

## 論文の内容の要旨

### 論文題目

IL-1 induces expression of p21<sup>WAF1</sup> independent of p53 in high passage human embryonic fibroblasts WI38.

### 和訳

継代を重ねたヒト胎児由来線維芽細胞株 WI38 における IL-1 により誘導される p53 非依存的な p21<sup>WAF1</sup> の発現

指導教官 松島 綱治 教授  
東京大学大学院医学系研究科  
平成8年入学  
医学博士課程社会医学専攻  
氏名 大澤 宜明

### 1.背景及び目的

哺乳動物細胞の増殖は、様々な因子の相互作用により調節されている。増殖するサイクルである細胞周期は Cyclin の発現及び Cyclin-dependent kinase (Cdk) との複合体の形成、活性化により制御されている。近年、これらの複合体の活性化を阻害する Cyclin dependent kinase inhibitor が明らかとなった。p21<sup>WAF1</sup> は Cyclin-Cdk 複合体に結合し、活性化を阻害する細胞周期調節因子である。p21<sup>WAF1</sup> 遺伝子は promoter 上流にがん抑制遺伝子、p53 の結合部位を持ち、p53 により発現が制御されていると考えられている。しかしながら、我々の研究室では、p53 を欠く白血病細胞での放射線による p21<sup>WAF1</sup> の発現の誘導を報告している。

一方、細胞の増殖はサイトカインなどの増殖因子により制御を受けている。多機能型サイトカインとして働き、様々な生物活性を与える Interleukin-1 (IL-1) は増殖因子として同定されたが、増殖を阻害する働きも持つ。また、IL-1 と多くの共通する生理活性をもつ Tumor Necrosis Factor (TNF) は、p21<sup>WAF1</sup> を誘導する。さらに、ある種の細胞では放射線による p21<sup>WAF1</sup> の誘導は、TNF の産生を介している。

p21<sup>WAF1</sup> は老化の進んだ細胞で高発現している因子として同定されたことから、培養細胞系において継代を制御する上での重要な調節因子と考えられていたが、最近の知見によると、p21<sup>WAF1</sup> による増殖阻害効果は細胞の種類及び外的因子によって異なる。今回、細胞の増殖抑制と p21<sup>WAF1</sup> の発現誘導との関係を明らかにするため、IL-1 により誘導された p21<sup>WAF1</sup> の cell cycle に対する影響、また、誘導される p21<sup>WAF1</sup> の発現機構に対する p53 タンパク質の活性化との関係について検討した。

## 2. 方法及び結果

1) 胎児ヒト線維芽細胞株 WI38 における継代の差による増殖性及び DNA 損傷に対する p53 の発現: 継代の異なる胎児ヒト線維芽細胞株 WI38 における細胞の増殖性を比較したところ、4 日目まではほぼ同様の増殖率を示した後、5 日目以降では継代早期の細胞は定常状態となるのに対して、継代を重ねた細胞は増殖し続けた。さらに、UV(20 J/m<sup>2</sup>)及び actinomycin D (5 µg/ml)刺激により、継代早期の細胞でのみ p53 タンパク質の発現が上昇した。

2) p21<sup>WAF1</sup> の発現は継代を重ねた細胞でのみ IL-1 により誘導され、継代早期の細胞では誘導されない: IL-1 により誘導される p21<sup>WAF1</sup> の発現を Western blotting にて検討した。継代を重ねた細胞及び継代早期の細胞に IL-1(100 U/ml)を添加し、p21<sup>WAF1</sup> タンパク質の 24 時間までの発現量の変化を検討した(Fig. 2)。IL-1 により p21<sup>WAF1</sup> タンパク質の発現は継代を重ねた WI38 細胞でのみ顕著に上昇したが、継代早期の細胞では上昇しなかった。継代を重ねた細胞での IL-1 による p21<sup>WAF1</sup> の発現は刺激後 3 時間で増加がみられ、6 時間で最大を示した。刺激後 24 時間でも p21<sup>WAF1</sup> タンパク質は、無刺激状態のものと比較して高かった。IL-1 の刺激に対する p53 の発現の変化は両細胞で認められなかった。

3) 継代を重ねた細胞では IL-1 により p21<sup>WAF1</sup> は mRNA レベルで誘導される: 継代を重ねた WI38 での、IL-1 による p21<sup>WAF1</sup> の誘導を mRNA レベルで検討した。様々な濃度による IL-1 刺激後の p21<sup>WAF1</sup> mRNA の発現を、Northern blotting にてみた。p21<sup>WAF1</sup> mRNA は恒常的に発現しており、さらに、IL-1 の刺激により、濃度依存的に上昇した(Fig. 3)。

4) 継代を重ねた細胞での IL-1 による細胞周期への効果: IL-1 により誘導される p21<sup>WAF1</sup> タンパク質の細胞周期の進行に対する影響を検討した。継代を重ねた WI38 を無血清状態で 48 時間培養して G0/G1 期に同調させた後、再び血清刺激にて細胞周期を進行させた際の IL-1 による影響をみた。propidium iodide で核を染色した後 FACS にて細胞周期の各期の割合を解析したところ、IL-1 存在下での細胞周期の進行は非存在下と比較して、顕著な差はみられなかった(Table 1)。

5) IL-1 による Cdk kinase 活性に対する効果: IL-1 により誘導される p21<sup>WAF1</sup> の生理活性を検討した。抽出したタンパク質より抗 p21<sup>WAF1</sup> 抗体で p21<sup>WAF1</sup> タンパク質を免疫沈降法により回収した。SDS-PAGE を行い、抗 Cdk2, 4, 6 抗体を用いて Western blotting を行った。Cdk2, Cdk4 及び Cdk6 と結合した p21<sup>WAF1</sup> の量は IL-1 により増加した(Fig. 4A)。

さらに Cdk-p21<sup>WAF1</sup> 複合体による、標的タンパク質のリン酸化の阻害作用について検討した。ヒストン H1 を外的基質とした kinase assay では基質のリン酸化は阻害されなかった(Fig. 4B, C)。

6) IL-1 による retinoblastoma gene product のリン酸化への効果: Cdk によりリン酸化調節を受ける細胞内標的タンパク質の一つである、retinoblastoma gene product (Rb)について、電気泳動の移動度の違いによるリン酸化の差を検討した。IL-1 は Rb のリン酸化に影響を与えなかった(Fig. 5)。

7) IL-1 の刺激による細胞周期関連タンパク質群の発現への効果: p21<sup>WAF1</sup> の標

的タンパク質群である Cdk2、Cdk4、および細胞周期タンパク質群である cyclin E、cyclin D1、さらに Cdk2 と結合する cyclin A, cyclin E、また、p21<sup>WAF1</sup> ファミリーの Cdk inhibitor である p27<sup>Kip1</sup> タンパク質の発現を Western blotting にて検討した。対照群と比較して、IL-1 の刺激によって p27<sup>Kip1</sup> タンパク質の発現が減少したが、他のタンパク質には影響を与えなかった(Fig. 6)。

8) 継代を重ねた細胞での p21<sup>WAF1</sup> 強制発現による増殖への影響: 継代を重ねた WI38 細胞において p21<sup>WAF1</sup> を強制発現させた際の増殖に対する効果について検討した。p21<sup>WAF1</sup> 発現ベクターを細胞内に導入し、Hygromycine B 処理にて stable transfectant を得た。p21<sup>WAF1</sup> を強制発現させたもの及びコントロールベクターのみを導入したものとでの増殖に差は認められなかった(Fig. 7)。

