

原 著

骨髓異形成症候群における p53 ,N-ras , DCC , FLT-3 各癌関連遺伝子異常の研究

中村 佳代 猪口 孝一 檀 和夫

日本医科大学内科学第3教室

Abnormalities of the p 53, N-ras, DCC and FLT-3 Genes in Myelodysplastic Syndromes

Kayo Nakamura, Koiti Inokuchi and Kazuo Dan

Department of 3rd Internal Medicine, Nippon Medical School

Abstract

The molecular mechanism of carcinogenesis is a multistep process that is characterized by both activation of oncogenes and inactivation of tumor suppressor genes. In the present study, mutations of N-ras, p 53 and FMS-like tyrosine kinase 3 (FLT-3) genes and loss of expression of the deleted in colorectal carcinoma (DCC) gene were analyzed in 59 patients with myelodysplastic syndromes (MDS). Mutations of N-ras, p 53, and FLT-3 genes were detected in 7, 7, 1 of the 59 patients with MDS, respectively. Loss of DCC expression was detected in 16 patients. Type of MDS patients with N-ras mutation were all refractory anemia with excess of blasts in transformation (RAEB-T). Abnormalities of p 53 and DCC genes were significantly associated with survival time ($p < 0.02$, $p < 0.004$, respectively) (J Nippon Med Sch 2001; 68: 143 - 148)

Key words : myelodysplastic syndromes, p 53, N-ras, DCC, FLT-3

緒 言

骨髓異形成症候群 (MDS) は末梢血では 2 ないし 3 血球系の血球減少症を示すにもかかわらず、骨髓はそれに反し過形成造血を示す無効造血を呈する。本症候群は予後不良の疾患群であり、白血病に移行する症例が多いことから、前白血病状態とも考えられている。MDS は FAB 分類¹により 5 病型に分けられ、病型毎に予後が異なるが白血病化、あるいは骨髓不全の進行による感染症や出血により死に至る。MDS は高齢者に好発し、高齢化社会になるにつれ発症患者数も増加の一途をたどり、今後臨床的にさらに重要性を増す疾患である。MDS の発症や白血病への進展には正常者には認められない複数の癌遺伝子や癌抑制遺伝子の異

常が関わっているとされている。MDS における N-ras 癌遺伝子あるいは p 53 癌抑制遺伝子解析の報告は現在までにいくつか見られるが、MDS の予後との関連の有無に関する報告は少なく結論はでない²⁻⁴。また、同一 MDS 患者における複数の遺伝子解析の報告もほとんどみあたらない。我々は N-ras , p 53 , deleted in colorectal carcinoma (DCC) , FMS-like tyrosine kinase (FLT-3) の 4 癌関連遺伝子の同時解析を試み、MDS における異常の頻度を解析し、その病態における意義を検討するとともにそれぞれ予後との関連を検討し、さらなる MDS 病態の解明を目的とした。

対象および方法

(1) 対象患者

1987 年 5 月より 1997 年 10 月までの間に日本医科大学を受診し、治療を受けた MDS 患者 59 例 (男性 47 例 , 女性 12 例) を対象とした。FAB 分類による病型別内訳は , refractory anemia (RA) 21 例 , RA with ringed

Correspondence to Koiti Inokuchi, Department of 3rd Internal Medicine, Nippon Medical School, 1-1-5 Sendagi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8603, Japan
Journal Website (<http://www.nms.ac.jp/jnms/>)

Table 1 Mutation of the N-ras gene

Case No.	FAB type	N-ras mutation			
		Codon 12		Codon 13	Codon 61
7	RAEB-T				CAA (Gln) CGA (Arg)
8	RAEB-T			GGT (Gly)	GCT (Ala)
15	RAEB-T			GGT (Gly)	GAT (Asp)
18	RAEB-T	GGT (Gly)	GAT (Asp)	GGT (Gly)	TGT (Cys)
43	RAEB-T	GGT (Gly)	GAT (Asp)		
56	RAEB-T	GGT (Gly)	GCT (Ala)		
59	RAEB-T			GGT (Gly)	GCT (Ala)

sideroblasts (RARS) 4 例, RA with excess of blasts (RAEB) 10 例, chronic myelomonocytic leukemia (CMML) 1 例, RAEB in transformation (RAEB-T) 23 例である. 治療は患者により経過観察(RA, RARS, CMML), 蛋白同化ホルモン(RA, RARS, RAEB), RAEB-T には少量 cytarabine (Ara-C) 療法もしくは少量 etoposide (VP-16) 療法などを基本とし施行した. 対象患者 59 例の発症診断時の平均年齢は 61.2 歳 (21 ~ 86 歳) であった. RA 21 例の平均年齢は 61.4 歳 (28 ~ 86 歳) で, RARS は 34 歳, 56 歳, 75 歳および 75 歳の 4 例であった. RAEB 10 例の平均年齢は 63.8 歳 (42 ~ 84 歳), RAEB-T 23 例の平均年齢は 59.6 歳 (21 ~ 78 歳), CMML 1 例は 72 歳であった. 骨髓細胞を用いた癌関連遺伝子解析は患者の同意を得て施行した.

(2) 遺伝子解析

遺伝子解析は治療前, 診断時の骨髓細胞を用いて行った. N-ras^{5,6}, p 53⁷, DCC 遺伝子⁸ 変異解析法は我々の前法にしたがって行った. FLT-3 遺伝子解析は Kiyoi らの方法⁹ に準じた. DNA および RNA は骨髓単核球より抽出した^{5,6}.

N-ras 遺伝子変異解析は抽出高分子 DNA (200 ng) より polymerase chain reaction (PCR) 後の突然変異特異的オリゴマーによる dot blot 解析⁵ と直接塩基配列決定法⁶ を併用して検出した. コドン 12 および 13 検出用 5' 側プライマーは (5'-ATGACTGAGTACAACTGGT-3'), 3' 側プライマーは (5'-CTATGGTGGGATCATATTCA-3') を使用した. コドン 61 検出用 5' 側プライマーは (5'-GGTGAAACCTGTTTGTGGA-3'), 3' 側プライマーは (5'-GATGGCAAATACACAGAGGA-3') を使用し増幅した.

p 53 遺伝子変異解析は抽出 RNA (100 ng) より Ma-

loney マウス白血病ウイルスの逆転写酵素にて鋳型 DNA を作成後, エクソン 5, 6, 7, 8 に相当するコドン 126 - 306 を polymerase chain reaction (PCR) にて増幅し (reverse transcriptase PCR; RT-PCR), single strand chain polymorphism (SSCP) 法により検出した⁷. 遺伝子変異が陽性のサンプルはその後 PCR 産物を pGEM-5 Zf クローニングベクターの EcoRV に挿入し, 塩基配列決定を行い遺伝子変異を同定した¹⁰.

DCC 遺伝子発現解析は抽出 RNA より β -actin をインターナルコントロールとして用いて, 半定量的 RT-PCR 法にて発現の有無を同定した⁸. PCR 産物はアガロースゲル電気泳動を行い発現の有無をエチジウムブロマイド染色後に判定した. コントロールと比較し, 明らかに PCR 産物が減少, 消失しているものを発現の異常として陽性とした.

FLT-3 遺伝子解析は抽出 RNA より RT-PCR を行った. 異常が集中するエクソン 11 および 12 領域を検出するプライマーを用いた. 5' 側プライマーは F-1 (5'-GCAATTTAGGTATGAAAGCCAGC-3'), 3' 側プライマーは F-2 (5'-CTTTCAGCATTTTGACGGCAA-CC-3') を使用した⁹. PCR 産物はアガロースゲル電気泳動を行いエチジウムブロマイドにて染色後異常 PCR バンドを検出した. 異常 PCR バンドは前述のようにクローニング後遺伝子配列決定を行い遺伝子変異を確認した¹⁰.

(3) 臨床統計

生存曲線は, Kaplan-Meier 法にて解析した¹¹. 解析した遺伝子異常と生存期間との相関は Cox Mantel テストを用いて検定し, 危険率 5% 以下を有意と判定した¹¹.

Table 2 Mutation of the p53 gene

Case No.	FAB type	Codon	Nucleotide
14	RAEB	193	CAT CGT (His Arg)
		195	ATC ACC (Ile Thr)
19	RA	Deletion of the p53 gene	
20	RAEB-T	241	TCC TC (frame shift)
40	RAEB-T	239	AAC GAC (Asn Asp)
		276	GCC GTGCC (frame shift)
43	RAEB-T	147	GTT TT (frame shift)
50	RA	241	TCC TGC (Ser Cys)
57	RARS	251	ACGCATGAACCGGAGGCCCAT insertion (ThrHisGluProGluAlaHis insertion)

結 果

1. N-ras 遺伝子変異の解析

7例(11.9%)に從來認められている N-ras 遺伝子変異を認めた(Table 1). 内訳はすべて RAEB-T 症例であり, RA, RARS, RAEB には異常は検出しなかった. コドン 12 に 3 例, コドン 13 に 4 例, コドン 61 に 1 例それぞれ異常が検出された. Case No. 18(RAEB-T)ではコドン 12 とコドン 13 に変異を同時に認めた.

2. p 53 遺伝子変異の解析

7例(11.9%)に 1 例を除き從來認められている p 53 遺伝子変異を認めた(Table 2). 内訳は RA 2 例, RARS 1 例, RAEB 1 例, RAEB-T 3 例である. Case No. 14 (RAEB) ではコドン 193 とコドン 195 に変異を認めた. Case No. 40 (RAEB-T) ではコドン 239 とコドン 276 に変異を認めた. Case No. 19(RA) では p 53 遺伝子 2 allele の欠失を認めた. p 53 遺伝子の異常は点突然変異が多く 1 塩基の置換, 1 塩基の欠損, 2 塩基の挿入などが見られたが, Case No. 57(RARS)では既報にはない新しい 21 塩基の挿入が検出された.

3. DCC 遺伝子発現変異の解析

DCC 遺伝子の RT-PCR 解析症例を示す(Fig. 1). 16 例(27.1%) に DCC 遺伝子発現の消失を認めた. 内訳は RA 5 例 (Case No. 1, 16, 22, 25, 50), RARS 1 例 (Case No. 42), RAEB 4 例 (Case No. 9, 14, 27, 55), RAEB-T 5 例 (Case No. 15, 18, 20, 21, 40) であった.

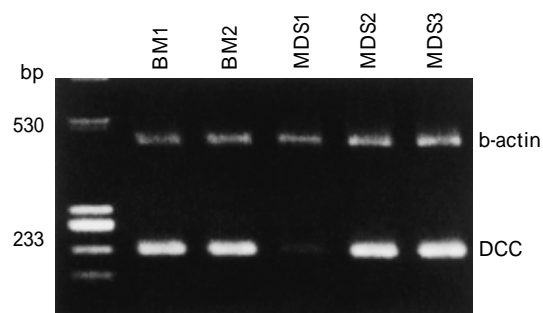


Fig. 1 Example of RT-PCR analysis of DCC-gene expression of MDS patients. Lane BM 1 shows normal bone marrow cells; lane BM 2, normal bone marrow cells; lane MDS 1, DCC-negative MDS patients; lanes MDS 2 and 3, DCC-positive MDS patients. The left lane shows markers of λ DNA fragments digested by Hind III and ϕ x 174 DNA fragments digested by HaeIII. Expressions of β -actin and DCC genes are shown at 530 and 233 bp, respectively.

4. FLT-3 遺伝子変異の解析

1例(1.7%)の RAEB-T 症例(Case No. 45)に FLT-3 遺伝子変異を認めた. 遺伝子異常はエクソン 11 の 108 bp におよぶ既報にない tandem duplication (TD)であった(Fig. 2).

5. 各遺伝子異常と生存期間との関連

対象 59 例を 60 歳以上(24.7 カ月)と 60 歳未満(33.2 カ月)の 2 群に分けたが, 生存期間に有意差は認めなかった($p < 0.20$).

N-ras 遺伝子変異はすべて RAEB-T 症例にもかかわ

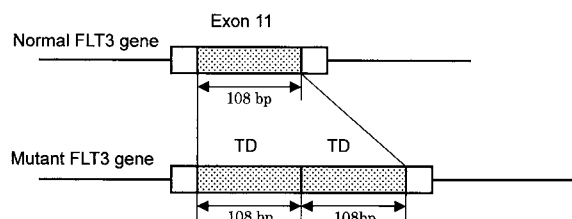


Fig. 2 Schema of the tandem duplication (TD) of the FLT-3.108 bases were inserted as TD.

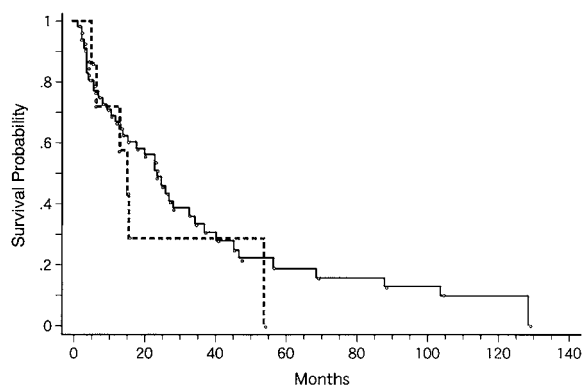


Fig. 3 Survival curve of the 59 MDS patients according to the N-ras status. There was no significant difference between the N-ras mutated cases (---) and the non-mutated cases (—) ($p < 0.63$)

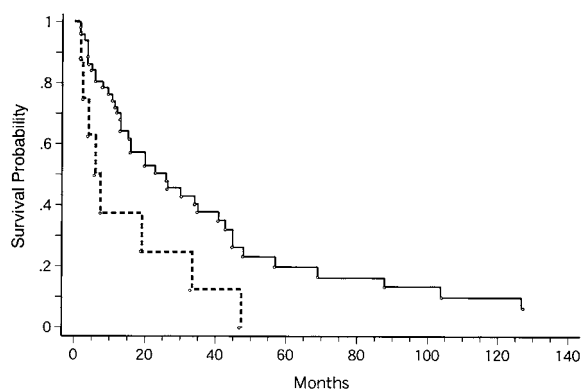


Fig. 4 Survival curve of the 59 MDS patients according to the p 53 status. Statistically significant difference was observed between the p 53 mutated cases (---) and the non-mutated cases (—) ($p < 0.0245$)

らず、N-ras 遺伝子正常者 52 例と N-ras 遺伝子変異 7 例との 2 群間で生存期間の有意差 ($p < 0.63$) は認められなかった (Fig. 3). p 53 遺伝子正常者 51 例と p 53 遺伝子変異 7 例との 2 群間で有意に ($p < 0.0245$) 生存期間の差を認めた (Fig. 4).

DCC 遺伝子正常者 43 例と DCC 遺伝子発現消失 16

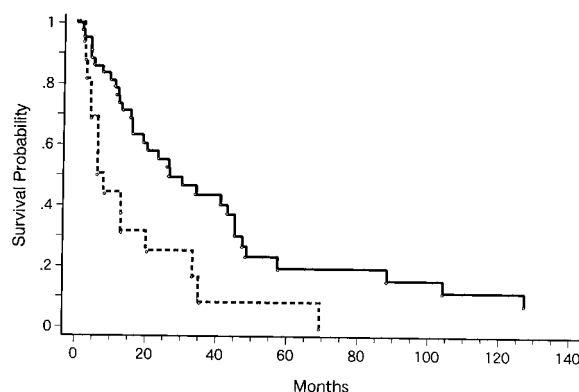


Fig. 5 Survival curve of the 59 MDS patients according to the DCC status. Statistically significant difference was observed between the loss of DCC expression cases (---) and the normal DCC expression cases (—) ($p < 0.004$)

例との 2 群間で有意に ($p < 0.004$) 生存期間の差を認めた (Fig. 5). FLT-3 遺伝子 TD 変異症例の生存期間は 14 ヶ月であった。

