy	1	0
計	65	3

一方，慢性骨髄性白血病（CML）8例，急性リンパ性白血病（ALL）16例，非ホジキン悪性リンパ腫7例，成人T細胞白血病／リンパ腫（ATLL）8例および悪性腫瘍の骨髄転移，非悪性血液疾患である真性多血症と再生不良性貧血の8症例，および7例の正常骨髄検体からは突然変異は検出されなかった（表2）．このことは，ras遺伝子の点突然変異がAMLやMDSに特異的であることを示している．一方多発性骨髄腫では12例中3例にras遺伝子の点突然変異を認めている（表2）[10]．従来，多発性骨髄腫は分化したB細胞の腫瘍性増殖と考えら

表3　ras遺伝子突然変異の見られたＡＭＬおよびＭＤＳ

No	症例	診断	年齢	性別	点突然変異	%blast
※7	N.T.	AML M4	22	F	N-12 (GAT)	>30%
					K-12(GTT,GAT)	
					N-61(GAT)	
8	K.K.	AML M4	54	M	N-12(GAT)	>30%
15	M.M.	AML M5	28	M	K-12(GAT)	>30%
23	K.K.	AML	37	M	N-12(TGT)	>30%
※25	U.M.	AML M2	46	M	N-13(GAT,GTT)	>30%
※32	I.S.	AML M1	61	M	N-12(GAT,GTT)	>30%
37	O.H.	AML M2	35	F	N-12(GAT)	>30%
※45	K.J.	AML	56	M	N-12(AGT,GAT,GTT)	>30%
49	T.K.	CMMoL	83	F	K-12(AGT)	<20%
※51	H.H.	RAEB	49	F	N-12(AGT,GAT)	<20%
52	H.S.	AML M3	40	M	N-12(GAT)	>30%
※53	H.S.	AML M5	82	M	N-12(GAT,GCT)	>30%
※59	M.H.	RAEB-t	76	M	N-13(AGT,GTT,GCT)	13%
					N-12(AGT,GTT,GCT,GAT)	
					K-12(AGT)	
60	M.M.	AML	68	M	N-12(GAT)	>30%
64	I.E.	AML M1	50	F	N-12(GAT)	>30%
70	S.T.	AML M3	64	M	N-13(GTT)	>30%
74	S.N.	AML M5	15	M	N-13(TGT)	>30%
75	K.E.	AML M5	64	M	N-12(AGT)	>30%
76	A.T.	RAEB	39	M	N-12(AGT)	28%

※：多発突然変異の見られた症例　　12：コドン12　　K：K-ras
↑：点突然変異を起こした塩基　　13：コドン13　　N：N-ras
61：コドン61

れてきた．しかしながら，最近のphenotypeの解析により，pre-B細胞，T細胞，あるいは骨髄単球性のマーカーを示すものもあり，MDSと同じく多能性造血幹細胞の異常に由来するという考え方も示されている[11]．一方，EB Virusで不死化されたヒトリンパ芽球に活性化H-あるいはN-ras遺伝子を導入すると細胞の腫瘍性増殖と共に形質細胞への分化傾向が証明されている[12]．以上のような一連の研究成果よりras遺伝子が多発性骨髄腫瘍の病因に関与している可能性が示唆されている．

ras遺伝子の突然変異が確認されたMDSおよびAML症例の臨床データは表3に示した[9]．ras突然変異は不応性貧血（RA）や鉄芽球性貧血（RARS）の初発時には検出されず，芽球増加を伴う不応性貧血（RAEB）や形質転化したRAEB（RAEB-t）などの進行性疾患において有意に検出された．またM5-AMLで高い検出率を示した（40%）．年齢による突然変異の頻度に差は見られなかったが，性差が認められ，男女比は14：5であった．

Kaplan-Meier法による計算では，ras遺伝子の突然変異を伴うAMLの生存率は突然変異を伴わない患者ととの間に有意差を示さなかった（図3）[9]．

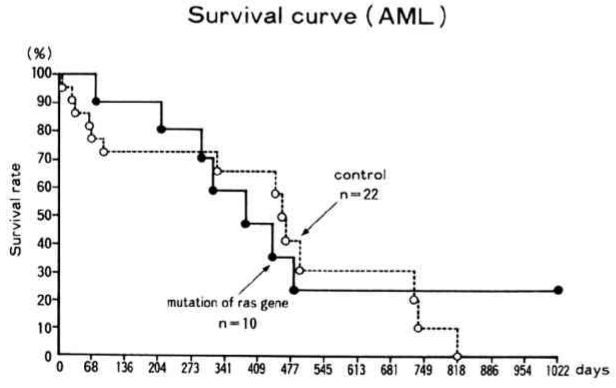

図3　ras遺伝子の突然変異に伴うAML患者（●—●）とras遺伝子突然変異を伴わないAML患者（○—○）の生存曲線．

最もよく起こるアミノ酸置換は，N-rasコドン12におけるGlyからAspへの置換であった（11/35）．このほか，35例中3例以上がK-rasのコドン12またはN-rasのコドン13におけるAsp置換であった．さらに，突然変異35例中22例がグアニン(G)からアデニン(A)への変化であった．N-rasのコドン12におけるAsp置換型ras蛋白は，ほかの突然変異ras蛋白と比較して，ワイルドタイプのGTPase活性の40%以上を維持していることが報告されている[13]．このことはGTPase活性の維持により選択的にAsp置換型の成長が有利になる，あるいはGTPase活性の欠失によってほかの突然変異の成長が不利になるためにAsp置換が多く検出されるという可能性を示唆している．従って，この結果はras遺伝子の突然変異がクローナルな病気の進展の役割を持っている可能性を示唆するものである．

3．ras遺伝子の多発点突然変異

AMLやMDSにras遺伝子の突然変異が認められる事は既に報告されているが，そのほとんどは1カ所の点突然変異である．今回我々が検討したMDSとAML計97例のうち，15例にras遺伝子の突然変異を認めたが，興味あることに比較的高頻度に2つ以上の異なった塩基に突然変異のある多発突然変異を認めている．多発点突然変異が検出されたのは以下の7例であった（表2）[9]．

- ●症例7：N-rasおよびK-rasコドン12の2番目の塩基とN-rasコドン61の3番目の塩基．
- ●症例25：N-rasコドン13の2番目の塩基．
- ●症例32：N-rasコドン12の2番目の塩基．
- ●症例45，症例51：N-rasコドン12の1番目の塩基と2番目の塩基．
- ●症例53：N-rasコドン12の2番目の塩基．
- ●症例59：N-rasコドン13の1番目と2番目の塩基，N-rasコドン12の1番目と2番目の塩基，K-rasのコドン12の1番目の塩基．

これらras遺伝子の多発点突然変異が個々の対立遺伝子または個々の細胞群に別々に起こっていることを証明するため以下の実験を行った．症例59のN-rasコドン12および13を含む増

幅された101bp の DNA をプラスミドにクローニングし，E-coliXL1-Blue にトランスフェクトさせ，Xgal/IPTG 選択培地により80クローンを得た．これを用いて N-ras コドン12および13に対するオリゴヌクレオチドプローブによりハイブリダイゼーションを行った．この結果，２クローンはコドンの12の１番目の塩基のみに，ほかの２クローンはコドン12の２番目に塩基のみに，またコドン13の２番目の塩基のみに突然変異があることが分かった．さらにクローンフラグメントをダイデオキシ法を用いて塩基配列を決定した（図４）．以上より，症例59における N-ras のコドン12および13に起こった５ケ所，８種類の突然変異は異なった対立遺伝子上すなわち個々の細胞に別々に起きていることが示された[9]．既に，AML の悪性化が単一のクローンから発症することが証明されているため[14]，AML の進展の過程でこれら ras 遺伝子の多発突然変異が多クローン性に出現したと考えられる．これらの結果は ras 遺伝子の多発点突然変異が initiation の後に起こり，疾患のクローナルな進展に関与している可能性を示唆している．

