

令和 3 年 6 月 16 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02608

研究課題名（和文）上皮integrity維持機構多様性の生物学的意義の解明

研究課題名（英文）The biological significance of the diversity of the epithelial cell integrity

研究代表者

佐邊 壽孝（Sabe, Hisataka）

北海道大学・医学研究院・教授

研究者番号：40187282

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、CDH1座へのp53結合依存的・非依存的上皮integrity維持機構に焦点を当て、同様なことが正常上皮細胞や個体でも見られるのか、もしくは、不死化や癌化過程ではじめて誘起されるものなのかを明らかにし、その生物学的意義を解明するものである。RNA-Seq解析、CDH1座の当該ヒストン修飾状態、さらにはヒストン修飾の元となる細胞内代謝等の解析によって、p53結合依存性あるいは非依存性に影響を与える要因や初発となる因子（群）の特定を行った。細胞内外の酪酸濃度に依存したCDH1座のヒストンアセチル化がp53結合性を決める要因の一つであることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回発見したp53の機能は、p53がE-カドヘリン遺伝子の発現調節部位に結合し、ヒストン修飾を制御する。また、高濃度酪酸などによるヒストン修飾の揺らぎがゲノムDNAへのp53結合性に影響することが分かった。酪酸は消化管から吸収され、酸化によりアセチルCoAに分解され、クエン酸回路によりエネルギー源として利用される。本成果が生体に普遍的なものであるならば、がんの悪性度進展だけでなく、iPS技術などを用いる再生医療においても深く考慮されるべき、未知の分子メカニズムが存在することになる。また、上皮性と免疫監視とが関連することも明らかにし、癌免疫治療の発展に寄与する根幹的知見を得た。

研究成果の概要（英文）：In this study, we aimed to elucidate the biological significance of the p53-dependent or -independent epithelial integrity, in which p53 ensures the E-cadherin expression by directly binding to the CDH1 locus. Especially, we aimed to determine whether or not p53 binds to the CDH1 locus in normal epithelial cells or in the in vivo settings, or the binding activity manifests only when the cells are immortalized or transformed. We studied factors that affect the p53-dependency when cells maintain the epithelial integrity by RNA-Seq, ChIP-Seq and metabolome analyses. We found that butyric acid elevates acetylated histones at the CDH1 locus, facilitating the p53-binding to this site. Therefore, we found that the metabolic status of the cell is critical for the p53-dependent epithelial integrity.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：上皮性維持 p53 CDH1 ヒストン修飾 代謝変換 免疫監視 免疫回避

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

私達は一貫して細胞運動や浸潤性、癌悪性度進展に関する研究を行ってきた。正常上皮細胞、並びに、癌細胞において、これらのことは EMT と密接に関連する為、EMT 進行の分子基盤に取り組んできた。EMT の基本は E-カドヘリンの不活性化とインテグリンの活性化であるが、その分子的基盤の解明に大きく貢献している。EMT は細胞外刺激によって誘導されるが、癌細胞においては TP53 遺伝子変異が大きな要因となることが知られている。EMT における TP53 遺伝子産物 p53 の機能についても解析を進め、その結果、p53 が駆動する EMT 進行には、細胞内メバロン酸代謝活性、geranylgeranyl-transferase 活性、低分子量 G タンパク質 Arf6 や Rab11 などが必須の役割をなすことを分子詳細と共に明らかにした。同時に、EMT を介した乳癌や腎癌、膵癌の悪性度進行の分子基盤も明らかにしている。これらの研究の過程で、p53 には従来言われているような miRNA 発現誘導だけではなく、新たな機序によって EMT 進行を阻止していることを示す結果を得た。この点に研究を進めた結果、今回の研究のベースとなる発見に至った。

### 2. 研究の目的

上皮間充織転換(EMT)は様々な生体過程に必須である。一方、上皮細胞には頑然たる「上皮性 integrity を維持する機構」が存在し、EMT は容易には誘導されない。私共は、上皮 integrity 維持機構は、これまで知られている以上に複雑で多様であることを見出した。TP53 癌抑制遺伝子産物 p53 は上皮 integrity に関与するが、これは p53 誘導性 miRNAs が介在するとされてきた。このような機序に加え、私達は、1) p53 が上皮性遺伝子発現制御領域に結合し周辺ヒストン修飾制御によって上皮性遺伝子発現を担保する機構が存在すること、2) p53 非依存性 integrity 維持をする上皮細胞においては、p53 結合や p53 依存性ヒストン修飾は検出されないことを見出した。本研究は、分子的基盤と共に、上皮 integrity 維持機構がこれまでの想定を超えた多様性を有することの生物学的意義を解明することを目的とする。

