

論文内容の要旨

論文提出者氏名 隄 康彦

論文題目

Deletion or methylation of *CDKN2A/2B* and *PVT1* rearrangement occur frequently in highly aggressive B-cell lymphomas harboring 8q24 abnormality.

論文内容の要旨

Burkittリンパ腫やびまん性大細胞型B細胞リンパ腫(DLBCL)の一部を含む高悪性度B細胞リンパ腫では、8番染色体長腕q24 (8q24)異常が高頻度にみられる。8q24異常には通常*MYC*遺伝子が関与していると考えられており、このうちの一部は、同様にB細胞リンパ腫に特異的な遺伝子異常である*BCL2* (18q21)異常を伴うことがある。この*MYC*と*BCL2*異常を共存するリンパ腫を、WHO分類2008ではDouble-hit lymphoma (DHL)と分類し、DLBCLとBurkittリンパ腫の中間型(intermediate BL/DLBCL)と位置づけている。一方で8q24異常を有する悪性リンパ腫の経過や治療反応性は多様であり、免疫化学療法により寛解が得られる症例から、極めて予後不良の経過を辿るものまでである。我々は8q24異常を有するDHL症例を分子細胞遺伝学的に解析し、その臨床的特徴を検討した。

2006年4月から2012年9月の間にB細胞リンパ腫と診断された症例のうち、8q24異常を有するDHLと診断され、オリゴヌクレオチドアレイによるゲノムコピー数の評価が可能であった8例を解析した。リンパ腫細胞の採取部位はリンパ節と骨髄が各3例、滲出液(胸水)と口腔咽頭腫瘍が各1例であった。病型の内訳はBurkitt-likeリンパ腫が3例、DLBCLが5例であった。8q24異常の検出は、5例はG分染法またはspectral karyotyping (SKY)法で、3例はfluorescence in situ hybridization (FISH)法で行った。FISH法では、8q24における遺伝子再構成の検出のため、*MYC*プローブとBACクローンから作製した*PVT1*特異的プローブを使用した。また*IGH*転座、*BCL2*転座、*BCL6*転座、免疫グロブリン鎖転座ならびに*CDKN2A/2B*遺伝子欠失の検出のため、それぞれに特異的なFISHプローブを使用した。その結果、8q24異常は、4例(症例3、6、7、8)では*MYC*遺伝子領域内に、2例(症例2、5)では*MYC*よりテロメア側に存在する*PVT1*遺伝子内に切断点を認めた。症例1はlong-distance PCR法で*MYC*と*IGH*(C γ)の融合が確認され、症例4では*MYC*と*PVT1*の増幅(6-7コピー)を認めた。*BCL2*、*BCL6*プローブによる検討では、5例に*BCL2*異常(*BCL2-IGH*転座が4例、*BCL2*高度増幅(20コピー以上)が1例)を認め、また*BCL6-IGH*、*BCL6-IGL*転座をそれぞれ1例ずつ認めた。このうち1例(症例6)は*MYC*、*BCL2*、*BCL6*の全てに異常がみられた。

次にゲノムコピー数評価のため、リンパ腫細胞からゲノムDNAを抽出し、オリゴヌクレオチドアレイによる解析を行ったところ、5例(症例1、2、3、6、7)に9p21.3領域の欠失を

認めた。その共通する範囲は69kbに限局しており、この領域内には癌抑制遺伝子である*CDKN2A*(p14、p16蛋白をコード)と*CDKN2B*(p15蛋白をコード)のみが含まれていた。これらの症例のゲノムコピー数の変化についてFISH法で検討したところ、アレイで確認された症例2のホモ欠失と症例7のヘミ欠失は標識プローブのシグナルの減弱として観察され、ホモ欠失であった症例3と6では赤シグナルが1つ残存していた。アレイで欠失を認めなかった症例4、5、8ではFISH法でも異常を認めなかった。オリゴヌクレオチドアレイとFISH法の結果の不一致は、*CDKN2A/2B*遺伝子の欠失領域が非常に狭く、プローブの認識部位が残存していることが原因であると考えられた。メチル化特異的PCR法によるプロモーター領域のメチル化状態の検討では、症例4で*p16*のメチル化を、症例5で*p15*のメチル化を認めた。以上を総合すると、8例中7例で*CDKN2A/2B*遺伝子は欠失またはメチル化によって不活化していると考えられた。

予後の検討では、解析した8例はいずれも国際予後指標(IPI)で進行期であり、うち6例は診断時に節外性病変を有した。リツキサンを含んだ免疫化学療法により3例で寛解が得られたが、残り5例は病状が進行(PD)し、全8例の生存期間中央値は6.7か月であった。8q24(*MYC/PVT1*)と*BCL2*の両者の異常を認めたDHL5例のうち3例は治療抵抗性で極めて予後不良であった(生存期間はそれぞれ5.5か月、1.5か月、8か月)。残りの1例は治療開始3か月の時点で進行(PD)、1例のみ観察期間17か月の時点で完全寛解(CR)を維持していた。一方で*MYC*と*BCL6*の両者の異常を認めた2例は、いずれも最終観察時に3年以上(60か月、36か月)の長期寛解を維持していた。

今回の検討では8q24(*MYC/PVT1*)と*BCL2*の両者の異常をもつDHL5例では、全例に*CDKN2A/2B*遺伝子のプロモーター領域の欠失またはメチル化がみられ、8q24(*MYC/PVT1*)と*BCL2*の両者の異常をもつ典型的なDHLの予後不良に、*CDKN2A/2B*の不活化が関与している可能性を示唆するものであった。このことからDHLの予後推測と個別化治療のために、*CDKN2A/2B*の不活化の有無を評価することが重要であると思われた。しかし、市販のdual-color Vysis CDKN2A/CEP9 Probeを用いたFISH法では、*CDKN2A/2B*遺伝子の欠失を正確に評価することは難しく、同プローブを使用したFISH法は、オリゴヌクレオチドアレイ解析の代用となるものではないことが確認された。

*PVT1*についてのFISH法での検討では、症例2と5は*PVT1*内に切断点を有しており、多発性骨髄腫と同様にB細胞リンパ腫の8q24異常でも*MYC*以外に*PVT1*が関与するケースがあることが確認された。*PVT1*は非コード遺伝子であるが、バーキットリンパ腫の亜型であるt(2;8)およびt(8;22)において、免疫グロブリン遺伝子領域に転座し、*MYC*の発現が亢進することが報告されており、B細胞リンパ腫の8q24異常にも*PVT1*が重要な役割を担っていると考えられた。