

Thesis

造血器腫瘍におけるETV6 (TEL) 遺伝子異常に基づく 発癌機構の多様性に関する研究

埼玉医科大学第1内科学教室
(指導：別所 正美教授)

矢ヶ崎 史治

目次

第1章 序論	T12頁
第2章 骨髓異形成症候群および急性白血病におけるt(5;12)(q31;p13)染色体 転座切断点の解析とETV6-ACS2融合転写産物の単離	T12頁
第1節 緒言	T12頁
第2節 対象と方法	T13頁
1. 対象症例	T13頁
2. 染色体解析	T13頁
3. Positional cloning法	T13頁
4. RNAの抽出と3'RACE法	T15頁
5. 5'RACE法	T16頁
6. 塩基配列解析と相同性解析	T16頁
7. Northern analysisによるACS2の組織発現	T16頁
8. RT-PCR法によるETV6-ACS2転写産物とACS2-ETV6転写産物の検出	T16頁
第3節 結果と考察	T16頁
1. t(5;12)(q31;p13)染色体転座の血液学的特徴と転座切断点の解析	T16頁
2. ETV6融合遺伝子とETV6転座相手遺伝子の全長cDNAの単離	T18頁
3. MDS/AMLにおけるETV6-ACS2融合遺伝子の意義	T19頁
第3章 末梢性T細胞悪性リンパ腫におけるt(4;12)(p16;p13)染色体転座切断点の解析と ETV6-FGFR3融合転写産物の単離	T21頁
第1節 緒言	T21頁
第2節 対象と方法	T22頁
1. 対象症例	T22頁
2. FISH法によるt(4;12)(p16;p13)転座切断点の解析	T22頁
3. RT-PCR法によるETV6-FGFR3融合転写産物の検出	T22頁
4. 塩基配列解析と相同性解析	T22頁
5. 免疫組織染色	T22頁
第3節 結果と考察	T22頁
1. t(4;12)(q31;p13)染色体転座における転座切断点	T22頁
2. ETV6-FGFR3融合遺伝子の単離と塩基配列解析	T22頁
3. PTCLにおけるETV6-FGFR3融合遺伝子の意義	T24頁
第4章 総括と結語	T24頁
謝辞	T25頁
参考文献	T25頁

第1章 序論

造血器腫瘍では特異的染色体異常が定型的な病像を呈することから、分子生物学的な解析が進歩し、特に転座型染色体異常においては次々に責任遺伝子の単離と融合遺伝子の機能解析がなされ発癌機構の全容が解明しつつある。特に急性前骨髄球性白血病 (APL) では、レチノイン酸受容体遺伝子異常に基づく発癌機序が分子生物学的に明らかとなり、寛解導入療法に大量レチノイン酸療法が導入されてから約90%の高い寛解率が得られるようになった。また慢性骨髄性白血病 (CML) ではPh染色体と呼ばれるt(9;22)(q34;q11) 転座が97%に認められ、22q11にある *bcr* 遺伝子と9q34にある *abl* 遺伝子が融合し *bcr-abl* 融合遺伝子が発現することが知られている。CMLでは、この *bcr-abl* 融合遺伝子が210 kdの融合蛋白に転写され細胞質内に局在し、融合蛋白におけるABLチロシンキナーゼ活性の恒常的活性化が癌化の原因と考えられている。近年、IFN抵抗性CMLに対してABL特異的チロシンキナーゼ活性阻害剤であるSTI571が高い細胞遺伝学的効果をもたらすこと¹⁾が明らかになった。さらにSTI571のPh陽性急性リンパ性白血病 (ALL) に対する *in vitro* における増殖抑制効果もKawaguchiらとの共同研究²⁾により明らかにされ、特定の遺伝子異常を標的とした治療法の確立は造血器腫瘍の予後をドラスティックに改善させると考えられる。従って、造血器腫瘍における分子生物学的な発癌機構を明らかにすることは新規の分子標的療法を開発する上で重要である。

1994年、Golubらによりt(5;12)(q33;p13)を有する慢性骨髄単球性白血病 (CMML) において12p13転座切断点に存在する *TEL* 遺伝子 (translocation Ets leukemia) と5q33上の *PDGFβR* 遺伝子が融合し、キメラ遺伝子を発現していることが報告された³⁾。*TEL* 遺伝子はets DNA結合領域を有しets familyの一員として *ETV6* (ets translocation variant 6) とも呼称されている (以下 *ETV6* と記す)。*ETV6* 遺伝子の存在する12番染色体短腕領域は様々な造血器腫瘍で欠失、転座が認められる。今日に至るまで *ETV6* 融合遺伝子を発現していることが判明している染色体転座は、小児preB急性リンパ性白血病 (ALL) の25%を占めるt(12;21)(p13;q22) 転座における *ETV6-AML1*^{4,5)}、t(9;12)(q34;p13)を有するpre B ALLにおける *ETV6-ABL*⁶⁾、t(6;12)(q23;p13)を有するpre B ALLにおける *ETV6-STL*⁷⁾、t(9;12)(p24;p13)を有するpre BまたはT ALLにおける *ETV6-JAK2*⁸⁾、t(12;22)(p13;q11)を有するAMLに

おける *ETV6-MNI*⁹⁾、t(12;15)(p13;q25)を有する急性骨髄性白血病 (AML) における *ETV6-TRKC*¹⁰⁾、t(1;12)(q25;p13)を有するAMLにおける *ETV6-ABL2*¹¹⁾、CML急性転化時に認められるt(3;12)(q26;p13)における *ETV6-EVII*¹²⁾、t(12;13)(p13;q12)を有するAMLにおける *ETV6-CDX2*¹³⁾、t(4;12)(q11-q12;p13)を有するAMLにおける *ETV6-BTL*¹⁴⁾、t(9;12)(q22;p13)を有する(骨髄異形成症候群) MDSにおける *ETV6-Syk*¹⁵⁾、t(1;12)(q21;p13)を有するAMLにおける *ETV6-ARNT*¹⁶⁾がある。これらの *ETV6* の転座相手遺伝子はいずれも造血発生、細胞分化および増殖に重要な役割を担っているのが特徴である。

我々は、現在まで造血器腫瘍に認められた2種類の *ETV6* 関連染色体転座における *ETV6* 融合遺伝子の同定および融合転写産物の単離を行ってきた。本稿では、これまでの研究成果¹⁷⁻¹⁹⁾と過去の報告から、造血器腫瘍における *ETV6* 遺伝子異常による発癌機構の多様性を考察する。

第2章

骨髄異形成症候群および急性白血病におけるt(5;12)(q31;p13)染色体転座切断点の解析と *ETV6-ACS2* 融合転写産物の単離およびヒト *ACS2* 全長cDNAの単離¹⁷⁾

第1節 緒言

急性白血病における均衡転座型染色体異常では、転座切断点に位置する責任遺伝子が転座の結果、キメラ型融合遺伝子を発現して癌化に関与している頻度が高い。この際に片方の責任遺伝子が明らかになればRapid amplification cDNA end method (RACE法)により転座相手遺伝子およびキメラ型融合遺伝子の単離は比較的容易である。一方でMDSにおける染色体異常は5q-, 7q-, 20q-, 11q-, 12p-等の欠失型染色体異常が多い特徴を有する。欠失型染色体異常ではKnudsonのtwo hit仮説により染色体欠失部位に癌抑制遺伝子が存在し、残存アリの遺伝子変異が生じていると推測されてきた。過去の研究では5q-の責任遺伝子を明らかにするためにFluorescence in situ hybridization (FISH)法により5q-(5番染色体長腕部分欠失)を有する個々の症例の染色体標本でmappingを行い、共通欠失領域を狭める努力がなされてきたが、依然として、その領域は5q31上の約1.5Mbと広範囲²⁰⁻²²⁾であり責任遺伝子の同定は困難である。そこで我々はt(5;12)(q31;p13)転座を有するMDS/AML3例で、12p13切断点为好発切断点である *ETV6* 遺伝子内に存在すれば、5q-の共通欠失領域である5q31上の責任遺伝子を直接単離しうる可能性があると考え、FISH法により12p13

切断点および5q31切断点の解析を行った。さらに本研究ではRACE法によりETV6融合遺伝子の単離を行い、ETV6転座相手遺伝子の全長cDNAの単離と組織における発現解析を行った。

第2節 対象と方法

1. 対象

対象症例の臨床血液的特徴をTable 1に示す。

2. 染色体解析

患者骨髄細胞を、colcemid (GIBCO-BRL, Tokyo, Japan) 0.01 μg/ml, 10% fetal calf serum添加 RPMI 培養液で 37°C, 24時間, 培養した。培養後は常法に従って低張処理し, G分染法により核型解析を行った。染色体核型表記法はInternational System for Human Cytogenetic Nomenclature (ISCN 1995)²³⁾に従った。

3. Positional cloning法

① ETV6遺伝子および5q31のgenome構造

ETV6遺伝子のgenomeの全長は約240 kbで, 12p13上のD12S1697からD12S98の間に位置している(Fig. 1)。8つのexonより構成されるがexon 1Aプロモーター領域にはSP1とAP2転写因子結合部位があり1500塩基上流にCpG islandが存在する²⁴⁾。染色体転座によってETV6上で発生する遺伝子再構成はETV6の全長が240 kbと長いことから, 通常のSouthern blot解析では検出が困難であり, 我々は12p13転座切断点の解析にFISH法によるpositional cloning法を用いた。FISH法は直接, 異常染色体上に目的の遺伝子を含むprobeをhybridizeし, probeからの蛍光シグナルを蛍光顕微鏡下で染色体上に観察するという利点を有している(Fig. 2)。現在, Genome projectにより, ヒト染色体は断片化され, YAC (Yeast artificial chromosome) (CEPH mega YAC library, Riken, Tsukuba, Japan), やP1ファージ, PAC (P1-derived artificial chromosome), BAC (Bacterial artificial chromosome)などにクローン化され, 染色体上に配列されている。YACでは1 Mb以上の染色体断片を

クローン化することが可能で, さらにP1, BAC, PAC, cosmidでは数100 kb から数10 kbのクローン化が可能であり目的に応じて利用される。今回は, ETV6遺伝子の全長を含むYAC964c10²⁵⁾ およびETV6の各exonを含むcosmidクローン¹⁸⁾をP. Marynen博士 (Leuven University, Leuven, Belgium) より供与を受けFISH解析のprobeとして使用した。5q31転座切断点の解析には5q31上に存在するYAC854g6, YAC886a12, YAC880g9 (CEPH mega YAC library, Riken, Tsukuba, Japan) およびEdward M. Rubin博士 (Human Genome Center, Lawrence Berkeley National Laboratory (LBNL), California) によって同部位に配列されたP1/PAC contig²⁶⁾の供与を受け, 切断点を含むクローンを検討した。使用したクローンの染色体上の存在部位をFig. 1に示す。

② FISH 法

YAC DNAの抽出とAluPCR法

YAC single colonyをAHC培養液で30°C, 3日間, 振盪培養した。菌体を回収したのち, Yeast Lytic Enzymeを用い酵母菌を溶解しPhenol/Chloroform法でDNA分画を精製した。得られた全酵母DNAから選択的にYAC由来DNAを得るためLedbetterらの方法²⁷⁾に従いinter ALUおよびinter L1-ALU polymerase chain reaction(PCR)法を用い, ヒト染色体由来DNAを増幅した。すなわち, ヒトgenomeには300塩基からなるAlu Iで切断される配列を有するfamilyが存在し, コンセンサス配列で87%の相同性がある。Alu配列はヒトgenomeに約100万コピー存在しているため(4-5 kb DNAあたり1回出現する), alu配列に対するコンセンサス primerにより酵母DNA100ngより特異的にヒト由来DNAをExpand Long Template PCR System (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany)を用いて増幅した。用いたprimerを以下に示す。

- CL1: 5'-TCCCAAAGTGCTGGGATTACAG-3'
- CL2: 5'-CTGCACTCCAGCCTGGG-3'
- 153Alu5': 5'-GTGGCTCACGCCTGTAATCCC-3'
- 154Alu3': 5'-TGCACTCCAGCCTGGGCAACA-3'
- 450Alu5': 5'-AAAGTGCTGGGATTACAGG-3'
- 451Alu5': 5'-GTGAGCCGAGATCGCGCCACTG-3'

Table 1. Hematologic characteristic of the patients with t(5;12)(q31;p12)translocation

No	Sex/Age	Diagnosis	WBC* (10 ⁹ /l)	PB** Eo/Ba (%)	BM*** blast (%)	splenomegaly	Karyotype
1.	F/68	RAEB	8.8	3/52	15	+	46,XX, t(5:12)(q31:p13)[10]/46,XX[10]
2.	M/21	AML M2 relapse	41.1	42/0	60	-	46,XY,t(5:12)(q31:p13), t(12:19)(p13;q?) [10]/46,XY[1]
3.	M/53	Eosinophilic leukemia	59.5	69/3	3.2	-	46,XY,t(5:12)(q31:p13)[18]/46,XY[2]

*: Eo/Ba represents eosinophil and basophil respectively. **:PB represents peripheral blood;***:BM represents bone marrow

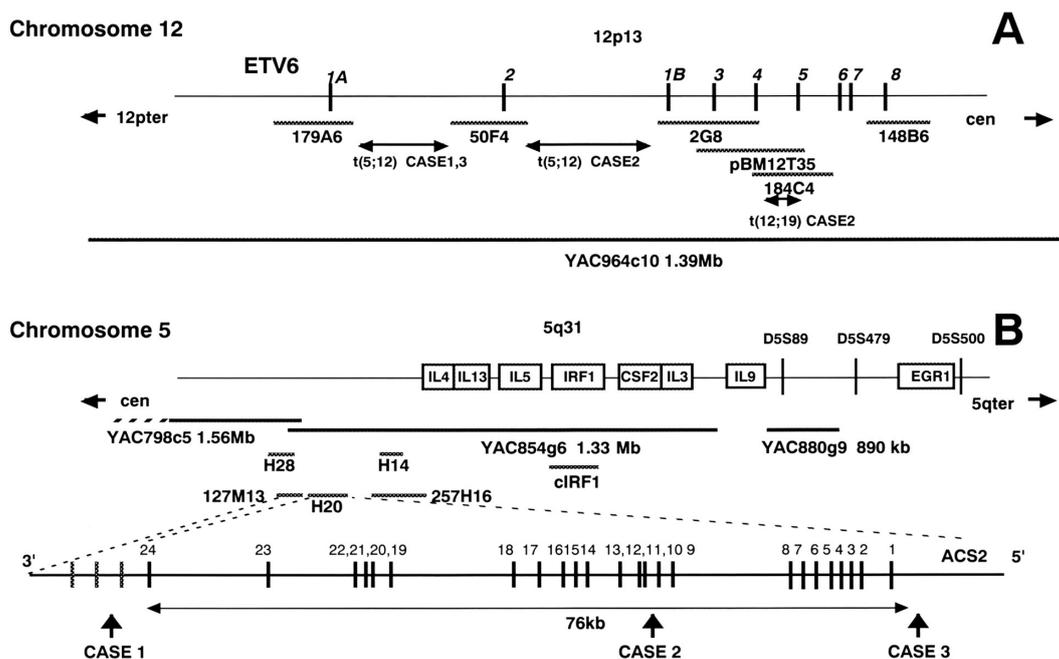


Fig. 1. FISH mapping of the 12p13 and 5q31 breakpoints in the three patients with $t(5;12)(q31;p13)$. (A) The upper line represents a genomic map of the *ETV6* gene described previously²⁴. The locations of the exons are indicated by vertical bars. The thick horizontal lines indicate the different cosmids and BAC probes used in this study. The breakpoint of the second *ETV6* allele by a $t(12;19)(p13;q1?)$ of case 2 is also presented. (B) Schematic map of part of the long arm of chromosome 5 illustrating the chromosomal localization and order of the *IL4*, *IL5*, *IRF1*, *IL3*, *GM-CSF*, *IL9*, and *EGR1* genes. The thick horizontal lines indicate the different YAC, P1, and BAC probes used for FISH analysis. These clones were ordered from the LBNL. The P1 clone H20 was previously reported to map telomeric to an *IL3* gene²⁰; however, FISH analysis revealed that H20 is located between BAC127M13 and BAC257H16. The lower line represents the distribution of exons (indicated by vertical bars) in the *ACS2* gene in H20 and BAC127M13, and the location of the breakpoint in each case.

These figures and tables were reproduced from the article : Fusion of TEL/*ETV6* to a novel *ACS2* in myelodysplastic syndrome and acute myelogenous leukemia with $t(5;12)(q31;p13)$. Yagasaki F, et al. *Genes Chromosomes Cancer*. 1999 Nov;26(3):192-202. Translated by permission of John Wiley & Sons, Inc. All rights reserved.

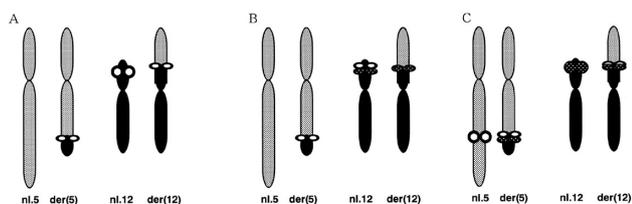


Fig. 2. Schematic diagram for FISH signal pattern for the $t(5;12)(q31;p13)$ chromosomal translocation. When a probe which involves a 12p13 breakpoint, is used for FISH analysis, split signals are detected on both der(5) and der(12) (A). When two flanking probes which locate either centromeric or telomeric to the 12p13 breakpoint, are used, the signal of telomeric probe is detected on der(5), whereas the signal of centromeric probe remains on der(12) (B). When two probes which involves both 5q31 and 12p13 breakpoints, are used for FISH analysis, two fusion signals (detected as yellow signal) are found on both der(5) and der(12) (C).

PCRの条件は95℃で2分間変性後、95℃で1分、50℃で30秒、68℃で7分を30サイクル行い、伸長反応は68℃、10分とした。電気泳動で効率良く増幅されたものを確認し標識反応に用いた。

③BAC, P1, cosmid クローンからのDNA抽出

Single colonyを選択的抗生剤添加LBもしくはTB培養液で37℃、18時間、振盪培養し、培養液の吸光度が $A_{550} = 1.3-1.5$ になった時点で集菌した。DNA抽出はQIAGEN plasmid kit (QIAGEN, Tokyo, Japan)を用いた。

④Probe labeling

上記の方法により抽出されたDNA 1μgをNick Translation Kit(Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany)を用いてbiotin-11-deoxyuridine triphosphateもしくはdigoxigenin-dUTPで標識した。ethanol沈殿法にてcarrier DNA(salmon sperm DNA 2 μg, tRNA 4 μg)と共に精製しホルムアミドで200-250 ng/5 μlに調整した。また5および12番染色体に対するCEP12 Spectrum Green Alpha Satellite DNA probe (Vysis, IL, USA), D5S23 probe (Oncor, Gaithersburg, MD)を併用した。

⑤Hybridization

スライド上に蒸気固定された染色体標本を70℃、30分ハードニングし2xSSC/0.1% tween 20で37℃、

30分処理後, 70%, 80%, 100% (各2分) のアルコール上昇系列で脱水処理した. 続いて70%ホルムアミド/4xSSC (pH 7.0) で75°C, 5分変性処理し4°Cの70%, 80%, 100%のアルコール上昇系列で脱水処理した. ホルムアミドで予め2 µg/µlに調節したCot1 DNA (GIBCO-BRL, Tokyo, Japan) をprobeDNAの5倍量を加え, 75°Cで5分変性処理し, これに等量のhybridization buffer (4xSSC, 20% 硫酸デキストラン, 20% BSA) を加えた. 37°C 30分間プレアニールした後, スライド上で37°Cで18時間ハイブリダイゼーションした. 引き続き37°C, 50% ホルムアミド/4xSSCで5分3回, 4xSSCで10分3回, 洗浄した.

⑥ Two color detection

2% BSA/4xSSCでブロッッキングしたのち, 一次反応液で37°C, 30分処理し37°C, 0.05% Tween 20/4xSSCで3回洗浄. 二次反応液で37°Cで30分処理し, 同様に洗浄後, 三次反応液で37°C, 30分処理し洗浄後DAPI antifade solution 10 µlで封入した. 反応液の調整法を以下に示す.

一次反応液: 2% BSA 1mlに対してavidin-FITC 10 µlを加えミリポアフィルターで濾過

二次反応液: 1% BSA, 2% rabbit serum混液1mlに対してanti-avidin-FITC 10 µlを加えミリポアフィルターで濾過

三次反応液: 1% BSA, 2% rabbit serum 混液1mlに対してavidin-FITC 10 µlとanti-dig rhodamine 加えミリポアフィルターで濾過

DAPI antifade solution: 1 µlのDAPI原液1 µl(1 µg/ml) (Vysis, IL, USA) に7 µlのantifade solution (Vysis, IL, USA) と20xSSC 2 µlを加える.

シグナルの観察は蛍光顕微鏡下で (E-800, Nikon,

Japan) を行い, 判定には少なくとも10個以上のmetaphaseを供した.

4. RNAの抽出と3'RACE法

患者の同意を得て取得した骨髄単核細胞よりguanidium thiocyanate法²⁸⁾に従って, total RNAを抽出した. ETV6融合転写産物をFrohmanらの3'RACE法²⁹⁾を用いて行った. RACEの原理をFig. 3に示す. すなわち既知の配列を有するoligo dT hybrid primerを用いてfirst strand cDNAを作成しETV6の5'非翻訳配列特異的primer (E10F1) およびoligo dT hybrid primerの既知領域に対するQ0 primerでPCR法を用いETV6関連転写産物を一次増幅する. 更に特異性を高めるためETV6各exon特異的primer (E93F1等) とQ1 primerによりnested PCRを行い電気泳動でPCR産物のサイズを推定した. 転座がETV6 intron (n) で発生しているとすると, exon (n) に対するprimerまで見られるbandでexon (n+1) に対するprimerを用いた場合に消失するものが, 求めるETV6融合転写産物である. 目的のPCR産物を泳動ゲルより切り出してサブクローニングし塩基配列解析に供した. 3'RACE法に用いたprimer, cDNAプールの作成法およびPCR反応の条件を以下に示す.

Primers

QT: 5'-CCAGTGAGCAGAGTGACGAGGACTCG-AGCTCAAGCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3'

Q0: 5'-CCAGTGAGCAGAGTGACG-3'

Q1: 5'-GAGGACTCGAGCTCAAGC-3'

E10F1: 5'-GAGAGATGCTGGAAGAAA-3'

E93F1: 5'-GGAAAAACCTGAGAATT-3'

Total RNA 5 µgをQT hybrid primer 50 ngを

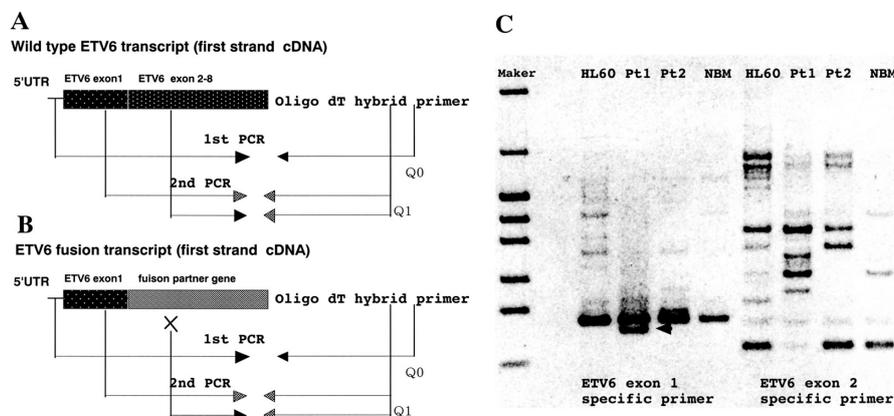


Fig. 3. Schematic diagram of 3'RACE method(A,B). Representative gel electrophoresis of 3'RACE products(C). Black arrow indicates a ETV6 fusion transcript derived from the patient 1's BM cells with ETV6 exon 1 specific primer and Q1 primer (B,C). This fusion transcript was not detected by RACE with ETV6 exon 2 specific primer and Q1 primer (B,C). HL60: acute myelogenous leukemia cell line; NBM: normal bone marrow;Pt : patient.

