

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460475

研究課題名(和文) 肝細胞癌で発現するp63の機能：DNA損傷応答およびウイルス発癌との関連

研究課題名(英文) Functions of p63 expressed in hepatocellular carcinoma: DNA damage responses and relation to virus-induced carcinogenesis

研究代表者

加藤 伊陽子 (KATO, Iyoko)

山梨大学・総合研究部・准教授

研究者番号：20333297

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)：本研究はがん抑制遺伝子p53ファミリーの1つであるp63の肝細胞での発現と機能、肝癌ウイルス関連因子とp63の相互作用を解析し、p63と肝癌発症の関連を明らかにすることを目的とした。扁平上皮癌と対照的に、p63のTAアイソフォーム(TAp63)を強く発現する肝癌細胞が多かった。しかし、肝癌細胞ではTAp63のDNA損傷に対する応答性やp63とウイルス関連因子の直接的な相互作用は検出できなかった。B型およびC型肝炎ウイルスで活性化されるWnt/カテニンシグナル伝達を Np63 が核内で抑制することが明らかになり、Np63が発現される場合、腫瘍化・悪性化の過程を抑制する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：This study investigated physical and functional interactions between p63, a member of the tumor suppressor p53 gene family, and hepatitis virus-related factors to detect the possible involvement of p63 in hepatocellular carcinogenesis. Interestingly, most of the hepatocellular carcinoma lines tested efficiently expressed the TA isoforms of p63 (TAp63) corresponding to p53. However, TAp63 did not respond to drug-induced DNA damage. No significant molecular interaction was evident between p63 and virus-related factors. Importantly, both HBV and HCV are known to activate the Wnt/beta-catenin signal transduction leading to carcinogenesis and malignancy. Our results showed interference of the Wnt-induced transcriptional activation by DeltaNp63alpha, indicating that hepatocellular carcinogenesis could be suppressed if the DeltaN isoform is expressed.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：p63

1. 研究開始当初の背景

TP63(p63) 遺伝子は、p53(TP53)、p73(TP73)とともに p53 がん抑止遺伝子ファミリーを構成する。転写開始点が2つあるために、トランスアクチベータ・ドメインを持つ TA 型(TAp63)と、持たないΔN 型(ΔNp63)として転写され、3'末端領域で / / のスプライスバリエーションが生じる。がんでの変異はほとんど見られず、基底層幹細胞に由来する頭頸部扁平上皮癌、皮膚癌、乳癌などで ΔNp63 アイソフォームが高発現していることが知られており、この p63 タンパク質は癌の悪性転化を抑制すると考えられている。

一方、肝癌における p63 の発現と肝癌の発症の関連についてはほとんど研究されていない。肝炎ウイルスの感染により誘導される細胞腫瘍化やがん抑制遺伝子 p53 が高頻度に変異している肝癌細胞の化学療法・放射線応答性を考える上で p63 の機能との関連に着目した。

2. 研究の目的

本研究はウイルス関連肝細胞の腫瘍化と p63 の機能の関連を明らかにすることを目的として実施した。具体的には (1) p63 遺伝子の肝細胞での発現様式、(2) p63 は肝細胞で DNA 損傷に反応し、細胞増殖抑制や細胞死誘導機能を発揮するか、(3) p63 と肝炎ウイルス因子が相互作用するか、について明らかにすることを目的とした。さらに、B 型肝炎ウイルス(HBV)が感染や C 型肝炎ウイルス(HCV)のコアタンパク質により カテニンの安定化・核移行が促進され Wnt シグナル伝達の活性化が起こり、腫瘍化につながる事が明らかになってきた[引用文献 1-3] ことから、Wnt シグナル伝達に着目し p63 がどのように作用するかについても解析した。

