

平成10年度厚生科学研究費補助金
(厚生科学特別研究事業)

研究報告書

細胞周期制御蛋白の調節によるヒト造血幹細胞制御技術の開発に関する研究

主任研究者 浅田 穰

分担研究者 山田 孝之

国立小児医療研究センター

細胞周期制御蛋白の調節によるヒト造血幹細胞制御技術の開発に関する研究

主任研究者 浅田 穰 国立小児医療研究センター

研究要旨

ヒト末梢血単球や皮下組織マクロファージは細胞周期阻害因子p21Cip1/WAF1を細胞質に発現していることを観察した。我々は細胞核においてp21Cip1/WAF1は細胞周期阻害因子として機能するが、細胞質においては様々な酸化ストレスによるアポトーシスを阻害する機能を果たすことを明らかにした。単球マクロファージは、活性酸素を産生して生態防御に重要な役割を果たしているが、その際自身の生存を保障する手段として細胞周期阻害因子p21Cip1/WAF1を細胞質に発現していると考えられ、生物学的にも細胞質p21Cip1/WAF1が重要な役割を果たしている可能性を示した。また、その阻害機構として、p21Cip1/WAF1がASK-1と複合体をつくり、アポトーシスを誘導するMAPキナーゼカスケードの活性化を抑制することを示した。単球系分化の過程でいかなるメカニズムでp21Cip1/WAF1が核から細胞質にその局在を移行するのかがまだ解明されていない。核内、あるいは核外移行シグナルになんらかの修飾があるのではないかと予想された。

分担研究者 山田孝之 国立小児医療研究センター
共同研究員

A. 研究目的

血球の分化、増殖、細胞死におけるp21Cip1/WAF1の役割を明らかにし、これを利用して造血細胞のin vitroにおける増幅系を確立し、パイオ血球などによる骨髄移植系への応用をはかる。

B. 研究方法

末梢血単球の分離

ヘパリン加静脈血を2%デキストランを用いて赤血球を除去し、Ficoll-Hypaque (Pharmacia Fine Chemicals, Piscataway, NJ)を用いて比重遠心法($<1.077 \text{ g/cm}^3$)により単核球(MNC)と多形核球(PNC)に分離した。MNCより、Percoll (Pharmacia; 290 mOsm, pH 7.4)を用いて15分間、600 gにて比重遠心法(1.062 g/cm^3)を行い、単球を分離した。インターフェースにある($<1.062 \text{ g/cm}^3$)細胞(単球を含む)を回収し、10% FBSを含むRPMI 1640培地で細胞を2回、洗浄した。

末梢血単球の二重染色

サイトスピン標本をアセトンで固定し、抗p21ウサギ抗体および抗CD14マウス抗体を同時に反応させた。ビオチン化抗ウサギ・羊IgGを反応させ、次にローダミン標識ストレプトアビジンと反応させた。よく洗った後、内因性アビジン・ビオチンブロッキングキット(ニチレイ)を用いて、フリーのビオチン、アビジンを中和した。その後、ビオチン化抗マウス・ウサギIgGを反応させ、次にFITC標識アビジンと反応させた。染色した標本は、蛍光顕微鏡(オリンパスBH2)により観察した。

アポトーシスの解析

DNA含量が2倍体より減少した集団をアポトーシスを起こした細胞として評価した。

TUNEL法によるアポトーシスの解析はOncor社のApopTag Plusキットを用いて行った。DNA末端にdigoxigenin-dUTPをTerminal deoxynucleotidyl transferaseにより取り込ませ、DNA断片化したアポトーシス細胞をFITC標識-抗digoxigenin抗体により検出した。FITC陽性細胞はFACSsortにより解析した。ミトコンドリア膜電位の解析は、細胞を37℃、15分間、40nM DiOC6(3)中でインキュベートし、FACSsortを使用してフローサイトメーター法により解析した。

免疫沈降法

35S-メチオニン存在下で細胞培養し、細胞蛋白質を標識した。プロテアーゼ阻害剤を添加した細胞抽出液I(20 mM Tris-HCl pH 7.5, 12 mM b-glycerophosphate, 150 mM NaCl, 5 mM EGTA, 10 mM NaF, 1% Triton-X-100, 0.5% Deoxycholate, 3 mM DTT)に細胞を懸濁し、氷水中で超音波破碎した。粗抽出液を遠心して得られた上清に、予め抗体と反応させたプロテインA/Gアガロース懸濁液を加えてインキュベートし、免疫沈降物を得た。免疫沈降物はSDS-PAGEにより解析した。

キナーゼ活性測定

細胞より細胞蛋白質を抽出し、抗Cdc2抗体、抗SAPK/JNK抗体、あるいは抗ASK1血清をもちいて、免疫沈降を行った。キナーゼ活性の測定は、得られた免疫沈降物を洗浄液I(500 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 5 mM EGTA, 1% Triton-X-100, 2 mM DTT, 1 mM PMSF)、次に洗浄液II(150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 5 mM EGTA, 2 mM DTT, 1 mM PMSF)により洗った後、キナーゼ緩衝液(20 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM MgCl₂, 5 mM MnCl₂, 1 mM DTT)に懸濁し、50 μM ATPおよび10 μCi γ-32P ATPを加え、ヒストンH1(Cdc2)、

ATF2(SAPK/JNK)、あるいはGST-MKK6(ASK1)を基質として、30℃で30分間反応させた。

Caspase 活性の測定

DEVD感受性、およびYVAD感受性 caspase の活性をそれぞれ Ac-DEVD-MCA または Ac-YVAD-MCA を基質として測定した。細胞を細胞抽出液II(0.5% nonidet P-40, 0.5 mM EDTA, 150 mM NaCl, 50 mM Tris, pH 7.5) に懸濁させ、氷上で30分インキュベートした。遠心した後、上清を回収し、上清に100 μMの基質を加え、酵素反応液(10 mM HEPES, 0.1 M NaCl, 5 mM DTT) 中で、37℃ 2時間 反応させた。酵素反応により、放出された蛍光物質 AMC の量を蛍光光度計 F-2000(日立)を用い、励起波長 365 nm および蛍光波長 450 nm にて測定した。2時間に放出される AMC 量が10 μmolのときを1単位とした。

GFP融合p21発現ベクターの作成と発現の解析

p21cDNA の種々の部分をPCR法により増幅し pEGFPcベクターにクローニングした。これらのGFP融合p21発現ベクターを293細胞やHeLa細胞にエレクトロポレーションにより導入し、蛍光顕微鏡(オリンパスBH2)によりGFP融合p21蛋白の発現および細胞内局在を観察した。

C. 研究結果

我々は、ヒト末梢血単球において、蛍光組織二重染色法により、単球のマーカーであるCD14発現細胞において、細胞周期阻害因子p21が細胞質に発現していることを見いだした。さらに、CD14陽性細胞を分取し、細胞核および細胞質よりそれぞれ蛋白質を抽出し、ウェスタンブロットによりp21、p53、およびBcl-2の発現を解析したところ、p21とBcl-2は細胞質分画に、p53は細胞核分画にその発現を見た。これにより、単球においてp21は細胞質に発現していることを世界で初めて明らかにした。次に、in vitro単球分化誘導システムを用いてp21の発現を解析した。単球系前駆細胞株U937やHL60はビタミンDにより、単球に分化誘導できるが、その際にp21の発現が見られることが報告されている。我々はこれらの細胞株においてビタミンDにより分化誘導した際のp21の発現を免疫組織染色により解析した。分化誘導初期(誘導後1日)にはp21は細胞核に発現していた。この時期には単球系マーカーであるCD14はまだ発現誘導されていない。ビタミンD刺激誘導後3日目において、これらの細胞株はCD14陽性になり、且つp21は細胞質にも発現が見られた。また、我々は、細胞周期阻害因子p21強制発現のみによる分化誘導系を確立していたが、その系においてもp21の細胞内局在を継時的に解析したところ、p21発現誘導6時間の時点では、p21は細胞核のみに発現し、CD14を発現する分化した時点ではp21の発現が細胞質にも見られるようになることを観察した。細胞は細胞質にp21を発現するようになると、どのような生物学的特性を示すのであろうか?分化していない

