

Microsatellite analysis of childhood leukemia : 9p and 12p abnormalities and expression of related genes

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/9277

小児白血病におけるマイクロサテライト解析： 染色体12p,9p領域の癌関連遺伝子の発現に関する研究

金沢大学医学部医学科小児科学講座 (主任：小泉 晶一教授)

西 村 良 成

マイクロサテライト解析は癌の遺伝子異常の解析において同一の手技でヘテロ接合性の消失 (loss of heterozygosity, LOH), DNA複製障害 (replication error, RER) の双方を検出できる優れた方法である。本法の普及により固形癌のみならず血液腫瘍においても LOH, RERの解析がなされるようになったが、その意味付けはあいまいである。本研究では小児血液腫瘍患者65名を対象として7箇所のマイクロサテライトマーカーを用いてRERの頻度を測定すると同時に、小児白血病において最も頻度が高いとされる染色体12p, 9p領域のLOHの頻度を測定した。また、12p, 9pに異常を認めた症例に対しTEL, KIP1, p16遺伝子およびTEL/AML1キメラ遺伝子の発現を逆転写PCR法 (reverse transcribed-PCR, RT-PCR) にて検討した。RERの頻度は総計65症例中5症例 (7.7%) と固形癌と比較し著しく低く、しかも全ての症例において1箇所のマーカーのみにおいて認められた。RERの発生時期に関しても初発時から存在するもの、再発時に見られるものなど様々であり、小児血液腫瘍におけるDNA修復系異常の関与は低いものと思われた。12pでLOH陽性でTEL/AML1発現を認めたコモン型急性リンパ性白血病 (common acute lymphoblastic leukemia, CALL) の2症例では正常TELの発現が認められず、2段階の遺伝子変化による発癌が示された。9pでLOHを認めたCALLの1例ではp16遺伝子およびその発現がないことが示され、p16遺伝子のLOHによる発癌が示唆された。注目すべき現象はRERがLOHの多いとされる12p, 9pに偏って認められたこと、および2症例で9p, 12p両領域にまたがって同時にマイクロサテライト異常、遺伝子異常が認められたことである。9pにLOHを認めたCALLの1例ではp16に異常は認められなかった代わりに、TEL/AML1の発現を認めた。12pでRERを認めた1症例ではKIP1, p16双方の遺伝子発現が認められなかった。これらのデータは小児白血病、特にCALLにおいては染色体領域9p, 12pは特に遺伝子変化 (染色体異常, LOH, RER, 遺伝子変異) を起こしやすいホットスポットであることを示唆しているものと考えられた。

Key words replication error, loss of heterozygosity, TEL/AML1 fusion gene, KIP1 (p27), p16

近年の分子生物学的解析の進歩により、様々な癌化の機構が遺伝子レベルで解明されつつある。これらを大別すると、転写因子や細胞内情報伝達に関わる癌遺伝子の発現型変異、癌抑制遺伝子のヘテロ接合性の消失 (loss of heterozygosity, LOH) による機能的欠失、および近年注目されるようになったDNA修復機構の異常によるDNA複製障害 (replication error, RER) が挙げられる¹⁾²⁾。一つの癌の発生 (イニシエーション initiation) および進展 (プロモーション promotion) にはこれらの変異が複合的に関与しているものと考えられている。

現在 LOH や RER の検出法の中核をなすのがマイクロサテライト解析 (microsatellite analysis) である³⁾。マイクロサテライト (microsatellite) とはヒトゲノムDNA上に多数存在する、数塩基程度の単純な塩基配列の繰り返し部位のことで、部位によっては繰り返し回数に高頻度の多型が認められる。PCR法によりこの多型を検出することで、同一の手技でLOH, RERの双

方の解析が可能である。

これまで LOH, RER の研究は主に固形癌を中心になされてきた。大腸癌における癌遺伝子、癌抑制遺伝子の変異の蓄積による多段階発癌の考え方はすでに教科書的事実として認められている⁴⁾²⁾、近年、大腸癌、胃癌など消化器癌を中心としてRERが高頻度で検出される事が明らかにされ、DNA修復機構の異常は癌における遺伝子変異の重要な位置を占めるものとして注目されている^{4)~7)}。一方、血液腫瘍においては染色体転座に伴うキメラ遺伝子、キメラ蛋白 (すなわち癌遺伝子、多くは転写因子) の発現が病因の中心的存在として研究されてきた経緯があるが、LOHによる癌抑制遺伝子の欠失やDNA修復機構の異常の関与も近年報告されるようになってきた⁸⁾。

小児血液腫瘍において最も高頻度にLOHが認められるのは12番染色体短腕 (12p), ならびに9番染色体短腕 (9p) である⁹⁾¹⁰⁾。各々の領域にはTEL, KIP1 (p27) およびp16遺伝子が存在しそ

平成9年11月27日受付, 平成10年1月19日受理

Abbreviations : AML, acute myelogenous leukemia; ALL, acute lymphoblastic leukemia; CALL, common acute lymphoblastic leukemia; LOH, loss of heterozygosity; RER, replication error; RT-PCR, reverse transcribed-PCR; TE, Tris-EDTA

の関与が研究されている^{13)~14)}。

DNA ミスマッチ修復機構に関しては、一般に血液腫瘍での RER の検出頻度は少ないとされているが^{15)~19)}、慢性骨髄性白血病での急性転化時²⁰⁾、骨髄異型性症候群²¹⁾、エイズ関連リンパ腫²²⁾などで若干の RER 陽性の報告がある。また DNA 修復機構の異常である遺伝性非腺腫性大腸癌の家系で白血病が発症したとの報告もある²³⁾。

このように血液腫瘍においてもマイクロサテライト解析を中心に LOH, RER の研究がなされてきてはいるが、その多くは固形癌の多段階発癌モデルを周到したものである。血液腫瘍、特に小児白血病において同様のモデルで解釈が可能であるかは疑問であるし、マイクロサテライト解析上の LOH, RER と疾患の病期 (初発, 再発) との関連や、分子生物学的機序の解釈に関して、その意味付けは十分にはなされていないのが現状である。

本研究は、小児血液腫瘍の発生、ならびに進展に LOH や DNA 修復遺伝子の異常がどのように関与しているかをマイクロサテライト解析を用いて明らかにすることを目的としてなされた。LOH は頻度の高いとされる 12p, 9p 領域に絞って検討し、この領域に関連する前述の遺伝子の発現を逆転写 PCR (reverse transcribed-PCR, RT-PCR 法) にて測定し、LOH の機能的意味づけについて検討を加えた。RER に関しては LOH 用のマーカーを含め、染色体上様々に位置する 7 箇所のマイクロサテライトを用いた。いずれも同一症例に関し複数個の検体を用い病期の進展との関連についても検討した。

対象および方法

I. 対象

1987年~1997年の間に、金沢大学医学部小児科学講座にて治療管理がなされた小児血液腫瘍患者のうち検体採取が可能であった小児急性リンパ性白血病 (acute lymphoblastic leukemia, ALL) 46名, 非ホジキンリンパ腫 (non-Hodgkin's lymphoma) 7名, 急性骨髄性白血病 (acute myelogenous leukemia, AML) 7名, 合計65名を対象とした (表1)。初発時, 再発時と経過を追えた症例も含め合計80検体を解析した。なお ALL については免疫学的表面マーカーの検索にて B 細胞系, T 細胞系に分類した。更に B 細胞系は CD10 陽性, CD19 陽性, 細胞質内 μ 鎖陰性をコモン型急性リンパ性白血病 (common acute lymphoblastic leukemia, CALL), CD10 陽性, 細胞質内 μ 鎖陽性をプレ B 型急性リンパ性白血病 (pre-B ALL), それ以外を分類不能 (other B)

Table 1. Patients and samples

Disease	No. of patients	No. of samples
CALL	32	39
pre-B All	5	5
other B	2	5
T-ALL	7	7
NHL	7	9
AML	12	15

CALL, common acute lymphoblastic leukemia; pre-B ALL, pre-B acute lymphoblastic leukemia; other B, other B-cell acute lymphoblastic leukemia; T-ALL, T-cell acute lymphoblastic leukemia; NHL, non-Hodgkin's lymphoma; AML, acute myelogenous leukemia.

の3つに亜分類した。

II. 方法

本研究の解析手順の概要を示す。

1) マイクロサテライト解析を用いて小児血液腫瘍の LOH ならびに RER の頻度を明らかにする。

2) 染色体9番短腕または染色体12番短腕で LOH, RER を認めた症例を中心に、その部位に位置する p16, TEL, KIP1 (p 27) と TEL/AML1 転座遺伝子の発現を逆転写 PCR 法で解析することで機能的意味付けと癌化との関連性について検討する。

1. 材料

初発時または再発時の患児の骨髓液, 末梢血またはリンパ節から Ficoll-Hypaque の比重遠心法にて単核球を分離し検体とした。検体中の腫瘍細胞の比率は、いずれも 90% 以上で正常細胞の混入は極く僅かであった。比較対象とする正常細胞は、同一症例における治療による完全寛解導入後の末梢血単核球を用いた。

2. 核酸の抽出

細胞 2×10^7 個をリン酸緩衝液 1ml に再浮遊, 10mg/ml のプロテナーゼ K (和光純薬工業, 大阪) を 100μ l 添加後, DNA/RNA/プラスミド抽出システム モデル 341 (Perkin-Elmer Applied Biosystems Division, California, USA) にて各細胞より染色体 DNA を抽出した。得られた DNA は $0.2 \times$ Tris-EDTA (T E) 緩衝液 (2mM トリスアミノメタン, 0.2mM EDTA, pH 7.0) に溶解した。一部を取り 260nm の吸光度を測定して DNA 濃度を計算した。また必要に応じ RNaseA (ニッポンジーン, 富山) にて RNA を分解しフェノール/クロロホルム抽出, エタノール沈澱にて再回収した。総 RNA の抽出は Chomczynski らの方法²⁴⁾ を以下のように改良して行った。1 容量の D 液 (4M グアニジウムチオシアネート, 25mM クエン酸ナトリウム pH 7.0, 0.1M 2-メルカプトエタノール, 0.5% N-ラウロイルサルコシン酸ナトリウム) に 1/10 容量の 2M 酢酸ナトリウム pH 4.0 と, 1 容量の二炭酸ジエチル (diethyl pyrocarbonate, DEPC) 処理水にて飽和したフェノールを混合し X 液を作成した。1. で準備した細胞 5×10^6 個に対し X 液 1ml を加え良く混合し, 0.2ml のクロロホルム (イソアミルアルコールを加えないもの) を加えボルテックスミキサーにて 20~30 秒間懸濁した。室温で 5 分静置後, 微量高速冷却遠心器 (トミー精工, 東京) にて 15,000 rpm, 20 分間, 4℃ で遠心分離し, 上層に等量のイソプロパノールを加え良く混和し, 室温で 5 分静置後再び 15,000 rpm, 20 分間, 4℃ で遠心した。遠心後上清を捨て, 沈殿 (RNA) を 75% エタノール 1ml に再浮遊させ洗浄後, 15,000 rpm, 5 分間, 4℃ で遠心し沈殿を回収した。上清を完全に除き室温で 5 分間放置し, 沈殿を乾燥させた。1 \times Tris-EDTA (TE) 緩衝液 (10mM トリスアミノメタン, 1mM EDTA, pH 6.8) に溶解し 260nm の吸光度を測定して総 RNA 濃度を測定した。また, 260nm, 280nm の吸光度の比を測定し RNA の純度の参考としたが, 本法によって得られる RNA は OD 260nm と OD 280nm の比が 1.9~2.0 ときわめて良好であった。

3. 1本鎖 cDNA の合成

上記によって得られた総 RNA 2μ g を鋳型としランダムプライマーにて 1本鎖 cDNA を合成した。まず, 総 RNA 2mg に 80mM ランダムヘキサヌクレオチドプライマー (宝酒造, 東京) 1.5μ l を加え, 1 \times T E 緩衝液 (pH 6.8) で総量 25μ l に調整し

Table 2. PCR primers for microsatellite analysis

Locus or Gene	Chromosomal localization	Repeat sequence	Primer sequence
D9S17	9p21	CA	5'-AGCTAAGTGAACCTCATCTCTGTCT-3' 5'-ACCCTAGCACTGATGGTATAGTCT-3'
D17S261	17p12-p11.1	AC	5'-CAGGTTCTGTCATAGGACTA-3' 5'-TTCTGGAAACCTACTCTGA-3'
D16S260	16q22.2	CA	5'-GGTTGAGATGCTCACATGC-3' 5'-CAGGGTGGCTGTTATAATG-3'
FGA	4q28	TCTT	5'-CCATAGGTTTTGAACTCACAG-3' 5'-CTTCTCAGATCCTCTGACAC-3'
D12S89	12p13	AC	5'-ATTTGAGAGCAGCGTGTTTT-3' 5'-CCATTATGGGGAGTAGGGGT-3'
D12S98	12p13	CA	5'-ATTGGGGACCCGTGCTA-3' 5'-CAAAGCCTGACGTAGAAGCATT-3'
DCC	18q21	TA/TA	5'-GATGACATTTTCCCTCTAGA-3' 5'-TTTAGTGGTTATTGCCTTGAA-3'

FGA, fibrinogen alpha chain; DCC, deleted in colorectal carcinoma.

Table 3. PCR primers for amplification of 12p or 9p related genes

Gene	Primers	Sequence	Ta (°C)
TEL	TEL-5 TEL-3	5'-ACCACATCATGGTCTCTGTC-3' 5'-GTTCTTATGGTTTCCCCACA-3'	55
TEL/AML1 fusion gene	TEL-5 AML1-3	5'-ACCACATCATGGTCTCTGTC-3' 5'-TGGAAGCGGGCGTGAAGC-3'	55
KIP1(p27)	KIP1-5 KIP1-3	5'-CTTGCCCGAGTTCTACTACA-3' 5'-TGGGGAACCGTCTGAAACAT-3'	55
p16 DNA	p16-5 p16-3 Ex	5'-GTAACCATGCCCGCATAGAT-3' 5'-AAAACACTACGAAAGCGGGGTG-3'	55
p16 RNA	p16-5 p16-3 In	5'-GTAACCATGCCCGCATAGAT-3' 5'-CGGGCTGAACTTCTGTGCT-3'	55

Ta, annealing temperature.

た. GeneAmp™ PCR System 9600-R (Perkin-Elmer Applied Biosystems Division, California, USA) を用い 65°C で 10 分間保持後, 20 分かけて 25°C まで冷却した. この過程で RNA の変性とプライマーのアニーリングを行った. 引き続き反応液 [100mM Tris-HCl (pH 8.3), 200mM KCl, 20mM MgCl₂, 20mM ジチオスレイトール (dithiothreitol), 各 2mM の 4 種類のデオキシリボヌクレオチド三リン酸 (deoxyribonucleotide triphosphate, dNTP), 逆転写酵素 RAV-2 (宝酒造) 10 単位] 25 μl を加え, 42°C で 60 分間保持し cDNA を合成させた後, 90°C, 2 分間で逆転写酵素 (RAV-2) を失活させた. 反応終了後 1 × T E 緩衝液 (pH7.0) 50 μl を加え総量 100ml とし, 1 回の PCR 反応に 5 μl を鋳型として用いた.

4. マイクロサテライト解析

本研究におけるマイクロサテライト部位としては, 小児血液腫瘍で LOH の多い 9p から 1 箇所 (D9S17), 12p から 2 箇所 (D12S89, D12S98) と固形癌の既報告例で高頻度に RER のみられる 4 箇所 (D17S261, D16S260, FGA, DCC), 合計 7 箇所を選定した. プライマーの塩基配列ならびに部位は, 表 2 に一覧表として示した. なおプライマーの塩基配列は, インターネット (<http://gdbwww.gdb.org/>) を介し Genome Data Base (GDB, Baltimore, USA) または文献から引用し²⁰⁾²⁹⁾, フナコシ株式会社 (東京) に合成委託したものをそのまま使用した.

マイクロサテライトの PCR は抽出した染色体 DNA 0.2 μg を鋳型として, 最終 0.2 μM の各プライマー, 各 200 μM の 4 種類の dNTP, PCR 反応緩衝液 (10mM Tris-HCl, pH 8.3, 50mM KCl, 1.5mM MgCl₂), Taq DNA ポリメラーゼ (Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, USA) 1.25 単位を加え全量 50 μl で行った. 反応は GeneAmp™ PCR System 9600-R を用い, 94°C × 5 分の初期変性の後, 95°C × 30 秒, アニーリング温度は 55°C ~ 57°C で 30 秒, 72°C × 30 秒のサイクルを 35 ~ 40 サイクル行った.

反応後 2 分の 1 容量のタイプ III 泳動緩衝液 (0.25% プロモフェノールブルー, 0.25% キシレンシアノール, 50% グリセリン) を加え, 5ml を 6% ~ 9% 非変性ポリアクリルアミドゲルに泳動した. 泳動後のゲルを Bio-Rad 銀染色キット (Bio-Rad, Hercules, USA) を用いて検出した.

腫瘍細胞と正常細胞を同時に電気泳動を行い, 腫瘍細胞で明らかに正常細胞と異なった長さのバンドが認められた場合を RER 陽性と判断した. また LOH の判定は, 正常細胞で 2 本バンドが分離しているにもかかわらず (ヘテロ接合), 腫瘍細胞では 1 本しかバンドが認められない場合とした. 正常細胞でバンドが 1 本しか認められない場合 (ホモ接合) そのマイクロサテライトに関しては判定保留とした. なお異常が認められた場合,

Table 4. Result of RER and LOH

Locus or Gene	No. of informative cases / no. of patients (%)	No. of RER cases / no. of informative cases (%)	No. of LOH cases / no. of informative cases (%)
D9S17	51/65 (78)	3/51 (5.9)	2/51 (3.9)
D17S261	44/65 (68)	0/44 (0)	0/44 (0)
D16S260	37/65 (57)	1/37 (2.7)	0/37 (0)
FGA	57/65 (88)	0/57 (0)	0/57 (0)
D12S89	47/65 (72)	1/47 (2.1)	3/47 (6.4)
D12S98	39/65 (60)	0/65 (0)	0/65 (0)
DCC	43/65 (67)	0/43 (0)	0/43 (0)

FGA, fibrinogen alpha chain; DCC, deleted in colorectal carcinoma; RER, replication error; LOH, loss of heterozygosity.

PCR条件などを少なくとも2回以上変更し再現性を確認した。

5. PCR, RT-PCR法

マイクロサテライト解析にて異常を認めた10症例および染色体分析G分染法にて12p欠失を認めた1例(表6, KT1)に対しRT-PCRにてTEL, KIP1(p27), TEL/AML1, p16のmRNAの発現の有無を検討した。また, p16に関しては染色体DNAを鋳型としたPCRにて対立遺伝子双方の欠失の有無につき検討した。用いたプライマーは, 全て今回新たに設計したもので塩基配列および至適アニーリング温度を表3にまとめて示す。PCR反応は, 上記調整した1本鎖cDNAのうち5 μ lを1回の反応の鋳型として, マイクロサテライトPCRと同様に最終0.2 μ Mの各プライマー, 各200 μ Mの4種類のdNTP, PCR反応緩衝液, Taq DNAポリメラーゼ1.25単位を加え全量50 μ lで行った。

反応条件は, 94 $^{\circ}$ C \times 5分の初期変性の後, 95 $^{\circ}$ C \times 30秒, 表3に示すアニーリング温度で30秒, 72 $^{\circ}$ C \times 30秒のサイクルを35~40サイクル行った。反応後10分の1容量のタイプII泳動緩衝液(0.25%プロモフェノールブルー, 0.25%キシレンシアノール, 15%フィコール400)を加え, 10mlを3%アガロースゲル(H14-Takara, 宝酒造)に泳動しエチジウムブロマイド染色後, 紫外線照射装置(トランスイルミネーター, フナコシ)上で観察した。

成 績

1. マイクロサテライト解析

7箇所のマイクロサテライトマーカーを用いて小児血液腫瘍65症例, 80検体を解析した。図1, 図2に代表的なバンドパターンを示す。それぞれの図の上段にLOH, 下段にRERの例を示した。表4に示したように65症例の内, 5症例(7.7%)でRERを認めたがいずれの症例も複数箇所での異常は認めなかった。5症例の内ALLが4例, AMLが1例であった。またRERは, 初発時より既に認められるもの, 再発時に初めて出現するものなど様々であった。次に各マイクロサテライトマーカーでのRERならびにLOHの頻度を表4にまとめて示す。RERを示した5例中3例が9番染色体短腕に位置するD9S17で異常がみられた。残る2例は, 12番染色体短腕に位置するD12S89と16番染色体に位置するD16S260でそれぞれ1例ずつRERが認められた。その他4箇所マイクロサテライトマーカーに於いては, いずれの症例でもRERはみられなかった(表5)。

LOHは, D9S17で51例中2例, 3.9%であった。D12S89では,

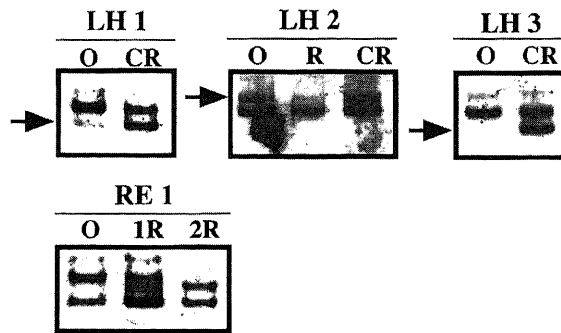


Fig. 1. LOH and RER of D12S89 (12p). LOH and RER are shown in the upper and the lower panels, respectively. LH1, LH2, LH3 and RE1 indicate the patient's numbers, the same as shown in Table 6. Each arrow indicates a loosed allele in LOH. O, CR, R, 1R and 2R denote at onset, complete remission, relapse, first relapse and second relapse, respectively.

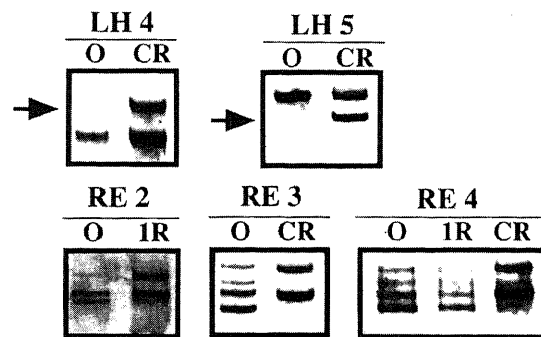


Fig. 2. LOH and RER of D9S17 (9p). LOH and RER are shown in the upper and the lower panels, respectively. LH4, LH5, RE2, RE3 and RE4 indicate the patient's numbers, the same as shown in Table 6. Each arrow indicates a loosed allele in LOH. O, CR, R, 1R and 2R denote at onset, complete remission, relapse, first relapse and second relapse, respectively.

47例中3例, 6.4%であったが残る5箇所のマイクロサテライトマーカー上ではいずれの症例でもLOHは認められず, 9番と12番染色体短腕に限局していた(表4).

II. 12p, 9p異常を示す症例でのTEL/AML1, TEL, KIP1(p27)ならびにp16遺伝子の発現解析

結果を一覧表にして表6に示す.

1. TEL/AML1と正常TELの発現関係

TEL/AML1は症例LH1, KT1, LH4で検出された(図3). KT1のバンドは他と比較すると短い, TEL/AML1の切断点は2箇所あり, 短い方の変異型(variant type)であった. いずれもCALLの症例であった. なお染色体分析G分染法では, 12番と21番染色体の相互転座は示されていない.

TEL/AML1の転座を有している3例中2例で(LH1, KT1)で正常TELの発現を認めなかった. しかしながらLH4に於いては正常TELの発現を認めた.

