

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10697

研究課題名(和文) iASPP遺伝子発現の調節機構と子宮頸癌細胞における機能的役割

研究課題名(英文) Functional role and regulatory mechanism of iASPP in cervical cancer

研究代表者

董 培新 (DONG, PEIXIN)

北海道大学・医学研究院・助教

研究者番号：50602504

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：p53の抑制因子であるiASPPは子宮頸癌で発現亢進し、その発現制御によりp53が再度活性化される可能性がある。我々は、子宮頸癌細胞におけるiASPP発現の調節機構と、その機能的役割(特にiASPPによるp53経路活性の制御)の詳細を明らかにすることを目的として本研究を行った。その結果、iASPPを標的する複数の癌抑制的miRNAの同定及びその機能解析に成功した。また、iASPPは直接にp53を制御することによって、子宮頸癌の転移能及び抗がん剤耐性の獲得に関与するという重要な成果が得られた。本研究により得られた知見は、今後子宮頸癌の根絶を目指す癌研究の発展に大きく貢献していると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Derepression of wild-type p53 by suppressing its negative inhibitor iASPP represents a potential therapeutic option for cervical cancer. We investigated whether targeting iASPP can restore p53 tumor suppressor functions and how epigenetic mechanisms, such as aberrant microRNA (miRNA) expression, regulate iASPP expression in this cancer. We found that iASPP acts as a key promoter of CC cell proliferation, EMT, invasion and cancer stemness, by interacting with p53 to suppress p53-mediated transcription of target genes and to reduce p53-responsive microRNA-34a levels. microRNA-124 directly targets iASPP to reduce the expression of iASPP and attenuate cervical cancer cell growth and invasiveness. iASPP also promotes EMT and confers cisplatin resistance in cervical cancer via p53-miR-20a-FBXL5/BTG3 signaling. Altogether, reducing iASPP expression leads to p53-dependent tumor suppression, suggesting a therapeutic strategy to treat iASPP-associated cervical cancer.

研究分野：婦人科腫瘍学

キーワード：子宮頸癌 microRNA EMT 癌幹細胞 p53

1. 研究開始当初の背景

子宮癌検診の普及で、進行子宮頸癌(頸癌)の発生頻度は減少傾向がある。しかし、近年若い世代の発生率が急増し、20~30歳代においては、婦人科悪性腫瘍の中で最も頻度の高い癌である。頸癌では、その発症過程と病態に、ヒトパピローマウイルス HPV (Human Papillomavirus) の感染が関与することが明らかにされ、頸癌の約9割に HPV 感染が認められる。HPV 感染者の多くは頸癌を発生しなく、HPV 感染と同時に並存する癌遺伝子や癌抑制遺伝子などの異常を分子レベルで明らかにする病態解明が重要である。他の癌と違って、頸癌では代表的な癌抑制遺伝子 p53 の変異は殆ど認められず、野生型 p53 が大半を占める。特に、HPV16、約5割の頸癌に同定され、その転写産物である E6 が、野生型 p53 と結合し、p53 の機能を抑制することで発癌に関与すると報告されている。p53 の安定性を高める Nutlin-3 は癌細胞に対して有意な細胞死を誘導しないことも判明した。新規分子標的治療法の開発は、頸癌の治療成績改善につながる可能性がある。

iASPP 遺伝子は、p53 遺伝子機能の抑制因子として様々な腫瘍に発現亢進し、癌細胞の増殖能と運動能の促進に大きな影響を与える。近年、その発現亢進は、早期頸癌の段階から高い頻度で検出され、高度侵襲と予後不良と有意に関係することが明らかになったが(Cell Tissue Res 2013)。iASPP 遺伝子の発現調節機構と頸癌細胞における機能的役割について十分に解明されていない。

一方、非コード RNA のうち、22塩基ほどの1本鎖 RNA により成る microRNA (miRNA) は、部分的に相補的な標的 mRNA と結合し、転写後の翻訳を抑制すると考えられている。更に、組織特異な発現様式を示し、腫瘍細胞の増殖能、運動能、浸潤能などの制御に強い影響を及ぼすと考えられる。大腸癌では、miR-124 は、iASPP 遺伝子を標的し、野生型 p53 が活性化され、癌細胞の増殖を抑制することが報告された(Biomed Res Int 2013)。我々の予備実験の結果から、iASPP 遺伝子が頸癌の発症と進展を促進し、その発現が、miR-124 などの癌抑制型 miRNAs により制御されている可能性が示唆された。

