

# PCR法による急性骨髄性白血病における免疫グロブリン重鎖遺伝子再構成の検出

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: 経田, 克則 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2297/9336">http://hdl.handle.net/2297/9336</a>

## PCR法による急性骨髄性白血病における 免疫グロブリン重鎖遺伝子再構成の検出

金沢大学医学部医学科内科学第三講座 (主任: 松田 保教授)

経 田 克 則

B細胞系悪性腫瘍において、免疫グロブリン重鎖 (immunoglobulin heavy chain, IgH) 遺伝子再構成はサザンブロットハイブリダイゼーションを用いて調べられてきたが、最近PCR法を用いて少量のDNAからのクロナリティーの解析が可能になった。急性骨髄性白血病 (acute myelogenous leukemia, AML) におけるIgH遺伝子再構成の検出に関する報告は少なく、PCR法を用いての検討は現在のところ報告されていない。本研究では35例の未治療のAMLにおいて、IgH遺伝子再構成の検出頻度をPCR法 (IgH-PCR) により調査し、再構成の有無が予後予測因子となるか否かを臨床的に検討した。PCRはIgHのD領域にある相補性決定部位 (complementarity determining region, CDR)-3をはさむプライマーを用いて行った。14例 (40%) に単クローン性のIgH遺伝子再構成が検出され、B細胞系抗原陽性であった5例では4例 (80%) に、陰性であった30例では10例 (33%) に認められた。ダウノルビシンを中心とした共通の化学療法を行い、29例 (83%) に完全寛解 (complete remission, CR) を得た。IgH遺伝子再構成を認めた群 (IgH-PCR陽性群) のCR率が64%であったのに対し、認められなかった群 (IgH-PCR陰性群) では95%であった。生存率の比較では、30カ月の時点でIgH-PCR陽性群が35%であったのに対し、IgH-PCR陰性群では63%であった。IgH遺伝子再構成の有無はAMLの新しい予後予測因子となり得ると考えられる。

**Key words** IgH gene rearrangement, PCR, AML, prognosis

免疫グロブリンは可変領域の構造の多様性によって無数の抗原に対して特異性を有している。多様性を獲得する機序として遺伝子再構成による重鎖のV, D, J遺伝子および軽鎖のV, J遺伝子の組み合わせが知られている<sup>1)</sup>。再構成された免疫グロブリン遺伝子は4つのフレームワークと、それらにはさまれた3つの相補性決定部位 (complementarity determining region, CDR) から構成される。CDRは抗体と直接接触する部位で、特にCDR-3は個々のクローンにおいて特異的な配列を有することから、免疫グロブリン遺伝子のなかでも最も注目され、よく研究されてきた領域である。

免疫グロブリン重鎖 (immunoglobulin heavy chain, IgH) 遺伝子再構成の解析がサザンブロットハイブリダイゼーションによって行われるようになり、リンパ系悪性腫瘍においてB細胞のクロナリティーが証明されるようになった<sup>2)-4)</sup>。しかし、この方法は解析に高分子量のDNAを比較的多く必要とするために操作に時間を要し、しかも生の標本しか利用できなかった。さらに、固定、染色を施行した標本からのDNAの抽出は不可能であり、過去を振り返っての検討は困難であった。最近、PCR法を用いてIgH遺伝子再構成を迅速に検出する方法 (IgH-PCR法) が報告され<sup>5)-13)</sup>、その後サザンブロット法との比較で、検出率において両者にほとんど差がないことが分かり、IgH-PCRの有用性が確認され<sup>14)-16)</sup>、臨床に応用されるようになった。

た。

IgH-PCR法は、少量のDNAで解析できるために血液塗抹標本を利用することができ、このために標本さえ保存されていれば過去を振り返っての検討が可能である。このような利点を有しているためにIgH-PCR法は急性リンパ性白血病 (acute lymphocytic leukemia, ALL) において微小残存病変の検出に利用されている<sup>17)-19)</sup>。一方、急性骨髄性白血病 (acute myelogenous leukemia, AML) には、骨髄球系抗原以外にB細胞系のリンパ球系抗原を有する症例も存在するが、そのような症例にB細胞のマーカーであるIgH遺伝子再構成が検出されるか否か、またB細胞系抗原を持たないAMLにおいても再構成が検出されることがあるか否か、再構成が認められるとすればどのような臨床的意義を有しているのかについての検討はなされていない。

本研究ではAMLにおけるIgH遺伝子再構成の検出頻度をPCR法により調査し、再構成の有無と予後との関係について臨床的に検討した。

### 対象および方法

#### 1. 対 象

1993年6月から1995年6月までに金沢大学医学部附属病院第三内科およびその関連病院を受診した未治療のAML患者で、

平成9年5月13日受付, 平成9年6月10日受理

Abbreviations : ALL, acute lymphocytic leukemia; AML, acute myelogenous leukemia; CDR, complementarity determining region; FAB, French-American-British; IgH, immunoglobulin heavy chain; JALSG, Japan Adult Leukemia Study Group; TcR, T cell receptor; TdT, terminal deoxynucleotidyl transferase

日本成人白血病治療グループ (Japan Adult Leukemia Study Group, JALSG) のAML-92プロトコル<sup>20,21)</sup> (表1) に従って治療を行った35例を対象とし、診断時の末梢血または骨髓について検討した。診断はフランス-アメリカイギリス (French-American-British, FAB) 分類<sup>22)</sup>に従った。年齢は15歳から84歳で、男性が21例、女性が14例で、FAB分類では、M0: 2例、M1: 5例、M2: 14例、M3: 7例、M4: 4例、M5: 2例およびM6: 1例であった (表2)。血球染色にはギムザ染色を行い、酵素染色としてはミエロペルオキシダーゼ染色<sup>23)</sup>およびエステラーゼ染色 (クロロアセテート染色,  $\alpha$ -ナフチルプチレート染色<sup>24)</sup>) を施した。FAB分類のM0以外の骨髓系白血病細胞でミエロペルオキシダーゼ染色は陽性を示し、さらに、クロロアセテート・エステラーゼ染色は顆粒球系細胞で陽性となり、 $\alpha$ -ナフチルプチレート・エステラーゼ染色は単球系細胞で陽性を示すことから、これらの酵素染色の結果を診断の参考とした。骨髓球系抗原の一つであるCD13は全症例で陽性を示した。骨髓を採取できた症例では全例に染色体の解析を行った。治療の効果判定はJALSGの基準<sup>25)</sup>に準じて行い、寛解導入療法後の骨髓穿刺で白血病細胞が5%以下で、末梢血の好中球数と血小板数の回復がみられ、この状態が4週間以上持続した場合を完全寛解 (complete remission, CR) とした。なお寛解に至らない場合を非寛解 (non response, NR) とした。本研究では骨髓異形成症候群を経て白血病化した症例は除外した。