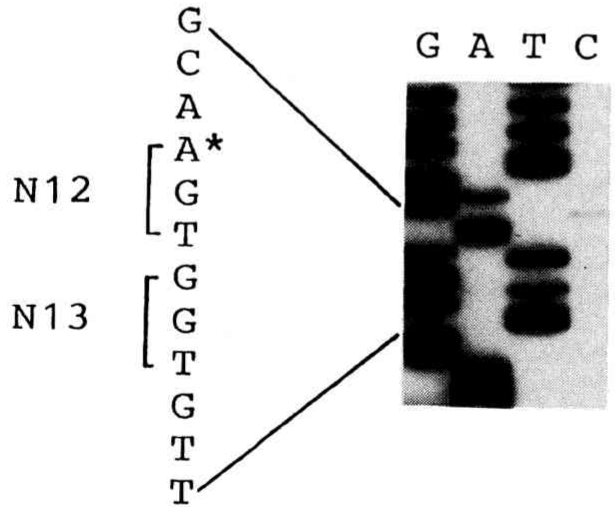

図４　症例59のコドン12，13を含む101bp フラグメントの塩基配列．
＊は突然変異した塩基対．

表４　ras遺伝子突然変異の継続的検討

No	症例	診断	年齢	性別	点突然変異(%blast) 初期症状	フォローアップ
5	U.K.	AML(M3)	43	M	-(80%)	-(<5%)
9	K.Y.	AML(M4)	71	F	-(72%)	-(<5%)
14	K.H.	AML(M3)	24	F	-(83%)	-(<5%)
21	M.S.	MDS(RAS)	61	M	−(3%)	−(3%)
28	M.Y.	AML(M6)	20	M	-(35%)	-(<5%)
★59	M.H.	MDS (RAEB-t)	76	M	N-12(13%) N-13 K-12	-(38%)
63	A.M.	AML(M2)	79	M	-(51%)	-(<5)
65	Y.I.	MDS(RA)	72	M	-(3%)	-(3%)
71	K.T.	MDS(RA)	69	M	-(2%)	-(2%)
72	N.T.	MDS(RA)	54	F	-(3%)	-(3%)
★74	S.N.	AML(M5)	15	M	N-13(38%)	-(<5%)
★76	A.T.	MDS(RA)	39	M	-(2%)	N-12(28%)
78	N.H.	AML(M2)	20	M	-(34%)	-(<5%)
81	O.S.	MDS(RA)	71	M	-(3%)	-(3%)

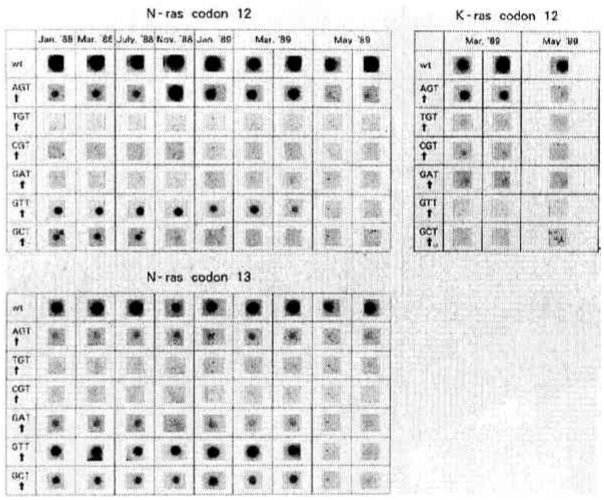

図５　症例59における ras 遺伝子突然変異の経時的変化．

４．ras 突然変異と骨髄性白血病の進展

以上のことより次に MDS や AML のクローナルな進展を追及する手段として ras 遺伝子の突然変異を経過を追って経時的に調べてみた．MDS と AML 各７例の患者について，２年間にわたって経時的な検討を行うことができた．骨髄細胞は診断時に採取し，その後３－５ケ月ごと，あるいは血液学的パラメーターに変化が認められた際に採取した．経時的な検討を行なった14例中３例に ras 遺伝子に関連した変化を認めている（表４）．その第１例は RAEB-t から

