

博士論文

RNA sequence を用いた骨における **p53** 標的遺伝子の同定

津田 祐輔

目次

要旨

第1章 序文

第2章 研究材料および方法

- 2-1. 細胞培養とマウス
- 2-2. 発現ベクターの作成
- 2-3. RNA sequence 解析
- 2-4. RNA sequence データ解析
- 2-5. Quantitative real-time PCR
- 2-6. cDNA microarray
- 2-7. Western blotting
- 2-8. 組織免疫染色
- 2-9. レポーターアッセイ
- 2-10. 融合タンパクの作成
- 2-11. 細胞増殖アッセイ
- 2-12. コロニー形成アッセイ
- 2-13. 安定発現細胞株を用いた実験
- 2-14. T 細胞アッセイ
- 2-15. マウス骨肉腫モデルの解析

第3章 結果

- 3-1. 骨において DNA ダメージにより発現が変化する遺伝子群の全体像とパスウェイ解析
- 3-2. p53 標的遺伝子のスクリーニング

3.3. 骨特異的標的遺伝子 CD137L の同定

3-4. p53 もしくは CD137L による細胞増殖抑制効果

3-5. CD137L 逆向きシグナルと正方向シグナルの骨肉腫細胞における役割

第4章 考察

第5章 結論

謝辞

引用文献

要旨

骨肉腫における *p53* 変異の意義を明らかにするため、マウス骨組織において *p53* 標的遺伝子を網羅的に探索した。野生型及び *p53* 欠損マウスに 10Gy の全身放射線照射を行い、各群 3 サンプル計 12 サンプル (*p53*^{+/+}、*p53*^{-/-}、照射有、照射無) について RNA sequence を施行した。*p53*^{+/+}照射有群においてその他の群と比較して、2 倍より大きく発現が上昇している 69 遺伝子を候補遺伝子として抽出した。ヒト骨肉腫細胞株を用いた解析の結果、新規 *p53* 標的遺伝子 *CD137L*、*CDC42BPG*、*FST* を同定した。*CD137L* は双方向性のシグナルを持ち、逆向きシグナルは細胞増殖を負に制御し、正方向シグナルは T 細胞を活性化し腫瘍免疫を増強させる可能性が示された。また、*CD137L* 融合タンパクはゼノグラフィドモデルにおいて腫瘍増殖を抑え、新規治療標的になりうることが示唆された。

第1章 序文

癌抑制遺伝子 *p53* の変異は多くの癌種に見られ頻度が高い (図 1)。*p53* は転写因子として機能し、その標的遺伝子の発現誘導を介してがん化を抑制する[1]。*p53* に発現誘導される遺伝子はアポトーシスや細胞周期の停止などを誘導し、がん化を抑制している[1,2]。さらに、近年では代謝[3]、幹細胞の維持[4]、転移[5]、免疫反応[6]を制御し、癌抑制的に働くことが明らかとなっている。これは *p53* が制御している癌抑制機能を明らかにすることにより、癌の早期発見や転移の抑制、癌の治療において新しい可能性が開かれることを示唆している。

骨肉腫の発生頻度は全悪性腫瘍の中で 0.2% であり、非常に稀な悪性腫瘍である[7]。骨原発悪性腫瘍の中では、最も発生頻度が高い腫瘍であり全骨原発悪性腫瘍の 30% 程度を占める[7]。近年の骨肉腫のゲノム解析において最も頻度が高い変異は *p53* 遺伝子変異であり、全ゲノム解析では 95% もの症例に構造異常や一塩基置換を含む何らかの *p53* の変異が見つかった (図 2) [8-12]。また、*p53* の生殖細胞系列に *p53* 変異をもつ Li-Fraumeni 症候群の小児患者において、骨肉腫の発生頻度が最も高いこと (表 1) [13] や間葉系幹細胞から骨芽細胞への分化過程のいずれかで *p53* に変異を導入したマウスに骨肉腫の発生頻度が高いこと (図 3) [7, 14] は骨肉腫発生における *p53* 変異の重要性を示す所見である。しかし、骨肉腫発生における *p53* 変異の役割については不明な点が多い。

近年の報告において *p53* の結合部位や転写活性能は細胞特異性があると報告されている[15]。さらに、Li-Fraumeni 症候群の患者や *p53* 欠損マウスにおいて、様々な臓器に悪性腫瘍が発生し、その腫瘍の発生頻度は異なっている (表

1、図 3) [13、16]。これらの結果は p53 の腫瘍抑制効果は臓器や細胞特異性を持つ可能性を示唆している。このような点を考慮すると、骨肉腫発生における意義を知る上で骨や骨芽細胞における p53 の機能を明らかにすることは重要であると考えられる。

骨肉腫の治療は現在、手術による切除とドキソルビシン、シスプラチン、メトトレキサートによる多剤併用化学療法が主体である。これらの治療により、局所病変のみの患者の 5 年生存率は 70% 程度に改善した[17]。しかし、転移や再発を起こした骨肉腫患者の 5 年生存率は 20% 程度と低く、この 30 年程進歩がない[18]。このため、新規治療の開発が望まれている。p53 の機能そのものを対象に薬物治療を行うことは p53 経路の複雑さに起因する副作用のため困難であり[1]、治療標的となりうる p53 標的遺伝子や下流の経路を同定することは、p53 遺伝子に変異のある癌を治療する上で鍵となる可能性がある。

そこで我々は、骨や骨芽細胞における p53 標的遺伝子を網羅的に探索し、新規 p53 標的遺伝子を発見することを目的として RNA sequence 解析を行った。また、本研究の目的は骨肉腫発生における p53 変異の意義を明らかにし、新規治療標的を同定することである。

第2章 研究材料および方法

2-1. 細胞培養とマウス

U2OS と SaOS2 は American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA) から提供を受けた。FreeStyle™ 293、LM8 は Invitrogen (Carlsbad, CA, USA) より購入した。U2OS(p53 wild)、SaOS2(p53 null)はヒト骨肉腫由来、LM8 はマウス骨肉腫由来、FreeStyle™ 293 は胎児腎臓由来の細胞株である。MCF10A は乳腺上皮細胞由来、HCT116 は大腸癌由来の細胞株である。骨芽細胞初代培養は以前に記載された方法で樹立した[19]。

U2OS は McCoy's medium +10% FBS+L-glutamine で培養した。SaOS2 は McCoy's medium+15% FBS+L-glutamine で培養した。FreeStyle™ 293 は FreeStyle™ 293 Expression Medium で培養した。

Small interfering RNA (siRNA) oligonucleotides は Sigma Genosis (Hokkaido, Japan) で合成して購入した。トランスフェクション試薬として Lipofectamine RNAiMAX reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) や FuGENE6 (Roche, Basel, Switzerland) を用いた。siRNA oligonucleotides のシーケンスは表 2 に示した。

p53 knockout C57BL/6J マウスは RIKEN BioResource Center (Ibaraki, Japan) から購入した。C3H/HeJ マウスは CLEA (Tokyo, Japan) から購入した。飼育ケージ内の移動は自由とし、飼料および飲用水は常時摂取可能な状態で、12 時間ごとの明暗サイクルにて飼育した。すべての動物実験は「東京大学医科学研究所動物実験指針」に従って行った。

2-2. 発現ベクターの作成

発現ベクターを作成するため、*CD137L*、*CDC42BPG*、*FST*の全長を KOD-Plus DNA polymerase (Toyobo, Osaka, Japan) で増幅して pCAGGS vector に挿入した。作成後に DNA sequence で vector への挿入を確認した。作成に使用したプライマーは表 2 に示した。

2-3. RNA sequence 解析

p53 野生型 ($p53^{+/+}$) およびノックアウトマウス ($p53^{-/-}$)、放射線照射ありなしの 4 群 (各群 3 匹ずつ) を用いた。p53 野生型・放射線照射なしを W 群、p53 野生型・放射線ありを WX 群、p53 ノックアウト・放射線なし群を K 群、p53 ノックアウト・放射線あり群を KX 群と定義した。X 線照射を 10Gy 行い、24 時間後に頭蓋骨を含む 24 臓器を摘出した。骨肉腫の前駆細胞と考えられている骨芽細胞が細胞の大部分を占めることから頭蓋骨を選択した。放射線照射の線量は 10Gy としたが、これは p53 を活性化させアポトーシスを誘導する線量であり、これまでの論文を参照して決定した [20, 21]。それぞれ回収した組織は RNA later に浸し RNA 回収まで 4°C で保管した。組織は Precellys を用いて QIAzol 中で破碎後、RNeasy plus universal mini kit (Qiagen, CA, USA) を用いて RNA を回収した。Nanodrop (Thermo scientific, USA) で回収量を、Bioanalyzer (Agilent technologies, CA, USA) で Quality を測定した。RT-qPCR でも Quality check を行い、ライブラリー作成へと進めた。1µg の total RNA から、TruSeq RNA Sample Preparation kit (Illumina) を用いてシーケンスライブラリーを作成した。まず、poly-T 付加磁気ビーズにて total RNA から poly-A RNA (mRNA) を精製し、これを 2 価陽イオンにて化学的に断片化した。断片化した mRNA から、逆転写酵素 (SuperScript II Reverse Transcriptase, Life

Technologies) を用いて cDNA を合成し、アダプター配列を付加した。作成したライブラリーは HiSeq2000 (Illumina) を用いて両端 100bp のシーケンスを行った。

2-4. RNA sequence データ解析

RNA sequence データ解析は TopHat-Cufflinks pipeline を用いて行った。データ解析前に FastQC でデータの Quality を確認した。シーケンスリードを TopHat (v2.0.9) を用いて、マウスゲノム mm9/GRCm37 にマッピングした。マッピングパラメーターは TopHat の初期設定に従った。Cufflinks (v2.2.1) を用いて、FPKM 値を算出した。それぞれの FPKM 値の解析を行う前に、0 を消すために 0.0001 をすべての値に加えた。WX 群において発現が 2 倍より大きく上昇する遺伝子を抽出するために「WX の FPKM 値の中央値/ K、KX、WX の FPKM の中央値内で最大値 >2」、 「WX とその他の群の FPKM 値を T-test で比較し $P < 0.05$ 」、 「WX の FPKM 値 >1」 の 3 つの基準を満たす遺伝子を抽出した。一方、1/2 より低下する遺伝子として「WX の FPKM 値の中央値/ K、KX、WX の FPKM 値の中央値内で最低値 <1/2」、 「WX とその他の群の FPKM 値を T-test で比較し $P < 0.05$ 」、 「K、KX、WX の中央値内で最低値 >1」 の基準で抽出した。DAVID (The Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery) を用いてパスウェイ解析を行った [22、23]。

2-5. Quantitative real-time PCR

Quantitative real-time PCR (RT-qPCR) は SYBR Green Master I を用いて Light Cycler 480 (Roche, Basel, Switzerland) で行った。プライマーのシーケンス

は表2に示した。Total RNAはRNeasy plus spin column kits (Qiagen、Valencia、CA、USA) を用いて手順書に沿って抽出した。Complementary DNAはSuper Script Preamplification System (Invitrogen、Carlsbad、CA、USA) を用いて合成した。抗がん剤であるAdriamycin (ADR)で処理をして回収したU2OS、骨芽細胞初代培養は、ADRによりp53の活性化を図ったものであり、p53の代表的な標的遺伝子であるp21の誘導をpositive controlとした。また、SaOS2にp53を発現させるために様々なmultiplicity of infection (MOI)でアデノウイルス (Ad-p53) もしくはコントロールとして LacZ (Ad-LacZ) を感染させた。

2-6. cDNA microarray

データは過去の我々の論文から引用した[24、25]。SurePrint G3 Human GE 8x60K microarray (Agilent、Santa Clara) を用いた。MCF10A $p53^{+/+}$ 、MCF10A $p53^{-/-}$ 、HCT116 $p53^{+/+}$ 、HCT116 $p53^{-/-}$ 細胞を用いて ADR で 2 時間処理した。ADR 投与後、0 h、12 h、24 h、48 h に細胞から RNA を回収した。47,534 peaks (derived from 22,276 genes) を用いて解析を行った。

2-7. Western blotting

Western blotting (WB) は通常のプロトコールにて行った。Protein lysatesは RIPA buffer (Thermo scientific、USA) と Protease inhibitor cocktail (Roche、Basel、Switzerland) で作成した。Anti- β -actin monoclonal antibody (clone AC15) はSigmaから購入した。Anti-p53 monoclonal antibody (clone DO-7) と anti-p21WAF1 monoclonal antibody (clone EA10) はCalbiochem (San Diego、CA、USA) から購入した。Anti-HA monoclonal antibody (clone 3F10) はRoche

から購入した。Anti4-1BBL (CD137L) monoclonal antibody (EPR1172Y) は GeneTex (CA, USA) から購入した。

2-8. 組織免疫染色

生後1週の $p53^{+/+}$ と $p53^{-/-}$ マウスの頭蓋骨を用いた。マウスは W 群、WX 群、K 群、KX 群の4群を用い、各群には3匹のマウスを使用した。組織免疫染色は以前に述べられた方法で行った[26]。Endogenous peroxidase をブロック後に染色を行い、抗体は Goat anti-Cd137l antibody (sc-11819, Santa Cruz) と rat anti-Ki67 antibody (clone MIB-5, Agilent Technologies) を用いた。染色は2人の独立した研究者により評価を行った。

2-9. レポーターアッセイ

p53 コンセンサス配列と比較して p53-binding site の可能性がある DNA 配列を転写開始点から 5000bp 上流もしくは第1イントロン内から抽出し、それらの DNA 配列を増幅し pGL4-promoter vector (Promega, WI, USA) でサブクローン化した。プライマーの配列は表2に示した。遺伝子導入においては SaOS2 をプレートに播種し、24時間後に Fugene-6 (Roche) を用いて PGL4 ベクターと発現ベクターを遺伝子導入した。細胞は導入後48時間にて回収した。ルシフェラーゼアッセイは、Dual Luciferase assay system (Promega) を用いて以前に示された方法で行った[26]。

2-10. 融合タンパクの作成

Recombinant CD137-Fc は次に示す方法で以前に報告された論文を参考にして作成した[27、28]。CD137 の細胞外ドメインを構成するシーケンス (human、amino acids 24–186; mouse、amino acids 24–187) や Cd137l の細胞外ドメインを構成するシーケンス (mouse、amino acids 104–304) とヒト IgG の Fc 部分 (amino acids 100–329) を増幅してクローニング後、制限酵素で切断して pCAGGS に組み込んだ。ベクターは Fugene6 を用いて FreeStyle 293-F 細胞に導入した。融合タンパク (human CD137-Fc、mouse Cd137-Fc、mouse Cd137l-Fc) は protein A-Sepharose (Invitrogen) を用いて、細胞上清より精製した。さらに、dialysis cassette (0.1–0.5 ml、10 K Molecular weight cut off、Thermo scientific) を用いて、精製を行った。human IgG antibody (American Qualex International、San Clemente、CA、USA) を用いて細胞上の Cd137 もしくは Cd137L と融合タンパクとの結合を確認した。

2-11. 細胞増殖アッセイ

細胞増殖は CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay (Promega) を用いてプロトコールに従って解析した。細胞は 96-well culture plate に播種し、開始時には SaOS2 は 4.0×10^3 個、骨芽細胞初代培養は 7.5×10^3 個とした。96-well culture plate に細胞を撒く 24 時間前より IgG-Fc もしくは CD137-Fc を用いてコートした。培養開始後 48h 後に microplate reader (Biotek Instruments、VT、USA) で 450 nm の吸光度を測定した。

2-12. コロニー形成アッセイ

Colony formation assay は 6-well culture plate で行った。細胞に pCAGGS/CD137L もしくは Mock plasmid を導入し Geneticin (U2OS は 1.0mg/ml、SaOS2 は 1.0 mg/ml、LM8 は 1.2mg/ml) (Invitrogen、Carlsbad、CA、USA) と一緒に 1-2 週間培養した。コロニーを crystal violet (Sigma、St Louis、MO、USA) で染色して Image J software で定量化した。

2-13. 安定発現細胞株を用いた実験

LM8 に対して Mock もしくは Cd137l-pCAGGS expression vector を Lipofectamine 2000 reagent (Invitrogen) を用いて導入した。両ベクターは Geneticin に対して耐性の遺伝子を発現しており、3 週間 Geneticin (1.0 mg/ml) を添加したメEDIUM で培養して Geneticin 耐性の細胞を濃縮した。それぞれのベクターを導入した細胞の中で CD137l 発現の差が大きい群として 3 クローンずつを選択した (Cd137l-1、Cd137l-2、Cd137l-3、Mock 1、Mock2、Mock3)。生後 6 週の C3H/HeJ マウスの背部皮下にこれらの細胞を移植した。1 × 10⁶ 個の LM8 安定発現細胞株を PBS0.1ml に入れて注射した。腫瘍径を 2、3 日毎に計測して体積を次の式で計算した。計算式: (長径) × (短径)² × 0.52。結果は平均 ± 標準偏差で示した。有意差は Wilcoxon rank-sum test で計算した。

2-14. T 細胞アッセイ

Cd137-Fc の T 細胞に対する影響を ELISA で IL2 を測定することで探索した。また、細胞増殖能の評価も行った。T 細胞は生後 6 週の C3H/HeJ マウス (CLEA Japan、Tokyo、Japan) の脾臓から採取して、FACS Aria (BD Biosciences、San Jose、CA、USA) を用いて CD4⁺または CD8⁺ T 細胞を分離し

た。24well プレートに CD4⁺ T 細胞を 5.0×10^5 個/500 μ l、CD8⁺ T 細胞を 2.5×10^5 個/500 μ l で播種した。細胞を播種する前に 5.0 μ g/ml の濃度で anti-CD3 antibody (clone 145-11C、Biolegend) と Cd137l-Fc (20 μ g/ml) もしくは Mock-Fc (20 μ g/ml) をプレートに固着させた。Anti-CD28 antibody (clone 37.51、eBioscience、San Diego、CA、USA、1.5 μ g/ml) をポジティブコントロールとして用いた。細胞播種 48 時間後に細胞上清の IL-2 を ELISA (mouse IL2 DuoSet ELISA、R and D systems、Minneapolis、MN、USA) を用いて測定した。アッセイは 3 回、繰り返して行った。

2-15. マウス骨肉腫モデルの解析

生後 6 週の C3H/HeJ マウスの左背部に 0.1 ml の PBS と 1×10^6 LM8 cells を注射した。腫瘍が 0.5cm 大になった時点で Cd137-Fc 融合タンパク (50 μ g) もしくは Mock-Fc (50 μ g) を 3 日間、腹腔内投与した。マウスは各群 3 匹を用いて、腫瘍径を 2、3 日毎に計測して体積を次に示す計算式で計算した。計算式: (長径) \times (短径)² \times 0.52。結果は平均 \pm 標準偏差で示した。有意差は Wilcoxon rank-sum test で計算した。

第3章 結果

結果 3-1. 骨において DNA ダメージにより発現が変化する遺伝子群の全体像とパスウェイ解析

p53 依存的に放射線による DNA ダメージ下で誘導される新規遺伝子を探索するため、RNA sequence を用いて 23813 遺伝子の発現を解析した。骨以外の 23 臓器の RNA sequencing データの詳細は次の論文に示されている[29]。解析の全体像を図 4 に示した。p53^{+/+}、放射線照射有群において、その他の群と比較して発現が 2 倍より大きく上昇する遺伝子として、69 遺伝子が抽出された (表 3)。代表的な p53 に発現誘導される遺伝子である p21、Bax、Fas はこの中に含まれていた (図 5)。一方、1/2 に低下する遺伝子として 127 の遺伝子が抽出された (表 4)。2 倍に上昇する遺伝子セットを用いて DAVID でパスウェイ解析を行ったところ、p53 signaling pathway が最も上位であり cytokine-cytokine receptor interaction (CD137L を含む)、TGF-beta signaling pathway (FST を含む) が次に関連するパスウェイとして挙げられた (表 5)。1/2 より低下する遺伝子セットは Cell cycle が最も関連するパスウェイであった。過去の論文を参照した CHIP sequence データでは、誘導される 69 遺伝子中 49 遺伝子 (71%) に p53 結合領域が見られた[30]。一方で、同じデータを参照すると、抑制される 127 遺伝子中では 8 遺伝子 (6%) のみに p53 結合領域が見られた。さらに、抑制される 127 遺伝子中 51 遺伝子は p53-p21-DREAM pathway によって制御されると報告されており[31]、抑制される遺伝子の多くは p53 により間接的なメカニズムで制御されている可能性が考えられた。

3-2. p53 標的遺伝子のスクリーニング

$p53^{+/+}$ 、放射線照射あり群において、その他の群と比較して2倍より大きく発現が上昇する69遺伝子の内訳はこれまでに $p53$ の標的遺伝子として報告されている遺伝子が28遺伝子、ヒトに相同遺伝子がない遺伝子が10遺伝子、残りが31遺伝子であった。 $p53$ 依存的に誘導される遺伝子を同定するため、野生型 $p53$ を発現している U2OS において siRNA で $p53$ の発現を抑制し、ADR を投与した。代表的な $p53$ 標的遺伝子である $p21$ が mRNA レベルにおいて ADR 投与によって誘導され、siRNA により抑制されることを確認した (図 6)。上述の2倍より大きく誘導され、既報とヒトに相同遺伝子がない遺伝子を除いた31遺伝子について RT-qPCR を行い、 $p53$ に制御される遺伝子として $CD137L$ 、 $CDC42BPG$ 、 FST の3遺伝子を同定した (図 6)。さらに、これらの3遺伝子の RNA sequence データでは放射線照射により発現が誘導されることを確認した (図 7)。さらに、 $p53$ 野生型である U2OS において ADR 投与によって発現が誘導された (図 8)。また、 $p53^{+/+}$ と $p53^{-/-}$ マウスから作成した骨芽細胞初代培養において、ADR 投与により発現が誘導され (図 9)、誘導は $p53$ 依存的であることが分かった (図 10)。また、 $p53$ null の細胞株である SaoS2 に Adenovirus を用いて $p53$ を発現させると、これらの3遺伝子の誘導がみられた (図 11)。これらのことから、 $CD137L$ 、 $CDC42BPG$ 、 FST は $p53$ 依存的に誘導される遺伝子であることが示唆された。また、これらの RT-qPCR の結果から U2OS、SaoS2、骨芽細胞において、ADR 投与なしのベースレベルで $CD137L$ の発現があることが確認できた。

3-3. 骨特異的標的遺伝子 $CD137L$ の同定

これら 3 遺伝子が p53 により直接転写誘導されるかを検討するために、遺伝子の転写開始点上流や 1st イントロンにおいてコンセンサス配列と類似する p53 結合領域を探索した。3 遺伝子ともに p53 結合領域の候補が見られ (図 12)、この領域をクローニングしてレポーターアッセイを行ったところルシフェラーゼ活性が上昇した (図 13)。さらに、p53 抗体を用いた CHIP sequence のデータを過去の論文より入手して検索すると [30]、FST 遺伝子の 3.5kb 上流にピークが見られ、この領域をクローニング (FST-BS2) してレポーターアッセイを行った。その結果、この領域においてもルシフェラーゼ活性が上昇した (図 13)。また、CHIP assay を行い、p53 タンパクとこれらの領域の DNA との直接の結合を確認した (図 14)。これらの結果は、*CD137L*、*CDC42BPG*、*FST* は p53 タンパクに直接制御されること示していると考えられた。

RNA sequence の結果を臓器毎に検討すると、*Cd137l* は骨においてのみ WX 群で 2 倍以上に誘導された (図 15)。*Cdc42bpg*、*Fst* は骨特異的な誘導は見られなかった。さらに、Western blotting を行い、U2OS に対して ADR を投与すると *CD137L* が誘導され、*si-p53* によって誘導は抑制された (図 16)。また、マウス頭蓋骨から採取した骨組織に放射線照射を行い、組織免疫染色を行うと *p53^{+/+}* 群のみ *Cd137l* が誘導された (図 17)。以上の結果より *Cd137l* について、さらなる機能解析を行うこととした。

我々の MCF10A と HCT116 を用いたマイクロアレイの結果では、MCF10A *p53^{+/+}*、HCT116 *p53^{+/+}* に加え、MCF10A *p53^{-/-}*、HCT116 *p53^{-/-}* においても *CD137L* の発現は誘導された (図 18)。また、H1299 肺癌細胞株においても、*CD137L* の発現は誘導された。これらの結果は *CD137L* が様々な細胞株におい

て p53 依存的もしくは非依存的に誘導されることを示している。マウスとヒトにおいて誘導が異なることは、CD137L はヒトにおいて 4 つの p53 結合領域の候補があると Remap で示されているが、これらはマウスにおいて保存されていない事が原因の一つと考えられる (図 19)。

3-4. p53 もしくは CD137L による細胞増殖抑制効果

骨芽細胞前駆細胞は骨肉腫の起源細胞と考えられており [19]、骨芽細胞の初代培養を用いて増殖能の評価を行った。以前に示されている様に、 $p53^{-/-}$ マウスから樹立した初代骨芽細胞は $p53^{+/+}$ マウスと比較して増殖能が亢進していた (図 20)。さらに、 $p53^{-/-}$ マウスから樹立した初代骨芽細胞においては Ki67 陽性の骨芽細胞が $p53^{+/+}$ マウスと比較して多かった (図 21)。 $p53^{+/+}$ マウスにおける Ki67 陽性細胞は放射線照射により $p53^{-/-}$ マウスよりも大きく減少し、p53 による細胞増殖抑制効果を示唆していると考えられた。

次に CD137L の機能を解析するために U2OS、SaOS2、LM8 を用いてコロニー形成アッセイを行った。CD137L を過剰発現させると、Mock と比較して細胞数が有意に減少した (図 22)。さらに、FST344 (major isoform of FST)、FST311 (minor isoform of FST)、CDC42BPG を過剰発現した場合にも細胞数は有意に減少した (図 23)。これらの結果より 3 遺伝子は細胞増殖を負に制御すると考えられた。

T 細胞はレセプターである CD137 を発現している。また、DNA ダメージにより骨芽細胞や U2OS に CD137 は誘導されることが分かった (図 24)。また、ベースのレベルにおいて、これらの細胞において CD137 が発現しているこ

とが分かった。これらの細胞が腫瘍細胞への CD137L 逆向きシグナルに参与している可能性がある。

次に我々は Cd137l の細胞増殖抑制効果を *in vivo* で調べた。Cd137l もしくは Mock を発現する LM8 を作成し (図 25)、CH3 のマウスの皮下に注射した。その結果、Cd137L を発現する LM8 は Mock を発現する細胞と比較して細胞増殖が減少した (図 26)。

3-5. CD137L 逆向きシグナルと正方向シグナルの骨肉腫細胞における役割

CD137L はリガンドであるが、CD137 と結合することで逆向きのシグナルが流れることが知られている[32]。この逆向きシグナルは増殖や分化など様々な細胞応答を引き起こす。CD137L の働きをより詳細に調べるために、CD137 もしくは CD137L の細胞外ドメインとヒト IgG の Fc 領域の融合タンパクを作成した (CD137-Fc、CD137L-Fc)。細胞免疫染色を行い、融合タンパクと細胞膜上の CD137L、CD137 との結合を確認した (図 27)。

CD137-Fc の細胞増殖への影響を調べるために、CD137-Fc もしくは Mock-Fc をプレートに固着させて、SaOS2 もしくは *p53^{+/+}* 骨芽細胞初代培養を培養した。CD137-Fc の群では細胞増殖が減少し、CD137L 逆向きシグナルは細胞増殖を負に制御すると考えられた (図 28、29)。

CD137 のリガンド/レセプターシステムは抗原提示細胞が T 細胞を刺激して活性化する際に用いられている事が報告されている[33]。CD137L-Fc が T 細胞へ持つ影響を調べるために、C3H/HeJ マウスの脾臓から樹立した CD4 陽性もしくは CD8 陽性 T 細胞を用いて IL2 産生能と増殖能のアッセイを行った。

CD137L-Fc と CD3 を固着させたプレートで CD4 陽性もしくは CD8 陽性 T 細胞

を培養すると Mock と比較して、IL2 産生能や増殖能が有意に増加した（図 30）。

最後に Cd1371-Fc が LM8 細胞の増殖能に対してどのように作用するかを *in vivo* のモデルを用いて検証した。6 週齢の C3H/HeJ マウスの左背部皮下に 1×10^6 の LM8 cells を移植した。腫瘍移植後、約 7 日目に 0.5cm に腫瘍が達した後より、Cd1371-Fc（0.2ml、50ug）もしくは Mock-Fc（0.2ml、50ug）を 3 日間連続で投与した。その結果、19 日目には Cd1371-Fc の群で Mock-Fc と比較して有意に腫瘍径が小さく、腫瘍増殖抑制効果が見られた（図 31）。また、Cd137-Fc の投与では細胞増殖抑制効果は見られなかった。

第4章 考察

我々は骨において p53 依存的に発現が誘導される遺伝子を RNA sequence を用いて網羅的に探索した。まず、骨において発現が変化する遺伝子群の全体像を明らかにし、p53 によって制御されるパスウェイを同定した。さらに骨において発現誘導される新規遺伝子群について骨肉腫細胞株を用いてスクリーニングを行い、p53 に直接制御される遺伝子として *CD137L*、*CDC42BPG*、*FST* を同定した。また、p53 により骨特異的に誘導される *CD137L* に着目し、細胞増殖能の低下と免疫応答を増強する作用を明らかにした。

p53 に誘導される遺伝子群に対してパスウェイ解析を行うとアポトーシス関連の遺伝子が集積していた。これまでに多くの報告で、p53 は細胞周期停止とアポトーシス誘導を介して腫瘍抑制的に働くと言われており、過去の報告に矛盾しない結果であった。我々の結果からは骨や骨芽細胞においても p53 は DNA ダメージに反応してアポトーシスと細胞増殖停止を引き起こすことで腫瘍抑制的に働いていると推察された。さらに、パスウェイ解析では「Cytokine-cytokine receptor interaction pathway」に関連する遺伝子が集積しており、このパスウェイが p53 の下流にあり腫瘍抑制的に働く可能性が示唆された (図 32)。このパスウェイに含まれる遺伝子としては *Inhbb*、*Tnfrsf10b*、*Gdf5*、*Eda2r*、*Fas*、*Cd137l* が含まれていた。この中で、*Tnfrsf10b*、*Eda2r*、*Fas* は p53 の標的遺伝子かつ腫瘍抑制的に働くことが報告されている[34、35、36]。

CD137L は骨で最も発現が誘導される p53 標的遺伝子であることを新たに発見した。*CD137L* は別名で *Tumour necrosis factor superfamily 9 (TNFSF9)* や *4-1BBL* としても知られており TNF superfamily の一員である。*CD137* のレセプ

ターリガンドシステムは抗原提示細胞による共刺激を通して、T細胞を活性化することが知られている[37、38]。T細胞の活性化は抗腫瘍免疫に重要であることが知られており、免疫療法は臨床的に有用な治療法であることが証明されてきている[39]。T細胞の活性化には主要な2経路の活性化が重要である[38]。一つは主要組織適合複合体（major histocompatibility complex（MHC） class I）とT細胞受容体との結合、もう一つは共刺激/共抑制分子同士の結合である。T細胞活性化の程度は共刺激分子と共抑制分子のバランスによって決まる[40]。p53はT細胞応答をMHC class I分子の誘導とPDL1の抑制を通じて制御している[41、42]。我々は今回初めて、p53が共刺激分子を制御することを明らかにした。我々の報告は免疫系の制御におけるp53の重要性を強調するものである。

CD137Lは2つのメカニズムにより骨肉腫発生を抑制している可能性がある（図33）。一つ目は逆向きCD137Lシグナルによる増殖抑制効果である。我々の研究では逆向きCD137Lシグナルは骨芽細胞やSaOS2に対して細胞増殖抑制効果を示した。逆向きCD137Lシグナルは内因性のアポトーシス経路を通じたアポトーシスや、細胞周期停止効果を示したと報告されている[43]。しかし、p53は多くの遺伝子を誘導して細胞増殖を負に抑制することが知られているが、本研究の結果からはCD137Lの逆向きシグナルによる細胞増殖抑制効果は弱く、限定的であると考えられた。

もう一つのCD137Lによる腫瘍抑制メカニズムはT細胞の活性化による可能性が考えられた。Cd137I融合タンパクはin vitroでT細胞を活性化したが、このデータはCD137Lの正方向のシグナルは骨肉腫の微小環境を改変してT細胞活性化を通じて抗腫瘍効果を発揮する可能性があることを示唆している。

CD137L を発現する肝細胞癌細胞株をマウスに移植すると、強い T 細胞応答と長期の腫瘍免疫を惹起すると報告されており [44]、我々の仮説を支持するものである。24 臓器の中で、Cd137l の発現は骨で最も発現が誘導されており、骨肉腫発生における CD137L の重要性を示唆している。

しかし、骨で最も誘導されるメカニズムについては不明である。Remap データベースでは骨分化因子である Runx1 と Runx3 は CD137L に結合していることが示されている。また、我々の RNA sequencing のデータにおいて Runx1 と Runx3 は骨において発現が高いことが示されている。さらに、RUNX ファミリータンパクは DNA ダメージに応じて p53 タンパクと結合して協調的に働く事が示されている [45、46、47]。以上より、RUNX ファミリーが Cd137l の骨における誘導に関与している可能性があると考えられた。

CD137L-Fc は *in vivo* で抗腫瘍効果を示した。そのメカニズムについては、さらなる検討が必要であるが、CD137L/CD137 シグナルは骨肉腫に対する新規の治療標的となるかもしれない。抗腫瘍効果を示した理由としては、CD137L-Fc による T 細胞活性化が関与している可能性がある。CD137L は強い免疫惹起作用を持ち、いくつかの癌腫に対して実現性のある免疫治療として注目されている [48]。PDL1 抗体や CTLA4 抗体は現在、骨肉腫に対しても治験が行われており (Clinical trial number: NCT03006848、NCT01445379)、これらの薬剤と CD137L アゴニスト抗体の併用による抗腫瘍効果の増強については、興味深い点であり今後の課題である。しかし、CD137L アゴニスト抗体の臨床試験 (NCT00309023) において副作用として好中球減少症や自己免疫の活性化による肝障害が報告されており免疫応答の制御が課題である [49]。

今回、検討することができなかったが、ヒト骨肉腫検体における CD137L や CD137 の発現は検討すべき点である。また、CD137L の soluble form は血清で測定可能であり [50]、検討すべき課題であると考えられる。

我々は *CDC42BPG* と *FST* を新規 p53 標的遺伝子として同定し、ともに U2OS と SaOS2 に対して増殖抑制効果を示した。増殖抑制効果以外にも、*CDC42BPG* は骨肉腫細胞の浸潤や転移に関与する CDC42 を抑制することで抗腫瘍効果を示す可能性がある [51、52]。また、p53 は CDC42/JNK1 パスウェイの活性化を通してアポトーシスを誘導し、CDC42 は miR-29 を通して p53 を負に制御すると報告されていることから、フィードバックループが存在している可能性がある [53、54]。さらに、*CDC42BPG* もこのフィードバックループに関与している可能性がある。また、*FST* は骨肉腫細胞の増殖を促進する BMP2 の抑制を通して、抗腫瘍効果を示している可能性がある [55、56]。

第5章 結論

我々は RNA sequence 解析から骨において p53 が制御する遺伝子やパスウェイの全体像を明らかにした。さらに、CD137L の骨肉腫発生における意義と治療標的としての可能性を示した。本研究は骨肉腫発生における p53 の関与と p53 による免疫制御に関して新しい視点を与えるものである。

謝辞

本研究の遂行におきましてご指導をいただきました東京大学医科学研究所の松田浩一先生に深謝いたします。また、基礎研究に従事する貴重な機会を与えて下さり、ご指導ご鞭撻を賜った東京大学整形外科教室の田中栄先生、河野博隆先生に深謝いたします。

引用文献

1. Bieging, K.T., Mello, S.S. & Attardi, L.D. Unraveling mechanisms of p53-mediated tumor suppression. *Nat. Rev. Cancer* **14**, 359–370 (2014).
2. Brady, C.A. *et al.* Distinct p53 transcriptional programs dictate acute DNA-damage responses and tumor suppression. *Cell* **145**, 571–583 (2011).
3. Maddocks, O.D. & Vousden, K.H. Metabolic regulation by p53. *J. Mol. Med.* **89**, 237–245 (2011).
4. Marión, R.M. *et al.* A p53-mediated DNA damage response limits reprogramming to ensure iPS cell genomic integrity. *Nature* **460**, 1149–1153 (2009).
5. Elyada, E. *et al.* CK1 α ablation highlights a critical role for p53 in invasiveness control. *Nature* **470**, 409–413 (2011).
6. Muñoz-Fontela, C., Mandinova, A., Aaronson, S.A. & Lee, S.W. Emerging roles of p53 and other tumor-suppressor genes in immune regulation. *Nat. Rev. Immunol.* **16**, 741–750 (2016).
7. Kansara, M., Teng, M.W., Smyth, M.J. & Thomas, D.M. Translational biology of osteosarcoma. *Nat. Rev. Cancer* **14**, 722–735 (2014).
8. Chen, X. *et al.* Recurrent somatic structural variations contribute to tumorigenesis in pediatric osteosarcoma. *Cell Rep.* **10**, 104–112 (2014).
9. Perry, J.A. *et al.* Complementary genomic approaches highlight the PI3K/mTOR pathway as a common vulnerability in osteosarcoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **111**, 5564–5573 (2014).
10. Bousquet, M. *et al.* Whole exome sequencing in osteosarcoma reveals important heterogeneity of genetic alterations. *Ann. Oncol.* **27**, 738–744 (2016).
11. Kovac, M. *et al.* Exome sequencing of osteosarcoma reveals mutation signatures

- reminiscent of BRCA deficiency. *Nat. Commun.* **6**, 8940 (2015) .
12. Lorenz, S. *et al.* Unscrambling the genomic chaos of osteosarcoma reveals extensive transcript fusion, recurrent rearrangements and frequent novel TP53 aberrations. *Oncotarget* **7**, 5273–5288 (2015) .
 13. Srivastava, S., Zou, Z.Q., Pirollo, K., Blattner, W. & Chang, E.H. Germline transmission of a mutated p53 gene in a cancer-prone family with Li-Fraumeni syndrome. *Nature* **348**, 747–749 (1990) .
 14. Walkley, C.R. *et al.*
Conditional mouse osteosarcoma, dependent on p53 loss and potentiated by loss of Rb, mimics the human disease. *Genes. Dev.* **22**, 1662–1676 (2008) .
 15. Nikulenkov, F. *et al.* Insights into p53 transcriptional function via genome-wide chromatin occupancy and gene expression analysis. *Cell Death Differ.* **19**, 1992–2002 (2012) .
 16. Donehower, L.A. *et al.* Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature* **356**, 215–221 (1992) .
 17. Collins, M. *et al.* Benefits and adverse events in younger versus older patients receiving neoadjuvant chemotherapy for osteosarcoma: findings from a meta-analysis. *J. Clin. Oncol.* **31**, 2303–2312 (2013) .
 18. Meyers, P.A. *et al.* Addition of pamidronate to chemotherapy for the treatment of osteosarcoma. *Cancer* **117**, 1736–1744 (2011) .
 19. Wang, X. *et al.* p53 functions as a negative regulator of osteoblastogenesis, osteoblast-dependent osteoclastogenesis and bone remodeling. *J. Cell Biol.* **172**, 115–125 (2006) .

20. E.A. Komarova, R.V. *et al.* Dual effect of p53 on radiation sensitivity in vivo: p53 promotes hematopoietic injury, but protects from gastro-intestinal syndrome in mice. *Oncogene* **23**, 3265-3271 (2004).
21. K. Oda. *et al.* p53AIP1, a potential mediator of p53-dependent apoptosis, and its regulation by Ser-46-phosphorylated p53. *Cell* **102**, 849-862 (2000).
22. Huang, D.W., Sherman, B.T. & Lempicki, R.A. Bioinformatics enrichment tools: Paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic Acids Res.* **37**, 1–13 (2009) .
23. Huang, D.W., Sherman, B.T. & Lempicki, R.A. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat. Protoc.* **4**, 44–57 (2009) .
24. Yodsurang V, Tanikawa C, Miyamoto T, Lo PHY, Hirata M, Matsuda K. Identification of a novel p53 target, COL17A1, that inhibits breast cancer cell migration and invasion. *Oncotarget*. 2017 Jun 9. doi: 10.18632/oncotarget.18433.
25. Mori J, Tanikawa C, Funauchi Y, Lo PH, Nakamura Y, Matsuda K. Cystatin C as a p53-inducible apoptotic mediator that regulates cathepsin L activity. *Cancer Sci.* 2016 Mar;107(3):298-306.
26. Tanikawa, C., Matsuda, K., Fukuda, S., Nakamura, Y. & Arakawa, H. p53RDL1 regulates p53-dependent apoptosis. *Nat. Cell Biol.* **5**, 216–223 (2003) .
27. Zhang, N. *et al.* Targeted and untargeted CD137L fusion proteins for the immunotherapy of experimental solid tumors. *Clin. Cancer Res.* **13**, 2758–2767 (2007) .
28. Madireddi, S. *et al.* Galectin-9 controls the therapeutic activity of 4-1BB-targeting antibodies. *J. Exp. Med.* **211**, 1433–1448 (2014) .
29. Tanikawa, C. *et al.* The Transcriptional Landscape of p53 Signalling Pathway.

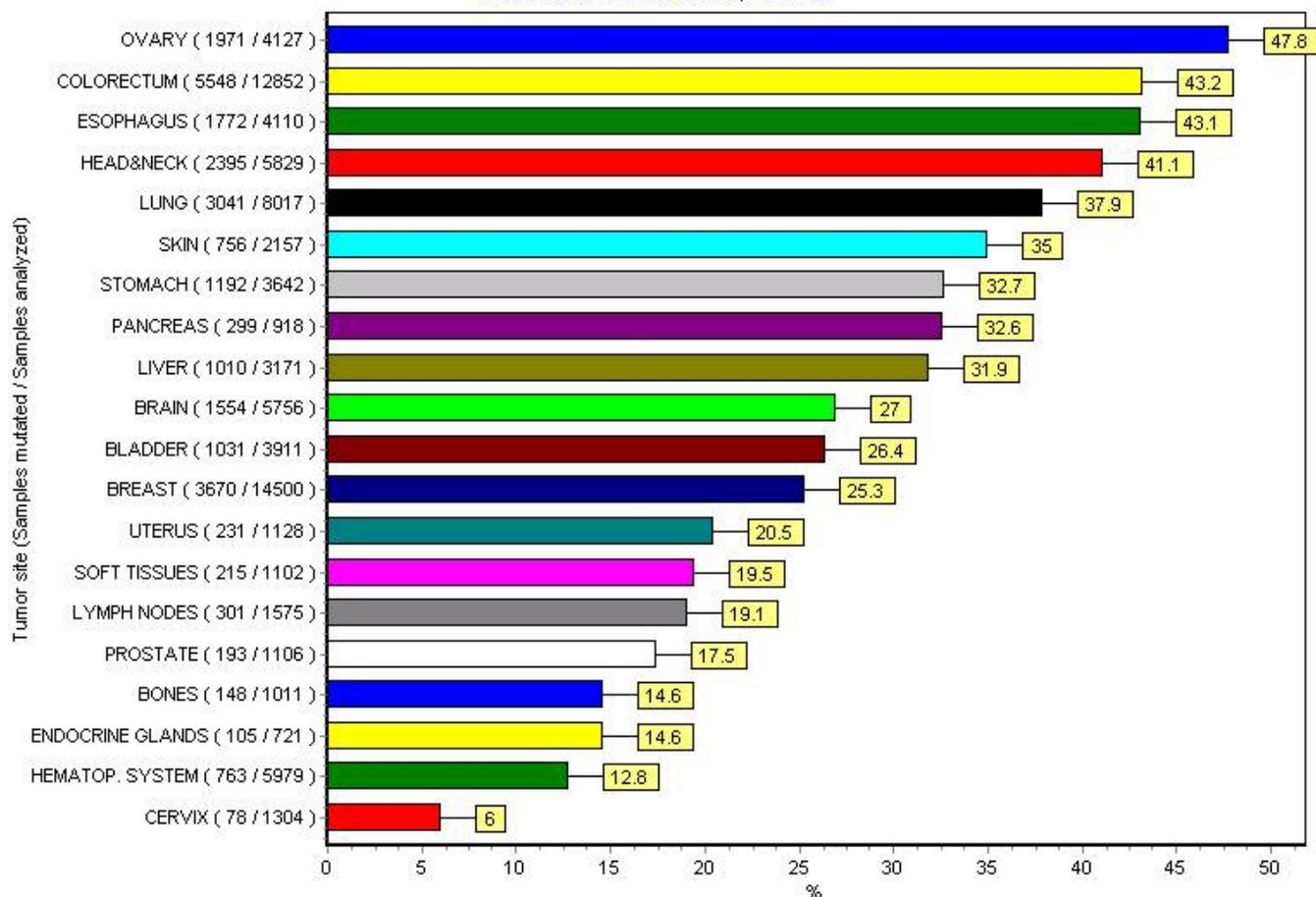
EBioMedicine 109-119. doi: 10.1016/j.ebiom (2017) .

30. Kenzelmann, B.D. *et al.* Global genomic profiling reveals an extensive p53-regulated autophagy program contributing to key p53 responses. *Genes Dev* 27, 1016-1031 (2013) .
31. Fischer, M., Grossmann, P., Padi, M. & DeCaprio, J.A. Integration of TP53, DREAM, MMB-FOXO1 and RB E2F target gene analyses identifies cell cycle gene regulatory networks. *Nucleic Acids Res* 44, 6070-6086 (2016) .
32. Menendez, d. *et al.* Diverse stresses dramatically alter genome wide p53 binding and transactivation landscape in human cancer cells. *Nucleic Acids Res* 41, 7286-7290 (2013) .
33. Lippert, U. *et al.* CD137 ligand reverse signaling has multiple functions in human dendritic cells during an adaptive immune response. *Eur. J. Immunol.* **38**, 1024–1032 (2008) .
34. Nagata, S. Fas-induced apoptosis, and diseases caused by its abnormality. *Genes Cells* **1**, 873–879 (1996).
35. Wu, G.S., Kim, K. & el-Deiry, W.S. KILLER/DR5, a novel DNA-damage inducible death receptor gene, links the p53-tumor suppressor to caspase activation and apoptotic death. *Adv. Exp. Med. Bio.* **465**, 143–151 (2000).
36. Tanikawa, C. *et al.* XEDAR as a putative colorectal tumor suppressor that mediates p53-regulated anoikis pathway. *Oncogene* **28**, 3081–3092 (2009) .
37. Ju, S. *et al.* A novel approach to induce human DCs from monocytes by triggering 4-1BBL reverse signaling. *Int. Immunol.* **21**, 1135–1144 (2009) .

38. Wen, T., Bukczynski, J. & Watts, T.H. 4-1BB ligand-mediated costimulation of human T cells induces CD4 and CD8 T cell expansion, cytokine production, and the development of cytolytic effector function. *J. Immunol.* **168**, 4897–4906 (2002) .
39. Pardoll, D.M. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat. Rev. Cancer* **12**, 252–264 (2012) .
40. Zou, W. & Chen, L. Inhibitory B7-family molecules in the tumour microenvironment. *Nat. Rev. Immunol.* **8**, 467–477 (2008) .
41. Wang, B., Niu, D., Lai, L. & Ren, E.C. p53 increases MHC class I expression by upregulating the endoplasmic reticulum aminopeptidase ERAP1. *Nat. Commun.* **4**, 2359 (2013) .
42. Cortez, M.A. *et al.* PDL1 Regulation by p53 via miR-34. *J. Natl. Cancer Inst.* **108**, doi: 10.1093/jnci/djv303 (2016).
43. Qian, Y. *et al.* CD137 ligand-mediated reverse signaling inhibits proliferation and induces apoptosis in non-small cell lung cancer. *Med. Oncol.* **32**, 44 (2015) .
44. Li, G. *et al.* Triple expression of B7-1, B7-2 and 4-1BBL enhanced antitumor immune response against mouse H22 hepatocellular carcinoma. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **137**, 695–703 (2011) .
45. Smith, N. *et al.* Overlapping Expression of Runx1 (Cbfa2) and Runx2 (Cbfa1) Transcription Factors Supports Cooperative Induction of Skeletal Development. *J Cell Physiol.* **203**, 133-143 (2005) .
46. Bauer, O., Sharir, A., Kimura, A., Hantisteanu, S., Takeda, S., Groner, Y. Loss of Osteoblast Runx3 Produces Severe Congenital Osteopenia. *Mol Cell Biol.* **35**, 1097-1109 (2015).

47. Ozaki, T., Nakagawara, A., Nagase, H. RUNX_Family Participates in the Regulation of p53-Dependent DNA Damage Response. *Int J Genomics*. 271347. doi: 10.1155/2013/271347. (2013) .
48. Melero, I. *et al.* Evolving synergistic combinations of targeted immunotherapies to combat cancer. *Nat. Rev. Cancer* **15**, 457–472 (2015) .
49. Bartkowiak, T., Curran, M.A. 4-1BB Agonists: Multi-Potent Potentiators of Tumor Immunity. *Front Oncol* **8**, 117 (2015).
50. Scholl, N. *et al.* The role of soluble and cell-surface expressed 4-1BB ligand in patients with malignant hemopoietic disorders. *Leuk Lymphoma* **50**, 427-36 (2009).
51. Yui, Y. *et al.* Mesenchymal mode of migration participates in pulmonary metastasis of mouse osteosarcoma LM8. *Clin. Exp. Metastasis* **27**, 619–630 (2010) .
52. Ng, Y., Tan, I., Lim, L. & Leung, T. Expression of the human myotonic dystrophy kinase-related Cdc42-binding kinase gamma is regulated by promoter DNA methylation and Sp1 binding. *J. Biol. Chem.* **279**, 34156–34164 (2004).
53. Thomas, A., Giesler, T. & White, E. p53 mediates Bcl-2 phosphorylation and apoptosis via activation of the Cdc42/JNK1 pathway. *Oncogene*. **19**, 5259-5269 (2000).
54. Park S.Y., Lee J.H., Ha M., Nam J.W. & Kim V.N. miR-29 miRNAs activates p53 by targeting p85a and CDC42. *Nat Struct Mol Biol.* **16**, 23-29 (2009).
55. Umulis, D., O'Connor, M.B. & Blair, S.S. The extracellular regulation of bone morphogenetic protein signaling. *Development* **136**, 3715–3728 (2009) .
56. Luo, X. *et al.* Osteogenic BMPs promote tumor growth of human osteosarcomas that harbor differentiation defects. *Lab. Invest. J. Tech. Methods Pathol.* **88**, 1264–1277 (2008) .

Prevalence of TP53 mutations by tumor site



(C) IARC TP53 Mutation Database, R13 release, November 2008

図1、原発巣別のp53変異の頻度
IARC TP53 Mutation Database (2008)から引用

Mutation Frequency in OS

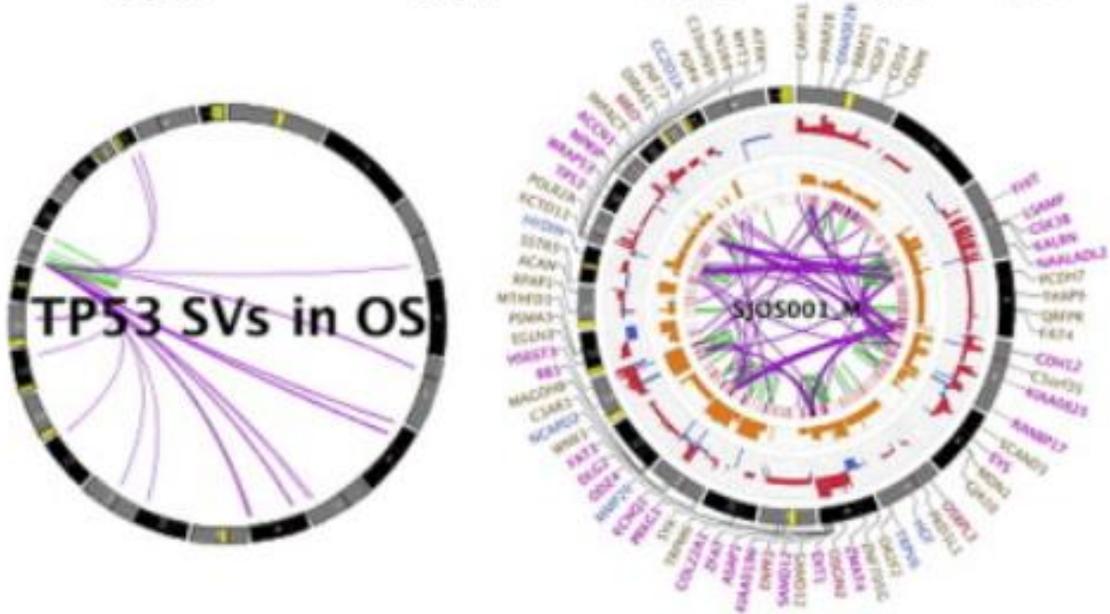
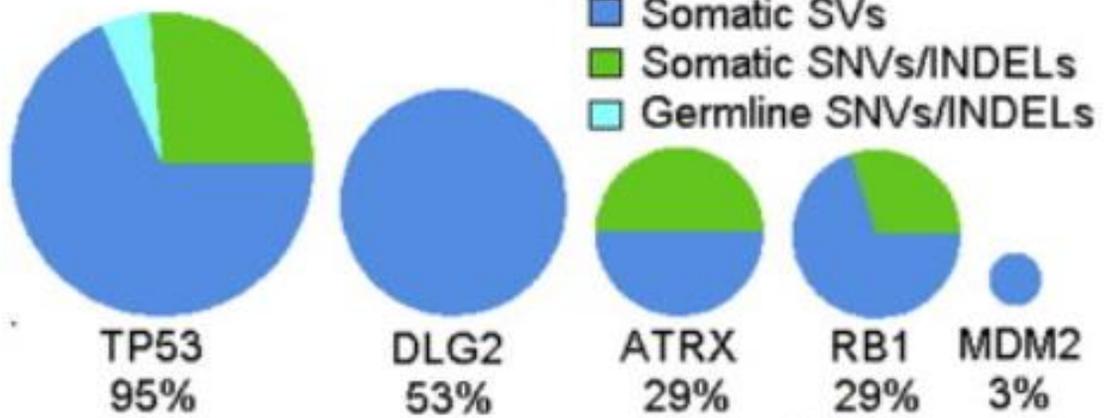
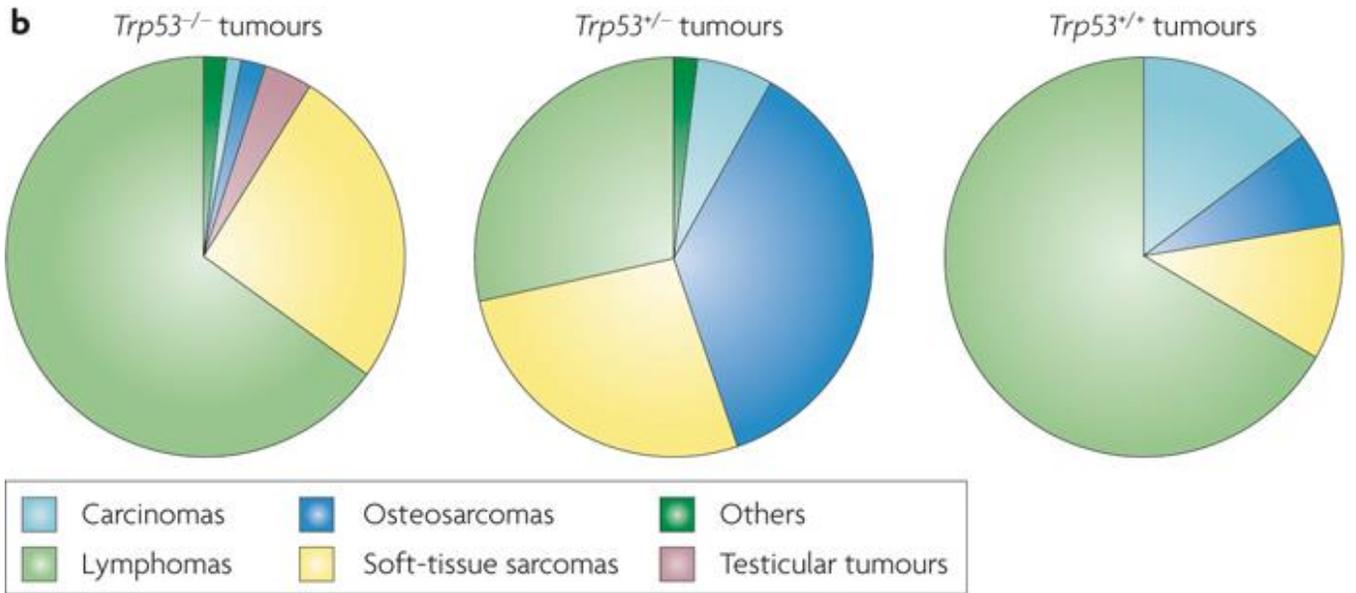


図2、骨肉腫におけるp53、およびその他の変異の頻度

文献8(Chen, X. et al. Recurrent somatic structural variations contribute to tumorigenesis in pediatric osteosarcoma. Cell Rep. **10**, 104–112)から引用



Nature Reviews | **Cancer**

図3、p53欠損マウスにおける悪性腫瘍の頻度

Donehower LA et al, 20 years studying p53 functions in genetically engineered mice. Nature Reviews Cancer **9**, 831-841から引用

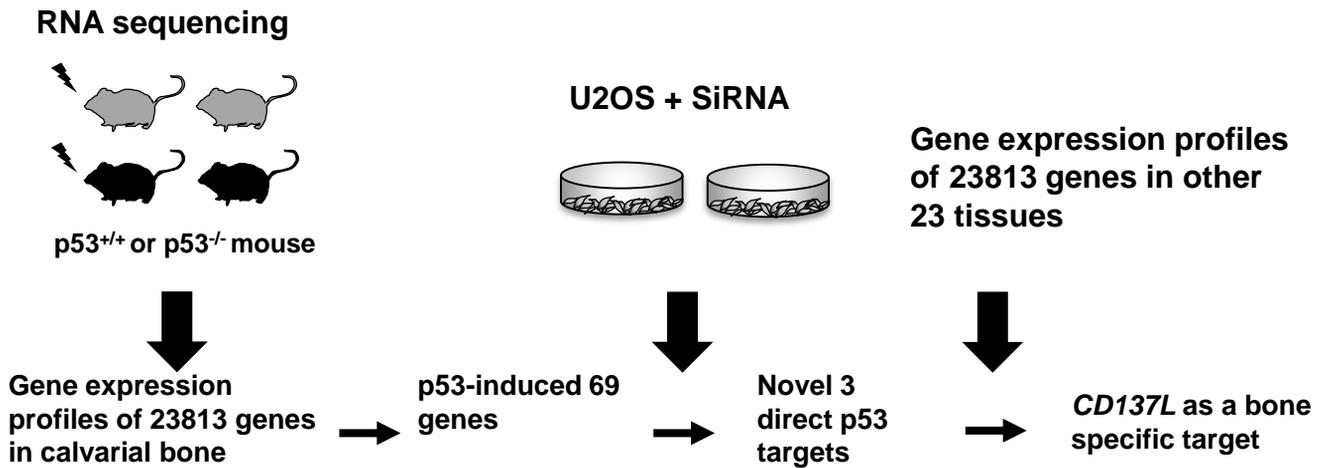


図4、解析の全体像

RNA sequenceの結果より23813遺伝子の発現情報が得られた。このうち69遺伝子を放射線照射によりp53依存的に誘導される遺伝子として同定した。骨肉腫細胞株を用いた2次スクリーニングで*CD137L*、*CDC42BPG*、*FST*の3遺伝子が新規のp53標的遺伝子であることが分かった。*CD137L*は24臓器の中で骨特異的に誘導された。

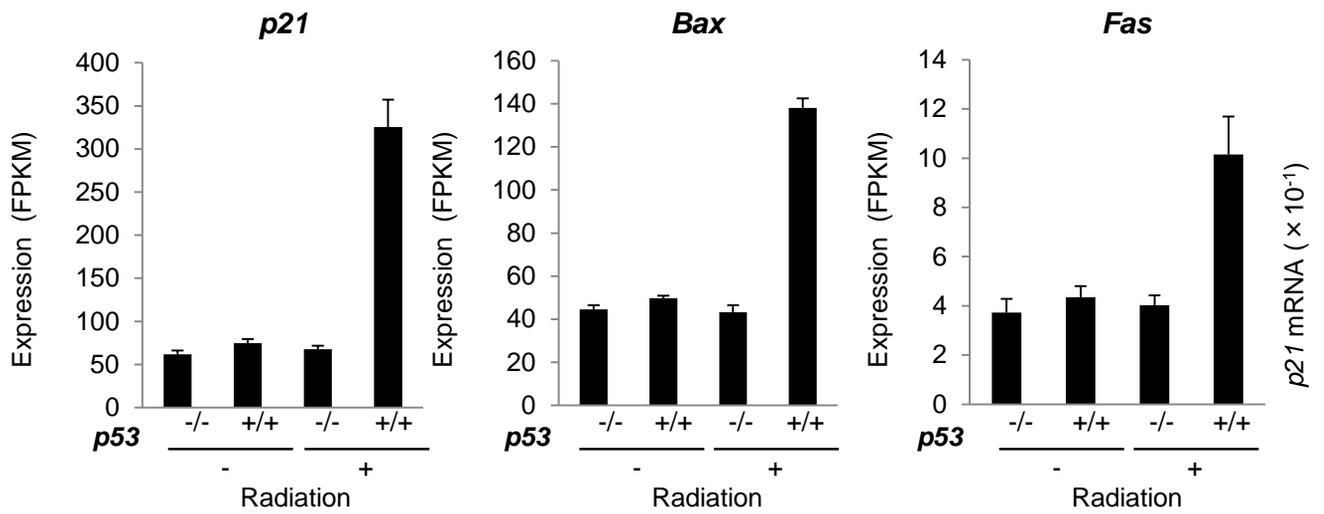


図5、代表的なp53標的遺伝子におけるRNA sequenceの発現データ

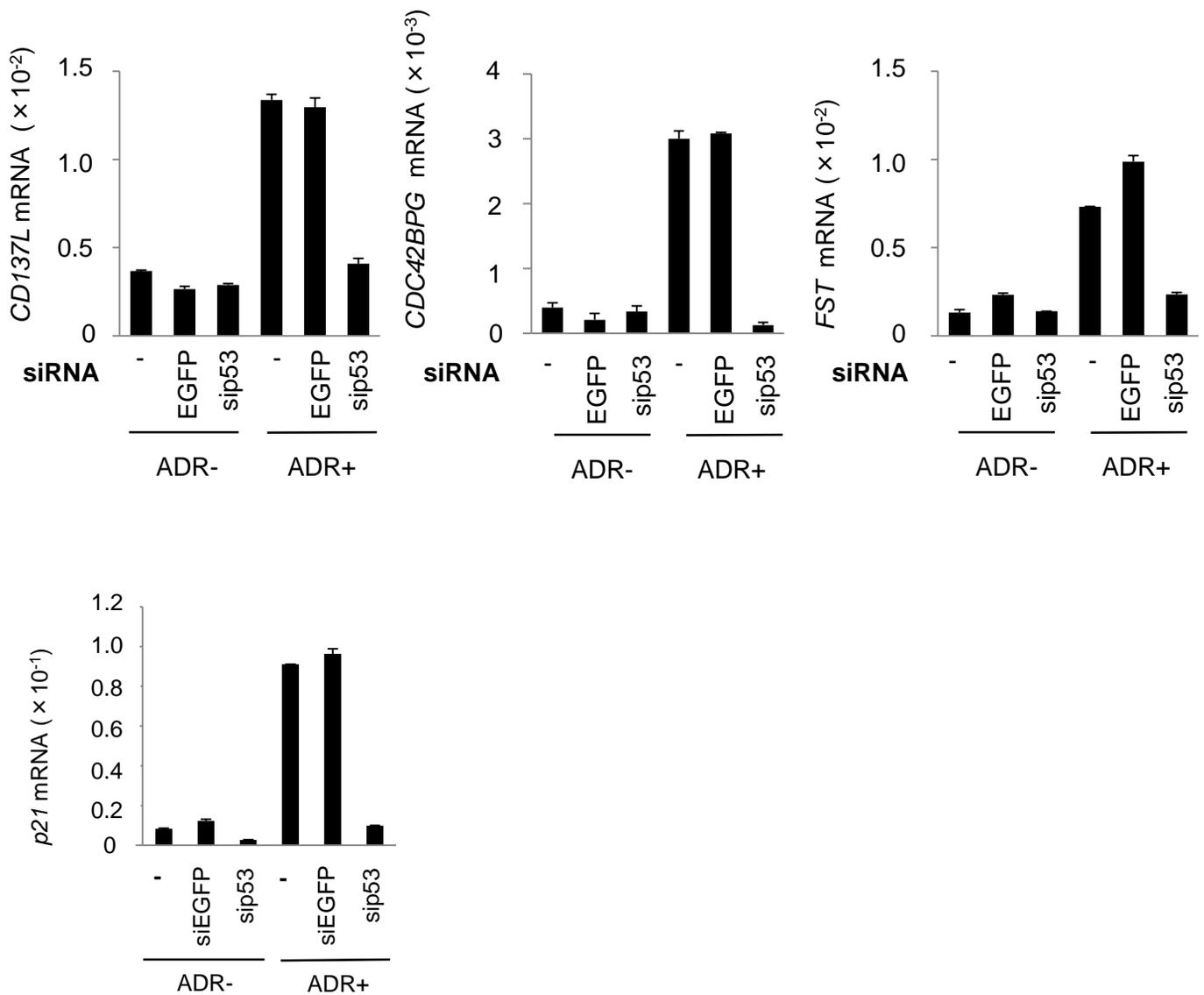


図6、U2OSを用いたqPCR解析

U2OSに対してsiRNAを導入した24時間後に、ADR (2 μ g/ml, 2 h)を投与した。投与36時間後に、cDNAを回収してqPCRを行った。EGFPに対するsiRNAはコントロールとして用いた。 β -actinを発現のノーマライゼーションに用いた。エラーバーは標準偏差を示している。

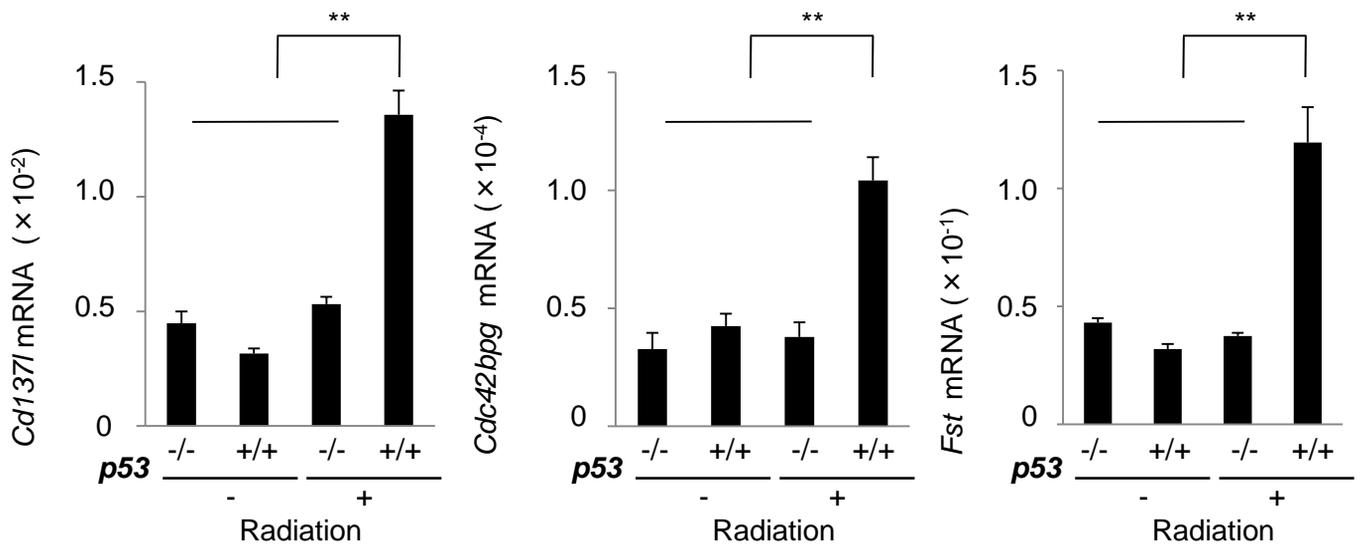


図7、*Cd137l*、*Cdc42bpg*、*Fst*におけるRNA sequenceデータ

** $P < 0.001$, Student's t-test.

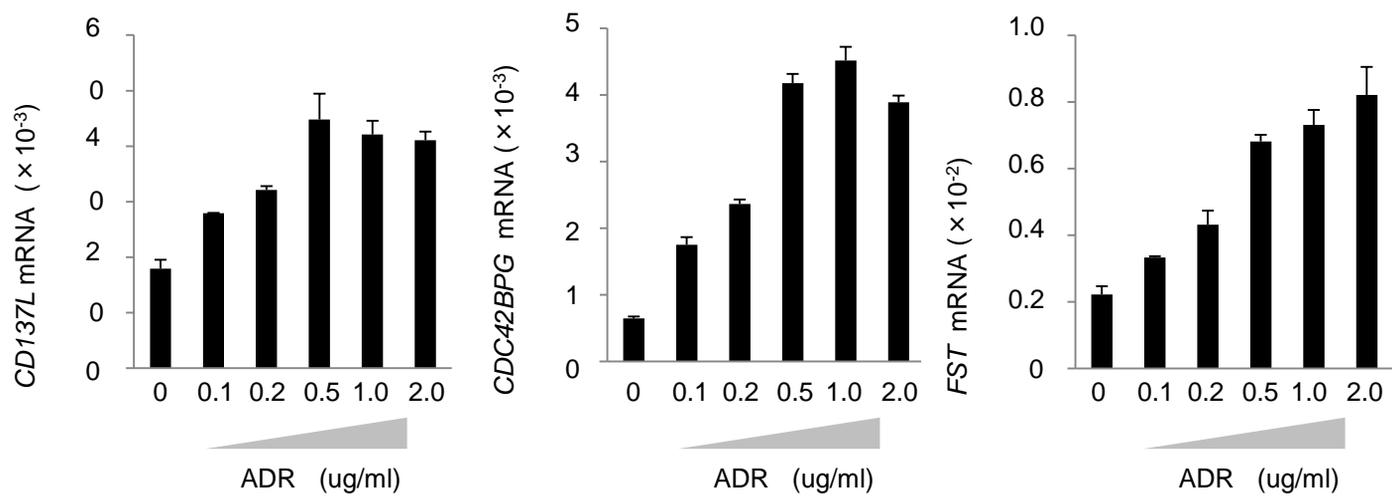


図8、U2OSを用いたqPCR解析

U2OSに対してADR (2 μ g/ml, 2 h)を投与した。投与36時間後に、cDNAを回収してqPCRを行った。 β -actinは発現のノーマライゼーションに用いた。エラーバーは標準偏差を示している。

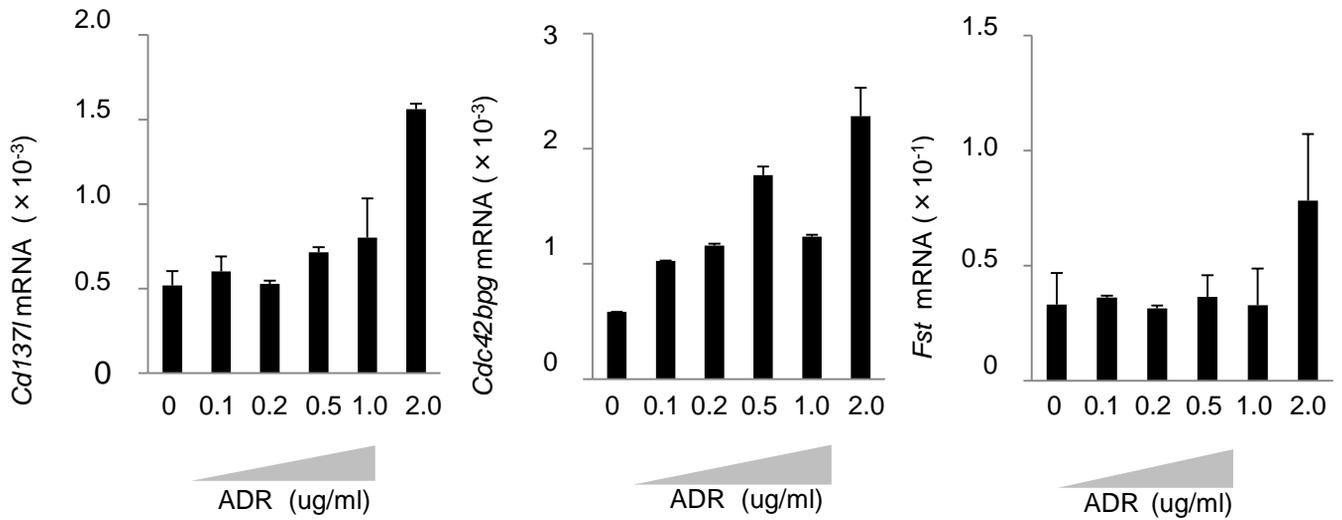


図9、 $p53^{+/+}$ マウスより樹立した骨芽細胞初代培養を用いたqPCR解析
 $p53^{+/+}$ 骨芽細胞初代培養にADR (0–2 $\mu\text{g/ml}$, 2 h)を投与して36時間後に
qPCR解析を行った。 $\beta\text{-actin}$ は発現のノーマライゼーションに用いた。エ
ラーバーは標準偏差を示している。

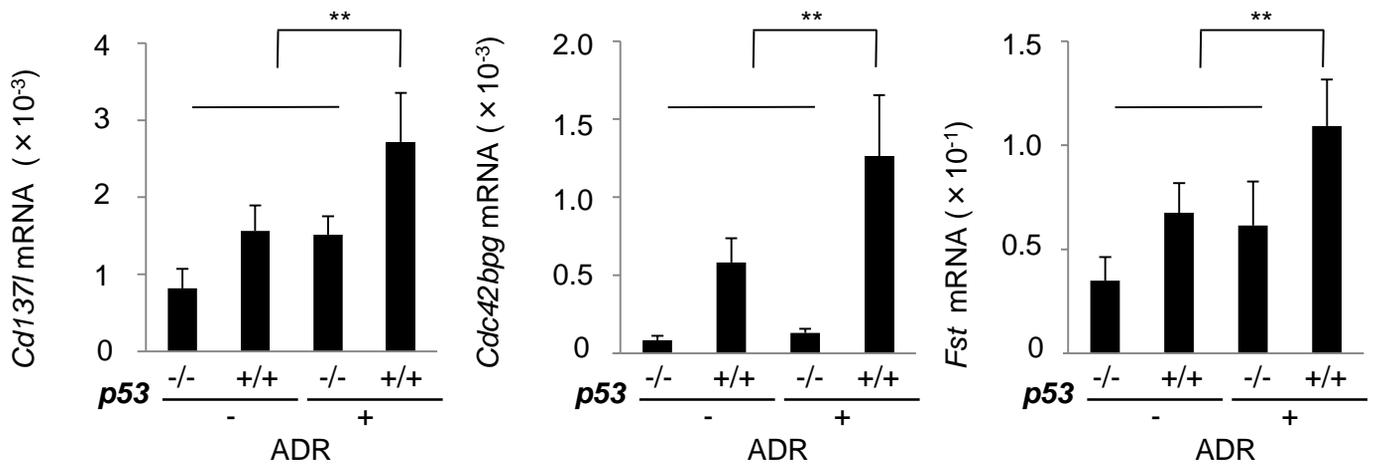


図10、 $p53^{+/+}$ もしくは $p53^{-/-}$ マウスより樹立した骨芽細胞初代培養を用いたqPCR解析
 $p53^{+/+}$ もしくは $p53^{-/-}$ 骨芽細胞初代培養にADR (2 $\mu\text{g/ml}$, 2 h)を投与して36時間後に
 qPCR解析を行った。β-actinは発現のノーマライゼーションに用いた。エラーバーは
 標準偏差を示している。** $P < 0.001$, Student's t-test.

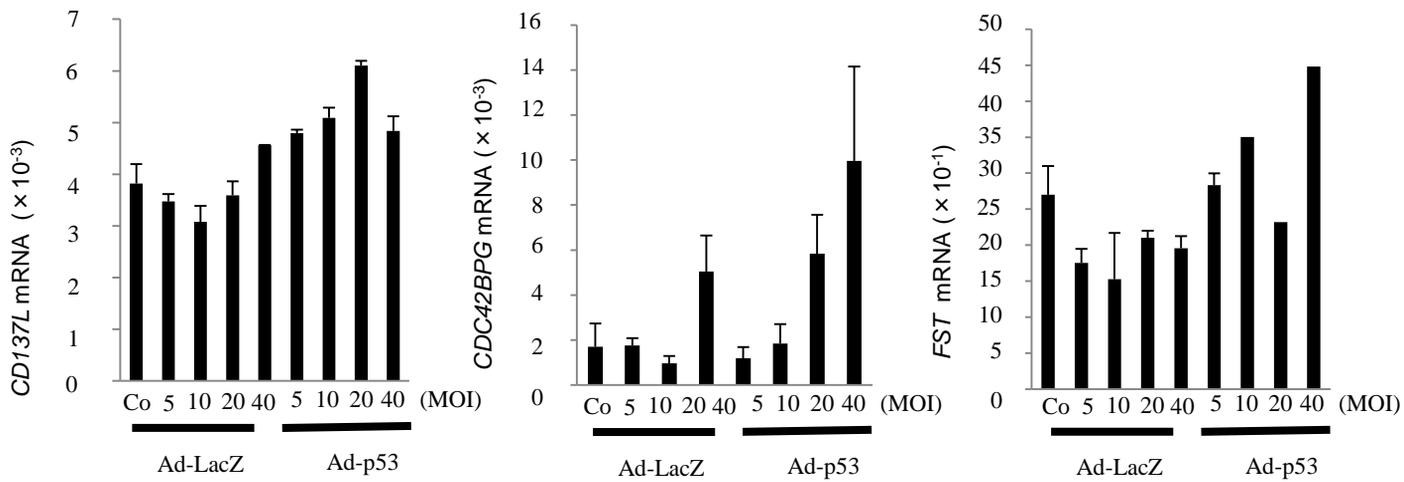


図11、SaOS2を用いたqPCR解析

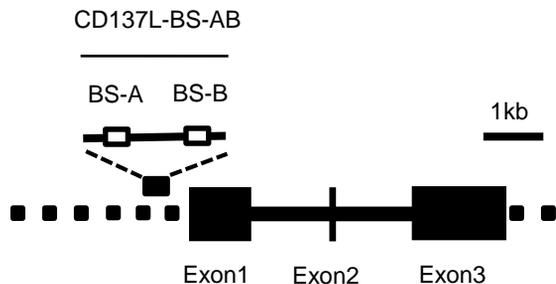
SaOS2にAdeno virusを用いてp53をは発現させ36時間後にqPCR解析を行った。β-actinは発現のノーマライゼーションに用いた。エラーバーは標準偏差を示している。

** $P < 0.001$, Student's t-test.

a

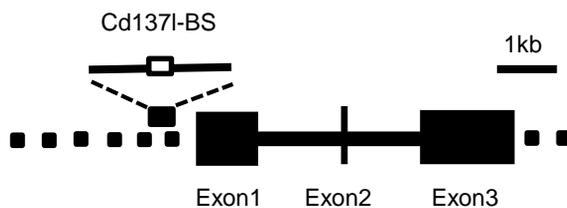
Human

Consensus RRRCWGGYYYRRRCWWGYYY
 CD137L-BS-A AcACTAGCCagtAACATtaCT
 CD137L-BS-B GGGCAcGgTaAcGCATGaCT



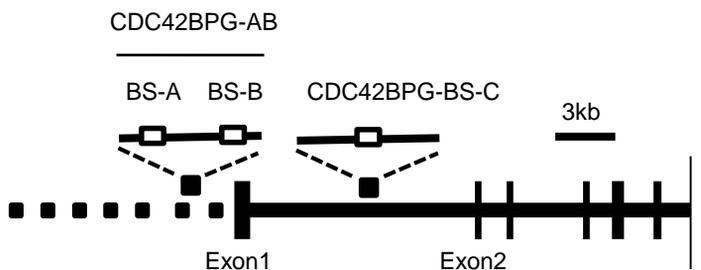
Mouse

Consensus RRRCWGGYYYRRRCWWGYYY
 Cd137I-BS GtGCATGCaCaTACATGCag

**b**

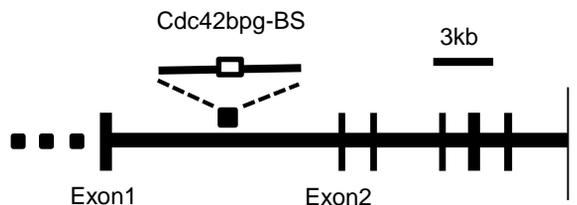
Human

Consensus RRRCWGGYYYRRRCWWGYYY
 CDC42BPG-BS-A AGGCATGagCcAcCATGCCC
 CDC42BPG-BS-B AtGCcAGTCCcAGcCcTGCCC
 CDC42BPG-BS-C ctGCTTGTCTctACTTGTCC



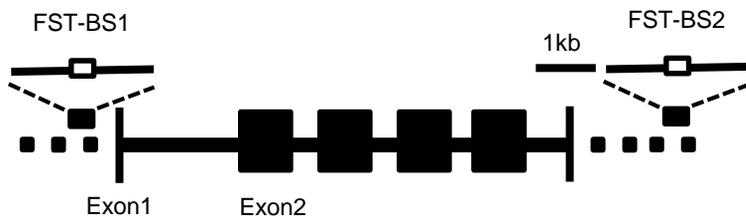
Mouse

Consensus RRRCWGGYYYRRRCWWGYYY
 Cdc42bpg-BS cAACTTGTCCctGctCcTGCCC

**c**

Human

Consensus RRRCWGGYYYRRRCWWGYYY
 FST-BS1 GAACcAGTaTtGACcTGTgT
 FST-BS2 GGACcTGCCCAGACATGTCC



Mouse

Consensus RRRCWGGYYYRRRCWWGYYY
 Fst-BS cGACATGTaaAAACATcCgT

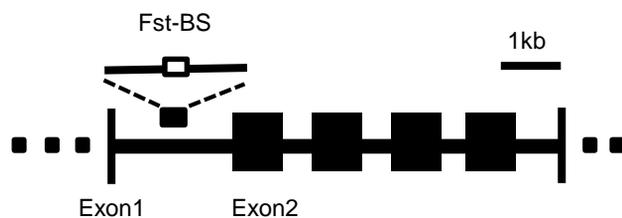


図12、p53結合領域の位置

ヒト(左)、マウス(右)。CD137L(a)、CDC42BPG(b)、FST(c)。

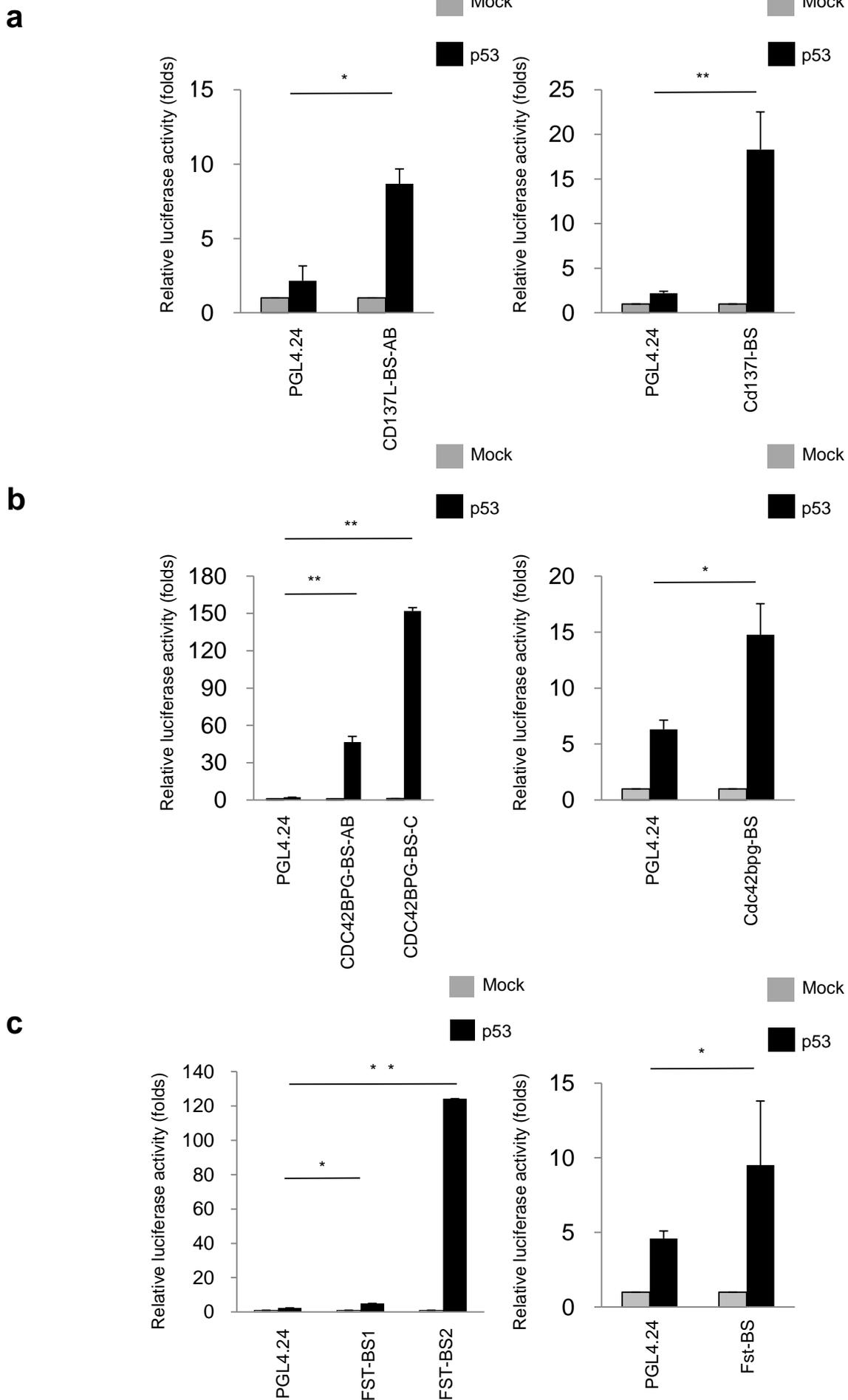


図13、(a)(b)(c)SaOSを用いたレポーターアッセイの結果
ヒト(左)、マウス (右)。CD137L(a)、CDC42BPG(b)、FST(c)。* $P < 0.05$, ** $P < 0.001$, Student's t-test。

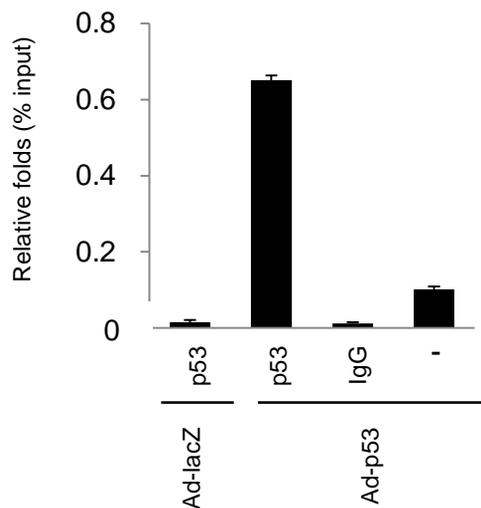
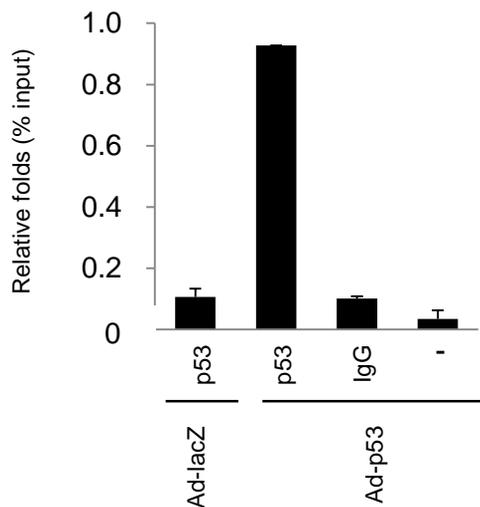
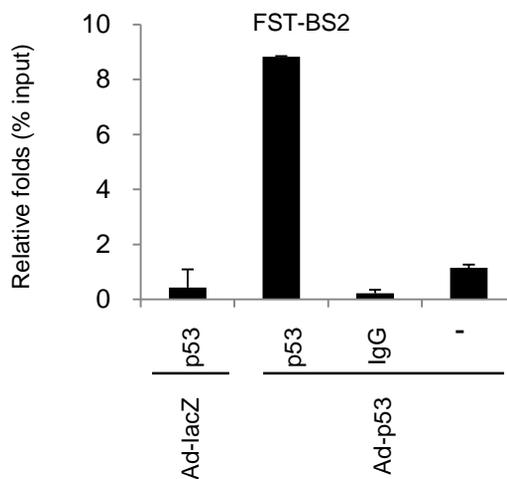
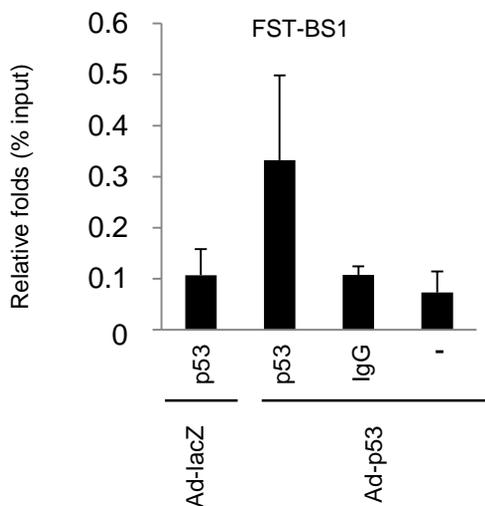
a**b****c**

図14、(a)(b)(c) CHIP アッセイの結果

CD137L (a)。 *CDC42BPG* (BS-C) (b)、 *FST* (BS-1, BS2)(c)。 SaOS2に対して Ad-LacZ (lane 1)、 Ad-p53 (lane 2-4)を感染させた。 DNAタンパク複合体を anti-p53 antibody (lanes 1 and 2)で免疫沈降後にqPCRを行った。 Input chromatin は破碎したクロマチンの1%を免疫沈降前に採取した。 ネガティブコントロールとしてanti-IgG antibody (lane 3) と抗体なし(lane 4)を用いた。 エラーバーは標準偏差を示している (n = 3)。

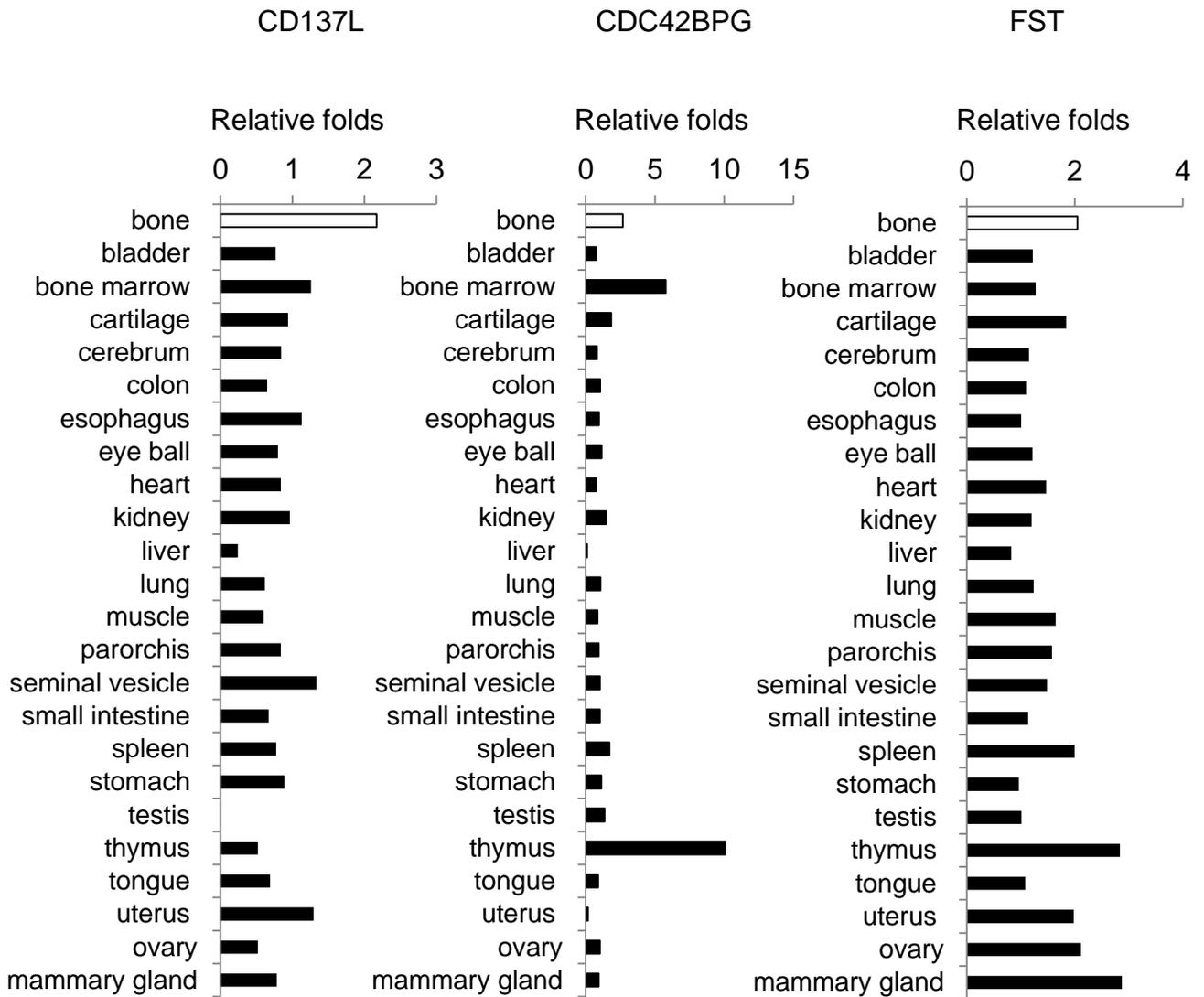


図15、24臓器における*Cd137l*の誘導

サンプルは4グループに分類した: (K) $p53^{-/-}$ マウス放射線照射なし、(W) $p53^{+/+}$ マウス放射線照射なし、(KX) $p53^{-/-}$ マウス放射線照射あり、(WX) $p53^{+/+}$ マウス放射線照射あり (n = 3 per group)。Median FPKM value of WX / maximum FPKM value of the median FPKM value K, KX or W を 24臓器に対して計算した。

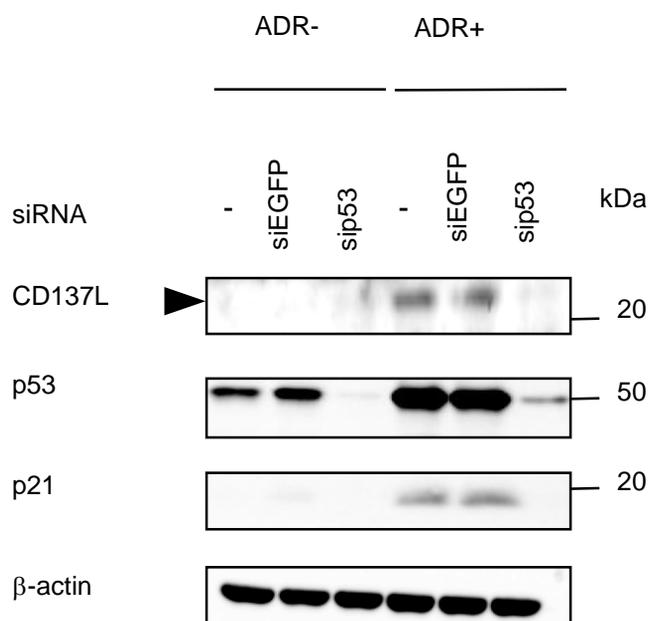


図16、U2OSを用いたWestern blotting

U2OSに対してsiRNAを導入した24時間後に、ADR (2 μ g/ml, 2 h)を投与した。投与36時間後に、タンパクを回収してWBを行った。EGFPに対するsiRNAはコントロールとして用いた。

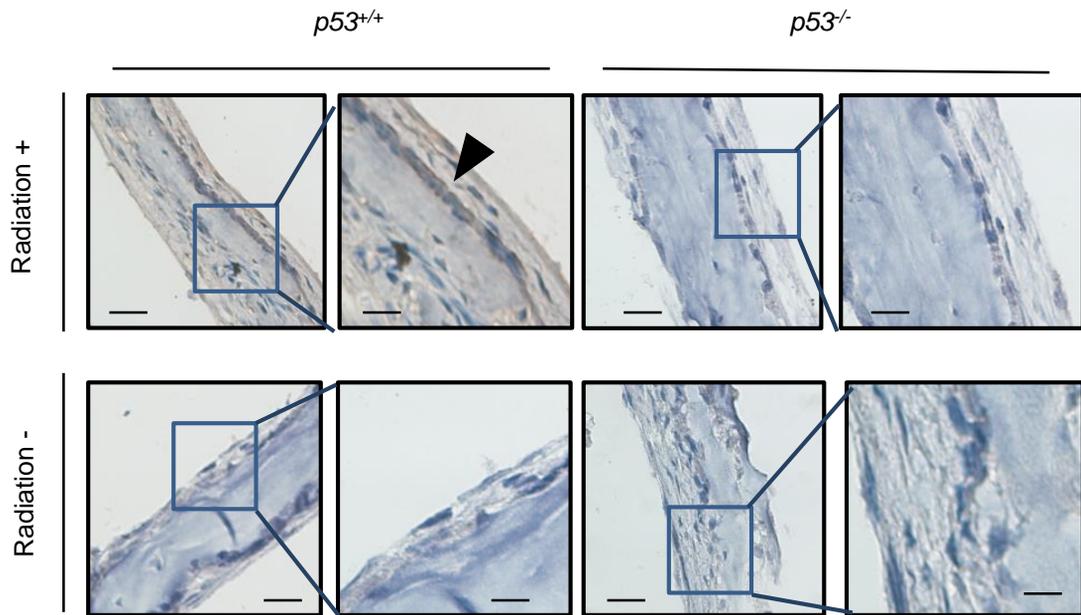


図17、組織免疫染色

Cd1371の免疫組織染色を $p53^{+/+}$ もしくは $p53^{-/-}$ マウス頭蓋骨より採取したK、KX、W、WXの4群に対して行った。各群3組織の中から代表的な組織像を示した。スケールバー(左) = 50 μm , スケールバー(右) = 20 μm . 矢印は骨芽細胞を示している。

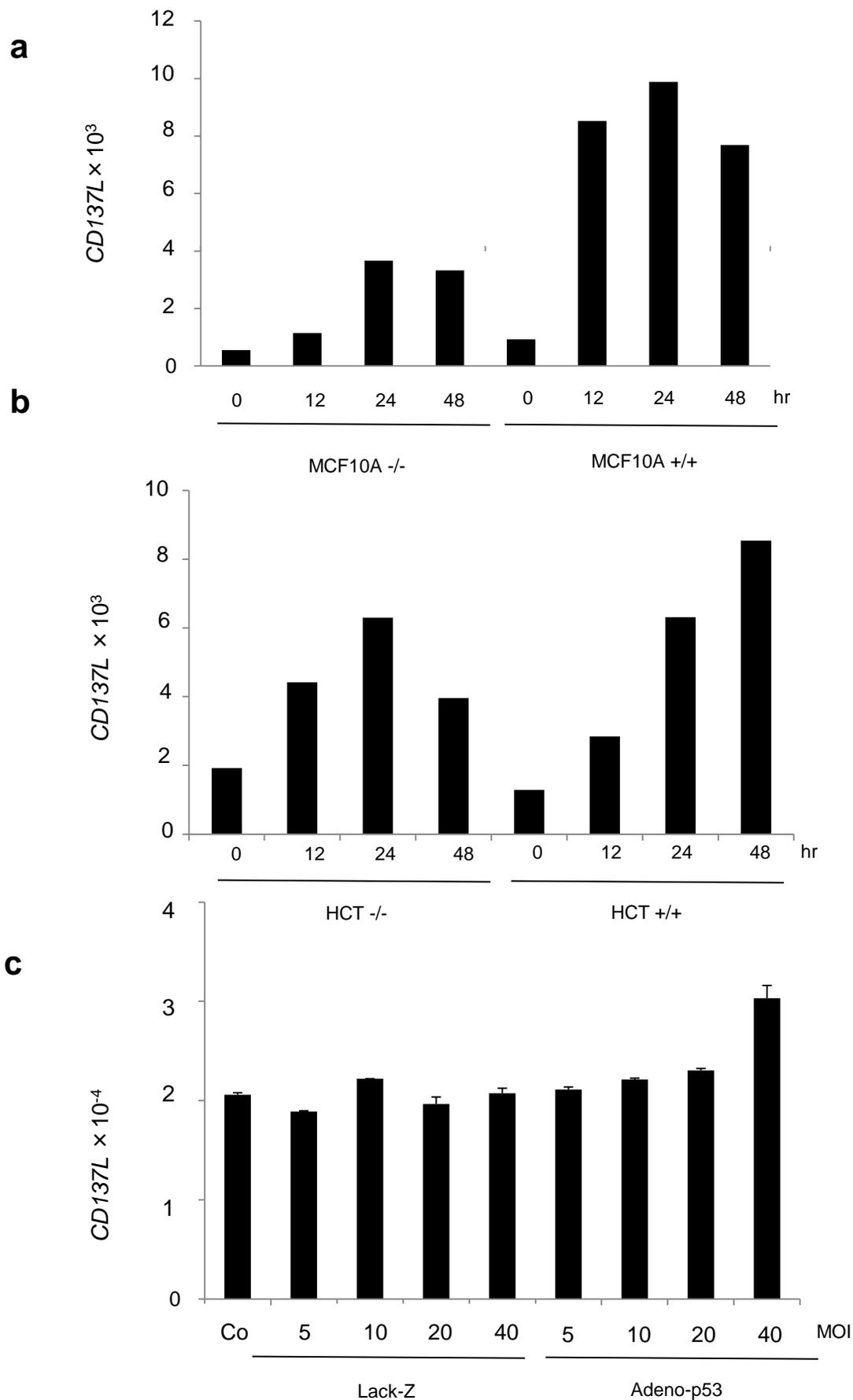
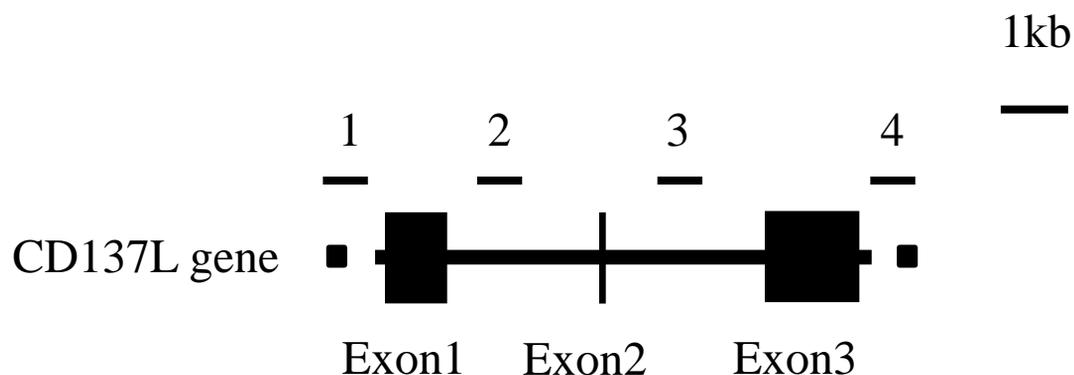


図18、様々な細胞株におけるCD137Lの誘導

マイクロアレイでのMCF10A、H1299におけるCD137Lの誘導。また、H1299においてAdeno virusを用いてp53の発現を誘導し、Cd137Lの発現を調べた。

p53 binding regions in the *CD137L* gene (+/- 1kb)
 Ch19: 6530010-6536939 (GRCh37/hg19)



1	chr19	Promoter	6530921	6531665
2	chr19	Intron1	6532281	6532324
3	chr19	Intron2	6534452	6534634
4	chr19	Downstream	6536671	6536767

図19, Remapデータベースによる*CD137L*の結合領域

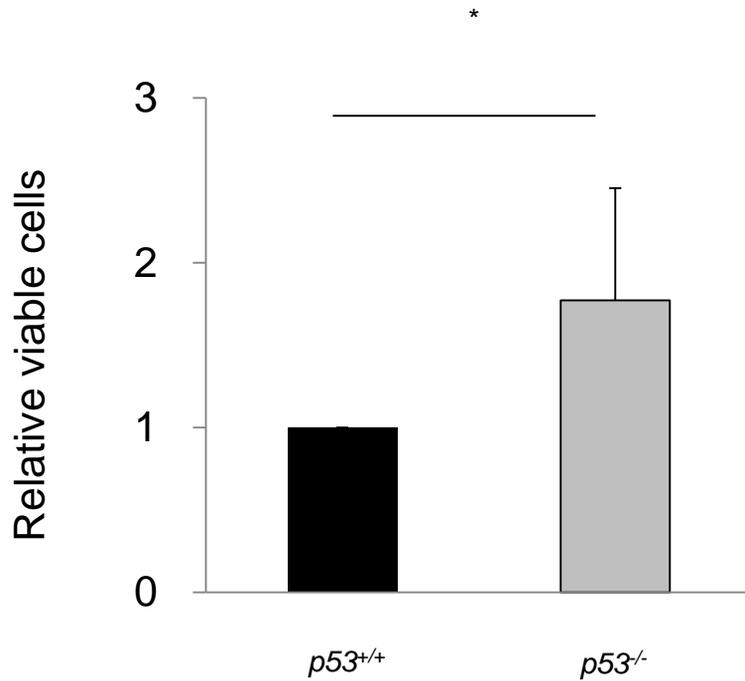


図20、 $p53^{+/+}$ 骨芽細胞初代培養と $p53^{-/-}$ 骨芽細胞初代培養を用いた増殖能の評価
 $p53^{+/+}$ 骨芽細胞初代培養細胞や $p53^{-/-}$ 骨芽細胞初代培養細胞を培養し、48時間後に細胞増殖の評価した。エラーバーは標準偏差を示している (n = 3)。* $P < 0.05$, Student's t-test.

