

原 著

## 8 ; 21 転座型急性骨髄性白血病の 1 例における *AML1-MTG8* mRNA 発現レベルの経時的解析

廣 瀬 衣 子, 犬 飼 岳 史, 宇 野 佳 奈 子, 赤 羽 弘 資,  
根 本 篤, 高 橋 和 也, 佐 藤 広 樹, 合 井 久 美 子,  
杉 田 完 爾, 中 澤 眞 平

山梨大学医学部小児科

要 旨 : 8 ; 21 転座型急性骨髄性白血病 (acute myelogenous leukemia, AML) では, 転座の結果形成される *AML1-MTG8* 融合遺伝子の定量的な polymerase chain reaction (PCR) 解析によって微小残存病変 (minimal residual disease, MRD) の評価が行われるようになった。我々は化学療法によって長期の寛解を維持している症例において, *AML1-MTG8* 融合遺伝子の発現レベルを経時的に追跡した。症例は 15 歳の女兒。骨髄でペルオキシダーゼ陽性の分化傾向のある芽球を認めて FAB 分類 M2 の AML と診断し, 骨髄の染色体分析で 8 ; 21 転座を認めた。寛解導入療法後に完全寛解を得て強化療法を 5 クール行い, その後はウベニメクスの内服を 28 ヶ月行った。定期の骨髄穿刺の際に, 塗沫標本の評価に加えて *AML1-MTG8* の real time reverse-transcriptase PCR 解析を行ったところ, 診断後 55 ヶ月まで *AML1-MTG8* mRNA が検出され続けた。その後無治療で 67 ヶ月時に陰性となり, 81 ヶ月を経過した現在も完全寛解を維持している。本症例の経過から, 化学療法の終了後に *AML1-MTG8* mRNA が検出されても必ずしも白血病細胞の残存を意味しないことが示唆される。

キーワード 急性骨髄性白血病, 8 ; 21 転座, 化学療法, 微小残存病変, real-time PCR

はじめに

白血病の微小残存病変 (minimal residual disease, MRD) の評価に染色体転座による融合遺伝子産物に対する reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) 解析が用いられているが, competitive PCR 法や real-time PCR 法の導入によって高感度で定量的な MRD 解析が可能となった。8 ; 21 転座型急性骨髄性白血病 (acute myelogenous leukemia, AML) では, 転座に由来する *AML1-MTG8*

mRNA による MRD 解析が試みられ, Miyamoto ら<sup>1)</sup> は RT-PCR 法で診断後 17-150 ヶ月の 12 名全例に, Sugimoto ら<sup>2)</sup> は real-time PCR 法で診断後 9-17 ヶ月の 3 名全例に, それぞれ *AML1-MTG8* mRNA を検出したと報告し, *AML1-MTG8* mRNA の検出が必ずしも再発を意味しないことが明らかになってきた。しかし, これまでの報告は一定の観察期間を経た後に, 凍結サンプルを評価した後方視的な解析が多く, 観察期間中に検体の採取と同時に評価する前方視的解析での確認はいまだ十分とは言えない。我々は定期の骨髄検査の際に, 8 ; 21 転座に由来する *AML1-MTG8* 融合遺伝子に対する real-time RT-PCR 解析を行い, *AML1-MTG8*

〒409-3898 山梨県中央市下河東 1110

受付 : 2006 年 12 月 1 日

受理 : 2007 年 1 月 30 日

mRNA が陽性にもかかわらず長期に初回完全寛解を維持している症例を経験したので報告する。

### 症 例

患者：15歳，女児

主訴：点状出血，全身倦怠感

既往歴，家族歴：特記事項なし

現病歴：15歳9ヶ月時に点状出血と全身倦怠感を主訴に近医を受診し，血液検査で白血球数増多，貧血，血小板減少を認めたため，当科を紹介されて入院した。

入院時検査所見：末梢血で白血球数が42,840/ $\mu$ l（芽球48%）と増加を認め，Hb 6.7g/dl，血小板数0.8万/ $\mu$ lと貧血，血小板減少を認めた。骨髄検査では有核細胞数が61万/ $\mu$ lと過形成を認め，ペルオキシダーゼ反応陽性の分化傾向のある芽球を80%認めた。CD45 blast gating法による表面抗原解析では，芽球はCD33（98%），CD13（90%），CD19

（43%），CD34（86%），HLA-DR（69%）が陽性であった。G-banding法による骨髄染色体解析では20細胞中19細胞に8;21転座を認めた。（Fig.1）

入院後経過：8;21転座を伴う急性骨髄性白血病（FAB分類M2）と診断し，TCCSG AML99プロトコールに従って寛解導入療法を行い，血液学的に完全寛解を確認した。引き続き強化療法を5クール行って診断後8ヶ月で化学療法を終了し，以後はウベニメクスの内服を28ヶ月行った。診断後81ヶ月を経過した現在も血液学的な完全寛解を維持している。

### MRD 解析結果

前腸骨稜から穿刺吸引した骨髄血を塗沫標本で評価するとともに，一部を採取当日に外注検査会社（SRL社）へ提出し，抽出したRNAからcDNAを作製してreal-time PCR法でAML1-MTG8に対する定量RT-PCR解析を行った。内因性コントロールとしてNADP遺伝子発現も

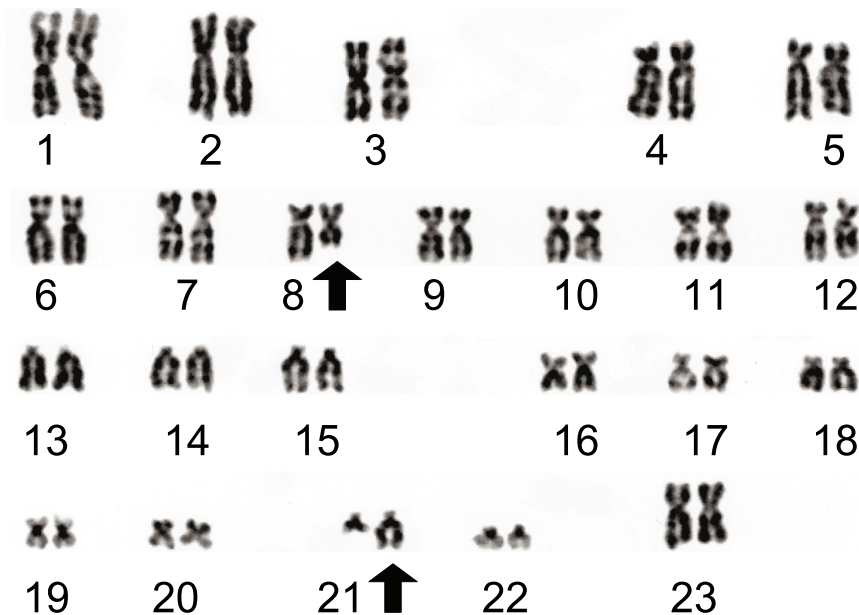


Fig. 1 骨髄染色体解析（G-banding法）  
20細胞中19細胞で8;21転座（矢印）を認めた。

real-time PCR法で定量して検出レベルを補正した。定量解析の検出限界は  $1.0 \times 10^2$  copy/ $\mu$ gRNA までで、 $1.0 \times 10^2$  copy/ $\mu$ gRNA 未満は定性的な評価となる<sup>3)</sup>。なお、診断時の骨髓のみ凍結保存した検体を用いて解析した。解析結果の経時的な推移を Fig. 2 に示す。診断時の凍結サンプルでは  $5.9 \times 10^5$  copy/ $\mu$ gRNA の AML1-MTG8 mRNA を検出し、診断後 8 ヶ月の化学療法終了時には  $5.5 \times 10^2$  copy/ $\mu$ gRNA と、検出レベルは約 1000 分の 1 に低下した。しかし、その後も診断後 11 ヶ月で  $1.6 \times 10^3$  copy/ $\mu$ gRNA、14 ヶ月で  $7.6 \times 10^2$  copy/ $\mu$ gRNA、18 ヶ月で  $1.4 \times 10^3$  copy/ $\mu$ gRNA と比較的高いレベルで AML1-MTG8 mRNA が検出された。診断後 23 ヶ月時にはじめて  $1.0 \times 10^2$  copy/ $\mu$ gRNA 未満と定量感度以下になったものの AML1-MTG8 mRNA は陽性であり、30 ヶ月時には  $1.3 \times 10^3$  copy/ $\mu$ gRNA に一旦増加した。診断後 35 ヶ月時に再度  $1.0 \times 10^2$  copy/ $\mu$ gRNA 未満となり、診断後 42 ヶ月時と診断後 55 ヶ月

時も同様であったが、診断後 67 ヶ月時にはじめて陰性化した。

考 察

8;21 転座型 AML において、化学療法のみで初回寛解を維持した症例の凍結サンプルを real-time PCR 法で後方視的に解析した報告<sup>2,4,5)</sup>を Fig. 3 に示す。いずれの報告も診断後 2 年以内の検体での解析であるが、全例で AML1-MTG8 mRNA が検出され、診断後 1 年以内では本症例を含む 9 例中 6 例で診断時の  $1 \times 10^{-3}$  以上の高レベルで検出されている。