3. 研究の方法

細胞株: 肝癌細胞株としては HCC 由来 HuH-7(分化型)、HLE(未分化型)、HepG2、PLC/PRF/5 (HBs 抗原陽性、アレキサンダー細胞)などを JCRB 細胞バンクから入手した。p63 を発現する下咽頭扁平上皮癌 FaDu は ATCC から、p63 を発現しないメラノーマ細胞 MeWo は JCRB 細胞バンクから入手した。

p63 の発現解析: 上記 HCC 細胞から RNA を精製し、RT-PCR 法を実施して、5'末端が TAp63 および ΔNp63 のアイソフォームと、3'末端のスプライスバリエーション α、β、γ の発現を解析した。またそれら発現パターンを TAp63 と Np63 を発現する FaDu 細胞、p63 を発現しない MeWo 細胞と比較した。

DNA 損傷応答: Huh7 細胞などを用いて TA-p63 の DNA 損傷への応答性を調べた。また、p53 および p63 の標的遺伝子の発現調節を解析した。

PP2A 酵素活性の測定: PP2A Immunoprecipitation Phosphatase Assay

Kit (Merck Millipore) を用いて PP2Ac に対する抗体で免疫沈降後、合成ペプチド基質を使って PP2Ac の酵素活性を測定した。

Wnt/βカテニン標的遺伝子発現制御:

主としてルシフェラーゼ・アッセイを行った。pGL3-OT、pGL3-OF、およびゲノムの WRE 配列を連結して作成したレポーター・プラスミドを カテニン、TCF4、p63 を発現するベクターとともにトランスフェクトした。48 時間後に HEK293 細胞、Huh7 細胞などでは Steady-Glo Luciferase assay system (Promega) を、Saos-2 細胞では高感度な Luciferase assay System (Promega) を用いて転写活性を解析した。また、ゲノムからの遺伝子発現の解析では、RNA を精製し、RT-PCR を実施した。

4. 研究成果

(1) 肝癌での p63 アイソフォームの発現

HuH-7 (分化型)、HLE (未分化型) では TAp63 が発現されていたが、Np63 の発現は見られなかった。HCV 感染細胞と非感染細胞を比較したが、p63 の発現に変化は見られなかった。マウス正常肝細胞でも TA が検出されたことから、一般的には肝細胞では TAp63 のみを発現し、Np63 は発現しないと考えられた。HepG2 では TA も N も全く RNA として検出できず、何らかの機構で silencing を受けていると推定された。

興味深いことに PLC/PRF/5 はアレキサンダー細胞とも呼ばれ、HBs 抗原陽性である。この細胞では TAp63 と Np63 が発現し、スプライスバリエーションが α > β レベルで、p63 の発現パターンが扁平上皮癌と同じであった。p63 が HBV の調節因子 HBx によるエピジェネティックな制御[4]を受けている可能性が考えられた。

頭頸部扁平上皮癌や皮膚癌では p63 遺伝子の N 型の発現が TA より優位であるのに対し、いくつかの肝癌細胞は TA のみを発現しており、TAp63 アイソフォームの機能を理解するために興味深い実験系を提供することも明らかになった。

(2) TAp63 の DNA 損傷応答

TAp63 はがん抑制タンパク質 p53 とよく似た構造をもち、p53 と同様に DNA 損傷に反応する(研究代表者らの報告)[5,6]。HuH-7 (分化型)、HLE (未分化型) を用いて、Doxolubicin (Dox) および Actinomycin (Act) で DNA 損傷を施し、TAp63 の蓄積を Western blot 法で解析した。コントロールとして、HCT116 細胞の p53^{+/+}、p53^{+/-}、p53^{-/-} を用いた。0.1 - 1 μM の Dox または Act 処理で p53^{+/+}、p53^{+/-} 細胞では p53 の蓄積が明確であったが、Huh-7 細胞では同濃度の DNA 損傷薬剤で TAp63 の蓄積は検出できなかった。さらに、0.1-1mM という高濃度で薬剤を用いると、TAp63 の量は逆に減少した。肝癌細胞では薬剤による DNA 損傷に応

