

Thesis

骨髓増殖症候群における N-ras, p 53 遺伝子の変異の検討

獨協医科大学 内科学 (血液)

鶴見 茂治

要 旨 骨髓増殖症候群 (myeloproliferative disorder : MPD) には真性赤血球増加症 (polycythemia vera : PV), 本態性血小板血症 (essential thrombocythemia : ET), 原発性骨髓線維症 (idiopathic myelofibrosis : MF) が含まれ, 骨髓系細胞の慢性的な増殖を主徴とするが, その発症や病期進展に關与する分子病態については未だ不明の点が多い. 我々は, 本邦の MPD 64 症例 (PV 15 例, ET 38 例, MF 11 例; 慢性期例計 58 例, 白血病化例計 6 例) につき, 造血器腫瘍で多く変異がみられる N-ras および p 53 遺伝子の変異についての解析を行った. 患者骨髓から得られたゲノム DNA から N-ras のエクソン 1, 2 および p 53 のエクソン 5-9 を PCR にて増幅しシーケンスを行ったところ, N-ras 遺伝子の変異はいずれの症例においてもみられなかったが, 2 例において計 3 つの p 53 遺伝子の変異が認められた. これらのうち 1 例は PV から慢性好中球性白血病に移行した症例であり, p 53 遺伝子のエクソン 5 内での点突然変異が認められた. 他の 1 例は ET から急性骨髓性白血病に移行した症例であり, p 53 遺伝子のエクソン 7 内の点突然変異とエクソン 5 内の 18 bp の欠失がみられ, これらの 2 つの変異は別々のアレルで生じていることが示された. 以上の結果より, MPD において N-ras および p 53 遺伝子の変異の頻度は低い, 後者は病期の進展に關与している可能性が示唆された.

Key Words : 骨髓増殖症候群, N-ras, p 53, 遺伝子変異

緒 言

骨髓増殖症候群 (myeloproliferative disorder : MPD) には, 真性赤血球増加症 (polycythemia vera : PV), 本態性血小板血症 (essential thrombocythemia : ET), 原発性骨髓線維症 (idiopathic myelofibrosis : MF) が含まれ, これらは慢性に経過する骨髓系細胞の増殖を主徴とし, 造血幹細胞レベルでのクローン性異常と考えられている¹⁻³⁾. MPD に類似した病態を呈する慢性骨髓性白血病 (chronic myelocytic leukemia : CML) ではフィラデルフィア転座による BCR/ABL キメラ遺伝子の形成が腫瘍化の本質と考えられているが⁴⁾, MPD においては, PV における 1q+, +8, +9, 20q- や MF における 1q+, 13q-, 20q- など recurrent な染色体異常が報告されてはいるものの疾患特異的とはいえず^{5, 6)}, その発症の分子機構もほとんど明らかにされていない. また, MPD においても, 実際の頻度は CML ほど高くなく病型によっても異なるが, 終局的には transformation を

きたし急性白血病に移行すると考えられている⁷⁾. しかし, その機序についても不明の点が多い.

Ras 遺伝子ファミリーおよび p 53 遺伝子は, 造血器腫瘍においてその病型を問わず変異がよく認められる遺伝子である. Ras 遺伝子は受容体からの増殖シグナル伝達において重要な役割を果たす G 蛋白をコードし, その 12, 13, 61 番目のアミノ酸の突然変異により GTPase 活性が低下することによってその下流の細胞増殖シグナルは亢進し細胞を癌化に導く^{8, 9)}. Ras 遺伝子, 特に N-ras 遺伝子の変異は急性白血病の 20~30% 程度, 骨髓異形成症候群 (myelodysplastic syndrome : MDS) の 10~20% 程度にみられ, 特に MDS から白血病への進展に關与していることが示されている⁹⁻¹⁷⁾. 一方, p 53 遺伝子は各種のストレスに反応して細胞周期を停止させたりアポトーシスを引き起こす転写因子をコードしており, 変異により不活性化され細胞を悪性化させる癌抑制遺伝子と考えられている^{18, 19)}. 本遺伝子は 17 番染色体短腕に存在し, 各種の悪性腫瘍において欠失や点突然変異などにより不活性化されることが知られており, その変異は, 進行型 MDS の 10~15% 程度に, 急性転化した CML の 20~30% 程度に認められ, やはり病勢の進展に關与していることが示されている^{16, 20-22)}.

