

## 第26回 シスメックス血液学セミナー / 質疑応答

### 3. 染色体分析と遺伝子診断は白血病にどのように有効か

三谷 綱子

【司会・中原】神戸会場で技師の方から、一つ質問がありますのでお願いしたいと思います。

(質問) M3とM3バリエーションで染色体異常に差はあるのでしょうか。

【三谷】基本的にはバリエーションにもt(15;17)は出ます。形態学的には違いますが、分子生物学的には差はありません。

【司会】もう一つ質問があります。

(質問) t(15;17)転座の約10%の例は、それが隠れたかたちで存在する。cryptic translocationであるということはどういう意味でしょうか。

【三谷】t(15;17)転座は、核板をお示ししたのですが、非常に分かりにくい染色体異常です。末端で入れ替わっている部分が非常に小さいので、染色体の短い不良なmetaphaseですとそれを見落とす可能性があるのです。そういう意味で「cryptic」という言葉をお使いになったと思うのですが、本当はあるのに見えないという解釈が正しいので、ぜひFISH法と併用していただいて、本当にPML-RAR $\alpha$ があるのかどうかを確認していただくのが重要だと思います。

【司会】ありがとうございました。東京会場で質問があるようです。

【東京会場・米山】技師の方から二つ質問をいただいています。

(質問) M2でeosinoの増加が見られます。M4 with eosinophiliaと同様な理由でeosinophiliaが起こるのでしょうか。また、hypereosinophilic syndromeもイマチニブで治療ができるということですが、この理由はどのように説明できるのでしょうか。

【三谷】まず最初の質問ですが、inv(16)を伴うM4Eoで見られるeosinophiliaに関しては、好酸球が異染性を示し腫瘍性のものであると考えられています。一方、M2に見られる好酸球の異染性は軽微であり本当に腫瘍性のものかということに関してはまだ答えがありません。確かに現象として

は同じ好酸球増多なのですが、質的に全く同じものであるかどうかは不明です。

HES発症の、分子機構については、4q21の部分欠失により、FIP1L1/PDGFR $\alpha$ キメラ遺伝子ができている症例が半数以上あることがわかってきました。PDGFR $\alpha$ の活性化をイマチニブが抑えることによって、HESにイマチニブが効くわけですね。

【東京会場・米山】ありがとうございます。もう一つ技師の方から、ご質問があります。

(質問) CMLで、経過観察に好中球のFISH検査が行われるようになってきました。好中球を取り出して、そこから核酸を抽出し、リアルタイムRT-PCRを行うとしたら、その検査の意味するところは同じでしょうか。

【三谷】恐らく、骨髄検査の意味するところと同じでしょうか、というご質問なのだと思うのですが、最初に腫瘍細胞が増殖してくる場合は骨髄ですので、正確に病期を判定するには骨髄を採ったほうがいいのではないかと思います。

【東京会場・米山】ご質問は恐らく、末梢血で調べる場合に、好中球でFISHをするのと、核酸を抽出してリアルタイムRT-PCRをするのと、その違いもお尋ねかと思いますが、その点はいかがでしょうか。

【三谷】FISH法の感度はせいぜい数パーセントですが、PCRの場合は、プライマーの位置やサイクル数によりますが、10の6乗かそれ以上の感度が得られます。従って、感度という点ではもちろんPCRのほうが優れています。

【東京会場・米山】ありがとうございます。

【司会】名古屋会場で質問があるようです。高本先生、お願いします。

【名古屋会場・高本】三谷先生、クリアなご講演をありがとうございました。技師の方から、質問をいただいております。

(質問) 急性白血病のクローン性及びMRDの評価に

WT1のmRNAが用いられることがあります。リンパ腫の骨髄浸潤の有無および治療効果判定にも有用ですか。

【三谷】WT1は、基本的には急性白血病では増えませんが、リンパ腫では増えないので有用ではないと思います。

【名古屋会場・高本】私の個人的な興味で恐縮ですが、先生のマウスのお話の中で、PML-RAR  $\alpha$  と、RAR  $\alpha$ 、PMLのF1でかなり白血病の発症率が高くなるというようなお話があったと思うのですが、それはどういう機序によるものでしょうか。