答して TAp63 を蓄積させる機構が欠落していると考えられた。

HuH-7、HLE 細胞で TAp63 を siRNA 法でノックダウンしたが、細胞の増殖促進もアポトーシス誘導も検出されなかった。

(3)HCV コアタンパク質が p53 と p63 の機能におよぼす影響

p53 および TAp63 は p21waf1 (*CKDN1A*)、RGC (ribosome gene cluster) の p53 標的配列に結合して転写を活性化する。この反応と HCV コアタンパク質の関連について、ルシフェラーゼ (luc) によるレポーター・アッセイにより検討した。細胞としては HCT116 細胞の p53^{+/+}、p53^{-/-}を用い、p53、TAp63、コアタンパク質を種々の組み合わせで導入して luc 発現を測定した。その結果、HCV コアタンパク質は p53 および p63 との濃度比によって促進する場合、抑制する場合、変化しない場合があり、p53 および p63 の機能制御に関する一定の評価結果を得ることができなかった。HCV コアタンパク質に未解明の役割があり、濃度バランスによっては p53/p63 などの転写活性化機能に正負の影響を与える可能性が考えられた。

さらに、HCV のコアタンパク質を発現するベクターと HA-タグを付した p63 (Np63) をトランスフェクトし、免疫沈降を行ったが、p63 とコアタンパク質は共沈しなかった。p63 は核に局在するが、コアの大部分は細胞質に存在し、直接の分子結合は検出できなかった。p63 は核内で種々のタンパク質と会合しており、間接的にコアタンパク質の制御を受ける可能性は否定できなかった。

(5) PP2Ac 活性の測定

HCV は Protein phosphatase 2A catalytic subunit (PP2Ac) を発現誘導することが知られていた [7]。一方、PP2Ac の制御因子 B56α と ΔNp63 が結合し、PP2Ac のホスファターゼ活性を阻害すると報告されていた [8]。p63 (TA と N) を発現する細胞で、PP2Ac を免疫沈降すると、報告どおり Np63 が共沈した。このとき、Np63 (+)(-) で PP2Ac の脱リン酸化酵素活性を測定すると、大きな差は認められなかった。また、PP2A の基質の 1 つである GSK-3 のリン酸化レベルにも影響はなかった。HCV によって PP2Ac が発現誘導を受けても、p63 がその PP2Ac の活性を抑制するとは考えられなかった。

(6) Wnt シグナル伝達への影響

HCV 感染では主としてコアタンパク質により カテニンの安定化と核移行が促進され、Wnt シグナル伝達の活性化が起こる。また、HBV 感染でも Wnt/ カテニンシグナル伝達の活性化が報告されている [1-3]。一方、p63 では活性化 [8] と抑制 [9] の対立する報告があった。

本研究では細胞株による差異や、レポーター

アッセイに用いる標的配列によって、実験結果が大きく変わることを明らかにした。結論として、p63 は カテニンの安定化と核移行には影響しない、Np63 は Wnt 標的遺伝子の転写を抑制する。従って、もし HCV や HBV によって カテニンの核移行が促進されたとしても、PLC/PRF/5 細胞株のように Np63 が核内に存在すると Wnt 標的遺伝子の転写が抑制され、ウイルスによる肝細胞の腫瘍化や悪性転化が制御される可能性があると考えられた。

<引用文献>

1. Cha M-Y, et al. *Hepatology*. 2004 Jun;39(6):1683-93
2. Liu J. et al. *PLoS One*. 2011; 6(11): e27496.
3. Tornesello ML et al. *Oncotarget*. 2016 Mar 2. doi: 10.18632/oncotarget.7837.
4. Lee SM, et al. *Proc Natl Acad Sci USA* 2014 111(26): 9555-9560
5. Katoh I. et al. *Oncogene*. 2000 Jun 22;19(27):3126-30.
6. Okada Y. et al. *Exp Cell Res*. 2002 Jun 10;276(2):194-200.
7. Bernsmeier, C. et al. *J. Hepatology* 2008, 49:429-440
8. Patturajan M. et al., *Cancer Cell*, 1: 369-379, 2002.
9. 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)

