

E. 結 論

家族性ペルゲル核異常では好中球の分葉異常と核クロマチン凝集粗大化が完全に一致しているのに対し、MDS では分葉異常は低率で、クロマチン粗大化は高率と一致しない点が最も大きな差異である。MDS における LBR 遺伝子変異の有無の検索が今後必要である。

F. 健康危惧情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 朝長万左男: 好中球の Pelger-Huet 核異常をめぐって. 血液形態学の進化, 臨床病理 53: 54-60, 2005

2. 学会発表

1. 日本臨床検査医学会第 51 回総会シンポジウム 3: 形態検査の再発見
2. 第 8 回国際 MDS シンポジウムにて一部発表

H. 知的所有権の出願・取得状況

なし

I. 参考文献

1. Pelger, K: Demonstratie van een paar zeldzaam voorkomende typen van bloedlich ampjes en bespreking der patienten. Nederl. tijdschr. v. geneesk 72: 1178, 1928.
2. Huet, G.J.: Über eine bisher unbekannte familiäre anomalie der leukocyten. Klinische Wochenschrift, 11: 1264-1266, 1932
3. Hoffmann, K. et al: Mutations in the gene encoding the lamin B receptor produce an altered nuclear morphology in granulocytes (Pelger-Huet anomaly). Nat Genet. Aug; 31: 410-414, 2002.
4. Stobbe, H. et al.: Findings in homozygous carriers of Pelger's anomaly. Schweiz Med Wochenschr. Oct 30; 95(44): 1524-9. 1965.

高齢者または臓器障害を有する high-risk 骨髄異形成症候群症例に対する 骨髄非破壊的移植前治療を用いた同種末梢血幹細胞移植に関する臨床第 I/II 相試験

谷本 光音¹、池田 和真¹、藤井 伸治¹、近藤 英生¹、
豊嶋 崇徳¹、品川 克至¹、石丸 文彦¹、原田 実根²

岡山大学大学院・血液腫瘍呼吸器内科学¹、九州大学大学院・病態修復内科学²

研究要旨 高齢または臓器障害を有する高リスク骨髄異形成症候群 (MDS) 症例に対して、フルダラビン 125 mg/m² とシクロフォスファミド 60 mg/kg を移植前治療とする骨髄非破壊的同種末梢血幹細胞移植を行った。7 例の登録があり、6 例に移植が行われ、3 例が完全キメラを達成して寛解生存を続けている。3 例では MDS クローンが残存または増殖した。本治療法は、芽球のコントロールがついている RAEB-t の症例においては、有効な治療法となりうることが示唆された。

A. 研究目的

同種造血幹細胞移植は、予後不良の MDS 症例に対して治癒を期待できる治療法であるが、患者が高齢であることなどから、通常の骨髄破壊的前処置を伴う同種造血幹細胞移植は適応とならないことが多い。このような状況の中で、骨髄非破壊的前処置を用いた同種造血幹細胞移植の安全性・有効性に関する検討が行われている。米国国立衛生研究所の Childs らによる、フルダラビン (Flu: 125 mg/m²) とシクロフォスファミド (Cy: 120 mg/kg) を用いた前治療 (Childs, 1999) は、非破壊的前処置の中でも、毒性が少ないとされているが、本研究では、さらに副作用を軽減するために Cy の投与量を 2 分の 1 にした前処置を用いた同種末梢血幹細胞移植の安全性と有効性を検討することを目的とする。

B. 研究方法

主要臓器に重篤な障害がない 55 歳以上 70 歳未満、または 15 歳以上 55 歳未満で臓器障害のために骨髄破壊的同種造血幹細胞移植の適応とならない RAEB、RAEB-t、CMMoL、IPSS 中間群 -2 の RA 症例を対象とした。移植前治療として Flu 25 mg/m²/day を 5 日間、Cy 30 mg/kg を 2 日間投与後、HLA 一致同胞から採取した末梢血幹細胞を輸注し、GVHD 予防としてシクロスポリン A とメソトレキセートを投与した。primary end point は安全性で、生着 (移植後 3 ヶ月後のキメリズム検査

でドナータイプが 50 % 以上)、GVHD、day100 までの死亡、Flu/Cy による前治療の有害事象、その他の有害事象を評価項目とした。

C. 研究結果

7 名 (男性 5 名: 女性 2 例、年齢中央値 63 (27 ~ 67) 歳、RAEB-t 6 例、CMMoL 1 例) が登録され、1 例 (67 歳男性 RAEB-t) が原病悪化のために移植前に死亡し、残りの 6 例に対して移植が行われた。移植された CD34 陽性細胞数の中央値は 3.7 (3.0 ~ 9.4) × 10⁶/kg、好中球 500/μl までの回復に要した日数の中央値は 12.5 (9 ~ 16) 日であった。移植された 6 例のうち 3 例では、移植後 MDS クローンが残存または再増殖した。移植後に MDS クローンが残存または増殖した 3 例以外の 3 例では、いずれも完全キメラを達成し、平成 16 年 12 月末現在の観察期間は 1079 日、939 日、579 日で、寛解を維持して生存している。移植後 100 日までの死亡は 2 例で、1 例 (day 98) では原病の悪化と GVHD が、他の 1 例 (day 69) では原病の悪化が原因であった。急性 GVHD は、移植された 6 例のうち 3 例に出現し、I 度が 1 例、III 度が 2 例であった。慢性 GVHD は、評価可能 4 例中 3 例に出現し、いずれも全身型であった。GVHD 以外の重篤な治療関連毒性はみられなかった。

D. 考 察

High-risk MDS に対して、骨髄非破壊的前治療として、Flu 125 mg/m² + thiotepa 10 mg/kg (Alessandrino, 2004)、Flu 150 mg/m² + busulfan 8 mg/kg + CAMPATH-1H (抗 CD52 抗体) (Ho, 2004)、Flu 100-150 mg/m²、melphalan 140 or 180 mg/m² (de Lima, 2004)、Flu 120 mg/m² + cytarabine 4 g/m² + idarubicin 36 mg/m² (de Lima, 2004)、Flu 125 mg/m² + Cy 120 mg/kg (Childs, 1999) などを用いた同種造血幹細胞移植が試みられている。少数例ではあるが、今回の検討によって、高リスク MDS 症例に対して、Flu 125 mg/m² + Cy 30 mg/kg を移植前治療に用いた同種末梢血幹細胞移植は、前治療の治療関連毒性も少なく、安全に行うことができ、芽球のコントロールがついている RAEB-t の症例においては、有効な治療法となることが示唆された。

E. 結 論

High-risk の MDS に対して、Flu 125 mg/m² + Cy 30 mg/kg を前治療とした同種末梢血冠細胞移植は、安全に行うことができ、移植時に芽球が制御されている RAEB-t 症例では、有効な治療法となることが示唆された。

F. 研究発表

なし

G. 知的所有権の取得状況

- | | |
|-----------|----|
| 1. 特許取得 | なし |
| 2. 実用新案登録 | なし |
| 3. その他 | なし |

MDS の鑑別診断における p53、HbF 免疫染色の意義について

村手 隆¹、杉崎 千穂²、浅野 治彦²、木下 朝博²、直江 知樹²
大橋 春彦³、伊藤 雅文⁴

名古屋大学大学院医学研究科保健学科¹、名古屋大学大学院医学研究科血液内科²、
国立病院機構名古屋医療センター・臨床研究センター³、名古屋大学医学部附属病院病理部⁴