U937細胞と分化したU937細胞において、腫瘍壊死因子(TNF)、セラミド、過酸化水素といった細胞毒性試薬に対するアポトーシス抵抗性を検討した。ビタミンD3あるいはp21Cip1/WAF1の強制発現により分化したU937細胞は、これらの刺激に対して細胞死抵抗性を示した。U937細胞は分化すると細胞質p21を発現するようになるが、p21の強制発現により分化することのない細胞ではアポトーシス抵抗性を獲得できるのかを検討するために、ヒト線維肉腫細胞株HT1080細胞にpMT-CB6-p21を導入した(HT/CB6-p21)。この細胞は3日間p21を強制発現してもその細胞内局在は核である。またその時点で過酸化水素添加培養するとアポトーシスが誘導された。

過酸化水素による細胞死をモデルとして、p21Cip1/WAF1のアポトーシス阻害機構を検討した。アポトーシス刺激の存在するときアポトーシスシグナルを伝達する分子としてSAPK/JNKやCaspaseが知られている。分化していないU937-mock細胞において過酸化水素によりアポトーシスを誘導すると、過酸化水素添加後2時間の時点でSAPK/JNKキナーゼの活性上昇が、3時間後からDEVD感受性caspaseの活性上昇が観察され、並行してアポトーシスを起こした細胞が検出された。p21の強制発現により分化したU937/CB6-p21細胞においては、キナーゼ活性の上昇は見られず、DEVD感受性caspaseの活性亢進も見られなかった。YVAD感受性caspaseの活性亢進はいずれの場合にも検出できなかった。これらの結果よりp21Cip1/WAF1はSAPK/JNK、およびDEVD感受性caspaseの活性亢進といったプロアポトーシスシグナルを抑制しうることが示された。p21Cip1/WAF1の細胞内局在とプロアポトーシスシグナルの関係を明らかにするために、過酸化水素によるSAPK/JNKの活性化を経時的に解析した。p21Cip1/WAF1の発現が核にみられる6時間亜鉛添加培養したU937/CB6-p21細胞、および3日間亜鉛添加培養したHT/CB6-p21細胞においては、過酸化水素添加後に著明なSAPK/JNKの活性化が観察された。対照的にp21Cip1/WAF1の発現が細胞質にみられる3日間培養したU937/CB6-p21細胞においては、過酸化水素添加後2時間におけるSAPK/JNKの活性化は見られなかった。これらの結果は、p21Cip1/WAF1の細胞内局在がSAPK/JNKの活性化の有無、アポトーシス感受性と密接に関与していることが示唆された。

p21Cip1/WAF1は、N側にサイクリン、CDKとの結合部位があり、C側にPCNA結合部位、および核移行シグナルがある。そこで、細胞質局在p21Cip1/WAF1の機能を明らかにするために、核移行シグナルを欠損した遺伝子を発現するベクターを構築した(CB6-DNLS-p21)。そのベクターをU937に導入し、細胞株を樹立した

(U937/CB6-DNLS-p21)。本細胞株は亜鉛添加により全長p21Cip1/WAF1より移動度の速いDNLS-p21を発現した。免疫組織染色によりp21の細胞内局在を解析すると、その局在は主に細胞質であった。また細胞質型p21の発現は細胞周期を停止させず、分化も誘導しなかった。このクローンが、特別にこれらの能力を失っているということではなく、この細胞においてもビタミンD3添加培養は、細胞周期停止および分化を誘導した。

U937/CB6-DNLS-p21細胞のアポトーシス感受性を、ミトコンドリアの膜電位保持機能により解析した。アポトーシスを起こす過程でDNA断片化に先立ってミトコンドリアの膜電位が低下することが報告されている。ミトコンドリアの膜電位はその電位依存によりミトコンドリアに取り込まれる色素、

DiOC6(3)、を用いてFACSにより解析した。C2-セラミドによるアポトーシス誘導の際のミトコンドリア膜電位の変化を解析した。亜鉛添加の有無に関わらず、刺激のない状態では膜電位が保持されているが、セラミド刺激により細胞質p21を発現していないと著名な膜電位低下を示し、アポトーシスが起きた。対照的に細胞質p21を発現している細胞は、膜電位低下に抵抗性を示した。次にTNF、C2-セラミド、過酸化水素、X線照射といった細胞障害刺激による、膜電位低下の割合を検討した。明らかに細胞質p21発現細胞はいずれの刺激に対してもアポトーシス抵抗性を示した。細胞質p21は過酸化水素によるSAPK/JNKの活性化も阻害していた。また、U937細胞のみではなく、ヒト線維肉腫細胞株HT1080細胞にpMT-CB6-DNLSp21を導入した(HT/CB6-DNLSp21)ところ、HT/CB6-DNLSp21細胞は強力なアポトーシス誘導剤であるスタウロスポリンに対してアポトーシス抵抗性を獲得した。

我々はp21Cip1/WAF1がSAPK/JNKの上流のMAPキナーゼを抑制しているのではないかと考え、がん研の一線/宮岡らによりクローニングされたASK1とp21の相互作用の可能性を検討した。我々は抗ASK1血清を用いて、p21Cip1/WAF1とASK1の相互作用があるか否か、免疫沈降法により解析した。ASK1はMAPKKKに属し、MAPKKであるSEK1やMKK6を活性化する。SEK1およびMKK6の活性化は、それぞれMAPKであるSAPK/JNK、p38の活性化を促す。ASK1の活性化はアポトーシスを誘導する。また、ストレスによるアポトーシス誘導の際、ASK1の活性化が起こる。さらに、細胞にASK1を強制発現させるとその細胞内局在は細胞質であることが一線らにより明らかにされている。U937/CB6-DNLS-p21細胞および分化したU937/CB6-p21細胞において、p21Cip1/WAF1とASK-1

が共沈したが、モック細胞においては共沈しなかった。さらに、キナーゼ活性を欠いたGST-MKK6を基質として過酸化水素によるASK1のキナーゼ活性を解析したところ、モック細胞においてはASK1の活性化が検出されたが、細胞質p21を発現しているU937/CB6-DNLS-p21細胞においては活性化を阻止した。我々は、先に末梢血単球において細胞質p21の発現を観察しているが、そのp21とASK1の免疫沈降実験を行った。単球で発現しているp21Cip1/WAF1はASK1と共に免疫沈降した。

次に、細胞分化に伴いどのようなメカニズムによりp21が核から細胞質に移行してくるのか検討した。p21のアミノ酸配列を解析したところ、中央よりC末側に疎水性でロイシン残基が規則的に見られる、核外移行シグナル(NES)と相同性のある領域が2ヶ所あることが判明した。これらの配列に焦点を絞り、細胞内蛍光物質であるGFPとp21の融合蛋白を発現する種々のGFP融合p21発現ベクターを構築した。NESの有無、核外移行シグナル(NLS)の有無を組み合わせたGFP融合p21発現ベクターを293細胞に導入し、融合蛋白質を発現させ、ウェスタンブロットにより予想される大きさの融合蛋白質を確認した。次に、これらのGFP融合p21発現ベクターをHeLa細胞に遺伝子導入し、その局在を蛍光顕微鏡にて解析した。その結果、NESの有無に関わらず、NLSがある場合は、GFP融合p21は細胞核に、NLSがない場合はGFP融合p21は細胞全体にその発現が見られ、少なくともHeLa細胞においては、p21の特異的な核外移行受容体の存在に否定的な結果となった。現在、我々は単球にp21特異的な核外移行受容体が存在することを想定した実験、ならびに分化した単球においてはp21の核内移行シグナルになんらかの修飾(リン酸化や結合蛋白質の存在)が起きている可能性を探っている。

D. 考察

我々は単球が細胞周期阻害因子p21を細胞質に発現しており、さらに細胞質に細胞周期阻害因子p21を発現すると細胞がアポトーシス抵抗性を獲得することを世界で初めて示した。前年度の我々の実験結果から細胞分化を誘導するためには細胞周期阻害因子p21Cip1/WAF1が核において発現することが必要であることを示した。核においてp21Cip1/WAF1はサイクリン/CDK複合体と結合してG0/G1細胞周期停止を来す。それでは、細胞質p21はどのようなメカニズムでアポトーシスを阻害するのだろうか。p21Cip1/WAF1を細胞質に発現している分化したU937細胞は、過酸化水素、セラミド、およびTNFといったアポトーシス誘導剤に対してアポトーシス抵抗性を示した。様々な刺激により細胞にアポトーシスが誘導される際、最初のスイッチは、それぞれの刺激の特異性により異

