



Title	Growth inhibition of human leukemic cells by WT1 (Wilms tumor gene) antisense oligodeoxynucleotides : Implications for the involvement of WT1 in leukemogenesis
Author(s)	山上, 保
Citation	大阪大学, 1996, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/40475
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名	山 上 保
博士の専攻分野の名称	博 士 (医学)
学位記番号	第 12617 号
学位授与年月日	平成 8 年 5 月 9 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学位論文名	Growth inhibition of human leukemic cells by WT1 (Wilms tumor gene) antisense oligodeoxynucleotides: Implications for the involvement of WT1 in leukemogenesis (WT1遺伝子に対するアンチセンスオリゴDNAによるヒト白血病細胞の増殖抑制)
論文審査委員	(主査) 教授 岸本 忠三 (副査) 教授 北村 幸彦 教授 秋山 徹

論文内容の要旨

【目的】

WT1 遺伝子は、小児の腎腫瘍ウイルムス腫瘍の原因遺伝子として単離された zinc finger 型の転写因子である。ウイルムス腫瘍の約10%において WT1 遺伝子の変異が認められ、これらの症例においては癌抑制遺伝子として働いていると考えられる。

我々は全ての白血病患者において、変異のない WT1 遺伝子の高い発現が認められること、その発現レベルが予後と逆相関にあることを明らかにしてきた。本研究の目的は、WT1 遺伝子に対するアンチセンスオリゴ DNA (antisense oligo DNA) を用いてその発現レベルを抑制する手法を用い、白血病細胞における WT1 遺伝子の発現が、その増殖に関与しているかどうかを明らかにすることにある。

【方法ならびに成績】

1. 白血病細胞株の増殖抑制

WT1 遺伝子の20か所に対して、sense (SE) 及び antisense (AS) 配列の天然型の18塩基 oligo DNA を合成した。又、共通のコントロールとして、同じく18塩基のランダム配列の oligo DNA (rand) を用いた。

WT1 遺伝子を強く発現している白血病細胞株 K562 の培養液中に24時間毎に oligo DNA を添加し、4日後に生細胞数を数えて増殖能を解析した。20か所のうち、2か所の cap site と ATG 領域及び exon 6 の一部の配列の計4か所の配列において、AS は SE 及び rand と比べて有意な細胞増殖抑制を示した。それらは、濃度依存性であった。

細胞増殖抑制が、WT1 遺伝子の配列に特異的なものであることを確認するために、ミエロペルオキシダーゼ遺伝子及び凝固第5因子遺伝子に対する AS oligo DNA を作製し同様の実験を行ったが、WT1 遺伝子に対する AS oligo DNA のみが細胞増殖抑制を示した。

WT1 遺伝子に対するこの 4 つの AS oligo DNA は、WT1 遺伝子発現のある他の細胞株 THP-1, HEL に対しても増殖抑制を示したが、WT1 遺伝子の発現のない細胞株 U937 の増殖に対しては影響を与えるなかった。

2. 白血病患者の白血病コロニー形成能の抑制

未治療の白血病患者より得た白血病細胞を oligo DNA 存在下に 4 日間液体培養した後メチルセロースを含む培地に移し、14日目に白血病コロニー (CFU-L) の数を数えた。17例中 8 例において AS oligo DNA による CFU-L の有意な減少を認めた。この CFU-L 形成能の抑制は、急性骨髓性白血病の病形、慢性骨髓性白血病の病期に関わらずに認められた。

3. 正常造血前駆細胞に対する影響

健常人ボランティアより得た骨髓細胞を用いて正常造血細胞コロニー (CFU-GM) 形成能に対する影響を検討した。4 人で検討したが、いずれにおいても AS oligo DNA による CFU-GM 形成能の抑制は認められなかった。

4. AS oligo DNA による WT1 蛋白の減少

白血病細胞株 K562 及び患者よりの白血病細胞を random oligo DNA 及び AS oligo DNA 存在下に 3 日あるいは 4 日間培養した後、蛋白を抽出し、WT1 蛋白に対するポリクローナル抗体を用いてウエスタンプロットを行った。K562、患者検体いずれにおいても、AS oligo DNA による WT1 蛋白レベルの明らかな低下が認められた。

5. WT1 遺伝子導入によるアンチセンス効果からの回復

K562 に、CMV プロモーターを有する WT1 cDNA をトランスフェクションし、WT1 遺伝子を恒常に発現させた。この細胞においては、AS oligo DNA による増殖抑制からの有意な回復が認められた。

【総括】

WT1 遺伝子に対するアンチセンスオリゴ DNA 投与により、白血病細胞の WT1 蛋白の減少がみられ、それに伴って細胞増殖が抑制された。このアンチセンスオリゴ DNA による細胞増殖抑制は、WT1 遺伝子の配列に特異的であり、WT1 遺伝子を発現していない血液細胞の増殖に影響を与えるなかった。更に WT1 遺伝子を恒常に発現させることによって、この増殖抑制からの回復が認められた。以上の結果より、白血病細胞における WT1 遺伝子の発現はその細胞増殖に対して促進的に働いていることが明らかとなった。

論文審査の結果の要旨

本研究は、白血病細胞に高い発現のみられる WT1 (Wilms tumor gene) 遺伝子が、その細胞増殖に関与しているかどうかを WT1 遺伝子に対するアンチセンスオリゴ DNA を用いて検討したものである。

WT1 遺伝子に対するアンチセンスオリゴ DNA 投与によって白血病細胞における WT1 蛋白の発現が抑えられ、それに伴って有意な細胞増殖抑制が認められたことより、WT1 遺伝子は白血病細胞の増殖に促進的に働いていることが明らかにされた。

このことは、癌抑制遺伝子として分類されている WT1 遺伝子が白血病の発症に促進的に関与していることを示唆する最初の報告であり本研究は学位の授与に値するものと考える。