

小児T細胞性腫瘍における

TAL1遺伝子の解析

菊地 陽

①

小児 T 細胞性腫瘍における

T A L 1 遺伝子の解析

菊 地 陽

目 次

	ページ
a 研究の目的及び背景	1
b 研究材料と方法	2
1. 実験に使用した検体	
2. 形態学的・組織化学的検討	
3. 細胞表面膜マーカーの検討	
4. 染色体分析	
5. サザン法による解析	
6. PCR法による解析	
7. 塩基配列の決定	
8. 統計学的解析	
c 結 果	6
1. TAL1遺伝子の解析	
2. TAL1遺伝子の再構成をもつ症例の臨床像	
3. 代表的2症例における微小残存腫瘍の解析	
d 考 察	9
e ま と め	14
f 引用文献	16
g 謝 辞	25
h 図・表	26

a 研究の目的および背景

ヒト急性リンパ性白血病 (Acute Lymphoblastic Leukemia : ALL) においては、これまでに多数の染色体異常が知られており [1,2]、病型に特異的な染色体異常において、判明している。片方の遺伝子をてがかりとして、転座の相手の新しい遺伝子産物を同定することが可能である。T細胞型急性リンパ性白血病 (T cell Acute Lymphoblastic Leukemia : T-ALL) においては、T細胞受容体 α/δ 遺伝子の座位する 14q11 を含む転座が知られており [3-6]、この転座は小児の ALL 全体の 2%、小児の T-ALL の 10% を占めるものである [4,5]。t(1;14)(p32;q11) の相互転座は、小児の T-ALL の約 5% と、比較的稀ではあるが、明らかに T-ALL に特異的な染色体異常である [7]。TAL1 遺伝子 [8] (SCL [9,10] または TCL5 遺伝子 [11]) は、この t(1;14)(p32;q11) をもつ T-ALL から単離された 1p32 に座位する遺伝子で、その cDNA の解析から、helix-loop-helix 構造をもつ DNA 転写因子であることが明らかにされ、またその遺伝子産物は E2A [12]、MyoD [13] などの産物と同様に DNA 結合能をもつと考えられている。この遺伝子は、正常の造血組織においても、赤芽球系・巨核球系及び肥満細胞系の細胞に発現されており、その分化・増殖に深くかかわっていると推測されている [14,15]。また、この

遺伝子は、t(1;14) のない T-A L L の約25%において部位特異的欠失 (Site-Specific Recombination: tal^d再構成) を示すことが知られている (図1) [16]。この欠失は、約90kbに及び、T A L 1 遺伝子を上流の S I L 遺伝子の近傍に位置させ [17, 18]、この欠失をもつ T-A L L の有用な遺伝子マーカーとなっている [19]。しかし、同じ T 細胞性腫瘍である T 細胞型非ホジキンリンパ腫 (T cell Non-Hodgkin's Lymphoma : T-N H L) におけるこの部位特異的欠失の頻度はまだ明らかではない。また、小児 A L L の予後は近年目覚ましく改善しているが、T-A L L はハイリスクとされ、さらなる予後の改善が望まれる病型であり、この欠失をもつ T-A L L 症例が共通の臨床的特徴をもち、臨床上意味のあるものであるかどうかは興味のあるところである。さらにこの欠失を利用した微小残存腫瘍の検出の症例報告はまだみられていない。これらの点に関し、小児及び成人の T 細胞性腫瘍の臨床検体を用いて検討した。

b 研究材料と方法

1. 実験に使用した検体

対象は小児及び成人の T 細胞性腫瘍 99 例で、内訳は小児 T-A L L 44 例、小児 T-N H L 20 例、成人 T-A L L 10 例、成人 T-N H L 3 例、成人 C D 7 陽

クローナル抗体を用いた間接蛍光抗体法により行ない[23]、CD 7・CD 5・CD 2のうち2抗原以上陽性のものをT細胞型と判定した。抗原が検体の25%以上に発現しているものを陽性とした。T-A L LはさらにReinherzら[24]及びFoonとTodd[25]により提唱されたリンパ球分化のモデルにより分類した。

4. 染色体分析

染色体分析は小児T-A L L 35例において通常のGバンド分染法により行ない、原則として20細胞を検索した[26]。核型の記載はISCN(1993)によった[27]。

5. サザン法による解析

腫瘍細胞からProteinase K-phenol-chloroform法により、高分子DNAを抽出した。これらのDNAを制限酵素Bam HI, Eco RI, Hind IIIを用いて消化した後、³²PでラベルしたT A L 1遺伝子のプローブ(B2EE-2.0)を用いてハイブリダイゼーションを行ない、サザン解析を行なった[28]。

6. P C R法による解析

腫瘍細胞より得られた高分子DNAを鋳型としてtal^o再構成をはさむsense primer (5'-AGGGGAGCTAGTGGGAGAAATTAAG-3') 及びantisense primer (5'-ACTGTCACAATGCCACCGCATGCACA-3')を用いて(図3)、P C R法[29]により行なった。P C R法の条件は、鋳型DNAを500ng用い、それぞれ25pmolのsense 及

性ALL 5例、成人T細胞性白血病10例、成人のその他のT細胞性腫瘍7例である。小児例は1才から15才とし、中央値は11才であった。白血病細胞は、初診時に骨髓または末梢血から採取し、凍結保存したものを用いた。小児T-ALLの治療には、東京小児がん研究グループ(TCCSG) L84-11、L89-12プロトコル[20]及び小児癌白血病研究グループL90-10プロトコル[5]を使用した。T-NHLの組織は化学療法前の生検・手術の際に摘出し、凍結したものを用いた。T-ALL及びT-NHLの診断はFAB分類[21]・リンパ腫病理組織分類[22]により行ない、骨髓に25%以上の芽球を含む症例をT-ALLとした。

2. 形態学的・組織化学的検討

白血病症例では全例で組織化学的検討を行ない、骨髓塗沫標本を、Wright-Giemsa染色、periodic acid-Schiff(PAS)染色、ベルオキシダーゼ染色、 α -naphthyl butyrateエステラーゼ染色を用いて検討した。急性白血病症例の形態学的検討にはFAB分類を用いた。

3. 細胞表面膜マーカーの検討

細胞表面膜マーカーの検討は、白血病・リンパ腫の全症例で行なった。白血病症例では骨髓及び末梢血より得られた白血病細胞をFicoll-Hypaqueを用いて遠心分離し、リンパ腫症例では生検・手術で得られた新鮮材料を細断し、モノ

び antisense primer を加えて、94°C (denaturation) 2 分、55°C (primer annealing) 2 分、72°C (extension) 2 分を 1 サイクルとして、30 サイクル増幅を行ない、得られた産物を 3 % アガロースゲルで電気泳動後、ethidium bromide で染色した。また、一部の症例 (2 症例) で、 ^{32}P でラベルした B2EE-2.0 を用いてサザンハイブリダイゼーションを行なった。また、PCR 法の感度を検討するために、段階的に $10^0 \sim 10^{-6}$ まで希釈した鋳型 DNA を用いて同時に PCR 法により増幅し、ethidium bromide 染色・サザンハイブリダイゼーションを行なってそれぞれの感度を検討した。

7. 塩基配列の決定

tal^a再構成のみられた 2 症例に対し、欠失前後の塩基配列の決定を Dideoxy chain termination 法により行なった [30]。

8. 統計学的解析

tal^a再構成の頻度に関する検討は、 χ^2 検定により検定した。生存曲線は、Kaplan-Meier 法で計算し [31]、欠失の有無による生存曲線の比較に際しては、generalized Wilcoxon 法を用いた [32]。

c 結 果

1. T A L 1 遺伝子の解析

小児及び成人のT細胞性腫瘍99例より抽出したDNAを用いて、制限酵素に *Bam* HI, *Eco* RI, *Hind* IIIを用いたサザン法及びPCR法によりtal^d再構成の有無を検索した。図2に*Bam* HIを用いたサザン法の結果を示す。その結果、小児T-A L L 10例において図に示すような再構成バンドが観察された。対照的に、小児T-N H L 20例、成人のT細胞性腫瘍35例では再構成バンドもしくはPCR産物は全く観察されなかった。これらの結果を表1に示す。今回検索した症例のうち、染色体分析が可能だった症例で1番染色体の異常を示したものはなく、観察された再構成バンドの大きさは全例で約4.5kbであり、T A L 1 遺伝子の部位特異的欠失の際にみられるものと同一のものであった。再構成のみられた症例から得られたPCR産物のうち、10症例中9症例分を図3に示した。再構成のみられた10例全例で予想された約240bpのバンドがみられ、サザン法でみられたこれらのバンドがすべてtal^d再構成によるものであることが確認された。図4に2症例（後に述べる表2の症例1・2）でみられたtal^d再構成をまたぐ塩基配列を示した。

2. T A L 1 遺伝子の再構成をもつ症例の臨床像

tal^d再構成のみられた小児 T - A L L 10 例の臨床像を表 2 に示す。内訳は、男児 8 例・女児 2 例で、年齢は 4 才から 14 才（中央値：11 才）にわたり、F A B 分類では L 1 が 7 例、L 2 が 2 例であった。表面マーカーの検討では CD 1 - CD 2 + CD 4 - CD 7 + CD 10 - が 10 例全例に共通する特徴であった。他の T 細胞関連抗原では CD 3 が 2 例に陽性であり、CD 8 が 4 例で陽性であった。T 細胞の胸腺内分化に関する Reinherz の分類に従うと、10 例中 8 例が stage I に属していた。CD 10・骨髓系抗原・B 細胞系抗原はいずれの症例でも発現していなかった。染色体所見では、分析可能であった 8 例中 5 例が正常核型であり、他の 3 例に del (6)、t(8;21)、t(8;14) の異常がみられた。治療では、10 例中 3 例が同種もしくは自家骨髓移植を受けていた。予後をみると、2 例がそれぞれ生存期間 15 ヶ月・42 ヶ月で死亡しているが、他の 8 例では 5 例の治療終了例を含めて、すべて初回寛解を維持している。予後の追跡が可能であった 40 例における、tal^d再構成の有無による予後の比較を図 5 に示すが、tal^d再構成を有する T - A L L は再構成を有さない症例に比べて、良好な予後を示しており、この差は、generalized Wilcoxon 検定でも有意なものであった ($p < 0.05$)。