なっており、プライベート経路とよばれている。しかし、アポトーシスは、最終的には共通の経路をたどり、細胞質凝縮、DNAの断片化、細胞膜変化を遂げる。過酸化水素の刺激は細胞内で活性酸素産生、SAPK/JNKの活性上昇といった、プライベート経路をたどり、ミトコンドリアの膜透過性亢進、caspaseの活性化という共通経路に入りアポトーシスを誘導すると考えられる。p21Cip1/WAF1によるアポトーシスの抑制は、SAPK/JNKやcaspaseの活性化抑制、ミトコンドリアの膜透過性亢進抑制、といったメカニズムで説明できるが、p21Cip1/WAF1の細胞内局在とSAPK/JNK活性化の有無とよく相関していた。これらの結果は、細胞質局在p21Cip1/WAF1がSAPK/JNKの活性化を阻害することが、p21によるアポトーシスの抑制機構である、ということを示唆している。

細胞質p21Cip1/WAF1によるアポトーシスの制御を直接、実験にて解明するために、細胞質に特異的に発現するように核移行シグナルを欠いたp21Cip1/WAF1をU937細胞およびHT1080細胞に導入したところ、これらの細胞はいずれもアポトーシス抵抗性を示した。これらの結果から細胞質局在p21Cip1/WAF1が、強力なアポトーシス阻害作用を持つことが判明した。また、U937/CB6-DNLS-p21細胞において、DNLS-p21を発現させても細胞周期停止および細胞分化が誘導できなかったことより、細胞周期停止、および細胞分化にはp21Cip1/WAF1が核に発現することが必須であり、アポトーシス抑制には細胞質に発現するp21Cip1/WAF1が機能すると考えられた。

U937細胞の過酸化水素によるプロアポトーシスシグナルを解析しとところ、SAPK/JNK活性化は刺激後1時間めから観察されたが、ミトコンドリアの膜電位低下、DEVD感受性caspaseの活性化はSAPK活性化より1-2時間遅れて観察された。また、ポンクレキック酸というミトコンドリア膜透過性阻害薬により、ミトコンドリア膜電位低下を阻害すると、アポトーシスは抑制したが、SAPK/JNK活性化は起こった。これらの結果は、細胞質p21Cip1/WAF1がSAPK/JNKの活性化を阻止しミトコンドリアの膜電位を保持する、というアポトーシス阻害機構を示している、と考えられた。これらの結果を裏付けるように、SAPK/JNKの活性化を上流にて制御しているASK-1とp21Cip1/WAF1が複合体を作り、その活性を抑制していた。p21Cip1/WAF1はMAPKKKであるASK-1の機能を抑制することにより、アポトーシスを促進するMAPキナーゼカスケードを働かせないようにしていると考えられた。アポトーシスを促進するMAPキナーゼカスケードは、ポジティブフィードバックループをつくる可能性が示唆されており、p21Cip1/WAF1はその経路をも作働させないようにしていると考えられる。

我々は、単球分化の過程においてp21Cip1/WAF1が核から細胞質に移行してくることを示したが、そのメカニズムに関しては現在のところ不明である。少なくともHeLa細胞においては、p21の特異的な核外移行受容体の存在に否定的な結果となった。現在、我々は単球にp21特異的な核外移行受容体が存在することを想定した実験、ならびに分化した単球においてはp21の核内移行シグナルになんらかの修飾（リン酸化や結合蛋白質の存在）が起きている可能性を探っている。蛋白質の核内移行、核外移行に関与するシステムが分化の過程で制御されていることが明らかになるとその生物学的意義ばかりでなく、臨床医学への応用という点からも大きな進歩になると考えられる。

E. 結論

p21Cip1/WAF1は細胞周期阻害因子として同定されたが、細胞内局在がその機能の決定に重要であり、造血細胞の分化や細胞生存因子として重要な役割をはたしていることが明らかになった。

F. 研究発表

1. 論文発表

Apoptosis inhibitory activity of cytoplasmic p21Cip1/WAF1 in monocytic differentiation. *EMBO J.* 18: 1223-1234, 1999

p21Cip1/WAF1 is important for differentiation and survival of U937 cells. *Leukemia* 12: 1944-1950, 1998

DNA damage associated cell cycle and cell death control is differentially modulated by caffeine in clones with p53 mutations. *Leukemia* 13: 70-77, 1999

Anti-tumor activity of antizyme which targets the ornithine decarboxylase (ODC) required for cell growth and transformation. *Oncogene* 18: 165-172, 1999

Defective control of apoptosis, radiosensitivity, and spindle checkpoint in ataxia telangiectasia. *Cancer Res* 58: 4923-9, 1998.

