

令和 2 年 6 月 4 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K17235

研究課題名(和文)p53シグナル伝達系標的薬剤による口腔癌の有効な化学療法の確立

研究課題名(英文)Effective chemotherapy for oral cancer with p53 signal targeted agents.

研究代表者

遠藤 学 (Endo, Manabu)

東北大学・歯学研究科・大学院非常勤講師

研究者番号：40613998

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)：本研究は、p53シグナル伝達系標的薬剤による口腔癌細胞に対する効果とその機序について検討した。ヒト口腔癌細胞株をp53シグナル伝達系標的薬剤(RITA, CP-31398, PRIMA-1)で処理した結果、細胞増殖を抑制し、さらにアポトーシス誘導も認められた。特にRITAはp53抑制に働くMDM2を抑制し、p53を活性化させた。さらに、p53依存性アポトーシスに關与するBAXの発現が増加した。このことからRITAは口腔癌細胞のMDM2の活性を抑制してp53を安定化し、p53シグナル伝達経路を活性化することによりアポトーシスを誘導させることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口腔癌で特徴的ながん抑制遺伝子であるp53のシグナル伝達経路の異常は、抗癌剤耐性の獲得や癌血管新生の誘導に關与することからp53シグナルの再活性化は、抗腫瘍作用および既知の抗癌剤に対する耐性の克服が期待される。今後、口腔癌化学療法において、p53シグナル伝達系を標的とした予知性の高い治療法の開発が期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the effect of p53 signal transduction targeting agent on oral cancer cells and its mechanism. Treatment of human oral cancer cell lines with p53 signal transduction targeting agents (RITA, CP-31398, PRIMA-1) suppressed cell proliferation and also induced apoptosis. In particular, RITA suppressed MDM2, which acts on p53 suppression, and activated p53. Furthermore, the expression of BAX, which is involved in p53-dependent apoptosis, was increased, which indicates that RITA suppresses MDM2 activity in oral cancer cells, stabilizes p53, and activates p53 signaling pathway to induce apoptosis.

研究分野：口腔癌

キーワード：p53シグナル アポトーシス 口腔癌化学療法

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

p53 遺伝子は、癌抑制遺伝子であり、正常細胞では、特定の塩基配列に結合する転写因子として、アポトーシス誘導や細胞周期調節、DNA 修復、細胞老化などに深く関与している。また、その点突然変異や欠失による不活性化は50%以上のヒト悪性腫瘍で認められており、p53 野生型癌組織においても、MDM2 (murine double minute 2) あるいはMDM4の過剰発現やHPV (Human papilloma virus) 感染によるE6遺伝子発現などによるp53シグナル伝達系のdown-regulation が提唱されている。それゆえ、p53は発癌やその進展過程に最も重要な遺伝子であると考えられており、本来のp53生理機能が正常に発揮されれば、細胞周期停止やアポトーシスの誘導による抗腫瘍効果が期待できるため、他のさまざまなシグナル伝達経路と同様に、p53シグナル伝達経路においても、多くの分子標的治療薬が報告されている。

癌蛋白であるMDM2は、そのN 末端にp53結合領域を有し、p53との相互作用において、自身のユビキチン・リガーゼ活性によりユビキチン化後、プロテアソーム系での分解を誘導する。通常、細胞内のp53蛋白量はこのMDM2により低レベルに抑制されている。様々な癌細胞において、MDM2遺伝子の過剰発現によって、p53は恒常的に抑制されている。従って、MDM2とp53の結合を阻害して細胞内のp53蛋白集積を誘導し、かつ、転写抑制を解除することにより、がん細胞の増殖抑制とアポトーシスの誘導が促進される。現在までに、MDM2阻害作用を有する小分子化合物として、nutlin-3、RITA (reactivation of p53 and induction of tumor cell apoptosis)、MI-63、MI-319等が報告されている。

一方で、変異型p53の機能回復により、がん細胞の増殖を抑制する小分子化合物の開発も行われており、現在までにCP-31398、PRIMA-1 (p53 reactivation and induction of massive apoptosis 1)、ellipticine、MIRA-1等が報告されている。1999年Foster らにより同定されたCP-31398は、in vitro で変異型p53発現大腸癌細胞のp21WAF1遺伝子の転写活性化能を回復させるほか、in vivo ではヌードマウス移植腫瘍に対して抗腫瘍効果を示した。その作用機序として、CP-31398がp53に直接結合し、p53のDNA 結合活性を回復させると考えられているが、明確には解明されていない。また、2002年Bykov らによって報告されたPRIMA-1も、p53変異型osteosarcoma細胞や卵巣癌細胞株を用いたin vitro およびin vivoにおいて、変異型p53の機能を回復させ、アポトーシスを誘導したがそのメカニズムは十分に解明されていない。

2. 研究の目的

様々な癌腫において p53-reactivating small molecules (p53RASMs)の効果について検討されているが、口腔がんに対する検討は少ない。そこで、今回口腔癌細胞株を用いて p53RASMs の抗腫瘍効果とそのメカニズムについて解析、検討した。

3. 研究の方法

ヒト歯肉扁平上皮癌細胞株 Ca9-22, HSC-2, HSC-3, HSC-4 (JCRB 細胞バンク) を p53 シグナル伝達系標的薬剤 (RITA, CP-31398, PRIMA-1) で処理後、細胞増殖を MTT 法で測定した。アポトーシス誘導は annexin V および PI 発現細胞を flow cytometry 法で測定した。また、p53 および p53 関連分子発現は Western blot 法で評価した。

4. 研究成果

口腔がん細胞における p53RASM の増殖抑制効果

始めに、ヒト歯肉扁平上皮癌細胞株 Ca9-22, HSC-2, HSC-3, HSC-4 を用いて p53RASM の増殖抑制効果について解析した。CP-31398, PRIMA-1 はそれぞれの細胞株で増殖抑制効果は様々であったが、RITA に関してはすべての細胞株で増殖抑制効果を示し、特に Ca9-22 ではその効果は顕著であった。RITA は Ca9-22 において、濃度依存的、時間依存的に増殖抑制効果を示した。さらに、電子顕微鏡所見にて細胞質の凝集、アポトーシス小体の形成を認め RITA が Ca9-22 においてアポトーシスを誘導していることが示唆された。そこで、p53RASM に対して感受性の高い Ca9-22 を用いてアポトーシス誘導効果について解析した。RITA、CP-31398、PRIMA-1 いずれもアポトーシス誘導効果を示したが、特に RITA は既知の抗がん剤である CDDP より顕著なアポトーシスを誘導し、今後の口腔癌化学療法の新たな戦略となることが示唆された。

RITA によるアポトーシス誘導効果のメカニズム

RITA は MDM2 と p53 の結合を阻害する作用を有するため、当然アポトーシス誘導に MDM2 と p-53 シグナル伝達経路が関与していることが考えられ、それらの変化について検討した。

MDM2 は、リン酸化やアセチル化といった翻訳後修飾を受けることで、その機能の抑制または活性化が誘導されることが知られている。リン酸化は MDM2 の活性を抑制し、MDM2 を脱リン酸化は MDM2 タンパク質を安定化して p53 タンパク質の分解を促進するなどが知られている。そこで本研究においても、MDM2 の発現量の変化、リン酸化の有無について検討した。Ca9-22 において RITA で 24 時間処理したところ、MDM2 の発現量に変化はなかったものの、MDM2 のリン酸化が認められた。さらに RITA の長時間処理 (96h) では時間依存的に MDM2 のリン酸化誘導が認められた。この結果から、RITA による p53 シグナル伝達経路の活性化が示唆されたため、p53 の発現量とリン酸化についても検討したところ、p53 の発現量は変化しなかったが、時間依存的にリン酸化 p53 の発現量が増加し、それに伴い、p53 依存性アポトーシスに關する BAX の発現増加も認められた。

このことから RITA は Ca9-22 において、MDM2 のリン酸化を誘導してその活性を抑制し、p53 の安定化および p53 のリン酸化 (活性化) させることにより p53 シグナル伝達経路が活性化し、アポトーシスを誘導していることが示唆された。

近年 p53 のリン酸化には ATM や ATR, DNA-PK, Chk 1, Chk 2 など様々な酵素が関与していること、核小体ストレスによって p53-MDM2 経路が制御されることが明らかになっており、RITA がこれらの酵素や核小体ストレスに与える影響については今後の検討課題と考えられた。

本研究では、口腔癌に対する RITA の有効性と、作用機序を明らかにした。実臨床への応用を前提とした安全性の評価を含め、さらなる検討が必要であるが今後、口腔癌化学療法において、p53 シグナル伝達系を標的とした予知性の高い治療法の開発が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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 遠藤 学・金子哲治・菅野千敬・北畠健裕・高橋 哲・長谷川博
2. 発表標題 p53 シグナル伝達系標的薬剤による口腔癌の有効 な化学療法の検討
3. 学会等名 第63回 日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2018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
--	---------------------------	-----------------------	----