



# 論文内容要旨

## 研究目的

神経膠腫におけるマイクロサテライト不安定性の関与について明らかにすること、及びマイクロサテライト不安定性の発生機序、マイクロサテライト不安定性に誘導される遺伝子の変異を解明することを目的とした。

## 研究方法

神経膠腫 80 例におけるマイクロサテライト不安定性の有無について 24 ヶ所のマイクロサテライトマーカーを用いて検討した。マイクロサテライト不安定性のある症例については 6 種類のミスマッチ修復酵素遺伝子の構造異常を Polymerase Chain Reaction-Single Strand Conformation Polymorphism (PCR-SSCP), Reverse Transcription (RT)-PCR-SSCP, 塩基配列決定法にて検索した。構造異常が検出されない症例についてはミスマッチ修復酵素遺伝子の発現量を duplex RT-PCR 法で検討した。マイクロサテライト不安定性のある腫瘍組織では human MutL homolog 1 (*hMLH1*) 遺伝子で構造異常の検出されなかったアレルからの発現が抑制されており, *hMLH1* 遺伝子のプロモーター領域のメチル化についてメチル化感受性制限酵素 *Hpa II* を用いて検討した。さらに *hMLH1* 遺伝子の片側アレルに胚細胞性変異をもつ症例では, 変異に伴う制限酵素 *Alu I* 認識部位の消失を利用して正常アレル特異的なメチル化について検討を加えた。マイクロサテライト不安定性に誘導される遺伝子異常について, Transforming Growth Factor-beta type II Receptor (*TGFβRII*), BCL2-Associated X protein (*BAX*), E2F transcription factor 4 (*E2F4*), Insulin-like Growth Factor II Receptor (*IGFIIIR*), human mutS homolog 3 (*hMSH3*), human mutS homolog 6 (*hMSH6*), Phosphatase and Tensin homolog deleted on chromosome Ten (*PTEN*) 遺伝子の変異を PCR-SSCP, RT-PCR-SSCP, 塩基配列決定法で検索した。

## 研究結果

神経膠腫 80 例のうち 10 代発症の膠芽腫 2 例 (症例 114,136) に著明なマイクロサテライト不安定性を認めた。本研究に含まれる 10 代発症の症例は 6 例のみであることから, この年齢層では高頻度 (2/6) にマイクロサテライト不安定性が関与していることが示唆された。一方, 他の 78 例にはマイクロサテライト不安定性は認められなかった。症例 136 は臨床的に Turcot's 症候群と診断された症例で *hMLH1* 遺伝子に異常スプライシングを引き起こす胚細胞性変異を認め

た。さらに腫瘍組織では、正常アレルの発現は認められなかった。症例 114 は散発性膠芽腫の症例でミスマッチ修復酵素遺伝子には変異は検出されなかった。しかし duplex RT-PCR 法にて *hMLH1* 遺伝子の発現量を検討したところ、症例 114 の腫瘍組織では *hMLH1* 遺伝子の発現量の低下が示唆された。この 2 例では、*Hpa II* 消化後の腫瘍 DNA から *hMLH1* 遺伝子プロモーター領域が PCR 法で増幅され、プロモーター領域のメチル化が示唆された。さらに症例 136 から得られた *Hpa II* 消化後の増幅断片を *Alu I* で消化した結果、正常アレルに特異的な断片が観察され、正常アレルのプロモーター領域が特異的にメチル化されていると考えられた。

症例 114, 136 について *TGF $\beta$ R II*, *BAX*, *E2F4*, *IGF II R*, *hMSH3*, *hMSH6*, *PTEN* 遺伝子の変異を検索した結果、症例 114 に *PTEN* 遺伝子のマイクロサテライト配列にフレーム内欠失がみられた。またマイクロサテライト不安定性のない 78 例でも 7 例に *PTEN* 遺伝子に変異が認められた。この 7 例には *PTEN* 遺伝子の存在する第 10 染色体長腕以外の染色体にヘテロ接合性の消失があり、染色体不安定性が基盤にあるものと考えられた。

## 結 論

悪性度の高い若年発症の神経膠腫の中には、*hMLH1* 遺伝子の構造異常、またはプロモーター領域のメチル化により生じたマイクロサテライト不安定性を基盤に発生、進展する症例が存在する。また *PTEN* 遺伝子は神経膠腫における染色体不安定性のみならず、マイクロサテライト不安定性の標的遺伝子の 1 つであることが示唆された。

## 研究の意義・独創的な点

神経膠腫の発生、進展におけるマイクロサテライト不安定性の関与、マイクロサテライト不安定性の発生機序については十分研究されていない。本研究ではこれらの点について詳細に検討した。この中で制限酵素を用いた方法でアレル別のメチル化を検討した点が独創的である。また *PTEN* 遺伝子変異が染色体不安定性のみならず、マイクロサテライト不安定性にも誘導されるという結果は神経膠腫の進展の経路を解明する上で意義あることと考えられる。

## 審査結果の要旨

悪性神経膠腫の治療予後は芳しくなく、現在の外科的摘出術、放射線化学療法では治療成績を向上させるには限界となっている。従って神経膠腫の発生、進展機序を解明することは極めて重要な意味合いを有している。神経膠腫の発生、進展には数多くの遺伝子異常が関与し、これらが蓄積することにより神経膠腫が悪性化すると考えられている。本研究では、これまで神経膠腫においては注目されていなかった遺伝子不安定性に着目し、神経膠腫におけるマイクロサテライト不安定性の発生機序、マイクロサテライト不安定性が引き起こす遺伝子異常について詳細に検討している。

まず80症例というまとまった症例数を用いて、神経膠腫におけるマイクロサテライト不安定性の有無を検討している。この結果、若年発症の悪性神経膠腫において、高頻度（33%）にマイクロサテライト不安定性が認められたことを報告している。マイクロサテライト不安定性がある神経膠腫の報告の中ではTurcot's症候群の症例が多くみられることから、この年齢層での悪性神経膠腫の診断上、有益な知見であると考えられる。

次に神経膠腫におけるマイクロサテライト不安定性の発生機序について述べられている。この発生機序の解析は論理的に行われており、本研究中でも重要なポイントとなっている。過去にはミスマッチ修復酵素遺伝子の胚細胞性変異を持つ症例でマイクロサテライト不安定性が観察されることが報告されているが、本研究では*hMLH 1* 遺伝子に胚細胞性変異を持つTurcot's症候群に発生した膠芽腫において、正常アレルのメチル化が2ヒット目として働き、同遺伝子を不活化させている事を明確に示している。一方、散発性膠芽腫におけるマイクロサテライト不安定性の原因についても検討を加え、*hMLH 1* 遺伝子における両アレルのプロモーター領域のメチル化に伴う発現抑制によるものであることを解明している。このように家族性、散発性に発症したマイクロサテライト不安定性をもつ膠芽腫において、*hMLH 1* 遺伝子が異なる機序で2ヒットを受け、不活化されている事実を解明したことは非常に興味深い。

さらに近年単離された神経膠腫の悪性化において重要な意義を持つがん抑制遺伝子である*PTEN* 遺伝子が、マイクロサテライト不安定性、染色体不安定性を有する症例で変異を認めることを明らかにし、*PTEN* 遺伝子が両遺伝子不安定性の標的遺伝子の1つであると報告している。

以上の検討結果より、遺伝子不安定性による神経膠腫の発生、進展経路を明らかにした。この結果は、今後の神経膠腫の発生、進展機序についての検討に大きく貢献するものと考えられる。

以上、本研究は方法、考察ともに明解、秀逸であり、学位に充分値するものと判断する。