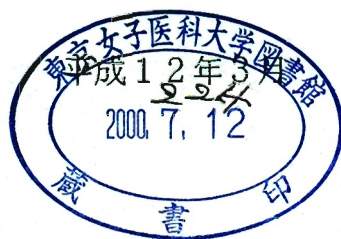
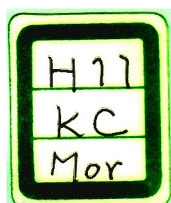

慢性骨髄性白血病の急性転化における
p73 遺伝子の役割

<研究課題番号> 10670972

平成10年度～平成11年度科学研究費補助金（基盤研究C）
研究成果報告書



研究代表者 森 直 樹
(東京女子医科大学医学部助手)



慢性骨髄性白血病の急性転化における

p73 遺伝子の役割

<研究課題番号> 10670972

平成10年度～平成11年度科学研究費補助金（基盤研究C）
研究成果報告書

平成12年3月

研究代表者 森 直 樹
（東京女子医科大学医学部助手）

課題番号 10670972

研究課題 慢性骨髄性白血病の急性転化における p73 遺伝子の役割

研究代表者 森 直 樹 (東京女子医科大学医学部助手)

研究経費 平成10年度 900千円

平成11年度 800千円

計 1,700千円

研究発表

ア 学会誌等

1. Mori N, Morosetti R, Spira S, Lee S, Ben-Yehuda D, Schiller G, Landorfi R, Mizoguchi H, Koeffler HP: Chromosome band 1p36 contains a putative tumor suppressor gene important in the evolution of chronic myelocytic leukemia. *Blood* 92: 3405, 1998
2. Mori N, Okada M, Motoji T, Mizoguchi H: Mutation of the WT1 gene in myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia post myelodysplastic syndrome. *Br J Haematol* 105: 844, 1999
3. Mori N, Morosetti R, Hoflehner E, Lubbert M, Mizoguchi H, Koeffler HP: Allelic loss in the progression of myelodysplastic syndrome. *Cancer Research*, in press

イ 口頭発表

1. 森直樹、溝口秀昭：慢性骨髄性白血病の急性転化におけるアレロタイプ。第60回日本血液学会総会、1998
2. 森直樹、溝口秀昭：慢性骨髄性白血病の急性転化における 1p の欠失領域の解析。第40回日本臨床血液学会総会、1998
3. 森直樹、溝口秀昭：骨髄異形成症候群の白血化における欠失。第96回日本内科学会総会、1999
4. 森直樹、溝口秀昭：骨髄異形成症候群の白血化におけるアレルの欠失。第61回日本血液学会総会、1999
5. 安並毅、泉二登志子、本村小百合、岩部弘治、吉永健太郎、志関雅幸、小林祥子、鮫島勇一、森直樹、和田真紀夫、山田 修、寺村正尚、増田道彦、溝口秀昭：当科における急性骨髄性白血病の治療成績。第61回日本血液学会総会、1999
6. 伊藤慶子、本村小百合、岩部弘治、吉永健太郎、志関雅幸、小林祥子、森直樹、和田真紀夫、寺村正尚、増田道彦、泉二登志子、溝口秀昭：骨髄異形成症候群に対するメチルプレドニゾン短期大量療法の治療成績。第61回日本血液学会総会、1999
7. 森直樹、安並毅、日台裕子、寺村正尚、増田道彦、泉二登志子、溝口秀昭：治療抵抗性特発性血小板減少性紫斑病にジアフェニルスルホンを投与した2例。第41回日本臨床血液学会総会、1999
8. 増田道彦、吉永健太郎、岩部弘治、志関雅幸、小林祥子、鮫島勇一、森直樹、和田真紀夫、大沢まゆみ、日台裕子、寺村正尚、泉二登志子、溝口秀昭：慢性骨髄性白血病に対するインターフェロン療法：細胞遺伝学的効果の検討2。第41回日本臨床血液学会総会、1999

