

令和 6 年 5 月 29 日現在

機関番号：11501

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K16867

研究課題名（和文）ぶどう膜悪性黒色腫に対するp53活性化誘導を基軸とした新規治療薬の開発

研究課題名（英文）Establishment of a novel treatment for uveal melanoma based on p53 pathway activation

研究代表者

富樫 敬太（Togashi, Keita）

山形大学・医学部・助教

研究者番号：80810796

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：本課題では、新規MDM4発現抑制薬CEP1347のぶどう膜悪性黒色腫（uveal melanoma: UM）細胞に対する効果を検討した。その結果、CEP1347が臨床濃度域でUM細胞におけるMDM4発現を抑制しp53を活性化すること、正常細胞に影響を与えずにUM細胞の生存・増殖を選択的に抑制することが明らかとなった。加えて、CEP1347がUM細胞においてProtein kinase C (PKC)の活性を抑制することも明らかにしたが、重要なことにPKC抑制がMDM4発現抑制と協調してp53を活性化するという、本課題では当初予想していなかった新知見を得ることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ぶどう膜悪性黒色腫は成人の原発性眼内悪性腫瘍の中では最も頻度が高く、しばしば致命的となる予後不良疾患である。早期診断例に対しては視機能を温存する種々の治療法が存在するが、治療後の眼内局所再発や遠隔転移に対する有効な治療法はいまだ存在せず、有効な薬物療法の確立が急務となっている。これに対して本課題では、すでにヒトに対する安全性が知られている薬剤CEP1347がその臨床濃度域においてぶどう膜悪性黒色腫細胞に対して選択的にp53を活性化し増殖を抑制する作用を有することを明らかにしており、ぶどう膜悪性黒色腫治療薬の新たな有力候補を見出したという点において医学・医療に貢献するものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this project, we examined the effects of a novel MDM4 inhibitor CEP1347 on uveal melanoma (UM) cells. We found that CEP1347 reduced the expression of MDM4, activated p53, and inhibited the viability of UM cells without affecting that of normal cells in its clinical concentration range. We also found that CEP1347 inhibited the activity of protein kinase C (PKC) in UM cells. Unexpectedly, we uncovered a novel mechanism in UM cells in which MDM4 and PKC cooperate to control the activity of p53.

研究分野：眼科

キーワード：ぶどう膜悪性黒色腫

1. 研究開始当初の背景

ぶどう膜悪性黒色腫は(uveal melanoma: UM)はぶどう膜に局在するメラノサイトを起源とし、約90%以上は脈絡膜に、7%は毛様体に、残りの3%は虹彩に発生する。本邦においても年間百万人当たり0.6人の新規発症者が報告されており、成人の原発性眼内悪性腫瘍の中では最も頻度が高く、その転帰として視機能を失うのみならず死に至る予後不良な疾患である。早期に診断された場合は、光凝固療法、温熱療法、放射線治療、重粒子線療法、局所切除術などの視機能を温存した治療法が検討される。しかし、放射線治療適応外の巨大腫瘍、続発性緑内障による眼痛、視神経浸潤などでは眼球摘出の適応となる。また肝臓などに転移した症例ではダカルバジンなど化学療法が適応となるがその効果は低く、近年海外で行われた免疫チェックポイント阻害薬とダカルバジンによる治療成績の比較では大差がない(Cancer 2016, 122:3344)。このように、現在UMの治療後の眼内局所再発や遠隔転移に対する有効な治療法は存在しないため、予後改善を目指してその確立が急務である。

皮膚悪性黒色腫は、KIT, BRAF, NRASなどの遺伝子変異が知られており、特にBRAF阻害剤やその下流因子のMEK阻害剤は臨床応用され、免疫チェックポイント阻害剤とともに皮膚悪性黒色腫の標準的治療薬となっている。一方でUMは皮膚悪性黒色腫に見られるような遺伝子変異は報告されておらず、免疫チェックポイント阻害剤の効果も期待できない(Cancer 2016, 122:3344)。UMにおける遺伝子変異についてはいくつかの報告が存在する。そのうち、最も重要な遺伝子変異として、三量体Gタンパク質をコードするGNAQ/GNA11が常時活性化型となる変異があり、下流のprotein kinase C (PKC)およびMAPK経路などを恒常的に活性化することでUMの発症・転移に関与すると考えられている(N Engl J Med 2010, 363:2191)。その一方、UMでは代表的ながん抑制遺伝子p53の変異は稀ではあるが、p53の負の制御因子であるMDM4の発現が高く、p53は機能的に抑制されることから細胞周期制御が崩壊し異常増殖が引き起こされている。このMDM4発現を遺伝子的に抑制することでUMの細胞増殖を抑制可能であること(Am J Cancer Res 2012, 2:492)、さらにMDM4を抑制しつつGNAQ/GNA11の下流因子の一つであるPKCを共に抑制することでよりUMの細胞増殖を抑制可能であることが近年報告された(Oncogenesis 2018, 7:33)。しかしながらヒトに対して安全にMDM4やPKCを抑制可能な薬剤は現状存在しない。これらの背景から本研究課題の研究代表者はMDM4およびPKCを安全に抑制することがUM治療に有用ではないかとの仮説を得るに至った。

一方、研究代表者はこれまでに、ドラッグリポジショニングという既存の承認薬や臨床試験で安全性が確認されたが有効性が確認されなかった薬剤について、別の適応疾患を見出すことで開発コスト・時間を大幅に削減できる手法を用いて、安全かつ有効な薬剤を探索・研究し成果を上げてきた(Anticancer Res 2020, 8:4961; Oncotarget 2017, 8:94872)。中でもパーキンソン症治療薬として開発され臨床的安全性は確認されたが、期待された効果が見いだされなかったmixed lineage kinase (MLK)阻害薬CEP1347に着目し、CEP1347が網膜芽細胞腫のMDM4発現量を減少させ、それに伴い、p53発現を亢進させることで増殖抑制を引き起こすことを見出した(Anticancer Res 2020, 8:4961)。このMLKはMAPK経路を活性化すること、三量体Gタンパクの下流で活性化するPKCの下流でMLK経路が活性化すること(Mol Cell 2007, 27:498)が知られている。

2. 研究の目的

以上の背景を踏まえて本課題では、以下に挙げる

- 1) CEP1347はUMの増殖能を抑制可能か？
 - 2) CEP1347によるUMの増殖抑制はどのような分子機序で引き起こされるか？
- などの「問い」に答えることを通じて、現状有効な薬剤が存在しないぶどう膜悪性黒色腫(UM)に対する安全な治療薬の開発及び治療法の確立を目的とする。

3. 研究の方法

実験にはUM細胞株92.1、Mel202の他、独自に患者腫瘍組織から樹立したUM-Y01を用いた。

薬剤が細胞の増殖・生存に及ぼす効果についてはWST法(=生細胞のミトコンドリア代謝活性を吸光代謝物質により比色定量)や色素排除法を用いて検討した。薬剤が遺伝子・タンパク発現に及ぼす影響についてはRT-PCR法、ウエスタンブロット法により検討を行なった。

4. 研究成果

本課題では以下の如く、当初の計画を超える具体的な成果を得ることができた。

まず各種UM細胞をCEP1347で処理したところ、臨床的妥当性のある濃度域内で濃度依存的に増殖が抑制され、細胞死が誘導されることが確認された。一方、UM細胞の増殖を明らかに抑制する濃度のCEP1347によっても正常線維芽細胞であるIMR90の増殖は抑制されなかった。また、この時の細胞内のp53経路の状態について調べたところ、CEP1347はUM細胞の増殖を抑制する濃度域でMDM4タンパクの発現を濃度依存的に抑制するとともにp53タンパクの発現

レベルを上昇させた。加えて転写活性化因子である p53 の標的遺伝子産物として知られる p21、MDM2 の発現も CEP1347 により p53 依存的に誘導されたことから、CEP1347 は正常細胞の増殖に影響しない臨床的妥当性のある濃度域で p53 活性を高めていることが明らかとなった。

以上の知見に加え本研究課題では、CEP1347 が正常細胞に対する毒性の見られない、臨床的妥当性のある濃度域で各種 PKC の活性を抑制していること、さらには PKC 活性の抑制が MDM4 抑制と協調的に p53 を活性化することを見出した。これはすなわち、CEP1347 が従来知られていた MDM4 発現抑制のみではなく、同時に PKC 抑制を行うことで効率良く UM 細胞における p53 活性化を誘導している可能性を意味しているものと考えられた。

尚、研究計画時には PKC は MAPK 経路を介して p53 経路とは別個に UM 細胞の増殖に寄与しているものと想定しており、PKC が p53 経路と相互作用することは全くの想定外であった。これに対して研究期間を延長した最終年度の検討から上記の通り PKC が MDM4 とともに p53 制御に関わっているという全くの新知見を得ることができたということは特筆に値するものと考えられる。

以上をまとめると、本研究を通じて、CEP1347 が UM 細胞において MDM4 に加え PKC を標的とすることで UM 細胞選択的に p53 活性化・増殖抑制効果を示す薬剤であり、UM 治療薬候補の一つとして有望であることを示すことができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 9件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Nakagawa-Saito Y, Mitobe Y, Togashi K, Suzuki S, Sugai A, Kitanaka C, Okada M.	4. 巻 43(3)
2. 論文標題 Givinostat Inhibition of Sp1-dependent MGMT Expression Sensitizes Glioma Stem Cells to Temozolomide.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Anticancer Res.	6. 最初と最後の頁 1131-1138.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticancerres.16258.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Mitobe Y, Nakagawa-Saito Y, Togashi K, Suzuki S, Sugai A, Matsuda KI, Sonoda Y, Kitanaka C, Okada M.	4. 巻 42(10)
2. 論文標題 CEP-1347 Targets MDM4 Protein Expression to Activate p53 and Inhibit the Growth of Glioma Cells.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Anticancer Res.	6. 最初と最後の頁 4727-4733.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticancerres.15977.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Okada M, Nakagawa-Saito Y, Mitobe Y, Sugai A, Togashi K, Suzuki S, Kitanaka C.	4. 巻 7;23(15)
2. 論文標題 Inhibition of the Phospholipase C -c-Jun N-Terminal Kinase Axis Suppresses Glioma Stem Cell Properties.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci.	6. 最初と最後の頁 8785
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms23158785.	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 Nakagawa-Saito Y, Saitoh S, Mitobe Y, Sugai A, Togashi K, Suzuki S, Kitanaka C, Okada M.	4. 巻 23(15)
2. 論文標題 HDAC Class I Inhibitor Domatinostat Preferentially Targets Glioma Stem Cells over Their Differentiated Progeny.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci.	6. 最初と最後の頁 8084
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms23158084.	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 SUZUKI SHUHEI, YAMAMOTO MASAHIRO, SANOMACHI TOMOMI, TOGASHI KEITA, SEINO SHIZUKA, SUGAI ASUKA, YOSHIOKA TAKASHI, OKADA MASASHI, KITANAKA CHIFUMI	4. 巻 41
2. 論文標題 Lurasidone Sensitizes Cancer Cells to Osimertinib by Inducing Autophagy and Reduction of Survivin	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 4321 ~ 4331
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticanres.15237	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Suzuki Shuhei, Yamamoto Masahiro, Sanomachi Tomomi, Togashi Keita, Sugai Asuka, Seino Shizuka, Yoshioka Takashi, Okada Masashi, Kitanaka Chifumi	4. 巻 11
2. 論文標題 Dexamethasone Sensitizes Cancer Stem Cells to Gemcitabine and 5-Fluorouracil by Increasing Reactive Oxygen Species Production through NRF2 Reduction	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Life	6. 最初と最後の頁 885 ~ 885
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/life11090885	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 Yamamoto Masahiro, Sanomachi Tomomi, Suzuki Shuhei, Togashi Keita, Sugai Asuka, Seino Shizuka, Sato Atsushi, Okada Masashi, Kitanaka Chifumi	4. 巻 3
2. 論文標題 Gemcitabine radiosensitization primes irradiated malignant meningioma cells for senolytic elimination by navitoclax	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neuro-Oncology Advances	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) 10.1093/oaajnl/vdab148	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 Okada Masashi, Suzuki Shuhei, Togashi Keita, Sugai Asuka, Yamamoto Masahiro, Kitanaka Chifumi	4. 巻 22
2. 論文標題 Targeting Folate Metabolism Is Selectively Cytotoxic to Glioma Stem Cells and Effectively Cooperates with Differentiation Therapy to Eliminate Tumor-Initiating Cells in Glioma Xenografts	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 11633 ~ 11633
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms222111633	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 Yamamoto Masahiro, Suzuki Shuhei, Togashi Keita, Sugai Asuka, Okada Masashi, Kitanaka Chifumi	4. 巻 14
2. 論文標題 Gencitabine Cooperates with Everolimus to Inhibit the Growth of and Sensitize Malignant Meningioma Cells to Apoptosis Induced by Navitoclax, an Inhibitor of Anti-Apoptotic BCL-2 Family Proteins	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 1706 ~ 1706
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers14071706	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 Nakagawa-Saito Yurika, Mitobe Yuta, Suzuki Shuhei, Togashi Keita, Sugai Asuka, Kitanaka Chifumi, Okada Masashi	4. 巻 24
2. 論文標題 Domatinostat Targets the FOXM1/Survivin Axis to Reduce the Viability of Ovarian Cancer Cells Alone and in Combination with Chemotherapeutic Agents	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 10817 ~ 10817
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms241310817	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Mitobe Yuta, Suzuki Shuhei, Nakagawa-Saito Yurika, Togashi Keita, Sugai Asuka, Sonoda Yukihiko, Kitanaka Chifumi, Okada Masashi	4. 巻 15
2. 論文標題 Antagonizing MDM2 Overexpression Induced by MDM4 Inhibitor CEP-1347 Effectively Reactivates Wild-Type p53 in Malignant Brain Tumor Cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 4326 ~ 4326
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers15174326	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Togashi Keita, Suzuki Shuhei, Mitobe Yuta, Nakagawa-Saito Yurika, Sugai Asuka, Takenouchi Senri, Sugimoto Masahiko, Kitanaka Chifumi, Okada Masashi	4. 巻 16
2. 論文標題 CEP-1347 Dually Targets MDM4 and PKC to Activate p53 and Inhibit the Growth of Uveal Melanoma Cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 118 ~ 118
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers16010118	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	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
--	---------------------------	-----------------------	----

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