

Title	OVEREXPRESSION OF THE WILMS' TUMOR GENE WT1 IN DE NOVO LUNG CANCERS
Author(s)	尾路, 祐介
Citation	大阪大学, 2003, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/44518">https://hdl.handle.net/11094/44518</a>
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、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

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

Osaka University

氏名	お 尾 じ 路 ゆう 祐 すけ 介
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 7 9 6 9 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 15 年 3 月 25 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	OVEREXPRESSION OF THE WILMS' TUMOR GENE <i>WT1</i> IN <i>DE NOVO</i> LUNG CANCERS (野生型ウィルムス腫瘍遺伝子 (WT1) の肺癌における過剰発現)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 川 瀬 一 郎  (副査) 教 授 戸 田 達 史 教 授 青 笹 克 之

### 論 文 内 容 の 要 旨

#### 〔目的〕

WT1 遺伝子は小児腎腫瘍ウィルムス腫瘍の原因遺伝子として単離された遺伝子で従来は癌抑制遺伝子と位置付けられてきた。しかしながらわれわれはこれまでに(1)ほとんど全ての白血病細胞において野生型 WT1 遺伝子が高発現しており、その発現レベルは患者予後と逆相関を示すこと、(2)WT1 タンパクの発現をアンチセンス DNA により抑制すると白血病細胞の増殖が抑制されること、そして(3)マウス骨髄前駆細胞 32DC13 に WT1 遺伝子を強制発現すると GCSF による好中球への分化が抑制されることなどから白血病細胞において WT1 遺伝子が癌抑制遺伝子というよりはむしろ癌遺伝子様の機能を果たしていることを明らかにしてきた。さらにわれわれは種々の固形癌細胞由来細胞株において野生型 WT1 遺伝子が様々な程度に発現されていることさらに WT1 アンチセンス DNA により WT1 タンパクの発現を抑制すると癌細胞の増殖が抑制されることより固形癌細胞においても野生型 WT1 遺伝子が増殖に関与し、癌遺伝子様の機能を果たしていることを明らかにしてきた。そこで本研究においては近年罹患率が増加し臨床的に重要性を増している肺癌における WT1 遺伝子の発現について解析した。

#### 〔方法ならびに成績〕

##### 1. 非小細胞肺癌における WT1 遺伝子の発現

56 例の非小細胞肺癌 (肺腺癌 41 例、肺扁平上皮癌 13 例、肺大細胞癌 2 例) の癌組織および肉眼的に正常な肺組織より total RNA を抽出し cDNA を合成、これを鋳型として定量的 Real-time PCR 法を行い WT1 遺伝子の発現レベルを決定した (WT1 遺伝子を高発現する白血病細胞株 K562 細胞における WT1 遺伝子の発現レベルを 1.0 と定義した)。41 例の肺腺癌のうち 39 例 (95%) において WT1 遺伝子が  $2.3 \times 10^{-4}$ — $1.4 \times 10^0$  level で発現していた。肺扁平上皮癌では 13 例のすべてにおいて WT1 遺伝子が  $8.6 \times 10^{-5}$ — $6.8 \times 10^{-1}$  level で発現していた。2 例の肺大細胞癌においては WT1 遺伝子が  $7.4 \times 10^{-3}$  および  $3.4 \times 10^{-2}$  level で発現していた。一方、肉眼的に正常な肺組織では 6 例のいずれにおいても WT1 遺伝子の発現を認めなかった ( $< 10^{-5}$  level)。以上より 56 例の非小細胞肺癌のうち 54 例 (96%) において WT1 遺伝子が過剰発現されていることが明らかになった。さらに Real-time RT-PCR 法にて WT1 遺伝子の発現が検出された 6 例の非小細胞肺癌細胞について免疫染色法を行ったところ WT1 タンパクの発現をいずれにおいても認め、肺癌組織における WT1 遺伝子のタンパクレベルでの発現が確認された。また、WT1 発現レ

ベルと臨床病期との関連を解析したが明らかな相関を認めなかった。

## 2. 小細胞肺癌における WT1 遺伝子の発現

WT1 遺伝子産物の発現を免疫染色法により解析した。6 例の小細胞肺癌のうち 5 例 (83%) において WT1 タンパクの発現を認め、小細胞肺癌においても WT1 遺伝子産物が過剰発現していることが明らかとなった。

## 3. 肺癌組織において発現される WT1 遺伝子は変異のない野生型である

WT1 遺伝子の変異の有無につき 7 例において WT1 ゲノム DNA を解析した。WT1 遺伝子の 10 エクソンの各々を PCR にて増幅し、direct sequencing によって解析したところ変異や欠失を認めなかった。

## 4. 肺癌組織において発現される WT1 遺伝子の splicing variant の発現比の決定

WT1 遺伝子には 2 か所の alternative splicing 部位 (17AA および KTS) がありその結果 4 種類の splicing variant が生じる。肺癌組織において発現される WT1 遺伝子における splicing variant の発現比を 3 組の primer を用いて RT-PCR を行うことにより決定した。解析した 4 例のいずれにおいても splicing variant の比は類似しており 4 種のうち 17AA(-)KTS(-)WT1 の発現比が低かった。

### [総括]

変異のない野生型 WT1 遺伝子が多くの肺癌組織において病型に関わり無く過剰発現していることを明らかにした。WT1 遺伝子が癌細胞の増殖に関与するというこれまでの研究の結果と併せて考えると、本研究の結果は野生型 WT1 遺伝子の肺癌の tumorigenesis への関与を強く示唆する。また、WT1 遺伝子産物が肺癌に過剰発現されていることが明らかになったことで WT1 を標的にした治療法が肺癌の新たな治療戦略になる可能性がある。

## 論文審査の結果の要旨

従来癌抑制遺伝子と考えられてきた WT1 遺伝子が白血病において癌遺伝子様の機能を果たしていること、さらに野生型 WT1 遺伝子が種々の固形癌由来細胞株において様々なレベルで発現し、細胞の増殖を促進して固形癌においても癌遺伝子様の機能を果たしている可能性を示してきた。

本論文では罹患率が上昇し臨床的重要性を増している肺癌についてヒト癌組織における WT1 遺伝子の発現を解析した。その結果腺癌 41 例中 39 例、扁平上皮癌 13 例中 13 例の全て、大細胞癌 2 例中 2 例の全てそして小細胞癌 6 例中 5 例で WT1 が過剰発現していること、そしてこの WT1 遺伝子は変異のない野生型であることを明らかにした。これらの結果は野生型 WT1 遺伝子が肺癌の発生において重要な役割を果たしていることを示唆している。また、これまでに WT1 が HLA 拘束性に CTL を誘導することができることを明らかにしており、今回の結果は WT1 を標的とした免疫療法が肺癌の新しい治療戦略になりうることを示している。

以上から本論文のもつ医学的意義は高く、博士 (医学) の学位授与に値する。