



## Persistent detection of a novel MLL-SACM1L rearrangement in the absence of leukemia

森, 健

---

(Degree)

博士（医学）

(Date of Degree)

2010-10-12

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲5102

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1005102>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏 名 森 健  
博士の専攻分野の名称 博士（医学）  
学 位 記 番 号 博い第 5102 号  
学位授与の要 件 学位規則第 5 条第 1 項該当  
学位授与の日 付 2010 年 10 月 12 日

【 学位論文題目 】

Persistent detection of a novel MLL-SACM1L rearrangement in the absence of leukemia (白血病が発症しない状態で持続的に同定される新規 MLL-SACM1L 遺伝子再構成)

審 査 委 員

主 査 教 授 南 博信  
教 授 横崎 宏  
教 授 伊藤 智雄

(課程博士関係)

## 学位論文の内容要旨

# Persistent detection of a novel *MLL-SACM1L* rearrangement in the absence of leukemia

白血病が発症しない状態で持続的に同定される新規 *MLL-SACM1L* 遺伝子再構成

## Persistent detection of a novel *MLL-SACM1L* rearrangement in the absence of leukemia

白血病が発症しない状態で持続的に同定される新規 *MLL-SACM1L* 遺伝子再構成

### 内容要旨

#### [背景]

混合性白血病(*Mixed lineage leukemia: MLL*)遺伝子は常染色体 11q23 にマップされ、Histone H3 lysine 4 をメチル化する histone methyltransferase 活性を持つ DNA 結合蛋白質をコードしている。MLL は、*Hox* 遺伝子を含む多数の遺伝子の発現を調節し、造血や胎児発達に重要な役割を果たしている。この *MLL* 遺伝子の再構成(転座)は白血病の予後不良因子であり、抗癌剤治療後の 2 次性白血病及び乳児白血病で特に高頻度に認められる。*MLL* 遺伝子の特定の領域(breakpoint cluster region: bcr)には topoisomerase II の認識部位が多数存在しており、がん治療として topoisomerase II 阻害薬を投与された患者に *MLL* 遺伝子再構成を伴った 2 次性白血病が発症し易いと考えられている。再構成した *MLL* 遺伝子がコードする *MLL* 融合蛋白質は histone methyltransferase 活性失っているが、造血幹細胞を効率良く白血化すると考えられており、これまでに *MLL* 遺伝子と再構成を起こすパートナー遺伝子が 50 種以上報告されている。

これまでに報告された *MLL* 遺伝子再構成例はほぼ全て白血病を発症しており、その予後は不良である。白血病を発症していない例は *MLL* 遺伝子再構成細胞が骨髄内で clonal expansion した 1 例のみである。

#### [症例]

発症時 3 歳の男児。高 2 倍体の染色体異常を伴う急性リンパ性白血病(ALL)に対して化学療法を受けた。約 2 年間の治療期間の内、18 ヶ月目の骨髄検査において顕微鏡的目視検査においては白血病細胞は認めなかったが、染色体 G-band 検査において *MLL* 遺伝子再構成の出現を疑わせる t(3;11)(p21;q23)を認めた。26 ヶ月目の骨髄検査において FISH 法検査により *MLL* 遺伝子再構成を示す split signal が確認された。その後も骨髄検査を継続した。顕微鏡的目視検査では白血病細胞が出現することはなく、染色体 G-band 検査においても異常は認められなくなったが、FISH 法では数%の *MLL* split signal が検出され続けた。

#### [目的]

我々はこれまでに、ALL の治療後に *MLL* 遺伝子再構成 t(3;11)(p21;q23)を伴う二次性白血病より、3p21 上の新規 *MLL* パートナー遺伝子 *AF3p21/NCKIPSD* を同定し報告している(Blood. Vol. 95 No. 3. 2000. pp1066-8)。今回、ALL の治療中に *MLL* 遺伝子再構成を認

神戸大学大学院医学系研究科医科学専攻

小児科学

(指導教員：松尾 雅文教授)

森 健

めにもかかわらず白血病細胞が出現しない症例を経験したので、その分子機構を明らかにすることを試みた。

#### 【材料と方法】

本研究について神戸大学医学部附属病院内の倫理委員会で審査を受けた。承認後、患者及び家族に説明の上、文書による同意を得た。発症 95 ヶ月目に行われた骨髄検体より RNA、DNA を抽出し、RT-PCR 法、直接塩基配列法により解析した。

#### 【結果】

患者 RNA に RT-PCR 法を行い *MLL-AF3p21/NCKIPSD* キメラ遺伝子の増幅を試みたところ、予想と異なる長さの遺伝子が増幅された。直接塩基配列法により遺伝子配列を解析した。5'側は *MLL* 遺伝子が exon 9 まで転写されており、3'側は 3p21 上の *AF3p21/NCKIPSD* 遺伝子とは 3Mb 離れた位置にある *SACMIL* 遺伝子の intron 1 内の配列が本来の転写方向とは逆向きに転写されていた。これは *MLL* 遺伝子に特異的な primer の 20 塩基の内 14 塩基が *SACMIL* 遺伝子の intron 1 内の配列と一致したためであった。改めて *SACMIL* 遺伝子の introm 1 に特異的な primer と *MLL* 遺伝子に特異的な primer を用いて RT-PCR 法を行ったところ、*MLL* exon 9 と *SACMIL* intron 1 が融合しているキメラ遺伝子が同定された。

