

機関番号：17401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009～2010

課題番号：21890200

研究課題名（和文） オートファジーを介した p53 遺伝子の癌抑制機能の解明

研究課題名（英文） Function of p53 tumor-suppressor gene mediated autophagy

研究代表者

宮本 裕士 (MIYAMOTO YUJI)

熊本大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：80551259

研究成果の概要（和文）：

今回のわれわれの研究目的は、オートファジーを調節する働きを有する新規の p53 標的遺伝子をマイクロアレイで網羅的に同定することである。p53 knock-down 細胞を構築し、p53 knock-down 細胞を及び p53 wild type 細胞と同時にアミノ酸飢餓状態とし、オートファジーが誘導された状態で DNA マイクロアレイ解析用にそれぞれの細胞の total RNA を抽出し精製した。total RNA から cRNA を精製し、cDNA マイクロアレイを行った。現在 p53 の有無によるオートファジー誘導時の遺伝子発現の違いを評価中である。

研究成果の概要（英文）：

In this study, our objective is to identify novel p53-target genes to regulate autophagy using microarray. First, we established the p53 knock-down and the control cell lines, and Each cell lines were collected after amino acid starvation. Total cellular RNA was extracted and purified. We purified cRNA from total RNA, and performed cDNA microarray. Now, we are evaluating the difference in gene expressions by the presense of p53 during induction of autophagy.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,450,000	435,000	1,885,000
2010年度	1,120,000	336,000	1,456,000
総計	2,570,000	771,000	3,341,000

研究分野：医歯薬学

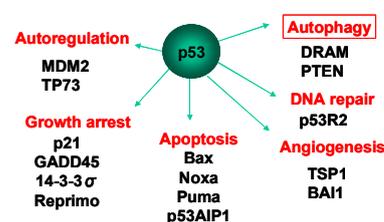
科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：オートファジー、p53、発癌

1. 研究開始当初の背景

ヒト癌で最も高頻度に変異が認められる癌抑制遺伝子 p53 は、標的遺伝子の DNA 配列特異的に結合し、その転写活性を制御する転写

Fig.2 Examples of p53-target genes



因子であり、複数の標的遺伝子の発現制御を通して、その生理機能が発揮される。DNAダメージ、低酸素、癌遺伝子の活性化などのストレスにより、細胞周期停止、アポトーシス、DNA修復等の機能を持つ p53 標的遺伝子が誘導され、癌抑制機構として機能している。

近年、p53 が上記機能を介した癌抑制機能だけでなく、オートファジーを制御する役割を持っていることが明らかになった (Feng Z. Proc Natl Acad Sci USA 102 2005, Crighton D et al. CELL 126 2006)。

オートファジーとは、栄養飢餓などに応じて細胞が自身の構成成分 (細胞質や細胞内小器官) をオートファゴソームと呼ばれる二重の脂質膜で包み込み、リソソームや液胞といった加水分解酵素を豊富に含む場へ輸送し、分解する現象であり、自食作用とも言われている。さらにオートファジーは飢餓適応だけの役割に関わらず、感染防御、細胞内浄化、細胞死、癌抑制の役割をもつことが近年報告されている (Mizushima N. Nature 451 2008)。

このオートファジー機能に関わる遺伝子のなかで癌抑制機能を持つ遺伝子が次々と発見され、オートファジーと癌抑制機能の係わり合いが注目されている (Liang XH. Nature 402 1999, Liang C. Nat Cell Biol. 8 2006)。

p53 がオートファジーを制御する経路は転写経路と非転写経路の 2 つの場合がある。活性化された p53 により転写された標的遺伝子は直接、あるいはオートファジー抑制作用を持つ mTOR を介してオートファジーを制御している。非転写経路においては活性化 p53 が AMPK-mTOR シグナル経路を活性化することでオートファジーを制御しているといわれている (Levine B. Nat CELL Biol. 10 2008)。p53 が異常を来すと、下図の如く、オートファジーが mTOR により抑制されてしまい、ミトコンドリアなどの細胞内小器官のクリアラン

スがうまくいかず、異常な細胞内小器官の蓄積から遺伝子不安定性につながると考えられている (Jin S. Autophagy 2 2006)。

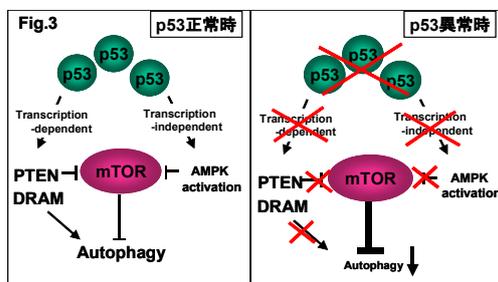
2. 研究の目的

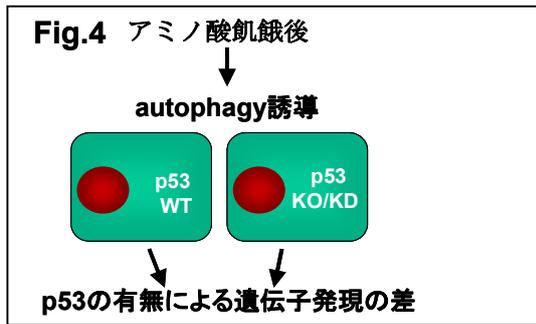
マイクロアレイシステムを用いてオートファジーを制御する新たな p53 標的候補遺伝子を網羅的に同定する。さらに、これらの遺伝子がオートファジーのどの過程を制御しているのかを明らかにし、p53 が標的遺伝子を介してどのようにオートファジーを制御しているかを解明する。

3. 研究の方法

細胞をアミノ酸飢餓状態にすると数時間でオートファジーが誘導されることが知られている。また、アミノ酸飢餓により p53 が活性化されることも報告されている (Bhat KP. EMBO J. 23 2004)。ヒト癌細胞において p53 knock-out 細胞あるいは knock-down 細胞を構築し、p53 wild type 細胞と同時にアミノ酸飢餓状態とし、オートファジーが誘導された状態でそれぞれの細胞の total RNA を抽出し精製した。この際、血清を除去することでアミノ酸飢餓状態を得ることとした。total RNA から cRNA を準備し、cDNA マイクロアレイを用いて p53 の有無によるオートファジー誘導時の遺伝子発現の違いを評価した。ターゲットとなりそうな遺伝子を確認後は real-time PCR を用いて結果の検証をした。

今後は p53 の直接の標的遺伝子であることを証明するために、p53 結合候補配列の検索を個々の候補遺伝子のゲノム DNA 上で行い、これらの配列が in vivo において p53 蛋白と結合しているか確認するため、CHIP assay を行う。





4. 研究成果

今回のわれわれの研究目的は、オートファジーを調節する働きを有する新規の p53 標的遺伝子をマイクロアレイで網羅的に同定することである。

まず、p53 の siRNA 配列を short hairpin RNA となるように retrovirus vector へ挿入後、293T 細胞へ導入しレトロウイルスを作製した。これをヒト肝細胞癌細胞株 HepG2 細胞及びヒト線維芽細胞株 HFF2 細胞に感染させ、薬剤選択することで p53 knock-down 細胞を構築した。

p53 wild type 細胞と同時にアミノ酸飢餓状態とし、何れの細胞でもオートファジーが誘導されることを、抗 LC3 抗体および抗 p62 抗体を用いた western blotting 法にて確認した。また、これらの細胞をアミノ酸飢餓後、継時的に p53 蛋白の発現量が増加することを確認した。

p53 knock-down 細胞を及び p53 wild type 細胞と同時にアミノ酸飢餓状態とし、オートファジーが誘導された状態で DNA マイクロアレイ解析用にそれぞれの細胞の mRNA を抽出し精製した。現在、mRNA から cDNA を精製し、そのクオリティを確認後、DNA マイクロアレイを行った。現在 p53 の有無によるオートファジー誘導時の遺伝子発現の違いを評価し、p53 標的遺伝子候補を同定中である。

今後はこの p53 標的候補遺伝子の結合候補

配列が p53 特異的な転写活性化能を有しているか調べるため、レポーターアッセイを行う。p53 結合候補配列を含む 200~300 塩基のゲノム配列をレポータープラスミドへそれぞれ組み、正常型 p53 プラスミドと co-transfection した場合のみ、Luciferase 活性が上昇することを確認する。これらの結果より、候補遺伝子が正常型 p53 特異的に反応する転写活性化能を有しており、p53 の直接の標的遺伝子であることを確認する。

オートファジー誘導時において、p53 正常発現時と p53 発現抑制時における細胞内遺伝子発現の違いを、cDNA マイクロアレイ解析を用いて網羅的に解析した。オートファジー誘導時に p53 特異的に発現変化がみられる目的遺伝子を絞り込み、これらが p53 の直接の標的遺伝子であるかを CHIP アッセイ、レポーターアッセイにて確認した。p53 の標的遺伝子であることを確認後、目的遺伝子の過剰発現系においてオートファジーが誘導され、knock down 系において阻害されることを確認する。その後、オートファジー関連蛋白質との多重免疫染色により目的遺伝子がオートファジー経路のどこに関連があるかを確認する。

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)

- 1) Miyamoto Y, Kitamura N et al. Possible existence of lysosome-like organella within mitochondria and its role in mitochondrial quality control. *PLoS One* 査読有 2011 6: e16054
- 2) Miyamoto Y, Futamura M, et al. Identification of UNC5A as a novel transcriptional target of tumor suppressor p53 and a regulator of apoptosis. *Int J Oncol.* 査読有 2010 36: 1253-1260

[学会発表] (計 6 件)

- 1) 宮本裕士 当科における骨盤内臓全摘術症例の検討:第 74 回大腸癌研究会:2011 年 1 月 22 日:福岡:アクロス福岡
- 2) 宮本裕士 StageIV大腸癌における原発巣切除の必要性:第 65 回日本大腸肛門病学会総会:2010 年 11 月 26 日:浜松:アクトシティ浜松
- 3) 宮本裕士 直腸癌局所再発に対する手術症例の検討:JDDW2010 第 8 回日本消化器外科学会大会:2010 年 10 月 16 日:横浜:パシフィコ横浜
- 4) 宮本裕士 Evaluation of the necessity of primary tumor resection for synchronous metastatic colorectal cancer :第 9 回アジア臨床腫瘍学会学術集会 (ACOS):2010 年 8 月 26 日:岐阜:岐阜グランドホテル
- 5) 宮本裕士 同時性転移を有する大腸癌患者における原発巣切除の必要性:第 65 回日本消化器外科学会総会:2010 年 7 月 14 日:福岡(下関):下関グランドホテル
- 6) 宮本裕士 大腸癌化学療法中の緊急手術症例の検討:第 110 回日本外科学会学術集会:2010 年 4 月 9 日:名古屋:名古屋国際会議場

[その他]

ホームページ等

<http://www2.kuh.kumamoto-u.ac.jp/shoukaki/igeka/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮本 裕士 (MIYAMOTO YUJI)

熊本大学・医学部附属病院・助教

研究者番号:80551259