Rad9 制御による頭頸部癌細胞死誘導の可能性の検討

石川 和宏¹⁾ 石井 秀始²⁾ 西野 宏¹⁾
古川 雄祐²⁾ 市村 恵一¹⁾

要 旨

DNA 損傷後のチェックポイント応答に関わる蛋白質 Rad9 の遺伝子はヒト第 11 番染色体長腕 13 領域に位置し、頭頸部、乳腺、食道癌等で本領域の遺伝子増幅が報告されている。また、Rad9 は p53 と直接結合し、その相互作用を通じて *P21* 発現と細胞周期制御に関与する。今回、Rad9 の発現制御による p53 の賦活化と癌細胞死誘導の可能性を検討した。Rad9 蛋白質断片発現ベクターを作製し頭頸部扁平上皮癌細胞株に導入すると、p53 と Rad9 の結合が減少し p21 の発現変化とアポトーシスの亢進が認められ、優勢阻害型 (dominant-negative) の機能が示唆された。一方 Rad9 siRNA を導入した場合もアポトーシスが亢進した。以上の結果より Rad9 の制御は p53 の賦活化と癌細胞死の誘導に有効である可能性が示唆された。

キーワード : Rad9, p53, p21, 頭頸部癌, アポトーシス

The regulation of Rad9 for therapy of head and neck cancer:

Kazuhiro Ishikawa¹⁾, Hideshi Ishii²⁾, Hiroshi Nishino¹⁾, Yusuke Furukawa²⁾ and Keiichi Ichimura¹⁾

¹⁾ Department of Otolaryngology-Head and Neck Surgery

²⁾ Center for Molecular Medicine, Jichi Medical University School of Medicine

Summary

Human Rad9 (hRad9) is a checkpoint molecule involved in processes including cell cycle arrest, repair of damaged DNA, or induction of apoptosis after DNA damage. Previous studies suggested that *hRAD9* is frequently amplified in epithelial tumor cells of breast, lung, and head and neck cancer, and participates in regulation of the tumor suppressor p53-dependent transactivation of pro-survival *P21*^{WAF1}. Recently, we reported the direct association of Rad9 and p53 results in regulation of the expression of *P21* gene. Here we studied the regulation of Rad9 for therapy of head and neck cancer. Overexpression of Rad9 mutant resulted in the reduction of association among p53 and Rad9 protein, and induction of p21 protein. Introduction of Rad9 mutant induced apoptosis in the head and neck cancer cell line. Rad9 inhibition using Rad9 siRNA also induced apoptosis. These results indicate that regulation of Rad9 may be effective for therapy of head and neck cancer.

Key words : Rad9, p53, p21, Head and neck cancer, apoptosis

[Received Aug. 31, 2007, Accepted Oct. 9, 2007]

はじめに

ヒト染色体の DNA は種々の外的および内的要因によりストレスを受け、遺伝子機能の阻害に曝露されている。DNA が損傷を受けると細胞内ではチェックポイント機能が活性化し、細胞周期進行の抑制と DNA の損傷修復を行うが、損傷が重大な場合には細胞死 (アポトーシス) へと導かれる。しかしながらチェックポイントに異常が生じると DNA 損傷に対する正常な応答が不可能となり、DNA

損傷が未修復の状態では細胞増殖を続け、本来であればアポトーシスへと導かれるはずの重大な損傷を受けた細胞も生存することになり、癌の発生と進展につながる可能性がある (ゲノム不安定性)^{1,2)}。

TP53 遺伝子はヒトの癌の 60% 以上でなんらかの変化がある重要な癌抑制遺伝子である。p53 蛋白質は腫瘍抑制効果のみならず、細胞に生じる種々のストレスに対する細胞周期の抑制やアポトーシスの誘導等に関与し、ゲノムの安定性を維持している³⁾。p53 の重要な転写標的が *P21* 遺

¹⁾ 自治医科大学耳鼻咽喉科

²⁾ 自治医科大学分子病態治療研究センター幹細胞制御研究部

[平成 19 年 8 月 31 日受付, 平成 19 年 10 月 9 日受理]

別刷請求先 : 〒 329-0498 栃木県下野市薬師寺 3311-1

自治医科大学耳鼻咽喉科

石川 和宏

伝子であり、*P21* 遺伝子の発現が誘導されると細胞周期が抑制され、DNA 損傷をうけた細胞が損傷部位の修復を行う時間的猶予が与えられる⁴⁾。

Rad9 はチェックポイントに関与する蛋白質で、DNA 損傷のシグナルを下流の因子群に伝達する⁵⁾。ほか、エクソスクレアゼ⁶⁾ やチェックポイント蛋白質 Chk1⁷⁾ を介してのチェックポイント活性化、DNA ポリメラーゼ β の活性化⁸⁾ やリボヌクレオチド合成⁹⁾ を通じた DNA 修復、抗アポトーシス蛋白質 Bcl-2 や Bcl-xL との抑制的結合によるアポトーシス誘導¹⁰⁾ 等に関与する極めて多機能な分子である。さらに我々の研究により Rad9 は p53 に対し競合的、抑制的に *P21* の転写を調節することが明らかとなった¹¹⁾。したがって Rad9 の機能制御の破綻は遺伝子変化の固定化と変異の蓄積した悪性細胞の生存に繋がると考えられる。

RAD9 遺伝子は第 11 番染色体長腕のバンド 13.1-13.2 領域に位置している。頭頸部癌、乳癌、食道癌等ではこの領域の遺伝子増幅がしばしば認められ¹²⁾、本領域の遺伝子増幅と患者の生存率低下が相関する¹³⁾。この領域には少なくとも 4 種以上の癌遺伝子が存在し、遺伝子増幅に付随して本領域上の癌遺伝子が過剰に発現し、生存率の低下につながると考えられているが、*RAD9* 遺伝子も癌遺伝子として機能している可能性が指摘され、Rad9 の機能的な制御により発癌や細胞増殖を抑制できることが示唆される。

本稿では Rad9 の発現制御による p53 の賦活化と癌細胞死誘導の可能性を検討したので報告する。

材料および方法

ヒト肺繊維芽細胞株 MRC5 細胞と当科で樹立した上顎洞扁平上皮癌細胞株 MMSI-1 を用いた。細胞培養には 10% 仔牛血清 (FCS) を含む DMEM 培地を用いた。

Rad9 プラスミドの発現導入には LipofectAMINE 2000 (Invitrogen) を使用し、製品プロトコールに従って行った。Rad9 siRNA (Santa Cruz) の導入には TransIT TKO (Mirus) を使用し、24 時間毎に合計 2 回導入した。

Western blotting は細胞を回収後溶解緩衝液で蛋白質を抽出、SDS-PAGE で展開し、polyvinylidene difluoride membrane に転写した。その後一次抗体に抗 FLAG 抗体あるいは抗 p21 抗体を用いて immunoblotting (IB) を行った。免疫沈降 (IP) は細胞から抽出した蛋白質をプロテイン G セファロースビーズで夾雑物を除去後、各特異的抗体で 16 時間反応させた。抗原抗体複合体をプロテイン G セファロースビーズに吸着させ、溶解緩衝液で洗浄した。ビーズとそれに吸着した蛋白質を加熱して抗原-抗体複合体を分解し、SDS-PAGE で展開、immunoblotting に用いた。

免疫組織染色はカバーガラス上に培養した細胞を 4% パラホルムアルデヒドで固定し 0.5% Triton X で処理した後 15% FCS を含む PBS でブロッキングし、一次抗体と 16 時間反応させた。PBS で洗浄後 cy3 二次抗体と 1 時間反応させ DAB で発色、ヘマトキシリンで核染色後、封入

図 1 変異型 Rad9 プラスミドの作製

A: 野生型 Rad9 (Rad9 WT) および変異型 Rad9 (Rad9 mt) タンパク質の発現プラスミドの概略図。PCNA fold は核内増殖抗原 (Proliferating Cell Nuclear Antigen) 様構造を表す。B: 野生型 Rad9 および変異型 Rad9 プラスミドを MRC5 細胞に導入し、その発現を Western blotting によって確認した。野生型に対して変異型では速い泳動を示す変異型 Rad9 の発現を認める。

した。

アポトーシスはカバーガラス上に培養した細胞を 4% パラホルムアルデヒドで固定し 4,6-ジアミジノ-2-フェニルインドール (DAPI) で核染色を行い、細胞の核が凝縮あるいは分葉状になったものをアポトーシスと判定し、細胞 500 個の中でアポトーシスを認める細胞数を計測した。

結 果

1. Rad9 蛋白質断片発現ベクター (Rad9 欠損プラスミド) の作製

細胞内の内因性 Rad9 と競合させるために Rad9 蛋白質断片発現ベクター (Rad9 欠損プラスミド) を作製した (図 1A)。野生型 Rad9 プラスミドを Advantage Clontaq システム (Clontech) を用いて PCR にかけて増幅を行った。その際、下記のオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いた。

(1) 5'-AGGACCTGCGGCCGCGTAAGATCCTGAT-GAAGTC-3' (2) 5'-TCCATTCTAGACATCTAAGAGT-CAATGTCGTCATTGG-3'

増幅した PCR 産物を 1% アガロースゲルで電気泳動し、ゲル精製キット (Qiagen) で精製した。これを制限酵素 NotI と XbaI で切断した後、pcDNA3.1-FLAG ベクターのクローニング部位に結合させ、Rad9 蛋白質断片発現ベクターを作製した。

こうして作製した変異型 Rad9 プラスミドおよび野生型

図2 変異型 Rad9 プラスミド導入による p53-Rad9 結合及び p21 発現の変化
A: 免疫沈降による p53 と Rad9 の結合。IB: immunoblot, IP: 免疫沈降, HC: IgG 重鎖。B: Western blotting による p21 の発現。

Rad9 プラスミドを MRC5 細胞に導入し、Western blotting で発現を確認した (図 1B)。野生型 Rad9 プラスミド (Rad9WT) ではコントロール (mock) に比較して Rad9 の発現の増強を認めるのに対し、変異型 Rad9 プラスミド (Rad9mt) を導入した細胞では泳動度の高いバンドが出現し、これらプラスミドの発現が確認された。

2. 変異型 Rad9 プラスミドを導入すると p53-Rad9 結合が減少する

上記の変異型 Rad9 プラスミド導入による Rad9-p53 結合の変化を検討した。非癌細胞の MRC5 細胞に野生型あるいは変異型 Rad9 プラスミドを導入し、免疫沈降で両者の結合をみると、野生型 Rad9 を導入した場合 Rad9 と結合する p53 が増加した (図 2A 上段, lane 2) のに対し、変異型 Rad9 を導入すると Rad9 と結合する p53 は減少した (図 2A 上段, lane 3)。さらに p21 の発現を Western blotting で検討すると、野生型 Rad9 の導入では p21 に有意な発現変化がみられないのに対し、変異型 Rad9 を導入すると p21 の発現が上昇した (図 2B)。したがって癌細胞に限らず細胞内では変異型 Rad9 の導入により変異型 Rad9 と野生型 Rad9 が競合し、Rad9 と p53 の結合抑制および p21 の発現亢進が生じると考えられ、癌細胞においても変異型 Rad9 を導入することにより p53 の賦活化と p21 の発現亢進が期待される。

