

学 位 論 文 題 名

膠芽腫化学療法感受性における
p53癌抑制遺伝子の役割に関する研究

学位論文内容の要旨

【目的】近年、癌抑制遺伝子の一つとして知られているp53の変異が、膠芽腫を含めた多くの腫瘍において確認され、このp53が化学療法感受性に影響を与える可能性が指摘され注目を集めている。したがって、抗癌剤感受性におけるp53変異の意義解明は、抗腫瘍効果の向上を図るためにも必要不可欠な問題と考えられる。これまでの検討の多くは、p53により引き起こされるアポトーシスの誘導が抗腫瘍効果にとって重要であるとし、p53の変異による機能喪失の結果、化学療法感受性は低下すると指摘している。これとは逆に、p53変異によってp53の持つDNA修復機能が障害され、抗癌剤に対する感受性が増すという報告や、p53は感受性に関係しないとの報告もあり、抗癌剤感受性へのp53機能の関わりには一定の見解はない。これは、検討された細胞の種類や薬剤、p53機能調節法の違いによるばかりでなく、たとえ同一種の細胞における検討であっても、複数の細胞株を用いて比較検討した場合、各々の細胞株ごとのp53機能を含めた遺伝子の生物学的特徴の違いにより、p53機能の役割を純粋に評価することができないことが原因と考えられている。よって、本研究では、etoposide、paclitaxel、cisplatin、1-(4-amino-2-methyl-5-pyrimidinyl)methyl-3-(2-chloroethyl)-3-nitrosourea hydrochloride (ACNU)の4剤について、同一細胞株において温度を変化させるのみで、p53以外の遺伝子形質を変えることなくp53機能のみを変化させ得る、温度感受性変異p53膠芽腫細胞株を用いて、p53機能変化に伴う化学療法感受性変化を、とくに細胞周期の変化に注目し検討した。

【材料および方法】使用した細胞株は、ヒト膠芽腫細胞株であるLN382、U251MGの2つとした。まず、各細胞株に対する温度による影響を以下の項目について確認した。温度については基本的に、37°Cと34°Cに設定し比較した。(1) p53転写活性能を、酵母を用いたp53機能アッセイにより評価した。このアッセイでは、得られた酵母が野生型p53を有する場合は白色、変異型p53の場合には赤色を呈する。(2) p53により制御される遺伝子の発現の有無を、multiplex reverse transcription-polymerase chain reactionにより、G3PDHをコントロールとして定量的に比較した。(3) 37°Cと34°Cの培養下の細胞数をカウントしその平均細胞数を算出し、37°Cに対する34°Cの細胞数の割合を増殖抑制率として求めた。(4) 細胞周期は、bromodeoxyuridine-propidium iodide (BrdU-PI) 二重染色法を用い、フローサイトメトリーにて検討した。(5) p53蛋白量は、enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法にて測定した。次に、化学療法感受性を3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT)アッセイにて検討した。各薬剤の最高投与濃度は、etoposideが150μM、paclitaxelが50μM、cisplatinが50μM、ACNU

が2000 μ Mとした。温度によらないp53機能調節を目的に、野生型p53遺伝子を哺乳類発現ベクターを用いてLN382細胞に導入した。遺伝子導入には、リポフェクトアミン法を用いた。この遺伝子導入により、通常の培養条件下では、野生型p53の発現が一緒に導入したlac repressor geneにより抑制され、isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG)を培養液に加えることで、lac repressor geneを抑制し導入された野生型p53の発現が得られる。さらに、etoposideとpaclitaxel投与による細胞周期の変化を、etoposide25 μ M、paclitaxel 3.1 μ Mを投与し比較した。

【結果】U251MGは、p53機能アッセイの結果、100%が赤色コロニーを示し変異型p53を有することが判明した。LN382は、100%がピンク色のコロニーを示し変異型p53を持つと同時に、部分的な転写活性を有することが示唆された。この細胞株は温度低下により、以下の実験結果を示した。(1) 酵母内のp53転写活性が回復した。(2) p53により制御される遺伝子が誘導もしくは抑制された。(3) 細胞増殖率が低下した。(4) 細胞周期がG1期停止を示した。(5) p53蛋白分解が回復し、p53蛋白量が減少した。これらの結果により、元来変異型p53をもつ細胞株であるLN382のp53蛋白は、37 $^{\circ}$ Cでは変異型として、34 $^{\circ}$ Cでは野生型として振る舞う温度感受性変異p53であることが判明した。この細胞株を34 $^{\circ}$ Cで培養すると、etoposideとpaclitaxelの感受性は低下した。さらに、哺乳類発現ベクターを使用し作製した外因性の野生型p53遺伝子の導入細胞株に対して、IPTGを加え野生型p53を発現させても、etoposideの感受性は低下した。薬剤投与に伴う細胞周期の解析では、34 $^{\circ}$ C培養では細胞がG1期に集積したが、37 $^{\circ}$ C培養ではG1期に留まらずに、G2M期への移行を示した。一方、変異型p53をもつU251MG細胞の感受性は温度に関わらず違いはなかった。また、cisplatinとACNUの感受性は、両細胞株ともに温度変化による違いを認めなかった。

【考察】本研究の結果からは、p53機能の回復によりetoposideとpaclitaxelの感受性は低下を示した。これは、投与後の細胞周期の変化の結果より、G1期停止に伴うG2M期への移行阻害が感受性の低下の原因であるものと推察された。この結果は、p53変異がありG1期停止を示さない膠芽腫への2剤のよい適応を示唆している。また、p53機能が正常でG1期停止を示す膠芽腫においてもG1期停止を含めた細胞周期の人為的抑制が感受性の増強に有効である可能性を示唆した。これに対し、cisplatinとACNUの感受性については、p53機能以外の要素が関与する可能性が示唆された。

【結語】Etoposideとpaclitaxelに対する膠芽腫細胞の感受性には、p53機能が強く関与する結果が得られた。一方、cisplatin、ACNUの感受性においてはp53機能の関与を示唆する結果を本研究の結果からは得られなかった。今後は、他の経路の関与を含めた検討が必要である。このように、膠芽腫細胞の化学療法剤選択の方針決定には、p53をはじめとする分子生物学的アプローチが今後の治療方針を決定するうえで重要になると考えられた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 阿 部 弘

副 査 教 授 長 嶋 和 郎

副 査 教 授 守 内 哲 也

学 位 論 文 題 名

膠芽腫化学療法感受性における

p53癌抑制遺伝子の役割に関する研究

癌抑制遺伝子p53の変異が、膠芽腫を含めた多くの腫瘍において確認され、このp53が化学療法感受性に影響を与える可能性が指摘され注目を集めている。これまでの抗癌剤感受性へのp53機能の関わりには一定の見解はない。これは、検討された細胞の種類や薬剤、p53機能調節法の違いばかりでなく、同一種の細胞であっても複数の細胞株を用いた場合、各々の細胞株ごとにp53を含めた遺伝子的要因の違いにより、p53機能の役割を純粋に評価することができないことが原因と考えられている。そこで、本研究では、etoposide、paclitaxel、cisplatin、ACNUの4剤について、同一細胞株において温度を変化させるのみで、p53以外の遺伝子形質を変えることなくp53機能のみを変化させ得る、温度感受性変異p53膠芽腫細胞株を用いて、p53機能変化に伴う化学療法感受性変化を検討した。ヒト膠芽腫細胞株であるLN382、U251MGを用い、各細胞株に対する温度による影響を確認した。(1) p53転写活性を、酵母を用いたp53機能アッセイにより評価した。(2) p53により制御される遺伝子の発現の有無を、multiplex RT-PCRにより検討した。(3) 37℃と34℃培養下の細胞数をカウントし、細胞増殖抑制効果を確認した。(4) BrdU-PI二重染色法を用いたフローサイトメトリーにて細胞周期解析を行った。(5) p53蛋白量はELISA法にて測定した。次に、化学療法感受性をMTTアッセイにて検討した。野生型p53遺伝子を哺乳類発現ベクターを用いてLN382細胞に導入した。さらに、etoposideとpaclitaxel投与による細胞周期の変化を検討した。U251MGは、p53機能アッセイの結果、100%が赤色コロニーを示し、変異型p53を有すると判明した。LN382は、100%がピンク色のコロニーを示し、部分的な転写活性を有することが示唆された。この細胞株は温度

低下により、以下の実験結果を示した。(1) 酵母内のp53転写活性が回復した。(2) p53により制御される遺伝子が誘導もしくは抑制された。(3) 細胞増殖率が著しく低下した。(4) 細胞周期がG1期停止を示した。(5) p53蛋白分解が回復し、p53蛋白量が減少した。以上の結果により、元来変異型p53をもつ細胞株であるLN382のp53蛋白は、37℃では変異型として、34℃では野生型として振る舞う温度感受性変異p53であることが判明した。この細胞株を34℃で培養すると、etoposideとpaclitaxelの感受性は低下した。さらに、野生型p53遺伝子の誘導発現においても、IPTG投与によるp53発現により、etoposide感受性は低下した。薬剤投与後の細胞周期変化は、34℃培養では細胞がG1期に集積したが、37℃培養ではG1期に留まらずに、G2/M期への移行を示した。一方、U251MG細胞の感受性は温度に関わらず違いはなかった。また、cisplatinとACNUの感受性は、両細胞株ともに温度変化による違いを認めなかった。本研究の結果からは、膠芽腫細胞におけるetoposideとpaclitaxelの感受性は、p53機能の回復により低下を示した。これは、投与後の細胞周期変化の結果により、G1期停止に伴うG2/M期への移行阻害が感受性の低下の原因であるものと推察された。これに対し、ACNUとcisplatinの感受性に、p53機能の関与を示唆する結果は得られなかった。今後、膠芽腫治療における抗癌剤選択の方針決定には、p53等の遺伝子解析が重要になると考えられた。

公開発表において、守内哲也教授より、IPTGによる野生型p53の誘導に関わるLac Switch Systemの具体的内容について、野生型p53を有する細胞株の感受性について、cisplatin自体によるp53の誘導に関しての質問があった。次いで、長嶋和郎教授よりLN382が温度感受性変異となる機序について、各薬剤の殺細胞効果の機序について、p53機能に関する臨床的効果についての質問があった。最後に、阿部弘教授よりp53以外の遺伝子における抗癌剤の感受性について、今後の臨床応用の可能性についての質問があった。いずれの質問に対しても、申請者は自らの研究に基づく経験や過去の論文の内容を引用し、豊富な知識に基づいて明解に解答した。

本研究は、膠芽腫化学療法感受性におけるp53機能の役割を明らかにした点が高く評価され、今後の膠芽腫化学療法に対する治療法の改善に役立つものと期待される。審査員一同は、これらの成果を高く評価し、研究者として誠実かつ熱心であり、申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。