

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 25 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22700890

研究課題名（和文）革新的インビロイメージングを駆使した癌の浸潤・転移における変異型 p53 の機能解析

研究課題名（英文）Functional analysis of mutant p53 on cancer invasion and metastasis using innovative in vivo imaging

研究代表者

井上 靖道（INOUE YASUMICHI）

名古屋市立大学・大学院薬学研究科・講師

研究者番号：10450579

研究成果の概要（和文）：p53 と TGF- β シグナルは細胞増殖停止やアポトーシスを誘導するなどがん抑制因子として作用する。一方で TGF- β はがん細胞に対し EMT を誘導してがんの浸潤・転移を促す作用も知られ、また変異型 p53 は腫瘍の悪性度を高めるなど両者のシグナルは密接に関係している。本研究では、TGF- β シグナルの負の制御因子として知られる原がん遺伝子 Ski が p53 に結合しその作用を抑制することが Ski によるがん化の一因であることを明らかにした。さらに、Ski の過剰発現は抗がん剤に対して抵抗性を示すようになり、Ski を標的とした分子標的の可能性が期待できた。また、p53 のレギュレーターとして知られる SET8 が TGF- β シグナル伝達制御に関与することも見いだした。

研究成果の概要（英文）：p53 and TGF- β signaling are well known as tumor suppressors which regulate cytothesis and apoptosis, whereas critical roles of mutant p53 and TGF- β signaling in cancer metastasis have now emerged. In this project, we have demonstrated that proto-oncoprotein Ski, which is an important negative regulator of TGF- β signaling, interacts with p53 and attenuates the biological functions of p53. Moreover, we have shown that Ski may prove to be an especially valuable therapeutic target. Also, we identified that histone methyltransferase SET8, which represses the biological functions of p53, also negatively regulates TGF- β signaling.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍生物学

キーワード：がん遺伝子、シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

p53 は腫瘍の発生を抑制する重要ながん抑制遺伝子であり、ほとんどのヒト腫瘍にお

いてその遺伝子の欠損や変異が高頻度に認められる。また、p53 遺伝子の胚細胞変異が遺伝的に受け継がれているリー・フラウメニ症候群の家系では、家族性に多発癌が発症す

る。さらに p53 遺伝子欠損マウスではきわめて高い頻度で腫瘍が発生することから、p53 はがん抑制に重要な因子であることは明らかである。一方で、腫瘍由来の変異 p53 の中には、p53 の欠損した培養細胞株に導入すると、腫瘍の悪性度を高めるものがあることが知られており、このような **oncogenic** な作用を有する p53 の変異は機能獲得型変異 (**gain-of-function**) と呼ばれている。また、TGF- β はがんの初期においては増殖抑制的な作用を示すが、後期においてはがん細胞の浸潤・転移を促進するという二面性を持ち、その相反する作用は Ras や Myc などのがん遺伝子によって調節されることが知られている。近年、p53 経路と TGF- β シグナルとのクロストークが注目されており、変異型 p53 が TGF- β によるがん細胞の浸潤・転移を促進することが報告されているがその分子メカニズムについてはまだ良くわかっておらず、p53 と TGF- β シグナルとのクロストークを解析することは発がんメカニズムの解明にとどまらず、がんの浸潤・転移のメカニズムを理解する上で重要であると考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、がんの浸潤・転移で重要な役割を果たす p53 と TGF- β シグナルとのクロストークを中心に、細胞生物学・分子生物学的アプローチならびにインビボイメーjing 技術を用いて解析をおこない、がんの浸潤・転移のメカニズムを理解することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) p53 を制御する新たな分子の同定とその作用機序

我々は TGF- β シグナルを負に制御する原がん遺伝子 Ski による発がんメカニズムを明らかにすべく Ski 結合タンパクとして p53 を同定していた。そこで、Ski による p53 の制御の可能性について検討を進めた。Ski による p53 活性制御については、Western blotting、RT-PCR 等で解析をおこなった。また p53 による生物学的応答への影響については BrdU

を用いた細胞増殖やアポトーシスの誘導等で検討した。

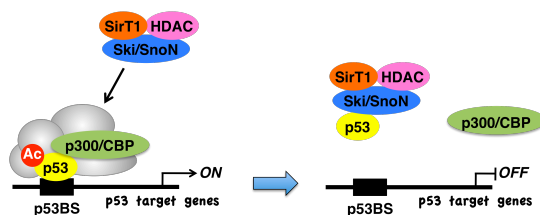
(2) TGF- β シグナルを制御する新たな分子の同定とその作用機序

近年、がんの浸潤・転移にヒストンメチル化・脱メチル化が深く関与していることが報告されており、それらメチルトランスフェラーゼと TGF- β シグナルとの関係を調べたところ、p53 経路の制御分子として知られる SET8 が TGF- β シグナルを制御する可能性が浮上した。そこで TGF- β シグナルに対する SET8 の作用を細胞増殖及び浸潤・転移について分子生物学的手法ならびにインビボイメーjing 技術を用いて検討を進めた。

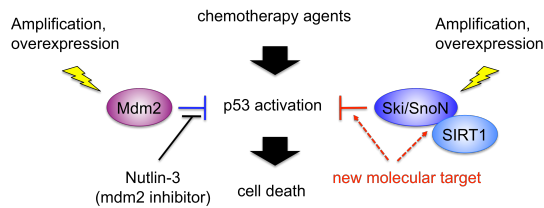
4. 研究成果

(1) 原がん遺伝子 Ski による新たな細胞がん化のメカニズムの研究

野生型 p53 を持つがん細胞株に Ski の siRNA を導入して Ski の発現を抑制すると p53 の転写活性が増強され、また、p53 依存性の細胞周期停止ならびにアポトーシスが增強された。逆に、Ski を過剰発現させると p53 の活性化が抑制されたことから、確かに Ski は p53 のネガティブレギュレーターであることが実証された。さらに、Ski がどのように p53 の転写活性化を抑制しているか検討したところ、p53 のアセチル化を抑制して DNA 結合能を低下させることがわかった。続いて、Ski による p53 アセチル化抑制機構の解析を進めた。Ski の新たな結合タンパクとしてヒストン脱アセチル化酵素 SIRT1 を同定し、SIRT1 が Ski の p53 に対する活性に必須であることが明らかとなった。Ski はスキヤフォールドとして SIRT1 を p53 ヘリクルートし、Ski が SIRT1 と協調的に p53 の脱アセチル化を促していた。



さらに、ヒトがん細胞株での Ski の過剰発現は抗がん剤に対して抵抗性を示すようになり、逆に Ski のノックダウンでその感受性が増強した。また、その作用は p53 に依存性していることも明らかとなった。以上の結果により、Ski は p53 活性を抑制することで抗がん剤抵抗性を示すことが明らかとなったので、Ski を標的とした分子標的の可能性が期待された (Inoue et al., *J Biol Chem*, 2011)。



(2) TGF- β シグナルを制御する新たな分子の同定とその作用機序

ヒストンメチルトランスフェラーゼ SET8 は p53 を負に制御することが知られているが、我々は新たに SET8 が TGF- β シグナルを制御することを見いだした。最初に、細胞内において SET8 と Smads が結合するかどうかを検討したところ、Receptor-activated Smad (R-Smad) である Smad2 と Smad3 が SET8 と結合することがわかった。また、Smad2 と SET8 との結合は TGF- β シグナルにより増強された。R-Smad と SET8 が結合することが明らかとなったため、次に SET8 をノックダウンできる shRNA 発現ベクターを使用し、TGF- β により活性化されるレポーター遺伝子を用いてレポーターアッセイを行った。SET8 をノックダウンすると TGF- β による転写活性化の増強が見られ、SET8 は TGF- β シグナルを負に制御していることが示唆された。そこで、ヒト肝がん由来細胞株 HepG2 を用いて TGF- β 刺激におけるその標的遺伝子の発現を RT-PCR 法により解析したところ、SET8 のノックダウンにより *PAI-1* などの TGF- β 標的遺伝子の発現が増強されることが明らかとなった。SET8 はヒトがんではそのタンパクの高発現が見られており、SET8 の過剰発現ががん細胞における TGF- β の増殖抑制作用を回避させる原因の一つである可能性が考えられた。一方で、SET8 はがんの浸潤・転移など腫瘍の進展に

働く TGF- β シグナルの作用には影響を与えない結果が得られつつあり、SET8 は TGF- β の作用を使い分ける分子として働いている可能性が示唆された。

(3) 変異型 p53 新規標的遺伝子の同定とその分子の機能解析

変異型 p53 新規標的遺伝子の探索をおこなう実験系を確立し検討を進めたが、新たなターゲットの発見には至らなかった。変異型 p53 は三次元培養下でその機能を強く発揮されるという報告がなされており、今後そのような条件下において変異型 p53 標的遺伝子の同定を目指したい。

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 5 件)

- ① Imamura T, Hikita A, Inoue Y. The roles of TGF- β signaling in carcinogenesis and breast cancer metastasis. *Breast Cancer*, **19**: 118-124, 2012. 査読有.
- ② Dan S, Okamura M, Mukai Y, Yoshimi H, Inoue Y, Hanyu A, Sakaue-Sawano A, Imamura T, Miyawaki A, Yamori T. ZSTK474, a specific PI3K inhibitor, induces G1 arrest of the cell cycle in vivo. *Eur J Cancer*, **48**: 936-943, 2012. 査読有.
- ③ 今村健志, 疋田温彦, 井上靖道, 羽生亜紀. 細胞周期/転移への Fucci 技術. がん分子標的治療, **9**: 227-233, 2011. 査読無.
- ④ Inoue Y, Iemura S, Natsume T, Miyazawa K, Imamura T. Suppression of p53 activity through the cooperative action of Ski and histone deacetylase SIRT1. *J Biol Chem*, **286**: 6311-6320, 2011. 査読有.
- ⑤ Kido S, Kuriwaka-Kido R, Umino-Miyatani

Y, Endo I, Inoue D, Taniguchi H Inoue Y, Imamura T, Matsumoto T. Mechanical stress activates Smad pathway through PKC δ to enhance interleukin-11 gene transcription in osteoblasts. *PLoS One*, 5: e13090, 2010. 査読有.

[学会発表] (計 3 件)

- ① Inoue Y, Imamura T. Oncoprotein Ski cooperates with histone deacetylases and facilitates suppression of p53 activity. 第 69 回日本癌学会学術総会, 2010 年 9 月 22 日, 大阪市, 大阪国際会議場
- ② Inoue Y, Fukunaga E, Hanyu A, Imamura T. Smurf2 induces ubiquitin-dependent degradation of Smurf1 to prevent breast cancer metastasis to bone. 第 59 回藤原セミナー, 2010 年 7 月 16 日, 苫小牧市, グランドホテルニュー王子
- ③ 井上靖道, 今村健志. がん遺伝子 Ski-SIRT1 複合体による p53 活性制御機構の解析. 第 14 回日本がん分子標的治療学会学術総会, 2010 年 7 月 8 日, 東京都江戸川区, タワーホール船堀

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井上 靖道 (INOUE YASUMICHI)

名古屋市立大学・大学院薬学研究科・講師
研究者番号: 10450579

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし