

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（医学） 氏名 真木 健裕

学位論文題名

食道癌、胆管癌、膵癌、肺癌における Wilms tumor 1 の発現解析
(Expression analysis of Wilms tumor 1 in esophageal, bile duct, pancreatic, and lung cancer)

【背景】 Wilms tumor 1 (WT1) 遺伝子は 1990 年にがん抑制遺伝子として同定された。WT1 は中胚葉由来組織の分化・発達を制御しており、中胚葉由来の健常組織および悪性新生物で発現が報告されている。そのため WT1 は、白血病の微小残存病変の評価や、中胚葉由来の固形がんと内胚葉由来の固形がんを区別する目的に利用されている。一方で、内胚葉や外胚葉由来のがんにおいても野生型 WT1 の過剰発現が複数報告されており、WT1 はがん免疫療法における最も有望ながん抗原と考えられている。実際に、様々な悪性腫瘍を対象とした WT1 特異的な免疫療法の臨床試験が行われている。一般的に、固形癌における WT1 発現は免疫組織化学染色法で検討されているが、WT1 に対する免疫組織化学染色の条件や染色結果の解釈法は確立していない。

【目的】 WT1 に対する合理的な免疫組織化学染色法および解析方法を確立し、食道癌・胆管癌・膵癌・肺癌における WT1 発現を再評価する。

【材料と方法】 遺伝子クローニングで WT1 発現の陽性対照と陰性対照を作成し、35 種類のヒト細胞株に対して免疫組織化学染色法、ウェスタンブロッティング、qRT-PCR を施行し、それらの結果をもとに免疫組織化学染色の解析方法を確立した。確立した解析方法に基づいて、ヒト食道癌・胆管癌・膵癌・肺癌組織において免疫組織化学染色法を施行しそれぞれにおける WT1 発現を調べた。

【結果】 遺伝子クローニングで作成した WT1 強制発現株に対するウェスタンブロッティングと免疫組織化学染色では、分子量 50-55kDa に相当する強いプロテインバンドと強い核染色を認めた。次に 35 種類のヒト細胞株に対して免疫組織化学染色・ウェスタンブロッティング・qRT-PCR を施行し、それらの結果をすべて数値化した。すなわち、免疫組織化学染色では核・細胞質の染色スコアを独立に算出し、ウェスタンブロッティングでは様々な分子量のプロテインバンドの強度を定量化し、qRT-PCR では異なる検出法で 2 通りの WT1 mRNA 発現量を算出した。これらの数値群の統計学的な関連を調べると、2 種類の WT1 抗体 (6F-H2、ab89901) による免疫組織化学的な核染色、ウェスタンブロッティングにおけるほとんどの種類のプロテインバンドの強度、異なる方法で測定した 2 通りの WT1 mRNA 発現量は、互いに統計学的に有意に正の相関を示した。一方で、免疫組織化学的な細胞質染色はプロテインバンドや WT1 mRNA 発現量と統計学的に有意な相

関を一切示さなかった。これらの結果から、WT1 の免疫組織化学染色において、核染色は特異的な WT1 発現と考えられ、細胞質染色は WT1 発現と無縁の非特異反応と考えられた。また、核と細胞質の両方に局在する green fluorescent protein (GFP) と WT1 タンパクの融合タンパク GFP-WT1 を作成したところ、核に局在することが確認された。ヒト組織サンプルに対して WT1 抗体 6F-H2 による免疫組織化学染色を施行したところ、健常腎、中皮、胸膜中皮腫、卵巣癌といった中胚葉由来組織には核染色を認めたが、食道癌・胆管癌・膵癌・肺癌で核染色を認めたものは 552 例中 3 例 (0.5%) のみであった。

【考察】本研究の結論は、固形がんに対する WT1 特異がん免疫療法の根拠となっている「様々な悪性腫瘍で WT1 が過剰発現している」という知見と対立する。WT1 の免疫組織化学染色において、中胚葉由来組織は核染色を呈し、中胚葉由来でない組織は細胞質染色を呈するという結果自体は、本研究を含め多くの WT1 発現解析において共通である。結論の相違は細胞質染色の解釈に起因している。一方、多くの病理学分野の研究が、明確な検証実験を提示してはいないものの、細胞質染色を非特異反応と考えており、中胚葉由来でない固形癌にはほとんど WT1 発現がないと結論付けている。本研究結果はこのような病理学分野の見解を科学的に支持する。我々はヒト組織サンプルに対するウェスタンブロットティングや qRT-PCR、あるいは細胞分画分離実験を施行しておらず、今後の課題と考えられる。WT1 を標的とした免疫組織化学的な細胞質染色は非特異反応であり、少なくとも食道癌・胆管癌・膵癌・肺癌には WT1 がほとんど発現していないことを考慮すると、中胚葉由来でない固形癌に対する WT1 特異的免疫治療には見直しが必要であると思われる。

【結論】WT1 の免疫組織化学染色における核染色は特異的に WT1 発現を反映し、細胞質染色は非特異反応と考えられた。さらに、核染色を認めない食道癌、胆管癌、膵癌、肺癌において WT1 の発現頻度は極めて低率であると考えられた。