

平成28年1月

西尾幸与 学位論文審査要旨

主 査 岡 田 太
副主査 久 郷 裕 之
同 領 家 和 男

主論文

Repression of hTERT transcription by the introduction of chromosome 3 into human oral squamous cell carcinoma

(ヒト口腔扁平上皮がんへの3番染色体導入によるhTERT発現抑制)

(著者：西尾幸与、大平崇人、砂村直洋、押村光雄、領家和男、久郷裕之)

平成27年 Biochemical and Biophysical Research Communications 466巻
755頁～759頁

参考論文

1. 口唇裂・口蓋裂患者の臨床統計的検討—合併した先天異常について—

(著者：吉田優、土井理恵子、西尾幸与、Abir Majbauddin、川崎誠、小谷勇、
領家和男)

平成26年 日本口蓋裂学会雑誌 39巻 28頁～33頁

2. 金属冠が舌内に迷入した交通外傷の1例

(著者：大竹史浩、谷尾和彦、永川賢治、田村隆行、西尾幸与、小谷勇)

平成27年 口腔顎顔面外傷 13巻 95頁～98頁

学 位 論 文 要 旨

Repression of hTERT transcription by the introduction of chromosome 3 into human oral squamous cell carcinoma

(ヒト口腔扁平上皮がんへの3番染色体導入によるhTERT発現抑制)

テロメラーゼは、細胞分裂の度に短縮する染色体末端（テロメア）を伸張する酵素である。テロメア逆転写酵素（TERT: telomerase reverse transcriptase）の過剰発現はテロメラーゼ活性の重要な因子として知られている。筆者らはこれまでに腎細胞癌株RCC23への改変3番染色体の導入により3番染色体上のTERT抑制遺伝子の存在を明らかにしている。一方、3番染色体の欠失は口腔がんにおいても高頻度にみられる染色体異常のひとつである。これまでに口腔がん由来細胞株HSC3細胞への正常な3番染色体導入により、腫瘍形成能が抑制され、3番染色体上の腫瘍抑制遺伝子の存在が示唆されると報告されている。本研究では、この腫瘍抑制効果がテロメラーゼ活性の制御経路に関与しているか、また既知の3番染色体上のTERT抑制遺伝子と共通するか否かを明らかにすることを目的とした。

方 法

口腔がん細胞HSC3細胞へ微小核細胞融合法を用いて正常ヒト3番染色体を導入し、3番染色体導入クローン（HSC3#3）を樹立した。正常ヒト3番染色体の導入を確認するため、FISH法（FISH: fluorescence *in situ* hybridization）による染色体解析を行った。さらに細胞融合法を用いて、既に3番染色体上のTERT発現抑制因子の存在が既に明らかとなっているRCC23細胞とのハイブリッドクローンを樹立した。樹立された3番染色体導入HSC3細胞および、RCC23細胞とHSC3細胞の融合細胞よりRNA抽出を行い、リアルタイムPCRによりTERTの発現動態を解析した。

結 果

まず、HSC3細胞におけるTERT発現をリアルタイムPCRで解析した。その結果、negative controlではTERT発現が0なのに対して、HSC3細胞ではTERTの過剰発現が知られるmelanoma細胞A2058と同等のTERT過剰発現が確認された。次に、微小核細胞融合法を用いて樹立した正常ヒト3番染色体導入HSC3細胞に対してFISH法を用いた染色体解析の結果、親細胞の3番染色体は短腕欠失などの異常形態を示し、正常な3番染色体は観察されなかった。一方、樹

立したHSC#3細胞では正常ヒト3番染色体の導入を確認した。正常3番染色体導入によるTERT発現動態の変化を明らかにするため、HSC3#3におけるTERT発現についてリアルタイムPCRにて解析し、親細胞と比較した。結果、得られた3番染色体導入クローン全てでTERT発現の抑制が確認された。さらに、RCC23細胞とHSC3細胞の融合細胞のTERT発現解析の結果、得られた9cloneのうち、7cloneでTERTの発現が抑制されることが明らかになった。

考 察

リアルタイムPCRによる解析の結果、HSC3親細胞株ではTERTの高発現がみられ、HSC3細胞の腫瘍形成能はTERT過剰発現によるテロメラーゼ活性に関連していることが示唆された。

一方で微小核細胞融合法を用いて樹立したHSC3への正常ヒト3番染色体導入細胞株

(HSC3#3)ではTERTの発現が抑制され、3番染色体上にTERT抑制関連因子が存在することが示唆された。HSC3細胞における3番染色体上のTERT抑制因子とRCC23におけるTERT抑制因子が共通するかどうかを明らかにするため、HSC3とRCC23の融合細胞を樹立した。2細胞のTERT抑制因子が共通していれば融合細胞ではTERTの発現に変化は起きないが、HSC3のTERT抑制因子がRCC23のTERT抑制因子と異なる場合には発現が低下するという仮説をたて、HSC3とRCC23との融合細胞でのTERT発現を解析した。結果、融合細胞では各々の親細胞株よりもTERTの発現が低下する傾向が見られた。このことから、RCC23の染色体上にはHSC3細胞の3番染色体上で欠失しているTERT抑制因子を補填する因子が、同様にHSC3の染色体上にはRCC23のTERT高発現を抑制する因子が存在することが示唆され、各々の細胞のTERT抑制因子は別個に存在している可能性が示された。

結 論

HSC3細胞における3番染色体導入による腫瘍抑制効果はテロメラーゼ制御遺伝子が関与している可能性が示唆され、さらにこのTERT抑制機構はRCC23で示されたものとは異なる可能性が示された。今後さらに詳細な解析を加え、3番染色体上の口腔癌TERT抑制因子の局在およびTERT抑制因子の同定を行うことにより、口腔癌の腫瘍増殖の基盤を明らかにし、口腔がんの早期診断、予後予測、治療効果予測の分子診断マーカー、新規治療薬開発への一助となり得ることを期待する。