

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 11 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.

## 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 奂, 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, 一条 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.

G. 知的所有権の取得状況  
なし

骨髄不全症を伴う遺伝性小児がんの研究

分担研究者 中畑龍俊 東京大学医科学研究所癌病態学研究部教授

研究要旨：日本の Fanconi 貧血 (FA)における FAC および FAA の異常の頻度や種類を解析し、変異の種類と疾患の表現型との関連を検討し以下の成果を得た。FA 患者検体 34 例中 9 例に FAC の変異を検出し、すべてが Ashkenazi Jews のみで報告されていた intron 4 の同一の変異 (IVS4+4 A to T) であった。欧米での報告と異なり IVS4 変異群と non-C 群とで血液学的異常発症年齢、先天性奇形の重症度は有意差を認めなかった。患者末梢血から EB transformed lymphoblast cell line の樹立を試み、non-C 群由来の患者 7 名より EB cell line を樹立した。そのうち 6 株において FAA 蛋白の発現の消失または異常を認め、これらの症例は A 群に属すると考えられた。

A. 研究目的

Fanconi 貧血 (FA)は、通常小児期に再生不良性貧血を発症し、高率に MDS や AML などの悪性腫瘍を合併する常染色体劣性遺伝疾患である。FA には A - H の 8 つの相補群があるが、C 群の FAC、A 群の FAA の 2 種類のみクローニングされている。欧米では C 群の変異の頻度は約 12%、A 群患者は約 65%程度とされるが、人種差、地域差が大きく、変異の種類も多様である。しかし、日本人における変異の解析はほとんど行われていない。

本年度は、日本人患者における FAC および FAA の異常の頻度や種類を解析し、変異の種類と疾患の表現型との関連を検討することを目的とした。

B. 研究方法

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。

C. 研究結果

わが国の各大学、病院から送付していただいた 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。IVS4 変異群は、欧米では早期発症と重症奇形を示すとされるが、今回の検討ではそのような傾向は見られず、人種により疾患表現型が異なる可能性も考えられる。

FA 患者末梢血から EB transformed lymphoblast cell line を樹立することは極めて困難なことが知られているが、今回樹立を試みた患者検体のうち、non-C 群由来の患者 7 名より EB transformed lymphoblast cell line を樹立することができた。この 7 株の EB cell line のうち、FAA 蛋白の発現を検討したところ、6 株において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。

#### D. 考案

Fanconi 貧血の遺伝子形質は、Fanconi 貧血細胞のDNA架橋剤に対する高感受性が細胞融合により補正されるかどうかで8つの相補群に分けられているが、最近まで同定されていたのはA群およびC群の遺伝子であったが、ごく最近G群の遺伝子が同定された。

C群の遺伝子であるFACは9番染色体長腕上に位置し、cDNAは4566bpの大きさを14個のエクソンから構成される1674bpのopen reading frameを持ち、558個のアミノ酸をコードしている。FACのコードする蛋白は主として細胞質内に存在するとされるが、機能に関しては明らかではない。一方、A群の病因遺伝子FAAは16番染色体長腕上に位置する80kbにわたる遺伝子で43個のエクソンを持ち、1455個のアミノ酸をコードし、核内に存在する蛋白に特徴的なアミノ酸配列(nuclear localising signal)を有する。FAC、FAAは既知の他の蛋白あるいは相互の有意なホモロジーは持っておらず、その分子の働きはまだ不明である。FACはDNAの修復や細胞周期、アポトーシスへの関与が示唆されている。

欧米ではC群の患者の頻度は約12%と比較的少ないが、FACの遺伝子変異は170家系以上について解析されており、現在までに9種類の変異が報告されている。変異の約90%はexon 1、14およびintron 4に集中している。最も多いのは、IVS4+4A→T(intron 4におけるAのTへの変換、splicing異常のためexon 4の欠失が起こる)であり、これはユダヤ人(Ashkenazi Jew)にのみ特徴的とされていた。次いで多いのがdelG322(exon 1内の322番目のGの欠損)で、frame shiftを起こす。exon 14には548番目のコドンのnonsense mutation、554番目のコドンのmissense mutationが報告されている。患者の三分の一は奇形を持たず、また三分の一は血液学的異常を示さない。すなわち、古典的な臨床症状をすべて持たない患者が多く、臨床表現型は非常に幅が広いことが知られている。一方、最近のInternational Fanconi Anemia Registryからの報告では、intron 4、exon 14に変異を有する患者は、exon 1に変異を持つ患者やtype C以外のFA患者に比べ、重症で予後不良であることが示されている。

日本人におけるFanconi 貧血の患者の頻度については、疾患自体の表現形質の多様性のため診断が困難なこともあり明らかではないが、小児再生不良性貧血の約5%を占めるとされる。DNA架橋剤による染色体断裂をFanconi 貧血の診断根拠とすると、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、地域あるいは人種により偏りがあることが知られている。日本人の患者に関しては、遺伝子異常のスクリーニングはほとんど行われていない。我々は、日本人FA患者34例においてゲノムDNAをPCR-SSCPにてスクリーニングし、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(投稿中)。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。また欧米では東欧系ユダヤ人のみで報告されているIVS4+4A→Tの変異が日本人のFACで高率にみられることは、民族学的見地からも興味深い。

一方、A群は欧米では細胞融合による相補性の検討から、FA患者の約60%を占めるとされている。FAAの遺伝子変異についても最近検討が進んできている。現在までの検討では、特定の領域への集中は認められないが、蛋白の異常が高頻度に見られている。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。いずれにしてもFAC、FAA蛋白としての機能が全く明らかにされていないので、今後機能的な解析が最も必要な課題であろう。今後、症例数を増やしてわが国におけるFACの特徴をさらに明らかにすると共にFAA、FAGについては遺伝子解析も進めていく予定である。さらに、未知の原因遺伝子(type B, type D, type E等)を発現クローニング法やpositional cloningを用いてクローニングする予定である。

また、治療の面では造血幹細胞のex vivo増幅や造血幹細胞への遺伝子導入、FAC、FAC遺伝子を組み込んだレトロウイルスベクターの作成など

遺伝子治療に向けた取り組みをわれわれは既に開始しており、この面でも研究を進展していきたいと考えている。

#### E. 結論

FA 患者検体 34 例中 9 例に FAC の変異を検出し、すべてが Ashkenazi Jews のみで報告されていた intron 4 の同一の変異 (IVS4+4 A to T) であった。欧米での報告と異なり IVS4 変異群と non-C 群とで血液学的異常発症年齢、先天性奇形の重症度は有意差を認めなかった。患者末梢血から EB transformed lymphoblast cell line の樹立を試み、non-C 群由来の患者 7 名より EB transformed lymphoblast cell line を樹立した。この 7 株の EB cell line のうち、6 株において発 FAA 蛋白の発現の消失または異常を認め、これらの症例は A 群に属すると考えられた。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. 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.
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. Tsuji K., Muraoka K., Nakahata T.: Interferon-g and human megakaryopoiesis. *Leukemia and Lymphoma* 31:107-113,1998..
8. 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.
9. Ishiguro A., Ishikita T., Shimbo T., Matsubara K., Baba K., Hayashi Y., Naritake S., Nakahata T.: Elevation of serum thrombopoietin precedes thrombocytopenia in Kawasaki disease. *Thromb. Haemostasis* 79:1096-1100,1998.
10. 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.
11. Suzuki H., Takei M., Nakahata T., Fukamachi H.: Inhibitory effect of adenosine on degranulation of human cultured mast cells upon cross-linking of FcεRI. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 242:697-702,1998.
12. 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.
13. Maruyama K., Tsuji K., Tanaka R., Yamada K., Koder 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.
14. Xu M., Tsuji K., Mukouyama 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.
15. 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.
16. 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.
17. 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.
18. 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.
19. 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.
20. 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.
21. 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.
22. Taniguchi T., Endo H., Chikatsu N., Uchimar K., Asano S., Fujita T., Nakahata T., Motokura T.: Expression of p21Cip1/Waf1/Sd1 and p27 Kip1 cyclin-dependent kinase inhibitors during human hematopoiesis. *Blood* in press.
23. 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.
24. Nakahata T., Toru H.: Development of human mast cells. *Adv. Immunol.* in press.
25. 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.
26. 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.
27. 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.
28. 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.
29. 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.
30. 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.
31. 中畑龍俊：造血幹細胞の試験管内増幅。臨床科学 34:1162-1170,1998.
32. 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.
33. 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.
34. 梅本有美、中畑龍俊：レプチンと造血。高久史麿、宮崎澄雄、齋藤英彦、溝口秀昭、坂田洋一（編）、Annual Review 血液 1998、pp 1-7、中外医学社、1998.

36. 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.
37. 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.
38. 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. 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.
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. 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.
11. 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.
12. 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.
13. 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.
14. 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.
15. 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.
16. 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.
17. 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.
18. 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.
19. 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.
20. 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.
21. 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. XXI International congress of pediatrics. Amsterdam, 1998.
22. 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. XXI International congress of pediatrics. Amsterdam, 1998.
23. 中畑龍俊：教育講演 造血幹細胞移植の将来展望. 第 18 回日本アフェレシス学会学術大会、東京、1998.
24. 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.
25. 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 回シスメックス血液学セミナー東京、神戸、1998.
26. 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.
27. 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.
28. 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.
29. Taniguchi T., Chikatsu N., Uchiyama K., Asano S, Fujita T, Nakahata T., Motokura T.: Expression of p21CIP1/WAF1/SDI1 and p27/KIP1 cycline-dependent kinase inhibitors during human hematopoiesis. 40th Annual Meeting of the American Society of Hematology, Miami Beach, U.S.A., 1998.
30. 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.
31. 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.
32. 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.
33. 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 associaten aplastic anemia following treatment with ALG, cyclosporine and rhG-CSF. Annual Meeting of the American Society of Hematology, Miami Beach, U.S.A., 1998.
34. 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.
35. 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

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

4.研究成果の刊行に関する一覧表

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

小児固形腫瘍発症の遺伝的・分子病理的背景の研究

分担研究者 秦 順一 慶應義塾大学医学部教授

研究要旨

分化・成熟途上の胎児性組織を発生母地とする腫瘍群の分子病理学的解析の結果、以下の点を明らかにした。（1）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。WT1 exon9-10 の異常を同定することは、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有用であることを明らかにした。

（2）散発性肝芽腫の腫瘍および非腫瘍部組織における肝芽腫における腫瘍発症には IGF2 の LOI よりも H19 の LOE が重要であることが示唆された。

A. 研究目的

小児腫瘍は成人の腫瘍に比し、その発症頻度は低い。しかしながら、乳幼児期に発生する胎児性腫瘍の発生機構の解析は、器官形成機序と腫瘍化との関連を知る上で、極めて重要な研究対象である。このような観点からわれわれは、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を明確にする。さらに転座によって生じるキメラ遺伝子については、発癌との直接的な関連を細胞および個体レベルで解析する。

B. 研究方法

（1）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。また、変異が isoform の異常を惹起するか否かを証明するため、変異を含んだ minigene を作成し cos 細胞に遺伝し導入し RT-PCR でその発現を解析した。（2）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。

C. 研究結果

（1）臨床的に Drash 症候群と診断された症例からわれわれが新たに見出した WT1 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、Frasier 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。

（2）H19 の maternal LOH : 3 例、hypermethylation による H19 の不活性化 (LOE) : 4 例を認めた。

D. 考察

（1）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。

（2）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。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。

## E. 結論

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。今後、形態形成と腫瘍発生との関連を詳細にしたい。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. 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
2. 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
3. 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
4. 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)
5. 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
6. 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)
7. Shimada, H., Ambros, I., Dehner, L.P., Hata, J., Joshi, V.V., Roald, B. : Establishments of the International Neuroblastic Pathology classification. *Cancer* (in press)
8. 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

9. 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
10. 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. *BBA*1396:132-137, 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

小児がん診断上の倫理的諸問題の研究

分担研究者 恒松 由記子 国立小児病院小児科医長

研究要旨：1) 小児がんの遺伝的な背景の研究は小児期特有のがんの研究を中心に行われてきた。しかし、一般的ながんの易罹患性と言う観点から、成人がんに包括して小児のがん易罹患性を研究する必要がある。今年度は、Wilms 腫瘍のあとで、26才時に二次性初がんとして大腸がんが生じた一例における腫瘍のマイクロサテライトマーカ-の不安定性 (MSI) を検索したところ大腸がん組織ばかりでなく、Wilms 腫瘍でも強陽性であった症例について、遺伝子レベルで5種類の遺伝子を検索したが、変異はなかった。まだ発見されていないミスマッチ修復遺伝子の変異である可能性がある。2) わが国で報告された P53 germline mutation を持つ家系を報告者が集まる会議で検討したところ、わが国では胃癌と肝がんが多いことがわかった。今後は独自の Li-Fraumeni 症候群の研究をすすめてハイリスク者への支援のプログラムを作成する必要がある事が確認された。3) 国立小児病院の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、研究段階にあるのものでも、インフォームド・コンセントを行うことが必要であり、癌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：

成人のがん多発家系に関与する原因遺伝子としてはミスマッチ修復遺伝子に関連するものももっとも多いとされている。しかし、この HNPCC のがん家系の中での小児がんの発生状況や遺伝子レベルの調査はまだない。また、わが国では小児がんの遺伝的背景を研究するためにクリアしなければならない倫理課題もあきらかにされていない。そこで本研究では  
1) 小児がんが多様な HNPCC 家系における腫瘍のコンポーネントとして存在しているかどうかを検索し、  
2) また Li-Fraumeni 症候群など種々のがんを発生し易い家系の探索を同時に行い  
3) 小児患者の材料を用いて研究際の倫理問題を明らかにしながら小児がんの遺伝的背景を研究する。

B. 研究方法：

1) 研究材料について：われわれは3年前から、国立小児病院のがん患者の腫瘍組織と正常組織を保存し、家族歴等の病歴とリンクさせて、遺伝学研究に役立つ病院ベースのがん材料登録を行ってきた。その中に、多重発がんや異常ながん家族集積を示し、遺伝的背景因子の関与が考えられる症例が蓄積してきた。今年度は、小児がんのあとで二次性発がんとして成人のがんを発生した患者や、がん多発家系中の小児がん患者で腫瘍組織において、replication error をスクリーニングして、陽性の患者の正常組織におけるミスマッチ修復遺伝子の異常の有無を検

査した。

2) わが国における Li-Fraumeni 症候群 (LFS) の文献検索を行い、報告者が参加する会議を開き、最近における家系の状況を聴取した。わが国における LFS の特徴やサーベランスの可能性を討議した。  
3) 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：

1) Wilms 腫瘍 (3 歳) が 26 歳で二次がんとして大腸がんを発症した患者で、大腸がん組織ばかりでなく、Wilms 腫瘍の組織にも著明な MSI が 6 種類の microsatellite marker (D2D123, D3s1029, Mfd27, Mfd47, D85254 and Tp53) で認められた。この患者の家系は HNPCC で認められる子宮がんを含むがん家系であった。しかし、末梢血や正常組織で得られた DNA samples で 5 つの mismatch-repair genes すなわち、hMSH2, hMLH1, hMSH6, hPMS1, and hPMS2 の変異を検索したが変異はなかった。  
2) わが国の Li-Fraumeni 症候群と P 5 3germline mutation の報告者による会議を 10 月 3 日に小児病院で開いた。その結果、わが国では、胃癌と小児の肝腫瘍が著明に多かった。わが国で、保因者のサーベランスの可能性を討議して LFS の登録

を行う方向となった。国立小児病院の症例で、発端者は肝肉腫（5才）、父親が胃癌（36才）で両者ともP53のgerm-line mutationがあった。

3) 小児がん患者とその家族130人から回答を得た。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. 考察：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、ライフスタイ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し、研究の必要性についての社会の理解を深めることが先決である。

1) 小児がんにおけるミスマッチ修復遺伝子の役割については、Turcot 症候群以外では未解決の分野である。ミスマッチ修復遺伝子はつぎつぎと発見されていて、われわれの症例もまだ発見されていない、新しい遺伝子の以上よる可能性もある。今後、遺伝的な背景がある家系で、小児がんのMSIとミスマッチ修復遺伝子の検索を系統的に研究している必要がある。

2) わが国では、P53germ-line mutationをもつ

家系の報告は24家系だった。わが国でのがんの種類が欧米とことなることが興味深い。これらの患者支援のためには、わが国独自のがん高危険群のサーベイランスのプログラムを作成する必要がある。

3) 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。研究の必要性についての社会の理解を深めることが先決である。

E. 結論：1) 小児がんの遺伝的な背景の研究は今までは、小児期特有のがんの研究を中心に行われてきたが、われわれが検索した症例のように、小児がんが多彩なHNPCC家系における腫瘍のコンポーネントとして存在している可能性がある2) わが国独自のLi-Fraumeni 症候群の研究をすすめてハイリスク者への支援のプログラムを作成する必要がある。3) がんの遺伝研究においては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) 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

2) 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

3) 小原美江、斎藤智恵子、山田こども、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

4) Tsunematsu, Y.: Ethical, legal and social issues in pre-symptomatic testing for cancer susceptibility in familial cancers. J Hum Genet. 43(Suppliment) 5, 1998

5) 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

6) 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

7) 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

8) 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

## 2. 学会発表

1) 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

2) 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

3) 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

## 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

ゲノム不安定性の新しい診断法の開発  
分担研究者 石岡千加史 東北大学加齢医学研究所・助教授

研究要旨

がん関連遺伝子、特に遺伝性高発癌性疾患の原因遺伝子の変異を系統的に明らかにする目的で、出芽酵母を用いる遺伝子診断系の開発を行っている。本年度は、末梢血管拡張性運動失調症(AT)の原因遺伝子ATMの変異のスクリーニング法を開発する目的で、独自に開発したストップコドンアッセイ(SC assay)をATM遺伝子に応用した。さらに、このSC assayをがん抑制遺伝子PTENの変異スクリーニングに用いたほか、p53遺伝子のホモログp51遺伝子の転写活性を指標とする機能診断系や、DNAミスマッチ修復遺伝子hMLH1のスクリーニング法を開発し、遺伝性非腺腫症性大腸癌由来のミスセンス変異の機能評価を行った。

A. 研究目的

各種ヒト細胞のがん細胞遺伝子、特にがん抑制遺伝子の変異の有無を系統的に明らかにし、がん化機構の解明や遺伝子診断に応用する。

B. 研究方法

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。

C. 研究結果

これらのベクターをura3変異酵母株に導入・発現すると、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。出芽酵母を用いる遺伝子診断系をPTENがん抑制遺伝子(SC assay)、p51遺伝子(p53遺伝子のホモログ)の転写活性を指標とする機能診断系、DNAミスマッチ修復遺伝子hMLH1の機能診断系に応用した。

D. 考察

ATMのSC assayについては、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。既報告のストップコ

ドンアッセイとp53遺伝子の機能診断系は、他の遺伝子 (*PTEN*, *p51*) 変異の検出やその機能評価に有用であった。*hMLH1*遺伝子の機能診断系は遺伝性非腺腫症性大腸癌の胚細胞変異の評価に有用であり、特に当該家系の遺伝子診断に重要な情報を提供するものと考えられる。

#### E. 結論

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。p51やhMLH1の機能診断系を開発した。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) 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.

2) 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.

3) 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.

4) 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.

G. 知的所有権の取得状況  
なし。