

原

著

ヒト血液細胞株及びトランスジェニックマウスを用いた BCR-ABL 遺伝子の造腫瘍性に関する検討

新潟大学医学部内科学第一教室（主任：柴田 昭教授）

新 國 公 司

The Study in the Oncogeneity of the Chimeric P210BCR-ABL Gene
by Using Human Hematopoietic Cell Line and Transgenic Mouse

Koji NIKKUNI

*First Department of Internal Medicine,
Niigata University School of Medicine
(Director: Prof. Akira SHIBATA)*

In order to investigate how the chimeric BCR-ABL gene is involved in the pathogenesis of human leukemia, we introduced a P210BCR-ABL and a BCR-v-abl gene into HSM-911, a human IL-3 or GM-CSF dependent myeloid cell line, and a P210BCR-ABL gene into the mouse germ line.

In experiments in vitro, clones of HSM-911 into which a BCR-v-abl gene was introduced revealed abrogation of IL-3 dependence, but those with a P210BCR-ABL gene did not proliferate independently of exogenous growth factors. Three of 7 P210BCR-ABL clones, however, acquired the ability to differentiate into mature cells. This results may indicate that the expression of P210BCR-ABL gene is associated with the maturation of cells established as blastic cell line from a leukemic patient, which is in accordance with the nature of terminal differentiation of granulocytes in chronic phase of CML.

Next, we have successfully generated mice transgenic for a P210BCR-ABL gene under the control of the MPSV promoter elements. Expression of the P210BCR-ABL mRNA was detected in almost every organ of mice analysed by RT-PCR. One of 12 founder mice died 90 days after birth, showing midgrade leukothrombocytosis with a prominent increase in the granulocytic lineage and splenomegaly. Pathological analysis showed

Reprint requests to: Koji NIKKUNI,
First Department of Internal Medicine,
Niigata University School of Medicine,
757 Asahimachi-dori 1, Niigata City,
951, JAPAN.

別刷請求先：〒951 新潟市旭町通1番町
新潟大学医学部内科学第一教室
新 國 公 司

disappearance of normal splenic structure and infiltration of cells in each maturation stages of three hematopoietic components, that is the findings characteristic of CML. Although this suggests that the P210BCR-ABL gene plays a crucial role in early stages of CML, the low incidence of the disease in our experiment may indicate that the level of P210BCR-ABL gene expression is related to the first step and further developments such as acceleration of CML require other factors, e.g. additional genetic events.

Key words: CML, Ph¹ chromosome, P210BCR-ABL gene, transgenic mice

慢性骨髄性白血病, Ph¹ 染色体, P210BCR-ABL 遺伝子, トランスジェニックマウス

緒 言

Philadelphia (Ph¹) 染色体は, 染色体転座 t(9;22)(q34;q11) により生じ, 慢性骨髄性白血病 (CML) の約95%, 急性リンパ性白血病 (ALL) の約25%に認められる染色体異常である. 分子生物学的には, CML においては, 9番染色体長腕 (9q34) 上の ABL 遺伝子が, 200 kb 以上に及ぶエクソン I b~II の部分を切断点として, 22番染色体長腕 (22q11) 上の BCR 遺伝子の約 5.8 kb に集中する break point cluster region (M-bcr) に転座して, BCR-ABL 融合遺伝子が形成される¹⁾²⁾. これにより, 正常 ABL 遺伝子による 6.0 及び 7.0 kb の ABL mRNA と異なる 8.5 kb の BCR-ABL 融合 mRNA が転写され³⁾, 145 kD の正常蛋白 P145^{ABL} と異なる 210 kD の蛋白 P210^{BCR-ABL} に翻訳される. 一方, Ph¹ 陽性 ALL の約半数は, BCR 遺伝子の切断点が CML と異なり M-bcr の約 50 kb 5'側のイントロン I 内にあり (m-bcr)⁴⁾⁵⁾, 7.0 kb の BCR-ABL 融合 mRNA が転写され⁶⁾, 190 kD の蛋白 P190^{BCR-ABL} に翻訳される.

非受容体チロシンキナーゼ型癌原遺伝子である c-abl (ABL) 遺伝子産物 P145^{c-abl} は, チロシンキナーゼ活性は低い, その相同遺伝子である v-abl 遺伝子産物 P160^{gag-v-abl} は, ABL 蛋白のN末端部が欠失してウイルス gag 蛋白質に置換しており強いチロシンキナーゼ活性を持ち, 高い造腫瘍性を示す. P210^{BCR-ABL} 及び P190^{BCR-ABL} も P160^{gag-v-abl} 同様高いチロシンキナーゼ活性を有する⁷⁾ ことから, これらが白血病の発症に直接的に関与しているものと推測されている. 最近では, BCR-ABL 遺伝子産物活性化のメカニズムに関する知見も得られている⁸⁾¹⁰⁾.

そこで我々は, BCR-ABL 融合遺伝子すなわち相互転座による ABL 遺伝子の活性化¹¹⁾ が白血病の発症に

どのように関与しているかを明らかにするために, BCR-ABL 融合遺伝子を増殖因子依存性ヒト血液細胞株に導入し, 細胞の増殖と分化に対する作用を観察するとともに, P210^{BCR-ABL} トランスジェニックマウスを作成し, その造腫瘍性について検討した.

対象と方法

ヒト血液細胞株への遺伝子導入

P210BCR-ABL 融合遺伝子 (pGD' 210, Martin L. Scott 博士 (Whitehead Institute) より供与¹²⁾) (図 1-a) 及び BCR-v-abl 遺伝子 (LTR (BCR-v-abl), Suzanne Cory 博士 (Walter and Eliza Hall Institute) より供与¹³⁾) (図 1-b) を, IL-3 あるいは GM-CSF 依存性ヒト血液細胞株 HSM-911 (小林正伸博士 (北大癌研病理) より供与) に既報の如く矩形波による電気パルス法を用いて導入した¹⁴⁾. pGD' 210 導入細胞は G418 添加培養にて, LTR (BCR-v-abl) 導入細胞は増殖因子無添加培養にて選択した¹⁵⁾. 遺伝子導入クローンは, AGPC 法¹⁶⁾ によりその total RNA を抽出して RT-PCR 法¹⁷⁾ により導入遺伝子の mRNA の発現をみることにより, 遺伝子の組み込み及び発現を確認した¹⁸⁾. PCR 法は, プライマーは BCR 遺伝子と ABL 遺伝子の融合部をはさんで, 5'側は BCR 遺伝子エクソン II 上の 3'-GGAGCTGCAGATGCTGACCAAC-5' を, 3'側は ABL 遺伝子エクソン II 上の 5'-TCAGACCCTGAGGCTCA-AAGTC-3' を用い¹⁹⁾²⁰⁾, 変性温度94°C30秒, アニール温度55°C60秒, 伸長温度72°C90秒で30サイクル実施した.

遺伝子導入細胞の増殖と分化に関する検討

各遺伝子導入細胞は, 増殖因子無添加培養により自律増殖能を調べた. 自律増殖能が得られた細胞の増殖因子産生能については, 各培養上清を増殖因子無添加 HSM-911 親株培養系に加えて検討した¹⁸⁾. 分化成熟能につ

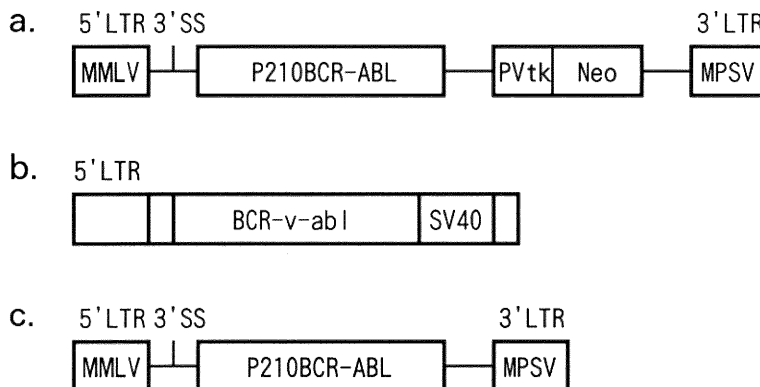


図 1 遺伝子導入に用いた construct.

a: pGD'210¹²⁾ は, pSV (X) B2-MPSV の Neo 遺伝子を欠失させた部位に P210BCR-ABL 融合 cDNA を挿入し, pMCINeo の Neo 遺伝子を ClaI 部位に挿入してあり, 3'LTR に MRSV 由来の LTR をもつ construct である. b: LTR (BCR-v-abl)¹³⁾ は, BCR-v-abl 融合の cDNA の5'側に MPSV 由来の LTR を, 3'側に SV40 の polyadenylation site をもつ construct である. c: a の construct より Neo 遺伝子及びそのプロモーターを欠失させた construct.

いては, 各クローンについて形態, peroxidase, sudan black B (SBB), naphthol-ASD-chloroacetate (NASD-CA) esterase, alphanaphthyl butyrate (α NB) esterase の各特殊染色及び各モノクローナル抗体を用いた FACS 解析による表面形質の検討を行った.

P210BCR-ABL トランスジェニックマウス

MPSV LTR のプロモーターとエンハンサーをもつ P210BCR-ABL の construct (図 1-c) を精製し, BDF1 (BALB/c \times DBA/2 F1) どうしの交配で得られた受精卵の前核に注入し, レシピエントメスマウスの卵管に移植した²¹⁾. 生後4週で尾よりゲノム DNA を抽出し, 制限酵素 BamHI で処理し, P210BCR-ABL cDNA の 1.4 kb の BamHI-BamHI フラグメントをプローブとしてサザンブロットハイブリダイゼーション法にて解析し, P210BCR-ABL 遺伝子導入トランスジェニックマウスを得た. トランスジェニックマウスは, 4~8週毎に末梢血を採取し, 血算及び導入遺伝子は発現を観察した. 死亡あるいは一部の生後6ヶ月で処理した個体は, 病理学的及び遺伝子学的検討を行った. 用いたマウスはすべて SPF 条件下で飼育した.

P210BCR-ABL 遺伝子の発現の検討

トランスジェニックマウスの末梢血及び各臓器より AG-PC 法より total RNA を抽出し, DNaseI により残存ゲノム DNA を処理した後, RT-PCR 法により P210-

BCR-ABL mRNA 及びマウス β アクチン mRNA の発現を検討した. β アクチンの PCR におけるプライマーは, イントロンⅢをはさんで5'側はエクソンⅢ上の 5'-TCATCACTATTGGCAACGAG-3' を, 3'側はエクソンⅣ上の 3'-TGGAGATACGGTTGTGTCAC-5' を用いた²²⁾⁻²⁴⁾. ゲノム DNA の残存については, β アクチン mRNA の 155 bp の増幅バンドの他に, ゲノム DNA の 250 bp の増幅バンドの出現の有無を観察し, また各濃度の BCR-ABL 導入ゲノムに対し DNaseI 処理および PCR を行い, DNA が完全に消化されているか否かを検討した.

結 果

HSM-911 への遺伝子導入

IL-3 あるいは GM-CSF 依存性ヒト血液細胞株 HSM-911 へ pGD'210 を導入して G418 に耐性となり, PCR 法で P210BCR-ABL mRNA の発現が確認された7クローン (pGD'210-1~3, 6~9) と, LTR (BCR-v-abl) を導入して増殖因子無添加条件下で自律増殖し, PCR 法で BCR-v-abl mRNA の発現が確認された5クローン (BCR-v-abl-1~5) が得られた (図 2-a, b).

遺伝子導入 HSM-911 細胞の自律増殖能

pGD'210 を導入した7クローンの増殖においては,

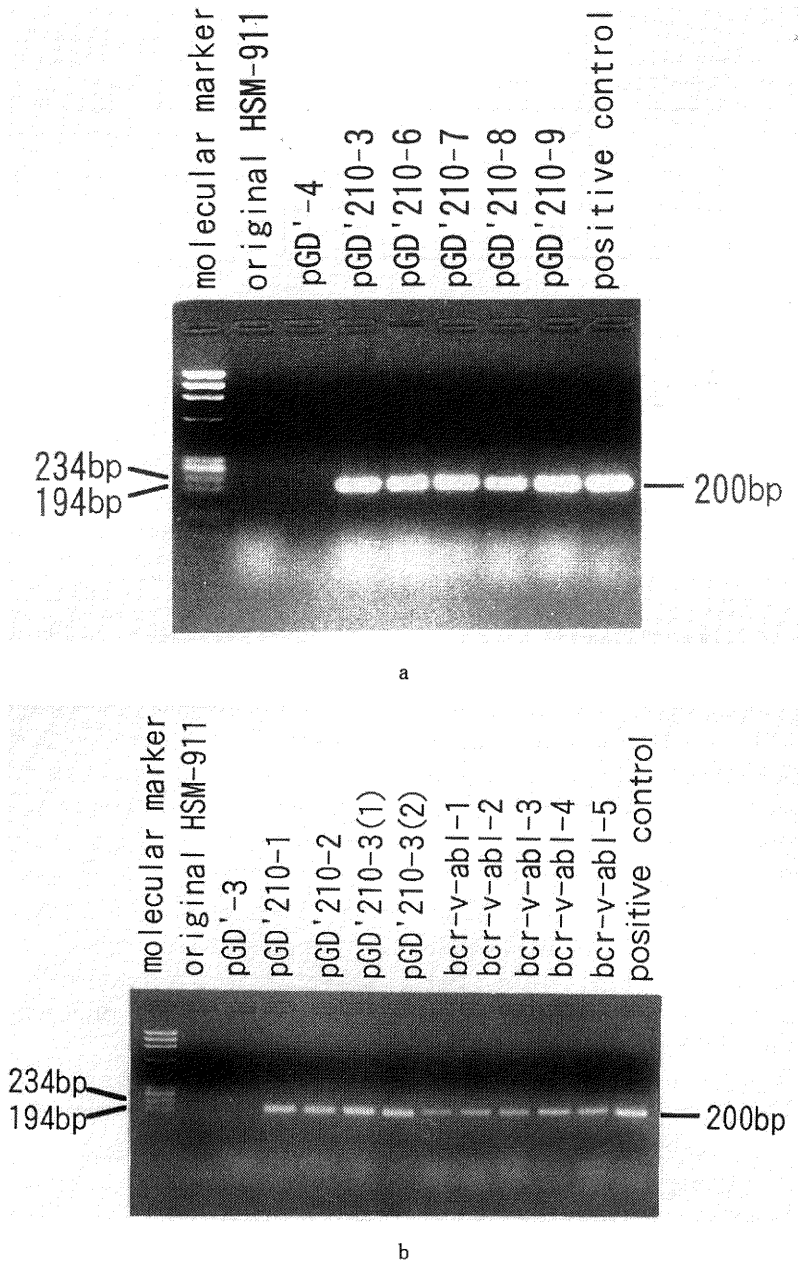


図2 pGD'210 及び LTR (BCR-v-abl) 導入細胞の、
導入遺伝子発現の検討。

HSM-911 へ pGD'210 を導入して G418 耐性となった7クローン (pGD'210-1~3, 6~9), pGD'210 のベクターのみを導入して得られたクローン (pGD'-3, 4), LTR (BCR-v-abl) を導入して増殖因子無添加条件下で自律増殖した5クローン (BCR-v-abl-1~5) 及びヒト CML 細胞株 K562 より total RNA を抽出し, RT-PCR 法にて導入遺伝子の発現を確認した。

