

審査結果の要旨

氏名 李 碩瑛

本研究は、造血器腫瘍において、lymphocyte developmentに非常に重要な役割を果たしている*Notch*遺伝子異常の有無とその意義を明かすことを目的とした。そのためにPCR-SSCP法やdirect sequencing法を用いた遺伝子変異の解析、その他種々のテクニックを駆使し、下記の結果を得ている。

1. 小児T-ALLの50%以上で活性型 *Notch 1* 遺伝子変異が検出されたことが報告されているが、成人T-ALLは必ずしも小児T-ALLと生物学的に同一ではないとの指摘もある。本研究で成人T-ALL検体を用いてheterodimerization(HD)領域、およびPEST領域におけるsequence配列をdirect sequenceを用いて検討した結果、37%という高い頻度で変異が見出された。同時に日本人小児T-ALLにおいても同様の解析を行い、48.5%で変異を見出したことから、日本人小児T-ALLにおいて海外からの報告を追試し得たと言える。
2. 次に、B細胞腫瘍において、マウスの脾臓辺縁部B細胞形成に重要である*Notch2*遺伝子の変異の有無およびその意義を検討した。びまん性大細胞性B細胞リンパ腫(DLBCL)、濾胞性リンパ腫、辺縁帯B細胞リンパ腫または腫粘膜関連リンパ組織リンパ腫において*Notch1*と同じ領域での変異の有無をPCR-SSCP法を用いてスクリーニングを行い異常なバンドの移動を認める症例に対しシーケンスを行った。その結果、109例内、5例でアミノ酸変化を伴う変異が認められた。4例ではPEST領域の一部または全部が切断される変異であり、1例ではPEST領域において1アミノ酸置換を伴う変異であった。変異の認められた症例はすべてDLBCLであり、免疫染色の結果、CD10-, BCL+, MUM1+ のactivated B cell-like DLBCLに分類された。
3. これらの変異*Notch2*の機能を検討するために*Notch*感受性ルシフェラーゼアッセイを行った。野生型*Notch2*及び検出された各変異を安定的に発現する細胞株を樹立後、刺激細胞と共培養しルシフェラーゼ活性を測定した結果、野生型*Notch2*に比べて変異型*Notch2*で有意義に高い活性が認められ、検出された遺伝子異常が活性型*Notch2*変異であることが示

- 唆された。これらのPEST領域における変異によって切断されたNotchの半減期が延長されるかを検討するために、 ^{35}S -labeling pulse-chase assayを行った結果、変異型Notch2において半減期の延長が認められた。
4. 活性型 *Notch2* 変異を伴う症例において、Affimetrix high-density oligonucleotide array (for SNP), Fluorescence *in situ* hybridization, Quantitative-PCRを用いてゲノムcopy数解析を行った。その結果、*Notch2*変異を伴う5例の内、2例でNotch2アレル総コピー数の増加を、1例でNotch2総アレル数の変化はないものの、変異アレルの重複と野生型アレルの欠失を認めた。総コピー数増加を認めた2例のうち1例では、変異を有するアレルが高度に増幅していた。

以上、本論文では造血器腫瘍における*Notch*遺伝子異常について解析を行い、T-ALLにおける活性型*Notch 1* 遺伝子変異に加えて、DLBCLにおいて*Notch 2* 遺伝子変異が存在することを明らかにした。特に、検出された*Notch 2*変異が活性型変異であり、なおかつ、*Notch 2*変異を有する対立遺伝子のcopy数増幅を証明することによって、不明であったB細胞腫瘍の発症における*Notch 2* シグナル異常の意義を明かしており、学位の授与に値するものと考えられる。