

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592827

研究課題名(和文) 口腔癌進行における p63 の発現消失と Wnt シグナルの活性化

研究課題名(英文) Activation of Wnt/beta-catenin signaling by the loss of p63 in malignant oral cancers

研究代表者

倉田 俊一 (Kurata, Shun-ichi)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・准教授

研究者番号：60140901

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000 円

研究成果の概要(和文)：TP63(p63)はTP53(p53)がん抑制遺伝子ファミリーの1つで、外胚葉性上皮組織(皮膚や口腔)の発生に不可欠な遺伝子である。p63は多くの口腔癌の高分化型で高発現するが、浸潤した細胞では消失するので、悪性を抑えると推測される。本研究では癌の浸潤と関係するWnt/β-cateninシグナル伝達とその標的遺伝子発現からp63の作用を解析した。その結果、p63はシグナル伝達には影響せず、主要p63タンパク質(ΔNp63α)がTCF(DNA結合タンパク質)と相互作用し、Wnt標的遺伝子の活性化を阻害することがわかった。p63はこの作用により口腔癌の進行を抑制する可能性が高い。

研究成果の概要(英文)：TP63 (p63), a member of the tumor suppressor TP53 (p53) gene family, is essential for development of ectodermal tissues including skin and head-and-neck. Although p63 is highly expressed in well-differentiated oral carcinomas, it disappears in invasive cancers, leading to the hypothesis that p63 suppresses malignant conversion. We studied how p63 controls the Wnt/beta-catenin signaling pathway in oral carcinoma cell lines by analyzing the pathway proteins as well as the target gene expression. The results indicate that the major p63 protein, DeltaNp63alpha, represses Wnt/beta-catenin target gene expression, by interacting with TCF-4, a Wnt target sequence-specific DNA binding protein. Malignant progression of oral cancers may be blocked by this function of p63.

研究分野：細胞生物学

キーワード：p63 扁平上皮癌

## 1. 研究開始当初の背景

p63(TP63)遺伝子は外胚葉性上皮組織発生において、ケラチノサイト幹細胞で発現し、幹細胞が分化能と増殖能を維持するために不可欠な遺伝子である。また、口腔癌を含む頭頸部扁平上皮癌で高発現するが、浸潤癌では消失し、癌の高分化型の維持に重要な役割を果たすと考えられている。

p63 タンパク質には TA 型と N 型という N 末端が異なるアイソフォームがあり、さらに C 末端には、  
、  
のスプライス・バリエーションが存在する。これら p63 タンパク質は核内で遺伝子発現を制御するが、多様な機能による様々な転写制御機構が考えられた。

特に、種々の系譜の浸潤癌でしばしば活性化されている Wnt/  
-カテニンのシグナル伝達系に関しては、p63 がその経路を(1)活性化する(引用文献 1)、(2)抑制する(引用文献 2)、という対立する研究結果が報告されていた。癌と p63 の関連を明らかにするには、Wnt/  
-カテニンのシグナル伝達系をどのように制御するかについて明確にすることは重要であると考えられた。

## 2. 研究の目的

口腔癌など扁平上皮浸潤癌において上皮幹細胞決定(維持)因子である p63 が発現消失することにより、Wnt/  
-カテニン・シグナル伝達経路が活性化され、癌細胞の悪性化を引き起こす可能性があることを明らかにする。

## 3. 研究の方法

頭頸部由来扁平上皮癌細胞 FaDu および HSC1 を用いて次の事項について解析した。

(1) p63 ノックアウトによる遺伝子発現プロファイルの変化を解析した。p63 標的 siRNA (p63si) および標的のない siRNA (Csi) をトランスフェクションにより細胞に導入し、RNA を精製した。遺伝子チップによる発現解析を行った。

(2) Wnt/  
-カテニン・シグナル伝達経路の変化を解析した。細胞を可溶化し、細胞質・核に分画して、ウエスタンブロット法によりタンパク質の局在、リン酸化を解析した。また、免疫沈降によってタンパク質の会合を検出した。

(3) WRE 依存性の遺伝子発現を luc (ルシフェラーゼ) レポーター・アッセイにより解析する。Wnt/  
-カテニン応答因子(WRE, Wnt/beta-catenin response element)を 3 コピーもつ pGL3-OT および WRE を変異させた pGL3-OF を用いた。さらに、標的遺伝子の調節領域の推定 WRE 配列を PCR で増幅し、luc プラスミドに連結して、  
-カテニン応答性と p63 による制御を解析した。

(4) クロマチン免疫沈澱 (ChIP) により標

的配列とタンパク質結合を解析した。p63、  
-カテニンおよび TCF-4 の抗体を用いて ChIP 解析を行った。Wnt 標的遺伝子の制御領域にプライマーを設計し、タンパク質と共沈殿した DNA 断片を検出した。MMP7 および CCND2 のゲノム上 WRE 部位を標的とするプライマーを設計し、定量 PCR (qPCR) を行った。

## 4. 研究成果

### (1) 遺伝子発現プロファイルの変化

FaDu および HSC1 細胞での p63 ノックアウトに伴う遺伝子発現の変化を次に要約する。(i) p63 標的遺伝子として報告された遺伝子の発現が低下した。(ii) p53 標的配列の中にも発現が低下する者があった。(iii) 未分化ケラチノサイト特異的遺伝子の発現が低下し、分化ケラチノサイトの発現が上昇した。(iv) Wnt 標的遺伝子の中で、MMP7 (matrix metalloproteinase-7)、AXIN2/CONDUCTIN などが p63 ノックアウトにより 3-5 倍発現上昇したが、一方で CCND2 (Cyclin D2)、SNAI2/SLUG などは 1/2 - 1/3 倍に低下した。

このように、ノックアウトと遺伝子発現プロファイル解析によってこれまでの研究結果を支持するデータが得られたが、Wnt 標的遺伝子に関しては、p63 による促進と抑制という 2 つの異なる結果が検出された。

### (2) Wnt/ -カテニン・シグナル伝達経路

p63 発現細胞での p63 ノックアウトにより  
-カテニンの核移行に変化は見られなかった。また、GSK-3β のリン酸化や、その制御に関わるホスファターゼ酵素活性にも影響はなかった。核抽出液での免疫沈降では p63 の主要アイソフォームである Np63 と TCF-4 会合が検出された。

### (3) WRE 依存性の遺伝子発現の制御

pGL3-OT を用いると、HEK293 および HeLa 細胞で Np63 が WRE を介して転写を活性化するという結果が得られた。しかも、  
-カテニン依存的な活性化であり、引用文献 1, 2 の結果と一致した。しかし、pGL3-OT には WRE の上流に p53 ファミリーの結合モチーフに類似した配列(p53FM と呼ぶ)が存在し、それを削除すると、p63 による活性化は消失し、むしろ抑制作用が現れた。実際、pGL3-OT を使って SAOS-2 細胞で実験を行うと、Np63 が明確な抑制作用を示した。pGL3-OT は Wnt/  
-カテニン・シグナル伝達経路の活性化を鋭敏に検出するプラスミドとして世界的によく用いられているが、p63 とともに上皮系の細胞で使用した場合、p53FM が関与する何らかの反応がおり、luc の発現を促進すると推定される。このことが過去の 2 つの研究(引用文献 1, 2) および研究代表者らの初期の研究を誤った方向に導いたと考えられる。

次に、MMP7 および CCND2 の制御領域に存在する WRE に関して luc アッセイを行うと、定常状態でも、 $\beta$ -カテニンによる活性化状態でも、p63 による抑制が検出された。これらの結果は、p63、特に Np63 が WRE を介する転写を抑制することを強く示唆した。

#### (4) クロマチン免疫沈澱 (ChIP)

FaDu 細胞で実験を行うと、MMP7 の転写開始点の 5.6 kbp 上流にある WRE では、p63 と TCF-4 の結合が検出された。p63 をノックアウトすると、p63 の結合は消失し、 $\beta$ -カテニンが強く結合するようになった。MMP7 の上流 WRE では Wnt/ $\beta$ -カテニンによる転写制御が可能で、p63 により抑制されていると考えられた。この ChIP 解析の結果は(1)で得られた、「p63 ノックアウトによる MMP7 の活性化」という結果と対応していた。

luc アッセイで  $\beta$ -カテニン応答性を示した CCND2 の WRE 配列で同様の実験を行ったが、その部位には TCF-4、p63、 $\beta$ -カテニンのいずれも結合していなかった。少なくともこの WRE は FaDu 細胞の染色体上では Wnt/ $\beta$ -カテニンには応答していないと考えられた。「p63 ノックアウトによる CCND2 の発現低下」は他の制御経路を介する可能性がある。実際、CCND2 の発現低下は RT-qPCR 法では 20%程度であった。

#### (5) 総合

p63 の主要アイソフォーム Np63 が Wnt/ $\beta$ -カテニン標的遺伝子の発現を抑制する。MMP7 は癌の浸潤・転移で活性化される遺伝子であることから、p63 が高分化型の頭頸部癌で高発現し、浸潤癌への進行を抑えていると考えられる。

#### <引用文献>

1. Patturajan M. et al., Cancer Cell, 1: 369, 2002.
2. Drewelus I. et al., Cell Cycle 9: 580-587, 2010

#### 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 8 件)

Hata R, Izukuri K, Kato Y, Sasaki S, Mukaida N, Maehata Y, Miyamoto C, Akasaka T, Yang X, Nagashima Y, Takeda K, Kiyono T, Taniguchi M.

