



Title	分子生物学的に同一クローンの再発を確認しえた biphenotypic leukemia
Author(s)	小野澤, 真弘; 橋野, 聡; 泉山, 康; 米積, 昌克; 千葉, 広司; 近藤, 健; 田中, 淳司; 今村, 雅寛; 浅香, 正博
Citation	臨床血液, 45(2), 161-163
Issue Date	2004-02-29
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/17242
Type	article (author version)
File Information	rinshoketsueki45-2.pdf



[Instructions for use](#)

原稿 No.03-065

短報:

分子生物学的に同一クローンの再発を確認しえた **Biphenotypic Leukemia**

小野澤真弘¹, 橋野 聡¹, 泉山 康¹, 米積昌克¹, 千葉広司¹, 近藤 健¹, 浅香正博¹,
田中淳司², 今村雅寛²

北海道大学医学部第三内科¹, 血液内科^{1,2}

Relapse of biphenotypic leukemia confirmed by molecular study.

Masahiro Onozawa¹, Satoshi Hashino¹, Koh Izumiyama¹, Masakatsu Yonezumi¹,
Kouji Chiba¹, Takeshi Kondo¹, Masahiro Asaka¹, Junji Tanaka^{2,3}, Masahiro
Imamura^{2,3}

¹Department of Gastroenterology and Hematology, Hokkaido University Graduate
School of Medicine

²Department of Hematology and Oncology, Hokkaido University Graduate School of
Medicine

³Hokkaido Leukemia Study Group

連絡者名:小野澤真弘

〒060-8648

住所:札幌市北区北 14 条西 5 丁目

北海道大学医学部第三内科

電話:011-716-1161

Fax:011-706-7867

E-mail:masahiro.onozawa@nifty.ne.jp

小野澤 真弘

緒言

近年、分子生物学的手法が血液悪性腫瘍の診断や治療効果判定に応用されている。特に急性リンパ性白血病(ALL)ではT細胞受容体(TCR)や免疫グロブリン重鎖(IgH)遺伝子のvariable regionを解析することで、モノクロナリティの決定や微小残存病変(MRD)のモニタリングが可能である^{1,2)}。今回我々はBiphenotypic leukemiaの再発症例で初発時と同一クローンであることの確認、およびMRDモニタリングに分子生物学的手法が有用であった一例を報告する。

症例

症例は60歳女性。平成9年10月発症の急性白血病。芽球は形態学上FAB分類ではALL-L2、染色体は正常女性核型であった。表面マーカーはCD10, 19, 13, 33, 34が陽性であり、サザンブロットでIgH-JH、TCR δ -J δ 1の再構成を認めたことから、Catovskyらの診断基準によりBiphenotypic leukemiaと診断した¹⁾。JALSG ALL-97プロトコルにて完全寛解となり、外来経過観察されていた。平

成 14 年 11 月の骨髄検査にて芽球 53.5%を認め再入院となった。染色体は 46,XX、表面マーカーはCD19, 33, 34 陽性、初発時に陽性だったCD10, 13 は陰性であった。Genomic DNAを用いてPCR法によりTCR γ , δ 、IgHのクロナリティ解析を行ったところIgH、TCR γ には再構成を検出できなかったが、TCR V δ 2-D δ 3 の再構成を検出した(Fig. 1A)。塩基配列解析ではV δ 2 とD δ 3 の間に 4 塩基の random sequenceが挿入されていることがわかった。この 4 塩基を含んだ症例特異的オリゴプローブを作成し、各検査ポイントでのPCR産物とハイブリダイズ(PCR-サザンブロット法)することでMRDを評価した(Fig. 1B)。再発時の白血病細胞から抽出した 50ng の genomic DNA を template として serial dilutionによりMRDの検出感度を検討したところ、1000 倍希釈までは検出可能と考えられた(Fig. 2A)。二次性白血病、de novo白血病との鑑別のため、初発時の保存白血病細胞についてもTCR V δ 2-D δ 3 の再構成を確認したところ、同じクローン由来であることが確認された。これにより分子生物学的にも再発であることが証明された。現在、再寛解導

入療法施行後、地固め療法中であるが、TCR δ 再構成を用いたMRDモニタリングは検出感度以下となっている(Fig. 2B)。

考察

疾患特異的な染色体・遺伝子異常を伴わないALLについては、これまで血液学的寛解以降MRDのモニタリングが困難であった。しかし、近年の分子生物学的手法の進歩より、リンパ系腫瘍についてはTCR・IgHのvariable regionを解析することで、症例特異的なMRDマーカーを得ることが可能となった^{2,3)}。我々の症例のようなBiphenotypic leukemiaでも本手法は有用と考えられた。また、本症例は比較的長期寛解持続後の再発であり、表面抗原が初発時と変化していたことから、再発かde novoの白血病かが問題となったが、分子生物学的にも再発であることが確かめられた。個々の症例につき症例特異的オリゴプローブを設定する必要があり、高価な検査ではあるが、今後、コマーシャルベースで可能となれば、MRDを指標にした新たな治療戦略が可能となるだろう。

