

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：34509

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07364

研究課題名(和文) 転写因子p63を介する外胚葉異形成症の病態機序解明とその調節因子の探索

研究課題名(英文) Identification of the p63-associated proteins regulating the pathological mechanisms of ectodermal dysplasia

研究代表者

鈴木 大介 (Suzuki, Daisuke)

神戸学院大学・栄養学部・講師

研究者番号：10439698

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：先天性希少疾患「外胚葉異形成症候群」の一部の亜型では、その病態が転写因子p63の機能異常に起因することが知られている。しかし、その機能を制御する分子機構は明らかとなっていない。本研究では、p63の機能調節に関わると考えられるp63タンパク質のリン酸化制御機構の解明に取り組み、プロテオーム解析によりp63に結合しキナーゼ活性を示すタンパク質の同定に成功した。p63陽性上皮幹細胞の中でこのタンパク質の機能を低下させると、細胞増殖が低下しコロニー形成が抑制されたことから、上皮幹細胞において本キナーゼがp63によるcell cycle制御を調節し、増殖能力維持に寄与することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で得られた成果は、幹細胞のcell cycleを調節する技術開発に繋がる点で大きな意義をもち、上記疾患の根治的治療法の開発をはじめ、幹細胞による組織修復を促す再生医療、そして老化組織の新陳代謝を促す抗加齢医療の技術発展につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)： Loss of normal functional of the transcription factor p63 is known to lead a congenital disorder, ectodermal dysplasia. However, the molecular mechanisms controlling p63 function remain unclear. To find the molecular machinery to regulate p63 function, we here screened p63-associated proteins through proteome analysis and then identified a candidate protein which is associated with p63 protein C-terminus. This protein showed that a kinase activity to phosphorylate p63 molecule in vitro. Furthermore, downregulation of the kinase gene expression in epithelial stem cells degraded the performance of colony formation and impaired their proliferative potential of the stem cells.

研究分野：幹細胞学、分子生物学、細胞生物学

キーワード：TP63 (Trp63) 外胚葉異形成症候群 幹細胞 上皮細胞 増殖 リン酸化 分化

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

外胚葉異形成症は、皮膚やその付属器の形成不全により、毛、歯、汗腺などの外胚葉組織に異常を認める先天的な遺伝性疾患である。その臨床像は、異常を示す組織の組み合わせにより180種類以上の亜型に分類されている。その発生機序は依然不明確なものがほとんどであり、現在も生後の治療は対症的処置しかなく、根治的治療法の開発のためにも、病因および病態の分子機序解明が望まれている。その背景において、申請者らは外胚葉異形成症の亜型の一つ AEC (Ankyloblepharon-Ectodermal dysplasia-Clefting) の疾患モデルマウス樹立に成功し、転写因子 p63 の機能異常が本疾患の原因となることを報告してきた [1]。

p63 は、p53 ファミリーの転写因子として90年代の終わりにクローニングされ、皮膚に代表される上皮組織の発生に不可欠な分子である。申請者らは、これまで転写因子 p63 が上皮幹細胞でリン酸化制御を受けることを発見し、上皮幹細胞における p63 の機能解析に取り組んできた [2,3]。この分子には複数の isoform が存在し、C 末端側はスプライシングを受けて、 $\Delta 1$ 、 $\Delta 2$ 、 $\Delta 3$ の3つの型をとることが知られている。その中で申請者らは、上皮幹細胞で主に発現する $\Delta 1$ isoform の C 末端領域 (C₁) が欠失することにより上皮組織に重篤な病態を引き起こすことを *in vitro* および *in vivo* の両面から証明した [1]。実際、ヒト AEC 患者群では p63 遺伝子の C₁ 領域に突然変異の蓄積が見つかっており、C₁ 全体の機能を欠く変異パターンの事例も確認されている。申請者らは C₁ を欠く上皮幹細胞では cell cycle を促進するメカニズムが破綻していることを実験的に示し、その制御の破綻は上皮細胞の供給不足を導くため、結果的に病態形成に至ることが推察された。しかし、C₁ を介し幹細胞動態を制御するその分子の実体の解析は未着手であり、依然不明のままであった。

2. 研究の目的

本研究は、上皮幹細胞の cell cycle 駆動機序において、申請者らが特定した p63C₁ 領域の機能的重要性を分子レベルで説明することが目的である。以前、申請者らは上皮幹細胞が cell cycle を開始する際に p63 分子の N 末端側にあるセリン残基がリン酸化されること [2,3]、しかも C₁ が欠失するとこのセリン残基をリン酸化できなくなることを報告している [1]。C₁ 中にはタンパク質間相互作用を担う Sterile- α -motif (SAM) 様のアミノ酸配列があることから、C₁ にリン酸化酵素が結合し、p63 分子をリン酸化することによって cell cycle をドライブする分子機序の存在が予測される。このような酵素はまだ見つかっておらず、この酵素こそが上皮幹細胞の cell cycle を駆動するメカニズム解明の鍵になると考え、本研究では (1)C₁ に結合するリン酸化酵素を同定し、p63 調節機能を特定すること、(2)幹細胞の cell cycle 駆動におけるこのリン酸化酵素の役割を明らかにすることを具体的な目標に据え、本申請の研究に取り組んだ。それらの解析に基づいて、p63 制御を軸とする上皮幹細胞における cell cycle 駆動制御の分子機序解明を目指した。

3. 研究の方法

(1) p63 結合タンパク質候補の探索

p63 タンパク質の C₁ 領域には、タンパク質結合モチーフが含まれる。我々はこの C₁ 領域に結合する分子を探索するため、ヒト p63 遺伝子の C₁ 領域をコードする cDNA に myc タグを付加した発現ベクターを作製し、増殖期の未分化ヒト表皮細胞株 HaCaT に強制発現した後、タンパ

ク質（未変性）を抽出した。そしてC に結合するタンパク質複合体を精製するため、抗 myc 抗体で免疫沈降し、共沈するタンパク質の質量分析を行った。

（２）候補分子の組織発現解析

共沈した分子の質量分析結果について、NCBI と Human Protein Atlas に照らし合わせ、酵素の分類、発現している組織/細胞系列についてデータベース解析を行なった。そしてリストアップされた分子群の中で、本研究ではリン酸化酵素に注目し、さらに p63 陽性上皮組織に発現する分子をリストの中から抽出した。その後、絞り込まれた候補分子について、p63 陽性ヒト上皮培養細胞およびヒト表皮組織切片において、実際にその発現が認められるかどうか免疫組織染色を行い検証した。

（３）候補分子による p63 に対するリン酸化能の検証

目的とする分子には、p63 タンパク質に対するリン酸化能が求められる。そのため我々は、p63 および候補分子の cDNA を組み込んだタンパク質発現用ベクターを作製し、大腸菌に導入して誘導性過剰発現株を樹立し、それぞれの精製タンパク質を調製した。その精製タンパク質を用い、in vitro でリン酸化能を調べる kinase assay を実施し、候補分子による p63 に対するリン酸化能の評価を行った。

（４）候補分子の遺伝子ノックダウンによる幹細胞動態に対する機能解析

p63 に対してリン酸化能を有する候補分子が、p63 陽性上皮幹細胞の動態制御において機能的にどのような役割をもつか調べるために、遺伝子工学的アプローチによって幹細胞の中で標的遺伝子の発現レベルを調節する実験系の起ち上げを行った。レトロウイルスベクターを用いたウイルス遺伝子導入法を採用し起ち上げ、細胞内において候補分子の発現低下を誘導する方法として低分子ヘアピン型 RNA 配列（shRNA）を組み込み、遺伝子ノックダウンを行う実験系を確立した。標的遺伝子の発現低下を誘導可能な shRNA 配列は、ウエスタンブロットングによってタンパク質量の低下を認める配列を調べ、選択した。この技術を使用し、p63 陽性の上皮幹細胞を含む未分化ヒト上皮培養細胞において候補分子のノックダウンを試みた。その後、発現低下を誘導した p63 陽性上皮幹細胞について、増殖を促進する培養系で維持・観察し、コロニー形成のレベルをコントロール群と比較し評価した。

（５）酵素活性阻害剤を用いた上皮幹細胞コロニー形性能の評価

遺伝子ノックダウンだけではなく、候補分子に対する低分子阻害剤を入手し、細胞培養下で上皮幹細胞に処理することで p63 に対するリン酸化を抑制し、上皮幹細胞の増殖がどのように影響を受けるのか観察を行なった。そしてまた、この阻害実験において、p63 タンパク質の分子動態を調べるため、阻害剤添加・処理後、細胞からタンパク質を抽出し、p63 タンパク質量に変化が認められるかどうか、ウエスタンブロットングで評価した。

４．研究成果

（１）p63 結合タンパク質を探索し、候補分子を抽出した

転写因子 p63 の機能異常が外胚葉異形成症候群の病態形成に関わることを見つけた申請者らは、p63 分子のリン酸化制御に必要なとなる C 末端（C ）領域の分子的役割解明に取り組んだ。この C 領域にはタンパク質結合モチーフが含まれるため、我々はプロテオーム解析で C に結

合し免疫沈降にて共沈してくるタンパク質の質量分析を行った。その結果、p63 と C を介して複合体を形成し得ると考えられるタンパク質が 334 分子得られ、これらについてデータベース解析を行い、酵素分類および発現組織をリストアップした。その中で本研究ではリン酸化酵素に注目し、且つ、p63 陽性上皮組織に発現が認められる 3 つのセリン/スレオニン・キナーゼを解析する対象候補として絞り込んだ。(各 K0 マウスはいずれも胎生致死となることが知られている)

(2) 組織発現解析を行い、p63 陽性上皮組織/細胞に発現する候補分子に絞り込んだ

データベース解析の情報に基づいて抽出したこれら 3 分子に対し、実際に p63 陽性組織において発現が認められるかどうか調べるために、p63 陽性ヒト上皮組織/細胞を用いて免疫組織化学染色を実施した。それぞれの候補分子を認識・結合する特異抗体を入手し、p63 を認識する抗体とともに、ヒトの上皮組織切片および不死化上皮細胞株(未分化)に対する二重染色を行った。その結果、p63 に対する染色が細胞核内に強いシグナルを示す中で、候補分子 1 つについては陽性シグナルを示さなかったが、残りの候補 2 分子について、核内を含み細胞内局在を示す陽性シグナルを認めた。

(3) p63 に対するリン酸化能をもつ候補分子(リン酸化酵素)を特定した

これら 2 つの候補分子には p63 をリン酸化修飾する機能が期待されるため、in vitro でリン酸化能を調べる Kinase assay を実施した。まず、p63 および候補遺伝子の cDNA を発現ベクターにそれぞれ組み込み、発現タンパク質を精製し、酵素(候補)タンパク質および基質となる p63 タンパク質を調製した。そして、in vitro で作用させ、候補分子のリン酸化能を測定した。その結果、候補分子の 1 つにおいて、p63 タンパク質をリン酸化する活性があることを特定した。

(4) 候補分子の発現低下は、上皮幹細胞のコロニー形成能低下につながることを発見した

我々は、p63 タンパク質に対するリン酸化能を有するこの候補分子(リン酸化酵素)が、上皮幹細胞の動態制御において機能的な役割を担っているかどうか検証する実験に着手した。上皮幹細胞の中で標的遺伝子の発現レベルを低下させその効果を観察するため、第一にレトロウイルスベクターを用いた遺伝子導入を行う実験系を立ち上げ、そして細胞内において候補分子の発現低下を誘導するためにデザインした shRNA をウイルスベクターに組み込み、遺伝子ノックダウンを誘導する実験系を確立した。この技術を使用し、p63 陽性の上皮幹細胞を含む未分化ヒト上皮培養細胞において候補分子のノックダウンを試みた結果、コントロール群は数日培養ののち未分化細胞を含む大きなコロニーを形成したのに対し、候補分子の発現低下を誘導した細胞群では、コロニー形成能が低下することが明らかとなった。

(5) 同定したリン酸化酵素が、p63 タンパク質の安定性維持に寄与することを見出した

さらに別のアプローチから検証するために、この候補分子(リン酸化酵素)に対する酵素活性阻害剤を入手し、in vitro 培養下で p63 陽性の上皮幹細胞を含む未分化ヒト上皮培養細胞に処理することで p63 に対するリン酸化を抑制し、上皮幹細胞の増殖がどのように影響を受けるのか観察を行なった。その結果、上皮幹細胞の増殖が著しく低下する結果を認め、本候補分子が細胞の増殖制御に寄与している可能性を見出した。そしてこの阻害実験において、p63 タンパク質の分子動態を調べたところ、阻害剤の濃度依存的に p63 タンパク質量が低下することを明らかにした。

以上、本研究で得られた成果より、我々が同定したリン酸化酵素は、p63 タンパク質の安定的な発現維持を担うことにより、上皮幹細胞の増殖/cell cycle 制御に機能的役割をもつことが示唆された。このような幹細胞の機能を制御する機序に関わる分子の同定は、幹細胞動態を制御する薬剤標的候補となり得、そして幹細胞機能の異常から生じる疾患の治療法開発につながる点で大いに役立つ知見となる。

<参考文献>

1. Suzuki D, Sahu R, Leu AN, Senoo M. The carboxy-terminus of p63 links cell cycle control and proliferative potential of epidermal progenitor cells. *Development*. 2015, 142:1-9.
2. Suzuki D, Senoo M. Increased p63 phosphorylation marks early transition of epidermal stem cells to progenitors. *J Invest Dermatol*. 2012, 132(10):2461-2464.
3. Suzuki D, Senoo M. Expansion of epidermal progenitors with high p63 phosphorylation during wound healing of the epidermis. *Exp Dermatol*. 2013, 22(5):374-376.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 谷家はな、堀川陽子、根尾櫻子、鈴木大介
2. 発表標題 エポキシ樹脂埋め込み型マウス骨格標本の作製
3. 学会等名 第70回日本実験動物学会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

神戸学院大学栄養学部鈴木研究室ホームページ http://www.nutr.kobegakuin.ac.jp/~suzuki lab/research.html
--

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