

学位論文題名

Suppression of Pancreatic Cancer by the Dominant Negative *ras* Mutant, N116Y

-Gene Therapy for Pancreatic Cancer by *ras* Suppressor-

(*ras*抑制変異体N116Yによる, 膵癌細胞株の抑制効果)

(-*ras*抑制変異体による, 膵癌の遺伝子治療-)

学位論文内容の要旨

緒言

ヒト膵癌において、K-*ras*癌原遺伝子におけるコドン12/13の点突然変異は非常に高頻度に認められる遺伝子変異であり、前癌病変においても変異が認められるとの報告もなされている。これらの事実は、膵癌の発生、増殖におけるRASの活性化が極めて重要な要素であることを示唆しており、活性化RASをターゲットとし、これを抑制することにより、膵癌の増殖を抑制し、治療応用しうることが予想される。

一方、われわれは、v-H-*ras*の116番目のコドンのアスパラギンからチロシンに置換して得られたH-*ras*抑制変異体、N116Yが、RASタンパクに対してdominant negativeな抑制効果を有しており、RAS以降のシグナル伝達を阻害することにより、NIH/3T3細胞におけるc-H-*ras*の過剰発現及びチロシンキナーゼ癌遺伝子によるトランスフォーム能を抑制し(Ogiso. *et al*; Exp Cell Res, 208)、胃癌(NKPS, TMK1)、膀胱癌(T24)などの様々な腫瘍細胞株の増殖を抑制することを既に報告してきた(Ogiso. *et al*; Gene Therapy, 1)。またヒト慢性骨髄性白血病細胞株(K562)においては、N116Yがアポトーシスを伴う細胞死を引き起すことを明らかにした(Sakai. *et al*; Exp Cell Res, 215)。

本論文において我々は、膵癌細胞におけるRASタンパクの機能を阻害することにより細胞増殖を抑制し、腫瘍形質を喪失させることを目的に、H-*ras*抑制変異体N116Yを用い、膵癌細胞株に対して遺伝子導入した。実験には膵癌細胞株8株を用い(PCI 10, 19, 24, 35, 43, 55, 64, 66)、これらに対しN116Yの発現ベクターであるpZIP-N116Yをリポフェクション法により遺伝子導入し、膵癌細胞株に対するN116Yの増殖抑制効果及び腫瘍形質に対する作用を検討し、治療遺伝子としての可能性を探った。

材料と方法

N116Yの発現ベクターであるpZIP-N116Yを膵癌細胞株8株(PCI 10, 19, 24, 35, 43, 55, 64, 66)に対し、リポフェクション法を用い遺伝子導入し、N116Yの増殖抑制効果を検討した。実験に先立ち、各細胞株の*ras*変異をPCR-SSCP法により検索した。

N116Yの遺伝子導入による増殖抑制効果の評価は、各膵癌細胞株に対して LIPOFECTIN (GIBCO BRL) を用いて、pZIP-N116Yを遺伝子導入した後に、G418 (GENETCIN : GIBCO BRL) 添加培地下に形成されたコロニー数を集計し、対照群を pZIP neo SV(X)とした際のコロニー形成率との比を増殖抑制率として算出し、検討した。

さらに、N116Yの腫瘍形質に対する効果を検討するため、PCI 35におけるN116Y導入膵癌細胞株 (PCI 35 N116Y-3, -4, -6, -7) をクローン化し、樹立した。各クローンにおけるN116Yの遺伝子導入と発現は、PCR法及びRT-PCR法により確認した。対照群としてpZIP neo SV(X)導入株 (PCI 35 neo-2, -3, -6)を樹立しこれを使用した。これらのクローンを用い、軟寒天培地下での増殖能及びヌードマウスにおける造腫瘍性に対するN116Yの遺伝子導入による効果を評価した。軟寒天培地下での増殖能の比較は、親株 (PCI35) 及び、N116Y発現膵癌細胞株 (PCI 35 N116Y-3, -4, -6, -7) 並びに、pZIP neo SV(X) 導入株 (PCI 35 neo-2, -3, -6) の各 5×10^3 個の細胞を、0.33% Agar Noble (DIFCO) を含む培地下に4週間培養した後、コロニー数を集計し、散布した細胞あたりのコロニー形成率を算出し検討した。ヌードマウスにおける造腫瘍性は、N116Y発現膵癌細胞株 (PCI 35 N116Y-3, -4, -6, -7) 及び、pZIP neo SV(X) 導入株 (PCI 35 neo-2, -3, -6) のそれぞれについて、 1×10^6 、或いは 2×10^6 個の細胞を、ヌードマウス (KSN Slc) の皮下に移植し、4週後の腫瘍形成の有無を比較検討した。