う。

本症例は表面形質上、骨髄系とBリンパ系のBiphenotypic leukemiaであったが、分子生物学的にはTCR δ の再構成を認めた。このようなphenotypeとgenotypeの不一致例は文献的にも報告されており、このような現象はspill overあるいはdual rearrangementとよばれている⁴⁾。特にprecursor B-ALLにみられるTCRの再構成は頻度が高く90%以上、またT-ALLでは約20%にIgHの再構成を認めるとの報告もある⁵⁾。これらのCross-lineage rearrangementは正常リンパ球や成熟リンパ球の悪性疾患では認められない。このことはALL細胞での遺伝子組換え活性化遺伝子(RAG-1,2)の持続的な活性化と関連づけられている。Biphenotypic leukemiaの臨床的な出現頻度は10%程度と報告されているが、遺伝子の段階ではCross-lineage rearrangementはさらに高い頻度で起きているものと考えられる。

結語

今回我々は **Biphenotypic leukemia** の再発症例で、白血球細胞が初発時と同一クローンであることの確認、および **MRD** モニタリングに分子生物学的手法が有用と考えられる一例を経験した。

文献

- 1) Catovsky D et al.: A classification of acute leukemia for the 1990s. Ann Hematol 62: 15-21, 1991
- 2) van Dongen JJM et al.: Prognostic value of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukaemia in childhood. Lancet 352: 1731-1738, 1998
- 3) Forida YM et al.: Minimal Residual Disease Tests Provide an Independent Predictor of Clinical Outcome in Adult Acute Lymphoblastic Leukemia. J Clin Oncol 20: 1094-1104, 2002
- 4) Hara J, Kawa-Ha K: T-cell receptor and gene assembly in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. Leukemia and Lymphoma 7: 363-370, 1992
- 5) Szczepanski T et al.: Unusual immunoglobulin and T-cell receptor gene rearrangement patterns in acute lymphoblastic leukemias. Curr Top Microbiol Immunol 246: 205-215, 1999

**Relapse of biphenotypic leukemia confirmed by
molecular study**

Masahiro Onozawa¹⁾, Satoshi Hashino¹⁾, Koh
Izumiyama¹⁾, Masakatsu Yonezumi¹⁾, Kouji Chiba¹⁾,
Takeshi Kondo¹⁾, Masahiro Asaka¹⁾, Junji
Tanaka^{2,3)}, Masahiro Imamura^{2,3)}

¹⁾ Department of Gastroenterology and Hematology,
Hokkaido University Graduate School of Medicine

²⁾ Department of Hematology and Oncology,
Hokkaido University Graduate School of Medicine

³⁾ Hokkaido Leukemia Study Group

英文抄録

A 60-year-old woman was admitted to our hospital
to receive treatment for relapse of biphenotypic
leukemia 4 years after initial presentation. Bone
marrow examination revealed 53.5% lymphoblasts,

which were classified as ALL-L2 with normal karyotype. Surface markers of lymphoblasts were positive for both B-cell and myeloid lineage. Immunoglobulin heavy chain and T-cell receptor gene rearrangements were investigated by PCR. Clonal rearrangement of TCR δ V δ 2-D δ 3 was detected. The same clonal rearrangement of TCR δ was found using frozen initial leukemic cells. Her leukemia was confirmed as not secondary leukemia but relapse of the initial clone. Detection of the rearrangement was also useful as a patient-specific marker for minimal residual disease.

Key words: Biphenotypic leukemia, Minimal residual disease, T-cell receptor rearrangement

Figure legends

Fig. 1A TCR V δ 2-D δ 3 rearrangement

PCR showed a monoclonal amplification for the TCR V δ 2-D δ 3 from the patient's sample (lane 5). Lane 1: molecular size marker; lane 2: template (-); lane 3: negative control; lane 4: positive control.

Fig. 1B DNA sequence of the V δ 2-D δ 3 rearrangement

Analysis of the DNA sequence revealed a 4-base insertion between V δ 2 and D δ 3. Random sequences consisting of 0~20 bases are introduced between V δ 2 and D δ 3 by terminal deoxynucleotidil transferase (TdT) activity at the time of TCR rearrangement. A Case-specific oligoprobe that contains 4-base insertion was hybridized with PCR products of each point to confirm monoclonality.

Fig. 2A MRD analysis

Serial dilutions of genomic DNA from leukemic cells at the time of diagnosis of relapse are compared with specimens from each clinical point. A specimen obtained after 6 courses of consolidation chemotherapy (lane 6) achieved molecular CR at the sensitivity of $<10^{-3}$.

