

平成 22 年 5 月 10 日現在

研究種目：	若手研究(B)
研究期間：	2008 ～ 2009
課題番号：	20791233
研究課題名(和文)	免疫グロブリンBCL6転座キメラ転写産物の定量測定による悪性リンパ腫の予後判定
研究課題名(英文)	Prognosis assesment by quantitative RT-PCR analysis of chimeric I $\mu$ /BCL6 transcripts
研究代表者	
	李 昊哲 (Lee Koutetsu)
	大阪医科大学・医学部・講師
研究者番号：	10368087

研究成果の概要(和文)：正常扁桃や脾臓に Ig/BCL6 転座 B 細胞が存在することが示された。また、Ig/BCL6 転座 B 細胞は、胚中心の B 細胞に存在することが示された。Ig/BCL6 転座によって形成される融合遺伝子からできる転写産物(Ig/BCL6 転座キメラ転写産物)を RT-PCR によって定量的に測定し、この Ig/BCL6 転座キメラ転写産物の発現量とリンパ腫の悪性度との関係を検討したところ悪性度が高いほど転写産物の発現量が多いことが示された。

研究成果の概要(英文)：The chimeric Ig-BCL6 transcripts found in normal human tonsil and spleen cells. The appearance of Ig/BCL6 chromosomal translocations was associated with the cells expressing germinal center B cell. This study showed higher grade of malignant lymphoma express much quantity of Ig/BCL6 transcripts.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,600,000	780,000	3,380,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・耳鼻咽喉科

キーワード：頭頸部外科学

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 3q27 転座 (BCL6 転座) は、びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫 (DLBCL) の 30-40%、濾胞リンパ腫 (FL) の 5-15% に認められる最も頻度の高い染色体転座の 1 つであり、その約 50% が免疫グロブリン遺伝子 (Ig) との転座である。

(2) Ig/BCL6 転座の切断点は、BCL6 遺伝子の第一エクソン近傍の major translocation

cluster (MTC) 領域に集中する。したがってこの転座は、染色体分析だけでなく、MTC プローブを用いたサザンプロットや切断点近傍の DNA クローンを組み合わせた FISH で検出できるが、どれも定量的に Ig/BCL6 転座 B 細胞の存在を検出できるものではない。

(3) この Ig/BCL6 転座キメラ転写産物は、通常、切断点が遺伝子のイントロンに存在するため、症例ごとに切断点が異なっても転写

産物である mRNA は同一であり、これを RT-PCR で同定することで Ig/BCL6 転座 B 細胞を定量的に測定する。

(4) ナイーブ B 細胞が抗原と出会ってから起こる体細胞突然変異とクラススイッチの制御に関しては、はっきりわかっていない。また、ヒト activation-induced cytidine deaminase (AID) には isoform が存在することが知られているがこれについてもはっきりわかっていない。

## 2. 研究の目的

(1) 悪性リンパ腫が疑われて生検された症例のリンパ節を用いて、BCL6 転座によって形成される Ig/BCL6 転座キメラ転写産物を定量し、その発現量と病理組織診断との関係を検討する。

(2) Ig/BCL6 転座キメラ転写産物の発現量と国際予後指標 (International Prognostic Index: IPI) との関係を検討する。また、BCL6 関連リンパ腫の正確な診断に対する有用性を検討する。

(3) 予後因子としての評価、骨髄進展症例の腫瘍残存あるいは再発の有無を検討する。

(4) Ig/BCL6 転座は、Ig 遺伝子のクラススイッチに伴って生じると考えられており、これから AID と染色体転座との間に深い関連があることが示唆される。これについても検討をする。

(5) ナイーヴ B 細胞が抗原と出会ってから起こるクラススイッチと体細胞突然変の制御や AID の発現に膜型 IgM レセプターと膜型 IgD レセプターが関与しているかどうかを調べる。

## 3. 研究の方法

(1) 手術により摘出された口蓋扁桃を用いてこれより total RNA を抽出し、この RNA の 1  $\mu$ g を用いて cDNA 20  $\mu$ L を合成し、この 2  $\mu$ L を用いて nested RT-PCR を施行し、Ig/BCL6 キメラ転写産物を定量的に測定した。Primer sequence と PCR 条件は表.1 と表.2 に示した。

表.1 Primer sequence

	Primer sequence
1st PCR	5' -CGACTGGCTGCTCAGGCCCCAGC-3' 5' -GATACAGCTGTCTAGCCGGCGAGGCCA-3'
2nd PCR	5' -TAATGGACTTGGAGGAATGATT-3' 5' -GATACAGCTGTCTAGCCGGCGAGGCCA-3'

表.2 PCR 設定条件

	条件
1st PCR	(95°C15 秒→65°C30 秒→72°C30 秒) ×40 サイクル
2nd PCR	(95°C15 秒→68°C40 秒) ×40 サイクル

(2) 平成 20 年から平成 21 年の間に頸部リンパ節生検を施行した悪性リンパ腫症例 36 例を対象とした。性別は男性 12 例、女性 24 例であった。年齢は 30 才から 90 才 (平均 64.8 才) であった。穿刺吸引細胞診で悪性リンパ腫疑いと診断された症例に対し切開生検で得られたリンパ節組織から取り出した細胞を材料として用いて、Ig/BCL6 キメラ転写産物を定量的に測定した。

(3) この結果と治療反応性との関連、予後因子との関係を検討した。

(4) 正常口蓋扁桃から Ig/BCL6 転座 B 細胞が存在しない CD38 陰性の B 細胞を取り出しこれに AID isoform を遺伝子導入し 3 日培養し、この細胞から total RNA を抽出して nested RT-PCR を施行し、I  $\mu$ /BCL6 キメラ転写産物を検出し、Ig/BCL6 転座 B 細胞が存在するかどうか調べる。

(5) ヒト PBMC を医局員のボランティアからの採血から作成し実験に用いた。この PBMC を IL-4、CD40 存在下に抗ヒト IgM 抗体、抗ヒト IgD 抗体などを加えて様々な条件下で培養し、3 日後に細胞を採取し、これより total RNA を抽出する。また、磁気ビーズを用いることで IgM による架橋を成立させることができる。この RNA を用いて cDNA を作成し RT-PCR を施行し、各々の条件下における full length AID や AID isoform の発現を調べる。

(6) PBMC を IL-4、CD40 存在下に抗ヒト IgM 抗体、抗ヒト IgD 抗体などを加えて様々な条件下で培養し、3 日後に細胞を採取しこれよりタンパク質を抽出しウエスタンブロッティングにより各々の条件下における full length AID や AID isoform の発現を調べる。培養条件を下記の表 3 のように設定する。抗体の濃度もいろいろ変えて実験を行う。

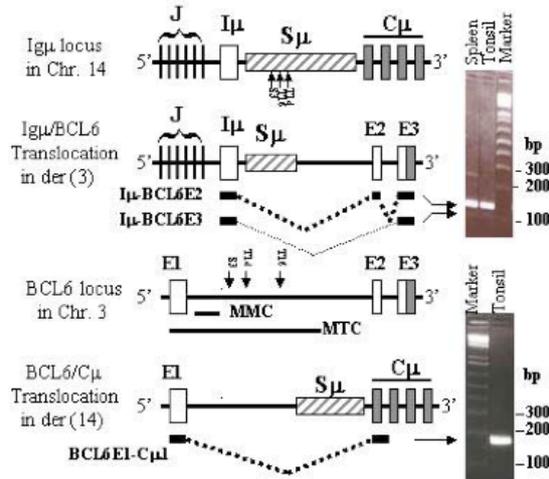
表.3 培養条件

medium のみ
IL-4+CD40
IL-4+CD40+抗 IgM 抗体
IL-4+CD40+抗 IgM 抗体+磁気ビーズ
IL-4+CD40+抗 IgD 抗体
IL-4+CD40+抗 IgD 抗体+磁気ビーズ
IL-4+CD40+抗 IgM 抗体+抗 IgD 抗体

#### 4. 研究成果

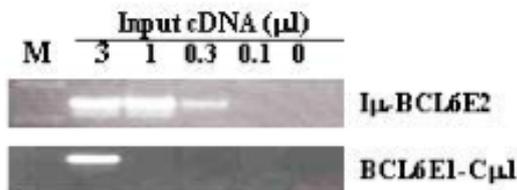
(1) 正常扁桃や脾臓の細胞から抽出した RNA より nested RT-PCR で 相補の Ig/BCL6 キメラ転写産物が検出できたことから正常扁桃や脾臓に Ig/BCL6 転座 B 細胞が存在することが示された (図. 1)

図. 1 正常扁桃や脾臓に Ig/BCL6 転座 B 細胞が存在する



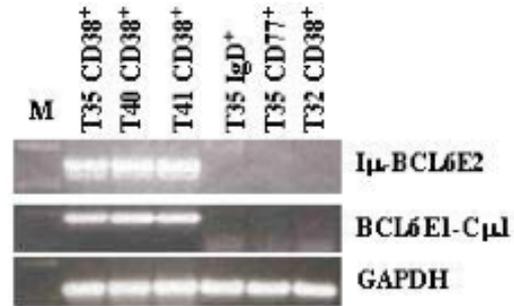
(2) Ig/BCL6 キメラ転写産物の I $\mu$ -BCL6E2 の検出率は、これに相補的なキメラ転写産物である BCL6E1-C $\mu$ 1 の検出率の 9 倍の検出率であった。つまり Ig/BCL6 転座 B 細胞の存在を nested RT-PCR で検出するには I $\mu$ -BCL6E2 を測定するのがよいと考えられた (図. 2)。

図. 2 相補的な Ig/BCL6 キメラ転写産物



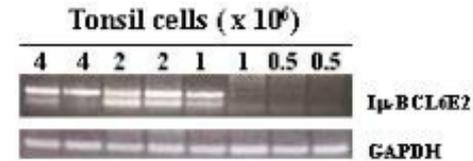
(3) CD38 陽性の胚中心の B 細胞に Ig/BCL6 転座 B 細胞が存在することが示された。また、存在しない症例もあることが示された。IgD 陽性のナイーブ B 細胞には Ig/BCL6 転座 B 細胞は存在しないことが示された (図. 3)。

図. 3 CD38 陽性の胚中心の B 細胞に Ig/BCL6 転座 B 細胞が存在する



(4) 正常口蓋扁桃の B 細胞には  $1/1 \times 10^6$  の頻度で Ig/BCL6 転座 B 細胞が存在することが示された (図. 4)。

図. 4 正常口蓋扁桃の B 細胞には  $1/1 \times 10^6$  の頻度で Ig/BCL6 転座 B 細胞が存在する



(5) 組織型は、リンパ節炎が 3 例、びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫が 30 例、濾胞リンパ腫が 3 例であった。リンパ節炎では  $10/10^6 \sim 10^2/10^6$  個の I $\mu$ /BCL6 転座 B 細胞が検出できた。びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫では  $1.5 \times 10^4/10^6 \sim 10^6/10^6$  個の Ig/BCL6 転座 B 細胞が検出できた。濾胞リンパ腫が 3 例と症例数波少ないが  $1.2 \times 10^3/10^6 \sim 10^4/10^6$  個 Ig/BCL6 転座 B 細胞が検出できた。Ig/BCL6 転座 B 細胞が検出の検出量は、炎症性<濾胞リンパ腫<びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫という傾向が見られ、悪性度が高いほど Ig/BCL6 転座 B 細胞が検出の検出量が多いことが推察された。症例数が十分でなく治療反応性との関連、予後因子との関係は検討できなかった。

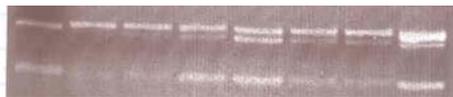
(6) CD38 陰性の B 細胞に AID isoform を遺伝子導入し、I $\mu$ /BCL6 キメラ転写産物の検出を調べたが、AID isoform の強発現が Ig/BCL6 染色体転座を生じさせるという予想された結果はでなかった。

(7)PBMCからセレクトしたCD27陰性細胞(ナイーブB細胞)をT細胞存在下に培養した細胞よりRNAと抽出しAID isoformの発現をRT-PCRで見たところ、IgM架橋刺激によりAID isoformは誘導された。

図.5 T細胞存在下ナイーブB細胞はIgM架橋刺激によりAID isoformを誘導する。

(RT-PCR)

1 2 3 4 5 6 7 8  
AID



I $\mu$ -C $\mu$



1. marker
2. mediumのみI
3. 2. IL4+CD40
4. 3. IL4+CD40+IgM0.25 $\mu$ L
5. IL4+CD40+IgM0.5 $\mu$ L、
6. IL4+CD40+IgM0.1.0 $\mu$ L、
7. IL4+CD40+IgM0.1.0 $\mu$ L
8. CD38陽性B細胞

(8)PBMCからセレクトしたCD27陰性細胞(ナイーブB細胞)をT細胞存在下に培養した細胞よりRNAと抽出しAID isoformの発現をRT-PCRで見たところ、IgM架橋刺激によりAID isoformは誘導され、IgDで抑制された。

図.7 T細胞存在下ナイーブB細胞はIgM架橋刺激によりAID isoformを誘導されIgDで抑制される。

(RT-PCR)

1 2 3 4 5 6 7 8  
AID



I $\mu$ -C $\mu$



1. mediumのみI
2. IL4+CD40+IgM
3. IL4+CD40+IgM+IgD2.5 $\mu$ L
4. IL4+CD40+IgM+IgD5 $\mu$ L
5. IL4+CD40+IgM+IgD10 $\mu$ L、
6. IL4+CD40
7. IL4+CD40+IgD5 $\mu$ L
8. IL4+CD40+IgD10 $\mu$ L

(9)PBMCからセレクトしたCD27陰性細胞(ナイーブB細胞)をT細胞存在下に培養した細胞よりAID isoformの発現をウエスタンブロットティングで見たところ、IgM架橋刺激によりAID isoformは誘導され、IgDで抑制された。

図.7 T細胞存在下ナイーブB細胞はIgM架橋刺激によりAID isoformを誘導されIgDで抑制される。

(ウエスタンブロットティング)

1 2 3 4 5 6 7 8  
AID



$\beta$ actin



1. mediumのみI
2. IL4+CD40
3. IL4+CD40+IgD2.5 $\mu$ L
4. IL4+CD40+IgD5 $\mu$ L
5. IL4+CD40+IgD10 $\mu$ L、
6. IL4+CD40+IgM1 $\mu$ L
7. IL4+CD40+IgM2 $\mu$ L
8. IL4+CD40+IgM4 $\mu$ L

以上の結果より1.ナイーブB細胞が活性化するとき膜型、IgMレセプターと膜型IgDレセプターはAID発現に関与している。2.クラススイッチと体細胞突然変異の制御にはAID isoformとfull length AIDのいずれかが関与している。3.膜型IgMレセプターと膜型IgDレセプターのどちらかがクラススイッチと体細胞突然変異のアップレギュレーションやダウンレギュレーションに関与していて、これによりAIDの発現が制御されていることが示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計0件)

[学会発表] (計0件)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

李 昊哲 ( Lee Koutetsu )  
大阪医科大学・医学部・講師  
研究者番号：10368087