

論文内容要旨

論文題目

卵巣癌における WT1 variant が腫瘍形成能に与える影響について

責任講座：産科婦人科講座

氏名：山内 敬子

【内容要旨】 (1,200 字以内)

Wilms' tumor 1 (WT1) 遺伝子は、卵巣癌において 80% 以上で発現している。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 [-17AA/-KTS (WT1A), +17AA/-KTS (WT1B), -17AA/+KTS (WT1C), +17AA/+KTS (WT1D)] があり、variant により apoptosis 誘導や細胞増殖能が異なると報告されている。しかし、卵巣癌における variant の腫瘍形成における役割はわかっていない。本研究では、卵巣癌において、WT1 variant の腫瘍形成における役割とメカニズムを検討することを目的とした。はじめに、WT1 未発現細胞株である SKOV3ip1 細胞に lentiviral vector を導入して、4 つの WT1 variant をそれぞれ過剰発現させた細胞株を作成した。対照細胞株は empty vector 導入細胞とした。作成した細胞株における WT1 の発現は western blot 法で確認した。5-7 週齢のメスヌードマウスにそれぞれの細胞株を腹腔内接種し、腫瘍重量と腹水量を検討した。また、それぞれの細胞株を接種させたマウスにおける生存率を Kaplan-Meier 法で検討した。WT1A 過剰発現させた細胞株を接種させたマウスでは対照と比較して腫瘍重量と腹水量は有意に増加した。さらに、WT1A を過剰発現させた細胞株を接種させたマウスでは対照群に比較して生存期間は有意に短縮した。以上の結果より、WT1A では腫瘍重量と腹水量が増加し、そのため生存率が優位に低下した。さらに、この機序について検討するため、WT1A とコントロールを過剰発現させた細胞株を接種したマウスから摘出した腫瘍組織において、WT1 が発現調節を行う 5 つの遺伝子 (*PCNA*, *IGFBP5*, *EGR-1*, *CCND2*, *VEGF*) の発現を RT-PCR 法と western blot 法で検討した。WT1A によって VEGF の発現が対照と比較して増強した。さらに、形成された腫瘍内における新生血管数を抗 CD31 抗体による免疫染色法で検討したところ、WT1A によって新生血管数が対照と比較して増加した。さらに、WT1A での腫瘍増加に VEGF が関与するかを検討するため、抗 VEGF 抗体 (bevacizumab) によって WT1A の発現による腫瘍重量と腹水量が抑制されるか否かを検討した。Bevacizumab 投与により、WT1A による腫瘍重量と腹水量の増加は有意に抑制された。これらの結果から、卵巣癌において WT1 variant の中で WT1A が腫瘍増殖、腹水産生と生存期間に関連していた。また、VEGF の発現亢進が WT1A の腫瘍形成に関与していた。

平成 27 年 1 月 16 日

山形大学大学院医学系研究科長 殿

学位論文審査結果報告書

申請者氏名： 山内 敬子

論文題目： 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 (卵巣癌における WT1 variant が腫瘍形成能に与える影響)について

審査委員：主審査委員 吉岡 孝志



副審査委員 北中 千史



副審査委員 永瀬 智



審査終了日：平成 27 年 1 月 9 日

【 論文審査結果要旨 】

Wilms' tumor 1 (WT1) 遺伝子は、卵巣癌で高頻度に発現している。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 (-17AA/KTS, +17AA/KTS, -17AA/+KTS, +17AA/+KTS) があり、variant により apoptosis 誘導や細胞増殖能が異なると報告されている。しかし、卵巣癌における variant の詳細な機能はわかっていない。

山内氏は、この WT1 variant と卵巣癌の悪性度との関連について検討した。初めに、WT1 未発現細胞株である SKOV3ip1 細胞に lentiviral vector を導入して、4 つの WT1 variant をそれぞれ過剰発現させた細胞株を作成し、対照細胞株を empty vector 導入細胞として実験を進めた。作成した細胞株における WT1 の発現は western blot 法で確認した。5-7 週齢のメスヌードマウスにそれぞれの細胞株を腹腔内投与し、腫瘍・腹水産生量を検討し、それぞれの細胞株を接種されたマウスにおける生存率を Kaplan-Meier 法で検討した。その結果、WT1 -17AA/KTS 過剰発現させた細胞株を接種させたマウスでは対照ならび他の variants と比較して腫瘍・腹水産生量は有意に増加し、生存期間は有意に短縮した。以上より、WT1 -17AA/KTS は腫瘍形成能・腹水産生能を増強させ、生存率を有意に低下させることを明らかにした。

さらに、この機序について検討するため、WT1 が発現調節を行う 5 つの遺伝子 (*PCNA*, *IGFBP5*, *EGR-1*, *CCND2*, *VEGF*) の発現を RT-PCR 法と western blot 法で検討したところ、WT1 -17AA/KTS によって VEGF の発現が対照と比較して増強していた。さらに、形成された腫瘍内における新生血管数を抗 CD31 抗体による免疫染色法で検討したところ、WT1 -17AA/KTS によって新生血管数が対照と比較して増加していた。さらに、抗 VEGF 抗体 (bevacizumab) によって WT1 -17AA/KTS 過剰発現による腫瘍・腹水産生が抑制されるか否かを検討したところ、Bevacizumab 投与により、WT1 -17AA/KTS による腫瘍・腹水産生量の増加は有意に抑制された。

これらのことから、初めて卵巣癌において WT1 variant の中で WT1 -17AA/KTS の発現が卵巣癌の悪性度と最も関連し、それは VEGF を介する腫瘍形成能増強による可能性があることを明らかにした。

学位論文としての体裁を整える必要が指摘されたが、内容は新規知見が含まれており、学位論文に値するとして、本審査は合格とした。