

Wilms 腫瘍の分子生物学：最新の知見

金子安比古, 春田 雅之

I はじめに

臓器を構成する組織は胎児期や出生直後に細胞分裂やアポトーシスによって複雑な制御を受け分化・成長する。この過程で胎児細胞の遺伝子に発現異常が生じると小児がんの発生がもたらされると考えられる¹⁾。特定の小児がんを好発する奇形症候群が知られている。組織の分化・成長と細胞の腫瘍化に共通の遺伝子が関与しており、その発現異常が腫瘍好発症候群を発生させているからである。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。この所見により、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てきたが、その仮説が分子生物学的に証明されつつある。

1 癌遺伝子、癌抑制遺伝子の構造異常とエピジェネティック異常

大多数のがんは、複数の遺伝子異常の蓄積の結果生じると考えられている。細胞のがん化にかかわる遺伝子には、癌遺伝子、癌抑制遺伝子、DNA 修復遺伝子が知られている。これまで、癌遺伝子と癌抑制遺伝子の発現異常はその構造異常によりが生じることが分かっていたが、最近、それ以外の機構としてエピジェネティック異常の役割が注目されている。エピジェネティクスとは「塩基配列の変化を伴わずに遺伝子を活性化したり、不活性化したりする機構」であり、個体の発

生・分化異常やがんの発生・進展にかかわっていることが明らかにされた²⁾。

2 *WT1* 遺伝子の機能と Wilms 腫瘍の発生

Wilms 腫瘍は小児の腎臓より発生する腫瘍で、その発生頻度は小児 1 万人に一人と報告されている。Wilms 腫瘍の 0.75% は Wilms tumor-aniridia-genitourinary malformation-mental retardation (WAGR) 症候群に合併して発生する³⁾。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 (図 1B)、この欠失領域から *WT1* 癌抑制遺伝子が単離された。*WT1* 異常は奇形を合併しない散発性 Wilms 腫瘍の 15~25% に報告されている。

WT1 遺伝子の大きさは約 50 kb であり、10 個のエキソンからなる。*WT1* 蛋白質の 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*, *P53* 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。*WT1* 遺伝子は、胎生期の後腎芽組織にある上皮細胞やネフロンで最も強く発現する。また、精巣、卵巣の原基である生殖隆起や、中皮細胞、脾臓、中枢神経の器官形成の特定の時期にも発現が認められる¹⁾。成人腎では podocyte のみに発現している。このことは *WT1* が腎泌尿生殖器系などの発生に重要な役割を担っていることを示している。泌尿生殖器以外の成人組織では肝、胸腺、脳、脊髄、骨髄幹細胞で発現がみられる。

Wilms 腫瘍を発生するモデルマウスの作成は成功していない。*WT1* ノックアウトマウスが作

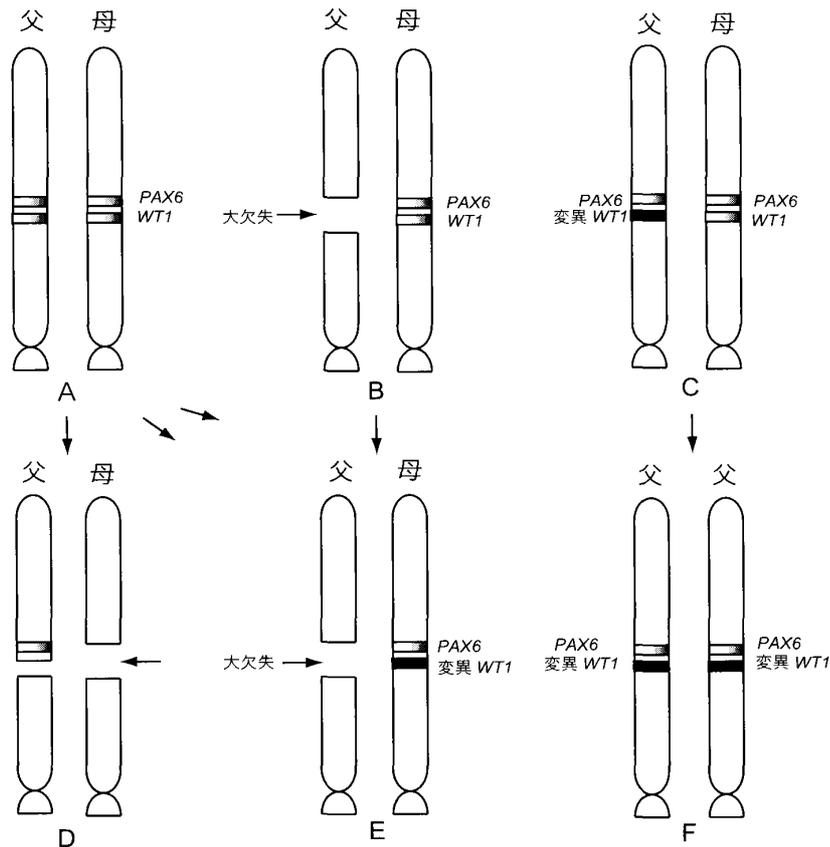


図1 Wilms 腫瘍患者の体細胞（上段）と腫瘍細胞（下段）の11番染色体の短腕（11p）を示す。A. 散発性 Wilms 腫瘍患者の11p. 11p13の *WT1* 遺伝子と *PAX6* 遺伝子は共に野生型（正常）である。B. WAGR 症候群の体細胞の11p. *WT1*と *PAX6*を含む大欠失が生じている。E. WAGR症候群に発生したWilms腫瘍の11p. 体細胞では野生型であった *WT1* アレルに点変異が生じている。C. Drash 症候群の体細胞の11p. 父由来 *WT1* アレルに点変異が生じている。F. Drash 症候群に発生した Wilms 腫瘍の11p. 母由来11pが欠失し、父由来11pが重複している。散発性 Wilms 腫瘍の11pはD, E, Fのいずれかの遺伝子型を示す。D. 両アレルの大欠失。E. 片アレルの大欠失と片アレルの点変異。F. 両アレルの点変異。父、母はそれぞれ父由来、母由来の11pを示す。

られているが、このマウスには腎が形成されず、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 を用いて腎形成の初期に *WT1* 発現を抑制すると細胞はアポトーシスに導入されるが、やや成熟して間充織が凝縮する時期に siRNA を作用させると分化が抑制され増殖が促進されたという。未熟腎細胞における *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¹⁾。

3 *WT1* 遺伝子と WAGR 症候群および Drash 症候群

WAGR 症候群 54 例の集計によると Wilms 腫瘍は 57%、虹彩欠損は 98%、泌尿生殖器異常は 76%、精神発達遅延は 72% にみられた。このように全ての患者が 4 症候を示すわけではない³⁾。虹彩欠損は *WT1* に近接する *PAX6* 遺伝子の欠失により生じる (図 1B)。WAGR 症候群に発生した Wilms 腫瘍を調べると片方の *WT1* アレルは顕微鏡レベルで検出可能な大きな欠失、もう片方のアレルには点変異が検出される (図 1E)。WAGR 患者は青年期以降に終末期腎症に進行することが多いので、臨床的にはそのフォローが重要である。

