

学位論文題名

ヒト絨毛癌細胞の形質における *ras* 遺伝子の意義

学位論文内容の要旨

初期の正常絨毛細胞に類似した形質を有していると考えられるヒト絨毛癌細胞株に、*ras*癌原遺伝子としての作用を強くもっている活性化*ras*遺伝子を導入することで惹起される生物学的性質の変化を解析することにより、*ras*癌原遺伝子の絨毛細胞系列における機能的意義を解明することを試み、絨毛組織の機能分化と*ras*遺伝子との関連を考察することを本研究の目的とした。

II. 研究材料および方法

(1) 細胞培養

ヒト絨毛癌細胞株CC1を、20% FCS 添加DMEMにて、37℃, 5% CO₂の条件で培養した。コラーゲンゲル包埋培養は、コラーゲン混合溶液をゲル化させた支持層上に、コラーゲン混合溶液にて細胞数を5x10⁴/mlに調整後、分注してゲル化させ、その上に20%FCS加DMEMを重ねし、37℃, 5% CO₂にて培養した。ゲルをホルマリン固定し、パラフィン包埋後に薄切し、ヘマトキシリン-エオジン染色を施し観察した。

(2) v-*ras* 発現クローンの単離

v-*ras* 癌遺伝子の発現ベクターとして、pSV2neo/H-*ras*, pSV2neo/K-*ras*, 対照としてpSV2neoを各々リポフェクション法にてCC1細胞 (5x10⁵個) にトランスフェクションし、G418にて選択培養後に耐性コロニーを単離した。導入遺伝子の発現は、v-*ras*に特異的なプライマーを用いたRT-PCR法にて確認した。増幅されたPCR産物を2%アガロースゲル中で電気泳動し、ethidium bromideにて染色後に写真撮影した。

(3) 細胞増殖曲線および軟寒天培地でのコロニー形成

5x10⁴個の細胞を35-mmシャーレに播種し、24時間ごとの細胞数をduplicateにてカウントして、細胞増殖曲線を作成した。

軟寒天培地でのコロニー形成能については、20% FCS加DMEMを含む0.5%寒天溶液を60-mmシャーレに注入して支持層とし、1x10⁴個の細胞を0.33%に希釈した軟寒天培地に浮

遊させ、支持層上に重層して3週間培養後、形成されたコロニー (直径200 μ m以上)数をカウントした。

(4) Na⁺-K⁺-ATPase活性の測定および細胞形態に対するウアバインの影響

5x10⁵個の細胞を60-mmシャーレに播種し、5日後に細胞を回収し、STE solution (0.25 M sucrose / 10 mM Tris-HCl, pH 7.5 / 2 mM EGTA)に浮遊させ、ホモジェナイズした。Belsham et al.(1980)の方法に従って分離された細胞膜分画を、10 mM Tris-HCl, pH 7.4に浮遊させ、Jørgensen (1974)の方法でNa⁺-K⁺-ATPase活性を測定し、蛋白質量で補正した。

5x10⁵個の細胞を60-mmシャーレに播種し、1週間後に各クローンの細胞形態を観察した際、シャーレ表面から遊離・膨隆した半球状の細胞層を”ドーム”と規定した。

Na⁺-K⁺-ATPaseの特異的阻害剤 (ウアバイン) を終濃度1x10⁻¹¹~1x10⁻⁸ Mの範囲で培地に添加し、24時間後に長径100 μ m以上のドームをduplicateにてカウントし、1cm²あたりのドーム数を算出した。

(5) hCG分泌量の測定

3x10⁵個の細胞を35-mmシャーレに播種し、48時間後に無血清培地 (DMEM) に交換した。さらに24時間後に再度無血清培地に交換し、その24時間後に培養液を回収し、培養上清中のhCG濃度をEIA法にて測定した。hCG分泌能は、細胞10⁵個あたりの分泌量で表した。

(6) hCG β mRNAの発現

2x10⁶個の細胞を100-mmシャーレに播種し、(5)と同様に細胞培養後、total RNAを抽出した。total RNA 30 μ gをグリオキサール化し、1%アガロースゲル中で電気泳動後、ナイロン膜に転写した。hCG β に対するプローブとして、Fiddes and Goodman (1980) が報告したhCG β cDNA, human cardiac actinの genomic DNAをランダムプライマー法で³²P標識したものをを用いた。ハイブリダイゼーション後、オートラジオグラフィーを行った。

III. 研 究 結 果

RT-PCR法にてv-rasの発現が確認されたクローン (H-ras-1, H-ras-5, K-ras-1, K-ras-2)と、対照クローン (neo-1, 2)を用いて検討を行い、以下の結果を得た。

(1) 細胞増殖能および足場非依存性増殖能

細胞増殖能、軟寒天培地中でのコロニー形成能については、v-ras発現クローンと対照クローンとの間で明らかな差異を観察し得なかった。

(2) 細胞形態

H-ras-1, 5では液体を貯留した三次元的なドーム形成が共通して観察されたのに対し、K-ras-1, 2とneo-1, 2とでは明らかな形態変化を示さなかった。顕微鏡での観察から、ドーム

は、培養皿と細胞層との間に液体が貯留して細胞層が培養皿から半球状に遊離・膨隆したものと考えられ、コラーゲンゲル包埋三次元培養でも液体を内包した囊胞形成が認められた。

(3) $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ 活性およびドーム形成に与えるウアバインの影響

ドームの形態観察から、 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ 活性の上昇がドーム形成の一つの要因と考え、 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ 活性($\mu\text{g Pi/min/mg protein}$, mean $\pm$ SE)を比較検討した結果、neo-1, 2では 3.08 ± 0.92 , 2.47 ± 0.79 , K-ras -1, 2では 3.50 ± 0.60 , 2.97 ± 1.03 であったのに対し、H-ras -1, 5では 10.83 ± 2.30 , 8.95 ± 2.45 と、neo-1, 2に比べて有意 ($p<0.05$)に高値を示した。

さらに、 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ の特異的阻害剤であるウアバインの添加によりドームが消失し、濃度依存性のドーム数の減少が確認された。

(4) hCG分泌能

H-ras-1, 5においては 0.85 ± 0.15 , 2.81 ± 0.39 (mIU/ml/ 10^5 cells, mean $\pm$ SE) とneo-1, 2の 1.82 ± 0.36 , 1.50 ± 0.41 に比べて明らかな差を認めなかったのに対し、K-ras-1, 2においては 5.09 ± 0.71 , 8.40 ± 1.20 と、neo-1, 2に比べて有意 ($p<0.01$)に高い分泌量を示した。

ノーザンブロット解析の結果、H-ras-1, 5ではneo-1, 2との比較において一定の傾向を示さなかったのに対し、K-ras-1, 2では明らかに高いhCG β mRNAレベルを示した。

IV. 考 察

(1) ドーム形成とH-rasとの関連

ドーム形成を示すv-H-ras発現CC1クローンの $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ 活性が対照クローンのそれに比べて高く、かつ特異的阻害剤(ウアバイン)の濃度依存性にドーム数の減少が観察されたことから、ドーム形成が、 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ で駆動される絨毛細胞を介した外界(培養液側)から細胞内へ向かう一方向性の液体輸送機構に基づく現象と考えられる。本研究の結果から、H-rasが絨毛細胞における経細胞性輸送機構に促進的に作用している可能性がはじめて示唆された。

(2) hCG分泌能とK-rasとの関連

従来、主にA-kinase系がhCG分泌調節機構に関与していることが確認されており、A-kinase系は細胞の増殖を抑制し、hCG分泌を亢進させる。これに対し、v-K-rasをCC1細胞内で発現させた場合、細胞増殖能に明らかな影響を与えることなくhCG β の発現が対照クローンと比べて増加していたことから、(1) 絨毛細胞におけるhCG β の調節機構として、A-kinase系とともにrasを介する系が存在していること、ならびに(2) rasが増殖旺盛な妊娠初期の絨毛細胞におけるhCG産生の主要な調節系の一つとして作用することで妊娠維持機構に関与している可能性があること、がはじめて推察された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 藤 本 征一郎

副 査 教 授 石 橋 輝 雄

副 査 教 授 葛 巻 暹

学 位 論 文 題 名

ヒト絨毛癌細胞の形質における *ras* 遺伝子の意義

ヒト絨毛癌細胞株に、*ras* 遺伝子を導入することで惹起される生物学的性質の変化を解析することにより、*ras* 癌原遺伝子の絨毛細胞系列における機能的意義を解明することを試み、絨毛組織の機能分化と *ras* 遺伝子との関連を考察することを本研究の目的とした。

ヒト絨毛癌細胞株CC1 を、20% FCS 添加DMEMにて、37°C、5% CO₂の条件で培養した。

コラーゲンゲル包埋培養は、コラーゲン混合溶液をゲル化させた支持層上に、コラーゲン混合溶液にて細胞数を 5×10^4 /mlに調整後、分注してゲル化させ、その上に20%FCS加DMEMを重層し、37°C、5% CO₂にて培養した。ゲルをホルマリン固定し、パラフィン包埋後に薄切し、ヘマトキシリン-エオジン染色を施し観察した。

v-*ras* 癌遺伝子の発現ベクターとして、pSV2neo/H-*ras*, pSV2neo/K-*ras*, 対照として pSV2neo を各々リポフェクション法にて CC1細胞 (5×10^5 個) にトランスフェクションし、G418にて選択培養後に耐性コロニーを単離した。導入遺伝子の発現は、v-*ras* に特異的なプライマーを用いたRT-PCR法にて確認した。

5×10^4 個の細胞を35-mm シャーレに播種し、24時間ごとの細胞数をduplicate にてカウントして、細胞増殖曲線を作成した。

軟寒天培地でのコロニー形成態については、20%FCS 加DMEMを含む0.5%寒天溶液を60-mmシャーレに注入して支持層とし、 1×10^4 個の細胞を0.33% に希釈した軟寒天培地に浮遊させ、支持層上に重層して3週間培養後、形成されたコロニー (直径200 μ m 以上) 数をカウントした。

Na⁺-K⁺-ATPase 活性の測定および細胞形態に対するウアバインの影響の観察のために、 5×10^5 個の細胞を60-mmシャーレに播種し、5日後に細胞を回収し、STE solution (0.25 M sucrose/10 mM Tris-HCl, pH 7.5 / 2 mM EGTA) に浮遊させ、ホモジェナイズした。分離した細胞膜分画を、10 mM Tris-HCl, pH 7.4に浮遊させ、Na⁺-K⁺-ATPase 活性を測定した。

5×10^5 個の細胞を60-mm シャーレに播種し、1週間後に各クローンの細胞形態を観察した際、シャーレ表面から遊離・膨隆した半球状の細胞層を”ドーム”と規定した。

Na⁺-K⁺-ATPase の特異的阻害剤 (ウアバイン) を終濃度 1×10^{-11} ~ 1×10^{-8} Mの範囲で培地に添加し、24時間後に長径100 μ m 以上のドームをduplicate にてカウントし、1cm²あたりのドーム数を算出した。

3×10^5 個の細胞を35-mm シャーレに播種し、48時間後に無血清培地 (DMEM) に交換した。さらに24時間後に再度無血清培地に交換し、その24時間後に培養液を回収し、培養上清中のhCG β 濃度をEIA法にて測定した。hCG β 分泌能は、細胞 10^5 個あたりの分泌量で表した。

さらに、 2×10^6 個の細胞を100-mmシャーレに播種し、total RNAを抽出した。total RNA 30 μ gをグリオキサール化し、1%アガロースゲル中で電気泳動後、ナイロン膜に転写した。hCG β に対するブ

ローブとして、hCG β cDNA, human cardiac actin の genomic DNA をランダムプライマー法で³²P 標識したものを用いた。ハイブリダイゼーション後、オートラジオグラフィを行った。

RT-PCR 法にて v-ras の発現が確認されたクローン (H-ras-1, H-ras-5, K-ras-1, K-ras-2) と、対照クローン (neo-1, 2) を用いて検討を行い、以下の結果を得た。

(1) 細胞増殖能および足場非依存性増殖能

細胞増殖能、軟寒天培地中でのコロニー形成能については、v-ras 発現クローンと対照クローンとの間で明らかな差異を観察し得なかった。

(2) 細胞形態

H-ras-1, 5 では液体を貯留した三次元的なドーム形成が共通して観察されたのに対し、K-ras-1, 2 と neo-1, 2 とでは明らかな形態変化を示さなかった。顕微鏡での観察から、ドームは、培養皿と細胞層との間に液体が貯留して細胞層が培養皿から半球状に遊離・膨隆したものと考えられ、コラーゲンゲル包埋三次元培養でも液体を内包した嚢胞形成が認められた。

(3) Na⁺-K⁺-ATPase 活性およびドーム形成に与えるウアバインの影響

ドームの形態観察から、Na⁺-K⁺-ATPase 活性の上昇がドーム形成の一つの要因と考え、Na⁺-K⁺-ATPase 活性 (μ g Pi/min/mg protein, mean $\pm$ SE) を比較検討した結果、neo-1, 2 では 3.08 ± 0.92 , 2.47 ± 0.79 , K-ras-1, 2 では 3.50 ± 0.60 , 2.97 ± 1.03 であったのに対し、H-ras-1, 5 では 10.83 ± 2.30 , 8.95 ± 2.45 と、neo-1, 2 に比べて有意 ($p < 0.05$) に高値を示した。

さらに、Na⁺-K⁺-ATPase の特異的阻害剤であるウアバインの添加によりドームが消失し、濃度依存性のドーム数の減少が確認された。

(4) hCG β 分泌能

H-ras-1, 5 においては 0.85 ± 0.15 , 2.81 ± 0.39 (mIU/ml/ 10^5 cells, mean $\pm$ SE) と neo-1, 2 の 1.82 ± 0.36 , 1.50 ± 0.41 に比べて明らかな差を認めなかったのに対し、K-ras-1, 2 においては 5.09 ± 0.71 , 8.40 ± 1.20 と、neo-1, 2 に比べて有意 ($p < 0.01$) に高い分泌量を示した。

ノーザンブロット解析の結果、H-ras-1, 5 では neo-1, 2 との比較において一定の傾向を示さなかったのに対し、K-ras-1, 2 では明らかに高い hCG β mRNA レベルを示した。

以上の実験成績から次の2点がはじめて示唆された。すなわち、(1) H-ras が絨毛細胞における経細胞性輸送機構に促進的に作用している可能性がある。(2) 絨毛細胞における hCG β の調節機構として、A-kinase 系とともに ras を介する系が存在している。

口頭発表に際し、葛巻教授から ras 蛋白とイオンチャンネル、ポンプとの関係、3種類の ras の機能的相違について、また、石橋教授からは、ドーム形成と Na⁺-K⁺-ATPase の作用機構との関連、膜蛋白である Na⁺-K⁺-ATPase に対する ras の作用機構、細胞膜での本酵素の局在などについて、さらに小山富康教授からは、正常絨毛細胞における K-ras と hCG 産生との関係、絨毛癌あるいは絨毛組織でのドーム形成現象の存在、水分輸送における Ca²⁺-ATPase の意義について、それぞれ質問があった。

申請者はこれらの質問に対して概ね適切に解答をなしたものだと思われた。

発表後、葛巻教授、石橋教授から個別に面接の上審査を受け合格の判定を下された。

以上、本研究はヒト絨毛癌細胞 (CCI) において、ras 癌原遺伝子の機能的意義をドーム形成、hCG 分泌能の両面から明確にしえた基礎的研究であり、博士 (医学) の授与に価すると判断された。