結果

実験に先立ち、膵癌細胞株8株のK-ras変異をPCR-SSCP法により検索したところ、全ての細胞株でK-rasのコドン12/13における変異を認めた。H-ras及びN-rasの変異は認めなかった。これらの膵癌細胞株8株に対するpZIP-N116Yの遺伝子導入によるG418選択培地下でのコロニー形成は、K-ras変異の存在にかかわらず強力に抑制された。特に、PCI 10, 24, 64の3株においては、細胞増殖が完全に抑制され (100%)、全ての細胞株において80%以上の増殖抑制率を呈した (PCI 19; 84.6%, PCI 35; 87.8%, PCI 43; 96.5%, PCI 66; 87.0%, PCI 66; 92.7%)。

次に、N116Yの腫瘍形質に対する効果を検討するために、PCI 35に対するpZIP-N116Yの遺伝子導入後のG418耐性コロニーより、N116Yが安定して遺伝子導入され、発現している4株をクローン化した (PCI 35 N116Y-3, -4, -6, -7)。これらのN116Y発現膵癌細胞株は、親株 (PCI 35) 及びpZIP neo SV(X)導入株 (PCI 35 neo-2, -3, -6) と比較し、円形或いは島状のコロニーを形成し、進展性の喪失を示唆する形態変化を来した。また、軟寒天培地における増殖能を比較したところ、N116Y発現膵癌細胞株では、有意にコロニー形成率が低下しており (N116Y-3; 2%, N116Y-4; 9%, N116Y-6; 5%, N116Y-7; 6% に対し、neo-2; 56%, neo-3; 70%, neo-6; 77%)、N116Yの遺伝子導入により親株の持つ腫瘍形質の一つである、足場非依存性増殖能が強力に抑制されたことを示した。さらに、これらのクローンのヌードマウスにおける造腫瘍性を検討したところ、pZIP neo SV(X)導入株は、4週までに全てのクローンで腫瘍を形成したのに対し、N116Y発現膵癌細胞株は、いずれも腫瘍を形成せず、N116Yの遺伝子導入により造腫瘍性が喪失したことを示した。

結論

本研究により、N116Yが膵癌細胞株に対して、強力な増殖抑制効果を有するこ

と証明した。また、N116Yの遺伝子導入により、腓癌細胞株の持つ腫瘍形質である足場非依存性増殖能及び、ヌードマウスにおける造腫瘍性が喪失することを示した。これらの結果より、N116Yが腓癌をはじめとする*ras*変異を有する癌に対する遺伝子治療の候補となり得ることが示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 細 川 眞澄男

副 査 教 授 葛 巻 暹

副 査 教 授 加 藤 紘 之

学 位 論 文 題 名

Suppression of Pancreatic Cancer by the Dominant Negative *ras* Mutant, N116Y

- Gene Therapy for Pancreatic Cancer by *ras* Suppressor -

(*ras*抑制変異体N116Yによる、膵癌細胞株の抑制効果)

(-*ras*抑制変異体による、膵癌の遺伝子治療-)

ヒト膵癌において、K-*ras* 変異は高率に認められる遺伝子変異であり、前癌病変においても変異を認める。これらの事実より、膵癌の発生、増殖において、RASの活性化は極めて重要な要素であり、活性化RASをターゲットとし、これを抑制することにより、膵癌の増殖を抑制しうることが予想される。本論文において、膵癌細胞におけるRAS機能を阻害することにより、細胞増殖を抑制し、腫瘍形質を喪失させることを目的に、*ras* 抑制変異体N116Yを用いた。実験には膵癌細胞株8株を用い、これらに対しN116Yをリポフェクション法により遺伝子導入し、膵癌細胞株に対するN116Yの増殖抑制効果及び腫瘍形質に対する作用を検討し、治療遺伝子としての可能性を探った。

