

ヒト線維肉腫細胞株 (HT1080) のがん形質抑制に係わる
正常1、11番染色体上遺伝子の量的効果の検討

鳥取大学医学部生命科学科細胞工学教室 (主任 押村光雄教授)

久郷裕之

Studies on Dosage-effect of Putative Tumor Suppressor
Genes for Human Fibrosarcoma Cell Line(HT1080)
on Normal Human Chromosomes 1 and 11

Hiroyuki KUGOH

*Department of Molecular & Cell Genetics, School of Life Sciences,
Faculty of Medicine, Tottori University, Yonago 683, Japan*

ABSTRACT

A human fibrosarcoma cell line(HT1080) consists of diploid(2N) and tetraploid(4N) cells at an equal rate. We first introduced a normal human chromosome 1, 2, 7, 11 or 12 into the 2N HT1080 cells. The microcell-hybrids with the introduction of chromosome 1 (2NMH-#1) showed suppression of tumorigenicity, alteration in cellular morphology and modulations of transformed properties *in vitro*, i.e., cell-growth in medium containing 10 % serum, growth in soft-agar and saturation density. The effect of chromosome 11 was on the suppression of tumorigenicity without changes in the *in vitro* growth behaviour of cells.

In this study, transfers by microcell fusion of either chromosome 1, 2 or 11 into 4N HT1080 cells were performed, and the ability to form tumor in nude mice and *in vitro* growth properties were compared with microcell hybrids(MH) from 2N HT1080 cells. We investigated whether a putative tumor-suppressor gene on the introduced chromosome is involved in the gene dosage effect. 1) 4NMH-#1 were as non-tumorigenic as 2NMH-#1. 2) All 2NMH-#11 were non-tumorigenic, whereas 4NMH-#11 were tumorigenic. 3) The introduction of chromosome 2 did not affect their tumorigenicity and *in vitro* transformed properties. Thus, a putative tumor suppressor gene on human chromosome 1 suppresses the neoplastic phenotype of 4N HT1080 cells. These findings suggest that the expression of tumorigenicity is regulated by a balance between positive and negative genes, and that the genes on chromosomes 1 and 11 control different neoplastic phenotypes.

(Accepted on September 13, 1994)

Key words : Chromosome transfer, Human fibrosarcoma cell line(HT1080),
Tumor suppressor gene, Gene dosage

はじめに

我々は、ヒト線維肉腫細胞株 (HT1080) における腫瘍形質抑制に係わる遺伝子のマッピングを微小核細胞融合法を用いた正常染色体移入によって進めてきた。このHT1080細胞株は2倍性細胞と4倍性細胞が約50%ずつの割合で混在している。2倍性細胞へ種々の染色体を移入した結果、1番染色体の移入により著しい細胞形態の変化 (Flat), *in vitro*における増殖特性および造腫瘍性の抑制効果が認められた。さらに、11番染色体の移入では造腫瘍性抑制効果のみが認められた。以上のことより、1番、11番染色体上に異なる機能の抑制遺伝子が存在することが示唆された⁵⁾。

今回、移入染色体上の遺伝子の量的効果が存在するか否かを検索する目的で、4倍性細胞へ1番、2番、11番染色体を移入し、ヌードマウスにおける造腫瘍性および*in vitro*の増殖特性を2倍性細胞における場合と比較検討した。

材料と方法

1. 細胞

ヒト線維肉腫細胞株HT1080は⁷⁾, American-Type Culture Collection (ATCC) より取り寄せた。細胞は、10%子牛血清を含むDMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) により培養した。染色体移入実験に用いた正常線維芽細胞由来染色体を1本含むマウスA9細胞⁸⁾は、G418 (800 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を含むDMEM培地で培養した。また、今回使用した細胞のマイコプラズマによる汚染は、認められなかった。

