

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

科学研究費助成事業

研究成果報告書



平成 29 年 5 月 30 日現在

機関番号：11501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20124

研究課題名(和文) WT1 variantの新規標的分子としての可能性：卵巣癌の進展機構への関与

研究課題名(英文) The functional analysis of Wilms' tumor 1 (WT1) variants in ovarian cancer

研究代表者

山内 敬子(漆山敬子)(YAMANOUCHI, Keiko)

山形大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：00594318

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：Wilms' tumor 1 (WT1)は、転写因子であり、RNA splicingを受け、exon5 (17AA)と exon9,10間の3つのamino acids (KTS)の有無によって4つのvariantがある。細胞増殖、腫瘍産生能は WT1 -17AA/-KTSが最も高かったが、薬剤感受性との関連は認めなかった。癌細胞は抗がん薬などのストレスに対して小胞体ストレス応答が活性化され、細胞死を回避している。卵巣癌細胞において小胞体ストレス誘導剤を投与すると、細胞増殖が抑制された。今後小胞体ストレスと薬剤感受性について検討を行う予定である。

研究成果の概要(英文)：The Wilms' tumor 1 gene WT1 encodes a zinc transcription factor involved in cancer-related processes. WT1 is spliced alternatively at two sites: exon 5 with 17AA and the KTS site, which exists between exons 9 and 10. Splicing at these sites yields four variants (-17AA/-KTS, +17AA/-KTS, -17AA/+KTS, and +17AA/+KTS). Forced expression of WT1 -17AA/-KTS in SKOV3ip1 cells resulted in an increase in cell proliferation compared with the control. Overexpression of -17AA/-KTS resulted in a significant increase in the disseminated tumor weight, as compared with that in tumors expressing the control vector. However, there is no correlation between WT1 variants and drug sensitivity. In response to stress such as chemotherapy, cancer cell often activate the endoplasmic reticulum (ER) stress sensor, the unfolded protein response (UPR). The drug inducing UPR inhibited cell proliferation in ovarian cancer cells. Further studies are needed to clarify the relation between UPR and drug sensitivity.

研究分野：医学

キーワード：Wilms' tumor 1 (WT1) WT1 variant 小胞体ストレス 薬剤耐性

1. 研究開始当初の背景

(1) Wilms' tumor 1 (WT1)は、核内に存在する転写因子であり、細胞周期や細胞分化・増殖、アポトーシスに関連する遺伝子の発現を調節する。また、WT1は様々な癌種で過剰発現しており (Sugiyama H. Jpn J Clin Oncol 2010)、WT1の発現が白血病や乳癌などで予後不良因子となることが報告されている (Inoue K. Blood 1994, Miyoshi Y. Clin Cancer Res 2002)。WT1は、RNA splicingを受け、exon5 (17AA)と exon9,10 間の3つの amino acids (KTS)の有無によって4つの variant があり、癌種により apoptosis 誘導や細胞増殖能などが異なる。しかし、卵巣癌においてこのような WT1 variant による機能の違いや悪性度との関連は未だ十分に解明されていない。これを解明することで、より高い細胞増殖・浸潤機能を持つ variant 遺伝子を同定し、これを標的とした分子標的治療を開発することで、卵巣癌の進展を抑え、卵巣癌患者の予後を改善できる可能性がある。

(2) 研究当初は、すでに樹立したそれぞれの variant を過剰発現させた卵巣癌細胞株を用いて、WT1 variant と薬剤感受性について検討したが、卵巣癌において WT1 variant の発現と薬剤耐性との関連が低いことが明らかになった。そこで我々は、新たな薬剤耐性に関連する概念として小胞体ストレスに着目し、薬剤耐性との関連を検討する方針とした。

(3) 小胞体ストレスとは、小胞体に何らかのストレスが負荷されて機能が恒常性が失われると変性した折りたたみ不全なタンパク質が蓄積することである。これらの状況を小胞体膜タンパク質が察知し、小胞体を起源とした核へ至るシグナル経路 (小胞体ストレス応答: unfolded protein response (UPR)) が活性化される。UPRは、細胞を危機的な状況から回避させる重要な応答システムであるが、何らかの強い、長時間に及ぶ負荷がかかることで小胞体機能喪失、多量の未熟タンパク質が蓄積、あるいは小胞体ストレス応答の異常活性化によって、細胞死誘導シグナルとして働く。卵巣癌において小胞体ストレス応答が薬剤抵抗性に関与しているかは明らかにされていない。卵巣癌の再発例では、癌細胞において抗がん薬というストレスに対する小胞体ストレス応答能が高まり、細胞を危機的な状況から回避させ、薬剤抵抗性となっている可能性がある。この小胞体ストレス応答による薬剤抵抗性の制御機構を明らかにすることで、再発症例に対して小胞体ストレス応答蛋白を標的とした新たな治療法を確立でき、卵巣癌患者の予後を著しく改善できる可能性がある。

2. 研究の目的

(1) WT1 variant によって細胞増殖能に違いがあるのか。また in vivo において腫瘍産

生能が異なるかを検討する。

(2) WT1 variant によって抗がん薬に対する感受性が異なるかを検討する。

(3) 卵巣癌における小胞体ストレス応答の発現と細胞増殖、薬剤感受性との関連を検討する。

3. 研究の方法

(1) WT1 variant 過剰発現卵巣癌細胞株の樹立: WT1 未発現である卵巣癌細胞株 SKOV3ip1 細胞に、4つの各 variant (17AA-/KTS-, 17AA+/KTS-, 17AA-/KTS+, 17AA+/KTS+)をレンチウイルスベクターにより導入し、各 variant が過剰発現する細胞株を樹立した。コントロールは空ベクターを導入した細胞株とした。

(2) WT1 variant による細胞増殖能の関する検討: 上記(1)の方法で樹立した5種類の細胞株を 1×10^4 cell を 12 well plate に播種し、培養液で7日間培養し、day1, 3, 5, 7 に細胞数をカウントした。

(3) WT1 variant による腫瘍産生能の検討: 上記で樹立した5つの細胞株を5~7週令のメスヌードマウスに接種し、35~40日目に安楽死させ、腫瘍産生量を比較した。

(4) WT1 variant と薬剤感受性の関連についての検討: WT1 variant 17AA-/KTS-導入細胞と空ベクター導入細胞を5~7週令のマウス腹腔内に接種し、2週間後より PBS またはシスプラチンを週1回腹腔内投与して、3週間後にマウスを安楽死させ、腫瘍重量を比較した。

(5) ヒト卵巣癌細胞株における小胞体ストレス応答関連蛋白の発現についての検討: 不死化正常卵巣上皮細胞(VOSE)、漿液性腺癌由来細胞株(SKOV3, OVCAR3)、明細胞腺癌由来細胞株(RMG1)、粘液性腺癌由来細胞株(Caov3)、未分化癌由来細胞株(A2780)において小胞体ストレス応答を担うセンサータンパク質である IRE1(inositol-requiring enzyme 1), XBP-1(X-box binding protein-1), PERK (PKR (protein kinase R) -endoplasmic reticulum kinase), ATF 6(activating transcription factor 6) と小胞体シャペロンである GRP78 (glucose-regulated protein 78)の発現を western blotting 法で検討した。

(6) 小胞体ストレス誘導剤による細胞増殖に対する影響の検討: 卵巣癌細胞株 SKOV3 を 12 well plate に播種し、小胞体ストレス誘導剤である tunicamycin を投与して7日間培養を行った。播種後 day1, 3, 5, 7 で細胞をカウントし、細胞増殖への影響を検討した。

(7) 小胞体ストレス誘導剤による小胞体ストレス応答蛋白の発現変化に関する検討：SKOV3 に小胞体ストレス誘導剤である tunicamycin または thapsigargin を投与し、小胞体ストレス応答蛋白の発現を western blotting 法で検討した。

4. 研究成果

(1) WT1 variant 過剰発現卵巢癌細胞株の樹立

レンチウイルスベクター (pHR-SIN-CSGW dlNotI) を用いて 4 つの WT1 variant を卵巢癌細胞株 SKOV3ip1 にそれぞれ導入し、WT1 variant の過剰発現細胞株を樹立した。細胞への WT1 variant 導入の確認は Western Blot で行った (図 1)。

