

| | | | |
|---------|---|--------|---------|
| 氏名(本籍) | なか お とも へい 中 尾 朋 平 (東京都) | | |
| 学位の種類 | 博 士 (医 学) | | |
| 学位記番号 | 博 甲 第 5112 号 | | |
| 学位授与年月日 | 平成 21 年 3 月 25 日 | | |
| 学位授与の要件 | 学位規則第 4 条第 1 項該当 | | |
| 審査研究科 | 人間総合科学研究科 | | |
| 学位論文題目 | Non-malignant elevation of Wilms tumor gene (WT1) expression is frequently observed in the blood and bone marrow of childhood acute leukemia in remission and in benign blood diseases. (小児急性白血病および良性血液疾患の末梢血や骨髄において, Wilms tumor (WT1) 遺伝子は再発や悪性細胞の増殖と無関係に高値をとる) | | |
| 主 査 | 筑波大学教授 | 医学博士 | 二 宮 治 彦 |
| 副 査 | 筑波大学准教授 | 博士(医学) | 小 室 広 昭 |
| 副 査 | 筑波大学准教授 | 博士(医学) | 川 内 康 弘 |
| 副 査 | 筑波大学講師 | 博士(医学) | 大 越 靖 |

論 文 の 内 容 の 要 旨

Wilms tumor 遺伝子 (WT1) は腎芽腫 (Wilms 腫瘍) の原因遺伝子として発見されたが, 多くの白血病で高発現していることが報告されており, その定量は成人 AL では予後予測因子や MRD の追跡に有用であることが示されている。一方で, 小児 AL の予後予測や MRD 追跡における WT1 定量の有用性については結論が得られていない。小児 AL の MRD 測定における WT1 定量の有用性の検討には, 健常小児における発現量の解析に加え, 寛解期 AL や良性血液疾患 (BD) 患者における発現量および多数の小児 AL 再発例を含む集団での検証が必要である。本研究は, 小児急性白血病寛解期と良性血液疾患における末梢血と骨髄の WT1 mRNA 発現量を測定・定量し, それぞれの WT1 発現量の基準値を検証することを目的とした。

(対象と方法)

対象: 寛解を維持している小児 AL 患児 58 名 (ALL36 名, AML22 名) を対象とした。PB および BM は (1) 発症時 (2) 寛解導入療法直後 (3) 強化療法中 (4) 維持療法中 (ALL のみ) (5) 治療終了後 1-3 か月 (6) 治療終了後 4 か月以上経過した時点の各時期に採取した。小児 BD 患児 67 名の PB および BM は治療前, 治療中および治療終了後に採取した。総検体数は PB 検体 957 件, BM 検体 279 件だった。AL 患児では (1) 発症時, (2) 寛解導入療法直後, (3) 強化療法中, (4) ALL の維持療法中, (5) 治療終了後 1-3 か月時, (6) ALL・AML の治療終了後 4 か月以上経過した時点の検体を用いた。追跡期間は 0-55 か月 (中央値は 17 か月), ALL 患児の寛解期間は 8-156 か月 (中央値 46 か月), AML 患児の寛解期間は 5-85 か月 (中央値 40 か月) だった。臨床的再発をきたした症例は ALL2 例, AML2 例。

試料の調整: 検体から抽出した total mRNA から逆転写して得た cDNA を PCR に供した。

検量曲線の作成: K562 細胞から得た cDNA を鋳型に PCR 法を行い, 増幅された WT1 産物を得た。分光光度計の定量値と分子量からコピー数を算出し, 希釈系列を作ってそれぞれの検量曲線を作成した。

WT1 定量：検体から得られた cDNA を鋳型に WT1 のプライマーセットを用いて ABI7900 で WT1 値を定量し、ALL、AML、BD の PB・BM 検体の定量値を、治療相ごとに比較検討した。また、寛解期 AL と BD で WT1 値が上昇した検体は、WT1 の上昇との関与が考えられる (1) G-CSF の使用 (2) 発熱を伴う、あるいは伴わない感染症 (3) 化学療法による骨髄抑制からの回復期 (4) 末梢血中の骨髓球系幼若細胞の出現の 4 項目について比較検討した。

WT1 値は過去の成人 AL の検討で AL の再発を示唆すると報告されている定量値 (PB では検出感度下限の 10^2 倍以上、当院の測定系では 10 [copies/total RNA 1 μ g] 以上；BM では検出感度下限の 10^3 倍以上、当院の測定系では 100 以上) をカットオフ値とした。

(結果) (*：有意差あり)

発症時 AL と BD の PB および BM の WT1 値

PB ALL (0.1-16,969；中央値 10.93) vs BD (0.1-2,735；中央値 0.1)

AML (2.08-7,344；中央値 1,340.9) > BD (*)

BM ALL (0.1-530,000；中央値 805) > BD (0.1-203；中央値 0.1) (*)

AML (0.1-970,000；中央値 25,000) > BD (*)

非再発例 AL の発症時 WT1 値で成人白血病の再発基準値 (PB で 10 以上、BM で 100 以上) を超えていたのは PB/ALL 7/14 (50%)、AML 4/5 (80%)、BM/ALL 52/60 (86.67%)、AML 13/14 (92.86%)

寛解期 AL と BD の PB および BM の WT1 値

PB ALL (0.1-340.7；中央値 0.1) vs AML (0.1-107.9；中央値 0.1) vs BD

BM ALL (0.1-361；中央値 7.301) vs BD

AML (0.1-5,300；中央値 130) > BD (*)

寛解期 AL と BD の WT1 の上昇 (PB で 10 以上、BM で 100 以上)

PB ALL 19/701 (2.71%)、AML 11/97 (11.34%)、BD 9/140 (6.43%)

BM ALL 3/117 (2.56%)、AML 23/36 (63.89%)、BD 8/52 (15.38%)

寛解期 AL と BD の治療相間の WT1 値の比較

ALL の PB で強化療法中 (0.1-52.3) > 維持療法中 (0.1-73.58) (*)

AML の PB で寛解導入直後 (0.1-71.06) > 治療終了後 4 か月以上 (0.1-4.639) (*)

BD では PB、BM とともに治療前、治療中、治療終了後の各採取時期の間の WT1 値の差は認めなかった

強化療法中 AL の WT1 値

PB ALL (PB 0.1-52.3；中央値 0.1) < AML (0.1-107.9；中央値 0.1) (*)

BM ALL (0.1-361 中央値；7.869) < AML (BM 1.104-1,200；中央値 50.98) (*)

治療終了後 1 から 3 か月後の AL の BM の WT1 値

ALL (0.1-74.19；中央値 0.1) < AML (0.1-5,300；中央値 88.035) (*)

その他の治療相では ALL と AML の比較では、PB・BM とともに有意差なし

(1) G-CSF の使用 (2) 発熱を伴う、あるいは伴わない感染症 (3) 化学療法による骨髄抑制からの回復期 (4) 末梢血中の骨髓球系幼若細胞の出現の 4 項目「events」について当時の臨床所見を確認できた寛解期 AL と BD の検体で比較した。

PB (4 項目のいずれかを認めた検体) > (4 項目のいずれも認めない検体) (*)

BM 同様の傾向を認めた

(考察)

成人白血病における WT1 発現量と予後や再発のリスクの関連はすでに多く検討されており、再発の基準値も提唱されている。一方、小児白血病では少数例での検討が散見されるのみで、まだ一致した見解はない。寛解期小児急性白血病と良性血液疾患では WT1 発現量が同レベルであり、しかも成人白血病の再発基準値を超えていた。また本研究の結果、G-CSF 投与や末梢血中の幼若細胞出現などの「events」が WT1 高値と相関し、WT1 を発現する非腫瘍性細胞の増殖によると考えられた。小児では成人と比較して WT1 を発現する非腫瘍性細胞が多く存在していると推測される。成人とは異なる小児の WT1 発現量の基準値を設定する必要がある。WT1 定量が MRD 判定として有用であるかを検討するには今後多数の再発例を含む小児急性白血病集団での解析が必要である。

(結論)

①小児急性白血病の寛解期では、寛解期の成人急性白血病と異なり、再発と無関係の WT1 値の上昇が認められた。②小児急性白血病の寛解期および小児良性血液疾患患者では、成人の WT1 発現量基準値と比較して、末梢血・骨髄ともに WT1 が高発現していた。③小児急性白血病患者の寛解期と小児良性血液疾患患者では、WT1 発現が同レベルであった。

略語：AL：急性白血病，MRD：微小残存病変，WT1：Wilms tumor 遺伝子，ALL：急性リンパ性白血病，AML：急性骨髄性白血病，BD：良性血液疾患，PB：末梢血，BM：骨髄血

審 査 の 結 果 の 要 旨

1. 小児における白血病の微小残存病変の評価に WT1 遺伝子の高発現を指標として応用するにあたり、基準となるデータを得るために、多くの臨床検体と多くの臨床経過を対比させた研究である。成人における WT1 の意義をそのまま適応できないことが明らかとなり、今後再発や MRD の評価の指標となる基準作りの必要性が強調されている。
2. 良性疾患における WT1 の高発現がなぜ起きているのか、単に成人と小児における基準値の設定の違いなのか、疑問点は残っている。
3. 一部、審議会の委員からの意見をふまえて論文の修正を必要としたが、今後の検討を行うにあたって貴重な研究結果を提供したと考えられる。

よって、著者は博士（医学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。