

令和 2 年 7 月 7 日現在

機関番号：32703

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11859

研究課題名(和文) 変異型p53が導くエンドサイトーシス異常の解析

研究課題名(英文) Analysis of abnormal endocytosis induced by mutant p53

研究代表者

鈴木 健司 (Suzuki, Kenji)

神奈川歯科大学・大学院歯学研究科・講師

研究者番号：80350536

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：頭頸部扁平上皮癌細胞株を糖不含の培地で培養し、糖を添加することでCXCL14の遺伝子発現が上昇することを明らかにした。この結果から、CXCL14は糖を感作する遺伝子である可能性が示され、近年報告されているGPRC5bとの関わりもあると考えられた。GPRC5bの遺伝子発現についても検討したところ、CXCL14と同様に、糖の添加によって遺伝子発現の上昇を示した。さらに、GPRC5bによる代謝メカニズムを解析したところ、マロニルCoAを介することを明らかとした。GPRC5bの代謝に与える影響について報告はなく、本研究が初めての試みとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

癌は細胞の増殖を促す遺伝子とそれにブレーキをかける遺伝子に異常が生じることで発生すると考えられている。p53は代表的ながん抑制遺伝子であるが、p53の癌細胞に対する増悪化メカニズムに、細胞のエネルギーセンサーであるGPRC5bが関与するのではないかと考え研究を行った。その結果、癌細胞が低栄養の環境下に置かれるとGPRC5bが活性化し、更に癌細胞の自然死を誘発する酵素の代謝が抑制されることで、癌細胞の自然死が回避されるのではないかという新しい知見を得ることができた。

研究成果の概要(英文)：We found that the expression of the chemokine ligand 14 gene (CXCL14) increases upon culturing a head and neck squamous cell carcinoma cell line in a sugar-free medium, followed by supplementation with sugar. These findings suggest that CXCL14 might be a sugar-sensitizing gene and could be related to the recently reported GPRC5b gene, which encodes a G protein-coupled receptor family C protein. Upon further examination, it was found that the addition of sugar increased GPRC5b expression, as seen with CXCL14. Moreover, mechanistic analysis of GPRC5b revealed that its metabolism is mediated by malonyl CoA. There have been no prior reports on the effect on the metabolism of GPRC5b, making this the first elucidative attempt to study this role.

研究分野：口腔外科学

キーワード：頭頸部扁平上皮癌 CXCL14 GPRC5b

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

p53 は「遺伝子の守護神」とも呼ばれ、最も有名な癌抑制遺伝子の 1 つであることは周知の事実であるが、1979 年の遺伝子発見から約 10 年間のあいだは癌遺伝子と認識されていことはあまり知られていない。p53 が癌遺伝子と呼ばれた理由としては、DNA 腫瘍ウイルスである SV40 の largeT 抗原と結合したこと、変異型 *ras* 遺伝子と共に正常細胞に遺伝子導入すると、細胞が癌化もしくは不死化したこと、さらには多くの悪性腫瘍細胞で過剰発現していたことが挙げられる。しかしながら、1989 年以降、実験に使用されていた p53 が変異型 p53 であることが判明し、正常な p53 を癌に遺伝子導入すると増殖抑制に働くことが明らかとなったため、癌遺伝子から癌抑制遺伝子としての不動の地位を獲得することとなった。p53 は変異によって「守護神」としての機能を失い細胞は癌化すると考えられていたが、近年、変異型 p53 は癌細胞にとって都合のよい 2 つの機能を有すると考えられている。1 つはドミナントネガティブ効果により正常な p53 の機能を喪失させることである。p53 は 4 量体を形成し転写因子として働くため、変異型 p53 が多量に存在すると野生型 p53 に結合してその機能を喪失させる。もう 1 つは、メカニズムこそ明らかになってはいないが、変異することで何らかの新たな機能を獲得する可能性が考えられている。事実、p53 が変異することで癌細胞は抗癌剤に対する耐性能獲得することや EGFR を過剰発現することが報告されている。非常に興味深いことに、我々は変異型 p53 を有する頭頸部扁平上皮癌細胞に sh-RNA を用いて遺伝子発現を抑制した結果、癌抑制性ケモカイン CXCL14 の遺伝子発現が上昇することを見出した。この CXCL14 について我々は、発癌、癌組織の増殖そして転移にいたるまで、各段階に対して極力な抗癌作用を有することを報告している。また、頭頸部癌において CXCL14 は EGFR シグナルによって発現抑制される分子であり、セツキシマブの抗腫瘍効果に關与することを明らかにしている。一方、p53 の新たな機能として、田矢洋一らの報告によると、野生型 p53 は核内でクラスリン重鎖（通常は細胞膜上に存在し、エンドサイトーシスに關与）と結合し、p53 の転写活性を増強することが明らかとなっている。ここで着目すべき点は、p53 がクラスリン重鎖との結合領域を有し、さらには変異型 p53 の多くは細胞質中に多く存在することである。本研究の最大の特徴は、田矢洋一らと逆の発想で、変異体 p53 がクラスリン重鎖と細胞質内で結合し、クラスリンのエンドサイトーシスを阻害、結果として EGF と結合した EGFR は分解されずシグナルを伝え続けることで CXCL14 の発現を抑制していることである。本研究の目的は変異型 p53 の新たな機能発見のみではなく、CXCL14 の発現抑制や EGFR の過剰発現への關与など、変異型 p53 が癌遺伝子としての機能を有する危険性を証明することである。

2. 研究の目的

p53 が変異することによって、機能の喪失、ドミナントネガティブ効果、新たな機能の獲得、の 3 つが挙げられる。本研究で我々は、CXCL14 と p53 の関係を明らかにするとともに、糖代謝の観点から、抗腫瘍メカニズムの解明を行ってきた。CXCL14 および p53 は、近年、糖尿病に關与する遺伝子であることが明らかとなっている。さらに、どちらの遺伝子もインスリン抵抗性に關与する分子であることが示されており、糖尿病の原因遺伝子として着目されている。癌細胞は増殖するために、糖を必要とすることは知られている。そこで、前述した 2 つの遺伝子による抗腫瘍メカニズムに癌細胞の糖代謝異常が關与するのではないかと考えた。計画書記載の時は、p53 の変異による細胞の増悪化が、EGFR の発現上昇に關与するためではないかと考えていた。その理由として、EGFR シグナルによって発現低下を示す CXCL14 が、p53 の sh-RNA の遺伝子導入により発現上昇を示したことが背景となっていた。また、遺伝子導入された癌細胞は、変異した p53 が過剰発現している細胞であったため、変異した p53 が EGFR シグナルに影響を及ぼすと考えた。しかしながら、変異した p53 は CXCL14 の遺伝子発現は上昇させるものの、変異した p53 の癌細胞増悪化メカニズムに EGFR が關与する所見を得ることはできなかった。結果として、CXCL14 および p53 の共通点である糖代謝に着目して基礎的研究に時間を費やした。そこで着目した遺伝子が、遺伝子改変マウスで CXCL14 と同じフェノタイプを示す新規エネルギーセンサー GPRC5b であった。GPRC5b については、糖尿病の研究で着目されているものの、癌について研究は行われていなかった。我々は、p53、糖代謝、GPRC5b についての関連性を含め、頭頸部癌に対する GPRC5b の機能解明を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

p53 の sh-RNA を使用し、EGFR や CXCL14 の発現について RT-PCR 法を用いて検討を行った。この遺伝子発現については、6 種類の細胞を使用し検討を行った。また、これらの細胞を用いて、GPRC5b の遺伝子発現レベルと、生育のための糖依存性について検討を行った。方法は、セルカウンティングキット 8 を使用し、培地中の糖濃度を变化させた際の、細胞生存活性を検討した。また、糖不含培地を使用し、GPRC5b を強制発現した細胞およびその MOCK 細胞で、細胞生存活性を検討した。なぜ、GPRC5b 強制細胞が糖不含培地で生存するのかそのメカニズムを解明するため、メタボローム解析 (受託サービス) で網羅的に検討した。

4. 研究成果

CXCL14 の発現は変化するものの EGFR の発現に変化は認められなかった。我々は、p53 の癌細胞に対する増悪化メカニズムに、細胞のエネルギーセンサーである GPRC5b が関与するのではないかと考えて研究を行った。GPRC5b は、脂質ラフトに存在する受容体で、糖尿病の原因遺伝子とも考えられている。正常細胞において GPRC5b は、細胞のインスリン抵抗性に関与することなど糖代謝に関与することが解明されていたが、GPRC5b が細胞に及ぼす代謝メカニズムについては明らかとなっていない。これまでに申請者らは、GPRC5b を癌細胞に強制発現させると、糖不含培地でその癌細胞を培養しても、細胞死を引き起こしにくい結果を得ていた。そこで、GPRC5b の代謝に関与するメカニズムを、GPRC5b 強制発現細胞のその MOCK 細胞を用意し、通常の培地および糖不含培地で培養後、その細胞をサンプルにメタボローム解析（委託サービスを利用）にて網羅的に解析を行った。結果として、通常培地では、GPRC5b 強制発現細胞と MOCK 細胞での代謝の変化は認められなかったものの、糖不含培地においては、GPRC5b 強制発現細胞において、脂肪酸やポリケチドの合成に重要な役割を果たすマロニル補酵素 A の代謝が抑制されている結果を得た。また、このマロニル補酵素 A は細胞内で蓄積すると、アポトーシスを誘導することが知られている。本研究結果より、GPRC5b の癌細胞に対する機能として、低栄養環境下に癌細胞がおかれると、GPRC5b が活性化し、マロニル CoA の代謝を抑制することによって、低栄養による癌細胞のアポトーシスを回避することが示唆された。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6 . 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	小澤 重幸 (Ozawa Shigeyuki) (40434394)	神奈川歯科大学・大学院歯学研究科・講師 (32703)	
研究分担者	小林 優 (Kobayashi Masaru) (00162024)	神奈川歯科大学・大学院歯学研究科・教授 (32703)	