

がんの性質を制御する mtDNA 突然変異の探索

小山 晃正 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 石川 香 (筑波大学 生命環境系)

背景・目的

ミトコンドリアは内膜および外膜からなる二重の膜を有する細胞内小器官である。内膜には呼吸酵素複合体 I ~ V が存在し、酸化リン酸化反応によって生命活動に必要な ATP の大部分を生産している。また、ミトコンドリアマトリクス (内膜の内側) 内にはミトコンドリア DNA (mtDNA) が細胞あたり数百から数千コピー存在している。mtDNA が核 DNA より突然変異を蓄積しやすいことや、がん化した細胞では、正常細胞と比較して mtDNA の突然変異がより高頻度に見つかることなどから、mtDNA の突然変異は細胞のがん化やがん化した細胞の性質に影響を及ぼしうると考えられてきた。一方で、mtDNA が完全に母性遺伝するのに対し、母性遺伝するがんの存在が疫学的に証明されていないことから、この説に対する反証も多く挙げられており、長く議論の対象となってきた。

所属研究室の先行研究では、独自の細胞質移植技術を使い、C57BL/6 (B6) 系統のマウスに由来する肺がん細胞で転移能が異なる 2 種類の細胞の核 DNA と mtDNA の組み合わせを入れ替えることにより、この細胞の転移能が核 DNA ではなく、mtDNA の突然変異に起因するものであることを世界で初めて証明した。この先行研究で転移能の原因になるとされた mtDNA の突然変異は、呼吸酵素複合体 I のサブユニットを構成する構造遺伝子にアミノ酸置換をもたらすものであったが、この突然変異の他にも、がん細胞の性質に影響を及ぼし得る mtDNA 突然変異が存在する可能性は十分に考えられる。

哺乳類の mtDNA の唯一のポリメラーゼであるポリメラーゼ γ (PolG) には複製機能と校正機能が備わっている。この校正機能を欠損したマウス (mtDNA mutator mice) では mtDNA の複製が起こる際に後天的にランダムな突然変異が蓄積するため、加齢にしたがって多様な変異が蓄積する。この構成機能をホモ (mut/mut) またはヘテロ (+/mut) で欠損した個体では、それぞれ重度および軽度の呼吸機能の低下が認められているが、野生型ホモ (+/+) の個体では突然変異の蓄積は起こらないため、正常な呼吸機能が維持される。しかし、+/mut 同士の交配から生まれる個体には、母親の体内で蓄積した mtDNA 変異の一部が Germline を通じて伝達されるため、代々+/mut 同士の交配によって維持された系統から得られる+/+のマウスには、通常の野生型マウスと比較して多くの mtDNA 突然変異を蓄積していると考えられる。以上のことから、+/+の mtDNA は呼吸機能に影響を及ぼさない程度にランダムに突然変異を蓄積しているとみなし、その突然変異の中からがん細胞の性質に影響を与え得る新規突然変異を見つけることを目標として研究を行った。

材料

所属研究室で 10 年以上前に樹立され、代々+/mut 同士の交配で維持されてきた PolG マウスの系統から 3 ヶ月齢の+/+を mtDNA ドナーとして用いた。

方法

1) サイブリッド作製

mtDNA ドナーの+/+マウスより採取した血小板 (無核であり、mtDNA を有する) を、mtDNA を完全に欠損した野生型 B6 マウスに由来するがん細胞 (ρ^0 P29 細胞) と融合させることによって、核は P29 細胞に由来し、mtDNA が+/+マウス由来である細胞質雑種 (サイブリッド; P29mt+/+) を複数クローン作製した。また、Control として B6 マウスの mtDNA をもつ細胞 (P29mtB6) を用いた。

2-1) *in vitro* での増殖能の評価

作成した細胞 1×10^4 個をディッシュに播種し、7 日目までの細胞数をカウントした。

2-2) *in vivo* での増殖能の評価

5×10^6 個の細胞をマウスの皮下に移植し、形成される腫瘍の体積を約 30 日間測定した。

2-3) 転移能の評価

5×10^5 個の細胞をマウスの尾静脈から移植し、移植後 20 日目に肺を摘出してブアン固定をした上で、形成された転移巣の数をカウントした。

結果

1) *in vitro* での増殖能の評価

最も増殖の早かったクローンと遅かったクローンでは、最終的に 5 倍以上の細胞数の差が見られた。

2) *in vivo* での増殖能 (腫瘍形成能) の評価

概ね、1) での結果と一致していたが、*in vitro* では増殖が比較的遅かったのに、*in vivo* における腫瘍形成では増殖が早くなったクローンも確認された。

3) 転移能の評価

Control の P29mtB6 には転移が認められなかった一方で、P29mt+/+の全クローンで転移能が認められた。しかし、その転移の程度にはクローン間で大きな違いが認められた。

考察・今後の展望

上記の結果より、同一個体の血小板から樹立されたにもかかわらず、性質が大きく異なるクローンが得られたと考えられる。現在、特に高い転移能を示したクローンの転移巣から回収した細胞を *in vitro* で培養しており、これらの細胞の塩基配列を解析することで、高い転移能をもたらす mtDNA 突然変異の同定を目指したい。

一方で、現時点では、培養中に挿入された核 DNA の突然変異によって腫瘍形成能や転移能の違いがもたらされた可能性を完全に否定することもできない。そこで、将来的には先行研究で実施されたのと同様の、核 DNA と mtDNA の組み合わせを入れ替える細胞質移植を行うことによって、観察された細胞の性質の違いが真に mtDNA の突然変異に起因するものであることを証明したいと考えている。