

学 位 論 文 題 名

A fundamental study on the gene therapy  
of human bladder cancer using the dominant negative  
H-*ras* mutant N116Y

(H-*ras* 優性抑制性変異体 N116Y を用いた  
膀胱癌遺伝子治療の基礎的研究)

学位論文内容の要旨

動物の癌の発生率は、寿命の延長や生活環境の変化など種々の要因から、明らかに増加している。現在、獣医学領域における癌治療は主に外科的療法、化学療法、及び放射線療法によって行われているが、癌による死亡率は高く、新たな癌治療法の開発が望まれている。一方、医学領域では、従来の治療法に加えて様々な新しい試みがなされているが、その中で遺伝子治療に期待が寄せられている。本研究では、癌遺伝子治療の獣医学領域への導入を目標として、ヒト膀胱癌の遺伝子治療の基礎的検討を行った。

ヒト膀胱癌の病理発生は多段階的な過程を経ているといわれ、数種の癌遺伝子や癌抑制遺伝子の関与が示唆されている。このような遺伝子の変化の中で、*ras* 癌遺伝子はヒト膀胱癌の病理発生に重要な役割を持つと考えられている。

*ras* 遺伝子によってコードされる Ras 蛋白質は、細胞増殖及び分化に関するシグナル伝達において、それぞれの刺激によって不活性型 GDP 結合体から活性型 GTP 結合体に転換され、これらのシグナル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。不活性型から活性型への転換は、Ras グアニンヌクレオチド交換反応により行われるが、この反応は Ras グアニンヌクレオチド交換反応促進因子により促進される。また、活性型 GTP 結合体から不活性型 GDP 結合体への転換は内在性の GTPase によって行われる。

son of sevenless (Sos) は、Ras グアニンヌクレオチド交換反応促進因子の一つであり、全身諸臓器に発現している。また growth-factor receptor binding protein 2 (Grb2) は、epidermal growth factor (EGF)-receptor の活性化を Sos へ伝達するアダプター蛋白質である。EGF 刺激により EGF-receptor が活性化され、EGF-receptor-Grb2-Sos の三者複合体が形成されることにより Ras の活性化が起こることが知られている。4 種の膀胱癌細胞株 (T24、UMUC-2、KU-1、KU-7) 及び正常膀胱上皮細胞における、EGF-receptor、Grb2、Sos の発現を調べた結果、膀胱癌細胞株においてのみ Grb2、Sos の発現増強が見られた。このことから Ras GDP/ GTP 交換反応が膀胱癌増殖に重要である可能性が考えられた。

H-*ras* の優性抑制性変異体 N116Y (N116Y *ras* mutant) は Ras グアニンヌクレオチド交換反応を阻害すること、ヒト食道癌、膵臓癌細胞の増殖を抑制することが示されている。N116Y *ras* mutant のヒト膀胱癌遺伝子治療への応用の可能性を調べるため、以下のような実験を行っ

た。

最初にレトロウイルスプロモーター制御下で N116Y *ras* mutant を発現するベクター pZIP-N116Y をヒト膀胱癌細胞株 (T24、UMUC-2、KU-1、KU-7) ヘトランスフェクションし、細胞増殖を調べた。その結果、N116Y *ras* mutant を発現した膀胱癌細胞の増殖は顕著に抑制された。

次に、N116Y *ras* mutant が膀胱癌細胞で弱発現した場合の効果を調べるため、ヒトメタロチオネインプロモーター制御下で N116Y *ras* mutant を発現するベクター pHS1-116Yneo を UMUC-2 細胞ヘトランスフェクションし、N116Y *ras* mutant を恒常的に発現するトランスフェクタントクローン C5 及び C13 を作成した。RT-PCR 法により、C5 は C13 に比べて多くの N116Y *ras* mutant mRNA を発現していることが示された。コントロールクローン N1 に比べ、C13 に顕著な形態学的変化は見られなかったが、C5 では著明な形態学的変化が認められた。これらのクローンの細胞増殖率を MTT 法により、また足場非依存性増殖能を軟寒天コロニー法により調べた結果、細胞増殖率はクローン間で有意な差は見られなかったが、足場非依存性増殖能はクローンの N116Y *ras* mutant mRNA 発現量に比例して抑制された。また、これらのクローンにおいて、Ras 下流のシグナル伝達因子である Jun kinase/ stress-activated protein kinase (JNK/ SAPK) 及び extracellular signal-regulated protein kinase (ERK) の活性化を調べるため、抗リン酸化 JNK 抗体および抗リン酸化 ERK 抗体を用いてウエスタンブロッティング法による解析を行った。その結果、ERK 活性化においてはクローン間で有意な差は見られなかったが、JNK 活性化においては、C5、C13 の両方において N1 に比べて顕著な抑制が見られた。これらのことから N116Y *ras* mutant は、弱発現状態で細胞増殖を抑制することはできないものの、腫瘍形質を抑制できることが示された。また活性型変異を起こした Ras による細胞の腫瘍化には JNK の活性化が関与していることから、N116Y *ras* mutant による腫瘍形質の抑制に、JNK リン酸化の抑制が関与していることが示唆された。

