

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 28 日現在

機関番号：11501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791680

研究課題名(和文) WT1の新規標的分子としての可能性：卵巣癌発がんと薬剤抵抗性機序への関与

研究課題名(英文) The possibility of WT1 gene for new therapeutic target in ovarian cancer

研究代表者

太田 剛(OHTA, Tsuyoshi)

山形大学・医学部・助教

研究者番号：50375341

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：卵巣癌マウス実験モデルを用いてWT1 variantの腫瘍産生能とマウスの生存期間に与える影響を検討した。WT1 variant (-17AA/-KTS)過剰発現細胞を接種したマウスはコントロール(空ベクターを導入)細胞を接種したマウスと比較して、腹水・腫瘍産量が有意に増加し、全生存期間の短縮を認めた。さらにWT1 (-17AA/-KTS)過剰発現によりVEGF (vascular endothelial growth factor)の発現と血管新生が増強していた。WT (-17AA/-KTS)はVEGFの発現増強を介して、腹水・腫瘍産生量を増強させ、卵巣癌の悪性度の高める可能性がある。

研究成果の概要(英文)：In this study, we sought to investigate the effects of WT1 splice variants on tumorigenic activity and survival in an in vivo ovarian cancer model. In mice inoculated intraperitoneally with SKOV3ip1 cells expressing WT1 -17AA/-KTS, disseminated tumor weights and production of ascites were significantly increased compared with those in mice inoculated with cells expressing the control vector. The overall survival in mice with WT1 -17AA/-KTS-expressing cells was significantly shorter than that in mice with control cells. WT1 -17AA/-KTS significantly increased the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and tumor microvessel density compared with the control. These results indicated that WT1 -17AA/-KTS could enhance tumorigenic activity and could decrease patient survival through up-regulation of VEGF expression in ovarian cancers. The expression of WT1 -17AA/-KTS may induce ovarian cancer cells into a more aggressive phenotype.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：産婦人科

キーワード：Wilms' tumor 1 (WT1) 卵巣癌 腫瘍産生 VEGF 血管新生

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 卵巣癌は主に4種の組織型(漿液性、粘液性、明細胞、類内膜)に分けられるが、その発生源となる細胞と発生の key となる遺伝子(driver gene)はそれぞれの組織型で異なると報告されている(Histopathology 2008)。高悪性型漿液性腺癌では、driver gene である p53 の変異と homeobox genes (HOX)9 の過剰発現があり、その他の組織型では PTEN, Kras, C-Myc などの変異と HOX10, 11 の過剰発現があると報告されている(Adv Anat Pathol 2009)。さらに最近、卵管上皮細胞(fallopian tube secretory epithelial cell (FTSEC))を immortalize すると高悪性型漿液性腺癌が発生し、従来の卵巣癌が卵巣上皮細胞(ovarian surface epithelial cell (OSE))から発生するという概念が覆された(PNAS 2011)。また本邦で発症頻度が高い明細胞腺癌は子宮内膜症病巣を発生母地とするという報告がある(Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 2009)。このような卵巣癌の組織型による発がん機序の違いは未だ十分には解明されていない。これを解明することによって、

卵巣癌の発症を抑えることが可能になり、さらに卵巣癌組織型による生物学的特徴が明らかとなって、卵巣癌組織型による薬剤感受性の相違、すなわち、漿液性・類内膜腺癌は抗がん薬に感受性であるが、粘液性・明細胞腺癌は抗がん薬に抵抗性である(J Clin Oncol 2007)という問題を解決できる可能性がある。

(2) 研究当初は、ヒト卵管上皮細胞株(FTSEC: fallopian tube secretory epithelial cell)の樹立し、WT1 と発がん機序の関連を検討する予定であったが、上記細胞の樹立には至らなかった。そこで我々は、WT1 が 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、variant により apoptosis 誘導や上皮間葉移行機能が異なると報告されていることに着目し、卵巣癌における WT1 variant の機能解析を行うことにした。

## 2. 研究の目的

WT1 は細胞によって tumor suppressor となる時もあり、oncogene となる時もある(Nat Rev Cancer 2011)。我々はこの現象が WT1 isoform によって機能が異なり、細胞における variant 発現の割合が異なることが原因となるのではないかと仮説を立てた。また発がん機序と腫瘍産生能は密接な関連があると考えられ、以下の3点を研究目的とした。

(1) 卵巣癌マウスモデルを用いて WT1 variant の発現と腹水・腫瘍産生能の関連について検討する。

(2) 卵巣癌マウスモデルを用いて WT1 variant の発現によるマウスの生存期間に与える影響を検討する。

(3) WT1 variant が制御する遺伝子を同定する。

## 3. 研究の方法

(1) WT1 isoform 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 による腹水・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、腹水・腫瘍産生量を比較した。

(3) WT1 variant による腹水・腫瘍産生能の違いがマウスの生存期間に与える影響についての検討: 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、Kaplan-Meier 法によってマウスの生存曲線を算出した。

(4) WT1 variant による VEGF (vascular endothelial growth factor)の発現の違いに関する検討: WT1 が制御する遺伝子である VEGF に着目し、Western blot で WT1 variant による発現の違いを検討した。

(5) WT1 variant による血管新生能の違いに関する検討: 産生された腫瘍を血管内皮のマーカーである抗 CD41 抗体で免疫染色を行い、光学顕微鏡100倍率でランダムに4視野をとり、CD41 陽性の血管数をカウントし、Microvessel density (MVD, number/mm<sup>2</sup>)を算出した。

(6) 抗 VEGF 抗体 (bevacizumab) を用いて、WT1 variant による腹水・腫瘍産生能の亢進が抑制されるか否かを上記(2)で示したマウス実験モデルで検討した。

## 4. 研究成果

(1) WT1 variant 過剰発現 SKOV3ip1 細胞の樹立

レンチウイルスベクター (pHR-SIN-CSGW dNotI)を用いて4つの WT1 variant を卵巣癌細胞株 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)。

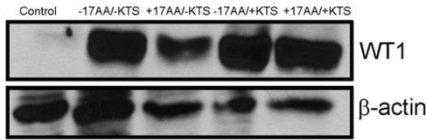


図 1. WT1 variant の発現

(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 による腹水・腫瘍産生能の違いを検討した。コントロールと比較して、WT1 variant (-17AA/-KTS)において腹水・腫瘍産生能ともにコントロールと比較して亢進を認めた。図 2 に各 WT1 variant 発現細胞を移植したマウスの開腹所見と腫瘍産生量を示す。

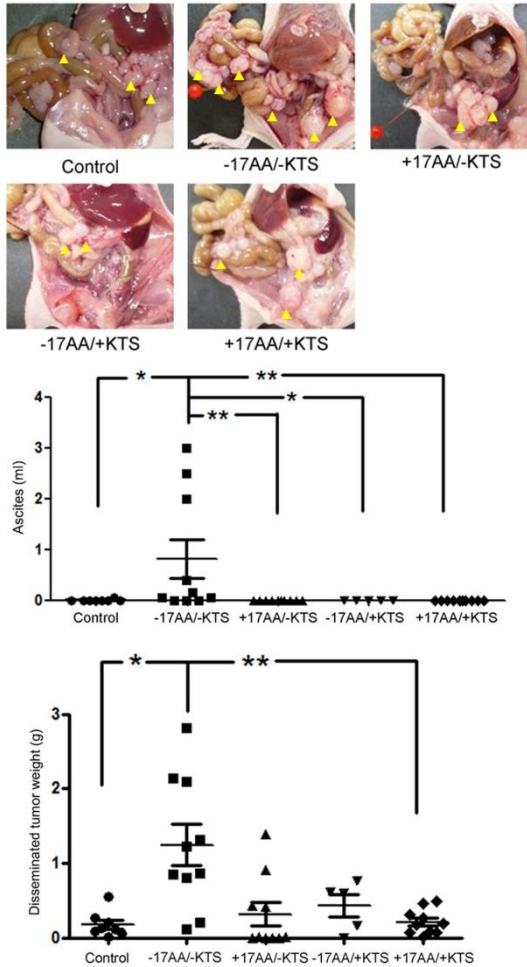


図 2. マウス開腹所見と腹水・腫瘍産生量

(3) WT1 variant によるマウスの生存期間に与える影響の検討

各 variant が発現した卵巣癌細胞株 SKOV3ip1 を移植したマウスにおける生存曲線を図 3 示す。WT1 variant (-17AA/-KTS)によりコントロールと比較してマウスの生存期間が短縮することが明らかとなった。

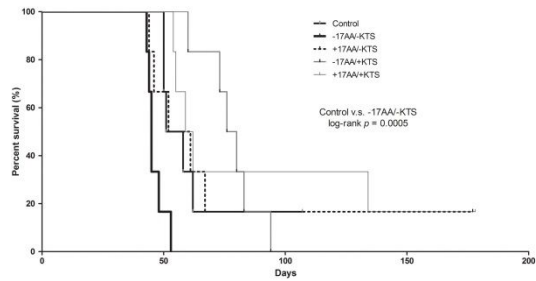


図 3. 各 WT1 variant 細胞を移植したマウスにおける生存曲線

(4) WT1 variant による VEGF の発現変化の検討

上記(3)の実験で、コントロールと比較して WT1 variant (-17AA/-KTS)において腹水・腫瘍産生能の亢進を認めた。WT1 が制御する遺伝子として VEGF があること、腹水産生に関して VEGF が関連していること、VEGF により細胞増殖が亢進することなどから WT1 variant (-17AA/-KTS)に関して、VEGF の発現をコントロールと比較した。Western blot による検討で、WT1 variant (-17AA/-KTS)により VEGF の発現量が増加することが明らかとなった (図 4)。

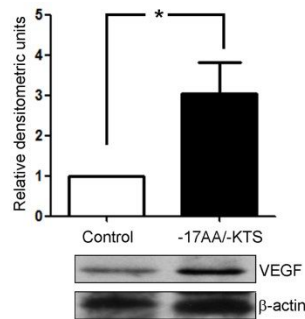
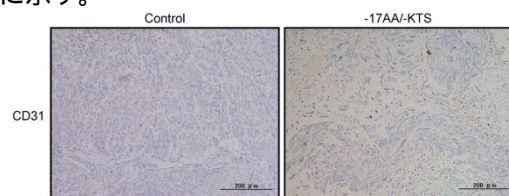


図 4. WT1 variant (-17AA/-KTS)における VEGF 発現

(5) WT1 variant による血管新生に対する影響の検討

上記(4)の結果から WT1 variant (-17AA/-KTS)では VEGF の発現がコントロールと比較して亢進していることから、産生腫瘍内の血管新生について抗 CD31 抗体の免疫染色を用いて、Microvessel density (MVD, number/mm<sup>2</sup>)を算出することで検討した。WT1 variant (-17AA/-KTS)ではコントロールと比較して血管新生が有意に更新していた。代表的な CD31 免疫染色写真と MVD の結果を図 5 に示す。



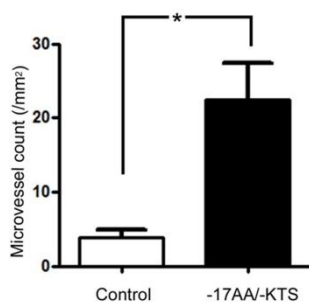


図5 .抗 CD41 抗体による免疫染色写真と WT1 variant (-17AA/-KTS) による血管新生数 (MVD)

(6) 抗 VEGF 抗体によって WT1 variant (-17AA/-KTS) の腹水・腫瘍産生能が抑制されるか否かの検討

WT1 variant (-17AA/-KTS) 発現細胞を移植したマウスに PBS または抗 VEGF 抗体 (bevacizumab) を投与したところ、bevacizumab によって WT1 variant (-17AA/-KTS) の腹水・腫瘍産生能が抑制された (図6)。

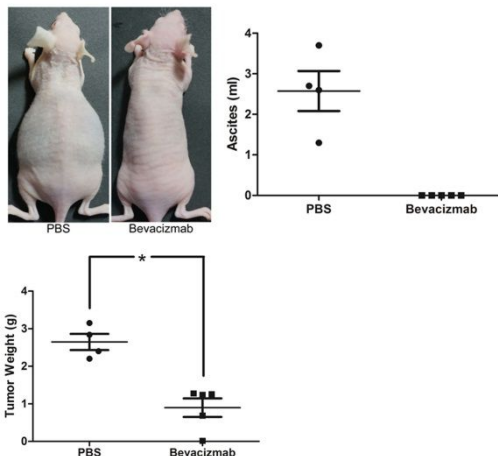


図6. Bevacizumab 投与によるマウスの外観と腹水・腫瘍産生量

## 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 5 件)

Matsumura S, Ohta T, Takahashi T, Yamazaki T, Takahashi K, Kurachi H. Non-sex cord-stromal ovarian tumors frequently produce and secrete estrogen in postmenopausal women: impact on bone metabolism and abnormal endometrial histology. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013 Jul; 98(7):2775-82. doi:10.1210/jc.2013-1267. (査読有)

長谷川 歩美, 太田 剛, 倉智 博久. 子宮頸部神経内分泌癌 6 例の解析. *臨床婦人科産科* 2013;68(1):165-170

<http://search.jamas.or.jp/index.php> (査読有)

Ohta T, Takahashi T, Shibuya T, Amita M, Henmi N, Takahashi K, Kurachi H. Inhibition of the Rho/ROCK pathway enhances the efficacy of cisplatin through the blockage of hypoxia-inducible factor-1 in human ovarian cancer cells. *Cancer Biol Ther.* 2012 Jan 1;13(1):25-33. doi:10.4161/cbt.13.1.18440. (査読有)

Ohta T, Ohmichi M, Shibuya T, Takahashi T, Tsutsumi S, Takahashi K, Kurachi H. Gefitinib (ZD1839) increases the efficacy of cisplatin in ovarian cancer cells. *Cancer Biol Ther.* 2012 Apr;13(6):408-16. doi:10.4161/cbt.19292. (査読有)

松村 創平, 太田 剛, 水谷 雅臣, 蜂谷 修, 木村 理, 菅井 幸雄, 高橋 一広, 倉智 博久. 婦人科腫瘍との鑑別が困難であった GIST の 2 例. *臨床婦人科産科* 2012;66(9):799-802

<http://search.jamas.or.jp/index.php> (査読有)

〔学会発表〕(計 2 件)

Takahashi T, Seino M, Ohta T, Sudo T, Ishida H, Kurachi H. Evaluation of preventive methods for the symptomatic pulmonary thromboembolism by postoperative anticoagulant therapy in VTE high risk patients with gynecologic malignancy. 第 65 回日本産科婦人科学会 ホテル札幌芸文館 (札幌市) 2013.5.10-12 (IS Poster)

Ohta T, Ota T, Chien J, Shridhar V, Kurachi H. The role of YY1 in paclitaxel-induced cytotoxicity in epithelial ovarian cancer. AACR March 31 - April 4, 2012, McCormic Place in Chicago, IL, USA

〔図書〕(計 1 件)

竹原 功, 太田 剛, 倉智 博久. [子宮体がん診療アップデート] 診断のトピックス 子宮体がん発症のリスク因子. *臨床婦人科産科* 2013;67(5):440-446

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.id.yamagata-u.ac.jp/ObGyn/>

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

太田 剛 (OHTA, Tsuyoshi)  
山形大学・医学部・助教  
研究者番号：50375341