



Title	優性阻害性p53変異体R248Qは口腔扁平上皮癌の運動浸潤能を増大させる [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	中澤, 誠多朗
Citation	北海道大学. 博士(歯学) 甲第11258号
Issue Date	2014-03-25
Doc URL	<a href="http://hdl.handle.net/2115/56193">http://hdl.handle.net/2115/56193</a>
Rights(URL)	<a href="http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/">http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/</a>
Type	theses (doctoral - abstract and summary of review)
Additional Information	There are other files related to this item in HUSCAP. Check the above URL.
File Information	Seitaro_Nakazawa_abstract.pdf (論文内容の要旨)



[Instructions for use](#)

# 学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士 (歯学) 氏名 中澤 誠 多 朗

## 学位論文題名

優性阻害性 p53 変異体 R248Q は口腔扁平上皮癌の運動浸潤能を増大させる

## 緒言

癌抑制遺伝子 TP53 は転写因子 p53 をコードしている。TP53 はヒト癌の約半数で変異が認められており、その変異の多くがホットスポットと呼ばれる DNA 結合領域に集中していることが知られている。これらホットスポットに変異をもった p53 は通常、野生型 p53 結合 DNA 配列への結合能力を失う。さらに、このタイプの変異型 p53 は野生型 p53 の機能を喪失させる。これは優性阻害性 (DN) 変異とよばれ、口腔扁平上皮癌を含む様々な癌の予後リスク因子のひとつになっている。さらに、最近、ホットスポットに変異を有する p53 の機能は、DN 効果による野生型 p53 の機能を阻害するだけではないことがわかってきた。大部分の癌では、p53 の片方のアレルに変異が生じる一方、ヘテロ接合性の喪失 (Loss of heterozygosity : LOH) により、対となるべき野生型 p53 アレルは欠失した状態にある。野生型 p53 が失われているにも関わらず、再発を上昇させるリスクファクターとなるのは、優性阻害性 p53 変異体が新規の機能を獲得 (gain-of-function : GOF) している可能性を示唆する。これまでに、p53 を発現していない非小細胞性肺癌 H1299 細胞の細胞浸潤能は Arg248 変異体 R248Q の導入

によって増強するが、R248W の導入では増強しないことが報告されている。本研究では R248 変異体, R248Q と R248W に着目し、これらの p53 変異体が口腔扁平上皮癌細胞に如何なる GOF を付与するのかを腫瘍細胞生物学的に解析した。

## 材料と方法

### 1. 細胞株

ヒト非小細胞性肺癌細胞株 H1299, ヒト口腔扁平上皮癌細胞株 SAS, Ca9-22, HSC4 を用いた。

### 2. 発現ベクターおよびレポーターベクター

野生型 p53 および p53R248Q 変異体の発現ベクターとして pTP53 : wt, pTP53R248Q および pTP53R248W を用いた。また、コントロールベクターには pIRES2-AcGFP1-p53 (1-83)を用いた。ホタルルシフェラーゼを有するレポーターベクターとして、p53-Luc, WWP-Luc, HDM2-Luc および pMO23 を、ウミシイタケルシフェラーゼの発現ベクターとして pRL-TK を用いた。

### 3. RNA interference (RNAi)

p53 mRNA を標的とする siRNA を作製した (sip53)。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

SAS, Ca9-22 および HSC4 細胞への遺伝子導入および siRNA の導入は Electroporation 法で行った。

### 5. Dual luciferase assay

24 ウェルプレートに播種した H1299, SAS 細胞に、1 ウェルあたり 0.1  $\mu$ g のホタルルシフェラーゼベクター (P53-Luc, WWP-Luc, HDM2-Luc または pMO23)

と 1ng の内部標準用ウミシイタケルシフェラーゼベクター(pRL-TK)を 1  $\mu$ g の p53 発現ベクターと共に Lipofectamine 2000 を用いて遺伝子導入し, その 24 時間後に細胞を回収してルシフェラーゼ発光反応を行い, 発光強度を測定した.

#### 6. ウェスタンブロット法

通常に従い細胞からタンパク質を抽出し, 10% 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 で室温 1 時間ブロッキングを行った後, 一次抗体 (抗 p53 抗体 DO-1), 二次抗体 (抗マウス IgG 抗体) の順で反応させ, 化学発光を行い撮影した.

#### 7. 細胞増殖アッセイ

各細胞を 1 ウェルあたり  $5 \times 10^2$  個 /  $100 \mu$ l を 96 ウェルプレートに播種した. 2, 3, 4, 5, 6 日後に Cell Counting Kit-8 を  $10 \mu$ l / ウェル添加し, 2 時間呈色反応を行った後に 450nm での吸光度を測定した.