しかしながら, 同じ骨髓系の腫瘍である MPD にお

平成 14 年 11 月 1 日受付, 平成 14 年 11 月 22 日受理

別刷請求先: 鶴見茂治

〒321-0293 栃木県下都賀郡壬生町北小林 880

獨協医科大学 内科学 (血液)

Table 1 MPD Patients in This Study

| | |
|--------|----|
| PV | 13 |
| PV/AML | 1 |
| PV/CNL | 1 |
| ET | 35 |
| ET/AML | 3 |
| MF | 10 |
| MF/AML | 1 |
| Total | 64 |

MPD, myeloproliferative disorder ; PV, polycythemia vera ; ET, essential thrombocythemia ; MF, idiopathic myelofibrosis ; AML, acute myelogenous leukemia ; CNL, chronic neutrophilic leukemia

Table 2 PCR Primers Used in This Study (5'→3')

| | | |
|----------------|-----|----------------------|
| N - ras exon 1 | (F) | CACTGAGTACAAACTGGTGG |
| | (R) | GGGCCTCACCTCTATGGTG |
| N - ras exon 2 | (F) | GATTCTTACAGAAACAAGT |
| | (R) | GTAGAGGTTAATATCCGCAA |
| p53 exon 5 | (F) | TTCCTCTTCCTACAGTACTC |
| | (R) | GCAAATTCCTTCCACTCGG |
| p53 exon 6 | (F) | ACCATGAGCGCTGCTCAGAT |
| | (R) | AGTTGCAAACCAGACCTCAG |
| p53 exon 7 | (F) | GTGTTATCTCCTAGGTTGGC |
| | (R) | CAAGTGGCTCCTGACCTGGA |
| p53 exon 8 & 9 | (F) | CCTATCCTGAGTAGTGGTAA |
| | (R) | CCAAGACTTAGTACCTGAAG |

F, forward ; R, reverse

Table 3 Mutations of The p53 Gene in MPD Patients

| Case | Age/Sex | Diagnosis | Mutated Exon | Nucleotide Change | Amino Acid Change |
|------|---------|-----------|--------------|-------------------|-------------------------|
| 1 | 55/M | PV/CNL | 5 | TGC→TTC | Cys176→Phe |
| 2 | 69/M | ET/RAEB-t | 5 | 18 bp deletion | 6 aa (158-163) deletion |
| | | ET/AML | 5 | 18 bp deletion | 6 aa (158-163) deletion |
| | | | 7 | CTG→CCG | Leu257→Pro |

MPD, myeloproliferative disorder ; PV, polycythemia vera ; ET, essential thrombocythemia, CNL, chronic neutrophilic leukemia ; RAEB-t, refractory anemia with excess of blasts in transformation ; AML, acute myelogenous leukemia

これらの遺伝子の変異については、少数例での報告はあるものの²³⁻²⁷⁾、その頻度につき同時検索されたものはまだみられていない。今回我々は、N-ras遺伝子およびp53遺伝子の変異のMPDの発症および病期進展における関与について明らかにするために、本邦のMPD計64例（白血球化した症例を含む）を対象として解析を行ったので報告する。

対象と方法

1. 対象

MPD患者64例（Table 1）を対象とした。それぞれの診断は、PVおよびETについてはPolycythemia Vera Study Groupの診断基準²⁸⁾に、MFについてはOkamuraらの提唱したもの²⁹⁾に従った。検体採取においては患者に説明し同意を得た。

2. DNAの抽出

ヘパリン加採取された骨髓血からFicoll-Paqueを用いた比重遠心法により単核細胞を分離し、フェノール・クロロホルム法により高分子DNAを抽出した。一部の症例では染色体分析用にカルノア固定された骨髓細胞より同様の方法にてDNA抽出を行った。

