

東北大学病院  
腫瘍内科講師  
医学博士  
加藤俊介  
  
安田勝洋  
坂本康寛

平成4年3月東北大学医学部卒業  
平成8年3月東北大学大学院  
医学研究科博士課程修了  
平成12年4月東北大学医学部附属病院  
・助手  
平成19年7月東北大学病院講師

## p53 機能修飾小分子が p53 ミスセンス変異体機能に与える影響

### はじめに

p53 蛋白質は、DNA 損傷刺激を受けると、細胞周期停止や DNA 修復反応を引き起こしてゲノムの恒常性を保つ方向に働くが、過大なストレスに対しては細胞死（アポトーシス）を引き起こし、遺伝的な異常細胞を排除する方向に働く<sup>1)</sup>。一方、p53 蛋白質およびその経路の機能異常は遺伝的不安定要素を引き起こす。p53 遺伝子の構造異常はヒト腫瘍の約半数で認められ、そのうちの75%は1アミノ酸置換を有するミスセンス変異体となる<sup>2),3)</sup>。また野生型の p53 を保持しているも、p53 蛋白質を量的制御している HDM2 の過剰発現などにより、その経路が破綻している腫瘍も少なくない<sup>4)</sup>。

一方、p53変異体については、NCI anticancer drug screening panel (60 cell panel) を用いた抗がん剤感受性試験では、白金系やアルキル化剤に対する感受性は野生型の方が高いが、Taxan系薬剤に対する感受性は変異型の方が高いと報告されている<sup>5)</sup>。

また、臨床においても、卵巣がん、乳がんでは p53 に変異がある場合、白金系薬剤よりも docetaxel の方が感受性は高いとの報告もある<sup>6),7)</sup>。

以上のことから、p53の機能の修飾は、がん治療における有力な分子標的であると考えられる。p53の機能修飾を起こすような小分子については、p53ミスセンス変異体の構造変化を引き起こして機能回復するとされるCP-31398<sup>8)</sup>、PRIMA-1<sup>9)</sup>、p53とHDM2との結合阻害によるp53蛋白質の安定性回復を引き起こすとされるNutlin<sup>10)</sup>、一方、放射線治療や抗がん剤による正常細胞の過大なp53応答刺激を抑制することで有害事象を防ぐPifithrin<sup>11)</sup>などが挙げられる。

一方、近年がん治療において第2の細胞死メカニズムであるオートファジーが注目されつつある。オートファジー阻害薬である3-Methyladenineは、PI3Kinaseの阻害を介してオートファジー阻害を引き起こすとされているが、p53もオートファジーに対して促進的に働くとの報告もあり、機能修飾分子の一つとして考えられる<sup>13)</sup>。

しかし、野生型、変異型p53に対するこれら小分子化合物の機能修飾についての詳細な分子メカニズムは未だに不明な点が多い。その原因の一つにはp53以外の遺伝的背景がそろっていないために、本来のp53に与える影響が不鮮明になっている点が挙げられる。

上記理由から、今回、これら小分子がp53変異体に与える影響について明らかにし、構造と機能との相関について解明するための糸口を得るために、p53<sup>-/-</sup>細胞であるヒトグリオーマ由来培養細胞SF126に、野生型p53、野生型p53よりもアポトーシス誘導能が強いsuper p53ミスセンス変異体S121F、細胞内局在に変化を与えるミスセンス変異体R306G、S121FとR306Gの二重変異体など、様々な機能を有する代表的なp53ミスセンス変異体を、テトラサイクリン存在下で安定的に発現させることができる細胞株の樹立を行い、これらp53機能修飾小分子化合物が与える分子生物学的および細胞生物学的な効果について解析を行った。

## 研究材料および研究方法

### (1) 培養細胞株

*TP53* 遺伝子の欠失が明らかなヒト悪性膠芽腫由来の SF126 細胞株を用いた。まず、以前われわれが構築した網羅的 p53 ミスセンスライブラリーより p53 ミスセンス変異 (p53MT) cDNA を単離し、pcDNA5/TO ベクター (Invitrogen 社) にサブクローニングして pcDNA5/TO-p53WT と pcDNA5/TO-p53MTs を作成した。p53 を発現しないコントロールベクターとして pcDNA5/TO を陰性コントロールに使用した。pcDNA5/TO-p53MTs にそれぞれのミスセンス変異が正しく導入されているかについてはシーケンスを行い DNA 塩基配列を確認した。

### (2) ドキシサイクリン誘導 p53 変異体発現株の作成

テトラサイクリン抑制遺伝子が恒常的に発現するベクター pcDNA6/TR (Invitrogen 社) を SF126 細胞にトランスフェクションし、blastcidin 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の薬剤耐性にて安定導入されたクローンを約 4 週間で選択した (SF126-TR clone1)。テトラサイクリン抑制遺伝子が安定に導入されたことは beta gal assay にて確認した。次に pcDNA5/TO-p53、pcDNA5/TON-p53MTs、pcDNA5/TON を制限酵素 *Sap* I で linear 化してからトランスフェクションし、hygromycin B 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  培地で選択し 4 週間でクローンを選択した。選択されたクローンについてドキシサイクリン 10ng/ml 存在下にてそれぞれの遺伝子が発現誘導されることをウェスタンブロッティング法にて確認した。

### (3) 免疫染色

クローン化された細胞を poly-D lysin でコートされたスライドガラス Lab-Tek chamber slide (Nunc 社) 上にて培養し、70% confluent となった時点で、最終濃度 10ng/ml となるようにドキシサイクリンを添加し p53 の発現を誘導した。24 時間後、細胞を PBS で洗浄し、次いでメタノール : アセトン (1:1) を加えて -20°C にて 20 分間保存した後、室温に戻して 10 分間乾燥させて固定した。固定された細胞を PBS-T (0.05% Tween 20 含有) で洗浄した後、5% スキンミルクを含む PBS-T を用いて室温で 1 時間ブロッキング操作を行った。再び PBS-T で洗浄した後、PBS-T にて 1/500 に希釈した FITC ラベルされた抗 p53 抗体 p53 (Do-1) FITC (Santa Cruze 社) を用い

て、室温で1時間反応させ免疫染色を行った。核染色を行う場合は50 $\mu$ g/mlのヨウ化プロピジウムを含有するPBS-Tを用いて、室温で30分間反応させた。上記反応を終えた後PBS-Tにて再度洗浄し、mounting bufferを加えてカバーガラスで密封した後、蛍光顕微鏡 (LSM5 PASCAL, Carl Zeiss 社)にて細胞の観察を行った。

#### (4) cell viability assay

4 $\times$ 10<sup>3</sup>cells/wellのp53発現抑制細胞株 (SF126 tet-p53WT, SF126 tet-p53MTs) もしくはコントロール細胞株 (SF126 tet-TON)を、96well-plate (35-3072, BD 社)で24時間培養後、10ng/mlのドキシサイクリンを添加 (p53発現状態)、または非添加 (p53未発現状態)、さらに各小分子化合物を添加、非添加し、0時間、24時間、48時間、72時間後のp53依存性細胞増殖抑制効果をCell Counting Kit-8 (Dojin Laboratories, Kumamoto, Japan)を用いて計測した。

各小分子に対するIC50を計測後、至適化し、Nutlinは最終濃度10 $\mu$ M、Pifithrin- $\mu$ は500 $\mu$ M、PRIMA-1は5 $\mu$ M、3-Methyladenineは6mMで実験を行った。

## 結果、考察

### 安定的発現株の樹立

樹立した各野生型あるいは変異型p53発現株がテトラサイクリンによりp53を安定的に発現することを確認するために、ドキシサイクリンを最終濃度10ng/mlになるように培地に添加し、24時間後にcell lysateを回収しウェスタンブロッティング法によりp53の発現を調べた。その結果、各クローンにおいてドキシサイクリン依存性p53発現誘導が観察された。さらにドキシサイクリン誘導p53発現株におけるp53タンパク質の細胞内局在を検討する目的で、各p53発現株を免疫染色し蛍光顕微鏡で観察した。

その結果、野生型p53とS121F発現株において、p53蛋白質は主として核内に局在し、R306G、S121F-R306G発現株においては主として細胞質局在を示した。この結果はR306G変異が野生型p53とS121Fの細胞質局在をもたらすことを示した (下図)。

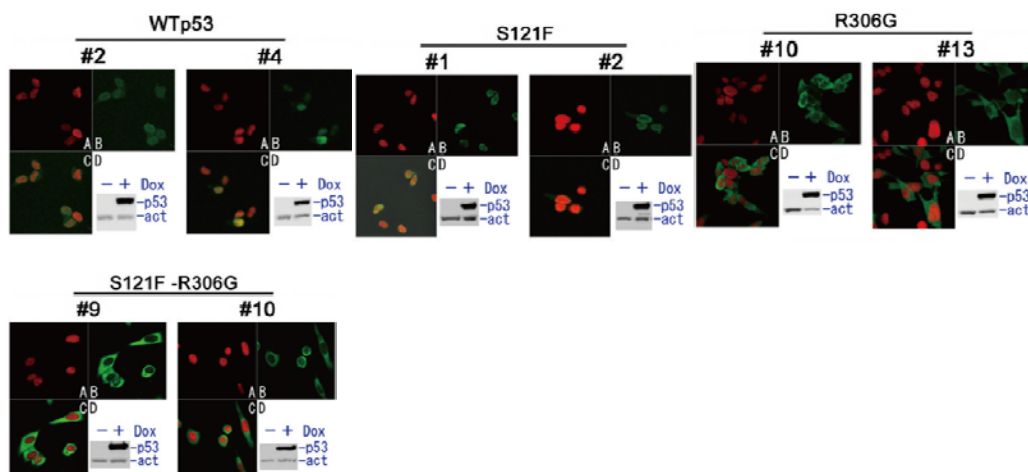


図1. 各野生型あるいは変異型p53発現株の細胞内局在の違い。R306Gの変異の導入によ

り細胞質に p53 が局在を示す。

## 感受性実験

### 1. Nutlin-3

Nutlin-3 は p53 と HDM2 との結合を阻害することにより、p53 の安定性を高め、p53 下流遺伝子の転写活性を上げると考えられる。野生型 p53 は Nutlin 存在下で、強い細胞増殖抑制能が認められた。一方、細胞死誘導能が野生型 p53 よりも強い S121F 変異体でも強い細胞増殖抑制効果が確認された。興味深いことに、細胞質に局在する R306G 変異体においても Nutlin-3 による細胞増殖抑制効果が見られた。以前われわれが行った出芽酵母による転写機能解析結果では、同変異体は転写機能を喪失しており、細胞質局在が転写機能喪失の理由として考えられていた。実際に免疫染色によって確認したところ、Nutlin-3 の有無にかかわらず、p53 蛋白質は細胞質に局在しており、Nutlin-3 の新たな作用メカニズムの存在が示唆された結果となった。

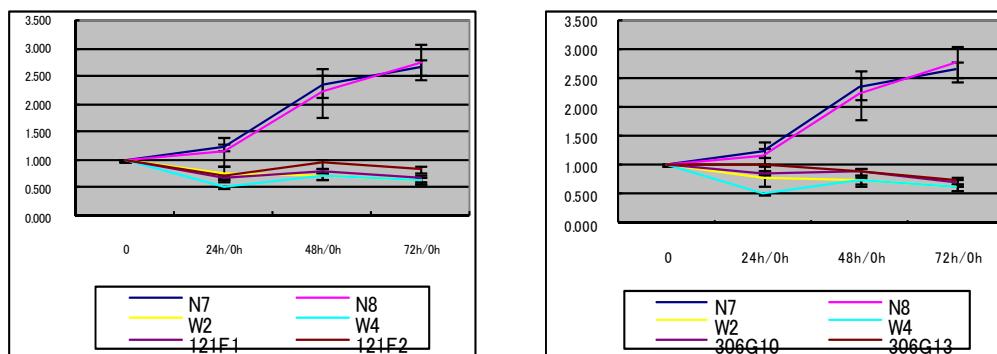


図 2. Nutlin-3 に対する各変異体の感受性試験。細胞質局在を示す 306G 変異体でも Nutlin-3 に対する感受性が保たれている (右図)。

### 2. Pifithrin- $\mu$

Pifithrin- $\mu$  は放射線治療や抗がん剤による正常細胞の過大な p53 応答刺激を抑制することで有害事象を防ぐとされている。その作用機序は p53 のミトコンドリアへの移行を阻害するところにあるとされている。Pifithrin- $\mu$  は既知の報告通り、野生型 p53 において増殖抑制効果をほぼ完全に阻害した。また、細胞死誘導能が野生型 p53 よりも強い S121F 変異体を発現させても、その増殖抑制効果をほぼ完全に阻害することが判明した。S121F 変異体の強力な細胞死誘導能についてはいまだ不明な点が多いが、Pifithrin- $\mu$  の効果が、野生型においても S121F 変異においても同様に働くことは、p53 野生型、S121F 変異体の細胞死や細胞増殖抑制効果に関わるメカニズムは共通な部分を有していることが強く示唆された。

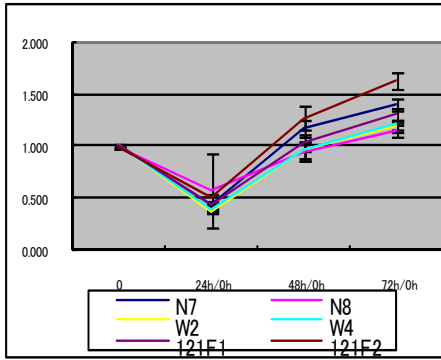


図3. Pifithrin- $\mu$  は野生型にも 121F にも細胞増殖抑制効果をほぼ完全に阻害する。

### 3. PRIMA-1

p53 ミスセンス変異体の構造変化を引き起こして機能回復するとされる PRIMA-1 は、野生型 p53 や S121F 変異体には細胞増殖抑制能に関して大きな変化を及ぼさなかった。また、細胞質局在型 p53 である R306G についてもその増殖抑制効果には大きな影響を及ぼさなかった。

### 4. 3-Methyladenine

オートファジー阻害剤である 3-Methyladenine は、野生型 p53 に対しては長期間の培養において細胞増殖能抑制能が解除されたが、S121F 変異体においては効果が見られなかった。

これは S121F が早期にすべてアポトーシスを起こし、オートファジーに至る事がないのに対して、野生型 p53 の細胞増殖抑制機能にはアポトーシスとオートファジーの両方が関与している可能性が考えられた。

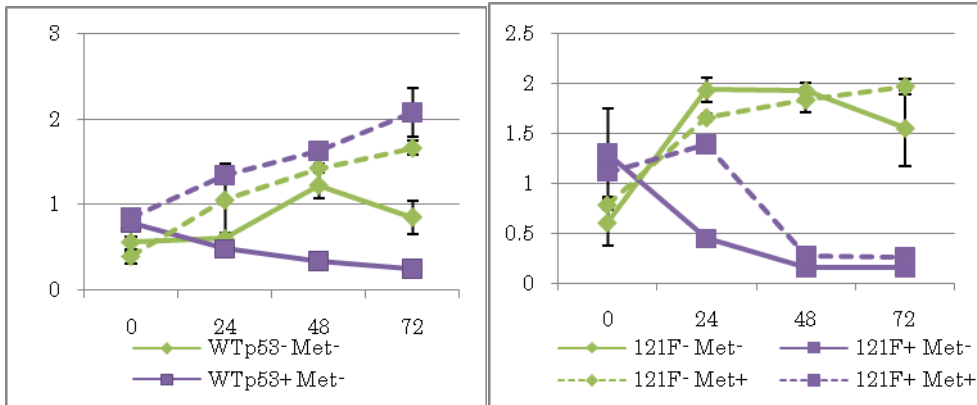


図4. 野生型 p53 は細胞飢餓状態において 3-Methyladenine を付加することにより細胞増殖が保たれるのに対して、S121F では細胞増殖抑制効果が見られる。

### 謝辞

本研究を遂行するにあたりまして、ご援助をいただきましたサッポロ生物科学振興財団に篤く御礼申し上げます。

## 文献

1. Harris SL, Levine AJ: The p53 pathway: positive and negative feedback loops. *Oncogene* 2005;24(17):2899-2908.
2. Hollstein M, Rice K, Greenblatt MS, et al: Database of p53 gene somatic mutations in human tumors and cell lines. *Nucleic Acids Res* 1994;22(17):3551-3555.
3. Soussi T: p53 alterations in human cancer: more questions than answers. *Oncogene* 2007;26(15):2145-2156.
4. Oliner JD, Kinzler KW, Meltzer PS, et al. Amplification of a gene encoding a p53-associated protein in human sarcomas. *Nature* 1992; 358: 80-83.
5. O'Connor PM, Jackman J, Bae I, et al: Characterization of the p53 tumor suppressor pathway in cell lines of the National Cancer Institute anticancer drug screen and correlations with the growth-inhibitory potency of 123 anticancer agents. *Cancer Res* 1997; 57: 4285-4300.
6. Kupryjanczyk J, Kraszewska E, Ziolkowska S, et al: TP53 status and taxane-platinum versus platinum-based therapy in ovarian cancer patients: A non-randomized retrospective study. *BMC Cancer* 2008; 8: 27.
7. Di Leo A, Tanner M, Desmedt C, et al. p-53 gene mutations as a predictive marker in a population of advanced breast cancer patients randomly treated with doxorubicin or docetaxel in the context of a phase III clinical trial. *Ann Oncol* 2007; 18: 997-1003.
8. Foster BA, Coffey HA, Morin MJ, et al. Pharmacological rescue of mutant p53 conformation and function. *Science*. 1999; 286: 2507-2510.
9. Bykov VJ, Issaeva N, Shilov A, et al. Restoration of the tumor suppressor function to mutant p53 by a low-molecular-weight compound. *Nat Med*. 2002; 8: 282-288.
10. Vassilev LT, Vu BT, Graves B, et al. In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2. *Science*. 2004; 303: 844-848.
11. Komarov PG, Komarova EA, Kondratov RV, et al. A chemical inhibitor of p53 that protects mice from the side effects of cancer therapy. *Science*. 1999; 285 :1733-1737.
12. Crighton D, Wilkinson S, O'Prey J, Syed N, Smith P, Harrison PR, Gasco M, Garrone O, Crook T, Ryan KM. DRAM, a p53-induced modulator of autophagy, is critical for apoptosis. *Cell*. 2006; 126, 121-134

