

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・遺伝子治療研究事業）

総括研究報告書

遺伝性小児がんの責任遺伝子の解明と小児のがんにおける遺伝的背景の
解明に関する研究

主任研究者 水谷修紀 国立小児医療研究センター研究室長

研究要旨:小児腫瘍の遺伝的要因を明らかにする目的でAtaxia Telangiectasia原因遺伝子ATM, Fanconi貧血原因遺伝子(FAA, FAC)の簡易診断法の開発を進めた。特にATMの診断において抗体による蛋白定量法が有用であるが、これをさらに精度の高いものにするために酵母によるストップコドンアッセイが有用と考えられ、本法確立に向けて前進した。胎児性腫瘍の分子病理学的解析の結果、Drash症候群とは異なった病態を示すFrasier症候群ではexon9のsplicing isoforms, +KTS/-KTSのimbalanceが生じていることまた、splicing isoformsのうち、+KTS成分が性分化に関連する機能を有することが示唆された。FA患者検体34例中9例にFACの変異を検出し、すべてがintron 4の同一の変異 (IVS4+4 A to T) であった。また、non-C群由来の患者7名のうち名においてA群であることを明らかにした。小児がん患者とその家族へのアンケート調査で、がんの遺伝研究においては患者への協力を求めるには、研究段階にあるものでも、インフォームド・コンセントを得ることが必要であり、がんの遺伝研究についての社会の理解が必要であることがわかった。

A. 研究目的

近年の遺伝学の進歩にともない、小児の悪性腫瘍発生における遺伝的要因の解明に関する研究が進んでいる。一方、遺伝性腫瘍に関する分子生物学的研究の進歩は著しい。この分野の研究に関する成果は単に遺伝性腫瘍の診断学や遺伝学に寄与するのみではなく、散発性腫瘍の原因としてのこれらの遺伝子の役割を明らかにするなど、小児腫瘍の病態研究においても重要な知見をもたらす。我々はこのような視点から 1) Ataxia telangiectasiaおよびそのキャリアー由来細胞の細胞生物学的特性の解明と遺伝子異常の簡易診断法の確立、 2) Fanconi貧

血原因遺伝子の遺伝子診断法の確立と日本における人類遺伝学的特徴の解明、 3) 胎児性腫瘍の発生機構の解明に向けて、腫瘍・奇形症候群を伴うWilms腫瘍、肝芽腫および特異な遺伝子転座によって発生するEwing肉腫を中心に、それぞれのWT1, H19などの遺伝子の変異と腫瘍発生および奇形発生の法則性の解明。 4) 小児腫瘍において特にその材料を用いて遺伝的要因を解明することの社会、倫理的諸問題について解析を行うことを目標に研究を行った。

B. 研究方法

AT患者およびそのキャリアー細胞の樹

立と生物学的解析

患者より採血したヘパリン加末梢血を比重遠心法で単核球を分離し、EBウイルス産生細胞株B 95-8培養上清存在下にて培養し、株化した。細胞の収穫30分前にBrdU（最終濃度10mM）にて標識し、その後70%のエタノールで細胞を固定した。固定後1mg/mlのRNaseで処理の後FITC標識抗BrdU抗体でさらに標識した。細胞を洗浄後25mg/mlのPropidium iodide (PI)により染色し、PIならびにFITC抗BrdUの両色素によって細胞周期解析の材料とした。細胞周期はベクトンデッキンソン社FACScanによりLysis IIプログラムを用いて解析した。算定のevent数は10,000 eventとした。S期ならびにG0/G1期の増加あるいは減少率はS(or G0/G1) with irradiation - S(or G0/G1) without irradiation/S(or G0/G1) without irradiationx100(%)で表現し、Mann-Whitney検定により結果を解析した。細胞への放射線量は基本的には5 Grayとした。H2O2は200mM, C2-ceramideは100mMを用いた。アポトーシス細胞の算定は細胞を0.1%サポニンA処理により細胞膜透過性を昂進させたのち、20mg/mlのPIにより染色し、FACScanによりsubdiploid分画を算定した。また一部の解析ではTUNEL法により断片化DNA保有細胞を算定した。

酵母によるATM遺伝子異常検出法の確立

ATM cDNAの翻訳領域全長を6個のDNA断片に分割してアッセイするためのRT-PCR条件を設定した。これら6断片をSC assay用ベクターpCI-HA(URA3)-2

のURA3 cDNAの5'側に翻訳フレームを一致させて挿入したプラスミドを構築した。

胎児性腫瘍の病態解明

奇形を伴わない散発性Wilms腫瘍のWT1全exonの塩基配列決定を行った。変異がisoformの異常を惹起するか否かについては変異を含んだminigeneを作成し、cos細胞に遺伝子導入し、RT-PCRでその発現を解析した。散発性肝芽腫8例の腫瘍および非腫瘍組織についてNorthern解析でimprinting geneであるH19, IGF2の発現を比較検討した。また、H19のプロモーター領域のメチル化をSouthern解析、bisulfite法によるシーケンスによって決定した。

Fanconi貧血遺伝子の解析

FAC遺伝子各exon-intron boundariesにprimerを設定し、PCR-SSCP法で患者ゲノムDNAをスクリーニング解析し、検出された変異バンドの塩基配列を確認した。また、FAA蛋白に対するポリクロナル抗体を作成し、患者末梢血由来EB transformed lymphoblast cell lineについて、FAA蛋白の発現をWestern blotおよびFACSにて解析した。

小児がんを研究材料とした研究の社会的倫理的諸問題

国立小児病院のがん患者とその家族に郵送自記式調査を行い、がん登録、保存材料の利用に関する意識調査とくに患者材料を遺伝的背景の検査に用いることを調査した。

C. 研究結果

ATM遺伝子はcDNAの大きさとして

10Kb以上の大きなものであり、その遺伝子異常をスクリーニングすることは容易ではない。しかし、少なくとも現時点までに明らかにされた異常は塩基の欠損を伴い、truncation type の異常であり、たんぱくの欠損を伴っているとされている。ATM遺伝子はがん抑制遺伝子p53の上流に位置するとされ、細胞増殖や損傷DNAの修復に関与することが言われている。ATM遺伝子異常を有するAT患者から樹立されたBリンパ球の機能解析を中心に行った。現在までに集めることのできた家系は10家系をこえる。まず我々はこれらのB細胞株でATM蛋白発現のレベルを解析した。その結果すべてのAT株化細胞においてATM蛋白の発現が認められないことが判明した。またATキャリアー細胞におけるAT蛋白の発現量は正常の1/2から1/3であることが判明した。これらの細胞株を用いて放射線照射によるp21の転写効率、細胞周期のG0/G1アレスト誘導能について解析した。その結果AT細胞株でG0/G1アレスト誘導能に欠陥が認められた。細胞周期制御異常をさらに詳細に解析する目的で、Mitotic/Spindleチェックポイントの制御についても解析を加えた。その結果放射線照射96、144時間の時点でAT細胞に顕著な多倍体細胞の出現を認めた。

一方ATキャリアー細胞における同様の解析によってこれらの細胞が放射線による急性アポトーシスの誘導に耐性であること、またG1チェックポイントはおおむね正常範囲内であるが、一部のキャリア細胞においてはMitotic/spindleチェックポイントに障害が認められることが判明

した。

ATM遺伝子異常のスクリーニング法として現在、主にATM蛋白の定量的ウエスタン法を用いている。しかし、スクリーニング法をさらに改善し、遺伝子異常を確定するスクリーニング法の開発は本研究の目的の一つである。このため、SC assay用ベクターpCI-HA(URA3)-2のURA3 cDNAの51側に翻訳フレームを一致させて挿入したプラスミドをura3変異酵母株に導入・発現した。その結果、各ATM cDNA断片とURA3 cDNAの融合タンパク質を発現し、ウラシル欠損培地上で増殖能を獲得した(Ura+)。これらのベクターのATM配列内の制限酵素部位2ヶ所を用いて切断・直線化することにより専用ギャップベクターを作成した。正常ATM細胞からRT-PCRにて増幅した各ATM断片と、各ATM断片に対応した専用ギャップベクターを酵母に導入するとDNA相同組み換えによりin vivoでATM-URA3融合タンパク質が発現した(Ura+)。一方、変異ATM細胞からRT-PCRにて増幅した各ATM断片の場合、ATM-URA3融合タンパク質が発現せず(Ura-)、正常ATM断片と区別できた。この方法を用いることによりATM遺伝子翻訳領域全長のナンセンスまたはフレームシフト変異を検出する可能性が示唆された。

胎児性腫瘍の表現形と遺伝子形の関連を明らかにする目的で、臨床的にDrash症候群と診断された症例から新たにWT1遺伝子変異を見いだしたが、これらのうちintron9の変異例は7例であった。様式を詳細にした結果、+4(c→t) 3例、+2(t

→c) 2例, +5(g→t), +5(g→a)各1例であった。これら全ての変異を含んだ minigeneを作成し、cos細胞に遺伝子導入し、RT-PCRでその発現を解析した結果、これらの全ての変異でexon9の splicing isoformのうち+KTS

(lysine, threonine, serine) の発現が認められないことが明らかとなった。さらに、このような異常を認めた症例の病態を分析した結果、これらの症例はDrash症候群とは異った、Fraiser症候群(軽度の腎障害、性分化異常、Wilms腫瘍を欠く)に相当していることが明らかになった。散発性肝芽腫8例の腫瘍および非腫瘍組織についてNorthern解析で imprinting geneであるH19, IGF2 の発現を比較検討した。また、H19のプロモーター領域のメチル化をSouthern解析, bisulfite法によるシークエンスによって決定した。その結果、H19のmaternal LOHを3例、hypermethylationによるH19の不活性化(LOE)を4例認めた。

日本全土から集めたFA患者検体34例中9例にFACの変異を検出し、すべてがintron 4の同一の変異(IVS4+4 A to T)であった。この変異は欧米ではAshkenazi Jewsに高率にみられる変異であり、人類遺伝学的にも興味深い。IVS4変異群とnon-C群とで血液学的異常発症年齢(中央値; IVS4変異群4.99歳、non-C群5.8歳、 $P=0.534$)、先天性奇形の重症度(平均値; IVS4変異群1.1、non-C群1.1、 $P=0.981$)は有意差を認めなかった。non-C群由来の患者7名よりEB transformed lymphoblast cell lineを樹立し、7株のうち、6株においてFAA蛋白発現の消失または異常を認め

た。これらの症例はA群に属すると考えられた。

小児がん患者とその家族130人からアンケート調査への回答を得た。検査や手術で余った材料の保存、研究利用については、「自分(自分の子ども)に役立てばかまわない」95%、「がん研究のためならよい」95%であったが、同時に「これらを利用することを説明し同意をとるべき」が85%であった。通常の採血時に研究用に余分に採血することについても同程度の回答であった。保存材料を利用したがん遺伝研究については、「利用に際して説明し許可を得てほしい」が91%、「そうした研究に協力してもよい」71%であり、協力してもよい、もしくはわからないとした人のうち74%が「結果を知りたい」と答えた。院内がん登録については、「登録されていることをあらかじめ知らせてほしい」92%、「その後の情報を積極的に知らせてもよい」59%、「研究でわかった一般的情報を教えてほしい」92%であった。また、がん登録や保存材料利用をめぐる心配事については、「個人情報の医療者以外への漏洩」「研究のためにとらなくてもよい材料を余分にとられてしまうこと」などの回答が多かったが、情報が漏れて生命保険や受験、就職、いじめなどの差別にあうことについては、結婚に対する心配がやや多かったものの、いずれも全体の半数に及ばなかった。

D. 考案

AT細胞でにおいてDNA障害に対する急性のアポトーシスに抵抗性であることに

加えて従来言われているG1, S, G2/M期のみならずMitotic/Spindle checkpointの異常を示すことが判明した。一方ATキャリアー細胞においても急性アポトーシス誘導に障害を認めるのみでなく一部のキャリアーにおいてはMitotic/Spindle checkpointの障害を認めることが明らかになった。これらの知見とATM遺伝子異常のキャリアーの頻度が人口の1%であるとされていることを考慮するとAT異常が小児がん患者の遺伝的要因として重要な役割を果たしていることが示唆される。

ATMの異常のスクリーニング法の改良をめざしてSC assayの開発に努力し、AT患者の診断に応用できる新しい方法を開発したが、AT保因者の遺伝子診断のために、ヘテロ接合性変異を検出可能な方法へのさらなる改良が必要であると考えられた。このため現在、マーカー遺伝子をURA3からGFPに変更するなどの改良を試みている

Drash症候群とは異なった病態を示すFrasier症候群ではexon9のsplicing isoforms, +KTS/-KTSのimbalanceが生じていることが初めて明らかにされた。また、splicing isoformsのうち、+KTS成分が性分化に関連する機能を有することが示唆された。WT1exon9-10の異常を同定は、Wilms腫瘍の発生と腎障害の病態を予測する遺伝子診断としても有用であることが明らかになった。肝芽腫においてH19はIGF2のimprinted状態に関係なく、imprinted tumor suppressor geneとして機能することが示唆された。即ち、肝芽腫における腫瘍発症にはIGF2のLOIよりもH19のLOEが重要と思われる

る。現在、本腫瘍を伴う奇形症候群であるBeckwith-Wiedemann syndromeにおける同遺伝子群の変化を解析中である。

日本人におけるFanconi 貧血の患者の頻度については、小児再生不良性貧血の約5%を占めるとされる。佐々木は、その発生頻度は1-40万人に1例で、保因者は0.3-2%と推定している。C群に関しては、欧米では約12%とされているが、日本人の患者に関して、我々は、日本人34例のFA患者においてIVS4変異のhomozygote

(IVS4+4A→T)を9例見出した。これらの例では欧米の報告とは異なり、重症例が多い傾向は認めなかった。この結果は、同じ変異でも人種により臨床表現型が異なることを示唆する。一方、A群は欧米ではFA患者の約60%を占めるとされている。われわれはC群以外の日本人患者7例でFAA蛋白をWestern blot法で解析し、6例において異常(欠失またはtruncation)を認めた。このことから、わが国においても欧米の報告とほぼ同様の頻度でFAAの遺伝子変異が存在していることが予想される。

小児がん材料の保存利用については、患者本人も家族も協力的であったが、その際の説明・同意取得の要望が高かった。また、アンケートに際し、院内がん登録や材料の保存利用の実状についての説明文書も同封したが、これらの現状は一般にはあまり知られておらず、今後、実際に即した説明の工夫を要すると思われる。がんの遺伝的な要因の研究と実用的な遺伝子診断の可能性を探ることは、発がんの機序を理解する上でも、がん予防にも重要である。すなわち、遺伝的な高危険群を一般集団から識別し、ライフスタ

ルや化学予防等で発がんを予防、または遅らせることが、新しいがん予防対策として注目されている。その場合予防的な介入は遅くとも成人癌の萌芽が発生する思春期までに開始される必要があり、未成年者を対象とした研究の倫理的/法的社会的問題を明らかにする必要がある。

E. 結論

細胞死や細胞周期制御機構の障害がATやそのキャリアーの正常体細胞で認められることを初めて明らかにした。出芽酵母を用いるSC assayによりATM遺伝子翻訳領域全長のナンセンスまたはフレームシフト変異を検出する診断系を開発した。WT1exon9-10の異常を同定は、Wilms腫瘍の発生と腎障害の病態を予測する遺伝子診断としても有用であることが明らかになった。FA患者検体34例中9例にFACの変異を検出した。non-C群由来の患者7名のうち、6名はA群に属すると考えられた。がんの遺伝研究において患者への協力を求めるには、詳細なインフォームド・コンセントと癌の遺伝研究についての社会の理解が必要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Teruko Shigeta, Masatoshi Takagi, Domenico Delia, Luciana Chessa, Satoshi Iwata, Yusuke Kanke, Minoru Asada, Mariko Eguchi, Shuki Mizutani. Defective control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint in heterozygous carriers of

ATM mutations. *Cancer Res* (in press)

2. Domenico Delia, Shuki Mizutani, Elda tagliabue, Enrico Fontanella, Minoru Asada, Takayuki Yamada, Yoichi Taya, Sabrina Prudente, Luigi Frati, Marco Pierotti, Lician Chessa. ATM protein and radiation response in Ataxia-Telangiectasia (AT) patients and AT heterozygotes. *Cancer Res.* (in press)

3. Minoru Asada, Takayuki Yamada, Hidenori Ichijo, Domenico Delia, Kohei Miyazono, Kenji Fukumoto, Shuki Mizutani. Apoptosis inhibitory activity of cytoplasmic p21Cip1/WAF1 in monocytes differentiation. *EMBO J.* (in press)

4. Ishii E, Yoshida N, Kimura N, Fujimoto J, Mizutani S, Sako M, Hibi S, Nagano M, Yoshida T, Mori T, Kiyokawa N, Mohri S, Tanaka T, Miyazaki S, Hara T. Clonal dissemination of T-lymphocytes in scid mice from familial hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Med Pediatr Oncol* (in press)

5. Masatoshi Takagi, Teruko Shigeta, Minoru Asada, Satoshi Iwata, Shinpei Nakazawa, Yusuke Kanke, Ko-ichi Ishimoto, Shuki Mizutani. DNA damage associated cell cycle and cell death control is differentially modulated by caffeine in clones with p53 mutations. *Leukemia* 13, : 70-77, 1999

6. Minoru Asada, Takayuki Yamada, Kenji Fukumoto, Shuki Mizutani. p21Cip1/WAF1 is important for differentiation and survival of U937 cells. *Leukemia* 12, : 1944-1950, 1998.
7. Satoshi Iwata, Yuya Sato, Minoru Asada, Masatoshi Takagi, Atsumi Tsujimoto, Toshiya Inaba, Takayuki Yamada, Shunji Sakamoto, Jun-ichi Yata, Tomomi Shimogori, Kazuei Igarashi, Shuki Mizutani. Anti-tumor activity of antizyme which targets the ornithine decarboxylase (ODC) required for cell growth and transformation. *Oncogene* 18, : 165-172, 1999
8. Shuki Mizutani. Recent advances in the study of the hereditary and environmental basis of childhood leukemia. (Review article) *International Journal of Hematology* 68 : 131-143, 1998
9. Takagi M, Delia D, Chessa L, Iwata S, Shigeta T, Kanke Y, Goi K, Asada M, Eguchi M, Kodama C, Mizutani S. Defective control of apoptosis, radiosensitivity, and spindle checkpoint in ataxia telangiectasia. *Cancer Res* 58 (21) : 4923-9, 1998.
10. Yamamoto S, Zaitu M, Ishii H, Yatsuki H, Mizutani S, Eguchi M, Ihara K, Okamura T, Hara T, Miyazaki S. High frequency of transcripts of exon 1 and exon 4/5 in AF-4 gene is observed in cord blood, as well as leukemic cells from infant leukemia patients with t(4;11)(q21;q23) *Leukemia* 12 : 1398-1403, 1998.
11. Tomita A, Watanabe T, Kosugi H, Ohashi H, Uchida T, Kinoshita T, Mizutani S, Hotta T, Murate T, Seto M, Saito H. Truncated c-Myb expression in the human leukemia cell line TK-6. *Leukemia* 12 : 1422-1429, 1998.
12. Ishii E, Ohga S, Tanimura M, Imasyuku S, Sako M, Mizutani S, Miyazaki S, the Japan LCH Study Group. Clinical and Epidemiologic Studies of Familial Hemophagocytic Lymphohistiocytosis in Japan. *Medical and Pediatric Oncology* 30:276-283, 1998.
13. Suzuki, T., Ishioka, C., Kato, S., Mitachi, Y., Shimodaira, H., Sakayori, M., Shimada, A., Mitsuo, A., and Kanamaru, R. Detection of APC mutations by a yeast-based protein truncation test (YPTT). *Genes Chromosomes & Cancer*, 21: 290-297, 1998.
14. FitzGerald, M. G., Marsh, D. J., Wahrer, D., Daphne, B., Caron, S., Shannon, K. E., Ishioka, C., Isselbacher, K. J., Garber, J. E., Eng, C., and Haber, D. A. Germline mutations in PTEN are an infrequent cause of genetic predisposition to breast cancer. *Oncogene*, 17: 727-732, 1998.
15. Osada, M., Ohba, M., Kawahara, C., Ishioka, C., Kanamaru, R., Katoh, I., Ikawa, Y., Nimura, Y., Nakagawara, A.,

- Obinata, M., and Ikawa, S. Cloning and functional analysis of human p51, which structurally and functionally resembles p53. *Nature Med.*, 4: 839-843, 1998.
16. Shimodaira, H., Filosi, N., Shibata, H., Suzuki, T., Radice, P., Kanamaru, R., Friend, S. H., Kolodner, R. D., and Ishioka, C. Functional analysis of human MLH1 mutations in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature Genet.*, 19: 384-389, 1998.
17. Kikuchi, H., Takada, A., Akasaka, Y., Fukuzawa, R., Yoneyama, H., Kurosawa, Y., Honda, M., Kamiyama, Y., Hata, J.: Do intronic mutations affecting splicing of WT1 exon 9 cause Frasier syndrome? *J Med Genetics* 35: 45-48, 1998
18. Urano, F., Umezawa, A., Yabe, H., Hong, W., Yoshida, K., Fujinaga, K., Hata, J.: Molecular analysis of Ewing's sarcoma: another fusion gene, EWS-E1AF, available for use in diagnosis *Jpn J Cancer Res* 89:703-711, 1998
19. Ishida, S., Yoshida, K., Kaneko, Y., Tanaka, Y., Sasaki, Y., Urano, F., Umezawa, A., Hata, J., Fujinaga, K., : The genomic breakpoint and chimeric transcripts in the EWS-E1AF gene fusion of Ewing's sarcoma. *Cytogenet Cell Genet* 82:278-283, 1998
20. Fukuzawa, R., Umezawa, A., Ochi, K., Ikeda, H., Hata, J.: High frequency of inactivation of the imprinted H19 gene in sporadic hepatoblastoma. *Int Natle J Cancer* (in press)
21. Abe, S., Imamura, T., Park, P., Nakano, H., Okita, H., Hata, J., Tateishi, A.: Small round-cell type of malignant peripheral nerve sheath tumor. *Modern Pathol* 11: 747-753, 1998
22. Shimada, H., Ambros, I., Dehner, L.P., Hata, J., Joshi, V.V., Roald, B. : Terminology and morphologic criteria of neuroblastic tumors: recommendation by th International Neuro-blastic Pathology Committee. *Cancer* (in press)
23. Shimada, H., Ambros, I., Dehner, L.P., Hata, J., Joshi, V.V., Roald, B. : Establishments of the International Neuroblastic Pathology classification. *Cancer* (in press)
24. Okita, H., Umezawa, A., Suzuki, A., Hata, J.: Up-regulated expression of murine Mcl1/EAT, a Bcl-2 related gene, in the early stage of differentiation of murine embryonal carcinoma cells and embryonic stem cells. *BBA*1398:335-341, 1998
25. Ando, T., Umezawa, A., Suzuki, A., Okita, H., Sano, M., Hiraoka, Y., Aiso, S., Saruta, T., Hata, J. EAT/mcl-1, a Member of the bcl-2 Related Genes, Confers Resistance to Apoptosis Induced by cis-Diamine Dichloroplatinum (II) in Mouse p53-Deficient Fibroblast Cells. *Jpn J*

- Cancer Res, 89:1326-1333, 1998
26. Hiraoka, Y., Ogawa, M., Sakai, Y., Taniguchi, K., Fujii, T., Umezawa, A., Hata, J., Aiso, S.: Isolation and expression of a human of human SRY-related cDNA, hSOX20. BBA1396:132-137, 1998
27. 恒松由記子：発がんしやすい遺伝的素質を遺伝子診断するときの倫理問題. 生物の科学 遺伝. 52 (1) : 34-38, 1998
28. 恒松由記子、掛江直子：DNAソースとなる試料の採取と保存に関連した倫理的問題. 臨床検査. 42 (3) : 344-346, 1998
29. 小原美江、斎藤智恵子、山田ことみ、吉岡明美。近藤陽一、恒松由記子：小児がんにおける疼痛アセスメント。がん看護. 3 (2) 118-124, 1998
30. Tsunematsu, Y.: Ethical, legal and social issues in pre-symptomatic testing for cancer susceptibility in familial cancers. J Hum Genet. 43(Suppliment) 5, 1998
31. 恒松由記子、掛江直子：倫理的、法的、社会的、心理的諸問題。家族性腫瘍 Molecular Medicine 別冊 (宇都宮譲二監修), 中山書店、東京、134-140, 1998
32. 恒松由記子：晩期障害。小児がんの診断と治療 (土田嘉昭、櫻井實、澤田淳監修)、診断と治療社、東京、157-163、1998
33. 恒松由記子：Li-Fraumeni症候群特集/家族性腫瘍の臨床-現状と問題点-。癌の臨床 (別冊) . 44 (10) pp 1053-1061, 1998
34. 恒松由記子、熊谷昌明：小児固形腫瘍 臨床腫瘍学 (第二版) (日本臨床腫瘍研究会編) 癌と化学療法社、東京 pp1433-1455, 1999
33. Manabe A., Mori T., Ebihara Y., Koyama T., Okuyama I., Hosoya R., Kaneko M., Ishimoto K., Nakahata T., Nakazawa S.: Characterization of leukemic cells in CD2/CD19 double positive acute lymphoblastic leukemia. Int. J. Hematol. 67:45-52, 1998.
34. Mukouyama Y., Hara T., Xu M., Tamura K., Donovan P.J., Kim H., Kogo H., Tsuji K., Nakahata T., Miyajima A.: Induction of hematopoiesis by oncostatin M in the AGM region. Immunity 8:105-114, 1998.
35. Toru H., Eguchi M., Matsumoto R., Yanagida M., Yata J., Nakahata T.: IL-4 promotes the development of tryptase and chymase double positive human mast cells accompanied with cell maturation. Blood 91:187-195, 1998.
36. Nakahata T.: Characteristics of hemopoietic stem/progenitor cells in bone marrow, peripheral blood and cord blood. Int. J. Pediatr. Hematol. Oncology 5:60-61. 1998.
37. Takahashi T., Yamada K., Tanaka T., Kumano K., Kurokawa M., Takahashi T., Hirano N., Honda H., Chiba S., Tsuji K., Yazaki Y., Nakahata T., Hirai H.: A novel molecular

- approach to ex vivo hematopoietic expansion with recombinant EGFR-expressing adenovirus vector. *Blood* 91:4509-4515,1998.
38. Nishihara M., Wada Y., Ogami K., Tsuji K., Mori K., Ueno H., Asano S., Nakahata T., Maekawa T.: A combination of stem cell factor and granulocyte colony-stimulating factor enhances the growth of human progenitor B cells supported by murine stromal cell line MS-5. *Eur. J. Immunol.* 28:855-864,1998.
39. Tsuji K., Muraoka K., Nakahata T.: Interferon- γ and human megakaryopoiesis. *Leukemia and Lymphoma* 31:107-113,1998..
40. Tajika K., Ikebuchi K., Inokuchi K., Hasegawa S., Dan K., Sekiguchi S., Nakahata T., Asano S.: IL-6 and SCF exert different effects on megakaryocyte maturation. *Brit. J. Haematol.* 100:105-111,1998.
41. Ishiguro A., Ishikita T., Shimbo T., Matsubara K., Baba K., Hayashi Y., Naritake S., Nakahata T.: Elevation of serum thrombopoietin precedes thrombocytopoiesis in Kawasaki disease. *Thromb. Haemostasis* 79:1096-1100,1998.
42. Yoshida K., Taga T., Saito M., Kumanogoh A., Tanaka T., Ozono K., Nakayama M., Nakahata T., Yoshida N., Kishimoto T.: Myocardial, hematological, and placental disorders caused by targeted disruption of gp130, a common signal transducer for IL-6 family of cytokines. *Contemporary Immunology: Cytokine Knockouts* (Durum S.K. & Muegge K. eds), Humana Press Inc. Totowa, NJ, pp259-289,1998.
43. Suzuki H., Takei M., Nakahata T., Fukamachi H.: Inhibitory effect of adenosine on degranulation of human cultured mast cells upon cross-linking of Fc ϵ RI. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 242:697-702,1998.
44. Sato T., Watanabe S., Ishii E., Tsuji K., Nakahata T.: Induction of the erythropoietin receptor gene and acquisition of responsiveness to erythropoietin by stem cell factor in HML/SE, a human leukemic cell line. *J. Biol. Chem.* 273:16921-16926,1998.
45. Maruyama K., Tsuji K., Tanaka R., Yamada K., Kodera Y., Nakahata T.: Characterization of peripheral blood progenitor cells mobilized by Nartograstim (N-terminal replaced granulocyte colony-stimulating factor) in normal volunteers. *Bone Marrow Transplant.* 22:313-320,1998.
46. Xu M., Tsuji K., Mukoyama Y., Hara T., Nishihara M., Ebihara Y., Kaneko A., Ueda T., Matsuoka S., Yang F., Manabe A., Kikuchi A., Miyajima A., Nakahata T.: Stimulation of mouse and human primitive hematopoiesis by murine embryonic aorta-gonad-mesonephros-derived

- stromal cells. *Blood* 192:2032-2040,1998.
47. Shichijo M., Inagaki N., Nakai N., Kimata M., Nakahata T., Serizawa I., Iikura Y., Saito H., Nagai H.: The effect of anti-asthma drugs on mediator release from cultured human mast cells. *Clin. Exp. Allergy* 28:1229-1236,1998.
48. Sako M., Ogawa H., Okamura J., Tamaki H., Nakahata T., Kishimoto T., Sugiyama H.: Abnormal expression of Wilms' tumor gene WT1 in juvenile chronic myeloid leukemia and infantile monosomy 7 syndrome. *Leukemia Res.* 22:965-967,1998.
49. Toru H., Pawankar R., Ra C., Yata J., Nakahata T.: Human mast cells produce interleukin-13 by high affinity IgE receptor cross-linking: enhanced IL-13 production by IL-4 primed human mast cells. *J. Allergy and Clin. Immunol.* 102:491-502,1998.
50. Yang FC, Watanabe S., Tsuji K., Xu MJ, Kaneko A., Ebihara Y., Nakahata T.: Human G-CSF stimulates the development of primitive multipotential progenitors of human G-CSF receptor-transgenic mice, but does not affect their commitment in vitro and in vivo. *Blood* 92:1632-1640,1998.
51. Nakahata T., Sui X., Tajima S., Tsuji K., Yasukawa K., Taga T., Kishimoto T.: Ex vivo expansion of human primitive hemopoietic progenitors. *Stem Cells.* in press.
52. Sui X., Tsuji K., Ebihara Y., Tanaka R., Muraoka K., Yoshida M., Yamada K., Yasukawa K., Taga T., Kishimoto T., Nakahata T.: Soluble IL-6 receptor with IL-6 stimulates megakaryopoiesis from human CD34+ cells through gp130 signaling. *Blood* in press.
53. Yang FC., Tsuji K., Oda A., Xu MJ., Ebihara Y., Kaneko A., Hanada S., Mitsui T., Kikuchi A., Manabe A., Watanabe S., Ikeda Y., Nakahata T.: Effects of human granulocyte colony-stimulating factor (hG-CSF) on megakaryopoiesis and platelet function in hG-CSF receptor-transgenic mice. *Blood* in press.
54. Taniguchi T., Endo H., Chikatsu N., Uchimaru K., Asano S., Fujita T., Nakahata T., Motokura T.: Expression of p21Cip1/Waf1/Sdi1 and p27 Kip1 cyclin-dependent kinase inhibitors during human hematopoiesis. *Blood* in press.
55. Duraisamy K., Saito H., Kaneko A., Fukagawa K., Nakayama M., Tomikawa M., Tachimoto H., Ebisawa M., Akasawa A., Miyagi T., Kimura H., Nakajima T., Tsuji K., Nakahata T.: Characterization of mast-cell-committed progenitors present in human cord blood. *Blood* in press.
56. Nakahata T., Toru H.: Development of human mast cells.

- Adv. Immunol. in press.
57. Hasegawa S., Pawankar R., Suzuki K., Nakahata T., Furukawa S., Okumura K., Ra C.: Functional expression of the high affinity receptor for IgE (Fc epsilon R) in human platelets and its intracellular expression in human megakaryocytes. Blood in press.
58. Hibino H., Tani K., Ikebuchi K., Wu M-S., Sugiyama H., Nakazaki Y., Tanabe T., Takahashi S., Tojo A., Suzuki S., Tanioka Y., Sugimoto Y., Nakahata T., Asano S.: Common Mamoset as a target preclinical primate for cytokine and gene therapy studies. Blood in press.
59. Yoshimura A., Tsuji K., Nakahata T., et al: Defective STAT5 function and altered T cell development in the cytokine-inducible SH2 protein-1 (CIS1)-transgenic mice. Mol. Cell. Biol. in press.
60. Kobayashi M., Ueda K., Kojima S., Ishiguro A., Shimbo T., Nishihira H., Nakahata T.: Serum granulocyte colony-stimulating factor levels in patients with chronic neutropenia of childhood: Modulation of G-CSF levels by myeloid precursor cell mass. Brit. J. Haematol. in press.
61. 中畑龍俊：造血幹細胞のin vitro増幅。特集 造血幹細胞移植の基礎と臨床。最新医学53:56-64, 1998.
62. 甲斐丈士、村岡健司、野村明彦、住江愛子、岩本彰太郎、武弘道、二木真琴、中畑龍俊：同年齢時に汎血球減少で発症したFanconi貧血の同胞例。小児科臨床51:2098-2102, 1998.
63. 中畑龍俊：造血幹細胞の試験管内増幅。臨床科学34:1162-1170, 1998.
64. 中畑龍俊：造血幹細胞のカイネテイクス。総合臨床47:2645-265, 1998.
65. 中畑龍俊：造血幹細胞の純化とex vivo増幅。カレントセラピー16:98-10, 1998.
66. 梅本有美、中畑龍俊：レプチンと造血。高久史麿、宮崎澄雄、斎藤英彦、溝口秀昭、坂田洋一（編）、Annual Review 血液1998、pp 1-7、中外医学社、1998.
67. 中畑龍俊：造血幹細胞。三輪史朗（監修）、赤血球、pp1-15、医学書院、1998.
68. 中畑龍俊 他：分子細胞生物学辞典、村松正実（編）、東京化学同人、1998.
69. 中畑龍俊、二木真琴：Fanconi貧血。日本遺伝子治療学会編、遺伝子治療開発研究ハンドブック、印刷中
2. 学会発表
1. Mizutani S, Asada M, Yamada T, Ichijyo H, Miyazono K, Delia D. Cytoplasmic p21 is a novel inhibitor of Apoptosis. Cancer Genetics & Tumor Suppressor Genes, Cold Spring Harbor, Aug.19-23, 1998.
2. Shen L, Miyauchi J, Matsuoka J, Tsunematsu Y, Saeki M, Honna T, Mizutani S. Immunohistochemical demonstration of the negative cell

cycle regulators P16INK4, P27K1P1 and retinoblastoma protein in pediatric cancers.

International Society of Pediatric Oncology (SIOP) XXXth Meeting, Yokohama, Oct. 4-8, 1998.

3. Mizutani S, Takagi M., Shigeta T, Asada M, Delia D, Chessa L
Cell cycle and apoptosis dysregulation in Ataxia Telangiectasia. Losane, Switzerland, January 27- 30, 1999

4. 高木 正稔, 重田 輝子, 岩田 敏, 浅田 穰, 水谷 修紀

毛細血管拡張性運動失調症 Ataxia Telangiectasia (AT) における細胞周期、アポトーシス誘導機構の解析。第12回日本家族性腫瘍研究会、東京、6月27日、1998.

5. 浅田 穰, 山田 孝之, 一條 秀憲, 水谷 修紀

細胞質 p21Cip1 によるアポトーシス抑制のメカニズム。第57回日本癌学会総会、横浜、9月30日-10月2日、1998.

6. 高木 正稔, 重田 輝子, 岩田 敏, 浅田 穰, 水谷 修紀

毛細血管拡張性運動失調症 Ataxia Telangiectasia (AT) における細胞周期、アポトーシス誘導機構の解析。第57回日本癌学会総会、横浜、9月30日-10月2日、1998.

7. 重田 輝子, 高木 正稔, 岩田 敏, 浅田 穰, 水谷 修紀

毛細血管拡張性運動失調症 Ataxia Telangiectasia(AT) 保因者であるヘテロ変異体における細胞周期、アポトーシス

誘導機構の解析。第57回日本癌学会総会、横浜、9月30日-10月2日、1998.

8. 浅田 穰, 山田 孝之, 一條 秀憲, 水谷 修紀

細胞質局在 p21Cip1 はアポトーシスを抑制する。第71回日本生化学会大会、名古屋、10月14-17日、1998.

9. 高木 正稔, 重田 輝子, 岩田 敏, 浅田 穰, 水谷 修紀

Ataxia Telangiectasia における細胞周期、apoptosis 調節機構。第71回日本生化学会大会、名古屋、10月14-17日、1998.

10. 山田 孝之, 辻本 敦美, 浅田 穰, 水谷 修紀

ヒト新規 TPR 遺伝子 kim-1 の mitosis における機能解析。第71回日本生化学会大会、名古屋、10月14-17日、1998.

11. 黒田 達夫, 佐伯 守洋, 中野 美和子, 嶋寺 伸一, 坂本 浩一, 本名 敏郎, 林 夙, 水谷 修紀

Single PCR 法による神経芽細胞腫 MRD 検索の臨床的評価。第14回日本小児がん学会、札幌、10月19-20日、1998.

12. 浅田 穰, 山田 孝之, 一條 秀憲, 水谷 修紀

細胞質局在 p21 によるアポトーシス抑制。第40回臨床血液学会、金沢、11月11-13日、1998.

13. 高木 正稔, 重田 輝子, 浅田 穰, 水谷 修紀

Caffeine 添加による放射線感受性、細胞周期調節機構の p53 変異株での検討。第40回臨床血液学会、金沢、11月11-13

- 日、1998.
14. 浅田 穰, 山田 孝之, 一条 秀憲, 水谷 修紀
細胞周期阻害因子 p21 は細胞質においてアポトーシス阻害因子として働く。第21回日本分子生物学会、横浜、12月16-19日、1998.
15. 山田 孝之, 辻本 敦美, 浅田 穰, 水谷 修紀
ヒトTPR 遺伝子 kim-1 の mitosis における機能解析。第21回日本分子生物学会、横浜、12月16-19日、1998.
16. 小児の治療関連二次性白血病 日本血液学会総会シンポジウム 「二次性白血病」1998年3月
17. 家族性腫瘍の倫理的諸問題 日本サイコオンコロジーシンポジウム 1998年6月
18. 遺伝性がんの素因遺伝子診断に関する倫理的問題 日本人類遺伝学会シンポジウム「遺伝カウンセリングをめぐる諸問題」 1998年10月
19. 中畑龍俊：造血幹細胞移植法の現状と将来への展望。第11回 自己血輸血学術総会 サテライトシンポジウム、埼玉、1998.
20. 融葉乃, 中畑龍俊：サイトカインによるヒト肥満細胞分化の調節。第60回日本血液学会総会、大阪、1998.
21. 本田浩章, 鈴木隆浩, 稲葉俊也, 辻浩一郎, 中畑龍俊, Thomas Look, 矢崎義雄, 平井久丸：E2A-HLF発現マウスにおけるリンパ球の発達異常及び白血病の発症。第60回 日本血液学会総会、大阪、1998.
22. 二木真琴, 岩尾宏, 宮島篤, 中畑龍俊, 浅野茂隆, 山下孝之：レチノイン酸(RA)によるJAK2/STAT5の持続的活性化と赤芽球系分化。第60回 日本血液学会総会、大阪、1998.
23. 真部淳, 海老原康博, 菊地陽, 辻浩一郎, 中畑龍俊：ビーズを用いたフローサイトメトリー(FCM)による少数細胞の解析法の開発。第60回 日本血液学会総会、大阪、1998.
24. 前川平, 西原政道, 石井武文, 和田結花, 尾上和夫, 中畑龍俊, 浅野茂隆：キメラ骨格を有するBcl-2アンチセンス核酸による白血病細胞の増殖制御に関する検討。第60回 日本血液学会総会、大阪、1998.
25. 谷口俊恭, 千勝紀生, 本倉徹, 藤田敏郎, 浅野茂隆, 中畑龍俊：ヒト造血コロニーにおけるp21,p27発現の解析。第60回 日本血液学会総会、大阪、1998.
26. 西原政道, 石井武文, 海老原康博, 和田結花, 尾上和夫, 辻浩一郎, 上野均, 浅野茂隆, 中畑龍俊, 前川平：臍帯血をもちいたヒトBリンパ球造血前駆細胞培養系の開発と分化増殖動態の解析。第60回日本血液学会総会、大阪、1998.
27. 許明江, 植田高弘, 海老原康博, 辻浩一郎, 宮島篤, 中畑龍俊：マウスGM領域由来ストローマ細胞株、AGM-S3細胞のヒト及びマウス造血支持能の解析。第60回 日本血液学会総会、大阪、1998.
28. 辻村秀樹, 東條有伸, 長山人三, 谷憲三朗, 海老原康博, 中畑龍俊, 浅野茂隆：CMLにおける末梢血樹状細胞の解析—健常者との比較。第60回 日本血液学会総会、大阪、1998.

29. 山田薫、日比野仁、辻浩一郎、谷憲三朗、杉本芳一、中畑龍俊：可溶性IL-6受容体を用いたヒト造血幹細胞への遺伝子導入の試み。第60回日本血液学会総会、大阪、1998.
30. 向山洋介、原孝彦、中畑龍俊、宮島篤：AGM(aorta-gonad-mesonephros)領域初代培養系における未分化造血細胞・血管内皮細胞の増幅。第60回日本血液学会総会、大阪、1998.
31. 楊逢春、渡辺すみ子、辻浩一郎、中畑龍俊：hG-CSFR-Tgマウス造血に対するhG-CSFのin vivo効果。第60回日本血液学会総会、大阪、1998. ...
32. 佐藤剛、辻浩一郎、中畑龍俊：ヒト白血病細胞株におけるSCF刺激によるEPOR発現誘導とEPO感受性獲得。第60回日本血液学会総会、大阪、1998.
33. 大野伸広、東條有伸、谷憲三朗、海老原康博、中畑龍俊、浅野茂隆：IgG-Fcフラグメント融合サイトカイン/接着分子の作製とその応用。第60回日本血液学会総会、大阪、1998.
34. 植田高弘、吉野浩、海老原康博、真部淳、菊地陽、辻浩一郎、中畑龍俊：NOD-SCIDマウスを用いたヒト臍帯血造血幹細胞の造血再構築能の検討。第60回日本血液学会総会、大阪、1998.
35. 前川平、西原政道、石井武文、和田結花、尾上和夫、高橋恒夫、浅野茂隆、中畑龍俊：臍帯血をもちいたヒトBリンパ球造血前駆細胞培養系の開発。第46回日本輸血学会総会、京都、1998.
36. 小原明、小島勢二、今宿晋作、大賀正一、小池健一、小西省三郎、土田昌宏、別所文雄、花田良二、中畑龍俊、月本一郎：小児期の肝炎後再生不良性貧血全国調査。第101回小児科学会学術集会、鳥取、1998.
37. 辻浩一郎、菊地陽、高橋恒夫、浅野茂隆、中畑龍俊：東京臍帯血バンクの現状。第101回小児科学会学術集会、鳥取、1998.
38. 吉野浩、植田高弘、吉田真、海老原康博、菊地陽、真部淳、辻浩一郎、中畑龍俊：ヒト臍帯血造血幹細胞の造血能の検討。第101回小児科学会学術集会、鳥取、1998.
39. Tada H., Ogawa Y., Kawano T., Goto A., Shirahata A., Horiuchi T., Ishikawa A., Nakahata T.: Long-term outcome of premature infants after erythropoietin treatment. XXII International congress of pediatrics. Amsterdam, 1998.
40. Shirahara A., Tada H., Ogawa Y., Kawano A., Goto A., Horiuchi T., Ishikawa A., Nakahata T.: The timing of the start of erythropoietin treatment for premature infants. XXII International congress of pediatrics. Amsterdam, 1998.
41. 中畑龍俊：教育講演 造血幹細胞移植の将来展望。第18回日本アフェレンス学会学術大会、東京、1998.
42. 白幡聡、多田裕、小川雄之亮、河野寿夫、後藤彰子、堀内勁、石川昭、中畑龍俊：未熟児貧血に対するエリスロポエチン製剤の投与時期に関する検討。第34回日本新生児学会学術集会、福岡、1998.

43. 中畑龍俊：造血幹細胞の増殖・分化機構とその臨床応用. 第21回シスメック血液学セミナー東京、神戸、1998.
44. 中畑龍俊：臍帯血移植の現状と将来. がんの子供を守る会・平成10年度定期総会. 東京、1998.
45. 中畑龍俊：特別講演 小児MDSの診断と治療. 第4回日本小児がんセミナー、岡山県、1998.
46. K.Misawa, S.Morita, T.Nosaka, A.Kaneko, T.Nakahata, T.Kitamura, : A NOVEL EXPRESSION CLONING METHOD FL-REX THAT IS DESIGNED TO SCREEN CDNA LIBRARIES BASED ON THE LOCALIZATION OF THE CDNA .: 27th ISEH , Vancouver,1998.
47. Taniguchi T., Chikatsu N., Uchiyama K., Asano S, Fujita T, Nakahata T., Motokura T.: Expression of p21CIP1/WAF1/SDI1 and p27/KIP1 cyclin-dependent kinase inhibitors during human hematopoiesis. 40th Annual Meeting of the American Society of Hematology , Miami Beach, U.S.A.,1998.
48. Sato T., Maekawa T., Watanabe S., Tsuji K., Nakahata T.: Erythroid progenitors differentiate and mature by self-produced erythropoietin. 40th Annual Meeting of the American Society of Hematology , Miami Beach, U.S.A.,1998.
49. Ebihara Y.,Tsuji K., Xu M.J., Manabe A., Kikuchi A., Kato S., Nakahata T.: Exclusive expression of G-CSF receptor on myeloid progenitors in bone marrow CD34+ cells. 40th Annual Meeting of the American Society of Hematology , Miami Beach, U.S.A.,1998.
50. Ishii T., Nishihara M., Ma F., Ebihara Y., Tsuji K., Asano S., Nakahata T., Maekawa T.: Expression of CXCR4 (fusin) on human CD34+ bonemarrow cells results in loss of the potential for myeloid, erythroid, megakaryocytic and mixed colony formations. Annual Meeting of the American Society of Hematology , Miami Beach, U.S.A.,1998.
51. Ohara a., Kojima S., Hibi S., Inada H., Kigasawa H., Okamura J., Ohga S., Toyoda Y., Bessyo F., Koike K., Konishi S., Tsuchida M., Hanada R., Imashuku S., Nakahata T., Tsukimoto I.: Development of MDS/AML in children with hepatitis associated aplastic anemia following treatment with ALG, cyclosporine and rhG-CSF. Annual Meeting of the American Society of Hematology , Miami Beach, U.S.A.,1998.
52. Xu M.J., Tsuji K., Matsuoka S., Yang F.C., Ebihara Y., Eguchi M., Nakahata T.: Evidence for the presence of murine primitive megakaryopoiesis in the early yolk sac. 40th Annual Meeting of the American Society of Hematology , Miami Beach, U.S.A.,1998.
53. Yamada K., Futaki M., Miyake

K., Suzuki N., Yamashita T., Shimada
T., Nakahata T.: Rapid
complementation analysis of Fanconi
anemia (FA) using bicistronic
retrovirus vector expressing FA typeA
gene and green fluorescent protein.
40th Annual Meeting of the American

Society of Hematology , Miami Beach,
U.S.A.,1998.

G.知的所有権の取得状況
なし。

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・遺伝子治療研究事業）

分担研究報告書

ゲノム不安定性を特徴とする小児がんの研究

研究者 水谷修紀 国立小児医療研究センターウイルス研究室長

研究要旨

小児がんの遺伝的発生の要因の解明を目的としてAtaxia Telangiectasia遺伝子異常保有細胞の生物学的特徴を患者ならびに保因者において解析し、細胞周期制御、細胞死制御障害が認められることを明らかにした。このことはATM異常ががん特に小児がんの発生前に寄与する遺伝的要因である可能性を否定しない。ATM異常のキャリアーが人口の1%であるとされることを考えるとATM異常診断の簡便化とそれに基づく保因者の頻度の解明や生物学的特徴を明らかにする必要がある。

A. 研究目的

Ataxia telangiectasia患者発生数は10万人にひとりとしてされ、その異常の保因者は欧米の報告によると人口の1%とされている。一方小児がんは環境要因によるよりも遺伝的要因によって発生する危険性が高く、ゲノムの不安定性要因を遺伝的背景として抱えている可能性が高い。小児期において悪性腫瘍発生にいたる遺伝的要因を明らかにする立場からAtaxia telangiectasia(AT)の発がん感受性決定における生物学的意義を明らかにする。われわれはATM異常の簡便な検出法の開発とATM異常による細胞生物学的変調の解明をめざして研究をすすめる。

B. 研究方法

細胞の株化

患者より採血したヘパリン加末梢血をFicoll-Hypaqueにより比重遠心法で単核球を分離し、EBウイルス産生細胞株B

95-8培養上清存在下にて培養し、株化した。

細胞周期の解析

固定細胞をPropidium iodide (PI)により染色し、細胞周期はベクトンデッキンソン社FACScanによりLysis IIプログラムを用いて解析した。S期ならびにG0/G1期の増加あるいは減少率はS(or G0/G1) with irradiation - S(or G0/G1) without irradiation/S(or G0/G1) without irradiationx100(%)で表現し、Mann-Whitney検定により結果を解析した。細胞への放射線量は基本的には5 Grayとした。

死細胞の同定と算定

H₂O₂は200mM, C2-ceramideは100mMを用いた。アポトーシス細胞の算定はFACScanによりsubdiploid分画を算定した。また一部の解析ではTUNEL法により断片化DNA保有細胞を算定した。

C. 研究結果

我々はATM遺伝子異常を有するAT患者からBリンパ球を株化し、その蛋白量の解析と機能変化の解析を中心に行ってきた。現在までに集めることのできた家系は10家系をこえるが、これらの株化細胞においてAT患者ではATM蛋白の発現がほとんどの症例で認められないことが明らかになった。またヘテロキャリアーに関する検討ではいずれも正常のATM量の50%程度の発現を認めた。これらの細胞株において放射線照射による細胞周期のG0/G1アレスト誘導能について解析した。その結果患者細胞株のすべてとヘテロ株の一部でG0/G1アレスト誘導能に欠陥が認められた。細胞周期制御異常をさらに詳細に解析する目的で、Mitotic/Spindleチェックポイントの制御についても解析を加えた。その結果放射線照射96、144時間の時点で患者株のすべて(2/2)とヘテロ細胞の一部(2/3)において顕著な多倍体細胞の出現を認めた。一方放射線照射による細胞死の誘導能については患者株およびヘテロ株全てにおいて等しく障害を認めた。この細胞死抵抗性は放射線のみでなくC2-ceramide, H2O2に対しても認められた。

D. 考案

AT細胞ではDNA障害に対する急性のアポトーシスに抵抗性であることに加えて従来言われているG1, S, G2/M期の細胞周期制御障害の他に新たにMitotic Spindle チェックポイントの異常を示すことが判明した。また、今回初めて人口の1%前後を占めるとされるATキャリアー

由来の細胞についてその細胞生物学的特徴を解析した。その結果1) これらの細胞株ではAT患者細胞株と同様にDNA障害に対する急性アポトーシスの誘導に障害を認めた。2) AT細胞の特徴として明らかにした細胞周期制御特にMitotic Spindle チェックポイントの障害についてキャリアー由来の細胞株の一部で障害を認めた。これらのことから患者株のみでなくヘテロ株においても細胞生物学的異常が認められることが明確になった。ヘテロ株においてはATMたんぱく質の発現量の低下あるいは変異たんぱく質によるドミナントネガティブ効果が生物学的特徴の決定に大きく寄与していることが考えられた。ATM遺伝子変異の高い浸透度とその細胞生物学的影響を考えると、ヘテロ変異の一般人口における正確な発生頻度の解明と、小児がんを始めとする一般癌患者にしめるヘテロ保因者の頻度を解明していく必要があると考えられる。

E. 結論

細胞死や細胞周期制御機構の障害がATのみならず、ATM異常の保因者で認められることを初めて明らかにした。またATM蛋白量の解析が診断上有用であり、保因者診断上の第一次スクリーニング法として有用であることが示唆された。新しいより簡便な遺伝子診断技術と併用することでより広範な患者あるいは保因者の診断に活用できることがあきらかになった。これらをもとに保因者の発がん特に小児がん患者予備軍としての意義を解明する必要があると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Teruko Shigeta, Masatoshi Takagi, Domenico Delia, Luciana Chessa, Satoshi Iwata, Yusuke Kanke, Minoru Asada, Mariko Eguchi, Shuki Mizutani. Defective control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint in heterozygous carriers of ATM mutations. *Cancer Res* (in press)
2. Domenico Delia, Shuki Mizutani, Elda tagliabue, Enrico Fontanella, Minoru Asada, Takayuki Yamada, Yoichi Taya, Sabrina Prudente, Luigi Frati, Marco Pierotti, Liciana Chessa. ATM protein and radiation response in Ataxia-Telangiectasia (AT) patients and AT heterozygotes. *Cancer Res.* (in press)
3. Minoru Asada, Takayuki Yamada, Hidenori Ichijo, Domenico Delia, Kohei Miyazono, Kenji Fukumoto, Shuki Mizutani. Apoptosis inhibitory activity of cytoplasmic p21Cip1/WAF1 in monocytes differentiation. *EMBO J.* (in press)
4. Ishii E, Yoshida N, Kimura N, Fujimoto J, Mizutani S, Sako M, Hibi S, Nagano M, Yoshida T, Mori T, Kiyokawa N, Mohri S, Tanaka T, Miyazaki S, Hara T. Clonal dissemination of T-lymphocytes in scid mice from familial hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Med Pediatr Oncol* (in press)
5. Masatoshi Takagi, Teruko Shigeta, Minoru Asada, Satoshi Iwata, Shinpei Nakazawa, Yusuke Kanke, Ko-ichi Ishimoto, Shuki Mizutani. DNA damage associated cell cycle and cell death control is differentially modulated by caffeine in clones with p53 mutations. *Leukemia* 13, : 70-77, 1999
6. Minoru Asada, Takayuki Yamada, Kenji Fukumoto, Shuki Mizutani. p21Cip1/WAF1 is important for differentiation and survival of U937 cells. *Leukemia* 12, : 1944-1950, 1998.
7. Satoshi Iwata, Yuya Sato, Minoru Asada, Masatoshi Takagi, Atsumi Tsujimoto, Toshiya Inaba, Takayuki Yamada, Shunji Sakamoto, Jun-ichi Yata, Tomomi Shimogori, Kazuei Igarashi, Shuki Mizutani. Anti-tumor activity of antizyme which targets the ornithine decarboxylase (ODC) required for cell growth and transformation. *Oncogene* 18, : 165-172, 1999
8. Shuki Mizutani. Recent advances in the study of the hereditary and environmental basis of childhood leukemia. (Review article) *International Journal of Hematology* 68 : 131-143, 1998
9. Takagi M, Delia D, Chessa L, Iwata S, Shigeta T, Kanke Y, Goi K, Asada M, Eguchi M, Kodama C, Mizutani S. Defective control of apoptosis, radiosensitivity, and spindle