

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 28 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19160

研究課題名(和文)MDM4を標的とした新規癌治療の開発研究

研究課題名(英文)A developmental research for a novel MDM4-targeted anti-cancer therapy

研究代表者

山本 祥之(Yamamoto, Yoshiyuki)

筑波大学・附属病院・病院講師

研究者番号：00649288

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：野生型TP53腫瘍において、MDM4やMDM2はp53の活性を低下させるだけでなく、MAPK経路の下流分子との相互作用により腫瘍増殖を促進させるとの報告がある。そこで本研究では、MDM4とMDM2を標的としたDNA修飾siRNA(dsRDC)と、MEK阻害薬(Trametinib)との併用効果を検討した。まず、複数のMDM4高発現野生型TP53かつRAS変異型細胞株に対して3剤併用の強い相乗効果を確認した。さらに、3剤併用においてアポトーシス誘導と細胞周期停止(G1およびG2 arrest)の誘導が増強された。今後、その相乗効果のメカニズムの詳細についてさらに検討していく必要がある。

研究成果の概要(英文)：In TP53 wild-type tumors, MDM4 and MDM2 promote tumor progression by not only down-regulation of p53 but also interactions with molecular of MAPK pathway. In this study, we aim to evaluate the combination effects of double-stranded RNA-DNA chimera (dsRDC)-modified siRNAs targeting MDM4 and MDM2, and MEK inhibitor (Trametinib). At first, the combination of these 3 drugs showed the potent synergistic effects on MDM4 overexpressed TP53 wild-type, and RAS mutant cancer cell lines. In addition, this triple-drug combination induced apoptosis and cell cycle arrests (G1 and G2 arrests). Further studies are needed to reveal the mechanism of this synergistic effect.

研究分野：消化器内科

キーワード：MDM4 MDM2 siRNA dsRDC p53 Trametinib KRAS変異

1. 研究開始当初の背景

(1) 癌抑制遺伝子である *TP53* の機能は悪性腫瘍の約半数において変異型失活をきたしているが、野生型 *TP53* 腫瘍においても *TP53* の機能を抑制する癌遺伝子である *MDM2* や *MDM4* により p53 の活性は低下している。この点から、我々は Murine Double Minute (MDM) 2、MDM4 を標的とした新規核酸医薬 (siRNA) の開発研究を行っており、MDM2 もしくは MDM4 高発現野生型 *TP53* 細胞株に対する *MDM2*、*MDM4* を標的とした DNA 修飾 siRNA (*MDM2/MDM4* dsRDC) の特異的細胞増殖抑制効果をそれぞれ示してきた。

(2) さらに近年、MDM4 は、MAPK シグナル伝達経路の下流分子との相互作用により腫瘍増殖を促進させるとの報告が複数ある。我々が調べた 7 種類の MDM4 高発現細胞株では、4 種類 (SNU-1、HCT116、LoVo、A549) に *KRAS* 変異が、1 種類 (A375) に *BRAF* 変異が生じていた。変異型 *KRAS* や *BRAF* は、その下流である MAPK シグナル伝達経路を恒常的に活性化するため、臨床研究において抗 EGFR 抗体薬は *RAS* や *RAF* の変異を有する腫瘍に対しては効果が期待できないことが明らかとなっており治療戦略に苦慮している。MDM4 高発現 *RAS/RAF* 変異型細胞株に対して MAPK シグナル伝達経路の活性化と MDM4 の腫瘍増殖に関する相乗的な作用の詳細なメカニズムを解明し、我々の設計した *MDM4* dsRDC と MEK 阻害剤等の MAPK シグナル伝達阻害薬を併用することでさらなる抗腫瘍効果の増強が示されれば、MDM4 を標的とした治療戦略に新たな可能性がもたらされると期待する。

(3) さらに我々の先行研究で、MDM4 高発現細胞株では、*MDM4/MDM2* 同時 knock-down によって相乗的な *TP53* 活性化と増殖抑制効果が示された。これらの事実は、MDM4 が MDM2 とヘテロダイマーを形成することで MDM2 の p53 ユビキチン化能を増強することや、*MDM4* 単独 knock-down による MDM2-p53 ネガティブフィードバックを *MDM2* knock-down の併用が阻止することが原因であると推測された。そのため、研究計画を改変し、更なる併用効果を期待して *MDM4* dsRDC と *MDM2* dsRDC と MAPK シグナル伝達阻害薬との 3 剤併用の効果を検討することとした。

