

Ph¹ 染色体陽性白血病細胞の遺伝子解析

中村 とすえ

①

中村 こそえ

Ph¹ 染色体陽性白血病細胞の遺伝子解析

中村 こそえ

A. 研究の目的、背景

近年白血病研究の進歩に伴い、白血病の生物学的多様性や病態の多様性が明らかになりつつある。さらに癌遺伝子の研究を中心に白血病化の分子機構の一部が明きらかにされ、またそれに基づいた白血病の分子遺伝学的診断法の開発が進んできている。今回、慢性骨髄性白血病などに認めるPhiladelphia染色体に関する分子生物学的解析を行った。

Philadelphia染色体 (Ph¹ 染色体)、t(9;22)(q34;q11)は9番染色体と22番染色体の相互転座の結果おこり、慢性骨髄性白血病(CML)の約95%に認められる。この転座の結果として9番染色体の癌遺伝子c-ablは22番染色体のbcr遺伝子と結合する¹。9番染色体のc-abl遺伝子内の100 kb以上に及ぶ領域と、CMLでは22番染色体の5.8 kbのMbcrc遺伝子領域にDNAレベルでは症例により異なる切断点をもつが^{2,3}、mRNAではMbcrc exon 2とc-abl exon 2またはMbcrc exon 3とc-abl exon 2が結合し、その結果としてchimeric bcr/abl mRNAが発現する^{4,5}。このchimeric Mbcrc/abl mRNAの大きさは8.5 kbで、210 kdの蛋白(P210^{bcr/abl} protein)に翻訳される。このP210^{bcr/abl}蛋白は通常のabl蛋白(P185^{abl} protein)より強いtyrosine kinase活性を有している。

一方、Ph¹染色体は約25%の成人の急性リンパ性白血病(ALL)と約10%の小児のALLにも認められる。これらの疾患での22番染色体の切断点は、約50%の成人のPh¹染色体陽性ALLではMbcrc遺伝子領域にあるが、残りの約50%の成人のPh¹染色体陽性ALLと殆ど全ての小児のPh¹染色体陽性ALLではMbcrc遺伝子領域の約50kb程5'側のmBCR遺伝子領域にある。後者の場合はmBCR exon 1とc-abl exon 2が転座により結合し、7 kbのchimeric mBCR/abl mRNAが発現し、185 kdの蛋白(P185^{bcr/abl} protein)に翻訳される⁶⁻⁸。P185^{bcr/abl}蛋白はtyrosine kinase活性やtumorigenic potentialはP210^{bcr/abl}蛋白より高いという報告が多い⁹。

Ph¹染色体は急性骨髄性白血病、Myelodysplastic syndrome、悪性リンパ腫などにも時に認めるが、これらの疾患におけるPh¹染色体の遺伝子解析は十分なされていない。

一方、Polymerase Chain Reaction(PCR)法はin vitroでDNAの特定の遺伝子領域を選択的に増幅させるのに極めて有用な方法である¹⁰。逆転写酵素(Reverse Transcriptase)で相補的DNA(cDNA)を合成することでmRNAの特定遺伝子領域の選

択的増幅にも応用できる(Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction: RT-PCR法)。

RT-PCR法を用いてPh¹染色体陽性造血器腫瘍細胞についてbcr/abl 遺伝子解析を行った¹¹。第I章では慢性骨髄性白血病(CML)で分子遺伝学的マーカーとして診断に有用であるか否かについて検討し、さらにPh¹染色体陽性細胞の分子遺伝学的多様性の検討を行った。第II章では高感度に特異性をもって遺伝子解析を行うことができるRT-PCR法の特長を利用して同種骨髄移植後のCML症例でPh¹陽性細胞が残存しているか否かの検討を行った。第III章ではlate appearing Ph¹ chromosomeを認めたMyelodysplastic syndrome(MDS)の一症例について詳細な遺伝子解析を行った。これらの研究を通じて白血病の病態の解明や臨床所見との関連の手がかりを得ることを期待した。

B. 全章に共通した研究方法

DNA 及びRNA 抽出

患者より末梢血または骨髄血をヘパリン採血し、Ficoll-Metrizoateの濃度勾配法により単核球層を分離した。分離した単核球からGuanidium/CsCl法により、total RNAを抽出した。DNAは常法により抽出した¹²。

RT-PCR法のprimerとprobeの合成

bcr 遺伝子とc-abl 遺伝子のDNA配列^{4-6, 13, 14}に基づき、primer及びprobeとして用いるoligonucleotideの配列を決定し、DNA synthesizerで合成した。5' primerとしてMbcx exon 1(b1), exon 2(b2), exon 3(b3), exon 4(b4)及び、mBCR exon 1(B), c-abl exon 2のplus strand (a2⁺)を合成し、3' primerとしてc-abl exon 2(a2⁻)とexon 3(a3⁻)のminus strandを合成した。internal probeとしてc-abl exon 2とexon 3 plus strand (a2⁺及びa3⁺)、Mbcx exon 2またはexon 3とc-abl exon 2の結合領域のminus strand (b2-a及びb3-a probe)を合成した(Table 1)。a2⁺はinternal probe及び正常c-abl mRNAの検出の際の5' primerとして使用した。

Table 1. primerとprobe として使用した合成oligonucleotide
(文献4-6,13,14 参照)

3'primer

a2 ;c-abl exon 2 (antisense) 5'-GCTCAAAGTCAGATGCTACT-3'
a3 ;c-abl exon 3 (antisense) 5'-TCCCCATTGTGATTATAGCC-3'

5'primer

b1 ;Mbcx exon 1 (sense) 5'-ATCTCCTCTGACTATGAGCG-3'
b2 ;Mbcx exon 2 (sense) 5'-ATTCCGCTGACCATCAATAA-3'
b3 ;Mbcx exon 3 (sense) 5'-CACTCAGCCACTGGATTAA-3'
b4 ;Mbcx exon 4 (sense) 5'-AAAGCAAAGACGCGCTCTA-3'
B ;mBCR exon 1 (sense) 5'-GTTGTCGTGTCCGAGGCCAC-3'

probe

b2-a probe;b2-a junction (antisense) 5'-GCTGAAGGGCTTCTCCTTATTGATG-3'
b3-a probe;b3-a junction (antisense) 5'-GCTGAAGGGCTTTTGAAGCTCTGCTTA-3'
B-a probe;B-a junction (antisense) 5'-GCTGAAGGGCTTCTGCGTCTCCAT-3'
a2' ;c-abl exon 2 (sense) 5'-AAGCCCTTCAGCGGCC-3'
a3' ;c-abl exon 3 (sense) 5'-GTGAAAAGCTCCGGGTCTTA-3'

*sense ;plus strand
antisense;minus strand

cDNAの合成

5 μ lのtotal RNA を凍結乾燥し、9 μ lのannealing buffer(250 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH8.3, 1 mM EDTA)で溶解した。100 pmolの3'primerを加えて、80°Cで3分熱し、31°Cで60分の条件でprimerとmRNAの相補部分の水素結合(annealing)を行った。さらに15 μ lのcDNA buffer(24 mM Tris HCl pH 8.3, 16 mM MgCl₂ 8 mM DTT, 0.4 mM 各dNTP)と5単位の逆転写酵素及び0.5単位のRNA分解酵素阻害剤(RNasin)を加えて42°Cで60分間、酵素反応させcDNAを合成した。

PCR 法

false positiveの問題を避けるためKwokらの推奨する方法に準じてPCR 反応を行った¹⁵。5 μ lの合成したcDNAに2.5 μ lの10倍Taq polymerase buffer(500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl pH 8.3, 150 mM MgCl₂, 0.1 % gelatin)、2.5 mMの各dNTPを各2.5 μ l及び100 pmolの5'primerを加え、滅菌蒸留水(DDW)で全量25 μ lに調整した。さらに反応中の蒸発を防ぐために適量のmineral oilを加えた。94°Cで6分間、denature (mRNAとcDNAの水素結合の解離)した後、2.5単位のTaq polymeraseを加えPCR 反応を行った。denaturation (2本鎖DNAの水素結合の解離)が94°Cで1分間、annealing (primerとDNAの相補部分の水素結合反応)が51°Cで1分間、extension (DNA合成)が72°Cで2分間の条件で30 cycleの反応を行った。

極少数のPh¹染色体陽性細胞の検出を行うためには、さらに7.5 μ lのbufferと2.5 mMの各dNTPを7.5 μ l加え、DDWで全量が100 μ lになるような調整し、2.5単位のTaq polymeraseを再び加えて同じ条件で30 cycle反応を追加し、60 cycleの反応を行った。

PCR産物はアルカリ・トランスファーによるサザンブロット変法により解析を行った。8 μ lのPCR産物は1% Seaken agaroseと3% Nusieve agaroseの混合gelでTBE(Tris/Borate/EDTA)をbufferにして電気泳動を行い、0.4 N NaOH bufferでNylon membraneにtransferした。このblotは5'end-labelしたprobeと

ssDNA 5 μ g/ml, 5 X SSPE, 0.6 % SDS の溶液で65°Cの条件でhybridization を行った。その後blotは5 X SSPE, 0.1 % SDS で60°Cで洗浄し、autoradiography に供した。

一部の検体では30 cycleの反応後のPCR 産物と60 cycleの反応後のPCR 産物についてサザンプロット変法による解析を試みて比較検討を行った。

サザンプロット法による解析

サザンプロット法により、Mbc_r領域遺伝子のDNA 解析を行った¹⁶。10 μ g の DNA を必要に応じて数種類の制限酵素(BamHI, HindIII, EcoRI, BglII)で処理した。この検体を0.7 % agarose gel で電気泳動し、NitrocelluloseまたはNylon membrane にtransferした。DNA probe はrandom primer 法により³²P-label した¹⁷。prehybridization, hybridization は常法に従い行ない、autoradiography に供した。

probe として3' Mbc_r Fragment (1.2 kb HindIII/BglII)は全ての検体で用い、必要に応じて5' Mbc_r Fragment (BglII/HindIII)^{18, 19}と 'large bcr probe'²⁰を用いた。Mbc_r遺伝子領域の切断点の詳細な解析のためには数種類の制限酵素とこれらのprobe を組合せて解析を行った。

第 I 章

RT-PCR法によるPh¹ 染色体陽性慢性骨髄性白血病におけるbcr/abl 遺伝子解析

a. 研究の目的、背景

Ph¹ 染色体陽性慢性骨髄性白血病 (CML) において RT-PCR法による chimeric bcr/abl mRNA の遺伝子解析を行い、CML の診断における分子生物学的マーカーとしての有用性と CML の分子生物学的多様性の検討を行った。同時にサザンブロット法により Mbcrl 遺伝子領域内における個々の症例における DNA の詳細な切断点の位置の分析を行い、発現する chimeric Mbcrl/abl mRNA の特徴の検討を行った。

b. 研究対象及び方法

研究対象

12施設より提供された Ph¹ 陽性慢性骨髄性白血病 (CML) の患者 32 症例の末梢血または骨髄血について解析を行った。臨床的には 5 症例は初診時に急性転化期または移行期と診断され、8 症例は経過観察中に急性転化をきたした (Table 2)。残りの 19 症例は観察期間中、慢性期を持続した。

研究方法

‘B. 全章に共通した研究方法’ に記した方法の準じて、RT-PCR法による chimeric bcr/abl mRNA の遺伝子解析とサザンブロット法による Mbcrl 遺伝子の解析を行った。

chimeric Mbcrl exon 2/c-abl exon 2 mRNA (b2-a) と Mbcrl exon 3/c-abl exon 3 mRNA (b3-a) の解析には 5' primer として Mbcrl exon 2 (b2) または Mbcrl exon 3 (b3)

を使用して反応を行い、Mbcx exon 2 またはMbcx exon 3 とc-abl exon 2の結合部のminus strand (b2-aまたはb3-a probe) をprobeとして解析した。

chimeric Mbcx exon 1/c-abl exon 2 mRNA(b1-a)の解析には、5'primerとしてMbcx exon 1(b1)を3'primerとしてc-abl exon 2 minus strand(a2⁻)を使用して反応を行い、internal probeとしてc-abl exon 2 plus strand(a2⁺)を用いた。この解析ではb1-aでは97 bp、b1-b2-aでは202 bp、b1-b2-b3-aでは227 bpのバンドが検出される。b1-b2-a またはb1-b2-b3-aのバンドの検出は反応のpositive controlにもなりうる。

chimeric Mbcx exon 4/c-abl exon 2 mRNA(b4-a)の解析には、Mbcx exon 4(b4)を5'primerとした解析とともに、Mbcx exon 3(b3)を5'primer、a2⁻を3'primer、a2⁺をinternal probeとした解析を行った。後者の解析ではb3-aでは67 bp、b3-b4-aでは145 bpのバンドが検出される。67 bpのバンドの検出は反応のpositive controlにもなりうる。

c. 結果

患者検体の解析

32症例のPh⁺陽性慢性骨髄性白血病(CML)患者検体についてRT-PCR法によるchimeric bcr/abl mRNAの遺伝子解析を行い、全例でchimeric Mbcx/abl mRNAの発現が確認された。chimeric mBCR/abl mRNAが検出された症例はなかった。32症例は①chimeric Mbcx exon 2/c-abl exon 2 mRNA(b2-a)のみを発現(7症例)、②chimeric Mbcx exon 3/c-abl exon 2 mRNA(b3-a)のみを発現(15症例)、③b2-aとb3-aの同時発現(11症例)の3群に分類された。chimeric Mbcx exon 1/c-abl exon 2 mRNA(b1-a)やchimeric Mbcx exon 4/c-abl exon 2 mRNA(b4-a)さらにchimeric mBCR exon 1/c-abl exon 2(B-a)が検出された症例はなかった(Table 2)。b1-aとb4-aの解析ではそれぞれ反応のpositive controlが検出されるのを確認した。

Table 2. 症例の臨床経過及び遺伝子解析

pt. no.	Status at		Clinical sampling characteristics	Follow up	breakpoint zone	chimeric mRNA				
	age	sex				b2-a	b3-a	b1-a	b4-a	B-a
1	12	F	bp(My)	B	1y10m	3	++	+	-	-
2	14	F	cp	C	3m	3	++	+	-	-
3	9	F	cp	C	1y 5m	3	++	+	-	-
4	10	M	cp	D	8m	3	+	++	-	-
5	14	M	cp	D	3y 9m	3	+	++	-	-
6	36	F	cp	D	6m	4	+	++	-	-
7	31	M	cp	D	3y 2m	4	+	++	-	-
8	44	F	cp	C	8y 0m	4	+	++	-	-
9	52	F	cp	C	1y11n	4	+	++	-	-
10	41	M	cp	C	8m	5	+	++	-	-
11	23	M	bp(?)	A	10m	5	+	++	-	-
12	81	F	cp	C	7m	2	+	-	-	-
13	12	M	cp	D	2y10m	3	+	-	-	-
14	8	M	bp(My)	B	4y 3m	3	+	-	-	-
15	49	M	bp(Ly)	B	1y 7m	3	+	-	-	-
16	22	M	cp	B	5y 5m	3	+	-	-	-
17	23	M	cp	C	1y 1n	3	+	-	-	-
18	12	F	cp	C	1y 1n	3	+	-	-	-
19	4	M	cp	B	2y 0m	3	-	+	-	-
20	5	M	cp	D	1y 7n	3	-	+	-	-
21	13	M	cp	C	4y 0m	3	-	+	-	-
22	8	M	cp	C	1y 4m	3	-	+	-	-
23	22	M	cp	D	1y 0m	3	-	+	-	-
24	14	M	cp	B	11n	4	-	+	-	-
25	8	F	bp(Ly)	A	7m	4	-	+	-	-
26	28	F	cp	D	8m	4	-	+	-	-
27	3	M	cp	D	10n	4	-	+	-	-
28	46	F	bp(Ly)	B	4y 4m	4	-	+	-	-
29	54	F	bp(Ly)	B	3y 3m	4	-	+	-	-
30	21	M	ap	E	1y 6m	5	-	+	-	-
31	8	F	bp(mix)	A	1y 0m	G	-	+	-	-
32	54	F	cp	A	9m	G	-	+	-	-

cp; 慢性期, bp: 急性転化期, ap; 移行期

(My); myeloblastic crisis, (Ly); Lymphoblastic crisis

(Mix); Mixed lineage crisis, (?); crisis のlineage 不明

A; 急性転化で診断 B; 経過観察中に急性転化 C; 経過観察中慢性期を継続

D; 第一寛解期に同種骨髄移植 E; 移行期で診断

zone; Mbcr領域の切断点の位置 (Fig.1参照) G; Mbcr領域がgerm line 型

Mbcr遺伝子領域の切断点と発現するchimeric mRNA の特徴

Mbcr遺伝子領域の切断点と発現するchimeric mRNAの特徴を検討した。Mbcr 遺伝子領域の制限酵素地図に基づき、Mbcr遺伝子領域を5'側よりzone 1から5 までの5つのzoneに分割し²¹(Fig.1)、32症例を分類した。2症例についてはMbcr遺伝子領域全体のcomplete deletion と推定され除外した(後述)。zone 1に該当する症例はなかった。zone 2は1症例、zone 3は16症例、zone 4は10症例、zone 5は3症例が該当した。さらにzoneと発現するchimeric Mbcr/abl mRNAの特徴を検討した。zone 2の1症例はb2-aが検出された。zone 3の16症例では6症例ではb2-aが検出され、5症例がb3-aが検出され、5症例はb2-aとb3-aが同時に発現されていた。zone 4の10症例では6症例でb3-aが検出され、4症例はb2-aとb3-aの同時発現が認められた。zone 4ではb2-aのみが発現している症例は認められなかった。zone 5の3症例のうち1症例(pt.no.30)はb3-a、2症例(pt.no.10,11)はb2-aとb3-aの同時発現をみた(Table 3)。b4-aの検出された症例はなかった。b3-aのみを発現している1症例(Pt.no.30)はDNA level ではMbcr exon 4 より3'領域に切断点があると推定されるが、それにもかかわらずb4-aの発現は認めなかった(pt.no.10及び11については切断点とMbcr exon 4 の位置関係について詳細な解析ができなかった。)。b4-aの検出には2種類の解析を行い、b4-aが検出されないことを確認した。

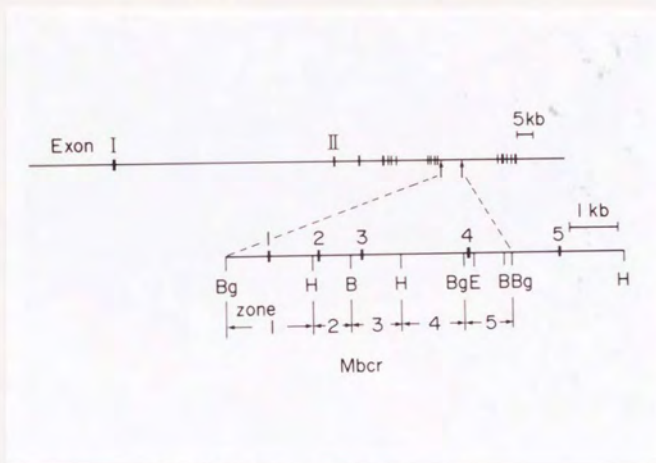


Figure 1. MbcR領域の制限酵素地図に基づき分割したzone
Bg;Bgl II,H;Hind I,B;BamH I,E;EcoR I

Table 3. CML 症例の遺伝子解析
Mbc r領域の切断点とbcr/abl mRNAの発現の関係

zone	b2-a	b3-a	b2-a/b3-a
1	0	0	0
2	1	0	0
3	6	5	5
4	0	6	4
5	0	1	2
G	0	2	0
total	7	14	11

chimeric bcr/abl mRNA のjunctionが
 b2-a;Mbc r exon 2/c-abl exon 2
 b3-a;Mbc r exon 3/c-abl exon 2
 b2-a/b3-a;両者の同時発現
 zone;Fig.1参照
 G;Mbc r領域がgerm line 型、
 deletionと推定される

2種類のchimeric bcr/abl mRNA の同時発現

b2-aとb3-aの同時発現が明らかになったが、さらにb1-aと、b2-aまたはb3-aが同時発現している可能性がないかを検討したが(Table 2)、b1-aは検出されなかった(Fig.2B)。

一方、b2-aとb3-aが同時に発現されたのは32症例のうち11症例であった(34%)。11検体のうち3検体はb2-aのsignalが優位で、8検体はb3-aのsignalが優位であり、b2-aとb3-aの同時発現した検体においても多様性があることが判明した(Table 2)。

Mbcr 遺伝子領域全体のcomplete deletionと考えられる症例

Ph⁺陽性慢性骨髄性白血病の32症例のうち、急性転化期で診断された2症例(Pt.no.31,32)において、サザンブロット法で3'Mbcr Fragment をprobeとした解析を行い、再構成バンドを認めなかった。さらに詳細な検討を行うために 'large bcr probe'²⁰と5'Mbcr Fragment^{18, 19}を使用して解析を行ったが、この2種類のprobeによる解析でも再構成バンドを認めないことを確認した(Fig.3)。RT-PCR法では、この2検体ではchimeric mBCR exon 1/c-abl exon 2 mRNA(B-a)を認めず、chimeric Mbcr exon 3/c-abl exon 2 mRNA(b3-a)が検出された。

