



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	慢性骨髓性白血病の急性転化に関する研究：細胞遺伝学的ならびに分子生物学的検討
Author(s)	田中，英二；森本，美恵；岡部，實裕 他
Citation	北海道大学医療技術短期大学部紀要，2，103-117
Issue Date	1989-11
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/37501
Type	departmental bulletin paper
File Information	2_103-118.pdf



慢性骨髓性白血病の急性転化に関する研究 ——細胞遺伝学的ならびに分子生物学的検討——

田中 英二*・森本 美恵*・岡部 實裕**
老田 誠**・森岡 正信**・宮崎 保**

Studies of the Blastic Crisis of Chronic Myelogenous Leukemia —Cytogenetic and Molecular Biological Findings—

Eiji Tanaka*, Mie Morimoto*, Mihiro Okabe**,
Makoto Oita**, Masanobu Morioka** and Tamotu Miyazaki**

Abstract

Chronic myelogenous leukemia (CML) is characterized by a reciprocal translocation between chromosome 9 and 22, producing the philadelphia (Ph¹) chromosome. The translocation involves a gene rearrangement of the breakpoint cluster region (bcr) gene located on chromosome 22 with the c-abl proto-oncogene on chromosome 9. The hybrid bcr/c-abl gene is transcribed into an abnormal messenger RNA that is translated into an abnormal protein of 210,000 molecular weight. Here, the first, we have performed cytogenetic studies on 42 Ph¹-positive CML patients, including 15 cases of blastic crisis (BC), in order to investigate pathophysiological condition of CML.

29 of 34 cases (85%) in chronic phase of CML showed a standard type of translocation of t(9q; 22q), and 5 of others (15%) showed only a small additional chromosomal changes. On the other hand, in 15 cases of CML-BC, only 33% of cases showed standard type of translocation and 67% showed more additional karyotypic evolutions, showing both numerical and structural changes.

These chromosomal aberrations might be useful diagnostic indications of the blastic crisis of CML, especially in an accelerated form of the BC.

The second, we have analyzed bcr-rearrangement and the expression of abl-related mRNA in Ph¹ positive CML patients (17 cases). In the DNA of all cases examined, rearrangement of bcr could be demonstrated. An analysis of the location of bcr breakpoints indicate that 3' breakpoint were found in almost all the cases. These findings suggest that the activation of abl gene plays an important role in the leukemogenesis of Ph¹-positive CML.

* 北海道大学医療技術短期大学部衛生技術学科

** 北海道大学医学部内科学第三講座

* Department of Laboratory Technology, College of Medical Technology, Hokkaido University

** 3rd Department of Internal Medicine, School of Medicine, Hokkaido University

要 旨

ph¹ 陽性慢性骨髄性白血病 42 症例, 急性転化例 15 症例を含む男性 32 例, 女性 10 例, 年齢 17 才~70 才で平均 40.2 才について分染法による染色体分析の結果, 慢性期では 85.3%が t (9 q⁺; 22 q⁻) の標準転座型 ph¹ を示し, その他の付加的染色体異常例は 15%に過ぎなかった。これに反し急性転化例では標準型は 33%で, 逆に付加的異常例が 67%にみられ, その異常は異数性のみならず構造異常なども含み, 病期の進行とともに極めて多彩な核型に進展した (karyotypic evolution)。つぎに慢性型 10 例, 急性転化例 7 例について Southern blot 法により bcr-再構成を検討したが, 17 例全例において bcr の再構成を認め, しかもその切断点の多くが 3' 側に集中しており bcr-region 以外に切断点を有する例はなかった。急性転化例では慢性期に比し signal の増強がみられ dot hybridization による abl mRNA の検索結果も同様であった。

I. はじめに

慢性骨髄性白血病 Chronic Myelogenous Leukemia (以下 CML と略す) は多能性造血幹細胞の腫瘍化したクローン性の疾患であり, 特徴的なフィラデルフィア染色体 (ph¹) は症例の 95%以上に認められる。さらに近年, 本症骨髄細胞の第 22 番染色体より breakpoint cluster reagon (bcr) がクローニングされ, 第 9 染色体 9 q 34 に位置する c-abl 癌遺伝子が bcr に転位結合し bcr rearrangement (再構成) が起こることが本症の病因であることが明らかになってきた¹⁾。一方造血器悪性腫瘍の化学療法は著しい進歩を遂げ, 悪性リンパ腫や急性白血病は今や curable な疾患となりつゝある。これに対して CML の治療は, 多くの抗白血病剤が登場し寛解率の若干の向上は認められるものの遅々としており, survival time でみる限り, この 50 年

間の進歩は遅くほとんど低迷を続けているのが現状である。一方治療の新しいアプローチとして, 腫瘍細胞の根絶を目指す Clarkson らの強力な化学療法 (L-15 プロトコール)²⁾ や Schwarzenberg らの摘脾³⁾, さらに根治が期待される骨髄移植⁴⁾ 等が試みられるようになった。しかし CML の治療理念の確立に関しては, 今日なお試行錯誤の段階といわざるを得ない。それは本症の natural history において最大の問題点である急性転化 (Blastic crisis, BC) によってほとんどの症例が死の転帰をとるためである。したがって CML-BC をいかに予知, 予防できるかが本症治療のポイントであると云っても過言ではない。われわれは CML-BC の病態を把握すべく, 慢性期 (Chronic phase; CP) および急性転化期 (Blastic phase; BP) について細胞遺伝学的ならびに分子生物学的検索を行い, これらの臨床的意義について考察し本症治療への道を探ってみた。

II. 対象ならびに方法

〔A〕 細胞遺伝学的検索

banding 法による染色体分析をなし得た ph¹ 陽性 CML 42 例を対象とした。男性 32 例, 女性 10 例で年齢は 17 才から 70 才で平均 40.2 才である。臨床病期分類は鎌田ら⁵⁾ の分類に, BC の診断は喜多嶋らの診断基準⁶⁾ に従った。染色体分析は患者の骨髄血を直接または overnight 培養し, 型の如く染色体標本を作製した。核型の決定にはトリプシン・ギムザによる G-band 法で, また複雑な構造異常の分析には蛍光色素を用いる Q-band 法にて正確に分析した。

〔B〕 分子生物学的検索 (bcr 再構成)

