

[別紙 1]

論文内容の要旨

論文題目 小児悪性固形腫瘍における $p16^{INK4A}$ 、 $p19^{ARF}$ 、 $p15^{INK4B}$
の解析と臨床像
氏名 尾花和子

a. 研究の目的、背景

小児悪性固形腫瘍のうち神経芽腫、Ewing 肉腫、横紋筋肉腫は、病理組織学的には小円形細胞腫瘍を呈し、しばしば鑑別が困難であり、進展例は治療に抵抗し、予後が不良であることが多い。その発生や進展に染色体転座やがん遺伝子、がん抑制遺伝子の異常の関与が成人の癌の場合にみられるような役割をになっているのかどうか注目されている。

サイクリン/サイクリン依存性キナーゼ (CDK) インヒビターの $p16^{INK4A}$ ($p16$)、 $p15^{INK4B}$ ($p15$) 遺伝子と、同じ 9p21 に座位し $p16$ の alternative splicing により異なる転写経路をもつ $p19^{ARF}$ ($p19$) 遺伝子は、急性白血病や成人の腫瘍などでの発現の異常が報告されており、がん抑制遺伝子と考えられている。これらの遺伝子の発現異常の機構については、ホモ接合体欠失や、点変異、小領域の欠失、遺伝子のメチル化などさまざまなものがあり、異常の頻度やタイ

ブに臓器、組織特異性があることも明らかになっている。

神経芽腫では 9p のホモ接合体欠失が約 40% に報告され、共通欠失領域は 9p21 とされた。本研究では 9p21 に座位する *p16*、*p15*、*p19* の発現の異常について小児小円形細胞腫瘍である神経芽腫、Ewing 肉腫、横紋筋肉腫の細胞株と新鮮腫瘍について検索し、臨床像との関連も検討した。

b. 研究材料と方法

培養細胞株として神経芽腫細胞株 17 株、Ewing 肉腫細胞株 8 株、横紋筋肉腫細胞株 7 株を使用した。新鮮腫瘍検体は、神経芽腫 31 例、Ewing 肉腫 5 例、横紋筋肉腫 12 例を用いた。正常 control として、健常成人 10 例のリンパ球を用いた。

すべての細胞株および新鮮腫瘍検体から抽出した total RNA より *p16*、*p19*、*p15* 遺伝子の発現を、reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) 法で検討した。*p16* 遺伝子と *p19* 遺伝子については sense primer は *p16* と *p19* それぞれに特異的に、antisense primer は *p16* と *p19* の共通のなるように設定した。*p15* 遺伝子については sense primer を exon 1 に、antisense primer を exon 2 に設定した。

検体中 DNA を抽出しえた細胞株 23 株、および新鮮腫瘍検体 24 例について、上記 PCR 産物を [α - 32 P]dCTP でラベルしプローブとして用い、*p16* と *p19* の Southern Blotting を行った。

RT-PCR 法で *p16* 遺伝子の発現の異常のみられた細胞株 10 株について、Southern Blotting にて 5' CpG island のメチル化の検索を行った。また、そのうち 7 株については、Western Blotting にて *p16* タンパクの発現を検討した。

c. 結果

RT-PCR 法を用いた検索の結果、*p15* については、神経芽腫、Ewing 肉腫、

横紋筋肉腫の細胞株、新鮮腫瘍のすべての検体に発現がみられた。

p16 と *p19* について RT-PCR 法を用いた検索の結果、神経芽腫細胞株では 12% (2/17)、Ewing 肉腫細胞株では 50% (4/8)、横紋筋肉腫細胞株では 43% (4/7) に *p16*、*p19* の発現の異常がみられた。Southern blotting では、すべての検体で *p16* と *p19* がともに欠失した株や再構成した株は認めなかった。*p16* の発現の異常がみられた神経芽腫 1 株、Ewing 肉腫 2 株、横紋筋肉腫 1 株に *p16* の DNA のメチル化を認めた。また、Western blotting では、*p16* の発現の異常がみられた 7 株はいずれも *p16* タンパクの発現はみられなかった。

新鮮腫瘍における *p16* と *p19* の発現については、神経芽腫では 16% (5/31)、Ewing 肉腫では 80% (4/5)、横紋筋肉腫では、83% (10/12) に *p16*、*p19* の発現の異常がみられ、神経芽腫、Ewing 肉腫では予後不良のものが多く見られた。これらの 3 腫瘍の新鮮腫瘍検体の Southern blotting ではすべてに *p16* と *p19* の欠失や再構成は認めなかった。

d. 考案

本研究において、神経芽腫では細胞株における *p16* の発現の異常は低頻度であったが、そのうち 1 株がメチル化によるものであった。一方、腫瘍の臨床材料における *p16* 遺伝子の発現の異常は細胞株の発現異常とほぼ同等であったが、特に予後不良例との関連が考えられた。

Ewing 肉腫や横紋筋肉腫での *p16* の発現の異常はこれまで報告されていない。本研究では細胞株では Ewing 肉腫、横紋筋肉腫に神経芽腫より高頻度に *p16* の発現の異常がみられ、新鮮腫瘍では Ewing 肉腫、横紋筋肉腫とも 80%以上の発現の異常がみられた。Ewing 肉腫 2 株、横紋筋肉腫 1 株に *p16* のメチル化がみられたことから、これらの腫瘍も *p16* の発現の異常は一部ではメチル化が関与しているものと考えられた。これらの結果からは、神経芽腫においては一部に *p16* 遺伝子の発現の異常がみられるものの、神経芽腫の発生や進展などの病態に大きく関わっている可能性は少ないと考えられるが、Ewing 肉腫、横紋筋肉

腫では *p16* の発現の異常の頻度は高く、特に新鮮腫瘍については、発生や進展に
関与する癌抑制遺伝子として働いている可能性も示唆された。

p15 については今回検討した細胞株と新鮮腫瘍の全検体に発現がみられ、神
経芽腫、Ewing 肉腫、横紋筋肉腫における発現異常は認められなかった。

p19 については、神経芽腫では 10%~12% に発現異常がみられ、*p16* の異常
にともなわないものもみられた。一方、Ewing 肉腫では細胞株で 38%、新鮮腫
瘍で 80% に発現の異常がみられ、横紋筋肉腫細胞株でも 43%、新鮮腫瘍は 75%
と、やはり *p16* の発現異常と同様に高頻度に発現の異常がみられた。*p19* の発
現を調節している機序については、欠失や再構成はみられず、メチル化などの
有無も明らかになっていない。しかし全体として、Ewing 肉腫、横紋筋肉腫で
は *p16* と *p19* はともに発現異常の頻度は高く、特に新鮮腫瘍については、発生
や進展に関与する可能性が示唆された。

e まとめ

9p21 に座位する *p16^{INK4A}* (*p16*)、*p15^{INK4B}* (*p15*) および *p19^{ARF}* (*p19*) 遺
伝子の変異については造血器腫瘍や成人の癌ではすでに多くの報告がなされて
おり、*p16*、*p15* は RB 遺伝子を介して、また *p19* 遺伝子は *p53* 遺伝子を介し
たがん抑制遺伝子として癌化の鍵を握る遺伝子群と考えられている。本研究で、
Ewing 肉腫、横紋筋肉腫では腫瘍の発生や進展に関与する可能性も示唆された。
神経芽腫については新鮮腫瘍の進展例で *p16*、*p19* 遺伝子発現の異常と予後不
良例との関連が考えられた。これらの三腫瘍はいずれも病理組織学的には小円
形細胞腫瘍を呈し、しばしば鑑別が困難であるが、腫瘍発生や進展についても
異なる腫瘍であるということがいえる。今後さらに対象数を重ね、また、腫瘍
の進展とともに遺伝子異常が変化していくかどうかなどの検討によって、*p16*
と *p19* 遺伝子の異常と、Ewing 肉腫、横紋筋肉腫、そして神経芽腫の予後との
関係を明らかにしていくことが望まれる。