

であった ($p < 0.0001$)。さらに CD65s^{low} 症例の発生率が年齢 50 歳以下で 20% であったのに対して 80 歳以上では 67% と、加齢とともに増加していた ($p < 0.0001$)。総じて、55 歳以上の症例における完全寛解 (CR) 率の検討では、CD65s^{high} AML 症例の 44% に対して CD65s^{low} AML 症例では 33% であった ($p = 0.055$)。以上から、CD65s^{low} AML は免疫表現型上は未分化な疾患であり、高齢者に発症しやすい。統計学的有意差がないにしても、CD65s^{low} 症例と 55 歳以上の症例のみにみられる CR 率の低下は相関性がありそうである。

30

多発性骨髄腫における反復性ゲノム異常の臨床的、生物学的関連性

Clinical and biologic implications of recurrent genomic aberrations in myeloma

Fonseca R, Blood E, Rue M, et al.

Division of Hematology/
Internal Medicine, Stabile 6-
22, Rochester, MN 55905,
USA
Blood
2003, 101: 4569-4575.

多発性骨髄腫 (MM) では、Ig 重鎖 (IgH) の転座を含む一定の反復性染色体異常が普遍的に起こっている。MM における IgH の転座は癌遺伝子の高発現を引き起こし、t(11;14)(q13;q32)、t(4;14)(p16;q32)、t(14;16)(q32;q23) がよくみられる。これらの転座の反復性の特性、およびこれらが形質細胞 (PC) の早期における異常であるという所見に基づき、これらが生物学的、臨床的多様性に寄与していると考えられた。さらに 13q14、17p13 の欠損は、生存期間の短縮に関与する可能性が考えられた。著者らは、Eastern Cooperative Oncology Group による臨床試験 E9486/9487 に登録され、通常の化学療法を受けた 351 例について、細胞質内 Ig をエンハンスした分裂間期の蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーションを用いて欠損 (13q14、17p13.1)、および IgH の転座を検出した。転座はしばしば不均衡性であり、派生染色体の一对が消失していた。t(4;14)(p16;q32) (42 例, 26 vs 45 カ月, $p < 0.001$)、t(14;16)(q32;q23) (15 例, 16 vs 41 カ月, $p = 0.003$)、-17p13 (37 例, 23 vs 44 カ月, $p = 0.005$)、そして -13q14 (176 例, 35 vs 51 カ月, $p = 0.028$) の存在は、生存期間の短縮に関与した。患者層を予後に基づき 3 群に分けた。予後不良群は t(4;14)(p16;q32)、t(14;16)(q32;q23)、-17p13 であり、中間群は -13q14 とし、それら以外を良好群とした。おのおのの生存期間の中央値は 24.7、42.3、50.5 カ月であった ($p < 0.001$)。この分子生物学的分類で患者層を予後不良群、中間群、良好群に分類できることがわかった。さらに重要なことは、MM がゲノム異常によって分類される亜集団で構成されているという証拠を強く示唆するものである。



OX40 (CD134) のライゲーションは同種骨髄移植患者の GVHD と移植片拒絶を調節している

Ligation of OX40 (CD134) regulates graft-versus-host disease (GVHD) and graft rejection in allogeneic bone marrow transplant recipients

Blazar BR, Sharpe AH, Chen AI, *et al.*

University of Minnesota Hospital, Box 109, Mayo Bldg., 420 SE Delaware St, Minneapolis, MN 55455, USA

Blood

2003, 101: 3741-3748.

OX40 (CD134) は活性化 T 細胞表面に発現しており, そのリガンドである OX40 リガンド (OX40L) は樹状細胞, B 細胞, 活性化内皮細胞に発現している。OX40 と OX40L 相互作用が GVHD にどのように影響するかを決定するために, 著者らは拮抗物質である抗 OX40 モノクローナル抗体 (mAb), または OX40^{-/-}ドナー, または OX40L^{-/-}レシピエントマウスを使用した。どの方法でも GVHD 発症頻度の減少が観察された。OX40 が GVHD 中に分離した CD4⁺, CD8⁺ T 細胞において発現亢進するという事実にもかかわらず, OX40 ライゲーションの主な作用は, GVHD と生着モデル系の両方において CD4⁺ T 細胞のアロ反応であり, CD8⁺ T 細胞のアロ反応ではない。OX40/OX40L 経路の遮断による GVHD 抑制は CD28 シグナル伝達を必要としない。いくつかの研究で, OX40 は T ヘルパー 2 (Th2) 反応の誘導に不可欠とされている。しかし, *in vivo* で OX40/OX40L 経路の遮断は transcription-6^{-/-} (Stat-6^{-/-}) (Th2 欠損), または Stat-4^{-/-} (Th1 欠損) MHC 不一致の脾細胞のシグナルトランスデューサー, アクチベーターのどちらかにより誘導された GVHD による死亡率を減少させた。このことは, GVHD を改善させる効果は Stat-4 または Stat-6 シグナル伝達を必要としないことを示唆する。OX40L が活性化 T 細胞上に発現していると報告されているにもかかわらず, 異なるモデルでは OX40L^{-/-} と OX40L^{+/+} T 細胞が輸注されたときには GVHD における効果は観察されなかった。これらの所見は GVHD の OX40/OX40L による調節にかかわる機序について示唆を与えるものである。



多発性骨髄腫特異的細胞傷害性 T リンパ球の *ex vivo* での誘導

Ex vivo induction of multiple myeloma-specific cytotoxic T lymphocytes

Hayashi T, Hideshima T, Akiyama M, *et al.*

Dana-Farber Cancer Institute, 44 Binney St., Boston, MA 02115, USA

Blood

2003, 102: 1435-1442.

多発性骨髄腫 (MM) は, 免疫抑制によって特徴づけられる治療不可能な形質細胞性腫瘍である。本研究で, 著者らは骨髄 (BM) 血清中に自己の抗 MM 免疫を抑制する因子を同定し, *ex vivo* で MM 特異的細胞傷害性 T リンパ球 (CTLs) を誘導する方策について検討した。著者らは, MM 患者の BM 血清が表現型および T 細胞増殖をわずかに刺激するのみであることから, 樹状細胞 (DCs) の誘導を抑制することを見出した。抗血管内皮細胞成長因子 (anti-VEGF) および/または抗 IL-6 (anti-IL-6) 抗体はこの抑制効果を中和し, 少なくとも一部で, VEGF と IL-6 が

MM患者における免疫抑制に関与していることを確認した。*Ex vivo*でMM特異的CTLsを誘導するために、GM-CSF、IL-4を含む培地で付着単核細胞を5日間培養し、未熟なDCsを誘導した。その後、TNF- α 存在下にアポトーシスMM小体と3日間共培養し、それらの成熟を促した。自己BMあるいは末梢血単核細胞はこれらのDCsで毎週刺激され、DCsをパルスするのに用いられるMM細胞に対する細胞傷害活性が測定された。アポトーシス小体と培養したDCs [T細胞/DCs比が360:1で刺激指数(SI)は23.2]は、MM細胞のみで刺激されたT細胞(SIは5.6)やDCsだけの場合(SIは9.3)、MM lysate-pulsed DCs(SIは13.5)に比べて、著明にT細胞増殖を刺激した。MM患者からのこれらのCTLsは、自己のMM細胞に対して特異的な細胞傷害活性 [エフェクター細胞/標的細胞比(E/T比)が40:1で24.7%]を示した。よって、本研究では、MM患者由来CTLsは自家腫瘍細胞を認識して壊死を引き起こすことが示され、MM患者の予後を改善する新しい免疫療法の枠組みが提案された。



骨髓異形成の成熟非芽球性骨髓系細胞における早期骨髓性抗原発現

Evidence for expression of early myeloid antigens in mature, non-blast myeloid cells in myelodysplasia
Xu D, Schultz C, Akker Y, et al.

