

## 肝細胞癌におけるサイクリン A と p53 の異常発現

—免疫組織化学的ならびに転写レベルにおける検討—

穀野 真一郎

東京医科大学内科学第四講座

(指導：齊藤利彦主任教授)

**【要旨】** ヒト肝細胞癌組織におけるサイクリン A と p53 遺伝子の発現を免疫組織化学的に検討した。ヒト肝細胞癌症例 10 例においてサイクリン A と p53 はそれぞれ 4 例発現していた。そのうちびまん性に発現した症例でサイクリン A と p53 の発現の分布はほぼ一致していた。サイクリン A 遺伝子のプロモーター領域を luciferase レポーター遺伝子の上流に組み込んだプラスミド DNA を肝癌由来の細胞株である HepG2, Huh7, HLE に導入し、サイクリン A の転写活性を調べた。その結果、サイクリン A プロモーター活性は Huh7 が最も高く、HepG2, HLE では低い傾向にあった。また、サイクリン A プロモーターの転写因子の結合塩基配列を含む領域の 5' 端を欠失させると、プロモーター活性は著明に抑制された。さらに p53 がサイクリン A の転写活性に及ぼす影響を調べるために、正常型および変異型 p53 発現プラスミドを肝細胞に導入した。その結果、すべての細胞株で正常型 p53 遺伝子導入により、サイクリン A のプロモーター活性は著明に抑制されたが、変異型 p53 遺伝子導入では、HLE ではサイクリン A のプロモーター活性は影響を受けず、HepG2 では活性化、Huh7 では抑制される傾向にあった。以上より肝細胞癌の増殖、進展にサイクリン A と p53 が相互作用しながら、深く関与していることが明らかになった。このような観点より、サイクリン A 遺伝子の発現の抑制あるいは p53 遺伝子の導入は肝細胞癌の治療に有効な方法となる可能性があると思われる。今後さらに他の細胞周期関連因子が肝細胞癌の増殖、進展にどのように関与しているのか詳細に検討することは、さらに新しい治療法の開発に重要なことと思われる。

## はじめに

肝臓癌による年間死亡者数は 3 万人以上にのぼり、男性では肺癌、胃癌に次いで多くを占めている。肝臓癌に対し、外科手術、経皮的エタノール注入療法及び肝動脈塞栓術などが行われているが、再発を繰り返し、満足な長期予後は得られていない。この現状を打開するためには、肝臓癌の発癌、進展の機序を明らかにし、それにもとづく治療法の開発が必要とされている。近年、細胞周期調節機構の研究の進歩により、発癌のメカニズムの解明は飛躍的に進みつつある。細胞周期はサイクリン、cdk、cdk 抑

制因子及び癌抑制遺伝子などが複雑に作用しあって調節されている。種々の癌でこれらの異常が指摘されており、これらの関連を明らかにすべく研究が進んでいる。細胞周期の進行は、細胞周期の時期によって特異的に誘導される多くの種類のサイクリンやサイクリン依存性キナーゼ (cdk) によって調節されている。サイクリンの中の 1 つサイクリン A は細胞周期の G1 後期から M 期にかけて作用し、G1~S 期では CDK2 と、G2~M 期では cell division cycle 2 (CDC2) と複合体を形成する。サイクリン A/CDK 2 複合体はキナーゼ活性をもっており、pRB やヒストン H1 などをリン酸化し、G1 から S 期への移行そして DNA 複製を誘導する<sup>1-5)</sup>。一方、

1999 年 2 月 4 日受付, 1999 年 3 月 2 日受理

キーワード：肝細胞癌, cyclin A, p53

(別刷請求先：〒160-0023 東京都新宿区西新宿 6-7-1 東京医科大学内科学第四講座 穀野真一郎)

細胞周期に抑制的に作用する p53 遺伝子は DNA 腫瘍ウイルス SV40 によりトランスフォームさせた細胞で、SV40 large T 抗原と複合体を形成する蛋白質の遺伝子として同定された。当初 p53 遺伝子は癌遺伝子と考えられていたが、正常型 p53 は細胞の増殖を抑制する癌抑制遺伝子として働くことがわかっている。p53 遺伝子の機能は DNA 損傷性ストレスを受けた細胞において娘細胞に変異をもった DNA を伝えないために、細胞周期を G1 期で停止させたり、アポトーシスを誘導すると考えられている。p53 によって p21 (WAF 1 / CIP 1)<sup>6)</sup>、サイクリン G<sup>7)</sup>、BAX<sup>8)</sup>、GADD45<sup>9)</sup> などの遺伝子の発現が誘導され、細胞増殖抑制に働くことが知られている。サイクリン A や p53 を含む細胞周期を調節している因子の異常が多数報告されている。サイクリンの中でも、サイクリン D とサイクリン E は種々の癌で過剰発現することが知られている<sup>10-13)</sup>。今回我々の検討したサイクリン A についても乳癌<sup>14)</sup>、大腸癌<sup>15)</sup>、血液悪性腫瘍<sup>1,16)</sup> などでの過剰発現が報告されている。肝細胞癌に関して、サイクリン遺伝子の異常が指摘されている。進行肝細胞癌の一部でサイクリン D1 の遺伝子の増幅と過剰発現が報告されている<sup>17,18)</sup>。また、肝細胞癌で B 型肝炎ウイルス遺伝子がサイクリン A 遺伝子の中に挿入され、サイクリン A の N 末端が肝炎ウイルスの pre-S 蛋白質に置換されている症例が報告されている<sup>19)</sup>。一方、p53 遺伝子の異常はヒトのほとんどすべての癌で、約 50% に認められ<sup>20,21)</sup>、肺、大腸、乳腺などの癌で高頻度に認められる<sup>22)</sup>。肝細胞癌でも p53 遺伝子の異常<sup>23)</sup> が指摘されており、肝癌由来の細胞株における p53 の DNA、RNA および蛋白質の異常やヒト肝癌組織での p53 遺伝子の点突然変異<sup>24)</sup> が報告されている。アフラトキシン B1 の汚染地域で、肝細胞癌の発生率の非常に高い中国と南アフリカのある地方で、肝細胞癌症例の 50% に p53 遺伝子の点突然変異を認め、そのほとんどがグアニンからチミンへの変異であるという報告もある<sup>25,26)</sup>。このように、細胞周期調節機構においてサイクリン A と p53 は重要な役割を果たしており、その発現、機能の異常は癌の進展に密接な関連性を持っていると考えられる。本研究では、肝癌の増殖、進展にサイクリン A と p53 がいかなる機序で関与しているのか明らかにするために、ヒト肝癌組織におけるサイクリン A と p53 の蛋白レベルの発現を免疫組織化学的に検

討するとともに、培養肝癌細胞において、サイクリン A 遺伝子の発現に p53 がどのように関与しているのか、遺伝子の転写レベルで検討した。

## 実験材料と方法

### I. ヒト肝細胞癌組織におけるサイクリン A および p53 の発現の免疫組織化学的検討

#### 1. 免疫染色

手術により摘出された 10 例の肝細胞癌組織を検討した。10% ホルマリン溶液で固定しパラフィン包埋されている組織を使用した。サイクリン A、p53 免疫染色および Hematoxylin-Eosin 染色用に、3 枚の連続切片を 6  $\mu$ m に薄切した。免疫染色は抗サイクリン A 抗体 (BF 683; Santa Cruz Biotechnology, USA) と抗 p53 抗体 (Do-1; DAKO, Denmark) を用いて行った。免疫組織化学的染色はアビジン-ビオチン-ペルオキシダーゼ複合法により、Histofine SAB-PO (M) detector kit (ニチレイ, 日本) を用いて行った。それぞれの切片はキシレンにて脱パラフィン化し、アルコール処理した。その後のマイクロウェーブ処理は 0.01 M 酢酸緩衝液 (pH 6.0) 中で 15 分間行った。内因性ペルオキシダーゼ活性を阻止するために 0.3% 過酸化水素を加えた。そして非特異的反応を阻害するために、正常ヤギ血清と反応させた。一次抗体を PBS で 100 倍に希釈し、切片と 4°C で一晚反応させた。ビオチン標識抗ウサギ IgG ヤギ血清とペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンによるストレプトアビジン-ビオチン化抗体法で、diaminobenzidine を基質として免疫染色を行った。対比染色はヘマトキシリンで軽度に行った。

#### 2. 免疫組織化学的染色の評価

染色評価は核が brownish に染色されたものを発色の程度にかかわらず陽性細胞とした。それぞれの切片の腫瘍細胞に占める陽性細胞の割合により以下に示すように分類した；陽性細胞が全く認められないものを negative, (-) とした。また陽性細胞の割合が 1~50% のものを focally positive あるいは regionally positive, (+) とした。さらに陽性細胞の割合が 50% 以上のものを diffusely positive, (++) とした。

II. 肝癌細胞株のサイクリンAプロモーター活性とその活性に及ぼすp53遺伝子導入の影響

1. プラスミドDNA

肝癌細胞株のサイクリンAの転写活性を調べるために、サイクリンA遺伝子のプロモーター領域を luciferase レポーター遺伝子上流に組み込んだプラスミドDNA (pCyclin A-luc)<sup>27)</sup> を実験に使用した。Fig. 1に pCyclin A-luc の構造を示す。実線部分は、βラクターゼ及び大腸菌由来である pBR322 ベクターのうちの Pvu II-EcoR I フラグメント部分で、この領域にはアンピシリン耐性遺伝子を含む。また白抜き太線部分は SV40 由来の部分であるが、SV40 のプロモーター部分は除去されている。さらに、矢印で示すようにサイクリンAプロモーター領域の下流にルシフェラーゼ遺伝子が連結されている。このプラスミドDNAが癌細胞などのサイクリンAが高発現している細胞に導入されると、サイクリンAプロモーター領域が活性化され、その下流のルシフェラーゼ遺伝子が翻訳され、ルシフェラーゼアッセイにおいて高い発光反応を示す。pCyclin A-luc のプロモーター領域を Fig. 2のごとく、5'末端を欠失させた construct 1, 2 および 3 を用いてルシフェラーゼアッセイを行い、プロモーター活性の発現に関与する領域を解析した。p53 発現プラスミドは正常型 p53 発現プラスミド pC53SN3.3 および 変異型 p53 発現プラスミド pC53SCX3.3 を用いた。コントロールとして pCMVneo を用いた。pC53SCX3.3 と pC53SN3.3 との違いは、一つの塩基が C から T へと異なることにより、pC53SCX3.3 は p53 のコドン 143 においてアラニンがバリンへと変化している<sup>28)</sup>。以上のプラ

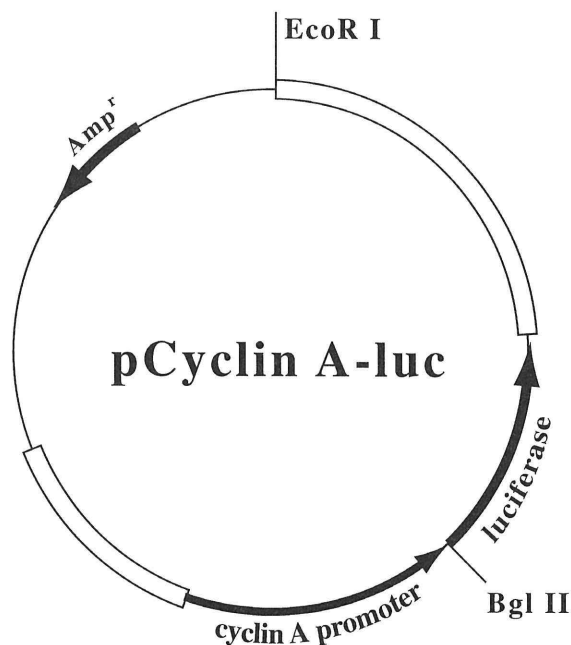


Fig. 1 Schematics of Cyclin A promoter region in plasmid DNA, which contain the luciferase gene as a reporter. Thin lines denote beta lactamase and E. coli origin of replication sequences derived originally from PvuII-EcoRI construct of pBR322. Blank bar denotes sequences derived from SV40. Luciferase coding sequence is linked downstream of cyclin A promoter region.

スミド DNA で Max efficiency DH 5a competent cell (Gibco BRL, U.S.A.) を transform し, Endo-free plasmid maxi kit (Qiagen, Germany) にて大量調製し、実験に用いた。

2. 肝臓癌細胞株の培養

ヒト肝臓癌由来の細胞である HepG2, Huh7, HLE は

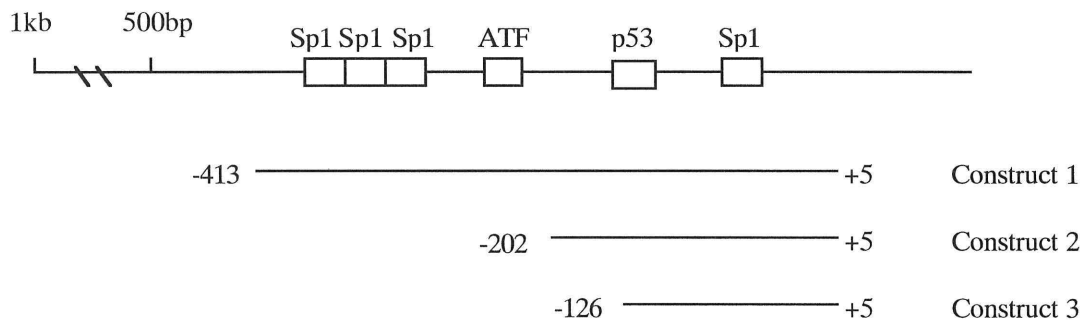


Fig. 2 Deletion analysis of the cyclin A promoter elements. The sites for known transcription factors in the promoter are shown on the top. Plasmids containing variable length of the 5' flanking sequence of the cyclin A gene and luciferase gene.

いずれも理研ジーンバンク・細胞開発銀行より分譲されたものを使用した。これらの細胞を 6-well 組織培養用プレート (Falcon, Japan) 上に  $2 \times 10^5$  cell/well の細胞数で培養を行った。培地は Dulbecco's Modified Eagle Medium (D-MEM) (GIBCO BRL, USA) に、10% FBS (fetal bovine serum) を加えたものを使用した。これらの細胞を CO<sub>2</sub> Water jacketed incubator 内で、37°C, 5% CO<sub>2</sub> にて培養した。培養開始 24 時間後に約 50~60% の confluency であることを確認したのち、後述のごとく遺伝子導入を行った。

### 3. 肝癌細胞への遺伝子の導入

6-well 組織培養プレートに前述の方法で培養した細胞に、以下の方法で遺伝子導入を行った。実験はすべて同様に 3 回行い、その平均値を結果とした。1well あたり、A 液として無血清の D-MEM 培地 100  $\mu$ l にそれぞれのプラスミド DNA を 1  $\mu$ g を加えたものと、B 液として無血清の D-MEM 培地 100  $\mu$ l に cationic liposome である lipofectin<sup>29,30)</sup> を 5  $\mu$ l 加えたものを 30 分室温で放置した後、A 液と B 液を混合し、さらに 20 分室温で放置し、これに D-MEM (10% FBS) を 0.8 ml 加えて、全量約 1 ml のプラスミド DNA—lipofectin complex 溶液を調製した。この溶液を細胞を PBS で 2 回洗浄した後、プレート上に加えた。その後 24 時間反応させ、無血清の D-MEM にて 2 回洗浄した後、D-MEM (10% FBS) を各 well に 2 ml 加え、24 時間培養を行った。

### 4. 肝癌細胞のサイクリン A プロモーター活性の測定

細胞を PBS で 2 回洗浄後、5 倍濃培養細胞融解剤 (Toyo ink, Japan) に PBS を加え 1 倍濃にした溶液を 150  $\mu$ l づつ各 well へ加え、室温で 15 分間放置後スクレーパーで細胞を回収し、12,000 rpm, 2 分間遠心後、上清を細胞抽出液としてルシフェラーゼアッセイに用いた。ルシフェラーゼアッセイは、細胞抽出液 20  $\mu$ l に発光基質液 (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 20 mM Tricine, 1.07 mM (MgCO<sub>3</sub>)<sup>4</sup> Mg (OH)<sup>2</sup>·5H<sub>2</sub>O, 2.67 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.1 mM EDTA, 33.3 mM DTT, 270  $\mu$ M Coenzyme A, 470  $\mu$ M luciferin, 530  $\mu$ M ATP) を 100  $\mu$ l 加え、ルミノメーター (Lumat, Biorad, USA) にて 20 秒間の発光量 (RLU) を測定した。また同時にこの細胞抽出液を BCA protein assay kit (Pierce,

USA) を用いて蛋白定量も行い、単位蛋白量あたりのルシフェラーゼ活性 (RLU/100  $\mu$ g protein) を算出した。蛋白定量は 96-well ELIZA 測定用プレート (Falcon, Japan) に細胞抽出液 10  $\mu$ l と working reagent (BCA protein assay kit, Pierce) を 200  $\mu$ l を入れ、30 秒間振動混和後、37°C, 30 分間放置した。その後 562 nm における吸光度を測定し、アルブミン標準液より作製した検量線を用いて細胞抽出液の蛋白濃度を算出した。ルシフェラーゼアッセイの活性値 (RLU) と蛋白濃度より、蛋白量あたりのルシフェラーゼ活性 (RLU/100  $\mu$ g protein) を算出した。

### 5. p53 遺伝子と pCyclin A-luc との cotransfection

6-well 組織培養用プレートに各細胞を前述の方法で培養し、培養開始後 24 時間後に Lipofectin を用いて、pC53SN3.3, pC53SCX3.3 および pCMVneo をそれぞれ 1  $\mu$ g/well と pCyclin A-luc 1  $\mu$ g/well を混合して遺伝子導入を行った。24 時間培養後、細胞を回収し、前述の方法でルシフェラーゼアッセイと蛋白濃度の定量を行い、単位蛋白量あたりのルシフェラーゼ活性を算出した。

## 結 果

### I. ヒト肝細胞癌組織におけるサイクリン A および p53 発現の免疫組織化学的検討

ヒト肝細胞癌組織 10 症例におけるサイクリン A および p53 発現の免疫組織化学的検討の結果を Table 1 に示す。10 例の肝細胞癌のうち、4 例が腫瘍細胞の核内にサイクリン A 蛋白の発現を認めた。4 例のサイクリン A 発現例のうち 1 例が diffusely positive であり、残りの 3 例が focally or regionally positive であった。一方、p53 についての検討では、10 例の肝細胞癌のうち、4 例が腫瘍細胞の核内に p53 蛋白の発現を認めた。4 例のサイクリン A 発現例のうち 1 例が diffusely positive であり、残りの 3 例が focally or regionally positive であった。サイクリン A 蛋白の発現症例と p53 蛋白の発現症例は一致していた。サイクリン A 蛋白の発現と p53 蛋白の発現が共に diffusely positive であった症例 1 の連続切片における HE 染色、サイクリン A および p53 免疫染色の光顕像を Fig. 3 に示す。サイクリン A 蛋白の発現の分布と p53 蛋白の発現の分布はほぼ一致していた。また、肝癌組織の病理学的分化度とサイクリ

**Table 1** Result of immunostaining for cyclin A and p53 in hepatocellular carcinomas according to histology.

Patient No.	Degree of differentiation	P53	cyclin A
1	poor	++	++
2	moderate	+	+
3	poor	+	+
4	well	+	+
5	moderate	-	-
6	well	-	-
7	moderate	-	-
8	well	-	-
9	well	-	-
10	moderate	-	-

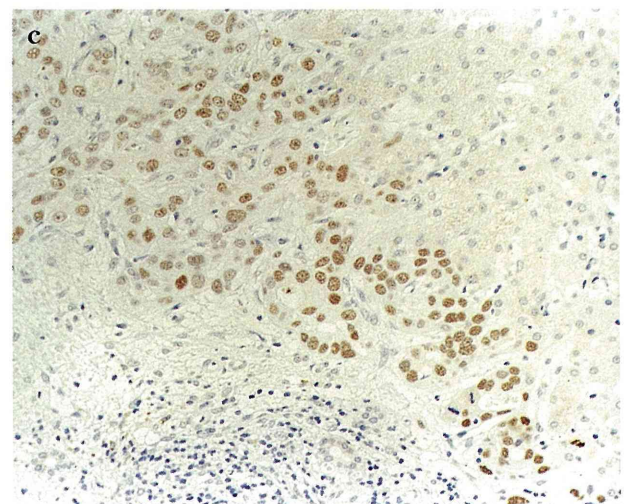
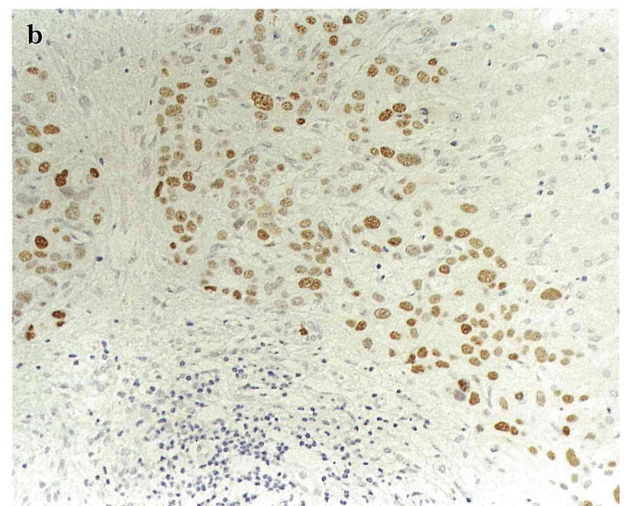
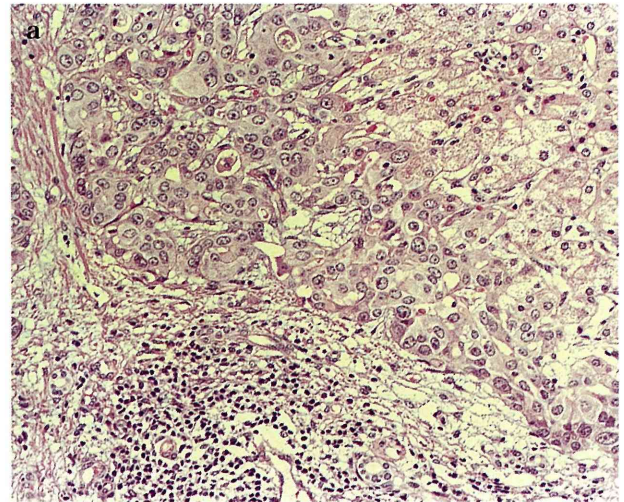
ンAおよびp53発現の関連性に関しては、Table 1に示すように分化度のより低い癌でサイクリンAとp53の発現が共に高頻度になる傾向があった。

## II. 肝癌細胞株のサイクリンAプロモーター活性

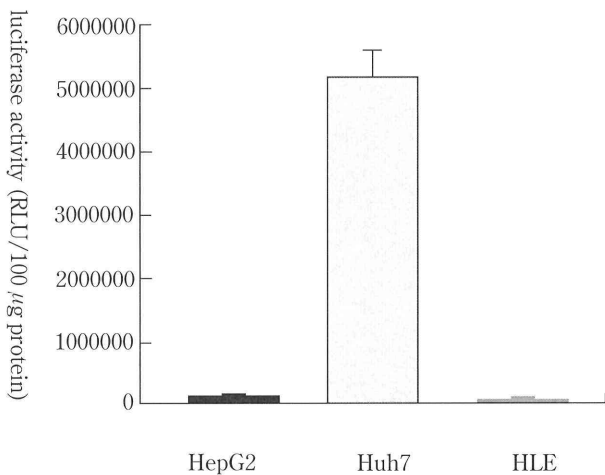
Fig. 4に肝癌細胞のルシフェラーゼアッセイによるサイクリンAプロモーター活性 (construct 1)を示す。HepG2, Huh7およびHLE細胞のルシフェラーゼ活性は、それぞれ128290, 5114710および15984 (RLU/100  $\mu$ g protein)であった。サイクリンAプロモーター活性は細胞の種類によって差がみられ、Huh7が最も高く、HepG2, HLEでは低い傾向にあった。次に、construct 1から5'側を欠失させたconstruct 2およびconstruct 3を導入したときのプロモーター活性をFig. 5に示す。細胞によってルシフェラーゼ活性に大きな差があるため、construct 1の活性を1とし、それに対するconstruct 2およびconstruct 3の割合を示した。construct 2およびconstruct 3の活性はconstruct 1に比べいずれの細胞においても著明に減少した。またその減少率はHuh7が最も著しかった。

## III. p53遺伝子導入が肝癌細胞のサイクリンAプロモーター活性に及ぼす影響

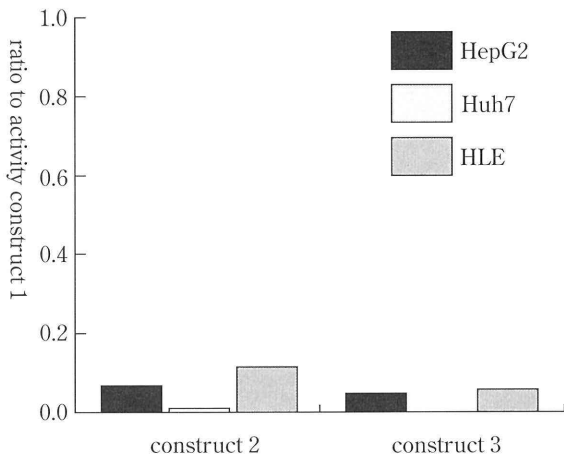
p53がサイクリンAの転写活性に及ぼす影響を調べるために、正常型p53発現プラスミドpC53SN3.3および変異型p53発現プラスミドpC53SCX3.3とpCyclin A-lucを肝癌細胞にcotransfectionした。P53遺伝子を含まないコントロールベクターのpCMVneoとcotransfectionしたときのルシフェラ



**Fig. 3** Hematoxylin-eosin staining (a), immunostaining for cyclin A (b), and p53 (c) in a hepatocellular carcinoma (a-c, serial sections of Case No. 1 in Table 1). Nuclear staining for both cyclin A and p53 is diffuse and the distribution of positive cells is almost identical.

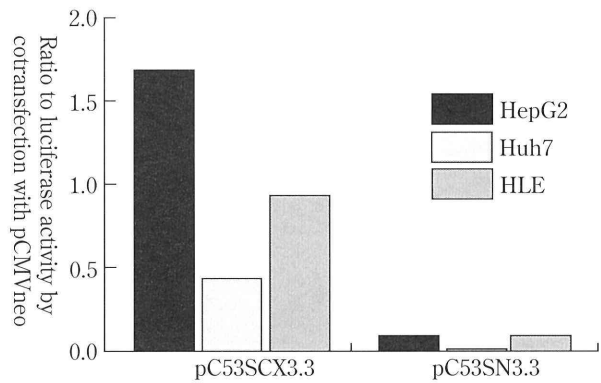


**Fig. 4** Cyclin A promoter construct 1 activity in various cell lines by luciferase assay. High level of luciferase expression is observed in Huh7 cells transfected with Cyclin A promoter-luciferase plasmid. On the other hand, low level of luciferase expression is observed in HepG2 and HLE cells.



**Fig. 5** Assay of regulatory elements of the cyclin A promoters in various cell lines. A series of deletion constructs of cyclin A promoters was transfected into Huh7, HepG2 and HLE cells, and luciferase activity, was expressed as ratio to activity of construct 1.

ーゼ活性を 1 とし、それに対する割合を示した (Fig. 6). すべての細胞株で正常型 p53 遺伝子導入により、サイクリン A のプロモーター活性は著明に抑制されたが、変異型 p53 遺伝子導入では、HLE ではサイクリン A のプロモーター活性は影響を受けず、HepG2 では活性化、Huh7 では抑制される傾向にあった。



**Fig. 6** A wild type p53 cDNA was inserted into pCMVneo to produce pC53-SN3. Similarly, a vector pC53-SCX3.3, expressing a mutant p53 cDNA from human colorectal tumor CX3, was also constructed. HepG2, Huh7, HLE cells were plated and transfected 24h later with 1 μg/well of pCyclin A-luc with 1 μg/well of pC53-SN3, pC53-SCX3.3 or pCMVneo. Change in cyclin A promoter activity by transfection with wild type p53 or mutant p53 was expressed as ratio to its activity by transfection with pCMVneo.

### 考 察

p53 遺伝子の異常は早期肝細胞癌、高分化型肝細胞癌にはほとんど認められず、肝細胞癌では p53 遺伝子の異常は癌化の後期で生じる変化と考えられている。我々の検討では肝細胞癌組織 10 例中 4 例で p53 蛋白質が発現していた。正常型 p53 は蛋白質の半減期が短いため、免疫染色では検出できないが、変異型 p53 蛋白質は半減期が延長しており、核内で検出が可能なることから、肝細胞癌組織における p53 の異常発現については詳細に検討されている<sup>31)</sup>。分化度の低い肝細胞癌組織ほど p53 蛋白質の発現が高頻度であること、また臨床病期の進行した症例で p53 蛋白質の発現が高頻度であることが知られており<sup>32~34)</sup>、我々の結果は症例数は少ないものの、これまでの報告と p53 の発現の頻度に著しい差は認めず、また癌の分化度と発現の関係も同様の傾向がみられた。一方サイクリン A 蛋白質も 10 症例中 4 例で発現していた。正木らは 17 例の肝細胞癌患者を対象とし、癌部の 41% にサイクリン A mRNA が発現しており、その発現は分化度のより低い癌で高頻度であることを報告している<sup>35)</sup>。蛋白質レベルと mRNA レベルとでサイクリン A の発現の検出方法は異なるもの

の、発現頻度、発現と分化度の関連性は同様の傾向を示した。我々の行ったp53とサイクリンAの肝癌組織における発現に関する結果は、それぞれ別に考えれば、そのこと自体新たな知見を示すものではない。しかし、癌の増殖、進展にサイクリンAとp53が相互作用しながら、関与していることを示唆する報告もあり<sup>27, 36)</sup>、肝癌組織において、サイクリンAとp53の発現の分布を連続切片で比較検討することは重要であると考えた。実際、Table 1に示すように、症例1~4はサイクリンAおよびp53の発現はともに陽性で、症例5~10はともに陰性であった。さらにFig 3に示すようにサイクリンAおよびp53の発現している癌細胞の分布はほぼ一致していた。以上の結果は変異型p53の発現がサイクリンAの過剰発現と関連し、癌の増殖、進展を促進している可能性を示唆するものである。

肝癌細胞のサイクリンAの発現の調節にp53がどのように関与しているか調べるために、培養肝癌細胞を用いて検討した結果、肝癌細胞の種類によりサイクリンAのプロモーター活性に大きな差があることが明らかになった。ヒト肝癌由来の細胞株としてHepG2, Huh7, およびHLEを用いたが、これらの細胞のp53遺伝子の変異についてはHepG2は正常型、Huh7は変異型(コドン220, 2A→G)、HLEは変異型(コドン249, 3G→C)であることが明らかにされている。これらの肝癌細胞のサイクリンA遺伝子の転写活性を調べるために、サイクリンA遺伝子のプロモーター領域をluciferaseレポーター遺伝子上流に組み込んだプラスミドベクターを、肝癌細胞にlipofectinを用いて導入した結果、Fig. 4に示すようにサイクリンAプロモーター活性はHuh7が最も高く、HepG2, HLEでは低い傾向にあった。山本らはサイクリンAプロモーターのSp1, ATF結合領域の下流にp53結合領域が存在し、正常型p53がその活性を抑制することを示している<sup>27)</sup>。我々の検討でサイクリンAプロモーター活性が変異p53のHuh7で高値を示し、正常型p53のHepG2で低値を示したことは、p53の変異とサイクリンAプロモーター活性の関連性からは、興味深い。すなわち、Huh7ではp53が変異型のためサイクリンAのプロモーター活性を抑制できず、HepG2ではp53が正常型のため、プロモーター活性がある程度抑制されているのではないかという推論ができる。しかしながらサイクリンA遺伝子の

転写にはp53以外の経路も関与しているので一面的には考えることはできないと思われる。近年、サイクリンAプロモーターの制御機構が明らかにされつつあるが<sup>37~43)</sup>、研究に用いられた細胞は繊維芽細胞、肺上皮細胞、血管内皮細胞などで、肝癌細胞を用いた検討はこれまで報告されていない。

次に、肝癌細胞のサイクリンAのプロモーターの活性化にプロモーターのどの領域が関与しているか、また癌細胞の種類によって違いがあるかどうか調べるために、サイクリンAのプロモーター塩基配列を5'で欠失し、異なる長さのプロモーター領域を持つ遺伝子をluciferaseレポーター遺伝子に連結し、それぞれ細胞株に導入し活性を測定した結果、サイクリンAプロモーターのSp1結合領域、ATF結合領域を欠失させたconstruct 2およびconstruct 3では、プロモーター活性は著明に抑制された(Fig. 5)。このことは肝癌細胞において、サイクリンAプロモーターの活性化にこれらの領域が重要な役割を果たしていることを示している。また細胞株の種類による違いとしてはプロモーター領域の欠失によるプロモーター活性の減少率がHuh7で最も著しかった点である。このことはサイクリンAプロモーターの活性化に、欠失させたSp1, ATF結合領域の依存性がHuh7が最も高いことを示唆している。

ところで肝細胞癌に対する遺伝子治療の方法として、インターロイキン2遺伝子などをウイルスベクターを用いて肝癌細胞に導入する免疫遺伝子治療<sup>44)</sup>、単純ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼ遺伝子を用いる自殺遺伝子療法<sup>45)</sup>の他にウイルスベクターに組み込んだp53遺伝子を用いた治療法<sup>46, 47)</sup>も開発、応用されようとしている。本研究では肝癌細胞としてp53に変異のある細胞(Huh7, HLE)とp53に変異のない細胞(HepG2)の両方を用いたが、これらの肝癌細胞のサイクリンAのプロモーター活性に外因性のp53がどのような影響を及ぼすか検討することは、肝癌細胞の増殖のメカニズムの解明に寄与するだけでなく、p53を用いた肝臓癌に対する遺伝子治療の応用のためにも重要なことと思われる。そこで我々は3種類の肝癌細胞株に正常型p53遺伝子(pC53SN3.3)および変異型p53遺伝子(pC53SCX3.3)を導入し、サイクリンAのプロモーター活性に及ぼす影響を検討した結果、正常型p53遺伝子導入により、肝癌細胞のサイクリンAプロ

モーター活性は細胞の染色体 DNA の p53 遺伝子の変異の有無にかかわらず、著明に減少した (Fig. 6). 正常型 p53 を持つ肝癌細胞でも、正常型 p53 遺伝子導入により、サイクリン A のプロモーター活性が抑制されたことは、プロモーター活性の制御に p53 蛋白質のアミノ酸配列の問題以外に蛋白質の量も関与していることを示唆している。変異型 p53 遺伝子導入により、HLE ではサイクリン A のプロモーター活性は影響を受けなかったが、HepG2 では活性化、Huh7 では抑制される傾向にあった。HepG2 でサイクリン A のプロモーター活性が活性化されたことは、正常型 p53 遺伝子をもつ HepG2 の細胞の中で変異型の p53 が産生され、ドミナント・ネガティブ効果により、正常型 p53 の機能が失われたものと、考えることもできる。しかし、なぜ Huh7 で活性が抑制されたのかは明らかではない。p53 は遺伝子の変異が特異的な構造転換を伴い、それが機能変化に結びつくと考えられており、変異の有無のみから蛋白質機能の変化を論じることはできない。以上のことより肝細胞癌の増殖、進展にサイクリン A と p53 が相互作用しながら、深く関与していることが明らかになった。このような観点より、サイクリン A 遺伝子の発現の抑制あるいは p53 遺伝子の導入は肝細胞癌の治療に有効な方法となる可能性があると思われる。今後さらに他の細胞周期関連因子が肝細胞癌の増殖、進展にどのように関与しているのか詳細に検討することは、さらに新しい治療法の開発に重要なことと思われる。

### 結 語

1) 肝細胞癌組織 10 例中 4 例で p53 蛋白質、およびサイクリン A 蛋白質が発現しており、分化度の低い癌ほど高頻度に発現する傾向が認められた。また、p53 とサイクリン A の蛋白質の発現は同一細胞で認められる傾向にあった。このことは変異型 p53 の発現がサイクリン A の過剰発現と関連し、癌の増殖、進展を促進している可能性を示唆している。

2) 肝癌由来の細胞株 HepG2, Huh-7, HLE のサイクリン A プロモーター活性は Huh7 が最も高く、HepG2, HLE では低い傾向にあった。肝癌細胞の種類によりサイクリン A のプロモーター活性に大きな差があることが明らかになった。

3) 肝癌由来の細胞株 HepG2, Huh-7, HLE のサイクリン A プロモーター活性はプロモーター領域の

Sp1 結合領域、ATF 結合領域を欠失させると著明に抑制された。このことは肝癌細胞において、サイクリン A プロモーターの活性化にこれらの領域が重要な役割を果たしていることを示している。またプロモーター領域の欠失によるプロモーター活性の減少率は Huh7 が最も著しかった。このことはサイクリン A プロモーターの活性化に欠失させた Sp1, ATF 結合領域の依存性が Huh7 が最も高いことを示唆している。

4) すべての細胞株で正常型 p53 遺伝子導入により、サイクリン A のプロモーター活性は著明に抑制された。一方変異型 p53 遺伝子導入では、HLE でプロモーター活性は影響を受けず、HepG2 では活性化、Huh7 では抑制される傾向にあった。

5) 以上のことより肝細胞癌の増殖、進展にサイクリン A と p53 が相互作用しながら、深く関与していることが明らかになった。このような観点より、サイクリン A 遺伝子の発現の抑制あるいは p53 遺伝子の導入は肝細胞癌の治療に有効な方法となる可能性があると思われる。今後さらに他の細胞周期関連因子が肝細胞癌の増殖、進展にどのように関与しているのか詳細に検討することは、さらに新しい治療法の開発に重要なことと思われる。

### 謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導、後校閲をいただきました斉藤利彦主任教授に深謝いたします。直接御指導頂きました真神易先生、サイクリン A プロモーター遺伝子を供与、研究に御協力いただきました信州大学産科婦人科二階堂敏雄先生に厚く感謝いたします。また御協力頂きました東京医科大学微生物学教室員各位に心から感謝の意を表します。

### 文 献

- 1) Pagano M, Pepperkok R, Verde F, Ansorge W, Draetta G: Cyclin A is required at two points in the human cell cycle. *EMBO J*, **11**(3): 961~971, 1992
- 2) Pines J, Hunter T: p34cdc2: the S and M kinase? *New Biol*, **2**(5): 389~401, 1990
- 3) Tsai LH, Harlow E, Meyerson M: Isolation of the human cdk 2 gene that encodes the cyclin A- and adenovirus E1A-associated p33. *Nature*, **353**(6340): 174~177, 1991
- 4) Sherr CJ: Mammalian G1 cyclins. *Cell*, **73**(6):



- 1059~1065, 1993
- 5) Sherr CJ : G1 phase progression: cycling on cue. *Cell*, **79**(4) : 551~555, 1994
  - 6) el-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, Lin D, Mercer WE, Kinzler KW, Vogelstein B : WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell*, **5**(4) : 817~825, 1993
  - 7) Okamoto K, Beach D : Cyclin G is a transcriptional target of the p53 tumor suppressor protein. *EMBO J*, **13**(20) : 4816~4822, 1994
  - 8) Miyashita T, Reed JC : Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell*, **80**(2) : 293~299, 1995
  - 9) Kastan MB, Zhan Q, el-Deiry WS, Carrier F, Jacks T, Walsh WV, Plunkett BS, Vogelstein B, Fornace AJ Jr : A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia-telangiectasia. *Cell*, **71**(4) : 587~597, 1992
  - 10) Tahara E : Genetic alterations in human gastrointestinal cancers. The application to molecular diagnosis. *Cancer* **75**, 1410~1417, 1995
  - 11) Akama Y, Yasui W, Yokozaki H, Kuniyasu H, Kitahara K, Ishikawa T, Tahara : Frequent amplification of the cyclin E gene in human gastric carcinomas. *Jpn J Cancer Res*, **86**(7), 617~621, 1995
  - 12) Motokura T, Bloom T, Kim HG, Juppner H, Ruderman JV, Kronenberg HM, Arnold : A novel cyclin encoded by a bc1-linked candidate oncogene. *Nature*, **350**(6318), 512~515, 1991
  - 13) Motokura T, Arnold A : Cyclins and oncogenesis. *Biochim. Biophys Acta* **1155**(1), 63~78, 1993
  - 14) Keyomarsi K, Pardee AB : Redundant cyclin overexpression and gene amplification in breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, **90**(3) : 1112~1116, 1993
  - 15) Wang A, Yoshimi N, Suzui M, Yamauchi A, Tarao M, Mori H : Different expression patterns of cyclins A, D1 and E in human colorectal cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*, **122**(2) : 122~126, 1996
  - 16) Paterlini P, Suberville AM, Zindy F, Melle J, Sonnier M, Marie JP, Dreyfus F, Brechot C : Cyclin A expression in human hematological malignancies: a new marker of cell proliferation. *Cancer Res*, **53**(2) : 235~238, 1993
  - 17) Zhang YJ, Jiang W, Chen CJ, Lee CS, Kahn SM, Santella RM, Weinstein IB : Amplification and overexpression of cyclin D1 in human hepatocellular carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun*, **196**(2) : 1010~1016, 1993
  - 18) Nishida N, Fukuda Y, Komeda T, Kita R, Sando T, Furukawa M, Amenomori M, Shibagaki I, Nakao K, Ikenaga M : Amplification and overexpression of the cyclin D1 gene in aggressive human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res*, **54**(12) : 3107~3110, 1994
  - 19) Wang J, Chenivesse X, Henglein B, Brechot C : Hepatitis B virus integration in a cyclin A gene in a hepatocellular carcinoma. *Nature*, **343**(6258) : 555~557, 1990
  - 20) Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC : p53 mutations in human cancers. *Science*, **253**(5015) : 49~53, 1991
  - 21) Levine AJ, Momand J, Finlay CA : The p53 tumour suppressor gene. *Nature*, **351**(6326) : 453~456, 1991
  - 22) Nigro JM, Baker SJ, Preisinger AC, Jessup JM, Hostetter R, Cleary K, Bigner SH, Davidson N, Baylin S, Devilee P, et al : Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types. *Nature*, **342**(6250) : 705~708, 1989
  - 23) Bressac B, Galvin KM, Liang TJ, Isselbacher KJ, Wands JR, Ozturk M : Abnormal structure and expression of p53 gene in human hepatocellular carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA*, **87**(5) : 1973~1977, 1990
  - 24) Murakami Y, Hayashi K, Hirohashi S, Sekiya T : Aberrations of the tumor suppressor p53 and retinoblastoma genes in human hepatocellular carcinomas. *Cancer Res*, **51**(20) : 5520~5525, 1991
  - 25) Hsu IC, Metcalf RA, Sun T, Welsh JA, Wang NJ, Harris CC : Mutational hotspot in the p53 gene in human hepatocellular carcinomas. *Nature*, **350**(6317) : 427~428, 1991
  - 26) Bressac B, Kew M, Wands J, Ozturk M : Selective G to T mutations of p53 gene in hepatocellular carcinoma from southern Africa. *Nature*, **350**(6317) : 429~31, 1991
  - 27) Yamamoto M, Yoshida M, Ono K, Fujita T, Ohtanifujita N, Sakai T, Nikaido T : Effect of tumor suppressors on cell cycle-regulatory genes: RB suppresses p34CDC2 expression and normal p53 suppresses cyclin A expression. *Experimental cell reserch*, **210** : 94~101, 1994
  - 28) Baker SJ, Markowitz S, Fearon ER, Willson JK, Vogelstein B : Suppression of human colorectal carcinoma cell growth by wild-type p53. *Science*, **249**(4971), 912~5, 1990
  - 29) Malone RW, Felgner PL, and Verma IM : Cationic liposome-mediated RNA transfection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 6077, 1989
  - 30) Felgner PL, Gadek TR, Holm M, Roman R, Chan HW, Wenz M, Northrop JP, Ringold GM and Danielson M : Lipofection: A highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc*

- Natl Acad Sci USA, **84**, 7413, 1987
- 31) 片岡正文, 岡林孝弘, 中島 明, 中谷 紳, 上平裕樹, 武田 晃, 折田薫二, 能見貴人, 金澤 浩: 大腸癌, 胃癌, 肺癌症例における癌抑制遺伝子 p53 の免疫組織化学的検討および SSCP 法による点突然変異検出との比較. 日消外会誌 **27**: 71~77, 1994
  - 32) 木村浩之, 香川恵造, 角水正道, 大河原徹, 中島智樹, 坂部一夫, 松本匡史, 水野雅之, 上田和茂, 正田 宇, 出口武司, 岡上 武, 加嶋 敬: 肝細胞癌における変異型 p53 遺伝子発現の免疫組織化学的検討. 肝臓, **34**(8), 606~610, 1993
  - 33) 伊藤隆之, 城 知宏, 関 寿人, 中川泰一, 若林正之, 塩崎安子, 井上恭一, 岡村明治: 肝細胞癌における癌抑制遺伝子: p53 蛋白の臨床病理学的検討-特に増殖能との関係について. 肝臓, **34**(12), 989~994, 1993
  - 34) 齋木 功, 宇根良衛, 西部 学, 平井春美, 嶋村剛, 神山俊哉, 石津寛之, 佐藤直樹, 中島保明, 秦温信, 藤岡保範, 内野純一: p53, HSP72 および PCNA と肝細胞癌の悪性度. 肝臓, **35**(9), 667~676, 1994
  - 35) 正木尚彦, 藤原研司: 肝細胞癌におけるサイクリン A 過剰発現, 医学のあゆみ **176**(13), 971~975, 1996
  - 36) Shiozawa T, Xin L, Nikaido T, Fujii S: Immunohistochemical detection of cyclin A with reference to p53 expression in endometrial endometrioid carcinomas. Int J Gynecol Pathol, **16**(4): 348~353, 1997
  - 37) Nakamura T, Okuyama S, Okamoto S, Nakajima T, Sekiya S, Oda K: Down-regulation of the cyclin A promoter in differentiating human embryonal carcinoma cells is mediated by depletion of ATF-1 and ATF-2 in the complex at the ATF/CRE site. Exp Cell Res, **216**(2): 422~430, 1995
  - 38) Shimizu M, Nomura Y, Suzuki H, Ichikawa E, Takeuchi A, Suzuki M, Nakamura T, Nakajima T, Oda K: Activation of the rat cyclin A promoter by ATF2 and Jun family members and its suppression by ATF4. Exp Cell Res, **239**(1): 93~103, 1998
  - 39) Liu N, Lucibello FC, Engeland K, Muller R: A new model of cell cycle-regulated transcription: repression of the cyclin A promoter by CDF-1 and anti-repression by E2F. Oncogene, **16**(23): 2957~63, 1998
  - 40) Desdouets C, Matesic G, Molina CA, Foulkes NS, Sassone-Corsi P, Brechot C, Sobczak-Thepot J: Cell cycle regulation of cyclin A gene expression by the cyclic AMP-responsive transcription factors CREB and CREM. Mol Cell Biol, **15**(6): 3301~3309, 1995
  - 41) Wang EH, Zou S, Tjian R: TAFII250-dependent transcription of cyclin A is directed by ATF activator proteins. Genes Dev, **11**(20): 2658~2669, 1997
  - 42) Spitkovsky D, Schulze A, Boye B, Jansen-Durr P: Down-regulation of cyclin A gene expression upon genotoxic stress correlates with reduced binding of free E2F to the promoter. Cell Growth Differ, **8**(6): 699~710, 1997
  - 43) Yoshizumi M, Wang H, Hsieh CM, Sibinga NE, Perrella MA, Lee ME: Down-regulation of the cyclin A promoter by transforming growth factor-beta1 is associated with a reduction in phosphorylated activating transcription factor-1 and cyclic AMP-responsive element-binding protein. J Biol Chem, **272**(35): 22259~22264, 1997
  - 44) Huang H, Chen SH, Kosai K, Finegold MJ, Woo SL: Gene therapy for hepatocellular carcinoma: long-term remission of primary and metastatic tumors in mice by interleukin-2 gene therapy in vivo. Gene Ther, **3**(11): 980~987, 1996
  - 45) Huber BE, Richards CA, Krenitsky TA, Huber: Retroviral-mediated gene therapy for the treatment of hepatocellular carcinoma: an innovative approach for cancer therapy. Proc Natl Acad Sci USA, **88**(18): 8039~8043, 1991
  - 46) Bischoff JR, Kirn DH, Williams A, Heise C, Horn S, Muna M, Ng L, Nye JA, Sampson-Johannes A, Fattaey A, McCormick F: An adenovirus mutant that replicates selectively in p53-deficient human tumor cells. Science, **274**(5286): 373~6, 1996
  - 47) Fricker J: Hepatocellular carcinoma and p53 gene therapy. Mol Med Today, **2**(9): 361, 1996

## Abnormal expression of cyclin A and p53 in hepatocellular carcinomas

Shinichiro KOKUNO

The Fourth Department of Internal Medicine, Tokyo Medical University  
(Director: Prof. Toshihiko SAITO)

The involvement of cyclin A and p53 in the development of hepatocellular carcinomas (HCC) was studied immunohistochemically. Of 10 cases of human HCC examined, 4 tumors overexpressed cyclin A and p53. In addition, cyclin A-positive cells were topographically related to those cells positive for p53. We studied cyclin A expression using plasmid DNA containing a luciferase coding sequence which is linked to the downstream of the cyclin A promoter. This plasmid DNA was transfected into various hepatoma cells, HepG2, Huh7, HLE, by lipofection, and luciferase assay was examined. A high level of cyclin A promoter activity was observed in Huh7. In contrast, a low level of activity was observed in HepG2 and HLE. We also studied the promoter activity of various deletion constructs of the cyclin A promoter region. Luciferase activity sharply decreased when the deletion construct lacked binding sites to Sp1 and ATF in all cells. We also studied the cotransfection of these cell lines with cyclin A promoter-luciferase expression vector with a plasmid expressing wild or mutant p53. Cyclin A promoter activity was remarkably suppressed by cotransfection with wild p53. However, cotransfection with mutant p53 indicated no change of cyclin A promoter activity in HLE, activation in HepG2, and suppression in Huh7. In conclusion, our data suggest that the abnormal expression of cyclin A and p53 is associated with the growth and progression of HCC. From this point of view, suppression of cyclin A gene expression and introduction of p53 gene may be effective therapy for HCC. To develop the novel therapeutic strategies, it is important to determine other cell cycle factors associated with the tumorigenesis and growth of HCC.

---

〈Key words〉 Hepatocellular carcinoma, cyclin A, p53

---