

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：33920

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590997

研究課題名(和文) 肝臓における細胞周期チェックポイント制御機構の破綻機序の解明

研究課題名(英文) The analysis of checkpoint mechanism of cell cycle in liver cancer cells

研究代表者

中尾 春壽 (Nakao, Haruhisa)

愛知医科大学・医学部・教授

研究者番号：60326139

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト遺伝子ターゲティング法を用いて内在性TP53 alleleのExon2をheteroに破壊したHepG2細胞(p53+/-)を樹立したがhomo knock-out細胞は得られなかった。TP53遺伝子が生存に必須かを検証するためsiRNA法でTP53 knock-downの影響を解析したがTP53遺伝子発現低下は致死性表現型とは無関係であった。一方、p53+/-ではp53のisoformの一つである N40p53が特異的に発現したため肝臓では未解明である N40p53の機能解析を行い、N40p53はp21発現を増強してp53の機能を補いG1/S arrestを増強することを解明した。

研究成果の概要(英文)：Using gene targeting with AAV vectors, we established hetero knock-out HepG2 cells clones (p53+/-) of which Exon2 in endogenous TP53 alleles were destroyed. However, TP53 homo knock-out HepG2 cells clones have not been obtained. These results derived a hypothesis that p53 might be essential for cell proliferation in HepG2 cells, but knock down of expression of p53 using siRNA did not decrease cell proliferation. On the other hand, we found that p53+/- cells constantly expressed deltaN40p53, an isoform of p53. Since the function of deltaN40p53 has been known little in liver cancer, we investigated the function of deltaN40p53 in HepG2 cells by using several methods. Our studies revealed that deltaN40p53 enhanced the expression of p21 and induced an increase of G1/S arrest, that is, deltaN40p53 made up for the function of p53 and suppressed tumor cell proliferation and induced cellular senescence in HepG2 cells when the expression of p53 was reduced.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：消化器内科

キーワード：肝臓 細胞周期 p53 delta-N40p53 p21 G1/S

1. 研究開始当初の背景

肝癌は、本邦の悪性新生物部位別死因では第4位で年間3万人以上が死亡しており、肝癌の制御と撲滅は急務であるが、肝癌の分子機構に関しては未だ不明な点が多い。

正常な細胞は、細胞分裂を促進する分裂促進因子とそれを阻害する分裂阻害因子の両者の作用により細胞増殖が制御されている。しかし、癌細胞は分裂促進因子に非依存的のみならず分裂阻害因子に抵抗性を示し、これらの因子と無関係に分裂、増殖をすることができ、細胞増殖を制御する機構が破綻している。

正常細胞では、G1期 S期 G2期 M期 G1期という順序で規則正しく細胞周期を繰り返して増殖するが、DNA障害のように細胞周期に影響を及ぼす異常事態が生じた際には、異常を検知して修復機構に知らせるとともに修復期間中は細胞周期を停止させて時間を稼ぐチェックポイント制御機構と呼ばれるシステムが備わっている。しかし、癌細胞では細胞周期チェックポイント制御機構が破綻しており、この制御機構の破綻が発癌に深く関与していると考えられている。

細胞周期制御機構では、最初にセンサーと呼ばれる分子がDNA障害を感知し、メディエーターと呼ばれる複数の分子を介してトランスジューサーの分子群を活性化する。活性化したトランスジューサー分子群は下流にあるエフェクターである癌抑制遺伝子のp53やCdc25 familyなどを活性化し、細胞周期停止やDNA修復、アポトーシスを誘導して異常細胞を排除し正常細胞の恒常性を維持している。このようにDNA障害時には多くの分子を介した情報伝達系がクロストークしながら複雑なネットワークを形成し、正常な細胞周期をコントロールしている(図1)。

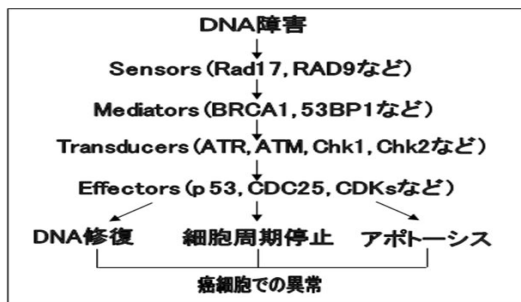


図1

しかし、癌細胞ではチェックポイント制御に破綻を来し、異常な細胞周期により癌細胞増殖を生じる。癌細胞における細胞周期関連分子の異常は多彩であるが、特にG1/S期チェックポイントやG2/M期チェックポイントでの異常が重要である。G1/S期チェックポイント期異常に関する遺伝子として、RBとともによく知られている癌抑制遺伝子p53は、肝癌を含む多くの癌で遺伝子異常が報告されており、p53が発癌とその進展に中心的な役割を果たしていると考えられる。

P53は、トランスジューサーの一つである

ATMが制御するMDM2により活性が抑制される。また、p53の上位に位置するトランスジューサー分子のChk2がp53に直接関与するとともにChk1も関与することが示唆されているが、詳細な分子機構については全てが明らかにされていないわけではない。さらにG2/Mチェックポイントを制御するChk1、Chk2の過剰発現や遺伝子変異は、大腸癌や肺癌など複数の癌に認められ、Chk1、Chk2は発癌時の細胞周期異常においてMDM2-p53経路とともに大切な役割を担っていると思われる(図2)。

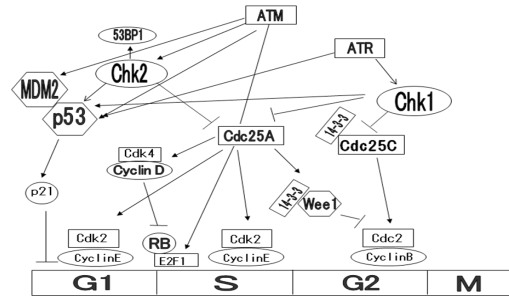


図2

しかし、肝癌においてp53とChk1、Chk2との関連性を検討した報告は乏しい。

肝癌において細胞周期関連分子の異常がどのように生じることで細胞周期制御機能が破綻していくのかという機構を明らかにすることは、肝発癌機構の解明および肝癌治療のために重要であると思われる。

2. 研究の目的

ヒト細胞遺伝子ターゲティング法を用いて内在性p53遺伝子破壊ヒト肝癌細胞株を樹立してp53と細胞周期制御機構および関連分子の関係を解析することにより、肝癌における細胞周期チェックポイント制御機構の破綻機構を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) ヒト細胞遺伝子ターゲティング法を用いた内在性TP53遺伝子(p53をコードする遺伝子)を破壊したヒト肝癌細胞株の樹立

FISH解析

p53 BAC probeを用いてp53のcopy数と効率を確認し、ターゲットとする肝癌細胞株決定する。

TP53遺伝子破壊(ノックアウト)ベクターの構築

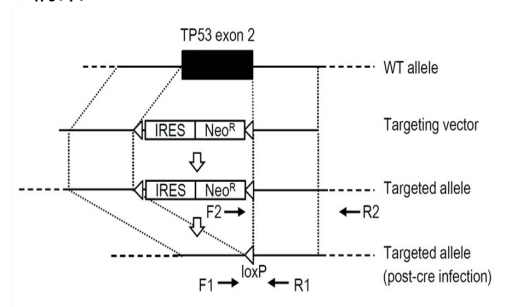


図3

アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターを用いて p53 をコードする TP53 アレルのエクソン 2 を破壊できる AAV ベクターを構築する。Cre-LoxP 部位特異的組換えによる TP53 遺伝子破壊 (図 3)

目的の肝癌細胞に構築した AAV ベクターを感染させた後に G418 により薬剤選択して TP53 アレルのノックアウト細胞をスクリーニングし、陽性細胞をモノクローン化する。その後 Cre リコンビナーゼを用いてネオマイシン耐性カセットの除去を行なう。

PCR 法を用いて TP53 遺伝子を hetero に破壊されたクローン (p53+/-) を選択する。

p53+/- のクローンに対して (3) (4) の操作を繰り返し、TP53 遺伝子がホモにノックアウトされたクローン (p53-/-) を選択することで p53 ホモ・ノックアウト肝癌細胞株を樹立する。

(2) 内在性 TP53 遺伝子破壊肝細胞と野生株の比較

細胞増殖能

Colony formation assay および MTT assay により細胞増殖能を比較する。

細胞周期解析

FACS scan を用いて細胞周期解析を行う。

アポトーシス解析

TUNEL 法および FACS scan を用いてアポトーシスを解析する。

p53 および細胞周期関連分子の転写、翻訳レベルの解析

転写レベルは、各分子の m-RNA を PCR 法にて測定する。

翻訳レベルは、各分子の蛋白質をウエスタンブロット法にて解析する。

内在性遺伝子破壊株樹立に用いた肝癌細胞株以外の他の肝癌細胞株でも再現性があるかを確認する。

(3) siRNA 法および外来性ベクターによるノックダウンでの結果との比較

前項 (2) の ~ と同様の実験を行う。

(4) マイクロアレイ解析

内在性 TP53 遺伝子破壊ノックアウト細胞、野生株細胞、ノックダウン細胞を用いてマイクロアレイ解析を行う。

4. 研究成果

(1) 内在性 TP53 遺伝子破壊肝細胞株樹立

まず、野生型 TP53 遺伝子を保有していることが確認されている HepG2, HepG2/C3A, Huh-6 の 3 株を p53 BAC probe を用いて FISH 解析をした結果、p53 のコピー数はすべて 2 コピーであったが、効率が 90% と良好であった HepG2 細胞を内在性 TP53 遺伝子破壊肝癌細胞株に用いることとした。

TP53 遺伝子ノックアウト AAV ベクターを構築し HepG2 細胞に感染させ、Cre-LoxP 部位特異的組換えによるヘテロな内在性 TP53 遺伝子破壊肝癌細胞クローンを PCR にてスクリーニングしたところ、p53 ヘテロ・ノックアウ

ト HepG2 細胞 (p53+/-HepG2) を 3 クローン得た (図 4)

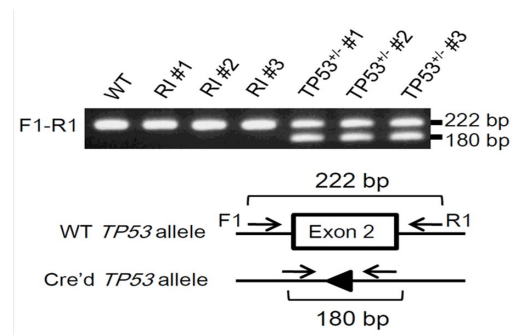


図 4

この 3 クローンを用いて遺伝子ターゲティングを繰り返したが、何回試みてもリターゲティングされてしまい、p53 ホモ・ノックアウト HepG2 クローンは得られなかった。

(2) p53 が HepG2 の生存に必須であるか?

p53 ホモ・ノックアウトクローンが得られないことから、HepG2 細胞では p53 が生存に必須である可能性が生じたため、この仮説を検証した。siRNA 法を持ちいて p53 遺伝子発現ノックダウン実験をおこなったが、TP53 遺伝子発現をしても HepG2 の細胞増殖は低下せず、むしろ増強していたことより HepG2 細胞において TP53 遺伝子は生存に必須ではないことが示唆された。

(3) p53+/-HepG2 における N40p53 出現

一方、p53+/-HepG2 では、p53 よりも分子量がやや小さい蛋白質が特異的に出現しており (図 5) PCR による m-RNA レベルで

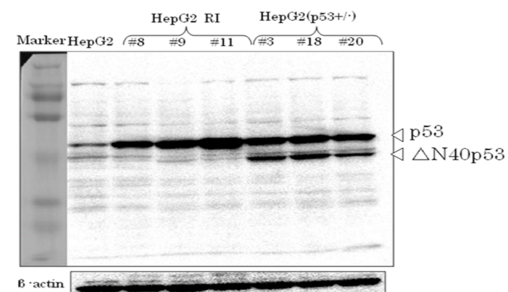


図 5

も同様に観察された。この蛋白質が、p53 のアイソフォームの一つである N40p53 であり、p53+/-HepG2 の表現型を規定している可能性が考えられたため、その検証に取り組んだ。N40p53 を野生型 HepG2 細胞に外因性にトランスフェクションした細胞と p53+/-細胞で、p53 の N 末以外を認識する抗体と p53 の N 末を認識する抗体を用いて、ウエスタンブロットで確認したところ、両細胞におけるバンドは一致した。また、m-RNA レベルでも同様な結果を認めた。さらに N40p53 に対する siRNA 法にて同バンドの発現はともにノックダウンされたことから、このバンドは N40p53 であり TP53 遺伝子がヘテロにノックアウトされた p53+/-HepG2 では N40p53 の発現が増強していると結論した。

(4) N40p53 の機能解析

N40p53 に関しては、肝癌における機能がまだ明らかにされていないため、肝癌における N40p53 の機能解析を優先として研究を進めることとした。

N40p53 を外因性に HepG2 細胞および Huh-6 細胞に導入して細胞増殖能および細胞周期関連分子における影響を解析した。N40p53 の過剰発現により p53^{-/+}HepG2 で認められた表現型と同様に細胞増殖能は増強した。また、p21 の発現と G1/S 期停止が増強していた。以上の結果より、N40p53 は、HepG2 肝癌細胞において p21 発現を増強することで G1/S 期停止を延長させており、p53 の機能を補っていることを本研究で明らかにした。この結果は、現在、英文誌に投稿中である。(DeltaN40p53 suppresses tumor cell proliferation and induces cellular senescence in hepatocellular carcinoma cells. Ota A, Nakao H, Konishi H, et al.)

また、p53^{+/-}HepG2、野生型 HepG2、N40p53 導入 HepG2 細胞などを用いて DNA マイクロアレイ解析を施行し、結果を解析中である。

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 1 件)

第 15 回消化器病病態研究会 (招待講演)
2014 年 1 月 28 日 名古屋

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中尾 春壽 (NAKAO, Haruhisa)

研究者番号：60326139

(2) 研究分担者

小西 裕之 (KONISHI, Hiroyuki)

研究者番号：20344335

中出 幸臣 (NAKADE, Yukiomi)

研究者番号：70431400

(3) 連携研究者

()

研究者番号：