

Title	Malignant transforming ability of the Wilms' tumor gene WT1
Author(s)	Tanyarat, Jomgeow
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	http://hdl.handle.net/11094/46348
DOI	
rights	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

氏名	タンヤールラット ジョムゲーオ Tanyarat Jomgeow
博士の専攻分野の名称	博士 (保健学)
学位記番号	第 20192 号
学位授与年月日	平成 18 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学系研究科保健学専攻
学位論文名	Malignant transforming ability of the Wilms' tumor gene <i>WT1</i> (ウイلمス腫瘍遺伝子 <i>WT1</i> の malignant transforming ability)
論文審査委員	(主査) 教授 杉山 治夫 (副査) 教授 松浦 成昭 教授 川野 淳

論文内容の要旨

野生型 *WT1* 遺伝子は白血病や種々の固形癌細胞において過剰発現している。*WT1* 遺伝子には 2ヶ所の alternative splicing が行なわれるため 4種類の *WT1* isoform が存在する。これらの 4種すべての isoform が白血病や固形癌細胞において発現していること、さらに各々の isoform が異なる機能を果たす可能性が報告されているが、癌細胞においてそれぞれの *WT1* isoform が果たす機能は未だ明確ではない。

本論文の主論文では 4種の *WT1* isoform の内、*WT1* 17AA(-)/*KTS*(-) isoform が細胞骨格の調節により細胞の形態変化をおこし、*in vitro* において運動能や浸潤能を増強することを明らかにした。まず、4種の *WT1* isoform のそれぞれを卵巣癌細胞株 *TYKnu.CP-r* (以下 *TYK*) に過剰発現させたところ、*WT1* 17AA(-)/*KTS*(-) isoform のみが細胞の形態変化を誘導した。*WT1* 17AA(-)/*KTS*(-) isoform はこの卵巣癌細胞株以外の 5種類の癌細胞株 (胃癌 *MKN28-1* 種、食道癌 *TE10-1* 種、乳癌 *ZR75*、*SkBr3-2* 種、とおよび線維肉腫 *HT-1080-1* 種) においても同様の形態変化を誘導した。次に、*WT1* 17AA(-)/*KTS*(-) が細胞-細胞外基質の接着やがん細胞の運動能や浸潤能に及ぼす影響を解析した。*WT1* 17AA(-)/*KTS*(-) を強制発現させた *TYK* 細胞がコントロールの細胞に比べトリプシナイズにより有意に浮遊しやすく細胞-細胞外基質の接着が低下していることが *detachment assay* により明らかになった。*WT1* 17AA(-)/*KTS*(-) を強制発現させた *TYK* 細胞がコントロールの細胞に比べ約 2 倍に運動能が増強していることが *Wound healing assay* や *Random migration assay* により、さらに *in vitro* 浸潤能が約 8 倍増強していることが *Transwell migration assay* により示された。

次に *WT1* 17AA(-)/*KTS*(-) isoform が cytoskeleton を制御しているメカニズムを明らかにするために *WT1* 17AA(-)/*KTS*(-) isoform 強制発現させた *TYK* 細胞、*TE-10* 細胞および *HT-1080* 細胞において *actin binding protein* (*ABP*) の発現レベルの変化を *RT-PCR* 法や *Western blot* 法にて解析した。その結果、*WT1* 17AA(-)/*KTS*(-) isoform を強制発現した *TYK* 細胞において α -*actinin1* や *cofilin* の発現の低下とともに *gelsolin* の発現の上昇が認められた。これらの *ABP* の変化が、*WT1* 17AA(-)/*KTS*(-) isoform により誘導される形質変化に関与していることを明らかにするために、*WT1* 17AA(-)/*KTS*(-) isoform を強制発現させた *TYK* 細胞において α -*actinin1*、および *cofilin* の発現を過剰発現させたところ α -*actinin1* と *cofilin* の発現レベルに比例して細胞-細胞外基質の接着能は増強し、運動能は低下した。さらに *WT1* 17AA(-)/*KTS*(-) isoform を強制発現させた細胞において、*gelsolin siRNA*

により gelsolin の発現レベルを親株細胞と似たレベルまで低下させたところ運動能は親株と同様のレベルまで低下したが、細胞の形態と細胞-細胞外基質の接着は変化しなかった。これらの結果は WT1 17AA(-)/KTS(-) isoform が actinin, cofilin や gelsolin などの ABPs の発現レベルを制御することにより細胞形態の変化や細胞運動や細胞浸潤の増強を誘導し、癌細胞の悪性化に関与していることを示している。

