

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 25 年 6 月 12 日現在

機関番号：82606

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2011～2012

課題番号：23890041

研究課題名（和文） 造血器悪性腫瘍における p63 の役割

研究課題名（英文） Role of p63 in hematological malignancies

研究代表者

山口 聡子 (YAMAGUCHI SATOKO)

独立行政法人国立がん研究センター・研究所・研究員

研究者番号：40609872

研究成果の概要（和文）：癌の治療では、化学療法に対する耐性の獲得が大きな課題であり、その原因の一つとしてがん幹細胞が示唆されている。p63 は、p53 ファミリーの転写因子であり、癌化や正常幹細胞の維持に重要であると考えられている。化学療法耐性を獲得した細胞株では、がん幹細胞の性質を持つと考えられるスフェロイド形成能が高いこと、スフェロイドでは p63 ΔN アイソフォームの発現が上がっていることがわかり、p63 のがん幹細胞の維持における役割が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Acquired chemoresistance is a major obstacle in treating cancer, and cancer stem cells (CSCs) are thought to be one of the causes. p63 is a member of the p53 family of transcription factors, which plays a role in tumorigenesis, as well as in maintenance of normal stem cells. Spheroid forming efficiencies, which is thought to reflect CSCs phenotype, were compared in pairs of cell lines derived from the same patients. Cells with acquired chemoresistance showed higher efficiencies than chemosensitive counterparts. In these spheroid cells, the expression of p63ΔN isoform was enhanced. These results imply the role of p63 in maintenance of CSCs.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・血液内科学

キーワード：分子生物学、悪性腫瘍、がん抑制遺伝子、がん幹細胞

1. 研究開始当初の背景

(1) p63 は、p53 ファミリーの転写因子として同定された。p53 と比較すると、癌細胞での p63 遺伝子の変異の頻度は非常に低いため、最近まで、癌化や癌の進行における p63 の役割は明らかにされていなかった。しかしながら最近、p63 が癌化に重要であるこ

とが明らかになってきた。p63 には N 端の転写活性ドメイン(TA)を持つ全長の TAp63 と TA を欠く p63ΔN のアイソフォームが存在する。TAp63 は p53 と類似した転写活性を持ち、細胞周期の進行を抑制し、アポトーシスを誘導する癌抑制因子であると考えられている。逆に p63ΔN は TAp63 や p53 の標

的遺伝子のプロモーターとの結合に競合し、**dominant negative** として作用するため、細胞増殖を促進し、アポトーシスを抑制する、発癌因子の性質を持つと考えられている。TAp63 と p63 Δ N には、スプライシングによる C 端の違いにより、それぞれ複数のアイソフォームが存在する。

慢性骨髄性白血病では、急性転化のときに p63 変異の頻度が高くなるという報告もあるが、p63 の造血器悪性腫瘍における役割については、明らかにされていない。

(2) また、p63 は、ヒトの正常組織では、主として上皮系の細胞に発現が見られ、正常の発生の過程で上皮系の組織の分化に必須である。最近、p63 が正常の上皮細胞の幹細胞の増殖能の維持に必要であることが報告されてきた。

がん幹細胞は、自己複製能を持つ細胞で、癌の再発や抗癌剤耐性の原因の一つと考えられている。がん幹細胞と正常幹細胞には多くの共通点があることが明らかになってきた。しかしながら、p63 のがん幹細胞における役割は明らかにされていない。

2. 研究の目的

(1)造血器悪性腫瘍における p63 の役割と制御メカニズムを解明する。

(2)がん幹細胞における p63 の役割を明らかにする。

3. 研究の方法

(1)各種の癌細胞の細胞株において、p63 の発現を調べる。発現をみとめた場合、アイソフォームを同定する。

(2)同一患者の化学療法感受性期と耐性期に由来する細胞株で、p63 の発現を比較する。さらに、様々な薬物の感受性や、がん幹細胞マーカーの発現、がん幹細胞性について調べ、p63 との関係性を調べる。

4. 研究成果

(1)

慢性骨髄性白血病の急性転化期に由来する K562 細胞株において、p63 の発現を調べたところ、mRNA レベルでは TAp63 と Δ Np63 の両方のアイソフォームの存在が確認された。p63 の機能が慢性骨髄性白血病の急性転化に関わるかについては、特定のアイソフォームの発現抑制を行うことにより、解析中である。なお、当初予定していた、造血器悪性腫瘍の患者検体における p63 の発現については、研究代表者が施設を異動したため、解析を行うことが困難となった。

(2)

p63 のがん幹細胞における役割を調べるため、同一患者の化学療法感受性期と耐性期に由来する細胞株を用いた。悪性腫瘍の中でも特に、卵巣がんでは初発時には化学療法感受性であることが多いが、再発時には化学療法耐性となっていることが多く、これにはがん幹細胞の関与が示唆されているため、卵巣がん細胞株を中心に解析した。

PEA1 は治療前、PEA2 は化学療法後再発時の同一患者由来の細胞株である。シスプラチン (CDDP) などの抗癌剤に対して、PEA2 の方が低い感受性を示すことが確認できた (図 1)。

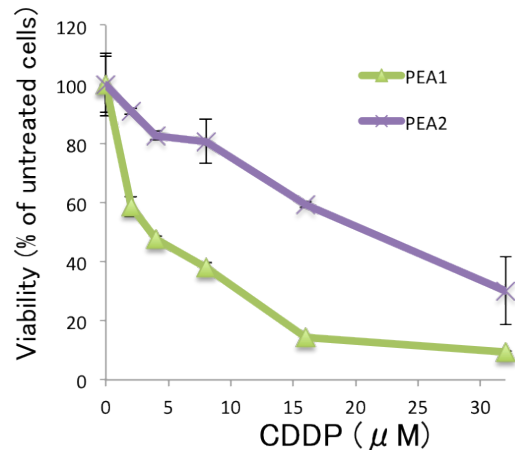


図1: 薬剤感受性

PEO1 と PEO4, PEO14 と PEO23 は、それぞれ同一患者由来の細胞株であり、PEA1/PEA2 同様に CDDP 感受性の違いが確認できた。これらの細胞株で各種マーカーの発現を調べたところ、CD133, CD44, ALDH などのがん幹細胞マーカーや、上皮間葉移行 (EMT) マーカーである N-Cadherin の発現は感受性株の方が耐性株よりもむしろ高い傾向がみとめられた (図 2)。

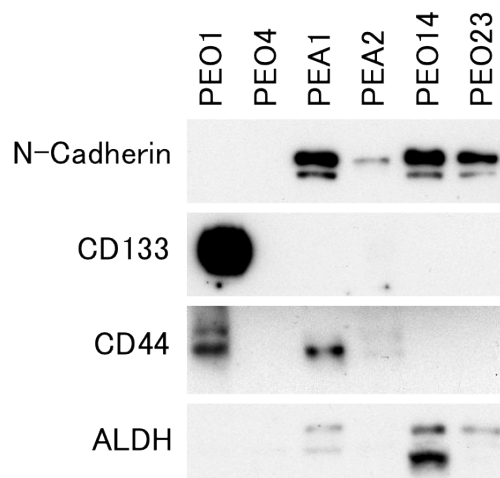


図2: がん幹細胞・EMTマーカーの発現

(3)

さらに、がん幹細胞形質を調べるために、無血清培地でのスフェロイド形成能を比較したところ、耐性株である PEO4, PEA2, PEO23 はそれぞれ、同一患者由来の感受性株である PEO1, PEA1, PEO14 と比較して、いずれもスフェロイド形成能が高いことがわかった (図 3)。

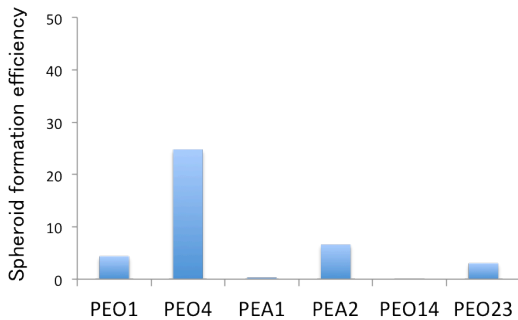


図3: スフェロイド形成能

さらに、無血清条件下では、感受性細胞株、耐性細胞株ともに、通常の培養条件と比較して、薬剤感受性がより低くなることがわかった (図 4)。

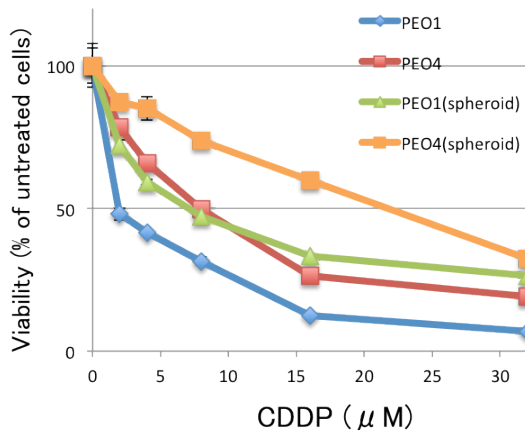


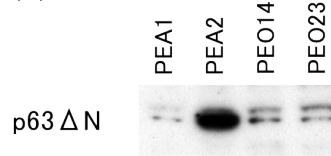
図4: 薬剤感受性

(4)

これらの細胞株を用いて、p63 の発現を調べた。特に、N 端の転写活性ドメインを欠く ΔN アイソフォームに特異的な抗体を用いて蛋白レベルでの発現を調べたところ、耐性株である PEA2 では感受性株である PEA1 よりも高い発現がみとめられた (図 5 (A))。また、PEO1/PE4, PEO14/PEO23 の細胞株では、

通常の培養条件下では p63 ΔN の発現レベルに差はみとめられなかったものの、無血清培地でスフェロイド培養を行うと、PEO1, PEO4 の両方で、p63 ΔN の発現が誘導されることがわかった (図 5 (B))。

(A)



(B)

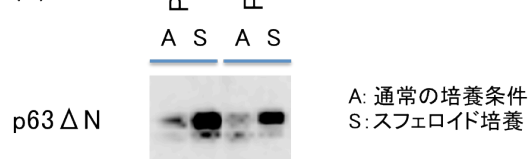


図5: p63 ΔN の発現

(5)

以上の結果から、化学療法耐性を獲得した細胞株は、スフェロイド形成能が高いことがわかり、がん幹細胞の性質を強く持っていることが示唆された。これらの細胞株では既知のがん幹細胞マーカーの発現は耐性獲得前の細胞株と比較してむしろ低下していたが、p63 の転写活性を持たないアイソフォームである p63 ΔN は耐性株や、スフェロイドでの発現がみとめられ、薬剤耐性やがん幹細胞の維持に関わる可能性が示唆された。今後は p63 ΔN の機能解析を行うとともに、治療標的としての可能性を検討していく。

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 0 件)

[学会発表] (計 2 件)

- ① 岡本奈緒子、加藤友康、吉田正行、山口聡子、安川麻美、木下圭太、深見希代子、津田均、増富健吉 Analysis of cancer stem cell markers in ovarian cancers. 第 71 回日本癌学会学術総会、2012 年 9 月 20 日、札幌
- ② 山口聡子、中村文彦、南谷泰仁、市川幹、黒川峰夫 Atypical B-cell proliferation in mature T cell lymphoma. 第 73 回日本血液学会学術集会、2011 年 10 月 15 日、名古屋

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山口 聡子 (YAMAGUCHI SATOKO)

独立行政法人国立がん研究センター・研究
所・研究員

研究者番号：40609872

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：