

博士(歯学) 吉川和人

学位論文題名

優性阻害性 p53変異体 R248Q は
H1299細胞の浸潤能を増大させる

学位論文内容の要旨

癌抑制遺伝子 *p53* は転写因子であり、4量体を形成して DNA 上の *p53* 結合配列に結合し、種々の標的遺伝子の発現を誘導する。また DNA 損傷に応答して *p53* は活性化され、細胞周期の停止、アポトーシスの誘導および DNA 修復を介して発癌抑制機能を発揮する。*p53* 遺伝子は、各種のヒト癌において約 50% の高頻度で変異が認められる。その多くは、*p53* タンパク質の DNA 結合領域内の 1 塩基変異によるアミノ酸置換である。特に、*p53* の DNA 結合ドメイン中の Gly143, Arg175, Gly245, Arg248, Arg273, Arg282 では変異頻度が極めて高くホットスポットと呼ばれている。*p53* に変異が起こると、転写因子として野生型 *p53* の機能が喪失し、その結果 *p53* 依存的な癌抑制機能の破綻が生じて発癌につながると考えられている。*p53* の変異は、その機能によって大きく 2 つに分けられる。1 つは *p53* の機能を喪失する劣性変異で、他は野生型 *p53* とヘテロ 4 量体を形成してその機能を阻害する優性阻害性 (dominant-negative: DN) 変異である。*p53* の DN 変異が機能喪失型の劣性変異と異なり生命予後や再発のリスクファクターになるのは、それが単に野生型 *p53* の機能を抑制するだけでなく、新たな機能獲得 (gain-of-function: GOF) するためであろうと考えられる。本研究では、*p53* のホットスポットの 1 つであるコドン 248 の Arg が Gln に置換した R248Q 変異と Trp に置換した R248W 変異の 2 つの DN 変異に着目し、それらを用いて GOF に関する研究を行った。

はじめに、*p53* の Arg248 変異体の機能を効率的に解析する目的でこの変異体の発現ベクターを内在性 *p53* が欠失した H1299 細胞に遺伝子導入し、安定発現株の樹立を行った。変異 *p53* 遺伝子産物の発現は、RT-PCR 法およびウェスタンプロット法により確認した。また、発現している *p53* が変異型かつ転写因子としての機能が喪失していることを酵母機能アッセイを用いて解析した。このアッセイでは、アデニン欠損培地にて酵母内で *p53* 依存的に *ADE2* 遺伝子が発現すれば酵母コロニーは白色を呈するが、*p53* に機能的変異があるために *ADE2* が発現しない場合は中間代謝産物の蓄積により赤色コロニーを形成する。変異型 *p53* である R248Q および R248W では赤色コロニーを呈し、変異 *p53* が正しく導入されたことを確認した。樹立した安定発現株を用いて、その増殖能、浸潤能、および運動能に関するアッセイを行うことで表現型の変化を調べた。まず、Arg248 変異体安定発現株の増殖性について検討したところ、Arg248 変異体安定発現株は親株および mock 株 (*p53* のコドン 1-83 をコードする DNA 断片が挿入されたベクター導入株対照) と比較して増殖性に顕著な差は認められなかった。次に、R248Q および R248W 発現細胞の浸潤能を chemo invasion assay で評価した。10% FBS 存在下で走化性因子としてフィブロネクチンを用いた。bulk 細胞(安定発現株であるが clone 化前の状態) および clone 化した細胞の両方において、フィブロネクチンの有無にかかわらず R248Q 発現細胞株は親株、mock 株および R248W 発現細胞株と比較して膜を通過した細胞数の増加が観察された。R248Q 発現細胞株で浸潤能の亢進が認められたことから、それが R248Q 発現細胞株の運動性の上昇に起因しているか否かについて解析した。

