

日本財団補助金による

1997年度財団法人日中医学協会助成報告書

—調査並びに研究に対する助成—

1998年3月10日

財団法人 日中医学協会

理事長 中島章殿

研究代表者氏名 佐藤 栄一
所属機関名 鹿児島大学医学部病理学第2
職名 教授 年齢 64 才
所在地 〒890-8520 鹿児島市科野5丁目35-1
電話 099-275-5267 内線 _____

1. 研究課題

日本と中国に於けるウイルス関連悪性腫瘍の病理疫学的比較研究

日本と中国の胃のB細胞性悪性リンパ腫の腫瘍細胞の免疫グロブリン重鎖遺伝子 (IgH) について polymerase chain reaction (PCR) による分子病理学的検索を行った。材料は、中国の9例の胃B細胞性悪性リンパ腫と日本の6例の胃のリンパ腫と2例の節外性リンパ腫のホルマリン固定パラフィン包埋切片である。DNA抽出には、脱バラ後に核染し実体顕微鏡下で少数個の細胞を採取するかその組織から目的の細胞を剃刀で削ぎ取り、proteinase Kで消化しDNAを抽出する方法、TAKARA DEXPAT™で直接DNAを抽出する方法の何れが適当な長さのDNAが得るのに適法であるかを検討した。IgHのPCRは、Fr2AとLJH、Fr3AとLJHのprimersを用いて、2 times PCR法で行った。中国の胃リンパ腫と日本の胃と節外性リンパ腫から抽出したDNAには、Fr2A-LJHのPCRで検出出来るだけの長さのDNAが遺残していないことが明らかになった。Fr3A-LJHのPCRで、中国の胃リンパ腫では1例で、日本の胃と節外性リンパ腫では4例で特異なDNA増幅が見られた。日本のリンパ腫で特異な長さのDNA増幅が見られなかった例のMALT型2例では幅広いDNA増幅を、MALT型1例と節外性1例(多発性骨髄腫)では全くDNA増幅が見られなかった。従って、中国の胃B細胞リンパ腫には、免疫グロブリン軽鎖遺伝子の異常がある可能性が示唆された。増幅されたDNAの核酸塩基配列の検索をdye-terminator法で行い、日本の胃のリンパ腫の2例で、通常は抗体産生のない物質とのDNAレベルで高いホモロジーが認められ、胃のB細胞性リンパ腫の細胞起源として免疫監視機序より逃れた異常クローンが想定された。

2. 研究期間 自 _____年____月____日 ~ 至 1998年3月15日

3. 研究組織

日本側研究者氏名 蓮井 和久 (43才)
所属機関 鹿児島大学医学部病理学第2 職名 講師
中国側研究者氏名 賈 巴 蓉 (54才)
所属機関 中国医科大学病理学教室
分子病理研究室 職名 教授

1997年度日中医学協力事業助成（調査並びに研究に対する助成） 報告書

研究代表者 佐藤栄一 (鹿児島大学医学部病理学第2講座・教授)
 日本側共同研究者 蓮井和久 (鹿児島大学医学部病理学第2講座・講師)
 中国側共同研究者 賈心善 (中国医科大学病理学教室分子病理研究室・教授)

研究課題 日本と中国に於けるウイルス関連悪性腫瘍の病理疫学的比較研究

研究報告

この研究では、日本と中国に於けるウイルス関連悪性腫瘍の分子病理学的特徴の比較研究を実施に
 に必要な技術習得とその技術の応用の可能性を模索する為に、胃の悪性リンパ腫を用いて、リンパ腫細胞
 の遺伝子の解析法を検討した。この研究は、将来的には、single cell PCR (polymerase chain reaction)による
 非腫瘍性B細胞やT細胞の認識する抗原をDNAレベルで解析する研究発展するものである。

