

京都大学	博士 (人間健康科学)	氏名	松尾 英将
論文題目	Purification of leukemic blast cells from blood smears using laser microdissection. (レーザーマイクロダイセクションを用いた血液塗抹標本からの白血病細胞の純化)		
(論文内容の要旨) 急性骨髄性白血病(AML)の治療においては、遺伝子異常に基づいたリスク層別化が行われてきた。これまでに患者の予後と相関する遺伝子異常(予後因子)が数多く同定されており、そのほとんどは診断時の末梢血や骨髄液から核酸を抽出し、遺伝子解析する手法が用いられてきた。しかし、検体中の白血病細胞(芽球)の割合が低い場合は、大多数を占める正常細胞の影響により正確な判定が行えない。また、骨髄線維症を合併するなどして十分な検体量が採取できない場合も多い。特にダウン症に合併した AML(AML-DS)では、上記の理由により予後因子に関する知見は乏しい。 レーザーマイクロダイセクション(LMD)は顕微鏡観察下で組織の目的の領域を採取する装置である。LMD は主に病理検査の領域で、例えば特定の組織の遺伝子発現量を調べるなどの目的で用いられてきた。血液塗抹標本から血液細胞の形態学的特徴により単一の細胞を採取することは原理的には可能であるものの、技術的困難さからこれまでに行われていない。 そこで今回、LMD を用いて芽球を純化する系を確立するために、実験を行った。AML-DS 患者から樹立した細胞株である KPAM1 および急性骨髄芽球性白血病細胞株である KO52 を 1:9 で混同し、疑似的に目的の細胞を 10%の割合で含む溶液を作成し、フィルム付きスライドガラス上に塗抹した。次にメイグリュンワルド・ギムザ染色を行い、AML-DS 細胞の特徴である大型で、好塩基性の細胞質を持ち、周囲に bleb の形成を伴う細胞を約 100 細胞採取した。続いて nested PCR およびサンガーシーケンスにより AML-DS 細胞にみられる GATA-1 遺伝子変異を調べた。その結果、2bp の欠失に伴うフレームシフト変異が検出された。今回野生型シグナルの重複がみられたものの、GATA-1 遺伝子は X 染色体上にあり、KPAM1 細胞株は女性患者由来であるためと考えられた。 さらに京都大学医の倫理委員会承認(G-516)を得て、GATA-1 遺伝子変異を持ち、一部が AML-DS を発症する一過性骨髄異常増殖症(TAM)患者の末梢血(芽球約 20%)を採取した。前述のように塗抹標本を作製し、顕微鏡観察下で形態学的特徴により芽球のみを約 100 細胞採取した。細胞形態の判定は 2 名の臨床検査技師で行った。変異解析の結果、GATA-1 遺伝子に 17bp の重複に伴うフレームシフト変異が検出された。検体は男性患者由来であり野生型シグナルがほとんど検出されなかったことから、TAM の芽球が正確に採取できていたと考えられた。 以上より、LMD により芽球を純化することで、感度の高い遺伝子変異解析が行える可能性が示された。今後は本手法を用いて、芽球割合が低い症例や十分な検体量がない場合でも、より正確な予後因子解析が行えると考えられる。			

(論文審査の結果の要旨)

白血病の予後因子解析は治療層別化や新規治療法の開発につながる。しかし一方で、白血病細胞の割合が低く検査結果が偽陰性になる場合や、十分な検体量が採取できない場合も多い。そこで本研究では、少量の血液もしくは骨髄液から塗抹標本を作製し、白血病細胞を純化することで感度の高い遺伝子解析を行う方法を確立することを目的に、研究を行った。

ダウン症合併急性骨髄性白血病患者由来の細胞株 KPAM1 を 10%の割合で含む塗抹標本を作製し、レーザーマイクロダイセクションを用いて形態学的特徴により KPAM1 細胞のみを 100 細胞採取し、GATA-1 遺伝子変異を調べた。その結果、2bp の欠失に伴うフレームシフト変異が検出された。さらに一過性骨髄異常増殖症患者の末梢血(芽球約 20%)を用いて同様の実験を行い、GATA-1 遺伝子に 17bp の重複に伴うフレームシフト変異が検出された。よって臨床検体においても本手法の有用性が示された。

以上の研究は白血病の正確な予後因子解析方法の解明に貢献し、本手法を応用した新規予後因子の同定、ひいては白血病患者の予後改善に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士 (人間健康科学) の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成 30 年 2 月 9 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。

論文内容の要旨、審査の結果の要旨及び学位論文の全文は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。

ただし、特許申請、雑誌掲載等の関係により、要旨を学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 年 月 日以降