

学位論文題名

Induction of apoptosis by the p53-273L (Arg → Leu)  
mutant in HSC3 cells without transactivation  
of p21<sup>Waf1/Cipl/Sdi1</sup> and bax

(p53-273L (Arg → Leu)変異株のHSC3細胞におけるp21<sup>Waf1/Cipl/Sdi1</sup>  
およびbaxの転写活性化によらないアポトーシス誘導能についての研究)

学位論文内容の要旨

I. 緒言

p53遺伝子のコドン273における変異は、実際にヒト癌細胞でしばしば見いだされ、ホットスポットの一つと認識されている。我々は6種類のコドン273変異株の機能解析を行い、p53-273L(Arg→Leu)は配列特異的転写活性化能を失っているにもかかわらず、細胞増殖を抑制しうることを明らかにした。そこで、この変異型p53-273Lの細胞増殖抑制能の本態を明らかにするために、野生型p53、変異型p53-175H(Arg→His)あるいはp53-273Lを各々導入したHSC3細胞株を樹立し、導入遺伝子をZn<sup>2+</sup>で誘導することにより各p53遺伝子の細胞内での転写調節能や細胞増殖に与える影響について検討した。

II. 材料と方法

(1) プラスミド及びプローブ

野生型p53(pC53-SN3)、変異型p53(pC53-175H, pC53-273L)からBamHI消化により分離された各p53cDNAを、Zn<sup>2+</sup>で発現を誘導出来るプロモーターを有するpSV2-HMT/Terベクターにクローニングし、pSV2-HMT/Ter-SN3, -175H, -273Lを得た。p5031\*-anti-p53はMMTV-LTRプロモーター下流に野生型p53cDNAのアンチセンスDNAをクローニングして作製した。ヒトbaxプローブは既知の塩基配列をもとにPCR法にて増幅し作製した。p53, p21プローブは各cDNAプラスミド(pC53-SN3, pcDSR α Δ-Sdi1)より調製した。

(2) 誘導可能なp53遺伝子を有するHSC3細胞株の樹立

2×10<sup>6</sup>個のHSC3細胞に、各p53クローン(pSV2-HMT/Ter-SN3, -175H, -273L)とp5031\*-anti-p53とをリン酸カルシウム法にてコ・トランスフェクトし、G418(350μg/ml)セレクションにて耐性コロニーを分離した(HSC3/SN3, HSC3/175H, HSC3/273L)。導入p53遺伝子の発現はZn<sup>2+</sup>(150μM)存在下でスクリーニングした。

(3) ルシフェラーゼアッセイ

2×10<sup>6</sup>個のHSC3細胞に、2.5μgのWWP-Lucレポータープラスミドと0.1, 0.5, 1.0, 2.5μgのpCMV-NeoBam(ベクタープラスミド), pC53-SN3, pC53-175H, pC53-273Lとを、リン酸カルシウム法にてコ・トランスフェクトし、24時間後の細胞抽出液における各々のルシフェラーゼ活性を測定、比較した。

#### (4)ノーザンブロットハイブリダイゼーション

40  $\mu$ gのtotal RNAを6.7%ホルムアルデヒドゲルで電気泳動後、ナイロン膜に転写し、 $^{32}$ Pでラベルしたプローブ(p53, p21, bax,  $\beta$ -actin)でハイブリダイゼーション後、オートラジオグラフィを行った。

#### (5)ウエスタンブロッティング

Zn $^{2+}$ 添加前と添加後12時間の各細胞株から抽出した蛋白(10  $\mu$ g)を10%PAGEで展開し、ニトロセルロース膜に転写し、一次抗体(PAb1801あるいはDO-7)、二次抗体に反応させ化学発光法にてバンドを検出した。

#### (6)細胞増殖曲線

各細胞株の細胞( $1 \times 10^6$ 個)を10cmディッシュに播種し、Zn $^{2+}$ 存在(100  $\mu$ M)下に5%及び0.1%FBS添加DMEMで培養し、48時間毎に生細胞数をカウントし作成した。

#### (7)FACS解析及びDNA断片化の検出

(6)と同様に培養した細胞を5%血清下ではday-0とday-6に、0.1%血清下ではday-0, 1, 3, 5, 7に浮遊細胞も含め回収し、propidium iodide(50  $\mu$ g/ml)溶液でDNA染色を行い細胞周期の解析を行った。また0.1%血清下で得られたサンプルから、フェノール/クロロホルム法によってDNAを抽出しジゴキシゲニン法にてラベル後、2%アガロースゲルにて電気泳動しナイロンメンブランに転写、化学発光法にてDNA断片化を検索した。

