

学位論文題名

CDDP 耐性ヒト頭頸部扁平上皮癌細胞株における
hCG α および *human mt COII* 遺伝子発現の増強

学位論文内容の要旨

緒言

cis-Diamminedichloroplatinum(II) (CDDP) は頭頸部癌に対する化学療法のキードラッグであり、癌細胞のCDDP耐性は临床上重要な問題である。CDDP耐性獲得には、金属代謝に関わるタンパク濃度の上昇やDNA修復能の増強、細胞内CDDP蓄積量の減少など様々な機序が関与すると考えられているが未だ完全には解明されていない。CDDP耐性との関連が報告されていなかった既知遺伝子 *T-plastin* の発現が、CDDP耐性細胞株において増強していることが Differential Display (DD)法を用いて最近明らかにされた。LiangとPardeeによって開発されたDD法は、任意の配列のプライマーをPCRに用いる事で複数のcDNA断片を同時に増幅しゲル電気泳動で展開後、得られたフィンガープリント間の比較により特異的発現パターンを示す分子種を同定する方法であり、真核細胞における遺伝子発現の差異を検出する強力な手段である。本研究ではDD法の改良版であるFluorescent DD (FDD) 法を用いて、2組のCDDP感受性/耐性ヒト頭頸部扁平上皮癌 (HNSCC) 細胞株における遺伝子発現差異を検討したので報告する。

材料と方法

1) 細胞株とCDDP処理による細胞生存率の測定

ヒト口腔底SCC細胞株KB, ヒト喉頭SCC細胞株HEp2と、それぞれのCDDP耐性変異株KB/cDDP, HEp2/cDDPを単層培養で継代維持し、sulforhodamine B assayを用いてCDDP処理による生存率を測定した。

2) Fluorescent Differential Display法

培養細胞からtotal RNAを抽出し、アンカープライマーを用いた逆転写反応によりcDNAを合成した。これを蛍光標識したアンカープライマーと任意プライマーを用いたPCRにより増幅し、得られたcDNA断片を電気泳動により分画し、遺伝子発現差異を蛍光イメージアナライザーで視覚化した。

3) cDNA断片の再増幅とサブクロニング、塩基配列の解析

親株と耐性株の間で蛍光信号強度の異なるバンドをゲルから切り出し再増幅した。得られたPCR産物をサブクロニングして塩基配列を解析しBLAST e-mailシステムを用いて相同性の検索を行った。

4) ノーザンプロット法

Total RNAをゲル電気泳動により分画しナイロン膜に転写し、ディゴキシゲニンで標識したcDNAプローブを用いてハイブリダイゼーションを行い、mRNAを検出した。対照として α -tubulin mRNAを用いた。

結果

1) CDDP処理による細胞生存率の比較

3×10^3 個の細胞を液体培地に懸濁して96穴プレートに播き、種々の濃度のCDDPで細胞を処理し生存率を測定した。IC₅₀で比較するとKB/cDDPとHEp2/cDDPはそれぞれの親株に対し2.5倍（50時間処理）と6倍（63時間処理）のCDDP耐性を示した。

2) FDD法

40種類の任意プライマーと蛍光アンカープライマーを組み合わせたPCRから得られたcDNA断片のFDDでは、KB、HEp2とそれぞれの耐性株の間で異なる発現をしているバンドは105個認められ、そのうち34個が親株に強く発現し、71個が耐性株に強く発現していた。これらのバンドは2回のFDDで再現性を示したため、ゲルから切り出しさらに検索した。

3) cDNA断片の再増幅と塩基配列の解析

105個のバンドのうち87個が再増幅され、47個がサブクローニング可能であった。この47個について塩基配列解析と同一性検索を行った結果、37個はデータベースに登録されている遺伝子と高い同一性を示し、残りの10個は有意な同一性を示さなかった。37個のうち2個は *human chorionic gonadotropin alpha subunit gene (hCG α)* の転写物の3'末端と99%以上の同一性を示した。また、他の1個は *human mitochondrion cytochrome oxidase subunit II gene (human mt COII)* の転写物の3'末端と全塩基配列が一致した。

