

令和 2 年 6 月 20 日現在

機関番号：82504

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10617

研究課題名(和文) がん抑制p53経路とHippo経路を標的とした消化器がんに対する治療法開発

研究課題名(英文) Molecular therapy for esophageal cancer targeting the p53 and the Hippo pathways

研究代表者

田川 雅敏 (TAGAWA, Masatoshi)

千葉県がんセンター(研究所)・がん治療開発グループ・特任研究員

研究者番号：20171572

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：食道がんの臨床検体を用いた解析から、p53分子とHippo経路の分子の遺伝子変異が多い。そこで上記経路の正常化あるいは異常亢進を阻害する薬剤を使用して、分子標的による細胞傷害活性を検討した。その結果食道がんにおいては、p53経路そのものの異常よりp53分子の変異による同経路の異常があり、p53分子の発現上昇を誘導する薬剤は細胞傷害活性を有し、細胞死を誘導した。一方Hippo経路のなかでFAK経路を阻害する薬剤は、食道がん細胞の増殖を抑制し、p53発現を増加させた。そこで、両者を併用させるとp53経路とFAK経路のクロストークが観察され、その併用によって相乗的な殺細胞効果が惹起された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高齢者に多い食道がんは、周辺組織への進展が早いことも多く、進行がんは難治であり根治的治療は困難であることが多い。そこで、同疾患の遺伝子変異に基づいて、それを標的とした薬剤の開発は、従来の放射線治療、抗がん剤治療に引き続いて新たな治療の方向性となる。このような遺伝子変異を狙う薬物は、正常組織では同変異がないことから、有害事象が少なく当該疾患に特異的に作用すると想定され、また従来の治療法との併用が可能である。高齢化社会でのがん治療に向けて、また今後臨床応用されるゲノム研究の成果を生かす方向として、遺伝子変異に立脚した当該疾患の治療法が開発できる可能性を本研究では示している。

研究成果の概要(英文)：Esophageal carcinoma has frequent mutations in genes encoding p53 and several molecules in the Hippo pathway. This suggests that restoration of the p53 pathway and suppression of the elevated Hippo pathway are therapeutic strategies for the malignancy. We used agents which augmented p53 expression or suppressed several Hippo-linked pathways and examined whether these agents induced apoptotic cell death. The present study showed that small molecules activating p53 expression killed the tumor cells but the apoptosis induced was not always relevant to p53-mediated cell death. Among agents inhibiting elevated Hippo-linked pathways, an inhibitor for focal adhesion kinase effectively suppressed the growth and augmented p53 expression. A combinatory use of p53-activating agent and the FAK inhibitor synergistically suppressed the growth through augmenting p53 and dephosphorylating FAK levels. These data indicated that agents targeting the pathways are potentially useful for the treatments.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：食道がん 遺伝子変異 p53経路 Hippo経路 FAK経路 細胞障害活性

1. 研究開始当初の背景

(1) 食道がんは補助化学療法や放射線治療との併用等によって、その予後は改善してきている。しかし、再発症例をはじめ進行食道がんは依然として予後不良であり、既存の分子標的薬に関しても、その効果に関する知見が乏しいのが現実である。また比較的高齢の患者さんが多く、そのため治療効果の高い化学療法の開発が望まれている。この状況のなかで、日本人および中国人の食道扁平上皮がんの臨床検体を使用した包括的な遺伝子異常に関する2つの報告がなされた。その結果、同食道がんは多彩な遺伝子異常を有するが、p53 経路に関する遺伝子変異が最も頻度が高いことが判明した。また、細胞間相互作用等に関与する Hippo 経路に関する遺伝子変異も他の腫瘍に比較して高頻度であり、これらの遺伝子異常と食道がんの予後が相関することが示唆されている。すなわち、このことから当該遺伝子異常は食道がんの治療標的となりえることが想定された。

(2) がん抑制に関与する p53 経路は細胞死に関連し、臨床面では抗がん剤・放射線感受性に影響を与えている。したがって、p53 経路の異常は食道がんにみられる抗がん剤・放射線耐性に関与すると考えられ、同経路の正常化は本疾患の抗がん剤・放射線感受性を向上させるはずである。そこで実際に正常 p53 遺伝子を発現するアデノウイルスベクター (Ad-p53) をヒト食道がん細胞に感染させてみると、p53 遺伝子型にかかわらず Ad-p53 によって遺伝子導入細胞は細胞死が誘導され、しかもシスプラチンをはじめ DNA 傷害を誘導する抗がん剤との併用で相乗的な細胞傷害活性が生じていた。このことは、p53 遺伝子変異の有無によらず、ヒト食道がんでは p53 分子より下流で細胞死を誘導する経路には異常がないこと、さらにこの経路は抗がん剤感受性を左右するものであることが明らかとなった。したがって、p53 分子の発現を上昇させる分子標的薬は、食道がんの薬剤感受性を改善して、より治療効果の向上が期待できるはずである。

(3) 一方 Hippo 経路の発がん・がんの進展過程における標的としては、低分子 G 蛋白質、focal adhesion kinase (FAK)、mTOR 経路であり、Hippo 経路異常としてこれらの経路不全が生じてくる。Hippo 経路の各分子は、相互に関連しながら、最終的には転写因子 YAP1 を介した遺伝子発現の異常に繋がるが、実際のがんの進展に関しては、上記経路に関連した細胞増殖、細胞接着に影響を与えている。したがって、Hippo 経路の遺伝子異常は、それ単独でまた他の経路との相互作用で食道がんの特性に関与しており、上記経路の発現異常の抑制は抗がん作用を有すると推定される。また、これらの生物学的特性は他の経路の影響も受け、これらの間のクロストークも想定される。

(4) すなわち、上記の2経路はそれぞれ食道がんの治療感受性・進展に影響を与えて、しかも相互に関連している可能性がある。したがって、p53 経路と Hippo 経路の正常化を薬物で誘導することができれば、同疾患の治療にとって意義ある結果が期待できる。

2. 研究の目的

(1) p53 経路の回復による抗腫瘍効果の検討:

食道がんでは p53 遺伝子の変異頻度が高いが、同遺伝子が正常である例も知られている。そこで、正常型4種類 (TE-2、TE-11、YES-4、YES-6) と変異型5種類 (TE-1、TE10、YES-2、YES-5、T.Tn) 合計9種類のヒト食道がん細胞に関して、p53 分子の正常化について、p53 に作用する薬剤による細胞傷害活性に関して検討を行う。このとき、p53 分子の分解にかかわる MDM2 分子の阻害剤 (nutlin-3a、RITA) を用いて、正常 p53 分子の安定化を図り、さらに p53 変異の場合は、正常型への変換が期待できる薬剤 (CP-31398、PRIMA-1) を使用する。MDM2 阻害剤は p53 の主たる分解経路であるユビキチン化に関わる MDM2 分子と、p53 分子との結合を阻害するもので、その結果 p53 分子のユビキチン化が阻止され、p53 分子の安定化 (半減期の増加) によって p53 発現が上昇する。一方 CP-31398 や PRIMA-1 は特定の変異型 p53 分子に結合して p53 分子を正常型に変換しうるが、その詳細な変換機序は不明である。

この p53 経路の正常化とそれによる抗腫瘍効果の指標はいくつか想定できるか、その内容に応じて各分子のリン酸化、細胞周期等を検討し、可能であればその細胞内刺激伝達系について解析する。

(2) Hippo 経路の標的分子阻害剤による細胞傷害活性:

