

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 15 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21390530

研究課題名（和文） 口腔癌におけるオートファジー関連因子 p62 欠損による発癌の解析

研究課題名（英文） Analysis of autophagy related protein p62 in carcinogenesis of oral cancer

研究代表者

柳川 徹 (YANAGAWA TORU)

筑波大学・医学医療系・准教授

研究者番号：10312852

研究成果の概要（和文）：

本研究ではオートファジー関連因子の p62 とアポトーシスの異常の関連を調べ口腔癌の発癌との関連を以下のように調べた。

I. *in vitro* の解析：p62 欠損 (p62(-/-)) MEF 細胞のアポトーシス抵抗性について原因を検討した結果、Src, Stat3 のリン酸化の上昇と、Bcl-2, Bcl-xL の上昇であることがわかった。LC/MS/MS による解析から p62 に結合物質として Mitofilin が同定されたが、検証実験で否定された。

II. *in vivo* の解析：マウス生体においても p62(-/-)マウスではアポトーシス抵抗性であることを確認した。

III. その他 PrxI(-/-)MEF はアポトーシス抵抗性について検討し、また、p62(-/-)マウスと NASH との関連を発見した。

研究成果の概要（英文）：

I. *in vitro* analysis

The purpose of this study is to reveal the association of autophagy related protein p62 and apoptosis, and carcinogenesis of oral cancer.

FACS analysis revealed that p62(-/-)MEF increased resistance to apoptosis, and the similar result was obtained from siRNA experiment.

Stat3 and Src phosphorylation were increased in p62(-/-)MEF. Real time PCR revealed Bcl-2 and Bcl-xL expression were increased. Immuno-blotting analysis showed that Bcl-2, Bcl-xL, and Bax were reduced in p62(-/-) and wild type MEF by UVB irradiation, however, no significant difference were observed between p62(-/-) and wild type MEF. ATM mRNA expression were not different between p62(-/-) and wild type MEF.

II. *in vivo* analysis

By UVB irradiation to skin of p62(-/-) and wild type mice showed that p62(-/-) skin had less apoptotic response resulting resistance to apoptosis.

III. Additional results

Prx I(-/-) MEF showed reduced resistance to apoptosis. We found NASH model mouse by using p62(-/-) and Nrf2 (-/-) mice.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	5200000	1560000	6760000
2010年度	4700000	1410000	6110000
2011年度	4000000	1200000	5200000
年度			
年度			
総計	13900000	4170000	18070000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：臨床腫瘍学

1. 研究開始当初の背景

オートファジーは、神経変性疾患や、個体発生過程でのプログラム細胞死に関わることが知られているが、近年、癌に深く関与することで注目されてきた。オートファジーと癌の関係は、癌細胞の栄養や酸素の枯渇時の生存、抗癌剤の耐性、細胞のがん化抑制やアポトーシスの抑制などに関連するという報告があるが、今回、我々は、このオートファジーのタンパク分解に選択性をもたらしている因子のp62とアポトーシスの関連を見出したことから、口腔癌のオートファジー機能障害によるアポトーシスの異常と発癌の関係を明らかにするべく本研究を立案した。

2. 研究の目的

近年、新しいタンパク分解系としてオートファジーの仕組みが解明されつつあるが、口腔癌の発癌について、どのように結びつか検討はなされていない。本研究はオートファジーの関連因子であるp62のノックアウトマウス生体および、胎児線維芽(MEF)細胞を用いて、

I. *in vitro*の実験として、1) p62 ノックアウト細胞アポトーシスシグナルの検討、2) LC MS/MS を用いた結合物質の検索を行い、オートファジーとの関連を調べる。と同時に、II. *in vivo*の実験として p62 ノックアウトマウス生体を使用し、DNA 傷害刺激によってアポトーシス異常を組織学的に調べる。以上によって、p62 のオートファジーの機能が、アポトーシスシグナルのどこに作用しているかを明らかにし、p62 と口腔癌の発癌との