4) ノーザンプロット法

FDDで蛍光信号強度の異なる47個のcDNA断片について、親株とCDDP耐性株のmRNAレベルでの発現差をノーザンプロット法により検討した。hCG α mRNAの発現はKB/cDDPに認められ、KBには認められなかった。human mt COII mRNAの発現は親株に比べKB/cDDPで増強していた。 α -tubulinの発現差は認めなかった。47個のcDNA断片のうち20個は親株と耐性株の間で発現差を認めず、24個はいずれの株でもmRNAを検出できなかった。

考察

本研究ではFDD法を用いてヒトHNSCC細胞株とそのCDDP耐性変異株の遺伝子発現差異を検討した。FDDフィンガープリント上では発現の異なる多くのバンドが認められたが、KB/cDDPに非常に強い蛍光強度を示した二つのバンドの塩基配列がhCG α の3'末端と一致し、ノーザンプロット法でもhCG α mRNAの発現がKBに比べKB/cDDPで増強している事が確認された。hCG α とCDDP耐性変異株との関係についての報告は本研究が初めてである。hCGは α と β のサブユニットから成る糖蛋白ホルモンの一つであり、通常妊娠女性の栄養膜細胞から産生される。ある種の腫瘍組織や腫瘍細胞株においてもhCGやそのサブユニットが産生される事が知られており、これらの蛋白は男性や非妊娠女性においては通常測定されないためその異所性発現は腫瘍の存在を示唆すると考えられている。現在hCG α のCDDP耐性機構における役割は不明である。もしヒトHNSCC患者にCDDPを用いた化学療法を行った後hCG α 蛋白が過剰発現するような場合、hCG α はCDDP耐性マーカーになる可能性があると思われる。

さらに本研究ではhuman mt COII mRNAの発現が、KBに比べその耐性株で増強している事をFDD法とノーザンプロット法で確認した。ミトコンドリアは様々な機能を有する細胞内小器官であり、活性酸素の産生を通じて細胞におけるATP産生や細胞内の酸化還元バランスに貢献している。近年CDDP耐性細胞株におけるチトクロームc酸化酵素の活性亢進やNADH脱水素酵素の異常、ミトコンドリアの膜電位上昇などが報告され、ミトコンドリアの機能異常とCDDP耐性と関連が注目されている。本研究で示したCDDP耐性細胞株におけるhuman mt COII mRNAの発現亢進は、ミトコンドリアの機能が細胞のCDDP耐性と関係している事を示

唆していると思われる。

DD法は遺伝子発現の差異を検出する強力な方法であり、本研究でもCDDP感受性細胞と耐性細胞の間で発現差を示す多くのバンドが認められ、その発現差は良好な再現性を示した。本研究の技術的な問題点としては、1) 目的とするバンドの精製度が低いためサブクロニングの効率が低かったこと、2) ノーザンプロット法でのmRNA検出率が半分以下であったこと、が挙げられる。後者の原因としてはDD法から得られるcDNA断片の多くがAT richで短い3'末端部分であり、ノーザンプロット法のcDNAプローブとして不適當である事が考えられる。

結語

FDD法を用いてCDDP感受性及び耐性ヒトHNSCC細胞株の遺伝子発現を比較し、*hCG α* と*human mt COII*の発現が親株に比べKB/cDDPに増強している事が認められた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 犬 山 征 夫
副 査 教 授 細 川 眞 澄 男
副 査 教 授 西 信 三

学 位 論 文 題 名

CDDP 耐性ヒト頭頸部扁平上皮癌細胞株における *hCG α* および *human mt COII* 遺伝子発現の増強

cis-Diamminedichloroplatinum(II) (CDDP) は頭頸部癌の化学療法におけるKey Drugであり、癌細胞のCDDP耐性獲得は臨床上重要な問題であるが未だ完全には解明されていない。本研究はFluorescent Differential Display (FDD) 法を用いて、2組のCDDP感受性及び耐性ヒト頭頸部扁平上皮癌 (HNSCC) 細胞株における遺伝子発現差異を検討した。

