

学位論文題名

p73 and MDM2 confer the resistance of
epidermoid carcinoma to cisplatin by blocking p53

(シスプラチン耐性獲得機構における p73の機能についての解析)

学位論文内容の要旨

はじめに

DNA 損傷を含む様々なストレスに応答した細胞周期の停止や細胞死の誘導過程において p53 は重要な役割を果たす。p53 は塩基配列特異的な転写制御因子として機能し、p21, MDM2, Bax, などの細胞周期停止や細胞死を誘導する下流標的遺伝子群の発現を昂進する。また、DNA 障害に応答して p53 は Ser15・Ser20 など複数箇所のリン酸化を介して活性型へと変換し、p53 に対する E3 ユビキチンリガーゼである MDM2 との相互作用が阻害され分解されずに核に集積する。抗癌剤の耐性獲得には多彩な分子生物学的機序が報告されているが、p53 の状態が DNA 損傷に応答した細胞の感受性を決定付ける重要な因子の一つであると考えられている。p53 の変異によって DNA 損傷に対する正常な応答が阻害され、p53 を介する細胞死誘導経路の欠損が腫瘍化能、抗癌剤耐性獲得過程において重要であると考えられる。一方、p73 は p53 と構造的及び機能的に非常に類似するが、多くのヒト腫瘍組織における p73 の変異は稀であり、しかも p73 欠損マウスでは腫瘍の発生は観察されない。しかし、DNA 損傷に起因する p53 を介した細胞死誘導には p73 あるいは p63 の共発現が必要であることが報告される一方で、p73 はその標的配列への結合を競合阻害して p53 の転写活性化能を減弱させること、ならびに卵巣癌由来の細胞株で p73 の発現により DNA 損傷に対する抵抗性が増加することを示す報告がある。p73 は癌細胞における抗癌剤耐性獲得に関与する可能性が示唆されている。

実験・結果

様々なヒト悪性腫瘍由来の細胞株を用いて半定量 RT-PCR を行い、転写レベルでの p53 ファミリーの発現を調べた。ヒト鼻咽癌 KB 細胞株においてはシスプラチン耐性株 (KCP-4) のみ p73 の高発現が検出され、シスプラチン感受性株 (KCP-4 の親株である KB3-1 及びリバータント株 KCP-4R) では p73 の発現は低レベルだった。p73 の発現レベルとシスプラチン耐性の程度が良く相関していることから、KB 細胞株のシスプラチン耐性獲得に p73 が関与する可能性が示唆された。MTT アッセイの結果、KCP-4 細胞は KB3-1 細胞に比較し約 60 倍、KCP-4R 細胞は KB3-1 細胞に比較し約 3 倍のシスプラチン耐性を示した。次に、シスプラチン濃度を 3 ないし 90 μM で各種細胞を培養し (3 μM では、KB3-1 細胞, KCP-4R 細胞のみが細胞死となるが、90 μM では KCP-4 細胞も細胞死となるシスプラチン濃度である。)、p73、p53 およびこれらの

転写標的遺伝子群の発現レベルを半定量 RT-PCR で調べた。その結果、*p53*, *p21^{WAF1}*, および *MDM2* の発現レベルは一定であった。KCP-4 細胞における *p73* はシスプラチン $3\mu\text{M}$ で高発現したが、 $90\mu\text{M}$ では発現レベルが顕著に低下した。KB3-1 細胞では *p73* の発現は検出できず、KCP-4R 細胞でも *p73* の発現レベルは微弱だった。また、多剤耐性関連遺伝子、DNA 損傷認識遺伝子、および DNA 修復関連遺伝子群の発現レベルはシスプラチン耐性との相関関係を示さなかった。さらに、蛋白レベルでの *p73* の発現を調べたが転写レベルと同様だった。*p53* の発現レベルは、KB3-1 細胞および KCP-4R 細胞では極めて低い、シスプラチン処理によってその発現レベルは著しく高まり、KCP-4 細胞においても、 $3\mu\text{M}$ ではその発現レベルに変化は認められないものの、 $90\mu\text{M}$ では著しい高発現が観察された。シスプラチン処理による *p53* の誘導には、Ser15 のリン酸化が伴っていたが、Ser20 および Ser392 のリン酸化は検出できなかった。KB3-1 細胞および KCP-4R 細胞に比較し KCP-4 細胞における *MDM2* および *p21^{WAF1}* の発現は高いレベルで維持され、 $90\mu\text{M}$ のシスプラチン処理でさらにその発現が高まった。これらの遺伝子産物の発現昂進は転写レベルではなく蛋白レベルでの安定化に起因することが示唆された。これらの実験結果から、シスプラチン処理による KB 細胞の細胞死誘導には *p53* Ser15 のリン酸化が必要であると推察された。この可能性を検討する目的で、KB3-1 細胞にリコンビナントアデノウイルスを用いて *p73 α* を過剰発現させた。*p73 α* の過剰発現により、*p53* および *MDM2* が高発現したが、*p53* Ser15 のリン酸化は検出されなかった。また、MTT アッセイの結果 *p73 α* を過剰発現させた KB3-1 細胞はコントロールに比較し約 1.5 倍から 3 倍のシスプラチン耐性を獲得し、しかもシスプラチン処理による *p53* Ser15 のリン酸化が阻害されていた。最後に *p73* を標的とした siRNA プラスミドを構築し KCP-4 細胞に導入した後、MTT アッセイを行った。この結果、*p73* の発現が抑制された KCP-4 細胞ではコントロール細胞と比較し約半分の生存数となり、シスプラチンに対する感受性が高まった。

考察

KCP-4 細胞には KB3-1 細胞とは異なり能動的なシスプラチン排出機構が存在することが既に報告されている。しかし、細胞内におけるシスプラチン集積の減少とシスプラチン耐性度との明確な相関関係はなく、KB 細胞には未だに解明されていないシスプラチン耐性獲得機構が存在すると推察される。本研究の結果、KCP-4 細胞におけるシスプラチン耐性と *p73* および *MDM2* の発現量が非常に相関していることが明らかになった。Vikhanskaya らの報告に示されている *p73* の過剰発現と様々な DNA 修復関連遺伝子群の発現亢進および DNA 損傷抵抗性との関連は認められなかった。*MDM2* は多剤耐性 p-glycoprotein を誘導することが報告されているが、KB3-1 細胞および KCP-4 細胞における p-glycoprotein の発現は明確ではない。我々の実験結果から、KB3-1 細胞および KCP-4R 細胞においてシスプラチンに応答した *p53* の Ser15 のリン酸化が検出されるのに対して、KCP-4 細胞においては高濃度のシスプラチン処理によってのみ *p53* の Ser15 がリン酸化された。また、膵癌細胞において *p53* Ser46 リン酸化の欠失により *p53* の細胞死誘導能が著しく低下するという報告からも、DNA 損傷に起因する細胞死誘導過程における *p53* のリン酸化の有無は極めて重要である。KB3-1 細胞にアデノウイルスを用いて *p73 α* を過剰発現させると著しい *MDM2* の発現昂進が認められ、*p53* Ser15 のリン酸化が阻害され、シスプラチンに対する感受性が低下した。この実験結果は、*p73* あるいは *MDM2* が KB

細胞におけるシスプラチン耐性獲得に関与することを強く示唆する。MDM2 は p53 の N 末端に結合し p53 の Ser15 のリン酸化を阻害することから、p73 の過剰発現により MDM2 が安定化し、p53 の Ser15 のリン酸化が阻害されることは十分に考えられることである。ヒト肺癌細胞由来株で p73 の存在下で MDM2 が安定化すること、ならびに大腸癌において siRNA を用いて MDM2 をノックダウンした結果シスプラチン感受性が高まることが報告されている。p73 依存性に MDM2 が安定化されるにいたる詳細な分子生物学的機序はいまだ不明であるが、今回の研究結果は新たな制癌剤耐性獲得機構の存在を明らかにすると同時に、制癌剤耐性克服の新たな戦略を提供するものと期待される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 浅 香 正 博

副 査 教 授 畠 山 鎮 次

副 査 教 授 藤 堂 省

学 位 論 文 題 名

p73 and MDM2 confer the resistance of epidermoid carcinoma to cisplatin by blocking p53

(シスプラチン耐性獲得機構における p73の機能についての解析)

DNA 損傷を含む様々なストレスに応答した細胞周期の停止や細胞死の誘導過程において p53 は重要な役割を果たす。p53 は塩基配列特異的な転写制御因子として機能し、p21, MDM2, Bax, などの細胞周期停止や細胞死を誘導する下流標的遺伝子群の発現を昂進する。また、DNA 障害に応答して p53 は Ser15・Ser20 など複数箇所のリン酸化を介して活性型へと変換し、p53 に対する E3 ユビキチンリガーゼである MDM2 との相互作用が阻害され分解されずに核に集積する。抗癌剤の耐性獲得には多彩な分子生物学的機序が報告されているが、p53 の状態が DNA 損傷に応答した細胞の感受性を決定付ける重要な因子の一つであると考えられている。一方、p73 は p53 と構造的及び機能的に非常に類似するが、p73 の変異は稀であり、p53 とは異なる機能が指摘されており、ある種の癌細胞において抗癌剤耐性獲得に関与する可能性が示唆されている。本研究では、まず様々なヒト悪性腫瘍由来の細胞株を用いて半定量 RT-PCR を行いヒト鼻咽癌 KB 細胞株のうちシスプラチン耐性株 (KCP-4) でのみ p73 が高発現することを見出した。興味深いことに細胞死が誘導される高濃度シスプラチンの条件下でこの p73 の発現は低下した。この発現変動は蛋白レベルでも同様の結果であり、p73 の発現とシスプラチン耐性が相関していた。p53 蛋白の発現レベルは、シスプラチン感受性株では極めて低いが、シスプラチン処理によってその発現レベルは著しく増加した。一方 KCP-4 細胞では p53 は低濃度シスプラチンでは発現は変わらなかったが、高濃度シスプラチンで高発現した。シスプラチン処理による p53 の誘導には、Ser15 のリン酸化を伴っていたが、Ser20 および Ser392 のリン酸化は検出できなかった。シスプラチン処理による KB 細胞の細胞死誘導には p53 Ser15 のリン酸化が必要であると推察された。次にリコンビナントアデノウイルスベクターを用いて KB3-1 細胞に p73 α を過剰発現させた。MTT アッセイの結果 p73 α を過剰発現させた KB3-1 細胞はコントロールに比較し約 1.5 倍から 3 倍のシスプラチン耐性を獲得した。このとき p53 および MDM2 は高発現したが、興味深いことにシスプ

ラチン処理による p53 Ser15 のリン酸化が阻害された。最後に p73 を標的とした siRNA プラスミドを構築し KCP-4 細胞に導入した。半定量 RT-PCR によって内因性 p73 の発現が抑制されていることが確認できた。MTT アッセイの結果 p73 の発現が抑制された KCP-4 細胞ではシスプラチンに対する耐性が減弱した。本研究の結果、p73 あるいは MDM2 が KB 細胞におけるシスプラチン耐性獲得に関与することを強く示唆する。MDM2 は p53 の N 末端に結合し p53 の Ser15 のリン酸化を阻害することから、p73 の過剰発現により MDM2 が安定化し、p53 の Ser15 のリン酸化が阻害されることは十分にありうる。p73 依存性に MDM2 が安定化されるにいたる詳細な分子生物学的機序はいまだ不明であるが、今回の研究結果は新たな制癌剤耐性獲得機構の存在を明らかにした。

公開発表後、副査の畠山教授より 1) KCP4 細胞における p73 のゲノムの変化について 2) p73 プロモーターの制御について、3) KCP4 細胞における p53 と MDM2 親和性の変化についての質問があった。それに対して 1) KCP4 細胞にゲノムの変化はまだ不明であること、2) p53 と類似した制御であること、3) p53 と MDM2 の親和性の変化については不明であることなどの回答があった。次いで、主査の浅香教授からは 1) 他の細胞における p73 の発現について、2) 今後の臨床応用について、3) p73 ファミリーの発分化・薬剤耐性獲得機能の関わりについて 4) シスプラチン以外の様々な抗癌剤に対する耐性獲得へのアプローチについての質問があった。それに対して 1) 他の細胞においては p73 の高発現の可能性はあるが確認されていないこと 2) p73 高発現に対する抑制、あるいは他の遺伝子治療との併用について 3) p53 ファミリーそれぞれが密接に関与すること 4) 他の薬剤耐性機序の可能性についての回答があった。また、副査の藤堂教授より 1) 薬剤耐性獲得機構における $\Delta Np73$ の役割について、2) anti-apoptotic と pro-apoptotic な遺伝子発現制御における NF κ B と p53 および p53 ファミリーの関係についての質問があった。これに対して 1) KCP 4 において $\Delta Np73$ は変動が少ないこと 2) NF κ B と p53 および p53 ファミリーは密接にリンクし制御されていることなどの回答があった。

本研究は p73 と MDM2 の発現により p53 のリン酸化が阻害されてシスプラチン耐性が得られることを示した初めての報告であり、抗癌剤耐性克服への臨床応用が期待されることを示した。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や単位取得なども併せ申請者が博士（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。