Suppressed rate of carcinogenesis and decreases in tumour volume and lung metastasis in CXCL14/BRAK transgenic mice.

Sci Rep. 2015 Mar 13;5:9083. doi: 10.1038/srep09083. 査読有

Miyamoto C, Maehata Y, Motohashi K, Ozawa S, Ikoma T, Hidaka K, Wada-Takahashi S, Takahashi SS, Yoshino F, Yoshida A, Kubota E, Hata R, Lee MC.

Fasudil, a Rho kinase inhibitor, suppresses tumor growth by inducing CXCL14/BRAK in head and neck squamous cell carcinoma.

Biomed Res. 2014;35(6):381-8.

doi: 10.2220/biomedres.35.381. 査読有

Tulafu M, Mitaka C, Hnin Si MK, Abe S, Kitagawa M, Ikeda S, Eishi Y, Kurata S, Tomita M. Atrial natriuretic peptide attenuates kidney-lung crosstalk in kidney injury.

J Surg Res. 2014 Jan;186(1):217-25. 査読有

Si MK, Mitaka C, Tulafu M, Abe S, Kitagawa M, Ikeda S, Eishi Y, Kurata S, Tomita M.

Inhibition of poly (adenosine diphosphate-ribose) polymerase attenuates lung-kidney crosstalk induced by intratracheal lipopolysaccharide instillation in rats.

Respir Res. 2013 Nov 15;14:126. 査読有

Katoh I, Kurata S.

Association of endogenous retroviruses and long terminal repeats with human disorders.

Front Oncol. 2013 Sep 11;3:234. 査読有

Miyamoto C, Maehata Y, Ozawa S, Ikoma T, Kubota E, Izukuri K, Kato Y, Hata R, Lee MC.

Fasudil suppresses fibrosarcoma growth by stimulating secretion of the chemokine CXCL14/BRAK.

J Pharmacol Sci. 2012;120(3):241-9 査読有

Hata R.

A New Strategy to Find Targets for Anticancer Therapy: Chemokine CXCL14/BRAK Is a Multifunctional Tumor Suppressor for Head and Neck Squamous Cell Carcinoma.

ISRN Otolaryngol. 2012 Nov 14;2012:797619. 査読有

Ikoma T, Ozawa S, Suzuki K, Kondo T, Maehata Y, Lee MC, Hata R, Kubota E.

Calcium-calmodulin signaling induced by epithelial cell differentiation upregulates BRAK/CXCL14 expression via the binding of SP1 to the BRAK promoter region.

Biochem Biophys Res Commun. 2012 Apr 6;420(2):217-22. 査読有

〔学会発表〕(計 5 件)

加藤伊陽子、福西菜穂子、藤室雅弘、畑隆一郎、倉田俊一  
p63(TP63)による Wnt 標的遺伝子の正と負の制御  
第 87 回日本生化学会大会  
2014 年 10 月 17 日 京都(国立京都国際会館)

加藤伊陽子、倉田俊一  
ミトコンドリア(intermembrane space)への procaspase-9 インポートの試み  
第 86 回日本生化学会大会  
2013 年 9 月 12 日 横浜(パシフィコ横浜)

加藤伊陽子、福西菜穂子、藤室雅弘、畑隆一郎、倉田俊一  
p 6 3 による新規 Wnt/beta-catenin シグナル活性化機構  
第 72 回日本癌学会学術総会  
2013 年 10 月 3 日 横浜(パシフィコ横浜)

Iyoko Katoh, Nahoko Fukunishi, Ryu-ichiro Hata, Shun-ichi Kurata  
p63 enhances Wnt target gene expression by nuclear complex formation with beta-catenin and TCF.  
第 71 回日本癌学会学術総会 札幌(ホテルロイトン札幌) 2012 年 9 月 20 日

倉田俊一 福西菜穂子 畑隆一郎  
加藤伊陽子  
p63 は Wnt シグナル標的遺伝子発現を活性化する  
第 85 回日本生化学会大会 福岡(マリンメッセ福岡)  
2012 年 12 月 4 日

〔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：  
出願年月日：

取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

倉田 俊一 (KURATA, Shun-ichi)  
東京医科歯科大学・難治疾患研究所・准教授  
研究者番号：60140901

(2)連携研究者

畑 隆一郎 (HATA, Ryu-ichiro)  
神奈川歯科大学・歯学部・特任教授  
研究者番号：10014276

(3)連携研究者

加藤 伊陽子 (KATOH, Iyoko)  
山梨大学・大学院総合研究部  
研究者番号：20333297