The in Vitro effects of All-Trans-Retinoic acid and Hematopoietic growth factors on the clonal growth and self-renewal of blast stem cells in acute promyelocytic leukemia. *Leukemia Res.* 21-4: 285-294, 1998

2. 学会発表

Cytoplasmic but not nuclear p21Cip1/WAF1 is a potent inhibitor of apoptosis.

Molecular mechanism of Approaches regulation.

Palm Springs, U.S.A. Jan. 9-13, 1998

Distinct biological activities of cytoplasmic and nuclear p21Cip1/WAF1 in the control of cell cycle arrest and apoptosis

Innovative Approaches to the Prevention, Diagnosis, and Therapy of Cancer

Maui, U.S.A. Feb. 16-21, 1998

単球における p21Cip1 の細胞質発現とアポトーシス抑制

第60回日本血液学会 大阪1998.3.25-27

アンチザイムによる細胞死誘導機構

第60回日本血液学会 大阪 1998.3.25-27

毛細血管拡張性運動失調症 Ataxia

Telangiectasia (AT) における細胞周期、アポトーシス誘導機構の解析

第4回日本家族性腫瘍研究会 東京1998.6.27

細胞質 p21Cip1 によるアポトーシス抑制のメカニズム

第57回日本癌学会総会 横浜1998.9.30-10.2.

毛細血管拡張性運動失調症 Ataxia

Telangiectasia (AT) における細胞周期、アポトーシス誘導機構の解析

第57回日本癌学会総会 横浜1998.9.30-10.2.

毛細血管拡張性運動失調症 Ataxia

Telangiectasia (AT) 保因者であるヘテロ変異体における細胞周期、アポトーシス誘導機構の解析

第57回日本癌学会総会 横浜1998.9.30-10.2.

細胞質局在 p21Cip1 はアポトーシスを抑制する

第71回日本生化学会大会名古屋1998.10.14-17

Ataxia Telangiectasia における細胞周期、apoptosis 調節機構

第71回日本生化学会大会名古屋1998.10.14-17

ヒト新規 TPR 遺伝子 kim-1 の mitosis における機能解析

第71回日本生化学会大会名古屋1998.10.14-17

Cytoplasmic p21 is a novel inhibitor of Apoptosis

Cancer Genetics & Tumor Suppressor Genes
Cold Spring Harbor 1998.Aug.19-23

細胞質局在 p21 によるアポトーシス抑制

第40回臨床血液学会 金沢 1998.11.11-13

Caffeine 添加による放射線感受性、細胞周期調節機構の p53 変異株での検討

第40回臨床血液学会 金沢 1998.11.11-13

細胞周期阻害因子 p21 は細胞質においてアポトーシス阻害因子として働く

第21回日本分子生物学会 横浜1998.12.16-19

ヒトTPR 遺伝子 kim-1 の mitosis における機能解析

第21回日本分子生物学会 横浜1998.12.16-19

分担研究報告書

細胞周期制御蛋白の調節によるヒト造血幹細胞制御技術の開発に関する研究

分担研究者 山田 孝之 国立小児医療研究センター

研究要旨

細胞周期阻害因子p21Cip1/WAF1の細胞内発現を遺伝子工学の手法を利用して制御できるようにp21アデノウイルスを作製した。

A. 研究目的

血球の分化、増殖、細胞死におけるp21Cip1/WAF1の役割を明らかにし、これを利用して造血細胞のin vitroにおける増幅系を確立し、バイオ血球などによる骨髄移植系への応用をはかる。

B. 研究方法

p21cDNAの単離

p21Cip1/WAF1のcDNAは、TPA処理したU937細胞より作成したcDNAを鋳型として、p21 5'-プライマー(5'-

GGAAGCTTCTGCGGAAGTCAGTTCCTTGTGGA-3')およびp21 3'-プライマー(5'-

CCAAGCTTCTGTGGGCGGATTAGGGCTT-3')を用いてPCR法により得た。核移行シグナル欠損p21ベクター(CB6-DNLS-p21)作成のために用いたプライマーはp21 5'-プライマーおよびp21 Dプライマー(5'-

GGTCTAGATCGACCCTGAGAGTCTCCAGG-3')を用いた。得られたp21cDNAは、pGEM-Tベクター (Promega)にクローニングした。

