

機関番号：82606

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590375

研究課題名(和文)新規 p63 - MYC 経路の異常を介した上皮がん悪性転換機構の解明

研究課題名(英文) Malignant conversion of epithelial cancers through dysregulation of the p63-MYC pathway

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・主任研究員

研究者番号：80311372

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000 円、(間接経費) 1,170,000 円

研究成果の概要(和文)：がん細胞は、正常な細胞に様々な遺伝子変化が起こることで発生します。特に、転移能を獲得し悪性化に向かう切っ掛けとなる遺伝子変化を突き止めることは、がんの本態を解明する上で極めて重要です。

私の研究は、上皮細胞が増殖する上で必須の役割を持つ p63 という因子が、がんの発生初期では細胞の増殖を促す“がん遺伝子”として働く一方、細胞が転移能を獲得するのを防ぐ“がん抑制遺伝子”として働く可能性を見出しました。がん化の過程で MYC というがん遺伝子産物が過剰になると、p63 を失っても細胞は増え続け且つ転移能を獲得するという悪性化の仕組みを初めて提唱しました。

研究成果の概要(英文)：Cancer cells evolve from normal cells through multiple genetic alterations. In particular, identification of a genetic cause behind the acquisition of the metastatic ability is very important for elucidating the nature of cancer.

In this study, I have found the possibility that p63, master regulator of epithelial development and stemness maintenance, acts as both an oncogene and tumor suppressor by increasing the proliferative capacity of cells while constraining metastatic tumor progression in early stages of carcinogenesis. I propose, for the first time, that up-regulation of c-MYC oncogene cancels the proliferative defect induced by p63 loss, thereby triggering malignant conversion in late stages of epithelial cancer development.

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 癌 悪性化 幹細胞性 発現制御 p63 MYC

1. 研究開始当初の背景

研究代表者らは、p53 ファミリーの一員である p63 が NOTCH1 遺伝子の転写抑制を介して正常角化細胞及び扁平上皮がん細胞の自己複製能の維持に働くことを明らかにした {Cancer Res. 2010 May 15;70(10):4034-44}。p63 は重層扁平上皮組織の発生・分化制御におけるマスター遺伝子である。p63 には異なる複数のアイソフォームが存在するが、N 末の転写活性化ドメインを欠いた Np63 アイソフォームが同組織の基底層で独占的に発現しており、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らないが、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において p63 の高発現が約 50%以上の症例で認められており、がん遺伝子として機能する可能性が示唆されている。一方で、p63 の発現低下や機能抑制とがんの進展・予後不良との相関が示されており、発がんにおける p63 の二面性が指摘されているものの、その詳細は不明である。特に、p63 の発現低下による細胞増殖能の喪失が回避され、浸潤・転移能の獲得へ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かった。

研究代表者の予備的結果から、正常上皮細胞において p63 が c-MYC 遺伝子の発現制御に関わる可能性を得た。また、複数の上皮がん細胞株を用いて p63 と c-MYC の発現解析を行ったところ、p63 の発現低下が認められるがん細胞株においては c-MYC の発現レベルが顕著に亢進していた。これらの結果から、p63 は正常上皮細胞において c-MYC の発現誘導を介して幹細胞性の維持に働き、がん化過程において一旦 c-MYC の過剰発現が引き起こされれば p63 の機能消失を許容する成因となり、悪性転換の引き金になるという仮説を立てた。即ち、c-MYC の発現量増加が p63 のがん化における機能表現を転換させる分子スイッチとして働くことと着想した。

2. 研究の目的

本研究では“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転換”とのギャップを埋める分子基盤を明らかにし、広く上皮がん悪性化の鍵となる機構の解明を目的とする。

3. 研究の方法

発がんにおける p63 の発現異常の意義は未解明である。本研究では上皮細胞の増殖能・幹細胞性維持に重要な p63 の標的遺伝子を同定し、発がん過程における遺伝子変化の結果 p63 非依存的にこの標的遺伝子発現が制御されることが、p63 機能消失を許容する成因となり悪性転換の引き金となりうることを実験的に検証した。

(1) p63 による c-MYC 遺伝子の発現制御：c-MYC が p63 の標的遺伝子候補となる可能性

を検討した。

TRANSFAC プログラムを用いて c-MYC 遺伝子の転写制御領域を解析した。

ヒト正常子宮頸部上皮細胞を用いて、p63 (Np63) を過剰発現またはノックダウンした場合の内在性 c-MYC の発現レベルをウェスタンブロット法により調べた。

(2) 上皮幹細胞性の維持における p63-MYC 経路の重要性：研究代表者らは、正常上皮角化細胞において p63 発現をノックダウンすると細胞増殖能が欠損することを既に明らかにしている。これまで p63 に特異的な標的として複数の遺伝子が同定されているが、それらの上皮幹細胞性維持における重要性は解明されていない。

正常子宮頸部または皮膚由来の角化細胞を用いて、c-MYC を外来性に発現導入することで、p63 ノックダウンによる細胞増殖能の喪失が回避・軽減されるか検討を行った。細胞増殖能は単層培養系における増殖アッセイとクローン性コロニー形成アッセイによって調べた。

p63 を高発現する複数の上皮がん細胞株においても(2)と同様のレスキュー実験を行い、がん細胞においても p63 が c-MYC の発現制御を介して増殖能を維持するか否か検討した。

(3) p63-MYC 経路の異常と悪性転換との関連：研究代表者のこれまでの結果から、p63 の発現低下が認められる上皮がん細胞株群ではほぼ共通して c-MYC の高発現が観察されており、p63 のノックダウンに耐性であることが分かっている。そこで c-MYC の高発現が上皮がん細胞の p63 非依存的増殖能を付与し、悪性転換へのスイッチ機序となっているか検討を行った。

研究代表者らはヒト正常子宮頸部上皮細胞や舌上皮細胞を基にウイルス性がん蛋白を始め種々のがん遺伝子を導入することで、子宮頸がん・口腔がんの多段階発がんモデルを樹立している {Cancer Res. 2008 Jul 15;68(14):5699-705, Am J Cancer Res. 2011;1(7):869-81}。このモデル細胞を用いてマウス皮下における腫瘍原性を評価したところ、活性型(変異)RAS に加えて c-MYC を導入した場合に高い造腫瘍能が付与されることを明らかにした。これは、c-MYC が腫瘍形成細胞の成立あるいは上皮幹細胞性の成立・維持に役割を持つことを示唆している。このモデル細胞系列において c-MYC と p63 (Np63) の発現レベルをウェスタンブロット法により調べた。

上記モデル細胞系列を用いて p63 ノックダウンによる細胞増殖能への影響をクローン性コロニー形成能を指標に調べた。

c-MYC を過剰発現する正常子宮頸部上皮細胞において p63 をノックダウンした場合、浸潤能が付与されるか否か三次元培養の組

織像を指標に解析を行った。

(4) c-MYC による p63 発現制御の可能性 : c-MYC の高発現によって p63 の機能が消失しても細胞増殖能が維持され、更に増殖優位性が獲得された場合、p63 発現の低下した細胞集団が選択的に増殖してくる可能性が考えられる。

上記多段階発がんモデル細胞系において、c-MYC の過剰発現によって内在性 p63 の発現が低下した細胞が出現・維持されるか検討した。

c-MYC の発現亢進による内在性 p63 発現への効果を検討するため、テトラサイクリン発現誘導系を用いてドキシサイクリン濃度依存的に c-MYC の発現誘導が可能な細胞系列を樹立した。この系を用いて c-MYC 発現誘導後の内在性 p63 発現レベルをウェスタンブロット法により調べた。