2. 微小核細胞融合法

微小核細胞融合法は、1) コルセミド処理および遠心、2) 微小核細胞の調製、融合および選択培養の大きく2つのステップに分けられる (図1)。

1) コルセミド処理および遠心

i. pSV2neo遺伝子で標識された正常ヒト染色体を1本含むマウスA9細胞を培養フラスコで80~90%の状態になるまでG418を含む培養液 (DMEM, 10% C.S.) で培養する。

ii. トリプシン処理により細胞を分散し、G418を含む培養液7mlに懸濁させ、遠心用フラスコ6個に懸濁した細胞液を1mlずつ分配し、2日間培養する。

優性遺伝子マーカー標識ヒト単一染色体を含むマウスA9細胞

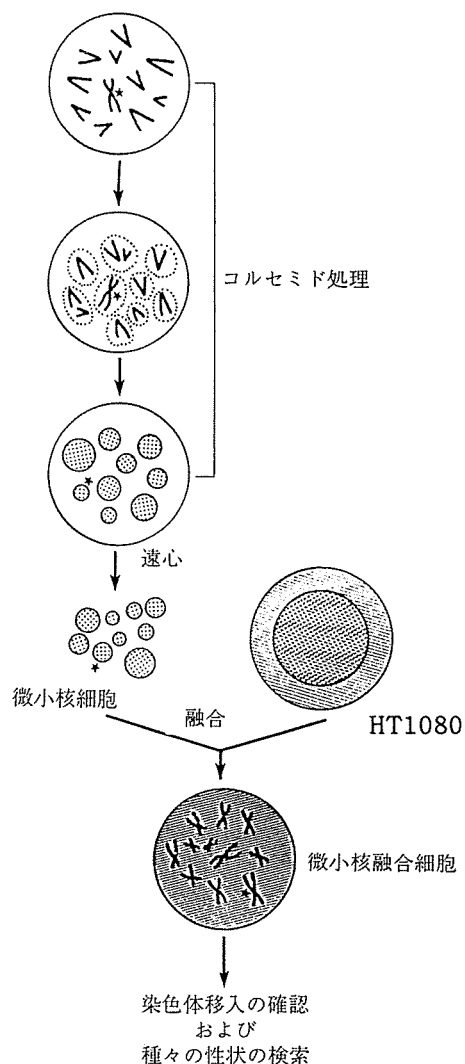


図1. 微小核細胞融合法を用いたpSV2neo標識特定ヒト染色体のHT1080細胞への移入

iii. コルセミド (0.05 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を含む培養液 (DMEM, 20%) に液換えし、さらに2日間培養を行い微小核を形成させる。

iv. 培養液を除去し、予め温めておいたサイトカシンB溶液を遠心フラスコに、ほぼいっぱい満たす。

v. 34°Cの条件下、8000rpmで1時間の遠心分離を行う。

2) 微小核細胞の調製および融合、選択培養

i. サイトカシンBを含んでいる培養液を除去後、得られた微小核細胞をそれぞれ2mlの無血清培養液 (DMEM) に懸濁して1本の遠心管に集める。

- ii. 細胞懸濁液を $8\mu\text{m}$, $5\mu\text{m}$, $3\mu\text{m}$ の順にフィルターを通し, 微小核細胞を精製する.
- iii. 融合させるHT1080細胞は, 予め培養用フラスコで80%飽和密度の状態にまで培養しておく.
- iv. 精製した微小核細胞は, 1500rpm, 5分間の遠心分離後, PHA($50\mu\text{g}/\text{ml}$) を含む無血清培養液で2mlに再懸濁する.
- v. 遠心分離の間に, HT1080細胞を無血清培養液で2回洗浄後, 再懸濁した微小核細胞を静かにまき, 15分間 (37°C) 放置後, 培養液を吸い取り予め調製したPEG溶液3mlを加え, 正確に1分間放置する.
- vi. PEG溶液を吸い出し, 無血清培養液で3回洗う. その後, 10% C.S. を含む培養液で1日間培養後, トリプシン処理により細胞を分散しG418を含む培養液に懸濁した細胞を3枚のプラスチックシャーレに植

え込み, 約3週間選択培養後, 耐性クローンを分離する.

3. ノードマウスにおける造腫瘍性の検索

継代数4~6の細胞をトリプシンにより分散し, 無血清培養液に浮遊させる. 10^7 個の細胞を4週齢のノードマウス(ICRnu/nu)の皮下に注入する. 腫瘍形成の観察は, 少なくとも120日間行った.

4. *in vitro* 増殖特性の分析

1) 増殖速度

5×10^4 個の細胞を60mm培養シャーレにまき, 培養液(DMEM)を3日おきに交換した. 細胞は, トリプシンにより分散させ, 細胞数を計測した. 増殖速度は, 増殖曲線の対数増殖期より算出した.

2) 細胞飽和密度

5×10^4 の細胞を24穴プレートに播いた. 細胞数を計測し, 最も細胞数が高いところを細胞飽和密度とした.

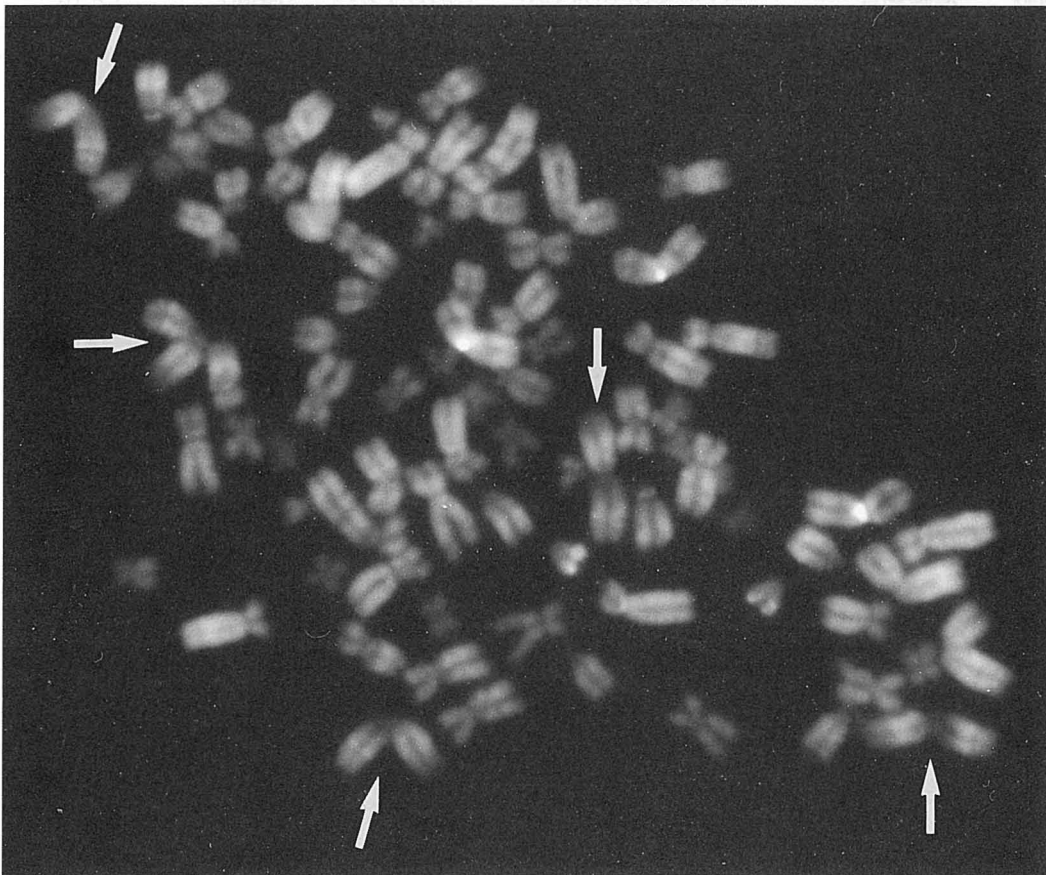


図2. 4倍性HT1080細胞における1番染色体移入クローンの中期分裂像
矢印, 1番染色体

3) 足場依存性

200個の細胞を0.33%の軟寒天にまいた。3週間後、100um以上のコロニーを計測した。さらに、200個の細胞を60mm培養シャーレにまき、2週間後にコロニーを計測した。

シャーレ上に出現したコロニー数を軟寒天中で出現したコロニー数で割り、パーセントとして足場依存性を算出した。

結 果

実験に使用した4倍性HT1080細胞の1番、2番、11番染色体は、安定に4本ずつ保有（2本の11番染色体は構造異常を示した）しているため移入する染色体数を検索することにより移入染色体の有無を推定することができる。図2には、4倍性HT1080細胞へ1番染色体を移入したクローン

