

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09855

研究課題名（和文）HSP40ファミリーと変異p53間の相互作用を標的とした新規癌治療法の開発

研究課題名（英文）Development of novel cancer therapy targeting the interaction of the HSP40 family with mutant p53

研究代表者

戒田 篤志（Kaida, Atsushi）

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・講師

研究者番号：40632097

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：本研究課題では、50種類ほど存在するHSP40ファミリーからsiRNAライブラリーを用いたスクリーニングにより変異p53を安定化し得るHSP40タンパク質の探索を行った。HSP40ファミリーメンバーであるDNAJA1については、すでに構造変異型p53と結合し安定化させることで、癌の転移を促進することを明らかにしてきたが、蛍光免疫染色を基にしたスクリーニングの結果、DNAJA1以外に8種類の候補因子が同定された。更に別法でのタンパク質解析によりvalidationを行ったところ、3種類のHSP40タンパク質が少なくとも変異p53の安定化に寄与している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

p53変異がしばしば検出される頭頸部がんにおいては、外科的切除がよく用いられているが、生活の質を維持し得る点からも非外科的な治療法は患者にとって重要な選択肢となり得る。様々な分子標的治療が開発されている中で、多くの頭頸部がんが発現している変異p53を標的とするのは有効な手段と考えられるが、未だ臨床応用には至っていない。本研究課題では、野生型p53とは異なり、変異p53がどのように安定化され、細胞内で蓄積することで癌の悪性化や転移に寄与しているのかに関するメカニズムに迫っており、今後、そのメカニズムの詳細を明らかにすることで変異p53を標的とした新規創薬につながる可能性が考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we explored HSP40 proteins that can stabilize mutant p53 by screening with an siRNA library for the approximately 50 types present in the HSP40 family. It has already been shown that DNAJA1, a member of the HSP40 family, binds to and stabilizes conformational mutant p53, thereby promoting cancer metastasis. However, the screening based on immunofluorescence identified eight candidate factors other than DNAJA1. Furthermore, protein analysis by an alternative method suggested that at least three types of HSP40 proteins might contribute to the stabilization of mutant p53.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：頭頸部がん p53変異 HSP40ファミリー スクリーニング siRNAライブラリー

## 1. 研究開始当初の背景

頭頸部領域は、発語、摂食、嚥下等、生命を維持するための様々な機能を司る重要臓器である。この領域に生じる頭頸部がんへの主な治療法は、外科療法が第一選択肢となることが多いが、侵襲の程度によっては治療後の生活の質(QOL)が著しく低下することは避けられない。一方、化学療法などの非侵襲的治療法は、治療後 QOL を維持することが可能であり、特に近年、分子標的薬の出現に伴い、薬物療法にかかる期待は日増しに大きくなっている。

癌抑制因子 **p53** は、大半の癌で変異が生じており、変異 **p53(mutp53)** は癌抑制因子としての機能を喪失(Loss of function)しているのみならず、**mutp53** が蓄積することにより、**oncogene** として癌の進行や転移を促す(Gain of function)ことが知られている。頭頸部扁平上皮癌(HNSCC)では、**p53** の変異発生頻度は半数以上と非常に高く、予後不良との関連についても報告されていることから、**mutp53** は恰好の治療標的であると考えられ、実際に、**mutp53** をノックダウンすることにより癌の進行や悪性度が顕著に抑制される (Iyer et al., *Oncotarget*, 2016)が、**mutp53** を標的とした治療法は、有害事象の問題から未だ実用化には至っていない。

私たちのグループは、**HSP40** ファミリーのひとつである **DNAJA1** が、構造変異型 **mutp53** と結合し、安定化させることで、**mutp53** の分解を抑制し、癌の転移を促進することを明らかにした(Parrales et al., *Nat Cell Biol*, 2016; Kaida et al., *Oncogene*, 2021)。しかしながら、**HSP40** ファミリーには**J-domain** を主体とした共通構造を有する多くのサブタイプ(**J-domain** タンパク質)が存在し、どの**J-domain** タンパク質が **mutp53** の安定化およびその蓄積に関与しているかは分かっていない。

## 2. 研究の目的

本研究課題では、**mutp53** を安定化する **J-domain** タンパク質を明らかにし、同定された **J-domain** タンパク質と **mutp53** との **interaction** の癌の悪性化や転移への影響を解析することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### 細胞株

それぞれ **C176F**、**R175H**、**R248Q** の **p53** 変異を有する頭頸部扁平上皮癌細胞株 **HN31** 細胞、**CAL33** 細胞、**HSC4** 細胞を使用した。いずれの細胞も **10%FBS** およびペニシリン・ストレプトマイシンを含む **DMEM** を用いて培養した。