CML-CP 10 例, CML-BP 7 例を対象とし, それらの白血病細胞について検索した。すなわち Phenol 抽出法により DNA を抽出し, 制限酵素 Eco RI, Hind III, Bgl II, Bam HI のいずれかにより切断し, Southern blot 法により検索した。

制限酵素切断 DNA を 0.75% agarose gel 電気泳動し、ニトロセルロース膜に転写したのち、nick-translation により ^{32}P 標識した bcr probe と hybridization し、80°C にてオートラジオグラフィーを施行した。3' bcr genomic DNA probe として 1, 2-kb Hind III-Bgl II fragment (Oncogene Science 社, Mineola, N. Y.) を用い、5' bcr genomic DNA probe は Ulm 大学 Dr. G. Assum より供与された 1, 9-Kb Hind III-Bgl II fragment を用いた。これら probe の制限地図を図-1 に示した。

〔C〕 分子生物学的検索 (abl mRNA の検索)

polyadenylated RNA の Northern blot 解析は既報の方法⁷⁾で行った。cellular DNA は guanidine thiocyanate-caesium chloride 法により抽出し、oligo (dT)セルロースカラムにより mRNA を回収した。検体を 7% formaldehyde 含有 1% agarose gel 電気泳動後、Biodyne 膜 (pall, Glen Cove, N. Y.) に blot し、nick-translation した abl-specific probe (pAb3, 1.5Kb Bgl II fragment) と hybridization 後オートラジオグラフィーを行った。

III. 結 果

〔A〕 細胞遺伝学的所見

Ph¹ 陽性 CML 42 例の病像の一部と染色体分析の結果を一括して示した(表-1)。症例 3 は CP 時標準型の Ph¹ のみであったが BP 時には +8, 17 q isochromosome の出現をみた。症例 10, 14 は BP 時 (13; 17) および (1; 17) の転座がみられた。また trisomy で注目されるのは症例 15 の +6, 症例 18 の +7, +15 など、共に BP 時のものである。症例 23 は初診時急転型で第 5 染色体の monosomy のほか、+8 と marker 染色体を有していた。症例 28 は missing Y の一例である。また症例 34 は (9, 14, 22) に転座を示す非標準 complex 型であった。つぎに CML-BC 15 例の臨床病型と染色体異常の種類および出現頻度を表-2 に示した。急性型 7 例、移行型 5 例、腫瘍形成型 3 例で、BP 時にその他の染色体異常が付加されなかった no change 例が 3 例あり全て急性型 BC 例であった。B 群 5 番染色体の monosomy 例は

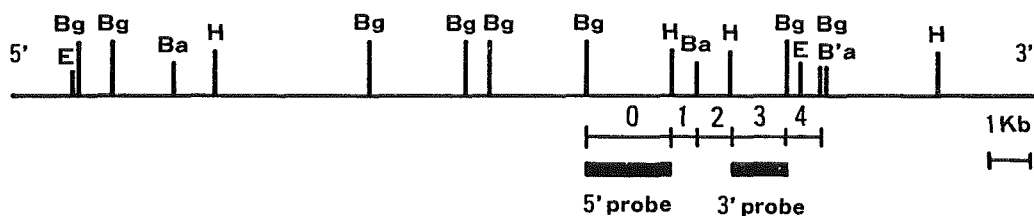


図-1 ヒト bcr 遺伝子の制限酵素地図と bcr genomic probes E : Eco RI, Ba : Bam HI, H : Hind III Bg : Bgl II

表-1 Summarized information on the patients with Ph¹-positive CML.

No.	Name	Age	Sex	spleen (qfb)	survival (mo.)	BC* When karyotyped	Chronosomal changes	
							standard	further changes
1	F.M.	50	M	2.5	13	Yes	+	
2	S.M.	42	M	U**-4	39	No	+	Ph ¹ , +8
3	Y.K.	28	M	5	80	{ No Yes	+	
							+	Ph ¹ , +8, i(17q) Ph ¹ , i(17q)
4	S.N.	25	M	U- 3	28+	No	+	
5	J.M.	53	M	—	53	No	+	
6	H.K.	34	M	—	34	No	+	
7	T.K.	41	M	2	84+	No	+	
8	S.S.	34	M	3	40	Yes	+	Ph ¹ , +8, +17, +19 Ph ¹ , +8, +19 Ph ¹ , +8, +8, +19
9	Y.H.	52	M	U- 2	72+	No	+	
10	S.Y.	43	M	5	35	{ No Yes	+	
							+	Ph ¹ , t(13p ; 17q)
11	M.K.	39	M	5	40	No	+	
12	S.M.	23	F	U- 2	28	No	+	
13	K.N.	45	M	—	18	{ No Yes	+	
							+	
14	E.S.	40	F	U- 3	89	Yes	+	Ph ¹ , t(1p ; 17q) , +Ph ¹
15	T.M.	27	M	U- 3	43	{ No Yes	+	
							+	Ph ¹ , +6, +8, +19, +21, +Ph ¹
16	Y.S.	29	M	5	27	Yes	+	Ph ¹ , +7, +Ph
17	T.M.	61	M	2.5	49+	No	+	Ph, t(6q- ; 13q+)
18	H.S.	36	M	—	24	{ No Yes	+	
							+	Ph ¹ , 21q+ Ph ¹ , +7, +8, +12, +15, 21q+

*BC : Blastic Crisis,

**U : below Umblicus,

慢性骨髓性白血病の急性転化に関する研究

表-1 (続)

No.	Name	Age	Sex	spleen (qfb)	survival (mo.)	BC* When karyotyped	Chronosomal changes	
							standard	further changes
19	J. S.	29	M	5	36	Yes	+	
20	Y. S.	56	M	1.5	41+	No	+	
21	H. N.	28	M	U-5	3	Yes	+	
22	M. M.	64	M	—	32+	No	+	
23	Y. H.	42	M	—	40	Yes	+	Ph ¹ , -5, +8, Mar,*
24	Y. T.	45	M	U-2	34+	No	+	
25	S. O.	55	F	U-2	18	No	+	Ph ¹ , 13q-
26	M. M.	39	M	U-1	30	Yes	+	Ph ¹ , 13q-, -19, Ph ¹
						No	+	
27	T. U.	17	M	—	27+	Yes	+	Ph ¹ , t(7p-; 11p+)
						No	+	Ph ¹ , t(7p-; 11p+), +
28	S. A.	39	M	2	18	No	+	Ph ¹ , -Y
29	M. S.	26	F	4	17+	No	+	
30	Y. M.	17	F	2	2	Yes	+	
31	T. H.	32	F	U-3	23+	No	+	
32	T. Y.	33	M	U-3	48+	No	+	
33	H. O.	65	F	—	40+	No	+	
34	A. T.	22	M	2	13+	No	+	Ph ¹ , t(9q; 14q; 22q)
35	T. W.	70	M	—	9	No	+	
36	Y. H.	47	F	—	12+	No	+	
37	T. N.	50	M	5	6+	No		
38	N. N.	34	F	4	54	No	+	
39	T. N.	41	M	—	43	No	+	
40	Y. M.	33	M	—	22+	No	+	
41	Y. B.	50	F	4	8+	No	+	
42	Y. I.	53	M	2	41	No	+	Ph ¹ , t(3q-; 3q+)

*Mar: Marker Chromosome

表-2 Chromosomal changes of CML in BP (15 cases)

change type	No.	-5, +6, +7,	+8	+12, +15, +17, +i(17q)	+19	+21	+Ph ¹	mar, other transloc.
急性型 7 (47%)	3	1	3	2	1		1	1 1
移行型 5 (33%)		1 1	2	1 1 1	1	1	2	1
腫瘍形成型 3 (20%)		1 1	1		1	1	2	
計	3	1 2 2	6	1 1 2 1	3	2	5	1 2

hypodiploidy を示した唯一の例であり、他は全て hyperdiploidy であった。すなわち急性型では +18, +17 が多く、移行型ではその他の異常の種類が多く、+8, +17, +19, +Ph¹, +17 qⁱ など clonal evolution の major route とされる核型の進展を示した。腫瘍形成型では double Ph¹ の頻度がやや多くみられた。慢性期から急性転化期に進展した例で染色体の追跡調査をなし得た 7 例をみると (表-3)、急性型 BP 2 例のうち 1 例は no change 型、他の一例では標準転座は見られず、非標準単純転座と double Ph¹ の二つのクローンが認められた。移行型の 4 例では付加的染色体異常の種類も多くなり、特

に +7, +12, +15, +19 などが注目され、一例 (No. 3) には 17 q isochromosome がみられた。腫瘍形式型の一例も +6, +19 など additive な異常を示した。次にこれら異常核型を示した例の一部を提示する。写真-1 は症例 3 のもので 17 q isochromosome と double Ph¹ がみられる。写真-2 は症例 15 の腫瘍形成型の BC で +6, +8, +19, +21, それに +Ph¹ など多彩を極めた核型の進展がみられる。写真-3 は症例 34 の CP の karyotype で (9 ; 14, 22) 内で非標準 complex 型の転座を認めた。次に CML 42 例における 49 回の染色体分析結果を表-4 に一括して示した。標準転座型のみ例

表-3 CP から BP への追跡調査例 (7 例)

(A) 急性型 (2例)	No 13	Ph ¹
	No 26	(-), Ph ¹ , t(7p- ; 11p+)/ Ph ¹ , t(7p- ; 11p+), +Ph ¹
(B) 移行型 (4例)	No 3	Ph ¹ /Ph ¹ , +8, i(17q)
	No 10	Ph ¹ /Ph ¹ , t(13p ; 17q)
	No 18	Ph ¹ /Ph ¹ , +7, +8, +12, +15, 21q ⁺
	No 25	Ph ¹ /Ph ¹ , 13q ⁻ , +19, +Ph ¹
(C) 腫瘍形成型 (1例)	No 15	Ph ¹ /Ph ¹ , +6, +8, +19, +21, +Ph ¹

表-4 Chromosomal changes of CML in CP and BP (49 specimens of 42 cases)

	standard Ph ¹	plus additive changes
Chronic Phase	29/34 (85%)	5/34 (15%)
Blastic Phase	5/15 (33%)	10/15 (67%)
Total	34/49 (69%)	15/49 (31%)

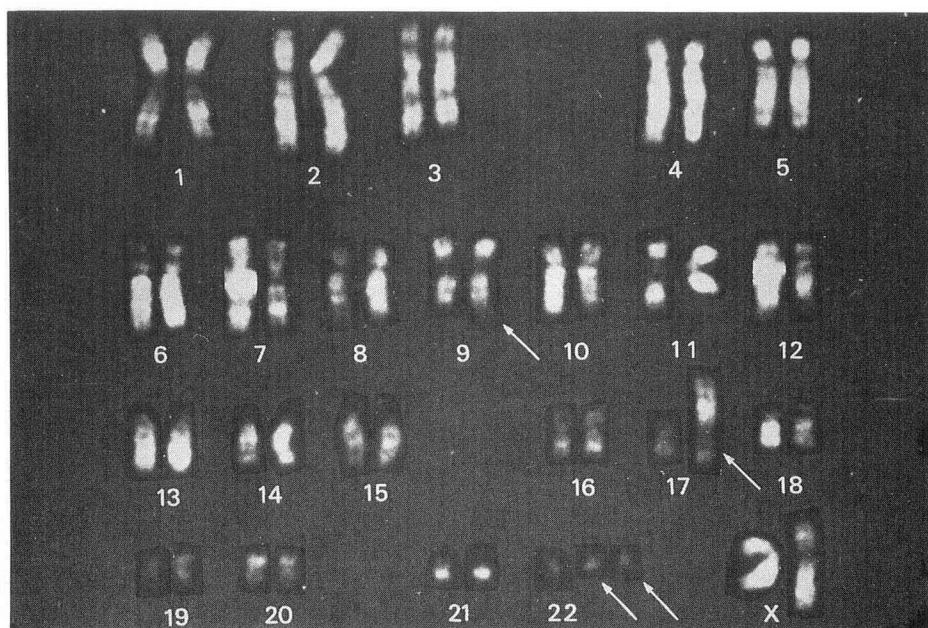


写真-1 (症例3) 標準転座型 Ph^1 と +22 q および 17 q-isochromosome がみられる

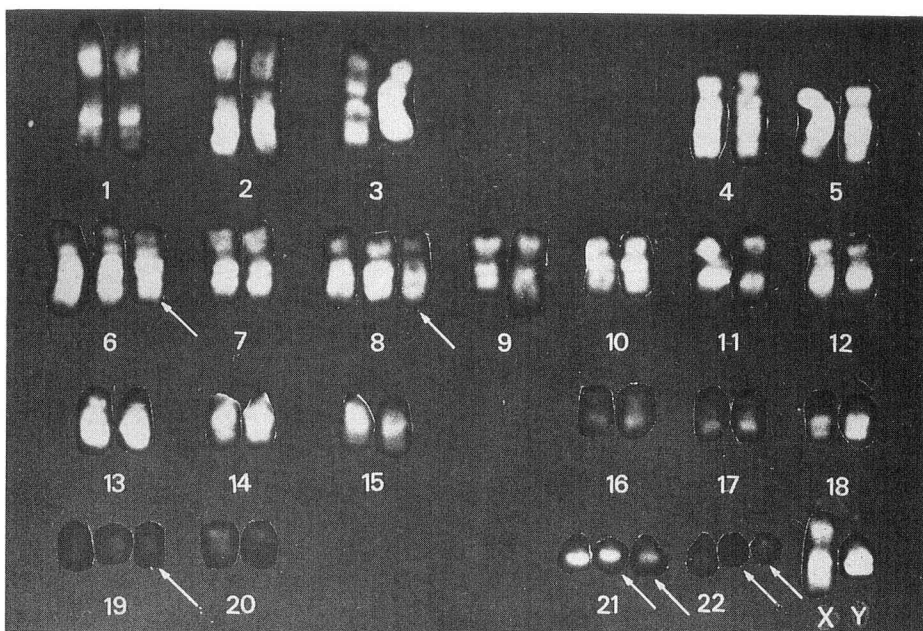


写真-2 (症例15) 腫瘍型成型 BC で +6, +8, +19, +21, +22 (double Ph^1) の核型を示す

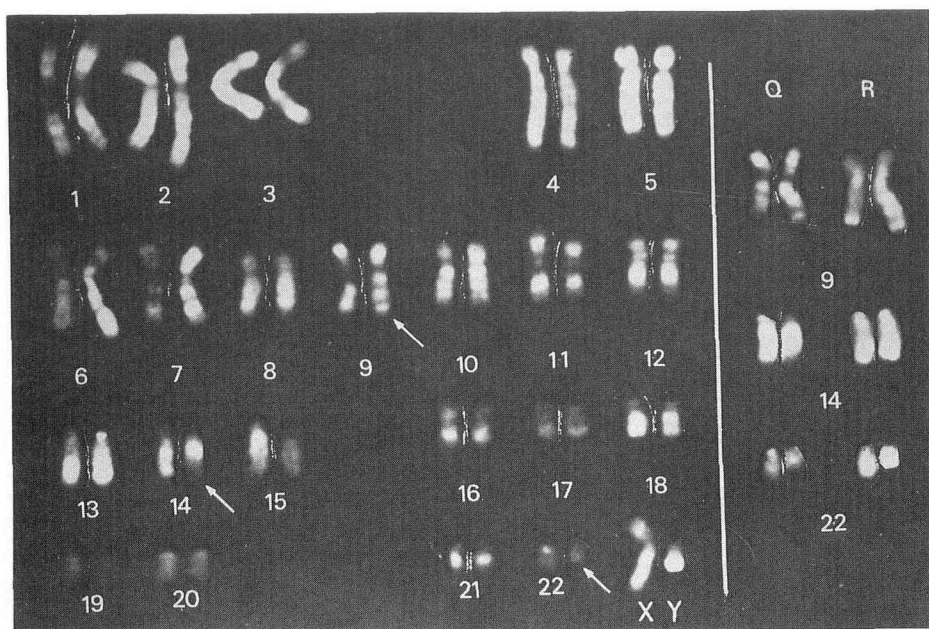


写真-3 (症例 34) 非標準 Complex 型転座 t (9 q ; 14 q ; 22 q) を示す

が 34 例 (69%), 標準転座型に付加的核型異常を伴った, いわゆる karyotypic evolution を示した例が 15 例 (31%) であった。これをさらに慢性期 (CP) と急性転化期 (BP) に分けてみると, CP 34 例中標準転座型のみは 29 例 (85%), その他の付加的異常を呈した例が 5 例 (15%) であったのに比べ, BP で標準転座型のみを示す例は 5 例 (33%) で, 残りの 10 例 (67%) は多彩な karyotypic evolution を示し, その傾向は移行型の crisis に著明であり major route 以外の多くの異常が認められた。

〔B〕 bcr 再構成の検討

検索した CML 17 症例の全例に bcr 再構成を認めた。しかも 3', 5' いずれの bcr probe を用いても Bgl II 処理 DNA で正常の 22 番染色体に由来する 5.0 Kb の germ line のバンドの他に異常バンドがみられた。(図-2)

それぞれの症例における bcr sequence 内での切断点をみたところ, bcr II 領域のエクソン "2" "3" "4" のいずれかの間のイントロン

すなわち bcr の中央から 3' 寄りの部分に切断点が集中しており, 5' 側の Bgl II/Hind III fragment (bcr II 領域) および 3' 側の Bgl II/Bam HI fragment に切断点を認めた例はなかった。また CP 症例 (白丸) と BP 症例 (黒丸) との間には bcr 内での切断点に一定の傾向は見られなかった。(図-3)

〔C〕 abl mRNA の検討

polyadenylated RNA の Northern blot 法による解析では, 正常 abl-mRNA の message である 7.0 Kb の signal に加えて 8.5 Kb の部位に bcr-abl hybride mRNA による異常な signal が認められた⁸⁾(data 未掲載)。CP 症例および BP 症例で bcr-abl mRNA の発現を比較すると, BP 症例ではその signal 発現が増幅している傾向がみられた⁹⁾ (data 未掲載)。また Dot Hybridization による abl 発現も検討したが Northern blot 法によると同様にその増幅が認められた。(図-4)

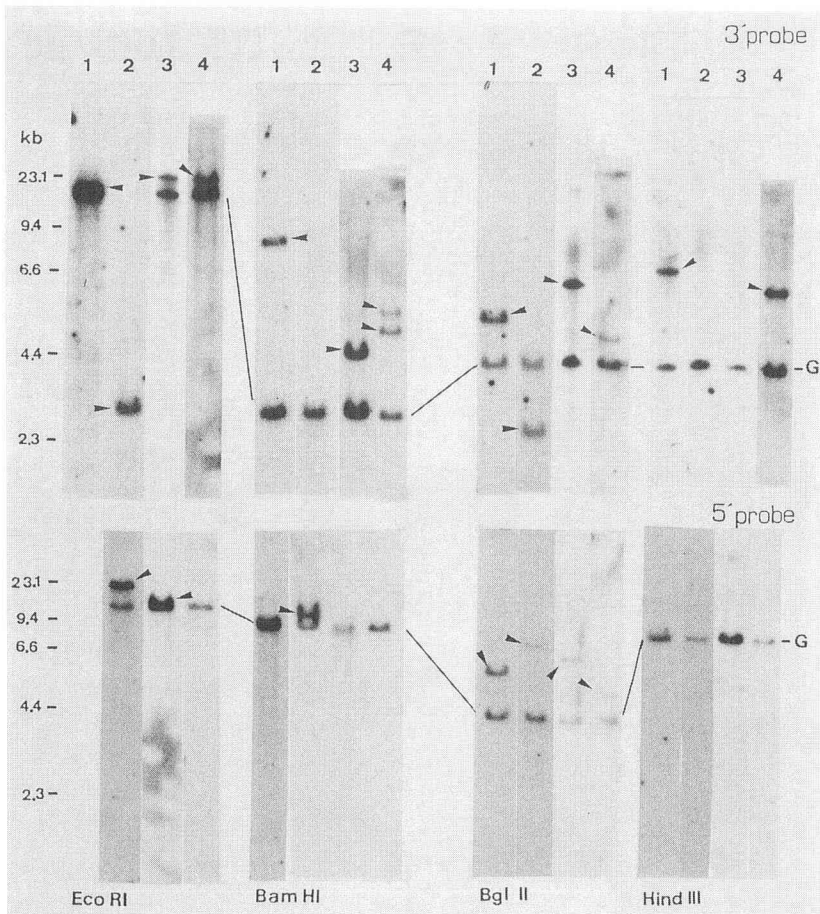


図-2 Southern blot hybridization による *bcr*-再構成
Bgl II による切断では 5Kb, *Bam* HI では 3.3 kb の germline の band がみられたが、症例 1, 2, 3, 4 では矢印の部に再構成 band がみられる

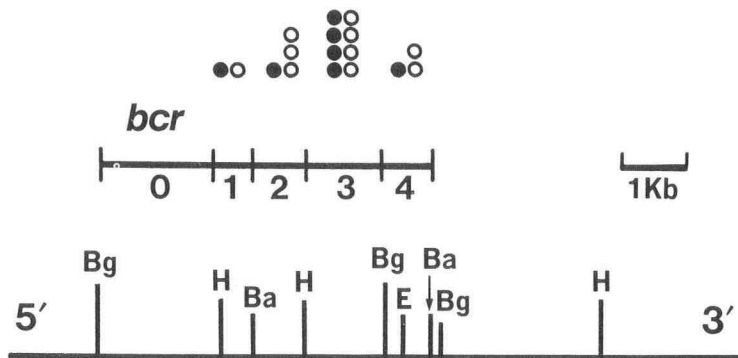


図-3 CML症例における *bcr* 領域内切断点
 ○ : CP 症例, ● : BP 症例

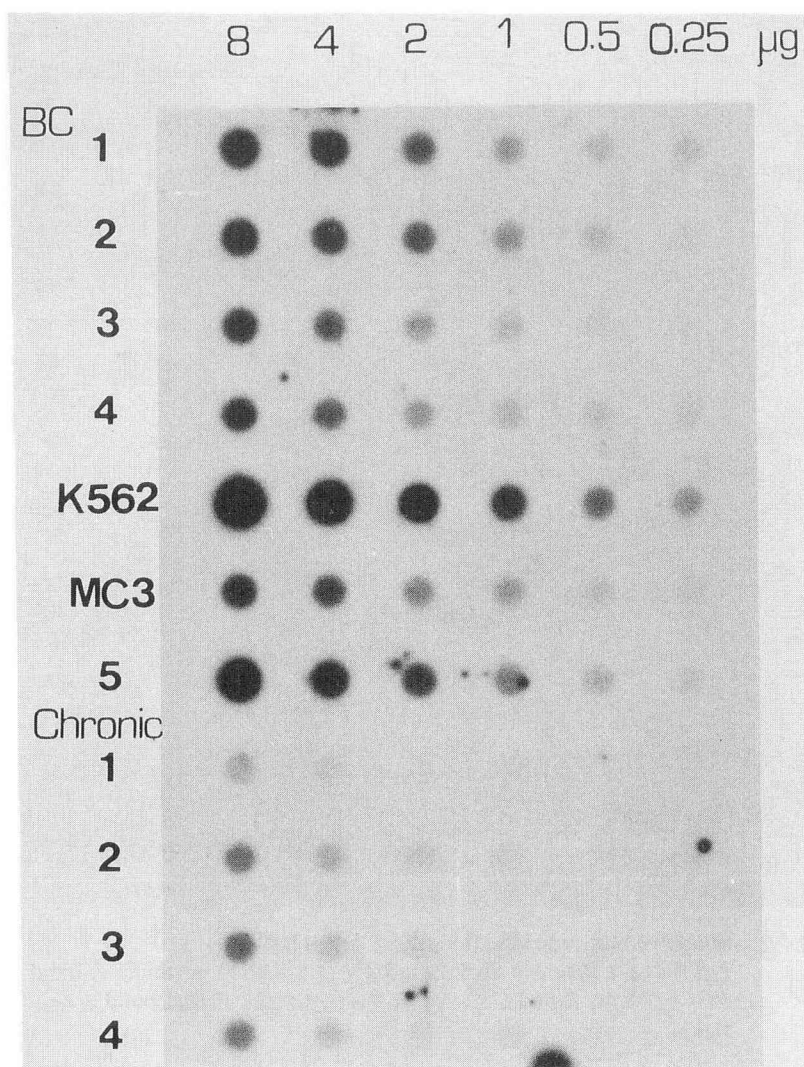


図-4 dot hybridization による *abl* の発現
CML-BC 例では発現の増幅がみられる

IV. 考 擦

近年、急性白血病は新しい抗白血病剤の開発と補助療法の進歩により寛解率、生存期間は飛躍的に向上し、5年生存率も増加の一途をたどり、まさに cure の可能性が云々される時代になっている。しかるに従来比較的症状が軽く経過も長いと考えられていた CML は、種々の治療法の改善にもかかわらず、平均生存期間には

