

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 9 月 16 日現在

機関番号：82504

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23501278

研究課題名(和文) 変異型 p53 の再活性化を介した抗癌剤感受性の向上に関する研究

研究課題名(英文) Enhancement of drug-sensitivity through the reactivation of mutant p53

研究代表者

尾崎 俊文(OZAKI, TOSHINORI)

千葉県がんセンター(研究所)・その他部局等・研究員

研究者番号：40260252

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：Two-hybrid screening 法の結果、コシャペロンであるDnaJC7 が同定された。DnaJC7 は変異型 p53 のみならず、野生型 p53 とも複合体を形成することが判明した。興味深いことに、DnaJC7 は MDM2 の野生型 p53 からの解離を促進し、その安定性および転写活性可能を亢進させた。また、DnaJC7 は、変異型 p53 による野生型 p53 の機能阻害を抑制することが判明した。したがって、変異型と野生型 p53 が共存するがん細胞においては、DnaJC7 を過剰発現させることによって、DNA 損傷性の抗がん剤に対する感受性を向上させうる可能性が期待される。

研究成果の概要(英文)：We have identified co-chaperon human DnaJC7 as one of the binding partners of mutant p53. According to our immunoprecipitation experiments, DnaJC7 was associated with mutant p53 as well as wild-type p53 in mammalian cultured cells. Of note, DnaJC7 promoted the dissociation of MDM2 from wild-type p53, and thereby extended its half-life and stimulated its transcriptional as well as pro-apoptotic activity. In addition, luciferase reporter assays demonstrated that DnaJC7 has an ability to reduce the inhibitory effect of mutant p53 on wild-type p53. Taken together, our present results strongly suggest that DnaJC7 might enhance the drug-sensitivity of malignant cancerous cells through the physical and functional interactions with wild-type p53 and/or mutant p53.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍生物学

キーワード：がん抑制遺伝子

1. 研究開始当初の背景

早期発見、早期治療の普及によって、がんの治癒率は確実に向上しているが、未だに我が国における死因のトップはがんによるものである。従って、難治性のがんを含むがんに対する新たな抗癌剤の開発や治療法の考案などの臨床に直結した応用研究や、それを支える基礎研究に対する国民の期待は大きい。がん治療の困難さの一因には、がん細胞が獲得する抗癌剤に対する耐性という生物学的な現象が存在し、それが治療の現場において大きな問題となっているのが現状である。これまでの国内および国外の研究成果から、DNA 損傷性の抗癌剤（シスプラチンやアドリアマイシン）に反応して、がん細胞死を引き起こす機能を持つ因子はがん抑制蛋白質である p53 であることが明らかになっている。p53 は核内転写制御因子であり、その直接的な標的遺伝子としては、DNA 損傷に反応して細胞周期の停止を誘導する機能を持つ p21 や、ミトコンドリアの機能不全に起因するチトクローム c の放出を介してカスパーゼの活性を昇進させる機能を持つ BAX, PUMA, NOXA および p53AIP1 などが知られている。一方で、50%を越えるがん組織において、機能喪失を伴う遺伝子変異が p53 遺伝子では認められる。p53 遺伝子の変異の 95%は、その DNA 結合ドメインをコードする領域に集積しており、その結果として変異型 p53 は配列特異的な転写因子としての機能を失う。注目すべきは、変異型 p53 の半減期は野生型 p53 に比べて非常に長く安定した蛋白質であることと、変異型 p53 は dominant-negative に野生型 p53 に作用して、その転写活性化能を介したがん細胞死誘導能を著しく阻害することである。p53 はその四量体形成ドメインを介してホモ四量体として機能することから、変異型 p53 による機能阻害のメカニズムの一端は、変異のついていない四量体形成ドメインを介して変異型 p53 が野生型 p53 とヘテロ四量体を形成することにあると言われている。このヘテロ四量体は配列特異的な DNA 結合活性を持たない。つまり、DNA 損傷に反応した正常なレスポンスが変異型 p53 の存在によって遮断されるが故に、p53 の活性化を介したがん細胞死が実行されないことになり、この事実ががん細胞の抗癌剤耐性獲得の分子的基盤であると言える。実際に、変異型 p53 を発現するがん細胞の抗癌剤感受性は極めて低い。p53 の DNA 結合領域に入ったアミノ酸置換を伴う変異は、DNA 結合領域のコンフォメーションを大幅に変換させることにより、p53 の標的配列への結合を阻害すると考えられている。

