

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 12 日現在

機関番号：32659

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25860092

研究課題名(和文) p53遺伝子中のナンセンス変異を標的としたリードスルー抗癌剤の創製

研究課題名(英文) Development of anti-cancer agents based on readthrough of nonsense mutation on TP53 gene

研究代表者

高山 健太郎 (Takayama, Kentaro)

東京薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：70611482

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ナンセンス変異を読み飛ばす活性をもつ合成ネガマイシン誘導体群から、p53遺伝子のナンセンス変異に効果を発揮するリードスルー化合物TCP-169を見出した。p53 nullのヒト肺腺癌由来Calu-6細胞に対し、TCP-169は明確な細胞増殖抑制活性を示した。また、ウエスタンブロットにより、Calu-6細胞におけるp53のタンパク質再発現が確認され、更にMDM2阻害剤ナトリン-3や小胞輸送阻害剤ブレフェルジンAの共投与により細胞増殖抑制活性が有意に増強された。一方で、p53再発現活性以外に、TCP-169が有する細胞増殖抑制機構の存在が示唆されたことで、今後の解明に期待が寄せられる。

研究成果の概要(英文)：In this research, TCP-169, which is a synthetic derivative based on (+)-negamycin, a dipeptidic antibiotic, significantly suppressed the proliferation of Calu-6 cells caused by nonsense mutation of TP53. This activity based on readthrough of nonsense mutation was significantly enhanced by the co-treatment of nutlin-3 or brefeldin A, which are a MDM-2 inhibitor or an intracellular protein transport inhibitor, respectively. Additionally, p53 protein re-expression in TCP-169-treated Calu-6 cell (p53 null) was confirmed by western blotting. On the other hand, this study suggested that TCP-169 might possess another function against cell proliferation in the cell except for accelerating re-production of p53 protein. Therefore, elucidation of the detailed anti-proliferative mechanism of TCP-169 is expected in the future work.

研究分野：生体機能化学

キーワード：リードスルー

1. 研究開始当初の背景

癌抑制タンパク質 p53 の遺伝子中で起こるナンセンス変異は、ヒトで発生する癌の 50 % 以上は p53 の変異によるものであり、そのうち 8 % がナンセンス変異に起因する。TP53 遺伝子で見られるナンセンス変異の中で、コドン 196 および 213 の変異はそれぞれ全体の 12%、15%を占める。これらのナンセンス変異を読み飛ばして完全長の p53 タンパク質を発現 (リードスルー) できれば、比較的多くの患者を対象としたナンセンス変異癌に対する新規治療法を開拓できる可能性がある。

そこで、リードスルーを促進させる化合物として比較的毒性のジペプチド型抗生物質ネガマイシンに着目した[1] (図 1)。当研究室では既に、デュシェンヌ型筋ジストロフィー発症の原因であるジストロフィンのナンセンス変異に対して高いリードスルー促進活性を示す誘導体 (TCP-126、TCP-112 等)[2]を複数獲得していた (図 1)。

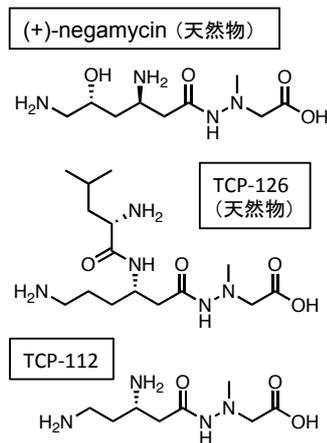


図 1. ネガマイシンおよびその誘導体の構造

ネガマイシン及びその誘導体以外のリードスルー促進化合物として、アミノグリコシド系抗生物質ゲンタマイシン (GM) および G418 などが古くから知られており、2011 年に、これらの抗生物質が p53 遺伝子中にナンセンス変異を有する癌細胞に対して作用し mRNA 発現量及び p53 タンパク質発現量を増大させる活性を有することが報告された[3]。また最近では、安全性が確立されているアミノグリコシド系抗生物質アルベカシン (ABK) にリードスルー促進作用が見出されている。しかしながら、これらはいずれも抗生物質としての薬理活性を存分に有しており、抗癌剤としての使用を考慮すると、副作用の発現が大いに懸念される。一方で、当研究室が保有する合成ネガマイシン誘導体のほとんどは抗菌活性を示さない[2, 4]ことから、薬効分離の観点から ABK などの抗生物質に比べてメリットがある。

