

19990341

平成 11 年度厚生科学研究費補助金
(ヒトゲノム・遺伝子治療研究事業)

事業実績報告書

主任研究者 水谷修紀

(国立小児医療研究センター)

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

小児の発がん感受性におけるATM遺伝子異常の役割に関する研究

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要因の解明を目的としてAtaxia Telangiectasia (ATM)遺伝子異常保有細胞の生物学的特徴を解析し、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。これをもとにATM遺伝子異常の関与を明らかにするための新しい方法としてin vivo機能アッセイとストップコドンアッセイを開発し、これを用いてATM異常が小児がん発生における遺伝的背景をなしている可能性を解析した。その結果、小児期発症のホジキン病がATM遺伝子のミスセンス変異を有する個人に多発していることを明らかにした。この変異のために、DNA障害に対するp53やChk2の反応性が低下していたことから本症におけるATM異常の関与はかなり確実なものと考えられた。小児がんと診断された子どもをもつ親たちは、動揺のあとに、スピリチュアルな治癒力により、よりしなやかな精神を取り戻し、知的にも発揚し、難解な事項でも吸収してゆくようである。「がんは遺伝子の病気である」「材料保存の意義と研究の重要性」などの勉強会をこのスピリチュアルな痛みを経験した患者や患者家族とともに行う必要を認めた。

分担研究者

恒松由紀子 国立小児病院
石岡千加史 東北大学加齢医学研究所

伝子(ATM)異常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。この最終目的に向けてATM異常による細胞生物学的変調の研究をすすめ、その成果を用いたATM異常の簡便な検出法の開発を行う。開発されたスクリーニング法を用いて種々の小児がん患者の正常体細胞を解析し、疑わしいものについては核酸配列の決定によりATM異常の関与の有無を確定する。

A. 研究目的

Ataxia telangiectasia患者発生数は10万人にひとりとされ、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。一方小児がんの発生には遺伝的要因が関与する可能性が高く、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責任遺

B. 研究方法

1. 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B95-8培養上清存在下にて培養し、株化した。

2. 抗ATM抗体の作成とATM蛋白の解析

ATMたんぱくN末端のリコンビナント蛋白を作成し、これをウサギならびにマウスに免疫することによりポリクローナル、ならびにモノクローナル抗体を作成した。これらの抗体はウエスタンブロットならびに免疫沈降に応用が可能であることが明らかになった。これらの抗体を用いて被験サンプルの細胞抽出液を用いてウエスタンブロットによりATM蛋白量を測定した。

3. DNAダメージに対する反応性の解析

被験細胞に5 Gyの放射線を照射し、照射後30分における細胞抽出液をもちいてSer15リン酸化p53蛋白量について特異抗体を用いたウエスタンブロット法により解析した。同様に抗Ser20リン酸化p53抗体（国立がんセンター、田矢博士より供与）をもちいてSer20リン酸化p53をウエスタンブロット法により解析した。Chk2によるCdc25Cのリン酸化能については抗Chk2抗体による免疫沈降物を用い、リコンビナントCdc25Cを基質として32pの取り込み反応で定量した。

4. 核酸配列の決定

疑わしいサンプルについてはcDNAをもちいてATM遺伝子の全配列を直接決定した。cDNA上変異が認められた場合はゲノムDNAについてその領域の核酸配列を決定した。さらに細胞株でこれらの異

常が確認できたものについては、新鮮凍結検体において変異の有無を確認した。

5. 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。

6. 聞き取り調査

小児がんと診断された子どもで、1999年12月現在に国立小児病院の血液病棟の乳児室に入院していた6人の患者の父母、および外来通院中の2家系のLi-Fraumeni症候群の本人と家族（母親）の計14人に、一時間の面接を行った。面接の前には質問紙をあらかじめ渡し、面接の許可を得て、父母には別個に同一の面接者が（腫瘍科医師）面接した。乳児患者の診断は2名のダウン症候群に合併した白血病の患者、2名の急性リンパ性白血病患者、1名の均衡型染色体点座による（父親がキャリアー）先天異常（溶血性貧血を合併）そして、一人の先天異常と腎芽腫の合併症で全員0才から2才の乳児であって、すでに、診断から一ヶ月以上を経た患者であった。本調査では、聞き取られた具体的内容を列記して、内容を記述し考察する方法をとった。

7. 倫理面への配慮

患者ならびに健常者検体は国立小児病院、昭和大学付属病院、東海大学医学部の各倫理委員会の審査で承認を得たものを用いた。

C. 研究結果

国立小児病院の血液腫瘍科（医長：恒松由記子博士）において検査の承諾の得られた小児白血病18例、ホジキン病3例の患者から正常末梢血液を入手し、全例においてEBウイルスによって株化細胞を樹立した。これらを用いてATM蛋白の発現量をウエスタンブロットにより解析し、ホジキン病の全例、白血病の3例においてATM蛋白の発現量の低下を認めた。今年度はこのうちホジキン病に焦点を絞ることにして、ホジキン病由来B細胞株をもちいて放射線照射後のp53Ser15, Ser20のリン酸化能をそれぞれの特異抗体をもちいて解析した。その結果3例のすべてにおいてp53のSer15, Ser20のリン酸化の低下を認めた。P53のSer20のリン酸化はATM経路においてDNA障害によって活性化されるChk2によるものであることが明らかにされている。そこでChk2の基質であるCdc25Cに対するChk2のリン酸化能を32Pの取り込みを指標として解析した。その結果、ホジキン患者由来細胞株でChk2によるCdc25Cのリン酸化能が有意に低下していることが判明した。

これらの状況証拠をもとにして3例のサンプルからRNAを抽出し、cDNAの核酸配列の決定を行った。その結果野生型アレルの他に一例においては4367T→A (Ser1455Arg)、残りの2例において4949A→G (Asn1650Ser) ヘテロ変異を有することが判明した。この変異はさらに患者の培養前血液細胞においても確認された。

ATM遺伝子異常の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、ストップコドン(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6分画したATMcDNAうち5分画において成功し、最後の一分画を残すのみとなった。

倫理関連研究の調査対象としたほぼ全員がDrotar (Pediatrics 56:710,1975) に示された様に、ショック、否認、悲しみと怒り、適応、再起の経過をたどることがわかった。病気の説明、治療の説明と選択、予後の見通しをきちんと説明してもらっていたので、大きな不信感はなかったが、大きな苦しみや不安を乗り越えてきたことがわかった。

D. 考案

昨年度の研究においてATM遺伝子異常

のキャリアー細胞がDNAダメージに対する細胞生物学的反応性において異常を示すことを報告した。これらの異常はDNAダメージに対するp53Ser15の反応性やp53の蓄積障害という生化学的反応性の異常とよく相関した。これらの結果とATキャリアーの頻度が人口の1%（欧米）とする歴史的経過を踏まえ、発がん感受性決定におけるATM異常の関与に我々は注目した。ATM遺伝子はcDNAのサイズが10Kb近くあり、また遺伝子異常におけるホットスポットは発見されておらず、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。そこで我々は発現されるATM蛋白量とその機能に着目し、第一次、第二次スクリーニングを進める方法を選んだ。その結果今回の解析では解析した3例のホジキン病において全例がATMシグナル伝達の障害を示し、それを根拠に核酸配列の決定にまで作業を進めたところアミノ酸の置換を伴うミスセンス遺伝子変異を3例全例において確認するに至った。このようなミスセンス変異の機能的意義についてはその解釈に慎重であらねばならないが、DNAダメージに対するP53ならびにChk2シグナル経路の部分的な障害を伴っていること、全世界で解析され報告された400例近くの症例の中にはこのような多型を示す例がないこと、また本邦臍帯血DNA98検体を用いた解析においてもこのような変異は見いだされなかったことから、今回の遺伝子変異は疾患感受性を決定するうえで、重要な役割を担っていることが考えられた。

以前よりホジキン病は一部のものにおいては家族性を示すことが報告され、そ

のようなものには小児ホジキンが多いことが注目されていた。今回の我々の発見はこれらの歴史的な疑問に答えを提供するものであるとともに、発がん感受性決定において鍵となる遺伝子の遺伝的多型が重要な研究テーマであることを示す最初の例ではないかと考えられる。

酵母によるATMのストップコドンアッセイが成功しつつあり、今後臨床への応用が期待される。

治療者は、診断後、患者や親たちに、がんが起って来るしくみ・治療の選択・治療研究についてもわかりやすく十分に説明することが大切であり、医療倫理のキーワードはこのインフォームドコンセント（I.C.）である。現在このI.C.がある程度ゆきわたってきたは注目に値する。国立小児病院血液科では、90年から本人にもがんを告知して説明している。しかし、今回の調査で親のショックと動揺、悲嘆・不安・怒りなどへのコーピングへの積極的な援助がほとんどなされていないことがわかった。個人ばかりでなく血縁者の未来の病気を予知する遺伝病の遺伝子診断で家族ごと病気の予防ができる時代になろうとしている。このような時代に、上記のような理解、それも自己理解の重要性に心療内科とのリエゾン医療で気づくことが出来た。これからもこのような視点を深めながら、実際の症例を前にして診断時からのカウンセリング、また、遺伝カウンセリングを行ってゆく必要が示された。

E. 結論

ATMシグナル伝達経路の障害を指標と

た*in vivo*機能アッセイやATMストップコードンアッセイの確立に成功し、ATM異常のスクリーニング法として開発することができた。これをもちいて小児期のホジキン病になりやすさの遺伝的背景をなす要因としてATM遺伝子異常が関与することを世界で始めて発見した（投稿中）。

