

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：82402

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791099

研究課題名(和文) 腎芽腫の原因遺伝子異常による予後予測の確立と薬剤耐性機構の解明

研究課題名(英文) Establishment of prognostic factor(s) by analysis of genetic abnormality and elucidation of the mechanism of drug resistance in nephroblastoma

研究代表者

春田 雅之 (Masayuki, Haruta)

埼玉県立がんセンター(臨床腫瘍研究所)・その他部局等・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、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：腎芽腫の生存率や再発率の改善および副作用や晩期障害の軽減のため、新規治療法の開発や患者を層別化して治療するための新規分子マーカーの開発が必要である。本研究で我々は原因遺伝子の変異解析およびがん抑制遺伝子のDNAメチル化解析を行い、全生存率解析によってWTX遺伝子異常とRASSF1A遺伝子のDNAメチル化異常が腎芽腫の新たな予後不良因子であることを明らかにした。また、WTX遺伝子異常とTP53遺伝子変異を併発した患児は特に予後不良であった。

研究成果の概要(英文)：In nephroblastoma, identification of new prognostic markers for better therapy planning are needed to improve the mortality and recurrence rate, and prevent side and late effects. In this study, we examined genetic and epigenetic abnormalities of the 5 genes (WT1, CTNNB1, WTX, TP53 and IGF2) and DNA methylation status of three tumor suppressor genes (RASSF1A, DCR2 and CASP8) in Japanese nephroblastoma. WTX mutation and RASSF1A hypermethylation was correlated with poor prognosis by Kaplan-Meier analysis ($p=0.040$ and $p=0.043$, respectively). Nephroblastoma patients with both WTX and TP53 mutation particularly showed poor prognosis.

研究分野：医歯薬学

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 予後因子

1. 研究開始当初の背景

腎芽腫は小児腎腫瘍の90%を占め、小児三大固形悪性腫瘍のひとつであり、日本で年間100人ほどが発症している。50年前では腎芽腫の5年生存率は20%と非常に予後不良な腫瘍であった。1970年代後半から退形成腎芽腫(anaplasia)は強力な予後予測因子であり予後不良病理型とされ、発症年齢そして病期とともに指標として治療方針が決定されるようになった。この30年ほどのめざましい治療法(外科的手術、化学および放射線療法)の発展により腎芽腫の5年生存率は90%まで劇的に改善された。

2009年の大植らの報告では1996年から2005年までにおける日本人腎芽腫210症例の解析で23症例(10.1%)が腫瘍死で7症例が副作用による死亡であった。この解析では退形成腎芽腫が6症例含まれたが全ての患者が予後追跡の結果にて生存していることが示されている。このことは退形成腎芽腫に対する治療法の確立を予感させる結果である。一方、Stage I から Stage IV まで全ての病期で腎芽腫患者の約10%が死亡に至り、更なる治療成績の向上には腎芽腫をさらに層別化できる新たな予後予測因子の開発と予後不良腎芽腫における新規治療法開発の必要性を示した。

(1) JWITS (日本 Wilms 腫瘍スタディーグループ) の協力の下、既知原因遺伝子である *WT1*、*IGF2*、*CTNNB1* および *WTX* 遺伝子の変異解析と SNP array 解析を行ってきた。遺伝子異常と臨床像を比較した結果、死亡症例10症例中7症例に *WTX* 遺伝子単独の異常を2症例に *WT1* および *CTNNB1* 両遺伝子の異常が生じていることが明らかになった。*WTX* 蛋白は *WT1* と結合し細胞質から核への輸送を促進し *WT1* の転写因子としての機能を亢進する。一方、*WTX* 蛋白は *GSK3* や *APC* と複合体を形成し β -カテニンのリン酸化を介する β -カテニンの分解にも関与する。このように *WTX* は *WT1* と β -カテニン両シグナル経路で機能する。つまり、死亡症例の9割で *WT1* と β -カテニン両シグナル経路の異常を見いだした。このことより *WT1* と β -カテニン両シグナル経路の異常が腎芽腫の薬剤耐性の引き金になり予後不良に至ると仮説を立てた。

(2) これまでに肝芽腫や神経芽腫においてがん抑制遺伝子 *RASSF1A* の DNA メチル化が患児の予後と相関することを明らかにしている。

2. 研究の目的

(1) 「*WT1* と β -カテニン両シグナル経路の異常を有する腎芽腫が予後不良である」という

仮説を検証するため、JWITS より取り寄せた腎芽腫患児死亡症例10検体の遺伝子解析を行う。また、これまでの解析より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日本人腎芽腫の予後因子として認められなかったことから、日本人腎芽腫で予後予測ができる染色体異常があるかどうかを解析する。

(2) 肝芽腫や神経芽腫のように腎芽腫においてもがん抑制遺伝子 *RASSF1A* の DNA メチル化が患児の予後と相関するかどうかを解析し、患者の層別化に有効であるかを検討する。

腎芽腫の更なる治療成績の向上に貢献するため、これらの解析によって腎芽腫を予後により層別化できる新たな予後予測因子を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 腎芽腫114検体における *WT1*、*CTNNB1*、および *WTX* 遺伝子異常と臨床像との相関を Kaplan-Meier 法を用いて全生存率および disease-specific survival rate に関して統計学的に解析する。日本ウィルムス腫瘍スタディーグループに分与頂いた腎芽腫患児死亡症例10検体(腎芽腫腫瘍死6検体、他因子死4症例)を用いて *WT1* はシーケンス解析および SNP array 解析、*CTNNB1* は変異多発領域のシーケンス解析、*WTX* はシーケンス解析、RealTime-PCR を用いた欠失解析およびメチル化解析、*TP53* 遺伝子はシーケンス解析を行い既知原因遺伝子(*WT1*、*CTNNB1*、*TP53* および *WTX*)の変異解析を行った。また、日本人腎芽腫で予後と相関する染色体異常があるかどうかを解析するため SNP array 解析を行った。

(2) 腎芽腫171検体を用いてがん抑制遺伝子 *RASSF1A* の DNA メチル化をリアルタイム PCR を用いて定量的に quantitative MSP (Methylation specific PCR)法にて測定した。*RASSF1A* の DNA メチル化と臨床像との相関を統計的手法を用いて解析した。

4. 研究成果

これまでの解析より死亡症例の9割で *WT1* と β -カテニン両シグナル経路の異常を見いだしていたが、Kaplan-Meier 法による解析によると全生存率で有意に *WTX* 変異を有する腫瘍が予後不良であった ($p=0.0402$) が、*WT1* と β -カテニン両シグナル経路の異常を有する腎芽腫とそうでない腎芽腫では生存率に有意な差を認めなかった ($p=0.117$)。腎芽腫腫瘍死に絞った disease-specific survival rate 解析では、*WT1* と β -カテニン両シグナル経路の異常も有意に予後不良であった ($p=0.0099$) が、より有意に *WTX* 変異を有する腫瘍の予後が不良である ($p=0.0031$) ことが明らかになった (Fig1, Fig2)。

Fig1. Wnt and WT1 pathway

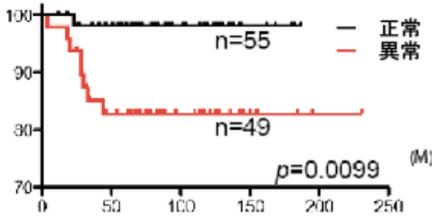
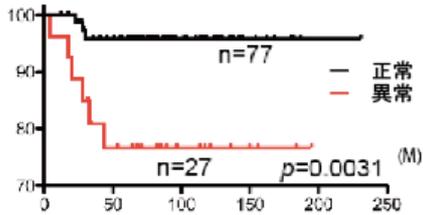


Fig2. WTX



追加腎芽腫患児死亡症例 10 検体の遺伝子異常の解析にて、腎芽腫腫瘍死 6 症例中 4 症例で *WTX* 遺伝子変異を見いだしたが *WT1* および *CTNMB1* 両遺伝子の異常は追加全 10 症例で生じていなかった。これらの結果は当初の仮説とは異なり *WTX* 遺伝子異常が腎芽腫の予後不良因子であることを示唆した。*TP53* 遺伝子変異は腎芽腫の予後不良因子である。*WTX* は *TP53* タンパク質の活性化を制御しているこのことより、*WTX* 遺伝子異常を呈する腎芽腫の予後は不良であると考えた。腎芽腫患児死亡症例と *WTX* 遺伝子異常症例での *TP53* 遺伝子変異解析から、*WTX* と *TP53* 両遺伝子異常を呈した腎芽腫患児 2 症例はともに治癒には至らず手術後 4 ヶ月で腎芽腫が原因で死亡し、死亡症例の中でも特に予後不良であった。この結果は *WTX* と *TP53* 両遺伝子異常を呈する腫瘍は *WTX* と *TP53* 異常の相乗効果により予後不良に至る可能性を示唆した。

日本人腎芽腫死亡症例特異的な染色体異常があるかどうかを調べるため SNP array 解析を行ったが、死亡症例特異的な染色体異常を見いだすことはできなかった。

正常腎および末梢血において *RASSF1A* 遺伝子は完全非メチル化状態であった。一方、腎芽腫 171 症例中 30 症例で完全非メチル化であったが残り 141 検体は様々なレベルでメチル化を示した (1-10% : 28、11-20% : 11、21-30% : 15、31-40% : 14、41-50% : 24、51-60% : 15、61-70% : 11、71-80% : 6、81-90% : 8、91-100% : 9)。メチル化のカットオフ値を 7% と設定した Kaplan-Meier 法による全生存率および無再発生存率の解析は有意な差を示した ($p=0.043$ および $p=0.018$) (Fig3, Fig4)。

Fig3. 全生存率

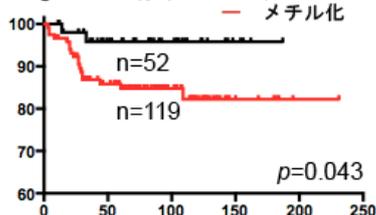
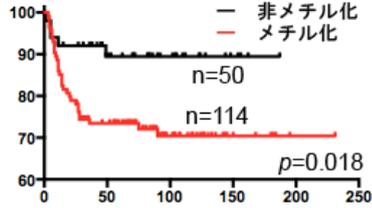


Fig4. 無再発生存率



年齢、病期および *RASSF1A* 遺伝子の DNA メチル化がそれぞれに全生存率に影響するかどうかを腎芽腫 158 症例にて多変量解析にて調べたところ、*RASSF1A* 遺伝子の DNA メチル化がこの 3 つの予後因子の中では最も高い危険因子であることが明らかになった (Table)。

Prognostic factors	Relative risk (95% CI)	P-value
Age		
<24 months versus >24 months	1.421 (0.502-4.021)	0.507
Stage of the disease		
I and II versus III and IV	1.664 (0.657-4.210)	0.282
<i>RASSF1A</i> promoter		
Unmethylated versus methylated	2.722 (0.573-12.930)	0.207

95%CI. 95% confidence interval.

本研究にて腎芽腫の予後不良因子として *WTX* 遺伝子の異常と *RASSF1A* 遺伝子 DNA メチル化が同定された。これら異常がどのように腎芽腫の悪性化に至るのか、そのメカニズムを解明することで治療薬の開発や腎芽腫患者の層別化による治療法開発による腎芽腫生存率の改善に貢献できると考える。

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 5 件)

Haruta M, Kamijo T, Nakagawara A, Kaneko Y.

RASSF1A methylation may have two biological roles in neuroblastoma tumorigenesis depending on the ploidy status and age of patients.

Cancer lett. 2014 in press 査読あり

Honda S, Miyagi H, Suzuki H, Minato M, Haruta M, Kaneko Y, Hatanaka KC, Hiyama E, Kamijo T, Okada T, Taketomi A.

RASSF1A methylation indicates a poor prognosis in hepatoblastoma patients. *Pediatr Surg Int.* 2013 29:1147-52.

doi: 10.1007/s00383-013-3371-z. 査読あり

Ichikawa M, Arai Y, Haruta M, Furukawa S, Ariga T, Kajii T, and Kaneko Y.

Meiosis error and subsequent genetic and epigenetic alterations invoke the malignant transformation of germ cell tumor.

Genes Chromosomes Cancer. 2013 52:274-86.

doi: 10.1002/gcc.22027. 査読あり

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 103:1129-35

doi: 10.1111/j.1349-7006.2012.02269.x.

査読あり

Ohshima J, Haruta M, Fujiwara Y, Watanabe N, Arai Y, Ariga T, Okita H, Koshinaga T, Oue 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 59:499-505

doi: 10.1002/pbc.24093. 査読あり

〔学会発表〕(計 2 件)

春田雅之、他 *WTX* 遺伝子変異は腎芽腫の予後予測因子である。第 54 回日本小児血液・がん学会学術集会 20121130-20121202 横浜

Haruta M, et. al. *WTX* mutation is a new prognostic factor for Wilms tumor. 第 71 回日本癌学会学術総会 20120919-20120921 札幌

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

埼玉県立がんセンター 臨床腫瘍研究所
<http://www.saitama-cc.jp/rinsyousyuyou-labo/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

春田 雅之 (Masayuki, Haruta)

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

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：