

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：82402

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461600

研究課題名(和文)腎芽腫におけるWTX遺伝子異常による薬剤抵抗性機構の解明

研究課題名(英文)Analysis of drug-resistant mechanism in nephroblastoma with WTX abnormality

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)・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) 3,700,000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。これまでの研究でWTX変異を呈する腎芽腫患児の予後が不良であることを報告した。しかしながら、WTX遺伝子変異を呈する腫瘍の多くは長期生存している。WTX異常に加えて腫瘍死特異的な染色体異常を呈するかどうかを明らかにするためSNP array解析を行った。しかしながら、腫瘍死症例特異的または長期生存症例特異的な染色体異常を同定することはできなかった。現在、治療抵抗性のメカニズムを明らかにするため網羅的発現解析を行っている。

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. We previously showed that WTX abnormality in nephroblastoma were correlated with poor prognosis in Japanese nephroblastoma. Some of nephroblastoma patients are long-term survive without relapse. In nephroblastoma with WTX abnormality, we performed SNP array analysis to clarify chromosomal abnormalities correlated with cancer death in 27 nephroblastoma with WTX abnormality. We couldn't identify chromosomal abnormalities correlated specifically with cancer death or event free. We have been performing comprehensive gene expression analysis for identification of signal pathway correlated with therapy resistance in nephroblastoma with WTX abnormality.

研究分野：小児腫瘍

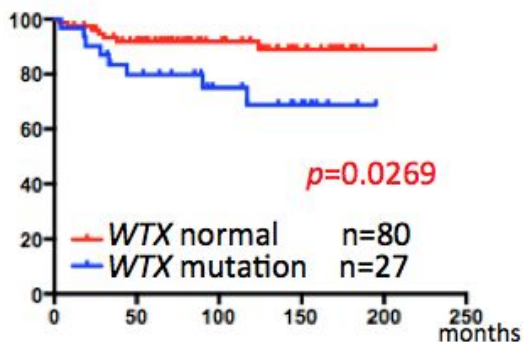
キーワード：腎芽腫 WTX

### 1. 研究開始当初の背景

腎芽腫は神経芽細胞腫や肝芽腫と並び小児三大固形悪性腫瘍のひとつであり、小児腎腫瘍の80%を占めている。日本で年間60人ほどが発症していると考えられている。40年前では腎芽腫の生存率は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ることが明らかになり、予後不良病理型として、発症年齢や病期とともに治療層別化の指標として用いられるようになり、治療方針が決定されるようになった。予後マーカーの発見とともに、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177症例の解析で23症例が腫瘍死で7症例が副作用など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。このことは症例数が少ないながらも日本人腎芽腫において退形成腎芽腫に対する現在の治療法の有用性を示す結果である。一方、Stage I から Stage IV までの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。

我々の日本人腎芽腫を対象としたこれまでの研究にて、腎芽腫原因遺伝子である *WT1*、*IGF2*、*CTNNB1* および *WTX* 遺伝子などの変異解析を行い、*WTX* 遺伝子異常を呈する腎芽腫患児の予後が不良であることを明らかにしてきた(図1)。一方、海外の報告では1pと16qの欠失、1qの増加、17pの欠失、*MYCN* 遺伝子の増加や転写因子 *SIX1/2* と miRNA processing genes (*DROSHA*、*DICER*、*DGCR8* など)の両方に変異を有する腎芽腫の予後が不良であることが明らかになった。



### 2. 研究の目的

下記3点を明らかにするため本研究を実施した。海外から報告された腎芽腫の予後と関連した染色体・遺伝子異常(1pと16qの欠失、1qの増加、17pの欠失、*MYCN* 遺伝子の増加や

転写因子 *SIX1/2* と miRNA processing genes (*DROSHA*、*DICER* および *DGCR8*)) が日本人腎芽腫において *WTX* 遺伝子異常のように予後予測分子マーカーとなるかを解析する。日本人腎芽腫において *WTX* 遺伝子異常を呈する腎芽腫患児の予後は不良であった。*WTX* 遺伝子異常を呈した患児27人中7人は腫瘍死に至ったが20人は長期生存している。よって腫瘍死症例特異的な染色体異常解析があるかどうかを解析する。予後不良である *WTX* 遺伝子異常を呈する腎芽腫と比較的予後良好である *WT1* 遺伝子異常を呈する腎芽腫において網羅的発現解析を行い、治療抵抗性のメカニズムを解明することにある。

### 3. 研究の方法

(1) 日本人腎芽腫132症例にて転写因子 *SIX1/2* と miRNA processing genes (*DROSHA*、*DICER* および *DGCR8*)) の変異のホットスポット領域をサンガーシーケンシングにて変異解析を実施した。また、染色体構造異常をアフメトリクス社の SNP array にて解析し、日本人腎芽腫において1pと16qの欠失、1qの増加、17pの欠失、*MYCN* 遺伝子の増加が予後と相関するかどうかを解析した。

(2) *WTX* 遺伝子異常を呈した腎芽腫27症例をアフメトリクス社の SNP array にて網羅的染色体異常解析を実施した。

(3) *WTX* 遺伝子異常を呈する腎芽腫4症例と比較的予後良好である *WT1* 遺伝子異常を呈する腎芽腫4症例にて網羅的発現解析(アジレント社)を実施した。

### 4. 研究成果

(1) 日本人腎芽腫132症例において *SIX1*、*SIX2*、および *DROSHA* の変異はそれぞれ4、1、2症例で生じていたが、*DICER1* および *DGCR8* の変異は認めなかった。再発1症例で *SIX2* と *DROSHA* の変異が認められたが、その他の変異5症例ではイベントは生じていなかった。日本人腎芽腫132症例において変異症例が少なく予後との相関を調べることは出来なかった。16qの欠失、17pの欠失を呈する腎芽腫患児の予後は日本人腎芽腫においても予後不良であった。しかしながら、1pと16qの両方の欠失、*MYCN* の増幅または1qの増加は日本人腎芽腫患児の予後と有意な相関は認められなかった。

(2) 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、死亡症例特異的および無再発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。

(3) *WTX* 遺伝子異常を呈する腎芽腫4症例と比較的予後良好である *WT1* 遺伝子異常を呈する腎芽腫4症例の網羅的発現解析を行った。*WTX* 遺伝子欠失症例では *WT1* 遺伝子異常を呈する腎芽腫群に比べ有意に *WTX* 遺伝子の発現の低下が認められた。*WTX* は TP53 の活性化に関わることが報告されており、現在 TP53 下

流遺伝子の発現を含め解析を行っている。

<引用文献>

- D'Angio GJ. 2007 Lifetime Data Anal 13:463-470  
Que et.al. 2009 *Pediatr Surg Int* 25:923-29  
Kim et.al. 2012 *Mol Cell*. 45(5):587-97.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

(1)Que T, Koshinaga T, Takimoto T, Okita H, Tanaka Y, Nozaki M, Haruta M, Kaneko Y, Fukuzawa M. Renal Tumor Committee of the Japanese Children's Cancer Group. Anaplastic histology Wilms' tumors registered to the Japan Wilms' Tumor Study Group are less aggressive than that in the National Wilms' Tumor Study 5. *Pediatr Surg Int*. 2016 32:851-5. doi: 10.1007/s00383-016-3929-7.

(2)Honda S, Minato M, Suzuki H, Fujiyoshi M, Miyagi H, Haruta M, Kaneko Y, Hatanaka KC, Hiyama E, Kamijo T, Okada T, Taketomi A. Clinical prognostic value of DNA methylation in hepatoblastoma: Four novel tumor suppressor candidates. *Cancer Sci*. 2016 107:812-9. doi: 10.1111/cas.12928.

(3)Que T, Fukuzawa M, Koshinaga T, Okita H, Nozaki M, Chin M, Kaneko Y, Tanaka Y, Haruta M, Tsuchiya K, Kuwashima S, Takimoto T. Management of pediatric renal tumor: Past and future trials of the Japan Wilms Tumor Study Group. *Pediatr Int*. 2015 57:828-31. doi: 10.1111/ped.12787.

(4)Kaneko Y, Okita H, Haruta M, Arai Y, Que T, Tanaka Y, Horie H, Hinotsu S, Koshinaga T, Yoneda A, Ohtsuka Y, Taguchi T, Fukuzawa M. A high incidence of WT1 abnormality in bilateral Wilms tumours in Japan, and the penetrance rates in children with WT1 germline mutation. *Br J Cancer*. 2015 112; 1121-33. doi: 10.1038/bjc.2015.13.

(5) 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 348: 167-76. doi: 10.1016/j.canlet.2014.03.022.

〔学会発表〕(計 8 件)

(1)Que T, Koshinaga T, Takimoto T, Okita H, Tanaka Y, Nozaki M, Haruta M, Kaneko Y, Fukuzawa M. Renal Tumor Committee of the

Japanese Children's Cancer Group. Characteristics of the Anaplastic Histology Wilms' Tumors Registered to the Japan Wilms' Tumor Study Group. 48th Annual Congress of the International Society of Paediatric Oncology. 2016.10.19-2016.10.22 (Dublin)

(2)Kaneko Y, Haruta M, Kamijo T, Arai Y, Okita H, Tanaka T, Takimoto H, Nakadate H, Que T, Nozaki M, M Chin, Koshinaga T, Fukuzawa M. Trisomy 12 occurs before alteration of *IGF2* expression and predicts favorable outcome in patients with Wilms tumors. 48th Annual Congress of the International Society of Paediatric Oncology. 2016.10.19-2016.10.22 (Dublin)

(3)金子 安比古, 春田 雅之, 上條 岳彦, 新井 康仁, 大喜多 肇, 陳 基明, 大植 孝治, 越永 従道, 福澤 正洋 22q uniparental disomyを伴うSMARCB1 遺伝子変異の頻度は欧米人の腎または脳ラブドイド腫瘍より日本人の腎ラブドイド腫瘍に高い。第 75 回日本癌学会学術総会 2016.10.8-2016.10.10 (横浜)

(4)Que T, Haruta M, Kaneko Y. Results of genetic analysis of Wilms tumors registered in JWITS. 6<sup>th</sup> SIOP-RTSG COMMITTEE MEETING. 2016.6.10-2016.6.11 (Tuebingen)

(5)春田雅之, 大島淳二郎, 新井康仁, 大喜多肇, 大植孝治, 田中祐吉, 野崎美和子, 瀧本哲也, 越永従道, 福澤正洋, 上條岳彦, 金子安比古 Relationships between genetic and chromosomal alterations and outcomes in Japanese Wilms tumor patients. 第 57 回日本小児血液・がん学会学術集会 2015.11.27-2015.11.29 (甲府)

(6)春田雅之, 新井 康仁, 大喜多 肇, 大植 孝治, 野崎 美和子, 越永 従道, 福澤 正洋, 上條 岳彦, 金子 安比古 SIX1/2, DROSHA および DGCR8 遺伝子変異でなく WTX 遺伝子変異は Wilms 腫瘍の予後因子である。第 74 回日本癌学会学術集会 2015.10.8-2015.10.10 (名古屋)

(7)大植 孝治, 越永 従道, 杉藤 公信, 高安 肇, 瀧本 哲也, 金子 安比古, 田中 祐吉, 陳 基明, 中館 尚也, 野崎 美和子, 大村 素子, 桑島 成子, 春田 雅之, 土屋 邦彦 難治性小児腎腫瘍に対する治療戦略 JWITSの取り組み 第52回日本小児外科学会学術集会 2015.5.28-2015.5.30 (神戸)

(8)金子 安比古, 大喜多 肇, 春田 雅之, 新

井 康仁、大植 孝治、越永 従道、福澤 正洋  
WT1 遺伝子異常タイプとその親由来が遺伝  
性 Wilms 腫瘍の浸透率に影響する。第 59 回  
日本人類遺伝学会 2014.11.19-2014.11.22  
(東京)

(9)Y. Kaneko, H. Okita, M. Haruta, Y. Arai,  
T. Oue, T. Koshinaga, M. Fukuzawa  
Parental Inheritance and WT1 Abnormality  
Types May Affect the Penetrance Rate of  
Hereditary Wilms Tumor. The 63rd Annual  
Meeting of the American Society of Human  
Genetics 2014.10.18-2014.10.22 (San  
Diego)

〔図書〕(計 1 件)

春田雅之, 上條岳彦. 東京医学社 分子生物  
学の新知見 小児外科 48:1129-1132 2016

〔産業財産権〕(計 0 件)

出願状況 (計 0 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 0 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  
<https://www.pref.saitama.lg.jp/saitama-cc/kenkyujo/kenkyujo.html>

6. 研究組織

(1) 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・  
専門研究員  
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 :

(4) 研究協力者

金子安比古 (Kaneko, Yasuhiko)  
埼玉県立がんセンター・臨床腫瘍研究所・参  
与