



Title	WT1 17AA(+)isoforms as a target of molecular-targeting therapy for cancers
Author(s)	辰巳, 直也
Citation	大阪大学, 2008, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/49035">https://hdl.handle.net/11094/49035</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">大阪大学の博士論文について</a>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	辰巳直也
博士の専攻分野の名称	博士(保健学)
学位記番号	第21892号
学位授与年月日	平成20年3月25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	WT1 17AA(+) isoforms as a target of molecular-targeting therapy for cancers (ウイルムス腫瘍遺伝子 WT1 17AA (+) アイソフォームは様々な癌に対する分子標的治療の標的である)
論文審査委員	(主査) 教授 杉山 治夫 (副査) 教授 松浦 成昭 教授 三善 英知

## 論文内容の要旨

野生型 WT1 遺伝子は白血病や、肺癌、大腸癌、食道癌、甲状腺癌、膵管癌、グリオblastoma、頭頸部扁平上皮癌、骨軟部肉腫など様々な固形癌において高頻度に過剰発現し、癌発症機序において重要な機能を果たす。WT1 遺伝子の機能に関してはこれまでに癌細胞の増殖に関与する報告があるが、その詳細な分子学的メカニズムは未だ明確ではない。さらに WT1 には4種のアイソフォームが存在し、それぞれが異なる機能を果たす可能性があると考えられているが、固形癌における4種のアイソフォームの詳細な機能は未だ不明である。本研究は、WT1 遺伝子が様々な固形癌に対する治療の標的分子になるかを検討するとともに、WT1 遺伝子を標的とした固形癌に対する新たな分子標的療法（特に RNA 干渉を利用した治療法）の開発を目的として行った。まず WT1 遺伝子に対して3種の short hairpin RNA (exon5 を標的とする shWTE5、exon10 を標的とする shWTE10、3'非翻訳領域を標的とする shWT3U)を作成し、癌細胞におけるそれぞれのアポトーシス誘導能を調べた。その結果、exon5 を標的とする WT1-shRNA (shWTE5) が3種のうちで最も効率よくアポトーシスを誘導した。よって、shWTE5 の様々な癌細胞に対するアポトーシス誘導剤としての効果を評価した。shWTE5 は、HT-1080 線維肉腫および LU99B 肺癌細胞において、内因性アポトーシス経路 (intrinsic pathway) に関わる caspase-9、caspase-3 を活性化させアポトーシスを誘導した。また shWTE5 は、WT1 を発現する5種の固形癌細胞株 (HT-1080 線維肉腫、LU99B 肺癌、AZ-521 胃癌、TYKnuCPr 卵巣癌、A172 グリオblastoma) においてミトコンドリア膜電位を低下させアポトーシスを誘導した。さらに shWTE5 は、4種の固形癌細胞株 (HT-1080、LU99B、TYK、A172) において、抗癌剤 (ドキソルビシン、エトボシド)、death ligand TRAIL によるアポトーシス誘導能を有意に増強した。一方で、Exon5 を有する WT1 isoforms [17AA(+)KTS(+)] および [17AA(+)KTS(-)] のそれぞれを強制発現させた HT-1080 線維肉腫細胞クローニーは、エトボシド、TRAIL によるミトコンドリア膜傷害を有意に抑制し、アポトーシス誘導に抵抗性を示した。さらに shWTE5 は WT1 発現癌細胞株 HT-1080 において、アポトーシス促進分子である Bak、Bax の発現を誘導し、抗アポトーシス分子である Bcl-xL、Bcl-2 の発現を抑制した。これらの結果は、WT1 17AA(+) アイソフォームが固形癌細胞において Bcl-2 family 遺伝子群の発現を調節することにより抗アポトーシス機能を果たすこと、さらにこれらの WT1 isoforms を標的とする shRNA は、癌に対する新たな治療戦略になりうることを示している。

## 論文審査の結果の要旨

野生型 WT1 遺伝子は白血病や、肺癌、大腸癌、食道癌、甲状腺癌、肺管癌、グリオblastoma、頭頸部扁平上皮癌、骨軟部肉腫など様々な固形癌において高頻度に過剰発現し、癌発症機序において重要な機能を果たす。WT1 遺伝子の機能に関してはこれまでに癌細胞の増殖に関与する報告があるが、その詳細な分子学的メカニズムは未だ明確ではない。さらに WT1 には 4 種のアイソフォームが存在し、それぞれが異なる機能を果たす可能性があると考えられているが、同形癌における 4 種のアイソフォームの詳細な機能は未だ不明である。本研究は、WT1 遺伝子が様々な固形癌に対する治療の標的分子になるかを検討するとともに、WT1 遺伝子を標的とした固形癌に対する新たな分子標的療法（特に RNA 干渉を利用した治療法）の開発を目的として行った。まず WT1 遺伝子に対して 3 種の short hairpin RNA (exon5 を標的とする shWTE5、exon10 を標的とする shWTE10、3'非翻訳領域を標的とする shWT3U) を作成し、癌細胞におけるそれぞれのアポトーシス誘導能を調べた。その結果、exon5 を標的とする WT1-shRNA (shWTE5) が 3 種のうちで最も効率よくアポトーシスを誘導した。よって、shWTE5 の様々な癌細胞に対するアポトーシス誘導剤としての効果を評価した。shWTE5 は、HT-1080 線維肉腫および LU99B 肺癌細胞において、内因性アポトーシス経路 (intrinsic pathway) に関わる caspase-9、caspase-3 を活性化させアポトーシスを誘導した。また shWTE5 は、WT1 を発現する 5 種の固形癌細胞株 (HT-1080 線維肉腫、LU99B 肺癌、AZ-521 胃癌、TYKnuCPr 卵巣癌、A172 グリオblastoma) においてミトコンドリア膜電位を低下させアポトーシスを誘導した。さらに shWTE5 は、4 種の固形癌細胞株 (HT-1080、LU99B、TYK、A172) において、抗癌剤（ドキソルビシン、エトボシド）、death ligand TRAIL によるアポトーシス誘導能を有意に増強した。一方で、Exon5 を有する WT1 isoforms [17AA(+)KTS(+) および 17AA(+)KTS(-)] のそれぞれを強制発現させた HT-1080 線維肉腫細胞クローンは、エトボシド、TRAIL によるミトコンドリア膜傷害を有意に抑制し、アポトーシス誘導に抵抗性を示した。さらに shWTE5 は WT1 発現癌細胞株 HT-1080 において、アポトーシス促進分子である Bak、Bax の発現を誘導し、抗アポトーシス分子である Bcl-xL、Bcl-2 の発現を抑制した。これらの結果は、WT1 17AA(+) アイソフォームが固形癌細胞において Bcl-2 family 遺伝子群の発現を調節することにより抗アポトーシス機能を果たすこと、さらにこれらの WT1 isoforms を標的とする shRNA は、癌に対する新たな治療戦略になりうることを示している。

本論文の結果は、保健学の学位を授与する価値のあるものである。