



p53 Controls Proliferation of Early B Lineage Cells by a p21 (WAF1/CIP1)-Independent Pathway

胡, 麗娜

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1996-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲1461

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1001461>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏名・（本籍）	胡麗娜（中華人民共和国）
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学位記番号	博い第993号
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位授与の日付	平成8年3月31日
学位論文題目	p53 Controls Proliferation of Early B Lineage Cells by p21 (WAF1/CIP1)-Independent Pathway (B細胞初期分化増殖におけるp21 (WAF1/CIP1) 非依存性p53の制御機能の解析)
審査委員	主査 教授 松尾雅文 教授 千原和夫 教授 堀田博

論文内容の要旨

「緒言」

p53遺伝子は多くの癌細胞でその欠失および点突然変異によって機能が失われていることから、腫瘍抑制遺伝子であると考えられている。実際に、p53を欠損したマウスではいくつかの組織における細胞増殖の亢進に伴い、悪性リンパ腫を含む腫瘍の発生が明らかにされている。

最近の研究によると、p53蛋白は転写因子として他の遺伝子の転写を制御することによって細胞分化増殖やDNA修復などにかかわっていることが明らかにされてきている。特にDNA damageなどにより誘導されたp53がp21 (WAF1/CIP1) 構造遺伝子上流にあるp53-binding siteに結合し、p21の転写を促進することが明らかにされた。このp21は細胞周期を制御するサイクリン依存性キナーゼ (CdK) の活性を阻害する機能を持ち、細胞周期のG1期において細胞増殖を停止させることが示された。したがって、p53はp21遺伝子の発現を介して細胞増殖を抑制することによりDNA修復反応にかかわっていると考えられた。

上記の結果は免疫グロブリン遺伝子の再構成を伴う初期B細胞分化増殖過程においても、再構成した遺伝子の修復などにおいてp53がp21を介して関与している可能性を示唆している。実際に正常マウスのB細胞初期分化増殖過程においてもp53の発現が見られた。そこで本研究ではこのp53のB細胞初期分化増殖における役割を明らかにすることを目的として、p53の欠如したノックアウトマウス (p53^{-/-}) を用いてそのB細胞初期分化増殖と細胞増殖能をp21の発現とからめて検討した。

「材料および方法」

1) マウス胎仔肝細胞培養

p53 wild-type (p53^{+/+}) .heterozygous (p53^{+/-}) .homozygousノックアウト (p53^{-/-}) マウス由来の妊娠15日目の胎仔肝細胞をPA6ストローマ細胞の上でIL-7 (10U/ml) とともに11日間培養した。経時的に培養細胞を回収し、B細胞表面抗原であるB220およびIgMに対する蛍光モノクローナル抗体で二重染色し、幼若B細胞からB細胞への分化過程をフローサイトメトリーを用いて解

析した。

2) DNA合成能の測定

p53 (+/+), (+/-), (-/-) マウス由来の妊娠19日目の胎仔肝細胞を種々の濃度のIL-7 (0-80U/ml) とともに4日間培養したのち、³H-thymidineを添加培養し6時間後にその取り込み率により細胞の増殖能を検討した。

3) Northern blotting法によるp53およびp21mRNAの測定

胎仔肝細胞および胎仔肝細胞培養系由来の幼若B細胞より粗RNAをグアニジン法により抽出し、その中のp53とp21mRNA量をNorthern blotting法により測定した。

「結果」

1) p53 (-/-) マウスにおけるIL-7依存性の胎仔肝細胞増殖の亢進

p53 (+/+), (+/-), (-/-) マウス由来の妊娠19日目の胎仔肝細胞を様々な濃度のIL-7とともに4日間培養し、Thymidine uptakeによりDNA合成能を測定した。p53 (-/-) マウスではIL-7のいずれの濃度でも細胞の増殖がp53 (+/+) やp53 (+/-) マウスより著しく高まり、最大で30倍もの差を示した。

次いでこのp53欠如によるIL-7依存性の幼若B細胞増殖の亢進とともに、その初期分化の亢進が見られるかどうかを、妊娠15日目の胎仔肝細胞をPA6ストローマ細胞の上でIL-7とともに11日間培養し、培養経過中のB細胞の分化段階をB220とIgMをマーカーとしてFACSで分析することにより調べた。その結果、p53 (+/+), (+/-), (-/-) マウスいずれにおいても妊娠15日目の胎仔肝細胞にはB220陽性B細胞がほとんど存在していなかった。IL-7で刺激してから、4, 7, 11日目のB220陽性幼若B細胞群の出現頻度はそれぞれのグループにおいて差が見られなかった。B220/IgM陽性のB細胞群ではp53 (-/-) の方が細胞数は多かったがその分化する時期には大きな差は認められなかった。また、幼若B細胞の細胞数に関しては、p53 (-/-) マウスにおいて非常に多いことが見られた。したがって、p53がB細胞の初期分化増殖過程において分化よりもその増殖において重要な役割を果たしていることが示唆された。

2) 幼若B細胞におけるp53非依存性のp21mRNA発現の誘導

妊娠15日目の胎仔肝細胞をストローマ細胞上でIL-7とともに8日間培養した後、分化して来た幼若B細胞におけるp53とp21mRNAの発現をNorthern blottingにより検討した。p53mRNAの発現はp53 (+/+) マウス由来の15日目の胎仔肝細胞と幼若B細胞の両者において高く、p53 (-/-) マウスでは認められなかった。p21の発現に関しては、p53 (+/+) マウスにおいて妊娠15日目の胎仔肝細胞でp53mRNAの発現が高いにもかかわらず、認められなかった。しかし、幼若B細胞においてはp21の発現が見られた。このp21の発現はp53 (-/-) マウス由来の幼若B細胞においても見られ、その量はp53 (+/+) マウス由来の幼若Bでの発現レベルと同様であった。これは幼若B細胞におけるp21の発現がp53非依存性によるものであることを示唆している。また、p53 (-/-) マウス由来の幼若B細胞では、p21の発現が見られるのにその細胞増殖が亢進したことから、p53はp21以外の細胞増殖抑制因子を誘導することにより幼若B細胞の増殖を制御していることが示唆された。

「考察」

p53は幼若B細胞の増殖にも深いかわりをもつ遺伝子であることが明らかにされた。すなわちp53ノックアウトマウスにおいては、幼若B細胞を含む胎仔肝細胞のIL-7に対する増殖反応が著明に亢

進したり、IL-7を用いた胎仔肝細胞培養においても幼若B細胞の増殖亢進が見られた。したがって、p53が幼若B細胞の増殖を制御していることが明らかになった。

これまでp53が細胞増殖を抑制する機能に関しては、p21を介して、細胞増殖を負に制御することが知られていた。ところが、今回の結果ではp53（-/-）マウスにおけるB細胞初期分化増殖過程において、正常p53が欠けている幼若B細胞にもp21の発現が認められたことから、p53がp21を介さずにB細胞の初期分化増殖を調節していると考えられた。このp53の細胞増殖抑制機能におけるp21非依存性の経路の存在はMichieliらの実験によっても線維芽細胞系でも証明されている。すなわちp53遺伝子が完全に欠損した細胞であるにもかかわらず血清刺激やある種の増殖因子に反応してp21の発現が見られたにもかかわらず増殖反応の亢進が見られている。これらの事実はp21以外にp53によりその発現が誘導される細胞増殖抑制因子があることを示唆している。また、このp53非依存性なp21発現誘導のメカニズムや生理的意義についてはさらなる解析が望まれる。

「結語」

以上の実験により以下のことが判明した。

1) IL-7に対する幼若B細胞の増殖能がp53の不活性により著しく増大したことから、p53が幼若B細胞の増殖を負に制御していることが明らかになった。

2) B細胞初期分化増殖においてp53がp21を介さない経路でその増殖抑制機能を発揮していることから、p21以外にも重要なp53の標的遺伝子が存在することが示唆された。

論文審査の結果の要旨

がん抑制遺伝子であるp53遺伝子は、種々の遺伝子の転写を制御することによって細胞の分化増殖やDNA複製、修復などにかかわっている。特に最近、p53は細胞周期を制御するサイクリン依存性キナーゼの活性を阻害する機能をもつp21（WAF1/CIP1）遺伝子の転写を促進することにより、細胞増殖反応をその細胞周期のG1期において停止させることが示された。免疫グロブリン遺伝子の再構成を伴う幼若B細胞分化増殖過程においても、再構成した遺伝子の修復などにおいてp53が関与する可能性が示唆されている。実際に正常マウスの幼若B細胞分化増殖過程においても、p53の発現が見られている。本研究はこのp53の幼若B細胞分化増殖における役割を明らかにすることを目的として、p53の欠如したマウス由来の幼若B細胞の分化増殖能をp21の発現とからめて検討したものである。

方法はp53ノックアウトマウス由来の妊娠15日目の胎仔肝細胞をPA6ストローマ細胞の上でIL-7とともに培養した。経時的に培養細胞を回収し、B細胞表面抗原であるB220およびIgMに対する蛍光モノクローナル抗体で二重染色し、pro-B細胞からB細胞への分化過程をフローサイトメトリーを用いて解析した。また、胎仔肝細胞および培養幼若B細胞より粗RNAをグアニジン法により抽出し、その中のp53とp21mRNA量をNorthern blotting法により測定した。

その結果、p53ノックアウトマウス由来の胎仔肝細胞を様々な濃度のIL-7とともに4日間培養し、Tymidine uptakeによりDNA合成能を測定したところ、p53ノックアウトマウスではIL-7のいずれの濃度でも幼若B細胞の増殖がコントロールマウスより著しく高まり、最大で30倍もの差を示した。この結果から、p53は正常幼若B細胞の増殖反応を抑制していることが明らかにされた。

次いでp53の幼若B細胞分化における機能を明らかにする目的で、p53ノックアウトマウス由来の胎仔肝細胞をPA6ストローマ細胞の上でIL-7とともに培養し、その間の幼若B細胞の分化をB220とIg

Mの発現を示標としてフローサイトメーターにより分析した。その結果、p53ノックアウトマウスとコントロールマウスでは幼若B細胞の分化過程に差が見られなかったことから、p53は幼若B細胞の分化よりもその増殖において重要な役割を果たしていることが示唆された。

さらに、この増殖過程におけるp53とp21mRNAの発現をNorthern blotting法により検討した。その結果p53ノックアウトマウスではp53mRNAの発現が認められなかったにもかかわらず、p21の発現がコントロールマウスでの発現レベルと同様に見られた。このことから、幼若B細胞においてもp21の発現が見られること、さらにこのp21の発現はp53非依存性であることが明らかにされた。また、p53ノックアウトマウス由来の幼若B細胞では、p21の発現が見られるにもかかわらず、その細胞増殖が増強していたことから、p53はp21以外の細胞増殖抑制遺伝子の発現を誘導することにより、幼若B細胞の増殖を抑制していることが示唆された。このp53の細胞増殖抑制機能におけるp21非依存性の経路の存在はMichieliらによっても線維芽細胞系で証明されている。

以上の結果から、本研究は、幼若B細胞の分化増殖過程におけるp53の機能について解析した研究であるが、p53がp21を介さない経路でその増殖抑制機能を発揮していることから、p21以外にも重要なp53の標的遺伝子が存在することを明らかにしたものであり、幼若B細胞の分化増殖機序について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって本研究者は博士（医学）の学位を得る資格があると認める。