4. 研究成果

(1) TRANSFAC プログラムを用いて c-MYC 遺伝子の転写制御領域を解析したところ、転写開始点上流 -318bp の領域にヒト、マウス、ラット間で保存されている p63(p53)結合候補配列を見出した。ヒト正常子宮頸部上皮細胞を用いて、p63(Np63)を過剰発現したところ内在性 c-MYC の発現亢進が認められ、p63 を shRNA を用いてノックダウンしたところ c-MYC の発現レベルが有意に低下した。

従って、p63 によって c-MYC 発現が正に制御されることが示された。

(2) 正常子宮頸部または皮膚由来の角化細胞や p63 を高発現する複数の子宮頸がん細胞株において p63 発現をノックダウンすると壊滅的な細胞増殖抑制が誘導されることを確認した。この細胞増殖能の喪失は c-MYC の過剰発現によってほぼ完全に回避され、クローン性増殖能の顕著な亢進が観察された(図 1)。

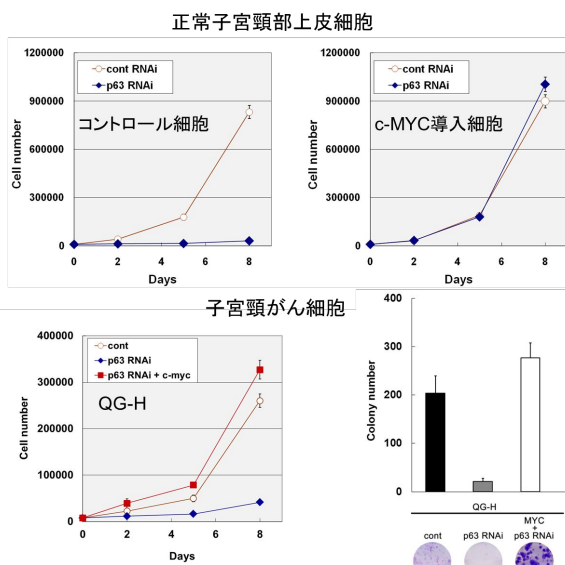


図1 c-MYCの過剰発現はp63欠損による細胞増殖能の喪失を回避する

p63 ノックダウン後に再増殖してきたコントロール細胞集団では p63 と c-MYC の発現回復が認められたのに対し、c-MYC 導入細胞では p63 の発現消失が細胞継代後も維持された(図 2)。また、コントロール細胞で認められた p63 ノックダウンによる分化マーカーの発現亢進が、c-MYC 導入細胞では観察されなかった。

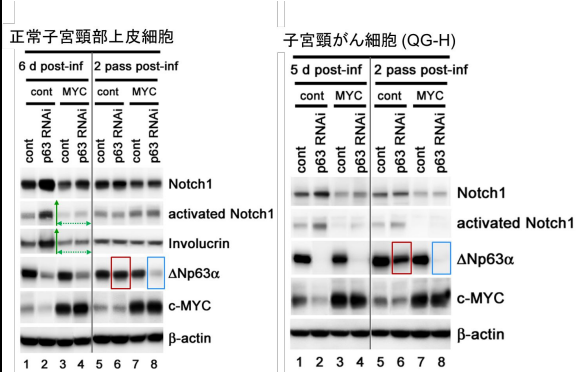


図2 c-MYC導入細胞ではp63の発現消失状態が維持される

このことから、p63 による細胞増殖能の維持には c-MYC が主要な役割を果たすことが示された。

(3) 子宮頸がん多段階発がんモデル細胞系においてウイルス性がん蛋白 E6, E7, 活性型 RAS に加えて c-MYC を導入した場合三次元培養系で浸潤像が観察され(図 3A)、このとき内在性 p63 発現レベルの低下が認められた(図 3B)。

