

令和 5 年 4 月 20 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07229

研究課題名(和文) Studying and targeting a proto-oncogenic Internal Ribosome Entry Site (IRES) in p53 mRNA that is activated by the most frequent mutations in cancer

研究課題名(英文) Studying and targeting a proto-oncogenic Internal Ribosome Entry Site (IRES) in p53 mRNA that is activated by the most frequent mutations in cancer

研究代表者

Candeias Marco (Candeias, Marco)

京都大学・医学研究科・講師

研究者番号：50750585

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：完全長(FL)のp53は癌抑制因子であるが、もう一つのp53タンパク質である 160p53は癌細胞の成長を促進する。ここで我々は、160p53がRNA構造(IRES)を介して合成されることを明らかにした。このIRESをコードする塩基配列は、がんではしばしば変異しており、160の合成が制御されず、腫瘍の拡大につながる。IRESを活性化する変異は、p53で最もよく見られる変異であり、これまで「機能獲得」(GOF)変異として知られていたが、その仕組みは解明されていなかった。我々は、GOF変異がIRESを活性化し、癌化促進タンパク質である 160p53を産生し、癌の進行につながることを提案する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の成果により、40年来の疑問であった「なぜ、がん抑制遺伝子p53は、たった1回の変異でがん遺伝子(がんを促進する遺伝子)になるのか? 私たちはこう答えました。それは、1つの変異がmRNAとタンパク質に同時に作用するからです。蛋白質のアミノ酸の変化は、完全長(FL) p53として知られる癌抑制蛋白質を不活性化し、一方、mRNAのヌクレオチドの変化は、癌化を促進する機能を持つ 160p53と呼ばれる短いp53蛋白質の合成を活性化するのである。p53が発見されてから40年が経過した今、私たちはついにp53の発癌性の活性化を標的にして、全人類の癌の50%以上を治癒することを試みることができるのです。

研究成果の概要(英文)：Full-length (FL) p53 protein from the p53 gene is a tumor suppressor. I have shown before, however, that a shorter p53 protein, D160p53, promotes cancer cell growth and invasion and is often present in cells with mutated p53. Here we could understand how D160p53 is produced in cancer cells and the impact this has for cancer progression. D160p53 protein is fabricated through an alternative process of protein synthesis that uses a specific RNA structure called IRES. The sequence that codes for this IRES in the p53 gene is often mutated in cancer. This leads to excessive and uncontrolled synthesis of D160p53 in these cells, ultimately facilitating tumor expansion. Interestingly, the mutations that activate the IRES are the most common mutations in p53 and have been known as “gain-of-function” (GOF) mutations because they create “new” oncogenic functions, though it was never understood how. We propose that GOF mutations activate an IRES that produces the pro-oncogenic protein D160p53.

研究分野：cancer/p53/translation/regulatory mRNA

キーワード：cancer p53 Delta160p53 Cancer mutation mRNA translation IRES GOF mutation regulatory mRNA

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

At the start we knew, like everyone, that full-length (FL) p53 protein is a tumor suppressor and that the p53 gene is the most critical gene in tumorigenesis. We also knew that certain mutations in p53 are very common in cancer and transform p53 gene into an oncogene that drives tumor growth and metastasis. What was not known, however, is what are the mechanisms that transform the tumor suppressor p53 gene into an oncogene.

2. 研究の目的

I had previously reported that a shorter p53 gene product, the D160p53 protein, is synthesized (expressed) in cancer cells that have specific mutations in the p53 gene and induces cancer cell growth, survival and invasion. The objective of this study was to investigate the mechanisms by which D160p53 is expressed in cancer cells and estimate the impact of its expression on tumor progression.

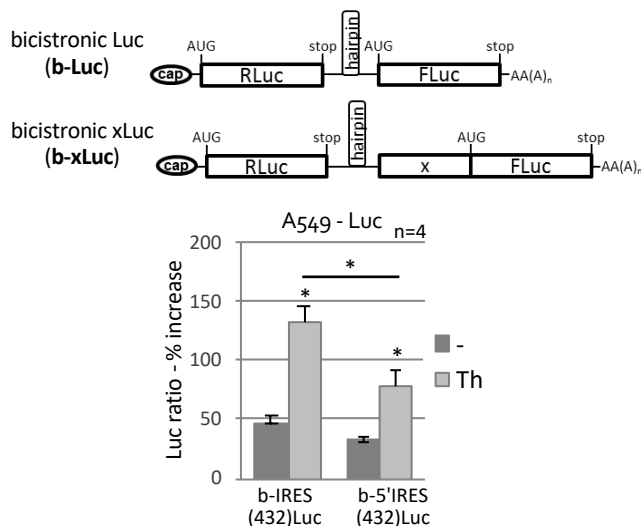
3. 研究の方法

We investigated the mechanisms that lead to accumulation of D160p53 in cancer cells upon p53 gene mutation. We could observe it was due to an increase in mRNA translation. We used different reporter systems to identify the exact mechanism of translation and the exact mutations that affect D160p53 synthesis. We investigated changes in RNA structure induced by the cancer mutations by using primer extension assays. We could revert the RNA structures and phenotype by using double mutants that confirmed our hypothesis. Finally we performed isoform-specific knock-down using antisense oligos together with cell-death, growth and tumor formation assays (both soft-agar and mouse xenograft) to show the importance of mutation-induced D160p53 translation for the oncogenic phenotypes of mutant p53 cells.

4. 研究成果

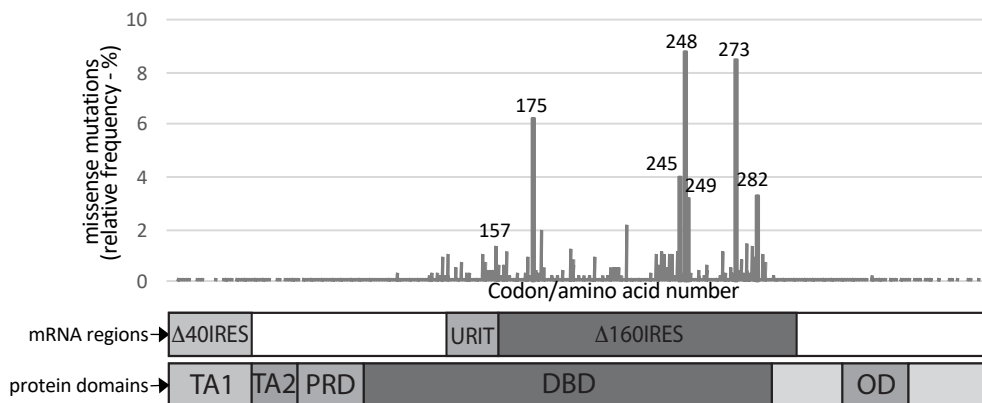
We could show that:

- (1) D160p53 protein is translated via a new internal ribosome entry site (IRES) present in the coding region of p53 mRNA:



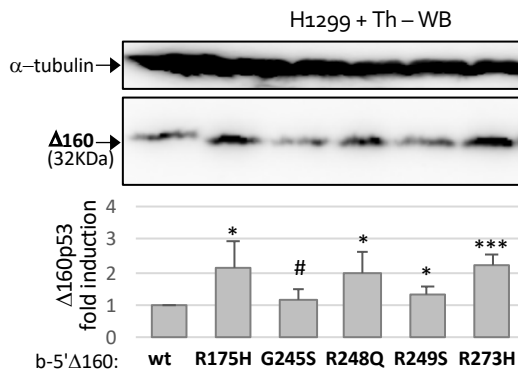
**Figure 1.** Dual luciferase reporter system shows IRES activity when the region downstream of AUG160 in the coding region of p53 mRNA is cloned upstream of FLuc. Interestingly the 5'-UTR of D160 inhibited D160p53 IRES activity.

(2) The most common mutations in p53 overlap with the D160p53IRES:



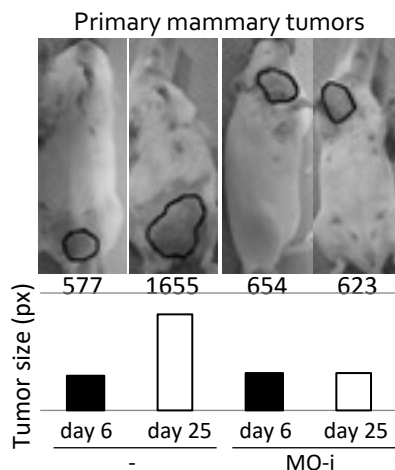
**Figure 2.** Most frequent mutations in p53 in cancer coincide with the DNA binding domain (DBD) in the p53 protein but even coincide even better with the new IRES that we have just identified in the p53 mRNA.

(3) “gain-of-function” (GOF) but not “loss-of-function” mutations in p53 activate D160p53IRES and induce D160p53 protein expression:



**Figure 3.** Loss-of-function (LOF) mutations inhibit p53 gene’s capacity to suppress tumors, while Gain-of-function (GOF) mutations in p53 (only works like this for p53, doesn’t work like this for any other gene) are mutations that inactive p53’s tumor suppressor activity plus also generate pro-oncogenic features. Interestingly GOF mutations like R175H, R248Q and R273H activated D160p53IRES and D160p53 protein expression, but LOF mutations did not. This is the first ever explanation to why some mutations in p53 are LOF while others are GOF.

(4) Inhibition of D160IRES activates cell-cycle arrest, cell death and impairs tumor growth:



**Figure 4.** Primary mammary tumors in MMTV-neu mice were treated with morpholino oligos against D160p53IRES (MO-i) or control.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 6件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Pan Melvin, Zorbas Christiane, Sugaya Maki, Ishiguro Kensuke, Kato Miki, Nishida Miyuki, Zhang Hai-Feng, Candeias Marco M., Okamoto Akimitsu, Ishikawa Takamasa, Soga Tomoyoshi, Aburatani Hiroyuki, Sakai Juro, Matsumura Yoshihiro, Suzuki Tsutomu, Proud Christopher G., Lafontaine Denis L. J., Osawa Tsuyoshi	4. 巻 13
2. 論文標題 Glutamine deficiency in solid tumor cells confers resistance to ribosomal RNA synthesis inhibitors	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-022-31418-w	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 該当する
1. 著者名 Lopez-Iniesta Maria Jose, Parkar Shrutee N., Ramalho Ana Catarina, Lacerda Rafaela, Costa Ines F., Zhao Jingyuan, Romao Luisa, Candeias Marco M.	4. 巻 23
2. 論文標題 Conserved Double Translation Initiation Site for 160p53 Protein Hints at Isoform's Key Role in Mammalian Physiology	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 15844 ~ 15844
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms232415844	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 該当する
1. 著者名 Lopez-Iniesta Maria Jose, Lacerda Rafaela, Ramalho Ana Catarina, Parkar Shrutee N., Marques-Ramos Ana, Pereira Bruna, Miyawaki Lina, Fujita Jun, Hrstka Roman, Romao Luisa, Candeias Marco M	4. 巻 -
2. 論文標題 Internal Translation of p53 Oncoproteins During Integrated Stress Response Confers Survival Advantage on Cancer Cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/2023.03.03.531004	査読の有無 無
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 該当する
1. 著者名 Parkar Shrutee N, Lopez-Iniesta Maria Jose, Ramalho Ana Catarina, Kimura Koto, Zhao Jingyuan, da Silva Rita Filipa, Romao Luisa, Candeias Marco M	4. 巻 -
2. 論文標題 246p53 is a new p53 isoform that responds to DNA damage and regulates tumour growth	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/2023.04.07.536059	査読の有無 無
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 該当する

1. 著者名 Jantrapirom Salinee, Koonrunsesomboon Nut, Yoshida Hideki, M. Candeias Marco, Pruksakorn Dumnoensun, Lo Piccolo Luca	4. 巻 -
2. 論文標題 Long noncoding RNA dependent methylation of nonhistone proteins	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 WIREs RNA	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/wrna.1661	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Lacerda Rafaela, Menezes Juliane, Candeias Marco M.	4. 巻 -
2. 論文標題 Alternative Mechanisms of mRNA Translation Initiation in Cellular Stress Response and Cancer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Advances in Experimental Medicine and Biology	6. 最初と最後の頁 117 ~ 132
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-3-030-19966-1_6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Marco Candeias
2. 発表標題 Translational switch during integrated stress response (ISR) provides oncogenic capability to tumor suppressor p53
3. 学会等名 MBSJ2019 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Marco Candeias
2. 発表標題 p53 family, isoforms and ubiquitination in development, inflammation, hypoxia and cancer
3. 学会等名 MBSJ2020 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名	Bruna Pereira, Rafaela Lacerda, M Maria Lopez-Iniesta, Luisa Romao, Marco Candeias
2. 発表標題	Common p53 mutations induce IRES-mediated translation of oncogenic shorter p53 isoforms
3. 学会等名	22 Reuniao Anual da Sociedade Portuguesa de Genetica Humana
4. 発表年	2018年 ~ 2019年

1. 発表者名	Ines Fonseca Costa, Rafaela Lacerda, Maria Lopez-Iniesta, Luisa Romao, Marco M Candeias
2. 発表標題	REGULATION OF IRES-MEDIATED TRANSLATION IN P53
3. 学会等名	23 Reuniao Anual da Sociedade Portuguesa de Genetica Humana
4. 発表年	2021年

1. 発表者名	Rafaela Lacerda, Ines Fonseca Costa, Maria Lopez-Iniesta, Luisa Romao, Marco Candeias
2. 発表標題	THE TUMOR SUPPRESSOR P53 ACQUIRES ONCOGENIC FUNCTIONS DUE TO A TRANSLATIONAL SWITCH DURING INTEGRATED STRESS RESPONSE
3. 学会等名	23 Reuniao Anual da Sociedade Portuguesa de Genetica Humana
4. 発表年	2021年

1. 発表者名	Rafaela Lacerda, Ines Fonseca Costa, Maria Lopez-Iniesta, Luisa Romao & Marco M. Candeias
2. 発表標題	Human TP53 is a tumour suppressor that acquires oncogenic functions during integrated stress response due to a translational switch
3. 学会等名	26th Annual Meeting of the RNA Society (国際学会)
4. 発表年	2021年

1. 発表者名 Luisa Romao & Marco M Candeias
2. 発表標題 Translational Control in Cancer
3. 学会等名 Cap-independent translation and cancer (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Marco M Candeias; Rieko Ohki; David Lane; Arnold Levine et al	4. 発行年 2020年
2. 出版社 IJMS	5. 総ページ数 378
3. 書名 p53 in Cancer and beyond, 40 Years after Its Discovery	

〔産業財産権〕

〔その他〕

Molecular and RNA Cancer Unit areap53.com
--

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
---------	---------