

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 16 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25430115

研究課題名(和文) p53経路の破綻による腫瘍悪性化の分子基盤の解明とその制御への応用

研究課題名(英文) New insights into p53 signaling regulation to cure cancer

研究代表者

時野 隆至 (TOKINO, Takashi)

札幌医科大学・医学部・教授

研究者番号：40202197

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：新規p53標的遺伝子FOXF1およびICAM2についての機能解析を行った。この2つの標的遺伝子は細胞運動・浸潤を阻害し、発現抑制は細胞運動・浸潤を活性化した。p53ががん細胞の浸潤・転移に關与する標的遺伝子を転写制御していることを示唆している。

p53はmiR-200ファミリーを介してがん遺伝子CRKLの発現を抑制した。CRKL強制発現は腫瘍細胞の増殖・浸潤能を促進した。p53がmiRNA転写制御を介して腫瘍細胞の増殖・浸潤に關与するがん遺伝子の発現を抑制することを明らかにした。したがって、p53経路に異常のあるがんに対してCRKLを分子標的とした治療薬が有効なことを示唆する研究成果を得た。

研究成果の概要(英文)： We found that forkhead transcription factor FOXF1 and intercellular adhesion molecule-2 (ICAM2) are novel target genes of p53. The ectopic expression of FOXF1 and ICAM2 inhibited cancer cell invasion and migration, whereas the inactivation of FOXF1 and ICAM2 stimulated cell invasion and migration. Our findings suggest that FOXF1 and ICAM2 induction by p53 are on key pathways in inhibiting cancer cell migration and invasion.

We also found CRKL oncogene is downregulated by p53 through miR-200s. First, we identified that miR-200s are direct transcriptional targets of p53 and then miR-200b/200c/429 inhibited CRKL mRNA and protein expression by directly targeting its 3' -UTR region. The CRKL oncogene encodes an adaptor protein containing Src homology 2 and 3 (SH2/SH3) domains and is reported to be overexpressed in a subset of cancer types. Our results demonstrate that the p53 target miR-200b/200c/429 miRNAs are negative regulators of the CRKL oncogene.

研究分野：分子生物学

キーワード：p53 がん抑制遺伝子

1. 研究開始当初の背景

(1) がんは日本国民の最大の死亡原因であり、近い将来国民の半数ががんにより死亡すると予測されている。「がん克服」を目標に多くの基礎・臨床研究が行われているが、治療抵抗性・転移・再発などを示す難治がんに対する治療法は未だ確立されていないのが現状である。

(2) p53 はヒト悪性腫瘍の約 50%と最も高頻度に変異や欠失が見出されるが、“がん抑制遺伝子”であるため p53 経路をターゲットとした治療薬の開発は遅れている。

2. 研究の目的

(1) p53 により転写制御されるがん浸潤・転移に関与する標的遺伝子を探索し、その p53 転写標的遺伝子の機能を解明する。

(2) 正常型 p53 により転写抑制され、変異型 p53 をもつ腫瘍細胞で発現が上昇する標的遺伝子を同定し、がん治療の有力な分子標的につながる研究の展開をめざす。

(3) p53 により転写制御される非コード RNA を同定し、その p53 標的 non-coding RNA の機能を解明する。

3. 研究の方法

(1) マイクロアレイ解析を利用して p53 により転写抑制される標的遺伝子を同定する。さらに、p53 によるその転写制御領域のヒストンアセチル化、ヒストンメチル化修飾を解析し、p53 の転写調節への関与を明らかにする。レポーターアッセイによる転写制御様式を解析する。

(2) 転移、浸潤への関与については、遺伝子発現系および遺伝子ノックダウンを利用して細胞運動・細胞浸潤活性測定、ヒトがん細胞のマウス転移モデルなどを用い、分子生物

学的・細胞生物学的な解析を行う。

(3) マイクロアレイおよび RNA-seq 解析を利用して p53 により転写制御される標的 microRNA および non-coding RNA を同定する。遺伝子発現系および遺伝子ノックダウンを利用して、細胞増殖、細胞周期、アポトーシスなどの機能に関して分子生物学的・細胞生物学的な解析を行う。

4. 研究成果

(1) p53 がクロマチンリモデリングを介して浸潤・転移に関与する標的遺伝子 HDGF (hepatoma-derived growth factor) の転写抑制を行うことを見出した。p53 が細胞運動能に関与する増殖因子 HDGF (hepatoma-derived growth factor) の転写を抑制すること、また変異型 p53 を有し HDGF を高発現している腫瘍細胞ではその運動能が上昇していることを確認した。さらに、臨床検体において p53 遺伝子変異をもつ胃がん、乳がん、肺がんで HDGF の高発現を確認し、悪性度との相関があることを見出した。

(2) 新規 p53 標的遺伝子 FOXF1 についての機能解析を行った。FOXF1 発現は細胞運動・浸潤を阻害し、FOXF1 発現抑制は細胞運動・浸潤を活性化した。FOXF1 もまた転写因子であり E-cadherin をコードする CDH1 遺伝子の発現を制御することによって、がん細胞の運動・浸潤能を調節する役割を明らかにした。さらに、種々の悪性腫瘍で FOXF1 の低発現が悪性度を相関することも見出している。p53 が細胞周期停止・アポトーシス誘導に関与する標的遺伝子を転写活性化するのみならず、がん浸潤・転移に関与する標的遺伝子を転写制御していることを実証した。

(3) miRNA 発現解析により正常型 p53 が miR-200 ファミリーを発現誘導することを見

出した。さらに miR-200b/200c/429 が発現制御する遺伝子として CRKL がん遺伝子を同定した。すなわち、p53 は miR-200 ファミリーを介してがん遺伝子 CRKL の発現を抑制する。CRKL タンパクは SH2 および SH3 ドメインをもつアダプタータンパクであり細胞内の様々なシグナル伝達経路を活性化すると考えられている。CRKL 強制発現は腫瘍細胞の増殖・浸潤能を促進した。また、臨床症例のデータ解析から非腫瘍部と比較して腫瘍組織で CRKL の発現が高く、さらに、乳がん症例における CRKL の発現レベルは p53 遺伝子ステータスと関連していた。

p53 が細胞周期停止・アポトーシス誘導に関与する標的遺伝子を転写活性化するのみならず、miRNA 転写制御を介して腫瘍細胞の増殖・浸潤に関与するがん遺伝子の発現を抑制することを実証した。したがって、p53 経路に異常のあるがんに対してがん遺伝子 CRKL を分子標的とした治療薬が有効なことを示唆する研究成果を得ることができた。

(4) 細胞間接着分子 ICAM2 (intercellular adhesion molecule-2) が p53 によって転写活性化されることを明らかにした。ICAM2 の強発現は腫瘍細胞の運動および浸潤を阻害する。さらに、腫瘍細胞で ICAM2 発現をノックダウンすると、ERK(extracellular signal-regulated kinase) リン酸化レベルを顕著に増加する。この結果は ICAM2 が ERK シグナル経路を介して細胞運動・細胞浸潤を抑制していることを示唆する。臨床例においても、p53 変異を有する腫瘍の ICAM2 の発現レベルは正常型 p53 遺伝子をもつ腫瘍と比較して低下している。さらに、各種のがんにおいて ICAM2 発現低下は生存率低下と相関があることを明らかにした。

(5) cDNA マイクロアレイ解析により p53 の標的遺伝子として LIMA1 (LIM domain and

Actin-binding protein 1) を同定した。ChIP-seq により LIMA1 遺伝子に 2 つの p53 応答配列を同定し、p53 の直接の転写標的遺伝子であることを確認した。LIMA1 がコードする EPLIN タンパクレベルは p53 を活性化する低分子化合物 nutlin-3a によって増加する。また、LIMA1 発現は正常組織に比較して腫瘍で有意に低下していた。LIMA1 ノックダウンは腫瘍細胞の浸潤を増加し、p53 による細胞浸潤の抑制機能を部分的に阻害した。さらに、LIMA1 発現が低レベルのがん患者は生存率が低く予後不良の傾向がある。したがって、p53 が発現誘導する LIMA1 は細胞浸潤を阻害し、p53 変異による LIMA1 発現低下はがん患者の生存率低下の一因となっている可能性がある。本研究成果は、種々の腫瘍で LIMA1 が発現低下している分子メカニズムを明らかにした。LIMA1 は新規の予後予測マーカーおよび治療標的になりうる可能性がある。

(6) 次世代シーケンサーを利用した p53 タンパクに対する ChIP-seq により、lncRNA (long non-coding RNA) NEAT1 が p53 の直接の転写標的であることを見出した。腫瘍細胞の増殖において、NEAT1 の発現抑制は p53 の機能を減弱させ、また、多くの lncRNA を含む遺伝子の転写制御に影響を及ぼす。数種類の悪性腫瘍において NEAT1 の低発現は予後不良と相関する。この研究成果は、NEAT1 発現が p53 の腫瘍抑制機能に寄与し、p53 と NEAT1 は腫瘍抑制に貢献する転写ネットワークを形成していることを示唆する。

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 18 件)

Idogawa M, Ohashi T, Sasaki Y, Nakase H, Tokino T: Long non-coding RNA NEAT1 is

a transcriptional target of p53 and modulates p53-induced transactivation and tumor-suppressor function. **Int J Cancer** 査読有, Vol. 140, No. 12, 2017, pp. 2785-2791.
doi: 10.1002/ijc.30689

Ohashi T, Idogawa M, Sasaki Y, Tokino T: p53 mediates the suppression of cancer cell invasion by inducing LIMA1/EPLIN. **Cancer Letters** 査読有, Vol. 390, 2017, pp.58-66.
doi: 10.1016/j.canlet.2016.12.034.