Hippo 経路の発がん・がんの進展過程における標的は、低分子 G 蛋白質、FAK、mTOR 経路であり、その機能の異常亢進が同経路における Hippo 経路の関与となっている。そこで、当該経路の中心的な分子に対する阻害剤を用いて、食道がんに対する細胞増殖抑制効果を検討する。このとき使用するものは、低分子 G 蛋白質に対しては非 Ras 系の geranylgeranyl transferase I 阻害剤 zoledronate、FKA に関しては FAK 阻害剤 (defectinib)、mTOR 経路では compound C と rapamycin である。Hippo 経路は他の3系統以外に、最終的には転写因子 YAP1 を介した転写制御に繋がっている。そこで、可能であれば同転写因子の関与についても検討する。

(3) p53 経路と Hippo 経路のクロストークの可能性:

食道がんにおける p53 と Hippo 経路との相互関係については報告が全くないが、p53 経路と FAK 経路は MDM2 を関しての制御の可能性が最近報告されている。そこで、p53 発現の変化によって、上記 Hippo 経路の3標的分子の発現の変化が生じるか、逆に Hippo 経路分子の発現の変化によ

って p53 発現が左右されるかを検討する。

3. 研究の方法

(1) 遺伝子発現の制御：

内因性の p53 発現上昇については、同分子のコピキチン化能を有する MDM2 の阻害剤 (p53 分子との結合阻害剤) である nutlin-3a あるいは RITA を使用した。MDM2 分子は構造のよく似た MDM4 分子と結合して、上記コピキチン化活性を有することが知られている。一方変異型 p53 分子はコピキチン化による分解を受けることが少ないため、当該阻害剤に影響は少ないと想定される。

低分子 G 蛋白阻害剤として bisphosphonate 製剤である zoledronate、FAK 阻害剤として defactinib、mTOR 阻害剤として compound C および rapamycin を使用した。これらの薬剤が実際に標的分子の機能を阻害する濃度で使用した。具体的には zoledronate については Rho A 等の細胞質分画から細胞膜分画への移動の阻害、defactinib では FAK のリン酸化阻害、compound C や rapamycin については p70S6K のリン酸化阻害などを指標にして有効濃度を決定した。これらの薬剤で処理後、解析する分子の発現およびリン酸化について当該抗体を用いたウエスタンブロット法にて検討した。また必要に応じて発現レベルを画像処理後 image analyzer で解析した。

(2) 細胞傷害活性：

食道がん細胞を上記の阻害剤で処理し、WST 法を用いて細胞傷害活性を検討した。また実際に生細胞数を算出し、細胞数の増加や減少を検討した。さらに処理細胞の細胞周期分布をセルソーターで検討した。また、薬剤の併用効果を検討するために CalcuSyn software を用いて combination index(CI)を算出した。

(3) siRNA による蛋白発現の制御：

分子の発現量を減少させるため、p53、p21、YY1 に対する si-RNA を使用して細胞を処理し、その後の変化を検討した。

4. 研究成果

(1) p53 経路による抗腫瘍効果の検討：

食道がん細胞における DNA 損傷後の p53 経路の活性化を検討するため、同細胞をシスプラチンで処理し、p53 経路に関連する分子の発現をウエスタンブロット法で解析した。同薬剤では p53 遺伝子型によらず細胞増殖は抑制され、その条件下で分子発現を検討した。その結果、p53 分子の発現上昇および活性化の指標である Ser15 残基のリン酸化は、p53 正常型である TE-11 および YES-4 細胞、p53 変異型である YES-2 細胞でみられたものの、その他の野生型の細胞では Ser 15 残基のリン酸化がおこらず、また変異型の細胞では同残基のリン酸化には影響がなかった。しかし、p53 mRNA はすべての p53 正常型食道がん細胞で増加していたので、DNA 傷害から p53 転写までの経路は正常と考えられる。事実、gamma-H2AX 発現は同薬剤処理で増加しており、DNA 傷害は惹起されていた。しかし、p53 family 分子である p73 (TPp73alpha, deltaNp73)、p63 については、CCDP 処理によってむしろ発現低下であった。一方、p53 経路の下流について検討してみると、正常型 p53 の一部の細胞以外に p21 分子発現上昇はなかったが、いずれの細胞も caspase-3 と PARP の cleavage は増加していた。したがって、食道がん細胞においては、DNA 傷害によって細胞死が誘導されるが、その経路は p53 非依存性であることが判明した。

そこでこの事実を確認するために、p53 分子の分解にかかわるコピキチン化を阻止できる MDM2 阻害剤である nutlin-3a を用いて、食道がん細胞における細胞傷害活性を検討した。同薬剤は、p53 正常型細胞において p53 分子の発現を増加させ、その結果 p53 依存性の細胞傷害活性を誘導する。しかし、食道がん細胞において p53 正常型細胞であっても IC50 値が p53 変異型腫瘍と変わらず、しかも IC50 値が p53 の遺伝子型によらず、ほぼ同じであった。このことは食道がん細胞では、p53 発現が増加しても p53 非依存性の細胞傷害活性が主体であると考えられた。また、MDM2 阻害剤である RITA についても nutlin-3a と同じ結果が得られた。Ad-p53 ウイルスによる食道がんに対する細胞傷害活性が p53 遺伝子型によらなかったことから、食道がんでは p53 分子の異常そのものが、細胞死に対して影響する可能性が考えられたため、p53 変異型を正常型に変換するものと期待される薬剤に関して、その抗腫瘍効果を検討した。

変異型 p53 分子を正常型に変えるものをして、現時点では CP-31398 と PRIMA-1 が知られている。そこで、両者を用いて、食道がん細胞における細胞傷害活性を検討したところ、いずれも p53 遺伝子型によらず、細胞傷害活性を示したが、CP-31398 の方が PRIMA-1 に比較してより強く同活性を示した。そこで、CP-31398 が細胞死を誘導するかどうかを検討するために、当該薬剤で処理した食道がん細胞の生存細胞数の変化、細胞周期を検討した。その結果、CP-31398 は濃度依存的に殺細胞効果を示し、細胞周期は G2/M 期および 4N 以上の hyperploidy 分画の増加に引き続いて sub-G1 分画の増加が観察された。この CP-31398 による細胞死の機構を検討するために、p53 経路の下流における各分子の発現をウエスタン法で検討した。その結果、p53 発現の増加、Ser 残基 15 及び 46 のリン酸化も p53 正常型の細胞の一部に細胞にのみ検出されが、p53 変異型細胞では検出されなかった。したがって CP-31398 は変異型 p53 を正常型に変換しないと考えられた。また同薬剤は p73 および p63 分子の発現をむしろ減少させる一方、MDM2 分子

の発現はほとんど変化を誘導しなかった。しかし、p53 経路の下流に存在する p21 分子の発現と、同分子の Thr145 残基のリン酸化がすべての細胞が増加していたが、p27 分子の発現増強はなく、また PARP および caspase-3 の cleavage が観察された。したがって、CP-31398 においても、同薬剤は p53 を活性化するも、p53 非依存的に細胞死を誘導することが判明した。この時、p21 分子の誘導に関して、AMPK および転写因子 YY2 の関与がしている可能性があったため、4E-BP1、p70S6K および YY2 分子の発現を検討したところ、CP-31398 処理によって、これらの発現は変化がなかった。そこで、YY2 と構造が類似し機能が YY2 と相反する機能を有する YY1 分子に関して、CP-31398 処理後による変化を検討すると、p21 分子の発現上昇がみられる濃度で YY1 分子の発現低下が生じていた。そこで、これを詳細に検討するために、CP-31398 処理細胞における p21mRNA を検討すると、同 mRNA は増加しており、また同細胞をあらかじめ YY1 に対する si-RNA で処理しておくこと、CP-31398 による p21 分子の誘導は生じなかった。また、p21 分子に発現を si-RNA で低下させ、この細胞に CP-31398 処理を行うと、sub-G1 増加が消失していた。したがって、CP-31398 は転写因子 YY1 の発現低下を誘導し、その結果 p21 分子の発現を誘導し、これによる細胞死をはじめとする細胞周期に変化をもたらすことが判明した。

(2) Hippo 経路の標的分子阻害剤による細胞傷害活性 :

Zoledronate、defactinib および compound C と rapamycin について、細胞傷害活性を検討した。これらはともに食道がん細胞の増殖を抑制したが、いずれも p53 遺伝子型はその細胞傷害活性に影響を与えなかった。しかし、これらの薬剤のなかで FAK 活性を抑制する defactinib は p53 分子の発現を上昇させることは判明した。Zoledronate 処理において p53 発現上昇は見られた細胞はあったが、p53 遺伝子型との関連はなかった。ただし、defactinib については正常型 p53 細胞では程度の差があっても p53 発現は上昇し、しかもその上昇は FAK 分子のリン酸化抑制に比例していた。また、MDM 2 阻害剤である nutlin-3a で処理するとリン酸化 FAK の発現レベルが低下していた。

(3) p53 経路と Hippo 経路の関係 :

上記の結果から p53 経路と Hippo 経路の中でも FAK とのクロストークの可能性が示唆された。また zoledronate に代表される低分子 G 蛋白と p53 発現は双方向性ではなかったため、クロストークに関する追求を行うことができなかった。そこで、まず p53 分子の発現を上昇させる MDM2 阻害剤である nutlin-3a と CP-31398 との併用効果について検討した。その結果、両者を併用すると、p53 発現はそれぞれ単独の場合より増加し、p21 および MDM2 発現も単独処理群より増加した。またこのとき caspase-8 および caspase-9 の cleavage も増加しており、また FAK 分子の発現は変わらなかったが、リン酸化 FAK の発現は著しく低下していた。さらに、両者の併用により、細胞傷害活性は単独よりも強く、正常型 p53 細胞では CI 値が 1 以下と相乗効果を示したのに対して、変異型 p53 細胞では同値が 1 以上と相乗効果はなかった。このとき細胞周期を検討すると、併用処理の場合単独処理に比較して sub-G1 期の割合が増加していた。このことは、p53 経路の増強と非 p53 経路の併用効果を示しているが、p53 経路と FAK 経路の関与も考えられた。そこで CP-31398 と defactinib との併用効果を検討すると、p53 正常型のみで細胞傷害活性は、単独の場合より増加し CI 値は 1 以下を示した。また併用によって p53 分子および Ser15 残基のリン酸化は増加し、リン酸化 FAK の発現も、単独の場合に比較して低下していた。また、両者の併用によって DNA 傷害が誘導されているが、これには CHK-2 が関与していることが判明した。すなわち以上のことは、p53 を活性化に作用する薬剤と FAK 経路阻害剤はともにクロストークを介して、相乗的に作用することを示している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Zhong, B., Shingyoji, M., Hanazono, M., Nguyen, T.T.T., Morinaga, T., Tada, Y., Hiroshima, K., Shimada, H. and Tagawa, M	4. 巻 -
2. 論文標題 Combination of a p53-activating CP-31398 and an MDM2 or a FAK inhibitor produces growth suppressive effects in mesothelioma with wild-type p53 genotype.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Apoptosis	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） なし	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 Zhong, B., Shingyoji, M., Hanazono, M., Nguyen, T.T.T., Morinaga, T., Tada, Y., Hiroshima, K., Shimada, H. and Tagawa, M.	4. 巻 9
2. 論文標題 A p53-stabilizing agent, CP-31398, induces p21 expression with increased G2/M phase through the YY1 transcription factor in esophageal carcinoma defective of the p53 pathway.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Am. J. Cancer Res.	6. 最初と最後の頁 79-93
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 Yamauchi Suguru, Zhong Boya, Kawamura Kiyoko, Yang Shan, Kubo Shuji, Shingyoji Masato, Sekine Ikuo, Tada Yuji, Tatsumi Koichiro, Shimada Hideaki, Hiroshima Kenzo, Tagawa Masatoshi	4. 巻 17
2. 論文標題 Cytotoxicity of replication-competent adenoviruses powered by an exogenous regulatory region is not linearly correlated with the viral infectivity/gene expression or with the E1A-activating ability but is associated with the p53 genotypes	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 BMC Cancer	6. 最初と最後の頁 622