次に N116Y *ras* mutant を発現するアデノウイルスベクター AdCMV-N116Y の膀胱癌細胞に対する治療効果を検討した。まず *in vitro* で、MTT 法により膀胱癌細胞 UMUC-2、KU-7 に対する AdCMV-N116Y の増殖抑制効果を、さらに Hoechst 33258 染色によりアポトーシス誘導効果を調べた。その結果、AdCMV-N116Y 感染膀胱癌細胞の顕著な増殖抑制及びアポトーシスの増加が示された。次にヌードマウスを用いたヒト膀胱癌細胞同所移植モデルを用いて、*in vivo* における AdCMV-N116Y の効果を検討した。UMUC-2 及び KU-7 細胞をヌードマウス膀胱内に移植したのち、2、3、4 日目に AdCMV-N116Y またはコントロールウイルス AdCMV-LacZ を  $1 \times 10^9$  PFU ずつ、または PBS を膀胱に注入し、10 日目に解剖、膀胱を採材した。膀胱を膨らませた状態で半割し、10% 緩衝ホルマリンにより固定、パラフィン包埋したのち、100  $\mu$ m の間隔で 40 枚の切片を作成した。これらの切片をヘマトキシリン-エオジンにより染色した後、イメージアナライザーを用いて各マウスの膀胱における腫瘍の総面積を算出し、腫瘍の大きさの指標とした。その結果、AdCMV-N116Y 注入マウスにおいて腫瘍の大きさに顕著な減少が観察された。

以上の成績から、N116Y 発現アデノウイルスベクターの膀胱内注入による遺伝子治療が、ヒト膀胱癌の治療に有効である可能性が示唆された。*ras* 遺伝子は哺乳類間で非常に高い相同性を持っていることが示されているので、N116Y *ras* mutant はヒト膀胱癌のみならず、動物の癌治療に対しても応用できると期待される。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 橋 本 晃  
副 査 教 授 梅 村 孝 司  
副 査 教 授 渡 辺 智 正  
副 査 講 師 篠 原 信 雄 (医病)

## 学位論文題名

### A fundamental study on the gene therapy of human bladder cancer using the dominant negative *H-ras* mutant N116Y

(*H-ras* 優性抑制性変異体 N116Y を用いた  
膀胱癌遺伝子治療の基礎的研究)

癌は多段階的な過程を経て発生するといわれている。数種の癌遺伝子、癌抑制遺伝子の変化がヒト膀胱癌で調べられているが、その中で、*ras* 癌遺伝子はヒト膀胱癌の病理発生に重要であると考えられている。本研究では、癌遺伝子治療の獣医学領域への導入を視野に入れ、*ras* 癌遺伝子の優性抑制性変異体 N116Y の膀胱癌遺伝子治療への応用の可能性を明らかにするための基礎的研究を行った。

まず最初にレトロウイルスプロモーター制御下で N116Y を発現するプラスミドをヒト膀胱癌細胞株へ導入し、その増殖を調べた結果、N116Y 発現細胞の増殖は顕著に抑制された。

次に N116Y が膀胱癌細胞で弱発現した場合の効果を調べた結果、N116Y mRNA 発現量に比例して、細胞の形態変化と足場非依存性増殖能の減少によって示される腫瘍形質の抑制が観察された。さらに Ras 下流のシグナル伝達である Jun kinase/stress-activated protein kinase (JNK/SAPK) および Extracellular signal-regulated protein kinase (ERK)の活性化を調べた結果、N116Y 発現により ERK 活性化に変化は見られなかったが、Ras による細胞の腫瘍化に関与しているといわれる JNK の活性化が抑制されていた。

最後にヒト膀胱癌細胞同所移植ヌードマウスモデルを用い、N116Y 発現アデノウイルスベクターの膀胱癌に対する治療効果を *in vivo* で検討した。その結果、アデノウイルスベクター注入マウスにおける腫瘍の著しい縮小が観察されたことから、N116Y 発現アデノウイルスベクターの膀胱

内注入による遺伝子治療の有用性が示唆された。

*ras* 遺伝子は哺乳類間で非常に高い相同性を持っているため、以上の成果は、動物への応用が十分期待できることから、獣医学における癌遺伝子治療の進展に貢献するものと判断された。よって審査員一同は、上記博士論文提出者 渡邊孝文 氏の博士論文は、北海道大学大学院獣医学研究科規程第 6 条の規定による本研究科の行う博士論文の審査等に合格と認めた。