

学位論文題名

MUTATIONS/DELETIONS OF THE *WT1* GENE,
LOSS OF HETEROZYGOSITY ON CHROMOSOME
ARMS 11P AND 11Q, CHROMOSOME PLOIDY,
AND HISTOLOGY IN WILMS' TUMORS IN JAPAN

(本邦ウイラムス腫瘍における組織型と染色体分析、
11番染色体短腕及び長腕での LOH 分析、*WT1* 遺伝子異常との解析)

学位論文内容の要旨

【目的】

Wilms 腫瘍は小児特有の腎原発腫瘍であるが、その発生頻度は日本をはじめアジアで低く、欧米の 1/2~1/3 に過ぎない。この人種間格差は 11p13 から単離された Wilms 腫瘍のがん抑制遺伝子である *WT1* 異常の人種間格差によるとする仮説を提唱し、*WT1* 遺伝子異常について解析をおこない、以下の検討をした。

1. *WT1* 異常を示すウイラムス腫瘍の発生頻度は日欧間で異なるか?
2. *WT1* 異常を示すウイラムス腫瘍の染色体、組織像、臨床像に特徴はあるか?
3. 日本と欧米のウイラムス腫瘍の発生頻度が異なるのは何故か?

【対象と方法】

対象は生後 3 か月から 10 歳までの本邦のウイラムス腫瘍 108 検体(105 例)で、7 例の先天異常合併例(WGAR 症候群 4 例、うち、両側腎原発 1 例、Denys-Drash 症候群 2 例、男性半陰陽 1 例)、5 例の先天異常を合併していない両側腎発症例、93 例の先天異常を合併していない片側性かつ散發性発症例である。病理組織は NWTS 病理組織分類をもとに分類した。*WT1* cDNA probe (WT33)によるサザン法、PCR-SSCP、*WT1* Exon 1 から 10 までの DNA Sequencing 解析、ならびに正常組織 DNA が入手できた 65 例で 25 個の RFLP マーカーやマイクロ・サテライトマーカーを用いて 11 番染色体の LOH 解析をおこなった。

【結果】

1. 先天異常を合併していない片側性かつ散發例 93 例中 13 例(14%)に以下の *WT1* 異常を認めた。

a. 巨大ホモ欠失	8 例
b. ヘミ欠失	1 例

- c. ヘミ欠失 + 微少変異 (欠失あるいは点変異) 1 例
- d. 微少変異 3 例

2. 11 番染色体の LOH 解析をおこなった 65 症例のうち、片側性かつ散発例 59 例において、18 例 (30.5%) が 11p LOH を認めた。そのうちわけは、11p13 のみが 4 例 (6.7%)、11p15 のみが 3 例 (5.1%)、11p13-11p15 が 9 例 (15.1%) であった。なお、59 例中 7 例 (11.9%) に 11q LOH を認めた。うち、4 例が 11q に限局した LOH を示していた。

3 病理組織分類は 62 例 (先天異常合併例 8 例、*WT1* 異常を認めた先天異常を合併していない片側性散発症例 9 例、*WT1* 異常のない先天異常を合併していない片側性散発症例 45 例) でなされ、以下の 4 群に分けられた。

- a. stromal-predominat 21 例
- b. blastemal predominant 27 例
- c. mixed triphasic 8 例
- d. others (3 purely epithelial, 3 CPDN) 6 例

WT1 異常を認めた先天異常合併例 8 例中 7 例 (88%) と *WT1* 異常を認めた先天異常を合併していない片側性かつ散発例 9 例のうち 8 例 (81%) が stromal-predominat の組織像を呈し、*WT1* 異常例では 88% の腫瘍で stromal-predominat の組織像を呈していたが、*WT1* 異常のない 45 例のうち stromal-predominat の組織像を呈していたは 6 例 (13%) に過ぎず、他は様々な組織型であった。