研究要旨 自験例 MDS 49 症例の骨髓クロットのパラフィン切片より抽出した DNA で Nested PCR、WAVE 法を用いて p53 遺伝子変異をスクリーニングし、p53 免疫染色の結果と比較した。p53 遺伝子変異は 18% にあり、全例染色陽性であったが、遺伝子変異のない症例でも染色陽性率は 65% と高かった。また HbF (fetal hemoglobin) 染色、染色体異常は全 MDS 症例の 73%、43% が陽性であった。一方、7 例の再生不良性貧血では診断に問題のあった 1 症例の p53 染色、HbF 染色陽性ともう 1 例の HbF 弱陽性を除いて、この 3 つの検査はすべて陰性であった。この結果、p53 染色、HbF 染色、ならびに染色体検査の組み合わせが、MDS (RA) と再生不良性貧血 (AA) との鑑別に临床上に有用である可能性が示唆された。

A. 研究目的

MDS の診断は形態診断中心で行われるが、AA との鑑別に苦慮する例も少なくない。遺伝子診断をしようとしても塗沫標本と固定されたクロットしかないことが多く、このような限られたサンプルで診断の精度をあげるために、免疫染色および標本からの DNA 抽出と解析が考えられる。我々はこれまでに癌化に関連するとされている p53 遺伝子に着目しクロット標本から抽出した DNA を用いて p53 遺伝子変異を確認し、p53 免疫染色の結果とあわせて検討した。また、MDS では HbF 陽性例が多いことが共同研究者の伊藤らにより報告されているので^{1,2)}、p53 免疫染色とともに、MDS と AA との鑑別に有用な指標となるかどうかを自験例で検討した。

B. 研究方法

2001 年 5 月以降に当院にて MDS と診断された患者 49 例について検討を行った。年齢中央値は 59 歳 (21-81 歳)、男女比 1.9 : 1、FAB 分類では、RA 19 例、RARS 1 例、RAEB 12 例、RAEB-T 3 例、CMML 1 例、MDS→OL 13 例。染色体分析の結果は表 1 に示す。この 49 症例のクロット標本として保存してある 10% ホルマリン固定パラフィン切片から、DNA 抽出剤 (DEXPAT、Takara) を使用して DNA を抽出し、Nested PCR を施行、PCR 産物を遺伝子変異を検出する WAVE System (Transgenomic 社、図 1 参照) を用いて p53 遺伝子変異 (exon 5-8) をスクリーニングし (図 1)、ダイレクトシーケンスにより変異を確認した。p53 と HbF 免疫染色は、49 例の MDS 症例とともに

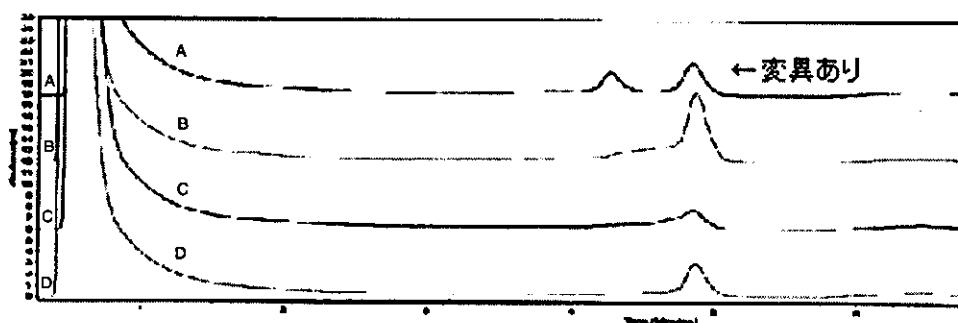


図1 WAVE SYSTEM による p53 遺伝子変異の検出

症例と p53 遺伝子の wild type (Molt-4) の PCR 産物とを混ぜて変性させ、WAVE SYSTEM で解析すると、変異 (-) は 1 ピーク、変異 (+) は 2 ピーク以上の形で変異が検出される。

に、7例のAAでも施行し、p53免疫染色については、有核細胞の5%以上が染色されている場合を染色陽性とし、HbFについては染色陽性細胞がある場合を陽性とし、染色陽性細胞のないものを陰性とした。

C. 研究成果

MDS 49症例のp53遺伝子変異の有無、p53とHbFの免疫染色、染色体分析の結果を表1に示す。49症例中でp53遺伝子変異は9例(18%)、p53染色陽性は35例(71%)、HbF陽性36例(73%)、染色体異常は21例(43%)に認められた。p53遺伝子変異のあった9例は全例でp53免疫染色陽性(100%)であり、HbF陽性は5例(56%)、染色体異常は7例(78%)に認められた(表2)。p53の遺伝子変異は調べた症例ではすべて点突然変異であった。一方、p53遺伝子変異のない40例では、陽性率はそれぞれ65%、78%、38%であった。特にAAとの鑑別で問題になるMDS(RA)19例中ではp53染色陽性は10例(53%)、HbF陽性は16例(84%)、染色体異常7例(37%)で、すべてのRA症例でこれらの検査のうち

かならず1つ以上は陽性であった。AAではp53染色陽性1例(14%)、HbF陽性2例(29%)、染色体異常はなかった。尚、このp53染色陽性であった1例は診断確定に若干の問題を残している。また、この症例のp53遺伝子変異はなかった。

D. 考察

自験例MDSでp53遺伝子変異のある症例では、変異のないものに比べ、p53免疫染色陽性率と染色体異常率が高かった(100% vs 65%、78% vs 38%)。しかし、変異がなくてもその65%ではp53染色陽性となるため、染色陽性を遺伝子変異陽性と同列に扱うことはできないと考えられた。またp53遺伝子変異陰性、染色陽性例では正常p53タンパクの発現上昇ないし分解の低下が予想され、病態を考える上で興味深い集団と思われる。p53遺伝子変異のある症例では予後不良^{3,4)}であるとの報告があるが、この49例については、有意差はでなかった。これは、検討症例の平均観察期間が2.6年と短いことによると考えられる。また、MDS(RA)19例は、(1)p53免疫染色陽性、

表1 MDS 49症例とAA 7例の結果

	患者数	p53遺伝子変異		p53免疫染色		HbF免疫染色		染色体異常	
		(+)	陽性率	(+)	陽性率	(+)	陽性率	(+)	陽性率
MDS	49	9	18%	35	71%	36	73%	21	43%
RA	19	3	16%	10	53%	16	84%	7	37%
RARS	1	0	0%	1	100%	0	0%	0	0%
RAEB	12	2	17%	11	92%	7	58%	3	25%
RAEB-T	3	1	33%	3	100%	3	100%	1	33%
CMML	1	0	0%	1	100%	1	100%	1	100%
OL	13	3	23%	9	69%	9	69%	9	69%
AA	7	ND	ND	1	14%	2	29%	0	0%

注 OL: MDSからOvert leukemia

表2 p53遺伝子変異のあった9症例の結果

年齢	MDS分類	p53変異	p53染色	HbF	染色体
69	OL	Exon5 cdn145(CTG-CGG)	+	+	45XY,add(5)(q13),-7,add(12)(p11)
61	OL	Exon5 cdn181(CGC-CTC)	+	+	42XY,-7,+8,-16,-17,-18,-22,他にもあり
81	OL	Exon5 cdn171(GAG-CAG)	+	-	45XY,del(7)(q11q11),t(17;18)(p10;p10),他にもあり
53	RAEB-T	Exon5 cdn151(GGG-GGA)	+	+	43XY,add(5)(q11),add(14)(p11),-17,-18,他にもあり
74	RAEB	Exon5 cdn152(CCG-TCG)	+	+	46XY,t(7;12)(q22;q13)
55	RAEB	Exon6 cdn219(CCC-TCC)	+	-	47XX,+8
27	RA	Exon7 cdn234(TAC-CAC)	+	+	46XX,del(20)(q11q13)
84	RAEB	Exon6 cdn211(ACT-ATT)	+	-	正常核型
21	RA	Exon5 cdn178(CAC-CAT)	+	-	正常核型

(2) HbF 免疫染色陽性、(3) 染色体異常の3つのうち必ず1つ以上は満たしており、この3つの指標がRAとAAの鑑別に臨床上有効であると考えられた。

E. 結 論

RA と AA の鑑別には、p53 染色、HbF 染色、染色体異常の検査の組み合わせが有用と考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表 該当なし
2. 学会発表 該当なし

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得 該当なし
2. 実用新案登録 該当なし
3. その他 該当なし

H. 参考文献

1. JW Choi, Y Kim, M Fugino, M Ito : Leukemia 16: 1478-1483, 2002
2. JW Choi, M Fugino, M Ito : International Journal of Hematology 75: 257-260, 2002
3. Y K Sasai : British Journal of Haematology 115: 309-312, 2001
4. K Nakamura : J Nippon Med Sch 68(2): 143-148, 2001

ハイリスク骨髄異形成症候群における予後因子の解析 —dCK と 5'-NT の発現に関して—

石田 陽治、鈴木 啓二郎、村井 一範

岩手医科大学 血液内科

A. 序

Cytarabin (Ara-C) を含む多剤併用療法の導入によりハイリスク骨髄異形成症候群 (MDS) の治療成績は向上しつつあるが、その成績は十分なものとはいえない。Ara-C は細胞内に取り込まれた後に、代謝され抗腫瘍効果を示す Ara-CTP となる (図 1)。Ara-C の代謝産物で抗腫瘍効果を示す Ara-CTP は細胞内 5'-nucleotidase (5'-NT) と deoxycytidine kinase (dCK) によりその細胞内濃度が左右されると考えられている。これら代謝酵素の発現が急性骨髄性白血病 (AML) の予後に関連すると近年報告されている^{1,3)}。これらのことより MDS においても細胞内 Ara-C 代謝の差異が治療成績に関連する可能性がある。昨年、我々はハイリスク MDS (RAEB、RAEB-t) 症例における 5'-NT mRNA の測定を行い、コントロール群に比べ有意にその発現が高く、5'-NT の発現が低い症例において生存期間が長い傾向があることを報告した。今回、我々は新たに症例を加え、ハイリスク MDS における 5'-NT mRNA ならびに dCK mRNA を測定し、予後ならびに治療効果について検討した。

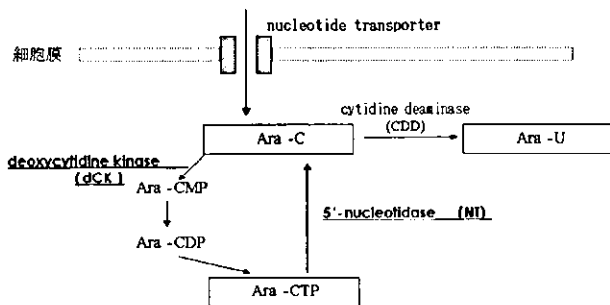


図 1. Ara-C の細胞内代謝

B. 方法と対象

平成 8 年から平成 16 年までに岩手医科大学でハイリスク MDS (RAEB、RAEB-t) と診断され

た 19 例を対象とした。診断時に採取・冷凍保存された各症例の骨髄単核球より Trizol 試薬 (Invitrogen) を用いて total RNA を抽出した。0.2 μ g の total RNA を用いて first strand cDNA synthesis kit (Roche) により cDNA を作成した。作成した cDNA を用い、hybridization probe 法により LightCycler で 5'-NT mRNA、dCK mRNA ならびに内部コントロールである β -actin mRNA の測定を行った。各症例における 5'-NT mRNA と dCK mRNA の発現量は β -actin mRNA との比で表した。またコントロールは保存されていた 12 例の volunteer の骨髄単核球を用いて、同様に 5'-NT mRNA と dCK mRNA、 β -actin mRNA の発現量を測定した。

C. 結 果

RAEB ならびに RAEB-t と診断された 19 例の内訳を表 1 に記した。年齢は 65.4 ± 9.7 歳 (男

表 1. 患者の 5'-NT mRNA と dCK mRNA の発現

症例	年齢	性別	診断	Blast%(BM)	IPSS	5'-NT mRNA	dCK mRNA
1	82	M	RAEB-t	20	2.5	0.221	0.249
2	74	M	RAEB	10.6	2.5	0.585	0.191
3	47	M	RAEB AML	20	2.5	0.231	0.164
4	69	M	RAEB AML	13	2	0.544	0.337
5	68	M	RAEB	11.6	2	0.294	0.158
6	65	M	RAEB	13.2	2.5	0.140	0.253
7	61	M	RAEB-t	5.2	1.5	0.360	0.001
8	72	F	RAEB-t	15.2	2	0.585	0.321
9	72	M	RAEB-t	25.6	3.5	0.151	0.010
10	68	M	RAEB	11.6	2	0.337	1.254
11	67	F	RAEB	11	2	0.095	1.166
12	70	M	RAEB	8	1.5	0.382	1.579
13	61	M	RAEB	24	2.5	0.166	1.258
14	74	F	RAEB	14	1.5	0.093	0.792
15	65	M	RAEB	17	1.5	0.180	0.700
16	52	M	RAEB	7.8	2	0.181	1.185
17	42	F	RAEB	11.2	2.5	0.079	0.546
18	69	M	RAEB-t	20.2	1.5	0.398	1.686
19	65	M	RAEB-t	18.8	2	0.149	0.751

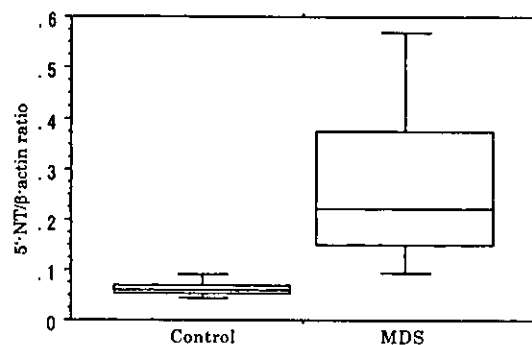
15例、女4例)であった。これらの症例のうち15例は化学療法を受け(Ara-C/VP16 9例、Ara-C/VP16+CAG 3例、IDA/AraC 2例、CAG/BEM 1例)、3例は対症療法のみ、1例は対症療法に加えダナゾールの投与が行われた(表2)。全症例の発症からの生存期間は(Mean ± SD) 25.5 ± 25.4ヶ月、化学療法を受けた群の発症からの生存期間は25.7 ± 24.2ヶ月、治療からの生存期間は14.5 ± 11.6ヶ月であった。非化学療法群の発症からの生存期間は24.8 ± 29.2ヶ月であった。化学療法を受けた症例のうち完全寛解(CR)に至ったのは6例、部分寛解(PR)は2例、治療抵抗性を示した症例は6例、化学療法死が1例であった。CRに至った症例が再発に至るまでの期間(Mean ± SD)は17.8 ± 13.9ヶ月であった。

表2. 治療成績と5'-NT mRNA、dCK mRNA 発現量

症例	治療	結果	初回治療			5'-NT mRNA	dCK mRNA
			発症からの生存期間	治療開始からの生存期間	寛解から再発までの期間		
1	AraC/VP16	CR	72	12	24	0.221	0.249
2	AraC/VP16, CAG	RF	14	14		0.585	0.191
3	AraC/VP16, CAG	CR	91	43	43	0.231	0.184
4	AraC/VP16	CR	26	10	7	0.544	0.337
5	AraC/VP16	PR	17	18		0.294	0.158
6	AraC/VP16	RF	29	29		0.140	0.253
7	AraC/VP16	RF	22	6		0.380	0.001
8	AraC/VP16, CAG	PR	17	5		0.585	0.321
9	CAG	RF	5	1		0.151	0.010
10	LDVPAC	CR	16	16	14	0.337	1.254
11	Danazol		84			0.095	1.166
12	AraC/VP16	RF	7	6		0.382	1.579
13	CAG, BEM	RF	10	10		0.186	1.258
14	No Cx		30			0.093	0.792
15	AraC/VP16	CR	18	17	9	0.180	0.700
16	IDA/AraC	CR	31	30		0.181	1.185
17	IDA/AraC	RF	10	2		0.079	0.548
18	No Cx		3			0.398	1.688
19	No Cx		2			0.149	0.751

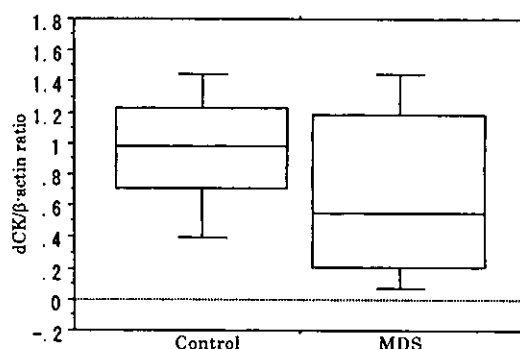
全症例における5'-NT mRNAの発現量(Mean ± SD)は0.272 ± 0.165、コントロールは0.0632 ± 0.019であり(図2)、MDS症例群が有意に発現量が高かった(p<0.01)。またdCK mRNAの発現量は0.663 ± 0.543、コントロールは0.951 ± 0.382でMDS症例群が低い傾向にあったが、統計学的な有意差は得られなかった(図3)。

上記の結果より5'-NT mRNAの発現量のcutoffを0.3、dCK mRNAの発現量のcutoffを0.6とし、生存期間について検討した(表3)。全症例における生存期間は、5'-NT mRNAの発現量が<0.3



Distribution of 5'-NT mRNA in bone marrow mononuclear cells for high risk MDS patients and healthy volunteers.

図2. ハイリスク MDS 骨髄単核球細胞における5'-NT mRNAの発現量



Distribution of dCK mRNA in bone marrow mononuclear cells for high risk MDS patients and healthy volunteers.

図3. ハイリスク MDS 骨髄単核球細胞における5'-NT mRNAの発現量

表3. 5'-NT と dCK の発現と生存期間

5'-NT		dCK	
発症からの生存期間			
5'-NT <0.3 (12例)	31.6 ± 23.5	dCK ≥0.6 (10例)	34.5 ± 19.5
5'-NT ≥0.3 (7例)	15.0 ± 16.0	dCK <0.6 (9例)	21.6 ± 17.0
化学療法後の生存期間			
5'-NT <0.3 (9例)	17.8 ± 13.9	dCK ≥0.6 (6例)	15.1 ± 13.2
5'-NT ≥0.3 (6例)	9.5 ± 4.6	dCK <0.6 (9例)	13.5 ± 9.9

生存期間 Mean ± SD、カッコ内は症例数。

の症例群(7例)で31.6 ± 23.5ヶ月、≥0.3の症例群(12例)で15.0 ± 16.0ヶ月と5'-NT mRNAの発現が低い群で生存期間が長い傾向があった(p=0.0644)。またdCK mRNA ≥0.6の症例群(10例)では34.5 ± 19.5ヶ月、<0.6の症例群(9例)で21.6 ± 17.0ヶ月とdCK mRNAの発現が高い群で生存期間が長い傾向をみたものの、有意差は認めなかった(p=0.9877)。

また化学療法を行った症例群で検討を行ったところ (表 3)、5'-NT mRNA の発現量が <0.3 の症例 (9 例) における治療開始後の生存期間は 17.8 ± 13.9 ヶ月、≥0.3 の症例 (6 例) では 9.5 ± 4.6 ヶ月と 5'-NT mRNA の発現が低い群で生存期間が長い傾向があった (p=0.0586)。一方、dCK mRNA の発現の違いは治療後の生存期間に影響を与えなかった (dCK mRNA ≥0.6 : 6 例 15.1 ± 13.2 ヶ月、<0.6 : 9 例 13.5 ± 9.9 ヶ月、p=0.684)。5'-NT と dCK の低・高発現で 4 群に分けて生存期間を比較したところ (表 4)、各群間で有意差はなかったものの 5'-NT の発現が低い 2 群で生存期間が長くなる傾向があった。

表 4. 5'-NT と dCK の発現と生存期間

	5'-NT ≥0.3	5'-NT <0.3
dCK <0.6	19.8 ± 14.5 (4) 8.8 ± 8.0 (4)	42.8 ± 29.0 (5) 20.0 ± 16.0 (5)
dCK ≥0.6	8.7 ± 7.0 (3) 11.0 ± 11.0 (2)	23.6 ± 18.0 (7) 14.8 ± 13.5 (4)

生存期間 Mean ± SD、カッコ内は症例数。

上段は発症からの生存期間、下段は化学療法後の生存期間。

D. 考 察

ハイリスク MDS に対し Ara-C を基本とする多剤併用療法が導入され、それらの有効性が示されているものの、治療抵抗性を示すことも多く、また寛解に至った症例でも早期に再発することが多く、未だに化学療法による治療は満足すべきものでない。現在、治療効果を的確に推定できる新たな因子の同定が待たれているところである。

Ara-C は細胞膜にある nucleotide transporter を経て細胞内に至り、cytidine deaminase (CD) により不活性化を受け Ara-U となるが、一部は dCK により、Ara-CMP となり、更にリン酸化を受け、抗腫瘍効果を示す活性型中間代謝物質である Ara-CTP となる。また Ara-CTP は 5'-NT により分解され、Ara-C となる。両酵素の均衡により細胞内の Ara-CTP 濃度は調節されていると考えられている (図 1)。近年、白血病細胞における Ara-CTP の細胞内濃度と治療反応性の関連が示されている。こ

れまでに AML 症例の初発時白血病細胞における 5'-NT の発現量が高い症例において、また dCK の発現が低い症例において、その予後が不良であると報告されている¹⁻³⁾。In vitro による検討でも 5'-NT の発現が高い、もしくは dCK の発現が低い細胞では Ara-C に対する耐性がみられると報告されている。しかし dCK 活性と予後との関連が有意ではないとする報告もあり、更なる検討が必要と思われる。これまでのところ、MDS 症例における 5'-NT ならびに dCK の発現を検討した報告はない。今回我々はハイリスク MDS 症例骨髓単核球における 5'-NT と dCK の mRNA を Real-time PCR で検討した。ハイリスク MDS 症例群では 5'-NT mRNA の発現がコントロールに比べ有意に高いことが明らかとなり、このことがハイリスク MDS において Ara-C 抵抗性を示している原因のひとつである可能性が強く示唆された。dCK に関しては、症例間で発現のばらつきをみたものの、コントロールとの明らかな発現の差は見られず、また生存期間への影響も明らかにすることが出来なかった。今後、大規模に Ara-C 代謝に関連する 5'-NT ならびに dCK の発現を検討することは、ハイリスク MDS の新たな予後因子、また十分な細胞内 Ara-CTP 濃度を得るための治療最適化を検討する糸口になると思われる。

E. 文 献

- Galmarini CM et al. Expression of high Km 5'-nucleotidase in leukemic blasts is an independent prognostic factor in adults with acute myeloid leukemia. *Blood* 98: 1922-1926, 2001
- Galmarini CM et al. Nucleoside analogues: mechanisms of drug resistance and reversal strategies. *Leukemia* 15: 875-890, 2001
- Galmarini CM et al. Deoxycytidine kinase and cN-II nucleotidase expression in blast cells predict survival in acute myeloid leukaemia patients treated with cytarabine. *Br J Haematol* 122: 53-60, 2003
- Jahns-Streubel G et al. Activity of thymidine kinase and of polymerase alpha as well as activity and gene expression of deoxycytidine deaminase in leukemic

blasts are correlated with clinical response in the setting of granulocyte-macrophage colony stimulating factor-based priming before and during TAD-9 induction therapy in acute myeloid leukaemia. *Blood* 90: 1968-1976, 1997

骨髄異形成症候群、高齢者白血病に対するシタラビン、メルファラン、ミトキサントロン3剤併用少量 (AMA) 療法、ならびに AL アミロイドーシスに対するメルファラン大量療法と同種ミニ移植の検討

上田 孝典、河合 泰一、山内 高弘

福井大学 医学部 第一内科

研究要旨 シタラビン (ara-C) の抗腫瘍効果は DNA 合成期特異的であるが、アルキル化剤との併用時、ara-C は後者による DNA 損傷修復過程で DNA 内に転入され細胞回転と無関係に殺細胞効果を発揮する。この併用効果も踏まえ、ara-C、melphalan、mitoxantrone3 剤併用少量療法を骨髄異形成症候群 (MDS)、高齢者白血病の患者 9 例に施行した。3 例に完全寛解を得た。S 期特異的な ara-C の効果を増強させる治療法が増殖 fraction の小さい MDS に有効である可能性が示唆された。

AL アミロイドーシス (AL) 4 例に対しメルファラン大量療法 (Mel) と、その無効例に対する同種ミニ移植 (RIST) を施行した。腎 AL 3 例は 100 日以上生存し治療効果は完全寛解 1 例、部分寛解 2 例であったが、心 AL 1 例には無効で第 46 病日に死亡した。部分寛解の腎 AL 1 例に対して RIST を施行したところ第 63 病日で完全寛解となりネフローゼ症候群も寛解した。Mel 無効の腎 AL に対し RIST が効果的である可能性が示唆された。

1. 骨髄異形成症候群、高齢者白血病に対するシタラビン、メルファラン、ミトキサントロン3剤併用少量 (AMA) 療法

A. 研究目的

シタラビン (ara-C) は、細胞内リン酸体 ara-CTP による DNA ポリメラーゼ阻害、DNA 内転入 ara-C による DNA 鎖伸長阻害により、DNA 合成を阻害して抗腫瘍効果を発揮するが、その効果は DNA 合成期特異的で非増殖細胞には及ばない。骨髄異形成症候群 (MDS) のなかで、白血病芽球の少ない RA、RARS においてはシクロスポリンなどによる免疫療法が、白血病芽球の多い RAEB、RAEB-t では抗白血病剤による化学療法が行われる。少量 ara-C 療法は頻用される化学療法の一つであるが寛解率 20% 前後とその有効性は低い。MDS における白血病芽球は骨髄内で 30% 未満であり、腫瘍細胞集団全体に占める増殖群 growth fraction は小さいと考えられる。つまり ara-C が MDS により有効であるためには非増殖群にも本剤が効果的であるような戦略が必要になる。

アルキル化剤による DNA 損傷は各種除去修復を惹起し、その過程は障害ヌクレオチドの切断除去、DNA 再合成による欠損部の充填、新生 DNA の再結合からなる。ヌクレオシドアナログはアルキル化剤との併用で修復過程の DNA 合成を阻害し抗腫瘍効果を発揮する¹⁾。即ち DNA 除去修復を利用することで ara-C の効果を非増殖細胞にも拡大することが可能になる^{2,3)}。

今回我々はこの理論的背景も踏まえ、ara-C、melphalan、mitoxantrone 併用少量 (AMA) 療法を考案し MDS あるいは高齢者白血病患者に施行した。

B. 研究方法

対象は高齢者 (65 歳以上、85 歳以下) の MDS または急性骨髄性白血病で、男性 7 人、女性 2 人の合計 9 例、年齢は 66 歳から 85 歳で中央値 75 歳であった (表 1)。本院 IRB の承認及び患者から本治療の同意を得た後、表 2 に示す AMA 療法を施行した。

表1 患者背景

患者	年齢 / 性別	診断	核型	FS	治療効果	
1	75/M	M2	治療抵抗性	未検査	NR	
2	78/M	RAEB-t	初回	46XY,t(1;7)(q10;p10)	1	CR
3	72/F	MDS-LT	再発	46XX,t(13)(q19)	2	CR
4	72/M	M5b	初回	46XY,t(9;11)(p22;p23)	2	CR
5	65/M	MDS-LT	初回	46XY	1	NR
6	75/M	M2	初回	未検査	1	NR
7	79/M	M2	治療抵抗性	46XY	2	NR
8	70/F	M2	治療抵抗性	44XX,add(3)(p13),-5,-7,+8	2	NR
9	85/M	M4	初回	46XY,+11	1	NR

CR, 完全寛解; NR, 非寛解

表2 AMA (ara-C, mitoxantrone, alkeran) 療法

薬剤	投与量、方法	投与期間
ara-C	10 mg/m ² x 2/日、皮下投与	1-14
Mitoxantrone	3 mg/m ² /day, 30分点滴	1, 4, 7, 10, 13
Melphalan	2 mg/body/day, 経口	1, 3, 5, 7, 9, 11, 13

Day 7, 10, 12で骨髓穿刺を施行しTarget point (骨髓有核細胞15,000/μl以下、芽球20%以下)に到達している場合は薬剤投与を終了する。最大2コース施行して効果を判定する。

C. 研究成果

9例中3例(症例2, 3, 4)が完全寛解に到達し(内、症例3は第2コースで寛解に到達)、6例は無効(含1死亡例(症例6))であった(JALSGの判定基準による)。寛解例と非寛解例で薬剤の投与期間に差はなかった(表3)。寛解例3例の寛解持続期間は症例2, 3, 4でそれぞれ142日、202日、80日であった。また生存期間はそれぞれ326日、510日、121日であった。寛解例における骨髓抑制は、白血球数1,000/μlを超えるまでの期間は13-24日間、3,000/μlを超えるまでの期間は15-64日間、血小板数50,000/μlを超えるまでの期間は9-26日間、100,000/μlを超えるまでの期間は15-35日間であった。半数にGrade3の感染性好中球減少が発症し、1例(症例6)でGrade4の感染(敗血症)が生じ死亡した。そのほかGrade2以上の非血液毒性はみられなかった。

表3 薬剤の投与日数

	全例(9例)	寛解例(3例)	非寛解例(6例)
ara-C	11 (7-14)	11 (9-14)	11 (7-14)
Mitoxantrone	4 (2-6)	5 (2-5)	5 (2-6)
Melphalan	6 (4-9)	6 (5-7)	6 (4-9)

D. 考察

寛解例、非寛解例で薬剤投与期間には差がなく、治療効果の差は白血球細胞の薬剤感受性による可能性が考えられた。抗腫瘍剤の少量投与にもかかわらず骨髓抑制期間が遷延し、感染症による死亡例が見られたことからMDSや高齢者では薬剤の投与期間に注意すべきと考えられた。本法の寛解率は従来のara-C少量療法による効果(約20%)より若干勝っている可能性もある。しかし本併用療法の効果が真にDNA修復阻害によるものかについて患者白血球細胞での臨床的検討をおこない投与方法を改善する余地があると考えられた。

E. 結論

MDS、高齢者急性骨髄性白血病においてara-C、アルキル化剤を含む併用療法を施行し33%に完全寛解が得られた。S期特異的なara-CがDNA修復を生物学的標的(Biologic Target)として治療効果を増強できるようなプロトコールが増殖fractionの小さいMDSに有効である可能性が示唆された。

F. 健康危惧情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

特になし

2. 学会発表

- 山内高弘, 岩崎博道, 吉田 明, 河合泰一, 岸慎治, 武村晴行, 稲井邦博, 高木和貴, 根来英樹, 荒井 肇, 浦崎芳正, 上田孝典: シタラピンによるDNA修復阻害とシタラピン, メルファラン, ミトキサントロン3剤併用少量療法の効果. 第66回日本血液学会, 第46回日本臨床血液学会 合同総会, 平成16年9月, 京都市

H. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得

特になし。

2. 実用新案登録

特になし。

3. その他

特になし。

1. 参考文献

1. Yamauchi T, et al. Clin Cancer Res 7: 3580, 2001
2. Yamauchi T, et al. Jpn J Cancer Res 93: 567, 2002
3. Yamauchi T, et al. Jpn J Cancer Res 93: 1334, 2002

2. AL アミロイドーシスに対するメルファラン大量療法と同種ミニ移植

A. 研究目的

欧米における臨床試験によると AL アミロイドーシス (AL) に対するメルファラン大量療法 (Mel) の血液学的寛解率は～47%にとどまる。自験 AL 4 例に対する Mel の転帰と、その無効例に対する、文献で検索した範囲内では第一例である、同種ミニ移植 (RIST) について報告する。

B. 研究方法

生検により確定診断された AL 4 例 (49-63 歳、男性：女性＝3：1、腎 AL 3 例、心 AL 1 例) に対し Mel 140-180 mg/m² 投与後、G-CSF により

動員した自家末梢血幹細胞移植を行った。Mel 部分寛解で血縁ドナーが存在する一例に対して同種 RIST を行った。

C. 研究成果

腎 AL 3 例は 100 日以上生存し治療効果は完全寛解 1 例、部分寛解 2 例で、心 AL 1 例は無効で Mel 後第 46 病日に死亡した。部分寛解の腎 AL 1 例に対して RIST を引き続いて行ったところ第 63 病日で完全寛解となり一日蛋白尿も 10.5 g から 0.5 g に改善し移植後 2.5 年で無再発で経過は順調であった (図 1)。

D. 考 察

欧米の結果とも一致し、腎 AL に比べ心 AL については Mel の毒性が高くその適応を慎重に再

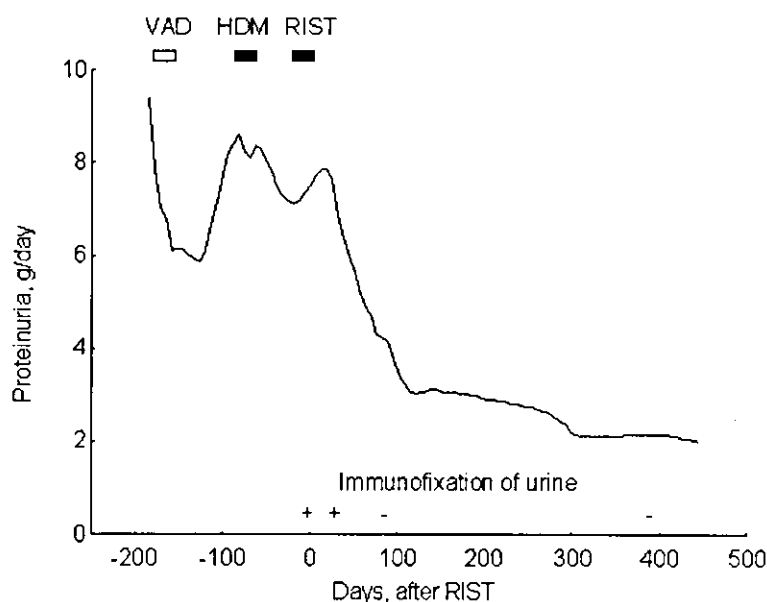


図 1 Melにて部分寛解のためRISTを施行した腎ALアミロイドーシスの経過. RIST後に免疫固定でのM-蛋白が陰性化しネフローゼ症候群も寛解した。VAD, combination chemotherapy of vincristine, doxorubicin, and dexamethazone; HDM, high-dose melphalan; RIST, reduced-intensity stem cell transplantation.

検討すべきと考えられた。Melにより腎ALの臨床症状改善に必要な条件となる血液学的寛解がえられない場合には、RISTも考慮されるべき一選択肢と考えられた。

E. 結 論

Mel無効例の腎ALに対してRISTが有用である可能性が示唆された。

F. 健康危惧情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kawai Y, Kinoshita K, Arai H, Kuwata A, Fukuoka Y, Yamaoka M, Imamura S, Tsutani H, Ueda T. Reduced intensity allogenic stem cell transplantation for systemic primary amyloidosis refractory to high-dose melphalan. *Eur J Haematol* 72: 448-450, 2004

2. 河合泰一, 津谷 寛, 上田孝典: AL アミロイドーシスに対する自己移植・ミニ同種移植連続治療. *中部リウマチ* 35: 16-17, 2004

2. 学会発表

1. 福岡良友, 河合泰一, 荒井肇, 上田孝典: Reduced intensity stem cell transplantation による M 蛋白消失に伴いネフローゼが改善した AL amyloidosis. 第 45 回日本臨床血液学会総会, 平成 15 年 8 月, 大阪市

2. 河合泰一, 福岡良友, 荒井肇, 上田孝典: シンポジウム「アミロイドーシス」AL アミロイドーシスに対する自己移植・同種移植連続治療の可能性. 第 15 回中部リウマチ学会, 平成 15 年 9 月, 長野市

H. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得

特になし。

2. 実用新案登録

特になし。

3. その他

特になし。

1. 参考文献

1. Dember LM, et al. *Ann Intern Med* 134: 746, 2001

2. Comenzo RL, et al. *Blood* 99: 4276, 2002

化学療法後に発現した NUP98 転座と 6p23 異常

大西 一功、杉浦 綾、竹下 明裕

浜松医科大学 第3内科

研究要旨 急性前骨髄性白血病 (APL) の化学療法中から骨髄抑制の遷延を認め、非定型慢性白血病に至った症例を解析することで 2 次性造血異常症のメカニズムを検討した。症例は APL を発症し、JALSG-APL97 プロトコールにて寛解となったが、23 ヶ月後骨髄過形成を認めた。del (6p23)、der (11p15) と NUP98 の転座が証明され、付加的染色体異常を次々と起こした。NUP98 と 6p23 異常が同時期に認められたことで MDS や骨髄増殖性疾患の発症機序を解析する上で興味深い症例と考えられた。

A. 研究目的

癌化学療法の治療成績向上とともに、治療後に発症してくる造血器疾患が注目されるようになった。骨髄異形成症候群や治療後白血病はその代表で難反応性、複雑な染色体異常等が報告されている。これらの疾患は造血器異常発病のメカニズムを検討する上のモデルとして重要である。急性前骨髄性白血病 (APL) の化学療法後に新しい染色体異常と NUP98 の転座を経験し、クローン性増殖の経緯を詳細に検討した。

B. 研究方法

症例は 59 歳男性、1998 年 5 月白血球減少と出血傾向にて受診し、染色体解析にて t (15; 17) (q22; q21) を示し、また PML-RAR α キメラ遺伝子が同定されたため APL と確診された。JALSG-APL97 プロトコールにより治療し完全寛解 (CR) となったが、地固め/強化療法中より骨髄抑制の遷延化を認めた。その後外来にて経過観察されていたが 2000 年 4 月頃より発熱と白血球減少を認め、骨髄穿刺を施行したところ過形成 (芽球 0.2%) を示し、骨髄増殖性症候群 (非定型慢性骨髄性白血病) が疑われた。染色体解析 (G-band 法) と spectral karyotyping (SKY) 法を施行した。PML-RAR α 、MLL、BCR-ABL 癒合遺伝子は FISH 法と reverse transcription (RT)-polymerase chain reaction (PCR) 法にて検討した。NUP98 遺伝子の融合相手遺伝子は HOXA 7、9、10、11、13 と DEK 等が FISH 法と RT-PCR 法にて検索された。

C. 研究成果

染色体解析では del (6p23)、der (11p15) が認められたが、相互転座はなかった。11p15 近傍の遺伝子を FISH にて検索したところ NUP98 の 7 番染色体への転座が証明された。報告上の HOX 7、9、10、11、13 との癒合遺伝子は PCR/FISH にて証明されず、signal の位置からも新しい転座が疑われた。PML-RAR α キメラ遺伝子、DEK 遺伝子の異常は認められなかった。染色体異常は 46, XY, del(6)(p23), der(11)(11qter→11p15::11?). ish del(6)(NUP98-,D6Z1+), der(7)(NUP98+,D7Z1+), der(11)(NUP98+,D11Z1+) と同定された。血清 G-CSF と GM-CSF 値は正常範囲であった。経過観察にて次々と付加的染色体異常 (表) が証明され、その後急性転化を起こした。芽球は CD45 blast-gate 上 CD1 2.7%, CD2 3.3%, CD3 1.3%, CD4 50.8%, CD8 1.2%, CD10 14.7%, CD13 45.2%, CD14 22.5%, CD19 1.0%, CD33 75.5%, CD34 5.9%, CD56 42.2%, HLA-DR 63.6%, CyMPO 42.7% であった。また難治性の皮膚浸潤を認めた。化学療法は一時的に効果を示したが、芽球の急激な再増殖をきたして死亡した。

D. 考 察

NUP98 も 6p23 異常も治療後白血病の造血器異常として報告されているが、同時期に認められたことでその発症機序を解析する上で興味深い。本例は化学療法中より骨髄異形成症候群が疑われ、その後、非定型慢性骨髄性白血病に分類される血液異常をきたした。また経時的観察により clonal

evolution の過程が詳細に証明された。また NUP98 は新しい転座を形成していることが強く疑われた。NUP98 と 6p23 は約 1 月の間に同時に認められた。相互の関係に関して文献上報告は認められなかったが、その血液異常の進展からも前後および相互関係は興味深い。

E. 結 論

化学療法後に発現した造血器異常とこれと同期して認められた NUP98 と 6p23 の異常はその後の血液異常の増悪と clonal evolution に関わっていると思われ今後の検討を要すると考えられた。

(表) 染色体異常の時間的な推移

1998/05/22	46,XY,t (15;17) (q22;q11-21) =20
1998/11/19	46,XY=20
1999/06/02	46,XY=20
1999/09/20	46,XY=20
2000/03/06	46,XY=20
2000/04/03	46,XY,del (6) (p23) ,der (11) (11qter→11p15::11?) =8 46,XY=12
2000/05/01	46,XY,del (6) (p23) ,der (11) (11qter→11p15::11?) =15 48,XY,+8,der (11) (11qter→11p15::11?) ,+21=5
2000/07/19	46,XY,del (6) (p23) ,der (11) (11qter→11p15::11?) =8 47,XY,+8,der (11) (11qter→11p15::11?) =2 48,XY,add (3) (p25) ,+8,der (11) (11qter→11p15::11?) ,+21=6 48,XY,add (6) (p23) ,+8,der (11) (11qter→11p15::11?) ,+21=3 49,XY,+8,der (11) (11qter→11p15::11?) ,+21,+mar1=1
2000/08/30	46,XY,del (6) (p23) ,der (11) (11qter→11p15::11?) =10 47,XY,+8,der (11) (11qter→11p15::11?) =3 48,XY,add (6) (p23) ,+8,der (11) (11qter→11p15::11?) ,+21=2 48,XY,add (3) (p25) ,+8,der (11) (11qter→11p15::11?) ,+21=1 48,XY,add (6) (q11) ,+8,der (11) (11qter→11p15::11?) ,+21=1 49,XY,+8,der (11) (11qter→11p15::11?) ,+21,+mar1=3
2000/10/03	46,XY=20
2001/02/22	46,XY,del (6) (p23) ,der (11) (11qter→11p15::11?) =11 47,XY,del (6) (p23) ,+8,der (11) (11qter→11p15::11?) =4 47,XY,del (6) (p23) ,+8,del (9) (q?) ,der (11) (11qter→11p15::11?) =1 48,XY,add (6) (p23) ,+8,der (11) (11qter→11p15::11?) ,+21=1

注) これらの染色体異常は G バンド法、SKY 法 と FISH 法にて検討した結果である。また下線の部分の異常は 2000 年 4 月 3 日に始めて出現した異常である。NUP98 のスプリットシグナルはそれ以前には認めないが 4 月以降は常時認められた。

F. 健康危惧情報

エトポシドを含む多剤併用化学療法は以前より2次性造血器疾患を引き起こす可能性があることは指摘されていたが、本例も染色体・遺伝子解析結果より、その因果関係が強く示唆された。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Takeshita A, Naito K, Shinjo K, Nakamura S, Sahara N, Matui H, Ohnishi K, Beppu H, Ohtsubo K, Hisatomi H, Horii T, Maekawa M, Inaba T and Ryuzo Ohno. del(6p23) and der(11p15) including NUP98 translocation in a case of secondary myeloproliferative disorder which eventually underwent clonal evolution and transformed to acute myeloid leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 152: 56-60, 2004

2. 学会発表

1. Takeshita A, Naito K, Shinjo K, Fujisawa S, Shigeno K, Horii T, Maekawa M, Ohnishi K, Ohno R. A new translocation, t(6,11), involving the NUP98 gene translocation, in a case of secondary myeloproliferative disorder, which eventually developed clonal evolution and transformed to acute myeloid leukemia. The 44th Annual Meeting of American Society of Hematology. *Blood* 100: 189b, 2002

H. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得 該当なし
2. 実用新案登録 該当なし
3. その他 該当なし

1. 参考文献

WAVE System を用いた MDS 症例における FLT3 遺伝子変異の高感度検出の試み

大橋 春彦

独立行政法人国立病院機構名古屋医療センター・臨床研究センター

研究要旨 臨床検体を用いて遺伝子変異の解析を行う場合の大きな問題は、正常細胞の混在により目的とする変異アレルの存在比が低下しその検出が困難になることである。我々は、WAVE System を用い、DHPLC 法の変法 (non-denaturing high performance liquid chromatography, ndHPLC 法) によりサイズの異なる PCR 産物を回収して再度 PCR を行うことにより、存在比の低い変異アレルを検出する方法を開発した。この方法の検出感度を MDS 患者の検体で認められた FLT3 遺伝子の internal tandem duplication (FLT3/ITD) を用いて検討した。また、移植前に FLT3/ITD を認めた MDS/AML 症例の移植後の検体についてこの方法を用いて検討したところ、一部の症例で臨床的な再発に先立って FLT3/ITD が検出された。

A. 研究目的

臨床検体を用いて遺伝子変異の解析を行う場合の大きな問題は、正常細胞の混在により目的とする変異アレルの存在比が低下しその検出が困難になることである。存在比の低い変異細胞 (変異アレル) の検出は、臨床的には化学療法あるいは造血幹細胞移植後の微小残存病変 (MRD) の検討、疾患の早期診断、あるいは各種体液を用いた悪性腫瘍の診断等に有用と考えられる。現在、大過剰の正常アレルが存在する条件下で特定の遺伝子変異を検出する方法としては変異アレルを特異的に増幅するプライマーを用いた PCR 法 (allele-specific PCR 法) が広く用いられている。この方法は高い検出感度を持っているが、特異的なプライマーを設定しなければならないために、疾患により遺伝子変異 (塩基配列) が特定されている場合、あるいは症例ごとに変異した塩基配列を決定した場合にしか用いることができない。また、変異アレルと正常アレルの配列の差が小さい場合は偽陽性 (正常アレルを増幅する) が生じ、十分な特異性を得られない場合もあると考えられる。

一方、特定の变異に限らず、ある遺伝子領域内に存在するすべての変異を検出する方法としては、single-strand conformation polymorphism (SSCP) 法や denaturing high performance liquid chromatography (dHPLC) 法が知られている。これらの方法においては、変異アレルは正常アレルと異なるバンドあるいはピークとして可視化され

る。しかしこれらの方法の検出感度 (正常アレルに混入した変異アレルをどのような存在比まで検出できるか) は、一般に 1 ~ 10 % 程度と考えられている。これは、変異アレルが増幅されないためでなく、変異アレル由来のシグナルが大過剰に存在する正常アレル由来のシグナルによってマスクされるためである。遺伝子のサイズの変化を来す変異について以上の問題点を克服するために、我々は WAVE System を用い、DHPLC 法の変法 (non-denaturing high performance liquid chromatography, ndHPLC 法) によりサイズの異なる PCR 産物を回収して再度 PCR を行うことにより、存在比の低い変異アレルを検出する方法を開発した。この方法の感度と有用性について、AML において最も高頻度に認められる遺伝子変異であり、また MDS から AML への進展にも関与すると考えられている FLT3 遺伝子の internal tandem duplication (FLT3/ITD)^{1,2)} を用いて検討した。

B. 研究方法

FLT3 遺伝子のエクソン 11 を増幅するプライマーを用いて、MDS/AML 患者の骨髄・末梢血細胞から抽出したゲノム DNA 検体について FLT3/ITD のスクリーニングを行った。ITD 陽性が確認された MDS 症例の DNA 検体を正常人の DNA 検体と種々の比率で混合し、GeneScan 法および ndHPLC-GeneScan 法を用いてそれぞれの検

出感度の検討を行った。GeneScan 法は蛍光ラベルプライマーを用いて増幅した PCR 産物をキャピラリー型オートシーケンサー (PRISM310 Genetic Analyzer, Applied Biosystems 社) を用いて泳動し、GeneScan ソフトウェアを用いてフラグメント解析を行った²⁾。ndHPLC-GeneScan 法は、まず非ラベルプライマーを用いて増幅した PCR 産物を WAVE System (TRANSGENOMIC 社) を用いてカラムへの吸着・溶出を行い、ITD を含む PCR 産物のピークを回収した。回収した PCR 産物を鋳型として蛍光ラベルプライマーを用いた PCR を行い、上記 GeneScan 法による解析を行った。

当院において同種造血幹細胞移植を行った MDS/AML 症例の中で移植前の骨髓細胞において FLT3/ITD が検出された 3 症例を対象として、移植後の経時的な骨髓・末梢血検体について GeneScan 法および ndHPLC-GeneScan 法による FLT3/ITD の検出を試みた。同時に short tandem repeat (STR) の多型を用いた造血キメリズム解析を行い、それぞれの検体における患者由来細胞の比率についても検討した³⁾。

C. 研究成果

まず、正常 FLT3 アリルと混在した FLT3/ITD アリルの検出に関して GeneScan 法と ndHPLC-GeneScan 法の感度を比較した (図 1)。GeneScan 法による解析では、患者検体を 16:1 に希釈した

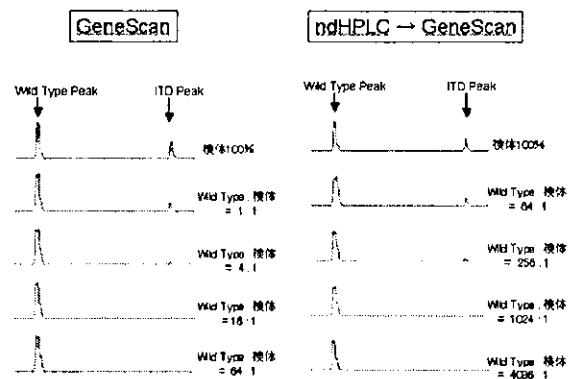


図 1

検体まで FLT3/ITD が検出できたのに対し、ndHPLC-GeneScan 法では 1,024:1 に希釈した検体まで FLT3/ITD が検出できた。すなわち ndHPLC-GeneScan 法は GeneScan 法のおよそ 64 倍の検出感度を有すると考えられた。なお、ここで用いた FLT3/ITD 陽性患者検体においては、FLT3/ITD アリルと正常 FLT3 アリルとの比はほぼ 1:3 であった。したがって、GeneScan 法および ndHPLC-GeneScan 法による ITD アリルの実際の検出感度はそれぞれ 2% および 0.03% 程度と考えられた。

FLT3/ITD 陽性の MDS/AML の 3 症例について移植後の検体を用いた FLT3/ITD の検出を GeneScan 法と ndHPLC-GeneScan 法を用いて行った。また、同じ検体を用いて STR の多型を利用したキメリズム解析も行った (表 1)。移植後 Day56 に再発と診断された症例 1 では Day28 の末

表 1

	キメリズム	FLT3/ITD	
		GeneScan 法	ndHPLC-GeneScan 法
症例 1 Day28 PB-non-T	CC	-	+
症例 2 Day84 BM-MNC	CC	-	-
症例 3	Day30 BM-MNC	CC	-
	Day59 BM-MNC	CC	-
	Day92 BM-MNC	MC	+

PB-non-T: CD3 陰性末梢血単核球、BM-MNC: 骨髓単核球

CC: 完全キメラ、MC: 不完全キメラ、+: 検出された、-: 検出されなかった

梢血検体 (CD3 陰性の単核球) では、キメリズム解析ではドナー型完全キメラであったが、ndHPLC-GeneScan 法による解析では FLT3/ITD が検出された。このとき GeneScan 法による解析では FLT3/ITD は検出されなかった。一方完全寛解を維持した状態で Day166 に感染により死亡した症例 2 では、移植後一貫して末梢血細胞でドナー型完全キメラが維持されていたのみでなく、Day86 の骨髄細胞ではいずれの方法でも FLT3/ITD は検出できなかった。移植後 Day119 に再発を認めた症例 3 では Day30、Day59 の骨髄細胞はドナー型の完全キメラであり、FLT3/ITD はいずれの方法でも検出されなかった。しかし、Day92 の骨髄細胞は不完全キメラ (患者由来細胞が 3% 存在) であり、FLT3/ITD もいずれの方法でも検出された。

D. 考 察

遺伝子の長さの変化を伴う変異である FLT3/ITD について、その変異の種類 (ITD の FLT3 遺伝子内の位置、配列、長さ) によらず、単一の方法で、高感度に変異を検出する方法 (ndHPLC-GeneScan 法) を確立し、その感度が従来の方法 (GeneScan 法) に比べて優れていることを確認した。また、この方法を用いて同種造血幹細胞移植前に FLT3/ITD 陽性であった患者の移植後の骨髄・末梢血細胞の検討を行い、臨床的な再発に先立って FLT3/ITD が検出される場合もあることを確認した。

E. 結 論

遺伝子の長さの変化を伴う変異を検出する方法として ndHPLC-GeneScan 法は、従来の方法と比較して優れた感度を有することが確認された。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし。
2. 学会発表
なし。

G. 知的所有権の取得状況

なし。

H. 参考文献

1. Yokota S, et al.: Internal tandem duplication of the FLT3 gene is preferentially seen in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome among various hematological malignancies. A study on a large series of patients and cell lines. *Leukemia* 11: 1605-1609, 1997
2. Shih LY, et al.: Acquisition of FLT3 or N-ras mutations is frequently associated with progression of myelodysplastic syndrome to acute leukemia. *Leukemia* 18: 466-475, 2004
3. Ohashi H, et al.: Leukemia relapse in the central nervous system after allogeneic stem cell transplantation with complete remission in the bone marrow and donor-type chimerism: report of two cases. *Am J Hematol*: in press