

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591395

研究課題名(和文) 白血病におけるWT1遺伝子のがん遺伝子機能解析とWT1分子標的療法の開発

研究課題名(英文) Oncogenic functions of the WT1 gene in leukemia

研究代表者

尾路 祐介(OJI, Yusuke)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・寄附講座教授

研究者番号：20294100

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：WT1遺伝子は様々な腫瘍の発生・悪性化に関与する。本課題ではWT1の新たな癌遺伝子機能としてDNA損傷修復促進と代謝調節の二つを明らかにした。まず、WT1のWTC isoformは遺伝子組換え(HR)因子のRad51D、XRCC2、およびRad54の発現を上昇させDNA損傷修復の主要経路HRを促進することで、腫瘍の抗癌剤抵抗性をもたらした。次に腫瘍細胞の細胞質に発現するWT1タンパクが、細胞の代謝に関わる酵素に直接結合しその活性を増強していることを示した。以上の知見はWT1遺伝子が様々な機序で癌遺伝子様機能を果たすとともにこれらを標的とした新たな分子標的治療法開発の可能性を示すものである。

研究成果の概要(英文)：The WT1 gene is overexpressed in leukemia and various types of solid tumors. In the present research project, we elucidated two novel mechanisms by which WT1 exerts its oncogenic functions. First, WT1 induced resistance to chemotherapeutic drugs such as DOX through promotion of homologous recombination (HR) that plays a critical role in DNA damage repair responses. Among four isoforms of WT1, WTC isoform alone promoted HR, which resulted from upregulation of HR factors, XRCC2, Rad51D, and Rad54. Immunohistochemistry showed that XRCC2 and Rad54 proteins were highly expressed in the majority of NSCLC and gastric cancer, and that expression of these two proteins was significantly correlated with that of WT1 protein in NSCLCs. Second, we showed the involvement of cytoplasmic WT1 protein in metabolic regulation through direct binding to metabolic enzymes in tumor cells. These interactions of WT1 with metabolic enzymes might be targets of novel molecular targeted cancer therapy.

研究分野：腫瘍生物学 血液学 腫瘍免疫学

キーワード：WT1 oncogene chemoresistance

1. 研究開始当初の背景

ウィルス腫瘍遺伝子 (WT1 遺伝子) は小児腎腫瘍ウィ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以下を明らかにしてきた。

- 1) 変異のない野生型 WT1 遺伝子が白血病や肺癌、大腸癌などの様々な固形癌において過剰発現
- 2) 白血病、軟部肉腫において WT1 mRNA の発現レベルと患者予後は逆相関を示す
- 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や固形癌細胞の増殖が抑制される
- 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
- 5) WT1 遺伝子の 4 種のアイソフォームのうち WTA(17AA+/KTS+), WTB(+/-) は白血病細胞および固形癌細胞のミトコンドリア膜電位の安定を介して抗がん剤であるドキソルビシンやエトポシド誘導性のアポトーシスを抑制する
- 6) WTD(-/-) はアクチン結合タンパクであるゲルゾリンやアクチニンの発現レベルを制御することにより腫瘍細胞の運動能や浸潤能を増強することを明らかにしてきた。

これらの結果は WT1 遺伝子がこれらの細胞における細胞増殖、分化の抑制や細胞死の抑制を介して白血病や固形癌の発生に重要な役割を果たし、WT1 遺伝子が癌抑制遺伝子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た。

さらに我々は本研究課題の先行研究において WT1 が新たな癌遺伝子様機能としてゲノム安定性維持・DNA 損傷修復や細胞の生存に関与する代謝系において役割を果たす可能性を明らかにしていた。

2. 研究の目的

本研究の研究目的はこれまでの研究で示唆された、ゲノム安定性・DNA 損傷修復および腫瘍細胞の代謝制御において WT1 遺伝子の果たす機能とその分子学的メカニズムを明確にすることである。さらに、WT1 タンパクがこれらの機能を果たすためには WT1 タンパクと binding partner となる分子の間の相互作用が重要であることが示唆されたので、本研究においては WT1 タンパクと binding partner の相互作用を WT1 ペプチドにより dominant negative に阻害することによって、WT1 が他の因子と協働して発揮する機能のメカニズムを解析することである。

3. 研究の方法

(1) WT1 遺伝子のゲノム安定性・DNA 損傷修復への関与について

1-1 WT1 の DNA 二本鎖切断 (DSB) の損傷修復への関与

DNA DSB の主たる修復経路である homologous recombination (HR) が起こると G F P を発現するレポーターベクターを導入した WT1 遺伝子を内在性に発現しないヒト細胞株に WT1 遺伝子の isoform のそれぞれを強制発現させ、WT1 の HR に及ぼす影響を検討した。WT1 が HR を介した DNA DSB の修復を促進したため、これらの WT1 強制発現細胞における HR 因子の発現変化を解析し、WT1 による HR 因子の発現調節の有無およびその機序について解析した。

1-2 WT1 とゲノム DNA 代謝因子 X の間の相互作用を阻害する WT1 ペプチドの同定

これまでの研究で WT1 タンパクがゲノム DNA の保護・修復に重要な役割を果たす因子 X (仮称) と直接結合することを *in vitro* binding assay により明らかにした。そこで、WT1 と因子 X を含む WT1 複合体がゲノム DNA 保護・

損傷修復において果たす役割を明らかにするために、WT1 の部分配列のペプチドライブラリーを合成し、WT1 タンパクと因子Xの結合を dominant negative に阻害する WT1 ペプチドを同定した。

(2) WT1 遺伝子による腫瘍細胞の代謝制御について

2-1 酵素活性の in vitro 測定系の確立

WT1 による制御が示唆された代謝経路および WT1 が直接結合しうる酵素 Y1, Y2 (仮称) の活性を in vitro で測定する系を確立した。さらに、これらの in vitro 測定系に、リコンビナントの全長 WT1 タンパクを加え、これらの代謝経路の活性、酵素の活性への影響を解析した。

2-2 WT1 タンパクと酵素 Y1, Y2 の結合を dominant negative に阻害しうる WT1 ペプチドの同定とその酵素活性への影響

酵素と結合しうる WT1 ペプチドは WT1 タンパクと酵素の結合を dominant negative に阻害しうる。そのため、酵素 Y1, Y2 と結合しうる WT1 ペプチドを同定し、これが酵素 Y1 および Y2 の活性に及ぼす影響を in vitro 測定系において解析した。

(3) WT1 分子標的療法の開発

細胞の生存および増殖に重要な役割を果たす WT1 タンパクとその binding partner の結合部位を標的として、これを阻害すると考えられる細胞膜透過配列を付加した WT1 ペプチドを合成し、その WT1 発現腫瘍細胞の増殖、生存に及ぼす影響を解析した。

4. 研究成果

(1) WT1 遺伝子のゲノム安定性・DNA 損傷修復への関与

本研究では WT1 の 4 種のアイソフォームのうちこれまで機能が明確ではなかった、WTC アイソフォームが重大な DNA 損傷である DNA の二本鎖切断において、その主要な修復経路である遺伝子組換え(HR)を促進することで、DNA 損傷修復を促進することを明らかにし、その機序として、HR の過程の早期のステップに關与する Rad51D および XRCC2、さらに中期から後期のステップに關与する Rad54 の発現の上昇を明らかにした。さらに WTC アイソフォームによるこれらの遺伝子の発現上昇の機序として、WTC タンパクが XRCC2 および Rad51D のプロモーター領域に直接結合していることを明らかにした。

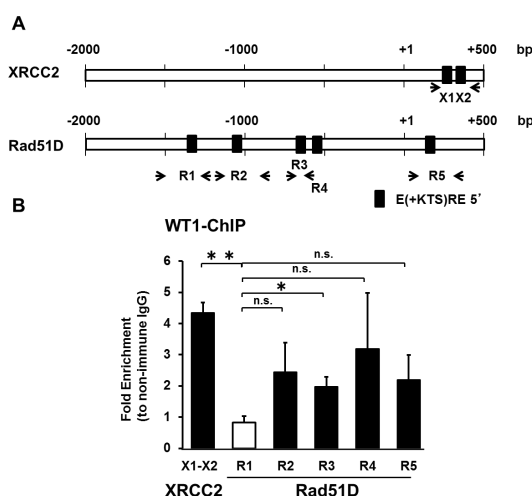


図 1. WTC タンパクの XRCC2 および Rad51D プロモーターへの結合 A. XRCC2 および Rad51D のプロモーター領域における KTS+WT1 アイソフォームの結合しうる部位. B. クロスリンク後、WTC タンパクと結合したゲノム DNA を WT1 抗体により免疫沈降し、それぞれの領域の DNA を Real-time PCR 法により増幅した。

さらに非小細胞肺癌および胃癌において、XRCC2 および Rad54 タンパクが高発現していること、非小細胞肺癌においてこれらのタンパクと WT1 タンパクの発現が相関していること、腫瘍細胞内に共発現していることを明らかにした。

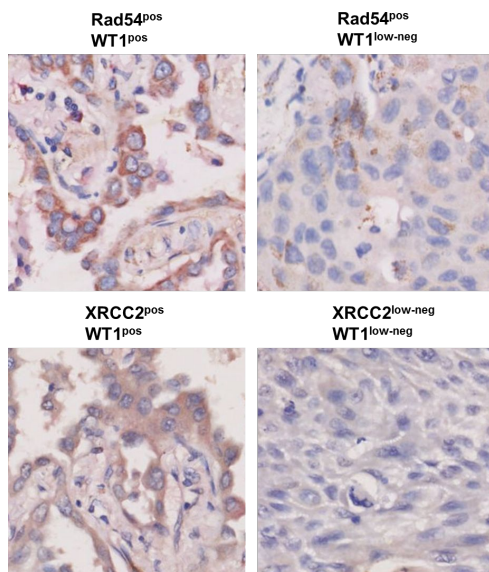


図2. WT1 と Rad54 または XRCC2 との肺癌組織の免疫組織化学による二重染色像。WT1 は赤、Rad54 および XRCC2 は茶色に染色される。

これらの研究成果は白血病や様々な固形癌で過剰発現する WT1 遺伝子の新たな癌遺伝子様機能を明らかにしたものである。さらに WT1 のアイソフォームのうち二つ目のスプライシング部位である KTS を持つ KTS(+)WT1 アイソフォームの転写因子としての役割は明確ではなく少数の報告があるのみであった。今回の結果により KTS(+)WT1 アイソフォームが転写因子として様々な遺伝子の発現を調節する可能性が示されたことは WT1 遺伝子の機能を理解する上で重要な知見である。以上の成果は *Mol Carcinog* 誌にて発表した。

(2) WT1 遺伝子の腫瘍細胞の代謝制御を標的にした分子標的療法の開発

WT1 が直接結合しうる酵素 Y1 および Y2 に全長 WT1 タンパクを加えたところ、WT1 タンパクが直接これらの酵素の活性を増強することを明らかにした。WT1 タンパク上の結合部位に該当する WT1 ペプチドは WT1 タンパクと酵素の結合を dominant negative に阻害しうる。そのため、酵素 Y1, Y2 と結合しうる WT1 ペプチドを同定し、これが WT1 タンパクによ

る酵素 Y1 および Y2 の活性増強をキャンセルすることを明らかにした。さらに細胞膜透過配列を付加した WT1 ペプチドを合成し、これで WT1 発現腫瘍細胞を処理したところ、これらの細胞に細胞死を誘導した。これらの結果は腫瘍細胞の代謝を標的とし、かつ WT1 を発現する腫瘍細胞に特異的な新たな治療法の開発につながる知見である。

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 13 件)

1. Oji Y, Tatsumi N, Kobayashi J, Fukuda M, Ueda T, Nakano E, Saito C, Shibata S, Sumikawa M, Fukushima H, Saito A, Hojo N, Suzuki M, Hoshikawa T, Shimura T, Morii E, Oka Y, Hosen N, Komatsu K, Sugiyama H. Wilms' tumor gene WT1 promotes homologous recombination-mediated DNA damage repair. *Mol Carcinog*. 2014, in press.
2. Oji Y, Tatsumi N, Fukuda M, Nakatsuka S, Aoyagi S, Hirata E, Nanchi I, Fujiki F, Nakajima H, Yamamoto Y, Shibata S, Nakamura M, Hasegawa K, Takagi S, Fukuda I, Hoshikawa T, Murakami Y, Mori M, Inoue M, Naka T, Tomonaga T, Shimizu Y, Nakagawa M, Hasegawa J, Nezu R, Inohara H, Izumoto S, Nonomura N, Yoshimine T, Okumura M, Morii E, Maeda H, Nishida S, Hosen N, Tsuboi A, Oka Y, Sugiyama H. The translation elongation factor eEF2 is a novel tumor associated antigen overexpressed in various types of cancers. *Int J Oncol*. 44: 1461-9,

- 2014.
3. Yamanouchi K, Ohta T, Liu Z, Oji Y, Sugiyama H, Shridhar V, Matsumura S, Takahashi T, Takahashi K, Kurachi H. The Wilms' Tumor Gene WT1 - 17AA/- KTS Splice Variant Increases Tumorigenic Activity Through Up-Regulation of Vascular Endothelial Growth Factor in an In Vivo Ovarian Cancer Model. *Transl Oncol.* 7: 580-9, 2014.
 4. Andersson C, Oji Y, Ohlson N, Wang S, Li X, Ottander U, Lundin E, Sugiyama H, Li A. Prognostic significance of specific anti-WT1 IgG antibody level in plasma in patients with ovarian carcinoma. *Cancer Med.* 3: 909-18, 2014.
 5. Nishida S, Koido S, Takeda Y, Homma S, Komita H, Takahara A, Morita S, Ito T, Morimoto S, Hara K, Tsuboi A, Oka Y, Yanagisawa S, Toyama Y, Ikegami M, Kitagawa T, Eguchi H, Wada H, Nagano H, Nakata J, Nakae Y, Hosen N, Oji Y, Tanaka T, Kawase I, Kumanogoh A, Sakamoto J, Doki Y, Mori M, Ohkusa T, Tajiri H, Sugiyama H. Wilms tumor gene (WT1) peptide-based cancer vaccine combined with gemcitabine for patients with advanced pancreatic cancer. *J Immunother.* 37: 105-14, 2014.
 6. Kijima N, Hosen N, Kagawa N, Hashimoto N, Kinoshita M, Oji Y, Sugiyama H, Yoshimine T. Wilms' tumor 1 is involved in tumorigenicity of glioblastoma by

regulating cell proliferation and apoptosis. *Anticancer Res.* 34: 61-7, 2014.

7. Lin Y, Fujiki F, Katsuhara A, Oka Y, Tsuboi A, Aoyama N, Tanii S, Nakajima H, Tatsumi N, Morimoto S, Tamanaka T, Tachino S, Hosen N, Nishida S, Oji Y, Kumanogoh A, Sugiyama H. HLA-DPB1*05:01-restricted WT1332-specific TCR-transduced CD4+ T lymphocytes display a helper activity for WT1-specific CTL induction and a cytotoxicity against leukemia cells. *J Immunother.* 36: 159-70, 2013.
8. Tachino S, Fujiki F, Oka Y, Tsuboi A, Morimoto S, Lin YH, Tamanaka T, Kondo K, Nakajima H, Nishida S, Hosen N, Oji Y, Kumanogoh A, Sugiyama H. Functional human Th17 clones with WT1-specific helper activity. *Cancer Immunol Immunother.* 62: 801-10, 2013.

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

大阪大学大学院医学系研究科免疫造血性制御学研究室ホームページ

<http://sahswww.med.osaka-u.ac.jp/~hmtonc/index.html>

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

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：