Genomic DNA (gDNA) の転座部位を同定するため同じ primer を用いて患者 DNA に PCR 法を行ったところ 8kb の増幅物が得られた。直接塩基配列法を行ったところ、*MLL* exon 10 と *SACMIL* intron 4 が融合していることが判明した。*MLL-SACMIL* 転座部位が判明したため *SACMIL-MLL* 転座部位を解析したところ、同じ部位で転座していることが判明し、本症例では均衡型染色体転座が起っていたことが明らかになった。

#### 【考察】

*MLL* 遺伝子再構成においては、*MLL* 遺伝子の bcr より N 末端側とパートナー遺伝子の C 末端側が融合した *MLL* 融合蛋白質が白血化に関与している。N 末端側には *MLL* の AT hooks (AT hook DNA binding motifs) があり、DNA との結合を担うと考えられる。C 末端側の 50 種以上のパートナー遺伝子は転写調節を行う domain を持つものと、蛋白-蛋白の相互作用により多量体形成に関与する domain を持つものに大別される。

今回の研究では *MLL* 遺伝子再構成の新たなパートナー遺伝子 *SACMIL* を同定した。*SACMIL* 遺伝子はイノシトールリン酸脱リン酸酵素をコードするが、その生理的機能はまだ明らかではない。今回の症例では *SACMIL* 遺伝子と *MLL* 遺伝子が互いに転写方向が逆向きに転座を起こしていた。転写された mRNA は *MLL* exon 9 が *SACMIL* intron 1 と融合しており、gDNA breakpoint となっている *MLL* exon 10 の一部と *SACMIL* intron 4 が融合した転写物は同定されなかった。本症例の転写物は 5'側にこれまで同定された *MLL* 融

合遺伝子の機能的 domain を全て含み、その 3'側には 8 残基のアミノ酸をコードする *SACMIL* intron 1 の逆向き配列を有していた。

急性骨髓性白血病の発症には、細胞増殖を刺激するクラス I 変異と造血細胞の分化を障害するクラス II 変異が必要と考えられている。この考え方従えば、本症例でみられた *MLL-SACMIL* 遺伝子再構成を伴った骨髄細胞はさらにクラス I 変異が起こらない限り白血化しないのかもしれない。また、*MLL-SACMIL* 遺伝子再構成が 7 年以上も持続的に同定されるということから、本症例における *MLL-SACMIL* 遺伝子再構成は、self-renewal 可能な幹細胞で起こっていると考えられる。

神戸大学大学院医学系研究科（博士課程）

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第 2135 号	氏名	森 健
論文題目	白血病が発症しない状態で持続的に同定される新規 <i>MLL-SACML</i> 遺伝子再構成		
Title of Dissertation	Persistent detection of a novel <i>MLL-SACML</i> rearrangement in the absence of leukemia		
審査委員 Examiner	主査 Chief Examiner 副査 Vice-examiner 副査 Vice-examiner	南 博信 印 横山 元 印 伊藤 祐輔 印	

(要旨は 1,000 字～2,000 字程度)

[背景]

混合性白血病(*Mixed lineage leukemia: MLL*)遺伝子は常染色体 11q23 にマップされ、Histone H3 lysine 4 をメチル化する histone methyltransferase 活性を持つ DNA 結合蛋白質をコードしている。MLL は、*Hox* 遺伝子を含む多数の遺伝子の発現を調節し、造血や胎児発達に重要な役割を果たしている。この *MLL* 遺伝子の再構成(転座)は白血病の予後不良因子であり、抗癌剤治療後の 2 次性白血病及び乳児白血病で特に高頻度に認められる。*MLL* 遺伝子の特定の領域(breakpoint cluster region: bcr)には topoisomerase II の認識部位が多数存在しており、がん治療として topoisomerase II 阻害薬を投与された患者に *MLL* 遺伝子再構成を伴った 2 次性白血病が発症し易いと考えられている。再構成した *MLL* 遺伝子がコードする *MLL* 融合蛋白質は histone methyltransferase 活性失っているが、造血幹細胞を効率良く白血化すると考えられており、これまでに *MLL* 遺伝子と再構成を起こすパートナー遺伝子が 50 種以上報告されている。

これまでに報告された *MLL* 遺伝子再構成例はほぼ全て白血病を発症しており、その予後は不良である。白血病を発症していない例は *MLL* 遺伝子再構成細胞が骨髄内で clonal expansion した 1 例のみである。

[症例]