コスミドベクターへのp21の挿入

pGEM-p21プラスミドを制限酵素Hind IIIにより消化し、p21cDNA断片を調整した。p21cDNA断片はDNA Blunting Kit (Takara)を用いて末端を平滑化し、精製した。コスミドベクターを制限酵素SwaIで完全に消化精製し、精製したp21cDNA断片を加え、エタノール沈殿を行った。

p21cDNA断片とコスミドベクターをライゲーション反応により結合させた。産物をエタノール沈殿し、インサートをもたないコスミドの出現を抑えるために再び制限酵素SwaIにより切断した。入パッケージングキットでパッケージングを行ったのち、大腸菌に感染させた。アンピシリンを含む寒天プレートに播き、37度で一晩培養した。得られたコロニーより、コスミドDNAの調整を行った。目的とするp21インサートの入ったコスミドクローンを選択するために'アデノ落としプラスミド'法により、インサートの配列および向きを確認した。アンチセンスp21、NLS欠損p21の入ったコスミドを常法により大量調整した。

組換えウイルスの作製

293細胞にリン酸カルシウム法により、p21コスミドを遺伝子導入した。293細胞の中で、ウイルスが増殖すると293細胞は死滅する。遺伝子導入した293細胞をコラーゲンコートした96ウェルプレートに段階希釈して、遺伝子導入していない293細胞と種々の割合で混ぜて播き、適当なウェルより培養液を回収して、1次ウイルスを得た。1次ウイルス液の各サンプルを293細胞およびHeLa細胞に感染させ、E1部分をもたない

(HeLa細胞で変性の認められない)アデノウイルスを選別した。感染させた293細胞のウェルのうち1つから培養液(死滅細胞ごと)を回収し、凍結融解を6回した後、遠心し、上清を調整し、2次ウイルス溶液として-80度に保存した。また感染細胞からDNAを抽出し、組換えウイルスの構造を確認した。2次ウイルス液より、斉藤博士らの方法により3次ウイルス液、4次ウイルス液を作製し、高力価のアデノウイルスを得た。

目的細胞へのウイルス感染

NIH3T3細胞にmoi 10でNLS欠損p21アデノウイルスを感染させた。U937細胞にはmoi 100, 300でアンチセンスp21アデノウイルスを感染させた。

ウェスタンブロット

蛋白質抽出バッファー(150 mM NaCl, 1.0% NP-40, 0.1% SDS, 1.0% Sodium deoxycholate, 5 mM EDTA, 10 mM Tris, pH 7.4)にプロテアーゼ阻害剤を加え、蛋白質を抽出した。DC Protein Assayキット(BIO-RAD)を用いて蛋白質濃度を測定した。30 μgの蛋白質をSDS-ポリアクリルアミドゲルで電気泳動し、PVDFナイロンメンブレンにトランスファーした。反応させた1次抗体は、ECLキット(アマシャム)により検出した。

細胞表面抗原

細胞表面抗原の解析は、単球系表面抗原CD14に対するモノクローナル抗体を用いて常法によりフローサイトメーターにより解析した。結合した1次抗体はFITC標識抗マウスウサギ抗体により検出した。フローサイトメーターはBecton-Dickinson社FACSsortを使用した。

C. 研究結果

アデノウイルスベクターは発現ベクターとして、高力価のウイルスを得ることができ、広い動物種に用いることができ、増殖細胞だけでなく静止期の細胞にも感染・発現できる。すなわち細胞周期の回転していない造血幹細胞にも遺伝子導入が可能であると考えられる。そこで、我々は細胞内のp21の発現の制御により、細胞の分化およびアポトーシスを制御し得るようにp21アデノウイルスを作製することにした。齊藤博士らにより開発されたCOS-TPC法により、アンチセンスp21アデノウイルスベクターおよび核移行シグナル(NLS)欠損p21アデノウイルスベクターを構築した。NLS欠損アデノウイルスベクターを293細胞に遺伝子導入し、高力価アデノウイルスを得た。このウイルスをマウス由来の細胞株NIH3T3やBAF3に、またヒト由来の細胞株HT1080、p21を遺伝子操作によって欠損している80S14細胞に感染させ、その発現をウェスタンブロットにより解析した。いずれの細胞でも外来p21の高い発現が見られた。

