

機関番号：82606

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008 ～ 2010

課題番号：20790265

研究課題名（和文） ヒト正常上皮細胞における p53-Notch1 経路の破綻とがん化

研究課題名（英文） Disruption of the p53-Notch1 pathway in the development of human epithelial cancers

研究代表者

温川 恭至（YUGAWA TAKASHI）

独立行政法人国立がん研究センター・研究所・研究員

研究者番号：80311372

研究成果の概要（和文）：ヒトの正常な細胞には、細胞の無秩序な増殖を防ぐためのブレーキ役となる様々な安全機構が備わっています。私の研究はこの安全機構の一つとして“p53-Notch1”という新規の分子経路を見出し、これがどのようにして破壊され細胞のがん化につながるのかを明らかにしました。特に、p53 のファミリー分子である p63 が Notch1 がん抑制遺伝子に直接作用して、p53 による Notch1 発現および p53 によらない Notch1 発現のいずれも阻害し、細胞増殖能の維持に働くことを突き止めました。

研究成果の概要（英文）：Human cells have evolved multiple safeguard mechanisms to prevent aberrant cell growth. We have identified the novel “p53-Notch1” pathway and pointed out its tumor suppressive role. We revealed how it is disrupted in cancer cells. Particularly, the p53 family member, p63, is found to inhibit both p53-dependent and -independent induction of the Notch1 tumor suppressor gene directly through the identified p53-responsive element, thereby maintaining the proliferative capacity of epithelial cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	800,000	240,000	1,040,000
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：分子腫瘍学、発がん、がん抑制遺伝子、転写調節、ゲノム傷害、細胞分化

1. 研究開始当初の背景

研究代表者らは、ウイルス性がん蛋白の分子生物学的解析を糸口に、p53 の新規標的遺伝子として Notch1 遺伝子を同定した {Mol. Cell. Biol. 2007 May ;27(10):3732-42}。Notch1 遺伝子は進化的に保存された細胞表面蛋白をコードしており、細胞運命の決定に必須な役割を果たしている。Notch1 は細胞種や細胞環境によって異なる

機能を持つことが明らかになりつつあり、発がんとの多様な関連も示されている。角化細胞では Notch1 は分化決定因子として機能し、皮膚等の重層扁平上皮組織におけるがん抑制遺伝子としての役割が示唆されている。発生生物学的にも極めて重要な因子でありながら、研究代表者らが報告するまで Notch1 遺伝子の発現制御機構は長年不明であった。一方、p53 ノックアウトマ

ウスは正常発生日角化細胞分化に p53 は必須ではないことから、生理学的環境下においては p53 以外の因子が Notch1 の遺伝子発現制御に関与している可能性がある。これに関し研究代表者は、p53 ファミリーメンバーである p63 が Notch1 プロモーター上の p53 応答配列に結合すること、ゲノム傷害時に p63 と p53 の置き換えが起こることを見出した。p63 は上皮組織の発生、分化制御のマスター遺伝子であり、成体組織では N 末の転写活性化ドメインを欠いた Δ Np63 α アイソフォームが独占的に発現し、基底層における幹細胞性の維持に必須の役割を持つことが知られている。p53 とは対照的に p63 の変異はがんにおいてほとんど見つかっていないが、 Δ Np63 α の高発現は皮膚がん、子宮頸がん、肺がん、頭頸部がんなどの扁平上皮がんの約 50%以上の症例で認められており、p53 変異との共存も報告されている。しかしながら、その発がんにおける意義は明らかにされていない。

2. 研究の目的

本研究は、ヒト正常上皮細胞において p53 の不活化や Δ Np63 α の過剰発現が p53-Notch1 経路に対して阻害作用を持つことで発がんを促進するという新規可能性を検討するとともに、p53 ファミリーによる Notch1 発現制御を介した細胞増殖、分化機構を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) p53-Notch1 経路の生理学的意義について：上皮がんにおいては p53 が Notch1 遺伝子の発現誘導を介して細胞分化を促進し、ゲノムに傷害を受けた細胞を増殖系列から排除する事で、その発生を抑制している可能性がある。