発症時 3 歳の男児。高 2 倍体の染色体異常を伴う急性リンパ性白血病(ALL)に対して化学療法を受けた。約 2 年間の治療期間の内、18 ヶ月目の骨髄検査において顕微鏡的目視検査においては白血病細胞は認めなかったが、染色体 G-band 検査において *MLL* 遺伝子再構成の出現を疑わせる t(3;11)(p21;q23) を認めた。26 ヶ月目の骨髄検査において FISH 法検査により *MLL* 遺伝子再構成を示す split signal が確認された。その後も骨髄検査を継続した。顕微鏡的目視検査では白血病細胞が出現することはなく、染色体 G-band 検査においても異常は認められなくなったが、FISH 法では数% の *MLL* split signal が検出され続けた。

[目的]

我々はこれまでに、ALL の治療後に *MLL* 遺伝子再構成 t(3;11)(p21;q23) を伴う 2 次性白血病より、3p21 上の新規 *MLL* パートナー遺伝子 AF3p21/NCKIPSD を同定し報告している(Blood. Vol. 95 No. 3, 2000, pp1066-8)。今回、ALL の治療中に *MLL* 遺伝子再構成を認めたにもかかわらず白血病細胞が出現しない症例を経験したので、その分子機構を明らかにすることを試みた。

[材料と方法]

本研究について神戸大学医学部附属病院内の倫理委員会で審査を受けた。承認後、患者及び家族に説明の上、文書による同意を得た。発症 95 ヶ月目に行われた骨髄検体より RNA, DNA を抽出し、RT-PCR 法、直接塩基配列法により解析した。

## [結 果]

患者 RNA に RT-PCR 法を行い *MLL-AF3p21/NCKIPSD* キメラ遺伝子の増幅を試みたところ、予想と異なる長さの遺伝子が増幅された。直接塩基配列法では、5'側は *MLL* 遺伝子が exon 9 まで転写されしており、3'側は 3p21 上の *AF3p21/NCKIPSD* 遺伝子とは 3Mb 離れた位置にある *SACMIL* 遺伝子の intron 1 内の配列が本来の転写方向とは逆向きに転写されていた。これは *MLL* 遺伝子に特異的な primer の 20 塩基の内 14 塩基が *SACMIL* 遺伝子の intron 1 内の配列と一致したためであった。改めて *SACMIL* 遺伝子の introm 1 に特異的な primer と *MLL* 遺伝子に特異的な primer を用いて RT-PCR 法を行ったところ、*MLL* exon 9 と *SACMIL* intron 1 が融合しているキメラ遺伝子が同定された。

Genomic DNA (gDNA) の転座部位を同定するため同じ primer を用いて患者 DNA に実施した PCR 法では 8kb の増幅物が得られ、直接塩基配列法では *MLL* exon 10 と *SACMIL* intron 4 が融合していることが判明した。*MLL-SACMIL* 転座部位が判明したため *SACMIL-MLL* 転座部位を解析したところ、同じ部位で転座していることが判明し、本症例では均衡型染色体転座が起っていたことが明らかになった。

## [考 察]

*MLL* 遺伝子再構成では、*MLL* 遺伝子の bcr より N 末端側とパートナー遺伝子の C 末端側が融合した *MLL* 融合蛋白質が白血化に関与する。N 末端側の *MLL* の AT hooks (AT hook DNA binding motifs) は DNA との結合を担うと考えられる。C 末端側の 50 種以上のパートナー遺伝子は転写調節を行う domain を持つものと、蛋白・蛋白相互作用により多量体形成に関与する domain を持つものがある。

今回の研究で *MLL* 遺伝子再構成の新たなパートナー遺伝子 *SACMIL* を同定した。*SACMIL* 遺伝子はイノシトールリン酸脱リン酸酵素をコードするが、その生理的機能は不明である。今回の症例では *SACMIL* 遺伝子と *MLL* 遺伝子が転写方向が逆向きに転座していた。転写された mRNA は *MLL* exon 9 が *SACMIL* intron 1 と融合しており、gDNA breakpoint となっている *MLL* exon 10 の一部と *SACMIL* intron 4 が融合した転写物は同定されなかった。本症例の転写物は 5'側にこれまで同定された *MLL* 融合遺伝子の機能的 domain を全て含み、その 3'側には 8 残基のアミノ酸をコードする *SACMIL* intron 1 の逆向き配列を有していた。

急性骨髓性白血病の発症には、細胞増殖を刺激するクラス I 変異と造血細胞分化を障害するクラス II 変異が必要と考えられ、本症例の *MLL-SACMIL* 遺伝子再構成を伴った骨髓細胞の白血化にはさらにクラス I 変異が必要と思われる。*MLL-SACMIL* 遺伝子再構成が 7 年以上も持続的に同定され、本症例における *MLL-SACMIL* 遺伝子再構成は、self-renewal 可能な幹細胞で起こっていると考えられる。

本研究は、二次性白血病に関与すると考えられる *MLL* 遺伝子再構成を認めたものの長期間白血化を起こさなかった小児急性リンパ性白血病の遺伝子を丁寧に解析し、あらたな融合遺伝子を同定したもので、二次性白血病の発症について重要な知見を得たものとして価値ある業績であると認める。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。