

Figure 6. Trim32 suppresses sphere formation in human neuroblastoma cells. A, representative images of sphere formation in Flag (control)-transfected, Flag-Trim32-transfected, and Flag-Trim32/3A-transfected SK-N-DZ after 7 days. Scale bars, 100 μm . B, numbers of spheres of $\geq 100 \mu\text{m}$ in each transfectant. Error bars, SEM from triplicate experiments. The numbers of spheres of $\geq 100 \mu\text{m}$ were lower in Flag-Trim32-transfected cells ($P = 0.0009$) and in Flag-Trim32/3A-transfected cells ($P = 0.026$) than in Flag (control)-transfected ones.

ACD; Fig. 7B and C). We additionally found ACD, in which Trim32 was oppositely distributed from MYCN at the end of cell division (Supplementary Fig. S11). We believe that this ACD status occurs in a neuroblastoma-specific manner. In Trim32-transfected cells, it was also detected that both NuMA and Trim32 localized to the same side of the daughter cell during anaphase (Fig. 7B). We termed this aberrant ACD "sympatric ACD." Although it is unknown why sympatric ACD was detected, correct distribution of other ACD-related components might be necessary for establishing complete ACD. In Trim32/3A-transfected cells, NuMA-ACD was detected but Trim32 distribution was not asymmetric (Fig. 7B and C). We also performed the transfection of the Trim32/3A vector with MYCN shRNA into SK-N-DZ cells (Supplementary Fig. S12A). Interestingly, in Trim32/3A-transfected and MYCN-knock-down cells, the percentage of NuMA-ACD cells significantly increased (Supplementary Fig. S12B). This result indicates that MYCN interferes with NuMA-ACD. Together, these results suggest that spindle pole localization of Trim32 may be important for both degradation of MYCN and reliable induction of complete ACD (Fig. 7D).

Discussion

In the present study, we found that Trim32 may be an inducer of ACD in our human neuroblastoma cell system. Recent studies showed that human neuroblastoma cells contain tumor-initiating cells whose phenotype resembles cancer stem cells, including features such as self-renewal, induction of multilineage cell differentiation, and high drug efflux capacity (7, 24). ACD is another important characteristic of cancer stem cells, and may cause tumor cell heterogeneity. Because Trim32 degrades MYCN, produces differentiated neuroblastoma cells that will eventually die, and suppresses sphere formation, we consider it to be a tumor suppressor in neuroblastoma. In fact, a public microarray database (R2) for human neuroblastoma using 88 clinical samples showed that patients with high Trim32 expression in neuroblastoma tumors had better relapse-free survival than those with low expression ($P = 0.05$; Supplementary Fig. S13). Therapies enhancing Trim32 activity may, thus, lead to a cure of refractory neuroblastoma with MYCN amplification.

In this study, although the forced expression of Trim32 targeted MYCN for degradation in MYCN-amplified

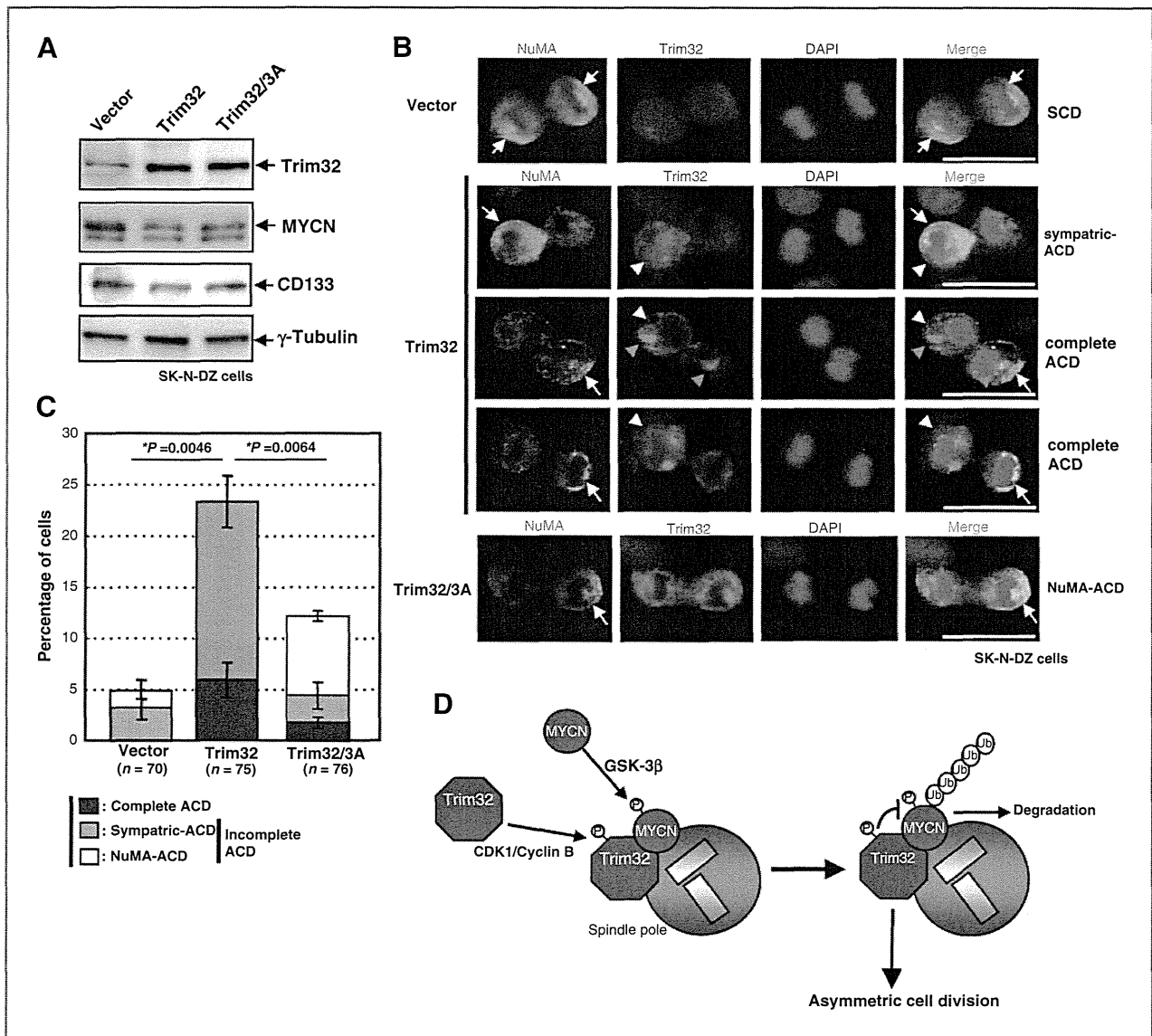


Figure 7. Trim32 induces ACD in human neuroblastoma cells. A, immunoblot of Trim32, MYCN, and CD133 (a putative neural stem cell marker) expression in SK-N-DZ cells transfected with the *Trim32* or *Trim32/3A* expression vector. Immunoblot of γ -tubulin served as a loading control. B, representative images of ACD during anaphase in SK-N-DZ cells transfected with the *Trim32* or *Trim32/3A* expression vector. Cell cortex marker NuMA, green; Trim32, red; DAPI (DNA), blue. SCD, symmetric cell division; NuMA-ACD, NuMA-cortex-based ACD; complete ACD, cell division in which NuMA and Trim32 were distributed at opposite ends of a dividing cell; and sympatric ACD, cell division in which NuMA and Trim32 were distributed at the same end of a dividing cell. Arrows, NuMA cortex; arrowheads, Trim32 distribution; red arrowheads, spindle poles. Scale bars, 10 μ m. C, percentage of ACD in SK-N-DZ cells transfected with the *Trim32* or *Trim32/3A* expression vector. Error bars, SEM from three experiments. Complete ACD is more frequent in Trim32-transfected cells than in control vector-transfected cells ($P = 0.0046$) or in Trim32/3A-transfected ones ($P = 0.0064$). D, a schematic model of Trim32-mediated ACD in MYCN-amplified human neuroblastoma cells.

neuroblastoma cells, we found that Trim32 also localized at spindle poles even in MYCN-nonamplified neuroblastoma cells (Fig. 2A, SH-SY5Y cells). This result suggests that Trim32 has not only ubiquitinylation activity for MYCN but may also have other functions. For example, Trim32 is known to function in the translation of mRNAs and to activate microRNAs, such as *let-7* (17). Thus, activation of microRNAs and translation of cell fate-related mRNAs by Trim32 might also be necessary for establishing complete ACD in neuroblastoma cells.

Spindle poles are organelles that ensure reliable segregation of chromosomes during mitosis. Our results show that the spindle pole localization of Trim32 itself may also be important for the suppression of self-renewal growth and the establishment of asymmetric cell polarity during mitosis. It is also known that spindle orientation and asymmetric segregation of cell-fate determinants are important for the establishment of ACD (3). Our results suggest that the spindle pole-associated ubiquitin-proteasome system is also indispensable for ACD. In fact, it is

known that proteasome localizes to centrosomes/spindle poles and functions for cell homeostasis in many mammalian cells (25, 26, 28). In addition, some proteasome components are known to segregate asymmetrically during mitosis in T lymphocytes (29) and human pancreatic cancer cells (30). Thus, we believe that the ubiquitin-proteasome system may largely contribute to the reliable establishment of ACD.

In summary, we showed here that human neuroblastoma cell lines are a very suitable model system for analyzing the mechanism of ACD in human cells. Our study may also provide new therapeutic clues for targeting cancer stem cells.

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interests were disclosed.

Authors' Contributions

Conception and design: H. Izumi, Y. Kaneko

Development of methodology: H. Izumi

Acquisition of data (provided animals, acquired and managed patients, provided facilities, etc.): H. Izumi

Analysis and interpretation of data (e.g., statistical analysis, biostatistics, computational analysis): H. Izumi, Y. Kaneko

Writing, review and/or revision of the manuscript: H. Izumi, Y. Kaneko

Administrative, technical or material support (i.e., reporting or organizing data, constructing databases): H. Izumi, Y. Kaneko

Study supervision: H. Izumi, Y. Kaneko

Acknowledgments

The authors thank Drs. M. Haruta and Y. Yamaguchi for excellent research support, K. Ono and H. Odagawa for technical assistance, and K. Ogawa and K. Mihashi for secretarial assistance. The authors also thank their laboratory members for continuous encouragement.

Grant Support

This work was supported in part by Grants-in-Aid for Scientific Research from the Ministry of Education, Science, Sports and Culture of Japan and the Kawano Masanori Memorial Foundation for the Promotion of Pediatrics, Japan.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

Received January 23, 2014; revised June 10, 2014; accepted July 9, 2014; published OnlineFirst August 6, 2014.

References

- Basto R, Brunk K, Vinadogrova T, Peel N, Franz A, Khodjakov A, et al. Centrosome amplification can initiate tumorigenesis in flies. *Cell* 2008;133:1032–42.
- Castellanos E, Dominguez P, Gonzalez C. Centrosome dysfunction in *Drosophila* neural stem cells causes tumors that are not due to genome instability. *Curr Biol* 2008;18:1209–14.
- Knoblich JA. Asymmetric cell division: recent developments and their implications for tumour biology. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010;11:849–60.
- Brodeur GM. Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma. *Nat Rev Cancer* 2003;3:203–16.
- Schwab M, Westermann F, Hero B, Berthold F. Neuroblastoma: biology and molecular and chromosomal pathology. *Lancet Oncol* 2003;4:472–80.
- Huang M, Weiss WA. Neuroblastoma and MYCN. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2013;3:a014415.
- Ross RA, Spengler BA. Human neuroblastoma stem cells. *Semin Cancer Biol* 2007;17:241–7.
- Knoepfler PS, Cheng PF, Eisenman RN. N-myc is essential during neurogenesis for the rapid expansion of progenitor cell populations and the inhibition of neuronal differentiation. *Genes Dev* 2002;16:2699–712.
- Mahler YY, Williams JP, Baird WH, Mitton B, Grossheim J, Saeki Y, et al. Neuroblastoma cell lines contain pluripotent tumor initiating cells that are susceptible to a targeted oncolytic virus. *PLoS ONE* 2009;4:e4235.
- Cotterman R, Knoepfler PS. N-Myc regulates expression of pluripotency genes in neuroblastoma including *lif*, *klf2*, *klf4*, and *lin28b*. *PLoS ONE* 2009;4:e5799.
- Nakagawa M, Takizawa N, Narita M, Ichisaka T, Yamanaka S. Promotion of direct reprogramming by transformation-deficient Myc. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:14152–7.
- Chappell J, Dalton S. Roles for MYC in the establishment and maintenance of pluripotency. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2013;3:a014381.
- Izumi H, Kaneko Y. Evidence of asymmetric cell division and centrosome inheritance in human neuroblastoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012;109:18048–53.
- Popov N, Schulein C, Jaenicke LA, Eilers M. Ubiquitylation of the amino terminus of Myc by SCF(beta-TrCP) antagonizes SCF(Fbw7)-mediated turnover. *Nat Cell Biol* 2010;12:973–81.
- Swartling FJ. Myc proteins in brain tumor development and maintenance. *Ups J Med Sci* 2012;117:122–31.
- Betschinger J, Mechler K, Knoblich JA. Asymmetric segregation of the tumor suppressor *brat* regulates self-renewal in *Drosophila* neural stem cells. *Cell* 2006;124:1241–53.
- Schwamborn JC, Berezikov E, Knoblich JA. The TRIM-NHL protein TRIM32 activates microRNAs and prevents self-renewal in mouse neural progenitors. *Cell* 2009;136:913–25.
- Yada M, Hatakeyama S, Kamura T, Nishiyama M, Tsunematsu R, Imaki H, et al. Phosphorylation-dependent degradation of c-Myc is mediated by the F-box protein Fbw7. *EMBO J* 2004;23:2116–25.
- Welcker M, Orian A, Jin J, Grim JE, Harper JW, Eisenman RN, et al. The Fbw7 tumor suppressor regulates glycogen synthase kinase 3 phosphorylation-dependent c-Myc protein degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:9085–90.
- Zhao X, Heng JI, Guardavaccaro D, Jiang R, Pagano M, Guillemot F, et al. The HECT-domain ubiquitin ligase Huwe1 controls neural differentiation and proliferation by destabilizing the N-Myc oncoprotein. *Nat Cell Biol* 2008;10:643–53.
- Dephore N, Zhou C, Villen J, Beausoleil SA, Bakalarski CE, Elledge SJ, et al. A quantitative atlas of mitotic phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:10762–7.
- Olsen J, Vermeulen M, Santamaria A, Kumar C, Miller ML, Jensen LJ, et al. Quantitative phosphoproteomics reveals widespread full phosphorylation site occupancy during mitosis. *Sci Signal* 2010;3:ra3.
- Fuentealba LC, Eivers E, Geissert D, Taelman V, De Robertis EM. Asymmetric mitosis: Unequal segregation of proteins destined for degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:7732–7.
- Wojcik C, DeMartino GN. Intracellular localization of proteasomes. *Int J Biochem Cell Biol* 2003;35:579–89.
- Wigley WC, Fabunmi RP, Lee MG, Marino CR, Muallem S, DeMartino GN, et al. Dynamic association of proteasomal machinery with the centrosome. *J Cell Biol* 1999;145:481–90.
- Fabunmi RP, Wigley WC, Thomas PJ, DeMartino GN. Activity and regulation of the centrosome-associated proteasome. *J Biol Chem* 2000;275:409–13.
- Ehrhardt AG, Sluder G. Spindle pole fragmentation due to proteasome inhibition. *J Cell Physiol* 2005;204:808–18.
- Puram SV, Kim AH, Park HY, Ancker J, Bonni A. The ubiquitin receptor S5a/Rpn10 links centrosomal proteasomes with dendrite development in the mammalian brain. *Cell Rep* 2013;4:19–30.
- Chang JT, Ciocca ML, Kinjyo I, Palanivel VR, McClurkin CE, Dejong CS, et al. Asymmetric proteasome segregation as a mechanism for unequal partitioning of the transcription factor T-bet during T lymphocyte division. *Immunity* 2011;34:492–504.
- Adikrisna R, Tanaka S, Muramatsu S, Aihara A, Ban D, Ochiai T, et al. Identification of pancreatic cancer stem cells and selective toxicity of chemotherapeutic agents. *Gastroenterology* 2012;143:234–45 e7.

Cancer Research

The Journal of Cancer Research (1916–1930) | The American Journal of Cancer (1931–1940)

Trim32 Facilitates Degradation of MYCN on Spindle Poles and Induces Asymmetric Cell Division in Human Neuroblastoma Cells

Hideki Izumi and Yasuhiko Kaneko

Cancer Res 2014;74:5620-5630. Published OnlineFirst August 6, 2014.

Updated version Access the most recent version of this article at:
[doi:10.1158/0008-5472.CAN-14-0169](https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-0169)

Supplementary Material Access the most recent supplemental material at:
<http://cancerres.aacrjournals.org/content/suppl/2014/08/06/0008-5472.CAN-14-0169.DC1.html>

Cited Articles This article cites by 30 articles, 12 of which you can access for free at:
<http://cancerres.aacrjournals.org/content/74/19/5620.full.html#ref-list-1>

E-mail alerts Sign up to receive free email-alerts related to this article or journal.

Reprints and Subscriptions To order reprints of this article or to subscribe to the journal, contact the AACR Publications Department at pubs@aacr.org.

Permissions To request permission to re-use all or part of this article, contact the AACR Publications Department at permissions@aacr.org.

【第55回日本小児血液・がん学会学術集会】プレナリーセッション

Wilms 腫瘍（腎芽腫）の発生に関わるジェネティック・エピジェネティック異常，および遺伝性・両側性 Wilms 腫瘍の原因遺伝子

金子安比古*

埼玉県立がんセンター臨床腫瘍研究所

要 旨

近年のがんゲノム研究により，小児がんは，胎児の臓器形成にかかわる数個の遺伝子異常が月単位の短期間に生じ，発生することがわかってきた。はじめて，Wilms 腫瘍モデルマウスの作製が，報告された。WT1 発現を消失させ，Igf2 を高発現させたトランスジェニックに腫瘍は発生したが，それぞれの遺伝子異常のみをもつマウスには発生しなかった。さらに最近，Let-7 miRNA の発現低下による LIN28B 遺伝子の高発現，miRNA プロセッシング遺伝子である DROSHA や DICER1 の変異による miRNA の産生低下，partial reprogramming によるポリコム複合体標的遺伝子の高発現など，腎前駆細胞に生じるジェネティック・エピジェネティック異常によって，マウスに Wilms 腫瘍を発生させることができたと報告された。Wilms 腫瘍は臨床的に heterogeneous な疾患であるが，その背景にある，多様な腫瘍化の分子機構が解明されようとしている。WT1 胚細胞変異をもつ家族性 Wilms 腫瘍家系の報告は少なく，浸透率は不明である。日本 Wilms 腫瘍研究グループ (JWiTS) では両側性・遺伝性 Wilms 腫瘍の遺伝子解析研究を開始した。この研究により，Wilms 腫瘍の浸透率を明らかにできれば，遺伝カウンセリングの基盤となるデータを提供できるのではなかと期待している。

キーワード：Wilms 腫瘍，LIN28，WT1，IGF2，microRNA

Key words: Wilms tumor, LIN28, WT1, IGF2, microRNA

I はじめに

小児がんと成人がんでは組織型，発生頻度，治癒率などが著しく異なる。近年のがんゲノム研究により，成人がんでは通常，いくつかの腫瘍化にかかわる多数の遺伝子変異が長期間にわたり蓄積した結果，発生すると報告された。一方，小児がんでは，胎児の臓器形成にかかわる数個の遺伝子異常が月単位の短期間に生じ，発生することがわかってきた¹⁾。

Wilms 腫瘍の発生にかかわる遺伝子として 11p13 の WT1 と 11p15 の WT2 が知られている。WT1 は，泌尿生殖器異常を伴う Wilms tumor-aniridia-genitourinary malformation-mental retardation (WAGR) 症候群および若年性腎障害を特徴とする Drash 症候群の原因遺伝子である^{2,3)}。一方，WT2 は過成長を特徴とする Beckwith-Wiedemann (B-W) 症候群の原因遺伝子であると想定された⁴⁾。その後 B-W 症候群は 11p15 に位置する複数のインプリント (刷り込み) 遺伝子のどれかの異常により発生するので，WT2 はこれらの遺伝子の総称とみなされている。11p15 遺伝子群の中で胎児期の細胞増殖因子である IGF2 の発現異常が Wilms 腫瘍の発生に

関わることは 1980 年代に報告されていた。最近，胎児組織発達のタイミングを調節している Lin28 遺伝子の高発現⁵⁾，miRNA のプロセッシングにかかわる RNA 切断酵素 (RNase III) の遺伝子変異⁶⁾，体細胞の partial reprogramming⁷⁾ など，新しいジェネティック・エピジェネティック異常により，Wilms 腫瘍が発生するという報告が，次々になされている。

治療成績の改善により Wilms 腫瘍を克服したサバイバーは増加している。Wilms 腫瘍の一部は遺伝性であるので，胚細胞遺伝変異保因者の数も増加していると予想される。日本ウィルムス腫瘍研究グループ (JWiTS) では，両側性腎芽腫に対する治療研究を開始したが，その付随研究として，両側性腎芽腫の遺伝子分析研究が並行して開始された⁸⁾。遺伝性 Wilms 腫瘍の遺伝子研究の現状についても，最近の知見を紹介したい。

II Wilms 腫瘍の発生母地と WT1 および WNT 遺伝子群の発現

Wilms 腫瘍の組織像は腎芽細胞，上皮細胞，間質細胞から構成されるが，これらの細胞は胎児期の後腎組織を構成する細胞と類似している。以上の所見により，Wilms 腫瘍は腎の前駆細胞に生じた遺伝子異常により発生すると推測された。

胎児腎の発生過程において，腎前駆組織は前腎，中腎，

2014 年 7 月 17 日受付，2014 年 7 月 17 日受理

* 別刷請求先：〒362-0806 埼玉県北足立郡伊奈町小室 818

埼玉県立がんセンター臨床腫瘍研究所 金子安比古

E-mail: kaneko@cancer-c.pref.saitama.jp

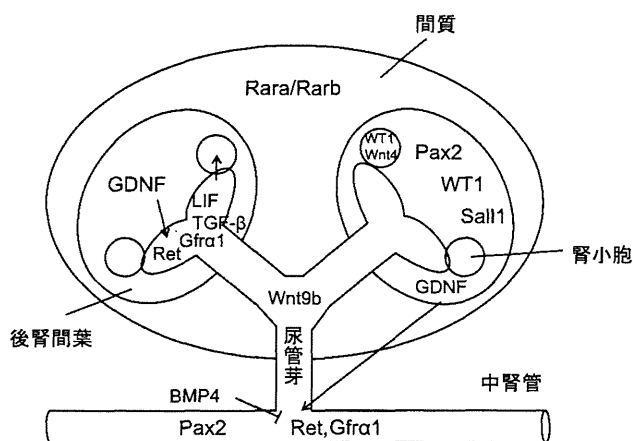


図1 マウスの腎発生初期の組織と発現する遺伝子群。尿管芽と後腎間葉は互いに作用する蛋白を発現し、腎を形成する⁹⁾。

後腎の順番に形成され、後腎が最終的な腎になる。ヒトでは受精後約22日に、中間中胚葉から前腎が発生する。前腎管は胎児の尾部に伸び、中腎管 (Wolf管) を誘導する。胎生第5週になると総排泄腔近くの中腎管から尿管芽が発生する。尿管芽は中胚葉由来の後腎間葉 (metanephric mesenchyme) と呼ばれる腎芽前駆細胞に侵入する。後腎間葉は尿管芽の分枝した先端から Wnt9b シグナルを受け、腎上皮前駆細胞である造腎間葉になり、間葉-上皮転換 (Mesenchymal-Epithelial Transition, MET) を経て、腎小胞 renal vesicle や尿管 renal tubule に分化する。一方、尿管芽は後腎間葉から Wnt4 シグナルを受け分枝し、尿管や集合管を形成する (図1)⁹⁾。METは、成人上皮癌でみられる EMT の反対現象である。

このような形態変換過程において、Wntリガンドは標的細胞において細胞特異的転写プログラムの細胞外スイッチを入れ、Wntシグナル伝達系を活性化する。Wnt9bは尿管芽より産生されるシグナルであり、後腎間葉に Wnt4 を誘導する。Wnt9b欠失マウスは後腎間葉を有するが、分化障害のために造腎間葉が形成されず、低形成腎を示す。この腎では正常後腎間葉に特徴的に発現し、腎の発生に関わる Pax8, Fgf8, Lh1 などの転写因子が発現しない⁹⁾。

Wnt4は Wnt9b に反応して誘導され、後腎間葉とそれに続いて形成される早期の上皮に局限して発現し、腎小胞の形成にかかわる。Wnt4欠失マウスは Wnt9b欠失マウスと同様に低形成腎を示し、尿管形成が停止する。Wnt4機能消失型変異はヒトの低形成腎症候群である SERKAL 症候群の原因であることがら、Wnt4は哺乳類の腎の発生に重要であると考えられる⁹⁾。

III WT1 遺伝子の機能と Wilms 腫瘍の発生

WT1 遺伝子は腎発生を司るマスター遺伝子であり、胎児の腎前駆細胞と成人腎の一部で発現する^{2,3)}。Wilms 腫瘍の0.75%は WAGR 症候群に合併して発生する。WAGR 患者のリンパ球など体細胞には顕微鏡で検出可能な大きさの11p13欠失 (胚細胞変異) がみられ、この欠失領域から WT1 癌抑制遺伝子が単離された。WT1 異常は散発性 Wilms 腫瘍の15~25%に報告されている。WT1 遺伝子の大きさは約50kbであり、10個のエキソンからなる。WT1 蛋白質は主として4個のアイソフォームをもち、C端には4個の zinc finger ドメインがあり特定の DNA 塩基配列と結合可能である。このドメインにより WT1 蛋白質は EGR1, IGF2, TP53 遺伝子などのプロモーター領域と結合し、その転写を制御している。

1. WT1 遺伝子の発現異常と Wilms 腫瘍の発生

WT1は Wnt4 の転写因子として働き、その発現を促進する。WT1は Wnt4 と同様に腎の発生過程で MET を生じる組織、つまり、後腎間葉、造腎間葉、腎小胞や尿管上皮などに高レベルで発現する^{2,3)}。最も強く発現するのはC字小体/S字小体で、腎の完成と共に発現は消失するが、糸球体の足細胞では成人になっても発現している。Wt1欠失マウスでは後腎間葉に尿管芽の侵入が起きず、後腎間葉に著しいアポトーシスを生じる。従って、腎が形成されず、胎児期に死亡するので、Wilms 腫瘍の発生は観察されない。Small interfering RNA (siRNA) は標的遺伝子の発現を抑制する。マウスの胎児腎器官培養法と siRNA を用いて後腎間葉が凝縮する時期に siRNA を作用させて WT1 発現を抑制すると、上皮細胞への分化が抑制され増殖が促進された。腎前駆細胞における WT1 の発現抑制が細胞増殖を引き起こす所見は、特定の時間と組織に生じる WT1 の機能的欠失が Wilms 腫瘍の発生に関わることを示唆している。

2. WT1 変異型 Wilms 腫瘍と CTNNB1 変異

βカテニンは、細胞表面のカドヘリンと細胞質のアクチンをつなぐ、細胞接着因子の機能と、核に移行し、転写因子と会合し、成長・増殖因子遺伝子を活性化する機能を合わせもつ。βカテニンは、細胞外分泌蛋白質である Wnt が不在の状態の細胞では、β-カテニン分解複合体で、セリン/スレオニンキナーゼである GSK3β によりリン酸化された後、ユビキチン化を受け、プロテアソームで分解される (図2A)。その結果、細胞質内のβカテニン蛋白質量は、低く保たれている。一方、Wntが細胞膜の受容体 (Fz) と LRP で形成される共役受容体に結合すると、Wntシグナル伝達経路が活性化する (図2B)。Fzの作用を受けた Dvlは

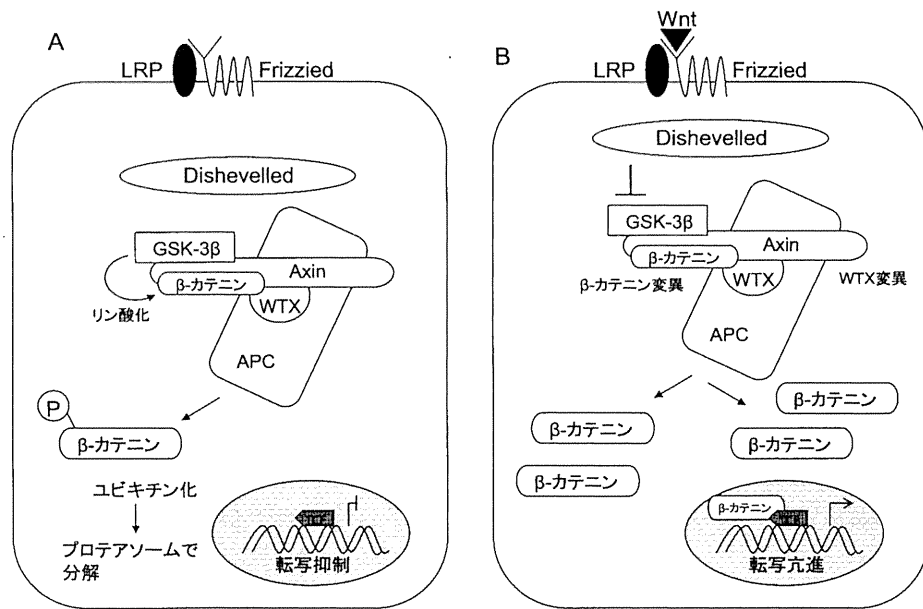


図2 正常細胞 (A) と腫瘍細胞 (B) の Wnt/β カテニンシグナル伝達系。

GSK3β 依存性の β-カテニンのリン酸化を抑制し、低リン酸化状態になった β-カテニンはプロテアソームによる分解をまぬがれる。その結果安定化した β-カテニンは細胞質に蓄積し、核に移行して転写因子 TCF/LEF と結合する (図 2B)。β-カテニンと結合した TCF/LEF は *cycline D1*, *MYC* などの標的遺伝子の発現を促進し、様々な種類の細胞の増殖・生存にかかわる。

Wilms 腫瘍の 20–30% に β カテニンをコードする *CTNNB1* 遺伝子の変異を認める^{3,10}。この変異は、GSK3β によりリン酸化を受けるセリン、スレオニン残基に集中して発生し、機能獲得型である。変異の結果、β カテニンはリン酸化を受けなくなるので安定し、標的遺伝子の転写を促進する。後腎間葉の上皮化には Wnt/β カテニン経路から Wnt/PCP 経路への切り替えを必要とする。*WT1* 変異型腫瘍と *WT1* 野性型腫瘍の *CTNNB1* 変異頻度は著しく異なり、前者で約 65% であるが、後者では 2–10% に過ぎない^{3,10}。*CTNNB1* 変異が生じているとこの切り替えが行われず、腎前駆細胞は分化できずに増殖する。*WT1/CTNNB1* 変異型 Wilms 腫瘍では、間葉上皮転換 (MET) がうまくいかないので、腎前駆細胞は分化の方向を誤り、筋肉細胞などへと分化すると考えられる。

ラット胎児から採取した後腎間葉細胞を増殖因子なしに培養するとアポトーシスを生じるが、機能獲得型変異をもつ *CTNNB1* 遺伝子を導入すると、アポトーシスを免れ、*PAX2* を発現し、増殖する。前述のように *Wt1* 欠失マウスでは後腎間葉にアポトーシスが生じる。ラット胎児の研究結果はヒト腎前駆細胞に *WT1* 欠失が生じて、*CTNNB1* 変異を合併するとアポトーシスを免れ、増殖する可能性を

示唆する。*WT1* 変異型 Wilms 腫瘍に *CTNNB1* 変異が高頻度に合併する理由かもしれない。

私たちは 3 組の *WT1* 変異型両側性 Wilms 腫瘍を分析し、片側には *WT1* 変異をもう片方には *WT1* 変異と *CTNNB1* 変異を認めた¹¹。一方、Fukuzawa らは同じ腎に発生した Wilms 腫瘍と腫瘍前駆組織である nephrogenic rest を分析し、前者には *WT1* 変異と *CTNNB1* 変異を認めたが、後者には *WT1* 変異のみを認めた¹²。両報告は *WT1* 変異型 Wilms 腫瘍の発生において、*CTNNB1* 変異は *WT1* 変異の後に生じることを示している。

3. *WTX* 遺伝子変異と Wilms 腫瘍

Wilms 腫瘍の一部に Xq11.2 バンドを欠失する腫瘍がある。*WTX* 遺伝子は、この欠失部位から単離された癌抑制遺伝子である¹³。*WTX* 遺伝子は 1,135 アミノ酸をコードしており、*WT1* と同様に胎児期の後腎間葉や糸球体前駆組織である上皮構造に発現している。このように、両遺伝子は Wilms 腫瘍の前駆細胞と考えられる胎児腎組織に発現しており、胎児腎形成にかかわる。一方、*WTX* 胚細胞変異は、線状広範性骨過剰症 *osteopathia striata congenita with cranial sclerosis* の原因になるが、この先天異常患者に Wilms 腫瘍の合併は報告されていない¹⁴。胎児腎に、*WTX* 変異の生じるタイミングが、腫瘍化には重要であることを示唆する。

Major 等は *WTX* 蛋白質が β カテニン、*AXIN1*, *βTrCP2*, *APC* などと β カテニン崩壊複合体を形成することを示した (図 2A)¹⁵。さらに、*WTX* が β カテニンのユビキチン化や分解を促進することを発見した。*WTX* は Wnt シグナ

リング系を抑制することにより、腫瘍抑制作用を示すのではないかと考えられている。WTX異常とCTNBN1変異を合併するWilms腫瘍は、まれである。この所見はWNT/ β カテニン・シグナル伝達系の異常部位が、 β カテニンであっても、WTXであっても、結果として同じシグナル異常が生じ、Wilms腫瘍の発生に関与していると予想される(図2B)。

WTXは細胞質と核を往復するシャトル蛋白質であり、WT1と結合し、核でWT1を介したAmphiregulin(糖蛋白質であり、神経鞘腫由来の増殖因子)の転写を促進する。WT1とWTXは、腎前駆細胞で共発現している。WTX変異はWT1蛋白質結合部位に集中しており、変異によりWT1の正常な機能に影響を与える¹⁶⁾。このように、WTXの機能は多面的であり、その異常のWilms腫瘍化における役割も多様である。

IV IGF2 (insulin-like growth factor 2) 遺伝子の高発現とWilms腫瘍の発生

1. Wilms腫瘍とBeckwith-Wiedemann(B-W)症候群

Wilms腫瘍を合併する先天異常症候群としてB-W症候群が知られている。B-W症候群は臍ヘルニア、巨舌、巨軀を主症状とする先天奇形症候群である。一部の患者に11p15トリソミーや、11p15に切断点を持つ転座がみられたこと、また連鎖解析の結果から、その遺伝子座は11p15に位置すると決められた。11p15領域には2か所のインプリンティング(刷り込み)を受けるドメインがあり、それぞれ複数の遺伝子で構成される(図3)¹⁷⁾。B-W症候群では、11p15のテロメア側にあるCDKN1C/KCNQ1OT1領域か; セントロメア側にあるIGF2/H19領域の、どちらかのイン

プリンティング遺伝子群に異常がみられる。CDKN1C/KCNQ1OT1領域では、母由来のKvDMR1(imprinting center 1, IC1)の脱メチル化、IGF2/H19領域では母由来H19-DMR(imprinting center 2, IC2)のメチル化、つまり、どちらのドメインにおいても、母由来アレルが父由来アレルの特徴を獲得することにより、B-W症候群は発生する。B-W症候群の12.5%にさまざまな腫瘍が発生するが、最も頻度の高いのはWilms腫瘍である。B-W症候群に合併する胎児性腫瘍のほとんどは、IGF2-H19遺伝子群の異常により発生したと報告されている。

2. Wilms腫瘍においてIGF2の過剰発現をもたらす二つの機構

IGF2は胎児期に働く細胞増殖因子であり、胎児腎で発現するが、出生後の腎では発現消失する。前述したように、IGF2とH19の両遺伝子は11番染色体短腕p15に隣り合って位置し、インプリンティングを受ける(図4A)。すなわち正常細胞では、IGF2は父由来アレルからのみ、H19は母由来アレルからのみ発現する。H19遺伝子の上流にはDMR(differential methylated region)と呼ばれる領域があり、その中にinsulator proteinであるCTCFの結合部位がある。父方アレルではH19-DMRのCTCF結合部位(CpG islands)がメチル化されており、CTCFが結合できないので、H19下流のエンハンサーがIGF2に発現シグナルを伝達し、IGF2が発現する。反対に母方アレルではCTCF結合部位は非メチル化状態にあり、CTCFが結合し、エンハンサーシグナルはCTCFで遮断されるため、IGF2に届かず、H19が発現する(図4A)。このように、H19-DMRのメチル化により、IGF2とH19の刷り込みは維持されている。

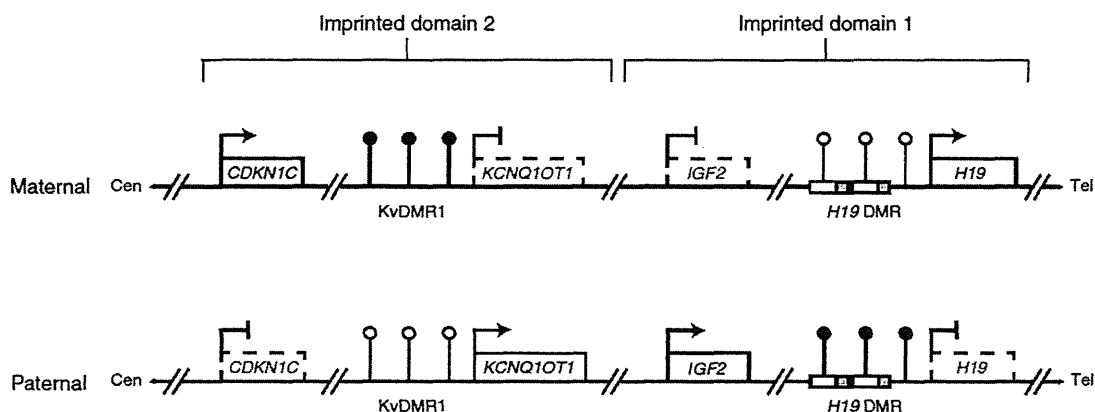


図3 11p15インプリンティング領域の模式図(文献17より引用)。11p15インプリンティング領域には2か所のドメインがあり、differentially methylated region(DMR)により4個の遺伝子発現が制御されている。父由来アレルでメチル化されているH19-DMR(imprinting center 1, IC1)により、IGF2-H19が、母由来アレルでメチル化されているKvDMR1(imprinting center 2, IC2)によりCDKN1C-KCNQ1OT1が制御されている。発現遺伝子は実線で、非発現遺伝子は破線で囲んで示す。各DMRのCpG islandメチル化は●で、同非メチル化は○で示す。

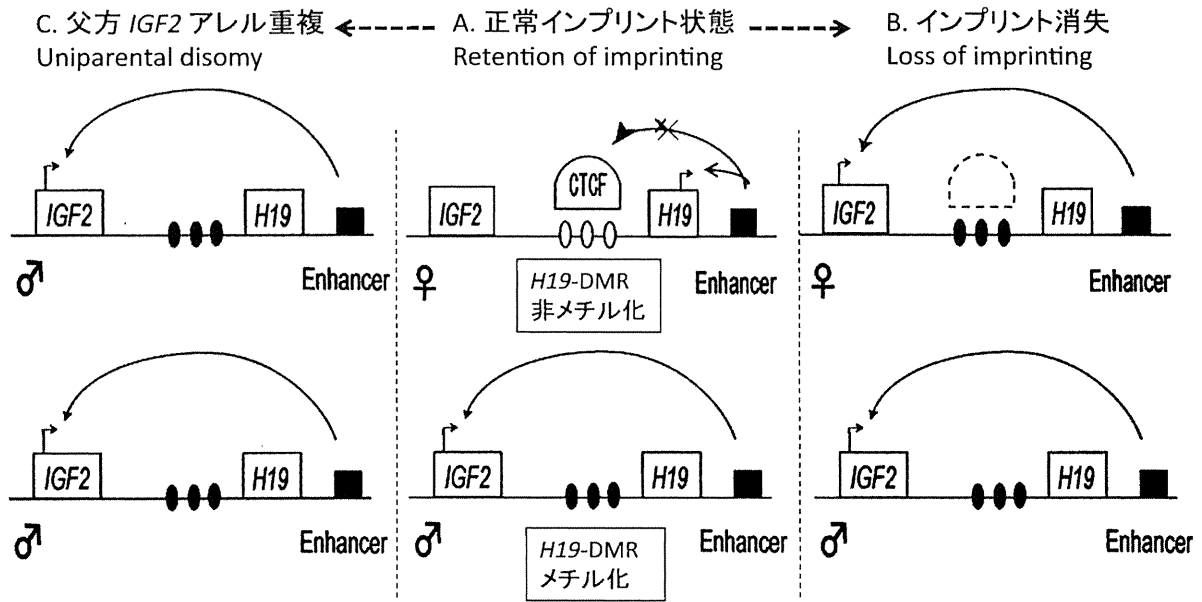


図4 *H19* 遺伝子上流の DMR にある CTCF (insulator 蛋白質) 結合部位のメチル化と *IGF2* 遺伝子の発現. A. 正常細胞の母由来アレルでは、CTCF 結合部位が非メチル化状態であり、CTCF が結合する。*H19* 下流からのエンハンサーシグナルは CTCF で遮断されるため、*H19* が発現する。父由来アレルでは CTCF 結合部位がメチル化状態であり、CTCF が結合できない。エンハンサーシグナルは *IGF2* を発現させる。B. 母由来アレルの CTCF 結合部位がメチル化している。これを loss of imprinting (LOI) と呼ぶ。C. 母由来 *IGF2* アレルが失われ、父由来 *IGF2* アレルが重複している。これを paternal uniparental disomy (UPD) と呼ぶ。LOI や UPD が生じると、*IGF2* 発現アレルは倍加するので、*IGF2* 蛋白質が過剰に産生される。

散発性 Wilms 腫瘍を調べると、30–70% では、母由来アレルの CTCF 結合部位がメチル化している。これを loss of imprinting (LOI) と呼ぶ (図4B)。また、Wilms 腫瘍の 30–40% では、母由来 *IGF2* アレルが失われ、父由来 *IGF2* アレルが重複している。これを paternal uniparental disomy (UPD) と呼ぶ (図4C)。LOI や UPD が生じると、*IGF2* 発現アレルは倍加するので、*IGF2* 蛋白質が過剰に産生される。そのために、Wilms 腫瘍前駆細胞の増殖が促進される。これが腫瘍化のワンステップになっていると考えられる²⁾。*IGF2* の LOI や UPD は肝芽腫や胎児性横紋筋肉腫など他の胎児性腫瘍においても生じており、胎児性腫瘍に共通な腫瘍増殖機構であると考えられている。

3. 散発性 Wilms 腫瘍患者の末梢血に発見された 11p15 異常

Scott 等はイギリスにおいて先天奇形のない散発性 Wilms 腫瘍 437 例の末梢血を分析し 13 例 (3%) に 11p15 異常を発見した¹⁷⁾。異常の内容は母由来 IC1 の高メチル化、父由来 11p15 の UPD、IC1 の塩基挿入や欠失である (図3)。母由来 IC1 の高メチル化は一般的にモザイク状態でみられたので、受精後早期に生じたと考えられた。13 例中 4 例は両側性腫瘍であり、その 12% を占めた。4 例中 3 例は父由来 *IGF2*-*H19* の UPD、1 例は母由来 *H19*-DMR の LOI によるものであり、両親の血液には異常はみられないので、新生突然変異により生じたと考えられた。このよう

に、臨床的に正常な表現型を示す患者の中に、生まれつきの 11p15 異常を示す患者がいる。

一方、日本の B-W 症候群 47 例の 11p15 領域の解析結果が報告されている⁴⁾。母由来 IC1 の高メチル化はアメリカやヨーロッパの患者の頻度に比して低く、染色体異常の頻度は日本で高かった。この 47 例中 3 例に肝芽腫が 1 例に横紋筋肉腫を合併していたが、Wilms 腫瘍の合併例はなかった。我が国において散発性 Wilms 腫瘍患者の末梢血の IC1、IC2 を分析した報告はない。

V Wilms 腫瘍発生モデルマウスの作製

1. *Wt1* 消失と *Igf2* 高発現マウスにおける Wilms 腫瘍の発生

Wt1 欠失マウスでは後腎間葉に尿管芽の侵入が起きず、後腎間葉に著しいアポトーシスを生じる (図1)。従って、腎が形成されず、胎児期に死亡するので、Wilms 腫瘍の発生は観察されない。一方、母由来 *H19*-DMR を欠失し、*IGF2* を過剰発現するマウスでは、過成長がみられるが、やはり Wilms 腫瘍の発生は観察されない。*Wt1* と *IGF2* の両遺伝子は 11 番染色体短腕に位置している。Haruta 等は *Wt1* 異常のある Wilms 腫瘍 36 例を分析し、1/3 の腫瘍に *Wt1* 変異と父由来 *IGF2* が UPD により重複していることを報告した¹¹⁾。この所見をヒントに、Hu 等は *Igf2* を過剰発現し、*Wt1* 発現消失した *Wt1*-*Igf2* トランスジェニックマウスを作

製し, Wilms 腫瘍を発生させることに成功した¹⁸⁾. *Wt1* 欠失は, 腎前駆細胞の分化を阻害し, *Igf2* の高発現は, その増殖を促進する. 両者の異常が腫瘍化には必要であることを示している. IGF2はチロシンキナーゼである IGF1 受容体のリガンドである. IGF1R の下流に ERK シグナル伝達経路があるが, このトランスジェニックマウスでは, リン酸化した ERK1/2 が高発現していた.

2. micro-RNA (miRNA) プロセッシングに働く DROSHA

および DICER1 と, Wilms 腫瘍におけるその遺伝子変異 miRNA は, 細胞内に存在する長さ 20 から 25 塩基の RNA であり, 他の遺伝子の発現を調節する. miRNA は, 蛋白質には翻訳されない non-coding RNA の一種である. 核内で内在性二重鎖 RNA (primary miRNA) は, RNA 切断酵素 (RNase III) Drosha によりヘアピン様二重鎖構造をもつ未熟 miRNA (pre-miRNA) として切り出される. さらに, この前駆物質は細胞質に移行し, 同じく RNA 切断酵素である Dicer により成熟二重鎖 RNA (miRNA) として切り出される. 細胞質内の RNA-induced silencing complex (RISC) において miRNA が mRNA に結合することにより, mRNA からポリペプチドへの翻訳が抑制される (図 5).

Torrezan 等は 1 家系のエクソーム解析を実施し, 発端者の Wilms 細胞に *DROSHA* 体細胞変異を発見した⁹⁾. 次いで Wilms 腫瘍 222 例において, 10 個の miRNA プロセッシングにかかわる遺伝子の塩基配列解析を実施し, 12% (26 例) に *DROSHA* 変異を発見した. その 81% は同一の変異 E1147K であった. *DROSHA* 変異のない腫瘍においては, *DGCR8*, *DICER1*, *XPO5*, *TARBP2* などのやはり miRNA プロセッシングにかかわる遺伝子に変異が検出された. さらに *DROSHA*-E1147K 変異を有する腫瘍や細胞株を検討すると, 変異のほとんどは片アレルにのみ生じており, dominant negative 効果により, 野生型 *DROSHA* の発現を抑制していると考えられた. また, *DROSHA* 変異腫瘍では, 特定の miRNA 群に発現抑制が生じていた. 次に行われた Wilms 腫瘍 66 例の解析では, miRNA プロセッシング遺伝子の変異が 33% にみられたのに対し, 既に Wilms 腫瘍に報告されている *WT1*, *CTNBL1*, *WTX*, *TP53*, *DIS3L2*, *FBXW7* などの遺伝子変異は 23% と低頻度であった. 興味深いことに *DROSHA* 変異を示す 10 腫瘍中 4 腫瘍に *WT1* 欠失の合併がみられた. *DROSHA* 変異は体細胞変異であり, 胚細胞変異を伴う家族性腫瘍は報告されていない.

DICER1 は細胞質で miRNA プロセッシングにかかわる遺伝子であるが, その変異はこれまでに, 胸膜肺芽腫, 多結節性甲状腺腫, 嚢胞性腎腫瘍, 卵巣性索間質腫瘍, 子宮頸部胎児性横紋筋腫や, まれではあるが Wilms 腫瘍に報告されてきた¹⁹⁾. 報告の多くは, 家族性腫瘍にみられる胚細胞変異である.

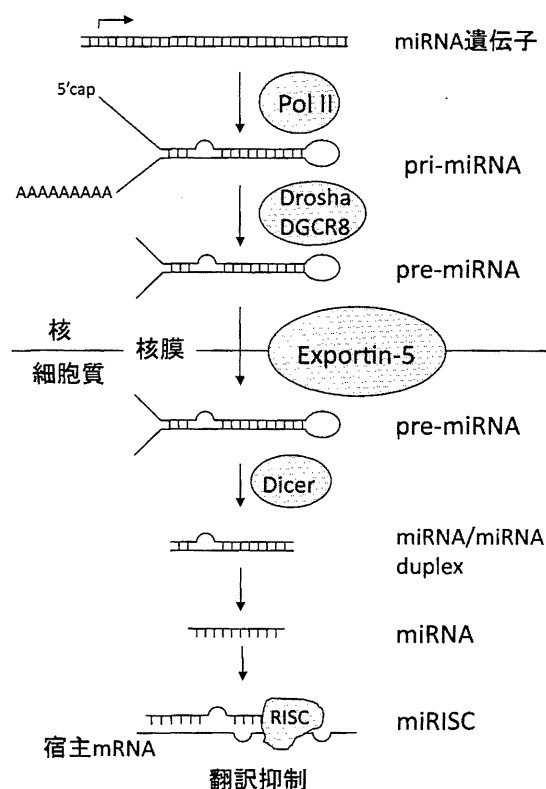


図 5 RNA 干渉の模式図. miRNA 遺伝子から RNA Polymerase II により転写された長い前駆 miRNA は pri-miRNA と呼ばれる. 核において pri-miRNA は, RNA 切断酵素 (RNase III) である Drosha により切断され, 約 70 塩基の断片である pre-miRNA が産生される. pre-miRNA は exportin 5 により核から細胞質に運び出された後, 別の RNase III である Dicer により切断され, 成熟 miRNA が産生される. RNA-induced silencing complex (RISC) に取り込まれた miRNA は, 自分自身の塩基配列と対合できる標的 mRNA と結合した後に, mRNA 崩壊や, 蛋白質の翻訳抑制などの作用を示す.

3. *Lin28* は腎前駆細胞の増殖を維持することにより, Wilms 腫瘍を発生させる

Lin28A とそのパラログである *Lin28B* は RNA 結合蛋白をコードしており, 多能性幹細胞に高発現している. iPS 細胞を誘導する山中 4 因子は *OCT3/4*, *KIF4*, *SOX2*, *MYC* であるが, Yu 等は *KIF4*, *MYC* の代わりに *LIN28*, *NANOG* を導入することにより, ヒト iPS 細胞を誘導できることを示した²⁰⁾. 一方, *LIN28* はさまざまな腫瘍で高発現していることが知られている. Urbach 等は *LIN28B* を発達過程や成長したマウスの腎に高発現させるために, *LIN28B* と *Wt1* を高発現するトランスジェニックマウスを作製した⁹⁾. *Wt1* は後腎のもとになる中間間葉に発現している. 胎児期に両遺伝子を高発現させると, 生後 2 週間以内にすべてのマウスに腎腫瘍が発生した. *Lin28a* は, 胎生 13.5 週までの正常マウス腎に発現しているが, その後, 衰退する. 一方, *Lin28b* は胎児マウス腎ではまったく発現していない. これらの所見から, *Lin28* が発現している間は, 後腎間葉

の最終的な上皮細胞への分化は起こらず、腎前駆細胞は活発に増殖する。そのため、Lin28 の発現消退が生じないと、腎前駆細胞に分化が起きず、最終的に Wilms 腫瘍が発生すると考えられる。Let-7 は miRNA であり、Lin28 発現を抑制する。Lin28b を高発現しているマウス腎腫瘍では、Let-7 発現が低下していた。Lin28 と Let-7 は相互に抑制する作用がある。イギリスのヒト Wilms 腫瘍 77 例の検討によると、LIN28B 高発現は 30% の腫瘍にみられ、腫瘍組織内の発現部位は腎芽細胞に局限し、再発、死亡と強い関係がみられた。Urbach 等は LIN28/LET-7 パスウェイが新しい Wilms 腫瘍の治療標的になるのではないかと提唱している⁹⁾。

4. 体細胞の partial reprogramming により発生するマウス Wilms 腫瘍

体細胞の reprogramming (初期化) により iPS 細胞は誘導される。Reprogramming を中断させる partial reprogramming により、Wilms 腫瘍を発生させるマウスモデルが、最近、我が国より報告された。Ohnishi 等は正常 2 倍体胚細胞に reprogramming 遺伝子 (山中 4 因子) を発現する ES 細胞を注入し、キメラマウスを作製した⁷⁾。このマウスでは、ドキシサイクリン投与により山中 4 因子の発現を調節可能である。生後 4 週のキメラマウスにドキシサイクリンを 4 週間投与し、山中 4 因子を継続して発現させると、さまざまな器官に奇形腫が発生した。しかし、4 因子を 7 日間発現させた後、ドキシサイクリンを中止し、4 因子の発現を止めたマウスには (partial reprogramming)、さまざまな上皮組織に異形成 (dysplasia) が生じた。異形成細胞は周囲の組織に浸潤し、腫瘍の特徴を示した。ドキシサイクリンにより腎に発生した腫瘍は、腎前駆細胞と同様に *Six2*, *Eyal*, *Lgr5* などの遺伝子が発現していた。これらの遺伝子は、分化に伴い ES 細胞においてポリコム複合体により発現が抑制されることが知られている。ドキシサイクリン誘導腎腫瘍では、体細胞の reprogramming が中断されるため、ポリコム複合体による遺伝子発現の抑制がかからず、その標的遺伝子の発現が継続したと考えられた。また、これらの腫瘍では、グローバルな DNA メチル化パターンに変化が生じていたが、遺伝子変異は認められなかった。これらの所見から、エピジェネティック異常により Wilms 腫瘍を発生可能とするマウスモデルが提唱された。

VI 家族性 Wilms 腫瘍

1. Wilms 腫瘍の地理的疫学

Wilms 腫瘍は、我が国では年間 80~100 例発生するが、その発生頻度は欧米の 1/2~1/3 であり、アジア全体の発生頻度も低い。アメリカの Wilms 腫瘍の平均発生年齢は 42~47 カ月となっているが、私たちの 158 例の解析結果では

31 カ月であり、日本では低いようだ。私たちと Fukuzawa 等の解析により、*WT1*, *CTNNB1*, *WTX* 遺伝子異常は日欧間に差がないが、*IGF2*-インプリント消失 (LOI) の頻度が我が国で低く、Wilms 腫瘍全体の頻度が低い一因であると考えられた^{10,21)}。

2. WT 変異型両側性 Wilms 腫瘍の遺伝子研究

日本 Wilms 腫瘍研究グループ (JWiTS) では「本邦における両側性腎腫瘍に対する統一プロトコール腎機能温存率と治療の完遂率の評価: 両側性腎芽腫の温存」に関する治療研究を 2014 年 6 月より開始した。同時に付随研究として「両側性腎芽腫の遺伝子分析と遺伝相談への応用」を開始した⁸⁾。これまでの研究で、日本人に発生した 30 例の両側性 Wilms 腫瘍の 80% に *WT1* 胚細胞変異が見られた。親の同意を得て *WT1* 胚細胞変異解析を 3 家系において実施した。一家系では、父親に Wilms 腫瘍の既往があり、*WT1* 変異を父親から受け継いだ子供に腫瘍が発生した。別の一家系では、Wilms 腫瘍の既往のない父親が *WT1* 変異の保因者であり、*WT1* 変異を受け継いだ子供に腫瘍が発生した。また、もう一家系では、両親のリンパ球の *WT1* 遺伝子は正常であり、両親と患者の血液と腫瘍の SNP (single-nucleotide polymorphisms) 解析より、父親の胚細胞に生じた新生突然変異により腫瘍が発生したと考えられた。このように、*WT1* 変異のある両側性 Wilms 腫瘍であっても、患者と親の末梢血の *WT1* 塩基配列、SNP や DNA コピー数を分析することにより、*WT1* 異常が親から伝承されたのか、新生突然変異であるのかがわかる。また、*WT1* 異常を保有していても Wilms 腫瘍を発病しない保因者の存在がわかる。*WT1* 異常をもつ家族性 Wilms 腫瘍家系は世界で 13 家系しか報告されておらず、浸透率 (*WT1* 胚細胞変異の保因者の中で Wilms 腫瘍を発生する患者の頻度) が不明である。この研究により、Wilms 腫瘍の浸透率を明らかにできれば、遺伝カウンセリングの基盤となるデータを提供できるのではなかと期待している。

3. WT1 変異のない両側性 Wilms 腫瘍の遺伝子研究

JWiTS の両側性 Wilms 腫瘍の遺伝子研究で収集した 80% の腫瘍に *WT1* 変異があることを既に述べたが、残り 20% は正常の *WT1* を示した。そのうちの 1 例は premature chromatid separation (PCS) 症候群であった。*BUB1B* 遺伝子は、細胞分裂中期において、染色体の正常な分配を制御するチェックポイント遺伝子のひとつであるが、その変異が PCS 症候群の原因である^{22,23)}。

PCS 症候群のリンパ球を培養後、観察すると分裂中期細胞の 50% 以上に未熟な染色分体 chromatid の分離と異数性細胞モザイクが認められる。臨床症状としては発育障害、小頭症、白内障、けいれん、多嚢胞性腎、乳幼児肥満で

あり, Wilms 腫瘍や横紋筋肉腫を好発する。胎児性腫瘍に対する化学療法には vincristine を併用することが多いが, その標的は分裂期細胞の紡錘糸であり, 細胞分裂機構が二重に障害されるため, 重度の副作用が出やすく, その投与には注意が必要である。

家族性 Wilms 腫瘍は全体の2%程度であり, その頻度は低い²⁴⁾。前述のように, *WT1* 変異による家系が一部にみられる。欧米の連鎖解析の結果より, 17q21 と 19q13 の DNA マーカーにそれぞれ連鎖する Wilms 腫瘍家系が報告され, 遺伝子座位は *FWT1* および *FWT2* と命名された。しかしながら, 両遺伝子は現在までに単離されていない。11p13 (*WT1*), 17q21, 19q13 に連鎖を示さない Wilms 腫瘍家系が報告されており, ほかの家族性 Wilms 腫瘍遺伝子の存在も示唆される。

VII おわりに

小児固形腫瘍は, 胎児期に器官形成にかかわる遺伝子のジェネティック・エピジェネティック異常により発生することが実証されつつあることを述べた。実際, *WT1* と *WTX* は胎児の腎発生に関わる遺伝子であることが証明され, ジェネティック異常により発生する腫瘍であることが明らかにされた。一方, 1980年代より Wilms 腫瘍の30%において, 母由来 *H19*-DMR に高メチル化 (Loss of imprinting, LOI) が生じており, その結果 *IGF2* が過剰発現していることが報告された。最近では, miRNA である *Let-7* の発現低下により高発現する *LIN28B* 遺伝子, miRNA プロセッシング遺伝子である *DROSHA* や *DICER1* の変異による miRNA の産生低下, partial reprogramming など, 腎前駆細胞に生じるエピジェネティック異常が腫瘍化にかかわることがわかってきた。Wilms 腫瘍は臨床的に heterogeneous な疾患であるが, その背景にある, 多様な腫瘍化の分子機構が解明されようとしている。

本論文の一部は, 第55回日本小児・血液がん学会学術集会プレナリーセッションで発表した。

文 献

- 1) Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, et al: Cancer genome landscapes. *Science*, 339: 1546–1558, 2013.
- 2) Rivera MN, Haber DA: Wilms' tumour: connecting tumorigenesis and organ development in the kidney. *Nat Rev Cancer*, 5: 699–712, 2005.
- 3) Huff V: Wilms' tumours: about tumour suppressor genes, an oncogene and a chameleon gene. *Nat Rev Cancer*, 11: 111–121, 2011.
- 4) Soejima H, Higashimoto K, et al: Japanese and North American/European patients with Beckwith-Wiedemann syndrome have different frequencies of some epigenetic and genetic alterations. *Eur J Hum Genet*, 15: 1205–1210, 2007.
- 5) Urbach A, Yermalovich A, Zhang J, et al: Lin28 sustains early renal progenitors and induces Wilms tumor. *Genes Dev*, 28: 971–982, 2014.
- 6) Torrezan GT, Ferreira EN, Nakahata AM, et al: Recurrent somatic mutation in DROSHA induces microRNA profile changes in Wilms tumour. *Nat Commun*, 5: 4039–4049, 2014.
- 7) Ohnishi K, Semi K, Yamamoto T, et al: Premature termination of reprogramming in vivo leads to cancer development through altered epigenetic regulation. *Cell*, 156: 663–377, 2014.
- 8) JWiTS home page: <http://jwits.umin.ac.jp>
- 9) 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 シグナルの重要性. *小児がん*, 47: 252–256, 2010.
- 10) Haruta M, Arai Y, Watanabe N, et al: Different incidences of epigenetic but not genetic abnormalities between Wilms tumors in Japanese and Caucasian children. *Cancer Sci*, 103: 1129–1135, 2012.
- 11) Haruta M, Arai Y, Sugawara W, et al: Duplication of paternal *IGF2* or loss of maternal *IGF2* imprinting occurs in half of Wilms tumors with various structural *WT1* abnormalities. *Genes Chromosome Cancer*, 47: 712–727, 2008.
- 12) Fukuzawa R, Heathcott RW, More HE, et al: Sequential *WT1* and *CTNBN1* mutations and alterations of beta-catenin localization in intralobar nephrogenic rests and associated Wilms tumours: Two case studies. *J Clin Pathol*, 60: 1013–1016, 2007.
- 13) Rivera MN, Kim WJ, Wells J, et al: An X chromosome gene, *WTX*, is commonly inactivated in Wilms tumor. *Science*, 315: 642–645, 2007.
- 14) Jenkins ZA, van Kogelenberg M, Morgan T, et al: Germline mutations in *WTX* cause a sclerosing skeletal dysplasia but do not predispose to tumorigenesis. *Nat Genet*, 41: 95–100, 2009.
- 15) Major MB, Camp ND, Berndt JD, et al: Wilms tumor suppressor *WTX* negatively regulates WNT/beta-catenin signaling. *Science*, 316: 1043–1046, 2007.
- 16) Rivera MN, Kim WJ, Wells J, et al: The tumor suppressor *WTX* shuttles to the nucleus and modulates *WT1* activity. *PNAS*, 106: 8338–8343, 2009.
- 17) Scott RH, Douglas J, Baskcomb L, et al: Constitutional 11p15 abnormalities, including heritable imprinting center mutations, cause nonsyndromic Wilms tumor. *Nat Genet*, 40: 1329–1334, 2008.
- 18) Hu Q, Gao F, Tian W, et al: *Wt1* ablation and *Igf2* upregulation in mice result in Wilms tumors with elevated ERK1/2 phosphorylation. *J Clin Invest*, 121: 174–183, 2011.
- 19) Foulkes WD, Bahubeshi A, Hamel N, et al: Extending the phenotypes associated with *DICER1* mutations. *Hum Mutat*, 32: 1381–1384, 2011.
- 20) Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, et al: Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*, 318: 1917–1920, 2007.

- 21) Fukuzawa R, Breslow NE, Morison IM, et al: Epigenetic differences between Wilms' tumours in white and east-Asian children. *Lancet*, 363: 446–451, 2004.
- 22) Matsuura S, Matsumoto Y, Morishima K, et al: Monoallelic BUB1B mutations and defective mitotic-spindle checkpoint in seven families with premature chromatid separation (PCS) syndrome. *Am J Med Genet A*, 140: 358–367, 2006.
- 23) Ochiai H, Miyamoto T, Kanai A, et al: TALEN-mediated single-base-pair editing identification of an intergenic mutation upstream of BUB1B as causative of PCS (MVA) syndrome. *PNAS*, 111: 1461–1466, 2014.
- 24) Ruteshouser EC, Huff V: Familial Wilms tumor. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*, 129C: 29–34, 2004.

Wilms 腫瘍 (腎芽腫) の分子生物学

金子 安比古*

はじめに

小児がんと成人がんとでは組織型, 発生頻度, 治癒率などが著しく異なる。近年のがんゲノム研究により, 成人がんでは通常, 腫瘍化にかかわる多数の遺伝子変異が長期間にわたり蓄積し, その結果, 発生すると報告された。一方, 小児がんでは, 胎児の臓器形成にかかわる数個の遺伝子異常が月単位の短期間に生じ, 発生することがわかってきた¹⁾。

Wilms 腫瘍の発生にかかわる遺伝子として 11p13 の *WT1* と 11p15 の *WT2* が知られている。*WT1* は, 腎発生を司るマスター遺伝子である²⁾。*IGF2* は胎児期の増殖因子であるが, *IGF2* の発現を制御している *H19* 遺伝子が *WT2* とされた。最近, 胎児組織発達のタイミングを調節している *LIN28* 遺伝子の高発現³⁾, miRNA のプロセッシングにかかわる遺伝子の変異^{4,5)}, 体細胞の部分初期化 partial reprogramming⁶⁾ など, 新しいジェネティック・エピジェネティック異常により, Wilms 腫瘍が発生するという報告が次々となされている (表)。これらと並行した遺伝性 Wilms 腫瘍の遺伝子研究も急速に進展している。一方, 治療成績の改善により Wilms 腫瘍サバイバーは増加している。家族性 Wilms 腫瘍の原因となる胚細胞遺伝子変異をもつ保因者は増加しており, 対策が必要である。

1. *WT1* 遺伝子異常と *CTNNB1* および *WTX* 遺伝子異常

WT1 遺伝子は, 胎児の腎前駆細胞と成人腎の一部で発現する²⁾。*WT1* 蛋白質は主として4個のアイソフォームをもち, C 端には4個の zinc finger ドメインがあり, 特定の DNA 塩基配列と結合可能である。このドメインにより *WT1* 蛋白質は *EGRI*, *IGF2*, *TP53* 遺伝子などのプロモーター領域と結合し, その転写を制御している。

1. *WT1* 遺伝子の発現異常と Wilms 腫瘍の発生

WT1 は *WNT4* の転写因子として働き, その発現を促進する。*WT1* は *WNT4* と同様に, 腎の発生過程で間葉上皮転換を生じる組織, つまり, 後腎間葉, 造腎間葉, 腎小胞や尿細管上皮などに高レベルで発現する²⁾。もっとも強く発現するのは C 字小体/S 字小体で, 腎の完成とともに発現は消失するが, 糸球体の足細胞では成人になっても発現している。*Wt1* 欠失マウスでは後腎間葉に尿管芽の侵入が起きず, 後腎間葉に著しいアポトーシスを生じる。したがって, 腎が形成されず, 胎児期に死亡するので, Wilms 腫瘍の発生は観察されない。散発性 Wilms 腫瘍の約 25% に *WT1* 遺伝子異常がみられる¹⁾。

2. *CTNNB1* 変異と Wilms 腫瘍

β カテニンは, 細胞表面のカドヘリンと細胞質のアクチンをつなぐ細胞接着因子の機能と, Wnt シグナル系の因子として核に移行後, 転写因子と会合し, 成長・増殖因子遺伝子を活性化する機能を併せもつ。Wilms 腫瘍の 20~30% に β カテニンをコードする *CTNNB1* 遺伝子に変異を認める¹⁾。この変異は, *GSK3 β* によりリン酸化するセリン・スレオニン残基に集中している。変異の結果,

Yasuhiko Kaneko

* 埼玉県立がんセンター臨床腫瘍研究所

〔〒362-0806 埼玉県北足立郡伊奈町小室 818〕

表 腎芽腫 (Wilms 腫瘍) の発生に関する遺伝子異常と関連する症候群

遺伝子	位置	症候群	症候	遺伝子の機能
胚細胞・体細胞遺伝子変異あり				
<i>WT1</i>	11p13	Drash 症候群, WAGR 症候群, 先天性ネフローゼ症候群	腎機能障害	転写因子をコードする腎発生のマスター遺伝子 <i>Wt1</i> ノックアウト・ <i>Igf2</i> 過剰発現マウスに腎芽腫が発生
<i>IGF2</i>	11p15.5	Beckwith-Wiedemann 症候群	臍ヘルニア, 巨舌, 巨軀過成長, 胎児性腫瘍の好発	胎児期の増殖因子
<i>DICER1</i>	14q32.13	<i>DICER1</i> 症候群	膝芽腫, 松果体芽腫 子宮頸部胎児型横紋筋肉腫 胚細胞腫瘍, 性索間質腫瘍	<i>LET7</i> がん抑制遺伝子やほかの miRNA の産生抑制 ヘテロ接合性遺伝子変異 変異は胚細胞と体細胞の両方に生じる
<i>ASXL1</i>	20q11.21	Bohring-Opitz 症候群	成長不良, 顔の火炎状母斑	<i>HOX</i> 遺伝子群の制御 骨髄性腫瘍で体細胞変異あり
<i>CTR9</i>	11p15.3	家族性 Wilms 腫瘍好発症候群	腫瘍以外の症状はない	RNA polymerase II を制御するがん抑制遺伝子 Wilms 腫瘍 35 家系中 3 家系に変異あり
<i>BUB1B</i>	15q15.1	premature chromatid separation 症候群	成育不良, 小脳症	紡錘体形成チェックポイントを制御
<i>MYCN</i>	2p24.3		両側性, 家族性に発症	胎児組織で発現し, 脳神経の発達に重要な働き
<i>FBXW7</i>	4q31.1		両側性, 若年発症	<i>MYCN</i> を分解するユビキチンリガーゼ
胚細胞遺伝子変異の報告のみ				
<i>DIS3L2</i>	2q37.1	Perlman 症候群	過成長症候群	RNA を切断する exonuclease 活性あり
体細胞遺伝子変異の報告のみ				
<i>CTNNB1</i>	3p22.1			大腸がんなど多種類のがんで変異あり 腎芽腫では <i>WT1</i> 変異型腫瘍と合併しやすい
<i>WTX</i>	Xq11.2			胚細胞遺伝子変異個体 (線状骨症) が腎芽腫を発症したという報告はない
<i>DROSHA</i>	5p13.3			<i>LET7</i> がん抑制遺伝子やほかの miRNA の産生抑制 E1147K 変異は dominant negative 機構により作用する

β カテニンはリン酸化を受けなくなるので安定し, 標的遺伝子の転写を促進する。後腎間葉の上皮化には, Wnt/ β カテニン経路から Wnt/PCP 経路への切り替えを必要とする。*WT1* 変異型腫瘍と *WT1* 野性型腫瘍の *CTNNB1* 変異頻度は著しく異なり, 前者で約 65% であるが, 後者では 2~10% にすぎない¹⁾。*CTNNB1* 変異が生じているとこの切り替えが行われず, 腎前駆細胞は分化でき

ずに増殖する。*WT1/CTNNB1* 変異型 Wilms 腫瘍では, 間葉上皮転換がうまくいかないため腎前駆細胞は分化の方向を誤り, 筋肉細胞などへと分化すると考えられる。

3. *WTX* 遺伝子変異と Wilms 腫瘍

Wilms 腫瘍の一部に Xq11.2 バンドを欠失する腫瘍がある。*WTX* 遺伝子は, この欠失部位から単離されたがん抑制遺伝子である¹⁾。*WTX* 遺伝

子は、*WT1*と同様に胎児期の後腎間葉や糸球体前駆組織である上皮構造に発現しており、胎児腎形成にかかわる。一方、*WTX*胚細胞変異は、線状骨症 (osteopathia striata congenita) の原因になるが、この先天異常患者に Wilms 腫瘍の合併は報告されていない¹⁾。この所見は、胎児腎に *WTX* 変異の生じるタイミングが腫瘍化には重要であることを示唆する。

Majorらは、*WTX*蛋白質がβカテニン、AXIN1、βTrCP2、APCなどとβカテニン崩壊複合体を形成することを示した¹⁾。さらに、*WTX*がβカテニンのユビキチン化や分解を促進することを発見した。*WTX*はWntシグナリング系を抑制することにより、腫瘍抑制作用を示すのではないかと考えた。*WTX*異常と*CTNNB1*変異を合併するWilms腫瘍はまれである。この所見は、WNT/βカテニン・シグナル伝達系の異常部位がβカテニンであっても、*WTX*であっても、結果として同じシグナル異常が生じ、Wilms腫瘍の発生に関与していることを示唆する¹⁾。

*WTX*は細胞質と核を往復するシャトル蛋白質であり、*WT1*と結合し、核で*WT1*を介した amphiregulin (糖蛋白であり、神経鞘腫由来の増殖因子)の転写を促進する。*WTX*変異は*WT1*蛋白質結合部位に集中しており、変異により*WT1*の正常な機能に影響を与える¹⁾。このように、*WTX*の機能は多面的であり、その異常のWilms腫瘍化における役割も多様である。

II. insulin-like growth factor 2 (*IGF2*) 遺伝子の高発現と Wilms 腫瘍

*IGF2*の高発現は多数の胎児性腫瘍で生じており、その発症機構を理解するうえで重要である。

1. Beckwith-Wiedemann (B-W) 症候群と Wilms 腫瘍

B-W症候群は臍ヘルニア、巨舌、巨軀を主症状とする先天奇形症候群である。B-W症候群の12.5%にさまざまな腫瘍が発生するが、もっとも頻度の高いのはWilms腫瘍である。B-W症候群患者の正常細胞では、11p15.5領域に位置する複数のインプリント遺伝子の一つに異常が生じている。また、Wilms腫瘍を合併したB-W症候群の

ほとんどは、父由来*IGF2-H19*重複 uniparental disomy (UPD)、または母由来*H19-DMR*のメチル化による母由来*IGF2*アレル発現 loss of imprinting (LOI) により発生したと報告されている¹⁾。

2. 散発性 Wilms 腫瘍患者の末梢血に見られた 11p15.5 領域遺伝子異常

Scottらは、イギリスにおいて先天奇形のない散発性Wilms腫瘍437例の末梢血を分析し、13例(3%)に11p15.5領域遺伝子異常を発見した¹⁾。異常の内容は母由来*H19-DMR*の高メチル化、父由来父由来*IGF2-H19*重複、*H19-DMR*の塩基挿入や欠失である。母由来*H19-DMR*の高メチル化は一般的にモザイク状態でみられたので、受精後早期に生じたと考えられた。13例中4例は両側性腫瘍であり、そのうち3例は父由来*IGF2-H19*のUPD、1例は母由来*H19-DMR*のメチル化によるものである。両親の血液にこれらの異常はみられなかったため、新生突然変異によると考えられた。このように、臨床的に正常な表現型を示す患者のなかに、生まれつき11p15.5領域の遺伝子に異常を示す患者がいる。

3. *Wt1* 消失および *Igf2* 高発現マウスにおける Wilms 腫瘍の発生

*Wt1*欠失マウスは胎児期に死亡する。一方、母由来*H19-DMR*を欠失し、*IGF2*を過剰発現するマウスでは過成長がみられるが、やはりWilms腫瘍の発生は観察されない。*WT1*と*IGF2*の両遺伝子は11番染色体短腕に位置している。Harutaら⁷⁾は、*WT1*異常のあるWilms腫瘍36例を分析し、1/3の腫瘍に*WT1*変異と父由来*IGF2*が11pUPDにより重複していることを報告した。この所見をヒントに、Huら⁸⁾は*Igf2*を過剰発現し、*Wt1*発現消失した*Wt1-Igf2*トランスジェニックマウスを作成し、Wilms腫瘍を発生させることに成功した。*Wt1*欠失は腎前駆細胞の分化を阻害し、*Igf2*の高発現はその増殖を促進する。両者の異常が腫瘍化には必要であることを示している。

III. micro-RNA (miRNA) プロセッシングに 働く遺伝子の異常と Wilms 腫瘍

miRNAは細胞内に存在する長さ20~25塩基の

RNA であり、ほかの遺伝子の発現を制御する。miRNA は、蛋白質には翻訳されない non-coding RNA の一種である。核内で内在性二重鎖 RNA (primary miRNA) は、RNA 切断酵素 (RNaseIII) DROSHA によりヘアピン様二重鎖構造をもつ未熟 miRNA (pre-miRNA) として切り出される。pre-miRNA は exportin 5 により核から細胞質に運び出されたのち、別の RNaseIII である DICER1 により切断され、成熟二重鎖 RNA (miRNA) になる。細胞質内の RNA-induced silencing complex (RISC) において、miRNA は単鎖の miRNA となり、mRNA に結合することにより、mRNA からポリペプチドへの翻訳を抑制する (図)。

1. DROSHA 遺伝子変異と Wilms 腫瘍

Torrezan ら⁴⁾はエクソーム解析により、Wilms 腫瘍に DROSHA 体細胞変異を発見した。ついで Wilms 腫瘍 222 例において、10 個の miRNA プロセシングにかかわる遺伝子の塩基配列を解析し、12% (26 例) に DROSHA 変異を発見した。その 81% は、同一のミスセンス変異 E1147K を示した。DROSHA 変異のない腫瘍においては DGCR8, DICER1, XPO5, TARBP2 などの、やはり miRNA プロセシングにかかわる遺伝子に変異が検出された。さらに E1147K 変異を有する腫瘍や細胞株を検討すると、変異のほとんどは片アレルにのみ生じており、dominant negative 効果により、野生型 DROSHA の発現を抑制していると考えられた。次に行われた Wilms 腫瘍 66 例の解析では、DROSHA を含む miRNA プロセシング遺伝子の変異が 33% にみられたのに対し、すでに Wilms 腫瘍に報告されている WT1, CTNBL1, WTX, TP53, DIS3L2, FBXW7 などの遺伝子変異は 23% と低頻度であった。miRNA プロセシング異常により発生する Wilms 腫瘍の存在が示された。DROSHA 変異は体細胞変異であり、胚細胞変異を伴う家族性腫瘍は報告されていない。

2. DICER1 遺伝子変異と Wilms 腫瘍

Rakheja ら⁵⁾は、Wilms 腫瘍 44 例のエクソーム解析を実施し、6 例に DROSHA 変異を、2 例に DICER1 変異を報告した。DICER1 体細胞変異はさまざまながんで見られるが、小児の胸膜肺芽腫、多結節性甲状腺腫、嚢胞性腎腫瘍、卵巣性索

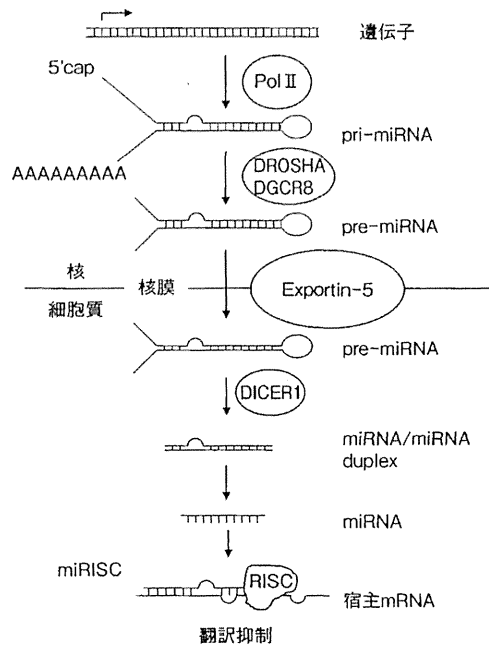


図 microRNA プロセシングの模式図 (本文参照)

間質腫瘍、子宮頸部胎児性横紋筋肉腫に多く報告されてきた¹⁾。これらの小児がんを好発する家族性腫瘍である DICER1 症候群においては、DICER1 の胚細胞変異が生じている。これらの家系では DICER1 変異の保因者が多く、浸透率は高くない。

3. LIN28 高発現と Wilms 腫瘍

LIN28A とそのパラログである LIN28B は RNA 結合蛋白をコードしており、多能性幹細胞に高発現している。iPS 細胞を誘導する山中 4 因子は OCT3/4, KIF4, SOX2, MYC であるが、Yu らは、KIF4, MYC の代わりに LIN28, NANOG を導入することによりヒト iPS 細胞を誘導した¹⁾。一方、LIN28 はさまざまな腫瘍で高発現している。Urbach ら³⁾は、LIN28B と Wt1 を高発現するトランスジェニックマウスを作成したところ、生後 2 週間以内にすべてのマウスに腎腫瘍が発生した。Lin28a は胎生 13.5 週までの正常マウス腎に発現しているが、その後、衰退する。一方、Lin28b は胎児マウス腎では全く発現していない。

これらの所見から、*Lin28*が発現しているあいだは後腎間葉の最終的な上皮細胞への分化は起こらず、腎前駆細胞は活発に増殖する。そのため、*Lin28*の発現が消退しないと腎前駆細胞は分化せず、Wilms腫瘍が発生すると考えられた。*Let-7*はmiRNAであり、*Lin28*発現を抑制する。*Lin28b*を高発現しているマウス腎腫瘍では、*Let-7*発現が低下していた。*LIN28*と*LET7*は相互に抑制する作用がある。イギリスのヒトWilms腫瘍77例の検討によると、*LIN28B*は30%に高発現し、発現部位は腎芽細胞に限局した。また、再発、死亡と強い関係がみられた³⁾。前項で述べた*DROSHA*と*DICER1*変異は*LET7*の発現低下をもたらすので、これらの変異を示す腫瘍では*LIN28*が高発現すると考えられる。

4. 体細胞の部分初期化により発生するマウスWilms腫瘍

体細胞の初期化によりiPS細胞は誘導される。初期化を中断させる部分初期化により、Wilms腫瘍を発生させるマウスモデルが、わが国から報告された。Ohnishiら⁶⁾は初期化遺伝子(山中4因子)を誘導可能なES細胞を正常2倍体胚胞に注入し、キメラマウスを作成した。生後4週の子マウスにドキシサイクリン(ドキシ)を4週間投与し、山中4因子を継続して発現させると、さまざまな器官に奇形腫が発生した。しかし、4因子を7日間発現させたのち、ドキシを中止したマウスにはさまざまな上皮組織に異形成(dysplasia)が生じた。異形成細胞は周囲の組織に浸潤し、腫瘍の特徴を示した。ドキシ休業により腎に発生した腫瘍は、腎前駆細胞と同様に*Six2*、*Eyal*、*Lgr5*などの遺伝子が発現していた。これらの遺伝子は分化に伴い、ES細胞においてポリコム複合体により発現が抑制されることが知られている。ドキシ休業誘導腎腫瘍では、体細胞の初期化が中断されるため、ポリコム複合体による遺伝子発現の抑制がかからず、その標的遺伝子の発現が継続したと考えられた。また、これらの腫瘍ではグローバルなDNAメチル化パターンに変化が生じていたが、遺伝子変異は認められなかった。これらの所見から、エピジェネティック異常によりWilms腫瘍が発生するというマウス

モデルが提唱された。

IV. 家族性Wilms腫瘍

家族性Wilms腫瘍の原因遺伝子として、*WT1*と*BUB1B*が知られていた。次世代シーケンサーの時代になって、*CTR9*、*ASXL2*、*DICER1*、*DIS3L2*などの遺伝子の胚細胞変異によっても家族性Wilms腫瘍が発生することがわかってきた。

1. *WT1*胚細胞変異とWilms腫瘍

日本ウィルムス腫瘍スタディグループ(JWiTS)では、「本邦における両側性腎腫瘍に対する統一プロトコル腎機能温存率と治療の完遂率の評価」に関する治療研究を2014年6月より開始した。同時に付随研究として、「両側性腎芽腫の遺伝子分析と遺伝相談への応用」を開始した¹⁾。これまでの研究で、日本人に発生した30例の両側性Wilms腫瘍の80%に*WT1*変異がみられた。親の同意を得て*WT1*胚細胞変異解析を3家系において実施した。一家系では、父親にWilms腫瘍の既往があり、*WT1*変異を父親から受け継いだ子どもにも腫瘍が発生した。別の一家系では、Wilms腫瘍の既往のない父親が*WT1*変異の保因者であり、*WT1*変異を受け継いだ子どもにも腫瘍が発生した。また、もう一家系では、父親の胚細胞に生じた新生突然変異により腫瘍が発生したと考えられた。このように、*WT1*変異のある両側性Wilms腫瘍であっても、患者と親の末梢血の*WT1*塩基配列、一塩基多型やDNAコピー数を分析することにより、*WT1*変異が親から伝承されたのか、新生突然変異であるのかがわかる。また、*WT1*異常を保有していてもWilms腫瘍を発病しない保因者の存在がわかる。*WT1*異常をもつ家族性Wilms腫瘍家系は世界で13家系しか報告されておらず、浸透率は不明である。この研究により、遺伝カウンセリングの基盤となるデータを提供できるのではないかと期待している。

2. *WT1*以外の遺伝子の胚細胞変異とWilms腫瘍

家族性Wilms腫瘍は全体の2%程度であり、その頻度は低い。JWiTSの両側性Wilms腫瘍の遺伝子研究で収集した20%の腫瘍は正常の*WT1*を示した。そのうちの1例は発育障害、小頭症、白

内障, けいれん, 多嚢胞性腎, 乳幼児期肥満を臨床症状とする premature chromatid separation (PCS) 症候群であった。この患者には *BUB1B* 胚細胞遺伝子がみられた。*BUB1B* は, 細胞分裂中期において染色体の正常な分配を制御するチェックポイント遺伝子の一つであるが, その変異が PCS 症候群の原因である¹⁾。

最近, 次世代シーケンサーを使用した家族性腫瘍家系の分析から, Wilms 腫瘍の原因となる *WT1* 以外の胚細胞遺伝子変異が発見された。Hanks ら⁹⁾は, 家族性 Wilms 腫瘍 35 家系を分析し, 3 家系に RNA polymerase II を制御する *CTR9* 遺伝子の変異を同定した。一方 Perlman 症候群は過成長と Wilms 腫瘍の好発を特徴とするが, 原因遺伝子として *DIS3L2* が同定された¹⁰⁾。*DIS3L2* は RNA を切断する exonuclease 活性をもち, RNA 代謝を制御している。また, 成長不良, 顔面の母斑, Wilms 腫瘍の好発を特徴とする Bohring-Opitz 症候群の原因遺伝子として *ASXL1* が同定された。この遺伝子は, 器官形成のマスター遺伝子である *HOX* 遺伝子群を制御しており, 骨髄系腫瘍で体細胞変異が報告されている。

おわりに

従来, Wilms 腫瘍の発生に *WT1* と *IGF2* が関与していることが知られていた。最近では, miRNA プロセッシング遺伝子である *DROSHA* や *DICER1* の変異により *LET7* などの miRNA の産生低下, *LET7* の発現低下による *LIN28B* 遺伝子の高発現, 部分初期化により腎前駆細胞に生じるエピジェネティック異常などが Wilms 腫瘍の発生にかかわることがわかってきた。Wilms 腫瘍は臨床的に heterogeneous な疾患であるが, その背景にある多様な腫瘍化の分子機構が急速な勢いで

解明されようとしている。

文 献

- 1) 金子安比古: Wilms 腫瘍 (腎芽腫) の発生に関わるジェネティック・エピジェネティック異常, および遺伝性・両側性 Wilms 腫瘍の原因遺伝子. 日小児血がん会誌 51: 423-431, 2014
- 2) Huff V: Wilms' tumours: about tumour suppressor genes, an oncogene and a chameleon gene. Nat Rev Cancer 11: 111-121, 2011
- 3) Urbach A, Yermalovich A, Zhang J, et al: Lin28 sustains early renal progenitors and induces Wilms tumor. Genes Dev 28: 971-982, 2014
- 4) Torrezan GT, Ferreira EN, Nakahata AM, et al: Recurrent somatic mutation in *DROSHA* induces microRNA profile changes in Wilms tumour. Nat Commun 5: 4039-4049, 2014
- 5) Rakheja D, Chen KS, Liu Y, et al: Somatic mutations in *DROSHA* and *DICER1* impair microRNA biogenesis through distinct mechanisms in Wilms tumours. Nat Commun 2: 4802-4811, 2014
- 6) Ohnishi K, Semi K, Yamamoto T, et al: Premature termination of reprogramming in vivo leads to cancer development through altered epigenetic regulation. Cell 156: 663-677, 2014
- 7) Haruta M, Arai Y, Kaneko Y, et al: Duplication of paternal *IGF2* or loss of maternal *IGF2* imprinting occurs in half of Wilms tumors with various structural *WT1* abnormalities. Genes Chromosome Cancer 47: 712-727, 2008
- 8) Hu Q, Gao F, Tian W, et al: *Wt1* ablation and *Igf2* upregulation in mice result in Wilms tumors with elevated ERK1/2 phosphorylation. J Clin Invest 121: 174-183, 2011
- 9) Hanks S, Perdeaux ER, Seal S, et al: Germline mutations in the PAF1 complex gene *CTR9* predispose to Wilms tumour. Nat Commun 5: 4398-4404, 2014
- 10) Astuti D, Morris MR, Cooper WN, et al: Germline mutations in *DIS3L2* cause the Perlman syndrome of overgrowth and Wilms tumor susceptibility. Nat Genet 44: 277-284, 2012

* * *

Keywords: *IGF2*; *WT1*; uniparental disomy of 11p; penetrance rate; bilateral Wilms tumour; hereditary Wilms tumour

A high incidence of *WT1* abnormality in bilateral Wilms tumours in Japan, and the penetrance rates in children with *WT1* germline mutation

Y Kaneko^{*1,2}, H Okita², M Haruta^{1,2}, Y Arai³, T Oue², Y Tanaka², H Horie², S Hinotsu², T Koshinaga², A Yoneda², Y Ohtsuka², T Taguchi² and M Fukuzawa²

¹Department of Cancer Diagnosis, Research Institute for Clinical Oncology, Saitama Cancer Center, Ina, Saitama 362-0806, Japan;

²Japan Wilms Tumor Study Group (JWiTS), Itabashi-Ku, Tokyo 173-8610, Japan and ³Division of Cancer Genomics, National Cancer Center Research Institute, Chuo-Ku, Tokyo 104-0045, Japan

Background: Bilateral Wilms tumours (BWTs) occur by germline mutation of various predisposing genes; one of which is *WT1* whose abnormality was reported in 17–38% of BWTs in Caucasians, whereas no such studies have been conducted in East-Asians. Carriers with *WT1* mutations are increasing because of improved survival.

Methods: Statuses of *WT1* and *IGF2* were examined in 45 BWTs from 31 patients with *WT1* sequencing and SNP array-based genomic analyses. The penetrance rates were estimated in *WT1*-mutant familial Wilms tumours collected from the present and previous studies.

Results: We detected *WT1* abnormalities in 25 (81%) of 31 patients and two families, which were included in the penetrance rate analysis of familial Wilms tumour. Of 35 BWTs from the 25 patients, 31 had small homozygous *WT1* mutations and uniparental disomy of *IGF2*, while 4 had large 11p13 deletions with the retention of 11p heterozygosity. The penetrance rate was 100% if children inherited small *WT1* mutations from their fathers, and 67% if inherited the mutations from their mothers, or inherited or had *de novo* 11p13 deletions irrespective of parental origin ($P=0.057$).

Conclusions: The high incidence of *WT1* abnormalities in Japanese BWTs sharply contrasts with the lower incidence in Caucasian counterparts, and the penetrance rates should be clarified for genetic counselling of survivors with *WT1* mutations.

Wilms tumour (WT; OMIM 194070) arises from the developmental kidney (Rivera and Haber, 2005). Wilms tumour and retinoblastoma are typical embryonal tumours. The *WT1* gene was altered in <25% of sporadic WTs (Haruta *et al*, 2012), whereas the *RBI* gene was shown to be altered in >90% of hereditary and non-hereditary retinoblastoma (Leiderman *et al*, 2007), indicating genetic heterogeneity and homogeneity of WT and retinoblastoma, respectively. Bilateral WT is thought to be hereditary, and the germinal mutation of *WT1* located in 11p13 and alterations of

11p15 were reported in 17–38% and 55%, respectively, of bilateral WTs in the series reported from USA, UK and Australia (Huff, 1998; Scott *et al*, 2012; Hu *et al*, 2013). Carriers with *WT1* mutations are now increasing because multidisciplinary therapies have improved the survival rates of patients with bilateral WTs and those with a unilateral WT (UWT) with a *WT1* germline mutation (Royer-Pokora *et al*, 2008; Hu *et al*, 2013). The penetrance rates of *WT1*-mutant familial WT (FWT) are needed for genetic counselling of WT survivors. However, investigators have never examined

*Correspondence: Dr Y Kaneko; E-mail: kaneko@cancer-c.pref.saitama.jp

Received 30 September 2014; revised 24 December 2014; accepted 31 December 2014

© 2015 Cancer Research UK. All rights reserved 0007–0920/15