はじめに chemotaxis assay にて運動性の検討を行った。フィブロネクチン存在下では R248Q 発現細胞株は mock 株および R248W 発現細胞株と比較してわずかにケモタキシスの増加が観察された。また、細胞浸潤アッセイでは 10% FBS を添加した条件で解析しており、培地中の血清に対するケモタキシスが生じている可能性が考えられたので、同条件でケモタキシスの解析を行った。その結果、mock 細胞株、および R248W 細胞株と比較してケモタキシスに顕著な差は認められなかった。次に wound healing assay による運動能の測定を行ったが、各細胞株において剥離部の幅の広さ、細胞の移動速度においても有意な差は認められなかった。R248Q 発現細胞株では特異的に浸潤能の亢進が観察されたことから、浸潤能に関する遺伝子の発現上昇が予想された。そこで、癌細胞で細胞外基質の分解に中心的役割を担っている MMP 遺伝子およびその阻害タンパク質遺伝子の mRNA の発現量の比較を行った。その結果、R248Q 発現細胞株における各遺伝子の発現は mock 細胞株、R248W 発現細胞株と比較して有意な差は認められなかった。

本研究では、p53 のホットスポットのひとつであり、DN 変異を示す Arg248 変異体について着目してその GOF について解析を行った。この結果の重要性として R248Q にのみ特異的で走化性因子非依存的に浸潤能の亢進が認められた点にある。しかし、ヒト癌で最も多く報告されている変異にもかかわらず R248Q および R248W の 2 つの相違を述べている報告は極めて少ない。DN 変異 p53 が GOF するメカニズムとして、DN 変異 p53 が野生型 p53 の結合配列とは異なる配列に結合する。また、野生型 p53 と異なる転写因子と複合体を形成して転写活性を増強することが報告されている。本研究での R248Q と R248W においての浸潤能の差はそれが結合する遺伝子のプロモーターの相違、あるいは転写因子複合体の相違により生じている可能性が考えられる。また運動能については、各細胞株間で顕著な差が認められず、R248Q 発現細胞株の浸潤能の亢進は、運動能の亢進が関与している可能性が低いと考えられる。最後に、R248Q 発現細胞株において浸潤能に関する遺伝子群についてリアルタイム RT-PCR により mRNA の発現量の比較を行ったが、R248Q 発現細胞株と比較して優位な差が認められなかった。しかし、MMP は酵素活性を持たない latent type として産生され、クリベージされることで活性型酵素となり機能するので、ウェスタンプロット法やゼラチンザイモグラフィーなどのアッセイ法を用いて確認する必要がある。また MMP 以外の基質分解酵素が関与している可能性も考えられ、DNA マイクロアレイ法を用いて R248Q 発現細胞において発現が変化している浸潤関連遺伝子を同定することも必要である。本研究では解析を行っていないが、浸潤能の亢進に、接着能の亢進が関与していることも考えられる。今後、臨床サンプルを用いて腫瘍における R248Q と R248W の違いがもたらす影響を詳細に検討することは、臨床的にも意義があり重要な問題であるといえる。本研究では、R248Q 発現細胞株が浸潤能を亢進させることを示した。浸潤能を亢進させる機構については未だ不明であり検討が必要である。しかし、本研究から得られた知見は、癌における p53 変異体の機能的意義の解明につながるだけでなく、癌診断のためのバイオマーカーに応用することでこれからの個別化医療の発展に貢献できると考えられる。

学位論文審査の要旨

主査 教授 北川 善政

副査 教授 戸塚 靖則

副査 教授 進藤 正信

副査 教授 守内 哲也 (医学研究科)

学位論文題名

優性阻害性 p53変異体 R248Q は H1299細胞の浸潤能を増大させる

審査は、審査担当者全員出席の下、申請者の研究要旨の説明後、本研究、提出論文とそれに関連した事項について口頭試問の形式にて行った。審査論文の概要は以下の通りである。

p53 は癌抑制遺伝子であり、各種のヒト癌において約 50% の高頻度で変異が認められる。p53 に変異が起こると、転写因子としての野生型 p53 の機能が喪失し、発癌につながると考えられている。p53 の機能的変異には、p53 の機能を喪失する劣性変異と野生型 p53 と四量体を形成してその機能を阻害する優性阻害性 (dominant-negative: DN) 変異がある。p53 の DN 変異が、子宮体癌の生命予後の悪化や口腔扁平上皮癌の再発率を上昇させるのは、それが単に野生型 p53 の機能を抑制するほかに、新たな機能獲得 (gain-of-function: GOF) するためであろうと考えられる。

本研究では、p53 のコドン 248 の R が Q に置換した R248Q 変異と W に置換した R248W 変異の 2 つの DN 変異に着目した。これらの発現ベクターを内在性 p53 が欠失した H1299 細胞に遺伝子導入し、安定発現株の樹立を行い、GOF に関する研究を行った。

変異型 p53 の発現は、RT-PCR 法およびウェスタンプロット法により確認した。また、転写因子としての機能が喪失していることを酵母機能アッセイで解析した。樹立した安定発現株を用いて、その増殖能、浸潤能、および運動能について調べた。まず、R248 変異体安定発現株の増殖能について検討した。R248Q および R248W 安定発現株は親株および mock 株 (コントロールベクター導入株) と比較して増殖性に顕著な差は認められなかった。

次に、R248Q および R248W 発現細胞株の浸潤能を chemoinvasion assay で評価した。bulk 細胞（安定発現株であるが clone 化前の状態）および clone 化した細胞において、フィブロネクチンの有無にかかわらず R248Q 発現細胞株は親株、mock 株および R248W 発現細胞株と比較して浸潤能の有意な亢進が認められた。

また、R248Q および R248W 発現細胞株の運動能を chemotaxis assay、および wound healing assay にて評価した。フィブロネクチン存在下では、R248Q 発現細胞株は mock 株、R248W 発現細胞株と比べてわずかにケモタキシスの増加が観察された。wound healing assay では各細胞株間で、運動能に有意な差は認められなかった。

R248Q 発現細胞株では特異的に浸潤能の亢進が認められたことから、浸潤関連遺伝子である MMP、TIMP、RECK に注目し、リアルタイム RT-PCR 法にて mRNA の発現量の比較を行った。その結果、R248Q 発現細胞株における各遺伝子の発現は mock 細胞株、R248W 発現細胞株と比較して有意な差は認められなかった。

本研究では、p53 の DN 変異である R248 変異体の GOF について解析を行った。この結果の重要性として R248Q にのみ特異的に浸潤能の亢進が認められた点にある。しかし、本研究では浸潤能の亢進の原因は特定できなかった。今後の課題として、MMP は酵素活性を持たない潜在型として産生され、クリベージされることで活性型酵素となり機能するので、タンパク質レベルでの発現を確認する必要がある。また MMP 以外の基質分解酵素が関与している可能性も考えられた。本研究では解析を行っていないが、浸潤能の亢進に、接着能の亢進が関与している可能性も示唆された。

論文審査にあたり、論文申請者による研究要旨説明後、本研究および関連する研究について口頭試問を行った。主な質問事項は、1) 発現ベクターの組成および導入細胞の選択理由、2) chemoinvasion および chemotaxis assay にて膜を通過した細胞が膜底部に付着する理由、3) p53 変異とその機能的影響、4) 転移・浸潤が起こるプロセスおよびそれに対するアッセイ法、5) p53 はどこのチェックポイントで働くか？6) R248Q 特異的に浸潤能が亢進した原因などであった。

これらの質問に対して申請者から適切かつ明快な回答、説明が得られた。本研究は、癌患者の生命予後の短縮、再発率の上昇により、DNp53 変異体による DN effect のほかに GOF の可能性が示唆されることに注目し、R248Q が GOF によって H1299 細胞で浸潤能を増加させたことを証明した。その内容、研究関連分野にも幅広い知識を有し、更なる発展的研究についても積極的に取り組む姿勢が高く評価された。

本研究から得られた業績は癌における p53 変異の機能的意義の解明のみならず、癌診断のバイオマーカにもなりうることが期待され、博士（歯学）の学位に値するものと認められた。