

令和 4 年 6 月 16 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03846

研究課題名(和文) 口腔癌の発癌におけるp62の核-細胞質シャトリングの役割の解析

研究課題名(英文) Analysis of p62 nuclear - cytoplasm shuttling in the carcinogenesis of oral cancer

研究代表者

柳川 徹 (Toru, Yanagawa)

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号：10312852

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではp62の口腔癌の発癌における役割について、p62の核-細胞質のシャトリングに注目して、p62の細胞内の局在が発がんにどのように影響を及ぼすかについての解析をおこなった。レプトマイシンB処理で核排出の機能を止めたところ核へのp62の集積が認められ、核排出シグナルと核局在シグナルに変異を加えたマウスを制作して表現型を解析したところ腎臓の足細胞に異常を認めた。また、白板症の臨床検体のサンプルを用いて、p62の核内局在と臨床指標・病理学的形態の関連を検討したところ、上皮異形と有意に関連することが証明された。以上からp62の局在の異常が発癌に関連していると推察された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではp62という選択的オートファジー(自食作用)を行う物質が口腔癌の発癌にどのように働いているかを、p62の核-細胞質の移動に注目して解析をおこなったところ、核排出シグナルと核局在シグナルに変異を加えたマウスを制作して表現型を解析したところ、核排出シグナルに異常があると細胞に異常を認め、また、前癌病変である白板症との関連を人の病理検体を用いて調べたところ、上皮異形と有意に関連することが証明されたため、p62の細胞内の局在が発癌に重要な役割をしていることが考えられた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we analyzed the role of p62 in oral carcinogenesis, focusing on the nuclear-cytoplasmic shuttling of p62 and how the subcellular localization of p62 affects carcinogenesis. When the nuclear efflux function was stopped by leptomycin B treatment, accumulation of p62 in the nucleus was observed. Phenotypic analysis of mice with mutations in the nuclear efflux and nuclear localization signals revealed abnormalities in kidney podocyte cells. In addition, using samples of clinical specimens of leukoplakia, we examined the association between nuclear localization of p62 and clinical indexes and pathological morphology, and proved that it was significantly associated with epithelial dysplasia. From the above, it was inferred that abnormal localization of p62 could be associated with carcinogenesis.

研究分野：口腔外科学

キーワード：p62 シャトリング 口腔癌

1. 研究開始当初の背景

オートファジーはユビキチン・プロテオソーム系と並ぶ真核細胞の主要な 2 つのタンパク質分解機構の 1 つで、とくに寿命の長いタンパク質やミトコンドリアなどのオルガネラを分解し細胞内の恒常性の維持に機能している。近年、オートファジー研究の発展と同時に、オートファジーと癌の関連が次々と解明され、とくに、肝細胞癌、膵管癌、肺腺癌、前立腺癌などの組織では解析が進んでいるが、扁平上皮癌では、そのメカニズムの解明はなされていない。扁平上皮癌は頭頸部癌の 90%、食道癌の 90%、肺癌の 30%、子宮頸癌の 75%をしめ、子宮頸癌などでは原因の多くがヒトパピローマウィルス (HPV) とされているが、口腔癌の発癌の原因は、HPV 以外の遺伝子の障害によるものが主流である。発癌の原因はタバコ・アルコール・高温などの物理・化学的なストレスによって起こると疫学的に知られているが、その機序は特定のもの以外は明らかにされていない。