2. 研究の目的

申請者は、p53 の変異によって誘発される DNA 結合領域のコンフォメーション変化を野生型 p53 の DNA 結合領域のコンフォメー

ションに近い状態に戻すことによって、変異型 p53 の再活性化が可能になるのではないかという着想に至った。本研究は変異型 p53 の再活性化を可能にする蛋白質を探索することによって、変異型 p53 を発現し抗癌剤耐性を獲得した悪性のがん細胞の抗癌剤感受性の向上に貢献することを目的とする。

3. 研究の方法

p53 のホットスポット変異である R175H および R273H を持つヒト乳癌由来の細胞株である HCC13965 および MDA-MB-468 細胞より、それぞれ RNA を抽出し cDNA に逆転写した後、その産物を鋳型にして変異を含む DNA 結合領域および変異を含まないカルボキシル末端領域をコードする cDNA を PCR 法によって増幅し、酵母のバイト用のベクターである pGBKT7 のマルチクローニングサイトに in frame になるように挿入し、ベクター特異的なプライマーを用いて cDNA 断片のシーケンスを行ない PCR 法による人為的な変異の有無を調べる。さらに、このベクターに存在する T7 プロモーターから in vitro 転写 / 翻訳を行ない、その産物を SDS-ポリアクリルアミドゲルで展開し、抗 GAL4DBD 抗体を用いたウエスタン解析を行ない期待に沿う産物が合成されているかどうかを検討する。人為的な変異がなく、また期待通りの産物を合成し得る cDNA を含むベクターを以下の two-hybrid screening に使用する。

酵母の形質転換には四種類のレポーター (ADE2, HIS3, lacZ, MEL1) を有する AH109 株を用いる。従来法に比べて、レポーター遺伝子の種類が増えているので偽陽性を拾う可能性は低いと期待される。リチウムクロライド法を用いて、バイト用ベクターとヒト脳由来の cDNA ライブラリーを含むベクターを AH109 株に導入し、選択培地で培養する。陽性クローンが得られたら、そのクローンよりライブラリーを含むベクターを調製し、再びバイト用ベクターと得られたベクターを AH109 株に導入し、再現性の有無を調べる。再現性が得られたら、ライブラリー由来の cDNA のシーケンスを行ない、遺伝子の同定を実施する。

バイト用ベクターおよび同定された遺伝子を含むライブラリーベクターを用いて、in vitro 転写 / 翻訳反応を行ない、両産物を混合して抗 GAL4DBD および抗 GAL4AD 抗体を用いて in vitro pull-down assay を行ない、両者の結合の有無を調べる。

上記の in vitro pull-down assay の結果は、あくまでフラグメント間の結合を確認するものなので、全長の変異型 p53 および目的とする遺伝子に対応する cDNA を RT-PCR 法を用いてクローニングし、哺乳類細胞用の発現ベクターに挿入し、ベクター由来のプライマーを用いてシーケンスを行ない PCR 反応によるエラーがないことを確認する。その際

に、この遺伝子がコードする蛋白質に対する抗体が市販されていない場合には、この遺伝子のアミノ末端に FLAG tag を導入しておく。

上記の発現ベクターを p53-deficient なヒト肺癌由来の細胞株である H1299 細胞に導入し、過剰発現を行ない、抗 p53 抗体および抗 FLAG 抗体を用いて免疫沈降反応を実施し、細胞内における両者の結合の有無を検討する。両者の結合が確認されたら、この遺伝子がコードする蛋白質に対する抗体が市販されていない場合には、その抗体の作成を外注する。

目的とする蛋白質による変異型 p53 の転写活性化能の回復を検討する目的で、変異型 p53 を発現する乳癌由来の MDA-MB-468 細胞においてこの蛋白質を過剰発現させた後に、全 RNA を回収して p53 の標的遺伝子群である p21, BAX, PUMA, NOXA, p53AIP1 の発現レベルの変化を RT-PCR 法を用いて検討する。さらに、ルシフェラーゼレポーター法を用いて、RT-PCR 法で得られた実験結果の妥当性の有無を調べる。

4 . 研究成果

酵母の two-hybrid screening 法の結果、コシャペロン機能を持つ DnaJC7 が同定された。哺乳動物由来の培養細胞を用いた免疫沈降法によると、DnaJC7 は変異型 p53 のみならず、野生型 p53 とも複合体を形成することが判明した。興味深いことに、DnaJC7 は MDM2 の野生型 p53 からの解離を促進し、その安定性および転写活性可能を亢進させることが明らかになった。また、DnaJC7 は変異型 p53 による野生型 p53 の機能阻害を抑制することが判明した。したがって、変異型と野生型 p53 が共存するがん細胞においては、DnaJC7 を過剰発現させることによって、変異型 p53 の野生型 p53 に対する負の効果を抑制させ、その結果として DNA 損傷性の抗がん剤に対する感受性を向上させうる可能が期待される。

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6件)

Kubo N, Wu D, Yoshihara Y, Sang M, Nakagawara A, Ozaki T. (査読有り)
Co-chaperon DnaJC7/TPR2 enhances p53 stability and activity through blocking the complex formation between p53 and MDM2.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 2013, 430: 1034-1039.

Ozaki T., Wu D, Sugimoto H, Nagase H, Nakagawara A. (査読有り)
Runt-related transcription factor 2 (RUNX2) inhibits p53-dependent apoptosis through

the collaboration with HDAC6 in response to DNA damage.

Cell Death Dis., 2013, e610.

Zhu Y, Li Y, Haraguchi S, Yu M, Ohira M, Ozaki T., Nakagawara A, Ushijima T, Isogai E, Koseki H, Nakamura Y, Kong C, Mehlen P, Arakawa H, Nakagawara A.

(査読有り)

Dependence receptor UNC5D mediates nerve growth factor depletion-induced neuroblastoma regression.
J. Clin. Invest., 2013, 123: 2935-2947.

Ando K, Ozaki T., Hirota T, Nakagawara A.

(査読有り)

NFBD1/MDC1 is phosphorylated by PLK1 and controls G2/M transition through the regulation of a TOPOII α -mediated decatenation checkpoint.
PLoS One, 2013, e82744.

Taniguchi M, Fujiwara K, Nakai Y, Ozaki T., Koshikawa N, Kojima T, Kataba M, Oguni A, Matsuda H, Yoshida Y, Tokuhashi Y, Fukuda N, Ueno T, Soma M, and Nagase H.

(査読有り)

Inhibition of malignant phenotypes of human osteosarcoma cells by a gene silencer Pyrrole-Imidazole polyamide targeting E-box.
FEBS Open Bio, 2014, 4: 328-334.

Shimozato O, Waraya M, Nakashima K, Soda H, Takiguchi N, Yamamoto H, Takenobu H, Uehara H, Ikeda E, Matsushita S, Kubo N, Nakagawara A, Ozaki T., Kamijo T. (査読有り)

Receptor-type protein tyrosine phosphatase κ (PTPRK) directly dephosphorylates CD133 and regulates downstream AKT activation.
Oncogene, 2014, in press.

[学会発表](計2件)

Ozaki T., Sugimoto H, Nakagawara A, Nagase H. RUNX2 inhibits p53-dependent apoptosis following DNA damage in collaboration with HDAC6. 日本癌学会、2013年10月4日、横浜

Ando K, Ozaki T., Hirota T, Nakagawara A. Phosphorylation of NFBD1/MDC1 by plk1 regulates decatenation checkpoint-mediated G2/M transition. 日本癌学会、2013年10月4日、横浜

[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
なし。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

千葉県がんセンター研究所 室長
尾崎 俊文 (OZAKI, Toshinori)

研究者番号：40260252

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：