自律増殖能は得られなかった。一方、LTR (BCR-v-abl) を導入した5クローンについては、自律増殖能を獲得した(図 3-a)。しかし、HSM-911 親株は、増殖因子無添加条件下でクローン BCR-v-abl-4, 5 の各液体培養上清を加えても増殖せず(図 3-b)、これらの遺伝子導入 HSM-911 細胞からの親株に対する増殖因子産生能は認められなかった。

遺伝子導入 HSM-911 細胞の分化成熟能

pGD' 210 を導入した7クローンのうち、クローン pGD' 210-1, 2 は形態学的にも(図 4-c)細胞表面性質上も芽球の特徴を示し、親株との相違は認められなかったが、クローン pGD' 210-3 は、核の分葉傾向(図 4-d)、NASDCA esterase の陽性化(図 4-h)、CD34 の消失、CD10, glycophorin A (GPA) の出現(図 5)など分化成熟傾向を示した。また、クローン pGD' 210-7, 8 も形態学的成熟傾向を示し(図 4-e)、CD34 の消失、CD10, GPA の出現が認められた(図 5)。しかし LTR (BCR-v-abl) を導入した各クローンは、親株に比し差異は認められなかった。

P210BCR-ABL トランスジェニックマウス

計12例の P210BCR-ABL トランスジェニックマウスが得られた。導入された遺伝子のコピー数は、1コピーから数10コピーと様々であった(図 6)。12例中 pGD210-0307, -0411, -1112 の3例が生後それぞれ94, 103, 90日で死亡した。pGD210-1112 は、死亡時末梢血所見上白血球数 63,000/ μ l、血小板数 86.0 万/ μ l と増多を示した。分画は成熟顆粒球と単球が主体で、幼若細胞の出現はみられなかった(図 7-a)。病理学的には、脾臓が226.6 mg と腫大し、組織学的には正常の脾構造は破壊され、各成熟段階の顆粒球系細胞、赤芽球及び巨核球の浸潤が認められた(図 7-b, c, d)。しかし他臓器には明らかな細胞浸潤は認められなかった。一方、pGD210-0307, -0411 は、死亡時末梢血所見上白血球数のみがそれぞれ500/ μ l, 800/ μ l と減少したが、病理学的には各臓器とも明らかな異常は認められなかった。また、他のマウスは約1.5年の経過観察にて末梢血所見上明らかな異常は

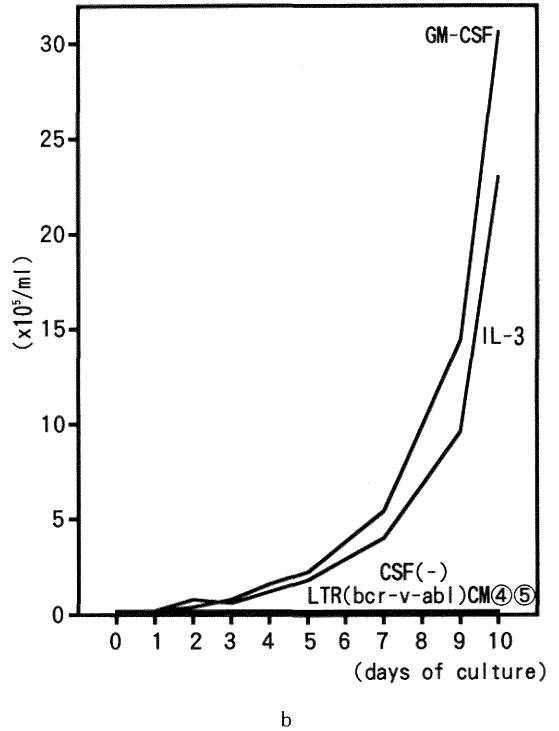
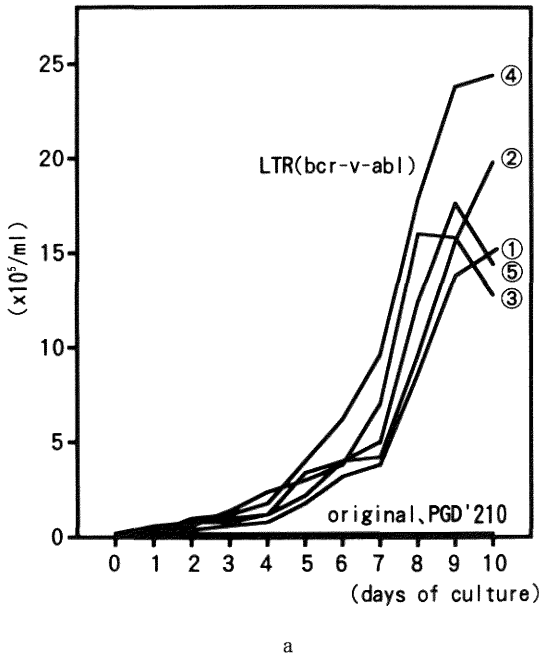


図 3 遺伝子導入細胞の自律増殖能と増殖因子産生能の検討。

a: pGD' 210 遺伝子導入クローン, LTR (BCR-v-abl) 導入クローン (BCR-v-abl-1~5) 及び HSM-911 親株を増殖因子無添加条件下で液体培養し、その増殖能をみた。b: LTR (BCR-v-abl) 導入クローン BCR-v-abl-4, 5 の培養上清, IL-3 及び GM-CSF の各々に対する HSM-911 親株の増殖能をみた。

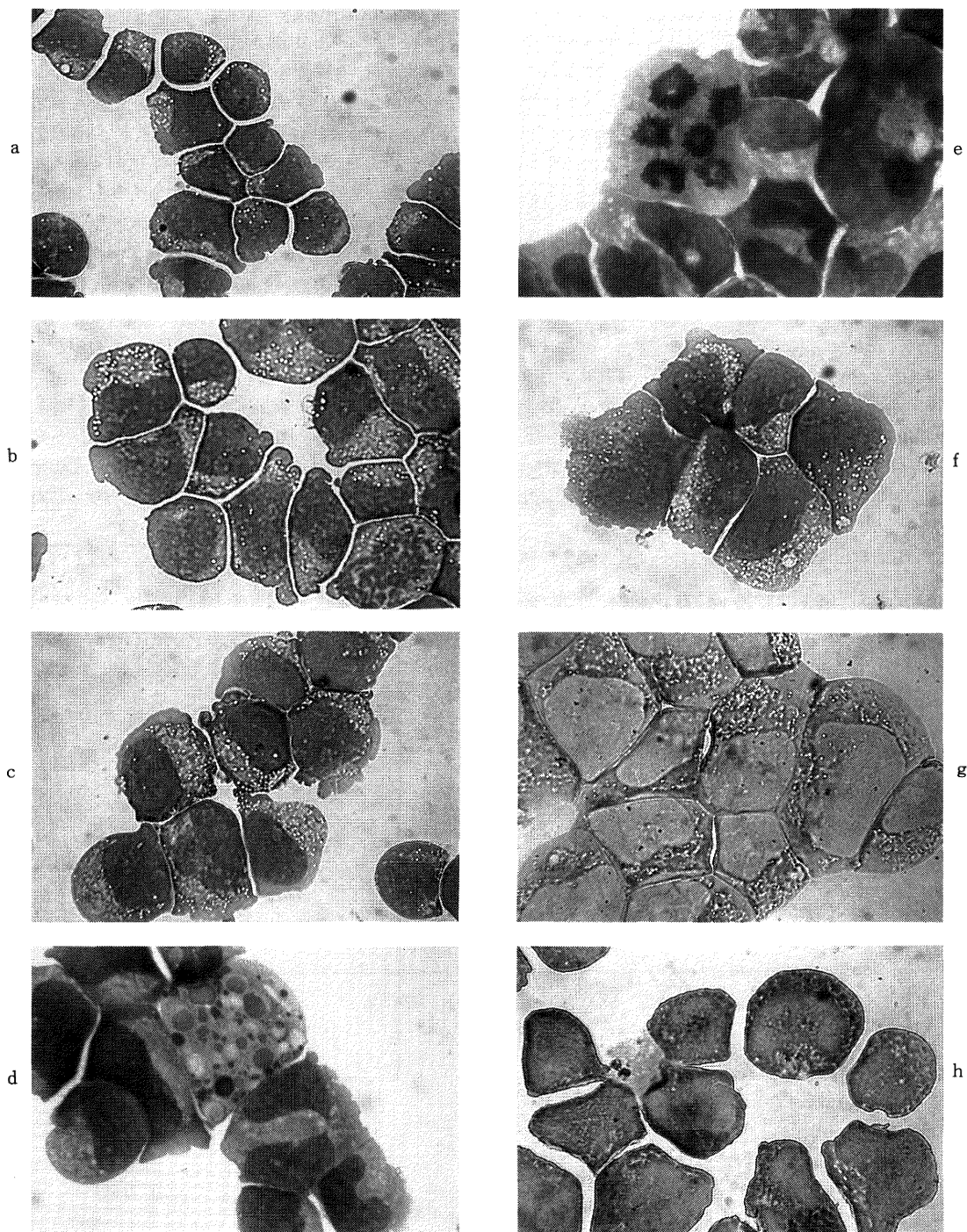


図4 pGD' 210 及び LTR (BCR-v-abl) 遺伝子導入クローンの形態.

a: HSM-911 (May-Giemsa). b: pGD' ベクターのみを導入したクローン (May-Giemsa).
 c: クローン pGD' 210-1 (May-Giemsa). d: クローン pGD' 210-3 (May-Giemsa). e: クローン
 pGD' 210-8 (May-Giemsa). f: クローン BCR-v-abl-1 (May-Giemsa). g: HSM-911
 (esterase double). h: クローン pGD' 210-3 (esterase double).

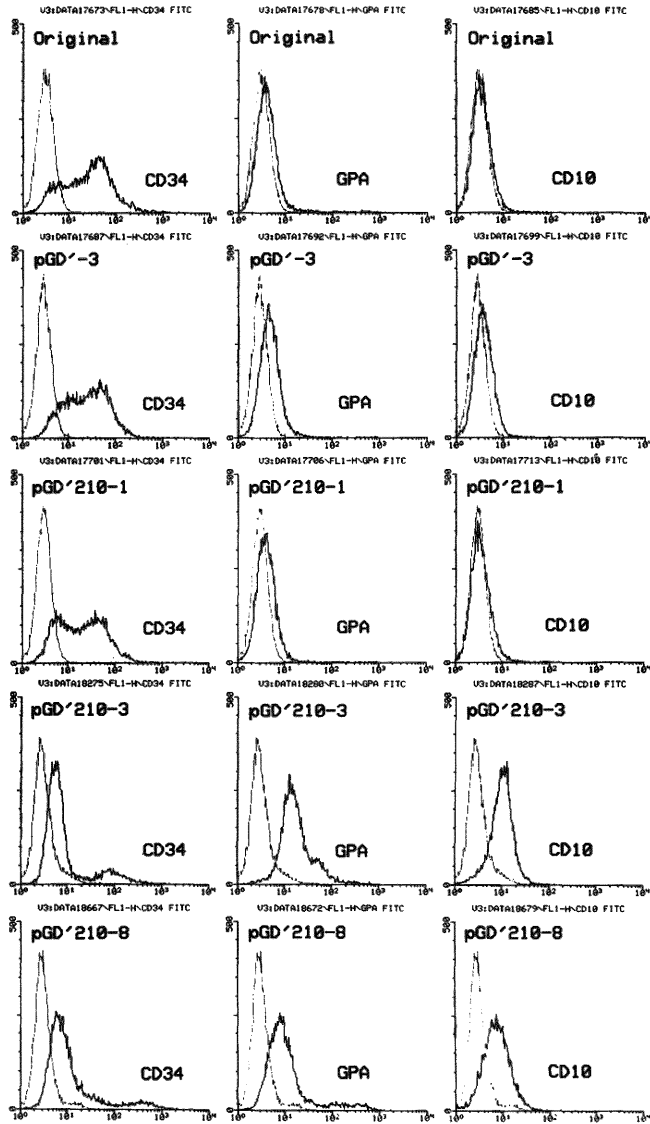


図 5 抗 CD34, 抗 glycophorin A 及び抗 CD10 モノクローナル抗体による細胞表面形質の FACS 解析。

認められず、生後 180 日で解析した pGD210-0203, -1134, -1202 に病理学的異常は認められなかった。

P210BCR-ABL mRNA の発現の検討

導入 DNA は BCR-ABL cDNA であり、mRNA 抽出の際のゲノム DNA の残存による偽陽性が問題になるが、 β アクトチンの PCR において、残存ゲノム DNA の増幅により出現すると予想される 250 bp のバンドが

みられない (図 8-a, b, 図 9-b) ことや、混入が予想される BCR-ABL 導入 DNA の量では DNaseI による消化が完全で、PCR により増幅バンドが出現しなかった (結果略) ことから、ゲノム DNA の残存による偽陽性の可能性は否定的と考えられた。死亡あるいは生後 6 ヶ月で処理した個体について、各臓器における P210BCR-ABL mRNA の発現を PCR 法により検討した。導入

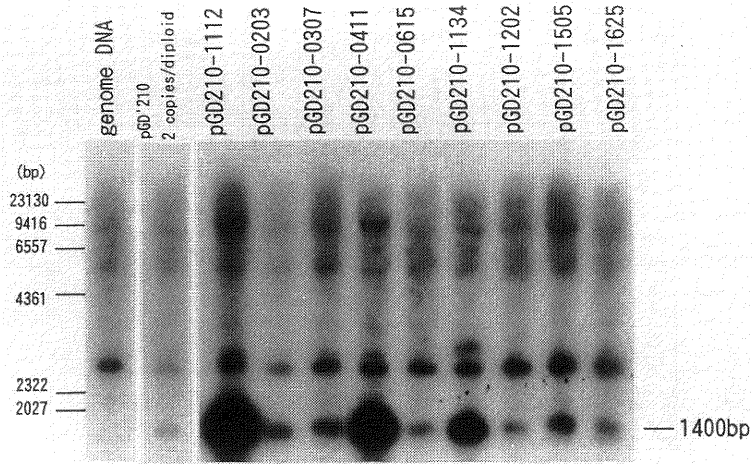


図6 pGD210BCR-ABL トランスジェニックマウス DNA の, Southern blot analysis による導入遺伝子の解析.