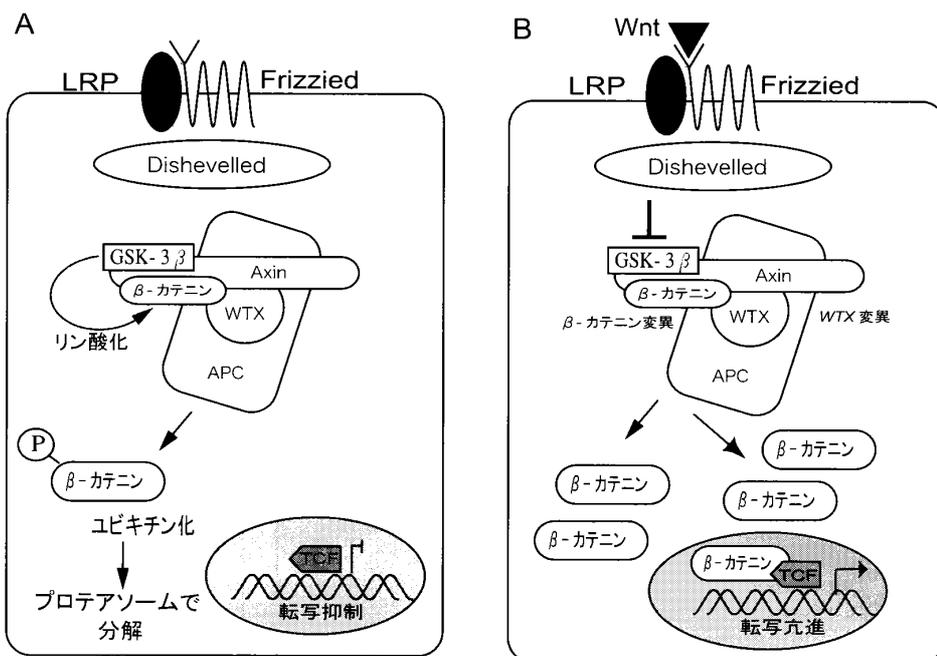


図2 正常細胞 (A) と Wilms 腫瘍細胞 (B) の Wnt/ β カテニンシグナル伝達系. A. β カテニンは APC-Axin-WTX 複合体に結合し, GSK-3 β によりリン酸化され, 次いでユビキチン化を受ける. その結果, プロテアソームで分解を受ける. B. Wilms 腫瘍細胞の約 15% に, β カテニン遺伝子の点変異がみられる. 変異はリン酸化部位に生じるので, β カテニンはリン酸化されず, 分解されないで細胞質に蓄積する. 次いで核に移行し, TCF と結合し, その転写活性を亢進する. WTX も複合体の 1 因子として, β カテニンのユビキチン化に働くので, その変異は β カテニンの細胞質における蓄積を促進する.

Drash 症候群は Wilms 腫瘍を合併するもうひとつの腫瘍好発症候群であり, 泌尿生殖器奇形, 早期腎不全を示す. この患者の体細胞には *WT1* 遺伝子の zinc finger ドメイン (構造) をコードする領域に点変異 (胚細胞変異) が発見される (図 1C). Drash 症候群に発生した Wilms 腫瘍を分析すると, 11 番染色体短腕の uniparental disomy が生じており, その結果もう片方の *WT1* アレルに同じ点変異がみられる (図 1F). WAGR 症候群と Drash 症候群は両側性 Wilms 腫瘍を発生しやすい.

4 *WTX* 遺伝子異常

DNA アレイは最近開発されたゲノム分析技術で腫瘍ゲノムに生じている染色体部分の増減を検出できる. Rivera 等は男児に発生した Wilms 腫瘍 26 例を分析し 5 例に Xq11.1 の欠失を発見した. 欠失領域にはただ一個の遺伝子が位置しており, これを *WTX* 遺伝子と名付けた⁴⁾. *WTX* 遺伝子は 1,135 アミノ酸をコードしており, マウス

では脳や腎臓に発現している. *WT1* と同様に *WTX* は胎児期の後腎間充織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いる. *WTX* 遺伝子も癌抑制遺伝子と考えられている.

Major 等は *WTX* 蛋白質が β カテニン, AXIN1, β TrCP2, APC などと複合体を形成することを示した (図 2A)⁵⁾. 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. WNT/ β カテニン・シグナル伝達系において Wnt シグナルは細胞増殖を促進する (図 2B). *WTX* はこの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. *WT1* 異常をもつ Wilms 腫瘍の半数に β カテニン遺伝子の変異がみられる. この変異は β カテニンのユビキチン結合部位をコードする領域に集中して発生する. 変異の結果, β カテニンはユビキチンによる分解を受けなくなるので, 細胞質に蓄積し, 核に移行する (図 2B). 核において

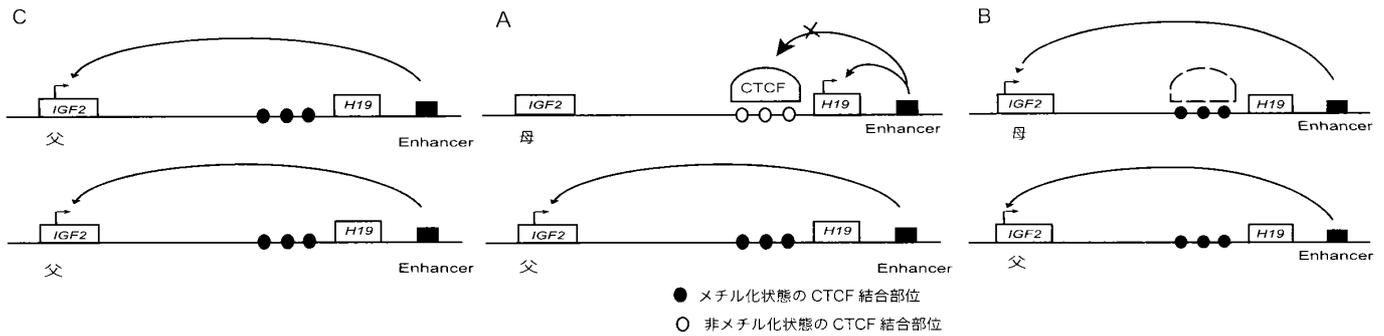


図3 *H19* 遺伝子上流 differentially methylated region (DMR) にある CTCF (insulator 蛋白質) 結合部位のメチル化と *IGF2* 遺伝子の発現. A. 正常体細胞の母由来アレルでは, CTCF 結合部位が非メチル化状態であり, CTCF が結合する. *H19* 下流からのエンハンサーシグナルは CTCF で遮断されるため, *H19* が発現する. 父由来アレルでは CTCF 結合部位がメチル化状態であり, CTCF が結合できない. エンハンサーシグナルは *IGF2* を発現させる. B. Wilms 腫瘍の 30-70% 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. C. Wilms 腫瘍の 30-40% では, 母方 *IGF2* アレルが失われ, 父方 *IGF2* アレルが重複している. これを uniparental disomy (UPD) と呼ぶ.

TCF などの転写因子と結合し, 標的遺伝子の発現を亢進させる. *WTX* 異常を示す腫瘍に β カテニン変異は証明されていない. 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.

Rivera 等は, 次いで 51 例の Wilms 腫瘍を分析し, 11 例に *WTX* 欠失, 4 例に点変異を認め, 29.4% に *WTX* 異常があると報告した. また, *WTX* 異常のある腫瘍に *WT1* 遺伝子異常はなかったと述べた. 2008 年になって Wilms 腫瘍における *WTX* 異常の頻度がふたつのグループより報告された. Ruteshouser 等は 125 例中 19 例 (15.2%), Perotti 等は 102 例中 7 例 (7%) に *WTX* 異常を発見した^{6,7)}. 私たちも同様な分析を実施しているが, やはり Rivera 等の報告よりも低い頻度であることを確認している. また, Ruteshouser 等と同様に同一の腫瘍に *WTX* 異常と *WT1* 異常を合併することを発見した.

5 *IGF2* (insulin-like growth factor 2) 遺伝子

IGF2 は胎児期に働く細胞増殖因子遺伝子であり, 胎児腎で発現しているが, 出生後の腎では発現しない. 細胞増殖にかかわるので, 癌遺伝子と考えてよい. *IGF2* と *H19* の両遺伝子は 11 番染

色体短腕 p15.5 に隣り合って位置し, 刷り込み (imprinting) を受ける (図 3A). すなわち正常細胞では, *IGF2* は父由来のアレルからのみ, *H19* は母由来のアレルからのみ発現する⁸⁾.

H19 遺伝子の上流には DMR (differentially 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 3A). 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.

Wilms 腫瘍において *IGF2* 発現アレルの親由来を調べると, 30~70% の腫瘍で両親由来のアレルが発現している⁸⁾. つまり, 母由来アレルの刷り込みが消失し, 両親由来の *IGF2* アレルが発現している. これを loss of imprinting (LOI) と呼ぶ (図 3B). これとは別に, Wilms 腫瘍では, *IGF2* 領域の loss of heterozygosity (LOH) が 30~40% の腫瘍に認められる (図 3C). *IGF2* LOH の際に欠失するのは母方アレルであり, セ

セントロメア領域で生じた mitotic recombination により父方アレルが重複している (図 3C). これを uniparental disomy (UPD) と呼ぶ. その結果, *IGF2* の LOI や UPD を示す腫瘍では *IGF2* 発現アレルが倍加し, 過剰発現するために, 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⁸⁾.

これまで, Wilms 腫瘍は *WT1* 異常型腫瘍と *IGF2* 異常型腫瘍に分類できると考えられていた. 私たちは 113 例の Wilms 腫瘍を分析し, *WT1* 異常のあった 36 例について, *IGF2* 遺伝子の異常を合わせて分析した. その結果, 父方 *IGF2* 領域が倍加する uniparental disomy (図 3C) が 16 例, LOI (図 3B) が 2 例, 正常インプリント ROI (図 3A) が 18 例にみられた. つまり, *WT1* 異常型腫瘍の半数に, 過剰発現の原因になる *IGF2* のジェネティックおよびエピジェネティック異常を発見した⁹⁾. これらの腫瘍では, *WT1* 異常の発生した後に *IGF2* 異常が発生したと考えられるので, *IGF2* の過剰発現が腫瘍の進展に役割を果たしていると考えられた.

6 *IGF2* 遺伝子と Beckwith-Wiedemann (B-W) 症候群

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 11p15.5 に決められた. この領域には *IGF2* や *H19* の他にも様々な刷り込み遺伝子が位置している. B-W 症候群では, 11p15 のテロメア側にある *KIP2/LIT1* 領域か, セントロメア側にある *IGF2/H19* 領域のどちらかの刷り込み遺伝子群に異常がある. *KIP2/LIT1* 領域では, 母方 *LIT*-DMR の非メチル化が, *IGF2/H19* 領域では母方 *H19*-DMR のメチル化が, つまり, どちらのドメインにおいても, 母方アレルが父方アレルの特徴を獲得することが, B-W 症候群の発生をもたらす¹⁰⁾. 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. 胎児性腫瘍の合併は多くの

場合, *IGF2-H19* 遺伝子群の異常により発生する B-W 症候群に報告されている. B-W 症候群の一部に CTCF 結合部位の DNA 欠失を示す家系が知られている. この欠失が母由来である時のみに, B-W 症候群は発生する.

II おわりに

小児固形腫瘍は胎児期の器官形成に携わる遺伝子の異常により発生すると予想される. 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, 証明されつつある. Wilms 腫瘍の発生に関わる遺伝子群の解明は, 腎の発生機構の解明に繋がるので, 再生医療へ応用できるのではないかと, 期待される.

文 献

- 1) Scotting PJ, et al. Childhood solid tumours: a developmental disorder. *Nat Rev Cancer* 5 : 481, 2005
- 2) 押村光雄編: わかる実験医学シリーズ, 注目のエピジェネティクスがわかる. 羊土社, 2004
- 3) 金子安比古: WAGR 症候群. 内分泌症候群 (第 2 版), 別冊日本臨床, No. 3 605, 2006
- 4) Rivera MN et al. An X chromosome gene, *WTX*, is commonly inactivated in Wilms tumor. *Science* 315 : 642, 2007
- 5) Major MB et al. Wilms tumor suppressor *WTX* negatively regulates WNT/beta-catenin signaling. *Science* 316 : 988, 2007
- 6) Ruteshouser EC et al. Wilms tumor genetics: mutation in *WT1*, *WTX*, and *CTNBN1* account for only about one-third of tumors. *Gene Chromosomes Cancer* 47 : 461, 2008
- 7) Perotti D et al. Functional inactivation of the *WTX* gene is not a frequent event in Wilms' Tumors. *Oncogene* 27 : 4625, 2008
- 8) Feinberg AP, Tycko B. The history of cancer epigenetics. *Nat Rev Cancer* 4 : 143, 2004
- 9) 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. *Gene Chromosomes Cancer* 47 : 712, 2008
- 10) 副島英伸, 他: Beckwith-Wiedemann 症候群の分子遺伝学. *細胞*, 36 : 278, 2004