#### 8. 金コロイド法による細胞運動アッセイ (Phagokinetic track assay)

Phagokinetic track assay は BSA をコートしたカバーガラス上に金溶液を滴下し, DMEM で洗浄後 2%FBS を含む DMEM を加えて細胞を播種し, 24 時間培養後に細胞毎に遊走した軌跡の面積を測定した.

#### 9. 細胞浸潤アッセイ

細胞浸潤アッセイは Transwell 8.0  $\mu$ m pore によって上室と下室に分けられた培養プレートを用い, 下室を I 型コラーゲンゲルで満たし, 上室に細胞を播種して 24 時間培養した後, Transwell を通過して I 型コラーゲンゲルへ浸潤した細胞数を計測した.

#### 10. 細胞接着アッセイ

細胞接着アッセイには Fibronectin, Laminin-1 およびコントロールとして Poly D-Lysine, BSA および Gelatin をコートした組織培養プレートを用いた. 各ウェルに血清を含まない DMEM を加え, SAS, Ca9-22 および HSC4 細胞を  $5 \times 10^5$  個播種し, 30 分, 90 分, 180 分および 360 分後に倒立顕微鏡を用いて細胞の形態変化を観察した.

## 11. 統計学的検定

統計学的検定として Tukey-Kramer の HSD 検定を有意水準  $p < 0.05$  の条件で行った.

## 結果と考察

本研究では, p53R248 変異体が口腔扁平上皮癌細胞に GOF を付与するのか否かを検討した. 劣性変異 E336X の p53 を有する舌癌由来細胞株 SAS に 2 種類の p53R248 変異体 R248Q あるいは R248W を強制発現させ, 各々の細胞の増殖, 浸潤, 運動, 接着能を解析した. その結果, R248Q を発現させた SAS 細胞でのみ細胞浸潤能の亢進を認め, 口腔扁平上皮癌においても H1299 細胞と同様に R248Q が悪性形質の獲得に関与していることが示された.

癌細胞の浸潤は, 転移成立過程のうち, とくに癌細胞が脈管内外へ移動する段階で重要であり, これは, 1) 細胞外基質への接着, 2) 細胞外基質の分解, 3) 癌細胞の運動, の3段階からなる現象である. そこで, p53R248Q 変異体が細胞運動および細胞接着能に及ぼす影響について調べた.

その結果, 細胞運動および接着能の増強は R248Q を発現させた SAS 細胞でのみ認められることがわかった. 一方, いずれの p53 変異体も細胞の増殖性には何ら影響を及ぼさなかった.

さらに、内在性に変異型 p53R248Q を発現している HSC4 細胞と、R248W を発現している Ca9-22 細胞の p53 の発現を抑制し、細胞の増殖、浸潤、運動および接着能の変化を調べた。その結果、SAS 細胞に p53 変異体を強制発現させた場合と同様の結果が得られた。すなわち、R248Q を発現する HSC4 細胞の浸潤、運動、接着性はその発現を抑制することによって有意に低下したが、R248W を発現する Ca9-22 細胞のそれらは p53 を抑制しても変化しなかった。増殖能は両細胞株ともに p53 の発現を抑制しても変わらなかった。

これら 3 株の OSCC 細胞を用いた実験結果は、p53R248Q 変異体がより高い浸潤性の獲得に関与していることを示している。さらに p53R248Q 変異体による浸潤性の増強は、細胞運動性および細胞外マトリックス成分に対する接着性の亢進に起因している可能性を示唆している。

本研究で浸潤能、運動能および細胞外基質接着能の亢進として見られた口腔扁平上皮癌細胞の GOF について、p53R248Q がこの機構でどのような役割を果たしているかについては明らかではない。その機序を考察する上で、p53R248Q が野生型 p53 とは異なる標的遺伝子の転写を活性化するか否かについてさらに検討を進める必要がある。また、本研究では同一コドンに生じた変異であっても R248Q と R248W の表現型が異なることも示された。これはそれぞれの変異体が結合可能な遺伝子のプロモーターの相違、あるいは複合体を形成できる転写因子の相違によって生じている可能性が考えられ、今後の検討課題である。

本研究では、p53 の変異のうちホットスポットである R248 の変異について、R248Q が口腔扁平上皮癌で浸潤能、運動能および細胞外基質接着能といった悪性形質の獲得に関与していることを示した。その機構については未だ不明であ

り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がるだけでなく、個々の癌の TP53 の変異について、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た。

## 結論

本研究により、優性阻害性p53変異体R248Qは、口腔扁平上皮癌細胞の浸潤、運動、接着能の増強に働くことがわかった。p53変異体R248Qによるこれら悪性形質の発現増強機構は現時点では不明であるが、細胞外基質と細胞接着分子との相互作用がひとつの重要な要因となっている可能性が示唆された。