### III. 結 果

親株及び樹立した各細胞株を、Zn $^{2+}$ 添加(150  $\mu$ M)下で培養すると、親株を除き、導入した各p53遺伝子は6時間後には既に誘導されており、この誘導は24時間後にも持続していることが確認された。ウエスタン法にて親株以外の細胞株においてp53蛋白の誘導も確認された。また野生型p53の発現によってのみp21が誘導され、273L, 175Hの発現ではp21は誘導されなかった。baxの発現には、どの細胞株においても明らかな変化を認めなかった。ルシフェラーゼアッセイにより、野生型p53のみがp21プロモーターを転写活性化し、273L及び175Hではこの機能を欠いていることが確認された。

これらの細胞株を5%FBS, Zn $^{2+}$ (100  $\mu$ M)下で培養すると、HSC3/SN3の細胞増殖は親株に比べ抑制されたが、HSC3/273Lの細胞増殖は親株と同等であった。しかし0.1%FBS下では、HSC3/175Hの細胞増殖は親株に比べ促進されたのに対し、HSC3/273Lでは著しく抑制された。

FACS解析の結果、5%FBS, Zn $^{2+}$ (100  $\mu$ M)下では、HSC3/SN3においてday-6におけるG1分画の細胞数がday-0に比べ30%以上増加していた。親株, HSC3/175H, HSC3/273LではG1分画の細胞数に変化は認められなかった。一方0.1%FBS, Zn $^{2+}$ (100  $\mu$ M)下では、親株においてday-3からsub-G1分画の増加が確認されたが、HSC3/SN3, HSC3/175Hではsub-G1分画の増加は認められなかった。しかし、HSC3/273Lでは、day-3, 5, 7と著しくsub-G1分画が増加していくことが確認され、day-7で親株の約3倍に達していた。アポトーシスによるDNAの断片化はHSC3/SN3, HSC3/175Hでは認められなかったのに対し、親株ではday-5から検出され始め、HSC3/273Lではday-3から著しく生じていることが確認された。

### IV. 考 察

p53遺伝子による細胞増殖抑制効果はその配列特異的転写活性化能とよく相関すると考えられている。今回、Zn $^{2+}$ で誘導可能な野生型p53, 変異型p53 (-175H, -273L)を導入し樹立したHSC3細胞株を用いて、変異型p53-273Lが、低血清条件下ではp21やbaxを介さない機序で

HSC3細胞にアポトーシスを誘導し、細胞増殖を抑制し得ることを明らかにした。また、野性型p53によるp21の誘導はアポトーシスを抑制することも確認された。従ってp53遺伝子によるアポトーシス誘導には、配列特異的転写活性化を介さない経路が存在することが示された。さらに変異型p53-273Lは、実際にヒトの癌で見出される変異でありながらこの経路を活性化する働きを保持していると考えられた。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 長 嶋 和 郎

副 査 教 授 吉 木 敬

副 査 教 授 藤 本 征一郎

学 位 論 文 題 名

## Induction of apoptosis by the p53-273L (Arg → Leu) mutant in HSC3 cells without transactivation of p21<sup>Waf1/Cipl/Sdi1</sup> and bax

(p53-273L (Arg → Leu)変異株のHSC3細胞におけるp21<sup>Waf1/Cipl/Sdi1</sup>およびbaxの転写活性化によらないアポトーシス誘導能についての研究)

p53 遺伝子のコドン 273 変異株(6 種類)の機能解析を行い、p53-273L(Arg→Leu)は配列特異的転写活性化能を失っているにもかかわらず、細胞増殖を抑制しうることを申請者らはすでに明らかにした。そこで申請者は今回、この変異型 p53-273L の細胞増殖抑制能の本態を明らかにするために、野生型 p53、変異型 p53-175H(Arg→His)あるいは p53-273L を各々導入した HSC3 細胞株を樹立し、導入遺伝子を Zn<sup>2+</sup>で誘導することにより各 p53 遺伝子の細胞内での転写調節能や細胞増殖に与える影響について検討した。

野生型 p53(pC53-SN3)、変異型 p53(pC53-175H,pC53-273L)から BamHI 消化により分離された各 p53cDNA を、Zn<sup>2+</sup>で発現を誘導出来るプロモーターを有する pSV2-HMT/Ter ベクターにクローニングし、pSV2-HMT/Ter-SN3,-175H,-273L を得た。p5031\*-anti-p53 は MMTV-LTR プロモーター下流に野生型 p53cDNA のアンチセンス DNA をクローニングして作製した。ヒト bax プローブは既知の塩基配列をもとに PCR 法にて増幅し作製した。p53,p21 プローブは各 cDNA プラスミド(pC53-SN3,pCDSR α Δ-Sdi1)より調製した。

2×10<sup>6</sup> 個の HSC3 細胞に、各 p53 クローン(pSV2-HMT/Ter-SN3,-175H,-273L) と p5031\*-anti-p53 とをリン酸カルシウム法にてコ・トランスフェクトし、G418(350 μg/ml)セレクションにて耐性コロニーを分離した(HSC3/SN3,HSC3/175H,HSC3/273L)。導入 p53 遺伝子の発現は Zn<sup>2+</sup>(150 μM)存在下でスクリーニングした。

40 μg の totalRNA を 6.7%ホルムアルデヒドゲルで電気泳動後、ナイロン膜に転写し、<sup>32</sup>Pでラベルしたプローブ(p53,p21,bax,β-actin)でハイブリダイゼーション後、オートラジオグラフィを行った。

Zn<sup>2+</sup>添加前と添加後 12 時間の各細胞株から抽出した蛋白(10 μg)を 10%PAGE で展開し、ニトロセルロース膜に転写し、一次抗体(PAb1801 あるいは DO-7)、二次抗体に反応させ化学発光法にてバンドを検出した。

親株及び樹立した各細胞株を、Zn<sup>2+</sup>添加(150 μM)下で培養すると、親株を除き、導入した各 p53 遺伝子は 6 時間後には誘導されており、24 時間後にも持続していることが確認された。

ウエスタン法にて親株以外の細胞株において p53 蛋白の誘導も確認された。また野生型 p53 の発現によってのみ p21 が誘導され、273L、175H の発現では p21 は誘導されなかった。bax の発現には、どの細胞株においても明らかな変化を認めなかった。ルシフェラーゼアッセイにより、野生型 p53 のみが p21 プロモーターを転写活性化し、273L 及び 175H ではこの機能を欠いていることが確認された。

これらの細胞株を 5%FBS, Zn<sup>2+</sup>(100 μM)下で培養すると、HSC3/SN3 の細胞増殖は親株に比べ抑制されたが、HSC3/273L の細胞増殖は親株と同等であった。しかし 0.1%FBS 下では、HSC3/175H の細胞増殖は親株に比べ促進されたのに対し、HSC3/273L では著しく抑制された。

FACS 解析の結果、5%FBS, Zn<sup>2+</sup>(100 μM)下では、HSC3/SN3 において day-6 における G1 分画の細胞数が day-0 に比べ 30%以上増加していた。親株、HSC3/175H、HSC3/273L では G1 分画の細胞数に変化は認められなかった。一方 0.1%FBS, Zn<sup>2+</sup>(100 μM)下では、親株において day-3 から sub-G1 分画の増加が確認されたが、HSC3/SN3、HSC3/175H では sub-G1 分画の増加は認められなかった。しかし、HSC3/273L では、day-3、5、7 と著しく sub-G1 分画が増加していくことが確認され、day-7 で親株の約 3 倍に達していた。アポトーシスによる DNA の断片化は HSC3/SN3、HSC3/175H では認められなかったのに対し、親株では day-5 から検出され始め、HSC3/273L では day-3 から著しく生じていることが確認された。

Zn<sup>2+</sup>で誘導可能な野生型 p53、変異型 p53 (-175H、-273L)を導入し樹立した HSC3 細胞株を用いて、変異型 p53-273L が、低血清条件下では p21 や bax を介さない機序で HSC3 細胞にアポトーシスを誘導し、細胞増殖を抑制し得ることを本研究において明らかにした。また、野生型 p53 による p21 の誘導はアポトーシスを抑制することも確認された。従って p53 遺伝子によるアポトーシス誘導には、配列特異的転写活性化を介さない経路が存在することがはじめて示された。さらに変異型 p53-273L は、実際にヒトの癌で見出される変異でありながらこの経路を活性化する働きを保持していると考えられた。

公開発表に際し、副査の吉木教授から、HSC3 細胞を実験に供した理由、HSC3 細胞でのアポトーシス誘導経路が他の癌細胞において存在する可能性、今回の in vitro の成果を in vivo(例えば SCID マウス)で確認したか、ヒトにおいてこの変異をもつことの予想される効果、配列特異的転写活性化を介さない経路でのアポトーシス誘導について具体的な実験施行の有無、アポトーシス誘導における p53 と p21 との関係、p53-273L によるアポトーシス誘導経路の解明にあたり、p21、bax 以外の他の因子の検討の必要性、などについて質問があった。副査の藤本教授からは、p53-273L が検出されるヒト癌の特徴とその癌の自然史、低血清濃度で細胞を培養したことの臨床的意義、亜鉛濃度(100 μM)を設定した根拠、DO-7 抗体を用いたウエスタン法で野生型 p53 蛋白のバンドが認められなかった理由、などについて質問があった。主査の長嶋教授からは、細胞株樹立時の回収クローン数とクローン間での p53-273L 誘導の差異、p21 の他にコドン 273 領域が転写活性化する因子、p53-273L が独自に活性化する因子の存在、p53 のリン酸化と p53-273L 変異との関連、273 コドンがロイシンに変化することによる p53 蛋白の立体構造への影響、などについて質問があった。これらの質問に対して、申請者は自身のこれまでの研究成績や文献的情報をもとに概ね妥当な回答をなした。

審査員一同は、p21 および bax の転写活性化によらない p53-273L によるアポトーシス誘導能を初めて示唆した本研究の成果を評価し、申請者が博士(医学)の学位を受けるのに資格を有するものと判定した。