① 子宮頸部や皮膚から単離したヒト正常角化細胞を用いて、電離放射線照射した際の p53、Notch1 の発現及び活性化と分化マーカーの発現レベルをウェスタンブロット法により確認した。また、p53 ノックダウン、Notch1 ノックダウンの細胞分化における影響を同条件下において確認した。

② 野生型及び p53 ノックアウトマウスを用いて、皮膚に UV を照射した際の Notch1 及び分化マーカーの発現レベルを免疫染色法により確認した。

(2) Δ Np63 α による Notch1 発現制御の可能性について：研究代表者は、ヒト正常角化細胞においてゲノム傷害誘導時に Notch1 プロモーターから Δ Np63 α が解離し p53 と置き換わることを、クロマチン免疫沈降法を用いて見出した。また、分化誘導時において活性化型 Notch1 と分化マーカーの発現亢進に伴

い Δ Np63 α の発現レベルが下方調節されることを見出した。これらの観察結果から、 Δ Np63 α が Notch1 プロモーターに対して転写抑制因子として機能し、細胞分化を負に制御しているという新規可能性を得た。

① ヒト正常角化細胞を用いて、 Δ Np63 α を過剰発現あるいは short hairpin RNA (shRNA) によりノックダウンした場合の Notch1 蛋白、mRNA の発現変化をそれぞれウェスタンブロット法、ノザンブロット法により調べた。尚、 Δ Np63 α の過剰発現レベルに関しては、実際にがん細胞株で観察される高発現レベルとほぼ同等となるよう、複数の発現プロモーター並びに分解部分耐性変異体を用いて調節した。

② Δ Np63 α の過剰発現やノックダウンによる Notch1 プロモーター活性の変化をリポーターアッセイにより解析した。また、電離放射線照射により内在性 p53 を活性化した際および血清暴露による分化誘導時の Notch1 プロモーター活性の変化とそれに対する Δ Np63 α 過剰発現の効果を Notch1 プロモーターリポーターを用いて解析した。

(3) Δ Np63 α の細胞増殖及び分化における役割と Notch1 発現制御との関連について：p63 ノックアウトマウスの解析より、p63 が欠失した場合、胚性上皮は異常な非再生的分化、発生過程をたどり、全ての重層扁平上皮組織の著しい欠損が生じることが示されている。研究代表者の結果からも、正常角化細胞において p63 をノックダウンすると壊滅的な細胞増殖抑制が引き起こされることを確認している。

① ヒト正常角化細胞を用いて、 Δ Np63 α の過剰発現またはノックダウンによる生物学的効果を、細胞分化、平皿上での細胞増殖能、及びクローン性コロニー形成能を指標に検討した。このとき Notch1 及び分化マーカーの発現をウェスタンブロット法により解析した。

② Δ Np63 α の標的遺伝子としての Notch1 の重要性を検討するため、 Δ Np63 α ノックダウンに対して Notch1 同時ノックダウンによるレスキュー実験を行った。平皿上での細胞増殖能及びクローン性コロニー形成能を指標に検討を行った。

(4) Δ Np63 α 高発現の細胞がん化における意義について： Δ Np63 α アイソフォームは、p53 を始め転写活性化ドメインを有する他の p53 ファミリーに対してドミナントネガティブに作用することが知られている。 Δ Np63 α の高発現は多くの扁平上皮がんにおいて高頻度に観察されており、p53 変異が同時に見られる上皮がんも報告されていることから、 Δ Np63 α は p53 とは独立してがん遺伝子とし

て働く可能性がある。

① p53^{+/+}、p53^{-/-}の同系大腸がん細胞株並びに p53 変異体を発現する複数の細胞株を用いて ΔNp63α 過剰発現の Notch1 発現における効果を調べた。

② ヒト正常角化細胞においてヒトパピローマウイルス E7 がん蛋白及び Hras 変異体と同時に ΔNp63α を過剰発現し、足場非依存性増殖能及びヌードマウス皮下における腫瘍原性を調べた。

③ ΔNp63α の高発現が見られる上皮がん細胞株において、電離放射線照射時または ΔNp63α をノックダウンした場合の Notch1 プロモーター活性の変化をリポーターアッセイにより解析した。

④ p53 の不活化と ΔNp63α の高発現が見られる上皮がん細胞株での ΔNp63α の役割を検討するため、ΔNp63α をノックダウンした際の平皿上での細胞増殖能及びクローン性コロニー形成能を調べた。また、高発現する ΔNp63α による Notch1 発現抑制が持つ意義を検討するため、同条件下において Notch1 同時ノックダウンによるレスキュー実験を行った。

4. 研究成果

(1) in vitro 並びに in vivo においてゲノム傷害により p53-Notch1 経路は活性化し、正常角化細胞の分化を促進することが確認された。

(2) Notch1 プロモーターを用いたリポーターアッセイ並びにクロマチン免疫沈降法により、ΔNp63α が先に同定した p53 応答配列を介して Notch1 遺伝子の転写抑制因子として機能することを明らかにした (図 1、2)。

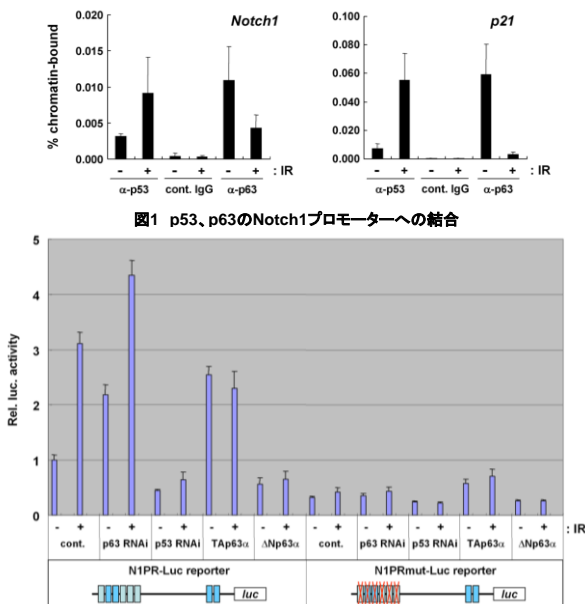


図2 Notch1プロモーターに対するΔNp63αの転写抑制活性

(3) ゲノム傷害または血清暴露によるヒト正常角化細胞の細胞分化誘導系において、ΔNp63α の過剰発現は p53 依存性ならびに非依存性の Notch1 発現誘導を阻害することを明らかにした。ΔNp63α による p53 非依存性の Notch1 発現抑制は p53^{+/+}、p53^{-/-}の同系大腸がん細胞株並びに p53 変異体を発現する複数の細胞株においても確認された。

(4) p53 の不活化並びに ΔNp63α の高発現が見られる上皮がん細胞では、電離放射線照射時においても、Notch1 プロモーターの活性化はほとんど起こらず、Notch1 遺伝子発現が構成的に抑制されていることが判明した。

(5) 正常角化細胞における ΔNp63α の欠失に伴う細胞増殖能の喪失は少なくとも部分的には Notch1 の機能を介したものであることが判明し、Notch1 遺伝子は ΔNp63α の重要な標的遺伝子であることが明らかになった (図 3)。また、上皮がん細胞においても同様に、高発現する ΔNp63α は Notch1 の構成的な発現抑制を介して増殖能の維持に働くことが明らかになった。

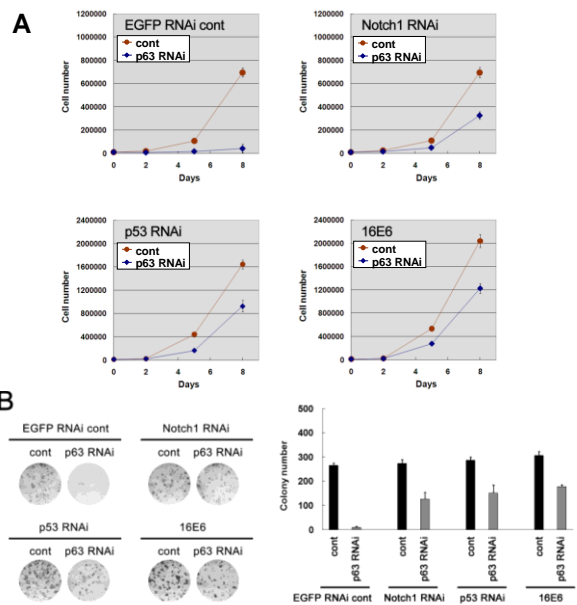


図3 p63欠損による細胞増殖能の喪失は Notch1の同時欠損によって回避される

(6) ΔNp63α の過剰発現によって正常角化細胞の分化が抑制され、クローン性増殖能が亢進することが判明した。またヒトパピローマウイルス E7 がん蛋白及び Hras 変異体と同時に ΔNp63α を過剰発現したところ、正常角化細胞に対して足場非依存性増殖能及びヌードマウス皮下における腫瘍原性が付与されたことから、ΔNp63α はがん遺伝子として機能することが明らかになった (図 4)。

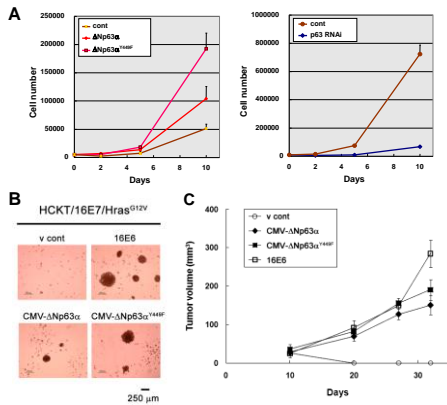


図4 Δp63α過剰発現は細胞増殖能の亢進をもたらす、腫瘍原性を付与する

以上より、初めて p53 ファミリーメンバーである ΔNp63α が Notch1 遺伝子の転写抑制因子として機能し、正常角化細胞及び上皮がん細胞のクローン性増殖能の維持に働くことを明らかにした。これらの結果は、p53 ファミリーと Notch1 の直接的リンクを示すとともに、p53 の機能消失と ΔNp63α の過剰発現がそれぞれ独立して Notch1 がん抑制遺伝子の構成的不活化を介して発がんを促進している可能性を提示するものである (図 5)。

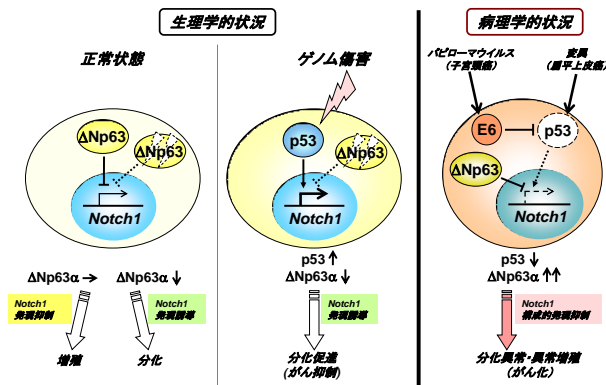


図5 p53ファミリーによるNotch1発現制御とその破綻

本研究は、高リスク型ヒトパピローマウイルス E6 がん蛋白の機能解析というユニークな切り口から、世界に先駆けて角化細胞の増殖、分化の分子基盤を p53 ファミリーによる Notch1 発現制御によって説明する研究へと発展した。さらに、この制御機構の破綻と細胞がん化との関連を指摘した。本研究から得られた知見は、ヒトパピローマウイルスが関与する子宮頸がんに限局されず、広く上皮発がん機構の解明に貢献するものである。

p53 とは異なり p63 の変異は、がんにおいてほとんど報告されておらず、また複数のアイソフォームが存在することからも、その役割に関しては依然未解明である。今回の研究代表者の成果により、扁平上皮がんの約 50% 以上の症例で高発現が認められる ΔNp63α は、少なくとも部分的には Notch1 がん抑制遺伝子の不活化を介してがん遺伝子として

機能することが明らかとなった。

p63 (ΔNp63α) は上皮細胞の増殖や幹細胞性維持に不可欠であるが、一方で p63 の発現低下や機能消失とがんの進展や予後不良との相関が示唆されている。しかしながら、その背景となる分子機構及び発がんにおける意義は明らかではない。特に、p63 の機能消失によって起こる細胞増殖能の喪失と、それが回避され悪性転換へと繋がる分子基盤について解明を試みる研究はこれまで為されていない。今後、“p63 による上皮幹細胞性、増殖能の維持”と“p63 の機能消失がもたらす上皮がん細胞の悪性化”とのギャップを埋める分子基盤について研究を展開し、広く上皮がん悪性化の鍵となる機構の解明を目指す。

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 9 件)

- ① Yugawa T, Narisawa-Saito M, Yoshimatsu Y, Haga K, Ohno S, Egawa N, Fujita M, Kiyono T.

DeltaNp63alpha repression of the Notch1 gene supports the proliferative capacity of normal human keratinocytes and cervical cancer cells.

Cancer Res. 70(10):4034-44, 2010

(査読あり)

- ② Yugawa T, Kiyono T.

Molecular mechanisms of cervical carcinogenesis by high-risk human papillomaviruses: novel functions of E6 and E7 oncoproteins.

Rev Med Virol. 19(2):97-113, 2009

(査読あり)

- ③ Sasaki R, Narisawa-Saito M, Yugawa T, Fujita M, Tashiro H, Katabuchi H, Kiyono T.

Oncogenic transformation of human ovarian surface epithelial cells with defined cellular oncogenes.

Carcinogenesis. 30(3):423-31, 2009

(査読あり)

- ④ Yugawa T, Kiyono T.

Molecular basis of cervical carcinogenesis by high-risk human papillomaviruses].

Uirusu. 58(2):141-54, 2008 (査読なし)

- ⑤ Narisawa-Saito M, Yoshimatsu Y, Ohno S, Yugawa T, Egawa N, Fujita M, Hirohashi S, Kiyono T.

An in vitro multistep carcinogenesis model for human cervical cancer.

Cancer Res. 68(14):5699-705, 2008

(査読あり)

[学会発表] (計 7 件)

- ① 温川恭至、齋藤真子、吉松有紀、稲川悠紀、藤田雅俊、清野 透
高リスク型ヒトパピローマウイルスによる発がんの分子機構：E6 の機能的役割
第 58 回日本ウイルス学会学術集会 シンポジウム 2010 年
- ② 温川恭至、齋藤真子、藤田雅俊、清野 透
高リスク型ヒトパピローマウイルスによる発がんの分子機構：E6 の機能的役割
日本ウイルス学会学術集会 シンポジウム 2010 年
Regulation of Notch1 gene expression by p53 family members and its disruption in cancer
第 69 回日本癌学会学術総会 口演 2010 年
- ③ Yugawa T, Narisawa-Saito M, Fujita M, Kiyono T
p63 supports proliferation of normal keratinocytes and cervical cancer cells via Notch1 repression.
The 26th International Papillomavirus conference 口演 2010 年
- ④ 温川恭至、齋藤真子、吉松有紀、大野真一、藤田雅俊、清野 透
16 型ヒトパピローマウイルス E6 による新規 p53-Notch1 経路の下方調節
第 57 回日本ウイルス学会学術集会 口演 2009 年
- ⑤ 温川恭至、齋藤真子、吉松有紀、大野真一、藤田雅俊、清野 透
p63-mediated repression of Notch1 supports the proliferative potential of normal human keratinocytes and cancer cells.
第 68 回日本癌学会学術総会 口演 2009 年
- ⑥ Yugawa T, Narisawa-Saito M, Fujita M, Kiyono T
Down-modulation of the p53-Notch1 pathway by HPV-16 E6.
The 25th International Papillomavirus conference 口演 2009 年
- ⑦ 温川恭至、齋藤真子、角田有紀、大野真一、藤田雅俊、清野 透
DeltaNp63alpha represses Notch1 tumor suppressor gene in normal human keratinocytes.
第 67 回日本癌学会学術総会 口演 2008 年

[その他]

ホームページ等

<http://www.ncc.go.jp/jp/nccri/divisions/10vir/10vir.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

温川 恭至 (YUGAWA TAKASHI)

独立行政法人国立がん研究センター・研究所・研究員

研究者番号：80311372

(2) 研究分担者

該当なし ()

研究者番号：

(3) 連携研究者

該当なし ()

研究者番号：