Matsunaga Y, Adachi Y, Sasaki Y, Koide H, Motoya M, Noshio K, Takagi H, Yamamoto H, Sasaki S, Arimura Y, Tokino T, Carbone DP, Imai K, Shinomura Y: The effect of forced expression of mutated K-RAS gene on gastrointestinal cancer cell lines and the IGF-1R targeting therapy. **Molecular Carcinogenesis** 査読有, Vol. 56, No. 2, 2017, pp.515-526,
doi: 10.1002/mc.22513.

Sasaki Y, Tamura M, Takeda K, Ogi K, Nakagaki T, Koyama R, Idogawa M, Hiratsuka H, Tokino T: Identification and characterization of the intercellular adhesion molecule-2 gene as a novel p53 target. **Oncotarget** 査読有, Vol. 7, No. 38, 2016, pp.61426-61437,
doi: 10.18632/oncotarget.11366.

Sasaki Y, Tamura M, Koyama R, Nakagaki T, Adachi Y, Tokino T: Genomic characterization of esophageal squamous cell carcinoma: Insights from next-generation sequencing. **World J Gastroenterol**. 査読有, Vol.22, No.7, 2016,

pp.2284-2293,
doi: 10.3748/wjg.v22.i7.2284

Kumegawa K, Maruyama R, Yamamoto E, Ashida M, Kitajima H, Tsuyada A, Niinuma T, Kai M, Yamano H, Sugai T, Tokino T, Shinomura Y, Imai K, Suzuki H: A genomic screen for long noncoding RNA genes epigenetically silenced by aberrant DNA methylation in colorectal cancer. **Scientific Reports** 査読有, 6:26699, 2016 May 24.
doi: 10.1038/srep26699.

Saijo H, Hirohashi Y, Torigoe T, Horibe R, Takaya A, Murai A, Kubo T, Kajiwara T, Tanaka T, Shionoya Y, Yamamoto E, Maruyama R, Nakatsugawa M, Kanaseki T, Tsukahara T, Tamura Y, Sasaki Y, Tokino T, Suzuki H, Kondo T, Takahashi H, Sato N: Plasticity of lung cancer stem-like cells is regulated by the transcription factor HOXA5 that is induced by oxidative stress. **Oncotarget** 査読有, Vol. 7, No.31, 2016, pp.50043-50056,
doi: 10.18632/oncotarget.10571.

Kai M, Niinuma T, Kitajima H, Yamamoto E, Harada T, Aoki H, Maruyama R, Toyota M, Sasaki Y, Sugai T, Tokino T, Nakase H, Suzuki H: TET1 depletion induces aberrant CpG methylation in colorectal cancer cells. **PLoS One** 査読有, Vol. 11, No. 12, 2016, e0168281.
doi: 10.1371/journal.pone.0168281.

Tamura M, Sasaki Y, Kobashi K, Takeda K, Nakagaki T, Idogawa M, Tokino T: CRKL oncogene is downregulated by p53 through miR-200s. **Cancer Science** 査読有, Vol.106,

No.8, 2015, pp.1033-1040,
doi: 10.1111/cas.12713.

Kamimae S, Yamamoto E, Kai M, Niinuma T, Yamano H, Nojima M, Yoshikawa K, Kimura T, Takagi R, Harada E, Harada T, Maruyama R, Sasaki Y, Tokino T, Shinomura Y, Sugai T, Imai K, Suzuki H: Epigenetic silencing of NTSR1 is associated with lateral and noninvasive growth of colorectal tumors. **Oncotarget** 査読有, Vol.6, No.30, 2015, pp.29975-29990,
doi: 10.18632/oncotarget.5034.

