

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 31 日現在

機関番号： 14401
 研究種目： 基盤研究 (C)
 研究期間： 2009～2011
 課題番号： 21591205
 研究課題名 (和文) 白血病における WT1 の抗アポトーシス機能の解析と WT1 分子標的療法の開発
 研究課題名 (英文) Antiapoptotic function of WT1 in leukemia and development of WT1-targeting molecular targeted therapy
 研究代表者
 尾路 祐介 (OJI YUSUKE)
 大阪大学・大学院医学系研究科・寄附講座教授
 研究者番号： 20294100

研究成果の概要 (和文)： 本研究では WT1 の 2 種のアイソフォームが白血病細胞において代謝経路上の複数の酵素の発現レベルを増加させるとともに直接これらの因子に結合することを明らかにした。これらの結果は WT1 遺伝子が代謝調節という新たな機能により白血病の発生・悪性化に関与することを示すとともに、この WT1 による代謝調節の分子メカニズムを標的とした分子標的治療法が白血病に対する新たな治療法の開発につながる可能性を示している。

研究成果の概要 (英文)： The *WT1* gene is overexpressed in leukemia and involved in leukemogenesis through its antiapoptotic functions. In the present study, proteomic analysis revealed that a protein which regulates metabolism of cancer cells was dephosphorylated in a leukemia cells with forced expression of WT1 17AA(+) isoform. Moreover, 60aa-long WT1-derived peptide induced apoptosis in leukemia cells. West-western analysis showed that this WT1-derived peptide bound directly to multiple proteins regulating metabolism of cancer cells. Moreover, forced expression of WT1 17AA(+) isoform increased these proteins. These results indicated that WT1 17AA(+) isoform was involved in cancer cell metabolism and the molecular mechanism of these functions of WT1 could be a target of novel molecular targeted therapy for leukemia.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|-----------|-----------|
| 2009 年度 | 1,500,000 | 450,000 | 1,950,000 |
| 2010 年度 | 1,300,000 | 390,000 | 1,690,000 |
| 2011 年度 | 700,000 | 210,000 | 910,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,500,000 | 1,050,000 | 4,550,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・血液内科学

キーワード： WT1, leukemogenesis, molecular targeted therapy, apoptosis

1. 研究開始当初の背景

ウイルス腫瘍遺伝子 (WT1 遺伝子) は小児腎腫瘍ウイルス腫瘍の原因遺伝子として単離された遺伝子で従来癌抑制遺伝子と考えられてきた。しかし、われわれはこれまでに 1) 変異のない野生型 WT1 遺伝子がほとんどすべての白血病において過剰発現して

おり、病型によらない鋭敏な腫瘍マーカーとなること (Blood, 84, 3071, 1994)、2) 白血病において WT1 mRNA の発現レベルと患者予後は逆相関を示すこと (Blood, 84, 3071, 1994)、3) WT1 アンチセンスオリゴ DNA により WT1 遺伝子の発現を抑制すると WT1 を発現する白血病細胞の増殖が抑制される

こと (Blood, 87, 2878, 1996)、4) WT1 遺伝子の強制発現がマウス正常骨髄前駆細胞の好中球への分化を抑制すること (Blood, 91, 2969, 1998)、5) 造血幹・前駆細胞 (CD34 陽性細胞) の 1.2% の細胞において WT1 mRNA が白血病細胞に匹敵するレベルで高発現していること (Brit J Hematol, 116, 409, 2002) を明らかにしてきた。これらの結果は少数の造血幹・前駆細胞において高発現する WT1 遺伝子の downregulation の障害がこれらの細胞における細胞増殖や分化の抑制を介して白血病の発生に重要な役割を果たし、WT1 遺伝子が癌抑制遺伝子というよりはむしろ癌遺伝子として機能していることを示している。