用いて、常法に従いMuMLV-reverse transcriptase 200 u (GIBCO-BRL, Tokyo, Japan) により逆転写しTEで1 mlに調整し、cDNAプールとした。Extend Long Template PCR System (Boehringer Mannheim) を用いてQ0およびE10F1 primerでFirst PCRを施行した。PCRの条件は92℃で2分間変性後、94℃で20秒、57℃で30秒、68℃で7分を30サイクル行い、伸長反応は68℃、10分とした。PCR反応液をTEで1 mlに希釈して1次PCR産物とした。Second PCRはQ1およびE93F1 primerを用い1 μlの1次PCR産物よりFirst PCRと同様の条件でSecond PCRを施行した。

5. 5'RACE法

*ETV6*融合新規遺伝子のcDNA5'断片を得るため5' RACE法を施行した。予め5末端に既知配列が付加してあるMarathon-Ready cDNA for human bone marrow (Clontech, Palo Alto, CA) を用いて、前述の3' RACE法により単離した*ETV6*融合新規遺伝子の配列に対する特異的primer UP3R (5'-CAAAACCAGCTGTC TCTGAAGATGGAGTA-3') および AP1 and AP2 primerを用いて、PCR法を施行した。

6. 塩基配列解析と相同性解析

RACE産物およびRT-PCR産物はTA cloning法を用いてpCRIIベクター (TA Cloning System Version 1.3, Invitrogen, Tokyo, Japan) にcloningし、dye terminator法により、それぞれ数クローンABI 310 DNA sequencer (Applied Biosystems, Urayasu, Japan) で解析した。得られた塩基配列はBLAST server at NIH (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 上でGenBank (blastn) データベースに登録されている既知の配列と相同性の解析を行った。

7. Northern AnalysisによるACS2の組織発現

5'RACE法により単離された全長ACS2 cDNA (*p3ACS2*) を *EcoR1* 消化して作成した2.5-kbのACS2 cDNA断片をメガプライムDNA標識システム (Amersham International Plc.) を用いて [α -32P]dCTP (New England Nuclear) で放射線標識し、multiple-tissue RNA filters (Human MTN; Clontech, Palo Alto, CA) に18時間、hybridizeした。常法に従いクエン酸溶液で洗浄後 Kodak XAR-5 film に-80℃、48時間感光した。

8. Reverse Transcription (RT)-PCRによるETV6-ACS2 転写産物とACS2-ETV6転写産物の検出

患者total RNA 1 μgから常法に従ってRT-PCR法により検出した。使用したprimerは以下のとおりである。

ETV6-ACS2 融合転写産物に対する primer:

(case 1) : E93F1 および UP3R

(cases 2 および 3) : TEL-E1 (5'-GAGACTCCTGCTCA GTGTAGCA-TTAAG-3') および ACS2R2 (5'-CTCGGCT TGCTTACGCTTTG-3')

ACS2-ETV6 融合転写産物に対する primer:

ACS2F2 (5'-CTATCCGCTACATCATCAAT-3') および EAS536 (5'-TTCAATGGTGGGAGGGTTAT-3')

PCRの条件は94℃で2分間変性後、94℃で20秒、58℃で20秒、72℃で90秒を35サイクル行い、伸長反応は72℃、10分とした。

第3節 結果と考察

1. t(5;12) (q31;p13) 染色体転座の血液学的特徴と転座切断点の解析

今回我々が検討しえたt(5;12) (q31;p13) 転座は、症例1および3で、初診時より認められ、好塩基球増多を伴うMDSや好酸球性白血病という血液学的特徴を有していた。症例2においてもAML第2再発期に好酸球増多を伴ってt(5;12) (q31;p13) が出現し、且つ同一染色体上でt(12;19) (p13;q?) が認められた。以上よりt(5;12) (q31;p13) を有するMDS/AMLは好塩基球や好酸球増多といった特徴的臨床像を有し、特異な疾患群を形成している可能性があると考えられた。以前より*ETV6*関連転座では好酸球増多を伴うことが報告されている^{3,11)}が、Matsushimaらによって好酸球増多を呈するMDSと5q-との関連³⁰⁾が、Riouxらによって家族性好酸球増多症における5q31遺伝子座の関与³¹⁾が報告されている。これらにおける責任遺伝子が好酸球および好塩基球の共通前駆細胞レベルでどの様に関与しているのか今後の検討が必要である。

12p13および5q31切断点のFISH解析による結果をTable 2に示す。12p13切断点は全ての症例でYAC964c10の分割シグナルがder(12) およびder(5) に認められることから転座切断点は*ETV6*内に存在することが示唆された。さらに*ETV6*の各exonを含有するcosmidを用いた解析では、exon 1を含有する179A6のシグナルがder(5) に、exon 2を含有する50F4のシグナルがder(12) に残存して認められ、症例1および3では*ETV6*のintron 1A内に転座切断点があることが判明した。さらに症例2では179A6および50F4のシグナルをder(5) t(5;12) およびder(19) t(12;19) 上に認め (Fig. 4A), exon 3を含有する2G8ではder(12) t(5;12) およびder(19) t(12;19) 上に認められた。次いで*ETV6* exon 4-5を含有する184C4を用いるとder(12) t(5;12), der(12) t(12;19) およびder(19) t(12;19) にそれぞれシグナルが認められ (Fig. 4B), 症例2にお

ける12p13の転座切断はt(5;12) 転座ではETV6 intron 2で, t(12;19) 転座ではETV6 intron 4-5の間で発生していると考えられた。

5q31切断点は全例でYAC854g6内に存在し, さらに症例2と3ではH20内に, 症例1ではBAC127M13内に存在していた (Fig. 4C,D)。Fig. 1で示すように, YAC854g6は1.33MbでIL4, IL5, IRF1, IL3やGM-CSF等のサイトカインクラスターを含有するクローンで

あり, 我々の転座切断の検討からはH20はYAC854g6の最もセントロメア側のBAC127M13とBAC257H16の間に存在すると考えられた。またH20とBAC127M13は200kb以内に近接して存在していること²⁶⁾から, 5q31切断点は全例で同一遺伝子内に存在している可能性があると考えられた。MDS/AMLに好発する5q-の共通欠失領域には3つの候補が挙げられている。Nagarajan²⁰⁾やZhao²⁶⁾らは, その一つとしてIL9か

Table 2. Results of FISH Analysis and Cytogenetic Data

		case 1		case 2				case 3	
karyotype		46,XX,t(5;12)(q31;p13) [10] / 46,XX [10]		46,XY [18] (at the first diagnosis) * 46,XY [11] (at the first relapse) * 46,XY, t(5;12)(q31;p13), t(12;19)(p13;q1?) [9] / 46,XY [1] (revised karyotype by FISH)				46,XY,t(5;12)(q31;p13) [18] / 46,XY [2]	
probe	localization	der (5)	der (12)	der (5) t(5;12)	der (12) t(12;19)	der (12) t(12;19)	der (19) t(12;19)	der (5)	der (12)
y886a12	5q23-31	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)
pH28	5q31	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)
y854g6		(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)
b127M13		(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)
pH20		(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)
b257H16		(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)
pH14		(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)
clRF1		(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)
y880g9	5q31	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)
y964c10	12p13	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)
c179A6	ETV6 exon 1	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)
c50F4	ETV6 exon 2	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)
c2G8	ETV6 exon 3-4	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)
pBM12T35	ETV6 exon 3-5	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)
c184c4	ETV6 exon 4-5	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)
c148B6	ETV6 exon 8	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)

ND: not done; *: FISH analysis could detect no abnormality

These figures and tables were reproduced from the article : Fusion of TEL/ETV6 to a novel ACS2 in myelodysplastic syndrome and acute myelogenous leukemia with t(5;12)(q31;p13). Yagasaki F,et al. Genes Chromosomes Cancer. 1999 Nov;26(3):192-202. Translated by permission of John Wiley & Sons, Inc. All rights reserved.

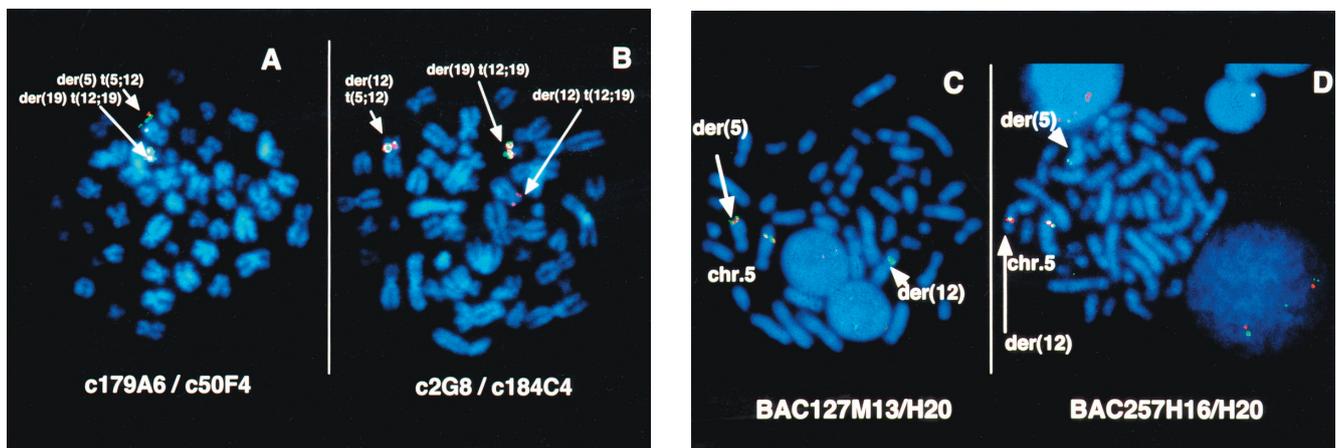


Fig. 4. Results of FISH analysis of the metaphase chromosomes of Patient 2. (A) FISH with c179A6 [detected with fluorescein isothiocyanate (FITC)] and c50F4 (detected with rhodamine). Hybridization signals were detected on both der(5) and der(19). (B) Hybridization with c2G8 (FITC) and c184C4 (rhodamine) shows that both c2G8 and c184C4 signals remained on der(12)t(5;12), while a split signal of c184C4 was detected on der(19)t(12;19), and the split signal of c184C4 and the signal of c2G8 were detected on der(12)t(12;19). These data show that biallelic translocation of ETV6 occurred during the same metaphase in this patient. (C) Hybridization with H20 (detected with FITC) and BAC127M13 (rhodamine) shows that a part of H20 was translocated to der(12), while BAC127M13 remained on der(5). (D) Hybridization with H20 (FITC) and BAC257H16 (rhodamine) shows that BAC257H16 was translocated to der(12), while split signals of H20 were detected on both der(5) and der(12). With these FISH results, it was confirmed that H20 is located between BAC127M13 and 257H16.

These figures and tables were reproduced from the article : Fusion of TEL/ETV6 to a novel ACS2 in myelodysplastic syndrome and acute myelogenous leukemia with t(5;12)(q31;p13). Yagasaki F,et al. Genes Chromosomes Cancer. 1999 Nov;26(3):192-202. Translated by permission of John Wiley & Sons, Inc. All rights reserved.

らEGR1間に存在するD5S479からD5S500の領域をMDSからAMLへの病態移行に關与する共通欠失領域であると報告している。我々がFISH解析に用いたYAC880g9はこの近傍に存在しているが、本転座における5q31切断点はYAC880g9よりセントロメア側に位置しており、この共通欠失領域には存在しないと考えられた。

2. ETV6融合遺伝子と新規ETV6転座相手遺伝子の全長cDNAの単離

上述したFISH解析により症例1ではETV6内の切断点はintron 1A内にあると考えられるので、我々は3'RACE法によりETV6 exon 1特異的primerで増幅されexon 2特異的primerで増幅し得ない短い転写産物を単離し、塩基配列解析を行ったところ、ETV6 exon1に融合するalu配列を含んだ未知の遺伝子配列を得た。実際には、このクローンはoligo dT hybrid primerがimmatureなETV6融合mRNA内に存在するalu配列内のpoly Aを認識して増幅したものと考えられた (Fig. 3C)。この未知の配列の内alu部分を除いた塩基配列に対するprimerを設定し5'および3'RACE法により得た多数のクローンのフラグメント解析を行い、転座相手遺伝子の完全長cDNAの3150bpの塩基配列を得た。また開始コドンと終止コドンを含む完全長cDNAを含有するクローンをp3ACS2として単離した。本遺伝子は相同性解析の結果、Fujinoらによって報告されているラットのAcyl CoA Synthetase 2遺伝子(ACS2)³²⁾とcDNAレベルで98%、アミノ酸レベル95%の相同性を示すことから、ヒトホモログと考えhuman ACS2と名称しGenbankに登録した (accession no. AF099740)。塩基配列解析結果を (Fig. 5) に示す。さらに我々のFISH解析よって5q31切断点を含有することが判明したP1クローンH20はFrazerらにより塩基配列が決定 (Genbank accession no. AC005217) されており²⁶⁾、H20内には74kbにわたってACS2の19個のexonと3'非翻訳領域をコードする5個のexonが存在することが判明した (Fig. 1)。さらにヒトのmultiple tissue blotを用いたNorthern解析ではACS2の発現を脳、胎生肝、骨髄で高レベルに認め、脳では7.0と2.7 kbの、骨髄では3.4kbの胎生肝では3.4と8.2 kbの転写産物を認めた。胎生肝は胎生期造血の主座であり、骨髄と合わせて、ACS2は造血において重要な役割を担っていると考えられる (Fig. 6)。Fujinoらはin vitroにおけるラットACS2の酵素活性を検討し、ACS2その他のACS familyに比してドコサヘキサエン酸(DHA)に対するアシル化活性が特異的に高いことを報告している³²⁾。脳にDHAが豊富に含まれていることを考慮すると、ACS2はDHAの代謝に選択的な役割を担っているとも考えられる。

-54	GCCTTATCTGACTCTTGTTCACACAGAGTTTCCCTCCTCACTTCTGGAGAAG	-1
1	ATGCAGACACAGGAGATCCTGAGGATCTCCGACTCCCTGAGCTAGGTGTGGGACG	60
21	M Q T Q E I L R I L R L P L E L G D L G Q	120
41	TTTTCCGAGCCTCCGGCCACCCTCGTAGTATGGGTCCTGGTGCATCTCT	180
61	F F R S L S A T L T L V S M G L A A L I L	240
81	GCCATCTGGTCTACTCACCGCCAAGGCTCGCAGCCGATCAACCTCTGATGGG	300
101	A Y W F T H R P K A L Q P P C N L L M Q	360
121	T C A G A A A G T A G A G C A G T G G C G G G C A C G G A T C T G T T G G G T C G G C C T C A G	420
141	S E E V E D S G G A R R S V I G S G P Q	480
161	C T A C T T A C C C A C T A T G A T G A T C C C G G A C C A T G A C A G G T G T C C G C T G G G G T T	540
181	L L T H Y Y D D A R T M Y Q V F F R R G L	600
201	A G C A T C T C A G G A A T G G C C C T G T T G T T T C A G A A G C T A A G C A G C T T A C C A G T G G	660
221	S I S G N G P C L G F R K P R S V I G S G P Q	720
241	C T G T C T A C C A G G A G T G G C C A C G G C T G A A T T C T G G G T C C G A C T T C T C A G C A G	780
261	L S Y Q E V A D R A E F L G S G L L Q H	840
281	A A T T G T A A A G C A T G C A T G A T T A T T G T G T T T T G C A A A A T G G C C A G A G T G G	900
301	N C K A C T D Q F I I V G F A Q N R P E W	960
321	A T C A T T G T G A G T G G C T G C T A C A C A T T C C A T T C C A T T G G T G G T G C C C C T C T A T G A C C C	1020
341	I I V E L A C Y T Y S M V V P L Y D T	1080
361	C T G G C C T G G G C T A C C G T A C A T C A T C A A T C A G C G G A C A T C A G C A C C G T G A T T G T G	1140
381	L G P G A I R Y I I N T A D I S T V I V	1200
401	G A C A A C C T C A G A G G C T G T G C T T C T G A G A C A T G T G G A G A G A A G A G A C T C C A G C G	1260
421	D K P Q K A V L L L E H V E R K E T P G	1320
441	C T C A A G T G A T C T C C A T G G A C C C A T T C G A A G A A G C C T G A A G A G A G A G G C A G A A G	1380
461	L K L I I L M D P F E E A L G K R G Q K	1440
481	T C G G G G T G G T C A T T A A G T C A T C A G C A C C T G A A G C C T G T G C C A A G A A T C C A C C A G	1500
501	C G V V I K S M Q A V E D C G E N H Q	1560
521	G C T C T G T G C C C C G A C C G T G A T G A C T C C A T T G T G T T C A A G C G G C A G C A C A	1620
541	A P V P P Q P D D L S I V C T S G T	1680
561	G G A A C C A A A G G T G C G A T G T C A C C A T T G G A A G C G T G G T G G T A D T F C A G G C T T T	1740
581	G N P K G A M L T H G N V A D A P S G F	1800
601	C T G A A G T G A C A G A G T C A G T G G G T C C C A T T G T G C G G A T G G C A C A T T C C A T T T G	1860
621	L K V T E S Q W A P T C A D V H I S Y L	1920
641	C T T T A G C A C A C A T T T G A G C G A A T G T G C A G T T C T G C T C T A T T G C C A G G A G G G C T P	1980
661	P L A H M F E R M V Q S V V Y C H G G R	2040
	G T T G G T T C T C A G G A G A T A C C G C T T C T C S A D A G A C A T G A A G G C T C T A T G C C C C V	
	V G F F Q G D I R L L S D D M K A L C P	
	A C C A T T C C C T G G T C C C A C G A C T G C T G A A C C G G A T G A C A G A A G T C T C A G C C A G	
	T I F P V V P R L L N R M Y D K I F S Q	
	G C A A A C A C C A T T A A A G C C T G G C T C T G G A T T T G C A G A A A G G T A A G C A A G C C G A G	
	A N T P L K R W L L E F A A K R K Q A E	
	G T C C G A G T G G A T C A T C A G A A T G A T A G T A T C T G G G A C T C T C T T T A A T A A G A T T	
	V R S G I I R N D S I W D E L F F N K I	
	C A G G C A G T T G G T G G T G T G C G A T T T A C T G G A G C A C C C C A C A T C A C C A	
	Q A S L G G C V R M I V T G A A P A S P	
	A C A T T C T G G A T T T C C G G C A G C T A G G C T G C C A G T T T A G A G T T A T G G C C A A	
	P L V L G F L R A A L G C Q V Y E G Y G Q	
	A C T G A T G C A C A G T G G T G A C T T C A C C A C T C C T G G C C A G T G A C C T C A G G C A C G T A	
	T E C T A G C T F T T P G D W T S G H V	
	G G G G C C A C T C C C T G C A A T C A T A C A A G T C C T G A T T G T G A G A A C T G A A C T A C T G G	
	G A P L P C N H I K L V D V E E L N Y W	
	G C C T G C A A A G G A G A G A G A T A T G T G A G A G G C A A A T G T C T T C A A G G C T A C T T G	
	A C K G E G E I C V R G P N V F K G Y L	
	A A A G T C C A G A C A G G A G A G G C C T G A C A G C G A T G G C T G C C T C A C A C T G G A G A C	
	K D P D R T K E A L D S D G W L H T G D	
	A T C G A A A T G G C T G C C G C A G A A C T C T T A A A T T A T T G T G R C G G A A A A A G C A T A T T T	
	I G K W L P A G T L K I I D R K K H I F	
	A A A C T G C T C A G G A G A A T A T G T G A C C C G A A A G T T G A G A A C A T C A C A T C C G G A G C	
	K L A Q G E Y V A P E K I E N I Y I R S	
	C A A C T G T G G C C A A A T C T A T G C A T G G G A C T T A A A G C C T T T T T G T A G G C A T T	
	Q P V A Q I Y V H G D S L K A F L V G I	
	G T T T G C C T G A C C T G A A G T T A T G C C T C T G G C C A G A A G A G A G A A T T G A A G A A C A	
	V V P D P E V M P S W A Q K R G I E G T	
	T A T G C A G A T C T G C A A A T A A G G A T T G A A G A A G C A A T T T T G A A G A T A T G G T G A G	
	Y A D L C T N K D L K K A I L E D M V R	
	T Y A G A A A A A A A G T G A C T C C A T T T T T G A G C A G C C T A C C A C A G T C T T A A T A C A G	
	L G K E S G L H S F E Q D L P Q C L T Q	
	A T T A A G G T T C A G T A A A T T T G A T C A A T G A C T A A A A C C C G A G G T A A A A C A G G T T C G	
	I K V F S K V *	
	A G A G A A A G C C A A G T G C A C G C T T T G C A A G A T T T G C A G A A A C C A G A C G G A C G A G G	2100
	C A G G A G T A C G C C T C T G G C C T T G A C C C T C G T T A G A G T T T C A C A G A G A A A A A A G C	2160
	C T C A G A A A A T A G T C T A G T A A G A C A C C A G G A T G A G A A G T T C A C T C T G C T G A A	2220
	T C A G T T A C T A G A C C C T C A G G T T A T A G T A T T C A A T A G T G A C T A G T A T C A G A	2280
	T T A G T T T G C A C C A T G G T A T G C C A G T T C T C T G A C C T A T T C A G T C A C A G A C T T A T	2340
	G C A G A T C A A C A G A T T T G A A G A G A G C T T C C T C A C C T G A C T G A C T T C A G A A A A T C A G A T	2400
	T A T T A G A C T G G A G T G C C A A C T T G A A G A A C A C A T G C A T G C A T G G A A A A T T C A C T C T T	2460
	C T G A C T C A G T A A G C A G T A G C A T A G A A G C C A C A G T T T C A A A T G C T C A G C A	2520
	A T T T C A G T C C T T C A G A A G A T A T C A G A A T G C A A A A C A G A A A C A G T A T C A G A T A	2580
	G C A G T C A A A T G T T C T C A A A G C A A A G T G C T T C A A A T T C A G A T C A G A A A A C A A A	2640
	T T C A G T A C T C C T G T A A G A A A A C A G A G C C T T T T A C A A G T A C T C A T C T C A G A C	2700
	A G C T G T T T T G T A T G A T T T G C C T A G T C A A A A G C A T C T T T T G A A G A A C T T T T C C	2760
	A A A T G C A C A A T A T G T T A A T T C A A A G A A T T T T C C T G A A T T T T C C G T T T C A G G A A A	2820
	T C T T C A A T G A G T T T C T C A A A T G C A T C A G A A A T G T T G T A T T A T A G A C A T C A C C	2880
	A G G A A T A G A C A A G T A A A A A A A A G G T T A T T G T A A A G A A G A A A T A T T C T C T C C	2940
	T A G G A T A C C C T C A G A T A T A T A A A A T G G C A T G G C A T G A A A A A C A G C T G T G C T G A A T	3000
	T T T C A C C A C T T T G A A G A C A G G A G T G A A G T C A A A G T A T A A A G C A G A A T G T C T G C C T G	3060
	A A A T A T A T G A A A T A A A A A T A A A A A T T C C A A A	3096

Fig. 5. Structure of human ACS2 cDNA. Nucleotide and deduced amino acid sequence of human ACS2 cDNA. Nucleotide residues are numbered on the right; amino acids are numbered on the left. Nucleotide 1 is the A of the initiator ATG codon. The predicted initiator methionine is underlined, and there is an in-frame stop codon upstream. Negative numbers refer to the 5'-untranslated region. Potential polyadenylation signals are underlined. The asterisk indicates a stop codon.

These figures and tables were reproduced from the article : Fusion of TEL/ETV6 to a novel ACS2 in myelodysplastic syndrome and acute myelogenous leukemia with t(5;12)(q31;p13). Yagasaki F, et al. Genes Chromosomes Cancer.1999 Nov;26(3):192-202. Translated by permission of John Wiley & Sons, Inc. All rights reserved.

3. MDS/AMLにおける ETV6-ACS2 融合遺伝子の意義

FISH解析および ETV6 融合遺伝子である ACS2 cDNA の単離の結果から、個々の症例における至適 primer を設定し、RT-PCR法で ETV6-ACS2 融合遺伝子の発現を解析したところ、全ての症例で ETV6-ACS2 融合遺伝子の発現を確認した (Fig. 7). 得られた増幅産物の塩基配列解析 (Fig. 8) から症例1では ETV6 の exon 1 に ACS2 の 3' 非翻訳領域が融合しており 127 個の短いアミノ酸配列をコードしているが、Swiss prot database において相同性のある配列は存在しなかった。症例2では ETV6 の exon 2 が ACS2 の exon 11 に融合し、症例3では ETV6 の exon 1 が ACS2 の exon 1 に融合していたが、どちらの転写産物もフレームシフトにより早期に終止コドンが出現し機能的蛋白への翻訳は不可能と考えられた。症例3では短い ETV6-ACS2 転写産物も認められたが、これは GT-AG rule に従って ACS2 内の exon 1 と exon 2 の間で選択的スプライシングによって生じたものと考えられた。

一方、ACS2-ETV6 転写産物は症例1および2に共に認められたが症例2では2種類の長短 ACS2-ETV6 転写産物が存在した。短い産物では ACS2 の exon 9 が ETV6 exon 3 に融合していたが、長い産物はスプライスされる前の ETV6 の intron 2 にあたる配列を含有していた。これらの結果から t(5;12) (q31;p13) 転座により生ずる ETV6-ACS2 転写産物は機能的蛋白質をコードしないと考えられた。また症例1で認められた ACS2-ETV6 転写産物も 3' 非翻訳領域を欠失していることから、融合 ACS2 mRNA の細胞内分布や寿命に与える影響があるものと推定される。

以上より t(5;12) (q31;p13) 転座においては、転座による ETV6 および ACS2 遺伝子の破壊、機能低下が発癌および病態に関与しているものと推察される。特に症例2では両側アレルの ETV6 が転座に関与しており ETV6 の機能喪失が生じていると考えられ興味深い。以前より ETV6-AML1 を生ずる t(12;21) (p13;q22) では白血病の進行に伴い高率に残存 ETV6 アレルの欠失が起こる³³⁾ ことから ETV6 の機能欠失が病態の進行に関与する可能性が指摘されてきた。また他にも ETV6 遺伝子の破壊や局在部位の変化が発癌に関与すると考えられる転座例が報告されている。

CML, AML, MDS で認められる t(12;22) (p13;q11) 転座では ETV6 は 22q11 の MNI と融合し、ETV6-MN1, MN1-ETV6 融合遺伝子が発現しているが ETV6-MN1 は機能的ドメインをコードせず、MN1-ETV6 が癌化に関与すると推察される⁹⁾。その後、Poirelらは t(12;22) を有する白血病細胞株 MUTZ-3 では ETV6-MN1 および

MN1-ETV6 融合遺伝子の発現を認めず、ETV6 の 5' 非翻訳領域に転座切断点があり、残存 ETV6 アレルも部分欠失していることから、ETV6 の喪失が発癌に関与すると推察している³⁴⁾。Sutoらは t(6;12) (q23;p13) を有する cALL 由来細胞株で、ETV6-STL が主に転写されるが機能的ドメインを持たず残存 ETV6 アレルも部分欠失していることを報告⁷⁾ しており、ETV6 の機

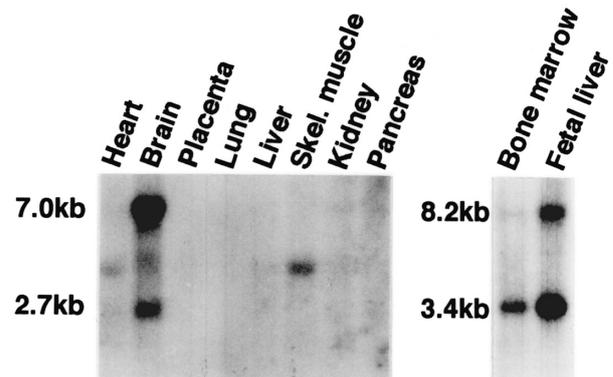


Fig. 6. Tissue distribution of ACS2 gene expression. Two different MTN blots purchased from Clontech Laboratories were hybridized with probe β 3ACS2.

These figures and tables were reproduced from the article : Fusion of TEL/ETV6 to a novel ACS2 in myelodysplastic syndrome and acute myelogenous leukemia with t(5;12) (q31;p13). Yagasaki F, et al. Genes Chromosomes Cenc. 1999 Nov;26(3):192-202. Translated by permission of John Wiley & Sons, Inc. All rights reserved.

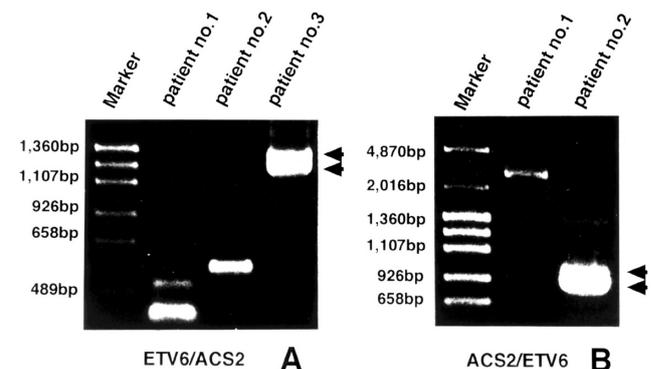


Fig. 7. Gel analysis of (A) amplified ETV6/ACS2 chimeric transcripts and (B) amplified ACS2/ETV6 chimeric transcripts by RT-PCR. (A) Lane M, size marker; lane 1, Patient 1; lane 2, Patient 2; lane 3, Patient 3. (B) ACS2 /ETV6 reciprocal transcripts are present in Patient 1 (lane 1) and Patient 2 (lane 2). The different PCR products in lane 3 (A) and lane 2 (B) are indicated with arrows. These are the result of alternative splicing events as shown in Fig. 8.

These figures and tables were reproduced from the article : Fusion of TEL/ETV6 to a novel ACS2 in myelodysplastic syndrome and acute myelogenous leukemia with t(5;12) (q31;p13). Yagasaki F, et al. Genes Chromosomes Cenc. 1999 Nov;26(3):192-202. Translated by permission of John Wiley & Sons, Inc. All rights reserved.

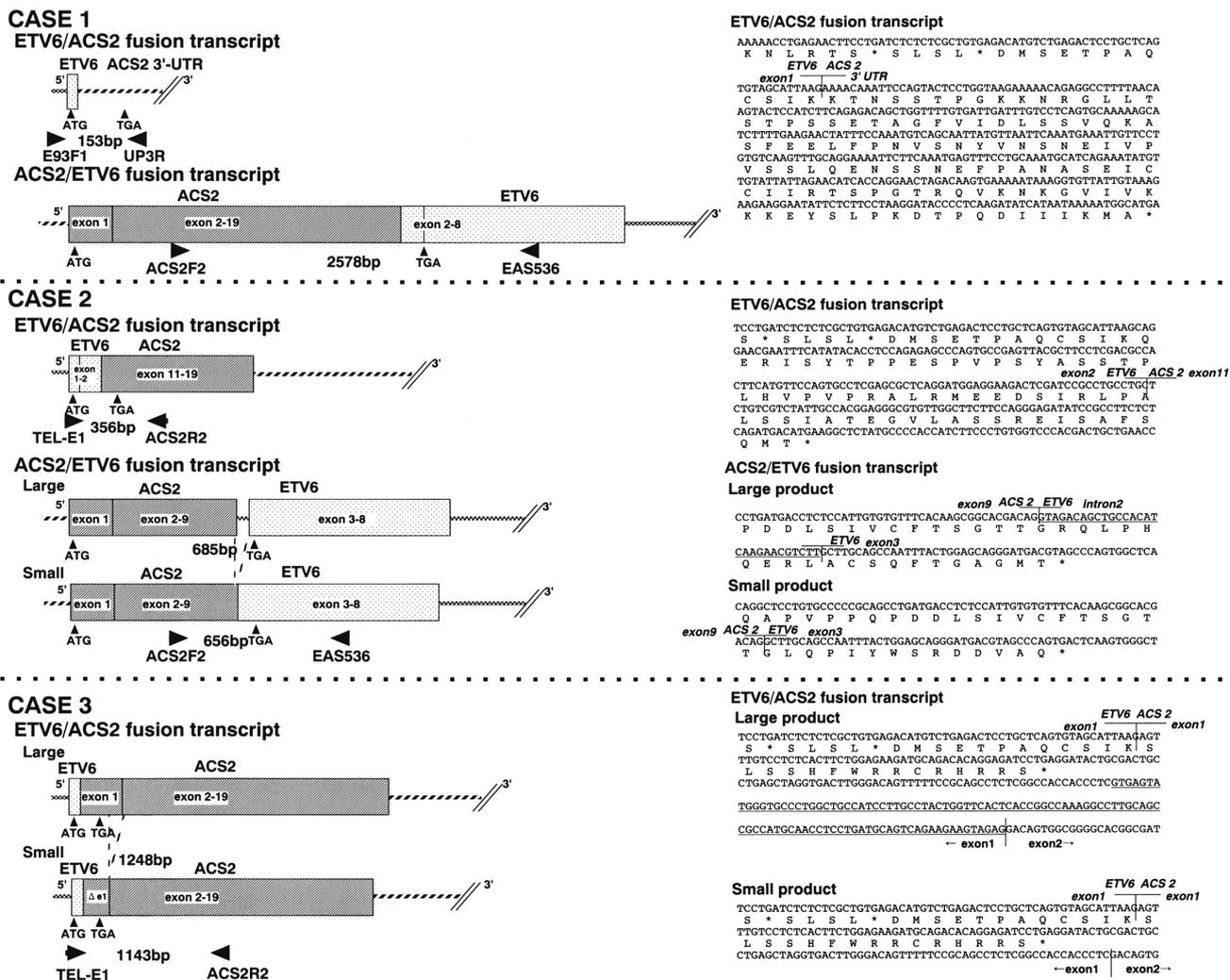


Fig. 8. Schematic diagram of the *ETV6/ACS2* and *ACS2/ETV6* fusion transcripts, and the partial nucleotide and deduced amino acid sequences near the breakpoint of the *ETV6/ACS2* and *ACS2/ETV6* fusion transcripts are shown. In Patients 2 and 3, an out-frame fusion of *ETV6/ACS2* occurred, and the resulting stop codon after the initiator methionine of *ETV6* is indicated by the asterisk. In Patient 3, two *ETV6/ACS2* splice variants are observed. Both PCR products show the fusion of exon 1 of *ETV6* to exon 1 of *ACS2*. The underlined nucleotide sequence in the larger fusion product represents the region which was spliced out according to the GT-AG rule in the smaller fusion product. In Patient 2, two *ACS2/ETV6* splice variants are observed. Both PCR products show the fusion of exon 9 of *ACS2* to exon 3 of *ETV6*. However, larger product contains unspliced intron 2 of *ETV6*. Position of primers used in each RT-PCR experiment (Fig.7) are indicated by the black arrows. Size of resulting PCR products are shown between the arrows. These figures and tables were reproduced from the article : Fusion of TEL/*ETV6* to a novel *ACS2* in myelodysplastic syndrome and acute myelogenous leukemia with t(5;12)(q31;p13). Yagasaki F, et al. Genes Chromosomes Cancer. 1999 Nov;26(3):192-202. Translated by permission of John Wiley & Sons, Inc. All rights reserved.

能の喪失が癌化に関与している可能性があると考えられる。またCoolsらによって、t(4;12)(q11-q12;p13)を有するAMLでは全例で*ETV6*の機能的ドメインを保持する*BTL-ETV6*が検出されたが、BTL (BRX like Translocated in Leukemia) はN末端に親水性アミノ酸のストレッチ構造を有するため、融合蛋白は細胞質に局在し、結果として*ETV6*の機能低下が生じて発癌に関与すると推察している¹²⁾。以上の様に*ETV6*の機能低下および喪失が示唆される報告が少なからず存在す

るが、*ETV6*の癌抑制遺伝子としての役割を証明するには至っていない。

また*ETV6*の転写抑制因子としての機能に関する報告が近年、増えつつある。トリ白血病を起こすトリ白血病ウイルスE26ゲノムは癌遺伝子*v-ets*と*v-myb*から構成され、*v-ets*のヒトホモログとして*ets1*が単離された。*Ets1*のC末端には85アミノ酸からなるwinged helix-turn-helix motif (*ets* DBD)が存在し、同領域を介してGGAA/Tを含むETS結合コンセンサス配列に結合

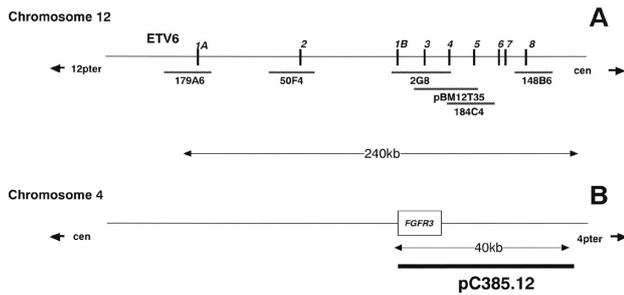


Fig. 9. FISH mapping of the 12p13 and 4p16 breakpoints in the patient with t(4;16)(p16;p13). (A) The upper line represents a genomic map of the *ETV6* gene described previously (Beans et al., 1996). The locations of the exons are indicated by vertical bars. The thick horizontal lines indicate the different cosmids and BAC probes used in this study. (B) Schematic map of part of the short arm of chromosome 4 illustrating the chromosomal localization of the *FGFR3* gene. The thick horizontal lines indicate the cosmid probe used for FISH analysis.

