

平成 30 年 5 月 23 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K20498

研究課題名(和文)機能獲得型変異TP53による口腔がんの悪性化進展の機序解析

研究課題名(英文)p53 mutant R248Q makes human oral squamous carcinoma cells more aggressive

研究代表者

中澤 誠多朗 (NAKAZAWA, Seitaro)

北海道大学・大学病院・助教

研究者番号：40736998

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究により、優性阻害性p53変異体R248Qは、口腔扁平上皮癌細胞の浸潤、運動、接着能の増強に働く一方で、優性阻害性のないR248Wでは浸潤、運動、接着能の増強はみられないことがわかった。

次に、SCIDマウスを用いた転移能の比較では、口腔癌細胞株SAS細胞に導入したDominant Negative変異の有無によってリンパ節への転移の頻度に有意な差は認めなかった。最後に、SAS細胞の抗がん剤・放射線抵抗性について検討した。5-FU、シスプラチンおよび放射線照射のいずれも、SAS細胞に導入したDominant Negative変異の有無によって抵抗性に変化を認めなかった。

研究成果の概要(英文)：This study aimed at determining whether R248Q and R248W were involved in OSCC cells.

When SAS cells, harboring recessive type p53 (E336X), expressed either p53R248Q or R248W; SAS cells expressing R248Q showed high spreading, motile and invasive activities compared to those expressing R248W. Cell growth activity of SAS cells transfected with either mutant p53 was similar to that of the parent or mock-transfected cells. When p53 expression was suppressed by transfection with siRNAs in HSC-4 cells and Ca9-22 cells, respectively harboring p53R248Q and R248W; The inhibition of p53 decreased spreading, motile and invasive activities of HSC-4 cells whereas it did not affect those activities of Ca9-22 cells. Cell growth activity of both cell lines transfected with siRNAs was similar to that of the parent or mock-transfected cells.

These findings suggest that R248Q p53 mutation, but not R248W p53 mutation, induces more motile and invasive potentials in human OSCC cells.

研究分野：高齢者歯科

キーワード：p53

1. 研究開始当初の背景

癌抑制遺伝子 TP53 は転写因子 p53 をコードしている。TP53 はヒト癌の約半数で変異が認められており、その変異の多くがホットスポットと呼ばれる DNA 結合領域に集中していることが知られている。これらホットスポットに変異をもった p53 は通常、野生型 p53 結合 DNA 配列への結合能力を失う。さらに、このタイプの変異型 p53 は野生型 p53 の機能を喪失させる。これは優性阻害性 (Dominant Negative) 変異とよばれ、口腔扁平上皮癌を含む様々な癌の予後リスク因子のひとつになっている。さらに、最近、ホットスポットに変異を有する p53 の機能は、DN 効果による野生型 p53 の機能を阻害するだけではないことがわかってきた。大部分の癌では、p53 の片方のアレルに変異が生じる一方、ヘテロ接合性の喪失 (Loss of heterozygosity : LOH) により、対となるべき野生型 p53 アレルは欠失した状態にある。野生型 p53 が失われているにも関わらず、再発を上昇させるリスクファクターとなるのは、優性阻害性 p53 変異体が新規の機能を獲得 (gain-of-function : GOF) している可能性を示唆する。これまでに、p53 を発現していない非小細胞性肺癌 H1299 細胞の細胞浸潤能は Arg248 変異体 R248Q の導入によって増強するが、R248W の導入では増強しないことが報告されている。

2. 研究の目的

TP53 の特定の部位に生じる Dominant Negative 変異が口腔癌の予後に関連する因子であることから、口腔癌の TP53 に生じる Dominant Negative 変異が GOF を引き起こす機序を解明することで、将来的に遺伝子診断による予後予測、あるいは治療標的としてのバイオマーカーに役立てることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 細胞株

ヒト非小細胞性肺癌細胞株 H1299、ヒト口腔扁平上皮癌細胞株 SAS、Ca9-22、HSC4 を用いた。

(2) 発現ベクターおよびレポーターベクター

野生型 p53 および p53R248Q 変異体の発現ベクターとして pTP53 : wt、pTP53R248Q および pTP53R248W を用いた。また、コントロールベクターには pIRES2-AcGFP1-p53 (1-83) を用いた。ホタルルシフェラーゼを有するレポーターベクターとして、p53-Luc、WWP-Luc、HDM2-Luc および pMO23 を、ウミシイタケルシフェラーゼの発現ベクターとして pRL-TK を用いた。

(3) RNA interference (RNAi)

p53 mRNA を標的とする siRNA を作製した (sip53)。また、コントロールとして siAllStars siRNA を用いた。

(4) 遺伝子導入および発現細胞の選択

SAS、Ca9-22 および HSC4 細胞への遺伝子導入および siRNA の導入は Electroporation 法で

行った。

(5) Dual luciferase assay

24 ウェルプレートに播種した H1299、SAS 細胞に、1 ウェルあたり 0.1 μ g のホタルルシフェラーゼベクター (P53-Luc、WWP-Luc、HDM2-Luc または pMO23) と 1ng の内部標準用ウミシイタケルシフェラーゼベクター (pRL-TK) を 1 μ g の p53 発現ベクターと共に Lipofectamine 2000 を用いて遺伝子導入し、その 24 時間後に細胞を回収してルシフェラーゼ発光反応を行い、発光強度を測定した。

(6) ウェスタンブロット法

通常に従い細胞からタンパク質を抽出し、10% SDS-PAGE で展開後、PVDF 膜に転写し、転写後の膜を 10% スキムミルクおよび TBS-T で室温 1 時間ブロッキングを行った後、一次抗体 (抗 p53 抗体 DO-1)、二次抗体 (抗マウス IgG 抗体) の順で反応させ、化学発光を行い撮影した。

(7) 細胞増殖アッセイ

各細胞を 1 ウェルあたり 5×10^2 個 / 100 μ l を 96 ウェルプレートに播種した。2、3、4、5、6 日後に Cell Counting Kit-8 を 10 μ l / ウェル添加し、2 時間呈色反応を行った後に 450nm での吸光度を測定した。

(8) 金コロイド法による細胞運動アッセイ (Phagokinetic track assay)

Phagokinetic track assay は BSA をコートしたカバーガラス上に金溶液を滴下し、DMEM で洗浄後 2% FBS を含む DMEM を加えて細胞を播種し、24 時間培養後に細胞毎に遊走した軌跡の面積を測定した。

(9) 細胞浸潤アッセイ

細胞浸潤アッセイは Transwell 8.0 μ m pore によって上室と下室に分けられた培養プレートを用い、下室を型コラーゲンゲルで満たし、上室に細胞を播種して 24 時間培養した後、Transwell を通過して型コラーゲンゲルへ浸潤した細胞数を計測した。

(10) 細胞接着アッセイ

細胞接着アッセイには Fibronectin、Laminin-1 およびコントロールとして Poly D-Lysine、BSA および Gelatin をコートした組織培養プレートを用いた。各ウェルに血清を含まない DMEM を加え、SAS、Ca9-22 および HSC4 細胞を 5×10^5 個播種し、30 分、90 分、180 分および 360 分後に倒立顕微鏡を用いて細胞の形態変化を観察した。

(11) in vivo における転移能

SCID マウスに SAS-R248Q、SAS-R248W および mock 細胞を正所移植し、リンパ節転移の有無を観察した。

(12) 抗がん剤・放射線抵抗性

SAS-R248Q、SAS-R248W および mock 細胞を用いて、抗がん剤 (5-FU およびシスプラチン) 存在下での足場依存的増殖・生存能 (96 穴培養プレートに細胞を播種し MTT 法で評価) および足場非依存的増殖・生存能 (軟寒天培地でのコ

ロニー形成能で評価)を調べた。IC50 を算出して抵抗性の変化を判定した。放射線抵抗性に関しても同様の実験にて評価した。

(13)統計学的検定

統計学的検定として Tukey-Kramer の HSD 検定を有意水準 $p < 0.05$ の条件で行った。

4. 研究成果

(1)R248QおよびR248Wp53変異体発現細胞の作製

同一コドンに生じたR248QおよびR248Wp53変異体のヒト口腔扁平上皮癌細胞における機能を調べるために、劣性変異p53 (E336X) をもつSAS細胞にこれらの変異型p53を発現させるベクター (pTP53R248QおよびpTP53R248W) を導入した。また、コントロールベクターとして、p53のコドン1-83をコードするDNA断片が挿入されたpTP53 (1-83) を導入した。各ベクターにはp53をコードする配列の下流にIRES (internal ribosomal entry site) 依存的に翻訳されるAcGFP1遺伝子が組み込まれている。従って、各ベクター導入後、AcGFP1の蛍光を指標にFACS Aria によってGFP陽性細胞を選別・分取した。それぞれの発現ベクター導入細胞の変異p53遺伝子産物の発現は、ウェスタンブロット法により確認した。

