

# WT1 mRNA 核酸増幅検査

## WT1 mRNA quantitation test

すぎ やま はる お  
杉 山 治 夫  
Haruo SUGIYAMA

### I. WT1 遺伝子

WT1 遺伝子は、小児の腎腫瘍 Wilms' tumor の原因遺伝子として単離された遺伝子で、転写因子をコードしており、細胞の増殖、分化に重要な役割を果たしている。WT1 遺伝子は、従来、癌抑制遺伝子と定義されたが、われわれは、一連の研究から WT1 遺伝子は癌遺伝子であると考えている。

### II. WT1 mRNA 定量による白血病細胞の定量

急性骨髄性白血病 (AML) の約 94% の症例で白血病細胞が WT1 mRNA を高発現しており、AML の腫瘍マーカーであることが判明した。WT1 mRNA の発現レベルは、正常骨髄細胞に比し、約 10 ~ 1,000 倍、正常末梢血に比し、約 1,000 ~ 100,000 倍であり<sup>1)</sup>、高感度で白血病細胞を検出することができる。WT1 mRNA 定量検査は、下記のような有用性をもっている。

#### 1. 治療効果を的確に診断

形態学的に白血病細胞に見えないものがあるので、形態学的診断では、必ずしも正確に診断できるとは限らない。例えば、形態学的診断では、白血病芽球が正常レベルであるので、完全寛解と診断されたが、WT1 mRNA レベルが高値であった症例があったが、この症例では、すぐに再発をきたした。このことは、形態学的診断では、白血病細胞量を正確に診断できないことを示している。

#### 2. 白血病の再発を早期に診断

形態学的には再発と診断できない時点 (分子再発)

で WT1 mRNA レベルが上昇し、白血病の再発を早期に診断できる。再発リスクの高い症例とは末梢血 WT1 mRNA の測定結果が次のような場合と考えられる。

①寛解に至るも持続的に WT1 mRNA を検出した場合<sup>2)</sup> (図 1)

②地固め療法後、WT1 mRNA を検出した場合

AML の地固め療法後の末梢血 WT1 mRNA レベルと無病生存期間との関係に関しては、50 コピー/ $\mu$ gRNA 未満群に比べ 50 コピー/ $\mu$ gRNA 以上群は有意に短く、また多くが 1 年以内に再発していた<sup>3)</sup>。1 年以内の早期再発例は 1 年以降に再発する例に比べ、再寛解導入率が低く予後不良であるため、同種造血幹細胞移植を優先的に行うことが勧められるだろう。

①寛解後経過観察中に WT1 mRNA 値が 200 コピー/ $\mu$ gRNA 以上を呈した場合<sup>2)</sup>

②治療前後の WT1 mRNA 減少率が小さい場合<sup>4)</sup>

③寛解後 WT1 mRNA 測定値が 2 回連続して増加した場合 (表 1)

#### 3. 白血病化しやすい疾患の白血病化のモニター

白血病化しやすい疾患、例えば再生不良性貧血、発作性夜間血色素尿症が、どの程度、白血病化しているかをモニターできる。これらの疾患の治療の最大の問題点の 1 つは、白血病化の兆候をいち早く診断することであるが、形態学的診断では困難なことがほとんどである。これらの疾患で白血病化が起ると、その程度に応じて WT1 mRNA レベルが上昇するので、WT1 mRNA レベルのモニタリングにより白血病化の程度をリアルタイムに診断できる。

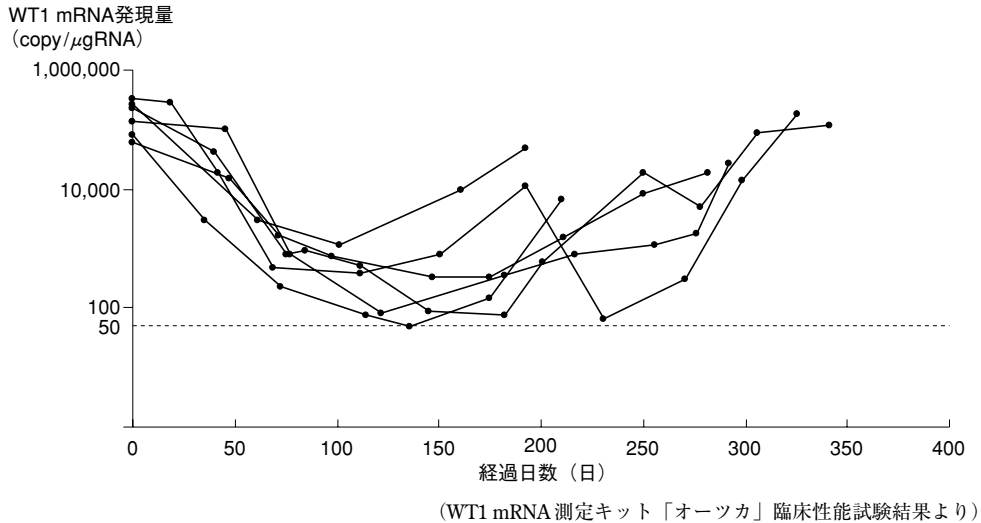


図1 完全寛解後再発した症例の末梢血 WT1 mRNA 発現量の推移  
 寛解後再発した症例は、治療後の末梢血 WT1 mRNA が常に検出された。

表1 末梢血 WT1 mRNA 月1回モニタリング時の推移と寛解・再発 (例数)

WT1 mRNA 連続上昇があった症例 19 例のうち 18 例が再発した。

	寛解	再発	合計
WT1 mRNA 連続上昇なし	41	6	47
WT1 mRNA 連続上昇あり	1	18	19
合計	42	24	66

( $\chi^2$ : P < 0.001)

(WT1 mRNA 測定キット「オーツカ」臨床性能試験結果より)

4. 反応性白血球増加と腫瘍性白血球増多 (白血病) の鑑別

反応性に白血球が増加しても、WT1 mRNA レベルは上昇しない。逆に、白血球数が正常値であっても、WT1 mRNA レベルが異常値の際は、白血病細胞あるいは、白血病前駆細胞の存在が疑われる。例えば、反応性の好酸球増多症と好酸球性白血病とを WT1 mRNA レベルで鑑別できる。末梢血幹細胞移植に際し、G-CSF を用いて末梢血に造血幹細胞を導出させても、末梢血での WT1 mRNA の上昇は見られないほど、WT1 mRNA の上昇は、臨床的には白血病細胞の増加に特異的である。

5. 白血病発症早期診断の可能性

将来、健康診断での白血病の早期診断に有用である可能性がある。WT1 遺伝子は、白血病の発症に

きわめて密に関与しており、そのため、WT1 mRNA レベルの上昇は白血病細胞の出現の可能性を意味している。白血病の再発に先立って WT1 mRNA レベルが上昇することや、白血病の前駆状態である骨髓異形成症候群などでは、白血病化で WT1 mRNA レベルが上昇する。

6. キメラ遺伝子では捉えられない白血病細胞を捉えられる

WT1 mRNA は多くの白血病症例に発現が認められるため、キメラ遺伝子発現の認められない白血病も含めて使用できる範囲が広い<sup>2)</sup>。

また、WT1 mRNA 定量検査は、キメラ遺伝子 mRNA 定量検査よりも、治療効果判定の感度が高い場合がある。WT1 mRNA は、増殖能のある白血病細胞で発現し、白血病細胞が分化するにつれて WT1 mRNA は減少し、分化した白血病細胞では WT1 mRNA の発現は消失する。例えば慢性骨髄性白血病 (CML) では、治療効果が出て、増殖力のある白血病細胞が減少すると、WT1 mRNA も急速に低下するが、bcr/abl mRNA は、分化した CML 細胞も発現しているため、bcr/abl mRNA は、急速に低下しない。また急性前骨髄球性白血病 (APL) でもオールトランスレチノイン酸 (ATRA) で治療後、臨床効果が出現して、白血病細胞が分化しはじめると、WT1 mRNA が急速に低下するにもかかわらず、分化した APL 細胞が多量の PML/RAR  $\alpha$  mRNA を

発現することから PML/RAR  $\alpha$  mRNA がむしろ増加することも起こる<sup>5)</sup>。

さらに、別のクローン増殖による再発では、初診時のキメラ遺伝子では検出できないこともあるだろう。

### Ⅲ. WT1 mRNA 定量による骨髓異形成症候群 (MDS) の白血病化の診断

MDS の治療上、白血病化の程度を的確に診断することは非常に重要であるが、これを形態学的に診断することは困難である。われわれは、1999 年、57 例の MDS での骨髓 (BM) および末梢血 (PB) での WT1 mRNA 定量結果を報告した<sup>6)</sup>。WT1 mRNA レベルは、BM および PB で、白血病化とともに上昇し、特に PB での WT1 mRNA レベルの上昇は、6 カ月以内の急性白血病化を予測した。かくして、MDS での WT1 mRNA 定量は、白血病化の程度の診断に有用であることが示された。その後も同様な報告がある<sup>7,8)</sup>。

さらに、日本における WT1 mRNA 測定キットの臨床性能試験が MDS 患者 126 例 (RA 69 例、RARS 9 例、RAEB 24 例、RAEB-t 13 例、AML-MDS 11 例) を対象に行われ、BM および PB の WT1 mRNA 量が測定された<sup>9)</sup>。その結果、FAB 分類および WHO 分類両者において RA  $\rightarrow$  RAEB  $\rightarrow$  RAEB-t と病勢が進行するにつれて BM および PB で、WT mRNA レベルが上昇し、病期と WT1 mRNA レベルとの間で、有意な相関が見られた。また、IPSS スコアと WT1 mRNA レベルとの相関については、BM、PB とともに low  $\rightarrow$  intermediate 1  $\rightarrow$  intermediate 2  $\rightarrow$  high とスコアの増加 (病勢の増悪) とともに、WT1 mRNA レベルも有意に上昇した。WPSS スコアと WT1 mRNA レベルとの相関についても同様の結果が得られた。骨髓液中の芽球の割合と BM や PB での WT1 mRNA レベルとの相関が解析されたところ、BM、PB とともに骨髓液中の芽球の割合と WT1 mRNA レベルとの間には相関が見られず、われわれの以前からのデータが確認された。このことは前項で述べたように、① WT1 を発現する増殖能のある白血病芽球、② WT1 の発現が低下し、増殖能が低下した白血病芽球、③ 正常骨髓芽球の 3 者を形態学的には正確に診断できないことを示唆している。

特に①と②の細胞の区別が形態学的には不可能であることを示唆していると考えられる。

### Ⅳ. 骨髓異形成症候群と再生不良性貧血の鑑別診断への WT1 mRNA 定量検査の応用

貧血をきたす再生不良性貧血 (AA) と、貧血をきたす MDS の一亜型である不応性貧血 (RA) との鑑別は、必ずしも容易でない。前述の日本における WT1 mRNA 測定キットの臨床性能試験では、AA 8 例と RA 69 例の末梢血の WT1 mRNA レベルを測定したところ、AA は 8 例全例で WT1 mRNA が 50 コピー/ $\mu$ gRNA 未満 (非検出) であったが、RA では約半数が 50 コピー/ $\mu$ gRNA 以上で異常値を示した。よって、WT1 mRNA レベルが異常値である時は RA である可能性が高く、WT1 mRNA の定量検査は、AA と MDS との鑑別診断補助として有用である。

#### おわりに

WT1 mRNA の測定は、研究検査から診療に役立つ検査へと進化してきた。この WT1 mRNA 定量臨床検査は、大塚製薬により治験が行われ、2007 年 11 月に急性骨髓性白血病に対し、また 2011 年 8 月には骨髓異形成症候群に対して保険採用された。今後とも知見を重ね、さらに有効な臨床応用が広がることを望んでいる。

#### 文 献

- 1) 井上和司, 杉山治夫: 造血器腫瘍に対する分子医学的アプローチ WT1 と白血病, 臨床血液 36 巻 6 号, 552-558, 1995.
- 2) 宮脇修一, 恵美宣彦, 三谷絹子, 大屋敷一馬, 北村邦朗, 森下剛久, 小川啓恭, 小松則夫, 相馬俊裕, 玉置俊治, 小杉浩史, 大西一功, 溝口秀昭, 平岡諒, 小寺良尚, 上田龍三, 森島泰雄, 中川雅史, 飛田規, 杉本耕一, 千葉滋, 井上信正, 濱口元洋, 古賀大輔, 玉置広哉, 直江知樹, 杉山治夫, 高久史磨: 急性骨髓性白血病 (AML) 191 例の臨床経過と WT1 mRNA の発現量 全国 23 施設による共同研究: 臨床血液 46 巻 12 号, 1279-1287, 2005.
- 3) Miyawaki S, Hatsumi N, Tamaki T, Naoe T, Ozawa K, Kitamura K, Karasuno T, Mitani K, Kodera Y, Yamagami T, Koga D: Prognostic potential of detection of WT1 mRNA level in peripheral blood in adult acute myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma*, **51** (10): 1855-1861, 2010.
- 4) 北村邦朗, 中野祐往, 綿本浩一, 古賀大輔, 直江知樹: 急

- 性骨髓性白血病における末梢血及び骨髓液 WT1 mRNA モニタリングの意義, 臨床血液 51 巻 12 号, 1748-1755, 2010.
- 5) Tamaki H, Yamagami T, Kawakami M, Kim EH, Mishima M, Kawase I, Soma T, Ogawa H : Different kinetics of WT1 and PML-RARalpha gene expression levels during remission induction therapy with all-trans retinoic acid alone in acute promyelocytic leukemia. *Int J Hematol*, **84** (5) : 468-470, 2006.
  - 6) Tamaki H, Ogawa H, Ohyashiki K, Ohyashiki JH, Iwama H, Inoue K, Soma T, Oka Y, Tatekawa T, Oji Y, Tsuboi A, Kim EH, Kawakami M, Fuchigami K, Tomonaga M, Toyama K, Aozasa K, Kishimoto T, Sugiyama H : The Wilms' tumor gene WT1 is a good marker for diagnosis of disease progression of myelodysplastic syndromes. *Leukemia*, **13** (3) : 393-399, 1999.
  - 7) Cilloni D, Gottardi E, Messa F, Fava M, Scaravaglio P, Bertini M, Girotto M, Marinone C, Ferrero D, Gallamini A, Levis A, Saglio G; Piedmont Study Group on Myelodysplastic Syndromes.: Significant correlation between the degree of WT1 expression and the International Prognostic Scoring System Score in patients with myelodysplastic syndromes. *J Clin Oncol*, **21** (10) : 1988-1995, 2003.
  - 8) Tamura H, Dan K, Yokose N, Iwakiri R, Ohta M, Sakamaki H, Tohyama K, Kondo A, Hyodo H, Nakamura K, Yamashita T, Elisseeva OA, Oka Y, Oji Y, Sugiyama H, Ogata : Prognostic significance of WT1 mRNA and anti-WT1 antibody levels in peripheral blood in patients with myelodysplastic syndromes. *Leuk Res*, **34** (8) : 986-990, 2010.
  - 9) WT1 mRNA 測定キット「オーツカ」添付文書, 2012 年 4 月現在