

氏 名	楊 力 春
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 2285 号
学位授与の日付	平 成 12 年 11 月 24 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	医 学 研 究 科 生 理 系 専 攻
学位論文題目	Trans-regulated Silencing and Reactivation of <i>TP53</i> Tumor Suppressor Gene in Malignant Transformation and Its Reversion (悪性形質転換とその復帰における <i>TP53</i> 癌抑制遺伝子の発現抑制ならびに再活性化のトランス制御)
論文調査委員	(主 査) 教 授 丹 羽 太 貫 教 授 藤 堂 剛 教 授 武 田 俊 一

論 文 内 容 の 要 旨

がん抑制遺伝子 *TP53* は腫瘍発生に関わる重要な調節因子であり、ヒトがんの約半数で機能喪失型の突然変異がみられる。しかし、残りの半数では突然変異が認められないことから別の機構による不活性化が考えられていた。実際に、*RBI*, *p16*, *MLH1*, *VHL*, *NF1*, *BRCA1* などのがん抑制遺伝子ではメチル化による遺伝子発現の不活性化の存在が明らかになりつつあるが、*TP53* に関してはこのような例はまだ報告されていない。そこで、*TP53* の機能と発がんとの関わりを明らかにする目的で、マウス培養細胞系を用い、悪性形質転換とその復帰変異における *TP53* 遺伝子の発現を検討した結果、*TP53* のメチル化による可逆的発現制御が悪性形質獲得に関係していることが明らかとなった。

実験に用いた m5S 細胞は、マウス胚皮膚から樹立された近 2 倍性の不死化細胞株で、基質依存性増殖、接触阻止能など正常細胞の形質を示し、造腫瘍性を持たない。この細胞に X 線を照射すると線量依存的に悪性形質転換細胞（悪性トランスフォーマント）が得られる。このようにして得られた悪性トランスフォーマント TR6110, TR2520, TR2531 は、軟寒天中で増殖し、ヌードマウスに対して強い造腫瘍性を示す。しかし、親細胞である m5S 細胞および悪性トランスフォーマント共に野生型の *TP53* を持つ。これらの細胞に X 線を照射し、照射後の p53 蛋白質の発現をウェスタンブロット法で調べた。m5s 細胞では未照射でも p53 は高レベルで発現しているが、照射直後に一過性に減少し、時間経過と共に再び上昇する。p53 で転写活性化を受ける p21 の発現は、未照射 m5S 細胞では見られず、発現量は照射後徐々に増加した。これは、未照射 m5S 細胞で発現している p53 は不活性型であり、X 線照射によって活性化した p53 が p21 の転写を促進したことによると考えられる。一方、TR6110, TR2520, TR2531 の悪性トランスフォーマントでは p53 の発現は検出できないか、或いは極めて微弱であり、X 線照射によっても発現が誘導できない。

悪性トランスフォーマントにおける *TP53* の不活性化の機構を解明するため、微小核融合法による染色体移入実験を行った。悪性トランスフォーマント TR6110 に 1 番, 2 番, 7 番, 11 番, 12 番, 17 番および 20 番ヒト染色体を移入したところ、11 番染色体を移入したクローン TR6110 (neo-11) のみが親株 m5S と類似した正常形態に復帰し、接触阻止能、軟寒天中コロニー形成能の消失、p53 の発現などがみられるようになった。ヒト 11 番染色体移入による同様な復帰変異は TR2520, TR2531 においても認められた。次に、復帰変異細胞 TR6110 (neo-11) に X 線照射を行うと、再び線量依存的に悪性トランスフォーマントが誘発された。このようにして得られた再トランスフォーマントはヒト 11 番染色体を保持したまま、TR6110 と類似した悪性形質を示し、p53 の発現も消失した。この再トランスフォーマントからヒト 11 番染色体を分離して TR6110 に再移入すると、細胞は再びフラットな形態を示し、軟寒天中での増殖能を失い、p53 の発現も回復した。また、TR6110, TR2520, TR2531 を脱メチル化剤である 5-aza-deoxycytidine で処理すると、処理した細胞は親細胞 m5S に類似のフラットな形態に復帰し、p53 の発現も回復した。

以上の結果から、マウス m5S 培養細胞系における悪性形質獲得にはメチル化を介した *TP53* の可逆的転写抑制の機構が存在し、しかもその発現のスイッチ機構はトランスに制御されていることが示唆される。

論文審査の結果の要旨

本研究は、細胞が悪性形質を獲得する過程に *TP53* 癌抑制遺伝子のメチル化による可逆的な発現抑制の機構が存在することを明らかにしたものである。マウス胚由来の培養細胞系を用い、X線照射によって誘発された悪性転換細胞の中には正常 *TP53* 遺伝子を持ちながらその発現が見られないものがあることを見いだした。メチル化阻害剤で発現が回復することから、この発現抑制は遺伝子のメチル化によることを示す。また、この悪性転換細胞にヒト11番染色体を導入すると *TP53* 遺伝子の発現が回復するとともに細胞は正常形質に復帰する。さらに、この復帰細胞はX線照射によって再び悪性転換することができるが、その悪性転換細胞の持つヒト11番染色体は他の悪性転換細胞に再導入すると細胞を正常形質に復帰させ、*TP53* 遺伝子を活性化させる能力を保存していることが判明した。この事実は、*TP53* 遺伝子の可逆的発現抑制が細胞の可逆的悪性形質と対応しており、その発現制御には遺伝子発現の状態に逆制御されるメチル化のスイッチ機構が存在することを示す。

以上の研究は、発癌における遺伝子制御の機序の解明に貢献し、癌研究の発展に寄与するところが多い。

したがって、本論文は、博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成12年10月10日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。