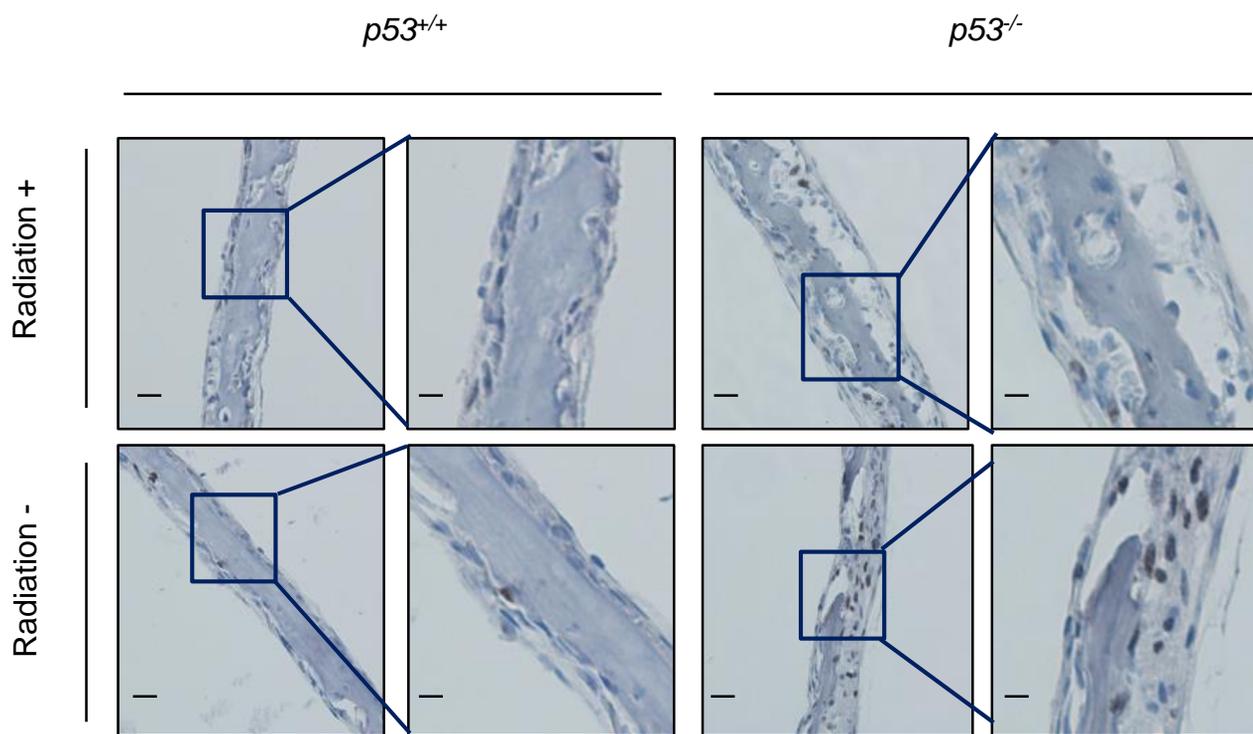


図21、マウス骨組織のKi67染色

p53^{+/+} or *p53*^{-/-} マウス頭蓋骨より採取したK、KX、W、WXの4群に対してKi67染色を行った。各群3組織の中から代表的な組織像を示した。スケールバー(左) = 50 μm, スケールバー(右) = 20 μm。

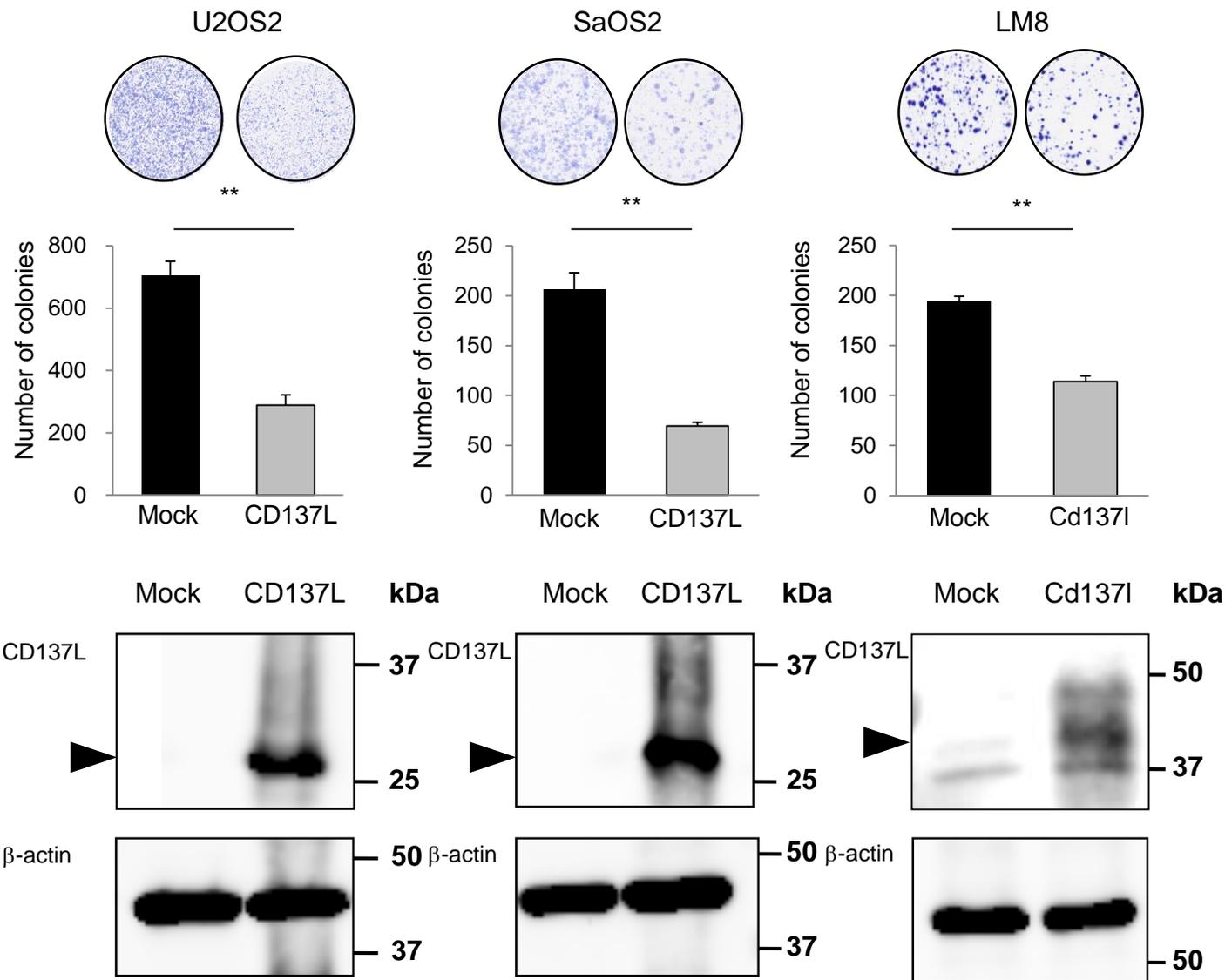


図22、SaOS2、U2OS、LM8を用いたコロニー形成アッセイ

CD137LもしくはMockを導入して、細胞数をカウントした。また、同様の系でタンパクを回収してWBを行い、CD137L抗体でブロットした。エラーバーは標準偏差を示している (n=3)。** $P < 0.001$, Student's t-test. β -actin (U2OS and SaOS2)と α -tubulin antibody (LM8)をコントロールとして用いた。

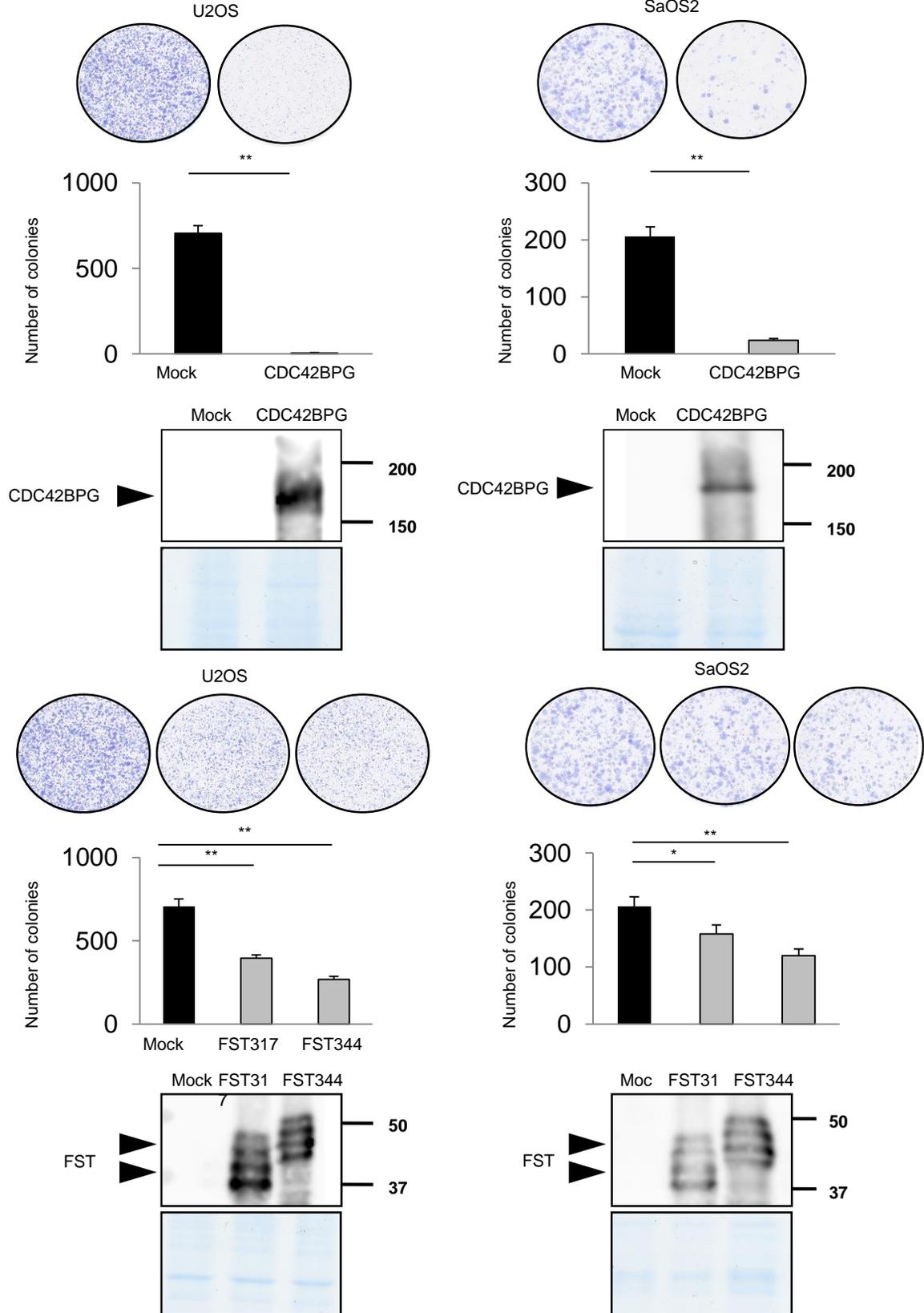
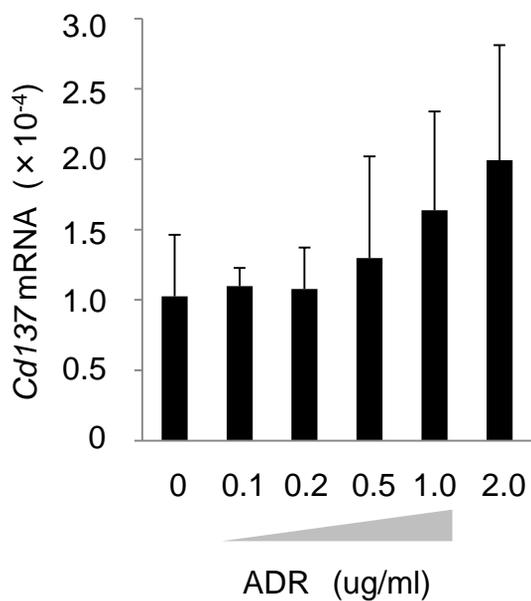
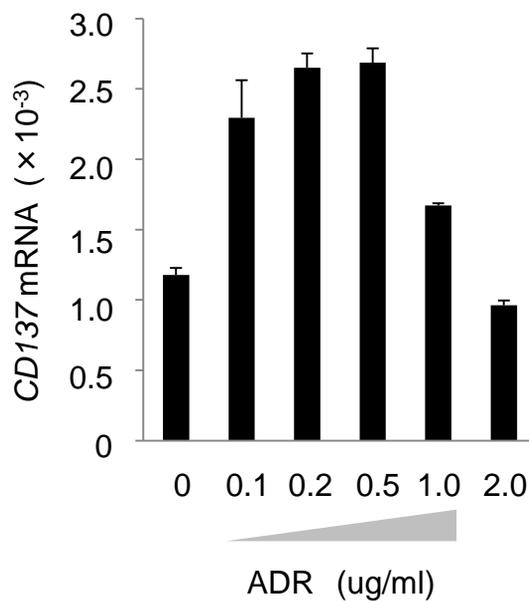


図23、SaOS2、U2OS、LM8を用いたコロニー形成アッセイ

CD137LもしくはMockを導入して、細胞数をカウントした。また、同様の系でタンパクを回収してWBを行い、CDC42BPG抗体、FST抗体でブロットした。エラーバーは標準偏差を示している (n = 3) 。** $P < 0.001$, Student's t-test.

a**b****図24、骨芽細胞初代培養とU2OSを用いたqPCR解析**

骨芽細胞初代培養(a)とU2OS(b)に対してADR (2 $\mu\text{g/ml}$ for 2 h)を投与した。投与36時間後に、cDNAを回収してqPCRを行った。 β -actinは発現のノーマライゼーションに用いた。エラーバーは標準偏差を示している。

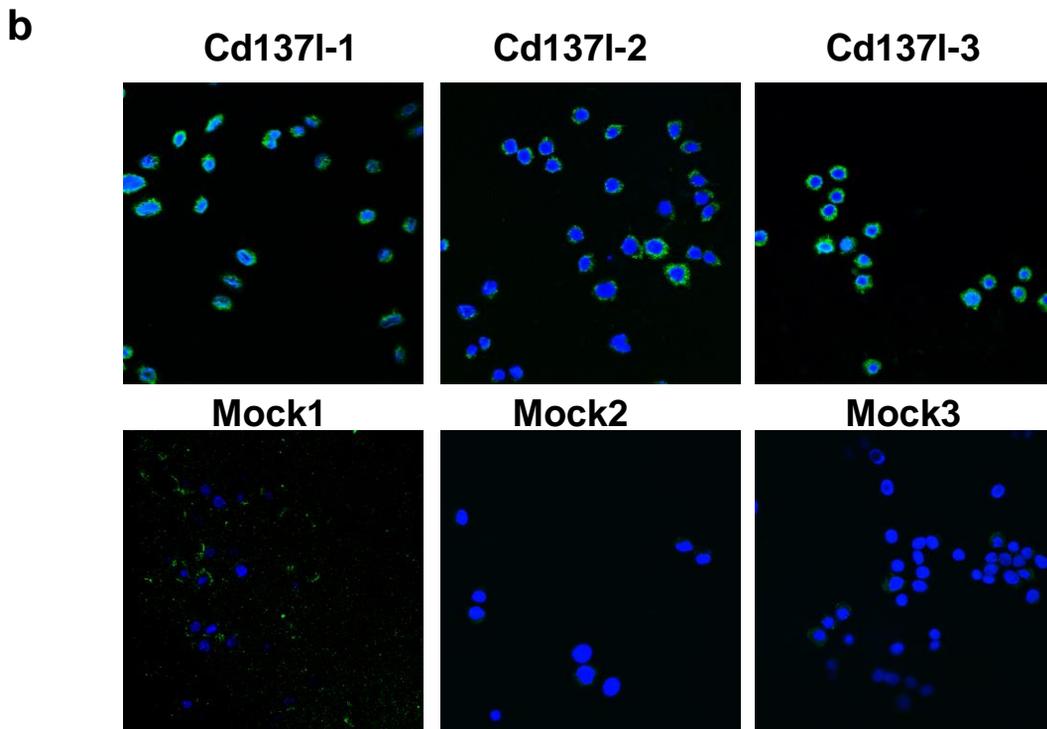
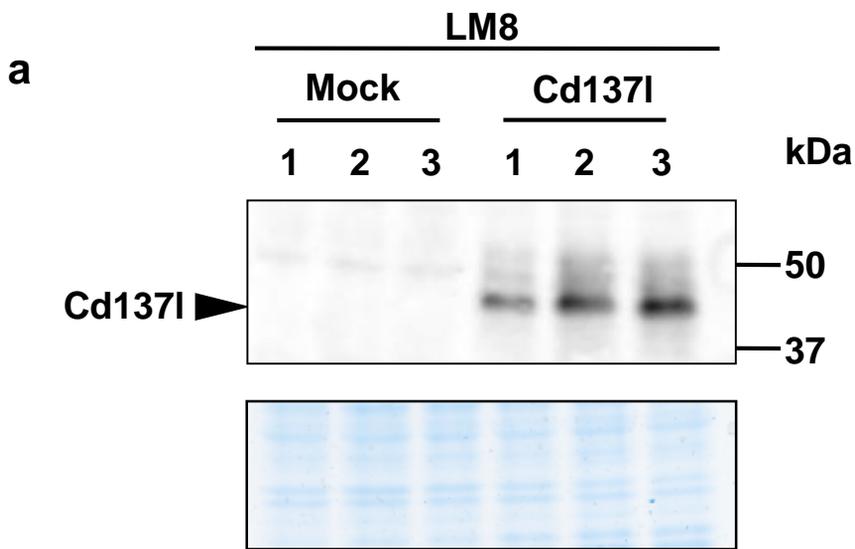


図25、Western blotting(a)と細胞免疫染色(b)

CD137L安定発現細胞株を樹立し、CD137Lの発現を確認した。

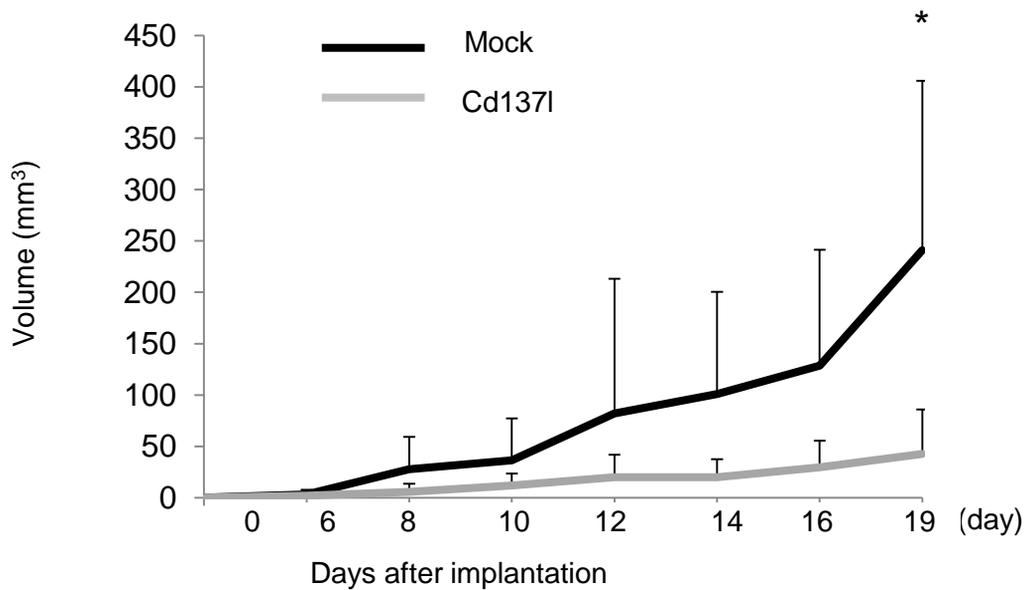


図26、ゼノグラフトを用いた増殖能の評価

Cd1371 (n=3) もしくはMock (n=3) を発現する安定発現細胞株をC3Hマウスの両背部に移植した。それぞれのマウスは2匹ずつ使用した。体積は2、3日毎に測定した。* $P < 0.05$, Wilcoxon rank-sum test。

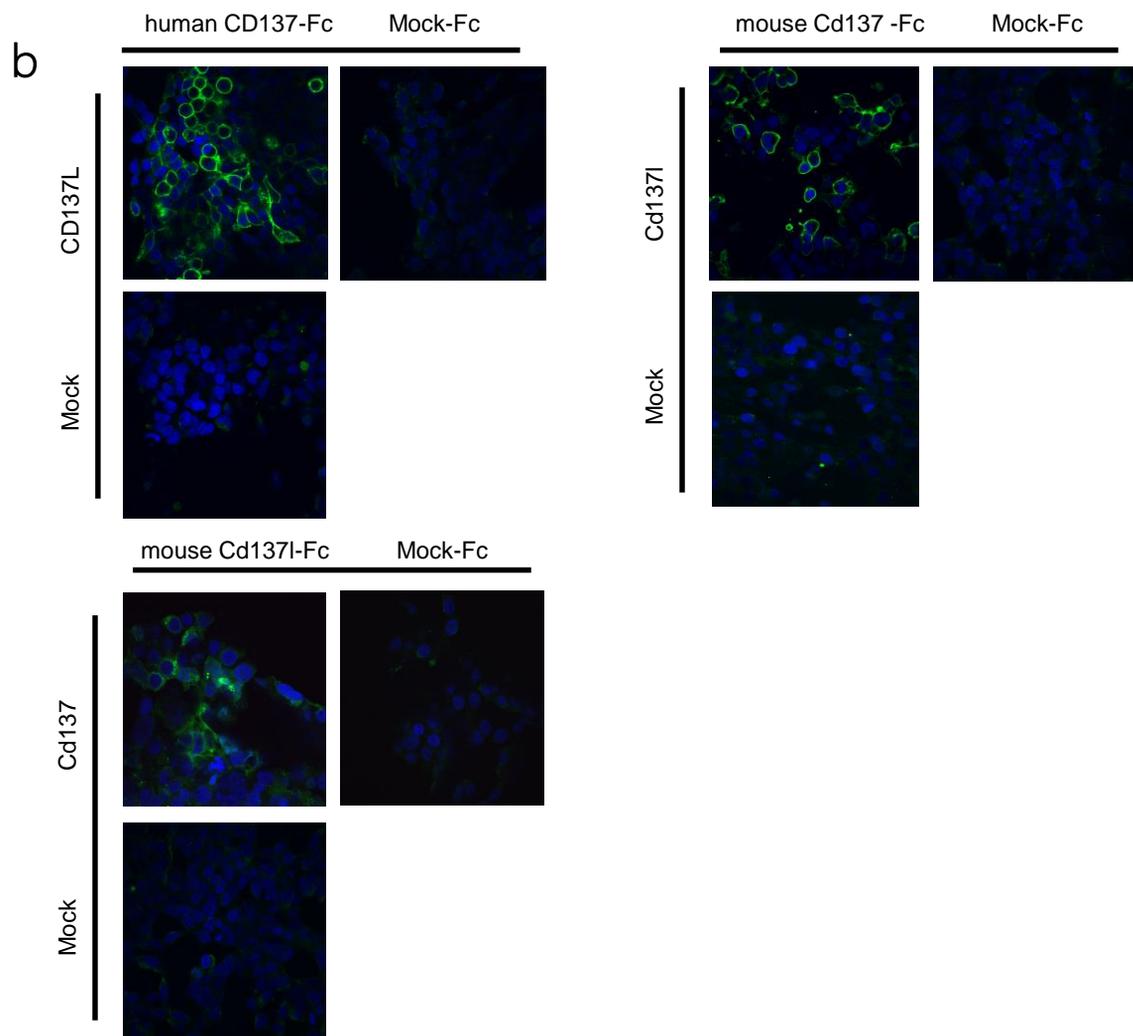
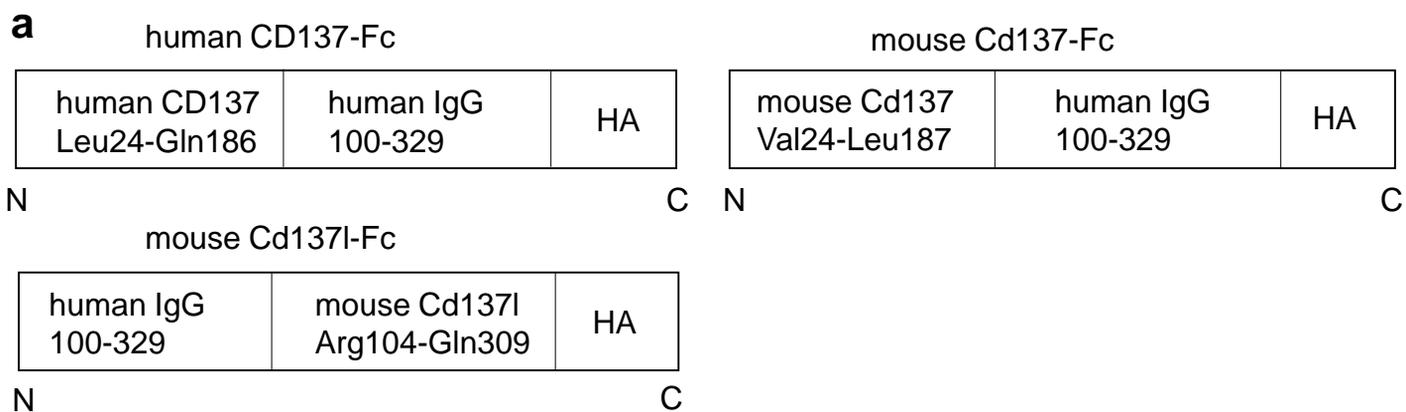


図27、Fc融合タンパクの設計と結合能の確認

(a) 融合タンパクのシェーマ。(b)293Tに発現ベクターを投与してCD137LもしくはCD137を過剰発現後に、Fc融合タンパクを投与してFc融合タンパクの結合能を確認した。

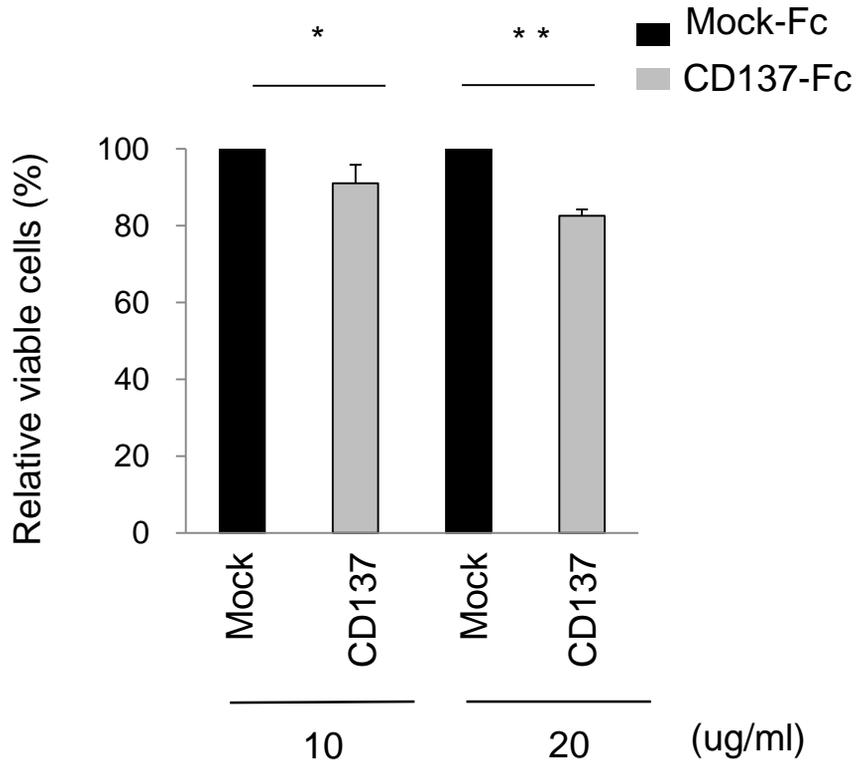


図28、SaOS2に対するCD137-Fcの細胞増殖抑制効果

SaOS2をCD137-Fc (10 から20 µg/ml) もしくは Mock-Fcと共に培養した。48時間後に細胞増殖を評価した。エラーバーは標準偏差を示している (n=3) * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$, Student's t-test。

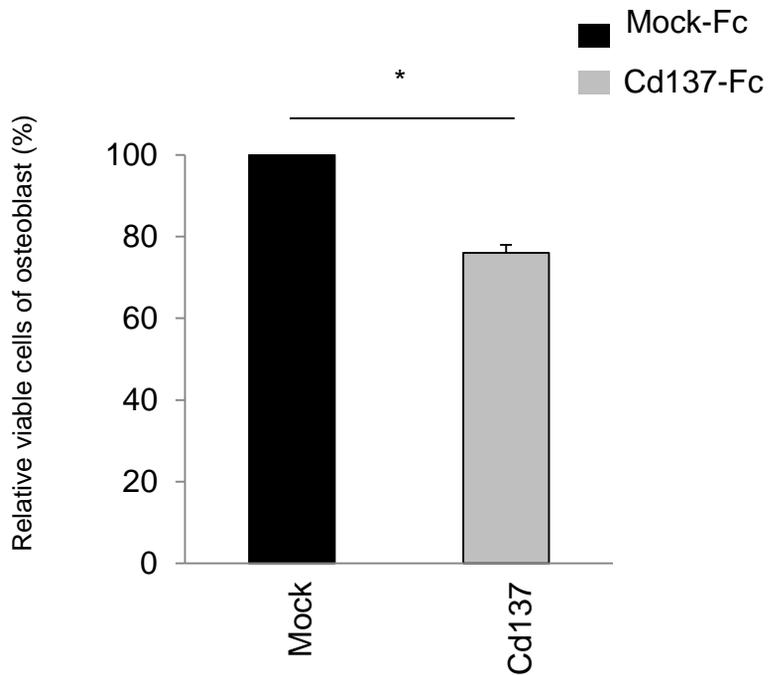
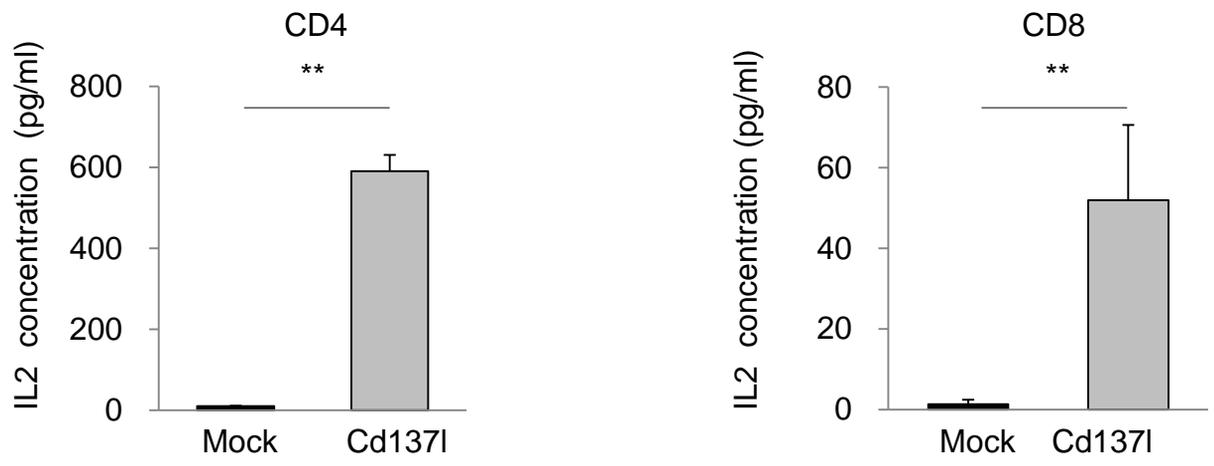


図29、 $p53^{+/+}$ 骨芽細胞初代培養に対するCD137-Fcの細胞増殖抑制効果

$p53^{+/+}$ 骨芽細胞初代培養をCd137-Fc (40 $\mu\text{g/ml}$) もしくはMock-Fc投与下で培養した。48時間後に細胞増殖を評価した。エラーバーは標準偏差を示している (n = 3)。

* $P < 0.05$, Student's t-test。

a



b

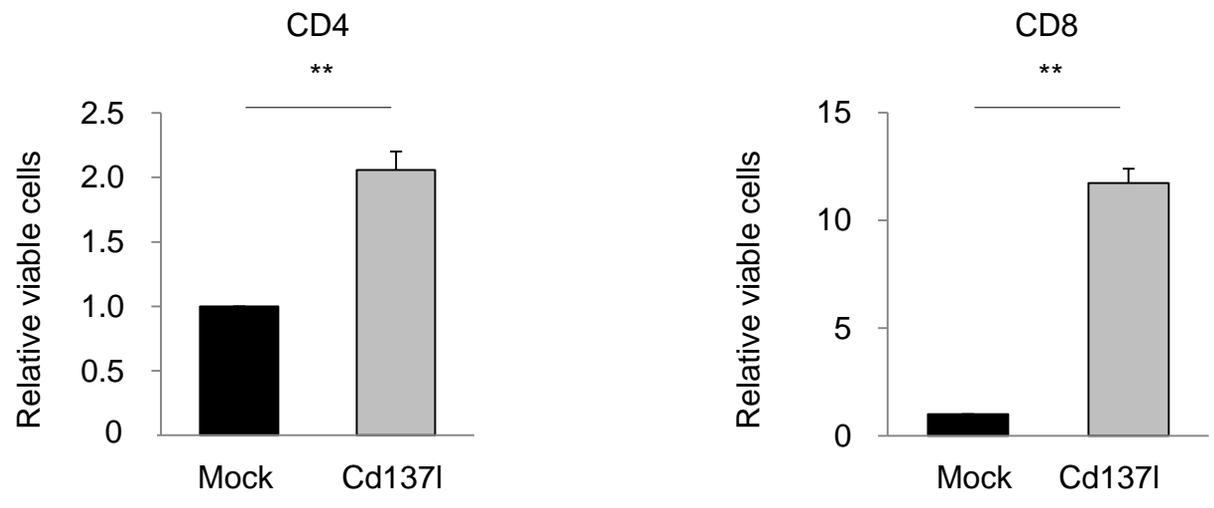


図30、CD4⁺ と CD8⁺ T細胞のIL2産生(a)と増殖(b)
Cd1371-Fc刺激後、48時間後に評価した。** $P < 0.001$, Student's t-test。

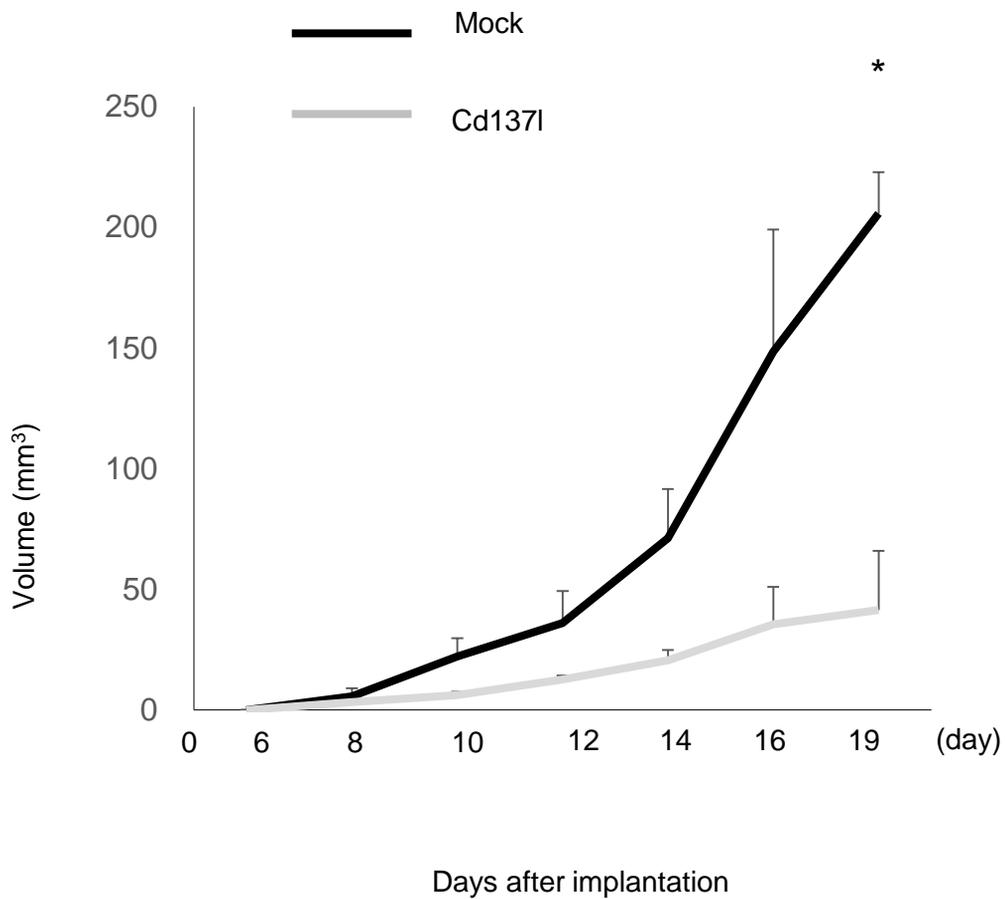


図31、ゼノグラフトモデルを用いたCd1371-Fcの増殖抑制効果

C3H/HeJマウス (each group, n = 3)の左背部皮下に 1×10^6 LM8を含むPBSを注射した。腫瘍が0.5cmの大きさに達した後にCd1371-Fc もしくはMock-Fcを3日間腹腔内に投与した。腫瘍径を2、3日毎に測定した。* $P < 0.05$, Wilcoxon rank-sum test。

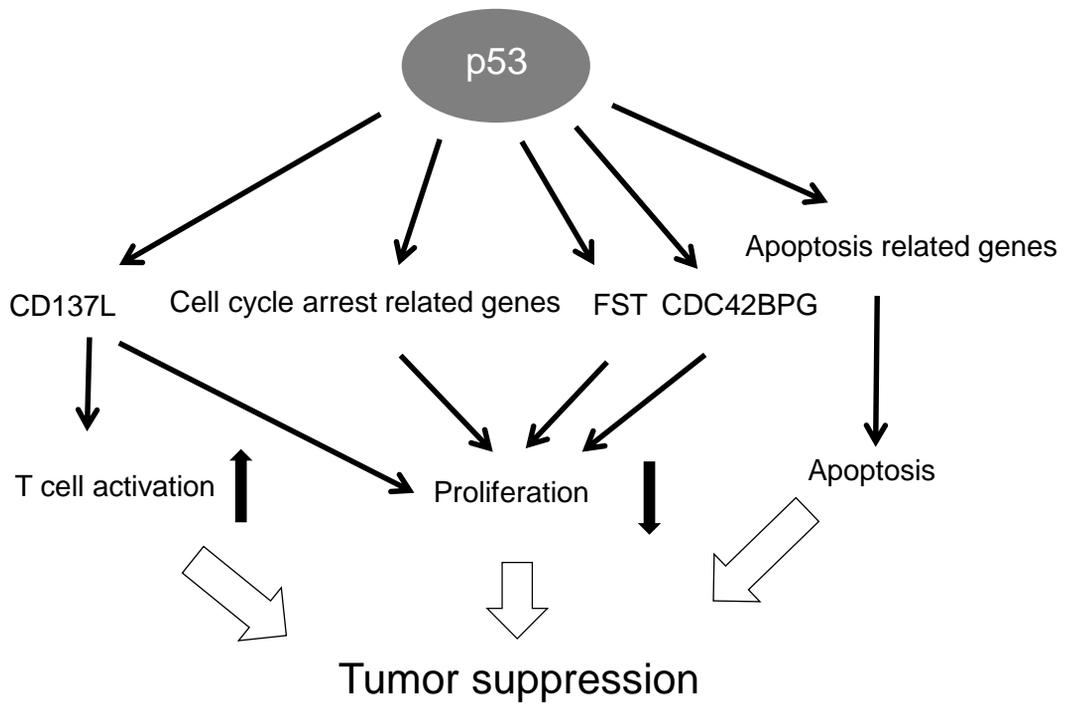


図32、CD137L機能のシエーマ
 p53によって制御されるパスウェイと遺伝子機能のシエーマ

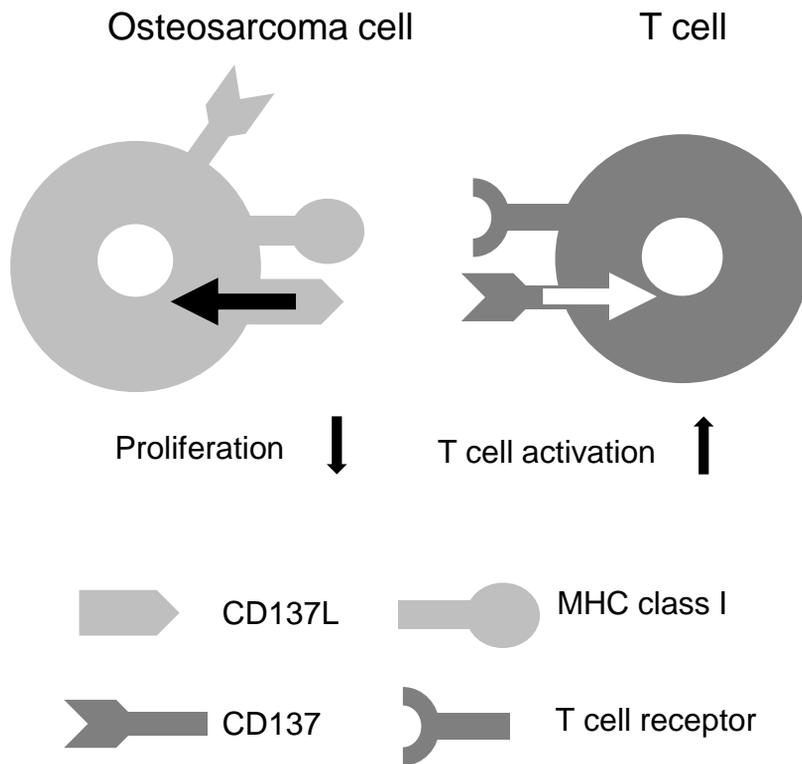


図33、逆方向と正方向CD137Lシグナルの機能

Table 1. Distribution of Tumors in Affected Germline TP53 Mutation Carriers

Tumor	No. of Tumors	No. of Patients	% of Affected Mutation Carriers	Mean/Median Age at Tumor Onset, Years (range)*
In All Patients (N = 322; 213†, 109‡)				
Breast carcinoma	172 (172†; 0‡)	127 (127†)	60†	35/33 (20-69†)
Soft tissue sarcoma	104 (54†; 50‡)	86 (46†; 40‡)	27	29/31 (0.5-67†; 0.5-70‡)
Osteosarcoma	53 (24†; 29‡)	50 (23†; 27‡)	16	18/16 (8-55†; 5-54‡)
CNS tumor	43 (25†; 18‡)	42 (25†; 17‡)	13	15/11 (0.3-67†; 1-33‡)
Adrenocortical carcinoma	43 (30†; 13‡)	42 (29†; 13‡)	13	6/1 (0.5-41†; 0.7-19‡)
Lung cancer	18 (8†; 10‡)	18 (8†; 10‡)	6	42/44 (14-58†; 37-54‡)
Leukemia	16 (9†; 7‡)	14 (7†; 7‡)	4	14/12 (6-35†; 2-16‡)
Prostate cancer	4 (4†)	4 (4†)	4‡	63/62 (57-71‡)
Colorectal cancer	12 (5†; 7‡)	11 (5†; 6‡)	3	40/40 (21-74†; 27-52‡)
Renal cancer	11 (4†; 7‡)	9 (3†; 6‡)	3	51/49 (34-68†; 41-70‡)
Melanoma	11 (9†; 2‡)	8 (6†; 2‡)	2	40/43 (25-65†; 15-55‡)
Lymphoma	7 (3†; 4‡)	7 (3†; 4‡)	2	18/13 (11-42†; 2-32‡)
Stomach carcinoma	7 (3†; 4‡)	7 (3†; 4‡)	2	41/44 (44-58†; 17-54‡)
Pancreas carcinoma	6 (2†; 4‡)	6 (2†; 4‡)	2	46/39 (32-64†; 37-66‡)
Head and neck cancer	6 (1†; 5‡)	6 (1†; 5‡)	2	41/42 (21†; 30-59‡)
Skin cancer	6 (4†; 2‡)	5 (3†; 2‡)	2	31/31 (29-39†; 19-ND‡)
Chondrosarcoma	5 (2†; 3‡)	5 (2†; 3‡)	2	32/31 (21-57†; 19-33‡)
Ovary carcinoma	3 (3†)	3 (3†)	1†	43/35 (26-69†)
Nephroblastoma	3 (0†; 3‡)	3 (0†; 3‡)	0.9	3/2 (1-6‡)
Thyroid carcinoma	3 (3†; 0‡)	3 (3†; 0‡)	0.9	42/40 (35-50†)
Endometrial carcinoma	2 (2†)	2 (2†)	0.9†	54/54 (31-77†)
Testis choriocarcinoma	1 (1†)	1 (1†)	0.9‡	17/17 (17‡)
Esophageal cancer	2 (0†; 2‡)	2 (0†; 2‡)	0.6	63/63 (59-67‡)
Bladder carcinoma	2 (1†; 1‡)	2 (1†; 1‡)	0.6	49/49 (66†; 31‡)
Cervical carcinoma	1 (1†)	1 (1†)	0.5†	ND†
Gestational choriocarcinoma	1 (1†)	1 (1†)	0.5†	30/30 (30†)
Neuroblastoma	1 (1†; 0‡)	1 (1†; 0‡)	0.3	0.5/0.5 (0.5†)
Mesothelioma	1 (1†; 0‡)	1 (1†; 0‡)	0.3	52/52 (52†)
Myeloma	1 (0†; 1‡)	1 (0†; 1‡)	0.3	43/43 (43‡)
Thymoma	1 (1†; 0‡)	1 (1†; 0‡)	0.3	33/33 (33†)
Appendix carcinoma	1 (1†; 0‡)	1 (1†; 0‡)	0.3	45/45 (45†)
Anal cancer	1 (0†; 1‡)	1 (0†; 1‡)	0.3	50/50 (50‡)
Not determined	4 (1†; 3‡)	4 (1†; 3‡)		(46†; 33-49‡)
In Children (n = 132; 70†, 62‡)				
Osteosarcoma	40 (20†; 20‡)	39 (19†; 20‡)	30	14/14 (8-18†; 5-18‡)
Adrenocortical carcinoma	37 (25†; 12‡)	36 (24†; 12‡)	27	2/1 (0.5-11†; 0.7-17‡)
CNS tumor	34 (19†; 15‡)	34 (19†; 15‡)	26	8/9 (0.3-18†; 1-18‡)
Soft tissue sarcoma	33 (13†; 21‡)	31 (12†; 19‡)	23	5/2 (0.5-17†; 0.5-16‡)
Leukemia	13 (7†; 6‡)	12 (6†; 6‡)	9	11/12 (6-17†; 2-16‡)
Lymphoma	4 (2†; 2‡)	4 (2†; 2‡)	3	9/10 (11-13†; 2-9‡)
Nephroblastoma	3 (0†; 3‡)	3 (0†; 3‡)	2	3/2 (1-6‡)
Testis choriocarcinoma	1 (1†)	1 (1†)	2‡	17/17 (17‡)
Neuroblastoma	1 (1†; 0‡)	1 (1†; 0‡)	0.8	0.5/0.5 (0.5†)
Lung cancer	1 (1†; 0‡)	1 (1†; 0‡)	0.8	14/14 (14†)
Stomach carcinoma	1 (0†; 1‡)	1 (0†; 1‡)	0.8	17/17 (17‡)
In Adults (n = 219; 160†, 59‡)				
Breast carcinoma	172 (172†; 0‡)	127 (127†)	79†	35/33 (20-69†)
Soft tissue sarcoma	70 (41†; 29‡)	59 (34†; 25‡)	27	41/42 (21-67†; 22-70‡)
Lung cancer	17 (7†; 10‡)	17 (7†; 10‡)	8	44/45 (22-58†; 37-54‡)
Prostate cancer	4 (4†)	4 (4†)	7‡	63/62 (57-71‡)
Osteosarcoma	13 (4†; 9‡)	13 (4†; 9‡)	6	31/28 (33-55†; 19-54‡)
Colorectal cancer	12 (5†; 7‡)	11 (5†; 6‡)	5	40/40 (21-74†; 27-52‡)
Renal cancer	11 (4†; 7‡)	9 (3†; 6‡)	4	51/49 (34-68†; 41-70‡)
CNS tumor	9 (6†; 3‡)	8 (6†; 2‡)	4	39/33 (20-67†; 30-33‡)

(continued on following page)

表1、Li-Fraumeni症候群患者における癌腫の頻度

Bougeard G et al, Revisiting Li-Fraumeni Syndrome From TP53 Mutation Carriers. J Clin Oncol. 2015 Jul 20;33(21):2345-52.から引用

		Forward	Reverse
Quantitative real-time PCR	human CD137L	TCAGGCTCCGTTTCACTTG	CAGGTCCACGGTCAAAGC
	human CD137	CCTGAAGACCAAGGAGTGGA	GCAAAGCTGATTCCAAGAGAA
	human CDC42BPG	AGATGCTGAAGAGGGCTGAG	CCCCTTTCACGAGCACAT
	human FST	TCTGCCAGTTCATGGAGGA	TCCTTGCTCAGTTCGGTCTT
	mouse Cd137l	CGCCAAGCTACTGGCTAAAA	CGTACCTCAGACCTTGAGATAGGT
	mouse Cd137	TGAGCTTCTCTCCAGTACCA	AGCAGCAAAGCCGATGTC
	mouse Cdc42bpg	GCCATTTGTGGCTTCACTT	GGGCAGCCATTAGCTCTG
	mouse Fst	AAGCATTCTGGATCTTGCAACT	GATAGGAAAGCTGTAGTCTGGTC
p53 binding site	human CD137L-BS-AB	AAAGGTACCTCCTTCAACACTAGCCAGTAACA	AAAAAGCTTTGGAACACAGGCACATACCA
	mouse Cd137l-BS	AAAGGTACCTCAGTGGCTGAGAGCATTTG	AAAAAGCTTTGCTCTTAACTGCTGAACCA
	human CDC42BPG-BS-AB	AAAGGTACCCACCCAGGCTGATCTTGAAC	AAAAAGCTTTGTGTGACCTCAGGCAAGTC
	human CDC42BPG-BS-C	AAAGGTACCTGCCTGTGTTGTGTCCACC	AAAAAGCTTTGGACAGGCTGCCTAATCCT
	mouse Cdc42bpg-BS	AAAGGTACCTTCTCCCTGCCTGCCTCT	AAAAAGCTTCTGCAGAAATATCAGAGGTGA
	human FST-BS	AAACTCGAGAACAAAAATGAAAGGCGACA	AAAAGATCTGCAGCTTGGTGTGTTGTTAGTG
	mouse Fst-BS	AAAGGTACCCCTGCAGATTCATATTCATTCTC	AAAAAGCTTTTGCATTGACTTTTACTAGACTGTTT
Expression vector	human CD137L	AAAGAATTCTCTCGTCATGGAATACGCC	AAACTCGAGTTCGGACCTCGGTGAAGG
	mouse Cd137l	AAAGAATTCACCGTGGTAATGGACCAGCAC	AAACTCGAGTTCATGGGTTGTGCGGGTTT
	human CDC42BPG	AAAGGTACCATGGAGCGGCGGCTGCGCGCG	AAAAGATCTAGGAGAGCTCTCCAATTC
	human FST317	AAAGGTACCCCCAGGATGGTCCGC	AAACTCGAGGTTGCAAGATCCGGA
	human FST344	AAAGGTACCCCCAGGATGGTCCGC	AAACTCGAGCCACTCTAGAAATAGA
Recombinant protein	human CD137	AAAGGTACCCAGGATCCTTGTAGTAACTGC	AAAGAGCTCGATCTGCGGAGAGTGTCTCTGG
	mouse Cd137	AAAGGTACCCAGAACTCCTGTGATAACTGT	AAAGAGCTCAGCTGCTCCAGTGGTCTTCTT
	mouse Cd137l	AAAGAATTCACCGAGCCTCGGCCAGCGCTC	AAACTCGAGTCATTCCCATGGGTTGTCGGG
Genotyping	mouse p53	GTTATGCATCCATACAGTACA	CCGCAGGATTTACAGACACC
CHIP assay	CD137L	TCCTTCAACACTAGCCAG	TCTCAGCACTGTGATGCC
	CDC42BPG	GGCCCTCTGTGACAATCTC	ACAGGCTGCCTAATCCTCTG
	FST	GATGCCACAGAAAGCCTAT	TGTCTGCTCAAATCAGCAC
siRNA		Sence	Antisense
	siP53	GACUCCAGUGGUAUUCUACTT	AGUAGAUUACCACUGGAGUCTT
	siEGFP	GCAGCACGACUUCUUAAGT	CUUGAAGAAGUCGUGCUGC

表2、プライマーの配列

gene	FPKM value					status
	WX	KX	W	K	WX/max	
Aen	35.15	7.68	8.84	7.32	3.98	R
Al414108	1.57	0.36	0.76	0.51	2.07	M
Akl	79.91	32.19	32.61	33.52	2.38	R
Ano3	1.37	0.05	0.03	0.06	24.64	N
Anxa8	36.83	16.46	15.49	14.13	2.24	N
Ass1	11.15	3.46	2.28	2.63	3.22	N
Atp1a2	13.71	6.47	3.39	4.68	2.12	N
B230120H23Rik	8.86	4.11	4.01	3.88	2.16	M
Bax	139.69	42.14	50.40	43.63	2.77	R
Bbc3	16.85	4.86	5.52	4.87	3.05	R
Cbln2	1.27	0.41	0.63	0.50	2.02	N
Ccng1	75.24	14.88	17.13	15.05	4.39	R
Cd80	2.00	0.64	0.51	0.41	3.14	N
Cd137l	1.76	0.81	0.72	0.81	2.17	N
Cdc42bpg	8.31	4.05	3.97	3.88	2.05	N
Cdkn1a	343.52	66.17	74.00	64.30	4.64	R
Celf5	5.47	0.94	1.68	1.14	3.25	N
Ces2e	2.25	0.63	0.63	0.54	3.57	M
Cox6b2	48.06	8.77	7.36	8.15	5.48	N
Cpt1c	27.30	9.44	11.19	10.20	2.44	R
Dcxr	41.06	6.28	6.28	5.57	6.54	N
Dynlrb2	1.31	0.17	0.09	0.62	2.13	N
Eda2r	5.71	0.13	0.25	0.22	22.60	R
Ephx1	73.75	6.92	9.36	8.42	7.88	N
Exoc4	17.97	4.26	5.22	4.05	3.44	N
Fam212b	8.10	0.53	1.46	1.22	5.56	N
Fas	9.32	4.00	4.37	3.99	2.13	R
Foxj1	1.72	0.31	0.54	0.72	2.38	N
Fst	6.16	2.13	2.01	2.30	2.67	N
Gas6	364.76	106.60	122.06	121.24	2.99	N
Gdf15	3.07	0.27	0.25	0.49	6.31	R
Gdf5	1.52	0.41	0.53	0.71	2.14	N
Gfap	13.30	1.35	3.26	2.14	4.08	N
Gm11974	19.70	7.27	8.98	8.32	2.19	M
Gria3	9.27	2.07	2.76	2.47	3.35	N
Inhbb	4.18	1.23	1.90	1.65	2.20	N
Lyve1	11.05	3.20	3.49	4.15	2.67	N
Mdm2	32.38	15.10	15.44	14.19	2.10	R
Mgmt	19.86	6.86	6.28	6.37	2.90	R
Mrap	4.22	0.83	0.87	1.25	3.38	N
Perp	8.48	2.65	3.54	3.91	2.17	R
Phlda3	90.31	18.02	23.24	19.30	3.89	R
Pmaip1	8.73	2.88	2.39	1.86	3.03	R
Polk	4.79	1.81	1.89	1.87	2.53	R
Pqlc3	27.80	12.27	12.74	10.70	2.18	N
Psrc1	29.63	7.09	5.53	4.77	4.18	R
Ptprv	16.15	7.26	7.25	7.43	2.17	R
Pvt1	2.63	1.17	1.00	0.89	2.25	R
Rnf169	6.01	2.72	2.85	2.91	2.07	N
Rprm	3.03	0.67	0.92	0.84	3.29	R
Rps27l	222.32	95.94	103.78	96.33	2.14	R
Serpina3n	2.53	0.94	0.83	0.94	2.69	M
Sesn2	17.52	3.66	4.21	3.62	4.16	R
Slc19a2	7.75	1.19	1.73	1.35	4.49	R
Slc2a9	2.73	0.64	0.61	0.65	4.23	R
Slco1c1	3.56	0.46	0.77	0.84	4.25	N
Svop	1.44	0.01	0.39	0.23	3.67	N
Syna	1.24	0.48	0.31	0.33	2.61	M
Tnfrsf10b	9.93	2.95	3.04	2.91	3.27	R
Trim7	7.52	1.62	1.27	1.74	4.33	N
Trp53inp1	25.23	5.36	5.87	4.88	4.30	R
Upk1b	2.42	0.27	0.19	0.38	6.43	N
Vnn1	1.67	0.44	0.38	0.55	3.04	N
Zfp365	5.47	1.72	1.91	1.55	2.87	R
Zmat3	15.04	3.06	3.82	3.15	3.94	R
1700003M07Rik	1.32	0.37	0.59	0.51	2.25	M
1700007K13Rik	3.76	0.05	0.29	0.23	13.01	M
2010001M06Rik	10.09	1.03	2.00	1.84	5.06	M
9030617O03Rik	11.29	2.76	3.29	2.68	3.43	M

FPKM, fragments per kilobase of exon per million mapped fragments

WX: irradiated $p53^{+/+}$ group, KX: irradiated $p53^{-/-}$ mice group, W: non-irradiated $p53^{+/+}$ group, K: non-irradiated $p53^{-/-}$ group.

WX/max is median of WX / maximum value in median K, median KX or median W.

R, reported gene as p53 target, N, non-reported gene as p53 target, M, mouse genes which don't have human homologue.

表3、p53依存的に発現が誘導される遺伝子群

gene	FPKM value					status
	WX	KX	W	K	WX/max	
Ankle1	1.07	4.59	3.11	3.05	0.35	N
Anln	1.23	5.02	3.27	3.58	0.38	N
Apitd1	1.37	3.08	3.67	3.01	0.45	N
Asf1b	1.95	10.43	7.53	7.02	0.28	N
Atad2	1.34	3.99	3.02	3.06	0.44	N
Aurkb	2.27	14.10	7.80	9.87	0.29	N
BC030867	0.43	2.41	1.23	1.47	0.35	M
Birc5	6.25	35.08	20.28	22.11	0.31	K
Bub1	0.75	3.99	2.14	2.42	0.35	N
Bub1b	2.22	8.43	5.06	5.47	0.44	N
Ccna2	5.40	26.62	16.43	17.42	0.33	N
Ccnb2	5.54	27.70	12.98	14.19	0.43	N
Ccne2	0.65	1.92	1.87	1.74	0.38	N
Ccr2	0.79	1.94	2.02	2.53	0.41	N
Cd79b	1.01	12.18	6.23	4.27	0.24	N
Cdc45	1.91	7.22	4.69	5.22	0.41	N
Cdc6	0.39	2.05	1.53	1.61	0.25	N
Cdca2	0.94	4.08	2.23	2.27	0.42	N
Cdca3	5.72	30.56	20.39	19.34	0.30	N
Cdca5	0.92	5.25	2.75	3.56	0.34	N
Cdca7	2.14	6.02	5.26	5.33	0.41	N
Cdca7l	0.67	2.43	1.99	2.03	0.33	N
Cdca8	4.13	18.56	10.12	11.95	0.41	N
Cdk1	4.57	19.31	9.90	10.90	0.46	N
Cdkn3	2.15	9.79	5.10	4.55	0.47	N
Cenpe	0.75	2.77	1.54	1.70	0.49	N
Cenpf	0.44	2.37	1.40	1.41	0.31	N
Cenph	1.41	5.88	3.22	4.03	0.44	N
Cenpi	0.82	2.89	1.84	1.96	0.44	N
Cenpk	1.55	4.67	3.50	3.59	0.44	N
Cenpm	1.24	5.52	4.00	4.42	0.31	N
Cenpn	1.82	5.94	3.90	4.34	0.47	N
Cenpp	1.11	4.86	3.27	3.44	0.34	N
Cep55	1.49	7.26	3.43	4.40	0.44	N
Chad	17.37	35.66	40.02	38.51	0.49	N
Chek1	1.01	2.83	2.11	2.17	0.48	R
Chtf18	1.12	3.31	2.29	2.76	0.49	N
Ckap2l	2.82	10.37	6.32	6.79	0.45	N
Clspn	0.50	2.81	1.90	2.01	0.27	N
Cybb	1.09	3.62	2.38	3.11	0.46	N
Depdc1a	0.95	4.97	2.82	3.26	0.34	N
Dhfr	0.96	2.72	2.08	2.21	0.46	N
Dlgap5	1.62	7.76	3.63	3.91	0.45	N
Dna2	0.59	1.54	1.21	1.38	0.49	N
Dscc1	0.37	1.82	1.18	1.61	0.31	N
E2f2	0.58	3.07	1.85	1.62	0.36	N
E2f8	0.78	3.97	3.06	2.86	0.27	N
Ect2	0.92	3.71	2.08	2.29	0.44	N
Esco2	0.40	2.57	2.17	2.26	0.18	N
Fam64a	3.76	13.57	9.54	10.56	0.39	N
Fbxo5	1.89	7.56	4.81	5.33	0.39	N
Fignl1	1.17	4.28	3.18	3.46	0.37	N
Foxm1	2.40	8.85	6.00	6.30	0.40	N
Gins2	4.85	13.00	9.85	11.45	0.49	N
Gpha2	10.17	26.16	25.66	20.35	0.50	N
Gsg2	0.54	2.41	1.26	1.38	0.43	N
Hells	0.97	3.65	2.48	2.67	0.39	N
Hmgb2	12.97	43.96	37.27	32.87	0.39	N
Incenp	5.67	18.42	11.53	11.94	0.49	N
Iqgap3	0.56	3.02	2.28	2.48	0.25	N
Kif11	1.35	7.05	4.40	4.81	0.31	N
Kif15	0.46	2.98	1.97	2.06	0.23	N
Kif18a	0.65	2.05	1.60	1.37	0.47	N
Kif20b	0.52	2.16	1.24	1.39	0.42	N
Kif22	3.84	14.39	9.36	9.80	0.41	N
Kif23	1.72	7.99	4.79	5.09	0.36	N
Kif2c	1.86	8.10	3.95	4.83	0.47	N
Kif4	0.88	3.80	2.14	2.54	0.41	N
Lmnbl	7.19	23.94	17.09	18.85	0.42	N
Map4k1	0.57	2.28	1.34	1.18	0.49	N
Mcm10	0.79	3.44	1.94	2.11	0.41	N
Mcm2	4.28	14.37	10.15	11.26	0.42	N
Mcm3	5.06	18.28	12.70	13.30	0.40	N
Mcm5	3.50	15.25	9.45	10.67	0.37	N

gene	FPKM value					status
	WX	KX	W	K	WX/max	
Mcm6	8.75	24.29	19.22	20.86	0.46	N
Melk	0.80	5.19	3.27	3.90	0.24	N
Mis18bp1	0.64	2.94	1.78	1.99	0.36	N
Mki67	1.89	12.20	8.92	7.99	0.24	R
Mns1	1.56	4.96	3.26	3.37	0.48	N
Mxd3	1.12	7.81	6.11	6.10	0.18	N
Mybl2	1.00	4.55	2.89	3.23	0.35	N
Napsa	0.77	5.17	2.14	2.62	0.36	N
Ncapg	0.63	3.25	2.06	2.46	0.31	N
Ncapg2	0.88	2.60	1.89	2.16	0.47	N
Ncaph	3.19	9.88	6.55	6.85	0.49	N
Ndc80	1.20	6.96	4.64	4.76	0.26	N
Neil3	1.25	6.67	4.58	4.60	0.27	N
Nek2	1.10	5.17	2.44	2.43	0.45	N
Nsl1	0.84	2.93	1.94	1.91	0.44	N
Nuf2	1.77	9.61	5.89	6.39	0.30	N
Nusap1	2.54	13.80	7.75	7.80	0.33	N
Oip5	0.59	2.71	1.68	1.78	0.35	N
Pbk	1.95	9.51	8.09	7.91	0.25	N
Plk1	3.60	16.23	8.36	9.19	0.43	R
Pole	0.48	2.05	1.32	1.55	0.36	N
Prc1	4.36	18.71	11.24	11.77	0.39	N
Prim1	2.88	9.11	6.77	8.20	0.43	N
Racgap1	4.82	19.10	11.62	13.16	0.41	N
Rad51	1.71	5.20	3.51	3.68	0.49	N
Rad51ap1	1.52	5.91	3.61	4.27	0.42	N
Rrm2	4.84	22.29	17.55	16.90	0.29	N
Sapcd2	0.39	1.77	1.09	1.22	0.36	N
Sgol1	0.64	3.03	1.63	1.78	0.39	N
Sgol2	0.70	2.88	1.54	1.65	0.45	N
Shcbp1	1.29	6.91	4.83	4.28	0.30	N
Ska1	0.33	1.77	1.25	1.29	0.27	N
Ska3	0.83	3.67	2.02	2.22	0.41	N
Smc2	1.52	5.15	3.93	3.67	0.42	N
Snora81	0.00	1.87	1.82	1.86	0.03	N
Spag5	1.45	5.84	3.05	3.51	0.48	N
Spc24	1.83	9.19	5.56	6.14	0.33	N
Spc25	3.04	10.43	7.02	7.86	0.43	N
Spdl1	1.01	3.29	2.19	2.38	0.46	N
Tcf19	5.84	17.81	15.21	17.29	0.38	N
Tk1	3.44	19.77	14.98	17.65	0.23	N
Top2a	4.44	21.32	12.51	13.25	0.36	N
Tpx2	3.14	13.18	7.40	7.94	0.42	N
Trip13	1.35	4.02	3.00	3.03	0.45	N
Ttk	0.94	3.56	2.54	2.31	0.41	N
Uhrf1	2.56	14.19	8.68	9.82	0.29	N
Vpreb3	0.13	10.44	5.31	3.64	0.04	N
Wldhd1	0.99	3.73	2.69	2.61	0.38	N
Xpnp2	0.71	1.63	1.74	1.60	0.44	N
1190002F15Rik	3.01	9.45	6.67	7.00	0.45	N
2700099C18Rik	1.47	5.75	3.68	3.59	0.41	M
2810417H13Rik	2.42	17.16	10.64	11.48	0.23	M
4930579G24Rik	1.88	4.55	3.92	4.04	0.48	M

FPKM, fragments per kilobase of exon per million mapped fragments

WX, irradiated $p53^{+/+}$ group, KX, irradiated $p53^{-/-}$ mice group, W, non-irradiated $p53^{+/+}$ group, K, non-irradiated $p53^{-/-}$ group.

WX/min is median WX / minimum value of median K, median KX or median W.

R, reported gene as p53 target, N, non-reported gene as p53 target, M, mouse gene which don't have human homologue.

表4、p53依存的に発現が抑制される遺伝子群

	Term	Genes	-log (p value)	Fold enrichment
p53-induced genes	p53 signalling pathway	P21, Bbc3, Z3, Bax, Rprm, Mdm2, Pmaip1, Fas, Perp, Sesn2, Ccng1	12.27	30.49
	Cytokine-cytokine receptor interaction	Inhbb, Tnfrsf10b, Gdf5, Eda2r, Fas, Cd137l	2.16	4.7
	TGF-beta signalling pathway	Inhbb, Gdf5, Fst	1.15	6.6
	Apoptosis	Tnfrsf10b, Bax, Fas	1.15	6.6
p53-repressed genes	Cell cycle	Cdk1, E2f2, Cdc6, Ttk, Chek1, Mcm2, Mcm3, Mcm5, Mcm6, Ccne2, Cdc45, Ccnb2, Plk1, Bub1, Bub1b, Ccna2	10.99	21.1
	DNA replication	Prim1, Dna2, Pole, Mcm2, Mcm3, Mcm5, Mcm6	5.70	33.75
	Oocyte meiosis	Ccne2, Cdk1, Ccnb2, Plk1, SgoL1, Bub1, Fbxo5	2.82	10.27
	p53 signalling pathway	Ccne2, Cdk1, Ccnb2, Rrm2, Chek1	2.44	12.23
	Progesterone-mediated oocyte maturation	Cdk1, Ccnb2, Plk1, Bub1, Ccna2	1.81	9.93
	Pyrimidine metabolism	Prim1, Rrm2, Pole, Tk1	1.54	7.03

表5、p53依存的に発現が誘導もしくは抑制される遺伝子を用いたパスウェイ解析