2. 研究の目的

頸癌における iASPP 遺伝子発現の制御機構と頸癌細胞における機能的役割(特に iASPP による p53 経路活性の制御機構)の詳細を明らかにする。

まず、miRNA の発現プロファイル解析により、新たな頸癌特異的 miRNA を単離する。同定される潜在的な癌抑制型 miRNA の機能解析を行い、miRNA による iASPP 遺伝子発現の制御を明らかにする。

そして、頸癌細胞における iASPP 遺伝子の役割について、RNA 干渉法または過剰発現による癌細胞悪性形質への影響を解析する。

更に、iASPP による野生型 p53 不活性化の分子メカニズムを解析して、iASPP の阻害により野生型 p53 分子経路の再度活性化の可能性を検討する。

3. 研究の方法

- (1) アジレント miRNA と遺伝子マイクロアレイを用いて、網羅的な miRNA 及び遺伝子の発現解析により、頸癌発生及び進展に関与する候補 miRNA と遺伝子を同定し、Realtime PCR と Western blot によりその発現レベルを確認する。
- (2) TargetScan と miRDB などのデータベースを用いて、(1)の解析より発見した候補 miRNA と遺伝子と照合して、頸癌の発癌と進展に関わる miRNA とその標的遺伝子群を絞り込む。
- (3) 候補 miRNA を頸癌細胞に導入して、miRNA による iASPP 遺伝子の mRNA と蛋白質発現の変化を Realtime PCR と Western blot 法により検討する。更に、候補 miRNA が iASPP 遺伝子の 3'-非翻訳領域と直接に結合するかについて、3'-非翻訳領域を含むレポータープラスミドを構築して、Luciferase assay で miRNA による iASPP 遺伝子の制御について確認する。
- (4) 頸癌細胞株を用いて、候補 miRNA の機能解析を行う。具体的に、miRNA の発現を過剰発現(Pre-miRNA)或はノックダウン(Anti-miRNA)の手法で抑制し、癌細胞の運動能を wound healing assay、浸潤能を invasion assay で、増殖能を clone formation assay で、スフェア形成能を sphere formation assay で、抗癌剤に対する耐性を MTT assay で、EMT、増殖関連遺伝子や癌幹細胞マーカー遺伝子発現の変化を Realtime PCR と Western blot 法により検討することで、頸癌細胞の悪性形質を規定する miRNA を、特に iASPP 遺伝子を抑制する miRNA を同定する。
- (5) iASPP 遺伝子の機能解析の手法として、iASPP 遺伝子を組み込んだ発現 vector を構築して、また特異的に iASPP 遺伝子をノックダウンする siRNA を設計して、頸癌細胞株に Effectene Transfection Reagent を用いて transfection を行う。
- (6) iASPP の強制発現と抑制は、EMT 形質に与える影響を顕微鏡で形態的観察して、E-cadherin、N-cadherin、ZO-1、Vimentin、Twist1、ZEB1 などの EMT 関連遺伝子の発現を Western blot 法により解析する。
- (7) iASPP の過剰発現と発現低下による癌細胞機能に変化があるかどうかについて、頸癌細胞を用いて、細胞 wound healing assay、invasion assay、clone formation assay、sphere formation assay、MTT assay で解析を行う。抗癌剤に対する耐性を cell counting Kit-8 で検討する。細胞のアポトーシスに関しては、

Annexin V Apoptosis Assay、TUNEL apoptosis assay によって解析を行う。Caspase 依存型の細胞アポトーシスを caspase-3/7 kit により分析する。

- (8) 頸癌細胞において、iASPP と p53 の結合があるのかを明確にするため、iASPP の免疫沈降を行い、沈降物の Western blot 解析は p53 抗体を用いて行う。
- (9) iASPP の過剰発現や、特異的 siRNA また miRNA による iASPP 発現の抑制は、p53 遺伝子の転写能を阻害するのかを、p53 とその下流標的である p21、Bax、PUMA などの promoter との結合能をクロマチン免疫沈降法により分析する。更に、luciferase assay を用いて、p21、Bax、PUMA promoter の転写活性を解析して、iASPP 発現の低下は、p53 遺伝子の下流標的遺伝子群を再活性化させるのかを明らかにする。

4. 研究成果

- (1) まず、頸癌患者の手術組織検体を用いて、アジレント miRNA と遺伝子マイクロアレイ発現解析により、複数の候補 miRNA と遺伝子を同定し、Realtime PCR によりその発現レベルを確認した。続いて、TargetScan と miRDB などのデータベースを用いて、マイクロアレイ解析より発見した候補 miRNA 及び遺伝子と照合して、頸癌の発癌と進展に関わる複数の miRNA とその標的遺伝子群を絞り込んだ。
- (2) そして、iASPP を直接に標的する miRNA 群を検索したところ、miR-124 及び miR-214 など複数の miRNA を同定した。miR-124 及び miR-214 を頸癌細胞株 HeLa、SiHa 及び CaSki に導入して、これらの miRNAs による頸癌細胞の EMT 形質、細胞運動、細胞浸潤、増殖及び癌幹細胞形質の制御を評価した。結果として、miR-124 及び miR-214 を導入すると、HeLa 及び SiHa 癌細胞は間葉系としての形質を失い、癌細胞の増殖能、運動能、浸潤能及び自己複製能が有意な抑制されることから、これらの miRNAs は頸癌細胞の悪性表現型を抑制することを明らかにした (Scientific Reports 2016)。
- (3) 更に、子宮体癌細胞にも miR-124 を導入して、その潜在的な抗癌機能を検討した。その結果、子宮体癌細胞においても、miR-124 は重要な癌抑制因子として機能して、癌遺伝子 IQGAP1 を直接に制御することで、子宮体癌細胞の EMT 形質及び浸潤能を抑えることを世界で初めて報告した (Oncotarget 2016)。
- (4) iASPP 遺伝子を組み込んだ発現 vector また特異的に iASPP 遺伝子をノックダウンする siRNA を、頸癌細胞株に transfection を行い、iASPP 遺伝子発現レベルの変化を Realtime PCR 及び Western blot 法により解析し、iASPP 遺

伝子発現の変化を確認した。次は、iASPP の強制発現と抑制による頸癌細胞の悪性形質の変化について解析した結果、iASPP の強制発現により頸癌細胞株 HeLa と SiHa をはじめ複数の癌細胞株で、癌細胞株の遊走能と浸潤能は増加し、上皮マーカーの E-cadherin と ZO-1 発現低下と間葉系マーカーの Vimentin、Twist1 と ZEB1 発現上昇がみられ、EMT に特有の形態変化を引き起こし、EMT が誘導されたことを確認した。逆に、iASPP の発現を特異的に抑制すると、EMT の形質を逆転させることが明らかになった。更に、iASPP の過剰発現と発現低下による癌幹細胞様形質の変化を解析し、また抗癌剤に対する耐性を検討した。これらの実験において、iASPP の発現を抑制すると、sphere 形成能が低下し、タキソール耐性も減弱し、癌細胞生存率が低下することが確認できた (Scientific Reports 2016)。

- (5) iASPP による p53 経路の不活性化機構の詳細を明らかにすることを目的として研究を行った。頸癌細胞において、両者の結合があるのかを明確にするため、iASPP の免疫沈降を行った結果、iASPP が p53 に直接に結合することで、p53 の機能を阻害することを明らかにした (Scientific Reports 2016)。
- (6) 癌の転移に深く関わる miR-20a など miR-17-92a cluster は、p53 によって抑制されていることがこれまで報告された。我々は iASPP 遺伝子がいかに p53 を制御することによって、miR-20a の発現、また頸癌細胞の浸潤及び抗がん剤耐性の獲得に関与するのか、詳細に解明した。iASPP 遺伝子の導入或は特異的抑制により、定量 PCR 法による miR-20a の発現を分析したところ、miR-20a の発現は iASPP によって促進されることや、p53 によって抑制されることを発見した。そして、iASPP によって誘導された頸癌細胞の浸潤及び抗がん剤耐性は、miR-20a のノックダウンによって抑制されることを見出した。更に、miR-20a の標的遺伝子を検索したところ、FBXL5 と BTG3 を同定した。FBXL5 と BTG3 遺伝子の導入で、頸癌細胞の浸潤及び抗がん剤耐性が、著しく抑制されたことを明らかにした (J Exp Clin Cancer Res 2017)。
- (7) 以上の研究によって、iASPP 遺伝子の過剰発現は、頸癌の転移を促進し、その発現が、miR-124 などの癌抑制型 miRNAs により制御されていることが判明した。iASPP は p53 遺伝子経路を介して、その下流に位置する miR-20a などの発現を制御することで、頸癌の転移能及び抗がん剤耐性の獲得に関与するという重要な成果が得られている。本研究により得られた知見は、今後子宮頸癌の根絶を目指

す癌研究の発展に大きく貢献している
と考える。

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12件)

Dong P, Xiong Y, Hanley SJB, Yue J, Watari H. Musashi-2, a novel oncoprotein promoting cervical cancer cell growth and invasion, is negatively regulated by p53-induced miR-143 and miR-107 activation. *J Exp Clin Cancer Res*. 2017 Oct 26;36(1):150. doi: 10.1186/s13046-017-0617-y. 査読有

Zhao G, Wang Q, Gu Q, Qiang W, Wei JJ, Dong P, Watari H, Li W, Yue J. Lentiviral CRISPR/Cas9 nickase vector mediated BIRC5 editing inhibits epithelial to mesenchymal transition in ovarian cancer cells. *Oncotarget*. 2017 Oct 17;8(55):94666-94680. doi: 10.18632/oncotarget.21863. 査読有

Zhang Q, Dong P, Liu X, Sakuragi N, Guo SW. Enhancer of Zeste homolog 2 (EZH2) induces epithelial-mesenchymal transition in endometriosis. *Sci Rep*. 2017 Jul 28;7(1):6804. doi: 10.1038/s41598-017-06920-7. 査読有

Xiong Y, Sun F, Dong P, Watari H, Yue J, Yu MF, Lan CY, Wang Y, Ma ZB. iASPP induces EMT and cisplatin resistance in human cervical cancer through miR-20a-FBXL5/BTG3 signaling. *J Exp Clin Cancer Res*. 2017 Apr 11;36(1):48. doi: 10.1186/s13046-017-0520-6. 査読有

Ihira K, Dong P, Xiong Y, Watari H, Konno Y, Hanley SJ, Noguchi M, Hirata N, Suizu F, Yamada T, Kudo M, Sakuragi N. EZH2 inhibition suppresses endometrial cancer progression via miR-361/Twist axis. *Oncotarget*. 2017 Feb 21;8(8):13509-13520. doi: 10.18632/oncotarget.14586. 査読有

Huo W, Zhao G, Yin J, Ouyang X, Wang Y, Yang C, Wang B, Dong P, Wang Z, Watari H, Chaum E, Pfeffer LM, Yue J. Lentiviral CRISPR/Cas9 vector mediated miR-21 gene editing inhibits the epithelial to mesenchymal transition in ovarian cancer cells. *J Cancer*. 2017 Jan 1;8(1):57-64. doi: 10.7150/jca.16723. 査読有

Wang B, Shen A, Ouyang X, Zhao G, Du Z, Huo W, Zhang T, Wang Y, Yang C, Dong P, Watari H, Pfeffer LM, Yue J. KLF4 expression enhances the efficacy of

chemotherapy drugs in ovarian cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2017 Mar 11;484(3):486-492. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.01.062. 査読有

Dong P, Xiong Y, Watari H, Hanley SJ, Konno Y, Ihira K, Suzuki F, Yamada T, Kudo M, Yue J, Sakuragi N. Suppression of iASPP-dependent aggressiveness in cervical cancer through reversal of methylation silencing of microRNA-124. *Sci Rep*. 2016 Oct 21; 6: 35480. doi: 10.1038/srep35480. 査読有

Dong P, Xiong Y, Watari H, Hanley SJ, Konno Y, Ihira K, Yamada T, Kudo M, Yue J, Sakuragi N. MiR-137 and miR-34a directly target Snail and inhibit EMT, invasion and sphere-forming ability of ovarian cancer cells. *J Exp Clin Cancer Res*. 2016 Sep 5;35(1):132-141. doi: 10.1186/s13046-016-0415-y. 査読有

Dong P, Ihira K, Xiong Y, Watari H, Hanley SJ, Yamada T, Hosaka M, Kudo M, Yue J, Sakuragi N. Reactivation of epigenetically silenced miR-124 reverses the epithelial-to-mesenchymal transition and inhibits invasion in endometrial cancer cells via the direct repression of IQGAP1 expression. *Oncotarget*. 2016 Apr 12;7(15):20260-70. doi: 10.18632/oncotarget.7754. 査読有

Hanley SJ, Fujita H, Yokoyama S, Kunisawa S, Tamakoshi A, Dong P, Kobayashi N, Watari H, Kudo M, Sakuragi N. HPV self-sampling in Japanese women: A feasibility study in a population with limited experience of tampon use. *J Med Screen*. 2016 Sep;23(3):164-70. doi: 10.1177/0969141315625702. 査読有

Dong P, Ihira K, Hamada J, Watari H, Yamada T, Hosaka M, Hanley SJ, Kudo M, Sakuragi N. Reactivating p53 functions by suppressing its novel inhibitor iASPP: a potential therapeutic opportunity in p53 wild-type tumors. *Oncotarget*. 2015 Aug 21;6(24):19968-75. doi: 10.18632/oncotarget.4847. 査読有

[学会発表](計11件)

Dong P, Epigenetic aspects of endometrial cancer progression: Insights into interactions of EZH2 and microRNAs, The 4th International Obstetrics & Gynecology Summit · The Red House Forum, 2017.6.4, Shanghai, China

Dong P, Reactivating the expression of

silenced miR-124 for endometrial cancer treatment, The 7th Annual World Gene Convention, 2016, 11.5, Shanghai, China

董培新, 井平 圭, 金野 陽輔, 渡利 英道, 櫻木 範明, Suppression of iASPP-dependent aggressiveness in cervical cancer through reversal of methylation silencing of microRNA-124, 第15回日本婦人科がん分子標的研究会, 2016.8.20, 札幌

Dong P, Targeting EZH2-miR-361-Twist axis in endometrial cancer, The 6th Annual World Congress of Molecular & Cell Biology, 2016.4.26, Dalian, China
Ihira K, **Dong P**, Hanley SJ, Sakuragi N. EZH2 stimulates Twist expression by epigenetic silencing of its suppressor miR-361 through an YY1-dependent mechanism, 第68回日本産科婦人科学会学術講演会, 2016.4.2 東京

Dong P, EZH2 Stimulates Twist Expression by Epigenetic Silencing of Its Suppressor miR-361 through an YY1-dependent Mechanism, The 8th World Congress of Regenerative Medicine & Stem Cell, 2015.11.20, Shanghai, China

Dong P, MicroRNA-101 targets EZH2, MCL-1 and FOS to suppress proliferation, invasion and stem cell-like phenotype of aggressive endometrial cancer cells, The European Cancer Congress, 2015.9.27, Vienna, Austria

金野 陽輔, **董培新**, 渡利 英道, 鈴木 史彦, 櫻木 範明, MicroRNA-101 は EZH2, MCL-1, FOS を制御して高悪性度子宮体癌細胞の増殖, 浸潤, がん幹細胞様形質を抑制する, 第14回日本婦人科がん分子標的研究会学術集会, 2015.7.17, 松本

Dong P, EZH2 stimulates Twist expression by epigenetic silencing of its suppressor miR-361 through an YY1-dependent mechanism. 第17回日本RNA学会年会, 2015.7.16, 札幌

Dong P, MicroRNA-101 attenuates Twist1 expression by induction of its negative regulator miR-361-5p through an EZH2-dependent mechanism, 第67回日本産科婦人科学会学術講演会, 2015.4.10, 横浜

金野 陽輔, **董培新**, 鈴木 史彦, 櫻木 範明, MicroRNA-101 は EZH2, MCL-1, FOS を制御して高悪性度子宮体癌細胞の増殖, 浸潤, がん幹細胞様形質を抑制する, 第67回日本産科婦人科学会学術講演会, 2015.4.10, 横浜

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

<https://scholar.google.com/citations?user=Ze3zIs4AAAAJ>

https://www.researchgate.net/profile/Peixin_Dong

6. 研究組織

(1) 研究代表者

董培新(DONG, Peixin)

北海道大学・大学院医学研究院・助教

研究者番号: 50602504