

細胞学部門

Department of Molecular and Cell Biology

当部門は癌の治療診断を最終目的として、臨床に応用可能な癌特異的マーカーを同定すべく、癌の悪性形質、特に転移に対して分子生物学的アプローチ及び癌化学療法実験を平行かつ相補的に行ってきた。井上光世、小林裕明が学位を取得し基礎大学院、臨床大学院をそれぞれ終了した。1992年1月1日に東海大学医学部より勝木元也教授が当部門教授として着任した。今後発生工学的手法を用い、新たな展開が計画されている。

A. マウス B16黒色腫の転移能と逆相関する新種アクチンの生化学的性質（貞野宏之，下川りえ，谷口俊一郎）

低転移性のマウス B16黒色腫 (F1) に発現し、高転移性の F10 で減少又は消失する新種アクチン βm の cDNA クローニングを行い、アミノ酸配列を明らかにしたところ、 β アクチンと比べて一ヶ所のアミノ酸変異があった (βm ; Leu, β ; Arg)。F1 において βm は β 、 γ アクチン (β , γ) と同様にストレスファイバーを形成し、又、精製した βm を用いた実験から、 βm は β 、 γ とともに重合する性質を有することが示された。更に βm の生化学的性質を検討し、 β 、 γ と比較した。

最近、アクチンの構造解析から 28 番目の Arg がミオシンとの相互作用に関与するアミノ酸の一つであることが報告されたので、 βm を含む F アクチンと β 、 γ のみの F アクチンのミオシン ATPase 活性化能を測定したところ低濃度の $MgCl_2$ 存在下で、 β 、 γ のみの F アクチンよりも βm を含む F アクチンの活性が高い傾向にあることが分かった。又、通常の脱重合条件下で、G アクチンの性質である DNase 1 阻害活性を調べたところ、 βm を含む画分は β 、 γ よりも阻害活性が低かった。又、このアクチン画分は βm 特異的抗体を用いた免疫沈降実験から、 βm は β 、 γ とともに凝集塊を形成している事が分かり、この為 DNase 1 阻害活性が低いと考えられた。

B. βm アクチン cDNA 導入によるマウス黒色腫 B16-BL6 の転移抑制（下川りえ，貞野宏之，小林裕明，谷口俊一郎）

βm の発現のない高転移性 B16-F10 に βm cDNA を導入発現させたところ細胞骨格構築の促進と浸潤能の低下が観察されたことを報告してきた。 βm の転移に対する影響を更に確認するために、B16-F10 より更に浸潤能の高い BL6 の再クローン化した細胞株に、 βm cDNA の発現ベクターを遺伝子マーカー (pHEBO) と共に、りん酸カルシウム法で導入した。受容細胞における βm cDNA の integration 及び発現は、サザンブロット及びウェスタンブロット解析に

より調べた。転移能は C57BL/6 を用い、自然肺転移能、実験的肺転移能によって判定した。又、細胞運動性は、金コロイド粒子をコートしたカバーガラス上での細胞の貧食後の足跡を見た。

その結果、外来性に導入した β m の発現に相関して、細胞骨格構築の増強、転移能の低下、細胞運動性の低下が観察された。尚、増殖能には差は見られなかった。

これらの結果より、 β m は細胞運動性を低下させることにより、マウス B16 黒色腫の転移能低下の一端を担っていることが示唆された。

C. 癌転移関連未知遺伝子の検索 (呉啓貴, 貞野宏之, 谷口俊一郎)

v-fos 導入によって転移能が増強した形質転換細胞において、発現増強が見られた未知遺伝子をプローブとして、ヒトメラノーマから相同性を有する遺伝子を単離、全翻訳領域を含む cDNA の塩基配列を決定した。この遺伝子は血清刺激及びホルボールエステルに応答して、転写が促進される。更にヒトのゲノムにおいて、複数のコピーが存在することを確認した。塩基配列と、予想されるアミノ酸配列は酵母のリボゾーム蛋白質 YL41 と相同性を持ちアルギニン、リジン (いずれも塩基性アミノ酸) の含量が高い。cDNA はポリ A 付加シグナルを備え、長い 3' 非翻訳領域を持っている。又、従来の報告から、哺乳動物のリボゾーム蛋白質をコードする mRNA は短いピリミジンの連続から開始するとされているが、この遺伝子には該当しない。したがって転写産物の全長が単離されていないのか、或は、異なる転写制御機構が働いている可能性がある。