WT1 遺伝子がコードする WT1 タンパクはその C 末側に 4 個の zinc finger モチーフを持つとともに N 末側には RNA 結合モチーフを持つ、タンパクとも DNA とも RNA とも結合することが可能な分子である。Zinc finger モチーフを持つことから転写因子と考えられてきたが、近年スプライシング因子と結合していることや WT1 タンパクが核と細胞質のポリソームの間をシャトルする可能性が示され、スプライシングや RNA の細胞内での輸送に関与している可能性が報告されている。また、WT1 には 2 箇所の alternative splicing 部位 (17AA と KTS) があり、各々の有無によって 4 種の isoform が存在し、各 isoform が異なる機能を持つと考えられている。我々はこれまでに WT1 の 4 種の isoform のうち 17AA 部位を持つ 2 種の isoform [WT1 17AA(+) isoforms; 17AA(+)KTS(+) および 17AA(+)KTS(-)] が白血病細胞において 17AA(-) isoform に比べてドミナントに発現して抗アポトーシス機能を有することを明らかにした (Oncogene, 25, 4217, 2006)。これはミトコンドリア膜電位の安定化による内因性アポトーシス経路の抑制によるものであり、それには 17AA(+)KTS(-) isoform による proapoptotic な Bak タンパクの発現の抑制が関与している可能性が明らかになった。しかしながら、17AA(+)KTS(+) isoform による抗アポトーシス機能の機序や 17AA(+)KTS(-) isoform による Bak タンパクの発現抑制以外の抗アポトーシス機能の機序については未だ明確ではない。

2. 研究の目的

本研究ではほとんどすべての白血病細胞に過剰発現し抗アポトーシス機能を果たす WT1 17AA(+) isoforms の機能の分子学的機序を明らかにするとともに、これを標的とした白血病に対する分子標的治療法の開発を行なうことを目的とする。

3. 研究の方法

[1] WT1 17AA(+) isoform が活性化/不活化する下流シグナル経路の同定

WT1 非発現癌細胞株に各々の WT1 17AA(+) isoform を過剰発現させた細胞クローンを樹立し、これらにおいて apoptosis 誘導剤 etoposide に対する抵抗性の増強がみられることを確認する。

WT1 17AA(+) isoform のそれぞれがタンパクの翻訳後調節によりシグナル経路の活性を変化させる可能性を考えて、上で樹立した WT1 17AA(+) isoform を過剰発現させた細胞において、タンパクを核と細胞質に分画し、各々の分画について 2 次元電気泳動やイオン交換などの方法によってタンパクを分離後、WT1 の発現によるタンパクのチロシン、セリンやスレオニン残基のリン酸化の状態の変化について解析した。

[2] WT1 17AA(+) タンパクのアミノ酸配列中で、WT1 の抗アポトーシス機能に関与する部位の同定とその部位を介して WT1 タンパクと相互作用する分子の同定

我々はこれまでに WT1 17AA(+)KTS(+) タンパクの様々な部位を欠失させた欠失変異体を作成し、これらの抗アポトーシス機能を解析した。その結果、WT1 17AA(+)KTS(+) の N 末側に欠失させると抗アポトーシス機能が却って増強される 60aa の領域を見出した。これは WT1 タンパクがこの 60aa の領域を介して他の分子と相互作用し、細胞の生存に関わる機能を果たしている可能性を示唆する。この結果に基づいて本研究では、この 60aa の配列をプローブとしてこれと結合するタンパクを West-western 法により探索するとともに、60aa の配列においてアポトーシスを誘導しうる配列を解析した。

[3] WT1 シグナル経路を標的とする新規分子標的薬の開発

(1) 薬剤候補としてペプチドを化学合成する際は長さが 20aa 以下であることが細胞への導入効率やコストの点で望ましいので、白血病細胞にアポトーシスを誘導した配列をさらに分割したペプチド (N 末に細胞膜通過配列を付与) を合成し、これらの白血病細胞に対するアポトーシス誘導能を in vitro で解析する。

(2) 白血病細胞にアポトーシスを誘導した WT1 由来ペプチドを、K562 白血病細胞のヌードマウスの xenograft model において静脈内投与を行い、in vivo 抗腫瘍効果を評価する。

