Osaka University Knowledge Archive

Title	Malignant transforming ability of the Wilms'tumor gene WT1
Author(s)	Tanyarat, Jomgeow
Citation	大阪大学, 2006, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/46348
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。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

【14】

氏　　名	Tanyarat Jomgeow（タンヤーラット　ジョムゲーオ）
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 *WT1* （ウイルムス腫瘍遺伝子 WT1 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。

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。