

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24650642

研究課題名(和文)変異p53に特異的な治療標的の発見

研究課題名(英文)Search of mutant p53-specific target of cancer cells

研究代表者

石岡 千加史(Ishioka, Chikashi)

東北大学・加齢医学研究所・教授

研究者番号：60241577

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：この研究は、ヒトがんを高頻度に見られる変異p53特異的に細胞死を引き起こす標的分子を発見することが目的である。ヒト悪性腫瘍で高頻度変異であるR175H変異p53を誘導発現するSF126細胞にレンチウイルスshRNAライブラリーにより網羅的に遺伝子発現をノックダウンし、R175H変異p53特異的細胞死遺伝子としての候補遺伝子を複数発見した。個々の候補遺伝子に対応するsiRNAを導入し、真に変異p53特異的に細胞死を引き起こす遺伝子としてID1遺伝子を同定した。将来、ID1遺伝子産物の阻害薬の開発に成功すれば、臓器横断的な新しいがん薬物療法の開拓に貢献しうる。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to find out a synthetic lethal/sickness gene for cancer cells expressing R175H mutant p53, a most frequent mutation in human cancer. A lentiviral shRNA library was transfected in SF126 cells expressing R175H mutant p53 and multiple candidate synthetic lethal/sickness genes against R175H mutant p53 were isolated. One of genes, ID1, truly introduced synthetic lethal/sickness in SF126 by a lentivirus-mediated knockdown by ID1 shRNA. In future, development of ID1 inhibitor might contribute a new era of anti-cancer drugs.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・臨床腫瘍学

キーワード：変異p53 合成致死

1. 研究開始当初の背景

(1) 国内・国外の研究動向及び位置づけ

発癌過程で重要な TP53 遺伝子の変異は全癌の約 50%に見つかる。一般的に変異を有する癌は予後不良で抗がん剤抵抗性である。変異スペクトラムはがん発生臓器による特異性がほとんどなく、その 75%は 1 塩基置換によるミスセンス変異である。変異は、p53 タンパク質の機能消失 (loss-of-function) だけでなく、がん遺伝子産物のように細胞核に過剰発現する変異 p53 タンパク質による獲得機能 (gain-of-function) が明らかにされている。しかし、未だ治療成績を飛躍的に向上させる p53 関連治療法は誕生していない。一方、従来の細胞シグナル伝達経路以外の分子標的探索で注目すべき海外研究として、がん抑制遺伝子 BRCA1 や BRCA2 変異陽性がん細胞に対する PARP 阻害剤による細胞死 (合成致死) の発見 (Farmer ら Nature, 2005) とその早期臨床開発の成功 (Fong ら N Engl J Med, 2009) がある。また、shRNA ライブラリーによる網羅的遺伝子発現ノックダウンにより、がん遺伝子 KRAS 変異陽性がん細胞に対する合成致死遺伝子の発見例 (Luo ら Cell, 2009) がある。

(2) 申請者らは、変異 p53 機能解析法の開発 (Nature Genet, 1993) と網羅的ミスセンス変異 (2,314 種類) 機能解析を行い (PNAS, 2003)、変異 p53 には温度感受性変異 (JBC 279:348-55, 2004) や野生型 p53 よりアポトーシス誘導能が強い変異体 (Cancer Res, 2005) が多数存在すること、がんを高頻度に見つかる変異 p53 の機能を回復する 2 次変異が存在すること (Int J Cancer, 2007)、p53 のアポトーシス誘導に分子シャペロンが必要なこと (Cancer Sci, 2009) 等、変異 p53 の機能的多様性を網羅的手法により明らかにした。そこで、がんを高頻度の変異 p53 に特異的に合成致死を引き起こす新規のがん分子標的をレンチウイルス shRNA ライブラリー

一網羅的遺伝子発現ノックダウン法により多数発見できるのではないかとの着想に至った。

2. 研究の目的

本研究の目的は、がんを高頻度に見つかる特定変異 p53 タンパク質 (以下、変異 p53) を発現するがん細胞に対して、変異 p53 特異的に細胞死を引き起こす標的分子を発見することである。

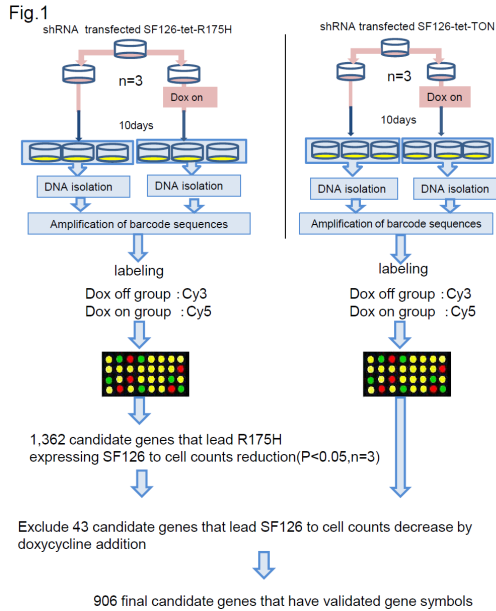
3. 研究の方法

変異 p53 (R175H, R248W, R273H) を誘導発現する SF126 細胞に対してレンチウイルス shRNA ライブラリーにより網羅的に遺伝子発現をノックダウンし、バーコードマイクロアレイでのスクリーニングを行い、変異 p53 特異的細胞死遺伝子としての候補遺伝子を複数発見する。個々の候補遺伝子に対応する siRNA を導入し、真に変異 p53 特異的に細胞死を引き起こす遺伝子を選択する。得られる変異 p53 特異的細胞死遺伝子が、変異 p53 を自然に発現する他の培養細胞でも細胞死を変異 p53 (R175H, R248W, R273H) 特異的に引き起こすか検証する。変異 p53 特異的な細胞死遺伝子のノックダウンがタンパク質発現抑制によって生じ、変異 p53 非発現時には起きないことを検証する (proof of concept)。

4. 研究成果

(研究協力者・今井 源氏の博士論文より引用)

(1) 変異型 p53 タンパク質 (R175H) 存在下で、非存在下に比して細胞数減少を生じる遺伝子の網羅的遺伝子抑制スクリーニング以前に構築した、SF126-tet-R175H および SF126-tet-TON を用いて 1 次スクリーニングを施行し (Fig. 1) $p < 0.05$ ($n=3$) の条件を満たして R175H 存在下 (ドキシサイクリン存在下) で細胞が減少しているバーコード配列から候補遺伝子を 1,362 個同定した。同時に、



ドキシサイクリン添加による影響を排除する目的で、SF126-tet-TON を使用し同様の実験を行い、ドキシサイクリン添加のみで細胞が減少している候補遺伝子 43 個を除外した。残りの 1319 個の候補遺伝子のうち gene symbol を有する遺伝子は 906 個であった。これらの遺伝子はドキシサイクリンによる細

Table 1.

一次スクリーニングにおける最終候補遺伝子と各遺伝子に対する siRNA 配列

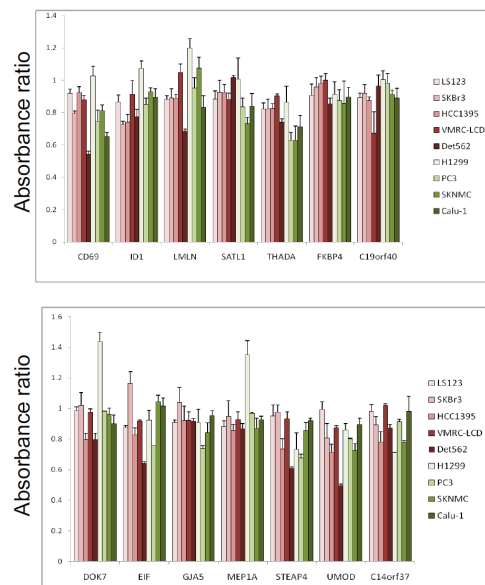
[smallest p-value]		
gene symbol	siRNA sense sequence	siRNA antisense sequence
UROS	CCTCTGTGGAAGCCAGCTTAA	TTAAGCTGGCTCCACAGAG
GYFC	GCTCAGAAGCAGTTGAAATAA	TTATTTCCAATCGTCTTGAGC
PRO1596	CGATGAATATCTCTGTGAATA	TATTCACAGAGATATTCATCG
CD69	GGAGCATTTTATAAATGGACAA	TTGTCCATTTATAAATGCTCC
PDXP	GGTACCAGTTTAGGTTCCCTAA	TTAGGAACCTAAACTGSGTACC
THADA	CGTACAGATGATTTCTGAAAT	ATTCCAGATCATCTGTAAAGCG
KCNJ10	GCAGATATCTTGGCCTGGTTA	TAACCAAGCCCAAGATATCTGC
ABCA12	CCAAATTCCTCCAACTGCAA	TTGCAAGTTGGAGAAATTTGG
UBA6	GCATTTGACTTGCCTTGAATA	TTTCAAGCCAGTAAACAAATGC
CD7	GCACCTTCAGCTCTGTTTATT	AATAACAGAGCTGAAAGTGC
ID1	GGAAATTCCTTGTATTTGAT	ATCAATCAAAAGCAATTTCC
CTBS	GGCTCTTATTATAACTATAA	TTATAGTTATAATAAGGAGCC
EIF2B3	CGGAGTGAACGATTCATAT	ATATGGAATCAGTTCACTCCG
UFM1	GGTAGCAAAAGTTACAGAAA	TTTCTGTAACACTTTGCTACC
PTCD1	CCTCGATGTGTTCAAGGAAAT	ATTTCTTGAACACATCGAGG
TPC2	GGAGCTCATGTTCCAGGATAT	ATATCCCTACAGGAGGCTCC
NEURL	GGGTAAACAATCTCCAGTAT	ATACTGGAGAAGTTGTTACCC
STEAP4	GCATATATTAGTTAAGTAT	ATACTTAACCTAATATAGTGC
C19orf40	GCATATTGGCCAAATGAGAA	TTCTCATTGGCCCAATATGCC
C19orf38	CCACCTTGATGATCACTCAG	CTGAGTGATCATCCAAGGTGC
C14orf37	GGAACTCCTTACAGCACTAA	TTAGTCTGTTAAGGAGTTCC
[largest fold change]		
gene symbol	siRNA sense sequence	siRNA antisense sequence
MGC42105	CCAGCTCAGCCCTTCAGAAA	TTCTCGAAGGGCGTCAAGCTGG
GF6	GGCTCCAGACGAGATCTCTAA	TTAGAGATCCGCTTGGAGGCC
BCL2L14	GCCTGTAGCTTCAAGTTCTAA	TTAGAACTTGAAGCTACAGGC
HILS1	GCCCAAGTGCCACTGCAATTA	TTAATTGCAAGTGGCACTTGGC
CLDND2	GAAAGATGCGTGAAGAACAA	TTGTCTTCCAGCGGATTTCTC
UMOD	CCACTGACACCTCAGAAGCAA	TTGCTCTGAGGTGTCAGTGG
RHAG	GGGCATATCTTTGAGTTATA	TATAAGCTAAAGAAATATGCC
GFR2	GCTACGAGTTTGAAGTGAAGAA	TTCTGACCTAAAGCTGTAGC
SATL1	AAGCATGGATTAATCTCAAA	ATTTGAAAGTAATCATGCTT
RTN4IP1	GCTGCAAGTGAATCTCTATA	TATAGGATTTACACTGGCAGC
DOK7	CCAAAGCGGATTCATCTTGA	TTCAAAGATGAATCCGCTGG
NUP98	GGCCAAAGGCTTACAACAAA	TTGTTTGAAGCCCTTTGGCC
PWWP2A	GCCATGCGCCCTCAAAAGTAA	ATTAATTTGGAGCGGATGGC
MEP1A	GCCTATAAGGCCATCATAGAA	TTCTATGATGGCCATATAGGC
CCT8B	TGGCTGAAGCTCTTGTACAT	ATGTAACAGAGCTTCAGCCA
PDXP	GGTACCAGTTTAGGTTCTCTAA	TTAGGAACCTAAACTGSGTACC
ZNF300	GCTAATATTAGCTTGTCTATA	TTATGACAGCTAAATATTAGC
DEFB125	AGAGATATACATTTGGAATTA	TAATCCAAATGTTATATCCCT
CJAS	CGTTTCTAATTAATCTAGAA	TTGTAGAATTAATGAGCAACG
EFNA4	CCATGTTCAATTCAGAGAA	TTCTTGAGCAATTTCAACACG
[double entry]		
gene symbol	siRNA sense sequence	siRNA antisense sequence
NINAT7	TCATCTGAAGTGTCACTGAAA	TTTAACTGACACTTCAGATGA
KLHL10	CTGTAGTACTTCAATGACAA	ATTTCTTCAAGTCACTCAAGC
LMNL	CCAGAGTGAACATGAGGTTA	TAACCTCATGTTCACTGTGG
FBXO22	TCCTCAAAATGAAGGAATA	TTATCTTCAATTTGAGGGA
ITGB7	GGACAGTAACTCTCTACAAA	TTGTAGAGAGGATTAATCTCC
CPN1	GGAAATGCAAGACTTTAATAT	ATAAATTAAGCTTCTGATTC
COLQ	GGCTACAATGCTCTCTCTCT	AAGAGGAAGAGCAATTTAGCC
AP3B2	GGATTGCACTGATGTTCTTAA	TTAAGACATCAGGTCGCAATCC
ANXA11	CGTGGTGAATGTCTCAAGAA	TTCTTGAGCAATTTCAACACG

胞毒性を除外し、発現抑制により R175H 発現時により強く細胞数減少を来し得る候補遺伝子と言える。これらの候補遺伝子中、p 値が上位の 21 個、細胞減少幅 (Fold change) が大きいもの 20 個を抽出した。さらに、同一遺伝子に対する異なる shRNA 配列で同様に細胞減少を来さず候補遺伝子も 9 個選択し、これらを合わせた 50 遺伝子を最終的な候補遺伝子とした (Table 1)。

(2) R175H 発現細胞と TP53 欠失細胞への候補遺伝子 siRNA 導入

個々の遺伝子発現を siRNA で抑制することにより R175H 依存的に細胞増殖抑制が生じるかを調べる目的で以下の解析実験を行った。当初、SF126-tet-R175H に合成した各 siRNA を導入し細胞増殖の変化を観察しようと考えたが、SF126 に GAPDH siRNA を数種類の濃度と時間で導入したが、GAPDH の発現抑制は観察できなかった (引用論文 1 . 参照)。また、内在性に R175H を発現している細胞において、SSL interaction を生じさせる候補遺伝子の探究を目的としているため、各 siRNA を R175H 発現細胞 (SKBr3, LS123, HCC1395, Detroit562, VMRC-LCD) と TP53 欠失細胞 (PC3, H1299, SK-N-MC, Calu-1) に導入し、非特異的 siRNA (ネガティブコントロール) を導入

Figure 3



した時と比べ、細胞数の減少が生じるかを調べた。30nM の GAPDH siRNA を 9 種類の細胞に作用させたところ、導入した全ての細胞において 2 日目以降に GAPDH が 70-80 % 発現抑制されたため (引用論文 1 . 参照)、各遺伝子特異的 siRNA は 30nM で導入し、各細胞数の変化を吸光度としてグラフに表した (Fig. 3)。次に、TP53 欠失細胞と R175H 発現細胞での吸光度について、R175H 発現細胞 (n=5) 対 TP53 欠失細胞 (n=4) の t 検定を行い、p 値の小さい 5 種類の候補遺伝子 (GYPC、NUP98、GP6、EFNA4、ID1) を選択した (Table 2)。

Table 2. R175H 内在細胞 (n=5) vs TP53 欠失細胞 (n=4) の細胞増殖抑制率における t 検定での上位 5 遺伝子と p 値

	Gene symbol	p-value
1	GYPC	0.002446
2	NUP98	0.029324
3	GP6	0.043416
4	EFNA4	0.055412
5	ID1	0.061552

(3) R175H を強制発現した TP53 欠失細胞における合成致死候補遺伝子発現抑制

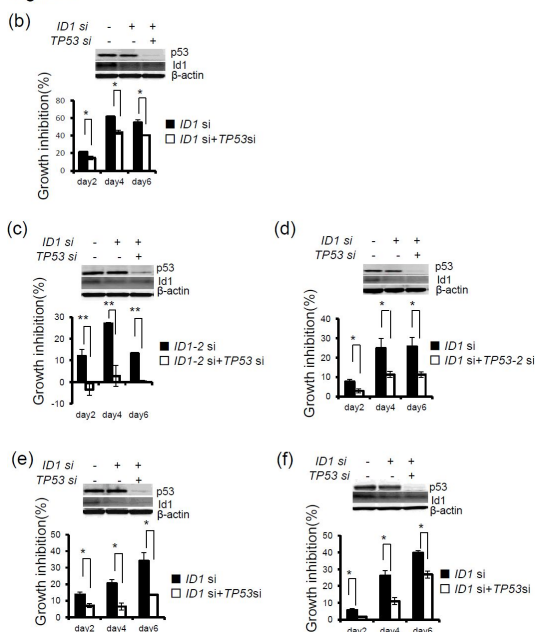
次に、候補遺伝子の発現抑制による細胞増殖抑制が R175H 依存性を解析するために、TP53 欠失細胞である PC3 に一過性に R175H を発現させ、さらに候補遺伝子の発現を抑制する実験を行った (引用論文 1 . 参照)。その結果、GYPC、NUP98、GP6 および EFNA4 の発現を抑制した場合には、R175H 存在下と非存在下で細胞増加抑制率に有意差は認められなかった。しかし、ID1 の発現を抑制すると、R175H 存在下では非存在下に比して有意に細胞増殖抑制率が上昇した。また、R175H 一過性発現と Id1 のタンパク質発現量の関係を調べたが、R175H 一過性発現により Id1 タンパク質の発現量は変化しなかった (引用論文 1 . 参照)。この結果から、R175H が Id1 のタンパク質発現量には影響を及ぼさず、ID1 発現抑制による細胞増殖抑制に寄与していることが示唆された。

(4) R175H 発現細胞における、SSL interaction 候補遺伝子と内在性変異 R175H 遺伝子の二重

発現抑制実験

一次スクリーニングにおいて、R175H 発現下で候補遺伝子を発現抑制した際、非発現下よりも細胞数が減少する候補遺伝子を選択してきたことから、逆に R175H 発現細胞で候補遺伝子発現抑制により減少した細胞数が、p53 siRNA を用いて内在性 R175H タンパク質の発現を抑制することにより回復するとの仮説を立て、次の実験を行った。SKBr3 細胞を用いて候補遺伝子と TP53 の二重発現抑制実験を行った結果、2 日目、4 日目、6 日目に、TP53 発現を抑制した状態と抑制しない状態でそれぞれ、細胞増殖抑制率を算出したところ、GYPC、NUP98、GP6、EFNA4 では目的とする細胞数回復は認められなかった (引用論文 1 . 参照) が、ID1 においては、TP53 の発現抑制により細胞増殖抑制の解除が認められた (Fig. 5b)。また、ID1 と TP53 に対する

Figure 5



siRNA に関し、配列の異なる siRNA (ID1-2、TP53-2) を用いて実験を施行し、同様の結果が得られたことから (Fig. 5c 5d)、観察した変化はオフターゲット効果ではなく ID1 特異的な現象と考えられた。さらに、同様の現象が R175H を発現する他の細胞 (LS123、HCC1395) においても認められるかについて、同様の実験を行った。その結果、ID1/TP53 の

二重発現抑制により減少した細胞数が、回復することが示された (Fig. 5e 5f)。また、野生型 p53 内在細胞である HCT116 と TP53 欠失細胞である PC3 を用いて同様の実験を施行したが、ID1/TP53 の二重発現抑制により細胞数の回復は認められなかった (引用論文 1 . 参照)。SKBr3 において TP53 発現抑制条件下での Id1 タンパク質発現量の変化は認めなかった (引用論文 1 . 参照)。これらの結果より、R175H が Id1 タンパク質の発現量に変化を及ぼさず、ID1 発現抑制により生じる細胞増殖抑制に寄与している事実がさらに支持された。

(5) 他の変異型 p53 (R273H) 発現下での ID1 発現抑制について

ID1 発現抑制による細胞増殖抑制には R175H が寄与していることが示唆されたため、他の変異型 p53 でも同様の結果が得られるか解析実験を行った。TP53 欠失細胞である PC3 にホットスポット変異である R273H を一過性に発現させ、同時に ID1 の発現を抑制したが、R273H の発現下と非発現下で ID1 発現抑制による細胞増殖抑制に有意差は認められなかった (引用論文 1 . 参照)。また R273H 発現細胞である HT-29 細胞と R273H と P309S の p53 二重変異をもつ SW480 細胞において ID1/TP53 の二重抑制実験を施行した。他の細胞と同様に ID1 発現抑制により細胞増殖は抑制されたが、TP53 発現抑制による細胞数の回復は認められなかった (引用論文 1 . 参照)。この結果、ID1 発現抑制による細胞増殖抑制は R175H により特異的に強められる可能性が示唆された。

(6) ID1 発現抑制及び ID1/TP53 二重発現抑制が細胞周期に及ぼす影響

R175H 存在下で ID1 の発現を抑制すると、非発現下と比して強く細胞数増加が抑制されることが示唆されたため、その機序を解明する目的で FACS 解析を行った (引用論文 1 . 参照)。その結果、R175H 内在細胞 (SKBr3)

野生型 p53 内在細胞 (HCT116) および TP53 欠失細胞 (PC3) で ID1 発現抑制により有意な S 期細胞数の減少と G1 期細胞数の増加が認められた。subG1 期の細胞数には全ての細胞において有意な変化は認められなかった。SKBr3 において、ID1 発現抑制により一旦減少した S 期の細胞数が、ID1/TP53 の二重抑制により有意に回復した。同時に ID1 発現抑制により一旦増加した G1 期分画の細胞が減少した。他方、HCT116 と PC3 では、ID1/TP53 二重発現抑制により、R175H 内在細胞において認められた変化は見られなかった (引用論文 1 . 参照)。この結果から、ID1 発現抑制による G1/S 期移行抑制の増強は R175H 特異的であることが示唆された。

(7) 結論

ヒト悪性膠芽腫由来の SF126 (TP53 欠失細胞) にドキシサイクリンにより変異型 p53 タンパク質 (R175H) を発現させて行った網羅的遺伝子抑制スクリーニングにより、ID1 発現抑制時に生じる細胞増殖抑制に R175H が寄与していることを確認した。

ID1 発現抑制条件下と ID1/TP53 二重発現抑制条件下での FACS 解析より、R175H は ID1 抑制による G1/S 期移行阻害を増強することが示唆された。

ID1 発現抑制による細胞増殖抑制増強の作用は、野生型 p53、他の変異型 p53 および TP53 欠失細胞では認められず、R175H 特異的な作用であることが示唆された。

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 1 件)

1 . Imai H, Kato S, Sakamoto Y, Kakudo Y, Shimodaira H, Ishioaka C. High throughput RNAi screening identifies ID1 as a synthetic sick/lethal gene interacting with the common TP53 mutation R175H. 査

読有、Oncol Rep 31 : 1043-1050, 2014. doi:
10.3892/or.2013.2953.

〔学会発表〕(計2件)

1 . Imai, H. , Kato, S. , Sakamoto, Y. ,
Takahashi, S. , Kakudo Y. , Shimodaira H. ,
Ishioka C. High throughput RNAi screening
of synthetic lethal genes interacting with
the common TP53 mutation R175H. The 103rd
Annual Meeting of American Association of
Cancer Research Apr 2, 2012 , Chicago,
IL, U.S.A.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

〔その他〕
ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究代表者

石岡 千加史 (ISHIOKA, CHIKASHI)
東北大学・加齢医学研究所・教授
研究者番号 : 60241577

(2)研究協力者

今井 源 (IMAI HIROO)
東北大学・大学院医学系研究科・大学院生

(3)連携研究者

加藤俊介 (KATO, SHUNSUKE)
東北大学・加齢医学研究所・准教授
研究者番号 : 40312657