. Katoh I, Fukunishi N, Fujimuro M, Kasai H, Moriishi K, Hata R, Kurata S. Repression of Wnt/β-catenin response elements by p63 (TP63). *Cell Cycle*. 2016 Mar 3;15(5):699-710. doi: 10.1080/15384101.2016.1148837. 査読有

Okuyama-Dobashi K, Kasai H, Tanaka T, Yamashita A, Yasumoto J, Chen W, Okamoto T, Maekawa S, Watashi K, Wakita T, Ryo A, Suzuki T, Matsuura Y, Enomoto N, Moriishi K. *Sci Rep*. 2015 Nov 23;5:17047. doi: 10.1038/srep17047 査読有

Kasai H, Kawakami K, Yokoe H, Yoshimura K, Matsuda M, Yasumoto J, Maekawa S, Yamashita A, Tanaka T, Ikeda M, Kato N, Okamoto T, Matsuura Y, Sakamoto N, Enomoto N, Takeda S, Fujii H, Tsubuki M, Kusunoki M, Moriishi K. Involvement of FKBP6 in hepatitis C virus replication. *Sci Rep*. 2015 Nov 16;5:16699. doi: 10.1038/srep16699 査読有

Tanaka T, Kasai H, Yamashita A, Okuyama-Dobashi K, Yasumoto J, Maekawa S, Enomoto N, Okamoto T, Matsuura Y, Morimatsu M, Manabe N, Ochiai K, Yamashita K, Moriishi K. Hallmarks of hepatitis C virus in equine hepatitis virus.
J Virol. 2014 Nov;88(22):13352-66. doi: 10.1128/JVI.02280-14 査読有

Katoh I.
Impacts of endogenous retroviruses on tumorigenesis, immunity, stem cells, and research safety.
Front Oncol. 2014 Mar 31;4:66. doi: 10.3389/fonc.2014.00066. 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. doi: 10.1016/j.jss.2013.07.033. 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. doi: 10.1186/1465-9921-14-126 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. doi: 10.3389/fonc.2013.00234. 査読有

〔学会発表〕(計 5 件)

倉田 俊一, 福西 菜穂子, 藤室 雅弘, 畑 隆一郎, 加藤 伊陽子
p63(TP63)は TCF/β-カテニンによる遺伝子発現誘導を制御する
第 88 回日本生化学会大会 1P0686
2015 年 12 月 1 日 神戸国際会議場(兵庫県・神戸市)

Iyoko Katoh, Ryu-Ichiro Hata, Shun-ichi Kurata
Repression of Wnt target genes by p63
第 74 回日本癌学会学術総会 P-1097
2015 年 10 月 8 日 名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市)

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 2P-378

2014 年 10 月 16 日 国立京都国際会館 (京都市・京都市)

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 2P-231
2013 年 9 月 12 日 パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

加藤伊陽子、福西菜穂子、藤室雅弘、畑 隆一郎、倉田俊一
p63 による新規 Wnt/β-catenin シグナル活性化機構
第 72 回日本癌学会学術総会 P-1448
2013 年 10 月 3 日 パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

〔その他〕
<http://sangaku.yamanashi.ac.jp/SearchResearcher/contents/7A93F75CD72F>
山梨大学ホームページ研究者総覧・研究紹介

6. 研究組織

(1)研究代表者
加藤 伊陽子 (KATOH, Iyoko)
山梨大学・総合研究部・准教授
研究者番号: 20333297

(2)連携研究者
森石 恆司 (MORIISHI, Kohji)
山梨大学・総合研究部・教授
研究者番号: 90260273

倉田 俊一 (KURATA, Shun-ichi)
神奈川歯科大学・歯学部・特任教授
研究者番号: 60140901