

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24年 6月8日現在

機関番号：82402

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21791021

研究課題名（和文） 腎芽腫におけるβ-カテニン分解系遺伝子異常の解析

研究課題名（英文） Analysis of genes involved in β-catenin degradation in nephroblastoma

研究代表者

春田 雅之（HARUTA MASAYUKI）

埼玉県立がんセンター・臨床腫瘍研究所・研究員

研究者番号：80392190

研究成果の概要（和文）：

腎芽腫の半数以上は既知原因遺伝子異常が認められないことより、未知原因遺伝子の存在が考えられている。腎芽腫 114 検体を用いた既知原因遺伝子異常の解析を行い、Wnt/βカテニン分解系に関わる遺伝子異常の頻度（*CTNNB1*:26.3%、*WTX*:22.8%）を明らかにした。SNP array 解析は少ないながらも *APC*、*AXIN1* および *AXIN2* コード領域の染色体構造異常を示し、Wnt/βカテニン分解系に異常を有さなかった 59 検体のうち 1 検体でダイレクトシーケンシング法にて *APC* 遺伝子変異を同定した。*WTX* 遺伝子異常を呈する腎芽腫の予後はそうでない腫瘍と比べ有意に不良であった（ $p=0.0402$ ）。

研究成果の概要（英文）：

More than half of nephroblastoma didn't show abnormalities in responsible genes for tumorigenesis in fetal kidney. Therefore, there may be mutations in other tumor suppressor genes. Abnormalities of *WTX* and *CTNNB1* known as tumor suppressor genes involved in WNT signaling pathway were detected in 22.8% and 26.3% of the 114 nephroblastomas. SNP array analysis clarified chromosomal abnormalities of *APC* (5q21-22), *AXIN1* (16p13) or *AXIN2* (17q23-24) coding regions in a little bit of cases. By direct sequencing analysis, a mutation of *APC* gene was indentified in one of 59 tumors which didn't have any abnormalities in known responsible genes. Patients with an abnormality in *WTX* gene were poor outcome than those without ($p=0.0402$).

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2009年度 | 1,200,000 | 360,000 | 1,560,000 |
| 2010年度 | 900,000 | 270,000 | 1,170,000 |
| 2010年度 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,100,000 | | 4,030,000 |

研究分野：小児腫瘍

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：腎芽腫、遺伝子異常

1. 研究開始当初の背景

腎芽腫（Wilms 腫瘍）は小児の腎臓に生じる代表的な胎児性腫瘍で、1万人に1人の割

合で発症し小児固形腫瘍の 6-8%を占める。組織学的に予後良好群と不良群に分類されるが、腎芽腫の分子生物学的特徴は未解明な部分が多い。現在、ヒト 11 番染色体短腕に位置する *WT1* が原因遺伝子として同定されており、同じく 11 番染色体短腕に位置する *IGF2* が第 2 原因遺伝子 *WT2* であると考えられている。大腸癌や肝芽腫で変異が報告されている *CTNNB1* も腎芽腫で変異が同定されている遺伝子である。また、X 染色体上に腎芽腫のがん抑制遺伝子として *WTX* 遺伝子が同定された。腎芽腫における各原因遺伝子異常の頻度は *WT1*:5-10%、*CTNNB1*:7-15%、*WTX*:7-25%、そして *IGF2* 発現様式異常:30-50%と報告されている。しかしながら、*WT1* 遺伝子異常および *IGF2* 発現様式異常は前がん病変部にも同定されており、腎芽腫の半数近くは未知原因遺伝子に異常が生じていると考えられ、未だ腎芽腫の分子生物学的特徴は未明な部分が多く残っている。腎芽腫の原因遺伝子は正常腎の発生に必要な不可欠であることから腎芽腫原因遺伝子は腎臓の発生に重要な遺伝子と考えられる。

2. 研究の目的

腎芽腫の多くの検体で β カテニンの核蓄積を認めることから、Wnt/ β カテニン分解系の異常が腎芽腫の発症に関与することが示唆されているが、 β カテニンと *WTX* の異常が報告されているのみで Wnt/ β カテニン分解系に関わる他の遺伝子については解析されていない。そこで腎芽腫の分子生物学的特徴の解析の一環として、本研究は腎芽腫発症における Wnt/ β カテニン分解系に関わる遺伝子群 (*AXIN1*, *AXIN2*, *APC*, *CTNNB1* そして *WTX*) 異常の関与とその意義を明らかにする。

3. 研究の方法

既知原因遺伝子および Wnt/ β カテニン分解系に関わる遺伝子群 (*AXIN1*, *AXIN2*, *APC*) の変異解析はダイレクトシーケンスにて行った。*WTX* 遺伝子の欠失は SNPs array および TaqMan probe を用いた real time PCR にて定量することにより解析した。*WTX* 遺伝子は X 染色体上に位置するため、その欠失が活性化 X 染色体で生じているか、あるいは不活性化 X 染色体で生じているかを明らかにするためアンドロゲンレセプター (*AR*) 遺伝子と *WTX* 遺伝子のプロモーター領域の DNA メチル化を COBRA 法および bisulfite シークエンス法にて解析した。*WT1*, *WTX*, *AXIN1*, *AXIN2*, および *APC* は蛋白コーディング領域を、*CTNNB1* は変異が多数報告されている hot spot 領域

