

氏名・(本籍)	井 上 誠 (岡山県)
学 位 の 種 類	博士 (医学)
学 位 記 番 号	博士 (論) 第227号
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位授与年月日	平成10年3月24日
学位論文題目	Chromosomal abnormalities and physical states of cottontail rabbit papillomavirus genome in a Shope carcinoma cell line and its sublines with different potential for differentiation and tumorigenicity (シヨープ癌細胞株とその亜株におけるワタノウサギ乳頭腫ウィルスゲノムの存在様式と染色体異常)

審査委員	主査 教授	土井田 幸 郎
	副査 教授	木 村 博
	副査 教授	瀬 戸 昭

## 論文内容の要旨

### 【目 的】

ワタノウサギ乳頭腫ウィルス (CRPV) は家兎に良性の乳頭腫を誘発するが、この良性腫瘍はしばしば悪性転換してシヨープ癌と呼ばれる扁平上皮癌となる。樹立されたシヨープ癌細胞株とその4亜株における、細胞の核型とウィルスゲノムの存在様式とを細胞遺伝学的手法、蛍光ハイブリダイゼーション (FISH) 法および二次元サザンブロット分析を用いて解析し、それらの成績と細胞の腫瘍原性あるいは分化度との関係を検討する。

### 【方 法】

**使用細胞株** CRPVで形質転換されたSC532細胞株と、腫瘍原性および分化度の異なるその亜株SCB-5 a、5 c、5 eおよび6 aを用いた。

**細胞の核型分析** メトトレキセートとチミジン添加により同調培養した細胞から染色体標本を作製した。それをトリプシン処理によりGバンド染色して、家兎の標準核型と比較した。

**蛍光ハイブリダイゼーション法 (FISH)** ニックトランスレーション法によりビオチン標識した、CRPV全ゲノムを含むDNAプローブを使用した。染色体標本は加熱処理であらかじめ固化させ、RNase処理後にホルムアミドで変性させた。染色体上にハイブリダイズしたシグナルを、FITC標識アビジンおよびビオチン化抗アビジン抗体を反応させることにより検出した。染色体自体はpropidium iodideで対比染色した。反応は蛍光顕微鏡により観察した後、ISO400のカラーリバーサルフィルムに撮影した。

**二次元サザンブロット分析** 各細胞から抽出した高分子DNAを、CRPVゲノムに切断部位を持たない制限酵素Kpn Iで消化した。その消化物を0.4%アガロースゲル (一次元目) と0.7%アガロースゲル (二次元目) で二次元電気泳動した。泳動ゲルはナイロンメンブレンにブロットし、ニックトランスレーション法により<sup>32</sup>P標識したCRPV全ゲノムを含むDNAプローブを用いてサザンブロット分析を行なった。

### 【結 果】

1. 核型分析の結果、SC532細胞株が近3倍体であるのに対し、その亜株はいずれも高2倍体であった。SC532細胞株およびその亜株共に、多くの染色体構造異常が観察され、特に転座が多く認められた。マーカー染色体は全ての亜株に認められた。欠失は親株のSC532細胞株と腫瘍原性のない亜株SCB-5 aおよび5 cに認められたが、腫瘍原性を有する亜株SCB-5 eおよび6 aには欠失は認められなかった。倍数性細胞の出現率は8.7~16%であり、SCB-6 aには4倍体あるいは高4倍体細胞が他の細胞よりも高頻度で観察された。
2. FISHで分析した結果、染色体上のウィルスゲノムの細胞あたりの挿入箇所数 (平均±SD) は

次の通りであった。すなわち、SC532では $2.69 \pm 1.11$ 箇所（35細胞解析）、SCB-5 aでは $3.91 \pm 0.88$ 箇所（66細胞解析）、SCB-5 cでは $5.17 \pm 0.96$ 箇所（86細胞解析）、SCB-5 eでは $3.75 \pm 0.83$ 箇所（103細胞解析）およびSCB-6 aでは $2.12 \pm 0.53$ 箇所（112細胞解析）であった。SCB-6 aを除く亜株では親株よりもCRPVゲノムの挿入箇所が多くなっていたが、SCB-6 aではやや少なくなっていた。

3. 二次元サザンブロット分析により、親細胞株SC532とSCB-5 a、5 eおよび6 aの亜株では染色体外（プラスミド状）と染色体上の両者の形態で存在していることが明らかになった。残る1種の亜株SCB-5 cではプラスミド状のウィルスゲノムは検出されなかった。しかし、その亜株の継代初期の細胞からは両タイプのCRPVゲノムが見つかった。

#### 【考察および結論】

細胞の核型分析によると、各亜株では親細胞株の染色体異常と共通の異常を有しており、特に染色体の転座が目立った。FISHによる解析から、SC532細胞株とその4亜株の染色体上にはCRPVゲノムが挿入されていることが明らかになった。しかしながら、ウィルスゲノムの挿入箇所数と細胞の腫瘍原性や分化度との関係は明確ではなかった。一方、二次元サザンブロット分析により、親細胞株とほとんどの亜株ではプラスミド状と染色体上に組み込まれたウィルスゲノムが検出され、腫瘍原性に乏しい性質を有する一つの亜株では細胞の継代により前者のタイプのゲノムが消失していたことが明らかになった。したがって、良性の乳頭腫ではプラスミド状のみ存在するウィルスゲノムが悪性化の過程で様々な染色体上の部位に挿入され、細胞増殖過程で失われていく可能性が示唆された。また、そのようなウィルスゲノムの挿入および消失が染色体異常と細胞性状の変化に繋がり、ひいては亜株における腫瘍原性と分化度に変化を生じる一因となったと考えられる。

### 論文審査の結果の要旨

本研究は、近交系家兎で新たに樹立されたショープ癌細胞株とその亜株におけるウィルスゲノムの存在様式を調べ、細胞の悪性度、分化度或いは染色体異常などの細胞性状との関連を検討したものである。その結果、造腫瘍能や分化度の異なるいずれの亜株も高2倍体ないしは近3倍体の染色体を有し、欠失、転座など多くの染色体構造の異常が観察された。マーカー染色体はすべての亜株に認められ、蛍光ハイブリダイゼーション（FISH）法による解析から、いずれの亜株にも染色体上に2～5箇所のウィルスゲノム組み込み部位が認められた。二次元サザン分析では、染色体上に組み込まれたゲノムの他にプラスミド状のゲノムも保有され、プラスミド状のゲノムは細胞増殖の過程で染色体に挿入あるいは消失する可能性が示唆された。以上のように本研究は、パピロマウィルス発癌において、腫瘍細胞中のプラスミド状ウィルスゲノムの存在がさまざまな異なった性状を持つ腫瘍細胞の出現に関与していることを示唆している点で重要であり、博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成10年2月20日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。