

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 22 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26861696

研究課題名(和文) 口腔扁平上皮癌におけるDNp53の予後マーカーとしての応用

研究課題名(英文) Application as the prognosis marker of DNp53 in oral squamous cell carcinoma

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) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、E336X変異を持つ口腔扁平上皮癌細胞SASにR248QあるいはR248Wを強制発現させ、それぞれの増殖・運動および浸潤能を対照細胞と比較した。R248Q変異体を発現したSAS細胞の運動・浸潤能は、SAS細胞に比べ有意に増強した。p53-nullのH1299細胞にそれぞれの変異体を強制発現させ、mRNAとmiRNAの発現プロファイルを比較したところ、発現が2倍以上異なる遺伝子が50種類挙がった。この結果からパスウェイ解析を行ったところ、R248W発現細胞より、R248Q発現細胞では、MAPK経路、focal adhesionの介在する経路などがより活性化している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, p53 R248Q or R248W mutant were over expressed in OSCC cell line SAS having p53 mutation at E336. Over expressed cell's cell growth, motility and invasive activity were compared with control cells. In R248Q over expressed cells showed significantly elevated cell motility and invasive activity. To determine the deference of biological effects induced by two kinds of mutant R248Q and R248W, each mutant were transfected to H1299 cell which was p53-null cell. Comparing mRNA and miRNA expression profile, 50 genes were picked up respectively that showed over two times difference in these expression levels between two different mutants. The results from pathway analysis showed that comparing with R248W expressing cells, R248Q expressing clones have more highly elevated MAPK pathway activity and also the pathway activity related to focal adhesion.

研究分野：医歯薬学

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 損傷に反応して活性化され、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: DN) という 2 つのタイプが存在する。DN 変異 p53 は野生型 p53 と 4 量体を形成して野生型 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。

我々はこれまでに DN 変異を示す Arg248 の変異体に着目し、その腫瘍生物学的機能について解析してきた。その結果、p53 の DN 変異が、野生型の p53 の機能を抑制するだけでなく転移・浸潤に関与する機能を付与している (gain-of-function, GOF) ことがわかった。さらに Arg248 の変異体である Arg248Gln と Arg248Trp では、その悪性化に及ぼす程度が異なることも明らかにした。

2. 研究の目的

DN 変異 p53 がヒト口腔扁平上皮がん (OSCC) 細胞にどのような GOF 機能を付与するのかを次の 2 つの観点から明らかにする。

(1) DN 変異 p53 を強制発現あるいは発現抑制させることによる OSCC 細胞の細胞増殖能および運動・浸潤能の変化を明らかにする。

(2) DN 変異 p53 の強制発現による遺伝子発現ネットワークを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 細胞株

ヒト口腔扁平上皮癌細胞株である SAS は劣性変異 p53 (Glu336Stop) を内在性に発現しているが、その発現レベルは極めて低いこと、さらに、この変異が野生型 p53 の機能をもっていないことを確認している。従って SAS 細胞は p53-null 細胞として DN 変異 p53 の GOF 機能を調べるには好都合な OSCC 株とみなすことができる。

(2) 発現ベクターおよびレポーターベクター

SAS 細胞に Arg248Gln あるいは Arg248Trp 発現ベクターをリポフェクション法で導入し、それぞれの細胞増殖能および運動・浸潤能を *in vitro* で調べる。

(3) 細胞増殖アッセイ

細胞増殖能は、96 ウェル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。

(4) 細胞運動能の測定

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

(5) 細胞浸潤能の測定

細胞浸潤能は 8 μ m 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 I 型コラーゲンゲルに浸潤した細胞数を計数して評価した。

(6) 細胞接着能の測定

細胞接着能は、細胞外マトリックス成分をコートした培養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し、その細胞の比率で接着能を評価した。

Arg248Gln をもつ OSCC 細胞 (HSC-4) および Arg248Trp をもつ OSCC 細胞 (Ca9-22) の変異 p53 の発現を持続的・特異的に抑制し、それぞれの細胞の細胞増殖能および運動・浸潤能を *in vitro* で調べる。

(7) 遺伝子発現プロファイルの検索

DN 変異 p53 による遺伝子発現プロファイルの変化を解析するために、p53-null 細胞株である NCI-H1299 細胞に Arg248Gln あるいは Arg248Trp 発現ベクターを導入・発現させ、それぞれから RNA を抽出し、cDNA マイクロアレイおよびマイクロ RNA (miRNA) マイクロアレイによるトランスクリプトーム解析を行う。そのデータをもとに各 DN 変異 p53 に特徴的な遺伝子発現ネットワークを見つけ出す。

4. 研究成果

(1) 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 E336X 変異を持つ OSCC 細胞 SAS に Arg248Gln あるいは Arg248Trp を強制発現させ、それぞれの増殖能、運動能および浸潤能を強制発現する前の対照細胞と比較した。その結果、いずれの p53 変異体も細胞増殖能には影響を与えなかった。Arg248Gln 変異体を発現した SAS 細胞の運動・浸潤能は、変異体導入前の SAS 細胞のそれに比べ、有意に増強した。この細胞運動・浸潤能の増強程度は、Arg248Trp 変異体を発現した SAS 細胞と元の SAS 細胞との間に見られる差に比べ有意に大きかった。細胞運動能、浸潤能のいずれにも重要な関連因子であるインテグリンを介した細胞接着能は、Arg248Gln 変異体を発現した SAS 細胞で高く、Arg248Trp 変異体を発現した SAS 細胞は、変異体導入前の SAS 細胞とほぼ同等であった。

(2) 内在性変異型 p53 の発現抑制

これまでは、Arg248Gln をもつ HSC-4 細胞および Arg248Trp をもつ Ca9-22 細胞の変異 p53 の発現を siRNA の導入によって一時的に抑制し、腫瘍細胞生物学的性状を解析してきた。しかしながら、変異体 p53 の役割を詳細に検討するためには、すべての細胞が持続的に p53 発現が抑制された状況を作る必要がある。そこで変異体特異的に発現抑制しうる shRNA 発現ベクターを作製し、各々の細胞株に導入し、shRNA 発現細胞を蛍光を指標に FACS で選別した。しかし、継代培養を行うと蛍光陽性細胞が減少していき、解析には使用できなかった。そこで、CRISPR/Cas9 システムによるゲノム編集技術を利用して変異体 p53 のノックアウトを試みた。現在、ゲノム編集を試みた細胞をクローニングして変異体 p53 の発現がなくなった細胞クローンを選別しているところである。

(3) mRNA と miRNA の発現プロファイル

変異体 p53 である Arg248Gln と Arg248Trp の細胞運動・浸潤における役割を明らかにするために、p53-null 細胞である NCI-H1299 細胞にそれぞれの変異体を強制発現させ、mRNA と miRNA の発現プロファイルを比較した。Arg248Gln 変異体発現細胞と Arg248Trp 変異体発現細胞との間で発現が 2 倍以上異なる遺伝子として約 50 個が候補としてあがった。この解析結果をもとにパスウェイ解析を行ったところ、Arg248Trp 発現細胞に比べ、Arg248Gln 発現細胞では、MAPK 経路、focal adhesion の介在する経路などがより活性化している可能性が示唆された。また、miRNA アレイ解析の結果から、Arg248Gln 発現細胞と Arg248Trp 発現細胞との間で発現が 2 倍以上の差がみられる miRNA は約 80 種類あることがわかった。現在、これら miRNA の発現を RT-PCR で確認し、cDNA アレイ解析の結果と合わせて、さらに統合的な解析を行う予定である。

以上の実験結果から、Arg248Gln は細胞

運動・浸潤能の増強に關与していること、パスウェイ解析の結果から Arg248Gln による運動・浸潤能の増強にはインテグリンを介した focal adhesion および MAPK 系のシグナル経路の活性化が重要であることが示された。

本研究で得られた知見は、p53 遺伝子の変異の有無だけでなく、変異の内容も加味することが個々のがんの悪性度の診断に役立つことを示唆している。

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 2 件)

Seitaro Nakazawa、Hisashi Iizasa、Shanshan Liang、Kazuhiro Yoshikawa、Haruhiko Kashiwazaki、Yoshimasa Kitagawa、Yutaka Yamazaki、Jun-ichi Hamada、Comparison of gain-of function effects between the p53 mutants R248Q and R248W in human oral cancer cells、日本癌学会学術集会、2014 年 9 月 25 日 - 9 月 27 日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

中澤誠多朗、飯笹久、梁珊珊、柏崎晴彦、山崎裕、吉川和人、北川善政、浜田淳一、変異 p53 R248Q は口腔扁平上皮癌細胞の運動・浸潤能を増強させる、日本がん転移学会学術集会・総会、2014 年 7 月 10 日 - 7 月 11 日、金沢市文化ホール(石川県金沢市)

〔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

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

(4) 研究協力者

なし