

Thesis

SYBR Green I を用いたWT1のReal Time PCR標準化曲線の立ち上げ
—SYBR Green 法を用いた膵臓癌におけるWT1の発現解析等—

埼玉医科大学 総合医療センター 外科

小田 慶太郎

The establishment of standardized curve for Real Time PCR of WT1 using SYBR Green I - To analyze WT1 expression in pancreatic cancer using SYBR Green I -

Keitaro Oda (Department of Surgery, Saitama Medical Center, Saitama Medical University, 1981 Tsujidomachi, Kamoda, Kawagoe-shi, Saitama 350-8550, Japan)

Due to difficulties in early detection of pancreatic cancer as well as rapid progression of the disease, it is extremely difficult to completely resect the tumor surgically. The improvement of prognosis may be expected with chemotherapy and radiation therapy for the remaining cancer cells or post-op adjuvant therapy, but there still has not been any effective treatment.

In recent years, tumor vaccine therapy using tumor antigen peptides are receiving attention. Especially, the WT1 antigen has been known to be expressed in many kinds of cancer, and is receiving attention as the possible universal vaccine for tumors. In Japan, promising results have been reported by H.Sugiyama et al for trial studies of treatment using tumor vaccine derived from WT1 based antigen peptides.

In order for the vaccine treatment targeted against tumor antigens to be effective, one must confirm that the antigen is expressed by the targeted tumors. In general, when enough cancerous tissue from surgical excision or biopsy can be obtained, immunohistochemical staining is the standard method. On the other hand, in hematological disease and in tumors of difficult anatomic access, allowing only endoscopic or aspiration biopsies, one must rely solely on method utilizing molecular biology.

The Real Time PCR has been known to be the method to quantitatively analyze the expression of mRNA in tissues and cells. Already, clinical laboratories have established the method to quantitatively analyze several of the protein expressions. Currently, the most common method adopted is Taqman. However, there are many problems with this method when using in research laboratories, since it is troublesome and its running cost is high. In this study, we established the Real Time PCR for WT1 expression, using the SYBR-Green method, which is easier and more cost effective than Taqman method. We then attempted to detect the expression of WT1 gene in clinical specimens of pancreatic cancer using this established method and showed the usefulness of our method.

Keywords: WT1, standardized curve of Real Time PCR, SYBR Green, Taqman, tumor antigen peptide, pancreatic cancer

はじめに

膵臓癌は難治癌のひとつであり、予後は極めて不良である。膵癌患者の予後を改善するためには、早期診断法の確立や有効な治療法の開発が必須である。

WT1遺伝子¹⁻³⁾は小児の悪性腎腫瘍であるウイルス腫瘍の原因遺伝子であり、正常な細胞ではほとんど発

現せず、白血病細胞や種々の固形癌細胞において様々な程度に発現していることが明らかとなっている⁴⁻⁶⁾。さらに、WT1遺伝子は癌遺伝子様の機能を果たし⁷⁻⁹⁾、それらの癌の発生に関与していることも明らかになってきた¹⁰⁾。

近年、腫瘍抗原ペプチドを用いた腫瘍ワクチン療法が注目を集めている。中でも、WT1抗原は多くの癌に発現していることが知られており、汎腫瘍ワクチンに

なる可能性があるため注目を集めている¹¹⁾。このような背景のもと、WT1は白血病における再発の分子マーカーとして、またペプチドワクチンや樹状細胞療法の標的分子として注目を集めており、現在も精力的な研究が行われている。

WT1を診断やワクチン療法などの標的分子となしうるかを判断するためには、標的腫瘍に抗原が発現していることを確認する手段の確立が必要である。通常、十分量の生検組織や手術摘出材料がある場合は、免疫組織学的手法によってWT1蛋白発現を確認する手法がとられる。しかし、病理検査のための十分な量の検体が確保できない場合や、検体の保存状態が十分ではなく蛋白解析が不可能な場合は、分子生物学的な方法で発現の検討が必要となる。その代表的なものが、Real Time PCR法である。

Real time PCR法は、サーマルサイクラーと分光蛍光光度計を一体化した装置を用いて、PCRでの増幅産物の生成過程をリアルタイムでモニタリングし、定量解析する方法である。この定量は蛍光色素を用いて行われ、大きく分けて2種類の方法がある。すなわち、増幅するDNA配列に特異的なオリゴヌクレオチドに蛍光色素を結合させたプローブ(TaqManプローブ)を用いる方法と、二本鎖DNAに特異的に挿入(インターカレート)して蛍光を発する色素(SYBR green I)を用いる方法である。TaqMan法はプライマーによる特異性にプローブによる特異性が加わるため特異性が高く、また多くのmRNA発現定量解析キットが既に製品化されているため、広く普及している。しかし、TaqMan法は蛍光プローブを作成する必要があり、コストが高くなるとともに取り扱いがやや煩雑となる。SYBR green Iを用いた方法は、特別なプローブを必要とせず簡便、安価であるが、一方で非特異的産物が増幅し、解析の精度を低下させる可能性が指摘されている。したがって、SYBR green Iを用いたReal Time PCR系を立ち上げるには、詳細な条件検討が必要となるため、今日まで普及してこなかった。

今回我々はSYBR Green Iを用いたWT1のReal Time PCR法の解析系の条件検討を行い、その確立した系を用いて切除腫瘍組織におけるWT1の発現量の定量測定を試みた。

対象と方法

細胞

WT1遺伝子の陽性コントロール・クローニング細胞として白血病細胞株K562細胞を用いた。

K562細胞は5%牛胎児血清を含むRPMI1640培地にて継代培養した。

陰性・定量発現コントロールとして健常ボランティア末梢血を用いた。

健常ボランティア末梢血は、採血後燐酸緩衝液

(Phosphate Buffered Saline: PBS)にて2倍希釈したあと、リンフォセパールI(免疫生物研究所)に重層した。1800回転、20分間、室温にて遠心し単核球分画を回収した。回収した単核球は、PBSにて2回洗浄して使用した。

RNA抽出

K562細胞並びに末梢血単核球は1,500回転10分間の遠心にてペレットを作製し、氷中にてペレットに1 mlのIsogen(ニッポンジーン)を加えた。Isogen中ですりつぶした細胞塊は、氷中につけたまま22Gの注射針をつけたシリンジで吸引排出を10回繰り返し、200 µlずつ分注して使用時まで-80℃のフリーザーにて凍結保管した。

解析日に、ISOGENに溶解しているサンプルを室温に戻し、等量のクロロホルムを加えて、転倒混和し、3分間室温にて静置した。その後4℃にて12,000 rpm、15分間遠心し、水層・中間層・有機層に分かれた水層のみを新しいエッペンチューブに移した。移した水層部に水層量と等量のイソプロパノールを加え、転倒混和し、5分間静置した後、4℃、15,000 rpm、15分間遠心した。上清を破棄した後、70%エタノール1 mlを加え攪拌し、4℃、7,500 rpm、5分間遠心洗浄し再度ペレットを作製した。遠心後上清を捨て乾燥させた後DEPC水100 µlを加え、5分間静置した。RNA濃度は分光光度計で測定し、約100~200 µg/mlになるように、DEPC水を加えて調整した。

プライマー

Real Time PCR用プライマーとして以下の2組のプライマーを用いた。

Pair 1

Forward 1:

5'-ATGAATTAGTCCGCCATCACAACA-3' (1118-1141)

Reverse 1:

5'-TGCTGCCTGGGACACTGAAC-3' (1201-1221)

PCR産物の大きさ: 104 bp

Pair 2

Forward 2:

5'-AGGGTACGAGAGCGATAACCACAC-3' (648-671)

Reverse 2:

5'-TCAGATGCCGACCGTACAAGA-3' (768-789)

PCR産物の大きさ: 142 bp

コントロールプラスミドの作製, クローニング

K562から得られたmRNAからSYBR[®] ExScript[™] RT-PCR Kit (TaKaRa)を用いてcDNAを作製した。試薬の調整はプロトコルに従い5×Ex Script Buffer (2 µl), dNTP Mixture (0.5 µl), Random 6mers (0.5 µl), ExScript RTase (0.25 µl), RNase Inhibitor (0.25 µl), RNase free dH₂O (1.5 µl), Total RNA (200 ng/5 µl) (5 µl)を加え、計10 µlとし、42℃ 15分間反応させた後、95℃ 2分間にて酵素を失活させた。この反応液1 µlにSYBR Premix Ex

Taq (10 μ l), PCR Forward Primer(10 μ M) (1 μ l), PCR Reverse Primer(10 μ M) (1 μ l), dH₂O (7 μ l)を加え計 10 μ lとし、LightCycler Software Ver. 3.5 (Roche)にてPCRを行った。反応条件は、95°C 30秒間にてDenatureした後、95°C 1秒間、59°C 5秒間、72°C 10秒間を35回繰り返し増幅し、その後4°Cにて保存した。PCR産物の一部を2%アガロースゲル泳動し、エチジウムブロマイドで染色し、PCR産物の大きさを確認した。

次に、TOPO[®] TA Cloning Kit (Invitrogen)を使用し、クローニングを行った。試薬の調整は添付のプロトコールを一部改変し、PCR産物 (1 μ l), Salt Solution (1 μ l), pCR[®] 2.1-TOPO[®] vector(1 μ l), 大塚蒸留水 (3 μ l)を加え、計 6 μ lとし、この反応液 1 μ lをTOP 10 (Invitrogen) 50 μ lに加え、氷上にて30分間放置し、次に保温槽にて42°C 30秒間トランスフォーメーションした。その後、氷上操作にてSOC medium 250 μ lを加え、BIO SHAKER BR-160L (TAITEC)にて225 rpmで1時間振盪した。振盪の間に、あらかじめ準備していたアンピシリンを含むLBプレート上にX-Gal (Promega) 40 μ lを塗布した。振盪した培養液 40 μ lをX-Gal塗布済みのアンピシリンプレートに塗布した。その後、同プレートをサンヨーインキュベーター MIR-153 (SANYO)にて37°Cで一晩培養した。続いて、アンピシリンプレート上の白色コロニー形成を確認した後、各20コロニー選択し、5 mlのアンピシリン加LB培地にて一晩培養した後、遠心にてペレットを作製し、QIAprep SPIN Miniprep Kit (QIAGEN)を用いてプラスミドを精製した。生成物をEcoRI (TOYOBO)にて切断後電気泳動を行い、pair1で増幅したPCR産物を含むプラスミドには122 bp, pair2で増幅したプラスミドには160 bpのPCR産物が組み込まれていることを確認した。目的の大きさのバンドが含まれているプラスミドを含む大腸菌を200 mlのアンピシリン加LB溶液にて再度培養し、Plasmid Midi Kit (QIAGEN)にてプラスミドを回収した。

シーケンス並びにコントロールプラスミドの作製

精製したプラスミドを用いて、RT-PCR産物の遺伝子配列を解析した。解析はBigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (アプライドバイオシステムズ社)を用いて行った。方法は添付の説明文書に従い、BigDye Terminator (8 μ l), M13 Primer (Forward or Reverse) (0.21 μ l) (= 3.2 pmol), 蒸留水 (5.26 μ l), Plasmid (6.53 μ l) (= 200 ngに調整済み)を加え計 20 μ lに調整し、96°C 1分間、96°C 10秒間、50°C 5秒間 (25サイクル), 60°C 4分間の設定で増幅した後4°Cにて保存した。増幅終了後、Centri-Sepスピニングカラム (アプライドバイオシステムズ社)を用いて反応液を精製し、乾燥後Hi-Di Formamide (アプライドバイオシステムズ社) 15 μ lを加えて溶解し、95°C 5分間にてDenatureした。解析はABI PRISM[®] 3100-Avant Genetic Analyzer (アプライドバイオシステムズ社)を用いた。解析データは、GeneBank

から得られたWT1の配列 (ACCESSION NM_000378)と比較、一致していることを確認した。

シーケンスにてWT1遺伝子が確認できたクローンを含む大腸菌を、アンピシリンを含む500 mlのLB培地にて大量培養し、Plasmid Maxi Kit (QIAGEN)を用いてプラスミドの精製を行い、コントロールとした。

Real Time PCR条件の検討並びに検量線の作成

Real Time PCRにおけるWT1のスタンダード系列作製のため、得られたコントロールプラスミドの260 nmでの吸光度でDNA濃度を測定し、以下の計算式を基にしてWT1のコピー数を算出した。

$$\bullet \text{ WT1濃度 (pmol/}\mu\text{l)} = A_{260} \times 100 / 1.5N_A + 0.71N_C + 1.20N_G + 0.84N_T$$

\bullet コピー数 (copies/ml) = アボガド数 \times 濃度 (mol/ μ l) 続いて、得られたコピー数と2種類のプラスミド原液を元に11個の10倍希釈系列を作成した。

各10倍希釈系列をReal Time PCR法にかけて、今後スタンダードとして使用する範囲を決定した。

臨床検体

当科で2003年7月から2005年6月の間に手術が施行された膵癌 (原発・転移性)9例を対象とした (Table 1)。

症例コントロールとしては、慢性骨髄性白血病非寛解期の患者末梢血を用いた。患者末梢血は、健常者末梢血と同様の処理を行った。

膵癌保存検体 (-80°C保存) は、凍結のまま2 mlのIsogenを加え、氷中にてホモゲナイザーを用いて腫瘍塊をすりつぶした。その後K562細胞と同様の操作で、凍結保管及びRNAの抽出を行った。

12例の臨床検体を、K562細胞の場合と同様の条件でReal Time PCR反応を行った。(それぞれプライマー2種類で行った)。

スタンダードは $2.93 \times 10^2 \sim 2.93 \times 10^7$ まで (10倍希釈で6個)使用した。

Positive controlはK562から抽出したRNA200 ngを用いてRT反応をした反応液を使用し、Negative controlはdH₂OとRNase free dH₂OでRT反応をした反応液の2種類を使用した。

さらに、膵癌検体のうち3検体に関しては病理組織学・免疫組織化学的検討 (免疫染色)を行い、Real Time PCRの結果と比較した。パラフィン切片より通法に従いHaematoxylin-eosin (H.E.) 染色標本作製し、E600^R (Nikon, Tokyo, Japan) 鏡顕下に観察した。免疫組織化学染色 (大阪大学に依頼) は、隣接パラフィン切片より脱パラフィン後、3%過酸化水素水を用いて内因性ペルオキシダーゼを除去し、抗マウスWT1 6F-H2モノクローナル抗体 (Dako Cytomation, Inc., Carpinteria, CA)を使用し、ENVISION/HRP kit (DAKO)を用いてデキストラポリマー法で行った。

臨床検体採取、患者採血に当たっては、それぞれ説明文書にもとづいて説明し、文書にて同意を得た。

Table 1. Clinicopathological parameter of patients with pancreatic cancer and expression of the WT1 gene

Pt ID	Age (year)	Sex	Location	Stage	Tumor size	Depth of invasion	Histological differentiation	WT1 mRNA expression
1	48	M	h	IVb	5.3×2.5×1.8cm	pT4	m	8.032×10 ²
2	57	F	h	IVa	5.0×5.0×4.0cm	pT4	w, m	3.594×10 ²
3	57	M	h	IVa	3×2.6×2.5cm	pT4	m	2.491×10 ²
4	68	M	bt	IVa	2.8×2.8×2.0cm	pT3	w, m	1.791×10 ³
5	73	F	h	III	4.8×2.8×2.5cm	pT4	m	1.106×10 ²
6	66	M	hb	IVb	5.8×3.8×2.0cm	pT3	w, m	1.635×10 ²
7	62	F	h	IVa	2.9×2.7×1.8cm	pT4	m	3.350×10 ²
8	77	M	h	IVa	0.6×0.3cm, 0.6cm 2×2×1.8cm,	pT4	m	9.612×10 ¹
9	53	M	bt	metastatic	1.5×1.2×1.0cm	Ukn	Ukn	1.278×10 ²

Location:h, head;b, body;t, tail. pT:pathological T. Differentiation: w, well differentiated; m, moderately differentiated. Ukn:unknown.

結果

WT1のプライマー2種類を用いたPCRで、K562より得られたPCR産物のバンドが想定された大きさに一致(pair1では104 bp, pair2では142 bp)していることがそれぞれ確認された (Fig. 1).

PCRにて得られたDNAをもとに、クローニングを行いpair1では122 bp, pair2では160 bpの大きさのPCR産物が組み込まれているプラスミドを持つ大腸菌が精製された (Fig. 2).

シーケンスにより、精製したプラスミドの遺伝子配列の解析結果が得られた (Fig. 3).

シーケンスの解析結果がGeneBankから得られたWT1の遺伝子配列と比較し一致していることを確認し (Fig. 4), 以後コントロールとして使用した.

得られたコントロールプラスミドのWT1コピー数はpair1で 2.92982×10^{14} copies/ml, pair2で 2.82504×10^{11} であった.

このコピー数を元に10倍の希釈系列を作製し (Table 2), Real Time PCRを行ってスタンダードとして使用する範囲を決定した (Fig. 5).

作製したスタンダード曲線を利用した臨床検体を用いたReal Time PCRでは、陰性コントロールとして用いた健康人末梢単核球のWT1値が陰性であるのに対して、陽性コントロールとして用いたK562細胞・慢性骨髄性白血病細胞株同様、膵癌症例にてWT1値の上昇が認められた (Table 3).

さらに、スタンダード曲線と比較し、膵癌症例においてmRNAレベルにおけるWT1値の上昇が明らかになった (Fig. 6a, 6b).

免疫染色では、いずれもReal Time PCRでWT1値の上昇を認めた3検体すべてにおいて癌細胞は細胞質が茶色に染色され (WT1免疫染色陽性), 非癌部膵細胞は染色されなかった (WT1免疫染色陰性) (Fig. 7).

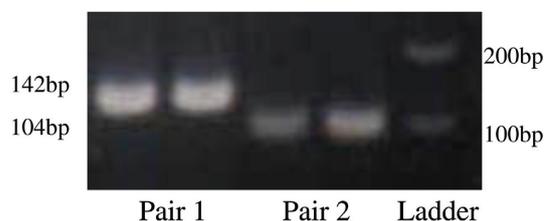


Fig. 1. The electrophoretic pattern of PCR products derived from K562 cell. The RT-PCR amplified products from RNA originated from K562 (the human CML stock with high expression of WT1) were confirmed to have the same size as expected (104 bp for pair 1 and 142 bp for pair 2).

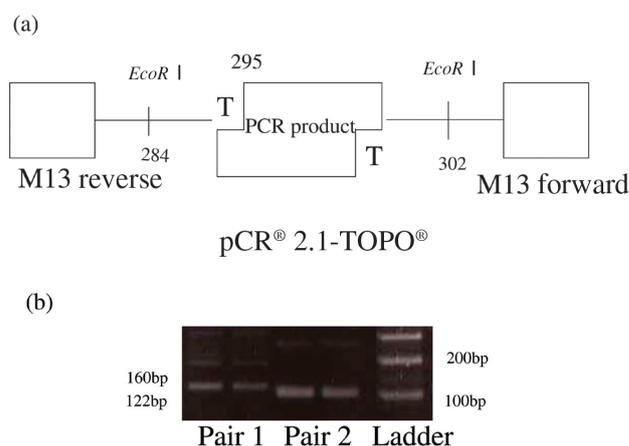


Fig. 2. The results of cloned plasmid and electrophoresis. By excising with *EcoR* I, the PCR products integrated into specific part of pCR2.1-TOPO were confirmed. The expected band size of 122 bp for Pair 1 and 160 bp for Pair 2 was detected. a) pCR[®] 2.1-TOPO[®] is a straight-chain vector with topoisomerase-I activated 3'-dt terminal protrusion. It is possible to excise the cloned inclusion fragment by the *EcoR* I portion at both ends of MCS. b) In pair 1, *E. coli* with plasmid that include 104 bp PCR product was purified. In pair 2, *E. coli* with plasmid that include 142 bp PCR product was purified.

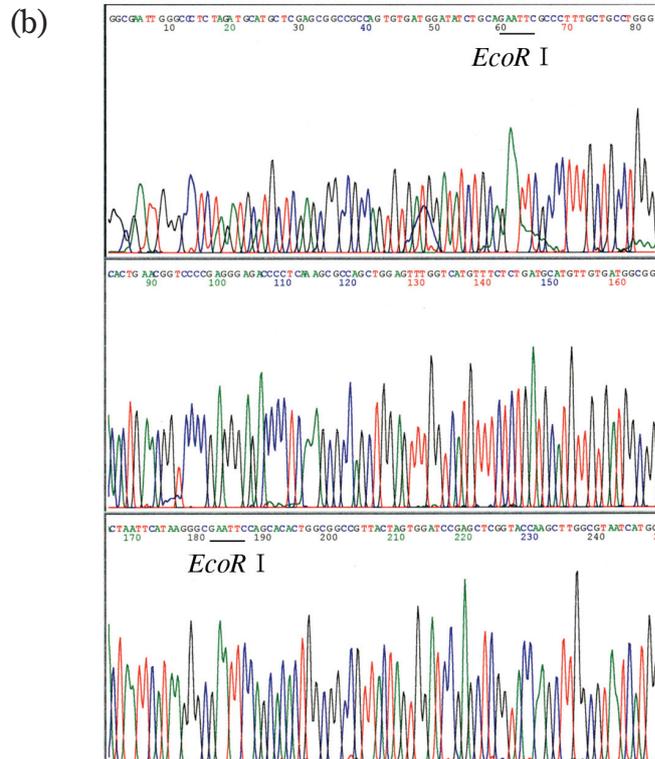
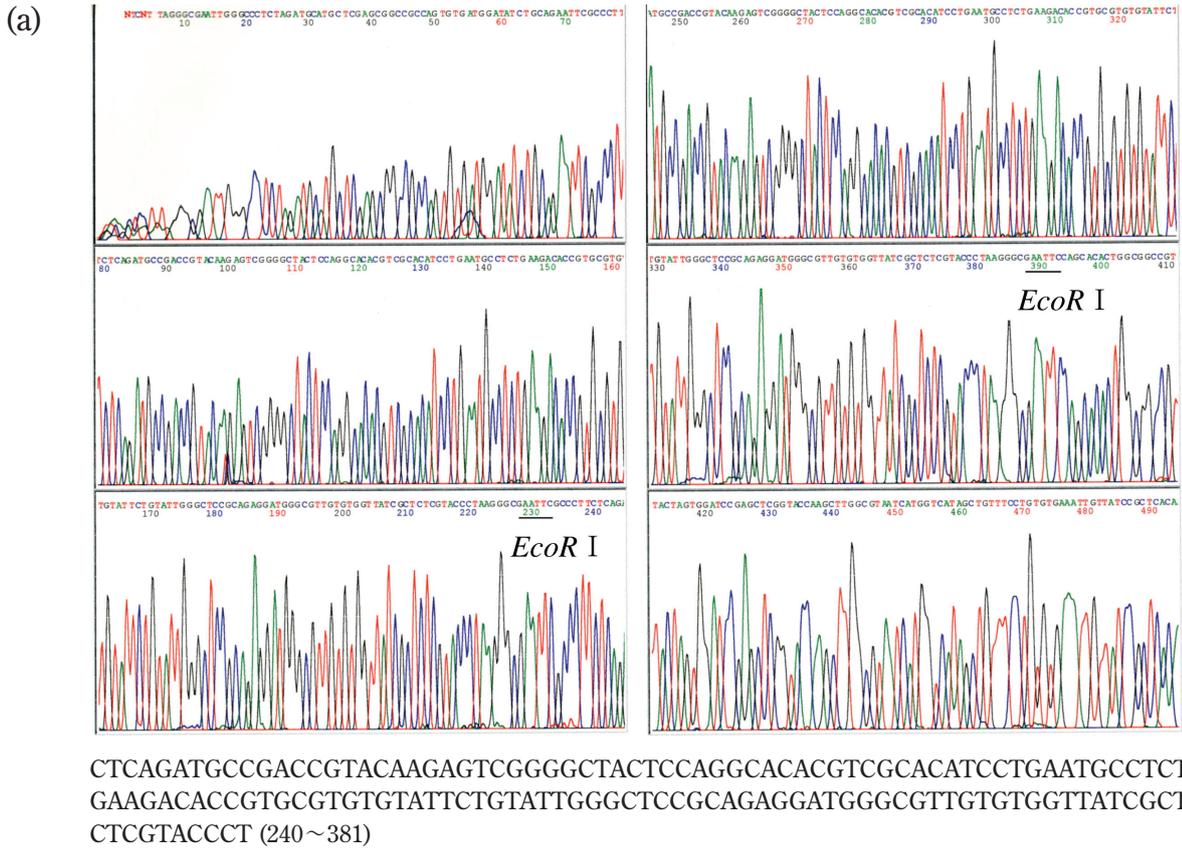


Fig. 3. The genetic sequence of WT1. The analysis of gene arrangement of purified plasmid was performed. The analysis by Dye Terminator Method using M13 forward and M13 reverse from pCR[®] 2.1-TOPO[®] as primer was performed. The figure is the result of sequencing the PCR products obtained from Pair 1 (a) and Pair 2 (b).

考 察

膀胱癌はその病態に応じて、切除可能例、局所進行例、遠隔転移例の3つに大別される。切除可能例には膀胱切除術が、局所進行例には放射線化学療法が、遠隔転移例には全身性化学療法が中心に行われている。また、

手術が行われた症例でも術後早期に再発することが多く、予後は極めて不良である。早期発見、診断、再発予知の観点より現在の画像診断等に加えて新たな診断法が望まれている。

WT1 遺伝子は、多くの癌に発現していることが知られており、早期発見のマーカーや汎腫瘍ワクチン

```

361 cgcgggcgt cgggtctga gcctcagca atgggctccg acgtgcggga cctgaacgcg
421 ctgctgccg cgtcccctc cctgggtg cggggcgct gtgccctgcc tgtgagcggc
481 gcggcgcagt gggcgccgt gctggactt gcgcccccg gcgcttcggc ttacgggtog
541 ttggcgccg ccgocgccc acggctccg ccgccacccc cggcggccc gcctcactcc
601 ttcataaac aggagccgag ctggggcggc gcggagccgc acgaggagca gtgccctgagc
661 gccttcaact tccactttc cggccagttc actggcacag cgggagcctg togtactcggg
721 cccttcggtc ctctccgcc cagccaggcg tcatccggc aggcaggat gtttctaac
781 gcgccctacc tgcccagctg cctcgagagc cagcccgta ttcgcaatca gggttacagc
841 acggtcacct tcgacgggac gccagctac ggtcacacgc cctcgcacca tgcggcgtag
901 ttcccacacc actcattcaa gcatgaggat cccatgggcc agcagggctc gctgggtgag
961 cagcagtact cggtgccgcc cccggtctat ggctgccaca ccccaccga cagctgcacc
1021 ggcagccagg ctttctgctg gaggacgcc tacagcagtg acaatttata ccaaatgaca
1081 tcccagcttg aatgcatgac ctggaatcag atgaacttag gagccacctt aaaggccac
1141 agcacagggt acgagagcga taaccacaca acgcccattc tctgcgggagc caaatcagca
1201 atacacacgc acgggtgctt cagaggcatt caggatgtgc gacgtgtgcc tggagttagc
1261 ccgactcttg tacggtcggc atctgagacc agtgagaaac gcccttcat gtgtgcttac
1321 ccaggctgca ataagagata ttttaagtg tccacttac agatgcacag caggaagcac
1381 actggtgaga aaccatacca gtgtgacttc aaggactgtg aacgaaggtt ttctggtcoa
1441 gaccagctca aaagacacca aaggagacat acagggtgta aaccattcca gtgtaaagct
1501 tgtcagcga agttctccc gtccgaccac ctgaagacc acaccaggac tcatacaggt
1561 gaaaagccct tcagctgtcg gtgccaagt tgtcagaaaa agtttgccc gtcagatgaa
1621 ttagtccgcc atcacacat gcatcagaga aacatgacca aactccagct ggcgcttga
1681 ggggtctccc tcggggaccg ttcagtgtcc caggcagcac agtgtgtgaa ctgctttcaa

```

Fig. 4. The genetic sequence of WT1 from Gene Bank (ACCESSION NM_000378 CDS:391..1680). We compared the sequence of RT-PCR products from K562 with those of WT1 from the Gene Bank. In the figure, the areas of products obtained from primers of Pair 1 and Pair 2 are shown. It was confirmed that the sequences of WT1 in Pair 1 and Pair 2 are the same as those from the Gene Bank.

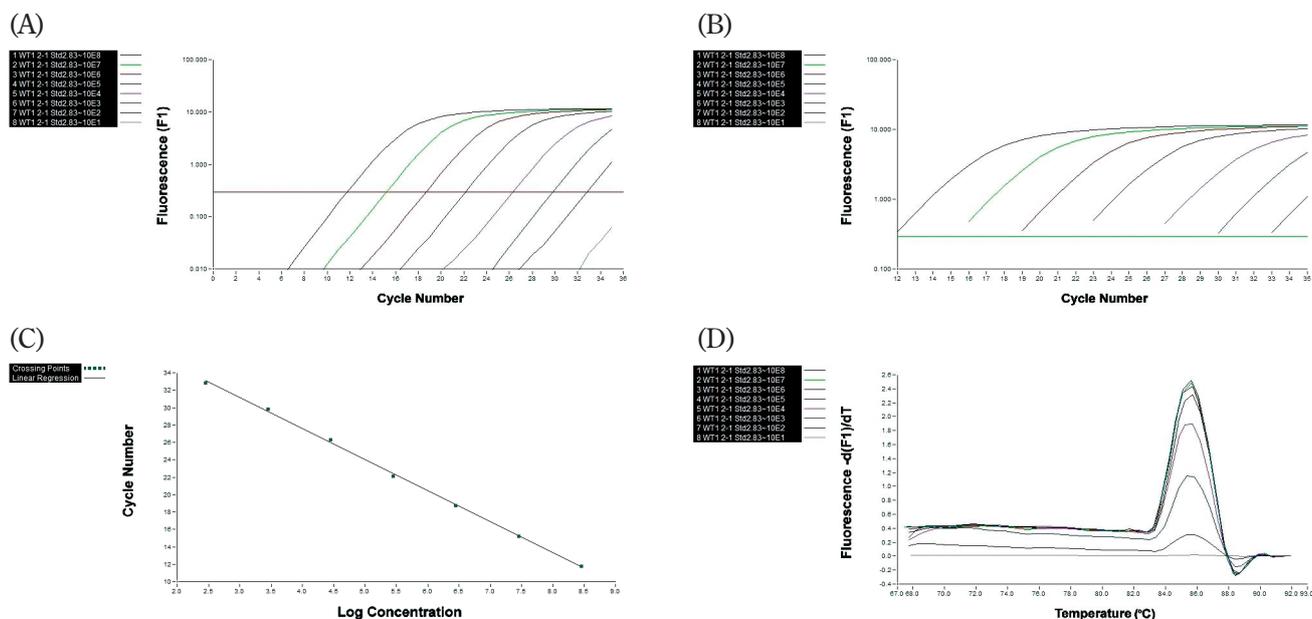


Fig. 5. The standard curve of real time PCR. (A) The Noise Band was set to the starting point of logarithmically straight area. (The data with fluorescence intensity lower than this level was considered to be background, and was excluded from analysis.) (B) Only data with levels higher than the Noise Band is shown. (The logarithmical lineage confirmed.) (C) The crossing point of Crossing Line and logarithmically straight area was plotted and the analytical curve was calculated. (*A-C: quantitative analysis by Fit Point method). (D) The analysis of melting curve: no non-specific peak was seen, only specific peaks appeared (melting peaks).

Table 2. The dilution series of control plasmid

PCR products of WT1	DDW
2.83×10^{10} $10 \mu l$	$90 \mu l$
2.83×10^9 $10 \mu l$	$90 \mu l$
2.83×10^8 $10 \mu l$	$90 \mu l$
2.83×10^7 $10 \mu l$	$90 \mu l$
2.83×10^6 $10 \mu l$	$90 \mu l$
2.83×10^5 $10 \mu l$	$90 \mu l$
2.83×10^4 $10 \mu l$	$90 \mu l$
2.83×10^3 $10 \mu l$	$90 \mu l$
2.83×10^2 $10 \mu l$	$90 \mu l$
2.83×10^1 $10 \mu l$	$90 \mu l$

From the size of plasmid included in the PCR products, the molecular weight of obtained PCR products were calculated. Based on those calculations, the number of copies of WT1 in the purified stock solution of control plasmid was calculated. As a result, the numbers of copies of WT1 control plasmid was 2.92982×10^{14} copies/ml for pair 1 and 2.82504×10^{11} for pair 2. From these numbers of copies, 10 times dilution series was obtained.

Table 3. The results of real time PCR (values)

	WT1 mRNA level
1 normal	ND
2 normal	ND
3 Panc ca	8.032×10^2
4 Panc ca	3.594×10^2
5 Panc ca	2.491×10^2
6 Panc ca	1.791×10^3
7 Panc ca	1.106×10^2
8 Panc ca	1.635×10^2
9 Panc ca	3.350×10^2
10 Panc ca	9.612×10^1
11 Metastatic Panc ca	1.278×10^2
12 Leukemia	3.559×10^3
13 K562 cell	2.101×10^5

ND, not determined

WT1(mRNA) of pancreatic	
Average	SD
4.483×10^2	$\pm 5.486 \times 10^2$
Min	Max
1.106×10^2	$\sim 1.791 \times 10^3$

For positive control, the human CML stock with high expression of WT1 (K562) was used. For negative control, the peripheral monocytes of healthy individuals were used. The expression of WT1 for each pancreatic cancer tissue was quantitatively measured. In cases of pancreatic cancer, the WT1 values were increased as seen in positive control of K562 cells and specimen from remission period of CML. The WT1 values of healthy individuals were low.

