

令和元年5月28日現在

機関番号：17401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19497

研究課題名（和文）p53機能修飾低分子化合物の天然資源からの探索

研究課題名（英文）Search for natural products that modify the p53 functions

研究代表者

塚本 佐知子（Tsukamoto, Sachiko）

熊本大学・大学院生命科学研究部（薬）・教授

研究者番号：40192190

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：がん抑制遺伝子産物p53は「ゲノムの守護神」と呼ばれ、ゲノムの安定性に重要な役割を果たしている。しかし、ヒト腫瘍の約半数でp53遺伝子の変異が認められる。そこで、変異型p53の機能を野生型へと回復させることのできる化合物は、がん細胞選択的に増殖抑制作用を示すと考えられ様々な研究が行われてきた。本研究では、変異型p53の機能を野生型へと活性化させる化合物を天然資源から探索した。先行実験では、phenethyl isothiocyanateやPRIMA-1でp53R175Hを処理することにより野生型へと活性化させることに成功しているため同様の実験を試みた。しかし、再現性を得るには至らなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がん抑制遺伝子産物p53は、がん抑制に重要な役割を果たしている。しかし、ヒト腫瘍の約半数でp53遺伝子の変異が認められる。変異型p53は、がん抑制の機能を果たすことができないので、機能を回復させることのできる化合物は、副作用のない理想的ながん治療薬になると考えられ様々な研究が行われてきた。本研究では、変異型p53を野生型へと活性化させることのできる化合物を天然資源から探索した。

研究成果の概要（英文）：The tumor suppressor p53 plays an important role for anti-tumor activity and has been referred to as the “guardian of the genome”. Therefore, the compounds that reactivate the p53 mutant can be the drug leads for cancer therapy. To search for the drug candidates from natural resources, we applied the methods reported by Aggarwal. However, we could not repeat the same results using phenethyl isothiocyanate or PRIMA-1.

研究分野：天然物化学

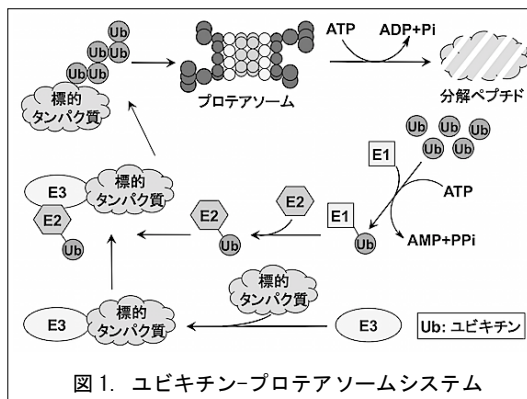
キーワード：変異型p53 天然資源 探索 がん抑制 野生型

## 1. 研究開始当初の背景

ユビキチン-プロテアソームシステム (図1) は、細胞内での選択的タンパク質分解を司るシステムである<sup>1)</sup>。標的タンパク質は、3種の酵素 (E1, E2, E3) によるユビキチン修飾後に、ユビキチンの除去に伴いプロテアソームにより分解される。近年、ユビキチン修飾系はタンパク質分解だけでなく多様な様式でタンパク質機能を調節することにより、多彩な生命現象の制御に中核的な役割を果たすことが明らかとなっている。そのため、本システムの各ステップに対する阻害剤は創薬シーズとして、また、本システムの未知の機能を解明するための分子ツールとして注目されている。しかしその開発は、既存の化合物ライブラリーのスクリーニングやリード化合物の修飾による開発が中心で、天然資源からの網羅的な探索は世界的にもあまり行われていない。

研究代表者は、2003年にプロテアソーム阻害剤 bortezomib が認可される以前から、ユビキチン-プロテアソームシステムの全体が創薬の標的になりうると考えた。また、構造的に多様性のある天然物を対象とした阻害剤の探索は、多様な新規次世代型がん治療薬の発見につながると考え、天然資源からの探索を行なってきた。そして、プロテアソーム、ユビキチン修飾系及び脱ユビキチン化酵素 (DUB) に対する阻害剤を探索するためのアッセイ系を確立してスクリーニングを行い、新規の各種阻害剤の発見に成功し、先駆的な成果をあげてきた。ヒト由来のユビキチン修飾系の E1 は主に1種、E2 と E3 はそれぞれ約40種及び600種、また DUB は98種存在する。そこで、研究代表者は、それぞれを阻害することで p53 の作用を増強すると考えられる Uba1 (E1)、Ubc13 (E2)、Mdm2 (E3) 及び USP7 (DUB) を対象として阻害剤の探索を重点的に行ってきた。それは、がん治療薬としての効果を考えると、p53 の作用を増強する薬剤の中で異なる標的に作用する薬剤を複数併用することにより相乗効果が現れ、治療効果の飛躍的な向上が期待できると考えたからである。これまでの研究成果は23報の原著論文で報告し、さらに12報の総説を執筆した。