### siRNA による遺伝子発現抑制

トランスフェクション **48-72** 時間前に **HN31** 細胞を播種し、**siRNA** トランスフェクションには **Lipofectamine RNAiMAX (Thermo Fisher Scientific)** を用いた。トランスフェクション **24** 時間後には培地交換を行った。

各 **J-domain** タンパク質に対する **siRNA** を **pre-designed Silencer Select siRNA (Thermo Fisher Scientific)** より **2** 種類ずつ選択し、**J-domain** タンパク質への **siRNA** ライブラリーを設計した。なお、**negative control siRNA** およびポジティブコントロールとして **TP53** に対する **siRNA** も上記ライブラリー上に配した。

### 蛍光免疫染色

細胞は **4%** パラホルムアルデヒドにて **20** 分間固定した。固定後、細胞は **0.5% Triton-X100** を含む **phosphate-buffered saline (PBS-T)** にて **10** 分間透過処理された。ブロッキングは **3% bovine serum albumin** を含む **PBS-T** にて室温下で **1** 時間行い、その後、抗 **p53** 抗体 (**DO-1, Santa Cruz Biotechnology**) にて **4** で一晩、一次抗体反応を行った。二次抗体反応は、**Alexa488 anti-Mouse IgG** 抗体 (**Thermo Fisher Scientific**) にて室温にて **1** 時間行い、**DAPI** にて核染色をした。**siRNA** ライブラリーにて処理され、染色された細胞は、カスタマイズされたハイスループト顕微鏡システム **IMACS2 (浜松フォトニクス)** にて各 **siRNA** について核および **p53** に対する画像を **9** 視野ずつ自動撮影した。撮影された画像は、**MetaMorph** イメージングソフトウェア (**Molecular Devices**) にて **1** 細胞あたりの蛍光強度を計測し、**p53** 発現レベルの平均値を算出した。算出された値は、**negative control siRNA** にて処理された細胞から得られた値を **1** としてノーマライズした。

### ウエスタンブロッティング

**siRNA** にて処理後、**RIPA** にて細胞よりタンパク質を抽出した。抽出したタンパク質は、**SDS loading buffer** と混和後、ボイルし、泳動サンプルとした。サンプルは **SDS-PAGE** にて分離、メンブレンにブロッティングを行った。ブロッキングは、**5% ECL blocking agent (Cytiva)** を含

む TBS-T にて室温下で 1 時間行い、その後、抗 p53 抗体 (DO-1 または 7F5, Cell Signaling Technologies)、抗 DNAJB14 抗体 (Proteintech)、抗 Vinculin 抗体 (MBL) にて 4 で一晚、一次抗体反応を行った。二次抗体反応は、anti-mouse IgG-HRP または anti-rabbit IgG-HRP 抗体にて室温にて 1 時間行い、化学発光法にて検出を行った。

#### 共免疫沈降

各細胞から NP40 buffer を用いてタンパク質を抽出した。抽出されたタンパク質は、Protein A/G PLUS-Agarose (Santa Cruz Biotechnology) を結合させた Mouse IgG2a isotype control または抗 p53 抗体 (DO-1) と 4 にて一晚インキュベートした。サンプルは PBS にて wash をし、その後、ペレット化させたビーズより SDS loading buffer を用いてタンパク質を溶出させ、泳動サンプルとし、ウエスタンブロッティングを行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) siRNA ライブラリーによるスクリーニング (図 1)

HN31 細胞を各 J-domain タンパク質への siRNA ライブラリーにて処理し、蛍光免疫染色により p53 の発現について評価したところ、すでに mutp53 の安定化因子として同定されている DNAJA1 をノックダウンすることで p53 発現量が減弱することが示され、このアッセイ系がワークしていることが確認された。そこで、他の J-domain タンパク質がノックダウンされたときの p53 発現量を解析したところ、W、X、Y、Z の 4 種類がそれぞれノックダウンされたとき、mutp53 レベルが低下していることが示された。この結果から、DNAJA1 以外の W、X、Y、Z の 4 種類が mutp53 の安定化に寄与し得る候補因子である可能性が示唆された。

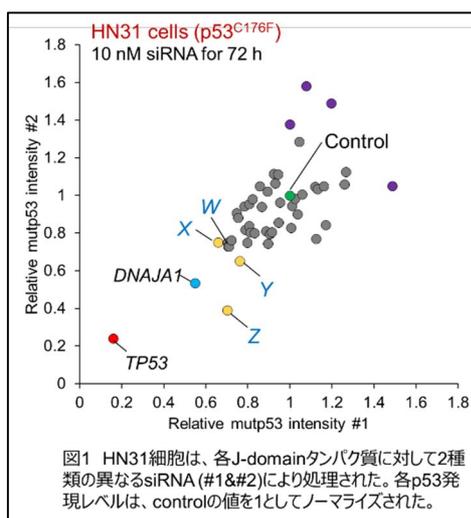


図1 HN31細胞は、各J-domainタンパク質に対して2種類の異なるsiRNA (#1&#2)により処理された。各p53発現レベルは、controlの値を1としてノーマライズされた。

