

氏 名	鹿 江 寛
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 2150 号
学位授与の日付	平 成 11 年 7 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 外 科 系 専 攻
学位論文題目	Characteristics of genomic breakpoints in TLS-CHOP translocations in liposarcomas suggest the involvement of Translin and topoisomerase II in the process of translocation (脂肪肉腫における TLS-CHOP 遺伝子のゲノム転座点でのトランスリン及びトポイソメラーゼ II の関与に関する研究)

論文調査委員 (主 査) 教 授 武 田 俊 一 教 授 今 村 正 之 教 授 中 村 孝 志

論 文 内 容 の 要 旨

癌における遺伝子変異の一つに血液系腫瘍でしばしば検出される、染色体の相互転座による融合遺伝子の形成という変異がある。近年、細胞遺伝学及び分子遺伝学的解析の進歩により、この転座型変異が固形腫瘍においても、その発生、進展に関与していることが分子レベルで明らかにされてきている。

脂肪肉腫は 40 ～ 60 才の成人の悪性軟部腫瘍の中で最も頻度が高いものである。いくつかの亜型分類の中で、粘液型と円形細胞型は病理組織学的に移行型が存在しており、また共通の染色体異常 (t (12;16) (q 32;q 16)) を持つ。1993 年、この変異の本体が、12 q の CHOP 遺伝子の上流に 16 q の TLS 遺伝子が転座し融合遺伝子を形成していることが、明らかにされ、その後の解析により、TLS/CHOP 融合遺伝子の形には二つの major なタイプと 1 つの rare variant があることが報告されている。本研究の目的は、まず臨床サンプルの解析により、新たな rare variant を検出し、融合遺伝子において癌化にとって重要な領域を同定する手がかりを得ること、そして切断点周辺のゲノムに何らかの共通した特徴が存在していないかを検索するという 2 点である。

9 例の粘液型脂肪肉腫及び 3 例の円形細胞型脂肪肉腫に対して、サザンブロッティング、RT-PCR 及びゲノム long-distance PCR の 3 つの方法で TLS/CHOP 転座について解析した。まずサザンブロッティングでは 12 例中 11 例で、TLS 遺伝子と CHOP 遺伝子の融合を示す結果が得られた。RT-PCR では、4 種類の異なる融合転写産物が検出され、そのうちの 2 つは新規の構造をもつものであった。1 つは CHOP 遺伝子のエクソン 2 を欠くもので、もう 1 つは TLS 遺伝子のエクソン 5 の 3' 領域を欠くものであった。これらの領域はこれまで単離された全ての融合遺伝子で存在していたが、この結果はこの領域の重要性を否定するものである。後者の変異は後述するゲノム切断点の解析より、エクソン内の切断・融合により新たにスプライシング認識部位が作り出されたものであることが判明した。

次にゲノム long-distance PCR により融合点を含む断片を増幅、塩基配列を決定し、TLS 及び CHOP 遺伝子座の正常塩基配列と比較することにより、切断点を決定し、周辺ゲノムの特徴を解析した。結果としてまず 10 例で TLS 及び CHOP 遺伝子の切断点の位置を同定することができた。切断点の位置と、ヒト反復配列である Alu 配列との間には、明確な関連性は認められなかった。転座点周辺の配列が詳細に解析できた 6 例の結果より、転座点にはいくつかの特徴があることが判明した。まず単純な転座はなく、常に欠失、重複、挿入などの他の構造異常を伴っていた。欠失あるいは重複した断片の両側には短い塩基配列の繰り返しが認められた。転座点周囲の配列と既知の組換えに関与すると考えられている DNA 結合蛋白の認識配列との homology 解析を行った。その結果、リンパ性白血病における切断点に結合する蛋白であるトランスリンの認識配列と高い homology をもつ配列が 2 例で検出された。更に、DNA 修復に関連した酵素であるトポイソメラーゼ IIα の

認識配列に類似性をもつ配列が6例全例検出された。以上の結果より、TLS/CHOP 転座変異の発生には、トランスリンやトポイソメラーゼII等の組換え関連因子が関与しており、転座が発生する部位はrandomではなく、何らかの特徴をもっていること示唆された。

論文審査の結果の要旨

TLS及びCHOP遺伝子間での相互転座による融合遺伝子形成は粘液型及び円形細胞型脂肪肉腫における特異的な遺伝子変異である。その変異機構を理解するために、サザンブロッティング、RT-PCR及びゲノムPCRにより、融合遺伝子の構造及び切断点近傍の塩基配列を解析した。その結果、まず融合遺伝子の構造としては、2種類の新規融合遺伝子が検出され、その特徴より融合遺伝子の機能上必要な部位に関する情報が得られた。切断点塩基配列の解析では、解析できた全例で欠失、重複、挿入など何らかの付加的な遺伝子変異が存在していること、更に切断点近傍の配列は、DNA修復に関連するトポイソメラーゼII及び白血病の転座機構に関与する蛋白であるトランスリンの認識配列が存在することを見出した。これらの結果は、TLS-CHOP融合遺伝子がDNA切断、修復、接合など複雑な過程を経て形成され、その過程にはトポイソメラーゼIIあるいはトランスリンなど複数の蛋白が関与していることを示唆すると考えられた。

以上の研究は相互転座の発生機構を分子レベルで理解するための臨床材料におけるデータとして重要なものであると考えられる。

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11年6月8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。