

学位論文題名

RAS 癌遺伝子抑制変異体による  
ヒト舌癌に対する増殖抑制効果

学位論文内容の要旨

緒言

現在まで舌癌の治療法としては主に外科療法、化学療法、放射線療法が用いられてきた。しかし、いずれの治療法でも機能障害や後遺症など患者に対する治療後の影響は無視できない。このため、患者に低侵襲かつ優れた効果を持つ新しい治療法として、遺伝子治療法の検討は重要である。本研究では、RAS 癌遺伝子の発現亢進を示すヒト舌癌に対する遺伝子治療の基礎研究として、RAS 癌遺伝子の機能を抑制する抑制変異体遺伝子 N116Y をアデノウイルスベクターに搭載してヒト舌癌細胞株に感染させ、細胞増殖に対する影響について検討した。

材料と方法

細胞株には、ヒト舌癌細胞株 HSC-3、HSC-4、SAS およびヒト口唇正常線維芽細胞株 KD を用いた。各細胞株の RAS 蛋白質の発現および ERK 蛋白質のリン酸化は、それぞれの抗体を用いてウエスタンブロット法で解析した。RAS 癌遺伝子抑制変異体 N116Y cDNA あるいはコントロールとして大腸菌  $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子 (LacZ) cDNA をサイトメガロウイルス (CMV) プロモーターと共に接続し、非増殖性アデノウイルスベクター AdCMV-N116Y、および AdCMV-LacZ を作製した。N116Y 遺伝子発現の検出は、AdCMV-N116Y または AdCMV-LacZ を各細胞株に感染、培養後に全 RNA を抽出して cDNA を合成し、RT-PCR を行った。各細胞株の増殖測定は、AdCMV-N116Y あるいは AdCMV-LacZ を感染後、経時的に生細胞を計数して行った。また、ヒトテロメラーゼ触媒サブユニット (hTERT) をプロモーターに用いたアデノウイルスベクター AdhTERT-N116Y を使用した実験では、MIT アッセイを行った。アポトーシスの検討は、各舌癌細胞株に AdCMV-N116Y あるいは AdCMV-LacZ を感染させたのち細胞を回収してヘキスト染色し、蛍光顕微鏡にて核の形態を観察して行った。hTERT プロモーター活性の測定には、ルシフェラーゼリポーター遺伝子を用いた。各結果は平均値と標準偏差値で示し、それぞれの数値を Student's *t*-test で検定した。

結果

1. RAS 癌遺伝子抑制変異体 N116Y のヒト舌癌細胞株に対する増殖抑制・アポトーシス誘導

RAS 癌遺伝子抑制変異体 N116Y の増殖抑制およびアポトーシス誘導効果を調べるため、各細胞株における RAS 蛋白質産生をウエスタンブロット法で検討した。正常線維芽細胞株 KD では RAS 蛋白質

質の産生がほとんど見られなかったのに対して、舌癌細胞株 HSC-3、HSC-4、SAS で RAS 蛋白質産生の亢進が確認された。CMV プロモーターを持つアデノウイルスベクター AdCMV-N116Y あるいはコントロールの AdCMV-LacZ を、正常細胞株 KD および舌癌細胞株 HSC-3、HSC-4、SAS に感染させ、N116Y 遺伝子発現を RT-PCR 法で確認した。AdCMV-LacZ 感染細胞では増幅産物が検出されなかったのに対して、全ての AdCMV-N116Y 感染細胞において N116Y 特異的増幅産物が検出された。AdCMV-N116Y あるいは AdCMV-LacZ 感染細胞株の細胞増殖抑制効果について検討したところ、AdCMV-LacZ を感染させた細胞株は、非感染細胞株と同じように増殖した。これに対して AdCMV-N116Y を感染させた全ての舌癌細胞株では、明らかな増殖抑制が見られた。また、AdCMV-LacZ 感染細胞株では形態変化は見られなかったのに対し、AdCMV-N116Y を感染させた場合では細胞の伸展性が阻止され島状に凝縮した像が観察された。さらに、AdCMV-LacZ を感染させた細胞株ではアポトーシスが見られなかったが、AdCMV-N116Y を感染させた HSC-3、HSC-4 では核濃縮や断片化などのアポトーシスの特徴が見られた。増殖抑制効果、形態変化およびアポトーシスは KD でも見られた。これらの RAS 癌遺伝子抑制変異体 N116Y による細胞に対する効果の機構を解析するため、RAS の下流で働くリン酸化酵素 ERK を調べた。AdCMV-LacZ を感染させた HSC-3 では、EGF 刺激後著明な ERK のリン酸化が検出された。これに対して、AdCMV-N116Y を感染させた場合は ERK のリン酸化が検出されず、N116Y 遺伝子の発現が RAS 下流の情報伝達系を抑制することが証明された。

## 2. hTERT プロモーターおよび N116Y 搭載アデノウイルスベクターの構築と癌特異的増殖抑制

癌特異的な N116Y 遺伝子の発現系を樹立するため、各細胞株における hTERT プロモーター活性を測定した。KD ではわずかなレベルの hTERT プロモーター活性しか見られなかったが、3つの舌癌細胞株全てにおいて高い hTERT プロモーター活性が確認された。そこで、hTERT プロモーターおよび N116Y 遺伝子をシャトルプラスミドに挿入して、非増殖性アデノウイルスゲノムプラスミドと共にヒト胎児腎由来 293 細胞にコトランスフェクションし、アデノウイルスベクター AdhTERT-N116Y を作製した。コントロールとして用いるアデノウイルスベクター AdhTERT も同様に作製した。次に、KD および HSC-3、SAS に対し AdhTERT-N116Y あるいは AdhTERT を感染させ、細胞増殖に対する効果を MTT アッセイにて調べた。AdhTERT は、いずれの細胞株に対しても細胞傷害性を示さなかった。これに対して AdhTERT-N116Y を用いた場合、高い hTERT プロモーター活性を持つ HSC-3、SAS では、非感染細胞と比較して増殖が有意に抑制された。これに対し、KD ではこのような増殖抑制効果は認められず、AdhTERT-N116Y の癌特異的な細胞増殖抑制効果が示された。

## 結語

RAS 癌遺伝子抑制変異体 N116Y は、ヒト舌癌細胞株 HSC-3、HSC-4、SAS に対して明らかな細胞増殖抑制効果を、更に HSC-3、HSC-4 に対してはアポトーシス誘導効果も示した。この機構は RAS 癌遺伝子下流で働くリン酸化酵素 ERK のリン酸化が抑制されるためであることが示された。多くの癌に発現し正常細胞株では発現していないヒトテロメラーゼ触媒サブユニット (hTERT) のプロモーターを持つ N116Y アデノウイルスベクターを構築し、舌癌細胞株に対する細胞増殖抑制効果を検討したところ、舌癌に特異的な抑制効果が見られた。これらの結果から、hTERT プロモーターを持つ N116Y アデノウイルスベクターが、ヒト舌癌に対する遺伝子治療に用いられる可能性が示唆された。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 北 川 善 政  
副 査 教 授 戸 塚 靖 則  
副 査 教 授 向 後 隆 男  
副 査 助 教 授 進 藤 正 信

学 位 論 文 題 名

## RAS 癌遺伝子抑制変異体による ヒト舌癌に対する増殖抑制効果

審査は、審査委員全員の出席の下に口頭試問の形式により行われた。申請者に対して提出論文とそれに関連した学科目について試問を行った。審査論文の概要は以下の通りである。

本研究は、ヒト舌癌に対する遺伝子治療の基礎研究として、RAS 癌遺伝子の機能を抑制する抑制変異体遺伝子 N116Y をアデノウイルスベクターに搭載して RAS 癌遺伝子の発現亢進を示すヒト舌癌細胞株に感染させ、細胞増殖に対する影響について検討したものである。

実験に先立って、各細胞株における RAS 蛋白質産生をウエスタンブロット法で検討した。正常線維芽細胞株 KD では RAS 蛋白質の産生がほとんど見られなかったのに対して、舌癌細胞株 HSC-3、HSC-4、SAS で RAS 蛋白質産生の亢進が確認された。CMV プロモーターを持つアデノウイルスベクター Ad.CMV-N116Y あるいはコントロールの Ad.CMV-LacZ を、正常細胞株 KD および舌癌細胞株に感染させ、N116Y 遺伝子の転写を証明するため RT-PCR 法で確認した。Ad.CMV-LacZ 感染細胞では増幅産物が検出されなかったのに対して、全ての Ad.CMV-N116Y 感染細胞において N116Y 特異的増幅産物が検出された。次に、RAS 癌遺伝子抑制変異体 N116Y の増殖抑制効果および細胞形態への影響について検討した。Ad.CMV-LacZ を感染させた細胞株は、非感染細胞株と同じように増殖したが、Ad.CMV-N116Y を感染させた全ての舌癌細胞株では、明らかな増殖抑制が見られた。また、Ad.CMV-LacZ 感染細胞株では形態変化やアポトーシスは見られなかったのに対し、Ad.CMV-N116Y を感染細胞株では細胞の伸展性が阻止され島状に凝縮した像が観察された。HSC-3、HSC-4 では核濃縮や断片化などのアポトーシスの特徴が見られた。増殖抑制効果、形態変化およびアポトーシスは KD でも見られた。これらの抑制変異体 N116Y 発現による細胞に対する効果の機構を解析するため、RAS の下流で働くリン酸化酵素 ERK を調べた。Ad.CMV-LacZ を感染さ

