

【要約】

A p53-stabilizing agent, CP-31398, induces p21 expression with increased G2/M phase through the YY1 transcription factor in esophageal carcinoma and achieves synergistic growth suppressive effects in combination with an MDM2 or a FAK inhibitor on mesothelioma

(p53 蛋白を安定化する CP-31398 は、食道がんにおいて YY1 発現を抑制し p21 分子を誘導し G 2 /M 期を増加させるが、悪性中皮腫においては MDM2 あるいは FAK 阻害剤と相乗的な増殖抑制効果を示す)

千葉大学大学院医学薬学府

先端医学薬学専攻

(指導教授：田川雅敏)

鐘博雅

【序論】 がん抑制経路の主要となる p53 の機能回復を図ることは、がん治療における主たる方向性の一つである。野生型 p53 分子の導入、変異型 p53 の機能抑制とならんで、p53 機能の回復を目指す低分子薬剤の開発も進行中である。その中で、本研究では変異型 p53 分子と結合して高次構造を変化させ、p53 機能を回復させる CP-31398 の作用機序について検討した。CP-31398 は野生型 p53 に対しても作用して p53 発現を上昇させることが知られており、その作用は MDM2 分子と p53 との結合を阻害することなく、p53 分子のユビキチン化を阻害するとう報告がある。そこで、CP-31398 の効果を検証するために、野生型 p53 分子に対する機能についてはヒト悪性中皮腫細胞を用いて、変異型 p53 分子に対する作用はヒト食道がん細胞を用いて解析した。

悪性中皮腫では臨床検体の大多数において p53 遺伝子は野生型であり、その下流領域においても変異は少なく、p53 経路が正常であることが多い。一方食道がんでは臨床検体のほとんどにおいて p53 遺伝子が変異型であることが多く、p53 経路に異常があることが多い。そこで、野生型 p53 の悪性中皮腫に対しては CP-31398 単独のみならず、MDM2 阻害剤 nutlin-3a との併用効果について、変異型 p53 の食道がん細胞については CP-31398 増殖抑制効果に関する機構について検討した。

【結果】

1. CP31398 が野生型 p53 細胞に与える効果の解析

それぞれ 4 種類の野生型 p53 と変異型 p53 遺伝子を有する悪性中皮腫細胞株に、CP-31398 を処理すると細胞増殖能は低下したが、その IC₅₀ 値に関して p53 遺伝子型による差はなかった。一方、同じ細胞群を MDM2 と p53 分子の結合を阻害する nutlin-3a で処理すると、p53 野生型の細胞のほうが変異型 p53 細胞より有意に IC₅₀ 値が低下していた。CP-31398 処理後、野生型 p53 細胞では内因性の p53 発現は上昇し、p21 発現も上昇していたが、変異型では p53 発現上昇はなかった。すなわち、CP-31398 の抗腫瘍効果は p53 の遺伝子型に依存しないが、p53 発現を上昇させることができる。

2. CP31398 と nutlin-3a との併用効果

CP31398 処理で内因性 p53 発現が上昇することから、野生型 p53 細胞に関して nutlin-3a と CP31398 との併用効果を検討した。その結果、両者の併用によって相乗的な細胞増殖抑制が誘導され、sub-G1 期の細胞が増加していた。Western blot 法でこの相乗効果を解析すると、併用によって p53 およびリン酸化 p53 分子

の発現が上昇し、その結果 p53 経路の標的分子である p21, MDMA 分子の発現も単独使用に比べて上昇していた。さらに FAK 発現量は変わらなかったが、リン酸化 FAK は単独使用より減少していた。これは p53 と FAK の相互関係から p53 発現増強による FAK 活性抑制の結果と考えられた。

そこで FAK 活性の抑制と p53 経路の活性化との関係を検証するために、FAK 阻害剤である defactinib と CP-31398 との併用効果について検討した。その結果、相乗的な細胞増殖抑制効果が見られた。この時、両者の併用は単独処理に比べて、p53 とリン酸化 p53 発現が上昇し、リン酸化 FAK 発現が低下していた。すなわち FAK と p53 は相互に抑制的に作用していると考えられた。

3. CP31398 が変異型 p53 細胞に与える効果の解析

食道がん細胞（野生型 p53 : 4 種類、変異型 p53 遺伝子 : 5 種類）を用いて CP-31398 の細胞増殖について検討すると、その抑制効果と p53 遺伝子型との間に相関性はなかった。また nutlin-3a についての細胞増殖効果についても p53 遺伝子型との相関性はなく、シスプラチンを用いて DNA 傷害を誘導しても、野生型 p53 細胞で p53 は上昇しなかった。すなわち、ここで使用した全ての細胞は p53 遺伝子型によらず、同経路の下流が失活していることを意味している。一方、細胞周期を検討すると、CP-31398 処理によって、G2/M 期の増加がほぼ全ての細胞に、また sub-G1 の増加が一部の細胞に見られた。

4. CP31398 による細胞内シグナル系への影響

CP-31398 処理によって、p53 およびリン酸化 p53 の増加はなかったが、p21 の発現は p53 遺伝子型によらず全ての細胞で上昇していた。このとき、siRNA で p53 発現を低下させても p21 発現上昇は変わらなかった。すなわち CP-31398 の p21 発現上昇は p53 非依存的であった。さらに p21 の転写調節を検討すると CP-31398 は p21 の mRNA 量を増加させており、このことは CP-31398 が転写調節に関わることを意味していた。

YY1 分子が p21 遺伝子の発現調節に関与する一つの転写因子であることから、CP-31398 処理後の YY1 発現を検討すると p53 変異型の TE-10 細胞以外、すべての細胞で YY1 発現が低下していた。さらに siRNA を用いて YY1 発現を低下させて CP-31398 処理を行うと、CP-31398 処理後の p21 の上昇はさらに増強した。このとき、TE-10 だけは YY1 発現低下によって p21 発現が低下した。また p21 の細胞周期における関与を検討するために、siRNA で p21 発現を低下させて CP-31398 を処理すると、CP-31398 による G2/M 期の上昇は消失した。すなわち、CP-31398 による G2/M 期の上昇は p21 発現に伴うものであった。

【考察】 CP-31398 に関して変異型 p53 から野生型の機能へと変換できる遺伝子変異部位は、これまでのところコドン 248, 249 および 273 に関してあり、本研

究で使用した変異型 p53 細胞はいずれもこの遺伝子変異部位に該当しない。食道がんにおいては、CP-31398 処理においてリン酸化 p53 の上昇がなく、p21 が誘導されていることから、野生型 p53 へと変換されたとは考えにくい。これを検証するには、野生型 p53 分子のみと反応する抗体を使用することが考えられるが、本研究では同抗体を使用しても、CP-31398 処理後に抗体反応性は惹起されなかった。しかし、CP-31398 によって caspase-3 や PARP の cleavage が誘導されることから、同薬剤は p53 非依存的な apoptosis を誘導していると推定される。一方野生型 p53 細胞である悪性中皮腫において、CP-31398 は内因性 p53 の発現を誘導したが、nutlin-3a の場合と異なり、その細胞増殖抑制効果に p53 遺伝子型は関与していない。また、CP-31398 と nutlin-3a は併用効果があることから、CP-31398 はたとえ p53 のユビキチン化を阻害しているとしても、nutlin-3a と別な機構で p53 の安定化に関与していると想定される。

食道がんにおける p21 の非 p53 経路による誘導は、YY1 によると考えられるが、TE-10 以外の細胞では YY1 は p21 発現に関して抑制的に、TE-10 細胞では正の方向に調節していた。過去の文献で YY1 における p21 の誘導に関しては、正あるいは負の方向へと 2 種類の調節が報告されている。また YY1 分子が直接 p21 の転写調節領域に結合することが知られているので、両方向への制御については、他の調節因子の関与が想定される。YY ファミリー分子の YY2 は YY1 と標的遺伝子の転写を逆方向に調節するので、本研究でも YY2 発現を検討したが、CP-31398 処理後の YY2 発現は YY1 と全く関連せず、本事例においては YY2 の関与は低いと想定された。一方 p21 は mTORC1 系によっても非 p53 依存的に発現が左右され、特に 4E-BP1 のリン酸化が p21 発現を抑制的に制御し、p70S6K 経路で MDM2 が阻害され p21 が誘導することが知られている。しかし、本研究においては CP-31398 処理後の 4E-BP1 および p70S6K さらに AMPK の発現は、各細胞によって全く異なっており、mTORC1 系が p21 発現に関与する可能性は低いと考えられた。通常 p21 は G1 期の細胞周期停止を誘導するが、本研究では G2/M 期での停止を誘導していた。さらに G2/M 期で細胞周期停止に作用する p27 は、CP-31398 処理によってほとんどその発現が左右されなかった。これは使用した細胞の特性によるものか、あるいは変異型 p53 細胞における非 p53 経路での p21 発現によるものかは今後検討を要する。

FAK 経路と p53 経路の相互関係はあまり解析されていないが、リン酸化 FAK は AKT を介して MDM2 のリン酸化（活性型）を誘導し、p53 発現を低下させる。また FAK は p53 と結合して MDM2 を無関係にもユビキチン化を引き起こす。これに反して、p53 発現が FAK 活性に与える効果はほとんど知られていないが、FAK の転写調節領域に p53 結合部位があることが報告されている。本研究では p53 発現上昇にともなって FAK 量は変化なかったが、リン酸化 FAK が

低下しており、これは本研究が最初の報告である。おそらく p53 発現による細胞増殖の低下、外因性の増殖因子の受容体結合阻害などが関与していると推定される。FAK は Hippo 経路の異常で活性化してくる経路の一つであり、悪性中皮腫では Hippo 経路異常の原因である NF2 遺伝子の変異が高いことが知られている。そこで、defactnib はすでに悪性中皮腫で臨床試験が開始されているが、有効であるとする報告は未だない。しかし、MDM2 阻害剤を中心として p53 経路を低分子化合物で活性化させる薬剤開発を考えると、FAK 阻害剤と p53 活性化は悪性中皮腫にとって有効な治療手段となる可能性がある。

【結論】 変異型 p53 分子に作用して p53 機能を回復させる薬剤として開発された CP-31398 は、野生型 p53 細胞では内因性 p53 発現を上昇させて、MDM2 阻害剤と相乗的に抗腫瘍効果を誘導した。さらに CP-31398 は FAK 阻害剤とも相乗的に細胞増殖抑制を誘導し、p53 発現と FAK 発現は相互に抑制的であった。一方 p53 機能が消失した細胞に対しても、CP-31398 は細胞増殖抑制効果を示したが、同時に p21 を誘導し G2/M 期でも細胞周期停止を誘導した。この p21 発現制御には転写因子 YY1 が関与していた。