4. 染色体分析は 95 腫瘍中 78 腫瘍で以下の結果が得られた。

- a. Hypodiploidy (41-45 chromosomes) 9 例
- b. Pseudodiploidy 14 例
- c. Hyperdiploidy (47-49 chromosomes) 9 例
- d. Hyperdiploidy (>50 chromosomes) 23 例
- e. Hypertriploidy 1 例
- f. Normal diploidy or tetraploidy 22 例

【考案】

WT1 異常の頻度は、われわれの 14.0% に対し、欧米での報告は 6.1%~18.7% とほぼ同様な傾向を示したが、*WT1* 異常の内容では、巨大ホモ欠失が 8.6% (本研究) vs 1.3% (Gessler 報告、米国) と日本に多く、mutation や deletion の微少変異は 4.3% (本研究) に対し 4.3~6.2% (Varasani ら、Gessler ら、Schumacher ら、Huff らの報告) で差はなかった。11 番染色体 LOH は、11p13 限局型が本研究の 6.7% に対して欧米では 3.4% (Grundy ら) と本邦に多く、11p15 限局型は 5.1% に対して 7.4% (Grundy ら) と欧米に多かった。病理組織型では *WT1* 異常は stroma 優位の組織型と関連していた。

以上から、Wilms 腫瘍の発生頻度が日本をはじめアジアで低い (欧米の 1/2~1/3) とする人種間格差は、日欧での *WT1* 遺伝子異常の内容の違いをはじめとする、ウィルムス腫瘍の遺伝学的差異に原因があることが示唆された。

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

MUTATIONS/DELETIONS OF THE *WT1* GENE, LOSS OF HETEROZYGOSITY ON CHROMOSOME ARMS 11P AND 11Q, CHROMOSOME PLOIDY, AND HISTOLOGY IN WILMS' TUMORS IN JAPAN

(本邦ウイラムス腫瘍における組織型と染色体分析、
11番染色体短腕及び長腕での LOH 分析、*WT1* 遺伝子異常との解析)

Wilms 腫瘍は小児特有の腎原発腫瘍であるが、その発生頻度は日本をはじめアジアで低く、欧米の 1/2 ~ 1/3 に過ぎない。この人種間格差は 11p13 から単離された Wilms 腫瘍のがん抑制遺伝子である *WT1* 異常の人種間格差によるとする仮説をたて、以下の検討をした、

1. *WT1* 異常を示すウイラムス腫瘍の発生頻度は日欧間で異なるか？
2. *WT1* 異常を示すウイラムス腫瘍の染色体、組織像、臨床像に特徴はあるか？
3. 日本と欧米のウイラムス腫瘍の発生頻度が異なるのは何故か？

対象は生後 3 か月から 10 歳までの本邦のウイラムス腫瘍 108 検体 (105 例) で、7 例の先天異常合併例 (WGAR 症候群 4 例、うち、両側腎原発 1 例、Denys-Drash 症候群 2 例、男性半陰陽 1 例)、5 例の先天異常を合併していない両側腎発症例、93 例の先天異常を合併していない片側性かつ散発性発症例である。病理組織は NWTS 病理組織分類をもとに分類した。*WT1* cDNA probe (WT33) によるサザン法、PCR-SSCP、*WT1* Exon 1 から 10 までの DNA sequencing 解析、ならびに正常組織 DNA が入手できた 65 例で 25 個の RFLP マーカーやマイクロ・サテライトマーカーを用いて 11 番染色体の LOH(Loss of Heterozygosity)解析をおこない以下の結果をえた。

1. 先天異常を合併していない片側性かつ散発例 93 例中 13 例 (14%) に以下の *WT1* 異常を認めた。
 - a. 巨大ホモ欠失 8 例
 - b. ヘミ欠失 1 例
 - c. ヘミ欠失 + 微少変異 (欠失あるいは点変異) 1 例
 - d. 微少変異 3 例
2. 11 番染色体の LOH 解析をおこなった 65 症例のうち、片側性かつ散発例 59 例において、18 例 (30.5%) が 11p LOH を認めた。そのうちわけは、11p13 のみが 4 例 (6.7%)、11p15 のみが 3 例 (5.1%)、11p13-11p15 が 9 例 (15.1%) であった。なお、59 例中 7 例 (11.9%)

に 11q LOH を認めた。うち、4 例が 11q に限局した LOH を示していた。

3. 病理組織分類は 62 例（先天異常合併例 8 例、*WT1* 異常を認めた先天異常を合併していない片側性散発症例 9 例、*WT1* 異常のない先天異常を合併していない片側性散発症例 45 例）でなされ、以下の 4 群に分けられた。

a. stromal-predominat	21 例
b. blastemal predominant	27 例
c. mixed triphasic	8 例
d. others (3 purely epithelial, 3 CPDN)	6 例

WT1 異常を認めた先天異常合併例 8 例中 7 例（88%）と *WT1* 異常を認めた先天異常を合併していない片側性かつ散発例 9 例のうち 8 例（81%）が stromal-predominat の組織像を呈し、*WT1* 異常例では 88%の腫瘍で stromal-predominat の組織像を呈していたが、*WT1* 異常のない 45 例のうち stromal-predominat の組織像を呈していたは 6 例（13%）に過ぎず、他は様々な組織亜型であった。

4. 染色体分析は 95 腫瘍中 78 腫瘍で以下の結果が得られた。

a. Hypodiploidy (41-45 chromosomes)	9 例
b. Pseudodiploidy	14 例
c. Hyperdiploidy (47-49 chromosomes)	9 例
d. Hyperdiploidy (>50 chromosomes)	23 例
e. Hypertriploidy	1 例
f. Normal diploidy or tetraploidy	22 例

WT1 異常の頻度は、われわれの 14.0%に対し、欧米での報告は 6.1%～ 18.7%とほぼ同様な傾向を示したが、*WT1* 異常の内容では、巨大ホモ欠失が 8.6%（本研究）vs 1.3%（Gessler 報告、米国）と日本に多く、mutation や deletion の微小変異は 4.3%（本研究）に対し 4.3～ 6.2%（Varasani ら、Gessler ら、Schumacher ら、Huff らの報告）で差はなかった。11 番染色体 LOH は、11p13 限局型が本研究の 6.7%に対して欧米では 3.4%（Grundy ら）と本邦に多く、11p15 限局型は 5.1%に対して 7.4%（Grundy ら）と欧米に多かった。病理組織型では *WT1* は stroma 優位の組織亜型と関連していた。

以上から、ウイルス腫瘍の発生頻度が日本をはじめアジアで低い（欧米の 1/2 ～ 1/3）とする人種間格差は、日欧での *WT1* 遺伝子異常の内容の違いをはじめとする、ウイルス腫瘍の遺伝学的差異に原因があることが示唆された。

公開發表に際し、副査の今村教授から、病理組織像と *WT1* 異常や LOH の有無との関係、*WT1* 異常と他の癌との関係、*WT1* の癌遺伝子としての可能性、ウイルス腫瘍の発生原基と造血細胞の関係など、副査の佐々木教授からウイルス腫瘍における 11q 染色体の意義について、*WT1* 異常と他の原因によるウイルス腫瘍組織の差が起こるメカニズムについて、他の遺伝子と *WT1* 遺伝子の相互関係について、主査の小林教授からウイルス腫瘍の発生における遺伝子 imprinting の関与について、ウイルス腫瘍発生機序の多彩さの意味について、また今後の研究の方向性についての質問があった。何れの質問に対しても、申請者は自らの実験と文献を用い、概ね妥当な回答を行った。

本研究は、ウイルス腫瘍の発生頻度が日本をはじめアジアで低いとする人種間格差が、日欧での *WT1* 遺伝子異常の内容の違いをはじめとする、ウイルス腫瘍の遺伝学的差異に原因があることを明らかにした。今後この結果に基づいた診断・治療の発展が期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、申請者が博士（医学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと判定した。