以上のように、研究代表者は、p53 やユビキチン-プロテアソームシステムを標的とする医薬シーズの探索に興味を持ち研究を行っていたが、2016年 Walerych らが変異型 p53 の機能獲得 (GOF, gain-of-function) として Nrf2 (酸化ストレス防御に中心的な役割を果たす転写因子) を介したプロテアソームの転写活性化を報告した<sup>2)</sup>ことを契機に、本研究を立案した。

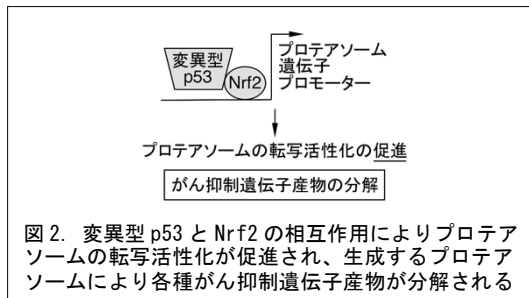


## 2. 研究の目的

がん抑制遺伝子産物 p53 はゲノムの安定性に重要な役割を果たしている、「ゲノムの守護神」と呼ばれている。細胞が DNA 損傷等のストレスを受けると、p53 は細胞周期停止や DNA 修復により細胞の恒常性を維持するが、DNA に対する損傷が大きい場合には、アポトーシスを誘導し自らの細胞を殺す。このように、p53 は異常な細胞の蓄積を抑え、その結果として細胞のがん化を抑えている。

p53 遺伝子の変異はヒト腫瘍の約半数で認められる。そして、がん治療で用いられる放射線や抗がん剤等は細胞に対してストレスになるため p53 の作用によりアポトーシスが誘導されるが、p53 に変異をもつがん細胞は p53 が正常に機能しないために治療効果が期待できない。そこで、変異型 p53 の機能を回復させることにより、がん治療への感受性を高める方法は、有望ながん治療戦略になると考えられ、「p53 の遺伝子治療」<sup>3)</sup>、「p53 の C 末端ペプチドの細胞内導入」<sup>4)</sup>、「化学シャペロンによる p53 の機能回復」<sup>5)</sup>あるいは「種々の低分子化合物を用いた方法 (p53 の分解を抑制し安定化させる方法<sup>6)</sup>や、変異型 p53 を正常型 (野生型) に活性化させる方法<sup>7)</sup>」が研究されている。そして、2016年に Walerych らは、変異型 p53 の機能獲得 (GOF) として、転写因子 Nrf2 を介したプロテアソームの転写活性化について報告した<sup>2)</sup>。

Walerych らは、変異型 p53 が Nrf2 と相互作用することにより、プロテアソームの転写活性化が促進され、種々のがん抑制遺伝子産物の分解が起こることを発見した (図2)。これは、p53 が変異により新たに獲得した機能 (GOF) であり、野生型 p53 では起きない現象である。そこで彼らは、変異型 p53 を野生型に変換させると、Nrf2 との相互作用が解消されるので、プロテアソームの転写活性化が消失し、その結果、種々のがん抑制遺伝子産物の作用によるがん抑制効果が期待できると考えた。そして、「変異型 p53 を野生型に変換させる化合物」を作用させると、Nrf2 を介するプロテアソームの転写活性化が消失することを示した。



一方、研究代表者は、「変異型 p53-Nrf2 相互作用を阻害する化合物」を発見して、それを作用させれば、Walerych らの実験結果と同様に、プロテアソームの転写活性化が消失し、がん抑制効果が得られると考えた。そこで、本研究では、「変異型 p53 を野生型に変換させる化合物」に加え、新たに「変異型 p53-Nrf2 相互作用を阻害する化合物」を天然資源から探索することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### 3-1. 変異型 p53-Nrf2 相互作用の阻害剤の探索

変異型 p53 と Nrf2 の相互作用は、変異型 p53 に特異的な抗体 (PAB240, Merck) を用いる免疫沈降法で調べる。すなわち、p53 変異株 (HCC-1395 細胞: p53 の 175 番目の Arg (R) 残基が His (H) に置換している R175H 変異体を発現しているヒト培養細胞) の細胞破砕液を調製し、変異型 p53 特異的な抗体 (PAB240) で免疫沈降を行う。次に、沈降物中の Nrf2 をウエスタンブロット法で検出する。当該阻害剤の存在下では沈降する Nrf2 量が減少することになるので、それを指標にして阻害剤を探索できる。

研究代表者は、スキューバダイビングにより薬用海洋資源の調査・採集を行い、海洋無脊椎動物 (海綿やホヤ等) や海洋微生物のエキスを含む、研究室独自の「薬用海洋資源抽出物ライブラリー」を構築した。このライブラリーを用いて、上記の方法に基づき、変異型 p53-Nrf2 相互作用の阻害剤のスクリーニングを行う。

#### 3-2. 変異型 p53 を野生型に変換させる化合物の探索

変異型 p53 の野生型への変換は、野生型 p53 に特異的な抗体 (PAB1620, Merck) を用いる ELISA で調べる。すなわち、大腸菌発現用の GST-変異型 p53 プラスミド (pGeX4T1-p53R175H: 175 番目の Arg (R) が His (H) に変異した p53 に GST を融合した配列を有するプラスミド) を大腸菌で発現し、グルタチオン-アガロースを用いて GST-変異型 p53 を単離する。その GST-変異型 p53 をサンプルと混合して反応後に、ELISA プレートに吸着させる。次に、野生型 p53 に特異的な抗体 (PAB1620) を用いて ELISA を行う。目的の化合物の存在下では、野生型 p53 特異的な抗体で反応するシグナルが増えることになるので、それを指標にして、当該化合物を探索できる。この方法に基づき、3-1 と同様に当該化合物のスクリーニングを行う。

#### 3-3. 天然資源からの化合物の精製と構造決定

上記 3-1 と 3-2 のスクリーニングでヒットした天然資源抽出物から、カラムクロマトグラフィや HPLC により目的の化合物を精製し、NMR スペクトル等のスペクトル解析や有機反応及び計算化学等により絶対立体配置を含め構造を決定する。

#### 3-4. 天然資源から単離した化合物の作用機構の解析

3-1 で得られた阻害剤が変異型 p53 に作用するのかあるいは Nrf2 に作用するのかを調べるために、PreScission protease 処理で GST を除去した変異型 p53 を調製し、阻害剤との相互作用をビアコアで調べる。また、変異型 p53 の調製と同様の操作で、大腸菌で発現した GST-Nrf2 から GST を除去した Nrf2 を調製し、阻害剤との相互作用をビアコアで調べる。一方、上記の変異型 p53 を用いて、3-2 で得られた化合物との相互作用もビアコアで調べ、さらに、その時の変異型 p53 の構造変化を CD で追跡する。