Montefiore Medical Center,
Department of Pathology,
North 4, 111 East 210th
Street, Bronx, NY 10467,
USA

Am J Hematol
2003, 74: 9-16.

MDSは、しばしば細胞遺伝学的異常を伴うクローナルな造血幹細胞障害である。この疾患は新規あるいは治療に関連して発生しうる。MDSの芽球については幅広く研究されてきたが、成熟非芽球性骨髓系細胞(NBMCs)についての報告はほとんどない。著者らは、retrospectiveに症例対照研究を行った。MDS 48例と非腫瘍性対照群12例の骨髓中のNBMCsを平均側方散乱光(SSC)チャンネル数と異常な細胞表面抗原の発現を用いた、多項目フローサイトメトリーにより解析した。MDS症例は、細胞遺伝学的異常に基づいて層別化された。正常核型のMDS患者のNBMCsは、対照群と比べてHLA-DR発現が有意に亢進していた($p = 0.034$)。細胞遺伝学的異常を伴い、骨髓芽球が5%以上のMDS患者のNBMCsは、対照群と比べてCD34およびHLA-DR発現が有意に亢進していたが、CD10と平均SSCチャンネル数は低値であった。細胞遺伝学的異常の有無に有意差を認めなかったが($p > 0.05$)、NBMCsでのCD34発現は、新規MDSと比べると治療関連性MDSで有意に亢進していた($p = 0.01$)。これらのデータは、MDSの骨髓成熟NBMCsが、健常対照群には認められない表現型変化をもつことを示唆している。

34

ALLとリンパ腫症例における抗アスパラギナーゼ抗体の免疫学的交差反応の評価

Evaluation of immunologic crossreaction of anti-asparaginase antibodies in acute lymphoblastic leukemia (ALL) and lymphoma patients

Wang B, Relling MV, Storm MC, et al.

Department of Hematology and Oncology, St. Jude Children's Research Hospital, 332 N. Lauderdale Street, Memphis, TN 38105-2794, USA

Leukemia
2003, 17: 1583-1588.

化学療法中に薬剤過敏反応を認めた、または認めなかった ALL/リンパ腫症例において、1種類のアスパラギナーゼ製剤に対する抗体によって、他のアスパラギナーゼ製剤に対する抗体の出現がどの程度予測でき相関するのかを評価した。新たに ALL またはリンパ腫と診断された小児 24 例において、多剤併用の寛解導入療法と再寛解導入療法の一部としての大腸菌アスパラギナーゼ 10,000 IU/m² 筋注を週 3 回、計 9 回の投与と、維持療法の最初の 7 ヶ月間に月 1 回、計 7 回の投与について調査した。寛解導入療法の前と後で血漿サンプルを集めた。24 例中 6 例は臨床的反応が出現しなかった（未反応群）ので、大腸菌製剤のみを投与された。アレルギー反応を起こした 18 例（反応群）について *Erwinia* アスパラギナーゼの投与に切り替えたところ、1 例がアナフィラキシー様反応を起こしたので、ポリエチレングリコール (PEG) アスパラギナーゼ投与に切り替えた。ELISA 法により、3 種類すべてのアスパラギナーゼに対する抗体レベルを測定した。導入療法後の大腸菌に対する抗体は、反応群 (0.063 ± 0.066) において未反応群 (0.019 ± 0.013) よりも高かった ($p = 0.03$)。再導入療法後の抗 *Erwinia* アスパラギナーゼ抗体は、反応群 (0.431 ± 0.727) が未反応群 (0.018 ± 0.009) よりも有意に高かった ($p = 0.007$)。検出された抗大腸菌アスパラギナーゼ抗体は、導入療法後 ($r = 0.714$, $p < 0.001$) および再導入療法後 ($r = 0.914$, $p < 0.001$) に検出された抗 PEG 抗体と相関したが、導入療法後 ($r = 0.119$, $p = 0.580$) および再導入療法後 ($r = 0.078$, $p = 0.716$) に検出された抗 *Erwinia* アスパラギナーゼ抗体とは相関しなかった。この結果から、患者の抗大腸菌アスパラギナーゼ抗体の自然獲得と抗 PEG アスパラギナーゼ抗体出現との間には交差反応性があるが、抗 *Erwinia* アスパラギナーゼ抗体出現には交差反応性がないことが示唆される。

35

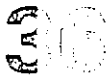
HLA 適合同胞ドナーを用いた造血幹細胞移植において、移植後の G-CSF の投与と II～IV 度の急性 GVHD の頻度の増加に関連が認められた

G-CSF given after haematopoietic stem cell transplantation using HLA-identical sibling donors is associated to a higher incidence of acute GVHD II-IV

Huddinge 大学病院において 1993～2001 年までに HLA 適合同胞ドナーより造血幹細胞移植 (HSCT) を施行された 155 例につき、移植後に投与される G-CSF の効果を検討した。血液悪性腫瘍の患者のみを対象とした。前処置として 118 例に全身放射線照射 (TBI) を行い、37 例にブスルファンを投与した。GVHD 予防のために、全例にメトトレキサ-

Remberger M, Naseh N, Aschan J, *et al.*
Clinical Immunology,
Huddinge University
Hospital, SE-141 86
Stockholm, Sweden
Bone Marrow Transplant
2003, 32: 217-223.

ト+シクロスポリンを併用投与した。155例のうち66例(43%)でHSCT後にG-CSFが投与された。G-CSFを投与された症例では、好中球の生着までの期間が有意に短かった($p < 0.001$)。G-CSFの投与は、赤血球輸血や血小板の生着、感染症には効果が認められなかった。しかし、G-CSFの投与を受けた患者群では投与を受けなかった患者群に対し、II～IV度の急性GVHDの頻度が有意に高かった(34% vs 9%, $p < 0.001$)。多変量解析では、G-CSFの効果がII～IV度の急性GVHDの他の既知のリスクファクターとは独立していることが示された。GVHDによる死亡は、2群においてそれぞれ4例と2例で認められた($p = 0.06$)。移植関連死や生存、慢性GVHD、再発、非再発生存の累積発生率は2群間で同等であった。結論として、HLA 適合同胞間におけるHSCT後のG-CSF投与はII～IV度の急性GVHDの危険性を高めはするが、移植関連死には関係しない。

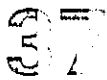


骨髓非破壊的造血細胞移植後の再発・進行に対する治療成績—— 予後に対する治療介入の効果

Relapse or progression
after hematopoietic cell
transplantation using
nonmyeloablative
conditioning: Effect of
interventions on outcome
Bethge WA, Storer BE, Maris
MB, *et al.*
Fred Hutchinson Cancer
Research Center, 1100
Fairview Avenue N., Seattle,
WA 98109-1024, USA
Exp Hematol
2003, 31: 974-980.

目的：骨髓非破壊的同種造血細胞移植(HCT)後に悪性腫瘍が再発・進行した患者に対する再寛解導入を目指した治療介入の効果を解析した。
方法：造血器悪性腫瘍に対してHCT療法を受けた224例のうち原疾患の再発・進行のみられた81例についてretrospectiveに解析を行った。すべての症例は2Gyの全身放射線照射(TBI)のみ、または2GyのTBIとフルダラビンでの前処置と、ミコフェノール酸モフェチルとシクロスポリンによる移植後免疫抑制療法を受けた。結果：再発・進行から12ヵ月後の全生存率は36%であった。再発・進行のみられた81例のうち15例は治療介入を行わなかったが、うち12例が病勢の進行により死亡し、3例(20%)が生存している。81%にあたる66例が何らかの治療介入を受けた(32例が免疫抑制剤の中止、13例がドナーリンパ球輸注、21例が化学療法)。66例中20例(30%)が生存しており、5例が完全寛解、4例が部分寛解、1例が不変であり、10例では病勢が進行した。治療介入の全奏効率は27%であった。治療介入を受けた症例のうち46例(70%)が死亡したが、その主な死因は再発・進行であった。再発・進行後に治療介入を受けなかった群の推定1年生存率は15%であったのに対して、治療介入を受けた群は41%であった。治療介入を受けた群の生存率に寄与した因子は、治療反応性($p = 0.002$)、原疾患($p = 0.001$)、移植から再発までの期間($p = 0.0005$)であった。結論：骨髓非破壊的HCT後に再発または進行した患者の予後は全体として不良であるが、免疫療法と化学療法の併用などの治療介入は生存率を改善する可能性

がある。



慢性 GVHD による血小板減少症の 2 症例においてみられた末梢血トロンボポイエチン濃度と血小板数との関連

Thrombopoietin concentrations in peripheral blood correlated with platelet numbers in two patients with thrombocytopenia by chronic graft-versus-host disease

Hirayama Y, Sakamaki S, Tsuji Y, *et al.*
Internal Medicine, Higashi Sapporo Hospital, Shiroishi-ku Higashi Sapporo 3-3, Sapporo, 003-8585, Japan
Am J Hematol
2003, 73: 285-289.

血小板減少症は、慢性 GVHD (cGVHD) における臨床症状の 1 つとして知られている。しかしながら、血小板減少症の原因が説明できない症例が存在する。近年、骨髓 (BM) 間質細胞由来のトロンボポイエチン (TPO) と、血小板・巨核球由来のトランスフォーミング増殖因子 (TGF)- β が、生体内における巨核球産生の強力な正および負の制御因子として同定された。著者らは、BM における TPO 産生の減少が cGVHD 患者における血小板減少症の一因であるとの仮説を立てた。よって、この研究では、HLA の適合した親族からの幹細胞移植を受け、引き続き重度の血小板減少症を伴う cGVHD を発症した 2 例の急性白血病患者において、末梢血 (PB) と BM における TPO と TGF- β の濃度を連続的に測定した。その結果、血小板数は TPO 濃度と関連しており、また、その濃度は PB よりも BM において恒常的に高いことが示された。BM と PB の TPO の濃度差は血小板数が低いときには減少し、BM 由来の TPO 産生量が血小板減少症を併発している期間中減少していることを示唆した。TGF- β の濃度は、すべての測定期間において正常であった。以上の著者らの結果により、cGVHD 患者における血小板減少症の 1 つの機序は、BM 細胞による TPO 産生量の低下であることが示唆された。

略語一覧

AIDS	後天性免疫不全症候群	HPLC	高速液体クロマトグラフィ
AIHA	自己免疫性溶血性貧血	Ht	ヘマトクリット
ALG	抗リンパ球グロブリン	³ H-TdR	トリチウム化チミジン
ALL	急性リンパ性白血病	HTLV	ヒトT細胞白血病ウイルス
AML	急性骨髄(芽球)性白血病	ICAM-1	intercellular adhesion molecule-1
ANLL	急性非リンパ性白血病	IDDM	インスリン依存性糖尿病
APL	急性前骨髄球性白血病	IFN	インターフェロン
APTT	活性化部分トロンボプラスチン時間	Ig	免疫グロブリン
Ara-C	シトシンアラビノシド	IL	インターロイキン
ATP	アデノシン三リン酸	ITP	特発性血小板減少性紫斑病
B-CLL	B細胞性慢性リンパ性白血病	LAK	リンホカイン活性化キラー
BFU-E	赤血球コロニー形成細胞	LDL	低比重リポ蛋白
cAMP	サイクリックアデノシン-リン酸	LGL	大顆粒性リンパ球
cDNA	相補的デオキシリボ核酸	LPS	リポ多糖体
CFU	コロニー形成単位	Mφ	マクロファージ
CFU-Eo	好酸球コロニー形成単位	M-CSF	マクロファージコロニー刺激因子
CFU-GEMM	顆粒球, 赤血球, 巨核球, 大食細胞コロニー形成単位	MDS	骨髄異形成症候群
CFU-GM	顆粒球マクロファージコロニー形成単位	M/E比	顆粒球赤血球比
CFU-Meg	巨核球前駆細胞コロニー形成単位	Meg-CSF	巨核球コロニー刺激因子
CFU-S	脾コロニー形成単位	MG	ミクログロブリン
CLL	慢性リンパ性白血病	MHC	主要組織適合遺伝子複合体
CML	慢性骨髄性白血病	mRNA	メッセンジャーリボ核酸
ConA	コンカナバリンA	NADP	ニコチナマイドアデニンジヌクレオチドホスフェート
CR	補体レセプター	NADPH	還元型NADP
CSF	コロニー刺激因子	NK細胞	ナチュラルキラー細胞
DNA	デオキシリボ核酸	PCR	ポリメラーゼ連鎖反応
DR	D関連抗原	PDGF	血小板由来成長因子
EBウイルス	Epstein-Barrウイルス	Ph ¹	フィラデルフィア染色体
EDTA	エチレンジアミンテトラ酢酸	PHA	フィトヘムアグルチニン
EIA	酵素免疫定量法	PNH	発作性夜間血色素尿症
ELISA	酵素免疫測定法	PWM	pokeweed mitogen
EPO	エリスロポエチン	r~	組み換え型~
Fab, F(ab') ₂	抗原結合フラグメント	RA	慢性関節リウマチ
FAB分類	(仏米英グループ) 急性白血病の形態学的分類法	RIA	ラジオイムノアッセイ(放射免疫測定法)
FACS	蛍光活性化細胞選別	RNA	リボ核酸
G-CSF	顆粒球コロニー刺激因子	SCID	重症複合免疫不全症
GM-CSF	顆粒球マクロファージコロニー刺激因子	SDS	ドデシル硫酸ナトリウム
GVH	対宿主移植片	SLE	全身性エリテマトーデス(汎発性紅斑点性狼瘡)
GVHD	移植片対宿主病	T-ALL	T細胞性急性リンパ性白血病
GVHR	移植片対宿主反応	TdT	終末デオキシヌクレオチド転換酵素
Hb	ヘモグロビン	TNF	腫瘍壊死因子
HDL	高比重リポ蛋白	t-PA	組織プラスミノーゲン活性化物質
HE染色	ヘマトキシリン・エオジン染色	VLDL	超低比重リポ蛋白
HIV	ヒト免疫不全症ウイルス	vWF	von Willebrand 因子
HLA	ヒト白血球抗原	WBC	白血球