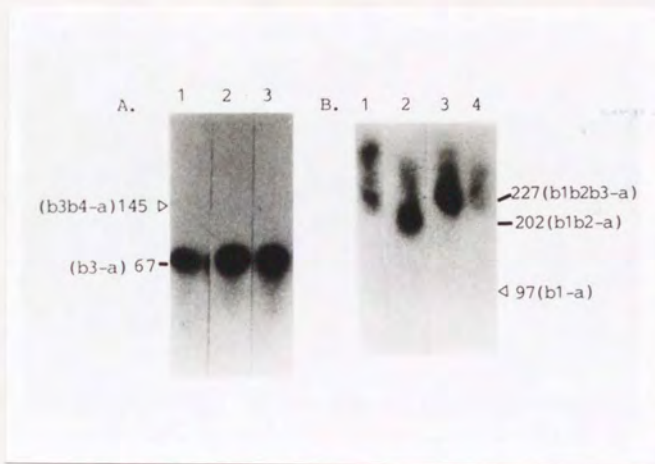


Figure.2.A. zone 5の3症例のb4-aの解析

b3,a2⁻をprimerとしてRT-PCR法を行い、a2⁺をprobeに使用した。
67 bpのb3-aは検出されたが、
145 bp(Δ)のb3-b4-aは検出されなかった。

lane 1; 症例10, lane 2; 症例11, lane 3; 症例30

B. b1-aの同時発現の解析

b1,a2⁻をprimerとしてRT-PCR法を行い、a2⁺をprobeに使用した。
202 bpのb1-b2-a または、227 bpのb1-b2-b3-aは検出されたが、
97 bp(Δ)のb1-aは検出されなかった。

lane 1-4; 症例19,15,20,21

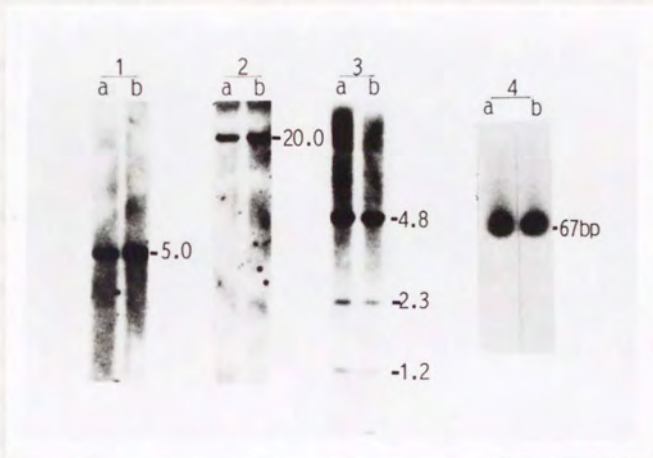


Figure.3. 症例31と32のサザンブロット法とRT-PCR法による解析

1-3; サザンブロット法

1; BanH I 処理後に5'MbcF Fragment をprobe として使用

2; EcoR I 処理後に5'MbcF Fragment をprobe として使用

3; Bgl II 処理後に 'large bcr probe' をprobe として使用

4; b3, a2 を primerとしてRT-PCR法

a; 症例31, b; 症例32

d. 考察

Ph¹ 染色体陽性慢性骨髄性白血病(CML) 32症例について、Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction(RT-PCR)法をもちいてchimeric bcr-abl mRNAの遺伝子解析を行った。全症例でchimeric Mbc^r/abl mRNAの発現が認められ、CMLの遺伝子解析にRT-PCR法は有用であると考えられた。

さらにCMLは発現しているchimeric Mbc^r/abl mRNAによりMbc^r exon 2/c-abl exon 2(b2-a)のみ(7症例: 21.9%)、Mbc^r exon 3/c-abl exon 3(b3-a)のみ(14症例: 43.7%)、b2-aとb3-aの同時発現(b2-a/b3-a)(11症例: 34.4%)の3群に分類された。この結果やそれぞれの頻度は従来の欧米での報告とほぼ一致している²²⁻²⁴。

またサザンブロット法によるDNA分析により個々の検体のMbc^r領域内の切断点の詳細な位置を検討した。Mbc^r領域を制限酵素地図に基づき5つのzoneに分割し(Fig.1)²¹、それぞれの症例の切断点を分類した。30症例について切断点の同定が可能であった。5'側よりzone 1, 2, 3, 4, 5としたところ、zone 1には該当症例はなかった。zone 2は1症例、zone 3は16症例、zone 4は10症例、zone 5は3症例が該当した。Mbc^r遺伝子領域の制限酵素地図とexonとの関係より、mRNAが発現するまで段階でexonのdeletion(alternative splicing)がなければ、zone 2に切断点があればchimeric Mbc^r exon 1/c-abl exon 2 mRNA(b1-a)またはb2-aが発現し、zone 3ではb2-aまたはb3-a、zone 4ではb3-aが、zone 5ではb3-aまたはchimeric Mbc^r exon 4/c-abl exon 2(b4-a)が発現することが推定される(Fig.1)。

zone 2の1症例はb2-aが検出されb1-aの発現は認めなかった。この症例では切断点がzone 2でもexon 2の3'側にあると推測された。zone 3に切断点のある16症例のうち6症例はb2-aのみ検出され、zone 3のexon 3の5'側に切断点がある推定された。残りの10症例ではb2-aを同時発現している症例も含めて、b3-aの発現が確認され、exon 3の3'側に切断点をもつと推定された。zone 4の10症例では全例にb2-aの同時発現の症例も含めてb3-aの発現があり、推定と一致した結果であった。

zone 5の3症例はb3-bのみ、またはb2-aとb3-aの同時発現を認め、b4-aの検出はされなかった。b4-aの検出はprimerとprobeの組合せを変えて2種類の反応を

行い、検出されないことを確認した(Fig.2a)。この3症例ではzone 5内でexon 4の5'側に切断点があると通常は考えられるが、b3-aのみを発現している1症例(Pt.no.30)においてはサザンプロット法によるDNA解析の結果ではMbcx exon 4の3'側に切断点があると推測され、Mbcx exon 4のsplicingが考えられ、まれな症例と推測された。

さらにこれらのMbcx領域の切断点の位置と発現されるchimeric Mbcx/abl mRNAの種類の詳細な分析により、DNAの切断点在同一zoneと推定される症例でも発現されるchimeric mRNAが異なることがあることが明らかとなった。

alternative splicingによりb2-aとb3-aが同時発現する現象があることは以前より知られているが²²⁻²⁴、その分子機構については解明されていない。今回は32症例で11症例にb2-aとb3-aの同時発現を認めた。

さらに新たな検索方法としてMbcx exon 1(b1)とexon 4(b4)のoligonucleotideを5'primerとして合成し、b1-aやb4-aの同時発現がないかを解析した。

b1-aの検討では個々の症例で、b2またはb3を5'primerにした解析結果に一致して、b1-b2-a またはb1-b2-b3-aがpositive controlとして検出されたが、b1-aは検出されなかつた。

Mbcx遺伝子領域の切断点がzone 5にある3症例では、同時発現を含めて少なくともb3-aが発現していた。b3またはb4を5'primerとする2種類の反応を行なつたがb4-aの検出はされず、positive controlとしてb3-aが検出されるのみであつた。

なぜb2-aとb3-aにおいてのみ、alternative splicingにより同時発現がおこりうるのかという疑問は現在までのところ解明されておらず、さらに検討が必要である。

2症例(Pt.no.31,32)はMbcx遺伝子領域全体のcomplete deletionがあると推測された。3'Mbcx Fragment や5'Mbcx Fragment さらに'large bcr probe'をprobeとして数種類の制限酵素を用いてサザンプロット法によるDNA解析を行つたが、2検体ともに再構成バンドを認めなかつた。通常はこれらの症例では22番染色体の切断点はMbcx遺伝子領域外、その殆どはmBCR遺伝子領域にあると推定され、B-aの発現が予想される。しかしRT-PCR法による解析ではB-aではなくb3-aが検出された。この一見矛盾する遺伝子解析結果はこの2検体では白血病細胞の大部分ではMbcx遺伝子領域全体がcomplete deletionされ少数のsubcloneにb3-a

が発現されており、検出感度の高いRT-PCR法では検出される。けれどもこのb3-a陽性subcloneはサザンブロット法の検出感度以下(1-5%)であるため再構成が検出されないと推測した。Mbc_r遺伝子領域の切断点の3'側のdeletionは時にみられる現象であり、また切断点の5'側のdeletionもまれではあるが報告があるが¹⁹、Mbc_r遺伝子領域全体のcomplete deletionの報告は殆どなく、まれな現象であると考えられる。これらの症例のbcr/abl遺伝子についてはさらに詳細な検討が必要であろう。

e.まとめ

32症例のPh¹染色体陽慢性骨髄性白血病についてReverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction(RT-PCR)法を用いてchimeric bcr/abl mRNAの遺伝子解析を行った。その結果は全症例にchimeric Mbc_r/abl mRNAが同定され、分子遺伝学的マーカーとして診断に有用であると考えられた。

さらにCMLはchimeric Mbc_r/abl mRNAの種類では3群に分類されて分子遺伝学的多様性があること、また2種類のchimeric bcr/abl mRNAの同時発現の現象が判明した。

次にサザンブロット法によるDNA解析でMbc_r領域内の詳細な切断点の検討を行い、切断点と発現するchimeric mRNAの特徴を検討し、Mbc_r exon 4のsplicingと推測される1症例とMbc_r遺伝子領域全体のcomplete deletionと考えられる2症例が判明した。

今後、RT-PCR法によるchimeric bcr/abl mRNA遺伝子解析がCMLの臨床診断に役立つことが期待され、分子遺伝学的多様性と臨床病態と関連について検討が必要と考えられる。

この章の研究は次の施設より提供された臨床検体により行った。

金沢大学 輸血部、広島大学 原爆放射能医学研究所 内科、三重大学 小児科、東京大学 小児科、東大分院 小児科、国立がんセンター 小児科、国立小児病院 血液科、茨城県立こども病院、神奈川県立こども医療センター 血液科、同 腫瘍科、埼玉県立小児医療センター 血液・腫瘍科、太田綜合病院 小児科、駒沢病院 内科

第 II 章

RT-PCR法による同種骨髄移植後の慢性骨髄性白血病の遺伝子解析

a. 研究の目的、背景

慢性骨髄性白血病(CML)は通常の化学療法では長期生存が期待できず、同種骨髄移植(BMT)の適応となる。しかし、骨髄移植後も約20%の臨床的再発がみられ²⁵、骨髄移植後の臨床的再発の早期診断が重要となる。

CMLでは約95%にPh¹染色体を認め、染色体転座によって発現するchimeric bcr/abl mRNAが白血病細胞の分子生物学的マーカーとして利用できることが第 I 章で明きらかになった。

従来、CML患者のBMT後残存する白血病細胞の検出のため、染色体分析やサザンプロット法によるMbc^r遺伝子解析が用いられてきたが、RT-PCR法は高感度に特異性をもってchimeric bcr/abl mRNAを検出できる特性があり、BMT後の極少数の残存白血病細胞の検出に有用であると考えられる。そこでRT-PCR法によりBMT後のCML症例においてchimeric bcr/abl mRNAの遺伝子解析を行い、残存するbcr/abl mRNA陽性白血病細胞の検索を行なった。

b. 研究対象及び研究方法

研究対象

9施設より提供された同種骨髄移植(BMT)後の慢性骨髄性白血病(CML)の35症例の末梢血または骨髄血を用いて解析を行った。全症例でBMT前はPh¹染色体が確認された。5症例は付加的染色体異常を伴っていた。8症例ではBMT前の検体についても解析を行なった。2症例はBMT後の臨床的再発時の検体であった。残りの33症例は観察期間中、臨床的寛解を継続している(Table 4)。一部の患者についてはBMT後に経過を追って解析を行った。対象としたBMT後の検体は骨髄血34検体、末梢血35検体であった。

Table 4

pt. no.	年齢	性	BMT時 病期	前処置	BMT前染色体 付加的異常	BMT前	BMT後	GVHD	
						PCR	bcr	急性	慢性
1	27	F	cp	A	-	+	G	-	-
2	22	M	cp	A	-	+	G	-	-
3	12	M	cp	A	-	+	G	-	-
4	5	M	cp	A	-	+	G	-	-
5	14	M	2cp	A	-	+	G	-	-
6	26	F	cp	A	-	+	G	+	+
7	28	M	cp	A	-	nt	nt	+	-
8	?	F	ap	A	-	nt	G	-	-
9	22	M	cp	A	-	nt	R	-	-
10	13	M	cp	A	-	nt	G	-	-
11	?	M	ap	B	double Ph ¹	nt	G	+	+
12	39	M	cp	B	-	nt	G	-	+
13	20	F	bp	B	i(17q)	nt	G	-	-
14	30	F	cp	B	-	nt	G	+	-
15	26	M	cp	B	-	nt	G	-	-
16	11	M	cp	B	-	nt	G	+	-
17	23	F	cp	B	-	nt	G	+	-
18	25	F	cp	B	-	nt	G	+	-
19	26	F	cp	B	-	nt	G	+	-
20	?	M	cp	B	-	nt	G	+	+
21	18	M	bp	B	-	nt	G	-	-
22	31	M	cp	C	-	nt	G	-	-
23	36	M	cp	C	inv(1p+q ⁺)	nt	G	-	-
24	26	M	bp [*]	C	-	nt	G	-	-
25	5	F	cp	D	-	nt	G	+	-
26	3	F	cp	D	-	nt	G	-	-
27	16	F	cp	E	-	nt	G	-	-
28	32	F	cp	E	-	nt	G	-	-
29	27	M	cp	E	-	nt	G	-	-
30	12	M	cp	F	-	nt	G	-	-
31	15	F	bp	F	-	nt	G	-	-
32	8	F	2cp [*]	F	double Ph ¹	+	G	-	-
33	10	M	cp	F	-	nt	G	-	-
34	14	M	2cp	A	-	nt	R	-	-
35	12	F	bp	F	3q ⁻	+	R	+	-

病期；cp;慢性期、2cp;第二慢性期、ap;移行期、bp;急性転化期、

*;pt.no.24;2nd BMT,pt.no.32;bp at onset

前処置；A:Ara-C+CPM+TBI,B;CPM+TBI,C;BUS+CPM,D:VP16+Ara-C+TBI,E;MCNU+CPM+TBI
F;その他

Ara-C;Cytarabine,CPM;Cyclophosphamide,BUS;Busulfan,VP-16;Etoposide
MCNU;Ranimustine,TBI;Total Body Irradiation

bcr;G;germ line,R;Rearrange

Pt.no.34,35;clinical relapse after BMT(positive control)

また7名の健常人の末梢血をcontrolに用いた。

RT-PCR法の検出感度の解析にはPh¹染色体陽性慢性骨髄性白血病患者より樹立された細胞株であるKOPM28²⁶を用いた。

研究方法

‘B.全章に共通した研究方法’に記した方法の準じて、RT-PCR法とサザンプロット法を行い、遺伝子解析を行った。

5'primerとしてはMbcx exon 2(b2)及びexon 3(b3)を、3'primerとしてc-abl exon 2(a2⁻)またはexon 3(a3⁻)を用いて、RT-PCR法による解析を行った。

サザンプロット法はとして3'Mbcx Fragmentを使用し、必要に応じて5'Mbcx Fragment及び‘large bcr probe’を用いて解析を行った。

c.結果

RT-PCR法の感度と特異性

最初にRT-PCR法によるbcr/abl遺伝子解析の感度を検討した。まずPh¹染色体陽性慢性骨髄性白血病患者より樹立された細胞株のKOPM28²⁶についてRT-PCR法による遺伝子解析を行い、chimeric Mbcx exon 3/c-abl exon 2 mRNA(b3-a)の検出を確認した。そこでKOPM28をPh¹染色体陰性細胞株のJM²⁷で段階希釈を行いRT-PCR法の感度を検討した。この結果、30 cycleのRT-PCR法では10⁴、60 cycleでは10⁵に1個のKOPM28の細胞が含まれていればb3-aが検出された。CMLのBMT後に臨床的完全寛解の患者の検体では30 cycleの反応で検出されたものはなく、検出されたのは全て60 cycleの反応であった。これは従来²⁸の報告と一致した結果となった²⁸。これらにより残存しているとしてもbcr/abl陽性白血病細胞は10⁴に1個未満と推測した。

8症例のBMT前の検体及びBMT後の臨床的再発時の2症例の5検体全てで30

cycle の反応で bcr/abl mRNA の検出がされた。

7名の健康人の末梢血では60 cycleの反応でも bcr/abl mRNA の検出はなく、特異性を確認した。

正常細胞でも c-abl mRNA は発現していることを利用して、bcr/abl mRNA の検出されない検体については c-abl exon 2 plus strand(a2') を 5' primer として c-abl exon 2 または c-abl exon 2/exon 3 が検出されるのを確認した。

患者検体の解析

35症例の同種骨髄移植(BMT)後の Ph⁺陽性慢性骨髄性白血病(CML)患者より得られた69検体についてRT-PCR法による chimeric bcr/abl mRNA の遺伝子解析を行った(Table 6)。BMT 後、臨床的完全寛解を継続している33症例でも22症例に bcr/abl 遺伝子が検出された。骨髄血と末梢血では症例の重複があるため、骨髄血では14症例中13症例(92%)、末梢血では25症例中13症例(52%)で bcr/abl mRNA が検出されたことになる(Table 6)。このうち骨髄血での5症例(pt.no.3,4,5,15,31)、末梢血の2症例(pt.no.9,15)では一過性の検出であった(Table 7)。検体数では骨髄血29検体中21検体(72.4%)末梢血では35検体中17検体(48.5%)であった。bcr/abl 遺伝子の検出された検体のBMT後の時期としては骨髄血では16日から1520日、末梢血では39日から5年に及んだ。サザンブロット法によるDNA解析では1症例(pt.no.9)の骨髄血でのみ Mbcrr 遺伝子の再構成が検出された(pt.no.9はRT-PCR法による遺伝子解析は末梢血のみでこの時の骨髄血の chimeric bcr/abl mRNA の解析はできなかった。)

BMT 後臨床的再発時の2症例(pt.no.34,35)の5検体では全検体で chimeric bcr/abl mRNA の検出と Mbcrr 遺伝子の再構成をみた。BMT 前の検体も解析できた1症例(pt.no.35)ではサザンブロット法においてBMT前と同一再構成バンドであることが確認された。

BMT 前検体が解析できた8症例では全例で bcr/abl mRNA の発現が確認された。

Table 5. RT-PCR法によるBMT 後のCML のbcr/abl 遺伝子解析結果

●; bcr/abl 陽性検体 ○; bcr/abl 陰性検体
 添数字は2検体以上の場合の検体数

A 骨髓血

Pt. no.	months after BMT										
	- 1	- 2	3- 4	5- 6	7- 9	10-12	13-16	17-24	25-		
22		○									
6	●	●	●								
7											●
10											●
14								●			
16										●	
25					●						
26						●					
28						●					
32	●	●	●			●					
3					○			●		○	
4										○	
5	●	●	●	○							
15			●	○ ²							
31								●		○ ²	
34							●	●		● ²	
35		●									

B 末梢血

Pt. no.	months after BMT										
	- 1	- 2	3- 4	5- 6	7- 9	10-12	13-16	17-24	25-		
1				○							
2						○					
18							○				
19										○	
20										○	
21								○			
22		○									
23			○								
25	○										
27	○										
28						○					
29			○								
7										●	
8											●
11											●
12											● ²
13										●	
14						●					
17										●	
24		●									
26		●									
30		●									
33						●					
9										○	
15	○ ⁴	● ²	●	○							

Table 6. 同種骨髄移植後のCML 患者検体のRT-PCR法によるbcr/abl 遺伝子解析

BMT 後の期間(M)	- 1	- 2	3- 4	5- 6	7- 9	10-12	13-16	17-25	25-	total
寛解持続症例										
骨髄血 (14例)	3/3	4/5	4/4	1/5	2/2	1/1	3/3	2/6	1/1	21/29
末梢血 (25例)	0/6	5/6	1/3	1/3	2/3	1/2	0/3	3/3	4/6	17/35
再発症例										
骨髄血 (2例)	1/1					1/1	1/1	2/2		5/5

bcr/abl 陽性検体数/ 総検体数

臨床経過とbcr/abl mRNA陽性細胞残存の関係

BMT 後臨床的完全寛解を継続している33症例について臨床経過とbcr/abl 陽性細胞残存との関係について検討した。

①前処置

10種類の異なる前処置が施行された。2症例以上施行された前処置について解析したが有為な差はなかった。

②骨髄移植時の病期

骨髄移植時、第2慢性期では2症例(Pt.no.5,32)中全例、移行期では2症例(pt.no.8, 11) 中全例、急性転化期では4症例(pt.no.13,21,24,31) 中3症例でchimeric bcr/abl mRNA が検出された。これらの結果は臨床的には第1慢性期でのBMT に比し、再発率が高い²⁹ことと合致するかもしれない。しかし検出が一過性であった症例(pt.no.5,31)もある。なお、BMT 後に臨床的再発した2症例は第2慢性期(pt.no.34)と急性転化期(pt.no.35)でのBMT 症例であった。

③GVHD(graft versus host disease)

急性及び慢性GVHDは11症例にみられ、8症例にchimeric bcr/abl mRNA が検出された。臨床的にはGVHDがみられた症例が再発が少ない²⁹とされ矛盾する結果になった。

骨髄移植後の経過時期と bcr/abl 陽性細胞の残存の検討

BMT 後の経過時期で、骨髄血では1 ヶ月以内 (3 検体) と3-4 ヶ月 (4 検体)、7-9 ヶ月 (2 検体)、10-12 ヶ月 (1 検体) 及び13-16 ヶ月 (3 検体)、末梢血では17-24 ヶ月 (3 検体) で全ての検体でchimeric bcr/abl mRNA が検出された。

逆に、骨髄血ではBMT 後5-6 ヶ月 (5 検体中1 検体)、17-24 ヶ月 (6 検体中2 検体)、末梢血では1 ヶ月以内 (6 検中0 検体)、3-4,5-6 ヶ月 (それぞれ3 検体中1 検体)、13-16 ヶ月 (3 検体中0 検体) の時期での検出率が低かった。また、これには一過性に検出された後、消失した患者検体も多く含まれている (Table 7)。

chimeric bcr/abl mRNA の一過性の検出

6 症例 (骨髄血5 症例、末梢血2 症例) ではchimeric bcr/abl mRNAが一過性に検出された (Table 7)。一過性に検出された時期と検出されなくなった時期は、BMT 後16-97 日に検出され、122-153 日に検出されなくなった2 症例と、284-391 日に検出され、502-598 日に検出されなくなった4 症例を認めた。BMT 後に検出されなくなる2 時期があるように思われた。

Table 7. bcr/abl mRNAが一過性に検出された症例

a. 骨髓血

Pt. no.	days after BMT
3	152 ○ ● ○ 390 ● ○ 502 ○
4	307 ● ○ 545 ○
5	16 ● 67 ● 97 ● 153 ○
15	67 ● 122 ○ 149 ○
31	391 ● ○ ○ 521 ○ ○ 706 ○

b. 末梢血

Pt. no.	days after BMT
9	284 ● ○ 593 ○
15	12 ○ 18 ○ 25 ○ 31 ○ 39 ● 67 ● 122 ○ 149 ○

