

6) CMLにおける bcr rearrangement の意義

新潟大学医学部第一内科 古川 達雄・成田美和子
 岸 賢治・高橋 益広
 森山 美昭・柴田 昭
 新潟大学脳研究所神経薬理学部門 崎村 建司・高橋 康夫

Significance of Bcr Rearrangement at Diagnosis
 and Clinical Course of CML

Tatsuo FURUKAWA, Miwako NARITA, Kenji KISHI,
 Masuhiro TAKAHASHI, Yoshiaki MORIYAMA and Akira SHIBATA

*First Department of Internal Medicine, Niigata
 University, School of Medicine*

Kenji SAKIMURA and Yasuo TAKAHASHI

*Department of Neuropharmacology, Brain Research
 Institute, Niigata University*

A specific chromosomal abnormality, the Philadelphia chromosome (Ph¹), is found in 90 to 95% of CML patients. Breakpoints on chromosome 22 in CML patients occur in a small region designated as the breakpoint cluster region (bcr). Using 3' bcr probe (a commercially available bcr probe), we screened bcr rearrangements in patients with CMPD including two patients with Ph1 (+) ALL. The results showed that bcr rearrangements appear only in patients with CML, indicating that screening an abnormal bcr rearrangement is a useful tool to diagnose CML. In addition we analyzed the DNA from Ph1 (+) CML patients in blastic crisis to determine whether the differences in location of molecular of breakpoints within the bcr are associated with heterogeneity of blastic crisis. The location of molecular breakpoints within the bcr appeared to be shifted to 5' breakpoint in most of patients with lymphoid blastic crisis, but varied in myeloid blastic crisis. Therefore, further studies should be necessary.

Key words: Chronic myelogenous leukemia (CML), bcr rearrangement, blastic crisis.
 慢性骨髄性白血病, 急性転化。

Reprint requests to: Tatsuo FURUKAWA,
 First Department of Internal Medicine,
 Niigata University, School of Medicine
 Niigata City, 951, JAPAN.

別刷請求先: 〒951 新潟市旭町通1番町
 新潟大学医学部第一内科

古川 達雄

はじめに

慢性骨髄性白血病 (Chronic myelogenous leukemia, CML) 患者の90~95%に Ph¹ 染色体を認める。Ph¹ 染色体は第9染色体と第22染色体の相互転座 t(9;22)(q34;q11)の結果生ずるもので、第9染色体長腕 (band q34) には c-abl 遺伝子が位置するが、相互転座により c-abl 遺伝子は第22染色体に移行する。一方第22染色体における切断は、5.8Kb の bcr (breakpoint cluster region) 領域で起こり¹⁾、この切断部位より5'側と c-abl 遺伝子の融合が生ずる。その結果正常の c-abl mRNA と異なる約8.5Kb の bcr-abl chimeric mRNA が形成され²⁾、さらに翻訳されて 210Kd の蛋白がつくられ

る。P210 bcr-abl は、正常 c-abl 蛋白よりチロシンキナーゼ活性が増強しており³⁾、CML に於ける Pathogenesis に関連しているものと考えられる (図 1)。今回我々は以上の bcr rearrangement が CML に特有の現象であるか否か、他の慢性骨髄増殖性疾患 (CMPD) および Ph¹(+) ALL と比較検討すると同時に CML における急性転化の多様性が、bcr 領域の切断部位と関係があるかなど、CML における bcr rearrangement の意義について検討した。

方 法

CML 10例, Polycythemia vera 2例, Essential thrombocythemia 2例, Primary myelofibrosis 1

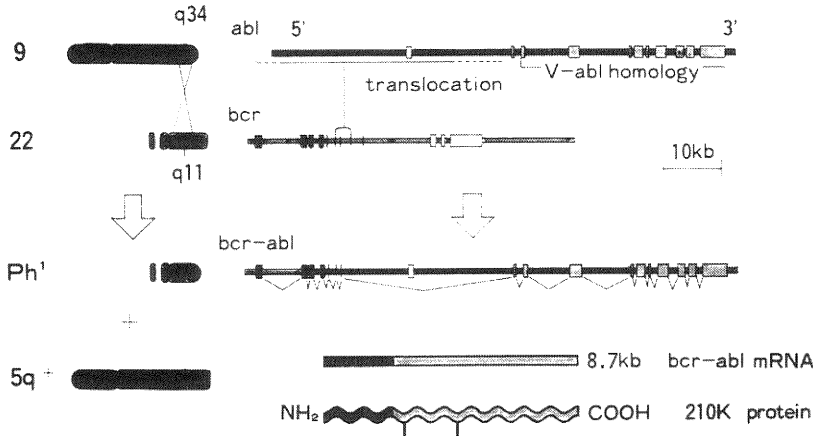


図 1 CML における Ph¹ 染色体と abl, bcr 遺伝子

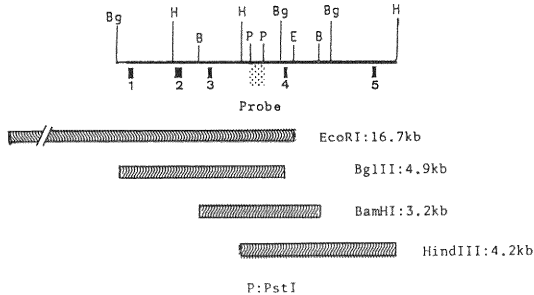


図 2 bcr 領域の制限酵素マップおよび normal band の大きさ

プローブは、HUMAN bcr (Pr-1) (ONCOGENE Science, INC, Mineola, NY) より subcloning した 0.6kb intron fragment を用いた

例, Chronic myelomonocytic leukemia 1例, さらに Acute lymphoblastic leukemia 2例を対象とした。患者の末梢血または骨髄から抽出した高分子 DNA を適当な制限酵素で切断、0.8%アガロースゲル電気泳動にて分離したのち、Southern blotting をおこない、ニトロセルロース膜 (Schleicher & Schuell) に移し⁴⁾、oligonucleotide priming method にてラベルした bcr 領域のプローブ (図 2) との hybridization にて rearrangement の有無を調べた¹⁾。Normal band の長さおよび bcr 領域の制限酵素マップを図 2 に示す。

成績および考案

1) CML 鑑別診断への bcr rearrangement の応用：臨床的に CML と鑑別を要する疾患として真性多血

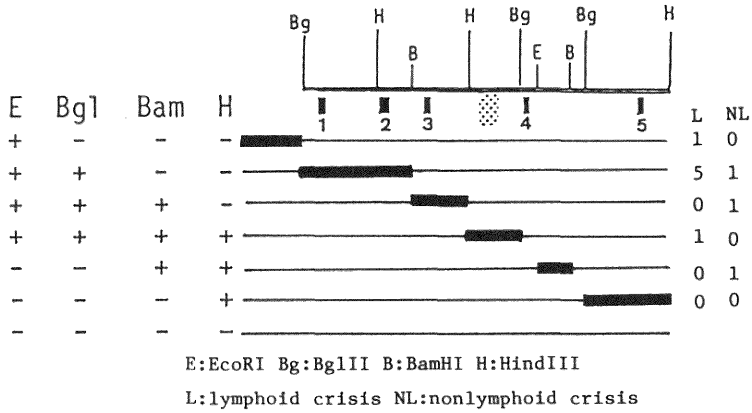


図3 bcr領域における切断部位と crisis の種類の相関

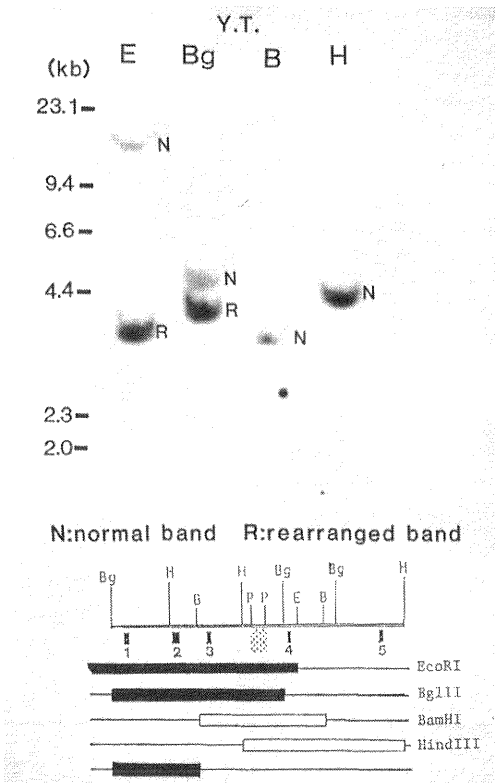


図4 CML lymphoid crisis の1例
本例では Eco RI, Bgl II で rearrangement band を認め他の制限酵素では normal band のみであることから切断部位は図の黒塗部分であると推定される

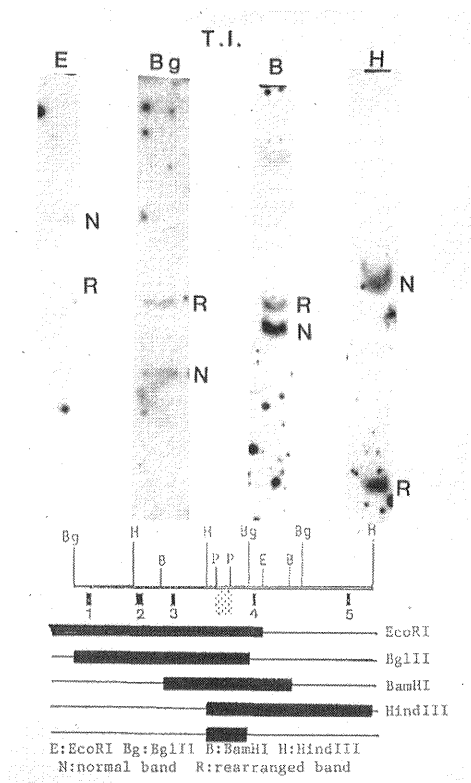


図5 CML myeloid crisis の1例
本例では4種類の制限酵素全てにおいて rearrangement band をみとめることから黒塗がすべて重なる部分に切断部位があると推定される

症 (PV) 2 例, 原発性血小板血症 (ET) 2 例, 原発性骨髄線維症 (PMF) 1 例, さらに慢性骨髄単球性白血病 (CMML) 1 例について, bcr rearrangement を検索した. その結果, 全例 6 例において rearrangement band は認められなかった. 一方 CML 症例にも転座に伴う deletion のため rearrangement band が検出されない例が報告されている⁵⁾ので, より 5' 側のプローブを作製して前記症例に hybridization を行ったが, これら 6 例ではすべて rearrangement band は検出されなかった. このことは, これらの症例では CML と異なり, bcr 領域での切断がないことを示している.

一方, 急性リンパ性白血病 (ALL) 症例の約 20% で Ph¹ 染色体を認める. このような de novo ALL は, CML のリンパ芽球性急性転化との鑑別が治療の面からも重要である. よって, Ph¹ positive ALL と診断された症例 2 例について bcr rearrangement を検索したが, 2 例とも rearrangement を認めなかった. これに対し, CML のリンパ芽球性急性転化例 7 例は全例に rearrangement を認め, 初診時に両者の鑑別が可能であると考えられる.

以上 bcr rearrangement の検索は, 複数の制限酵素を用い, さらに bcr 領域の複数のプローブを用いることにより, 初診時における CML 慢性期と, 他の Chronic myelo proliferative disorders, Myelodysplastic syndrome との鑑別診断, 急性転化時の CML と Ph¹ positive ALL との鑑別診断に有用であると考えられる.

2) 急性転化の種類と bcr rearrangement: CML 症例は, 一般的に 3~5 年程度の慢性期を経て急性転化を起こす. CML 急性転化は多様で, 増殖した芽球の形態や症状から, リンパ芽球性, 骨髄芽球性, 赤芽球性, 単球性, 巨核芽球性など, 種々のタイプに分けられる. これらのうち, リンパ芽球性急性転化は治療 (vincristine と prednisolone の併用) が著効を示すが, 他のものは治療抵抗性であることが知られている.

一方 bcr 領域における切断部位は rearrangement を持つ制限酵素によって 7 種類に分けられる (図 3). 図 4 に示す例では, EcoRI, BgIII, には, rearrangement band を認め, BamHI, HindIII では認めないことから, 切断部位は図に示す部位にあると判断される. 同様にして図 5 の例では, 4 種類の制限酵素全てにおいて rearrangement を認め, 切断部位は前例とは異なる領域に位置することが分かる. このようにして各症例における bcr の切断部位を決めることが可能である.

CML blastic crisis の症例 10 例についてその切断部位と crisis の種類 (lymphoid crisis と nonlymphoid

crisis) の関係を検討した. その結果 lymphoid crisis の症例において 5' 側に切断部位が多い傾向を認めた (図 3). 一方, myeloid crisis では 3' 側に切断部位が多いとの報告もある⁶⁾が, 症例数が少なく結論は得られなかった.

おわりに

以上のように, bcr rearrangement はかなり CML に特有の現象であり, 他の CMPD および Ph¹ (+) ALL との鑑別診断に応用できるものと考えられる. 一方 CML における急性転化の多様性と, bcr 領域の切断部位との関係は明らかにはできなかった. 今後症例を重ねて検討して行きたいと考えている.

参考文献

- 1) Groffen, J., Stephenson, J.R., Heisterkamp, N. de Klein, A., Bartram, C.R. and Grosfeld, G.: Philadelphia chromosomal breakpoints are clustered within a limited region, bcr, on chromosome 22, *Cell*, **36**: 93~99, 1984.
- 2) Shtivelman, E., Lifshitz, B., Gale, R. P. and Cannani, E.: Fused transcript of abl and bcr genes in chronic myelogenous leukemia, *Nature*, **315**: 550~554, 1985.
- 3) Konopka, J.B., Watanabe, S.M. and Witte, O.N.: An alteration of the human c-abl protein in K562 leukemia cells unmasks associated tyrosine kinase activity, *Cell*, **37**: 1035~1042, 1984.
- 4) Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook, J.: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, pp.382~389, Cold Spring Harbor Laboratory (New York) 1982.
- 5) Popenoe, D.W., Schaefer-Rego, K., Mears, J.G., Bank, A. and Leibowitz, D.: Frequent and extensive deletion during the 9, 22 translokation in CML, *Blood*, **68**: 1123~1128, 1986.
- 6) Shtivelman, E., Gale, R. P., Drezzen, O., Berrebi, A., Zaizov, R., Kubonishi, I., and Cannani, E.: bcr1-abl RNA in patients with chronic myelogenous leukemia, *Blood*, **69**: 971~973, 1987.

司会 CML の bcr の切れる場所によって血液学的に CML の多様性が説明できるかというようなお話でしたが、質問ございますでしょうか。

木南 分けられてやっておられるのはいいと思うのですが、何かその根拠はあるのですか。例えば、別にノーザンプロットした方がもう少し根拠がありそうな気がするのですが。

古川 その通りなのですが、テクニカルの問題で、患者さんからノーザンをやる為にとる血液量が多くないとどうしてもうまくいかないもので、それで今は DNA からこれを想定しているわけで、このことを考えた根拠の一つは、蛋白で先程の bcr の中のエクソンの 3' の部分を使った蛋白を調べたところが、crisis を起こした時に非リンパ芽球性急性転化の症例というのは、どうも 3' 側のエクソンの蛋白の抗体で認識される蛋白を作っているという論文が出たのと、何らかの違いが、慢性期にずっとこの蛋白が作られているわけで、それが何らか

の影響を持って急性転化を起こす原因になる可能性はあるのではないかと想定の下でやりました。

辻 細かいことで恐縮なのですが、サザンプロットで rearrangement から由来するバンドのシグナルの強さと、正常のバンドのシグナルの強さとはずいぶん違うようですが、それはコピー数の関連で何か意味があるのでしょうか。それとも、そのオーバーラップする部分の問題なのでしょうか。

古川 一つはですね、例えば末梢血を取った時に一般的に T リンパ球というのは Ph1 を持たないと今は考えられているので、末梢血で DNA を取ってきた時には Ph1 を持っていない細胞も DNA の中に混じってきてしまうので、濃さは全く比較の対象にならないと考えています。

司会 ありがとうございます。最後に、B型肝炎ウイルスの複製及び発癌ということで、小方先生お願い致します。

7) B型肝炎ウイルスの肝細胞癌発症機構

新潟大学医学部第三内科学教室 (主任: 市田文弘教授)

小方 則夫

A Mechanistic Role of Hepatitis B Virus in the Development of Hepatocellular Carcinoma

Norio OGATA

*Third Department of Internal Medicine,
Niigata University School of Medicine,
(Director: Prof. Fumihiko ICHIDA)*

We have previously described that 1) integration of hepatitis B virus (HBV) DNA into host chromosomes of hepatocytes occurs at a high frequency during the course of the viral carrier state, 2) hepatocytes containing the integrated viral DNA undergo multiclonal growth, and 3) all hepatocellular carcinomas (HCCs) develop clonally and some HCCs are of multiclonal origins even in a same liver. These findings indicate that HBV related HCC may be established through several steps of

Reprint requests to: Norio Ogata,
Third Department of Internal
Medicine, Niigata University School
of Medicine, Niigata, 951, JAPAN.

別刷請求先: 〒951 新潟市旭町通1番町
新潟大学医学部第三内科学教室

小方 則夫