

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：82402

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K07579

研究課題名（和文）小児腎腫瘍（腎芽腫）における11p13-14の新規原因遺伝子同定と機能解析

研究課題名（英文）Identification of novel causative genes at 11p13-14 in nephroblastoma

研究代表者

春田 雅之（Haruta, Masayuki）

地方独立行政法人埼玉県立病院機構埼玉県立がんセンター（臨床腫瘍研究所）・臨床腫瘍研究所・研究員

研究者番号：80392190

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：我々は日本人腎芽腫150症例の解析から、WT1遺伝子が位置する11pに腎芽腫の新規原因遺伝子がある可能性を見出していた。より詳細な染色体異常解析から11番染色体のWT1遺伝子よりテロメア側に限局した共通微小染色体異常領域（11p13-14領域 1.0 Mb）を同定し、新規原因遺伝子の存在が示唆された。11pにLOHが認められた腎芽腫32症例にて、この領域の3遺伝子について変異解析を実施したが変異は認められなかった。しかしながら、多くの腫瘍でmRNA発現消失または減少が認められた。このことからこの領域の原因遺伝子候補は欠失とエピジェネティック異常が生じていることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腎芽腫患児の20%程は再発・死亡に至り予後不良であることが知られている一方、腎芽腫は治療成績が良く長期に生存するため、副作用や腎機能障害などの晩期障害の軽減を考慮した治療が今後の課題である。これらの課題を克服するためには腎芽腫の原因となっている遺伝子またはカスケードを標的とした新たな治療法の開発（分子標的薬を含む）が鍵となる。これまでに腎芽腫の半数程度で既知原因遺伝子異常が認められず、他の新規原因遺伝子（群）が存在すると考えられている。本研究において、11p13-14領域に腎芽腫の新たな原因遺伝子候補を同定した。

研究成果の概要（英文）：Based on the analysis of 150 cases of Wilms tumor in Japanese patients, we have identified a potential novel causative gene for Wilms tumor located on 11p, where the WT1 gene resides. Detailed chromosomal abnormality analysis revealed a common microchromosomal abnormality region (1.0 Mb in the 11p13-14 region) localized to the telomeric side of the WT1 gene on chromosome 11, suggesting the presence of a novel causative gene. Mutation analysis was conducted on three genes in this region in 32 cases of Wilms tumor with observed LOH (loss of heterozygosity) on 11p, but no mutations were found. However, many tumors exhibited a loss or reduction of mRNA expression. These results suggest that the candidate causative gene in this region is affected by deletions and epigenetic abnormalities.

研究分野：小児腫瘍

キーワード：腎芽腫 11p13

## 1. 研究開始当初の背景

腎芽腫は小児腎にできる固形腫瘍で、日本では年間発症数は70例ほどと少ないことから、全国規模な分子生物学的解析や治療研究が必須の領域である。日本では1996年から中央病理診断を導入した統一治療プロトコールによる全国規模での多施設共同治療研究が実施され、米国ウィルムス腫瘍スタディ(NWTS)や欧州を中心とした国際小児がん学会腎腫瘍スタディグループ(SIOP-RTSG)と同様におよそ85%の患児が治癒する(*Pediatr Blood Cancer*. 2018 65:e27056)。これは、予後因子(病期や病理組織型)による患者の層別化、集中的な化学療法と統一した放射線療法によるところが大きい。しかし、これらの治療にも関わらず再発、死亡を呈する予後不良症例が20%~25%程度存在する。一方で腎芽腫は治療成績が良く長期に生存するため、副作用や腎機能障害などの晩期障害の軽減を考慮した治療が今後の課題である。これらの課題を克服するためには、より強い治療を必要とする悪性腎芽腫と悪性度が低く副作用や晩期障害を考慮し治療を軽減可能な腎芽腫とを層別化する新たな分子マーカーの同定、および腎芽腫の原因となっている遺伝子またはカスケードを標的とした新たな治療法の開発(分子標的薬を含む)が鍵となると考えられる。

