

25 子宮頸部腺癌細胞株における VEGF の腫瘍形成能に及ぼす影響

佐賀医大

横山正俊、中尾佳史、原 浩一、安永牧生、小屋松安子、岩坂 剛、杉森 甫

〔目的〕 VEGF は種々の腫瘍の増殖、進展、転移に深く関与していることが知られている。今回、子宮頸癌の進展過程における VEGF 発現の影響を子宮頸部腺癌由来株である HeLa において in vivo, in vitro で調べた。〔方法〕新生血管が豊富であり、VEGF が著明に発現しているヒトグリオーマ細胞から VEGF165cDNA を得た。さらに発現型ベクター pMO5 に組み込み、センス、アンチセンス方向のプラスミッドを作成した。これらを HeLa に導入し、それぞれのクローンにおいて細胞増殖能、腫瘍形成能を比較検討した。また、血管新生やアポトーシス、mitosis についてもそれぞれ検討した。〔成績〕 in vitro における細胞増殖能においてはそれぞれのクローン間に著明な差は認められなかった。しかし、これらの細胞をヌードマウスに移植すると、センス VEGF 導入細胞ではコントロールの約 10 倍のサイズの腫瘍を形成した。また、センス VEGF 導入細胞の腫瘍では、VEGF 蛋白発現の増加とともに微小血管数の増加が認められた。これに対し、アンチセンス VEGF 導入細胞の腫瘍では微小血管数はコントロールと比べ減少していた。また、センス VEGF 導入細胞の腫瘍では mitosis が目立ち、一方アンチセンス VEGF 導入細胞の腫瘍では mitosis が減少し、アポトーシス様細胞の増加が観察された。〔結論〕 VEGF 蛋白の発現の増加に伴って、in vivo において腫瘍形成能の亢進が観察された。子宮頸癌の進展過程における VEGF とアポトーシスの関連も示唆された。これらの結果から、子宮頸癌においても VEGF がその血管新生を通してその進展過程に関与していることが実験的に示された。

口演
3 日(月)

26 子宮頸部扁平上皮癌細胞からの SN38 耐性株の樹立とその分子細胞生物学的性状の解析

大阪市立大

深山雅人、田中哲二、梅咲直彦、荻田幸雄

〔目的〕塩酸イリノテカン(CPT-11)耐性化の分子機構を明らかにするためにヒト子宮頸癌細胞株 ME180 より SN38 耐性株を樹立し、その分子細胞生物学的性状を解析した。〔方法〕 ME180 株から 4 回の段階的 SN38 暴露により安定した SN38 耐性細胞を誘導し、限界希釈法により単細胞由来 SN38 耐性株を 7 株樹立した。各 SN38 耐性株について親株との細胞増殖速度の比較、他抗癌剤交差耐性の有無、放射線耐性化獲得の有無、半定量的 RT-PCR 法による既知癌遺伝子・既知抗癌剤耐性化遺伝子・既知アポトーシス関連遺伝子の発現異同、Flow cytometry による細胞表面抗原の発現変動と DNA 量解析、Differential display(DD)法による発現異常を示す遺伝子のクローニング、等を行った。〔成績〕親株との IC50 比から、検討した SN38 耐性株全てに 125 倍以上の paclitaxel 耐性化、25 倍以上の BLM・VP16 耐性化、5 倍以上の THP・CDDP 耐性化の獲得を認めた。同時に放射線抵抗性獲得も認めた。検討した全株で p53 遺伝子発現には変動なく c-fos, c-myc の遺伝子発現の低下を確認し、2 株では c-fos 発現が認められなかった。bcl-X, bax, bcl-2 発現レベルは耐性株により異なる動態を示し、Fas 抗原、TNF-R 等のアポトーシス受容体発現は低下していた。DD 法により SN38 耐性化関連遺伝子 13 個のサブクローニングに成功した。〔結論〕 CPT-11 耐性化現象には特に paclitaxel・BLM・VP16 に対する著しい交差耐性獲得を伴うため、臨床における抗癌剤選択に考慮すべきである。放射線感受性シグナルと SN38 感受性シグナルには共通する細胞内経路が存在する。CPT-11 耐性化にはアポトーシス関連遺伝子の発現変動と一定した癌遺伝子の発現異常が関与している。

27 子宮頸癌細胞における β -catenin 遺伝子変異の検討

大阪医大、千葉大*

植田政嗣、植木 實、田中尚武*, 関谷宗英*

〔目的〕 β -catenin は cadherin の裏打ち蛋白質として細胞接着に関与するだけでなく、Wnt signaling pathway において Tcf/Lef family の転写因子と結合して標的遺伝子の転写を活性化する。近年、大腸癌、悪性黒色腫、内臓癌等で β -catenin 遺伝子変異とその過剰発現による発癌への関与が指摘されているが、頸癌での報告はみられない。そこで今回、種々の頸癌培養細胞における β -catenin 遺伝子変異を検索した。

〔方法〕頸部扁平上皮癌 12 株 (SKG-I, SKG-II, SKG-IIIa, QG-H, QG-U, YUMOTO, ME180, SiHa, CC19, Caski, C-33A, C4i) および腺癌 7 株 (NUZ-1, CAC-1, OMC-4, TCO-1, TCO-2, HOKUG, HeLa) を用いた。計 19 株から phenol-chloroform 法にて DNA を抽出し、GSK-3 β のリン酸化部位である β -catenin exon 3 に対して PCR-SSCP を行った。また、6 株 (ME180, CC19, Caski, C-33A, C4i, HeLa) から guanidinium thiocyanate 法にて total RNA を抽出後 random primer 法にて cDNA を合成し、 β -catenin cDNA の全長をカバーする 6 種の primer pair を用いて全 exon に対して RT-PCR-SSCP を行った。得られた polymorphic band は reamplify, gel purification の後、direct sequence を施行した。

〔成績〕PCR-SSCP では 19 株全てにおいて polymorphism はみられなかった。RT-PCR-SSCP では HeLa で variant band が検出され、sequence の結果 codon 214 (exon 5) に 1 塩基置換が認められたが、silent mutation (ACC $\rightarrow$ ACT ; threonine) であった。

〔結論〕頸癌培養細胞における β -catenin 遺伝子変異は rare event であることが示唆された。