Mitsuhashi K, Yamamoto I, Kurihara H, Kanno S, Ito M, Igarashi H, Ishigami K, Sukawa Y, Tachibana M, Takahashi H, Tokino T, Maruyama R, Suzuki H, Imai K, Shinomura Y, Yamamoto H, Noshio K: Analysis of the molecular features of rectal carcinoid tumors to identify new biomarkers that predict biological malignancy. **Oncotarget** 査読有, Vol.6, No.26, 2015, pp.22114-22125,
doi: 10.18632/oncotarget.4294

Isosaka M, Niinuma T, Nojima M, Kai M, Yamamoto E, Maruyama R, Nobuoka R, Nishida T, Kanda T, Taguchi T, Hasegawa T, Tokino T, Hirata K, Suzuki H, Shinomura Y: A screen for epigenetically silenced microRNA genes in gastrointestinal stromal tumors. **PLoS One** 査読有, Vol.10, No.7, 2015, pp.e0133754,
doi: 10.1371/journal.pone.0133754.

Murata A, Ito Y, Kashima R, Kanbayashi S, Nanatani K, Igarashi C, Okumura M, Inaba K, Tokino T, Takahashi S, Kamagata K. One-dimensional sliding of p53 along DNA

is accelerated in the presence of Ca(2+) or Mg(2+) at millimolar concentrations. **J Molecular Biology** 査読有, Vol.427, No.16, 2015, pp.2663-2678,
doi: 10.1016/j.jmb.2015.06.016.

Someya M, Yamamoto H, Nojima M, Hori M, Tateoka K, Nakata K, Takagi M, Saito M, Hirokawa N, Tokino T, Sakata K: Relation between Ku80 and microRNA-99a expression and late rectal bleeding after radiotherapy for prostate cancer. **Radiother Oncol**, 査読有, Vol.115, No.2, 2015, pp.235-239,
doi: 10.1016/j.radonc.2015.04.008.

Idogawa M, Ohashi T, Sugisaka J, Sasaki Y, Suzuki H, Tokino T: Array-based genome-wide RNAi screening to identify shRNAs that enhance p53-related apoptosis in human cancer cells. **Oncotarget** 査読有, Vol.5, No.17, 2014, pp.7540-7548,
doi: 10.18632/oncotarget.2272

Tamura M, Sasaki Y, Koyama R, Takeda K, Idogawa M, Tokino T: Forkhead transcription factor FOXF1 is a novel target of the p53 family and regulates cancer cell migration and invasiveness. **Oncogene** 査読有, Vol.33, No.40, 2014, pp.4837-4846,
doi: 10.1038/onc.2013.427.

Idogawa M, Ohashi T, Sasaki Y, Maruyama R, Kashima L, Suzuki H, Tokino T: Identification and analysis of large intergenic non-coding RNAs regulated by p53 family members through a genome-wide analysis of p53-binding sites. **Human Molecular Genetics** 査読有, Vol.23, No.11,

2014, pp.2847-2857,
doi: 10.1093/hmg/ddt673.

Ito M, Mitsuhashi K, Igarashi H, Noshio K, Naito T, Yoshii S, Takahashi H, Fujita M, Sukawa Y, Yamamoto E, Takahashi T, Adachi Y, Nojima M, Sasaki Y, Tokino T, Baba Y, Maruyama R, Suzuki H, Imai K, Yamamoto H, Shinomura Y: MicroRNA-31 expression in relation to BRAF mutation, CpG island methylation and colorectal continuum in serrated lesions. **Int J Cancer** 査読有, Vol.135, No.11, 2014, pp.2507-2515,
doi: 10.1002/ijc.28920.

〔学会発表〕(計 5件)

Tokino T, Tamura M, Idogawa M, Sasaki Y. p53 downregulates CRKL oncogene through miR-200. American Association of Cancer Research (AACR) annual meeting. 2016 April 19, New Orleans (USA).

Tokino T, Tamura M, Idogawa M, Sasaki Y. p53 regulates cancer cell migration and invasion through FOXF1. Tenth AACR-JCA Joint Conference on Breakthroughs in Cancer Research: From Biology To Therapeutics. 2016 February 16, Maui (USA).

Tokino T. Genome-wide RNAi screening to identify shRNAs that enhance p53-related apoptosis in human cancer cells. 2015 SNUCRI Cancer Symposium, 2015 April 4, Gwangju (Korea).

Tokino T. Genome-based personalized medicine in oncology. The 18th International Congress of Personalized

Medicine. Presidential Lecture, 2014 June 14, Sapporo Convention Center (Sapporo, Hokkaido).

Tokino T, Tamura M, Idogawa M, Sasaki Y. Forkhead transcription factor FOXF1 is a novel target gene of the p53 family and regulates cancer cell migration and invasiveness. American Association of Cancer Research (AACR) annual meeting. 2014 April 6, San Diego (USA).

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://web.sapmed.ac.jp/canmol>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

時野 隆至 (TOKINO, Takashi)

札幌医科大学・医学部・教授

研究者番号: 40202197