

TABLE 4. Primer Sequence, Genomic Position, PCR Condition, and Product Size^a

Primer name	Primer sequence	Genomic position	Annealing temp. (°C)	Product size (bp)
MEOX2-MF1 ^b	TTTATATGTAAAGGAGATTGGTCGT	+105 ^c	60	259
MEOX2-MR1	TAAAAAACGAATACAAACCTTACG			
MEOX2-UF1 ^d	TTTATATGTAAAGGAGATTGGTTGT	+105	60	260
MEOX2-UR1	AAAAAAACAAATACAAACCTTACACC			
MEOX2-MF2	GATATTGATAAGTTACGTTTTTTCGA	-270	60	225
MEOX2-MR2	CACCTTCCTATCTCCTACTAAACGA			
MEOX2-UF2	ATATTGATAAGTTATGTTTTTTTGA	-270	54	228
MEOX2-UR1	ATTCCACTTCCTATCTCCTACTAAACA			
MEOX2-MF3	TTATTTTCGTAATTTTAGATTTGGC	-609	56	270
MEOX2-MR3	ACTTTCCTCTCGAAAAACGTA			
MEOX2-UF3	ATTTTGTAAATTTTAGATTTGGTGT	-609	56	271
MEOX2-UR3	CTCACTTTCCTCTCAAAAAACATA			

^aPrimers for methylation-specific PCR for 3 CpG Islands of MEOX2.

^bMF1 and MR1, primers for the methylated templates.

^c+105, the nucleotide number from the transcriptional start site.

^dUF1 and UR1, primers for the unmethylated templates.

Temecula, CA) and normal lymphocyte DNA were used as controls for methylated and unmethylated templates, respectively. PCR products were run on 2% agarose gels and visualized after staining with ethidium bromide.

Statistical Analysis

Differences in the incidences of various clinical and biological aspects of disease were examined between tumors with and without 7p alterations by Student's *t* test and the χ^2 test using the 2×2 or 2×3 table. Differences in the expression of MEOX2 (0, 1+, and 2+) between tumors with and without 7p alterations, and between tumors with or without methylated MEOX2 CpG islands were examined with Mann-Whitney's *U* test. Likewise, differences in the expression of SOSTDC1 between 5 tumors with 7p alterations or SOSTDC1 mutation and 17 tumors with no 7p alterations or SOSTDC1 mutation were examined with Mann-Whitney's *U* test. All statistical analyses were performed using Statcel 2 software (OMS Publishing, Tokorozawa, Japan).

RESULTS

Genome-Copy Number Analysis Using SNP Arrays

A SNP array-based analysis was performed in 100 WTs and three established cell lines derived from WTs. Of 100 tumors, 89 showed chromosomal gains or losses, and 11 showed no chromosomal aberrations (Fig. 2). The 11p was the most common region for losses; 24 tumors showed a loss of 11p13-p13 where WT1 resides, and 7 had

a loss of 11p15.5 where multiple imprinted genes, including IGF2, reside. Other chromosomal regions frequently deleted were found in 11q (13 tumors), 1p (9 tumors), 7p (8 tumors), and 16q (7 tumors) (Table 5). A homozygous deletion was found at 11p13-p13 in two tumors, at 7p21.3-p21.1 in one, and at 11q22.3-qter in one. UPD regions were identified at 11p in 32 tumors, at 11q and 18q each in five, at 3p in four, and at 1p and 7p each in three (Table 5). Of three tumors with 7p UPD, one had UPD, including 7p21. Thus, 7p21 is one of the regions for recurrent genomic alterations where tumor suppressor genes may reside. Three WT cell lines showed no 7p alterations. The detailed characteristics of 7p alterations in nine tumors and their clinical characteristics are summarized in Figure 2 and Table 6.

Genomic changes were examined with SNP arrays using self-controls in 21 tumors, and non-self controls consisting of four to eight peripheral blood samples from healthy individuals in 79 tumors. We excluded common copy number polymorphisms from the genomic gains and losses found in the present series of WTs by checking a genomic variation database (<http://projects.tcag.ca/variation/>), however, the possibility that some UPD regions and genomic gains and losses were of germline origin could not be ruled out.

Homozygous Deletion at 7p21.3-p21.1 Validated by Quantitative Real-Time PCR

The SNP array revealed one tumor (No. 1) with a HD at 7p21.3-p21.1 (4.3 Mb) where at

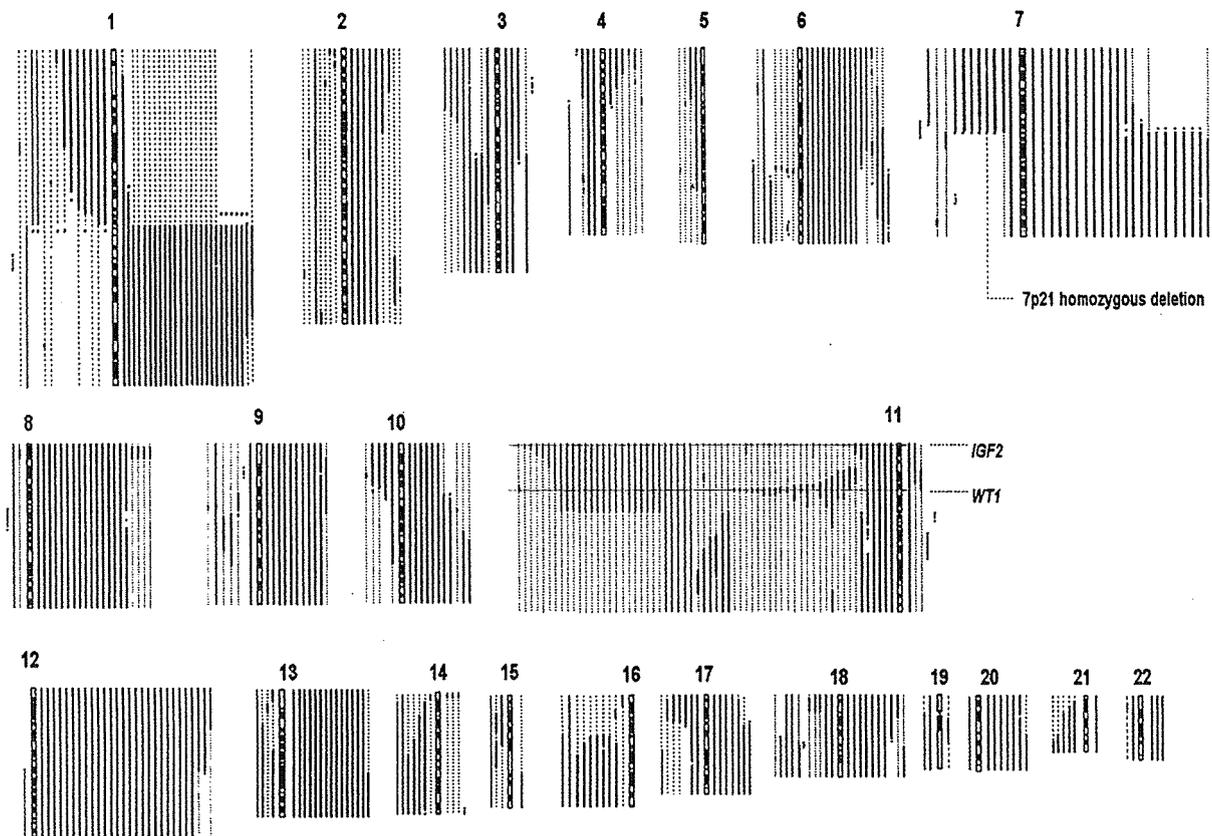


Figure 2. Summary of chromosomal alterations in Wilms tumors detected with the SNP array. Hemizygous (dark blue) and homozygous (light blue) losses and UPD (green) are shown on the left, and gains (red) are shown on the right. Dotted lines indicate normal chromosome copies.

least 13 protein-coding genes are located (Figs. 3A and 3B). A self-control was not available for this tumor. The tumor had one Chromosome 7 missing all of 7p and one with a large deletion of 4.3 Mb at 7p21. Another tumor (No. 100) derived from the identical twin showed normal Chromosome 7 homologues. Such a large deletion, which rarely occurs as a germinal mutation, and the absence of alterations in 7p in the tumor from the identical twin indicate that the deletion is not a germline copy number polymorphism, but of somatic origin. The result was validated by quantitative real-time PCR (Fig. 3C). PCR products of *ARL4A* and *TSPAN13* were approximately half the quantity of those of control DNA, indicating a hemizygous deletion of the two loci, and those of *ETV1*, *DGKB*, *MEOX2*, and *SOSTDC1* were between 0.25 and 0.42, indicating a homozygous deletion. The presence of PCR products in the HD region indicates that normal cells contaminated the tumor tissue. Thus, we identified the homozygously deleted region of 4.3 Mb between the centromere side of *ARL4A* and the telomere

side of *BZW2* where 10 genes reside (Fig. 3B). Sossey-Alaoui et al., (2003) reported a HD of 4.2 Mb at 7p21-p15 in a WT. This region partially overlapped with the present HD region. Consequently, the HD region was narrowed down to 2.1 Mb where eight genes are located (Fig. 3B).

Expression Analysis of 10 Genes Located Within or Near the HD Region in Three Cell Lines and Fetal and Normal Kidney Tissues

To select candidate tumor suppressor genes, we evaluated the expression status of 10 genes located within or near the HD region in three cell lines and fetal and normal kidney tissues. Both fetal and normal kidney tissues showed the expression of eight genes, but not the expression of two genes (*LOC100131022* and *LOC100129335*), which were excluded as candidate tumor suppressor genes (Fig. 4). Of the eight genes, *ETV1*, *LOC729920*, and *ANKMY2* were expressed in all three cell lines, *DGKB*, *TMEM195*, *LOC100129771*, and *SOSTDC1* were

TABLE 5. Numbers and Common Regions of Each Chromosomal Arm Affected by Deletion and Uniparental Disomy in 100 Wilms Tumors

Chromosome region	Deletion			Common region	Uniparental disomy			
	Whole	Partial	Total		Whole	Partial	Total	Common region
11p	5	22	27	11p13-p13 (24/27 ^a) 11pter-p15.4 (7/27)	22	10	32	11pter-p15.4 (30/32) 11p13-p13 (24/32)
11q	6	7	13	11q23.3-q24.1 (13/13)	5	0	5	Whole p and q arms (5/5)
1p	2	7	9	1pter-p36.21 (8/9)	2	1	3	1p31.1-p31.1 (2/2)
7p	7	1	8	7pter-p13 (8/8)	0	3	3	7p13-p12.1 (3/3)
16q	4	3	7	16q21-qter (7/7) 16q12.2-q12.2 (6/7)	2	0	2	Whole p and q arms (2/2)
6q	0	5	5	6q16.3-q21 (4/5) 6q25.3-q25.3 (2/5)	1	1	2	6q16.3-qter (2/2)
17p	5	1	6	17p13.1-p12 (6/6)	0	0	0	-
21q	0	5	5	21q22.2-qter (5/5)	0	0	0	-
14q	0	5	5	14q23.2-q32.2 (4/5)	1	1	2	14q11-qter (2/2)
18p	4	1	5	18p11.31-p10 (5/5)	2	0	2	Whole p and q arms (2/2)
9q	1	3	4	9q21-q21 (4/4)	1	0	1	-
10p	2	3	5	10p12.31-p12.31 (5/5)	0	0	0	-
18q	2	2	4	18q21.2-q21.2 (4/4)	2	2	4	18q22.1-q22.1 (4/4)
3q	2	1	3	3q10-q22.1 (3/3)	2	0	2	Whole p and q arms (2/2)
9p	1	2	3	9p21.3-p21.1 (2/3) 9p23-p23 (2/3)	1	1	2	9p21.1-p13.3 (2/2)
4p	3	1	4	4pter-p16.1 (4/4)	0	0	0	-
3p	1	1	2	3p12.3-p10 (2/2)	2	3	5	3pter-p21.32 (5/5)
4q	2	1	3	4q28.3-q28.3 (3/3)	0	2	2	4q31.22-q31.24 (2/2)
2p	0	3	3	2p25.3 (2/3)	1	1	2	2p12-p11 (2/2)
7q	1	2	3	7q21.1-q21.1 (2/3) 7q35-q35 (2/3)	0	2	2	Not overlapped -
13q	0	3	3	13q21.32-qter (2/3)	1	0	1	-
5p	1	1	2	5pter-p13.1 (2/2)	0	1	1	-
16p	0	2	2	16p13.2-p13.2 (2/2)	1	0	1	-
22(q)	1	1	3	22q11.21-q12.1 (2/2)	0	0	0	-

^aTwenty-four of 27 tumors had 11p13-p13 deletion in common.

TABLE 6. Clinical, Genetic, and Epigenetic Status of 9 Tumors with 7p Alterations

Tumor no. ^a	Age	Sex	Stage	Present status	Occurrence of relapse	Status of chromosome 7	Alterations of other chromosomes			WT1 status	IGF2 status
							Gain	Loss	UPD		
Homozygous deletion at 7p21											
1	1y8m	F	1	NED	No	d7p (7p21.3-p21.1HD), e7q	9q	No	11p	Abnormal	UPD
Hemizygous deletion of whole or partial 7p											
2	0y9m	F	2	NED	No	d7	No	No	11p	Abnormal	UPD
3	0y9m	F	2	NED	Yes	d7p	6q13-qter	No	11p, 12q14-q14	Abnormal	UPD
4	1y2m	M	5	NED	No	d7p, e7q	No	No	3p, 11p	Abnormal	UPD
5	4y2m	F	3	NED	No	d7p, e7q	No	No	2q, 11p	Normal	UPD
6	4y6m	F	4	NED	Yes	d7p, e7q	1q	No	No	Normal	LOI
7	2y2m	M	2	DOU	No	d7p, e7q, UPD7q31.32-q32.1	13q31.1-qter	No	No	Normal	LOI
8	7y2m	M	1	NED	No	d7pter-p13, e7q, UPD7p13-p10	1q, 8, 12, 13,	10p12-p12,	18q	Normal	LOI
Uniparental disomy (UPD) of partial 7p											
9	1y7m	F	2	NED	No	e7p12.1-qter, UPD7pter-p12.1	6, 8, 12	No	11p, 11q, 16	Normal	UPD

M, male; F, female; NED, No evidence of disease; DOU, died of unrelated disease; d, diminished; e, enhanced; HD, homozygous deletion UPD, uniparental disomy; LOI, loss of imprinting.

^aTumors 1, 2, 3 and 4 were reported as tumors 36, 25, 27 and 2, respectively, in the paper by Haruta et al. (2008).

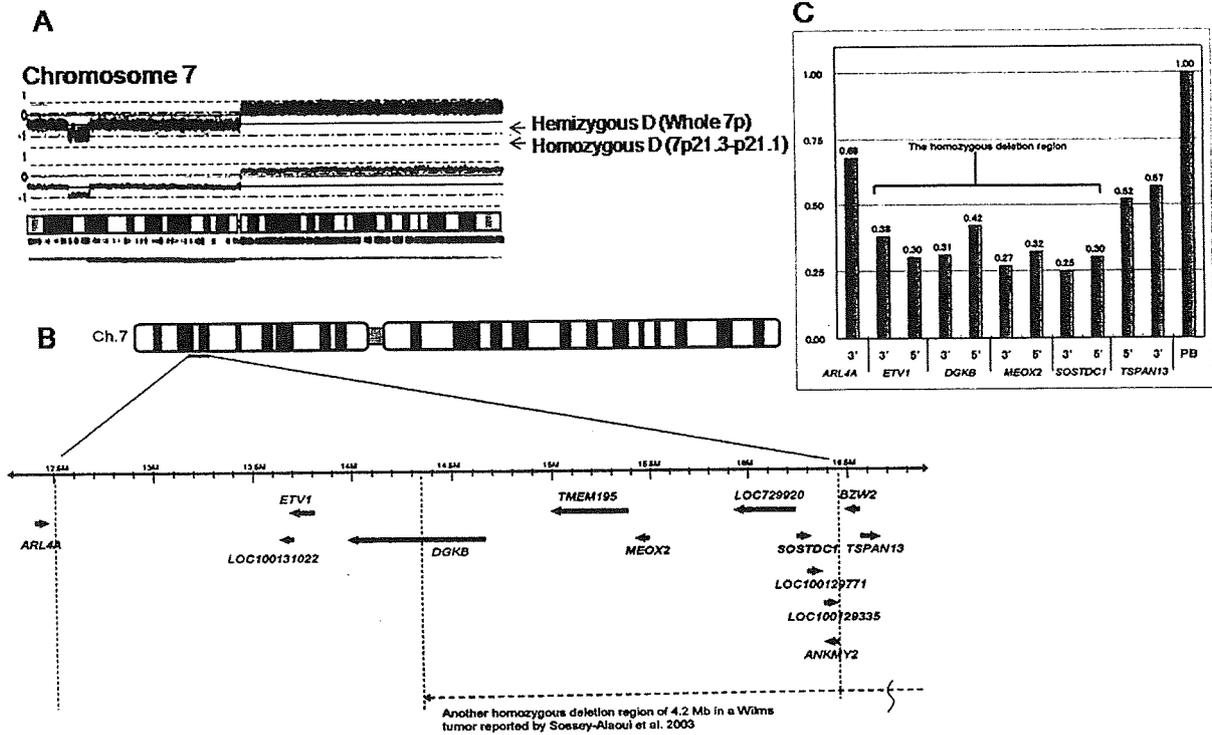


Figure 3. A homozygous deletion (HD) region of 4.3 Mb at 7p21 found in a Wilms tumor (No. 1). (A) A SNP array profile of Chromosome 7 showing a hemizygous deletion of the entire 7p, a homozygous deletion (HD) limited to 7p21.3-p21.1 and a gain of all of 7q. (B) HD regions identified in the present and previous studies (Sossey-Alaoui et al., 2003). There are 10 genes in the

HD region of 4.3 Mb in the present tumor, and 8 genes in a region of 2.1 Mb overlapping between the two tumors. (C) Validation of the HD region in a tumor (No. 1) by quantitative real-time PCR. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at www.interscience.wiley.com.]

	WIT49	CCG99-11	HFWT	FK	NK8y	Control cDNA	gDNA	H ₂ O
LOC100131022	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
ETV1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
DGKB	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
TMEM195	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
MEOX2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
LOC729920	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
LOC100129771	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
SOSTDC1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
LOC100129335	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
ANKMY2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
GAPDH	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Figure 4. Results of RT-PCR of 10 genes in three Wilms tumor cell lines (WIT49, CCG99-11 and HFWT), and fetal and normal kidney tissues. FK, fetal kidney tissues; NK8y, normal kidney tissue of an 8-year-old child. Control cDNA was obtained from various tumor cell lines expressing the respective genes. Control genomic DNA was obtained from lymphocyte DNA of a healthy individual, and showed that proper primers and PCR conditions were used to detect PCR products.

disease-causing mutations (Sossey-Alaoui et al., 2003). The lack of *MEOX2* expression in the three cell lines with normal Chromosome 7 homologues suggests this gene to be a tumor suppressor gene inactivated by methylation of the promoter. In addition, previous papers reported that both *MEOX2* and *SOSTDC1* are implicated in tumorigenesis (Patel et al., 2005; Blish et al., 2008). Thus, we selected these two genes for further analysis.

Deletion and Mutation Analysis of the *MEOX2* and *SOSTDC1* Genes

A quantitative real-time PCR analysis of genomic DNA was performed in 88 tumors using primer sets for *MEOX2* and *SOSTDC1*, and confirmed hemizygous deletion of the two genes in seven tumors with 7p alterations that had been detected with the SNP array, and normal copies of the two genes in 81 tumors with no 7p alterations. These findings indicate that no tumors have a subtle deletion at 7p21 undetectable with the SNP array.

expressed in one or two cell lines, and *MEOX2* was not expressed in the three cell lines. A previous analysis of *DGKB* failed to detect

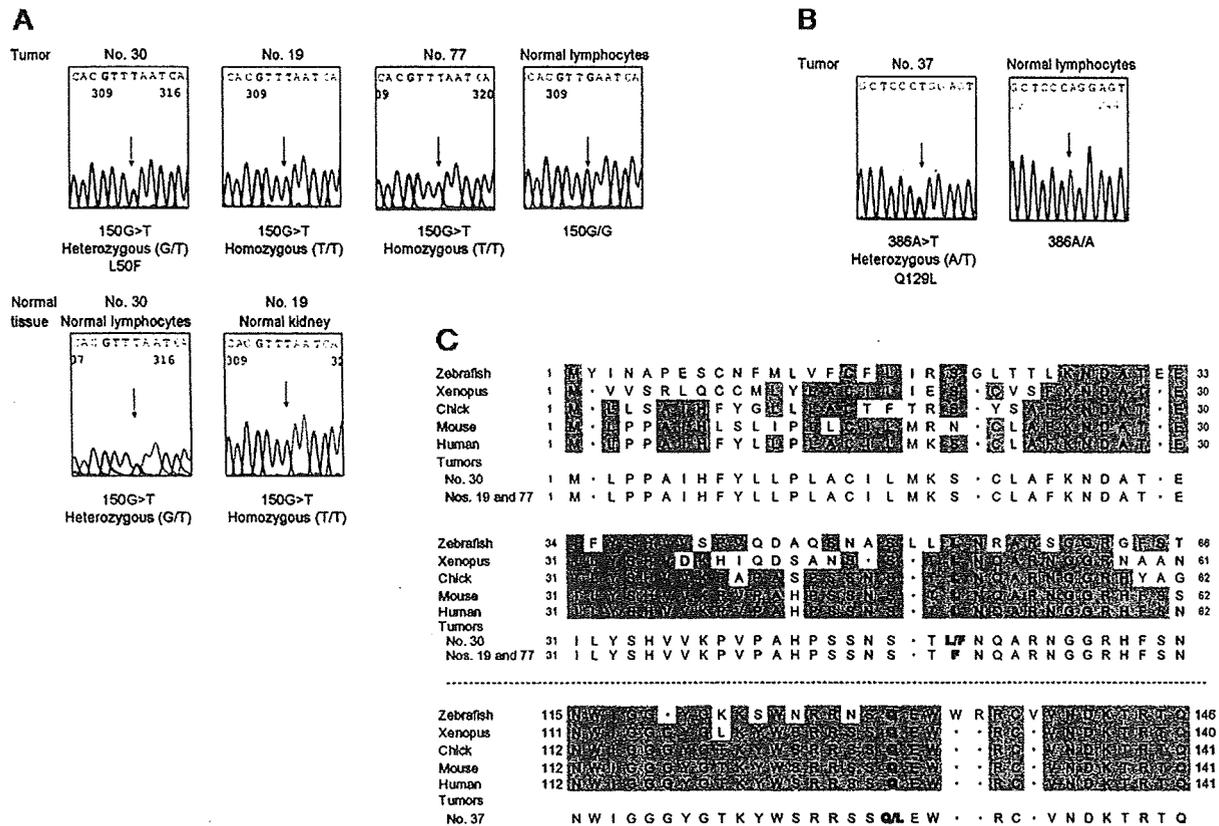


Figure 5. Results of sequence analysis of *SOSTDC1* in tumor samples, corresponding normal tissue samples and a control sample from a healthy individual, and the amino acid sequence of *SOSTDC1*. (A) A heterozygous (No. 30) or homozygous (Nos. 19 and 77) G to T transversion in Exon 1 found in three tumors. The mutation causes the substitution of leucine with phenylalanine (L50F). (B) A heterozygous A to T transversion in Exon 2 found in a tumor (No. 37). The

mutation causes the substitution of arginine with leucine (Q129L). (C) Amino acid sequences of *SOSTDC1* proteins of zebrafish, *Xenopus*, chick, mouse, human, and Wilms tumor samples. Shaded letters indicate identical amino acids among species, and bold letters indicate amino acids, in which substitutions are predicted in four tumors identified in the present study. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at www.interscience.wiley.com.]

Coding exons of *MEOX2* and *SOSTDC1* were directly sequenced in 94 and 95 tumors, respectively, and three cell lines to detect possible mutations of the two genes. The SNP array-based analysis of the 94 tumors showed that 86 had a biallelic *MEOX2*, and 8 had a monoallelic *MEOX2* because of 7p deletion or UPD. *MEOX2* has a string of polymorphic histidine repeats in Exon 1 reported in the National Center for Biotechnology Information (NCBI) database. Allelic frequencies of 12 and 13 repeats were 87.2 and 12.8%, respectively. All eight tumors with a hemizygous 7p deletion or 7p UPD had the 12 repeats allele; normal counterpart tissue of one tumor (No. 2) showed homozygous 12 repeats alleles, suggesting no correlation of the 13 histidine repeats allele with the development of WT with 7p alterations. Two cell lines had homozygous 12 repeats alleles, and one (WiT49) had heterozygous 12 and 13 repeats alleles. No nucleotide

changes were found in any exons of *MEOX2* in the 94 tumors or three cell lines.

We found two novel missense mutations in *SOSTDC1* in four tumors with no 7p alterations (Fig. 5A). A G to T transversion (150G>T) in Exon 1, resulting in an amino acid substitution from leucine to phenylalanine (L50F), was found in three tumors; the substitution was heterozygous in one (No. 30), and homozygous in two (Nos. 19 and 77). The same change was found in peripheral blood (No. 30) and normal kidney tissue (No. 19) of the same patients, indicating that the transversion was of germline origin. In addition, an A to T transversion (386A>T) in Exon 2, resulting in an amino acid substitution from arginine to leucine (Q129L), was found in one tumor (No. 37) (Fig. 5B); the change was heterozygous, and both alleles were of the same height suggesting a germline origin, although no normal tissue was available to confirm the origin

TABLE 7. The Expression Status of *MEOX2* and *SOSTDC1* and Clinical, Epigenetic, and Other Genetic Characteristics in 22 Wilms Tumors

Tumors ^a and cell lines	Histidine repeats ^b	<i>MEOX2</i> expression	CpG islands ^c			<i>SOSTDC1</i> expression	<i>WT1</i> status
			+105	-270	-609		
Tumors with 7p alterations (n = 4)							
1	ND	0	ND	ND	ND	0	Abnormal
4	12	1+	M	M	U	2+	Abnormal
5	12	1+	U	U	U	0	Normal
6	12	1+	U	U	U	0	Normal
Tumors with no 7p alterations (n = 18)							
10	12/13	2+	U	U	U	1+	Abnormal
11	12	2+	U	M	M	0	Abnormal
12	12	2+	U	U	U	1+	Abnormal
13	12/13	2+	U	U	U	2+	Abnormal
14	12/13	2+	U	U	U	2+	Abnormal
15	12	2+	ND	ND	ND	2+	Abnormal
16	12	2+	U	M	M	1+	Abnormal
17	12/13	2+	U	U	U	0	Abnormal
18	12	2+	U	U	U	1+	Abnormal
19 ^d	12	0	ND	ND	U	0	Normal
20	12	2+	U	U	M	0	Normal
21	12	0	M	U	U	2	Normal
22	12	2+	ND	ND	ND	2	Normal
23	12	2+	U	M	U	1+	Normal
24	12	1+	U	U	U	2+	Normal
25	12	2+	U	U	U	1+	Normal
26	12/13	2+	U	U	U	1+	Normal
27	12	0	U	U	U	2	Normal
Cell lines (n = 3)							
WiT49	12/13	0	M	M	M	2	Normal
CCG99-11	12	0	U	U	U	2	Normal
HFWT	12	0	M	M	M	1+	Normal

^aTumors 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 and 18 were reported as tumors 9, 23, 6, 5, 24, 15, 34, 33 and 4, respectively, in the paper by Haruta et al. (2008).

^bPolymorphic histidine repeat numbers.

^cThe location of three CpG islands is shown in Figure 1.

^dTumor 19 had *SOSTDC1* mutation. ND, not done; M, methylated; U, unmethylated.

of the change. Neither nucleotide change has been reported as a SNP in the NCBI database. No nucleotide changes were found in any exons of *SOSTDC1* in the other 91 tumors or three cell lines.

RT-PCR Analysis of *MEOX2* and *SOSTDC1*

A RT-PCR analysis of *MEOX2* and *SOSTDC1* was performed in 22 tumor samples and fetal kidney tissues, and the results are shown in Table 7 and Figure 6. The expression levels of *MEOX2* were classified as 0 in 4 tumors, as 1+ in 4 tumors and as 2+ in 14 tumors, and the three cell lines showed no expression (Table 7 and Figs. 4 and 6). Four tumors with 7p alterations had lower levels of *MEOX2* than 18 tumors with no 7p alterations ($P = 0.017$). Of 18 tumors with no 7p alterations, 13 had homozygous 12 histidine repeats alleles, and 5 had heterozygous 12 and 13

histidine repeats alleles; there was no difference in the expression of *MEOX2* between the two groups of tumors ($P = 0.08$). Likewise, of 18 tumors with no 7p alterations, 9 had *WT1* abnormality and 9 had no *WT1* abnormality; the tumors with *WT1* abnormality had higher *MEOX2* expression levels than the tumors with no *WT1* abnormality ($P = 0.028$). *SOSTDC1* expression was examined in only one (No. 19) of four tumors with *SOSTDC1* mutation, and this tumor showed no expression. Five tumors with 7p alterations or *SOSTDC1* mutation tended to have lower *SOSTDC1* levels than 17 tumors with no 7p alterations or *SOSTDC1* mutation ($P = 0.056$).

Methylation Status of *MEOX2* and its Correlation with the Expression Levels of *MEOX2*

Because *MEOX2* expression was reduced in tumor samples with 7p alterations and the three

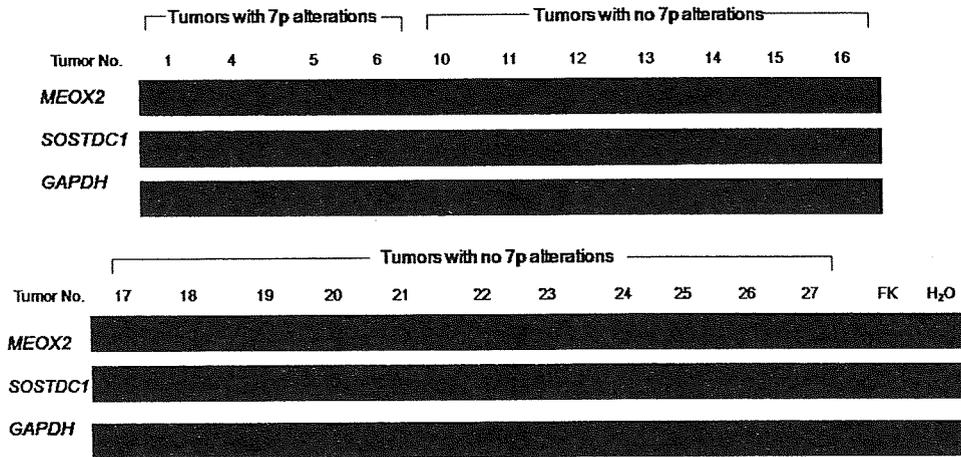


Figure 6. Results of RT-PCR analysis of *MEOX2* and *SOSTDC1* in Wilms tumor samples with or without 7p alterations and fetal kidney tissues. *GAPDH* was included as a control for integrity and quantity (lower panel). The expression levels of *MEOX2* and *SOSTDC1* are also shown in Table 7.

cell lines, we examined the methylation status of three CpG islands upstream of or within *MEOX2* Exon 1 by MSP to determine whether methylation is inversely correlated with the expression. Of 22 tumors in which *MEOX2* expression was examined, DNA for a MSP analysis was available for 18 tumors. DNA and RNA were available for all three cell lines. Four tumor and cell line samples with the methylated CpG island +105 showed lower *MEOX2* levels than 17 tumors with the unmethylated CpG island +105 ($P = 0.006$) (Table 7). If we exclude the three cell lines, 2 tumors with the methylated CpG island +105 showed lower *MEOX2* expression levels than 16 tumors with the unmethylated CpG island +105 ($P = 0.04$). There was no difference in the incidence of the methylated CpG island +105 between 3 tumors with 7p alterations and 15 tumors with no 7p alterations ($P = 0.18$). There was no significant difference between the methylation status of CpG islands -270 or -609 and the expression levels of *MEOX2*.

Clinical, Genetic, and Epigenetic Characteristics of Wilms Tumors with or Without 7p21 Alterations

There were no significant differences in clinical characteristics, including age, the ratio of boys to girls, stage distribution, and outcome between 9 patients with 7p21 alterations and 88 patients with no 7p21 alterations (Table 8). In addition, there were no significant differences in the incidences of *WT1* abnormality, *CTNNB1* mutation and *SOSTDC1* mutation between the two groups of tumors. In contrast, UPD in the *IGF2* region

tended to be more frequent in tumors with 7p21 alterations than in tumors with no alterations ($P = 0.056$), and there was a difference in the status of *IGF2* [uniparental disomy (UPD), loss of imprinting (LOI), and retention of imprinting (ROI)] between 9 tumors with 7p alterations and 91 tumors with no 7p alterations ($P = 0.028$) (Table 8). One tumor (No. 1) from identical twins with *WT1* mutation had 7p deletion, and the other (No. 100) with the same *WT1* mutation had no 7p alteration.

DISCUSSION

The present SNP array-based analysis demonstrated 7p alterations, including a hemizygous loss, a homozygous loss, or UPD, in 9 of 100 WTs. A homozygous deletion found in one tumor was located in the 7p21.3-p21.1 region of 4.3 Mb where 10 protein-coding genes reside. This region partially overlaps with another HD region of 4.2 Mb in a previously reported WT (Sossey-Alaoui et al., 2003). Consequently, the region was narrowed down to a stretch of 2.1 Mb, where eight protein-coding genes reside (Fig. 3B). Based on the expression of the 10 genes in three WT cell lines and previous reports implicating *MEOX2* and *SOSTDC1* in tumorigenesis, we selected these 2 genes for further analysis.

Mutation analysis of *MEOX2* showed histidine repeat polymorphisms (12 and 13 histidine repeats), but no correlation between the 12 or 13 repeat alleles and the expression of *MEOX2* or 7p alterations. Tumors with 7p alterations showed lower levels of *MEOX2* than tumors with no 7p

TABLE 8. Clinical and Genetic Characteristics in Wilms Tumors with and Without 7p Alterations

		7p alterations	No 7p alterations	P value
Total number of patients (n = 97)		9 (9.3%)	88 (90.7%)	
Age at diagnosis (month; mean ± SD)		32.5 ± 25.8	33.3 ± 31.7	0.94
Sex	Male	3 (33.3%)	37 (42.0%)	0.44
	Female	6 (66.7%)	51 (58.0%)	
Stage (n = 90)	I	2 (22.2%)	29 (35.8%)	0.48
	II	4 (44.5%)	18 (22.2%)	
	III	1 (11.1%)	22 (27.2%)	
	IV	1 (11.1%)	8 (9.9%)	
	V	1 (11.1%)	4 (4.9%)	
Occurrence of relapse (n = 83)	Relapsed	2 (22.2%)	12 (16.2%)	0.82
	Not relapsed	7 (77.8%)	62 (83.8%)	
Outcome (n = 94)	Died	1 (11.1%)	13 (15.3%)	0.59
	Alive	8 (88.9%)	72 (84.7%)	
		9 (9.0%)	91 (91.0%)	
Total number of tumors (n = 100)		9 (9.0%)	91 (91.0%)	
Status of <i>WT1</i> (11p13) (n = 100)	Abnormal	4 (44.4%)	29 (31.9%)	0.46
	Normal	5 (55.6%)	62 (68.1%)	
Status of <i>CTNNB1</i> (3p14) (n = 81)	Mutated	2 (22.2%)	20 (27.0%)	0.70
	Not mutated	7 (77.8%)	52 (73.0%)	
Status of <i>SOSTDC1</i> (7p21) (n = 95)	Mutated	0 (0%)	4 (4.7%)	0.67
	Not mutated	9 (100%)	82 (95.3%)	
UPD of <i>IGF2</i> (11p15.5) (n = 100)	UPD	6 (66.7%)	27 (29.7%)	0.056
	No UPD	3 (33.3%)	64 (70.3%)	
Status of <i>IGF2</i> (11p15.5) (n = 100)	UPD	6 (66.7%)	27 (29.7%)	0.028
	LOI	3 (33.3%)	27 (29.7%)	
	ROI	0 (0%)	37 (40.6%)	

UPD, uniparental disomy; LOI, loss of imprinting; ROI, retention of imprinting.

alterations. In addition, tumors with methylated CpG islands +105 showed lower expression levels of *MEOX2* than tumors with unmethylated CpG islands +105, suggesting that the methylation of Exon 1 contributes to downregulation of the gene. A recent study also showed that *MEOX2* was aberrantly methylated in lung cancer, with an inverse correlation between the methylation of its 5'-UTR and the gene expression, suggesting that the gene may be downregulated by DNA methylation (Cortese et al., 2008).

MEOX2, a key regulator of vascular-cell function, is expressed in quiescent cells and also known as the growth arrest-specific homeobox (*Gax*) gene (Gorski et al., 1993). *MEOX2* negatively regulates the cell cycle in vascular smooth muscle cells by directly upregulating the transcription of *CDKN1A*, leading to reduced cyclin-dependent kinase 2 activity and cell cycle arrest (Smith et al., 1997), and also induced apoptosis in *CDKN1A*-null proliferating cells via another pathway (Perlman et al., 1998). *MEOX2* expression resulted in decreased expression of genes implicated in endothelial cell activation and angiogenesis. Furthermore, *MEOX2* downregulated numerous nuclear factor-kappa B (NF- κ B) target genes and decreased the binding of NF- κ B to its

target sequence in electrophoretic mobility shift assays (Patel et al., 2005). These findings suggest that loss of *MEOX2* may promote angiogenesis in tumor tissues. In a study of expression profiles in WTs, Li et al., (2004) found overexpression of *MEOX2* in *WT1*-mutant tumors but not in *WT1* wild-type tumors. The present study confirmed their findings in WTs with no 7p alterations, and found that *MEOX2* overexpression is not relevant to the *WT1*-mutant tumors with 7p alterations.

Sequence analysis of *SOSTDC1* showed two missense mutations in four tumors, and one of the two was proved to be of germinal origin. Both changes resulted in an amino acid substitution of L50F and Q129L, and the replaced amino acids were highly conserved among five species (Fig. 5C). Tumors with 7p alterations or *SOSTDC1* mutation tended to show lower *SOSTDC1* expression levels than tumors with neither 7p alterations nor *SOSTDC1* mutation. *SOSTDC1*, consisting of 206 amino acids, encodes a bone morphogenetic protein (BMP) antagonist, and plays important roles in tooth, hair, and neural formation as a modulator of the Wnt signaling pathway by binding to LDP6 (Itasaki et al., 2003; Laurikkala et al., 2003; Kassai et al., 2005; Yanagita et al., 2006). Recently, Blish et al., (2008)

demonstrated that while normal kidney tissues highly expressed SOSTDC1 protein, clear cell renal carcinoma tissues showed a reduced expression, and SOSTDC1 could also negatively regulate the Wnt signaling pathway, exerting an antiproliferative effect on clear cell renal carcinoma cells. CTNNB1 (β -catenin) and WTX form the APC complex, and abnormalities of CTNNB1 or WTX accelerate the Wnt signaling pathway in WT (Major et al., 2007). Although the precise roles of SOSTDC1 in the embryonic development of the kidney are unknown, the lack of SOSTDC1 may cause strong activation of the Wnt pathway and the two missense mutations found in four tumors may have a role in the downregulation of SOSTDC1 expression.

The present study found no difference in clinical characteristics between tumors with and without 7p alterations. Powlesland et al., (2000) found no particular clinical phenotype to be associated with 7p LOH either. Eight of nine tumors with 7p alterations in the present study had a hemizygous loss or UPD in almost the entire short arm of Chromosome 7, and previous studies identified two candidate tumor suppressor genes, *POU6F2* and *PTH-B1*, at 7p14.1 and 7p14.3, respectively, that were located about 15 Mb from the *MEOX2* and *SOSTDC1* loci (Vernon et al., 2003; Perotti et al., 2004; Renzo et al., 2006). These findings suggest the presence of more than one tumor suppressor gene in 7p, and the abnormality of each gene may have resulted in heterogeneous clinical characteristics in tumors with 7p alterations.

In contrast, all nine tumors with 7p alterations in the present study showed either UPD or LOI of *IGF2*, and the incidence of UPD or UPD plus LOI was higher in tumors with 7p alterations than in tumors with no 7p alterations. A similar association between 7p LOH and *IGF2* alterations or *WT1* abnormality in WTs was reported by other investigators (Yuan et al., 2005; Vuonovirta et al., 2008). Furthermore, *WT1* mutation or LOI of *IGF2* but not 7p alteration was shared in bilateral tumors occurring in the same patients in previous series (Powlesland et al., 2000; Yuan et al., 2005). Likewise, one WT occurring in identical twins in the present study had both *WT1* mutation and 7p loss, but another tumor in the other twin had *WT1* abnormality but no 7p alterations. These findings suggest that the 7p gene abnormality occurred after the *WT1* or *IGF2* abnormality. Losses of *MEOX2* and *SOSTDC1* are thought to accelerate angiogenesis and aug-

ment signals in the Wnt pathway, respectively. We and other investigators previously reported that a *CTNNB1* mutation that affects the Wnt signaling pathway is a later event than a *WT1* abnormality (Fukuzawa et al., 2007; Haruta et al., 2008). Taken together, 7p genes are thought to have a role in the progression but not the initiation of Wilms tumorigenesis, and we propose that *MEOX2* and *SOSTDC1* are prime candidates for 7p tumor suppressor genes, and single or combined abnormalities of the two genes may cause WT to progress.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the physicians of the Japan Wilms Tumor Study Group (JWiTS) who supplied samples for this study. They also thank Drs. Y. Nannya and S. Ogawa for providing the CNAG program, and Drs. B. Tycko and H. Yeger for providing Wilms tumor cell lines, CCG99-11 and WiT49, respectively.

REFERENCES

- Alami J, Williams BR, Yeger H. 2003. Derivation and characterization of a Wilms' tumour cell line, WiT 49. *Int J Cancer* 107:365-374.
- Beckwith JB, Palmer NF. 1978. Histopathology and prognosis of Wilms tumor: Results from the First National Wilms' Tumor Study. *Cancer* 41:1937-1948.
- Blish KR, Wang W, Willingham MC, Du W, Birse CE, Krishnan SR, Brown JC, Hawkins GA, Garvin AJ, D'Agostino RB, Jr, Torti FM, Torti SV. 2008. A human bone morphogenetic protein antagonist is down-regulated in renal cancer. *Mol Biol Cell* 19:457-464.
- Cortese R, Hartmann O, Berlin K, Eckhardt F. 2008. Correlative gene expression and DNA methylation profiling in lung development nominate new biomarkers in lung cancer. *Int J Biochem Cell Biol* 40:1494-1508.
- d'Angio GJ, Breslow N, Beckwith JB, Evans A, Baum H, deLorimier A, Fernbach D, Hrabovsky E, Jones B, Kelalis P, Otherson HB, Tefft M, Thomas PRM. 1989. Treatment of Wilms' tumor. Results of the Third National Wilms' Tumor Study. *Cancer* 64:349-360.
- Fukuzawa R, Heathcote RW, More HE, Reeve AE. 2007. Sequential *WT1* and *CTNNB1* mutations and alterations of β -catenin localization in intralobar nephrogenic rests and associated Wilms tumours: Two case studies. *J Clin Pathol* 60:1013-1016.
- Fukuzawa R, Anaka MR, Weeks RJ, Morison IM, Reeve AE. 2009. Canonical WNT signalling determines lineage specificity in Wilms tumour. *Oncogene* 28:1063-1075.
- Gessler M, Poustka A, Cavenee W, Neve RL, Orkin SH, Bruns GA. 1990. Homozygous deletion in Wilms tumours of a zinc-finger gene identified by chromosome jumping. *Nature* 343:774-778.
- Gorski DH, LePage DF, Patel CV, Copeland NG, Jenkins NA, Walsh K. 1993. Molecular cloning of a diverged homeobox gene that is rapidly down-regulated during the G0/G1 transition in vascular smooth muscle cells. *Mol Cell Biol* 13:3722-3733.
- Grundy RG, Pritchard J, Scambler P, Cowell JK. 1998. Loss of heterozygosity for the short arm of chromosome 7 in sporadic Wilms tumour. *Oncogene* 17:395-400.
- Haruta M, Arai Y, Sugawara W, Watanabe N, Honda S, Ohshima J, Soejima H, Nakadate H, Okita H, Hata J, Fukuzawa M, Kaneko Y. 2008. Duplication of paternal *IGF2* or loss of maternal *IGF2* imprinting occurs in half of Wilms tumors with various structural *WT1* abnormalities. *Genes Chromosomes Cancer* 47:712-727.

- Herman JG, Graff JR, Myöhänen S, Nelkin BD, Baylin SB. 1996. Methylation-specific PCR: A novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:9821–9826.
- Ishiwata I, Ono I, Ishiwata C, Soma M, Nakaguchi T, Ohara K, Hirano M, Ishikawa H. 1991. Carcinoembryonic proteins produced by Wilms' tumor cells in vitro and in vivo. *Exp Pathol* 41:1–9.
- Itasaki N, Jones CM, Mercurio S, Rowe A, Domingos PM, Smith JC, Krumlauf R. 2003. Wise, a context-dependent activator and inhibitor of Wnt signalling. *Development* 130:4295–4305.
- Japanese Society of Pathology. 2008. The committee on histological classification of childhood tumors: Tumors of the kidney. Tokyo: Kanahara Shuppan.
- Kaneko Y, Homma C, Maseki N, Sakurai M, Hata J. 1991. Correlation of chromosome abnormalities with histological and clinical features in Wilms' and other childhood renal tumors. *Cancer Res* 51:5937–5942.
- Kassai Y, Munne P, Hotta Y, Penttilä E, Kavanagh K, Ohbayashi N, Takada S, Thesleff I, Jernvall J, Itoh N. 2005. Regulation of mammalian tooth cusp patterning by ectodin. *Science* 309:2067–2070.
- Knudson AG, Jr, Strong LC. 1972. Mutation and cancer: a model for Wilms' tumor of the kidney. *J Natl Cancer Inst* 48:313–324.
- Laurikkala J, Kassai Y, Pakkasjärvi L, Thesleff I, Itoh N. 2003. Identification of a secreted BMP antagonist, ectodin, integrating BMP, FGF, and SHH signals from the tooth enamel knot. *Dev Biol* 24:91–105.
- Li CM, Kim CE, Margolin AA, Guo M, Zhu J, Mason JM, Hensle TW, Murty VV, Grundy PE, Fearon ER, D'Agati V, Licht JD, Tycko B. 2004. *CTNNB1* mutations and overexpression of Wnt/ β -catenin target genes in WT1-mutant Wilms' tumors. *Am J Pathol* 165:1943–1953.
- Major MB, Camp ND, Berndt JD, Yi X, Goldenberg SJ, Hubbert C, Biechele TL, Gingras AC, Zheng N, Maccoss MJ, Angers S, Moon RT. 2007. Wilms tumor suppressor WTX negatively regulates WNT/ β -catenin signaling. *Science* 316:1043–1046.
- Nannya Y, Sanada S, Nakazaki K, Hosoya N, Wang L, Hangaishi A, Kurokawa M, Chiba S, Bailey DK, Kennedy GC, Ogawa S. 2005. A robust algorithm for copy number detection using high-density oligonucleotide single nucleotide polymorphism genotyping arrays. *Cancer Res* 65:6071–6079.
- Northcott PA, Nakahara Y, Wu X, Feuk L, Ellison DW, Croul S, Mack S, Kongkham PN, Peacock J, Dubuc A, Ra YS, Zilberberg K, McLeod J, Scherer SW, Rao JS, Eberhart CG, Grajkowska W, Gillespie Y, Lach B, Grundy R, Pollack IF, Hamilton RL, Van Meter T, Carlotti CG, Boop F, Bigner D, Gilbertson RJ, Rutka JT, Taylor MD. 2009. Multiple recurrent genetic events converge on control of histone lysine methylation in medulloblastoma. *Nat Genet* 41:465–472.
- Patel S, Leal AD, Gorski DH. 2005. The homeobox gene *Gax* inhibits angiogenesis through inhibition of nuclear factor- κ B-dependent endothelial cell gene expression. *Cancer Res* 65:1414–1424.
- Perlman EJ, Grosfeld JL, Togasi K, Boccon-Gibod L. 2004. Pathology and genetics of tumours of the urinary system and male genital organs. In: Eble JN, Sauter G, Epstein JI, Sesterhenn IA, editors. *World Health Organization Classification of Tumours*. Lyon: IARC Press. p 48–52.
- Perlman H, Sara M, Le Roux A, Sedlak TW, Branellec D, Walsh K. 1998. Bax-mediated cell death by the *Gax* homeoprotein requires mitogen activation but is independent of cell cycle activity. *EMBO J* 17:3576–3586.
- Perotti D, De Vecchi G, Testi MA, Lualdi E, Modena P, Mondini P, Ravagnani F, Collini P, Di Renzo F, Spreafico F, Terenziani M, Sozzi G, Fossati-Bellani F, Radice P. 2004. Germline mutations of the *POU6F2* gene in Wilms tumors with loss of heterozygosity on chromosome 7p14. *Hum Mutat* 24:400–407.
- Perotti D, Gamba B, Sardella M, Spreafico F, Terenziani M, Collini P, Pession A, Nantron M, Fossati-Bellani F, Radice P. 2008. Functional inactivation of the *WTX* gene is not a frequent event in Wilms' tumors. *Oncogene* 27:4625–4632.
- Powlesland RM, Charles AK, Malik KT, Reynolds PA, Pires S, Boavida M, Brown KW. 2000. Loss of heterozygosity at 7p in Wilms' tumour development. *Br J Cancer* 82:323–329.
- Ravenel JD, Broman KW, Perlman EJ, Niemitz EL, Jayawardena TM, Bell DW, Haber DA, Uejima H, Feinberg AP. 2001. Loss of imprinting of insulin-like growth factor-II (*IGF2*) gene in distinguishing specific biologic subtypes of Wilms tumor. *J Natl Cancer Inst* 93:1698–1703.
- Renzo FD, Doneda L, Menegola E, Sardella M, De Vecchi G, Collini P, Spreafico F, Fossati-Bellani F, Giavini E, Radice P, Perotti D. 2006. The murine *Pou6f2* gene is temporally and spatially regulated during kidney embryogenesis and its human homolog is overexpressed in a subset of Wilms tumors. *J Pediatr Hematol Oncol* 28:791–797.
- Rivera MN, Haber DA. 2005. Wilms' tumour: Connecting tumorigenesis and organ development in the kidney. *Nat Rev Cancer* 5:699–712.
- Rivera MN, Kim WJ, Wells J, Driscoll DR, Brannigan BW, Han M, Kim JC, Feinberg AP, Gerald WL, Vargas SO, Chin L, Iafate AJ, Bell DW, Haber DA. 2007. An X chromosome gene, *WTX*, is commonly inactivated in Wilms tumor. *Science* 315:642–645.
- Ruteshouser EC, Robinson SM, Huff V. 2008. Wilms tumor genetics: mutations in *WT1*, *WTX*, and *CTNNB1* account for only about one-third of tumors. *Genes Chromosomes Cancer* 47:461–470.
- Smith RC, Branellec D, Gorski DH, Guo K, Perlman H, Dedieu JF, Pastore C, Hahfoudi A, Denéfle P, Isner JM, Walsh K. 1997. p21 CIP1-mediated inhibition of cell proliferation by overexpression of the *gax* homeodomain gene. *Genes Dev* 11:1674–1689.
- Sossey-Alaoui K, Vieira L, David D, Boavida MG, Cowell JK. 2003. Molecular characterization of a 7p15–21 homozygous deletion in a Wilms tumor. *Genes Chromosomes Cancer* 36:1–6.
- Sugawara W, Haruta M, Sasaki F, Watanabe N, Tsunematsu Y, Kikuta A, Kaneko Y. 2007. Promoter hypermethylation of the *RASSF1A* gene predicts the poor outcome of patients with hepatoblastoma. *Pediatr Blood Cancer* 49:240–249.
- Vernon EG, Malik K, Reynolds P, Powlesland R, Dallosso AR, Jackson S, Henthorn K, Green ED, Brown KW. 2003. The parathyroid hormone-responsive B1 gene is interrupted by a t(1;7)(q42;p15) breakpoint associated with Wilms' tumour. *Oncogene* 22:1371–1380.
- Vuononvirta R, Sebire NJ, Dallosso AR, Reis-Filho JS, Williams RD, Mackay A, Fenwick K, Grigoriadis A, Ashworth A, Pritchard-Jones K, Brown KW, Vujanec GM, Jones C. 2008. Perilobar nephrogenic rests are nonobligate molecular genetic precursor lesions of insulin-like growth factor-II-associated Wilms tumors. *Clin Cancer Res* 14:7635–7644.
- Wang-Wuu S, Soukup S, Bove K, Gotwals B, Lampkin B. 1990. Chromosome analysis of 31 Wilms' tumors. *Cancer Res* 50:2768–2793.
- Yanagita M, Okuda T, Endo S, Tanaka M, Takahashi K, Sugiyama F, Kunita S, Takahashi S, Fukatsu A, Yanagisawa M, Kita T, Sakurai T. 2006. Uterine sensitization-associated gene-1 (*USAG-1*), a novel BMP antagonist expressed in the kidney, accelerates tubular injury. *J Clin Invest* 116:70–79.
- Yuan E, Li CM, Yamashiro DJ, Kandel J, Thaker H, Murty VV, Tycko B. 2005. Genomic profiling maps loss of heterozygosity and defines the timing and stage dependence of epigenetic and genetic events in Wilms' tumors. *Mol Cancer Res* 3:493–502.

