

[別紙2]

審査の結果の要旨

氏名 滝田順子

本研究は小児の固形腫瘍である神経芽腫（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 における全 22 対染色体の allelotype 解析を行ったものであり、下記の結果を得ている。

1. NB の新鮮腫瘍 81 例を用いて、全染色体領域の Allelic imbalance (AI) 解析を行った結果、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 *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. 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。

3. 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。

4. 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。

以上、本論文は Allelotype 解析から、新たに 2q、9p および 18q が 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関与することを示した。特に 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、18q21.1 上の *DCC* 遺伝子も NB の候補がん抑制遺伝子であることを明らかにした。本研究はこれまで不明であった神経芽腫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。