次に本論文の副論文 1 において WT1 の 4 種の isoform のうち 17AA(+)/WT1 isoforms が細胞の intrinsic apoptosis pathway に働きかけ、アポトーシスを抑制することを明らかにした。さらに副論文 2 において WT1 遺伝子が、グリオブラストーマにおいて過剰発現していること、さらにグリオブラストーマ細胞株において WT1 遺伝子の発現をアンチセンス DNA を用いて抑制するとグリオブラストーマ細胞の増殖が抑制されることから WT1 がグリオブラストーマの癌化過程に関与している可能性そしてこれらの腫瘍に対する治療法の新たな分子標的になりうることを示した。以上の結果をまとめると WT1 遺伝子のそれぞれの isoform が様々な固形がん細胞において細胞骨格の調節や抗アポトーシスなどの機能を果たし、細胞の malignant transformation において重要な役割を果たしていることを示す。

論文審査の結果の要旨

野生型 WT1 遺伝子は白血病や種々の固形癌細胞において過剰発現している。WT1 遺伝子には 2 ケ所の alternative splicing が行なわれるため 4 種類の WT1 isoform が存在する。これらの 4 種すべての isoform が白血病や固形癌細胞において発現していること、さらに各々の isoform が異なる機能を果たす可能性が報告されているが、癌細胞においてそれぞれの WT1 isoform が果たす機能は未だ明確ではない。

本論文の主論文では 4 種の WT1 isoform の内、WT1 17AA(-)/KTS(-) isoform が細胞骨格の調節により細胞の形態変化をおこし、in vitro において運動能や浸潤能を増強することを明らかにした。まず、4 種の WT1 isoform のそれぞれを卵巣癌細胞株 TYKnu.CP-r (以下 TYK) に過剰発現させたところ、WT1 17AA(-)/KTS(-) isoform のみが細胞の形態変化を誘導した。WT1 17AA(-)/KTS(-) isoform はこの卵巣癌細胞株以外の 5 種類の癌細胞株 (胃癌 MKN28-1 種、食道癌 TE10-1 種、乳癌 ZR75、SkBr3-2 種、とおよび線維肉腫 HT-1080-1 種) においても同様の形態変化を誘導した。次に、WT1 17AA(-)/KTS(-) が細胞-細胞外基質の接着やがん細胞の運動能や浸潤能に及ぼす影響を解析した。WT1 17AA(-)/KTS(-) を強制発現させた TYK 細胞がコントロールの細胞に比べトリプシナイズにより有意に浮遊しやすく細胞-細胞外基質の接着が低下していることが detachment assay により明らかになった。WT1 17AA(-)/KTS(-) を強制発現させた TYK 細胞がコントロールの細胞に比べ約 2 倍に運動能が増強していることが Wound healing assay や Random migration assay により、さらに in vitro 浸潤能が約 8 倍増強していることが Transwell migration assay により示された。

次に WT1 17AA(-)/KTS(-) isoform が cytoskeleton を制御しているメカニズムを明らかにするために WT1 17AA(-)/KTS(-) isoform 強制発現させた TYK 細胞、TE-10 細胞および HT-1080 細胞において actin binding protein (ABP) の発現レベルの変化を RT-PCR 法や Western blot 法にて解析した。その結果、WT1 17AA(-)/KTS(-) isoform を強制発現した TYK 細胞において α -actinin1 や cofilin の発現の低下とともに gelsolin の発現の上昇が認められた。これらの ABP の変化が、WT1 17AA(-)/KTS(-) isoform により誘導される形質変化に関与していることを明らかにするために、WT1 17AA(-)/KTS(-) isoform を強制発現させた TYK 細胞において α -actinin1、および cofilin の発現を過剰発現させたところ α -actinin1 と cofilin の発現レベルに比例して細胞-細胞外基質の接着能は増強し、運動能は低下した。さらに WT1 17AA(-)/KTS(-) isoform を強制発現させた細胞において、gelsolin siRNA により gelsolin の発現レベルを親株細胞と似たレベルまで低下させたところ運動能は親株と同様のレベルまで低下したが、細胞の形態と細胞-細胞外基質の接着は変化しなかった。これらの結果は WT1 17AA(-)/KTS(-) isoform が actinin, cofilin や gelsolin などの ABPs の発現レベルを制御することにより細胞形態の変化や細胞運動や細胞浸潤の増強を誘導し、癌細胞の悪性化に関与していることを示している。

次に本論文の副論文 1 において WT1 の 4 種の isoform のうち 17AA(+)/WT1 isoforms が細胞の intrinsic apoptosis

pathway に働きかけ、アポトーシスを抑制することを明らかにした。さらに副論文 2 において WT1 遺伝子が、グリオブラストーマにおいて過剰発現していること、さらにグリオブラストーマ細胞株において WT1 遺伝子の発現をアンチセンス DNA を用いて抑制するとグリオブラストーマ細胞の増殖が抑制されることから WT1 がグリオブラストーマの癌化過程に関与している可能性そしてこれらの腫瘍に対する治療法の新たな分子標的になりうることを示した。以上の結果をまとめると WT1 遺伝子のそれぞれの isoform が様々な固形がん細胞において細胞骨格の調節や抗アポトーシスなどの機能を果たし、細胞の malignant transformation において重要な役割を果たしていることを示す。