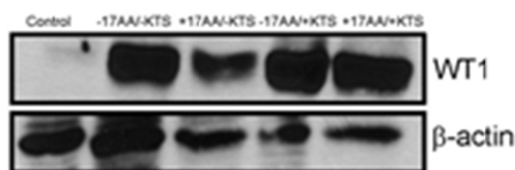


図 1. WT1 variant の発現

(2) WT1 variant による細胞増殖能に関する検討

4 つの各 variant (17AA/-KTS-, 17AA/+KTS-, 17AA/-KTS+, 17AA/+KTS+) と空ベクターを導入した細胞において WT1 -17AA/-KTS が variant の中で、最も細胞増殖能が高いことが明らかになった (図 2)。

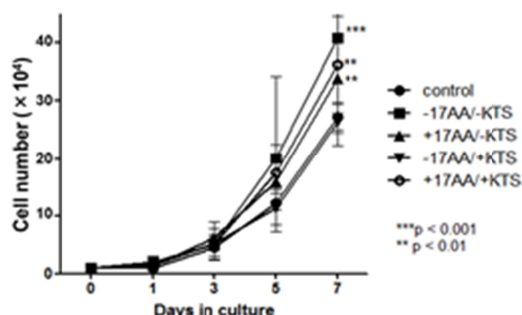


図 2. WT1 variant と細胞増殖能

(3) WT1 variant による腫瘍産生能の検討 上記実験(1)で樹立した細胞株をマウスの腹腔内に移植し、WT1 variant による腫瘍産生能の違いを検討した。

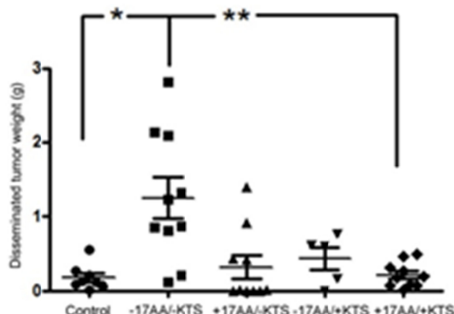


図 3. WT1 variant による腫瘍産生能

コントロールに比較して、WT1 variant (-17AA/-KTS) において腫瘍産生能がコントロールに比較して亢進した (図 3)。

(4) WT1 variant と薬剤感受性の関連についての検討

WT1-17AA/-KTS または空ベクター (control) を導入した細胞株をマウス腹腔内に接種し、2 週間後より PBS またはシスプラチンを投与した。薬剤投与 3 週後に腫瘍重量を測定したところ PBS 投与群に比較してシスプラチン投与群では腫瘍形成を抑制する傾向を認め、コントロールでは腫瘍形成を認めなかった (図 4)。当初、我々は WT1-17AA/-KTS を導入した細胞株ではシスプラチンに対して抵抗性を示すものと予想していたが、予想と異なる結果であり、WT1 variant と薬剤感受性についての関連は低いと考えられた。

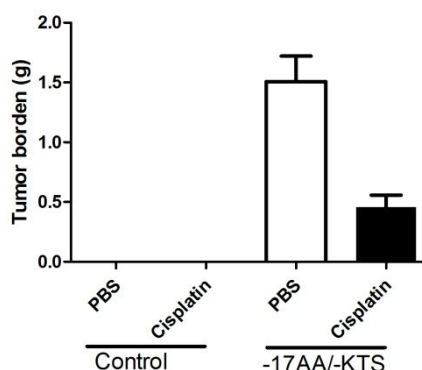


図 4. WT1 variant とシスプラチン感受性

(5) ヒト卵巢癌細胞株における小胞体ストレス応答関連蛋白の発現についての検討

小胞体シャペロンである GRP78 は RMG-1 では低発現だったが、他の細胞株では basal な発現を認めた (図 5)。この結果から卵巢癌細胞株では小胞体ストレス反応が起こっていることが明らかになった。さらに正常卵巢上皮細胞 VOSE で発現が低下していたことから、発がんという観点からの小胞体ストレスの関与が示唆された。また、小胞体ストレス応答を担うセンサータンパク質で、タンパクの折りたたみと不全タンパクの degradation を亢進する XBP-1 の発現はすべての細胞株で認められた (図 6)。XBP はスプライシングを受ける前 (XBP-1U) とスプライシング後 (XBP-1S) の 2 つのバンドを確認できた。IRE-1, PERK, ATF 6 についても検討を行ったが、有効なバンドを確認できなかった (data not shown)。

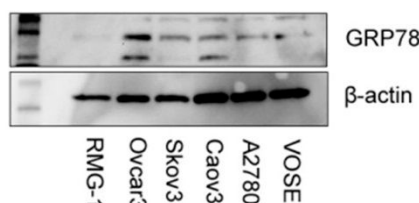


図 5. 卵巢癌細胞株における GRP78 の発現

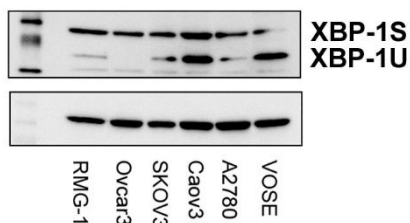


図 6. 卵巣癌細胞株における XBP-1 の発現

(6) 小胞体ストレス誘導剤による細胞増殖に対する影響の検討

SKOV3 に小胞体ストレス誘導剤である tunicamycin を投与したところ、day7 でコントロール（薬剤投与なし）に比較して tunicamycin 1.0 μ g/ml を投与した細胞で細胞増殖抑制作用を認めた（図 7）。

(7) 小胞体ストレス誘導剤による小胞体ストレス応答蛋白の発現変化に関する検討

SKOV3 に tunicamycin または thapsigargin を投与したところ、tunicamycin は濃度依存的に GRP78 の発現を亢進させ、thapsigargin は一律に GRP78 の発現が亢進させた（図 8）。また tunicamycin, thapsigargin のいずれも XBP1 の発現を増強させた（図 9）。

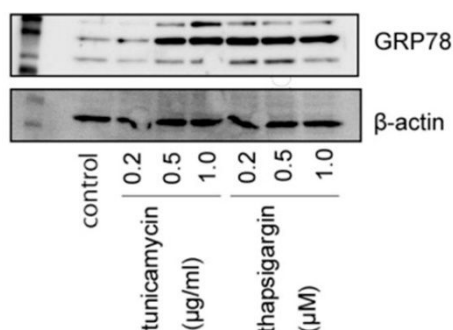


図 8. 小胞体ストレス誘導剤による GRP78 発現の変化

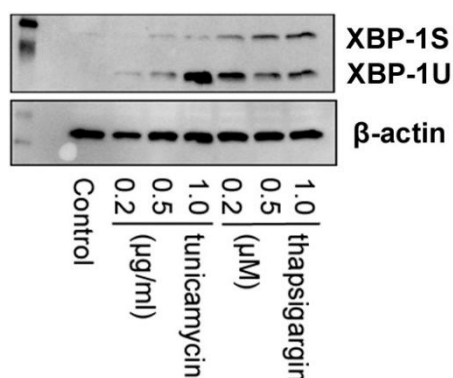


図 9. 小胞体ストレス誘導剤による XBP-1 発現の変化

実験（6）（7）の結果より小胞体ストレスを誘導し、過剰な小胞体ストレスを加えると細胞増殖を抑制し、卵巣癌細胞に対して毒性を示すことが明らかとなった。

今後は小胞体ストレス誘導剤と抗がん薬（シスプラチン、パクリタキセル）を併用投与す

ることで薬剤感受性が増強するか否かを検討する予定である。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 0 件）

〔学会発表〕（計 1 件）

山内敬子, 太田 剛, 松村創平, 高橋俊文, 高橋一広. 卵巣癌における WT1variant の腫瘍産生能に関する検討. 第 67 回日本産科婦人科学会 パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）2015.4.9-12

〔その他〕

ホームページ等

<http://yamagata-obgy.com/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山内敬子（YAMANOUCHI, Keiko）

山形大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：00594318