

嶋田貴子 論文内容の要旨

主論文

Identification of NADH dehydrogenase 1 α subcomplex 5 capable to transform murine fibroblasts and overexpressed in human cervical carcinoma cell lines

(ヒト子宮頸癌細胞株において過剰発現し、マウス線維芽細胞を形質転換する NADH dehydrogenase 1 alpha subcomplex 5 の同定)

嶋田貴子、森内良三、森剛志、山田兼史、石丸忠之、片峰茂

Biochemical and Biophysical Research Communications 339: 852-857, 2006

長崎大学大学院医学研究科

新興感染症病態制御学系専攻

(指導教授：片峰茂教授)

〔緒言〕

Human papillomaviruses (以下 HPV) はヒトの皮膚や外陰部、呼吸器系においてパピローマを形成する DNA ウイルスである。子宮頸癌の 90%以上が HPV 感染に関係しているとされており、High risk 群 HPV の E6、E7 遺伝子はがん細胞のゲノムに組み込まれた形で認められる。E6、E7 蛋白質は、p53 や Rb といった腫瘍抑制遺伝子の働きを抑制することが知られており、HPV による細胞がん化過程において不可欠な働きをもっていると考えられている。しかし過去の文献において、HPV 16 や 18 自体はヒトの角化細胞を不死化することは出来るが、腫瘍形成性に転換するには十分でないと報告されており細胞側要因の関与が示唆される。本研究では、がん化に関与する細胞側分子の同定を目指して、子宮頸癌由来細胞株 (HeLa) cDNA 発現ライブラリーをマウス線維芽細胞 NIH3T3 細胞の形質転換能を指標にしてスクリーニングを行った。

〔対象と方法〕

レトロウイルスベクターを用いて HeLa 細胞からの cDNA 発現ライブラリーを作成した。それをパッケージング細胞 293 10A-1 にトランスフェクションすることでリコンビナントレトロウイルスライブラリーを作成し、NIH3T3 細胞に感染させ、フォーカス形成試

験を行った。またヌードマウスへフォーカス細胞を皮下移植し、形成した腫瘍から cDNA を単離し一次構造を決定した。子宮頸癌細胞株における mRNA の発現レベルの検討は Roche Molecular Biochemicals の LightCycler を用いた RT-PCR で行った。統計学的有意差は、Fisher PLSD で検討した。

[結果]

作成したレトロウイルスライブラリーを NIH3T3 細胞に感染後、13 日目にフォーカスの形成が認められた。このフォーカス形成細胞をクローニングしヌードマウスに皮下移植したところ、約 2 週間目に腫瘍形成が 12 個のクローンに認められた。12 個のクローンのうち、フォーカスと腫瘍形成性に再現性があったクローンは 2 つであった。シーケンスの結果、それぞれ NADH dehydrogenase 1 alpha subcomplex 5 (以下 NDUFA5) および Zinc Finger Protein 9 (以下 ZNF9) 遺伝子の ORF region と 100% 相同性があることが判明した。軟寒天でのコロニー形成試験において、NDUFA5 または ZNF9 を導入した NIH3T3 細胞は足場非依存性にコロニーを形成しながら増殖することを認めた。HPV-negative あるいは -positive の数種類の子宮頸癌細胞株および正常人上皮細胞とで、NDUFA5 と ZNF9 遺伝子の mRNA 発現量に差があるかどうかを RT-PCR により検討したが正常のヒト上皮細胞である NHEK 細胞や HPV-negative の子宮頸癌細胞株より HPV-positive 子宮頸癌細胞株での NDUFA5 遺伝子の発現量は有意に高値であった。ZNF9 においては差を認めなかった。

[考察]

本研究により、NDUFA5 及び ZNF9 の発現が NIH3T3 細胞の増殖能を高進させることが判った。NDUFA5 や ZNF9 を導入した NIH3T3 細胞はマウスにおいて腫瘍を形成し、軟寒天培地でコロニーを形成した。とくに、NDUFA5 は HPV 陽性の子宮頸癌細胞株で有意に高発現していた。NDUFA5 はミトコンドリアの呼吸鎖複合体の構成成分であり、ATP 産生に寄与している。その機能は NADH から NAD⁺への変換で媒介されており、NAD⁺は p53 の発現調節に関与していることが考えられている。私たちは NDUFA5 を導入した NIH3T3 細胞を 2.5% calf serum、30 μM エトポシド入りの DMEM で培養した場合、48 時間目に TUNEL 陽性細胞が著しく減少することを認めている (未発表)。これは、エトポシドにより誘導されるアポトーシスへの抵抗性に NAD⁺が何らかの機構で関わっている可能性を示唆している。本研究により NDUFA5 の発現が子宮頸癌発生においてなんらかの働きをしている可能性が示唆された。