(2)R248QおよびR248Wp53変異体のp53結合配列依存的な転写活性能

R248QおよびR248Wp53変異体が、p53結合配列依存的な転写活性化能を失っているのかを解析した。

はじめに、HSV-TKプロモーターおよびホタルルシフェラーゼ遺伝子の5'上流にp53結合配列が15回タンデムに繰り返して挿入されているレポーターベクターp53-Lucを、R248変異体あるいは野生型p53 (wtp53) の発現ベクターと共にH1299およびSAS細胞に導入し、それぞれの転写活性能をルシフェラーゼアッセイにより解析した。その結果、wtp53 を導入したH1299およびSAS細胞では転写活性の上昇が認められたが、変異型p53R248QおよびR248Wを導入した細胞ではH1299およびSAS細胞ともに転写活性化は認められなかった。

p21Waf1、MDM2およびBax遺伝子は、それぞれのプロモーター内にp53結合配列を有しており、野生型p53によって転写活性化される。それぞれのプロモーター配列を有するレポーターベクターWWP-Luc、HDM2-LucおよびpMO23を用いて、p53転写活性能を調べた。WWP-Luc、HDM2-LucあるいはpMO23をR248変異体あるいはwtp53の発現ベクターと共にH1299およびSAS細胞に導入し、それぞれの転写活性能をルシフェラーゼアッセイにより解析した。その結果、いずれのレポーターにおいてもwtp53を導入したH1299およびSAS細胞では転写活性の上昇が認められたが、変異型p53 R248QおよびR248Wを

導入した細胞ではH1299およびSAS細胞ともに転写活性化は認められなかった。

(3)p53R248変異体発現SAS細胞の増殖能の解析

p53R248変異体を発現させたSAS細胞の増殖性について検討した。親株 (parent) であるSAS細胞、コントロールベクターを導入したmock、p53R248変異体発現細胞であるR248QおよびR248Wの細胞を96ウェルプレートに播種し培養した。播種後2、3、4、5、6日目にWST法で細胞数を解析した。その結果、R248変異体発現細胞の増殖性は親株SAS細胞およびmock細胞と同程度であることがわかった。

(4)p53R248変異体発現SAS細胞の浸潤能の解析

次に、p53R248変異体がSAS細胞の細胞浸潤能に如何なる影響を与えるかについて調べるために、Transwellチャンバーを用いた型コラーゲンゲルに対する浸潤アッセイを行った。その結果、R248Q発現細胞の浸潤能は他の3群と比較して約1.5倍に増強していた。一方、R248W発現細胞の浸潤能は、親株およびmock細胞と比較して有意な増強は見られなかった。

(5)p53R248変異体発現SAS細胞の運動能の解析

R248Q発現細胞で浸潤能の亢進が観察されたことから、それがR248Q発現細胞の運動性の上昇に起因しているか否かについて検討を行った。

運動能は、Phagokinetic track assayで評価した。R248Q発現細胞の運動能は他の3群に比べて高かった。一方、R248W発現細胞の運動能は、親株およびmock細胞と同程度であった。

(6)p53R248変異体発現SAS細胞の細胞外基質接着能の解析

次に、細胞浸潤・運動に重要な要因となる細胞外基質に対する接着性を検討した。Fibronectin、Laminin-1、およびコントロールとしてPoly D-LysineおよびGelatinをそれぞれコートした組織培養プレート上に細胞を播種し、30分、90分、180分および360分後に細胞の形態を観察した。その結果、Fibronectinをコートした場合には、細胞を播種して30分後に観察すると、R248Q発現細胞は他の3群に比べて有意に伸展した細胞が多かった。Lamininをコートした場合には、播種後30分、90分、180分の時点でR248Q発現細胞はより多くの伸展した細胞が観察された ($p < 0.05$)、一方、Poly D-LysineおよびGelatinをコートした条件では、いずれの時間においてもR248Q発現細胞で接着能の亢進を認めなかった。また、R248W細胞はいずれの条件でも親株、mock細胞に対して接着能の有意な変化を示さなかった。

