HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	食道癌，胆管癌，膵癌，肺癌におけるWilms tumor 1の発現解析
Author(s)	真木，健裕
Description	配架番号：2319
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第12578号
Issue Date	2017-03-23
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k12578
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/65938
Type	doctoral thesis
File Information	Takehiro_Maki.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学　位　論　文

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）

2017 年 3 月

北　海　道　大　学

真木　健裕

学　位　論　文

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）

2017 年 3 月

北　海　道　大　学

真木　健裕

目　　次

発表論文目録および学会発表目録 …… 1 頁

緒言 …… 3 頁

略語表 …… 5 頁

実験方法 …… 6 頁

実験結果 …… 15 頁

考察 …… 30 頁

総括および結論 …… 33 頁

謝辞 …… 34 頁

引用文献 …… 35 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に掲載予定（2016 年 10 月 27 日に受理された）である。

1. Takehiro Maki, Hiroaki Ikeda, Aki Kuroda, Noriaki Kyogoku, Yoshiyuki Yamamura, Yukiko Tabata, Takehiro Abiko, Takahiro Tsuchikawa, Yasuhiro Hida, Toshiaki Shichinohe, Eiichi Tanaka, Kichizo Kaga, Kanako Hatanaka, Yoshihiro Matsuno, Naoko Imai, Satoshi Hirano

Differential detection of cytoplasmic Wilms tumor 1 (WT1) expression by immunohistochemistry, Western blotting, and mRNA quantification

International Journal of Oncology

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. Takehiro Maki, Masaki Miyamoto, Takahiro Tsuchikawa, Noriaki Kyogoku, Aki Kuroda, Yoshiyuki Yamamura, Takehiro Abiko, Yasuhiro Hida, Toshiaki Shichinohe, Eiichi Tanaka, Kichizo Kaga, Satoshi Hirano, Satoshi Kondo

WT1 is not overexpressed in solid cancers of 4 different organs

第 15 回日本がん免疫学会総会、2011 年 6 月 30 日、大阪

2. Takehiro Maki, Masaki Miyamoto, Takahiro Tsuchikawa, Noriaki Kyogoku, Aki Kuroda, Yoshiyuki Yamamura, Takehiro Abiko, Yasuhiro Hida, Toshiaki Shichinohe, Eiichi Tanaka, Kichizo Kaga, Satoshi Hirano, Satoshi Kondo

WT1 expression in solid cancers of 4 organs

第 17 回日本遺伝子治療学会年次学術集会、2011 年 7 月 15 日、福岡

3. Takehiro Maki, Masaki Miyamoto, Takahiro Tsuchikawa, Noriaki Kyogoku, Aki Kuroda, Yoshiyuki Yamamura, Takehiro Abiko, Yasuhiro Hida, Toshiaki Shichinohe, Eiichi Tanaka, Kichizo Kaga, Satoshi Hirano, Satoshi Kondo

WT1 expression in solid cancers of 4 different organs

第 70 回日本癌学会学術総会、2011 年 10 月 4 日、名古屋

4. 真木　健裕、宮本　正樹、土川　貴裕、京極　典憲、黒田　晶、山村　喜之、安孫子　剛大、樋田　泰浩、七戸　俊明、田中　栄一、加賀　基知三、平野　聡

4 種固形癌における WT1 タンパク発現

第 112 回日本外科学会定期学術集会、2012 年 4 月 12 日、千葉

緒言

WT1 遺伝子は 1990 年に Wilms 腫瘍におけるがん抑制遺伝子として初めて同定された[1, 2]。WT1 は腎・中皮・性腺といった中胚葉由来組織の分化・発達を制御しており[3, 4, 5]、中胚葉由来の健常組織および悪性新生物において発現していると報告されている。白血病では 44-93%[6, 7]、中皮腫では 72-100%[8-14]、卵巣癌では 45-100%[11, 13, 15, 16] の症例に WT1 が発現していると報告されている。そのため、WT1 の mRNA は白血病の微小残存病変の指標として測定されており[6]、WT1 に対する免疫組織化学染色は胸腔内腫瘍が中胚葉由来の中皮腫であるか内胚葉由来の肺癌であるかを区別する手段として利用されている[8, 10-13, 15, 16]。

また一方で、WT1 は中胚葉由来組織の“がん”だけでなく、内胚葉および外胚葉由来組織の様々な固形がんにおいても過剰発現しているとされ、食道癌では 45-95%[17, 18]、胃癌では 42%[18]、大腸癌では 69-89%[18, 19]、肝細胞癌では 95%[20]、胆管癌では 68%[18]、膵癌では 65-75%[18, 21]、甲状腺癌では 95%[22]、前立腺癌では 25%[18]、肺癌では 30-83%[18, 23]、乳癌では 26-87%[18, 24-26]、脳腫瘍では 88-96%[18, 27] の頻度と報告されている。こうした固形がんで過剰発現している WT1 は野生型と考えられており[19, 22, 23, 27]、この野生型 WT1 はがん免疫療法の理想的な標的抗原として多くの研究者の関心を集めている。米国国立癌研究所（National Cancer Institute）は、がん免疫療法において WT1 が最も有望な標的タンパクであると結論付けている[28]。これまでに様々な悪性腫瘍を対象とし、野生型 WT1 を標的とする特異的がん免疫療法の臨床試験が行われてきた[29-36]。

一般的に、固形がんにおける WT1 発現は免疫組織化学染色で検討されている。しかし、WT1 に対する免疫組織化学染色法は、用いる抗体やコントロールあるいは核・細胞質などの陽性基準が各研究によって異なり、その解析方法が確立しているとは言えない。免疫組織化学染色では標的タンパクの分子量やアミノ酸配列を知ることができないので、染色結果だけで特異的な

染色と非特異的な染色とを客観的に区別することができない。そのため、適切なコントロール下に染色の結果を別の実験モダリティーから得られる結果と照合する必要がある。WT1 の検出方法の精度を高めることは特異的がん免疫療法の適切な施行にとってきわめて重要である。本研究は WT1 に対する合理的な免疫組織化学染色の解析方法を確立し、その方法を用いて食道癌・胆管癌・膵癌・肺癌における WT1 発現を再評価することを目的とした。

結論として、固形がんに対する WT1 の免疫組織化学染色において細胞質染色は非特異反応の可能性がある。また、食道癌・胆管癌・膵癌・肺癌において WT1 発現は細胞質にはほとんど認められないことが明らかになった。

略語表

本文中および図中で使用した略語は以下のとおりである。

aa	amino acids
bp	base pairs
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
GFP	green fluorescent protein
mRNA	messenger ribonucleic acid
PCR	polymerase chain reaction
qRT-PCR	quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction
SCC	squamous cell carcinoma
WT1	Wilms tumor 1

実験方法

本研究は「医の倫理委員会内規」（北海道大学大学院医学研究科・医学部医学科)・「ヘルシンキ宣言」・「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」（文部科学省・厚生労働省)・「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」（文部科学省・厚生労働省・経済産業省）に則って施行され、すべてのヒトサンプル提供者から書面でインフォームド・コンセントを得ている。

【細胞株】

本研究で使用した 35 種類のヒト細胞株を表 1 に示す。

表 1　本研究で使用した 35 種類のヒト細胞株

Origin	**Cell lines**
Mesodermally derived cells	
Embryonal human kidney	293FT
Chronic myelogenous leukemia	K562
Mesothelioma	HMMME, ACC-MESO-1, ACC-MESO-4
Ovary serous adenocarcinoma	JHOS-2, JHOS-3
Uterine cervical cancer	HeLa
Esophageal cancer	TE-2, TE-4, TE-5, TE-8, TE-9, TE-14, SGF7, HEC46
Bile duct cancer	TFK-1, HuCCT1, TKKK, RBE, HuH-28
Pancreatic cancer	PANC-1, PCI-6, KP-1N, SUIT-2, AsPC-1, BxPC-3
Lung cancer	
Adenocarcinoma	A549, RERF-LC-MS, RERF-LC-OK, ABC-1, VMRC-LCD
Squamous cell carcinoma	H226, LK-2, PC10

293FT は Invitrogen（Carlsbad, CA, USA）から購入した。K562・HMMME・ACC-MESO-1[37]・ACC-MESO-4[37]・JHOS-2・JHOS-3・HeLa・TFK-1・HcCCT1・TKKK・RBE・HuH-28・PANC-1 は Riken Bio Resource Center Cell Bank （筑波）から購入した。TE-2・TE-4・TE-5・TE-8・TE-9・TE-14[38] は西平哲郎氏（東北大学）よりご提供を受けた。SGF7[39] は斉藤智裕氏（富山医科薬科大学）よりご提供を受けた。HEC46[40] は峠哲哉氏（広島大学）よりご提供を受けた。PCI-6[41] は北海道大学大学院医学研究科病理学講座分子病理学分野よりご提供を受けた。KP-1N・SUIT-2・A549・RERF-LC-MS・RERF-LC-OK・ABC-1・VMRC-LCD・H226・LK-2・PC10 は Japanese Cancer Research Resource Bank（東京）から購入した。AsPC-1・BxPC-3 は American Type Culture Collection（Manassas, VA, USA）より入手した。

293FT は Dulbecco’s Modified Eagle Medium（Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA）で、その他の細胞株は Roswell Park Memorial Institute medium-1640（Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA）で培養した。それぞれの培地にウシ胎仔血清を 10%, ペニシリンとストレプトマイシンをそれぞれ 1%分付加した。すべての細胞株について 5% CO_2 を含む 37℃の加湿環境で培養し、0.25%トリプシンを使用して継代した。

【Tissue microarray サンプルの作成】

1994 年から 2005 年にかけて北海道大学病院消化器外科 II で切除を施行した 552 症例（食道癌 101 症例、胆管癌 96 症例、膵癌 99 症例、肺癌 256 症例）から得られた癌組織と正常上皮組織を使用した。それぞれのサンプルを 10%ホルマリンで固定後パラフィンに包埋し、Manual Tissue Arrayer（Beecher Instruments, WI, USA）で径 0.6mm の円柱状に組織をくり抜いて新たなパラフィンブロックに包埋した。サンプルごとに 3-4 個の小円柱サンプルをくり抜き、全サンプルを 25 個のパラフィンブロックに集約、これを免疫組織化学染色に使用した。ヒト組織サンプルにおける WT1 発現の陽性対照候補と

して、腎・胸膜中皮・精巣・胸膜中皮腫・卵巣漿液性腺癌を使用した。

【遺伝子クローニングとトランスフェクション】

遺伝子クローニングとトランスフェクションにより WT1 発現の陰性対照と陽性対照を作成した。Internal ribosome entry site と GFP の cDNA を pcDNA3.1(+) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)のマルチクローニングサイトにクローニングした（Empty Vector）。Human Kidney QUICK-Clone cDNA（TaKaRa, 大津）を鋳型とした PCR で WT1 の cDNA を増幅し、Empty Vector にクローニングした（Vector WT1）。各プラスミドの塩基配列は single-nucleotide primer extension method で確認した。Lipofectamine 2000（Invitrogen, Carlsbad, CA, USA）を使用して Empty Vector と Vector WT1 を 293FT・K562・HeLa にトランスフェクションした。トランスフェクションの可否は GFP の蛍光観察により確認した。Empty Vector と Vector WT1 を導入した細胞株を、それぞれ WT1 タンパク発現の陰性対照・陽性対照として使用した。WT1 の mRNA は RNA スプライシングにおいて skip されうる配列を少なくとも 2 か所持っているため、WT1 タンパクには少なくとも 4 つの isoform が存在する（図 1）。すなわち、exon 5 の全配列（配列 17AA）、と exon 9 の C 末端の 9 塩基対（配列 KTS）の欠失如何により 4 つの isoform（WT1[++], WT1[+-], WT1[-+], WT1[--]）が生ずる。本研究ではこれらに対応する 4 種類の陽性対照を作成した。

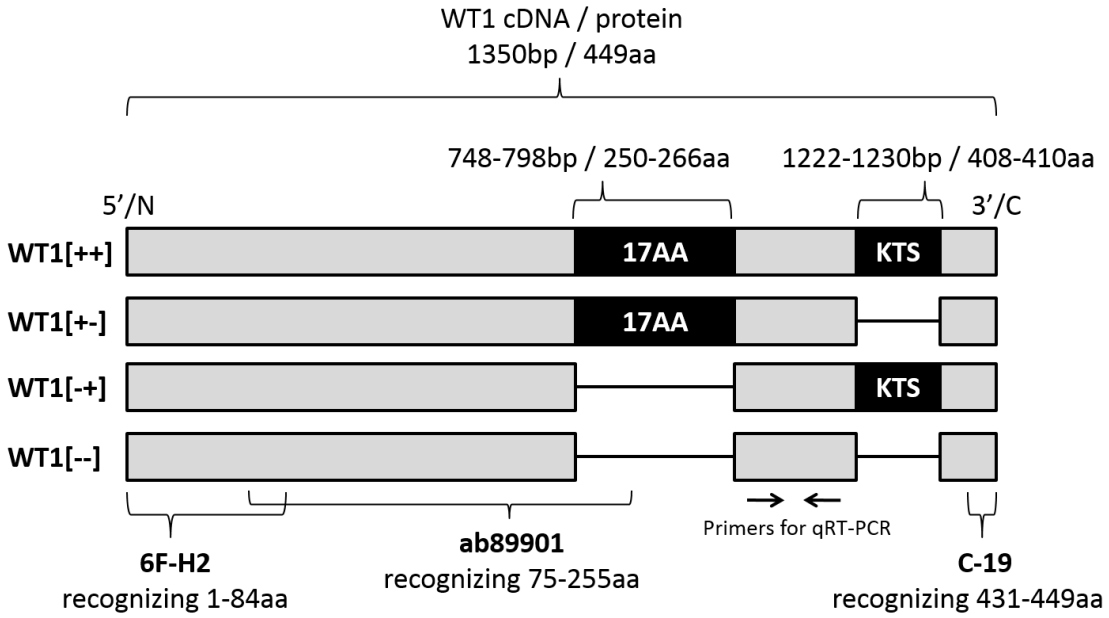


図 1　WT1 の 4 つの isoform と本研究で使用した WT1 抗体・qRT-PCR 用プライマーの詳細

WT1 には 4 種類の isoform が存在し、それぞれに対応する 4 つの陽性対照を作成した。本研究で使用した 3 種類の WT1 抗体の認識部位と qRT-PCR 用プライマーの結合部位を図示してある。

次に、WT1 タンパクの細胞内局在を確認するために、GFP と WT1 の融合タンパク（GFP-WT1）を作成した。pcDNA3.1(+)のマルチクローニングサイトに GFP の cDNA をクローニングした（Vector GFP）。Vector GFP の GFP cDNA 部分の C 末端の stop codon を欠失させ、同部位に WT1 の cDNA をクローニングした（Vector GFP-WT1）。Vector GFP-WT1 の塩基配列は single-nucleotide primer extension method で確認した。Vector GFP と Vector GFP-WT1 を Lipofectamine LTX（Invitrogen, Carlsbad, CA, USA）を使用して 293FT・K562・HeLa にトランスフェクションした。これらの遺伝子導入細胞はそれぞれ GFP、GFP-WT1 を産生すると期待できる。既述の通り、WT1 には 4 つの isoform が存在するので、それぞれに対応する Vector GFP-WT1 とその遺伝子導入細胞を作成した。

【免疫組織化学染色】

培養細胞は 0.25%トリプシンで遊離し、遠心分離で clot とした。培養細胞の clot またはヒト組織サンプルを 10%ホルマリンで固定し、パラフィンブロックに包埋した。これを 2μm 厚に薄切し、組織切片をパラフィン除去後に加水して圧力釜で抗原を賦活化した（pH7.0 のクエン酸緩衝液、100°C、2 気圧、2 分間）。WT1 抗体として 6F-H2 を使用する場合に限って、圧力釜の処理の前に、組織切片を 10% Proteinase K Ready-to-use enzyme（Dako、京都）に室温で 5 分間曝露した。圧力釜処理後の組織切片をメタノールで希釈した 0.3%過酸化水素に室温で 15 分間曝露した。その後、組織切片を 10%ヤギ血清（Nichirei Corporation、東京）に室温で 30 分間曝露した。1 次抗体として、市販の WT1 抗体である 6F-H2（mouse monoclonal, Dako, 京都）、ab89901（rabbit monoclonal, Abcam, Cambridge, UK）、C-19（rabbit polyclonal, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA）を使用し（図 1）、Antibody Diluent（Dako、京都）でそれぞれ 1:100，1:200，1:100 に希釈して組織切片に 4℃で 12 時間曝露した。1 次抗体に対する陰性対照として Mouse IgG1 (Dako、京都)と rabbit polyclonal IgG (Abcam, Cambridge, UK)を使用した。その後、組織切片を 2 次抗体としての Histofine Simple Stain MAX-PO MULTI（Nichirei Corporation、東京）に室温で 30 分間曝露した。最後に、組織切片を Histofine Simple Stain DAB Solution（Nichirei Corporation、東京）に 4 分間に曝露し、ヘマトキシリンで対比染色した。

細胞株の免疫組織化学染色においては、核全体・核小体・細胞質に着目してそれぞれ独立に染色スコアを算出した。図 2 に示すように、核全体と細胞質を染色陰性（0）から強陽性（3）までの 4 段階に、核小体を陰性（0）と陽性（1）に分けて評価し、各細胞の染色強度の平均値を染色スコアとして算出した。染色スコアは、1 人の病理医の指導のもと 2 人の外科医が独立に算出し、その平均値を各サンプルの最終的な染色スコアとした。

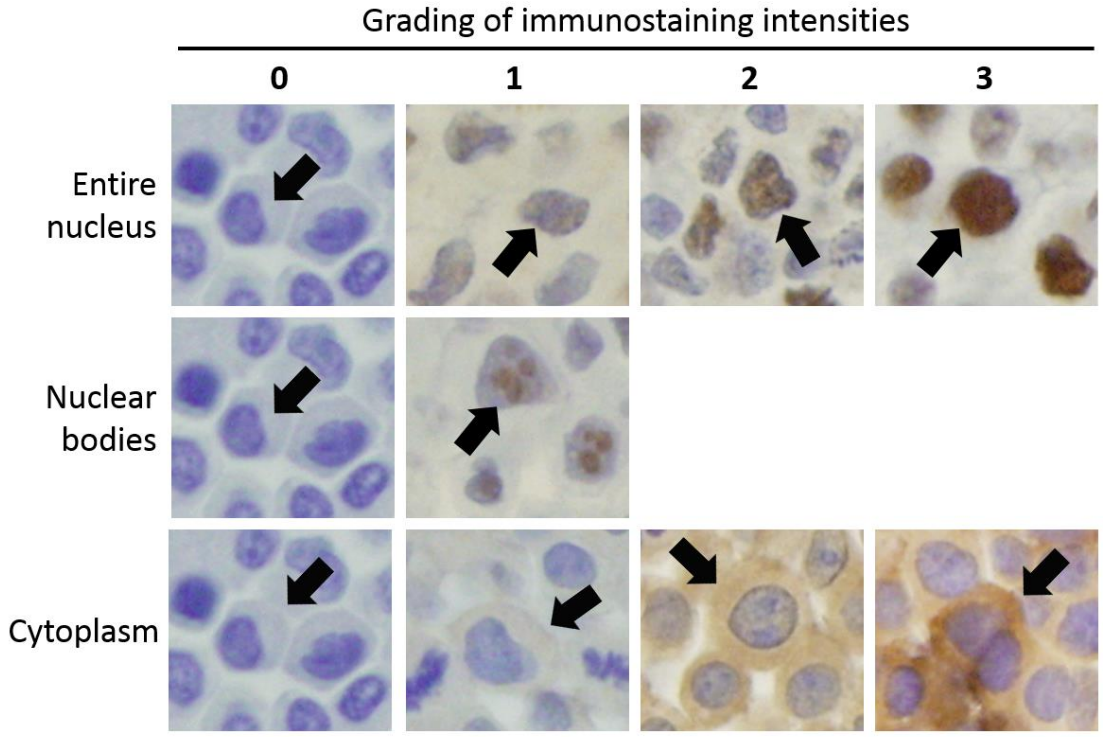


図 2　免疫組織化学染色における染色強度の指標

WT1 に対する免疫組織化学染色における染色強度を核全体・核小体・細胞質それぞれにおいて独立に定義した。核全体と細胞質は 0-3 の 4 段階、核小体は 0-1 の 2 段階で判定した。矢印は代表的な染色強度を示す細胞を示している。

【ウェスタンブロッティング】

Triple-detergent lysis buffer を使用して細胞内の総タンパクを抽出した。Protein assay kit （Bio-Rad, Hercules, CA, USA）を使用して Bradford method でタンパク濃度を測定した。タンパクを抗原賦活化のため 100℃で 2 分間処理した後、ポリアクリルアミドゲルで電気泳動分離し、Hybond-ECL nitrocellulose membrane（GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, NJ, USA）に転写した。Membrane を 5%スキムミルクに 4℃で 12 時間曝露し、希釈した

1 次抗体に室温で 1 時間曝露した後、希釈した 2 次抗体に室温で 1 時間曝露した。1 次抗体は免疫組織化学染色で使用したのと同じ 3 種類の WT1 抗体（6F-H2，ab89901，C-19）と mouse monoclonal GFP antibody（Clontech、大津）、actin C4 antibody（MILLIPORE, Billerica, MA, USA）を使用した。2 次抗体は Peroxidase-conjugated AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG H+L antibodies（Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA）あるいは peroxidase-conjugated AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG H+L antibodies（Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA）を使用した。プロテインバンドを ECL-Plus Western Blotting Detection System（GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, NJ, USA）と Detector Lumino Imaging Analyzer model FAS-1000（TOYOBO、大阪）を使用して可視化した。プロテインバンドの強度を ImageJ (http://rsbweb.nih.gov/ij/)を使用して定量化し、サンプルごとに対応する actin バンドの強度で補正し、Vector WT1[--]を導入した 293FT 細胞のプロテインバンドを 1 として相対化した。ポリアクリルアミドゲルにアプライするタンパク量と 1 次抗体・2 次抗体の希釈率については表 2 に示す通り 2 種類の実験条件 A，B を使用したが、プロテインバンド強度の比較は同一条件下で行った。

表 2　ウェスタンブロッティングにおける 2 つの実験条件

Primary antibody	Amount of protein per lane (μg)		Dilution factor			
			Primary antibody		Secondary antibody	
	A	B	A	B	A	B
WT1 antibodies						
6F-H2	10	20	40	15	4000	1500
ab89901	10	20	4000	500	10000	7000
C19	10	20	2000	150	10000	10000
GFP antibody	10	40	300	50	10000	3000
Actin antibody	5		800		10000	

【qRT-PCR】

TRI Reagent（Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA）を使用して培養細胞の総 RNA を抽出した。混入しうる DNA を RQ1 RNase-Free DNase（Promega、東京）で除去した後、β アクチンに対する PCR によって DNA の混入がないことを確認した。SuperScript VILO cDNA Synthesis Kit（Invitrogen, Carlsbad, CA, USA）を使用した逆転写反応により mRNA から cDNA を合成した。合成した cDNA を再蒸留水で 20 倍に希釈し定量 PCR の鋳型として使用した。定量 PCR は Power SYBR Green PCR Master Mix（Applied Biosystems，東京）を使用した intercalator-based method と、TaqMan Universal Master Mix II（Applied Biosystems，東京）を使用した fluorescent probe–based method の 2 通りを施行した。PCR の反応条件は「94℃、30 秒間＋60.4℃、30 秒間＋72℃、30 秒間」を 1 サイクルとし 40 サイクル施行した。定量 PCR の結果を ABI PRISM 7000 Sequence Detection System（Applied Biosystems，東京）で解析した。各サンプルの WT1 mRNA の発現量を β アクチン mRNA の発現量で標準化し、K562 における WT1 mRNA の発現量を 1 として相対化した。

使用したプライマーとインターナルプローブの塩基配列は以下のとおりである。

WT1 センスプライマー：5’-TGCGGAGCCCAATACAGAATACAC-3’

WT1 アンチセンスプライマー：5’-TCAGATGCCGACCGTACAAGAG-3’

WT1 インターナルプローブ：
5’-FAM-AGAGGCATTCAGGATGTGCGACG-TAMRA-3’

β アクチン　センスプライマー：5’-CAACCGCGAGAAGATGACCC-3’

β アクチン　アンチセンスプライマー：5’-ACCGGAGTCCATCACGATGC-3’

β アクチン　インターナルプローブ：

5’-FAM-CCAGGCTGTGCTATCCCTGTACGC-TAMRA-3’

WT1 に対するプライマーは exon 6 の C 末端と exon 7 の N 末端に結合するよう設計しており、理論的には WT1 の 4 つの isoform すべてを検出できるようになっている（図 1)。β アクチンに対するプライマーは exon 3 の C 末端と exon 4 の N 末端に結合するよう設計している。

【統計学的解析】

2 変数群の相関を StatView Version 5.0 software（SAS Institute Inc.）を使用してスピアマンの順位相関係数で評価した。$|r| > 0.4$ かつ $p < 0.05$ で統計学的に有意な相関ありと評価した。

実験結果

【遺伝子導入細胞株における WT1 発現】

3 種類のヒト由来細胞株 293FT・K562・HeLa それぞれに 4 種類の WT1 isoform を遺伝子導入して 12 種類の WT1 強制発現株を作成した。これらに対して 3 種類の WT1 抗体を使用した免疫組織化学染色とウェスタンブロッティングを施行した結果を図 3 に示す。293FT，K562，HeLa に対するウェスタンブロッティングはそれぞれ表 2 に示す条件 A，A，B で施行した。

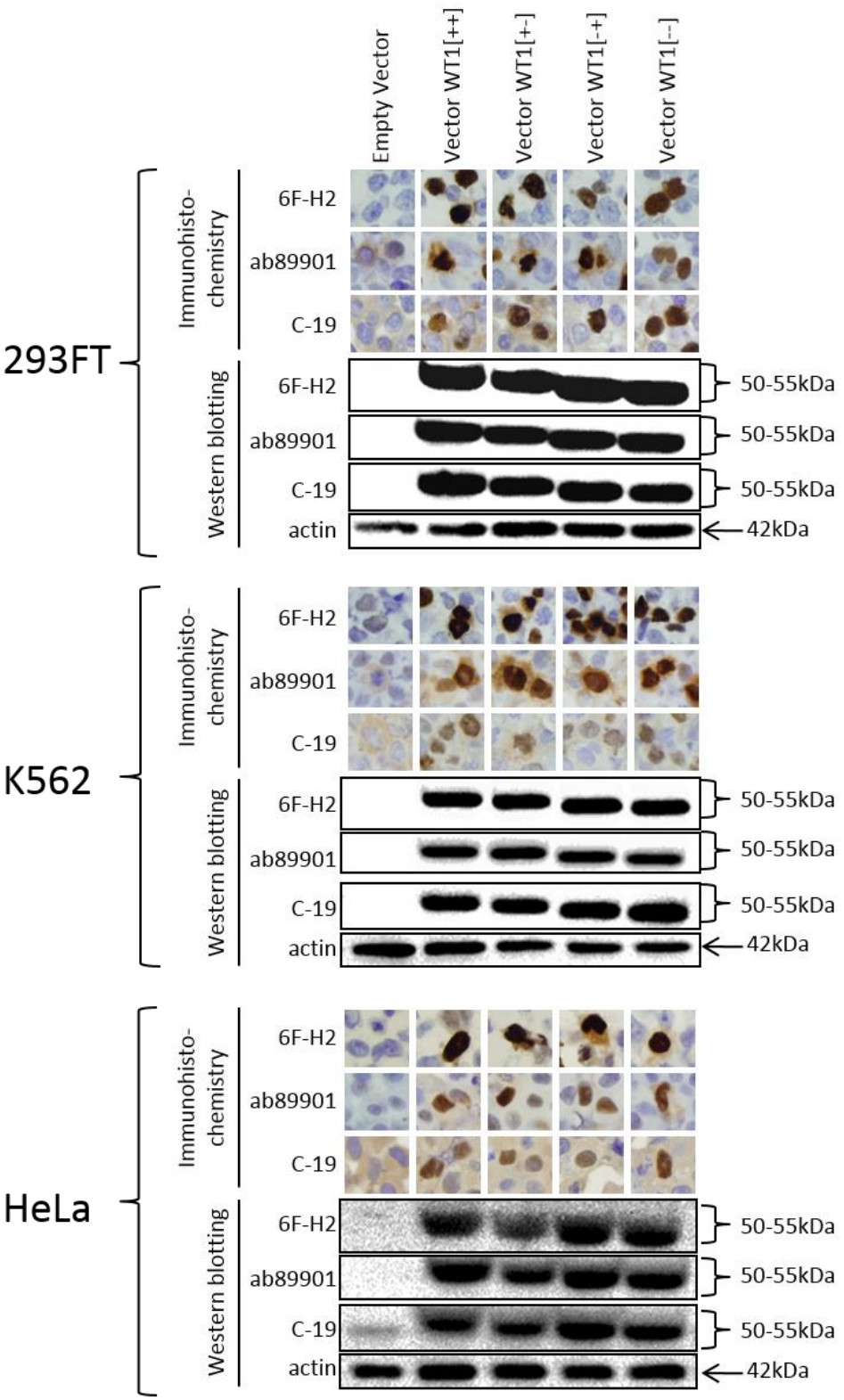


図 3　遺伝子導入細胞株に対する免疫組織化学染色とウェスタンブロッティングの結果

293FT，K562，HeLa 細胞株に対して 3 種類の WT1 抗体を用いて免疫組織化学染色とウェスタンブロッティングを行った。WT1 を遺伝子導入した細胞では核染色と 50-55kDa のバンドを認めた。

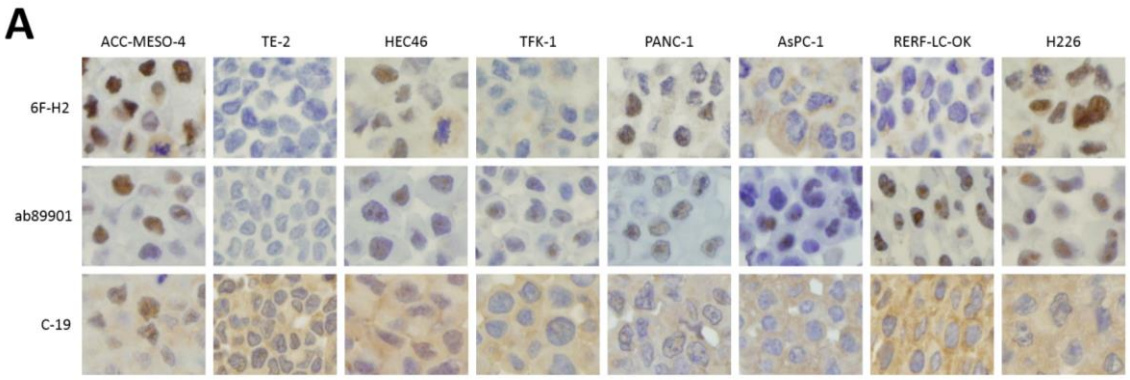
ウェスタンブロッティングでは、3 種類の細胞株全てにおいて、かつ、3 種類の WT1 抗体全てにおいて、分子量 50-55kDa に相当する強いプロテインバンドを認め、これは WT1 の 4 種類の isoform 全てに共通であった。免疫組織化学染色では、3 種類の細胞株全てにおいて、かつ、3 種類の WT1 抗体全てにおいて、強い核染色を認め、これは WT1 の 4 種類の isoform 全てにおいて共通であった。この強い核染色はウェスタンブロッティングにおける 50-55kDa の強いプロテインバンドと完全に同調して認められた。一方で、細胞質染色は Empty Vector 導入細胞株において Vector WT1 導入細胞株と同等に認められ、強い核染色に付随するものを除くとプロテインバンドとの明らかな関連はなかった。

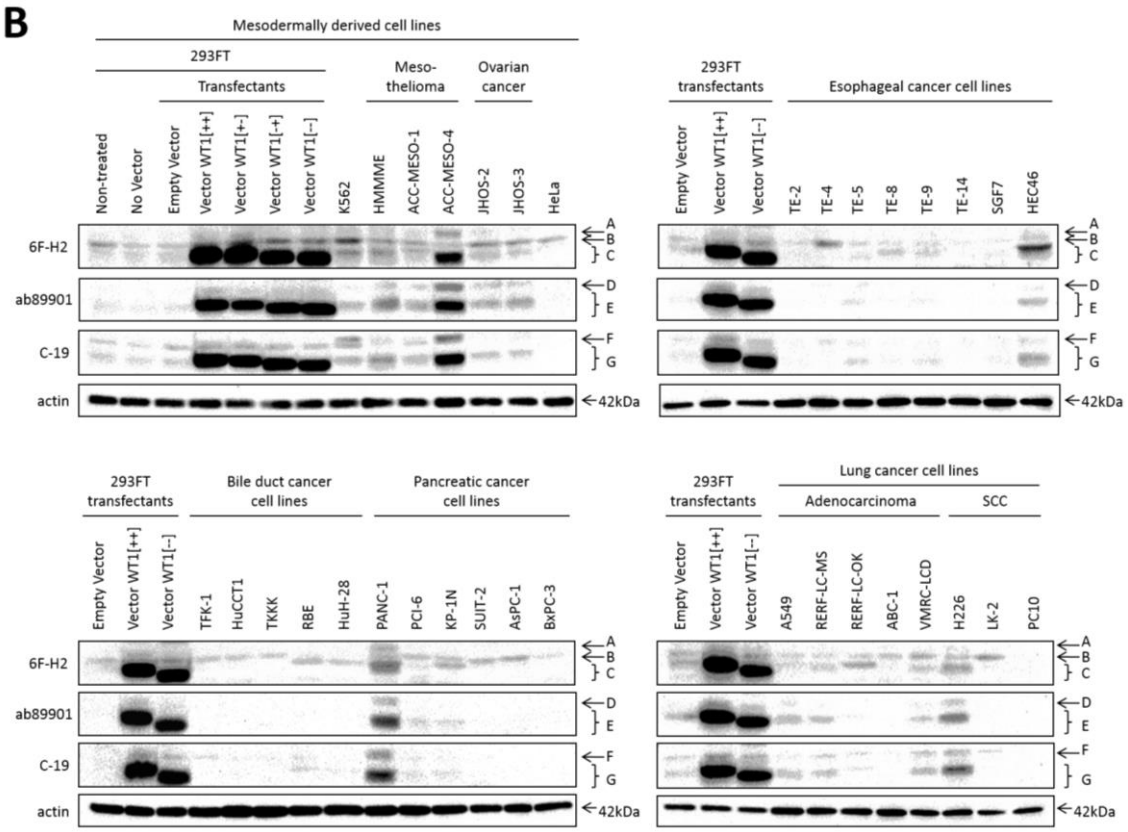
これらの結果から、強制発現 WT1 は核において認められ、免疫組織化学染色における細胞質染色は外因性 WT1 の発現量とは無関係であると考えられる。Empty Vector 導入細胞株と Vector WT1 導入細胞株を、以降の実験における WT1 タンパク発現のそれぞれ陰性対照、陽性対照として使用した。

【ヒト細胞株に対する免疫組織化学染色・ウェスタンブロッティング・qRT-PCR の結果とその関連性】

免疫組織化学染色の内因性 WT1 に対する特異性を検討するために、その染色結果を同一サンプルに対するウェスタンブロッティングと qRT-PCR の結果と照らし合わせた。図 4 は 35 種類のヒト細胞株に対する免疫組織化学染色、ウェスタンブロッティング、qRT-PCR の結果を示す。ウェスタンブロッティングは表 2 における条件 B で施行した。‘Non-treated’はベクターや

遺伝子導入に必要な試薬を一切作用させていないサンプルであり、‘No Vector’は遺伝子導入に必要な試薬のみを作用させたサンプルである。‘Vector WT1’は Vector WT1 導入細胞株から抽出したタンパク 1μg と Empty Vector 導入細胞株から抽出したタンパク 19μg からなる（条件 B で Vector WT1 導入細胞株から抽出したタンパク 20μg を使用するとプロテインバンドの強度が過剰になるため）。6F-H2 による 60kDa，57kDa，50-55kDa のプロテインバンドをそれぞれ A，B，C、ab89901 による 60kDa，50-55kDa のプロテインバンドをそれぞれ D，E、C-19 による 60kDa，50-55kDa のプロテインバンドをそれぞれ F，G と定義する。




B
Mesodermally derived cell lines
293FT
Transfectants
Meso-thelioma
Ovarian cancer
Non-treated
No Vector
Empty Vector
Vector WT1[++]
Vector WT1[+-]
Vector WT1[-+]
Vector WT1[--]
K562
HMMME
ACC-MESO-1
ACC-MESO-4
JHOS-2
JHOS-3
HeLa
293FT transfectants
Esophageal cancer cell lines
TE-2
TE-4
TE-5
TE-8
TE-9
TE-14
SGF7
HEC46
6F-H2
ab89901
C-19
actin
A
B
C
D
E
F
G
42kDa
Bile duct cancer cell lines
Pancreatic cancer cell lines
TFK-1
HuCCT1
TKKK
RBE
HuH-28
PANC-1
PCI-6
KP-1N
SUIT-2
AsPC-1
BxPC-3
Lung cancer cell lines
Adenocarcinoma
SCC
A549
RERF-LC-MS
RERF-LC-OK
ABC-1
VMRC-LCD
H226
LK-2
PC10

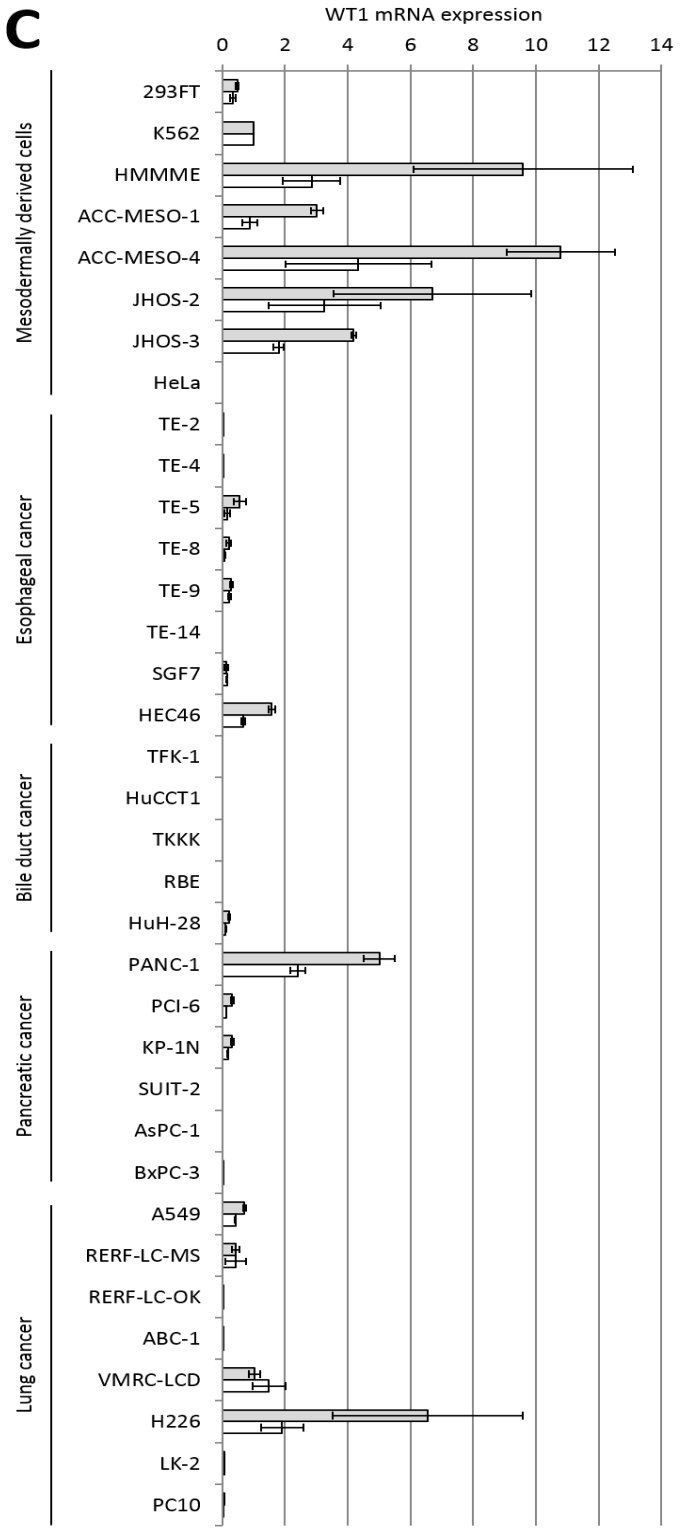


図 4　35 種ヒト細胞株に対する免疫組織化学染色、ウェスタンブロッティング、qRT-PCR の結果

A）免疫組織化学染色における代表的な染色像。B）ウェスタンブロッティングの結果。使用した抗体と分子量に応じて、7 種類のバンド（A-G）を認めた。C）qRT-PCR の結果。灰色の棒グラフは intercalator-based method で解析した WT1 mRNA 量、白の棒グラフは fluorescent probe–based method で解析した WT1 mRNA 量、Error bar は標準偏差。

免疫組織化学染色では核全体、核小体、細胞質それぞれにおける染色スコアを独立に算出した。ウェスタンブロッティングでは抗体により 7 種類の様々な分子量のプロテインバンドが認められ（図 4B）、それぞれの染色強度を定量化した。qRT-PCR では 2 種類の検出方法で WT1 mRNA 量を算出した。表 3 にこれらの定量値を示す。表 3 で示した各群の統計学的相関を表 4 に示す。

表 3　35 種ヒト細胞株における免疫組織化学染色スコア、ウェスタンブロットバンドの強度、WT1 mRNA 発現量

Cell lines	Immunostaining scores								Intensities of Western blotting bands								WT1 mRNA expression	
	6F-H2			ab89901			C-19		6F-H2			ab89901		C19				
	EN	NB	CP	EN	NB	CP	EN	NB	CP	A	B	C	D	E	F	G	IC	FP
293FT	0.000	0.000	0.000	0.282	0.204	0.082	0.000	0.000	0.938	0.022	0.193	0.104	0.004	0.050	0.077	0.093	0.475	0.335
K562	0.600	0.000	0.596	0.055	0.555	0.100	0.000	0.000	1.880	0.168	0.397	0.287	0.014	0.119	0.244	0.162	1.000	1.000
HMMME	1.830	0.000	0.389	0.958	0.108	0.004	0.241	0.026	1.585	0.118	0.180	0.241	0.077	0.256	0.064	0.262	9.595	2.852
ACC-MESO-1	0.539	0.000	0.189	0.118	0.527	0.036	0.030	0.000	0.753	0.063	0.133	0.174	0.045	0.154	0.074	0.155	3.015	0.876
ACC-MESO-4	1.705	0.000	0.188	0.839	0.195	0.020	0.639	0.136	2.055	0.128	0.099	0.488	0.224	0.552	0.248	0.664	10.795	4.335
JHOS-2	0.508	0.000	0.220	0.255	0.176	0.056	0.000	0.000	1.465	0.051	0.253	0.169	0.097	0.159	0.023	0.109	6.694	3.256
JHOS-3	0.417	0.000	0.000	1.180	0.060	0.049	0.273	0.000	2.020	0.021	0.171	0.080	0.069	0.201	0.037	0.086	4.183	1.797
HeLa	0.019	0.000	0.902	0.228	0.142	0.056	0.000	0.000	1.909	0.006	0.111	0.003	0.005	0.002	0.005	0.001	0.000	0.000
TE-2	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.093	0.060	1.805	0.024	0.055	0.044	0.003	0.007	0.012	0.013	0.008	0.011
TE-4	0.000	0.000	0.039	0.130	0.094	0.016	0.025	0.000	1.955	0.019	0.180	0.045	0.007	0.003	0.021	0.006	0.002	0.003
TE-5	0.006	0.000	0.838	0.356	0.284	0.062	0.000	0.000	1.665	0.006	0.039	0.033	0.014	0.024	0.017	0.036	0.551	0.166
TE-8	0.000	0.000	0.000	0.106	0.635	0.005	0.030	0.109	1.500	0.007	0.030	0.056	0.006	0.005	0.007	0.010	0.200	0.064
TE-9	0.008	0.000	0.230	0.068	0.274	0.025	0.080	0.000	1.850	0.012	0.046	0.056	0.005	0.011	0.010	0.029	0.287	0.216
TE-14	0.000	0.000	0.000	0.061	0.037	0.000	0.048	0.000	1.985	0.004	0.015	0.009	0.001	0.000	0.009	0.002	0.000	0.000
SGF7	0.016	0.000	0.158	0.070	0.079	0.125	0.238	0.073	2.025	0.002	0.013	0.019	0.001	0.001	0.012	0.014	0.122	0.141
HEC46	0.729	0.000	0.188	0.107	0.246	0.056	0.231	0.067	1.725	0.041	0.120	0.327	0.012	0.086	0.032	0.160	1.576	0.653
TFK-1	0.000	0.000	0.477	0.068	0.320	0.017	0.028	0.009	1.405	0.016	0.131	0.011	0.008	0.003	0.032	0.004	0.000	0.000
HuCCT1	0.000	0.000	0.000	0.000	0.269	0.055	0.012	0.000	1.580	0.014	0.077	0.002	0.002	0.002	0.015	0.012	0.000	0.000

表 3 （続き）

Cell lines	Immunostaining scores									Intensities of Western blotting bands							WT1 mRNA expression	
	6F-H2			ab89901			C-19			6F-H2			ab89901		C19			
	EN	NB	CP	EN	NB	CP	EN	NB	CP	A	B	C	D	E	F	G	IC	FP
TKKK	0.026	0.000	0.387	0.580	0.165	0.000	0.023	0.000	1.455	0.009	0.077	0.001	0.003	0.003	0.017	0.015	0.000	0.000
RBE	0.013	0.000	0.501	0.072	0.422	0.041	0.010	0.020	1.690	0.008	0.062	0.092	0.001	0.002	0.039	0.059	0.000	0.000
HuH-28	0.063	0.000	0.000	0.011	0.019	0.000	0.000	0.000	1.029	0.008	0.010	0.069	0.001	0.002	0.007	0.005	0.218	0.103
PANC-1	0.775	0.000	0.396	0.453	0.103	0.010	0.128	0.016	1.405	0.171	0.204	0.459	0.138	0.517	0.217	0.539	5.003	2.398
PCI-6	0.000	0.000	0.624	0.198	0.140	0.062	0.016	0.000	1.550	0.023	0.148	0.061	0.010	0.072	0.030	0.056	0.310	0.120
KP-1N	0.038	0.019	0.467	0.410	0.087	0.000	0.007	0.000	2.055	0.016	0.099	0.182	0.006	0.070	0.021	0.054	0.315	0.173
SUIT-2	0.000	0.000	0.675	0.000	0.000	0.000	0.008	0.000	1.600	0.015	0.139	0.042	0.005	0.003	0.001	0.012	0.000	0.000
AsPC-1	0.000	0.000	0.934	0.105	0.331	0.027	0.010	0.000	1.519	0.003	0.199	0.007	0.003	0.027	0.001	0.001	0.000	0.000
BxPC-3	0.000	0.000	0.194	0.097	0.168	0.041	0.007	0.000	1.578	0.002	0.050	0.001	0.002	0.004	0.000	0.001	0.000	0.001
A549	0.146	0.000	0.414	0.118	0.323	0.045	0.008	0.000	1.811	0.012	0.067	0.062	0.019	0.084	0.015	0.063	0.707	0.416
RERF-LC-MS	0.092	0.000	0.591	0.322	0.385	0.134	0.023	0.000	1.695	0.012	0.056	0.069	0.008	0.069	0.038	0.063	0.412	0.432
RERF-LC-OK	0.015	0.000	0.594	0.153	0.516	0.063	0.019	0.000	1.785	0.011	0.070	0.122	0.001	0.007	0.024	0.016	0.021	0.013
ABC-1	0.000	0.000	0.109	0.170	0.154	0.007	0.015	0.000	1.539	0.012	0.072	0.021	0.001	0.001	0.008	0.003	0.002	0.001
VMRC-LCD	0.298	0.000	0.489	0.329	0.013	0.026	0.108	0.000	1.940	0.015	0.146	0.088	0.017	0.055	0.070	0.088	1.027	1.483
H226	1.490	0.000	0.261	0.660	0.314	0.106	0.044	0.015	1.941	0.017	0.099	0.181	0.066	0.219	0.115	0.272	6.547	1.911
LK-2	0.032	0.000	0.595	0.060	0.346	0.051	0.038	0.000	1.600	0.015	0.253	0.049	0.009	0.005	0.040	0.006	0.051	0.068
PC10	0.029	0.000	0.185	0.363	0.446	0.099	0.023	0.008	1.500	0.006	0.012	0.008	0.001	0.002	0.008	0.001	0.052	0.025

表 4　35 種ヒト細胞株に対する免疫組織化学染色、ウェスタンブロッティングおよび qRT-PCR の定量的結果における統計学的相関

			Immunostaining scores									Intensities of Western-blot bands										WT1 mRNA expression
			6F-H2			ab89901			C19			6F-H2			ab89901			C19				
			EN	NB	CP	EN	NB	CP	EN	NB	CP	A	B	C	D	E	F	G	IC	FP
Immunostaining scores	6F-H2	EN	-	0.069 (0.686)	0.102 (0.553)	0.515 (0.003)	0.091 (0.594)	0.197 (0.252)	0.316 (0.065)	0.238 (0.165)	0.187 (0.275)	0.500 (0.004)	0.269 (0.117)	0.722 (<0.001)	0.658 (<0.001)	0.686 (<0.001)	0.625 (<0.001)	0.733 (<0.001)	0.794 (<0.001)	0.800 (<0.001)
		NB	0.069 (0.686)	-	0.085 (0.619)	0.187 (0.276)	0.017 (0.322)	-0.247 (0.150)	-0.179 (0.297)	-0.113 (0.508)	0.280 (0.102)	0.060 (0.729)	0.000 (>0.999)	0.204 (0.255)	-0.009 (0.960)	0.102 (0.552)	-0.008 (0.961)	0.034 (0.843)	0.051 (0.765)	0.051 (0.765)
		CP	0.102 (0.553)	0.085 (0.619)	-	0.071 (0.679)	0.251 (0.143)	0.231 (0.177)	-0.314 (0.067)	-0.256 (0.136)	0.041 (0.810)	-0.059 (0.732)	0.334 (0.052)	0.028 (0.871)	0.207 (0.227)	0.175 (0.308)	0.102 (0.554)	0.049 (0.776)	-0.073 (0.672)	-0.069 (0.686)
	ab 89901	EN	0.515 (0.003)	0.187 (0.276)	0.071 (0.679)	-	-0.036 (0.836)	0.151 (0.378)	0.215 (0.209)	0.096 (0.574)	0.098 (0.567)	0.244 (0.154)	0.198 (0.249)	0.363 (0.034)	0.496 (0.004)	0.536 (0.002)	0.420 (0.014)	0.469 (0.006)	0.566 (0.001)	0.536 (0.002)
		NB	0.091 (0.594)	0.017 (0.322)	0.251 (0.143)	-0.036 (0.836)	-	0.490 (0.004)	-0.182 (0.290)	0.058 (0.737)	-0.267 (0.120)	-0.085 (0.619)	-0.015 (0.930)	0.098 (0.587)	0.042 (0.805)	0.122 (0.476)	0.203 (0.236)	0.073 (0.670)	0.042 (0.809)	0.024 (0.891)
		CP	0.197 (0.252)	-0.247 (0.150)	0.231 (0.177)	0.151 (0.378)	0.490 (0.004)	-	-0.155 (0.367)	-0.048 (0.780)	0.100 (0.559)	-0.043 (0.803)	0.075 (0.682)	0.105 (0.539)	0.101 (0.556)	0.169 (0.323)	0.289 (0.092)	0.225 (0.190)	0.248 (0.148)	0.273 (0.112)
	C19	EN	0.316 (0.065)	-0.179 (0.297)	-0.314 (0.067)	0.215 (0.209)	-0.182 (0.290)	-0.155 (0.367)	-	0.576 (<0.001)	0.313 (0.068)	0.282 (0.100)	-0.002 (0.989)	0.234 (0.173)	0.287 (0.094)	0.255 (0.137)	0.336 (0.050)	0.298 (0.082)	0.314 (0.067)	0.331 (0.053)
		NB	0.238 (0.165)	-0.113 (0.508)	-0.256 (0.136)	0.096 (0.574)	0.058 (0.737)	-0.048 (0.780)	0.576 (<0.001)	-	0.081 (0.656)	0.178 (0.300)	-0.189 (0.270)	0.277 (0.106)	0.125 (0.464)	0.137 (0.425)	0.211 (0.219)	0.260 (0.129)	0.227 (0.186)	0.204 (0.234)
		CP	0.187 (0.275)	0.280 (0.102)	0.041 (0.81)	0.098 (0.567)	-0.267 (0.120)	0.100 (0.559)	0.313 (0.068)	0.081 (0.656)	-	-0.021 (0.900)	-0.107 (0.534)	0.148 (0.389)	0.102 (0.552)	0.077 (0.654)	0.096 (0.576)	0.144 (0.402)	0.700 (0.484)	0.162 (0.346)
Intensities of Western-blot bands	6F-H2	A	0.500 (0.004)	0.060 (0.729)	-0.059 (0.732)	0.244 (0.154)	-0.085 (0.619)	-0.043 (0.803)	0.282 (0.100)	0.178 (0.300)	-0.021 (0.900)	-	0.673 (<0.001)	0.734 (<0.001)	0.717 (<0.001)	0.732 (<0.001)	0.734 (<0.001)	0.744 (<0.001)	0.653 (<0.001)	0.640 (<0.001)
		B	0.269 (0.117)	0.000 (>0.999)	0.334 (0.052)	0.198 (0.249)	-0.015 (0.930)	0.075 (0.662)	-0.002 (0.989)	-0.189 (0.270)	-0.107 (0.534)	0.673 (<0.001)	-	0.392 (0.022)	0.589 (<0.001)	0.542 (0.002)	0.531 (0.002)	0.404 (0.019)	0.310 (0.071)	0.321 (0.062)
		C	0.722 (<0.001)	0.204 (0.235)	0.028 (0.871)	0.363 (0.034)	0.098 (0.567)	0.105 (0.539)	0.234 (0.173)	0.277 (0.106)	0.148 (0.389)	0.734 (<0.001)	0.392 (0.022)	-	0.623 (<0.001)	0.772 (<0.001)	0.757 (<0.001)	0.866 (<0.001)	0.819 (<0.001)	0.809 (<0.001)
	ab 89901	D	0.658 (<0.001)	-0.009 (0.960)	0.207 (0.227)	0.496 (0.004)	0.042 (0.805)	0.101 (0.556)	0.287 (0.094)	0.125 (0.464)	0.102 (0.552)	0.717 (<0.001)	0.589 (<0.001)	0.623 (<0.001)	-	0.875 (<0.001)	0.647 (<0.001)	0.739 (<0.001)	0.795 (<0.001)	0.778 (<0.001)
		E	0.686 (<0.001)	0.102 (0.552)	0.175 (0.308)	0.536 (0.002)	0.122 (0.476)	0.169 (0.323)	0.255 (0.137)	0.137 (0.425)	0.077 (0.654)	0.732 (<0.001)	0.542 (0.002)	0.772 (<0.001)	0.875 (<0.001)	-	0.672 (<0.001)	0.836 (<0.001)	0.855 (<0.001)	0.847 (<0.001)
	C19	F	0.625 (<0.001)	-0.008 (0.961)	0.102 (0.554)	0.420 (0.014)	0.203 (0.236)	0.289 (0.092)	0.336 (0.050)	0.211 (0.219)	0.096 (0.576)	0.734 (<0.001)	0.531 (0.002)	0.757 (<0.001)	0.647 (<0.001)	0.672 (<0.001)	-	0.830 (<0.001)	0.667 (<0.001)	0.671 (<0.001)
		G	0.733 (<0.001)	0.034 (0.843)	0.049 (0.776)	0.469 (0.006)	0.073 (0.670)	0.225 (0.190)	0.298 (0.082)	0.260 (0.129)	0.144 (0.402)	0.744 (<0.001)	0.404 (0.019)	0.866 (<0.001)	0.739 (<0.001)	0.836 (<0.001)	0.830 (<0.001)	-	0.853 (<0.001)	0.844 (<0.001)
WT1 mRNA expression		IC	0.794 (<0.001)	0.051 (0.765)	-0.073 (0.672)	0.566 (0.001)	0.042 (0.809)	0.248 (0.148)	0.314 (0.067)	0.227 (0.186)	0.700 (0.484)	0.653 (<0.001)	0.310 (0.071)	0.819 (<0.001)	0.795 (<0.001)	0.855 (<0.001)	0.667 (<0.001)	0.853 (<0.001)	-	0.986 (<0.001)
		FP	0.800 (<0.001)	0.051 (0.765)	-0.069 (0.686)	0.536 (0.002)	0.024 (0.891)	0.273 (0.112)	0.331 (0.053)	0.204 (0.234)	0.162 (0.346)	0.640 (<0.001)	0.321 (0.062)	0.809 (<0.001)	0.778 (<0.001)	0.847 (<0.001)	0.671 (<0.001)	0.844 (<0.001)	0.986 (<0.001)	-

上段は相関係数 r、下段（）内は p 値、網掛けは統計学的に有意に正の相関を示すもの（$r > 0.4$ かつ $p < 0.05$）。

ウェスタンブロットバンドの強度（バンド B を除く）と WT1 mRNA 発現量はどれも統計学的に強い正の相関を示した。6F-H2 による核全体の免疫組織化学染色はウェスタンブロットバンドの強度（バンド B を除く）と WT1 mRNA 発現量と統計学的に強い正の相関を示した。ab89901 による核全体の免疫組織化学染色は、6F-H2 による核全体の染色やウェスタンブロットバンドの強度、WT1 mRNA 発現量の複数の群と統計学的に有意な正の相関を示した。対照的に、C-19 による核染色と 3 種 WT1 抗体すべてにおける細胞質染色はウェスタンブロットバンドの強度および WT1 mRNA 発現量と一切有意な相関を示さなかった。統計学的に有意な負の相関（$r < -0.4$ かつ $p < 0.05$）は確認されなかった。

これらの結果から、ウェスタンブロッティング（バンド B を除く）と qRT-PCR の結果は内因性 WT1 発現の指標として信頼性が高く、これらと高度に同調する 6F-H2 による核全体の免疫組織化学染色は内因性 WT1 に特異的な染色と評価できる。ab89901 による核全体の免疫組織化学染色も 6F-H2 ほどではないが、内因性 WT1 発現を反映していると言える。一方で、C-19 による核染色と、少なくとも本研究で使用した 3 種類の WT1 抗体による細胞質染色は、ウェスタンブロッティング、qRT-PCR と有意な相関を示さず、内因性 WT1 を特異的に検出しているとは言い難いと考えられた。

【融合タンパク GFP-WT1 の細胞内局在】

WT1 タンパクの細胞内局在を別の方法で検討するため、融合タンパク GFP-WT1 を作成した。Vector GFP-WT1 導入細胞株における融合タンパク GFP-WT1 の特異的な発現はウェスタンブロッティングで確認した（図 5）。GFP と WT1 の分子量はそれぞれ 27kDa，50-55kDa と考えられ、融合タンパク GFP-WT1 の分子量は 77-82kDa と予想される。3 種 WT1 抗体および GFP

抗体によるウェスタンブロッティングにおいて、77-82kDa の特異的なプロテインバンドを認めた。293FT，K562，HeLa に対するウェスタンブロッティングはそれぞれ表 2 の条件 A，A，B で施行した。図 6 に融合タンパク GFP-WT1 強制発現細胞株の蛍光顕微鏡像を示す。GFP を導入した細胞株において緑色蛍光は核または細胞質に確認されたが、GFP-WT1 を導入した細胞株においては緑色蛍光が核のみに確認された。

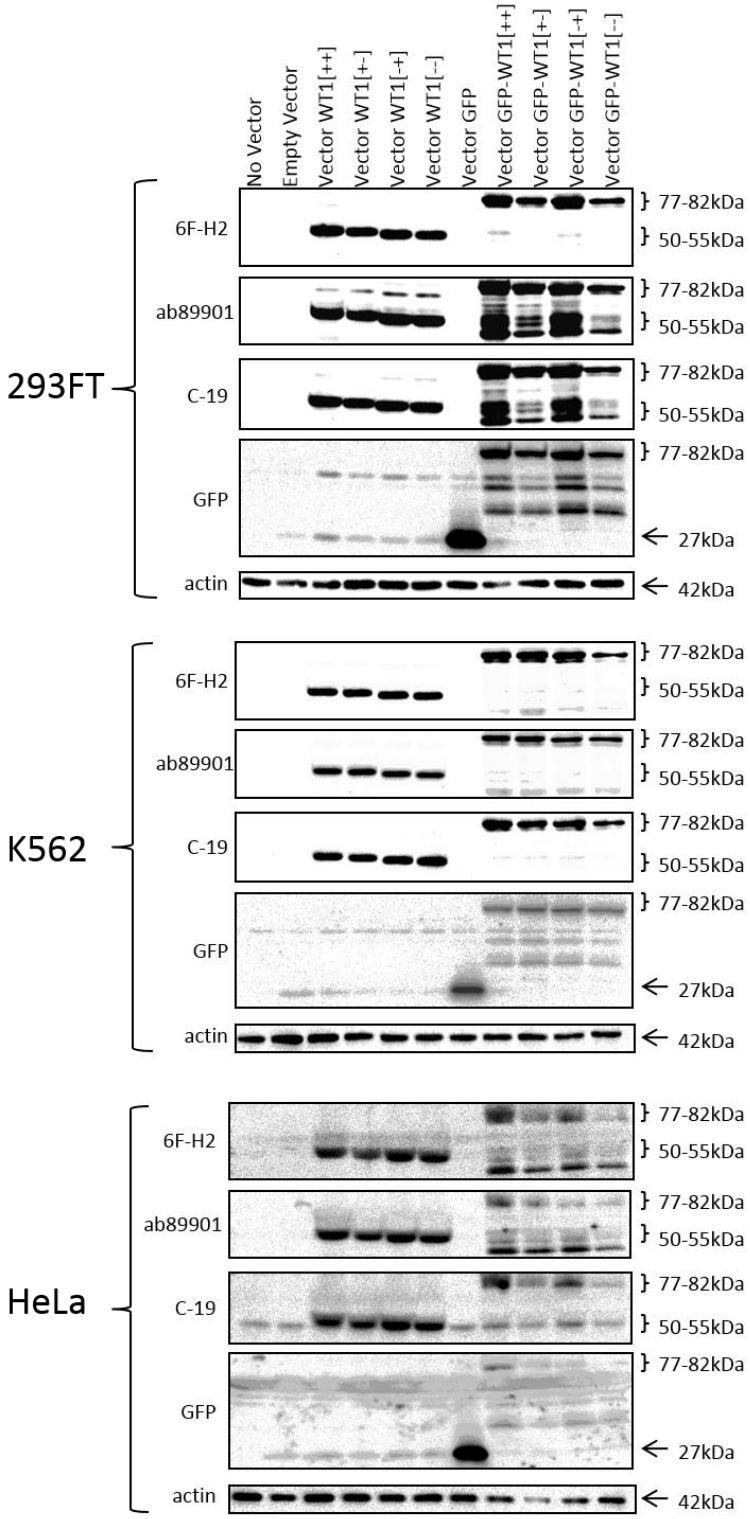


図 5　融合タンパク GFP-WT1 強制発現株に対するウェスタンブロッティング

GFP-WT1 を遺伝子導入した細胞では、融合タンパク GFP-WT1 の推定分子量に相当する 77-82kDa のバンドを認めた。

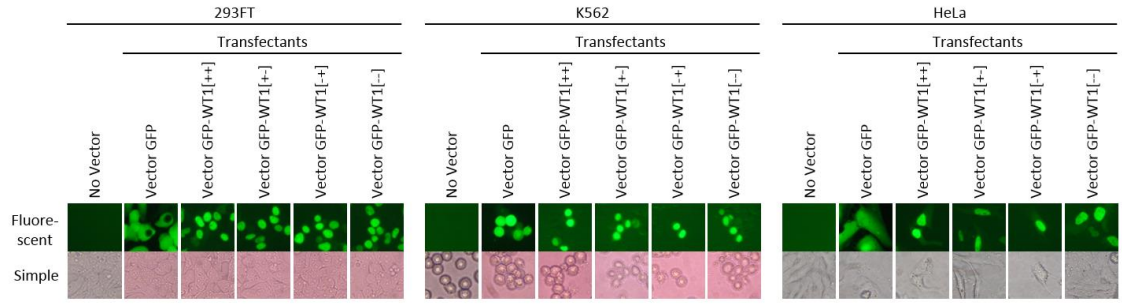


図 6　融合タンパク GFP-WT1 強制発現細胞株の顕微鏡像

GFP を遺伝子導入した細胞では細胞全体に緑色蛍光が観察されるが、GFP-WT1 を遺伝子導入した細胞では核に緑色蛍光が集中して観察された。

【ヒト組織サンプルにおける WT1 発現】

ここまでの検討から 6F-H2 抗体を用いた評価法が妥当と考えられ、以降の検討では 6F-H2 抗体を用いて検討した。食道癌・胆管癌・膵癌・肺癌の 552 症例から得た癌組織とそれに対応する正常上皮組織に対して 6F-H2 による免疫組織化学染色を施行した。図 7 に代表的な染色像を、表 5 に核染色と細胞質染色の結果を示す。

6F-H2 による免疫組織化学染色において、胸膜中皮腫・卵巣癌・腎・胸膜といった中胚葉由来組織で核染色を認めたが、食道・胆管・膵・肺の癌組織・正常上皮組織では核染色をほとんど認めなかった。これらの結果は食道癌・胆管癌・膵癌・肺癌における WT1 発現が正常組織を含む中胚葉由来組織と比較してきわめて低いことを示している。一方、食道癌・胆管癌・膵癌・肺癌において細胞質染色は高い頻度で認められた。

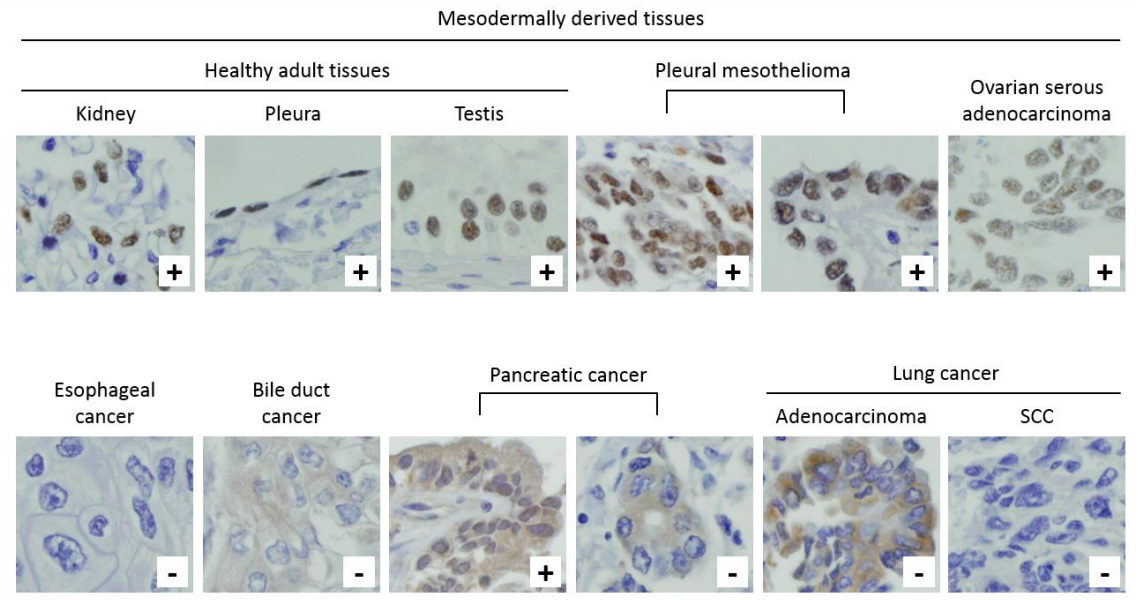


図 7　ヒト組織に対する 6F-H2 による免疫組織化学染色像

“+”は核染色陽性を、“-”は核染色陰性を示す。中胚葉由来組織には核染色を認めるが、食道・胆管・膵・肺組織にはほとんど核染色を認めなかった。

表 5　ヒト組織に対する 6F-H2 による免疫組織化学染色の結果

Human tissue samples	**Immunostaining (6F-H2)**							
	Cancer cells				**Normal epithelium**			
	Entire nucleus		**Cytoplasm**		**Entire nucleus**		**Cytoplasm**	
Esophagus	0/99	(0%)	79/99	(80%)	0/89	(0%)	38/89	(43%)
Bile duct	0/95	(0%)	59/95	(62%)	0/54	(0%)	33/54	(61%)
Pancreas	3/98	(3.1%)	58/98	(59%)	1/53	(1.9%)	5/53	(9.4%)
Lung								
(Adenocarcinoma)	0/164	(0%)	83/164	(51%)	0/158	(0%)	0/158	(0%)
(Squamous cell carcinoma)	0/71	(0%)	33/71	(46%)	0/61	(0%)	0/61	(0%)
(Cancers of other histological types)	0/14	(0%)	5/14	(36%)	0/11	(0%)	0/11	(0%)

考察

WT1 は 1990 年に Wilms 腫瘍で同定された中胚葉由来組織の成長に関わる転写調節因子である [1-5]。Wilms 腫瘍と関連が強い Denys-Drash 症候群と Frasier 症候群において、WT1 遺伝子における特異的な遺伝子変異が同定されている。すなわち、前者においては exon 8-9 のヘテロ接合ミスセンス変異が、後者においては intron 9 のスプライシングドナーサイトのヘテロ接合性変異を認め、変異 WT1 タンパクが正常 WT1 タンパクの作用を阻害することで標的 DNA への結合能が低下するために腎症が発症し、Wilms 腫瘍が発生すると考えられている [42-44]。特発性 Wilms 腫瘍においては、15%に WT1 遺伝子の変異が認められる [45]。WT1 遺伝子を細胞株に導入すると、動物に移植した腫瘍の成長が抑制されることがわかっている [46, 47]。分子生物学的には、WT1 がアポトーシスを促進する BAK を刺激したり [48]、上皮成長因子受容体を抑制して腫瘍細胞死を促進することが確認されている [49]。これらの研究結果に基づいて、WT1 遺伝子は当初がん抑制遺伝子と考えられた。一方、2000 年以降、WT1 が内・外胚葉由来がんにおいて広く過剰発現していると報告されるようになり [17-27]、これらの WT1 に変異が確認されない [19, 22, 23, 27] ことも加えて、WT1 遺伝子にはがん遺伝子の一面もあると考えられるようになった。現在、野生型 WT1 を標的としたがん免疫療法が既に施行されている [29-36]。WT1 遺伝子ががん遺伝子であり、かつ、がん抑制遺伝子であるという解釈は一見矛盾しており、その二面性を十分に説明する決定的な理論と実証はない。

本研究は固形がんに対する WT1 標的治療を適切に行うために、WT1 に対する免疫組織化学染色の解析方法を確立することを目的とした。そのために、遺伝子レベルで陰性対照、陽性対照を作成し、複数の WT1 抗体を用いたウェスタンブロッティングや qRT-PCR で WT1 遺伝子産物に対して多角的にアプローチし、その結果を数値化した。これらを統計学的に検討した結果、免疫組織化学染色における核染色が特異的な WT1 発現を反映し、細胞質染色は非特異的な反応である可能性を示した。融合タンパク GFP-WT1 が核に偏

在する結果は、WT1 が核に移行する強い能力を有していることを示唆しており、免疫組織化学染色において核染色が特異的で細胞質染色が非特異的であることを支持する結果となった。また、食道癌、胆管癌、膵癌、肺癌に対する免疫組織化学染色で核染色はほとんど認められず、一方で、細胞質染色は高い頻度で認められた。

WT1 に対する免疫組織化学染色において、中胚葉由来組織では核染色を認め、中胚葉由来でない組織では核染色をほとんど認めず細胞質染色を高頻度に認めるという結果は、本研究を含め多くの研究で共通している [8-16, 17-23, 27]。転写因子である WT1 タンパクは原則的に核に存在すると考えられており、少なくとも 2 つの特異的な核移行シグナルが同定されている [50]。このため、病理学分野の研究者らは WT1 の免疫組織化学的な細胞質染色を一般的に非特異反応と捉えており、WT1 は中胚葉由来でない固形がんにおいてほとんど発現していないと結論付けている（大腸癌で 0%[11,15]、膵癌で 0%[16]、甲状腺癌で 0%[11]、前立腺癌で 0%[11]、肺癌で 0-20%[8-15]、乳癌で 0-7%[11,13,15]）。それゆえ、胸腔内腫瘍における胸膜中皮腫と肺癌の鑑別 [8, 10-14] や悪性腹水の原発臓器検索における卵巣癌と膵癌の鑑別 [16] に WT1 が使用されている。一方、固形がんに対する WT1 標的治療に従事する研究者たちは、免疫組織化学染色における細胞質染色を根拠として、中胚葉由来でない様々な固形がんにおいて WT1 が過剰発現していると考えている [17-28]。つまり、固形がんにおける WT1 発現に関する結論の相違は、免疫組織化学染色における細胞質染色の解釈に依存しているが、細胞質染色が WT1 発現を反映するかどうかを検証した決定的なエビデンスはない。本研究では多角的かつ統計学的な検証結果に基づき、WT1 の免疫組織化学的な細胞質染色が非特異反応である可能性を示すことができた。すなわち、本研究結果は WT1 が中胚葉由来でない悪性腫瘍にほとんど発現していない可能性を示唆しており、WT1 をがん遺伝子と捉える見解に疑問を投じるものである。健常腎、中皮で WT1 の強い核染色が認められる点も踏まえ、中胚葉由来でない固形がんに対する WT1 標的治療はその論理的な整合性に再検討が必要であると考える。