の exon 3, 7 と 8 を解析した。また、それぞれの遺伝子異常と予後との相関を Kaplan-Meier 法により解析した。

4. 研究成果

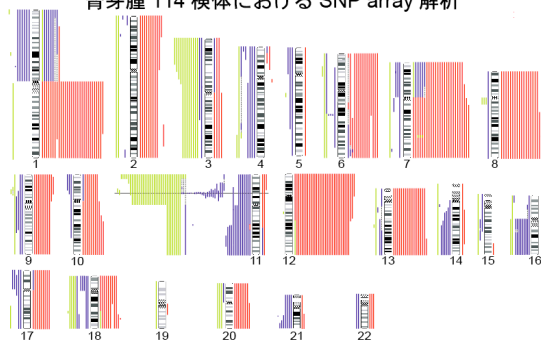
腎芽腫 114 検体の既知原因遺伝子解析は *WT1* 異常:36 検体 (31.6%)、*CTNNB1* 異常:29 検体 (25.4%)、*WTX* 異常:26 検体 (22.8%)、*IGF2* 発現様式異常:24 検体 (21.1%) を同定した。Wnt/ β カテニン分解系 (*CTNNB1* と *WTX*) の異常が 114 検体中 55 検体で生じていた。既知原因遺伝子に異常が認められなかった 25 症例に加え、前がん病変部で異常が認められる *WT1* 異常および *IGF2* 発現様式異常のみを示した 34 症例で未知原因遺伝子異常が存在する可能性があると考えられた。

腎芽腫 114 症例における原因遺伝子異常

| Gene(s) | (<i>IGF2</i>) | Sporadic | Syndromc |
|----------------------|-----------------|----------------|----------|
| <i>WT1</i> | (UPD, LOI) | 4 (1, 1) | 4 (1, 0) |
| <i>WT1+CTNNB1</i> | (UPD, LOI) | 15 (8, 0) | 9 (4, 1) |
| <i>CTNNB1</i> | (UPD, LOI) | 5 (1, 1) | 0 |
| <i>WT1+WTX</i> | (UPD, LOI) | 4 (2, 0) | 0 |
| <i>WTX</i> | (UPD, LOI) | 22 (5, 9) | 0 |
| Only <i>IGF2</i> UPD | | 14 | 0 |
| Only <i>IGF2</i> LOI | | 12 | 0 |
| | | 76/101 (75.2%) | 13/13 |

腎芽腫 114 検体を用いた SNP array 解析は既知原因遺伝子である *WT1* 遺伝子 (11p13) および *IGF2* 遺伝子 (11p15) 領域に集中した共通微小染色体構造異常を示した。その他の領域は 12 番染色体で見られるような染色体レベルでの増加や 1 番染色体長腕および 16 番染色体短腕で見られるような染色体腕レベルでの異常が多く認められた。

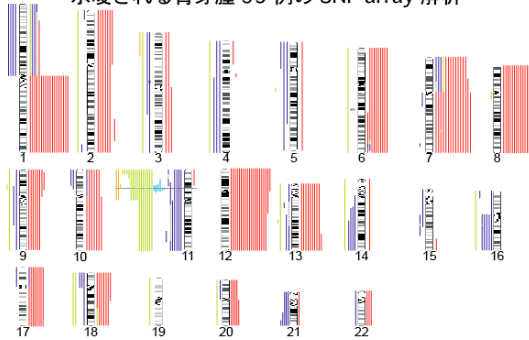
腎芽腫 114 検体における SNP array 解析



既知原因遺伝子異常の解析から他の原因遺伝子異常の存在が示唆された 59 症例の解

析では、*AXIN1* 遺伝子をコードする 16p13 は片アレルの消失および UPD が 1 症例ずつ、*AXIN2* 遺伝子をコードする 17q23-24 は片アレルの消失 2 症例および UPD が 1 症例、そして *APC* 遺伝子をコードする 5q21-22 は片アレルの消失が 2 症例で生じていた。

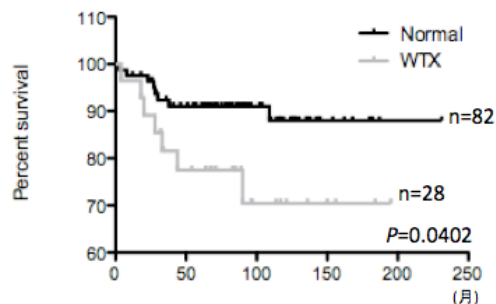
腎芽腫発症に関する未知原因遺伝子の存在が示唆される腎芽腫 59 例の SNP array 解析



他の原因遺伝子異常の存在が示唆された 59 症例におけるダイレクトシーケンスによる変異解析では *AXIN1* および *AXIN2* に変異は認められなかった。しかしながら、SNP array 解析で *APC* 遺伝子をコードする 5q21-22 に片アレルの欠失を呈した 1 症例において一塩基置換を見いだした。この一塩基置換は大腸癌などで体細胞変異として報告されていた。

これら原因遺伝子異常と予後との相関を Kaplan-Meier 法により解析したところ *WTX* 異常をもつ腫瘍が異常をもたない腫瘍より有意に予後が悪いことが明らかになった ($p=0.0402$)。一方、国外で報告されている 1 番染色体短腕および 16 番染色体長腕のヘテロ接合性消失は予後因子として認められなかった。腎芽腫 114 症例の遺伝子解析で *WTX* 遺伝子異常は 28 症例で生じておりそのうち 7 症例が死亡に至った。このことは *WTX* 遺伝子異常に追加の遺伝子異常などの他の要素が必要であることを示唆している。しかしながら、*WTX* 遺伝子異常をもつ腫瘍で予後により分類し染色体異常を解析したが予後不良例特異的な染色体異常は同定できていない。

WTX 異常をもつ腎芽腫は予後不良である



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

Haruta M, Arai Y, Watanabe N, Fujiwara Y, Honda S, Ohshima J, Kasai F, Nakadate H, Horie H, Okita H, Hata JI, Fukuzawa M, Kaneko Y.

Different incidences of epigenetic but not genetic abnormalities between Wilms tumors in Japanese and Caucasian children. *Cancer Sci.* 2012 in press

査読有り

Ohshima J, Haruta M, Fujiwara Y, Watanabe N, Arai Y, Ariga T, Okita H, Koshinaga T, Que T, Hinotsu S, Nakadate H, Horie H, Fukuzawa M, Kaneko Y.

Methylation of the *RASSF1A* promoter is predictive of poor outcome among patients with Wilms tumor.

Pediatr Blood Cancer. 2012 in press

査読有り

Arai Y, Honda S, Haruta M, Kasai F, Fujiwara Y, Ohshima J, Sasaki F, Nakagawara A, Horie H, Yamaoka H, Hiyama E, Kaneko Y.

Genome-wide analysis of allelic imbalances reveals 4q deletions as a poor prognostic factor and *MDM4* amplification at 1q32.1 in hepatoblastoma.

Genes Chromosomes Cancer. 2010 49:596-609.

査読有り

金子安比古, 春田雅之.

小児腫瘍から学ぶ臓器形成における Wnt シグナリングの重要性

小児がん 2010 47:252-6

査読無し

Ohshima J, Haruta M, Arai Y, Kasai F, Fujiwara Y, Ariga T, Okita H, Fukuzawa M, Hata J, Horie H, Kaneko Y.

Two candidate tumor suppressor genes, *MEOX2* and *SOSTDC1*, identified in a 7p21 homozygous deletion region in a Wilms tumor.

Genes Chromosomes Cancer. 2009 48:1037-50.

査読有り

金子安比古, 春田雅之.

Wilms 腫瘍の分子生物学：最新の知見
小児がん 2009 46:282-6
査読無し

〔学会発表〕(計6件)

大島淳二郎 春田雅之 他
がん抑制遺伝子 RASSF1A のプロモーターメチル化は Wilms 腫瘍の予後不良因子である
第53回日本小児血液・がん学会学術集会
20111125-20111127
前橋

Haruta M, et. al.
SNP array patterns in Wilms tumors with the possibility of abnormalities of unknown genes responsible for tumorigenesis
第69回日本癌学会学術総会
20100922-20100924
大阪

Haruta M, et. al.
The different incidence rate of Wilms in races profoundly contributes to *IGF2* LOI, but not abnormality of *WT1*, *WTX* and *CTNBN1*.
AACR 101st Annual Meeting
20100417-20100421
Washington DC

Padilla R, Haruta M, et. al.
Loss of Heterozygosity Analysis in Wilms Tumor.
ASHG 59th Annual Meeting
20091020-20091024
Honolulu

春田雅之 他
ウィルムス腫瘍で初めて同定された APC 遺伝子変異
第68回日本癌学会学術総会
20091001-20091003
横浜

大島淳二郎 春田雅之 他
Wilms 腫瘍の 7p21 ホモ欠失領域から同定された候補腫瘍抑制遺伝子 MEOX2 と SOTDC1
第68回日本癌学会学術総会
20091001-20091003
横浜

〔その他〕
ホームページ等
http://www.saitama-cc.jp/rinsyousyuyou_lab0/index.html

春田 雅之 (Haruta Masayuki)
埼玉県立がんセンター・臨床腫瘍研究所・
研究員
研究者番号：80392190

(2) 研究分担者
なし

(3) 連携研究者
なし

6. 研究組織
(1) 研究代表者