

令和 4 年 6 月 16 日現在

機関番号：32660

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16789

研究課題名(和文) p53PAD7傍分泌とHippoシグナル経路によるがん抑制機構の解明

研究課題名(英文) Secreting protein p53PAD7 suppresses tumor proliferation via the Hippo signaling pathway

研究代表者

滝川 雅大 (Takikawa, Masahiro)

東京理科大学・理工学部応用生物科学科・助教

研究者番号：80807834

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：p53PAD7は代表的ながん抑制遺伝子であるp53の標的遺伝子であり、細胞増殖を抑制する働きがある。我々はこれまでにp53PAD7が細胞外へ分泌されることを発見し、リコンビナントp53PAD7蛋白質が細胞増殖を抑制する働きを示すことを明らかにした。さらに、質量分析による網羅的な解析からプロトカドヘリンファミリー蛋白質が受容体候補であることを同定しており、Hippoシグナル経路への関連を明らかにした。本研究ではリコンビナントp53PAD7蛋白質を培養培地に添加した際の遺伝子発現の網羅的な変化を検出し、さらにマウス個体での腫瘍悪性化に対するp53PAD7の影響を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

胃がんと乳がんの一部ではp53PAD7のプロモーター領域が高度にメチル化されることで発現が抑制されることが明らかになっており、p53PAD7の発現低下は予後不良マーカーと考えられている。リコンビナントp53PAD7タンパク質を添加した細胞のmRNA発現量を網羅的に解析した結果、アポトーシスを起こした細胞に見られる発現変化が観察された。p53の下流遺伝子であるp53PAD7を介して、癌化した細胞の周辺にアポトーシスを起こし、排除させるための機構として働いていると考えられる。

研究成果の概要(英文)：p53PAD7 is one of a target gene of p53. Overexpression of p53PAD7 leads to inhibition of cell proliferation but the molecular mechanisms were still unknown. We found that p53PAD7 is secreted out of the cellular membrane and that addition of recombinant p53PAD7 protein to culture media leads to inhibition of cell proliferation. Mass spectrometric analysis identified that receptor candidates includes protocadherin families that is related to Hippo signaling pathway. In this study, we analyzed changes in mRNA expression profiles in cells treated with recombinant p53PAD7. Furthermore, we investigated the effect of p53PAD7 to tumor progression in mice.

研究分野：分子生物学

キーワード：がん抑制遺伝子 Hippoシグナル経路 アポトーシス p53

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

がん抑制遺伝子p53の最大の働きは標的遺伝子の転写活性化であり、さまざまな標的遺伝子の発現を上昇させることで細胞の増殖抑制、遺伝子の修復、アポトーシスの亢進などを制御する。p53標的遺伝子の働きを解析することで、細胞が本来備えているがん抑制機構を解き明かし、がんの臨床応用に向けた基盤的な成果が得られるものと期待できる。p53の標的遺伝子であるp53PAD7のプロモーター領域が、胃がんや乳がんでは高度にメチル化され、発現量が低下しているという報告があることから、p53PAD7の機能喪失はがん悪性化のマーカーに活用できると考えられている。しかしながら、p53PAD7が細胞増殖抑制に寄与することは報告されていたがその分子メカニズムはほとんど明らかにされていない。我々はp53PAD7が細胞外へ分泌されることを発見し、同因子を介した腫瘍微小環境制御機構に焦点を当てて研究を進めてきた。リコンビナントp53PAD7タンパク質を添加した培養細胞は、Hippoシグナル経路を介して増殖抑制を起こすことも明らかにしてきた。p53によってp53PAD7の発現が上昇し、細胞外へ分泌され、周囲の細胞の増殖を抑制するそれは、あたかも“毒を撒き散らす”形で周囲の細胞の増殖抑制を引き起こすと考えられるが、詳細な分子メカニズムやがん治療に応用可能かという検証は全く行われていない。