本研究における今後の検討課題として以下の 3 点が考えられる。まず、本

研究では、これまでも数多くの基礎研究で使用されているプラスミドベクターと遺伝子導入を利用して WT1 発現の厳格な陽性対照・陰性対照を作成した。本研究において、遺伝子導入細胞株はそれ自体に対する発現解析によって WT1 発現に関する明瞭な知見を提供し、細胞株における解析においても陽性対照・陰性対照として機能した。遺伝子発現解析において、遺伝子導入による陽性対照・陰性対照の設定は正確な知見を得るのに有効な手段であるが、遺伝子導入細胞株が産生するタンパクは外因性であり、その性質や発現の程度が内因性タンパクと異なる可能性があることに留意すべきである。また、本検討では WT1 に対する免疫組織化学染色を、ヒト細胞株を対象として複数の実験モダリティーを使用して検証したが、ヒト組織サンプルに対しては免疫組織化学染色の結果しか提示していない。細胞株と組織とでは WT1 タンパクの局在が異なる可能性があるため、ヒト組織サンプルを対象としたウェスタンブロッティングや qRT-PCR を施行した方が信頼性の高いデータが得られる可能性がある。しかし、組織サンプルは中胚葉由来である間質や血球を含んでおり、これらは WT1 タンパクを発現しうるため、その結果の解釈は容易でないと思われる。腫瘍組織サンプルへの非腫瘍成分の混入は、qRT-PCR においてきわめて重要な問題となる。さらに、腫瘍の不均一性のために、同じ腫瘍であっても採取部位によって WT1 発現が異なる可能性を考慮すべきである [51]。また、腫瘍細胞の核と細胞質を分離してウェスタンブロッティングを施行するのも理想的だが、他分画成分の混入を回避する技術的な解決策が必要である。本研究は WT1 のノックアウト実験も施行しておらず、mRNA 発現とタンパク発現が必ずしも相関する必然性がないこと、WT1 が核と細胞質の間を移行する分子生物学的なメカニズム、WT1 の局在や isoform による半減期の相違などの詳細には踏み込んでいない。さらに、本研究は細胞質染色を認める固形がんに対して WT1 を標的とした免疫療法が特異的に作用するかどうかは検討していない。細胞質内に少量の WT1 タンパクが存在するとして、WT1 特異的がん免疫療法が機能するにはそれで十分である可能性は否定できない。細胞質染色陽性患者を対象とした WT1 標的免疫治療の臨床試験が多施設で展開されているが、その有効性に関する研究結果によっても、更なるエビデンスが集積されると考えられる。

総括および結論

① 本研究から得られた新知見

・WT1 を標的とした免疫組織化学染色において、核染色は特異的に WT1 発現を反映するが、細胞質染色は非特異的な反応である可能性を示唆した。

・今回の実験系では、食道癌、胆管癌、膵癌、肺癌における WT1 はほとんどが細胞質での染色であった。

② 新知見の意義

・WT1 に関連した免疫組織化学的な細胞質染色を非特異反応と考える病理学分野における見解と一致するものであった。

・WT1 に関する免疫組織化学的な細胞質染色が非特異的な WT1 発現とした場合、WT1 特異的がん免疫療法の有用性につき再検討が必要である。

③ 新知見に基づき今後展開されうる研究

・WT1 の免疫組織化学染色で核染色を認めず、細胞質染色を認める腫瘍細胞に対し、WT1 免疫療法が特異的に作用するか否かを検討する研究が望まれる。

④ 今後の課題

・本研究はヒト組織サンプルに対しては免疫組織化学染色しか施行していない。ヒト組織サンプルに対するウェスタンブロッティングや qRT-PCR といった多角的な発現解析を行う必要がある。

・腫瘍細胞の核と細胞質の分離技術を確立し、それぞれの WT1 タンパク発現を検討する研究が期待される。

謝辞

本研究を行うにあたり、研究の機会を与えていただき御指導下さいました、北海道大学大学院医学研究科消化器外科学分野 II 平野 聡教授に深く感謝いたします。また、研究結果をまとめるにあたり御指導下さいました長崎大学大学院医歯薬学総合研究科腫瘍医学分野 池田 裕明教授に深く感謝いたします。また、研究チームの指導者として研究方法に際してあらゆる御指導を下さいました、当時北海道大学大学院医学研究科消化器外科学分野 II 助教、故 宮本 正樹先生に深く感謝いたします。

免疫組織化学染色の技術的な助言をいただいた志田 啓氏および実験試薬の準備に協力していただいた斉藤 直美氏に感謝の意を表します。

引用文献

1. Call, K.M., Glaser, T., Ito, C.Y., Buckler, A.J., Pelletier, J., Haber, D.A., Rose, E.A., Kral, A., Yeger, H., Lewis, W.H., Jones, C. & Housman, D.E. Isolation and characterization of a zinc finger polypeptide gene at the human chromosome 11 Wilms' tumor locus. *Cell* 60, 509-520 (1990).

2. Gessler, M., Poustka, A., Cavenee, W., Neve, R.L., Orkin, S.H. & Bruns, G.A. Homozygous deletion in Wilms tumours of a zinc-finger gene identified by chromosome jumping. *Nature* 343, 774-778 (1990).

3. Pritchard-Jones, K., Fleming, S., Davidson, D., Bickmore, W., Porteous, D., Gosden, C., Bard, J., Buckler, A., Pelletier, J., Housman, D., Van Heyningen, V. & Hastie, N. The candidate Wilms' tumour gene is involved in genitourinary development. *Nature* 346, 194-197 (1990).

4. Mundlos, S., Pelletier, J., Darveau, A., Bachmann, M., Winterpacht, A. & Zabel, B. Nuclear localization of the protein encoded by the Wilms' tumor gene WT1 in embryonic and adult tissues. *Development* 119, 1329-1341 (1993).

5. Larsson, S.H., Charlieu, J.P., Miyagawa, K., Engelkamp, D., Rassoulzadegan, M., Ross, A., Cuzin, F., van Heyningen, V. & Hastie, N.D.. Subnuclear localization of WT1 in splicing or transcription factor domains is regulated by alternative splicing. *Cell* 81, 391-401 (1995).

6. Menssen, H.D., Renkl, H.J., Rodeck, U., Maurer, J., Notter, M., Schwartz, S., Reinhardt, R. & Thiel, E. Presence of Wilms' tumor gene (wt1) transcripts and the WT1 nuclear protein in the majority of human acute leukemias. *Leukemia* 9, 1060-1067 (1995).

7. Miwa, H., Beran, M. & Saunders, G.F. Expression of the Wilms' tumor gene (WT1) in human leukemias. *Leukemia* 6, 405-409 (1992).

8. Amin, K.M., Litzky, L.A., Smythe, W.R., Mooney, A.M., Morris, J.M., Mews,

D.J., Pass, H.I., Kari, C., Rodeck, U., Rauscher, F.J. 3rd, Kaiser, L.R. & Albelda, S.M. Wilms' tumor 1 susceptibility (WT1) gene products are selectively expressed in malignant mesothelioma. *Am. J. Pathol.* 146, 344-356 (1995).

9. Kumar-Singh, S., Segers, K., Rodeck, U., Backhovens, H., Bogers, J., Weyler, J., Van Broeckhoven, C. & Van Marck, E. WT1 mutation in malignant mesothelioma and WT1 immunoreactivity in relation to p53 and growth factor receptor expression, cell-type transition, and prognosis. *J. Pathol.* 181, 67-74 (1997).

10. Oates, J. & Edwards, C. HBME-1, MOC-31, WT1 and calretinin: an assessment of recently described markers for mesothelioma and adenocarcinoma. *Histopathology* 36, 341-347 (2000).

11. Ordóñez, N.G. Value of thyroid transcription factor-1, E-cadherin, BG8, WT1, and CD44S immunostaining in distinguishing epithelial pleural mesothelioma from pulmonary and nonpulmonary adenocarcinoma. *Am. J. Surg. Pathol.* 24, 598-606 (2000).

12. Foster, M.R., Johnson, J.E., Olson, S.J. & Allred, D.C. Immunohistochemical analysis of nuclear versus cytoplasmic staining of WT1 in malignant mesotheliomas and primary pulmonary adenocarcinomas. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 125, 1316-1320 (2001).

13. Hecht, J.L., Lee, B.H., Pinkus, J.L. & Pinkus, G.S. The value of Wilms tumor susceptibility gene 1 in cytologic preparations as a marker for malignant mesothelioma. *Cancer* 96, 105-109 (2002).

14. Tsuta, K., Kato, Y., Tochigi, N., Hoshino, T., Takeda, Y., Hosako, M., Maeshima, A.M., Asamura, H., Kondo, T. & Matsuno, Y. Comparison of different clones (WT49 versus 6F-H2) of WT-1 antibodies for immunohistochemical diagnosis of malignant pleural mesothelioma. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.* 17, 126-130 (2009).

15. Hwang, H., Quenneville, L., Yaziji, H. & Gown, A.M. Wilms tumor gene product: sensitive and contextually specific marker of serous carcinomas of ovarian surface epithelial origin. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.* 12, 122-126 (2004).

16. Han, L., Pansare, V., Al-Abbadi, M., Husain, M. & Feng, J. Combination of MUC5ac and WT-1 immunohistochemistry is useful in distinguishing pancreatic ductal carcinoma from ovarian serous carcinoma in effusion cytology. *Diagn. Cytopathol.* 38, 333-336 (2010).

17. Oji, Y., Yano, M., Nakano, Y., Abeno, S., Nakatsuka, S., Ikeba, A., Yasuda, T., Fujiwara, Y., Takiguchi, S., Yamamoto, H., Fujita, S., Kanato, K., Ito, K., Jomgeow, T., Kawakami, M., Tsuboi, A., Shirakata, T., Nishida, S., Hosen, N., Oka, Y., Aozasa, K., Monden, M. & Sugiyama, H. Overexpression of the Wilms' tumor gene WT1 in esophageal cancer. *Anticancer Res.* 24, 3103-3108 (2004).

18. Nakatsuka, S., Oji, Y., Horiuchi, T., Kanda, T., Kitagawa, M., Takeuchi, T., Kawano, K., Kuwae, Y., Yamauchi, A., Okumura, M., Kitamura, Y., Oka, Y., Kawase, I., Sugiyama, H. & Aozasa, K. Immunohistochemical detection of WT1 protein in a variety of cancer cells. *Mod. Pathol.* 19, 804-814 (2006).

19. Oji, Y., Yamamoto, H., Nomura, M., Nakano, Y., Ikeba, A., Nakatsuka, S., Abeno, S., Kiyotoh, E., Jomgeow, T., Sekimoto, M., Nezu, R., Yoshikawa, Y., Inoue, Y., Hosen, N., Kawakami, M., Tsuboi, A., Oka, Y., Ogawa, H., Souda, S., Aozasa, K., Monden, M. & Sugiyama, H. Overexpression of the Wilms' tumor gene WT1 in colorectal adenocarcinoma. *Cancer Sci.* 94, 712-717 (2003).

20. Sera, T., Hiasa, Y., Mashiba, T., Tokumoto, Y., Hirooka, M., Konishi, I., Matsuura, B., Michitaka, K., Udaka, K. & Onji, M. Wilms' tumour 1 gene expression is increased in hepatocellular carcinoma and associated with poor prognosis. *Eur. J. Cancer* 44, 600-608 (2008).

