

【要約】

Role of p53mut in regulation of
three dimensional malignant formation
in breast cancer cells

(三次元培養を用いた乳癌悪性化に
関与する変異 p53 とコレステロール
合成経路の役割)

千葉大学大学院医学薬学府
先端医学薬学専攻

(主任：横手 幸太郎教授)

中山 哲俊

【目的】がん抑制遺伝子 p53 は多くの癌で変異や欠失がみられる。その中でも、変異 p53 は単純に癌抑制機能を失うだけではなく「gain of function」による新たな機能獲得により腫瘍の増殖および悪性化に関与することが明らかとなっている。しかし、その作用分子機序はいまだ十分に明らかとなっていない。一方で、コレステロール合成経路と癌の関わりについては、コレステロールが腫瘍形成を促進することや癌の死亡率を上げるなど、その関連性が報告されている。しかし、変異 p53 とこれらの関わりについては十分に明らかにはなっていない。そこで、変異 p53 による「gain of function」とコレステロール合成経路、特にメバロン酸合成経路に着目し、3次元培養を用いて変異 p53 が乳癌悪性形質に与える影響、及び変異 p53 とメバロン酸合成経路との関連について検討を行ったので報告する。

【方法・結果】 p53 が WT である乳がん細胞株 MCF7 と変異 p53(R280K)を持つ乳がん細胞株 MDA-231 を用い、3次元培養にて悪性度の指標となるコロニー形態像の割合を比較検討した。その結果、MDA-231 では MCF7 に比べ benign 型である lumen の減少と悪性形質である malignant 型の著明な増加が認められた。特に MDA-231 では malignant 型の中に poor-architecture を示すコロニー集塊を認めることが明らかとなった。そこで、p53, RB, GATA3 の single knockout(KO)、p53&RB, p53&GATA3 の double KO の MCF7 細胞と p53-KO MDA-231 細胞を CRISPR/CAS9 SYSTEM を用いて作成した。樹立した p53-KO MCF7 細胞を用い3次元培養にて変異 p53 の効果を検討した。その結果、単純な p53 の KO では、悪性と良性の中間形質である intermediate 型の著明な増加がみられたが、malignant 型の増加は見られなかった。しかし、p53-KO 細胞へ p53 変異遺伝子を導入すると、malignant 型の大幅な増加が確認された。次に、siRNA を用いて MDA-231 細胞における変異 p53 のサイレンシング効果を3次元培養にて確認した。変異 p53 サイレンシングでは malignant 型の著明な減少を認め、特に poor-architecture が消失した。この結果は変異 p53 が乳癌の悪性化コロニー形態に重要であることを裏付けている。次に、2大がん抑制経路のもう一方である RB, GATA3 についても同様にそれぞれの遺伝子を KO した MCF7 細胞を用い3次元培養にて検討した。その結果、RB-KO, GATA3-KO の両方で p53 と同様に lumen 型の減少と intermediate 型の著明な増加を認めた。しかし、malignant 型の変化は認めなかった。そこで、p53 と RB/GATA3 double KO の効果を確認した。興味深いことに、p53&RB, p53&GATA3 共に lumen 型の著明な減少と malignant 型の顕著な増加がみられた。これらのことから、p53 と RB, GATA3 はそれぞれ単独のノックアウトでは intermediate 型の形質を示し、両方のノックアウトにより悪性形質を呈することが明らかとなった。一方、変異 p53 は gain of function によって、単独で malignant 型を呈することも示された。しかし、この悪性形質発現の分子メカニズムは十分にわかっていない。そこで、次にそのメカニズムを明らかにする目的で悪性化形質とコレステロールとの関わりについて検討を行った。

コレステロールはメバロン酸合成経路により細胞内で合成されることが知られている。そこで、まずメバロン酸合成経路の律速酵素として知られる HMG-CoA 還元酵素の阻害剤である Simvastatin と下流の中間代謝物であるメバロン酸、FPP、GGPP、コレステロールを

