

主論文

**Expression of the myeloperoxidase gene in AC133 positive leukemia cells
relates to the prognosis of acute myeloid leukemia**

AC133 陽性白血病細胞におけるミエロペルオキシダーゼ遺伝子の発現は
急性骨髄性白血病の予後と関連する

田口潤、宮崎泰司、堤千寿子、澤山靖、安東恒史、対馬秀樹、福島卓也、
波多智子、吉田真一郎、栗山一孝、本田純久、陣内逸郎、間野博行、朝長万左男

Leukemia Research, 30 (2006) 1105-1112

長崎大学大学院医学研究科内科系専攻 (指導教授 朝長万左男 教授)

(緒言) ミエロペルオキシダーゼ (MPO) は、骨髄系にコミットした正常造血細胞に発現している酵素であり、白血病芽球における MPO 酵素活性および蛋白の有無は急性骨髄性白血病 (AML) の診断に用いられている。また、白血病芽球における MPO 陽性率は AML の予後因子であり、陽性率が高い群が予後良好である。白血病芽球における MPO 活性は単なる骨髄系分化の指標であるだけではなく、その生物学的特性と関連しているという仮説に基づき、白血病幹細胞分画が含まれる AC133 陽性細胞分画における MPO 遺伝子発現、蛋白発現および酵素活性を測定し、白血病予後との相関を検討した。

(方法) 細胞分離・純化: 治療前の AML33 症例及び健常者 10 名の骨髄を採取し、骨髄単核球から磁気ビーズを有する抗 AC133 抗体と MACS 磁気カラムを用いて AC133 陽性細胞分画を純化した。AC133 陽性細胞数が 1×10^6 以上採取可能であった AML7 症例に関しては、フローサイトメトリーを用いて AC133 陽性率を測定し、その他の症例に関してはサイトスピン標本にて前骨髄球の混入を形態学的にチェックした。

定量的 RT-PCR: MPO 遺伝子発現は 2 回以上の定量的 RT-PCR 法により測定した。RQ-PCR データは、GAPDH は U937 細胞株 cDNA で、MPO は MPO cDNA で標準化した。また、t(8;21) 転座を有する 8 症例に関しては、AML1-ETO 融合遺伝子を AC133 陽性分画に純化前後で定量的に測定した。

細胞染色: MPO 蛋白と MPO 酵素活性の存在を観察するため、AC133 陽性細胞のサイトスピン標本をそれぞれ DAKO LSAB+ Kit を用いた抗 MPO 抗体で免疫学的に、またジアミノベンジジン法により細胞化学的に染色した。

(結果)

1. AC133 陽性細胞の純化

採取した AC133 陽性細胞の純度は中央値で 98.8%であった。AC133 陽性細胞は検鏡で前

骨髓球が含まれていないことを確認した。また、t(8;21)転座を有する症例の AC133 陽性細胞における AML1-ETO 融合遺伝子発現を確認し、純化した AC133 陽性細胞が残存正常幹細胞のみではないことを確認した。

2. RT-PCR 法による MPO 遺伝子の定量的測定

MPO 発現量を MPO/GAPDH 比で表すと、健常人では 3.2-11.8 に分布したのに対して、AML 症例では 0.05-49.9 と発現量に大きな差が認められた。MPO/GAPDH 比 > 15 を MPOg-H 群 (10 例)、≤ 15 を MPOg-L 群 (23 例) と 2 群に分けると、AC133 陽性細胞における MPO 酵素活性を有する症例は 1 例を除いて MPOg-H 群に属していた。さらに骨髓スマアでの芽球 MPO 陽性率 > 50% を MPOa-H 群 (18 例)、≤ 50% を MPOa-L 群 (15 例) と 2 群に分け比較すると、MPOa-L 群は全て MPOg-L 群に属したが (15 例)、MPOa-H 群は MPOg-H 群 (10 例) と MPOg-L 群 (8 例) とに分けられた。生存率において、MPOa-H 群と MPOa-L 群では有意差は認められなかったが、MPOg-H 群と MPOg-L 群とでは統計学的有意差を認めた。

3. MPOg-H 群と MPOg-L 群の臨床的症例解析

年齢と PS には差異は認められなかったが、多血球系異形成を伴う AML は MPOg-L 群のみに認められた。染色体リスク群では、良好群は 5 例中 4 例が MPOg-H 群、不良群は全例 MPOg-L 群であった。MPOg-H 群で診断時白血球数は有意に高く、生存率は有意に良好であった。

(考察) 正常造血幹細胞および白血病幹細胞に発現すると考えられている AC133 が陽性の芽球を純化し MPO 遺伝子発現を検討した。純化された AC133 陽性細胞は、形態学的にも未分化であり、また t(8;21)転座を有する AML 症例については AML1-ETO 遺伝子発現が確認され、白血病細胞を含む成分であると考えられた。

成熟細胞成分を有する AML (FAB 分類 M2、M4) 症例が、MPOg-H 群と MPOg-L 群との両群に属していたことから、AC133 陽性白血病細胞における MPO 遺伝子発現は白血病の形態学的分化に基づく FAB 分類との明確な相関はないと考えられた。

AC133 陽性白血病細胞における MPO 遺伝子発現が骨髓球系の分化と独立したものであるかは不明であるが、MPO 発現は形態学的分化よりも早期の骨髓系分化を表している可能性が示唆される。

MPOg-H 群は、MPOg-L 群と比較して生存率は明らかに良好であった。t(8;21)の染色体リスク良好群は MPOg-H 群に属しており、染色体リスク不良群は全て MPOg-L 群であり、2 群間での生存率の差異を支持するデータであると考えられた。我々は臨床試験により白血病芽球の MPO 陽性率が AML の独立した予後因子であることを報告してきた。しかし、今回の検討では、AC133 陽性白血病細胞における MPO 遺伝子の発現レベルが AML 症例におけるさらに強い予後因子である可能性が示唆された。