p62 は研究代表者のグループで、当初 A170 という酸化ストレスタンパク質としてクローニングしたタンパク質で (Ishii T, Yanagawa T, et al. *Biochem Biophys Res Commun* 1996, 226:456-460)、選択的オートファジーのアダプタータンパク質であることが解明されてきた (Komatsu M, Yanagawa T, Warabi E, et al. *Cell* 2007) が、この p62 は、近年、臨床的に口腔癌での発現と予後との関連など報告されて来ている。また、親電子反応・酸化ストレスの防御系を制御する Nrf2-Keap1 系は、オートファジーを介した細胞の腫瘍化に関連があることがわかってきた。研究代表者は前回の研究で、p62-Nrf2 遺伝子ダブルノックアウトマウスを製作し、NAFLD から NASH を経て肝臓癌へと進展する肝臓癌発症モデルマウスを製作し、p62 の欠損が肝臓癌発症へ至ることを解明した (Akiyama K, Yanagawa T, et al. *Exp Anim* 2018, 67:201-218)。近年の研究では肝臓癌の過程では p62 の蓄積が mTORC1~c-Myc の活性化を上昇させ、発癌の原因を起こしていることが知られてきたが、どのように発癌を起こすかそのメカニズムについて明確にされていない。一方、臨床的な検討から、p62 やオートファジー因子である LC3A, B の発現が予後に関連することなどを免疫組織化学的な結果から得ており、すでに健常である部分でオートファジーの異常が起きていることを研究代表者らの研究で示している (Terabe T, Yanagawa T, et al. *Hum Pathol* 2018, 73:156-163)。今回、研究代表者らは、発癌剤やタバコ、アルコールなどによる障害によって正常細胞が前癌病変から扁平上皮癌に至る過程はいったいどのような機序で行われるのか？を p62 の核-細胞質シャトリングの障害による核内への異常タンパクの集積による発癌という観点から検討すべく本実験を立案した。

2. 研究の目的

近年、オートファジーの研究の進展とともにオートファジーの異常による発癌について急速に解明が進んでいるが、口腔癌の発癌機構についての未知な部分が多い。p62/A170 は研究代表者のグループで酸化ストレスタンパク質としてクローニングした分子で、選択的オートファジーのアダプター分子としての役割を解明してきたが、近年、口腔癌を含む多くの癌で発癌や予後との関連が報告されている。本研究では、正常組織が前癌病変を経て扁平上皮癌へと発癌に至るメカニズムを、p62 の核-細胞質間のシャトリングの障害による異常タンパクの蓄積という観点から解明を図る。そのために、1) p62 の核移行に変異のある遺伝子改変マウスを製作し生体内で障害が起きた際のマウスの発癌の検討と 2) 患者の臨床検体の前癌病変における p62 の局在の免疫組織学的解析の二方向から検討を行い口腔癌の発癌における意義を検討する。以上から p62 の核-細胞質のシャトリングの発癌における役割を解明する。

3. 研究の方法

本研究では、p62 が扁平上皮癌の発癌のメカニズムにおける役割を調べるために、p62 の核-細胞質シャトリングに障害をきたした細胞およびマウスの変化を検討すると同時に、臨床の前癌病変の組織切片で p62 の核・細胞質の局在が臨床的にどのような意義をもつのか分析した。

I. 基礎的探求として、1. *in vitro* の解析：ゲノム編集で核移行シグナルを欠損させた細胞を用いて、細胞レベルでの p62 の核と細胞質のシャトリングとオートファジーの変化を調べる。2. *in vivo* の解析：核排出シグナル (NES: Nuclear export signal) と核局在シグナル (NLS: Nuclear localization signal) に変異を加えた遺伝子改変マウスを制作することにより、p62 の核-細胞質のシャトリングの障害を人為的にマウスに起こし表現型を解析し口腔癌の発症のメカニズムを探った。また、II. 臨床的探求として、前癌病変の口腔白板症の臨床検体を用いて p62 およびオートファジー関連因子を免疫組織化学的に調べ、p62 の局在の変化が実際の病変の中でどのように臨床病態と関連するかを検討した。具体的には以下のとおりである。

I 基礎的探索

1. *in vitro* の検討

1) p62 の核～細胞質間シャトリングの検討: p62 は通常の条件下での免疫染色では細胞質に染まって見えるが、エクスポーチン (Xpo1) の阻害剤であるレプトマイシン B (LMB) を処理で核排出を止めた際に局在がどこになるか、p62 抗体で染色して、細胞内局在を蛍光レーザー顕微鏡で観察を行った。またアポトーシスについて Cleaved Caspase-3 の発現, Tunnel 染色で評価した。

2) ゲノム編集による p62 の核排出_核移行シグナル変異の導入: p62 タンパク質には核排出シグナル (NES: Nuclear export signal) と核局在シグナル (NLS: Nuclear localization signal) が存在するため、NES と NLS 配列に CRISPR/CAS9 によるゲノム編集によりミューテーションを入れ、p62 の欠損 MEF (p62^{-/-}MEF) に変異を導入した細胞を製作した。一塩基を置換するための一本鎖 DNA (ssODN) は図 1 に示すとおりとした。