2. 研究の目的

(1) MDM4 高発現 *TP53* 野生型かつ *RAS* 変異型細胞株に対して、*MDM4* dsRDC と *MDM2* dsRDC と MAPK シグナル伝達阻害薬との 3 剤併用の効果を検討することで、MDM4 を標的とした新たな治療戦略を確立することを目的とする。

(2) さらに、MDM4 高発現 *RAS* 変異型細胞株における MAPK シグナル伝達経路の活性化と MDM4 の腫瘍増殖に関する相互作用

について詳細に検討し、併用治療の相乗効果の詳細なメカニズムを解明する。

3. 研究の方法

(1) MDM4 高発現野生型 *TP53* 細胞株のうち、大腸癌細胞株 HCT116 (*KRAS* コドン 13 変異)、胃癌細胞株 SNU-1 (*KRAS* コドン 12 変異)、肺癌細胞株 A549 (*KRAS* コドン 34 変異) の 3 種類に対して、*in vitro* における *MDM4* dsRDC と *MDM2* dsRDC と MEK 阻害薬である Trametinib の 3 剤併用効果を WST-8 assay で検討した。各細胞株に対する *MDM4* dsRDC、*MDM2* dsRDC の投与濃度は Western blot 法を用いて十分な knock-down 効果が得られる至適濃度とし、Trametinib の投与濃度は細胞株毎に算出した IC₅₀ より決定した。併用投与による薬剤相互作用の有無は Combination Index (CI) を算出することで評価した。

(2) 次に、HCT116 を用いて、*MDM4* dsRDC (1 nM)、*MDM2* dsRDC (1 nM)、Trametinib (2 nM) の単剤および各コンビネーション下での共培養における apoptosis の誘導や cell cycle arrest について、Flow cytometry にて解析した。

(3) 3 剤併用による apoptosis 誘導増強の詳細について HCT116 を用いて、*MDM4* dsRDC (0.5 nM)、*MDM2* dsRDC (0.5 nM)、Trametinib (0.5-1.0 nM) の単剤および各コンビネーション下での共培養における、p53 シグナル下流のアポトーシス関連蛋白 (p21, Noxa, Cleaved PARP) および MAPK 下流の p-ERK の発現レベルについて、Western blotting 法で解析した。

(4) 3 剤併用による G1 arrest 増強の詳細について HCT116 を用いて、*MDM4* dsRDC (0.5 nM)、*MDM2* dsRDC (0.5 nM)、Trametinib (2 nM) の単剤および各コンビネーション下での共培養における、G1/S Checkpoint に関連する蛋白 (p53, p21, p27, p15, CDK2, CDK4, CDK6, Cyclin E, Cyclin D, Rb, E2F1) および E2F1 の標的遺伝子の蛋白 (Thymidylate synthase, RRM1, DNA polymerase α , DNA polymerase δ , PCNA) の発現レベルについて、Western blotting 法で解析した。

(5) 3 剤併用による G2 arrest 増強の詳細について HCT116 を用いて、*MDM4* dsRDC (0.5 nM)、*MDM2* dsRDC (0.5 nM)、Trametinib (2 nM) の単剤および各コンビネーション下での共培養における、G2/M Checkpoint に関連する蛋白 (p53, p21, GADD45, Cdc2, 14-3-3 σ , Cyclin B1) の発現レベルについて、Western blotting 法で解析した。

4. 研究成果

(1) MDM4 高発現野生型 *TP53* かつ *KRAS* 変異型細胞株である HCT-116、SNU-1、A549 の 3 種類の細胞株いずれにおいても *MDM4*

dsRDCとMDM2 dsRDCとTrametinibの3剤併用投与により強い相乗効果を示した (CI > 1.0 : 減衰効果、CI = 1.0 : 相加効果、CI < 1.0 : 相乗効果) (表 1)。

HCT-116

| MDM4 dsRDC (nM) + MDM2 dsRDC (nM) | Trametinib (nM) | Fa | CI |
|-----------------------------------|-----------------|------|------|
| 0.5 + 0.5 | 1 | 0.77 | 0.36 |
| 0.5 + 0.5 | 2 | 0.82 | 0.36 |

SNU-1

| MDM4 dsRDC (nM) + MDM2 dsRDC (nM) | Trametinib (nM) | Fa | CI |
|-----------------------------------|-----------------|------|------|
| 0.5 + 0.5 | 0.5 | 0.77 | 0.58 |
| 0.5 + 0.5 | 1 | 0.86 | 0.40 |

A549

| MDM4 dsRDC (nM) + MDM2 dsRDC (nM) | Trametinib (nM) | Fa | CI |
|-----------------------------------|-----------------|------|-------|
| 1 + 1 | 1 | 0.62 | 0.087 |
| 1 + 1 | 2 | 0.64 | 0.064 |

Fa, Fractional-affect; CI, combination index

表 1 各細胞株に対する3剤併用投与による相乗効果

(2) HCT116 を用いた Flow cytometry による apoptosis の誘導や cell cycle arrest をみた cell cycle assay で、コントロール (Control siRNA: siNAIT01) と比較して、MDM4 dsRDC + MDM2 dsRDC は apoptosis 誘導 (sub G1 増加)、G1 arrest 誘導 (G1 増加)、G2 arrest 誘導 (G2 増加) のいずれもが、Trametinib は apoptosis 誘導 (sub G1 増加)、G2 arrest 誘導 (G2 増加) が増強し、3 剤併用においては apoptosis 誘導、G1 arrest 誘導、G2 arrest 誘導が更に増強される結果であった (図 1、表 2)。

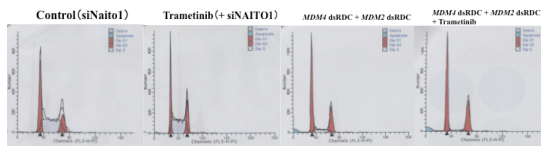


図 1 Flow cytometry による cell cycle assay

| | subG1 (%) | G1 (%) | G2 (%) | S (%) |
|--------------------------------------|-----------|--------|--------|-------|
| Control (siNAIT01) | 0.01 | 33.8 | 15.9 | 50.4 |
| MDM4 dsRDC + MDM2 dsRDC | 5.54 | 55.3 | 27.6 | 17.1 |
| Trametinib (+ siNAIT01) | 1.68 | 30.2 | 21.1 | 48.8 |
| MDM4 dsRDC + MDM2 dsRDC + Trametinib | 7.75 | 59.9 | 33.8 | 6.2 |

表 2 Cell cycle assay における細胞周期割合

(3) 3 剤併用による apoptosis 誘導増強の詳細について HCT116 を用いて、p53 シグナル下流のアポトーシス関連蛋白および MAPK 下流の p-ERK の発現レベルについて、Western blotting 法で解析した。コントロールと比較して MDM4 dsRDC + MDM2 dsRDC は p53 や p21 の発現増強を誘導したが、PUMA や Noxa、Cleaved PARP の発現に関しては一定の変化はみられなかった。Trametinib は Cleaved PARP の発現増強が確認された。3 剤併用においては p53 や p21 の発現増強を誘導し、Trametinib 単剤と比較して ERK のリン酸化を抑制したが、apoptosis 関連蛋白については一定の変化はみられず、蛋白発現解析においては apoptosis 誘導増強の機序解明には至らなかった (図 2)。

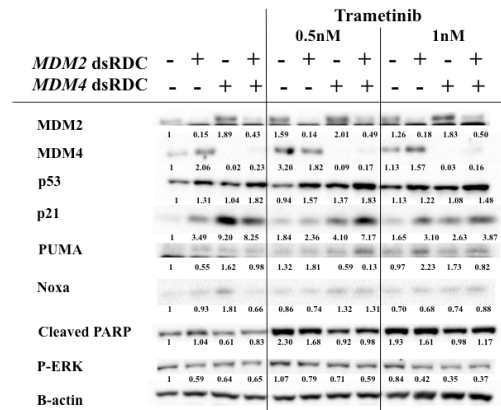


図 2 Apoptosis 関連蛋白および P-ERK の発現変化

(4) 3 剤併用による G1 arrest 増強の詳細について HCT116 を用いて、G1/S Checkpoint に関連する蛋白および E2F1 の標的遺伝子の発現蛋白の発現レベルについて、Western blotting 法で解析した。MDM4 dsRDC + MDM2 dsRDC 投与により、MDM4、MDM2 の発現低下を認め、その下流の p53、p21、p27 の発現亢進、CDK2 の発現低下およびそれに伴う Rb、E2F1 の発現低下を認めた。一方、Trametinib 投与により仮説では MYC 発現阻害により P15ink4b の機能活性により Cyclin D/CDK4,6 の阻害作用が推定されたが、明らかな変化は認めなかった。3 剤併用においては、MDM4、MDM2 阻害作用が主体と考えられる Rb、E2F1 の発現低下を認めたが、E2F1 の標的遺伝子の発現蛋白に一定の変化はみられず、一連の蛋白発現解析においては G1 arrest 増強の機序解明には至らなかった (図 3、図 4)。

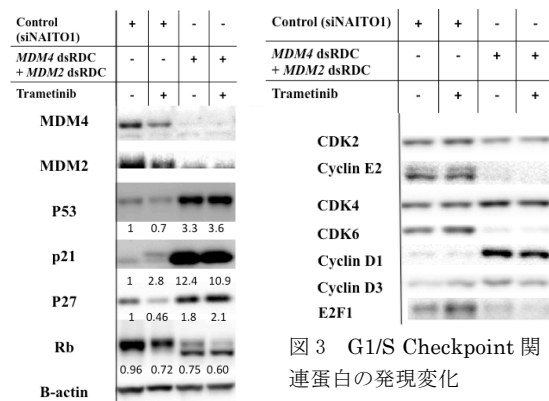


図 3 G1/S Checkpoint 関連蛋白の発現変化

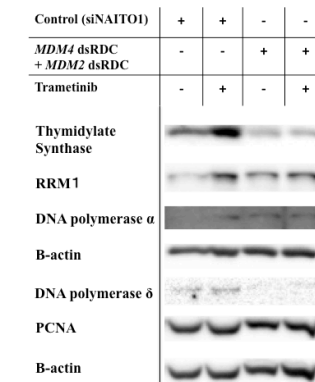


図 4 E2F1 の標的遺伝子の関連蛋白の発現変化

(5) 3剤併用による G2 arrest 増強の詳細について HCT116 を用いて、G2/M Checkpoint に関連する蛋白の発現レベルについて、Western blotting 法で解析した。MDM4 dsRDC + MDM2 dsRDC 投与により、p53 の発現亢進を認め、p53 の働きによると推測される p21、14-3-3 σ 、GADD45 の発現亢進を認めた。さらに p53 の直接作用および p21、14-3-3 σ 、GADD45 の作用を介在する Cyclin B1、Cdc2 の発現低下を認めた。また、Trametinib の作用として、MEK 阻害により MYC の作用を抑制することで Cyclin B/Cdc2 の阻害作用をもたらし G2 arrest を増強することが推測されるが、Trametinib の投与で Cyclin B1 の発現低下が認められた。さらに 3 剤併用により、Cyclin B1 および Cdc2 の発現低下の更なる増強が認められた (図 5)。

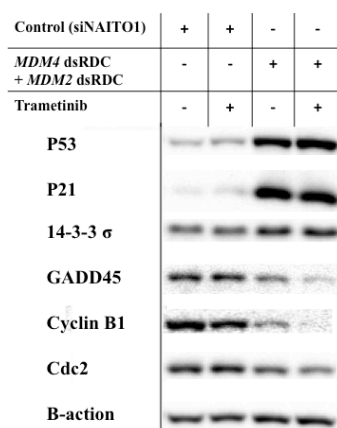


図 5 G2/M Checkpoint 関連蛋白の発現変化

以上より、MDM4 高発現野生型 TP53 かつ KRAS 変異型細胞株に対して、MDM4 dsRDC と MDM2 dsRDC と Trametinib の 3 剤併用投与は *in vitro* において強い相乗効果を示し、その相乗効果の機序として、Flow cytometry による解析で apoptosis 誘導、G1 arrest 誘導、G2 arrest 誘導の増強が考えられた。しかしながら、apoptosis 誘導、G1 arrest 誘導に関する詳細な機序に関しては Western blotting 法を用いた解析では各関連蛋白の発現変化に一定の変化は認めなかった。一方、G2 arrest 誘導に関しては、Western blotting 法を用いた解析で、3 剤併用により Cyclin B/Cdc2 の強い阻害作用が確認された。以上の結果より、RAS 変異型悪性腫瘍に対する MDM2 dsRDC と MDM4 dsRDC と MAPK シグナル伝達阻害薬との 3 剤併用療法は、将来有望な治療戦略として期待されるが、今後、G2 arrest 誘導に関して 3 剤併用による Trametinib の MEK 阻害からの下流の経路 (MYC 阻害→Cyclin B/Cdc2 阻害) への影響および、p53 の発現増強への影響等、更なるメカニズムの解明のための検討を要する。また、*in vivo* における 3 剤併用の抗腫

瘍効果の増強の有無についても検討が必要であると考えられた。

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 0 件)

[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]

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 祥之 (YAMAMOTO, Yoshiyuki)

筑波大学, 附属病院, 病院講師

研究者番号: 00649288

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし

(4) 研究協力者 なし