## II. 方 法

### 1. 細胞表面抗原の解析

リンフォブレップ (Nycomed Pharma As, Oslo, Norway) にて末梢血または骨髓液より単核球 (白血病細胞) を分離し、以下の抗体を用いてフローサイトメーター (FACScan, 日本ベクトン・ディッキンソン, 東京) にて表面抗原を解析した。使用した抗体はCD13 (日本ベクトン・ディッキンソン), CD14 (日本

Table 1. Remission induction chemotherapy protocol of Japan Adult Leukemia Study Group (JALSG) AML-92

Anticancer drug	Administration	
	Dose (mg/m <sup>2</sup> )	Duration (day)
A) Behenoyl cytosine arabinoside	200	1-10
Daunorubicin	40	1-4, 8-9
6-Mercaptopurine	70	1-10
B) Behenoyl cytosine arabinoside	200	1-7
Etoposide	100	1-5
Daunorubicin	40	1-4
6-Mercaptopurine	70	1-7
When patients do not obtain CR,		
Mitoxantrone	7	1-3
Cytosine arabinoside	200	1-5

AML, acute myelogenous leukemia.

Table 2. Results of PCR analysis and the response to induction therapy

Case no.	Age	Sex	FAB	Sample	POX	CD13	B-cell marker	T-cell marker	IgH-PCR	Response
1	73	M	M0	BM	N	P	N	N	+	NR
2	30	M	M0	PB	N	P	N	N	+	NR
3	16	M	M1	BM	P	P	N	N	+	NR
4	60	M	M1	BM	P	P	N	N	-	CR
5	37	F	M1	BM	P	P	N	P (CD7)	+	CR
6	66	M	M1	BM	P	P	N	N	-	CR
7	29	M	M1	BM	P	P	N	P (CD7)	+	CR
8	52	M	M2	BM	P	P	P (CD10, CD19)	N	+	CR
9	63	M	M2	BM	P	P	N	N	-	CR
10	34	F	M2	BM	P	P	N	N	-	CR
11	52	M	M2	BM	P	P	P (CD19)	N	-	CR
12	63	M	M2	BM	P	P	N	P (CD7)	-	CR
13	48	F	M2	BM	P	P	N	N	-	CR
14	67	M	M2	BM	P	P	N	N	+	NR
15	45	M	M2	PB	P	P	N	N	+	CR
16	61	F	M2	BM	P	P	N	N	+	CR
17	40	F	M2	BM	P	P	N	N	-	CR
18	58	M	M2	BM	P	P	N	N	-	NR
19	15	M	M2	BM	P	P	N	N	-	CR
20	58	M	M2	BM	P	P	N	P (CD4)	-	CR
21	31	F	M2	BM	P	P	N	N	-	CR
22	59	F	M3	BM	P	P	P (CD19, CD21)	N	+	CR
23	66	F	M3	BM	P	P	N	N	-	CR
24	51	F	M3	BM	P	P	N	N	-	CR
25	31	F	M3	BM	P	P	N	N	-	CR
26	58	M	M3	BM	P	P	N	P (CD2)	+	NR
27	39	F	M3	BM	P	P	N	N	-	CR
28	52	M	M3	BM	P	P	N	P (CD2)	-	CR
29	84	M	M4	BM	P	P	P (CD19, CD22)	N	+	CR
30	44	F	M4	BM	P	P	N	P (CD7)	+	CR
31	72	M	M4	BM	P	P	N	N	-	CR
32	68	F	M4	BM	P	P	N	P (CD4)	-	CR
33	63	M	M5	BM	P	P	N	N	-	CR
34	53	M	M5	PB	P	P	N	N	-	CR
35	63	F	M6	BM	P	P	P (CD19)	N	+	CR

M, male; F, female; BM, bone marrow; PB, peripheral blood; P, positive; N, negative; +, clonal rearrangement; -, no clonal rearrangement; CR, complete remission; NR, non response; POX, myeloperoxidase.

ベクトン・ディッキンソン), CD33 (日本ベクトン・ディッキンソン), CD34 (日本ベクトン・ディッキンソン) (以上骨髄球系), CD2 (日本ベクトン・ディッキンソン), CD3 (ファーミンジェン, 大阪), CD4 (ファーミンジェン), CD5 (日本ベクトン・ディッキンソン), CD7 (ファーミンジェン) (以上T細胞系), CD10 (日本ベクトン・ディッキンソン), CD19 (ファーミンジェン), CD20 (日本ベクトン・ディッキンソン), CD22 (コールター, 大阪) (以上B細胞系)である。各抗体を用いて解析した抗原陽性細胞の比率(陽性率)が20%を超えた場合を陽性とした<sup>20</sup>。1種類以上のB細胞系抗原が陽性の場合, B細胞系抗原陽性とし, T細胞系抗原も同じように判定した。

## 2. 染色体の解析法

Seabright<sup>27</sup>のGバンド法に従い, 染色体スライドをトリプシン液に浸した後, ギムザ染色を施し鏡検した。

## 3. PCRによるIgH遺伝子再構成(IgH-PCR)の検出

### 1) テンプレートDNAの抽出

タンパク分解酵素処理後にヨウ化ナトリウムを加え, イソプロピルアルコールでDNAを沈殿させるヨウ化ナトリウム法<sup>28</sup>(DNA Extractor WB Kit, 和光, 大阪)を用いて末梢血または骨髄の未染色の塗抹標本よりDNAを抽出した。

### 2) PCR

PCRはIgH D領域のCDR-3をはさむ図1に示す塩基配列を有するプライマー(サワデーテクノロジー, 東京)を用いて実施した<sup>29,30</sup>。反応液はTaq DNAポリメラーゼ2.0単位, 10x緩衝液(100mM Tris-HCL, 500mM KCl, 15mM MgCl<sub>2</sub>, 1% Triton X-100) 5.0 $\mu$ l, デオキシヌクレオチド混合液3 $\mu$ l(いずれも和光), センスおよびアンチセンスプライマー各50ng, テンプレートDNA 0.5mgで, 総量が50 $\mu$ lとなるように精製水を加えた。反応条件は94 $^{\circ}$ C・2分30秒の前変性の後, 94 $^{\circ}$ C・30秒, 56 $^{\circ}$ C・45秒, 72 $^{\circ}$ C・1分45秒を32サイクル繰り返し, 最後に72 $^{\circ}$ C・7分の再伸長反応を行った。

### 3) 電気泳動

増幅産物は電気泳動装置(ミニゲルスラブ電気泳動装置, 日本エイドール, 東京)により100V定電圧下で10%ポリアクリルアミドゲル電気泳動<sup>10,15</sup>を行い, エチジウムブロマイド染色後トランスイルミネーター(UVP, フナコシ, 東京)上の紫外線下にて写真撮影した。なおPCRの陽性コントロールにはALL(B細胞)の細胞株であるBALL-1(理化学研究所細胞開発銀行か

ら供与)を用い, 陰性コントロールには正常人の末梢血を用いた。分子量マーカーとしては, *Hae*III消化 $\phi$ x174(マーカー4, ニッポンジーン, 東京)を用いた。

## 4. IgH-PCRの検出感度の検討

### 1) 細胞株

検体の中に単クローン性のB細胞がどの程度含まれているとIgH-PCRが陽性となるか, すなわちIgH-PCRの検出感度を検討するために, B細胞株を用いて次の実験を行った。

ALL(B細胞)の細胞株であるBALL-1を正常人の末梢血リンパ球にて希釈し, 50%, 10%, 1%および0.1%の濃度とし, それぞれについてIgH-PCR法により解析した。

### 2) 臨床検体

IgH-PCRの陽性症例において, 化学療法後に骨髄の白血病細胞が5%以下になり, 末梢血の回復がみられたとき, すなわちCRと判定された時点でIgH-PCRが陰性化するかどうかを確認するために, 初診時のIgH-PCRが陽性で治療後CRとなり, その後再発した1例について, 初診時, CR時, 再発時のそれぞれの骨髄中の白血病細胞におけるIgH-PCRの解析を行った。なお今回の症例中, 初診時にIgH-PCRが陽性で, CR後に再発したのは1例のみであった。

## 5. DNAの確認

目的とするDNAが正しく抽出されているかどうかを確認するために, 目的とするDNAに存在する既知の領域に対するプライマーを用いてPCRを行った。本研究ではアセチルCoAアセチルトランスフェラーゼ遺伝子に対するプライマー<sup>31</sup>を用いてPCRを行い, 全症例で正しく抽出されていることが確認された。

## 6. 統計学的解析

全生存率の計算は診断日より死亡日までで行った。生存曲線は Kaplan-Meier product-limit method<sup>32</sup>を用いた。2群間のCR率の比較はフィッシャー法(Fisher's exact test)にて行い, 全生存率の比較はログランクテスト(log-rank test)により検討した。

## 成 績

### I. 細胞表面抗原解析結果

すべての患者で骨髄球系抗原であるCD13が陽性であった。これに加えて5例(14%)でB細胞系抗原が陽性, 8例(23%)で

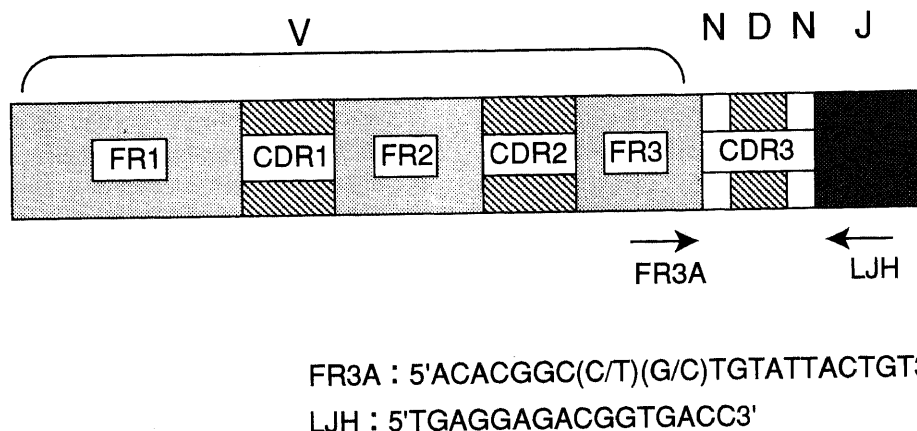


Fig. 1. Schematic representation of a rearranged IgH gene and sequences of the oligonucleotide primers. FR, framework; CDR, complementarity determining region.

T細胞系抗原が陽性であった。なお22例(63%)ではB細胞系抗原, T細胞系抗原ともに陰性であった(表2)。

II. 染色体の解析結果

治療前に骨髄が採取できた32例について染色体の解析を行った。その結果14例に染色体異常を認めた。内訳はt(8;21)を6例に, t(15;17)を5例に, その他の異常を3例に認めた。

III. IgH-PCR解析結果

1. 検出感度

1) 細胞株を用いての検討

BALL-1を正常リンパ球で希釈した場合, 濃度が1%以上あればモノクローナリティーを確認することができた(図2A)。したがって, 細胞株を用いた場合のIgH-PCRの感度は1%と考えられた。

2) 臨床検体での検討

初診時および再発時でIgH遺伝子再構成を確認できたが, CR時には確認できなかった(図2B)。したがって, 骨髄の白血病細胞が5%以下まで減少するとIgH遺伝子再構成は検出でき

ず, 臨床検体を用いた場合のPCR感度は5%以下であると考えられた。

2. IgH遺伝子再構成の有無と予後予測因子との関係

14例(40%)でIgH-PCRが陽性であった(表2)(図3)。これらの例について以下の項目につき検討した。

1) FAB分類

FAB分類M0-M6のすべての例においてIgH-PCR陽性を1症例以上に認めたが, とくにM0, M1およびM6にIgH-PCR陽性例が多い傾向がみられた(表3)。

2) 細胞表面抗原

B細胞系抗原陽性の5例中4例(80%)がIgH-PCR陽性であり, B細胞系抗原陰性の30例中10例(33%)がIgH-PCR陽性であった。また, T細胞系抗原陽性の8例中4例(50%)がIgH-PCR陽性であった。

3) 染色体

染色体異常を認めなかった群の18例中9例(50%)がIgH-PCR陽性であった(表4)。染色体異常を認めた群の14例中5例

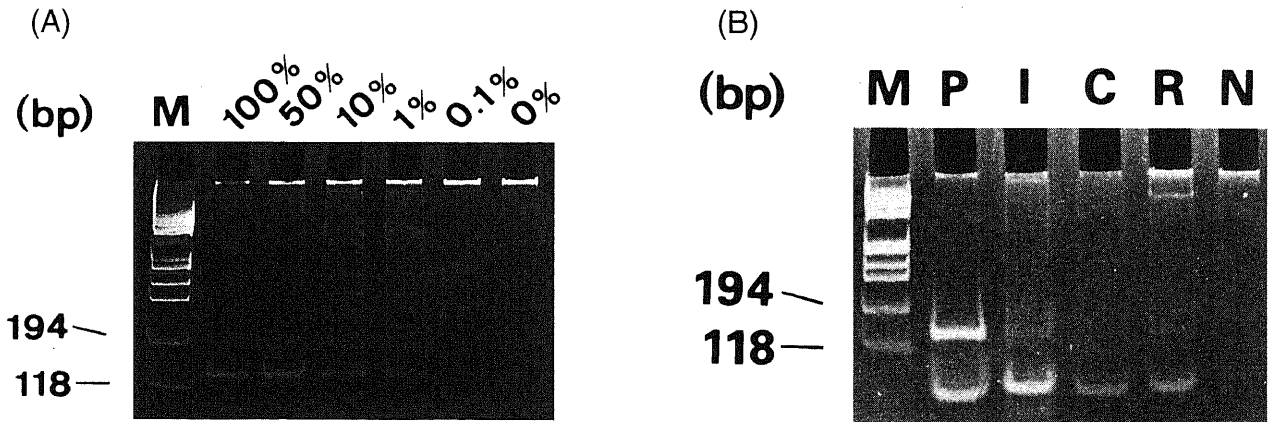


Fig. 2. Assessment of the sensitivity of IgH-PCR. (A) DNA extracted from B cell line (BALL-1) diluted with normal lymphocytes was amplified with FR3A and LJH primers. Polyacrylamide gel analysis of IgH-PCR products was performed. Clonal amplification products were detectable at a level of DNA extracted from BALL-1 cells diluted to 1%. (B) Polyacrylamide gel analysis of IgH-PCR products from Case No. 5. Clonal IgH gene rearrangement was not seen at CR state. M, size marker ( $\phi$ X174/*Hae* III); P, positive control (BALL-1); N, negative control (normal peripheral blood); I, at initial diagnosis; C, at CR; R, at relapse.

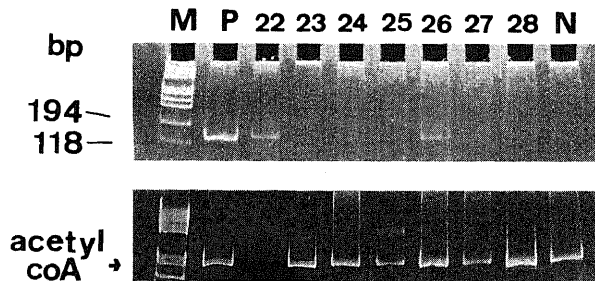


Fig. 3. Polyacrylamide gel analysis of IgH-PCR products from 7 patients (case no. 22, 23, 24, 25, 26, 27 and 28). Clonal IgH gene rearrangement was detected in two patients (case no. 22 and 26). Primers from acetyl CoA acetyltransferase gene were used to check the integrity of the DNA. M, size marker ( $\phi$ X174/*Hae* III); P, positive control (BALL-1); N, negative control (normal peripheral blood).

Table 3. Relationship between FAB classification and IgH rearrangement

FAB classification	No. of patients examined	No. (%) of patients with IgH-PCR +
M0	2	2 (100)
M1	5	3 ( 60)
M2	14	4 ( 29)
M3	7	2 ( 29)
M4	4	2 ( 50)
M5	2	0 ( 0)
M6	1	1 (100)

FAB, French-American-British ; IgH, Immunoglobulin heavy chain ; +, positive.

Table 4. Relationship between chromosome abnormality and IgH rearrangement

Chromosome abnormality	No. of patients examined	No. (%) of patients with IgH-PCR +
Normal	18	9 (50)
t (15; 17)	5	2 (40)
t (8; 21)	6	2 (33)
Other	3	1 (33)
Not evaluable	3	0 ( 0)

IgH, immunoglobulin heavy chain ; +, positive ; t, translocation.

Table 5. Therapeutic response according to FAB classification

FAB classification	No. of patients examined	No. (%) of patients with CR
M0	2	0 ( 0)
M1	5	4 ( 80)
M2	14	12 ( 86)
M3	7	6 ( 86)
M4	4	4 (100)
M5	2	2 (100)
M6	1	1 (100)

FAB, French-American-British ; CR ; complete remission.

Table 6. Therapeutic response according to chromosome abnormality

Chromosome abnormality	No. of patients examined	No. (%) of patients with CR
Normal	18	14 ( 78)
t (15; 17)	6	5 ( 83)
t (8; 21)	6	6 (100)
Other	3	2 ( 67)
Not evaluable	2	2 (100)

CR, complete remission ; t, translocation.

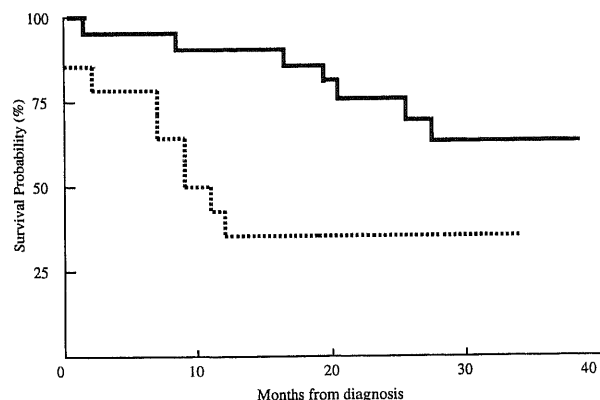


Fig. 4. Kaplan-Meier estimate of overall survival in IgH-PCR positive and negative patients with AML (n=35). Overall survival percentages for IgH-PCR positive and negative patients at 30 months were 35 % and 63 %, respectively ( $p < 0.05$ ). ----, IgH-PCR positive; —, IgH-PCR negative.