4. 研究成果

[1] WT1 17AA(+) isoform が活性化/不活化する下流シグナル経路の同定

WT1 17AA(+) isoformによる標的タンパクの翻訳後修飾や細胞内局在の変化を明らかにするためにプロテミクス的手法により解析を行い、WT1 17AA(+) isoformの強制発現によりそのリン酸化が低下するタンパクとして細胞の代謝調節に関与するタンパクを同定した。

[2] WT1 17AA(+)タンパクのアミノ酸配列中で、WT1の抗アポトーシス機能に関与する部位の同定とその部位を介してWT1タンパクと相互作用する分子の同定

WT1タンパクの部分配列である60aaの配列をプローブとしてこれと結合するタンパクをWest-western法により探索し、3種のタンパクをその候補として同定した。そのうちの2種は低酸素状態における代謝に関与するタンパクであり、さらにそのうちの一方は、これまでにWT1の発現によりリン酸化が低下するタンパクとして同定したタンパクであった。これらの結果は、WT1タンパクの機能の発現の機序として、これまでに明らかではなかった、細胞の代謝の調節が重要である可能性を示す。そこで、WT1遺伝子による癌細胞の代謝調節を明確にするためにWT1の4種のアイソフォームのそれぞれを強制発現した細胞クローンを用いて1) WT1の2種のアイソフォームがストレス状況下における細胞増殖を促進すること、2) WT1の2種のアイソフォームが、代謝経路上の複数の因子のmRNAの発現レベルを増加させることを明らかにし、これらの遺伝子発現がタンパクレベルでも増加すること、3) WT1がこの代謝経路の最終産物の産生を増加させることを示し、WT1遺伝子の2種のアイソフォームが癌細胞の代謝経路上の因子の発現調節を介して、この代謝調節を行っていることを明らかにした。さらにWT1タンパクによる直接的な酵素活性の調節については、まず、癌細胞の細胞質分画を用いてこの中の酵素活性がWT1部分配列ペプチドの添加により抑制された。これはWT1部分配列ペプチドの細胞死誘導の作用機序が代謝経路の抑制であることを明らかにし、この経路が新たな分子標的治療薬の標的となりうることを示している。

[3] WT1シグナル経路を標的とする新規分子標的薬の開発

薬剤候補としてペプチドを化学合成する際は長さが20aa以下であることが細胞への導入効率やコストの点で望ましいので、白血病

細胞にアポトーシスを誘導した60aaの配列をさらに分割したペプチド(N末に細胞膜通過配列を付与)を合成し、これらの白血病細胞に対するアポトーシス誘導能をin vitroで解析し、WT1を発現する癌細胞に効率よくアポトーシスを誘導するWT1部分配列ペプチドを同定した。

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17件) すべて査読あり

- ① Hayashi S, Oji Y, Kanai Y, Teramoto T, Kitaichi M, Kawaguchi T, Okada M, Sugiyama H, Matsumura A. Low Wilms' tumor gene expression in tumor tissues predicts poor prognosis in patients with non-small-cell lung cancer. *Cancer Invest.* 2012;30:165-71. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22148937>
- ② Hosen N, Matsuoka Y, Kishida S, Nakata J, Mizutani Y, Hasegawa K, Mugitani A, Ichihara H, Aoyama Y, Nishida S, Tsuboi A, Fujiki F, Tatsumi N, Nakajima H, Hino M, Kimura T, Yata K, Abe M, Oka Y, Oji Y, Kumanogoh A, Sugiyama H. CD138-negative clonogenic cells are plasma cells but not B cells in some multiple myeloma patients. *Leukemia.* 2012. doi: 10.1038/leu.2012.80.
- ③ Shirakata T, Oka Y, Nishida S, Hosen N, Tsuboi A, Oji Y, Murao A, Tanaka H, Nakatsuka S, Inohara H, Sugiyama H. WT1 peptide therapy for a patient with chemotherapy-resistant salivary gland cancer. *Anticancer Res.* 2012;32:1081-5. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22399636>
- ④ Chiba Y, Kinoshita M, Okita Y, Tsuboi A, Isohashi K, Kagawa N, Fujimoto Y, Oji Y, Oka Y, Shimosegawa E, Morita S, Hatazawa J, Sugiyama H, Hashimoto N, Yoshimine T. Use of (11)C-methionine PET parametric response map for monitoring WT1 immunotherapy response in recurrent malignant glioma. *J Neurosurg.* 2012;116:835-42. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22242671>

- ⑤ Nakajima H, Oka Y, Tsuboi A, Tatsumi N, Yamamoto Y, Fujiki F, Li Z, Murao A, Morimoto S, Hosen N, Shirakata T, Nishida S, Kawase I, Isaka Y, Oji Y, Sugiyama H. Enhanced tumor immunity of WT1 peptide vaccination by interferon- β administration. *Vaccine*. 2012;30:722-9. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22133512>
- ⑥ Morimoto S, Oka Y, Tsuboi A, Tanaka Y, Fujiki F, Nakajima H, Hosen N, Nishida S, Nakata J, Nakae Y, Maruno M, Myoui A, Enomoto T, Izumoto S, Sekimoto M, Kagawa N, Hashimoto N, Yoshimine T, Oji Y, Kumanogoh A, Sugiyama H. Biased usage of T cell receptor β -chain variable region genes of Wilms' tumor gene (WT1)-specific CD8⁺ T cells in patients with solid tumors and healthy donors. *Cancer Sci*. 2012;103:408-14. doi: 10.1111/j.1349-7006.2011.02163.x.
- ⑦ Hosen N, Ichihara H, Mugitani A, Aoyama Y, Fukuda Y, Kishida S, Matsuoka Y, Nakajima H, Kawakami M, Yamagami T, Fuji S, Tamaki H, Nakao T, Nishida S, Tsuboi A, Iida S, Hino M, Oka Y, Oji Y, Sugiyama H. CD48 as a novel molecular target for antibody therapy in multiple myeloma. *Br J Haematol*. 2012;156:213-24. doi: 10.1111/j.1365-2141.2011.08941.x.
- ⑧ Tsuboi A, Oka Y, Kyo T, Katayama Y, Elisseeva OA, Kawakami M, Nishida S, Morimoto S, Murao A, Nakajima H, Hosen N, Oji Y, Sugiyama H. Long-term WT1 peptide vaccination for patients with acute myeloid leukemia with minimal residual disease. *Leukemia*. 2011. doi: 10.1038/leu.2011.343.
- ⑨ Hashii Y, Sato-Miyashita E, Matsumura R, Kusuki S, Yoshida H, Ohta H, Hosen N, Tsuboi A, Oji Y, Oka Y, Sugiyama H, Ozono K. WT1 peptide vaccination following allogeneic stem cell transplantation in pediatric leukemic patients with high risk for relapse: successful maintenance of durable remission. *Leukemia*. 2012;26:530-2. doi: 10.1038/leu.2011.226.
- ⑩ Sitaram RT, Degerman S, Ljungberg B, Andersson E, Oji Y, Sugiyama H, Roos G, Li A. Wilms' tumour 1 can suppress hTERT gene expression and telomerase activity in clear cell renal cell carcinoma via multiple pathways. *Br J Cancer*. 2010;103:1255-62. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20842112>
- ⑪ Fujiki F, Oka Y, Kawakatsu M, Tsuboi A, Tanaka-Harada Y, Hosen N, Nishida S, Shirakata T, Nakajima H, Tatsumi N, Hashimoto N, Taguchi T, Ueda S, Nonomura N, Takeda Y, Ito T, Myoui A, Izumoto S, Maruno M, Yoshimine T, Noguchi S, Okuyama A, Kawase I, Oji Y, Sugiyama H. A clear correlation between WT1-specific Th response and clinical response in WT1 CTL epitope vaccination. *Anticancer Res*. 2010;30:2247-54. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20651376>
- ⑫ Oji Y, Oka Y, Nishida S, Tsuboi A, Kawakami M, Shirakata T, Takahashi K, Murao A, Nakajima H, Narita M, Takahashi M, Morita S, Sakamoto J, Tanaka T, Kawase I, Hosen N, Sugiyama H. WT1 peptide vaccine induces reduction in minimal residual disease in an Imatinib-treated CML patient. *Eur J Haematol*. 2010 Oct;85(4):358-60. doi: 10.1111/j.1600-0609.2010.01497.x.
- ⑬ Van Tendeloo VF, Van de Velde A, Van Driessche A, Cools N, Anguille S, Ladell K, Gostick E, Vermeulen K, Pieters K, Nijs G, Stein B, Smits EL, Schroyens WA, Gadsseur AP, Vrelust I, Jorens PG, Goossens H, de Vries IJ, Price DA, Oji Y, Oka Y, Sugiyama H, Berneman ZN. Induction of complete and molecular remissions in acute myeloid leukemia by Wilms' tumor 1 antigen-targeted dendritic cell vaccination. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107:13824-9. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2922237/?tool=pubmed>
- ⑭ Ichinohasama R, Oji Y, Yokoyama H, Takeuchi K, Fujiwara T, Ishizawa K, Taniguchi O, Tsuboi A, Oka Y, Sugiyama H. Sensitive immunohistochemical detection of WT1 protein in tumors with anti-WT1 antibody against WT1 235 peptide. *Cancer Sci*. 2010;101:1089-92. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1349-7006.2010.01522.x/abstract;jsessionid=8A19D28E675DF64AEAAAC58923BDEE88.d02t03>

- ⑮ Murao A, Oka Y, Tsuboi A, Elisseeva OA, Tanaka-Harada Y, Fujiki F, Nakajima H, Nishida S, Hosen N, Shirakata T, Hashimoto N, Myoui A, Ueda T, Takeda Y, Osaki T, Enomoto T, Yoshikawa H, Kimura T, Oji Y, Kawase I, Sugiyama H. High frequencies of less differentiated and more proliferative WT1-specific CD8+ T cells in bone marrow in tumor-bearing patients: an important role of bone marrow as a secondary lymphoid organ. *Cancer Sci.* 2010;101:848-54.
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1349-7006.2009.01468.x/abstract>
- ⑯ Tanaka-Harada Y, Kawakami M, Oka Y, Tsuboi A, Katagiri T, Elisseeva OA, Nishida S, Shirakata T, Hosen N, Fujiki F, Murao A, Nakajima H, Oji Y, Kanda Y, Kawase I, Sugiyama H. Biased usage of BV gene families of T-cell receptors of WT1 (Wilms' tumor gene)-specific CD8+ T cells in patients with myeloid malignancies. *Cancer Sci.* 2010;101:594-600.
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1349-7006.2009.01453.x/abstract>
- ⑰ Tamura H, Dan K, Yokose N, Iwakiri R, Ohta M, Sakamaki H, Tohyama K, Kondo A, Hyodo H, Nakamura K, Yamashita T, Elisseeva OA, Oka Y, Oji Y, Sugiyama H, Ogata K. Prognostic significance of WT1 mRNA and anti-WT1 antibody levels in peripheral blood in patients with myelodysplastic syndromes. *Leuk Res.* 2010;34:986-90.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20031209>

[学会発表] (計 2 件)

- ① Oji Y, Berneman Z. N, Keilholz U, O'reilly R, Saglio G, Wagner N, Heike Y, Lundin E, Aozasa K, Pauwels P, Anguille S, Cilloni D, Ohashi H, Waelput W, Fukuda M, Tatsumi N, Oka Y, Sugiyama H.
Standardization of WT1 Immunohistochemical Staining and Evaluation of WT1 Positivity in Solid Cancers.
April 15, 2011, Turin, Italy
- ② Fukuda M, Oji Y, Nakatsuka S, Oka Y, Tsuboi A, Hosen N, Nishida S, Tatsumi N, Aozasa K, Sugiyama K.
WT1 Expression in Tumor Endothelial Cells.
2010年9月24日 第69回日本癌学会学術集会 (大阪)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

尾路 祐介 (OJI YUSUKE)
大阪大学・大学院医学系研究科・寄附講座
教授

研究者番号 : 20294100

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