3. 変異型 Rad9 プラスミドを導入すると癌細胞のアポトーシスが増加する

次に上顎洞扁平上皮癌細胞株 MMSI-1 に野生型あるいは変異型 Rad9 プラスミドを導入して DAPI での染色によりアポトーシスの変化を検討した。Rad9 の遺伝子導入効率は野生型で 36%, 変異型で 45% であった。その結果、変異型 Rad9 プラスミドを導入すると有意にアポトーシス

図3 上顎洞扁平上皮癌細胞への変異型 Rad9 導入によるアポトーシスの変化
上顎洞扁平上皮癌細胞株 MMSI-1 に野生型 Rad9 又は変異型 Rad9 発現プラスミドを導入し、免疫蛍光染色 (抗 FLAG 抗体を使用) でプラスミドの発現を確認し、DAPI による染色でアポトーシスの変化を検討した。

図4 上顎洞扁平上皮癌細胞への Rad9 siRNA 導入によるアポトーシスの変化
MMSI-1 に Rad9 siRNA を導入し、DAPI による染色でアポトーシスの変化を検討した。

が亢進した (野生型 1.6% 対変異型 4.3%)。すなわち変異型 Rad9 プラスミドの導入により内因性の Rad9 と競合して p53 との結合を阻害し、癌細胞死を誘導する可能性が示唆される。

4. Rad9 siRNA を導入すると癌細胞のアポトーシスが増加する

次に癌細胞において Rad9 を直接抑制するために Rad9 siRNA を導入してアポトーシスの変化を検討した。その結果、対照 (mock) に比較し Rad9 siRNA 導入後ではアポトーシスが有意に亢進した (3.0% と 12.0%)。以上の結果から Rad9 を抑制することにより癌細胞のアポトーシスを誘導できる可能性が示唆された。

考 察

Rad9 は DNA 損傷後のチェックポイントに関与するのみならず、DNA の損傷修復、アポトーシスの誘導など多岐にわたりゲノムの安定性に関与する分子である。その中で、我々は Rad9 が p53 に結合し *P21* の転写を調節すること¹¹⁾、頭頸部癌細胞では *P21* の転写制御異常が関与し

ている可能性があること¹⁴⁾を報告した。これまで肺癌や乳癌でも Rad9 が強発現していることが報告されており^{15,16)}, Rad9 の強発現に伴うチェックポイントや細胞周期の異常が存在し, Rad9 が癌細胞の増殖に深く関与していることが示唆される。今回, Rad9 を制御することによる癌細胞死誘導の可能性を検討した。

Rad9 の N 末端の一部を含む Rad9 蛋白質断片発現ベクターを作製し, 細胞内に導入すると Rad9 と結合する p53 は減少した。したがって遺伝子増幅に付随して内因性 Rad9 が強発現している癌細胞では変異型 Rad9 を発現させることにより内因性 Rad9 と競合し, Rad9 と結合する p53 が減少するとともに p53 の機能が賦活化することが期待される。実際に今回の検討では癌細胞にこのプラスミドを導入するとアポトーシスが亢進した。さらに siRNA で Rad9 を直接抑制することでも同様の結果が得られ, Rad9 を制御することで癌細胞の細胞増殖抑制と細胞死誘導へつながる可能性が強く示唆された。今回の検討ではアポトーシスが誘導された細胞は腫瘍全体の割合から見ると少なかったが, 細胞死の誘導に関しては Rad9 以外にも数多くの関連する因子があり, Rad9 単独の制御でより効率よく細胞死誘導を引き起こすためには今後更なる検討が必要である。なお今回のアポトーシス測定では, Rad9 が膜蛋白質でないため FACS では遺伝子導入された細胞を分別できず, Lipofectamine での導入効率を考慮すると, そのままでは変異型 Rad9 による正確なアポトーシスの分画が得られないことや, アネキシン V はアポトーシス早期の細胞を検出するのに向く一方, DAPI はアポトーシス後期の細胞を検出に向くことから, より確実なアポトーシス検出のために DAPI での染色による測定を選択した。

従来の研究により p53 が変異をきたしている癌細胞で野生型 p53 を強制発現させることでがん治療につながる可能性が報告されている¹⁷⁾が, 今回の検討のように Rad9 を制御することによる癌細胞死誘導は, p53 に変異がない場合でも有効な可能性があり, 治療の新たな展開の一助となることが期待される。今回は *in vitro* の実験による検討であったが, 今後は *in vivo* での検討を含め, 発癌や癌細胞の増殖における Rad9 の機能的役割の一層の解明と Rad9 制御の可能性のより詳細な検討が必要と考えられる。

文 献

- 1) Elledge S.J.: Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis. *Science* 274 : 1664-1672, 1996
- 2) Kastan M.B., Bartek J.: Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature* 432 : 316-323, 2004
- 3) Levine A.J.: p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 88 : 323-333, 1997
- 4) El-Deiry W.S., Tokino T., Velculescu V.E., et al: WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 75 : 817-825, 1993
- 5) Burtelow M.A., Kaufmann S.H., Karnitz L.M.: Retention of the human Rad9 checkpoint complex in extraction-resistant nuclear complexes after DNA damage. *J Biol Chem* 275 : 26343-26348, 2000
- 6) Bessho T., Sancar A.: Human DNA damage checkpoint protein hRAD9 is a 3' to 5' exonuclease. *J Biol Chem* 275 : 7451-7454, 2000
- 7) Roos-Mattjus P., Hopkins K.M., Oestreich A.J., et al: Phosphorylation of human Rad9 is required for genotoxin-activated checkpoint signaling. *J Biol Chem* 278 : 24428-24437, 2003
- 8) Toueille M., El-Andaloussi N., Frouin I., et al: The human Rad9/Rad1/Hus1 damage sensor clamp interacts with DNA polymerase beta and increases its DNA substrate utilisation efficiency: implications for DNA repair. *Nucleic Acids Res* 32 : 3316-3324, 2004
- 9) Lindsey-Boltz L.A., Wauson E.M., Graves L.M., et al: The human Rad9 checkpoint protein stimulates the carbamoyl phosphate synthetase activity of the multifunctional protein CAD. *Nucleic Acids Res* 32 : 4524-4530, 2004
- 10) Komatsu K., Miyashita T., Hang H., et al: Human homologue of *S. pombe* Rad9 interacts with BCL-2/BCL-xL and promotes apoptosis. *Nat Cell Biol* 2 : 1-6, 2000
- 11) Ishikawa K., Ishii H., Murakumo Y., et al: Rad9 modulates the *P21^{WAF1}* pathway by direct association with p53. *BMC Molecular Biology* 8 : 37, 2007
- 12) Schwab M.: Amplification of oncogenes in human cancer cells. *Bioessays* 20 : 473-479, 1998
- 13) Tsuda H., Hirohashi S., Shimosato Y., et al: Correlation between long-term survival in breast cancer patients and amplification of two putative oncogene-amplification units: *hst-1/int-2* and *c-erbB-2/ear-1*. *Cancer Res* 49 : 3104-3108, 1989
- 14) 石川和宏, 石井秀始, 西野宏他: P53/P21 経路における Rad9 の役割と頭頸部癌への関与. *頭頸部癌* 32(4) : 417-422, 2006
- 15) Maniwa Y., Yoshimura M., Bermudez V.P., et al: Accumulation of hRad9 protein in the nuclei of nonsmall cell lung carcinoma cells. *Cancer* 103 : 126-132, 2005
- 16) Cheng C.K., Chow L.W., Loo W.T., et al: The cell cycle checkpoint gene Rad9 is a novel oncogene activated by 11q13 amplification and DNA methylation in breast cancer. *Cancer Res* 65 : 8646-8654, 2005
- 17) Bossi G., Sacchi A.: Restoration of wild-type p53 function in human cancer: relevance for tumor therapy. *Head Neck* 29 : 272-284, 2007