添加し形態変化を評価することで、メバロン酸合成経路の乳がんの悪性化形態への寄与を検討した。3次元培養条件下において、MDA-231細胞に Simvastatin を添加すると malignant 型の著明な減少を認めた。更に、代謝産物であるメバロン酸、FPP、GGPP の添加により悪性形質の抑制効果が解除されることが明らかとなった。また、コレステロールの添加では、増殖抑制の回復が見られた。これらのことから、p53 変異株における3次元培養での悪性形質の形成にはメバロン酸合成経路、特に FPP、GGPP が必要で、増殖にはコレステロールが重要であることが確認された。そこで、次に培養条件と変異 p53 のメバロン酸合成酵素遺伝子に与える影響について検討を行った。まず、MCF7細胞を用い、2次元培養と3次元培養でのメバロン酸合成酵素遺伝子の遺伝子発現変化を qPCR にて確認した。その結果、3次元培養時に多くの遺伝子が優位に発現上昇していることが確認された。そこで、次に3次元培養時の変異 p53 の影響を検討した。その結果、変異 p53 の存在がメバロン酸合成酵素遺伝子に影響を与えることが確認され、特に FDPS、GGPS の発現に大きな影響を与えることが明らかとなった。この結果は、Simvastatin による検討結果とも一致している。そこで、この分子メカニズムを検討するため、メバロン酸合成酵素遺伝子の上流の転写制御因子である SREBP2 に着目した。SREBP2 は核内に移行することにより下流遺伝子の転写活性化を促進することが知られている。そこで、MDA-231細胞の3次元培養において SREBP2 の細胞内局在を確認したところ、lumen, intermediate, malignant 型と悪性度が上昇するにつれ、SREBP2 の核や核膜への集積が見られた。特に poor-architecture では核や核膜に強い集積を認めた。これらのことは SREBP2 の局在変化がメバロン酸合成経路の活性化をもたらす悪性度に寄与することを示唆している。そこで、SREBP2 をサイレンシングし、FPP、GGPP を加えた際の形態変化と遺伝子発現を確認した。これらは Simvastatin の結果と同様に、SREBP2 のサイレンシングにより malignant 型の減少がみられ、FPP、GGPP の添加により悪性形質の抑制効果が解除されることが明らかとなった。また、メバロン酸合成酵素遺伝子の発現を検討したところ、SREBP2 のサイレンシングによりメバロン酸合成酵素遺伝子の遺伝子発現は予想に一致して、大幅に低下していた。更に、脂質代謝産物である FPP、GGPP、コレステロールを添加しコロニーの悪性形質抑制を解除した状態においても、これらの遺伝子発現は抑制されたままであった。つまり、乳癌の3次元培養における悪性形質にはメバロン酸合成経路の代謝産物が必要で、その分子メカニズムとして SREBP2 を介したそれらの合成酵素の遺伝子発現制御の存在が明らかとなった。そこで、変異 p53 がこれらの遺伝子制御機構にどのように関与するのか検討を行った。

まず p53-KO MCF7細胞に p53 (WT、変異 p53^(R280K)) と SREBP2 を過剰発現させ免疫沈降/ウェスタンブロットにより両者の結合を確認した。その結果、p53 と SREBP2 の結合が確認された。また、MDA-231細胞を3次元培養した際の変異 p53 と SREBP2 の共局在を共焦点顕微鏡で解析した結果、変異 p53 と SREBP2 は核内で共局在していることが明らかとなった。

そこで、変異 p53 と SREBP2 が転写因子であることに着目しプロモーター領域への結合

状態を明らかにする目的でクロマチン免疫沈降法を行った。まず、コレステロール合成に重要である DHCR7 のプロモーター領域への結合を検討した。DHCR7 プロモーター領域は、2つの SRE(Sterol Regulatory Element)を有している。SREBP2 は2カ所の SRE をピークとした二相性の結果を示した。また、興味深いことに変異 p53 も同様の領域に二相性に結合することが明らかとなった。更に、現在までに報告のあるメバロン酸合成経路遺伝子の SRE サイトについても同様に検討を行ったところ、変異 p53 と SREBP2 は多くのメバロン酸合成経路遺伝子の SRE サイトに共結合していることが確認された。最後に GEO データベースを用い、実際の乳がん患者での検討を行った。その結果、メバロン酸合成経路関連遺伝子の高発現群では組織型悪性度が高くなることが分かった。また、 Kaplan-Meier を用い予後との関連を検討したところ、FDPS、GGPS、MVK では有意差を認めなかったが、DHCR7 高発現群で予後が有意に短縮することが明らかとなった。

【考察】3次元培養条件下では SREBP2 の核内移行が促進することが明らかとなった。核内移行した SREBP2 によりメバロン酸合成経路が活性化され、それらの関連遺伝子群の発現が上昇することが示された。その結果 FPP、GGPP、コレステロールが増加し、malignant 型の形態変化が起こると考えられる。また、このプロセスに変異 p53 の積極的関与があることが示された。そのメカニズムとして、メバロン酸合成経路遺伝子のプロモーター領域に SREBP2 と共結合し、SREBP2 による転写調節を制御していることが考えられる。実際に、乳がん患者における発現と臨床形質との関連解析においても、メバロン酸合成経路遺伝子が乳がんの悪性度や予後に重要であることが確認された。変異 p53 を持つ乳癌は予後が悪く治療抵抗性であることが報告されている。従って、これらの分子メカニズムをターゲットとした新たな抗がん剤の開発につながるものが今後期待される。