大きな進歩が見られず、現在でも約 3.5 年であり有意の延長とはいい難く、そのほとんどは末期に発症する急性転化により死亡する。したがって CML-BC の病態に関する研究は本症の治療理念確立のためにも必須であり多くの研究報告がある¹⁰⁾¹¹⁾¹²⁾。著者らは Ph^1 陽性 CML-BC の病態研究で、細胞遺伝学的検討の中から karyotypic evolution の多彩な進展を経験した。すなわち 42 例 49 回の染色体分析の結果

CPにおいては標準転座型 Ph¹ 例は 85%であり、その他の付加的異常染色体は 15%に過ぎなかった。これに対して BP での標準転座型は 33%で、逆に付加的異常を示した例が 67%と多数に認められた。この CML-BC での付加的染色体異常は、通常特定の染色体の獲得による高二倍体 (hyperdiploidy) を示すことが多いが、欠失や構造異常のこともある。Mittelman ら¹³⁾ は BP で 80%以上の付加的異常を認め、+8, +19, +22 q (double Ph¹), i (17 q) などを観察報告している。また貞森ら¹⁴⁾ も 26 例中 19 例 (73%) に認めている。これらの変化を経時的に観察すると、大多数の症例では核型の進展が stepwise に認められることから、この核型の変化は clonal evolution と呼ばれている。1970 年染色体分析に分染法が導入され、個々の染色体の同定が容易に行われるようになり、特に BP における種々の異常が新しいクローンによるものであることが分かってきた。Ph¹ 染色体の転座に関しては症例 10, 14 の BP 時に (13; 17) および (1; 17) がみられた。このような第 9 番染色体体外の染色体に転座する例は Hayata ら¹⁵⁾ が (2; 22) 転座を報告して以来、種々の転座例の報告が相次ぎ、Nos. 1, 7 を除くすべての染色体が Ph¹ 転座に関与することが知られている¹⁶⁾。しかしこのような variant 型は全体の 2-10%といわれ¹⁷⁾、そのほとんどが (9; 22) の標準転座でありきわめて non-random な evolution といえる。trisomy では症例 15, 18 の BP で +6 および +7, +15 などが注目されたが、頻度の多いものは諸家の報告¹³⁾¹⁸⁾ と一致して +8, +19, +22 q であった。また構造異常では i (17 q) が症例 3 の一例にみられたが、これは CP 時のもので、BP 時には i (17 q) + α の型をとっていた。missing-Y (Y 染色体欠失) は症例 28 の一例のみであった。一般に Y 欠失現象は 60 才以上の健康な高齢者にも暫々みられるともいわれ¹⁹⁾、CML での Y 欠失は当初、経過緩慢で急性転化しにくく長期生存

例が多いといわれていた。しかし、三上らの集計²⁰⁾によると Y 欠失 CML 42 例の平均生存期間は 40.5 ヶ月で、一般の CML の 42 ヶ月²¹⁾ に比し差は認められなかったという。著者らの例では 39 才であった。なお症例 34 は CP 時に標準転座型クローンの他に t (9 q; 14 q; 22 q) のごとく 22 番染色体断片が 9 q 以外に転座していた。このような例は variant 転座型の一つで複雑相互転座 (complex 型 Ph¹ 転座) といわれ、Y 染色体以外のすべての染色体を含む complex 型 Ph¹ が報告されている¹⁷⁾。阿部ら²²⁾ は 170 例を集計し、その 60%が 9 番、22 番とさらに一つの染色体からなる complex-Ph¹ であったと報告している。これらのことから CML の発症には 22 q 11 および 9 q 34 の変化が基本的な重要な意味を持つことが症例の染色体解析から想定される²³⁾²⁴⁾。以上 CML-BC における付加的染色体異常は、高二倍体などの数的異常や marker 染色体の出現など極めて多彩であったが、中でも +8 + α , +19 + α , +22 + α (double Ph¹), i (17 q) + α などに異常が集中しており、これらの変化が at random に起こっていることは考え難い¹⁴⁾。特に著者らは近年その臨床診断が困難といわれている移行型急性転化例で 10 種類の付加的染色体異常を認めたので、頻回の染色体分析が本型 BC の早期予知、発見に有用であろうと考えている。しかし CML-CP および BP の染色体分析による診断は 9 q 34 が染色体末端部であるため、22 q 11 に転座している染色体断片は分染法を用いても光学顕微鏡で確認することは通常困難であり、自づと限界があった。近年 CML における Ph¹ 転座は分子生物学的手法、すなわち DNA レベルで解析されるようになり、転座による癌遺伝子の転位が CML 発症に重要な役割を演じていることが示唆されている。これにより従来の細胞遺伝学的解釈の再検討を余儀なくしている部分もあるが、それは Ph¹ 染色体が発見当初 21 番染色体に存在すると信じられていたり、通常のギムザ

染色で Ph¹ 染色体が見られないにもかかわらず、分染法で 22 q 11 の変化が証明される例 (masked Ph¹ 染色体) もある図式と同じで、科学技術の進歩とともに見えないものが見えてくるのは至極当然の経緯であったと思われる。

CML の診断は Ph¹ 染色体の存在は極めて有用ではあるが、これが CML の造血細胞の異常増殖とどのようにかかわっているのかは未だ充分明らかでない。しかし Ph¹ 染色体と関連して認められる bcr-abl 遺伝子の存在は、Ph¹ 染色体が CML 発症の要因の一つであるとの考えをかなり確かなものとしている²⁵⁾。染色体は図-5 に示すごとく、22 番染色体と 9 番染色体の間の相互転座 (reciprocal translocation) によって起った異常であるが、その際 22 番染色体上の 5.8 Kb という非常に限られた領域 (break point cluster region ; bcr region) に 9 番染色体の 9 q 34.1 に存在する発癌遺伝子 c-abl が

結合して bcr-abl の新しい DNA が形成される。元来 c-abl 遺伝子は 7.0 Kb と 6.0 Kb の mRNA を転写しているが、CML で新しく作られた b-cr-abl の hybrid 遺伝子は両方の遺伝情報を有し、その転写産物は正常より大きい 8.5 Kb の bcr-abl のキメラ mRNA をも転写するようになる。この 8.5 Kb の mRNA は正常の p 145 蛋白とは異なり、p 210 蛋白に翻訳される。p 210 蛋白は p 145 蛋白が持っていない tyrosine kinase 活性を有し、この活性蛋白が CML の発症に関与していることが想定されている²⁶⁾。Ph¹ 陽性 CML の中には、bcr 領域内に切断点が存在することを示す bcr 再構成を認めない例もある²⁸⁾。これらを勘案の上 Groffen らは Ph¹ に関係の深い 22 番染色体上の DNA sequence を bcr を含めて Ph¹ 遺伝子と名付け²⁹⁾、bcr は Ph¹ の一部であるとしている。したがって bcr 再構成を認めない Ph (+) CML で

