

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460624

研究課題名(和文) p53変異型癌細胞におけるp73活性化を応用した新規癌治療の基礎研究

研究課題名(英文) A basic research of p73 activation as a novel treatment for p53-mutant type cancer

研究代表者

兵頭 一之介 (HYODO, Ichinosuke)

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号：60416469

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：がん抑制遺伝子p53変異型癌細胞では、高い相同性を有するp73遺伝子がp53と同様に転写調節因子として働き、腫瘍細胞の増殖抑制効果を示すと報告されている。本研究では、p73の抗腫瘍効果について種々のヒトがん細胞株を用いて検討した。大腸癌細胞株(DLD-1、HCT116)において5-FUあるいはイリノテカンでp73が誘導された。そこで、HCT116を用いて様々な関連分子の修飾下において、p73の腫瘍増殖に与える影響を検討した。その結果、変異型p53の存在下及び非存在下いずれにおいてもp73の腫瘍抑制効果は低かった。がん治療におけるp73活性化の応用には、さらなる検討が必要と考えられた。

研究成果の概要(英文)：p73 has a high homology to tumor-suppressor gene p53, and acts as a translational factor like p53 in p53-mutant type cancer cells. In this study, we evaluated the tumor growth inhibition of p73 in human tumor cell lines. p73 was induced by 5-FU or irinotecan administration in the colon cancer cells (DLD-1, HCT116). Using HCT116, the function of p73 was investigated with various inhibition of related-molecules under 5-FU exposure. As the results, p73 tumor-suppressive function was little in this cancer line regardless of harboring p53 mutation. Further studies are needed to develop a novel strategy using p73 for anticancer treatments.

研究分野：消化器内科学

キーワード：p73 がん

1. 研究開始当初の背景

(1) p53 は細胞周期、アポトーシスを制御している重要な蛋白で、その遺伝子は癌抑制遺伝子として知られている。ヒト癌において約半数に、この癌抑制遺伝子 p53 の変異が生じ、その抑制機能が失われている。残りの半数の p53 野生型の癌においても様々な機序により、その機能が阻害されている。これまで我々は p53 野性型の癌において、その機能の回復を目指して p53 分解を担うユビキチン化蛋白 MDM (Murine Double Minute) 2/MDM4 を小分子化合物や siRNA を用いて阻害し、細胞停止、アポトーシスが誘導され、良好な腫瘍抑制効果が得られることを報告し、その治療への応用を模索してきた。

(2) 一方で約半数の p53 変異型癌細胞では、MDM2/MDM4 の制御による治療戦略は、全く効果が見られず、この分子生物学的解明と、その解決へ向けた研究が求められている。

2. 研究の目的

(1) p53 変異型癌細胞では、p53 遺伝子と高い相同性を有する p73 遺伝子が p53 と同様に転写調節因子として腫瘍細胞の増殖抑制効果を示すと言われている。また、p73 は p53 と複合体を形成し、その転写活性化能を高めることが報告されている。MDM2 や Np73 (p73 の N 末端トランス活性化ドメイン欠損変異体)、Aurora kinase A、iASPP (inhibitory member of the ASPP family) などは、p73 活性を抑制することで、癌の増殖や転移を促進すると言われている。

(2) 本研究では、様々なヒト癌細胞株における p73 誘導の抗腫瘍効果について検討し、これを臨床応用への可能性へ繋げることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 使用した癌細胞株

- 大腸癌 (DLD-1、HCT116)
- 胃癌 (Kato-III、NUGC3)
- 卵巣癌 (SK-OV-3)
- 肝臓癌 (HuH-7)
- 骨肉腫 (Soas-2)

(2) タンパク発現解析

p73、Np73、p53、MDM2、MDM4、p21CIP1/WAF1、 β -actin の発現は、それぞれ特異抗体を用いたウエスタンブロット法で解析した。

(3) 試験管内細胞生存率の解析

未処理の培養細胞に対して抗がん剤と siRNA を導入した培養細胞の生存率を、WST-8 アッセイで解析した。抗腫瘍効果=未処理細胞生存率 - 導入細胞生存率とした。

(4) siRNA による蛋白ノックダウン

p73 に対しては、2 種類の特異的 siRNA を、

p53、MDM2 及び MDM4 に対しては、それぞれに対して特異的な 1 種類の siRNA を用いた。

4. 研究成果

(1) 先ず、様々な癌腫細胞株で p73 の発現について検討した。

いずれの細胞においても、p53 遺伝子変異の有無に関わらず、非刺激下では p73 及び Np73 の発現は低かった。

(2) 次に、抗がん剤 (5-FU、Cisplatin、Oxaliplatin、Irinotecan) による発現誘導について検討したところ、大腸癌細胞株 (DLD-1、HCT116) においのみ 5-FU (図 1) あるいは Irinotecan (図 2) 単独で p73 が誘導された。その際、Np73 の発現誘導は検出されなかった。

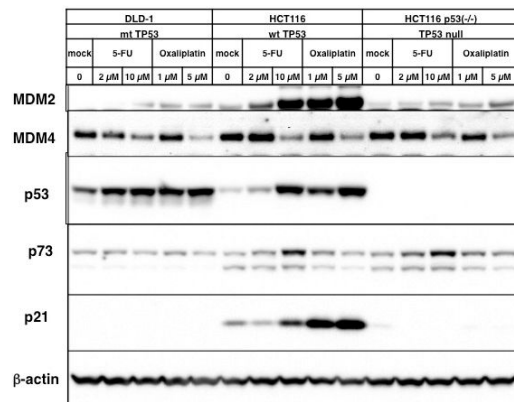


図 1 大腸癌細胞株における 5-FU 投与による p73 の発現増強

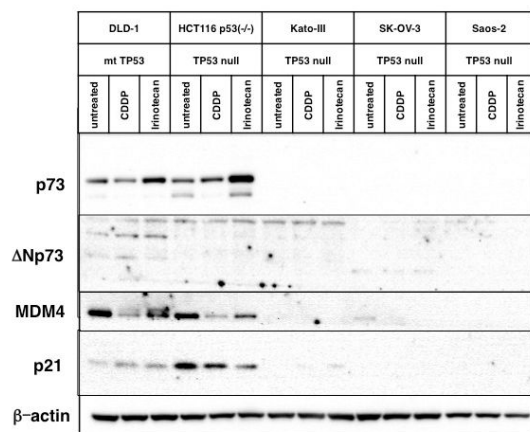


図 2 大腸癌細胞株におけるイリノテカン投与による p73 の発現増強

(3) 続いて、誘導された p73 の 5-FU の抗腫瘍効果に及ぼす影響を検討した。

HCT116 は、野生型 p53 を発現しているため、p53 非存在下で、p73 単独での抗腫瘍効果を調べるために、TP53 ノックアウトした HCT116 p53(-/-) を用いた。5-FU は、HCT116 p53(-/-) においても親株と同等の抗腫瘍効果と p73 発

現誘導性を示した。HCT116 p53(-/-)においてp73発現をsiRNAでノックダウンしたのちに、5-FUによる抗腫瘍効果を解析したが、p73発現抑制は、5-FUの抗腫瘍効果を抑制しなかった(図3)。

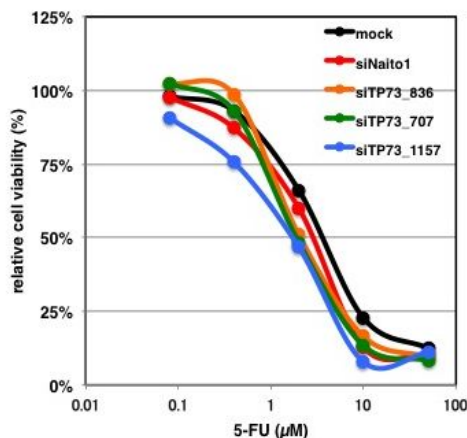
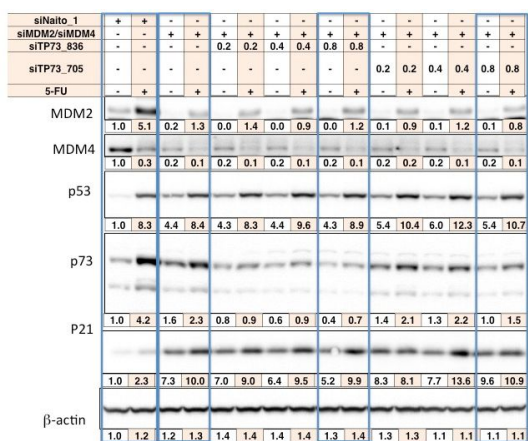


図3 p73 knockdownの5-FUによるHCT116 p53(-/-)細胞の殺細胞効果への影響(siNAIT01: control siRNA)

以上からp53非存在下でp73は5-FUの抗腫瘍効果に関与していないことが示唆された。

(4) HCT116細胞は、野生型TP53を有するとともに、p53と拮抗するMDM2及びMDM4両遺伝子を高発現している。5-FU投与とMDM2/MDM4同時ノックダウンは、HCT116細胞の増殖を相乗的に抑制する。ここで5-FUによるp73誘導がどの程度これらの併用効果に関与しているか検討するために、siRNAによるp73発現抑制後に5-FUへの暴露とMDM2/MDM4同時ノックダウンによる殺細胞効果を解析した。p73発現抑制は、5-FUとMDM2/MDM4に対するsiRNAによって誘導されるp53やその下流のp21の発現及び増殖抑制効果のいずれも妨げなかった(図4)。

図4 HCT116細胞におけるp73 knockdownのMDM2/MDM4



knockdownと5-FU併用によるp53関連遺伝子の発現誘導に及ぼす影響 (siNAIT01: control siRNA)

以上より、野生型p53の存在下及び非存在下

いずれにおいてもHCT116における5-FUとsiRNAノックダウン併用による増殖抑制効果にはp73の関与が少ないことが示唆された。

p53変異癌細胞におけるp73の発現は低く抑えられており、細胞生存のための何らかのp73抑制機序が働いていると推定される。今回の結果からは、この機序においてMDM2/MDM4のノックダウンあるいは5-FU投与によりp73が誘導されるものの、その結果として得られる腫瘍抑制効果は小さいことが明らかとなった。p73を癌治療に応用するためには、さらにMDM2/MDM4以外のp73制御機序との関連や癌種と抗癌剤の組み合わせについて検討し、今回観察されたp73レベルよりも高い発現の誘導が必要であると考えられた。

<引用文献>

Endo S, Yamato K, Hirai S, Moriwaki T, Fukuda K, Suzuki H, Abei M, Nakagawa I, Hyodo I. Potent in vitro and in vivo anti-tumor effects of MDM2 inhibitor nutlin-3 in gastric cancer cells. *Cancer Sci.* 102(3):605-13, 2011.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

Sugaya A, Hyodo I, Koga Y, Yamamoto Y, Takashima H, Sato R, Tsumura R, Furuya F, Yasunaga M, Harada M, Tanaka R, Matsumura Y. Utility of epirubicin-incorporating micelles tagged with anti-tissue factor antibody clone with no anticoagulant effect. *Cancer Sci.* 査読有、2016;107(3):335-340. doi: 10.1111/cas.12863

Hirose M, Yamato K, Endo S, Saito R, Ueno T, Hirai S, Suzuki H, Abei M, Natori Y, Hyodo I. MDM4 expression as an indicator of TP53 reactivation by combined targeting of MDM2 and MDM4 in cancer cells without TP53 mutation. *Oncoscience.* 査読有、2014;1(12): 830-843. doi: 10.18632/oncoscience.103

Hirai S, Endo S, Saito R, Hirose M, Ueno T, Suzuki H, Yamato K, Abei M, Hyodo I. Antitumor effects of a sirtuin inhibitor, tenovin-6, against gastric cancer cells via death receptor 5 up-regulation. *PLoS One.* 2014;9(7): e102831. doi: 10.1371/journal.pone.0102831

〔学会発表〕(計2件)

Hirai S, Endo S, Saito R, Hirose M, Ueno T, Suzuki H, Yamato K, Hyodo I. Antitumor activity of a sirtuin inhibitor tenovin-6 and combined

effects with cytotoxic agents in gastric cancer cells. 日本癌学会 2014 年 9 月 27 日、パシフィコ横浜・神奈川県・横浜市

Hirose M, Yamato K, Saito R, Ueno T, Hirai S, Suzuki H, Endo S, Hyodo I. Specific growth suppression of wild-type p53 tumor cells by DNA-modified siRNA sequences targeting MDM2. 2014 年 4 月 7 日、米国癌学会、San Diego, U.S.A.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

特記事項なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

兵頭 一之介 (HYODO, Ichinosuke)

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号：6 0 4 1 6 4 6 9

(2) 研究分担者

大和 建嗣 (YAMATO, Kenji)

筑波大学・医学医療系・研究員

研究者番号：5 0 1 7 4 7 5 1

遠藤 慎治 (ENDO, Shinji)

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：4 0 6 2 5 9 1 9

山本 祥之 (YAMAMOTO, Yoshiyuki)

筑波大学・附属病院・病院講師

研究者番号：0 0 6 4 9 2 8 8

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし