

学 位 論 文 題 名

The dominant negative H-ras mutant, M116Y,
suppresses growth of metastatic human
pancreatic cancer cells in the liver of nude mice

(H-ras 制御変異体 N116Y はヌードマウスヒト膵癌細胞の
転移性肝腫瘍増殖を抑制する)

学位論文内容の要旨

目的

膵癌は、根治切除術後でも約60%の症例に肝転移再発するとされており、術後の有効な追加補助療法の確立が急務である。膵癌ではK-ras変異が高率に証明され、発癌、増殖に関与すると考えられている。Ras抑制変異体N116Yはv-H-rasのコードンの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、Ras以降のシグナル伝達を阻害し、腫瘍細胞の増殖を抑制する。これまでに申請者らは、K-ras変異のある膵癌細胞株にN116Y遺伝子をリポフェクション法で遺伝子導入すると、in vitroで強力な増殖抑制効果が得られることを明らかにしてきた。今回さらに、遺伝子導入効率が良く、癌胎児性抗原 (CEA) 産生膵癌特異的な遺伝子発現を目的として、CEAプロモーターを組み込んだアデノウイルスベクターAd CEA-N116Yを作成し、in vivoにおける肝転移抑制効果を検討した。

材料と方法

細胞株：ヒト正常膵臓組織由来の細胞株1C3D3と、ヒト膵癌細胞株PCI-19、PCI-24、PCI-35、PCI-43の5株を用いた。これら細胞株でのCEA産生をEIA法で測定した。CEAプロモーター活性は、ルシフェラーゼ遺伝子導入後の酵素活性で測定した。

組み換えアデノウイルス：アデノウイルスAd CEA-N116YはCEAプロモーター、N116Y cDNA、SV 40 poly AがアデノウイルスのE1欠損部位に挿入されている。サイトメガロウイルス (CMV) プロモーターアデノウイルスAd CMV-N116Y、 β -galactosidase cDNAを組み込んだアデノウイルスAd CMV-Lac ZとAd CEA-Lac Z、あるいは空ベクターをコントロールに用いた。

アデノウイルス感染効率：Ad CMV-Lac Zをmultiplicities of infection (MOI)25-1000で各細胞株に感染させ、1.2 % glutaraldehydeで細胞を固定後、X-galで染色された細胞を計測した。

RT-PCRによるN116Y mRNAの検出：Ad CEA-N116Y感染48時間後にRNAを抽出、RT-PCRを行いN116Y mRNAを検出した。感染コントロールとして空ベクターとAd CMV-N116Yを、内部コントロールとしてglyceraldehydephosphate dehydrogenaseを用いた。

In vitroにおけるN116Yの細胞増殖抑制効果と核断片化の検討： 2×10^4 個あるいは 5×10^4 個の細胞に、Ad CEA-N116Yを感染させトリパンブルー染色を用いて1日おきに細胞数を計測した。 1×10^4 個の細胞にAd CEA-N116Yを感染させ、48時間後に核断片化を引き起こした細胞 (apoptotic cell) 数を、蛍光DNA結合色素Hoechst 33342による核染色後に計測、感染コントロールの結果と比較した。

肝転移モデル：PCI-43細胞 1×10^6 個をヌードマウス脾臓内に注入して肝転移モデルを作成した。5

日後にAd CEA-Lac Zを 4×10^8 plaque forming units (pfu)脾注、3日後に肝臓を摘出、2 % formaldehydeで固定後に水平断で3分割、X-gal染色し、パラフィン包埋切片を作成した。これをhematoxylinとeosinで染色し、鏡検した。翌日あるいは5日後にAd CEA-N116Yを 4×10^8 pfu脾注、6週後に肝臓を摘出、10 % formaldehydeで固定後に水平断で3分割し、パラフィン包埋切片を作成した。これをhematoxylinとeosinで染色し、鏡検、肝転移結節数を計測した。Ad CEA-Lac Zを用いて感染コントロールとした。

結果

In vitro実験

各細胞株のCEA産生をELISA法で測定した結果、1C3D3、PCI-19、PCI-24ではCEA産生を認めず、PCI-35、PCI-43ではCEA産生を認めた。ルシフェラーゼアッセイでCEAプロモーター活性を測定した結果、1C3D3、PCI-19、PCI-24はプロモーター活性陰性、PCI-35、PCI-43は陽性であった。アデノウイルスベクターによる遺伝子導入効率は、1C3D3ではMOI1000で80 %、膵癌細胞株ではMOI400で約90 %であった。Ad CMV-N116Y感染後には、全細胞株でN116Y-mRNAの発現が確認されたが、Ad CEA-N116Y感染では、N116Y-mRNA発現はプロモーター活性陽性膵癌細胞株PCI-35、PCI-43に特異的であった。細胞増殖抑制効果を調べたところ、Ad CMV-N116Y感染後では全ての細胞株において、細胞増殖が有意に抑制されたのに対し、Ad CEA-N116Y感染後は、1C3D3、PCI-19、PCI-24では細胞増殖が抑制されず、PCI-35、PCI-43では5日後までに有意に細胞増殖が抑制された。細胞の核形態変化を観察した結果、Ad CMV-N116Y感染後は全ての細胞株において、apoptosisに特徴的な核形態変化を示した。Ad CEA-N116Yを感染させた細胞では、1C3D3、PCI-19、PCI-24においてはapoptotic cellの割合はコントロールと差がないのに対し、PCI-35、PCI-43では有意にapoptotic cellが増加していた。さらにPCI-35、PCI-43ではapoptotic cellは時間依存的に増加し、Ad CMV-N116Y感染と比較しても、その効果に差はなかった。以上より、Ad CEA-N116YはCEA産生陽性膵癌細胞特異的に増殖抑制効果を持ち、apoptosisを誘導、その効果は、強力なプロモーターを持つAd CMV-N116Yと同等であることがわかった。

In vivo実験

肝転移モデルにAd CEA-Lac Zを脾注、肝臓標本を β -gal染色すると、ヒト膵癌細胞PCI-43の転移結節のみが染色された。これはCEAプロモーターアデノウイルスを脾注すると、肝内のCEA産生陽性膵癌細胞にのみ遺伝子導入できることを示す。次に同じモデルでAd CEA-N116Yを脾注し、6週後の肝臓標本で転移結節数を計測すると、モデル作成1日後に脾注した場合、肝内に転移結節を認めず、5日後に脾注した場合でも転移結節数はコントロールと比較し、有意に減少していた。以上より、脾注されたAd CEA-N116Yは、ヒト膵癌細胞PCI-43に特異的に作用し、肝転移結節の形成、増殖を効果的に抑制することが明らかになった。

考察

K-ras変異は、癌細胞の浸潤、転移、特に膵癌においては肝転移の発生、進行に関与する可能性が報告されている。従って、強力なRas阻害作用を持つN116Yの癌特異的遺伝子導入が、肝での転移性増殖の抑制に有効かどうかを検討した。in vitro実験ではAd CEA-N116YのCEA産生膵癌特異性が確認された。in vivo実験では、肝転移早期のN116Y遺伝子導入で、癌細胞の転移能、増殖能は著しく抑制されることがわかった。これは、活性化K-rasのシグナル伝達を阻止ことで、膵癌細胞肝転移の抑制が可能であることを示唆する。臨床的には膵癌手術前後の潜在的肝転移に対し、N116Yを選択的に遺伝子導入すれば、肝転移の発生、増殖を抑制する効果を期待でき、膵癌における有力な補助療法としてのN116Y遺伝子治療の可能性を示している。

結語

Ras抑制変異体N116Yは、膵癌細胞にapoptosisを誘導し、CEAプロモーターアデノウイルスを用いたN116Yの導入は、肝転移モデルにおけるヒト膵癌の増殖を強く抑制した。

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

The dominant negative H-ras mutant, M116Y, suppresses growth of metastatic human pancreatic cancer cells in the liver of nude mice

(H-ras 制御変異体 N116Y はヌードマウスヒト膵癌細胞の
転移性肝腫瘍増殖を抑制する)

膵癌は、根治切除後でも約60%の症例に肝転移再発するとされており、術後の有効な追加補助療法の確立が急務である。膵癌ではK-ras変異が高率に証明され、発癌、増殖に関与する。Ras抑制変異体N116Yはコドン116をアスパラギンからチロシンに置換した変異体で、Ras以降のシグナル伝達を阻害し、細胞の増殖を抑制する。今回、癌胎児性抗原(CEA)プロモーターを組み込んだアデノウイルスAd CEA-N116Yを作成し、CEA産生膵癌特異的な遺伝子発現を試み、選択的N116Y遺伝子導入による肝転移抑制効果を検討することを目的とした。

細胞株はヒト正常膵臓組織由来の1C3D3、ヒト膵癌細胞株PCI-19、PCI-24、PCI-35、PCI-43の5株を用いた。これら細胞株でのCEA産生をEIA法で、CEAプロモーター活性をルシフェラーゼ活性で測定した。組み換えアデノウイルスAd CEA-N116Yの他、サイトメガロウイルス(CMV)プロモーターアデノウイルスAd CMV-N116Y、 β -galactosidase cDNAを組み込んだアデノウイルスAd CMV-LacZとAd CEA-LacZあるいは空ベクターをコントロールに用いた。アデノウイルス感染効率は、Ad CMV-LacZをMOI 25-1000で各細胞株に感染させ、1.2% glutaraldehydeで細胞を固定後、X-gal染色陽性細胞数で計測した。N116Y発現は、Ad-N116Y感染48時間後にRNAを抽出し、RT-PCRで検出した。内部コントロールとしてglyceraldehydephosphate dehydrogenaseを用いた。*In vitro*におけるN116Yの細胞増殖抑制効果は、2あるいは 5×10^4 個の細胞にAd-N116Yを感染させ、1日おきにトリパンブルー染色後の生細胞数で評価した。N116Yによる核断片化の検討は、 1×10^4 個の細胞にAd-N116Yを感染させ、48時間後に蛍光DNA結合色素Hoechst 33342で核染色し、断片化引き起こした細胞数で評価した。肝転移モデルはPCI-43を 1×10^6 個をヌードマウス脾臓内に注入し、作成した。5日後にAd CEA-LacZ 4×10^8 pfu脾注、3日後に肝臓を摘出、固定後に水平断で3分割、X-gal染色後に切

片を作成、これをHE染色し、鏡検した。治療実験では、細胞接種翌日あるいは5日後にAd CEA-N116YあるいはAd CEA-LacZを 4×10^8 pfu脾注、6週後に肝臓を摘出、固定後、同様に標本を作成し鏡検、肝転移結節数を計測した。

結果として、*in vitro*で1C3D3、PCI-19、PCI-24はCEA産生、プロモーター活性陰性で、PCI-35、PCI-43はCEA産生、プロモーター活性ともに陽性であった。感染効率は1C3D3はMOI 1000で80%、膵癌細胞株はMOI 400で約90%であった。Ad CMV-N116Yは全細胞株でN116Yを発現し、細胞増殖を抑制、apoptosisを誘導した。一方で、Ad CEA-N116YはCEA陽性膵癌細胞株PCI-35、PCI-43でのみN116Y発現、細胞増殖抑制、核断片化を示した。さらに、これらの細胞株ではAd CMV-N116Y感染と比較し、その宿主抑制効果に差はなかった。*In vivo*肝転移モデルでAd CEA-LacZを脾注すると、ヒト膵癌細胞株PCI-43転移結節でのみX-gal染色陽性であり、CEAプロモーターアデノウイルスによる選択的遺伝子導入が可能であることを示した。次に、治療実験で、細胞接種1日後に、Ad CEA-N116Yを脾注した場合、細胞接種6週後の肝内に転移結節を認めず、細胞接種5日後に脾注した場合でも転移結節数はコントロールと比較し、有意に減少していた。つまり、脾注されたAd CEA-N116Yはヒト膵癌細胞株PCI-43特異的に作用し、転移結節の形成、増殖を効果的に抑制した。

以上、強力なRas 阻害作用を持つN116Yの癌特異的遺伝子導入は、肝での膵癌転移性増殖の抑制に有効であった。今回の結果は、膵癌手術前後の潜在的肝転移に対する将来的な遺伝子治療の可能性を示唆した。

口頭発表において、葛巻暹教授より*in vivo*実験でのLacZ遺伝子の影響、広範な膵癌に適したプロモーターの可能性、化学療法に対する遺伝子治療の優位性についての質問があった。ついで加藤紘之教授よりさらなるプロモーターの開発、*in vivo*実験での遺伝子導入効率と安全性についての質問があった。また今村雅寛教授より臨床でのCEA産生膵癌の比率、N116Yの肝転移抑制効果におけるapoptosisの関与と他の機序の可能性についての質問があったが、申請者はおおむね妥当な回答をした。

N116Yの選択的遺伝子導入による、ヒト膵癌細胞の肝転移抑制効果を明らかにし、膵癌におけ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、審査員一同協議の結果、本論文は博士（医学）の学位授与に値するものと判定した。