

学位論文題名

Detection of AP12-MALT1 chimaeric gene in extranodal  
and nodal marginal zone B cell lymphoma  
by reverse transcription-polymerase chain reaction (PCR)  
and genomic long and accurate PCR analyses

(PCR法を用いた、節外性・節性 marginal zone リンパ腫における  
AP12-MALT1 融合遺伝子の発現についての研究)

学位論文内容の要旨

MALT リンパ腫(mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma)は 1983 年 Isaacson らにより提唱され、現在 REAL 分類にて節外性 marginal zone リンパ腫に分類されている。*Helicobacter pylori* 胃炎や自己免疫疾患を背景に持つことが多く、早期の段階では病変は局所にとどまり予後良好な疾患である。t(11;18)転座が MALT リンパ腫に特徴的な染色体異常とされていたが、最近の研究の結果、この転座によってアポトーシス抑制遺伝子の一つである API2 (apoptosis inhibitor 2)と、新規遺伝子である MALT1 (mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma translocation gene 1)が融合遺伝子を形成していることが判明した。API2 は IAP(inhibitor of apoptosis)遺伝子ファミリーの一つであり、3 つの BIR (baculovirus IAP repeat) ドメインと CARD (caspase recruitment domain)・RING フィンガードメインを持ち、BIR ドメインがアポトーシス抑制に重要であるとされている。MALT1 は最近カスパーゼ遺伝子ファミリーと相同部位を持つことが判明したが、その機能はまだ解明されていない。

本研究では RT-PCR 法を用い、MALT リンパ腫・節性 marginal zone リンパ腫・節外性びまん性大細胞型リンパ腫多数例において、API2-MALT1 融合遺伝子の発現頻度を検討した。また genomic DNA を用いた long and accurate (LA)-PCR 法の確立を試みた。

【方法と結果】

対象として、過去 10 年間に診断された MALT リンパ腫 95 例、節性 marginal zone リンパ腫 9 例・節外性びまん性大細胞型リンパ腫 16 例の凍結保存検体を用いた。組織学的診断は REAL 分類に従ってなされた。Total RNA をグアニジンイソチオシアネート法によって凍結検体から抽出、逆転写酵素を用いて cDNA に変換し、RT-PCR を 30 サイクル施行した。反応液の一部をアガロースゲルを用いて電気泳動を行い、エチジウムブロマイドにより DNA バンドを染色し融合遺伝子の有無を判定した。次に、得られたバンドから融合遺伝子を抽出し、直接シーケンスを行い塩基配列を決定した。また、API2・MALT1 両者のエクソンイントロン構造からプライマーを設定し、検体の genomic DNA を用いて LA-PCR を施行、同

様に融合遺伝子の有無を判定した。

RT-PCR 法によって、MALT リンパ腫 95 例中 17 例 (17.9%) において融合遺伝子が検出され、そのバンドの長さはサンプル間で異なっていた。また、リンパ腫の原発臓器別で見ると、胃原発例では 43 例中 5 例 (11.6%)、肺では 16 例中 10 例 (62.5%)、腸では 2 例中 2 例が陽性であった。一方、唾液腺原発の 6 例、甲状腺 12 例、眼窩 15 例、皮膚 1 例においては融合遺伝子は検出されなかった。同様に節性 marginal zone リンパ腫 9 例・節外性びまん性大細胞型リンパ腫 16 例でも発現は認められなかった。シーケンス解析では、転座切断点の異なる 5 種類の融合遺伝子が検出された。全ての融合遺伝子は in frame で結合しており、API2 の BIR ドメイン・MALT1 の caspase-like domain が保たれていた。

LA-PCR 法では、4 通りのプライマーの組み合わせを用いることによって、RT-PCR 陽性例において 1 例を除く全例で融合遺伝子のバンドが検出された。RT-PCR 陰性の 12 例でも LA-PCR を施行したが、全てのプライマーの組み合わせで融合遺伝子は認められなかった。

#### 【考察】

我々は今回、DNA レベルでも API2-MALT1 融合遺伝子が検出できる LA-PCR 法を確立し、その感度は 94.1% (16/17) であった。RT-PCR 法単独では、融合遺伝子のサイズの種類が限られているため、RNA の混入による偽陽性が完全には否定できない。今回の検索では、ケース 1 から 9 のサンプルで RT-PCR 法にて同サイズのバンドが認められたが、genomic DNA を用いた LA-PCR 法で異なるサイズのバンドが得られたことから、これらは真に各々の検体由来の融合遺伝子であることが示された。また、今回の LA-PCR 法では 2 組のプライマーの組み合わせによってほとんどの検体で融合遺伝子が検出可能であった。本法は RNA 抽出が必要な RT-PCR 法より簡便に、また内視鏡生検で得られるような微小な検体からでも融合遺伝子を検索する事が可能であり、臨床的に有用と考えられた。また我々を含む最近の報告では、API2-MALT1 融合遺伝子が存在する胃 MALT リンパ腫症例では、*Helicobacter pylori* の除菌療法に不応性であることが示されており、本転座の検索は MALT リンパ腫の診断や治療方針決定の際にも有用であると思われる。

また今回は、API2-MALT1 融合遺伝子の頻度を検索した中では最も多数例での報告でもある。本転座の頻度は、同じ MALT リンパ腫の中でもその発生する臓器によって明らかに異なり、特に肺由来のリンパ腫で高いことが示された(肺：その他=62.5%：8.9%、 $p<0.0001$ )。これまでのいくつかの報告では、融合遺伝子の検出に FISH、RT-PCR、nested RT-PCR、リアルタイム RT-PCR といった様々の方法が用いられている。我々と同様の RT-PCR 法を用いた Remstein らの報告でも、本融合遺伝子は MALT リンパ腫全体で 21% であり、肺由来で 44% と我々と同様の傾向があった。この結果は、肺原発 MALT リンパ腫が API2-MALT1 融合遺伝子の存在と密接に関連しており、また MALT リンパ腫が遺伝子学的に異なる背景を持った疾患群であることを示唆している。