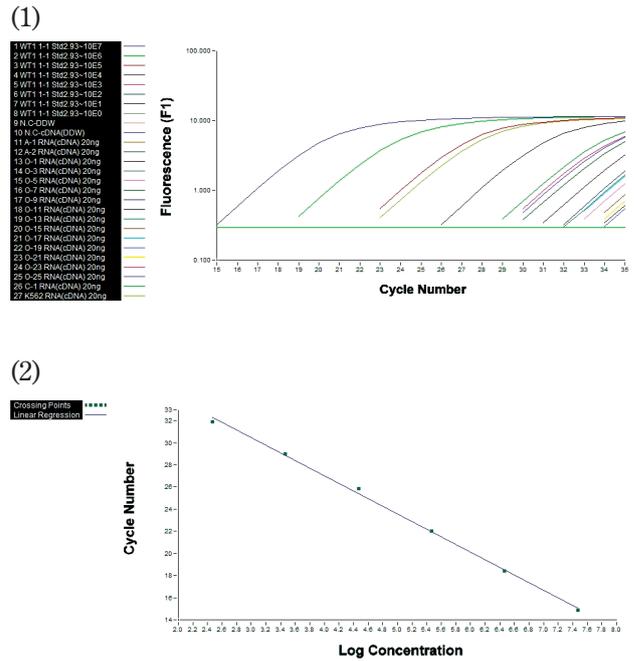


Fig. 6a. The results of real time PCR using clinical pancreatic cancer specimen (quantitative analysis by Fit Point method). The real time PCR was performed on standard series and clinical specimen simultaneously. In the pancreatic cancer cases, amplification was seen near 10E2.

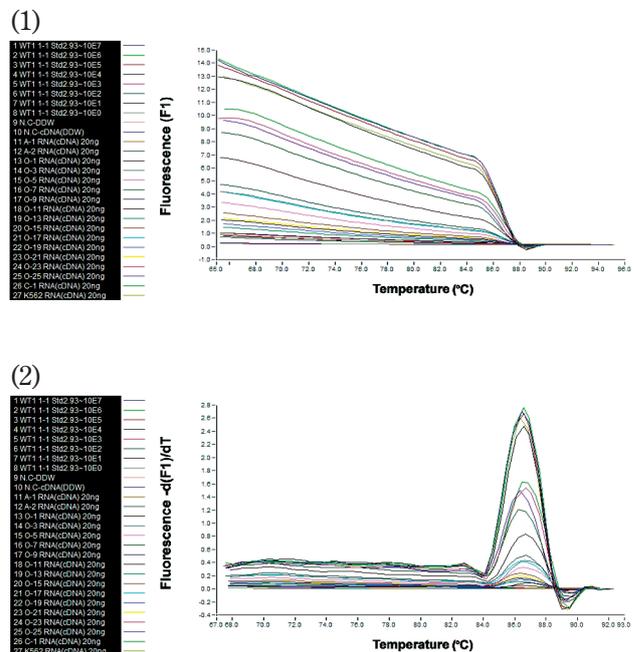


Fig. 6b. The results of real time PCR using clinical pancreatic cancer specimen (analysis of melting curve). (1) Specific melting curve was obtained. The melting occurred at specified melting temperature. (2) Specific melting peak was obtained. (*The height of peak was proportional to the amount of PCR product.) (Only PCR product with single melting temperature was amplified.)

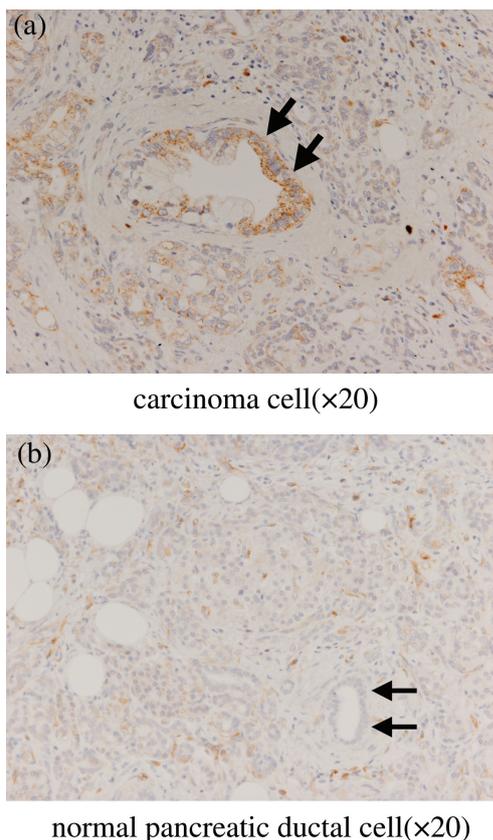


Fig. 7. Immunohistochemical staining of WT1. Over expression of WT1 protein in pancreatic ductal adenocarcinoma. Expression of WT1 protein was immunohistochemically analyzed in pancreatic ductal adenocarcinoma tissue. WT1 protein appears brown in carcinoma cells (arrow)(a) but is not seen in normal pancreatic ductal cells (arrowheads)(b).

になる可能性があるため注目を集めている¹²⁻¹⁴。WT1は、従来癌抑制遺伝子と位置付けられてきたが¹⁵、白血病細胞や肺癌¹⁶⁻¹⁸、乳癌¹⁹⁻²¹、大腸癌²²、甲状腺癌²³、精巣癌²⁴、頭頸部扁平上皮癌²⁵や骨・軟部腫瘍のsarcoma²⁶等の種々の固形癌細胞²⁷⁻³⁰においても様々な程度に発現し、また、癌の発生・予後・悪性度に関与していることが明らかとなってきた³¹。さらに、アンチセンスDNAによってWT1遺伝子の発現を抑制すると癌細胞の増殖が抑制されることが報告され^{32, 33}、WT1は癌遺伝子様の機能を持つと考えられるようになった。

正常細胞では殆ど発現せず多くの癌に発現しているWT1抗原は、上記のように固形腫瘍を含む多くの悪性腫瘍の腫瘍マーカーや、あるいは汎腫瘍ワクチンになる可能性があるため注目を集め、わが国においても、大阪大学を中心に精力的な臨床研究が展開されており、その成果が期待されている。

WT1を診断やワクチン療法の分子標的として使用する場合、標的腫瘍における抗原発現を確認する必要がある。通常、十分量の生検組織や手術摘出材料が

ある場合は、免疫組織学的手法によってWT1蛋白の発現を確認する手法がとられるが、十分な量の検体が確保できない場合は、PCR等の分子生物学的な方法で発現の検討が必要となる。さらには、従来核内に存在すると言われていたWT1が、細胞質内にも存在する場合があることや、局在の変化によりタンパクの構造・機能が異なる可能性も報告されている。

それだけにWT1の発現を調べる際、免疫組織化学的解析・分子生物学的解析どちらか一方だけの解析では不十分なことが多い。免疫組織化学的解析の代表的なものひとつが免疫染色であり、分子生物学的解析の代表的なものひとつがReal Time PCR法である。

Real Time PCR法とは、PCRでの増幅量をリアルタイムでモニターし解析する方法であり、迅速性と定量性に優れた方法である。通常、Real Time PCRのモニターは蛍光試薬を用いて行う。蛍光を発する方法としては複数あるが、遺伝子産物に特異的に結合するプローブ(TaqManプローブ)を用いる方法が現在主流を占めている。しかし、Taqman法では、PCRプライマーに加えTaqManプローブも用いるため試料の準備が煩雑なうえランニングコストが高く、一般の研究室レベルでは多用しづらい点がある。最近、Taqmanに替わるReal Time PCR法として、DNAに結合する色素SYBR Green Iを用いるインターカレーター法(二本鎖DNAに結合することで蛍光を発する試薬をPCR反応系に加える方法)が注目を集めている。SYBR Green Iを用いた方法は、TaqManプローブを必要としないので簡便、安価である一方、非特異的産物も検出してしまおうという欠点がある。そこで今回、我々は、SYBR Green Iを用いて、WT1のReal Time PCRにおける標準化曲線を確立するために、1)複数のprimer間での比較、2)PCR kit(試薬)間での比較、3)annealing時間での比較等条件を変えて検討した。その結果、安定し特異的な標準化曲線が得られた(Fig. 5)。標準化曲線を確立することにより、今まで言われてきた非特異的産物も検出してしまおうというSYBR Green法での欠点を克服でき、特異的で感度が良い系の確立ができた。

この系を用いた膵癌臨床検体の解析では、Fit Point法による定量分析(Fig. 6a)にて、膵癌組織のmRNAレベルでのWT1の発現を確認し(Fig. 6a, Table 3)、さらに融解曲線分析にて特異的なMelting Peakが認められることより、それらのデータがWT1に特異的なものであることを確認した(Fig. 6)。さらに、今回の検討では、WT1 mRNAの発現が確認できた患者病理組織において、免疫組織化学法(免疫染色)においてもWT1の蛋白レベルでの発現を確認している(Fig. 7)。このことは、Real Time PCRの解析結果が、最終産物であるWT1蛋白の発現を反映していることを強く示唆している。

このことは、我々が確立した系が精度、特異度に

において優れていることを示しており、疾患の早期診断・術後根治度の評価・早期再発予知等に有用にもちいることができることが示唆された。

免疫組織学的検査のためには、十分量の検体を確保する必要がある。一部の経皮的生検が容易な癌種や、外科的アプローチが行いやすい癌では検体の確保はさほど問題にはならないが、膵癌患者から免疫組織学的検査に十分な検体確保をおこなうことは難しい例が多い。また、仮に免疫組織学的検査に十分な量の検体が確保されたとしても、病理標本による免疫染色のみでWT1の出現を判定することは困難で、我々の検討においても、症例によっては、病理専門医による陽性・陰性の判断が分かれる場合もあり、病理標本での発現の有無の判定の難しさをあらためて認識した。このような、術前・術後の病理標本でWT1タンパク発現の有無の判定に迷うような症例においても、病理検査の結果と併せて今回確立した系を併用する事で、診断精度を上げる事が可能であると思われる。

現時点では、SYBR greenを用いたreal time PCRは確立された方法ではなく増幅遺伝子毎、primer毎に詳細な条件検討が必要である。そのため、1)適切な特異的プライマーの設計と確認、2)適切なアニーリング温度の設定と確認、3)適切なテンプレートの量の設定と確認、4)検量線の設定・再現性の確認、これらを一つ一つ検証していかなければならない。

今回、我々が行ったSYBR Green Iを用いたWT1のReal Time PCR解析系は、高感度で高精度の発現解析系である。この系を利用すれば、少量の検体でWT1の発現解析が可能である。次の目標として生検や内視鏡的アプローチで得られた膵液中に含まれる細胞からWT1の発現を定量解析可能か否かの検討を行いたい。更に、通常の方法では解析が不可能であった膵癌症例におけるWT1発現を解析し、その診断と治療、さらには非完全切除膵癌症例や術前・術後アジュバンドとしてのWT1を分子標的とした腫瘍ワクチン療法(WT1ペプチド癌ワクチン療法)の臨床開発を行いたいと考えている。

結 論

我々は、膵癌を含む悪性腫瘍で強発現し、癌遺伝子として働くWT1のSYBR Greenを用いたReal Time PCRにおける標準化曲線を確立した。従来のTaqman法と比較して、本邦ではじめて確立されたSYBR Green Iを用いたWT1のReal Time PCRの系は簡便で費用も安い。今後プロトコール研究にて、この方法の有用性を検証していく予定である。また本研究で確立した標準化曲線で、簡便かつ安価にWT1の発現の大きさを判断し、確定診断、術前・術後化学療法の適応、術後再発予知等に加え、WT1ペプチド癌ワクチン療法への応用も可能となったと考える。

参考文献

- 1) Call KM, Glaser T, Ito CY, Buckler AJ, Pelletier J, Haber DA, et al. Isolation and characterization of a zinc finger polypeptide gene at the human chromosome 11 Wilms' tumor locus. *Cell* 1990;60(3):509-20.
- 2) Gessler M, Poustka A, Cavenee W, Neve RL, Orkin SH, Bruns GA. Homozygous deletion in Wilms tumours of a zinc-finger gene identified by chromosome jumping. *Nature* 1990;343:774-8.
- 3) Pelletier J, Bruening W, Li FP, Haber DA, Glaser T, Housman DE. WT1 mutations contribute to abnormal genital system development and hereditary Wilms' tumour. *Nature* 1991;353:431-4.
- 4) Inoue K, Sugiyama H, Ogawa H, Nakagawa M, Yamagami T, Miwa H, et al. WT1 as a new prognostic factor and a new marker for the detection of minimal residual disease in acute leukemia. *Blood* 1994;84:3071-9.
- 5) Oji Y, Yano M, Nakano Y, Abeno S, Nakatsuka S, Ikeba A, et al. Overexpression of the Wilms' tumor gene WT1 in esophageal cancer. *Anticancer Res* 2004;24:3103-8.
- 6) Inoue K, Ogawa H, Sonoda Y, Kimura T, Sakabe H, Oka Y, et al. Aberrant overexpression of the Wilms tumor gene (WT1) in human leukemia. *Blood* 1997;89:1405-12.
- 7) Oji Y, Ogawa H, Tamaki H, Oka Y, Tsuboi A, Kim EH, et al. Expression of the Wilms' tumor gene WT1 in solid tumors and its involvement in tumor cell growth. *Jpn. J. Cancer Res* 1999;90:194-204.
- 8) Yamagami T, Sugiyama H, Inoue K, Ogawa H, Tatekawa T, Hirata M, et al. Growth inhibition of human leukemic cells by WT1 (Wilms tumor gene) antisense oligodeoxynucleotides: Implications for the involvement of WT1 in leukemogenesis. *Blood* 1996;87:2878-84.
- 9) Oji Y, Inohara H, Nakazawa M, Nakano Y, Akahani S, Nakatsuka S, et al. Overexpression of the Wilms' tumor gene WT1 in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Sci* 2003;94:523-9.
- 10) Sugiyama H. Wilms' tumor gene WT1: its oncogenic function and clinical application. *Int J Hematol* 2001;73:177-87.
- 11) Elisseeva O.A, Oka Y, Tsuboi A, Ogata K, Wu F, Kim E.H, et al. Humoral immune responses against Wilms' tumor gene WT1 product in patients with hematopoietic malignancies. *Blood* 2002;99:3272-9.
- 12) Oka Y, Uda K, Tsuboi A, Elisseeva O.A, Ogawa H, Aozasa K, et al. Cancer Immunotherapy targeting

- Wilms' tumor gene WT1 product. *Journal of Immunology* 2000;164:1873-80.
- 13) Oka Y, Elisseev O.A, Tsuboi A, Ogawa H, Tamaki H, Li H, et al. Human cytotoxic T lymphocyte responses specific for peptides of wild-type Wilms' tumor gene WT1 product. *Immunogenetics* 2000;51:99-107.
 - 14) Tsuboi A, Oka Y, Udaka K, Murakami M, Masuda T, Nakano A, et al. Enhanced induction of human WT1-specific cytotoxic T lymphocytes with a 9-mer WT1 peptide modified at HLA-A*2402-binding residues. *Cancer Immunology and Immunotherapy* 2002;51:614-20.
 - 15) Call KM, Glaser T, Ito CY, Buckler AJ, Pelletier J, Haber DA, et al. Isolation and characterization of a zinc finger polypeptide gene at the human chromosome 11 Wilms'tumor locus. *Cell* 1990;60:509-20.
 - 16) Oji Y, Miyoshi S, Takahashi E, Koga S, Nakano Y, Shintani Y, et al. Absence of mutations in the Wilms' tumor gene wt1 in de novo non-small cell lung cancers. *Neoplasma* 2004;51:17-20.
 - 17) Oji Y, Miyoshi S, Maeda H, Hayashi S, Tamaki H, Nakatsuka S, et al. Overexpression of the Wilms' tumor gene WT1 in de novo lung cancers. *International Journal of Cancer* 2002;100:297-303.
 - 18) Tsuboi A, Oka Y, Osaki T, Kumagai T, Tachibana I, Hayashi S, et al. WT1 peptide-based immunotherapy for patients with lung cancer: report of two cases. *Microbiol Immunol* 2004; 48:175-84.
 - 19) Miyoshi Y, Ando A, Egawa C, Taguchi T, Tamaki Y, Tamaki H, et al. High expression of Wilms' tumor suppressor gene (WT1) predicts poor prognosis in breast cancer patients. *Clinical Cancer Research* 2002;8:1167-71.
 - 20) Oji Y, Miyoshi Y, Kiyotoh E, Koga S, Nakano Y, Ando A, et al. Absence of mutations in the Wilms' tumor gene WT1 in primary breast cancer. *Jpn J Clin Oncol* 2004;34:74-7.
 - 21) Loeb DM, Evron E, Patel CB, Sharma PM, Niranjana B, Buluwela L, et al. Wilms' tumor suppressor gene (WT1) is expressed in primary breast tumors despite tumor-specific promoter methylation. *Cancer Res* 2001;61:921-5.
 - 22) Oji Y, Yamamoto H, Nomura M, Nakano Y, Ikeba A, Nakatsuka S, et al. Overexpression of the Wilms' tumor gene WT1 in colorectal adenocarcinoma. *Cancer Science* 2003;94:712-7.
 - 23) Oji Y, Miyoshi Y, Koga S, Nakano Y, Ando A, Nakatsuka S, et al. Overexpression of the Wilms' tumor gene WT1 in primary thyroid cancer. *Cancer Science* 2003;94:606-11.
 - 24) Harada Y, Nonomura N, Nishimura K, Tamaki H, Takahara S, Miki T, et al. The WT1 expression in human testicular germ cell tumors. *Molecular Urology* 1999;3:357-63.
 - 25) Oji Y, Inohara H, Nakazawa M, Nakano Y, Akahani S, Nakatsuka S, et al. Overexpression of the Wilms' tumor gene WT1 in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Science* 2003;94: 523-9.
 - 26) Ueda T, Oji Y, Naka N, Nakano Y, Takahashi E, Koga S, et al. Overexpression of the Wilms' tumor gene WT1 in human bone and soft-tissue sarcomas. *Cancer Science* 2003;94:271-6.
 - 27) Ogawa H, Tamaki H, Ikegame K, Soma T, Kawakami M, Tsuboi A, et al. The usefulness of monitoring WT1 gene transcripts for the prediction and management of relapse following allogeneic stem cell transplantation in acute type leukemia. *Blood* 2003;101:1698-1704.
 - 28) Tamaki H, Ogawa H, Inoue K, Soma T, Yamagami T, Miyake S, et al. Increased expression of the Wilms tumor gene (WT1) at relapse in acute leukemia. *Blood* 1996;88:4396-9.
 - 29) Inoue K, Ogawa H, Yamagami T, Soma T, Tani Y, Tatekawa T, et al. Long-term follow-up of minimal residual disease in leukemia patients by monitoring WT1 (Wilms tumor gene) expression levels. *Blood* 1996;88:2267-78.
 - 30) Ogawa H, Tsuboi A, Oji Y, Tamaki H, Soma T, Inoue K, et al. Successful donor leukocyte transfusion at molecular relapse for a patient with acute myeloid leukemia who was treated with allogeneic bone marrow transplantation : importance of the monitoring of minimal residual disease by WT1 assay. *Bone Marrow Transplant*;21:525-7.
 - 31) Oji Y, Ogawa H, Tamaki H, Oka Y, Tsuboi A, Kim E.H, et al. Expression of the Wilms' tumor gene WT1 in solid tumors and its involvement in tumor cell growth. *Japanese Journal of Cancer Research* 1999;90:194-204.
 - 32) Oji Y, Nakamori S, Fujikawa M, Nakatsuka S, Yokota A, Tatsumi N, et al. Overexpression of the Wilms' tumor gene WT1 in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Sci* 2004;95:583-7.
 - 33) Oji Y, Suzuki T, Nakano Y, Maruno M, Nakatsuka S, Jomgeow T, et al. Overexpression of the Wilms' tumor gene WT1 in primary astrocytic tumors. *Cancer Sci* 2004;95:822-7.