

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 27 日現在

機関番号：10101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24890011

研究課題名(和文) 口腔癌におけるDN変異p53の個別化医療のバイオマーカーとしての有用性

研究課題名(英文) DN p53 mutants in OSCC are expected to be useful for diagnosis and therapeutic strategy fitting the individual patients.

研究代表者

吉川 和人 (Yoshikawa, Kazuhito)

北海道大学・大学病院・助教

研究者番号：00637267

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円、(間接経費) 690,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではp53のコドン248に生じた変異R248Q、R248Wがヒト口腔扁平上皮癌細胞の悪性形質発現にどのような役割を果たしているのか検討した。野生型p53の機能を欠くSAS細胞にR248Q、R248W発現ベクターを発現させると、R248Qを発現させたSAS細胞のみに浸潤能、運動能、接着能が増強した。

また、R248Q、R248Wを発現する口腔癌細胞株(HSC-4、Ca9-22)にp53の発現をsiRNAで抑制して同様の実験を行った。p53の発現抑制によりHSC4のみに浸潤能、運動能および接着能は低下した。以上よりR248Q変異p53はヒト口腔癌細胞において高い運動、浸潤能の獲得に働いた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we compared gain-of-function effects of two p53 mutants (R248Q and R248W) in the malignant behavior of three OSCC cell lines (SAS, HSC-4, Ca9-22). 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. And cell growth activity of SAS cells transfected with either mutant p53 was similar to that of the parent or mock-transfected cells. In HSC-4 cells and Ca9-22 cells, respectively harboring p53R248Q and R248W, the p53 expression was inhibited by siRNAs targeting p53. 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. These findings suggest that R248Q p53 mutation, but not R248W p53 mutation, promotes malignancy in human OSCC cells.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系歯学

キーワード：p53

1. 研究開始当初の背景

ゲノムの守護神といわれる p53 は DNA 損傷に应答して活性化され、癌抑制遺伝子として機能している。また、p53 は転写因子であり、4 量体を形成して DNA 上の p53 responsible element と呼ばれる配列に結合して種々の標的遺伝子の発現を誘導する。その結果、細胞周期の停止、アポトーシス誘導および DNA 修復を介して発癌抑制機能を発揮する。ヒトでは p53 遺伝子の変異が様々な癌に見られ、その頻度は 50%以上に達することから p53 はヒト腫瘍の抑制経路において中心的な役割を果たしていると考えられる。

癌で検出される p53 変異の大多数は 1 塩基置換による点変異であり、特に p53 の DN 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。変異の生じた p53 では転写因子としての機能が喪失しており、その結果 p53 依存的な癌抑制機能の破綻が生じ、発癌につながると考えられている。

p53 の変異には劣性変異 (recessive mutation) と優性阻害性変異 (dominant negative mutation) の 2 つが存在し、DN 変異 p53 は野生型 p53 と 4 量体を形成して野生型の p53 の機能を抑制する。我々の教室および本研究の協力者である北大遺伝子病制御研究所幹細胞生物学分野 (旧 癌関連遺伝子分野) では、これまでに DNp53 が癌患者の予後因子として評価できることを報告した。

子宮体癌の生命予後の重要なリスクファクターであること (Sakuragi, Moriuchi, et al., Int J Cancer. 2005 Sep 10; 116(4): 514-9)、口腔扁平上皮癌での無再発生存期間の強いリスクファクターであることを明らかにした (Hassan NM, Yamazaki Y et al., Cancer Lett. 2008 Oct 18; 270(1): 108-19)。

これらの現象は p53 の DN 変異が野生型の p53 の機能を抑制しただけでは説明できず、新たな機能を獲得 (gain of function, GOF) した可能性が考えられる。

我々はこれまで DN 変異を示す Arg248 の変異体に注目し、その腫瘍生物学的機能について解析した。p53 を欠失したヒト小細胞性肺癌細胞株 NCI-H1299 細胞に 2 種類の Arg248 変異 (Arg248Gln と Arg248Trp) p53 発現ベクターをそれぞれ遺伝子導入し、安定発現株を樹立した。これら 2 つの変異体は同じコドン 248 に生じたものであるが、Arg248Gln を発現した細胞は Arg248Trp を発現した細胞およびコントロールである親株に比べ *in vitro* における遊走能および浸潤能が著しく高いことがわかった (Yoshikawa K, Kitagawa Y et al., Biomed Res. 2010 Dec 31(6): 401-11)。これらの事実は、DN 変異であってもこの変

