

令和元年6月27日現在

機関番号：82504

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09598

研究課題名(和文)特徴的ながん抑制経路の遺伝子異常を標的化した悪性中皮腫に対する治療法開発

研究課題名(英文) A therapeutic strategy for malignant mesothelioma with reconstituting tumor suppressor pathways which were defective due to the characteristic genetic deletion

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：難治性の悪性中皮腫では、INK4A/ARF領域の遺伝子欠損とNF2関連遺伝子の変異という、他の腫瘍にはない特徴的な遺伝子異常があり、その結果p53機能の失活、pRbの過剰な活性化、Hippo経路の亢進という状態が生じている。したがって、これらの異常が当該疾患の治療標的となり、本研究ではp53機能の回復とそれに伴うpRbの脱リン酸化、Hippo経路の主なシグナル経路の阻害を中心として検討した。その結果、内因性および外因性のp53発現、Hippo経路抑制は当該疾患の細胞増殖の停止を誘導し、双方の併用は抗腫瘍効果を増強したことが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

悪性中皮腫は今後とも本邦で増加する疾患であり、その治療は難しく、また多くの場合早期診断も容易ではなく、極めて予後不良の疾患である。さらにアスベスト(石綿)の消費は新興国を中心に継続しており、今後とも世界的レベルで患者数が増加する。そこで本研究では同疾患の特徴的な遺伝子変異に着目し、それに起因する細胞増殖機構に基づいて、幾つかの薬剤による細胞傷害効果を検討した。その結果複数の経路を薬物で制御することによって、当該疾患の治療法が開発できる可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：Clinical specimens from malignant mesothelioma patients showed two characteristic genetic abnormalities, a defect in the INK4A/ARF region and several types of gene mutations mapped in the Hippo pathway, which consequently induced a functional loss of the p53 pathway, and up-regulation of pRb and Hippo pathways. These genetic changes can be therapeutic targets for mesothelioma treatments. We then took an approach to reconstitute the p53 pathway, which suppressed pRb functions accordingly, and to inhibit effectors of the augmented Hippo pathway. Enhanced expression of endogenous or exogenous p53 and inhibition of down-stream signaling of the Hippo pathways achieved growth suppressive effects in mesothelioma and a combination of activated p53 and inhibited Hippo pathway produced synergistic cytotoxic effects to mesothelioma.

研究分野：呼吸器内科

キーワード：悪性中皮腫 p53経路 Hippo経路 細胞障害活性 アデノウイルス MDM2阻害剤

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 本邦における悪性中皮腫は、石綿の職業的暴露が主な原因であり、過去の石綿使用量から推定すると、今後ともその発症数は増加すると考えられる。一方現時点においてその年間患者数は2,000名以下であり、希少がんの範疇内にあるため、社会的関心とは裏腹に新規治療への対応は乏しい。同腫瘍は主に胸膜に発生することから、短時間で胸腔内に進展し外科的切除が困難となる。放射線治療は肺組織への広範囲な傷害を避けられないため、抗がん剤が治療の主体をなしている。しかし、最近に至るまでシスプラチンにペメトレキセドの併用以外に有効性を示した薬剤はなく、同薬剤の併用でも生存期間平均値は約1年である。しかし最近になって、上記第一選択薬に抗 VEGF 抗体の併用効果、また免疫チェックポイント阻害剤である抗 PD-1 抗体の有用性、さらに第一選択薬と抗 PD-L1 抗体との併用について検討されている。したがって、今後悪性中皮腫の化学療法に一定の変化が生じる可能性はあるものの、DNA 傷害および DNA 合成阻害剤の有用性は大きく変わらないと考えられる。

(2) このような状況下において、悪性中皮腫の遺伝子変異に着目し、同変異の基づく新しい治療薬の開発はこれまで皆無である。悪性中皮腫の臨床検体をを用いた解析によって、同疾患は極めて特異的な遺伝子異常を示すことが欧米人でも日本人検体でも確認されているが、この変異の中で最も頻度が高いものは、臨床検体の70-80%で見つかる INK4A/ARF 領域の欠損である。この欠損の結果、同領域にコードされる p14 分子および p16 分子発現が消失し、MDM2 分子の亢進にともなう p53 分子の分解促進、CDK4/6 系を介した pRb の過剰なリン酸化が生じることになる。しかし p53 遺伝子自体の変異は少なく、INK4A/ARF 領域の欠損は p53 の遺伝子型のよらず p53 経路の機能的欠損となり、リン酸化 pRb とならんで悪性中皮腫では2つの代表的ながん抑制経路が loss of function となっている。また同臨床検体の約半数で、NF2 遺伝子およびその下流分子の遺伝子変異があることが判明している。この NF2 分子異常は最終的には YAP1 の発現低下に結びつくが、標的領域から見れば Hippo 経路の異常に関連している。Hippo 経路は細胞の接着や増殖等、多様な生物学的特性に関与しているが、発がん過程から見ると、その機能は低分子 G 蛋白質、focal adhesion kinase (FAK)、mTOR 経路に絞ることが可能である。したがって、上記の遺伝子異常を踏まえると、p53 経路の回復と Hippo 経路の抑制が悪性中皮腫における遺伝子異常に基づく治療標的と想定される。

2. 研究の目的

(1) p53 経路の回復による抗腫瘍効果の検討:

大多数の悪性中皮腫の症例では、p53 遺伝子型は正常型でありながらその上流に位置する p14 分子の欠損により、p53 経路が機能的に失活している。すなわち p14 分子は p53 のユビキチン化を担う MDM2 分子の機能を阻害するが、p14 分子の欠損は、p53 分子のユビキチン化とそれともなる同分子の崩壊を促進することになるからである。したがって、MDM2 分子の阻害剤 (MDM2 分子と p53 分子の結合阻害剤) は悪性中皮腫において、正常型 p53 分子の分解を阻止し同分子の発現上昇が期待できる。また p16 分子の欠損は CDK4/6 の機能異常となり、pRb の持続的なリン酸化と、その結果として細胞周期が常に進行することになる。ところが p53 分子の発現によって誘導される p21 分子は、CDK2 に作用して CDK4/6 と同様に、pRb 分子のリン酸化阻止あるいは脱リン酸化に作用し、細胞周期を停止できる。すなわち、MDM2 阻害剤等による p53 分子の発現誘導は、悪性中皮腫の2つのがん抑制経路異常を回復することができ、抗がん剤等による細胞死誘導に対する感受性の回復と、持続的な細胞周期の進行を阻害することができるはずである。

(2) Hippo 経路の標的分子阻害剤による細胞傷害活性:

Hippo 経路の発がん・がんの進展過程における標的は、低分子 G 蛋白質、FAK、mTOR 経路であり、その機能異常が Hippo 経路傷害の表れである。そこで、当該分子に対する阻害剤を用いて、悪性中皮腫に対する細胞増殖抑制効果を検討する。この時、多くの阻害剤が候補として考えられるが、低分子 G 蛋白質に対しては非 Ras 系の geranylgeranyl transferase I 阻害剤を使用する。これは悪性中皮腫において Ras の遺伝子変異は知られておらず、同分子のがんの進展に果たす役割は高くないと推定されるからである。

(3) p53 経路と Hippo 経路の関係:

悪性中皮腫臨床検体の解析では、INK4A/ARF 領域欠損と NF2 遺伝子変異は重複がありうる。遺伝子変異の重複がかならずしもその下流経路のクロストークの存在を意味しないが、mTOR 経路と p53 分子発現の相互関係は過去の研究に報告がある。そこで p53 発現の上昇と Hippo 経路の阻害との関係について検討した。

3. 研究の方法

(1) 遺伝子発現の制御:

内因性で正常型 p53 発現の上昇には、同分子のユビキチン化能を有する MDM2 の阻害剤 (p53 分子との結合阻害剤) である nutlin-3a あるいは RITA を使用した。MDM2 分子は構造のよく似た MDM4 分子と結合して、上記活性を有することが知られている。そこで MDM4 阻害剤である HSP90 阻害剤は、MDM2 分子機能を間接的に阻害すると考えられ、結果的に p53 分子の安定化に寄与できる。すなわち MDM2 および MDM4 阻害剤は、p53 分子分解阻止によって内因性 p53 発現を上昇できはざである。一方変異型 p53 分子はユビキチン化による分解を受けることが少ないため、

当該阻害剤による p53 発現の上昇は期待できない。

外因性に p53 発現を上昇させるにはアデノウイルス (Ad) を用いて正常型 p53 遺伝子を発現できるベクター (Ad-p53) を使用した。したがって、Ad-p53 に上記の MDM2 あるいは MDM4 阻害剤を併用すると、発現した外因性 p53 分子の安定化が期待できる。