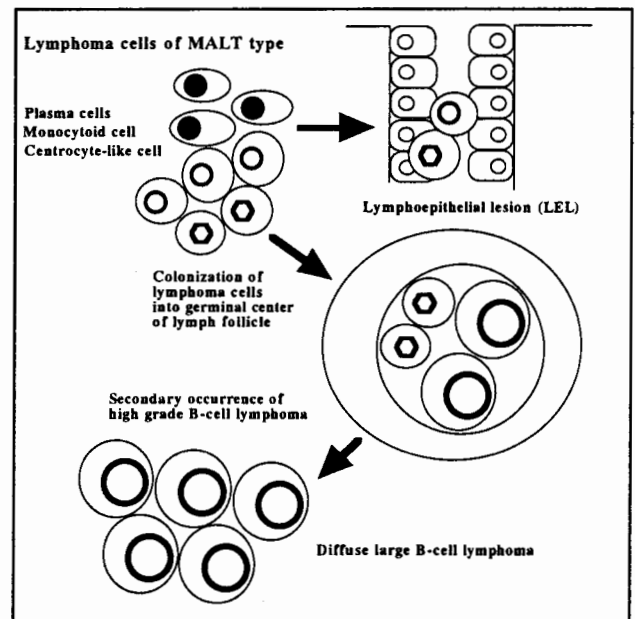
節外性B細胞性リンパ腫のリンパ腫細胞の免疫グ
 ロブリンの重鎖のCDRIII可変領域をpolymerase
 chain reaction (PCR)で増幅し、増幅DNAのシークエ
 ンスを行う方法が、既に、紹介されている(湯本典
 夫他、病理と臨床 vol. 14 臨時増刊号, 1996)。

胃悪性リンパ腫の組織像は、右図に示す様に、リン
 パ腫細胞がmonocytoid cells, centrocyte-like cellsと
 plasma cellsから成り、部位によりリンパ腫細胞の構
 成が異なる特徴がある。リンパ腫細胞は腺管へ浸潤
 し、リンパ上皮性病変 (lymphoepithelial lesion: LEL)
 を形成する。この組織像を呈する胃リンパ腫はlow-
 grade mucosa-associated lymphatic tissue (MALT)型と
 呼ばれる。更に、centrocyte-like cellsは反応性リンパ
 装置の濾胞胚中心に侵入(colonization)し大型化す
 る、そして、high-grade MALT型リンパ腫への形態
 転換が起こる。一方、ヘリコバクター・ピロリー菌
 (HP) の感染による胃粘膜免疫の賦活が、
 胃のlow-grade MALT型リンパ腫の発生に
 強く関与し、HPへの免疫の陰で、免疫的
 な癌発生の監視機構の乱れが示唆されて
 いる。

従って、この研究は、胃リンパ腫の腫
 瘍細胞の構成が異なる部位別にDNA抽出
 する方法を試み、リンパ腫細胞の免疫学
 的特徴として、免疫グロブリン重鎖遺伝
 子の可変領域の検索(Kurosaki K et al, Labo-
 ratory Investigation 74(3):609-616;1996)を
 企図した。