9) p53 の機能面からみた p21<sup>WAF1</sup> の発現への影響: Transcriptional run-on assay により、継代を重ねた WI38 細胞では IL-1 の刺激により p21<sup>WAF1</sup> は転写レベルが増加する事を示した(Fig. 8)。p53 タンパク質の増加は認められなかった。さらに、IL-1 により誘導される p21<sup>WAF1</sup> の発現は p53 に依存しない発現経路により誘導されているかを検討するため、p53 結合部位を持った CAT reporter gene を electroporation 法により細胞内に導入した。wt p53 を強制発現させた細胞では CAT reporter gene の活性が増加したのに対し、IL-1 の刺激では増加は認められなかった(Fig. 9)。さらに、Gel-shift assay により p21<sup>WAF1</sup> promoter 領域に存在する p53 結合部位との結合能を検討したところ、IL-1 による p53 タンパク質の結合能は増強しなかった(Fig. 10)。

### 3 まとめ及び考察

今回の研究では、IL-1 は継代を重ねた WI38 細胞においてのみ p21<sup>WAF1</sup> の発現を誘導することを示した。しかしながら、誘導された p21<sup>WAF1</sup> は細胞周期に影響を与えなかった。また、この IL-1 による p21<sup>WAF1</sup> の発現誘導は、p53 の活性化を伴わなかった。

IL-1 は Cdk2 の kinase 活性を阻害せず、細胞周期に影響を与えなかった。p21<sup>WAF1</sup> は休止期にある細胞が、増殖刺激を受けると一過的に発現が上昇し、初期応答遺伝子として働くことが報告されているが、IL-1 の刺激による発現上昇は 24 時間まで維持されていた。この事から、初期応答として働いていたとは考えにくく、以下の可能性が示唆される。①IL-1 により誘導される p21<sup>WAF1</sup> の発現量が不十分であり、Cyclin-Cdk 複合体の活性を完全に阻害するに至らない。②IL-1 の刺激により p27<sup>Kip1</sup> の発現が減少したこと、p21<sup>WAF1</sup> を強制発現させても細胞増殖に大きな影響はなかったことから、継代を重ねた WI38 細胞での細胞周期調節には p21<sup>WAF1</sup> 以外の制御因子が働いていると想定される。また、増殖刺激などによる p53 非依存的な細胞周期の調節機構では p27<sup>Kip1</sup> がより重要な役割を持つ可能性がある。さらに、ある種の細胞では IL-1 と類似した生理作用を持つ TNF により誘導される p21<sup>WAF1</sup> は細胞周期に作用しないこと等が報告されている。以上のことから、継代を重ねた WI38 細胞における IL-1 による p21<sup>WAF1</sup> の発現誘導は、p53 非依存的な p21<sup>WAF1</sup> 誘導機構の一つであり、さらに p21<sup>WAF1</sup> によらない細胞周期調節機構の存在を示唆するものである。

Fig. 1A

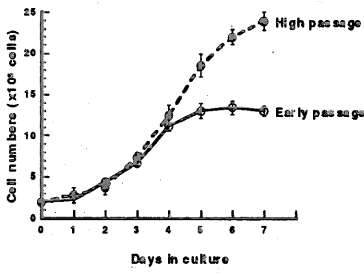


Fig. 1B

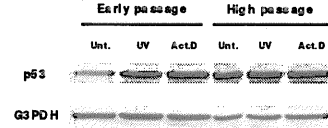


Fig. 5

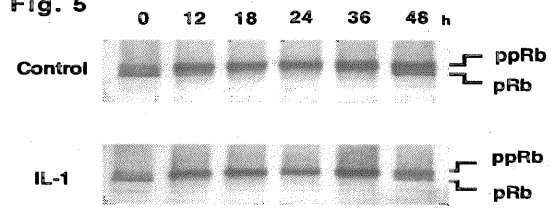


Fig. 2A

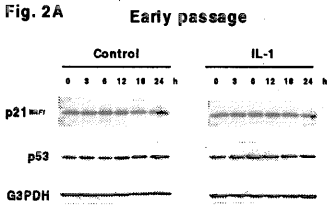


Fig. 2B

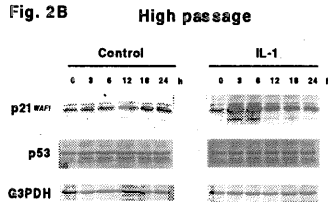


Fig. 6

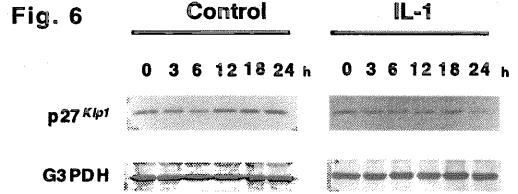


Fig. 3A

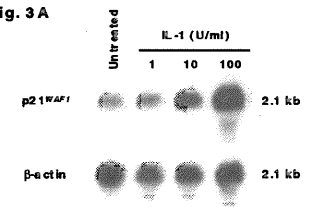


Fig. 3B

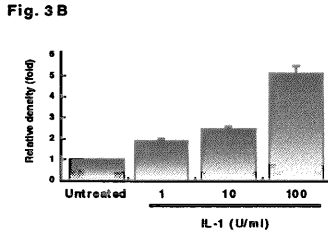


Fig. 7

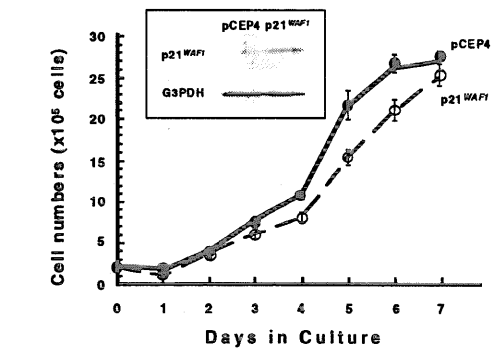


Table 1

Incubation duration	Cell cycle phase	Treatment		
		Control	IL-1	IL-1(+12 h)
(% of cells)				
Untreated	G0/G1	52.7		
	S	14.5		
	G2/M	18.5		
Serum-starved	G0/G1	80.6		
	S	4.2		
	G2/M	15.2		
12 h	G0/G1	66.9	72.2	64.8
	S	14.5	10	16.9
	G2/M	18.5	17.8	18.2
18 h	G0/G1	22.6	19.2	27.5
	S	74.4	78.6	71.6
	G2/M	3	2.2	0.9
24 h	G0/G1	29.7	35.9	34.8
	S	33.3	28.9	30.4
	G2/M	37	35.2	34.8
36 h	G0/G1	49.6	36.1	42.4
	S	33.5	42.4	34.8
	G2/M	16.9	21.5	22.8
48 h	G0/G1	57.1	54	50.4
	S	21.4	25.6	32.3
	G2/M	21.5	20.4	17.3

Fig. 8A

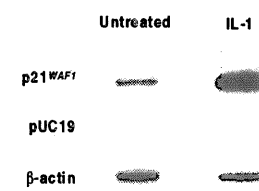


Fig. 8B

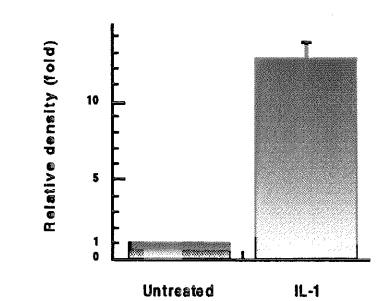


Fig. 4A

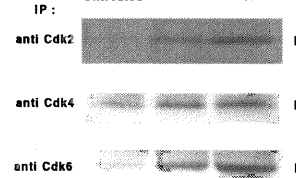


Fig. 4B



Fig. 4C

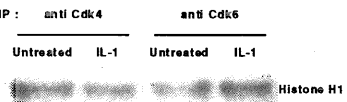


Fig. 9

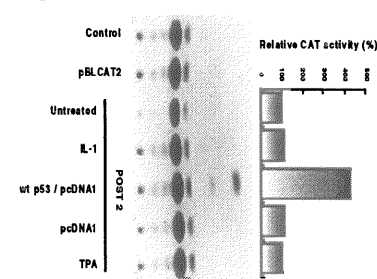


Fig. 10