がん、先天異常、遺伝病を持つ両親達は、それぞれの病気が診断されるたびに、多かれ少なかれ、全員がショック、否認、悲しみと怒り、適応、再起の経過をたどるが、動揺のあとに、やがてスピチュアルな治癒力が働き、心の奥底がしなやかになるとともに知的にも発揚し、難解な事項でも吸収してゆくことがわかった。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Miyauchi J, Asada M, Tsunematsu Y, Kaneko Y, Kojima S, Mizutani S. Abnormalities of the p53 Gene in Juvenile Myelomonocytic Leukaemia. Br.J.Haematol.106:980-986,1999
- 2) Nagano M, Kimura N, Ishii E, Yoshida N, Yoshida T, Sako M, Hibi S, Imashuku S, Miyazaki S, Hara T, Mizutani S. Clonal expansion of $\alpha\beta$ -T Lymphocytes with inverted J β 1 bias in familial hemophagocytic Lymphohistiocytosis. Blood 94 (7):2374-82,1999
- 3) Shigeta T, Takagi M, Delia D, Chessa L, Iwata S, Kanke Y, Asada M, Eguchi M, Mizutani S. Defective control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint in heterozygous carriers of ATM mutations. Cancer Res 59:2602-2607,1999
- 4) Delia D, Mizutani S, Tagliabue E, Fontanella E, Asada M, Yamada T, Taya Y, Prudente S, Frati L, Pierotti M, Chessa L. ATM protein and p53-serine 15 phosphorylation in Ataxia-Telangiectasia (AT) patients and AT heterozygotes. Br. J. Cancer (in press)
- 5) Asada M, Yamada T, Ichijo H, Delia D, Miyazono K, Fukumuro K, Mizutani S. Apoptosis inhibitory activity of cytoplasmic p21Cip1/WAF1 in monocytic differentiation. EMBO J. 18 (5):1223-1234,1999
- 6) Takagi M, Shigeta T, Asada M, Iwata S, Nakazawa S, Kanke Y, Ishimoto K, Mizutani S. DNA damage associated cell cycle and cell death control is differentially modulated by caffeine in clones with p53 mutations. Leukemia 13:70-77,1999
- 7) Iwata S, Sato Y, Asada M, Takagi M, Tsujimoto A, Inaba T, Yamada T, Sakamoto S, Yata J, Shimogori T, Igarashi K, Mizutani S. Anti-tumor activity of antizyme which targets the ornithine decarboxylase(ODC)

- required for cell growth and transformation. *Oncogene* 18:165-172,1999
- 8) 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* 32 (3) : 201-208,1999
- 9) 水谷修紀 ATM遺伝子と発癌実験医学 第17巻 第5号 (増刊) : 41-47, 1999
- 10) 水谷修紀 慢性骨髄性白血病の分子病態 医学のあゆみ 第190巻 第5号 341- 345, 1999
- 11) 水谷修紀 小児がんと遺伝 Li-Fraumeni症候群、Ataxia Telangiectasiaをめぐる最近の話題 小児科診療 第62巻 第8号 :1137 - 1144, 1999
- 12) Shimada, A., Kato, S., Enjo, K., Osada, M., Ikawa, Y., Kohno, K., Obinata, M., Kanamaru, R., Ikawa, S., and Ishioka, C. The transcriptional activities of p53 and its homologue p51/p63: similarities and. *Cancer Res*, 59: 2781-6, 1999.
- 13) Kato, S., Shimada, A., Osada, M., Ikawa, S., Obinata, M., Nakagawara, A., Kanamaru, R., and Ishioka, C. Effects of p51/p63 missense mutations on transcriptional activities of p53 downstream gene promoters. *Cancer Res*, 59: 5908-11, 1999.
- 14) Sunahara, M., Shishikura, T., Takahashi, M., Todo, S., Yamamoto, N., Kimura, H., Kato, S., Ishioka, C., Ikawa, S., Ikawa, Y., and Nakagawara, A. Mutational analysis of p51A/TAp63gamma, a p53 homolog, in non-small cell lung cancer and breast cancer. *Oncogene*, 18: 3761-5, 1999.
- 15) Osada, M., Ishioka, C., Ichinohasama, R., Kadowaki, I., Murakawa, Y., Watanabe, M., Kanamaru, R., and Ikawa, S. Influence of p53 mutation on pathological grade, but not prognosis of non-Hodgkin's lymphoma. *Anticancer Drug Des*, 14: 107-14, 1999.
- 16) Yamashita, Y., Sagawa, T., Fujimoto, T., Sugawara, T., Yamada, H., Hoshi, N., Sakuragi, N., Ishioka, C., and Fujimoto, S. BRCA1 mutation testing for Japanese patients with ovarian cancer in breast cancer screening. *Breast Cancer Res. Tr.*, 58: 11-17, 1999.
- 17) Bell, D. W., Wahrer, D. C., Kang, D. H., MacMahon, M. S., FitzGerald, M. G., Ishioka, C., Isselbacher, K. J., Krainer, M., and

- Haber, D. A. Common nonsense mutations in RAD52. *Cancer Res*, 59: 3883-8, 1999.
- 18) Shafman, T. D., Levitz, S., Nixon, A. J., Gibans, L. A., Nichols, K. E., Bell, D. W., Ishioka, C., Isselbacher, K. J., Gelman, R., Garber, J., Harris, J. R., and Haber, D. A. Prevalence of germline truncating mutations in ATM in women with a second breast cancer after radiation therapy for a contralateral tumor. *Genes Chromosomes Cancer*, 27: 124-129, 2000.
- 19) Nichols, K. E., Levitz, S., Shannon, K. E., Wahrer, D. C., Bell, D. W., Chang, G., Hegde, S., Neuberg, D., Shafman, T., Tarbell, N. J., Mauch, P., Ishioka, C., Haber, D. A., and Diller, L. Heterozygous Germline ATM Mutations Do Not Contribute to Radiation-Associated Malignancies After Hodgkin's Disease. *J Clin Oncol*, 17: 1259-1266, 1999.
- 20) Tsunematsu Y, Yoshizawa Y, Miyauchi J, Konishi M, Miyaki M: A novel case with Wilms tumor followed by colon cancer both showing microsatellite instability. *Oncolo* 2000;58:159-160
- 21) Meadows AT, Tsunematsu Y: The late effects of treatment for neuroblastoma. In: Neuroblastoma (ed by Brodeur G M, Sawada T, Voute P A), *Elsevier Science*, Amsterdam (in press)
- 22) Sugano K, Taniguchi T, Saeki M, Tsunematsu Y, Tomaru U, Shimoda T: Germline *P53* mutation in a case of Li-Fraumeni syndrome presenting gastric cancer. *Jpn. J. Clin. Oncol*, 29: 513-516, 1999
- 23) Tachibana A, Kato T, Ejima Y, Yamada T, Shimizu T, Yang L, Tsunematsu Y and Sasaki S: The *FANCA* gene in Japanese Fanconi anemia: Reports of eight novel mutations and analysis of sequence variability.: *Human Mutation*, 13: 237-244, 1999
- 24) Nakabate H, Tuchiya T, Maseki N, Hatae Y, Tsunematsu Y, Horikoshi Y, Ishida Y, Kikuta A, Eguchi H, Endo M, Miyake M, Sakurai M and Kaneko Y: Correlation of chromosome abnormalities with presence or absence of *WT1* deletions/mutations in Wilms tumor.: *Genes, Chromosomes & Cancer*, 25: 26-32, 1999
- 25) 恒松由記子、掛江直子。「家族性腫瘍における遺伝子診断の研究とこれを応用した診療に関するガイドライン(案)」-作成の経緯と主旨. 遺伝子医学.1999;3(2)132-136
- 26) 恒松由記子. 遺伝性腫瘍の易罹性 (susceptibility) に関する遺伝

- 子診断の倫理的諸問題. 新潟医学会雑誌.1999;133(2)99-103
- 27) 恒松由記子, 伊藤千賀子, 味木和喜子. わが国の小児がんの疫学的動向. 小児科診療. 1999;8(3)1129-1136
- 28) 恒松由記子. 家族性腫瘍の遺伝子診断の倫理的・法的・社会的諸問題. 現代医療. 1999;31(9)2399-2405
- 29) 恒松由記子. 家族性腫瘍と遺伝子診断. OB/GYN CURRENT CONCEPT AND PRACTIC. 2000;7(1)14-15
- 30) 熊谷昌明, 恒松由記子. Evidenceに基づく小児がんの化学療法. 癌と化学療法. 2000;27(2)203-220
2. 学会発表
- 1) Mizutani S, Takagi M., Shigeta T, Asada M, Delia D, Chessa L. Cell cycle and apoptosis dysregulation in Ataxia Telangiectasia. Losane, Switseralnd, Jan.27- 30,1999
- 2) 浅田 穰, 山田 孝之, 一條 秀憲, 吉田 稔, 水谷 修紀
p21Cip1 の細胞質発現とアポトーシス耐性の機構 第61回日本血液学会, 東京, 4月19-21日, 1999.
- 3) 小口 薫, 高木正稔, 浅田 穰, 水谷修紀, 岩田 力, 瀬川 昌也, 二瓶健次 Ataxia Telangiectasia の細胞におけるプロテインキナーゼ chk2 の異常 第41回日本小児血液学会, 東京, 9月10-11日, 1999.
- 4) Minoru Asada, Takayuki Yanmada, Hidenori Ichijo, Domenico Delia, Shuki Mizutani. Apotosis inhibitory activity of cytoplasmic p21Cip1/WAF1 The Programmed Cell Death meeting. Cold Spring Habor, USA, Sept. 29- Oct. 3, 1999
- 5) 土田 里香, 宮内 潤, 恒松 由記子, 加藤 順也, 別所 文雄, 水谷 修紀 横紋筋肉腫の分化における細胞周期抑制因子 p27/Kip1 と転写因子 AP-1 の coactivator p38/Jab1 の発現に関する免疫組織学的検討 第15回日本小児癌学会, 宝塚, 11月18-19日, 1999.
- 6) 浅田 穰, 山田 孝之, 一條 秀憲, 水谷 修紀 アポトーシス阻害因子としての p21CKI 第22回日本分子生物学会, 福岡, 12月7-10日, 1999.
- 7) Tsunematsu, Y; Therapy related second leukemia and myelodysplastic syndrome :A National survey in Japan. Hiroshima Cancer Seminar Nov. 18, 1999. in Hiroshima City
- 8) 恒松 由記子, 吉沢 康男, 宮内 潤, 小西 省子, 宮木美知子: Wilms 腫瘍に続発し, マイクロサテライト不安定を両者に認めた26歳大腸がんの一例, 日本がん学会, 1999年9月, 広島市
- 9) 恒松由記子, 岩川真由美, 大川治夫, 大橋靖雄, 金子安比古, 土田嘉昭, 秦 順一, 樋之津史郎, 美杉和章, 山田正夫, 横森欣司 (日本ウイ

ルムス腫瘍スタディーグループ) :
情報ネットワークを用いた日本ウィ
ルムス腫瘍グループスタディー：日
本小児がん学会、1999. 11月
宝塚市

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

ATM遺伝子異常と小児がんに関する研究

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要因の解明を目的としてAtaxia Telangiectasia (ATM)遺伝子異常保有細胞の生物学的特徴を解析し、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。ATM遺伝子異常の関与を明らかにするための新しい方法を開発し、小児がん発生における遺伝的背景をなしている可能性を解析した。その結果、小児期発症のホジキン病がATM遺伝子のミスセンス変異を有する個人に多発していることを明らかにした。この変異のために、DNA障害に対するp53やChk2の反応性が低下していたことから本症におけるATM異常の関与はかなり確実なものと考えられた。

A. 研究目的

Ataxia telangiectasia患者発生数は10万人にひとりとされ、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責任遺伝子(ATM)異常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。この最終目的に向けて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研究をすすめる。開発されたスクリーニング法を用いて種々の小児がん患者の正常体細胞を解析し、疑わしいものについては核酸配列の決定によりATM異常の関与の有無を確定する。

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B95-8培養上清存在下にて培養し、株化した。

抗ATM抗体の作成とATM蛋白の解析

ATMたんぱくN末端のリコンビナント蛋白を作成し、これをウサギならびにマウスに免疫することによりポリクローナル、ならびにモノクローナル抗体を作成した。これらの抗体はウエスタンブロットならびに免疫沈降に応用が可能であることが明らかになった。これらの抗体を用いて被験サンプルの細胞抽出液を用いてウエスタンブロットによりATM蛋白量を測定した。

DNAダメージに対する反応性の解析

被験細胞に5 Gyの放射線を照射し、照

射後30分における細胞抽出液をもちいてSer15リン酸化p53蛋白量について特異抗体を用いたウエスタンプロット法により解析した。同様に抗Ser20リン酸化p53抗体（国立がんセンター、田矢博士より供与）をもちいてSer20リン酸化p53をウエスタンプロット法により解析した。Chk2によるCdc25Cのリン酸化能については抗Chk2抗体による免疫沈降物を用い、リンコンビナントCdc25Cを基質として32pの取り込み反応で定量した。

核酸配列の決定

疑わしいサンプルについてはcDNAをもちいてATM遺伝子の全配列を直接決定した。cDNA上変異が認められた場合はゲノムDNAについてその領域の核酸配列を決定した。さらに細胞株でこれらの異常が確認できたものについては、新鮮凍結検体において変異の有無を確認した。

C. 研究結果

国立小児病院の血液腫瘍科（医長：恒松由記子博士）において検査の承諾の得られた小児白血病18例、ホジキン病3例の患者から末梢血液を入手し、全例においてEBウイルスによって株化細胞を樹立した。これらを用いてATM蛋白の発現量をウエスタンプロットにより解析し、ホジキン病の全例、白血病の3例においてATM蛋白の発現量の低下を認めた。今年度はこのうちホジキン病に焦点を絞ることにして、ホジキン病由来B細胞株をもちいて放射線照射後のp53Ser15, Ser20のリン酸化能をそれぞれの特異抗体をもちいてウエスタンプロット法により解析した。その結果3例のすべてにおいてp53の

Ser15, Ser20のリン酸化の低下を認めた。P53のSer20のリン酸化はATM経路においてDNA障害によって活性化されるChk2によるものであることが明らかにされている。そこでChk2の基質であるCdc25Cに対するChk2のリン酸化能を32Pの取り込みを指標として解析した。その結果、Chk2によるCdc25Cのリン酸化能が有意に低下していることが判明した。

これらの状況証拠をもとにして3例のサンプルからRNAを抽出し、cDNAの核酸配列の決定を行った。その結果野生型アレルの他に一例においては4367T→A (Ser1455Arg)、残りの2例において4949A→G (Asn1650Ser) ヘテロ変異を有することが判明した。

D. 考案

昨年度の研究においてATM遺伝子異常のキャリアー細胞がDNAダメージに対する細胞生物学的反応性において異常を示すことを報告した。これらの異常はDNAダメージに対するp53Ser15の反応性やp53の蓄積障害という生化学的反応性の異常とよく関連した。これらの結果とATキャリアーの頻度が人口の1%（欧米）とする歴史的経過を踏まえ、発がん感受性決定におけるATM異常の関与に我々は注目した。ATM遺伝子はcDNAのサイズが10Kb近くあり、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。また、遺伝子異常におけるホットスポットは発見されておらず、全領域の配列を決定しなければならないという困難さをはらんでいる。そこで我々はATM蛋白量とその

機能に着目し、ATMを介するシグナル伝達障害を指標にして第一次、第二次スクリーニングを進める方法を選んだ。その結果今回の解析では解析した3例のホジキン病において全例がATMシグナル伝達の障害を示し、それを根拠に核酸配列の決定にまで作業を進めたところアミノ酸の置換を伴うミスセンス遺伝子変異を3例全例において確認するに至った。このようなミスセンス変異の機能的意義についてはその解釈に慎重であらねばならないが、DNAダメージに対するP53ならびにChk2シグナル経路の部分的な障害を伴っていること、ATMの遺伝子多型については今回見いだされた変異の報告がないこと、また臍帯血DNA98検体を用いた解析においてもこのような変異は見いだされなかったことから、今回の遺伝子変異は疾患感受性を決定するうえで、重要な役割を担っていることが考えられた。

ホジキン病はEBウイルスや遺伝的要因の関与が以前より示唆されていた。特に一部のものにおいては家族性を示すことが報告され、そのようなものには小児期ホジキンが多いことが注目されていた。今回の我々の発見はこれらの歴史的な疑問に答えを提供するものであるとともに、発がん感受性決定において鍵となる遺伝子の遺伝的多型が重要な研究テーマであることを示す最初の例ではないかと考えられる。

E. 結論

ATM異常のスクリーニング法を開発した。これをもちいて小児期のホジキン病になりやすさの遺伝的背景をなす要因と

してATM遺伝子異常が関与することを世界で始めて発見した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Miyauchi J, Asada M, Tsunematsu Y, Kaneko Y, Kojima S, Mizutani S. Abnormalities of the p53 Gene in Juvenile Myelomonocytic Leukaemia. Br.J.Haematol.106:980-986,1999
- 2) Nagano M, Kimura N, Ishii E, Yoshida N, Yoshida T, Sako M, Hibi S, Imashuku S, Miyazaki S, Hara T, Mizutani S. Clonal expansion of $\alpha\beta$ -T Lymphocytes with inverted J β 1 bias in familial hemophagocytic Lymphohistiocytosis. Blood 94 (7):2374-82,1999
- 3) Shigeta T, Takagi M, Delia D, Chessa L, Iwata S, Kanke Y, Asada M, Eguchi M, Mizutani S. Defective control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint in heterozygous carriers of ATM mutations. Cancer Res 59:2602-2607,1999
- 4) Delia D, Mizutani S, Tagliabue E, Fontanella E, Asada M, Yamada T, Taya Y, Prudente S, Frati L, Pierotti M, Chessa L. ATM protein and p53-serine 15 phosphorylation in Ataxia-Telangiectasia (AT) patients and AT heterozygotes. Br. J. Cancer

- (in press)
- 5) Asada M, Yamada T, Ichijo H, Delia D, Miyazono K, Fukumuro K, Mizutani S. Apoptosis inhibitory activity of cytoplasmic p21Cip1/WAF1 in monocytic differentiation. *EMBO J.* 18 (5):1223-1234,1999
 - 6) Takagi M, Shigeta T, Asada M, Iwata S, Nakazawa S, Kanke Y, Ishimoto K, Mizutani S. DNA damage associated cell cycle and cell death control is differentially modulated by caffeine in clones with p53 mutations. *Leukemia* 13:70-77,1999
 - 7) Iwata S, Sato Y, Asada M, Takagi M, Tsujimoto A, Inaba T, Yamada T, Sakamoto S, Yata J, Shimogori T, Igarashi K, Mizutani S. Anti-tumor activity of antizyme which targets the ornithine decarboxylase(ODC) required for cell growth and transformation. *Oncogene* 18:165-172,1999
 - 8) 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* 32 (3) : 201-208,1999
 - 9) Asada M, Yamada T, Fukumoto K, Mizutani S. p21Cip1/WAF1 is important for differentiation and survival of U937 cells. *Leukemia* 12:1944-1950,1998.
 - 10) 水谷修紀 ATM遺伝子と発癌 実験医学 第17巻 第5号 (増刊) : 41-47, 1999
 - 11) 水谷修紀 慢性骨髄性白血病の分子病態 医学のあゆみ 第190巻 第5号 341- 345, 1999
 - 12) 水谷修紀 小児がんと遺伝 Li-Fraumeni症候群、Ataxia Telangiectasiaをめぐる最近の話題 小児科診療 第62巻 第8号 :1137 - 1144, 1999
- ## 2. 学会発表
- 1) Mizutani S, Takagi M., Shigeta T, Asada M, Delia D, Chessa L. Cell cycle and apoptosis dysregulation in Ataxia Telangiectasia. *Losane, Switseralnd, Jan.27- 30,1999*
 - 2) 浅田 穰, 山田 孝之, 一條 秀憲, 吉田 稔, 水谷 修紀 p21Cip1 の細胞質発現とアポトーシス耐性の機構 第61回日本血液学会, 東京, 4月19-21日, 1999.
 - 3) 小口 薫, 高木正稔, 浅田 穰, 水谷修紀, 岩田 力, 瀬川 昌也, 二瓶健次 Ataxia Telangiectasia の細胞におけるプロテインキナーゼ chk2 の異常 第41回日本小児血液学会, 東京, 9月10-11日, 1999.
 - 4) Minoru Asada, Takayuki

Yanmada, Hidenori Ichijo,
Domenico Delia, Shuki Mizutani.
Apoptosis inhibitory activity of
cytoplasmic p21Cip1/WAF1 The
Programmed Cell Death meeting.
Cold Spring Harbor, USA, Sept.
29- Oct. 3, 1999

- 5) 土田 里香, 宮内 潤, 恒松 由
記子, 加藤 順也, 別所 文雄, 水
谷 修紀 横紋筋肉腫の分化におけ
る細胞周期抑制因子 p27/Kip1 と転
写因子 AP-1 の coactivator
p38/Jab1 の発現に関する免疫組織
学的検討 第15回日本小児癌学会,
宝塚, 11月18-19日, 1999.

- 6) 浅田 穰, 山田 孝之, 一條 秀
憲, 水谷 修紀 アポトーシス阻害
因子としての p21CKI 第22回日本
分子生物学会, 福岡, 12月7-10日,
1999.

G. 知的所有権の取得状況

なし

小児がん診断時の倫理問題

分担研究者 恒松 由記子 国立小児病院血液科医長

研究要旨

小児がんや遺伝病を発症した患者の両親に面接して、小児がん診断遺伝カウンセリングの際に重要な問題の聞き取り調査をした。診断や治療のインフォームドコンセントが行われていて、納得出来る医療を受けられていたにも関わらず、ショック、否認、悲嘆と怒りそして適応と再起の経過を経過することがわかった。親たちは、動揺のあとに、スピリチュアルな治癒力により、よりしなやかな精神を取り戻し、知的にも発揚し、難解な事項でも吸収してゆくようである。また、患者同志によるピアサポートが大きな力を示す。また、患者同志・家族同志は、再起の後は疾患の原因を明らかにする研究や治療の研究に積極的になることもわかった。われわれは、「がんは遺伝子の病気である」「材料保存の意義と研究の重要性」などの勉強会をこのスピリチュアルな痛みを経験した患者や患者家族とともに今後行ってゆく。

分担研究者 恒松 由記子 国立小児
病院血液科医長

A. 研究目的

小児がん患者の診断時における倫理問題については、患者が未成年者であるために、インフォームドコンセントは親の代諾により行われるため、医療者側が、親とのコミュニケーションスキルに熟達し心理的支援を十分に行うことが基本となる。

小児がんをもつ子どもの親の診断時における倫理的問題をさらに掘り下げるために、直接、面接によって、親たちへの支援で必要なこと、偶然や遺伝病に対する意識などを調査した。

B. 研究方法と結果

小児がんと診断された子どもで、1999年12月現在に国立小児病院の血液病棟の乳児室に入院していた6人の患者の父母、および外来通院中の2家系の Li-

Fraumeni 症候群の本人と家族（母親）の計14人に、一時間の面接を行った。面接の前には質問紙をあらかじめ渡し、面接の許可を得て、父母には別個に同一の面接者が（腫瘍科医師）面接した。乳児患者の診断は2名のダウン症候群に合併した白血病の患者、2名の急性リンパ性白血病患者、1名の均衡型染色体点座による（父親がキャリアー）先天異常（溶血性貧血を合併）そして、一人の先天異常と腎芽腫の合併症で全員0才から2才の乳児であって、すでに、診断から一ヶ月以上を経た患者である。本調査では、聞き取られた具体的内容を列記して、内容を記述し考察する方法をとり、集計は行わなかった。

共通の質問は

- ・こどもの病名を聞いた時の心境
- ・それから、どのように立ち直ったか？

- ・どのような言葉がほしかったか？
- ・病気は通常偶発的に起こることをきいてどう思ったか？
- ・こどもが先天異常だと聞いたときの心境
- ・それから、どのように立ち直ったか？
- ・どのような言葉がほしかったか？
- ・子どもが病気になってからと後からとではどのように変わったか？
- ・子どもが病気にかかるまでに、もっとつらい、あるいは同等の経験があったか？であった。

C. 研究結果

全員致死的な経過をたどらなかったが、多かれ少なかれ、全員が Drotar (Pediatrics 56:710,1975) に示された様に、ショック、否認、悲しみと怒り、適応、再起の経過をたどることがわかった。病気の説明、治療の説明と選択、予後の見通しをきちんと説明してもらっていたので、大きな不信感はなかったが、多きな苦しみや不安を乗り越えてきたことがわかった。

子どもの病気を聞いたときの心境：

- ・覚悟していたが、やはりほんとに白血病と聞いた時はショック。今でもその恐怖を考えると身震いする
- ・うちの子に限ってそんなことはない。
- ・深いショックで覚えていない。
- ・なぜうちの子に？
- ・深い悲しみ。悲しみが波のように。
なぜわれわれだけが苦しまなければならないのか？誰のせいで？死ぬとすればいつ？ 苦しみは？ 治っても私の子は変わってしまうのか？ 次ぎの子は？ この子の子どもは？

それからどのようにたちなおったか？

- ・病気の説明、治療の説明と選択、予後の見通しが非常に詳しく、正確な情報がなにもまして勇気をあたえてくれた。
- ・同室、同じ病気の親たちがいるということ患者会で知り合った仲間達がいることで慰められた
- ・大声でなきまくり、怒りをぶつけられる相手として、親しい友人に聞いてもらった
- ・アメリカの家族が書いた英語サポートブックをくまなく読んだ
- ・妻が落ち込んでしまっているのをケアすることが今でも大変
- ・親や子どもの心のケアをやってもらえるとよい

どのようなことばがほしかったか？どんな言葉にきずついたか？

- ・言葉かけより、聴いてくれるひとが必要
- ・「2才までにあるければ頭は大丈夫」というなにげない言葉にきずついた。

病気が偶然におこることをきいて

- ・自分の育て方や環境でないということについては心のわだかまりがなくなったが、ではなぜ自分の子どもに？と考えた時に、神様は不公平だな？と思った。偶然ということでは気が収まらない。

子どもが病気になってからとあとからでは

- ・子どもが宝であることを実感した
- ・家族のありがたさを感じ、家族中心の生活にかわった

子どもが病気になったことと同等のことは

- ・夫が遺伝性がんで亡くなった時
- ・父が亡くなったとき

回答は非常に共通していた。また、がんと診断されたときと同様にそれがあとから、遺伝病として起こったことがわかったとき、または、先天異常児として生まれた子どもを持つ親が、次に白血病とわかったときに二度目のショックと立ち直りの道をたどっていた。

D. 考察

治療者は、診断後、患者や親たちに、がんが起って来るしくみ・治療の選択・治療研究についてもわかりやすく十分に説明することが大切なことは言うまでもない。医療倫理のキーワードはこのインフォームドコンセント (I.C.) である。現在この I.C. がある程度ゆきわたってきた。国立小児病院血液科では、90年から本人にもがんを告知して説明している。しかし、今回の調査で親のショックと動揺、悲嘆・不安・怒りなどへのコーピングへの積極的な援助がほとんどなされていないことがわかった。

最近改訂された、WHO の健康の定義 (1999年11月改訂) として、スピリチュアルにも健康であることが、肉体的・精神的な健康に加えられた。スピリチュアルに健康であれば、これらの怒り・悲嘆は一種の人間の治癒能力により次第に自然にも癒されてゆくようだ。重症患者や遺伝病などの患者や家族を支援する医療者の倫理原則は彼らが経験的するスピリチュアルで全人的な病苦をまた、スピリチュアルに支えることが基本にあると考えた。従って、診断

時には通常のインフォームドコンセントの他に全人的にサポートするスピリチュアルな人的資源を必要とする。

親たちは、動揺のあとに、やがて心の奥底がしなやかになるとともに知的にも発揚し、難解な事項でも吸収してゆくようである。

国立小児病院血液科では心療内科とのリエゾンサイカエトリーを行っている。診療内科 (精神科) が準拠している人間理解は、医療モデルでは包含できない人間と人間との関わり、自分自身とどう向き合い、自分の内部を見つめていき、そこに人間としての資源を見つけるかなどに関して多くのヒントを与えてくれた。

これは非常に微妙な事柄に属するので、なかなか同僚の医師たちとの会話に乗せられるものではない。しかし「スピリチュアルな痛み」「全人的な痛み」を引き受けることなしには、がんの治療は極めて中途半端なものになってしまう。

個人ばかりでなく血縁者の未来の病気を予知する遺伝病の遺伝子診断で家族ごと病気の予防ができる時代になろうとしている。このような時代に、上記のような理解、それも自己理解を医師ができることの重要性に心療内科とのリエゾン医療で気づくことが出来た。これからもこのような視点を深めながら、実際の症例を前にして診断時からのカウンセリング、また、遺伝カウンセリングを行ってゆきたい。

E. 結論

がん、先天異常、遺伝病を持つ両親達は、それぞれの病気が診断されるたびに、多かれ少なかれ、全員が Drotar (Pediatrics 56:710,1975) が示した様に、ショック、否

認、悲しみと怒り、適応、再起の経過をたどるが、動揺のあとに、やがてスピチュアルな治癒力が働き、心の奥底がしなやかになるとともに知的にも発揚し、難解な事項でも吸収してゆくことがわかった。

F. 研究発表

論文発表

- 1) Tsunematsu Y, Yoshizawa Y, Miyauchi J, Konishi M, Miyaki M : A novel case with Wilms tumor followed by colon cancer both showing microsatellite instability. : *Oncology* 2000;58:159-160
- 2) Meadows AT, Tsunematsu Y :The late effects of treatment for neuroblastoma. In : Neuroblastoma (ed by Brodeur G M, Sawada T, Voute P A), Elsevier Science, Amsterdam (in press)
- 3) Sugano K, Taniguchi T, Saeki M, Tsunematsu Y, Tomaru U, Shimoda T : Germline P53 mutation in a case of Li-Fraumeni syndrome presenting gastric cancer. *Jpn. J. Clin.Oncol*, 29 : 513-516,1999
- 4) Tachibana A, Kato T, Ejima Y, Yamada T, Shimizu T, Yang L, Tsunematsu Y and Sasaki S : The FANCA gene in Japanese Fanconi anemia: Reports of eight novel mutations and analysis of sequence variability.: *Human Mutation*, 13 : 237-244,1999
- 5) Nakabate H, Tuchiya T, Maseki N, Hatae Y, Tsunematsu Y, Horikoshi Y, Ishida Y, Kikuta A, Eguchi H, Endo M,

Miyake M, Sakurai M and Kaneko Y : Correlation of chromosome abnormalities with presence or absence of WT1 deletions/mutations in Wilms tumor.: *Genes, Chromosomes & Cancer*,

25 : 26-32,1999

- 6) 恒松由記子、掛江直子.「家族性腫瘍における遺伝子診断の研究とこれを応用した診療に関するガイドライン(案)」-作成の経緯と主旨. *遺伝子医学*.1999;3(2)132-136
- 7) 恒松由記子. 遺伝性腫瘍の易罹患性(susceptibility)に関する遺伝子診断の倫理的諸問題. *新潟医学会雑誌*.1999;133(2)99-103
- 8) 恒松由記子、伊藤千賀子、味木和喜子. わが国の小児がんの疫学的動向. *小児科診療*. 1999;8(3)1129-1136
- 9) 恒松由記子. 家族性腫瘍の遺伝子診断の倫理的・法的・社会的諸問題. *現代医療*. 1999;31(9)2399-2405
- 10) 恒松由記子. 家族性腫瘍と遺伝子診断. *OB/GYN CURRENT CONCEPT AND PRACTIC*. 2000;7(1)14-15
- 11) 熊谷昌明、恒松由記子. Evidenceに基づく小児がんの化学療法. *癌と化学療法*. 2000;27(2)203-220

学会発表:

- 1) Tsunematsu, Y; Therapy related second leukemia and myelodysplastic syndrome :A National survey in Japan. Hiroshima Cancer Seminar Nov. 18, 1999. in Hiroshima City
- 2) 恒松 由記子、吉沢 康男、宮内 潤、

小西 省子、宮木美知子：Wilms 腫瘍に
続発し、マイクロサテライト不安定を両者
に認めた26歳大腸がんの一例、日本がん
学会、1999年9月、広島市

3) 恒松由記子、岩川真由美、大川治夫、
大橋靖雄、金子安比古、土田嘉昭、秦 順

一、樋之津史郎、美杉和章、山田正夫、横
森欣司（日本ウィルムス腫瘍スタディーグ
ループ）：情報ネットワークを用いた日本
ウィルムス腫瘍グループスタディー：日本
小児がん学会、1999. 11月 宝塚市