

審査の結果の要旨

氏名 吉田 美沙

本研究は進行神経芽腫に多く見られる 11q LOH の標的遺伝子として *ATM* に着目し、*ATM* と神経芽腫との関連性について検討するために、*ATM* のプールシーケンス法を用いた全エクソントターゲットアンプリコンシーケンス解析を行い、加えて、網羅的コピー数解析、健常人の *ATM* 変異解析、*ATM* 経路上の遺伝子の変異解析も行い、さらに共同研究により *ATM* の機能解析、*PARP* 阻害剤の使用検討等も行い、統合的解釈を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. 臨床検体の 24% に 11q LOH が検出され、その多くが *ATM* 領域を欠損していた。*ATM* 変異は臨床検体の 5.6% に同定され、そのほとんどは生殖細胞起源の変異であった。健常人の *ATM* 変異頻度は 5.2% で、腫瘍と同一の変異はほとんど認めなかった。*ATM* 以外の DNA 損傷応答関連遺伝子変異は臨床検体の 20% に検出され、ほとんどが生殖細胞起源であった。
2. 11q 欠失と *ATM* 変異は相互排他的であり、*ATM* 以外の DNA 損傷応答関連遺伝子についても変異遺伝子どうし相互排他的であり、変異と欠失も排他的傾向を示した。*ATM* はがん抑制遺伝子とされているものの、*ATM* の片アレル欠損ないし変異のいずれか一方だけでも神経芽腫の病態に関与する可能性が示唆された。*ATM* 経路上の DNA 損傷応答関連遺伝子についても片アレル異常が病態に関与する可能性が示唆された。
3. *ATM* ハプロイドの神経芽腫細胞株では *ATM* 発現低下傾向を認めた。*ATM* の下流分子リン酸化 *SMC1* の発現は *ATM* ハプロイドの細胞株の大部分で放射線照射後に減弱した。このことから *ATM* の片アレル欠損は *ATM* の発現量を低下させ *ATM* 経路の活性化を低下させる傾向が観察され、前述の 2 と合わせて、*ATM* の haploinsufficiency が病態に関与することが示唆された。
4. *ATM* 変異株を用いた機能解析では、腫瘍に検出された変異は *ATM* 欠損細胞の放射線高感受性を修復しない傾向が、健常人に検出された変異は修復する傾向がそれぞれ観察され、腫瘍に検出された変異だけが *ATM* の機能障害をもたらす可能性が示唆された。*ATM* の機能障害をもたらす生殖細胞変異が健常人と比較し臨床検体に多かったことと前述の 2 から、*ATM* の生殖細胞変異は神経芽腫発症の遺伝的リスクとなることが示唆された。*ATM* 以外の DNA 損傷応答関連遺伝子についても変異のほとんどが生殖細胞起源であったことと、遺伝子異常の相互関係や過去の報告と考え合わせると、神経芽腫発症の遺伝的リスクとなることが示唆された。
5. 腫瘍に検出された変異だけが *ATM* の機能障害をもたらす可能性が示唆され、*ATM* の欠失と変異が排他的であったことから、本研究では正常片アレル残存時の *ATM* 機能は不明で

あるものの、過去の報告も参照すると *ATM* の変異は **dominant negative** により病態に関与している可能性も考えられた。

6. DNA 損傷応答関連遺伝子異常陽性症例は全体の 48% を占め、進行例は非進行例と比較して DNA 損傷応答関連遺伝子異常陽性のオッズ比は 2.44 (p 値 0.015) であった。このことから DNA 損傷応答関連遺伝子の片アレル異常が神経芽腫の進展に関与する可能性が示唆された。
7. 生存曲線では DNA 損傷応答関連遺伝子異常陽性群は予後不良傾向を示したが、有意差は認められなかった。本コホートの症例数が少ないことや観察期間が短いものが含まれることから、正確な関係を知るには限界があると考えられる。
8. DR-GFP 相同組み換えアッセイにより、*ATM* 阻害剤添加神経芽腫細胞株における相同組み換え修復効率の低下が観察され、*ATM* が相同組み換え修復に関与することが神経芽腫細胞株においては初めて示された。神経芽腫細胞株への *PARP* 阻害剤添加によって大部分の細胞株でコロニー数減少が観察された。*ATM* に異常が同定されなかった株も含め大部分の細胞株の *PARP* 阻害剤感受性が観察され、この結果からも *ATM* 以外の DNA 損傷応答関連遺伝子異常が示唆された。
9. 神経芽腫において *MYCN* 過剰発現は *miR-421* を介して *ATM* の発現を抑制するという過去の報告において *MYCN* 増幅群と 11q 欠失群のいずれも DNA 損傷応答障害を有することが推察されていることや、本研究で対象としなかった DNA 損傷応答関連遺伝子についても神経芽腫における変異の報告が認められることや、前述 8 を考慮すると、進行神経芽腫の多くが様々な形で DNA 損傷応答障害を有する可能性も考えられ、難治性神経芽腫に対する *PARP* 阻害剤を用いた治療法の開発が予後の改善に寄与する可能性が期待された。

以上、本論文では *ATM* のヘテロ接合性生殖細胞変異が神経芽腫の病態に関与する可能性が新たに示された。また、*ATM* をはじめ、*ATM* 経路上の DNA 損傷応答関連遺伝子の片アレル異常が病態に関与し特に進行神経芽腫に認められやすい可能性も示され、難治例の治療への利用、中でも今後の *PARP* 阻害薬の実用可能性を検討するに当たり重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。