

令和 4 年 5 月 26 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K17646

研究課題名(和文)p53タンパク質分解を標的とした抗腫瘍効果を持つ新規化合物のスクリーニング

研究課題名(英文)A screening of novel anti-tumor compounds targeting p53 degradation

研究代表者

徳山 信嗣(Tokuyama, Shinji)

大阪大学・医学系研究科・招へい教員

研究者番号：00804890

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)：p53タンパク質寿命を指標とする独自のハイスループットスクリーニング系を構築した。この系を用いて小分子化合物ライブラリーでスクリーニングを行い68種のヒット化合物を同定した。内因性p53タンパク質への作用を評価し7種へと絞り込んだ。そのうち2種の化合物は同一の骨格を有し、今までにp53への作用の報告がない化合物であった。この化合物は大腸癌細胞株に対してDNA障害を起こさず、ユビキチン化を阻害することでp53タンパク質を安定化した。プルダウンアッセイ、サーマルシフトアッセイではp53-MDM2結合阻害作用を示さず、MDM2阻害剤と異なる機序によって分解阻害による安定化がなされていることを明らかとした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本邦において大腸癌は罹患数・死亡数ともに上位に入る悪性腫瘍であり、進行再発病変に対する薬物加療は新たな薬剤の開発により延長しているとはいえ根治に至ることは困難でありさらなる分子メカニズムに基づいた治療の開発が望まれている。p53タンパク質を活性化するMDM2阻害剤が今まで報告されていたが血液毒性が問題となっており、新たな機序によるp53活性化剤の開発が期待されている。本研究で同定した化合物がその候補であり、またスクリーニング系を用いることでさらなる化合物ライブラリーでの評価が可能となる。

研究成果の概要(英文)：We constructed a unique sensitive high-throughput screening system using p53 protein degradation as an index. Using this system, 10000 small molecule compound libraries were screened and 68 hit compounds were identified. The effect on the endogenous p53 protein was evaluated and narrowed down to 7 compounds. Two of these compounds have the same skeleton and have not been reported to have any effect on p53. These compounds did not cause DNA damage to colorectal cancer cell lines, while stabilizing p53 protein by inhibiting ubiquitination. In addition, the pull-down assay and thermal shift assay did not show inhibition of p53-MDM2 binding, and it was clarified that stabilization by degradation inhibition was achieved by a mechanism different from that of MDM2 inhibitors.

研究分野：大腸癌

キーワード：大腸癌 p53

1. 研究開始当初の背景

大腸癌治療における現状

本邦において大腸癌は罹患数 1 位、死亡数 2 位と多く (2018 年がん統計予測)、進行再発大腸癌については殺細胞性抗癌剤と分子標的薬を併用する多剤化学療法により予後は徐々に延長しつつあるが [Douillanrd JY et al, 2013]、依然として致死的な疾患である。主な死因である肝転移巣や、局所再発率が高い骨盤内の進行病変に対して病勢コントロールの後に最も治癒力の高い根治的外科切除を行うことが重要である。そのためにも術前化学療法による病勢の制御の重要性が増しているが、EGFR 阻害剤など RAS 系の増殖シグナルの異常に対する抑制だけでは不十分であり、癌抑制機能の再活性化など新たな機序の抗癌剤治療の開発が望まれている。

治療標的としての p53 遺伝子

我々は主な癌抑制遺伝子の一つである p53 遺伝子に着目した。p53 遺伝子は癌化シグナルを含めた種々のストレスに应答し、抗腫瘍作用をもつ下流の標的を転写する転写因子 p53 タンパク質を code する [Arnold J. Levine et al. Nat Rev Cancer (2009)]。癌細胞の発生、維持にはこの p53 タンパク質を中心とした抗腫瘍作用の障害が必要不可欠であり、癌細胞においては p53 の制御因子の異常または p53 自身の変異により経路の機能障害が生じている [Brown CJ et al. Nat Rev Cancer (2009)]。

この障害された p53 の機能を再活性化することにより抗腫瘍効果を示すことが *in vitro*, *in vivo* で複数報告されており [Carla P. Martins et al. Cell (2006)]、魅力的な治療標的であるが臨床応用される薬剤の開発までには至っていない。

分解、タンパク寿命を操作する化合物のスクリーニング系

p53 経路を活性するために p53 タンパク質の分解に焦点を当てた。p53 の分解には主な E3 ligase である MDM2 を介したユビキチンプロテアソーム系による経路が存在するが未だ不明な点も多い。我々は標的タンパクの量的変化や寿命をターゲットとする独自のハイスループットスクリーニング系の基盤を有しており、以前より分解を標的としタンパク寿命を操作することで効果を示すヒット化合物の同定に成功している [Kato H, et al. PNAS (2014)]。この系ではハイコンテンツイメージング装置を用いたセルベースのアッセイによりタンパクの分解や量的変化を高精度かつ高感度に測定することができ、p53 タンパク質の分解を標的とし抗腫瘍効果を示すような化合物の探索へと応用が可能であると考えた。

抗腫瘍効果の活性化へのアプローチは p53 の status によって異なっており、大腸癌の半数を占める p53 野生型の腫瘍に関しては、野生型 p53 タンパク質寿命を延長することで p53 経路の抗腫瘍作用を機能させ、腫瘍を縮小し得る [Vassilev LT, et al. Science (2004)]。一方で残りの半数を占める p53 変異型の腫瘍においては、変異により正常の p53 タンパク質の転写因子としての作用が消失するだけでなく、変異タンパクが蓄積・凝集することで癌化シグナルを惹起しており、その蓄積・凝集の解消により抗腫瘍効果を示すことが報告されている [Chen et al. PNAS (2015)]。

先述のスクリーニング系を応用することにより同一の系で細胞株を変えるだけで野生型、変異型の両者の stability を標的とすることが可能であり、野生型 p53 の stability を上昇させ活性化する化合物や、変異型 p53 の stability を低下させ分解する化合物の同定が期待できる。近年、酵素活性を持たない分子を阻害するアプローチとして分解誘導剤の概念が提唱されているが、変異型 p53 に対する分解誘導剤を同定する可能性をも秘めている。さらにヒット化合物の分解に関わる作用の分子生物学的なメカニズム解明により新たな分解機構の解明の一助となる可能性がある。

2. 研究の目的

本研究では、p53 タンパク質分解を標的とした独自のスクリーニング系により p53 タンパク質寿命を操作し抗腫瘍効果をもたらす新規リード化合物の同定を目的とする。

3. 研究の方法

- (1) 基盤となるスクリーニング系を応用し、野生型、変異型それぞれの p53 タンパク質の分解に着目したスクリーニング系を構築する。また自家蛍光や非特異的プロテアソーム阻害による偽陽性を排除するカウンターアッセイの構築を行う。
- (2) 化合物ライブラリーに対するスクリーニングの実施により p53 の stability を操作するヒット化合物を同定する。カウンタースクリーニング、内因性 p53 に対する作用のバリデーションを行いヒット化合物の評価を行う。
- (3) ヒット化合物に対して *in vitro*, *in vivo* で増殖やアポトーシス、コロニー形成能などを評価し抗腫瘍効果を持つ化合物を同定する。また正常細胞に対する毒性評価を行う。
- (4) ヒット化合物の p53 の stability への作用の分子生物学的なメカニズムを解明する。

4. 研究成果

p53 タンパク寿命を指標とする独自のハイスループットスクリーニング系を構築し、まず野生型 p53 のタンパク寿命を延長する化合物の探索を行った。EGFP 融合 p53 タンパク質の安定発現株を用いたスクリーニング系を構築し、この系の Z' factor(系の精度の指標)は 0.7~0.8 と高感度であり、小分子化合物による野生型 p53 タンパク寿命の変化を鋭敏に評価することが可能であった。またカウンターアッセイとして EGFP-CL1degron 発現株を用いた系も作成し、非特異的プロテアソーム阻害や自家蛍光による偽陽性の排除が可能であることを確認した。この系を用いて小分子化合物ライブラリー10000 種に対してスクリーニングを行い、68 種のヒット化合物を同定した。さらに内因性 p53 タンパクへの作用、用量依存性を western blotting により評価し、ヒット化合物 7 種へと絞り込んだ。それぞれの化合物は p53 の分解を阻害することで p53 タンパクの寿命を延長しており、そのうち 5 種類は p53 への作用の報告があり、スクリーニング系の妥当性が示唆された。残り 2 種の化合物は同一の骨格を有し、今までに p53 への作用の報告がない化合物であった。

この 2 種の化合物の p53 安定化の機序について探索を行ったところ、大腸癌細胞株に対して DNA 障害を起こさず、一方でユビキチン化を阻害することで p53 タンパクを安定化することを明らかにした。またプルダウンアッセイ、サーマルシフトアッセイでは p53-MDM2 結合阻害作用を示さず、MDM2 阻害剤と異なる機序によって分解阻害による安定化がなされていることを明らかにした。

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 徳山信嗣、高橋秀和、加藤久和、藤野志季、荻野崇之、三吉範克、植村守、松田宙、山本浩文、水島恒和、高島成二、森正樹、土岐祐一郎
2. 発表標題 スクリーニングによるp53タンパク分解を標的とする抗腫瘍効果を示す新規化合物の同定
3. 学会等名 第120回日本外科学会学術集会
4. 発表年 2020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
---------	---------