

学位論文題名

Cryptic translocation t(12;15)(p13;q26) producing *ETV6-NTRK3* fusion gene and no loss of *IGF2* imprinting in congenital mesoblastic nephroma with trisomy 11:FISH and *IGF2* allelic expression analysis

(トリソミー11を伴う先天性間葉性腎芽腫における FISH 法による微小転座 t(12;15)(p13;q26)の検出と *IGF2* アレル発現分析)

学位論文内容の要旨

先天性間葉性腎芽腫は小児腎腫瘍の5%を占める予後良好な腫瘍である。病理組織学的に富細胞型と線維型に分類されるが、前者にのみ手術後再発する症例が知られている。富細胞型には特異的な染色体異常として11トリソミー、分子生物学的異常として *ETV6-NTRK3* 融合遺伝子が知られており、これらは同時に起こるとされている。しかしながら *ETV6-NTRK3* 融合遺伝子を形成する t(12;15)(p13;q26) は、転座切断点である12p13と15q26がともに染色体末端に位置するため従来の染色体分析では通常検出できない。今回、*ETV6*、*NTRK3*、11番セントロメアをプローブに用いて FISH 分析を行い、t(12;15)(p13;q26)及び11トリソミーを検出した。次にトリソミー11と *ETV6-NTRK3* 融合遺伝子が同時に発生する理由について、11番染色体上で通常父性発現する *IGF2* の両性発現(インプリンティングの喪失(LOI))が関与していると考え *IGF2* アレル発現分析を行った。またトリソミー11を伴った急性骨髄性白血病では11番染色体上の *MLL* の再構成がみられるため、トリソミー11を伴う先天性間葉性腎芽腫において同様の所見が存在するかどうかを知るためにサザン分析を行った。

<対象・方法> 対象は1985年から2001年に先天性間葉性腎芽腫と診断された日本人小児6例である。患者年齢は新生児から生後4ヵ月で、性別は男児4例、女児2例であった。病理組織型は富細胞型が2例、混合型が1例、線維型が3例であった。*ETV6*、*NTRK3*をそれぞれ含むプローブ、11番染色体セントロメアプローブ、15番ペインティングプローブを用いて FISH を行なった。また RT-PCR 法で *ETV6-NTRK3* 転写産物の有無を分析した。*IGF2* 中の RFLP 部位をはさむプライマーと腫瘍 DNA, RNA を用いて PCR を行い、アレル発現を分析し、LOIの有無を検討した。サザン法で *MLL* 再構成を分析した。

<結果> 間期核 FISH 法で *ETV6-NTRK3* 融合シグナルを富細胞型及び混合型の全3症例に証明した。うち2症例は、分裂期 FISH で従来の染色体分析では明らかにできな

った染色体転座を明らかにできた。1例は $t(12;15)(p13;q26)$ 微少転座、もう1例は $ins(12;15)(p13;q22q26)$ 挿入であった。線維型の全3症例では *ETV6-NTRK3* のシグナル融合を認めなかった。RT-PCR法により、*ETV6-NTRK3* 融合 mRNA を富細胞型と混合型の3例に証明したが、線維型には証明できなかった。11番染色体セントロメアプローブを用いた FISH で *ETV6-NTRK3* 融合シグナルを伴う富細胞型及び混合型の3症例は全て、11トリソミーまたはテトラソミーを示した。*IGF2* アリルの発現を、富細胞型及び混合型の2症例、線維型2症例について解析し、全例 LOI を示さなかった。またサザン分析の結果、全例が *MLL* 再構成を示さなかった。

<考案> 染色体分染法で、これまで多数分析された先天性間葉性腎芽腫において $t(12;15)(p13;q26)$ を明らかにできたのはわずか1例に過ぎない。今回、我々は FISH 法を用いる事によって、従来の染色体分染法では解析が困難であった染色体転座を明らかにできた。その異常は、1例が $t(12;15)(p13;q26)$ 微少転座、もう1例が $ins(12;15)(p13;q22q26)$ 挿入であった。先天性間葉性腎芽腫において *ETV6* のプローブのみを用いて転座を論じた報告はあるが、*ETV6*、*NTRK3* のプローブを同時に使い、*ETV6-NTRK3* 融合遺伝子の存在を染色体レベルで明らかにできたのは今回が初めてである。また FISH 法により *ETV6-NTRK3* 融合遺伝子とトリソミーまたはテトラソミー11を同時に検出する事ができた。

RT-PCR法によっても *ETV6-NTRK3* 融合 mRNA を富細胞型と混合型の3例に確認した。合わせて *NTRK3-ETV6* mRNA の有無を検討したが、過去の報告同様にこの mRNA は証明されなかった。Knezevich らによると *NTRK3-ETV6* 蛋白は *ETV6-NTRK3* 発癌蛋白に対し抑制的に作用するのではないかと推測している。なぜ先天性間葉性腎芽腫において全例でこの *NTRK3-ETV6* mRNA が欠落するのか今後検討が必要である。

先天性間葉性腎芽腫では *ETV6-NTRK3* 融合遺伝子に伴ってトリソミー11をほぼ全例で認める。ウィルムス腫瘍や横紋筋肉腫などの胎性期癌では、11番染色体上で通常父性発現する *IGF2* の両性発現（インプリンティングの喪失、LOI）が生じており、腫瘍の発生や進展に関与している。同様の所見が先天性間葉性腎芽腫においてみられるかどうか分析を行ったが、LOI は認められなかった。父由来の11番染色体の増加により *IGF2* が過剰発現している可能性は否定できないが、このことから *IGF2* は、先天性間葉性腎芽腫において腫瘍の発生や進展に大きな役割を果たしているとは言えないと考えた。

またトリソミー11を伴った急性骨髄性白血病では11番染色体上の *MLL* の再構成がたびたび報告されている。トリソミー11を伴う先天性間葉性腎芽腫にも同様の所見がみられるかどうかを検討するため3例にサザン法を用いて *MLL* 分析を行ったが、*MLL* 再構成は認められなかった。

トリソミーを認める腫瘍、例えばトリソミー21を伴う急性骨髄性白血病では21番染色体長腕上の遺伝子 *AML1* の変異を認めるなど該当する染色体上の癌関連遺伝子の異常が指摘される事が多い。トリソミー11を伴う先天性間葉性腎芽腫では今回11番染色体上の遺伝子 *IGF2* と *MLL* について検討を行い、これらに異常を認めなかった。しかし11番染色体上に何らかの異常を有する遺伝子が存在している可能性が高く、今後検討する必要がある。

この研究により、FISH 法により、富細胞型及び混合型と線維型の鑑別を、細胞遺伝学的に容易に行える事を明らかにできた。今後、先天性間葉性腎芽腫の診断に活用できると考える。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小 林 邦 彦
副 査 教 授 今 村 雅 寛
副 査 教 授 佐々木 文 章

学 位 論 文 題 名

Cryptic translocation t(12;15)(p13;q26) producing *ETV6-NTRK3* fusion gene and no loss of *IGF2* imprinting in congenital mesoblastic nephroma with trisomy 11:FISH and *IGF2* allelic expression analysis

(トリソミー11を伴う先天性間葉性腎芽腫における FISH 法による
微小転座 t(12;15)(p13;q26)の検出と *IGF2* アレル発現分析)

先天性間葉性腎芽腫は小児腎腫瘍の 5%を占める予後良好な腫瘍である。病理組織学的に富細胞型と線維型に分類されるが、前者にのみ手術後再発する症例が知られている。富細胞型には特異的な染色体異常として 11 トリソミー、分子生物学的異常として *ETV6-NTRK3* 融合遺伝子が知られており、これらは同時に起こるとされている。しかし、*ETV6-NTRK3* 融合遺伝子を形成する t(12;15)(p13;q26) は、転座切断点である 12p13 と 15q26 がともに染色体末端に位置するため従来の染色体分析では通常検出できない。申請者は、*ETV6* , *NTRK3* , 11 番セントロメアをプローブに用いた FISH 分析を行い、t(12;15)(p13;q26)及び 11 トリソミーの検出を試みた。さらにトリソミー 11 と *ETV6-NTRK3* 融合遺伝子が同時に発生する理由について、11 番染色体上で父性発現する *IGF2* の両性発現 (imprinting の喪失 (LOI)) の可能性を RT-PCR 法で、またトリソミー 11 を伴った急性骨髄性白血病では 11 番染色体上の *MLL* の再構成があることから、その関与を考え *MLL* 再構成をサザン分析で行った。対象は 1985 年から 2001 年に先天性間葉性腎芽腫と診断された日本人小児 6 例で、病理組織型は富細胞型 2 例、混合型 1 例、線維型 3 例である。間期核 FISH 法で *ETV6-NTRK3* 融合シグナルを 富細胞型及び混合型の全 3 症例に証明した。うち 2 症例は、分裂期 FISH で従来の染色体分析では明らかにできなかった染色体転座で、1 例は t(12;15)(p13;q26) 微少転座、もう 1 例は ins(12;15)(p13;q22q26) 挿入であった。線維型の全 3 症例では *ETV6-NTRK3* のシグナル融合を認めなかった。*ETV6-NTRK3* 融合 mRNA は富細胞型と混合型の 3 例に認めたが、線維型には認めなかった。11 番染色体セントロメアプローブの FISH で *ETV6-NTRK3* 融合シグナルを伴う富細胞型及び混合型の 3 症例全てに、11 トリソミーまたはテトラソミーを認めた。*IGF2* アレルの発現は、富細胞型、混合型および 線維型の全例に LOI を認めなかった。またサザン分析の結果、全例が *MLL* 再

