

[別紙1]

## 論文の内容の要旨

論文題目 ヒト扁平上皮癌細胞への *patched* 遺伝子導入による癌形質の抑制

指導教官 伊庭英夫 客員教授

東京大学大学院医学系研究科

平成9年4月入学

医学博士課程

病因・病理学専攻

氏名 小池千加

*patched* 遺伝子はもともと *Drosophila* のセグメントポラリティー遺伝子のひとつとして同定され、これまでそのホモログを用いてマウスやニワトリにおいても発生学における機能の解析が行われてきた。その産物である Patched (Ptc) は12回膜貫通型タンパク質として細胞膜上に存在し、通常は他の7回膜貫通型タンパク質である Smoothened (Smo) と結合してそのシグナル伝達活性を抑制している。Ptc にそのリガンドタンパク質でありモルフォゲンとして機能する Sonic hedgehog (Shh) が結合すると、Ptc は Smo に対する抑制活性を失って、Smo からのシグナルが細胞内に伝達されるようになる。このいわゆる Shh/Ptc/Smo シグナルはパターン形成や器官形成で重要な働きをしている。このシグナル伝達系の下流の詳細はまだ明らかにされていないが、伝達系の活性化により *gli 1*、*patched* などの遺伝子はその標的遺伝子として発現誘導される。すなわち、*patched* 遺伝子の発現量はこのシグナル伝達系のフィードバック制御をとおして自己制御されているものと考えられる。

一方、ヒトの常染色体優性遺伝疾患である基底細胞母斑症候群において染色体 9q22 附近の欠損がみられ、その位置に *patched* 遺伝子が存在することから、この遺伝子とヒトの疾患との関連が注目された。この疾患に罹患しているヒトでは紫外線照射などによるこの位置のヘテロ接合体の消失 (LOH; loss of heterozygosity) によって基底細胞腫などの腫瘍が形成されたものと考えられ

る例が蓄積している。偶発性の基底細胞腫においても、必ずしも両 allele 共の損傷ではないものの *patched* 遺伝子の欠損、変異が検出されたことからおそらく *patched* 遺伝子は癌抑制遺伝子として機能するものと考えられる。しかしながら、こういった腫瘍部位の遺伝子解析の記述のみでは決定的な結論は得られず、今後はより積極的、直接的に *patched* 遺伝子の機能を解析していく必要がある。

我々の研究室ではヒト遺伝子治療に利用できる VSV-G シュードタイプレトロウイルスベクターとその産生系の開発を行っており、このベクターが1回のトランスダクションで多コピーの遺伝子をヒト培養細胞に導入することを示してきた。実際に、転写制御因子 AP-1 のドミナントネガティブ変異体である *supjunD-1* や天然の癌抑制遺伝子である p53 をこのベクターを用いてヒト固形癌由来の細胞株で発現させてその発癌性を効率良く抑制することを示した。

*patched* が癌抑制遺伝子であってその欠損、変異のみで癌化をひき起こしているならば、*patched* を強制発現させれば癌化を抑制し得ると予想される。そこで本研究では *patched* の癌抑制遺伝子としての機能の解析を目的として chicken *patched* 遺伝子を発現する VSV-G シュードタイプレトロウイルスベクターを作製した。この chicken *patched* 遺伝子を発現するウイルスをいくつかのヒト癌由来の樹立細胞株に導入し、軟寒天中でのコロニー形成を指標として癌抑制活性を検討した。その結果、発現している *patched* mRNA に変異のある扁平上皮癌細胞 A431 や KA 株にこの Ptc ウイルスを導入した場合に、導入量に依存してコロニー形成が著しい抑制がみられた (表 1)。これらの上皮癌細胞に *supjunD-1* を導入した場合には、抑制活性はあまりみられなかった (表 2)。これとは逆に *patched* 遺伝子に変異を持たない扁平上皮癌細胞 NA 株や対照で用いた ras でトランスフォームした NIH-3T3 細胞 (NIH-ras) への導入では *supjunD-1* で強い抑制がみられたのに対し (表 2)、Ptc では抑制はあまりみられなかった (表 1)。また、精製 Shh タンパク質溶液を添加した培地を用いて軟寒天中でのコロニー形成活性を検討した。*patched* 遺伝子を導入した A431、KA 株ではコロニー形成能が著しく抑制されるが、Shh の添加によってコロニー形成率 *patched* 遺伝子を導入しない場合の 70%程度まで回復した (表 3)。さらに、Smo のシグナル伝達系の阻害剤であり、発生期に催奇性を示す物質である cyclopamine を添加した培地を用いて軟寒天中でのコロニー形成活性を検討したが、この場合にも A431 や KA 株では添加量に依存して著しい抑制効果が示されたが、NIH-ras では抑制は一切みられなかった。NA 株に対する cyclopamine のコロニー形成率に対する抑制効果もやや見られたものの、A431 や KA 株に比べて低いものであった。10 $\mu$ M の cyclopamine の添加により足場依存的増殖において A431、KA 株、NA 株ともに抑制がみられたことから cyclopamine の高濃度の添加は扁平上皮癌細胞に対する毒性を示す可能性がある。A431、KA 株においては Ptc ウイルス導入と、cyclopamine 添加が同じシグナル経路を辿って癌抑制効果を発揮していることを示唆している。さらに、Shh/Ptc/Smo シグナル伝達系により発現調節されると考えられて

いる遺伝子 *patched* および *gli 1* の mRNA 発現を RT-PCR により検討した。その結果、A431 では *patched*、*gli 1* 共に Ptc ウイルス導入により発現量が減少していた。KA 株では *patched* の発現量はあまり変化がないものの、*gli 1* の発現量は Ptc ウイルス導入により減少していた。NA 株ではどちらもほとんど変化がなく、とくに *gli 1* の発現レベルは *patched* 遺伝子導入の有無に関わらず非常に低かった。これらの遺伝子発現量の減少はこれら A431、KA 株において *patched* 遺伝子の変異によって Smo 以下のシグナルを抑制できずに過剰に機能していたことつまり標的遺伝子が過剰発現していたこと、外来の野生型 *patched* 遺伝子の発現により、それが抑制されたことを示唆する。以上より、Ptc の導入に特異的に癌抑制効果があられたことから、これらの上皮癌細胞 A431、KA 株では機能をもった Ptc を産生していないことが癌化の要因となっており、野生型 Ptc を導入するだけで足場非依存的増殖能すなわち癌形質を失うことが示された。とくに A431 ではこれまで EGF 受容体の過剰発現等が癌化に関わっているのではないかと考えられていたが、そういったシグナルの下流にあると考えられる内在性 AP-1 に対してドミナントネガティブに作用する *supjunD-1* 遺伝子導入では効果がなくむしろ *patched* 遺伝子の導入に足場非依存的増殖能を抑制する効果が見られたことからこの細胞においては *patched* 遺伝子の変異が癌化の主要因となっていると考えられる。反対に、NA 株や NIH-ras においては *patched* 遺伝子の導入ではなく *supjunD-1* 遺伝子導入により足場非依存的増殖能を抑制する効果が見られた。これらの結果から今回調べたそれぞれの癌細胞株において癌化に関わる経路はそれぞれ独立であることを示唆している。

本研究で、Ptc の発現に異常のある細胞にレトロウイルスを用いて *patched* 遺伝子を導入することで、その発癌を抑制し得ること、その抑制は Shh/Ptc/Smo シグナル伝達系の制御によるものであることを示した。このことは扁平上皮癌などのヒトの疾患における *patched* 遺伝子導入による遺伝子治療の可能性を示している。

表1 *patched* 遺伝子導入の増殖に対する効果

細胞	軟寒天中における コロニー形成 (%) *		単層培養における増殖			
	MOI 0.1	MOI 3	倍加時間 (%) *		飽和濃度 (%) *	
			MOI 0.1	MOI 3	MOI 0.1	MOI 3
A431	35±7	21±3	95±0	100±4	99±11	78±19
KA	40±17	25±2	107±3	114±2	96±20	88±11
NA	82±3	73±2	101±2	92±2	104±11	108±20
NIH-ras	82±7	97±9	96±3	110±3	97±19	105±11

\*コントロールベクター導入細胞に対する比率 (%)

表2 *supjunD-1* 遺伝子導入の増殖に対する効果

細胞	軟寒天中における コロニー形成 (%) *		単層培養における増殖			
	MOI 0.1	MOI 3	倍加時間 (%) *		飽和濃度 (%) *	
			MOI 0.1	MOI 3	MOI 0.1	MOI 3
A431	79±9	78±7	100±5	96±3	97±12	94±28
KA	67±18	57±13	100±3	90±1	95±14	104±12
NA	42±6	18±3	105±2	110±5	98±7	99±18
NIH-ras	42±3	34±1	117±4	121±3	93±17	99±6

\*コントロールベクター導入細胞に対する比率 (%)

表3 Shh添加の足場非依存的増殖に対する効果\*

	A431		KA		NA	
	control	patched	control	patched	control	patched
-Shh	100	26	100	34	100	76
+Shh (200ng/ml)	87	67	96	78	88	88

\*Shh非存在下においてコントロールウイルス導入細胞のコロニー数を100とした比率