

論文の内容の要旨

論文題目 小児 *MLL* 関連白血病と小児ホジキン病における遺伝的背景に関する研究
-*ATM* (Ataxia Telangiectasia Mutated) 遺伝子の胚細胞変異の関与について-

氏名 小口 薫

発癌には遺伝的素因と環境的素因の両者が関わっているが、小児の悪性腫瘍は出生後早期に発病し、環境に曝露されることが少ないことから成人の悪性腫瘍よりも遺伝的素因が強く関わっている可能性が高いと考えられる。毛細血管拡張性運動失調症 (ataxia telangiectasia; AT) の患者は発癌の頻度が高いだけでなく、AT 保因者でも発癌の危険性が高いという報告がされていること、患者由来の細胞の生物学的特徴として放射線や化学物質などで生じる DNA 損傷に対する反応の異常があることから、小児の悪性腫瘍で AT の責任遺伝子である *ATM* (ataxia telangiectasia mutated) 遺伝子の異常が遺伝的素因の一因として関与している可能性があるのではないかという仮説に基づき、研究を行った。ATM タンパクはホスファチジルイノシトール 3 キナーゼ (PI3-K) ドメインを介して、DNA 損傷に対し、他の様々なタンパクに作用しており、その作用の中で重要なものは細胞周期制御である。正常細胞において DNA が放射線、紫外線、薬剤などにより損傷を受けると、ATM は様々なタンパクをリン酸化することにより細胞周期を停止させる。その間に修復に必要なタンパクの転写が誘導され、細胞は DNA の修復を行うことができる。実際、AT 患者由来の細胞ではチェックポイントの障害が認められている。AT 保因者では発癌の危険性が正常人の 4 倍であるという報告もされている一方、変わらないとする報告もされており、議論を呼んでいる。AT 保因者のスクリーニングを行う方法として全長のシーケンスを行わず、truncation mutation を見つける方法を使用した場合、missense mutation は見逃されてしまい、AT 保因者では発癌の危険性が変わらないという結果が導き出された可能性がある。AT 保因者において片方のアレルが truncation mutation の場合、変異 ATM

タンパクは不安定となりほとんど検出されないが、正常なアレルから生じる正常な ATM タンパクの機能は存在する。片方のアレルが missense mutation の場合、変異 ATM タンパクは存在するがそれ自身正常に機能しないだけでなく、もう一方の正常なタンパクの機能も抑制するというドミナントネガティブ効果があるのではないかと推測されている。最近になり、シーケンスの方法が改良されたことにより ATM 遺伝子の全長のシーケンスが比較的、行いやすくなったことでさまざまな癌における missense mutation が報告されるようになった。若年発症の乳癌、リンパ系悪性腫瘍である T 細胞性前リンパ性白血病、B 細胞型慢性リンパ性白血病、マンツル細胞リンパ腫の患者の体細胞レベルで、ATM の変異が認められている。これらの変異は missense mutation で、その大部分は ATM の機能上、重要な働きをする PI3-キナーゼドメインに存在していることより、ATM 遺伝子の missense mutation がリンパ系悪性腫瘍の進展を進める因子となりうる可能性、すなわち ATM 遺伝子が癌抑制遺伝子として機能することを示唆している。また、B 細胞型慢性リンパ性白血病の患者では胚細胞レベルでもヘテロの ATM の missense mutation が見つかり、ATM の変異が遺伝的発癌の要因としてもとりあげられている。

今回、小児の MLL (mixed lineage leukemia) 関連白血病 1 例とホジキン病 5 例の症例において ATM 遺伝子でヘテロの塩基置換が見つかった。そのうちの白血病症例での塩基置換 8921C→T とホジキン病症例での塩基置換 4949A→G について、その塩基置換から生じるタンパクが、生物学的活性が低下していること、ドミナントネガティブ効果を有することから、病的な意味を持つ変異と考えられた。

8921C→T は 1 歳 5 ヶ月の ALL の女兒で見つかった。この変異は、ATM タンパクの重要な部分である PI-3 キナーゼドメイン内に存在している missense mutation であり、2974 番目のアミノ酸のプロリンがロイシンに変化することによりタンパクの 2 次構造に変化をもたらす可能性がある変異であった。その変異タンパクは、ATM 欠損細胞でのトランスフェクションアッセイにおいて放射線高感受性を修復する機能が劣っており、p53 セリン 15 をリン酸化するキナーゼ活性も低下していた。さらに、野生型の ATM タンパクが存在する U2OS 細胞に変異タンパクを発現させたところ、p53 セリン 15 のリン酸化が減少しており、この変異 ATM タンパクが野生型 ATM タンパクの機能を阻害する効果、すなわちドミナントネガティブ効果が明らかになった。この変異が見つかった患者由来の細胞 L-4 では正常人と同程度の ATM タンパクの発現は認められたものの、p53 セリン 15 のリン酸化は減少していた。実際、患者の白血病細胞で LOH (loss of heterozygosity) はみられず、野生型 ATM 遺伝子と変異 ATM 遺伝子が存在していたことから、8921T 変異 ATM 遺伝子はドミナントネガティブ効果をもたらすことにより白血病化の一因になっている可能性が考えられた。また、他の MLL 関連白血病の 2 ヶ月の ALL の症例において、ATM の変異は見つからなかったが、ATM タンパクの発現量は著明に減少していることが判明し、ATM タンパクの減少が白血病化に関与している可能性が考えられた。

ホジキン病の2症例で見つかった4949A→Gの変異に関しても、白血病症例ほど顕著ではなかったが、その変異タンパクが、生物学的活性が低下しており、軽度のドミナントネガティブ効果を有していた。ホジキン病では固形腫瘍ゆえ癌細胞のみ取り出して実験することが困難であり、癌細胞におけるLOHを解析することが不可能であったため、見つかった変異の癌細胞における作用を検討することはできなかった。しかし、健常人での変異の頻度は0%であることも考えると、なんらかの環境因子や他の遺伝子の変異が加わることにより、4949A→Gがホジキン病の病気の進展に関与している可能性が示唆される。

以上のようなATM変異保因者が悪性腫瘍に罹患した場合は、治療に際し放射線療法を避けるなどの配慮を行って、2次癌の発生を予防することも今後、重要となるであろう。今回、研究対象となった白血病、ホジキン病以外でも、同じ悪性腫瘍であっても患者個々により遺伝的素因が異なることを考慮する必要がある。特に小児の悪性腫瘍では、環境因子より遺伝的素因に関する因子の関与が大きいことから、その遺伝的背景を理解し、様々な遺伝子に関する機能解析、DNAチップなどを使用した多数の遺伝子の異常のチェックを行うことは、小児悪性腫瘍の克服に向けて重要なことであろう。