● ; bcr/abl 陽性検体、○ ; bcr/abl 陰性検体
数字はBMT 後の期間 (日)

d. 考察

RT-PCR法によるchimeric Mbc_r/c-abl mRNAの遺伝子解析を同種骨髄移植(BMT)後の慢性骨髄性白血病(CML)症例で行った。

BMT後に臨床的再発した2症例の再発時の5検体では30 cycleのPCR法でbc_r/abl mRNAが検出され、再発時の白血病細胞が患者由来であることが推定された。このうち1症例においてはBMT前も検索でき、サザンプロット法によりMbc_r領域遺伝子解析においてBMT前と後で同一再構成バンドが確認され、再発時の白血病細胞はBMT前と同一cloneと考えられる。2症例ともBMT後の臨床的再発前の検体での検索はできず、臨床的再発前より30cycleまたは60 cycleのPCR反応でbc_r/abl mRNAが検出されるか否かは検討できなかった。

臨床的完全寛解を継続している33症例においても66.7%、即ち骨髄血で92%、末梢血で52%の頻度でbc_r/abl mRNAの検出ができた(molecular relapse)。しかし、観察期間中の臨床的には完全寛解を継続した。6症例の骨髄血または末梢血では一過性検出であった。従来のBMT後のCMLについてのRT-PCR法によるbc_r/abl 遺伝子解析の報告は症例数が少なく末梢血での検索が多いが³⁰⁻³⁴、ほぼ同じ結果であると考えられた。また以前のBMT後のPh¹染色体陽性CMLの染色体分析の報告でも、臨床的完全寛解の骨髄血でもPh¹染色体が検出されることがあり(cytogenetic relapse)、臨床的再発の初期であることもあるが、一過性出現のみで消失し臨床的には寛解を持続する症例もあり³⁰、臨床的完全寛解を持続した症例でもbc_r/abl 遺伝子の検出された結果と矛盾しないと考えられる。

この結果はBMTの前処置でbc_r/abl 陽性細胞が完全に根絶されるのではなく、また一度はRT-PCR法の感度以下に減少しても再びRT-PCR法の感度以上に増加することもあることを意味している。しかしその後も臨床的完全寛解を持続し、またbc_r/abl 陽性細胞がRT-PCR法の感度以下に減少することもあるのは、BMT後の移植細胞が白血病細胞を免疫的に攻撃する移植片対白血病細胞効果(Graft versus leukemia effect、GVL効果)などのためとも考えられる。

骨髄血または末梢血でbc_r/abl 遺伝子が検出されたBMT後の期間は16日より5年に及んだ。今回の研究では観察期間中に臨床的再発をきたした症例はなかったが、CMLではBMT後の3年を越えた遅延性の臨床的再発の報告もあり²⁵、mole-

cular relapse から臨床的再発をきたすことがあるか否か、臨床的再発するとすればどのような症例であるかの解明には、さらに長期間の観察が必要であると考えられる。

検出率が高いのは骨髄血ではBMT 後 1-4ヶ月と7-16ヶ月、末梢血では17-24ヶ月であり、逆に低いのは骨髄血では5-6ヶ月と17-24ヶ月、末梢血では0-6ヶ月と13-16ヶ月であった。BMT 後のCML 症例のRT-PCR法によるbcr/abl 遺伝子解析は骨髄血での解析の報告は殆どなく、末梢血の解析³¹⁻³⁴でも総症例数自体が少なく、BMT 後の時期とbcr/abl 陽性細胞の残存の十分されていないので、これは新たな所見と思われた。

臨床的には完全寛解を継続している6症例でchimeric bcr/abl mRNA の一過性の検出をみた。骨髄移植後16-97日に検出され122-153日に消失(2症例)、284-391日に検出され502-593日に消失(4症例)と2群に分かれる傾向があった。症例数は少ないが、一過性検出した症例において、chimeric bcr/abl mRNA の検出される骨髄移植後の時期に一定の傾向があることは新しい知見であると思われた。

bcr/abl 陽性細胞の残存と前処置の種類や臨床経過との関連を検討したが有意の結果は得られなかった。症例数やBMT 後の同一時期での検体数を増やしての検討が望まれる。

骨髄移植後の臨床的完全寛解を継続している患者検体ではchimeric bcr/abl mRNAは30 cycleでは検出されず、60 cycleのRT-PCR反応で検出された。これは以前の報告と一致した²⁸。細胞株における感度の検索よりbcr/abl 陽性細胞は残存しても 10^4 に1個未満と推測した。

しかしPCR法は高感度に特定した遺伝子を増幅できるだけに、微妙な反応条件に影響されやすく、質的判定はできるが、量的判定はわずかしいとされる。同じ反応条件でもtube毎の微妙な条件の違いなどによる増幅率の差異も指摘されている。従来のCML の骨髄移植後の末梢血におけるRT-PCR法によるbcr/abl 遺伝子解析でも報告毎に検出にかなりばらつきがある^{27, 29-33}。新たな試みとして定量された合成RNA を目的とする検体と同一tubeに加えて(internal standard) RT-PCR法を行い検体中のmRNAを測定する方法の報告がある³⁵。今後残存細胞と臨床経過などの関連を厳密に検討する場合や経過を追った遺伝子解析や他の研究室との共

同研究の場合はこのような試みも必要かもしれない。その上で症例数と経過観察時期を増やしての厳密な遺伝子解析を臨床的再発との関連で検索することが期待される。

e.まとめ

骨髄移植(BMT)後の35症例のPh¹陽性CML患者検体についてReverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction(RT-PCR)法によるchimeric Mbc_r/abl mRNAについて遺伝子解析を行った。

その結果、BMT後に臨床的再発時の2症例では全検体でbcr/abl mRNAが検出され、再発時の白血病細胞が患者由来であることが推定された。

骨髄移植後に臨床的には完全寛解を継続している33症例で67%即ち骨髄血で92%、末梢血で52%の症例でbcr/abl mRNAが検出され(molecular relapse)、BMTの前処置により白血病細胞が完全に根絶されるのではないことが判明した。このような症例での臨床的寛解の持続は移植片対白血病細胞効果(GVL効果)などが推測された。

bcr/abl mRNAの検出と前処置の種類や骨髄移植時の病期、GVHDなど臨床症状との関連も検討したが有意な結果は得られず、さらに症例を増やして長期間の経過観察が必要である。

また、bcr/abl mRNAの検出と骨髄移植後の時期との関連も検索し、一過性に検出された6症例で検出されなくなる2時期があることが判明した。

このようなmolecular relapseと臨床的再発との関係を明らかにし、BMT後の臨床的再発の早期診断に結び付くかの検討が必要である。

この章の研究は次の施設より提供された臨床検体により行った。

金沢大学 輸血部、近畿大学 第三内科、女子医科大学 血液内科、東海大学
小児科、東北大学 第二内科、兵庫医科大学 第二内科、国立がんセンター 小
児科、国立病院 九州がんセンター 小児科、大阪府立成人病センター 第五内
科

第三章

late appearing Ph¹ chromosome を認めたMDS 症例に関する分子遺伝学的解析

a. 研究の目的、背景

初診時にPh¹ 染色体を認めず、その後に出現するPh¹ 染色体、即ちlate appearing Ph¹ chromosomeは慢性骨髄性白血病(CML) や他の造血器腫瘍で報告があるが³⁶⁻⁴⁰、chimeric bcr/abl mRNA やbcr/abl fused protein まで検索されている症例は殆どなく、またPh¹ 染色体陰性時期の検体での極少数のPh¹ 染色体陽性subcloneの存在またはmasked Ph¹ chromosome の可能性についても十分検索されていない。

また、late appearing Ph¹ chromosome を認めた症例において、染色体転座のよって変異した癌遺伝子から新たな蛋白が発現するか、発現するとすればCML やPh¹ 染色体陽性急性リンパ性白血病などと同じP210^{bcr/abl} 蛋白あるいはP185^{bcr/abl} 蛋白であるかの解明はされていない。

これらを検索することで、癌遺伝子の変異による蛋白の新たな出現と、白血病化や白血病化後の病態との関連を明らかにすることが期待される。

今回、late appearing Ph¹ chromosome を認めたMyelodysplastic syndrome(MDS)の1症例についてReverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction(RT-PCR)法によるchimeric bcr/abl mRNA の解析やimmune complex kinase assay によるbcr/abl fused protein の分析をおこなった。特にRT-PCR法は特定のmRNA遺伝子領域を高感度に検出でき、Ph¹ 染色体陰性時期の検体で極少数のPh¹ 染色体陽性subcloneが存在するか否かについて検討に最適であると考えられた。

b. 研究方法、研究対象

研究対象

埼玉県立小児医療センター 血液・腫瘍科で診断された男児で、初診時は3歳。1985年9月にpancytopenia で発症した。末梢血では白血球数は $4.7 \times 10^9/l$ であり、

2%にmyeloblastを認めた。骨髓血では有核細胞数の増加を認め、18%にAuer小体をもつmyeloperoxidase 反応陽性のmyeloblastと少数の小巨核芽球を認めた。FAB 分類のMyelodysplastic syndrome(MDS) のrefractory anemia with excess blasts in transformation(RAEBt)⁴¹ と診断され、Acralubicin とBehenoyl-Ara-C を併用した化学療法で寛解になるも、1987年8月に再びpancytopeniaをきたした。この時の骨髓は有核細胞数は減少し、33%にAuer小体のあるmyeloperoxidase 反応陽性のmyeloblastを認めた。MDS の白血病化と診断され、Cytarabine, Etoposide, Mitoxantrone を併用した再寛解療法が施行されるが臨床所見の改善を見なかった。その後、1988年5月頃より末梢血の白血球数が著しく増加し、6月1日には末梢血の白血球数は $66.9 \times 10^9/l$ で芽球を89%に認め、骨髓血では光顕的にはAuer小体のないmyeloperoxidase 反応弱陽性の芽球を92%認めた。この芽球は電顕的peroxidase反応は陽性であり、電顕的超微細構造は急性巨核芽球性白血病の所見を呈した。Cytarabine, Etoposide, Vincristine, Prednisolone, Cyclophosphamide, Pirarubicin, Ranimustineなどを併用した種々の化学療法を試みるがいずれも無効で11月19日死亡した。

この症例について、白血病化と診断された1987年8月と、白血病化してから10ヶ月後で病態がaggressiveとなった1988年6月の骨髓血について遺伝子解析を行った。また、初診時治療前の1985年9月、白血病化した1987年8月と白血病化してから10ヶ月後の1988年6月の骨髓血を用いて染色体分析を行った。

研究方法

①染色体分析

白血病細胞は無刺激で24時間培養した。染色体分析は通常のギムザ染色とG-band及びQ-band法で行った。核型はISCN(1985)に順じて記載した⁴²。ClonalityはFirst International Workshop on Chromosome in Leukemiaのクライテリア(1977)により決定した⁴³。即ち各検体については少なくとも20-30細胞の分裂像を分析し、2細胞以上に同一の異常を認めた場合にclonalな異常とした。

②PCR 法及びサザンブロット法による遺伝子解析

‘B.全章に共通した研究方法’に記した方法に準じて行った。

RT-PCR法による遺伝子解析では、5種類 (b1-a, b2-a, b3-a, b4-a, B-a) の chimeric bcr/abl mRNAの発現を各検体について検討した。

サザンブロット法による遺伝子解析では3種類のprobe (3'Mbcr Fragment, 5'Mbcr Fragment, 'large bcr probe') と4種類 (Bgl II、EcoRI、HindIII、BanHI) の制限酵素をもちいてMbcr遺伝子領域の切断点の検討を行った。

