

博士(医学) 長 祐子

学位論文題名

成人T細胞性白血病細胞のadriamycinにより誘導される
細胞死および耐性獲得におけるp53の役割に関する検討

学位論文内容の要旨

【緒言】 化学療法がめざましく進歩した近年においてもT細胞性白血病の治療成績は満足のいくものとは言えず、特にヒトT細胞性白血病ウイルス-1型(HTLV-1)により発症する成人T細胞性白血病(ATL)は初期より化学療法に抵抗性を示す症例が多く、極めて予後不良な疾患である。したがってATL細胞における薬剤耐性機序を解明することはATLに対するより有効な化学療法を確立していくうえで重要な課題のひとつである。

近年、多くの抗癌剤により生じる細胞死が、観察される形態学的な変化やDNAの断片化などからapoptosisであることが示され、また細胞死のメカニズムが徐々に明らかになるにつれ、薬剤耐性の獲得はapoptosis耐性の獲得によるものであると考えられるようになった。癌抑制遺伝子p53は紫外線、放射線および活性酸素などによりDNAが損傷をうけると発現が誘導され、p21、Baxなどの標的遺伝子の転写調節領域の特異的配列に結合してこれらの遺伝子の発現を促進する。その結果、細胞周期が停止してDNA修復が行われたり、修復不能な細胞にはapoptosisが誘導される。抗癌剤により誘導される癌細胞のapoptosisにもp53が深く関わっていると考えられており、癌細胞においてp53の変異や欠失が生じると、抗癌剤により誘導されるapoptosisから逃れ、治療抵抗性を獲得することが報告されている。

【目的】 本研究ではATLの代表的な治療薬剤であるadriamycin(ADM)により誘導されるATL細胞の細胞死および耐性の獲得にp53がどのような役割を果たしているかを明らかにするため、以下の実験を行った。まずADM感受性の異なる数種類のATL細胞株におけるp53の機能的変異の有無を調べ、ADM感受性との相関を検討した。またADM耐性株を樹立し、p53の機能的変異が生じたか否かについても検討した。さらにp53の機能的変異を有する細胞株と有しない細胞株をそれぞれADMで処理した場合のp53およびその関連蛋白の発現を経時的に追跡し、同時にcell cycleの変化を解析した。

【材料および方法】 HTLV-1陽性ATL細胞株としてATL-2、SALT3およびED-Sを用いた。またADM耐性株としてATL-2、SALT3より、培地内のADMの濃度を段階的に高めることにより樹立したATL-2/ADM、SALT3/ADMを用いた。

各々の細胞株のADMに対する感受性はMTT assayより算出されるIC₅₀で比較検討した。

p53変異の検出にはyeast functional assayを用いた。まず培養細胞より全RNAを抽出しp53特異的プライマーを用いてRT-PCRによりp53cDNAを増幅した。RT-PCRで得られたp53cDNAをpSS16大腸菌・酵母シャトルベクターとともにADE2変異酵母株yIG397に導入した。酵母内では遺伝子相同組換えによるギャップ修復によって、被検

p53cDNAがプラスミドに組み込まれ、ギャップ修復領域の上流にあるADH1プロモーターによりヒトp53が酵母内で恒常に発現する。この形質転換を受けた酵母を低アデニン加ロイシン無添加選択プレート上で培養するとp53が野生型である場合にはアデニンが產生され酵母コロニーは白くなる。変異型p53であればp53認識配列に結合できないためADE2遺伝子が活性化されずアデニン中間代謝産物が蓄積し酵母コロニーは赤くなる。赤(変異型p53)、白(野生型p53)のコロニー数から赤コロニーの割合を算定し、p53変異の有無を評価した。

yeast functional assayにて検出した変異型p53の塩基配列の決定は1検体につき少なくとも4個の酵母赤コロニーよりプラスミドを抽出し、プラスミド中のp53の全配列を網羅するための4種のプライマーを用いて塩基配列決定反応を行い、それを sequencerにて解析した。

p53および関連蛋白の発現を調べるため、ED-S、SALT3、SALT3/ADMを各々のIC₅₀濃度のADMで処理し、0時間、1時間、3時間、6時間、12時間、24時間、48時間後に蛋白を抽出しWestern-Blot法にて解析した。また処理濃度の違いによりp53の発現パターンに差ができる可能性を考え、SALT3/ADMについてはその親株であるSALT3のIC₅₀濃度のADMで処理した場合も検討した。

cell cycleの解析はED-S、SALT3、SALT3/ADMを各々のIC₅₀濃度のADMで処理し、0時間、6時間、24時間、48時間、72時間後に細胞を回収し、propidium iodideをもつてDNAを発色させフローサイトメトリーにて解析した。また処理濃度の違いによりcell cycleの変化に差ができる可能性を考え、SALT3/ADMについてはその親株であるSALT3のIC₅₀濃度のADMで処理した場合も検討した。

