

論文審査の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（ 医学 ）	氏名	河島 茉澄
学位授与の条件	学位規則第 4 条第① 2 項該当		
論文題目 <b><i>TERT</i> promoter region rearrangements analyzed in high-risk neuroblastomas by FISH method and whole genome sequencing</b> （FISH 法と全ゲノムシーケンスによる予後不良の神経芽腫における <i>TERT</i> プロモーター領域再構成の解析）			
論文審査担当者			
主 査	教 授	岡 田	賢 印
審査委員	教 授	田 代	聡
審査委員	講 師	山 崎	文 之
〔論文審査の結果の要旨〕			
<p>神経芽腫は代表的な小児の悪性固形腫瘍のひとつである。神経芽腫の中には、自然退縮する予後良好群がある一方で、悪性度の高い予後不良群も存在する。腫瘍細胞の遺伝学的、生物学的な特徴によって、神経芽腫の悪性度が決定される。予後不良の神経芽腫は、<i>MYCN</i> 増幅を認め、テロメラーゼの活性化や alternative lengthening of telomeres (<i>ALT</i>) によってテロメアの安定化を獲得している。近年、<i>TERT</i> 遺伝子のプロモーター領域の再構成でテロメラーゼを活性化し神経芽腫の予後不良群の一因子となることが注目されている。しかし、<i>TERT</i> プロモーター領域再構成は、全ゲノムシーケンスなど高度な手法で検討されてきており、臨床例で実用的な判定方法は開発されていない。そこで、簡便な手段として、FISH 法による <i>TERT</i> プロモーター領域再構成の検出の可能性について検討した。</p> <p>広島大学病院で治療を行った神経芽腫 14 例の切除検体で FISH 法を行った。病期は国際神経芽腫リスクグループ分類（International Neuroblastoma Risk Group Staging System : INRGSS）分類により評価した。14 例の内訳は、病期 M かつ <i>MYCN</i> 増幅が 3 例、病期 M かつ <i>MYCN</i> 増幅なしが 8 例、病期 MS が 1 例、病期 L2 かつ 18 カ月未満が 1 例、病期 L2 かつ 18 カ月以上が 1 例とした。14 例中、男児 11 例、女児 3 例で、平均月齢は 36.4 か月（1–122 か月）であった。これらの症例を対象に、腫瘍 DNA を用いた <i>MYCN</i> 増幅の検討に加え、腫瘍 mRNA を用いて <i>TERT</i> 発現レベルをリアルタイム RT-PCR 法で検討し、内部標準として GAPDH の発現レベルで補正した。</p>			

*TERT*プロモーター領域再構成は、神経芽腫症例の摘出腫瘍の初代培養細胞を用いて、Agilent社の the Agilent FISH General Purpose Reagents protocol with overnight hybridizationによるFISH法で評価した。FISHプローブは*TERT*遺伝子上流と下流にそれぞれ約400kbpの範囲に設計し、Cy3とCy5でラベルした。FISH法で再構成ありと判断したサンプルは、全ゲノムシーケンスにより再構成の部位を特定し、更にサンガーシーケンスで再構成部位を確認した。

神経芽腫14例中2例で、FISH法にてCy3とCy5の蛍光が分離したことから、可視的に*TERT*プロモーター領域再構成ありと判定した。この2例は、どちらも予後不良群であったが、*MYCN*増幅は認めなかった。*TERT*発現レベルは、4513と5359 copiesで、2例とも著明に高値で、*TERT*プロモーター領域再構成を認めなかった症例(0-139.5 copies: 平均53.6 copies)の*TERT*発現レベルと明らかな差を認めた。全ゲノムシーケンスによると、遺伝子転座が5番染色体にみられ、FISH法の結果と合致した。1例は5番染色体の*TERT*上流にある*SLCA6A19*遺伝子と22番染色体の転座であり、もう1例は*TERT*下流から5番染色体上で転座を認めた。サンガーシーケンスの結果、これらの染色体転座は腫瘍組織のみで認め、正常組織では認めなかった。

*TERT*プロモーター領域再構成は、予後不良の神経芽腫の一部で認められた。*MYCN*増幅は、神経芽腫の予後不良因子として知られているが、*TERT*プロモーター領域再構成をみとめた2例は、いずれも*MYCN*遺伝子の増幅を認めなかった。さらに、2例とも*TERT*発現レベルは高く、*TERT*プロモーター領域再構成が*TERT*発現を増強していることが示された。*MYCN*も*TERT*のプロモーター領域に結合して*TERT*発現を増強するが、この2例では*MYCN*増幅がないことから、*MYCN*増幅と*TERT*プロモーター領域再構成は、それぞれ*TERT*発現への独立した活性化因子である可能性が示唆された。神経芽腫においてテロメアバイオロジーの解析は重要であり、*TERT*発現増強によるテロメラーゼの活性化を経てテロメアの安定化することで、神経芽腫は予後不良群として悪性度を獲得していくものがあると考えられた。

以上の結果から、本論文は*TERT*プロモーター領域の再構成によって*TERT*が活性化し神経芽腫の悪性度獲得に働き、これらがFISH法で確認できることを示した点で高く評価される。

よって審査委員会委員全員は、本論文が著者に博士(医学)の学位を授与するに十分な価値あるものと認めた。