

Denaturing High Performance Liquid Chromatography (DHPLC) 法を用いた *BCR/ABL* 遺伝子点突然変異の早期発見システムの確立

三橋 直美¹, 松田 基夫¹, 佐藤 裕子²

¹麻布大院 環境 分子生物学, ²国立国際医療センター研 臨床病理 超微細構造

1. はじめに

慢性骨髄性白血病 (CML) では, 95 %以上の患者に9番染色体と22番染色体の相互転座により生じる Philadelphia (Ph) 染色体が認められる。この転座によって形成される *BCR/ABL* 融合遺伝子からは *BCR/ABL* 蛋白が発現し, その高いチロシンキナーゼ活性により造血幹細胞が腫瘍化することがCMLの分子発症機序とされている。CMLの治療は1980年代に *IFN α* が導入され, 感受性のある1/3の症例では慢性期の延長が可能となったが, 細胞遺伝学的緩解例 (染色体検査レベルでPh染色体が消失すること) は10%以下であり, 完治を期待できる治療法ではなかった。しかし, 1996年, 選択的 *ABL* チロシンキナーゼ阻害剤であるイマチニブが開発され, 細胞遺伝学的緩解例は85%, さらに分子レベル緩解例 (PCRレベルで *BCR/ABL* mRNA が消失すること) も14%に達し, 完治の可能性も期待できる治療法と考えられている。しかし, 一方で, イマチニブ耐性CML症例の出現という新たな問題が浮上してきた。イマチニブは *BCR/ABL* 蛋白のATP結合領域にATPと競合して結合し, チロシンリン酸化を阻害することで, その後に続くシグナル伝達を遮断する。しかし, イマチニブ耐性症例では, *BCR/ABL* 遺伝子の点突然変異によるATP結合部位の構造変化により, イマチニブが *BCR/ABL* 蛋白に結合できなくなる。現在, この点突然変異は30部位44種類報告されている。これら耐性クローンを早期段階で発見することができれば, 他の治療法に変更するなどして耐性化を免れること

ができるはずである。

我々は, これまで臨床的にイマチニブ耐性と診断された11症例 (急性リンパ球性白血病を1例含む) で *ABL* ATP結合部位のシーケンス解析を行ったが, 点突然変異を認めたのは3例のみであった。この理由として, 25%以下の少数クローンはシーケンス解析法では検出不能であることが考えられる。一方, Denaturing High Performance Liquid Chromatography (DHPLC) 法では少数クローンでも2%以上であれば検出可能とされている。そこで, 我々は簡便・迅速, かつ高感度な点突然変異検出法としてDHPLC法を取り入れることを試みた。本法により, 早期に点突然変異が検出できればイマチニブ耐性出現を阻止しうると考えられる。

2. 材料と方法

BCR/ABL 遺伝子のATP結合部位に人工的に点突然変異を入れた8種類の代表的なイマチニブ耐性クローン (M244V, Q252R, Q252H, Y253H, Y253F, E255K, T315I, M351T) と野生型クローンをを用い, DHPLC法による検出感度を検討した。*ABL* ATP結合部位の中でも, 特にイマチニブ耐性となる点突然変異が集中する2領域をPCR法で増幅し, 野生型と耐性クローンを任意の割合で混合し, ヘテロデュプレックス反応後, DHPLC自動化装置であるWAVEシステム (Transgenomic, USA) を利用し, 点突然変異の検出感度の検討を行った。検出感度の決定後, 臨床サンプルを用い, 実際に点突然変異の検出を行う。

3. 結果および考察

イマチニブ耐性クローンと野生型クローンの、図1に示される Fragment 1 と Fragment 2 の領域をそれぞれPCR法により増幅し、任意の割合で混合、ヘテロデュプレックス反応後、WAVEシステムを使用し、点突然変異の検出感度の検討を行った。その結果、変異の位置により多少感度の差が見られるものの、Fragment 1 における M244V, Q252R, Q252H,

Y253H, Y253F, E255K の検出感度は、3～5%であった。また Fragment 2 における T315I, M351T の検出感度は、2～3%であった。これらの結果を基に、臨床サンプルでの点突然変異の検出を行っていく。また、今後の展開として、DHPLCにより検出された変異ピークの分画のみを採取し、シーケンシングを行うことで、突然変異部位を特定することを考えている。

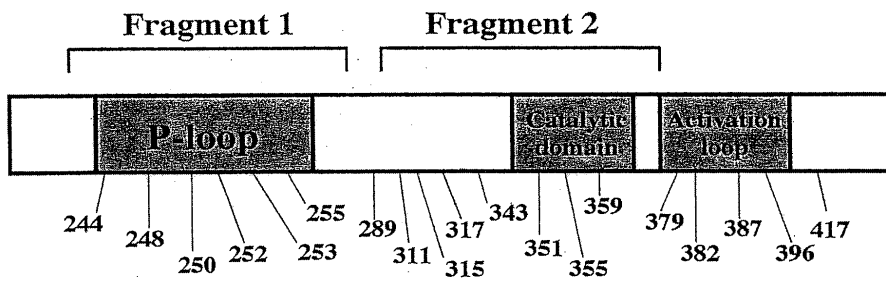


図1. ABL キナーゼドメインにおける点突然変異部位の分布