

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月11日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2009～2011

課題番号：21659086

研究課題名（和文） 悪性リンパ腫症例における BCL6 転座に関与する遺伝子の DNA メチル化の検討

研究課題名（英文） DNA methylation analysis of the BCL6 translocation partners in malignant lymphoma

研究代表者

吉田 祥子 (YOSHIDA SHOKO)

東京医科歯科大学・大学院保健衛生学研究科・助教

研究者番号：20359681

研究成果の概要（和文）：

悪性リンパ腫症例において、BCL6 転座のパートナー遺伝子の突然変異検出領域にある CpG アイランドの DNA メチル化状態が、その遺伝子発現量や突然変異発生に関与しているのか、さらには悪性リンパ腫の病型や予後などとの相関を示すのかを調べるため、当該領域の DNA メチル化状態の検討を行った。今回の結果からは、パートナー遺伝子の遺伝子発現や突然変異発生に CpG アイランドの DNA メチル化状態は関係しないであろうことが考えられた。

研究成果の概要（英文）：

This study was carried out to examine the DNA methylation status of the BCL6 translocation partner gene, particularly the CpG island within the frequently mutated regions, among the cases with malignant lymphoma to study whether it affects the expression or mutagenesis of the partner gene, and whether it is associated with the subtypes or prognosis of the malignant lymphoma. The present study indicated that the DNA methylation status of CpG islands of the partner genes did not affect the expression or mutagenesis of the genes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	600000	0	600000
2010年度	500000	0	500000
2011年度	700000	210000	910000
年度			
年度			
総計	1800000	210000	2010000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：悪性リンパ腫・DNA メチル化・BCL6 転座

1. 研究開始当初の背景

悪性リンパ腫の亜型の中で最大の病型であるびまん性大細胞型 B リンパ腫 (DLBL) においては、約 30% に 3q27 転座が認められ、この染色体領域に同定された BCL6 が悪性リン

パ腫発症の原因遺伝子ではないかと考えられている。過去の研究において、BCL6 転座のパートナー遺伝子として CIITA、pim-1、transferrin receptor、EIF4A2、ikaros (IKZF1) を検出し、BCL6 転座がリンパ

節胚中心における somatic hypermutation (SHM) のメカニズムによって起こった可能性が示唆されることを報告した (Yoshida S, et al., 1999)。

また、BCL6 転座をもつ細胞において 5'-partner gene/BCL6-3' 融合転写産物が発現していると報告されたことから、従来、BCL6 のプロモーター領域がパートナー遺伝子のそれと置き換わること (promoter substitution) による BCL6 の脱制御が、悪性リンパ腫発症の原因であると考えられてきたが、症例について解析した結果、reciprocal な融合転写産物 (5'-BCL6/partner gene-3') を発現している例もあり、かつ、パートナー遺伝子が、増殖、分化さらには癌化に関わると報告されている遺伝子であったことから、悪性リンパ腫の発症にパートナー遺伝子側の脱制御も関わっている可能性があることを報告した (Kaneita Y, et al., 2001)。

その後、BCL6 においては、その遺伝子変異が正常な胚中心 B 細胞においても生理的に起こっている一方で、パートナー遺伝子における遺伝子変異は、正常な胚中心 B 細胞においては認められず、腫瘍特異的にのみ起こっていることが報告された (Pasqualucci L, et al. 2001)。前研究 (平成 15~17 年度: 若手研究 B・悪性リンパ腫症例における BCL6 転座に関与する遺伝子の変異と発現の検討) 期間において、過去に報告したパートナー遺伝子が転座時に BCL6 遺伝子と結合していた切断点の近傍、約 1.5 kbp の領域 (hypermethylation が起こりやすいと報告された転写開始点から下流 2 kb までの 5' 側上流領域に存在) における突然変異の検索を悪性リンパ腫症例検体を用いて行い、パートナー遺伝子に突然変異が認められることを確認している。

一方、CpG アイランドのメチル化は遺伝子不活化と関連し、インプリンティングおよび組織特異的遺伝子発現に重要であることが示されてきた。また、プロモーターから遺伝子転写開始領域にかけて存在する CpG アイランドの DNA メチル化が癌抑制遺伝子の転写抑制と関連することが発見されて以来、これまでに癌細胞で DNA メチル化によって不活化される遺伝子が多数報告されている。

近年、胃・大腸癌において CIITA 遺伝子の発現が一部の癌細胞で消失しており、その原因が当該遺伝子 IV 型プロモーター領域の CpG アイランドの DNA メチル化亢進にあること、CIITA 発現消失が、癌細胞が免疫監視機構を回避するのに重要であるという可能性が報告された (Satoh A, et al., 2004)。

報告された CIITA の高メチル化領域について検討したところ、前研究において突然変異を検出した領域に一致していることが分かった。また、コンピュータ解析の結果、5つのパートナー遺伝子 (CIITA、pim-1、transferrin receptor、EIF4A2、IKZF1) のうち4つの遺伝子 (IKZF1 除く) において突然変異の検出領域に CpG アイランドが存在することが分かった。

脱アミノ化酵素である AID (activation-induced cytidine deaminase) が突然変異を誘発することと、このメカニズムにより免疫グロブリン遺伝子の SHM が起こるという現象が知られており、BCL6 の転座や SHM も同じメカニズムにより起こると考えられている。パートナー遺伝子の転座や突然変異もそのメカニズムによるものと考えられているが、前研究において検出した突然変異が AID のターゲットとするモチーフ

(WRCY/RGYW) 近傍に必ずしもあるものではなかったこと、CpG アイランドのシトシンをメチル化の標的とする DNA メチル化酵素が DNMT であること、その DNMT1 および DNMT3b の発現が悪性リンパ腫で上昇しているという報告 (Amara K, et al., 2010) や DNMT3 が脱アミノ化酵素としても働くという報告 (Metivier R, et al., 2008) を合わせて、パートナー遺伝子発現の脱制御だけでなく、突然変異発生に CpG アイランドの DNA メチル化状態が関与しうる可能性、すなわち、メチル化がよく起こる領域 (=DNMT がよく作用するであろう領域) において相反する作用である脱メチル化も起こっており、これによって突然変異が誘導されるのではないかという可能性を考えた。

2. 研究の目的

悪性リンパ腫の発症、進展に影響を及ぼすのが、遺伝子の変異や増幅、欠失といったジェネティックな異常だけでなく、塩基配列の変化を伴わずに遺伝子発現を制御する機構の破綻、つまりエピジェネティックな異常によることも視野に入れ、網羅的かつ多角的に解析することが必要である。本研究の遂行により、前研究で突然変異を検出した症例での比較ができることから、DNA メチル化との関係性を検討し、悪性リンパ腫の病型、予後などとの相関を示すことができれば、これらを利用した総合的な遺伝子診断システムを構築することができるのではないかと考えた。そこで、本研究期間内においては、悪性リンパ腫症例検体のゲノム DNA を用いて、過去に報告した 4 パートナー遺伝子の突然変異検出領域内 CpG アイランドにおける DNA メチル化状態を網羅的に解析したいと考えた。

3. 研究の方法

材料として、前研究期間においてパートナー遺伝子に突然変異を検出した18例 (DLBCL 14例、FL 4例)、変異がなかった5例 (DLBCL 2例、FL 2例、lymphoblastic lymphoma 1例) および扁桃腺切除術材料4例(コントロール)を用いた。

方法は、少量の DNA から高感度かつピンポイントに DNA メチル化部位を検出することができるバイサルファイトシーケンス法を用いることとした。

4 パートナー遺伝子 (CIITA、pim-1、transferrin receptor、EIF4A2) の突然変異検出領域内 CpG アイランド中の DNA メチル化状態を検索できるように Methyl Primer Express(R) Software v1.0 (Applied Biosystems) を用いて Primer を設計した。

症例から定法により抽出した DNA サンプルについて Methylamp One-Step DNA Modification Kit (Epigentek) を用いたバイサルファイト処理を行った。TaKaRa Taq Hot Start Version (TaKaRa)を用いた PCR を行い、アガロースゲル電気泳動にて増幅を確認後、TA クローニングを行った。BigDye(R) Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems)によるサイクルシーケンス反応後、ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer により解析した。

4. 研究成果

検討に用いた症例、つまり突然変異を検出した18例 (DLBCL 14例、FL 4例)、変異がなかった5例 (DLBCL 2例、FL 2例、lymphoblastic lymphoma 1例) および扁桃腺切除術材料4例 (コントロール)、すべてについて4つの遺伝子 (CIITA、pim-1、transferrin receptor、EIF4A2) の突然変異検出領域内 CpG アイランドにおける DNA メチル化状態を検索することができ、以下のことが分かった。

・突然変異検出領域内 CpG アイランドにおける DNA メチル化を検出したもののその程度は低く、正常扁桃組織由来 DNA におけるメチル化の程度と同じであった。

低メチル化がゲノム不安定性を起し、この機構により転座や突然変異を起している (DNA メチル化の減少→T リンパ腫発症モデルマウス) の報告 (Gaudet F et al., 2003) があり、悪性リンパ腫症例の転座や突然変異においてはむしろこちらの可能性を反映しているのかもしれない。

・症例間においても DNA メチル化の程度に違

いはなく、特異的に DNA メチル化している部位もないことが分かった。

・DNA メチル化は突然変異をもつアレルにも、もたないアレルにも見られた。

これは前研究で突然変異が両方のアレルにわたって存在していたのと同じである。

・各症例の正常組織における DNA メチル化についての検討はできないので、患者毎にもととの DNA メチル化の程度が異なっていたり、(高メチル化→) 脱メチル化が一過性に起こったために今回の方法では検出できなかった可能性は排除できない。

今回の結果からは、悪性リンパ腫症例においてパートナー遺伝子の遺伝子発現や突然変異発生に CpG アイランドの DNA メチル化状態は関係しないであろうことが考えられた。

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)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉田 祥子 (YOSHIDA SHOKO)

東京医科歯科大学・大学院保健衛生学研究
科・助教

研究者番号：20359681

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：