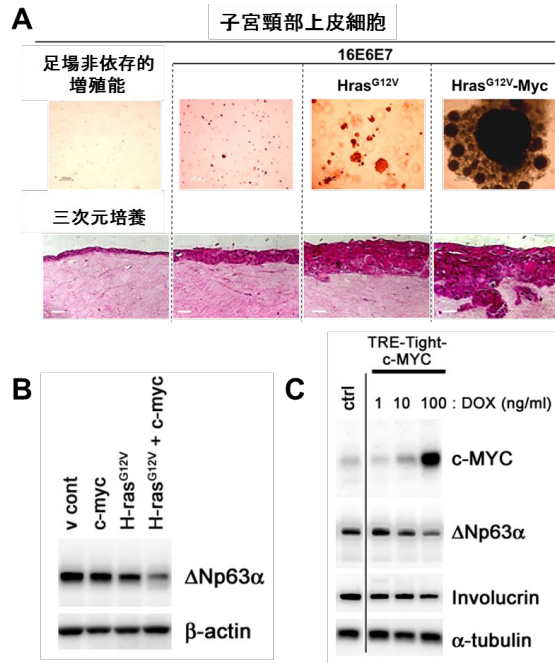


図3 子宮頸がん多段階発がんモデルと c-MYC発現誘導系

c-MYC まで導入した細胞では、p63 ノックダウンによるクローン性増殖能の損失が認められなかった。また、この c-MYC まで導入した細胞を分化誘導培地で培養し、分化抵抗性を獲得した細胞集団を選択したところ、ほぼ全ての細胞が腫瘍形成能を獲得すると共に

三次元培養系での浸潤像がよりアグレッシブなものとなったが、この細胞では p63 の発現低下がより顕著であった。

c-MYC を過剰発現する正常子宮頸部上皮細胞において p63 をノックダウンした場合、三次元培養系において浸潤像が観察された。

これらの結果から、c-MYC が高発現し p63 の発現低下が起きた細胞では、p63 非依存性の増殖能が付与されると同時に、悪性形質を獲得することが明らかとなった。

(4) c-MYC まで発現導入した多段階発がんモデル細胞では、p63 発現が低下した状態を維持して増殖能が保持された。p63 の発現低下がどのタイミングで認められるかを検討するため、ドキシサイクリン濃度依存的に c-MYC の発現誘導が可能な細胞系列を樹立し、c-MYC を異なる発現レベルで誘導して 3 日後の内在性 p63 の発現レベルを解析した。c-MYC の発現誘導レベルを最も高くしたものは、子宮頸がん細胞株 HeLa のそれと同等になるよう調節した。HeLa 細胞では c-MYC の遺伝子増幅が知られており、p63 の発現に関しては検出限界以下にまで低下していることを確認した。c-MYC を発現誘導 3 日後には、p63 の発現低下が観察され、c-MYC と p63 の発現レベルは逆相関を示した (図 3C)。このことから p63 による c-MYC 発現制御に加え、c-MYC によって p63 発現が負に制御されることが示され、p63 と c-MYC の間に発現制御ループが存在する新たな可能性を見出した。

以上の結果から、c-MYC の高発現が p63 の機能消失による幹細胞性の破綻・分化誘導を回避し、上皮性腫瘍悪性化の分子基盤となることを実験的に明らかにした。

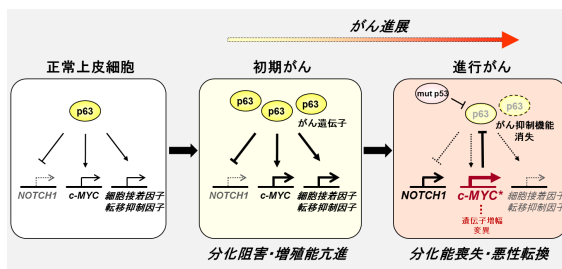


図4 p63-MYC経路の異常と扁平上皮がん進展モデル

これまでに研究代表者は、p63 が NOTCH1 プロモーター上に存在する p53/p63 応答配列への直接結合を介して転写抑制因子として機能することを見出している { Mol Cell Biol. 2007 May; 27(10):3732-42, Cancer Res. 2010 May 15; 70(10):4034-44 }。p63 は p53 依存性ならびに非依存性の NOTCH1 発現を阻害することで細胞分化を負に制御し、クローン性増殖能の維持に働くことを示した。本研究結果と総合して、多くの扁平上皮がん症例で高頻度に高発現が認められている p63 は、少なくとも部分的には NOTCH1 の不活化と c-MYC の発現誘導を介してがん遺伝子として機能することを明らかにした。一方、膀胱がん・前

立腺がん・頭頸部がんなどの扁平上皮がんにおいて p63 の発現低下は予後不良因子であることが報告されており、p63 の発現低下とがんの進展・悪性化との関連が示唆されている。p63 には複数のアイソフォームが存在しており、N 末の転写活性化ドメインを有する TAp63 アイソフォームは、がん抑制機能を持つことが知られている。従って、p63、特に TAp63 アイソフォームの機能消失が悪性化の促進に繋がったと推測される。それぞれのアイソフォーム間で相反あるいは重複する働きが知られており、それらの役割の詳細は依然未解明であるものの、アイソフォームの発現や活性のバランスによって p63 の発がんにおけるユニークな特徴が決定付けられる可能性がある。

しかしながら、p63 は幹細胞性の維持に必須の役割を果たしており、p63 の機能消失による細胞増殖への影響、即ちがん細胞株によっては正常上皮細胞と同様に増殖能を維持する上で致命的になること、またその回避機構の実体については未解明であった。本研究では、がん化過程で起こるそのような代償機構として c-MYC に着目し、c-MYC 高発現下では p63 消失による細胞増殖能の喪失が回避されると同時に、浸潤能が獲得されることを明らかにした。本研究結果から、p63 の発現パターン変化はがん化ステージを反映している可能性が得られた (図 4)。即ち、高頻度に認められるものの比較的予後が良いとされる p63 を高発現するがんは初期段階にあり、幹細胞性の要となる c-MYC の発現は p63 依存的に制御され、p63 はがん遺伝子として働く。がん化過程で起こる遺伝子変化によって c-MYC が高発現すると p63 消失が許容され、p63 のがん抑制機能が失われることで悪性転換へと繋がる可能性がある。また、c-MYC によって p63 発現が負に制御されたことから、c-MYC 過剰発現後の p63 発現消失は、増殖優位性によって特定の細胞集団が選択された結果見られるものではない可能性も新たに示唆された。

今後、p63 発現消失が見られる実際のがん細胞において、p63 のプロモーター状態や転写活性を詳細に解析していく。更に、臨床検体を用いて p63 と c-MYC の発現レベルを免疫組織化学的に解析し、がん化過程における p63 の発現パターン変化と c-MYC レベルとの相関関係、並びに悪性度・予後との関連を調べる予定である。最終的には p63-MYC 経路の異常に着目し、上皮性腫瘍の悪性化に対する新たな診断応用を目指す。

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 7 件)