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12885-017-3621-x	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 Morinaga Takao, Nguyen Thao Thi Thanh, Zhong Boya, Hanazono Michiko, Shingyoji Masato, Sekine Ikuo, Tada Yuji, Tatsumi Koichiro, Shimada Hideaki, Hiroshima Kenzo, Tagawa Masatoshi	4. 巻 14
2. 論文標題 An image cytometric technique is a concise method to detect adenoviruses and host cell proteins and to monitor the infection and cellular responses induced	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Virology Journal	6. 最初と最後の頁 219
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12985-017-0888-0	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 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Masatoshi Tagawa, Yuji Tada, Hideaki Shimada, Kenzo Hiroshima
2. 発表標題 Increased p53 expression augments DNA damages and viral replications of p53-activating oncolytic adenoviruses through NF1 induction in mesothelioma with the wild-type p53 genotype
3. 学会等名 12th Annual Conference of International Oncolytic Virus Conference (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masatoshi Tagawa
2. 発表標題 Activation or suppression of immune responses for oncolytic virus therapy
3. 学会等名 International Forum on Regulatory Sciences for Advanced Therapy Medical Products (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masatoshi Tagawa, Yuji Tada, Hideaki Shimada, Kenzo Hiroshima.
2. 発表標題 Increased p53 expression augments DNA damages and viral replications of p53-activating oncolytic adenoviruses through NF1 induction in mesothelioma with the wild-type p53 genotype.
3. 学会等名 12th Annual Conference of International Oncolytic Virus Conference (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masatoshi Tagawa.
2. 発表標題 Activation or suppression of immune responses for oncolytic virus therapy.
3. 学会等名 International Forum on Regulatory Sciences for Advanced Therapy Medical Products (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鐘博雅、関根郁夫、滝口裕一、グエン タオ、盛永敬郎、多田裕司、山口直人、田川雅敏
2. 発表標題 核酸合成酵素非依存的なペメトレキセート耐性はAICARTを介したAMPKの活性化に關与している
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田川雅敏、盛永敬郎、鐘博雅、Nguyen Thi Thanh Thao、久保秀司、多田裕司、巽浩一郎、島田英昭、廣島健三、山口直人
2. 発表標題 HSP90阻害剤は内因性p53発現を上昇させるが外因性p53発現をプロテアソーム活性で抑制する
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takao Morinaga, Thao Thi Thanh Nguyen, Boya Zhong, Shuji Kubo, Masato Shingyoji, Yuji Tada, Koichiro Tatsumi, Hideaki Shimada, Kenzo Hiroshima, Masatoshi Tagawa
2. 発表標題 A Wee1 kinase inhibitor increases apoptosis of replication-competent adenoviruses through induction of mitotic catastrophe and enhancement of viral replications
3. 学会等名 23rd annual meeting of Japan Society of Gene Therapy
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 盛永敬郎、グエン タオ、鐘博雅、久保秀司、関根郁夫、多田裕司、巽浩一郎、島田英昭、廣島健三、田川雅敏
2. 発表標題 A role of Wee1 kinase in adenoviruses-induced cell death and viral replication
3. 学会等名 第76回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2017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	島田 英昭 (SHIMADA Hideaki) (20292691)	東邦大学・医学部・教授 (32661)	