2. KIP1(p27)の発現

KIP1(p27)は, 症例RE1で著しく発現量が低下していた(図4). それ以外の症例では, 十分に発現されていた. この症例RE1の遺伝子異常は, KIP1(p27)近傍のマイクロサテライトマーカーであるD12S89でRERを認めるのみでLOHは認めておらず, 少なくとも大きなDNA欠失はなく, 微小欠失, 点変異などによるmRNA安定性の変化またはメチル化などによる転写量の変化が考えられた.

3. p16遺伝子とその発現

p16遺伝子のエクソン2とイントロン3の間で染色体DNAのPCR, エクソン2とエクソン3でRT-PCRを行った結果を示す(図4).

p16遺伝子はD9S17の近傍に位置し, これによりLOHが証明されたLH5では染色体DNAの増幅もなく, RT-PCRで発現も認めず, 両対立遺伝子の広範な欠失が考えられた. 一方, 同様

Table 5. Microsatellite markers of the RER-positive cases

Patient	Disease	State	Markers						
			D9S17	D17S261	D16S260	FGA	D12S89	D12S98	DCC
RE1	CALL	1R/2R	-	-	-	-	+	-	-
RE2	AML	1R	+	-	-	-	-	-	-
RE3	T-ALL	O	+	-	-	-	-	-	-
RE4	CALL	O/1R	+	-	-	-	-	-	-
RE5	CALL	O	-	-	+	-	-	-	-

+, RER-positive; -, RER-negative; CALL, common acute lymphoblastic leukemia; AML, acute myelogenous leukemia; T-ALL, T-cell acute lymphoblastic leukemia; 1R, first relapse; 2R, second relapse; O, at onset.

Table 6. Clinical characteristics and the gene expression of LOH- or RER-positive cases

Patient	Disease	State	Karyo-type	LOH	RER	TEL/AML1	TEL	KIP1	p16 DNA/RNA
LH1	CALL	O	NM	D12S89	-	+	-	+	+/+
KT1*	CALL	O	a	-	-	+	-	+	+/-
LH2**	Infantile leukemia	O	b	-	-	-	+	+	+/+
		R (CNS)	ND	D12S89	-	-	+	+	+/+
LH3	AML	O	c	D12S89	-	-	+	+	+/+
		R	d	D12S89	-	-	+	+	+/+
LH4	CALL	O	NM	D9S17	-	+	+	+	+/+
		R	e	D9S17	-	-	+	+	+/-
RE1	CALL	R	ND	-	D12S89	-	+	-	+/-
RE2	AML	R	ND	-	D9S17	-	+	+	+/+
RE3	T-ALL	O	ND	-	D9S17	-	+	+	+/+
RE4	CALL	R	ND	-	D9S17	-	+	+	+/+
RE5	CALL	O	f	-	D16S260	-	+	+	+/+

NM, no metaphase; ND, not determined; LOH, loss of heterozygosity; RER, replication error; +, positive; -, negative; CNS, central nervous system; CALL, common acute lymphoblastic leukemia; AML, acute myelogenous leukemia; T-ALL, T-cell acute lymphoblastic leukemia; O, at onset; R, relapse; a, 45, X, -X, 1p-, 6q-, 8q-, 12p, 13q+ (9/20) 46, XX (11/20); b, 47, XX, +Xt (11;9) (q23;p13); c, 46, XY, t (7;8) (p22;q22) del (12) (p11.2p13); d, 46, XY, t (7;8) (p22; qww) del (12) (p11.2p13) del (17) (p13); e, 45, XX, 4q-, -9, 9p+, 16q-, 17p+; f, 46, XY. *Although KT1 shows mosaicism in karyotype, almost all cells for analysis were leukemic blasts. **LH2 has mixed lineage leukemia (MLL) gene rearrangement. ***Variant type.

にLOHが証明されたLH1では、染色体DNAとRT-PCRで明瞭なバンドを認めており、同じLOHでも対立遺伝子の状態は異なっていると考えられた。

また9pに異常を認めないRE1では、少なくとも一方のp16遺伝子が存在しているにもかかわらず発現量が著減していた。かつ、この症例では前述のとおり、p16と同様な細胞周期制御因子で

あるKIP1(p27)の発現量が低下していた。

考 察

固形癌においては様々な癌遺伝子や癌抑制遺伝子の異常が蓄積することにより正常組織から前癌病変を経て多段階に発癌することが知られている¹⁹⁾。この際LOHにより次々に癌抑制遺伝子が欠失していくに従い癌の悪性度は上昇し、細胞のDNA修復機構の低下を反映してRERの検出頻度が高くなる。DNA修復能の低下は次の遺伝子変異を容易に引き起こし、かくして癌の遺伝子変異は加速度的に蓄積されていく。

一方、血液腫瘍における遺伝子変異の研究は、慢性骨髄性白血病におけるフィラデルフィア (ph1) 染色体の発見を皮切りに染色体転座に伴うキメラ遺伝子の発現を中心になされてきた。特に小児急性白血病では疾患特異的な染色体転座、キメラ遺伝子発現が多数知られるようになり、このタイプの遺伝子異常が発癌に最も重要であり、かつ中心的役割をはたしていることは疑いようのない事実になってきている³⁰⁾。一方で、今日では血液腫瘍においてもRAS, p53などの検討がなされ³¹⁾、一応多段階発生説が支持されている。しかしその意味付けは固形癌ほど定かではない。

発癌機構を解明する上で重要な意味を持つLOHやRERを同時に検出する優れた方法としてマイクロサテライト解析がある。マイクロサテライトとはヒトゲノムDNA上に存在する1塩基から数塩基程度の単純な塩基配列の繰り返し部位のことで、部位によっては繰り返し回数に高頻度の多型が認められ、今日では全ての染色体上のあらゆる部位に高度多型を示すマイクロサテライトが多数マッピングされている²⁹⁾。この繰り返し部位の両側を挟むようにPCRプライマーを設定し増幅を行えば、繰り返し回数の違いをバンドの長さの違いとして検出することができる。常染色体上のマイクロサテライトに多型が存在すれば正常では父親由来、母親由来の対立遺伝子に対応して2本のバンドが検出される。この方法ではLOHという現象は、正常細胞では多型を示すバンドの一方が腫瘍細胞では消失し1本のバンドとして観察される。つまり対立遺伝子の一方が欠失していることが容易に示される。腫瘍細胞において高頻度にLOHが観察された場合、癌抑制遺伝子の2段階変化説 (two hit theory) に基づき、検索したマーカーの近傍に癌抑制遺伝子の存在が強く示唆される。実際固形癌においては多くの癌抑制遺伝子がLOH解析の結果として発見されてきた。

また、細胞には本来、DNA複製の際に生じた小さな変異(点変異や数塩基程度までの欠失や挿入など)を修復する能力が備わっている。これはDNAミスマッチ修復機構と呼ばれ、ヒトではこれに関する遺伝子としてhMLH1, hMSH2などの遺伝子産物がクローニングされている⁷⁾。腫瘍細胞でDNA修復能が低下した状態にあると、DNA合成の際マイクロサテライト部位を正常に複製することができず繰り返し回数に変化が生じる。すなわちマイクロサテライト解析に於いて、正常細胞と腫瘍細胞ではバンドの長さや数が異なる現象が観察され、これをRERまたは、マイクロサテライト不安定性 (microsatellite instability, MSI) と呼びDNA修復能低下の一つの指標としている²⁹⁾。近年、このような遺伝子変異の頻度を高めるような遺伝子異常の存在が明らかにされ、DNAミスマッチ修復異常と呼ばれている。この異常は、当初は遺伝性非腺腫性大腸癌という遺伝性腫瘍で明らかにされ⁴⁵⁾、細胞分裂に伴い生じた異常遺

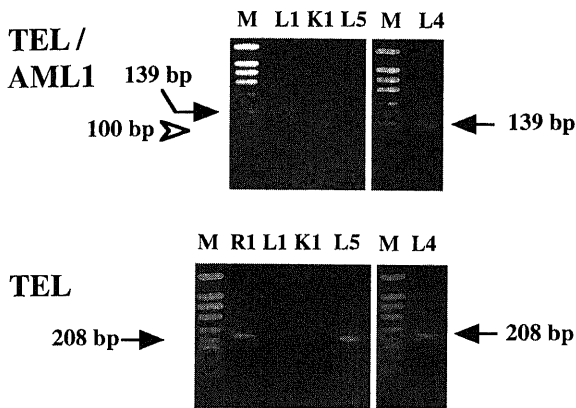


Fig. 3. RT-PCR analysis of TEL gene and TEL/AML1 fusion gene. Each black arrow indicates a PCR product size. The white arrow head indicates TEL/AML1 variant. M denotes a molecular weight marker. L1, L4, L5 and K1 denote patients LH1, LH4, LH5 and KT1, respectively, shown in Table 6

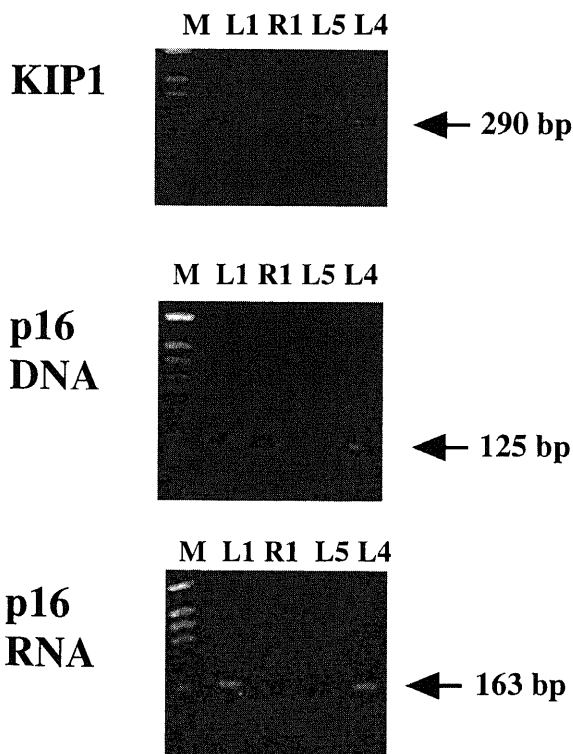


Fig. 4. RT-PCR analysis of KIP1 and p16 genes. The p16 gene was also analyzed by genomic PCR (p16 DNA). Arrows indicate the PCR product, the size of which is shown on the right. L1, L4, L5, and R1 denote patients LH1, LH4, LH5, and RE1, respectively, as shown in Table 6.

伝子を修復することができないため異常遺伝子が蓄積し若年発癌に至ると考えられている。その後先天性異常ばかりでなく後天性にも異常が起こることが判明し、散発性の大腸癌、胃癌、膵臓癌、卵巣癌など様々な固形癌で高率に異常が認められるため癌遺伝子、癌抑制遺伝子とならんで発癌機構を考えるうえで重要な位置を占めるものと認識されるに至っている^{27,28)}。

固形癌、特に大腸癌を中心に現在多くの研究者がマイクロサテライト解析上の一方のバンドの消失を近傍に存在する癌抑制遺伝子のLOHと解釈し、その遺伝子を同定するという方向で研究を進めているが、血液腫瘍に対してもこの考えをそのまま拡張するのは若干問題があると思われる。

小児白血病においてマイクロサテライト解析上最も高頻度にLOH (バンドの一方が欠失する) が認められるのは、12番染色体短腕(12p) および9番染色体短腕(9p) である^{9,10)}。

12pに関してはLOH部位に位置するETS遺伝子ファミリーに属する転写因子の遺伝子であるTELと細胞周期制御遺伝子であるKIP1 (p27) が癌抑制遺伝子の候補として研究が続けられているが、12pに欠失を認める症例の塩基配列解析の結果では、両遺伝子とも残存対立遺伝子の翻訳領域の突然変異は全く認められていない¹²⁾³²⁻³⁴⁾。ただしこれらの論文ではTEL, KIP1のmRNA発現は調べておらず、翻訳領域に異常のない発現低下を引き起こす変異(プロモーター変異など)の可能性は残されている。

むしろ12p欠失に関しては、現在TEL/AML1キメラ遺伝子との関連で理解され初めている³⁵⁻³⁷⁾。TEL遺伝子は、白血病においては様々な相手遺伝子とキメラを形成し、白血病発症に重要な役割を担っている。特に小児におけるCALLでは、遺伝子転座t(12;21)(p13;q22)により生じるTEL/AML1キメラ遺伝子の形成が10-30%と高頻度に認められると報告されている。この相互転座は染色体レベルでは長さ、バンドパターンの変化に乏しく通常のGバンド分染法においてはほぼ100%検出できない。臨床的にはこのキメラ遺伝子発現を認める症例は予後良好であり、初発時白血球数5万/ml以下、5年寛解維持率92%とされる³⁸⁾。最近、TEL/AML1キメラ遺伝子陽性の症例で、正常TEL対立遺伝子が欠失しやすいことが証明された³⁸⁾³⁹⁾。正常細胞内ではTELはホモ2量体を形成して働くことと推察されているが、TEL/AML1キメラ蛋白は試験管内(in vitro)の実験ではホモ2量体および正常TELとのヘテロ2量体を形成することが示された。この場合白血病化に強く関連するのがTEL/AML1ホモ2量体であるならば転座を起こさなかったTEL正常対立遺伝子の発現があることは発癌に関して抑制的に働くものと解釈される。本研究の結果上もこの考えは支持され、TEL/AML1発現を認めたLH1, KT1の2症例においては正常TELの発現は初発時より認められなかった。すなわちこれらの症例におけるマイクロサテライト解析上の12p欠失は、正常TELの欠失を意味するものと考えられる。

このような機序で発癌が生じる場合、やはり2段階の変化が生じていることになるが、それはキメラ遺伝子の形成による癌遺伝子(異常転写因子)の機能発現と、正常対立遺伝子(正常転写因子)の消失の2つの変化の組み合わせであり、癌抑制遺伝子が対立遺伝子双方で機能欠失を起こすという従来のLOHの概念からは外れたものである。逆にこのような機序が証明されている以上、小児白血病においてマイクロサテライト上のバンドの欠失を認めたならばその近傍に存在する癌遺伝子が染色体

転座によりキメラ遺伝子を形成している可能性も考慮しなければならないことになる。

一方で症例LH3, LH4のようにマイクロサテライト解析上12pに欠失を認めながらTEL/AML1の発現がない症例もあり、この場合はいずれもTEL正常遺伝子の発現が認められていた。これらの症例における12p欠失は上記の機序では説明されない。特にLH2においては、初発時には12p欠失は認められず、中枢神経系白血病再発の際に初めて認められた。この症例における12p欠失は少なくとも癌の発生(イニシエーション)そのものには関与しておらず、癌の進展に伴って生じてきた変化であると考えられる。その解釈はこの領域に存在する他の癌抑制遺伝子のLOHの可能性も残るが、少なくともそれはKIP1(p27)ではない。前述したように12pに欠失を認める血液腫瘍において残存KIP1(p27)の翻訳領域に変異が認められないことはすでに示されており、今回の研究にてLH2, LH3両症例ともRT-PCRにてKIP1(p27)mRNAの発現が正常に認められることが示された。

また、Kimら³⁸⁾によると、CALLの患者より確立した細胞株においてTEL/AML1の発現が認められずかつTELの発現が認められなかったものがあり、TEL/AML1キメラ遺伝子の形成がなくとも、TELに対立遺伝子双方の機能欠失がおこれば癌化に働く可能性があることと報告されている。しかしKimらが報告したのは病期が進んだ状態で確立された細胞株であり、同一患者の初発時から確立された細胞株においてはTEL発現は認められている。また、初発時より染色体分析上遺伝子欠失del(12)(p11.2p13)が認められており、初発時すでにTELの一方の対立遺伝子は欠失していたと考えられる。本研究におけるLH2, LH3においては経過を通じてTEL発現は保たれておりこの遺伝子の関与は薄いと考えられる。これはLH2は細胞表面マーカー上はCALLであるが乳児白血病でありミックストリネエーグ白血病(mixed lineage leukemia, MLL)遺伝子の再構成を認めること、LH3は急性骨髄性白血病(acute myelogenous leukemia, AML)でありTEL/AML1, TEL系に異常を認めるLH1, KT1のCALLとは根本的に発癌に関する遺伝子異常の機序が異なっているためと解釈される。

このようにマイクロサテライト解析上は同一の結果となる12p欠失であっても、症例によりその意味合いはまるで異なっていることがわかる。

9pに関してはB細胞性急性白血病の10-20%、T細胞性急性白血病の70%前後においてこの部位に位置するp16遺伝子の対立遺伝子双方の欠失が認められることが報告されている⁴⁰⁻⁴²⁾。p16ではまた残存対立遺伝子の変異ばかりでなく転写開始部位のメチル化により転写が阻害されることによる不活化の機構が判明している⁴³⁾。

この場合は従来の意味におけるLOHと解釈してよいと思われるが、今回解析したT細胞性白血病7症例に関しては9pのLOHを認めたものはなかった。今回の解析で9pにLOHを認めたのはCALLの2例であったがLH5では染色体分析上9pを認めており、PCR, RT-PCRの結果ではp16遺伝子、遺伝子発現とも認められず対立遺伝子双方の欠失が示された。一方LH4ではマイクロサテライト上9pを認めるにもかかわらずp16のDNA PCR, RT-PCR双方ともに陽性であり少なくとも一方の対立遺伝子には欠失がなく機能的にも発現していることが示された。

多くの論文上血液腫瘍でのRERの検出頻度は極めて少ない

とされている^{16)~19)44)45)}。小児血液腫瘍の多くはいずれも急性発症を特徴とするものであり、時間の経過とともに徐々に良性腫瘍から悪性腫瘍へと進展する固形癌とは根本的に発癌の機構が異なるのかもしれない。事実、血液腫瘍でも時間の経過とともに更に悪性化する骨髄異型性症候群の一部や、慢性骨髄性白血病ではRERが認められるという報告もある²⁰⁾²¹⁾。その他、エイズ関連リンパ腫などでRER陽性の報告があり²²⁾、また最近問題となっている抗癌剤や放射線治療後の2次癌の症例でP53遺伝子の異常に伴いRERが認められることも報告されている⁴⁶⁾。また遺伝性非腺腫性大腸癌の家系で白血病が発症したとの報告もある²³⁾。

本研究では、血液腫瘍で染色体異常が多く報告されている12pと9pから3箇所、固形腫瘍で異常の多い4箇所、合計7箇所のマイクロサテライトマーカーを用いて小児血液腫瘍の発生、進展におけるミスマッチ修復系の異常の有無を検討した。表4に示したようにRERの頻度は数%程度で固形癌の頻度に比べ著しく低かった。

また図1, 2に示すように、初発時より既に陽性のもの、あるいは再発時に初めて陽性となるものなど様々であり、病期の進展や重症度との相関は認められなかった。表5に示すように、7箇所のマイクロサテライトマーカーで検索したが2箇所以上でRERを示したものはなかった。実際に固形癌の症例で、DNAミスマッチ修復遺伝子に異常のある場合、複数箇所のマイクロサテライトマーカーでRERが証明されており、今回のような1箇所のみ異常は積極的にミスマッチ修復遺伝子の異常を示唆するものではない。以上より小児血液腫瘍の発生、進展にはDNA修復系異常の関与は重要ではないものと考えられた。

注目すべきは、LOHが多い12p, 9pに偏ってRERが認められたことである。この事実は小児血液腫瘍において変化(転座, 欠失, RER, 点変異)を起こしやすい染色体上の部位が存在することを示しているのかもしれない。Kimら³⁰⁾の報告によればCALL患者より樹立された細胞株4例にTEL/AML1キメラ遺伝子を認め、うち3例には同時にp16遺伝子の発現低下を認めている。12p, 9pにおけるLOH, RERとTEL, KIP1(p27), p16遺伝子発現との関連、特にこの2つの領域における関連性を明らかにするためLOH, RERを認めた全例に関し可能な限り検索を試みた。Kimらの解析は株化した細胞を用いているので必ずしも生体内で生じている変異を反映しているものとは言い難いが、非常に興味深いことに今回の研究によっても12p, 9p双方にマイクロサテライト変異、遺伝子変異をもつ症例が確認できた。

症例LH4では9pにLOHを認めたにもかかわらずp16には異常が認められなかった一方で、12pでLOHを認めないにもかかわらずTEL/AML1発現を認めた。このケースでは残存TELの発現は正常に保たれていた。

症例RE1ではマイクロサテライト解析上9pにRERを認め、12pでは異常を認めなかったが、KIP1(p27), p16発現の著減を同時に認めた。p16のDNA-PCRではバンドが認められ、この症例におけるp16異常は症例LH5とは異なり対立遺伝子双方の欠失ではないものと考えられた。この2症例はともにCALLであり、CALLにおける12p, 9p異常の関連性がここでも示された。

マイクロサテライト解析はLOH, RERの双方を同時に解析できる方法であるが、換言するなら現在LOH, RERと呼ばれ

ているものはマイクロサテライト解析の結果の解釈にすぎない。

その解釈は固形癌でなされた研究に基づいており、血液腫瘍、ことに小児白血病においては単純には当てはまらない。小児白血病は基本的には染色体転座によるキメラ遺伝子発現に代表される大きな遺伝子変化によって規定されていると考えるべきであり、それこそが小児期(早い場合には新生児期にさえ)に急性発症する要因かもしれない。しかしながら、TEL/AML1とTEL欠失の2段階の変化を認めたり、症例RE3, RE4のように初発時からすでにRERを示したり、症例LH2, LH3のように転座とは関係のない欠失を示したりすることを考えると、癌化のイニシエーションから臨床的に明らかな白血病となるまでの間にいくらかの遺伝子変異が付加されていることが示される。

このうち癌の進展と共に生じてくるLH2の12p欠失等の現象は癌化にともなう細胞機能の低下が変化の出やすい部位に現れたことを反映しているだけであり、特別な遺伝子変化を意味するものではないのかもしれない。あるいはまた、RERの存在はその部位のDNA複製が障害されていることを意味し、これこそが染色体転座の起こりやすい原因となっているのかもしれない。

いずれにしても最も興味をもたれるのは小児血液腫瘍でLOHが多いとされる9p, 12pにやはり比較的多くのRERが見い出されたこと、いくつかの症例で12p, 9p両領域にまたがって同時に変異が認められたことである。このことは両領域に存在する遺伝子の直接の相互作用というよりも、むしろ小児血液腫瘍特にCALLにおいては遺伝子, DNA変化を起こしやすい染色体領域上のホットスポットが存在するという仮説を抱かせる。その確認には今後より多くの部位でのマイクロサテライト解析が必要であると思われるが、そこでは固形癌のモデルを一旦捨て、同一の実験をしながらLOHはLOH, RERはRERという観点で分けて考えずに、領域特異的遺伝子変化といった目でマイクロサテライト解析を見直す必要があるであろう。

結 論

小児血液腫瘍検体を対象に染色体9p, 12p領域を中心にマイクロサテライト解析および当該領域に位置する遺伝子発現を調べ以下の結論を得た。

1. RERの頻度は固形癌に比べ著しく低かった。また固形癌でRERの検出頻度が高いとされるマイクロサテライトマーカーではほとんどRERを認めなかったが、小児白血病でLOHが多いとされている12p, 9p領域で若干のRERが観察された。RERが認められた症例に於いては、初発時から変化の認められたもの、再発時に変化のみられたものなど様々でありRERをおこす時期に特異性はなかった。また、全ての症例において2カ所以上のマイクロサテライトマーカーでRERが認められたものはなく、小児血液腫瘍におけるDNA修復酵素異常の関与は少ないと考えられた。

2. LOHを示唆するマイクロサテライト解析上の一方のバンドの消失は12pに3症例、9pに2症例認められた。12pのLOHを認めたCALLの2症例ではいずれもTEL/AML1キメラ遺伝子の発現を認め、かつ正常TELの発現を認めなかった。キメラ遺伝子の形成(癌遺伝子の機能獲得)と正常TEL対立遺伝子の欠失の2段階の変異が白血病化に重要であると解釈された。このような変化は古典的な意味でのLOHの概念からは外れたも

のである。中枢神経白血病再発時に12pでLOHを認めた乳児白血病の1例ではTEL, TEL/AML1, KIP1(p27)発現に異常を認めず、上記2例とはマイクロサテライト解析の解釈が異なることが示された。その意味づけは現在のところ不明であるが癌の進展に伴い付加されたDNA, 遺伝子の異常を示すものと推察される。

3. 文献上9pのLOHはT細胞性急性リンパ性白血病に多いとされるが今回調べた7症例では全例認められず、LOHを認めたのはCALLの2症例であった。このうち1例ではp16遺伝子の対立遺伝子双方の欠失がPCR, RT-PCRにて証明された。この症例ではp16遺伝子の古典的な意味でのLOHが発癌に関与しているものと考えられた。

4. CALLの2症例で9p, 12p両領域にまたがってマイクロサテライト異常, 遺伝子発現異常が認められた。症例LH4では9pにLOHを認めると同時にTEL/AML1発現を認めた。症例RE1では9pにRERを認めp16発現の消失を認めたが、これに加えKIP1(p27)発現消失を同時に認めた。以上より、RERが9p, 12pのマーカーで比較的高頻度で認められたことと合わせて、小児血液腫瘍, 特にCALLにおいてはDNAの変化が生じやすい染色体上の領域特異性が存在することが示唆された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、研究の御指導と御校閲を賜りました金沢大学医学部小児科学講座小泉 晶一教授に深甚なる感謝の意を表します。また、本研究の遂行し際し終始、御指導、御助言をいただきました同教室新井田 要助手に深く御礼申し上げます。さらに、御支援と御協力を頂きました技術補佐員駒場 裕代さん、ならびに金沢大学医学部小児科学講座の皆様にご心から感謝いたします。

文 献

- 1) Vogel F, Motulsky AG. Human genetics, 3rd ed, p431-456, Springer, Heidelberg, 1997
- 2) Thompson MW, McInnes RR, Willard HF. Genetics in medicine, 5th ed, p365-381, Saunders, Philadelphia, 1991
- 3) Weber JL, May PE. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. Am J Hum Genet 44: 388-396, 1989
- 4) Aaltonen LA, Peltomaki P, Leach S, Sistonen P, Pylkanen L, Mecklin JP, Jarvinen H, Powell SM, Jen J, Hamilton SR, Peterson GM, Kinzler KW, Vogelstein B, de la Chapelle A. Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. Science 260: 812-816, 1993
- 5) Thibodeau SN, Bren G, Schaid D. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. Science 260: 816-819, 1993
- 6) Ionov Y, Peinado MA, Malkhosyan S, Shibata D, Perucho M. Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. Nature 363: 558-561, 1993
- 7) 中村祐輔. ミスマッチ修復遺伝子の異常と遺伝性癌・多重癌. 蛋白質核酸酵素 40: 1689-1697, 1995
- 8) Hangaishi A, Ogawa S, Mitani K, Hosoya N, Chiba S, Yazaki Y, Hirai H. Mutations and loss of expression of a mismatch repair gene, hMLH1, in leukemia and lymphoma cell lines. Blood 89: 1740-1747, 1997
- 9) Cave H, Guidal C, Elion J, Vilmer E, Grandchamp B. A low rate of loss of heterozygosity is found at many different loci in childhood B-lineage acute lymphocytic leukemia. Leukemia 10: 1486-1491, 1996
- 10) Takeuchi S, Bartmam CR, Wada M, Reiter A, Hatta Y, Seriu T, Lee E, Miller CW, Miyoshi I, Koeffler HP. Alleotype analysis of childhood acute lymphoblastic leukemia. Cancer Res 55: 5377-82, 1995
- 11) Stegmaier K, Pendse S, Barker GF, Bray-Ward P, Ward DC, Montgomery KT, Krauter KS, Reynolds C, Sklar J, Donnelly M, Bohlander SK, Rowley JD, Sallan SE, Gilliland DG, Golub TR. Frequent loss of heterozygosity at the TEL gene locus in acute lymphoblastic leukemia of childhood. Blood 86: 38-44, 1995
- 12) Stegmaier K, Takeuchi S, Golub TR, Bohlander SK, Bartram CR, Koeffler HP. Mutational analysis of the candidate tumor suppressor genes TEL and KIP1 in childhood acute lymphoblastic leukemia. Cancer Res 56: 1413-1417, 1996
- 13) Hebert J, Cayuela JM, Berkeley J, Sigaux F. Candidate tumor-suppressor genes MTS1 (p16INK4A) and MTS2 (p15INK4B) display frequent homozygous deletions in primary cells from T-but not from B-cell lineage acute lymphoblastic leukemias. Blood 84: 4038-4044, 1994
- 14) Takeuchi S, Bartram CR, Seriu T, Miller CW, Tobler A, Janssen JWG, Reiter A, Ludwig WD, Zimmermann M, Schwaller J, Lee S, Miyoshi I, Koeffler HP. Analysis of a family of cyclin-dependent kinase inhibitors: p15/MTS2/INK4B, p16/MTS1/INK4A, and p18 genes in acute lymphoblastic leukemia of childhood. Blood 86: 755-760, 1995
- 15) Pabst T, Schwaller J, Bellomo MJ, Oesreicher M, Muhlematter D, Ichelli A, T obler A, Fey MF. Frequent clonal loss of heterozygosity but scarcity of microsatellite instability at chromosomal breakpoint cluster regions in adult leukemias. Blood 88: 1026-1034, 1996
- 16) Sill H, Goldman JM, Cross NCP. Rarity of microsatellite alterations in acute myeloid leukemia. Br J Cancer 74: 255-257, 1996
- 17) Robledo M, Martinez B, Arranz E, Trujillo MJ, Gonzalez Ageitos A, Rivas C, Benitez J. Genetic instability of microsatellites in hematological neoplasmas. Leukemia 9: 960-964, 1995
- 18) Tasaka T, Lee S, Spira S, Takeuchi S, Hatta Y, Nagai M, Takahara J, Koeffler HP. Infrequent microsatellite instability during the evolution of the myelodysplastic syndrome to acute myelocytic leukemia. Leukemia Res 20: 113-117, 1996
- 19) Gartenhaus R, Johns III MM, Wang P, Rai K, Sidransky D. Mutator phenotype in a subset of chronic lymphocytic leukemia. Blood 87: 38-41, 1996
- 20) Wada C, Shinoyama S, Fujimoto Y, Tokohiro H, Akahoshi T, Uchida T, Ohatani H. Genomic instability of microsatellite repeats and its association with the evolution of chronic myeloid leukemia. Blood 83: 3449-3456, 1994
- 21) Kaneko H, Horiike S, Taniwaki M, Misawa S. Microsatellite instability is an early genetic event in myelodysplastic syndrome but is frequent and not associated with TGF- β receptor type II gene mutation. Leukemia 10: 1696-1699, 1996
- 22) Bedi GC, Westra WH, Farzadegan H, Pitha PM, Sidransky

- D. Microsatellite instability in primary neoplasmas from HIV+ patients. *Nat Med* 1: 65-68, 1995
- 23) Love RR. Small bowel cancers, B-cell lymphatic leukemia, and six primary cancers with metastases and prolonged in the cancer family syndrome of Lynch. *Cancer* 55: 449-502, 1985
- 24) Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162: 156-159, 1987
- 25) Weissenbach J, Gyapay G, Dib C, Vifnal A, Morissette J, Millasseau P, Vaysseix G, Lathrop M. A second-generation linkage map of the human genome. *Nature* 29: 794-801, 1992
- 26) 池島三与子, 島田 隆: ミスマッチ修復の分子機構と発癌. *New メディカルサイエンスシリーズ*, DNA複製, 修復と発癌. 羊土社, pp. 143-157, 1996
- 27) Han HJ, Yanagisawa A, Kato Y, Park JG, Nakamura Y. Genetic instability in pancreatic cancer and poorly differentiated type of gastric cancer. *Cancer Res* 53: 5087-5089, 1993
- 28) Fujita M, Enomoto T, Yoshino K, Nomura T, Buzard GS, Inoue M, Okudaira Y. Microsatellite instability and alterations in the hMSH2 gene in human ovarian cancer. *Int J Cancer* 64: 361-366, 1995
- 29) Weber JL, Kwitek AE, May PE. Dinucleotide repeat polymorphisms at the D16S260, D16S261, D16S265, D16S266, and D16S267 loci. *Nucleic Acids Res* 18: 4034, 1990
- 30) 林 泰秀. 小児白血病の染色体・遺伝子異常による分類. *小児内科* 29: 184-192, 1997
- 31) Kawamura M, Kikuchi A, Kobayashi S, Hanada R, Yamamoto K, Horibe K, Shikano T, Ueda K, Hayashi K, Sekiya T, Hayashi Y. Mutation of the p53 and ras genes in childhood t(1;19)-acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 85: 2546-2552, 1995
- 32) Kawamata N, Morosetti R, Miller CW, Park D, Spirin S, Nakamaki T, Takeuchi S, Hatta Y, Simpson J, Wilczynski S, Lee YY, Bartram CR, Koeffler HP. Molecular analysis of the cyclin-dependent kinase inhibitor gene p27/Kip1 in human malignancy. *Cancer Res* 55: 2266-2269, 1995
- 33) Ponce-Castaneda MV, Lee MH, Latres E, Polyak K, Lacombe L, Montgomery K, Mathew S, Krauter K. p27KIP1: chromosomal mapping to 12p12-12p13.1 and absence of mutations in human tumors. *Cancer Res* 55: 1211-1214, 1995
- 34) Pietenpol JA, Bohlander SK, Sato Y, Papadopoulous N, Liu B, Friedman C, Trask BJ, Roberts JM, Kinzler KW, Rowley JD, Vogelstein B. Assignment of the human p27Kip1 gene to 12p13 and its analysis in leukemia. *Cancer Res* 55: 1206-1210, 1995
- 35) Romana SP, Mauchauffe M, Le Coniat M, Chumakov I, Le Paslier D, Berger R, Bernard OA. The t(12;21) of acute lymphoblastic leukemia results in a tel-AML1 gene fusion. *Blood* 85: 3362-3370, 1995
- 36) McLean TW, Ringold S, Neuberg D, Stegmaier K, Tantravahi R, Ritz J, Koeffler HP, Takeuchi S, Jassen JW, Seriu T, Bartram CR, Sallan SE, Gilliland DG, Golub TR. TEL/AML1 dimerizes and is associated with a favorable outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 88: 4252-4258, 1996
- 37) Golub TR, Barker GF, Bohlander SK, Hiebert SW, Ward DC, Bray-Ward P, Morgan E, Raimondi SC, Rowley JD, Gilliland DG. Fusion of the TEL gene on 12p13 to the AML1 gene on 21q22 in acute lymphoblastic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 4917-4921, 1995
- 38) Kim D, Moldwin RL, Vignon C, Bohlander SK, Suto Y, Giordano L, Gupta R, Fears S, Nucifora G, Rowley JD, Smith SD. TEL-AML1 translocations with TEL and CDKN2 inactivation in acute lymphoblastic leukemia cell lines. *Blood* 88: 785-794, 1996
- 39) Raynaud S, Cave H, Basens M, Bastard C, Cacheux V, Grosgeorge J, Guidal-Giroux C, Guo C, Vilmer E, Marynen P, Grandchamp B. The 12;21 translocation involving TEL and deletion of the other TEL allele: Two frequently associated alterations found in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 87: 2891-2899, 1996
- 40) Hebert J, Cayuela JM, Berkeley J, Sigaux F. Candidate tumor-suppressor genes MTS1 (p16INK4A) and MTS2 (p15INK4B) display frequent homozygous deletions in primary cells from T- but not from B-cell lineage acute lymphoblastic leukemias. *Blood* 84: 4038-4044, 1994
- 41) Takeuchi S, Bartram CR, Seriu T, Miller CW, Tobler A, Janssen JW, Reiter A, Ludwig WD, Zimmermann M, Schwaller J, Lee S, Miyoshi I, Koeffler HP. Analysis of a family of cyclin-dependent kinase inhibitors: p15/MTS2/INK4B, p16/MTS1/INK4A, and p18 genes in acute lymphoblastic leukemia of childhood. *Blood* 86: 755-760, 1995
- 42) 小川誠司, 平井久丸. p15, p16 遺伝子と白血病. *Anneal Review 血液* 1996 (高久史磨, 宮崎澄雄, 斎藤英彦, 溝口秀昭, 坂田洋一編), 第1版, 106-122頁, 中外医学社, 東京, 1996
- 43) Herman JG, Merlo A, Mao L, Lapidus RG, Issa JJ, Davidson NE, Sidransky D, Baylin SB. Inactivation of the CDKN2/p16/MTS1 gene is frequently associated with aberrant DNA methylation in all common human cancers. *Cancer Res* 55: 4525-4530, 1995
- 44) Volpe G, Gamberi B, Pastore C, Roetto A, Pautasso M, Parvis G, Camaschella C, Mazza U, Saglio G, Gaidano G. Analysis of microsatellite instability in chronic lymphoproliferative disorders. *Ann Hematol* 72: 67-71, 1996
- 45) Mori N, Takeuchi S, Tasaka T, Lee S, Spira S, Ben-Yehuda D, Mizoguchi H, Schiller G, Koeffler HP. Absence of microsatellite instability during the progression of chronic myelocytic leukemia. *Leukemia* 11: 151-152, 1997
- 46) Ben-Yehuda D, Krichevsky S, Caspi O, Rund D, Polliack A, Abeliovich D, Zelig O, Yahalom V, Paltiel O, Peretz T, Ben-Neriah S, Yehuda O, Rasmilewits EA. Microsatellite instability and p53 mutations in therapy-related leukemia suggest mutator phenotype. *Blood* 88: 4296-4303, 1996

Microsatellite analysis of childhood leukemia: 9p and 12p abnormalities and expression of related genes Ryosei Nishimura, Department of Pediatrics, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920-8640 – J. Juzen Med Soc., 107, 44 – 54 (1998)

Key words replication error (RER), loss of heterozygosity (LOH), TEL/AML1 fusion gene, KIP1 (p27), p16

Abstract

Microsatellite analysis is one of the excellent methods of gene analysis, which can detect both loss of heterozygosity (LOH) and replication error (RER). Recently, malignant solid tumors in adults have been vigorously examined by microsatellite analysis, but the meaning and interpretation of the results are not clear for hematological malignancies, especially childhood leukemia and lymphoma. In this study, 65 cases of childhood leukemia and lymphoma were examined using 7 different microsatellite markers in order to estimate the frequency of RER. Additionally, LOH in the two loci (9p and 12p), which have been most frequently identified in childhood leukemia, was investigated. Furthermore, the TEL, TEL/AML1 and KIP1 genes on 12p, and the p16 gene on 9p were analyzed by the reverse transcribed (RT)-PCR method. RER was detected in 5/65 cases (7.7%) which showed very low compared to that of solid tumors. There were no cases which showed RER at more than one locus. Three cases showed RER at onsets, and 2 cases at relapses. From these data it is suggested that RER was not the major abnormality in childhood leukemia, and that the abnormality of DNA mismatch repair system was not involved in leukemogenesis. Gene expression analysis showed that 2 cases with common acute lymphoblastic leukemia (CALL) with 12p LOH expressed TEL/AML1 fusion gene, but not the normal TEL gene. Another CALL case with 9p LOH had no p16 DNA and its expression, suggesting two-step leukemogenesis in these cases. More interestingly, most (4/5 cases) RER were selectively detected in 9p and 12p, which were also the major loci of LOH. There were 2 cases that had DNA abnormalities both of 9p and 12p. One case with CALL showed 9p LOH without p16 abnormality, but with TEL/AML1 fusion gene. The other CALL with 12p RER had a diminished expression of both KIP1 and p16 genes. These data suggested that 9p and 12p might be the hot spots of DNA rearrangement and gene mutation in childhood leukemia, especially in CALL.