これまでに *WT1*、*CTNNB1*(カテニン)、*WTX*、*SIX1/2*、miRNA processing genes (miRNAPGs: *DICER1*, *DROSHA*, *DGCR8* など) および *TP53* の遺伝子変異と *IGF2* の発現様式異常が腎芽腫の原因として主に報告されている。これらの原因遺伝子変異および発現異常の認められない腎芽腫が半分から2/3程度あることが予想されており、我々は日本人腎芽腫の解析から腎芽腫の半分程度でこれら既知原因遺伝子異常が認められないことを明らかにした(*Cancer Sci*. 2012 103:1129-35、*Neoplasia* 2019 21:117-131.)。このことより、遺伝子変異またはエピジェネティック異常により腎芽腫の発症に関与する遺伝子が既知原因遺伝子の他に存在すると考えられているが、多検体の腎芽腫で異常を生じている遺伝子は上記以外に見つかっていない(*Nature Genet* 2017; 49:1487-1494、*Lancet Child Adolesc Health* 2019; 3: 322-331)。我々はこれまでに日本人腎芽腫150症例の原因遺伝子・染色体構造異常の解析において、11番染色体短腕の部分的または短腕レベルの片親性ダイソミーが認められるにもかかわらず *WT1* 遺伝子変異がない症例が多数認められることから、*WT1* 遺伝子が位置する11番染色体短腕に腎芽腫の新規原因遺伝子がある可能性を見出した。

## 2. 研究の目的

腎芽腫患児の20%程は再発・死亡に至り予後不良であることが知られている一方、腎芽腫は治療成績が良く長期に生存するため、副作用や腎機能障害などの晩期障害の軽減を考慮した治療が今後の課題である。これらの課題を克服するためには腎芽腫の原因となっている遺伝子またはカスケードを標的とした新たな治療法の開発(分子標的薬を含む)が鍵となる。これまでに腎芽腫の半数程度で既知原因遺伝子異常が認められず、他の新規原因遺伝子(群)が存在すると考えられている。本研究において、11番染色体短腕に位置する腎芽腫の新規原因遺伝子の同定を目指した。

## 3. 研究の方法

- i) 11 番染色体の染色体異常をより詳細に解析可能な CGH + SNP array システムを開発した。
- ii) 開発した array システムを用いて、11 番染色体短腕欠失を呈する腎芽腫における微小共通欠失領域を同定した。
- iii) 微小共通欠失領域に位置した新規原因候補遺伝子においてダイレクトシーケンスによる変異解析、real time PCR 法による mRNA 発現解析、およびそれぞれの遺伝子のプロモーター領域の COBRA 法による DNA メチル化解析を実施した。

#### 4 . 研究成果

腎芽腫の予後予測マーカーとして知られる染色体レベルの異常および 11 番染色体の構造異常を詳細に解析することが可能な Agilent の 8 x 60K カスタム CGH + SNP array を開発した。この系を腎芽腫 8 症例にて解析したところ、3 症例で 11 番染色体の WT1 遺伝子より少しテロメア側に限局した 11 番染色体異常を同定した。3 症例中 1 症例で homoWT1 遺伝子欠失が生じていたが、この欠失とは独立した微小 homo 欠失を 11p14 領域に同定した。この候補領域に LOH を呈する 32 症例において新規原因候補 3 遺伝子についてダイレクトシーケンスによる変異解析を実施したが、アミノ酸コード領域に変異はなかった。新規原因候補 3 遺伝子について、この領域の欠失がない多数検体にて mRNA 発現が低下または消失していた。発現低下または発現消失腎芽腫検体において COBRA 法による各遺伝子のプロモーター領域の DNA メチル化は認められず、DNA メチル化とは異なるミカニズムによって各遺伝子の発現が消失、減少している可能性が示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