異体によって GOF の機能は異なることを示している。以上のことから、我々は p53DN 変異体の機能をプロファイリングすることによって p53 変位状態を癌患者の個別化予後予測バイオマーカーとして利用できると考えるに至った。

2. 研究の目的

本研究では p53 のホットスポットであるコドン 248 に生じた変異 R248Q、R248W がヒト口腔扁平上皮癌細胞において悪性形質発現にどのような役割を果たしているのか検討した。

3. 研究の方法

(1) 細胞株

ヒト口腔扁平上皮癌細胞株 SAS、Ca9-22 および HSC4 は非働化した牛胎仔血清を 10%添加した DMEM 中で 37℃、5% CO₂ の条件下で培養した。

(2) 発現ベクターおよびレポーターベクター

変異型 p53R248Q および R248W 発現ベクターを構築し、それぞれ pTP53R248Q および pTP53R248W と名付けた。コントロールベクターには p53 のコドン 1 から 83 を発現する truncated p53 発現ベクターを用いた。ルシフェラーゼを用いたレポーターベクターには、ホタルルシフェラーゼを有するレポーターベクターで、HSV-TK プロモーターの上流に合成 p53 結合配列が 15 回繰り返して挿入されている p53-Luc、ヒト p21^{waf1} プロモーター配列を含む WWP-Luc、ヒト MDM2 プロモーター配列を含む MDM2-Luc、および Bax プロモーター配列を吹く右 pMO23 を使用した。また、ウミシイタケルシフェラーゼの発現ベクターである pRL-TK を内部標準用のレポーターとして用いた。

(3) siRNA による p53 の発現抑制

p53 の蛋白発現を抑制するために BLOCK-IT RNAi Designer を用いて (small interfering RNA) を設計した。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

ヒト口腔扁平上皮癌細胞への発現ベクターあるいはレポーターベクターの導入は Electroporation 法で行った。安定発現株の寿膾には、トランスフェクションの翌日から G418sulfate 存在下で選択培養を行った。

(5) レポーターアッセイ

24-well プレートに播種した細胞にホタルルシフェラーゼベクターと内部標準用ウミシイタケルシフェラーゼベクターを遺伝子導入し、その 24 時間後に細胞を回収した。細胞抽出液の調整ならびにルシフェラーゼ発光反応には Dual-Luciferase Reporter

Assay System を使用し、測定にはルミノメーターを用いた。

(6) ウェスタンブロット法

培養している細胞からプロテアーゼインヒビターを含んだ細胞溶解液を用いてタンパク質を抽出した。タンパク質は 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 (0.6% Tween20 含有 TBS; 最終濃度 0.05M Tris, 0.138M NaCl) でブロッキングを行った後、一次抗体、2 次抗体 (ペルオキシダーゼ標識抗マウス IgG 抗体) の順で反応させ、化学発光を用いてバンドを検出した。

(7) 細胞増殖アッセイ

96-well プレートに細胞を播種し、Cell Counting Kit-8 を用いて細胞数を算定した。

(8) 細胞運動能の測定

細胞運動能は Phagokinetic track assay で評価した。

(9) 細胞浸潤能の測定

細胞浸潤の右派 8 μm の小孔の開いたトランスウェルチャンバーの下室に充填した型コラーゲンゲルに浸潤した細胞数を係数して評価した。

(10) 細胞接着能の測定

フィブロネクチン、ラミニン 1、ポリ D リジン、ウシヒト血清アルブミン (BSA) あるいはゼラチンコートした組織培養プレートを準備した。プレートの各ウェルに無血清の DMEM に浮遊させた細胞を播種し、経時的に倒立顕微鏡下で細胞の形態を観察した。伸展した形態を示した細胞を接着細胞として計数紙、その細胞の比率で接着能を評価した。

