

CGH法によるATLの解析ならびにSKY法, CGH法によるdminの染色体DNA の由来と増幅遺伝子の同定

有山 洋二

近畿大学医学部第3内科学教室

抄 録

ATLにおける各染色体領域のコピー数の変化を同定するために comparative genomic hybridization を用いて ATL 由来細胞株 8 株と ATL 症例 12 例の末梢血液を解析した。細胞株において高頻度にコピー数増加を検出した領域は 2p, 7q, 14q であり, 最小共通領域はそれぞれ 2p16-22, 7q21-36, 14q32 であった。14q32 と 2p16-22 にはそれぞれ T-cell lymphoma/leukemia-1 (TCL1) 遺伝子と human T-cell leukemia virus enhancer factor (HTLF) 遺伝子が存在する。ATL 細胞株の FISH による解析の結果 TCL1 と T-cell receptor α (TCR α) 遺伝子の再構成はなく, 14q32 のコピー数増加があるにも拘らず TCL1 の発現はなかった。さらに 2p のコピー数増加を検出した ATL 細胞株に HTLF 遺伝子の高発現はなかった。2p16-22 と 14q32 の染色体領域に HTLF と TCL1 以外の ATL の不死化や白血病化に関与する遺伝子の存在が示唆された。double minute chromosome (dmin) は遺伝子増幅の場となる染色体異常として知られている。spectral karyotyping 及び comparative genomic hybridization を用いて dmin を持つ白血病細胞の増幅遺伝子の起源の同定を行った。急性骨髄性白血病 (AML) 細胞株 KY821 及び AML 症例を対象とした。SKY 法の結果から KY821 の dmin は 8 番染色体由来の染色体断片であることが明らかになった。CGH 法により 8q22-24 のコピー数増加を検出し, c-myc 遺伝子の増幅を明らかにした。AML 症例の dmin は 11 番染色体由来の断片であり, さらに partial tandem duplication を伴う myeloid-lymphoid leukemia (MLL) の遺伝子増幅であることを明らかにした。

Key words: SKY, CGH, ATL, dmin, 遺伝子増幅, MLL, PTD

結 言

近年 fluorescent in situ hybridization (以下 FISH 法) を基盤とする 2 つの分子細胞遺伝子解析法が確立されてきた。comparative genomic hybridization (以下 CGH 法) は腫瘍に生じたコピー数の異常を第 1-22, XY 染色体上に検出する copy number karyotyping 法であり^{1,2}, spectral karyotyping (以下 SKY 法)³ は 24 種類のヒト染色体のすべてを染め分けることができる。これらの方法により, 従来の染色体技術では見いだせなかった遺伝子増幅や微細な染色体転座が同定できるようになった。

adult T-cell leukaemia/lymphoma (ATL) は HTLV-1 ウイルス感染が関与し^{4,5}, リンパ球の形態異常, T 細胞マーカーなどの臨床像により特徴づけ

られる。しかし, HTLV-1 ウイルス自身には癌遺伝子を持たないこと, HTLV-1 感染者のうち極くわずかの患者 (0.01-0.02%) にしか ATL を発症しないこと⁶ などから何らかの付加的遺伝学的変化がこの疾患の発症に関与していると考えられている。ATL の細胞遺伝学調査でトリソミー 3, 7, 21 や 6q, 3q, 10p, の欠失や 14q32 または 14q11 転座などの多数の細胞学的異常が報告されている⁷。しかし, ATL の核型は複雑であり, その異常は多岐にわたるため, 各染色体領域のコピー数の変化を含めた異常を見いだすことは診断, 予後の判定に重要な意義がある。CGH 法は, 腫瘍細胞に生じた各染色体領域の過剰, 欠失さらに遺伝子増幅を一度の解析でスクリーニングしうる whole-genome scanning に有用な方法である⁸。本研究では, 各染色体領域のコピー数の変化

を見いだすために急性型 ATL 症例および ATL 由来細胞株を対象に CGH 法を用いて解析を行った。今回の研究で用いた ATL 細胞株には 14q32 と 2p16-22 に高頻度にコピー数の増加を検出した。14q32 領域には TCL1 遺伝子が存在し、peripheral T-cell lymphocytic leukaemias (PTLL) においては t(14;14)(q11;q32.1) や inv(14)(q11;q32.1) のような TCR α/δ loci の転座や逆位が高頻度に見られる^{9,10}。14q32 領域のコピー数の増加を認めたことから ATL の病態にも TCL1 遺伝子 TCR α/δ 遺伝子の再構成が関与している可能性があるため、ATL 細胞株における TCR α の再構成を伴った TCL1 のコピー数増加の有無を検討した。さらに、14q32 領域のコピー数の増加を認めた細胞株の TCL1 遺伝子の発現レベルでの増加の有無を検討するために RT-PCR 法を用いて調べた。また、2p16-22 領域には転写因子のひとつである HTLF (human T-cell leukemia virus enhancer factor) 遺伝子が存在し¹¹、ATL の病態への関与を調べるために ATL 細胞株における HTLF の発現を RT-PCR 法を用いて調べた。

double minute chromosome (dmin) 及び homogeneous staining region (HSR) は遺伝子増幅の場となる染色体異常として知られている¹²。dmin や HSR にはしばしば、癌遺伝子や増殖因子、増殖因子受容体、さらに薬剤耐性遺伝子などが増幅している。逆に dmin や HSR などの染色体異常を検出した腫瘍細胞では何らかの遺伝子変化が生じており、増幅したゲノム DNA を解析することにより新規の癌遺伝子や薬剤耐性遺伝子を同定しうる可能性がある。本研究では、dmin を持つ AML 由来の細胞株 KY821¹³ および AML 症例を対象に、SKY 法、CGH 法を用いたアプローチを用いて dmin の由来の同定を行ったところ、AML 症例の dmin 上で myeloid-lymphoid leukemia (MLL) 遺伝子が増幅していることが明らかになった。MLL 遺伝子は 11q23 領域に座位しており、11q23 型転座は de novo 及び二次性の急性骨髄性白血病 (AML) の両方におこりうる遺伝子変化の一つである^{14,15}。11q23 型転座例では MLL 遺伝子と他の遺伝子が融合し、癌発症または進展に関連した融合蛋白を発現していると考えられている¹⁴。11q23 型転座は少なくとも 26 の異なった染色体パートナーが報告されており^{16,17}、MLL 遺伝子の exon5-11 (9kb) に breakpoint cluster lesion (bcr) が存在することが知られている^{14,15,18}。また最近、正常核型もしくはトリソミー-11 の AML のいくつかの例に MLL 遺伝子の internal portion の partial tandem duplication (PTD) が発生することが

報告された^{19,20}。PTD を起こす型の MLL 遺伝子の再構成は白血病化に関連した partially duplicated protein をコードする mRNA を転写していると考えられている¹⁹。本研究における AML 症例の増幅 MLL 遺伝子が他の染色体パートナーと再構成しているか否かを調べ、さらに、増幅 MLL 遺伝子に PTD を起こしているかどうか調べるために FISH 法、RT-PCR 法による検討を行った。

材 料

ATL

ATL 由来の細胞株 8 種類と急性型 ATL12 症例の血液から得た末梢血単核球 12 例を対象とした (表 1)。ATL 細胞株のうち 3 種類 (HUT78, ATL-5T, SD-4) については詳細な報告がなされており^{21,22}、他の 5 種類の細胞株 (OMT-1, KK-1, KPNT-1, IPAT-1 and ST-1) は治療前の ATL 患者の末梢血単核球から樹立された。6 種類の細胞株 (OMT-1, KK-1, SD-4, KPNT-1, IPAT, ST-1) は IL-2 依存性であった (表 1)。12 例の ATL は臨床像、血液学的所見、血清 HTLV-1 抗体から診断し、末梢血単核球は ficoll/hypaque (Pharmacia LKB, Uppsala, Sweden) を用いて比重遠心法で単離した。さらに、全ての例において HTLV-1 DNA のホストゲノムへのインテグレーションをサザンブロット法によって確認した。

