

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 16 日現在

機関番号：13501
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2009～2011
 課題番号：21590434
 研究課題名（和文）p63による扁平上皮癌細胞の活性化経路を決定するリン酸化プロテオーム解析
 研究課題名（英文） Phosphoprotein array analyses for determination of signaling pathways activated by p63 in squamous cell carcinomas
 研究代表者
 加藤 伊陽子（KATOH IYOKO）
 山梨大学・医学工学総合研究部・准教授
 研究者番号：20333297

研究成果の概要（和文）： 頭頸部、皮膚等の扁平上皮癌細胞で高発現する p63（p53 ファミリー）と細胞シグナル伝達経路との関係を明らかにするため、RNA 干渉とリン酸化プロテイン・アレイ、遺伝子アレイ等により解析した。p63 の $\Delta Np63\alpha$ 型はタンパク質脱リン酸化酵素 PP2A、 β カテンン、TCF-4 と相互作用し、Wnt シグナルの標的遺伝子発現を活性化することが示唆された。

研究成果の概要（英文）： To explore p63-controlled cellular signaling pathways, we performed p63 RNA interference, phosphoprotein array analyses and gene expression profiling. Results suggest that the $\Delta Np63\alpha$ isoform interacts with protein phosphatase 2A (PP2A), β -catenin and TCF-4 to activate Wnt signal target gene expression.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：腫瘍

1. 研究開始当初の背景

P63 研究は、(1) 発生学的には表皮、腺組織、頭頸部形成における細胞の増殖・分化の制御、(2) 腫瘍学的には頭頸部扁平上皮癌をはじめとする重層上皮に由来する癌での増殖・分化の制御、の 2 面で重要性が認められるようになった。このために、細胞の種々のシグナル伝達経路との関連を明らかにする必要があった。

2. 研究の目的

細胞のタンパク質リン酸化を総合的に分

析するとともに、遺伝子発現の変化と細胞増殖能を検討する。扁平上皮癌の新しい治療・予後診断法創出の基礎基盤として、p63 が支配するタンパク質リン酸化経路を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) P63 の RNA 干渉 (p63 ノックダウン)

P63 を発現する扁平上皮癌細胞株 (A431、FaDu、HSC-1) に研究代表者らが設計した p63 を標的とする siRNA をトランスフェクション

により導入した。

(2) リン酸化プロテオーム解析

siRNA 導入後、48、72、96 時間後に細胞からタンパク質を抽出した。この時、細胞質画分と核画分に分画し、以下の解析に供した。

リン酸化タンパク質アレイとしては、R&D 社の Human Phospho-MAPK Array Kit、Human Phospho-Kinase Antibody Array などのメンブレンアレイを用いた。

(3) 遺伝子発現プロファイリング

Whole human genome オリゴ DNA マイクロアレイ・キット (Agilent Technology) を用いて解析を行った(オンコミクス社)。

(4) 従来法による解析

Western blot, 免疫沈降, RT-PCR などの従来法により、マルチ解析の結果を確認するとともに、分子機構に関する解析を進展させた。

(5) PP2A 脱リン酸化酵素活性の測定

PP2A Immunoprecipitation Phosphatase Assay Kit (Upstate) を用いた。細胞質画分と核画分から免疫沈降法により PP2A を精製し、ペプチド基質と反応させた後、遊離したリン酸をマラカイトグリーン法により定量した。免疫沈澱で得られた PP2A-c サブユニットを Western blot 法のバンドにより定量化し、タンパク質量あたりの活性を比較した。

(6) レポーター・アッセイによる Wnt 標的遺伝子発現の解析

Wnt 応答配列 (WRE) 配列をもつ Luciferase 発現ベクター (pGL3-0T) とその変異体 (pGL3-0F)、GSK-3 β 、 β カテニン、TCF、p63 の各アイソフォームを発現するベクターを様々な組み合わせ導入し、Wnt シグナル伝達系に対する p63 の作用を転写誘導の面から解析した。

(7) 細胞増殖の検討

細胞増殖能には ATP 測定を、細胞周期の解析にはフローサイトメトリー解析を行った。

4. 研究成果

(1) 結果

① p63 ノックダウンの結果

siRNA トランスフェクション後 24 時間で、FaDu, HSC-1 細胞では p63 タンパク質が 20%以下に減少し、遺伝子アレイ解析でも p63 の mRNA が 1/6.5 倍すなわち 15%にまで低下していた。Western blot および細胞の免疫染色により p53 ファミリーに属する p63 以外のタンパク質 p53 および p73 には影響しないことを確認した。

② リン酸化プロテイン・アレイ解析結果

上の条件で細胞質および核の分画について解析した。核から得られるタンパク質の量は細胞質から得られるタンパク質の量と比べて約 1/5 で、核抽出物のリン酸化アレイ解

析で十分なシグナルを得るためには細胞培養のスケールを 5 倍にする必要があった。

FaDu 細胞に p63 をノックダウンしたとき、細胞質ではタンパク質リン酸化の変化は検出できなかったが、核では p63 ノックダウンで Erk 1 (extracellular signal-regulated kinase-1) と GSK-3 β のリン酸化上昇が検出された。同じサンプルでは Western プロットでも Erk 1 と GSK-3 β (glycogen synthase kinase-3 β) のリン酸化の増強を示した。ところがこの変化は初期に一過性に起こり、p63 消失による恒常的な細胞応答ではないことが示唆された。一過性とはいえ、p63 が標的としているシグナル伝達経路と何らかの関連があると考えられた。

③ 遺伝子発現プロファイリングの結果

FaDu, A431 における p63 ノックダウンでは、Wnt 標的遺伝子の SNAI2, DKK3, CCND2 などの発現低下が見られた。上記②で検出された GSK-3 β が Wnt シグナル伝達経路の調節因子であることから、p63 による GSK-3 β のリン酸化調節と Wnt 標的遺伝子発現調節が関連していると推測された。

④ 従来法による解析結果

①-③の結果をもとに GSK-3 β および Wnt シグナル伝達に焦点を合わせ、Western blot, RT-PCR によって詳しく解析した。その結果、GSK-3 β リン酸化増強に関しては、他の細胞株では同じ変化が見られなかったこと、p63 を HeLa 細胞に導入しても同様の変化が誘導されなかったこと、GSK-3 β の基質 β カテニンのリン酸化と核移行に影響しなかった。

さらに解析を進めると、GSK-3 β のリン酸化を制御する PP2A は Δ Np63 α および β カテニン (GSK-3 β の標的) と核内で相互作用することがわかった。また、 Δ Np63 α は TCF-4 と複合体を形成していた。さらに、Wnt 標的遺伝子発現が p63 で促進されていることが RT-PCR により確認できた。

⑤ PP2A 脱リン酸化酵素活性の測定結果

細胞質画分、核画分ともに脱リン酸化酵素活性は p63 ノックダウンによって変化しなかった。また、タンパク質量あたりの PP2A 活性は細胞質に比べ核内で数倍高かった。制御サブユニット B56 α は細胞質よりも核に高濃度に存在し、核抽出液から PP2A 触媒サブユニットと共に免疫沈降した。PP2A は核内で B56 α と結合して活性化されているが、その酵素活性は p63 による影響を受けていないと考えられた。

⑥ レポーター・アッセイの結果

pGL30T (TOPFlash に相当) を使ったルシフェラーゼ・アッセイで、 β カテニンと TCF-4 を共に導入した場合、 Δ Np63 α によって 500 倍もの発現活性化が検出された。TAp63 α 、TAp63 γ 、 Δ Np63 γ では活性化は見られなかった。WRE 配列の一部に変異を持つ pGL30F で

はルシフェラーゼ活性が1/5に低下した。WREを標的とする Δ Np63 α による活性化は、 β カテニンの野生型と変異体 Δ 45およびリン酸化部位変異体S33Yで大きな差異はなかった。また、GSK-3 β による大幅な抑制は検出されなかった。

これまで知られていた β カテニンの安定化による核移行促進とは全く異なる機構により Δ Np63 α は β カテニン/TCF機能を促進することが示唆され、上述の結果④と矛盾しなかった。

⑦増殖の解析結果

p63ノックダウン96時間でATP量の測定を行うとp63ノックダウン細胞では50%に低下していた。ソフトアガー中のコロニー形成においても約45%のコロニー数減少が観察された。フローサイトメトリーでは細胞周期のG1停止が検出された。これら3つの解析結果は、p63が扁平上皮癌の増殖能を増強することを示していた。

⑧その他の結果

高分化型扁平上皮癌での Δ Np63自体の発現誘導には新規ケラチノサイト特異的TGF- β シグナル伝達経路が作用していることを明らかにした。その際、核内Smad2のser465/467およびSer245/250/255リン酸化が検出された。TGF- β 受容体からのリン酸化シグナル伝達もp63を増強する重要な制御経路と考えられた(論文発表 ②Fukunish N他)。

(2)要約と考察

リン酸化プロテイン・アレイ解析によって、p63と関係するリン酸化経路としてGSK-3 β が関与する可能性が示唆された。さらなる解析を行った結果、① Δ Np63 α はGSK-3 β の制御因子であるPP2AおよびGSK-3 β の標的 β カテニンと核内で相互作用すること、② Δ Np63 α はTCF-4と複合体を形成すること、③ β カテニン/TCF複合体によるWnt標的遺伝子発現誘導を増強することが明らかになった。

APC (adenomatous polyposis coli) 遺伝子変異によるWntシグナルの活性化が大腸癌発症を誘導することはよく知られているが、本研究は扁平上皮癌においてp63がWntシグナルを核内で活性化することを明らかにした。p63が新規の機構により発癌の共通基盤Wntシグナルを活性化するという結果は非常に重要な研究成果である。

また、p63ノックダウン細胞では96時間後には50%の増殖抑制が起こり、G1期停止が観察された。p63の消失によるWntシグナルの標的遺伝子発現低下がその原因の一つと考えられる。

最近、 β カテニンが直接PP2Aによって調節を受けている場合があることも報告されている。本研究で検出されたp63-TCF結合とp63-PP2A- β カテニンの相互作用により

Wntシグナル活性化複合体 β カテニン-TCFの形成が促進されると推測される。p63によるWntシグナル増強機構を分子生物学的に理解するためにはさらなる解析が必要である。

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3件)

① Katoh I, Mirová A, Kurata S, Murakami Y, Horikawa K, Nakakuki N, Sakai T, Hashimoto K, Maruyama A, Yonaga T, Fukunishi N, Moriishi K, Hirai H. Activation of the long terminal repeat of human endogenous retrovirus K by melanoma-specific transcription factor MITF-M. Neoplasia 13:1081-1092, 2011 査読有 DOI 10.1593/neo.11794

② Fukunish N, Katoh I, Tomimori T, Tsukinoki K, Hata RI, Nakao A, Ikawa Y, Kurata S Induction of DeltaNp63 by the eratinocyte-specific pathway of TGF-beta with Smad2 and I kappa B kinase alpha in squamous cell carcinoma. Neoplasia 12: 969-979, 2011 査読有 DOI 10.1593/neo.101054

③ Bilali A, Kurata S, Ikeda S, Georgieva GS, Zhu C, Tomita M, Katoh I, Mitaka C, Eishi Y, Imai T. Lung-lung interaction in isolated perfused unilateral hyperventilated rat lungs. Translational Research 155:228-237 2010 査読有 DOI 10.1016/j.trsl.2010.01.001

[学会発表] (計8件)

① 加藤 伊陽子
扁平上皮癌でのp63による核内GSK-3 β を介した β カテニンの制御
第70回日本癌学会学術総会 2012年10月3日
名古屋国際会議場 (名古屋)

② 倉田 俊一
p63による核内GSK-3 β を介した β -catenin依存性遺伝子発現の制御
第84回日本生化学会大会 2012年9月22日
京都国際会議場 (京都)

③ Katoh, I
Human Endogenous Retrovirus K (HERV-K) is

induced by MITF-M, a melanogenesis transcription factor activated in melanomas.

American Association for Microbiology
General Meeting 2011、2011年5月22日
Ernest Morial Convention Center
(New Orleans, USA)

④ 福西 菜穂子

Induction of p63 by the keratinocyte-specific TGF-beta signaling pathway in squamous cell carcinomas.

第69回日本癌学会学術総会
2010年9月23日 大阪国際会議場 (大阪)

⑤ 加藤 伊陽子

Induction of human endogenous retrovirus-K (HERV-K) LTR in melanomas by MITF, a melanogenesis transcription factor.

第69回日本癌学会学術総会
2010年9月22日大阪国際会議場 (大阪)

⑥ 福西 菜穂子

p63 の ΔN プロモータはケラチノサイト特異的な新規 TGF- β シグナルの標的である

第 82 回日本生化学会大会 2009 年 10 月 23 日 神戸コンベンションセンター (神戸)

⑦ 福西 菜穂子

p63 promotes proliferation of squamous cell carcinomas through a novel pathway of PP2A and GSK-3beta

第 68 回日本癌学会学術総会
2009 年 10 月 2 日 パシフィコ横浜 (横浜)

⑧ 加藤 伊陽子

$\Delta Np63$ is inducible by Smad2 and IKK α , the newly identified keratinocyte-specific TGF- β signaling partners

第68回日本癌学会学術総会
International Session
2009 年 10 月 1 日 パシフィコ横浜 (横浜)

[その他]

ホームページ等

<http://sangaku.yamanashi.ac.jp/SearchResearcher/contents/7A93F75CD72F80F2.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加藤 伊陽子 (KATOH IYOKO)
山梨大学・医学工学総合研究部・准教授
研究者番号：20333297

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

倉田 俊一 (KURATA SHUNICHI)
東京医科歯科大学・難治疾患研究所・准教授
研究者番号：60140901