

Title	子宮頸癌組織中の transforming 遺伝子
Author(s)	岡本, 祐之
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	http://hdl.handle.net/11094/36069
DOI	
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/repo/ouka/all/>

氏名・(本籍)	おか	もと	ゆう	じ
	岡	本	祐	之
学位の種類	医	学	博	士
学位記番号	第	8592		号
学位授与の日付	平成元年	3月	24日	
学位授与の要件	医学研究科病理系専攻 学位規則第5条第1項該当			
学位論文題目	子宮頸癌組織中の transforming 遺伝子			
論文審査委員	(主査) 教授	羽倉	明	
	(副査) 教授	加藤 四郎	教授	高橋 理明

論文内容の要旨

〔目的〕

近年、子宮頸癌の発生要因の一つとして、ヒトパピローマウイルス（以下、HPV）が注目されている。それは、子宮頸癌組織やその前癌病変中に特定のタイプの HPV DNA が高率に検出されることや、NIH 3 T 3 細胞など株化細胞を用いて HPV 16, 18 型の初期遺伝子（特に E 6, E 7 領域）に transform 活性があることが証明されたことによる。しかし、その transform 活性は初代培養細胞では完全な形で認められないことなどから、HPV は子宮頸癌発生上、重要な因子ではあっても HPV 単独で子宮頸癌の発生を説明することは困難と考えられる。一方、種々のヒト「癌」細胞で活性化癌遺伝子が検出されており、こうした癌遺伝子の活性化が癌化に重要な役割を果しているものと考えられている。しかし、子宮頸癌に関しては、活性化癌遺伝子に関する報告は乏しい。本研究は子宮頸癌組織より抽出した DNA を NIH 3 T 3 細胞に導入し transform 活性を示す遺伝子を検索することによって、子宮頸癌の発生機序に関与する遺伝子を明らかにすることを目的としている。

〔方法〕

i) transform 実験：インドネシア大学医学部より提供された、子宮頸癌患者の摘出組織より一部を細切し、proteinase K, RNase A, SDS で処理した後 phenol, chloroform/isoamyl alcohol, n-butanol で抽出し、細胞の全 DNA を回収した。その 20 μ g を carrier DNA を使用することなく pSV2neo plasmid DNA 0.6 μ g と共に NIH 3 T 3 細胞 2×10^5 に、DNA-Ca-phosphate 法により transfect した。次いで、G 418 1.1 mg/ml (net) を含む 1xDMEM, 10% calf serum 中で培養し (37°C, 7.5% CO₂)、G 418 抵抗性の細胞を選択後、5~8 週齢のヌードマウスの皮下に接

種した ($5 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ cells/site, 2 sites/mouse)。その後3ヶ月の観察期間内に形成された皮下腫瘍を摘出し以後の実験に用いた。また、この方法では、一つの腫瘍が複数の transformant に由来する可能性があるため、第2代以降はより clonality の高い transformant を得るため focus 形成能で選択する方法 (focus assay) も行った。focus assay には、細胞の全 DNA のみを上記と同様の方法で transfect し、週に2回培養液 (1xDMEM, 10% calf serum) を交換し4週間後まで観察した。形成された focus 構成細胞を増殖させ、実験に用いた。

ii) 得られた transformant の解析 : (i) の過程で得られた腫瘍及び focus 形成細胞を用い、子宮頸癌組織からの DNA 抽出時と同様の方法で細胞の全 DNA を回収した。その $10 \mu\text{g}$ を制限酵素で切断し Southern blot hybridization を行うことによって、Alu 配列、HPV 16/18型 DNA、H/K-ras、myc の細胞 DNA 内に於ける存在の有無、rearrangement について検討した。

〔結果〕

- i) 第1代 transform 実験で52例の子宮頸癌組織中17組織の DNA に transform 活性を認め、39の transformant を得た。同39株中34株が Alu 陽性であった。
- ii) Alu 配列を含む第1代 transformant 34株から抽出した DNA を用い第2代 transformant 19株を分離した。第2代 transformant 中の子宮頸癌由来 DNA を調べた結果、19株中14株 (73.7%) の transformant 中に HPV 16/18型 DNA が存在していることを確認した。上記19株中の transforming gene は8例の子宮頸癌組織から由来したものであり、これら8例の子宮頸癌の全てが transforming gene として、HPV 16/18型 DNA を持つことが明らかとなった。
- iii) 第2代と第3代の transformant について、HPV DNA の存在を比較したところ、HPV の存在する第2代 transformant から、HPV の存在しない第3代 transformant が出現しており、HPV 16, 18以外にも重要な transforming gene が存在する可能性が示唆された。そこで、上記19株の第2代 transformant について、子宮頸癌組織中での遺伝子増幅が報告されている myc, H-ras, 種々の腫瘍で活性化の報告のある K-ras についてその rearrangement の有無を検討したところ、myc の rearrangement は確認されず、H-ras 3/19 (15.8%), K-ras 17/19 (72.2%) に何らかの rearrangement が検出された。このうち、H-ras 1/3 K-ras 5/17 では ras と Alu が同位置に認められ、また 15/17 (88.2%) で、EcoRI 消化後の Southern blot hybridization でヒト c-K-ras 2 を代表すると思われる位置に K-ras の hybridization が認められた。また、Alu 陽性で HPV も ras もその存在が確認されない transformant も1例存在し、HPV や H/K-ras 以外にも transforming gene が存在する可能性が示唆された。
- iv) 第3代 transformant についても同様に myc, H/K-ras の rearrangement について検討したところ、myc には rearrangement なく、H-ras 1/17 (0.06%), K-ras 16/17 (94.1%) に rearrangement を認め、このうち K-ras の3例は同位置に Alu が存在し、11/16 (68.8%) はヒト c-K-ras 2 由来と想定される位置に K-ras の band が存在し、第2代 transformant と同様にヒト c-K-ras 由来の ras 遺伝子による rearrangement を高率に認めた。

〔総括〕

NIH 3T3 細胞を用いて、子宮頸癌組織中の活性化癌遺伝子の検索を行った。その結果、第2代及び第3代 transformant 中に HPV 16/18型 DNA とヒト細胞由来と考えられる ras 遺伝子が高率に存在していることが明らかとなった。この結果は上記両遺伝子が子宮頸癌の発生に重要な役割を果たしていることを示唆している。

論文の審査結果の要旨

最近、子宮頸癌の発生要因として、ヒトパピローマウイルス (HPV) が注目されている。しかし、その作用機序の詳細は不明である。本研究は、子宮頸癌組織中の活性化癌遺伝子の検索を通して、頸癌発生に関与する遺伝子を明らかにすることを目的とし、NIH 3T3細胞を用い子宮頸癌組織中の transforming 遺伝子の詳細な研究を行なった。その結果、transformed 細胞中に HPV 16/18型 DNA が高率に認められ、更にヒト由来の ras 遺伝子 (特に c-K-ras) が同時に存在することを認め、子宮頸癌の発生に HPV 及び ras 遺伝子が重要な役割を果たす可能性を明らかにした。子宮頸癌の発生に HPV 遺伝子に加えて、他の固形腫瘍で指摘されているような oncogene の関与を指摘したのは本研究が最初であり、子宮頸癌の発生機構解明に貢献し得る価値ある研究であり高く評価される。