

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2022

課題番号：17K07152

研究課題名(和文) P53ファミリー遺伝子の正常機能、癌抑制能の解明及び応用法の探索

研究課題名(英文) Normal and tumor suppressive function of p53 family genes and their therapeutic application

研究代表者

井川 俊太郎 (Ikawa, Shuntaro)

東北大学・加齢医学研究所・准教授

研究者番号：50241576

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：p53ファミリー遺伝子のp63の解析過程で種々の乳がん細胞で、Np63の強制発現実験を行った。エストロゲン受容体(ER)を発現するMCF7等細胞でのみ、p63に誘導されるmir-205依存性のBRCA1抑制による細胞増殖抑制を見出した。さらに、luminalA/Bタイプの乳がんにおいて、Np63の発現量が高いと予後が良いことを見出した。また、始源生殖細胞は、放射線、抗がん剤に対する感受性が体細胞に比して、異常に高いこと、これが、通常のアポトーシス誘導性遺伝子の転写誘導によるものでなく、アポトーシスを阻害している広範にわたるmiRNAの低下によるという新規現象を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で見出したluminalA/Bタイプの乳がんにおいてp63の発現量が高いと予後が良いことを見出した。このことから、Np63発現が、luminal typeの乳がんにおいて、quiescenceを誘導し、がん細胞を潜在的な状態に保持することが、乳がんの長期にわたるdormancyのメカニズムの一つであることが示唆された。一見治癒したように見えても、5年以上経過してから再発転移することが知られている乳がんの治療法の改善にも寄与しうる。始源生殖細胞の研究は、放射線被ばくを受けたり、放射線治療を受ける女性、男性の生殖細胞の保持に指針を与えることが期待され、研究を進める。

研究成果の概要(英文)：Np63 (p53 family genes) expression in MCF7, estrogen receptor positive (ER+) luminal breast cancer cells, led to quiescence and acquisition of progenitor cell-like properties. We found that this phenomenon is caused by Np63 dependent induction of miR-205 leading to downregulation of BRCA1 pathway. Furthermore, we found that p63 / expression is associated with better relapse- and metastasis-free survival of ER+ and/or luminal A-type patients, but not of the other subtypes. We also found that primordial germ cells are much more sensitive to radiation and anti-tumor drugs compared to somatic cells. This phenomenon turned out to be caused by overall reduction of anti-apoptotic miRNA contrasting to the induction of pro-apoptotic genes, which is commonly involved in ordinary apoptotic programs.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：p53ファミリー遺伝子 乳癌 始源生殖細胞

1. 研究開始当初の背景

申請者は、癌抑制遺伝子 p53 の類似遺伝子として、p51/p63 (以下 p63)、p73 を単離した。p63 は、幹細胞の維持・分化制御、ストレス応答時の細胞の運命決定 (アポトーシス、セネッセンス) に深く関与している。さらには、p63 は扁平上皮をはじめ様々な組織系で、幹細胞の維持・分化の制御を担っていることを見出した。また、生殖細胞の正常ゲノムの安定性維持機構にも p63 が関与し、雌性生殖細胞の守護神とも称される。以上のように、この経路は、生命にとってたいへん重要かつ広範なシグナル経路であることが判明しているおり、研究対象として、大変興味深く発展性があるものである。したがって本研究は、がん、再生医療のみならず、不妊や胎児生殖細胞の放射線障害など、我が国の抱える社会的な問題にも有意義な知見を与える事が期待できる。

2. 研究の目的

前述したように p53 ファミリー遺伝子は、広範な生命現象に関与している。本課題は、(1)p53 ファミリー遺伝子の幹細胞の維持、分化機構、(2) がん細胞の発生時のがん抑制遺伝子としての機能、(3) 幹細胞制御とがん抑制の統合制御メカニズム、(4) 生殖細胞保護機構の解明、および (5) ファミリー遺伝子を利用したがん抑制、がん治療への応用を目指すものであった。しかしながら、これら全てを網羅することは現実的ではないので、研究の進展しているものから、順次研究をするものである。中でも乳癌、生殖細胞に関わるものに特に進展が見られたので、これらを中心に述べる。

3. 研究の方法

乳がんについては、p63 を強制発現させた MCF7 などの乳癌細胞に、タモキシフェン、エストロゲンなどを作用させ、細胞周期、アポトーシス、分化マーカー等を解析し、p63 の乳癌細胞での機能を検討した。エストロゲン受容体 (ER) の発現量等を検討し、ER 制御に関する機能を検討した。さらには DNA チップによる網羅的な解析を行い、p63 の強制発現細胞などにタモキシフェン、エストロゲンなどを作用させ、p63 系路上の遺伝子を探索し、同定した。同定された遺伝子を乳癌細胞に発現させ、その影響を解析した。生殖細胞については、近年、ES 細胞から高効率に運命決定直後の生殖細胞のモデルとなる細胞を誘導できる *in vitro* 培養システムが開発された。この技術を生かして本研究では、分化誘導前の多能性幹細胞、運命決定直後の始原生殖細胞 (PGC) 様細胞、の 2 種類を用いて、DNA 損傷および放射線照射に応答して誘導される遺伝子群と miRNA 群の相違を比較した。これにより PGC 様細胞でのみ特異的に変動する候補因子群を同定し、それらの機能を検証した。

4. 研究成果

(1) 乳がんについて

p63 は乳腺上皮細胞の幹細胞の維持に重要な機能を有することから、種々の乳がん細胞で p63 の発現を検討したところ TAp63 α / Δ Np63 α ともに発現していた。これらの細胞で、 Δ Np63 α の強制発現実験を行ったところ、エストロゲン受容体 (ER) を発現する比較的予後の良好な乳がんの代表である MCF7 細胞のみにおいて、増殖を抑制することが判明した。この抑制には、mir-205 を介した BRCA1 の抑制によるという重要な知見も得た。また、 Δ Np63 α の強制発現させた MCF7 細胞はパクリタキセル等の抗がん剤耐性を示した。一方、MCF10A 正常乳腺基底細胞においては、 Δ Np63 α 強制発現は細胞増殖、幹細胞性を増強した。より悪性度の高い乳がん細胞株には影響を与えなかった。さらに、luminalA/B タイプの乳がんにおいて p63 の発現量が高いと予後が良いことを見出した。この現象が、p63 誘導性の miRNA が ER を抑制していることに起因していることを見出した。乳がんは、一見治癒したように見えても、5 年以上経過してから再発転移することが知られており、そのメカニズムの解明は乳がんの治療法の改善にも寄与することが、期待され、このメカニズムの解明をもくろんでいる。乳がんについては、乳がん切除後、長期間潜伏した (dormant) 後に再発するメカニズムは長年にわたってなぞであった。本研究から Δ Np63 α 発現が、luminal type の乳がんにおいて、quiescence を誘導し、がん細胞を潜在的な状態に保持することが、乳がんの長期にわたる dormancy のメカニズムの一つであることが示唆される。そこで今後このことを MCF7 細胞に Dox 依存性 p63 発現系を導入し、マウス *in vivo* xenograft モデルを用いて検証することが急務である。さらに TAp63 が miRNA の mir-130b 転写誘導する

ことで、細胞の遊走性を抑制することを見出したので、このメカニズムをも解明する予定である。今後以上のことを総合して、p63 の乳がんにおける役割を解明し、難治性の乳がんの治療法を提言したい。

(2) 生殖細胞について

胎児期の生殖細胞は、形成直後に既に体細胞と比較して、放射線など DNA 損傷性ストレスに高感受性を示す。胚発生過程において最初に形成される生殖細胞である始原生殖細胞 (PGC) は、生殖細胞としての分化運命決定依存的に、体細胞とは異なる DNA 損傷性ストレスへの高感受性を示す。そこで、本研究では、マウス胚の生殖細胞に放射線を照射しマイクロアレイ解析を行ない、照射に応答した発現変動が観察された候補遺伝子群、分子経路、microRNA 群を同定した。これらについて、*in vitro* ならびに *in vivo* で解析し、関連する分子ネットワークの解析を行った。その結果、始原生殖細胞の、放射線、抗がん剤に対する感受性の亢進は、通常のアポトーシス誘導性遺伝子の転写誘導によるものでなく、アポトーシスを阻害している広範にわたる miRNA 発現量の低下によるという新規現象を見出した。現在、この放射線、抗がん剤依存性の miRNA 発現量の低下するメカニズムを解析中である。このことは、放射線被ばくを受けたり、放射線治療を受ける女性、男性の生殖細胞の保持に指針を与えることが期待され、研究を進めていく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Tawarayama Hiroshi, Yamada Hirohisa, Amin Ruhul, Morita-Fujimura Yuiko, Cooper Helen M, Shinmyo Yohei, Tanaka Hideaki, Ikawa Shuntaro	4. 巻 431
2. 論文標題 Draxin-mediated Regulation of Granule Cell Progenitor Differentiation in the Postnatal Hippocampal Dentate Gyrus	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neuroscience	6. 最初と最後の頁 184 ~ 192
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neuroscience.2020.02.005	査読の有無 無
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 -
1. 著者名 Rashad S, Niizuma K, Sato-Maeda M, Fujimura M, Mansour A, Endo H, Ikawa S, Tominaga T.	4. 巻 1699
2. 論文標題 Early BBB breakdown and subacute inflammasome activation and pyroptosis as a result of cerebral venous thrombosis.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Brain Res.	6. 最初と最後の頁 54-68
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.brainres.2018.06.029.	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 Rashad S, Niizuma K, Saigusa D, Han X, Sato-Maeda M, Saito R, Uruno A, Fujimura M, Ikawa S, Yamamoto M, Tominaga T.	4. 巻 384
2. 論文標題 Intracellular S1P Levels Dictate Fate of Different Regions of the Hippocampus following Transient Global Cerebral Ischemia.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Neuroscience	6. 最初と最後の頁 188-202
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neuroscience.2018.05.015.	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 Tawarayama H, Yamada H, Shinmyo Y, Tanaka H, Ikawa S.	4. 巻 500
2. 論文標題 The chemorepellent draxin is involved in hippocampal mossy fiber projection.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun.	6. 最初と最後の頁 217-223
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2018.04.043.	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 Tawarayama H, Yamada H, Amin R, Morita-Fujimura Y, Cooper HM, Shinmyo Y, Kawata M, Ikawa S, Tanaka H.	4. 巻 8
2. 論文標題 Draxin regulates hippocampal neurogenesis in the postnatal dentate gyrus by inhibiting DCC-induced apoptosis.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 840
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-19346-6.	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 該当する

1. 著者名 Sato-Maeda M, Fujimura M, Rashad S, Morita-Fujimura Y, Niizuma K, Sakata H, Ikawa S, Tominaga T.	4. 巻 26
2. 論文標題 Transient Global Cerebral Ischemia Induces RNF213, a Moyamoya Disease Susceptibility Gene, in Vulnerable Neurons of the Rat Hippocampus CA1 Subregion and Ischemic Cortex.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Stroke Cerebrovasc Dis.	6. 最初と最後の頁 1904-1911
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2017.06.032.	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 -

1. 著者名 Tawarayama H, Yamada H, Amin R, Morita-Fujimura Y, Cooper HM, Shinmyo Y, Kawata M, Ikawa S, Tanaka H.	4. 巻 8
2. 論文標題 Draxin regulates hippocampal neurogenesis in the postnatal dentate gyrus by inhibiting DCC-induced apoptosis.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-19346-6.	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 -

1. 著者名 Tawarayama H, Yamada H, Shinmyo Y, Tanaka H, Ikawa S.	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 The chemorepellent draxin is involved in hippocampal mossy fiber projection.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun.	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2018.04.043.	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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