

氏 名 (本籍) ほし の 野 あつし 敦

学 位 の 種 類 博 士 (医 学)

学 位 記 番 号 医 第 2807 号

学 位 授 与 年 月 日 平 成 7 年 9 月 13 日

学 位 授 与 の 条 件 学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当

最 終 学 歴 昭 和 60 年 3 月 26 日
東 北 大 学 医 学 部 医 学 科 卒 業

学 位 論 文 題 目 免 疫 グ ロ ブ リ ン 重 鎖 遺 伝 子 complementarity-
determining region 3 (CDR3) を 指 標 と し た B
細 胞 系 非 ホ ジ キ ン リ ン パ 腫 の 微 量 病 変 の 検 出

(主 査)

論 文 審 査 委 員 教 授 佐 々 木 毅 教 授 今 野 多 助

教 授 菅 村 和 夫

論文内容要旨

【目 的】

B細胞系非ホジキンリンパ腫について、免疫グロブリン重鎖 (IgH) 遺伝子再構成 gene rearrangement を利用した DNA 診断を用いて、微量病変の検出、特に骨髓への微量浸潤の有無を検索し、診断・治療の指標となり得るかを追求した。ここにおいて、Lumigen PPD を利用した非 RI 検出法を確立することを試み、その有用性を検討した。

【方 法】

検出条件の検討のため、B細胞系腫瘍細胞株である CCRF-SB を用いた。臨床検体は、B細胞系非ホジキンリンパ腫患者 7 例のリンパ節生検組織、骨髓穿刺液、末梢血等を用いた。リンパ節生検材料の凍結組織より、genomic DNA を抽出し、腫瘍細胞特異的な IgH の complementarity-determining region 3 (CDR 3) 領域を PCR にて増幅した。この時、増幅が行われやすいように、複数の PCR プライマーの組み合わせを用いた。増幅した CDR 3 領域を電気泳動にて分画後、抽出し、T-vector にサブクローニングし、塩基配列の解析を行った。これより各腫瘍細胞に特異的な PCR プライマーと検出プローブを決定した。

次に、微量病変の検索を目的とした骨髓、末梢血などから genomic DNA を抽出し、上記で作成した腫瘍細胞特異的な PCR プライマーを用いて各々の CDR 3 領域を増幅した。この PCR 産物を電気泳動後、ナイロンメンブレンにトランスファーし、上記の検出プローブでハイブリダイゼーションを行った。なお検出は Lumigen PPD による化学発光検出系を用いて行った。

【結 果】

- (1) CCRF-SB を用いた検出条件の検討では、RI と同等の検出感度が得られた。
- (2) 臨床検体では、7 例中 5 例で CDR 3 領域が増幅可能とされた。これらの例ではいずれも塩基配列が決定できた。
- (3) 微量病変の検出。いずれの例でも光顕レベルではリンパ腫細胞の浸潤が確認はできなかった。しかし、この 5 例中 3 例で、腫瘍特異的 CDR 3 領域の DNA を検出することが可能とされた。
- (4) 治療前後で骨髓穿刺液を得られた 2 症例中 1 例で、治療後も骨髓中に腫瘍細胞特異的 DNA が検出された。この例は再燃した。一方、治療後に寛解を維持した例では、治療後も骨髓中に腫瘍細胞特異的 DNA を検出しなかった。

【考 察】

B細胞系非ホジキンリンパ腫は、B細胞系急性リンパ性白血病に比較して、IgHの gene rearrangementがPCRにて増幅しにくいとされている。方法では増幅プライマーの組み合わせを複数用いることでこれに対応し、7例中5例で増幅可能とした。特に diffuse, large cell typeでは4例中4例が増幅可能であり、本法の有用性を示唆するものと思われる。

本法での検出感度は、CCRF-SBによる希釈系列では 10^{-5} の程度までシグナルが認められ、RIと同等の感度と推定された。臨床検体においては、陽性対象の希釈系列を用いた成績より、 10^{-3} ～ 10^{-5} の範囲で検出可能と推定された。光顕レベルで腫瘍細胞が確認できなかった5例中3例で腫瘍細胞特異的DNAが検出され、すなわち、腫瘍細胞の微量浸潤が存在していたと診断された。経過の追えた2例では骨髄中の微量病変の存在が、臨床経過と良く対応していると考えられた。

今後、より多くの症例で、本法を用いることにより、腫瘍細胞の骨髄浸潤の臨床的意義を明らかにすることが可能とされよう。また、悪性リンパ腫の分子生物学的アプローチによる本態の把握においても、手懸かりを与え得るものと思われる。さらに、自家骨髄移植や末梢血幹細胞移植時の、微量病変混入の検出や、ex vivo purgingの効果判定などにも、本法の応用が期待し得るものと考ええる。

【結 論】

1) IgHの gene rearrangementを指標としてB細胞系非ホジキンリンパ腫のDNA診断の確立を計った。本法により、B細胞系非ホジキンリンパ腫の微量病変、特にその骨髄浸潤を検索することが可能とされた。

2) 臨床経過と本法による骨髄での腫瘍細胞浸潤の検索成績がよく対応した例が認められ、高感度の微量病変検出法の臨床上における有用性が示唆された。

審査結果の要旨

悪性リンパ腫における治療方針の決定及び治療効果の判定には、微量の、あるいは残存する異常細胞の存在を把握することが重要である。本研究では各々の症例に特異的な免疫グロブリン重鎖 (IgH) CDR3 領域の DNA を増幅し、これを指標として微量病変の検出を計った。特に骨髄等において異常細胞の浸潤の有無を検索し、この DNA 診断が同疾患の診断・治療において有用であるかを追求した。まず本疾患における DNA 診断を以下の事項を検討することにより確立した。すなわち (1)Luminogen PPD を利用した非 RI による検出方法の開発、(2)症例特異的プローブとなる CDR3 領域 DNA を効率よく得るために複数のプライマーを用いた PCR の検討、(3)B 細胞クローンを用いて、腫瘍特異的 DNA 検出のための基礎条件の検討を行った。これらにもとづき以下の成績を得た。

- ① B 細胞非ホジキンリンパ腫 7 例中 5 例で CDR3 領域の増幅が可能とされ、いずれでも同領域の塩基配列が決定できた。
- ② 微量病変の検出。いずれの例でも顕微鏡レベル等ではリンパ腫細胞の骨髄、末梢循環での存在を確認できなかった。しかし、この中の 3 例の骨髄において、症例特異的な DNA の検出により異常細胞の存在が証明できた。
- ③ 治療前後で骨髄穿刺液が得られた 2 症例はいずれも肉眼的に異常細胞は検出されなかった。このうちの 1 例では、治療後も骨髄液中に異常細胞特異的 DNA が検出された。この例は間もなく、臨床的にリンパ腫の再燃が確認された。一方、治療後も骨髄中に異常細胞特異的 DNA を検出しなかった例は、臨床上で寛解を維持している。

これらの知見は、リンパ腫で IgH CDR 領域が PCR では増幅されにくいとする技術上の問題点を一部は克服しうることを示す。その結果、従来は困難とされたリンパ腫の微量病変の検出を本法により可能となることを示している。本法は特異性も高く、本診断の臨床上で有用性が期待される。と同時に、preliminary な成績ではあるが、異常細胞の残存とリンパ腫例の予後がよく相関することより、DNA 診断が臨床上で意義が高いことが示唆される。本法の開発により腫瘍細胞の骨髄浸潤の臨床的意義が更に明らかとされることが期待できよう。また、悪性リンパ腫の分子生物学的アプローチによる本態の把握においても、有用な手段となるものである。今後、自家骨髄移植や末梢血幹細胞移植の臨床応用が急速に進展すると推定されている。ここで採取した幹細胞分画での微量病変混入の検索や、ex vivo purging の効果判定などにおいて、本法の応用が期待し得る。

以上より、非ホジキン型 B リンパ腫の診断に有用な DNA 診断法の開発、確立を行った研究とされ、医学博士学位論文として適当であるとみなされる。