

報告書

平成14年度 丸木記念特別奨学研究費 B 研究実績報告書

再生不良性貧血における染色体不安定性が白血病への
病態移行に与える影響に関する研究

受賞者 矢ヶ崎 史治 (埼玉医科大学血液内科学教室)

共同研究者 松田 晃*, 別所 正美*

[要旨] 再生不良性貧血 (AA) の予後は免疫抑制療法の導入により改善したが、一部の症例が治療後に数的染色体異常を有する急性骨髄性白血病 (AML) や骨髄異形性症候群 (MDS) に移行する。今回我々は、未治療 AA 19 例の骨髄細胞を対象に、分裂期染色体における染色体不安定性のマーカーと考えられる Premature Chromatid Separation (PCS) の出現頻度と間期核 FISH 法による 1, 6, 7, 8, 17 番染色体の異数性との相関を検討した。結果、解析染色体のいずれかに異数性を認めた群 (13 例) では PCS は $24.2 \pm 9.0\%$ で、(-) 群の $7.0 \pm 8.8\%$ に比して有意に高かった ($p=0.007$)。染色体の数的異常が個々の細胞に出現するモザイク異数性を呈するが、染色体異常の内訳は減数性で $-6(42\%)$, $-1(37\%)$, $-7(26\%)$, 増数性では $+6(37\%)$, $+8(21\%)$, $+1(16\%)$ であり、クローン性疾患移行時に好発する染色体異常が多かった。以上より AA では初診時より染色体不安定性によりモザイク異数性が起きていると考えられた。

[緒言]

再生不良性貧血 (AA) は、造血幹細胞の減少により汎血球減少をきたす良性疾患と考えられており、近年、免疫抑制療法 (IST) により予後は著しく改善した。しかし、IST 後、約 10 年で 10-15% の症例が骨髄異形性症候群 (MDS) や急性骨髄性白血病 (AML) に移行 (clonal evolution) することが問題になっている¹⁾。MDS/AML 移行例における染色体異常は $+8$, -7 等の数的染色体異常の頻度が高いことが特徴であり、これらの病態変化は骨髄移植後には認められない。そこで我々は、AA 治療前にこれらの数的染色体異常がすでに発生している可能性を考え、潜在的な -7 minor clone の存在と clonal evolution との関連性を高感度 Two-color FISH 法を用いて検討してきた。結果、AA 初診時に存在する -7 minor clone は早期に clonal

expansion するものと、治療後に感度以下に消退するものがあることが判明した²⁾。近年、AA 治療後に一過性に -7 などの染色体異常が出現し自然消退する報告も散見される。また別所らによるセントラルレビューによって AA と診断され IST を施行された 79 例の病態移行に関する前方向研究の結果、観察期間 1 年で MDS 移行と診断されたのは 5 例でいずれも治療前後ともに染色体異常は認めないこと、治療前後で核型解析が可能であった 56 例中、10 例 (17.9%) に染色体異常が出現するが形態学的に MDS や AML の移行を認めないことが明らかにされた。染色体異常の内訳は $-7:5$ 例; $del(13):2$ 例; $+8:1$ 例; $+22:1$ 例; その他: 1 例であった。さらに間期核 FISH 法による解析では治療後 11.1% に -7 陽性化を認めた³⁾。過去の報告では AA から MDS 移行までの期間の中央値は約 5 年であり、染色体異常として -7 や $+8$ が多いことが知られており、本研究の結果は病態移行に先立って染色体異常が早期に出現している可能性を示唆している。

今日まで、癌細胞における数的染色体異常は癌化の結果生ずる染色体不安定性に起因する二次的なものと考えられてきた。近年、急速に染色体分裂機構が分子生物学的に解明されつつあり⁴⁾、mitotic check point 遺伝子である MAD2 の haplo-insufficient mice では染色体不安定性が生じ減数性染色体異常が発生すること、長期の潜伏後に肺癌が発生することが報告され注目されている⁵⁾。さらに mitotic check point 機構に異常が発生すると紡錘糸阻害剤存在下でも、cohesin の分解により姉妹染色体の早期解離現象、premature chromatid separation (PCS) が発生した。また Kajii らによって PCS 家系におけるホモ接合体例では Wilms 腫瘍が高率に発生することも報告⁶⁾され、PCS が発癌の initiation になりうることを示唆されている。

そこで我々は AA における数的染色体異常の発生原因として、染色体分配異常を引き起こす染色体不安定性が AA で亢進している可能性を考え、染色体不安定

* 埼玉医科大学血液内科学教室

性を示唆すると考えられるPCSの分裂期染色体における出現頻度と間期核FISH法を用いた骨髓細胞における染色体異数性との相関を検討した。

[対象と方法]

1998年5月から当科で入院加療された再生不良性貧血19例および健常者7例の骨髓細胞における染色体異数性とPCSを以下の方法で検討した。CEP7と7q31上のD7S486に対するdual color probeをcohybridizationし間期核500個を観察し、両者のsignalが一ケのものを-7とした。CEP6, CEP8およびCEP1, CEP17をそれぞれcohybridizationし間期核200個におけるsignal数をカウントした。さらに骨髓液にcolcemid 0.01μg/mlを添加し、37℃、18時間培養。常法に従って、低張および固定処理した。上記のFISH標本における分裂前期から中期の染色体を最低20細胞観察しPCSの出現頻度を解析した。

[結果]

再生不良性患者骨髓細胞におけるPCSの出現

AAで認められた典型的PCS像をFig.1に示す。PCSの発生比率はAA治療前(n=19)で19.0±11.5% (median ± SD) (range:0-37.4)であり健常者骨髓(n=7)では10.8±3.9% (median ± SD) (range:2.9-14.5)であった(Fig. 2)。両群間に有意差は認められなかったが(p=0.088; Mann-Whitney U)。AAではPCSの発生比率が高い症例(PCS>20%)が53% (10/19)に認められ(Table 1)、PCSの発生比率と重症度の相関は認めなかった(Fig 2)。さらに個々の症例の治療経過におけるPCSの推移を検討すると、初診時にPCS高値を示した症例(20.0%、

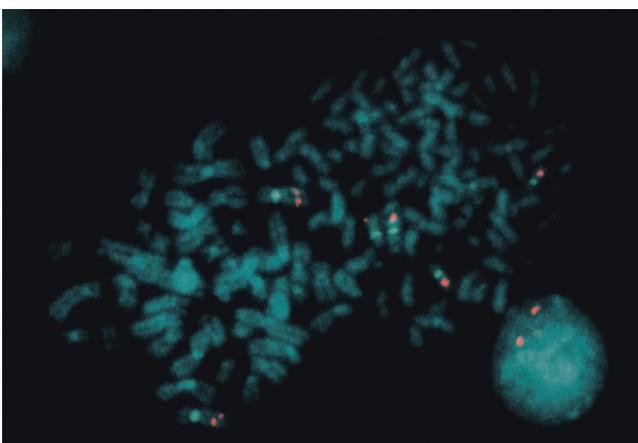


Fig 1. A representative premature chromatid separation metaphase (right) and a normal metaphase (left) from BM cells of a patient with aplastic anemia, treated with 0.01 μg of colcemid/ml for 18hrs. FISH analysis using dual color probes for the centromere (green) and D7S486 (red) of chromosome 7 shows completely separated sister chromatids with the premature metaphase of chromosome 7.