ウイルス腫瘍

大喜多 肇^{*1} (おおきた はじめ)

秦 順一^{*1,2} (はたじゅんいち)

^{*1}国立成育医療センター研究所

^{*2}常盤大学人間科学部

要旨

ウイルス腫瘍は小児腎腫瘍の90%以上を占める。本腫瘍は無虹彩症や生殖泌尿器系の奇形を伴うことが多く、*WT1* 遺伝子のクローニングに繋がった。その後11p15領域にある一連のインプリンティング遺伝子の発現と腫瘍発生との関連が明らかになり、臓器発生とepigeneticな遺伝子発現に興味深い示唆を与えた。本稿ではこれらの遺伝子の腫瘍発生と器官形成の意義について概説した。

Key words : ウイルス腫瘍, Denys-Drash 症候群, *WT1*, imprinting gene, H19

はじめに

神経芽腫、ウイルス腫瘍、肝芽腫、胚細胞腫瘍に代表される胎児性腫瘍は、主に乳幼児期に発生する特有な腫瘍群である。これら胎児性腫瘍は器官形成途上の母細胞から発生し、腫瘍細胞が発生母地の有する分化・成熟能を潜在的に有している。一方、腫瘍発生機構においては遺伝子異常が重要な要因であり同時に、それは環境の付加的要因により修飾されることが明らかになっている。本腫瘍の発生は疫学的にもきわめて興味深い。すなわち白人種に多く、日本人を含めて「有色人種」に少ない。ちなみに、米国の統計では16歳以下の10,000人に1人の割合で発生し、年間460名内外の患者が発生し、小児がんの6%を占めている。さらに白人種だけに3倍の頻度であるという。

本腫瘍の発生母地や腫瘍発生機序に関しては、最近、多くの分子遺伝学的研究の集積がみられる。ウイルス腫瘍は組織像の類似性から腎発生途上に生じる後腎芽細胞に由来するという見解が一般的である。すなわちウイルス腫瘍は後腎組織由来の腫瘍で、同組織を構成する後腎芽細胞が胎生30週以前に尿管芽に誘導されて、糸球体や尿細管に分化する途上の細胞が腫瘍化したものと考えられている。腫瘍性の後腎芽細胞は多分化能を有しており、糸球体様な

らびに尿細管上皮に分化した上皮様細胞と同時に横紋筋、平滑筋、軟骨、脂肪などの間葉細胞にも分化し、腫瘍構成成分の一部となる。本腫瘍の特異性は、家族内発生が多いこと、患児の胚細胞系列に染色体異常や奇形をしばしば伴うことにある。ウイルス腫瘍と染色体異常、奇形の合併は古くから知られていた。本稿ではこのようなウイルス腫瘍の遺伝子異常の特徴について概説する。

I 11p13に存在する*WT1* 遺伝子 (*WT1*) の構造・機能および発現

先に述べたように、ウイルス腫瘍を発生する患児に形成異常(奇形)を伴うことが古くから知られていた。このような奇形は染色体異常のパターンと密接に関連している。11p13領域の欠失を伴う奇形として無虹彩症、尿道下裂、WAGR症候群、Drash症候群があり、同領域にウイルス腫瘍の発生と器官形成にかかわる遺伝子の存在が想定されてきた。1990年にほぼ同時に2つのグループより、11p13領域からウイルス腫瘍の発生に関連する*WT1*と命名された遺伝子が単離された。¹⁾²⁾

*WT1*は全長約50kbで10個のエクソンからなり、mRNAの大きさは3.5kbである。エクソン5全体とエクソン9のエクソンイントロ

1. 4 個の zinc finger 構造をもつ転写因子をコード
2. 2 カ所の alternative splice sites が存在
 エクソン 5 : 全体
 エクソン 9 : 3'側 9 塩基 [lysine, threonine, serine(KTS)]
3. 胎児期の腎・性腺に発現し, 泌尿生殖器形成に関与
4. Pax, PDGF などの結合して転写調節を行う

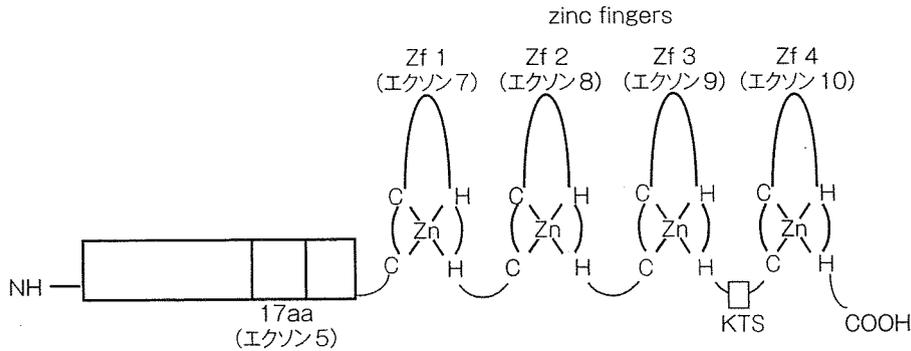


図1 WT1の構造

エクソン7~10はzinc finger domainをコードしている。

ン接合部付近の2カ所に alternative splice の部位があり, 4種の splicing variants が存在する。WT1のNH側は glutamine-proline-glycine rich 部位で, またCOOH側の4個のエクソンはそれぞれ(Cys)2-(His)2 zinc finger 構造をもつ(図1)。同部はDNAの特定の配列(-GCCGGGGCG-)に結合することが証明され, 転写調節因子であることが判明した。実際に EGR-1, IGF2, IGF2 receptor, PDGF, Pax-2 などの発現を転写レベルで調節し, 分化を促進させる機能をもつことが明らかにされている³⁾。一方, WT1 蛋白は胎児期では腎糸球体の原基である podocyte および後腎芽細胞に発現している。また, 精巣, 卵巣の間質細胞の原基である生殖隆起, 中皮細胞, 脾臓, 中枢神経などにも時期特異的に発現している。成人では糸球体上皮, 精巣の Sertoli 細胞および卵巣の濾胞細胞に発現している⁴⁾。

Keridberg らによって行われた WT1 のターゲットニングによって, 同遺伝子が欠失した胎仔は後腎芽細胞にアポトーシスが生じ, その結果腎組織は形成されなかった。また, 生殖器の分化に重要な Sertoli 細胞や卵巣の濾胞細胞の

原基である生殖隆起の萎縮が生じていたという⁵⁾。このような実験結果から, WT1 が腎形成のほか, 男性生殖器, すなわち生殖隆起を起源とする間質細胞が惹起する Y 染色体上にある性決定遺伝子 SRY の活性化, および男性生殖器の形成に重要な機能を有することが判明した。

1. WT1 異常とウイルス腫瘍発生のメカニズム

散発性ウイルス腫瘍での WT1 変異の頻度は15%程度といわれている。われわれは97例の散発性ウイルス腫瘍の解析の結果, サザンブロット法で5例, PCR産物の塩基配列決定で15例に異常を認めた。微小変異の範囲はほとんどすべてのエクソンにわたっているが, 多くはzinc fingerドメインの変異であり, エクソン8, 9のミスセンス変異を伴った点突然変異や数十塩基対の重複や欠失例の報告を含めて, 後述する奇形症候群を伴うものよりも多彩であった。変異を有する症例の組織像は胎児性横紋筋腫様腎芽腫(fetal rhabdomyomatous nephroblastoma: FRN)を含めた古典的ウイルス腫瘍で15例中9例に葉内腎芽腫症を伴っ

ていた。しかしながら、散発性ウイルス腫瘍における *WT1* 変異と腫瘍発生機序の詳細はいまだ明確にされていない。同遺伝子の変異がウイルス腫瘍の発生に必ずしも十分条件でない可能性も指摘されている⁶⁾。

2. *WT1* 異常とウイルス腫瘍の組織像

WT1 が腎発生→成熟に重要な機能を有することが判明し、その異常がウイルス腫瘍の発生に関連していることが明らかになっているが、*WT1* の機能消失が組織型にどのように反映しているのかについては不明な点が多い。Schumacher ら⁷⁾、Miyagawa ら⁸⁾は *WT1* の機能喪失によって、ウイルス腫瘍において、間葉成分の優位性、とくに筋成分の増多が認められるとしている。

われわれはウイルス腫瘍のうち、腫瘍組織に横紋筋細胞を多く含む FRN、または腫瘍の間葉成分として横紋筋成分が腫瘍の約 1/4 を占める組織型を示した 5 例の腫瘍組織で、*WT1* 変異を検索した結果、いずれもエクソン 9 における¹¹⁶⁸C→T の変異となり、結果として³⁹⁰Arg が stop codon になるナンセンス変異を認めた。しかもこれらは 1 例を除いて、両側性の腫瘍であった。また、このような患者では germline で、腫瘍に認められた変異と同一の変異を認められた。

これら 4 例の身体的特徴を詳細に検索すると、4 例中 3 例が男児で、停留精巣および尿道下裂を伴い、1 例の女児でも卵巣低形成などの生殖泌尿器系小奇形を合併していた。*WT1* の特定部位の germline 変異 (¹¹⁶⁸C→T) は同遺伝子の機能喪失を招来し、生殖泌尿器系の小奇形とともに、きわめて特異的な組織像も示すウイルス腫瘍を発生せしめる可能性が示唆される⁹⁾。

3. ウイルス腫瘍・奇形症候群における *WT1* 異常

散発性ウイルス腫瘍と異なり、Drash 症候群では *WT1* が責任遺伝子であることが明らか

にされた。本症候群はウイルス腫瘍の発生と乳児期に発症し、進行性に経過する diffuse mesangial sclerosis による腎不全および 46XY の核型を示しながら女性外性器を伴う、いわゆる XY gonadal dysgenesis から構成される¹⁰⁾。外性器の異常は生殖隆起の間質細胞に発現する *WT1* の機能不全によると考えられている。Drash 症候群では *WT1* の zinc finger ドメインの点突然変異が体細胞レベルで、一方の対立遺伝子に生じるとドミナントネガティブ効果で腎障害・性分化の異常を、さらに腎で両方の対立遺伝子に生じるとウイルス腫瘍を発生し、同症候群を惹き起こすという仮説が Pelletier によって提唱された¹¹⁾。Drash 症候群では報告例も含めほぼ 100%、zinc finger 領域に異常が認められる。

一方、興味深いのは同症候群に類似した Frasier 症候群 (晩発性の腎障害、精巢性女性化症候群、ウイルス腫瘍発生なし)¹²⁾では、イントロン 9 の splicing donor sites に点突然変異を示すことが明らかにされた。エクソン 9 は *WT1* の alternative splicing site にあたり、splicing isoform として 9 塩基対で構成される 3 つのアミノ酸 lysine, threonine, serine (KTS と略) が存在する isoform (+KTS) とそれらを含まない isoform (-KTS) が構成される。splicing donor sites に異常をきたすと +KTS isoform が形成されない。その結果、正常のアレルからは +KTS/-KTS が正常に構成されるのに対して、異常をもつ対立遺伝子からは -KTS しか生じない。そのため、+KTS/-KTS の不均衡が生じることになる。すなわち、Frasier 症候群が *WT1* isoform の均衡の異常が原因である可能性が示唆される¹³⁾。すなわちエクソン 7~10 における質の異なる遺伝子異常によって、近似はしているが異なった症候群が生じることが判明した (genotype-phenotype correlation) (図 2)。このような *WT1* 変異の同定は難治性腎障害の予後や、Drash 症候群で

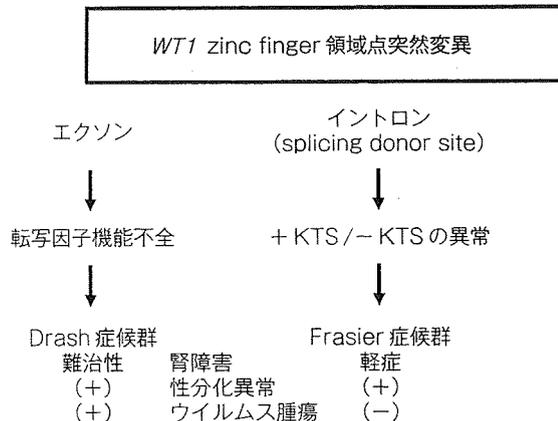


図2 Drash/Frasier 症候群の遺伝子型と表現型の対比

は、6歳以上になると80%以上の確率でウィルムス腫瘍が発生するといわれているので、腫瘍発生の子測診断としても有用である。

II 11p15 のインプリンティングを受ける遺伝子群

1. Beckwith-Wiedemann 症候群に伴う腎芽腫

腎芽腫は、WAGR 症候群や Denys-Drash 症候群とともに、Beckwith-Wiedemann 症候群に伴うことが知られている。本症候群は、片側肥大 (hemihypertrophy)、内臓肥大 (visceromegaly)、巨舌 (macroglossia)、臍帯ヘルニア (omphalocele) を特徴としており、染色体 11p15 領域の異常が原因と考えられている。Beckwith-Wiedemann 症候群では、胎児性腫瘍、とくに腎芽腫を発生するリスクが高いことが知られており、本症候群の原因とされる 11p15 領域が WT2 とよばれ、また腎芽腫の原因遺伝子として腫瘍発生との関連が解析されてきた。

2. 11p15 にクラスタリングするインプリンティング遺伝子群

11p15 領域には、インプリンティングを受け

る遺伝子、すなわち、片親から受け継いだアレルのみを発現する遺伝子がクラスターをなして存在することが知られている。また、腎芽腫では母親由来のアレルが欠失しやすいことが報告されており、腎芽腫の発生にインプリンティング異常が関与することが想定されてきた。この領域は、2つのドメインから構成され、それぞれインプリンティングセンター (differentially methylated region, 父親由来アレルと母親由来アレルで DNA メチル化の状態が異なる) によってコントロールされている (図3)。

1つ目の領域は IGF2/H19 ドメインあるいはインプリンティングドメイン1とよばれ、IGF2 と H19 からなる。IGF2 は父親由来のアレルのみが発現する胎児性の成長因子である。H19 は母親由来アレルのみが発現するが、蛋白をコードしていないと考えられている。この領域のインプリンティングは H19-DMR (H19 differentially methylated region, imprinting center 1: IC1) において、父親由来のアレルがメチル化を受けることによって制御されている。H19-DMR は非メチル化状態では、CTCF が結合しインスレーターとして作用することにより下流にあるエンハンサーがブロックされ、IGF2 のプロモーターに作用できない。したがって母親由来アレルの IGF2 は発現せず、H19 が発現する。一方、父親由来の H19-DMR はメチル化されているため CTCF が結合できず、下流のエンハンサーが作用し IGF2 は発現する。

2つ目の領域は CDKN1C (p57Kip2)、KCNQ10T1 (LIT1) から構成されており、KIP2/LIT1 ドメインあるいはインプリンティングドメイン2とよばれる。インプリンティングセンターである LIT1 DMR (imprinting center 2: IC2, KvDMR1) によって、IGF2/H19 ドメインとは独立して制御されている。p57Kip2 は、サイクリン/CDK 複合体を阻害する細胞増殖の負の制御因子であり、LIT1 は KvLQT1 のアンチ

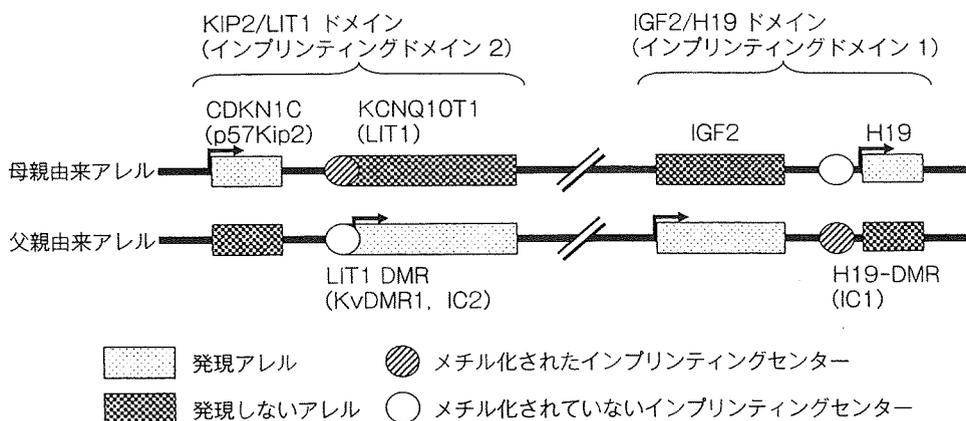


図3 11p15領域に認められるインプリンティング遺伝子群とその機能

センス転写産物である。

3. Beckwith-Wiedemann 症候群と 11p15 領域の異常

Beckwith-Wiedemann 症候群では、11p15 領域に遺伝的な、あるいはエピジェネティックな異常が同定されている。本症候群における 11p15 の異常としては、IGF2/H19 ドメイン、KIP2/LIT1 ドメインどちらか、あるいは両者を含む異常が同定されている。KIP2/LIT1 ドメインの異常としては、インプリンティングセンターである LIT1 DMR の低メチル化、あるいは p57Kip2 の遺伝子変異がある。IGF2/H19 ドメインの異常としては H19-DMR の高メチル化と IGF2 のインプリンティング喪失 (loss of imprinting: LOI), IC1 の microdeletion などが報告されている。また、両方のドメインを含む異常としては、11 番染色体の父性片親性ダイソミー (uniparental disomy: UPD) や 11 番染色体の重複や転座などがある。なお 1/3~1/4 程度の症例では、11p15 に異常が同定されない。

Beckwith-Wiedemann 症候群における腫瘍発生のリスクは、父性 UPD を伴う症例や IGF2/H19 ドメインの異常を有する例に高い。一方、KIP2/LIT1 ドメインの異常のみを伴う症例では、腫瘍発生のリスクが低いと考えられており、腫瘍、とくに腎芽腫発症には IGF2/

H19 ドメインが関与していると想定されている。一方で、Beckwith-Wiedemann 症候群の父性 UPD 症例の 5 歳時の腫瘍発生リスクは 24% と報告されており、11p15 領域の異常のみでは腫瘍発生に不十分と考えられる¹⁴⁾。

4. 腎芽腫と 11p15 領域の異常

腎芽腫では、IGF2 のヘテロ接合性消失 (LOH) が 30~40% に報告されており、IGF2 の LOI は 30~70% に報告されている。IGF2 の LOI の多くは H19-DMR の高メチル化を伴っている。インプリンティングの喪失により、本来は父親由来のアレルのみから発現する IGF2 が両アレルから発現することにより過剰となることが腫瘍発症に関与すると考えられる。

本邦においては、Sato らが 35 例の腎芽腫における 11p15 の遺伝的あるいはエピジェネティックな異常を解析し、29% で 11p15 の LOH を、40% で IGF2 の LOI (H19-DMR の過剰なメチル化を含む) を認めると報告した¹⁵⁾。また、Haruta らは、WT1 異常を伴う腎芽腫 36 例で IGF2/H19 ドメインの異常を解析したところ半数の 18 例に異常、すなわち 13 例に 11p13-15 の父性 UPD、3 例に 11p15 に限局する UPD、2 例に IGF2 の LOI を同定した¹⁶⁾。これらの結果より、腎芽腫における 11p15 の異常は、当初考えられていたよりも頻度が高く、WT1 異常

の有無にかかわらず, IGF2/H19 ドメインの異常が腫瘍発生にかかわっていると考えられはじめている. 一方で, アジア人では IGF2 の LOI はまれとする報告もあり¹⁷⁾, 本邦の腎芽腫における IGF2/H19 ドメインの関与はさらなる検証が必要である.

近年, 奇形を伴わない散発性腎芽腫の中にも, 胚細胞系列での 11p15 の異常を示す症例があることが報告された. Scott らは, 437 例の散発性ウイルス腫瘍患者の 11p15 領域の IGF2/H19 ドメイン, KIP2/LIT1 ドメインを解析し, 3% に何らかの異常を同定した¹⁸⁾. とくに両側腎芽腫では 12% に異常が同定され, その中には一家系の家族性腎芽腫が含まれていた. その異常には, H19-DMR の高メチル化, 11p15 の UPD, H19-DMR の micro deletion/insertion が含まれていたが, KIP2/LIT1 ドメインに限局する異常は認められなかった. このことも 11p15, とくに IGF2/H19 ドメインの異常が腎芽腫発生の原因の一つであることを支持している.

文献

- 1) Call KM et al : Isolation and characterization of a zinc finger polypeptide gene at the human chromosome 11 Wilms' tumor locus. *Cell* 1990 ; 60 : 509
- 2) Gessler M et al : Homozygous deletion of Wilms' tumors of a zinc finger gene identified by chromosome jumping. *Nature* 1990 ; 343 : 774
- 3) Drummond, IA et al : Repression of the insulin-like growth factor II gene are associated by the Wilms' tumor suppressor WT1. *Science* 1992 ; 257 : 674
- 4) Pritchard-Jones K et al : The candidate Wilms' tumor gene is involved in genitourinary development. *Nature* 1990 ; 346 : 194
- 5) Keridberg JA et al : WT1 required for early kidney development. *Cell* 1993 ; 74 : 679
- 6) Kikuchi H et al : A critical mutation in both WT1 alleles is not sufficient to cause Wilms' tumor. *FEBS Lett* 1995 ; 360 : 16-28
- 7) Schumacher V et al : Correlation of germline mutations and two-hit inactivation of the WT1 gene with Wilms tumors of stromal-predominant histology. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997 ; 94 : 3972-3977
- 8) Miyagawa K et al : Loss of WT1 function leads to ectopic myogenesis in Wilms' tumour. *Nat Genet* 1998 ; 18 : 15-17
- 9) Shibata R et al : Correlation between a specific Wilms tumour suppressor gene (*WT1*) mutation and the histological findings in Wilms tumour (WT). *J Med Genet* 2002 ; 39 : E83-85
- 10) Drash A et al : A syndrome of pseudohermaphroditism, nephritis, Wilms' tumor, hypertension and degenerative renal disease. *J Pediatr* 1970 ; 76 : 585
- 11) Pelletier J et al : Germ line mutations in the Wilms' tumor suppressor genes are associated with abnormal irogenital development in Dynes-Drash syndrome. *Cell* 1991 ; 67 : 437
- 12) Moorthy AV et al : Chronic renal failure and XY gonadal dysgenesis : "Frasier syndrome"-a commentary on reported cases. *Am J Med Genet* 1987 ; 3 (Suppl) : 297-302
- 13) Kikuchi H, Takata A, Hata J : Do intronic mutations affecting splicing of WT1 exon 9 cause Frasier syndrome?. *J Med Genet* 1998 ; 35 : 45-48
- 14) Cooper WN et al : Molecular subtypes and phenotypic expression of Beckwith-Wiedemann syndrome. *Eur J Hum Genet* 2005 ; 13 : 1025-1032
- 15) Satoh Y et al : Genetic and epigenetic alterations on the short arm of chromosome 11 are involved in a majority of sporadic Wilms' tumours. *Br J Cancer* 2006 ; 95 : 541-547
- 16) Haruta M et al : Duplication of paternal IGF2 or loss of maternal IGF2 imprinting occurs in half of Wilms tumors with various structural WT1 abnormalities. *Genes Chromosomes Cancer* 2008 ; 47 : 712-727
- 17) Fukuzawa R et al : Epigenetic differences between Wilms' tumours in white and east-Asian children. *Lancet* 2004 ; 363 : 446-451
- 18) Scott RH et al : Constitutional 11p15 abnormalities, including heritable imprinting center mutations, cause nonsyndromic Wilms tumor. *Nat Genet* 2008 ; 40 : 1329-1334

小児科 第50巻 第7号 (平成21年6月30日発行) 別冊

Pediatrics
of Japan

小児科

特集：小児疾患における臨床遺伝学の進歩

遺伝子診断と生命倫理

福嶋義光

金原出版株式会社

遺伝子診断と 生命倫理

福島義光* (ふくしまよしみつ)

*信州大学医学部遺伝医学・予防医学講座，信州大学医学部附属病院遺伝子診療部

要旨

遺伝子情報には、① 不変性、② 予見性、③ 共有性、という通常の臨床情報にはない特殊性があるため、出生前遺伝学的検査、発症前遺伝学的検査、保因者遺伝学的検査などにおいては、考慮すべき倫理的課題が存在する。小児疾患の遺伝子診断においては、両親の意向だけでなく、患児自身にとって何が最善であるかを考えることが必要である。さらに、遺伝学的検査に関するガイドラインを遵守し、適切な遺伝子診療体制において、遺伝カウンセリングを行うことが重要である。

Key words : 遺伝学的検査, 遺伝カウンセリング, 遺伝子診療, 生命倫理原則

はじめに

DNA や RNA を解析する臨床検査はひとくちに「遺伝子検査」と総称されることが多いが、臨床的な遺伝子解析はその遺伝子の由来から、

① 感染症の原因となった病原微生物（細菌やウイルス）由来の遺伝子の存在を明らかにする病原体遺伝子検査（病原体核酸検査）

② 後天的に身体の一部の細胞のみに生じた遺伝子の変化を明らかにする体細胞遺伝子検査（白血病やがんなどで行われる遺伝子検査）

③ 個人が生まれながらに有し、生涯変化しない生殖細胞系列変異を明らかにする遺伝学的検査

以上の3種類に大別することができる。英文で“genetic testing”と表現されている場合は主としてこの③を指す。本稿では、「遺伝子診断」を“生殖細胞系列の遺伝子変異を明らかにするために行われる遺伝学的検査の結果をもとにされる診断”と定義して話を進める。

I 生殖細胞系列の遺伝子情報の特殊性

生殖細胞系列の遺伝子情報には、通常の臨床情報とは異なる次の3つの特殊性がある。

1. 不変性

個人の生殖細胞系列の遺伝子情報は受精の時に決定され、生涯変化しない。それゆえ情報の扱いを誤ったり管理に不備があったりすれば差別や烙印付けに悪用されるなど、被検者の社会生活に大きな不利益が生じる危険性をはらむ。また、遺伝学的検査はその不変性ゆえに通常何度も再検査が行われることはない。したがって、万が一情報の解釈の誤りや検体の取り違いなどが起こると、誤った情報で患者や家族を一生振り回すことにもなりかねない。これは、第三者による精度管理がなされていない大学などの研究室で独自に遺伝子解析を行っているような場合、とくに注意しなければならないことである。

2. 予見性

生涯変化しないこととも関係するが、遅発性の疾患の場合、まだ発症していない健常者を対象に遺伝学的検査（発症前検査）が考慮される場合がある。予防法や治療法のある疾患（家族

性腫瘍など)においてはきわめて有用な臨床情報となりうるが、対処する方法のない神経変性疾患などでは、将来の発症の予告は、被検者に大きな心理的負担や絶望感をもたらすことにもなり、慎重な対応が求められる。また、疾患感受性遺伝子のように、個々の遺伝子が発症に及ぼす影響は環境要因などと比較して小さく、発症確率を多少上げる程度の情報の場合、その検査の有用性が十分証明されていないにもかかわらず、遺伝子決定論的な誤った解釈がなされる可能性があるため、注意が必要である。

3. 共有性

生殖細胞系列遺伝子変異は血縁者間で共有している可能性がある。1度近親者(親・子・同胞)間では、1/2の遺伝子を共有している。これは、遺伝学的検査によって特定の遺伝子変異が同定された場合に、血縁者も一定の確率で同じ変異を有していることを意味する。つまり個人の遺伝情報は個人特有のものでありながら、すでに血縁者も共有している可能性があるという両面性を有している。これは、疾患によってはひとりの遺伝学的検査で得られた情報によって、血縁者における早期診断、早期治療、あるいは発症予防を可能にできる一方、何ら健康に問題を感じていなかった家族が否応なしに病気や遺伝の問題に巻き込まれる可能性があることをも意味している。

II 小児医療における遺伝学的検査の倫理的課題

医学・医療における倫理問題を考える際、次の4つの生命倫理原則に基づくことが重要であるとされている。

- ① 個人の自律尊重(自分自身の医療的ケア、医療情報を自分自身でコントロールする権利、および強制を受けない権利を保護する)。
- ② 善行・仁恵(患者にとってよいことを行う)。

③ 無危害(まず、害をなすなかれ)。

④ 正義(すべての個人が等しく公正に医療が受けられることを保証する)。

医療の実践において倫理的に悩むのは、この4原則の原則と原則との間で不一致を起している場合である。遺伝子情報には前述した特殊性があるため種々の倫理ジレンマが起こりうる。小児医療における倫理ジレンマのいくつかを列挙する。

1. 出生前遺伝学的検査

重篤な遺伝性疾患に罹患している可能性のある胎児を妊娠している妊婦・カップルが選択的人工妊娠中絶を前提とした出生前遺伝学的検査を希望した場合、どのような条件が整っていれば、対応してよいのであろうか? これは、妊婦・カップルの自律尊重を優先すべきか、または胎児にとっての無危害を優先すべきか、の倫理ジレンマである。さらに、今後の急速な遺伝子解析技術の進展を考えると、疾患とは直接関係のない、知能、性格、体格、身体的特徴なども技術的には出生前遺伝学的検査の対象となってくるかもしれない。その場合、妊婦などの当事者の要望をどこまで取り入れてよいのか、重篤さの判定をどのように行ったらよいのか、について難しい問題が内在している。

2. 発症前遺伝学的検査

無症状の小児を対象とした発症前遺伝学的検査のあり方については、両親の意思とともにその子が成長した後の自律尊重についても考慮する必要がある。治療法・予防法が確立した疾患であれば発症前遺伝学的検査の有用性は明らかであるが、まだ確立していない疾患においては、両親の自律尊重と子の善行・仁恵、無危害とのバランスを十分検討する必要がある。

3. 保因者遺伝学的検査

保因者遺伝学的検査は、常染色体劣性遺伝疾患、X連鎖劣性遺伝疾患、あるいは染色体均衡型転座など、自分自身は発症することはないが、将来病気の子をもつ可能性のある保因者である

表1 医療・介護関係事業者における個人情報の適切な取扱いのためのガイドライン

10. 遺伝情報を診療に活用する場合の取扱い
 遺伝学的検査等により得られた遺伝情報については、本人の遺伝子・染色体の変化に基づく体質、疾病の発症等に関する情報が含まれるほか、その血縁者に関わる情報でもあり、その情報は生涯変化しないものであることから、これが漏えいした場合には、本人及び血縁者が被る被害及び苦痛は大きなものとなるおそれがある。したがって、遺伝学的検査等により得られた遺伝情報の取扱いについては、UNESCO 国際宣言等（別表6）^{*1}、別表5^{*2}に掲げる指針及び関係団体等が定める指針を参考とし、特に留意する必要がある。
 また、検査の実施に同意している場合においても、その検査結果が示す意味を正確に理解することが困難であったり、疾病の将来予測性に対してどのように対処すればよいかなど、本人及び家族等が大きな不安を持つ場合が多い。したがって、医療機関等が、遺伝学的検査を行う場合には、臨床遺伝学の専門的知識を持つ者により、遺伝カウンセリングを実施するなど、本人及び家族等の心理社会的支援を行う必要がある。

^{*1}別表6 UNESCO 国際宣言等

○「ヒト遺伝情報に関する国際宣言」（UNESCO October 16, 2003）

○「遺伝学的検査に関するガイドライン」（平成15年8月 遺伝医学関連10学会：日本遺伝カウンセリング学会、日本遺伝子診療学会、日本産科婦人科学会、日本小児遺伝学会、日本人類遺伝学会、日本先天異常学会、日本先天代謝異常学会、日本マススクリーニング学会、日本臨床検査医学会（以上五十音順）、家族性腫瘍研究会）

^{*2}別表5 医学研究分野における関連指針

○「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」（平成16年12月28日 文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第1号）

○「疫学研究に関する倫理指針」（平成16年12月28日 文部科学省・厚生労働省告示第1号）

○「遺伝子治療臨床研究に関する指針」（平成16年12月28日 文部科学省・厚生労働省告示第2号）

○「臨床研究に関する倫理指針」（平成16年12月28日 厚生労働省告示第459号）

かどうかを検査するものである。この場合も、子どもの自律尊重と、両親の善意に基づく要求とのバランスをよく考える必要がある。

4. 予期せぬ結果の取扱い

すでに発症している子どもの確定診断のために行った遺伝学的検査の結果、両親のどちらかとも同じ変異を有しており、まだ発症していないという状況が、表現促進（anticipation）のある神経変性疾患などでは起こりうる。小児科診療においては、患児の診断に注意が集中しがちになるが、両親を含めた総合的な遺伝医療の提供が必要になる場合があることについても留意すべきである。

わが国ではきわめて少ないといわれているが、患児の確定診断のために行った遺伝学的検査の結果、異父性（生物学的父親が異なっている）が明らかになることもあるので、そのような場合の対処法についても検討しておく必要がある。

III 遺伝子診断とガイドライン

今まで述べてきたように遺伝学的検査には種々の課題があることから、実施の際には、次の2つのガイドラインを遵守すべきである。

1. 「医療・介護関係事業者における個人情報の適切な取扱いのためのガイドライン」（厚生労働省 平成16年12月24日通達、平成18年4月21日改正）

<http://www-bm.mhlw.go.jp/topics/bukyoku/seisaku/kojin/dl/170805-11a.pdf>

個人情報保護法が2005年4月に完全施行となることを受けて、厚生労働省は「医療・介護関係事業者における個人情報の適切な取扱いのためのガイドライン」を作成した。個人情報の中でも遺伝情報は特殊であることから、ガイドラインの10番目の項目に「遺伝情報を診療に活用する場合の取扱い」が設けられ、「医療機関等が、遺伝学的検査を行う場合には、臨床遺伝