材料

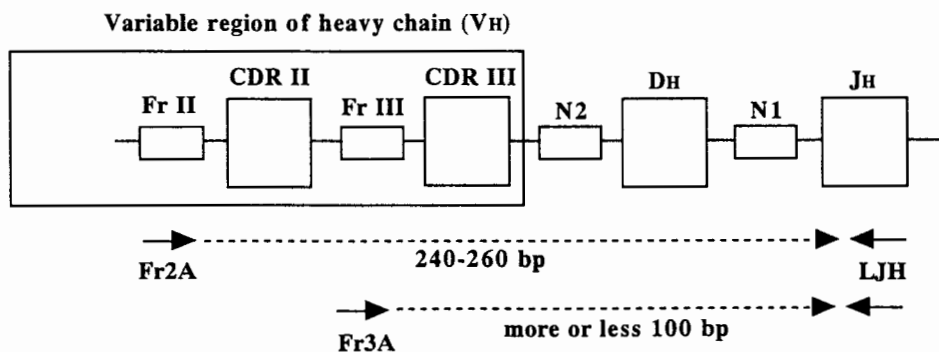
材料は、右表に示す9例の中国胃リン
 パ腫と日本の6例の胃リンパ腫と2例の



検索症例

DNA抽出	組織型	実体顕微鏡下切片採取
中国例 (胃悪性リンパ腫)		
1, No. 1 69321	Typical, low-grade MALT	1
7, No. 7 52953	Low-grade MALT	8, 9, 10
4, No. 4 104176	Immunocytoma	4
9, No.10 95470	Early phase of High grade MALT	13, 14
2, No. 2 93461 -1	Diffuse large B-cell ML (CB-like)	2
5, No. 5 108605 -1	Diffuse B-cell ML (High grade MALT)	5, 6
6, No. 6 47699-5	Diffuse large B-cell ML	7
8, No. 8 54764	Diffuse large B-cell ML	11, 12
3, No. 3 99907	Anaplastic B-cell lymphoma (HD-like)	3
日本例 (胃リンパ腫)		
4, No.5 II962778-1,-2	Quite early MALT	7, 8
2, No.2 II951468-4	MALT (intramucosal lesion)	2, 3, 5
3, No.4 II896485-14	MALT	6
1, No.1 S95-1309-16	Diffuse large B-cell lymphoma	1
5, No.6 II950587-6	Diffuse large B-cell ML a)	8, 9
6, No.7 S910069-2	Diffuse large B-cell ML	10
日本例 (節外性)		
7, C-1 P85-5063	Multiple myeloma (BM)	11
8, No.8 S902376	Immunocytoma (LN)	12

Primers of PCR detecting rearranged immunoglobulin heavy chain gene



節外性リンパ腫(多発性骨髄腫を含む)である。

中国の9例の胃リンパ腫は、immunocytomaを入れて3例のlow-grade MALT型リンパ腫と6例のhigh-grade MALT型とその他のリンパ腫であった。日本の胃リンパ腫は3例のlow-grade MALT型リンパ腫と3例のhigh-grade MALT型とその他のリンパ腫であった。

免疫グロブリン重鎖遺伝子のPCR

免疫グロブリン重鎖(IgH)遺伝子の可変領域は、上図に示す様に、Fr I-CDR I-Fr II-CDR II-Fr III-CDR IIIから成る。この可変領域を含むPCRのprimersの組み合わせが公表されている(Ramasamy I et al. J Clin Pathol 1992;45;770-775)。Fr2AとLJHのprimersでは、CDR IIとIIIを含む増幅DNAは240~260bpの長さであり、非特異な100bp前後のDNA増幅もあることが明らかにされている。このprimersの組み合わせによるPCRでは、B細胞性リンパ腫の検索において、リンパ腫細胞がリンパ濾胞胚中心細胞より未分化であるのか否かをsomatic mutationにて知ることが出来る(田丸淳一他, 日本網内系学会誌 35(3・4); 1995;181-186)。また、Fr3AとLJHの組み合わせのPCRでは、30~60bpの再構成CDR IIIの長さの検索も可能である(Kurosu K et al, Laboratory Investigation 74(3);609-616;1996)。

DNA抽出

DNAの抽出方法は、以下の3つの方法を試みた。
a) 脱バラ後、ヘマトキシリンで核染し、実体顕微鏡下で目的リンパ腫細胞を少数個(100個レベル)で、ガラスプローブ(パスツールピペットの細い部分をガスバーナーで加熱し、引き伸ばしながら細くして切断して作成)で、100 μ l用PCR用チューブの中の10 μ lの200mg/ml proteinase K TRIS緩衝液中に細胞を採取する。37 $^{\circ}$ C 3時間のincubation後に、PCR装置で、94 $^{\circ}$ C 10分間で、proteinase Kを失活させた。そ

の10 μ lを、DNA template溶液とし、PCRを行う。

b) 上記の少数の細胞を採取した残りのリンパ腫組織を剃刀でそぎ取り、100 μ lの200mg/ml proteinase K TRIS緩衝液中に採取する。37 $^{\circ}$ C overnight以上のincubation後に、100 $^{\circ}$ C 3~5分間の加熱でproteinase Kを失活させる。その上清5 μ を、DNA template溶液とし、PCRを行う。

c) 3 μ m厚さの切片数枚を、1.5mlチューブに取り、TAKARA DEXPATTMで、PCR用DNA template溶液を採取する。その溶液の5 μ lをPCRに用いる。

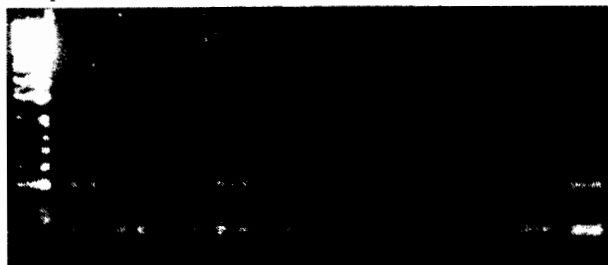
Fr2A-LJHのPCRの結果

上記のa)のDNA抽出法で、検索症例切片からDNAを採取した。そして、Fr2A-LJHのPCRを、predenature 94 $^{\circ}$ C 5min., 30サイクルのdenature 94 $^{\circ}$ C 30s, annealing 55 $^{\circ}$ C 30s, extension 72 $^{\circ}$ C 30sとpost-extension 72 $^{\circ}$ C 5min.の2 times PCR法で行った。2回目のPCRのDNA templateは、1回目のPCR産物の100倍

中国の胃リンパ腫のa)DNA抽出法によるFr2A-LJHの2 times PCRの産物の電気泳動、左より、Marker 9とSample 1 to 14 (検索症例表参照)



日本の胃と節外性リンパ腫のa)DNA抽出法によるFr2A-LJHの2 times PCRの産物の電気泳動、左より、Marker 9とSample 1 to 3と5 to 12 (検索症例表参照)



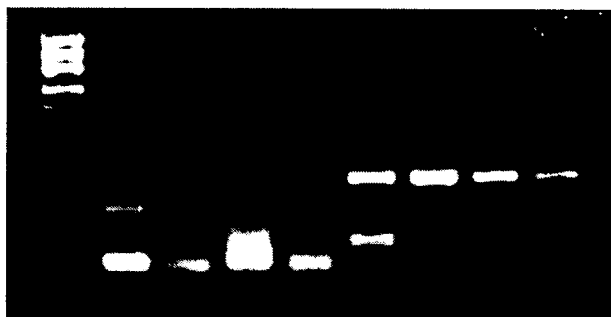
希釈溶液である。中国の胃リンパ腫でも日本の胃と節外性リンパ腫でも、240~260bpの特異な増幅DNAは得られなかった。

フォルマリン固定の影響と長期のブロックの保存による遺残DNAが非常に短くなっていることが示唆された。因みに、日本の胃と節外性リンパ腫の少数例では、100bp前後の非特異なDNAの増幅が確認された。

human β -globin遺伝子のPCR (切片中の遺残DNAの長さの検討)

human β -globin遺伝子のprimersの組み合わせによるPCRで、中国の胃リンパ腫のb)とc)法で抽出したDNAを用いて、切片中の遺残DNAの長さの検討を行った。その結果、中国の胃リンパ腫の切片には、少なくとも110bp前後の長さのDNAしか残っていないことが明らかになった(日本例でも同様)。

中国の胃リンパ腫症例6と8のb)とc)法による抽出DNAのhuman β -globin遺伝子のGH20-21 (増幅DNAは408bpと204bp)とPC03-04 (増幅DNAは110bp)のPCRによる抽出DNAの長さの検討



左より、Marker 9、GH20-21のPCR (左より、症例6のb)法とc)法、症例8のb)法とc)法)とPC03-34のPCR (左より、症例6のb)法とc)法、症例8のb)法とc)法)

Fr3A-LJHのIgHのPCR

中国の胃リンパ腫切片からc)法で抽出したDNAと日本の胃と節外性リンパ腫のa)法で抽出したDNAで、Fr3A-LJHのIgHのPCRを行った。

中国例では、1例(症例5)で100bp前後の増幅DNAを認めた。症例5は、びまん性大細胞性B細胞性リンパ腫であるが、粘膜にLELを示す小型リンパ

中国の胃リンパ腫のc)DNA抽出法によるFr3A-LJHの2 times PCRの産物の電気泳動、左より、Marker 9 とcase 1 to 10 (検索症例表参照、case 10は胃癌)



腫細胞を認め、high-grade MALT型リンパ腫とされるものであった。Fr3A-LJHのPCRで特異な長さのDNA増幅が認められることは、monoclonalな増殖を示す。

IgH遺伝子のFr3A-LJHのPCRで特異な長さのDNA増幅が認められないB細胞性リンパ腫が多い中国の胃悪性リンパ腫には、狭義のlight chain diseaseと他の癌遺伝子とight chain 遺伝子の再構成による遺伝子異常が存在する可能性が示唆される。

日本の胃と節外性リンパ腫では、sample 3、5、8、9、10、12で、100bp前後で増幅DNAを認めた。

sample 7は、monocytoid cellsがリンパ濾胞周辺部に出現し早期のMALT型リンパ腫とされた部位から抽出されたDNAであり、明らかなDNA増幅が認められなかった。リンパ濾胞周辺部に出現するmonocytoid cellsは、未だIgH遺伝子の再構成が起こっていない前リンパ腫細胞ないし反応性細胞である可能性が示唆された。

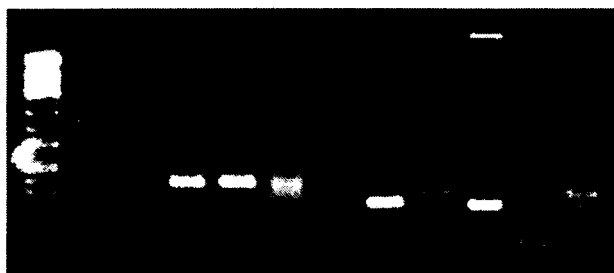
sample 2, 3, 5 は、症例2の粘膜病変の異なる部位から抽出されたDNAである。sample 3と5で100bp前後の同長のDNA増幅が認められたが、sample 2ではより短い幅広いDNA増幅が見られた。MALT型リンパ腫のリンパ腫細胞にはclonalな成分とpolyclonalな成分から成る粘膜病変があることが示唆された。

sample 8は、症例5の胃壁内のびまん性大細胞性B細胞性リンパ腫組織から抽出されたDNAである。sample 9はこのリンパ腫の所属リンパ節転移部位からのDNAである。sample 8は60bp前後の明瞭なDNA増幅を、sample 9は60bp前後のDNA増幅を示し、優勢な壁内リンパ腫細胞と異なるクローンが所属リンパ節に転移増殖していることを示唆した。

sample 11はmultiple myelomaの骨髄からのDNAであるが、特異なDNA増幅は認められず、light chain diseaseが示唆された。

sample 12は節外性のimmunocytomaの抽出DNAであるが、80bp前後と60bp前後のDNA増幅が見られ、ologoclonalなリンパ腫細胞であることが示唆された。

日本の胃と節外性リンパ腫のa)DNA抽出法によるFr3A-LJHの2 times PCRの産物の電気泳動、左より、Marker 9 とSample 1 to 3 と5 to 12 (検索症例表参照)



J10 Fr3AでのDNA配列解析結果とLJHの相補的DNA配列とのMaximum matching

```

1  GNGAGANANNAGAGNGAGANNTCGTGNGTGGGCGTGGGCGCACNNGGGACN      50
-54 .....
51  CNNNGGGNACACGCGNTCTCTCTACAA.....      100
    ||  ||| ||  ||| ||  ||
-4  .....GGT-CAC-CGT-CTC-CT-CA.....      45
    
```

