

学位論文題名

ras 抑制変異体による腫瘍形質発現の抑制

学位論文内容の要旨

I 研究目的

p21 ras癌原遺伝子産物は、細胞増殖、分化の信号を下流に伝達するスイッチの役目を果たしていると考えられている。また、rasは点突然変異によって腫瘍形質を獲得することが知られており、実際に多くのヒトの癌において活性型突然変異が報告されている。しかし、腫瘍形質の獲得においてrasの活性化が、rasの下流にあると今までに報告されているERKを介する増殖信号伝達系を増強するためなのか、あるいは別の信号伝達系が必要なのかについては明らかになっていなかった。

ras抑制変異体N116Yは腫瘍形質を細胞増殖より強く抑制するため、腫瘍形質発現に関わるシグナルを解析する実験系として有効であると考えられる。そこでこの性質を利用して、正常c-Ha-rasを過剰発現させたNIH3T3由来のトランスフォーマントである18AでN116Yの発現誘導を行い、rasによる腫瘍形質発現を調節することによって、増殖や分化のシグナルと腫瘍形質発現の関係を解析することを試みた。

II 実験方法

細胞：マウス線維芽細胞NIH3T3、これに正常c-H-rasを過剰発現させ形質転換させた細胞株18A、更にこれに抑制変異体N116Yを持続的に発現させた正常復帰株F32、F33。ヒトメタロチオネイン・プロモーターhMT II_AによってN116Y発現誘導可能な細胞株T1、T6、ベクターのみを導入した対照細胞N3を実験に用いた。これらの細胞は10%牛胎児血清(FCS)を含むDMEMを用いて培養した。

またNIH3T3にN116Yを発現させた1-20細胞のみ20%FCSを含むDMEMを用いて培養した。

発現ベクターpHS116の構築と細胞への導入：N116Yの発現誘導を可能にするために、ヒトのメタロチオネイン・プロモーターを持つ発現ベクターpHS 1のマルチクローニング・サイトにN116Yの配列を持つpSVneo/ras2の2.2kbのBam HI-Eco RI フラグメントを挿入し、得られた発現ベクターpHS116はリポフェクチン法によってG418耐性遺伝子をもつpSV2neoとともに18A細胞に導入した。培地中に硫酸カドミウム $3\mu\text{M}$ を添加し、8時間後にTotal RNA抽出し、N116Yの発現をv-H-rasの1.3kbのSst II-Xba I断片をプローブとしたノーザンブロット解析で確認した。

細胞生物学的解析：塩化亜鉛 $100\mu\text{M}$ 存在下で24時間培養し、形態変化を観察した。また、 1×10^4 個の細胞を0.33%の軟寒天培地で培養し、5、10、20%FCS及びEGF刺激による各細胞の足場非依存性増殖を観察した。更に、塩化亜鉛 $100\mu\text{M}$ 添加し、N116Y発現誘導の影響を検討した。

ERK2リン酸化の解析：塩化亜鉛添加によりN116Y発現誘導した後、10%FCSあるいは50ng/mlのEGFまたはPDGFで15分間刺激し、抗ERK2抗体を用いたウエスタンブロット解析によりERK2リン酸化を検出した。

ras結合グアニンヌクレオチドの検出：各細胞を可溶化し、抗rasモノクローナル抗体Y13-259とプロテインAセファロースで作成した複合体と反応させてras p21を免疫沈降した。rasと結合していたグアニンヌクレオチドを薄層クロマトグラフィーで展開し、GTP結合体の比率を求めた。

Ⅲ 結果

抑制変異体N116Yの発現誘導：クローンT1、T7では硫酸カドミウム添加により、低レベルであるが2.5kbのN116Yに特異的なバンドの発現誘導が認められた。同時にN116Yの発現に関連するものと思われる4.4kbのバンドの増強も認められた。一方、対照細胞N3これらのバンドは認められなかった。