特集 知っておきたいゲノムの知識

ゲノムと技術

間野 博行

J I M

第14巻 第2号 別刷
2004年2月15日 発行

医学書院

ゲノムと技術

間野 博行

Question&Answer

Q：ヒトゲノムの解明が医療・医学にもたらす影響は？

A：多くの疾患の発症・進展のメカニズムが、これまでにないスピードで解明されていく。さらに、これらの知見を基にした新しい疾患分類法、診断法および治療法が提案されるようになる。

Keyword：PCR法、ゲノムワイドスクリーニング、DNAチップ。

ヒトゲノムの塩基配列解明とともに、ヒトのもつ全遺伝子セットが明らかになりつつある。蛋白質をコードしない遺伝子がどの程度あるかは未だ不明であるが、蛋白質を作る一般的な遺伝子のほぼすべてが決定される日は近い。21世紀の医療・医学はこの膨大なヒトゲノム情報によって大きく変革されると期待される。現在なお病因が不明な疾患の発症機構はこれまでにないスピードで解明されると考えられ、それに伴い疾患の診断法・治療法も大きな変化を余儀なくされるであろう。さらに、遺伝子異常を基にした新しい疾患概念の定義、分類の変更も現実のものになるであろう。本稿では、今日の医療の場において利用される遺伝子診断法を概説するとともに、DNAチップを初めとした新しいゲノミクス技術についても紹介したい。

Polymerase chain reaction (PCR) 法

PCRは、任意の遺伝子領域を試験管のなかできわめて簡便に増幅する代表的な手技であり、数時間の反応で100万倍ほどの増幅率を得ることも困難ではない。実際には、増幅したいDNA領域の両端に結合する短いDNA断片(プライマー)を基質となる微量のDNAと混和し、DNA合成酵素

を働かせる。すると、プライマーを先頭としてDNAが合成されていくが、ここでいったん試験管を熱し、作成された2本鎖DNAを解離させる。その後もう1度冷やすことにより、新たなプライマーの結合が生じ、再びDNA合成酵素を働かせることでプライマーからの新しい合成が起きる。これをn回繰り返すと、理論的にはプライマーで挟まれた領域が 2^n 倍に増幅されることになる(図1)。

PCRを応用することで、健常者には「存在しない」が特定の疾患のみで「存在する」ようなDNA/RNA断片を、きわめて高感度かつ信頼性良く検出することができる。PCRによる診断法の応用範囲は広いが、たとえば感染症の遺伝子診断などはその最も良い例であろう。今日の医療においても、PCR法を用いることで、結核菌やC型肝炎ウイルスをきわめて感度良く検出することができる。

現在臨床の場で行われているPCRの他の適応として、「疾患特異的染色体転座」の検出がある。たとえば、慢性骨髄性白血病のほぼ全例および急性リンパ性白血病の一部において、9番染色体と22番染色体の相互転座であるt(9;22)が認められ、その結果BCR遺伝子とABL遺伝子との融合遺伝子BCR-ABLが生じることになる。今この融合点をまたぐようにBCRとABL両遺伝子中に

プライマーを設定しPCR反応を行うと、両遺伝子の融合産物のみを増幅可能である。健常者においては、9番と22番染色体は物理的につながっていないためPCR産物は作られない。また、これまで白血病の「完全寛解」は「骨髄中に幼若芽球が5%以下しか存在しない」ことによって定義されてきたが、PCRを用いれば、たとえば100万個の血液細胞中に1個でも白血病細胞が残っていれば検出できるのだ¹⁾。現在ではこのようにして、微少残存白血病細胞をきわめて高感度に検出でき、それを基に患者さんの治療戦略を変更することが可能である。さらに最近は、real-time RT (reverse transcription)-PCR法、TaqMan RT-PCR法など、遺伝子発現量を定量的に評価するPCR法も広く用いられるようになってきている。

新しい技術

旧来のPCR法、サザンブロット法(DNAを検出する)、ノーザンブロット法(mRNAを検出する)などは原則的に1~数種類の遺伝子(あるいは蛋白質)の解析を前提とした技術であり、たとえば1度に数百の標的を解析することは不可能であった。しかし近年、ヒトゲノム情報を直接利用する全く新しい技術が開発されつつある。

■ DNA チップ

たとえばDNAチップ・DNAマイクロアレイ(以下、DNAチップ)を用いることで、何万種類もあるヒト全遺伝子の発現量を簡便に測定することも可能になってきた。DNAチップは、スライドガラスなどの小さな担体上にきわめて高密度にDNA断片あるいはオリゴヌクレオチドを配置したもので、1度の実験でこれらすべての遺伝子の発現量を定量可能である(図2)²⁾。1枚のスライド上に3万種類上のヒト遺伝子すべてのcDNAをセットすれば、1回の実験で「ヒト全遺伝子の発現スクリーニング」という夢のような解析が可能

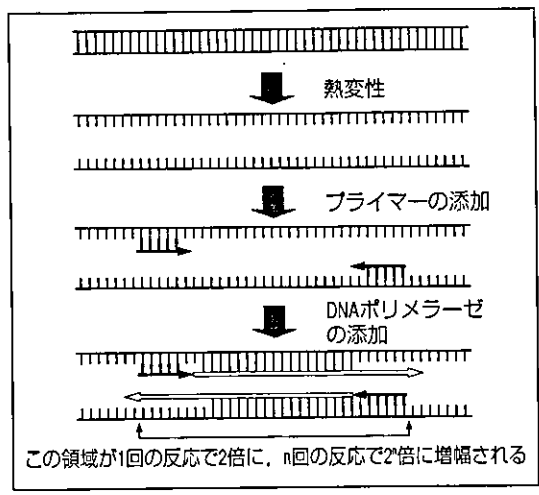


図1 PCR法のメカニズム

基質DNAを熱変性後、プライマーを添加しDNA合成酵素を作用させることで、プライマーから相補的なDNA鎖を合成する。その後「熱変性-プライマーの結合-DNA合成」を繰り返すことで、指数関数的にプライマーで挟まれた領域を試験管内で増幅可能である。RNAに関しても、逆転写酵素でいったんcDNAとすることで、同様に増幅できる。