4. 研究成果

(1) p53 変異の同定

本研究で用いた 3 株のヒト口腔扁平上皮癌 (SAS、Ca9-22 および HSC-4) の p53 の変異について調べた。その結果、SAS は E336X、Ca9-22 は R248W および HSC-4 は R248Q の変異をもつことがわかった。

(2) SAS 細胞の p53 標的遺伝子に対する転写活性化能

E336X 変異を持つ変異をもつ SAS 細胞に各種のレポーターベクター (p53-Luc、WWP-Luc、MDM2-Luc および pMO23) を導入し転写活性化能を解析した。その結果、SAS 細胞はいずれのレポーターに対しても転写を活性化しないことがわかった。次に、同様のレポーターベクターと野生型 p53 発現ベクターを同時に導入しレポーターアッセイを行ったところ、いずれのレポーターに対しても転写活性化能を示した。こもところから、SAS 細胞は p53-null 細胞と同様に扱うことができると解釈した。

(3) 変異型 p53R248W あるいは R248Q を発

現させた SAS 細胞の増殖・浸潤・運動・接着能

親株である 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 細胞を 96-well プレートに播種し、WST 法で細胞数を測定した。その結果、両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。次に、両変異体が SAS 細胞の浸潤能に与える影響を調べるために、トランスウェル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 15 倍に増強していた。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した。

R248Q 発現細胞の運動能は他の 3 群に比べて高かった。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調べた。その結果、R248Q 発現細胞のフィブロネクチンおよびラミニン 1 への接着性は他の 3 群の細胞と比較して優位に高いことが明らかとなった。

(4) 内在性の変異型 p53 の発現抑制

Ca9-22 細胞 (R248W) および HSC-4 細胞 (R248Q) のもつ変異型 p53 の発現を抑制するために p53 mRNA を標的とした siRNA を設計し、それぞれの細胞に遺伝子導入した。ウェスタンブロット解析の結果、siRNA 導入細胞の p53 タンパク質の発現は著しく低下することがわかった。

(5) 変異型 p53 発現抑制に伴う細胞増殖・浸潤・運動・接着能の変化

まず、変異型 p53 の発現を抑制させた HSC-4 および Ca9-22 細胞の増殖能について検討した。親株、Electroporation のみを施した細胞、siRNA である siAllStars および sip53 を導入した細胞を 96-well プレートに播種し、細胞数の変動を解析した。その結果、HSC-4 および Ca9-22 細胞のいずれの細胞においても、変異型 p53 の発現抑制による増殖性の変化は認めなかった。次に、変異型 p53 の発現を抑制することで HSC-4 および Ca9-22 細胞の細胞浸潤能が変化するかどうか調べた。siRNA 導入後に、型コラーゲンゲルへの浸潤能を測定したところ、R248Q の発現が抑制された HSC-4 細胞の浸潤能は他の 3 群と比較して著しく低下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が見られなかった。さらに、変異型 p53 の発現を抑制した際の HSC-4 および Ca9-22 細胞の運動能の変化を解析した。その結果、R248Q の発現を抑制した HSC-4 細胞の運動能は他の 3 群に比べて低かったが、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ることが明らかとなった。最後に、変異型 p53 の「発現抑制が細胞外基質への接着能にいかなる影響をあたえるかを検討した。R248Q 発現を抑制された HSC-4 細胞のフィブロネクチンおよびラミニン 1 に対する接着能は他のコントロール細胞に比べ有意に低かった。一方、Ca9-22 細胞では、R248W の発現抑制が接着能に影響を与えないという事実はえられなかった。

本研究から、p53 の変異の一つである R248Q が口腔扁平上皮癌の浸潤能、運動能および細胞外基質へ接着能といった悪性形質の獲得に関与していることが示された。その機構の詳細についてはさらなる検討が必要であるが、本研究で得られた知見は、口腔扁平上皮癌における p53 変異体の機能的意義の解明につなげるだけでなく、個々の癌の TP53 変異体について、その部位だけでなく種類にも注目することで、より細やかな悪性度診断に役立つものと考えられる。

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 0 件)

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

吉川 和人 (YOSHIKAWA KAZUHITO)
北海道大学・北海道大学病院・助教
研究者番号 : 00637267

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし