

นิพนธ์ต้นฉบับ

**Wilms' tumor gene 17AA(-)/KTS(-) ลดความสามารถในการเกาะพื้นผิว fibronectin
ส่งผลต่อการเปลี่ยนรูปร่างและการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็ง**

ธัญญารัตน์ จอมแก้ว* และ สิ่งหำ ธิมา*

บทคัดย่อ

Wilms' tumor gene (WT1) 17AA(-)/KTS(-) isoform มีผลต่อรูปร่าง การเคลื่อนที่และการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง ซึ่งน่าจะเกี่ยวข้องกับการเกาะพื้นผิวของเซลล์ต่อ extracellular matrix (ECM) และ integrin subunits ซึ่งเป็น receptor ที่เซลล์ใช้จับกับ ECM การศึกษาในครั้งนี้จึงได้ทดสอบผลของ WT1 17AA(-)/KTS(-) ต่อความสามารถในการเกาะพื้นผิว extracellular matrix (ECM) แต่ละชนิดในเซลล์มะเร็ง โดยใช้ ovarian cancer และ fibrosarcoma cell line ซึ่งทำให้มีการแสดงออกของ WT1 17AA(-)/KTS(-) ในระดับสูง เพื่อนำไปศึกษาผลของ WT1 17AA(-)/KTS(-) ต่อการเกาะพื้นผิวของเซลล์ต่อ ECM ต่างชนิดกันคือ Fibronectin, Collagen I และ Laminin โดยใช้ cell adhesion assay พบว่า WT1 17AA(-)/KTS(-) ทำให้เซลล์เกาะพื้นผิว ECM ชนิด Fibronectin ลดลง และไม่เปลี่ยนแปลงใน ECM อื่นๆ แสดงให้เห็นว่า WT1 17AA(-)/KTS(-) น่าจะมีผลต่อกลไกการเกาะพื้นผิวของเซลล์มะเร็ง โดยมีความเป็นไปได้สูงที่จะควบคุมการทำงานของ integrin subunits ที่รับผิดชอบต่อการจับกับ Fibronectin ซึ่งอาจทำให้มีผลต่อการเปลี่ยนรูปร่างของเซลล์และการเคลื่อนที่ของเซลล์ ตลอดจนการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งได้ วารสารเทคนิคการแพทย์เชียงใหม่ 2552; 42: 233-241.

คำรหัส: ดับบลิวที 1 ยีน, อินทิกริน การเกาะพื้นผิวของเซลล์มะเร็ง การแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง

*แขนงวิชาจุลทรรศน์ศาสตร์คลินิก ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Abstract: Wilms' tumor gene 17AA(-)/KTS(-)- reduced ability of cancer cell adhesion to fibronectin substratum

Tanyarat Jomgeow* and Singkome Tima*

Wilms' tumor gene (WT1) 17AA(-)/KTS(-) isoform alters morphological changes, motility and invasion of cancer cells that may involve in cell attachment to extracellular matrix (ECM) and its receptor integrin subunits. The objective of this study is to determine effect of WT1 17AA(-)/KTS(-) cell adhesion on each type of ECM coating substratum in ovarian cancer and fibrosarcoma cell line. Constitutively expression of WT1 17AA(-)/KTS(-) in both cell lines were determined cell adhesion assay to Fibronectin, Collagen I or Laminin substratum compared to mock control cells. We found that WT1 17AA(-)/KTS(-) reduced the ability of cancer cells to Fibronectin substratum. This data suggested that 17AA(-)/KTS(-) may has function in cancer cells adhesion mechanism and may has highly possible to involve the function of Fibronectin substratum binding-integrin subunits that related to cancer cells morphological changes, motility and invasion. Bull Chiang Mai Assoc Med Sci 2009; 42: 233-241.

Keywords: WT1 gene, integrin, cancer cell adhesion, cancer cell metastasis

* Division of Clinical Microscopy, Department of Medical Technology, Faculty of Associated Medical Sciences, Chiang Mai University

บทนำ

Wilms' tumor gene หรือ WT1 gene ถูกจัดให้เป็น tumor suppressor gene ต่อ Wilms' tumor ซึ่งเป็นมะเร็งของไตในเด็กแรกเกิด¹ แต่ในระยะต่อมา มีหลายรายงานได้ศึกษาพบว่า มีการแสดงออกของ WT1 gene ระดับสูงในมะเร็งเม็ดเลือดขาว และ solid tumor หลายชนิด อีกทั้งพบว่าระดับการแสดงออกมีความสัมพันธ์กับมะเร็งในระยะที่สูงขึ้นและมีการพยากรณ์โรคที่เลวลง²⁻¹² นอกจากนี้ยังพบว่า WT1 gene มีองค์ประกอบทางโครงสร้างที่มีคุณสมบัติเป็น transcription factor โดยมีส่วนของ zinc finger domain อยู่ถึง 4 ตำแหน่ง ซึ่งเป็น

DNA-binding domain ควบคุมการแสดงออกของยีนต่างๆ ที่มีความเกี่ยวข้องกับ cell proliferation และ growth factor เช่น PDGF-A chain, CSF-1, IGF-II, GF-IR, RAR- α และ RNA metabolism เป็นต้น¹³ นอกจากนี้ การมี alternative splicing ของ WT1 gene โดยการเติม amino acid 17 ตัว ที่ exon 5 และ amino acid 3 ลำดับ (KTS) ระหว่าง zinc finger domain 3 และ 4 จึงทำให้เกิด WT1 isoform 4 isoform คือ 17AA(+)/KTS(+), 17AA(+)/KTS(-), 17AA(-)/KTS(+), และ 17AA(-)/KTS(-) ตามลำดับแต่ละ isoform มีคุณสมบัติเป็น transcription factor โดยมีการควบคุมยีนแตกต่างกัน นอกจากนี้ WT1 gene ยังมีคุณสมบัติ

anti-apoptosis ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว และเซลล์มะเร็งชนิดก่อนหลายชนิด และมีผลต่อการกระตุ้น cell proliferation ในเซลล์มะเร็ง¹³ จากคุณสมบัติต่างๆ ที่ได้กล่าวมาข้างต้น WT1 gene จึงมีคุณสมบัติเป็นยีนก่อมะเร็งตัวหนึ่ง ซึ่งอาจควบคุมกลไกการเกิดมะเร็งด้วย ผู้วิจัยและคณะ¹⁴ ได้รายงานผลของ WT1 isoform 17AA(-)/KTS(-) ต่อการเปลี่ยนรูปร่างของเซลล์มะเร็ง ความสามารถในการเกาะพื้นผิว การเคลื่อนที่ของเซลล์ และการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง (*in vitro*) พบว่าทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์จาก epithelial cell shape เป็น small round cell shape หรือ fibroblast like shape ความสามารถในการเกาะพื้นผิวลดลง เคลื่อนที่ได้เร็วขึ้น ลักษณะดังกล่าวนี้มักพบในเซลล์มะเร็งที่มีการพัฒนาไปสู่ระยะที่สูงขึ้นและมีการแพร่กระจาย จากนั้นเมื่อมีการขยาย ผลการศึกษาไปในระดับโครงสร้างของเซลล์และกลไกในระดับชีวโมเลกุล พบว่า WT1 17AA(-)/KTS(-) ทำให้ filamentous actin cytoskeleton และ adhesion protein complex มีปริมาณน้อยลง และยังพบว่าเกิดจากการที่ WT1 17AA(-)/KTS(-) ไปควบคุมการแสดงออกของ actin binding protein 3 ชนิด ได้แก่ actinin, cofilin และ gelsolin ซึ่งมีหน้าที่เกี่ยวกับการควบคุม actin cytoskeleton การเคลื่อนที่ของเซลล์ และการเกาะพื้นผิวของเซลล์

ผู้วิจัยได้ทำการศึกษากลไกของ WT1 17AA(-)/KTS(-) ต่อการเกาะพื้นผิวของเซลล์มะเร็ง เนื่องจากเป็นกระบวนการหลักที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงอื่นๆ ได้แก่ รูปร่างและการเคลื่อนที่ของเซลล์ การศึกษาที่ผ่านมาพบว่า WT1 17AA(-)/KTS(-) ทำให้ความแข็งแรงในการเกาะพื้นผิวของเซลล์ลดลง ทำให้เซลล์เคลื่อนที่ได้เร็วขึ้น ซึ่งนอกจากจะเป็นผลจากการควบคุมการแสดงออกของ actinin ซึ่งเป็น adhesion protein แล้ว ยังมีความเป็นไปได้สูงว่า WT1 17AA(-)/KTS(-) อาจมีผลต่อการจับกันของ integrin receptor และ extracellular matrix เนื่องจาก integrin เป็น up stream signaling cascade หนึ่ง ของ adhesion protein complex และ cell motility signaling cascade งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อให้ทราบกลไกของ WT1 17AA(-)/KTS(-) ต่อการเกาะพื้นผิวของเซลล์ ผ่านทาง

integrin signaling cascade โดยศึกษาในเซลล์มะเร็งที่มีการแสดงออกของ WT1 17AA(-)/KTS(-) สูง เพื่อดูผลของ WT1 17AA(-)/KTS(-) ต่อการเกาะพื้นผิวที่มี extracellular matrix (ECM) 3 ชนิด ได้แก่ Fibronectin, Collagen type I และ Laminin โดยใช้ cell adhesion assay ECM แต่ละชนิดจับกับ integrin จำเพาะต่างกัน ซึ่งจะทำให้ทราบว่า WT1 17AA(-)/KTS(-) มีผลต่อ integrin ซึ่งจับกับ ECM ชนิดใด เพื่อเป็นแนวทางในการศึกษาต่อเนื่องถึงกลไกการเปลี่ยนรูปร่างของเซลล์ การส่งเสริมการเคลื่อนที่ของเซลล์ และการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง โดย WT1 17AA(-)/KTS(-)

วัสดุและวิธีการ

การเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็ง

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็ง 2 ชนิด คือ ovarian cancer cell line (TYK-nu.CP-r) และ fibrosarcoma cell line (HT-1080) ที่ถูก transfect ด้วย pcDNA3.1+/ WT1 17AA(-)/KTS(-) isoform plasmid vector และคัดเลือกโคลนที่มีการแสดงออกของ WT1 17AA(-)/KTS(-) ในระดับสูงและมีการแสดงออกที่สม่ำเสมอ (constitutively expression) โดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM ที่มี 10% Fetal Bovine Serum และมี G418 500 ug/ml เป็น selective drug เพาะเลี้ยงในตู้ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% และมีอุณหภูมิ 37°C

siRNA transfection

โคลนที่มีการแสดงออกของ WT1 17AA(-)/KTS(-) ในระดับสูงและมีการแสดงออกที่สม่ำเสมอ ได้ถูกนำมา transfection ด้วย WT1 17AA(-) specific siRNA โดย lipofection kit (Superfect, Qiagen) เพื่อลดระดับการแสดงออกให้เท่ากับเซลล์ดั้งเดิม จากนั้นเก็บเซลล์ที่เวลา 48 ชั่วโมงหลังการ transfection เพื่อทำการทดลองต่อไป

RT-PCR

ตรวจวัดระดับการแสดงออกของ WT1 isoform ด้วย RT-PCR โดย total RNA ถูกสกัดด้วย TRIzol reagent (Invitrogen) จากนั้น ถูกเปลี่ยนเป็น cDNA ด้วย enzyme reverse transcriptase (MMLV-RT, Invitrogen)

และเพิ่มปริมาณ PCR product ด้วย WT1 17AA(+/-) specific primer¹⁴ ตรวจสอบ PCR product โดยผ่านกระแสไฟฟ้าใน 2% agarose และ Gel documentation (Bio-rad)

Cell adhesion assay

เคลือบหลุมทดสอบ (96 well plate) ด้วย fibronectin (10 ug/ml), collagen type I (10 ug/ml) หรือ laminin (2 ug/ml) นานมากกว่าสองชั่วโมงหรือข้ามคืน จากนั้นล้างออกด้วย PBS block ด้วย 0.1% BSA นาน 30 นาที trypsinize และนับเซลล์ที่เลี้ยงไว้ข้ามคืนในสภาวะที่ไม่มี serum และเตรียมเซลล์ให้มีความเข้มข้น 1×10^5 cells/ml ใน DMEM free serum เติมเซลล์ลงใน plate ที่เคลือบไว้ ทิ้งให้เซลล์เกาะพื้นผิวเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นล้างเอาเซลล์ที่ไม่เกาะพื้นผิวออกและนับเซลล์มีชีวิตที่เกาะพื้นผิวเซลล์ โดยการทดลองทั้งหมด ทำมากกว่าสามครั้ง และแต่ละครั้งทำในเวลาที่แตกต่างกัน