### 2. 研究の目的

以下に示す2項目を本研究の目的とする

- (1) p53PAD7がHippoシグナル経路に関連して細胞増殖抑制を示唆する結果を既に得ているが、詳細な分子メカニズムを明らかにし、がん抑制経路の基盤的な研究成果を得る
- (2) マウスを用いた実験を通じて、がん悪性化に対する個体レベルでの影響を評価する

### 3. 研究の方法

- (1) 分泌性タンパク質の働きを明らかにするために、リコンビナントp53PAD7タンパク質を精製し、培養細胞の培地に添加し、その影響を評価した。リコンビナントp53PAD7タンパク質はアデノウイルスを用いてHeLa細胞に発現させ、アフィニティー精製を行うことで取得した。ベクターDNAやアデノウイルスを導入することでp53PAD7を発現させることも可能であるが、リコンビナントタンパク質を活用することで、分泌されたp53PAD7のみの機能を解析できる利点がある。
- (2) p53PAD7を発現させて分泌する細胞と、腫瘍細胞をマウスに皮下移植することで腫瘍塊形成能の検討を行い、がん悪性化に対するp53PAD7の影響を調べた。

### 4. 研究成果

- (1) リコンビナントp53PAD7タンパク質を培養細胞の培地に添加したところ、実験を行った4つのがん細胞株に対して、致死的な影響を与えることを観察した。p53PAD7濃度を高くした場合には細胞がアポトーシスを起こしていると予想し、TUNEL assayを行ったところ、非常に高い割合

の細胞が陽性となり、細胞死を起こしていることを確認した。さらに、ウエスタンブロッティング法により、アポトーシスのエフェクターとして知られる caspase-3 の切断を確認したところ、リコンビナント p53PAD7 を添加した細胞では確かに切断されていることが明らかとなった。これらの結果は、リコンビナント p53PAD7 タンパク質を細胞の培地に添加することで、細胞はアポトーシスを惹起されていることを示している。このようなアポトーシスは p53PAD7 の受容体タンパク質を介して細胞内に伝達していると予想した。既に我々は受容体タンパク質候補を同定していたため、受容体タンパク質の細胞内ドメインを切断する酵素の阻害剤を用いて p53PAD7 によるアポトーシスに影響が現れるかを検討した。しかしながら予想に反して、当該酵素の阻害剤を用いても p53PAD7 によるアポトーシスを抑制できなかった。受容体タンパク質は複数同定しており、それらが冗長に働いている可能性や、未同定の受容体が働いている可能性が考えられる。Hippo 経路に関連するある遺伝子を RNA 干渉法によって抑制したところ、p53PAD7 によるアポトーシスを抑制することに成功した。この結果から、p53PAD7 は Hippo シグナル経路に依存してアポトーシスを起こしていることを示している。

(2) p53PAD7 を発現する正常細胞とがん細胞を、マウスに皮下移植し、腫瘍塊形成能の検討を行った。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 滝川 雅大、渡邊 祐三、岡部 篤史、金田 篤志、石川 冬木、定家 真人、大木 理恵子
2. 発表標題 Secreting protein p53PAD7 induces apoptosis via the Hippo signaling pathway
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 滝川 雅大、渡邊 祐三、岡部 篤史、金田 篤志、石川 冬木、定家 真人、大木 理恵子
2. 発表標題 分泌性タンパク質p53PAD7とHippoシグナル経路による増殖抑制機構の解明
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 滝川 雅大、渡邊 祐三、岡部 篤史、金田 篤志、石川 冬木、大木 理恵子
2. 発表標題 分泌性タンパク質p53PAD7とHippoシグナル経路による増殖抑制機構の解明
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 滝川 雅大、渡邊 祐三、岡部 篤史、松下 周、金田 篤志、石川 冬木、大木 理恵子
2. 発表標題 分泌性タンパク質p53PAD7とHippoシグナル経路による増殖抑制機構の解明
3. 学会等名 第一回日本癌学会若手の会
4. 発表年 2020年

〔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
---------	---------