し転写因子として働くことが知られている。現在まで約30種類の遺伝子がets DBDを有することが報告されets familyを形成している。骨軟部腫瘍や白血病におけるets family遺伝子異常は良く知られており³⁵⁾, ets familyに属し、マウスFriend白血病のproto-oncogeneである*Fli-1*は、Ewing肉腫の90%で認められるt(11;22)転座により*EWS-Fli-1*融合遺伝子として発現し、Fli-1依存性の転写活性が亢進している³⁶⁾。*ETV6*は*Drosophila yan/pok*と同一性が高く転写抑制因子と考えられ、ETS結合コンセンサス配列に結合して転写を抑制したり、HLHを介した蛋白相互作用により転写抑制的に機能することが推察されてきた³⁾。

Kwiatkowskiらはtwo-hybrid法を用いて*ETV6*とFli-1とが会合していることや、*in vitro*で*ETV6*がFli-1依存性のプロモーター活性を阻害し、完全な阻害には*ETV6*のHLHのみでは不十分でありDBD領域も必要であることを報告している。さらに*ETV6*がFli-1プロモーターに存在するETS結合配列に結合し転写を抑制することや、その際には*ETV6*のHLHが必須であることが示されている³⁷⁾。

このように*ETV6*融合蛋白も、正常*ETV6*に結合して機能低下を起こしたり、他のets familyの転写活性に影響を与える可能性がある。HLHを介する蛋白相互作用としてはGABP α や*ETV6*を除いてets family間のオリゴマー形成は見られず、*ETV6*のHLH構造の特殊性によるものと推察される。また*Drosophila yan*がMAPKカスケードにおいてリン酸化を受け転写抑制活性を変化させること³⁸⁾から、今後、シグナル伝達系における*ETV6*の役割も解明されると思われる。以上、*ETV6*の転写抑制因子としての性格が徐々に明らかに

されてきているが、真に生体内で*ETV6*が癌抑制的に機能しているかは今後の課題である。

一方、ACSは細胞内で脂肪酸が利用される際に必須であるアシル化を司る酵素で、ミトコンドリアにおける脂肪酸の β 酸化および細胞内脂質合成に必須の酵素である。さらにACSによる生成物であるAcyl CoAは細胞内蛋白の装飾³⁹⁾、蛋白輸送に重要な役割を担っており⁴⁰⁾、またProtein kinase C活性や甲状腺ホルモン受容体の調節因子⁴¹⁻⁴²⁾であることも知られている。現時点ではACS2の造血における役割は不明であるが、我々は現在までに赤芽球系コロニーおよび顆粒単球系コロニー、急性白血病におけるACS family (ACS1-4)の発現解析を行い報告してきた⁴³⁾。赤芽球コロニー構成細胞ではACS2のみの、顆粒単球系コロニー構成細胞ではACS2以外のACS1,3,4の発現を認めた。さらに急性白血病ではPML-RARAキメラ遺伝子を発現しているAPL全例にACS2の発現を認めたことからAPL細胞株であるNB4の発現パターンを検討した。その結果、NB4ではATRA非添加時にはACS2-4を発現しているが、ATRAによる分化誘導8時間後からACS2の発現のみが低下し、ACS3の発現が亢進することが判明した(投稿準備中)。以上よりACS2は赤芽球のみならず前骨髄球レベルで分化、増殖に重要な役割を果たしていると考えられるが、病態解明には、今後、更なるACS2の機能解析が必要と考えられる。

第3章

末梢性T細胞悪性リンパ腫におけるt(4;12)(p16;p13)染色体転座切断点の解析とETV6-FGFR3融合転写産物の単離¹⁸⁾

第1節 緒言

末梢性T細胞性悪性リンパ腫(PTCL)における染色体異常の報告は少なく1p36, 14q11, +8q等の異常が散発的に報告されているのみでPTCLの発癌機構については未知の点が多い。今回、著者は過去に報告されていないt(4;12)(p16;p13)染色体異常を有するPTCL症例を経験し、12p13切断点が造血器腫瘍にける好発転座遺伝子*ETV6*が存在することから責任遺伝子および新規融合遺伝子の単離を行った。*ETV6*のリンパ性悪性腫瘍における関与は、小児preB-ALLに認められる*ETV6-AML1*^{4,5)}やt(12;14)(p11;q32)を有するB細胞性悪性リンパ腫⁴⁴⁾およびT-ALLにおける*ETV6-JAK2*⁸⁾等が報告されているが、PTCLにおける報告はなく、本研究はPTCLの発癌機構および造血器腫瘍における*ETV6*の関与を考える上で重要である。また4p16切断点には多発性骨髄腫で認められるt(4;14)(p16.3;q32)

の責任遺伝子である *fibroblast growth factor receptor 3* (*FGFR3*)⁴⁵⁾ が存在していることから、*FGFR3* の関与を疑い、本症例における転座切断点の解析を FISH 法で、さらに RT-PCR 法で *ETV6-FGFR3* 融合遺伝子の発現の有無を検討した。

第2節 対象と方法

1. 対象症例

症例は63才、女性。持続する発熱と全身性の表在リンパ節の腫大を主訴に来院した。頸部リンパ節の生検で病理組織学的に悪性リンパ腫と診断された。免疫組織染色の結果ではリンパ腫細胞は CD3 および CD4 が陽性、CD20、CD79a、CD56 が陰性であり、HTLV-1 抗体陰性で PTCL stage I V と最終診断された。初診時、骨髄生検で骨髄へのリンパ腫細胞の浸潤が 2.8% に認められ、その際の骨髄細胞染色体解析 46,XX,t(4;12)(p16;p13) [3]/49,XX,+i(1)(q10),t(4;12)(p16;p13),+10,+19[10]/49,XX,+i(1)(q10),t(4;12)(p16;p13),+11,+19[3]/46,XX[4] の異常核型を認めた。CHOP 療法施行後、全身の表在リンパ節の腫大は消失したが、骨髄染色体解析では 46,XX,t(4;12)(p16;p13)[2],46,XX[18] と異常クローンが残存していた。

2. FISH法によるt(4;12)(p16;p13)転座切断点の解析

ETV6 の各 exon を含有する cosmid クローン:179A6 (exon 1), 50F4 (exon 2), 2G8 (exon 3), 184C4 (exon 4-5), および 148B6 (exon 8) は P. Marynen 博士 (Leuven University, Leuven, Belgium) より供与を受け FISH 解析の probe として使用した。4p16 転座切断点の解析には *FGFR3* を含有する cosmid pC385.12⁴⁶⁾ を M.R. Altherr 博士 (Los Alamos National Laboratory, USA) より供与を受け使用した。各クローンの染色体上の存在部位を Fig. 9 に示す。前述した方法 (第2章、第2節 対象と方法の項目参照) を用いて、各 probe を作成し、骨髄細胞染色体に対して FISH 解析を施行した。

3. RT-PCR法によるETV6-FGFR3融合転写産物の検出

患者の同意を得て骨髄 total RNA 1 μ g から *ETV6-FGFR3* 融合 mRNA および *FGFR3-ETV6* 融合 mRNA の発現を、TAKARA LA-PCR kit (TAKARA, Tokyo, Japan) を用いて RT-PCR 法で検出した。使用した primer と以下に示す。

ETV6-FGFR3 融合 mRNA に対する primer :

E93F1: (5'-GGAAAAACCTGAGAACTT-3')

FGF-RI: (5'-GACCAGTGGCCCTTCACG-3')

ACS2-ETV6 融合 mRNA に対する primer :

FGF-F2: (5'-ACGAAGACGGGGAGGACGAG-3')

TEL-AS1: (5'-GCTGAGGTGGACTGTTGGTT-3') .

PCR の条件は 95°C で 1 分変性後、94°C で 1 分、58°C で 20 秒、72°C で 1 分 30 秒を 40 サイクル行い、伸長反応は 72°C、10 分とした。

4. 塩基配列解析と相同性解析

RT-PCR 産物は泳動ゲルより切り出して、PCR に用いた primer を用い dye terminator 法により直接塩基配列解析を行った。得られた塩基配列は BLAST server at NIH (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 上で GenBank (blastn) データベースに登録されている既知の配列と相同性の解析に供された。

5. 免疫組織染色

患者リンパ節および正常リンパ節のパラフィン固定標本をウサギ抗 *FGFR3* C 末端特異血清 (sc-123; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) を用いて免疫組織染色を行った。検出には Biotinylated secondary antibody および horseradish peroxidase-conjugated avidin-biotin system (Vector Laboratories, Burlingame, CA) を用いた。発色基質として diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) (Vector Laboratories, Burlingame, CA) を用いた。

第3節 結果と考察

1. t(4;12)(q31;p13)染色体転座における転座切断点

FISH 解析により 12p13 切断点は、179A6 (exon 1), 50F4 (exon 2), 2G8 (exon 3) のシグナルが der (4) に、148B6 (exon 8) のシグナルが der (12) に残存して認められ、さらに 184C4 (exon 4-5) 用いると、分割シグナルが der (4) および der (12) の両者に認められ、12p13 切断点は *ETV6* intron 4-5 内に存在すると考えられた。4p16 切断点は cosmid pC385.12 の分割シグナルが der (4) および der (12) の両者に認められ、pC385.12 内に存在すると考えられた。184C4 (rhodamine) および cosmid pC385.12 (FITC) を cohybridization すると、それぞれの分割シグナルが der (4) および der (12) の両者に認められ、融合シグナル (黄色) として検出される (Fig. 10A)。本法を用いた FISH 標本で背景に存在する細胞を観察すると 90% 以上の間期核細胞では融合シグナルは認められず、分裂期異常染色体は骨髄浸潤リンパ腫細胞の細胞回転周期の亢進を表すものと考えられた。

2. ETV6-FGFR3融合遺伝子の単離と塩基配列解析

RT-PCR 法で *ETV6-FGFR3* 融合遺伝子の発現を解析したところ、長短 2 種類の転写産物の発現を認

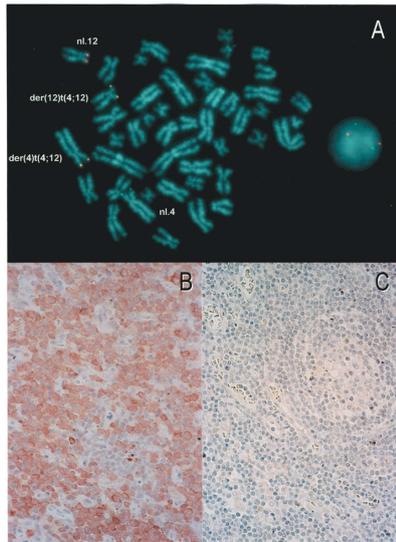


Fig. 10. (A) Two color FISH analysis of the t(4;12)(p16;p13) translocation. FISH with pC385.12 containing the entire *FGFR3* (detected with fluorescein isothiocyanate, FITC) and 184C4 (detected with rhodamine). Yellow fusion signals were detected on both der(4) and der(12). Split signals were also detected on der(4) and der(12). These data suggests that the 12p13 breakpoint had occurred in *ETV6* and the 4p16 breakpoint had occurred in *FGFR3*. Further FISH analyses with *ETV6* exon specific cosmids confirmed that the 12p13 breakpoint was between exons 3 (2G8) and exon 8 of *ETV6* (148B6) (data not shown). (B) Expression of *FGFR3* protein in PTCL cells. Immunohistochemical staining shows inappropriate strong *FGFR3* expression (brown cytoplasmic staining) in numerous lymphoma cells except for residual follicular lymphocytes, endothelial cells (Original magnification, X400). (C) The lack of *FGFR3* staining of normal lymphoid tissue is shown as negative control (Original magnification, X400).

These figures were reproduced from the article: Fusion of *ETV6* to fibroblast growth factor receptor 3 in PTCL with a t(4;12)(p16;P13) chromosomal translocation. Yagasaki F, et al. *Cancer Research*. 2001 Dec; 61:8371-4 Translated by permission of American Association for Cancer Research. All rights reserved.

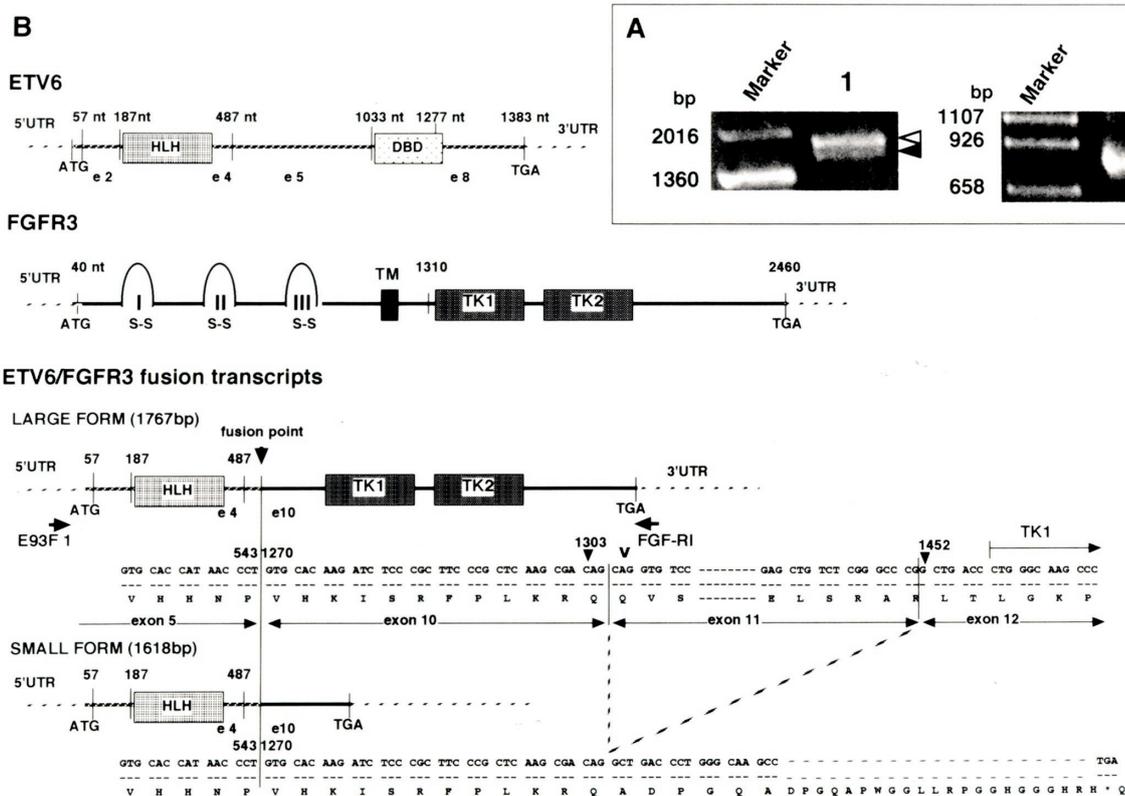


Fig. 11. (A) Gel analysis of RT-PCR amplified *ETV6-FGFR3* fusion transcripts (left) and amplified *FGFR3-ETV6* fusion transcripts (right). Marker sizes are indicated to the left of the gels. Two specific bands of 1767bp and 1618bp (indicated by arrowheads, lane 1) were detected by RT-PCR using primers E93F1 and FGF-RI. The two *ETV6-FGFR3* products are the result of an alternative splicing event in the *FGFR3* gene, as shown in (Fig 11B). *FGFR3-ETV6* fusion transcript (predicted PCR product size :983bp) was not detected from this patient's BM RNA (lane 3), although a band of beta actin was detected as a positive control (lane 2). (B) Part of the nucleotide and deduced amino-acid sequence and a schematic diagram of *ETV6* and *FGFR3* cDNAs and the chimeric fusion transcripts. The positions of the primers used and the size of resulting PCR products are shown. Nucleotide numbers are derived from the sequences of *TEL* cDNA and *FGFR3* cDNA (GenBank accession numbers: HSU11732 and 182568, respectively). An out-of-frame fusion occurred in the 1618bp splicing variant and the resulting stop codon is indicated by an asterisk, the alternatively spliced *FGFR3* exon 11 is indicated also. The vertical lines indicate the exon boundaries. HLH, helix-loop-helix; DBD, ETS-family DNA binding domain; TK, protein-tyrosine kinase domain; V, position of tri-nucleotide insertion.

These figures were reproduced from the article : Fusion of *ETV6* to fibroblast growth factor receptor 3 in PTCL with a t(4;12)(p16;P13) chromosomal translocation. Yagasaki F, et al. *Cancer Research*. 2001 Dec; 61:8371-4 Translated by permission of American Association for Cancer Research. All rights reserved.

めた (Fig. 11A). それぞれのPCR産物の塩基配列解析の結果, 両者は *ETV6* の exon 5 内の nt 543 までの配列に *FGFR3* の exon 10 内の nt 1270 からの配列が融合を起こしていた. *ETV6* および *FGFR3* の融合切断点には GT-AG rule に従った 潜在的スプライス部位は見いだせなかったが, PCR法によるDNAレベルの切断点の解析で同部位における融合を検出し得なかったことから, 選択的スプライシングによって生じたものと考えられる. 長い 1767 bp の転写産物では転座によるフレームシフトは生じておらず *ETV6* の HLH ドメインと *FGFR3* のチロシンキナーゼドメインを有する 64 kD のキメラ蛋白に翻訳されると推定された. また過去の報告にない CAG tri-nucleotide の挿入が *FGFR3* exon 11 の始まりの部位に認められたが, これが先天性の多型を表すものか体細胞変異は不明である. その他, 骨髄腫で好発する点変異は認められなかった. 短い転写産物は *FGFR3* の exon 11 スプライスアウトされたものであることが判明したが, これによりフレームシフトが生じて終止コドンが出現するため HLH ドメインのみを有する蛋白を生ずると考えられる (Fig. 11B). さらに *FGFR3-ETV6* 融合転写産物の発現は認められなかった.

今回, 遺伝子解析に用いた検体はいずれも骨髄からのものであり, 患者リンパ節においても t(4;12) (p16;p13) が存在していることを検証するために, *FGFR3* の C 末端に対する特異血清を用いてリンパ節生検標本に対する免疫組織染色を行った. その結果, 患者標本では Fig. 10B で示すように, 残存リンパ濾胞を除き *FGFR3* の発現が認められた. 一方で正常リンパ節では *FGFR3* の発現が認められず (Fig. 10C), Chesi らの血液細胞における *FGFR3* の発現は非常に低レベルで殆ど認めないという報告⁴⁵⁾ と合致した所見であった. 以上より t(4;12) (p16;p13) 転座ではリンパ腫細胞において *ETV-FGFR3* キメラ型蛋白を発現していると考えられた.

3. PTCLにおける *ETV6-FGFR3* 融合遺伝子の意義

近年, Chesi らは t(4;14) (p16;q32) を有する多発性骨髄腫において 14q32 上の *IgH* enhancer 活性により転座を起こした *FGFR3* の過剰発現が起きていること, さらに病期の進行に伴って *FGFR3* の点突然変異が生じて活性化が起きていることから, receptor tyrosine kinase (RTK) である *FGFR3* の癌遺伝子としての役割を論じている⁴⁷⁾.

また *ETV6* 関連転座では RTK である *PDGFβR*, *TRKC* や protein TK である *ABL2*, *ABL*, *JAK2*, および *Syk* が融合を起こし, いずれの *ETV6* 融合転写産物も *ETV6*

の HLH ドメインと TK ドメインの両者からなるキメラ蛋白をコードしている. これらの *ETV6* 融合転写産物では *ETV6* 由来の HLH ドメインを介したオリゴマー形成により恒常的にチロシンキナーゼが活性化されることや *in vitro* で形質転換能を有すること^{16,48-51)} が知られている. 今回の *ETV6-FGFR3* 融合遺伝子においても HLH を介した恒常的活性化という点でほぼ同様の発癌機序を有すると考えられる. この様に *ETV6* の HLH ドメインは様々な RTK や PTK に融合して, それらを活性化しうることは *ETV6* の HLH の立体構造を考える上で興味深い点であると思われる.

さらに Peeters らは t(3;12) を有する骨髄増殖性疾患で *ETV6-MDS1-EVI1*, *ETV6-EVI1* の 2 種類の融合遺伝子が発現している³⁶⁾ ことを発見し, 融合転写産物内に *ETV6* の機能的ドメインが無いことから, *ETV6* プロモーターによる *EVI1* の異所性発現が癌化を起こすと推察している. さらに Chase らによって t(12;13) (p13;q12) を有する AML3 例中 1 例で *ETV6-CDX2* が発現していることが報告された. *CDX2* は尾椎体節形成に関与するホメオボックス遺伝子で成体では腸上皮に発現しているが骨髄では発現していない. 大腸癌では *CDX2* の発現が消失することが知られているが, 白血病では *CDX2-ETV6* の発現を認めず *ETV6* exon1-2 に *CDX2* exon2 がインフレームで融合し発現しており *CDX2* の異所性発現が癌化を起こすと考えられる³³⁾. 今回, 明らかになった *ETV6-FGFR3* においても, 通常では造血細胞に発現しない *FGFR3* が *ETV6* プロモーターにより異所性に発現することが癌化に寄与すると考えられる.

以上より今回の t(4;12) (p16;p13) 転座によって生ずるキメラ蛋白は *FGFR3* の ligand 結合部位を転座切断により欠失しているが, N 末端には *ETV6* 由来 HLH ドメインが存在するため, HLH ドメインを介した多量体化により相互的リン酸化し, 異所性に発現した *FGFR3* のチロシンキナーゼドメインが恒常的に活性化することが癌化の原因であると推察される. 今後は, この仮説を実験的に検証する必要があると考えられる.

第4章

総括

今回の研究では 2 種類の新規 *ETV6* 関連転座における遺伝子異常について細胞遺伝学的に解析を行った. t(5;12) (q31;p13), t(4;12) (p16;p13) どちらの転座においても *ETV6* 融合遺伝子の発現が認められたが, 発癌における関与のあり方は異なると考えられる. すなわち t(5;12) (q31;p13) 転座では *ETV6* や *ACS2* の遺伝子破壊による機能的低下が発癌機構に関与していると考

えられ、t(4;12) (p16;p13) 転座ではETV6プロモーターにより癌遺伝子の異所性の発現が誘導され、さらにHLHを介した多量体化によるチロシンキナーゼの活性化が発癌に寄与していると考えられた。近年、TECプロモーターを用いたCMLモデルマウスの研究では、BCR-ABLキメラ蛋白を造血幹細胞レベルで発現させることにより、初めてCMLが再現できること⁵²⁾が示され、造血器腫瘍の発生には腫瘍発生母地となりうる未分化前駆細胞レベルで遺伝子異常が生じることが必須と考えられる。WangらのETV6 gene targetingによるETV6の機能解析ではホモ欠損マウスは胎仔期に死亡するものの卵黄嚢造血は影響を受けなかった⁵³⁾。さらに成体でリンパ球を産生できないRAG-2欠損胚盤胞(G418感受性)へG418耐性ETV6 (+/-) ES及びETV6 (-/-) ESを移植してキメラマウスを作製し、キメラマウス骨髓細胞の選択培地によるコロニー形成により、成体造血におけるETV6の役割を検討したところ、ETV6 (-/-) ES由来の前駆細胞は認められず、ETV6は肝臓から骨髓への造血幹細胞の移行、造血の維持に必須であること⁵⁴⁾を明らかにしている。このようにETV6は成体造血における幹細胞レベルより発現することが、多様な造血器腫瘍の発生に関与することを可能にしていると考えられる。

さらにETV6関連転座の頻度を高める原因としてETV6遺伝子のgenome不安定性が示唆されている。Satoらは12p13染色体異常を有するAML/MDS, ALL, 悪性リンパ腫における12p13切断点のFISH法による解析の結果、23例中12例でETV6遺伝子内に再構成を認め、さらに詳細な検討では微細な欠失や転座が発生していることを見いだした⁵⁵⁾。また我々はYamamotoとの共同研究により、12p13に5番長腕が付加した染色体異常を有するMDSにおいて、ETV6内での転座切断が初診時に認められたが、病期の進行に伴ってETV6が完全欠失したことをFISH法で明らかにし、ETV6内でのgenome不安定性が完全欠失に先立って亢進していることを見いだした¹⁹⁾。最近、IshimaeらによりB細胞におけるアポトーシス刺激が*in vitro*でETV6内のDNA2重鎖切断を引きおこし、その結果ETV6-AML1融合が発生すること⁵⁶⁾も報告されている。また今回の研究結果でもETV6の転座切断点はbreak cluster regionという一定の領域に集中せず、ETV6の転座切断点の多様性とgenomeの不安定性が種々の転座の発生に寄与していると考えられる。

結 語

造血器腫瘍におけるETV6遺伝子異常による発癌機構は多様性に富んでいる。その理由として、未分化

造血細胞におけるETV6のプロモーター活性による癌遺伝子の発現、ETV6内のHLH構造による多量体化、ETV6のgenome不安定性やETV6の転写抑制的作用による癌抑制的機能が考えられる。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導、御高閲を賜りました埼玉医科大学第1内科別所正美教授に深謝いたします。また実験に協力頂いた埼玉医科大学染色体検査室の横山泰子女史、宮崎洋美女史および第1内科研究室、内田優美子女史に深謝します。また貴重な御意見を賜りました第1内科非常勤講師山本昭子先生および、第1病理学教室茅野秀一先生、第1内科医局員の先生方の御協力に深謝いたします。

参考文献

- 1) Druker BJ, Talpaz M, Resta DJ, Peng B, Buchdunger E, Ford JM, et al. Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2001;344:1031-7.
- 2) Kawaguchi Y, Jinnai I, Nagai K, Yagasaki F, Yakata Y, Matsuo T, et al. Effect of a selective Abl tyrosine kinase inhibitor, STI571, on in vitro growth of BCR-ABL-positive acute lymphoblastic leukemia cells. *Leukemia*. 2001;15:590-4.
- 3) Golub TR, Barker GF, Lovett M, Gilliland DG. Fusion of PDGF receptor beta to a novel ets-like gene, tel, in chronic myelomonocytic leukemia with t(5;12) chromosomal translocation. *Cell* 1994;77:307-16.
- 4) Romana SP, Poiriel H, Leconiat M, Flexor MA, Mauchauffe M, Jonveaux P, et al. High frequency of t(12;21) in childhood B-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1995;86:4263-9.
- 5) Golub TR, Barker GF, Bohlander SK, Hiebert SW, Ward DC, Bray WP, et al. Fusion of the TEL gene on 12p13 to the AML1 gene on 21q22 in acute lymphoblastic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:4917-21.
- 6) Papadopoulos P, Ridge SA, Boucher CA, Stocking C, Wiedemann LM. The novel activation of ABL by fusion to an ets-related gene, TEL. *Cancer Res* 1995;55:34-8.
- 7) Suto Y, Sato Y, Smith SD, Rowley JD, Bohlander SK. A t(6;12)(q23;p13) results in the fusion of ETV6 to a novel gene, STL, in a B-cell ALL cell line. *Genes*

- Chromosomes Cancer 1997;18:254-68.
- 8) Lacronique V, Boureux A, Valle V.D, Poirel H, Quang CT, Mauchauffe M, et al. TEL-JAK2 fusion protein with constitutive kinase activity in human leukemia., Science. 1997;278: 1309-12
 - 9) Buijs A, Sherr S, van BS, van der Plas D, Geurts van Kessel A, Riegman P, et al. Translocation (12;22) (p13;q11) in myeloproliferative disorders results in fusion of the ETS-like TEL gene on 12p13 to the MN1 gene on 22q11. Oncogene 1995;10:1511-9.
 - 10) Eguchi M, Eguchi-Ishimae M, Tojo A, Morishita K, Suzuki K, Sato Y, et al. Fusion of ETV6 to neurotrophin-3 receptor TRKC in acute myeloid leukemia with t(12;15) (p13;q25). Blood 1999;93: 1355-63.
 - 11) Cazzaniga, G, Tosi S, Aloisi A, Giudici G, Daniotti M, Pioltelli P, et al. The tyrosine kinase abl-related gene ARG is fused to ETV6 in an AML- M4Eo patient with a t(1;12) (q25;p13): molecular cloning of both reciprocal transcripts, Blood. 1999;94:4370-3.
 - 12) Chase A, Reiter A, Burci L, Cazzaniga G, Biondi A, Pickard J, et al. Fusion of ETV6 to the caudal-related homeobox gene CDX2 in acute myeloid leukemia with the t(12;13) (p13;q12), Blood. 1999;93:1025-31.
 - 13) Cools J, Bilhou-Nabera C, Wlodarska I, Cabrol C, Talmant P, Bernard P, et al. Fusion of a novel gene, BTL, to ETV6 in acute myeloid leukemias with a t(4;12) (q11-q12;p13), Blood. 1999;94: 1820-4.
 - 14) Peeters P, Wlodarska I, Baens M, Criel A, Selleslag D, Hagemeijer A, et al. Fusion of ETV6 to MDS1/EVI1 as a result of t(3;12) (q26;p13) in myeloproliferative disorders. Cancer Res 1997; 57:564-9.
 - 15) Salomon-Nguyen F, Della-Valle V, Mauchauffe M, Busson-Le Coniat M, Ghysdael J, Berger R, et al. The t(1;12) (q21;p13) translocation of human acute myeloblastic leukemia results in a TEL-ARNT fusion, Proc Natl Acad Sci. U.S.A. 2000;97:6757-62.
 - 16) Kuno Y, Abe A, Emi N, Iida M, Yokozawa T, Towatari M, et al. Constitutive kinase activation of the TEL-Syk fusion gene in myelodysplastic syndrome with t(9;12) (q22;p12), Blood 2001;97: 1050-5.
 - 17) Yagasaki F, Jinnai I, Yoshida S, Yokoyama Y, Matsuda A, Kusumoto S, et al. Fusion of TEL/ETV6 to a novel ACS2 in myelodysplastic syndrome and acute myelogenous leukemia with t(5;12) (q31;p13), Genes Chromosomes Cancer 1999;26:192-202.
 - 18) Yagasaki F, Wakao D, Yokoyama Y, Uchida Y, Murohashi I, Kayano H, et al. Fusion of ETV6 to fibroblast growth factor receptor 3 in PTCL with a t(4;12) (p16;p13) chromosomal translocation. Cancer Res 2001;61;8371-4.
 - 19) Yamamoto K, Nagata K, Yagasaki F, Tsurukubo Y, Tamura A, Taniwaki M, et al. Interstitial deletion of the short arm of chromosome 12 during clonal evolution in myelodysplastic syndrome with t(5;12) (q13;p13) involving the ETV6 gene. Cancer Genet Cytogenet 2000 ;119:113-7.
 - 20) Nagarajan L, Zavadil J, Claxton D, Lu X, Fairman J, Warrington JA, et al. Consistent loss of the D5S89 locus mapping telomeric to the interleukin gene cluster and centromeric to EGR-1 in patients with 5q- chromosome. Blood 1994; 83:199-208.
 - 21) Le Beau M, Espinosa RIII, Neuman WL, Stock W, Roulston D, Larson RA, et al. Cytogenetic and molecular delineation of the smallest commonly deleted region of chromosome 5 in malignant myeloid diseases. Proc Natl Acad Sci USA 1993;90:5484-8.
 - 22) Zhao N, Stoffel A, Wang PW, Eisenbart JD, Espinosa RIII, Larson RA, et al. Molecular delineation of the smallest commonly deleted region of chromosome 5 in malignant myeloid diseases to 1-1.5 Mb and preparation of a PAC-based physical map. Proc Natl Acad Sci USA 1997; 94:6948-53.
 - 23) Mitelman F. An International System for Human Cytogenetic Nomenclature. Basel: S.Karger; 1995.
 - 24) Baens M, Peeters P, Guo C, Aerssens J, Marynen P. Genomic organization of TEL: the human ETS-variant gene 6, Genome Res 1996;6:404-13.
 - 25) Kobayashi H, Montgomery KT, Bohlander SK, Adra CN, Lim BL, Kucherlapati RS, et al. Fluorescence in situ hybridization mapping of translocations and deletions involving the short arm of human chromosome 12 in malignant hematologic diseases. Blood 1994;84:3473-82.
 - 26) Frazer KA, Ueda Y, Zhu Y, Gifford VR, Garofalo MR, Mohandas N, et al. Computational and biological analysis of 680 kb of DNA sequence from the human 5q31 cytokine gene cluster region. Genome Res 1997;7:495-512.
 - 27) Ledbetter SA, Nelson DL, Warren ST, Ledbetter DH.

- Rapid isolation of DNA probes within specific chromosome regions by interspersed repetitive sequence polymerase chain reaction. *Genomics* 1990;6:475-81.
- 28) Chirgwin JM, Przybyla AE, MacDonald RJ, Rutter WJ. Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* 1979;18:5294-9.
- 29) Frohman MA. Rapid amplification of complementary DNA ends for generation of full-length complementary DNAs: thermal RACE. *Meth Enzymol* 1993;218:340-56.
- 30) Matsushima T, Murakami H, Tsuchiya J. Myelodysplastic syndrome with bone marrow eosinophilia: clinical and cytogenetic features. 1994; *Leuk Lymph* 15:491-7.
- 31) Rioux JD, Stone VA, Daly MJ, Cargill M, Green T, Nguyen H, et al. Familial eosinophilia maps to cytokine gene cluster on human chromosomal region 5q31-33. *Am J Hum Genet* 1998;63:1086-94.
- 32) Fujino T, Yamamoto T. Cloning and functional expression of a novel long-chain acyl-CoA synthetase expressed in brain. *J Biochem (tokyo)* 1992 111:197-203.
- 33) Raynaud S, Cave H, Baens M, Bastard C, Cacheux V, Grosgeorge J, et al. The 12;21 translocation involving TEL and deletion of the other TEL allele: two frequently associated alterations found in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 1996;87: 2891-9.
- 34) Poirel H, Lacronique V, Mauchauffe M, Le Coniat M, Raffoux E, Daniel MT et al. Analysis of TEL proteins in human leukemias. *Oncogene* 1998;16:2895-903.
- 35) Dittmer J, Nordheim A. Ets transcription factors and human disease. *Biochim Biophys Acta* 1998;1377:1-11.
- 36) Kwiatkowski BA, Bastian LS, Bauer TR Jr, Tsai S, Zielinska-Kwiatkowska AG, Hickstein DD. The ets family member Tel binds to the Fli-1 oncoprotein and inhibits its transcriptional activity. *J Biol Chem* 1998;273: 17525-30.
- 37) Lopez RG, Carron C, Oury C, Gardellin P, Bernard O, Ghysdael J. TEL is a sequence-specific transcriptional repressor. *J Biol Chem*. 1999;274(42):30132-8.
- 38) Brunner D, Ducker K, Oellers N, Hafen E, Scholz H, Klambt C. The ETS domain protein pointed-P2 is a target of MAP kinase in the sevenless signal transduction pathway. *Nature* 1994;370:386-9.
- 39) Grand RJ. Acylation of viral and eukaryotic proteins. [Review] *Biochem* 1989;258:625-38.
- 40) Glick BS, Rothman JE. Possible role for fatty acyl-coenzyme A in intracellular protein transport. *Nature* 1987; 326:309-12.
- 41) Bronfman M, Orellana A, Morales MN, Bieri F, Waechter F, Staubli W, et al. Potentiation of diacylglycerol-activated protein kinase C by acyl-coenzyme A thioesters of hypolipidaemic drugs. *Biochem Biophys Res Commun* 1989;159:1026-31.
- 42) Li QL, Yamamoto N, Inoue A, Morisawa S. Fatty acyl-CoAs are potent inhibitors of the nuclear thyroid hormone receptor in vitro. *J Biochem (Tokyo)* 1990;107:699-702.
- 43) 矢ヶ崎史治, 伊藤善啓, 楠本修也, 松田晃, 別所正美, 陣内逸郎. 正常造血細胞および白血病細胞における Acyl CoA Synthetase の発現. *Journal of Hematology* 2000;71 (suppl 1):101 abstract.
- 44) Wlodarska I, La SR, Baens M, Dierlamm J, Uyttebroeck A, Selleslag D, et al. Fluorescence in situ hybridization characterization of new translocations involving TEL (ETV6) in a wide spectrum of hematologic malignancies. *Blood* 1998;91:1399-1406.
- 45) Chesi M, Nardini E, Brents LA, Schrock E, Ried T, Kuehl WM, et al. Frequent translocation t(4;14)(p16.3;q32.3) in multiple myeloma is associated with increased expression and activating mutations of fibroblast growth factor receptor 3. *Nat Genet* 1997;16:260-4.
- 46) Finelli P, Fabris S, Zagano S, Baldini L, Intini D, Nobili L, et al. Detection of t(4;14)(p16.3;q32) chromosomal translocation in multiple myeloma by double-color fluorescent in situ hybridization. *Blood* 1999;94:724-32.
- 47) Chesi M, Brents LA, Ely SA, Bais C, Robbiani DF, Mesri EA, et al. Activated fibroblast growth factor receptor 3 is an oncogene that contributes to tumor progression in multiple myeloma. *Blood* 2001;97: 729-36.
- 48) Carroll M, Tomasson MH, Barker GF, Golub TR, Gilliland, DG. The TEL/platelet-derived growth factor beta receptor (PDGF beta R) fusion in chronic myelomonocytic leukemia is a transforming protein that self-associates and activates PDGF beta R kinase-dependent signaling pathways, *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:14845-50.

- 49)Liu Q, Schwaller J, Kutok J, Cain D, Aster JC, Williams IR, et al. Signal transduction and transforming properties of the TEL-TRKC fusions associated with t(12;15)(p13;q25) in congenital fibrosarcoma and acute myelogenous leukemia. *EMBO J* 2000;19:1827-38.
- 50)Okuda K, Weisberg E, Gilliland DG and Griffin JD. ARG tyrosine kinase activity is inhibited by STI571. *Blood* 2001;97:2440-8.
- 51)Ho JM, Beattie BK, Squire JA, Frank DA, Barber DL. Fusion of the ets transcription factor TEL to Jak2 results in constitutive Jak-Stat signaling. *Blood* 1999;93:4354-64.
- 52)Honda H, Hirai H. Model mice for BCR/ABL-positive leukemias. *Blood Cells Mol Dis.* 2001;27:265-78.
- 53)Wang LC, Kuo F, Fujiwara Y, Gilliland DG, Golub TR, Orkin SH. Yolk sac angiogenic defect and intra-embryonic apoptosis in mice lacking the Ets-related factor TEL. *EMBO J* 1997;16:4374-83.
- 54)Wang LC, Swat W, Fujiwara Y, Davidson L, Visvader J, Kuo F, et al. The TEL/ETV6 gene is required specifically for hematopoiesis in the bone marrow. *Genes Dev* 1998;12:2392-402.
- 55)Sato Y, Bohlander SK, Kobayashi H, Reshmi S, Suto Y, Davis EM, et al. Heterogeneity in the breakpoints in balanced rearrangements involving band 12p13 in hematologic malignancies identified by fluorescence in situ hybridization: TEL (ETV6) is involved in only one half. *Blood* 1997;90:4886-93.
- 56)Eguchi-Ishimae M, Eguchi M, Ishii E, Miyazaki S, Ueda K, Kamada N, et al. Breakage and fusion of the TEL (ETV6) gene in immature B lymphocytes induced by apoptogenic signals. *Blood* 2001;97:737-43.