【三谷】RAR  $\alpha$ -PMLキメラ形成に伴う癌抑制遺伝子PMLの不活化が重要であると考えられています。従来、血液学者はPML-RAR  $\alpha$  が大事だと思って、その機能を随分検討し白血病原性を証明してきたわけですが、実際にトランスジェニックマウスを作製してみたら両方のキメラ遺伝子を持っているほうがよりアグレッシブなAPLを発症することが明らかになり、逆側のメッセージが注目されました。

【名古屋会場・高本】ありがとうございました。もう1問あるのですが、質問が長いものですから、ほかの会場を先に進めておいていただければと思います。よろしく願います。

【司会】高本先生のほうで少し質問を詳察していただく間、特に他の会場で質問がないようですので、三谷先生、最後のほうを飛ばされたところが少しあるのですが、この時間をご利用して少し追加していただけますでしょうか。

【三谷】大体はお話させていただいたのですが、1点飛ばしてしまったのは、AML1関連の白血病に関しても、モデルマウスが非常に面白いことを教えてくれたことです。今、高本先生から、PML-RAR  $\alpha$  と、RAR  $\alpha$ -PMLと両方必要なのはなぜかというご質問がありましたが、AML1に関してはこういうことがわかっています。

AML1-MTG8のモデルマウスは、コンディショナルとトランスジェニックという2種類の方法で作製されています。ノックインマウスは胎生期に致死になりますので、これらとはにかく成体までマウスを生かしておいて、その時点でAML1-MTG8を発現させるための技術なのです。残念ながら

AML1-MTG8はそれだけでは白血病を起こさないということがわかりました。一方、アルキル化剤を添加すると白血病を発症することも明らかにされました、このAML1-MTG8は非常に有名な白血病原因遺伝子ですが、これはワンヒットでは白血病を発症させず、何か別のヒットが必要であるということがわかりました。

【司会】ありがとうございました。高本先生、先ほどの質問をお願いできますでしょうか。

【名古屋会場・高本】ご本人に直接ご質問をしていただきたいと思います。

【質問者】骨髄移植後に、患者がO型でドナーがAB型で、抗体価が徐々に下がり、逆に抗原が出てきたのですが、多分day49ぐらいで、FISHで、100%キメラということになったのですが、その少し手前ぐらいから逆に抗体価は上がりはじめ、抗原が消失しはじめたのですが、FISHの100%というのはどのぐらいの感度かと思ひまして、すべてキメラになったということだったのですが、それをどう解釈していいのかを教えていただきたいと思います。

【三谷】移植後の異性間FISHのお話ですよ。

【質問者】血清学的なものとは抗原側のものとかが分離してしまいましたので、その解釈をお教えください。

【三谷】FISH法の感度は数パーセント程度です。ABOの血液型の変化に関しては、赤血球の寿命は120日ありますので、これを考慮する必要があります。感度という点では、むしろPCRのほうがキメリズムの検出はより鋭敏にできると思います。

【質問者】ありがとうございました。

【司会】ありがとうございました。それでは、東京会場、よろしく願います。

【東京会場・米山】私自身、今日お示しいただいたような遺伝子学的な新しい知見がまだまだこれから臨床の場にも役に立つのではないかとということで非常に興味深く聞かせていただきました。

その中で、一つ私からお尋ねしたかったのは、テキストの「TCRの遺伝子の再構成の証明」のところ、特異的なプライマーを設定して症例ごとのMRDの検出ができるというようなことをお書

きいただいているのですが、そういったことが実際の臨床でどのくらい今後実用化されていきそうかということと、また、同じようにRAS 遺伝子の変異とか、そういうことが今後どんどん実際の臨床に使われていきそうかという見通しをお聞かせいただけませんかでしょうか。

**【三谷】**まず最初の質問ですが、TCRや免疫グロブリンのVDJ再構成の症例特異的なプライマーを設定して、治療経過を通してMRDを評価するという事は理論的には可能で、報告もいくつかあります。私たちの施設も臨床研究の一環として骨髄腫やリンパ腫を対象に試みてはいるのですが、なかなか症例特異的なプライマーを設定することが困難なことが多いので、現状では実用的なレベルに持っていくのは難しいと考えています。

RAS 遺伝子の変異に関しては、起こるところは3か所に決まっていますので、その有無は簡単にシーケンスを行えば決定することができます。今後、RASの分子標的療法としてファルネシル化阻害剤の臨床応用の可能性もありますので、臨床検査としてルーチン化していただくのは非常に意義があると思います。

**【東京会場・米山】**ありがとうございました。もう1点、技師の方からの質問で、先ほど少しお触れいただいたと思いますが、非常に興味深いホットなところですので少しご説明をいただいたらと思います。

(質問)グリベックを使用した際、Ph 染色体の消失が見られることもあるそうですが、この機序はどのようなになっているのでしょうか。

**【三谷】**BCR-ABLはその亢進したチロシン・キナーゼ活性をもって三つの下流シグナルを活性化することにより、造血幹細胞を腫瘍化させます。グリベックはチロシン・キナーゼ活性を抑制し、三つの下流シグナルを遮断することによって、腫瘍細胞の増殖を抑制しph1 染色体は消失します。最近わかってきたことは、グリベックはBCR-ABL陽性細胞にアポトーシスは誘導しないということです。本当にグリベックだけでCMLが治癒可能かどうかということに関しては今後の検討を待つ必要があると思います。Ph1が消えること=治癒である

判定するにはまだ時期尚早ではないかと思えます。

**【東京会場・米山】**ありがとうございます。耐性化ということに関してはどういう説明になっていますでしょうか。グリベックを使ったときに効かなくなってくるという分子的な機序に関しては。

**【三谷】**いくつかありますが、ATP結合部位に突然変異が入るためにグリベックがBCR-ABLに結合できないで機能を失うというのが一番有名な機序です。少なくとも一部の症例においては、グリベック使用前から突然変異が入ったクローンが存在していて、グリベックを使うことによってセレクションがかかってそういうクローンが残存し増殖してくると考えられています。

他には、BCR-ABLの遺伝子増幅か、多剤耐性P糖蛋白質の発現亢進等の機序も存在します。

**【東京会場・米山】**ありがとうございました。

**【司会】**三谷先生、今日一番最初に朝長先生のお話もあったのですが、WHO分類の中で遺伝子診断が随分導入されてきている。本日、会場の中には臨床検査技師の方が一番たくさん来られているのですが、それを臨床の実際の現場に導入していく場合に、一つには、以前と比べると手技的にはかなり簡便にはなっているのですが、まだまだ必ずしも十分ではない。そういう点が一つ今後やっていくべき道かなと我々は思っているわけですが、先生は実際にこれから遺伝子診断を実際の臨床に応用していく場合に、問題点や、あるいはどのようにそれを改善していくべきについて、ご意見がもしありましたらこの機会にお聞かせいただけるとありがたいのですが。

**【三谷】**難しい問題ですが、ぜひ専門家を育ててほしいということでしょうか。各病院で臨床検査技師の方々の役割や配置は違うのでしようし、ローテーションで回ってしまったりというようなこともあるようですが、遺伝子診断をやるのだという技師の方をぜひ育てていただけるとありがたいと思います。遺伝子診断は難しいことではなくて、だれでも正確にきっちりやればできることで、専門家をぜひ育てていただいて一緒に臨床にあたればと思います。

**【司会】**PCRやRT-PCR法等においても、特に最近、

定性と定量法が随分出てきています。それによってまたMRDのモニタリング等も行われるわけですが、そんな時に、検査の標準化といいますか、必ずしもまだその辺のところを整っておらず、これからやっていかなければいけないことかと思うのですが、その辺についてはいかがでしょうか。

**【三谷】**それは非常に大事な点で、特にキメラ mRNA の検出に関しても、どこにプライマーを設定するかだけで感度が10の何乗というオーダーで全然違うのです。ですから、国際的に規格化されたプライマーの位置やサイクル数で今後はMRDの評価をしていく必要があると思います。各施設がばら

ばらにプライマーを設定してサイクル数を決めているようでは、比較はできないですし、国際的な標準化が一番大事だと思います。

**【司会】**ありがとうございました。特にご質問がなければそろそろ時間ですので、ここで三谷先生の講演を終わりたいと思います。大変わかりやすく、また今後我々に対して、遺伝子診断、あるいは治療についてどんなふうにしていくべきかという大変示唆に富んだお話をいただきましてありがとうございました。