##### (2) 同定された候補因子のバリデーション

上記で同定された候補因子 W、X、Y、Z について更にバリデーションを行うため、蛍光免疫染色に加え、ウエスタンブロッティングを用い、p53 発現への影響を解析した。その結果、特に X、Y、Z をノックダウンしたときに mutp53 の発現レベルが低下することが示され (図 2) これら 3 種類が mutp53 を安定化させるうえで重要な因子である可能性が示唆された。

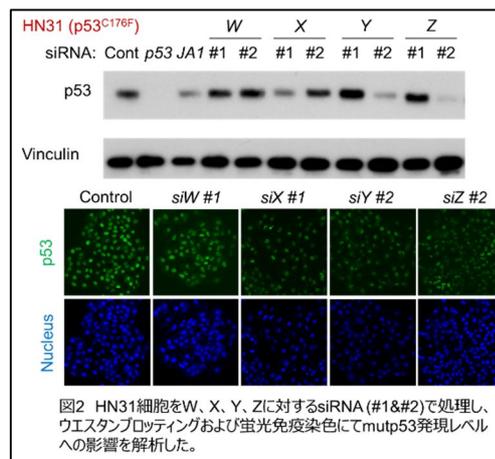


図2 HN31細胞をW、X、Y、Zに対するsiRNA (#1&#2)で処理し、ウエスタンブロッティングおよび蛍光免疫染色にてmutp53発現レベルへの影響を解析した。

##### (3) DNA 結合変異型 p53 に対する候補因子の影響

HN31 細胞は、構造変異型 p53 を有しており、上記実験からは DNAJA1 に加え、X、Y、Z が少なくとも構造変異型 p53 の安定化に寄与していることが示唆された。しかし、DNAJA1 の場合、DNA 結合変異型 p53 に対してはほとんど影響していなかったことから、これら 3 種類の候補因子についても DNA 結合変異型 p53 に対する影響について検討した。(2)で X、Y、Z それぞれで最も効果的であった siRNA を用い、DNA 結合変異型 p53 (R248Q)

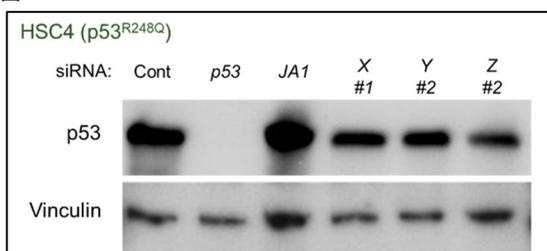


図3 HSC4細胞をX、Y、Zに対するsiRNAで処理し、ウエスタンブロッティングにてmutp53発現レベルへの影響を解析した。

を有する HSC4 細胞を処理したところ、いずれをノックダウンしても p53 発現レベルは大きく影響されないことが示された (図 3)。すなわち、この結果は、X、Y、Z の 3 種類についても

DNA 結合変異型 p53 というよりは、構造変異型 p53 と協調していることを示している。

#### (4) p53 に対する候補因子 Z の結合解析

これまでの結果から 3 種類の候補因子が構造変異型 p53 の安定化に寄与している可能性が示唆されたが、その中でも siRNA による p53 発現への影響が最も大きかった候補因子 Z に着目し、共免疫沈降により mutp53 との結合について解析した。その結果、構造変異型 p53 を有する HN31 細胞、DNA 結合変異型 p53 を有する HSC4 細胞、いずれにおいても Z は mutp53 に結合していることが示唆されたが、構造変異型 p53 のほうが候補因子 Z と強力に結合していることが示された。