【結果および考察】ATL-2、SALT3、ED-SのIC₅₀はそれぞれ0.397μM、0.141μM、0.087μMであった。またATL-2/ADM、SALT3/ADMのIC₅₀は1.165μM、0.450μMと各々の親株の約3倍の濃度のADMに対して抵抗性を示した。

yeastを用いたassayでは、ADMに対する耐性が比較的高い細胞株ATL-2、SALT3が野生型p53を有することや、むしろADMに比較的感受性のあるED-Sが変異型p53を有することを見い出した。また野生型p53を有する株(ATL-2、SALT3)から樹立されたADM耐性株(ATL-2/ADM、SALT3/ADM)においても野生型p53は保持されていた。このことはより高い耐性を獲得する過程でp53の変異は必ずしも必要でないことを意味する。

Western-Blot法による蛋白発現の検討では、p53は野生型(SALT3およびSALT3/ADM)、変異型(ED-S)にかかわらずADM処理後一定の時間を経て発現誘導されていた。野生型p53細胞株であるSALT3およびSALT3/ADMではいずれもp53は24時間でピークをむかえたのち減衰し、ほぼ同様の誘導がp21にも観察された。これはSALT3/ADMをSALT3のIC₅₀濃度のADMで処理した場合にも同様であった。ED-Sではp53は48時間まで増強し続けたがp21は誘導されなかった。Bcl-2、Baxの変化はいずれの細胞株においてもp53の変化に非依存的であった。

ADM処理後のcell cycleの解析では、p53が正常に機能しp21が誘導される野生型p53細胞株では、親株(SALT3)、耐性株(SALT3/ADM)とともにG1およびG2 arrestが生じたうえで一部の細胞がDNA断片化をおこしていた。これは従来のcell cycleに関するp53の見解をそのまま支持するものであり、同時にcell cycleに与えるp53の機能においても親株と耐性株間では差がないことを示している。一方変異型p53細胞株(ED-S)においてはADM処理後G2 arrestしか観察されず、p53が蛋白としての発現はあってもcell cycle調節因子としては機能していないことが確認された。しかし、p53が正常に機能している細

胞株においても機能していない細胞株においても、同様の時間的経過でDNA断片化が起こっていた。

以上よりADMによるATL細胞の細胞死および耐性獲得にはp53以外の因子が中心的な役割を果たしていると考えられた。

学位論文審査の要旨

主査 教授 小林 邦彦

副査 教授 細川 真澄男

副査 教授 浅香 正博

学位論文題名

成人T細胞性白血病細胞のadriamycinにより誘導される細胞死および耐性獲得におけるp53の役割に関する検討

【緒言】 化学療法が進歩した近年においてもT細胞性白血病の治療成績は満足のいくものとは言えず、特にヒトT細胞性白血病ウイルス-1型(HTLV-1)により発症する成人T細胞性白血病(ATL)は初期より化学療法に抵抗性を示す症例が多く、極めて予後不良な疾患である。したがってATL細胞における薬剤耐性機序を解明することはATLに対するより有効な化学療法を確立していくうえで重要な課題のひとつである。

近年、多くの抗癌剤により生じる細胞死が、観察される形態学的な変化やDNAの断片化などから apoptosisであることが示され、また細胞死のメカニズムが徐々に明らかになるにつれ、薬剤耐性の獲得は apoptosis耐性の獲得によるものであると考えられるようになった。癌抑制遺伝子p53は紫外線、放射線および活性酸素などによりDNAが損傷をうけると発現が誘導され、p21、Baxなどの標的遺伝子の転写調節領域の特異的配列に結合してこれらの遺伝子の発現を促進する。その結果、細胞周期が停止してDNA修復が行われたり、修復不能な細胞にはapoptosisが誘導される。抗癌剤により誘導される癌細胞のapoptosisにもp53が深く関わっていると考えられており、癌細胞においてp53の変異や欠失が生じると、抗癌剤により誘導されるapoptosisから逃れ、治療抵抗性を獲得することが報告されている。

【目的】 ATLの代表的な治療薬剤であるadriamycin(ADM)により誘導されるATL細胞の細胞死および耐性の獲得にp53がどのような役割を果たしているかを明らかにするため、以下の実験を行った。①ADM感受性の異なる数種類のATL細胞株におけるp53の機能的変異の有無を調べ、ADM感受性との相関をみた。②ADM耐性株を樹立し、p53の機能的・構造的変異が生じたか否かについて検討した。③p53の機能的変異を有する細胞株と有しない細胞株をそれぞれADMで処理した場合のp53およびその関連蛋白の発現を経時に追跡し、同時にcell cycleの変化を解析した。

【材料および方法】 HTLV-1陽性ATL細胞株としてATL-2、SALT3およびED-Sを用いた。またADM耐性株としてATL-2、SALT3より、培地内のADMの濃度を段階的に高めることにより樹立したATL-2/ADM、SALT3/ADMを用いた。

各々の細胞株のADMに対する感受性はMTT assayより算出されるIC50で比較検討した。

p53変異の検出にはyeast functional assayを用いた。本法で得られた赤(変異型p53)、白(野生型p53)のコロニー数から、p53変異の有無を評価した。変異型p53の塩基配列の決定は1検体につき少なくとも4個の酵母赤コロニーよりプラスミドを抽出し、p53の全配列を網羅するための4種のプライマーを用いて塩基配

列決定反応を行い、それを sequencerにて解析した。

p53および関連蛋白の発現を調べるため、ED-S、SALT3、SALT3/ADMを各々のIC50濃度のADMで処理し、各時間毎に蛋白を抽出しWestern-Blot法にて解析した。SALT3/ADMについてはその親株であるSALT3のIC50濃度のADMで処理した場合も検討した。

cell cycleの解析はED-S、SALT3、SALT3/ADMを各々のIC50濃度のADMで処理し、各時間毎に細胞を回収し、propidium iodideを用いてフローサイトメトリーにて解析した。

【結果および考察】 ATL-2/ADM、SALT3/ADMのIC50は各々の親株の約3倍の濃度のADMに対して抵抗性を示した。

yeast functional assayにより、ADMに対する耐性が比較的高い細胞株ATL-2、SALT3が野生型p53を有することや、むしろADMに比較的の感受性のあるED-Sが変異型p53を有することを見い出した。また野生型p53を有するATL-2、SALT3から樹立されたADM耐性株(ATL-2/ADM、SALT3/ADM)においても野生型p53は保持されていた。このことはより高い耐性を獲得する過程でp53の変異は必ずしも必要でないことを意味する。

Western-Blot法による検討では、p53は野生型(SALT3およびSALT3/ADM)、変異型(ED-S)にかかわらずADM処理後一定の時間を経て発現誘導された。野生型p53細胞株であるSALT3およびSALT3/ADMではいずれもp53は24時間でピークをむかえたのち減衰し、ほぼ同様の誘導がp21にも観察された。これはSALT3/ADMをSALT3のIC50濃度のADMで処理した場合にも同様であった。ED-Sではp53は48時間まで増強し続けたがp21は誘導されなかった。Bcl-2、Baxの変化はいずれの細胞株においてもp53に非依存的であった。

ADM処理後のcell cycleの解析では、p53が正常に機能しp21が誘導される野生型p53細胞株では、親株(SALT3)、耐性株(SALT3/ADM)ともにG1およびG2 arrestが生じたうえで一部の細胞がDNA断片化をおこしていた。これは従来のcell cycleに関するp53の見解をそのまま支持するものであり、同時にcell cycleに与えるp53の機能においても親株と耐性株間では差がないことを示している。一方変異型p53細胞株(ED-S)においてはADM処理後G2 arrestしか観察されず、p53が蛋白としての発現はあってもcell cycle調節因子としては機能していないことが確認された。しかし、p53が正常に機能している細胞株においても機能していない細胞株においても、同様の時間的経過でDNA断片化が起こっていた。

以上よりADMによるATL細胞の細胞死および耐性獲得にはp53以外の因子が中心的な役割を果たしていると考えられた。

公開発表に際し、副査の浅香教授から、他の薬剤耐性機序としてのADF(ATL derived factor)とp53の関係、p53と他の薬剤との関係など、副査の細川教授から、apoptosisの証拠、薬剤処理濃度とapoptosisの関係、p53変異株でもapoptosisが誘導される理由など、主査の小林教授から、データの解釈の妥当性、これから研究の方向性などについての質問がなされたが、申請者は何れに対しても適切な回答を行った。審査員一同は、成人T細胞白血病細胞のadriamycin耐性獲得における、p53および他のapoptosis関連分子の位置づけを明らかにし、今後の研究の方向性を示したことを高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士(医学)の学位を受けるに充分な資格を有するものと判定した。