

氏名（本籍）	松原 理絵		
学位の種類	博士（医学）		
学位記番号	博甲第	7453	号
学位授与年月	平成 27 年 3 月 25 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当		
審査研究科	人間総合科学研究科		
学位論文題目	Detection of the G17V <i>RHOA</i> mutation in angioimmunoblastic T-cell lymphoma and related lymphomas using quantitative allele-specific PCR (血管免疫芽球性 T 細胞性リンパ腫の疾患特異的な遺伝子 異常を利用した新規診断方法の確立)		
主査	筑波大学教授	医学博士	二宮 治彦
副査	筑波大学教授	博士（医学）	西山 博之
副査	筑波大学教授	博士（医学）	野口 恵美子
副査	筑波大学准教授	博士（医学）	矢作 直也

## 論文の内容の要旨

### (目的)

血管免疫芽球性リンパ腫 (Angioimmunoblastic T-cell lymphoma; AITL) は悪性リンパ腫の一種である。AITL は腫瘍細胞比率が低いことなどから、病理診断が困難な症例がしばしば存在した。AITL 疾患特異的な遺伝子異常、G17V *RHOA* 変異が報告されている。これは、AITL および末梢性 T 細胞性リンパ腫分類不能型 (Peripheral T-cell lymphoma, not otherwise specific; PTCL-NOS) の一部にのみ高頻度に検出され、他の造血器腫瘍では検出されない。本研究は、本遺伝子異常を検出する新規検出システムの構築を図ることを目標とした。

### (対象と方法)

- 1) AITL および PTCL-NOS 患者リンパ節由来 108 例、骨髄系腫瘍、他の T 細胞性腫瘍、B 細胞性リンパ腫 180 例のゲノム DNA を抽出した (合計 288 例)。
- 2) G17V *RHOA* 変異部位を Forward primer の 3' 端となるように mutation-specific primer を作成した。Wild-type primer は変異のない配列に沿って設計した。Reverse primer は共通とし、73bp の産物が出来るよう設計した。
- 3) *RHOA* 遺伝子を pBluescript へとサブクローニングし、mutant と Wild-type のそれぞれの cDNA を

含んだ plasmid を得た(mut/pBS RHOA, wt/pBSRHOA)。

4) 本解析系の感度は、mut/pBSRHOA および wt/pBSRHOA を混合し、人為的に 100%, 10%, 1%, 0.1%, 0.01%の濃度のサンプルを作成し、realtime PCR により評価した。

5) 1)由来で得られたゲノム DNA をテンプレートとし、4)と同様それぞれ mutant primer および wild-type primer で realtime PCR を行った (それぞれの値を[mut], [wt]とする)。[mut]/([wt]+[mut]) value を計算し、カットオフ値は ROC 曲線を利用し 0.015 に設定した。

6) 次世代シーケンサーMiSeq と比較した。

#### (結果)

mut/pBSRHOA および wt/pBSRHOA を混合した plasmid における感度は、0.1%まで検出できた。[mut]/([wt]+[mut])は、 $7.9 \times 10^{-5} \sim 1.8 \times 10^{-1}$ の間で分布していた。カットオフ値を 0.015 と設定したとき、AITL および PTCL-NOS 以外の骨髄系腫瘍、T 細胞性腫瘍、B 細胞性リンパ腫はすべてカットオフ値以下を示し。次に、AITL および PTCL-NOS 由来のゲノムについて値を比較したところ、ホルマリン固定 (FFPE) 由来のサンプルでは有意に偽陰性率が高く、FFPE 由来ゲノムを除いた 95 サンプルで解析した。95 サンプルにおいては、MiSeq を基準とすると、感度 94.7%、特異度 96.5%であった。95 サンプル中 4 サンプルで MiSeq との乖離が見られた。リンパ腫生検サンプルにおいて、大半が FFPE 由来であるため、nested-PCR の理論を応用し、下記のような解析系を追加で設計した。1) FFPE 由来ゲノムをテンプレートとして、AmpliTaq Gold 360 および新規に設計した mutation specific primer よりも外側の primer 対を用いて、予め PCR で増幅産物を作製。2) この産物の濃度を Qubit fluorometer で測定し、 $1.0 \times 10^{-2} \text{ng}$  となるよう調整。3) これらの産物を上記解析系と同様に、[mut]/([wt]+[mut])を計算した。この結果、FFPE サンプルにおいても、感度 87.5%、特異度 80%という成績が得られ、本解析法の FFPE サンプルにおける有用性が示された。

#### (考察)

従来の病理学的診断が困難な症例が多数存在した AITL において、疾患特異的遺伝子の発見はその診断を劇的に発展させるものと考えられる。遺伝子変異の解析は通常 Sanger 法が伝統的に使用されてきたが、これは変異頻度が 20%程度ないと判別が困難であり、AITL のような腫瘍比率の少ない腫瘍においては偽陰性が多くなってしまう。本解析系の確立により、疾患特異的な G17V RHOA 遺伝子の検出は簡便かつ安価に可能となり、今後臨床応用されていくことが期待される。

## 審査の結果の要旨

#### (批評)

1. 病理学的診断の困難なことのある悪性リンパ腫に疾患特異性の高い遺伝子変異を高い精度で検出するシステムの開発に成功している。
2. 他の遺伝子変異の検出方法による結果との乖離が認められることがあるが、検出感度や一致率は良好と考えられる。
3. 臨床診断への応用には検体採取の方法などの点で問題を残すものの、新規検出システム開発の意義は高く評価する。

平成 27 年 1 月 5 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもと論文について説明を求め、関連事項について質疑応答を行い、最終試験を行った。その結果、審査委員全員が合格と判定した。

よって、著者は博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認める。