低分子 G 蛋白阻害剤として bisphosphonate 製剤である zoledronic acid、FAK 阻害剤として defactinib、mTOR 阻害剤として compound C および rapamycin を使用した。これらの薬剤が実際に標的分子の機能を阻害する濃度で使用した。具体的には zoledronic acid については Rho A 等の細胞質分画から細胞膜分画への移動の阻害、defactinib では FAK のリン酸化阻害、compound C や rapamycin については p70S6K のリン酸化阻害などを指標とした。

(2) 細胞傷害活性:

内因性あるいは外因性 p53 発現を増強させた細胞、Hippo 経路の標的分子の阻害剤で処理した細胞に対して、WST 法を用いて細胞傷害活性を検討した。また実際に生細胞数を算出し、細胞数の増加や減少を検討した。複数の処理による薬剤の相互反応を検討するために CalcuSyn ソフトを使用した。このとき各 Fa ポイントにつき combination index (CI) を算出し、CI 値が 1 以下であれば相乗効果、CI 値が 1 以上であれば拮抗効果と判断した。また細胞周期についてはセルソーターで検討した。

(3) 発現の解析:

蛋白発現量とリン酸化蛋白発現量は、それぞれを認識する抗体を用いたウエスタンブロット法にて検討した。必要に応じて発現量を画像処理後 image analyzer で解析した。なお上記の検討について、ヒト悪性中皮腫で p53 遺伝子が正常型 5 種類、変異型 3 種類の細胞を用いて検討した。

4. 研究成果

(1) p53 経路の回復による抗腫瘍効果の検討:

内因性の p53 発現を増加させるために、MDM2 阻害剤である nutlin-3a および RITA を用いて、細胞傷害活性を検討した。その結果 nutlin-3a に関しては、p53 遺伝子型が正常型の細胞は、変異型の細胞に比較して有意に低濃度で細胞傷害活性を示し、かつ p53 分子の発現、リン酸化 p53 分子の発現も増加していた。しかし、変異型 p53 遺伝子の細胞においては p53 分子の発現とリン酸化分子の発現レベルは、nutlin-3a の処理濃度によらず未処理の場合と大差なかった。一方 RITA については、p53 遺伝子が正常型の場合 nutlin-3a の結果とほぼ同じであったが、変異型遺伝子の場合でも p53 分子の発現とリン酸化分子の発現が上昇する例があり、RITA は nutlin-3a と作用特異性が異なることが推定される。一方、MDM4 阻害剤である HSP90 阻害剤を用いた場合、正常型 p53 分子の発現は増加し、細胞死が誘導されていたが、その細胞傷害活性は p53 遺伝子型に依存しなかった。ところが、興味深いことに MDM2 阻害剤と MDM4 阻害剤を併用すると、両者は相乗的な細胞傷害活性を示し、この相乗効果は p53 遺伝子型が正常型の細胞のほうがより強かった。すなわち MDM4 と MDM2 の相互作用はありうるが、p53 変異型に対する効果については非 p53 経路の関与が推定される。

外因性に p53 分子を発現させるため Ad-p53 を用いた場合、p53 遺伝子型によらず、悪性中皮腫細胞に細胞傷害活性が誘導され、しかも細胞周期で sub-G1 分画が増加し、各種 caspase の cleavage が生じていた。したがって、悪性中皮腫にあっては、p53 遺伝子型が変異型であっても、同分子発現以降の p53 経路は正常であることを、この結果は意味している。すなわち悪性中皮腫細胞における p53 経路の失活は、同遺伝子型に関わらず正常型 p53 分子の発現増強によって回復可能であり、p53 分子がまさに同腫瘍における標的分子と結論できる。この結果を踏まえて、Ad-p53 を感染させた細胞に nutlin-3a および RITA を併用すると、相乗的な細胞傷害活性が惹起されていた。この時、p53 遺伝子型が正常型のほうが変異型の細胞に比較して、より強く相乗効果が誘導されており、このことは上記の結果と一致する。このとき、p53 分子の発現とリン酸化 p53 分子の発現は、MDM2 阻害剤併用によって増加し、またそれに呼応して細胞周期で sub-G1 分画も増加していた。ところが、興味深いことに Ad-p53 を感染させた細胞に HSP90 阻害剤を併用すると、Ad-p53 による細胞傷害活性が減少し、またウエスタンブロット法を用いた p53 分子およびリン酸化 p53 分子の発現が低下していた。これは HSP90 阻害剤が有する MDM4 阻害効果ではなく、HSP90 の有するシャペロン効果の阻害すなわちプロテアソーム活性の阻害、によるものと考えられた。そこで、同シャペロン効果の阻害が HSP90 阻害剤の有する非 p53 経路の一つと考えられる。

