

[別紙 1]

論文内容の要旨

論文題目 Search for Tumor Suppressor Genes Involved in
the Pathogenesis of Neuroblastoma
(神経芽腫の発生と進展に関与するがん抑制遺伝子の探索)

氏名 滝田順子

I はじめに

近年の分子生物学の発達により、がん抑制遺伝子の不活化が多くの腫瘍の発生と進展に関与することが明らかにされてきた。がん抑制遺伝子を不活化する主なメカニズムには、片側 allele の欠失に加えてもう片側 allele の変異および両 allele のホモ欠失などがある。片側 allele の欠失は allele の不均衡 (allelic imbalance; AI) とも言われ、多くの腫瘍でそれぞれに特異的な染色体領域が報告されている。これまでにそれらの AI 領域から、*RB*、*WT1*、*DCC*、*MST1 (p16)* および *Smad4* 遺伝子などのがん抑制遺伝子が単離されてきた。また最近、CpG island のメチル化がいくつかのがん抑制遺伝子の不活化に密接に関与していることが明らかとなった。

神経芽腫 (NB) は胎生期の神経堤 (neural crest) 由来の原始神経芽細胞が分化・成熟する過程で発生する腫瘍と考えられている。小児悪性腫瘍の中では白血病、脳腫瘍に次いで頻度が高い。約 90% が 5 歳以下で発症し、発症年齢が 1 歳未満の症例は予後良好で自然消退する例もある。一方、発症年齢が 1 歳以上の症例はほとんどが進行例で、予後不良である。このように NB は生物学的に大きく 2 つに分けられるので、heterogeneous な疾患と考えられている。

これまでに報告されているNBの遺伝子異常として、*MYCN*の遺伝子増幅および*TRKA*や*RASH*の高発現などがある。特に*MYCN*の増幅は予後と関連し、臨床にも応用されている。しかしその頻度は進行例でも約50%程度で、*MYCN*の増幅以外にもNBの進展に関与するがん抑制遺伝子が存在することが示唆されている。また*TRKA*や*RASH*の高発現はNBの予後良好因子と考えられているが、*MYCN*の増幅と逆相関を示すことから、*MYCN*の増幅と独立した予後因子とはいえない。NBの高頻度染色体欠失領域として、これまでに1番染色体短腕(1p)、11番染色体長腕(11q)および14qが報告されているが、その頻度はいずれも50%以下で現在のところNBの原因遺伝子は単離されていない。今回、NBの発生と進展に関与するがん抑制遺伝子座位を同定する目的で、NBの新鮮腫瘍81例を用いて、全22対染色体領域のallelotype解析を行った。その結果、新たに2q、9pおよび18qも高頻度に欠失していることが判明した。特に9pの欠失は予後不良群に有意に多く認められたことから、この領域にはNBの進展に関与するがん抑制遺伝子が存在することが示唆された。また最近、この9p21の近傍から*MST2* (*p15*)、*p16*および*p19*遺伝子が、18q21の近傍より*DCC*、*Smad2*および*Smad4*遺伝子が単離された。これらの遺伝子は成人のいろいろながんで異常を起こしていることが報告され、がん抑制遺伝子と考えられている。更に、これらの遺伝子がNBの発生と進展に関与するか否かについてを検討した。

II 材料と方法

材料としてNBの細胞株19株、新鮮腫瘍81例(I期21例、II期26例、III期9例、IV期17例およびIVS期8例)を用いた。正常コントロールとして、81例の患者のリンパ球より抽出したDNAを用いた。

方法としては、allelotype解析、9番と18番の染色体欠失地図の作成にはSouthern blot法とpolymerase chain reaction (PCR)-AI法を用いて、染色体欠失領域を同定した。*p15*、*p16*、*p19*、*DCC*、*Smad2*および*Smad4*遺伝子の解析にはSouthern blot、Northern blot、Western blotおよびPCR-single-strand conformation polymorphism (SSCP)法を用いた。*p16*遺伝子に関してはメチル化の検討と、発現ベクターを用いた細胞周期の解析も行った。更にパラフィン切片を用いて、*p16*蛋白の免疫染色を行い、発現低下と臨床的因子との関連性を検討した。統計学的解析にはFisherの直接検定とKaplan-Meier法を用いた。

III 結果と考察

(1) 神経芽腫における allelotype 解析

NB の発生と進展に関与するがん抑制遺伝子の座位を同定するために、NB の新鮮腫瘍 81 例を用いて、全染色体領域の AI 解析を行った。その結果、従来より報告のある 1p、11q および 14q に加え、新たに 2q、9p および 18q が高頻度に欠失していることが判明した。これらの AI の頻度は 20~30%で、その他の領域は 13%以下であった。特に 9p の欠失は進行例に多く、予後不良と有意な相関が認められた。これは *MYCN* の増幅とは独立して認められた。このことから、9p には *MYCN* 遺伝子とは違う経路で腫瘍の進展に関与する未知のがん抑制遺伝子が存在することが示唆された。NB では単一の特異的な高頻度染色体欠失領域が認められず、複数の領域がほぼ同程度に欠失していた。以上より、NB の発生と進展には複数のがん抑制遺伝子が関与していることが示唆された。

(2) 9 番染色体に座位する神経芽腫のがん抑制遺伝子の検索

近年、9p21 領域から成人のいろいろながんで異常がみられる *p15*、*p16* および *p19* 遺伝子が相次いで単離された。これらの遺伝子と NB の関連性を明らかにするために、NB における 9 番染色体の欠失地図を作成した。その結果、共通欠失領域は 9p21 と 9q34-qter であった。9p の欠失は有意に予後不良と相関していたが、9q の欠失と予後との相関は認められなかった。9p21 の共通欠失領域内に *p15*、*p16* および *p19* 遺伝子が含まれるので、これらの遺伝子を解析したところ、NB の細胞株 72%に *p16* 遺伝子の発現の消失が認められ、新鮮腫瘍 1 例で exon 2 の missense mutation を検出した。これに対し、*p19* 遺伝子の発現の低下は、26%のみに認められ、*p15* 遺伝子の発現は全て正常であった。以上より 9 番染色体には NB のがん抑制遺伝子が少なくとも 2 個存在することが判明し、そのうち 9p21 に存在するがん抑制遺伝子は NB の進展に関与していることが示唆された。また 9p21 上の *p16* 遺伝子は NB の候補がん抑制遺伝子である可能性が示唆された。

NB における *p16* 遺伝子の不活化のメカニズムを明らかにし、この遺伝子が NB の進展に関与しているか否かを検討する目的で、メチル化について解析し、*p16* の発現ベクターを用いて細胞周期の解析も行った。更に、*p16* 蛋白の免疫染色も行った。その結果、*p16* の発現がみられない NB の細胞株の 54%にメチル化を検出した。また *p16* 野生株のベクターを導入した細胞では著明な G1 arrest が認められたが、*p16* 変異ベクターを導入した細胞では細胞周期に変化は認められなかった。免疫染色では、パラフィン切片 74

例中 45 例(61%) で p16 蛋白の発現の低下が認められた。また p16 の発現低下は予後不良と有意な相関が認められたが MYCN の増幅とは相関しなかった。以上より、NB で p16 遺伝子は主にメチル化によって不活化されており、MYCN 遺伝子とは異なる機序で腫瘍の進展に関与することが示唆された。

(3) 18 番染色体に座位する神経芽腫のがん抑制遺伝子の検索

18q は以前より大腸がんや肺がんおよび膵臓がんなどで高頻度に AI が検出されている。近年、18q21 領域から DCC に次いで Smad2 と Smad4 ががん抑制遺伝子が単離された。また最近、DCC 遺伝子は神経系細胞の分化に関与すること、更に神経栄養因子である netrin-1 の受容体であることが判明した。そこで 18q21 の 17 座位で AI 解析を行い、NB における 18 番染色体欠失地図を作成した。その結果、共通欠失領域は 18q21.1 と 18pter-q12.3 の 2 箇所であった。18q21.1 の共通欠失領域内に DCC 遺伝子は含まれるが、Smad2 と Smad4 遺伝子は含まれなかった。以上より、NB の抑制遺伝子は 18 番染色体に少なくとも 2 個存在することが推定された。DCC 遺伝子は 18q21.1 の共通欠失領域内に存在することから NB の候補がん抑制遺伝子である可能性が示唆されたが、mutation の頻度が低かったので、この領域にはこれ以外にも NB のがん抑制遺伝子が存在する可能性が示唆された。

IV まとめ

Allelotype 解析から、従来より報告のある 1p、11q および 14q に加え、新たに 2q、9p および 18q も NB で高頻度に欠失していることを明らかにし、NB の発生と進展には複数のがん抑制遺伝子が存在することを示した。特に 9p の欠失は予後不良と有意な相関を示したことから、この領域には NB の進展に関与するがん抑制遺伝子が存在することが示唆され、9p21 上の p16 遺伝子は MYCN 遺伝子とは異なる機序で腫瘍の進展に関与する NB の候補がん抑制遺伝子であることを明らかにした。また 18 番染色体上には NB のがん抑制遺伝子が少なくとも 2 個存在することが推定され、18q21.1 上の DCC 遺伝子は NB の候補がん抑制遺伝子であることを明らかにした。この領域には更に未知のがん抑制遺伝子が存在する可能性が示唆された。