การคำนวณทางสถิติ

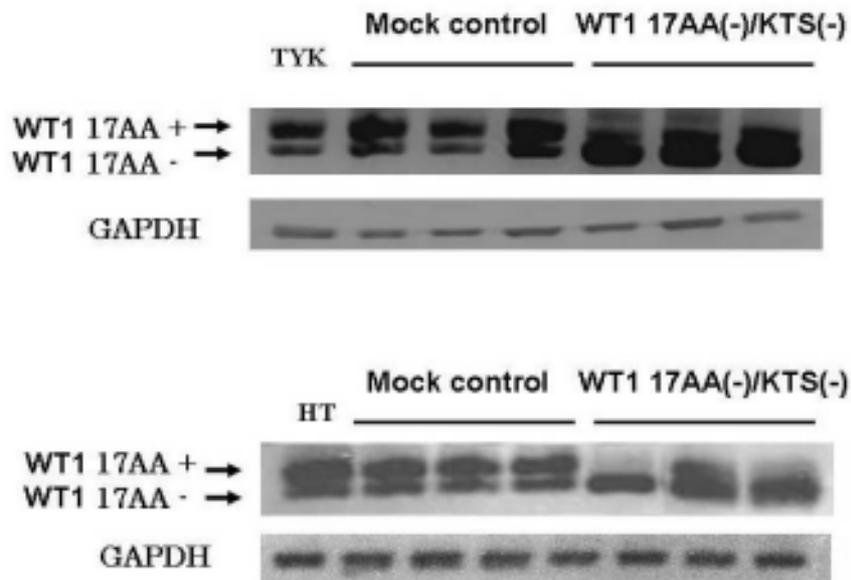
ผลการทดลองที่ได้ นำมาวิเคราะห์เพื่อหา นัยสำคัญทางสถิติด้วย Student t test

ผลการทดลอง

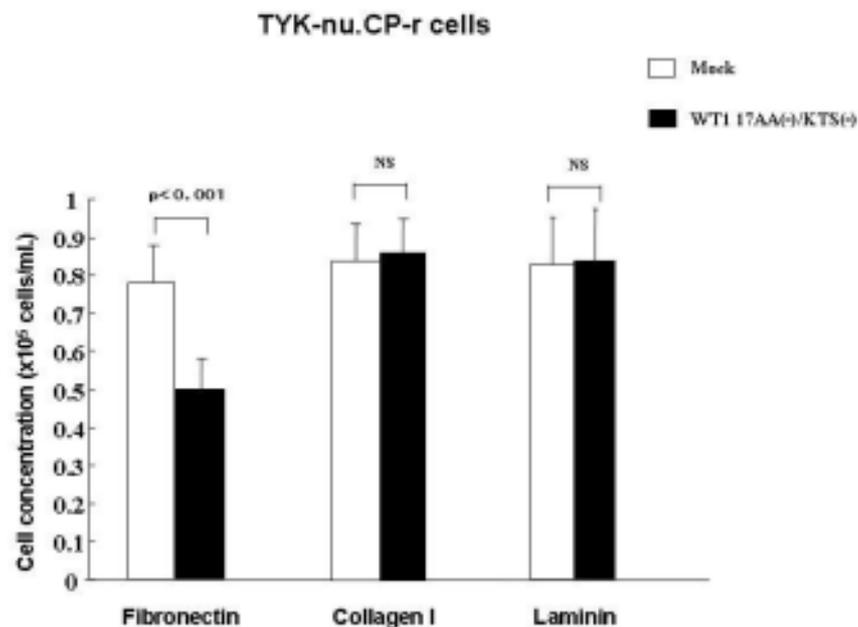
เซลล์ที่มีการแสดงออกของ WT1 17AA(-)/KTS(-) ในระดับสูง และสม่ำเสมอ (constitutively expression clone) ได้ถูก คัดเลือกด้วย G418 (Neomycin derivative) จำนวน 3-5 โคลน เมื่อทำการตรวจสอบระดับการแสดง

ออก ของ WT1 โดย densitometer ดังแสดงในรูปที่ 1 พบว่า ระดับของ WT1 17AA(-) สูงกว่า mock หรือ control cell (empty vector) มากกว่า 3-5 เท่า จากนั้นเซลล์ที่ถูก ทำให้มีระดับการแสดงออกของ WT1 17AA(-)/KTS(-) สูงและสม่ำเสมอ ถูกนำมาทำการทดลอง cell adhesion assay ใน 96 well plate ที่เคลือบด้วย extra-cellular matrix แต่ละชนิด พบว่าเซลล์ทั้งสองชนิด เมื่อมีระดับของ WT1 17AA(-)/KTS(-) สูงขึ้น มีความสามารถในการเกาะพื้นผิว fibronectin ลดน้อยลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยลดลงประมาณ 35-40% เมื่อเทียบกับ mock clones ในขณะที่บนพื้นผิวของ collagen type I และ laminin นั้นเซลล์ยังสามารถในการเกาะพื้นผิวได้เท่ากับ mock clones (รูปที่ 2-3)

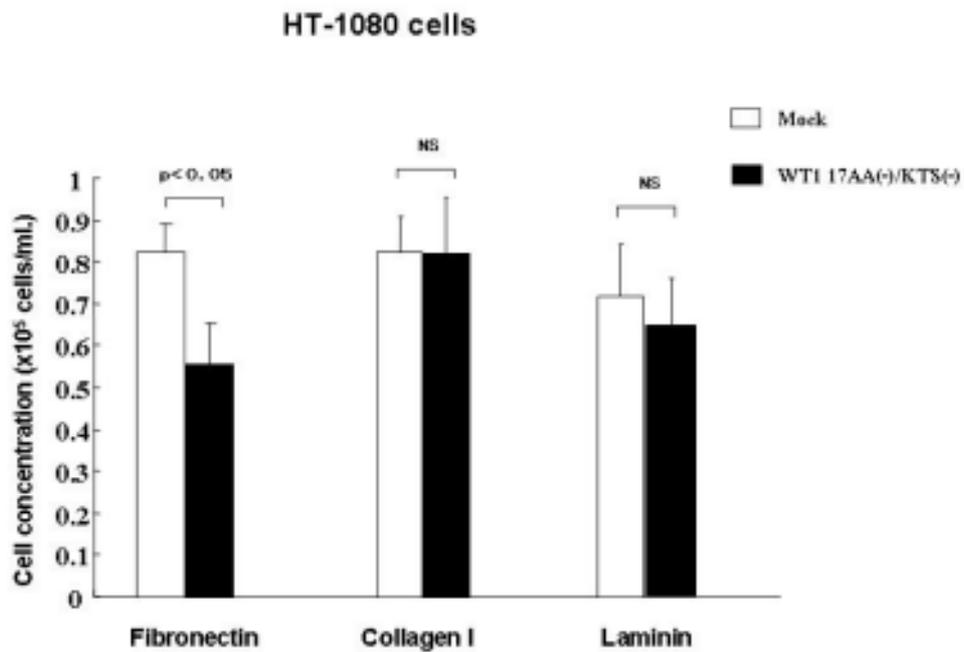
เพื่อเป็นการยืนยันว่า WT1 17AA(-)/KTS(-) มีผลต่อการเกาะพื้นผิว fibronectin ของเซลล์ทั้งสองชนิดจริง จึงได้ทำการลดการแสดงออกของ WT1 17AA(-)/KTS(-) ด้วย WT1 17AA(-) specific siRNA เพื่อทดสอบว่าเมื่อระดับของ WT1 17AA(-)/KTS(-) กลับสู่ภาวะใกล้เคียงกับ control cells แล้ว ความสามารถในการเกาะพื้นผิวของเซลล์ต่อ fibronectin substratum จะกลับคืนสู่ภาวะปกติได้หรือไม่ โดยก่อนการทดสอบ cell adhesion assay ได้ทำการตรวจวัดระดับการแสดงออกของ WT1 mRNA ในเซลล์ที่ได้รับ WT1 17AA(-) specific siRNA เทียบกับ control cells (รูปที่ 4) และเมื่อทำ cell adhesion assay พบว่าความสามารถในการเกาะพื้นผิว fibronectin ของเซลล์ที่ได้ WT1 17AA(-) specific siRNA กลับคืนสู่ปกติ ใกล้เคียงกับ mock control (รูปที่ 5-6)



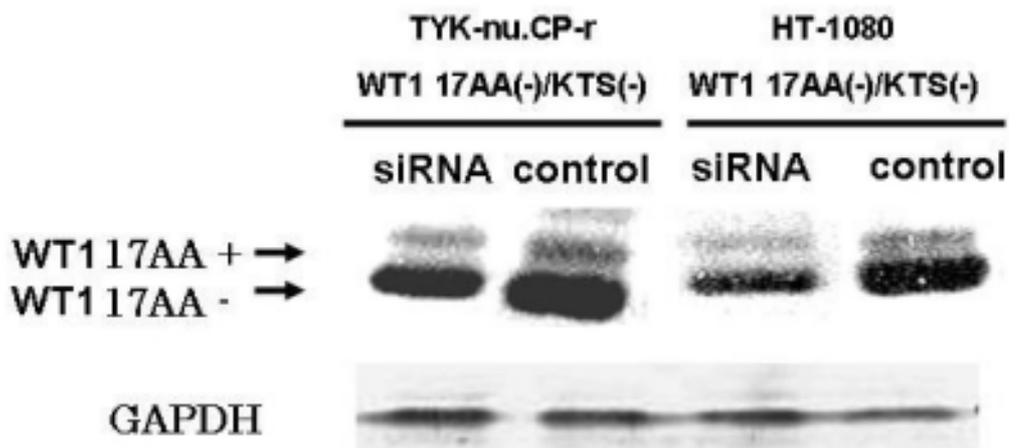
รูปที่ 1 การตรวจสอบ ระดับการแสดงออกของ WT1 gene mRNA โดยวิธี RT-PCR ใน parental cell line ได้แก่ ovarian cancer cell line TYK-nu.CP-r (TYK) และ fibrosarcoma cell line HT-1080 (HT) และ constitutively expression of WT1 17AA(-)/KTS(-) cell clones ที่ผลิตจากเซลล์ทั้งสองชนิด เทียบกับ empty vector control cells (mock control cells) อย่างละ 3 โคลน



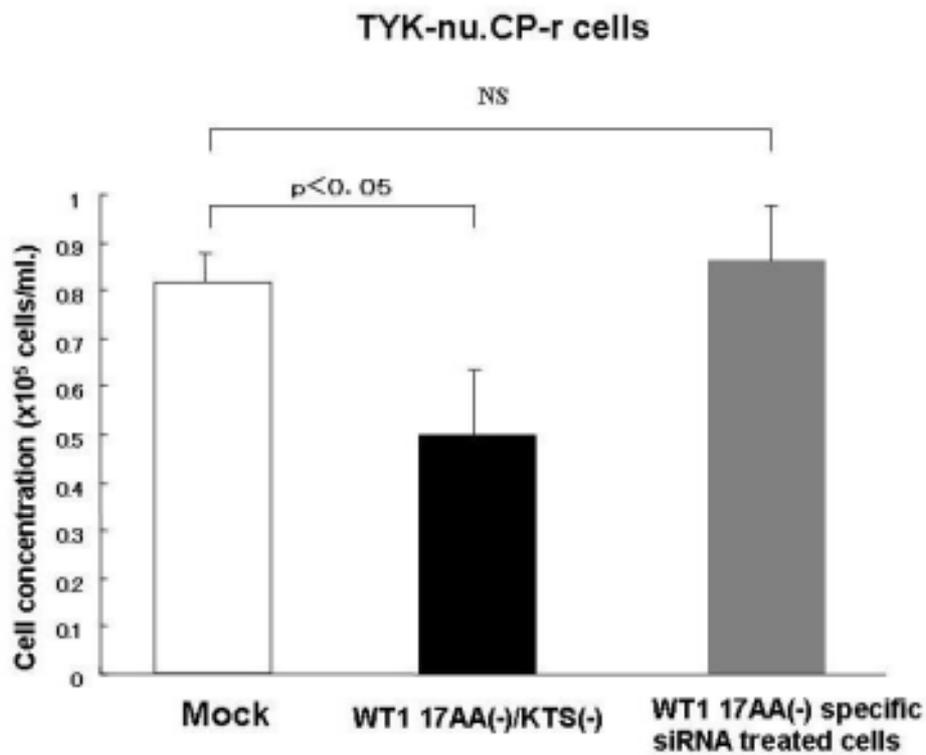
รูปที่ 2 ผลการทดสอบ cell adhesion assay ในเซลล์ที่มีการแสดงออกของ WT1 17AA(-)/KTS(-) สูง และสม่ำเสมอ (กราฟแท่งสีดำ) เทียบกับ mock control cells (กราฟแท่งสีขาว) ใน TYK-nu.CP-r cell line บนพื้นผิวที่เคลือบ ด้วย fibronectin, collagen type I และ laminin



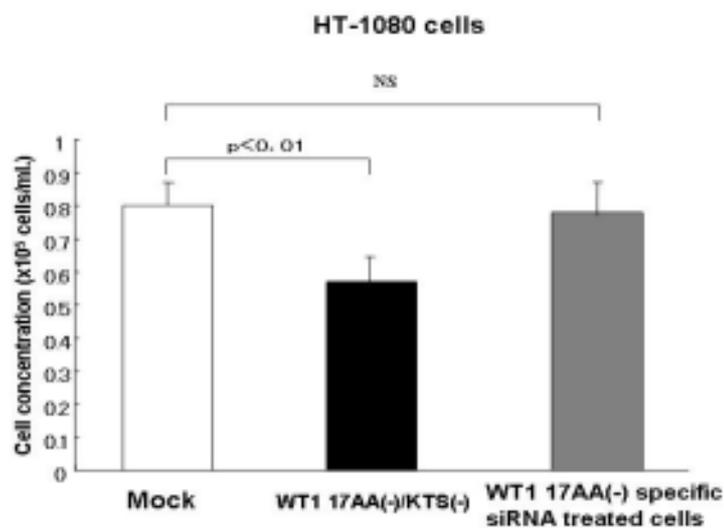
รูปที่ 3 ผลการทดสอบ cell adhesion assay ในเซลล์ที่มีการแสดงออกของ WT1 17AA(-)/KTS(-) สูง และสม่ำเสมอ (กราฟแท่งสีดำ) เทียบกับ mock control cells (กราฟแท่งสีขาว) ใน HT-1080 cell line บนพื้นผิวที่เคลือบด้วย fibronectin, collagen type I และ laminin



รูปที่ 4 ระดับการแสดงออกของ WT1 17AA(-)/KTS(-) mRNA หลัง transfection ด้วย WT1 17AA(-) specific siRNA เทียบกับ control cells



รูปที่ 5 ผลการทดสอบ cell adhesion assay ใน constitutively WT1 17AA(-)/KTS(-) expression clones หลัง transfection ด้วย WT1 17AA(-) specific siRNA เทียบกับ constitutively WT1 17AA(-)/KTS(-) expression clones และ mock control cells ใน TYK-nu.CP-r cell line



รูปที่ 6 ผลการทดสอบ cell adhesion assay ใน constitutively WT1 17AA(-)/KTS(-) expression clones หลัง transfection ด้วย WT1 17AA(-) specific siRNA เทียบกับ constitutively WT1 17AA(-)/KTS(-) expression clones และ mock control cells ใน HT-1080 cell line

สรุปและวิจารณ์ผลทดลอง

จากผลการวิจัยชี้ให้เห็นว่าเมื่อเพิ่มระดับการแสดงออกของ WT1 17AA(-)/KTS(-) ในเซลล์มะเร็ง ovarian cancer cell line และ fibrosarcoma cell line ให้สูงขึ้นมากกว่าระดับปกติถึง 3-5 เท่า ซึ่งเป็นกลไกเลียนแบบให้คล้ายกับสภาวะที่เซลล์มะเร็งมีระดับของ WT1 สูง เมื่ออยู่ในระยะที่ร้ายแรงขึ้น² แล้วนั้น พบว่าเซลล์ดังกล่าวมีความสามารถในการเกาะพื้นผิว fibronectin ลดลงเมื่อเทียบกับ control cells ในขณะที่ไม่มีความเปลี่ยนแปลงเมื่ออยู่บนพื้นผิวของ collagen type I และ laminin นอกจากนี้ เมื่อลดระดับ WT1 17AA(-)/KTS(-) ให้กลับสู่ปกติใกล้เคียงกับ control cells โดยใช้ WT1 17AA(-) specific siRNA เพื่อยับยั้ง การแสดงออกของ WT1 17AA(-)/KTS(-) พบว่า ความสามารถในการเกาะพื้นผิวของเซลล์ดังกล่าวได้กลับคืนเป็นปกติ ซึ่งแสดงว่า WT1 17AA(-)/KTS(-) มีผลต่อเซลล์มะเร็งทั้งสองชนิดในการเกาะพื้นผิว fibronectin และมีความเป็นไปได้สูงมากที่ WT1 17AA(-)/KTS(-) น่าจะมีผลต่อระดับการแสดงออก หรือ การทำงานของ integrin subunits ที่เป็น receptor บนผิวเซลล์ที่รับผิดชอบต่อการจับกับ fibronectin ซึ่งเป็นที่ทราบกันดีว่า integrin protein เป็นด่านแรกของเซลล์ หรือ upstream signaling ที่เกี่ยวข้องกับ กระบวนการ cell adhesion, cell migration และ cancer cell invasion โดยส่งผ่านสัญญาณไปยัง adhesion molecules, actin binding protein และ cell cycle regulation pathway มีรายงานการศึกษาที่ผ่านมากล่าวถึง actin binding protein ทั้งสามชนิดคือ gelsolin, cofilin และ α actinin 1 ซึ่งผู้วิจัยและคณะได้ค้นพบว่าเป็น target protein และถูกควบคุมการแสดงออกโดย WT1 17AA(-)/KTS(-) ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง การเกาะพื้นผิว และการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็ง¹³ นั้น เป็น down stream ใน integrin signaling pathway จึงน่าจะมีความเป็นไปได้ว่า WT1 17AA(-)/KTS(-) อาจมีผลต่อ integrin signaling pathway และส่งผลต่อการแสดงออกของยีนทั้งสามชนิดนี้ได้ ซึ่งไม่น่ามีรายงานว่า WT1 17AA(-)/KTS(-) สามารถควบคุมการแสดงออกของ α 4 integrin subunit¹⁵ ได้โดยตรง และนอกจากนี้ มีรายงานว่า เซลล์มะเร็ง

รังไข่ในระยะแพร่กระจายที่ได้จากผู้ป่วย มีการเกาะพื้นผิวของเซลล์ ลดลงเมื่ออยู่บน fibronectin substratum¹⁶

สิ่งที่น่าสนใจและมีความสำคัญในผลการวิจัยในครั้งนี้คือ ผลที่ได้สามารถนำไปศึกษาต่อเนื่องในระดับการทำงานของ WT1 17AA(-)/KTS(-) ว่ามีผลอย่างไรต่อ integrin subunits ในระดับชีวโมเลกุล ซึ่งจะนำไปสู่การเชื่อมโยงถึงกลไกการทำงานของ WT1 ที่มีผลต่อการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งได้ และอาจเป็นส่วนหนึ่งเพื่อให้ได้มาซึ่งองค์ความรู้ที่สามารถพัฒนาการรักษาโรคมะเร็งต่อไปในอนาคตได้

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณคณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่ได้ให้การสนับสนุนทุนวิจัยในการทำการศึกษาในครั้งนี้ โดยคณะผู้วิจัยได้รับการสนับสนุนจากทุนรายได้คณะเทคนิคการแพทย์ ประจำปี พ.ศ. 2550 และขอขอบคุณภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่ให้การสนับสนุนสถานที่ เครื่องมือ และ อุปกรณ์ ในการศึกษาในครั้งนี้ และขอขอบคุณ ศ.นพ.ฮารุโอะ ชูเกยามา และ รศ.ดร.นพ.ยูซุเกะ โอจิ จากคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยโอซากา ที่เอื้อเฟื้อ เซลล์และพลาสมิดที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

1. Call KM, Glaser T, Ito CY *et al.* Isolation and characterization of a zinc finger polypeptide gene at the human chromosome 11 Wilms' tumor locus. *Cell* 1990; 60: 509-20.
2. 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.
3. 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.
4. Oji Y, Yamamoto H, Nomura M *et al.* Overexpression of the Wilms' tumor gene WT1

- in colorectal adenocarcinoma. *Cancer Sci* 2003; 94: 712-7.
5. Oji Y, Yano M, Nakano Y *et al.* Overexpression of the Wilms' tumor gene WT1 in esophageal cancer. *Anticancer Res* 2004; 24: 3103-8.
 6. Loeb DM, Evron E, Patel CB *et al.* Wilms' tumor suppressor gene (WT1) is expressed in primary breast tumors despite tumor-specific promoter methylation. *Cancer Res* 2001; 61: 921-5
 7. 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.
 8. Oji Y, Miyoshi Y, Koga S *et al.* Overexpression of the Wilms' tumor gene WT1 in primary thyroid cancer. *Cancer Sci* 2003; 94: 606-11.
 9. Oji Y, Nakamori S, Fujikawa M *et al.* Overexpression of the Wilms' tumor gene WT1 in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Sci* 2004; 95: 583-7.
 10. Oji Y, Inohara H, Nakazawa M *et al.* Overexpression of the Wilms' tumor gene WT1 in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Sci* 2003; 94: 523-9.
 11. Ueda T, Oji Y, Naka N *et al.* Overexpression of the Wilms' tumor gene WT1 in human bone and soft-tissue sarcomas. *Cancer Sci* 2003; 94: 271-6.
 12. Oji Y, Suzuki T, Nakano Y *et al.* Overexpression of the Wilms' tumor gene W T1 in primary astrocytic tumors. *Cancer Sci* 2004; 95: 822-7.
 13. Ito K, Oji Y, Tatsumi N *et al.* Antiapoptotic function of 17AA(+)WT1 (Wilms' tumor gene) isoforms on the intrinsic apoptosis pathway. *Oncogene* 2006; 13;25(30):4217-29.
 14. Jomgeow T, Oji Y, Ito K *et al.* Wilms' tumor gene WT1 17AA(-)/KTS(-) isoform induces morphological changes and promotes cell migration and invasion *in vitro*. *Cancer Science* 2003; 97(4): 259-70.
 15. Kirschner MK, Wagner N, Wagner KD *et al.* The Wilms Tumor Suppressor Wt1 promotes cell adhesion through transcriptional activation of alpha4 integrin gene. *The journal of biological Chemistry* 2006; 281(42): 31930-9.
 16. Ahmed N, Riley C, Rice G *et al.* Role of integrin receptor for fibronectin collagen and laminin in the regulation of ovarian carcinoma functions in response to a matrix micro environment. *Clinical and Experimental Metastasis* 2005; 22: 391-402.