

機関番号：12602

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20590380

研究課題名（和文） p63 が制御する細胞接着因子の発現プロファイルと上皮 - 間葉転換
研究課題名（英文） p63-controlled gene expression profiles implicated in epithelial-mesenchymal transition

研究代表者

倉田 俊一（KURATA SHUNICHI）

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・准教授

研究者番号：60140901

研究成果の概要（和文）：扁平上皮癌細胞の発症と進行における p63 の機能を明らかにするため、RNA 干渉法で p63 をノックダウンし、発現プロファイルを解析するとともに、p63 を誘導するシグナル伝達系と上皮 - 間葉転換（EMT）の関連を検討した。その結果、p63 ノックダウンにより上皮細胞特異的に発現する種々の細胞接着因子および分化マーカーの発現が低下する一方、浸潤癌と関係する遺伝子が発現誘導され、EMT 様の変化がおこることが分かった。また、IKK が作用するケラチノサイト特異的な TGF- β 経路により p63 が発現誘導を受けることを明らかにし、p63 と IKK の相互活性化とそれぞれの経路での遺伝子発現制御によって浸潤型への進行が阻止されることが強く示唆された。

研究成果の概要（英文）：To understand the functions of p63 in squamous cell carcinomas (SCC) and the malignant progression, we performed gene expression profiling after p63 silencing in cell lines. Cellular signaling mechanisms that induce p63 and block the malignant conversion were also studied. p63-knockdown cells showed loss of varied gene expression for epithelial cell adhesion and keratinocyte differentiation. Increases in gene expression associated with malignant cancers were also detected, suggesting epithelial-mesenchymal transition (EMT)-like events. Furthermore, we determined that $\Delta Np63$ is induced by the keratinocyte-specific TGF- β signaling with IKK α . The mutual induction between p63 and IKK α and the transcriptional control in each system may altogether block the gain of invasive phenotype in early phase SCC.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2009 年度	700,000	210,000	910,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：細胞、扁平上皮癌、p63

1. 研究開始当初の背景

p63 は p53 がん抑制遺伝子ファミリーの 1 つとして発見され、当初は p63 のがん抑制作用に注目された。しかし、われわれの

研究でも明らかになったように、p63 は p53 の標的であるアポトーシス誘導や細胞周期停止に関わる遺伝子の発現を誘導するのではなく、細胞の分化や増殖と関係する

種々の接着因子の遺伝子を活性化するという新しい概念が広く認められつつあった。一方、扁平上皮癌の非浸潤型（高分化型）ではp63が増強されるが、浸潤癌ではp63が消失することが臨床研究から知られていた。癌の制御におけるp63の果たす役割とその機構についての分子細胞生物学的な研究を計画した。

2. 研究の目的

頭頸部扁平上皮癌細胞でp63をノックダウンすると、上皮-間葉転換に関わる遺伝子発現の変化が起こり、細胞が浸潤能を獲得することを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) siRNAによるp63ノックダウン
ステージの異なる扁平上皮癌細胞株で様々な試薬や条件を検討し、siRNAのトランスフェクションによりp63のノックダウンを実施した

(2) 遺伝子発現プロファイルの解析
Agilent社 Whole Human Genome Array を用いた解析をOmics社に依頼した。

(3) 細胞形質の解析

増殖(ATP測定法、軟寒天コロニー法)、浸潤能(マトリゲル浸潤アッセイ)、細胞周期の解析(フローサイトメトリー)を行った。

(5) p63遺伝子プロモーター領域の解析
Luciferase reporter assayを実施し、変異導入、TGF-刺激を行った。

(6) 扁平上皮癌組織アレイでの検討

市販の癌組織アレイを用いてp63とIKKの発現に関して蛍光免疫染色を行った。

4. 研究成果

(1) p63ノックダウンによる遺伝子発現プロファイルの変化。p63ノックダウンによる発現低下を、上昇を、で、大まかに表す。FaDu細胞での結果を示すが、A431その他の細胞でも類似の結果を得た。

《要約》 様々な上皮細胞接着因子の発現が低下し、非上皮性のものが上昇した。上皮特異的中間径細胞骨格タンパク質cytokeratins、上皮細胞が産生するマトリクスタンパク質、ケラチノサイトの分化後期の遺伝子発現が低下した。さらに、浸潤癌で見られるメタロプロテイナーゼの上昇があり、上皮成長因子の受容体発現が低下し、悪性化と関連する膜タンパク質の発現が上昇した。TGF- β /activin-inhibinが6倍以上上昇するとともに、組織発生、特にパターンニング因子の発現低下があった。総合して、p63を消失した癌細胞は上皮特異的な接着因子の遺伝子発現が減弱し、浸潤能と関連する遺伝子の発現上昇がみられた。

細胞接着因子

CLDN1 (Claudin 1, cell-cell)

NECL1 (nectin, cell-cell)

BCAM (laminin receptor)

CEACAM1 (cell-cell)

PCDH8 (protocadherin alpha 8)

BPAG1/COL17A1(hemidesmosome)

DSM3 (Desmoglein 3, desmosome)

ITGB2 (CD18, leukocyte adhesion)

MUC1, 4 (Mucin)

細胞骨格 (keratin)

KRT23, KRT16, KER17

KRT5, KRT14, KRT10

細胞外マトリクス

Laminin5

TNXB (tenascin XB)

表皮細胞分化

TGM3(transglutaminase)

LCE5A (late cornified envelope)

CSTA(cystatin A, cornified envelope)

マトリクス・メタロプロテイナーゼ

MMP7 (Matrix metalloproteinase-7)

TIMP2 (MMP inhibitor 2)

膜タンパク質(受容体など)

EGF-R (EGF receptor)

NGFR (NGF receptor)

PARRES1 (Retinoic acid responder)

PZDK1IP1 (上皮癌の悪性化と関連)

TGF- 経路

BMP8A (BMP-8a)

INHBB (Inhibin β B)

TGFB2 (TGF- β 2)

組織発生制御

HOXA3, WNT6, JAG2

p53 標的遺伝子

GADD4A, BAX

TP53INP1, TP53I11(PIG11)

(2) 浸潤能、増殖能

p63ノックダウンにより、扁平上皮癌細胞は浸潤能を獲得・増強することが、マトリゲル・メンブレン通過により確認された。しかし、浸潤癌が示す増殖能が増強されたのではなく、G1期停止が観察された。非浸潤癌においてp63は細胞増殖能の維持とケラチノサイト分化の両方に重要であると考えられた。

(3) p63の発現誘導機構と浸潤の抑制

p63の Δ Np63の遺伝子発現が新規に同定されたSmad2とIKK α を介するケラチノサイト特異的なTGF- β シグナルで誘導されることを明らかにした。細胞生物学的解析や扁平上皮癌組織アレイの解析によって、この誘導経路はp63が高発現する高分化型(非浸潤)癌で機能しており、それによりIKK α とp63の相互活性化が成立すると考えられた。

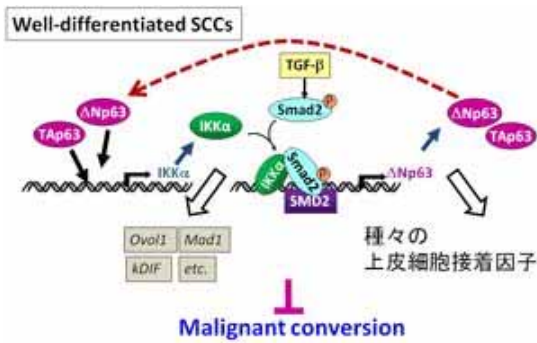


図. p63 による細胞接着因子の遺伝子発現誘導と浸潤の抑制: 上述(1) - (3)の結果を総合し、高分化型扁平上皮癌での p63 の発現誘導と、p63- $IKK\alpha$ 間の相互活性化、およびp63による細胞接着因子の誘導機能によりEMTが抑制され、浸潤型への進行が阻害されると推定された。(Fukunishi N. et al. Neoplasia, 12:969, 2010)

(総合) 意義、国際的な注目度、今後の発展 意義および国際的な注目度

- ・扁平上皮癌における p63 の役割のうち、上皮形質を維持する機能が、遺伝子発現プロファイルにより鮮明にされた。これまでの知見を確認されるとともに、未報告の遺伝子群への影響が示唆された。
- ・p63 と TGF- β シグナル経路との相互作用を世界で初めて明らかにした。
- ・論文のデータベース以外にも、使用した抗体の reference や、遺伝子データベースにも掲載された。外国から使用したプラスミドの請求があった。

今後の発展

- ・p63 ノックダウンで発現上昇する多数の遺伝子の中に β -catenin 標的の遺伝子が含まれていた。すなわち、p63 は β -catenin による発現誘導を抑制する可能性が示唆された。われわれの同時進行の研究で、 $\Delta Np63$ は GSK-3 β のリン酸化に影響するという結果が得られている。核内での $\Delta Np63$ による β -catenin 制御について研究を進展させる。
- ・また、細胞株の由来や癌のステージによって p63 ノックダウンで影響される遺伝子発現が必ずしも同一ではなかったが、そのことは大変興味深い。扁平上皮癌の進行と p63 関与する遺伝子発現制御およびシグナル伝達反応の変化について研究を進める。

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 5 件)

Fukunishi N, Katoh I, Tomimori Y, Tsukinoki K, Hata R, Nakao A, Ikawa Y, Kurata S.
Induction of Np63 by the newly identified keratinocyte-specific

transforming growth factor Signaling Pathway with Smad2 and I B Kinase in squamous cell carcinoma. Neoplasia. 2010 12(12):969-79. 査読有

Bilali A, Kurata S, Ikeda S, Georgieva GS, Zhu C, Tomita M, Katoh I, Mitaka C, Eishi Y, Imai T.

Lung-lung interaction in isolated perfused unilateral hyperventilated rat lungs. Transl Res. 2010 155(5):228-37. 査読有

Zhu C, Bilali A, Georgieva GS, Kurata S, Mitaka C, Imai T.

Salvage of nonischemic control lung from injury by unilateral ischemic lung with apocynin, a nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase inhibitor, in isolated perfused rat lung. Transl Res. 2008 152(6):273-82. 査読有

Katoh I, Sato S, Fukunishi N, Yoshida H, Imai T, Kurata S.

Apaf-1-deficient fog mouse cell apoptosis involves hypo-polarization of the mitochondrial inner membrane, ATP depletion and citrate accumulation. Cell Res. 2008, 18(12):1210-9. 査読有

Okuyama T, Kurata S, Tomimori Y, Fukunishi N, Sato S, Osada M, Tsukinoki K, Jin HF, Yamashita A, Ito M, Kobayashi S, Hata RI, Ikawa Y, Katoh I.

p63(TP63) elicits strong trans-activation of the MFG-E8/lactadherin/BA46 gene through interactions between the TA and DeltaN isoforms. Oncogene. 2008 27(3):308-17. 査読有

[学会発表](計 11 件)

Aishan B 他

High tidal volume(TV) ventilation induced cytokine mRNA and edema in hyperventilated lung in isolated perfused unilateral hyperventilated Rat lung. 37th congress of Critical Care Med. (Oral) Miami April 18 2008

Chenting Z., Aishan B 他

Ameliorating effect of combination of NADPH oxidase inhibitor (apocynin) and TNF converting enzyme inhibitor on ischemia/reperfusion (I/R) injury. 37th congress of Critical Care Med. Miami April 18 2008

Shun-ichi Kurata, 他

Apaf-1-independent mitochondrial in situ caspase-9 activation.

第 67 回日本癌学会 名古屋 10 月 28 日 2008

Nahoko Fukunishi 他
Sustained ERK-1 (MAPK) phosphorylation in carcinoma cells with p63-silencing. Iyoko Katoh, Youji Ikawa, Ryu-ichiro Hata, Shunichi Kurata 第67回日本癌学会 名古屋 10月28日 2008

倉田俊一 他
ミトコンドリアのメタボリック経路によるアポトーシス制御
第81回日本生化学会(分子生物との合同会議) 神戸 12月9日 2008

福西菜穂子 他
p63による扁平上皮癌細胞の増殖抑制: ERK(MAPK)の関与
第81回日本生化学会(分子生物との合同会議) 神戸 12月9日 2008

Katoh, I. 他(インターナショナルセッション)
DeltaN-p63 is inducible by Smad2 and IκKα, the newly identified keratinocyte-specific TGF-β signaling partners.
第68回日本癌学会学術総会、10月1日、2009 Pacifico Yokohama, 横浜

Fukunishi, N. 他
p63 promote proliferation of squamous cell carcinomas through a novel pathway of PP2A and GSK-3β
第68回日本癌学会学術総会、10月1日 2009 Pacifico Yokohama, 横浜

福西菜穂子 他
p63のNプロモータはケラチノサイト特異的な新規TGF-シグナルの標的である
第82回日本生化学会 2009年10月23日 神戸

Fukunishi, N. 他
Induction of p63 by the keratinocyte-specific TGF-β signaling pathway in squamous cell carcinomas.
第69回日本癌学会学術総会 2010年9月23日、大阪国際会議場

Katoh, I. 他
Induction of human endogenous retrovirus-K (HERV-K) LTR in melanomas by MITF, a melanogenesis transcription factor.
第69回日本癌学会学術総会 2010年9月22日、大阪国際会議場

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

倉田 俊一 (Kurata Shun-ichi)
東京医科歯科大学・難治疾患研究所・准教授
研究者番号: 60140901

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

加藤 伊陽子 (Katoh Iyoko)
山梨大学・医学工学総合研究部・准教授
研究者番号: 20333297