

ミトコンドリア DNA の突然変異ががんの悪性化に及ぼす影響の解析

WILSON KAYE EMMA (筑波大学生物学類)

指導教員：中田 和人 (筑波大学生命環境系)

【背景・目的】

ミトコンドリアは呼吸酵素複合体を介した酸化的リン酸化によって ATP を産生する細胞小器官であり、独自の環状二本鎖 DNA (mtDNA) を有する。mtDNA は 1 細胞あたり数百から数千コピー存在し、その病原性突然変異の蓄積は、ミトコンドリアの機能を低下させ、ミトコンドリア病やがんなどの原因となりうるとされている。

所属研究室の先行研究において、mtDNA 突然変異の蓄積が細胞のがん化を誘発するという「がんミトコンドリア原因説」の検証が行われた結果、用いた細胞においては、がん化の原因は核 DNA 突然変異であることが示唆された。さらに、mtDNA 突然変異ががんの悪性化に関与する可能性を検証するため、C57BL/6 (B6) 系統マウスのルイス肺がん由来細胞株である低転移性がん細胞 P29 と、高転移性がん細胞 A11 の mtDNA 置換によってサイブリッド (cytoplasmic hybrid; 細胞質雑種) が作製された。その結果、A11 由来の mtDNA を有するサイブリッドは高転移性を示し、P29 由来の mtDNA を有するサイブリッドは低転移性を示したことから、用いた細胞においては mtDNA ががんの悪性化の原因であることが示唆された。両サイブリッドの mtDNA 塩基配列解析結果から、G13997A 突然変異ががんの転移を誘導しうると報告されたが、ほかにもがん細胞の悪性化に寄与しうる mtDNA の突然変異が存在する可能性は十分にあると考えられる。

そこで、がんの悪性化に寄与しうる新規 mtDNA 突然変異を同定するため、DNA polymerase gamma (POLG) の校正機能欠損によりランダムな mtDNA 突然変異が蓄積するとされている mtDNA mutator mice を用いた検証が行われた。この系統の +/mut マウスを代々掛け合わせて得た +/+ マウスは、生殖細胞系列を通じて mtDNA 突然変異が蓄積していくため、生まれながらに通常の野生型マウスより mtDNA の突然変異の頻度が高いと考えられる。この +/+ マウス血小板と ρ^0 P29 細胞を融合させて得たサイブリッドクローン (P29mt+/+) を用いて、増殖能、腫瘍形成能、転移能が評価された。その結果、得られた 5 つのクローンは、同じマウス由来の mtDNA を有するにもかかわらず、それぞれ大きく異なる特性を示した。Clone1 は、5 つのクローンのうち最も低い転移能を示したが、このクローンの核の由来である P29 細胞にはもともと転移能はほとんどなかったのに、低いながらも転移能を有することから、がん細胞が転移能を獲得するきっかけとなる突然変異を有している可能性があると考えられた。そこで、次世代シーケンサーによる mtDNA の塩基配列解析が行われた結果、変異含有率 50% 以上の Clone1 特有の点突然変異が 6 箇所発見された。これらの変異が、がん細胞の転移能獲得に寄与している可能性がある。しかし、サイブリッド樹立時に核 DNA に偶発的に生じた何らかの突然変異が、がん細胞の性質に影響を及ぼしている可能性も完全に否定することはできない。

そこで本研究では、先行研究で同定された mtDNA 突然変異が、がん細胞の悪性化に寄与しているかどうかを明確にすることを目的として検証を進めた。

【材料・方法】

Clone1 の特性の原因が mtDNA 突然変異であるかを明確にするために、核背景の異なるサイブリッドを作製し、その可能性を検証した。まず、P29mt+/+-1 を脱核して得た P29mt+/+-1 細胞質体と、非転移性マウス繊維肉腫 B82 細胞の mtDNA を除去した ρ^0 B82 を融合させ、B82mt+/+-1 を作製した。次に、得られた 3 つのサイブリッドクローンについて、PCR-RFLP 法を用いた変異検出を行った。先行研究で同定された Clone1 に含まれる突然変異のうち、特にヒトとの保存性が高い 3 つの変異 (C8122T)、(T10465C)、(C13559T) に着目し、これらの変異の検出を試みた。さらに、4 種類のサイブリッド (P29mtB6、B82mtB6、P29mt+/+-1、B82mt+/+-1) を対象として COX/SDH 染色を行うことにより、mtDNA 突然変異のミトコンドリア呼吸活性への影響を評価した。

【結果・考察】

上記の脱核融合により、計 3 つのサイブリッドクローンを得ることに成功した。

その他、結果の詳細は発表会にて報告する予定である。

【展望】

今後は、Clone1 に特有な突然変異の導入に成功したサイブリッドを用いてマウス生体における造腫瘍試験や転移能を評価する試験等を行いながら、確認された突然変異のがん悪性化への影響を解析していきたいと考えている。