

## p21 によるヒト肝細胞株での分化誘導療法の開発

國枝 武美

近年、肝不全に対する肝補助療法として肝細胞移植や肝機能の中心を担う部分に生物学的素材を用いたバイオ人工肝臓の開発が望まれている。肝細胞療法に使用する細胞はより高い分化肝機能が維持されていることが重要であると考えられる。p21WAF1は cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitor であり、特に G1 期における細胞周期停止を誘導する事が知られている。また、p21 を強制発現させる事で様々な細胞株で分化誘導が示されている。本研究では SV40T 抗原ヒト不死化肝細胞株 NKNT-3 における p21 の分化誘導能を検討した。NKNT-3 に p21 発現アデノウイルスベクター (AdCMVp21, CMV のエンハンサー及びプロモーター下流に p21 がインサートされている) および TAT protein と p21 の fusion protein (pTAT-p21) を用いて、p21 の形質導入をおこなった。細胞形態、細胞周期、アルブミン発現、薬物代謝酵素である cytochrome P450 関連酵素 (CYP) 発現に及ぼす効果を検討した。免疫染色および Western blotting によって AdCMVp21 および pTAT-p21 による効果的な p21 の発現が NKNT-3 細胞に認められた。p21 形質導入後の細胞は細胞密度は減少し、胞体の増大を認め N/C 比の低下が認められた。細胞周期解析では G1 arrest の状態となった。また、アルブミンおよび CYP3A4, CYP2C9 の発現増強が認められた。ヒト不死化肝細胞 (NKNT-3) に p21 を過剰発現させることにより分化機能誘導が可能であることが示唆された。

(平成14年8月29日受理)

### p21 Transduction Augments Differentiated Phenotypes in Immortalized Human Hepatocytes

Takemi KUNIEDA

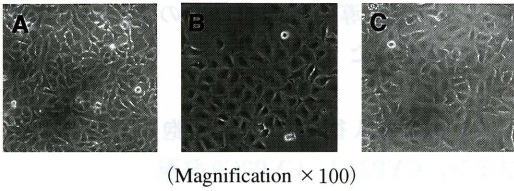
Recently, there has been great expectation regarding the use of cell therapies such as hepatocyte transplantation and bioartificial livers to treat patients with liver failure. Improvement of differentiated cellular functions is of fundamental importance in hepatocyte-based biological therapies. The molecule of p21, known as WAF1, is a potent cyclin-dependent kinase inhibitor which regulates the transition from the G1 phase to the S phase in a cell cycle. Investigators have demonstrated that p21 transduction induces cellular differentiation in various cell lines. We used SV40Tag-immortalized human NKNT-3 hepatocytes in this study. A replication-deficient adenovirus vector, Ad5CMVp21, expressing a p21 gene under the control of the CMV promoter, was used to achieve efficient p21 delivery. A pTAT-p21 fusion protein was also utilized for transduction in NKNT-3 cells. Morphological alteration, cell-cycle progression, and protein expression of albumin, CYP3A4, and CYP2C9 were analyzed in the p21-transduced NKNT-3



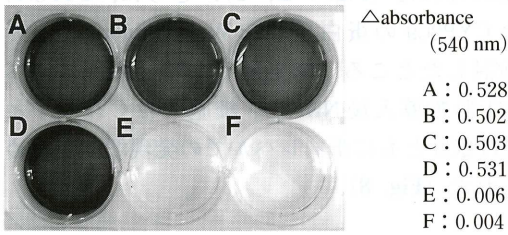






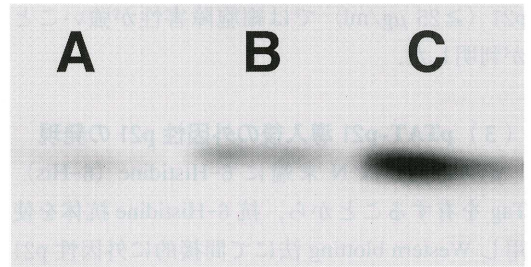


**Fig. 1.** Morphological appearance after p21 transduction  
After p21 transduction, decreased cell-density with a lower nuclear-to-cytoplasmic (N/C) ratio and enlargement of the size were occurred in p21-transduced NKNT-3 cells. (A ; unmodified NKNT-3, B ; NKNT-3 treated with AdCMVp21, C ; NKNT-3 treated with 10 µg/ml pTAT-p21, magnification x 100).

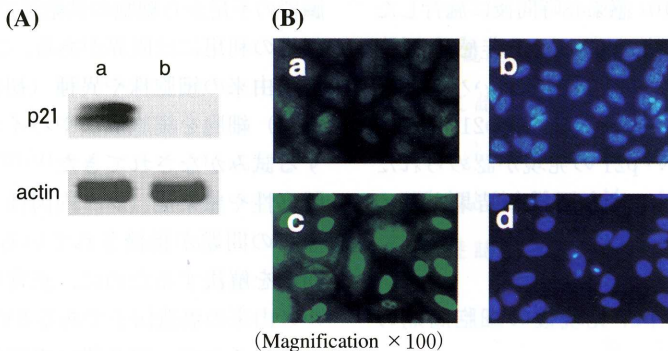


**Fig. 2.** MTT-cytotoxicity assay of pTAT-p21 transduction  
pTAT-p21-induced cellular damage was occurred in dose-dependent manner. Transduction of NKNT-3 cells with pTAT-p21 of 2.5 to 10 µg/ml showed no abnormalities in MTT-uptake, whereas treatment with ≥ 25 µg/ml pTAT-p21 severely damaged cells. NKNT-3 was transduced with TAT/p21 of 0 µg/ml (A), 2.5 µg/ml (B), 5 µg/ml (C), 10 µg/ml (D), 25 µg/ml (E), and 50 µg/ml (F).

問題点を解決するために、SV40T 抗原にて不死化されたヒト肝細胞株 NKNT-3 を材料に細胞周期調節分子である p21 を発現させることで分化形質の誘導，増強を本研究では検討した。SV40T 抗原は p53 および retinoblastoma (Rb) の経路を抑制することが知られており，細胞周期を正の方向に向かわせ強制的に増殖の方向へと誘導させる。そこで今回，注目したのが p53 の下流に位置し細胞周期を調節している遺伝子である p21 である。p21 は，1993年にはじめ



**Fig. 3.** Detection of exogenously transduced pTAT-p21  
Uptake of pTAT-p21 by NKNT-3 cells was detected by Western blotting analysis by means of a mouse anti-6Histidine antibody. Intensity of the band for 6-His increased in a dose-dependent manner of pTAT-p21 used (A ; 2.5 µg/ml pTAT-p21, B ; 5 µg/ml, C ; 10 µg/ml). These findings demonstrated the efficient transduction of NKNT-3 cells with pTAT-p21.



**Fig. 4.** p21 expression by Western blotting analysis and immunofluorescent study  
(A) Bands for p21 were detected in NKNT-3 cells treated with Ad5CMVp21 (a ; Ad5CMVp21-transduced NKNT-3, b ; untransduced NKNT-3).  
(B) Much more intense expression of p21 was observed in the nucleus of Ad5CMVp21-transduced NKNT-3 cells compared to unmodified counterparts (a ; untransduced NKNT-3, b ; Hoechst staining for a, c ; Ad5CMVp21-transduced NKNT-3, d ; Hoechst staining for c, magnification x 100).



てp53により誘導されるWAF1 (wild type p53 activated factor) 遺伝子が同定され<sup>16)</sup>、また同じ頃にサイクリン依存性キナーゼ (cyclin dependent kinase : Cdk)の活性を阻害するタンパク質としてp21Cip1がクローニングされた<sup>1)</sup>。これらが同一分子であることから、p53のCdk阻害タンパク質p21WAF1/Cip1を介した細胞周期の調節機構が明らかになった。また、p21は同時期にsenescent cell-derived inhibitor1 (sdi1)としても同定されて<sup>17)</sup>、細胞の分化/老化にも関与していると推測される。p21はCdk複合体に結合することで活性を抑えその結果Rbのリン酸化を抑制し転写因子E2Fの機能を抑制することでG1/S停止に関与する。現在、p21ファミリーとしてp21(Waf1)、p27(Kip)<sup>18)</sup>、p57(Kip2)<sup>19)</sup>が知られており、これらは、N末端に、相同性を有し、その部分でCdk/cyclin複合体と結合して幅広く活性を抑制する。また、p21はDNAポリメラーゼの複製活性を促進するproliferating cell nuclear antigen (PCNA)も抑制することが知られている<sup>20), 21)</sup> (Fig. 9)。未分化腫瘍に比べ高分化型肺非小細胞癌ではよりp21の発現増強が見られたとする報告<sup>22)</sup>や、monoblastic cell lineにおいてp21の過剰発現により分化が誘導されたとする報告<sup>23)</sup>もある。また、食道癌細胞株にアデノウイルスベクターを用いp21Cip1/sdi1を遺伝子導入することにより扁平上皮細胞の分化マーカーの指標の1つであるinvolucrin蛋白質の発現レベルが著明に増強したとする報告<sup>24)</sup>もある。これらの報告は不死化ヒト肝細胞においても癌細胞と同様にp21が分化機能への影響をあたえることを示唆した。しかしながら、これ

