

令和 3 年 6 月 1 日現在

機関番号：86301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07288

研究課題名(和文) EGFR-p53抑制機構を標的とした消化器癌治療の基礎研究

研究課題名(英文) A research for gastrointestinal cancer treatment targeting EGFR-p53 pathway

研究代表者

兵頭 一之介 (HYODO, ICHINOSUKE)

独立行政法人国立病院機構四国がんセンター(臨床研究センター)・その他部局等・医師

研究者番号：60416469

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：多くのがん細胞の増殖因子シグナルは活性化されており、消化器癌ではKRAS変異によるEGFRシグナル増強が代表的である。KRAS変異型-TP53野生型ヒト癌細胞株(HCT116大腸癌株、LoVo大腸癌株、SNU-1胃癌細胞株)においてKRAS変異によって生じる異常シグナルをMEK阻害剤トラメチニブを用いて抑制し、同時にMDM4・MDM2-siRNAを併用してp53の活性化を誘導することにより、相乗的な腫瘍増殖抑制効果が得られることを明らかにした。本研究結果から同時性のEGFRシグナルの抑制とp53活性化の治療戦略は、KRAS変異を有するp53野生型消化器癌において有望であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多くのがん細胞の増殖因子シグナルは活性化されており、消化器癌ではKRAS変異によるEGFRシグナル増強が代表的である。今回の研究結果から同時性のEGFRシグナルの抑制とp53活性化の治療戦略は、KRAS変異を有するp53野生型消化器癌(胃癌、大腸癌)において有望であることが示唆された。KRAS変異は他のがん種においても高頻度に認められ、ここで示した治療戦略は多くのがん治療において貢献できる可能性を秘めている。

研究成果の概要(英文)：Oncoprotein murine double minute homolog 2 (MDM2) and MDM4 cooperatively inhibit tumor-suppressor protein p53. Our previous study reported that the simultaneous inhibition of MDM2 and MDM4 using nutlin-3 (a small molecule inhibitor of MDM2-p53 interaction) and chimeric small interfering RNA with DNA-substituted seed arms (named chiMDM2 and chiMDM4) more potently activated p53 than the MDM2 or MDM4 inhibitor alone and synergistically augmented antitumor effects in various types of cancer cells with the wild-type TP53. Moreover, our study showed this time that the triple inhibition of MDM4, MDM2 and MEK exerted a potent antitumor effect in wild-type TP53 colon and gastric cancer cells with mutant KRAS. We have revealed simultaneous activation of p53 and inhibition of aberrant KRAS signaling may be a rational treatment strategy for gastrointestinal tumors.

研究分野：消化器内科

キーワード：p53腫瘍抑制遺伝子

1. 研究開始当初の背景

(1) 癌遺伝子である Murine Double Minute (MDM) 2 はユビキチン・リガーゼ活性を有し、がん抑制蛋白 p53 の分解を促進し、また p53 の転写活性を直接阻害する。MDM4 は MDM2 と協調的に働き、これら作用を増強することが知られている。正常細胞においては、この3者はフィードバック機構により相互に協調して p53 は常に低レベルに制御されている。様々な TP53 野生型のがんにおいては MDM2/4 が恒常的に活性化され細胞周期の停止やアポトーシスの誘導という p53 のがん抑制機能は強く阻害されている。我々は、MDM2 と MDM4 に対する siRNA のシード部分を DNA に置換した RNA-DNA chimera, chiMDM2, chiMDM4 を作成し (これにより siRNA の安定性と標的特異性を向上)、これを用いた研究から胃癌や大腸癌細胞において MDM2 と同時に MDM4 をノックダウンすることにより相乗的に p53 を活性化し細胞周期の停止やアポトーシスを誘導することを報告してきた (Endo S, et al. *Cancer Sci* 102: 605-613, 2011, Hirose M, et al. *Oncoscience* 1: 830-843, 2014, Imanishi M, et al. *Cancer Sci* 110: 639-649, 2019)。

(2) 多くの固形がんにおいて様々な遺伝子異常により EGFR-RAS 経路が活性化され、この経路はがんの発生や進展に深く関与していることが明らかとなっている。そこで、研究当初、既に我々は RAS の下流の経路を MEK 阻害剤で抑制し、かつ MDM2/4 の抑制による p53 の活性化を併用することにより相乗的な腫瘍抑制が得られることを確認していた。次にそのメカニズムを解析しようと試みていたところ、同時期に Hata AN らにより MDM2 と MEK の小分子阻害薬の併用が相乗効果を示したとの、我々の知見の一部と同様の報告がなされた (*Oncogene* 36: 6581-6591, 2017)。そこで我々は、さらにこの併用における MDM4 阻害の意義を検討し、そのメカニズムを解明することとした。

2. 研究の目的

(1) TP53 野生型かつ RAS 変異型大腸癌、胃癌細胞株に対して chiMDM4 が chiMDM2 と MEK 阻害薬 (トラメチニブ) の併用あるいは MDM2 阻害薬 Nutlin-3 とトラメチニブの併用の腫瘍増殖抑制に、どのように作用するかを明らかにすることで、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、同細胞株における3剤併用治療 (chiMDM4/chiMDM2+トラメチニブ) 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) 野生型 TP53 細胞株のうち、大腸癌細胞株 HCT116 (KRAS コドン 13 変異), LoVo (KRAS コドン 13 変異)、胃癌細胞株 SNU-1 (KRAS コドン 12 変異) の3種類に対して、in vitro における chiMDM4 の chiMDM2/トラメチニブ併用および Nutlin-3/トラメチニブ併用効果に及ぼす影響を WST-8 assay で検討した。各細胞株に対する chiMDM4, chiMDM2 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、トラメチニブの投与濃度は細胞株毎に算出した IC50 を参考に決定した。併用投与による薬剤相互作用の評価は CalcuSyn software (Biosoft, Cambridge, UK) を用いて Chou-Talalay 法により Combination Index (CI) を算出することにより行った。CI 値 <0.9 , $\geq 0.9 \sim <1.1$, ≥ 1.1 を、それぞれ synergistic effect, additive effect, antagonistic effect と判定した。siRNA など遺伝子細胞導入は lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を用いた。

(2) 単剤および各コンビネーション下での共培養におけるアポトーシスの誘導 (subG1 画分) や細胞周期の停止については Flow cytometry にて解析した。また細胞周期関連蛋白 (p21, p27, p151, CDK2/4, cyclin A/B1/D1/D3/E2, CDC2/25A, E2F1, PCNA, DNA polymerase δ/α , 等) の変動についても Western blotting 法にて評価した。

(3) アポトーシス関連蛋白 (p21, Fas, PUMA, caspase8, 9 等) について Western blotting 法で解析した。

(4) アポトーシスのミトコンドリア経路の関与を見るため、lentivirus plasmid BCL2/pLenti6.3 を用いて BCL2 強発現細胞株を作成し解析した

4. 研究成果

(1) chiMDM4 の野生型 TP53 かつ KRAS 変異型細胞株 HCT-116、LoVo, SNU-1 細胞株における腫瘍増殖抑制効果の解析

すべての細胞株において chiMDM2, chiMDM4, トラメチニブの、それぞれ単剤が用量依存的に腫瘍増殖抑制効果を示した (図 1)。chiMDM2/トラメチニブ併用は相乗効果を示し、chiMDM4 の追加は、この併用効果をさらに増強した (図 1、表 1)。

chiMDM2 を Nutlin-3 に変更した実験においても同様の変化を確認した。

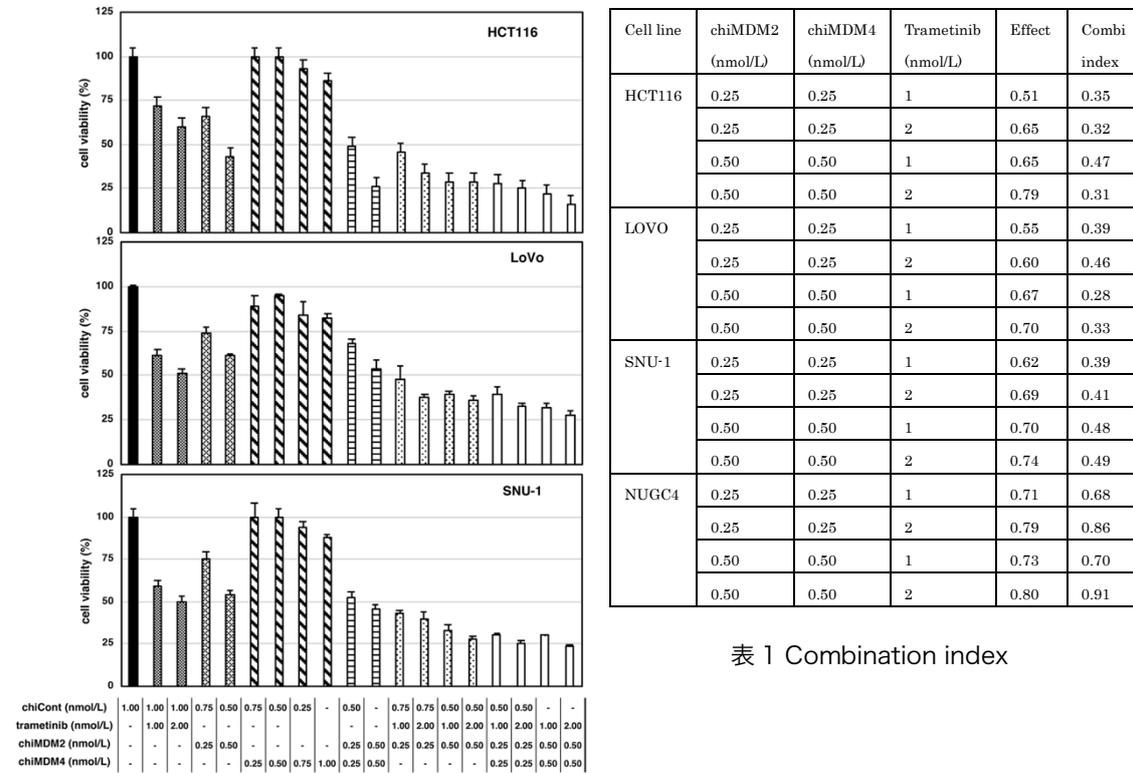


表 1 Combination index

図 1 chiMDM4, chiMDM2, トラメチニブ腫瘍増殖抑制効果

(2) 細胞周期に及ぼす効果

各薬剤投与下の細胞周期画分の割合を図 2 に示した。トラメチニブ単剤、chiMDM2/ chiMDM4、3 剤併用の順に G1 分画の増加、S、G2/M 分画の減少、さらには subG1 (apoptosis) の増加が観察された。つまり 3 剤併用により強い細胞周期の G1 停止とアポトーシスが誘導されたことが示された。

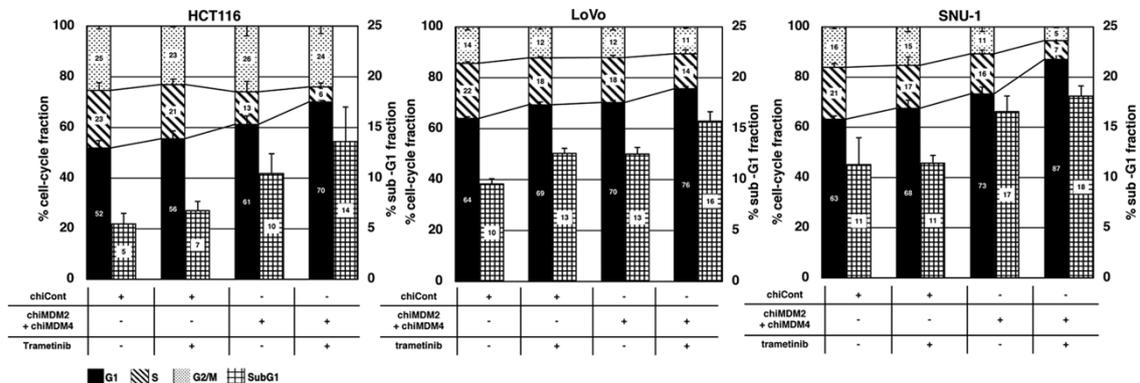


図 2 細胞周期割合の変化

(3) 細胞周期とアポトーシス関連蛋白の解析

まず HCT116 細胞において細胞周期とアポトーシス関連蛋白を Western blotting により解析した。コントロール、chiMDM4/chiMDM2 あるいはトラメチニブに比べ 3 剤併用が 2 倍以上の増減を示した分子を選別した。p53, p15, p27, p53 活性化蛋白 (p21, Fas, PUMA, 14-3-3 σ) は有意な増加を、MDM2, p-ERK2, MYC, E2F1, E2F1-activated proteins (cyclin A, cyclin B1, DNA polymerase δ , TYMS, CDC2, CDC25A) は有意な減少を示した。これらの代表的な分子につき他

の細胞も同様に解析した (図 3、表 2)。

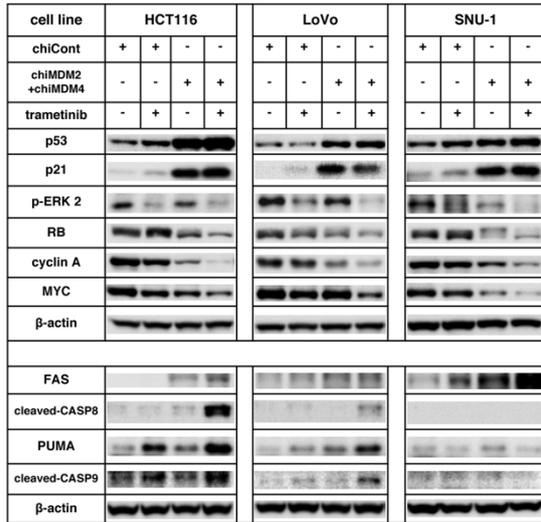


図 3 細胞周期・アポトーシス関連蛋白の変化

Cell line	Cell cycle apoptosis regulating protein	fold change relative to control			
		Trametinib	chiMDM2 +chiMDM4	Combination	
HCT116	Upregulated	p53	1.6	7.7	11.3
		p21CIP1	2.0	19.5	21.8
		Fas	2.9	27.1	40.4
	Down regulated	PUMA	2.6	1.9	5.0
		Phospho-ERK2	2.2	1.0	5.0
		MYC	1.6	2.9	3.5
LoVo	Upregulated	p53	1.3	3.1	3.1
		p21CIP1	3.0	20.4	13.4
		Fas	1.1	1.2	1.3
	Down regulated	PUMA	1.9	2.1	4.2
		Phospho-ERK2	2.1	1.4	5.3
		MYC	1.5	1.5	4.4
SNU-1	Upregulated	cyclin A	1.3	2.3	4.2
		p53	1.4	2.0	2.9
		p21CIP1	3.7	14.2	18.0
	Down regulated	Fas	2.1	3.3	5.1
		PUMA	1.1	2.2	1.7
		Phospho-ERK2	1.8	1.1	4.0
	MYC	1.5	3.3	6.7	
	cyclin A	1.4	2.3	5.6	

表 2 細胞周期・アポトーシス関連蛋白変化

pERK は Rb, caspase 8, 9 のリン酸化を通じて細胞周期の G1 開始とアポトーシス抑制をもたらす、腫瘍細胞増殖を促進する。chiMDM2/chiMDM4 とトラメチニブの併用は p53 活性化とともに、この pERK の作用を阻害し相乗的に作用することが明らかにされた。3 剤併用によりリン酸化 Rb の減少が顕著に認められ、E2F1 による cyclin A の活性化が強く抑制されている (図 3、表 2)。これは G1 停止のメカニズムを説明可能な変化と考えられる。Fas は HCT116, LoVo 細胞では単剤、併用により段階的に強く誘導され、さらにそれに伴いアポトーシス経路の cleaved caspase 8 が誘導されている (図 3)。また PUMA-cleaved caspase 9 も同様の傾向が認められた。SUN-1 細胞では、これら変化は弱かったが、傾向は同様であった (図 3、表 2)。

(4) Bcl-2 高発現 HCT116, LoVo 細胞株におけるアポトーシスの解析

Bcl-2 はミトコンドリア系アポトーシスを制御する抗アポトーシス蛋白の一つである。3 剤併用ではコントロールに比較して sub-G1 分画が増加しておりアポトーシスが誘導されている。Bcl-2 高発現株では、この sub-G1 分画の増加が明らかに減弱していることが認められ、ミトコンドリア経路のアポトーシスも 3 剤併用の腫瘍抑制に一部関与していることが分かる (図 4)。

(5) 以上の(1)-(4)の結果より、大腸癌、胃癌細胞において chiMDM4 は chiMDM2+トラメチニブ併用による細胞周期の G1 停止とアポトーシス誘導を相乗的に増強し、MDM2/MEK の抑制に加えて MDM4 の抑制が腫瘍増殖抑制に効果的であることが示された。

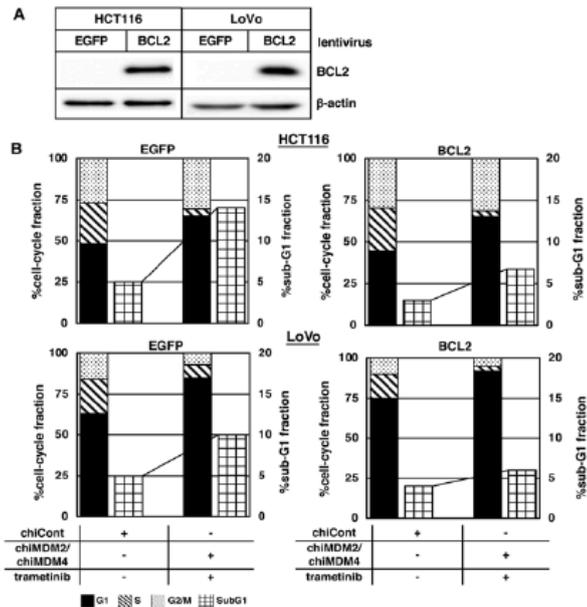


図 4 Bcl2 高発現株におけるフローサイトメトリ一解析

(6) 本研究で得られた3剤併用のメカニズム経路を図5に示した。本併用はp53蛋白の集積、ERKのリン酸化の抑制、Rb蛋白リン酸化の抑制、E2F1活性化蛋白の抑制を介して強い細胞周期のG1停止をもたらした。この効果はp53-p21-Rb経路以外にMEKの抑制によるpERKの発現低下と、それによるRbのリン酸化の抑制(これによりE2F1の活性化がRbにより阻害された状態に維持される)が関与していると考えられる。さらに本併用療法はFas/PUMA発現を増強し外因性・内因性アポトーシスを誘導した。MDM2/MEKの抑制はBcl-2-like protein 11、PUMAを誘導しアポトーシスがもたらされることが、既に報告されている。我々のBcl2高発現株におけるミトコンドリア経路のアポトーシスの検討結果も、これを支持している。これ以外に3剤併用はFas-caspase 8の外因性経路も活性化しており、併せて強いアポトーシスを誘導するものと思われる。

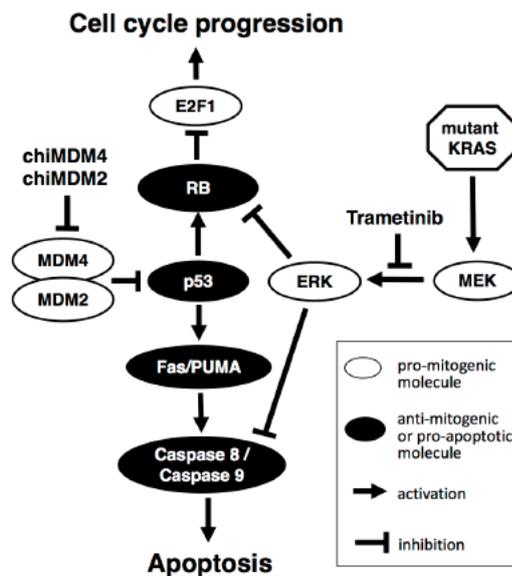


図5 MDM4/MDM2, MEK 阻害による腫瘍抑制経路

(7) MDM4/MDM2の発現抑制によるp53経路の活性化とMEK阻害によるEGFR-KRAS経路の制御は相乗的な腫瘍増殖抑制をもたらし、TP53野生型RAS変異型大腸癌・胃癌における有望な新たな治療戦略を提供するものと思われる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Wang Xiaoxuan, Yamamoto Yoshiyuki, Imanishi Mamiko, Zhang Xiaochen, Sato Masashi, Sugaya Akinori, Hirose Mitsuaki, Endo Shinji, Natori Yukikazu, Moriwaki Toshikazu, Yamato Kenji, Hyodo Ichinosuke	4. 巻 22
2. 論文標題 Enhanced G1 arrest and apoptosis via MDM4/MDM2 double knockdown and MEK inhibition in wild-type TP53 colon and gastric cancer cells with aberrant KRAS signaling	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Oncology Letters	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） 10.3892/ol.2021.12819	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 ZHANG XIAOCHEN, YAMAMOTO YOSHIYUKI, WANG XIAOXUAN, SATO MASASHI, IMANISHI MAMIKO, SUGAYA AKINORI, HIROSE MITSUAKI, ENDO SHINJI, MORIWAKI TOSHIKAZU, YAMATO KENJI, HYODO ICHINOSUKE	4. 巻 41
2. 論文標題 MDM4 as a Prognostic Factor for Patients With Gastric Cancer With Low Expression of p53	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 1475 ~ 1483
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/anticancerres.14906	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0件

〔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	山本 祥之 (YAMAMOTO YOSHIYUKI) (00649288)	筑波大学・附属病院・病院講師 (12102)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------