③Immune complex kinase assay によるP210^{bcr/abl} の検出

bovine thyroglobulinと合成peptide(Cys-Ser-Asp-Glu-Val-Glu-Lys-Glu-Leu-Gly-Lys)で免疫されたNew Zealand white rabbits より抗abl 抗体を得た^{44, 45}。immune complex kinase assay は、 1×10^7 /mlに調整した細胞をLysis buffer (0.15 M NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 1 % Triton X-100, 1 % sodium deoxycholate, 0.1 % sodium dodecyl sulfate, 5 mM EDTA, 2 mM Phenylmethylsulfonyl fluoride, 500 U/ml aprotinin, 0.1 mM ZnCl₂, 0.1 mM Na₂VO₄) で溶解し、4℃で20分間、10,000 gで10分間の遠心で上清を得た。上清はpreimmune rabbit 血清で10分前処置を行った後、protein A Sepharose で4℃で45分間、反応させた。免疫沈降反応は1 mlの検体に3 μlの抗abl 抗体を加えて4℃で2時間行った。protein A Sepharose で回収したimmune complexは50 mM Tris-HCl (pH 7.4) bufferで洗浄した。In vitro immune complex kinase assayは10 μCi γ -³²P ATP (>3000 Ci/mmol)と20 mM MnCl₂ と20 mM Hepes buffer pH 7.0 で4℃で30分反応させ、sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel電気泳動(SDS-PAGE)で分析した⁴⁶。

c. 結果

染色体分析

診断時の1985年9月と白血病化した時期の1987年8月の骨髓血では30個の分裂

像の分析を行い、全てが正常男性核型であった。白血病化してから10ヶ月後の1988年6月の骨髓血及び末梢血では検索した20分裂像の全てに46,XY,t(9;22)(q34;q11)の標準型Ph¹染色体を認めた。

サザンプロット法によるDNA解析

白血病化した後のPh¹染色体陰性時期(1987年8月)とPh¹染色体陽性時期(1988年6月)の骨髓血についてMbc^r遺伝子領域の解析を行った。3種類のprobe(3'Mbc^r Fragment, 5'Mbc^r Fragment, 'large bcr probe')をもちいて解析を行ったが、染色体陰性時期の検体では再構成バンドを認めず、Ph¹染色体陽性検体でのみ再構成バンドを認めた(Fig. 4A)。再構成バンドは3'Mbc^r Fragmentをprobeとして使用するとBgl^{II}とEcoR^I処理で認め、Hind^{III}とBamH^I処理で認めなかった。Mbc^r領域の制限酵素地図より切断点はMbc^r exon 1の5'側のBgl^{II} siteからexon 3の5'側のBamH^I siteの間にあると考えられた(Fig. 4B)。

また免疫グロブリン重鎖joining領域(IgJ_H)遺伝子、T細胞受容体β鎖、γ鎖、δ鎖遺伝子(TCRβ, TCRγ, TCRδ)について解析を行ったが、2検体ともに全ての遺伝子についてgerm lineであった。

PCR法による遺伝子解析

RT-PCR法によりchimeric bcr/abl mRNAの検出を行った。Ph¹染色体陽性時期の検体においてchimeric Mbc^r exon 2/c-abl exon 2 mRNA(b2-a)が検出された。発現しているbcr/abl mRNAの種類はサザンプロット法で解析されたDNAの切断点とも矛盾しない結果であった。両検体では5種類のchimeric bcr/abl mRNA(b1-a, b2-a, b3-a, b4-a)について検討したが、Ph¹染色体陰性時期の検体ではどれも検出されなかった。

一方c-abl mRNAは正常細胞でも発現しており、c-abl exon2/exon 3 mRNA(a2/a3)をRT-PCR法で解析すればpositive controlとなる。RT-PCR法により両検体でa2/a3の解析を行い、両検体ともに検出されることを確認した(Fig. 4A)。

また、N-ras codon 12, 13, 61の点突然変異についてPCR法で遺伝子解析を行ったが両検体ともに点突然変異を認めなかった。

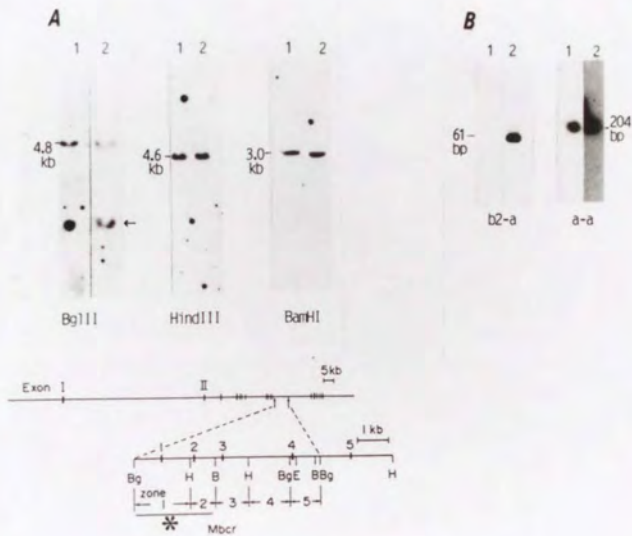


Figure 4. 白血病化した後のPh¹ 染色体陰性検体と陽性検体の遺伝子解析

A; 上図; サザンプロット法; 3'Mbar Fragment 使用
矢印はRearrange bandを示す

下図; Mbar遺伝子領域の制限酵素地図
*; 推測される切断点の位置

B; RT-PCR法; b2-aとa2⁺/a3⁻ (positive control)

lane 1; Ph¹ 染色体陰性時期の検体(1987年 8月)

lane 2; Ph¹ 染色体陽性時期の検体(1988年 6月)

immune complex kinase assay によるP210^{bcr/abl} 蛋白の検出

Ph¹ 染色体陽性時期の検体について、immuno complex kinase assay のよる解析を行い、P210^{bcr/abl} 蛋白が発現していることが確認された。Ph¹ 染色体陽性細胞株であるK562はP210^{bcr/abl} 蛋白が高レベルに発現しており⁴⁵、positive control として用いた(Fig.5)。

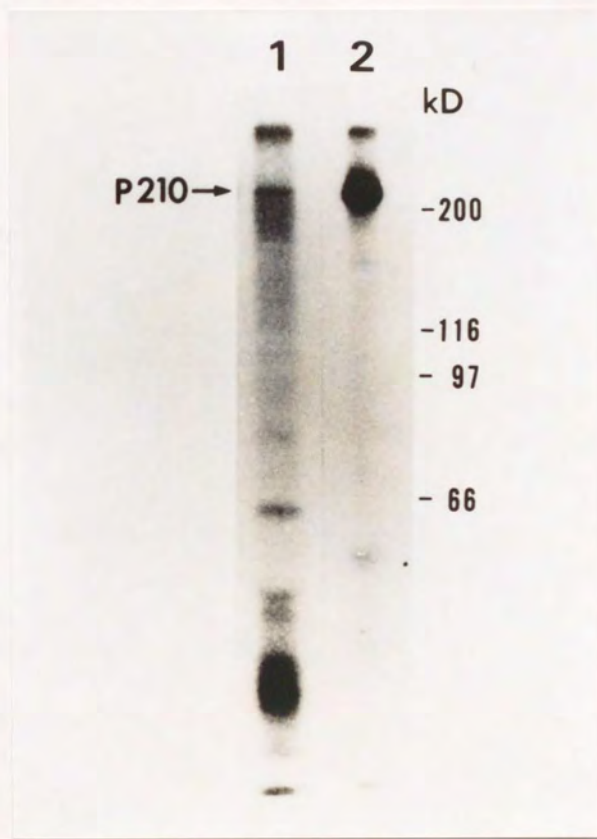


Figure 5. in vitro immuno complex kinase assay

lane 1; 1988年6月の患者検体 (5×10^7)
 lane 2; K562 (0.5×10^7)

Table 8. late appearing Ph¹ chromosome を認めたMDS の1症例

	染色体	Mbc _r 再構成	bcr/abl mRNA	P210 ^{bcr/abl}
87/8	46,XY	G/G	b2-a;- ,b3-a;-	nt
88/8	t(9;22)	G/R	b2-a;+ ,b3-a;-	+

G;germ line,R;rearreange

d. 考察

Myelodysplastic syndrome(MDS) の1症例で初診時と白血病化と診断された時の染色体分析では正常核型で、白血病化してから10ヶ月後に標準型のPh¹染色体46,XY,t(9;22)(q34;q11)を認めた。

サザンブロット法によるDNA分析ではPh¹染色体陽性時期の検体でMbcx exon 1の5'側のBgl II siteよりexon 3の5'側のBamH I siteに切断点があると推定された。RT-PCR法ではchimeric Mbcx exon 2/c-abl exon 2 mRNA(b2-a)が検出され、Mbcx領域の切断点から予測されるchimeric mRNAと矛盾しなかった。

慢性骨髄性白血病(CML)の一部の症例などで、Ph¹染色体は陰性でありながら、DNAではbcr遺伝子領域に切断点を認め、chimeric bcr/abl mRNAが発現するmasked Ph¹ chromosomeを時に認めるが、本症例のPh¹陰性時期の検体でのmasked Ph¹ chromosomeの可能性はこれらの解析で否定された。

さらにimmune complex kinase assayの結果よりP210^{bcr/abl}蛋白質に翻訳されていることが確認された。この症例のlate appearing Ph¹ chromosomeから翻訳される癌遺伝子の蛋白質はCMLに認めるものと同じであることが証明された。MDSに時に認めるPh¹染色体について蛋白レベルでの解析の報告は殆どなく、さらにCMLやMDSやその他の造血器腫瘍でlate appearing Ph¹ chromosomeの報告はあるが³⁶⁻⁴⁰、chimeric bcr/abl mRNAやbcr/abl fused proteinについて解析されている症例は殆どない。MDSでもCMLと同じP210^{bcr/abl}蛋白質が発現することがあること、さらにlate appearing Ph¹ chromosomeによりP210^{bcr/abl}蛋白質が発現していることが証明された最初の症例と考えられる。P210^{bcr/abl}蛋白質がCMLや一部のPh¹陽性ALL以外でも発現することや、白血病の経過中の新たな出現もありうる事が判明した。この症例は白血病の経過中に癌遺伝子に変異による新たな蛋白質の発現が証明されたまれな症例と考えられる。

一般にP210^{bcr/abl}蛋白質はP185^{bcr/abl}蛋白質に比較してkinase活性やtumorigenic potentialは低いとされる⁹。しかし、この症例の臨床経過を考えるとP210^{bcr/abl}蛋白質の出現が白血病化をさらにaggressiveにしたと推定される。この臨床経過はlate appearing Ph¹ chromosomeを認めたrefractory anemiaの白血病化⁴⁰の症例やsmoldering leukemia³⁹の症例についての報告とも一致してい

る。

本症例では、白血病化後のPh¹染色体陰性時期の検体で極少数のPh¹染色体陽性subcloneが既に存在していたのか、secondary changeとしてPh¹染色体が出現したのかの2つの仮説が考えられる。これらの仮説の検討には高感度に特定領域のmRNAを検出できるRT-PCR法によるchimeric bcr/abl mRNAの遺伝子解析が有用であった。この症例ではlate appearing Ph¹ chromosomeと白血病化は直接関連がなく、白血病化後のclonal evolutionや化学療法後のDNA damageなどにより、Ph¹染色体が出現し、白血病をaggressiveな病態へ導いたと考えられる。

さらに、Ph¹染色体陽性時期の芽球はAuer小体陰性、光顕的peroxidase陰性、電顕的peroxidase陽性の巨核芽球の所見を呈した。このPh¹染色体陽性芽球がPh¹染色体陰性時期の芽球と同一cloneであるか検討を行った。分子生物学的マーカーとして、免疫グロブリン重鎖遺伝子(IgH)、T細胞受容体(TCR) β , γ , δ 鎖遺伝子の再構成とN-ras遺伝子のcodon 12,13,61の変異を検索した。しかし両検体ともにサザンプロット法の解析結果ではIgH, TCR β , TCR γ , TCR δ 遺伝子は全てgerm lineであり、また、PCR法での解析ではN-ras codon 12,13,61の点突然変異は検出できなかった。このようにPh¹染色体陽性巨核芽球とPh¹染色体陰性白血球細胞との関連については十分検索できなかったが、診断時より既に小巨核芽球が存在したことを考えて、同一cloneでのPh¹染色体陽性化と推測した。

Ph¹染色体陽性白血病については、多能性造血幹細胞のclonalな異常増殖がまずおこり、次にこの異常cloneにPh¹染色体の新たに出現するというmultistep pathogenesisの仮説がある^{48, 49}。この症例はPh¹染色体のmultistep pathogenesisの仮説を支持するまれな症例と考えられる。

e.まとめ

Myelodysplastic syndrome(MDS)の1症例において初診時と白血病化した時期では染色体は正常核型であったが、白血病化した10ヶ月後にPh¹染色体が確認された。Ph¹染色体陽性時期の検体ではRT-PCR法でchimeric Mbcr/abl mRNA、immune complex kinase assayでP210^{bcr/abl}蛋白が検出され、この結果、P210^{bcr/abl}蛋白が慢性骨髄性白血球病や一部のPh¹染色体陽性急性リンパ性白血球病のみではなくMDSでも認めることがあること、白血病の経過中に新たな出現が

あることが判明した。この症例は白血病の経過中に癌遺伝子の変異により新たな蛋白が出現することが証明されたまれな症例と考えられる。

また高感度に検出ができるRT-PCR法でもPh¹染色体陰性時期の検体ではbcr/abl mRNAの検出はされず、この時期での少数のPh¹染色体陽性clone存在は否定的であり、Ph¹染色体は白血病化の後に新たに出現したと推定された。これはPh¹染色体のmultistep pathogenesisの仮説を支持しているように思えた。

E. 全体のまとめ

Ph¹ 陽性白血病細胞についてRT-PCR法を用いてbcr/abl 遺伝子の解析を行った。

第I章では慢性骨髄性白血病(CML)の32症例について遺伝子解析を行った。

全症例でchimeric bcr/abl mRNA が検出され分子生物学的マーカーとしてCMLの診断に有用であること、2種類のchimeric bcr/abl mRNA の同時に発現する症例があること、及びCMLは発現するmRNAでは3群に分類されることが判明した。これらは従来のもとの報告とほぼ一致した結果となった。

さらにMbcx exon 4 のsplicingと推定される症例とMbcx遺伝子領域全体のcomplete deletionと推定される2症例が明らかになり、これらの希な症例については詳細に検討した報告は殆どないと思われる。

このような症例も存在するほどCMLは分子遺伝学的に多様な疾患であると考えられた。

第II章では高感度に特定遺伝子の検出ができるというRT-PCR法の特性を利用して同種骨髄移植(BMT)後のCML症例について、残存白血病細胞の検討を行った。臨床的寛解を継続している33症例においても22症例で骨髄血または末梢血でbcr/abl 陽性細胞が検出された。しかし、この研究の観察期間中にこれらの22症例で臨床的再発は認めず、また6症例では一過性の検出であった。これら結果より、BMTの前処置で白血病細胞が完全に根絶するのではないが、移植片対白血病細胞効果(GVL効果)などにより臨床的寛解が継続し、白血病細胞が検出されなくなることもであると推測された。従来のもとの報告は、末梢血における解析が多くまた症例数も少ないが、ほぼ一致した結果と思われる。

さらに一過性に検出された症例よりBMT後の経過時期に白血病細胞が消失しやすい時期があることが推定され、新しい所見であると思われる。

今後、これらの所見と臨床経過との関連の検討が望まれる。

第III章ではlate appearing Ph¹ chromosomeのみられたMDS(RAEBt)の一症例について経過を追った詳細な遺伝子解析を行った。

RT-PCR法によりPh¹染色体陰性時期の検体でのmasked Ph¹ chromosomeの可能性や極少数のPh¹染色体陽性細胞の存在を否定し、Ph¹染色体のmultistep pathogenesisが示唆された。

Immune complex kinase assay により Ph^1 染色体陽性時期の検体で慢性骨髄性白血病に発現するのと同じ $P210^{bcr/abl}$ 蛋白が確認された。 $P210^{bcr/abl}$ 蛋白は MDS でも発現することがあることや、白血病の経過中に新たな出現することが判明した。癌遺伝子の変異により経過中に新たな蛋白が発現することもあることが証明されたまれな症例であると考えられる。

late appearing Ph^1 chromosome や Ph^1 染色体を認めた MDS については報告は多いが、詳細な遺伝子解析や蛋白分析がされた症例は殆どなく本症例はこれらが出来たまれな症例である。

これらのまれな症例についてさらに詳細な分子遺伝学的検討が必要であろう。それにより Ph^1 染色体陽性白血病細胞における chimeric bcr/abl 遺伝子の白血病化や白血病化後の役割について解明されることが期待される。

F. 文献

1. Groffen J, Stephenson JR, Heisterkamp N, de Klein A, Bartram CR, Grosveld G: Philadelphia chromosomal breakpoints are clustered within a limited region, bcr, on chromosome 22. *Cell* 36:93, 1984
2. Shtivelman E, Lifshitz B, Gale RP, Roe BA, Canaani E: Alternative splicing of RNAs transcribed from the human abl gene and from the bcr-abl fused gene. *Cell* 47: 277, 1986
3. Bernards A, Rubin CM, Westbrook CA, Paskind M, Baltimore D: The first intron in the human c-abl gene is at least 200 kilobases long and is a target for translocations in chronic myelogenous leukemia. *Mol. Cell. Biology* 7:3231, 1987
4. Heisterkamp N, Stan K, Groffen J: Structural organization of the bcr gene and its role in the Ph1 translocation. *Nature* 315:758, 1985
5. Shtivelman E, Lifshitz B, Gale RP, Canaani E: Fused transcript of abl and bcr genes in chronic myelogenous leukemia. *Nature* 315:550, 1985
6. Clark SS, McLaughlin J, Timmons M, Pendergast AM, Ben-Neriah Y, Dow LW, Crist W, Rovera G, Smith SD, Witte ON: Expression of a distinctive BCR-ABL oncogene in Ph1-positive acute lymphocytic leukemia (ALL). *Science* 239:775, 1988
7. Hermans A, Heisterkamp N, von Lindern M, van Baal S, Meijer D, van der Plas D, Weidenmann LM, Groffen J, Bootsma D, and Grosveld G: Unique fusion of bcr and c-abl genes in Philadelphia chromosome positive acute lymphoblastic leukemia. *Cell* 51:33, 1987

8. Fainstein E, Marcelle C, Rosner A, Canaani E, Gale RP, Drezzen O, Smith SD, and Croce CM: A new fused transcript in Philadelphia chromosome positive acute lymphocytic leukemia. *Nature* 330:386, 1987
9. Lugo TG, Pengergast AM, Muller AJ, Witte ON: Tyrosine kinase activity and transformation potency of bcr-abl oncogene products. *Science* 247:1079, 1990
10. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA: Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239:487, 1988
11. Kawasaki ES, Clark SS, Coyne MY, Smith SD, Champlin R, Witte ON, McCormick FP: Diagnosis of chronic myeloid and acute lymphocytic leukemias by detection of leukemia-specific mRNA sequences amplified in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5698, 1988
12. Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J: *Molecular cloning a laboratory manual*; Cold Spring Harbor Laboratory. 1982
13. Ben-Neriah Y, Bernards A, Paskind M, Daley GQ, Baltimore D: Alternative 5' exons in c-abl mRNA. *Cell* 44:577, 1986
14. Grosveld G, Verwoerd T, Van Agthoven T, De Klein A, Ranachandern KL, Heisterkamp N, Groffen J: The chronic myelocytic cell line K562 contains a breakpoint in bcr and produces a chimeric bcr/c-abl transcript. *Mol Cell Biology* 6:607, 1986
15. Kwok S, Higuchi R: Avoiding false positive with PCR. *Nature* 339:237, 1989
16. Southern EM: Specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 98:503, 1975

17. Furley AJW, Chan LC, Mizutani S, Ford AM, Weilbaecher K, Pergram SM, Greaves MF; Lineage specificity of rearrangement and expression of genes encoding the T cell receptor-T3 complex and immunoglobulin heavy chain in leukemia. *leukemia* 1:644, 1987
18. Bartram CR, Kleihauer E, de Klein A, Grosveld G, Teyssier JR, Heisterkamp N, Groffen J: c-abl and bcr are rearranged in a Ph1-negative CML patient. *EMBO* 4:683, 1985
19. Bartram CR, Janssen JWG, Becher R, De Klein A, Grosveld G: Persistence of chronic myelocytic leukemia despite deletion of rearranged bcr/c-abl sequences in blast crisis. *J Exp Med* 164:1389, 1986
20. Chan L, Chen P, Powles R, Saragas E, Wiedeman LM, Groffen J, Greaves MF: Molecular lesion in chronic granulocytic leukemia is highly conserved despite ethnic and geographical variation. *Leukemia* 1:486, 1987
21. Schaefer-Rego K, Dudek H, Popenoe D, Arlin Z, Mears JG, Bank A, Leibowitz D: CML patients in blast crisis have breakpoints localized to a specific region of the BCR. *Blood* 70:448, 1987
22. Lee M, LeMaistre A, Kantarjian HM, Talpaz M, Freireich EJ, Trujillo JM, Stass SA: Detection of two alternative bcr/abl mRNA junction and minimal residual disease in Philadelphia chromosome positive chronic myelogenous leukemia by polymerase chain reaction. *Blood* 73:2165, 1989
23. Shtivelman E, Gale RP, Dreazen O, Berrebi A, Zaizov R, Kubonishi I, Miyoshi I, Canaani E: bcr-abl RNA in patients with chronic myelogenous leukemia. *Blood* 69: 971, 1987
24. Lange W, Snyder DS, Castro R, Rossi JJ, Blume KG: Detection by enzymatic amplification of bcr-abl mRNA in peripheral blood and bone marrow cells of patients with chronic myelogenous leukemia. *Blood* 73:1735, 1989

