

ヒト染色体10p導入による肝細胞癌細胞株 (HMc-Li7) の テロメラーゼ活性の抑制

鳥取大学医学部生命科学科細胞工学教室 (主任 押村光雄)

三 浦 典 正

Repression of Telomerase in a hepatocellular carcinoma cell line (HMc-Li7) by introduction of human chromosome 10p

Norimasa MIURA

*Department of Molecular and Cell Genetics, School of Life Sciences,
Faculty of Medicine, Tottori University, Yonago, Tottori 683, Japan.*

ABSTRACT

Telomeres at the chromosome ends shorten with each cell division, resulting in cellular senescence. Tumor cells, unlike normal somatic cells, express telomerase that maintains telomere length. As a number of chromosomes with loss of heterozygosity (LOH) were reported in hepatocellular carcinoma (HCC), we transferred 5 different, individual normal chromosomes (2, 4, 5, 10, and 16) to a HCC cell line (HMc-Li7) by microcell fusion. Only chromosome 10 suppressed the cell proliferation and telomerase activity.

A9 cells containing the short arm of chromosome 10 (10p) were isolated from A9 cells containing a human chromosome 10 during several passages. The fragment repressed both proliferation and telomerase activity in HMc-Li7 cells by microcell fusion. Revertant clones which escaped from the cellular senescence program showed the telomerase activity again. Thus, the loss of indefinite growth potential was associated with the loss of telomerase activity. For more detailed mapping of the putative repressor gene, we isolated 20 A9 clones with the further smaller size of fragments by microcell fusion using X-ray irradiation (2.5~10 Gy). Four clones of them induced the cellular senescence and severe reduction of telomerase activity in HMc-Li7 cells. We attempted FISH-painting analysis with the probe which consisted of the products obtained by Alu-PCR, using DNA derived from the human chromosome fragments (A2.52) that showed the suppression of cellular proliferation and the reduction of telomerase activity. Thus, the fragments were derived from 10p12 or 10p14. These findings indicate that the putative repressor gene on chromosome 10p12 or 10p14 is associated with regulation of telomerase function in the HCC cell line.

(Accepted on March 18, 1996)

Key word : microcell-mediated chromosome transfer
telomerase repressor gene
telomere

はじめに

染色体両端に存在する繰り返しのテロメア配列 (TTAGGG) を付加する酵素であるテロメラーゼは、テロメレ配列の鋳型としてのRNAをもつRNA-蛋白複合体であり、一種の逆転写酵素である⁸⁾⁹⁾²⁰⁾。テロメラーゼ活性は不死化細胞と腫瘍細胞において認められ、正常細胞と癌細胞の間に違いが示されている¹⁴⁾³⁵⁾。腫瘍細胞の細胞抽出液でのテロメラーゼ活性は正常細胞の細胞抽出液で抑制されないため、正常細胞は腫瘍細胞のテロメラーゼ活性を抑制する抑制物質を含まず、むしろテロメラーゼ発現に対するリプレッサー遺伝子の存在が想定されている²⁶⁾。特異的な染色体に存在していると推定されるこのテロメラーゼリプレッサー遺伝子のマッピングの一つのアプローチは、正常染色体移入により抑制されたテロメラーゼ活性が再活性されたハイブリッド細胞での欠失した染色体領域の同定である。さらに直接的なアプローチは、特異的な単一染色体やその断片を保有するA9細胞を微小核融合法によって腫瘍細胞へ移入し、細胞形態の変化、細胞増殖抑制、テロメラーゼ活性抑制を検索し、染色体断片を同定することである³³⁾⁴⁴⁾¹⁵⁾²⁸⁾³⁶⁾。

肝細胞癌 (HCC) は分子遺伝学的なアプローチによって、段階的に起こる多くの遺伝的変化の蓄積が明らかにされてきた腫瘍の一つである。例えば、p53やRBのような癌抑制遺伝子の不活化あるいは癌遺伝子の活性化などがあり、肝発癌の現象に深く関与している³⁹⁾⁴⁰⁾⁴²⁾⁷⁾²²⁾¹⁶⁾⁴¹⁾。HCCでのLoss of heterozygosity (LOH) は、1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 21, 22番染色体でしばしば観察されている。一方、細胞増殖抑制の多経路モデルは染色体移入法を用いた研究結果によって実証されているが³²⁾、テロメラーゼ活性抑制がその1つと考えられる。この可能性を確かめるため、癌抑制遺伝子が存在すると推定される染色体のうち、2, 4, 5, 10, 16番染色体をヒトのHCCから樹立された細胞株 (HMc-Li7)¹¹⁾²⁷⁾ に微小核融合法により移入し

た。その結果、2, 4, 5, 16番染色体では効果はなかったが、10番染色体によって著明にHMc-Li7の増殖を抑制し、有意なテロメラーゼ活性抑制を示した。まれに出現するリバータント細胞は再びテロメラーゼの活性を認めた。当研究によって、10p12と10p14の両方あるいはどちらか一方がテロメラーゼ活性抑制遺伝子であることを示唆する結果を得た。

対象及び方法

1. 細胞

HMc-Li7は肝細胞癌患者 (45歳 男性) の癌部組織より国立ガンセンターの広橋らによって樹立された細胞株である¹¹⁾²⁷⁾。染色体の核型分析により約70%の細胞で46, XY, -8, -11, -17, -21, +4, +marという核型であり、他の細胞では46, XY, -8, -11, -17, -21に付加的でランダムな染色体変化が認められた。これらの細胞は造腫瘍性があり 10^7 個をヌードマウスに注入すると2~4週間で腫瘍を形成した。この細胞株はRPMI 1640, 10%FCS, 100U/ml ペニシリン, 100 μ g/ml ストレプトマイシンで培養した。ヒト染色体のドナーとして使われたヒトの単一染色体 (2, 4, 5, 10番染色体) を含むマウスA9微小核雑種細胞クローン [A9 (bsr2), A9 (bsr4), A9 (bsr5), A9 (bsr10)] はpSV2bsr遺伝子で標識されており、ヒト10番染色体 [A9 (neo10)] はpSV2neoプラスミドDNAで標識されている¹⁵⁾。これらのクローンをDMEM, 10%CS, 100U/ml ペニシリン, 100 μ g/ml ストレプトマイシンと3 μ g/mlのBSHあるいは800 μ g/mlのG418で培養した。この間すべての細胞株でマイコプラズマの存在を否定した。培養は37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂のインキュベーター中で行われた。細胞はPBSで洗い、0.2%のトリプシン (0.5mMのEDTAを含む) で処理することによりサブクローン化した。

2. X線照射微小核細胞融合法による染色体移入

pSV2-neoあるいはpSV2-bsrで標識されたヒト染色体をもつマウスA9-ヒト染色体ライブラ

リーを使って2, 4, 5, 10, 16番染色体を微小核融合法により各々単独にHMc-Li7に移入した。微小核を誘導するために 1×10^6 個のA9微小核雑種細胞をコルセミド処理し, 20%FCS, DMEMで培養した。48時間の培養後, 温めておいた無血清の $10 \mu\text{g/ml}$ のサイトカラシンBを含むDMEMで満たし, 超遠心機を用い 34°C , 1hr, 10000gで遠心した。ペレットとなった微小核を無血清のDMEMで再懸濁し, $8 \mu\text{m}$, $5 \mu\text{m}$, $3 \mu\text{m}$ のフィルターで処理した。この3段階のフィルター処理の前に, 超遠心分離後ペレット化した微小核細胞に総量2.5から10GyまでのX線を照射し, 微小核細胞を断片化した。精製された微小核細胞は400g, 10分で遠心しペレット化し, $100 \mu\text{g/ml}$ のPHAを含む無血清DMEM 4 mlで懸濁した。微小核細胞は予め洗っておいた親株のHMc-Li7に接着させた。その際, 80%の細胞密度で, 37°C , 15分培養した。細胞は47%のPEG 3 mlで1分間処理し, DMEMで洗った。24時間後, 細胞をトリプシン処理し, 6枚のフラスコへ蒔き, $8 \mu\text{g/ml}$ のBSHあるいは $400 \mu\text{g/ml}$ のG418を含む培地で3週間以上培養した。BSHあるいはG418を含む培地で選択培養後, 雑種細胞はクローニングし, 更なる解析目的ため, 継代培養すると同時にその染色体をキナクリン染色とヘキスト33258染色で解析した⁴⁵⁾。

3. 染色体解析

前述した方法で染色体解析を行うため, HMc-Li7細胞および染色体導入細胞中の染色体をキナクリン+ヘキスト33258染色法によって解析し, 少なくとも100個の中期の染色像を詳しく核型分析した。

4. 造腫瘍性の検索

ヌードマウスでの造腫瘍性を調べるために10pを移入し, BSHで選択されたクローンのリバートアント細胞をトリプシン処理し回収した後, 無血清のRPMI1640で4~6回洗った。0.2mlのRPMI 1640中に懸濁した 1×10^7 個の細胞を4~5週齢の無胸腺ヌードマウス (BALB/CA Jcl-nu mice)の皮下へ接種した。6ヵ月間ヌードマウスの腫瘍形成能を調べ, その造腫瘍性は連続的に腫瘍を形成する能力で評価した。

5. In vitro growth assay

親株であるHMc-Li7と微小核雑種細胞の増殖率と飽和密度を検索するために, 細胞を60mmのプラスチックペトリディッシュあるいは24穴のディッシュに細胞を播き, 1ディッシュ当たり 5×10^4 個の密度で10%FCSを含む培地で培養した。培地は3日毎に交換した。細胞の算定は連日24時間毎に約2週間にわたりトリプシン処理後の細胞で行い, その増殖率を増殖曲線の対数部分から求めた。また各々のクローンが最高飽和状態の細胞数から細胞飽和密度を算定した。

6. pSV2bsrの検出

選択マーカー遺伝子であるpSV2bsrの微小核雑種細胞での導入を確認するためのPCR解析は, 特に増殖抑制を起こしたクローンを用いて行った。プライマー5'-AGTAG-CGACAGAGAAGATTAC-3'(bsr1)と5'-ACAATCTGGTGCATAGTCTGA-3'(bsr2)はbsrをコードしているシークエンスを含む298bpの領域を増幅した。微小核融合法により得た微小核雑種細胞のうち増殖抑制を起こした細胞からDNAを抽出した。そして $1 \mu\text{l}$ の細胞抽出液からDNA (50ng~100ng)を各々 $200 \mu\text{M}$ のデオキシリボヌクレオチドトリホスフェイト (dATP, dCTP, dTTP, dGTP), $1 \mu\text{M}$ のプライマー-bsr1とbsr2, 0.25UのAmpli-Taq polymeraseとPCRバッファーからなる $10 \mu\text{l}$ の反応溶液で増幅した。最初の変性は 95°C で2分間, それ以後は 94°C で45秒間, 57°C でのアニーリングが30秒間, そして 72°C の増幅が45秒間の30サイクル, 最後は 72°C の増幅が2分15秒間であった。増幅されたbsrシークエンスは電気泳動で $1 \times \text{TBE}$ 中のポリアクリルアミドゲル上で分離し, エチジウムブロマイドやUVイルミネーターで処理した。PCRプライマーはBio-synthesis DNA synthesizerを使って合成されたものを用いた。

7. サザンプロットによるテロメア長の測定

テロメア長を反映しているTRF (terminal repeat fragment)をサザンプロット解析によって測定した。高分子量のDNAはプロテアーゼK処理, フェノール/クロロホルム抽出を含む標準的方法に従って細胞株から採取した。制限酵素であるエンドヌクレアーゼHinf I)で完全に切断し,

0.7%アガロースゲルで電気泳動し、ナイロンメンブレンへのトランスファーを行った。合成されたオリゴヌクレオチド (TTAGGG)₄を [γ -32 p] ATPで末端標識し、テロメア繰り返し配列のハイブリダイゼーションプローブとして使用した。ハイブリダイゼーションは50°Cで20時間、6 × SSPE/1% SDS中で行った。最後にメンブレンは50°Cで6 × SSC/0.1% SDSで洗い、オートラジオグラフィーを行い、スメア状のシグナルを測定した。

8. テロメラーゼ活性測定のためのTRAPアッセイ

TRAP (telomeric repeat amplification protocol) アッセイをKim et al¹⁴⁾によって示された方法で行った。すなわち、組織サンプル (100mg, -80°C凍結保存) を200 μ lの氷冷したライシスバッファーでホモジェナイズし、16000gで遠心分離した。上清の一部 (0.1あるいは1 μ gの蛋白質) を予め50 μ lの反応溶液が分注されているTRAPアッセイチューブに加えた。反応溶液の組成は20 mM Tris-HCl (pH=8.3), 1.5 mM MgCl₂, 63 mM KCl, 0.005% Tween20, 1 mM EGTA, 50 μ M dNTPs, 0.1 μ gのTS プライマー, 1 μ gのT4g 32プロテイン, BSA (0.1 mg/ml), 2 μ Ciの [α -32 p] dCTPと2ユニットのTaq DNAポリメラーゼ, 0.1 μ gのCX プライマーであり, CX プライマーはAmpliwaxによってチューブの底に分離されている。10分間, 23°C処理でTS プライマーにテロメア繰り返し配列を付加伸長させ, 95°C (30秒), 50°C (30秒), 72°C (1分30秒) を31サイクル行った。RNase (0.1 μ g/サンプル, 37°C, 10分) で前処理したサンプルは陰性のコントロールとして用いた。最終産物は10%ポリアクリルアミドゲルでの電気泳動とオートラジオグラフィーによって処理した。

9. Inter-AluおよびL1 PCR解析

部分的に欠落している10番染色体をもつ微小核雑種細胞を選別するためにスクリーニングによるInter AluおよびL1-PCR解析を行った^{17,25)}。1 ~ 3 × 10³個のX線照射した微小核雑種細胞からDNAを抽出するために0.45%のNP40, 0.45%のTween20と600 μ g/mlのプロテアーゼ K, そして35 μ lのPCRバッファーを加えて, 37°C, 6 ~ 10h

培養した。プロテアーゼKの熱処理後 (95°C, 10分), 2 μ lの細胞抽出液から抽出したDNAを20 μ lの反応溶液で増幅した。反応溶液とはdATP, dCTP, dTTP, dGTPを各々250 μ Mずつ, 1 μ MのプライマーTC-65およびL1Hs, 0.5UのAmpli-Taq polymeraseとPCRバッファーを含むものである。初期変性は95°C (4分) で, 94°C (1分), 55°Cのアニーリング (1分), 72°Cの増幅 (4分) を35サイクル行い, 最後は72°C (7分) で増幅した。増幅されたinter-AluあるいはL1 シークエンスは0.5 × TBE中で1.2%のアガロースゲルの上で電気泳動により分離した。その後, エチジウムブロマイド染色, UVイルミネーターで処理した。プライマーTC-65のシークエンスはAAGTCGCGGCCGCTTGCAGTGAGCCGAGATであり, プライマーL1HsはScott et al¹³⁾によって示された3'末端側208bpのシークエンスであった。

10. Chromosomal Fluorescence in situ Hybridization (FISH)

微小核雑種細胞の有糸分裂の中期の染色体はキナクリンマスタードで標識し, 形態からヒト染色体を同定した。PinkelやCherifら⁴³⁰⁾のin situ hybridization法を用いて10番染色体上のpSV2bsrの標識部位をマッピングした。pSV2bsrプラスミドDNA (500ng/ μ l) はdATP, dGTP, dCTP (0.4 mMずつ) とビオチン-16-dUTP (1 mM) を使い, ニックトランスレーションによって15°C, 1.5hでラベルした。ラベルされたプローブをサケ精子由来DNAでブロックし, 20 μ lのホルムアミドに溶解した。そのプローブ溶液を75°C, 5分で変性し, 20%デキストラン硫酸塩を含む等量の4 × SSCで混和し, そのハイブリダイゼーション溶液は変性されたスライド上に滴下し, 37°Cで16 ~ 24 h湿気のあるインキュベーターで培養した。50%ホルムアミド/2 × SSC, 2 × C, 1 × SSC (各々37°C, 15分間), 4 × SSC (37°C, 5分間) で洗った後スライドはFITC (5 μ g/ml) と共に4 × SSC/1% BSAで培養した (37°C, 45分間)。スライドを4 × SSC, 4 × SSC (0.1% TritonX-100を含む), 4 × SSCで各々10分間ずつ洗った後, スライドをアンチアビジン (5 μ g/ml) と共に4 × SSC/1% BSAで37°C, 1h培養し, 5分間ずつ4 × SSC, 0.1% TritonX-100を含む4 × SSC, 4 ×

SSCで洗った。アビジン-FITCでの37℃, 45分間処理を再度行った後, 同様に5分間ずつ洗い, 0.5 μg/mlのPIを含む抗退色防止剤で封入し, シグナルを顕微鏡下で確認し写真撮影した。

11. Chromosomal in situ suppression(CISS)ハイブリダイゼーション

正常な男性のドナー(提供者)からのPHA刺激済みの末梢血リンパ球を10%FCSを含むTC199で培養し有糸分裂の中期像をR-バンド法で処理した。培養は5%CO₂, 37℃, 48hで行った。チミジン(300 μg/ml)を培養中に加え, さらに15.5h培養を継続した。細胞はTC199で2回洗い, 25 μg/ml Brduで処理し, さらに6.5h, 37℃で培養した。その後30分間コルセミド処理をした。その後標準的な方法により染色体標本を作製した。R-バンドの検出のためにはLichter et alによる蛍光標識法(1990)を応用した。染色体標本はヘキスト33258(1 μg/ml)を含むソーレンゼ酸緩衝液(pH6.8)中で5分間標識した。十分洗った後, カバーガラスの下にバッファーと共に封入した。スライドは3分間, 75℃でホットプレートに置いた。その後, 200Wのブラックライトを照射し, 1.0~1.5cm離して75℃で6分間処理した。処理済みのスライドはハイブリダイゼーションまで-80℃で保存した。微小核融合法によりHMc-Li7のテロメレース活性を抑制し, 増殖を抑制した領域, すなわち雑種細胞に保有されたヒト10番染色体の断片領域を同定するために, R-バンドの有糸分裂中期像を準備した¹⁹⁾。HMc-Li7に増殖抑制及びヒト染色体10p由来の断片を含むクロンのテロメレース活性の抑制を誘導したX線照射雑種細胞パネル[A9(bsr10p), A2.52, A2.57]からヒト特異的DNAプローブを作製するために, Lengauerら¹⁸⁾によって作製された2つのプライマー(CL1とCL2)を用いてAlu-PCRを行った。プライマーの塩基配列は, CL1, 5'-TCCCAAAGTGCTGGGATTACAG-3'; CL2, 5'-CTGCACTCCAGCCTGGG-3'であった。PCRアッセイでは, プライマーは各々濃度0.25 μMで, 250 μMのdNTPsと2.0UのTaq polymeraseを含みPCRバッファーで全量を100 μlとし, それと等量の約100~150ngの雑種細胞DNAを加えた。初期変性は96℃, 3分間で, その後96℃(1分間), 37℃のアニーリング(30秒), 72℃の増幅(6分

間)を30サイクル, 最後に72℃の増幅(5分間)を行った。10 μlの増幅されたDNAシークエンスは1×TBE中の1.5%アガロースゲルでの電気泳動により分離した。PCR産物はエタノール沈殿し, 2倍量の蒸留水で再懸濁し, 得られたDNAプローブはCISSハイブリダイゼーションを用いた。CISSハイブリダイゼーションと, アビジンが結合したFITCによるプローブの検出は以下のプロトコールで行われた。300~500ngのAlu-PCRで増幅し, dATP, dGTP, dCTP(各0.4mM)とビオチン-16-dUTP(1mM)を使ったニックトランスレーションによって標識された雑種細胞DNAを, 標識されていないヒトDNAによるプレアニーリングの後ペインティングプローブとして使用した。ペインティングプローブ溶液は75℃で5分間変性処理し, 20%のデキストラン硫酸塩を含む等量の4×SSCで混和し, ハイブリダイゼーション溶液は変性されたスライドに滴下し37℃, 16~24h培養した。50%ホルムアミド/2×SSC, 2×SSC, 1×SSC(37℃, 15分各々)で洗った後, 4×SSC(37℃, 5分)で洗い, さらに, 4×SSC/1%BSA [アビジン, FITC(0.3 μg/ml)]で37℃, 45分間培養した。スライドを10分間ずつ4×SSC, 0.1 TritonX-100を含む4×SSC, 4×SSCで洗った後, 4×SSC/1%BSA(アンチアビジンを含む)で37℃, 1時間培養した。その後, 4×SSC, 0.1% TritonX-100を含む4×SSC, 4×SSCで5分間ずつ洗った。37℃, 45分間でアビジン-FITC処理を再度行い, 前述したように5分間ずつ洗い, 1%DABCOを含む抗退色防止剤に溶解されたPIで染色を行い, シグナルを観察した。

12. サザンプロット解析

HMc-Li7のテロメレース活性を抑制し, 増殖を抑制する10番染色体短腕の領域について, FISHによって得られた結果を確認するため, サザンプロットによるマッピングを行った。陰性のコントロールとしてA9細胞のDNAs, 10番染色体のコントロールとして, A9(neo10), A9(bsr10p), 放射線照射雑種クロン(A2.52, A2.55, A41, A44, A45, A82, A83, A84, A102, A103, A105, A109, A1011), 陽性のコントロールとしてヒト線維芽細胞, bsr遺伝子のコントロールとしてA9(bsr16)を使用し, 制限酵

素としては, Msp I (25unit/ μ l)を用いた. DNA断片を0.7%アガロースゲル上で電気泳動により分離し, 0.4N NaOH中でナイロンメンブレンに移した. 5つの10番染色体特異的なDNAプローブ [SPDS-4 (D10S17;10pter ~p13), VNTR-52 (D10S15;10q11.2), SPDS-29 (D10S16;10q21.1 ~q23), HG105 (hu. urokinase cDNA;10q24), HG240 (hu. OAT cDNA;10q26)] を解析のために使用した. これらのプローブをランダムプライム法によって放射能標識し, フィルターをプレハイブリダイズし, サザンプロット法でハイブリダイズした.

13. Microsatellite多型解析

10番染色体短腕についてより詳細な解析を加えるため, ヒト10番染色体の各部分を含む微小核雑種細胞を用いて, マイクロサテライト多型を用い, 解析をPCR法で行い, 電気泳動した. 10番染色体短腕のシークエンスから得られたPCRプライマーは [D10S172 (10p13)], [D10S89 (10p12.3)], [D10S111 (10p11)] であり, 長腕は [RBP3 (10q11.2)], [D10S109 (10q21)], [D10S215 (10q22.3)], [D10S192 (10q23.1)], [D10S222 (10q23.31 ~q23.33)], [D10S168 (10q24.1)], [D10S209 (10q25.1)] [D10S169 (10q26~qter)] であった⁴³⁾. PCR 反応は100ngのDNAを含む全量10 μ lで行い, 各々のプライマーは1 μ M, 50mMのKCl, 10mMのTris-HCl(pH8.3), 1.5mMのMgCl₂, 200 μ MのdNTPs, 0.5UのTaqポリメラーゼを含んでいる. PCR増幅は初めの5分は94 $^{\circ}$ Cで変性し, その後94 $^{\circ}$ C (1分間), アニールは55 $^{\circ}$ C (2分間), 増幅は72 $^{\circ}$ C (2分間) を35サイクル行い, 最後の5分間は72 $^{\circ}$ Cで行った. PCR産物は

3%アガロースゲルで分離され, エチジウムブロマイドで処理した.

結 果

1. 微小核細胞融合法による染色体移入及び微小核雑種細胞の染色体解析

HMc-Li7と正常ヒト染色体を保有するA9微小核雑種細胞 A9 (bsr2), A9 (bsr4), A9 (bsr5), A9 (bsr10), A9 (bsr10p), A9 (neo16) との微小核融合法により得られた微小核細胞を, 5個~20個単離した (表1). それらには各々の染色体が移入されており, さらなる解析のために継代した. 微小核融合法により2, 4, 5, 16番染色体を移入した後に形成された全てのBSH及びG418耐性のコロニーは形態的な変化を示さなかった. またBSH耐性クローンのキナクリン解析ではクローンの70~100%でヒト染色体の2, 4, 5, 16番と推定される正常な染色体のコピーが1つないし2つ存在した. 一方, 完全な10番染色体を含むA9細胞を微小核融合法によりHMc-Li7に移入したところ, 増殖抑制の後, リバータント様の再増殖を認めた. そこでpSV2 bsrプラスミドDNAプローブを使ったFISH解析⁴³⁾を行ったところ, HMc-Li7に移入された10番染色体の10pに共通欠失が認められた. 次いで10pを染色体移入して得られたBSH耐性のコロニー20のうちの10コロニーはbsr遺伝子が存在するにも関わらず細胞形態の変化, 増殖抑制, テロメラーゼ活性の抑制をきたし, それらの10クローンから5つのリバータントを得た. それらのQ-バンド染色及びFISH解析により, ヒト10番染色体断片のコピーが1本あるいは2本認められた.

表 1. 肝癌細胞株 (HMc-Li7) へのヒト染色体移入効果のまとめ

Human chromosome transferred	Average number of BSH or G418-resistant colonies/experiment	Total number of colonies examined	Number of clones that senesced	Number of revertant clones
#2	18.2	16	0	0
#4	16.7	18	0	0
#5	12.0	18	0	0
#10p	28.5	20	10	5
irradiated #10p (A2.52)	4.5	9	4	2
#16	12.8	23	0	0

2. 造腫瘍性とin vitroにおける微小核雑種細胞の増殖率

5つのリバータントクローンと2つの増殖抑制を示すクローンの造腫瘍性と細胞形態の変化を、親株であるHMc-Li7のそれと比較した。HMc-Li7

とリバータント細胞を、生後4~5週間の無胸線ヌードマウスの1箇所10⁷個皮下注射し、すべての接種部位に2週間の潜伏期の後、腫瘍形成を認めた。

in vitroにおける5つのリバータントクローン

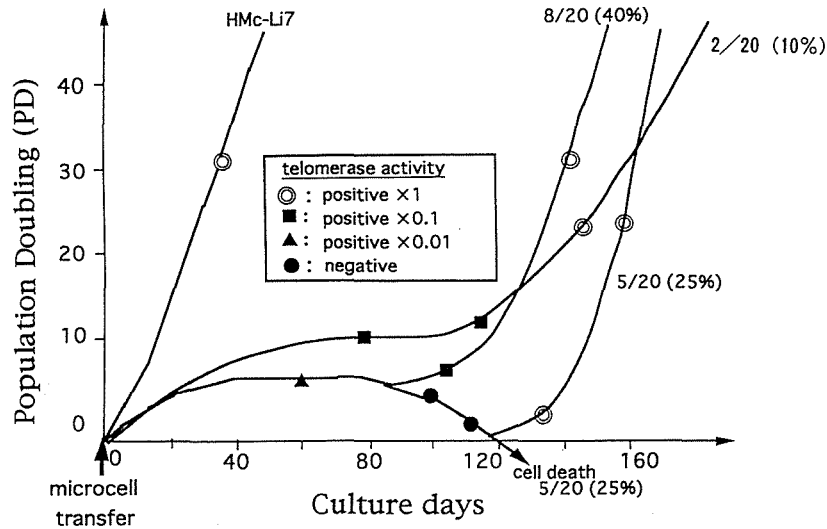


図 1. テロメラーゼ活性をもつHMc-Li7と10番染色体短腕を移入した微小核雑種クローン (20個) の増殖曲線. そのうちの10個のクローンは約40回の細胞分裂の後に増殖抑制を示し、著明なテロメラーゼ活性抑制を示した. 各々、5クローンは細胞死に至り、もう5クローン (HM10-1, 10-5, 10-13, 10-15, 10-18) は増殖抑制から逃れ、50回以上の細胞分裂後、親株とほぼ同じテロメラーゼ活性を示した.

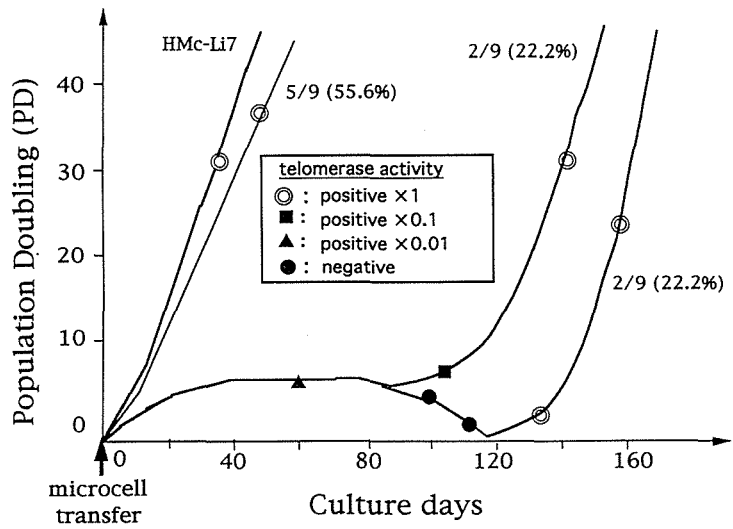


図 2. テロメラーゼ活性をもつHMc-Li7にX線を照射した10番染色体短腕の異なる断片を保有する22個の雑種クローンのうちのA2.52を移入した移入クローンの増殖曲線. 4クローンは著明なテロメラーゼ活性の抑制と、増殖抑制を認めたが、再びテロメラーゼ活性を得て増殖抑制から逃れた. 他の5クローンは細胞増殖能は抑制されず、テロメラーゼ活性も抑制されなかった.

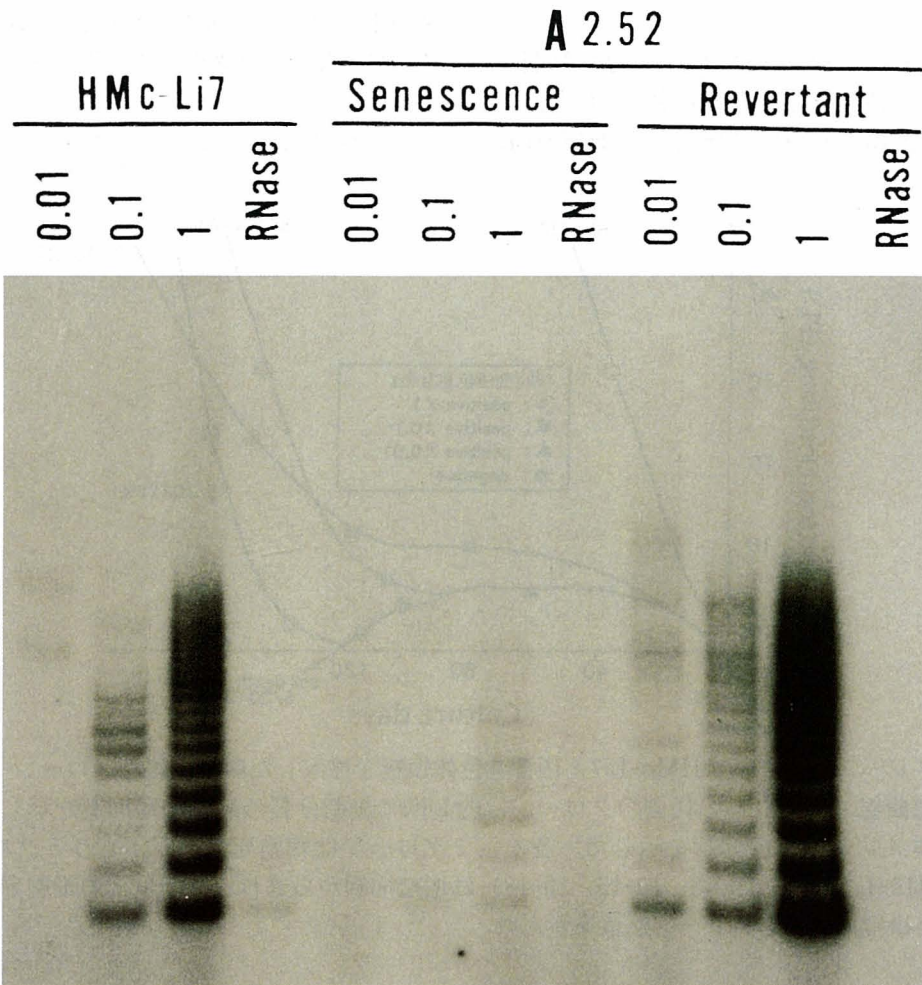


図 3. HMc-Li7と10番染色体短腕の一部を含む (A2.52 を導入したHMc-Li7) 雑種クローンのテロメラーゼ活性. A2.52 S (senescence)はA2.52を移入することによって増殖抑制を示した雑種クローンを意味し, A2.52 R (revertant)は細胞増殖から逃れたクローンを意味する. A2.52 Sはテロメラーゼ活性は親株と比較して有意に弱くRNase感受性であり, A2.52 Rはテロメラーゼ活性は親株と同様でありRNase感受性である. このことはA2.52を含むヒト染色体の断片はHMc-Li7のテロメラーゼ活性を抑制することを示している.

の増殖率を, 10%CSを含む培地での倍加時間と飽和密度で検討した. HMc-Li7細胞と比較すると, 1つのクローンを除いた全てのリバータントの増殖率は, 親細胞と同程度かやや減少傾向にあった.

このように, 10番染色体の断片の移入によりHMc-Li7の増殖抑制を認め, 移入された部分の欠失によってリバータント化し, 増殖能と造腫瘍能の再獲得を確認した.

3. X線照射雑種細胞クローンのスクリーニング

10番染色体の短腕が部分的に欠失し, その欠失

部分が異なっている微小核雑種細胞をスクリーニングするために, X線照射後のA9 (bsr10p)の微小核細胞とマウスA9細胞とでX線照射微小核融合を行い⁵⁾, プライマーとしてTC-65やL1Hsを用いたinter Alu-PCR解析によるスクリーニングを行った¹⁷⁾²⁵⁾³⁴⁾. その結果, 22個のBSH耐性クローンが, X線照射雑種細胞パネルとしてクローニングされた. 22クローンのうち13クローンはHMc-Li7に移入するために継代した.

4. 微小核細胞融合法により移入されたクローンのテロメラーゼ活性

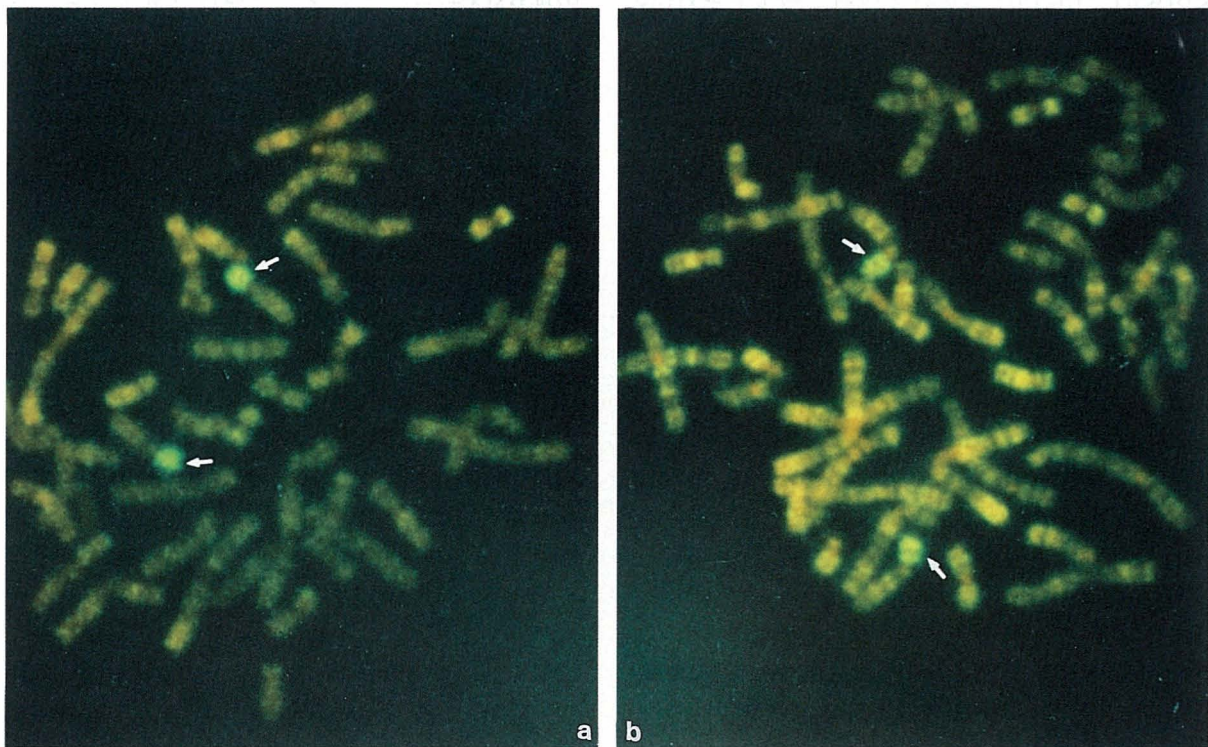


図 4. R-バンドの中期像でのchromosomal in situ suppression(CISS)ハイブリダイゼーション解析. 4-a) Alu-PCRによってA9 (bsr10p)から得られたプローブでのペインティングを示す. b) Alu-PCRによってA2.52から得られたプローブでのペインティングを示す. 増殖抑制およびテロメラーゼ活性抑制を誘導する領域を10p12および10p14に同定した.

10番染色体の断片が移入されたクローンは、初期の段階で細胞形態の変化かつ細胞増殖抑制をきたし、中には細胞死に至るものもあるため、そのDNAは抽出できなかつた. 微小核融合法によって移入され、細胞増殖抑制に至った10クローンのテロメラーゼ活性は陰性であり、10番染色体短腕移入により細胞増殖抑制を示したクローンのうち5つのリバータントクローン (HM10-1, HM10-5, HM10-13, HM10-15, HM10-18) はテロメラーゼの再活性を示し、各々の活性の強さは親株と比べて同程度であった (図1). さらに、10番染色体短腕の断片化された染色体を含むA9細胞 (A2.52, A2.57, A41, A103) と親株との微小核融合により同現象が観察された. また増殖抑制の誘導は、HMc-Li7とX線照射雑種クローン (A2.52, A2.57) との微小核融合法で得られた9クローンのうちの4クローンでも認められた (図2).

このように、この10番染色体の断片部分は、細胞の増殖を抑える、テロメラーゼ活性も抑制することが明らかとなった (図3).

5. 増殖抑制とテロメラーゼ活性の抑制に関わる染色体領域のマッピング

増殖抑制及びテロメラーゼ活性抑制を誘導する領域の同定を行った. 増殖抑制を誘導した雑種クローン (A2.52, A2.57) とA9 (bsr10p) から、Alu-PCRによって増幅したヒト特異的プローブを用いて、典型的なR-バンドの中期分裂像にFISHを行った¹⁹⁾³⁸⁾. 図4 (4-a, 4-b) は、Alu-PCRで増幅されたヒト特異的領域のCISS(chromosomal in situ suppression)ハイブリダイゼーションの結果で、A9 (bsr10p)とX線照射雑種細胞 (A2.52) から得た¹⁸⁾. 3枚のスライドで100個の中期分裂像を解析した結果、前者では10番染色体の短腕に強いシグナルが2本の染色体で認められた. 後者では10p12と10p14に特異的なシグナルが観察された.

これらの結果は、Msp Iで切断されたDNAによるサザンブロット解析や、10番染色体のマイクロサテライト多型を用いたPCR解析によって確認した. 特に10p14に含まれるプローブとして

SPDS04, 10p12に含まれるプローブとしてD10S172, D10S89そしてD10S111を用いて目的の染色体領域を検索したところシグナルが検出できず, 目的の領域がさらに小さな領域であることが示唆された. 以上より, 10p12と10p14の両方あるいは一方が細胞の増殖抑制およびテロメラーゼ活性抑制を制御する原因遺伝子を含む領域と考えられた.

考 察

10番染色体のヘテロ接合性の欠失 (LOH)は, HCC全体の25%で認められる10q26.11~qterの領域を除いては全く報告されていない⁷⁾. しかし10番染色体の比較的頻繁に起こる変異と欠失は, 多形性膠芽腫, 悪性黒色腫, 前立腺癌, 腎臓癌そして子宮頸癌を含む高転移能を有するヒトの腫瘍において同定されてきた²³⁾²¹⁾³¹⁾³⁷⁾. さらに, 10番染色体全体あるいは10番染色体のかなりの部分を含むヒトの多形性膠芽腫の雑種細胞は軟寒天培地上での増殖能が抑制され, またヌードマウスでの腫瘍形成も抑制され²⁹⁾, 10番染色体上の癌抑制遺伝子の存在が示唆されていた. 多形性膠芽腫のような星状細胞腫では, 10番染色体の3つの異なる欠失領域が認められ, それらの1つはD10S33, D10S28, D10S34の領域を含む短腕の末端側であった¹³⁾³⁷⁾. 以上より10番染色体上に幾つかの癌抑制遺伝子が離れて存在する可能性が示唆されていることと, 発癌のメカニズムとして2ヒット説だけでなく遺伝子量効果による発癌の可能性もあると推察され, これが悪性腫瘍増殖の一因となっている可能性を示している. 10p12あるいは10p14の構造的な変化は最も悪性度が高く高転移能を有する腫瘍の悪性黒色腫 (10p13~pter)と星状細胞腫 (grade3~4)(10p14~pter)にのみ観察されており, そのためこの特異的な染色体の領域を欠失することが増殖抑制からの回避と, 転移能の獲得をもたらすと考えられる.

最近, 2つの異なる正常染色体の移入により同一の腫瘍細胞株に細胞増殖抑制を誘導することが報告されてきたが, それは増殖抑制の多経路が細胞株で不活化されているということを示している³²⁾. テロメラーゼは内因性のRNAsを含み, 一般的には1.5リピートのテロメア相補配列CU-AACCCUAを含む2つの蛋白質からなる¹⁶⁾. 完全にテロメラーゼを発現するために少なくとも内

因性RNAをコードしている遺伝子群と2種の蛋白質は必要不可欠なものであると思われる. したがって, テロメラーゼが発現している細胞ではテロメラーゼを構成する1因子をも阻害, 抑制されていないと考えられる. 一方, 正常体細胞でもわずかにテロメラーゼが発現しており, そこではテロメラーゼ活性を支配しているリプレッサー遺伝子群が何らかの機能を果たしていると考えられる¹²⁾. それゆえに, 腫瘍細胞におけるリプレッサー遺伝子の欠失や変異がテロメラーゼの強い活性化を導くものと考えられる.

我々はヒト染色体の10p12と10p14がヒト肝細胞癌由来細胞株に移入された際に, 細胞増殖抑制を誘導し, これらの細胞のテロメラーゼ活性を抑制することを示した. テロメラーゼ活性は, 不死化を制御している多経路において主な機能を果たしている. 我々の結果から癌抑制遺伝子 (TSGs)とテロメラーゼリプレッサー遺伝子 (TRGs)の両方が無関係か, あるいは相互作用的に関係しており, それらの局在は次のように推定される. 1)10p12がTSGsをコードしており, 10p14はTRGsをコードしている. 2)10p12はTRGsをコードしており, 10p14はTSGsをコードしている. 3)10p12はTRGsとTSGsの両方をコードしている. 4)10p14はTSGsとTRGsの両方をコードしている. 5)TSGsはTRGsと同一であり, 10p12か10p14かのいずれかに位置している. 同一の遺伝子によれば, 細胞周期に関与するTSGsの性質上, テロメラーゼが細胞周期依存性であることになり, さらにHarleyらの仮説におけるM₁期とM₂期の両方に同一の遺伝子が関わるという可能性は考えにくい. しかし, *in vivo*すなわち肝発癌の過程では, 非癌部である慢性肝炎や肝硬変ではテロメラーゼの発現が弱いながらも認められ, 前癌病変である腺腫様過形成でのテロメラーゼ活性が肝細胞癌相当の高いレベルで発現していることから, M₁期の時点で既にテロメラーゼに関わる遺伝子変化が起こっているとも推察される. この点について更に当研究の継続と蓄積が必要であり, これらの2つの領域と可能性として考えられる2つの遺伝子がどのように関連しているのかを解明することが期待される. 現在, 我々は新しい腫瘍抑制遺伝子とテロメラーゼリプレッサーに関連した遺伝子を精製するポジショナルクローニングのために, 10p12と10p14からのコス

ミドクロンの局在性に基づいて10p12と10p14から多くのコスミドクロンを単離している。

結 語

1. 微小核融合法を用いて、肝細胞癌細胞株に10番染色体を移入することによって細胞形態の変化、細胞増殖抑制、テロメラーゼ活性の著減を認め、リバータントではテロメラーゼの再活性を認めた。

2. 断片化された10番染色体の移入により、現象の再現を認めたクロンにつきマッピングを行い、10p12, 10p14が原因遺伝子の候補領域として考えられた。

3. 10p12および10p14の2つの領域と可能性として考えられる2つの遺伝子がどのような関連の下に発現および機能するのか、今後クローニングを含めて原因遺伝子の解明が期待される。

稿を終えるにあたり、御指導・御校閲賜りました鳥取大学医学部細胞工学教室押村光雄教授、および御校閲賜りました2内科川崎寛中教授、分子生物学教室の佐藤建三教授に衷心より感謝致します。

文 献

- 1) Bhattacharyya, A. and Blackburn, E.H. (1994). Architecture of telomerase RNA. *EMBO J.*, **13**, 5721-5731.
- 2) Bigner, S.H., Mark, J., Bigner, D.D. (1990). *Cancer Genet. Cytogenet.*, **47**, 141-154.
- 3) Carter, B.S., Ewing, C.M., Ward, W.S., Treiger, B.T., Aalders, T.W., Schalken, J.A., Epstein, J.I. and Isacs, W.B. (1990). Allelic loss of chromosomes 16q and 10q in human prostate cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 8751-8755.
- 4) Cherif, D., Bemard, O., Berger, R. (1989). Detection of single-copy genes by nonisotopic in situ hybridization on human chromosomes. *Hum. Genet.*, **81**, 358-362.
- 5) Cox, D.R., Burmeister, M., Price, E.R., Kim, S. and Myers, R.M. (1990). Radiation hybrid mapping: a somatic cell genetic method for constructing high-resolution maps of mammalian chromosomes. *Science*, **250**, 245-250.
- 6) Feng, J., Funk, W.D., Wang, S.S., Weinrich, S.L., Avilion, A.A., Chiu, C.P., Adams, R.R., Chang, E., Allsopp, R.C., Yu, J., Le, S., West, M.D., Harley, C.B., Andrews, W.H., Greider, C.W. and Villeponteau, B. (1995). The RNA component of human telomerase. *Science*, **269**, 1236-1241.
- 7) Fujimori, M., Tokino, T., Hino, O., Kitagawa, T., Imamura, T., Okamoto, E., Mitsunobu, M., Ishikawa, T., Nakagama, H., Harada, H., Yagura, M., Matsubara, K. and Nakamura, Y. (1991). Allelotype study of primary hepatocellular carcinoma. *Cancer Res.*, **51**, 89-93.
- 8) Greider, C.W. and Blackburn, E.H. (1985). Identification of a specific telomere terminal transferase activity in *Tetrahymena* extracts. *Cell*, **43**, 405-413.
- 9) Greider, C.W. and Blackburn, E.H. (1989). A telomeric sequence in the RNA of *Tetrahymena* telomerase required for telomere repeat synthesis. *Nature*, **337**, 331-337.
- 10) Hastie, N.D., Dempster, M., Dunlop, M.G., Thompson, A.M., Green, D.K. and Allshire, R.C. (1990). Telomere reduction in human colorectal carcinoma and with ageing. *Nature* **346**, 866-868.
- 11) Hirohashi, S., Shimosato, Y., Kameya, T., Koide, T., Mukojima, T., Taguchi, Y. and Kageyama, K. (1979). Production of α -fetoprotein and normal serum proteins by xenotransplanted human hepatomas in relation to their growth and morphology. *Cancer Res.*, **39**, 1819-1828.
- 12) Hiyama, K., Hirai, Y., Kyoizumi, S., Akiyama, M., Hiyama, E., Piatyszek, M.A., Shay, J.W., Ishioka, S. and Yamakido, M. (1995). Activation of telomerase in human lymphocytes and hematopoietic progenitor cells. *J Im-*

- munol, 155, 3711-3715.
- 13) Karlbom, A. E., James, C. D., Boethius, J., Cavenee, W.K., Collins, V.P., Nordenskjold, M. and Larsson, C. (1993). Loss of heterozygosity in malignant gliomas involves at least three distinct regions on chromosome 10. *Hum Genet.*, 92, 169-174.
 - 14) Kim, N.M., Piatyszek, M.A., Prowse, K.R., Harley, C.B., West, M.D., Ho, P.L.C., Coviello, G.M., Wright, W.E., Weinrich, S.L. and Shay, J.W. (1994). Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science*, 226, 2011-2015.
 - 15) Koi, M., Shimizu, M., Morita, H., Yamada, H., Satoh, H., Barrett, J.C. and Oshimura, M. (1989a). Normal human chromosome 11 suppresses tumorigenicity of human cervical tumor cell line Si-Ha. *Mol. Carcinogen.*, 2, 12-21.
 - 16) Konishi, M., Kikuchi-Yanoshita, R., Tanaka, K., Sato, C., Tsuruta, K., Maeda, Y., Koike, M., Tanaka, S., Nakamura, Y., Hattori, N. and Miyaki, M. (1993). Genetic changes and histopathological grades in human hepatocellular carcinomas. *Jpn. J. Cancer Res.*, 84, 893-899.
 - 17) Ledbetter, S. A., Nelson, D. L., Warren, S.T. and Ledbetter, D.H. (1990). Rapid isolation of DNA probes within specific chromosome regions by interspersed repetitive sequence polymerase chain reaction. *Genomics*, 6, 475-481.
 - 18) Lengauer, C., Green, E. D. and Cremer, T. (1992). Fluorescence in situ hybridization of YAC clones after inter-Alu-PCR amplification. *Genomics*, 13, 286-289.
 - 19) Lichter, P., Ledbetter, S. A., Ledbetter, D.H. and Ward, D.C. (1990). Fluorescence in situ hybridization with Alu and L1 polymerase chain reaction probes for rapid characterization of human chromosomes in hybrid cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 6634-6638.
 - 20) Morin, G.B. (1991). Recognition of a chromosome truncation site associated with alpha-thalassaemia by human telomerase. *Nature*, 353, 454-456.
 - 21) Morita, R., Saito, S., Ogawa, O., Yoshida, O., Yamakawa, K. and Nakamura, Y. (1991). Common regions of deletion on chromosomes 5q, 6q, and 10q in renal cell carcinoma. *Cancer Res.*, 51, 5817-5820.
 - 22) Murakami, Y., Hayashi, K., Hirohashi, S. and Sekiya, T. (1991). Aberrations of the tumor suppressor p53 and retinoblastoma genes in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res.*, 51, 5520-5525.
 - 23) Nakamura, Y., Leppert, M., O'Connell, P., Wolff, R., Holm, T., Culver, M., Martin, C., Fujimoto, E., Hoff, M. and Kumlin, E. (1987). Variable number of tandem repeat (VNTR) markers for human gene mapping. *Science*, 235, 1616-1622.
 - 24) Nakamura, Y., Lathrop, M., Bragg, T., Leppert, M., O'Connell, P., Jones, C., Lalouel, J.M. and White, R. (1988). An extended genetic linkage map of markers for human chromosome 10. *Genomics*, 3, 389-392.
 - 25) Nelson, D. L., Ledbetter, S. A., Corbo, L., Victoria, M.F., Ramirez-Solis, R., Webster, T.D., Ledbetter, D.H. and Caskey, C.T. (1989). Alu polymerase chain reaction: A method for rapid isolation of human-specific sequences from complex DNA sources. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86, 6686-6690.
 - 26) Ohmura, H., Tahara, H., Suzuki, M., Ide, T., Shimizu, M., Yoshida, M.A., Tahara, E., Shay, J.W., Barrett, J.C. and Oshimura, M. (1995). Restoration of the cellular senescence program and repression of telomerase by chromosome 3.

- Jpn. J. Cancer Res., 86, 899-904.
- 27) Osada, T., Sakamoto, M., Ino, Y., Iwamatsu, A., Matsuno, Y., Muto, T. and Hirohashi, S. submitted.
- 28) Oshimura, M., Kugoh, H., Koi, M., Shimizu, M., Yamada, H., Satoh, H. and Barrett, J.C. (1990). Transfer of a normal human chromosome 11 suppresses tumorigenicity of some but not all tumor cell lines. *J. Cell. Biochem.*, 42, 135-142.
- 29) Pershouse, M.A., Stubblefield, E., Hadi, A., Killary, A.M., Yung, W.K. and Steck, P.A. (1993). Analysis of the functional role of chromosome 10 loss in human glioblastomas. *Cancer Res.*, 55, 5043-5050.
- 30) Pinkel, D., Straume, T., and Gray, J.W. (1986). Cytogenetic analysis using quantitative high sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc Natl Acad Sci, USA* 83, 2934-2938.
- 31) Rempel, S.A., Schwechheimer, K., Davis, R.L., Cavenee, W.K. and Rosenblum. (1993). Loss of heterozygosity for loci on chromosome 10 is associated with morphologically malignant meningioma progression. *Cancer Res.*, 53, 2386-2392.
- 32) Sasaki, M., Honda, T., Yamada, H., Wake, N., Barrett, J. C. and Oshimura, M. (1994). Evidence for multiple pathways to cellular senescence. *Cancer Res.*, 54, 6090-6093.
- 33) Saxon, P. J., Srivatsan, E. S. and Stanbridge, E.J. Introduction of human chromosome 11 via microcell transfer controls tumorigenic expression of HeLa cells. (1986). *EMBO J.*, 15, 3461-3466.
- 34) Scott, A. F., Schmeckpeper, B. J., Abdelrazik, M., Comey, C. T., O'Hara, B., Rossiter, J.P., Cooley, T., Heath, P., Smith, K.D. and Margolet, L. (1987). Origin of the human L1 elements: Proposed progenitor genes deduced from a consensus DNA sequence. *Genomics*, 1, 113-125.
- 35) Shay, J. W., Tomlinson, G., Piatyszek, M.A., Gollahon, L.S. (1995). Spontaneous in vitro immortalization of breast epithelial cells from a patient with Li-Fraumeni syndrome. *Mol. Cell. Biol.*, 15, 425.
- 36) Shimizu, M., Yokota, J., Mori, N., Shuin, T., Shinoda, M., Terada, M. and Oshimura, M. (1990). Introduction of normal chromosome 3p modulates the tumorigenicity of a human renal cell line YCR. *Oncogene*, 5, 185-194.
- 37) Steck, P.A., Ligon, A.H., Cheong, P., Alfred-Yung, W.K. and Pershouse, M. A. (1995). Two tumor suppressive loci on chromosome 10 involved in human glioblastomas. *Genes Chromosom Cancer*, 12, 255-261.
- 38) Takahashi, E., Hori, T., O'Connell, P., Leppert, M. and White, R. (1990). R-banding and nonisotopic in situ hybridization: precise localization of the human type b) collagen gene (COL2A1). *Hum. Genet.* 86, 14-16.
- 39) Tsuda, H., Hirohashi, S., Shimosato, Y., Ino, Y., Yoshida, T. and Terada, M. (1989). Low incidence of point mutation of c-Ki-ras and N-ras oncogenes in human hepatocellular carcinoma. *Jpn. J. Cancer Res.*, 80, 196-199.
- 40) Tsuda, H., Zhang, W., Shimosato, Y., Yokota, J., Terada, M., Sugimura, T., Miyamura, T. and Hirohashi, S. (1990). Allele loss on chromosome 16 associated with progression of human hepatocellular carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 6791-6794.
- 41) Ueda, H., Ullrich, S.J., Gangemi, J. D., Kappel, C. A., Ngo, L., Feitelson, M.A. and Jay, G. (1995). Functional inactivation but not structural mutation of p 53 causes liver cancer. *Nature Genet*, 9, 41-47.
- 42) Walker, G. J., Hayward, N. K., Falvey, S. and Cooksley, W.G.E. (1991). Loss

- of somatic heterozygosity in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res.*, **51**, 4367-4370.
- 43) Weissenbach, J., Gyapay, G., Dib, C., Vignal, A., Morissette, J., Millasseau, P., Vaysseix, G. and Lathrop, M. (1992). A second-generation linkage map of the human genome. *Nature* **359**, 794-801.
- 44) Weissman, B. E., Saxon, P. J., Pasquale, S. R., Jones, G. R., Geiser, A. G. and Stanbridge, E. J. (1987). Introduction of a normal human chromosome 11 into a Wilms' tumor cell line controls its tumorigenic expression. *Science*, **236**, 175-180.
- 45) Yoshida, M. A., Ikeuchi, T. and Sasaki, M. (1975). Differential staining of parental chromosomes in interspecific cell hybrids with a combined quinacrine and 33258 Hoechst technique. *5*, 184-187.