

氏名	さわだ まちこ 澤田 眞智子
学位(専攻分野)	博士(医学)
学位記番号	医博第2292号
学位授与の日付	平成13年1月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	医学研究科内科系専攻
学位論文題目	Evaluation of mutant frequencies in pediatric cancer patients before and during treatment (小児癌患者における体細胞突然変異率に関する研究) (1) Evaluation of mutant frequencies at the <i>hprt</i> and the T-cell receptor loci in pediatric cancer patients before treatment (治療前の小児癌患者における <i>hprt</i> 遺伝子座および T 細胞受容体遺伝子座の突然変異率に関する研究) (2) Prospective study of mutant frequencies at the <i>hprt</i> and T-cell receptor gene loci in pediatric cancer patients during chemotherapy (化学療法中の小児癌患者における <i>hprt</i> 遺伝子座および T 細胞受容体遺伝子座の突然変異率の前方視的研究)
論文調査委員	(主査) 教授 藤堂 剛 教授 内山 卓 教授 中畑 龍 俊

論文内容の要旨

近年、強力な化学療法の進歩により小児悪性疾患患者の長期生存が可能となってきたが、一方で二次癌を発症する症例が増加しており深刻な問題となっている。二次癌発症の要因の一つとされる抗癌剤や放射線は、DNAに損傷を与えることにより体細胞突然変異をひきおこすと考えられており、こうした治療による生体への影響を明らかにする目的で *hypoxanthine phosphoribosyl transferase* 遺伝子座 (*hprt*) や T 細胞受容体遺伝子座 (*TCR*) における体細胞突然変異率 (*Mf*) を治療前、治療経過中にわたり評価した。

方法は、*hprt-Mf* については T 細胞クローニング法を用いた。すなわち末梢血単核球を 6-チオグアニン存在下に培養、コロニー形成細胞を突然変異細胞としてクローニング率 (CE) を求め、対照の 6-チオグアニン無添加の CE で除して *Mf* を求めた。*Mf* 高値例については得られた複数の *hprt* 突然変異細胞の *TCR γ* 鎖遺伝子 (*TCR- γ*) 再構成パターンを解析、クローン性を評価した。すなわち PCR 法にて増幅した *TCR- γ* 領域を制限酵素 *Bst*NI, *Rsa*I にて切断、泳動し、同じパターンのものを同一クローン由来とした。また *TCR-Mf* については *TCR $\alpha\beta$* 鎖遺伝子に突然変異がおきると *TCR-CD3* 複合体が成熟 T 細胞表面に発現しないことを用い、フローサイトメトリーにて末梢血 CD4 陽性細胞中の CD3 陰性細胞の割合を測定した。

治療前の固形腫瘍患者27名と急性白血病患者5名、対照として26名の健常児について評価を行った。固形腫瘍患者3名において対照から算出した95%信頼区間を上回る *hprt-Mf* 高値が認められた。この3名は Hodgkin 病が2名、Askin 腫瘍が1名で、Hodgkin 病患者は検索した3名中2名で *hprt-Mf* 高値を呈していた。白血病患者では *hprt-Mf* 高値はみられず、また *TCR-Mf* はいずれの患者においても正常範囲を上回らなかった。

さらに9名の固形腫瘍患者について治療経過中の *hprt-Mf* および *TCR-Mf* の推移を評価した。患者の内訳は Hodgkin 病3名、神経芽細胞腫4名、Wilms 腫瘍2名であった。*hprt-Mf* は神経芽細胞腫の患者1名と Wilms 腫瘍の患者1名を除き治療開始後早期に上昇を示したが、特に Hodgkin 病患者において著しい傾向があった。*hprt-Mf* が上昇した Hodgkin 病患者の突然変異細胞における *TCR- γ* 再構成パターン解析の結果から、*Mf* の上昇は生じた変異細胞のクローン性増幅の結果ではなく、突然変異事象そのものの増加によると考えられた。一方、*TCR-Mf* についてもほとんどの患者で上昇傾向を認めたがその時期は一定でなかった。今回の化学療法に用いられた薬剤の中ではシクロフォスファミドが *hprt-Mf* の上昇に関与している可能性が考えられた。

Hodgkin 病は二次癌の発症率が高いことで知られているが、同病患者における *hprt*-Mf は治療経過中に著しい上昇を示すのみならず、一部の患者では治療前から高値をとっていた。化学療法による Hodgkin 病患者 Mf の著しい上昇には大量のアルキル化剤を含むその治療内容だけでなく、個体に元々存在する何らかの遺伝子不安定性が関与している可能性が示唆された。化学療法は明らかに Mf を上昇させたが、その程度は基礎疾患、治療内容、あるいは個体により差がみられた。個々の患者が化学療法からうける DNA 損傷の程度、ひいては二次発癌のリスクを推測する方法として、体細胞突然変異率の測定は有用であると考えられた。

論文審査の結果の要旨

癌化学療法は、体細胞突然変異を引き起こすことにより、二次癌発症に関与すると考えられる。すでに報告されている癌治療後の体細胞突然変異率 (Mf) の上昇をふまえ、小児癌患者の治療前及び治療経過中の、hypoxanthine phosphoribosyl transferase 遺伝子座 (*hprt*) 及び T 細胞受容体遺伝子座 (TCR) における Mf が詳細に検討された。

治療前 Mf は、固形腫瘍患者 27 例、急性白血病患者 5 例、対照健常児 26 例について検討された。Hodgkin 病 2 例、Askin 腫瘍 1 例において、*hprt*-Mf が対照の 95% 信頼区間を上回っていた。さらに 9 例の固形腫瘍患者 (Hodgkin 病 3 例、神経芽細胞腫 4 例、Wilms 腫瘍 2 例) について、治療経過中の Mf の変化が評価された。Hodgkin 病患者 3 例において、治療による著明な *hprt*-Mf の上昇を認めた。TCR- γ 遺伝子再構成の検討から、この上昇は突然変異細胞のクローン性増幅の結果ではないことが示された。一方、TCR-Mf は治療前の上昇例を認めず、治療中も上昇傾向を認めはしたが対照の 99% 信頼区間を越える例はなかった。

小児癌患者において、化学療法により実際に体細胞突然変異が増えることが示された。また Hodgkin 病患者の *hprt*-Mf 高値の原因として、大量のアルキル化剤を含む治療の他に、未知の遺伝子不安定性が関与する可能性が示唆された。

以上の研究は、小児癌患者において、癌化学療法が体細胞遺伝子に与える影響を明らかにすることに貢献し、二次癌発症の抑止に貢献するところが多い。

従って本論文は博士 (医学) 学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は平成 12 年 11 月 2 日実施の論文内容とそれに関連した諮問を受け、合格と認められたものである。