Lane 1: template (-); lane 2: 50 ng genomic DNA at the time of diagnosis of relapse; lane 3: 10^{-1} dilution of lane 2; lane 4: 10^{-2} dilution of lane 2; lane 5: 10^{-3} dilution of lane 2; lane 6: specimen from the patient after 6 courses of consolidation chemotherapy.

Fig. 2B Clinical course and TCR rearrangement

Highly sensitive monitoring of MRD is possible by the PCR method. In our case, the monoclonal TCR rearrangement became negative after 6 courses of consolidation chemotherapy.

Fig. 1A TCR V δ 2- D δ 3 rearrangement

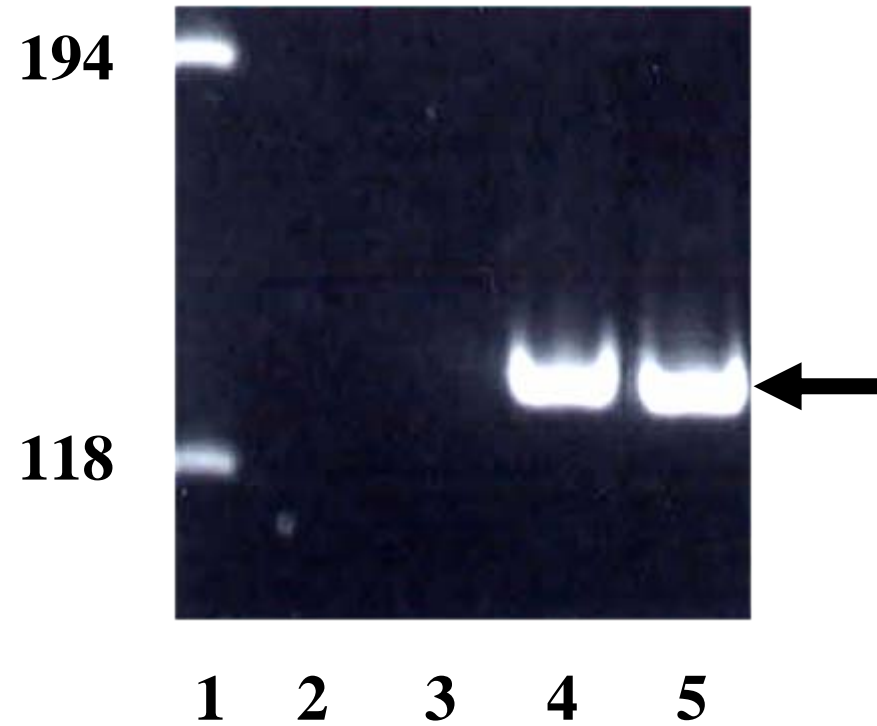


Fig. 1B DNA sequence of TCR V δ 2- D δ 3 rearrangement

5' - GCA CCA TCA GAG AGA GAT GAA GGG TCT TAC TAC
sense primer

V δ 2 ← | | → **D δ 3**
TGT GCC TGT GAC ACC CCC GTA CTG GGG GAT ACG CAC
case specific probe

AGT GCT ACA AAA CCT ACA GAG ACC TGT ACA AAA ACT

GCA GGG GCA AAA GTG CCA TTT CCC T - 3'
antisense primer

Fig. 2A MRD analysis

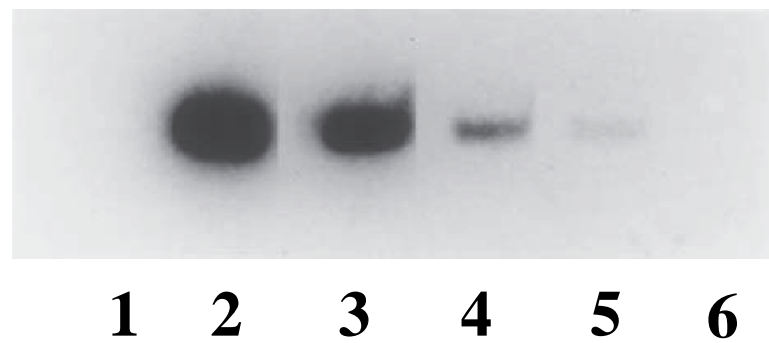


Fig. 2B Clinical course and TCR rearrangement

Date	chemotherapy	hematological status	Karyotype	TCR rearrangement
2002.11.27	on admission	relapse	46,XX[20]	(+)
2003.1.5	after induction	CR	46,XX[20]	N.A.*
2003.1.29	after C-①*	CR	46,XX[20]	(-)
2003.2.26	after C-②*	CR	46,XX[20]	(+)
2003.4.15	after C-③*	CR	46,XX[20]	(+)
2003.5.27	after C-④*	CR	46,XX[20]	(+)
2003.6.19	after C-⑤*	CR	N.A.*	(+)
2003.7.15	after C-⑥*	CR	46,XX[20]	(-)
2003.8.11	after C-⑦*	CR	46,XX[20]	(-)

*C: consolidation

*N.A.: not analyzed