

学位論文題名

Suppression of Erk Activation and In Vivo  
Growth in Esophageal Cancer Cells by  
The Dominant Negative Ras Mutant, N116Y

(Ras 抑制変異体 N116Y による食道癌細胞の  
Erk 活性化の抑制と in vivo での増殖制御)

学位論文内容の要旨

I. 目的

食道癌は消化器癌の中では予後不良な癌の一つであり、集学的治療が行われているが、いまだ満足な治療成績を得るに至っていない。このため新しい治療法の開発が望まれる。その一つとして癌抑制遺伝子やアンチセンスなどを用いた遺伝子治療法が注目されている。

epidermal growth factor receptor (EGFR) は Ras の経路を活性化するが、食道癌では約 90% 以上にその発現量の増加が認められており、Ras の機能を抑制することが食道癌の増殖を抑制するための有効な手段となりうることを示唆している。Ras 抑制変異体 N116Y は、v-H-ras のコドンの 116 番目をアスパラギンからチロシンに置換して得られた変異体であり、GDP/GTP exchange protein と結合することにより Ras p21 が活性型 Ras p21 · GTP に転換されるのを抑制し Ras 以降のシグナル伝達を阻害する。これまでに申請者らは N116Y が胃癌、膀胱癌、膵癌などの様々な腫瘍細胞株の増殖を in vitro で抑制することを明らかにしてきた。アデノウイルスベクターは高力価のウイルスを調整でき in vivo 遺伝子導入が可能なベクターである。そこでアデノウイルスベクターを用いて N116Y の食道癌に対する in vivo での増殖抑制効果と Erk2 活性化の抑制効果について検討した。

II. 材料と方法

1) 細胞株と polymerase chain reaction-single-strand conformation polymorphism (PCR-SSCP) 及びシーケンス反応：ヒト食道扁平上皮癌細胞株、TE8, HEC46, SGF3, SGF7 の 4 株を用いた。これらの細胞株における k-ras, H-ras の変異を検索するために、PCR-SSCP と DNA sequencing kit<sup>R</sup> を用いてシーケンス反応を行った。

2) 組み換えアデノウイルス：アデノウイルス AdCMV-N116Y は サイトメガロウイルス (CMV) プロモーター、N116Y cDNA と SV40 polyA がアデノウイルスの E1 欠損部位に挿入されている。コントロールとして CMV プロモーターと SV40 polyA からなる AdCMV を用いた。

3)  $\beta$ -gal stain によるアデノウイルスの感染効率の評価：AdCMV LacZ を multiplicity of infection (MOI) 25-400 で食道癌細胞株に感染させ 1.2% glutaraldehyde で細胞を固定後 X-gal (0.6mg/ml) で染色された細胞を計測した。

4) Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) による N116Y mRNA の検出：アデノウイルス感染 48 時間後に RNA を抽出した。RT 反応は 1  $\mu$ g の total RNA を使用して 42

℃で50分行った。PCRは94℃1分, 55℃30秒, 72℃1分を30サイクル施行した。内部コントロールとしてglyceraldehyde-3phosphate dehydrogenaseを用いた。

5) *in vitro*における細胞増殖抑制効果の検討:  $2 \times 10^4$  (TE8, SGF7)または $5 \times 10^4$  (HEC46, SGF3)の細胞にアデノウイルスベクターを感染させ1日おきにトリパンブルー染色を用いて生細胞数を計測した。colony forming assayはAd CMV-N116YをMOI 400で感染後24時間目の細胞 $5 \times 10^3$ 個を軟寒天培地上で4週間培養後にコロニー数を計測した。

6) *in vivo*における増殖抑制効果の検討:  $2 \times 10^6$ のTE8または $5 \times 10^6$ のSGF3をヌードマウスの皮下に移植し、3-5, 8-10日目に $4 \times 10^8$  pfuのAdCMVまたはAdCMV-N116Yを腫瘍に直接注入し、1-2日毎に腫瘍径を計測し体積を算出した。体積は $V = (\text{長径}) \times (\text{短径})^2 / 2$ により求めた。

7) 細胞周期の解析とWestern Blot AnalysisによるErk2活性化の検討:  $5 \times 10^5$ の細胞にアデノウイルスベクターを感染させ48時間後に細胞を回収し70%エタノールで固定後、DNAをpropidium iodideで染色しDNA contentをフローサイトメトリーを使用して解析した。Erk2のリン酸化は、アデノウイルス感染48時間後より無血清培地下でさらに24時間培養し、20ng/mlのEGFで10分刺激後に蛋白を抽出し、Western blot analysisを行い解析した。

### III. 結果

1) 食道癌細胞株におけるRasの変異とアデノウイルスの感染効率: HEC46はk-rasコドン12にGGT(Gly)→GTT(Val)の点突然変異を認めた。他の3株には変異を認めなかった。感染効率は4株ともMOI 200で75%-80%であった。

2) AdCMV-N116YによるN116Y mRNAの発現の検討: AdCMV-N116Y感染群でのみ254bpのN116Yフラグメントが認められた。これらの結果はAdCMV-N116Yの感染によりN116Y mRNAが効果的に発現していることを示している。

3) AdCMV-N116Yによる*in vitro*における増殖抑制効果の検討: AdCMV-N116Yは、TE8, SGF3, SGF7の*in vitro*での増殖を10-20%に強く抑制した。HEC46では、増殖抑制効果は約50%であった。HEC46のAdCMV-N116Y感染後のコロニー形成率( $13.9 \pm 1.2\%$ )はコントロール( $19.0 \pm 2.8\%$ )と差はなかった。TE8, SGF7ではAdCMV-N116Y感染後のコロニー形成率(TE8: $0.8 \pm 0.6\%$ , SGF7: $1.2 \pm 0.3\%$ )は、コントロール(TE8: $9.6 \pm 1.0\%$ , SGF7: $13.5 \pm 1.9\%$ )に比し有意に低下していた。

4) AdCMV-N116Yによる*in vivo*における腫瘍抑制効果の検討: TE8, SGF3ともにAdCMV-N116Y投与群の1月後の腫瘍の体積(TE8:  $359 \pm 47.6$  mm<sup>3</sup>, SGF3:  $535 \pm 52.8$  mm<sup>3</sup>)は、コントロール(TE8:  $1278.5 \pm 61.3$  mm<sup>3</sup>, SGF3:  $1660.3 \pm 198$  mm<sup>3</sup>)と比較して有意に減少した。

5) N116Yの細胞周期とErk2リン酸化に対する効果の検討: コントロール感染後のTE8ではG1期37%, S期51%, G2-M期12%に対し、AdCMV-N116Y感染細胞はG1期78%, S期11%, G2-M期11%とG1 accumulationが起こった。また、AdCMV-N116Y感染後のTE8, SGF3, SGF7ではEGF刺激後のErk2のリン酸化が抑制されたのに対し、HEC46ではErk2のリン酸化が起きた。これらの結果はErk活性化の抑制と細胞増殖抑制効果が相関することを示している。

### IV. 考察

食道癌における遺伝子異常としてはp53の変異, cyclin D1とEGFRの過剰発現などが高頻度で認められることが報告されている。EGFRはEGFなどと結合するとRas-MAPK (Erk) カスケードへと細胞増殖刺激を伝達する。Erkカスケードの阻害がcyclin D1の発現, DNA複製と細胞増殖を抑制することが報告されている。今回の検討では食道癌細胞にN116Yを導入すると3株ではErk2の活性化が強く抑制され、また、N116Yの細胞増殖抑制効果とErk2の活性化の阻害が相関

することが示された。すなわちN116YがErkの伝達経路を遮断し、その結果、G1停止による食道癌細胞の増殖抑制が起こるものと考えられる。またヌードマウスに移植した腫瘍へ直接AdCMV-N116Yを投与した場合、TE8、SGF3ともに腫瘍の増殖は抑制され、N116Yが食道癌の治療用遺伝子の候補の一つとなりうることを示している。

#### V. 結語

Ras抑制変異体N116YはErk2の活性化を阻害し、アデノウイルスを用いたN116Yの導入はヒト食道扁平上皮癌の増殖をin vivoで強く抑制した。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 今 村 雅 寛

副 査 教 授 葛 巻 暹

副 査 教 授 加 藤 紘 之

学 位 論 文 題 名

## Suppression of Erk Activation and In Vivo Growth in Esophageal Cancer Cells by The Dominant Negative Ras Mutant, N116Y

(Ras 抑制変異体 N116Y による食道癌細胞の  
Erk 活性化の抑制と in vivo での増殖制御)

食道癌は消化器癌の中では予後不良な癌の一つであり、集学的治療が行われているが、いまだ満足な治療成績を得るに至っていない。このため新しい治療法の開発が望まれる。その一つとして遺伝子治療法が注目されている。Epidermal growth factor receptor (EGFR) は Ras の経路を活性化するが、食道癌では約 90% 以上にその発現量の増加が認められており、その機能を抑制することが食道癌の増殖を抑制するための有効な手段となり得ることを示唆している。Ras 抑制変異体 N116Y は、*v-H-ras* のコドンの 116 番目をアスパラギンからチロシンに置換して得られた変異体であり、GDP/GTP exchange protein と結合することにより Ras p21 が活性型 Ras p21 · GTP になるのを抑制し Ras 以降のシグナル伝達を阻害する。これまでに申請者らは N116Y が胃癌、膀胱癌、膵癌などの様々な腫瘍細胞株の増殖を *in vitro* で抑制することを明らかにしてきた。アデノウイルスベクターは、高力価のウイルスを調整でき *in vivo* 遺伝子導入が可能なベクターである。そこで申請者らはアデノウイルスベクターを用いて、N116Y の食道癌に対する *in vitro* および *in vivo* での増殖抑制効果とその抑制機構を Erk2 の活性化に対する効果を検討した。

材料としてヒト食道扁平上皮癌細胞株、TE8、HEC46、SGF3、SGF7 の 4 株を用いた。PCR-SSCP とシーケンス反応を行い、これら細胞株における K-*ras*、H-*ras* の変異を検索した。遺伝子導入のベクターとしてアデノウイルス (Ad) 用い、サイトメガロウイルス (CMV) プロモーター、N116Y cDNA と SV40 polyA をアデノウイルスの E1 欠損部位に挿入し、AdCMV-N116Y を作成した。コントロールとして CMV プロモーターと SV40 polyA からなる AdCMV を用いた。アデノウイルスの感染効率は AdCMV LacZ を食道癌細胞株に感染させ X-gal 染色により評価した。N116Y mRNA の発現を RT-PCR により評価した。*in vitro* における細胞増殖抑制効果はアデノウイルスを感染させ 1 日おきにトリパンブルー染色を用いて生細胞数を算定する方法と、アデノウイルスを感染後軟寒天培地上で 6 週間培養しコロニー数を算定する方法で評価した。*in vivo* における細胞増殖抑制効果は  $2 \times 10^6$  個の TE8 または  $5 \times 10^6$  個の SGF3 をヌードマウスの皮下に移植し、アデノウイルスを腫瘍に直接注入し、腫瘍径を計測し体積を算出して行った。さらに、フローサイトメトリーと Western blot analysis を行い細胞周期と Erk2 の活性化を解析した。

これらの解析の結果、食道癌細胞株におけるrasの変異はHEC46にK-rasコドン12の点突然変異が認められ、他の3株には変異はなく、感染効率は4株ともMOI 200で75%-80%と証明された。Ad CMV-N116Yの感染によりN116Y mRNAが効果的に発現しTE8、SGF3、SGF7の*in vitro*での増殖を強く抑制した。HEC46では、増殖抑制効果は約50%であった。HEC46のAdCMV-N116Y感染後のコロニー形成率はコントロールと差はなく、TE8、SGF7ではコントロールに比し有意に低下していた。ヌードマウスに移植されたTE8とSGF3はN116投与群で有意の増殖抑制が誘導された。AdCMV-N116Y感染細胞ではG1からS期への移行が抑制されていた。AdCMV-N116Y感染後のTE8、SGF3、SGF7ではEGF刺激後のErk2のリン酸化が抑制されたのに対し、HEC46ではErk2のリン酸化が認められた。

以上の結果から食道癌細胞にN116Yを導入すると3株ではErk2の活性化が強く抑制され、N116Yの細胞増殖抑制効果とErk2の活性化の阻害が相関することが示された。また、ヌードマウスに移植した腫瘍へ直接AdCMV-N116Yを投与した場合、TE8、SGF3ともに腫瘍の増殖は抑制され、N116Yが食道癌の遺伝子治療の治療用遺伝子の候補の一つとなり得ることが示唆された。

口頭発表において副査葛巻暹教授より、N116Yによる食道癌抑制効果を向上させる方法、遺伝子導入効率を上げる方法、正常組織への副作用を防ぐ方法についての質問があり、次いで副査加藤紘之教授より細胞株での実験から臨床に応用するときの問題点について、*in vivo*での効果の増強と持続性についての質問があった。会場より癌研病理部門の細川眞澄男教授よりras変異株で抑制効果が弱かった理由について、癌研遺伝子制御部門藤田寿一助手よりras変異株でErk2のリン酸化が軽度に抑制された理由についての質問があった。また、主査今村雅寛教授より*in vivo*でのアデノウイルス投与方法について、臨床で用いる場合アデノウイルスに対する免疫反応をどのように克服するかについての質問があった。以上の質問に対し申請者は概ね妥当と思われる回答をした。

審査員一同は、Ras抑制変異体の食道癌増殖抑制における役割を解析し、食道癌の遺伝子治療に結びつく成果が得られたことを高く評価し、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。