2. 研究の目的

本研究では、合成ネガマイシン誘導体を基に、p53 null の癌細胞における p53 タンパク質再発現のための強力なリードスルー促進活性を有し、低毒性で抗癌活性を発揮する (リードスルー抗癌剤) の創出を目指す。

3. 研究の方法

(1) 細胞増殖抑制活性評価と p53 再発現解析:

細胞増殖抑制活性評価において、ヒト肺腺癌由来 Calu-6 細胞 (R196X) を、対照としてヒト肺腺癌由来 A549 細胞 (wt p53 発現) あるいはアフリカミドリザル腎臓由来 COS-7 細胞を用い、それぞれ 5000 cells/well で 96 穴プレートに播種し、24 時間培養後、各リードスルー化合物を任意の濃度で添加した。ナトリン-3 (10 μ M)、ブレフェルジン A (10 nM)、Z-VAD-FMK (10, 50 μ M) をそれぞれ共投与する場合は、リードスルー化合物と同時に添加した。48 時間培養後、WST-1 試薬を用いて生細胞数を測定、あるいはウエスタンブロットにより p53 タンパク質の発現を解析した。

(2) 機能解析:

レポーターアッセイにおいて、96 穴プレートに Calu-6 細胞を 5000 cells/well で播種し、24 時間培養後、p53 応答性レポータープラスミド (pGL4. 38[luc2P/p53RE/Hygro], Promega) およびコントロールベクター (pGL4. 74[hRluc/TK], Promega) をトランスフェクションした。24 時間培養後、TCP-169 を任意の濃度にて添加し、4 時間培養後のレポーター活性に基づく発光シグナルをルミノメーターで測定した。カスパーゼ-3 活性測定において、96 穴プレートに Calu-6 細胞を 5000 cells/well で播種し、24 時間培養後、TCP-169 を任意の濃度で添加し、4 時間培養後のカスパーゼ活性に基づく発光シグナルをルミノメーターで測定した。

4. 研究成果

(1) リードスルー抗癌剤候補 TCP-169 の獲得:

p53 の N 末端から 196 番目のコドンに TGA のナンセンス変異を有する Calu-6 細胞 (R196X) を用い、22 種の合成ネガマイシン誘導体の細胞増殖抑制活性を評価した。その結果、図 1 に示すネガマイシンおよび TCP-126、TCP-112 は 200 μ M の濃度において全く活性を示さなかった。一方で、TCP-112 の右翼カルボン酸をエステル型としたプロドラッグ体 (TCP-169、TCP-182 等、図 2) [4] が、顕著な細胞増殖抑制活性を示す傾向があることを先ず見出した。その中でも、TCP-169 (TCP-112 の *o*-プロモベンジルエステル型プロドラッグ) が最も高い細胞増殖抑制活性を示すことを明らかとした (図 3)。加えて、TCP-169 の濃度依存性についても評価し、50 μ M の濃度においても顕著な細胞増殖抑制活

性が観察された。以上の検討にて得られた構造活性相関は、別途これまでに得ていたジストロフィン遺伝子中のナンセンス変異（デュシェンヌ型筋ジストロフィー発症原因）を標的としたリードスルー活性評価の結果[4]と培養細胞レベルで良く一致した。

次に、陰性対照細胞の増殖に対する検討を実施した。まず、野生型 p53 を発現する A549 細胞に対する各種合成ネガマイシン誘導体の細胞増殖抑制活性を評価した。その結果、TCP-169 をはじめとする高いリードスルー活性を示す誘導体群において若干の細胞増殖抑制活性が認められた。A549 細胞は、LKB1 癌抑制遺伝子にナンセンス変異を有しており、本変異に対するリードスルーが起こったことにより、上述のような増殖抑制が認められたものと考えられた。ゆえに、本細胞は陰性対照として適さないことが明らかとなった。そこで、当研究室にて、別途、ジストロフィン遺伝子中のナンセンス変異を標的としたリードスルー活性評価に用いている COS-7 細胞にて同様の評価を実施した。その結果、TCP-169 は顕著な細胞増殖抑制活性を示さなかったため、COS-7 細胞を本評価系の陰性対照細胞とした。ネガマイシン、TCP-112、TCP-182、G418 についても、COS-7 細胞の増殖にはほとんど影響を与えなかった。

