

令和元年6月19日現在

機関番号：33920

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09381

研究課題名(和文) 内在性遺伝子ターゲティング法を用いた肝臓におけるp53アイソフォームの機能解析

研究課題名(英文) The analysis of the p53 isoforms in hepatocellular carcinoma cells using endogenous gene modification.

研究代表者

中尾 春壽 (NAKAO, HARUHISA)

愛知医科大学・医学部・教授

研究者番号：60326139

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：CRSPR/CAS9システムで 40p53および 133p53の内在性遺伝子改変細胞株を樹立し、40p53は肝細胞において細胞増殖を抑制し細胞老化を誘導することを証明した(J cell Sci 2017)。C末の構造が異なる 133p53 と 133p53 も細胞増殖を抑制し細胞老化を誘導した。p53同士は結合するがp53 とp53は結合しなかった。cDNAマイクロアレイ法で遺伝子発現様式を検討しp53の標的遺伝子はアイソフォーム間で異なる可能性が示唆された。ラットを用いてinvivoでのアイソフォームを解析したが加齢と共に増加するFL-p53は糖尿病ラットでは変化を認めなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝臓は本邦で年間3万人以上が死亡しており、肝臓の制御と撲滅は急務であるが癌の分子機構は不明な点が多い。発癌には複数の癌抑制遺伝子が関与するが、その中でもp53は多くの癌種に関与する重要な蛋白質である。近年、蛋白質のアイソフォームの重要性が認識され、その解析に注目が集まっている。我々は発癌に重要なp53蛋白質アイソフォームの肝臓における機能に着目して研究し、その一つである 40p53の肝臓での機能を世界で初めて報告した。p53には10以上のアイソフォームがあり他のp53アイソフォームにも研究を進展させた。p53アイソフォームの機能を解析することは発癌における分子機構の解明に貢献すると思われる。

研究成果の概要(英文)：We established several hepatocellular carcinoma cell lines of which endogenous TP53 alleles were modified using CRSPR/CAS9 system, and analyzed the function of several p53 splicing isoforms. We reported that 40p53 suppressed tumor cell proliferation and induced cellular senescence in hepatocellular carcinoma cells (J cell Sci 2017; 130(3): 614-625). 133p53 and 133p53, which have same structure in C-terminal but different in N-terminal, also showed the function as same as 40p53. However, 133p53 was combined with 133p53, but 133p53 was not. The cDNA array analysis suggested that target gene expression pattern to each isoform was different. In the animal experiment of p53 isoforms, the expression of full-length p53 decreased with aging in control rats, but did not in diabetes model rats. We are analyzing the detail more.

研究分野：肝臓病学

キーワード：p53 isoform CRSPR/CAS9 肝臓 p53 p53 細胞周期 アポトーシス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

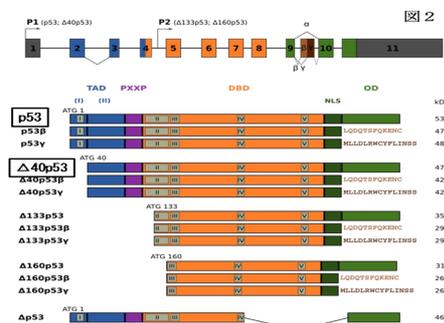
## 1. 研究開始当初の背景

肝癌は、本邦の悪性新生物部位別死因では第 4 位で年間 3 万人以上が死亡しており、肝癌の制御と撲滅は急務であるが、肝癌の pathogenesis における分子機構には未だ不明な点が多い。正常な細胞は、細胞外の分裂促進因子や成長因子などによる誘導を受けなければ増殖せず、細胞分裂を促進する分裂促進因子とそれを阻害する分裂阻害因子の両方の作用により細胞増殖が制御されている。しかし癌細胞は分裂促進因子に非依存的のみならず分裂阻害因子に抵抗性を示し、これらの因子と無関係に分裂、増殖をすることができ、細胞増殖を制御する機構が破綻している。

正常の細胞では、G1 期 S 期 G2 期 M 期 G1 期という順序で規則正しく細胞周期を繰り返して増殖するが、DNA 障害などの細胞周期に影響を及ぼす異常事態が生じた際には、異常を検知して修復機構に知らせるとともに修復期間は細胞周期を停止させて時間を稼ぐチェックポイント制御と呼ばれるシステムが備わっている。しかし、癌細胞では細胞周期チェックポイント制御機構が破綻しており、この制御機構の破綻が発癌に深く関与していると考えられている。細胞周期制御機構では、最初に Sensors と呼ばれる分子群が DNA 障害などの細胞ストレスを感知し、Mediators と呼ばれる複数の分子を介して Transducers の分子群を活性化させた後に Effectors 分子群が G1/S arrest や G2/M arrest によりチェックポイント制御を行なう。

Effectors の一つである p53 は guardian of the genome とも呼ばれ G1/S arrest や G2/M arrest を含む細胞周期チェックポイント制御機構を有するとともに DNA 修復、アポトーシス誘導、老化、血管新生制御など細胞の様々な機能を有しており(図 1) これらの機能が障害されることが発癌に重要であると考えられている。実際に p53 遺伝子 (TP53) の変異は、ヒト癌の中で最も高頻度にみられる遺伝子異常であり肝癌においても多数例に変異がみられ p53 は癌抑制遺伝子の一つとして肝発癌に深く関与している。

p53 には複数のスプライシングアイソフォーム(以下アイソフォーム)が存在することが知られているが(図 2) 各アイソフォームの役割に関しては不明な点が多い。p53 のアイソフォームのひとつであり、N 末端の 39 アミノ酸残基が欠失している delta40p53 (40p53) は、MDM2 結合部位を含む最初の transactivation domain (TAD-) を欠いている。40p53 の発現は、マウス胚性幹細胞やヒト神経前駆細胞および様々な上皮性、非上皮性悪性腫瘍において認められており、40p53 のマウスホモログである p44 を過剰発現させたトランスジェニックマウスは短命なことが知られている。また、一部のヒト癌細胞株を用いた実験では、40p53 はアポトーシスを介した制癌特性を有することや、野生型 p53 では誘導されない遺伝子も誘導することが報告されている。しかしながら、肝癌における 40p53 に関する報告はまだなく、その機能は明らかにされていない。肝臓における 40p53 をはじめとする p53 アイソフォームの機能や標的分子を解明することは、肝癌発現機構の解明のために重要であると思われる。申請者は、肝細胞内情報伝達系やアポトーシスの研究において豊富な経験を持ち分担研究者と肝癌における細胞周期チェックポイント制御機構の綻びを共同研究しており、研究過程にて我々は HepG2 細胞を用いた Cre-LoxP システムを用いたヒト細胞遺伝子ターゲティング法により 40p53 と p53 が



発現する内在性 p53 遺伝子ヘテロ破壊肝細胞株 (p53<sup>+/-</sup> 40) と CRISPR/Cas9 システムを用いたヒト細胞遺伝子ターゲティング法により TP53 の exon4 を改変して p53 の機能をノックアウトさせた内在性 p53 遺伝子ホモ破壊肝細胞株 (p53<sup>-/-</sup>) を既に確立しており、内在性遺伝子破壊肝細胞株や遺伝子ターゲティングの技術と経験は本研究に利用可能である。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、内在性遺伝子ターゲティング法を用いて肝臓における p53 アイソフォームの機能と標的分子の解析し、肝臓の pathogenesis における分子機構の解明に寄与することである。

## 3. 研究の方法

1) CRISPR/Cas9 システムを用いた遺伝子ターゲティング法により各種の p53 アイソフォームの内在性遺伝子改変肝細胞株を樹立する。

2) 作成した内在性遺伝子改変肝細胞株を用いて、over expression および negative dominant plasmid による外来性遺伝子導入や siRNA 法による標的遺伝子ノックダウンにより各々の p53 アイソフォームの機能を 細胞増殖能、細胞周期、アポトーシス、転写調節能を中心に解析する。細胞増殖に対しては MTT assay および clonogenic assay、細胞周期に対してはフローサイトメトリー、Western blot 法、RT-PCR 法、アポトーシスに対してはフローサイトメトリーおよび Western blot 法を用いる。転写調節能はルシフェラーゼ・アッセイを用いる。

3) Whole Human Genome オリゴ DNA マイクロアレイを用いて各 p53 アイソフォームに関連する分子を網羅的に解析して p53 アイソフォームの機能を検証する。

4) 実験動物を用いて in vivo における p53 アイソフォームの機能を解析する。

## 4. 研究成果

### 1) 40p53 の機能解析:

CRISPR/CAS9 システムを用いた 40p53 および 133p53 の内在性遺伝子改変細胞株 (p53<sup>40/40</sup>、p53<sup>133/133</sup>) を樹立し、既に作成した p53<sup>-/-</sup> および p53<sup>+/-</sup> 40 内在性遺伝子破壊肝細胞株と点変異導入した negative strand vector や siRNA 法を用いて 40p53 の機能を解析した。40p53 は、肝臓細胞においてアポトーシスの増加は認めずに細胞増殖を抑制し、細胞老化を誘導することを世界で初めて明らかにし報告した (J cell Sci 2017; 130(3): 614-625)。

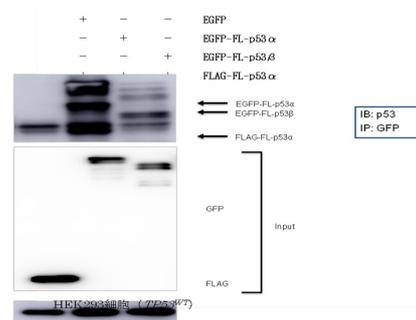
### 2) 133p53 , 133 p53 の機能解析:

40p53 よりも N 末端がさらに欠失した 133p53 の機能を解析した。40p53 と同様に解析したところ 40p53 と同様に肝臓細胞において細胞増殖を抑制し、細胞老化を誘導することを証明した。40p53 や 133p53 には N 末端の構造が同じだが C 末端の構造が異なるアイソフォームである 40p53 と 133p53 が存在する。133p53 の機能を検討したところ 133p53 と同様の機能を認めた。しかし、Luciferase assay による解析では、133p53 単独による p53 転写活性は低かった。

### 3) p53 アイソフォーム間の相互作用の解析

p53 蛋白質は 4 量体として機能し, 1 分子のみが変異型の場合は残り 3 分子の野生型形質は抑え込まれ, 変異型の形質を表現することが知られている。そのため isoform 同士の相互作用も p53 の活性に重要と考えられるため p53 アイソフォーム同士の相互作用に関して検討した。

野生型 p53 である full-length p53 (FL-p53) と C 末側の構造が異なる FL-p53 を加え 133p53 との相互作用を検討した。FLp53 と FLp53 による上乗せ効果は認められなかったが、133p53 は FLp53 と協調的な増殖効果が示唆された。しかし、FL-p53 同士は結合するが、FL-p53 と FL-p53 は結合しないことが明らかとなった。さらに 40p53 や 133p53 は典型的な p53 の DNA 結合領域には結合せずに増殖抑制効果を発揮する可能性が示唆された



#### 4) cDNA マイクロアレイ法による関連分子の解析

$TP53^{+/+}$  クローン、40p53 を発現する  $TP53^{40/WT}$  クローン、133p53 を発現する  $TP53^{133/133}$  クローン、p53 を発現しない  $TP53^{-/-}$  クローンにおいて各クローン間の遺伝子発現様式を cDNA マイクロアレイ法で比較検討した。その結果、p53 の標的遺伝子である *BAX*, *IGFBP3*, *FAS*,  $p21^{CIP1/WAF1}$  は、 $p53^{-/-}$  クローンに比べて FL-p53 や 40p53 を発現するクローンにおいて高発現を認めたが、 $TP53^{133/133}$  では発現変化が認められなかった。一方で、*ACSS1* は p53 アイソフォームを発現するすべてのクローンにおいて高発現を示した。以上の結果から、p53 の標的遺伝子はアイソフォーム間で異なる可能性が示唆された。

#### 5) 実験動物を用いた *in vivo* での p53 アイソザイムの解析

肝癌の背景因子のうち最も多いのは B 型・C 型肝炎ウイルスであるが、抗ウイルス剤の進歩によりその頻度は減少傾向にある。一方で NASH を代表とする日常生活習慣病に関連した非 B 非 C 型慢性肝疾患からの肝発癌が増加している。糖尿病は、日常習慣病の代表疾患であるが、糖尿病を合併していると糖尿病を有しない場合に比して 2 倍以上の肝発癌リスクがあると報告されている。我々は糖尿病が肝発癌の危険因子となることに着目し、糖尿病モデルラットである WBN/Kob ラットと Wistar ラット (対照) を用いて p53 アイソザイムの *in vivo* での機能を解析した。Wistar ラットでは加齢と共に増加する FL-p53 は WBN/Kob ラットでは変化を認めなかった。また、N 末領域 p53 のみをエピトープにもつ DO-1 抗体と p53 アイソフォームすべてを検知できるポリクロナール抗体を用いて検討すると 133p53 の分子量相当を呈する band に差異を認めたが、詳細は現在解析中である。

### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

40p53 suppresses tumor cell proliferation and induces cellular senescence in hepatocellular carcinoma cells. Ota A, Nakao H, Sawada Y, Karnan S, Wahiduzzaman M, Inoue T, Kobayashi Y, Yamamoto T, Ishii N, Ohashi T, Nakade Y, Sato K, Itoh K, Konishi H, Hosokawa Y, Yoneda M. J Cell Sci. 2017 Feb 1;130(3):614-625. doi: 10.1242/jcs.190736.

[学会発表] (計 5 件)

Haruhisa Nakao, Akinobu Ota, Yumi Sawada, Sivasundaram Karnan, Md Wahiduzzaman, Tadashi Inoue, Yuji Kobayashi, Norimitsu Ishii, Tomohiko Ohashi, Yukiomi Nakade, Yoshio Sumida, Kiyoaki Itoh,

Hiroyuki Konishi, Yoshitaka Hosokawa, Masashi Yoneda The analysis of delta40p53, one of p53 splicing isoforms, in hepatocellular carcinoma cells. European Association for the study of Liver; The International Liver Congress 2018 in Paris. 2018年4月 France

Haruhisa Nakao, Akinobu Ota, Mayu Ibusuki, Rena Kitano, Satoshi Kimoto, Tomohiko Ohashi, Yukiomi Nakade, Yoshio Sumida, Kiyooki Itoh, Hiroyuki Konishi, Yoshitaka Hosokawa, Masashi Yoneda Delta133p53, one of the p53 Isoforms, suppresses Tumor Cell Proliferation and induces Cellular Senescence in Hepatocellular Carcinoma Cells. American Association for the Study of Liver Diseases; The Liver Meeting 2018 San Francisco 2018年11月 USA

中尾春壽、太田明伸、山本高也 遺伝子ターゲティング法を用いた p53 蛋白質 splicing isoform の肝細胞癌における機能解析 第 52 回日本肝臓学会総会 2016年5月19日 千葉

中尾春壽、太田明伸、坂本和賢、山本高也、大橋知彦、中出幸臣、角田圭雄、伊藤清顕、米田政志 Delta40p53 (p53 蛋白質 splicing isoform) の肝細胞癌における機能解析 第 53 回日本肝臓学会総会 2017年6月9日 広島

中尾春壽、太田明伸、北野礼奈、坂本和賢、大橋知彦、中出幸臣、角田圭雄、伊藤清顕、米田政志 内在性遺伝子改変法を用いた肝癌における p53 splicing isoform の機能解析 第 54 回日本肝臓学会総会 2018年6月15日 大阪

〔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：  
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：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織  
(研究代表者) 中尾 春壽：研究の立案・総括と実験実施  
(研究分担者) 太田 明伸：研究の助言と実験実施  
(研究分担者) 稲熊 真悟：研究の助言と実験実施

(1)研究分担者

研究分担者氏名：太田 明伸  
ローマ字氏名： Ota Akinobu  
所属研究機関名：愛知医科大学  
部局名：医学部  
職名：講師  
研究者番号（8桁）：30438048

研究分担者氏名：稲熊 真悟  
ローマ字氏名： Inaguma Shingo  
所属研究機関名：愛知医科大学  
部局名：医学部  
職名：講師  
研究者番号（8桁）：80410786

(2)研究協力者  
研究協力者氏名：  
ローマ字氏名：

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、研究者個人に帰属されます。