

機関番号：32660

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21791218

研究課題名 (和文) 金属錯体モジュールを利用した新規 p53 阻害剤の開発

研究課題名 (英文) Development of novel kind of p53 inhibitors that target the zinc binding site of p53

研究代表者

森田 明典 (MORITA AKINORI)

東京理科大学・理工学部・助教

研究者番号：90334234

研究成果の概要 (和文)：本研究では、p53 阻害に有効な亜鉛キレート化剤に、p53 結合性モジュールを付加し、p53 への特異性を高めた放射線防護剤の開発を目指した。5 種の候補亜鉛キレート化剤の活性評価を行い、p53 依存性アポトーシス抑制効果が最も高いキレート化剤として Bispicen を見出した。さらに、この Bispicen に p53 特異的結合ペプチドを付加したハイブリッド化合物を合成し、Bispicen 単体よりも毒性の少ない p53 阻害剤の開発に成功した。

研究成果の概要 (英文)：We evaluated some zinc chelators for inhibition of p53-dependent apoptosis. As a result, two out of five zinc chelators suppressed the apoptosis. Our findings indicate that using zinc chelation would be a new approach to inhibition of the apoptotic pathways.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・放射線科学

キーワード：p53 阻害剤、放射線防護剤、亜鉛キレート化剤、DNA 損傷、アポトーシス

1. 研究開始当初の背景

p53 阻害剤は、がんの放射線療法や化学療法において治療を妨げる副作用の原因となる正常組織障害を軽減する防護剤としての応用が期待されている。研究代表者らは、チロシンホスファターゼ阻害剤として広く用いられているオルトバナジン酸ナトリウム (バナデート) が、p53 転写依存性・非依存性の両経路を抑制する優れた p53 阻害剤であることを見出していた。さらに、他の代表的な p53 阻害剤には認められないバナデートの作用機作として、研究代表者らはバナデートが有する p53 変性作用に注目した。この p53

変性作用は、p53 分子内に存在する金属イオン結合部位に配位する亜鉛イオンの解離によって生じることが報告されていた。

2. 研究の目的

本研究では、p53 阻害に有効な亜鉛イオンキレターに、p53 結合性モジュールを付加し、p53 への特異性を高めた放射線防護剤の開発を目指した。

3. 研究の方法

p53 依存性の放射線誘発アポトーシスを引き起こすヒト T 細胞性白血病細胞株 MOLT-4

の放射線細胞死をモデル細胞死として、候補亜鉛キレート化剤の p53 阻害剤としての活性評価を以下の方法で行った。

- (1) アポトーシス抑制効果は、色素排除試験と MitoTracker 染色法によるミトコンドリア膜電位の測定で検討した。
- (2) p53 抑制効果は、p53 の標的遺伝子産物である PUMA、p21 の転写活性化を RT-PCR 法、ウェスタンブロット法で検討した。
- (3) p53 変性効果は、変性した p53 に特異的なモノクローナル抗体 PAb240 を用い、免疫沈降法で検討した。
- (4) 転写非依存性経路に対する阻害効果は、この経路の起点となる p53 と Bcl-2 ファミリー分子との結合について、キレート化剤処理による両分子の結合抑制効果を免疫共沈降法で検討した。
- (5) (1) ~ (4) の阻害活性評価を経て、最も優れた p53 抑制効果を示した亜鉛キレート化剤をキレートモジュールとし、さらに p53 特異的結合ペプチド CDB3 (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 937-942, 2002) を付加して p53 への特異性を高めたハイブリッド化合物を合成し、その阻害活性を検討した。

4. 研究成果

2009 年度は、亜鉛キレート化剤の p53 阻害剤としての有効性評価を行った。その結果、検討した 5 種のキレート化剤の内、Bispicen と TPA の 2 種がアポトーシス抑制効果を示した (図 1)。

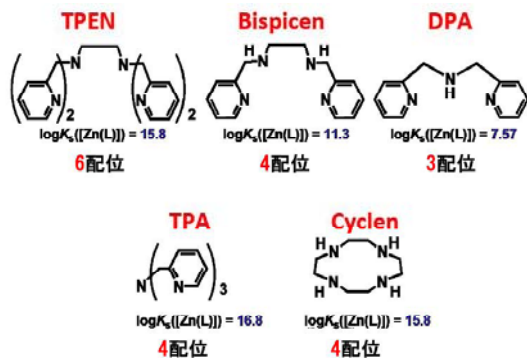


図 1 候補亜鉛キレート化剤

アポトーシス抑制効果が最も高かった Bispicen は、p53 変性作用を示し、転写依存性・非依存性両経路のアポトーシス過程を抑制した。さらに、p53 ノックダウン細胞株では、Bispicen の細胞死抑制効果が認められなかったことから、Bispicen が細胞死抑制効果を発揮するためには、p53 が必須であることも明らかとなった (図 2)。