の中期分裂像を示し、完全な5本の1番染色体の存在が染色体分析により確認できた。このように、少なくとも完全な染色体が移入されたと考えられるクローンを用いて以下の実験結果を得た。

1. ノードマウスにおける造腫瘍性

4倍性HT1080細胞へヒト正常1, 2, 11番染色体を各々移入したマイクロセルハイブリッド(MH)クローンのノードマウスにおける造腫瘍性および*in vitro*の増殖特性を表1に示した。

親細胞HT1080および1, 2, 11番染色体を移入したMHクローンは、 10^7 個ずつ6週齢のノードマウスの皮下に注入した。その結果、親細胞では2倍性細胞と同様に4倍性細胞においても高い腫瘍性が認められ、腫瘍出現潜伏期も7日以内を示した。1番染色体移入クローンでは、2倍性細胞移入クローンと同様に造腫瘍性は1クローンを

表1 4倍性ヒト線維肉腫細胞株 (HT1080) への正常染色体の移入効果

細胞	造腫瘍性	血清要求性 (1% CS/10% CS)	足場依存性 (SAE/PE) ^a	増殖速度 (時間)	飽和細胞密度 ($\times 10^5$)
<u>4倍性HT1080細胞</u>					
clone-3	+	0.35	43.1	14.5	18.4/2cm ²
clone-5	+	0.35	34.9	15.4	14.5
<u>マイクロセル雑種クローン</u>					
1番染色体移入クローン					
#1-9	-	0.48	2.4	20.9	6.1
#1-10	-	0.44	N. T. ^b	17.8	8.5
#1-11	-/+	0.54	1.6	17.8	6.3
#1-15	-	N. T.	N. T.	N. T.	N. T.
2番染色体移入クローン					
#2-3	+	0.30	54.9	14.4	N. T.
#2-5	+	0.64	46.6	11.7	12.1
#2-9	+	N. T.	N. T.	N. T.	N. T.
11番染色体移入クローン					
#11-4	+	0.28	26.5	12.1	13.8
#11-8	+	0.34	N. T.	14.7	10.2
#11-7	+	N. T.	N. T.	N. T.	N. T.

a: SAE/PE= 軟寒天培地におけるコロニー形成率/コロニー形成率

b: N. T., not tested.

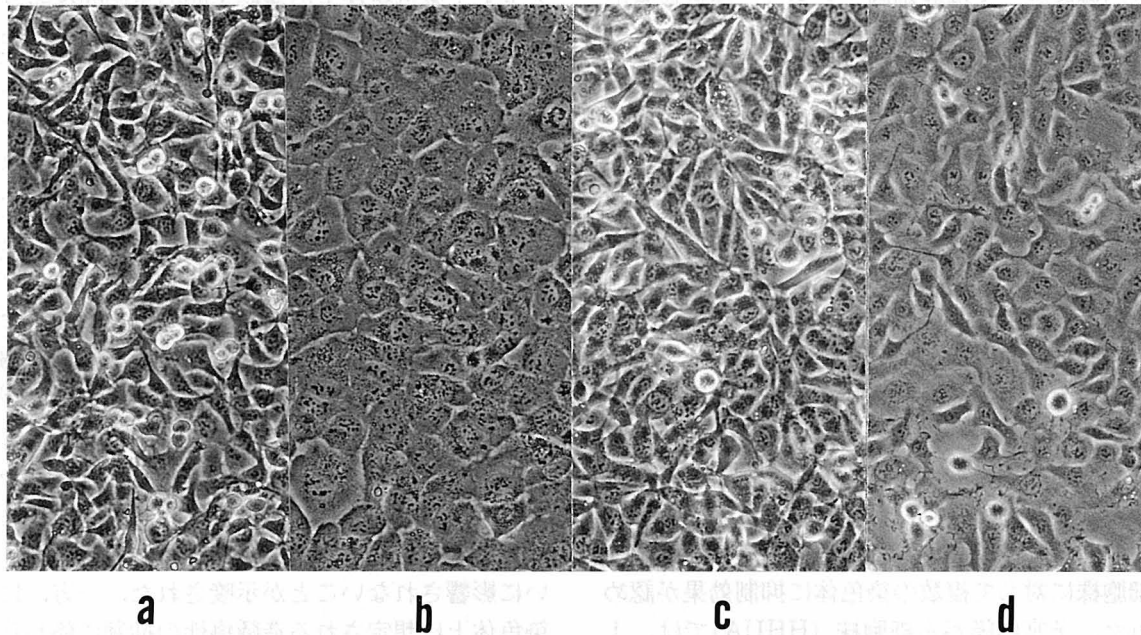


図3. ヒト正常染色体移入による4倍性HT1080細胞の細胞形態の変化

a. 4倍性HT1080細胞, b. 1番染色体移入クローン, c. 2番染色体移入クローン, d. 11番染色体移入クローン

除いて全く認められなかった(120日間の観察)。また、腫瘍形成の認められたクローンの腫瘍形成率は、低頻度であり腫瘍潜伏期の延長(14日)も認められた。11番染色体移入クローンでは、2倍性細胞移入クローンの造腫瘍性抑制効果が認められたのに対し、4倍性細胞移入クローンの抑制効果は認められず親細胞と同様の高い腫瘍性を示した。2番染色体移入クローンでは、2倍性細胞移入クローンと同様に7日以内の腫瘍潜伏期で高い腫瘍性を示し、造腫瘍性抑制効果は認められなかった。

2. *in vitro* 増殖特性

*in vitro*における4倍性細胞移入クローンの増殖特性は、血清要求性、足場依存性、増殖速度、飽和細胞密度の4種類の実験により比較検討した。1番染色体を移入したクローンの足場依存性および飽和細胞密度は、2倍性細胞移入クローンと同様に親細胞に比べて著しく低下した。しかし、血清要求性および増殖速度は、親細胞と同様の結果を示した。一方、他の2番、11番染色体移入クローンでは、2倍性細胞移入クローンと同様の傾向を示し、*in vitro*の増殖特性における抑制効果は認められなかった。

また、1番染色体を2倍性細胞へ移入したクローンで認められた細胞形態の変化(Flat)は、4倍性細胞移入クローンでは軽度に認められた

が、他の染色体移入クローンでは細胞形態の変化は認められなかった(図3)。

考 察

2倍性細胞と4倍性細胞が約50%ずつの割合で混在しているヒト線維肉腫細胞株HT1080細胞に種々の染色体を2倍性細胞へ移入した結果、1番染色体の移入により細胞形態の顕著な変化(Flat)、造腫瘍性抑制効果および*in vitro*での腫瘍形質抑制効果が認められ、11番染色体の移入では造腫瘍性抑制効果のみを示し、1番および11番染色体上にHT1080細胞の腫瘍形質の抑制に係わる遺伝子の存在が強く示唆された⁵⁾。今回、移入染色体上の遺伝子の量的効果の存在を確認する目的で4倍性細胞へ1番、2番、11番染色体を各々移入した。その結果、1番染色体移入クローンでは、2倍性細胞移入クローンと同様に、細胞形態の顕著な変化(Flat)、造腫瘍性抑制効果および*in vitro*での腫瘍形質抑制効果が認められた。しかし、2倍性細胞に11番染色体を移入したクローンで認められた造腫瘍性抑制効果は、4倍性移入クローンでは認められなかった。また、2番染色体移入クローンでは、2倍性細胞移入クローンと同様に抑制効果は認められなかった。これらのことより、1番染色体上の腫瘍形質抑制に係わる遺

伝子の機能は、4倍性細胞にも十分に腫瘍形質の抑制効果を持ち、11番染色体上に存在すると考えられる腫瘍抑制遺伝子は遺伝子の量的効果が関与していることが強く示唆された。

がんの発生および進展は、複数の遺伝子変化の積み重ねであり多数のがん遺伝子が存在する事実からも多くのがん形質の抑制に係わる遺伝子の存在が推測されている。現在まで種々のがん細胞において染色体分析およびRFLP(Restriction Fragment Length Polymorphism)分析により、複数の特異的な染色体消失あるいは欠失が高頻度に認められている²⁾¹³⁾¹⁴⁾。それらの欠失部位に抑制遺伝子が存在すると考えられ、抑制機構もそれぞれ異なることが示唆されている。一方、微小核細胞融合法を用いた染色体移入実験においても、1つの細胞株に対して複数の染色体に抑制効果が認められた。子宮内膜がん細胞株(HHUA)では、1番、6番、9番、11番染色体に抑制効果が認められ¹²⁾、子宮頸がん細胞株(SiHa)では、2番、11番染色体⁴⁾¹¹⁾、大腸がん細胞株(COKFu)では、1番、5番、18番染色体がそれぞれ抑制効果を示した⁸⁾⁹⁾。また、今回の研究においてHT1080細胞の2倍性細胞と4倍性細胞への1番、11番染色体移入クローンの抑制効果の違いは、2つの染色体上に存在する抑制遺伝子の機能と抑制機構が異なることを強く示唆している。

腫瘍形成能の獲得は、抑制遺伝子の消失あるいはその不活性化と細胞の腫瘍形成能に対して正、負に働く遺伝子間の釣り合いが関与していると考えられる。HT1080細胞の1番染色体は、正常N-rasとN-ras部位(コドン61)に突然変異をもつ2本の染色体を保持している。雑種細胞の研究より腫瘍性を再獲得した雑種細胞における特定1番染色体の消失は、少なくとも正常N-rasを含む1番染色体だと考えられた¹⁾。また、MNNGで化学処理してえられたFlat-revertantの解析より、非腫瘍性のFlat-revertantでは変異したN-rasをもつ1番染色体と正常なN-rasをもつ1番染色体の比が1:2であり、腫瘍性をもつre-revertantではその比が2:2または3:2になっていた。さらに、2倍性細胞と正常線維芽細胞から形成された4倍性の雑種細胞では、腫瘍形成能が消失していたのに対して4倍性のHT1080細胞と正常線維芽細胞から形成された6倍性の雑種細胞では造腫瘍性の抑制は認められなかった⁶⁾。このように少な

くとも1番染色体上の遺伝子間の量的関係が存在することが強く示唆されていた。また、ヒト正常3番染色体を腎細胞がん細胞株(YCR)へ移入した結果、造腫瘍性抑制効果の認められたクローンおよび認められないクローンが出現した。これらのクローンの染色体解析により抑制効果が認められたクローンは、2本の3番染色体が移入されていた。一方、抑制効果が認められなかったクローンでは、移入染色体が1本あるいは2本の場合でもその染色体の保持率は50%以下であり、抑制遺伝子の量的効果が存在することが示唆された⁸⁾。しかし、今回の実験結果から示されるように、HT1080細胞における正常由来1番染色体上の腫瘍形質抑制に係わる遺伝子の抑制効果は、腫瘍形成能に対して正、負に働く遺伝子の量的な釣り合いに影響されないことが示唆された。一方、11番染色体上に想定される造腫瘍性の抑制に係わる遺伝子には、遺伝子の量的効果が関与していることが明らかになった。

結 語

4倍性ヒト線維肉腫細胞株(HT1080)細胞へ正常細胞由来1, 2, 11番染色体を移入し、がん形質抑制効果が認められた2倍性細胞移入クローンと比較検討した。その結果、

1) 1番染色体が移入されたクローンにおいては、2倍性HT1080細胞移入クローンと同様に造腫瘍性は全く認められないか、あるいは認められても低い頻度であった。

2) 2倍性細胞へ1番染色体を移入した場合と比べ、軽度ではあったが細胞形態の変化および*in vitro*における増殖抑制が認められた。また、軟寒天培地中における増殖能においては2倍性HT1080細胞移入クローンと同等の低下が認められた。

3) 11番染色体の移入により2倍性HT1080細胞の造腫瘍性が抑制されたのに対し、4倍性HT1080細胞の抑制は認められなかった。

4) 2番染色体移入では2倍性細胞、4倍性細胞いずれも抑制効果は認められなかった。

以上の結果より、2倍性HT1080細胞の腫瘍形質抑制に係わる正常由来1番染色体上の遺伝子量は、4倍性HT1080細胞にも十分に抑制効果をもつことを示し、11番染色体上に想定される造腫瘍性の抑制に係わる遺伝子には、量的効果が関与していることが示された。さらに、1, 11番染色体