(2) Hippo 経路の標的分子阻害剤による細胞傷害活性:

Hippo 経路の主要な 3 経路を阻害する薬剤の抗腫瘍効果を検討した。Zoledronic acid は膀胱がん等の他の腫瘍細胞に比較して、低濃度で悪性中皮腫に対して細胞傷害活性を示したが、p53 遺伝子型による感受性に差はなかった。しかし正常型 p53 遺伝子を有する細胞に対しては、p53 分子の発現を上昇させていた。また siRNA によって p53 発現を阻害すると、同分子の発現は上昇しなかったが、細胞傷害活性自体は変わらなかった。このことは低分子 G 蛋白阻害と p53 経路のクロストークは双方向的ではないことを意味している。ただし、zoledronic acid で p53 発現を上昇させると、シスプラチンやペメトレキセドに対する感受性は上昇していた。FAK 阻害剤である defactinib の細胞傷害活性は、p53 遺伝子型によらなかったが、NF2 遺伝子型あるいは NF2 分子発現とも関連を示さなかった。これは従来の報告とは異なるもので、今後検討が

必要である。さらに mTOR 経路の主たる p70S6K のリン酸化を阻害する rapamycin、および直接的には同リン酸化を阻害しない compound C を使用して、悪性中皮腫に対する抗腫瘍効果を検討した。その結果、確かにこれらの阻害剤は細胞傷害活性を誘導したが、やはり p53 および NF2 遺伝子型との関連性はなかった。この研究の過程で、ペメトレキセド耐性となった悪性中皮腫細胞では、mTOR 経路の上流にあたる AMPK の活性化の指標である持続的な同分子のリン酸化、と p53 分子のリン酸化が起きていることが判明し、rapamycin や compound C ではその活性化および薬剤耐性を解除できなかった。したがって、p53 分子と Hippo 経路のクロストークは p70S6K を介していないことが判明した。

(3) p53 経路と Hippo 経路の関係：

上記の研究から p53 経路と Hippo 経路のクロストークの可能性が示唆された。ただし、低分子 G 蛋白と p53 発現は双方向性ではないため、それ以上を追求はできていない。ところが FAK 阻害剤を使用するとリン酸化 FAK の低下とともに p53 分子の発現が上昇し、逆に p53 分子の発現を上昇させる MDM2 阻害剤を用いると、リン酸化 FAK の発現レベルが低下した。このことは FAK と p53 の間にクロストークが存在していることを意味している。この経路の果たして MDM2 が関与しているかどうかは今後の課題である。一方 mTOR 経路と p53 経路については複雑な結果となっている。上記のように mTOR 阻害剤では p53 経路との関連性は不明であったため、AMPK を介して mTOR を阻害する metformin を使用して p53 発現を検討した。その結果、metformin 処理によって p53 発現が上昇する場合と低下する場合があります、この二つの経路のクロストークには他の分子の介在があることが示唆された。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計4件)

Chai, K., Ning, X., Nguyễn, T.T.T., Zhong, B., Morinaga, T., Li, Z., Shingyoji, M., Tada, Y., Tatsumi, K., Shimada, H., Hiroshima, K. and Tagawa, M.: Heat shock protein 90 inhibitors augmented endogenous wild-type p53 expression but down-regulate the adenovirally-induced expression by inhibiting a proteasome activity. *Oncotarget* 9: 26130-26143, 2018. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.25452> 査読有

Qin, Y., Sekine, I., Fan, M., Takiguchi, Y., Tada, Y., Shingyoji, M., Hanazono, M., Yamaguchi, N. and Tagawa, M.: Augmented expression of cardiac ankyrin repeat protein is induced by pemetrexed and a possible marker for the pemetrexed resistance in mesothelioma cells. *Cancer Cell. Int.* 17; 120, 2017. <https://doi.org/10.1186/s12935-017-0493-8> 査読有

