

令和 3 年 5 月 16 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K18118

研究課題名(和文)食道癌に対する変異p53機能回復薬を併用した新規複合化学療法の開発

研究課題名(英文)Development of new combined chemotherapy with mutant p53 function recovery drug for esophageal cancer

研究代表者

小林 照之(Kobayashi, Teruyuki)

大阪大学・医学系研究科・招へい教員

研究者番号：70779751

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：食道扁平上皮癌におけるTP53遺伝子変異率は9割以上といわれ、化学療法の耐性に関与する。p53ミスセンス変異株において、PRIMA-1METはいずれの抗癌剤との組み合わせでも相加効果以上の抗腫瘍効果を示し、特に5-FUとの併用で相乗効果を示した。この併用療法でApoptosisが強く誘導され、p53およびp73、NOXAの発現増強を認めた。p53ミスセンス変異株(TE8)を用いた皮下腫瘍モデルマウスやヒト由来の細胞を使用したPDXモデルマウスでも、5-FU+ PRIMA-1MET併用群では各単剤投与よりも明らかに抗腫瘍効果が強く、治療後の腫瘍組織でp73・NOXA発現の増強を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

食道扁平上皮癌におけるTP53遺伝子変異率は9割以上といわれ、化学(放射線)療法の耐性や予後に関与する。PRIMA-1METは、2002年に小分子化合物スクリーニングで同定されとくにp53ミスセンス変異の転写能を回復するとされるが、食道扁平上皮癌に対する治療効果、メカニズムの一端、化学療法との併用効果が明らかとなった。今後、食道扁平上皮癌に対して、個別医療・オーダーメイド医療を改良するにあたって、治療選択肢の一助を担う有意義な成果であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The TP53 gene mutation rate in esophageal squamous epithelial cancer has been reported to be 90% or more, and is involved in chemotherapy resistance. In the p53 missense mutant strain, PRIMA-1MET showed an antitumor effect more than the additive effect when combined with any anticancer agent, and particularly showed a synergistic effect when used in combination with 5-FU. Apoptosis was strongly induced by this combination therapy, and the expression of p53, p73, and NOXA was enhanced. Even in subcutaneous tumor model mice using p53 missense mutant strain (TE8) and PDX model mice using human-derived cells, the antitumor effect was clearly stronger in the 5-FU + PRIMA-1MET combination group than in each single agent administration. Increased expression of p73 / NOXA was observed in the tumor tissue after treatment.

研究分野：消化器外科

キーワード：食道扁平上皮癌 PRIMA-1MET 5-FU p53 p73 NOXA

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

進行食道扁平上皮癌において現在術前化学療法が標準治療であるが、その奏効率は4割弱(Ando N et al. Ann Surg Oncol 2012)とまだ改善の余地が大きい。食道癌は他癌に比べても癌抑制遺伝子 p53 に変異率が高く、当科では以前より食道癌においてこの p53 に変異をもつことが臨床的に治療耐性に関与することを報告してきた(Yamasaki M et al. Ann Surg Oncol 2010, Makino T et al. Ann Surg Oncol 2010)。したがって変異 p53 遺伝子が食道癌の重要な治療標的になり得ると考え、我々は変異 p53 機能回復薬(とくに PRIMA-1^{MET})に着目して、先行研究としてとくに p53 ミスセンス変異を有する食道癌への単剤投与による抗腫瘍効果を報告してきた(H. HURUKAWA, Cancer Science 2017)。本研究では、食道癌化学療法の奏効率の向上のための有効な「新規複合化学療法」を確立し臨床導入することを目的として、食道癌に対する変異 p53 機能回復薬と抗癌剤との併用の有効性およびその相乗効果のメカニズム(p53 依存性, p53 非依存性)を検証することとした。具体的には In vitro 実験, 細胞株を用いた皮下腫瘍モデルマウスに加え、臨床検体による PDX(Patient-derived xenografts)モデルやオルガノイドを用いたより臨床に近い実験計画とし、のちの臨床応用を目指す。

2. 研究の目的

食道扁平上皮癌細胞株の p53 変異株および p53 野生株を用いて、変異 p53 機能回復薬 (PRIMA-1^{MET}) と抗癌剤(5-FU/シスプラチン/ドセタキセル)との併用効果を Isobologram 法を用いて検討し、p53 ミスセンス変異株において総じて相加以上の抗腫瘍効果を示すこと、中でも 5-FU との併用において相乗効果を示すことが現時点で分かっている。また、作用メカニズムとして p53 下流の apoptosis signal の中でも Noxa が増強することが示唆された。さらに in vivo においても 5-FU との併用で強い抗腫瘍効果を示すことも分かってきた。今後は、増殖抑制経路, p53 非依存性の経路の解析(p63, p73, microRNA), PDX モデルマウスやオルガノイドでのより臨床に則した抗腫瘍効果の検討を進めていく予定である。

3. 研究の方法

1. 食道癌細胞株を使った変異 p53 機能回復薬と抗癌剤との併用効果の解析

食道扁平上皮癌細胞株のうち p53 ミスセンス変異株 (TE1, 4, 5, 8, 10) と、p53 ナンセンス・フレームシフト変異株(TE9, 14), p53 野生株(KYSE410, 960)を用いて、PRIMA-1^{MET} と 5-フルオロウラシル/シスプラチン/ドセタキセルとの併用効果を isobologram 法にて評価する。

p53 null(ナンセンス・フレームシフト変異)の細胞株に、p53 正常遺伝子, p53 ミスセンス変異遺伝子をそれぞれノックインし PRIMA-1^{MET} を併用し、両者の抗腫瘍効果や、apoptosis 経路と増殖抑制経路のシグナルを比較することで PRIMA-1^{MET} が有効な p53 ステータスを明確にする。

PRIMA-1^{MET} と抗癌剤併用下での p53 下流の apoptosis 経路と増殖抑制経路のシグナル解析(PTEN, Nf- B, Jnk, ERK, MEK など)。

PRIMA-1^{MET}+抗癌剤併用投与前後での食道癌細胞内 microRNA アレイ解析, 培養液中のエクソソーム内の microRNA 網羅的解析, グルタチオン酸濃度解析を行う。

2. 食道扁平上皮癌皮下腫瘍モデルマウスによる併用効果と作用機序の解析

食道扁平上皮癌 p53 ミスセンス変異株を用いた皮下腫瘍モデルマウス(BALBc nu/nu)を作製し、抗癌剤と PRIMA-1^{MET} との併用効果, 体重, 臓器障害を評価する。

PRIMA-1^{MET} と抗癌剤併用下での p53 下流の apoptosis 経路と増殖抑制経路のシグナル (Bax, Puma, Noxa, AIP1, Bcl-2, p21, PTEN, Jnk)解析を行う。

評価方法：TUNEL assay, 免疫染色, Western blot

PRIMA-1^{MET} + 抗癌剤併用投与前後での生着腫瘍及び血清エクソソームにおける microRNA アレイ解析

3. 食道癌患者検体を用いた PDX マウス/オルガノイドでの併用効果の検証

食道扁平上皮癌 p53 ミスセンス変異型/p53 野生型を有する患者検体を用い PDX モデルマウス/オルガノイドを作製し, 抗癌剤+PRIMA-1^{MET} の併用効果を評価する。

PRIMA-1^{MET}+抗癌剤併用投与前後での p53 下流の apoptosis 経路と増殖抑制経路のシグナル解析。評価方法：TUNEL assay, 免疫染色, Western blot

PRIMA-1^{MET}+抗癌剤併用投与前後での食道癌細胞及び培養上清 microRNA アレイ解析。

4 . 研究成果

食道扁平上皮癌細胞株のうち p53 ミスセンス変異株 (TE1, 4, 5, 8, 10) と, p53 ナンセンス・フレームシフト変異株 (TE9, 14), p53 野生株 (KYSE410, 960) を用いて, PRIMA-1MET と 5-フルオロウラシル/シスプラチン/ドセタキセルとの併用効果を isobologram 法にて評価し, 併用に関しては p53 ミスセンス変異株において各抗癌剤との併用効果が高いこと, また抗癌剤の中でも 5-フルオロウラシルが併用 効果が高いこと, さらに併用によってアポトーシス作用が増強されることが分かった。ただし, 既存の報告通り p53 野生株や p53 ナンセンス・フレームシフト変異 株はそれらの効果がみられないことが分かった。作用機序に関しては, PRIMA-1MET と抗癌剤併用下での p53 下流の apoptosis 経路と増殖抑制経路のシグナル解析 (PTEN, Nf- B, Jnk, p21, p63, p73, p53 関連シグナル) を western blot にて評価した。p53 ファミリーでは p73 の発現が上昇すること, p53 関連シグナルの中では Noxa が強く増強することが分かった。

さらに抗腫瘍効果やシグナルの変化に関しては, 食道扁平上皮癌細胞株を用いた皮下腫瘍モデルマウス (食道癌細胞株 TE8 KYSE410 を用いて) で確認したところ, in vitro の結果と同様に, p53 ミスセンス変異株 (TE8) の皮下腫瘍モデルにおいて APR-246 の抗腫瘍効果が強くみられ, 5-フルオロウラシルにて増強された。シグナル解析においても, p53 ミスセンス変異株 (TE8) において TUNEL assay にて APR-246 単剤にてアポトーシス増強がみられ, 5-フルオロウラシル併用ではさらにアポトーシスが増強された。Western blot によるシグナル解析では, p53 ミスセンス変異株 (TE8) において p73 の発現が上昇すること, p53 関連シグナルの中では Noxa が強く増強することが分かった。さらに, 臨床サンプル (p53 ミスセンス変異) を用いた PDX (Patient derived xenograft) モデルを使用してその抗腫瘍効果と機序を確認したところ, APR-246 の抗腫瘍効果が強くみられ, 5-フルオロウラシルにて増強された。シグナル解析においても, TUNEL assay にて APR-246 単剤にてアポトーシス増強がみられ, 5-フルオロウラシル併用ではさらにアポトーシスが増強された。免疫染色によるシグナル解析では, p73 の発現が上昇すること, p53 関連シグナルの Noxa が強く増強することが分かった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小林 照之
2. 発表標題 Combined effect and mechanism of the mutant p53 function restoration drug PRIMA-1MET with chemotherapy for esophageal squamous cell carcinoma
3. 学会等名 第119回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 小林 照之
2. 発表標題 The combination effect of PRIMA-1MET and chemotherapy via p73-NOXA axis in esophageal cancer
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 小林 照之
2. 発表標題 Combined effect of PRIMA-1MET + chemotherapy via p73-NOXA pathway in esophageal squamous cell carcinoma
3. 学会等名 第120回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2020年～2021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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------