N116Y発現誘導による18A由来クローンの形質変化：クローンT1およびT6は塩化亜鉛非存在下で親細胞株18Aと同様な紡錘形あるいは円形の形態を示し、接着性が弱かったが、塩化亜鉛 $100\mu\text{M}$ 存在下では10時間経過から細胞形態が変化しはじめ、約24時間でNIH 3T3に近い扁平な形態を示した。またクローンT1およびT6の軟寒天培地中でのコロニー形成能は、T1、T6、N3共に血清濃度5%ではコロニー形成がほとんど認められなかったが、10%及び20%では10

%程度のコロニー形成が認められた。N116Yを発現誘導により、T1及びT6はほとんどコロニーを形成しなかったが、N3では塩化亜鉛添加による影響はほとんど認められなかった。EGF刺激によるコロニー形成能も、N116Y発現誘導によってほぼ完全に抑制された。

N116Yによる信号伝達抑制機構の解析：ウエスタンブロット解析の結果、N116Yの発現によってEGFによるERK2リン酸化はほぼ完全に抑制されたのに対し、PDGF、FCSではリン酸化抑制はほとんど認められなかった。N116Y安定発現株F32、F33及び1-20も同様の結果だった。

rasp21のGDP/GTP交換反応の解析より18Aにおいて認められた各増殖因子の増殖刺激によるGTP結合型ras p21の増加は、F33においては全く見られなかった。

IV 考察

GDP/GTP交換反応の解析の結果では、N116YはEGF、PDGFおよびFCS刺激によるGTP結合型の生成を抑制していた。このことによってN116Yは細胞内のGDP/GTP交換反応を不活性化し、その結果rasの機能を抑制すると考えられた。またN116Yは、各増殖因子による18Aの軟寒天培地中でのコロニー形成を抑制した。これらの結果から18Aの腫瘍形質発現は増殖刺激によるras活性化に依存し、N116Yがras活性化を抑制することが明らかにした。

しかしPDGFやFCSによるERKリン酸化はN116Yによるrasの抑制下でも起きたことから、これらのリン酸化には必ずしもras活性化を必要としないことが明らかになったが、18AにおいてEGFが関与するERKリン酸化にはrasを介した信号伝達系が必要であることが示された。

このことからERK活性化はrasを介する足場非依存性増殖によって示される腫瘍形質の発現に必ずしも必要ではなく、rasからの信号はERKとは別な分子を介して形質転換を引き起こしている可能性が高いことが示唆された。PDGFやFCSによるERKリン酸化がN116Yのras機能抑制にあまり影響を受けない理由としては、ERKリン酸化が以前より報告されているras-Raf1-MEKの経路以外のPLC- γ やPKCを介した信号伝達系によってある程度代償されることが考えられ、増殖刺激の信号伝達系は複雑なネットワークを形成している可能性があると考えられる。

V 結語

本研究では、rasの活性化の阻害によって、トランスフォーム形態や足場非依存性増殖を抑制したが、PDGFやFCSによるERKリン酸化にはあまり影響がなかった。このことはPDGF,FCSの信号はEGFとは異なった経路でも伝達されること、その経路のうちrasを介する経路が足場非依存性増殖という腫瘍形質発現に重要であることが示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 大 浦 武 彦

副 査 教 授 葛 巻 暹

副 査 教 授 藤 本 征 一 郎

学 位 論 文 題 名

ras 抑制変異体による腫瘍形質発現の抑制

I 研究目的

rasは点突然変異によって腫瘍形質を獲得することが知られているが、増殖信号伝達系を増強するためか、別の信号伝達系が必要かは明らかではなかった。

ras抑制変異体N116Yは腫瘍形質を細胞増殖より強く抑制する。この性質を利用して正常c-Ha-rasを過剰発現させたNIH3T3由来のトランスフォーマントである18AでN116Yの発現誘導を行い、rasによる腫瘍形質発現を調節し、増殖のシグナルと腫瘍形質発現の関係を解析した。

II 実験方法

細胞：マウス線維芽細胞NIH3T3、18A、抑制変異体N116Yを持続的に発現させた正常復帰株F32、F33、1-20。ヒトメタロチオネイン・プロモーターhMT II_AによってN116Y発現誘導可能な細胞株T1、T6、対照細胞N3を実験に用いた。

発現ベクターpHS116の構築と細胞への導入：N116Yの発現誘導をのために、pHS 1にN116Yの配列を挿入し、発現ベクターpHS116を構築し、18A細胞に導入した。培地中に硫酸カドミウムを添加し8時間後にRNAを抽出し、発現をノーザンブロット解析で確認した。

細胞生物学的解析：塩化亜鉛存在下で培養し、形態変化を観察した。また、軟寒天培地で培養しFCS及びEGF、PDGF刺激による各細胞の足場非依存性増殖を観察した。更に、塩化亜鉛を添加し、N116Y発現誘導の影響を検討した。

ERK2リン酸化の解析：N116Y発現誘導し、増殖因子で刺激した後、ウエスタンブロット解析によりERK2リン酸化を検出した。

ras結合グアニンヌクレオチドの検出：各細胞を可溶化しras p21を免疫沈降後、GTP結合体の比率を求めた。

III 結果

抑制変異体N116Yの発現誘導：クローンT1、T7では硫酸カドミウム添加により、2.5kbのN116Yに特異的なバンドと、N116Yに関連すると思われる4.4kbのバンドの増強が認められた。一方、対照細胞N3ではこれらのバンドは認められなかった。

N116Y発現誘導による18A由来クローンの形質変化：クローンT1およびT6は塩化亜鉛非存在下で親細胞株18Aと同様な形態を示したが、塩化亜鉛存在下では約24時間でNIH3T3に近い扁平な形態を示した。軟寒天培地中でのコロニー形成はN116Yを発現誘導により、T1及びT6はほとんどコロニーを形成せず、EGF刺激によるコロニー形成もほぼ完全に抑制されたが、N3では塩化亜鉛添加による影響はほとんど認められなかった。

N116Yによる信号伝達抑制機構の解析：ウエスタンブロット解析の結果、N116Yの発現によってEGFによるERK2リン酸化はほぼ完全に抑制されたが、PDGF、FCSではリン酸化抑制は認められなかった。N116Y安定発現株F32、F33及び1・20も同様の結果だった。

rasp21のGDP/GTP交換反応の解析より、18Aにおいて認められた各増殖因子の増殖刺激によるGTP結合型ras p21の増加は、F33においては全く見られなかった。

IV 考察

N116YはGTP結合型の生成を抑制していた。よってN116YはGDP/GTP交換反応を不活性化し、rasの機能を抑制すると考えられた。また各増殖因子による18Aの軟寒天培地中でのコロニー形成を抑制した。これらの結果から18Aの腫瘍形質発現は増殖刺激によるras活性化に依存し、N116Yがras活性化を抑制することを明らかにした。

PDGFやFCSによるERKリン酸化はN116Yによるrasの抑制下でも起きたことから、これらのリン酸化には必ずしもras活性化を必要としないことが明らかになったが、EGFでは必要であることが示された。

以上からERK活性化はrasを介する足場非依存性増殖によって示される腫瘍形質の発現に必ずしも必要ではなく、rasからの信号はERKとは別な分子を介して形質転換を引き起こしている可能性が高いことが示唆された。

V 結語

本研究ではrasの活性化の阻害によって、トランスフォーム形態や足場非依存性増殖を抑制したが、PDGFやFCSによるERKリン酸化にはあまり影響がないことを示した。このこと増殖信号が複数の経路で伝達され、そのうちrasを介する経路が腫瘍形質発現に重要であることが初めて明らかにされた。この結果は創傷治癒、腫瘍遺伝子の治療の両面から今後の臨床への発展が期待される。

口頭発表に際し、N116Yの性質、現在の情報伝達系の研究の結果から考えられるras以外の増殖信号伝達経路についての質問があったが、著者は概ね適切な回答を行った。また引き続き行われた副査の葛巻教授、藤本教授の個別審査の結果、合格と判定された。

以上のことから博士（医学）学位に妥当なものと判断される。