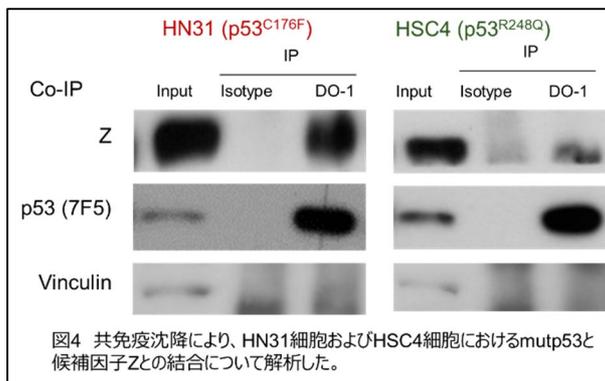


図4 共免疫沈降により、HN31細胞およびHSC4細胞におけるmutp53と候補因子Zとの結合について解析した。

以上の結果から、候補因子 Z は、特に構造変異型 p53 の安定化に寄与し得る HSP40 タンパク質であることが示唆された。現在、進行中ではあるが、実際に候補因子 Z をノックダウンし、mutp53 発現が減弱すると、それに伴って細胞遊走能が低下することも示されつつあり、少なくともがんの転移においては候補因子 Z および mutp53 間の相互作用が重要な役割を果たしていると考えられる。私たちは以前に DNAJA1 が同様に構造変異型 p53 の安定化、さらにはがんの悪性化に寄与することを示しており、次の課題としては、候補因子 Z が DNAJA1 とどのように協調して mutp53 を安定化しているのかを検討するとともに、p53 ステータスについても細胞種によって様々である点からもどのようなステータスにおいて候補因子 Z が協調するかを明らかにする予定である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 5件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Ranjan Atul, Thoenen Elizabeth A., Kaida Atsushi, Wood Stephanie, Van Dyke Terry, Iwakuma Tomoo	4. 巻 15
2. 論文標題 Characterization of an Mtbp Hypomorphic Allele in a Diethylnitrosamine-Induced Liver Carcinogenesis Model	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 4596 ~ 4596
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers15184596	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Nishikawa Shigeto, Kaida Atsushi, Parrales Alejandro, Ranjan Atul, Alalem Mohamed, Ren Hongyi, Schoenen Frank J., Johnson David K., Iwakuma Tomoo	4. 巻 8
2. 論文標題 DNAJA1- and conformational mutant p53-dependent inhibition of cancer cell migration by a novel compound identified through a virtual screen	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell Death Discovery	6. 最初と最後の頁 437
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41420-022-01229-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Alalem Mohamed, Bhosale Mrinalini, Ranjan Atul, Yamamoto Satomi, Kaida Atsushi, Nishikawa Shigeto, Parrales Alejandro, Farooki Sana, Anant Shrikant, Padhye Subhash, Iwakuma Tomoo	4. 巻 14
2. 論文標題 Mutant p53 Depletion by Novel Inhibitors for HSP40/J-Domain Proteins Derived from the Natural Compound Plumbagin	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 4187 ~ 4187
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers14174187	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Kaida Atsushi, Yamamoto Satomi, Parrales Alejandro, Young Eric D., Ranjan Atul, Alalem Mohamed A., Morita Kei-ichi, Oikawa Yu, Harada Hiroyuki, Ikeda Tohru, Thomas Sufi M., Diaz Francisco j., Iwakuma Tomoo	4. 巻 40
2. 論文標題 DNAJA1 promotes cancer metastasis through interaction with mutant p53	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Oncogene	6. 最初と最後の頁 5013 ~ 5025
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41388-021-01921-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Kaida Atsushi、Iwakuma Tomoo	4. 巻 22
2. 論文標題 Regulation of p53 and Cancer Signaling by Heat Shock Protein 40/J-Domain Protein Family Members	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 13527 ~ 13527
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms222413527	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

[学会発表] 計6件(うち招待講演 1件/うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Atsushi Kaida, Masahiko Miura, Tomoo Iwakuma
2. 発表標題 Identification of potential contributors to stabilization of mutant p53 in HSP40 protein family
3. 学会等名 10th International MDM2 workshop (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 戒田篤志、三浦雅彦
2. 発表標題 変異p53の安定化に寄与し得る新規HSP40タンパク質の探索
3. 学会等名 第26回癌治療増感研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 戒田 篤志、岩熊 智雄、三浦 雅彦
2. 発表標題 HSP40/DNAJA1による構造変異型p53の安定化を介した癌転移促進機構の解明
3. 学会等名 第27回癌治療増感研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 戒田 篤志、岩熊 智雄
2. 発表標題 HSP40/DNAJA1による構造変異型p53依存的な癌転移促進機構の解明
3. 学会等名 日本ハイパーサーミア学会第39回大会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 戒田 篤志、三浦 雅彦
2. 発表標題 HSP40ファミリー-DNAJA1と変異p53間のinteractionを介した癌転移促進機構
3. 学会等名 日本歯科放射線学会第232回関東地方会・第40回北日本地方会・第28回合同地方会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Atsushi Kaida, Satomi Yamamoto, Atul Ranjan, Alejandro Parrales, Mohamed Alalem, Tomoo Iwakuma
2. 発表標題 DNAJA1 promotes cancer metastasis through the interaction with misfolded mutant p53
3. 学会等名 2nd International Conference “Cancer Metastasis”（国際学会）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
研究協力者	三浦 雅彦  (Miura Masahiko)		

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	岩熊 智雄  (Iwakuma Tomoo)		
研究協力者	野島 瞳  (Nojima Hitomi)		

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			
米国	Children's Mercy Research Institute			