Shimazu, K., Tada, Y., Morinaga, T., Shingyoji, M., Sekine, I., Shimada, H., Hiroshima, K., Namiki, T., Tatsumi, K. and Tagawa, M.: Metformin produces growth inhibitory effects in combination with nutlin-3a on malignant mesothelioma through a cross-talk between mTOR and p53 pathways. *BMC Cancer* 17: 309, 2017. DOI 10.1186/s12885-017-3300-y 査読有

Jiang, Y., Zhong, B., Kawamura, K., Morinaga, T., Shingyoji, M., Sekine, I., Tada, Y., Tatsumi, K., Shimada, H., Hiroshima, K. and Tagawa, M.: Combination of a third generation bisphosphonate and replication-competent adenoviruses augments the cytotoxicity on mesothelioma. *BMC Cancer* 16: 455, 2016. DOI 10.1186/s12885-016-2483-y 査読有

[学会発表](計6件)

Masatoshi Tagawa, Thảo Thị Thanh Nguyễn, Takao Morinaga, Masato Shingyoji, Yuji Tada, Koichiro Tatsumi, Hideaki Shimada, Kenzo Hiroshima: An MDM2 inhibitor achieves synergistic cytotoxicity with oncolytic adenoviruses on mesothelioma with the wild-type p53 gene. The 14th international conference of the international mesothelioma interested group, 2018, Ottawa, Canada.

Thao Thi Thanh Nguyen, Takao Morinaga, Boya Zhong, Shuji Kubo, Masato Shingyoji, Yuji Tada, Yuichi Takiguchi, Koichiro Tatsumi, Hideaki Shimada, Kenzo Hiroshima, Masatoshi Tagawa: Cytotoxicity of Replication-Competent Adenoviruses Defective of E1B55kDa Molecules Is Irrelevant to P53 Expression, but Increases with a P53-Augmenting MDM2 Inhibitor through DNA Damages and Enhanced Viral Propagations in Mesothelioma with the Wild-Type P53 Genotype. 21st annual meeting of American Society of Gene and Cell Therapy, 2018, Chicago, USA.

Masatoshi Tagawa, Thao Thi Thanh Nguyen, Takao Morinaga, Boya Zhong, Michiko Hanazono, Shuji Kubo, Masato Shingyoji, Yuji Tada, Koichiro Tatsumi, Hideaki Shimada, Kenzo Hiroshima: An inhibitor for the MDM2-p53 Interaction Produces Synergistic Cytotoxicity

with Oncolytic Adenoviruses on Mesothelioma with Wild-type p53 Genotype. 20th annual meeting of American Society of Gene and Cell Therapy, 2017, Washington DC.

Masatoshi Tagawa, Thao Thi Thanh Nguyen, Takao Morinaga, Boya Zhong, Michiko Hanazono, Shuji Kubo, Masato Shingyoji, Yuji Tada, Koichiro Tatsumi, Hideaki Shimada, Kenzo Hiroshima: A MDM2 inhibitor augments cytotoxicity of oncolytic adenoviruses defective of E1B 55kDa molecules through enhancing DNA damages and apoptosis in mesothelioma. 23th annual meeting of Japan Society of Gene Therapy, 2017, Okayama.

Masatoshi Tagawa, Shinya Okamoto, Takao Morinaga, Masato Shingyoji, Ikuo Sekine, Toshio Suzuki, Yuji Tada, Koichiro Tatsumi, Hideaki Shimada, Kenzo Hiroshima: Combination of nutlin-3a and HSP90 inhibitors produces synergistic cytotoxicity on mesothelioma with the wild-type p53. The 13th international conference of the international mesothelioma interested group, 2016, Birmingham, UK.

Yuji Tada, Thi Thanh Thảo Nguyễn, Shuji Kubo, Masato Shingyoji, Ikuo Sekine, Koichiro Tatsumi, Hideaki Shimada, Kenzo Hiroshima, Masatoshi Tagawa: Enhanced expression of endogenous p53 contributes to E1B55-defective adenoviruses-induced cell death of mesothelioma deleted in the INK4a/ARF region. Tenth international meeting on replicating oncolytic virus therapeutics, 2016, Vancouver, Canada.

〔図書〕(計0件)

なし

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

なし

取得状況(計0件)

なし

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：新行内 雅斗

ローマ字氏名：(SHINGYOJI Masato)

所属研究機関名：千葉県がんセンター(研究所)

部局名：呼吸器内科

職名：部長

研究者番号(8桁)：60450433

(2)研究協力者

研究協力者氏名：田川 雅敏

ローマ字氏名：(TAGAWA, masatoshi)