

氏 名	くら た まさ ゆき 倉 田 雅 之
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 2539 号
学位授与の日付	平成 15 年 1 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	Characterization of t(3; 6)(q27; p21) breakpoints in B-cell non-Hodgkin's lymphoma and construction of the histone <i>H4/BCL6</i> fusion gene, leading to altered expression of Bcl-6 (B 細胞性非ホジキンリンパ腫における t(3; 6) (q27; p21) 転座接合部の解析と, Bcl-6 蛋白発現に変化を及ぼす histone <i>H4/BCL6</i> 融合遺伝子コンストラクトの作製。)
論文調査委員	(主 査) 教 授 中 畑 龍 俊 教 授 前 川 平 教 授 内 山 卓

論 文 内 容 の 要 旨

BCL6 遺伝子を責任遺伝子とする 3q27 転座 (*BCL6* 転座) は、濾胞性リンパ腫 (FL) の 5~15%, びまん性大細胞型リンパ腫 (DLBCL) の 20~40% に認められる。*BCL6* 転座は、免疫グロブリン遺伝子 (*IG*) ばかりでなく、*H4* ヒストン遺伝子をはじめとする多様な非免疫グロブリン遺伝子 (non-*IG*) を転座のパートナーとする。*BCL6* 上の転座切断点は *BCL6* の第 1 エクソン近傍に集中しており、パートナー遺伝子のプロモーターが *BCL6* のそれと入れ替わることによって *BCL6* の発現調節に異常をきたし、リンパ腫発症に至ると考えられている。しかし、転座発生の分子メカニズムや、転座が *BCL6* の蛋白発現レベルに及ぼす影響は不明である。本研究では、体細胞変異 (somatic mutation) と染色体転座の関係を明らかにするために *H4/BCL6* 融合遺伝子の転座接合部近傍の塩基配列を解析した。ついで、*H4/BCL6* 融合遺伝子の機能解析を行い、染色体転座が *BCL6* の蛋白発現に与える影響について検討した。

B 細胞性非ホジキンリンパ腫 5 症例の t(3; 6) (q27; p21) の転座接合部を long-distance (inverse) PCR を用いてクローニングした。6p21 上の切断点は、同一の *H4* ヒストン遺伝子のエクソン後半部分から下流のパリンドローム配列近傍に分布していた。一方、*BCL6* 上の切断点は 4 例がクラスター領域、1 例はやや下流にあった。切断点近傍の塩基配列を解析したところ、*H4* 上には 4 個、*BCL6* 上には 8 個の点変異が認められ、接合部近傍には *H4*, *BCL6* のいずれにも欠失や重複が認められた。

次に、*H4/BCL6* 融合 mRNA を RT-PCR で解析したところ、2 症例で増幅産物が得られた。塩基配列の解析の結果、いずれも *BCL6* 第 1 イントロンの cryptic splice donor site を介して *H4* と *BCL6* の転写産物が結合していた。

B 細胞性非ホジキンリンパ腫症例由来の *H4/BCL6* 融合領域と *BCL6* の正常のプロモーター領域をルシフェラーゼベクターに組み込み、COS7 細胞に一過性導入してプロモーター活性を比較したが、両者に差はなかった。そこで、非ホジキンリンパ腫症例と同様の構造の融合 mRNA を転写するように設計した *H4/BCL6* コンストラクトを作製し COS7 細胞に一過性導入した。その結果、導入細胞には Bcl-6 蛋白の高い発現が認められ、免疫蛍光法でも核内が粗大顆粒状に染色された。また、*H4/BCL6* コンストラクトの欠失ミュータントを作製し Bcl-6 の発現レベルを比較したところ、*H4* のプロモーター領域を欠失したミュータントの導入細胞では Bcl-6 の発現レベルが基礎レベルに低下した。

同様の *H4/BCL6* コンストラクトを 293T 細胞に導入し、遺伝子発現プロファイルの変化を cDNA アレイで解析した。その結果、*BCL6* の高発現に伴って多くの遺伝子の発現レベルが低下するにもかかわらず、activating transcription factor3 (*ATF3*), prefoldin4 (*PFDN4*), retinoblastoma-binding protein7 (*RBBP7*) の発現レベルが亢進した。これらの遺伝子の発現増加は RT-PCR でも確認された。

最後に、t(3; 6) (q27; p21) 転座非ホジキンリンパ腫症例の臨床材料における *BCL6* mRNA レベルをリアルタイム RT

-PCRを用いて定量したところ、B細胞性非ホジキンリンパ腫の各病型の平均値より低値を示した。

以上より、本研究においてt(3; 6)(q27; p21)転座発生には免疫グロブリン遺伝子の体細胞変異のメカニズムが関与していることが示された。また、H4/BCL6融合遺伝子では、BCL6の発現が亢進し、細胞の遺伝子発現プロファイルを変化させることが示された。Bcl-6は転写抑制因子としてだけでなく、転写促進因子としても作用し、ポジティブフィードバックループを介してBcl-6の発現を一過性に著しく増加させる可能性がある。t(3; 6)(q27; p21)転座はリンパ腫発症の初期段階には関与するが、一旦腫瘍化するとBCL6の高発現は腫瘍クローンの維持に必要でなく、ダウンレギュレートされるのではないかと考えられる。

論文審査の結果の要旨

BCL6遺伝子を責任遺伝子とする3q27転座は、濾胞性リンパ腫の5～15%、びまん性大細胞型リンパ腫の20～40%に認められ、H4ヒストン遺伝子をはじめとする多様な染色体領域を転座のパートナーとする。本研究では、転座発生の分子メカニズムや、転座がBCL6の蛋白発現レベルに及ぼす影響を明らかにするために、H4/BCL6融合遺伝子の転座接合部近傍の塩基配列の解析と、その機能解析を行った。

まず、t(3; 6)(q27; p21)を有する5症例の切断点近傍の塩基配列を解析し、H4上には4個、BCL6上には8個の点変異が認められ、接合部近傍にはH4、BCL6のいずれにも欠失や重複が存在することを示した。この結果、体細胞変異(somatic mutation)の機構が染色体転座に関わっていることを明らかにした。

次に、症例と同じ構造の融合mRNAを転写するように設計したH4/BCL6コンストラクトを作製し、COS7細胞に一過性導入すると、Bcl-6蛋白の高い発現が認められた。欠失ミュータントの作製によって、Bcl-6蛋白の高い発現はH4のプロモーター領域に依存することを示した。同様のコンストラクトを293T細胞に導入し、遺伝子発現プロファイルの変化をcDNAアレイで解析した結果、BCL6の高発現に伴い多くの遺伝子の発現レベルが低下する中で、ATF3、PFDN4、RBBP7の発現レベルが亢進した。これは、Bcl-6蛋白高発現に関与するポジティブフィードバックループの存在を示唆している。

以上の論文は、t(3; 6)(q27; p21)転座発生機構の解明と染色体転座に伴うBCL6の脱制御の解明に貢献し、悪性リンパ腫発症のメカニズムの究明に寄与するところが多い。

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14年11月25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。