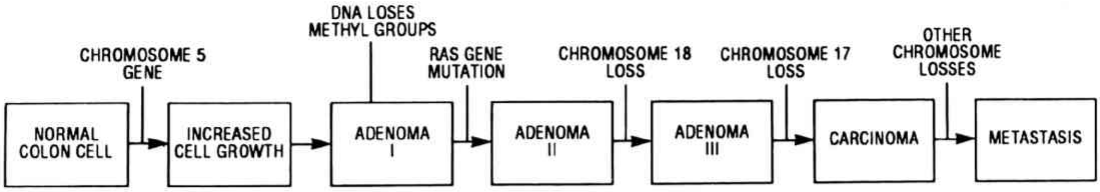

図6　大腸癌における多段階発癌モデル[8)16)].

AMLに進行し，ras遺伝子に5ケ所の多発突然変異が認められた症例59で，約2年後に突然変異の消失が見られ，同時に染色体異常46, XY, −17＋der（17）t（17;?）（p13;?），del（9）（q13q22）を獲得している[15)]．この現象を確認するために，さまざまな時点で採取した症例59のDNAをPCRで増幅し突然変異認識プローブで同時にハイブリダイズした（図5）[15)]．
この症例は，ras遺伝子の突然変異を持たない17P13の染色体異常を獲得したクローンが致命的な疾患に進展したと考えられた．すなわちras遺伝子の突然変異が発症時および病初期に関係していたが，続いて出現した染色体異常がAMLの進展に関与したと考えられる．

またCMLの急性転化例に点突然変異によるP53癌抑制遺伝子の不活化が多く認められるという報告もある[17)]．我々の症例でも17P13に存在する癌抑制遺伝子であるP53遺伝子に突然変異が証明できており，このような多段階の要因がMDSやAMLの発症，進展に関与していることが示されたものと考えている（投稿準備中）．第2例は急性単球性白血病（AMoL）の症例74で初期にはN-rasコドン13の突然変異が認められたが，完全寛解時にはras遺伝子の突然変異は消失した．ras遺伝子の突然変異はAMLにおける寛解の指標として有用であると言えよう．第3例は初期にはras突然変異の見られなかった不応性貧血（RA;症例76）で，7ケ月後にRAEB-tに進展した時点でN-rasのコドン12（AGT）の突然変異を獲得した．初発時の検査でras遺伝子の突然変異のなかった他の11例は疾患の進行する間にras突然変異を獲得することはなかった．

以上のように，ras遺伝子の突然変異が発症と進展の両者に関与しており，かつこれ以外の遺伝子，たとえばP53癌抑制遺伝子がAMLの進展に関与していることが理解された．これらのことを明らかにするためMDSおよびAMLにおける分子生物学的なデータを経時的な検討によりさらに蓄積する必要があると考えられた．

5．まとめ

ras遺伝子群の突然変異による活性化やP53癌抑制遺伝子の不活性化が臨床的にもMDSやAMLの発症・進展に関与していることが説明された．大腸癌発癌モデル（図6）のように詳細ではないが，今後症例を重ねるとともに，染色体分析法によって知られている他の欠失型染色体異常における癌抑制遺伝子の関与についてさらに分子生物学的手法を用いて検討を続けていきたいと考えている．

