

平成 21 年 6 月 8 日現在

研究種目：若手研究（A）

研究期間：2006 - 2008

課題番号：18687012

研究課題名（和文） 細胞老化に關与する p53 下流遺伝子の単離と機能解析

研究課題名（英文） Identification and functional analysis of novel p53 target genes related to cellular senescence.

研究代表者

氏名（アルファベット）松田 浩一（MATSUDA KOICHI）

所属機関・所属部局名・職名 東京大学・医科学研究所・助教

研究者番号 90401257

研究成果の概要：老化関連研究は社会の高齢化に伴い注目度も高まり、老化関連因子が次々と明らかになる等分子レベルでもそのメカニズムが解明されつつある。癌化との関連についても活発に研究が進められ、細胞老化という現象が前癌組織でも観察され、老化が癌化へのバリアーとして機能している可能性が示唆された。さらにマウスでの解析などにより代表的な癌抑制遺伝子である p53 が個体老化及び細胞老化へ關与することが示され、細胞老化誘導が p53 の癌抑制機能の一端を担っていると認識されるようになった。

本研究の目的は 1)p53 遺伝子導入による発現誘導 2)細胞の継代に伴う遺伝子発現変化 3)癌組織及び前癌組織における遺伝子発現プロファイル 以上 3 つのマイクロアレーデータを用いて網羅的な遺伝子スクリーニングを行うことにより p53 依存性細胞老化関連遺伝子を単離することである。その結果 p53 及び細胞老化の過程で発現誘導されかつ前立腺癌組織で顕著に発現が減少している遺伝子として p53SA1 を同定した。p53SA1 はプロモーター上の p53 結合配列を介して p53 によって発現誘導され p53 の直接の下流遺伝子である事が明らかとなった。さらに p53SA1 を過剰発現させた際に、複数の細胞株において増殖抑制効果を示すとともに、老化のマーカーである SA - gal 染色陽性細胞が観察された。また p53SA1 の発現抑制によっても酸化ストレスによって誘導される細胞老化が抑制されたことより、p53SA1 は細胞老化の重要なメディエーターである事が明らかとなった。

p53SA1 遺伝子上のアミノ酸置換を伴う多型によって、細胞内の局在が膜型と細胞質型とに変化することが確認された。さらに膜型の p53SA1 のキャリアーでは前立腺癌の発症が増加する傾向が認められた。また前立腺癌組織において発現を検討した所、顕著な発現抑制が確認され、この発現低下には p53 の変異に加え epigenetic な発現抑制機序が關与していることが示された。以上の結果より p53SA1 は癌組織において老化を誘導することによって癌抑制遺伝子として働く可能性が示唆された。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	6,600,000	1,980,000	8,580,000
2007 年度	7,000,000	2,100,000	9,100,000
2008 年度	6,200,000	1,860,000	8,060,000
年度			
年度			
総計	19,800,000	5,940,000	25,740,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学  
 キーワード：p53 老化

### 1. 研究開始当初の背景

老化関連研究は社会の高齢化に伴い注目度も高まり、老化関連因子が次々と明らかになる等分子レベルでもそのメカニズムが解明されつつある。癌化との関連についても活発に研究が進められ、細胞老化という現象が前癌組織でも観察され、老化が癌化へのバリアーとして機能している可能性が示唆された。さらにマウスでの解析などにより代表的な癌抑制遺伝子である p53 が個体老化及び細胞老化へ関与することが示され、細胞老化誘導が p53 の癌抑制機能の一端を担っていると認識されるようになった。

### 2. 研究の目的

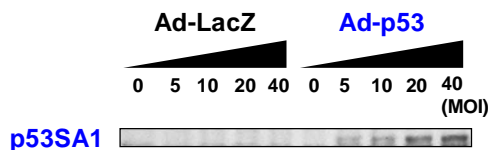
本研究の目的は網羅的な遺伝子スクリーニングを行うことにより p53 依存性細胞老化関連遺伝子を単離し、p53 の癌抑制機能における細胞老化を誘導能の役割を解明する事である。

### 3. 研究の方法

1) p53 遺伝子導入による発現誘導 2) 細胞の継代に伴う遺伝子発現変化 3) 癌組織及び前癌組織における遺伝子発現プロファイル以上 3 つのマイクロアレーデータを用いて p53 依存的な細胞老化誘導に関連する遺伝子を同定する。またこの遺伝子を過剰発現もしくは発現抑制した際に細胞老化や細胞増殖に与える影響を検討する。さらに癌化における意義を解明する目的で癌組織での発現を検討する。

### 4. 研究成果

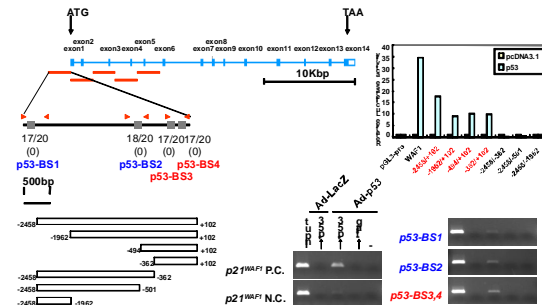
(1) cDNA マイクロアレイによるスクリーニングにより、p53 で発現誘導されかつ細胞老化の際に顕著に発現誘導される遺伝子として p53SA1 遺伝子を同定した。上段 U373MG 細胞に p53 及びコントロールとして LacZ 遺伝子を導入し、p53SA1 のタンパク質発現量を検討。下段、NHDF 細胞を継代数に応じて回収。p53SA1 遺伝子の発現量を RT-PCR で定量化。



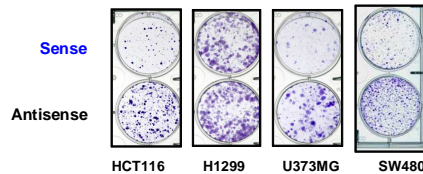
P3 P7 P13 P19 P26

p53SA1

(2) p53SA1 遺伝子領域で p53 結合配列を探索し、プロモーター領域に結合候補配列を同定。(上左) p53SA1 の遺伝子構造 (下左) プロモーター領域の fragment を含んだレポーターベクターを作成 (上右) U373MG 細胞を用いたレポーターアッセイの結果。(下右) CHIP アッセイ。以上の結果 p53BS3,4 に結合し転写を活性化する事が明らかとなった。

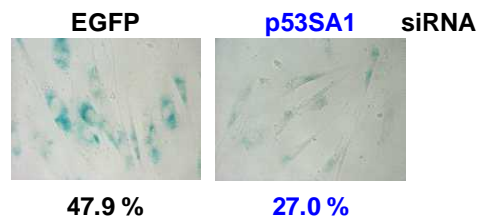


(3) p53SA1 遺伝子を発現誘導した際に、顕著に細胞増殖が抑制され、また細胞老化も誘導された。複数の細胞株を用いたコロニーフォーメーションアッセイの結果、いずれの細胞株でも顕著に増殖が抑制された。



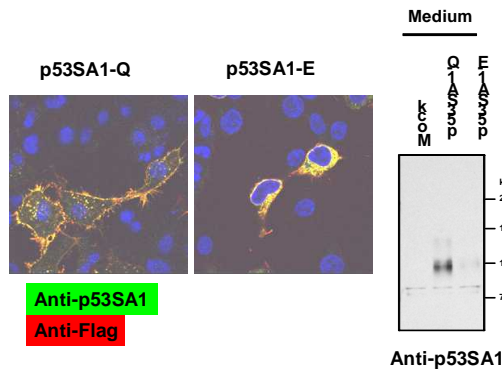
(4) さらに p53SA1 の発現抑制によって、酸化ストレスによる細胞老化が抑制されたことより、p53SA1 は細胞老化の重要なメディエーターである事が明らかとなった。NHDF 細胞に p53SA1 に対する siRNA を導入後、H2O2 刺激を加え細胞老化を誘導した際の SA-β-gal 染色の結果、染色陽性細胞が顕著に減少した。

#### Senescence-associated -Gal staining

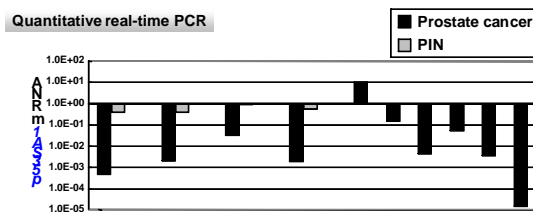


(5) p53SA1 遺伝子上のアミノ酸置換を伴う多

型によって、細胞内の局在が膜型と細胞質型とに変化することが確認された。Qタイプでは膜に局在するのに対し、Eタイプでは細胞質に局在した。またQタイプでは膜上で細胞外領域が切断されることが明らかとなった。

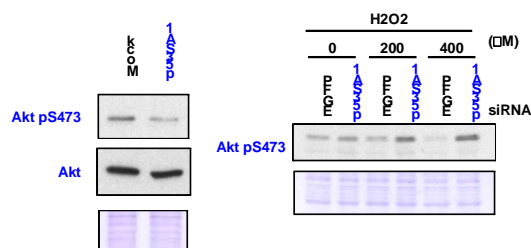


(6)また前立腺癌組織において発現を検討した所、顕著な発現抑制が確認され、この発現低下には p53 の変異に加え epigenetic な発現抑制機序が関与していることが示された。以上の結果より p53SA1 は癌組織において老化を誘導することによって癌抑制遺伝子として働く可能性が示唆され、またその遺伝子多型が癌の易罹患性に関与する可能性が示唆された ( $P=8.2 \times 10^{-4}$ )。前立腺癌 10 症例中、9 症例でコントロールと比較し 20%以下に発現が減少していた。さらに前癌病変では 4 症例中全例で 50%以下の減少は認めなかった。



(7)また p53SA1 の下流シグナルを検討した所、Akt1 の活性を制御する事によって細胞老化を誘導する可能性が示唆された。p53SA1 の過剰発現によって Akt のリン酸化が顕著に減少し、また siRNA によって発現抑制する事により、上昇した。

#### Inhibition of Akt signal by p53SA1



以上の解析結果より、p53SA1 は p53 依存的な細胞老化誘導の重要なメディエーターである事が明らかとなった。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

(雑誌論文)(計 15 件:原著 14 件、総説 1 件)

1. Tanikawa C, Furukawa Y, Yoshida N, Arakawa H, Nakamura Y, Matsuda K. XEDAR as a putative colorectal tumor suppressor that mediates p53-regulated anoikis pathway. *Oncogene*. 2009; In press.
2. Morioka K, Tanikawa C, Ochi K, Daigo Y, Katagiri T, Kawano H, Matsuda K et al. Orphan receptor tyrosine kinase ROR2 as a potential therapeutic target for osteosarcoma. *Cancer Sci*. 2009 Apr 15.
3. Kamatani Y, Wattanapokayakit S, Ochi H, Kawaguchi T, Takahashi A, Hosono N, Matsuda K et al. A genome-wide association study identifies variants in the HLA-DP locus associated with chronic hepatitis B in Asians. *Nat Genet*. 2009 May;41(5):591-5.
4. Han S, Kim-Howard X, Deshmukh H, Kamatani Y, Viswanathan P, Guthridge JM, Matsuda K et al. Evaluation of imputation-based association in and around the integrin-alpha-M (ITGAM) gene and replication of robust association between a non-synonymous functional variant within ITGAM and systemic lupus erythematosus (SLE). *Hum Mol Genet*. 2009 Mar 15;18(6):1171-80.
5. Tenesa A, Farrington SM, Prendergast JG, Porteous ME, Walker M, Haq N, Matsuda K et al. Genome-wide association scan identifies a colorectal cancer susceptibility locus on 11q23 and replicates risk loci at 8q24 and 18q21. *Nat Genet*. 2008 May;40(5):631-7.
6. Suzuki A, Yamada R, Kochi Y, Sawada T, Okada Y, Matsuda K, et al. Functional SNPs in CD244 increase the risk of rheumatoid arthritis in a Japanese population. *Nat Genet*. 2008 Oct;40(10):1224-9.
7. Shimo A, Tanikawa C, Nishidate T, Lin ML, Matsuda K, Park JH, et al. Involvement of kinesin family member 2C/mitotic centromere-associated kinesin overexpression in mammary carcinogenesis. *Cancer Sci*. 2008 Jan;99(1):62-70.
8. Okuma C, Kaketa T, Hikita A, Matsuda K, Nakamura M, Nagase Y, et al. Potential involvement of p53 in

ischemia/reperfusion-induced osteonecrosis. *J Bone Miner Metab.* 2008;26(6):576-85.

9. Oishi T, Iida A, Otsubo S, Kamatani Y, Usami M, Takei T, Matsuda K et al. A functional SNP in the NKX2.5-binding site of ITPR3 promoter is associated with susceptibility to systemic lupus erythematosus in Japanese population. *J Hum Genet.* 2008;53(2):151-62.

10. Kidokoro T, Tanikawa C, Furukawa Y, Katagiri T, Nakamura Y, Matsuda K. CDC20, a potential cancer therapeutic target, is negatively regulated by p53. *Oncogene.* 2008 Mar 6;27(11):1562-71.

11. Kamatani Y, Matsuda K, Ohishi T, Ohtsubo S, Yamazaki K, Iida A, et al. Identification of a significant association of a single nucleotide polymorphism in TNXB with systemic lupus erythematosus in a Japanese population. *J Hum Genet.* 2008;53(1):64-73.

12. Kubo M, Hata J, Ninomiya T, Matsuda K, Yonemoto K, Nakano T, et al. A nonsynonymous SNP in PRKCH (protein kinase C eta) increases the risk of cerebral infarction. *Nat Genet.* 2007 Feb;39(2):212-7.

13. Hosokawa M, Takehara A, Matsuda K, Eguchi H, Ohigashi H, Ishikawa O, et al. Oncogenic role of KIAA0101 interacting with proliferating cell nuclear antigen in pancreatic cancer. *Cancer Res.* 2007 Mar 15;67(6):2568-76.

14. Hata J, Matsuda K, Ninomiya T, Yonemoto K, Matsushita T, Ohnishi Y, et al. Functional SNP in an Sp1-binding site of AGTRL1 gene is associated with susceptibility to brain infarction. *Hum Mol Genet.* 2007 Mar 15;16(6):630-9.

15 大腸癌関連遺伝子の全ゲノム関連解析 2009 最新医学 64 巻 4 号 p880-886.

〔学会発表〕(計 7 件)

(2006)

・アメリカ癌学会 (4/2 Washington, DC) Screening of p53 regulated genes by cDNA microarray and analysis of its expressions in cancer tissue.

・日本癌学会 (9/28 横浜) 細胞老化にともなう p53 関連遺伝子の発現解析

(2007)

・アメリカ癌学会 (4/15 Los Angeles) Identification of novel p53-target genes and their physiological roles in tumor

suppression and cellular senescence.

・日本癌学会 (10/3 横浜) Genome wide screening of novel p53 target genes and their involvement in tumorigenesis and cellular senescence.

・日本骨代謝学会 (7/19 大阪) メカニカルストレスに反応して骨量維持に働く新規遺伝子 Znt5 (Zinc transporter 5) の単離と機能解析

(2008)

・日本癌学会 (10/28 名古屋) Genome-wide association study identified colorectal cancer susceptible loci on 11q23, 8q24, and 18q21 in both Caucasian and Japanese population

・日本人類遺伝学会 (9/28 横浜) Genome-wide association study identified colorectal cancer susceptible loci on 11q23, 8q24, and 18q21 in both Caucasian and Japanese population

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

研究成果の新聞発表 3 件

2008.3.31 毎日新聞 「大腸癌疾患感受性遺伝子を同定」

2009.5.1 朝日新聞 「慢性 B 型肝炎の個人差関連の遺伝子を特定」

2009.5.14 読売新聞 「お酒に弱いのに飲酒・喫煙 食道がんリスク 190 倍」

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

松田浩一 (MATSUDA KOICHI)

東京大学・医科学研究所・助教

90401257

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし