学位論文題名

Suppression of tumorigenicity and induction
of senescence on human endometrial carcinoma
cell lines by transfer of normal human chromosomes

(正常ヒト染色体移入による子宮内膜癌細胞株の
造腫瘍性の抑制と老死化の誘導)

学位論文内容の要旨

I. 緒言

正常細胞に癌抑制遺伝子が存在することは、正常細胞と腫瘍細胞との融合細胞において、造腫瘍性が抑制される事実より示唆されてきた。これら融合細胞を用いて癌抑制遺伝子が存在する特定の染色体を同定するためには、長期にわたる培養過程で染色体が脱落し、かつ造腫瘍性を再獲得した融合細胞クローンが複数必要であった。しかし、今回 pSV2neo 遺伝子を正常ヒト染色体に導入した後、単一ヒト染色体を含むマウスA9細胞ライブラリーを作製し、これらを用いることによって腫瘍細胞に対する癌抑制遺伝子が存在する染色体を直接的に同定する方法を開発した。

本研究では2種類の子宮内膜癌細胞株に対する種々の単一ヒト染色体移入実験を行ない、単一ヒト染色体移入細胞(微小核融合細胞)クローンの腫瘍特性の変化を検討することによって、子宮内膜癌に対する癌抑制遺伝子の存在する染色体の同定を試みた。

II. 研究材料および方法

1. 細胞

HHUAおよびIshikawa細胞は分化型腺癌由来の子宮内膜癌細胞株で、HHUA細胞の染色体核型は46,XX(73%)と46,XX,4p+(37%)であり、またIshikawa細胞の染色体核型は46,XX,5p+,-13,+(13q),+marである。両細胞ともヌードマウスへの移植(1×10^7 個)によって、100%の部位に3-5週間で腫瘍を形成する。両細胞を微小核融合実験の対象細胞とした。微小核細胞は pSV2neo 遺伝子をもつ単一ヒト染色体(MRC-5またはNT1-4細胞由来)を含むマウスA9細胞ライブラリーより作製された。

2. 微小核融合法を用いた単一ヒト染色体移入

単一ヒト染色体をもつマウスA9細胞を48時間コルセミド($0.05 \mu\text{g/ml}$)処理した後、フラスコをサイトカラシン($10 \mu\text{g/ml}$)を含む培養液で満たし、8000rpm、60分間(37°C)の超遠心を行なった。得られた微小核細胞をフィルター($8 \mu\text{m}$ 、 $5 \mu\text{m}$ および $3 \mu\text{m}$)濾過後、47%ポリエチレングリコール(MW1000)を用いてHHUAおよびIshikawa細胞と融合した。細胞はG418($800 \mu\text{g/ml}$)を含む培地で3週間以上培養され、pSV2neo遺伝子が導入された微小核融合細胞(G418耐性クローン)だけが選択された。得られたG418耐性クローンをキナクリンマスタード法にて染色体核型分析し、単一ヒト染色体の移入を確認した。

3. 染色体 in situ ハイブリダイゼーション

pSV2neo plasmid を $[^3\text{H}]d\text{ATP}$ と $[^3\text{H}]d\text{CTP}$ を用いてNick-translation法でラベルし、染色体スライド上でハイブリダイゼーションを行なった。染色体スライドは洗浄後、NR-M2 nuclear track emulsionで被覆され、11日間の静置(4°C)後に現像された。同時に染色体をキナクリンマスタード法にて染色した。

4. 腫瘍特性の検討

親細胞および微小核融合細胞クローンを4-6週令のヌードマウス(ICR nu/nu)に移植(1×10^7 個)し、経時的に腫瘍径を計測することによって造腫瘍性の検討を行なった。軟寒天培地(0.33%)に 1×10^3 個の細胞を播種し、3週間後に直径 $100 \mu\text{m}$ 以上のコロニー数を計測することによって足場非依存性増殖能を検討した。また、直径20mm dishに 1×10^5 個の細胞を播種し、2-3日毎に細胞数を測定し細胞増殖速度を算定すると同時に、7日後に飽和細胞密度を算定した。

III. 結 果

1. 微小核融合法を用いた単一ヒト染色体移入

正常ヒト1, 6, 9, 11および19番染色体の各移入実験によって、5-15個(HHUA)または8-11個(Ishikawa)のG418耐性クローンを得た。1番染色体移入実験によって得られたG418耐性クローンの66.7%(10/15, HHUA)と40.0%(4/10, Ishikawa)が17細胞分裂以前に老死化し、細胞質の巨大化、細胞の多核化および扁平化などの細胞形態の著しい変化が観察された。6, 9, 11および19番染色体移入実験によって得られたG418耐性クローンでは培養の過程で細胞形態の変化は観察されず、老死化は認められなかった。

2. 微小核融合細胞クローンの染色体分析

染色体核型分析の結果、1本または2本の1, 6, 9, 11および19番染色体の移入を60-100%(HHUA)および33-100%(Ishikawa)のG418耐性クローンで確認した。染色体 in situ ハイブリダイゼーションの結果、1番染色体でpSV2neo遺伝子が導入されている染色体座位を1p34-36であることを同定し、ヒト1番染色体をもつマウスA9細胞のpSV2neo遺伝子が導入されている染色体座位と同一であることを確認した。

3. 微小核融合細胞クローンの 造腫瘍性(in vivo)

1, 6および9番染色体移入クローンで、ヌードマウスにおける造腫瘍性の完全な抑制が認められた(HHUAおよびIshikawa)。しかし、19番染色体移入クローンでは造腫瘍性の抑制は観察されなかった(HHUAおよびIshikawa)。11番染色体移入Ishikawaクローンでは造腫瘍性の抑制は観察されなかったが、11番染色体移入HHUAクローンで造腫瘍性の低下(腫瘍生着率の減少)が認められた。

4. 微小核融合細胞クローンの in vitro 腫瘍特性

1番染色体移入クローンで足場非依存性増殖能、細胞増殖速度および飽和細胞密度の低下が観察された(HHUAおよびIshikawa)。

6, 9, 11および19番染色体移入クローンでは足場非依存性増殖能、細胞増殖速度および飽和細胞密度は、親細胞と同等で in vitro 腫瘍特性の低下は認められなかった(HHUAおよびIshikawa)。

IV. 考 察

2種類の子宮内膜癌細胞株(HHUAおよびIshikawa)への正常ヒト1, 6および9番染色体移入によって、in vivo の造腫瘍性が完全に抑制されたことから、子宮内膜癌抑制遺伝子がこれらの染色体上に位置することが示唆された。また、一種類の染色体だけではなく、複数の染色体が同等に造腫瘍性を完全に抑制したことは、子宮内膜細胞の癌化過程において単一ではなく、複数の癌抑制遺伝子の異常が関与(多段階発癌)している可能性を示唆するものである。癌抑制遺伝子の作用機能という観点からは、最低限一つの癌抑制遺伝子の依存のもとで、その効果(造腫瘍性の完全な抑制)が十分発現することが判明した。

1番染色体の移入により、in vivo の造腫瘍性の抑制のみならず、in vitro の腫瘍特性の低下が観察され、細胞形態の著しい変化(細胞質の巨大化、細胞の多核化および扁平化)が認められたこと、およびG418耐性クローンの選択過程で大部分のクローンが老死化した現象から、1番染色体上に子宮内膜癌の老死化に係わる遺伝子が存在する可能性が本研究によってはじめて示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 藤 本 征一郎
副 査 教 授 細 川 眞澄男
副 査 教 授 葛 巻 暹

学位論文題名

Suppression of tumorigenicity and induction
of senescence on human endometrial carcinoma
cell lines by transfer of normal human chromosomes

(正常ヒト染色体移入による子宮内膜癌細胞株の
造腫瘍性の抑制と老死化の誘導)

2種類の子宮内膜癌細胞株(HHUA およびIshikawa細胞)に対する種々の単一ヒト染色体移入実験を行ない、単一ヒト染色体移入細胞(小核融合細胞)クローンの腫瘍特性の変化を検討することによって、子宮内膜癌に対する癌抑制遺伝子の存在する染色体の同定を試みることを本研究の目的とした。

HHUAおよびIshikawa細胞は分化型腺癌由来の子宮内膜癌細胞株で、両細胞ともヌードマウスへの移植(1×10^7 個)によって、100%の部位に3-5週間で腫瘍を形成する。微小核細胞はpSV2neo遺伝子をもつ単一ヒト染色体(MRC-5またはNTI-4細胞由来)を含むマウスA9細胞ライブラリーより作製された。

単一ヒト染色体をもつマウスA9細胞を48時間コルセミド($0.05 \mu\text{g/ml}$)処理した後、フラスコをサイトカラシン($10 \mu\text{g/ml}$)を含む培養液で満たし、8000rpm、60分間(37°C)の超遠心を行なった。得られた微小核細胞をフィルター($8 \mu\text{m}$, $5 \mu\text{m}$ および $3 \mu\text{m}$)濾過後、47%ポリエチレングリコール(MW1000)を用いてHHUAおよびIshikawa細胞と融合した。細胞はG418($800 \mu\text{g/ml}$)を含む培地で3週間以上培養され、pSV2neo遺伝子が導入された微小核融合細胞(G418耐性クローン)だけが選択された。得られたG418耐性クローンをキナクリンマスタード法にて核型分析し、単一ヒト染色体の移入を確認した。

pSV2neo plasmid を $[^3\text{H}]$ dATPと $[^3\text{H}]$ dCTPを用いてNick-translation法でラベルし、染色体スライド上でハイブリダイゼーションを行なった。染色体スライドは洗浄後、NR-M2 nuclear track emulsionで被覆され、11日間の静置(4°C)後に現像された。同時に染色体をキナクリンマスタード法にて染色した。

親細胞および微小核融合細胞クローンを4-6週令のヌードマウス(ICR nu/nu)に移植(1×10^7 個)し、経時的に腫瘍径を計測することによって造腫瘍性の検討を行なった。軟寒天培地(0.33%)に 1×10^3 個の細胞を播種し、3週間後に直径 $100 \mu\text{m}$ 以上のコロニー数を計測することによって足場非依存性増殖能を検討した。また、直径20mm dishに 1×10^5 個の細胞を播種し、2-3日毎に細胞数を測定し細胞増殖速度を算定すると同時に、7日後に飽和細胞密度を算定した。

以上の研究方法により、以下の成績がえられた。

1. 微小核融合法を用いた単一ヒト染色体移入

正常ヒト1, 6, 9, 11および19番染色体の各移入実験によって、5-15個 (HHUA) または8-11個 (Ishikawa) のG418耐性クローンを得た。1番染色体移入によって得られたG418耐性クローンの66.7% (10/15, HHUA) と40.0% (4/10, Ishikawa) が17細胞分裂以前に老死化し、細胞質の巨大化、細胞の多核化および扁平化などの細胞形態の著しい変化が観察された。6, 9, 11および19番染色体移入によって得られたG418耐性クローンでは培養の過程で細胞形態の変化は観察されず、老死化は認められなかった。

2. 微小核融合細胞クローンの染色体分析

染色体核型分析の結果、1本または2本の1, 6, 9, 11および19番染色体の移入を60-100% (HHUA) および33-100% (Ishikawa) のG418耐性クローンで確認した。染色体in situ ハイブリダイゼーションの結果、1番染色体で pSV2neo遺伝子が導入されている染色体座位を 1p34-36であることを同定し、ヒト1番染色体をもつマウスA9細胞のpSV2neo 遺伝子が導入されている染色体座位と同一であることを確認した。

3. 微小核融合細胞クローンの造腫瘍性 (in vivo)

1, 6 および 9番染色体移入クローンで、ヌードマウスにおける造腫瘍性の完全な抑制が認められた (HHUA およびIshikawa)。しかし、19番染色体移入クローンでは造腫瘍性の抑制は観察されなかった (HHUA およびIshikawa)。11番染色体移入Ishikawaクローンでは造腫瘍性の抑制は観察されなかったが、11番染色体移入HHUAクローンで造腫瘍性の低下 (腫瘍生着率の減少) が認められた。

4. 微小核融合細胞クローンの in vitro 腫瘍特性

1番染色体移入クローンで足場非依存性増殖能、細胞増殖速度および飽和細胞密度の低下が観察された (HHUA およびIshikawa)。6, 9, 11 および19番染色体移入クローンでは足場非依存性増殖能、細胞増殖速度および飽和細胞密度は、親細胞と同等で in vitro 腫瘍特性の低下は認められなかった (HHUA およびIshikawa)。

これらの実験成績を要約すると、2種類の子宮内膜癌細胞株 (HHUAおよびIshikawa) への正常ヒト1, 6 および9番染色体移入によって、in vivo の造腫瘍性が完全に抑制されたことから、子宮内膜癌抑制遺伝子がこれらの染色体上に位置することが示唆された。また、一種類の染色体だけではなく、複数の染色体が同等に造腫瘍性を完全に抑制したことは、子宮内膜細胞の癌化過程において単一ではなく、複数の癌抑制遺伝子の異常が関与している可能性を示唆する。

とくに、1番染色体の移入により、in vivo の造腫瘍性の抑制のみならず、in vitroの腫瘍特性の低下が観察され、細胞形態の著しい変化 (細胞質の巨大化、細胞の多核化および扁平化) が認められたこと、およびG418耐性クローンの選択過程で大部分のクローンが老死化した現象から、1番染色体上に子宮内膜癌の老死化に係わる遺伝子が存在する可能性が本研究によってはじめて示唆された。

口頭発表に際し、葛巻教授から6, 9番染色体上に狭義の癌抑制遺伝子が存在するか否かについて、また1番染色体のNeuroblastoma 遺伝子と本研究の細胞の老死化を惹起する遺伝子との関係についての質問があった。細川教授からは、1番染色体上の変異が子宮内膜細胞以外ではどの細胞の癌化と関係しているか、p53が座位する17番染色体を移入した場合の成績について、などの質問があった。さらに柿沼教授からは、1つの癌抑制遺伝子の変異を他の癌抑制遺伝子の発現調節で補完する現象の可能性とそれ以外の本研究の意義について、また吉木教授からは1番染色体移入による細胞形態の変化はAnaplasia と考えてよいか否か、1番染色体には細胞の形態そのものを変化させる遺伝子が存在する可能性があるか否か、について質問があった。

申請者は、本研究の本質に関連するこれらの質問に対して、概ね適切に解答しえたことと判断された。

その後、細川教授、葛巻教授には個別に面接試問を受け合格の判定を下された。

以上、本研究は子宮内膜癌における新しい癌抑制遺伝子の存在を示唆する基礎的研究であり、博士 (医学) の授与に相当すると判定された。