せた HSC-3 では、EGF 刺激後著明な ERK のリン酸化が検出された。これに対して、Ad.CMV-N116Y を感染させた場合は ERK のリン酸化が検出されず、N116Y 遺伝子の発現が RAS 下流の情報伝達系を抑制することが証明された。

癌特異的な N116Y 遺伝子の発現系を樹立するため、まず各細胞株におけるヒトテロメラーゼ触媒サブユニット(hTERT)プロモーター活性を測定した。KD ではわずかなレベルの活性しか見られなかったが、3つの舌癌細胞株全てにおいて高い hTERT プロモーター活性が確認された。そこで、hTERT プロモーターおよび N116Y 遺伝子をシャトルプラスミドに挿入して、非増殖性アデノウイルスゲノムプラスミドと共にヒト胎児腎由来 293 細胞にコトランスフェクションし、アデノウイルスベクター Ad.hTERT-N116Y を作製した。コントロールとしてアデノウイルスベクター Ad.hTERT も同様に作製した。次に、KD および HSC-3、SAS に対し Ad.hTERT-N116Y あるいは Ad.hTERT を感染させ、細胞増殖に対する効果を MTT アッセイにて調べた。Ad.hTERT は、いずれの細胞株に対しても細胞傷害性を示さなかった。Ad.hTERT-N116Y を用いた場合は、高い hTERT プロモーター活性を持つ HSC-3、SAS において、非感染細胞と比較して増殖が有意に抑制された。これに対し、KD ではこのような増殖抑制効果は認められず、Ad.hTERT-N116Y の癌特異的な細胞増殖抑制効果が示された。

RAS 癌遺伝子抑制変異体 N116Y は、ヒト舌癌細胞株 HSC-3、HSC-4、SAS に対して明らかな細胞増殖抑制効果を、更に HSC-3、HSC-4 に対してはアポトーシス誘導効果も示すことが明らかになった。この機構は RAS 癌遺伝子下流で働くリン酸化酵素 ERK のリン酸化が抑制されるためであることが示唆された。多くの癌に発現し正常細胞株では発現していない hTERT のプロモーターを持つ N116Y アデノウイルスベクターを構築し、舌癌細胞株に対する細胞増殖抑制効果を検討したところ、舌癌に特異的な抑制効果が見られた。これらの結果から、hTERT プロモーターを持つ N116Y アデノウイルスベクターが、ヒト舌癌に対する遺伝子治療に用いられる可能性が示唆された。

論文審査にあたって、論文申請者による研究要旨の説明後、本研究ならびに関連する研究について口頭試問を行った。

主な質問事項は、1) RAS タンパクの GDP/GTP 結合部位の中で 116 番目アミノ酸変異体を選んだ理由、2) ウエスタンブロットで各細胞株の RAS 蛋白質のどのような状態が確認できたか、3) Ad.CMV-N116Y を各細胞株に導入した際の N116Y 発現の相違について、4) 逆転写酵素について、5) ヘキスト染色以外のアポトーシスの確認法、6) 抑制変異体による細胞増殖の抑制とアポトーシスの関係、7) ERK 以外の MAPK 系のキナーゼのリン酸化について、8) 抗癌剤によるアポトーシスに関与している JNK 経路も確認した方が良いのでは、9) Ad.hTERT-N116Y による遺伝子発現は、リアルタイム RT-PCR による定量化やタンパク発現も確認した方が良いのでは、10) 得られた結果の重要性と今後の研究の方向性、等であった。

これらの試問に対して申請者は明快な回答、説明を行った。本研究は低侵襲かつ優れた効果を持つ新しい口腔癌の治療法として、N116Y 抑制変異体を使った遺伝子治療の可能性を

示したものであり、その内容が高く評価された。学位申請者は、関連分野にも幅広い学識を有していると認められ、更に有効な遺伝子治療の研究を進めており、将来性についても評価された。本研究業績は口腔癌治療のみならず関連領域にも寄与すること大であり、博士（歯学）の学位に値するものと認められた。