

審査の結果の要旨

氏名 小池 千加

本研究は *patched* 遺伝子の癌抑制遺伝子としての機能を解析することを目的として、野生型 *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、ヒト扁平上皮癌由来の樹立細胞株に導入してその形質に与える影響を検討し、下記の結果を得ている。

1. ニワトリ *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、発現している *patched* 遺伝子に変異をもつヒト扁平上皮癌由来細胞 A431、KA 株、変異をもたない NA 株、対照として *ras* でトランスフォームした NIH-3T3 (NIH-*ras*) に導入した。その結果、いずれの細胞においても単層培養における増殖に影響はなかった。癌形質を強く示唆する軟寒天中におけるコロニー形成に与える影響を検討した。その結果、*patched* 遺伝子に変異をもつ A431、KA 株では著しいコロニー形成の抑制がみられた。この効果は導入量依存性であった。変異をもたない NA 株、NIH-*ras* ではあまり抑制は見られなかった。
2. Patched のリガンドである Shh タンパク質を添加した培地を用いて軟寒天中におけるコロニー形成活性を検討した。その結果、*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 の添加によりそのコロニー形成能は *patched* 遺伝子を導入しない場合の 70% 程度まで回復する事が示された。*patched* 遺伝子に変異をもたない NA 株では Shh の添加効果は見られなかった。
3. Shh/Ptc/Smo シグナル伝達系の阻害剤である植物から得られたアルカロイド cyclopamine を添加した培地を用いて軟寒天中におけるコロニー形成活性を検討した。その結果、A431、KA 株ではその添加量に依存して著しい抑制効果が示された。NIH-*ras* では抑制は一切みられなかった。NA 株ではやや抑制効果がみられたものの、その効果は A431 や KA 株に比べて低いものであった。A431、KA 株においてコロニー形成能に対する *patched* 遺伝子導入と cyclopamine 添加の効果が似ていたことはこれらが同じ経路を阻害してコロニー形成を抑制していることを示す。
4. Shh/Ptc/Smo シグナル伝達系の標的と考えられている遺伝子 *patched* および *gli* 1 の mRNA の発現を RT-PCR によって検討した。その結果、A431 では *patched*、*gli* 1 とともに野生型 *patched* 遺伝子導入により減少していた。KA 株では *patched* の発現量はあまり変化がないものの、*gli* の発現量は野生型 *patched* 遺伝子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、特に *gli* 1 の発現レベルは非常に低いものであった。これらの遺伝子の発現量の減少は A431、KA 株では *patched* 遺伝子の変異により Smo のシグナル伝達活性を抑制できないために過剰にシグナルが伝達されて標的遺伝子が発現していて、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。

5. *patched* 遺伝子導入との効果の比較を目的として AP-1 のドミナントネガティブ

変異体 *supjunD-1* を発現するウイルスを各細胞に導入し、軟寒天中におけるコロニー形成を検討した。その結果、A431、KA 株ではあまり抑制がみられなかった。NA 株、NIH-ras では強い抑制効果がみられた。A431、KA 株では AP-1 を介する経路よりも Patched を介する経路がより癌化との関連が強いことを示唆する。また、NA 株では *supjunD-1* 遺伝子導入がコロニー形成の抑制を示したことから、扁平上皮癌を同種の癌としてひとくくりにできないことを示す。このような癌形質抑制効果の違いは、それぞれの癌においてその癌化の主要因となる経路は異なり、治療の標的となり得る遺伝子が異なることを示す。

以上、本論文は野生型 *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てヒト扁平上皮癌細胞株に導入し、その癌形質が抑制されることを示した。この結果は *patched* 遺伝子による癌抑制効果を示した最初の報告であり、また野生型 *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が一部の扁平上皮癌の有効な治療手段であること示したことにおいても意義深いものである。本研究は *patched* 遺伝子の癌抑制遺伝子としての機能解析、また遺伝子治療の基礎研究として重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。