になる。すなわち、ヒトにおける任意の細胞および組織における遺伝子発現プロファイル(JI)全体を、直接比較することができるのだ。たとえば、このような全ヒト遺伝子チップを用いて、ある疾患の患者20名と健常者20名のサンプルを比較することにより、疾患患者においてのみ発現が上昇(あるいは低下)する遺伝子が同定できるであろう。これらの遺伝子は診断用遺伝子マーカーとしてきわめて有用だけでなく、疾患発症自体の原因となっている可能性も高い。さらに、これまでは鑑別診断に苦慮していた類縁疾患AとBとを直接比較することで、新しい診断法も提示できると予想される³⁾。

JIMノート

J1 遺伝子発現プロファイル

任意の遺伝子に関する発現量、あるいはその変化のパターンなどの特徴を総称する言葉。近年は、任意の細胞や組織におけるすべての遺伝子に関する発現様式(=トランスクリプトーム)についても用いられることが多い。

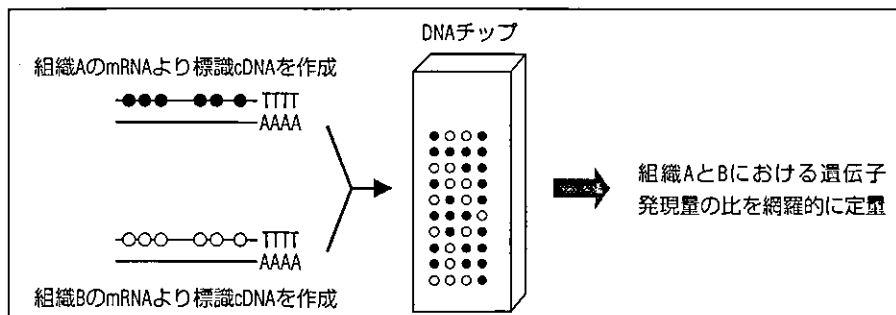


図2 DNAチップ実験の原理

組織AとBとの間で遺伝子発現プロファイルを比較したい場合、まず組織AとBそれぞれから等量のmRNAを調整する。次にこれらmRNAからオリゴdTプライマーと逆転写酵素(RT)を用いてcDNAを合成する。その際に蛍光色素であるCy3あるいはCy5で標識したdUTPをそれぞれに加えることで、各組織由来のcDNAを異なる蛍光色素で標識する。この標識cDNA混合物を、DNAチップとハイブリダイゼーションさせることで、各スポットに標識cDNAが結合する。その結果、任意のスポット上の遺伝子に関する組織Aと組織Bにおける発現量の比は、Cy3とCy5との蛍光強度の比で表されることになる。

しかし、DNAチップがその新しいパワーを最も発揮できる局面は、「疾患の分類」自体を再定義できることではないだろうか。たとえば、多くの癌はその細胞の形態からサブグループが定義されてきたが、DNAチップを用いた解析によって「治療に対する反応性」自体を規定する遺伝子が検出可能であるし、それら遺伝子の発現量に依存した形での疾患の新しい分類法が提唱されるであろう。そうやってこそ初めて、「臨床診断に応用される簡易DNAチップ」が現実のものになると思われる。

■ 遺伝子多型解析

ヒト染色体上には数百塩基対に1つ程度の割合で配列の多様性があり、なかでも1塩基の多型(single nucleotide polymorphism: SNP)が代表的である。ある遺伝子のプロモーター配列上にSNPが存在すれば、その配列に依存した形で遺伝子発現量に変化することが予想される。同様にSNPがエキソン上にあれば、mRNAの安定性や、コードする蛋白質の配列自体に影響を及ぼすこともある。このようなSNPに代表される遺伝子多型は、各個人の生活習慣病への罹りやすさや、薬

剤の代謝能力を直接反映していると予想されており、いわば「遺伝的個性」を規定すると考えられる。

多型をゲノムワイドで解析する技術も急速に進歩しており、TaqMan PCR法、Invader法などさまざまな方法が広く用いられている。またSNP解析専用のDNAチップも市販されており、これらの技術を通して、疾患関連SNPの同定が世界中で大規模に試みられている⁴⁾。

文献

- 1) Ben-Yehuda D, et al : Molecular follow-up of disease progression and interferon therapy in chronic myelocytic leukemia. *Blood* 90 : 4918-4923, 1997.
- 2) 間野博行 : DNAチップ法. 横田昇平(編) : 血液・固形腫瘍診断マニュアル, pp70-75, フジメディカル出版, 2002.
- 3) Oshima Y, et al : DNA microarray analysis of hematopoietic stem cell-like fractions from individuals with the M2 subtype of acute myeloid leukemia. *Leukemia* 17 : 1990-1997, 2003.
- 4) Ozaki K, et al : Functional SNPs in the lymphotoxin- α gene that are associated with susceptibility to myocardial infarction. *Nat Genet* 32 : 650-654, 2002.

まのひろゆき

自治医科大学ゲノム機能研究部

〒329-0498 栃木県河内郡南河内町薬師寺 3311-1

Tel : 0285-58-7449 Fax : 0285-44-7322

血液・免疫・腫瘍 BIC Forum

別冊

メディカルレビュー社

7 ゲノミクス解析に基づく白血病治療

間野 博行*

Key Sentences

- ①DNA マイクロアレイによる遺伝子発現プロファイルによって白血病の新しい鑑別診断が可能になる。
- ②遺伝子発現プロファイルを利用することで、治療反応性を予測可能な新しい疾患グループが定義できる。
- ③遺伝子多型を解析することで代表的な白血病治療薬の最適量を患者個人に最適化できる。

Key Words

急性骨髄性白血病, 悪性リンパ腫, 多発性骨髄腫, GST

はじめに

約 30 億塩基対におよぼヒトゲノムの核酸配列を決定する大規模事業である「ヒトゲノムプロジェクト」がついに 2003 年 4 月に終了宣言を行い、ヒト染色体の euchromatin 領域のほぼ完全な塩基配列が決定された (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/seq/>)。現在これら配列上に遺伝子を割り付ける作業が行われており、

ヒトの持つ総遺伝子数はおそらく 3 万種類前後になると予想されている。現段階では遺伝子予測プログラムの精度などの問題から実際的な全遺伝子構造の解明にはまだ時間がかかるが、かつて夢であったヒトの全遺伝子プールの全貌がいよいよ明らかになるとうとしている。

これからの「ポストゲノム」時代においては、造血器悪性腫瘍の臨床も大きく様変わりすることが予想される。例えば疾患の分類・カテゴリーについても、旧来の診断法に大きく寄与していたものは病理学すなわち「疾