上の抑制遺伝子の機能と抑制機構は異なることが示唆された。

稿を終えるにあたり、終始懇切なる御指導と御校閲を賜りました鳥取大学医学部生命科学科細胞工学教室押村光雄教授に深甚なる謝意を捧げます。

文 献

- 1) Benedict, W.F., Weissman, B.E., Mark, C., Stanbridge, E.J. (1984). Tumorigenicity of human HT1080 fibrosarcoma × normal fibroblast hybrids: Chromosome dosage dependency. *Cancer Res.* 44, 3471-3479.
- 2) Ehlen, T., Dubeau, L. (1990). Loss of heterozygosity on chromosomal segments 3p, 6q and 11p in human ovarian carcinomas. *Oncogene* 5, 219-223.
- 3) Koi, M., Shimizu, M., Morita, H., Yamada, H., Oshimura, M. (1989). Construction of mouse A9 clones containing a single human chromosome tagged with neomycin-resistance gene *via* microcell fusion. *Jpn. J. Cancer Res.* 80, 413-418.
- 4) Koi, M., Morita, H., Yamada, H., Satoh, H., Barrett, J.C., Oshimura, M. (1989). Normal human chromosome 11 suppresses tumorigenicity of human cervical tumor cell line SiHa. *Molecular Carcinogenesis* 2, 12-21.
- 5) Kugoh, H., Hashiba, H., Shimizu, M., Oshimura, M. (1990). Suggestive evidence for functionally distinct, tumor-suppressor genes on chromosome 1 and 11 for a human fibrosarcoma cell line, HT1080. *Oncogene* 5, 1637-1644.
- 6) Paterson, H., Reeves, B., Brown, R., Hall, A., Furth, M., Bos, J., Jones, P., Marshall, C. (1987). Activated N-ras controls the transformed phenotype of HT1080 human fibrosarcoma cells. *Cell* 51, 803-812.
- 7) Rasheed, S., Nelson-Rees, W.A., Toth, E.M., Arnstein, P., Gardner, M.B. (1974). Characterization of a newly derived human sarcoma cell line (HT 1080). *Cancer* 33, 1027-1033.
- 8) Shimizu, M., Yokota, J., Mori, N., Shuin, T., Shinoda, M., Terada, M., Oshimura, M. (1990). Introduction of normal chromosome 3p modulates the tumorigenicity of a human renal cell carcinoma cell line YCR. *Oncogene* 5, 185-194.
- 9) Tanaka, K., Oshimura, M., Kikuchi, R., Seki, M., Hayashi, T., Miyaki, M. (1991). Suppression of tumorigenicity in human colon carcinoma cells by introduction of normal chromosome 5 or 18. *Nature* 349, 340-342.
- 10) Tanaka, K., Yanoshita, R., Konishi, M., Oshimura, M., Maeda, Y., Mori, T., Miyaki, M. (1993). Suppression of tumorigenicity in human colon carcinoma cells by introduction of normal chromosome 1p36 region. *Oncogene* 8, 2253-2258.
- 11) Uejima, H., Mitsuya, K., Horikawa, I., Kugoh, H., Oshimura, M. (1994). A normal human chromosome 2 induces cellular senescence in a human cervical carcinoma cell line (SiHa). *Jpn. J. Human Genet.* 39, 65.
- 12) Yamada, H., Wake, N., Fujimoto, S., Barrett, J. C., Oshimura, M. (1990). Multiple chromosomes carrying tumor suppressor activity for a uterine endometrial carcinoma cell line identified by microcell-mediated chromosome transfer. *Oncogene* 5, 1141-1147.
- 13) Yokota, J., Wada, M., Shimosato, Y., Terada, M., Sugimura, T. (1987). Loss of heterozygosity on chromosome 3, 13, and 17 in small-cell carcinoma and on chromosome 3 in adenocarcinoma of the lung. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 9252-9256.
- 14) Yvonne, C.T., Peter, W.N., Alan, L. H., Zippora, W., Donald, G.S., Peter, A.J. (1990). Allelic losses of chromosome 9, 11 and 17 in human bladder cancer. *Cancer Res.* 50, 44-47.