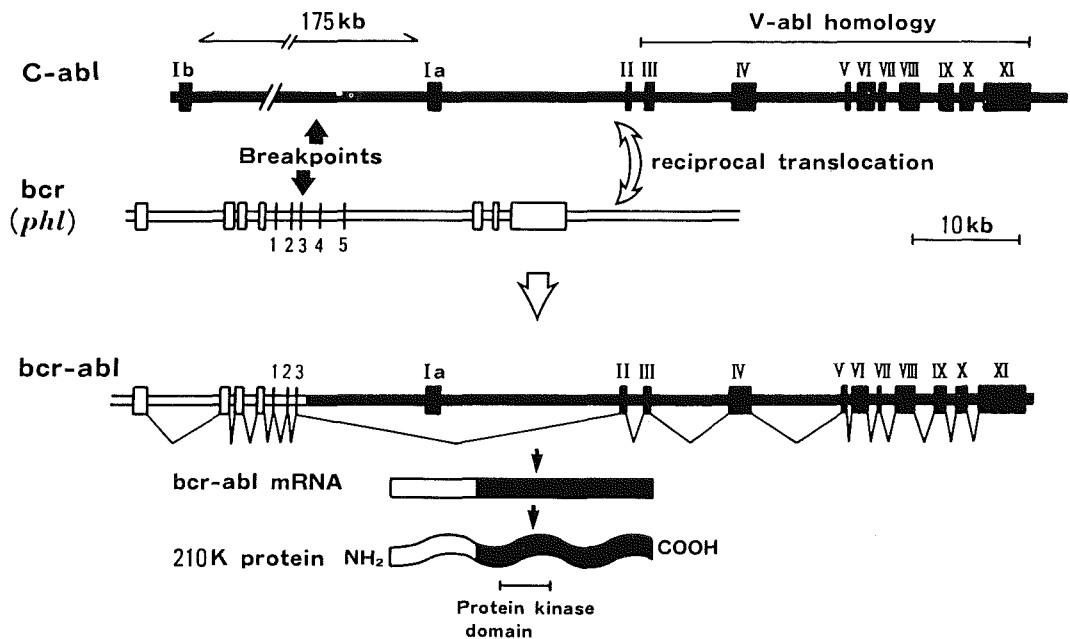


図-5 c-abl 癌遺伝子と bcr との相互転座の模式図
下段は bcr-abl hybrid 遺伝子が新しい異常たん白 (p-210) を転写産生するところを示す

も Ph¹ 内で切断が起こっている可能性があることになる。

22 番染色体における Ph¹ の切断点は上述のごとく DNA の 5.8 Kb のシークエンス内で生じるが、この中での切断点の相違と臨床病期に関する研究は Shaefer-Rogo の報告³⁰⁾がある。それによると CML-CP の大多数でその切断点は bcr の 5' 側領域 (Ph¹ 上の bcr sequence に特異的) に存在するのに対して CML-BC では 3' 側領域 (9 番染色体が転座する bcr sequence に特異的) に存在することから、急性転化と bcr の 3' 側領域での切断との間に関連性があると述べている。しかし、それに対する反論³¹⁾もある。著者らの成績では CML 17 例の全例に bcr 再構成を認めたが、それぞれの症例における bcr sequence 内での切断点と臨床病期の間には明らかな関連性を見出し得なかった。しかし abl-mRNA で検討すると、CML-BC 症例は CP 例に比し当該遺伝子が増幅している傾向を認めた。Collins ら³²⁾は CML における芽球は成熟顆粒球に比し abl-mRNA の発現が強いと報告しており、CML-BC に伴う本現象が CML-BC の原因となるのか、あるいは単なる結果なのかは現時点では断を下し得ない。また BP の中でも CP と同様にその発現が低値を示す例が報告されており、bcr-abl transcript が CML の細胞増殖に重要な役割を果たしていると思われるが、その増幅のみで BC を惹起する分子遺伝学的機序を説明するには未だ確証に乏しいというのが現状である。著者らの一人 Okabe³²⁾は NIH3T3 細胞を用いた *in situ* transfection assay により、CML-BC では N-ras 癌遺伝子が活性化されている症例のあることを明らかにした。また Bishop らの group も *in vitro* transfection assay で ras-遺伝子の point mutational な活性化を証明している。これらの事実は CML-BC では abl-癌遺伝子と密接に関連した CML 増殖に加えて、さらに ras-遺伝子 family を含む transforming 遺伝子が関与する可能性

を示唆している。CML-BC にともなう付加的染色体異常の分子遺伝学的機序の解析と、従来の cytogenetics では明らかにし得ない癌遺伝子の point mutational な活性化の解析、さらにそれらと abl-遺伝子の絡み合い等の詳細な解析は CML-BC の機序解明は勿論、leukemia の multi-step process の解明にも貴重な示唆を与えるものと思われる。今後細胞遺伝学の分野では超精度分染法による染色体のより詳細な分析が、また分子生物学の分野では Polymerase Chain Reaction (PCR) などの手法により Southern blot 分析では認められないほど微量の bcr rearrangement を増幅することにより、わずかに残存しているキメラの bcr-abl 転写産物の検出も可能になってくると思われるので、これらの科学技術の総合的進歩発展により CML の発症ならびに CML-BC の病態が近い将来一元的に解釈され、それが本症の診断あるいは治療に貢献することが期待される。

V. 結 語

1) Ph¹ 陽性 CML 42 例の染色体分析の結果、慢性期 34 例中、標準転座型のみは 29 例 (85%)、その他の付加的異常例は 5 例 (15%) であり、+8, Y 欠失, 13q⁻, t(3q⁻; 3q⁺), t(6q⁻; 13q⁺), t(9q; 14q; 22q) などがみられた。

2) 急性転化 15 例中、標準転座型のみは 5 例 (33%) であり、残りの 10 例 (67%) は多彩な Karyotypic evolution を示し、臨床病期の進行とともに核型も進展した。

3) Southern blot 法による bcr の再構成の検討では、17 症例の全てに bcr 再構成を認め、その切断点は 3' 側に集中していた。

4) abl mRNA の Northern blot 分析では、正常 abl mRNA の signal である 7.5 Kb の他に 8.5 Kb の位置にも bcr-abl hybrid mRNA による異常な signal を認めた。しかもこの signal は CP 時よりも BP 時に増幅される傾向

にあった。

5) Dot Hybridization 法による *abl* 発現の検討でも Northern blot 法によると同様にその増幅が認められた。

(稿を終るに臨み、染色体分析の御協力をいただいた北海道大学理学部附属動物染色体研究施設佐々木本道教授ならびに元大学院生富安孝文先生に深謝いたします。なお本症例の一部は第43回日本血液学会総会ならびに第50回日本血液学会総会シンポジウムで報告した。)

Key Words : CML Blastic Crisis Complex ph^1
Karyotypic Evolution *bcr* gene *c-abl* gene
bcr Rearrangement *bcr/c-abl* Hybrid mRNA

文 献

- 1) Cananni E. et al. : Altered transcription of oncogene in chronic myeloid leukemia. *Lancet* 1 : 593-595, 1984
- 2) Goto T. et al. : Growth characteristics of leukemic and normal hematopoietic cells in $Ph^1(+)$ CML and effects of intensive treatment. *Blood* 59 : 793-808, 1982
- 3) Schwarzenberg L. et al. : Hydroxyurea, leucopheresis and splenectomy in CML at the preblastic phase. *Brit. Med. J.* 1 : 700-703, 1973
- 4) Champlin R. et al. : The role of bone marrow transplantation in the treatment of chronic myelogenous leukemia. *Recent Advances in Bone Marrow Transplantation*. ed. by Gale R. P., Alan R. Liss Inc. N. Y. 141-158, 1983
- 5) 鎌田七男他 : CML 急性転化時の染色体異常—とくに E 17 の異常例について. *臨床血液* 17 : 233-234, 1976
- 6) 喜多島康一他 : 慢性骨髄性白血病の早期診断, 早期治療に関する臨床的研究. *臨床血液* 13 : 560-568, 1972
- 7) Okabe M. et al. : Establishment and characterization of a cell line¹ TOM-1¹ derived from a patient with Ph^1 -positive ALL. *Blood* 69 : 990-1189, 1987
- 8) 岡部実裕他 : Ph^1 陽性 ALL における *bcr* 再構成と *c-abl* 遺伝子発現. *医学のあゆみ* 140 : 525-526, 1987
- 9) Okabe M. et al. : Ph^1 positive leukemia ; Molecular analysis of *bcr* and *abl* genes and transforming genes. *Acta Haematol JPN.* (in press)
- 10) 八尾栄一他 : 慢性骨髄性白血病の急性転化後の予後に関する細胞遺伝学的研究. *臨床血液* 25 : 1183-1189, 1984
- 11) Boggs D. et al. : Hematopoietic stem cell theory in relation to possible lymphoblastic conversion of chronic myeloid leukemia. *Blood* 44 : 449-453, 1974
- 12) 渡辺英二他 : 慢性骨髄性白血病の予後に関する統計的検討, *日血会誌* 51 : 582-586, 1988
- 13) Mittelman F. et al. : Non-random karyotypic evolution in chronic myeloid leukemia. *Int J Cancer* 18 : 24-30, 1976
- 14) 貞森直樹他 : 慢性骨髄性白血病の急性転化指標に関する細胞遺伝学的研究. *臨床血液* 21 : 600-605, 1980
- 15) Hayata I. et al. : New translocation related

- to the Philadelphia chromosome. *Lancet* ii : 1385, 1973
- 16) Misawa S. et al. : Cytogenetic studies of chronic myelocytic leukemia. I. Chromosome constitution of chronic myelocytic leukemia in the chronic phase and blastic phase. *Kyoto Pref Univ Med* 87 : 807—831, 1978
- 17) De Braekeleer M. et al. : Variant translocation in chronic myeloid leukemia. *Cytogenet Cell Genet* 44 : 215—222, 1987
- 18) 橋本哲男他 : 造血器腫瘍染色体異常における異常型相互関連性の解析. *臨床血液* 28 : 1990—1999, 1987
- 19) Pierre R. et al. : Age associated aneuploidy : Loss of chromosome from human bone marrow cells with aging. *Cancer* 30 : 889—894, 1972
- 20) 三上素子他 : 被爆者にみられた 45 X, -Y, CGL の一例とその文献的考察. *臨床血液* 19 : 139—146, 1978
- 21) 鎌田七男他 : 慢性骨髄性白血病 55 例における細胞遺伝学的研究—急性転化 17 例を含む. *日内会誌* 61 : 70—77, 1972
- 22) 安部達生他 : 細胞遺伝学, 慢性骨髄性白血病, 柴田昭編, 初版, 西村書店, 29—89, 1986
- 23) Rowley J. D. et al. : Ph¹ positive leukemia, including chronic myelogenous leukemia. *Clin Haematol* 9 : 55—86, 1980
- 24) Sandberg A. A. et al. : The cytogenetics of chronic myelocytic leukemia : Chronic and blastic crisis. *Cancer Genet Cytogenet* 1 : 217—228, 1980
- 25) Heiterlamp N. et al. : Structural organization of the bcr gene and its role in the Ph¹ translocation. *Nature* 315 : 758—761, 1985
- 26) Ben-Neriah Y. et al. : The chronic myelogenous leukemia specific p210 peotein is the product of the bcr/abl hybrid gene. *Science* 233 : 212—214, 1986
- 27) Sella L. et al. : Philadelphia positive chronic myeloid leukemia with a chromosome 22 breakpoint outside the breakpoint cluster region. *Blood* 70 : 1659—1664, 1987
- 28) Stam K. et al. : Evidence that the phl gene encode a 160,000-dalton phosphoprotein with associated kinase activity. *Mol Cell Biol* 7 : 1955—1960, 1987
- 29) Schaefer-Rego L. et al. : CML patients in blast crisis have breakpoints localised to a specific region of the bcr. *Blood* 70 : 448—455, 1987
- 30) Mills K. et al. : The site of the breakpoint within the bcr is a prognostic factor in Philadelphia-positive CML patients. *Blood* 72 : 1237—1241, 1988
- 31) Collins S. J. et al. : Chronic myelogenous leukemia : Amplification of a rearranged c-abl oncogene in both chronic phase and blast crisis. *Blood* 69 : 893—898, 1987