3. 代表的 2 症例における微小残存腫瘍の解析

この再構成を利用して、tal^d再構成を有する 2 症例で、P C R 法により行なっ

た残存腫瘍の検出を図6に示す。PCR法の検出感度を検討したところ、

ethidium bromide法・サザン法ともに 10^{-4} レベルであった(図7)。

〔症例1〕13才男児、1989年3月初診。初診時白血球数 $237000/\mu l$ で、TC CSG L84-11 Hexプロトコールの治療で初回寛解を維持していたが、1990年12月骨髄再発した。1991年5月、第2寛解で弟より同種骨髄移植を施行したが、1992年1月、頸部リンパ節腫脹・胸水にて再発。再寛解導入されるも、放射線照射によるmyelopathyの進行により、治療を遂行できず、骨髄再発で死亡した。PCR法による骨髄の残存腫瘍(図6-1)をみると、初発時・再発時には明瞭なバンドがみられ(Lane 1,2)、骨髄移植後にはみられていないが(Lane 3-5)、髄外再発時にはわずかにバンドがみられている(Lane 6)。そして、この後の第3寛解期にもやはりバンドがみられており、この時の寛解深度が浅かったことが推測される(Lane 7-9)。

〔症例2〕11才男児、1990年10月初診。初診時白血球数 $87300/\mu l$ で、TC CSG L89-12 HR プロトコールで寛解導入され、現在まで初回寛解を維持している。PCR法による検討(図6-2)では、腫瘍クローンは初診時に認められるのみで(Lane 1)、寛解期には残存腫瘍は認められない(Lane 2-4)。

d 考 察

この研究で、小児のT-A L L 患児44例中10例(22.7%)においてtal^d再構成がみられた。この頻度は、従来の報告とほぼ一致するものである[16, 18, 33]。さらに、本研究では同じT細胞性腫瘍である小児T-N H L 20例でもtal^d再構成の有無を検索したが、再構成を示した症例は1例もみられなかった。一方、対照として行なった小児の非T細胞型A L L 35例での検討においても、tal^d再構成はみられていない。 χ^2 検定による検定によると、小児T-A L L におけるtal^d再構成の頻度はT-N H L のそれに比べ、有意に高いものであり、これらを総合すると、小児においてはtal^d再構成はT-A L L に特異的な遺伝子変化であると考えられる。また、成人のT細胞性腫瘍35例においてもtal^d再構成は観察されず、この結果も含めて考えると、tal^d再構成はすべての腫瘍の中で小児のT-A L L に特異的な遺伝子変化であるということができるかもしれない。残念ながら、今回の検討は症例数もさほど多くなく、これを結論づけることはできない。しかし、tal^d再構成が小児のT-N H L にみられないということは今まで報告されておらず、新しい知見といえる。tal^d再構成は、免疫グロブリン/T細胞受容体のrecombinase の異常な活性化によって起こると思われるが[16]、この再構成が小児のT-A L L のみにみられ、T-N H L に

はみられない理由は明らかではない。一つの説明として考えられるのは、T-A L L・T-N H Lがそれぞれ胸腺内のT細胞分化の異なった段階から発生し[24, 25]、tal^d再構成が正常なT細胞分化のごく限られた段階でのみみられる現象であるというものである。実際、この研究においてtal^d再構成のみられた症例の多くは、胸腺内のT細胞分化のモデルにおいてstage Iに属するものであり、T-N H Lではstage Iに属する症例の報告は非常に稀である[34]。また、T-A L LとT-N H Lの発生母地の違いのもう一つの説明は、その染色体所見の違いである。例えば、14q11, 7q35, 7p15といったT細胞受容体 α/δ , β , γ が座位する部位の転座はT-A L LにもT-N H Lにも共通に同じ頻度でみられる[5]。しかし、ある種の転座、例えば、t(9;17)などはT-N H Lのみにみられ[5]、T-A L Lにはみられない異常であり、これなどはT-N H LにはT-A L Lにない特有の病型があることの一つの証であると考えられる。正常核型は、胸腺分化のモデルにおいてReinherzの分類のstage I、Foonの分類のstage IIに属するT-A L Lに比較的多くみられる染色体所見であるが[4, 5, 24, 25]、T-N H Lではほとんどみられない[5]。T-A L Lにおける正常核型の頻度は約25%と報告されているが[35]、本研究でみられたtal^d再構成をもつ症例ではT細胞分化のstage Iに属し、正常核型をもつ症例が多かった。tal^d再構成の起こる機序の解析が、T-A L LとT-N H Lの発症機序

のちがいの解析に役立つかもしれない。

Garrolらは、t(1;14)をもつT-A L LではCD4、CD8などとともに他のT細胞抗原を多く発現し、同時に骨髄系抗原も発現していると報告している[7]。本研究でみられたtal^d再構成をもつ症例では、CD2・CD7は全例で発現されていたが、CD1・CD4・CD10は全例で発現がみられず、また骨髄系抗原の発現も一切みられなかった。これらのことから、tal^d再構成をもつT-A L Lとt(1;14)を有するT-A L Lでは同じT A L 1遺伝子の異常をもつ白血病でも表現型が異なり、異なるsubgroupであることが示唆された。CD10抗原は多くのB前駆細胞型A L Lで発現され、T-A L Lにおいても約25%で発現されるとされているが[35,36]、本研究でみられたtal^d再構成をもつ症例で全く発現がみられなかったということは興味ある所見である。

T-A L Lは一般に、白血球数が多く、男の年長児に多くみられ、縦隔腫瘍が多くみられるとされている。本研究でみられたtal^d再構成をもつ症例も縦隔腫瘍の頻度を除いては、これらの特徴を有していると思われた。縦隔腫瘍の頻度は本研究では10例中3例であり、これまで報告されているT-A L Lにおける縦隔腫瘍の頻度と比較して明らかに低い[36]。縦隔腫瘍はT-N H Lでは非常に高い頻度でみられるものであり、tal^d再構成がT-N H Lでみられないことと関連して注目される。tal^d再構成をもつT-A L Lの症例では腫瘍形成性

が少ないのかもしれない。さらに、tal^d再構成をもつ症例10例のうち8例が3ヶ月から59ヶ月の間で初回寛解を維持していることは注目に値する。今回の検討では、tal^d再構成をもつ10例とtal^d再構成をもたないT-A L Lのうち予後追跡可能であった30例との比較では、tal^d再構成をもつ10例のほうが良好な予後を示し、この差は統計学的に有意なものであった。近年の強力な化学療法にもかかわらず、小児T-A L Lの予後は3年生存率で40~50%にとどまっている[35-38]。これらの数字と比較して、tal^d再構成をもつT-A L Lは予後良好であると言える。これは一つにはtal^d再構成をもつ10例中3例で骨髄移植のようなさらに強力な治療を受けていることによるかもしれない。また、化学療法も画一ではなく、3つの異なるプロトコールが用いられている点も考慮する必要がある。しかし、白血病の治療成績が向上しているなか、初診時に判明する遺伝子変化により予後が予測できるかどうかは重要な問題であり、今後の検討が必要である。tal^d再構成がT-A L Lの発症にどのようにかかわっているかは不明であるが、T-A L Lにおける予後因子として有用であるかどうかということは今後のさらに多数例の解析が待たれるところである。

文献的に、小児例でT A L 1 遺伝子の変化をみた報告にはBashらによるアメリカのP O Gグループのものがある[39]。この報告によれば、彼らは合計 182例の小児T-A L Lのうち、48例(26%)にT A L 1 遺伝子のサザン解析での

再構成を認め、そのうち47例がtal^d再構成であったとしている。tal^d再構成をもたない症例との臨床データの比較では、初診時の白血球数・ヘモグロビン値がtal^d再構成をもつ症例で有意に高く、また、表面マーカーではCD2の発現がtal^d再構成をもつ症例で有意に高く、CD10の発現が有意に低かったとしている。さらに予後に関しては、彼らもtal^d再構成をもつ群がもたない群に比べ、予後良好であるように思われたと記載しているが、統計学的に有意なものではなかったと述べている。また、ドイツのJanssen らの報告では、小児T-A L L 76例中7例、成人T-A L L 66例中2例でtal^d再構成がみられたとしている[40]。しかし、この成人例の2例はいずれも17才の症例であり、小児例に近いものであると推測される。彼らは再構成のみられた症例にとくに表面マーカー上の特徴はなかったとし、また、予後の比較については述べていない。

また、今回の検討では、この再構成を利用して2例のT-A L Lの症例で微小残存腫瘍の検出を試みた。この系におけるPCR法の感度は 10^{-4} レベルであった。症例1は2度の再発の後に不幸な転帰を取った症例であるが、経時的に微小残存腫瘍の検出を行っていたにもかかわらず、2度目の再発の予知はできなかった。これは一つには、2度目の再発が髄外再発であり、骨髓での腫瘍量が少なかったためであると考えられる。白血病の微小残存腫瘍の検出には、ほとんどの場合骨髓の検体が用いられるが、髄外再発の予知は一考を要するも

のと思われる。また、この症例の第3寛解期の骨髓における検討ではわずかながらバンドがみられ、寛解深度が浅かったことが推測される。このような情報は腫瘍特異的な遺伝子異常を利用したPCR法による検討で初めて得られるものであり、PCR法による微小残存腫瘍の検出の有用性を示していると言える。症例2では、PCR法の結果が順調な臨床経過を裏付ける結果となっており、寛解の深さが確認されている。まだまだ検討できている症例数は少ないが、こういった検討により寛解期に微小残存腫瘍が検出された症例に対し、どういった治療方針で臨んでゆくかということが今後の課題であると思われる。

e まとめ

1. 小児T-A L L 44例、小児T-N H L 20例、成人のT細胞性腫瘍35例においてtal^d再構成の有無を検索し、小児T-A L L 10例にのみこの再構成を認めた。小児T-N H Lでこの再構成が全くみられないというのは、新しい知見であり、これらのことから、tal^d再構成は小児のT-A L Lに特異的な遺伝子変化であることが示唆された。
2. 再構成を認めたこれら10例は男児8例・女児2例で、年齢は4才から14才（中央値：11才）で、F A B分類ではL 1が7例、L 2が2例であった。表

面マーカーの検討ではCD1 - CD2 + CD4 - CD7 + CD10 - が10例全例に共通する特徴であり、骨髄系抗原・B細胞系抗原はいずれの症例でも発現していなかった。染色体所見では、分析可能であった8例中5例が正常核型であり、他の3例にdel(6)、t(8;21)、t(8;14)の異常がみられた。治療では、10例中3例が同種もしくは自家骨髄移植を受けていた。

