

変異型 p53 による細胞浸潤能の増強とその機序解析

[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：

坂田 健一郎(北海道大学遺伝子病制御研究所)

研究費：物件費 131,260 円，旅費 48,740 円

[2] 研究経過

ゲノムの守護神と呼ばれる p53 は、DNA 損傷に応答して活性化され、がん抑制遺伝子として機能する。ヒトでは、p53 遺伝子の変異が様々な種類のがんでみられ、その頻度は全がんの約 50% である。p53 の変異は機能的に劣性変異と優性阻害性変異に大別できる。後者は野生型 p53 の機能を阻害するだけでなく、新たな機能を獲得する (gain-of-function, GOF) 場合も知られている。これまで我々はコドン 248 に変異をもつ 2 つの p53 蛋白、R248Q と R248W を、p53 をもたないがん細胞 NCI-H1299 に強制発現させ、それぞれの細胞の *in vitro* における悪性形質について調べてきた。その結果、R248Q は R248W とは異なり、NCI-H1299 細胞の浸潤能を増強させることがわかった。本プロジェクトは、R248Q による浸潤能の増強機序を明らかにすることを目的として行った。

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坂田が進めた。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、ならびに石岡先生が所有している臨床検体の cDNA アレイデータを使った解析の有用性について検討した。さらに、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、以下に示す研究成果を得た。

まず第 1 に、R248Q と R248W の GOF の質的相

違が NCI-H1299 細胞以外でも認められるのか否かを明らかにするために以下の実験を行った。劣性変異 p53-E336X をもつヒト口腔がん SAS 細胞に各変異 p53 を強制発現させ、浸潤能を解析した。その結果、R248Q を発現させた SAS 細胞 (SAS-R248Q) は、SAS 親株細胞や SAS-R248W 細胞に比べ有意に浸潤能が高く、口腔扁平上皮癌においても NCI-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。さらに、R248Q 強制発現による浸潤能の増強が細胞外マトリックスへの接着能、細胞外マトリックスの分解能あるいは細胞運動能のいずれの亢進に起因するのかを調べた。SAS-R248Q 細胞は他の細胞に比べ、フィブロネクチンなどの細胞外マトリックス成分に対する接着能ならびに運動能が高いことがわかった。これらのことから、p53 変異体 R248Q は細胞の接着能および運動能を亢進させることによって高い浸潤性を引き起こしていると考えられた。

つぎに、p53 変異体 R248Q の強制発現による浸潤能の増強に関わる遺伝子発現ネットワークを探るために、NCI-H1299 細胞に R248Q、R248W あるいはコントロールベクターを導入・発現させた細胞から mRNA を抽出し、cDNA アレイならびに miRNA アレイ解析を行った。R248Q 発現細胞と R248W 発現細胞の間で発現が 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、R248W 発現細胞に比べて、R248Q 発現細胞では MAPK 経路、Focal adhesion の介在する経路などがより高く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、R248Q 発現細胞と R248W 発現細胞との間で発現レベルに 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、これらの miRNA の発現を RT-qPCR 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進めている。

(3-2) 波及効果と発展性など

本共同研究は、変異 p53 のがん遺伝子としての役割とその変異の種類によるがん遺伝子としての質的な相違を明らかにした。このことは、p53 の変異の有無だけでなく変異の種類をも明らかにすることが、

がんの予後診断にも有用であることを示唆している。

[4] 成果資料

- (1) 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 第 23 回日本がん転移学会学術集会 (7 月 10・11 日、金沢)
- (2) Seitaro Nakazawa, Hisashi Iizasa, Shanshan Liang, Kazuhito 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. The 73rd Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (September 25-27, 2014, Yokohama)