21. Oji, Y., Nakamori, S., Fujikawa, M., Nakatsuka, S., Yokota, A., Tatsumi, N., Abeno, S., Ikeba, A., Takashima, S., Tsujie, M., Yamamoto, H., Sakon, M., Nezu, R., Kawano, K., Nishida, S., Ikegame, K., Kawakami, M., Tsuboi, A., Oka, Y., Yoshikawa, K., Aozasa, K., Monden, M. & Sugiyama, H. Overexpression of the Wilms' tumor gene WT1 in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Sci.* 95, 583-587 (2004).

22. Oji, Y., Miyoshi, Y., Koga, S., Nakano, Y., Ando, A., Nakatsuka, S., Ikeba, A., Takahashi, E., Sakaguchi, N., Yokota, A., Hosen, N., Ikegame, K., Kawakami, M., Tsuboi, A., Oka, Y., Ogawa, H., Aozasa, K., Noguchi, S. & Sugiyama, H. Overexpression of the Wilms' tumor gene WT1 in primary thyroid cancer. *Cancer Sci.* 94, 606-611 (2003).

23. Oji, Y., Miyoshi, S., Maeda, H., Hayashi, S., Tamaki, H., Nakatsuka, S., Yao, M., Takahashi, E., Nakano, Y., Hirabayashi, H., Shintani, Y., Oka, Y., Tsuboi, A., Hosen, N., Asada, M., Fujioka, T., Murakami, M., Kanato, K., Motomura, M., Kim, E.H., Kawakami, M., Ikegame, K., Ogawa, H., Aozasa, K., Kawase, I. & Sugiyama, H. Overexpression of the Wilms' tumor gene WT1 in de novo lung cancers. *Int. J. Cancer* 100, 297-303 (2002).

24. Loeb, D.M., Evron, E., Patel, C.B., Sharma, P.M., Niranjan, B., Buluwela, L., Weitzman, S.A., Korz, D. & Sukumar, S. Wilms' tumor suppressor gene (WT1) is expressed in primary breast tumors despite tumor-specific promoter methylation. *Cancer Res*. 61, 921-925 (2001).

25. Miyoshi, Y., Ando, A., Egawa, C., Taguchi, T., Tamaki, Y., Tamaki, H., Sugiyama, H. & Noguchi, S. High expression of Wilms' tumor suppressor gene predicts poor prognosis in breast cancer patients. *Clin. Cancer Res.* 8, 1167-1171 (2002).

26. Lee, A.H., Paish, E.C., Marchio, C., Sapino, A., Schmitt, F.C., Ellis, I.O. & Reis-Filho, J.S. The expression of Wilms' tumour-1 and Ca125 in invasive micropapillary carcinoma of the breast. *Histopathology* 51, 824-828 (2007).

27. Oji, Y., Suzuki, T., Nakano, Y., Maruno, M., Nakatsuka, S., Jomgeow, T., Abeno, S., Tatsumi, N., Yokota, A., Aoyagi, S., Nakazawa, T., Ito, K., Kanato, K., Shirakata, T., Nishida, S., Hosen, N., Kawakami, M., Tsuboi, A., Oka, Y., Aozasa, K., Yoshimine, T. & Sugiyama, H. Overexpression of the Wilms' tumor gene WT1 in primary astrocytic tumors. *Cancer Sci.* 95, 822-827 (2004).

28. Cheever, M.A., Allison, J.P., Ferris, A.S., Finn, O.J., Hastings, B.M., Hecht, T.T., Mellman, I., Prindiville, S.A., Viner, J.L., Weiner, L.M. & Matrisian, L.M. The prioritization of cancer antigens: a National Cancer Institute pilot project for the acceleration of translational research. *Clin. Cancer Res.* 15, 5323-5337 (2009).

29. Oka, Y., Tsuboi, A., Taguchi, T., Osaki, T., Kyo, T., Nakajima, H., Elisseeva, O.A., Oji, Y., Kawakami, M., Ikegame, K., Hosen, N., Yoshihara, S., Wu, F., Fujiki, F., Murakami, M., Masuda, T., Nishida, S., Shirakata, T., Nakatsuka, S., Sasaki, A., Udaka, K., Dohy, H., Aozasa, K., Noguchi, S., Kawase, I. & Sugiyama, H. Induction of WT1 (Wilms' tumor gene)-specific cytotoxic T lymphocytes by WT1 peptide vaccine and the resultant cancer regression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 13885-13890 (2004).

30. Morita, S., Oka, Y., Tsuboi, A., Kawakami, M., Maruno, M., Izumoto, S., Osaki, T., Taguchi, T., Ueda, T., Myoui, A., Nishida, S., Shirakata, T., Ohno, S., Oji, Y., Aozasa, K., Hatazawa, J., Udaka, K., Yoshikawa, H., Yoshimine, T., Noguchi, S., Kawase, I., Nakatsuka, S., Sugiyama, H. & Sakamoto, J. A phase I/II trial of a WT1 (Wilms' tumor gene) peptide vaccine in patients with solid malignancy: safety assessment based on the phase I data. *Jpn. J. Clin. Oncol.* 36, 231-236 (2006).

31. Izumoto, S., Tsuboi, A., Oka, Y., Suzuki, T., Hashiba, T., Kagawa, N., Hashimoto, N., Maruno, M., Elisseeva, O.A., Shirakata, T., Kawakami, M., Oji, Y., Nishida, S., Ohno, S., Kawase, I., Hatazawa, J., Nakatsuka, S., Aozasa, K., Morita, S., Sakamoto, J., Sugiyama, H. & Yoshimine, T. Phase II clinical trial of Wilms tumor 1 peptide vaccination for patients with recurrent glioblastoma

multiforme. *J. Neurosurg.* 108, 963-971 (2008).

32. Keilholz, U., Letsch, A., Busse, A., Asemissen, A.M., Bauer, S., Blau, I.W., Hofmann, W.K., Uharek, L., Thiel, E. & Scheibenbogen, C. A clinical and immunologic phase 2 trial of Wilms tumor gene product 1 (WT1) peptide vaccination in patients with AML and MDS. *Blood* 113, 6541-6548 (2009).

33. Ohno, S., Kyo, S., Myojo, S., Dohi, S., Ishizaki, J., Miyamoto, K., Morita, S., Sakamoto, J., Enomoto, T., Kimura, T., Oka, Y., Tsuboi, A., Sugiyama, H. & Inoue, M. Wilms' tumor 1 (WT1) peptide immunotherapy for gynecological malignancy. *Anticancer Res.* 29, 4779-4784 (2009).

34. Van Tendeloo, V.F., Van de Velde, A., Van Driessche, A., Cools, N., Anguille, S., Ladell, K., Gostick, E., Vermeulen, K., Pieters, K., Nijs, G., Stein, B., Smits, E.L., Schroyens, W.A., Gadisseur, A.P., Vrelust, I., Jorens, P.G., Goossens, H., de Vries, I.J., Price, D.A., Oji, Y., Oka, Y., Sugiyama, H. & Berneman, Z.N. Induction of complete and molecular remissions in acute myeloid leukemia by Wilms' tumor 1 antigen-targeted dendritic cell vaccination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107, 13824-13829 (2010).

35. Krug, L.M., Dao, T., Brown, A.B., Maslak, P., Travis, W., Bekele, S., Korontsvit, T., Zakhaleva, V., Wolchok, J., Yuan, J., Li, H., Tyson, L. & Scheinberg, D.A. WT1 peptide vaccinations induce CD4 and CD8 T cell immune responses in patients with mesothelioma and non-small cell lung cancer. *Cancer Immunol. Immunother.* 59, 1467-1479 (2010).

36. Kaida, M., Morita-Hoshi, Y., Soeda, A., Wakeda, T., Yamaki, Y., Kojima, Y., Ueno, H., Kondo, S., Morizane, C., Ikeda, M., Okusaka, T., Takaue, Y. & Heike, Y. Phase 1 trial of Wilms tumor 1 (WT1) peptide vaccine and gemcitabine combination therapy in patients with advanced pancreatic or biliary tract cancer. *J. Immunother.* 34, 92-99 (2011).

37. Usami, N., Fukui, T., Kondo, M., Taniguchi, T., Yokoyama, T., Mori, S., Yokoi, K., Horio, Y., Shimokata, K., Sekido, Y. & Hida, T. Establishment and

characterization of four malignant pleural mesothelioma cell lines from Japanese patients. *Cancer Sci.* 97, 387-394 (2006).

38. Nishihira, T., Hashimoto, Y., Katayama, M., Mori, S. & Kuroki, T. Molecular and cellular features of esophageal cancer cells. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 119, 441-449 (1993).

39. Saito, T., Kato, H., Saito, M., Karaki, Y., Tazawa, K. & Fujimaki, M. TNF receptor number-dependent cytotoxicity to TNF-resistant human esophageal cancer cell lines by combination with recombinant human necrosis factor and hyperthermia. *Hum. Cell* 7, 55-61 (1994).

40. Yanagihara, K., Ito, A., Toge, T. & Numoto, M. Antiproliferative effects of isoflavones on human cancer cell lines established from the gastrointestinal tract. *Cancer Res.* 53, 5815-5821 (1993).

41. Sugiura, H., Ishikura, H., Omi, M., Kaji, M., Iwai, K., Kishimoto, T., Takahashi, T., Kimura, C., Kato, H. & Yoshiki, T. Lymphokine-activated killer cytotoxicity against pancreas adenocarcinoma cell lines and vascular endothelial cells. *Pathol. Int.* 44, 688-696 (1994).

42. Little, M.H., Williamson, K.A., Mannens, M., Kelsey, A., Gosden, C., Hastie, N.D. & van Heyningen, V. Evidence that WT1 mutations in Denys–Drash syndrome patients may act in a dominant-negative fashion. *Hum. Mol. Genet.* 2, 259–264 (1993).

43. Little, M., Holmes, G., Bickmore, W., van Heyningen, V., Hastie, N. & Wainwright, B. DNA binding capacity of the WT1 protein is abolished by Denys-Drash syndrome WT1 point mutations. *Hum. Mol. Genet.* 4, 351–358 (1995).

44. Klamt, B., Koziell, A., Poulat, F., Wieacker, P., Scambler, P., Berta, P. & Gessler, M. Frasier syndrome is caused by defective alternative splicing of WT1 leading to an altered ratio of WT1 +/-KTS splice isoforms. *Hum. Mol.*

Genet. 7, 709–714 (1998).

45. Little, M. & Wells, C. A clinical overview of WT1 gene mutations. *Hum. Mutat.* 9, 209–225 (1997).

46. Haber, D.A., Park, S., Maheswaran, S., Englert, C., Re, G.G., Hazen-Martin, D.J., Sens, D.A. & Garvin, A.J. WT1-mediated growth suppression of Wilms tumor cells expressing a WT1 splicing variant. *Science* 262, 2057–2059 (1993).

47. McMaster, M.L., Gessler, M., Stanbridge, E.J. & Weissman, B.E. WT1 expression alters tumorigenicity of the G401 kidney-derived cell line. *Cell Growth Differ.* 6, 1609–1617 (1995).

48. Morrison, D.J., English, M.A. & Licht, J.D. WT1 induces apoptosis through transcriptional regulation of the proapoptotic Bcl-2 family member Bak. *Cancer Res.* 65, 8174–8182 (2005).

49. Menke, A.L., Shvarts, A., Riteco, N., van Ham, R.C., van der Eb, A.J. & Jochemsen, A.G. Wilms' tumor 1-KTS isoforms induce p53-independent apoptosis that can be partially rescued by expression of the epidermal growth factor receptor or the insulin receptor. *Cancer Res.* 57, 1353–1363 (1997).

50. Bruening, W., Moffett, P., Chia, S., Heinrich, G. & Pelletier, J. Identification of nuclear localization signals within the zinc fingers of the WT1 tumor suppressor gene product. *FEBS Lett.* 393, 41-7 (1996).

51. Gerlinger, M., Rowan, A.J., Horswell, S., Larkin, J., Endesfelder, D., Gronroos, E., Martinez, P., Matthews, N., Stewart, A., Tarpey, P., Varela, I., Phillimore, B., Begum, S., McDonald, N.Q., Butler, A., Jones, D., Raine, K., Latimer, C., Santos, C.R., Nohadani, M., Eklund, A.C., Spencer-Dene, B., Clark, G., Pickering, L., Stamp, G., Gore, M., Szallasi, Z., Downward, J., Futreal, P.A. & Swanton, C. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N. Engl. J. Med.* 366, 883-892 (2012).