(36 %) が IgH-PCR 陽性であった。

#### 4) 白血球数

初診時の白血球数が  $20000/\mu\text{l}$  未満の群の 18 例中 12 例 (33 %) が IgH-PCR 陽性であった。白血球数が  $20000/\mu\text{l}$  以上の群では 17 例中 8 例 (47 %) が IgH-PCR 陽性であった。

#### IV. 治療効果と予後

29 例 (83 %) の患者が CR に到達した (表 2)。治療効果と予後に関して以下の項目について検討した。

##### 1. FAB 分類

FAB 分類の M0 は 2 例ともに CR に入らなかった。M4, M5 および M6 では全例が CR に到達した (表 5)。

##### 2. 細胞表面抗原

CR 率は B 細胞系抗原陽性群で 100 % (5 例中 5 例), T 細胞系抗原陽性群で 88 % (8 例中 7 例), 両者ともに陰性の群で 77 % (22 例中 17 例) であった。

##### 3. 染色体

t (15; 17) で 83 %, t (8; 21) で 100 % と高い CR 率を認めた (表 6)。染色体異常のない群の CR 率は 78 % であった。

##### 4. 白血球数

初診時の白血球数  $20000/\mu\text{l}$  未満の群での CR 率は 94 % (18 例中 17 例) と高率であったのに対し,  $20000/\mu\text{l}$  以上の群での CR 率は 71 % (17 例中 12 例) であった。

##### 5. IgH 遺伝子再構成の有無と全生存率

CR 率は IgH-PCR 陽性群で 64 % (14 例中 9 例) なのに対し, 陰性群で 95 % (21 例中 20 例) と有意に高率であった ( $p=0.02$ )。30 カ月の時点での全生存率も IgH-PCR 陽性群で 35 % であるのに対し, 陰性群では 63 % と有意に高率であった ( $p < 0.05$ ) (図 4)。

## 考 察

PCR 法による解析の結果, 35 例の AML 患者のうち 14 例 (40 %) にクローナルな IgH 遺伝子再構成を認めた。特に B 細胞抗原陽性群では 80 % に, B 細胞抗原陰性群においても 33 % に認めた。AML 患者における IgH 遺伝子再構成の検討は報告例が少なく<sup>16)33)~42)</sup>, しかもいずれの報告も症例数が少ないために, 再構成の頻度は 0-21 % とばらつきがみられた。1991 年に Adriaansen ら<sup>42)</sup>が自験例および過去の報告について調査したところ, 自験例では 54 例中 7 例 (13 %) に, 過去の報告と合わせると 423 例中 58 例 (14 %) に再構成を認めたと報告している。しかしこれまでの報告はいずれもサザンブロット法によるもので, PCR 法を用いた検討はまだない。IgH 遺伝子再構成の検討において PCR 法はサザンブロット法に比べ感度が約 100 倍高いとされている<sup>43)</sup>。本研究において IgH-PCR の感度を細胞株を用いて測定したところ, 検体中に単クローン性を有する B 細胞が 1 % 以上含まれていれば IgH-PCR 陽性と判定することができた。したがって今回の検討で単クローン性の IgH 遺伝子再構成を認めた症例がこれまでの報告に比べて多かったのは, 測定感度がより鋭敏であるためと考えられる。

一方で PCR 法はその感度の良さからしばしば偽陽性が問題となる。しかしこれまでのところ, 本研究と同様な実験条件下での IgH-PCR の検討において偽陽性を多く認めたという報告はない。本研究では初診時, CR 時および再発時について IgH-PCR の観察を行うことで, 精度を推定する指標とした。初診時の IgH-PCR が陽性であり, 治療後に CR に到達し, その後再発した 1 症例について, 経時的に CR 時および再発時の IgH-PCR

も調べることができた。この結果初診時と再発時にはIgH遺伝子再構成を認めたが、CR時にはみられなかった。このことから、IgH-PCR法は正確に病態を反映しているものと考えられた。

リンパ球系抗原陽性のAMLは化学療法に対する反応が不良とされている。Crossら<sup>44)</sup>は、リンパ球系抗原の一つであるCD2が陽性の10例のAMLについて検討を行い、CR率は50%でCD2の陰性例に比較して低率であったと報告している。またJensenら<sup>45)</sup>はリンパ球系抗原のうちCD7のみ陽性のAMLは予後が不良であると報告している。このようにリンパ球系抗原の中でも、CD2やCD7などのT細胞系抗原について予後との関係が報告されているが、B細胞の重要なマーカーの一つであるIgH遺伝子の再構成と予後についてはこれまで検討されていなかった。本研究においてIgH-PCR陰性群は陽性群に比べてCR率、全生存率ともに有意に高率であった。したがってIgH遺伝子再構成の有無はAMLにおいて予後予測因子の一つになり得ると考えられた。

AMLの予後予測因子については多くの報告がみられる<sup>46)~51)</sup>。Yunisら<sup>46)</sup>は105例のAMLについて検討を行い、FAB分類M1, M2, M4, M5aおよびM6の中で複雑な染色体異常をもつ例は予後が不良で、CR率は14%、生存期間の中央値は2.5カ月であったと報告している。Francais de Cytogenetique Hematologiqueグループ<sup>47)</sup>は148例のAMLの染色体異常について検討を行い、t(8;21)を持つAMLは予後が良くCR率は90.7%で、生存期間の中央値は17.5カ月、5年生存率は24%であったと報告している。またKantarjianら<sup>50)</sup>は、治療前の白血球数が多い例では予後が不良であったと報告している。森島ら<sup>51)</sup>も初診時の白血球数20000/ $\mu$ l以上の例では予後は不良であったと述べている。本研究においても、リンパ球系抗原の有無、染色体異常、白血球数について治療効果との関連性を検討した。その結果、染色体異常t(8;21)を持つ群のCR率は100%、白血球数が20000/ $\mu$ l未満の群のCR率は94%と良好で、これまでの報告と同様の成績が得られた。しかし、リンパ球系抗原の有無と治療効果との間には関連はみられなかった。また、染色体異常および白血球数とIgH遺伝子再構成との関係を検討したが、相関は認められなかった。

AMLにおける白血病細胞でIgH遺伝子再構成が検出される理由は明らかではない。同じような現象はリンパ球系のマーカーとされているターミナルデオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ (terminal deoxynucleotidyl transferase, TdT) においても認められている。TdTはDNAポリメラーゼの一種であり、ALLの約95%に陽性を示すが、AMLの一部にも陽性を示すことが知られている。TdTとIgH遺伝子再構成の関係については、Seremetisら<sup>37)</sup>が42例のAMLにおいて、TdT陽性例の60%以上にサザンブロット法でIgH遺伝子再構成を認めたと報告している。またFoaら<sup>40)</sup>は52例のAMLにおいて、TdT陽性例の10例中8例と高率にIgH遺伝子再構成を認めたのに対し、TdT陰性例では42例中2例にのみ再構成を認めたとすきず、このことからTdTの発現とIgH遺伝子再構成との間には関連性があり、TdTはIgHの再構成の際に働く重要な酵素ではないかと推測している。またTdTはAMLにおいて、FAB分類のM0やM1のような未分化な型に高率に出現することが知られている。Greavesら<sup>52)</sup>は、AMLにおいてリンパ球系抗原が陽性であったり、IgHやT細胞受容体(T cell receptor, TcR)の遺伝子再構成

が検出されるのは、遺伝子のプログラミングミスではなく、多能性幹細胞や正常の血液細胞分化の過程において一時的にみられる“系の混乱”(lineage promiscuity)のためであると説明している。Fontenayら<sup>53)</sup>も、AMLにおけるTcR遺伝子再構成は、未分化なAMLに多くみられ、lineage promiscuityのためにリンパ球系抗原を合わせ持ったと考えられると報告している。本研究ではTdTの検索は行わなかったが、未分化なAMLとされているFAB分類のM0やM1にIgH遺伝子再構成を有する例が多くみられたことは、“系の混乱”(lineage promiscuity)で生じた可能性を示唆していると考えられる。

以上のようにIgH遺伝子再構成の有無はAMLの予後予測因子になり得ると考えられる。今後、PCR法を用いたIgH遺伝子再構成の検索は、造血幹細胞移植を必要とする症例を選択する際の判断の材料にするなど、臨床の場での利用が期待される。

## 結 論

AMLにおける白血病細胞のIgH遺伝子再構成についてPCR法により検討し、再構成の有無が予後予測因子となり得るか否かについて臨床的に解析し、以下の結果を得た。

- 1) 35例のAML患者のうち14例(40%)に単クローン性のIgH遺伝子再構成を認めた。
- 2) B細胞系抗原陽性群では80%に、陰性群においても33%にIgH-PCR陽性を認めた。
- 3) IgH遺伝子再構成の無いAMLは再構成を有する例に比べてCR率、全生存率ともに有意に高率であった。
- 4) 予後予測因子とされている初診時の末梢白血球数や染色体異常とIgH遺伝子再構成の有無との間に相関関係は認められなかった。
- 5) IgH遺伝子再構成の有無はAMLの新しい予後予測因子の一つになるものと考えられた。

## 謝 辞

稿を終えるに臨み、御指導と御検閲を賜りました松田 保教授に深甚なる謝意を表します。また、御指導と御助言を頂きました中村 忍内科学第三講座助教授ならびに内科学第三講座の諸先生方に深謝いたします。また細胞表面抗原の解析にご協力いただいた輸血部の安江静香技官に感謝いたします。

なお、本論文の一部は、第26回国際血液学会議(1996, シンガポール)、第59回日本血液学会総会(1997, 京都)において発表した。

## 文 献

- 1) Alt FW, Oltz EM, Young F. VDJ recombination. *Immunol Today* 13: 306-314, 1992
- 2) Korsmeyer SJ, Hieter PA, Ravetch JV, Poplack DG, Waldmann TA, Leder P. Developmental hierarchy of immunoglobulin gene rearrangements in human leukemic pre-B cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 78: 7096-7100, 1981
- 3) Cleary ML, Chao J, Warnke R, Sklar J. Immunoglobulin gene rearrangement as a diagnostic criterion of B-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 593-597, 1984
- 4) Griesser H, Tkachuk D, Reis MD, Mak TW. Gene rearrangements and translocations in lymphoproliferative disease. *Blood* 73: 1402-1415, 1989
- 5) Griesser H, Feller A, Lennert K, Minden M, Mak TW. Rearrangement of the  $\beta$  chain of the T cell antigen receptor and

- immunoglobulin genes in lymphoproliferative disorders. *J Clin Invest* 78: 1179-1184, 1986
- 6) Korsmeyer SJ, Arnold A, Bakhshi A, Ravetch JV, Siebenlist U, Hieter PA, Sharrow SO, LeBien TW, Kersey JH, Poplack DG, Leder P, Waldmann TA. Immunoglobulin gene rearrangement and cell surface antigen expression in acute lymphocytic leukemias of T cell and B cell precursor origins. *J Clin Invest* 71: 301-313, 1983
- 7) Trainor KJ, Brisco MJ, Story CJ, Morley AA. Monoclonality in B-lymphoproliferative disorders detected at the DNA level. *Blood* 75: 2220-2222, 1990
- 8) Trainor KJ, Brisco MJ, Wan JH, Neoh S, Grist S, Morley AA. Gene rearrangement in B and T-lymphoproliferative disease detected by the polymerase chain reaction. *Blood* 78: 192-196, 1991
- 9) Linke B, Pytlich J, Tiemann M, Suttorp M, Parwaresch R, Hiddemann W, Kneba M. Identification and structural analysis of rearranged immunoglobulin heavy chain gene in lymphomas and leukemias. *Leukemia* 9: 840-847, 1995
- 10) Aubin J, Davi F, Nguyen Salomon F, Leboeuf D, Debert C, Taher M, Valensi F, Canioni D, Brousse N, Varet B, Flandrin G, Macintyre EA. Description of a novel FR1 IgH PCR strategy and its comparison with three other strategies for the detection of clonality in B cell malignancies. *Leukemia* 9: 471-479, 1995
- 11) McCarthy KP, Sloane JP, Wiedemann LM. Rapid method for distinguishing clonal from polyclonal B cell populations in surgical biopsy specimens. *J Clin Pathol* 43: 429-432, 1990
- 12) Ben-Ezra J. Variable rate of detection of immunoglobulin heavy chain V-D-J rearrangement by PCR: a systematic study of 41 B-cell non-Hodgkin's lymphomas and leukemias. *Leuk Lymphoma* 7: 289-295, 1992
- 13) Liang R, Chan V, Chan TK, Wong T, Chiu E, Lie A, Todd D. Detection of immunoglobulin gene rearrangement in lymphoid malignancies of B-cell lineage by seminested polymerase chain reaction gene amplification. *Am J Hematol* 43: 24-28, 1993
- 14) Lehman CM, Sarago C, Nasim S, Comerford J, Karcher DS, Garrett CT. Comparison of PCR with southern hybridization for the routine detection of immunoglobulin heavy chain gene rearrangements. *Am J Clin Pathol* 103: 171-176, 1995
- 15) Sioutos N, Bagg A, Michaud GY, Irving SG, Hartmann DP, Siragy H, Oliveri DR, Locker J, Cossman J. Polymerase chain reaction versus Southern blot hybridization. Detection of immunoglobulin heavy chain gene rearrangements. *Diagn Mol Pathol* 4: 8-13, 1995
- 16) Rovigatti U, Mirro J, Kitchingman G, Dahl G, Ochs J, Murphy S, Stass S. Heavy chain immunoglobulin gene rearrangement in acute nonlymphocytic leukemia. *Blood* 63: 1023-1027, 1984
- 17) Marshall GM, Kwan E, Haber M, Brisco MJ, Sykes PJ, Morley AA, Toogood I, Waters K, Tauro G, Ekert H, Norris MD. Characterization of clonal immunoglobulin heavy chain and T cell receptor gamma gene rearrangements during progression of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 9: 1847-1850, 1995
- 18) Brisco J, Hughes E, Neoh SH, Sykes PJ, Bradstock K, Enno A, Szer J, McCaul K, Morley AA. Relationship between minimal residual disease and outcome in adult acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 87: 5251-5256, 1996
- 19) Ladetto M, Corradini P, Astolfi M, Campana S, Tarella C, Pileri A. Long-term molecular remission after conventional chemotherapy in a patient with Philadelphia-negative acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* 81: 159-161, 1996
- 20) 金丸昭久. 急性骨髄性白血病の治療方針. *カレントセラピー* 12: 55-59, 1994
- 21) Kanamaru A, Takemoto Y, Tanimoto M, Murakami H, Asou N, Kobayashi T, Kuriyama K, Ohmoto E, Sakamaki H, Tsubaki K, Hiraoka A, Yamada O, Oh H, Saito K, Matsuda S, Minato K, Ueda T, Ohno R. All-trans retinoic acid for the treatment of newly diagnosed acute promyelocytic leukemia. *Blood* 85: 1202-1206, 1995
- 22) Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DAG, Gralnick HR, Sultan C. Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. *Ann Int Med* 103: 620-625, 1985
- 23) William JW, Beutler E, Erslev AJ, Lichtman MA. Chapter A22 Leukocyte peroxidase. *Hematology*, 4th ed, p1745-1746, McGraw-Hill, New York, 1989
- 24) William JW, Beutler E, Erslev AJ, Lichtman MA. Chapter A27 Leukocyte esterases. *Hematology*, 4th ed, p1751-1754, McGraw-Hill, New York, 1989
- 25) Kobayashi T, Miyawaki S, Tanimoto M, Kuriyama K, Murakami H, Yoshida M, Minami S, Minato K, Tsubaki K, Ohmoto E, Oh H, Jinnai I, Sakamaki H, Hiraoka A, Kanamaru A, Takahashi I, Saito K, Naoe T, Yamada O, Asou N, Kageyama S, Emi N, Matsuoka A, Tomonaga M, Saito H, Ueda R, Ohno R for the Japan Adult Leukemia Study Group. Randomized trials between behenoyl cytarabine and cytarabine in combination induction and consolidation therapy, and with or without ubenimex after maintenance/intensification therapy in adult acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol* 14: 204-213, 1996
- 26) Paietta E, Andersen J, Wiernik PH. A new approach to analyzing the utility of immunophenotyping for predicting clinical outcome in acute leukemia. *Leukemia* 10: 1-4, 1996
- 27) Seabright M. A rapid banding technique for human chromosomes. *Lancet* 2: 971-972, 1971
- 28) Wang L, Hirayasu K, Ishizawa M, Kobayashi Y. Purification of genomic DNA from human whole blood by isopropanol-fractionation with concentrated NaI and SDS. *Nucleic Acids Res* 22: 1774-1775, 1994
- 29) 湯本典男, 黒須克志, 尾崎修武, 三村 孝, 伊藤國彦, 谷口克, 三方淳男. 胃および甲状腺リンパ腫パラフィン切片のPCRを用いたクロナリティーの検出. *日網会誌* 34: 337-346, 1994
- 30) De Re V, De Vita S, Carbone A, Ferraccioli G, Gloghini A, Marzotto A, Pivetta B, Dolcetti R, Boiocchi M. The relevance of VDJ PCR protocols in detecting B-cell clonal expansion in lymphomas and other lymphoproliferative disorders. *Tumori* 81: 405-409, 1995
- 31) Height SE, Swansbury GJ, Matutes E, Treleaven JG,



