

3 HPV18型による子宮頸部扁平上皮細胞の不死化とcigarette smoke condensate での悪性形質転換

佐賀医大, 小城町立病院*
中尾佳史, 横山正俊, 松尾憲人*, 岩坂 剛,
杉森 甫

[目的] 喫煙は子宮頸癌の発癌機構の中で, Humann Papillomavirus (HPV) 感染に引き続く cofactor の一つとして重要視されている。今回, この可能性の証明と癌化機構の解明に有用なモデルの確立を試みた。

[方法] 正常子宮頸部扁平上皮細胞に全長HPV18型DNAを導入し不死化細胞株を確立した。この細胞株をcigarette smoke condensate (CSC) を添加した培養液で培養し、細胞をヌードマウスに接種することにより腫瘍形成能を調べた。また、悪性形質転換の前後におけるHPV-DNA及びRNAの状態をサザンブロット, ノーザンブロットとRT-PCRで検討した。さらにそれぞれの細胞株のin vitroでの分化能をcollagen gelによる三次元培養法で調べた。

[成績] 確立された不死化細胞株ではHPV-DNAは宿主DNAにintegrateされ, E2/E4領域は欠如していた。三次元培養法による分化アッセイではCIN I様の組織像を示し, 腫瘍形成能は認められなかった。そして, この細胞株に対するCSC処理により, 腫瘍形成能を持つクローンを得た。このクローンはHPV-RNAの発現が若干増強しているものの, HPVのDNA増幅並びにスプライシング形式は腫瘍形成能の獲得の前後では変化は認められなかった。しかし, 分化アッセイではCIN III様の組織を構築した。

[結論] HPVによる子宮頸癌発癌のcofactorとして, 喫煙の関与が強く示唆された。また, 一連の細胞株は子宮頸癌の癌化過程を反映しており, 多段階発癌機構の解明に有用なin vitroシステムとなると思われた。

4 HPV18-DNAによる子宮頸部由来不死化細胞株樹立過程におけるHPV遺伝子の変化

佐賀医大, 小城町立病院*
横山正俊, 中尾佳史, 松尾憲人*, 岩坂 剛,
杉森 甫

[目的] 子宮頸部病変でのHPV-DNAのインテグレーションの重要性を調べるために, HPV18-DNAを導入した子宮頸部由来不死化細胞株の crisis 前後での比較検討をした。

[方法] 正常子宮頸部扁平上皮細胞にHPV18-DNAを導入し, 不死化細胞株 (HEC-18) を樹立した。HEC-18のcrisis 前後において, サザンブロットティング, 二次元電気泳動によるサザンブロットティング, ノーザンブロットティング, RNA-PCRでHPV18-DNA, RNAの変化を調べた。また, シリコン膜を利用したヌードマウスにおける in vivo implantation と collagen gel による三次元培養法でその分化能を調べた。さらに, ヌードマウスでその腫瘍形成能を検討した。

[成績] crisis 前は 100 コピー以上のエピゾーム状態のHPV-DNA を含んでいたが, その後はすべてインテグレートされ, しかも数コピーになっていた。full-length E2 repressor は, crisis 前は発現していたが, その後は発現していなかった。unspliced E6 oncogene はどちらでも発現していなかった。in vivo implantation ではどちらもCIN I 様の組織像を示し, 差は見られなかった。三次元培養法では, crisis 後は角化傾向が見られた。ヌードマウスにはどちらも腫瘍を形成することはできなかった。

[結論] HPV18-DNA のインテグレーションは, 悪性化には充分ではないが, 不死化の確立とその安定性において重要であることが示唆された。