

平成 26 年 5 月 23 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2013

課題番号：22791522

研究課題名(和文) 子宮体癌におけるWt1腫瘍遺伝子と細胞増殖及び血管新生での分子生物学的解明

研究課題名(英文) Molecular biological approach to correlation between Wt1 gene and cell proliferation, angiogenesis in Endometrial cancer

研究代表者

土肥 聡 (DOHI, Satoshi)

金沢大学・大学病院・医員

研究者番号：90547184

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円、(間接経費) 780,000円

研究成果の概要(和文)：Wt1の発現は64症例(91%)に確認された。殆どすべての症例で、Wt1発現は腫瘍細胞の細胞質に認められた。腫瘍細胞のWt1発現量はFIGO手術進行期分類stageII以上の進行群、子宮筋層浸潤を1/2以上認める群、分化度grade2以上の組織型高分化群で高値であった。MVDはFIGO手術進行期分類stageII以上の進行群、子宮筋層浸潤を1/2以上認める群、分化度grade2以上の組織型高分化群で高値であった。Wt1とMVDの間には正の相関関係が認められ、免疫組織化学染色でWt1とVEGFが同一部位に発現していることを確認した。

研究成果の概要(英文)：A strong association was found between Wt1 expression score and mean vascular density. Immunohistochemistry of serial sections revealed that Wt1 and VEGF were co-expressed in the same area of endometrial cancer tissue. Tumor-produced Wt1, which may regulate the expression of VEGF, is found to be associated with induction of angiogenesis in endometrial cancer.

研究分野：産婦人科学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：Wt1 子宮体癌 血管新生 細胞増殖

1. 研究開始当初の背景

子宮体癌は近年増加傾向にある代表的な婦人科悪性腫瘍であり、抗癌剤治療の発達により、子宮体癌の治療成績は向上しているものの、再発症例や発見が遅れて進行癌となった症例においては十分とはいえない。そこで癌の新規治療戦略として、分子標的治療が注目されており、子宮体癌の分子学的機序の解明は急務とされている。

その1つとして研究代表者らの研究室ではWilms腫瘍遺伝子WT1(以下、WT1)に注目している。WT1は小児の腎腫瘍であるWilms'tumorの原因遺伝子として発見され、その後の研究で、白血病や様々な悪性固形腫瘍においても、その発現が認められた事からすべての癌の根源的な遺伝子である可能性が指摘されている。WT1の機能として、白血病や様々な悪性固形腫瘍で細胞増殖促進、アポトーシス抑制、分化促進、血管新生などへの関与の可能性が示唆されているが、まだ詳細は不明な点が多い。そこで今回、婦人科悪性腫瘍におけるWT1の病態生理学的役割について検討を行うことを計画した。

2. 研究の目的

Wilms腫瘍遺伝子(WT1)は、小児の腎腫瘍であるWilms'tumorの原因遺伝子として発見された。その後の研究によって、WT1は、白血病をはじめ種々の悪性固形腫瘍において、細胞増殖促進、アポトーシス抑制、細胞分化促進、血管新生などに関与していることが明らかとなりつつある。そこで今回、婦人科癌におけるWT1の役割について分子生物学的アプローチを用いて解明することで、婦人科癌の治療効果向上を目指す。

(1) 子宮体癌におけるWT1と細胞増殖について研究代表者は子宮体癌について癌における細胞増殖についての免疫組織染色を用いて細胞増殖の関連性を示した。

そこで、この現象の背景となるメカニズムを明らかにするために、WT1と細胞増殖との関連性について検討を行う。

(2) 子宮体癌におけるWT1とアポトーシスについて

Matsushimaらは、前立腺癌の細胞増殖、アポトーシスおよび血管新生について免疫組織染色を行ったところ、アンドロゲン除去下においてそれらに関連性があり、自発的アポトーシスは血管新生を抑制すると示している(Matsushima *et al.*, Correlation between proliferation, apoptosis, and angiogenesis in prostate carcinoma and their relation to androgen ablation: *Cancer*. 15; 85: 1822-1827, 1999)。

しかし、現在のところ、子宮体癌においても細胞増殖、アポトーシス、血管新生について関連性についてin vivoでの報告はない。

そこで、この現象の背景となるメカニズムを明らかにするために、WT1とアポトーシスとの関連性について検討を行う。

(3) 子宮体癌におけるWT1と血管新生について

既に申請者は予備的な検討として、子宮体癌組織において腫瘍細胞のWT1発現が、腫瘍組織内の新生血管密度と正の相関関係にあることを見いだしている。そこで、この現象の背景となるメカニズムを明らかにするため、WT1と血管新生因子(VEGFなど)との関連について検討を行う。

3. 研究の方法

本研究計画では子宮体癌の癌細胞増殖、アポトーシス、血管新生における分子生物学的アプローチの未だ解明されていない基礎的な問題を解決し、さらに今後のWT1ワクチン療法の改良や発展へと展開するための研究基盤を確立する。具体的な研究計画・方法は以下の通りである。

(1) 金沢大学産婦人科において1995年から2002年までの間に初発子宮体癌に

対して根治手術で摘出された 70 症例の標本における cyclin D1、STAT3、Bcl-2、c-myc の発現の確認(免疫組織染色)と WT1、cyclin D1、STAT3、Bcl-2、c-myc の発現の確認(ウエスタンブロット法)

- (2) Real time PCR による WT1、cyclin D1、STAT3、Bcl-2、c-myc の mRNA 定量および臨床病理学的背景との関連性の検討
- (3) MACS(Magnetic Activated Cell Sorting; 磁気細胞分離法)によるアポトーシスおよび死細胞の染色
- (4) Real time PCR による VEGF の mRNA 定量および WT1 mRNA との関連性の検討

4. 研究成果

WT1 の発現は 64 症例 (91%) に確認された。殆どすべての症例において、WT1 発現は腫瘍細胞の細胞質に認められた。腫瘍細胞の WT1 発現量は FIGO 手術進行期分類 stage II 以上の進行群 ($p = 0.0233$)、子宮筋層浸潤を 1/2 以上認める群 ($p = 0.0477$)、分化度 grade 2 以上の組織型高分化群 ($p = 0.0049$) で高値であった。

PCNA-Labeling Index は WT1 発現量と強い相関関係を示し ($p = 0.0081$)、

MVD は FIGO 手術進行期分類 stage II 以上の進行群 ($p = 0.0191$)、子宮筋層浸潤を 1/2 以上認める群 ($p = 0.0120$)、分化度 grade 2 以上の組織型高分化群 ($p = 0.0019$) で高値であった。WT1 と MVD との間には正の相関関係が認められた。 ($p < 0.001$, $n = 70$, $r = 0.568$)。また免疫組織化学染色で WT1 と VEGF が同一部位に発現していることを確認した。

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 3 件)

- 1) 土肥聡、大野智、大野由美子、高倉正博、京哲、杉源一郎、杉山治夫、井上正樹 : WT1 Peptide Vaccine Stabilized Intractable Ovarian Cancer Patient for One Year: A Case

Report (抗癌剤治療抵抗性卵巣癌患者に対して WT1 ペプチドワクチン療法による長期間病状安定が得られた 1 症例) Anticancer Research 第 31 巻第 7 号 2441 頁~2445 頁 2012 (査読あり)

- 2) SATOSHI OHNO, FUMIHIDE TAKANO, YASUYUKI OHTA, SATORU KYO, SUBARU MYOJO, SATOSHI DOHI, HARUO SUGIYAMA, TOMIHISA OHTA, MASAKI INOUE: Frequency of Myeloid Dendritic Cells Can Predict the Efficacy of Wilms' Tumor 1 Peptide Vaccination (WT1 ペプチドワクチン療法の臨床評価予測因子と末梢血中樹状細胞数の関連性) Anticancer Research 第 31 巻第 7 号 2447 頁~2452 頁 2012 (査読あり)
- 3) 土肥聡、大野智、高倉正博、京哲、杉源一郎、杉山治夫、井上正樹 WT1 Expression Correlates with Angiogenesis in Endometrial Cancer Tissue (子宮体癌における WT1 蛋白発現と血管新生の関連性) Anticancer Research 第 30 巻第 8 号 3187 頁~3192 頁 2011 (査読あり)

[学会発表] (計 3 件)

- 1) Satoshi Dohi, Satoshi Ohno, Masahiro Takakura, Satoru Kyo, Genichiro Soma, Haruo Sugiyama, Masaki Inoue, WT1 Peptide Vaccine Stabilized Intractable Ovarian Cancer Patient over One Year: A Case Report, 第 70 回日本癌学会学術総会, 2011 年 10 月 3 日~5 日, 愛知県名古屋市
- 2) 土肥聡、大野智、大野由美子、杉源一郎、高倉正博、京哲、杉山治夫、井上正樹、抗癌剤治療抵抗性卵巣癌患者に対して WT1 ペプチドワクチン療法による長期間病状安定が得られた 1 症例、第 14 回バイオ治療法研究会学術集会、2010 年 12 月 11 日、福岡

3) Satoshi Dohi, Satoshi Ohno, Satoru Kyo, Genichiro Soma, Haruo Sugiyama, Masaki Inoue, WT1 expression correlates with angiogenesis in endometrial cancer tissue, 第70回日本癌学会, 2010年9月22日～24日, 大阪

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

土肥 聡 (DOHI, Satoshi)

金沢大学・大学病院・医員

研究者番号: 90547184

(2) 研究分担者: なし

(3) 連携研究者: なし