

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 24 日現在

機関番号：82504

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591185

研究課題名(和文) 遺伝子医薬等による p53 経路の活性化と抗がん剤による悪性中皮腫に対する治療法開発

研究課題名(英文) Activation of the p53 pathway by gene medicine and a chemotherapeutic agent produces anti-tumor effects on human mesothelioma cells

研究代表者

新行内 雅斗 (Masato, Shingyoji)

千葉県がんセンター(研究所)・その他部局等・その他

研究者番号：60450433

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000 円

研究成果の概要(和文)：悪性中皮腫は各種治療法に抵抗性を示し、極めて予後が不良の難治性腫瘍の一つである。この悪性中皮腫の大部分には特徴的な遺伝子欠損があり、その結果代表的ながん抑制遺伝子であるp53とpRbがともに機能的に欠損となっている。そこで、この遺伝子欠損を突いて、p53経路の活性化の有用性について検討した。複数のアデノウイルスベクターを使用してp53経路を活性化させると、当該細胞はアポトーシスの陥り、p53のリン酸化とpRbの脱リン酸化が生じていた。また、悪性中皮腫細胞は、低分子G蛋白質のプレニル化を阻害するビスフォスフォネートに著しく感受性で、同薬剤処理でp53経路が活性化し、細胞死が誘導されていた。

研究成果の概要(英文)：We examined a possible therapeutic strategy for mesothelioma, which is linked with asbestos exposure. A major genetic characteristic of the clinical specimens is a deletion of p14 and p16 genes, which subsequently inactivate the p53 and the pRb pathways. We thereby targeted the p53 pathway and reconstituted the functions by gene transduction with a few kinds of adenovirus vectors. The adenovirally transduced cells showed apoptotic cell death accompany by phosphorylation of p53 and dephosphorylation of pRb. We also found that bisphosphonates, commonly used for malignancy-linked hypercalcemia and for osteoporosis, was highly cytotoxic to mesothelioma. The agent is inhibits prenylation of small G proteins and subsequently suppress the functions. The cells treated with bisphosphonates were subjected to apoptotic cell death with activation of the p53 pathways.

研究分野：呼吸器内科

キーワード：悪性中皮腫 アデノウイルス p53経路 アポトーシス ビスフォスフォネート

1. 研究開始当初の背景

悪性中皮腫は多くの場合、職業性の石綿暴露後平均 38 年を経て発症する疾患である。その発症の機序は不明で、石綿暴露後に当該疾患を予防する方法はなく、また当該症状に明確なものもなく早期発見が難しい。また、現在の治療成績は決して満足すべきものではない。早期症例では外科的手術も可能であるが、胸膜と片肺をすべて切除する方法は、術後患者の quality of life を著しく悪化させる。また、多くの当該症例で再発が見られ、術後の成績は不良をいわざるを得ない。放射線治療は照射野が広汎な範囲に及ぶため、有害事象が多く発生し、実際問題として実施は難しく、当該治療は姑息的手段に限られている。したがって、治療の主流は抗がん剤であるが、第一選択薬であるシスプラチンとペメトレキセドの併用であっても、平均生存期間は 1 年余に過ぎず、第二選択薬は知られていない。しかもこの状況は過去 10 年以上にわたっても変化がない状況である。したがって、従来の枠組みに囚われず、新規治療法を目指すことも現在の医療にとって必要なことである。

2. 研究の目的

(1) 悪性中皮腫の遺伝的特性：

悪性中皮腫は特徴的な遺伝子欠損が知られている。それは染色体 9 番目の INK4a/ARF 領域の欠損であり、その結果 p14 と p16 遺伝子が消失している。両遺伝子は MDM2 および CDK を介して p53 と pRb 分子の機能に影響を与えているが、当該遺伝子の欠損は p53 経路の機能的な消失と pRb の恒常的なリン酸化を引き起こし、DNA 傷害等に対する修復や細胞周期の停止に関する機能が失活する事態に陥っている。この代表的な 2 つの遺伝子の機能不全が、悪性中皮腫の抗がん剤耐性に関与していると考えられる。

(2) p53 経路の活性化：

上記の遺伝的特性を標的化し当該機能欠損を突くためには、p53 分子の発現が重要である。すなわち、p53 発現によって p21 分子が誘導され、当該分子によって CDK 活性が抑制され、pRb 分子の脱リン酸化がおこると想定されるからである。また、p53 経路の活性化は抗がん剤に対する感受性を向上させるはずで、これを考慮すると p53 分子の発現が悪性中皮腫の治療にとっていわばコーナーストーンに相当するはずである。

(3) ビスフォスフォネート：

同薬剤は、悪性腫瘍に伴う高カルシウム血症の治療薬であり、米国では骨粗鬆症にも適用されている。この薬剤は低分子 G 蛋白質のプレニル化を阻害するため、当該蛋白が細胞質から細胞膜に移行できず、同分子の機能が消失する。この薬剤は意外なことに、他の腫瘍に比較して悪性中皮腫細胞に強い細胞傷害活性を有していた。

(4) 研究目的：

本研究ではいくつかの方法で、p53 経路の活性化を悪性中皮腫に惹起させ、細胞死の状況を検討するとともに、低分子化合物であるビスフォスフォネートの細胞死誘導についても検討し、両者が DNA 損傷を誘導する抗がん剤等と併用効果があるのかどうかについて検討する。

3. 研究の方法

(1) アデノウイルスの作成：

本研究では 2 種類のベクター系を作成した。一つは p53 遺伝子を発現する Ad-p53 であり、もう一つは E1B55kDa 分子を欠損させた Ad-E1B55 である。ともに通常のキットを用いて作成したタイプ 5 型ベクターで、Ad-p53 は非増殖型であり、Ad-E1B55 は E1A 領域遺伝子が当該ウイルスの転写調節領域で活性化される増殖型である。なお、対照として、 β -galactosidase 遺伝子を発現する Ad-LacZ も合わせて作成した。

(2) 細胞傷害活性：

ヒト悪性中皮腫細胞を 96 穴プレートに播き、アデノウイルスあるいは薬剤を感染・投与し、一定の時間後に WST 試薬を反応させて、吸光度を測定した。未感染・未処理の細胞の吸光度を 100% として処理群の吸光度より、細胞傷害活性を検出した (WST アッセイ法)。

(3) ウエスタンブロット法：

アデノウイルスあるいは薬剤を感染・投与した悪性中皮腫細胞を溶解し、通常の方法で sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis を実施後、ナイロンフィルターに蛋白質をプロットし、一次抗体で反応させた後、ECL 試薬により発色させた。

(4) 細胞周期の測定：

アデノウイルスあるいは薬剤を感染・投与した悪性中皮腫細胞を 70% アルコールで固定した後、RNase で処理し、propidium iodide を用いて DNA を染色し、CellQuest ソフト (BD Biosciences 社) を利用したセル・ソータで解析した。

(5) 相乗効果の解析：

併用効果の解析には CalcuSyn ソフト (Biosoft 社) を使用した。当該ソフトの解析では、combination index (CI) が 1 以上では相乗効果、1 未満では相加効果、1 未満では相乗効果であること意味している。

4. 研究成果

(1) アデノウイルスによる p53 発現の効果：

Ad-p53 を悪性中皮腫細胞に感染させて、WST 法により細胞傷害活性を検討すると、アデノウイルスの受容体が発現していない細胞を除いては、使用したウイルス量に応じて細胞傷害活性が誘導されていた。この細胞傷害活性は、p53 遺伝子タイプによらず誘導されることが判明した。また Ad-E1B55 を悪性中皮腫に感染させると、Ad-p53 の場合と同様にウイルス受容体発現がない細胞以外には、細胞

傷害活性を惹起したが、対照として使用した Ad-LacZ 感染細胞は、ほとんど細胞傷害活性を示すことはなかった。

(2) p53 発現による細胞死の検討：

Ad-p53 感染細胞が細胞死を誘導するかどうかを検討した。当該感染細胞は時間経過とともに sub-G1 分画が増加し、ウエスタンブロット法で検討すると、caspase および PARP の cleavage が観察され、アポトーシスが生じていた。また同時に p53 分子のリン酸化、pRb 分子の脱リン酸化も生じていた。さらに Ad-E1B55 が感染した細胞も同様な分子変化が生じ、アポトーシスが誘導されていることが判明した。但し、Ad-E1B55 は増殖性ウイルスのためか、細胞周期で 4N 以上の分画が増加しており、時間経過とともに当該分画は sub-G1 分画に移行した。この 4N 以上の分画は Ad-p53 感染細胞では観察されなかった。

(3) ビスフォスフォネートによる細胞傷害活性：

同薬剤を 9 種類の悪性中皮腫細胞に処理すると、細胞傷害活性が誘導された。この活性は p53 の遺伝子型とは関係しなかったが、ヒト膀胱がん細胞と比較してより低濃度で殺細胞効果が観察された。このとき、p53 遺伝子が野生型の細胞の場合、p53 分子の発現上昇と同分子のリン酸化が誘導されていた。細胞周期を検討すると、多くの細胞で sub-G1 分画の増加が観察され、アポトーシスが惹起されたことが判明した。しかし、この細胞株をあらかじめ p53 の siRNA で処理し p53 発現を低下させても、ビスフォスフォネートによる細胞傷害活性は変化せず、当該薬剤による細胞死には p53 経路は関与していないことが判明した。

(4) 動物実験による効果：

悪性中皮腫細胞のなかで MSTO-211H 細胞は、ヌードマウスの胸腔内に腫瘍を形成することが可能である。その当該実験モデルを使用して、アデノウイルスおよびビスフォスフォネートの抗腫瘍効果を検討した。上記細胞を胸腔内に投与後、Ad-p53 あるいはビスフォスフォネートをさらに胸腔内に投与すると、腫瘍形成は抑制され、一カ月後の腫瘍重量は当該処理群で、未処理群に比較して減少していた。すなわち、アデノウイルスおよびビスフォスフォネートとも、その抗腫瘍効果が in vivo においても実証された。

(5) アデノウイルスベクターと抗がん剤との併用効果：

Ad-p53 と悪性中皮腫の第一選択薬であるシスプラチンあるいはペメトレキセドを併用して、その細胞傷害活性を検討した。その結果、fraction affected が 0.2 から 0.8 の範囲において、Ad-p53 は、シスプラチンあるいはペメトレキセドのいずれの組み合わせに

おいても CI 値が 1 以下となり、両者は相乗効果を示すことが判明した。

(6) ビスフォスフォネートと抗がん剤との併用効果：

ビスフォスフォネートの細胞傷害活性は、p53 依存的ではなかったが、p53 発現を上昇させたので、同薬剤とシスプラチンとの併用効果を検討した。その結果はやり fraction affected が 0.2 から 0.8 の範囲において、両者の併用は CI 値より相乗効果を示すことが判明した。すなわち、ビスフォスフォネート処理による p53 分子の発現上昇は、それ自体の細胞傷害活性はなかったものの、シスプラチンへの感受性を亢進させていた。

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 11 件)

Zhong, B., Ma, G., Sato, A., Shimoizato, O., Liu, H., Li, Q., Shingyoji, M., Tada, Y., Tatsumi, K., Shimada, H., Hiroshima, K. and Tagawa, M.: Fas ligand DNA enhances a vaccination effect by coadministered DNA encoding a tumor antigen through augmenting production of antibody against the tumor antigen. J Immunol Res. Volume 2015, Article ID 743828, <http://dx.doi.org/10.1155/2015/743828>

Shingyoji, M., Nakajima, T., Yoshino, M., Yoshida, Y., Ashinuma, H., Itakura, M., Tatsumi, K. and Iizasa, T.: Endobronchial ultrasonography for positron emission tomography and computed tomography-negative lymph node staging in non-small cell lung cancer. Ann Thorac Surg. 98:1762-1767, 2014. doi: 10.1016/j.athoracsur.2014.05.078.

Okamoto, S., Jiang, Y., Kawamura, K., Shingyoji, M., Tada, Y., Sekine, I., Takiguchi, Y., Tatsumi, K., Kobayashi, H., Shimada, H., Hiroshima, K. and Tagawa, M.: Zoledronic acid induces apoptosis and S-phase arrest in mesothelioma through inhibiting Rab family proteins and topoisomerase II actions. Cell Death Dis. 5: e1517, 2014. doi: 10.1038/cddis.2014.475.

Zhang, M., Kawamura, K., Jiang, Y., Shingyoji, M., Ma, G., Li, Q., Hu, J., Qi, Y., Liu, H., Zhang, F., Kang, S., Shan, B., Wang, S., Chada, S. and Tagawa, M.: Heat-shock protein 90 inhibitors synergistically enhance melanoma differentiation-associated gene-7-mediated cell killing of human pancreatic carcinoma. Cancer Gene Ther. 20: 663-670, 2013. doi:10.1038/cgt.2013.66

Kawamura, K., Hiroshima, K., Suzuki, T., Chai, K., Yamaguchi, N., Shingyoji, M., Yusa, T., Tada, Y., Takiguchi, Y., Tatsumi, K., Shimada, H. and Tagawa, M.: CD90 is a diagnostic marker to differentiate between malignant pleural mesothelioma and lung carcinoma with immunohistochemistry. *Am. J. Clin. Pathol.* 140:544-549; 2013.

doi:10.1309/AJCPM2Z4NGIIPBGE

Li, Q., Kawamura, K., Yang, S., Okamoto, S., Kobayashi, H., Tada, Y., Sekine, I., Takiguchi, Y., Shingyoji, M., Tatsumi, K., Shimada, H., Hiroshima, K. and Tagawa, M.: Interferon- β produces synergistic combinatory anti-tumor effects with cisplatin or pemetrexed on mesothelioma cells. *PLoS ONE.* 8: e72709, 2013. doi:10.1371/journal.pone.0072709

Okamoto, S., Jiang, Y., Kawamura, K., Shingyoji, M., Fukamachi, T., Tada, Y., Takiguchi, Y., Tatsumi, K., Shimada, H., Hiroshima, K., Kobayashi, H. and Tagawa, M.: Zoledronic acid produces combinatory anti-tumor effects with cisplatin on mesothelioma by increasing p53 expression levels. *PLoS ONE* 8; e60297, 2013. doi:10.1371/journal.pone.0060297

Yamanaka, M., Tada, Y., Kawamura, K., Li, Q., Okamoto, S., Chai, K., Yokoi, S., Liang, M., Fukamachi, T., Kobayashi, H., Yamaguchi, N., Kitamura, A., Shimada, H., Hiroshima, K., Takiguchi, Y., Tatsumi, K. and Tagawa, M.: E1B-55kD-defective adenoviruses activate p53 in mesothelioma and enhance cytotoxicity of anti-cancer agents. *J. Thorac. Oncol.* 7: 1850-1857, 2012. doi: 10.1097/JTO.0b013e3182725fa4.

Kitazono-Saito, M., Takiguchi, Y., Kitazono, S., Ashinuma, H., Kitamura, A., Tada, Y., Kurosu, K., Sakaida, E., Sekine, I., Tanabe, N., Tagawa, M. and Tatsumi, K.: Interaction and cross-resistance of cisplatin and pemetrexed in malignant pleural mesothelioma cell lines. *Oncol. Rep.* 28: 33-40, 2012. doi: 10.3892/or.2012.1799.

Okamoto, S., Kawamura, K., Li, Q., Yamanaka, M., Yang, S., Fukamachi, T., Tada, Y., Tatsumi, T., Shimada, H., Hiroshima, K., Kobayashi, H. and Tagawa, M.: Zoledronic acid produces antitumor effects on mesothelioma through apoptosis and S-phase arrest in p53-independent and Ras prenylation-independent manners. *J. Thorac. Oncol.* 7; 873-882, 2012. doi: 10.1097/JTO.0b013e31824c7d43.

Li, Q., Kawamura, K., Okamoto, S., Yamanaka, M., Yang, S., Yamauchi, S., Fukamachi, T., Kobayashi, H., Tada, Y.,

Takiguchi, Y., Tatsumi, K., Shimada, H., Hiroshima, K. and Tagawa, M.: Upregulated p53 expression activates apoptotic pathways in wild-type p53-bearing mesothelioma and enhances cytotoxicity of cisplatin and pemetrexed. *Cancer Gene Ther.* 19: 218-228, 2012. doi:10.1038/cgt.2011.86.

〔学会発表〕(計9件)

Masatoshi Tagawa, Masato Shingyoji その他: A small molecule that inhibits p53 degradation influences cytotoxicity of Ad-p53 in INK4A/ARF-defective mesothelioma with wild-type p53 gene. 17th annual meeting of American Society of Gene and Cell Therapy, May 22, 2014, Washington DC USA

Masatoshi Tagawa, Masato Shingyoji, その他: Activation of p53 pathways with adenoviruses bearing the p53 gene and an inhibitor for the interaction between Mdm2 and p53 produces synergistic cytotoxicity in mesothelioma. The 12th international conference of the international mesothelioma interested group, October 23, 2014, Cape Town, South Africa

田川雅敏, 新行内雅斗, その他: アデノウイルス製剤を用いた悪性中皮腫に対する遺伝子治療の実施にむけて 第21回石綿・中皮腫研究会 平成26年10月11日、名古屋市

Masatoshi Tagawa その他: Anti-tumor effects of Ad-p53 on INK4A/ARF-defective mesothelioma are influenced positively by small G protein inhibitors but negatively by heat shock protein 90 inhibitors. 16th annual meeting of American Society of Gene and Cell Therapy, May 26, 2013, Salt Lake City USA

Masatoshi Tagawa その他: Activation of p53 pathways produces combinatory effects with chemotherapeutic agents on p53 wild-type mesothelioma. 19th annual meeting of Japan Society of Gene Therapy, July 5, 2013, Okayama

Masatoshi Tagawa その他: Cytotoxicity of replication-competent adenoviruses are enhanced by co-transduced p53 gene. 21th Annual Congress of the European Society of Gene and Cell Therapy, October 26, 2013, Madrid, Spain

Masatoshi Tagawa, Masato Shingyoji その他: Reactivation of p53-mediated pathways induces apoptosis in mesothelioma with wild-type p53 gene and produces combinatory synergistic effects with anti-cancer agents. The 11th international conference of the international mesothelioma interested

group, September 13, 2012, Boston, USA
Yuji Tada Masatoshi Tagawa その他 :
Zoledronic acid, the third generation of
bisphosphonates, produces anti-tumor
effects on mesothelioma in vitro and in
vivo through apoptosis or S phase arrest
in p53-independent and Ras
prenylation-independent manners. The 11th
international conference of the
international mesothelioma interested
group, September 14, 2012, Boston, USA

Masatoshi Tagawa, Masato Shingyoji, その他 :
A small G protein inhibitor,
bisphosphonates, produces synergistic
cytotoxicity on wild-type p53-bearing
mesothelioma with adenoviruses
up-regulating the p53 expression level.
20th Annual Congress of the European
Society of Gene and Cell Therapy, October
26, 2012, Versailles, France
〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

新行内 雅斗 (SHINGYOJI Masato)

千葉県がんセンター(研究所)・呼吸器内

科・部長

研究者番号 : 60450433

(2)研究分担者

田川 雅敏 (TAGAWA Masatoshi)

千葉県がんセンター(研究所)・がん治療

開発グループ・部長

研究者番号 : 20171572

(3)連携研究者

なし