J10 LJHでのDNA配列解析結果とFr3Aの相補的DNA配列とのMaximum matching

```

1  TACCCAACNCTGTCGCCCTTTTATCCTCGCACAAAGTAATACACAGCCCG      50
                                ||| | ||||| ||| |
-30 .....ACA-GYAATACANNGCC-G      19
51  TGTA.....      100
    |||
20  TGT.....      69
    
```

J10のDNA配列のJ10 Fr3AとJ10 LJHの解析配列を基に決定したDNA配列とのホモロジー検索結果

DNASIS
Maximum Matching [J10 Fr3A -43(CORRECTED) VS HUMDMKIN 11300-11330]

```

File1: J10 Fr3A -43(CORRECTED)
Mode: Normal          1 -      43
File2: HUMDMKIN 11300-11330
Mode: Normal          1 -      43
    
```

Matching Percentage (Total Window: 63%, Alignment Window: 64%)

```

0  .GCGAGATAAAAGAGGGAGACATCGTGTGTGGGCGTG-G-GCGCAC....      49
    ||| | ||||| ||| | ||||| ||| | | |||
1  TTTGAGC-ACCAGAGGGA--CATAGGGTGTGTTAGTGTGTGAGCAC....      50
    
```

免疫グロブリン重鎖遺伝子の
Fe3A-LJH のPCR の
増幅DNAのシーケンス

前記のFr3A-LJHのPCRで増幅されたDNAの核酸塩基配列の解析を、direct法のdye-terminater法で検討した。direct法とは、DNA組換え過程を含むDNAクローニング法を利用しない方法で、特異なprimersが準備可能なPCRの増幅DNAの解析に利用出来る方法である。dye-terminater法は、A、T、C、Gの核酸塩基に対応し蛍光色素で標識され類似物質がDNA合成に用いられると、それ以降のDNA合成が行われないことを利用し、片側のサイクルPCRを行い、DNAの核酸塩基配列を知る方法である。

中国の症例5、日本の症例2のsample 3と5、症例5のsample 8と9、症例6のsample 10、症例8のsample 12のFr3A-LJHのPCRで増幅されたDNAの全量を4% agar-geldで電気泳動し、DNAバンドをゲルごと切り出し、TAKARA SUPREC01を用いて、

DNAを回収した。そのDNAの核酸塩基配列を検索した。

DNAの配列がある程度判明したのは、日本の症例5のsample 8と症例6のsample 10であった。

日本の症例6のsample 10のFr3AとVLJHをprimerとする両方向の解析では、上図に示した様に、Fr3AとLJHがおよそ判読されていた。その判読された2本のDNA配列よりNと表記された不明部位を修正し、DYNASISによるホモロジー検索を行った。その結果、このDNA配列は、human myotonic dystrophy kinase (DM kinase) gene (HUMDMKIN) の11300前後のDNA配列と72.7%のmatching%を示した。図に示したのは、Maximum matchingの結果である。

また、症例5のsample 8のFr3AとVLJHをprimerとする両方向の解析では、Fr3Aでの解析でしかLJHと相補的DNA配列は判読されなかったため、Nと表記された判読不明の配列が多かったが、この配列のホモロジー検索を行い、H. sapiens (D13S260) DNA

segment containing (CA) repeat (HA177XF4)の310-360の配列と50.0%の、Human ornithin decarboxylase (ODC) gene, 5' flanking reion (HUMORNDECA)の530-570の配列と51.9%のMatching%を得た。

日本の胃のリンパ腫の症例5と6のリンパ腫細胞の免疫グロブリン重鎖遺伝子の可変領域(CDR3)は本来抗体産生のない生体の成分とDNAレベルで近似した配列を示し、胃のB細胞性悪性リンパ腫の細胞起源として、免疫監視機序より逃れた異常クローンが想定された。

核酸塩基配列の解析が出来なかったsampleは、ホルマリン固定パラフィン包埋と長期の保存によるDNAへの影響が考えられると共に、胃や節外性リンパ腫がクローン内でも遺伝子の再構築がon-goingの状態にある可能性も示唆した。

