

チャイニーズハムスター胎児細胞の自然がん化過程 におけるN-ras及びp53遺伝子の関与

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-05 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/15994

氏名	清水 貴 壽
生年月日	
本籍	愛知県
学位の種類	博士(薬学)
学位記番号	博甲第151号
学位授与の日付	平成7年9月26日
学位授与の要件	課程博士(学位規則第4条第1項)
学位授与の題目	チャイニーズハムスター胎児細胞の自然がん化過程における <i>N-ras</i> 及び <i>p53</i> 遺伝子の関与 (<i>N-ras</i> and <i>p53</i> mutation associated with neoplastic progression of spontaneous transformation in cultured Chinese hamster embryo cells.)
論文審査委員	(主査) 鈴木 文 男 (副査) 二階堂 修, 大熊 勝 治 山口 和 男, 正宗 行人

学位論文要旨

I have examined the genetic changes in the progression of spontaneous neoplastic transformation in cultured Chinese hamster embryo (CHE) cells. All nine CHE cell strains, each initiated from a separate cell stock obtained from different mothers, proliferated at varying growth rates for 60 passages in culture. After 5 passages, CHE cells exhibited a constant growth rate and showed common karyotype changes, trisomy of chromosome 3q or 5. However only 2 (designated CHE A1 and CHE A2) out of 9 strains expressed malignant phenotypes at later passages. The acquisition of tumorigenicity in nude mice was observed in CHE A1 and CHE A2 cells at passage 40 and 10, and later passages, respectively. DNA from these tumorigenic cells and their malignant cell lines obtained from tumors consistently showed a high ability to transform mouse NIH3T3 cells. CHE A2 cells cultured for 25 passages and their tumor derived cell lines had one mutation, A to T transversion, in the second position of *N-ras* codon 61, although there was no mutation in exon 2 to 10 of *p53* gene. It was found, on the contrary, that G to A transition in *p53* at codon 245 was detected in CHE A1 cells cultured for passage 40 and that this mutant allele became predominant with increasing passages thereafter. Tumor derived cell lines from CHE A1 cells contained only the mutant allele and showed a high degree of aneuploidy with various abnormal chromosomes. These data demonstrate that mutations in *N-ras* and *p53* genes may play an important role in the progression of neoplastic transformation in cultured CHE cells.

がんの発生及び進展の機構を解明することは、将来がんを克服するための最重要課題である。この発がん機構の解析として、がん患者より得られたがん組織を対象とした遺伝子異常の解析が進められているが、このようながん細胞では悪性度が進行しているため、既に種々の遺伝子変化が生じていることが多く、多段階的な発がん過程に参与する遺伝子を同定することは困難である。その点、培養細胞を用いた試験管内発がん系は、正常細胞ががん化する過程を経時的に調べるのが可能であり、細胞がん化機構を解析するのに非常に適した系である。本研究では、チャイニーズハムスター胎児細胞を用いて自然がん化系を確立し、そのがん化過程に参与する染色体変化及び遺伝子変化について解析を行った。

チャイニーズハムスターの母体3匹より得られた9種の胎児細胞系について、継代培養を繰り返した結果、全ての細胞系が、がん化形質の第一段階である無限増殖能を獲得した。その後60継代まで培養を続け、これら各継代期の形質転換細胞について、最終的な悪性形質の指標とされる、ヌードマウス皮下における可移植性について調べた。その結果、9種中2種(A1、A2)の細胞系がそれぞれ、40継代目、10継代目で造腫瘍性を示した。次に、これらのがん化形質発現に染色体変化が参与しているかどうかを調べるために、各継代期の細胞についてギムザ分染法を用いた詳細な核型分析を行った。その結果、9例中6例に3番染色体長腕部の付加(3qトリソミー)が、9例中5例に5番染色体の付加が観察された。また造腫瘍性を示した2種の細胞系に共通して検出された染色体変化(3qトリソミー)は、これらの腫瘍から獲得した4種の腫瘍由来細胞(T40A1、T60A1、T15A2、T25A2)にも検出された。しかしながら3qトリソミーを持ちながら造腫瘍性を示さない細胞が存在することから、悪性形質の獲得には、この染色体変化に加えて他の遺伝子レベルでの変化が必要と考えられる。そこで、この遺伝子レベルでの変化を同定するために、がん遺伝子及びがん抑制遺伝子について解析を行うことにした。まず、がん遺伝子についてトランスフォーミング活性を指標にして解析を進めた。各種形質転換細胞からDNAを抽出し、マウスNIH3T3細胞に導入することにより活性化がん遺伝子の有無を調べた。その結果、造腫瘍性を示す細胞や腫瘍由来細胞のDNAを導入すると、一様にトランスフォーミング活性が認められた。また、こうして得られた1次トランスフォーム細胞のDNAを再度NIH3T3細胞に導入すると再びトランスフォーミング活性が検出できた。この結果より、造腫瘍性を示すチャイニーズハムスター悪性形質転換細胞内での活性化がん遺伝子の存在が示唆された。この活性化がん遺伝子を同定するために8種の既知のがん遺伝子をプローブとしてサザンブロット解析を行った。その結果、T25A2細胞DNA由来の1～3次トランスフォーム細胞において、N-rasをプローブに用いた場合にチャイニーズハムスター由来のバンドが検出され、A2細胞系のがん化過程でのN-ras遺伝子の関与が示唆された。ras遺伝子の活性化機構としては12、13、61番コドンでの点突然変異が報告されているので、この遺伝子領域を非対称PCRで増幅し、ジデオキシ法により直接塩基配列を決定した。その結果、腫瘍由来細胞(T25A2)に61番コドンでCAA(Gln)→CTA(Leu)の点突然変異が検出された。続いて、制限酵素MaeIを用いたより高感度な解析法で調べたところ、T25A2細胞のもとの細胞(CHE A2 p25)でも同タイプの点突然変異が検出さ

れた。これらの結果より、N-ras 遺伝子の活性化が A2 細胞系の自然がん化過程の最終段階に参与していることが示唆された。

次に、多数のヒトがんで最も高頻度に変異が検出されるがん抑制遺伝子 *p53* について解析を進めることにした。チャイニーズハムスターの *p53* 遺伝子はまだ分離されていないので、まず、チャイニーズハムスター *p53* 遺伝子の cDNA をクローニングして塩基配列を決定した。チャイニーズハムスター *p53* 蛋白質は 393 アミノ酸から成り、シリアンハムスターと 95.9%、マウスと 78.6%、ヒトと 79.4% のホモロジーを示した。また、他の動物種の *p53* 蛋白質に検出されている特徴的な部位が検出された。このチャイニーズハムスター *p53* 遺伝子の塩基配列を参考にしてプライマーを作製し、SSCP 解析を用いて点突然変異について解析を行うことにした。*p53* 蛋白質をコードする全領域を 7 つの領域に分け、9 種のチャイニーズハムスター形質転換細胞及び 4 種の腫瘍由来細胞について、それぞれの領域を RT-PCR で増幅し、SSCP 解析によって点突然変異の有無を調べた。その結果、9 種中 8 種の形質転換細胞では全ての領域で点突然変異は検出されなかった。造腫瘍性を示した A1 細胞系の 50 継代以降の細胞と A1 細胞系由来の 2 種の腫瘍由来細胞において、コドン 226 - 316 の間に点突然変異の存在が示唆された。詳細な変異位置をダイレクトシーケンス法によって調べたところ、コドン 245 で GGC (Gly) → AGC (Ser) の変異が検出された。コドン 245 でのアミノ酸置換は、ヒトのがんにおいて既に数多く報告されており、またこのコドンでの変異が *p53* 蛋白質の機能に影響を与えることも示唆されているので、今回検出された *p53* 遺伝子の変異は、A1 細胞系の自然がん化に重要な役割を果たしていることが考えられる。最近の *p53* 遺伝子の機能に関する研究より、*p53* 遺伝子は細胞の遺伝子安定性の維持に関わっていることが示唆されている。そこで、本研究で検出された *p53* 遺伝子変異の細胞の遺伝子安定性に与える影響を検討するために、4 種の腫瘍由来細胞の染色体数の分布を調べた。その結果、野生型 *p53* 遺伝子を持つ細胞 (T15A2、T25A2) に対して変異型 *p53* 遺伝子を持つ細胞 (T40A1、T60A1) では染色体数のモード値が増加し、また各モード値の染色体数を持つ細胞の割合は、それぞれ 42% (T40A1)、41% (T60A1)、60% (T15A2)、67% (T25A2) という値を示した。また詳細な核型解析を行ったところ、野生型 *p53* 遺伝子を持つ細胞では 90% 以上の細胞で同じ核型を示したのに対して、変異型 *p53* 遺伝子を持つ細胞では非常に様々な染色体に異常を示すヘテロな細胞の集団であることがわかった。これらの結果より、A1 細胞系において生じた *p53* 遺伝子の変異が、核型の不安定性を引き起こしていることが示唆された。

従来よりチャイニーズハムスターの 3 番染色体短腕部でのがん抑制遺伝子の存在が示唆されているが、この *p53* 遺伝子が位置していると仮定すると、先に検出した染色体変化 (3q トリソミー) と *p53* 遺伝子の変異との関わりが考えられる。そこでチャイニーズハムスター *p53* 遺伝子の染色体マッピングを行うことにした。チャイニーズハムスター *p53* genomic DNA をプローブにして direct R-banding fluorescence in situ hybridization (FISH) 法を用いて解析した結果、チャイニーズハムスター *p53* 遺伝子は 7 番染色体の q4 の位置にマッピングされた。この結果より、3q トリソミーと *p53* 遺伝子の変異には関わりがないこ

とが示された。

以上の結果より、チャイニーズハムスター細胞の自然がん化は多段階より成り立っており、その悪性化の段階には特定の染色体変化に加えて *N-ras* や *p53* 遺伝子の変異が関与していることがわかった。また A1 細胞系において明らかとなったように、変異型 *p53* 遺伝子を有する細胞では染色体が不安定となり、その結果としてより悪性な細胞へと形質転換することが示唆された。

学位論文の審査結果の要旨

本論文の審査は、各審査委員が提出された論文の内容につき慎重な審査を行い、かつ平成7年8月2日開催の口頭発表会での発表内容を踏まえて、同日開催された論文審査委員会において協議した。その結果、以下の結論に達した。

本研究論文は、チャイニーズハムスター胎児由来細胞を用いて試験管内発がん系を確立し、その細胞がん化過程に関与する染色体変化やがん遺伝子およびがん抑制遺伝子の変異について研究を行ったものである。従来この種の研究は、主にヒトがん組織や実験動物腫瘍を用いて行われてきたため、細胞がん化過程に関わる複雑な遺伝的変化を同定することは困難とされていた。しかしながら組織培養技術の進歩により、細胞レベルでの発がん研究が可能となり、正常細胞から悪性ながん細胞に至る過程を詳細に調べることができるようになった。本研究の特徴は、これまで体細胞遺伝学的研究に汎用されてきたチャイニーズハムスター細胞を用いて解析しているところにある。主な研究成果は以下の3点に要約される。(1) チャイニーズハムスター細胞は継代培養するだけで容易に株化し、さらに継代培養するとその一部は悪性な形質転換細胞になること（自然がん化の多段階性）を示した。(2) またこの細胞の悪性化には特定の染色体変化に加えてがん遺伝子 (*N-ras*) やがん抑制遺伝子 (*p53*) の変異が関与していることを明らかにした。(3) さらに *p53* 遺伝子の変異は染色体の不安定性を誘起することを示唆した。

以上のように、本研究では細胞がん化系を用いて細胞生物学から分子生物学にわたって幅広い研究が行われ、種々の貴重な知見が得られており、今後のさらなる発展が期待される。特に、本研究過程において、世界に先駆けてチャイニーズハムスターの *p53* 遺伝子 (cDNA) をクローニングし、その染色体マッピングに成功したことは高く評価できる。よって本委員会は、本研究を博士論文に値するものと判定した。