

平成 21 年 5 月 28 日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19791002
 研究課題名（和文） グリオーマにおける p53 リン酸化と標的遺伝子の選択性に関する検討
 研究課題名（英文） the interaction between phosphorylation of p53 and selectivity of p53-target genes in human glioma cells
 研究代表者
 天野 敏之（AMANO TOSHIYUKI）
 九州大学・大学院医学研究院・助教
 研究者番号：70448413

研究成果の概要：ヒトグリオーマ細胞株における p53 誘導性のアポトーシスには、p53 の 15 番目と 20 番目のセリン残基のリン酸化が深く関与しており、両セリン残基のリン酸化が同時に起こった場合には、それだけで十分に p53 誘導性のアポトーシスが引き起こされる。その際には p53 標的遺伝子の一つである Fas および PUMA 遺伝子の転写活性が選択的に上昇し、各々 death receptor pathway と mitochondrial pathway を経由して p53 誘導性のアポトーシスが惹起される。

交付額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|---------|-----------|
| 2007 年度 | 2,000,000 | 0 | 2,000,000 |
| 2008 年度 | 1,200,000 | 360,000 | 1,560,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,200,000 | 360,000 | 3,560,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・脳神経外科学

キーワード：脳腫瘍学

1. 研究開始当初の背景

(1) p53 遺伝子は代表的な腫瘍抑制遺伝子であり、その変異はヒト癌細胞の約 60-70% に認められる最も一般的な遺伝子異常の一つである。脳腫瘍においても p53 の遺伝子異常が約 30-40% に認められ、p53 の変異による不活化が脳腫瘍の発生や発育・増殖に関与している事が示唆されている。基礎実験での報告では、p53 遺伝子に変異を持つ神経膠腫細胞に野生型の p53 遺伝子を導入すると、劇的なアポトーシスが誘導される事が示され、その観点からアデノウイルスベクターを用いた悪性神経膠腫に対する p53 の遺伝治療が国内外で試みられ

ている (Lang et al. J Clin Oncol, 2003)。しかし、p53 遺伝子の局所投与だけでは十分な殺腫瘍効果は得られていないのが現状であり、原因の一つとして外因性の p53 の不活性化が挙げられるが、その詳細に関しては未だ不明である。悪性神経膠腫における p53 の機能解析を行う事は腫瘍の生物学的特徴を理解するうえで必要な事であり、その結果として p53 遺伝子治療への応用が期待される。我々は、in vitro の実験において、野生型 p53 遺伝子を有する神経膠腫細胞に対しても、外因性の野生型 p53 遺伝子を導入する事で、その後の放射線照射や化学療法に対する感受性が増強し、有意

に高率なアポトーシスが誘導される事を示した(Shono et al. Cancer Res, 2002)。その際にはp53蛋白のN端側のセリン残基がリン酸化されていることが判明し、アポトーシスの誘導との相関が認められた。しかしながら、p53蛋白のセリン残基のリン酸化とアポトーシスの誘導能との関連性は未だ明確には示されておらず、どのような機序でp53の標的遺伝子が転写活性化されアポトーシスを引き起こすのかは不明である。これまでの報告ではp53蛋白の46番目のセリン残基がリン酸化されることで、p53の標的遺伝子の一つであるp53AIP1が制御されている事が報告されている(Oda et al. Cell, 2000)。

2. 研究の目的

(1) p53 蛋白のリン酸化とアポトーシスの関連性をその標的遺伝子の選択性の面から解析することで、脳腫瘍の生物学的特徴を理解し、p53 遺伝子治療を含めたより強力な集学的治療への発展へ寄与する。

これまでの報告では複数のセリン残基を同時に置換させた p53 発現プラスミドを使用した研究報告は少ないが、リン酸化のパターンの違いによりアポトーシスの誘導能や標的遺伝子の発現パターンにも相違が認められると予想される。予備実験の段階では、アポトーシスを起こしたグリオーマ細胞において、p53 の 15 番目および 20 番目のセリン残基のリン酸化が認められること、またこれまでの報告でこれらのセリン残基が p53 の安定化に関わっていることなどから、これらのセリン残基のリン酸化をブロックする事で、アポトーシス誘導能が低下することを証明する。野生型 p53 を有するグリオーマ細胞においては何らかの機序によりその機能が抑制されている可能性が示唆されるが、そこに外因性の野生型 p53 を導入する事で p53 が正常に機能する事、および他の癌細胞と比較しグリオーマ細胞に p53 遺伝子変異が少ない事を考慮すると、グリオーマ細胞に特徴的な p53 遺伝子の役割や機能が認められる可能性が高く、悪性グリオーマに対して試みられている p53 遺伝子治療の改良へつなげる。

(2)p53 遺伝子に変異を持つグリオーマ細胞株と変異を持たない野生型の p53 を有するグリオーマ細胞株において、それぞれ野生型の p53 遺伝子を導入する事でそれぞれのリン酸化の状態を確認する。アポトーシスの誘導と関連性の高い p53 のセリン残基を同定することで、アポトーシスの側面から p53 の機能解析を進める。加えてアポトーシス関連の p53 標的遺伝子の発現を確認することで、放射線照射や化学療法により p53 蛋白のリン酸化に差異が認められるのか、さらには p53 標的遺

伝子の発現量に差異が認められるのかを合わせて検討することで、p53 のリン酸化の状態と標的遺伝子の関連性について評価する。

(3)リン酸化の状態と標的遺伝子の選択性に関連性が認められた場合は、p53 蛋白が標的遺伝子のプロモーターに結合している事を定量的に評価し、p53 蛋白が転写因子として活性化され、機能している事を確認する。p53 標的遺伝子の制御に関わるセリン残基に関しては、同残基をアラニンやアスパラギン酸に置換して、リン酸化をブロックする事で(セリン アラニン)あるいは擬似的にリン酸化させた状態にする事で(セリン アスパラギン酸) 同残基の役割を詳細に検討し、標的遺伝子との関連性を解析する。また、複数のセリン残基を同時に擬似リン酸化させた p53 遺伝子を導入する事で、リン酸化のパターンとアポトーシスの誘導能および標的遺伝子の選択性に関する検討を行う。

3. 研究の方法

(1)変異型p53を有するグリオーマ細胞株(U251, U373)と、変異をもたない野生型p53を有するグリオーマ細胞株(U87, D54)に対して、p53発現アデノウイルスを用いて野生型p53遺伝子を導入し、p53蛋白の発現および各セリン残基のリン酸化の状態をリン酸化特異的抗体を用いてWestern blottingにて確認する。また野生型p53を有するグリオーマでは、外因性の野生型p53遺伝子導入のみでは、アポトーシスが誘導されないため、p53遺伝子導入後に放射線照射(X-ray 9Gy)や化学療法(Cisplatin 30 μM)によりDNA障害性ストレス刺激を加える事でアポトーシスを誘導し(Shono et al. Cancer Res, 2002)、リン酸化の状態を確認する。細胞活性は細胞増殖曲線やMTT assay、アポトーシスはCell cycle analysisやAnnexin V assayにより評価を行う。

(2)p53発現プラスミドの15番目と20番目のセリン残基をアラニン残基に置換して、リン酸化をブロックさせる変異型p53発現プラスミドを作製し、グリオーマ細胞株に導入する。p53のリン酸化をブロックした状態で、同様の実験を行い、アポトーシスの誘導能を同様に確認し、p53のセリン残基のリン酸化の役割を検討する。また、セリン残基をアスパラギン酸残基に置換して、機能的に擬似リン酸化した状態の変異型p53発現プラスミドを作成し、野生型p53を有するグリオーマ細胞株に導入する。これらのセリン残基が単独で、あるいは同時にリン酸化された状態で、どのようなアポトーシス誘導能を示すのかを同様の手法により確認する。

(3) グリオーマ細胞株に対して野生型 p53 遺伝子を導入する事で、あるいは DNA 障害性のストレス刺激を新たに加える事でアポトーシスが誘導される。また p53 のセリン残基の中で 15 番目と 20 番目のセリン残基が同時にリン酸化された場合には、それだけでアポトーシスが誘導される。その際にアポトーシス誘導に関連する p53 標的遺伝子 (Fas、DR5、Bax、Bcl-2、Bcl-XL、Bid、PUMA、Noxa) の発現量がどのように変化しているのかを Western blotting により検討する。また p53 誘導性のアポトーシスがどのような経路で誘導されるのかを caspase cascade の関連蛋白を Western blotting により観察することで、Death receptor pathway あるいは Mitochondrial pathway のいずれの経路を經由しているのかを合わせて検討する。

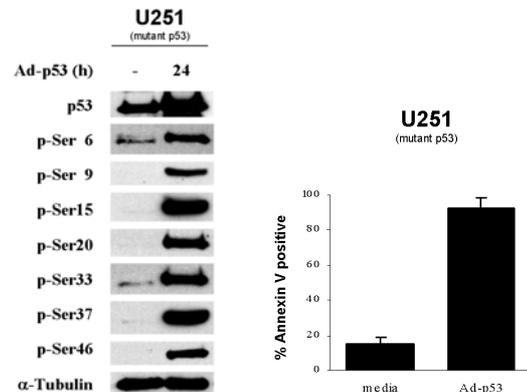
(4) p53 の 15 番目と 20 番目のセリン残基をアスパラギン酸に置換して、同残基を機能的に擬似リン酸化させた変異型 p53 遺伝子発現アデノウイルスを利用し、グリオーマ細胞株に p53 遺伝子を導入し、野生型 p53 を有するグリオーマ細胞株 (U87、D54) における細胞活性の変化を細胞増殖曲線により、またその際のアポトーシスの誘導能の変化を cell cycle analysis により確認する。

(5) 野生型の p53 遺伝子を有するグリオーマ細胞株 (U87、D54) において、p53 の 15 番目と 20 番目のセリン残基をアスパラギン酸に置換して、機能的に擬似リン酸化させた変異型 p53 遺伝子を発現するアデノウイルスを用いて、これらのセリン残基が同時にリン酸化された変異型 p53 遺伝子を導入し、アポトーシスがどのような pathway を賦活化して誘導されるのかを caspase cascade 関連蛋白の変化を Western blotting により観察することで確認する。さらにその上流で caspase cascade を賦活化する p53 標的遺伝子の発現を death receptor pathway (Fas、DR5)、および mitochondrial pathway (Noxa、PUMA、Bcl-2、Bcl-xL、Bax) について各々関連蛋白の発現を Western blotting により観察することで確認する。また mitochondrial pathway においては Bax および cytochrome c の細胞内局在を subcellular fractionation により確認する。

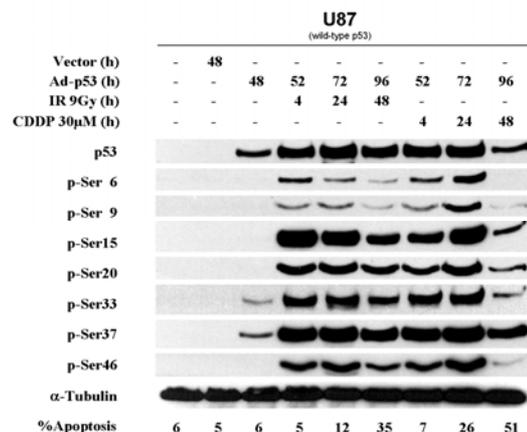
(6) 野生型 p53 を有するグリオーマ細胞株 (U87) において、15 番目と 20 番目のセリン残基が選択的に同時にリン酸化された場合に、p53 蛋白が標的遺伝子のプロモーター領域への結合能にどのような変化が生じるのかを、Chromatin immunoprecipitation assay により確認する。またデンシトメトリーにより、その結合能の変化を統計学的に評価する。

4. 研究成果

(1) p53 遺伝子に変異を持つグリオーマ細胞株 (U251) に野生型 p53 遺伝子を導入すると、p53 の N 端側のセリン残基 (Ser6, 9, 15, 20, 33, 37, 46) がリン酸化され、劇的なアポトーシスを引き起こすことが Western blotting および Annexin V assay により確認された。

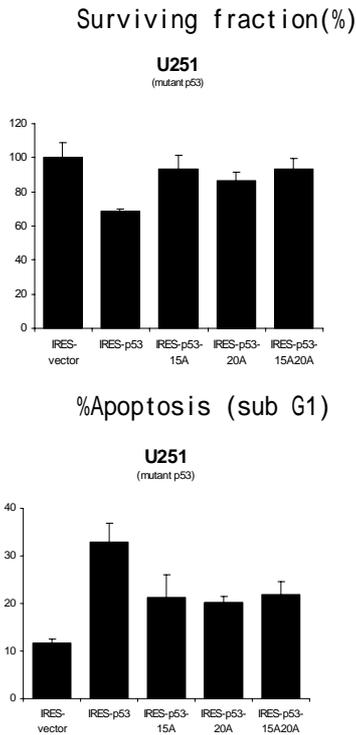


また野生型 p53 遺伝子を有するグリオーマ細胞株 (U87) に野生型の p53 遺伝子を導入しても、同セリン残基のリン酸化は起こらず、アポトーシスも誘導されなかったが、DNA 障害性のストレス刺激として、放射線照射 (9Gy) あるいはプラチナ製剤 (CDDP 30 μM) を追加投与したところ、同セリン残基がすべてリン酸化され、アポトーシスが誘導されることが Western blotting および Annexin V assay により示された。これらの結果により p53 の N 端側のセリン残基のリン酸化が p53 誘導性のアポトーシスに非常に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

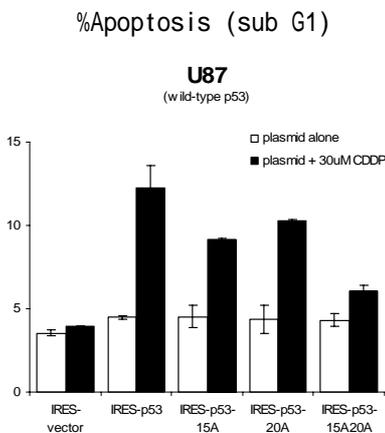


(2) p53 の N 端側の 15 番目と 20 番目のセリン残基をアラニン残基に置換してリン酸化をブロックする変異型 p53 遺伝子発現プラスミドを、変異型 p53 遺伝子を有するグリオーマ細胞株 (U251) に導入したところ、野生型の p53 遺伝子を導入した場合と比較して、細胞活性の低下

が抑制されることがMTT assayで示され、アポトーシスの誘導能も低下することがcell cycle analysisで示された。

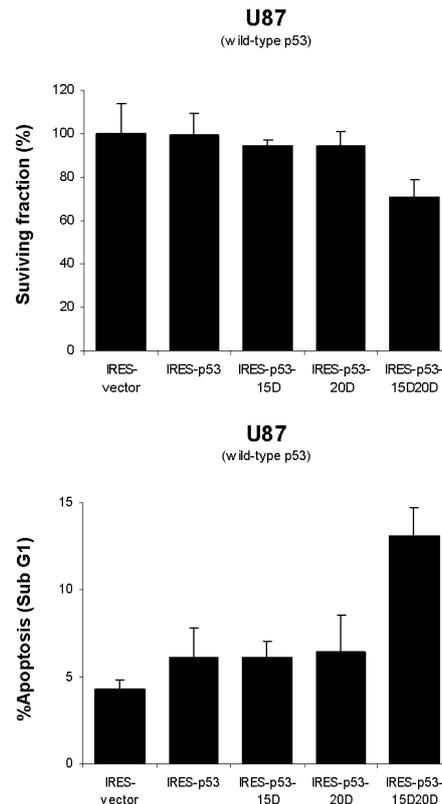


またp53のN端側の15番目と20番目のセリン残基をアラニン残基に置換してリン酸化をブロックする変異型p53遺伝子発現プラスミドを、野生型p53遺伝子を有するグリオーマ細胞株(U87)に導入し、プラチナ製剤(CDDP 30 μM)を投与したところ、野生型のp53遺伝子を導入した場合と比較して、アポトーシスの誘導能が低下することがcell cycle analysisで示された。これらの結果により、p53のN端側の15番目と20番目のセリン残基のリン酸化が、アポトーシス誘導能に関与することが示唆された。

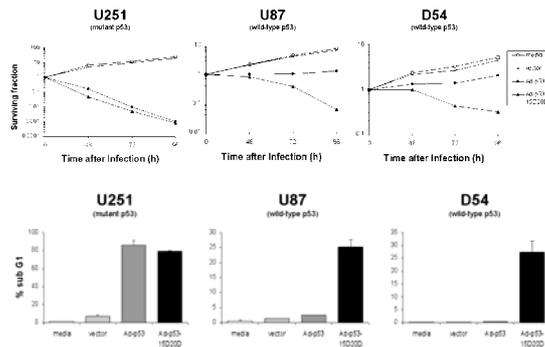


(3) p53の15番目と20番目のセリン残基をアスパラギン酸に置換して、機能的に擬似リン

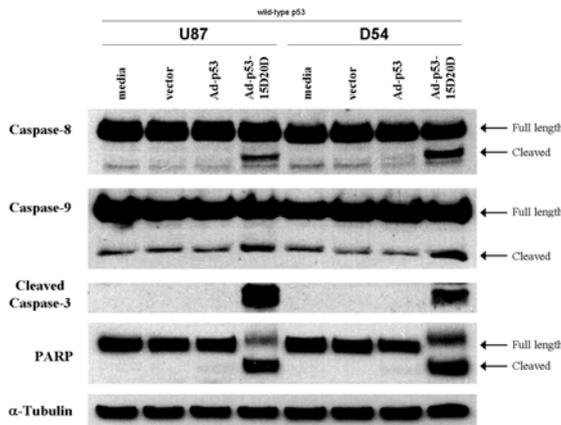
酸化させたp53発現プラスミドを野生型p53遺伝子を有するグリオーマ細胞株(U87)に導入すると、各々が単独でリン酸化されるよりも選択的に同時にリン酸化された場合に、より細胞活性が低下することがMTT assayにより示され、アポトーシスが高率に誘導されることがcell cycle analysisにより示された。この結果によりグリオーマ細胞株におけるN端側のセリン残基が複数箇所(15番目と20番目)が同時にリン酸化された場合に、p53誘導性のアポトーシスが引き起こされることが示唆された。



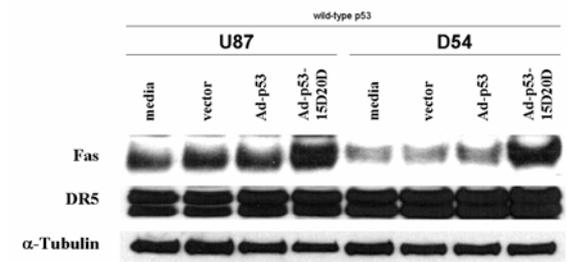
(4) p53の15番目と20番目のセリン残基をアスパラギン酸に置換して、同残基を機能的に擬似リン酸化させた変異型p53遺伝子発現アデノウイルスを用いて、グリオーマ細胞株にp53遺伝子を導入した場合、プラスミドを用いた実験系と同様に、野生型p53を有するグリオーマ細胞株(U87, D54)においても、新たなDNA障害性ストレス刺激を加えなくても、有意に細胞活性が低下し、高率にアポトーシスを引き起こすことが細胞増殖曲線やcell cycle analysisにより示された。



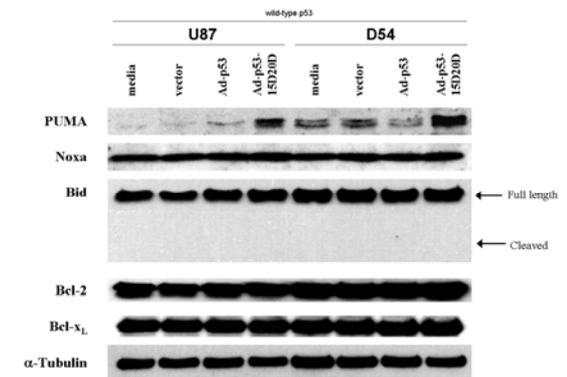
(5)野生型のp53遺伝子を有するグリオーマ細胞株(U87、D54)において、p53のリン酸化により引き起こされるアポトーシスがどのような pathway を賦活化して誘導されるのかを Western blotting により確認した。p53の15番目と20番目のセリン残基のみを擬似リン酸化させたアデノウイルスを導入した細胞にのみアポトーシスが確認され、同細胞において Caspase8 および 9 がともに活性化されていた。これらの結果により、p53に15番目と20番目のセリン残基が同時にリン酸化された場合に誘導されるアポトーシスは、death receptor pathway および mitochondrial pathway の両者がともに賦活化されて引き起こされることが確認された。



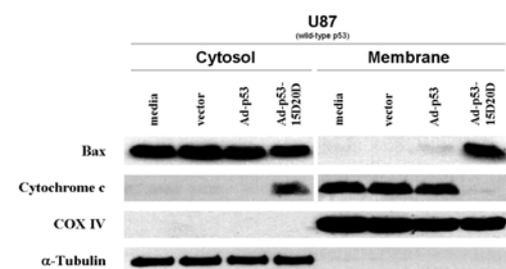
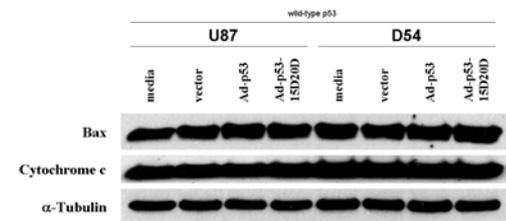
さらにその上流のp53標的遺伝子の発現を Western blotting により確認したところ、p53の15番目と20番目のセリン残基を擬似リン酸化させた変異型p53を発現するグリオーマ細胞株(U87、D54)において、death receptor pathway ではFasの発現量が選択的に優位に上昇していた。



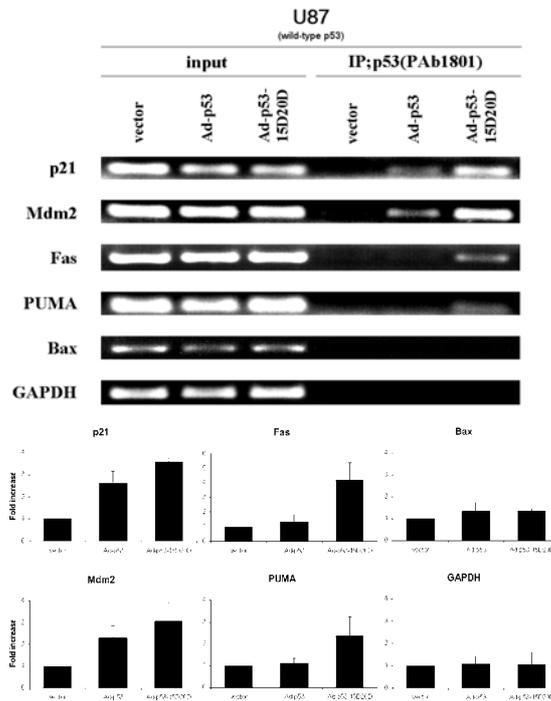
一方 mitochondrial pathway ではPUMAの発現量が選択的に有意に上昇していた。



mitochondrial pathway の関連蛋白であるBaxの発現量には変化を認めなかったが、p53の15番目と20番目のセリン残基が選択的に同時にリン酸化されアポトーシスが誘導される場合には、Baxが細胞質からミトコンドリアへと移動し、同時にミトコンドリアのcytochrome cが細胞質へと放出されることが示された。これらの結果によりp53の15番目と20番目のセリン残基が同時にリン酸化されることにより、特定の標的遺伝子(Fas、PUMA)の発現が上昇し、death receptor pathway および mitochondrial pathway を介したアポトーシスが誘導されることが示された。またp53標的遺伝子のBaxは発現量の変化は認めないが、機能的にアポトーシスの誘導に関与していることが示された。



(6)p53の15番目と20番目のセリン残基が同時にリン酸化された場合には、p53標的遺伝子のFasとPUMAの発現が選択的に上昇していたが、p53が転写的にこれらの遺伝子を活性化しているかどうかをChIP assayで確認したところp53はPUMAやFasなどの特定の標的遺伝子のプロモーター領域に結合していることが示された。またデンシトメトリーにより統計学的に有意差を持って結合能が上昇していることが示された。これらの結果より、グリオーマ細胞におけるp53のリン酸化は、15番目と20番目のセリン残基が選択的に同時にリン酸化された場合に、その標的遺伝子であるPUMAやFasの転写活性が上昇し、p53誘導性のアポトーシスを引き起こすことが示唆された。



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2件)

Amano T, Nakamizo A, Mishra SK, Gumin J, Shinojima N, Sawaya R, Lang FF: Simultaneous phosphorylation of p53 at serine 15 and 20 induces apoptosis in human glioma cells by increasing expression of pro-apoptotic genes. *Journal of Neuro-Oncology* 92: 357-371, 2009

Nakamizo A, Amano T, Zhang W, Zhang XQ, Ramdas L, Liu TJ, Bekele BN, Shono T, Sasaki T, Benedict WF, Sawaya R, Lang FF: Phosphorylation of Thr18 and Ser20 of p53 in Ad-p53-induced apoptosis.

Neuro-Oncology 10: 275-91, 2008

6. 研究組織

(1)研究代表者

天野 敏之 (AMANO TOSHIYUKI)
九州大学・大学院医学研究院・助教
研究者番号：70448413

(2)研究分担者

()
研究者番号：

(3)連携研究者

()
研究者番号：