

[別紙2]

審査結果の要旨

氏名 アシュラフル イスラム

本研究は小児固形腫瘍である神経芽腫（NBL）の発生と進展にアポトーシス抑制遺伝子（IAP）の一員であるサーバイビン（SVV）遺伝子が関与しているか否かを検討したものであり、下記の結果を得ている。

1. NBLにおけるSVVの発現をノーザンブロット解析により検討したところ、SVVの高発現は年令12ヶ月以上、進行した病期、マススクリーニング発見例でない症例、TrkAの低発現と有意に相関していた。これらはいずれも予後不良因子として知られていることから、SVVの高発現はNBLの予後不良因子となりうることが示唆された。
2. CHP134・NBL細胞にレチノイン酸を作用させたところ、DF45/ICAD蛋白の解離とそれに伴うカスパーゼ3の誘導と活性化が観察され、タネル染色法によりアポトーシスが確認された。更に、CHP134細胞でSVVを強制発現させると、レチノイン酸によるアポトーシスは著明に抑制された。またSVVの発現は、分化を起したSH-SY5Y細胞において中程度に減弱し、レチノイン酸に反応しないことが知られているSK-N-AS・NBL細胞では、その発現は一定に留まるか、むしろアップ・レギュレートされていた。以上より、SVV遺伝子がNBL細胞においてアポトーシスと分化に重要な役割を果たしていることが判明した。
3. SVVのクローニングの過程でわれわれはSVVのアイソフォームを発見し、直接シーケンスとRT-PCR法で解析したところ、SVVのアイソフォーム（SVV β ）では抗アポトーシスの機能を有するBIRDメインに23個のアミノ酸が挿入された構造を有していた。このため、SVV β はSVVに対して、機能的不活性化またはドミナント・ネガティブにより拮抗的に作用する可能性が示唆された。予後良好なNBLの33%はSVVよりもSVV β 優位な発現を示していた。アポトーシスに際しては、SVVが完全にダ

ウン・レギュレートされるのに対して、SVV β は常に発現していた。アポトーシスの過程においてSVV β が持続的に発現することは、少なくとも一部の自然退縮を示すNBLにおいてこのアイソフォームが作用している可能性が示唆された。In-vitro の結合および競合実験では、SVV β は重合チューブリンと結合し、しかもSVVと競合することが確認された。マイクロチューブルをチューブリンに分解するカスパーゼ3の作用をを押しやることにより、重合したチューブリンと結合したSVVはアポトーシスを抑制する。われわれはコンペティション・アッセイにより、SVV β が重合チューブリンへのアンタゴニストとして働き、SVVの作用を抑制することを証明した。

4. 予後不良のNBLには17qゲインが高頻度に認められる。そこで、SVVが17qゲインのターゲット遺伝子の候補となりうることを確認するために、サザン・ブロットイングとFISH法を行った。SVV遺伝子はPAC (P1 Artificial Library) から単離し、制限酵素地図により確認した。31例のマスクリーニング発見NBLでは、サザン・ブロットイングでSVVゲインは1例も認められなかった。マスクリーニング発見以外のNBL症例においても、SVVゲインの頻度は最近のヨーロッパのグループ・スタディの結果に較べると低値であった。しかし1例のMYCの増幅と1pLOHを伴う症例で、t(1;17)によるSVVゲインのシグナルを1pの遠位領域にFISHによって確認することができた。今回の研究では、SVVゲインとそのmRNA発現との間には相関を見いだすことができなかった。しかしMYCNの増幅と1pの欠失を伴う症例において、SVVゲインを含む17qが1pに転座していることをFISH法により直接証明することができたことは、大きな意義があると考えている。SVVに特異的なプローベを用いて、より多くのNBL症例を検討する必要があると考えられる。

以上、本論文はSVV遺伝子がNBL細胞のアポトーシスや分化を促進する重要な働きをしていることを明らかにし、この遺伝子がNBLの発生や進展に関与していることを示した。特に、SVVのアイソフォームを新しく発見し、これがSVVと拮抗することにより、NBLの自然退縮に作用している可能性を示し、今後、このアイソフォームを治療に応用することの有用性を示唆した。本研究はこれまでに不明であったNBLの発生と進展の機序の解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。