D. ラット肝癌細胞で発現される低分子型トロポミオシンの cDNA クローニング (宮戸健二, 貞野宏之, 谷口俊一郎)

細胞の悪性度と細胞骨格関連蛋白質の発現変化について調べ、B16 メラノーマの高転移性細胞では低分子型トロポミオシンの発現が増強されることを当研究室では報告してきた。

トロポミオシンは数種類の分子種が存在しアクチンフィラメントの安定性を制御する因子として考えられている。特に低分子型トロポミオシンは、細胞の悪性化に伴って発現されることからストレスファイバーの不安定化や形質転換細胞の形態及び運動能の変化に関わっている可能性がある。そこで、今回悪性度の異なる細胞 (B16-F1, B16-F10, NH, 正常肝細胞) について Northern blot 行い、悪性度との関連を調べた。NH は WKA ラットを 3' Me-DAB によって発癌させ、継代培養された肝癌細胞である。Northern blot 解析の結果、NH と B16-F10 において B16-F1, 正常肝細胞に比べ、低分子型トロポミオシンの強い発現が観察された。そこで、NH から抽出した poly(A) + RNA 5 μ g より cDNA ライブラリーを作成し、スクリーニングを行った。プローブとしては、マウス TM5 UTR3' を用いた。

その結果、約 45,000 個の cDNA ライブラリーから 7 個のクローンが得られた。その中の 1 ク

ローン (約1.7kb) の Scal, BamHI, NcoI による切断部位がヒト TM30nm と一致した。更に、5' 末端から Scal 部位までの約600bp を部分シーケンスしたところヒトの5' 末端から Scal 部位までの配列と高い相同性が見られた。

低分子型トロポミオシンの全塩基配列を決定し、cDNA 導入実験による細胞の形態変化及び運動能の変化を観察する計画である。

E. a. ヒト卵巣癌組織における平滑筋型 α アクチン (SMA) の発現変化 (小林裕明, 谷口俊一郎)

これは、九州大学産婦人科学教室小林裕明博士等との共同研究である。我々は、先にヒト悪性黒色腫組織において良性組織と比べて SMA の発現低下が血管周細胞等において生じること、そしてこれが、黒色腫細胞から分泌される sis 癌遺伝子産物 (PDGF) に因る事を示した (九大皮膚科学教室井上光世博士との共同研究)。そこで SMA 発現の発現低下が卵巣組織の悪性化で見られるか否か検討した。その結果、類似の現象、即ち、組織全体における SMA 低下が、Western blot で観察され、又、悪性卵巣腫瘍組織における血管の SMA 発現低下が見られた。更に、癌周辺組織の正常血管においても SMA 発現低下を観察した。

更に防府胃腸病院川野豊一博士等と共同で胃及び腸の腺腫及び癌等について、その組織における SMA の発現変化を Western blot 解析及び組織免疫染色法にて調べた。その結果癌組織全体における SMA の低下、そして癌組織内の間質細胞における SMA 低下が観察された。

F. 緑茶の主成分である EGCG (Epigallocatechin Gallate) 経口投与による転移抑制実験 (谷口俊一郎, 呉啓貴, 小林裕明, 下川りえ, 宮戸健二, 貞野宏之)

この研究は、国立がんセンターの藤木博太博士との共同研究である。EGCG が発癌抑制効果を有することが明らかにされ、癌の転移に関しての効果も期待された。そこで、マウス B16 黒色腫を用いて、その実験的及び自然転移能に対する EGCG の効果を飲料水に溶解し検討した。その結果、EGCG の全く毒性を示さない投与量で肺への実験的及び自然転移を抑制することが観察された。又、in vitro で細胞毒性を示さない EGCG の濃度で、マトリゲルの透過性 (in vitro の浸潤) が抑制された。EGCG が平素の日常生活で自然に摂取する物質であり、それが毒性を示さない量で、転移を抑制した事は、EGCG の臨床応用への可能性を示唆している。

原著論文

1. Taniguchi, S., Miyamoto, S., Sadano, H. and Kobayashi, H. 1991.

Rat elongation factor 1 α : sequence of cDNA from a highly metastatic fos-transferred cell line.

Nucleic Acids Research, 19(24), 6949.

2. 谷口俊一郎：1991. v-fos 癌遺伝子導入による転移能変動の検討.
消化器癌 (日本医学館), 1(1), 121-124.
3. Kobayashi,H., Hasuda,K., Taniguchi,S. and Baba,T. 1991.
Therapeutic efficacy of two-route chemotherapy using cis-DDP (II) and Its Antidote,
Sodium Thiosulfate, Combined with the Angiotensin II - induced Hypertension Method
in a Rat Uterine Tumor.
Int. J. Cancer, 47, 893-898.
4. Taniguchi,S. and Sadano,H. 1992.
Biological and Biochemical analysis of newly identified actin in mouse B16-melanoma.
Pigment Cell Research, 2, 185-190.
5. Nakayama,J., Moroi,Y., Toshitani,A., Taniguchi,S., Okamoto-Inoue,M. and Hori,Y.
1991.
Responses of murine B16 melanoma cell lines F1 and F10 to hyperthermia, LAK cells
or a combination of both in vitro.
BRITISH JOURNAL OF DERMATOLOGY, in press

総説

1. 谷口俊一郎. 1991.
癌の転移と関連遺伝子
BIOTHERAPY, 5(4), 509-520.

学会発表

1. Kobayashi,H., Taniguchi,S., Abe,T., January 23-26, 1991.
Improved efficacy of "Two route Chemotherapy" using cisplatin and Its Antidote,
Sodium Thiosulfate, in Combination with Angiotensin II sixth international
symposium on platinum and other metal coordination compounds in cancer
chemotherapy.
2. 貞野宏之, 谷口俊一郎 (1991, 4/20-4/21).
B16メラノーマに発現する新種アクチンの細胞生物学的及び生化学的性質についての研究.
平成3年度生化学会九州支部例会, 鹿児島.
3. 財前善雄, 水田祥代, 谷口俊一郎 (1991, 6/5-6/7).
神経芽細胞の浸潤性と N-myc 遺伝子.
第28回日本小児外科学会総会, 名古屋.
4. Shimokawa,R., Sadano,H., Hori,Y. and Taniguchi,S. (1991, 7/10-7/12)

- Effects of newly identified actin (β m) on metastasis in mouse B-16 melanoma.
第16回日本研究皮膚科学会総会, 名古屋.
5. 下川りえ, 貞野宏之, 小林裕明, 谷口俊一郎 (1991, 9/10-9/12).
 β m アクチン cDNA 導入によるマウス黒色腫 B16-BL6の転移抑制. pp.154
第50回日本癌学会総会, 東京.
 6. 貞野宏之, 谷口俊一郎 (1991, 9/10-9/12).
マウス B16黒色腫の転移抑制に関与する新種アクチン (β m) の生化学的機能. pp.170
第50回日本癌学会総会, 東京.
 7. 井上光世, 谷口俊一郎, 貞野宏之, 堀嘉昭 (1991, 9/10-9/12).
ヒト悪性黒色腫細胞株 M14由来の PGDF 様物質による血管平滑筋型 α アクチンの発現抑制作用. pp.203
第50回日本癌学会総会, 東京.
 8. 谷口俊一郎, 藤木博太, 呉啓貴, 宮戸健二, 小林裕明, 貞野宏之 (1991, 9/10-9/12).
緑茶の成分, EGCG によるマウス黒色腫 B16-F10の肺コロニー形成能抑制. pp.210
第50回日本癌学会総会, 東京.
 9. 宮城妙子, 秦敬子, 今野公男, 谷口俊一郎, 立木蔚 (1991, 9/10-9/12).
形質転換3Y1細胞の転移能獲得に伴うシアリダーゼ及びシアリトランスフェラーゼの活性変化. pp.212
第50回日本癌学会総会, 東京.
 10. 川野豊一, 谷口俊一郎, 坂本清人, 八尾隆史, 甲斐秀信, 恒吉正澄, 戸田智博 (1991, 9/10-9-12).
消化管腫瘍における平滑筋型 α -actin の発現. pp.343
第50回日本癌学会総会, 東京.
 11. 貞野宏之, 谷口俊一郎 (1991, 10/2-10/5)
マウス B16メラノーマに発現する β アクチンの性質.
第50回日本癌学会総会, 東京.
 12. 井上光世, 谷口俊一郎, 堀嘉昭 (1991, 11/30-12/1)
悪性神経鞘腫における増生血管の α アクチン発現変化.
第42回日本皮膚科学会中部総会, 神戸.
 13. Taniguchi,S. and Sadano,H. (1991. 11/21-11/23)
Microfibrament system in cancer cells: its relation to malignant phenotypes.
第44回日本細胞生物学会大会, 福岡.
 14. 宮戸健二, 貞野宏之, 竹永啓三, 崎山樹, 谷口俊一郎 (1991, 11/21-11/23)
ラット癌細胞の低分子型トロポミオシン TM5の cDNA クローニング.

第44回日本細胞生物学会大会，福岡．講演要旨集 pp.149

著書

1. 谷口俊一郎．

分子生物学・バイオテクノロジー編 分担執筆

先端医学キーワード辞典，日本書院，印刷中