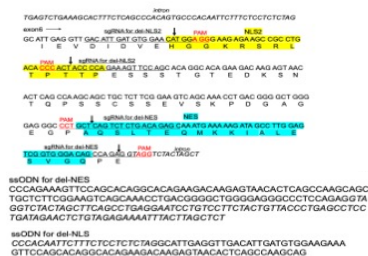


図 1 NLS NES の ssODN

2. *in vivo* の研究

1) p62 の核排出、核移行シグナル変異の導入マウスの作製: p62 が核内と細胞質内に局在するが存在するため、前述のように NES と NLS 配列に CRISPR/CAS9 によるゲノム編集によりミューテーションを NLS と NES に入れた遺伝子改変マウス dNLS マウスと dNES マウスを制作した。
2) 表現型の解析: マウスの体重測定と生育曲線の作成、全身の病理学的検索を行った。また、dNLS/dNLS マウス dNES/dNES の BUN、Cre、総タンパク量の生化学的検査を行った。

II 臨床的探索

1. 臨床検体による p62 の局在の検討

口腔白板症のパラフィンブロック 50 例を選択し、臨床指標、核酸の酸化マーカーである 8-OHdG、細胞増殖の指標として Ki67、がん抑制遺伝子である p53 の発現状態を比較検討し、正常粘膜から口腔白板症、さらにはがん化へ至る過程の p62 の発現の意義を考察した。

対象は口腔白板症患者 50 例のホルマリン固定パラフィン包埋組織および臨床指標 (年齢, 性別, 部位, 発生様式, 飲酒歴, 喫煙歴), 上皮異型有無を医療記録から収集した (表 1)。患者構成は、男性 24 名、女性 26 名で、中央値は 68 歳 (28~95 歳) であった。口腔白板症検体は、舌が 18 例、その他の部位が 32 例であった。p62 抗体、8-OHdG 抗体、Ki67 抗体、p53 抗体 を用いて免疫組織化学染色を LsAB 法でおこない行った。免疫染色の評価は、3 名の口腔外科医が標本を独立して行い、結果を χ^2 乗検定と多変量ロジスティック解析により検討した。

表 1 対象の臨床指標

age	
-64	20
65-	30
sex	
man	24
weman	26
location	
tongue	18
others	32
occurrence form	
single	43
multiple	7
drinking	
yes	18
no	31
smoking	
yes	24
no	24
epithelial dysplasia	
positive	18
negative	32

4. 研究成果

I 基礎的探索

1. *in vitro* の検討

1) p62 の核～細胞質間シャトリングの検討: p62 は通常の条件下での免疫染色では細胞質に染まって見えるが、エクスポーチン (Xpo1) の阻害剤であるレプトマイシン B (LMB) を処理で核排出を止めた際の蛍光レーザー顕微鏡で観察を行った。LMB 処理による p62 の継時的な局在変化 LMB 処理による p62 の継時的な細胞内局在変化を、免疫染色とウエスタンブロットで調べたところ、p62 の核蓄積は LMB 処理後 1 時間から見られた。24 時間後にはより多くの p62 が核に蓄積していた (図 2)。

LMB 毒性の時間・濃度依存性について WT と p62^{-/-}MEF に LMB を加え、MTT 試薬により生細胞 活性を調べたところ、WT では LMB により著大な生存細胞の減少が認められたが、p62-KO MEF では減少はほとんど認められなかった (図 3)。

WT と p62-KO MEF における LMB により誘導されるアポトーシスを、ウエスタンブロットにより Cleaved Caspase-3 の発現量を調べて評価したところ、野生型 (WT) では LMB により Cleaved Caspase-3 の誘導が認められたが、p62^{-/-}MEF ではその程度は小さかった。KO 細胞の p62 強制発現による LMB 感受性の変化について調べるため、p62^{-/-}MEF に p62 発現ベクターをトランスフェ

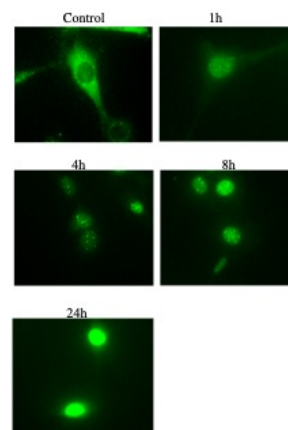


図 2 LMB 処理による p62 の局在の変化

クシオンして LMB 毒性の変化を調べたところ、p62 を強制発現させた p62^{-/-}MEF では LMB による細胞毒性が高まった、LMB 処理によるユビキチン化蛋白の局在変化 WT と p62^{-/-} MEF に LMB を加え、p62 とユビキチン化蛋白の細胞内局在変化を、免疫染色で調べたところ、WT では核内にユビキチン化蛋白の凝集が認められ p62 の凝集と一致したが、p62^{-/-}MEF では LMB 処理による変化は認められなかった。

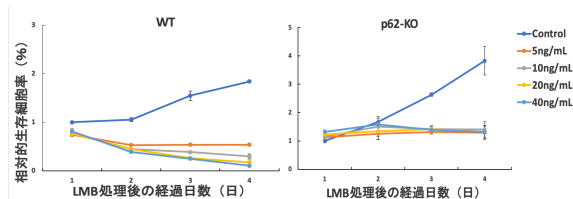


図3 p62の有無によるLMB刺激の変化

2)ゲノム編集による p62 の核排出_核移行シグナル変異の導入: p62 タンパク質には核排出シグナル (NES: Nuclear export signal)と核局在シグナル(NLS: Nuclear localization signal)が存在するため、NES と NLS 配列に CRISPR/CAS9 によるゲノム編集によりミューテーションを入れ、p62^{-/-}MEF に変異を導入した細胞を製作し、LMB 処理に対する p62 の応答を調べた。dNES/dNES 導入の細胞では、LMB 処理の有無に関係なく p62 は核内に偏在していたが、一方、dNLS/dNLS では LMB の刺激により核内の p62 が核外への移行が通常通り起きていた (図 4)。

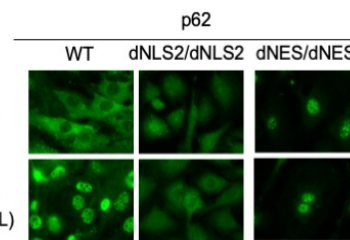


図4 dNLS dNES に対する LMB 処理の応答

マウスの表現型を見たところ、dNLS/dNLS マウスには明かな変異は見られなかったが (図 5)、dNES/dNES は明らかに個体の大きさが小さく、体重増加が 4 週間より WT と比較して現象を認め、約 7 週間まで致死となった (図 6)。病理解剖によって、腎臓の萎縮を認めたため、組織学的に観察を行ったところ、dNES/dNES マウスは腎尿管に異常が認められ (図 7) 腎機能障害を呈する事が解った。さらに電顕的に検索を行ったところ 3 週齢より足突起の消失が見られ足細胞の基底膜との間に異常が生じていることが解った (図 8)。

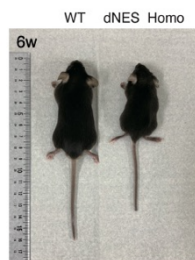


図5 dNES/dNES マウスの表現型

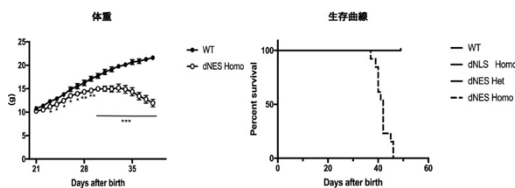


図6 dNES/dNES マウスの体重と生存曲

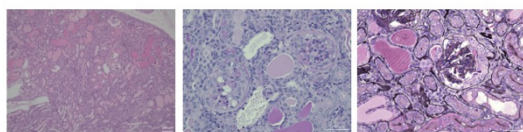


図7 病理組織学的所見 腎尿管の変異

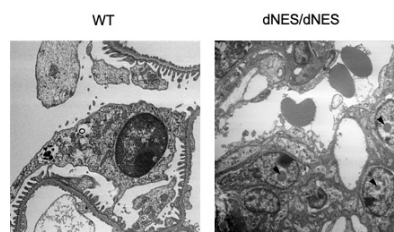


図8 足細胞の電顕的所見

II 臨床的探索

結果: 口腔白板症 50 人の患者のうち、上皮異形を有するものは 18 例で、単発性の発生様式が 43 例で多発性発生様式が 7 例であった。p62 核染色陽性は 21 例、p62 凝集陽性は 14 例、p62 細胞質染色陽性は 29 例 (図 9)、飲酒は 18 例 (不明 1 例)、喫煙歴は 24 例 (不明 2 例)、8-OHdG (50%) 陽性は 32 例、Ki67 (1%) 陽性は 10 例、p53 (1%) 陽性は 29 例であった。p62 核染色と p62 凝集と上皮異形の関連性に有意差を認めた (P<0.05)。これらより、前がん病変である口腔白板症における p62 の細胞内蓄積が、悪性化のリスク因子となる上皮異形の関連 であることを明らかにした。このことから、口腔白板症における p62 の核内の蓄積

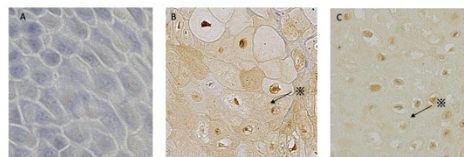


図9 口腔白板症臨床検体の p62 の核内の発現

が発癌に関連する可能性を有している可能性があることが示唆された。

研究の総括

I 基礎的探索と II 臨床的探索の結果を総合的に考察すると、p62 は核内と核外へのシャトリングを常時行っていて、その排出が困難になって核内に蓄積した場合、細胞に障害が起こることが判明した。さらに、遺伝子改変マウスの解析から、核移行シグナル、核排出シグナルのうち、核排出シグナルの変異により、細胞内に p62 が集積して、異常の蓄積から細胞の障害が生じていることが判明した。臨床検体では、p53 のほか、酸化ストレスのマーカーである 8-OHG、増殖マーカーの Ki67 などとは関連が見られないものの、p62 の核内の集積、凝集には上皮異型と関連が有意に認められたことから、p62 の核内の集積による変異が腎臓の足細胞と基底膜に関連するに相当する部位に何らかの影響を与えて口腔癌の発癌の過程に関与していることが証明できたと考えられる。今後、この p62 の核内の集積がもたらす口腔癌の発癌について、より、具体的な部位と発癌に至るメカニズムの解明を行っていきたいと考える。

表 2 p62 の局在と臨床指標の関連

Parameter	univariate nominal scale logistic regression analysis			multivariate nominal scale logistic regression analysis		
	odd's-ratio	95%CI	p-value	odd's-ratio	95%CI	p-value
p62 in nucleus	3.457	1.024-11.558	0.044*	5.750	1.262-26.189	0.024*
p62 aggregation	3.467	0.959-12.536	0.058	6.157	1.013-37.418	0.048*
p62 in cytoplasm	1.222	0.377-3.986	0.738	1.904	0.420-8.622	0.403
8-OHG	2.722	0.733-10.114	0.135	5.306	0.966-29.458	0.056
Ki67	1.238	0.299-5.134	0.769	1.458	0.274-7.757	0.658
p53	1.785	0.531-5.865	0.354	2.349	0.566-9.759	0.240

Concerning the positive number of epithelial dysplasia, nucleus p62(-) were 7 of 29 and nucleus p62(+) were 11 of 21. p62 aggregation (-) were 10 of 36 and in p62 aggregation (+) were 8 of 14. p62 cytoplasm (-) were 7 of 21 and p62 cytoplasm(+) were 11 of 29. 8-OHG(-) were 4 of 18 8-OHG (+) were 14 of 32. Ki67 (-) were 14 of 40 Ki67(+) were 4 of 10. p53 (-) were 6 of 21 and p53 (+) were 12 of 29. There was a significant difference between epithelial dysplasia and p62 in nucleus in univariate nominal scale logistic regression analysis only, but there was a significant difference between epithelial dysplasia and p62 in nucleus, p62 aggregation in multivariate nominal scale logistic regression analysis respectively.

表 1 対象の臨床指標

p62 in nucleus			
Parameter	odd's-ratio	95%CI	p-value
8-OHG	2.600	0.750-9.008	0.132
Ki67	4.333	0.966-19.429	0.055
p53	3.938	1.137-13.645	0.031*
p62 aggregation			
Parameter	odd's-ratio	95%CI	p-value
8-OHG	1.591	0.417-6.071	0.497
Ki67	2.000	0.467-8.557	0.350
p53	3.667	0.874-15.384	0.076
p62 in cytoplasm			
Parameter	odd's-ratio	95%CI	p-value
8-OHG	1.667	0.518-5.363	0.392
Ki67	3.619	0.682-19.208	0.131
p53	2.090	0.663-6.593	0.354

The relationship between p62 parameters and other biomarkers (8-OHG, Ki67, p53). There was a significant difference in association with p62 in nucleus and p53 only.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6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 Agas D, Amaroli A, Lacava G, Yanagawa T, Sabbieti MG.	4. 巻 235
2. 論文標題 Loss of p62 impairs bone turnover and inhibits PTH-induced osteogenesis.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Cell Physiol.	6. 最初と最後の頁 7516-7529
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jcp.29654.	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 該当する
1. 著者名 Watahiki T, Okada K, Warabi E, Nagaoka T, Suzuki H, Ishige K, Yanagawa T, Takahashi S, Mizokami Y, Tokushige K, Ariizumi SI, Yamamoto M, Shoda J.	4. 巻 69
2. 論文標題 Gender difference in development of steatohepatitis in p62/Sqstm1 and Nrf2 double-knockout mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Exp Anim	6. 最初と最後の頁 395-406
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1538/expanim.20-0028.	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 Nomura N, Ito C, Ooshio T, Tadokoro Y, Kohno S, Ueno M, Kobayashi M, Kasahara A, Takase Y, Kurayoshi K, Si S, Takahashi C, Komatsu M, Yanagawa T, Hirao A.	4. 巻 11
2. 論文標題 Essential role of autophagy in protecting neonatal haematopoietic stem cells from oxidative stress in a p62-independent manner	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 1666
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-81076-z	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 Agas D, Amaroli A, Lacava G, Yanagawa T, Sabbieti MG.	4. 巻 -
2. 論文標題 Loss of p62 impairs bone turnover and inhibits PTH-induced osteogenesis.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Cell Physiol	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jcp.29654.	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 Yoshida T, Terabe T, Nagai H, Uchida F, Hasegawa S, Nagao T, Miyabe S, Ishibashi-Kanno N, Yamagata K, Warabi E, Goshio M, Yanagawa T, Bukawa H.	4. 巻 5
2. 論文標題 Association between p62 expression and clinicopathological characteristics in oral leukoplakia.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Clin Exp Dent Res	6. 最初と最後の頁 389-397
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cre2.193.	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 Yamada T, Dawson TM, Yanagawa T, Iijima M, Sesaki H.	4. 巻 15
2. 論文標題 SQSTM1/p62 promotes mitochondrial ubiquitination independently of PINK1 and PRKN/parkin in mitophagy.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Autophagy	6. 最初と最後の頁 2012-2018
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/15548627.2019.1643185.	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

〔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 藤 栄治, Ning Baoshuo, 布施谷清香, 森戸直記, 白井俊明, 柳川 徹, 水野聖哉, 川西 邦夫, 高橋 智
2. 発表標題 オートファジー選択的基質p62/Sqstm1の細胞質 - 核間シャトリング異常はポドサイト障害を引き起こす
3. 学会等名 第6回ポドサイト研究会
4. 発表年 2022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
研究 分担者	田淵 克彦 (Tabuchi Katsuhiko) (20546767)	信州大学・学術研究院医学系・教授 (13601)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究分担者	藤 栄治 (Warabi Eiji) (70396612)	筑波大学・医学医療系・講師 (12102)	
研究分担者	山縣 憲司 (Yamagata Kenji) (00420084)	筑波大学・医学医療系・准教授 (12102)	
研究分担者	内田 文彦 (Uchida Fumihiko) (70736008)	筑波大学・医学医療系・講師 (12102)	

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