N116Yの発現ベクターであるpZIP-N116Yを作成し、これをPCR-SSCP法によりK-*ras* 変異を確認した膵癌細胞株8株 (PCI 10, 19, 24, 35, 43, 55, 64, 66) に対し、リポフェクション法を用い遺伝子導入した。LIPOFECTIN (GIBCO BRL)を用いた遺伝子導入後、G418 (GENETCIN: GIBCO BRL) 選択培地下に形成されたコロニー数を集計し、対照群をpZIP *neo* SV(X)とした際の増殖抑制率を算出し、N116Yの増殖抑制効果を検討したところ、pZIP-N116Yの遺伝子導入により、各膵癌細胞株の増殖はK-*ras* 変異の存在にかかわらず強力に抑制された。特に、PCI 10, 24, 64の3株においては、細胞増殖が完全に抑制され (100%)、他の8株において80%以上の増殖抑制率を呈した (PCI 19; 84.6%, PCI 35; 87.8%, PCI 43; 96.5%; PCI 66; 87.0%, PCI 66; 90.8%)。さらに、N116Yの腫瘍形質に対する影響を検討するため、pZIP-N116Y導入膵癌細胞株 (PCI 35 N116Y-3, -4, -6, -7) をクローン化した。各クローンにおけるN116Yの遺伝子導入と発現は、PCR法及びRT-PCR法により確認した。対照群としてpZIP *neo* SV(X)導入株 (PCI 35 *neo*-2, -3, -6)を用いた。これらのN116Y導入

株は、円形或いは島状のコロニーを形成し、進展性の喪失を示唆する形態変化を来たした。さらにこれらのクローンに対し、親株の持つ癌形質である足場非依存性増殖能及びヌードマウスにおける造腫瘍性を検討した。足場非依存性増殖能の比較のために、 5×10^3 個の細胞を、0.33% の軟寒天培地下に4週間培養した後のコロニー形成率を算出したところ、N116Y導入株では、コロニー形成率が低下しており（PCI 35 N116Y-3; 2%, -4; 9%, -6; 5%, -7; 6% に対し、PCI 35 neo-2; 56%, -3; 70%, -6; 77%）、N116Yの遺伝子導入により、足場非依存性増殖能が抑制されたことを示した。次に、ヌードマウスにおける造腫瘍性の検討のために、neo導入株（PCI 35 neo-2, -3, -6）及び、N116Y導入株（PCI 35 N116Y-3, -4, -6, -7）それぞれを、 1×10^6 、或いは 2×10^6 個を、ヌードマウス（KSN Slc）の皮下に移植し、4週後の腫瘍形成の有無を比較したところ、neo導入株（PCI 35 neo-2, -3, -6）の全てで腫瘍を形成したのに対し、N116Y導入株（PCI 35 N116Y-3, -4, -6, -7）は、いずれも腫瘍を形成せず、N116Yの遺伝子導入により造腫瘍性が喪失したことを示した。

以上の結果により、N116Yが膀胱癌細胞株に対して、強力な増殖抑制効果を有すること証明した。また、N116Yの遺伝子導入により、膀胱癌細胞株の持つ腫瘍形質である足場非依存性増殖能及び、ヌードマウスにおける造腫瘍性が喪失することを示した。

これらの結果より、N116Yが膀胱癌に対する遺伝子治療の候補となり得ることが示唆された。

口頭発表において、篠原信雄助手より、N116Yの活性化RASに対する抑制効果の作用機序について、葛巻暹教授より、臨床応用に際しての問題点となりうる、導入方法、危険性について、他の遺伝子との相違点について、加藤紘之教授より、実験における問題点として、PCI 35以外の細胞株についてのクローニング実験の有無について、ヌードマウスにおける造腫瘍性の喪失の理由について、実際の治療法の可能性の有無について、膀胱癌におけるK-ras変異の原因について、細川眞澄男教授より、N116Yを用いた理由について、K-ras, H-ras の相違点についての質問があつたが、申請者は、おおむね妥当な回答をした。

膀胱癌に対する遺伝子治療の可能性を示唆した本研究の意義は大きく、審査員協議の結果、本論文は、博士（医学）の学位授与に値するものと判定する。