

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20791299

研究課題名(和文) Wilms腫瘍に対するWT1遺伝子のサイレンシングによる分化誘導療法の開発

研究課題名(英文) Effects of WT1 gene knockdown in Wilms tumor

研究代表者

高間 勇一 (TAKAMA YUICHI)

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：50467560

研究成果の概要(和文)：

神経芽腫群腫瘍において WT1 蛋白の発現は分化した神経節細胞に高発現で、神経節腫は神経芽腫に比して有意に発現率が高かった。また *WT1* 遺伝子のノックダウンにより、神経芽腫細胞株 NB69 で有意の腫瘍増殖の亢進が認められたことから神経芽腫において WT1 遺伝子は oncogene としての働きは無く、むしろ腫瘍細胞の分化に関与していることが示唆され、WT1 遺伝子のサイレンシングによる分化誘導療法の可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：

Immunohistochemical staining revealed that in neuroblastoma (NB), differentiating cells showed strong cytoplasmic staining. Expression of WT1 was higher in mature ganglionic cells, and in the immunohistochemical analysis, the WT1 positivity for ganglioneuromas was significantly higher than that for neuroblastomas. Knockdown of WT1 gene promoted the proliferation of NB69 cells ($P < .01$). The WT1 may govern cell differentiation and suppress cell proliferation in NB. The WT1 does not act as an oncogene, but it may participate in the maturation of NB, therefore can be a potential therapeutic target for cell differentiation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・小児外科学

キーワード：WT1 遺伝子，サイレンシング，分化誘導療法，SiRNA，腎芽腫，神経芽腫

1. 研究開始当初の背景

WT1 遺伝子は、代表的な小児腎腫瘍である Wilms 腫瘍（腎芽腫）の原因遺伝子のひとつで、Wilms 腫瘍の 10-15%に変異が認められる。その産物（WT1 蛋白）は正常発生の過程では胎児の腎、精巣、卵巣に発現し、泌尿生殖器の形成の過程で転写調節因子として働くと考えられる。WT1 は当初癌抑制遺伝子とされていたが、腫瘍細胞の増殖を促進するなど発癌遺伝子としても機能することが明らかになってきている。このように、WT1 は癌抑制遺伝子と発癌遺伝子の相反する機能をもつと考えられ、また最近白血病をはじめ種々の腫瘍で高い発現が認められることから、種々の腫瘍の悪性化に深く関わっていると推察されている。しかし、小児腫瘍における WT1 遺伝子の働きについての詳細は不明である。

Wilms 腫瘍においては、WT1 遺伝子に変異を持つ腫瘍は組織学的には間葉成分が主体の間葉型(mesenchymal type)が多く、横紋筋などの間葉成分への分化を高率に認めると報告されている。また WT1 遺伝子の mRNA の発現や、免疫組織染色による蛋白の発現の検討では、未分化な腎芽細胞が増殖の主体をなす腎芽型(nephroblastic type) で発現が亢進し、間葉成分が主体の間葉型では発現が低下、あるいは欠失していると報告されている。これらの結果から WT1 は未分化な腎芽細胞に高発現し、その発現を低下あるいは欠失せ

しめると腫瘍細胞は横紋筋などの間葉系の細胞に分化することが予測される。このように、小児腫瘍では WT1 の抑制により腫瘍の進行を抑制できる可能性が期待される。そこで我々は種々の小児腫瘍における、WT1 遺伝子の発現を検討し、さらに WT1 遺伝子をターゲットとした分化誘導療法の可能性を検討するため、本研究を実施した

2. 研究の目的

WT1 遺伝子の発現は免疫組織染色により検討し、WT1 遺伝子の抑制は、small interfering RNA (siRNA) を用いた RNA 干渉法を用いて行なった。さらに分化誘導できた腫瘍細胞をヌードマウスに移植し、増殖抑制効果を検討し、WT1 遺伝子が分化誘導療法の標的となりうるかどうかを検討することが本研究の目的である。

3. 研究の方法

- (1) WT1 蛋白の発現は、当科にて手術した小児固形腫瘍症例のうち、パラフィンブロックが保管されている 65 症例（神経芽腫 20、横紋筋腫 18、肝芽腫 9、腎腫瘍 9、その他 9）を対象に、免疫組織染色にて検討した。WT1 mRNA の発現は、凍結腫瘍が保管されていた 56 例に関して検討し、定量的 RT-PCR 法を用いて検討した。
- (2) 免疫組織染色で、WT1 遺伝子発現と分化

との関連が見られた神経芽腫群腫瘍に注目し、神経芽腫細胞株4株に関してWT1遺伝子の発現を検討した。

- (3) WT1 遺伝子発現の高かった NB19, NB69 の2株に対し、siRNA を用いて WT1 遺伝子をノックダウンし、腫瘍増殖に対する影響を WST-1 assay にて検討した。

4. 研究成果

- (1) 免疫組織染色による検討: 免疫組織染色の結果、神経芽腫の 25%、横紋筋肉腫の 83%、肝芽腫の 78%、腎腫瘍の 67% に WT1 遺伝子の発現を認めた。ほとんどの症例で、細胞質に発現を認め、横紋筋肉腫では蜂巣型の方が胎児型より強い発現を示すものが多かった。神経芽腫では分化した細胞に強い発現を認めることが多かった。WT1 mRNA は、神経芽腫の 55%、横紋筋肉腫の 45%、横紋筋肉腫の 33%、腎芽腫の 94% で基準値のレベルを超える発現を認めたが、発現のレベルと、病期などの臨床的因子、予後との相関は、いずれの腫瘍でも認められなかった。これらの検討で、腎芽腫以外の小児腫瘍においても広く WT1 遺伝子の発現が認められることが判明した。今後、各腫瘍における WT1 遺伝子の果たす役割を検討し、治療の標的となる可能性につき検討してゆく必要があると考えられた。
- (2) WT1 の発現と腫瘍細胞の分化が認められた神経芽腫に関して、WT1 遺伝子のノックダウンによる分化誘導にする実験を行った。WT1 遺伝子のノックダウンによ

り、NB19 では有意な腫瘍増殖の変化は見られなかったが、WT1 の発現が最も高かった NB69 で有意の腫瘍増殖の亢進が認められた。

- (3) 以上の結果から、神経芽腫において WT1 遺伝子の発現が悪性度や予後と関連しないことから oncogene としての働きは無く、分化した細胞に高発現であることから腫瘍細胞の分化に関与することが示唆され、分化誘導療法のターゲットの可能性が示唆された。

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 2 件)

- ① Que T, Uehara S, Yamanaka H, Takama U, Fukuzawa M: Expression of Wilms Tumor 1 (WT1) Gene in a Variety of Pediatric Tumors. J Pediatr Surg (in Press)
- ② Wang J, Que T, Uehara S, et al: The role of WT1 gene in neuroblastoma. J Pediatr Surg. 2011;46:326-31.

[学会発表] (計 2 件)

- ① Que T, Wang J, Uehara S, Yamanaka H, Oji Y, Fukuzawa M: The Role of WT1 gene in neuroblastoma. 57th Annual Congress of the British Association of the Paediatric Surgeons (BAPS), Aberdeen, UK, 2010. 7
- ② Que T, Uehara S, Yamanaka H, Takama U, Fukuzawa M: Expression of Wilms Tumor 1 (WT1) Gene in a Variety of Pediatric

Tumors. 44th Annual Meeting of the
Pacific Association of Pediatric
Surgeons. Cancun, Mexico, 11-14, 4,
2011

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高間 勇一 (TAKAMA YUICHI)
大阪大学・医学部附属病院・医員
研究者番号：50467560

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

大植 孝治 (OUE TAKAHARU)
大阪大学・医学系研究科・講師
研究者番号：50314315
福澤 正洋 (FUKUZAWA MASAHIRO)
大阪大学・医学系研究科・教授
研究者番号：60165272