

氏 名	にし 錦 織 もも 子
学位の種類	博 士 (医 学)
学位記番号	医 博 第 2737 号
学位授与の日付	平 成 16 年 3 月 23 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	High-level expression of <i>BCL3</i> differentiates t(2;5) (p23;q35)-positive anaplastic large cell lymphoma from Hodgkin disease (<i>BCL3</i> の高発現はt(2;5) (p23;q35) 陽性未分化大細胞型リンパ腫をホジキン病から区別する)
論文調査委員	(主 査) 教 授 前 川 平 教 授 淀 井 淳 司 教 授 内 山 卓

論 文 内 容 の 要 旨

未分化大細胞型リンパ腫 (anaplastic large cell lymphoma, ALCL) とホジキン病 (Hodgkin disease, HD) は、ともに CD30 を高発現するなど、多くの細胞学的特性を共有している。これらの二疾患の差異を明らかにする目的で、cDNA アレイを用いて ALCL 4 株 (Karpas 299, SU-DHL-1, DEL, SR-786) と HD 3 株 (KM-H2, L428, HDLM-2) の遺伝子発現プロファイルを比較したところ、110種類の遺伝子の発現パターンにより ALCL と HD は明瞭に分離され、そのうち ALCL において、NF- κ B 転写因子を抑制する I κ B ファミリーに属する *BCL3* の発現が HD に比し高いことが判明した。ALCL 株では mRNA のみならず蛋白レベルでも *BCL3* の発現が亢進していた。またリアルタイム定量 RT-PCR においては、細胞株と同様に t(2;5) (p23;q35) 転座を有する ALCL の臨床検体 3 例においても *BCL3* の発現が高いことが示され、既に *BCL3* の高発現が知られる、t(14;19) (q32;q13) 転座 (*BCL3* と *IGH* の転座) を有する B 細胞性慢性リンパ性白血病 (B-CLL) の症例と同レベルであった。

ALCL における *BCL3* の高発現の機序として、*BCL3* 遺伝子が関与する転座は認めなかったが、*BCL3* を含む BAC クローンをプローブにした FISH 解析を行った結果、SU-DHL-1 では *BCL3* の遺伝子増幅が認められ、Karpas 299 においては *BCL3* が 1 細胞あたり 4 コピーに増加していた。また、*BCL3* 遺伝子は 2 ヶ所の CpG island を有し、そのうち遺伝子内にある 3' CpG island に多様性のあることが知られているが、メチル化特異的制限酵素を用いたサザンブロッティングおよび disulfite sequence 法により、ALCL 2 株 (SU-DHL-1, DEL) において 3' CpG island の脱メチル化が認められた。これらの結果から、ALCL における *BCL3* の高発現には、遺伝子増幅や DNA の脱メチル化などの機序が関与していることが示唆された。

また、*BCL3* が I κ B ファミリーの遺伝子であることから、ALCL の NF- κ B 活性につき検討を行った。 κ B モチーフをプローブとしたゲルシフトアッセイにより HD では p65/p50 のヘテロダイマーの強い DNA 結合活性がみられ、ALCL では (p50)₂ ホモダイマーの DNA 結合が認められたが、ALCL と HD で NF- κ B の構成蛋白の発現量には明らかな差を認めなかった。そこで、間接蛍光抗体法により Bcl-3, p65, p50 の細胞内の局在を観察したところ、Bcl-3 は ALCL の核で鮮やかに染まったのに対し HD ではほとんど染色されず、p65 は ALCL では細胞質、HD では核に強く染まり、p50 は ALCL では核優位、HD では細胞質優位に染色された。このことから、ALCL と HD における NF- κ B 活性の差異は、構成蛋白の局在の違いにより生じると考えられ、ALCL においては Bcl-3 が p50 ホモダイマーと三量体を形成して DNA に結合し、転写活性を担う p65/p50 のヘテロダイマーが DNA に結合するのを阻んでいると推測された。

BCL3 は元来 B-CLL の染色体転座の接合点から見出された遺伝子であるが、以上のように T 細胞性腫瘍である ALCL の発症にも関与することが示唆された。さらに、ALCL の細胞特性や HD との差異を明らかにする上でも重要な遺伝子であると考えられる。

論文審査の結果の要旨

未分化大細胞型リンパ腫（ALCL）とホジキン病（HD）は、ともにCD30を高発現するなど、多くの細胞学的特性を共有している。これら2疾患の差異を明らかにする目的で、cDNAアレイを用いてALCL 4株とHD 3株の遺伝子発現プロファイルを比較し、ALCLにおいて、NF- κ B転写因子を抑制するI κ Bファミリーに属する*BCL3*の発現が高いことを見出した。ALCL株ではmRNA、蛋白とも*BCL3*の発現が亢進しており、リアルタイムPCRにより臨床検体3例においても*BCL3*の高発現を証明した。

*BCL3*を含むBACクローンをプローブにしたFISH解析により、ALCL 4細胞株中2細胞株で遺伝子増幅を、また2株において*BCL3*遺伝子内の CpG island の脱メチル化をそれぞれ認め、これらの機序が*BCL3*の高発現に関わっていることが示唆された。

また、 κ Bモチーフをプローブとしたゲルシフトアッセイにより、HDではDNA結合活性が強く、ALCLでは弱い、各々のNF- κ B蛋白の発現量に差はなく、間接蛍光抗体法による細胞染色により、NF- κ B活性の差異は構成蛋白の局在の違いにより生じることを示した。この結果から、ALCLにおいてはBcl-3がp50ホモダイマーと三量体を形成してDNAに結合し、転写を担うp65/p50のヘテロダイマーのDNAへの結合を阻止していると推測した。

本研究は、悪性リンパ腫の分子病態の解明に貢献し、血液腫瘍の診断、治療の発展に寄与するところが多い。従って、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、本学位申請者は、平成16年2月2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。