6. DCC 異常と p 53 遺伝子異常患者の臨床像

癌関連 4 遺伝子の異常のうち DCC 異常と p 53 遺伝子異常が予後との相関を認めたため、それぞれの群における臨床像の比較を行った (Table 3). DCC 正常群と異常群では FAB 分類による病型、年齢、性に偏りは認めなかった。p 53 遺伝子正常群と異常群の間にも病型、年齢、性に偏りは認めなかった。

考 察

腫瘍細胞における ras 遺伝子 (H-, K-, N-ras) 変異はコドン 12, 13 および 61 に生じており、この点突然変異により恒常的に Ras 分子が燐酸化され下流のシグナル伝達系が活性化すると理解されている¹²。これが癌遺伝子 ras の癌化能である。一方で p 53 遺伝子は点突然変異などの遺伝子変異により機能が不活化する。正常の p 53 遺伝子は細胞回転の制御、アポトーシスの制御など多数の機能を持ち合わせている。点突然変異、frame shift、挿入変異などの異常によりこれらの機能が失活することにより発癌に導かれる¹³。これらの遺伝子異常はそれぞれ治療や経過によって変化せず不変であり、蓄積され腫瘍細胞のさらなる悪化化に關与する^{12, 13}。

MDS 症例における N-ras 遺伝子変異の発現率は 3 ~ 38% (平均 11%) と報告されている¹²。今回の我々の解析でも 7 症例/59 症例 (11.8%) であり、従来の報告

Table 3 Clinical characteristics of the patients according to the status of the p53 gene and DCC expression

	DCC expression			p53 mutation		
	Normal expression	Loss of expression	p value	Normal	Mutation	p value
FAB			NS			NS
RA	16	5		19	2	
RAEB	6	4		9	1	
RAEB-T	17	6		20	3	
RARS	3	1		3	1	
CMMoL	1	0		1	0	
Age (yr) mean	60.7	62.5	NS	61.0	62.5	NS
range	(21 86)	(31 75)		(21 86)	(37 74)	
Sex			NS			NS
Male	33	14		40	7	
Female	10	2		12	0	

Numbers indicate patients numbers. Abbreviation: NS, not significant.

を裏付けていた。また、従来よりコドン 12 とコドン 13 に変異が多く¹⁴、コドン 61 に変異が少ないが、これも我々の検討と一致した。N-ras 遺伝子変異と予後との関連の有無に関する報告は多数みられるが未だに結論はでていない。今回の我々の検討で生存期間との関連は認められなかったが、N-ras 遺伝子変異と予後との関連の有無に関しては今後も症例の蓄積が必要と考えられる。興味深いことに N-ras 遺伝子変異は全例 RAEB-T 症例で検出したが、生存期間との間に有意差は認めなかった。これは N-ras 遺伝子活性化変異が MAP キナーゼシグナル伝達系の活性化を必ずしも意味していないことを示唆しているのかもしれない¹⁵。一方、N-ras 遺伝子変異を認めたのがすべて RAEB-T 症例であったことは、MDS 病型進展における N-ras 遺伝子変異の分子生物学的役割は他の癌関連遺伝子異常に比べて病態進展後期であることを示唆している。

MDS 症例における p 53 遺伝子変異は 11% 前後とされている¹⁶。今回、我々の解析では p 53 遺伝子変異は 7 症例/59 症例 (11.9%) であった。p 53 遺伝子正常者群と p 53 遺伝子変異群との 2 群間で有意に ($p < 0.0245$) 生存期間の差を認めたことは、従来の報告のごとく p 53 遺伝子の変異が明確な予後不良因子であることを示している³。p 53 遺伝子の変異は N-ras 遺伝子変異よりは早期におこる異常であり、MDS 症例の予後を強く左右していると考えられた。しかし、本研究で N-ras 遺伝子変異と p 53 遺伝子変異を重複して検出した Case No 43 (RAEB-T) の生存期間は 19 カ月であり検討対象 59 例の 50% 生存期間 20.6 カ月と差はみられなかった。このことは予後を左右している因子が他にもある可能性を示しており、p 53 遺伝子変異が絶対的な予後決定因子ではないことを意味する

ものと思われる。

DCC 分子はアポトーシス促進分子であることが近年明らかとなった癌抑制遺伝子である¹⁶。DCC 遺伝子を発現させると G 2/M 細胞周期の停止が起こるとの報告もあり、DCC 遺伝子発現の消失は細胞周期を回転させることになり細胞の増殖につながるものと考えられる¹⁷。MDS 症例における DCC 遺伝子発現の消失は 10% 弱とされているが¹⁸、今回の解析では従来の報告より多い結果となった (16/59 例, 27.1%)。DCC 遺伝子発現の消失例は正常例に比して有意に生存期間の短縮を認めたが、MDS 症例での DCC 遺伝子解析の報告は少なく生存期間との関連を検討している報告は本研究が初めてである。

急性骨髄性白血病や MDS において、FLT-3 はエクソン 11 あるいは 12 の TD 異常を認めたとの報告がある¹⁹。TD 異常により増殖シグナル伝達分子である STAT 5 や MAP キナーゼを恒常的に燐酸化させることが示されている²⁰。MDS における TD 異常頻度は約 5% と報告されているが、本研究では RAEB-T の 1 例に異常を検出したのみであった。しかし、108 bp の異常は TD としては最も長い異常であった。FLT-3 の TD 異常も MDS 症例では未だに報告が少なく今後症例の蓄積が必要と考えられた。

MDS 症例において N-ras , p 53 , DCC , FLT-3 の各癌関連遺伝子の同時解析を行い、さまざまな頻度での異常を検出した。また、MDS の発症、進展にそれぞれの遺伝子が異なった関与のしかたをしていることを示した。さらに、p 53 と DCC 遺伝子の変異は患者生存期間に有意に関与していることが明らかとなった。これらの研究結果は、きわめて予後不良な疾患群である MDS の病態解明、および臨床にきわめて有益な示唆

を与えるものである。

結 論

骨髄異形成症候群 59 症例において N-ras , p 53 , FLT-3 各癌関連遺伝子の遺伝子変異の解析を行うとともに , DCC 遺伝子発現の減少の有無も検討した . N-ras , p 53 , FLT-3 遺伝子の変異はそれぞれ 7 例 , 7 例 , 1 例で検出した . DCC 遺伝子発現の減少は 16 例で検出した . N-ras 遺伝子変異は 7 例全例 RAEB-T 症例であった . p 53 遺伝子変異や DCC 遺伝子発現の減少は survival time と有意の相関を認めた ($p < 0.02$, $p < 0.004$). これらの研究結果は , 骨髄異形成症候群の分子生理学的病態を考察するうえで価値がある結果と考えられた .

文 献

- 1 . Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DAG, Gralnick HR, Sultan C: The French-American-British Co-operative Group: Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol* 1982; 51: 303 306.
- 2 . Bar-Eli M, Ahuja H, Gonzales-Cadavid N, Foti A, Cline MJ: Analysis of N-ras exon-1 mutations in myelodysplastic syndromes by polymerase chain reaction and direct sequencing. *Blood* 1989; 73: 281 283.
- 3 . Wattel E, Preudhomme C, Hecquet B, Vanrumbeke M, Quesnel Dervite I, Morel P, Fenaux P: p 53 mutations are associated with resistance to chemotherapy and short survival in hematologic malignancies. *Blood* 1994; 84: 3148 3157.
- 4 . Paquette RL, Landaw L, Pierre RV, Kahan J, Lubbert M, Lazcano O, Isaac G, McCormick F, Kaeffler P: N-ras mutations are associated with poor prognosis and increased risk of leukemia in myelodysplastic syndrome. *Blood* 1993; 82: 590 599.
- 5 . Inokuchi K, Amuro N, Futaki M, Dan K, Shinohara T, Kuriya S, Okazaki T, Nomura T: Transforming genes and chromosome aberrations in therapy-related leukemia and myelodysplastic syndrome. *Ann Hematol* 1991; 62: 211 216.
- 6 . Inokuchi K, Futaki M, Miyake K, Kuwabara T, Shinohara T, Dan K, Nomura T: N-ras activation in the terminal stage of undifferentiated chronic myeloproliferative disease. *Int J Hematol* 1992; 56: 9 16.
- 7 . Abo J, Inokuchi K, Dan K, Nomura T: p 53 and N-ras mutations in two new leukemia cell lines established from a patient with multilineage CD-7 positive acute leukemia. *Blood* 1993; 82: 2829 2836.
- 8 . Inokuchi K, Miyake K, Dan K, Nomura T: DCC protein expression in hematopoietic cell populations and its relation to leukemogenesis. *J Clin Invest* 1993; 97: 852 857.
- 9 . Kiyoi H, Naoe T, Yokota S, Nakao M, Minami S, Kuriyama K, Takeshita A, Saito K, Hasegawa S, Shimodaira S, Tamura J, Shimazaki C, Matsue K, Kobayashi H, Arima N, Suzuki R, Morishita H, Saito H, Ueda R, Ohno R: Internal tandem duplication of FLT 3 associated with leukocytosis in acute promyelocytic leukemia. *Leukemia* 1997; 11: 1447 1452.
- 10 . Inokuchi K, Futaki M, Hanawa H, Tanosaki S, Yamaguchi H, Iwakiri R, Nomura T, Dan K: Heterogenous expression of bcr-abl fusion mRNA in a patient with Philadelphia-chromosome-positive acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* 1997; 97: 837 840.
- 11 . Tanosaki S, Inokuchi K, Shimada T, Dan K: Relation between microsatellite instability and N-ras mutation and duration of disease free survival in patients with acute leukemia. *Cancer* 1998; 83: 475 481.
- 12 . Bos JL: Ras oncogenes in human cancer. *Cancer Res* 1989; 49: 4682 4689.
- 13 . Tanaka H, Arakawa H, Yamaguchi T, Shiraishi K, Fukuda S, Matsui K, Takei Y, Nakamura Y: A ribonucleotide reductase gene involved in a p 53-dependent cell-cycle checkpoint for DNA damage. *Nature* 2000; 404: 42 49.
- 14 . 猪口孝一: RAS 遺伝子 . 白血病とリンパ腫の分子生物学 . 平井久丸編 . 1995; pp 123 131. 中外医学社 .
- 15 . Iida M, Towatari M, Nakao A, Iida H, Kiyoi H, Nakano Y, Tanimoto M, Saito H, Naoe T: Lack of constitutive activation of MAP kinase pathway in human acute myeloid leukemia cells with N-ras mutation. *Leukemia* 1999; 13: 585 589.
- 16 . Mehlen P, Rabizadeh S, Snipas SJ, Assa-Munt N, Salvesen GS, Bredesen DE: The DCC gene product induces apoptosis by mechanism requiring receptor proteolysis. *Nature* 1998; 395: 801 804.
- 17 . Chen YQ, Hsieh JT, Yao F, Fang B, Pong R, Cipriano SC, Kreputat F: Induction of apoptosis and G 2/M cell cycle arrest by DCC. *Oncogene* 1999; 18: 2747 2754.
- 18 . Miyake K, Inokuchi K, Nomura T: Expression of the DCC gene in human hematological malignancies. *Leukem Lymphom*, 1994; 16: 13 18.
- 19 . Nakao M, Yokota S, Iwai T, Kaneko H, Horiike S, Kasima K, Sonoda W, Fujimoto T, Misawa S: Internal tandem duplication of the flt 3 gene found in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 1996; 10: 1911 1918.
- 20 . Hayakawa F, Towatari M, Kiyoi H, Tanimoto M, Kitamura T, Saito H, Naoe T: Tandem-duplicated Flt 3 constitutively activates STAT 5 and MAP kinase and introduces autonomous cell growth in IL-3-dependent cell lines. *Oncogene* 2000; 19: 624 631.

(受付 : 2000 年 8 月 2 日)

(受理 : 2000 年 9 月 13 日)