関連を調べることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) *in vitro*の解析

① FACS をもちいたアポトーシスの解析
Wild type および p62(-/-) MEF 細胞に DNA 傷害性の刺激としてシグナル経路の明確な UVB を選択し、300、600mJ/cm² の UVB 照射を行い、アネキシンとヨードプロピジウムでラベルし、FACS 解析によりアポトーシスの割合を調べた。受託サービスにより siRNA を制作して RNA 干渉の実験を行う。siRNA を含む Mixture を細胞に添加し、72 時間後に細胞を回収して効果を確認する。リアルタイム PCR 法による mRNA の発現量の定量、ウエスタンブロット法による発現タンパク質量の検証を行い、確実なノックダウンの培養系を確立した。FACS を用いてノックダウンによってアポトーシスの異常が生じることをノックダウン培養系に UVB を照射し、アポトーシスに差が出るかを確認を行った。

② アポトーシスシグナルの解析

a) リン酸化シグナルの検索：p62(-/-) および p62(+/-) の MEF 細胞に対して 300、600mJ/cm² の UVB 照射を行い、Stat3 と Src のリン酸化を調べた。また、Real time PCR を用いて、Bcl-2, BclxL, ATM の発現量を調べた。ウエスタンブロットによるシグナルの検索を行った。以上により、p62 がアポトーシスのシグナルのどこに位置するかを検討した。さらに、活性酸素の発生量を DCFH-DA で蛍光強度

から測定した。

③ LC/MS MSによる p62 の結合物質の検索

a) Flag-p62 過剰発現培養系の確立: 過剰発現は、p62 の Flag-p62 を発現ベクターをカチオンリポソーム法でトランスフェクションし細胞中で強制発現させ、培養細胞溶解液を免疫沈降法により Flag 抗体で落とした。これらの沈降物を Flag ペプチドで溶出させサンプルを得た。

b) 電気泳動: 溶出させた結合物質を、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって分離し、これによって結合タンパク質を選定し、バンドの選定をおこなった。

c) LC/MS MSによる測定:

を使用し、蛋白質固有のピークの数値を調べ、表示された結果を調べ、それらの値から結合物質を同定した。

(2) *in vivo* の解析

DNA 傷害によるアポトーシスの実験

10 週齢の p62(+/-) および p62(-/-) マウスに対して、200mJ/cm² の UVB を照射し 36 時間後に採取し、組織学的検索をおこなった半定量化しアポトーシスを比較した。

細胞培養

マウス胎児から分離した線維芽細胞 (MEF) を、10 cm² ディッシュを使用し、10% (v/v) 牛胎児血清 (FBS) を加えた DMEM 培地で培養した。継代は週 2 回行った。細胞の播種は以下のように行った。培養液をアスピレーターで吸い取り、PBS (-) を 10 ml 入れ細胞を洗浄した。洗浄後 PBS (-) を吸い取り、トリプシンを 1 ml 加えインキュベートし、10% FBS 培地を 10 ml 加えピペティングし細胞をディッシュから剥がし、50 ml チューブに移し 1000 rpm で 5 分間遠心した。遠心後、上清を吸い取り 10% FBS 培地を 5 ml 加え細胞を懸濁し、エッペンチューブに細胞 20 μ l、トリパンプル 80 μ l 入れピペティングし、混合後 80 μ l 取り計算盤に移し細胞数を数えた。5 \times 10⁴ cell/ml になるように細胞を希釈し、35 mm² ディッシュに細胞を 2 ml 加え均一になるように混合し 37 $^{\circ}$ C でインキュベートした。本研究はすべてこの条件で行った。

UV 照射

培養液をアスピレーターで吸い取り、PBS (-) で細胞を洗浄し、細胞に色素を含まず HEPES バッファー (pH 7.4) を 30 mM 加えた培養液を 1 ml 加えた。dish の蓋を外し、紫外線ランプ (UVA:FL20SBLB UVB:FL20SE Toshiba) を設置した箱に入れ照射した。UVA 実験では UVB

の影響を抑制するため、UVB と UVC をカットするフィルター (UV-35 Asahi Technoglass) をディッシュの上に乗せ照射した。照射している間、未照射の細胞も紫外線の影響を受けないようにアルミホイルに包み照射機に入れた。照射後、培養液をアスピレーターで吸い取り通常の培養液を 2 ml 加え 37 $^{\circ}$ C でインキュベートした

Real time PCR

培養液をアスピレーターで取り除き、セパノールを 1 ml 加え細胞を可溶化しスクレイパーでかき集めてエッペンチューブに移し攪拌した。クロロホルムを 200 μ l 加え、チューブをシェイクし 12000 rpm で 10 分間遠心した。遠心している間、新しいエッペンチューブに 2-イソプロパノールを 500 μ l 入れた。遠心後水層を 500 μ l 取りイソプロパノール入りのエッペンチューブに移しボルテックスし 14000 rpm で 10 分間遠心した。上清を捨て、70% エタノールを 1 ml 加え転倒混和し 14000 rpm で 10 分間遠心した。ゆっくり上清を捨て、Diethylpyrocarbonate (DEPC) 処理水を 10 μ l 加えボルテックスし、精製した RNA を吸光度により濃度測定した。

アガロースを 0.5 g 三角フラスコに入れ、1 \times TAE (40 mM-Tris Acetate pH 8.3 10 mM-EDTA) を 50 ml 加え電子レンジで加温しアガロースを溶解した。10 分間程度冷ましエチジウムブロマイドを 1 滴加えた。型に流して固まるまで待った。泳動槽に 1 \times TAE を浸した。エッペンチューブにサンプル、DEPC 処理水、loadingdye をそれぞれ 1:4:1 の割合で混合した。ゲルの左端にマーカーを 1 μ l 入れ、その隣からサンプルを 6 μ l 入れた。100 V で 30 分間電気泳動し撮影した。

4. 研究成果

(1) *in vitro* の解析

UVB 照射によるアポトーシスの検索

p62(+/-) および p62(-/-) MEF 細胞に UVB を選択し、300、600mJ/cm² の UVB 照射を行い、FACS 解析によりアポトーシスの割合を調べたところ、p62(-/-) MEF 細胞の方が、アポトーシスの割合が低く、アポトーシス抵抗性であることが示された。また、siRNA で p62 をノックダウンすると同様な効果が得られた。よって、p62 欠損によりはアポトーシス抵抗性となることが考えられた (Fig. 1)。

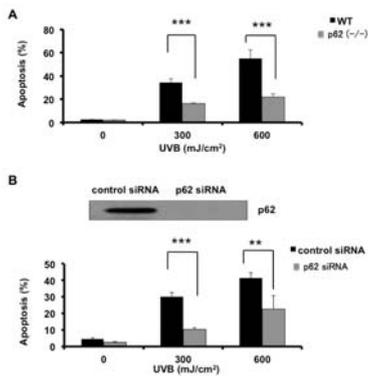


Fig. 1 UVB障害に対するWTとp62(-/-)MEFの比較

Stat3 は、細胞の増殖や分化を制御することが知られているため、Stat3 のリン酸化と Src のリン酸化レベルを調べたところ p62(-/-) MEF 細胞では、Stat3 のリン酸化の亢進が認められると同時に、Src のリン酸化が認められた (Fig. 2)。

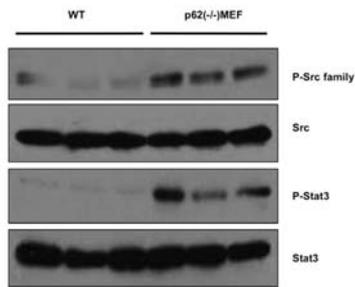


Fig. 2 WT と p62(-/-)MEF における Src と Stat3 のリン酸化レベルの比較

WT と p62(-/-)MEF を Src 阻害剤 PP2 を 1-20 μ M で処理し、ウエスタンブロットにより Stat3 と P-Stat3 を比較したところ、濃度依存的に Stat3 のリン酸化を消失させた。 WT と p62(-/-)MEF を PP2 (20 μ M) で 12 時間処理し、UVB を 300 と 600 mJ/cm² それぞれ照射し、24 時間後の細胞を AnnexinV/PI で染色しアポトーシス細胞を FACS で定量化したところ、アポトーシスに有意な差があったものが、阻害剤により消失した。 ***P<0.005 (Fig. 3)

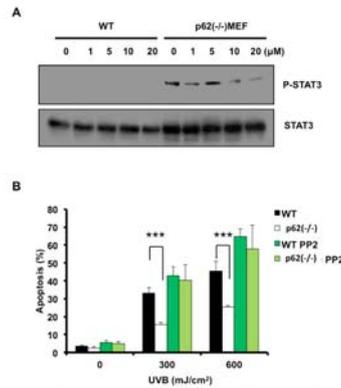


Fig. 3 Src キナーゼ阻害剤 PP2 による Stat3 のリン酸化阻害と UVB 障害への影響

WT と p62(-/-)MEF で転写因子 Stat3 によって転写誘導される抗アポトーシス因子である Bcl-2 と Bcl-xL の mRNA の発現量をリアルタイム PCR により定量化したところ、Bcl-2 と Bcl-xL とも p62(-/-)MEF では mRNA の発現が亢進していた。 *P<0.05 (Fig. 4)

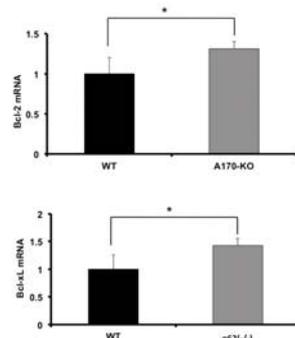


Fig. 4 WT と p62(-/-)MEF における Bcl-2 と Bcl-xL mRNA 発現量の比較

MEF に UVB を 600 mJ/cm² 照射し、12 時間後に細胞内の Bcl-2、Bcl-xL、Bax タンパク質をウエスタンブロットにより検出したところ、UVB 照射によりいずれのタンパク質も減少していた。 (Fig. 5)

WT と p62(-/-)MEF に UVB を 300 mJ/cm² 照射し、12 時間後の DNA ダメージにより応答する遺伝子である ATM の mRNA の発現量をリアルタイム PCR により検出したところ ATM の mRNA の発現に有意な差は見られなかった。 (Fig. 6)

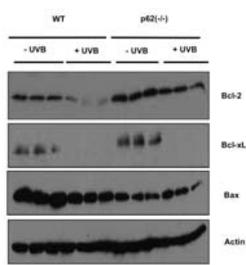


Fig. 5 WTとp62(-/-)MEFにおけるUVB照射前と照射後のBcl-2ファミリー発現量の比較

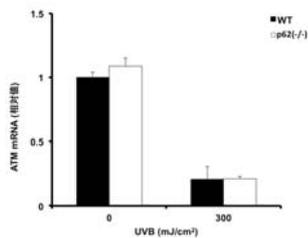


Fig. 6 WTとA170-KO MEFにおける標的転写因子ATM mRNAの相対的発現量

WTとp62(-/-)MEFにおける細胞内活性酸素産生の比較をするため、WTとp62(-/-)MEFにUVBを300 mJ/cm²照射し、12時間後の活性酸素産生を蛍光素DCFH-DAで染色しFACSで定量化した。WTにUVB照射した値を100%とし、定量化を行ったところ、照射では両者の細胞は有意に活性酸素産生量が增大していたが、p62(-/-)MEFの方が、活性酸素の量は少なく増大のも少なかった。*P<0.05 ***P<0.005 (Fig. 7)

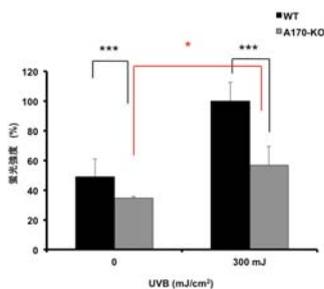


Fig. 7 WTとA170-KO MEFにおける細胞内活性酸素産生の比較

LC/MS MSによるp62の結合物質の検索

過剰発現は、p62のFlag-p62を発現ベクターをカチオンリポソーム法でp62(-/-)MEFにトランスフェクションし細胞中で強制発現させ、培養細胞溶解液を免疫沈降法によりFlag抗体で落とし、これらの沈降物をFlagペプチドで溶出させ、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって分離し、Flagのみのコントロール群とバンドを比較し、発言しているバンドの選定をおこなった。

その後、LC/MS MSを使用し、蛋白質固有のピークの数値を調べ、表示された結果を調べ、それらの値から結合物質を予測したところ、Mitofirinが同定された。

しかし、再度、Flag-tagのみを細胞中で強制発現させ、同様に作業をおこなったところ、同様なバンドが現れ、p62に対する結合物質ではなく、Flag-tag等の、p62以外の部位に結合する夾雑物と類推され、結合物質の同定は不可能であった。

(2) in vivoの解析

WTとA170-KOマウスにUVBを200 mJ/cm²照射し、24時間後の皮膚をホルマリン固定後、切片をHE染色し光学顕微鏡で観察した。

UVB照射したWTの表皮では核の凝縮が起こっているが、A170-KOの表皮では核の凝縮が見られず、p62の生体においてもアポトーシスの抵抗性が見られた(Fig. 8)。

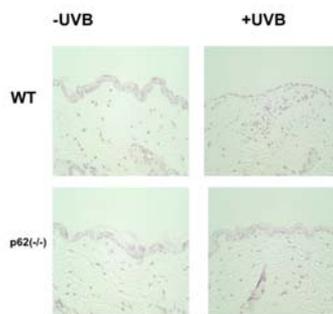


Fig. 8 UVB皮膚障害の比較

DNA 傷害による発癌実験として、10 週齢の p62(+/-) および p62(-/-) マウスに、300mJ/cm² の UVB を 週三回照射し照射を続け、癌の発生率の検討を開始したが、C57BL では発癌に至る前に死亡するためアポトーシスの検索に切り替えた。

考察

以上により、オートファジー関連因子の p62 のアポトーシスと関連性を探った p62 の欠損によって、アポトーシスが低下し、アポトーシスの抵抗性を示していることが *in vivo* でも *in vitro* でも証明された。アポトーシスシグナルの入力地点としては、p62 の作用点が Src 以上の上流で制御をかけて、Stat3 のリン酸化の亢進とそれに続く Bcl, Bcl-xL, Bax の系に続くと考えられた。p62 の結合物質の同定が可能であれば、さらに、その作用点の解析が進んだと思われ、惜しまれる。今後も、p62 の作用点について継続して検討を加え、発癌との関連を調べ、また、オートファジーとアポトーシスの関係も検討していきたいと考えている。

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 2 件)

Sugimoto R, Warabi E, Katayanagi S, Sakai S, Uwayama J, Yanagawa T, Watanabe A, Harada H, Kitamura K, Noguchi N, Yoshida H, Siow RC, Mann GE, Ishii T.
Enhanced neointimal hyperplasia and carotid artery remodelling in sequestosome 1 deficient mice.
J Cell Mol Med. 2010 14(6B):1546-54.

Ma D, Warabi E, Yanagawa T, Kimura S, Harada H, Yamagata K, Ishii T.
Peroxiredoxin I plays a protective role against cisplatin cytotoxicity through mitogen activated kinase signals.
Oral Oncol. 2009 45(12):1037-43.

[学会発表] (計 1 件)

Sakai S, Warabi E, Katayanagi S, Yanagawa T, Ishii T.
Deficiency of sequestosome 1 accelerates neointimal hyperplasia and carotid artery
UK-Japan Research symposium Molecular Mechanisms of Stress Response in Disease

April, 2012 Tsukuba

[図書] (計 1 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称：非アルコール性脂肪性肝炎および肝腫瘍自然発症モデルとしての p62:Nrf2 遺伝子二重欠損マウスおよび該マウスを用いた方法

発明者：蕨栄治 正田純一 岡田浩介 柳川徹 山本雅之

権利者：国立大学法人筑波大学

種類：特許出願

番号：特願 2012-078966

出願年月日：2012 年 3 月 30 日

国内外の別：国内

○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

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柳川 徹 (YANAGAWA TORU)

研究者番号：10312852

(2) 研究分担者

石井哲郎 (ISHII TETSURO)

研究者番号：20111370

蕨 栄治 (WARABI EIJI)

研究者番号：70396612

(3) 連携研究者

なし