

論文の内容の要旨

論文題目 EB ウイルス関連リンパ腫の遺伝子異常

指導教官 岩本愛吉教授

東京大学大学院医学系研究科

平成9年4月入学

医学博士課程

内科学専攻

氏名 石田建

序論

EB ウイルスは Burkitt's lymphoma, 膿胸関連リンパ腫, HIV 関連リンパ腫などにおいて高頻度に感染を認め, その発症に関与していると考えられている. 一方で悪性リンパ腫にはその組織型に対応した様々な遺伝子異常が認められる. 本研究では, EB ウイルス関連リンパ腫がどのような遺伝子異常や蛋白の発現と関連しているかを調べることにより, EB ウイルス感染が悪性リンパ腫の発症および分化において果たす役割を明らかにすることを試みた.

対象と方法

48 例の non-Hodgkin lymphoma, diffuse large B cell type と診断された病理組織検体と, 同一検体から抽出した DNA を用いた. EB ウイルス感染の有無は EBERs in situ hybridization 法により判定した. EB ウイルス陽性症例には LMP1 と EBNA2 の免疫組織化学染色を行ない, latency 1 から 3 に分類した. 遺伝子変異の検索には PCR-SSCP 法を用いて, p53 遺伝子(exon 5-exon 8)と BCL6 遺伝子(somatic hypermutation 領域)を解析した. p53 蛋白と BCL6 蛋白の発現に関しては, 免疫組織化学染色を行ない, immunoreactive score(IRS; 陽性細胞の割合と染色の強さにより 0-12 点に数値化し, none(0), low(1-3), intermediate(4 or 6), high(8-12)に群分けした)を用いて判定した. 悪性リンパ腫の分化段階を調べるために, BCL6 のほか VS38c, Syndecan1 の免疫組織化学染色を行なった. EB ウイルス感染とアポトーシスとの関連を調べるために, single stranded DNA (ssDNA)に対する免疫組織化学染色を行ない, apoptotic index(AI; 腫瘍細胞 1000 個当たりの陽性細胞数)を算出した.

このような病理組織検体での分析結果をもとに, 同一クローン由来で EB ウイルス陰性の lymphoma cell line(FL-18)と陽性の cell line(FL-18-EB)を用いて, 上記と同様の遺伝子変異の検索, 免疫組織化学染色および Northern hybridization 法と GeneChip を用いた遺伝子発現解析を行なった.

結果

EBERs in situ hybridization 法により、48 例中 21 例が EB ウイルス陽性、27 例が EB ウイルス陰性と判定された。EB ウイルス陽性症例のうち、7 例が膿胸関連リンパ腫、4 例が HIV 関連リンパ腫であった。Latency 3 に分類されたのは、膿胸関連リンパ腫の 7 例全例と HIV 関連リンパ腫の 4 例中 3 例であった。EB ウイルス感染の有無と BCL6 蛋白の発現との関連を調べたところ、EB ウイルス陽性症例では IRS にて intermediate および high の症例は 21 例中 4 例(19%)、EB ウイルス陰性症例では 27 例中 20 例(74%)であり、EB ウイルス陽性症例では有意に BCL6 蛋白の発現が低下していた($P < 0.001$)。一方、BCL6 遺伝子変異の頻度は、EB ウイルス感染の有無で差を認めなかった(33% vs 37%)。また、BCL6 遺伝子変異の有無と BCL6 蛋白の発現との間にも明らかな関連を認めなかった。遺伝子変異のパターン(transition/transversion ratio)を調べたところ、EB ウイルス陽性症例では陰性症例より同比率が高かった(1.6 vs 0.88)。同様に EB ウイルス感染の有無と p53 蛋白の発現との関連を調べたところ、IRS にて intermediate および high の症例は EB ウイルス感染の有無で差を認めなかった(43% vs 33%)。また、p53 遺伝子変異の頻度についても EB ウイルス感染の有無で有意差を認めなかった(14% vs 3.7%)。p53 遺伝子変異の有無と p53 蛋白の発現との関連では、遺伝子変異を有する 4 症例がすべて IRS で intermediate および high の症例であり、p53 蛋白の発現を強く認めた。遺伝子変異のパターンでは、EB ウイルス陽性症例では 5 か所の変異全てが transition であったが、EB ウイルス陰性症例の 1 か所の変異は transversion であった。EB ウイルス感染の有無、BCL6、p53 蛋白の発現の有無とアポトーシスの頻度との関連について ssDNA に対する免疫組織化学染色を行ない、AI(mean \pm SD)を算出して統計学的に比較した。その結果、EB ウイルス感染の有無および BCL6 蛋白の発現の有無では、AI に差を認めなかったが(3.4 ± 3.7 vs 3.0 ± 2.8 , 2.9 ± 2.3 vs 3.5 ± 3.9)、p53 蛋白の発現の有無では AI に有意差を認め(4.6 ± 3.9 vs 2.3 ± 2.4 , $p < 0.05$)、更に野生型 p53 蛋白を発現している症例では、変異型を発現している症例と比して AI が有意に高値であった(5.4 ± 4.0 vs 1.8 ± 1.0 , $p < 0.05$)。BCL6、VS38c、Syndecan1 の発現様式により、diffuse large B cell lymphoma の分化段階を表の様に 4 段階に分類することを試みた。

