

### 3 白血病の治療効果判定における遺伝子マーカー

古川 達雄

新潟大学医学部付属病院高密度無菌治療部

#### Molecular Cytogenetical Markers Used for Evaluation of the Therapy for Hematological Malignancies.

Tatsuo FURUKAWA

*Division of Bone Marrow Transplantation*

*Niigata University Medical Hospital*

#### Abstract

Chromosomal translocations, involving transfer of DNA between chromosomes, are found in many of the hematological malignancies. As a result of chromosomal translocation a gene from one chromosome ends up adjacent to a gene on the chromosome to which the DNA has been translocated, and this may have important consequences for the cell and the patient. In some instances, fusion of genes results in the expression of abnormal chimeric oncoproteins whose altered biochemical properties contribute to the disruption of normal mechanisms. Translocations serve as useful disease markers at presentation and at follow-up for a variety of leukemias and lymphomas. For detection of MRD (minimal residual disease), standard morphology and karyotypic analysis is not sufficiently sensitive for follow-up but other techniques can be applied, including FISH (Fluorescence in situ hybridisation) and PCR (polymerase chain reaction).

Hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) has been one of the effective therapies for the patients with hematological disorders including leukemia. Serial monitoring of chimerism after allogeneic HSCT can be easily and rapidly performed using PCR-based assays analyzing informative tandem repeat genetic markers including short tandem repeat (STR) polymorphism. We applied this analysis using the GenePrint™ STR Multiples Systems (Promega) for the evaluation of chimerism after HSCT. We could detect the recipient specific band easily and rapidly which indicated the leukemic relapse early after transplantation. It is, therefore, confirmed that the STR analysis using GenePrint™ STR Multiples Systems is useful for detection of chimerism in HSCT therapy.

**Key words:** chromosomal translocation, MRD, short tandem repeat, HSCT

---

**Reprint requests to:** Tatsuo FURUKAWA  
Division of Bone Marrow Transplantation  
Niigata University Medical Hospital  
1-754 Asahimachi-dori,  
Niigata 951-8520 Japan

**別刷請求先:** 〒951-8520 新潟市旭町通り1-754  
新潟大学医学部付属病院 無菌治療部

古川 達雄

## はじめに

白血病をはじめとする血液悪性腫瘍患者においては、同種造血細胞移植をはじめとして多くの治療法が発展してきて、現在では治癒が期待できる悪性腫瘍の一つと考えられるようになった。さらに白血病を確定診断する診断法も、形態学的検索から細胞の表面抗原、さらには遺伝子検索までと発展してきている。今回は、白血病において利用されている遺伝子マーカーについて、その特徴を取上げ、さらに白血病治療への応用として、微小残存白血病の利用、そして遺伝子解析法の応用として、当院検査部で施行されている同種造血細胞移植後のキメラズム解析をまとめてみた。

### 白血病における遺伝子マーカー

白血病症例では、およそ 2/3 以上の症例において染色体異常を認める。その染色体異常は多彩ではあるが、なかでも最も頻度が高い異常は転座型染色体異常である。これまで転座に関連して異常を起こしている遺伝子が、数多く解明されてきている。染色体転座を遺伝子工学的に詳しく解析すると、転座が二つの遺伝子の途中で発生して、その結果一方の染色体上の遺伝子 A の 5' 側と、もう一方の染色体に乗っている遺伝子 B の 3' 側が融合して、あらたにキメラ遺伝子が形成される。その結果融合遺伝子からは、2 種類の蛋白が融合して形の異常な蛋白が形成される。そして結果的にはそれぞれの蛋白が有している正常な働きとは異なる、異常な活性を有する蛋白が細胞増殖や、細胞分化に異常をもたらして、白血病化に結びつくことがこれまでの研究で明らかにされてきている。

新たに形成されたキメラ遺伝子は、白血病細胞に特異的であることから、この遺伝子異常を検出することで、白血病の特異的診断に有用で、実際の診断にも利用されている。転座により形成された、新たな異常キメラ遺伝子（融合遺伝子）を検出する方法としては、Fluorescent In Situ hybridization (FISH) 法と Polymerase chain reaction

