

学 位 論 文 題 名

Gelsolin: A Candidate for Suppressor of Human Bladder Cancer

(ゲルゾリン：ヒト膀胱癌における癌抑制遺伝子の一候補)

学位論文内容の要旨

研究 目 的

膀胱癌の発癌初期に見られる遺伝子異常のうち、第9染色体短腕12から長腕34.1までのヘテロ接合性の消失(Loss of Heterozygosity; LOH)が重要とされており、また近年この領域に膀胱癌の癌抑制遺伝子が存在する可能性が指摘されている。アクチン調節蛋白質であるゲルゾリンをコードする遺伝子は第9染色体長腕33に座位し、しかもヒト活性化H-*ras*癌遺伝子により癌化したマウス線維芽細胞(EJ-NIH3T3)にゲルゾリン遺伝子を導入することにより、この細胞の腫瘍形質能を抑制することが知られている。そこで、ヒト膀胱癌細胞株及び組織におけるゲルゾリンの発現及び膀胱癌細胞株におけるゲルゾリン遺伝子の腫瘍形質に与える影響について検討し、ヒト膀胱癌におけるゲルゾリン遺伝子の役割を明らかにした。

対 象 及 び 方 法

ヒト膀胱癌細胞株DAB-1, EJ, MGH-U1, T24, UMUC-2, UMUC-6の計6株及び手術より得られたヒト膀胱癌組織18例ならびに正常ヒト膀胱粘膜上皮を対象とした。各膀胱癌細胞株から全RNAと蛋白質を、各膀胱癌細胞株及び組織から蛋白質を抽出しゲルゾリンの発現についてノーザンブロット法、ウエスタンブロット法により正常ヒト膀胱粘膜上皮をコントロールとして比較し検討した。さらに、膀胱癌細胞株及び組織についてゲルゾリン免疫組織化学染色法により正常ヒト膀胱粘膜上皮と比較し検討した。また、軟寒天培地内コロニー形成能による腫瘍形質は、 1×10^4 細胞を軟寒天培地内にまき3週間後のコロニー形成数をカウントし検討した(triplicate)。造腫瘍性の検討は、ヒト膀胱癌細胞株UMUC-2へヒト(pLKCG), マウス(pLK319)野生型ゲルゾリン遺伝子及びコントロールベクター(LK444)をリポフェクション法により導入した各々のクローンを用い、各々を 3×10^6 細胞ずつ3週齢雄ヌードマウス皮下に移植し検討した。

結 果

(1)膀胱癌細胞株及び組織におけるゲルゾリン発現：ノーザンブロット法のプローブにはマウス野生型ゲルゾリンcDNA全長を用い、膀胱癌細

胞株6株について検討した。膀胱癌細胞株6株全例とも正常ヒト膀胱粘膜上皮に比べゲルゾリンmRNAの発現は非常に低く、またDAB-1, UMUC-6ではmRNAの発現は認められなかった。また、ウエスタンブロット法及び免疫組織化学染色法には抗ヒトゲルゾリンマウスモノクローナル抗体を用い、膀胱癌細胞株及び組織で検討した。ノーザンブロット法と同様、膀胱癌細胞株6株全例とも正常ヒト膀胱粘膜上皮に比べゲルゾリン発現は非常に低く、またDAB-1, UMUC-6ではその発現は認められなかった。さらに、膀胱癌組織18例のうち14例(77.8%)においても正常ヒト膀胱粘膜上皮に比べゲルゾリンの発現は低下していた。また、膀胱癌組織18例のうちゲルゾリン発現の低下がウエスタンブロット法にて認められなかった4症例において、癌細胞以外の平滑筋や血管内皮などにゲルゾリン発現を免疫組織化学学的に認め、膀胱癌腫瘍細胞でのゲルゾリン発現の低下が確認された。

(2)膀胱癌細胞株へのゲルゾリン遺伝子導入による生物学的解析：膀胱癌細胞株UMUC-2へヒト(pLKCG), マウス(pLK319)野生型ゲルゾリン遺伝子及びコントロールベクター(LK444)をリポフェクション法により導入し、ヒトゲルゾリン(UCG-a, UCG-b), マウスゲルゾリン(U319-a, U319-b)及びコントロール(Uneo-a, Uneo-b)の安定発現株を各々2クローンずつ得た。コントロールクローン(Uneo-a, Uneo-b)に比べヒトゲルゾリン発現クローン(UCG-a, UCG-b)では細胞の分化傾向が形態学的に観察された。軟寒天培地内コロニー形成能はコントロールクローンではUneo-a; $26.8 \pm 0.7\%$, Uneo-b; $24.0 \pm 2.4\%$ であったのに対し、ヒトゲルゾリンはUCG-a; $11.2 \pm 1.7\%$, UCG-b; $18.4 \pm 1.6\%$, マウスゲルゾリンはU319-a; $12.1 \pm 1.2\%$, U319-b; $18.2 \pm 1.7\%$ と有意に低く($p < 0.01$; unpaired *t* test), 腫瘍形質能の低下を認めた。また、ヌードマウス皮下移植による造腫瘍性の検討ではコントロールクローンではUneo-a; 4/4, Uneo-b; 3/3と全例に腫瘍形成を認めたのに対し、ヒトゲルゾリンではUCG-a; 0/5, UCG-b; 0/5, マウスゲルゾリンではU319-a; 0/5, U319-b; 2/5とマウスゲルゾリンのU319-bクロノンのうち5匹中2匹のみに腫瘍形成を認めた。

考案

今回の検討から、ゲルゾリンは膀胱癌においてその発現が低下・消失しており、また膀胱癌細胞株UMUC-2にゲルゾリン遺伝子を導入することにより癌の腫瘍形質を抑え、さらにヌードマウス皮下移植において腫瘍抑制的に作用することが指摘された。一般に、ゲルゾリンはカルシウム結合型アクチン調節蛋白質であり、その発現は細胞の分化・癌化など細胞骨格の変化に伴いその発現は変化する。実際に、ヒト活性化H-ras癌遺伝子やSV40により癌化したマウス線維芽細胞や胃癌においてもその発現は低下していることが報告されている。また、骨髓細胞であるU937やHL60などを薬剤により分化させるとゲルゾリンmRNAの発現は約60倍に増加すること、膀胱癌細胞株T24をトリコスタチンAにて処理するとゲルゾリン遺伝子導入と同様な分化を示す形態学的変化を認め、ゲルゾリン発現も約7倍に増加することが報告されている。

最近、第9染色体短腕16にあるMTS-1遺伝子が癌抑制遺伝子として同定されたが、第9染色体長腕に存在する癌抑制遺伝子は未だに同定されていない。肺小細胞癌や髄膜芽細胞腫などにおいてもゲルゾリン遺伝子を含んだ領域の欠損が報告されている。ゲルゾリンは膀胱癌においてその発現が低下・消失していること、また腫瘍抑制効果を有することなどか

ら癌抑制遺伝子の一つである可能性が指摘される。大腸癌における Vogelstein modelと同様に、膀胱癌の発癌過程においてもこれに近似したmodelの存在が推測され、ゲルゾリン遺伝子は膀胱の発癌初期に関与する可能性が指摘された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 細 川 眞澄男

副 査 教 授 小 柳 知 彦

副 査 教 授 葛 巻 暹

学 位 論 文 題 名

Gelsolin: A Candidate for Suppressor of Human Bladder Cancer

(ゲルゾリン：ヒト膀胱癌における癌抑制遺伝子の一候補)

膀胱癌の発癌初期に見られる遺伝子異常のうち、第9染色体短腕12から長腕34.1までのヘテロ接合性の消失(LOH)が重要とされており、近年この領域に膀胱癌の癌抑制遺伝子が存在する可能性が指摘されている。アクチン調節蛋白質であるゲルゾリンをコードする遺伝子は第9染色体長腕33に座位し、しかもヒト活性化H-ras癌遺伝子により癌化したマウス線維芽細胞(EJ-NIH3T3)にゲルゾリン遺伝子を導入することにより、この細胞の腫瘍形質が抑制されることが知られている。そこで、ヒト膀胱癌細胞株及び組織におけるゲルゾリンの発現及び膀胱癌細胞株におけるゲルゾリン遺伝子の腫瘍形質に与える影響について検討し、ヒト膀胱癌におけるゲルゾリン遺伝子の役割を明らかにした。ヒト膀胱癌細胞株DAB-1, EJ, MGH-U1, T24, UMUC-2, UMUC-6の計6株及び手術より得られたヒト膀胱癌組織18例ならびに正常ヒト膀胱粘膜上皮を対象とした。各膀胱癌細胞株から全RNAを、各膀胱癌細胞株及び組織から蛋白質を抽出しゲルゾリンの発現について、正常ヒト膀胱粘膜上皮をコントロールとしてノーザンブロット法、ウエスタンブロット法により、さらに膀胱癌細胞株及び組織についてゲルゾリン免疫組織化学染色法により正常ヒト膀胱粘膜上皮と比較し検討した。また、軟寒天培地内コロニー形成能およびヌードマウス皮下移植による造腫瘍性により腫瘍形質の検討を行った。

ノーザンブロット法では、膀胱癌細胞株6株全例とも正常ヒト膀胱粘膜上皮に比べゲルゾリンmRNAの発現は非常に低く、またDAB-1, UMUC-6ではmRNAの発現は認められなかった。また、ウエスタンブロット法においてもノーザンブロット法と同様、膀胱癌細胞株6株全例とも正常ヒト膀胱粘膜上皮に比べゲルゾリン蛋白発現量は非常に低く、またDAB-1, UMUC-6ではその発現は認められなかった。さらに、膀胱癌組織18例のうち14例(77.8%)においても正常ヒト膀胱粘膜上皮に比べゲルゾリンの発現は低下していた。また、膀胱癌組織18例のうちゲ

ルゾリン発現の低下がウエスタンブロット法にて認められなかった4症例においては、癌細胞以外の平滑筋や血管内皮などにはゲルゾリン発現を免疫組織化学染色学的に認め、膀胱癌の腫瘍細胞でのゲルゾリン発現の特異的低下が確認された。膀胱癌細胞株UMUC-2へヒト(pLKCG)、マウス(pLK319)野生型ゲルゾリン遺伝子及びコントロールベクター(LK444)を導入し、ヒトゲルゾリン(UCG-a, UCG-b)、マウスゲルゾリン(U319-a, U319-b)及びコントロール(Uneo-a, Uneo-b)の安定発現株を各々2クローンずつ得た。コントロールクローン(Uneo-a, Uneo-b)に比べヒトゲルゾリン発現クローン(UCG-a, UCG-b)では細胞の分化傾向が形態学的に観察された。軟寒天培地内コロニー形成能はコントロールクローンではUneo-a; $26.8 \pm 0.7\%$ 、Uneo-b; $24.0 \pm 2.4\%$ であったのに対し、ヒトゲルゾリンはUCG-a; $11.2 \pm 1.7\%$ 、UCG-b; $18.4 \pm 1.6\%$ 、マウスゲルゾリンはU319-a; $12.1 \pm 1.2\%$ 、U319-b; $18.2 \pm 1.7\%$ と有意に低く($p < 0.01$; unpaired *t* test)、腫瘍形質の減弱を認めた。また、ヌードマウス皮下移植による造腫瘍性の検討ではコントロールクローンではUneo-a; 4/4、Uneo-b; 3/3と全例に腫瘍形成を認めたのに対し、ヒトゲルゾリンではUCG-a; 0/5、UCG-b; 0/5、マウスゲルゾリンではU319-a; 0/5、U319-b; 2/5とマウスゲルゾリンのU319-bクローンのうち5匹中2匹のみに腫瘍形成を認めた。

以上の検討により、ゲルゾリンは膀胱癌においてその発現が低下・消失しており、また膀胱癌細胞株UMUC-2にゲルゾリン遺伝子を導入することにより癌の腫瘍形質を抑えられ、さらにヌードマウス皮下移植において腫瘍抑制的に作用することが観察された。ゲルゾリンは膀胱癌においてその発現が低下・消失していること、また腫瘍抑制効果を有することなどから癌抑制遺伝子の一つである可能性およびゲルゾリン遺伝子を用いた遺伝子治療の可能性が示唆された。

口頭発表において主査細川真澄男より、膀胱癌におけるゲルゾリンの役割に関連して、膀胱癌組織4例においてウエスタンブロットで正常と同等にゲルゾリンが発現されていたことに対する説明、膀胱癌以外の癌におけるゲルゾリンの役割、膀胱癌における癌遺伝子、ゲルゾリン発現の低下・消失に伴うアクチンの変化、ゲルゾリンを用いた膀胱癌への遺伝子治療の可能性とその場合のゲルゾリンの至適発現量について、副査葛巻暹教授より、第9染色体に存在する癌抑制遺伝子の種類、膀胱癌における癌抑制遺伝子p53の役割、ゲルゾリンを膀胱癌への遺伝子治療の臨床応用の具体的方法について、副査小柳知彦教授より、進行性膀胱癌に対してもゲルゾリンは抑制効果が期待できるのかについての質問があり、申請者はおおむね妥当な回答をした。

審査員一同は、これらのヒト膀胱癌におけるゲルゾリンの役割に関して検討した本研究の成果を高く評価し、申請者が博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。