

# 博士論文審査報告書

## 論 文 題 目

Simple and accurate methodology for quantification of genetic markers in acute leukemias and myeloproliferative neoplasms

急性白血病と骨髄増殖性腫瘍における遺伝子マーカーの  
簡便・正確な定量手法

申 請 者

Soji	Morishita
森下	総司

生命医科学専攻 環境生命科学研究

2011 年 2 月

遺伝子マーカーは、遺伝子定量手法の発展・普及により比較的簡便に検出あるいは定量できるため、病態の診断、治療の予後予測、病態のモニタリングに利用されるなど、臨床の現場へ着実に応用されつつある。特に血液疾患における遺伝子マーカーの研究はめざましい進歩を遂げ、他のがん分野を常に牽引してきた。例えば、慢性骨髄性白血病（CML）患者の90%以上に、CMLの遺伝子マーカーであるBCR/ABLキメラ遺伝子が存在することが知られている。BCR/ABLキメラ遺伝子はCML診断の極めて有効な指標であるばかりか、BCR/ABLキメラ遺伝子のABLキナーゼドメインにおける点突然変異の有無や種類が薬剤選択の指標となるため、治療の予後予測が立てやすい。さらには、BCR/ABLキメラ遺伝子量を定量することで、治療の経過を容易にモニタリングできる。

近年、網羅的なゲノム解析を可能とする様々な手法が確立され、それらを用いた解析により、新たな遺伝子マーカーが次々と発見されている。それに伴い、病態診断の拠り所として、また、治療の予後予測や病態モニタリングの手段として、遺伝子マーカーの定量技術をスタンダード化する必要性が高まっている。

本論文では造血器腫瘍関連、特に白血病と骨髄増殖性腫瘍の遺伝子マーカーを定量するための新規な遺伝子定量技術の確立を目的としている。本論文は5章から構成されている。以下に各章の審査概要を述べる。

第1章では、造血器腫瘍の遺伝子マーカーと、その検出・定量技術に関する既往の知見および問題点を、最近の研究動向を踏まえつつ概説し、本論文の背景をまとめるとともに、本論文の意義および目的を明らかにしている。

第2章では、白血病（特に急性白血病）の汎用遺伝子マーカーとして臨床検査へ実用化されたウィルムス腫瘍抑制遺伝子1（Wilms' tumor suppressor gene 1: WT1）mRNAの発現量を、既存手法と比較し、より迅速、簡便に定量するための新たな定量系を確立している。まず、reverse transcription loop-mediated isothermal amplification（RT-LAMP）法を用い、WT1 mRNAの迅速・簡便な定量系を構築している。RT-LAMP法は、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応法（RT-PCR）法のように温度変化を必要とせず、等温条件下で対象遺伝子を増幅可能な新規遺伝子増幅手法である。WT1 mRNAを特異的に増幅させるようなオリゴDNAのセットをプライマーとして設計し、それらを用いてRT-LAMP法によってWT1 mRNAの増幅を試みたところ、10コピーのWT1 mRNAを30分程度で検出できることを示している。さらに、HeLa細胞RNAにWT1 mRNAを既知量混入させたものを測定用サンプルとして調製し、これらサンプル中のWT1 mRNA量をRT-LAMP法およびリアルタイムRT-PCR法でそれぞれ定量した結果、両手法とも真値に近い値を示すことを示している。これらの結果から、RT-LAMP法はリアルタイムRT-PCR法と同等の定量精度を持つことを明らかにしている。RT-PCR法ではRNAの逆転写反応とその後の増幅反応を別々に実施する必要があるのに対し、RT-LAMP法は等温反応であるため、逆転写反応と増幅反応が同時に起こ

り、比較的短時間で反応が終了するという利点を有する。また、遺伝子増幅反応の副産物であるピロリン酸マグネシウムの生成量を濁度としてリアルタイムに測定することで、対象の遺伝子量を定量することも可能である。このように、本論文では、RT-LAMP法が既存の手法と同等の精度を持ちながら、より迅速・簡便に白血病の病態をモニタリングできる手法であることを明らかにしている。つづいて、より正確な病態モニタリング実現のため、遺伝子の増幅阻害物質混入下でも正確な遺伝子定量が可能な手法である Alternately Binding quenching probe Competitive(ABC)法を RT-PCR法と組み合わせ(ABC RT-PCR法)、WT1 mRNAの簡便・正確な定量手法の確立を試みている。ABC RT-PCR法では、測定対象となる遺伝子と等しい増幅効率で競合的に増幅される既知量の遺伝子を内部標準として反応系に添加し、定量を行う。反応系にはグアニン塩基との電子移動により蛍光強度が著しく消光する性質を持った蛍光色素がラベルされたプローブが添加されている。従って、増幅反応後の蛍光強度が対象遺伝子と内部標準遺伝子の割合を反映するため、対象遺伝子量を算出できる。急性白血病患者2名より経時的に採取した骨髓サンプルよりトータル RNA を抽出し、これらのサンプル中の WT1 mRNA 発現量を ABC RT-PCR法にて定量した。その結果、各々の患者の病態に従って WT1 mRNA 発現量が増減する様子が確認されたことから、ABC RT-PCR法により白血病の病態モニタリングが可能であることを示している。本手法の最大の特長は、内部標準法であるために遺伝子の増幅阻害物質の影響を数学的に打ち消すことのできる点であり、既存手法と比較して、より正確な定量が可能となった。

第3章では、骨髓増殖性腫瘍(myeloproliferative neoplasm: MPN)において2005年に報告された遺伝子マーカーである Janus Kinase 2 (JAK2) 遺伝子の点突然変異(JAK2V617F)のアレルバーデン、すなわち[変異 JAK2 遺伝子量/JAK2 全遺伝子量) × 100%]について、簡便・低コスト・正確な定量手法の構築を行っている。本章では、第2章と同様に ABC-PCR法の適用を試み、既存手法であるリアルタイム Allele Specific PCR (AS-PCR)法と比較している。ABC-PCR法の定量精度確認のため、UT-7細胞株(JAK2野生型株)抽出DNAとHEL細胞株(JAK2変異型株)抽出DNAを任意のアレルバーデンとなるように混合し、模擬定量サンプルを調製している。これらの JAK2 アレルバーデンを ABC-PCR法とリアルタイム AS-PCR法で定量し、その値を真値と比較した。その結果、ABC-PCR法はアレルバーデン 10%~90%の範囲においてリアルタイム AS-PCR法よりも真値をよく反映した値を示し、リアルタイム AS-PCR法はある程度の真値からのずれを許容すればアレルバーデン下限値 1%まで定量可能であるという結果を得ている。つぎに、MPN患者と健常者より採取した血液サンプルより DNA を抽出し、それらのサンプル中の JAK2 アレルバーデンを ABC-PCR法およびリアルタイム AS-PCR法でそれぞれ定量し、その値を比較している。結果として、アレルバー

デン下限値 10%までにおいて両者の定量結果には相関性があることを示している。以上の結果から、ABC-PCR 法は、アレルバーデン 10%~90%の範囲では、血液サンプル中の JAK2 アレルバーデンを簡便・正確に定量できることを明らかにしている。ABC-PCR 法では、増幅反応後の蛍光値が対象のアレルバーデンに依って変化するため、PCR 法により DNA を増幅し、その後に蛍光強度を測定するのみで対象の JAK2 アレルバーデンを定量することが可能である。さらに、ランニングコストをおよそ半分に抑えることも可能であることから、実用的な手法として普及することが期待される。

第4章では、第3章で確立した ABC-PCR 法による JAK2 アレルバーデン定量のための標準サンプルの作製・評価手法を提案している。近年、標準曲線を用いた相対定量ではなく、絶対定量によって対象の遺伝子数を測定する新たな手法としてデジタル PCR 法が確立された。本論文では、アレルバーデンの値を保証された標準サンプルの作成用に、デジタル PCR 法を利用することを提案している。まず、AS-PCR 法を基盤としてデジタル PCR 法により JAK2 アレルバーデンを定量できるような反応条件を検討し、次いでこれを用いて野生型と変異型の JAK2 遺伝子量をデジタル PCR 法で定量し、その定量値をもとに ABC-PCR 法のための標準サンプルを作製することに成功している。そして、作製した標準サンプルを用いて ABC-PCR 法を実施し、アレルバーデンの真値を忠実に反映した定量結果を得られることを確認している。このような標準サンプルの作成技術の確立は、実用化の促進に寄与すると思われる。

第5章では本論文の総括を行っている。

以上、本論文では造血器腫瘍、特に白血病と骨髄増殖性腫瘍の遺伝子マーカーを簡便・低コスト・正確に検出・定量できる手法の確立を行っている。本成果は、造血器腫瘍の診断の指標としての利用に留まらず、治療の予後予測、病態のモニタリング、さらには治療のための投薬判断の指標などに利用される可能性が高い。また、今後さらに発見がなされてゆくものと予想される種々の遺伝子マーカーの検出・定量へも応用可能であり、臨床検査医学の分野への幅広い寄与が期待される。よって、本論文は博士（工学）の学位論文として価値あるものと認める。

2011年2月

審査員	(主査)	早稲田大学教授	博士(工学) 東京大学	常田 聡
		早稲田大学教授	医学博士(慶應大学)	池田康夫
		早稲田大学教授	博士(理学) 早稲田大学	加藤尚志
		順天堂大学教授	医学博士(自治医科大学)	小松則夫