KY821

急性骨髄性白血病患者から樹立された細胞株¹³で、核型は複雑な構造異常とともに多数の dmin を持つ (図 6 a)。KY821 の亜株である MTX 耐性株では dehydrofolate reductase (DHFR) 遺伝子の増幅を Southern 及び in situ hybridization 法で証明されている。しかし、KY821 親株では c-myc 遺伝子や dehydrofolate reductase (DHFR) 遺伝子の遺伝子増幅を証明されていない²³。

AML 症例

64 歳男性。主訴は鼻出血と全身倦怠感。myelotoxic drug や放射線照射を受けた既往はない。末梢血白血球数 90000/ μ l (monoblast cell 84%) と増加し、骨髓塗抹検査より FAB 分類に従って AML-M5a と診断した。患者は behenoyl cytarbin, daunorubicin, methotrexate による化学療法を施行されたが治療抵抗性で 23 日後に敗血症と DIC (disseminated intravascular coagulation) のため死亡した。骨髓細胞の G 分染法で 20 のメタフェーズを解析し、核型は全て 45, X, -Y, +6, +8, -11, add(17)

(p13), -20, add(22)(p10), 6~21 dmin であった。

方 法

CGH 法

CGH 法は既報の方法で行った^{1,29}。プローブとする高分子 DNA は、白血病細胞と正常末梢血単核球からそれぞれプロテナーゼス/フェノール/クロロホルム処理によって抽出した。腫瘍(test)DNA は Spectrum Green-dUTP (Vysis, Boston, MA) で、正常リファレンス DNA は Texas Red-dUTP (NEN-Dupont, Boston, MA) でそれぞれニックトランスレーション法を用いて標識した。標識した腫瘍 DNA と正常 DNA は同量 (180 ng) ずつ Cot-1 DNA (15 µg) (GIBCO/BRL, Gaithersburg, MD) と共にエタノール沈殿し、ハイブリダイゼーションバッファーに溶解した。正常男性の末梢血リンパ球から PHA 刺激によって得たメタフェーズ染色体上に調整したプローブを置き湿箱中で 37°C, 3 日から 5 日間ハイブリダイズした。ハイブリダイゼーション後洗浄し、染色体を同定するために 4', 6'-diamino-2-phenylindol (DAPI) を用いて対比染色をした。蛍光ハイブリダイゼーションシグナルと DAPI 染色パターンは CCD (cooled charge-coupled device) カメラ (Photometrics, Tucson, AZ) を装着した Nikon 顕微鏡 (Eclips E600) で取り込み、Quips image analysis system (Vysis) を用いて解析を行った。用いたソフトウェアによって G/R (腫瘍 DNA/正常 DNA) 蛍光強度比をそれぞれの染色体の長軸に沿って算出した。少なくとも 6 つの染色体の G/R 蛍光強度比の平均をグラフ化しプロファイルを描いた。セントロメア領域やヘテロクロマチン領域は反復配列で構成され、個人の多型性からこれらの領域の G/R 蛍光強度比の定量性に欠くためにセントロメア近傍のと Y 染色体全体は解析から除外した。

two-color FISH 法

プローブの標識とハイブリダイゼーションおよびシグナルの検出は既報の方法で行った²⁴。シグナルを検出しようとする一方のプローブを digoxigenin-11-dUTP (Boehringer, Indianapolis) で、もう一方を biotin-16-dUTP (Boehringer, Indianapolis) でそれぞれニックトランスレーション法で標識した。標識したプローブは短鎖化鮭精子 DNA と共にエタノール沈殿し 20 µg のホルムアルデヒドに溶解した。プローブ溶液(それぞれ 125 ng)はハイブリダイゼーションバッファーを加える前に Cot 1 DNA

(250 ng/µl) と共に加熱変性した。ハイブリダイゼーション混合液を通常の方法で作成した腫瘍細胞のメタフェーズ染色体標本の上に置き、湿箱中で 37°C, 16~18 時間ハイブリダイズした。洗浄後に FITC-アビジン (終濃度 5 µg/ml) と抗ジゴキシゲニン-ローダミン (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Germany) (終濃度 1 µg/ml) でシグナルを検出した。DAPI を用いて対比染色後、CCD camera (Photometrics) を装着した Nikon Eclipse 蛍光顕微鏡でシグナルを観察した。画像は Quips (Vysis) ソフトウェアで取り込んだ。

RT-PCR

材料となる ATL 細胞株から TRIzol (Gibco BRL) 試薬を用いて total RNA を抽出した。抽出した total RNA からランダムプライマー (Boehringer Mannheim, Indianapolis) を用いて逆転写酵素により cDNA を作製した。ATL 細胞株の RT-PCR 解析のために既報の cDNA 配列をもとに TCL1, HTLF, β アクチン特異的プライマーを作製した。TCL1 特異的プライマー; TCL1-U1 (5'-AGGCCTATGACCCCCACC-3'), TCL-R2 (5'-CATTCCTCCC AGACCCCA-3'), HTLF 特異的プライマー; HTLF-2F (5'-CACCAACAGGCTGGAAGAAT-3'), TCL-R2 (5'-GGATCAATGCTGGTGG CTAA-3'), β アクチン特異的プライマー; ACTIN-S (5'-CCAGAGATGGCCACGGCTGCT-3') ACTIN-AS (5'-TCCTTCTGCATCCTGTCGGCT-3') とした。PCR 条件は変性 94°C で 30 秒, アニーリング 60°C で 30 秒伸長反応を 72°C で 30 秒を 1 サイクルとし 25 (TCL1), 30 (HTLF), 25 (β-action) サイクルで行った。PCR 産物を 3.0% アガロースゲル電気泳動し、ナイロンメンブレンにサザンブロットした後 ³²P 標識したインターナルオリゴヌクレオチドでハイブリダイズした。AML 症例のカルノア固定細胞核からは CatrimoxTM-14 RNA isolation kit (TAKARA, Shiga) を用いて total RNA を抽出した。AML 症例の PTD を検出するために既報のプライマーを使用した¹⁹。ファーストストランド cDNA は MLLex3R (5' AGG GCT TTG TCT GAC AAC TG 3') を用いて合成した。ファーストラウンド PCR は 654c (5' AGG AGA GAG TTT ACC TGC TC 3') と 5.3f (5' GGA AGT CAA GCA AGC AGG TC 3') を用いて増幅した。セカンドラウンド PCR はファーストラウンド PCR 産物を鋳型に 6.1 (5' GTC CAG AGC AGA GCA AAC AG 3') と 400c (5' ACA CAG ATG GAT CTG AGA GG 3') を用いて増幅した。MLL exons 2-3 の

cDNA は RT-PCR のインナーコントロールとして用い、プライマー Cf1 (5' AA TTC TTA GGT TTT GGC TCA G 3') と 654c を使用した。全ての PCR 産物は 2.0% アガロースゲル電気泳動し、確認のために 228bp 産物を ABI オートシーケンサーでダイレクトシーケンスを行った。

SKY 法

SKY 法は既報の方法で行った^{26,27,28}。Spectrum Orange, Texas Red, Cy5, Spectrum Green, Cy5.5 の 5 種類の色素を種々の組み合わせで各染色体を標識したプローブである SKY™ hybridization and detection kit (ASI, Israel) を用いた。リファレンススペクトラムの組み合わせによってそれぞれの染色体を識別する蛍光色素の差異は SkyView システム (ASI) を用いて検出した²⁶。5 種類の色素を単独で単一の染色体にハイブリダイズした後、それらの蛍光スペクトルを測定し、リファレンススペクトラムを作製した。腫瘍サンプルのメタフェーズ標本は標準的方法で作製した。カルノア固定細胞核を予め洗浄したスライドガラスの上に落とした後、70%酢酸で余分な細胞質を除去した。ハイブリダイゼーション前にメタフェーズ染色体スライドの細胞質を除去するために 0.01% トリプシン処理を行った後、熱変性した SKY™ プローブ混合液 10 µl を染色体標本上に乗せ湿箱中で 37°C で 48 時間静置した。ビオチン標識したシーケンスはアビジン-Cy5 で、ジゴキシゲニン標識したシーケンスは抗マウスジゴキシン抗体を結合後ヤギ抗マウス抗体-Cy5.5 でそれぞれ蛍光シグナルを検出し、染色体を同定するために DAPI で対比染色を行った。SpectraCube SD200 システム (Applied Spectral Imaging, Migdal HaEmek, Israel) を装着した蛍光顕微鏡 (Olympus) を用いて蛍光シグナルを取り込んだ。システムにはスペクトラムを測定するためのフーリエ変換スプロトメーター (Sagnac interferometer) で蛍光を感知する cooled charge-coupled device (CCD) カメラ (Hamamatsu Photonics) を装備している。各染色体の放つ蛍光は以下の原理でデジタル化される。
1) トリプルバンドパスフィルターを通過後、干渉稿として CCD カメラに受光される。2) デジタル化された干渉波から得られた情報 (インターフェログラム) をフーリエ変換によって強度、波長の 2 次元に展開し、各色調に特有の曲線 (蛍光スペクトル) を得る。3) 最終的にはスペクトルの違いによって 24 種類の染色体を識別する。それぞれのスペクトラムはディスプレイカラーにコンバートして識別した染色体を表示する。

結 果

CGH 法による ATL の解析

CGH 法を用いて ATL 細胞株 8 株、ATL 症例 12 例のコピー数の変化を検出した。全例において CGH による解析は良好に行われ、代表的 CGH 画像 (SD4) を図 1 に示した。図 1 の緑色が強調されている染色体領域はコピー数の増加を示し、赤色が強調されている領域はコピー数の減少を示しており、コピー数に変化のない領域は中間色の黄色に近い色調で表している。

臨床検体 12 例中 5 例はコピー数の変化を検出しなかったが、他の臨床検体 7 例と全ての細胞株においてはコピー数の変化を検出した (表 1)。各染色体領域のコピー数の変化をまとめたものを図 2 に示す。ATL 細胞株において最も高頻度に過剰を検出した領域は 2p(6/8), 7q(4/8), 14q(4/8) で、それぞれの最小共通領域は 2p16-22, 7q21-36, 14q32 であった (図 2, 3)。ゲノム増幅を意味する High-level gain (HLG) を検出した領域は 2p16-25 (HUT-78, SD-4, KK-1), 9q33-34 (HUT-78), 12p11.2-13 (ATL-5T), 14q31-32 (OMT-1), 18q11.2-23 (SD-4) であった (図 2 の白抜き線を示す)。しかし、臨床検体においては共通する染色体領域にコピー数の変化を検出しなかった。



図 1 ATL 細胞株の CGH イメージの代表例として細胞株 SD4 の結果を示す。緑色が強調されている染色体領域はコピー数の増加を示し、赤色が強調されている領域はコピー数の減少を示しており、コピー数に変化のない領域は中間色の黄色に近い色調で表わされている。

表1 Characteristics of ATL cell lines and clinical samples and Results of chromosome imbalances detected by CGH

Sample name	Sex/Age	HTLV-1	IL-2 dependency	14q32		2P16-22		Copy Number Abnormalities Detected by CGH
				gain	loss	gain	loss	
HUT-78		+	-	+	+			1p33-35, 1p13, 2p16-25, 3q27-29, 4p16, 6p11.2-21.3, 6q22-27, 7q21-36, 8q34, 9q33-34, 10p15, 12q23-24, 14q32, 15q22-26, 17p11.2-13, 17q11.2-25, 19p13.3, 19p13.2-13.3, 20p13, 20q12-13.3, 22q12-13, Xq27-28
OMT-1		+	+	+	+			2q24-33, 4q13-24, 7p15-22, 9p12-24, 9q13-22, 10q23-25, 13q14-21, 14q11.2-22, 16q12-21, 18q11.2-23
KK-1		+	+	-	+			2p12-22, 3p21-26, 6p24-25, 7p21-22, 12q21, 14q31-32, 16p13.1-13.2, 17q25, 20p12-13, 9q11.2-32, 13q21-34, 2p22-25
ATL-ST		-	-	-	-			2p11.2-25, 2q11.2-22, 6p11.2-23, 10q24-26
SD-4		+	+	+	+			1q43-44, 11p14-15, 12p11.2-13, 13q32-34, 17p11.2-12, 17q11.2-25
KPNT-1		+	+	-	+			3q26-29, 4q34-35, 10p11.2-12
IPAT-1		+	+	-	+			2p16-25, 2p16-12, 2q32-33, 7q22-36, 9p21-23, 11q23-25, 12p13, 14q32, 18q11.2-23, 20p11.2-13, 20q11.2-13.3, Xp11.2-22.3, Xq12-21
ST-1		+	+	+	+			1p35-36, 3q12-21, 6q21-23, 9q13-21, 10p11.2-15, 18p11.2-11.3
G529	F/73	+	+	-	+			1q31-41, 2p11.2-23, 2q11.2-37, 8q24
G523	M/54	+	+	-	+			none
G614	M/70	+	+	-	+			1p34-36.1, 1q22-24, 2p22-25, 6p23-25, 9p13-24, 9q13-9q34, 12p11.2-12, 13q22, 17p11.2, 17q11.2-17q21, 19p13.1-13.2
G616	F/43	+	+	-	+			3p24-26, 10p11.2-15, 10q11.2-26, 13q32-34, 14q12-21, 15q24-26, 16q12.1-24
G540	F/47	+	+	-	+			7q21-36, 8q22-24, 14q24-32, 18q12-23, 21q21-22
G537	F/40	+	+	-	+			2p22-36, 2q32-37, 3q12-21, 18p11.2-11.3
G603	M/34	+	+	-	+			4p15-16, 7q34-36, 17p11.2-13, 17q12, 17q25, 18p11.2-11.3, 19p13.1-13.3
G615	F/40	+	+	-	+			none
G603	F/64	+	+	-	+			1p34-36, 7q12-36, 10q21, 16p12-13.1, 19p11-13.3
G602	M/58	+	+	-	+			4q35, 9p23-24, 15q26
G643	M/53	+	+	-	+			1p34-36, 1q21-41, 16p11.2-13.1, 19p13.1-13.3, 19q13.1-13.4
AZI	M/46	+	+	-	+			Xp22.2-22.3
		+	+	-	+			5p12-15, 5q31-35, 11q24-25
		+	+	-	+			none
		+	+	-	+			1p36, 14q21-32, 16p11.2-13.3
		+	+	-	+			losses none
		+	+	-	+			16p12, 18p11.2-11.3, 18q22-23
		+	+	-	+			losses none
		+	+	-	+			Xp11.2, Xq12-28
		+	+	-	+			losses none
		+	+	-	+			Gains none
		+	+	-	+			losses none
		+	+	-	+			Gains none
		+	+	-	+			losses none
		+	+	-	+			Gains none
		+	+	-	+			losses none
		+	+	-	+			Gains none
		+	+	-	+			losses none
		+	+	-	+			Gain none
		+	+	-	+			losses none

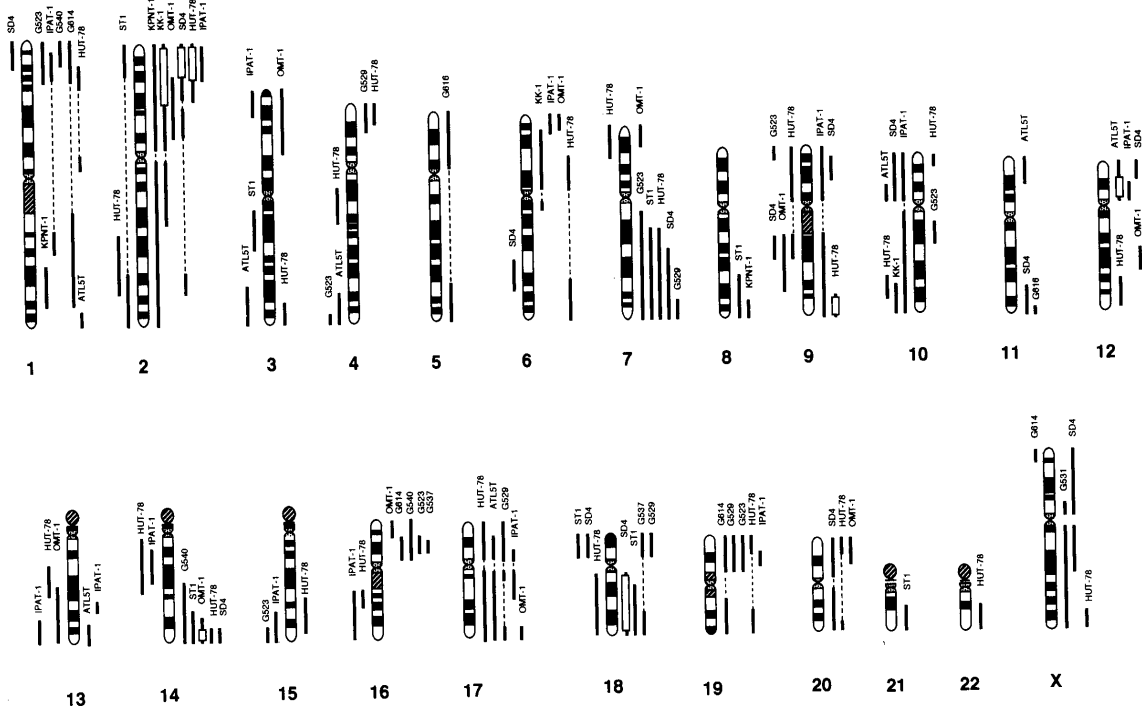


図2 ATL細胞株8例およびATL臨床検体におけるCGH解析結果のまとめ。各染色体の右に示す縦線はコピー数の増加，左に示す縦線はコピー数の減少を表す。白抜き領域は高い増幅(HLG)を表す。

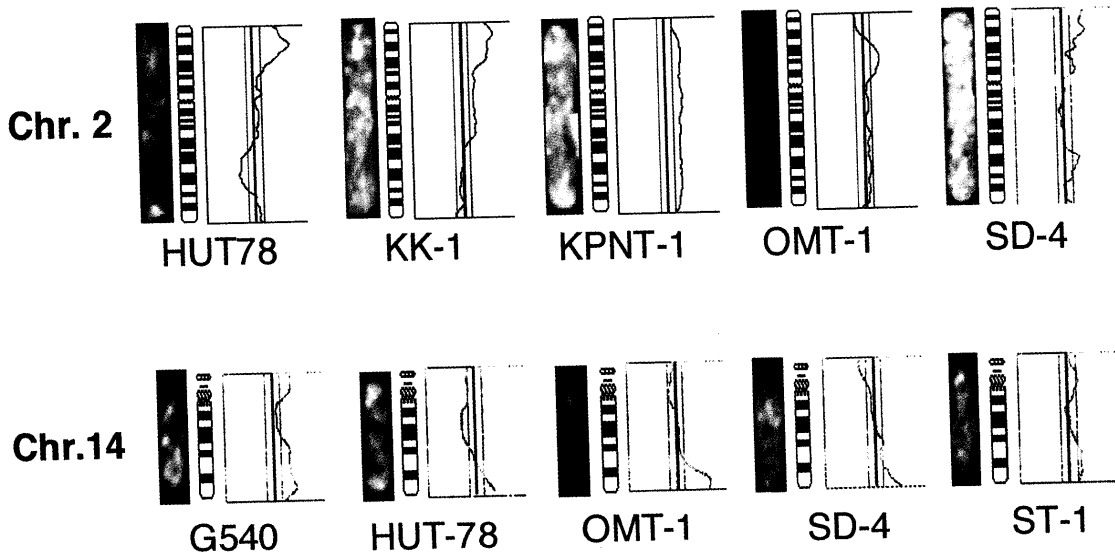


図3 2p16-22と14q32領域のコピー数の増加を検出したATL細胞株のプロファイルとCGHイメージ。上段には2p16-22領域のコピー数の増加を検出した細胞株における第2番染色体(chr. 2)の結果を示し、下段には14q32領域のコピー数の増加を検出した第14番染色体(chr. 14)の結果を示している。

FISH法によるTCL1とTCR α 再構成の検討

CGH法によるATLの解析結果からTCL1の座位である14q32領域にコピー数の増加を見いだ

した。ATL細胞株で14q32領域にコピー数の増加のあったサンプルにおいてTCL1領域とTCR α 領域の再構成が起きているかどうか調べるためにTCL1

(pLC1; 14q32) と TCR α (PICos22, 14q11) に特異的なコスミドプローブを用いた two-color FISH で解析を行った。FISH シグナルのカウントはそれぞれの細胞株において、少なくとも65個の間期核と20の分裂期染色体を対象に施行した(結果を示さず)。代表例として OMT-1 のメタフェーズ染色体を用いた FISH の結果を示す(図4)。4種類の細胞株(HUT78, SD-4, ST-1, OMT-1)において TCL1 は3コピー以上に増加し, CGH 法の結果と一致するものであったが, TCL1 と TCR α が融合しているシグナルは観察されなかった。

ATL 細胞株における TCL1 と HTLF の発現

14q32 領域のコピー数の変化と TCL1 遺伝子の発現の相関を調べるために, RT-PCR を用いて ATL 細胞株の解析を行った。既報で TCL1 の発現が確認

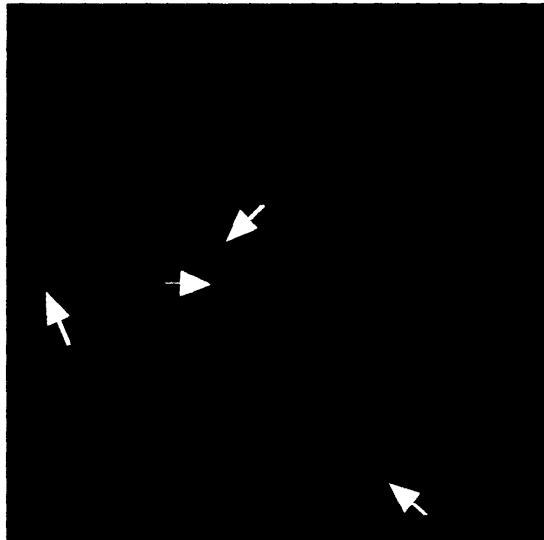


図4 OMT-1におけるTCRa(赤色シグナル)TCL1(緑色シグナル)特異的コスミドをプローブにしたtwo-color FISH. TCL1は4コピーに増加しているが, TCL1とTCR α の融合はないことがわかる。

されているヒト胎児胸腺細胞と白血病細胞株(BV173)をポジティブコントロール¹⁰とした。RT-PCRの結果14q32のコピー数増加の有無に関らずATL細胞株にはTCL1の発現を認めなかったがポジティブコントロールにはTCL1の発現を検出した(図5a)。2p16-p25のコピー数増加とHTLF遺伝子の発現の相関を調べるためにsemiquantitative RT-PCRを用いてATL細胞株の解析を行った。既

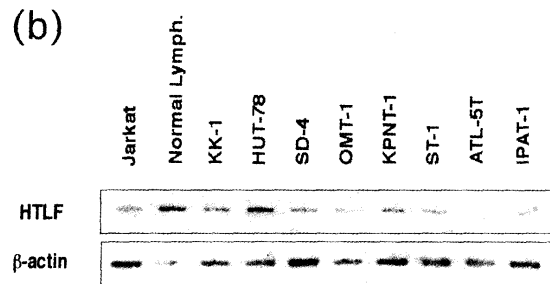
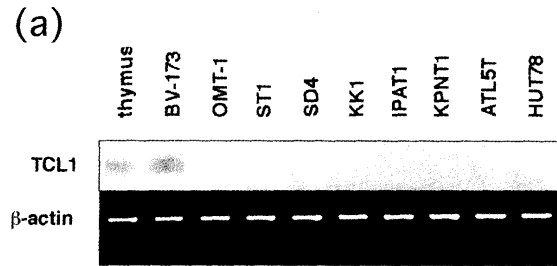


図5 ATL細胞株におけるTCL1およびHTLFのQuantitative RT-PCR.

(a) 14q32のコピー数の増加のあったATL細胞株(OMT-1, SD-4, ST-1, HUT78)と14q32のコピー数の増加のなかったATL細胞株(IPAT-1, KK1, KPNT-1, ATL-5T)いずれもTCL1の発現はない。ポジティブコントロール(胎児胸腺細胞, BV173)にはTCL1の発現を認める¹⁰。(b) 6つの細胞株(KK-1, HUT78, SD4, OMT-1, ST-1 and KPNT-1)とJurkat, 正常リンパ球にHTLFの発現を認める

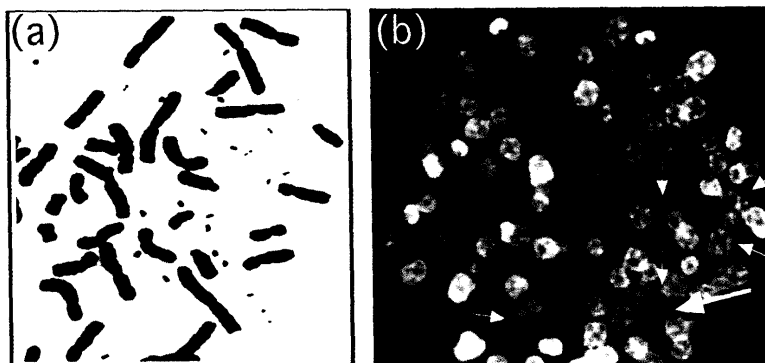


図6 由来細胞株KY821のSKY法による解析

(a) KY821のギムザ染色像:多数のdminを有する細胞株であることがわかる。(b) KY821のスペクトラムカラーイメージ:大きな矢印で示すdminのスペクトラムを測定し第8番染色体由来の染色体構造である。小さな矢印で示す他のdminも第8番染色体由来の構造であることがわかる。

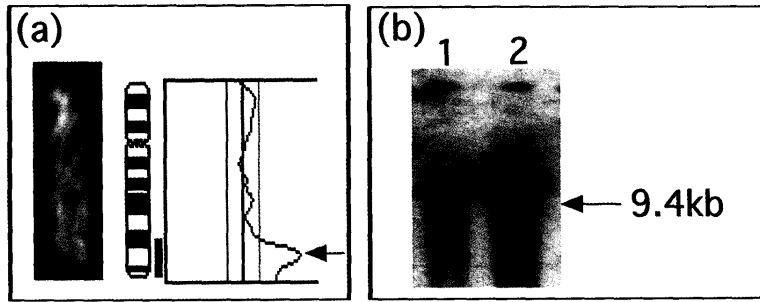


図7

KY821 における CGH 解析(a)および c-myc のサザンハイブリダイゼーション(b).

(a) 8q22-24 領域に強い green fluorescent signal を検出し、プロフィールでは矢印で示すように蛍光強度比が2.0を超えるシャープなピークを示している。(b) レーン1は正常末梢血、レーン2はKY821の結果を示す。KY821にc-mycの明らかな遺伝子増幅があることがわかる。

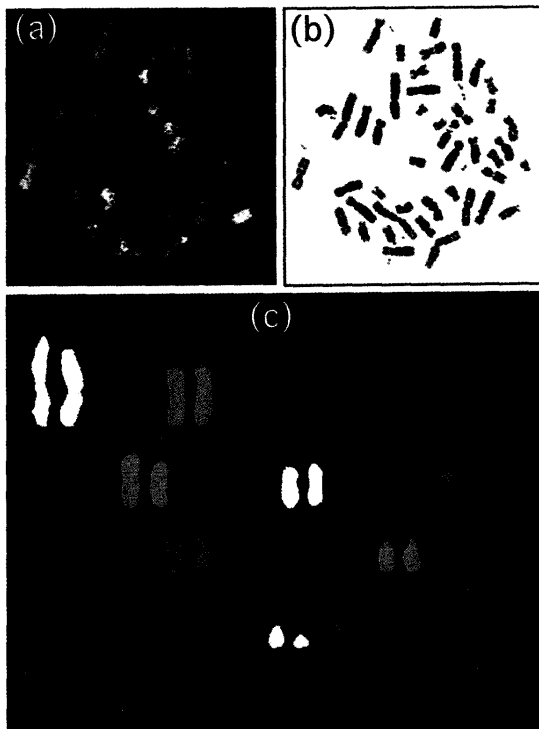


図8 AML症例におけるSKY法の解析結果。

(a)ディスプレイカラーイメージ(b)Gバンド様のパターンを示すDAPIバンド；dminを有することがわかる。(c)疑似カラーイメージ：add(17)(p13)とadd(22)(p10)はそれぞれ第20番染色体、第11番染色体由来の構造で、dminは第11番染色体由来の染色体断片であることがわかる。

報でHTLFの発現が確認されているJurkatと正常リンパ球をポジティブコントロールとした。結果、6種類のATL細胞株(KK-1, HUT78, SD4, OMT-1, KPNT-1, ST-1)にHTLFの発現を検出したがATL-5T, IPAT-1には発現を検出せず(図5b), 2p16-p25のコピー数増加とHTLFの発現に相関は認められなかった。

KY821 における dmin の起源の同定

KY821 親株における dmin の起源を明らかにするために SKY 法で解析した。まず、図 6 b の大きな矢印で示す dmin のスペクトラムを測定し、そのスペクトラムは 8 番染色体の標識に用いた Spectrum Green のスペクトラムと類似していたことから KY821 親株の dmin は 8 番染色体由来の染色体断片であることを同定した。さらに、同様にして図 6 b の小さな矢印で示す他の dmin も第 8 番染色体由来の構造であることがわかった。KY821 親株における dmin 上で増幅するゲノム DNA が 8 番染色体のどの領域に起源するかどうかを CGH 法を用いて解析した結果 8q22-24 領域に強い green fluorescent signal を検出した。プロフィールにおける蛍光強度比 (green/red) は 2.0 を越え、シャープなピークは c-myc 遺伝子の存在する 8q24 バンド上にあった(図 7 a)。さらに、サザンハイブリダイゼーション法によっても KY821 親株の c-myc の遺伝子増幅を確認した(図 7 b)。

AML 症例における dmin の染色体起源の同定

DAPI 染色反転像にて AML 症例に dmin を有していることを確認し(図 8 b)、付加染色体構造である add(17)(p13), add(22)(p10)および dmin を同定するために SKY システムを用いて 24 種類の全染色体を染め分けた(図 8 a)。add(17)(p13), add(22)(p10)のスペクトラルパターンはそれぞれ 20 および 11 染色体と一致した(図 8 c)。AML 症例の dmin のスペクトラムは 11 番染色体のスペクトラムと一致し、dmin は 11 番染色体の染色体断片であった。dmin の起源は whole-chromosome 11 painting (WCP) プローブを用いて確認した(結果示さず)。以上より、AML 症例の核型は 45, X, -Y, +6, +8, -11, der(17)t(17; 20)(p13; ?), -20, der(22)t(11; 22)(?; p10), 6~21 dmin (WCP11+) と決定した。

AML 症例における MLL 遺伝子の増幅

dmin 上で増幅している遺伝子を同定するため

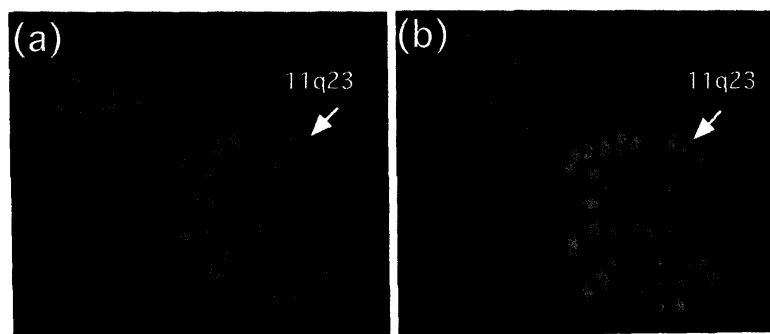


図9 AML症例におけるtwo-color FISH. (a) MLL遺伝子のbcrをまたぐexons 2-20を含むYAC 822g08をプローブにしたシグナル. (b) MLLのbcrの遠位側マーカであるコスミド cosE14 (exon 22を含む)をプローブにしたシグナル. (a)と(b)のいずれのプローブもdmin上とintact 11q23にシグナルを検出していることがわかる.

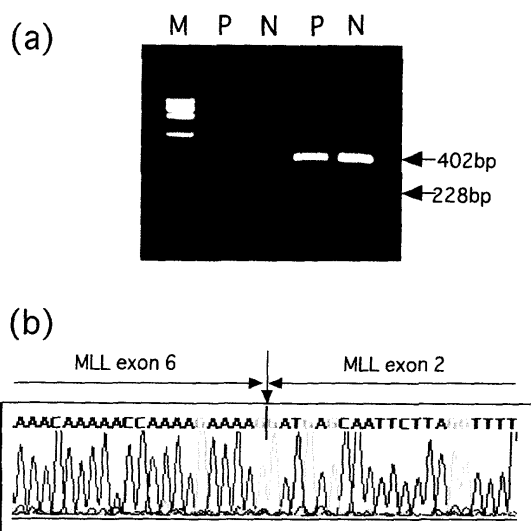


図10 AML症例におけるMLL PTD (a) RT-PCR産物のエチジウム染色. AML症例(Pで示す)に228-bpのバンドを検出するが, 正常リンパ球(Nで示す)には検出しない. (b) RT-PCR産物のダイレクトシーケンス. MLL exon6とexon2の融合を起こしていることがわかる.

に, 候補遺伝子であるMLL遺伝子, BCL1 (B cell leukemia/lymphoma) 遺伝子を含む yeast artificial chromosome (YAC) を用いて FISH を施行した. FISH 法の結果 11q23 の MLL (822g08) のシグナルを dmin 上に検出したが, BCL1 の YAC (214d11) ではシグナルを検出できなかった. さらに, YAC 822g08 (MLL の bcr をまたぐ exon2-20 を含む) とコスミド cos14E (distal marker; MLL の exon22 を含む) を用いた two-color FISH の結果, dmin と intact 11q23 (図 9 の 矢印) には YAC 822g08 とコスミド cos14E のシグナルを検出したが, der(22)t(11;22)(?; p10) にはシグナルを検出できなかった (図 9).

AML 症例における MLL の PTD

PTD を検出する既報のプライマー¹⁹ を用いて RT-PCR を施行した結果, AML 症例に 228-bp のバンドを検出した (図10 a). PCR 産物のダイレクトシーケンスによって AML 症例の MLL 遺伝子に exon6 と exon2 の inframe の融合を伴った PTD を起こしていることを確認した (図10 b). インナーコントロールとして行った nested RT-PCR の結果, 正常細胞, 白血病細胞いずれにも MLL exon2-3 のバンドを検出した.

考 察

今回の研究により ATL 細胞株において 2p, 7q, 14q32 領域のコピー数が増加する頻度が高いことを示した. しかし, ATL 臨床検体においては12例中7例にしかコピー数の変化を検出できなかった. 107例の ATL を対象にした大規模な細胞学的研究で61例 (59%) では異常核型が混在し, 4例では正常核型のみを呈したと報告されている⁷. したがって, ATL 発症時は正常核型であるが, 後に進行の過程で染色体異常が発生すると考えられている. すなわち, これらの例では発症時にはなかった ATL の進展に関わる細胞遺伝学的変化が後になって付加されていると考えられる. 実際に ATL 症例の細胞学的研究のいくつかにおいて診断時には正常核型であったが, 後に再発時には複雑な核型になったという報告もある^{30,31}. 今回の研究において12例の臨床検体のうち5例 (42%) にしかコピー数の変化を CGH 法で検出できなかったことは報告の事実を支持するものであった. しかし, 本研究の ATL 細胞株に生じたコピー数の変化は必ずしも ATL の進展にかかわる変化であるとは限らず, 細胞の不死化に関与する変化または細胞株樹立後に2次的に生じた変化である可能性は否定できない. しかしながら, 本研究の ATL 細胞株に共通する染色体領域のコピー数の変化を認めたことは, ATL の病態にかかわる変化である可能性もあり, 特に, 7q と 14q32 領域に高頻度にコピー数増加および HLG を検出したことは最も特筆すべきこ

とである。大規模な細胞学的研究の結果、ATL にトリソミー7を検出する例があると報告されている⁷。今回の研究結果は過去の研究結果と一致するものであり、gene dosage effectによってATLの白血病化を誘導する遺伝子座位が第7番染色体長腕に存在すると考えられる。ATL細胞株8株中4株とATL臨床検体1例に検出した14q32のコピー数増加も重要な結果である。TCL1は14q32に座位しており、成熟T細胞白血病においてt(14;14)(q11;q32.1)やinv(14)(q11;q32.1)のような特異的染色体再構成を起こすことが知られている^{9,10}。染色体再構成の結果、TCL1 proto-oncogeneはTCR α 遺伝子エンハンサーエレメントによって作用を受け、T-cell腫瘍への進展早期に起こると考えられている³²。正常T細胞、T細胞由来細胞株、T-ALL症例と比較してATLではTCL1遺伝子の発現量が多いことが示されたこと³³からTCL1遺伝子はATLの病態における重要な役割を果たしていると考えられている。しかし、本研究では14q32にコピー数増加を検出したATL細胞株4株においてはTCL1とTCR α の再構成を検出できなかった。さらに、14q32にコピー数増加があるか否かに拘らず、どのATL細胞株にもTCL1の発現は認められなかった。これらの結果から遺伝子増幅によってATLの白血病化に関与するTCL1以外の遺伝子が14q32に存在することがこの研究から示唆された。ATL細胞株8株中6株に検出した2p16-22のコピー数増加もまたATLの白血病化または白血球の不死化に重要であると考えられた。HTLFはHTLV-1のlong terminal repeat (LTR)に結合する転写因子のひとつでありヒト染色体2p16-22にマップされている¹¹。遺伝子増幅の結果しばしば遺伝子の発現量を増加させることがあり、HTLFのコピー数増加によりATLの進展に反応するシグナルを生じている可能性がある。特に、HTLV-1を制御する蛋白である“tax”はウイルスゲノムの転写を調節する因子である^{34,35}。tax蛋白はHTLV-1 LTRに直接結合せずに、LTRに特異的結合する細胞因子のtranscriptional transactivatorとして作用する^{36,37}ため、HTLFは“tax”によって発現を誘導される他の細胞因子(例えばIL2, IL2a, IL3, IL6, GM-CSF, TNF-b, c-fos, NF-kB)³⁶のようにATLの病態に関与する候補因子になりうる。しかし、2p16-22のコピー数増加を検出したにも関わらず、RT-PCR解析の結果ATL細胞株におけるHTLFの発現量は増加していなかったことから、ATLの病態に関与する何らかの他の遺伝子の存在が示唆された。さらに、2p16-22のコピー数増加を検出したATL細胞株6

株中5株はIL-2を含んだ培養液中でしか培養できなかったことは、同領域にIL-2依存性に関する遺伝子が含まれている可能性を示唆するものであった。今回行ったCGH法によるATLの解析によって14q32領域と2p16-22領域のコピー数の増加を検出したが、TCL1遺伝子、HTLF遺伝子の発現量が増加していなかったことは、これらの染色体領域にATLに関与する未知の癌遺伝子存在する可能性を示唆し、今後それらの解明が期待される。

従来、未知ゲノムDNAの由来を同定するにはマイクロダイセクション法などの特殊な方法を必要とした。今回の研究ではSKY法とCGH法を用いたアプローチでKY821のdminは第8番染色体由来の染色体断片であり、増幅染色体領域が8q22-24であることを同定し、c-mycの遺伝子増幅を明らかにすることができた。DNA増幅をきたした染色体領域にはしばしば癌遺伝子、増殖因子、増殖因子受容体さらに薬剤耐性遺伝子を含んでいる。悪性腫瘍細胞における新規の染色体領域にひそむ増幅遺伝子の同定を行うことによって新規の腫瘍増殖遺伝子や薬剤耐性遺伝子を同定しうる可能性がある。SKY法およびCGH法を用いることにより、これまで検出できなかった増幅領域の同定および新規増幅遺伝子の同定を迅速かつ簡便にしうる方法として有用であることを具体的に示すことができた。

本研究におけるAML症例のSKY法による解析の結果、dminは第11番染色体由来の染色体断片であることを明らかにした。第11番染色体上にマップされている造血器腫瘍に関わる既知遺伝子はBCL1, Ets1さらにMLLなどがあるが、11q23のMLLおよび11q13のBCL1の増幅の有無を確認したところAML症例のdmin上でMLL遺伝子が増幅していることが明らかとなった。11q23型転座例においてMLL遺伝子は様々な染色体パートナーと再構成することで白血球の進展に関わると考えられている^{16,17}。本研究に用いたAML症例のdminは他の染色体パートナーと再構成した染色体断片で構成されている可能性もある。今回の研究におけるFISH法の結果、MLL-bcrより遠位側の(exon22)プローブと切断点をまたぐ(exon2-20)プローブの両方でdmin上にシグナルを検出したことからAML症例に出現したdminにMLL-bcrの近位側と遠位側をともに含むシーケンスが増幅していることが示唆された。すなわち、MLLが他の染色体パートナーと再構成せずにdmin上で遺伝子増幅を起こしていることが強く示唆された。さらに、正常核型もしくはトリソミー11のAMLのいくつかの例にMLL遺伝子のinternal portionのPTDが発生することが最

近報告され^{19,20}, MLL 遺伝子の再構成は白血病化に関連した partially duplicated protein を encode する mRNA を転写しうると考えられている¹⁹. FISH の結果から本症例における MLL の増幅に関する異なった状態が示唆された;(1)他の染色体パートナーと再構成をしていない intact MLL が dmin 上で増幅している。(2)他の染色体パートナーと再構成をせず MLL の internal portion の PTD が起きて, PTD MLL が dmin 上で増幅している。(3)PTD を伴った増幅 MLL の再構成が起こる前に intact MLL が dmin 上で増幅している。本研究の PTD を検出する RT-PCR 解析によって exon2-6 の PTD を検出した結果から(1)と(3)より(2)の可能性が高いと考えられたが,残っている正常に見える第11番染色体上で PTD MLL が存在し,かつ dmin では intact MLL が増幅している可能性は否定できない。今回の研究に用いた AML 症例のゲノム再構成または融合を起こしているかどうかをサザンハイブリダイゼーションまたは DNA-PCR を施行すべきであったが,白血病細胞の凍結サンプルは保存されておらず,保存されていた高分子 DNA の量は MLL 遺伝子のゲノム再構成を調べるのに十分ではなかった。しかし,本研究の FISH 法と PTD を検出する RT-PCR の結果は, dmin 上で PTD を伴った MLL 遺伝子が増幅していることを強く示唆するものであった。

謝 辞

本稿を終えるにあたり,ご指導とご校閲を賜りました近畿大学医学部第3内科学教室 堀内篤教授,金丸昭久教授に深甚なる謝意を捧げます。また,終始懇切なご指導,ご助言,ご校閲をいただいた東京医科歯科大学難治疾患研究所遺伝疾患研究部門 稲澤譲治教授,京都府立医科大学衛生学教室 阿部達生教授,東大医科研ヒトゲノムセンター 中村祐輔教授に深謝いたします。

文 献

- Kallioniemi A, Kallioniemi O-P, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F, Pinkel D (1992) Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* 258: 818-821
- duManoir S, Speicher MR, Joos S, Schock E, Popp S, Dohner H, Kovacs G, Robert-Nicoud M, Lichter P, Cremer T (1993) Detection of complete and partial chromosome gains and losses by comparative genomic in situ hybridization. *Hum Genet* 90: 590-610
- Schrock E, duManoir S, Veldman T, Schoell B, Wienberg J, Ferguson-Smith MA, Ning Y, Ledbetter DH, Bar-Am I, Soenksen D, Garini Y, Ried T (1996) Multicolor spectral karyotyping of human chromosomes. *Science* 273: 494-497
- Hinuma Y, Komoda H, Chosa T, Kondo T, Kohakura M, Takenaka T, Kikuchi M, Ichimaru M, Yunoki K, Sato I, Matsuo R, Takiuchi Y, Uchino H, Hanaoka M. (1982) Antibodies to adult T-cell leukemia-virus-associated antigen (ATLA) in sera from patients with ATL and controls in Japan: a nation-wide sero-epidemiologic study. *Int J Cancer* 29: 631-635
- Seiki M, Eddy R, Shows TB, Yoshida M. (1984) Nonspecific integration of the HTLV provirus genome into adult T-cell leukaemia cells. *Nature* 309: 640-642
- Seiki M, Hattori S, Hirayama Y, Yoshida M. (1983) Human adult T-cell leukemia virus: complete nucleotide sequence of the provirus genome integrated in leukemia cell DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 80: 3618-3622
- Kamada N, Sakurai M, Miyamoto K, Sanada I, Sadamori N, Fukuhara S, Abe S, Shiraiishi Y, Abe T, Kaneko Y, Shimoyama M. (1992) Chromosome abnormalities in adult T-cell leukemia/lymphoma: a karyotype review committee report. *Cancer Res* 52: 1481-1493
- Kallioniemi OP, Kallioniemi A, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F, Pinkel D. (1993) Comparative genomic hybridization: a rapid new method for detecting and mapping DNA amplification in tumors. *Semin Cancer Biol* 4: 41-46
- Virgilio L, Isobe M, Narducci MG, Carotenuto P, Camerini B, Kurosawa N, Abbas-ar-Rushdi, Croce CM, Russo G. (1993) Chromosome walking on the TCL1 locus involved in T-cell neoplasia. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 9275-9279
- Virgilio L, Narducci MG, Isobe M, Billips L, Cooper M, Croce CM, Russo G. 1994; Identification of the lymphocyte-specific TCL1 gene involved in T-cell malignancies. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 12534-12534
- Li C, Lusk AJ, Sparkes R, Tran SM, Gaynor R. (1992) Characterization and chromosomal mapping of the gene encoding the cellular DNA binding protein HTLF. *Genomics* 13: 658-664
- Stark GR, Debatisse M, Giulotto E, Whal GM (1989) Recent progress in understanding mechanisms of mammalian DNA amplification. *Cell* 57: 901-908
- Ohta Y, Kishi K (1974): Double minute chromosomes (DMs) in a case of acute myeloblastic leukemia and the cell line derived from the patient. *Jpn J Human Genet.* 28: 258-261
- Rowley J (1993) Rearrangements involving chromosome band 11q23 in acute leukemia. *Seminars Cancer Biol* 4: 377-385
- Bernard OA, Berger R (1995) Molecular basis of 11q23 rearrangements in hemopoietic malignant proliferations. *Genes Chromosomes Cancer* 13: 75-85
- Raimondi SC (1993) Current status of cytogenetic research in child hood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 81: 2237-2251
- Mitelman F, Mertens F, Johansson B (1997) A brea-

- kpoint map of recurrent chromosomal rearrangements in human neoplasia. *Nature Genet* 15 : 417-474
18. Yamamoto K, Seto M, Akao Y, Iida S, Nakazawa S, Oshimura M, Takahashi M, Ueda R. (1993a) Gene rearrangement and truncated mRNA in cell lines with 11q23 translocation. *Oncogene* 8 : 479-485
 19. Caligiuri MA, Strout MP, Schichman SA, Mrozek K, Arthur DC, Herzig GP, Baer MR, Schiffer CA, Heinonen K, Knuutila S, Nousiainen T, Ruutu T, Block AW, Schulman P, Pedersen-Bjergaard J, Croce CM, Bloomfield CD (1996) Partial tandem duplication of ALL1 as a recurrent molecular defect in acute myeloid leukemia with trisomy 11. *Cancer Res* 56 : 1418-1425
 20. Caligiuri MA, Strout MP, Lawrence D, Arthur D, Baer MR, Yu F, Knuutila S, Mrozek K, Oberkircher AR, Marcucci G, de la Chapella A, Elonen E, Block AW, Rao NP, Herzig GP, Powell B, Ruutu T, Schiffer CA, Bloomfield CD (1998) Rearrangement of ALL1 in acute myeloid leukemia with normal cytogenetics. *Cancer Res* 58 : 55-59
 21. Miyamoto K, Kagami Y, Shimoyama M, Miwa M, Tomita N, Suzuki C, Ishii A, Sanada H, Hiraki Y, Kitajima K. (1987) A unique T-cell line derived from an HTLV-1-negative adult T-cell leukemia patient. *Jpn. J. Cancer Res* 78 : 1031-1035
 22. Tawaki M, Yamaguchi K, Matsuoka M, Ishii T, Miyasaka M, Mori S, Takatsuki K, Watanabe T. (1995) Constitutive overexpression of the L-selectin gene in fresh leukemic cells of adult T-cell leukemia that can be transactivated by human T-cell lymphotropic virus type 1 Tax. *Blood* 86 : 3109-17
 23. Saito H, Kishi K, Narita M, Furukawa T, Nagura E, Maekawa T, Abe T, Shibata A (1992) : A new myeloblastic leukemia cell line with double minute chromosomes. Induction of methotrexate resistance and dehydrofolate reductase gene amplification. *Leukemia Res* 16 : 217-226
 24. Inazawa J, Ariyama T, Takino T, Tanigami A, Nakamura Y, Abe T. (1994) High resolution ordering of DNA markers by multi-colour fluorescent in situ hybridization of prophase chromosomes. *Cytogenet Cell Genet* 65 : 130-135
 25. Ariyama T, Fukuda Y, Okuno Y, Seto M, Date K, Abe T, Nakamura Y and Inazawa J. Amplification on Double Minute Chromosomes and Partial Tandem-Duplication of the MLL Gene in Leukemic Cells of a Patient with Acute Myelogenous Leukemia. *Genes Chrom Cancer* (in press)
 26. Han H-J, Maruyama M, Baba S, Park JG, Nakamura Y. (1995) Genomic structure of human mismatch repair gene, hMLH1, and its mutation analysis in patients with hereditary non-polyposis colorectal cancer (HNPCC). *Hum Mol Genet* 4 : 237-242
 27. Garini Y, Macville M, duManoir S, Buckwald RA, Lavi M, Katzir N, Wine D, Bar-Am I, Schrock R, Cabib D, Ried T (1996) Spectral karyotyping. *Bioimaging* 4 : 65-72
 28. Veldman T, Vignon C, Schrock E, Rowley J, Ried T (1997) : Hidden chromosomal abnormalities in haematological malignancies detected by multicolor spectral karyotyping. *Nature Genet.* 15 : 406-410
 29. Ariyama Y, Sakabe T, Shinomiya T, Mori T, Fukuda Y, Inazawa J. (1998) Identification of amplified DNA sequences on double minute chromosomes in a leukemic cell line KY821 by means of spectral karyotyping and comparative genomic hybridization. *J Hum Genet* (in press)
 30. Sanada I, Tanaka R, Kumagai E, Tsuda H, Nishimura H, Yamaguchi K, Kawano F, Fujiwara H, Takatsuki K. (1985) Chromosomal aberrations in adult T-cell leukemia : relationship to the clinical severity. *Blood* 65 : 649-654
 31. Shimoyama M, Abe T, Miyamoto K, Minato K, Tobinai K, Nagoshi H, Matsunaga M, Nomura T, Tsubota T, Ohnoshi T, Kimura I, Suemasu K. (1987) Chromosome aberrations and clinical features of adult T-cell leukemia-lymphoma not associated with human T-cell leukemia virus type I. *Blood* 69 : 984-989
 32. Narducci MD, Virgilio L, Isobe M, Stoppacciaro A, Elli R, Fiorilli M, Carbonari M, Antonelli A, Chessa L, Croce CM, Russo G. (1995) TCL1 oncogene activation in preleukemic T-cells from a case of a ataxia-telangiectasia. *Blood* 86 : 2358-2364
 33. Narducci MG, Stoppacciaro A, Imada K, Uchiyama T, Virgilio L, Lazzeri C, Croce CM, Russo G. (1997) TCL1 is overexpressed in patients affected by adult T-cell leukemias. *Cancer Res* 57 : 5452-5456
 34. Tanaka A, Takahashi C, Yamaoka S, Nosaka T, Maki M, Hatanaka M. (1990) Oncogenic transformation by the tax gene of human T-cell leukemia virus type I in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 87 : 1071-1075
 35. Franchini G. (1995) Molecular Mechanisms of human T-cell leukemia/lymphotropic virus type I infection. *Blood* 86 : 3619-3639
 36. Yoshida M, Suzuki T, Fujiwara J, Hirai H. (1995) HTLV-1 oncoprotein Tax and cellular transcription factors. *Curr Topics Microbiol Immunol* 193 : 79-89
 37. Fujisawa J, Seiki M, Kiyokawa T, Yoshida M. (1985) Functional activation of the long terminal repeat of human T-cell leukemia virus type I by a trans-acting factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 82 : 2277-2281
 38. Marcucci G, Strout MP, Bloomfield CD, Caligiuri MA (1998) Detection of unique ALL1 (MLL) fusion transcripts in normal human bone marrow and blood : distinct origin of normal versus leukemic ALL1 fusion transcripts. *Cancer Res.* 58 : 790-793