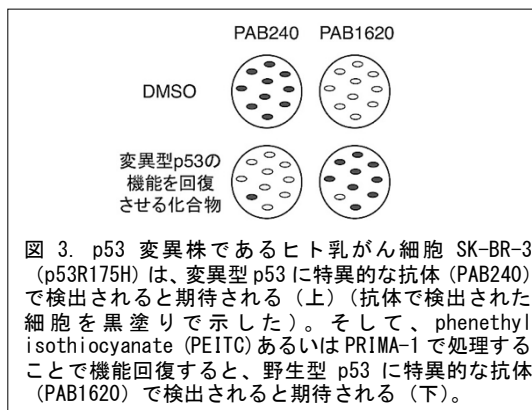
#### 3-5. 天然資源から単離した化合物の抗がん作用を調べる動物実験

p53 変異株 (HCC-1395 細胞) を移植したマウスに、本研究で天然資源から単離した化合物を静脈内注射し、がんが縮小するか否かを調べる。

### 4. 研究成果

初めに「3-2. 変異型 p53 を野生型に変換させる化合物の探索」研究に着手した。

まず、Aggarwal らの報告<sup>8)</sup>の再現性を調べるため、p53 に変異を有するヒト乳がん細胞 SK-BR-3 (p53R175H) を phenethyl isothiocyanate (PEITC)<sup>8)</sup> で処理することにより、機能回復するかどうかを調べた。すなわち、機能回復する前は、変異型 p53 に特異的な抗体 (PAB240) で検出され、機能回復後には野生型 p53 に特異的な抗体 (PAB1620) で検出されると期待される (図 3)。実験は、野生型 p53 を有するヒト肺腺基底上皮腺がん細胞 A549 に対する作用と比較した。しかし、種々条件検討したが、Aggarwal らの報告のように明確な違いを観察することができなかった。そこで、同様に変異型 p53 の機能回復作用を示すことが報告されて



いる PRIMA-1<sup>7)</sup> で細胞を処理した。しかし、機能回復を示唆するような結果は得られなかった。そこで、変異型 p53 タンパク質 (p53R175H) を大腸菌で発現・精製し、同様の実験を行なった。PEITC あるいは PRIMA-1 で処理し、機能回復するかどうかについて様々条件検討したが、Aggarwal らの報告を再現することはできなかった。今後、別な検出方法を適用することにより、目的とする「変異型 p53 を活性化させる化合物」を天然資源から探索する予定である。

#### <引用文献>

- 1) Glickman MH, Ciechanover A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol. Rev.* 82, 373-428, 2002.
- 2) Walerych D, Lisek K, Sommaggio R, Piazza S, Ciani Y, Dalla E, Rajkowska K, Gaweda-Walerych K, Ingallina E, Tonelli C, Morelli MJ, Amato A, Eterno V, Zambelli A, Rosato A, Amati B, Wiśniewski JR, Del Sal G. Proteasome machinery is instrumental in a common gain-of-function program of the p53 missense mutants in cancer. *Nat. Cell Biol.* 18, 897-909, 2016.
- 3) Blagosklonny MV, El-Deiry WS. In vitro evaluation of a p53-expressing adenovirus as an anti-cancer drug. *Int J. Cancer.* 67, 386-392, 1996.
- 4) Selivanova G, Iotsova V, Okan I, Fritsche M, Ström M, Groner B, Grafström RC, Wiman KG. Restoration of the growth suppression function of mutant p53 by a synthetic peptide derived from the p53 C-terminal domain. *Nat. Med.* 3, 632-638, 1997.
- 5) Brown CR, Hong-Brown LQ, Welch WJ. Correcting temperature-sensitive protein folding defects. *J. Clin. Invest.* 99, 1432-1444, 1997.
- 6) Vassilev LT, Vu BT, Graves B, Carvajal D, Podlaski F, Filipovic Z, Kong N, Kammlott U, Lukacs C, Klein C, Fotouhi N, Liu EA. In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2. *Science* 303, 844-848, 2004.
- 7) Bykov VJ, Issaeva N, Shilov A, Hultcrantz M, Pugacheva E, Chumakov P, Bergman J, Wiman KG, Selivanova G. Restoration of the tumor suppressor function to mutant p53 by a low-molecular-weight compound. *Nat. Med.* 8, 282-258, 2002.
- 8) Aggarwal M, Saxena R, Sinclair E, Fu Y, Jacobs A, Dyba M, Wang X, Cruz I, Berry D, Kallakury B, Mueller SC, Agostino SD, Blandino G, Avantaggiati ML, Chung FL. Reactivation of mutant p53 by a dietary-related compound phenethyl isothiocyanate inhibits tumor growth. *Cell Death Differ.* 23, 1615-1627, 2016.

#### 5. 主な発表論文等

[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

<http://kumamoto-natmed.org/>

#### 6. 研究組織

(1) 連携研究者

研究分担者氏名：加藤 光

ローマ字氏名：(KATO, hikaru)

所属研究機関名：熊本大学

部局名：大学院生命科学研究部

職名：助教

研究者番号：20547129

(2) 連携研究者

研究分担者氏名：人羅 勇氣  
ローマ字氏名：(HITORA, yuki)  
所属研究機関名：熊本大学  
部局名：大学院生命科学研究部  
職名：助教  
研究者番号： 00755308