3. 予後を見ると、2例がそれぞれ生存期間15ヶ月と42ヶ月で死亡しているが、他の8例ではすべて初回寛解を維持していた。予後の追跡が可能であった40例における、tal^d再構成の有無による予後の比較ではtal^d再構成を有するT-A L Lは再構成を有さない症例に比べ、有意に予後が良好であった。

4. この再構成を利用して、T-A L Lの2例において微小残存腫瘍の検出を経時的に行ない、寛解のレベルを知る上で有用な情報が得られた。

5. tal^d再構成がT-A L Lの発症にどのようにかかわっているかは不明であるが、T-A L Lにおける予後因子として有用であるかどうかということは今後のさらに多数例の解析が待たれるところである。

f 参考文献

1. Rowley J.D.:Biological implication of consistent chromosome rearrangements in leukemia and lymphoma. *Cancer Res.* 44:3159-3168, 1984.
2. Pui C-H., Crist W.M., Look A.T.:Biology and clinical significance of cytogenetic abnormalities in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 76:1449-1463, 1990.
3. Hayashi Y., Yamamoto K., Kojima S.:T-cell acute lymphoblastic leukemias with a t(8;14) possibly involving a c-myc locus and T-cell receptor α -chain genes. *N Eng J Med.* 314:650-651, 1986.
4. Raimondi S.C., Behm F.G., Robertson P.K., Pui C-H., Rivera G.K., Murphy S.B., Williams D.K.:Cytogenetics of childhood T-cell leukemia. *Blood* 72:1560-1566, 1988.
5. Kaneko Y., Fizzera G., Shikano T., Kobayashi H., Maseki N., Sakurai M.:Chromosomal and immunophenotypic patterns in T cell acute lymphoblastic leukemia(T-ALL) and lymphoblastic lymphoma(LBL). *Leukemia* 3:886-892, 1989.

6. Erikson J., Finger L., Sun L., AR-Rushdi A., Nishikura K., Minowada J., Finan J., Emanuel B.S., Nowell P.C., Croce C.M.: Deregulation of c-myc by translocation of the α -locus of the T-cell receptor in T-cell leukemia. *Science* 232:884-886, 1986.
7. Carrol A.J., Crist W.M., Link M.P., Amylon M.D., Pullen J., Ragab A.H., Buchanan G.R., Wimmer R.S., Vietti T.J.: The t(1;14)(p34;q11) is non-random and restricted to T-cell acute lymphoblastic leukemia: a Pediatric Oncology Group Study. *Blood* 76:1220-1224, 1990.
8. Chen Q., Chen J.T., Tsai L.H., Schneider N., Buchanan G., Carrol A., Crist W., Ozanne B., Siciliano M.J., Baer R.: The tal gene undergoes chromosome translocation in T-cell leukemia and potentially encodes a helix-loop-helix protein. *Eur Mol Biol Org J* 9:415-424, 1990.
9. Begley C.G., Aplan P.D., Davey M.P., Nakahara K., Tchorz K., Kurzberg J., Hershfield M.S., Haynes B.F., Cohen D.I., Waldmann T.A., Kirsch I.R.: Chromosomal translocation in a human leukemic stem-cell line disrupts the T-cell antigen receptor δ -chain diversity region and results in a previously unreported fusion transcript. *Proc Natl*

Acad Sc USA 86:2031-2035,1989.

10. Begley C.G., Aplan P.D., Denning S.M., Haynes B.F., Waldmann T.A., Kirsch I.R.: The gene SCL is expressed during early hematopoiesis and encodes a differentiation-related DNA-binding motif. Proc Natl Acad Sci USA 86:10128-10132, 1989.
11. Finger L.R., Kagan J., Christopher G., Kurzberg J., Hershfield M.S., Nowell P.C., Croce C.M.: Involvement of the TCL5 gene on human chromosome 1 in T-cell leukemia and melanoma. Proc Natl Acad Sci USA 86:5039-5043, 1989.
12. Mellentin J.D., Murre C., Donlon T.A., McCaw P.S., Smith S.D., Carroll A.J., McDonald M.E., Baltimore D., Cleary M.L.: The gene for enhancer binding proteins E12/47 lies at the t(1;19) breakpoint in acute leukemias. Science 246:379-382, 1989.
13. Murre C., McCaw P.S., Baltimore D.: A new DNA binding and dimerization motif in immunoglobulin enhancer binding daughterless, MyoD, and myc proteins. Cell 56:777-783, 1989.
14. Green A.R., Lints T., Visvader J., Harvey R., Begley C.G.: SCL is coexpressed with GATA-1 in hematopoietic cells but is also

- expressed in developing brain. *Oncogene* 7:653-660,1992.
15. Mowthorn M.A., Bernard O., Mitjavila M.T., Romeo P.H., Vainchenker W., Mathieu-Mahul D.: Expression of tal-1 and GATA-binding proteins during human hematopoiesis. *Blood* 81:647-655,1993.
16. Brown L., Chen J.T., Chen Q., Siciliano M.J., Crist W., Buchanan G., Baer R.: Site-specific recombination of the tal-1 gene is a common occurrence in human T-cell leukemia. *Eur Mol Biol Org J* 9:3343-3351, 1990.
17. Aplan P.D., Lombardi D.P., Ginsberg A.M., Cossman J., Bertness V.L., Kirsch I.R.: Disruption of the human SCL locus by 'illegitimate' V-(D)-J recombinase activity. *Science* 250:1426-1429,1990.
18. Aplan P.D., Lombardi D.P., Reaman G.H., Sather H.N., Hammond G.D., Kirsch I.R.: Involvement of the putative hematopoietic transcription factor SCL in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 79:1327-1333,1992.
19. Jonsson O.G., Kitchen R.L., Baer R.J., Buchanan G.R., Smith R.J.: Rearrangement of the tal-1 locus as clonal markers for T-cell acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Invest* 87:2029-2035,1991.

20. Tsuchida M., Akatsuka J., Bessho F., Chihara H., Hayashi Y., Hoshi Y.,
other 36 ICCSG members :Treatment of acute lymphoblastic leukemia
in Tokyo Children's Cancer Study Group preliminary results of L84-
11 protocol. *Acta Paediat Jpn* 33:522-535, 1991.
21. Bennett J.M., Catovsky D., Daniel M-T., Flandrin G., Galton D.A.G.,
Grainick H.R., Sultan C.:Proposal for the classification of the
acute leukemias. French-American-British(FAB) Co-operative Group
Br J Haematol 33:451-458, 1976.
22. Non-Hodgkin's Lymphoma Pathologic Classification Project. National
Cancer Institute sponsored study of classifications of
non-Hodgkin's lymphomas: summary and description of a working
formulation for clinical usage. *Cancer* 49:2112-2135, 1982.
23. Hayashi Y., Kobayashi Y., Hirai H., Hanada R., Yamamoto K., Abe T.,
Sugita K., Nakazawa S., Suetake N., Hoshino H., Kuroume T., Bessho F.,
Hayakawa H., Takaku F.: Immunoglobulin heavy chain gene
rearrangement and mixed lineage characteristics in acute leukemias
with the 11;19 translocation. *Cancer* 61:712-720, 1988.
24. Reinherz E.L., Kung P.C., Goldstein G., Levey R.H., Schlossman S.F.:

Discrete stages of human intrathymic differentiation. Analysis of normal thymocytes and leukemic lymphoblasts of T-cell lineage.

Proc Natl Acad Sci USA 77:1588-1592, 1980.

25. Foon K.A., Todd R.F.: Immunologic classification of leukemia and lymphoma. Blood 68:1-31, 1986.
26. Hayashi Y., Eguchi M., Sugita K., Nakazawa S., Sato T., Kojima S., Bessho F., Konishi S., Inaba T., Hanada R., Yamamoto K.: Cytogenetic findings and clinical features in acute leukemia and transient myeloproliferative disorder in Down's syndrome. Blood 72:15-23, 1988.
27. Harnden D.G., Klinger H.P., eds. ISCN(1993): an international system for human cytogenetic nomenclature. Published in collaboration with Cytogenet Cell Genet; Basel: Karger.
28. Southern E.M.: Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J Mol Biol 98:503-517, 1975.
29. Saiki R.K., Gelfand D.H., Stoffel S., Scharf S.J., Higuchi R., Horn G.T., Mullis T.B., Erlich H.A.: Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science

239:487-491, 1988.

30. Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R.: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74:5463-5467, 1977.
31. Kaplan E.L., Meier P.: Nonparametric estimation for incomplete observation. *J Am Stat Assoc* 53:457-481, 1958.
32. Gehan E.: A generalized Wilcoxon test comparing arbitrarily singly censored samples. *Biometrika* 52:203-224, 1965.
33. Macintyre E.A., Smit L., Ritz J., Kirsch I.R., Strominger J.L.: Disruption of the SCL locus in T-lymphoid malignancies correlates with commitment to the T-cell receptor $\alpha\beta$ lineage. *Blood* 80:1511-1520, 1992.
34. Bernard A., Boumsel L., Reinherz E., Nadler L.M., Ritz J., Coppin H., Richard Y., Valensi F., Dausset J., Flandrin G., Lemerle J., Schlossman S.F.: Cell surface characterization of malignant T cells from lymphoblastic lymphoma using monoclonal antibodies: evidence for phenotypic differences between malignant T cells from patients with acute lymphoblastic leukemia and lymphoma. *Blood* 57:1105-1110, 1981.

35. Pui C.H., Behm F.G., Singh B., Schell M.J., Williams D.L., Rivera G.K., Kalwinsky D.K., Sandlund J.T., Crist W.M., Raimondi S.C.:
Heterogeneity of presenting features and their relation to
treatment outcome in 120 children with T-cell acute lymphoblastic
leukemia. *Blood* 75:174-179, 1990.
36. Shuster J.J., Falletta J.M., Pullen D.J., Crist W.M., Humphrey G.B.,
Dowell B.L., Wharam M.D., Borowitz M.: Prognostic factors in
childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia: A pediatric
oncology group study. *Blood* 75:166-173, 1990.
37. Pullen D.J., Sullivan M.P., Falletta J.M., Boyette J.M., Humphrey G.B.,
Starling K.A., Land V.J., Dyment P.G., Vats T., Duncan M.H.: Modified
LSA₂L₂ treatment in 53 children with E-rosette positive T-cell
acute lymphoblastic leukemia: Results and prognostic factors.
Blood 60:1159-1168, 1982.
38. Crist W.M., Shuster J.J., Falletta J., Pullen D.J., Berard C., Vietti T.
J., Alvarado C.S., Roper M.A., Prasthofer E., Grossi C.E.: Clinical
features and outcome in childhood T cell acute lymphoblastic
leukemia-lymphoma according to stage of thymic differentiation.

Blood 72:1891-1897, 1988.

39. Bash R.O., Crist W.M., Shuster J.J., Link M.P., Amylon M., Pullen J., Carroll A.J., Buchanan G.R., Smith R.G., Baer R.: Clinical feature and outcome of T-cell acute lymphoblastic leukemia in childhood with respect to alterations at the TAL1 locus: A pediatric oncology group study. Blood 81:2110-2117, 1993.
40. Janssen J.W.G., Ludwig W-D., Sterry W., Batram C.R.: SIL-TAL1 deletion in T-cell acute lymphoblastic leukemia. Leukemia 7:1204-1210, 1993.

§ 謝 辞

本研究に検体を提供していただいた国立小児病院小児医療研究センター 病理病態研究部 藤本純一郎先生、埼玉がんセンター 臨床検査部 金子 安比古先生、三重大学医学部 第二内科 三輪 啓志先生、北 堅吉先生、および全般にわたり多くのご指導、ご協力をいただいた東京大学 医学部 小児科学教室の林 泰秀先生に深謝いたします。

図1 TAL1遺伝子の構造



図2 T A L 1 遺伝子のサザン法による解析

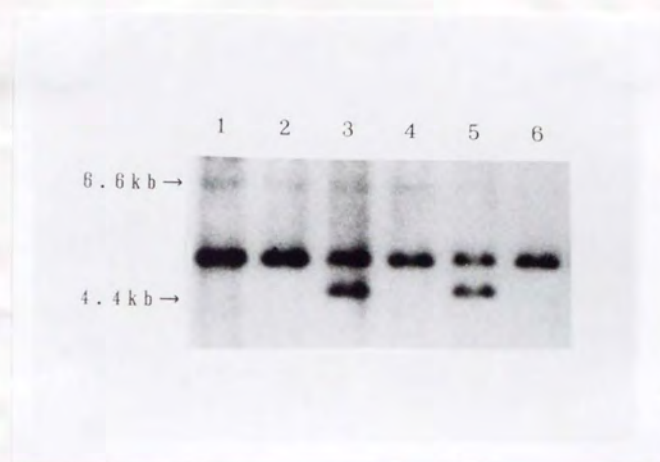


図3 tal^d再構成を有する症例のPCR法による検討



図4 tal^d再構成を有する2症例の再構成をはさむ塩基配列

5' - AGGGGAGCTAGTGGGAGAAATTAAGCAGTCCATGAAATCCTTGGGTATCATCTGAGCTAAGGTATGTGAAAGAGGTTTGC

Sense Primer

AGTCGATAACGTGCCATTAAAGTTGTTTTACGGTGGGAATTCTTGAGGACTGAAACCTTGAATGCTCGCTCTTGCAAT

	(Case 1)		
CCT	CACAATTTCGGCT	tecacccac GITGGTTTT★CATT	CTTCTTCGTGGTTGTGTGCATGCGGTGGGATTGTGAGAGT -3'
CA	aacaga	GGTTTTTCATT	Antisense Primer
	(Case 2)		

図5 tal^d再構成の有無によるEvent-free survival の比較

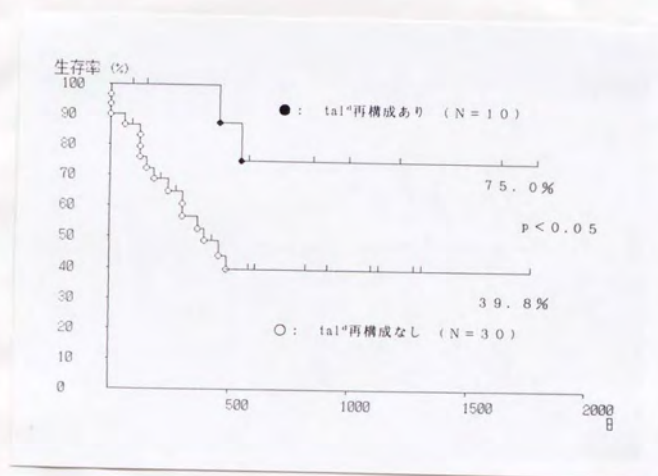


図6 PCR法による微小残存腫瘍の検出

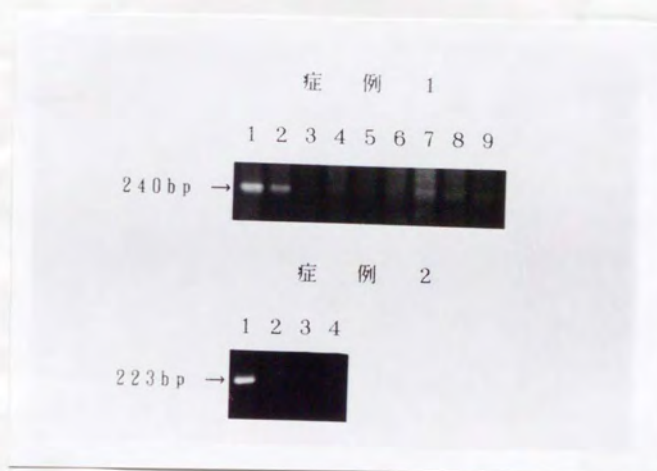
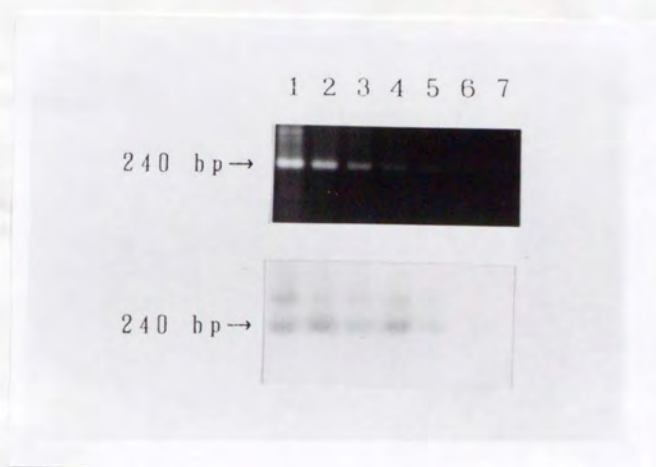


図7 PCR法の感度の検討



図の説明

図1 T A L 1 遺伝子の構造

E : *Eco* RI site, H : *Hind* III site

Exonを示す枠のうち、黒塗りの部分は Coding Sequenceを示す。

図2 T A L 1 遺伝子のサザン法による解析

小児 T - A L L 6 例における T A L 1 遺伝子プローブ (B2EE-2.0) を
用いたサザン法による解析 : Lane 3, 5 に再構成バンドがみられる。

図3 tal^d再構成を有する症例の P C R 法による検討

tal^d再構成を有する小児 T - A L L 9 例から得られた P C R 産物
Lane 1 - 9 のすべてに約 240bp の P C R 産物がみられる。

図4 tal^d再構成を有する 2 症例の再構成をはさむ塩基配列

tal^d再構成を有する T - A L L 2 症例 (症例 1・2) の
再構成をはさむ塩基配列 : 下線は sense 及び antisense の
primer の位置を示し、小文字はクローン特異的配列を示す。
*印は T の欠失を示す。

図5 tal^d再構成の有無によるEvent-free survival の比較

● : tal^d再構成を有する症例

○ : tal^d再構成を有さない症例

tal^d再構成を有する症例がtal^d再構成を有さない症例に比べ、

有意に良好な予後を示している。($p < 0.05$)

図6 PCR法による微小残存腫瘍の検出

症例1 : Lane 1 , 初発時 ; Lane 2 , 再発時 , Lane 3 - 5 , 骨髄移植後,

Lane 6 , 髄外再発時 , Lane 7 - 9 , 第3寛解期

症例2 : Lane 1 , 初発時 ; Lane 2 - 4 , 第1寛解期

図7 PCR法の感度の検討

上段 : エチジウムブロマイド染色

下段 : T A L 1 遺伝子プローブ (B2EE-2.0) によるHybridization

Lane 1 , 10^0 ; Lane 2 , 10^{-1} ; Lane 3 , 10^{-2} ; Lane 4 , 10^{-3} ;

Lane 5 , 10^{-4} ; Lane 6 , 10^{-5} ; Lane 7 , 10^{-6}

検出感度はどちらも 10^{-4} レベルであった。

表1 ヒトT細胞性腫瘍におけるtal^d再構成の頻度

病 型		tal ^d 再構成あり	tal ^d 再構成なし
小 児	T - A L L	10	34
	T - N H L	0	20
成 人	T - A L L	0	10
	T - N H L	0	3
	CD7(+) A L L	0	5
	成人T細胞性白血病	0	10
	他のT細胞性腫瘍	0	7
合 計		10	89

表2 tal⁺再構成をもつT-A L L 10症例の臨床的特徴

No. 年齢/性	初診時 WBC (μ l)	T細胞関連抗原								FAB	治療	生存期間 (月)	染色体所見
		CD1	CD2	CD3	CD4	CD5	CD7	CD8	細胞 腫瘍				
1 13/男	237000	-	+	-	-	+	+	-	+	L 1	骨髄移植	42	46, XY
2 11/男	87300	-	+	-	-	+	+	-	+	L 1	L 89-12	17+	46, XY, del(6)(q15q25)
3 14/男	178500	-	+	+	-	+	+	+	-	L 2	L 84-11	54+	46, XY
4 4/女	45700	-	+	-	-	+	+	-	-	L 2	骨髄移植	59+	検査せず
5 13/女	271400	-	+	-	-	+	+	+	-	L 1	L 84-11	40+	検査せず
6 5/男	40000	-	+	+	-	+	+	+	-	記載なし	骨髄移植	28+	47, XY, +21, t(8;21)(q24;q22)
7 6/男	302000	-	+	-	-	不明	+	+	-	L 1	90-10	15	46, XY
8 5/男	80100	-	+	-	-	-	+	-	-	L 1	90-10	33+	46, XY
9 14/男	230100	-	+	-	-	+	+	-	-	L 1	90-10	3+	46, XY, t(8;14)(q24;q11)
10 15/男	197200	-	+	-	-	+	+	-	+	L 1	L 89-12	5+	46, XY

注：生存期間の+は、現在も生存中を表す。