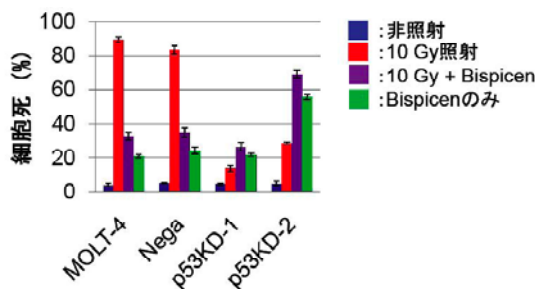


図 2 Bispicen の p53 特異性の検討

照射 18 時間後の細胞死を色素排除試験により判別した。

Bispicen は、照射直後に 200 μ M で処理した。

MOLT-4 : 親株

Nega : Negative shRNA 発現細胞株

p53KD-1: p53 shRNA 発現細胞株 1

p53KD-2: p53 shRNA 発現細胞株 2

また、亜鉛キレート化剤選出の過程で追加検討した化合物群中に、p53 転写非依存性アポトーシス誘導経路に特異的に作用する化合物も見出した。

2010 年度は、Bispicen をキレートモジュールとし、さらに p53 特異的結合ペプチド CDB3 を付加したハイブリッド化合物を実際に合成し、その有効性の評価を進めた (図 3)。

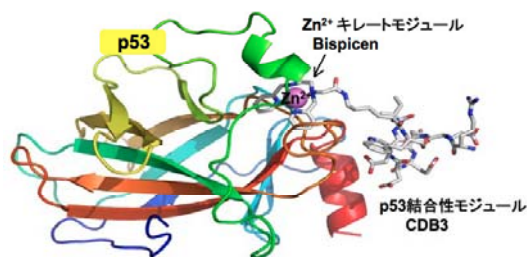


図 3 ハイブリッド化合物による p53 阻害の模式図

合成した試作品の p53 依存性アポトーシス抑制効果を検討したが、試作品は細胞膜透過性が低く、培地に添加するだけでは十分なアポトーシス抑制効果は得られなかった。そこで、CDB3 が酸性ペプチドであることを考慮し、リポポリアミン系の細胞導入試薬を用いたところ、導入が可能となった。導入された細胞は、Bispicen 単体を処理した細胞よりもアポトーシスが抑制され、このハイブリッド化合物の p53 特異性が高まっていることが明らかとなった。

現在、このハイブリッド化合物の改良版として CDB3 ペプチドの N 末端に細胞導入効率を高める官能基の導入を進めているところである。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計9件)

- ① A. Ito, A. Morita, S. Ohya, S. Yamamoto, A. Enomoto, and M. Ikekita. Cycloheximide suppresses radiation-induced apoptosis in MOLT-4 cells with Arg72 variant of p53 through translational inhibition of p53 accumulation. *J. Radiat. Res.*, Article first published online (Mar. 31, 2011) 査読有.
- ② 森田明典、大谷聡一郎. 科学教養講座「バナデート：アポトーシスを抑える新しいタイプの放射線防護剤」理大科学フォーラム 27(12), 28-33, 2010, 査読無.
- ③ 田中薫、王冰、森田明典、池北雅彦. 「バナデート：p53 依存性アポトーシス制御による新しいタイプの放射線防護剤」放射線科学 53(11), 15-19, 2010, 査読無.
- ④ 森田明典、山元真一、池北雅彦、王冰、田中薫. 「バナデート：p53 に作用する新しいタイプの放射線防護剤」*RADIOISOTOPES* 59, 459-462, 2010, 査読有.
- ⑤ A. Morita, S. Yamamoto, B. Wang, K. Tanaka, N. Suzuki, S. Aoki, A. Ito, T. Nanao, S. Ohya, M. Yoshino, J. Zhu, A. Enomoto, Y. Matsumoto, O. Funatsu, Y. Hosoi, and M. Ikekita. Sodium orthovanadate inhibits p53-mediated apoptosis. *Cancer Res.* 70, 257-265, 2010, 査読有.
- ⑥ N. Sasano, A. Enomoto, Y. Hosoi, Y. Katsumura, Y. Matsumoto, A. Morita, K. Shiraiishi, K. Miyagawa, H. Igaki, and K. Nakagawa. Edaravone, a known free radical scavenger, enhances X-ray-induced apoptosis at low concentrations. *Cancer lett.* 293, 53-57, 2010, 査読有.
- ⑦ R. Ohshima, M. Kitamura, A. Morita, M. Shiro, Y. Yamada, M. Ikekita, E. Kimura, and S. Aoki. Design and synthesis of a fluorescent probe for Zn²⁺, 5,7-bis(N,N-dimethylaminosulfonyl)-8-hydroxyquinoline-pendant 1,4,7,10-tetraazacyclododecane and Zn²⁺-dependent hydrolytic and Zn²⁺-independent photochemical reactivation of its benzenesulfonyl-caged derivative. *Inorganic Chem.* 49, 888-899, 2010, 査読有.

[学会発表] (計21件)

- ① Akinori Morita. Vanadate: a novel type of radioprotector acts by inhibiting both transcription-dependent and transcription-independent p53 apoptotic pathways. 5th TUS International Collaboration Workshop, 2010年12月6日, Hotel Metropolitan Edmont (東京都).
- ② 森田明典. 放射線誘発アポトーシスの分子機構とそれを利用した防護剤に関する研究 (日本放射線影響学会 奨励賞受賞講演) 日本放射線影響学会第53回大会, 2010年10月21日, 京都テルサ(京都府).
- ③ 大谷聡一郎、森田明典 他. p53 分子内の亜鉛イオン結合部位を標的とする新規阻害剤の開発, 日本放射線影響学会第53回大会, 2010年10月21日, 京都テルサ(京都府).
- ④ 内田孝俊、森田明典 他. p53 転写非依存性アポトーシス誘導経路に特異的に作用する亜鉛キレート化剤の作用機構解析, 日本放射線影響学会第53回大会, 2010年10月21日, 京都テルサ(京都府).
- ⑤ 伊藤あずさ、森田明典 他. タンパク質合成阻害剤シクロヘキシミドを用いた MOLT-4 細胞におけるp53 依存性放射線誘発アポトーシス経路の解析, 日本放射線影響学会第53回大会, 2010年10月20日, 京都テルサ(京都府).
- ⑥ 王冰、田中薫、森田明典 他. オルトバナジン酸ナトリウム(バナデート)は、マウスにおいて全身照射後の障害に対して有効な緩和剤(Mitigator)である, 日本放射線影響学会第53回大会, 2010年10月20日, 京都テルサ(京都府).
- ⑦ 森田明典. バナデート：p53 転写依存性・非依存性両経路に作用する新しいタイプの放射線防護剤, 放医研研究会講演会, 2010年6月29日, 放射線医学総合研究所(千葉県).
- ⑧ 青木 伸、中村 有香里、塚本 雅登、高澤涼子、森田明典 他. 亜鉛イオン(II)との錯体生成によって活性化されるアポトーシス誘導剤の設計と合成, 日本薬学会 第130年会, 2010年3月29日, 岡山県.
- ⑨ 森田明典 他. オルトバナジン酸ナトリウムによるp53 転写非依存性アポトーシス抑制機構および放射線防護効果, 日本放射線影響学会第52回大会, 2010年11月12日, 広島市南区民文化センター(広島県).

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.rs.noda.sut.ac.jp/~masalab/C09.html>

東京理科大学受賞紹介

<http://www.tus.ac.jp/news/news.php?20101215120520>

東京理科大学ニュース紹介

<http://www.tus.ac.jp/news/news.php?20100301144955>

放射線医学総合研究所プレス発表

http://www.nirs.go.jp/information/press/2009/02_12.shtml

報道関連情報

① 平成23年4月28日号『週間新潮』47-48頁, ビール? アサリ? 「放射線防護食品」は何が効くのか

② 平成22年3月26日付『日刊工業新聞』
<http://www.nikkan.co.jp/news/nkx0720100326eaab.html>

③ 平成22年2月26日付『科学新聞 第3281号』

以上の3誌において、*Cancer Research* 誌発表の研究内容であるバナデートの強力な放射線防護効果について掲載、報道された。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森田 明典 (MORITA AKINORI)

東京理科大学・理工学部・助教

研究者番号：90334234