

氏 名	こ い し せい じ 小 石 誠 二
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 2278 号
学位授与の日付	平 成 12 年 9 月 25 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	Biomarkers in long survivors of pediatric acute lymphoblastic leukemia patients: late effects of cancer chemotherapy に関する研究 (小児急性リンパ性白血病の長期生存者に於ける生物学的マーカー：癌化学療法の晩期の影響)
論文調査委員	(主 査) 教 授 内 山 卓 教 授 上 田 國 寛 教 授 中 畑 龍 俊

論 文 内 容 の 要 旨

小児癌の治療成績の向上につれ、二次発癌が大きな問題になりつつある。二次発癌の原因の一つとして、化学療法薬剤による DNA 傷害の結果体細胞突然変異が誘発されることが指摘されている。本研究では小児急性リンパ性白血病 (ALL) 治療後の長期生存者を対象として、生体内におけるヒポキサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼ遺伝子座の突然変異の頻度 (*hprt*-Mf) 並びに突然変異細胞のクローン性 (clonality), T 細胞受容体遺伝子座の突然変異頻度 (TCR-Mf) や姉妹染色分体交換頻度 (SCE) を測定し、癌化学療法の体細胞突然変異に与える影響を検討した。

治療終了後 2 年以上経過し完全寛解を維持している ALL の患児 15 名から末梢血単核球を採取し 6-チオグアニンの存在下で T 細胞クローニング法を用いて *hprt*-Mf を測定した。更に得られた *hprt* 変異クローンにつき、PCR を用いて T 細胞受容体遺伝子の組換え部分を増幅し、この産物を 2 種の制限酵素で切断し、その電気泳動パターンで突然変異細胞のクローン性を解析した。末梢血 T 細胞に於いて CD3 分子は TCR と細胞内で会合して細胞表面に発現する為、TCR に変異がおきると CD3 の発現が欠損する。このことを利用して細胞表面 CD4 抗原陽性かつ CD3 抗原陰性のリンパ球をフローサイトメトリーで検出することにより TCR-Mf を測定した。SCE は 5 プロモデオキシウリジンを含む培地内で 2 回細胞分裂した後、紫外線や蛍光色素で処理し、ギムザで染色して光顕で染色分体間の部分的な入れ替わりを計数する方法で測定した。

hprt-Mf は患児 15 名中 10 名で年齢に応じて算出される正常対象の 99% 信頼限界を越える結果が得られた。正常対象小児の平均値以下を示したものは無かった。高値の 10 名は治療終了後 2 年 0 カ月から 16 年 2 カ月であり、同一症例で 6 カ月以上の間隔をおいて再検しても高値を維持していた。逆に 99% 信頼限界の範囲内の患児は毎回 99% 信頼限界の範囲内だった。*hprt* 変異細胞のクローン解析では同一クローンから派生したと判断されるものが *hprt*-Mf 高値の患児で多い傾向があったが、このことを考慮して Mf を修正しても Mf は高値の域にあった。TCR-Mf は *hprt*-Mf 高値の患児を含む全例で 99% 信頼限界の範囲内であり、又 SCE も 99% 信頼限界を越えるものは無かった。

小児の ALL では屢々治療後長期間に亘って *hprt* 座の突然変異頻度の上昇が遷延していることを明らかにした。リンパ球の細胞死では Fas を介したアポトーシスが重視されている為、突然変異のあるクローンと同一患児の正常クローンとで細胞表面の Fas 抗原の発現をフローサイトメトリーを用いて比較したが、突然変異のあるクローンでも細胞表面の Fas 抗原の発現が特に低下しているものはなかった。Fas を介したアポトーシスを逃れて変異細胞が有利に残存する可能性は否定的と思われる。クローン性の解析から突然変異の生じたクローンが生体内で有利に増殖する為でなく、変異が幹細胞に近いレベルで起き、長く残存する為であると考えられた。*hprt*-Mf 高値の患児でも TCR-Mf や SCE は特に高値を示さず、抗癌剤の影響は標的分子により異なることが示された。*hprt*-Mf 高値遷延は ALL 治療後の二次癌発症のメカニズムを考える上で重要な知見と思われる。

論文審査の結果の要旨

化学療法による DNA 傷害で生じる体細胞突然変異は二次癌の一因とされる。本研究では長期生存中の小児急性リンパ性白血病（ALL）症例で、生体内のヒポキサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼ遺伝子座と T 細胞受容体遺伝子座の突然変異頻度（*hprt*-Mf, *TCR*-Mf）並びに前者の突然変異細胞のクローン性や、姉妹染色分体交換頻度（SCE）を測定し、癌化学療法が体細胞突然変異に与える影響を検討した。

治療終了後 2 年以上経ており完全寛解維持中の ALL 患児 15 名から末梢血を採取して実験を行った。

hprt-Mf は 15 名中 10 名で正常対象の 99% 信頼限界を越える高値を示した。これら 15 名で、6 カ月以上後の再検査でも Mf 値が大きく変動した例は無かった。*hprt*-Mf 高値遷延例では変異細胞に若干のクローン性が見られたが、これは Mf 値に大きな影響を持つものではなかった。*TCR*-Mf や SCE は全例で 99% 信頼限界内だった。

小児の ALL では治療後長期間 *hprt*-Mf の高値が持続することを明らかにした。クローン性の解析結果から変異細胞の増殖によるもめは否定的で、変異が増殖可能な前駆細胞のレベルで生じて残存するものと思われた。又、抗癌剤の影響が標的分子により異なることも示された。

以上の研究は小児において癌化学療法で生じる体細胞突然変異の解明に貢献し、白血病治療に伴う晩期障害の軽減に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士（医学）の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 9 月 4 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。