25. Goldmen JM, Gale RP, Horowitz MM, Biggs JC, Champlin RE, Gluckman E, Hoffmann J, Jacobsen SJ, Marmont AM, Mcglave PB, Messner HA, Rimm AA, Rozman C, Speck B, Tura S, Weiner RS, Bortin MM: Bone Marrow Transplantation for Chronic Myelogenous Leukemia in Chronic Phase: Increased Risk for Relapse Associated with T-Cell Depletion, *Ann Inter Med*, 108:806, 1988
26. Mori T, Nakazawa S, Nishino K, Sugita K, Takane K, Mori M, Sagawa K, Hahashi Y, Sakurai M: Ph¹-positive CML-derived myeloid-monocytoid precursor cell line producing substance(s) that stimulates normal CFU-C, *Leuk Res*, 11:241, 1987
27. Schneider U, Schwenk HU, Bornkann G: Characterization of EBV-genome negative "null" and "T" cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma, *Int. J. Cancer*, 19:621, 1977
28. Martiat P, Maisin D, Philippe M, Ferrant A, Michaux JL, Cassiman JJ, Van den Berghe H: Detection of residual BCR/ABL transcripts in chronic myeloid leukemia patients in complete remission using the polymerase chain reaction and nested primers, *Br J Haematol* 75:355, 1990
29. Thomas ED, Clift RA, Fefer A, Appelbaum FR, Beatty P, Bensinger WI, Buckner CD, Cheever M, Deeg HJ, Doney K, Flournoy N, Greenberg P, Hansen JA, Martin P, McGuffin R, Ramberg R, Sanders JE, Singer J, Stewart P, Storb R, Sullivan K, Weiden PL, Witherspoon R: Marrow transplantation for the treatment of chronic myelogenous leukemia, *Ann Inter Med*, 104:155 1986

30. Arthur CK, Apperley JF, Guo AP, Rassool F, Gao LM, Goldman JM: Cytogenetic events after bone marrow transplantation for chronic myeloid leukemia in chronic phase. *Blood* 71:1179, 1988
31. Morgan GJ, Hughes T, Janssen JWG, Gow J, Guo AP, Goldman JM, Wiedemann LM, Bartram C R: Polymerase chain reaction for detection residual leukemia, *The Lancet* i, 928, 1989
32. Lange W, Snyder DS, Castro R, Rossi JJ, Blume KG: Detection by enzymatic amplification of bcr-abl mRNA in peripheral blood and bone marrow cells of patients with chronic myelogenous leukemia, *Blood*, 73:1735, 1989
33. Roth MS, Antin JH, Bingham EL, Ginsburg D: Detection of Philadelphia chromosome-positive cells by the polymerase chain reaction following bone marrow transplant for chronic myelogenous leukemia, *Blood*. 74:882, 1989
34. Sawyers CL, Timson L, Kawasaki ES, Clark SS, Witte ON, Champlin R: Molecular relapse in chronic myelogenous leukemia patients after bone marrow transplantation detected by polymerase chain reaction, *Proc Natl Acad Sci USA* 87:563, 1990
35. Wang AM, Doyle ML, Mark DF: Quantitation of mRNA by the polymerase chain reaction, *Proc Natl Acad Sci USA* 86, 9717, 1989

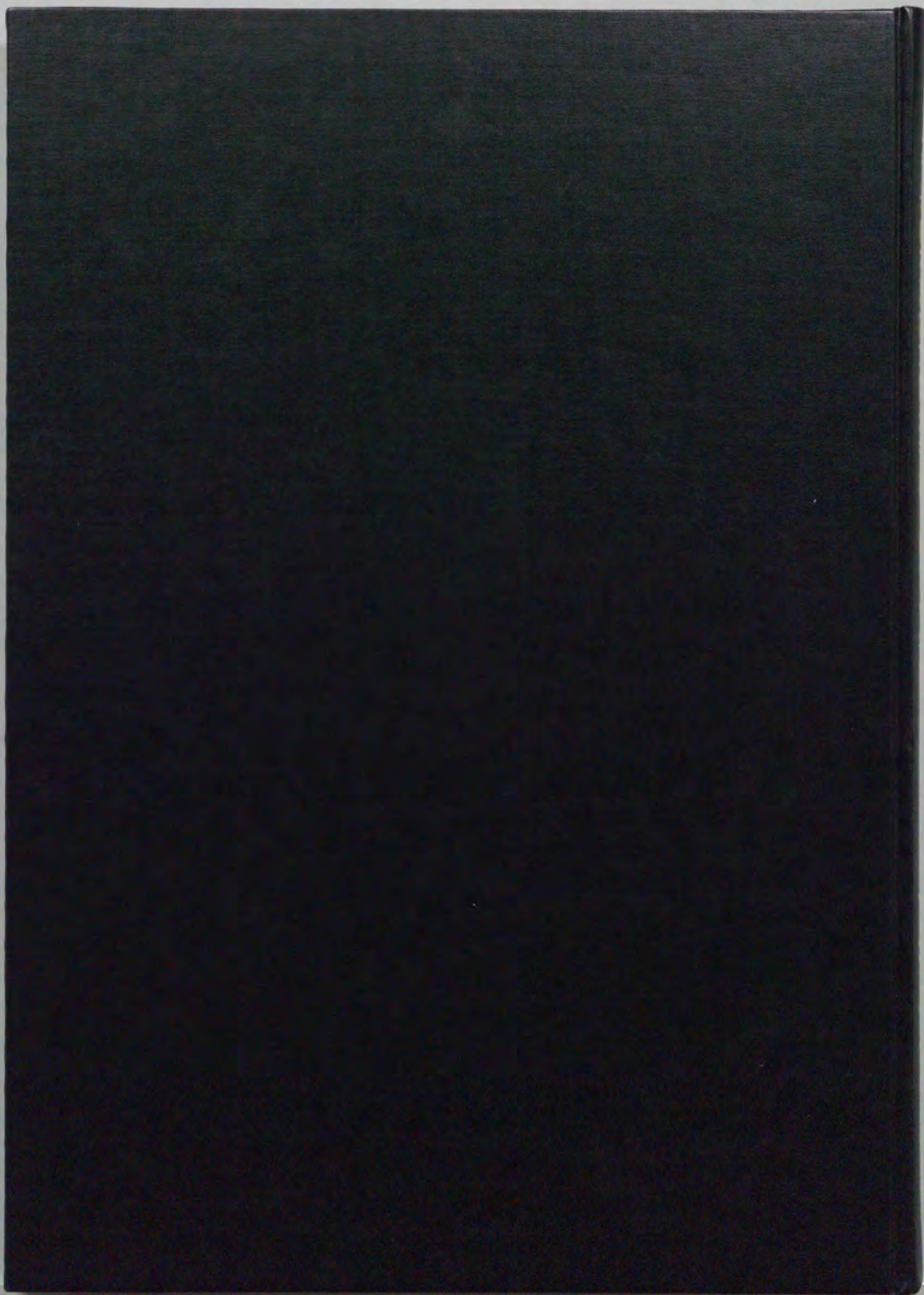
36. Lisker R, Casas L, Mutchinick O, Perez-Chavez F, Labardini J: Late appearing Philadelphia chromosome in two patients with chronic myelogenous leukemia. *Blood* 56:812, 1980
37. Miller BA, Reid MR, Neil M, Lipton JM, Sallan SE, Nathan DG, Tantravahi R: T-cell acute lymphoblastic leukemia with late developing Philadelphia chromosome. *Br J Haematol* 56:139, 1984
38. Shikano T, Kaneko Y, Ishikawa Y, Niikawa N, Tono-oka T, Takeda T, Kikuchi M: Ph1-negative and Ph1-positive abnormal cell lines in a child with lymphoblastic lymphoma. *Br J Haematol* 58:459, 1984
39. Kohn G, Manny N, Eldor A, Cohen M: De novo appearance of the Ph1 chromosome in a previously monosomic bone marrow (45, XX, -6): conversion of a myeloproliferative disorder to acute myelogenous leukemia. *Blood* 45:653, 1975
40. Snadja K, Krulik M, De Gramont A, Brisaid P, Debray J: Acquisition of a Philadelphia chromosome concomitant with transformation of a refractory anemia into an acute leukemia. *Cancer* 55:1477, 1985
41. Bennet JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandarin G, Galton DAG, Granlneck HR, Sultan C: Proposal for classification of the myelodysplastic syndrome. *Br J Haematol* 51:189, 1982
42. Handen DG, Klinger HP, eds. *ISCN(1985): an international system for human cytogenetic nomenclature*. Published in collaboration with *Cytogenet Cell Genet*, Basel: Karger, 1985

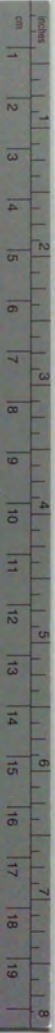
43. First International Workshop on Chromosomes in Leukemia: general report on the First International Workshop on chromosomes in leukemia. *Int J Cancer* 21:307, 1987
44. Hermans A, Gow J, Selleri L, von Lindern M, Hagemeijer A, Wiedemann M, Grosveld G: bcr-abl oncogene activation in Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2:628, 1988
45. Walker LC, Ganesan TS, Dhut S, Gibbons B, Lister A, Rothbard J, Yang BD: Novel chimeric protein expressed in Philadelphia positive acute lymphoblastic leukemia. *Nature* 329:851, 1987
46. Laemmli UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680, 1970
47. Collins SJ, Groudine MT: rearrangement and amplification of c-abl sequences in the human chronic myelogenous leukemia cell line K-562. *Proc Natl Acad Sci USA* 80:4813, 1983
48. Fialkow PJ, Martin PJ, Najfeld V, Penfold GK, Jacobson RJ, Hansen J: Evidence for a multistep pathogenesis of chronic myelogenous leukemia. *Blood* 58:158, 1981
49. Greaves MF: 'target' cell, differentiation and clonal evolution in chronic granulocytic leukaemia: a 'model' for understanding the biology of malignancy, *Chronic Granulocytic Leukemia* (ed. by M.T. Shaw), pp14, Praeger, New York 1982

50. Nakamura K, Miyashita T, Ozaki M, Zhong WK, Iwaya M, Nakazawa S, Okamura J, Takayama J, Ohira M, Kamata N, Tanaka K, Tamura K, Kobayashi N, Mizutani S: Molecular studies of chronic myelogenous leukemia by polymerase chain reaction. *Cancer in press*
51. 中村こずえ 水谷修紀 末永孝生: 慢性骨髄性白血病症例におけるbcr/abl mRNAの解析—同種骨髄移植症例について— *日本臨床血液学会雑誌* 投稿中
52. Nakamura K, Inaba T, Nishimura J, Morgan GJ, Hayashi Y, Hanada R, Yamamoto K, Wada H, Kawaguchi H, Miyashita T, Wiedemnn LM, Mizutanu, S: Molecular analysis of BCR/ABL products in a case of myelodysplastic syndrome with late appearing Philadelphia chromosome. *Br J Heamatol in press*

研究を御指導いただいた国立小児病院 小児医療研究センター ウイルス研究室長 水谷修紀先生、共同研究者のウイルス研究室 宮下俊之先生、尾崎美和子先生、仲惟昆先生、亀田総合病院 内科 末永孝生先生、埼玉県立小児医療センター 血液・腫瘍科 林泰秀先生、稲葉俊哉先生、九州大学 第三内科 西村純二先生、その他貴重な臨床検体、細胞株を提供いただいた諸先生方に謝意を評します。

本論文の内容は文献50-52 に発表予定である。





Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM, Kodak



Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM, Kodak

A 1 2 3 4 5 6 **M** 8 9 10 11 12 13 14 15 **B** 17 18 19

