

学位論文題名

p53 dominant-negative mutant R273H promotes invasion and migration of human endometrial cancer HHUA cells

(p53遺伝子ドミナントネガティブ変異による

子宮体癌細胞 HHUA の浸潤、運動能の促進に関する研究)

学位論文内容の要旨

【背景と目的】

子宮体癌は欧米では婦人科癌の中で最も頻度の高い悪性腫瘍であるが、近年、日本においても、子宮体癌の頻度が増加してきている。子宮体癌の筋層浸潤および子宮体部外進展が患者さんの予後と強く関連している。子宮体癌の治療成績向上のためには、子宮体癌細胞の浸潤および運動機構を解明し、それに基づく適切に個別治療方針が不可欠である。

p53タンパク質は転写因であり、癌抑制遺伝子として働き、p21、BAXなど多くの遺伝子群の発現に関与し、損傷を受けたDNAの修復、細胞周期の制御、細胞アポトーシスの誘導の機能を持っている。近年、野生型p53遺伝子は癌細胞浸潤に関連する遺伝子Maspin、PAI-1およびKAI1の機能を制御することが示唆された。一方、p53遺伝子の変異が人の癌の半分位で見られ、野生型p53遺伝子の転写機能を阻害するドミナントネガティブ作用 (dominant negative)、また癌浸潤や抗癌剤耐性など非野生型p53依存性機能亢進 (gain-of-function) を保有するのが報告された。

子宮体癌の26%にp53変異が認められ、p53 (dominant negative) 変異を持つ子宮体癌患者さんは癌進展しやく、予後が有意に悪いことが判明した。しかし、p53 dominant negative変異は子宮体癌進展に与える影響がまだ十分に解明されていない現状である。従って、p53遺伝子変異がdominant negative作用およびgain-of-function作用によって、子宮体癌細胞浸潤能/運動能を促進できる仮説を立てた。そこで、以下の2点を目的とする。(1) 野生型p53を有する子宮体癌細胞株HHUAにDNE作用を持つ変異を導入し、p53 dominant negative変異が子宮体癌悪性を誘導する分子メカニズムの解明を目指している。(2) 野生型p53を欠失している卵巣癌細胞株や骨肉種細胞株にp53DNE変異を導入し、p53変異のgain-of-function作用による癌細胞の浸潤および運動能を加速するかどうかを明らかにする。

【材料と方法】

材料は、野生型p53を有する子宮体癌細胞株としてHHUA、野生型p53を欠失している卵巣癌細胞株SK-OV-3や骨肉種細胞株Saos-2を用い以下の検討を行った。

1. p53 dominant negative変異R273Hの導入による子宮体癌細胞株HHUAの増殖能、運動能、浸潤能変化の検討

① p53遺伝子変異の発現ベクターの構築：p53 dominant negative変異 (R273H) と recessive 変異 (R213Q) の強制発現ベクターpcDNA-R273HおよびpcDNA-R213Qを作製した。

② 細胞株の作製：子宮体癌細胞HHUAにpcDNA-R273H、pcDNA-R213Q、またempty pcDNA 3.1ベクターを導入し、HHUA-273H、213QおよびMockの細胞株を作製した。

③ 導入されたp53遺伝子変異発現の確認：Yeast functional assayにより調べた。

④ 野生型p53標的遺伝子p21、Bax並びにMDM2のpromoterの転写機能解析：

Luciferase assay により解析する。

⑤ 細胞増殖能の測定：MTT assay により検討した。

⑥ 細胞運動能/浸潤能の測定：CP-31398は変異型 p 5 3 の機能を回復できる small molecule compound である。273H 細胞株、213Q 細胞株および E 細胞株に種々の濃度 CP-31398 を添加し、細胞運動能および浸潤能を cell migration assay と cell invasion assay により検討した。

⑦ 野生型 p53 標的遺伝子 Maspin, PAI-1 および KAI1 の mRNA 発現の解析：Realtime RT-PCR により確認する。

2. p 53 変異 R273H が、p53 を欠失している癌細胞の浸潤能および運動能変化にどのように関与しているのを明らかにする。

① 細胞株の作製：卵巣癌細胞株 SK-OV-3 や骨肉種細胞株 Saos-2 に pcDNA-R273H および empty pcDNA 3.1 ベクターを導入し、SK-OV-3-273H と SK-OV-3-mock、また Saos-2-273H と Saos-2-mock 細胞株を作製した。

② 細胞運動能/浸潤能の測定：細胞運動能および浸潤能を cell migration assay と cell invasion assay により検討した。

③ 野生型 p53 標的遺伝子 Maspin, PAI-1 および KAI1 の mRNA 発現の解析：Real-time RT-PCR により検討する。

【結果】

1. p 53 dominant negative 変異 R273H の発現による子宮体癌細胞株 HHUA の増殖能、運動能、浸潤能を促進された。

① Yeast functional assay により、273H 細胞株並びに 213Q 細胞株で、変異 p53 の発現を確認し、E 細胞株では、変異 p53 の発現を認めなかった。

② 273H 細胞は、213Q 並びに E 細胞株に比べて、p 21、Bax 並びに MDM2 遺伝子 promoter の転写活性が有意に低下し、p53 変異の dominant negative 作用が認められた。

③ 273H 細胞では、213Q 並びに E 細胞株に比べて、増殖能が有意に亢進していた。これらは全て CP-31398 処理により抑制された。

④ 273H 細胞では、213Q 並びに E 細胞株に比べて、浸潤能および運動能が有意に亢進していた。これらは全て CP-31398 処理により抑制された。

⑤ 273H 細胞では、213Q 並びに E 細胞株により、Maspin, PAI-1 および KAI1 の mRNA 発現が有意に低下していた。

2. p 53 変異 R273H の発現が、p 53 を欠失している癌細胞の浸潤能および運動能に関与していないことを明らかにした。

① SK-OV-3-273H と SK-OV-3-mock、また Saos-2-273H と Saos-2-mock 細胞株の間に運動能と浸潤能の変化が認めなかった。

② SK-OV-3-273H と SK-OV-3-mock、また Saos-2-273H と Saos-2-mock 細胞株の間に Maspin, PAI-1 および KAI1 の mRNA 発現の変化が認めなかった。

【考察】

野生型 p 5 3 を有する子宮体癌細胞 HHUA に、p 53 遺伝子変異 R273H が強い dominant negative 作用を示し、野生型 p 5 3 標的遺伝子 p 21、Bax 並びに MDM2 の promoter の転写機能解析を有意に抑制していた。更に、HHUA 細胞の浸潤能および運動能が有意に促進することが認められた。この変化に関連して、273H 細胞では、Maspin, PAI-1 および KAI1 の mRNA 発現が有意に低下していた。これらの変化は変異型 p 5 3 の機能を回復できる CP-31398 の処理により抑制された。また、R273H の発現が p 53-null 癌細胞 SK-OV-3 や Saos-2 の浸潤能および運動能を促進することができず、この変異が dominant negative 作用による子宮体癌 HHUA 細胞の浸潤および運動能を加速していると考えられる。

【結論】

p 53 遺伝子 dominant negative 変異 R273H が野生型 p 53 遺伝子の転写機能を阻害し、癌浸潤抑制遺伝子 Maspin, PAI-1, KAI-1 の mRNA 発現を低下させ、子宮体癌細胞 HHUA の浸潤能および運動能を促進する可能性が高いと考えられた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 福 田 論
副 査 教 授 守 内 哲 也
副 査 教 授 秋 田 弘 俊
副 査 教 授 櫻 木 範 明

学位論文題名

p53 dominant-negative mutant R273H promotes invasion and migration of human endometrial cancer HHUA cells

(p53遺伝子ドミナントネガティブ変異による

子宮体癌細胞 HHUA の浸潤、運動能の促進に関する研究)

p53はヒト癌において最も高頻度に変異が見られる遺伝子である。変異p53タンパクの機能的類型は、1) 野生型p53遺伝子の転写機能の喪失 (loss of function)、2) 野生型p53遺伝子の転写機能を阻害するドミナントネガティブ作用 (dominant negative effect)、3) 癌浸潤や抗癌剤耐性などの機能亢進作用 (gain-of-function effect) に分けられる。体癌の26%にp53変異が認められ、p53ドミナントネガティブ (DNE) 変異を持つ子宮体癌は進展しやく、有意に予後不良であることが明らかとなっている。子宮体癌に認められるp53変異の機能的類型と癌細胞の浸潤能、運動能との関連を明らかにすることを目的に以下の検討を行った。(1) 野生型p53を有する体癌細胞株HHUAにDNE作用を持つ変異 (R273H) と持たないrecessive変異 (R213Q) を導入し、p53 DNE変異が体癌の高悪性化を誘導する分子メカニズムを解明する。(2) 野生型p53を欠失している卵巣癌細胞株や骨肉種細胞株にp53 DNE変異を導入し、p53変異のgain-of-function作用により癌細胞の浸潤および運動能が促進されるかどうかを検討する。その結果次のことが明らかとなった。1) p53 DNE変異R273Hの発現により体癌細胞株HHUAの増殖能、運動能、浸潤能が促進される。2) p53 DNE変異R273Hの発現はp53を欠失している癌細胞の浸潤能および運動能には関与しない。すなわちR273Hは、gain-of-function作用ではなく、野生型p53遺伝子の転写機能を阻害し、癌浸潤抑制遺伝子Maspin, PAI-1, KAI1のmRNA発現を抑制し、体癌細胞の浸潤能および運動能を促進する可能性が高いと考えられた。R213Q には浸潤能、運動能促進作用は認められなかった。

発表終了後、副査の守内教授から、1) 野生型 p53 を有する体癌細胞株 HHUA に導入した p53 DNE 変異が gain-of-function 作用によって浸潤能、運動能を促進する可能性、2) recessive p53 変異を有する体癌患者の予後は、野生型 p53 を持つ体癌患者と同様に良好であるので、recessive p53 変異が野生型 p53 と同様に体癌細胞株 HHUA の浸潤能および運動能を抑制できるかについて質問があった。副査の秋田教授からは、1) p53 null の卵巣癌細胞 SK-OV-3 および骨肉腫細胞 Saos-2 に p53 DNE 変異を導入した場合の増殖能の変化、2) HHUA-73H, 213Q および mock 細胞に対する adriamycin 添加による細胞アポトーシスの変化について質問があった。副査の櫻木教授から、1) p53 DNE 変異導入による抗がん剤耐性関連遺伝子発現の変化、2) p53 を欠失した子宮体癌細胞を用いて p53 DNE 変異の gain-of-function について検討する必要性について質問があった。主査の福田教授から、1) p53 DNE 変異の他部位の癌での報告について、2) p53 DNE 変異の結果に基づく適切な個別治療方針の方向性、将来展望について質問があった。これらの質問に対して、申請者は自身のこれまでの研究成績や文献的情報をもとに概ね妥当な回答をなした。

本論文は高悪性度の子宮体癌において高頻度に認められる p53 変異について、その機能的類型と悪性形質との関連の一端を明らかにしたものであり、今後 p53 変異を標的とした治療法開発にあたっては、変異の有無のみではなく、その機能に応じた個別的検討が必要であることを示したことで高く評価される。

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取得単位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。