Table 1. Patient Characteristics and Results of Interphase FISH and PCS Analyses

Patient No.	Age/y.	Sex	Gbanding	Severity	Therapy	Res to Tx	WBC	Neu	Hb	Plt	RBC	Ret	PCS%	No.of Meta	Anu	+7 (%)	-7 (%)	+8 (%)	-8 (%)	+6 (%)	-6 (%)	+1 (%)	-1 (%)	+17 (%)	-17 (%)
SM-P1	68F	F	46,XX[20]	non S	CYA	NR	2400	960	7.5	1.5	202	5.25	2	50no	0	0.2	1.1	3.6	3.2	3.2	3	3	0	1.0	
SM-P2	64F	F	46,XX[20]	non S	ATG+PSL	ND	2460	934	7.3	2.4	212	4.35	7	102no	0	0.6	0.5	4.5	1.5	8.5	1	3.5	0	1.1	
SM-P3	83F	F	46,XX[20]	non S	CYA	NR	2240	531	5.7	1.2	152	1.98	10	20no	0	0.2	0.4	8.2	0	3.8	1	4	0	1.0	
SM-P4	77F	F	46,XX[20]	S	CYA	NR	1270	240	5.3	0.4	173	0.62	15.4	26yes	0	0.6	0	9	1	10.1	1	3	0	12.5	
SM-P1	5F	F	46,XX[20]	non S	BMT	NR	5170	1225	7.1	3.9	208	2.13	20	100yes	0	1.9	0.8	3.9	1.6	5.4	5	3	0.5	7	
SM-P5	21M	M	46,XX[20]	S	ATG+CVA	RES	2880	345	4	0.7	119	0.96	27	44yes	0	1.3	0.3	8.5	0.3	21.5	1	3.5	0	16.5	
SM-P6	51F	F	46,XX[20]	S	ATG+CVA	NR	2380	595	6.1	0.8	179	1.29	5	30no	0	0.8	0	4.5	0	4.5	0	3.5	0	1.1	
SM-P7	32F	F	46,XX[20]	S	ATG+CVA	RES	1570	312	4.1	6.8	0.9	193	5	50yes	0	1.1	0.5	3.5	0	4.5	2	1	6		
SM-P8	71F	F	46,XX[20]	non S	CYA	RES	2440	854	8.1	2.5	269	5.7	37.4	91yes	0	0.4	4.2	8.8	2.3	8.3	2.5	3.5	4	11.5	
SM-P9	74M	M	46,XX[20]	S	CYA	ND	1070	43	4.5	0.5	129	0.4	30.6	49yes	0	0.6	2.5	5.5	0	15.5	3.5	6.5	0	11.5	
SM-P10	47M	M	46,XX[20]	S	ATG+CVA	RES	670	312	5	1.6	159	2.04	19.2	47yes	0	1.6	4	4.9	3.6	7.1	4	1.5	8.5		
SM-P11	68F	F	46,XX[20]	S	CYA	NR	2700	493	7.1	0.9	242	0.97	30.2	63yes	0	0.2	1	2.8	3.2	3.7	5	3.5	3	9	
SM-P12	45F	F	No Analyzable Metaphase	VS	ATG+CVA	NR	1050	73	4.8	0.3	185	0.389	0	8no	0	0.4	0	9	0	1.3	0	2.5	0	12.5	
SM-P13	71F	F	46,XX[20]	non S	CYA	NR	4390	1360	7.6	2.3	262	1.73	23	61no	0	0.8	0.5	4.4	0	12.9	0.4	18.4	1.5	5	0
SM-P14	61F	F	46,XX[20]	VS	ATG+CVA	RES	1440	115	5.1	0.9	163	0.88	33.3	24yes	0	0.4	0	4.4	0	5.9	0	4	0	1.5	
SM-P15	42F	F	46,XX[20]	non S	ATG+CVA	ND	2850	660	7.5	0.7	244	4.94	1.5	20yes	0.7	1.8	2.5	7	1.5	13.5	1	5	0	12.5	
SM-P16	66F	F	46,XX[20]	non S	ATG+CVA	RES	2750	853	6.6	5.7	190	3.09	25.5	55yes	0.8	0.4	0	13.1	0.5	22.3	1	13.9	0	17.9	
SM-P17	38M	M	No Analyzable Metaphase	S	ATG+CVA	NR	1580	284	7.6	0.7	251	0.3	6.5	62yes	0	0.8	0.5	14	0.5	25.1	0.5	10.4	0	19.9	
SM-P18	34F	F	45,XX,-5[1] 45,XX,-19[1], 46,XX[18]	non S	CYA	RES	2090	690	3.8	1.4	103	2.47	34.4	29yes	0	0.2	0	7.4	0	10.3	0	10.4	0	11.9	

Severity was defined according to the EBMT criteria. VS means very severe; S, severe; and non S, non severe. Res to Tx means response to the indicated therapy at the 9th month, evaluation was performed according to the EBMT response criteria. RES includes both CR and PR. ATG, antithymocyte globulin; CYA, Cyclosporin A; ana, anabolic steroid; BMT, allogeneic bone marrow transplantation; WBC, number of white blood cells per 10⁹/L; Neu, number of neutrophils per 10⁹/L; Hb, hemoglobin concentration (g/dl); Plt, number of platelets per 10⁹/L; RBC, number of red blood cells per 10⁹/L; Ret, number of red blood cells per 10⁹/L; PCS means the percentage of metaphase with the premature chromatid separation in the total metaphases analyzed (indicated by No. of meta); Aneu (yes) indicates the presence of aneuploidy of chromosome 1, 6, 7, 8, and 17 are shown respectively. nuclei with triple signals or single signal in at least 200 nuclei studied by interphase FISH analyses for chromosome 1, 6, 7, 8, and 17 are shown respectively.

