

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462922

研究課題名(和文)p53とFEN1が創りだす細胞の運命

研究課題名(英文)The fate of cells dependent on p53 and FEN1

研究代表者

片山 郁夫 (KATAYAMA, Ikuo)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・助教

研究者番号：80295089

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、p53遺伝子とFEN1遺伝子の発現のバランスが細胞の運命を決めているかどうかを調べた。p53遺伝子に変異しているT24細胞ではFEN1遺伝子の抑制によって細胞老化が促進するが、正常なp53遺伝子を発現させた細胞株を作製しFEN1遺伝子を抑制すると細胞死が起こった。一方、p53遺伝子が正常なHCT116細胞ではFEN1遺伝子を抑制すると細胞死が起こるが、p53遺伝子を持たないHCT116細胞ではFEN1遺伝子を抑制しても細胞老化や細胞死が起きなかった。これらの結果は、p53遺伝子とFEN1遺伝子の相互作用が細胞の運命を決める一つの要因となることを示唆するものとする。

研究成果の概要(英文)：We investigated whether the balance between p53 and FEN1 decide the fate of cells. Inhibition of FEN1 induced cell senescence in p53 mutant T24 cells, but induced cell death in p53 wild type T24 cells. On the other hand, inhibition of FEN1 induced cell death in p53 wild type HCT116 cells, but did not induce cell senescence and cell death in p53 deficient HCT116 cells. These results suggest that relationship between p53 and FEN1 may decide the fate of cells.

研究分野：歯科放射線学

キーワード：p53 FEN1 細胞老化 細胞死

1. 研究開始当初の背景

(1) FEN1 は DNA 複製に際して生じる Okazaki fragment の形成や、DNA 二重鎖切断の際の修復過程の 1 つである nonhomologous end joining (NHEJ)、また DNA 一重鎖切断の修復過程において複数個の塩基除去の際に必要な long patch base excision repair (EBR) において重要な役割を果たしている endo/exonuclease である。

(2) われわれの研究室では、これまで受けた文部科学研究費補助金基盤研究「FEN1 はアンチエイジングに関与しているのか？」(課題番号 18390500)、「FEN1 抑制による老化促進機序の解明」(課題番号 22592089)において、FEN1 と老化との関連を探ってきた。こうした一連のわれわれの研究から、少なくとも細胞レベルにおいては FEN1 の働きによって老化が抑えられることが明らかとなった。しかしながら、FEN1 がどのようなメカニズムで老化を抑制しているかについてはまだほとんど解明できていない。

2. 研究の目的

これまでの研究において、FEN1 遺伝子の抑制によって細胞老化が促進することを見出したが、一部の細胞株では FEN1 抑制による細胞老化がみられないものがあつた。細胞老化を起こす細胞との違いはその細胞には正常な p53 癌抑制遺伝子が存在していることであつた。この p53 が正常な細胞は、FEN1 抑制によって p53 が活性化されそのシグナルによって細胞死に至るのではないかと推測した。すなわち、FEN1 抑制による細胞老化を p53 が抑制し、細胞死に導いているのではないかと考えた。よって本研究では、「老化」と「細胞死」という異なる事象が、「FEN1 と p53 の相互作用」の違いによって起こることを解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 細胞

- ① T24 (ヒト膀胱癌細胞株、p53 が変異)
- ② T24-p53wt (T24 に正常な p53 が恒的に発現するように遺伝子導入し作製した)
- ③ HCT116(p53+/+) (ヒト大腸がん細胞株、正常な p53 が発現)
- ④ HCT116(p53-/-) (ヒト大腸がん細胞株、p53 が欠失)
- ⑤ Saos2 (ヒト骨肉種細胞株、p53 が欠失)
- ⑥ Saos2-p53wt (Saos2 に正常な p53 が恒的に発現するように遺伝子導入し作製した)

(2) 遺伝子導入

p53 が恒的に発現する細胞を作製するため、T24 および Saos2 に p53 の遺伝子発現ベクター-pCMV-p53 をトランスフェクションし、G418 でセクションを行った。生き残った細胞からクローニングを行い、T24-p53wt と Saos2-p53wt を作製した。

(3) FEN1、p53 の抑制

(1)の①~⑥の細胞にそれぞれ siRNA をトランスフェクションし FEN1 を抑制した。p53 の抑制にも siRNA を用いた。それぞれ抑制されたことはウエスタンブロット法で確認した。

(4) 細胞老化、細胞死、細胞増殖の評価

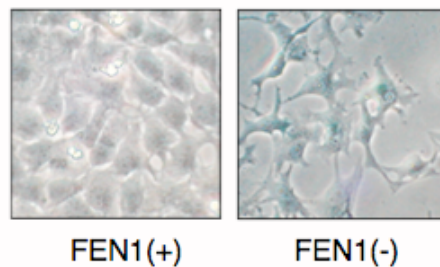
細胞老化は SA-β-galactosidase の活性で評価を行い、細胞死、細胞増殖は顕微鏡下の観察及びギムザ染色により評価を行った。

4. 研究成果

(1) T24 (p53 が変異)

FEN1 の抑制により細胞老化が起こった。

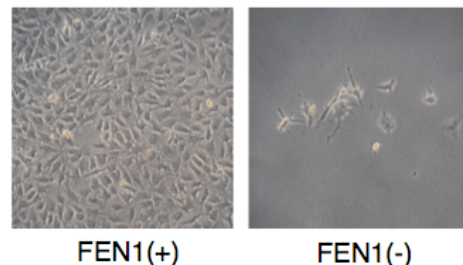
SA-β-galactosidase 染色による観察



(2) T24-p53wt (p53 が正常)

FEN1 の抑制により細胞死が起こり付着した細胞がほとんどなくなった。

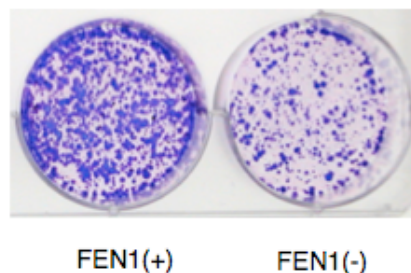
位相差顕微鏡による観察



(3) HCT116(p53+/+) (p53 が正常)

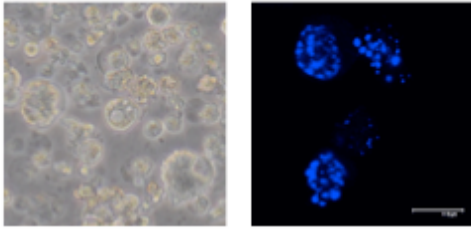
① FEN1 の抑制により細胞死が起こり付着細胞が少なくなった。

ギムザ染色による観察



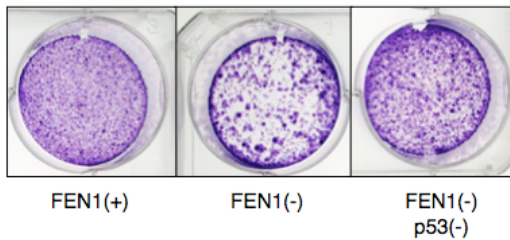
② 培養液中に浮遊した細胞の Dapi 染色を行い共焦点レーザー顕微鏡で細胞核を観察し、核の断片化を確認した。

位相差顕微鏡および
共焦点レーザー顕微鏡による観察



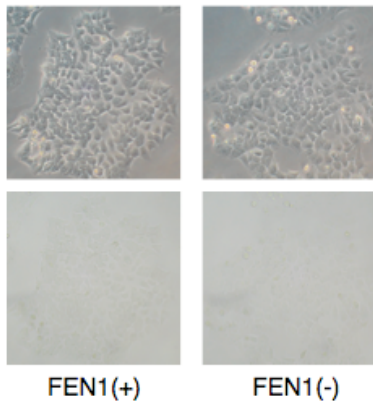
(4) HCT116 (p53+/+) において FEN1 の抑制と同時に p53 の抑制を行うと、細胞死が抑制された。

ギムザ染色による観察

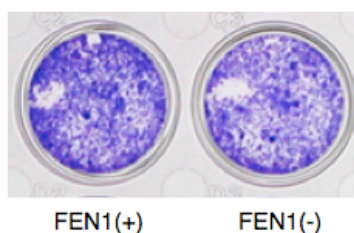


(5) HCT116 (p53-/-) (p53 が欠失) では FEN1 の抑制により①細胞老化や②細胞死は起こらなかった。

① 位相差顕微鏡および
SA-β-galactosidase 染色による観察

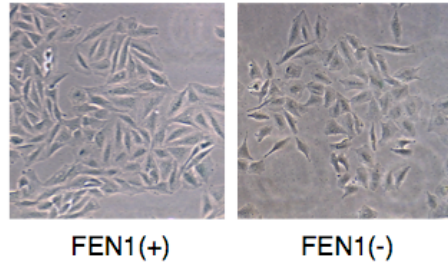


② ギムザ染色による観察



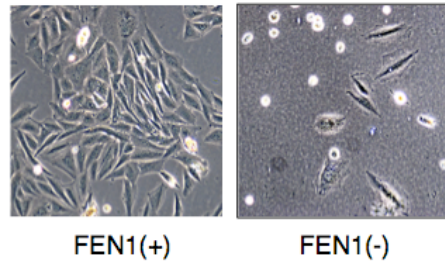
(6) Saos2 (p53 が欠失) では FEN1 の抑制により細胞老化や細胞死は起こらなかった。

位相差顕微鏡による観察



(7) Saos2-p53wt (p53 が正常) では FEN1 の抑制により細胞死が起こった。

位相差顕微鏡による観察



以上の結果より、FEN1 の抑制を行った際、p53 が変異している細胞では細胞老化が促進するが、p53 が正常な細胞では細胞死が起こることが確認できた。さらには、p53 遺伝子が正常な HCT116 細胞では FEN1 遺伝子を抑制すると細胞死が起こるが、p53 遺伝子と FEN1 遺伝子を同時に抑制するとこの細胞死が抑制された。これらの結果は、p53 遺伝子と FEN1 遺伝子の相互作用が細胞の運命を決める一つの要因となることを示唆するものと考えられる。

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

片山 郁夫 (KATAYAMA, Ikuo)

長崎大学・医歯薬学総合研究科 (歯学系)・
助教

研究者番号：80295089

(2) 研究分担者

中村 卓 (NAKAMURA, Takashi)

長崎大学・医歯薬学総合研究科 (歯学系)・
教授

研究者番号：30172406
佛坂 由可 (HOTOKEZAKA, Yuka)
長崎大学・病院（歯学系）・講師
研究者番号：10244089

田代 茂樹 (TASHIRO, Shigeki)
長崎大学・病院（医学系）・助教
研究者番号：20300882

佐々木 美穂 (SASAKI, Miho)
長崎大学・病院（歯学系）・助教
研究者番号：10437874