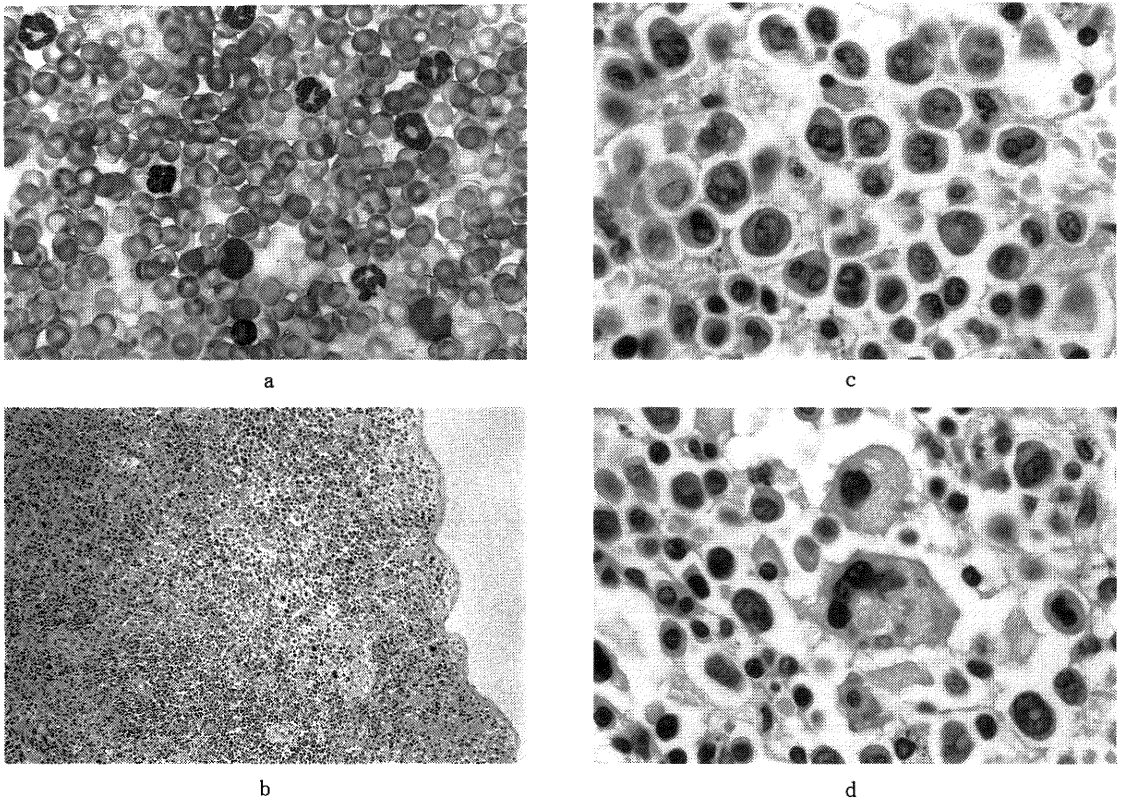


図7 トランスジェニックマウス pGD210-1112 の末梢血液像及び脾組織像。
 a: 末梢血液像 (May-Giemsa). b, c, d: 脾組織像 (Hematoxylin-Eosin. b: 弱拡大, c: 各分化段階の顆粒球系細胞. d: 巨核球.).

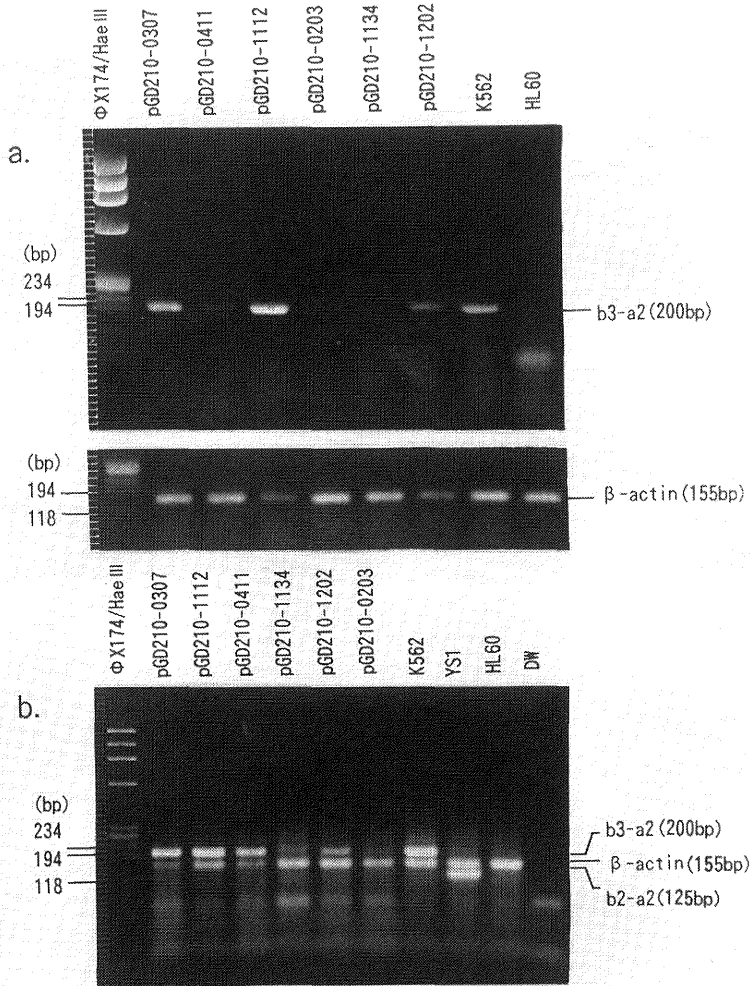


図 8 RT-PCR 法による pGD210BCR-ABL トランスジェニックマウス骨髄及び脾臓における導入遺伝子の発現の解析.

pGD210-0307, -0411, -1112 は死亡した個体で, pGD210-0307 は白血球増加, 脾臓に細胞浸潤を呈した. 他は生後 6 ヶ月で処理した個体.
a: 骨髄, b: 脾臓における P210BCR-ABL mRNA の発現.

遺伝子は, いずれの個体においてもほぼ各臓器にて発現が認められた (図 8-a, b, 図 9-a). しかし, 個体及び臓器によりバンド濃度にばらつきがみられ, 脾腫を呈して死亡した pGD210-1112 では, 各臓器ともバンド濃度が高かった. 末梢血の発現量の時間的経過は, 個体によりばらつきがみられるもののほぼ定常的な傾向を示した (結果略).

考 察

CML や Ph¹ 陽性 ALL の発症に関して BCR-ABL 融合遺伝子が果たす役割を明らかにするために, その機能について, *in vitro* 及び *in vivo* の系においてこれまで数多くの検討がなされている.

まず, *in vitro* の系において, レトロウイルスベクターを用いて BCR-ABL 遺伝子の各系の細胞に導入し,

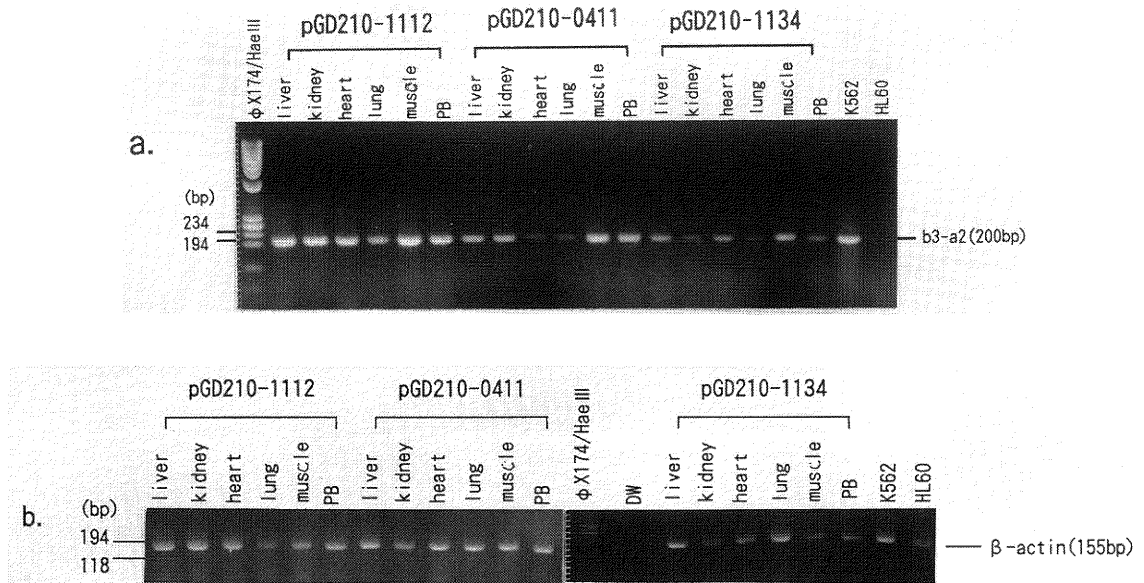


図9 RT-PCR法による pGD210BCR-ABL トランスジェニックマウス各臓器における導入遺伝子の発現の解析。

a: 導入 P210BCR-ABL 遺伝子 mRNA の発現. b: β -actin mRNA の発現.

その増殖能や造腫瘍能について検討された。P210BCR-ABL 遺伝子は、線維芽細胞に対しては、v-abl と異なり NIH3T3 細胞に対する形質転換能は無かったが²⁵⁾、Rat-1 細胞に対しては造腫瘍能を示した²⁶⁾。マウス血液細胞に対しては、長期培養 B 細胞株²⁷⁾²⁸⁾、IL-3 依存性 proB 細胞株 Ba/F3²⁹⁾、IL-3 あるいは GM-CSF 依存性骨髓球系細胞株 FDC-P1³⁰⁾、FDC-P2¹⁸⁾ 及び IL-3 依存性骨髓球系細胞株 32D C13 (G)³¹⁾ に対して、増殖因子非依存性自律増殖能および細胞により悪性形質の程度の差はあるもののヌードマウスに対する造腫瘍性を賦与し、P210BCR-ABL 遺伝子の癌原性が示された。また、P210BCR-ABL 遺伝子と p190BCR-ABL 遺伝子の性質の差異についての検討では、P190BCR-ABL 遺伝子の方がチロシンキナーゼ活性が高く³²⁾、未分化 B 前駆細胞に対して高率かつ早期の造腫瘍性を賦与した³³⁾。

今回我々は、新たに IL-3 あるいは GM-CSF 依存性ヒト血液細胞株 HSM-911 に対する P210BCR-ABL 遺伝子及び BCR-v-abl 遺伝子の作用を検討したが、BCR-v-abl 遺伝子導入細胞株は自律増殖能を獲得したものの、P210BCR-ABL 遺伝子導入細胞株では自律増殖性は得られなかった。これは従来の検討結果とは異なる所見であるが、その原因は、今回我々はヒト血液細胞

株を用いておりその生物学的の差異による可能性や、更に長期の培養により自律増殖性が獲得される可能性が考えられる。

興味深いのは、P210BCR-ABL 遺伝子導入 7 クローン中 3 クローンで、その形態、特殊染色所見及び細胞表面形質において分化傾向を示したことである。このような P210BCR-ABL 遺伝子導入細胞における分化能を報告した例は過去にない。この機序は明らかではないが、CML の慢性期においては、骨髓細胞の著明な増殖がみられ、なおかつその分化能が保たれていることの説明として、P210BCR-ABL 遺伝子は血液細胞に対し、増殖能とともに分化能をも積極的に賦与している可能性を示す所見と考えられた。

次に、in vivo の系における検討として、BCR-v-abl 遺伝子や、P190 あるいは P210BCR-ABL 遺伝子による白血病発症マウス作製の試みがなされてきた。

まず、これらの遺伝子を導入したトランスジェニックマウスを作製し、検討した報告がいくつかみられる。BCR-v-abl 遺伝子を導入した系では¹³⁾³⁴⁾、マウス Igh 遺伝子のプロモーターとエンハンサー及び MPSV LTR を用いたが¹³⁾、CML 様の所見は得られず、T 及び preB リンパ腫が高率に発症した。導入遺伝子は腫瘍組織のみ

に発現していた。P190BCR-ABL 遺伝子の系では³⁵⁾⁻³⁸⁾、メタロチオネインのプロモーターを用いた検討で³⁵⁾、急激な ALL 及び CML 急性転化様病態の発症を観察した。導入遺伝子はほとんどすべての臓器で発現していた。P210BCR-ABL 遺伝子の系では³⁹⁾、BCR のプロモーターを用いたところ、遺伝子導入胚はすべて死亡した。

一方、P210BCR-ABL 遺伝子をレトロウイルスベクターを用いて *in vitro* でマウス骨髄細胞に導入し、致死量放射線照射マウスに移植した検討もいくつかある。MPSV 由来のベクターを用いて BALB/c の系で検討した例では¹²⁾、脾腫大、白血球増多を伴う CML 様骨髄増殖性疾患が発症した。しかし、MPSV 由来ベクターを用いて C57BL/6 及び DBA2 の系で検討した例では⁴⁰⁾、CML 様病態は得られず、マクロファージ、肥満細胞、赤芽球系及びリンパ球系腫瘍等多様な病態を観察した。また、*v-abl* 遺伝子と P210BCR-ABL 遺伝子を MLV 由来ベクターを用いて BALB/c 系に導入した検討では⁴¹⁾、高率に CML 様病態及び PreB リンパ腫の発症をみたが、用いた *v-abl* および P210BCR-ABL 遺伝子との間に病態の差異はなく、骨髄増殖性疾患の発症には宿主因子が重要であると示した。

これらの検討から、BCR-ABL 遺伝子と白血病発症との関連については、発症率、発症までの期間及び染色体付加異常などの観察から、BCR-ABL 遺伝子単一の存在のみで白血病の発症に必要な十分であるとする考察もある³⁵⁾が、完全な腫瘍化には更なる遺伝子変異等の因子が必要であるとしているものが多い¹³⁾²⁶⁾²⁷⁾⁴⁰⁾。CML においても、急性転化に伴い約25%に P53 遺伝子の変異が認められ⁴²⁾、病勢の進行との関連が注目されている。

今回、P210BCR-ABL 遺伝子導入トランスジェニックマウスの作製に始めて成功し、報告した。現在までの検討で、12匹中1匹ながら白血球増多、脾腫大及び脾内に血液3系統の各成熟段階の細胞浸潤がみられた。異常が血液3系統に及んでいることは、造血幹細胞由来の腫瘍化と考えられている CML の病態と一致する。また、多コピーの P210BCR-ABL 遺伝子が導入され、PCR 法による増幅バンドの濃度から高い mRNA の発現が示唆された。従って、P210BCR-ABL 遺伝子が CML 発症の本態であることが示唆された。しかし、遺伝子導入部位におけるゲノム癌原遺伝子などの活性化や癌抑制遺伝子の不活化などによる可能性も否定はできない。また、BCR-*v-abl* や P190BCR-ABL 導入トランスジェ

ニックマウスに比べ、P210BCR-ABL 遺伝子が発現していながら CML の発症率が低かったのは、導入遺伝子の construct の臓器特異性や発現量の問題、用いたマウスの系統の問題、更に、Michelle らの検討結果とは反するが⁴¹⁾、P210^{BCR-ABL} と P190^{BCR-ABL} あるいは P160^{v-abl} との間の生物学的性質の差異によるものと思われた。従って、P210BCR-ABL 遺伝子の CML の発症における役割は、その重要な first step であることは示唆されたものの、発症そのものも含めて病勢の進行には、更なる染色体付加異常などの別の因子が必要である可能性も推測された。

今後、この仮説を確認するために、P210BCR-ABL 遺伝子導入マウスに、放射線照射や変異原性のある薬物を投与することにより、どのような病態が出現するかを検討する予定である。

結 語

BCR-ABL 遺伝子が白血病の発症にどのように関与しているかを明らかにするために、*in vitro* において、P210BCR-ABL 遺伝子及び BCR-*v-abl* 遺伝子を IL-3 あるいは GM-CSF 依存性ヒト血液細胞株 HSM-911 に導入して、増殖、分化に関する観察を行うとともに、*in vivo* において、P210BCR-ABL 遺伝子導入トランスジェニックマウスを作製し、その造腫瘍性について検討した。

in vitro の検討では、BCR-*v-abl* 遺伝子を導入して得られたクローンは自律増殖性を獲得したが、P210BCR-ABL 遺伝子を導入したクローンでは自律増殖性は得られなかった。興味深いことに、P210BCR-ABL 遺伝子を導入したクローンの一部で形態や細胞表面形質において分化傾向を示し、CML における P210BCR-ABL 遺伝子の血液細胞に対する積極的な分化能の賦与を示唆する所見と考えられた。

in vivo の検討では、P210BCR-ABL 遺伝子導入トランスジェニックマウスを始めて作製し、12匹中1匹に CML 慢性期様の血液3系統の増殖性疾患が得られたことから、P210BCR-ABL 遺伝子が CML 発症の本態と強く関連することが示唆された。発症率が低かったことについては、P210BCR-ABL 遺伝子の発現量や、用いたマウスの系統との関連が示唆されたが、病勢の進行には染色体付加異常など他の因子が必要であることも考えられた。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜りまし

た新潟大学医学部内科学第一教室柴田 昭教授、直接の御指導を賜りました森山美昭助教授（高密度無菌治療部）、高橋益広助手（内科学第一教室）、並びに病理学的検討をお願いした福田剛明講師（病理学第二教室）に、深く感謝致します。また、実験を補助していただいた田中いづみさん、木村美奈子さん（内科学第一教室）にも深謝致します。

参 考 文 献

- 1) Heisterkamp, N., Stephenson, J.R., Groffen, J., Hansen, P.F., de Klein, A., Bartram, C.R. and Grosveld, G.: Localization of the c-abl oncogene adjacent to a translocation breakpoint in chronic myelogenous leukemia. *Nature*, **306**: 239~242, 1983.
- 2) Groffen, J., Stephenson, J.R., Heisterkamp, N., de Klein, A., Bartram, C.R. and Grosveld, G.: Philadelphia chromosomal breakpoints are clustered within a limited region, bcr, on chromosome 22. *Cell*, **36**: 93~99, 1984.
- 3) Shtivelman, E., Lifshitz, B., Gale, R.P. and Canaani, E.: Fused transcript of abl and bcr genes in chronic myelogenous leukemia. *Nature*, **315**: 550~554, 1985.
- 4) Erikson, J., Griffin, C.A., ar Rushdi, A., Valtieri, M., Hoxie, J., Finan, J., Emanuel B.S., Rovera, G., Nowell, P.C. and Croce, C.M.: Heterogeneity of chromosome 22 breakpoint in Philadelphia-positive (Ph+) acute lymphocytic leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **83**: 1807~1811, 1986.
- 5) De Klein, A., Hagemeijer, A., Bartram, C.R., Houwen, R., Hoefsloot, L., Carbonell, F., Chan, L., Barnett, M., Greaves, M., Kleihauer, E., Heisterkamp, N., Groffen, J. and Grosveld, G.: bcr rearrangement and translocation of the c-abl oncogene in Philadelphia positive acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, **68**: 1369~1375, 1986.
- 6) Hermans, A., Heisterkamp, N., von Linden, M., van Baal, S., Meijer, D., van der Plas, D., Wiedemann, L.M., Groffen, J., Bootsma, D. and Grosveld, G.: Unique fusion of bcr and c-abl genes in Philadelphia chromosome positive acute lymphoblastic leukemia. *Cell*, **51**: 33~40, 1987.
- 7) Klotzner, W., Kurzrock, R., Smith, L., Talpaz, M., Spiller, M., Gutterman, J. and Arlinghaus, R.: The human cellular abl gene product in the chronic myelogenous leukemia cell line K562 has an associated tyrosine protein kinase activity. *Virology*, **140**: 230~238, 1985.
- 8) McWhirter, J.R. and Wang, J.Y.: Activation of tyrosinase kinase and microfilament-binding functions of c-abl by bcr sequences in bcr/abl fusion proteins. *Mol. Cell. Biol.*, **11**: 1553~1565, 1991.
- 9) Muller, A.J., Young, J.C., Pendergast, A.M., Pondel, M., Landau, N.R. and Witte, O.N.: BCR first exon sequences specifically activate the BCR/ABL tyrosine kinase oncogene of Philadelphia chromosome-positive human leukemias. *Mol. Cell. Biol.*, **11**: 1785~1792, 1991.
- 10) Pendergast, A.M., Muller, A.J., Havlik, M.H., Maru, Y. and Witte, O.N.: BCR sequences essential for transformation by the regulatory domain in a non-phosphotyrosine-dependent manner. *Cell*, **66**: 161~171, 1991.
- 11) Jackson, P. and Baltimore, D.: N-terminal mutations activate the leukemogenic potential of the myristoylated form of c-abl. *EMBO J.*, **8**: 449~456, 1989.
- 12) Daley, G.Q., Van Etten, R.A. and Baltimore, D.: Induction of chronic myelogenous leukemia in mice by the P210 bcr/abl gene of the Philadelphia chromosome. *Science*, **247**: 824~830, 1990.
- 13) Hariharan, I.K., Harris, A.W., Crawford, M., Abud, H., Webb, E., Cory, S. and Adams, J.M.: A bcr-v-abl oncogene induces lymphomas in transgenic mice. *Mol. Cell. Biol.*, **9**: 2798~2805, 1989.
- 14) Takahashi, M., Furukawa, T., Nikkuni, K., Aoki, A., Nomoto, N., Koike, T., Moriyama, Y. and Shibata, A.: Efficient introduction of a gene into hematopoietic cells in S-phase by electroporation. *Exp. Hematol.*, **19**: 343~346, 1991.
- 15) Takahashi, M., Furukawa, T., Saitoh, H, Aoki, A., Koike, T., Moriyama, Y. and Shibata, A.:

- Gene transfer into human leukemia cell lines by electroporation: experience with exponentially decaying and square wave pulse. *Leuk. Res.*, **15**: 507~513, 1991.
- 16) **Chomczynski, P. and Sacchi, N.**: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.*, **162**: 156~159, 1987.
- 17) **Kawasaki, E.S., Clark, S.S., Coyne, M.Y., Smith, S.D., Champlin, R., Witte, O.N. and McCormick, F.P.**: Diagnosis of chronic myeloid and acute lymphocytic leukemias by detection of leukemia-specific mRNA sequence amplified in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **85**: 5698~5702, 1988.
- 18) **Takahashi, M., Furukawa, T., Tanaka, I., Ohsawa, Y., Nikkuni, K., Aoki, A., Goto, T., Hashimoto, S., Kishi, K., Koike, T., Moriyama, Y. and Shibata, A.**: Transfection of the bcr/abl oncogene into factor-dependent cells by electroporation: Acquisition of autonomous proliferation. *Hematol. Oncol.* in press.
- 19) **Shtivelman, E., Lifshitz, B., Gale, R.P., Roe, B.A. and Canaani, E.**: Alternative splicing of RNAs transcribed from the human abl gene and from the bcr-abl fused gene. *Cell*, **47**: 277~284, 1986.
- 20) **Furukawa, T. and Shibata, A.**: Serial detection of residual bcr/abl mRNA by polymerase chain reaction in patients with chronic myelogenous leukemia after bone marrow transplantation. *Leuk. Lymph.*, **4**: 263~269, 1991.
- 21) **Gordon, J.W., Scangos, G.A., Plotkin, D.J., Barbosa, J.A. and Ruddle, F.H.**: Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **77**: 7380~7384, 1980.
- 22) **Ng, S.Y., Gunning, P., Eddy, R., Ponte, P., Leavitt, J., Shows, T. and Kedes, L.**: Evolution of the functional human beta-actin gene and its multi-pseudogene family: conservation of noncoding regions and chromosomal dispersion of pseudogenes. *Mol. Cell. Biol.*, **5**: 2720~2732, 1985.
- 23) **Tokunaga, K., Taniguchi, H., Yoda, K., Shimizu, M. and Sakiyama, S.**: Nucleotide sequence of a full-length cDNA for mouse cytoskeletal beta-actin mRNA. *Nucleic Acids Res.*, **14**: 2829, 1986.
- 24) **Jonathan, B.E., Johnson, D.A., Rossi, J., Cook, N. and Wo, A.**: Effect of fixation on the amplification of nucleic acids from paraffin-embedded material by the polymerase chain reaction. *J. Histochem. Cytochem.*, **39**: 351~354, 1991.
- 25) **Daley, G.Q., McLaughlin, J., Witte, O.N. and Baltimore, D.**: The CML-specific P210 bcr/abl protein, unlike v-abl, does not transform NIH/3T3 fibroblasts. *Science*, **237**: 532~535, 1987.
- 26) **Lugo, T.G. and Witte, O.N.**: The BCR-ABL oncogene transforms Rat-1 cells and cooperates with v-myc. *Mol. Cell. Biol.*, **9**: 1263~1270, 1989.
- 27) **McLaughlin, J., Chianese, E. and Witte, O.N.**: In vitro transformation of immature hematopoietic cells by the P210 BCR/ABL oncogene product of the Philadelphia chromosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **84**: 6558~6562, 1987.
- 28) **Young, J.C. and Witte, O.N.**: Selective transformation of primitive lymphoid cells by the BCR/ABL oncogene expressed in long-term lymphoid or myeloid cultures. *Mol. Cell. Biol.*, **8**: 4079~4087, 1988.
- 29) **Daley, G.Q. and Baltimore, D.**: Transformation of an interleukin 3-dependent hematopoietic cell line by the chronic myelogenous leukemia-specific P210 bcr/abl protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **85**: 9312~9316, 1988.
- 30) **Hariharan, I.K., Adams, J.M. and Cory, S.**: bcr-abl oncogene renders myeloid cells line factor independent: potential autocrine mechanism in chronic myeloid leukemia. *Oncogene Res.*, **3**: 387~399, 1988.
- 31) **Laneuville, P., Sun, G., Timm, M. and Vekemans, M.**: Clonal evolution in a myeloid cell line transformed to interleukin-3 independent growth by retroviral transduction and expression of p210 bcr/abl. *Blood*, **80**: 1788~1797, 1992.
- 32) **Lugo, T.G., Pendergast, A.M., Muller, A.J.**

- and Witte, O.N.:** Tyrosine kinase activity and transformation potency of bcr-abl oncogene products. *Science*, **247**: 1079~1082, 1990.
- 33) **McLaughlin, J., Chianese, E. and Witte, O.N.:** Alternative forms of the BCR-ABL oncogene have quantitatively different potencies for stimulation of immature lymphoid cells. *Mol. Cell. Biol.*, **9**: 1866~1874, 1989.
- 34) **Harris, A.W., Bath, M.L., Rosenbaum, H., McNeall, J., Adams, J.M. and Cory, S.:** Lymphoid tumorigenesis by v-abl and BCR-v-abl in transgenic mice. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **166**: 165~173, 1990.
- 35) **Heisterkamp, N., Jenster, G., ten Hoeve, J., Zovich, D., Pattengale, P.K. and Groffen, J.:** Acute leukaemia in bcr/abl transgenic mice. *Nature*, **344**: 251~253, 1990.
- 36) **Voncken, J.W., Morris, C., Pattengale, P., Dennert, G., Kikly, C., Groffen, J. and Heisterkamp, N.:** Clonal development and karyotype evolution during leukemogenesis of BCR/ABL transgenic mice. *Blood*, **79**: 1029~1036, 1992.
- 37) **Griffiths, S.D., Healy, L.E., Ford, A.M., Bennett, C.A., Voncken, J.W., Heisterkamp, N., Groffen, J. and Greaves, M.F.:** Clonal characteristics of acute lymphoblastic cells derived from BCR/ABL p190 transgenic mice. *Oncogene*, **7**: 1391~1399, 1992.
- 38) **Voncken, J.W., Griffiths, S., Greaves, M.F., Pattengale, P.K., Heisterkamp, N. and Groffen, J.:** Restricted oncogenicity of BCR/ABL p190 in transgenic mice. *Cancer Res.*, **52**: 4534~4539, 1992.
- 39) **Heisterkamp, N., Jenster, G., Kioussis, D., Pattengale, P.K. and Groffen, J.:** Human bcr-abl gene has a lethal effect on embryogenesis. *Transgenic Res.*, **1**: 45~53, 1991.
- 40) **Elefanty, A.G., Hariharan, I.K. and Cory, S.:** bcr-abl, the hallmark of chronic myeloid leukemia in man, induces multiple haemopoietic neoplasms in mice. *EMBO J.*, **9**: 1069~1078, 1990.
- 41) **Kelliher, M.A., McLaughlin, J., Witte, O.N. and Rosenberg, N.:** Induction of a chronic myelogenous leukemia-like syndrome in mice with v-abl and BCR/ABL. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **87**: 6649~6653, 1990.
- 42) **Ahuja, H., Bar, E.M., Advani, S.H., Benchimol, S. and Cline, M.J.:** Alterations in the p53 gene and the clonal evolution of the blast crisis of chronic myelocytic leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **86**: 6783~6787, 1989.

(平成6年2月15日受付)