### 3. 研究の方法

正常乳腺上皮細胞をマウス個体から調製し、in vitro 培養したもの、並びに、SV40LT にて不死化したもの、各々複数 clone を調製し、ヒト細胞の場合と同様の解析を行い、上皮 integrity 維持に多様性が存在するか否かを調べる。ヒストン修飾解析や ChIP-Seq 解析に加え、ヒストン修飾や p53 結合性に対する酪酸や細胞外 pH の影響、マウス細胞における内在性 telomerase 活性とその影響等も含め、詳細な解析を行う。

### 4. 研究成果

本研究では、CDH1 座への p53 結合依存的・非依存的上皮 integrity 維持機構に焦点をあて、同様なことが正常上皮細胞や個体でも見られるのか、もしくは、不死化や癌化過程ではじめて誘起されるものなのかを明らかにし、その生物学的意義を解明するものである。

#### (1) ヒト正常乳腺上皮細胞での検討

HMLE はヒト乳腺上皮細胞(HMEC)を SV40 large T antigen(LT)と human telomere reverse transcriptase(hTERT)によって不死化したものである。HMLE は不安定な形質を示すことが知られているが、複数の細胞 clone を調製し(一部、R. Weinberg から入手) p53 結合依存性 clone と p53 結合非依存性 clone が存在することを見出した。そこで、不死化していない HMEC でもこのような多様性が存在するかを確認している。単一細胞解析は困難であり、HMEC(市販品)を cloning し、それぞれの clone から上皮 integrity 維持機構多様性が存在するか否かの解析を行った。

#### (2) 上皮 integrity 維持機構の多様性とその分子基盤

RNA-Seq 解析、CDH1 座の当該ヒストン修飾状態、さらにはヒストン修飾の元となる細胞内代謝等の解析によって、p53 結合依存性あるいは非依存性に影響を与える要因や初発となる因子(群)の特定を行った。細胞内外の酪酸濃度に依存した CDH1 座のヒストンアセチル化が p53 結合性を決める要因の一つであることが分かった。

#### (3) 上皮 integrity 維持における miRNA の関与多様性

以前に細胞運動性促進シグナル経路に存在する AMAP1 蛋白質を見いだして。癌細胞においては AMAP1 発現促進は上皮間充織変換(EMT)を密接に関連することを観察していたが、その実態は不明であった。また、癌細胞における TP53 遺伝子変異は癌細胞 EMT 進行と関連する場合があることも知られていたが、実態は不明であった。ここでは、AMAP1 mRNA と相互作用

しその発現低下を促進する miRNA 群の発現制御が p53 支配下であり、TP53 遺伝子変異によるこの経路の破綻が AMAP1 mRNA レベルを上昇させ、癌的 EMT やそれに伴う運動性浸潤性亢進の一端であることを明らかにした。

#### (4) 上皮性維持と発現ケモカイン種の変換

正常上皮細胞が様々なケモカインを発現することは知られているが、同一上皮細胞が状況に応じて発現するケモカインの種類を変換すること、そのことによって、上皮性を維持している場合は主に免疫監視を促すケモカイン類を発現し、組織リモデリングや創傷治癒過程、すなわち EMT を起こした場合は、抗炎症性ケモカインを主に発現することを見いだした。このことは癌細胞に顕著であり、このようなケモカイン変換が癌細胞の免疫回避に根幹的であることも明らかにした。現在その分子機構詳細を解明している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Hashimoto Ari, Handa Haruka, Hata Soichiro, Tsutaho Akio, Yoshida Takao, Hirano Satoshi, Hashimoto Shigeru, Sabe Hisataka	4. 巻 19
2. 論文標題 Inhibition of mutant KRAS-driven overexpression of ARF6 and MYC by an eIF4A inhibitor drug improves the effects of anti-PD-1 immunotherapy for pancreatic cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Communication and Signaling	6. 最初と最後の頁 54
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12964-021-00733-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tsutaho Akio, Hashimoto Ari, Hashimoto Shigeru, Hata Soichiro, Kachi Shion, Hirano Satoshi, Sabe Hisataka	4. 巻 18
2. 論文標題 High expression of AMAP1, an ARF6 effector, is associated with elevated levels of PD-L1 and fibrosis of pancreatic cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Communication and Signaling	6. 最初と最後の頁 101
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12964-020-00608-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hashimoto S*, Furukawa S*, Hashimoto A*, Tsutaho A, Fukao A, Sakamura Y, Parajuli G, Onodera Y, Otsuka Y, Handa H, Oikawa T, Hata S, Nishikawa Y, Mizukami Y, Kodama Y, Murakami M, Fujiwara T, Hirano S, Sabe H (*equally contributed)	4. 巻 116
2. 論文標題 ARF6 and AMAP1 are major targets of KRAS and TP53 mutations to promote invasion, PD-L1 dynamics, and immune evasion of pancreatic cancer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America	6. 最初と最後の頁 17450 ~ 17459
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1901765116	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nishikawa Shigeto, Menju Toshi, Takahashi Koji, Miyata Ryo, Chen Yoshikawa Toyofumi Fengshi, Sonobe Makoto, Yoshizawa Akihiko, Sabe Hisataka, Sato Tosiya, Date Hiroshi.	4. 巻 Volume 11
2. 論文標題 Statins may have double-edged effects in patients with lung adenocarcinoma after lung resection	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Management and Research	6. 最初と最後の頁 3419 ~ 3432
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2147/CMAR.S200819	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Oikawa T, Otsuka Y, Sabe H.	4. 巻 10 (6)
2. 論文標題 p53-Dependent and -Independent Epithelial Integrity: Beyond miRNAs and Metabolic Fluctuations.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 162
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers10060162	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Handa H, Hashimoto A, Hashimoto S, Sugino H, Oikawa T, Sabe H.	4. 巻 16 (1)
2. 論文標題 Epithelial-specific histone modification of the miR-96/182 locus targeting AMAP1 mRNA predisposes epithelial function of p53 to suppress cell invasion.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cell Communication and Signaling	6. 最初と最後の頁 94
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12964-018-0302-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Hisataka Sabe
2. 発表標題 Pancreatic KRAS/TP53 oncogenes promote immune evasion via activating eIF4A/4E-dependent translation and protein prenylation
3. 学会等名 The 38th Sapporo International Cancer Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Oikawa T, Ohnishi N, Onodera Y, Hashimoto A, Ueda K, Sabe H
2. 発表標題 p53 excludes EZH2 from H3.1 interactome during S phase to maintain histone code.
3. 学会等名 The 38th Sapporo International Cancer Symposium (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tsukasa Oikawa, Naomi Ohnishi, Yasuhito Onodera, Ari Hashimoto, Koji Ueda and Hisataka Sabe
2. 発表標題 Requirement for p53 in intra-nuclear dynamics of the K27-trimethylated histone H3 during DNA replication.
3. 学会等名 第92回日本生化学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hashimoto A, Hashimoto S, Furukawa S, Tsutaho A, Fukao A, Onodera Y, Handa H, Oikawa T, Hata S, Nishikawa Y, Mizukami Y, Kodama Y, Murakami M, Fujiwara T, Hirano S, and Sabe H.
2. 発表標題 Upregulation of eIF4A/4E-dependent mRNA translation is the major target of KRAS signaling.
3. 学会等名 第19回蛋白質科学・第71回日本細胞生物合同年次大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hashimoto A, Hashimoto S, Furukawa S, Tsutaho A, Fukao A, Onodera Y, Handa H, Oikawa T, Hata S, Nishikawa Y, Mizukami Y, Kodama Y, Murakami M, Fujiwara T, Hirano S, and Sabe H.
2. 発表標題 Pancreatic KRAS/TP53 mutations promote ARF6-based immune evasion via activating mRNA translation and protein prenylation.
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tsukasa Oikawa, Yuki Shino, Suguru Kurosawa, Yasuhito Onodera, Yutaro Otsuka, Ari Hashimoto, Hisataka Sabe
2. 発表標題 Requirement for p53 in intra-nuclear dynamics of the K27-trimethylated histone H3 during DNA replication
3. 学会等名 第70回日本細胞生物学会（日本発生物学会合同大会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Haruka Handa, Shingo Takada, Yutaro Otsuka, Yasuhito Onodera, Tsukasa Oikawa, Hisataka Sabe
2. 発表標題 Epithelial-mesenchymal transition accompanies mitochondrial fission and enhanced OXPHOS activity
3. 学会等名 Nutrient Signaling 2018 Cold Spring Harbor Laboratory meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

研究室ホームページ <a href="http://g21001.med.hokudai.ac.jp/">http://g21001.med.hokudai.ac.jp/</a>
--

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------