構成を示さなかった。これまで染色体分染法で多数分析された先天性間葉性腎芽腫において t(12;15)(p13;q26) を明らかにできたのはわずか1例に過ぎない。申請者は今回の FISH 法で、従来の染色体分染法では解析が困難であった染色体転座を明らかにした。1例は t(12;15)(p13;q26) 微小転座、もう1例は ins(12;15)(p13;q22q26)であった。また、FISH 法で *ETV6-NTRK3* 融合遺伝子の存在を染色体レベルで初めて明らかにするとともに、トリソミーまたはテトラソミー11も同時に検出する事ができた。*ETV6-NTRK3* 融合 mRNA 発現を富細胞型と混合型の3例に確認したが、その reciprocal 転写産物である *NTRK3-ETV6* mRNA は、過去の報告同様に証明されなかった。Knezevich らによると *NTRK3-ETV6* 蛋白は *ETV6-NTRK3* 発癌蛋白に対し抑制的に作用するのではないかと推測している。なぜ先天性間葉性腎芽腫において全例でこの *NTRK3-ETV6* mRNA が欠落するのか今後検討が必要である。先天性間葉性腎芽腫では *ETV6-NTRK3* 融合遺伝子に伴ってトリソミー11をほぼ全例で認める。ウィルムス腫瘍や横紋筋肉腫などの胎性期癌では、11番染色体上で通常父性発現する *IGF2* の両性発現 (LOI) が生じており、腫瘍の発生や進展に関与している。しかし、先天性間葉性腎芽腫では、LOIは認められなかった。ただし、父由来の11番染色体の増加により *IGF2* が過剰発現している可能性は否定できない。またトリソミー11を伴った急性骨髄性白血病では11番染色体上の *MLL* の再構成がたびたび報告されているが、先天性間葉性腎芽腫では *MLL* 再構成は認められなかったことから、この遺伝子の関与は否定される。トリソミーを認める腫瘍、例えばトリソミー21を伴う急性骨髄性白血病では21番染色体長腕上の遺伝子 *AML1* の変異を認めるなど該当する染色体上の癌関連遺伝子の異常が指摘される事が多い。トリソミー11を伴う先天性間葉性腎芽腫では今回11番染色体上の遺伝子 *IGF2* と *MLL* に異常を認めなかったが、11番染色体上に何らかの異常を有する遺伝子が存在している可能性が高く、今後検討する必要がある。

公開発表に際し、副査の今村教授から、転座の違いと予後の関係、11番染色体トリソミー検出率、癒合遺伝子と11番染色体トリソミーがおこるメカニズム、診断治療における有用性について、の質問があった。ついで、副査の佐々木教授から、富細胞型と線維型腫瘍の異同について、過去の報告と異なる今回の結果の解釈、11番染色体の重要性について、鑑別診断についての質問があった。最後に、主査の小林教授から、reciprocal fusion 遺伝子が検出されない理由とその意義、トリソミーと遺伝子融合が同時に起こるメカニズムに関する質問があったが、何れに対しても、自らの実験結果と文献を引用し、概ね妥当な回答を行った。

この研究は先天性間葉性腎芽腫の鑑別や組織的に鑑別困難な明細胞肉腫を、細胞遺伝学的に容易に行える事を明らかにし、今後、先天性間葉性腎芽腫の診断・予後判定に活用できると期待される。

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。