(PCR) 法を用いた診断法がもっとも有用である。

FISH 法は蛍光色素で標識した一本鎖 DNA プローブを、分裂期核または間期核内に存在する相補的な染色体上の DNA 配列部分とハイブリダイズさせる。転座に関与しているそれぞれの遺伝子を、異なる蛍光色素（たとえば赤色と青色）にて標識しておくことで、異常を有している遺伝子融合遺伝子においては、融合の結果二つの融合した（たとえば黄色の）色素として認識される。

この方法の感度は、1/100 から 1/1,000 程度であるが、ある細胞集団における転座異常を有する細胞の割合が直接的に解析され、たとえば慢性骨髄性白血病などの治療効果判定には重要な検査となっている。

一方 PCR 法を用いた診断法は、PCR の性格上大変感度がよく、1/10,000 から 1/1,000,000 程度にまで感度を上げることができる。転座型染色体異常を有する白血病においては、転座の結果形成される融合遺伝子から翻訳されて発現するキメラ mRNA を、reverse transcriptase (RT) を用いて cDNA を作成、その cDNA の融合部分を特異的に PCR 法を用いて増幅する RT-PCR 法がもっとも有用な検査となっている。

### 微小残存白血病の検出とその意義

急性白血病患者さんにおける治療経過を考えてみると、診断時の白血病患者さんの体内には、約  $10^{12}$  個の白血病細胞が存在するといわれている。その後化学療法による寛解導入療法を施行する。その結果治療がうまくいった例では正常の骨髓造血が回復して、骨髓検索等では見かけ上白血病細胞が 5 % 以下に減少した寛解と称される状態に至る。しかしながら寛解導入直後には、まだ最大  $10^9 \sim 10^{10}$  個程度の白血病細胞が残存している事が明らかにされており、このような微小残存病変 (MRD, minimal residual disease) を検出することで、白血病治療経過の評価に重要な情報を提供することが期待される。しかし寛解後の白血病細胞の割合は 3 % 未満と少なくなるので、光学顕微鏡による観察では微小残存白血病は診断困難であ

る。そこで現在汎用されている方法として、FISH法とPCR法が開発されてきた。それぞれの方法の感度は、FISH法で約1%程度、PCR法の応用では0.001%未満にすることすら可能になってきている。このように感度と特異性の高い検出法を実際の臨床に応用した研究として、特にPCR法を応用した白血病の治療経過を利用した成績が近年評価されてきている<sup>1)~3)</sup>。しかしながら、本当の評価が確立するためには、臨床経過の長期にわたる経過観察が重要であり、今後の臨床例の蓄積の結果、明らかになるものと考えられる。

### 同種造血細胞移植後のキメリズム解析

同種造血幹細胞移植は、白血病をはじめとする血液悪性腫瘍患者において、完全治癒を期待できる治療法として確立している。ドナー細胞の移植後に、生着したドナー細胞の存在を確認することは、拒絶や再発を含めた移植の評価において重要な検査である。移植後のドナー骨髄生着の確認方法としてはこれまで、

- 1) 染色体分析(性染色体など)
- 2) 赤血球抗原型判定
- 3) HLA型判定
- 4) 赤血球・白血球酵素型判定
- 5) DNA診断

などの方法が使用されてきたが、近年、法医学分野において個人識別や親子鑑定などの目的に利用されてきたSTR(Short Tandem Repeat)解析を応用し、骨髄移植前後におけるドナー由来細胞とレシピエント由来細胞のキメリズム解析をおこなって、移植後生着を確認している<sup>4)5)</sup>。

### Short Tandem Repeat (STR) の有用性

STR法を用いることで、同種造血幹細胞移植を施行した症例について、移植後のドナー細胞と患者細胞の割合を算出することが可能であり、そのような割合を経過観察することで、移植前の患者細胞の残存が検出される例もかなりの例で経験されている<sup>6)</sup>。そのような例におけるドナー細胞と

患者細胞の混合状態の意義は、今後さらに臨床例を蓄積することで明らかになっていくものと期待している。またこのような移植前の患者細胞の検出は、移植の成否を決定する再発の早期検出をも可能にしていって、現在は移植後検査の中でも必須の検査となっている。

### 謝 辞

共同研究者(日頃の御協力に感謝申し上げます)

新潟大学医学部第一内科: 血液班の諸先生方

新潟大学医学部附属病院輸血部 布施一郎先生

新潟大学医学部附属病院検査部

武田宏子さん、馬場みや子さん、山崎房子さん

稲野浩一先生、岡田正彦教授

### 文 献

- 1) Cave H, van der Werff ten Bosch J, Suciu S, Guidal C, Waterkeyn C, Otten J, Bakkus M, Thielemans K, Grandchamp B and Vilmer E: Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. European Organization for Research and Treatment of Cancer - Childhood Leukemia Cooperative Group. N Engl J Med 339: 591-598 1998.
- 2) Nyvold C, Madsen HO, Ryder LP, Seyfarth J, Svejgaard A, Clausen N, Wesenberg F, Jonsson OG, Forestier E and Schmiegelow K: Precise quantification of minimal residual disease at day 29 allows identification of children with acute lymphoblastic leukemia and an excellent outcome. Blood 99: 1253-1258 2002.
- 3) Mortuza FY, Papaioannou M, Moreira IM, Coyle LA, Gameiro P, Gandini D, Prentice HG, Goldstone A, Hoffbrand AV and Foroni L: Minimal residual disease tests provide an independent predictor of clinical outcome in adult acute lymphoblastic leukemia. J Clin Oncol 20: 1094-1104 2002.
- 4) 山崎房子, 稲野浩一, 古川達雄, 橋本誠雄, 相澤義房, 岡田正彦: 骨髄移植後のキメリズム解析におけるSTRの応用. 臨床検査 44: 327-330

- 2000.
- 5) 武田宏子, 稲野浩一, 山崎房子, 古川達雄, 岡田正彦: ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer (GeneScan 法) を用いた STR キメリズム解析の有用性. 日本検査血液学会雑誌 2: 255-260 2001.
- 6) 古川達雄, 橋本誠雄, 稲野浩一, 山崎房子, 武田宏子, 柿原敏夫, 矢野敏雄, 阿部 崇, 樋口 渉,

鳥羽 健, 高橋益広, 小池 正, 相澤義房: 造血器悪性腫瘍に対する同種造血幹細胞移植後の chimerism 解析. 臨床血液 42: 488-495 2001.

司会 どうもありがとうございました。それでは最後のご講演を拝聴することにします。歯学部の新垣先生から「口腔がんの診断マーカー」のお話です。よろしくお願いいたします。

#### 4 口腔がんの腫瘍マーカー

新垣 晋

新潟大学医歯学総合研究科  
組織再建口腔外科学分野

#### Tumor Marker for Oral Cancer

Susumu SHINGAKI

*Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences  
Department of Regeneration and Reconstruction,  
Division of Reconstructive Surgery*

#### 要 旨

臨床に應用されている口腔がんの腫瘍マーカーは治療効果の評価, 再発の早期発見など臨床経過を追跡するには有用であっても, がんのスクリーニングにはその意義は少ない。

頭頸部扁平上皮がん 139 症例について腫瘍マーカーの SCC 抗原と CEA を測定し T-stage, 分化度, リンパ節転移との関連性を検討した。SCC 抗原, CEA の陽性率はそれぞれ 22 % (31/139), 27 % (38/139) と低く, その combination assay の陽性率も 43% (60/139) と低い結果であった。T-stage, リンパ節転移との関連性は認められないものの腫瘍の分化度とは関連性を認め低分化型ほど高い陽性率を示した。

がんの微小転移, 血中のがん細胞が注目されその臨床的意義について報告がされてきている。口腔がん患者の血中抗 p53 蛋白抗体を測定し腫瘍の大きさ, 分化度, リンパ節転移と関連性を認め予後不良因子であることが示されている。また末梢血液中のがん細胞を cytokeratin (CK)

Reprint requests to: Susumu SHINGAKI  
Department of Regeneration and Reconstruction  
Division of Reconstructive Surgery  
Niigata University Graduate School of Medical  
and Dental Sciences  
2-5274 Gakkochō-dori,  
Niigata 951-8514 Japan

別刷請求先:  
〒951-8514 新潟市学校町通り 2-5274  
新潟大学大学院医歯学総合研究科・口腔生命科学  
顎顔面再建学講座・組織再建口腔外科学分野  
新垣 晋