稿を終えるに当たり，本研究をご指導頂いた多くの共同研究者の諸先生方に心から感謝の意を表します．

1．Stam K, Heisterkamp N, Grrsveld G, et al.: Evidence of a new chimeric bcr/c-abl mRNA in patients with chronic myelocytic leukemia and the Phi‡adelphia chromosome N Eng J Med. 313-1429, 1985.
2．Barbacid M: Ras genes. Ann. Rev. Biochem.; 56: 779-827, 1987.
3．Nakagawa T, Mabry M, De Bustros A, Ihle JN, Nelkin BD, and Baylin SB. Introduction of v-Ha-ras oncogene induces differentiation of

cultured human medullary thyroid carcinoma cells. Proc. Natl. Acad. Sci. 84: 5923-5927, 1987.

4. Bos JL. Ras oncogenes in human cancer: a review. Cancer Res. 1989; 49: 4682-4689.

5. Hirai H, Kobayashi Y, Mano H, Hagiwdra K, Maru Y, Omine M, Mizoguti H, Nishida J, and Takaku F. A point mutation at codon 13 of the N-ras oncogene in myelodysplastic syndrome. Nature, 327: 430-432, 1987.

6. Lee E, To H, Shew J. et. al Inactivation of the retinoblastoma susceptibility gene in human breast cancers. Science 241: 218-221, 1988.

7. Harbour J, Lai S, Whang P, et. al. Abnormalities in structure and expression of the human retinoblastoma gene in SCLC. Science 241: 353-357, 1988.

8. Baker S, Fearon E, Nigro J, et. al Chromosome 17 deletions and p53 gene mutation in colorectal carcinomas. Science 244: 217-221, 1989.

9. Nakagawa T, Saitoh S, Imoto S, et al. Multiple point mutation of N-ras and K-ras oncogenes in myelodysplastic syndrome and acute nyelogenous leukemia. Oncology 49; 114-122, 1992.

10. Matozaki S, Nakagawa T, Nakao Y, et.al. Ras gene mutations in multiple myeloma and related monoclonal gammopathies. Kobe J. Med. Sci 37: 35-45, 1991.

11. Grogan T, Durie B, Lomen C, et. al. Delineation of a novel pre-B cell component in plasma cell myeloma : Immunochemical, immunophenotypic, genotypic, cytologic, cell culture and kinetic features. Blood 70: 932-942, 1987.

12. Seremetis S, Inghirami G, Ferrero D, et. al. Transformation and plasmacytoid differentiation of EBV-infected human B lymphoblasts by ras oncogenes. Science 243: 660-663, 1989.

13. Farr CJ, Saiki K, Erlich HA, McCormick F, and Marshall CJ, Analysis of ras gene mutations in acute myeloid leukemia by polymerase chain reaction and oligonucletide probes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 85: 1629-1633, 1987.

14. Fialkow P, Singer JW, Raskin WH, Adamson JW, Jacobson RJ, Bernstein ID, Dow LW, Najfeld V, and Veith R. Clonal development, stem-cell differentiation, and clinical remission in acute nonlymphocytic leukemia. N. Engl. J. Med. 317: 468-473, 1987.

15. Nakagawa T, Saitoh S, Imot S, Itoh M, Tsuwsumi M,Hikiji K, Nakao Y, Fujita T. Loss of multiple point mutations of ras genes associated with acquisition of chromosomal abnormalities during disease progression in myelodysplastic syndrome. Br. J. Haematol 77: 250-252, 1991.

16. John M, Jean M, et. al Many gene changes found in cancer. The common malignancies, including colon, lung, and breast cancer, apparentlly develop by a stepwise accumula tion of mutations affecting both oncogenes and suppressor genes. Science 246: 1386-1388, 1989.

17. Feinstein E, Cimino G, Gale R, et. al. p53 in chronic myelogenous leukemia in acute phase. Prroc. Natl. Acad. Sci. USA Medical Sciences 88: 6293-6297, 1991.