

がんの悪性化に寄与しうる新規ミトコンドリア DNA 突然変異の探索

齊藤 さくら (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】

細胞小器官のひとつであるミトコンドリアは、呼吸酵素複合体を介した酸化リン酸化によって ATP を産生しており、独自のゲノム、ミトコンドリア DNA (mtDNA) を有する。mtDNA は細胞あたり数百~数千コピー存在し、呼吸酵素複合体 I、III、IV、V のサブユニットと、これらの翻訳に必要な tRNA や rRNA をコードしている。

一部の発がん性化学物質が核 DNA よりも mtDNA に結合しやすいとの報告等から、mtDNA に突然変異が蓄積することが、がん化の原因のひとつであるとする「がんミトコンドリア原因説」が提唱されている。しかし mtDNA は完全に母性遺伝するのに対し、がんは一般的に母性遺伝しない等の報告から、この説に対する異論も多く存在する。そこでこの説を検証するために、所属研究室の先行研究において、正常細胞とがん細胞との間で mtDNA を相互に置換したサイブリッド (cytoplasmic hybrid; 細胞質雑種) の作製が行われた。得られたサイブリッドの性質が評価された結果、mtDNA の由来に関係なく、がん細胞由来の核 DNA を有する細胞のみが造腫瘍性を示すことが明らかとなった。つまりこの実験により、用いた細胞におけるがん化の原因は mtDNA 変異ではなく核 DNA にあることが示唆された。しかし mtDNA 変異が、がんの悪性化へ関与している可能性が考えられたため、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 および高転移性がん細胞 A11 との間で mtDNA を置換した実験が行われた。この実験では、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。そこで両者の mtDNA 配列の比較が行われた結果、mtDNA の点突然変異が、がん細胞の転移能を誘導するという、mtDNA 誘導性がん転移が提唱された。この先行研究でがん転移を誘導しうると報告されたのは、マウス mtDNA の G13997A 変異であったが、他にもがん細胞の性質に影響を及ぼす mtDNA 突然変異が存在する可能性は十分に考えられる。そこで、mtDNA mutator mice の+/mut マウスを代々かけ合わせて得た、生殖細胞系列にランダムな mtDNA 突然変異が蓄積している++マウスの血小板をマウス ρ^0 細胞に融合させて得たサイブリッドクローンを用いて、造腫瘍性と転移能が評価された。その結果、得られたサイブリッドクローンは、同一個体に由来する mtDNA を有しているにも関わらず、造腫瘍性や転移能において大きく異なる性質を示した。

そこで本研究では、がんの悪性化に関与する新規 mtDNA 突然変異を同定することを目的として、先行研究で得られたクローンの中で、特に造腫瘍性や転移能が著しく高いクローンを中心に、次世代シーケンサーによる mtDNA の塩基配列解析を行った。

【材料・方法】

先行研究で樹立されたサイブリッドクローンのうち、低度の造腫瘍性及び転移能を示した Clone1 (P29mt+/+1)、高度の造腫瘍性及び転移能を示した Clone5 (P29mt+/+5)、コントロールとし

て B6 系統のマウス由来の mtDNA を有する P29mtB6 を解析対象サンプルとした。Clone5 については、先行研究において転移能及び造腫瘍性が高いことが明らかとなったため、がんの悪性化に大きく関与する変異を有することが期待でき、これらの変異は腫瘍形成後や転移後に濃縮することが予想される。このことを検証するため、P29mt+/+5 の尾静脈注射によって肺転移を誘導し、その後肺結節から回収した P29mt+/+5iv を転移後サンプルとした。さらに P29mt+/+5 の背部皮下注射によって腫瘍形成を誘導し、そこから回収した P29mt+/+5sc を腫瘍形成後サンプルとした。これらのサンプルについて次世代シーケンサーによる mtDNA の塩基配列解析を行うことによって、がん細胞の悪性化に寄与しうる新規 mtDNA 変異の同定を試みた。

【結果・考察】

上記 5 種のサンプルについて解析を行った結果、変異含有率 50%以上の点突然変異を、呼吸酵素複合体や rRNA、tRNA 上など計 24 箇所見出した。そのうち Clone1 (P29mt+/+1) および Clone5 (P29mt+/+5, P29mt+/+5iv, P29mt+/+5sc1, P29mt+/+5sc2, P29mt+/+5sc3) に共通する変異が 12 個、Clone1 に特異的な変異が 7 個、Clone5 に特異的な変異が 5 個存在した。さらに Clone5 に特異的な変異については、転移後や腫瘍形成後に変異含有率が濃縮するという傾向が確認されたことから、特にこれらの変異はがんの悪性化に直接寄与しているのではないかと考えられる。その他、結果の詳細は発表会にて報告する。

【展望】

本研究では、がんの悪性化に寄与する可能性がある新規 mtDNA 点突然変異を複数見出したが、現時点ではサイブリッドを作製した際に、核 DNA にサイブリッドクローンおよび腫瘍の特性に影響を及ぼす突然変異が偶発的に起きた可能性を完全に排除することができない。そこで今後は、サイブリッドクローンの腫瘍形成能や転移能が、核 DNA 変異と mtDNA 変異のどちらによって誘導されたものであるかを明らかにすることを目的として、脱核融合およびサイブリッド作製を行う予定である。具体的には、サイブリッド P29mt+/+を脱核した細胞質体と、非転移性マウス繊維肉腫 B82 の mtDNA を除去した ρ^0 B82 を融合し、B82mt+/+を作製する。このサイブリッドを用いた検証実験やマウス生体における造腫瘍試験等を行うことによって、確認された点突然変異の性質を評価していきたいと考えている。