

慢性骨髄性白血病における BCR 再構成部位と臨床経過に関する検討

神山 憲王, 島原 将精, 大槻 剛巳*, 井上 孝文*, 岡本 直人*,
白戸 りさ*, 神崎 暁郎*, 山田 治*, 八幡 義人*

慢性骨髄性白血病 (CML) では, 特有の染色体転座に伴って, 9 番染色体上の癌遺伝子 ABL と 22 番染色体の BCR の再構成が生じ, 近年, この検索は, 診断上不可欠になってきている. 最近では, BCR 遺伝子内の切断部位により, 慢性期 (CP) の期間が異なるとの報告もみられ, この BCR 再構成は予後を検討するうえでも, 重要な情報である可能性が示唆されつつある. 今回, 当科で経験した 6 例の CML において, BCR 再構成の検査結果より切断点の存在する部位を推定し, それぞれの臨床経過と照らし合わせたところ, BCR の中でもより 5' 側に切断点を有する症例が, 現在までのところ CP のままであることが判明した. 今回は, 少数例の検索であるため, 明確な結論には至らないが, 今後症例を積み重ねて, 予後判定としての BCR 再構成の検討を加えていきたい. (平成 3 年 10 月 19 日採用)

Correlation of Localization of Breakpoints in BCR Gene and Clinical Course in Patients with Chronic Myelogenous Leukemia

Norio Kamiyama, Masakiyo Shimabara, Takemi Ohtsuki*,
Takafumi Inoue*, Naoto Okamoto*, Lisa Shirato*, Akio Kanzaki*,
Osamu Yamada* and Yoshihito Yawata*

Recent advances in molecular biology have made the confirmation of rearrangement of the BCR (breakpoint cluster region) gene on chromosome 22 necessary for the diagnosis of chronic myelogenous leukemia (CML). This rearrangement is caused by chromosomal translocation of the Philadelphia chromosome, t (9; 22) (q34; q21), and by the formation of a hybrid gene of an ABL oncogene on chromosome 9 and a BCR gene on chromosome 22.

In addition, some reports have demonstrated a positive correlation between the localization of the breakpoints in the BCR gene and the duration of the chronic phase in CML patients.

In this study, we investigated the correlation between the localization of the breakpoint and the duration of chronic phase in six CML patients diagnosed in our hospital. In three of the six patients, who have been in the chronic phase over 22 months observation, the breakpoints in the BCR gene are localized in the 5' region of the BCR. Although our experience is very much limited due to the small number of

川崎医科大学 内科
〒701-01 倉敷市松島577
* 同 内科血液部門

Department of Medicine, Kawasaki Medical School:
577 Matsushima, Kurashiki, Okayama, 701-01 Japan
Division of Hematology, Department of Medicine

patients, these results have confirmed previous findings which showed that the patients with localization of the BCR gene in the 5' region had a chronic phase of longer duration than other patients with 3' BCR breakpoints. In our future studies, we intend to carry out molecular analyses of BCR gene rearrangements to help us determine the CML patient's prognosis, and we believe it may be useful for choosing the most adequate treatment for this disorder. (Accepted on October 19, 1991) *Kawasaki Igakkaishi* 17(3): 237-244, 1991

Key Words ① CML ② BCR ③ Molecular diagnosis

はじめに

近年、慢性骨髄性白血病 (chronic myelogenous leukemia: CML) では、Philadelphia (Ph¹) 染色体と呼ばれる、特有の染色体転座: t(9;21)(q34;q21) により、9番染色体上の癌遺伝子 ABL が、22番染色体の BCR (breakpoint cluster region) 領域に移動し、BCR-ABL の再構成が起きることによって hybrid DNA ができ、それによって正常とは異なるチロシンキナーゼ活性をもった蛋白: P-210 が翻訳されることが知られてきている。^{1)~3)} よって、実地臨床の場合においても、この解析は CML の診断上、不可欠の検査となっている。

しかし、最近になって BCR 遺伝子の切断点は三つの部分 (major BCR: M-BCR と minor-BCR-1 および minor-BCR-2) に集中していることが明らかになってきた。⁴⁾ さらに、M-BCR 領域は、ほぼ 5.8 kilobases (kb) の長さを持ち、この中をいくつかの fragment に分割すると、切断点の位置する fragment の部位によって、ある程度の臨床経過との相関が得られるといった報告も認められてきている。^{5)~8)}

今回、少数例ではあるが当科で経験した 6 例の CML において、BCR 再構成の検査結果より、M-BCR 内の切断点の位置する fragment を解析し、臨床経過と比較検討を試みたので報告する。

対象と方法

1) 症例

症例は、昭和62年より平成2年の間に当科に受診した CML のうち、染色体検査、BCR 再構成の検索をし、現在も経過を観察中の 6 例とした。男性 3 例、女性 3 例で、年齢は 34 歳から 64 歳 (中央値 49 歳) であった。Table 1 に、それぞれの症例の初診時の血液学的臨床所見をまとめて示す。症例 1 を除いて、いずれの症例も、初診時は慢性期 (chronic phase: CP) で軽度の貧血と、1 例 (症例 2) を除いて、種々の程度の血小板増多を認め、症例 2 以外では、好塩基球増多も認められた。また、半数では、著しい脾腫を認めた。

2) BCR 再構成の解析

BCR 再構成の解析は、各症例の骨髄穿刺液より得られた腫瘍細胞から、高分子 DNA を抽出し、サザン法⁹⁾ に行行った。高分子 DNA の切断には、制限酵素 BamH I (B) および BglII (Bg) を用い、BCR 3' probe としては human bcr-probe 1¹⁾ を用いた。切断 DNA を電気泳動後、ナイロンフィルターに転写し、ビオチン標識されたプローブとハイブリダイゼーションを行行った。なお、CML に合致する明らかな臨床所見と、染色体異常が認められたにもかかわらず、BCR 3' probe でのサザン法では、異常バンドが検出されなかった症例については、BCR 5' probe として human bcr-probe 2¹⁰⁾ を用いて、再度ハイブリダイゼーションを行行った。

3) BCR 遺伝子の切断部位と fragment の解析

M-BCR 遺伝子内の切断点の解析と、臨床経過との間の関係を見るために、Shtalrid ら⁹⁾、Morris ら¹¹⁾ の報告に従って、M-BCR を各種制限酵素の認識部位で分画した (fragment : F 0 ~ 4)。それぞれの fragment と M-BCR の制限酵素地図との関係は **Figure 1** および **2** に示したとおりである。サザン法の結果より得られた、異常バンドの長さから、各症例における切断 fragment 部位を推定した。

結 果

1) BCR 再構成

それぞれの症例についての、3' probe を用いたサザン法にて検出された異常バンドの長さ、あるいは 3' probe で異常バンドが検出されなかった場合、5' probe を用いた場合に異常バンドが検出されたかどうかを、**Table 2** にまとめて示す。異常バンドの長さは、各症例間で一定の傾向はなかった。また、3' probe で異常バンドが検出されなかった症例 2 および 3 においては、5' probe を用いた検索では、異常バンドが検出された。

2) 切断 fragment の推定

症例 1 では、3' probe を用いて、制限酵素 B 処理および Bg 処理のいずれでも 6.0 kb の異常バンドが検出されている。もし、切断点が F1 であるならば、B 処理では正常 3.3 kb より長いバンドは検出されないはずであるし、また、F3 であるならば、いずれの酵素処理でも 2 本の異常バンドが検出されなければならない。F4 ならば、Bg 処理にては、異常バンドが検出されない。よって、F2 に切断点が存在することが想定される (**Fig. 1**)。

症例 2 では、3' probe を用いた場合、異常バンドが検出されていない。このことより推測される切断部位は F1 よりも 5' 末端側の F0 か、もしくは M-BCR 周辺での切断が起こっていないような場合である。一方、5' probe でのサザン

法では、B および Bg 処理のいずれでも異常バンドが検出され、F0 もしくは F1 に切断点が存在することが示唆された。よって、本例の切断点は F0 に存在すると想定された (**Fig. 2**)。

このように、推定していくと、症例 3、4 および 5 では、それぞれ F0、F4 そして F1 が、切断点の存在部位となる。

症例 6 では、3' probe を用いた B 処理の場合、6.0 kb と 4.0 kb の 2 本の異常バンドが、Bg 処理では 2.0 kb の異常バンドが検出された。B 処理の結果からは、F2、F3、および F4 のいずれもが、Bg 処理の結果からは F3 が切断部位として適当と考えられる。しかし、切断点が F3 内の 1 カ所のみであるとするならば、B 処理の場合、異常バンドは 1 本のみしか検出されないこととなり、B 処理で検出され、Bg 処理では検出されない切断部位としては、F4 を推定するのが妥当と考えられる。ABL 遺伝子の切断点は、比較的多様性を示すことが報告されており¹²⁾ また、ABL の切断点が 2 カ所ある可能性も否定し得ないが、その場合 Bg 処理で複数本の異常バンドが検出されると想定される。よって、本例では F3 と F4 を、切断部位とした。

以上により推定された各症例の切断 fragment の結果を、**Table 2** に示した。

3) 臨床経過との関係

Table 3 に切断 fragment、各症例の現在の病期、慢性期の期間、治療をまとめて示す。

今回の検討の対象とした 6 例のうち、現在、症例 2、3 および 5 は CP、症例 6 は、平成 2 年 4 月初診の CP 例であったが、平成 2 年 10 月上旬より好塩基球増多、好中球アルカリホスファターゼスコアの上昇傾向が認められ、移行期 (accelerated phase : AP) への進行が疑われている。また、症例 1 は、昭和 59 年近医初診で、昭和 63 年、巨核球系への急性転化 (blastic crisis : BC) にて当科初診の症例である。いったんは CP へ導入し得たものの、平成 3 年 4 月再び巨核球系 BC を呈し、治療のかいなく 8 月に死亡した。また、症例 4 は、平成元年 6 月初診、AP が疑われていたが、同年 12 月リンパ系 BC へ移行、以後化学

Table 1. Clinical findings at diagnosis

Case	Age/Sex	WBC ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	Hb (g/dl)	Plat. ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	Blast (%)	Eosino. (%)	Baso. (%)	LDH (IU/l)	Vit. B12 (pg/ml)
1	53/M	66.6	10.6	658	2.5	4.0	12.0	516	NE
2	67/F	132.0	10.8	233	(+)	1.0	2.5	576	6,616
3	40/M	124.8	10.5	848	1.0	5.0	7.0	753	7,131
4	57/F	23.0	12.0	1,551	0	4.5	7.0	120	3,386
5	34/M	20.6	14.1	320	0	2.5	5.0	271	4,759
6	38/F	70.2	9.5	490	1.5	4.0	4.5	244	45,474

NE ; not examined, NC ; not counted, MCL ; midcostal line, BM ; bone marrow
NCC ; nucleated cell counts

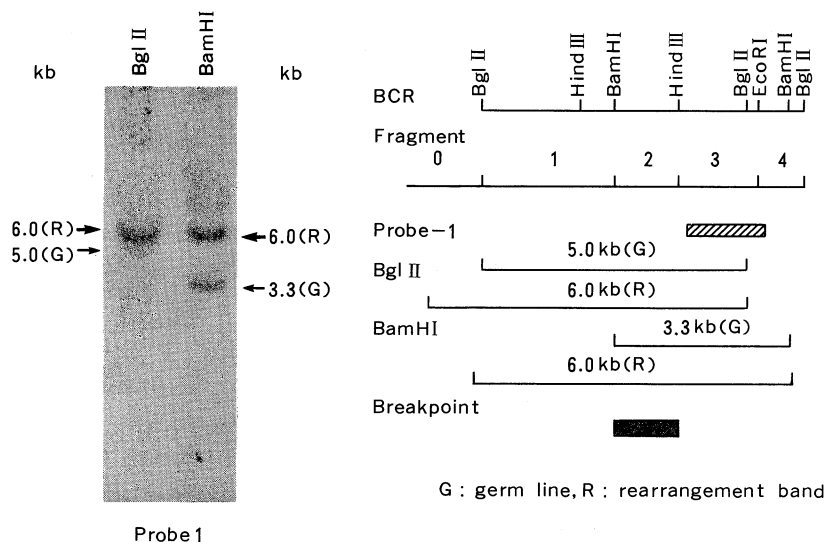


Fig. 1. Southern blotting analyses of Case 1

At the left portion of figure, the results of Southern blotting indicated the presence of a 6.0 kilobases (kb) rearrangement (R) band and a 5.0 kb germ line (G) band on the left lane in which DNAs were digested by restriction endonuclease, Bgl II. On the right lane digested by BamH I, a 6.0 kb R band and a 3.3 kb G band were observed. At the right portion, the restriction sites of BCR gene, location of fragments 0 to 4, and the probe used are shown. The fragment, on which the breakpoint of this case appear to be localized, is showed by black box.

療法にて血液学的にはやや改善が認められたものの、BCから完全にCPに戻ることなく、平成3年5月死亡した。

CPの3例におけるM-BCR切断fragment部位は、それぞれF0、F0およびF1であり、AP例はF3/F4、そして、BCの2例はF2とF4であった。

考 察

CMLは、現在のところ、診断確定後の平均生存期間は3~4年であり、大多数の症例はBCを来して死亡する^{13),14)}。根治療法としては、CPでの骨髄移植が、期待されるのみであるが、年齢、ドナーが得難い点などの問題も多い。最近では、 α -インターフェロンの長期投与にて、Ph⁺

LAP score (Control)	BM NCC ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	BM M/E	Splenomegaly (Under MCL)	Chromosome
132 (259)	NC	21.4/1.0	13 cm	47, XX, +22q-, 9q-, 17q+, 22q-
103 (263)	NC	11.9/1.0	(-)	46, XX, t(9q+; 22q-)
33 (247)	237	25.2/1.0	14 cm	46, XY, t(6; 9; 22) (p12; q34; q21)
182 (261)	148	14.1/1.0	(-)	46, XX, t(9q+; 22q-)
130 (266)	1,074	19.6/1.0	(-)	46, XY, t(9q+; 22q-)
91 (250)	NC	11.0/1.0	16 cm	46, XX, t(9q+; 22q-)

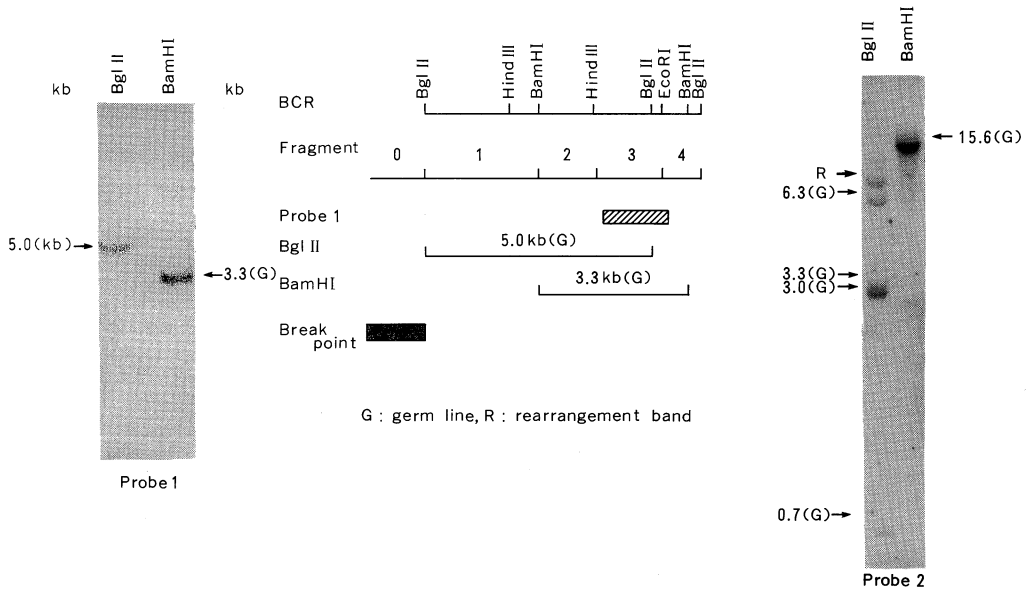


Fig. 2. Southern blotting analyses of Case 2

Results of Southern blotting analyses are shown at the left portion of this figure. At the middle, an experimental scheme for analysis of BCR fragments is shown. Results by probe 2 are shown at the right portion of this figure.

染色体の消失した例が報告され、¹⁵⁾ 期待されているが、実際にはブスルファンやヒドロキシウレアの投与にて、末梢白血球数を1~2万/ μl に保ち、普通の社会生活を送ることが目標となっているのが現状である。

また、診断学的には、本稿で述べたように、遺伝子診断が近年になって飛躍的に進歩し、Ph¹染色体のみならず、BCR 遺伝子の再構成をもって CML の診断がなされるようになり、Ph¹陰性 CML や Ph¹陽性急性リンパ性白血病などとの鑑別が明らかになってきている。^{16),17)} しかし、こ

の BCR の切断点の解析と、臨床病型、治療効果もしくは予後との関連については、いくつかの報告は認められているものの、いまだ一定の評価はくたされていない。

Shtivelman らは、21人の CML 症例のうち19例に BCR-ABL 再構成遺伝子よりの異常 hybrid RNA が検出されたものの、そのシグナルの強度や発現量と臨床病期との間に関連はなかったと報告している。¹⁸⁾ また、Dreazen らも、BCR もしくは ABL 遺伝子の切断点と CP の持続期間との間に、明らかな関連はなかったと報

Table 2. Results of Southern blotting and presumed fragment in which breakpoints are localized

Case	Length of abnormal band (kb)			5' probe	Fragment of breakpoint in M-BCR
	Probe		3' probe		
	Restriction enzyme	Bam H I	Bgl II		
1		6.0	6.0		F2
2		(-)	(-)	(+)	F0
3		(-)	(-)	(+)	F0
4		6.6	(-)		F4
5		(-)	9.0		F1
6		6.0/4.0	2.0		F3/F4

Table 3. Correlation of breakpoint fragment and clinical status

Case	Fragment	Current clinical status	Duration of CP	Treatment
1	F2	BC (megakaryocytic) → dead	46 months	BU → CC → HU → CC
2	F0	CP	>24 months	BU → (-)
3	F0	CP	>28 months	IFN α 2a
4	F4	BC (lymphoblastic) → dead	6 months	BU → CC
5	F1	CP	>22 months	IFN α 2a
6	F3/F4	AP (suspected)	7 months	HU → IFN α 2a

CP; chronic phase, AP; accelerated phase, BC; blastic crisis, CC; cytoreductive chemotherapy, BU; busulfan, HU; hydroxyurea, IFN; interferon

告している。¹⁹⁾

今回、我々は Shtalrid らの報告⁵⁾を参考にし、検討をしたが、彼らの報告によれば、BCR の切断部位 (F) と症例の臨床検査所見、年齢、性あるいは脾腫の程度との関連はなかったものの、F2 に切断部位が存在する症例で、CP の期間が長い傾向にあるとしている。⁵⁾ また、Schaefer-Rego らは、26人の CML 症例のうち、BC の9例では、1例を除いて F3 に切断点が存在していたと報告している。⁶⁾

このように BCR 内の切断点の部位が、臨床経過となんらかの関連があるとする報告は他にも認められ、M-BCR 内でも、切断部位が 3' BCR に存在するほうが、5' BCR に存在するよりも CP が短期間であるとする成績が、Mills ら、⁷⁾ Eisenberg ら⁸⁾ により報告されている。

今回の我々の検討は、症例数が少ないため、統

計学的に明確な結論を得るには至らないものの、現在も CP である症例は、本稿で表すところの F0 もしくは F1 に切断部位を有する症例、すなわち M-BCR の 5' BCR が切断部位である症例である。これは上記の、切断部位と臨床病態とを関連付けているいくつかの報告と一致した結果となっている。

今後、ここに記した6例ばかりでなく、他の CML 症例においても BCR 遺伝子再構成の検索と、臨床病態の推移を検討していき、このような DNA 診断が、診断的価値にとどまることなく、臨床病態や予後、ひいては治療法の選択等にも応用され、より本疾患の治療に寄与していくことを期待したい。

稿を終えるにあたり、BCR 再構成の解析に協力いただいた株式会社エスアールエルに、深謝いたします。

文 献

- 1) 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
- 2) Clark, S. S., Crist, W. M. and Witte, O. N.: Molecular pathogenesis of Ph-positive leukemias.

Annu. Rev. Med. 40 : 113—122, 1989

- 3) Leibowitz, D. and Young, K. S. : The molecular biology of CML : A review. *Cancer Invest.* 7 : 195—203, 1989
- 4) Gale, R. P. and Goldman, J. M. : Rapid progress in chronic myelogenous leukemia. *Leukemia* 2 : 321—324, 1988
- 5) Shtalrid, M., Talpaz, M., Kurzrock, R., Kantarjian, H., Trujillo, J., Gutterman, J., Yoffe, G. and Blick, M. : Analysis of breakpoints within the *bcr* gene and their correlation with the clinical course of Philadelphia-positive chronic myelogenous leukemia. *Blood* 72 : 485—490, 1988
- 6) Schaefer-Rego, K., Dudek, H., Popenoe, D., Arlin, Z., Mears, J. G., Bank, A. and Leibowitz, D. : CML patients in blastic crisis have breakpoints localized to a specific region of the BCR. *Blood* 70 : 448—455, 1987
- 7) Mills, K. I., MacKenzie, E. D. and Birnie, G. D. : The site of the breakpoint within the *bcr* in a prognostic factor in Philadelphia-positive CML patients. *Blood* 72 : 1237—1241, 1988
- 8) Eisenberg, A., Silver, R., Soper, L., Arlin, Z., Coleman, M., Bernhard, B. and Benn, P. : The location of breakpoint within the breakpoint cluster region (*bcr*) of chromosome 22 in chronic myeloid leukemia. *Leukemia* 2 : 642—647, 1988
- 9) Southern, E. M. : Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98 : 503—517, 1975
- 10) Heisterkamp, N., Stam, K., Groffen, J., de Klein, A. and Grosveld, G. : Structural organization of the *bcr* gene and its role in the Ph¹ translocation. *Nature* 315 : 758—761, 1985
- 11) Morris, S. W., Daniel, L., Ahmed, C. M. I., Elias, A. and Lebowitz, P. : Relationship of *bcr* breakpoint to chronic phase duration, survival, and blastic crisis lineage in chronic myelogenous leukemia patients presenting in early chronic phase. *Blood* 75 : 2035—2041, 1990
- 12) Kurzrock, R., Gutterman, J. U. and Talpaz, M. : The molecular genetics of Philadelphia chromosome-positive leukemias. *N. Engl. J. Med.* 319 : 990—998, 1988
- 13) Lichtman, M. A. : Chronic myelogenous leukemia and related disorders. *In* Hematology, ed. by Williams, W. J., Beutler, E., Erslev, A. J. and Lichtman, M. A. 4th ed. New York, McGraw-Hill. 1990, pp. 202—223
- 14) Kantarjian, H. M., Smith, T. L., McCredie, K. B., Keating, M. J., Walters, R. S., Talpaz, M., Hester, J. P., Bligham, G., Gehan, E. and Freireich, E. J. : Chronic myelogenous leukemia : A multivariate analysis of the associations of patient characteristics and therapy with survival. *Blood* 66 : 1326—1335, 1985
- 15) Talpaz, M., Kantarjian, H. M., McCredie, K., Keating, M. J., Trujillo, J. and Gutterman, J. : Clinical investigations of human alpha interferon in chronic myelogenous leukemia. *Blood* 69 : 1280—1288, 1987
- 16) Kurzrock, R., Kantarjian, H. M., Shtalrid, M., Gutterman, J. U. and Talpaz, M. : Philadelphia chromosome-negative chronic myelogenous leukemia without breakpoint cluster region rearrangement : A chronic myeloid leukemia with a distinct clinical course. *Blood* 75 : 445—452, 1990
- 17) 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
- 18) Shtivelman, E., Gale, R. P., Dreazen, O., Berrebi, A., Zaizov, R., Kubonishi, I., Miyoshi, I. and Canaani, E. : *bcr-abl* RNA in patients with chronic myelogenous leukemia. *Blood* 69 : 971—973, 1987

- 19) Drazzen, O., Berman, M. and Gale, R. P. : Molecular abnormalities of *bcr* and *c-abl* in chronic myelogenous leukemia associated with a long chronic phase. *Blood* 71 : 797-799, 1988