

学位論文題名

Two candidate tumor suppressor genes, *MEOX2* and *SOSTDC1*, identified in a 7p21 homozygous deletion region in a Wilms tumor

(ウィルムス腫瘍で発見された 7p21 のホモ欠失領域に、
2 つの候補腫瘍抑制遺伝子 *MEOX2* と *SOSTDC1* が同定された。)

学位論文内容の要旨

【背景と目的】

Wilms 腫瘍 (WT) は乳幼児期に発症する代表的な胎児性腫瘍であり、先天奇形の合併例や家族性発症例が報告されている。WT 細胞は様々な染色体異常を伴うことが知られ、発生に複数の遺伝子異常の関与が示唆されている。WT の原因遺伝子としては *WT1* (11p13) や *IGF2* (11p15.5)、*WT3* (16q24)、*WTX* (Xq11.1) などが知られているが、その他に WT では +7, 7p-, i(7q) などの 7 番染色体異常が 10-27% と高率に認められ、未知の原因遺伝子が同領域に想定されている。本研究では SNP アレイにより WT 腫瘍細胞のゲノム増減を俯瞰的に解析し、7p 領域の遺伝学的解析により原因遺伝子を見出すことを目的とした。

【対象と方法】

両側性 3 例を含む 97 症例の同腫瘍 100 検体を対象とし、SNP アレイ解析により各染色体コピー数の増減を解析した。7p21 領域のホモ欠失が示された 1 例に対し、同領域と周辺の 5 遺伝子 (*ARL4A*, *ETV1*, *DGKB*, *MEOX2*, *SOSTDC1*, *TSPAN13*) の real-time PCR 法による genome DNA 定量を行った。さらに 7p21 ホモ欠失領域の 10 遺伝子 (*LOC100131022*, *ETV1*, *DGKB*, *TMEM195*, *MEOX2*, *LOC729920*, *LOC100129771*, *SOSTDC1*, *LOC100129335*, *ANKMY2*) について、WT 細胞株 3 種類と胎児腎、正常腎細胞を対象として RT-PCR を行った。*MEOX2*, *SOSTDC1* の両遺伝子についてはダイレクトシーケンス法による変異解析を行った。*MEOX2* のプロモーター領域に位置する 3 つの CpG island について、メチル化特異的 PCR 法によるメチル化解析を行った。*MEOX2*, *SOSTDC1* について WT 腫瘍検体 22 例で RT-PCR による mRNA 発現解析を行った。以上の結果を Student's *t* 検定および χ^2 検定、Mann-Whitney's *U* 検定を用いて Statcel 2 ソフトを用いて統計学的に解析した。

【結果】

SNP アレイ解析で WT100 例中 9 例の 7p 異常 (欠失ないしは片親性ダイソミー) を認めた。また 7p 異常 9 例中 1 例で 7p21 領域のホモ欠失を認め、過去の別な報告におけるホモ欠失例と 2.1Mb の領域で重複していた。ホモ欠失領域の 10 遺伝子における WT 腫瘍株 3 例と正常胎児腎を対象とした RT-PCR 解析では、*MEOX2* と *SOSTDC1* の 2 遺伝子で腫瘍細胞での mRNA 発現が低下ないしは消失していることがわかった。WT 腫瘍検体 (n=100) にて両遺伝子の変異解析を行ったところ、2 例に *SOSTDC1* のミスセンス変異 (L50F、Q129L) を認めた。2 例における L50F 変異は胚細胞変異であることがわかった。*MEOX2* では転写開始点より +105 の CpG island のメチル化が発現と相関することがわかり ($P=0.098$)、WT 腫瘍検体 (n=22) に対する RT-PCR では 7p 異常例 (n=4) で *MEOX2* が有意に低発現であることが判明した ($P=0.017$)。また 7p 異常と *SOSTDC1* 変異を伴う群 (n=5) で

有意に *SOSTDC1* が低発現であった ($P=0.056$)。7p 異常例 ($n=9$) において特異的な臨床像との相関はなかったが、7p 異常の有無と *IGF2* 増幅機構 (インプリンティング喪失または片親性ダイソミー) の有無とに相関を認めた ($P=0.028$)。

【考察】

今回 SNP アレイ解析により 100 例の Wilms 腫瘍のうち 9 例 (9%) に 7p のヘミ欠失ないしは 7p の片親性ダイソミーを認め、さらに 7p21-3-21.1 領域に 4.3Mb の微細なホモ欠失があることがわかった。同領域は過去に報告のある別の 4.1Mb のホモ欠失領域と一部重複しており、10 の遺伝子をコードしているが、このうち我々は WT 細胞株における RT-PCR で発現低下ないしは消失を示した *MEOX2* と *SOSTDC1* という 2 つの遺伝子に着目した。

MEOX2 の発現は転写開始点から +105 の塩基から始まる CpG island のメチル化により制御されている可能性が示唆され、さらに 7p 異常例では有意に同遺伝子の発現が低下していることが示された。*MEOX2* は血管内皮細胞を制御し、特に静止細胞で発現することから古くより growth arrest-specific homeobox (Gax) gene の別名でも知られてきた。近年、同遺伝子はサイクリン依存性キナーゼ 2 の活性を減弱させる *CDKN1A* を促進的に制御して、結果として血管平滑筋の細胞周期を抑制することがわかり、また *CDKN1A* とは別の経路を介してアポトーシスを誘導することもわかってきた。さらに、*MEOX2* は NF- κ B の標的遺伝子を抑制的に制御し、NF- κ B の結合を妨げていることがわかった。こうした報告は、同遺伝子の欠失が腫瘍組織における血管形成を促進する可能性を支持するものである。

一方 *SOSTDC1* では WT100 例中 4 例でミスセンス変異を認めた。変異を認めた塩基が進化的に保存性が高いことがわかり、機能的に重要な変異である可能性があると考えられた。さらに *SOSTDC1* 変異例または 7p 欠失例では同遺伝子の発現が有意に低下ないしは消失していた。*SOSTDC1* は骨形成蛋白 (BMP) の拮抗体で、最近 LDP 6 への結合を介して Wnt シグナル経路を抑制的に制御することが明らかになった。また同遺伝子が正常腎細胞で高発現しているのに対し腎明細胞癌では発現が低下していることもわかった。Wnt シグナル経路は β カテニンの蓄積や APC/WTX 複合体の形成など、Wilms 腫瘍の腫瘍増殖に関わる重要な経路であり、これらの報告は *SOSTDC1* の欠失や変異による発現低下が Wnt シグナルの活性化を導き、その結果腫瘍増殖シグナルを促進するという構図を支持している。

過去に 7p の候補遺伝子としては、7p14 に坐位する POU6F や PTH-B1 が報告されてきた。今回の我々のデータとこれらの報告は、7p 領域には複数の腫瘍抑制遺伝子が存在し、各々の異常が多彩な病像や heterogeneous な病因を形成していることを示唆している。今回の研究では、7p の異常と臨床像、WT1 の異常との相関は示されなかったが、7p 異常例全例で何らかの *IGF2* 増幅機構を合併していたことは興味深い。今回ホモ欠失を認めた例は一卵性双胎発症例の一方の例であるが、両者で同じ WT1 変異があったのに対し 7p 欠失は一方にしか認められなかった。過去の報告においても両側性 WT 例で WT1 異常が両側に認められるのに対し 7p 異常は片側にしか認められておらず、こうしたデータから 7p 異常は、WT1 や *IGF2* 異常の後に引き続いて発生する遅発性のイベントであると考えられる。

【結果】

7p21 に位置する *MEOX2*, *SOSTDC1* の両遺伝子が Wilms 腫瘍の腫瘍形成に関与する重要な候補腫瘍抑制遺伝子であることが示された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 佐々木 文 章

副 査 教 授 有 賀 正

副 査 教 授 田 中 伸 哉

学位論文題名

Two candidate tumor suppressor genes, *MEOX2* and *SOSTDC1*, identified in a 7p21 homozygous deletion region in a Wilms tumor

(ウィルムス腫瘍で発見された 7p21 のホモ欠失領域に、

2 つの候補腫瘍抑制遺伝子 *MEOX2* と *SOSTDC1* が同定された。)

Wilms 腫瘍 (WT) の細胞は様々な染色体異常を伴い、原因遺伝子として知られている *WT1* (11p13) や *IGF2* (11p15.5)、*WTX* (Xq11.1) 以外に +7, 7p-, i(7q) などの 7 番染色体異常が 10-27% に認められ、未知の原因遺伝子が同領域に想定される。本研究では 97 例の同腫瘍 100 検体を対象に SNP アレイ解析による各染色体コピー数解析を行い、得られた 7p 異常例のデータを基に同領域に位置する候補遺伝子の解析を行ったものである。7p 異常 (欠失ないしは片親性ダイソミー) 例は 9 例 (9%) で、さらに 1 例では 7p21 領域のホモ欠失を認めた。real-time PCR 法によるゲノム定量により示された 4.3Mb の欠失領域に位置する 10 の遺伝子に対し、WT 細胞株と胎児腎、正常腎細胞における発現解析を行い、腫瘍細胞の mRNA 発現が低下していた *MEOX2* と *SOSTDC1* の 2 遺伝子を解析対象とした。2 例で *SOSTDC1* の胚細胞変異 (L50F) を認めた。RT-PCR で 7p 異常例 ($P=0.017$) と、*MEOX2* のプロモーター領域メチル化 ($P=0.098$) が *MEOX2* の低発現と相関し、さらに 7p 異常と *SOSTDC1* 変異群で有意に *SOSTDC1* が低発現であった ($P=0.056$)。また 7p 異常と *IGF2* 増幅機構の有無に相関を認めた ($P=0.028$)。 *MEOX2* は *p21* の転写因子として細胞周期を抑制し、さらに NF- κ B の標的遺伝子を制御しており、同遺伝子の欠失が腫瘍増殖や血管形成が促進する可能性がある。また *SOSTDC1* は Wnt シグナル経路を抑制的に制御しており、発現低下が腫瘍増殖シグナルを導く可能性がある。7p 異常例の一卵性双胎の WT 発症例では 7p 異常が認められず、こうした 2 遺伝子の機能と併せ 7p 異常が腫瘍発生の late event として機能していることが示唆されている。

以上の研究結果を審査・質疑応答により検証した。質疑は 1) WT の組織像との関連 (田中教授)、2) 2 つの遺伝子の機能解析などの展望 (田中教授)、3) 両側性 WT における *WT1* の変異 (有賀教授) 4) メチル化異常や胚細胞変異の有無と late event としてのメカニズム (有賀教授)、5) WT の発生における *WT1* と 7p 異常の構図の全体像 (佐々木教授) の 5 点であった。以下に各質疑に対する応答を記す。1) 今回の対象症例には古い例が含まれ、症例数が多く得られた反面、病理診断の細分類が一定しないというというデメリットがあった。日本ウィルムス腫瘍スタディグループの中央病理診断が得られているのは半数未満であり、組織像との比較検討は難しい。予後不良因子である Anaplastic tumor は 1 例も認めなかった。2) 機能実験については具体的な計画段階ではないが、特に *SOSTDC1* 変異については細胞増殖との関連や *SOSTDC1* の蛋白結合性など、興味深いテーマが残され

ており可能な限り取り組んでいきたい。3) 両側性 WT の WT1 変異は記憶する限りでは両側に認めていた。WT1 は early event として発生に関わる遺伝子であり、その個体に生じた胚細胞変異であると考えて矛盾しない。4) *SOSTDC1* の変異は胚細胞変異であるにも関わらず late event として考察することには確かに矛盾があり、機能実験も含め今後の課題である。5) *WT1*, *WTX* の異常を有する症例は見解も異なり議論の最中ではあるが、現時点では一個体の腫瘍発生イベントとしては必須の条件であろうと考えられる。一方で IGF2 は単独で腫瘍が発生するようなイベントであるかという疑問がある。今回のデータからは、7p の異常は腫瘍発生の独立した必要条件ではなく、また 7p の責任領域も 7p15-21 領域以外に 7p14 の候補遺伝子の報告があることから、heterogeneous な疾患である WT の腫瘍発生において supportive に機能する複数の因子の一つとして捉えられるのではと考えている。

以上の学位論文および公開発表の内容を検討し、この論文が小児の固形腫瘍である Wilms 腫瘍の発生・進展の原因となる遺伝的素因とエピジェネティクスな解析として高く評価された。本研究が本腫瘍のメカニズムの全容の解明に寄与し、今後、今回扱われた 2 遺伝子の発現低下、変異、メチル化の異常などを起因とするがん抑制遺伝子としての機能喪失が、本腫瘍の増殖のみならず成人も含めた他の悪性腫瘍との関連が示唆される可能性も期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。