- Catovsky D, Dyer MJS. Analysis of clonal rearrangements of the Ig heavy chain locus in acute leukemia. *Blood* 87: 5242-5250, 1996
- 32) Kaplan EL, Meier P. Non parametric estimation from incomplete observation. *J Am Stat Assoc* 53: 457-481, 1958
- 33) Ha K, Minden N, Hozumi N, Gelfand EW. Immunoglobulin gene rearrangement in acute myelogenous leukemia. *Cancer Res* 44: 4658-4660, 1984
- 34) Cheng GY, Minden MD, Toyonaga B, Mak TW, McCulloch EA. T cell receptor and immunoglobulin gene rearrangements in acute myeloblastic leukemia. *J Exp Med* 163: 414-424, 1986
- 35) Foa R, Casorati G, Giubellino MC, Basso G, Schiro R, Pizzolo G, Lauria F, Lefranc MP, Rabbitts TH, Migone N. Rearrangements of immunoglobulin and T cell receptor  $\beta$  and  $\gamma$  genes are associated with terminal deoxynucleotidyl transferase expression in acute myeloid leukemia. *J Exp Med* 165: 879-890, 1987
- 36) Boehm TLJ, Werle A, Drahovsky D. Immunoglobulin heavy chain and T cell receptor  $\gamma$  and  $\beta$  chain gene rearrangements in acute myeloid leukemias. *Mol Biol Med* 4: 51-62, 1987
- 37) Seremetis SV, Pelicci PG, Tabilio A, Ubriaco A, Grignani F, Cuttner J, Winchester RJ, Knowles DM II, Dalla-Favera R. High frequency of clonal immunoglobulin or T cell receptor gene rearrangements in acute myelogenous leukemia expressing terminal deoxyribonucleotidyl transferase. *J Exp Med* 165: 1703-1712, 1987
- 38) Goorha R, Bunin N, Mirro J Jr, Murphy SB, Cross AH, Behm FG, Quertermous T, Seidman J, Kitchingman GR. Provocative pattern of rearrangements of the genes for the  $\gamma$  and  $\beta$  chains of the T-cell receptor in human leukemias. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 4547-4551, 1987
- 39) Lee MS, Chang KS, Trujillo JM, McCredie KB, Keating MJ, Freireich EJ, Stass SA. T-cell receptor gamma chain gene rearrangement in acute myelogenous leukemia - evidence for lymphoid lineage prematurity. *Hematol Pathol* 1: 93-98, 1987
- 40) Foa R, Casorati G, Giubellino MC, Basso G, Schiro R, Pizzolo G, Lauria F, Lefranc MP, Rabbitts TH, Migone N. Rearrangements of immunoglobulin and T cell receptor  $\beta$  and  $\gamma$  genes are associated Mertelsmann R, Herrmann F. Incidence of lineage promiscuity in acute myeloblastic leukemia: diagnostic implications of immunoglobulin and T-cell receptor gene rearrangement analysis and immunological phenotyping. *Leuk Res* 12: 887-895, 1988
- 41) Fontenay M, Flandrin G, Baurman H, Loiseau P, Valensi F, Daniel MT, Sigaux F. T cell receptor d gene rearrangements occur predominantly in immature myeloid leukemias exhibiting lineage promiscuity. *Leukemia* 4: 100-105, 1990
- 42) Adriaansen HJ, Soeting PWC, Wolvers-Tettero ILM, Dongen JJM. Immunoglobulin and T-cell receptor gene rearrangements in acute non-lymphocytic leukemias. Analysis of 54 cases and review of the literature. *Leukemia* 5: 744-751, 1991
- 43) De Re V, De Vita S, Carbone A, Ferraccioli G, Gloghini A, Marzotto A, Pivetta B, Dolcetti R, Boiocchi M. The relevance of VDJ PCR protocols in detecting B-cell clonal expansion in lymphomas and other lymphoproliferative disorders. *Tumori* 81: 405-409, 1995
- 44) Cross AH, Goorha RM, Nuss R, Behm FG, Murphy SB, Kalwinsky DK, Raimondi S, Kitchingman GR, Mirro J Jr. Acute myeloid leukemia with T- lymphoid features: a distinct biologic and clinical entity. *Blood* 72: 579-587, 1988
- 45) Jensen AW, Hokland M, Jorgensen H, Justesen J, Ellegaard J, Hokland P. Solitary expression of CD7 among T-cell antigens in acute myeloid leukemia. *Blood* 78: 1292-1300, 1991
- 46) Yunis JJ, Brunning RD, Howe RB, Lobell M. High resolution chromosomes as an independent prognostic indication in adult acute nonlymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 311: 812-818, 1984
- 47) Groupe Francais de Cytogenetique Hematologique. Acute myelogenous leukemia with an 8; 21 translocation. A report on 148 cases from the Groupe de Cytogenetique Hematologique. *Cancer Genet Cytogenet* 44: 169-179, 1990
- 48) Mitus AJ, Miller KB, Schenkein DP, Ryan HF, Parsons SK, Wheeler C, Antin JH. Improved survival for patients with acute myelogenous leukemia. *J Clin Oncol* 1995 13: 560-569, 1995
- 49) Schwarzingler I, Valent P, Koller U, Marosi C, Schneider B, Haas O, Knapp W, Lechner K, Bettelheim P. Prognostic significance of surface marker expression on blasts of patients with de novo acute myeloblastic leukemia. *J Clin Oncol* 8: 423-430, 1990
- 50) Kantarjian HM, Keating MJ, Walters RS, McCredie KB, Freireich EJ. The characteristics and outcome of patients with late relapse acute myelogenous leukemia. *J Clin Oncol* 6: 232-238, 1988
- 51) 森島泰雄, 谷本光音, 小寺良尚, 宮脇修一, 平林憲之, 朝長万左男, 小島博嗣, 小林 透, 小野澤康輔, 仁田正和, 椿 和央, 山田博豊, 平岡 諒, 浜島信之, 大野竜三 名古屋骨髄移植グループ Japan Adult Leukemia Study Group. HLA適合同種骨髄移植の成績とその限界 - 急性骨髄性白血病第1寛解期における骨髄移植成績と化学療法成績との比較 -. *臨床血液* 36: 517-523, 1995
- 52) Greaves MF, Chan LC, Furley AJ, Watt SM, Molgaard HV. Lineage promiscuity in hemopoietic differentiation and leukemia. *Blood* 67: 1-11, 1986
- 53) Fontenay M, Flandrin G, Baurman H, Loiseau P, Valensi F, Daniel MT, Sigaux F. T cell receptor d gene rearrangements occur predominantly in immature myeloid leukemias exhibiting lineage promiscuity. *Leukemia* 4: 100-105, 1990

**Detection of immunoglobulin heavy chain gene rearrangement in acute myelogenous leukemia using polymerase chain reaction** Katsunori Kyoda, Third department of Internal Medicine, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920 — J. Jusen Med Soc., **106**, 391 — 399 (1997)

**Key words** IgH gene rearrangement; PCR; AML; Prognosis

#### **Abstract**

Immunoglobulin heavy chain (IgH) gene rearrangement in B cell malignancies has been analyzed using Southern blot hybridization. Recently clonality can be determined using the polymerase chain reaction (PCR). Little attention, however, has been given to the relationship between prognosis and IgH gene rearrangement in patients with acute myelogenous leukemia (AML). There has been no report about IgH gene rearrangement in AML using PCR. In this study, IgH gene rearrangement in 35 untreated AML patients was examined using PCR. Furthermore, whether IgH gene rearrangement can be a prognostic factor in AML was analyzed. PCR was performed using consensus heavy chain complementarity to determine region (CDR)-3 primers. Clonal IgH gene rearrangement was detected in 14 patients (40%). Four of 5 patients (80%) who were positive for B cell markers had clonal IgH gene rearrangement. Ten of 30 B cell antigen-negative patients (33%) also showed IgH rearrangement. All patients were treated with a daunorubicin-based regimen, resulting in complete remission for twenty-nine patients (83%). Sixty-four percent of those with IgH rearrangement and 95% of those without rearrangement had complete remission. Overall survival of IgH-PCR positive and negative patients at 30 months were 35% and 63%, respectively. IgH-PCR positivity may be a new poor prognostic factor in AML.