



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">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> 大阪大学の博士論文について

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

氏名	尾路祐介
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第17969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 (野生型ウイルムス腫瘍遺伝子(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イ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32DCl3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、これを鑄型として定量的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つた( $< 10^{-5}$ 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つた。

## 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つた。

## 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つた。

## 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。