また、定性的な RT-PCR 法を用いた凍結サンプルの解析でも、最長で診断後 10 年以上も AML1-MTG8 mRNA が検出されたと報告されている<sup>1,6)</sup>。これに対して、骨髓移植を施行した症例では、いずれも移植後 3 ヶ月以内に real-time PCR 法で検出感度以下となったことが報告されている<sup>2,4)</sup>。

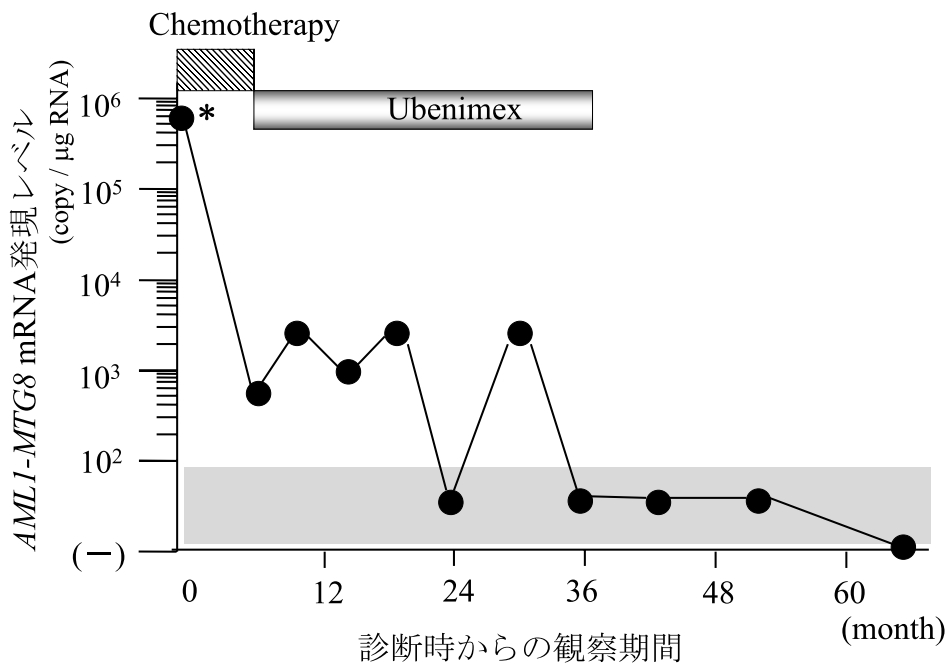


Fig. 2 real-time RT-PCR 解析による AML1-MTG8 mRNA の経時的変化  
診断時 (\*) のみ凍結サンプルを用いて解析を行った。

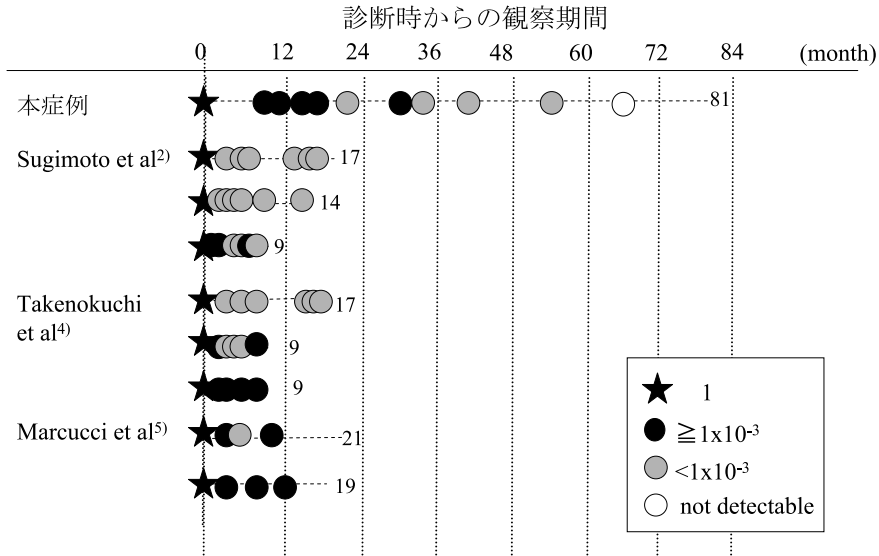


Fig. 3 化学療法による寛解維持例における定量的 RT-PCR 法による *AML1-MTG8* mRNA 解析の報告  
 今回の症例と、凍結保存サンプルを用いた 3 つの報告の各症例で、診断時の検出レベルを 1 として換算した。  $1 \times 10^{-3}$  レベル以上を  $\geq 1 \times 10^{-3}$  レベル未満を  $< 1 \times 10^{-3}$  レベル未満を  $< 1 \times 10^{-3}$  レベル未満を、検出感度以下を  $< 1 \times 10^{-3}$  レベル未満を で示した。各症例の最終的な寛解確認月数を右端に示す。

Tobal ら<sup>7)</sup> は competitive な nested-PCR 法による半定量的解析で、*AML1-MTG8* mRNA が  $1 \times 10^3$  copy/ $\mu$ gRNA 未満であれば安定した寛解状態を意味し、 $2.27 \times 10^3$  copy/ $\mu$ gRNA 以上のレベルで検出された症例はその後に再発したと報告している。本症例では、解析方法は異なるものの寛解導入後は最高でも  $1.6 \times 10^3$  copy/ $\mu$ gRNA とほぼ Tobal らの安全域レベルで推移し、診断後 81 ヶ月まで寛解を維持している。従って、化学療法による長期寛解例において、*AML1-MTG8* mRNA の検出は実際の白血病の残存を必ずしも意味するものではないことが、本症例の経過からも示唆される。

8 ; 21 転座型 AML の化学療法後の長期寛解症例の骨髄において、*AML1-MTG8* mRNA がリンパ球系を含む血球系の各分画<sup>8)</sup> や赤芽球系コロニーや単球・顆粒球系コロニーを形成する細胞の一部にも<sup>1)</sup> 検出されていることから、正常血球に分化可能な造血幹細胞の一部に 8 ; 21 転座が存在することが示唆される。従って、

化学療法で白血病細胞が根絶できても、8 ; 21 転座を有する前白血病段階の造血幹細胞が長期間にわたり残存するために *AML1-MTG8* mRNA が微少残存病変として検出されると考えられる。逆に言えば、8 ; 21 転座単独では白血病に至らず、付加的な遺伝子変異が加わることで白血病を発症することが示唆される。一方、化学療法後に検出される 8 ; 21 転座をもつ造血幹細胞が、長期の経過で消失するのかどうかについては、いまだ不明である。本症例では診断後 67 ヶ月時に real-time PCR 法で陰性化しており、8 ; 21 転座をもつ造血幹細胞はやがては消失する可能性も示唆されることから、今後より多くの症例での解析が必要である。

以上から 8 ; 21 転座型 AML においては *AML1-MTG8* mRNA の検出を MRD の指標とすることは適切ではなく、発現レベルの上昇を認められた際には、他の検査法ともあわせて経過を観察し慎重に治療方針を判断する必要がある。

## 文 献

- 1) Miyamoto T, Nagafuji K, Akashi K, Harada M, Kyo T *et al*: Persistence of multipotent progenitors expressing AML1/ETO transcripts in long-term remission patients with t(8;21) acute myelogenous leukaemia. *Blood*, **87**: 4789–4796, 1996.
- 2) Sugimoto T, Das H, Imoto S, Murayama T, Gomyo H *et al*: Quantitation of minimal residual disease in t(8;21)-positive acute myelogenous leukemia patients using real-time quantitative RT-PCR. *Am J Hematol*, **64**: 101–106, 2000.
- 3) 飯嶋健太郎, 土田昌宏, 中川秀枝, 中川博子, 二星葉子ほか: 白血病関連定量検査法の確立. *SRL 宝函* **24**: 65–68, 2000.
- 4) Takenokuchi M, Yasuda C, Takeuchi K, Nakamachi Y, Mukai M *et al*: Quantitative nested reverse transcriptase PCR vs. real-time PCR for measuring AML1/ETO (MTG8) transcripts. *Clin Lab Haem*, **26**: 107–114, 2004.
- 5) Marcucci G, Livak KJ, Bi W, Strout MP, Bloomfield CD *et al*: Detection of minimal residual disease in patients with AML1/ETO-associated acute myeloid leukemia using a novel quantitative reverse transcription polymerase chain reaction assay. *Leukemia*, **12**: 1482–1489, 1998.
- 6) Guerrasio A, Rosso C, Martinelli G, Lo Coco F, Pampinella M *et al*: Polyclonal haemopoieses associated with long-term persistence of the AML1-ETO transcript in patients with FAB M2 acute myeloid leukaemia in continuous clinical remission. *Br J Haematol*. **90**: 364–368, 1995.
- 7) Tobal K, Newton J, Macheta M, Chang J, Morgenstern G *et al*: Molecular quantitation of minimal residual disease in acute myeloid leukemia with t(8;21) can identify patients in durable remission and predict clinical relapse. *Blood*, **95**: 815–819, 2000.
- 8) Miyamoto T, Weissman IL, Akashi K: AML1/ETO-expressing nonleukemic stem cells in acute myelogenous leukemia with 8;21 chromosomal translocation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**: 7521–7526, 2000.