3. PCRおよびDNAシーケンス

各症例から得られたゲノムDNAを用いて、Table 2に示す各プライマーにより、N-ras遺伝子のエクソン1, 2, およびp53遺伝子のエクソン5, 6, 7, 8, 9を含む領域のPCR増幅を行った。50 ngのDNAを鋳型として、AmpliTaq Gold DNA Polymerase (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)を用い、添付されたバッファーから調製した反応液にdNTPを200 μM、各セットのプライマーを0.5 μMになるように加え、94℃、30秒（変性）、55℃、30秒（アニーリング）、72℃、1分（伸長反応）からなる過程を40サイクル行った。得られたPCR産物は同じプライマーとBig Dye DNA Polymerase (Applied Biosystems)を用いたdye terminator法により直接シーケンスを行い、変異の有無を検索した。変異があると考えられた検体については、もう一度PCRを行い得られた産物をpCR 2.1 プラスミド (Invitrogen, San Diego, CA, USA)にクローニングした後、dye primer法によりシーケンスを行い変異を確認した。

結 果

N-ras遺伝子の第1および第2エクソンの変異は、AMLやMDSでよく観察される12, 13, 61番目のアミ

Table 4 Changes of Chromosomal Abnormalities and p 53 Mutations in Case 2.

| | 1990. 3 | 1998. 10 | 1998. 12 |
|-------------------------|---------|---------------|--------------------------------|
| Diagnosis | ET | RAEB-t | AML |
| Chromosomal Abnormality | (-) | -5, -7, 20q- | inv (3), -5, -7, der (11) |
| p 53 Mutation | n. d. | del (158-163) | del (158-163) Leu 257 → Pro |

n. d., not determined ; del, deletion.

ノ酸に対応する部分を含め慢性期例および白血病化例のいずれにおいてもみられなかった。

p53 遺伝子の変異は、慢性期例ではいずれの病型においても認められなかったが、白血病化した2症例において計3つのものが検出された (Table 3)。

これら2例のうち、1例 (症例1) はPVから慢性好中球性白血病 (chronic neutrophilic leukemia ; CNL) に移行した症例であり³⁰⁾、p 53のエクソン5内で1塩基置換 (TGC → TTC) が起こり、p 53蛋白のDNA結合領域内の176番目のアミノ酸がCys → Pheへと変化する点突然変異であった (Fig 1A)。このアミノ酸残基はp53蛋白のコアドメイン内でDNAとの特異的結合に重要な保存領域III内に位置する。

もう1例 (症例2) はETと診断されてから8年後にMDS (RAEB-t) に移行し、さらに2カ月後にAMLに進展した症例である³¹⁾。染色体分析の結果では、ETと診断時には正常核型であったものが、RAEB-tへの移行時には-5, -7, 20q-の異常がみられるようになり、さらにAMLへの進展時にはinv (3), der (11) が加わっている (Table 4)。

本症例のRAEB-tへの移行時の検体にてp53のエクソン5内に18bpの欠失が認められ、158番目から163番目までの6アミノ酸の欠失を引き起こすと考えられた (Fig 1B)。さらに、AMLへの進展時の検体では、上記の変異に加えて、エクソン7内の257番目のアミノ酸をコードする部位の1塩基置換 (CTG → CCG) (アミノ酸はLeu → Proへと変化) による点突然変異が認められるようになった (Fig 1C)。これらの変異部位ともにコアドメイン内に存在し、後者の点突然変異は保存領域IV内に位置する。

また、AMLへの進展時の検体においてエクソン5からエクソン7までを含む領域をPCRにより増幅し、同様にpCR 2.1プラスミドにクローニングし、シーケンス解析を行ったところ、これら2つの変異は別々のプラスミドのクローンに認められ、両アレルに独立に生じていることが示された。

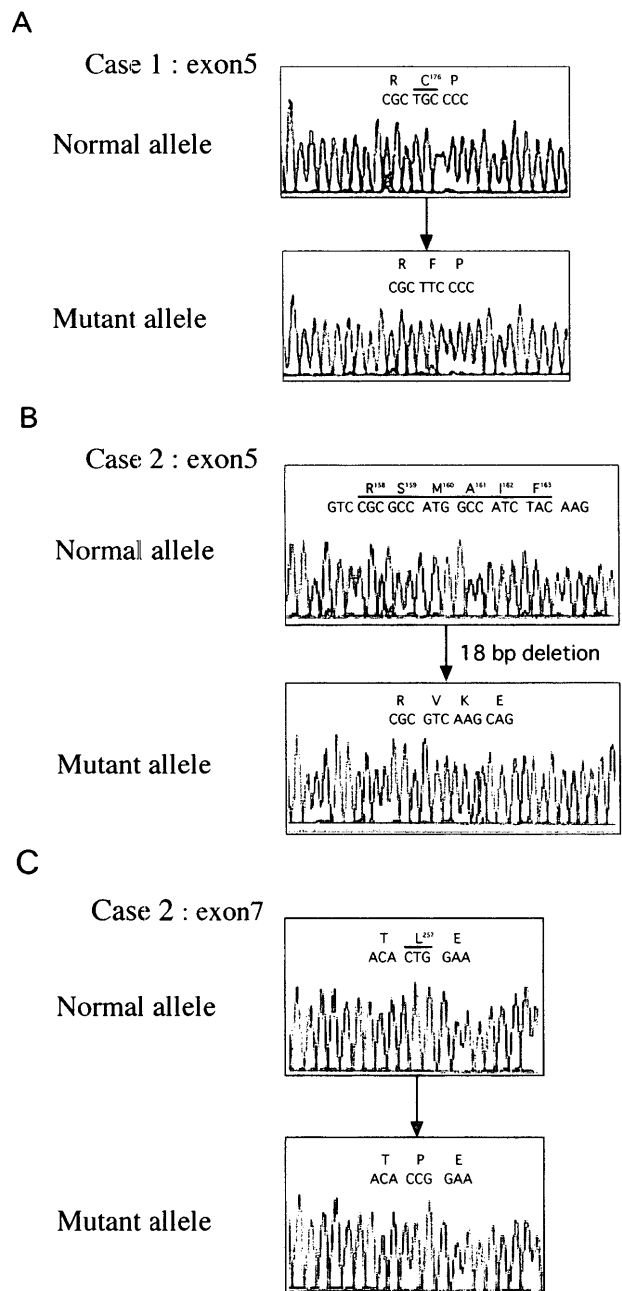


Fig. 1 p53 mutations in MPD patients. Nucleotide and amino acid changes are shown by arrows.

考 察

MPDの発症や病期進展に関与する遺伝子変異についてはまだ不明の点が多い。Ras遺伝子およびp 53遺伝子は造血器腫瘍において変異がよく認められる遺伝子であるが、MPDの多数例につき同時解析された報告はまだみられていない。

今回、我々は本邦のMPD 64例を対象として検討したところ、N-ras, p 53遺伝子の変異は、各々64例中0例(0%)、64例中2例(3.1%)と、AMLやMDSなど他の骨髄系造血器腫瘍に比し著しく低頻度であることが判明した。Gaidanoらの報告^{23, 24)}でも、PV, ETの慢性期の症例についてはras, p 53遺伝子ともに変異が認められず、我々の結果もこれに合致し、これらの遺伝子変異はPVやETの発症にはあまり関与していないものと考えられる。

しかしながら、また、Gaidanoらの報告²⁴⁾では、急性期の症例については、N-rasの変異はPVでは7例中0例、ETでは10例中1例にしかみられなかったが、p 53の変異は、PVでは7例中3例、ETでは10例中4例にみられ、これらの疾患の発症後の病勢の進展において何らかの役割を担っているものと考察している。今回の我々の検索でもp 53の変異は白血病化症例において6例中2例(33.3%)と比較的よく認められた。

症例1はPVからCNLへの移行という非定型的な経過を示した症例であるが、p53の変異は赤芽球系細胞の増殖から分化した好中球系細胞の増殖への変換の一因となっている可能性が考えられる。また、症例2は8年間のET慢性期を経て、RAEB-t, AMLへと移行した症例であり、RAEB-tへの移行時にはp53エクソン5内の18bp欠失による変異が、AMLへの進展時にはさらにもう片方のアレルでのエクソン7内での点突然変異が加わり、染色体異常とあわせて、このようなp 53の変異の蓄積がより悪性度の高い芽球の増殖を導いたものと考えられる。

一方、MFに関しては、Reillyらは慢性期MF症例においてN-rasの変異につき検索し、50例中3例(6%)に変異を見い出している²⁶⁾。また、Gaidanoらも慢性期・急性期合わせて9例のMF症例において2例にN-rasの、1例にp53の変異がみられたことを報告している²³⁾。今回、我々が検索したMF症例11例においては、N-ras, p53ともにその変異は検出されず、この差異の理由については明らかでない。今後さらに多数の本邦のMF症例についての解析が必要と思われる。

謝 辞 稿を終えるにあたり、終始、本研究のご指

導・ご校閲を賜りました獨協医科大学内科学(血液)三谷絹子教授、中村裕一講師に深謝いたします。

また、患者検体を供与していただきました、以下の先生方に感謝いたします。

東京大学血液腫瘍内科 小川誠司先生、半下石明先生、平井久丸先生

昭和大学藤が丘病院 小峰光博先生、藤田和博先生
九州大学第一内科 岡村孝先生、仁保喜之先生

日赤医療センター 橋本幸子先生、菅野恵子先生、鈴木憲史先生

文 献

- 1) Means RT Jr. : Polycythemia vera. in "Win trobe's Clinical Hematology" ed by Lee GR, Foerster J, Lukens J, et al. Williams & Wilkins, Baltimore, pp 2374-2389, 1999.
- 2) Levine SP. : Thrombocytosis. in "Wintrobe's Clinical Hematology" ed by Lee GR, Foerster J, Lukens J, et al. Williams & Wilkins, Baltimore, pp 1648-1660, 1999.
- 3) Clark DA, Williams WL. Myelofibrosis. in "Wintrobe's Clinical Hematology" ed by Lee GR, Foerster J, Lukens J, et al : Williams & Wilkins, Baltimore, pp 2390-2404, 1999.
- 4) Kurzrock R, Gutterman JU, Talpaz M. : The molecular genetics of Philadelphia chromosome - positive leukemias. N Engl J Med, **319** : 990-998, 1988.
- 5) Heim S, Mittelman F. : Chronic myeloproliferative disorders. in "Cancer Cytogenetics" Wiley-Liss, New York, pp 166-179, 1995.
- 6) Sandberg AA. : "The Chromosomes in Human Cancer and Leukemia" Elsevier, New York, 1992.
- 7) Cervantes F, Tassies D, Salgado C, et al : Acute transformation in nonleukemic myeloproliferative disorders : actuarial probability and main characteristics in a series of 218 patients. Acta Hematol, **85** : 124-127, 1991.
- 8) McCormick F. : ras Oncogenes. in "Oncogenes and the Molecular Origins of Cancer" ed by Weinberg RA : Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, pp 125-145, 1989.
- 9) Bos JL. : Ras oncogenes in human cancer : a review. Cancer Res, **49** : 4682-4689, 1989.
- 10) Janssen JWG, Steenvoorden ACM, Lyons J, et al : RAS gene mutations in acute and chronic myelocytic leukemias, chronic myeloproliferative disorders, and myelodysplastic syndromes. Proc Natl Acad Sci USA, **84** : 9228-9232, 1987.

- 11) Hirai H, Kobayashi Y, Mano H, et al : A point mutation at codon 13 of the N-ras oncogene in myelodysplastic syndromes. *Nature*, **327** : 430-432, 1987.
- 12) Hirai H, Okada M, Mizoguchi H, et al : Relationship between an activated N-ras oncogene and chromosomal abnormality during leukemic progression from myelodysplastic syndrome. *Blood*, **71** : 256-258, 1989.
- 13) Yunis IJ, Boot AJ, Mayer MG, et al : Mechanisms of ras mutation in myelodysplastic syndrome. *Oncogene*, **71** : 256-258, 1989.
- 14) van Kamp H, de Pijper C, Verlaan-de Vries M, et al : Longitudinal analysis of point mutations of N-ras protooncogene in patients with myelodysplasia using archived blood smears. *Blood*, **79** : 1266-1270, 1992.
- 15) Paquette RL, Landaw EM, Pierre RV, et al : N-ras mutations are associated with poor prognosis and increases risk of leukemia in myelodysplastic syndrome. *Blood*, **82** : 590-599, 1993.
- 16) Mitani K, Hangaishi A, Imamura N, et al : No concomitant occurrence of the N-ras and p 53 gene mutations in myelodysplastic syndromes. *Leukemia*, **11** : 863-865, 1997.
- 17) Nakagawa T, Saitoh S, Imoto S, et al : Multiple point mutation of N-ras and K-ras oncogenes in myelodysplastic syndrome and acute myelogenous leukemia. *Oncology*, **49** : 114-122, 1992.
- 18) Levine AJ, Momand J, Finlay CA. : The p53 tumor suppressor gene. *Nature*, **351** : 453-456, 1991.
- 19) Harris CC, Hollstein M. : Clinical implications of the p53 tumor-suppressor gene. *N Engl J Med*, **329** : 1318-1327, 1993.
- 20) Sugimoto K, Hirano N, Toyoshima H, et al : Mutations of the p 53 gene in myelodysplastic syndrome (MDS) and MDS-derived leukemia. *Blood*, **81** : 3022-3026, 1993.
- 21) Wattel E, Preudhomme C, Hecquet B, et al : p 53 mutations are associated with resistance to chemotherapy and short survival in hematologic malignancies. *Blood*, **81** : 3022-3026, 1993.
- 22) Adamson DJA, Dawson AA, Bennett B, et al : p 53 mutation in the myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol*, **89** : 61-66, 1995.
- 23) Gaidano G, Guerrasio A, Serra A, et al : Mutations in P53 and RAS family genes are associated with tumor progression of BCR/ABL negative chronic myeloproliferative disorders. *Leukemia*, **7** : 946-953, 1993.
- 24) Gaidano G, Pastore C, Santini V, et al : Genetic lesions associated with blastic transformation of polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Genes Chromosome Cancer*, **19** : 250-255, 1997.
- 25) Sterkers Y, Preudhomme C, Lai J-L, et al : Acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes following essential thrombocythemia treated with hydroxyurea : high proportion of cases with 17p deletion. *Blood*, **91** : 616-622, 1998.
- 26) Reilly JT, Wilson G, Barnett D, et al : Karyotypic and ras gene mutational analysis in idiopathic myelofibrosis. *Br J Haematol*, **88** : 575-581, 1994.
- 27) Buschle M, Janssen JW, Drexler H, et al : Evidence for pluripotent stem cell origin of idiopathic myelofibrosis : clonal analysis of a case characterized by a N-ras gene mutation. *Leukemia*, **2** : 658-660, 1988.
- 28) Murphy S. : Diagnostic criteria and prognosis in polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Semin Hematol*, **36** : Suppl 2, 9-13, 1999.
- 29) Okamura T, Kinukawa N, Niho Y, et al : Primary chronic myelofibrosis : clinical and prognostic evaluation in 336 Japanese patients. *Int J Hematol*, **73** : 194-198, 2001.
- 30) Higuchi T, Oba R, Endo M, et al : Transition of polycythemia vera to chronic neutrophilic leukemia. *Leuk Lymphoma*, **33** : 203-206, 1999.
- 31) 堀越桃子, 他 : 胃癌治療後骨髓異形成症候群を経てinv (3) を呈する急性骨髄性白血病へ移行した本態性血小板血症. *臨床血液*, **41** : 68-71, 2000.

Examination of the Variation of N-ras in a Marrow Multiplication Syndrome, and p53 Gene

Shigeharu Tsurumi

Department of Hematology, Dokkyo University School of Medicine, Mibu, Tochigi, 321 - 0293 Japan

We investigated the involvement of the N-ras oncogene and the p 53 tumor suppressor gene in samples from 64 patients with myeloproliferative disorders (MPD), including polycythemia vera (PV), essential thrombocythemia (ET) and idiopathic myelofibrosis (MF). The mutations in N-ras exons 1 and 2 (containing codons 12, 13 and 61) and p 53 exons 5 - 9 were tested by polymerase chain reaction (PCR)-direct sequencing. No mutations in the N-ras gene were detected in any cases. Alteration of the p 53 gene was found in two patients, one with chronic neutrophilic leukemia

derived from PV and one with acute myelogenous leukemia derived from ET. The former case exhibited a missense mutation within exon 5. The latter presented a small deletion within exon 5 and a missense mutation within exon 7 occurring independently on both alleles. These results suggest that the involvement of both genes are rare in chronic phase MPD and inactivation of the p 53 gene might play a role in progression of the disease.

Key Words : myeloproliferative disorder, N-ras, p 53, gene mutation