細胞株はヒト口腔底SCC細胞株KB, ヒト喉頭SCC細胞株HEp2と、それぞれのCDDP耐性変異株KB/cDDP, HEp2/cDDPを用いた。CDDP処理による生存率はsulforhodamine B assayで測定した。FDD法では培養細胞からtotal RNAを抽出し、アンカープライマーを用いた逆転写反応によりcDNAを合成後、蛍光標識したアンカープライマーと任意プライマーを用いたPCRにより増幅し、得られたcDNA断片を電気泳動により分画し、遺伝子発現差異を蛍光イメージアナライザーで視覚化した。親株と耐性株の間で蛍光信号強度の異なるバンドをゲルから切り出し再増幅した。得られたPCR産物をサブクロニングして塩基配列を解析しBLAST e-mailシステムを用いて相同性の検索を行った。mRNAレベルでの発現差をノーザンプロット法により検討した。対照として α -tubulin mRNAを用いた。

CDDP処理による細胞生存率をIC50で比較すると、KB/cDDPとHEp2/cDDPはそれぞれの親株に対し2.5倍(50時間処理)と6倍(63時間処理)のCDDP耐性を示した。40種類の任意プライマーと蛍光アンカープライマーを組み合わせたFDDでは、KB, HEp2とそれぞれの耐性株の間で異なる発現をしているバンドは105個認められ、そのうち34個が親株に強く発現し、71個が耐性株に強く発現していた。このうち87個が再増幅され、47個がサブクロニングされた。塩基配列解析と相同性検索を行った結果、このうち37個は既知遺伝子で、10個は未知遺伝子であった。そのうち2個は*human chorionic gonadotropin alpha subunit (hCG α) gene*と99%以上の相同性を示し、他の1個は*human mitochondrion cytochrome oxidase subunit II (human mt COII) gene*と一致した。ノーザンプロット法により47個のcDNA断片について親株とCDDP耐性株のmRNAレベルでの発現差を確認した結果、hCG α mRNAとhuman mt COII mRNAの発現が親株に対しKB/cDDPで増強していた。 α -tubulinの発現差は認めなかった。他の20個は親株と耐性株の間で発現差を認めず、残りの24個はいずれの株でもmRNAを検出できなかった。

FDD法を用いてCDDP感受性及び耐性ヒトHNSCC細胞株の遺伝子発現を比較し、*hCG α* と

*human mt COII*の発現が親株に比べKB/cDDPに増強している事が認められた。*hCG α* とCDDP耐性細胞株との関係についての報告は本研究が初めてであるが、*hCG α* のCDDP耐性機構における役割は分かっていない。*hCG*は α と β のサブユニットから成り、腫瘍組織や腫瘍細胞株において*hCG*やそのサブユニットが異所性発現することが報告されている。もしヒトHNSCC患者にCDDPを用いた化学療法を行った後*hCG α* 蛋白が過剰発現するような場合、*hCG α* はCDDP耐性マーカーになる可能性があると思われる。*human mt COII*がCDDP耐性機構にどのような役割を果たしているかは不明であるが、ミトコンドリアの機能が細胞のCDDP耐性と関係している事を示唆している可能性があると思われる。

公開発表では、細川眞澄男教授からFDDで発現差を示すバンドの多くがノーザンブロッティングで発現差を示さない理由について質問があった。西信三教授は*hCG α* と*human mt COII*のHEp2とそのCDDP耐性細胞株における発現の有無について質問した。犬山征夫教授は*hCG α* のCDDP耐性マーカーとしての臨床応用の展望を求めた。いずれの質問に対しても、申請者はおおむね妥当な回答をした。

この論文は、*hCG α* と*human mt COII*の発現がCDDP耐性HNSCC株において増強していることをはじめ明確にしたことで高く評価され、今後のFDD法を用いたCDDP耐性の研究の発展が期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。