|  |                         |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Ando K, Kurashina R, Motoi N, Iizuka T, Inoue M, Maruyama R, Mitani K, Takenobu H, Haruta M, Onuki R, Matsuoka Y, Kamiyo T, Kageyama Y.                                      | 4. 巻<br>676             |
| 2. 論文標題<br>Positive regulatory loop of platelet-derived growth factor DD-induced STAT3 activation is associated with poor prognosis in advanced urothelial carcinoma.                  | 5. 発行年<br>2023年         |
| 3. 雑誌名<br>Biochem Biophys Res Commun.  | 6. 最初と最後の頁<br>165-170   |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1016/j.bbrc.2023.07.054.  | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている (また、その予定である)   | 国際共著<br>-               |
| 1. 著者名<br>Kurashina R, Ando K, Inoue M, Izumi K, Maruyama R, Mitani K, Takenobu H, Haruta M, Iizuka T, Kamiyo T, Kageyama Y.   | 4. 巻<br>42              |
| 2. 論文標題<br>Platelet-to-Lymphocyte Ratio Predicts the Efficacy of Pembrolizumab in Patients With Urothelial Carcinoma.  | 5. 発行年<br>2022年         |
| 3. 雑誌名<br>Anticancer Res.  | 6. 最初と最後の頁<br>1131-1136 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.21873/anticancerres.15576.  | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている (また、その予定である)   | 国際共著<br>-               |
| 1. 著者名<br>Haruta M, Arai Y, Okita H, Tanaka Y, Takimoto T, Kamiyo T, Oue T, Souzaki R, Taguchi T, Kuwahara Y, Chin M, Nakadate H, Hiyama E, Ishida Y, Koshinaga T, Kaneko Y.           | 4. 巻<br>60              |
| 2. 論文標題<br>Frequent breakpoints of focal deletion and uniparental disomy in 22q11.1 or 11.2 segmental duplication region reveal distinct tumorigenesis in rhabdoid tumor of the kidney | 5. 発行年<br>2021年         |
| 3. 雑誌名<br>Genes Chromosomes Cancer.  | 6. 最初と最後の頁<br>546-558   |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1002/gcc.22952.   | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難   | 国際共著<br>-               |
| 1. 著者名<br>Akter J, Katai Y, Sultana P, Takenobu H, Haruta M, Sugino RP, Mukae K, Satoh S, Wada T, Ohira M, Ando K, Kamiyo T.   | 4. 巻<br>10              |
| 2. 論文標題<br>Loss of p53 suppresses replication stress-induced DNA damage in ATRX-deficient neuroblastoma  | 5. 発行年<br>2021年         |
| 3. 雑誌名<br>Oncogenesis  | 6. 最初と最後の頁<br>73        |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1038/s41389-021-00363-6.  | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている (また、その予定である)   | 国際共著<br>-               |

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件）

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Masayuki Haruta, Motoki Sugawara, Hajime Okita, Yukichi Tanaka, Tetsuya Takimoto, Shuichiro Uehara, Miwako Nozaki, Tsugumichi Koshinaga, Takaharu Oue, Takehiko Kamijo |
| 2. 発表標題<br>Analysis for telomere elongation and alternative lengthening of telomeres in Wilms tumor   |
| 3. 学会等名<br>第65回日本小児血液・がん学会学術集会  |
| 4. 発表年<br>2023年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>春田雅之                         |
| 2. 発表標題<br>腎芽腫における基礎・トランスレーショナル研究の最近の知見 |
| 3. 学会等名<br>第64回日本小児血液・がん学会学術集会（招待講演）    |
| 4. 発表年<br>2022年                         |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>春田雅之   |
| 2. 発表標題<br>The frequency of chromosomal and genetic abnormalities differences in Wilms tumors between Japanese and Western patients |
| 3. 学会等名<br>2nd APHOG/SIOP Asia Joint Virtual Symposium（招待講演）（国際学会）  |
| 4. 発表年<br>2022年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Yasuhiko Kaneko, Masayuki Haruta, and Yasuhiro Arai  |
| 2. 発表標題<br>Patterns of the first- and second-hit WT1 mutations may affect the risk of developing Wilms tumor in patients with WAGR, Drash, or genitourinary malformation syndrome |
| 3. 学会等名<br>第80回日本癌学会学術総会  |
| 4. 発表年<br>2021年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Motoki Sugawara, Masayuki Haruta, Atsuko Nakazawa, Hajime Okita, Tetsuya Takimoto, Tatsuro Tajiri, Shuichiro Uehara, Tsugumichi Koshinaga, Miki Ohira, Takehiko Kamiyo |
| 2. 発表標題<br>Q-PCR C-circle assay may be useful to identify NB patients with poorer prognosis in each high and low/intermediate risk  |
| 3. 学会等名<br>第62回日本小児血液・がん学会学術集会  |
| 4. 発表年<br>2021年   |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号) | 備考 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|                           |                       |    |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|         |         |