Genomics-based medicine for leukemias

* MANO Hiroyuki : 自治医科大学ゲノム機能研究部教授

表1 AMLにおける予後関連遺伝子

VDAC1	ZYX	VAT1	NPC2	AZU1
ECGF1	HOMER-3	PGD	ENSA	TKT
BST1	STK17B	CDK6	RAB32	PTP4A2
APLP2	CYLN2	OGT	HNRPD	POLR2H
TIAL1	ATP6F	NME1	GRIK5	CD14
GABARAP	NFKBIA	GCN5L2	HSPE1	LBR
ECE2	BZRP	XPO1		

(文献5より改変, 引用)

患責任細胞の形態学的変化」であった。しかし例えばこれまでの分類では単一の「白血病」と考えられていたものでも、実際の患者1人ひとりの治療反応性は大きく異なる。ある患者では骨髄移植を行っても短期間の内に白血病の再発が生じる一方、別の患者では化学療法で速やかに治癒がもたらされる。今後の医療においては、ゲノミクス技術を駆使した大規模な疾患細胞の情報が蓄積され、これを基にした新たな層別治療が可能になると期待される。各患者の治療反応性の違いを精度良く予測する方法の開発も可能になるであろうし、また例えば特定の薬を使うことによって生じる副作用の種類・程度を予測することも可能ではないであろうか？

新しい疾患の分類法

疾患責任細胞のダイナミックな遺伝子変化をリアルタイムに把握し、疾患の予後に直結した分類法・診断法の開発の上では、DNAマイクロアレイを中心とした網羅的遺伝子発現解析が有用である²³⁾。例えば白血病の診断を行う場合、旧来では患者骨髄細胞を①ペルオキシダーゼ、エステラーゼなどの特殊染色、②FACSを用いた細胞表面マーカーの解析、③遺伝子異常の有無の解析(免疫グロブリン遺伝子やT細胞表面受容体遺伝子の再構成、*BCR-ABL* 遺伝子、*PML-RAR α* 遺伝子などの有無)、④染色体型の解析、などの情報を基にそれぞれの疾患におけるFAB分類を行ってきた²⁴⁾。これらを総合的に解析することで予後にある程度リンクした診断が行えるが、上記の解析を全て行うのは煩雑であり多くの専門技術も必要とする。一方、例えば一枚のDNAマイク

ロアレイを用いることで旧来の方法で得られる情報がすべて解析可能となれば、診断はより簡便になりかつ異なった施設間での診断の一致率も上昇するであろう。

このようなDNAマイクロアレイを用いた診断の試みとしてGolubらは、6817遺伝子を配置したDNAマイクロアレイによる発現プロファイルに基づいて、急性骨髄性白血病(AML)と急性リンパ性白血病(ALL)とを鑑別する可能性について検討した²⁵⁾。AML 11例、ALL 27例をこのDNAマイクロアレイによって解析した結果、約50個の遺伝子がAMLとALLの間で偏って発現していることが明らかになった。そこでこれら“informative genes”から20個の遺伝子を選びそれらの発現量の偏りの程度を数値化したものを実際の発現量をかけあわせ合計することで、それぞれの患者のAMLあるいはALLの確からしさを数値化した。本法を患者におけるAMLとALLの鑑別診断に応用してみると38例中34例で正しい診断が行われ、1例不明、3例が誤診であった。したがってある程度の確からしさを持ってDNAマイクロアレイによる疾患診断が可能であることがわかった。

一方DNAマイクロアレイによる解析は新しい疾患分類法の開発にも有用である。Yagiらは小児AML患者54例についてAffymetrix社GeneChip HGU 95 Aチップを用いた遺伝子発現解析を行い、小児AML内での予後良好群と不良群とを予測する試みを行っている²⁶⁾。彼らのサンプル内で3年以上完全寛解を維持している症例9例と初回緩解導入に失敗した症例9例の間で発現量が統計的に異なる遺伝子35種類を抽出し(表1)、これら予後関連遺伝子の発現をもととして、患者全体を2wayクラスタリング法あるいはsupported vector

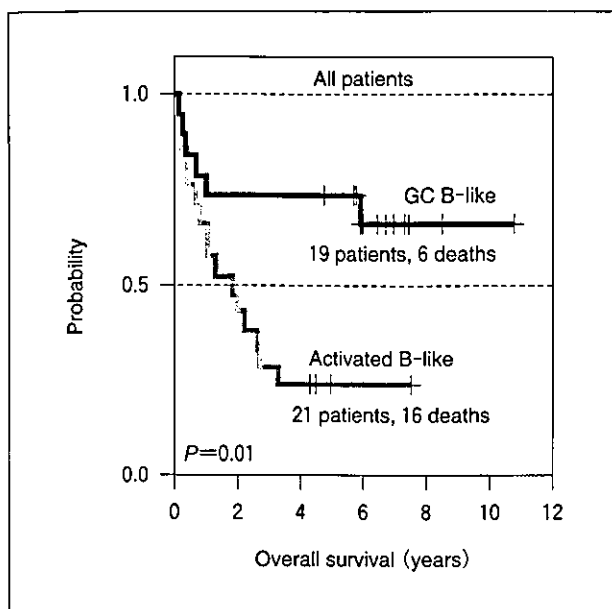


図1 びまん性大細胞型リンパ腫の予後

びまん性大細胞型悪性リンパ腫患者を、リンパ節の遺伝子発現プロファイルから「濾胞中心 B リンパ球に発現パターンが似たサンプル群 (GC B-like)」と「活性化 B リンパ球に似た群 (Activated B-like)」に分け、両者の生命予後をグラフ (Kaplan-Meier 解析) にした。後者が有意に予後不良群であることがわかる。

(文献 6 より改変、引用)

machine (SVM) 法によって層別化した。その結果どちらの方法によっても AML 内で生命予後が異なるサブグループを検出することに成功している。すなわち遺伝子発現プロファイルを基にした新しい疾患分類法の可能性が提示されたことになる。

悪性リンパ腫についても、Alizadeh らは DNA アレイを用いて非 Hodgkin リンパ腫の 1 つであるびまん性大細胞リンパ腫の新たな予後予測法の開発を試みている⁶⁾。その結果、びまん性大細胞リンパ腫には濾胞中心 B リンパ球に遺伝子発現パターンが似ている群と活性化 B リンパ球に似ている群が存在することが示され、しかも両群間で予後に有意な差が認められることが明らかになった。すなわち活性化 B リンパ球に似た細胞からなるリンパ腫患者の 5 年生存率 (16%) は濾胞中心 B リンパ球に似た細胞からなるリンパ腫患者のそれ (76%) に比べて有意に低いことがわかった (図 1)。このことは DNA マイクロアレイによる解析で非 Hodgkin 悪性リンパ腫

の新たなサブグループが定義可能なこと、しかもその分類が予後判定に有意な情報を与えることを示唆しており、今後の臨床における DNA マイクロアレイの新たな可能性を示したものとして意義深い。

多発性骨髄腫 (multiple myeloma ; MM) は CD 138 陽性形質細胞の腫瘍性増殖であるが、Zhan らは MM 内の予後良好群と不良群を鑑別する目的で、CD 138 に対するアフィニティカラムを用いて同分画を純化しアレイ解析を行っている⁷⁾。具体的に健常者 31 例、MGUS 患者 5 例および MM 患者 74 例の骨髄より形質細胞分画を純化し、Affymetrix 社の GeneChip HuGeneFL チップ (~6800 遺伝子) による実験を行った。これら発現データを基に MM サンプルの系統樹を作成すると、図 2 に示されるように大きく同患者が 4 種類のサブグループ (MM 1 ~ MM 4) に別れることが明らかになった。しかも MM 1 は monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) に最も近い遺伝子発現プロファイルをもち、一方 MM 4 グループは骨髄腫細胞株に最も近似したプロファイルをもつことも示された。すなわち MM 内のこれらサブタイプが患者の予後にリンクする可能性が示唆されたのである。

遺伝子多型解析

ヒトゲノムの解明が医学・医療にもたらす第二の革新は個人の持つ先天的なゲノムの多様性・個性の解明であろう。ヒトゲノムの配列は各個人間で完全に同じではなく、例えばアングロサクソンとコーカシアンでは人種特異的な塩基配列の違いが存在することが知られる。また例えば同じ日本人の中でも地域によって固有の塩基配列の多型があり、さらに部分的には各家系、個人にも固有の配列多型があると思われる。一塩基多型 (single nucleotide polymorphism ; SNP) が話題に上ることが多いが、これら SNP を含む遺伝子配列の多型が個人の遺伝的個性を決定していると予想される。

今後の白血病臨床における遺伝子多型が持つ重要な意義は、薬剤感受性あるいは薬剤の副作用発症の予測である⁸⁾。例えばアミノグリコシド系抗生剤の重要な副作用

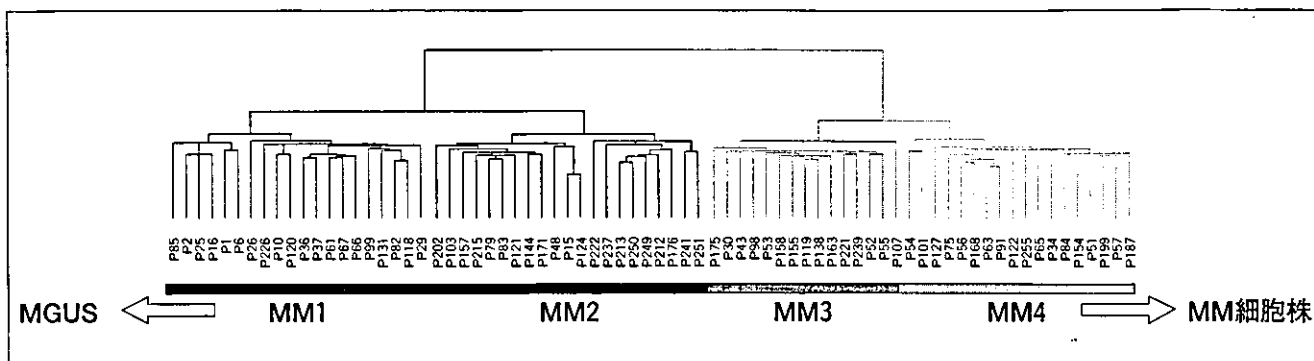


図2 MM患者サンプルの遺伝子発現プロファイルによる系統樹

MM患者74例の骨髄CD138陽性細胞における遺伝子発現プロファイルを基にサンプルの系統樹を作成したところ、MM1～MM4までの4種類のサブタイプに大きく分類されることが示された。なおMM1はMGUSのCD138陽性細胞に似た発現プロファイルを持ち、MM4は骨髄腫細胞株群と似たプロファイルを持つ。

(文献7より改変、引用)

用に難聴があるが、薬剤投与の結果難聴が生じるのはごく一部の患者のみである。詳細な解析の結果12SリボソームRNA遺伝子にA1555G変異があると重度の難聴が発症することがわかっており、このような多型をあらかじめ検査することで副作用の発生を最小限にとどめることが可能になるであろう。

一方有効な抗癌剤を選択する上でも遺伝子多型は重要な評価ポイントとなるであろう。細胞内は常に酸化ストレスにさらされている状態であり、真核生物にはこのような酸化状態から細胞を守る様々なメカニズムが存在する。その代表的なものがグルタチオンを利用した還元系であり、なかでもglutathione S-transferase (GST)は重要な役割を担っている¹⁰⁾。GST活性は重要な抗アポトーシス因子であり、実際ある種の癌細胞においては亢進したGST活性により抗癌剤が無効になる。しかもGST遺伝子ファミリーは遺伝子多型が豊富なことでも知られており、遺伝子の配列異常、欠失を含む変化が抗癌剤感受性を直接制御している。代表的な薬剤感受性・毒性関連遺伝子多型に関する個人情報が入力された電子カードをもって診療を受ける、というような時代も遠からず訪れるのではないだろうか。

最後に

ヒトゲノムの完全版配列が完成しても、そこに存在する遺伝子の多様性はまだ十分に解明されていない。これまで「遺伝子」は暗黙のうちに「蛋白をコードする単位」と考えられていたが、意外にもたとえ長大なmRNAを作っても蛋白をコードする領域を持たない「遺伝子」が極めて多く存在することもわかってきた¹¹⁾。また数は少ないもののmicroRNAと呼ばれる20-30塩基の短いRNAも全く異なった生理機能を持って存在しているらしい。ヒトゲノムプロジェクトの成果を医療・社会へフィードバックする事業はまだ始まったばかりである。この分野の進歩においてもわが国から多くの貢献がなされることを期待したい。

文献

- 1) Duggan DJ, Bittner M, Chen Y, et al : Expression profiling using cDNA microarrays. *Nat Genet* 21 : 10-14, 1999
- 2) Cheung VG, Morley M, Aguilar F, et al : Making and reading microarrays. *Nat Genet* 21 : 15-19, 1999
- 3) Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, et al : Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. A report of the French-American-British Cooperative Group. *Ann Intern Med* 103 : 620-625,

1985

- 4) Golub TR, Slonim DK, Tamayo P, et al : Molecular classification of cancer : class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science* 286 : 531-537, 1999
- 5) Yagi T, Morimoto A, Eguchi M, et al : Identification of a gene expression signature associated with pediatric AML prognosis. *Blood* 102 : 1849-1856, 2003
- 6) Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, et al : Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* 403 : 503-511, 2000
- 7) Zhan F, Hardin J, Kordsmeier B, et al : Global gene expression profiling of multiple myeloma, monoclonal gammopathy of undetermined significance, and normal bone marrow plasma cells. *Blood* 99 : 1745-1757, 2002
- 8) Roses AD : Pharmacogenetics and the practice of medicine. *Nature* 405 : 857-865, 2000
- 9) Relling MV and Dervieux T : Pharmacogenetics and cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 1 : 99-108, 2001
- 10) Tew KD : Glutathione-associated enzymes in anti-cancer drug resistance. *Cancer Res* 54 : 4313-4320, 1994
- 11) Ota T, Suzuki Y, Nishikawa T, et al : Complete sequencing and characterization of 21, 243 full-length human cDNAs. *Nat Genet* 36 : 40-45, 2004

予後の予測
急性白血病

間野 博行

臨床医

Vol. 30 No. 12 別刷

2004年12月10日発行

中外医学社

1. 急性白血病

間野博行

急性白血病の治療戦略は、アントラサイクリン + シトシンアラビノシドを中心とする化学療法と骨髄移植療法とを二本柱としたプロトコルで組み立てられてきた。しかし近年、白血病の病態解明と臨床データが蓄積されるに従い、各患者個人に最適化された治療スケジュールの構築が求められている。急性白血病はきわめて多様な病因・臨床像からなるいわば症候群のようなものであるため、白血病患者への治療法の最適化のためには、白血病の成因・予後因子に応じた形での新たな患者層別化が必要であろう。そのよい例としてt(15;17)を有する急性前骨髄球性白血病 (APL) があげられる。この染色体転座の結果、レチノイン酸受容体 (RAR α) と PML との融合蛋白質が産生されるが、本分子を標的とした all-trans retinoic acid は APL の寛解導入に著効するのである。

これまで急性白血病の分類には、主に白血病細胞の形態学を基盤とした French-American-British グループ (FAB) 分類¹⁾ が利用されてきたが、近年の遺伝子解析の知見を取り入れた World Health Organization (WHO) 分類が1999年に提唱された²⁾。しかしながら、これらの分類法は各患者の予後予測にはいまだ不十分であり、たとえばDNAマイクロアレイによる網羅的発現解析データを取り入れる工夫などが試みられている。

急性骨髄性白血病 (AML)

旧来の FAB 分類では、APL に相当する M3 サブタイプが予後良好なこと、また未分化なタイプの M0 および赤白血病 M6、巨核芽球性白血病 M7 が予後不良なことが知られていた。しかしながら、症例数の多い M1 や M4 サブタイプの患者予後は均一ではなく、新たな層別化のマーカーが待たれていた。その後、AML においてしばしば観察される染色体転座の原因遺伝子が同定され、これら染色体異常と各患者予後との詳細な解析がなされるに至った。

現段階では、これらの知見を取り入れた核型による患者層別化がシンプルでかつ AML の予後予測に最も有効なものといえる。Medical Research Council (MRC) による1,600例に及ぶAML患者の核型解析の結果、表1に示される患者層別化が

表1 核型に基づくAMLサブグループの定義

グループ	核型
favorable	t(8;21)
	t(15;17)
	inv(16)
intermediate	all others
adverse	−5/del(5q)
	−7
	abnormal 3q
	complex

まの ひろゆき / 自治医科大学ゲノム機能研究部教授

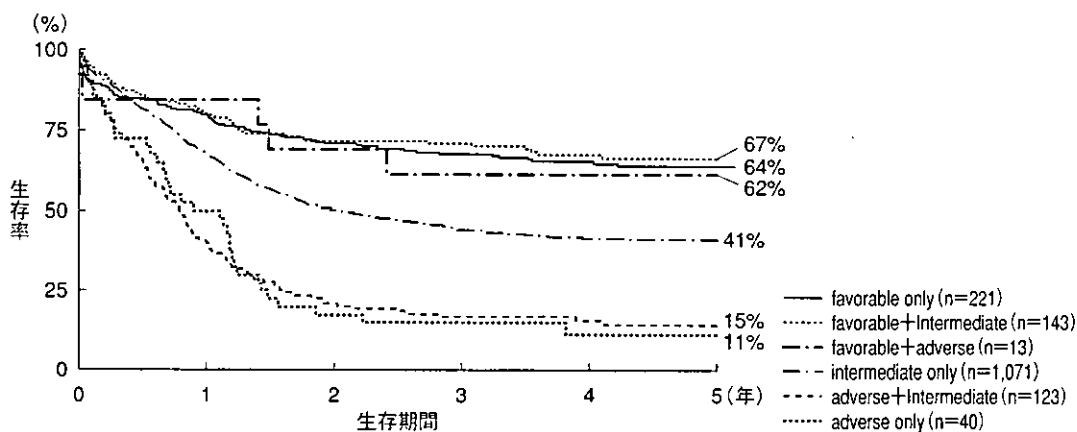


図1 核型による患者生命予後 (文献3より改変)

表1に示されるfavorable, intermediate, adverse各患者グループの生存曲線をKaplan-Meier解析で示す。3群の長期生存率が大きく異なることがわかる。

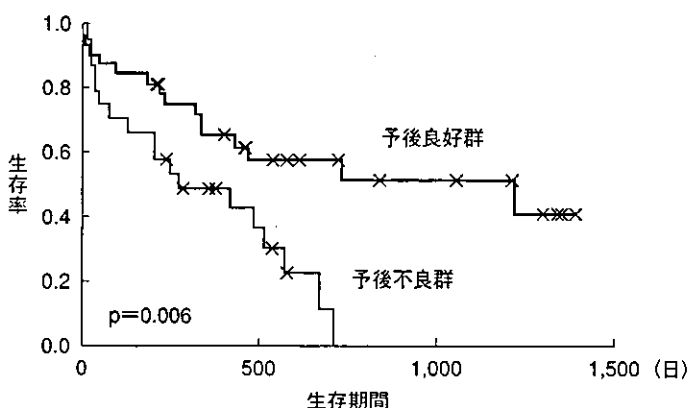


図2 DNAマイクロアレイによる層別化 (文献5より改変)

DNAマイクロアレイ解析の結果同定された「予後にリンクする遺伝子セット」の発現量を用いて、患者を2群に分類した。両群間の生存曲線が大きく異なることをKaplan-Meier解析で示す。

提案された³⁾。予後良好なfavorable groupに属するt(15;17), t(8;21) およびinv(16) は、それぞれFAB分類におけるM3, M2およびM4 Eoに相当する。また, intermediate groupに属する11q23転座はMLL遺伝子の変化を含むことが多い。一方, monosomy 7および5q-は重要な予後不良因子であるが, 本核型異常において具体的に

どの遺伝子の量的変化が重要なのかは全く不明なままである。これら核型による予後予測はきわめて強力であり, たとえば表1の各グループの長期生命予後を比較すると図1の生存曲線に示されるとおり, 3群は大きく異なる予後を有することが明らかである。なお, 「正常核型」が予後良好群ではなくintermediate groupに属することは注意すべきであろう。

核型による分類だけでは, AML患者の約半数を占める正常核型を有する患者の層別化が困難である。そこで核型以外のさまざまな

パラメータも単変量あるいは多変量解析によって検討されてきた。たとえばJapan Adult Leukemia Study Group (JALSG) の解析では, 年齢, 芽球のmyeloperoxidase陽性率, performance status, 末梢血白血球数, 血球の異形成の有無などが生存に有意にリンクすることが報告されている⁴⁾。

近年では, DNAマイクロアレイを用いた網羅