(7)内在性p53R248変異体の発現抑制

次に、内在性に発現しているp53R248変異体の役割を解析するために、口腔扁平上皮癌細胞 (HSC-4およびCa9-22) の変異p53の発現をRNA

干渉を利用して抑制した。

HSC4細胞は内在性にR248Qを、Ca9-22はR248Wを発現している。これらの変異型p53の発現を抑制するために、p53 mRNAを標的とするsiRNA (sip53) をHSC4およびCa9-22細胞に導入した。実験にはsip53導入細胞の他に親株 (parent)、siRNAを加えずにElectroporationのみを行ったE.only細胞およびコントロールとしてsiAllStarsを導入した細胞を用いた。それぞれの細胞の変異p53遺伝子産物の発現は、ウェスタンブロット法により確認した。

(8)内在性p53R248変異体発現抑制にともなう増殖能の変化

内在性p53R248変異体の発現を抑制させたHSC4およびCa9-22細胞の増殖性について検討した。親株 (parent)、Electroporationのみを施した細胞 (E.only)、siRNAであるsiAllStarsおよびsip53を導入した直後の細胞を96ウェルプレートに播種し培養した。播種後2、3、4、5、6日目にWST法で細胞数を解析した。その結果、HSC4およびCa9-22細胞どちらも、Electroporationを施したE.only、siAllStars、sip53の3群はparentに対して増殖性の低下を示した。HSC4およびCa9-22細胞どちらも、E.only、siAllStars、sip53の3群間では増殖性の変化は認めなかった。

(9)内在性p53R248変異体発現抑制にともなう浸潤能の変化

次に、p53R248変異体の発現を抑制することでHSC4およびCa9-22細胞の細胞浸潤能に如何なる影響を与えるかを調べた。siRNA導入2日後に、I型コラーゲンゲルへの浸潤能を測定した。その結果、R248Qの発現を抑制されたHSC4細胞の浸潤能は他の3群と比較して半分以下に減少していることがわかった。一方、Ca9-22細胞のR248Wの発現を抑制しても、その浸潤能はコントロール群と比較して有意な低下は見られなかった。

(10)内在性p53R248変異体発現抑制にともなう運動能の変化

p53R248変異体の発現を抑制した場合のHSC4およびCa9-22細胞の運動能の変化をPhagokinetic track assayで解析した。E.only、siAllStars、sip53の条件はElectroporation 2日後の細胞を用いた。その結果、R248Qの発現を抑制したHSC4細胞の運動能は他の3群に比べて低かった。一方、R248Wの発現を抑制したCa9-22細胞の運動能は、コントロール群と同程度であった。

(11)内在性p53R248変異体発現抑制にともなう細胞外基質接着能の変化

次に、p53R248変異体の発現抑制が、HSC4およびCa9-22細胞において細胞外基質接着能に如何なる影響を与えるか検討した。その結果、HSC4細胞をFibronectinをコートしたウェルに播種した場合、播種後180分の時点でR248Qの発現を抑制された細胞のみが、細胞の伸展率 (接着

率) が低かった。さらに、R248Q発現を抑制されたHSC4細胞はLaminin-1に対する接着率も、播種後30分の時点で減少していた。一方で、BSAおよびGelatinをコートした条件では、R248Q発現抑制HSC4細胞の接着能低下は見られなかった。

また、Ca9-22細胞では、どの条件、どの時点でもR248W発現抑制細胞は他の3群の細胞と比べ接着性の変化を示さなかった。

(12)in vivoにおける転移能

次に、SCIDマウスを用いた転移能の比較では、SAS細胞に導入したDominant Negative変異の有無によってリンパ節への転移の頻度に有意な差は認めなかった。

(13)抗がん剤・放射線抵抗性

最後に、SAS細胞の抗がん剤・放射線抵抗性について検討した。5-FU、シスプラチンおよび放射線照射のいずれも、SAS細胞に導入したDominant Negative変異の有無によって抵抗性に変化を認めなかった。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

[その他]

ホームページ等

<https://www.den.hokudai.ac.jp/koreisha/index.html>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

中澤 誠多朗 (NAKAZAWA Seitaro)

北海道大学・北海道大学病院・助教
研究者番号：40736998

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
なし