

氏 名 (本籍)	ほし 星	まさ 雅	と 人
学 位 の 種 類	博 士 (医 学)		
学 位 記 番 号	医 博 第 1 6 8 0 号		
学 位 授 与 年 月 日	平 成 1 2 年 3 月 2 3 日		
学 位 授 与 の 条 件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当		
研 究 科 専 攻	東 北 大 学 大 学 院 医 学 系 研 究 科 (博 士 課 程) 外 科 学 系 専 攻		
学 位 論 文 題 目	ヒト神経芽細胞腫に認められる第14番染色体長腕 32上の染色体欠失の詳細なマッピングと同領域の bacterial artificial chromosome (BAC) による コンティグの作製及び検討		
	(主 査)		
論 文 審 査 委 員	教 授 大 井 龍 司	教 授 野 田 哲 生	
	教 授 北 本 哲 之		

論文内容要旨

神経芽細胞腫は小児において最も高頻度に発症する悪性固形腫瘍の一つであり、その頻度は約8000出生に一人であるとされる。しかし、新生児マススクリーニングによる早期発見の努力や末梢血幹細胞移植などを背景とした強力な化学療法を施行するなど、臨床的には様々な努力が行われているにもかかわらず、進行例での予後は今なお不良である。神経芽細胞腫の背景にある細胞レベルあるいは分子レベルの病因を解明することは、その治療にとって非常に重要であるが、様々な検討にも関わらず、真にその病因を説明するような報告は現在のところなされていない。

本研究では、神経芽細胞腫の原因となる遺伝子を同定し、その病態の解明に寄与することを目的として、神経芽細胞腫に見られる第14番染色体長腕(14q)の染色体欠失(loss of heterozygosity, LOH)に着目してその詳細な検討を行った。神経芽細胞腫における14q LOHは、比較的高頻度であることが以前より報告されているが、いずれもRFLPマーカーによる報告であり、その限定される領域は広く、詳細な検討を行ったものはなかった。これらの検討により、同領域に存在すると考えられる神経芽細胞腫関連遺伝子の単離・同定のための第一歩とすることが本研究のメインテーマである。

用いた症例は、1988年9月より1995年6月までの間に東北大学医学部附属病院、埼玉がんセンター、および、それらの関連施設において切除術の施行された原発性神経芽細胞腫54例で、これらを用いてマイクロサテライト解析を行った。用いたマーカーは14q32領域由来の10個を含めたマイクロサテライトマーカー計12個で、PCR-LOH法によるマイクロサテライト解析を行った。その結果、17例(31%)に14qでの染色体欠失を認めた。欠失を示した17例中15例は、14qでのlarge deletionを示していたが、2例は14q32上でinterstitial deletionを示しており、共通欠失領域は、マイクロサテライトマーカーD14S62とD14S987との間の約1cMであると想定された。Interstitial deletionを示した2例について、この染色体欠失を別の方法で検証するために、欠失を示したマイクロサテライトマーカーを含むコスミドまたはBACクローンと、それに隣接し欠失を示さなかったマーカーを含むクローンをプローブとしてfluorescence *in situ* hybridization (FISH)を行い、allelic imbalanceとしてその欠失を確定する事ができた。今回認められた14q32上での染色体欠失と発症年齢、ステージ、ploidy、およびMYCN増幅といった臨床的な特徴との間には、有意な相関関係は認められなかった。今回検討された神経芽細胞腫の14q32上でのLOHは、同一の症例での解析では、第1番染色体短腕1p32領域(D1S197)のLOHとは同時に存在しない傾向を認め、14q32上には1p lossとは関係のない神経芽細胞腫の病態に関与する遺伝子が存在する可能性が示唆された。また、RIによるLOHの検討の際、同

時にマイクロサテライトの長さに関する情報を得たが、informativeなケースについて、その長さに関して変化を示したマーカーは全く存在しなかった。すなわち、microsatellite instability (MSI) を示す症例は一例も存在せず、MSIが神経芽細胞腫の病態に関わっている可能性は低いと考えられた。

今回同定された共通欠失領域に存在すると考えられる、神経芽細胞腫の発生・進展に関与すると思われる遺伝子を検索するために、我々はこの領域をカバーする sequence-ready BAC contig を作製した。このコンティグによるとマイクロサテライトマーカーの相対的な配置は、14cen-D14S62-D14S987-D14S1067-D14S979-D14S65-D14S998-D14S1019-D14S267-14qterであった。Contigの解析では、共通欠失領域は少なくとも6個のBACクローンによってカバーされ、その物理的距離は約1.1Mb程度であることが、pulse field gel electrophoresis (PFGE) によって確認された。今回の研究では、この1.1Mb内に、神経芽細胞腫の発生・進展に関与する遺伝子が存在することが強く示唆された。

審査結果の要旨

様々な検討にもかかわらず、神経芽腫の病態は未だに解明されていない。病態が不明であることが進行例での予後を改善しない原因の一つとなっていると考えられ、神経芽腫の病態の究明が、予後改善には必要不可欠である。

神経芽腫では、染色体欠失の研究から、特に 1p や 14q において、関連する癌抑制遺伝子の存在が以前より強く示唆されてきた。中でも、1p での検討は予後との関連から数多くなされているが、一方で 14q での検討は、欠失が 22~50% と高頻度でありながら進んでおらず、詳細な欠失領域の報告や候補遺伝子の検討はなされていなかった。今回著者は検討の進んでいない 14q に焦点を当て神経芽腫の癌抑制遺伝子についての研究を行った。

まず始めに、著者は、神経芽腫切除例 54 例について、14q32 領域由来の 10 個のマイクロサテライトマーカを用いてマイクロサテライト解析を行った。その結果、17 例 (31%) に 14q での染色体欠失を認めた。欠失を示した 17 例中 15 例は、14q での large deletion を示していたが、残りの 2 例は 14q32 上で interstitial deletion を示しており、その結果から共通欠失領域は D14S62 と D14S987 との間の約 1cM であると想定された。これら 2 例については、fluorescence *in situ* hybridization (FISH) 法により allelic imbalance としてその欠失が確定された。14q32 LOH と発症年齢、ステージ、ploidy、および *MYCN* 増幅の間には、有意な相関関係は認められず、また、1p32 領域 (D1S197) の LOH の結果から 1p LOH と 14q32 LOH とは同時に存在しない傾向があり、14q32 には 1p loss とは関係のない神経芽腫関連遺伝子が存在する可能性が示唆された。

さらに著者は、同定された共通欠失領域をカバーする sequence-ready BAC (bacterial artificial chromosome) contig を作製し、解析した。その結果、共通欠失領域は最少で 6 個の BAC クローンによってカバーされ、その物理的距離は約 1.1Mb 程度であり、同領域内にはまた、*Not I* site が 2 カ所存在することが確認された。

以上本研究では、神経芽腫に関与する未知遺伝子の存在についての検討を、14q32 に焦点を当てて詳細に行い、その結果約 1Mb という狭い領域に癌抑制遺伝子の局在が強く示唆された。今後のさらなる検討を必要とするものの、神経芽腫の持つ生物学的多様性についての新たな一面も示している。本研究は豊富な実験結果によって神経芽腫の新たな知見を示しており、学位論文に値するものと考えられる。