

ヒト悪性胸膜中皮腫細胞の低酸素・低栄養下での増殖における野生型 p53 蛋白の役割

[1] 組織

代表者：濱田 淳一

(北海道大学遺伝子病制御研究所)

対応者：石岡 千加史

(東北大学加齢医学研究所)

分担者：

前田 浩次郎 (北海道大学遺伝子病制御研究所)

研究費：物件費 81,427 円, 旅費 46,240 円

その他 5,933 円

[2] 研究経過

ゲノムの守護神として知られる TP53 遺伝子は転写因子 p53 をコードしている。p53 は DNA 損傷を受けた細胞を細胞周期の停止やアポトーシスに導き、細胞のもつ遺伝子情報の保護に務める。この重要な機能を有する p53 の異常は、細胞のがん化に結びつく変化を引き起こす。事実、TP53 遺伝子の変異は、多くの種類のヒトがんにおいて高頻度に認められる。一方、最近では、このゲノム情報の保護機構のほか、p53 は解糖、酸化的リン酸化、アミノ酸代謝など、一連の細胞代謝過程に影響を及ぼすことが報告されるようになってきた。

我々はこれまでに、酵母を使ったヒト p53 の機能アッセイを利用して臨床材料ならびに細胞株の p53 の状態 (野生型・変異型) を解析してきた。その過程で悪性胸膜中皮腫細胞と悪性黒色腫細胞は、他の大多数のがん種と異なり、極めて p53 の変異が少ない、すなわちほとんどの細胞株が野生型 p53 を発現していることに気づいた。両がん種ともに悪性度の極めて高い腫瘍であることから、我々はこれらの腫瘍において野生型 p53 を発現していることが生存やがんとしてのふるまいに有利に働いているのではないかと仮説を立てた。本研究では、p53 の役割を解析しやすくするために、とくに低酸素あるいは低グルコース環境という細胞ストレス下でヒト悪性胸膜中皮腫 (MPM) 細胞を培養し、その動態を調べることにした。

MPM 細胞を低酸素 (1% O₂) あるいは低グルコース (100 mg/L) で培養し、対照群 (21% O₂ あるいは 1000 mg/L D-グルコース) との間で以下の *in vitro* 増殖能を比較検討した: doubling time, plating efficiency, 軟寒天培地での cloning efficiency および sphere 形成能。本研究の大部分は北大・遺伝子病制御研究所において濱田および前田が進めた。また、濱田は加齢医学研究所にて石岡先生と個々の実験データについての解釈、今後の研究の進め方および展望について話し合った。

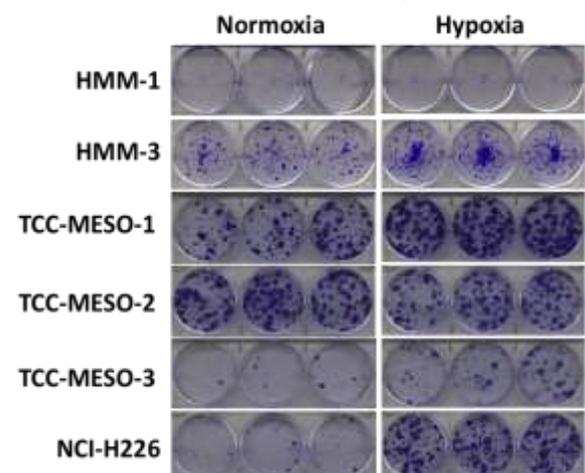
[3] 成果

(3-1) 研究成果

本年度は以下の研究成果を得た。

1. 低酸素環境下における MPM 細胞の増殖能：6 系の MPM 細胞株を低酸素あるいは常酸素下で培養し、それらの増殖能を比較した。その結果、二次元での増殖速度、飽和密度および形成された sphere の大きさは低酸素下で培養された場合に低下することがわかった。一方、plating efficiency および cloning efficiency は低酸素下で培養されたほとんどの細胞株で増強した (図)。

図 Plating efficiency



2. 低酸素環境下における p53 の発現

p53 の発現が低酸素環境に影響されるのか否かをウ

エスタンプロット法で解析したところ、6 系いずれの細胞株も低酸素下でその発現が低下することがわかった。

3. 低グルコース環境下における MPM 細胞の増殖能

MPM 細胞を低グルコース下で培養した場合、その増殖速度、飽和密度および **plating efficiency** は低下した。

4. p53 の発現抑制と増殖能

TP53 mRNA を標的とした short hairpin RNA (shRNA) を MPM 細胞内で発現させ、p53 の発現を抑制した。対照にはルシフェラーゼを標的とした shRNA (shLuc) を発現させた細胞を用いた。両者とも増殖速度および飽和密度は低酸素下で低下し、一方、**plating efficiency** は低酸素下で増強した。また、低グルコース下で培養した場合には、いずれの細胞も増殖速度、飽和密度および **plating efficiency** は低下した。shp53 と shLuc 導入細胞の増殖能を比較したところ、いずれの培養環境においても増殖速度および飽和密度には有意な差は認められなかったが、常酸素圧下で観察した **plating efficiency** は p53 抑制細胞において低下する傾向がみられた。

(3-2) 波及効果と発展性など

本共同研究を利用して野生型 p53 の oncogenic な機能というチャレンジングな研究に着手することができた。現在のところ、野生型 p53 の発現抑制が **plating efficiency** の低下につながるようなデータが得られているが、まだ確信のもてる段階には至っていない。今後、さらなる実験を積み重ね、悪性胸膜中皮腫細胞における野生型 p53 の役割を明らかにしていきたい。今後の展開によってはがん細胞における野生型 p53 の新たな腫瘍生物学的意義を見出せる可能性がある。

[4] 成果資料

平成 26 年度のがんとハイポキシア研究会において本研究の成果を発表する予定である。