

氏 名	あか さか たか し 赤 坂 尚 司
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学位記番号	医 博 第 1848 号
学位授与の日付	平 成 9 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	医 学 研 究 科 内 科 系 専 攻
学位論文題目	Application of long-distance polymerase chain reaction to detection of junctional sequences created by chromosomal translocation in mature B-cell neoplasms (Long-distance PCR を用いた分化型 B 細胞性腫瘍における染色体転座接合部の遺伝子解析に関する研究)
論文調査委員	(主 査) 教 授 清 水 章 教 授 佐 々 木 正 夫 教 授 大 熊 稔

論 文 内 容 の 要 旨

悪性リンパ腫を中心とする分化型 B 細胞性腫瘍では、腫瘍特異的な染色体転座が認められ、転座接合部から腫瘍関連遺伝子が次々に分離されてきた。これらの腫瘍関連遺伝子は、染色体転座によって免疫グロブリン遺伝子 (*IG*) に近接するので、両遺伝子からなる転座接合部の特異的構造を検出することにより、B 細胞性腫瘍の診断を迅速に行うことができる。本研究において開発された Long-Distance PCR (LD-PCR) は、腫瘍関連遺伝子のエクソンあるいはフランキングと、*IG* 遺伝子のコンスタント (C) 領域に特異的プライマーをデザインし、接合部を含む数 kb 以上の DNA 断片を一気に増幅する新しい PCR 増幅法である。

LD-PCR の optimal condition は、接合領域をラムダファージにクローニングした t (3 ; 22) (q27 ; q11) 転座症例を用いて決定した。プライマーは *BCL6* の第 2 エクソンと *IG* λ の C 領域に設計した。クローン DNA とゲノム DNA をテンプレートし、long target 用の *Taq* polymerase を用いて PCR 増幅を行った結果、いずれの DNA でも接合部をまたぐ約 10 kb の PCR 産物を得ることができた。さらに適切なプローブとサザンハイブリダイズすることにより、目的とする転座接合部の DNA が増幅されたことを確認した。

次に LD-PCR を t (8 ; 14) (q24 ; q32) 転座に応用した。*c-MYC* 遺伝子の第 2 エクソンと *IGH* 遺伝子の *C_μ*、*C_γ*、*C_α*、*C_ε* に相補的なプライマーをデザインし、転座の遺伝子構造が明らかにされている細胞株 4 株で t (8 ; 14) の接合部を増幅した。得られた PCR 産物の長さは報告されている遺伝子構造と完全に一致し、さらに internal probe とハイブリダイズすることにより特異性を確認した。次いで、日本人症例から樹立された細胞株と臨床検体に同様の LD-PCR を行った。その結果、*c-MYC* 遺伝子の再構成を認めた 17 検体すべてに LD-PCR 産物が認められた。バンドの長さは 2.3 kb-12 kb にわたり、それぞれの検体に特異的であった。C 領域は *C_μ* が 5 例、*C_γ* が 9 例、*C_α* が 3 例であった。t (8 ; 14) は en-

demic type と non-endemic type に分類されるが、LD-PCR は non-endemic type の転座を検出することができる。また転座に関わる C 領域が C γ に最も高頻度であったことは、non-endemic type の t (8 ; 14) が class switch に関連して発生するとされていることを支持する。

3q27 転座では、*BCL6* と各 *IG* 遺伝子の C 領域にデザインしたプライマーを用い、t (3 ; 22), t (2 ; 3), t (3 ; 14) の接合部を増幅検出することができた。t (3 ; 14) の 1 例の *IGH* 上の切断部位は、他の症例の switch 領域とは異なり、*IGH* の J₆ と enhancer 領域の間であった。t (14 ; 18) では、*BCL2* の再構成を認めたリンパ系腫瘍 52 症例の接合部を解析した。プライマーは MBR 上流の coding 領域、*mcr* の約 10 kb 上流、*IGH* の enhancer, C 領域にそれぞれ設計した。適当な primer pair を用いた LD-PCR によって、検索した 52 症例すべてに症例特異的な PCR 産物が得られ、サイズは 3.9~16 kb にわたった。*BCL2* 上の切断点は従来の報告と異なり、MBR から *mcr* 領域にかけて広い範囲に分布していた。*IGH* 側の J segment は、J₆ ; 37 例、J₅ ; 3 例、J₄ ; 10 例、J₃ ; 1 例、J₁ ; 1 例であり、J₆ での転座の頻度が最も高かった。C 領域は C μ ; 9 例、C γ ; 41 例、C α ; 2 例であり、C γ 領域に高頻度に class switch していた。

LD-PCR の感度は、EtBr 染色で 10^{-3} であり、特異的プローブとハイブリダイズすることにより 10^{-4} に上昇する。100 ng の genomic DNA を template にしているの、計算上 1 copy の接合部分中が検出可能である。

以上の研究により、B 細胞性腫瘍に認められる重要な染色体転座をほぼ網羅することができた。LD-PCR によって得られる PCR 産物は、転座に関与する遺伝子の重要なセグメントを含むので、転座構造の解析を容易に行うことが可能となり、上記の新知見を得ることができた。一方、LD-PCR は複雑な手技の必要な Southern blotting に完全にとってかわる手法であり、B 細胞性腫瘍の的確かつ迅速な診断に有用である。さらに、LD-PCR は従来の PCR に匹敵する感度を有するあめ、微少残存病変の評価にも有用であることが期待される。

論文審査の結果の要旨

悪性リンパ腫を中心とする分化型 B 細胞性腫瘍で見られる染色体転座接合部の特異的構造を検出することにより、B 細胞性腫瘍の診断を迅速に行うことができる。本研究では転座接合部を含む数 kb 以上の DNA 断片を一気に増幅する新しい PCR 法 Long-distance (LD) PCR 法を開発した。LD PCR の条件設定では、接合領域をラムダファージにクローニングした t (14 ; 19), t (3 ; 22) 転座症例を用い、接合部をまたぐ約 2~10 kb の PCR 産物を得た。t (8 ; 14) では *c-MYC* 遺伝子の再構成を認めた例で LD PCR 法が可能であり、また免疫グロブリン (*IG*) 遺伝子の検討より転座がクラススイッチに伴って生じることが示唆された。3q27 転座では、*BCL6* と各 *IG* 遺伝子のコンスタント領域にデザインしたプライマーを用い、t (3 ; 22), t (2 ; 3), t (3 ; 14) の接合部を増幅検出することができた。本法の感度は、 10^4 倍であった。

以上の研究は、新しく開発した LD PCR により B 細胞性腫瘍に認められる重要な染色体転座を的確かつ迅速に解析できる点に特徴があり、今後の染色体転座接合部の構造の解明のみならず、広く造血器腫瘍

の臨床診断や微少残存病変の評価にも寄与するところが大きい。

したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成9年1月27日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。