บทความปริทัศน์

บทบาทของ WT1 ในมะเร็งเต้านมและมะเร็งชนิดต่างๆ: ยีนส่งเสริมมะเร็งหรือยีนยับยั้งมะเร็ง

พจนพร ไกรดิษฐ์

The role of WT1 in breast and other cancers: oncogene or tumor suppressor gene?

Graidist P.

Tumor Biology Research Unit,

Department of Biomedical Sciences,

Faculty of Medicine, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla, 90110, Thailand

Songkla Med J 2009;27(5):435-449

Abstract:

The Wilms' tumor 1 (WT1) gene is originally identified in Wilms tumor, a childhood kidney cancer. This gene encodes a zinc finger transcriptional regulatory protein that has been implicated in growth, normal development, survival and apoptosis. Alternative splicing of the WT1 transcript generates four major protein isoforms and thirty six minor protein isoforms, each having different functional properties. The expression and role of WT1 also varies by cell type and its interacting proteins. Although the WT1 gene has been considered as a tumor suppressor gene, a wild type WT1 gene is expressed in several cancers

---

หน่วยวิจัยชีววิทยาของเนื้องอก, ภาควิชาชีวเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา 90110
รับต้นฉบับวันที่ 30 มิถุนายน 2552 รับลงตีพิมพ์วันที่ 30 กันยายน 2552

including leukemia, breast and colon cancer. Since the mechanism of WT1 in breast and other cancers remains unclear, this review focuses on functional activity as a transcription factor, its role in growth and proliferation, and as a tumor suppressor gene and oncogene.

Key words: *breast cancer, oncogene, tumor suppressor gene, WT1*

บทคัดย่อ:

ยีนวิล์มทูเมอร์วัน (WT1) เป็นยีนที่พบครั้งแรกในวิล์มทูเมอร์วันซึ่งเป็นมะเร็งไตที่พบในเด็ก โดยโปรตีน WT1 มีส่วนของ zinc finger ทำหน้าที่เป็นทรานสคริพชันแฟคเตอร์ (transcription factor) จึงทำให้ WT1 มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโต การพัฒนา การมีชีวิตรอด และการตายแบบอะพอพโทสิสของเซลล์ การเกิด alternative splicing ของยีน WT1 ทำให้โปรตีน WT1 มี 4 ไอโซฟอร์มหลัก และ 36 ไอโซฟอร์มย่อย ซึ่งแต่ละไอโซฟอร์มมีหน้าที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของเซลล์และโปรตีนที่ทำงานร่วมกัน มีรายงานว่า WT1 เป็นยีนยับยั้งมะเร็ง แต่ในขณะเดียวกันก็สามารถพบการแสดงออกของยีน WT1 ในมะเร็งหลายชนิด เช่น มะเร็งเม็ดเลือดขาว มะเร็งเต้านม และมะเร็งลำไส้ เป็นต้น เนื่องจากที่ผ่านมายังไม่มีการสรุปถึงหน้าที่ของ WT1 ในมะเร็งเต้านมและมะเร็งชนิดอื่นๆ อย่างชัดเจน ในบทความนี้ได้รวบรวมข้อมูลและสรุปบทบาทของ WT1 ในการทำหน้าที่เป็นทรานสคริพชันแฟคเตอร์ หน้าที่ในการควบคุมการเจริญเติบโตและการแบ่งตัวของเซลล์ การทำหน้าที่เป็นยีนยับยั้งมะเร็งและยีนส่งเสริมมะเร็ง

คำสำคัญ: *WT1, มะเร็งเต้านม, ยีนยับยั้งมะเร็ง, ยีนส่งเสริมมะเร็ง*

บทนำ

โรคมะเร็งเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญในระดับประเทศและระดับโลก อุบัติการณ์โรคมะเร็งทั่วโลกในปี พ.ศ. 2543 พบว่ามีผู้ป่วยโรคมะเร็ง 22.4 ล้านราย และในปี พ.ศ. 2550 มีผู้ป่วยรายใหม่ 12.3 ล้านราย[1] คาดว่าในปี พ.ศ. 2563 ทั่วโลกจะมีผู้ป่วยรายใหม่ 15.6 ล้านราย และจะเสียชีวิต 10 ล้านราย สำหรับในประเทศไทยในปี พ.ศ. 2545 และ 2551 มีสถิติของผู้ป่วยโรคมะเร็งรายใหม่ 94,652 ราย และ 125,922 ราย ตามลำดับ[2] จากข้อมูลในปี พ.ศ. 2550 พบว่าชนิดของมะเร็งที่พบมากที่สุดในเพศชาย คือ มะเร็งปอด และในเพศหญิง คือ มะเร็งเต้านม ในปี พ.ศ. 2550 พบมะเร็งเต้านมในเพศหญิง 40 รายต่อประชากร 100,000 ราย[3] รายงานอุบัติการณ์ของโรคมะเร็งเต้านมในประเทศสหรัฐอเมริกาในปี พ.ศ. 2550 พบว่ามีผู้ป่วยมะเร็งเต้านมรายใหม่ซึ่งอยู่ในระยะที่มีการลุกลาม (invasive breast cancer) 178,480 ราย และอยู่ในระยะที่ไม่มีการแพร่กระจาย (in situ breast cancer) 62,030 ราย[4]

สาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดโรคมะเร็ง คือ ความผิดปกติในระดับโมเลกุล ซึ่งส่งผลต่อการควบคุมการทำงานของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของเซลล์ ทำให้เซลล์แบ่งตัวเพิ่มขึ้น และเกิดการตายแบบอะพอพโทซิส (apoptosis) ลดลง กลุ่มยีนที่สัมพันธ์กับการเกิดโรคมะเร็งมี 2 กลุ่ม คือ ยีนส่งเสริมมะเร็ง (oncogene) และยีนยับยั้งมะเร็ง (tumor suppressor gene) ความผิดปกติของยีนส่งเสริมมะเร็งที่สำคัญได้แก่ *WT1, c-erb-B2, CCND1, Bcl-2, c-Myc* และ *human telomerase reverse transcriptase (hTERT)* เป็นต้น[5-7] และความผิดปกติของ

ยีนยับยั้งมะเร็งได้แก่ *WT1, p53, E-cadherin, p16/INK4, Rb* และ *Bax* เป็นต้น[8-10] จะเห็นได้ว่ายีน *WT1* ทำหน้าที่เป็นทั้งยีนส่งเสริมมะเร็งและยีนยับยั้งมะเร็ง ซึ่งสามารถพบการแสดงออกของยีน *WT1* ได้ทั้งในเซลล์ปกติและเซลล์มะเร็ง ตัวอย่างของเซลล์มะเร็งที่พบได้แก่ เซลล์ปฐมภูมิของมะเร็งเม็ดเลือดขาว[11] มะเร็งปอด[12] มะเร็งลำไส้ใหญ่[13] มะเร็งหลอดอาหาร[14] และมะเร็งเต้านม[15-16] เป็นต้น จากการศึกษายีน *WT1* ในมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเฉียบพลัน พบว่าสามารถใช้ยีน *WT1* เป็นตัวติดตามการกลับเป็นซ้ำและใช้ในการพยากรณ์การดำเนินโรคได้[11] สำหรับบทบาทหน้าที่ของยีน *WT1* ต่อกระบวนการเกิดมะเร็งเต้านมนั้นยังไม่มีข้อสรุปชัดเจน มีรายงานโดย Miyoshi และคณะ[16] พบว่าการทำงานของยีน *WT1* ที่สูงขึ้นส่งผลต่อการพยากรณ์โรคไม่ดีในผู้ป่วยมะเร็งเต้านม ส่วนรายงานของ Silberstein และคณะ[17] ไม่พบโปรตีน WT1 ในมะเร็งเต้านม แต่พบการแสดงออกในชิ้นเนื้อเต้านมปกติ และพบการเกิด splicing ใน mRNA ของยีน *WT1* ในส่วน zinc-finger domain ในมะเร็งเต้านม แต่ไม่พบในชิ้นเนื้อเต้านมปกติ จึงเป็นที่น่าสนใจว่า WT1 ทำหน้าที่อย่างไรในการเกิดมะเร็งเต้านมและมะเร็งชนิดต่างๆ ซึ่งคาดว่าจะสามารถนำความรู้และความเข้าใจในบทบาทและหน้าที่ของ WT1 ไปพัฒนาการรักษาโรคมะเร็งในอนาคต เช่น ใช้เป็นยีนเป้าหมายในการรักษาด้วยเทคโนโลยี gene therapy หรือ immunotherapy หรือใช้เป็นตัวบ่งชี้หรือติดตามการเกิดมะเร็ง (cancer marker) และพยากรณ์ความรุนแรงของโรค

ยีนวิล์มทูเมอร์วัน (*WT1*) คืออะไร

ยีนวิล์มทูเมอร์วัน (*WT1*) เป็นยีนที่พบครั้งแรกที่มะเร็งไตในเด็ก มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาของไต โดยพบว่ายีน *WT1* มีการแสดงออกเมื่อไตเริ่มพัฒนาตั้งแต่หนูอยู่ในท้องวันที่ 8 และมีการแสดงออกสูงสุดในวันที่ 17 จากนั้นจะลดลงเมื่อหนูคลอดและมีอายุ 3 วัน[18] ผลที่ได้สอดคล้องกับการศึกษาทารกในครรภ์ระยะ 6-7 สัปดาห์ ซึ่งพบว่ามียีน *WT1* สูงเช่นเดียวกัน[19] มีการศึกษาเพิ่มเติมในหนูที่มีการยับยั้งยีน *WT1* แบบถาวร พบว่าหนูที่ไม่มีการแสดงออกของยีน *WT1* จะมีการพัฒนาของไตที่ผิดปกติ และส่งผลให้ไตไม่สามารถทำงานได้ตามปกติ[20] ส่วนในหนูเต็มวัย WT1 เกี่ยวข้องกับการทำงานของไต ระบบประสาทส่วนกลาง และเนื้อเยื่อที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเม็ดเลือด ได้แก่ ไขกระดูก และต่อมน้ำเหลือง[21]

โครงสร้างของ WT1

WT1 เป็นยีนที่อยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 11p13 มีขนาดประมาณ 1.3-1.5 kb ประกอบด้วย 10 exon โดยส่วน N-terminal ของโปรตีน WT1 ประกอบด้วย RNA recognition, self association, repression domain และ activation domain อยู่ในตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 11-72, 1-180, 84-124 และ 181-250 ตามลำดับ ในส่วน C-terminal ประกอบด้วย zinc finger 1, 2, 3 และ 4 ซึ่งมีบริเวณที่ทำหน้าที่เป็น DNA binding อยู่ในตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 323-438 สำหรับส่วนที่เป็น RNA recognition จะอยู่ในส่วนของ zinc finger 1 ส่วนบริเวณที่เป็น nuclear localization signal จะอยู่ในตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 291-350 และระหว่าง zinc finger ที่ 2 และ 3 นอกจากนี้ยังมีการเติมฟอสเฟตในตำแหน่ง serine ที่ 365 และ serine ที่ 363 ซึ่งอยู่บน zinc finger ที่ 2 และ 3[22]

โปรตีน WT1 มีจำนวน 36 ไอโซฟอร์ม[23] เกิดจากกระบวนการ RNA splicing, RNA editing, alternative splicing และการแปลรหัสในตำแหน่งเริ่มต้นที่แตกต่างกันหรือแปลรหัสในตำแหน่งที่ไม่ใช่ AUG (start codon) เช่น แปลรหัสในตำแหน่ง CUG ที่อยู่บริเวณ upstream ของ AUG จะได้โปรตีนที่มีขนาดประมาณ 60-62 kDa[24] แต่ถ้ามีการแปลรหัสที่ตำแหน่ง AUG127 จะได้โปรตีนที่มีขนาดประมาณ 36-38 kDa ซึ่งเล็กกว่าโปรตีน WT1 ปกติ (wild type WT1)[25] เป็นต้น ไอโซฟอร์มของ WT1 ที่เกิดจาก alternative splicing มี 4 ไอโซฟอร์มหลัก โดยเกิดจาก

การตัดใน 2 ตำแหน่ง คือ 1) เกิดจากการมีหรือไม่มีกรดอะมิโนจำนวน 17 ตัว ในตำแหน่ง exon ที่ 5 (ระหว่างตำแหน่ง proline และ glutamine rich) และ 2) เกิดจากการมีหรือไม่มีกรดอะมิโน lysine, threonine และ serine หรือ KTS ในตำแหน่ง exon ที่ 9 (ระหว่าง zinc-finger domain ตำแหน่งที่ 3 และ 4) ไอโซฟอร์มทั้ง 4 ไอโซฟอร์มมีสัญลักษณ์และขนาดดังนี้

1. WT1(17AA-)(KTS-) หรือไอโซฟอร์ม A มีกรดอะมิโน 429 ตัว หรือ 47.19 kDa

2. WT1(17AA+)(KTS-) หรือไอโซฟอร์ม B มีกรดอะมิโน 446 ตัว หรือ 49.06 kDa

3. WT1(17AA-)(KTS+) หรือไอโซฟอร์ม C มีกรดอะมิโน 432 ตัว หรือ 47.52 kDa

4. WT1(17AA+)(KTS+) หรือไอโซฟอร์ม D มีกรดอะมิโน 449 ตัว หรือ 49.39 kDa

นอกจาก WT1 ทั้ง 4 ไอโซฟอร์มนี้แล้ว ยังมีการพบไอโซฟอร์มที่ 5 คือ WT1(17AA-)(KTS-) ที่มีกรดอะมิโนจำนวน 68 ตัว เพิ่มทางด้านปลาย N-terminal ทำให้ WT1 ไอโซฟอร์มนี้มีกรดอะมิโน 497 ตัว หรือ 54.67 kDa[26-27] จากการศึกษาพบว่าโปรตีน WT1 ไอโซฟอร์มที่แตกต่างกันมีหน้าที่ที่แตกต่างกัน และหน้าที่ที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของเซลล์ด้วย[28] การศึกษา WT1 ในเซลล์มะเร็งหลายชนิดสนับสนุนผลการศึกษาเริ่มต้นที่ว่ายีน *WT1* เป็นยีนยับยั้งมะเร็ง และสามารถจับกับ p53 ซึ่งเป็นโปรตีนที่ทำให้เกิดการตายแบบอะพอพโทสิสได้[29] Idelman และคณะ[30] ได้รายงานเพิ่มเติมว่า WT1(KTS-) สามารถควบคุมยีนเป้าหมาย insulin-like growth factor - I receptor (IGF-IR) โดยขึ้นอยู่กับยีน *p53* ในเซลล์ เช่น มีผลยับยั้งยีน IGF-IR เมื่อไม่มีการกลายพันธุ์ของยีน *p53* ในขณะที่ WT1 (KTS+) ไม่มีผลยับยั้งยีน IGF-IR นอกจากนี้ยังมีรายงานว่ายีน *WT1* ดั้งเดิม (wild type *WT1*) ทำหน้าที่เป็นยีนส่งเสริมมะเร็งมากกว่ายีนยับยั้งมะเร็ง ซึ่งพบในเซลล์มะเร็งหลายชนิด เช่น มะเร็งเม็ดเลือดขาว[11] มะเร็งเต้านม และเนื้องอกที่เกิดจากเซลล์สืบพันธุ์ต้นกำเนิดของอัณฑะ (testicular germ cell tumor)[31] นอกจากนี้พบว่า WT1 (17AA+)(KTS+) เป็นไอโซฟอร์มที่มีการแสดงออกมากที่สุด โดยมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของเซลล์[32]

หน้าที่ของ WT1 ในมะเร็งเต้านมและมะเร็งชนิดต่าง ๆ

WT1 เกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็งโดยการทำหน้าที่เป็นทรานสคริพชันแฟคเตอร์ ซึ่ง WT1 เป็นโปรตีนในกลุ่ม zinc finger family[33-34] ที่มีโครงสร้างเหมือนกับ early growth response (Egr) family[35] ที่ควบคุมยีนเป้าหมายได้หลายกลุ่ม (ตารางที่ 1) ได้แก่ 1) ยีนในกลุ่มที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของเซลล์[36-42] 2) ยีนที่เกี่ยวข้องกับการแพร่กระจายของมะเร็ง[43] 3) ยีนที่เกี่ยวข้องกับการแก่ของเซลล์ (senescence)[44] และ 4) ยีนที่เกี่ยวข้องกับการตายแบบอะพอพโทสิส[28, 45]

จากการที่ WT1 มีหน้าที่แตกต่างกันโดยขึ้นอยู่กับไอโซฟอร์ม ชนิดของเซลล์ และการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องหรือยีนที่ทำงานร่วมกับ WT1[28, 46] จึงทำให้ WT1 มีหลายหน้าที่ ได้แก่ หน้าที่ในการเจริญเติบโตและการแบ่งตัวของเซลล์ หน้าที่ยับยั้งมะเร็งและยีนส่งเสริมมะเร็ง

1. WT1 ทำหน้าที่เป็นทรานสคริพชันแฟคเตอร์

บริเวณ zinc finger ที่อยู่ด้าน C-terminal ของโปรตีน WT1 มีหน้าที่ถอดรหัสยีนเป้าหมาย (ตารางที่ 1) โดย WT1 ทำหน้าที่กระตุ้นหรือยับยั้งการถอดรหัสของยีนใดนั้น ขึ้นอยู่กับชนิดของเซลล์และไอโซฟอร์ม เช่น WT1(KTS+) จับกับ mRNA ของยีน IGF-II ได้ดีกว่า WT1 (KTS-)[47] และ WT1(17AA+)(KTS+) มีผลยับยั้งการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงของหนูชนิดไมอีลอยด์ (myeloid) ชนิด 32D cl3 (murine myeloid cell line)[48] นอกจากนี้ WT1 ยังสามารถกระตุ้นโปรโมเตอร์ของยีน *c-Myc* ทำให้มีการกระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งเต้านมเพาะเลี้ยงชนิด MDA-MB-468 และ MCF-7 รวมทั้งเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด K562[49] แต่จากการศึกษาในเซลล์มะเร็งปากมดลูกเพาะเลี้ยงชนิด Hela พบว่า WT1 มีผลยับยั้งโปรโมเตอร์ของยีน *c-Myc*[45]

ตารางที่ 1 ยีนเป้าหมายของ WT1 และผลที่เกิดขึ้นจากการถอดรหัสของยีนเป้าหมาย

ยีนเป้าหมาย	ผลที่เกิดขึ้น	หน้าที่ของ WT1
Growth factor		
Amphiregulin	Activation	Tumor suppressor[42]
Colony-stimulating factor-1 (CSF-1)	Repression	Transcription factor[50]
Insulin-like growth factor II (IGF-II)	Activation	Growth stimulation[51]
	Repression	Growth inhibition[39, 52]
Platelet-derived growth factor A (PDGF-A)	Activation	Transcription factor[53]
	Repression	Tumor suppressor[40, 53-54]
Transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1)	Repression	Tumor suppressor[41]
Connective tissue growth factor (CTGF)	Repression	Tumor suppressor[55]
Receptor		
Androgen receptor	Repression	Prostate cancer development and progression[56]
Epidermal growth factor receptor (EGFR)	Repression	Tumor suppressor[38, 57-58]
Insulin receptor	Repression	Tumor suppressor[57, 59]
Insulin-like growth factor - I receptor (IGF-IR)	Repression	Tumor suppressor[36-37, 60]
Retinoic acid receptor alpha (RAR-alpha 1)	Repression	Transcription factor[61]
Transcription factor		
c-Myb	Repression	Tumor suppressor[62]
c-Myc	Activation	Oncogene[49, 63]
	Repression	Tumor suppressor[45]
Cyclin E	Repression	Cell cycle progression[64]
Cyclin G1 (CCNG1)	Activation	Cell cycle-checkpoint[65]
Insulin-like growth factor binding protein 4 (IGFBP-4)	Activation	Growth suppressor[65]
p21	Activation	Tumor suppressor[66]
Pax-2	Repression	Tumor suppressor[67]
Enzyme		
Human telomerase reverse Transcriptase (hTERT)	Repression	Tumor suppressor[44]
Ornithine decarboxylase (ODC)	Repression	Tumor suppressor[68-69]
Extracellular protein		
E-cadherin	Activation	Tumor suppressor[43]
Thrombospondin 1 (TSP1)	Repression	Oncogene[70]
Syndecan-1	Activation	Epithelial differentiation (kidney development)[71]

ตารางที่ 1 (ต่อ)

ยีนเป้าหมาย	ผลที่เกิดขึ้น	หน้าที่ของ WT1
Other		
Wnt-4	Activation	Epithelial transition (kidney development)[72]
Bcl-2	Activation	Oncogene[73]
	Repression	Tumor suppressor[45, 74]
Bax	Activation	Tumor suppressor[28]
Bak	Activation	Tumor suppressor[28]
Erythropoietin (EPO)	Activation	Transcription factor[75]

2. WT1 ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตและการแบ่งตัวของเซลล์

WT1 ทำหน้าที่เป็นทรานสคริพชันแฟคเตอร์ โดยการกระตุ้นหรือยับยั้งการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโต เช่น *IGF-IR, IGF-II, platelet-derived growth factor A (PDGF-A), transforming growth factor- beta1 (TGF-β), c-Myc, amphiregulin* และ *epidermal growth factor receptor (EGFR)* เป็นต้น (ตารางที่ 1) มีรายงานว่าสามารถใช้ antisense oligonucleotide ยับยั้งการแสดงออกของยีน *WT1* และส่งผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเต้านมชนิดต่างๆ ได้แก่

1. ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเต้านมเพาะเลี้ยงชนิด MCF-7, MDA-MB-453, T-47D และ MDA-MB-435 ได้มากกว่าร้อยละ 50

2. ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเต้านมเพาะเลี้ยงชนิด MDA-MB-468 และ BT-474 ได้ร้อยละ 50

3. ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเต้านมเพาะเลี้ยงชนิด SKBr-3 และ MDA-MB-361 ได้น้อยกว่าร้อยละ 50

4. ไม่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเต้านมเพาะเลี้ยงชนิด MDA-MB-231 และ Hs578T[76]

3. WT1 ทำหน้าที่เป็นยีนยับยั้งมะเร็ง

WT1 ทำหน้าที่ยับยั้งมะเร็งโดยการเป็นทรานสคริพชันแฟคเตอร์และทำงานร่วมกับยีนยับยั้งมะเร็ง เช่น *p53, Bax, Bak* และ *Par-4* เป็นต้น นอกจากนี้ WT1 ยังสามารถยับยั้งการทำงานของยีนในกลุ่มที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตและการแบ่งตัวของเซลล์ เช่น *IGF-IR* และ *EGFR* เป็นต้น (ตารางที่ 1)

มีรายงานสนับสนุนการเป็นยีนยับยั้งมะเร็งของ *WT1* โดยนักวิทยาศาสตร์หลายคณะ เช่น Silberstein และคณะ[17] รายงานการพบ mRNA ของยีน *WT1* ในเนื้อเยื่อเต้านมปกติ ในขณะที่พบ mRNA ของยีน *WT1* ที่มีการกลายพันธุ์ซึ่งเกิดจาก alternative splicing ในเนื้อเยื่อมะเร็งเต้านม และเมื่อย้อมเซลล์ด้วยวิธี immunostaining พบโปรตีน WT1 ร้อยละ 93 ในเนื้อเยื่อเต้านมปกติ และร้อยละ 40 ในเนื้อเยื่อมะเร็งเต้านม นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าการแสดงออกของยีน *WT1* ที่เพิ่มมากขึ้น มีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์และทำให้เซลล์ตายแบบอะพอพโทสิสในเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากเพาะเลี้ยงชนิด LNCap[77] และเซลล์มะเร็งเต้านมเพาะเลี้ยงชนิด MDA-MB-231 และมีผลยับยั้งการเกิดเนื้องอกใน nude mice โดยการยับยั้งที่เกิดขึ้นนี้เกิดจาก WT1 ไปยับยั้งยีน β-catenin[78] หรือยีน *c-Myc*[45] ซึ่งพบว่าเมื่อยับยั้ง

mRNA ของยีน *c-Myc* แบบชั่วคราว (knockdown) ด้วย siRNA จะมีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเต้านมเพาะเลี้ยงชนิด MCF-7 และลดการเจริญเติบโตของเนื้องอกใน nude mice รวมทั้งเซลล์เกิดการตายแบบอะพอพโทสิสเพิ่มขึ้นด้วย[79] จากการศึกษาของ Maheswaran และคณะ[29] ซึ่งศึกษาในเซลล์ไตเพาะเลี้ยงของลูกหนูชนิด baby rat kidney (BRK) พบว่าโปรตีน WT1 ในส่วนของ zinc finger ตำแหน่งที่ 1/2 สามารถจับกับ p53 และส่งผลยับยั้งการแสดงออกของยีน early growth response gene 1 (EGR1) แต่ในกรณีที่เซลล์ไม่มียีน *p53* หรือยีน *p53* มีการกลายพันธุ์ พบว่า WT1 มีผลกระตุ้นการแสดงออกของยีน EGR1 นอกจากนี้ WT1 ยังสามารถควบคุมการสังเคราะห์โปรตีน Bcl-2 ซึ่งเป็นโปรตีนต้านการตายแบบอะพอพโทสิส (anti-apoptotic protein) โดย WT1 จับที่โปรโมเตอร์ของยีน *Bcl-2* และจับกับ Par-4 จากนั้น Par-4 จะจับกับตัวยับยั้ง ทำให้ไม่มีการแสดงออกของยีน *Bcl-2*[80] การจับกันของ WT1 และ Par-4 จะเกิดขึ้นที่ตำแหน่ง exon ที่ 5 ที่กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 250-266[81] โดยปกติ Par-4 จะเป็นโปรตีนที่ถูกกระตุ้นได้ง่ายและส่งผลให้เกิดการตายแบบอะพอพโทสิสในเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก[82] และ WT1 ยังสามารถเหนี่ยวนำให้มีการสร้าง Bak ซึ่งเป็นโปรตีนในกลุ่มที่ทำให้เกิดการตายแบบอะพอพโทสิส (pro-apoptotic protein) โดยการจับกับโปรโมเตอร์ของยีน Bak[83]

หน้าที่ของ WT1 ในการเป็นยีนยับยั้งมะเร็งของทั้ง 4 ไอโซฟอร์มดังนี้

1. WT1(17AA-)(KTS-) ทำหน้าที่ยับยั้งมะเร็งโดยการเหนี่ยวนำให้เกิดการยับยั้งวัฏจักรของเซลล์ให้อยู่ที่ G1 (G1 arrest) ในเซลล์มะเร็งกระดูกเพาะเลี้ยง[66] และยับยั้งการดำเนินไปของวัฏจักรของเซลล์ให้เคลื่อนจากระยะ G1/S (G1/S progression) รวมทั้งเร่งการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงของหนูชนิดไมอีลอยด์ชนิด 32D cl3 จากการกระตุ้นด้วย granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF)[84] นอกจากนี้ยังเกี่ยวข้องกับการตายแบบอะพอพโทสิสโดยการยับยั้งโปรโมเตอร์ของยีน *Bcl-2* ในเซลล์มะเร็งปากมดลูกเพาะเลี้ยงชนิด Hela[28] มีการศึกษาโดย Burwell และคณะ[46] โดยทำให้เซลล์เพาะเลี้ยงชนิด H16N-2 ซึ่งเป็นเซลล์เต้านมปกติที่ไม่มีการแสดงออกของยีน *WT1* มีการสร้างโปรตีน WT1 พบว่า WT1(17AA-)(KTS-) ทำให้เซลล์แบ่งตัวช้าลง โดยไปทำให้ p21 แสดงออกเพิ่มขึ้น ส่งผลให้เซลล์เข้าสู่การยับยั้งวัฏจักรของเซลล์ให้อยู่ที่ G2 (cell cycle G2 arrest)

2. WT1(17AA+)(KTS-) ทำหน้าที่ยับยั้งมะเร็งต่อมน้ำเหลือง โดยโปรโมเตอร์ lck กระตุ้นให้ยีน *WT1* แสดงออกเพิ่มขึ้น และมีผลยับยั้งการพัฒนาการของเซลล์ T lineage[85] และ WT1 ยังเหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบอะพอพโทสิสในเซลล์มะเร็งกระดูกเพาะเลี้ยงชนิด Saos-2 และ U2OS และในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด M1 leukemia[28] นอกจากนี้ WT1(17AA+)(KTS-) ยังสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งไตเพาะเลี้ยงชนิด G401 (kidney derived tumor cell line) และลดการเกิดเนื้องอกใน node mice แต่ให้ผลยับยั้งน้อยกว่า WT1 (17AA-)(KTS+)[86] จากการศึกษาในเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยงหลายชนิด เช่น มะเร็งเม็ดเลือดขาว มะเร็งกระดูก (ชนิด U2OS, Saos-2 และ osteosarcoma) มะเร็งตับ (ชนิด Hep3B และ HepG2) พบว่า WT1(KTS-) สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบอะพอพโทสิสโดยไม่ส่งสัญญาณผ่านทาง p53 แต่เกี่ยวข้องกับการยับยั้ง EGFR และ insulin receptor[38, 57]

3. WT1(17AA-)(KTS+) ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งไตเพาะเลี้ยงชนิด G401 และลดการเกิดเนื้องอกใน node mice โดยที่ WT1(17AA-)(KTS+) ให้ผลการยับยั้งได้ดีกว่า WT1(17AA+)(KTS-)[86] การศึกษาโดย Smith และคณะ[87] พบว่าการแสดงออกของ WT1(KTS+) มีผลลดการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด M1 ซึ่งสอดคล้องกับรายงาน

ของ Loeb[28] ที่พบว่า WT1 ไอโซฟอร์มนี้เหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบอะพอพโทสิสได้ในเซลล์มะเร็งตับเพาะเลี้ยงชนิด HepG2

4. WT1(17AA+)(KTS+) เหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบอะพอพโทสิสในเซลล์มะเร็งตับเพาะเลี้ยงชนิด HepG2[28]

อย่างไรก็ตาม WT1 ทั้ง 4 ไอโซฟอร์มทำหน้าที่เหมือนกัน คือ มีผลยับยั้งโปรโมเตอร์ของยีน *IGF-IR* ในเซลล์มะเร็งเต้านมเพาะเลี้ยงชนิด MCF-7[88]

4. WT1 ทำหน้าที่เป็นยีนส่งเสริมมะเร็ง

WT1 ทำหน้าที่ส่งเสริมการเกิดมะเร็งโดยการเป็นทรานสคริพชันแฟคเตอร์และทำงานร่วมกับยีนส่งเสริมมะเร็ง เช่น *Bcl-2* และ *Bfl-1/A1* เป็นต้น นอกจากนี้ WT1 ยังกระตุ้นการทำงานของยีนในกลุ่มที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโต และการแบ่งตัวของเซลล์ เช่น *IGF-IR* เป็นต้น (ตารางที่ 1) รวมถึงการยับยั้งยีนที่ทำให้เกิดการตายแบบอะพอพโทสิส เช่น *caspase-3* และ *caspase-9* เป็นต้น

ปัจจุบันมีรายงานการทำหน้าที่เป็นยีนส่งเสริมมะเร็งของ *WT1* ในมะเร็งหลายชนิด รวมทั้งในมะเร็งเม็ดเลือดขาวซึ่งเดิมรายงานว่าเป็นยีนยับยั้งมะเร็ง โดยพบ mRNA ของยีน *WT1* ในผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด acute myeloid leukemia จำนวน 354 ราย จากทั้งหมด 476 ราย (ร้อยละ 74) และในผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด acute lymphoblastic leukemia พบจำนวน 86 ราย จากทั้งหมด 131 ราย (ร้อยละ 66)[22] ส่วนในมะเร็งเต้านมคาดว่าสามารถใช้ WT1 ในการพยากรณ์โรคที่ไม่ดีได้ ซึ่งจากการศึกษาระดับของ mRNA และโปรตีน WT1 ในมะเร็งเต้านม โดย Miyoshi และคณะ[16] พบการแสดงออกของยีน *WT1* มากถึงร้อยละ 90 ในขณะที่ไม่พบการแสดงออกของยีน *WT1* เลยในเนื้อเยื่อเต้านมปกติ และจากการศึกษาโดย Oji และคณะ[89] พบยีน *WT1* ในผู้ป่วยมะเร็งเต้านมจำนวน 31 ราย จากทั้งหมด 36 ราย (ร้อยละ 86) นอกจากนี้ Loeb และคณะ[15] ยังพบโปรตีน WT1 ในผู้ป่วยมะเร็งเต้านม 27 ราย จากทั้งหมด 31 ราย แต่พบในเต้านมปกติเพียง 1 ราย จากทั้งหมด 19 ราย ส่วนรายงานของ Dechsukhum และคณะ[90] พบยีน truncated *WT1* ทั้งชนิด (KTS-) และ (KTS+) ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด K562, เซลล์มะเร็งเต้านมเพาะเลี้ยงชนิด MCF-7 และในตัวอย่างเลือดของผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาว

Oji และคณะ[91] ศึกษาการแสดงออกของยีน *WT1* ด้วยวิธี reverse transcriptase-polymerase chain reaction ในเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยง 34 ชนิด และพบยีน *WT1* ในเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยง 28 ชนิด ได้แก่ มะเร็งกระเพาะอาหาร มะเร็งลำไส้ใหญ่ มะเร็งปอด มะเร็งเต้านม เนื้องอกที่เกิดจากเซลล์สืบพันธุ์ต้นกำเนิด (germ cell tumor cell line) มะเร็งรังไข่ มะเร็งมดลูก มะเร็งต่อมไทรอยด์ และมะเร็งตับ โดยพบจำนวน 3, 5, 12, 2, 1, 2, 1, 1 และ 1 ชนิด ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าการยับยั้งยีน *WT1* ด้วย antisense oligomer มีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Navakanit และคณะ[92] ที่ศึกษาในเซลล์มะเร็งเต้านมเพาะเลี้ยงชนิด MCF-7 โดยใช้ siRNA ในการยับยั้งยีน *WT1* แบบชั่วคราว

จากการศึกษาของ Han และคณะ[93] พบว่าเซลล์มะเร็งเต้านมเพาะเลี้ยงชนิด MCF-7 ที่มีการแสดงออกของ WT1 มากกว่าปกติ เกิดการตายแบบอะพอพโทสิสได้น้อยลงเมื่อกระตุ้นด้วยยา tamoxifen และ WT1 ทำให้ estrogen receptor-alpha แสดงออกลดลง ในขณะที่เมื่อใช้ shRNA ยับยั้ง mRNA ของยีน *WT1* แบบชั่วคราวในเซลล์มะเร็งเต้านมเพาะเลี้ยงชนิด MDA468 และ HCC1954 ซึ่งเป็นเซลล์ที่มีการแสดงออกของ WT1 สูง และเป็นเซลล์ที่ให้ผลลบกับ estrogen receptor-alpha พบว่า estrogen receptor-alpha มีการแสดงออกเพิ่มขึ้น และเซลล์มีความไวต่อยา tamoxifen เพิ่มขึ้น (เซลล์ตายมากขึ้น) ซึ่งสามารถเชื่อมโยงผลที่ได้นี้กับการแสดงออกของ WT1 ในมะเร็งเต้านมได้ว่า เมื่อพบการแสดงออกของ

WT1 สูงจะพบการแสดงออกของ estrogen receptor-alpha น้อย หรือให้ผล estrogen receptor-alpha เป็นลบ ซึ่งส่งผลต่อการพยากรณ์โรคที่ไม่ดี

หน้าที่ของ WT1 ในการเป็นยีนส่งเสริมมะเร็งของทั้ง 4 ไอโซฟอร์มหลักได้ดังนี้

1. WT1(17AA-)(KTS-) ทำหน้าที่ส่งเสริมมะเร็งโดยการกระตุ้นโปรโมเตอร์ของยีน *Bcl-2* ในเซลล์มะเร็งกระดูกเพาะเลี้ยงชนิด Saos-2 และเซลล์ไตเพาะเลี้ยงของลิงชนิด CV1[28] หรือกระตุ้นผ่านทาง cytoskeletal โดยทำให้รูปร่างของเซลล์มะเร็งเต้านมเพาะเลี้ยงชนิด ZR-75 และ SKBr3 เปลี่ยนแปลง รวมทั้งสามารถลดการแสดงออกของ alpha-actinin 1 และ cofilin และยังเพิ่มการแสดงออกของ gelsolin ซึ่งมีผลทำให้เซลล์เกิด migration และ invasion ได้มากขึ้น[94] นอกจากนี้ WT1 ยังทำให้ Bfl-1/A1 แสดงออกเพิ่มขึ้น ส่งผลให้เซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงของหนูชนิดไมอีลอยด์ชนิด 32D cl3 ทนต่อยาเคมีบำบัด[95]

2. WT1(17AA+)(KTS-) ทำหน้าที่ต้านการเกิดอะพอพโทสิสในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด K562, HL-60 และ Kasumi-1 โดยเมื่อยับยั้ง mRNA ของยีน *WT1(17AA+)* จะทำให้ caspase-3 และ caspase-9 เพิ่มขึ้น แต่ไม่พบการกระตุ้นการตายแบบอะพอพโทสิสในเซลล์ที่ยับยั้งยีน *WT1(17AA-)* และพบว่าการแสดงออกของ WT1(17AA+)(KTS-) ที่เพิ่มขึ้นในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด K562 มีผลทำให้เซลล์ตายด้วย etoposide และ doxorubicin ลดลง และเซลล์มีการแสดงออกของ Bak ซึ่งเป็นโปรตีนที่ทำให้เกิดการตายแบบอะพอพโทสิสลดลงด้วย จึงสรุปได้ว่า WT1(17AA+)(KTS-) เป็นโปรตีนต้านการตายแบบอะพอพโทสิสผ่านทาง intrinsic pathway ในไมโตคอนเดรีย (mitochondria)[96] นอกจากนี้ WT1(17AA+)(KTS-) ยังกระตุ้นโปรโมเตอร์ของยีน *Bcl-2* และลดการแสดงออกของยีน *Bak* ในเซลล์มะเร็งกระดูกเพาะเลี้ยงชนิด Saos-2 และเซลล์ไตเพาะเลี้ยงของลิงชนิด CV1[28]

3. WT1(17AA-)(KTS+) ทำหน้าที่ต้านการตายแบบอะพอพโทสิสโดยการยับยั้ง caspase 3, caspase 9 และ Bax[28]

4. WT1(17AA+)(KTS+) ทำหน้าที่คล้ายกับ WT1 (17AA-)(KTS+) คือ ยับยั้ง caspases 3, caspase 9 และ Bax[28] และพบว่า WT1(17AA+)(KTS+) ไม่มีผลต่อการแสดงออกของ p21 แต่มีผลเพิ่มการแสดงออกของ Vimentin และช่วยในการย้าย E-cadherin จากเมมเบรนกลับมายังไซโตพลาสซึมส่งผลให้เซลล์เต้านมเพาะเลี้ยงชนิด H16N-2 มีชีวิตรอดและเจริญเติบโตเพิ่มขึ้น[46]

สรุป

WT1 มีบทบาทในการเกิดมะเร็งโดยการทำหน้าที่กระตุ้นหรือยับยั้งการเจริญเติบโตและการแบ่งตัวของเซลล์ รวมทั้งเป็นยีนส่งเสริมและยับยั้งมะเร็ง ซึ่งการทำหน้าที่ที่แตกต่างกันของ WT1 ขึ้นอยู่กับ 3 ปัจจัยหลัก ได้แก่ ชนิดของไอโซฟอร์ม ชนิดของเซลล์ และชนิดของโปรตีนที่ทำงานร่วมกับ WT1 ดังนั้นการศึกษาเพื่อให้เข้าใจหน้าที่ของ WT1 ในมะเร็งหลายๆ ชนิดจึงเป็นสิ่งสำคัญ เนื่องจากไม่สามารถใช้ข้อมูลจากมะเร็งไตหรือมะเร็งเม็ดเลือดขาวไปอธิบายมะเร็งเต้านมและมะเร็งชนิดอื่นได้ นอกจากนี้การใช้ WT1 เป็นตัวติดตามหรือตัวตรวจสอบการเป็นมะเร็ง จำเป็นต้องคำนึงถึงเทคนิคหรือวิธีการตรวจสอบ เนื่องจากยีน *WT1* เป็นยีนที่เกิด alternative splicing หรือ alternative start site ทำให้มีหลายไอโซฟอร์ม ดังนั้นวิธีการที่ใช้จะต้องมีความไวและจำเพาะกับชนิดของ WT1 ในมะเร็งชนิดที่ต้องการศึกษา ทั้งนี้การเข้าใจบทบาทและหน้าที่ของ WT1 กับการเกิดมะเร็งน่าจะเป็นข้อมูลพื้นฐานที่เป็นประโยชน์ในการพัฒนาวิธีการรักษามะเร็งต่อไปในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

1. Garcia M, Jemal A, Ward EM, et al. Global cancer facts & figures 2007. Atlanta: American Cancer Society; 2007.
2. จีริชุดา ปัทมดิลก. สถานการณ์โรคมะเร็งในปัจจุบันและอนาคต [monograph on the Internet]. กรุงเทพมหานคร: โรงพยาบาลศูนย์วิจัยศึกษาและบำบัดโรคมะเร็ง สถาบันวิจัยจุฬาภรณ์; 2552 [เข้าถึง 22 พฤษภาคม 2552]. เข้าถึงได้จาก: http://www.cccthai.org/New-Atticle/2551-12-15_Cause_factor_for_cancer/Cause_factor.html.
3. จีริชุดา ปัทมดิลก. แนวทางการรักษาโรคมะเร็งในปัจจุบันและอนาคต [monograph on the Internet]. กรุงเทพมหานคร: โรงพยาบาลศูนย์วิจัยศึกษาและบำบัดโรคมะเร็ง สถาบันวิจัยจุฬาภรณ์; 2552 [เข้าถึง 22 พฤษภาคม 2552]. เข้าถึงได้จาก: http://www.cccthai.org/New-Atticle/2551-12-15_Risk_of_cancer/2551-12-15_Risk_of_cancer.html.
4. Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics 2007. CA Cancer J Clin 2007;57:43-66.
5. Buckley MF, Sweeney KJ, Hamilton JA, et al. Expression and amplification of cyclin genes in human breast cancer. Oncogene 1993;8:2127-33.
6. Johnston SR, MacLennan KA, Sacks NP, et al. Modulation of Bcl-2 and Ki-67 expression in oestrogen receptor-positive human breast cancer by tamoxifen. Eur J Cancer 1994;30:1663-9.
7. Bic□he I, Nogu□s C, Paradis V, et al. Quantitation of hTERT gene expression in sporadic breast tumors with a real-time reverse transcription-polymerase chain reaction assay. Clin Cancer Res 2000;6:452-9.
8. Berns EM, de Klein A, van Putten WL, et al. Association between RB-1 gene alterations and factors of favourable prognosis in human breast cancer, without effect on survival. Int J Cancer 1995;64:140-5.
9. Krajewski S, Thor AD, Edgerton SM, et al. Analysis of Bax and Bcl-2 expression in p53-immunopositive breast cancers. Clin Cancer Res 1997; 3:199-208.
10. Heimann R, Lan F, McBride R, et al. Separating favorable from unfavorable prognostic markers in breast cancer: the role of E-cadherin. Cancer Res 2000;60:298-304.
11. Inoue K, Sugiyama H, Ogawa 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.
12. Oji Y, Miyoshi S, Maeda H, et al. Overexpression of the Wilms' tumor gene WT1 in de novo lung cancers. Int J Cancer 2002;100:297-303.
13. Oji Y, Yamamoto H, Nomura M, et al. Overexpression of the Wilms' tumor gene WT1 in colorectal adenocarcinoma. Cancer Sci 2003; 94:712-7.
14. Oji Y, Yano M, Nakano Y, et al. Overexpression of the Wilms' tumor gene WT1 in esophageal cancer. Anticancer Res 2004;24:3103-8.
15. Loeb DM, Evron E, Patel CB, et al. Wilms' tumor suppressor gene (WT1) is expressed in primary breast tumor despite tumor specific promoter methylation. Cancer Res 2001;61:921-5.
16. Miyoshi Y, Ando A, Egawa C, et al. High expression of Wilms' tumor suppressor gene predicts poor prognosis in breast cancer patients. Clin Cancer Res 2002;8:1167-71.
17. Silberstein K, Van Horn P, Strickland C, et al. Altered expression of WT1 Wilms' tumor sup-

pressor gene in human breast cancer. Proc Natl Acad Sci USA 1997;94:8132-7.

18. Buckler AJ, Pelletier J, Haber DA, et al. Isolation, characterization, and expression of the murine Wilms' tumor gene (WT1) during kidney development. Mol Cell Biol 1991;11:1707-12.
19. Pritchard-Jones K, Fleming S, Davidson D, et al. The candidate Wilms' tumor gene is involved in genitourinary development. Nature 1990;346: 194-7.
20. Kreidberg JA, Sariola H, Loring JM, et al. WT-1 is required for early kidney development. Cell 1993;74:679-91.
21. Menke A, McInnes L, Hastie ND, et al. The Wilms' tumor suppressor WT1: approaches to gene function. Kidney Int 1998;53:1512-8.
22. Yang L, Han Y, Saurez Saiz F, et al. A tumor suppressor and oncogene: the WT1 story. Leukemia 2007;21:868-76.
23. Hohenstein P, Hastie DN. The many facets of the Wilms' tumour gene, WT1. Hum Mol Genet 2006;15:R196-201.
24. Bruening W, Pelletier J. A non-AUG translational initiation event generates novel WT1 isoforms. J Biol Chem 1996;271:8646-54.
25. Scharnhorst V, Dekker P, van der Eb AJ, et al. Interal translation initiation generates novel WT1 protein isofroms with distinct biological properties. J Biol Chem 1999;274:23456-62.
26. Gessler M, Konig A, Bruns GA. The genomic organization and expression of the WT1 gene. Genomics 1992;12:807-13.
27. Haber DA, Sohn RL, Buckler AJ, et al. Alternative splicing and genomic structure of the Wilms' tumor gene WT1. Proc Natl Acad Sci USA 1991;88:9618-22.
28. Loeb DM. WT1 influences apoptosis through transcriptional regulation of Bcl-2 family members. Cell Cycle 2006;5:1249-53.
29. Maheswaran S, Park S, Bernard A, et al. Physical and functional interation between WT1 and p53 proteins. Proc Natl Acad Sci USA 1993;90:5100-4.
30. Idelman G, Glaser T, Roberts CT Jr, et al. WT1-p53 interactions in insulin-liked growth factor-I receptor gene regulation. J Biol Chem 2003;278: 3474-82.
31. Harada Y, Nonomura N, Nishimura K, et al. WT1 gene expression in human testicular germ-cell tumors. Mol Urol 1999;3:357-64.
32. Hubinger G, Schmid M, Linortner S, et al. Ribozyme-mediated cleavage of wt1 transcripts suppresses growth of leukemia cells. Exp Hematol 2001;29:1226-35.
33. Madden SL, Cook DM, Morris JF, et al. Transcriptional repression mediated by the WT Wilms tumor gene product. Science 1991;253:1550-3.
34. Madden SL, Cook DM, Rauscher III FJ, et al. A structure-function analysis of transcriptional repression mediated by the WT1, Wilms' tumor suppressor protein. Oncogene 1993;8:1713-20.
35. Rauscher FJ. The WT1 Wilms tumor gene product: a developmentally regulated transcription factor in the kidney that functions as a tumor suppressor. FASEB J 1993;7:896-903.
36. Werner H, Re GG, Drummond IA, et al. Increased expression of the insulin-like growth factor I receptor gene, IGF1R, in Wilms tumor is correlated with modulation of IGF1R promoter activity by the WT1 Wilms tumorgene product. Proc Natl Acad Sci USA 1993;90:5828-32.

37. Werner H, Rauscher III FJ, Sukhatme VP, et al. Transcriptional repression of the insulin-like growth factor I receptor (IGF-I-R) gene by the tumor suppressor WT1 involves binding to sequences both upstream and downstream of the IGF-I-R gene transcription start site. J Biol Chem 1994;269:12577-82.
38. Englert C, Hou X, Maheswaran S, et al. WT1 suppresses synthesis of the epidermal growth factor receptor and induces apoptosis. EMBO J 1995;14:4662-75.
39. Drummond IA, Madden SL, Rohwer-Nutter P, et al. Repression of the insulin-like growth factor II gene by the Wilms tumor suppressor WT1. Science 1992;257:674-8.
40. Wang ZY, Madden SL, Deuel TF, et al. The Wilms' tumor suppressor gene product, WT1, repress transcription of the platelet-derived growth factor A chain gene. J Biol Chem 1992; 267:21999-2002.
41. Dey BR, Sukhatme VP, Roberts AB, et al. Repression of the transformimg growth factor-beta1 gene by the Wilms' tumor suppressor WT1 gene product. Mol Endocrinol 1994;8:595-602.
42. Lee SB, Huang K, Palmer R, et al. The Wilms' tumor suppressor WT1 encodes a transcriptional activator of amphiregulin. Cell 1999;98:663-73.
43. Hosono S, Gross I, English MA, et al. E-cadherin is a WT1 target gene. J Biol Chem 2000;275: 10943-53.
44. Oh S, Song Y, Yim J, et al. The Wilms' tumor 1 tumor suppressor gene represses transcription of the human telomerase reverse transcriptase gene. J Biol Chem 1999;274:37473-8.
45. Hewitt SM, Hamada S, McDonnell TJ, et al. Regulation of the proto-oncogene bcl-2 and c-myc by the Wilms' tumor suppressor gene WT1. Cancer Res 1995;55:5386-89.
46. Burwell EA, McCarty GP, Simpson LA, et al. Isoforms of Wilms' tumor suppressor gene (WT1) have distinct effects on mammary epithelial cells. Oncogene 2007;26:3423-30.
47. Caricasole A, Duarte A, Larsson SH, et al. RNA binding by the Wilms' tumor suppressor zinc finger proteins. Proc Natl Acad Sci USA 1996; 93:7562-6.
48. Inoue K, Tamaki H, Ogawa H, et al. Wilms' tumor gene (WT1) compares with differentiation-inducing signal in hematopoietic progenitor cells. Blood 1998;91:2969-76.
49. Han Y, San-Marina S, Liu J, et al. Transcriptional activation of c-myc proto-oncogene by WT1 protein. Oncogene 2004;23:6933-41.
50. Harrington MA, Konicek B, Song A, et al. Inhibition of colony-stimulating factor-1 promoter activity by the product of the Wilms' tumor locus. J Biol Chem 1993;268:21271-5.
51. Nichols KE, Re GG, Yan YX, et al. WT1 induces expression of insulin-like growth factor 2 in Wilms' tumor cells. Cancer Res 1995;55:4540-3.
52. Ward A, Pooler JA, Miyagawa K, et al. Repression of promoters for the mouse insulin-like growth factor II-encoding gene (Igf-2) by products of the Wilms' tumour suppressor gene wt1. Gene 1995;167:239-43.
53. Wang ZY, Qiu QQ, Deuel TF. The Wilms' tumor gene product WT1 activates or suppresses transcription through separate functional domains. J Biol Chem 1993;268:9172-5.
54. Gashler AL, Bonthron DT, Madden SL, et al.

Human platelet-derived growth factor A chain is transcriptionally repressed by the Wilms tumor suppressor WT1. Proc Natl Acad Sci USA 1992; 89:10984-8.

55. Stanhope-Baker P, Williams BR. Identification of connective tissue growth factor as a target of WT1 transcriptional regulation. J Biol Chem 2000;275:38139-50.
56. Zaia A, Fraizer GC, Piantanelli L, et al. Transcriptional regulation of the androgen signaling pathway by the Wilms' tumor suppressor gene WT1. Anticancer Res 2001;21:1-10.
57. Menke AL, Shvarts A, Riteco N, et al. 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 1997;57:1353-63.
58. Liu XW, Gong LJ, Guo LY, et al. The Wilms' tumor gene product WT1 mediates the down-regulation of the rat epidermal growth factor receptor by nerve growth factor in PC12 cells. J Biol Chem 2001;276:5068-73.
59. Webster NJ, Kong Y, Sharma P, et al. Differential effects of Wilms tumor WT1 splice variants on the insulin receptor promoter. Biochem Mol Med 1997;62:139-50.
60. Tajinda K, Carroll J, Roberts CT Jr. Regulation of insulin-like growth factor I receptor promoter activity by wild-type and mutant versions of the WT1 tumor suppressor. Endocrinology 1999; 140:4713-24.
61. Goodyer P, Dehbi M, Torban E, et al. Repression of the retinoic acid receptor-alpha gene by the Wilms' tumor suppressor gene product, wt1. Oncogene 1995;10:1125-9.
62. McCann S, Sullivan J, Guerra J, et al. Repression of the c-myb gene by WT1 protein in T and B cell lines. J Biol Chem 1995;270:23785-9.
63. Udtha M, Lee SJ, Alam R, et al. Upregulation of c-MYC in WT1-mutant tumors: assessment of WT1 putative transcriptional targets using cDNA microarray expression profiling of genetically defined Wilms' tumors. Oncogene 2003;22: 3821-6.
64. Loeb DM, Korz D, Katsnelson M, et al. Cyclin E is a target of WT1 transcriptional repression. J Biol Chem 2002;277:19627-32.
65. Wagner KJ, Patek CE, Miles C, et al. Truncation of WT1 results in downregulation of cyclin G1 and IGFBP-4 expression. Biochem Biophys Res Commun 2001;287:977-82.
66. Englert C, Maheswaran S, Garvin AJ, et al. Induction of p21 by the Wilms' tumor suppressor gene WT1. Cancer Res 1997;57:1429-34.
67. Ryan G, Steele-Perkins V, Morris JF, et al. Repression of Pax-2 by WT1 during normal kidney development. Development 1995;121: 867-75.
68. Li RS, Law GL, Seifert RA, et al. Ornithine decarboxylase is a transcriptional target of tumor suppressor WT1. Exp Cell Res 1999;247:257-66.
69. Moshier JA, Skunca M, Wu W, et al. Regulation of ornithine decarboxylase gene expression by the Wilms' tumor suppressor WT1. Nucleic Acids Res 1996;24:1149-57.
70. Dejong V, Degeorges A, Filleur S, et al. The Wilms' tumor gene product represses the transcription of thrombospondin 1 in response to overexpression of c-Jun. Oncogene 1999;18: 3143-51.

71. Cook DM, Hinkes MT, Bernfield M, et al. Transcriptional activation of the syndecan-1 promoter by the Wilms' tumor protein WT1. Oncogene 1996;13:1789-99.
72. Sim EU, Smith A, Szilagi E, et al. Wnt-4 regulation by the Wilms' tumour suppressor gene, WT1. Oncogene 2002;21:2948-60.
73. Mayo MW, Wang CY, Drouin SS, et al. WT1 modulates apoptosis by transcriptionally upregulating the bcl-2 proto-oncogene. EMBO J 1999;18:3990-4003.
74. Heckman C, Mochon E, Arcinas M, et al. The WT1 protein is a negative regulator of the normal bcl-2 allele in t(14;18) lymphomas. J Biol Chem 1997;272:19609-14.
75. Dame C, Kirschner KM, Bartz KV, et al. Wilms tumor suppressor, Wt1, is a transcriptional activator of the erythropoietin gene. Blood 2006; 107:4282-90.
76. Zapata-Benavides P, Tuna M, Lopez-Berestein G, et al. Downregulation of Wilms' tumor 1 protein inhibits breast cancer proliferation. Biochem Biophys Res Commun 2002;295:784-90.
77. Fraizer G, Leahy R, Priyadarshini S, et al. Suppression of prostate tumor cell growth in vivo by WT1, the Wilms' tumor suppressor gene. Int J Oncol 2004;24:461-71.
78. Zhang TF, Yu SQ, Guan LS, et al. Inhibition of breast cancer cell growth by the Wilm's tumor suppressor WT1 is associated with a destabilization of beta-catenin. Anticancer Res 2003;23: 3575-84.
79. Wang YH, Liu S, Zhang G, et al. Knockdown of c-Myc expression by RNAi inhibits MCF-7 breast tumor cells growth in vitro and in vivo. Breast Cancer Res 2005;7:R220-8.
80. Cheema SK, Mishra SK, Rangnekar VM, et al. Par-4 transcriptionally regulates Bcl-2 through a WT1-binding site on the bcl-2 promoter. J Biol Chem 2003;278:19995-20005.
81. Richard DJ, Schumacher V, Royer-Pokora B, et al. Par4 is a coactivator for a splice isoform-specific transcriptional activation domain in WT1. Genes Dev 2001;15:328-39.
82. Sells SF, Wood Jr DP, Joshi-Barve SS, et al. Commonality of the gene programs induced by effectors of apoptosis in androgen-dependent and -independent prostate cells. Cell Growth Differ 1994;5:457-66.
83. Morrison DJ, English MA, Licht JD. WT1 induces apoptosis through transcriptional regulation of the proapoptotic Bcl-2 family member Bak. Cancer Res 2005;65:8174-82.
84. Loeb DM, Summers JL, Burwell EA, et al. An isoform of the Wilms' tumor suppressor gene potentiates granulocytic differentiation. Leukemia 2003;17:965-71.
85. Li H, Oka Y, Tsuboi A, Yamagami T, et al. The lck promoter-driven expression of the Wilms tumor gene WT1 blocks intrathymic differentiation of T-lineage cells. Int J Hematol 2003; 77:463-70.
86. McMaster ML, Gessler M, Stanbridge EJ, et al. WT1 expression alters tumorigenicity of the G401 kidney-derived cell line. Cell Growth Differ 1995;6:1609-17.
87. Smith SI, Down M, Boyd AW, et al. Expression of the Wilms' tumor suppressor gene, WT1, reduces the tumorigenicity of the leukemic cell

line M1 in C.B-17 scid/scid mice. Cancer Res 2000;60:808-14.

88. Reizner N, Maor S, Sarfstein R, et al. The WT1 Wilms' tumor suppressor gene product interacts with estrogen receptor-alpha and regulates IGF-I receptor gene transcription in breast cancer cells. J Mol Endocrinol 2005;35:135-44.
89. Oji Y, Miyoshi Y, Kiyotoh E, et al. Absence of mutations in the Wilms' tumor gene WT1 in primary breast cancer. Jpn J Clin Oncol 2004; 34:74-7.
90. Dechsukhum C, Ware JL, Ferreira-Gonzalez A, et al. Detection of a novel truncated WT1 transcript in human neoplasia. Mol Diagn 2000;5: 117-28.
91. Oji Y, Ogawa H, Tamaki H, 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.
92. Navakanit R, Graidist P, Leeanansaksiri W, et al. Growth inhibition of breast cancer cell line MCF-7 by siRNA silencing of Wilm tumor 1 gene. J Med Assoc Thai 2007;90:2416-21.
93. Han Y, Yang L, Suarez-Saiz F, et al. Wilms' tumor 1 suppressor gene mediates antiestrogen resistance via down-regulation of estrogen receptor-alpha expression in breast cancer cells. Mol Cancer Res 2008;6:1347-55.
94. Jomgeow T, Oji Y, Tsuji N, et al. Wilms' tumor gene WT1 17AA(-)/KTS(-) isoform induces morphological changes and promotes cell migration and invasion in vitro. Cancer Sci 2006; 97:259-70.
95. Simpson LA, Burwell EA, Thompson KA, et al. The antiapoptotic gene A1/BFL1 is a WT1 target gene that mediates granulocytic differentiation and resistance to chemotherapy. Blood 2006; 107:4695-702.
96. Ito K, Oji Y, Tatsumi N, et al. Antiapoptotic function of 17AA(+)WT1 (Wilms' tumor gene) isoforms on the intrinsic apoptosis pathway. Oncogene 2006;25:4217-29.