



p21(WAF1/Cip1/Sdi1/Pic1)mRNA is expressed in neuroblastoma cell lines but not in Ewing's sarcoma and primitive neuroectodermal tumor cell lines

前田, 太郎

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1998-03-20

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙2231

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2002231>

※ 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） まえ だ た ろう 前 田 太 郎 （愛媛県）

博士の専攻
分野の名称 博士（医学）

学位記番号 博ろ第1632号

学位授与の要件 学位規則第4条第2項該当

学位授与の日付 平成10年3月20日

学位論文題目 p21（WAF1/Cip1/Sdi1/Pic1） mRNA is expressed in neuroblastoma cell lines but not in Ewing's sarcoma and primitive neuroectodermal tumor cell lines
（神経芽細胞腫では発現しているがユーイング肉腫やPNETでは現していないp21（WAF1/Cip1/Sdi1/Pic1） mRNA）

審査委員 主査 教授 中 村 肇
教授 前 田 盛 教授 熊 谷 俊 一

論文内容の要旨

I. 序 文

WAF1は人の脳腫瘍の細胞より同定され、その塩基配列はCip1, Sdi1及びPic1と一致した。p21タンパクはWAF1の遺伝子産物でありサイクリン-Cdk複合体の活性を抑制する。p21の遺伝子領域の上流にはp53結合領域が2箇所みつかっており癌抑制タンパクであるp53は、p21の発現を介して細胞増殖を抑制すると考えられている。

p53は大腸癌、肺癌、乳癌などの殆どの成人の癌種で異常が報告されている。一方、神経芽細胞腫は小児の主要な癌であり神経提由来の腫瘍である、p53の異常が無かったと報告されている。しかし、同じ神経提由来の腫瘍であるユーイング肉腫及びPNET（primitive neuroectodermal tumor）ではp53の異常が報告されてる。

この研究の目的はp53のシグナル伝達系の下流を神経提由来の腫瘍で比較することによりこれらの小児癌の発癌機序の特徴について検討することにある。

II. 方 法

A. 細胞系

使用した腫瘍細胞は以下の通りである。

1. 神経芽細胞腫の細胞株として

NB9, NB16, NB69, SMS-MSN, SMS-KAN, SK-N-SH-EP1, SK-N-SH-SY, GOTO

2. PNETの細胞株として

SK-N-MC-IXC及びKU-SN

3. ユーイング肉腫の細胞株として

RD-ES及びSK-ES-1

を使用した。

細胞培養は10%牛胎児血清を含むDMEM培養液にて5%CO₂中、37度C下におこなった。

B. p21及びp53のノザンプロット分析

培養細胞より全RNAを採取し非特異的反応を避けるためp21及びp53のcDNAの非翻訳領域をプローブとして行った

C. 神経芽細胞腫、ユーイング肉腫及びPNETの細胞株におけるp53cDNAの塩基配列分析

採取したRNAより逆転写酵素をつかってcDNAを作成し3箇所に分けPCR法により増幅したDNAを大腸菌pGEM-3zf (+) にサブクローニングしApplied Biosystems社のModel373Aのシーケンサーにより塩基配列分析を行った。

III. 結 果

A. p21及びp53のノザンプロット分析

p53mRNAは神経芽細胞腫、ユーイング肉腫及びPNETの全ての細胞株で発現が認められた。一方、p21mRNAは8種類の神経芽細胞腫の細胞株のうち6種類の細胞株 (NB9, NB16, SMS-MSN, SMS-KAN, SK-N-SH-EP1, GOTO) で発現が認められた。ユーイング肉腫及びPNETの細胞株ではp21 mRNAの発現は認められなかった。

B. p53cDNAの塩基配列分析

調べたすべての種類の細胞株にp53cDNAのコドン72においてCCCからCGCへのpoint mutationをみとめた。SMS-MSNのコドン52においてCAAからCAGへのsilent mutationを認めた。またSK-N-MC-IXCではコドン71からコドン120に欠失が認められた。ユーイング肉腫の細胞株のRD-ES及びSK-ES-1ではコドン273にCGTからTGTへのpoint mutationがありこれは神経芽細胞腫の細胞株であるSK-N-SH-EP1にも認められた。

IV. 考 察

p53は癌抑制遺伝子でありその遺伝子の変異は成人の種々の悪性腫瘍で高頻度に認められる。このためp53は癌化機構において重要な役割をしていると考えられている。しかし、最近の研究によれば神経芽細胞腫の原発巣ではp53の変異はないと報告されている。また神経芽細胞腫ではp53タンパクが高レベルに発現されていると言う報告もある。これらの事実から我々は、神経芽細胞腫のp53の癌抑制系の下流にあるp21mRNAの発現を調べ非常によく似た腫瘍であるユーイング肉腫及びPNETと比較した。

p21mRNAは8種類の神経芽細胞腫の細胞株のうち6種類の細胞株で発現が認められたが、発現している細胞株としていない株との特徴的違いはなかった。

調べたすべての種類の細胞株にp53cDNAののコドン72においてCCCからCGCへのpoint mutationをみとめたが、これは神経提由来の腫瘍の特徴かもしれない。しかし、この変異には癌化能は無いため、これらの腫瘍の癌化機構とは関係はないだろうと考えている。SK-N-MC-IXC, RD-ES及びSK-ES-1はp53cDNAの変異を有するためにp21mRNAの発現が見られないのであろうが、NB69, SK-N-SH-SY5Y及びKU-SNではp53cDNAの変異を認めず説明がつかない。SV40のLargeT抗原やアデノウイルスのE1B,あるいは発癌タンパクのmdm2などはp53と結合し細胞を癌化させることが知られているが、同様な機序が働いているのかもしれない。

SK-N-SH-EP1はユーイング肉腫の細胞株が有するのと同じp53の変移を有していたがp21mRNAの発現が見られた。神経芽細胞腫ではp53に因らない別の系でp21を発現しているのかもしれない。

この研究の興味深い点は、細胞周期の進行を抑制するp21のmRNAが神経芽細胞腫では発現してい

ると言う事実である。神経芽細胞腫はどうやってp21の細胞周期の抑制から逃れているのだろうか？非常に強い細胞増殖のシグナルがあるのであろうか。あるいは、p21に変異があるのであろうか。我々は抗p21抗体を用いて2種類の神経芽細胞腫（GOTO, SMS-KAN）でウェスタンブロット分析をおこなったがいずれの細胞株でもp21タンパクは認められなかった。理由は不明であるが、神経芽細胞腫ではp21mRNAはタンパクに翻訳されていないのかもしれない。

V. 結 論

他の神経提由来の腫瘍と違って神経芽細胞腫ではp21のmRNAの発現は保存されている。しかしながら、神経芽細胞腫におけるp21のmRNAの発現はp53抑制系と違う別の機序で制御されているかもしれない。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

p53は大腸癌、肺癌、乳癌などの成人の癌種で異常が報告されている。一方、小児の主要な癌である神経芽細胞腫ではp53の異常がないとされているが、同じ神経提由来の腫瘍であるユーイング肉腫及びprimitive neuroectodermal tumor (PNET) ではp53の異常が報告されてる。p21の遺伝子領域の上流にはp53結合領域が2箇所あることから、癌抑制タンパクであるp53はp21の発現を介して細胞増殖を抑制すると考えられている。

本申請者は、異なる二つの神経提由来の腫瘍でp53のシグナル伝達系の下流を比較することにより、小児癌の発癌機序の特徴を明らかにしようと試みた。

使用した腫瘍細胞は、神経芽細胞腫の細胞株として8種類、PNETの細胞株として2種類、ユーイング肉腫の細胞株として2種類を使用している。各細胞について、p21およびp53のノザンブロット分析、および採取したRNAより逆転写酵素をつかってcDNAを作成し、p53cDNAの塩基配列分析を行っている。

p53mRNAは、神経芽細胞腫、ユーイング肉腫及びPNETの全て細胞株で発現している。一方、p21mRNAは8種類の神経芽細胞腫の細胞株で発現を認め、ユーイング肉腫及びPNETの細胞株ではp21mRNAの発現を認めていない。p53cDNAの塩基配列分析では、すべての種類の細胞株にコドン72におけるCCCからCGCへのpoint mutationを認めている。これ以外の異常として、神経芽細胞腫、ユーイング肉腫の細胞株に共通するもの、神経芽細胞腫のいくつかにのみ認められるもの等があった。神経芽細胞腫SK-N-SH-EP1株ではユーイング肉腫の細胞株が有するのと同じp53の変異を有していたが、p21mRNAの発現をみており、神経芽細胞腫では、p53に因らない別の系によるp21の発現も考えられるという。

本研究は、神経提由来の小児腫瘍である神経芽細胞腫とユーイング肉腫及びprimitive neuroectodermal tumor (PNET) でp53とp21のmRNAの発現、並びにp53cDNAの塩基配列解析を行い、異なる二つの神経提由来の腫瘍でp53のシグナル伝達系の違いをはじめて明らかにしたもので、小児癌の発癌機序解明の上で重要な知見を得たものとして価値ある業績である。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。