9. 小林祥子、本村小百合、岡村隆光、岩部弘治、吉永健太郎、志関雅幸、鮫島勇一、森直樹、和田眞紀夫、山田 修、寺村正尚、増田道彦、泉二登志子、溝口秀昭：Poor-risk lymphoid malignancy に対する大量 MTX を含んだ治療の試み。第 4 1 回日本臨床血液学会総会、1 9 9 9
10. 安並毅、森直樹、寺村正尚、増田道彦、泉二登志子、溝口秀昭：抗胸腺グロブリン（ATG）が奏功した再生不良性貧血（AA）一週間血色素尿症（PNH）症候群。第 1 3 7 回日本臨床血液学会例会、2 0 0 0

研究成果

以下のとおり

研究目的

慢性骨髄性白血病 (Chronic Myelocytic Leukemia; CML)は多能性幹細胞の腫瘍化と考えられ、慢性期には症状に乏しいが、急性転化をおこすと予後は極めて不良となり、その進展機構の解明は急務である。CMLの急性転化の過程でみられる癌抑制遺伝子の異常としては、p53 遺伝子の変異、RB 蛋白質の欠如、p16 遺伝子の欠失などがこれまでに報告されているが、これらだけで急性転化の機構を説明することは困難である。また、癌遺伝子の異常として、Ras 遺伝子の変異や c-Myc 遺伝子の増幅の報告はあるものの頻度は稀である。

近年、我々は第 1 染色体の短腕 (1p)に分子レベルで欠失 Loss of heterozygosity (LOH)が高率に認められることを報告した(Blood 90: 2010-2014, 1997)。さらに共通に欠失している 1p 上の領域を解析してきた。この領域は神経芽細胞腫、大腸癌、乳癌、甲状腺腺腫、褐色細胞腫などの様々な固形腫瘍で LOH が報告されている領域と一部重なっていた。最近 1p36 の神経芽細胞腫における共通欠失領域から癌抑制遺伝子の候補として p73 遺伝子が単離された。この遺伝子は p53 遺伝子と homology があり、p53 遺伝子と同様に p21(WAF1)遺伝子の発現を誘導することが知られている。また細胞に発現させると増殖を抑えることから癌抑制遺伝子と考えられている。さらにこの遺伝子は正常人において片方の親からの対立遺伝子のみが発現していることが報告された。本研究は CML の急性転化 における p73 遺伝子の役割を解明することを目的とする。

研究方法

CML の患者の慢性期、急性転化の骨髄および末梢血から、細胞を分離し以下の検索を行なった。

1. 染色体分析

G-band 法で骨髄、末梢血の細胞を解析し 20 個の metaphase を撮影し 10 個で核型を決定した。

2. Microsatellite を用いた LOH 解析

CML の患者の慢性期及び急性転化または移行期の骨髄から DNA を抽出した。この DNA を、p73 遺伝子の近傍を含む第一染色体の短腕上の microsatellite markers を用いて PCR 法で増幅し [α - 32 P]dCTP でラベルした。この断片を電気泳動後 autoradiography を行ない、慢性期と急性転化または移行期を比較し LOH の有無を解析した。

3. MDS における LOH 解析

MDS および MDS から移行した AML (AML post MDS) とで DNA を抽出し、acrocentric chromosome の短腕を除く常染色体の長短腕上の各 2 個の microsatellite markers を用いて MDS の白血化における LOH をあわせて解析した。

4. p73 遺伝子の発現の解析

骨髄細胞から RNA を抽出した。RT-PCR 法により p73 遺伝子の cDNA を増幅し電気泳動を行い発現を解析した。

5. PCR による p73 遺伝子の増幅と解析

前出の DNA を鋳型とし、PCR 法により p73 遺伝子の DNA 断片を増幅する。この DNA 断片を SSCP 法を用いて解析し、微細な変異を検索する。SSCP 法により異常が認められた症例で、塩基配列を解析し変異を同定する。

結果および考察

1. 染色体分析

CMLの70例で染色体分析を行った。1p上の欠失は明らかでなかったが、1pが関係した転座が1例で認められた。

2. Microsatellite を用いた LOH 解析

CML30例において、1pで30個、1qで3個のmicrosatellite markersを用いて解析した。30例中14例で1pにLOHを認めた(図1)。14例中2例では1p上のすべての情報が得られたlociでLOHを認めたが、他の12例では一部のlociでのみLOHが認められた。CMLの急性転化の過程で認められたこれらの症例における共通欠失領域はD1S508より近位でD1S507より遠位(1p36)であり(図2)、p73遺伝子座も含まれる可能性が示唆された。

またCMLの共通欠失領域と神経芽細胞腫、大腸癌、肝細胞癌、甲状腺腺腫などの腫瘍における共通欠失領域が一部重複しておりこれらの固形腫瘍と共通の遺伝子の関与か、1p36に複数の癌抑制遺伝子の存在が考えられた。

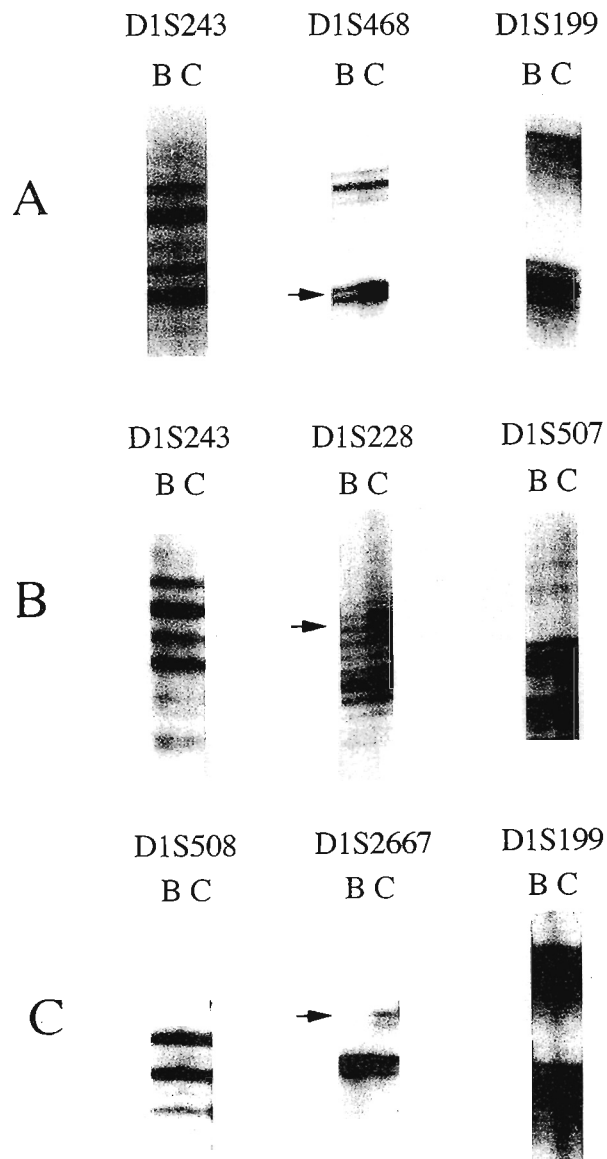


図1 CMLの急性転化におけるLOH。

→がLOHを示す。上部にlocus、B：急性転化、C：慢性期を表わしている。

(A)ではD1S468、(B)ではD1S228、(C)ではD1S2667で各々LOHを認めた。

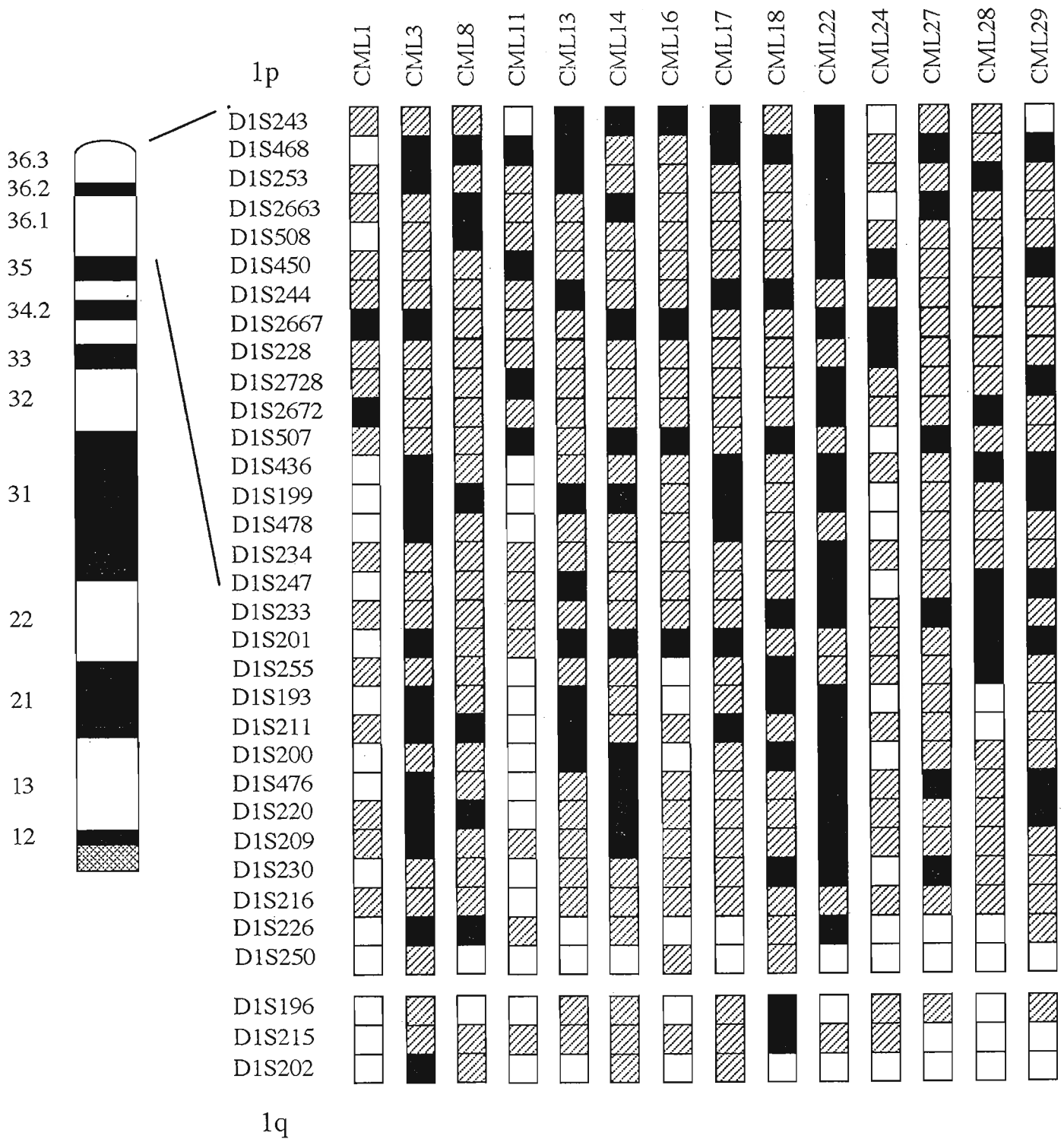


図2 CMLの急性転化における共通欠失領域。

CMLの急性転化の過程で認められたこれらの症例における共通欠失領域(—)はD1S508より近位でD1S507より遠位(1p36)であった。黒はLOH、白はLOHを認めないもの、斜線は情報のなかったものを示す。

3. MDSにおけるLOH解析

MDSの白血化24例中18例で少なくとも1つのlocusでLOHを認めた(75%)。情報が得られた症例の20%以上でLOHを認めたのは6q(31%)、7p(23%)、10p(31%)、11q(27%)、14q(25%)、20q(23%)であった(図3)。最もLOHの頻度が高かったのは6qと10pであったが、CMLの急性転化と同様に一部の症例では1pでもLOHを認めている。MDSにおいてp73遺伝子の異常がある可能性も否定できない。

4. p73遺伝子の発現の解析

慢性骨髄性白血病(Chronic Myelocytic Leukemia; CML)の患者の慢性期20例、急性転化15例の骨髄および末梢血から、単核細胞を分離した。これらの細胞からRNAを抽出しRT-PCR法によりp73遺伝子の発現を解析した。一部の症例を除きp73遺伝子の発現が認められた。発現を認めなかった症例でメチレーションの有無などを解析する予定である。

5. PCRによるp73遺伝子の増幅と解析

上出のcDNA産物を用いてゲル電気泳動を行ったが、これまでのところ明らかな異常は認められなかった。

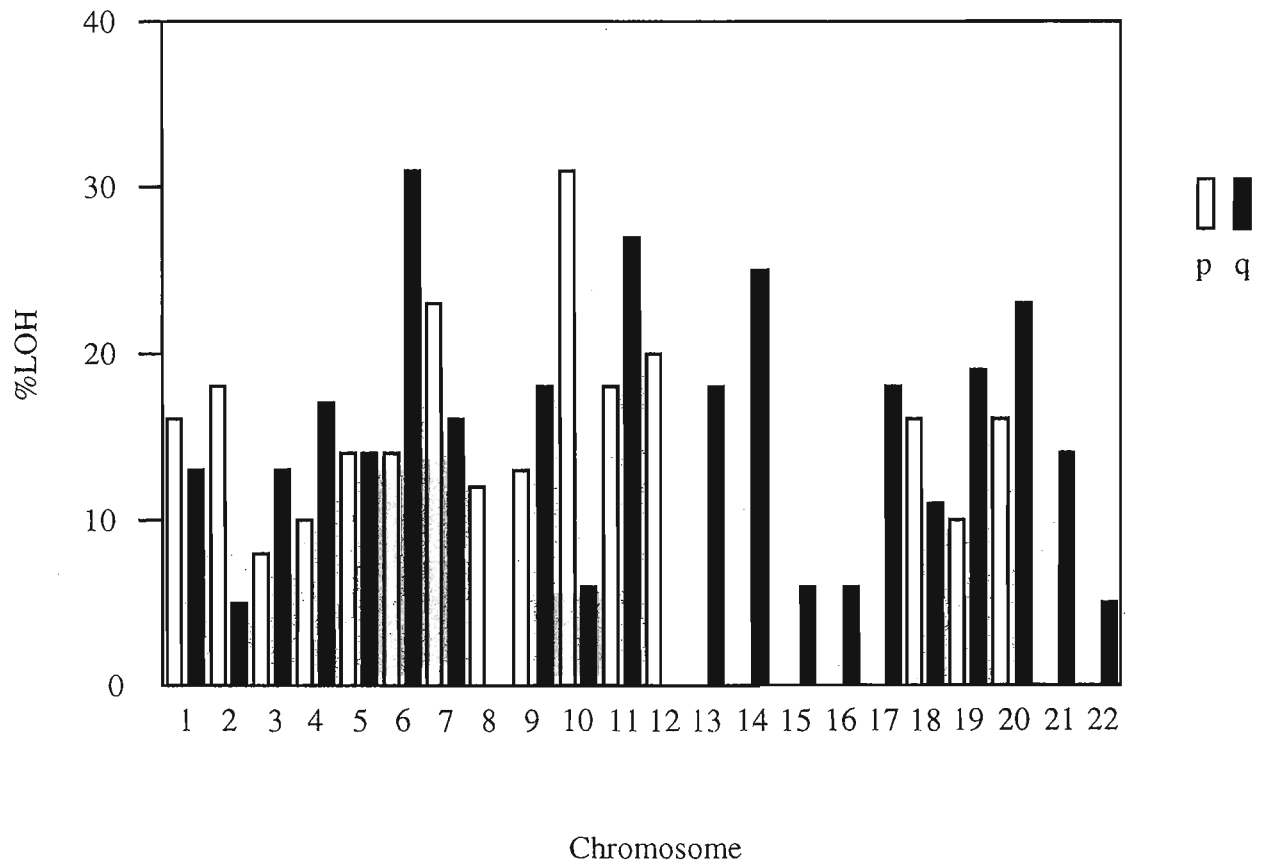


図3 MDSの白血化における各染色体のLOHの頻度。

MDSの白血化の過程で情報が得られた症例の20%以上にLOHを認めたのは6q(31%)、7p(23%)、10p(31%)、11q(27%)、14q(25%)、20q(23%)であった。