

## がん細胞の転移・増殖に寄与するミトコンドリアゲノム変異の探索

重松 夏帆 (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膜を有する細胞小器官である。内膜には呼吸酵素複合体 I ~ V が存在しており、酸化リン酸化反応によって生命活動に必要な ATP の大部分を産生している。また内膜の内側 (ミトコンドリアマトリクス) には、核 DNA とは異なる独自のミトコンドリア DNA (mtDNA) が細胞あたり数百から数千コピー存在している。また mtDNA には複合体 II を除く複合体の一部を構成する構造遺伝子と、その翻訳に必要な rRNA および tRNA がコードされている。

mtDNA は核 DNA に比べて突然変異を蓄積しやすく、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 が母性遺伝するのに対し、母性遺伝するがんの存在は疫学的に証明されておらず、この説に対する反証も多く、長ら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用い、C57BL/6 (B6) 系統のマウス由来の肺がん細胞で、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ことが明らかとなった。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、がん細胞の転移および増殖に関与し得る 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。PolG の校正機能を欠損したマウス (mtDNA mutator mouse) 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生じ、加齢に伴って mtDNA に多様な変異が蓄積していくとされている。この校正機能をホモ (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。

そこで本研究では、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* で再培養し、これらの細胞の塩基配列を解析することで、がん細胞の転移・増殖に寄与し得る mtDNA 突然変異の同定を目指すことを目標とする。

## 【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+/+マウスを mtDNA ドナーとして用いた。

## 【方法】

## (1) サイブリッド細胞の作製

mtDNA ドナーの+/+マウスより採取した血小板 (無核で 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 (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、コントロールとして B6 マウスの mtDNA をもつ細胞 (P29mtB6) を用いた。

## (2) 解析による腫瘍形成能・転移能の評価

樹立された複数クローンのサイブリッドをマウスの皮下に移植して腫瘍形成能を、また尾静脈から移植して転移能を、それぞれ評価した。その結果、同一個体の mtDNA を有するにも関わらず、クローン間で造腫瘍性・転移能に大きな違いがあることが明らかになった。そこで、特に造腫瘍性や転移能が高かったクローンについて、移植に用いた親株と共に、形成された腫瘍や転移巣から得た細胞を *in vitro* で再培養した細胞について、mtDNA の塩基配列を次世代シーケンスによって解析し、コントロールである P29mtB6 細胞と比較することで、造腫瘍性や転移能の発現に繋がり得る変異候補を探索した。

## 【結果】

P29mtB6 細胞と違いが認められた変異のうち、ヒト mtDNA の突然変異のデータベースである MITOMAP に登録されている病原性の突然変異と相同の変異を探索した結果、D-loop 領域に存在する 15930 番目の塩基に、各クローンにおいて 80~99% という高い割合で遺伝子変異が存在していることが明らかとなった。

その他の結果の詳細については、発表会にて報告する。

## 【考察・今後の展望】

今回発見された、増腫瘍性および転移能を有する細胞群で見られた変異は、がん細胞の転移・増殖に寄与する可能性がある。

しかし腫瘍形成能や転移能が mtDNA ではなく、核 DNA の変異によってもたらされている可能性も現時点では排除できない。そのため、将来的には先行研究で実施されたような mtDNA の交換を行うことで、腫瘍形成能および転移能が mtDNA 変異によるものであることを証明する実験が必要となるだろう。