考察

この研究の過程で、以下の点が明らかになった。

1) フォルマリン固定パラフィン包埋切片からDNAを抽出して検索を行ったが、切片中の遺残DNAは予想以上に短いDNAである。可能な限り、新しい症例での検索が望まれる。また、凍結標本での検索が最も良い結果が出ると思われる。

2) DNA抽出方法として、実体顕微鏡下でガラスプローブを用いる方法は、一組のprimersのPCRでしか検索出来ないが、singel cell PCRと通常の切片単位のPCRの中間にある方法であり、病理組織所見と対応した解析が行えて、今後、頻繁に利用される技術と思われる。

3) 免疫グロブリン軽鎖遺伝子の異常や再構成を検索する方法の開発が必要である。

4) PCRで増幅されたDNAの核酸塩基配列の解析の利用範囲が、single cell PCRの技術の確立により、非腫瘍性B細胞が検索対象となり、種々の免疫機序の関与する病変の組織分子病理学的研究分野を開くものと思われる。

5) 同様の方法で、T細胞での抗原受容体の解析には、 β 鎖ではレパトリーのレベルが問題であり応用出来ないが、 γ 鎖では応用出来る可能性があることが、文献的に明らかになった。

要約

日本と中国の胃のB細胞性悪性リンパ腫の腫瘍細胞の免疫グロブリン重鎖遺伝子(IgH)のpolymerase chain reaction(PCR)による分子病理学的検索を行った。材料は、中国の9例の胃B細胞性悪性リンパ腫と日本の6例の胃のリンパ腫と2例の節外性リンパ腫のホルマリン固定パラフィン包埋切片であ

る。DNA抽出には、脱パラ後に核染し実体顕微鏡下で少数個の細胞を採取するかその組織を剃刀で削ぎ取る方法でproteinase Kで消化しDNAを抽出する方法、TAKARA DEXPATTMで直接DNAを抽出する方法を試みた。IgHのPCRは、Fr2AとLJH、Fr3AとLJHのprimersを用いて、2 times PCR法で行った。中国の胃リンパ腫と日本の胃と節外性リンパ腫から抽出したDNAには、Fr2A-LJHのPCRで検討出来るだけの長さのDNAが遺残していないことが明らかになった。Fr3A-LJHのPCRで、中国の胃リンパ腫では1例で、日本の胃と節外性リンパ腫では4例で特異なDNA増幅が見られた。日本のリンパ腫で特異なDNA増幅が見られない例のMALT型2例では幅広いDNA増幅を、MALT型1例と節外性1例(多発性骨髄腫)では全くDNA増幅が見られなかった。従って、中国の胃B細胞リンパ腫には、免疫グロブリン軽鎖遺伝子の異常がある可能性が示唆された。増幅されたDNAの核酸塩基配列の検索をdye-terminater法で行い、日本の胃のリンパ腫の2例で、通常は抗体産生のない物質とのDNAレベルで高いホモロジーが認められ、胃のB細胞性リンパ腫の細胞起源として免疫監視機序より逃れた異常クローンが想定された。

謝辞

この検索の実施にあたり、免疫グロブリン重鎖遺伝子のPCRについて多くの情報を提供して下さった田丸淳一先生(千葉大学一病理、三方淳男教授)に、PCR産物のDNA配列の検索法の解説をして頂いた古河龍彦先生(鹿児島大学腫瘍研、秋山伸一教授)に、DNAのdye-terminater法の検索に全面的に協力して頂いた中川正法先生(鹿児島大学三内科、納光弘教授)に、著者らは深謝致します。

DNA抽出方法は、皮膚リンパ腫研究学会の機関誌に症例報告の形で、現在、印刷中であり、また、日本樹状細胞研究会の機関誌であるDENDRITIC CELLSにも症例報告の形で印刷の予定である。この報告の内容は、平成10年3月の時点で、未発表である。



スナップ写真（左より、買教授、佐藤教授、蓮井）