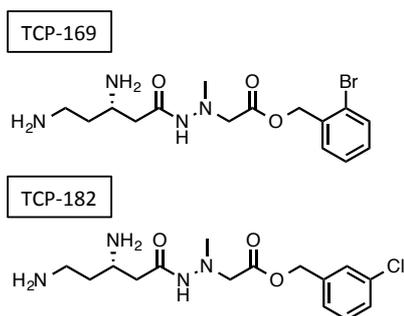


図 2. TCP-169 及び TCP-182 の構造

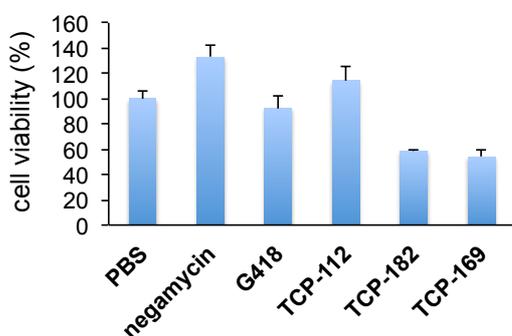


図 3. Calu-6 細胞に対する増殖抑制活性評価 (化合物濃度: 200 μM ; n = 3)

TCP-169 のリードスルー活性を裏付ける一環として、Calu-6 細胞における TCP-169 の p53 再発現活性を評価するために、ウェスタンブロットを行った (コントロールとして野生型 p53 を発現する A549 細胞を用いた)。そ

の結果、300 μM の TCP-169 を添加した場合に p53 の薄いバンドが検出され、1 mM の濃度では明確なバンドが検出された。したがって、TCP-169 は p53 遺伝子中のナンセンス変異に対するリードスルー活性を示し、p53 タンパク質の再発現を促していることが明らかとなった。ただし、A549 細胞における p53 タンパク質発現量と比較すると非常に少なく、明確なバンド検出のために比較的高濃度の TCP-169 を要していることから、そのリードスルー効率は非常に低いものであると考えられる。

これまでは、アミノグリコシド系抗生物質 (ゲンタマイシン、G418) に p53 の再発現活性が認められる報告[3]があったが、その毒性の強さから臨床への応用には向いていないことが問題であった。それに対して、本研究で用いているネガマイシン誘導体群は、それらに比べて低毒性であり、また抗菌活性をほとんど示さず、実用性の点で優位であるため、詳細な分子機能解析を実施する価値があるものと考えられた。

(2) 再発現 p53 機能の増強:

TCP-169 により Calu-6 細胞内で再発現した p53 が機能的であるかを検証した。まず、機能強化に資する試薬としてナトリン-3 を共投与し、細胞増殖抑制活性が向上するか評価した。尚、ナトリン-3 は p53 タンパク質の分解に関わる MDM-2 の阻害剤 (p53 stabilizer) であり、p53 の寿命を伸ばすことでその機能の強化が図れる[5]。図 4 に示すように、Calu-6 細胞が p53 を発現していない状態 (TCP-169 非添加) ではナトリン-3 (10 μM) はその細胞増殖に影響をあたえないが、TCP-169 の存在下ナトリン-3 添加によりその細胞増殖抑制活性が有意に増強される結果が得られた。また、ナトリン-3 のみでは細胞増殖に影響を与えなかった。

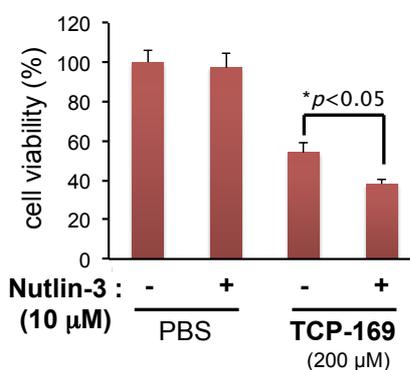


図 4. ナトリン-3 併用による TCP-169 の Calu-6 細胞増殖抑制活性の強化 (n = 3)

同様に、TCP-169 の細胞増殖抑制活性の有意な増強は、ブレフェルジン A (10 nM) の添加によっても観察された。小胞輸送阻害剤であるブレフェルジン A で処理された細胞では、ストレス応答により p53 タンパク質発

現が促進されることが知られている[6]。ナトリン-3と同様、ブレフェルジンA単独ではCalu-6細胞の増殖に影響を及ぼさなかった。

以上の結果より、TCP-169のリードスルー活性に基づいて再発現したp53タンパク質が機能的に働くことで、Calu-6細胞の増殖が抑制されたものと考えられた。

一方で、p53応答性レポータープラスミドを用いたレポーターアッセイにおいては、TCP-169処理によるレポーター活性の有意な増強は認められなかった。また、カスパーゼ-3の活性化、アポトーシス阻害剤Z-VAD-FMK共投与によるアポトーシス経路活性化の評価についても、同様にしてTCP-169処理による有意なアポトーシス活性化は認められなかった。これらの結果は、図3および4において200 μ MのTCP-169が示した細胞増殖抑制活性は、p53再発現以外のメカニズムによっても誘起されている可能性を示唆するものと考えられ、タンパク質合成系への影響を含めた詳細な分子機構の解明が今後期待されるものである。

以上の成果より、本研究においてp53 nullのヒト肺腺癌由来Calu-6細胞に対して顕著な細胞増殖抑制活性を示すリードスルー促進化合物TCP-169の獲得に成功した。TCP-169処理されたCalu-6細胞において、そのリードスルー促進活性に基づくp53タンパク質の再発現が確認され、p53 stabilizerであるナトリン-3あるいは小胞輸送阻害剤ブレフェルジンAの共投与によりその細胞増殖抑制活性が増強された。よって、TCP-169は、抗菌活性をもたないリードスルー抗癌剤として、更なる作用機構の解明とともに発展していくことが今後期待されるものである。

<引用文献>

- (1) Arakawa M, Shiozuka M, Nakayama Y, Hara T, Hamada M, Kondo S, Ikeda D, Takahashi Y, Sawa R, Nonomura Y, Sheykholeslami K, Kondo K, Kaga K, Kitamura T, Suzuki-Miyagoe Y, Takeda S, Matsuda R., Negamycin restores dystrophin expression in skeletal and cardiac muscles of mdx mice, *J. Biochem.* 134, 751-758 (2003).
- (2) Taguchi A, Hamada K, Kotake M, Shiozuka M, Nakaminami H, Pillaiyar T, Takayama K, Yakushiji F, Noguchi N, Usui T, Matsuda R, Hayashi Y., Discovery of natural products possessing selective eukaryotic readthrough activity: 3-epi-deoxynegamycin and its leucine adduct, *ChemMedChem* 9, 2233-2237 (2014).
- (3) Floquet C, Deforges J, Rousset JP, Bidou L., Rescue of non-sense mutated p53 tumor suppressor gene by aminoglycosides, *Nucleic Acid Res.* 39,

3350-3362 (2011).

- (4) Hamada K, Taguchi A, Kotake M, Aita S, Murakami S, Takayama K, Yakushiji F, Hayashi Y., Structure-activity relationship studies of 3-epi-deoxynegamycin derivatives as potent readthrough drug candidates, *ACS Med. Chem. Lett.* 6, 689-694 (2015).
- (5) Vassilev LT, Vu BT, Graves B, Carvajal D, Podlaski F, Filipovic Z, Kong N, Kammlott U, Lukacs C, Klein C, Fotouhi N, Liu EA., In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2, *Science* 303, 844-848 (2004).
- (6) Lin WC, Chuang YC, Chang YS, Lai MD, Teng YN, Su IJ, Wang CC, Lee KH, Hung JH, Endoplasmic reticulum stress stimulates p53 expression through NF- κ B activation, *PLoS One* 7, e39120 (2012).

5. 主な発表論文等

[学会発表] (計 2件)

- ① Kentaro Takayama et al., Development of (+)-negamycin-derived ester-type prodrugs promoting premature termination codon-readthrough and its application for suppressing cancer cell growth, The 2014 ASCB/IFCB Meeting, Philadelphia, USA, December 6-10, 2014.
- ② 濱田 圭佑 他, 高リードスルー活性を有する新規ネガマイシン誘導体の合成と癌細胞増殖抑制への応用, 第17回日本RNA学会, 2015年7月15-17日, 札幌.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高山 健太郎 (TAKAYAMA, Kentaro)
東京薬科大学・薬学部・助教
研究者番号: 70611482

(2) 研究協力者

濱田 圭佑 (HAMADA, Keisuke)