

## 学位論文題名

## 各種固形悪性腫瘍由来細胞株120系について

yeast assay を用いた p53, APC, PTEN 遺伝子変異の検討

## 学位論文内容の要旨

【緒言】 癌の発生機序の解明, 生物学的特徴の解析および治療方法の開発などの研究において, 培養癌細胞株は実験モデルとして重要な役割を担ってきた。また, 培養癌細胞株は扱いやすいことから, 各種の細胞生物学的および分子生物学的研究で正常細胞の代役としても用いられてきた。しかし, これらの研究は培養癌細胞株における未知の遺伝子変異により, 誤った実験結果を招きうる潜在的な危険性を有している。したがって, 各種の生物学的および医学的研究に用いる細胞株の遺伝子異常をあらかじめ同定しておくことは実験結果を評価する上で極めて重要である。本研究では各種培養癌細胞株の研究における情報資源を提供する目的で, ヒト固形悪性腫瘍由来細胞株 120 系を対象に, 癌抑制遺伝子 p53, APC および PTEN について解析を行った。これらの細胞株に関する癌抑制遺伝子変異に関する報告はこれまでも多くなされてきたが, しばしば不正確である。本研究では癌研究に用いられる多くの細胞株を対象に, 遺伝子の状態について信頼しうるデータベースの作製を目的とした。本結果は全ての研究者にとって重要な情報資源になると考え, 入手経路の確かな細胞株を用い, 変異検出に正確性が証明されている yeast assay によるスクリーニングを行い, 塩基配列決定により正確に変異を決定することに留意した。

【材料と方法】 細胞株: 検討に用いたヒト各種固形悪性腫瘍由来細胞株は胆道癌 3 系, 膀胱癌 1 系, 脳腫瘍 6 系, 乳癌 11 系, 大腸癌 13 系, 線維肉腫 1 系, 胃癌 9 系, 肝腫瘍 11 系, 肺癌 22 系, melanoma 8 系, 口腔扁平上皮癌 6 系, 骨肉腫 1 系, 卵巣癌 9 系, 膵癌 12 系, 前立腺癌 4 系, 腎癌 2 系, 皮膚癌 1 系の計 120 系である。遺伝子解析: yeast p53 functional assay ; p53 遺伝子解析を Tada らの方法に従って行った。yeast-based PTEN stop codon assay ; PTEN 遺伝子解析は Zhang らの方法に従い, ストップコドンアッセイ法を用いて行った。APC yeast color assay ; PTEN 遺伝子解析を Furuuchi らの方法に従い, 酵母カラーアッセイ法を用いて行った。

【結果】 検討に用いたヒト各種固形悪性腫瘍由来細胞株 120 系のうち, 文献報告のあった細胞株 71 系中, 25 系 (35.2%) に異なった結果を認めた。p53 assay では 120 系中, RT-PCR にて cDNA の増幅が得られたものが 117 系で, その内 88 系に変異を認めた。Hep 3B, HRA, SaOS2 の 3 系に cDNA の増幅が得られなかった。変異およ

び発現消失を認めたものは 91 系 (75.8%) であった。その腫瘍別内訳は胆道癌 2/3, 膀胱癌 1/1, 脳腫瘍 6/6, 乳癌 8/11, 大腸癌 11/13, 繊維肉腫 0/1, 胃癌 7/9, 肝腫瘍 9/11, 肺癌 17/22, melanoma 1/8, 口腔扁平上皮癌 5/6, 骨肉腫 1/1, 卵巣癌 8/9, 膵癌 11/12, 前立腺癌 3/4, 腎癌 0/2, 皮膚癌 1/1 であった。変異は 88 系に 97 個を認め、内訳はミスセンス変異 65 個 (65.0%), 中断型変異 23 個 (ナンセンス変異 8, 欠失 11, 挿入 4) (23.0%), インフレーム挿入 3 個 (3.0%), インフレーム欠失 6 個 (6.0%) であった。

PTEN は 120 系中, RT-PCR で cDNA の増幅が得られたものが 112 系で, その内 10 系に 12 個の変異を認めた。変異の内訳はエクソンスキッピング 3 個, 欠失 3 個, 挿入 2 個, ナンセンス変異 3 個, ミスセンス変異 1 個である。8 系に cDNA の増幅が得られなかった。PTEN の異常を認めたものは胆道癌 1/3, 脳腫瘍 3/6, 乳癌 4/11, 大腸癌 1/13, 胃癌 1/9, 肝腫瘍 2/11, 肺癌 3/22, 膵癌 2/12, 前立腺癌 1/4 であった。変異および発現消失を認めたものは 18/120 (15.0%) であった。

APC は 120 系中, PCR で cDNA の増幅が得られたものが 119 系で, その内 18 系に 23 個の変異を認めた。変異の内訳は欠失 5 個, 挿入 8 個, ナンセンス変異 10 個で, おもに変異集積領域に分布していた。MIA PaCa-2 に cDNA の増幅が得られなかった。なお, 卵巣癌より樹立された HRA の APC は mouse 由来 APC であった。APC の異常を認めたものは脳腫瘍 1/6, 大腸癌 11/13, 胃癌 2/9, melanoma 1/8, 卵巣癌 2/9, 膵癌 1/12, 前立腺癌 1/3 で, 大腸癌に高率な変異を認めた。変異および発現消失を認めたものは 20/120 (16.7%) であった。

p53, PTEN, APC の異常をいずれも認めなかった系は 27 系であった。

【考察】 p53, PTEN, APC について酵母アッセイを用いて変異の解析を行った。その結果, これらの変異の解析について文献報告のあった細胞株 71 系中, 25 系 (35.2%) に異なった結果を認めた。これらの文献報告と本結果が異なった原因としては SSCP 法での判定困難例, direct sequence 法による対側 allele の deletion 検出困難, autoradiogram の誤判定例, PCR に Taq polymerase を用いたことによる PCR エラーなどの可能性が疑われる。また, DNA を用い, 一部の exon しか解析していない報告もあった。さらに細胞の取り違えが疑われる報告もあった。APC 変異の検討では卵巣癌とされてきた HRA が mouse 由来 APC と判明し, 樹立方法または入手経路のいずれかに問題があったと推測された。これらの結果は細胞株を用いた研究を行う際には常に細胞の取り違え, コンタミネーションに留意する必要があること, さらに本研究で用いたような信頼性の高い手法で, 分子生物学的背景が判明している細胞株を用いる必要性を強調するものである。

p53 では各種臓器悪性腫瘍において広く異常を認め, その造腫瘍性における重要性を反映したものであった。PTEN の異常は脳腫瘍, 乳癌で多く認められた。PTEN の異常には高率に対立遺伝子のホモ欠失が報告されている。したがって, 8 系に cDNA の増幅が得られなかった背景には対立遺伝子のホモ欠失の存在が疑われた。APC では大腸癌に高率な変異を認めた。

【結語】 本研究の結果は細胞株を用いた様々な研究の基礎となるもので, 今後のさらなる解析につながるものである。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 浅 香 正 博

副 査 教 授 守 内 哲 也

副 査 教 授 吉 木 敬

学 位 論 文 題 名

## 各種固形悪性腫瘍由来細胞株120系について

### yeast assay を用いた p53, APC, PTEN 遺伝子変異の検討

癌の発生機序の解明、生物学的特徴の解析および治療方法の開発などの研究において、培養癌細胞株は実験モデルとして重要な役割を担ってきた。また、培養癌細胞株は扱いやすいことから、各種の細胞生物学的および分子生物学的研究で正常細胞の代役としても用いられてきた。しかし、これらの研究は培養癌細胞株における未知の遺伝子変異により、誤った実験結果を招きうる潜在的な危険性を有している。したがって、各種の生物学的および医学的研究に用いる細胞株の遺伝子異常をあらかじめ同定しておくことは実験結果を評価する上で極めて重要である。本研究では各種培養癌細胞株の研究における情報資源を提供する目的で、ヒト固形悪性腫瘍由来細胞株120系を対象に、癌抑制遺伝子p53, APCおよびPTENについて解析を行った。p53, APC, PTENの解析はそれぞれyeast p53 functional assay, APC yeast color assay, yeast PTEN stop codon assayを用いて変異のスクリーニングを行った後、塩基配列の決定を行った。その結果、p53異常を91系(75.8%)に認めた。各種臓器悪性腫瘍において広く異常を認め、その造腫瘍性における重要性を反映したものだ。しかし、細胞株におけるp53変異頻度は必ずしも臨床検体における頻度を反映するものではなく、p53変異を有したものが多く樹立されると推測された。PTEN異常を18系(15.0%)に認めた。APC異常を20系(16.7%)に認め、大腸癌に高率だった。本結果と文献報告の比較検討により、p53変異またはPTEN、APC変異のいずれかが既に報告された系は71系で、そのうち25系(35.2%)に異なる結果を認めた。その原因として、細胞株の取り違いや細胞コンタミネーション、何らかの実験過程での問題が推測された。これらの結果は細胞株を用いた研究を行う際には常に細胞の取り違い、コンタミネーションに留意する必要があること、さらに本研究で用いたような信頼性の高い手法で、分子生物学的背景が判明し

ている細胞株を用いる必要性を強調するものと考えられた。以上、ヒト各種固形悪性腫瘍由来細胞株120系を対象に、異なる経路を介する主要な腫瘍抑制遺伝子であるp53, PTEN, APCについて変異解析を行い、その分子遺伝学的背景を明らかにした。

口頭発表後、副査の吉木教授から1. 培養癌細胞株の特殊性、臨床検体との相関性、2. 変異スクリーニングのカットオフ値を赤コロニー>20%にした意味について、3. 今後の応用について質問があった。1について、樹立されやすい細胞が細胞株になるものと推測され、細胞株での変異頻度が臨床検体とは必ずしも相関しない。よって、細胞株での結果を全て、臨床検体の結果に当てはめるのは危険があると回答した。2については実験方法上、背景に最大約10%の赤コロニーが生じる。今回は確実な変異を検出するため、カットオフ値を高くしたと回答した。3については更なる細胞株、臨床検体の変異解析はもとより、各種実験における細胞の選択を行う際の基礎データとして、また、DNAアレイ解析における前情報として応用が可能と回答した。副査の守内教授より染色体検査の有無、マイコプラズマの感染の有無について質問があった。染色体は細胞バンクで一部調べられている旨、マイコプラズマは一部に感染を認めしたが、変異解析結果に影響を及ぼさない旨を回答した。主査の浅香教授から1. 今までの細胞株のデータが著しく異なるものであったということだが、インパクトファクターの高い雑誌のデータはどうか、2. 細胞株の結果がそのまま臨床検体を反映しないこともあり得るか、等の質問があった。1についてはそのような雑誌の報告も異なったものがあつた、2についてはそのとおりであると回答した。最後に主査の浅香教授が上記審査員の質問への補足質問とその回答の確認を行って、発表を終了した。

本研究は各種培養癌細胞株の研究における情報資源を提供し、細胞株を用いた様々な研究の基礎となるもので、今後のさらなる解析につながるものと期待される。

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と判定した。