API2-MALT1 融合遺伝子がリンパ腫の発生・進展にどう関与しているかの詳細は現在のところ不明である。細胞への遺伝子導入実験により、API2・MALT1 単独では起こらない転写因子 NF- $\kappa$ B の活性化を API2-MALT1 融合遺伝子が引き起こすことが最近報告された。この実験系では MALT1 の caspase-like domain が NF- $\kappa$ B 活性化に必須であるが、今回 RT-PCR 法で同定された融合遺伝子 5 種類全てにおいてこのドメインが保たれていた。API2-MALT1 融

合遺伝子は NF- $\kappa$ B を介したシグナル伝達機構を乱す事により、アポトーシスを抑制する方向に働き腫瘍発生に寄与するのかもしれない。

【結論】

MALT リンパ腫多数例において、API2-MALT1 融合遺伝子の頻度を RT-PCR 法にて検討した。その頻度は MALT リンパ腫の発生臓器別に異なっており、肺由来のリンパ腫で特に高かった。また RT-PCR 法とほぼ同様の検出感度を持つ genomic LA-PCR 法を確立し、本融合遺伝子が DNA レベルでも検出可能であり、臨床的に有用である事を示した。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 今 村 雅 寛

副 査 教 授 浅 香 正 博

副 査 教 授 小 池 隆 夫

## 学位論文題名

### Detection of API2-MALT1 chimaeric gene in extranodal and nodal marginal zone B cell lymphoma by reverse transcription-polymerase chain reaction (PCR) and genomic long and accurate PCR analyses

(PCR法を用いた、節外性・節性 marginal zone リンパ腫における API2-MALT1 融合遺伝子の発現についての研究)

MALT リンパ腫(mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma)は、*Helicobacter pylori* 胃炎等の慢性炎症を背景に持つことが多く、早期の段階では病変は局所にとどまり予後良好な疾患である。t(11;18)転座が MALT リンパ腫に特徴的な染色体異常とされていたが、最近の研究の結果、この転座によってアポトーシス抑制遺伝子の一つである API2 (apoptosis inhibitor 2) と、機能不明の新規遺伝子である MALT1 (mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma translocation gene 1)が融合遺伝子を形成していることが判明した。本研究では RT-PCR 法を用いて API2-MALT1 融合遺伝子の発現頻度を検討した。また genomic DNA を用いた long and accurate (LA)-PCR 法の確立を試みた。

対象として、MALT リンパ腫 95 例、節性 marginal zone リンパ腫 9 例・節外性びまん性大細胞型リンパ腫 16 例の凍結保存検体を用いた。RT-PCR 法によって、MALT リンパ腫 95 例中 17 例 (17.9%) において融合遺伝子が検出され、肺原発例で 16 例中 10 例(62.5%)と高率に認められた。LA-PCR 法では、4 通りのプライマーの組み合わせを用いることによって、RT-PCR 陽性例において 1 例を除く全例で融合遺伝子のバンドが検出された。本転座の頻度は、MALT リンパ腫の中でも特に肺原発例で高いことが示され、肺原発 MALT リンパ腫が API2-MALT1 融合遺伝子の存在と密接に関連していることが示唆された。また LA-PCR 法は RNA 抽出が必要な RT-PCR 法より簡便に、また内視鏡生検で得られるような微小な検体からでも融合遺伝子を検索する事が可能であり、臨床的に有用と考えられた。

口頭発表に当たり、副査の小池教授からは、t(11;18)転座がこのリンパ腫で特徴的な異常であるがそれを遺伝子レベルまで検索する意味合いについて、また肺由来に頻度が多い理由について質問があった。申請者は、染色体レベルで共通した異常でも遺伝子転座としては異なった異常である可能性があることを同じ 18q21 上に存在する遺伝子 bcl-2 と MALT1 を例に

挙げて説明し、また肺では他の臓器に比し MALT リンパ腫の発生母地として慢性炎症の関与がはっきりせず、融合遺伝子の頻度の違いに関連している可能性について述べた。副査の浅香教授からは、他の報告での本融合遺伝子の頻度と、転座の有無と病理所見との相関、また *H.pylori* 以外にリンパ腫に関わる抗原刺激因子があるかといった質問があった。申請者は、他にも肺由来 MALT リンパ腫で本融合遺伝子が高率に認められている報告があること、本融合遺伝子陽性の MALT リンパ腫では比較的均一な小リンパ球から形成される low-grade type が多いこと、また MALT リンパ腫と橋本病・シェーグレン症候群といった自己免疫疾患との関連について述べた。主査の今村教授からは、節性と節外性での marginal zone lymphoma の相違、転座切断点による病像の変化について、また本転座陽性例の付加染色体異常の有無について質問があった。申請者は、少なくとも本融合遺伝子陽性 MALT リンパ腫は遺伝子学的に独立した疾患単位としてよいと考えられるが、本融合遺伝子陰性 MALT リンパ腫と節性 marginal zone lymphoma の遺伝子学的背景については更なる検索が必要であること、本研究では転座切断点による臨床像の違いは明らかでないこと、この転座はほとんどの例で単独の異常として認められ、腫瘍機序に密接に関連すると予想されることを述べた。

本研究は、一つの疾患単位にまとめられている MALT リンパ腫が、遺伝子学的には発生機序が異なる疾患群である可能性を明らかにした点で高く評価される。また今後本融合遺伝子の具体的な分子学的機能の解明が期待され、本研究はその基礎データとなるものである。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。