Iwahori S, Kohmon D, Kobayashi J, Tani

Y, Yugawa T, Komatsu K, Kiyono T, Sugimoto N, Fujita M.
ATM regulates Cdt1 stability during the unperturbed S phase to prevent re-replication.
Cell Cycle. 13(3):471-481, 2014
DOI: 10.4161/cc.27274.
(査読あり)
Yugawa T, Nishino K, Ohno S, Nakahara T, Fujita M, Goshima N, Umezawa A, Kiyono T.
Noncanonical NOTCH signaling limits self-renewal of human epithelial and induced pluripotent stem cells through ROCK activation.
Mol Cell Biol. 33(22):4434-4447, 2013
DOI: 10.1128/MCB.00577-13.
(査読あり)
Nishimoto N, Watanabe M, Watanabe S, Sugimoto N, Yugawa T, Ikura T, Koiwai O, Kiyono T, Fujita M.
Heterocomplex formation by Arp4 and -actin is involved in the integrity of the Brg1 chromatin remodeling complex.
J Cell Sci. 125(Pt 16):3870-3882, 2012
DOI: 10.1242/jcs.104349.
(査読あり)
Narisawa-Saito M, Inagawa Y, Yoshimatsu Y, Haga K, Tanaka K, Egawa N, Ohno S, Ichikawa H, Yugawa T, Fujita M, Kiyono T.
A critical role of MYC for transformation of human cells by HPV16 E6E7 and oncogenic HRAS.
Carcinogenesis. 33(4):910-917, 2012
DOI: 10.1093/carcin/bgs104.
(査読あり)
Egawa N, Nakahara T, Ohno S, Narisawa-Saito M, Yugawa T, Fujita M, Yamato K, Natori Y, Kiyono T.
The E1 protein of human papillomavirus type 16 is dispensable for maintenance replication of the viral genome.
J Virol. 86(6):3276-3283, 2012
DOI: 10.1128/JVI.06450-11.
(査読あり)
Zushi Y, Narisawa-Saito M, Noguchi K, Yoshimatsu Y, Yugawa T, Egawa N, Fujita M, Urade M, Kiyono T.
An in vitro multistep carcinogenesis model for both HPV-positive and -negative human oral squamous cell carcinomas.
Am J Cancer Res. 1(7):869-881, 2011
URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3196285/>
(査読あり)
Sugimoto N, Yugawa T, Iizuka M, Kiyono T, Fujita M.
Chromatin remodeler sucrose

nonfermenting 2 homolog (SNF2H) is recruited onto DNA replication origins through interaction with Cdc10 protein-dependent transcript 1 (Cdt1) and promotes pre-replication complex formation.
J Biol Chem. 286(45):39200-39210, 2011
DOI: 10.1074/jbc.M111.256123.
(査読あり)

[学会発表](計 6件)

温川恭至、大野真一、中原知美、藤田雅俊、五島直樹、清野 透

Non-canonical NOTCH signaling limits self-renewal of human keratinocytes through ROCK activation. (非古典的 NOTCH シグナルは ROCK の活性化を介して角化細胞の自己複製能を制限する)

第 36 回 日本分子生物学会年会
示説発表 2013 年 12 月 4 日 神戸

温川恭至、大野真一、中原知美、藤田雅俊、五島直樹、清野 透

Non-canonical NOTCH signaling integrates into ROCK activation to induce differentiation of human keratinocytes. (非古典的 NOTCH シグナリングによる ROCK の活性化と角化細胞分化)

第 72 回 日本癌学会学術総会
口演 2013 年 10 月 5 日 横浜

Yugawa T, Kiyono T

Molecular mechanisms dictating the biological outcome of p63 loss in human keratinocytes.

The 6th International p63/p73 Workshop
招待口演 2013 年 9 月 17 日 Kazusa
Akademia Park

温川恭至、藤田雅俊、清野 透

Dysregulation of the p63-MYC pathway in the development of squamous cell carcinomas. (扁平上皮がん発生における p63-MYC 経路の異常)

第 71 回 日本癌学会学術総会
口演 2012 年 9 月 19 日 札幌

温川恭至、藤田雅俊、清野 透

c-MYC over-expression cancels the proliferative defect triggered by p63 loss in keratinocytes. (c-MYC の過剰発現は p63 欠損による角化細胞増殖能の喪失を回避する)

第 70 回 日本癌学会学術総会
示説発表 2011 年 10 月 3 日 名古屋

Yugawa T, Kiyono T

Regulation of Notch1 gene expression by p53 family members and its disruption by HPV-16 E6.

ICGEB (International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology) DNA Tumour Virus Meeting

口演 2011 年 7 月 23 日 Trieste, Italy

〔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・主任研究員
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：