27.0%) はいずれも骨髄移植やIST反応後に5.0%に低下しており, うち1例はAA再燃時にPCSの再上昇(34.5%)を認めた. またISTに対して不応性を示した症例ではPCS高値が持続した. また初診時PCSが0%であった症例は, IST不応時, 46%に上昇し約10ヶ月という短期間の内に数的染色体異常を伴うMDSに移行した. MDS移行後はPCSは低下し安定した(Fig. 4).

染色体異常性

Table 1で示すように, 様々な染色体の数的異常が個々の細胞に出現しておりモザイク異常性を呈していた. 異常性の内訳を見ると減数性では-7:5例, -8:3例, -6:8例, -1:7例, -17:3例, 増数性では+8:4例, +6:7例, +1:2例, +17:2例であり, AA初診時に好発する+8,+6やclone性疾患移行の際に好発する-7な

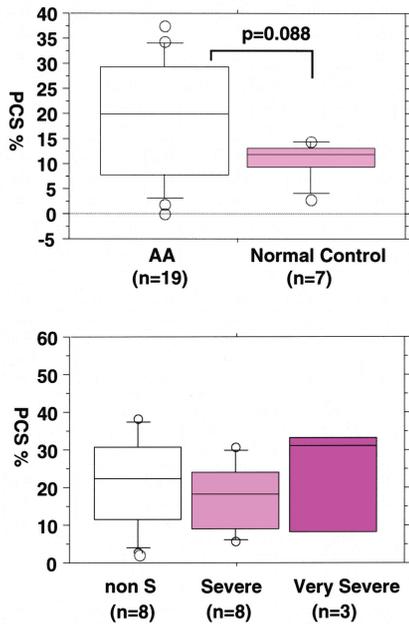


Fig 2. PCS Metaphase of Bone Marrow Cells in Patients with Aplastic Anemia and Healthy Volunteers. Box plots of the percentage of PCS metaphases are shown. The boxes extend from the 25th percentile to the 75th percentile, the lines indicate the median values, and the whiskers indicate the range of values. Statistical difference was evaluated using the Mann Whitney U analysis.

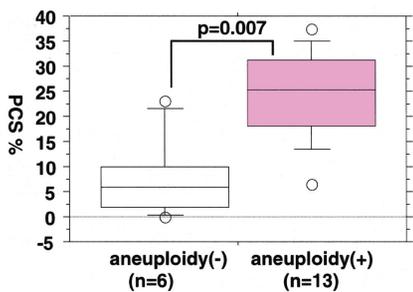


Fig 3. Rate of PCS metaphase are significantly higher in AA patients with aneuploidy in comparison with those without aneuploidy. Box plots of the percentage of PCS metaphases are shown. The boxes extend from the 25th percentile to the 75th percentile, the lines indicate the median values, and the whiskers indicate the range of values. Statistical difference was evaluated using the Mann Whitney U analysis.

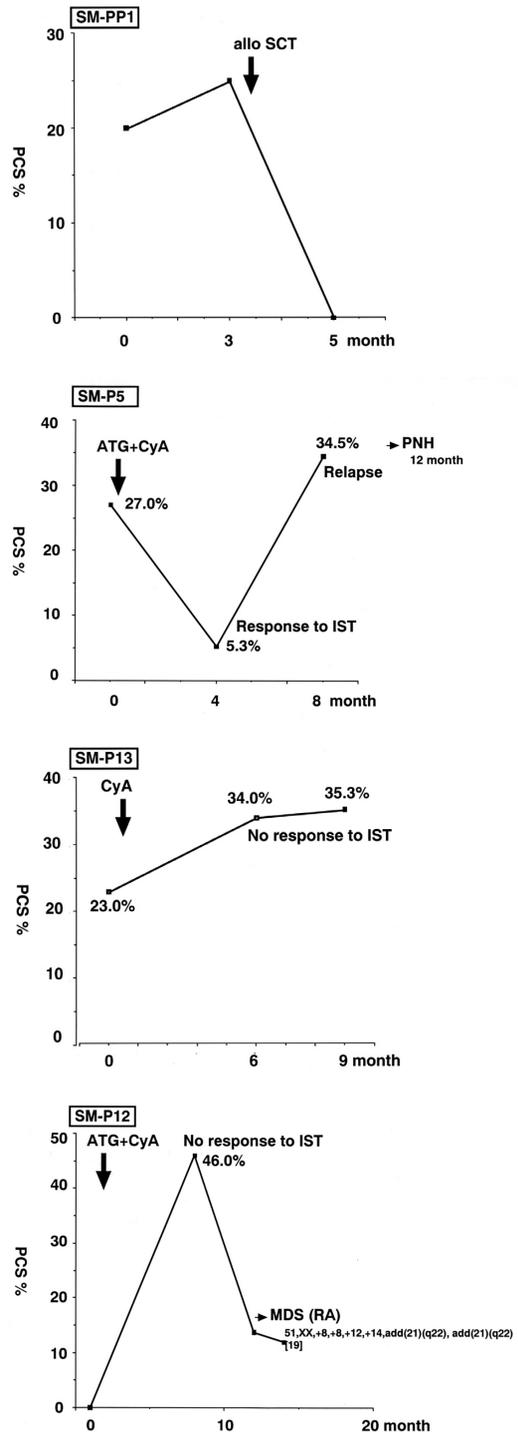


Fig. 4. Representative change of PCS in the clinical courses of patients with AA.

どの頻度が高かった (Table 2). また-6が全症例の42%と高い頻度で認められた. また初診時PCSが34.4%と高値であった症例では核型解析でもモザイク異数性が認められた. さらにFig. 3で示すように, PCSと異数性の関係を検討すると, 解析染色体のいずれかに異数性を認めた群 (13例) ではPCSは $24.2 \pm 9.0\%$ で, (-)群の $7.0 \pm 8.8\%$ に比して有意に高かった ($p=0.007$).

[考察・結論]

今回の検討から, AAの半数例でPCSが高値 (>20%)を示し, 治療反応例ではPCSが低下するこ

とが明らかになった. 1,6,7,8,17番染色体のいずれかに異数性を認めた症例ではPCSが高値のものが多く, PCSと染色体異数性には有意な相関関係が認められた. 以上よりPCSはAAにおける染色体不安定性を示すマーカーと考えられる. また短期培養する前に, 4°C overnightで保存した検体ではPCSは認められないことから, 従来の外注検査の検体でPCSを評価することは出来ないことに注意すべきである. MDSやPNHといったclone性疾患移行例では初診時PCSは低値であったがMDS移行直前にPCSの上昇を認め, 治療抵抗性AAではPCS高値の状態が持続していることから, 治療抵抗例ではPCSによる染色体不安定性が遷延しclonal evolutionのリスクが高まると予想される. 今後はPCSによる染色体不安定性がclone性疾患移行の危険因子になりうるかを, 症例を拡大し観察期間を延長して検討する必要がある.

[結論]

AAではPCSにより染色体不安定性が亢進し染色体異数性が生じやすい病態が存在すると考えられる.

[文献]

1. Socie G, et al. N Engl J Med 1993;1152
2. 別所正美, 他 特発性造血障害に関する研究班 平成13年度研究事業報告書, 2002; 65
3. Bessho M, et al. Int J Hematology 2003;77:152
4. Nasmyth K. Science. 2002;297(5581):559 Review
5. Michel LS, et al. Nature. 2001, 409:355
6. Kajii T, et al. Am J Med Genet. 1998;78:245

Table 2. Summary of results of Interphase FISH Analyses for Gains and Losses of Chromosomes 1, 6, 7, 8, and 17

Chr.	No. of Pts (%)	Range, %	Normal Control	
			Cut off, %	(mean \pm SD, %)
-6	8/19 (42)	10.1-25.1	8.9	(8.0 \pm 0.9)
-1	7/19 (37)	5.0-13.9	4.3	(3.3 \pm 1.0)
-7*	5/19 (26)	1.1-1.9	0.8	(0.4 \pm 0.4)
-8	3/19 (16)	12.9-14.0	10.0	(7.9 \pm 2.1)
-17	3/19 (16)	16.5-19.9	13.6	(10.7 \pm 2.9)

+6	7/19 (37)	1.1-3.6	1.0	(0.7 \pm 0.3)
+8	4/19 (21)	2.5-4.2	1.3	(0.7 \pm 0.6)
+1	2/19 (11)	5.0-5.5	3.6	(1.9 \pm 1.7)
+17	2/19 (11)	3.0-4.0	2.5	(1.0 \pm 1.5)
+7*	0/20 (0)	-	1.0	(0.7 \pm 0.3)

Cut off values are shown as mean plus standard deviation of positive rates per at least 200 nuclei for each chromosome aneuploidy from 6 BM samples from healthy volunteers. *indicates that the values were obtained by the highly sensitive dual color interphase FISH method for chromosome 7 aneuploidy. No. of patients means the number of patients whose BM cells are positive for each chromosome aneuploidy.