	BCL6	VS38c	Syndecan1
Type 1	+	-	-
Type 2	+	+	-
Type 3	-	+	-
Type 4	-	+ or -	+

この分類では Type 1 から Type 4 に向かって分化が進み、GC(germinal center)

phenotype(Type 1 と 2)の腫瘍が post GC phenotype(Type 3 と 4)に分化すると仮定した。その結果、EB ウイルス陽性症例では Type 1 の症例を認めず、Type 2 から 4 をそれぞれ 6, 7, 4 例認めた。一方で、EB ウイルス陰性症例では Type 1 から 3 をそれぞれ 5, 17, 3 例認めたが、Type 4 の症例は認めなかった。培養細胞を用いた実験として、FL-18 と FL-18-EB(latency 3)について、BCL6 somatic hypermutation 領域の遺伝子変異と蛋白の発現を調べた。BCL6 の遺伝子変異は FL-18 と FL-18-EB に同一であり、5 か所に点突然変異を認めた。免疫組織化学的には、FL-18 では BCL6 蛋白の発現を認めたが、FL-18-EB では認めなかった。さらに VS38c, Syndecan1 の免疫組織化学染色を行なった結果、FL-18 は BCL6+/VS38c-/Syndecan1- の GC phenotype を示し、FL-18-EB は BCL6-/VS38c+/Syndecan1+ の post GC phenotype を示した。Northern hybridization 法を用いて BCL6 遺伝子の発現を調べたところ、FL-18 のみで発現を認めた。GeneChip を用いた遺伝子発現解析では、免疫組織化学染色の結果と一致した遺伝子発現を認めた。

考察

今回検討した 48 例の diffuse large B cell lymphoma では、21 例が EB ウイルス陽性、27 例が陰性と判定された。EB ウイルス陽性症例には 7 例の膿胸関連リンパ腫と 4 例の HIV 関連リンパ腫が含まれており、これらを含めて節外性発症を 16 例(76%)認めた。また、EB ウイルス陽性症例では、latency 1 から 3 をそれぞれ 3, 8, 10 例認め、latency 3 は膿胸関連リンパ腫 7 例全例と HIV 関連リンパ腫 4 例中 3 例で認められた。このような特異な発症形態およびウイルス遺伝子の発現が、今回明らかになった EB ウイルス関連リンパ腫の 2 つの特徴、すなわち、BCL6 蛋白の発現が有意に低下していることと、post GC phenotype への分化が認められること、の原因になっていると考えられる。

EB ウイルス陽性症例で、免疫組織化学的な BCL6 蛋白の発現が低下していた原因として、まず BCL6 遺伝子の somatic hypermutation 領域の遺伝子変異に着目した。それは、同領域の遺伝子変異の付加が BCL6 蛋白の発現を抑制するとの報告に基づく。しかし、BCL6 遺伝子変異の頻度は EB ウイルス感染の有無で差を認めず、また変異の有無と蛋白の発現との間に関連を認めなかったことより、BCL6 遺伝子変異が蛋白の発現を抑制するとの考え方は否定的であった。

そこで、EB ウイルス陰性の lymphoma cell line (FL-18)と、EB ウイルス陽性の cell line (FL-18-EB)を用いて、EB ウイルス感染が BCL6 蛋白の発現を抑制する機序を明らかにすることを試みた。FL-18 と FL-18-EB はともに BCL6 遺伝子の somatic hypermutation 領域に同一の変異を認めたが、BCL6 蛋白の発現は FL-18 のみに認めた。また、Northern hybridization 法により、FL-18 に

は BCL6 遺伝子の発現を認めましたが、FL-18-EB では認めなかった。この結果は、EB ウイルス感染が BCL6 mRNA の発現を抑制することを示しており、その結果 BCL6 蛋白の発現が抑制されていることが明らかになった。

もう 1 つ明らかになったことは、EB ウイルス陽性症例では VS38c, Syndecan1 の発現した post GC phenotype を多く認め、EB ウイルス感染が悪性リンパ腫の分化に関与している可能性を示したことである。この結果は、病理組織検体、cell line のいずれにおいても同様であった。BCL6 遺伝子は分化のスイッチとして機能し、GC B cell が memory B cell や plasma cell に分化する際にはその発現が抑制される。BCL6 蛋白の発現が恒常的となった結果、GC phenotype から分化できずに腫瘍化するのが通常の diffuse large B cell lymphoma の一部であるのに対し、EB ウイルス感染により BCL6 遺伝子の発現が抑制された結果、post GC phenotype への分化が誘導された lymphoma を EB ウイルス関連リンパ腫の一部と考えることができる。このような分化段階の調節に関与している EB ウイルス遺伝子が何であるかについては現時点では明らかではない。しかし、post GC phenotype を示した EB ウイルス陽性症例の多くが latency 3 であったことから、LMP1 遺伝子はその候補として挙げられる。今後、LMP1 遺伝子の遺伝子導入や LMP1 アンチセンスを用いた実験系で、分化段階がどのように変化するのかを確かめていく必要がある。

本研究では、EB ウイルス関連リンパ腫と p53 遺伝子異常との間に明らかな関連を認めなかったが、p53 遺伝子変異を有する症例では p53 蛋白の発現を強く認めること、野生型 p53 蛋白の発現が強い症例ではアポトーシスを多く認めることが明らかになった。また統計学的な有意差は認めないものの、EB ウイルス陽性症例では、BCL6 と p53 の遺伝子変異における transition の割合が高く、腫瘍の発生に何らかの役割を果たしている可能性が考えられた。

結語

EB ウイルス関連リンパ腫のうち latency 3 の症例では、免疫組織化学的な BCL6 蛋白の発現が低下していた。細胞株を用いた実験系で、EB ウイルス感染が BCL6 遺伝子の発現を抑制していることを証明した。また、BCL6 遺伝子の発現が抑制された結果、post GC phenotype への分化が認められた。Latency 3 の EB ウイルス感染は、B 細胞性リンパ腫において、分化と関連した遺伝子群の発現制御に重要な働きを有していることが明らかになった。