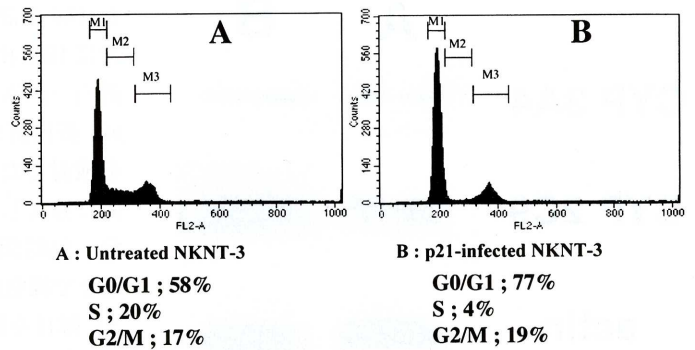


Fig. 5. Cell cycle analysis in treated AdCMVp21  
Remarkable G0/G1 arrest was occurred in NKNT-3 cells treated with AdCMVp21.

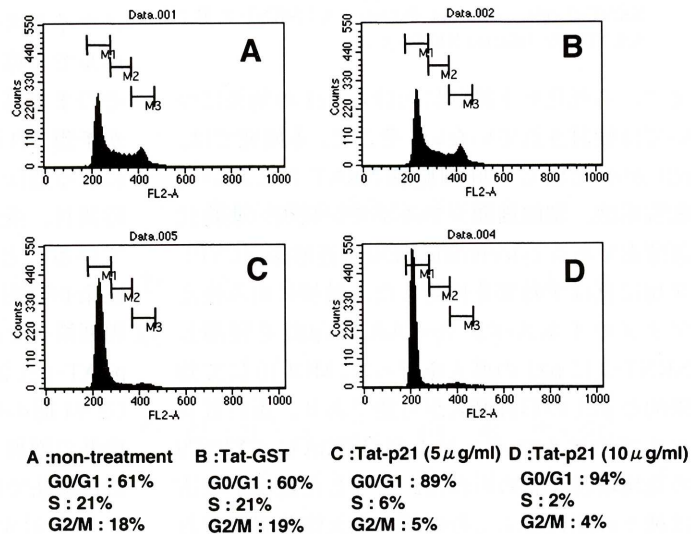
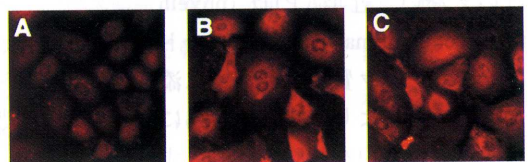
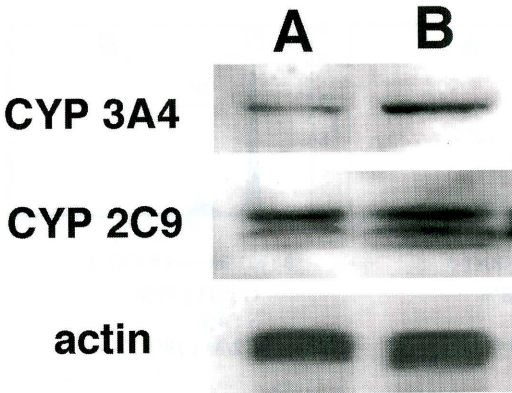


Fig. 6. Cell cycle analysis in treated pTAT-p21  
Remarkable G0/G1 arrest was occurred in NKNT-3 cells treated with pTAT-p21 of 5 and 10 μg/ml.



(Magnification × 100)

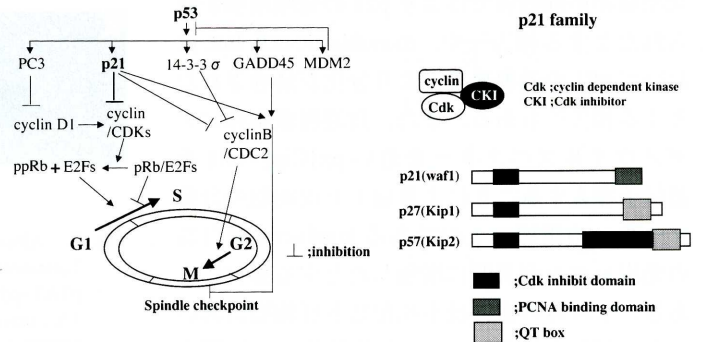
Fig. 7. Albumin expression after p21 transduction  
Treatment of NKNT-3 cells with 10MOI AdCMVp21, pTAT-p21 of 10 μg/ml, increased albumin expression (A; untransduced NKNT-3, B; AdCMVp21-infected NKNT-3, C; pTAT-p21-transduced NKNT-3).



**Fig. 8.** Western blotting analysis for CYP 3A4 and 2C9  
 Protein expression of CYP 3A4 and CYP 2C9 increased in NKNT-3 cells after adenoviral p21 transduction. Similar results were observed in pTAT-p21-transduced NKNT-3 cells (data not shown) (A; NKNT-3, B; AdCMVp21-infected NKNT-3).

まで、不死化ヒト細胞における p21 の効果については検討されていない。そこで、本研究では、p21 が不死化ヒト肝細胞株 NKNT-3 において細胞形態、細胞周期、アルブミン発現、薬物代謝酵素である cytochrome P450 関連酵素 (CYP) 発現に及ぼす効果を検討した。最初に組み換えアデノウイルスベクター AdCMVp21 を使用し NKNT-3 に p21 の導入を行った。MOI 10 にて効果的な p21 の形質導入が可能であり、蛋白質レベルでのアルブミンおよび CYP3A4, CYP2C9 の発現増強が認められた。こうした遺伝子療法は種々の癌種をふくむ疾病、先天性代謝異常および細胞療法において有望な治療法の一つであると考えられるが、高い標的効率の条件および比較的大分子蛋白質発現においてはまだ十分とはいえない。近年、PTD (protein transduction domain) 関連ペプチドとそのタンパク質は培養液中に添加することにより、比較的容易に目的とした蛋白を細胞内に導入することが可能であることが報告されている<sup>2), 3), 8), 25)</sup>。また、in vivo において TAT 蛋白と  $\beta$ -galactosidase 蛋白 (120-kD) との融合蛋白 (TAT- $\beta$ -Gal) をマウス腹腔内に投与し脳を含む全身臓器に TAT-

$\beta$ -Gal を認めたとする報告もある<sup>26)</sup>。そこで、次に HIV 由来の TAT 蛋白と p21 蛋白との融合蛋白 (pTAT-p21) を作製し、NKNT-3 細胞に p21 蛋白質を導入する蛋白療法 (protein therapy) を検討した。蛋白療法の利点として、1) 短時間に導入した蛋白の機能発現が期待できる (15 分~24 時間)、2) 添加する蛋白量を調節することで細胞内濃度を正確にコントロールできる、3) 酵母を除いたあらゆる細胞に応用可能である、4) 細胞に均一に蛋白を導入可能であることが挙げられている。事実、pTAT-p21 は濃度依存性 (2.5~10  $\mu$ g/ml) に短時間で NKNT-3 細胞内に効率的に導入することができた。アデノウイルスベクターを利用する場合、遺伝子レベルでの導入であるため蛋白発現は、蛋白質をそのまま導入する蛋白療法に比べ当然遅いことが予想される。一般的にアデノウイルスベクターによる遺伝子導入はそのピークが感染後 48~72 時間目、蛋白療法では 3~24 時間目に検討されていることから、今回の検討では AdCMVp21 感染 48 時間後、pTAT-p21 添加 24 時間後に細胞周期解析を施行した。G0/G1 期の細胞数割合は pTAT-p21 添加群が AdCMVp21 感染より増加、G2-M 期の細胞数の割合は逆に AdCMVp21 感染群で増加していた。当該データは、pTAT-p21 蛋白療法では p21 の作用がより迅速に出現することを示す。pTAT-p21 導入後の NKNT-3 は AdCMVp21 を用いた時と同様な形態変化をきたし、G0/G1 停止を呈した。また、機能的にもアルブミン、CYP3A4, CYP2C9 の発現増強が



**Fig. 9.** Schematic drawing representing cell cycle regulation by p53 and its associated molecules



認められた。しかしながら、高濃度添加においては細胞障害性が認められた。TAT融合蛋白が細胞内に搬入される機序として、TAT蛋白がマイナス電荷を帯びており細胞膜での電荷の差により細胞膜に歪みをきたし細胞内に入るものと推測されている<sup>2), 27), 28)</sup>。高濃度添加では細胞膜の安定性が極めて低下するために細胞障害性が強く認められたと推測される。こうした細胞障害は、融合蛋白のさらなる精製化にてある程度乗り越えることができることが現在判明している。TAT蛋白を用いた蛋白療法は、導入効率が良好で、短時間で目的蛋白を細胞内に導入できることから細胞療法や癌治療などにおける遺伝子治療とは異なる新しい手法として期待できるものである。

ヒト不死化肝細胞にp21を形質導入する事により、アルブミンおよびCYP3A4, CYP2C9の

発現増強が認められた。p21を過剰発現させることにより分化形質の誘導が可能であった。これらの結果は種々のcell-lineにおいてp21形質導入が分化機能誘導に有効な手段となり得る可能性を示唆している。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり、終始御親切なる御指導と御校閲を賜りました川崎医科大学内科学（消化器I）教室、山本晋一郎教授に深甚なる謝意を表します。また、本研究を遂行するに当たり、細胞を提供して頂き、直接御指導頂きました、岡山大学大学院医歯学総合研究科・消化器・腫瘍外科学の田中紀章先生、小林直哉先生、および、pTAT-p21を作製してくださいました岡山大学細胞生物学教室の阪口政清先生に厚く御礼を申しあげます。

## 文 献

- 1) Harper JW, Adami GR, Wei N, Keyomarsi K, Elledge SJ : The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinase. *Cell* 75 : 805-816, 1993
- 2) Green M, Loewenstein PM : Autonomous functional domains of chemically synthesized human immunodeficiency virus Tat trans-activator protein. *Cell* 55 : 1179-1188, 1988
- 3) Frankel AD, Pabo CO : Cellular uptake of the Tat protein from human immunodeficiency virus. *Cell* 55 : 1189-1193, 1988
- 4) Kobayashi N, Fujiwara T, Westerman KA, Inoue Y, Sakaguchi M, Noguchi M, Miyazaki M, Cai j, Tanaka N, Fox JJ, Le Boulch P : Prevention of acute liver failure in rats with reversibly immortalized human hepatocytes. *Science* 287 : 1258-1262, 2000
- 5) Nakabayashi H, Taketa K, Miyano K, Yamane T, Sato J : Growth of human hepatoma cell lines with differentiated functions in chemically defined medium. *Cancer Res* 42 : 3858-3863, 1982
- 6) Estham JA, Hall SJ, Sehgal I, Wang J, Timme TL, Yang G, Connell CL, Elledge SJ, Zhang WW, Harper JW, Thompson TC : In vivo gene therapy with p53 or p21 adenovirus for prostate cancer. *Cancer Res* 55 : 5151-5155, 1995
- 7) Kagawa S, Fujiwara T, Hizuta A, Yasuda T, Zhang WW, Roth JA, Tanaka N : p53 expression overcome p21 WAF1/CIP1-mediated G1 arrest and induces apoptosis in human cancer cells. *Oncogene* 15 : 1903-1909, 1997
- 8) Nagahara H, Vocero-Akbani AM, Snyder EL, Ho A, Latham DG, Lissy NA, Becker-Hapak M, Ezhevsky SA, Dowdy SF : Transduction of full-length TAT fusion proteins into mammalian cells : TAT-p27Kip1 induced cell migration. *Nat Med* 4 : 1449-1452, 1998
- 9) Carmichael J, DeGraff WG, Grazdar AF, Minna JD, Mitchell JB : Evaluation of a tetrazolium-based automated colorimetric assay. *Cancer Res* 47 : 936-42, 1987
- 10) Sakaguchi M, Miyazaki M, Inoue Y, Tsuji T, Kouchi H, Tanaka T, Yamada H, Namba M : Relationship between contact inhibition and intranuclear S100C of normal human fibroblasts. *J Cell Biol* 149 : 1193-1206, 2000

- 11) Wang L, Sun J, Mears D, Horvat M, Sheil AG : Comparison of porcine hepatocytes with human hepatoma (C3A) cells for use in a bioartificial liver support system. *Cell Transplant* 7 : 459 – 468, 1998
- 12) Ellis AJ, Hughes RD, Wendon JA, Dunne J, Langley PG, Kelly JH, Gislason GT, Sussman NL, Williams R : Pilot-controlled trial of the extracorporeal liver assist device in acute liver failure. *Hepatology* 24 : 1446 – 1451, 1996
- 13) Sussman NL, Kelly JH : Artificial liver : a forthcoming attraction. *Hepatology* 17 : 1163 – 1164, 1993
- 14) Patience C, Takeuchi Y, Weiss RA : Infection of human cells by an endogenous retrovirus of pigs. *Nat Med* 3 : 282 – 286, 1997
- 15) Paradis K, Langford G, Long Z, Heneline W, Sandstrom P, Switzer WM, Chapman LE, Lockey C, Oniona D, The Xen 111 study group, Otto E : Search for cross-species transmission of porcine endogenous retrovirus in patients treated with living pig tissue. *Science* 285 : 1236 – 1241, 1999
- 16) 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* 75 : 817 – 825, 1993
- 17) Noda A, Ning Y, Venable SF, Pereria SM, Smith JR : Cloning of senescent cell-derived inhibitor of DNA synthesis using an expression screen. *Exp Cell Res* 211 : 90 – 98, 1994
- 18) Polyak K, Kato JY, Solomon MJ, Sherr CJ, Massague J, Roberts JM, Koff A : p27Kip1, a cyclin-Cdk inhibitor, links transforming growth factor-beta and contact inhibition to cell cycle arrest. *Genes Dev* 8 : 9 – 22, 1994
- 19) Matsuoka S, Edwards MC, Bai C, Parker S, Zhang P, Baldini A, Harper JW, Elledge SJ : p57KIP2, a structurally distinct member of the p21CIP1 Cdk inhibitor family, is a candidate tumor suppressor gene. *Genes Dev* 9 : 650 – 662, 1995
- 20) Waga S, Hannon GJ, Beach D, Stillman B : The p21 inhibitor of cyclin-dependent kinases controls DNA replication by interaction with PCNA. *Nature (London)* 369 : 574 – 578, 1994
- 21) Nakanishi M, Robortorye RS, Adami GR, Pereira SM, Smith JR : Identification of the active region of the DNA synthesis inhibitory gene p21<sup>Sdi1/CIP1/WAF1</sup>. *EMBO J* 14 : 555 – 563, 1995
- 22) Marchetti A, Doglioni C, Barbareschi M, Buttitta F, Pellegrini S, Bertacca G, Chella A, Merlo G, Angeletti CA, Dalla PP, Bevilacqua G : p21 RNA, and protein expression in non-small cell lung carcinomas : evidence of p53-independent expression and association with tumoral differentiation. *Oncogene* 12 : 1319 – 1324, 1996
- 23) Liu M, Lee MH, Cohen M, Bommakanti M, Freedman LP : Transcriptional activation of the Cdk inhibitor p21 by vitamin D3 leads to the induced differentiation of the myelomonocytic cell line U937. *Genes Dev* 10 : 142 – 153, 1995
- 24) Kadowaki Y, Fujiwara T, Fukazawa T, Shao J, Yasuda T, Itoshima T, Kagawa S, Hudson LG, Roth JA, Tanaka N : Induction of differentiation-dependent apoptosis in human esophageal squamous cell carcinoma by adenovirus-mediated p21<sup>Sdi1</sup> gene transfer. *Clin Cancer Res* 5 : 4233 – 4241, 1999
- 25) Vives E, Brodin P, Lebleu B : A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus. *J Biol Chem* 272 : 16010 – 16017, 1997
- 26) Schwarze SR, Ho A, Vocero-Akbani A, Dowdy ST : In vivo protein transduction : Delivery of a biologically active protein into the mouse. *Science* 285 : 1569 – 1572, 1999
- 27) Elliott G, Hara P : Intercellular trafficking and protein delivery by a herpesvirus structural protein. *Cell* 88 : 223 – 233, 1997
- 28) Schwarze SR, Hruska KA, Dowdy ST : Protein transduction : unrestricted delivery into all cells. *Cell Biol* 10 : 290 – 295, 2000