

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：18001

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2022

課題番号：18K07039

研究課題名(和文) CBP/p300依存性EGFRシグナリングを利用した皮膚恒常性維持制御法の開発

研究課題名(英文) Exploring CBP/p300-dependent EGFR signaling to develop a method to control skin homeostasis

研究代表者

市瀬 多恵子 (Ichise, Taeko)

琉球大学・病院・ポスドク研究員

研究者番号：00396863

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究において、表皮ケラチノサイトでは、CBP/p300にはMig6の発現量を維持することでEGFR-Ras-Erkシグナリングの活性化を負に制御する作用があること、そしてその制御の破綻が表皮ケラチノサイトのがん化を促進していることを明らかにした。以上の結果を含む成果をJournal of Pathology誌で発表した。さらに、CBP/p300によるRas-Erkシグナリングの抑制が、CBP/p300の酵素活性に依存している可能性に着目し、CBP/p300のインヒビターを用いることで、EGFRシグナリングを遮断することなく強度を人為的かつ適切に制御する方法について検討し、新たな知見を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

EGFRは上皮性腫瘍の癌化に深く寄与しており、EGFRを標的としたキナーゼ活性の抑制による治療法が開発されている。しかし、EGFRは上皮細胞の増殖を担うのみならず、上皮組織の恒常性維持やバリア機能にも寄与しており、EGFRのキナーゼ活性の抑制は皮膚、肺、腸管での炎症や感染症を引き起こす。そのため、副作用を伴わないEGFRシグナリングの抑制方法の開発、EGFRシグナリングを遮断することなく、適度に抑制する方法の開発が望まれている。本研究は、EGFRキナーゼ活性抑制による副作用の問題を回避する、新たなEGFRシグナリングの抑制方法を提案するものである。

研究成果の概要(英文)：In this study, we found that CBP/p300 negatively regulates the activation of EGFR-Ras-Erk signaling in epidermal keratinocytes by maintaining the expression level of Mig6, and that the disruption of this regulation promotes epidermal keratinocyte tumorigenesis. We published our findings in the Journal of Pathology. In addition, we focused on the possibility that the suppression of Ras-Erk signaling by CBP/p300 depends on the enzymatic activity of CBP/p300 and investigated how to appropriately regulate Ras-Erk signaling without blocking the EGFR kinase by using an inhibitor of CBP/p300.

研究分野：実験病理学

キーワード：CBP/p300 EGFR 皮膚 Ras

1. 研究開始当初の背景

CBP/p300は、ヒストンや転写因子などのリシン残基をアセチル化することでクロマチン構造の弛緩や転写活性化に寄与する、エピジェネティック制御因子である。転写因子のコファクターとして癌化を促進する転写活性化に寄与する側面がある一方、一部の腫瘍、たとえば皮膚扁平上皮癌では CREBBP/EP300の機能喪失変異が高頻度(20-30%)に見つかっており、表皮ケラチノサイトにおいて CREBBP/EP300が癌抑制遺伝子として機能している可能性が示唆されている。しかし、CBP/p300変異が癌化のドライバー変異であることは実証されておらず、表皮の発生・分化・恒常性維持におけるCBP/p300の役割も不明である。

一方、EGFRは上皮性腫瘍の癌化に深く寄与しており、EGFRを標的としたキナーゼ活性の抑制による治療法が開発されている。しかし、EGFRは上皮細胞の増殖を担うのみならず、上皮組織の恒常性維持やバリア機能にも寄与しており、EGFRのキナーゼ活性の抑制は皮膚、肺、腸管での炎症や感染症を引き起こす。そのため、副作用を伴わないEGFRシグナリングの抑制方法の開発、EGFRシグナリングを遮断することなく、適度に抑制する方法の開発が望まれている。

研究代表者は、これまでに遺伝子改変マウスを用いて、高次脳機能、発癌、形態形成におけるRasの役割を中心に研究を進めてきた(Ise, 2000; Manabe, 2000; Nakamura, 2008; Ichise, 2010)。また、内皮細胞におけるRasの役割に焦点を置き、Rasシグナルがリンパ管内皮細胞の挙動を決める重要なシグナルであることを、遺伝子改変マウスおよびマウス不死化リンパ管内皮細胞の解析によって明らかにした(Ichise, 2010; Ichise, 2012; Ichise, 2014)。そして、Ras下流のMAPキナーゼシグナリングが、リンパ管内皮細胞において内皮細胞特異的遺伝子の発現制御、および内皮・間葉移行の負の制御を担うことで、リンパ管内皮細胞の性質の維持に寄与していることを明らかにした(Ichise, 2012; Ichise, 2014)。これらの研究を進める過程でRas-Erkシグナルの修飾因子としてのCBP/p300に着目するようになった。

表皮ケラチノサイトにおいてRas-Erkシグナリングが亢進したCGH^{T35S};K14Creマウスは、生育可能だが表皮ケラチノサイトの分化抑制傾向と細胞増殖亢進を特徴とした異常を呈する。一方、表皮ケラチノサイト特異的*Ep300*; *Crebbp*コンディショナルKOマウスの場合、*Ep300*あるいは*Crebbp*の機能的アリルを1コピー有していれば生育可能であり、CBP/p300発現の減少だけでは表皮の外見上の異常は引き起こされない。しかし、CBP/p300の発現量の減少はCGH^{T35S};K14Creに認められる異常をより顕著にすることを見出した。基底細胞層と有棘細胞層のさらなる肥厚が起こるだけでなく、12週齢までに皮膚の若齢個体における乳頭腫・扁平上皮癌の形成が高頻度に認められた。表皮ケラチノサイトにおいては、EGFによりEGFRが活性化すると、下流のRas-Erkシグナリングが活性化することが知られている。このことから、表皮ケラチノサイトにおいて、CBP/p300により、EGF-EGFR-Ras-Erkシグナリングの抑制機構が存在するのではないかと考え、本研究を開始した。

2. 研究の目的

研究代表者らの先行研究で、CBP/p300の発現減少はRas-Erkシグナリングに依存した表皮ケラチノサイトの増殖を促進することを見出していたが、本研究ではその分子メカニズムを明らかにすること、特にEGF-EGFR-Ras-Erkシグナリングの抑制機構に着目して分子メカニズムを明らかにすることを第一の目的とした。さらに、CBP/p300の発現量減少によるRas-Erkシグナルの亢進が、CBP/p300の酵素活性に依存している可能性に着目し、CBP/p300の酵素活性をインヒビターにより変化させることで、EGFRシグナリングを遮断することなく、EGFRシグナリングの強度を人為的かつ適切に制御する方法について検討することを第二の目的とした。

3. 研究の方法

生後 0 日から 2 日目のマウス皮膚より定法によりケラチノサイトの分離培養を行った。マウス初代培養ケラチノサイトに、コントロール siRNA、CBP/p300 siRNA をトランスフェクションし、リアルタイム PCR により CBP/p300 の発現量低下を確認した。この細胞を用い、CBP/p300 の発現量減少により、EGFR のリガンドや EGFR シグナリングのネガティブレギュレーターの発現量が変動しているかをリアルタイム PCR により解析した。また、コントロール siRNA、CBP/p300 siRNA をトランスフェクションしたケラチノサイトを EGF で刺激し、EGFR のリン酸化、EGFR の下流で活性化される、Raf1、Mek1/2、Erk1/2 のリン酸化、Erk 応答遺伝子である Dusp6 の発現量をウエスタンブロット法により解析した。また、ヒトでも同様の分子メカニズムが存在することを確認するために、初代ヒトケラチノサイトに、ヒトテロメラーゼ逆転写酵素(hTERT ; Human Telomerase Reverse Transcriptase)を発現させ、ヒト不死化ケラチノサイトを作製し解析に用いた。

4. 研究成果

CBP/p300 siRNAを導入したマウス表皮ケラチノサイトでは、コントロールsiRNAを導入した場合と比較して、Ras-Raf1-Mek1/2-Erk1/2下流経路の活性化亢進、EGFRのリン酸化レベルの亢進が見られた。そこで、EGFRのリン酸化レベルの亢進が、EGFRリガンドの発現量上昇により引き起こされている可能性や、EGFRの脱リン酸化酵素などのEGFRシグナリングのネガティブレギュレーターの発現量減少により引き起こされている可能性などについて検討した。すると、EGFRリガンド刺激に対するEGFR下流でのネガティブフィードバック制御に関与することが知られているMig6の発現量が、CBP/p300の発現量低下により有意に減少していることが明らかになった。これらの結果から、表皮ケラチノサイトにおいて、CBP/p300にはMig6の発現量を維持することでEGFR-Ras-Erkシグナリングの活性化を負に制御する作用があること、そしてその制御の破綻が表皮ケラチノサイトのがん化を促進していることが明らかとなった。以上の結果を、申請時点で明らかになっていた研究成果と合わせて論文としてまとめ、Journal of Pathology 誌で発表した(図1)。

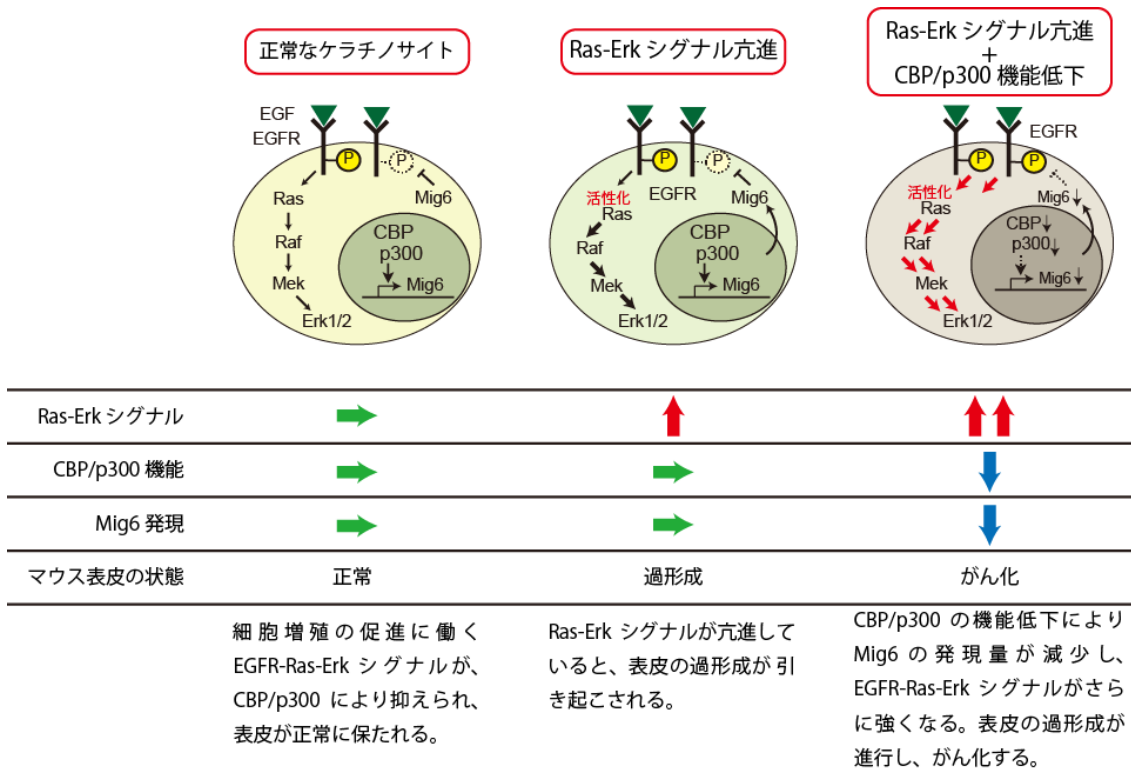


図1 表皮ケラチノサイトのがん化におけるCBP/p300の役割

(琉球大学ウェブサイトより引用<https://www.u-ryukyu.ac.jp/news/5192/>)

マウスで得た知見がヒトにも適用できることを検証するために、ヒトケラチノサイトを用いた実験系の確立に努めた。独自に作出したヒト不死化ケラチノサイトは、サイトケラチン遺伝子 (*KRT5*, *KRT14*)、*TP63* 遺伝子、カドヘリン遺伝子群 (*CDH3*, *CDH1*)などを高発現しており、正常細胞の性質をよく保持していた。また、カルシウム添加による分化誘導を行ったところ、基底細胞層で発現する、*KRT5*, *KRT14* 遺伝子の発現減少、および、有棘細胞層や顆粒細胞層で発現する、*KRT1*, *KRT10*, *Involucrin*, *Loricrin* 遺伝子の発現上昇が見られ、分化刺激に対しても正常細胞同様の遺伝子発現の変動が見られた。このヒト不死化ケラチノサイトを用いて、CRISPR/Cas9システムを用いたゲノム編集による *CREBBP*, *EP300* 遺伝子の破壊を行い、それぞれの発現が消失したヒトケラチノサイトの作製に成功した。また、特殊素材を足場として用いた、真皮・表皮からなる全層皮膚の3次元培養系の確立を進めた。

CBP/p300の酵素活性を抑制するCBP/p300インヒビター、あるいはCBP/p300依存性のアセチル化修飾を亢進する効果を有するヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)インヒビターの存在下で、独自に作出したヒト不死化ケラチノサイトを培養し、各種インヒビターの特異性、至適濃度、反応時間の検討を行った。ウエスタンブロットによりヒストンH3のリジン残基のアセチル化を検出し、特異性の指標とした。対照として、CRISPR/Cas9システムを用いたゲノム編集により作出した、*CREBBP*, *EP300* 遺伝子破壊ヒトケラチノサイトを用いることで、インヒビターの特異性を検討した。最も特異性が高く効果的であったインヒビターでは、ヒストンH3の9番目のリジン残基のアセチル化状態には影響が出ないが、CBP/p300のターゲットとして知られる18番目および27番目のリジン残基のアセチル化が消失することを確認した。このインヒビター存在下で培養したケラチノサイトにおいて、各種ケラチンマーカージン遺伝子の発現量の変化、MIG6発現量の変化、細胞増殖、カルシウムにより誘導される分化について検討して、新たな知見を得た。また、ケラチノサイトにおいて、ヒストンH3のそれぞれのリジン残基がもつ役割を明らかにするために、9番目のリジン残基をアセチル化することで知られる、GCN5 (*KAT2A*)、PCAF(*KAT2B*)遺伝子のノックダウンを行い、各種ケラチンマーカージン遺伝子の発現量の変化等を検討して、新たな知見を得た。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ichise T, Yoshida N, Ichise H.	4. 巻 249(1)
2. 論文標題 CBP/p300 antagonises EGFR-Ras-Erk signalling and suppresses increased Ras-Erk signalling-induced tumour formation in mice.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Pathology	6. 最初と最後の頁 39-51
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/path.5279	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 市瀬 広武、市瀬多恵子
2. 発表標題 トランスジェニックアレルを利用したマウス内皮細胞の選択的培養法
3. 学会等名 日本実験動物学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 市瀬 広武、市瀬 多恵子
2. 発表標題 CBP/p300はマウスにおいて表皮ケラチノサイトのがん化を抑制する
3. 学会等名 日本実験動物学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ichise H.
2. 発表標題 CBP/p300 suppresses increased Ras-Erk signaling-induced tumor formation in mice.
3. 学会等名 The 78th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association.
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 市瀬 広武
2. 発表標題 マウスを用いた内皮・上皮の形態形成機構の解析
3. 学会等名 九州実験動物研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 市瀬 広武、市瀬 多恵子、吉田 進昭
2. 発表標題 マウスでの標的遺伝子導入に適したpermissive lociの探索
3. 学会等名 第65回日本実験動物学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 市瀬 広武
2. 発表標題 CBP/p300はマウス表皮ケラチノサイトの癌化を抑制する
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

表皮ケラチノサイトの過剰増殖やがん化を抑制するメカニズムの発見
<https://www.u-ryukyu.ac.jp/news/5192/>

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	市瀬 広武 (Ichise Hirotake) (10313090)	琉球大学・医学部・准教授 (18001)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関