

論文題目 Analysis of Notch gene abnormalities in hematologic malignancies

造血器腫瘍における Notch 遺伝子異常の解析

指導教員 千葉 滋

東京大学大学院医学系研究科

平成 16 年 4 月入学

医学博士課程

内科学専攻

氏名 李 碩 瑛

Notch シグナルは種々の細胞で分化、増殖、細胞の運命の決定に重要な役割を

果たしている。Notch 1 遺伝子は正常な T 細胞の初期分化に必須である。発癌遺

伝子としての Notch の役割は、t(7;9)(q34;q34.3)染色体転座を持つヒト T 細胞

性急性リンパ性白血病(T-cell acute lymphoblastic leukemia, T-ALL)において、

Notch1 遺伝子が第 9 染色体上の転座点に位置し、第 7 染色体上の転座点に位置

する T 細胞抗原受容体遺伝子の発現調節領域によって、恒常的活性型 Notch1

タンパク質が発現されることから示された(Ellisen, et al, 1990)。その後マウス

を用いた実験でも、 $t(7;9)(q34;q34.3)$ 転座型 Notch1 が T-ALL を発症させることが示された(Pear, et al. 1996)。しかし $t(7;9)(q34;q34.3)$ 転座は、T-ALL 全体の 1%未満にしか見られない希な染色体転座であり(Look, レビュー)、またこれ以外のヒト腫瘍で Notch1 の構造異常を伴う染色体異常の報告もなかったことから、癌遺伝子としての Notch の臨床的意義は長い間不明であった。

$t(7;9)(q34;q34.3)$ 転座型 Notch1 の発見から 14 年を経て、Notch1 タンパク質に異常活性化を伴う Notch1 遺伝子の微小な変異が、小児 T-ALL の 50%以上で検出されることが示され、T-ALL の発症や進展に Notch1 遺伝子異常が重要な役割を演ずる可能性が改めて示唆された(Weng, et al., 2004)。この微小変異とは、多数例において、Notch1 タンパク質細胞外の二量体形成領域(heterodimerization domain, HD 領域) および PEST 領域(proline-glutamic acid-serine-threonine-rich; Notch 受容体のカルボキシル末端付近に位置し、polyubiquitin 化を受けてタンパク質分解に関与する領域) 付近をコードする部分をシークエンスすることで発見された。この変異は次のような意義をもつと考えられる。すなわち、生理的な細胞内 Notch シグナル伝達は、リガンドが結合することにより Notch 受容体の細胞外部分に切断(S2 cleavage) が生じ、細胞外領域が除去されることによって、残った Notch 分子がさらに細胞膜内で切断(S3 cleavage) を受け、細胞内領域(NICD) が細胞膜から遊離し、核内に

移行して転写活性化の引き金を引く。T-ALL では、Notch1 の HD においてアミノ酸の置換・欠失・挿入を伴う変化が、また PEST 領域（およびそのアミノ末端側）では、フレームシフトや点変異によって早期翻訳停止をおこす変異が検出される。安定的なヘテロ二量体形成の維持に関わっている HD 領域の保存された部位において変異がおこることにより二量体形成が不安定になり、細胞外サブユニットが乖離することによりリガンド非依存的に Notch1 の切断が起こる。また ubiquitin ligase の標的部位である PEST 領域の変異により、切断された Notch1 の半減期が延長する。いずれの変異でも、Notch1 シグナルが生理的なレベルを超えて活性化されると推測される。

この論文で私は、日本人小児 T-ALL 検体を用いて既報通り *Notch1* 遺伝子に高い頻度で変異が見出されるかを確認し、さらに成人 T-ALL 検体を用いて *Notch1* の HD 領域、および PEST 領域コード配列をシークエンスした。その結果、*Notch1* 遺伝子の活性型変異は小児 T-ALL で既報通り約 50% の頻度で見出された。また成人 T-ALL においても、37% という高い頻度で見出され、*Notch1* 変異による Notch1 シグナルの異常活性化は、小児・成人を問わず、T-ALL における共通の分子基盤であることが示唆された。

一方、Notch 受容体ファミリーの一つである *Notch2* は、マウスの成熟 B 細胞に高発現していて脾臓の辺縁部 B 細胞形成に重要であることが報告されてい

るが、B の発症において Notch2 シグナルの異常が何らかの意義を有するかについては全く不明だった。そこで私は、ヒト成熟 B 細胞の腫瘍である悪性リンパ腫 109 例において、Notch2 遺伝子の HD 領域および PEST 領域をコードする配列をシークエンスした。用いた悪性リンパ腫検体は、びまん性大細胞性 B 細胞性リンパ腫(diffuse large B-cell lymphoma, DLBCL) 3 例、濾胞性リンパ腫(follicular lymphoma) 18 例、辺縁帯 B 細胞リンパ腫(Marginal zone B cell lymphoma)または粘膜関連リンパ組織リンパ腫(mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma) 22 例である。リンパ腫の検体は診断用に生検した組織の残余であって、相当の正常細胞混入が予想され、ダイレクトシークエンス法で変異を検出する感度が低いと予想されたため、まず single-strand conformational polymorphism (SSCP) 法により変異候補サンプルを選択し、異常バンドをゲルから切り出して DNA を抽出し、ダイレクトシークエンスを行った。その結果、109 例中 5 例(4.6%)でアミノ酸変化を伴う変異が認められた。5 例のうち 1 例は PEST 領域をコードする配列において点変異により 1 アミノ酸置換を伴う変異であり、4 例は PEST 領域をコードする配列において一塩基の欠失またはノンセンス変異によって stop codon が生じ、PEST 領域の一部または全部が切断される変異であった。

変異を認めた症例はすべて DLBCL であった。これら変異を有する症例は免疫染色で、全て CD10 陰性、BCL6 陽性、MUM-1 陽性であった。CD10、BCL6、

MUM-1 の染色パターンにより、発現アレイ解析から同定される DLBCL の 2 病型[濾胞中心 B(GCB) 様細胞 DLBCL および活性化 B(ABC) 様細胞 DLBCL]を推定できるとされる。これに従えば、上述のパターンは ABC 様細胞 DLBCL の中の一部と分類される。

また高密度 SNP アレイを用いてゲノムコピー数の解析を行った結果、ノンセンス変異を有する 3 例中 2 例では、Notch2 のコピー数が増加しており、このうち 1 例では、変異アレルが高度に増幅していた。3 例のうち残り 1 例では Notch2 の総コピー数は正常だったが、変異アレルが重複し、正常アレルが失われていた。

検出された変異の機能への影響を検討するために Notch シグナル評価系として確立されているレポーターアッセイを行った。野生型、ノンセンス変異による PEST 領域切断型、および 1 アミノ酸置換型それぞれのヒト Notch2 (wtN2、nsmN2、rqN2) の cDNA を作製して CHO 細胞に導入後、各々の蛋白質を安定的に発現する独立した複数のクローンを樹立した。これらのレスポンダー細胞と刺激細胞 [CHO 細胞またはこれに全長ヒト Delta1 を発現させた CHO 細胞 (D1/CHO 細胞)] とを共培養し、Notch シグナル活性をルシフェラーゼ・アッセイにより検討した。刺激に CHO 細胞を用いた場合、nsmN2 および rqN2 は、wtN2 に比べてそれぞれ 5.2 倍および 3.7 倍の活性を示した。刺激に D1/CHO

を用いると、CHO を用いた場合と比べ、wtN2 は約 40 倍の活性を示し、nsmN2 および rqN2 は、さらにその 8.1 倍および 3.2 倍の活性を示した。

また、PEST 領域における変異により Notch2 細胞内領域の半減期が実際に延長しているかを検討するために、野生型 Notch2 細胞内領域(wtN2ICD)発現プラスミド、および PEST 領域を欠く Notch2 細胞内領域(dCN2ICD)発現プラスミドを作製し、これを CHO(r)細胞に一過性に発現させてパルスチェイス・アッセイを行った。3 時間チェイスの結果、PEST 領域欠失型において野生型より半減期が延長されていることが確認された。

私が行ったこれらの解析は、独立した複数の造血器腫瘍において、*Notch1* より *Notch2* それぞれの遺伝子異常がおこっており、その結果腫瘍細胞では生理的レベルを超えた Notch シグナルが伝達されていることを示すものであり、これらの遺伝子異常が腫瘍の発症または進展に関与していることを示唆するものである。現在、Notch シグナルが一つの治療の分子標的として注目されている。私の解析結果は、この可能性を支持するものと考える。