アンチセンスp21アデノウイルスベクターも293細胞に遺伝子導入し、高力価アデノウイルスを得た。このウイルスをU937細胞に感染させ、その細胞をビタミンDにより分化誘導を行ったところ、コントロールとしてLacZの入ったウイルスを感染させたU937細胞はCD14を発現するようになり細胞分化が誘導されたが、アンチセンスp21を感染させたU937細胞は分化が阻害された。これらの結果より、今回作製したアデノウイルスベクターは、p21の細胞内発現を制御可能なレベルまで目的遺伝子を発現させることができたと考えられた。

D. 考察

p21Cip1/WAF1はサイクリン/CDK複合体と結合してG0/G1細胞周期停止を来す。昨年度の報告でU937細胞にp21Cip1/WAF1を遺伝子導入し強制発現させることにより、単球系分化誘導に成功した。すなわちp21Cip1/WAF1の強制発現のみで、ビタミンD3と同様にU937細胞を分化しうることを示した。さらに、p21Cip1/WAF1のみを選択的に阻害するアンチセンスp21をあらかじめ発現させておくとビタミンD3による細胞分化を阻止できることを示した。また、ヒト造血幹細胞と考えられるCD34陽性細胞もサイトカインによって分化の進んだ造血細胞となる際にp21の発現がみられると報告されている。つまり、p21の発現を巧妙に制御することにより細胞の分化を阻止したまま造血幹細胞を増殖させる技術開発につながる。今回我々は、アンチセンスp21アデノウイルスベクター、NLS欠損p21アデノウイルスベクターを作製した。アンチセンスp21アデノウイルスにより、ビタミンDによるU937細胞は分化が阻害されたことは、このウイルスにより造血幹細胞

の分化を阻害したままで増殖させる実験の一手前まで来たことになる。今後、アンチセンスp21アデノウイルスを用いたコロニーアッセイ等により、その可能性を探りたい。NLS欠損p21アデノウイルスは感染細胞に細胞質p21を発現させることができたが、そのアポトーシス抑制作用をみるまでには至っていない。現在、このウイルスによりアポトーシス抵抗性を獲得した細胞を樹立できるか検討中である。

E. 結論

細胞周期阻害因子p21Cip1/WAF1の細胞内発現をp21アデノウイルス用いて制御できる基礎を築いた。

F. 研究発表

1. 論文発表

Apoptosis inhibitory activity of cytoplasmic p21Cip1/WAF1 in monocytes differentiation. EMBO J. 18: 1223-1234, 1999

p21Cip1/WAF1 is important for differentiation and survival of U937 cells.

Leukemia 12: 1944-1950, 1998

Anti-tumor activity of antizyme which targets the ornithine decarboxylase (ODC) required for cell growth and transformation. Oncogene 18: 165-172, 1999

2. 学会発表

Distinct biological activities of cytoplasmic and nuclear p21Cip1/WAF1 in the control of cell cycle arrest and apoptosis. Innovative Approaches to the Prevention, Diagnosis, and Therapy of Cancer

Maui, U.S.A. Feb. 16-21, 1998

単球における p21Cip1 の細胞質発現とアポトーシス抑制

第60回日本血液学会 大阪 1998.3.25-27

アンチザイムによる細胞死誘導機構

第60回日本血液学会 大阪 1998.3.25-27

細胞質 p21Cip1 によるアポトーシス抑制のメカニズム

第57回日本癌学会総会 横浜 1998.9.30-10.2.

細胞質局在 p21Cip1 はアポトーシスを抑制する

第71回日本生化学会大会 名古屋 1998.10.14-17
ヒト新規 TPR 遺伝子 kim-1 の mitosis における機能解析

第71回日本生化学会大会 名古屋 1998.10.14-17

Cytoplamic p21 is a novel inhibitor of
Apoptosis
Cancer Genetics & Tumor Suppressor Genes
Cold Spring Harbor 1998. Aug. 19-23

細胞質局在 p21 によるアポトーシス抑制
第40回臨床血液学会 金沢 1998.11.11-13

細胞周期阻害因子 p21 は細胞質においてアポトー
シス阻害因子として働く
第21回日本分子生物学会 横浜 1998.12.16-19

ヒトTPR 遺伝子 kim-1 の mitosis における機能
解析
第21回日本分子生物学会 横浜 1998.12.16-19