

機関番号: 11301

研究種目: 若手研究(B)

研究期間: 2009～2010

課題番号: 21790516

研究課題名(和文) 変異 p53 の機能獲得メカニズムの解析と新しいがん分子標的治療への応用

研究課題名(英文) Analysis of gain-of-function mechanisms of mutant p53 and identification of novel target for cancer therapy.

研究代表者 角道 祐一(KAKUDO YUICHI)

東北大学・加齢医学研究所・助教

研究者番号: 10396484

研究成果の概要(和文): p53 の GOF mutant である S121F のメカニズム解析を遺伝子発現マイクロアレイを用いて行った。既知の p53 標的遺伝子の中から、DRAM (damage-regulated autophagy modulator) が候補遺伝子として同定された。DRAM が p53 依存性アポトーシス誘導能に与える影響を調べた結果、Saos-2 細胞において、DRAM 過剰発現によって野生型 p53 のアポトーシス誘導能が有意に増強することが明らかとなった。しかし DRAM ノックダウンで S121F のアポトーシス誘導能の減弱は認められなかった。本研究では、DRAM が p53 依存性アポトーシス誘導の強化に重要な標的遺伝子であることを明らかにし、同時に S121F の GOF 機構は DRAM 発現誘導の増強が一因である可能性を提示した。

研究成果の概要(英文): So far, "super p53" mutants of several gain-of-function mutants have been reported as mutants exhibiting more potent ability to induce apoptosis than wild-type p53. The super p53s may provide a clue for development novel therapeutic targets, but the major mechanism underlying the super p53-dependent apoptosis remains unclear. To identify critical gene(s) in the mechanism, we performed comprehensive and comparative expression analysis in p53-null Saos-2 cells with conditional expression of wild-type p53 and S121F, previously reported as a super p53 mutant. We identified damage-regulated autophagy modulator (DRAM) as one of the genes that were more upregulated by S121F than wild-type p53. Although knockdown of DRAM was not sufficient for reducing the ability of S121F to induce apoptosis, overexpression of DRAM enhanced the ability in a wild-type p53-dependent manner. Here, we show that DRAM is an important gene for the enhancement of p53-dependent apoptosis.

交付決定額

(金額単位: 円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野: 医歯薬学

科研費の分科・細目: 境界医学・応用薬理学

キーワード: 薬物治療学、分子標的治療

1. 研究開始当初の背景

がんの増殖・浸潤・転移などのメカニズムについて新たな知見を得ることは、新しいがん治療法の開発に直結するものであり極めて重要であると言える。現在使用される分子標的治療薬の多くは、増殖シグナル経路の遮断によって細胞増殖抑制を誘導しがんの進行を抑えるものである。しかし、この作用のみでは増殖抑制が主であって根絶には至らない。がん抑制遺伝子 *TP53* は約 50%ものがんに変異が認められることから、その遺伝子産物である p53 ががん抑制に重要な因子であることは明らかである。野生型 p53 の持つ多岐にわたる機能のなかでも特にアポトーシス誘導能は、がん細胞を死に至らしめられる稀少かつ重要な機能であり、がん治療においては極めて魅力的なものである。*TP53* に見つかる変異の約 75%はミスセンス変異であり、その中で機能喪失型変異体 (loss of function mutant (LOF mutant)) や機能獲得型変異体 (gain of function mutant (GOF mutant)) の存在が知られている。これら変異体、特に GOF mutant のアポトーシス誘導能の解析により新しい知見が得られれば、これを標的とした新たながん分子標的治療薬の開発につながる可能性があると考えられた。

2. 研究の目的

miRNA マイクロアレイおよび遺伝子発現マイクロアレイを用いて、変異 p53 の GOF に関与する候補遺伝子の同定を試みることを目的とし研究を行った。

3. 研究の方法

(1) miRNA マイクロアレイおよび遺伝子発現マイクロアレイを用い GOF 機構の候補遺伝子 (RNA 遺伝子/コーディング遺伝子) の抽出を行い、RT-PCR やウェスタンブロッティングにより発現変化を確認する。

(2) 候補遺伝子に対する変異 p53 の転写活性化能を評価する。

(3) 同定した標的遺伝子の阻害または過剰発現によるアポトーシス誘導能への影響を解析する。

(4) その他複数のがん細胞株を用いた検討を行う。

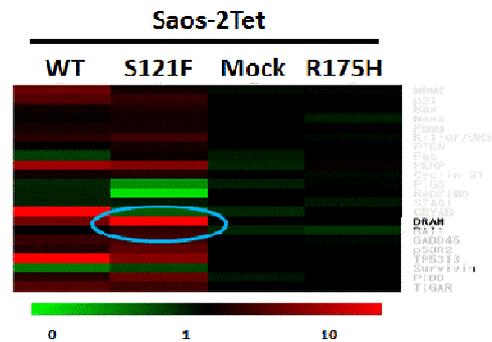
4. 研究成果

(1) まず、LOF mutant の 1 つである R175H、およびとコントロールとして野生型 p53、を p53 欠失細胞株 (Saos-2) で強制発現させ、miRNA マイクロアレイおよび遺伝子発現マイクロアレイを行った。このデータを基に階層的クラスタ解析を行った結果、野生型 p53

と比較し R175H で有意に発現上昇が認められる RNA 遺伝子群 (数十種類) が同定された。このうち幾つかの候補 RNA 遺伝子 (data not shown) の knock down を試みたがアポトーシス誘導能の回復や細胞増殖抑制効果が確認されなかったことから、単一でなく複数の候補 RNA 遺伝子がアポトーシス誘導能の喪失に関与していると考えられた。また、単一の RNA 遺伝子だけでも標的となる候補コーディング遺伝子が複数存在する可能性があり、miRNA アレイを用いた LOF または GOF mutant の特定の target の同定は極めて困難であると判断し、遺伝子発現マイクロアレイ解析による GOF 候補遺伝子の抽出を試みることにした。

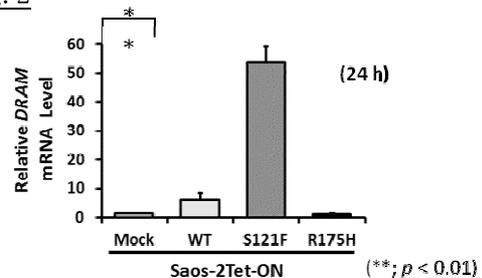
まず、GOF mutant で、野生型 p53 よりも強力なアポトーシス誘導能を持つ変異体 S121F mutant を用いた網羅的遺伝子発現解析を Saos-2 細胞で行った。既知の p53 標的遺伝子の中から、アポトーシス、細胞周期停止、オートファジー、p53 分解への関与が報告されている遺伝子群を抽出し比較検討した結果、野生型 p53 に対し S121F で最も大きな発現の亢進を認めた DRAM (damage-regulated autophagy modulator) が候補遺伝子として同定された (Fig. 1)。

Fig. 1



また、RT-PCR で DRAM の mRNA レベルの発現上昇を確認した (Fig. 2)。

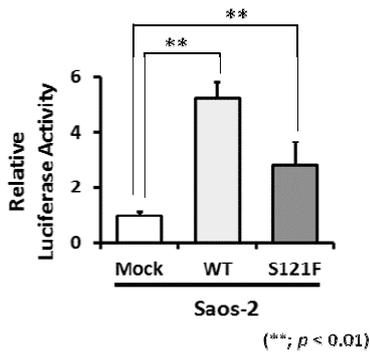
Fig. 2



と比較し R175H で有意に発現上昇が認められる RNA 遺伝子群 (数十種類) が同定された。このうち幾つかの候補 RNA 遺伝子 (data not shown) の knock down を試みたがアポトーシス誘導能の回復や細胞増殖抑制効果が確認されなかったことから、単一でなく複数の候補 RNA 遺伝子がアポトーシス誘導能の喪失に関与していると考えられた。また、単一の RNA 遺伝子だけでも標的となる候補コーディング遺伝子が複数存在する可能性があり、miRNA アレイを用いた LOF または GOF mutant の特定の target の同定は極めて困難であると判断し、遺伝子発現マイクロアレイ解析による GOF 候補遺伝子の抽出を試みることにした。

(2) DRAM 遺伝子のプロモーター領域 (p53 応答配列を含む約 700bp の領域) に対する転写活性化能を調べた。その結果、Mock のルシフェラーゼ活性に対する比は、野生型 p53 と S121F でそれぞれ 5.2 ± 0.6 、 2.8 ± 0.8 (平均値 \pm S.D.) であったが (両者とも $p < 0.01$)、mRNA レベルとは逆に、S121F では野生型 p53 よりもルシフェラーゼ活性が低かった ($p < 0.01$) (Fig. 3)

Fig. 3



(3) DRAM が p53 依存性アポトーシス誘導能に与える影響を調べるため、FACS 解析を行った結果、DRAM 過剰発現によって野生型 p53 のアポトーシス誘導能 (Δ subG1) が有意に増強することが明らかとなった (Fig. 4a)。しかし、DRAM 発現抑制による S121F の強力なアポトーシス誘導能の減弱は認められなかった (Fig. 4b)。

Fig. 4a

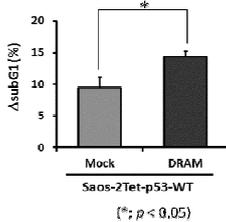
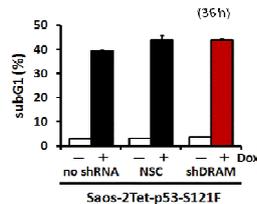


Fig. 4b



(4) DRAM 過剰発現によるアポトーシス誘導能の有意な増強が p53 欠失型ヒト悪性膠芽腫由来細胞株 SF126 においても、Saos-2 と同様に確認された (data not shown)。

p53 依存性アポトーシス誘導には内在性 DRAM が重要であることは既に報告されているが、本研究では、DRAM の過剰発現によって p53 依存性アポトーシス誘導がより増強されることを新たに見出し、DRAM が p53 依存性アポ

トーシス誘導の強化に重要な標的遺伝子であることを明らかにした。また S121F の GOF 機構として、DRAM の著明な発現誘導が一つの要因である可能性を提示した。

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 2 件)

1. Yoshioka T, Kato S, Gamoh M, Chiba N, Suzuki T, Sakayori N, Kato S, Shibata H, Shimodaira H, Otsuka K, Kakudo Y, Takahashi S, Ishioka C. Phase I/II study of sequential therapy with irinotecan and S-1 for metastatic colorectal cancer. Br J Cancer. 2009

Dec 15;101(12):1972-7. 査読有り

2. Shibata H, Yamakoshi H, Sato A, Ohori H, Kakudo Y, Kudo C, Takahashi Y, Watanabe M, Takano H, Ishioka C, Noda T, Iwabuchi Y. Newly synthesized curcumin analog has improved potential to prevent colorectal carcinogenesis in vivo. Cancer Sci. 2009 May; 100(5): 956-60 査読有り

[学会発表] (計 13 件)

1. 添田大司, 下平秀樹, 小峰啓吾, 加藤俊介, 森隆弘, 角道祐一, 大堀久詔, 高橋信, 秋山聖子, 鈴木貴夫, 蒲生真紀夫, 渡辺みか, 岩間憲行, 鈴木博義, 石岡千加史: 大腸癌における抗 EGFR 抗体薬のバイオマーカー EGFR シグナル伝達因子検索の意義. 第 48 回日本癌治療学会学術集会 (京都・国立京都国際会館) 2010 年 10 月 29 日. シンポジウム

2. 下平秀樹, 森隆弘, 角道祐一, 高橋信, 大堀久詔, 秋山聖子, 坂本康寛, 高橋昌宏, 添田大司, 工藤千枝子, 吉田こず恵, 塩野雅俊, 高橋雅信, 加藤俊介, 石岡千加史: 東北大学病院化学療法カンファレンスの現状と課題. 第 48 回日本癌治療学会学術集会 (京都・国立京都国際会館) 2010 年 10 月 28 日. 口演

3. 加藤俊介, 森隆弘, 柴田浩行, 下平秀樹, 角道祐一, 大塚和令, 高橋信, 高橋雅信, 大堀久詔, 秋山聖子, 佐々木巖, 古山美智子, 本間とし子, 原沙絵, 石岡千加史: 東北大学病院腫瘍内科のセカンドオピニオン外来の現状と役割. 第 48 回日本癌治療学会学術集会 (京都・グランドプリンスホテル京都) 2010 年 10 月 28 日. ワークショップ

4. 角道祐一: 当院における外来化学療法の現状. 石巻がん化学療法セミナー (石巻・石巻グランドホテル) 2010 年 10 月 22 日. セミナー一般講演

5. 高橋昌宏, 角道祐一, 坂本康寛, 高橋信, 加藤俊介, 石岡千加史: DRAM は p53 依存性アポトーシスの効果を増強する
Overexpression of DRAM enhances p53-dependent apoptosis. 第 69 回日本癌学会学術総会 (大阪・リーガロイヤルホテル大阪) 2010 年 9 月 23 日. ポスター

6. 添田大司, 下平秀樹, 小峰啓吾, 加藤俊介, 森隆弘, 角道祐一, 大堀久詔, 高橋信, 坂本康寛, 鈴木貴夫, 安田勝洋, 石岡千加史: FcγR 遺伝子多型と KRAS 野生型の進行・再発大腸癌における cetuximab の治療効果
FcR polymorphisms and clinical outcome of cetuximab in metastatic colorectal cancer patients with wild-type KRAS. 第 69 回日本癌学会学術総会 (大阪・大阪国際会議場) 2010 年 9 月 23 日. ポスター

7. 下平秀樹, 高橋信, 大堀久詔, 角道祐一, 加藤俊介, 石岡千加史: 悪性末梢性神経鞘腫を併発した神経線維症の 2 例. 第 16 回日本家族性腫瘍学会学術集会 (新潟・新潟コンベンションセンター (朱鷺メッセ)) 2010 年 7 月 9 日. 一般口演

8. 添田大司, 下平秀樹, 小峰啓吾, 加藤俊介, 森隆弘, 角道祐一, 大堀久詔, 高橋信, 秋山聖子, 渡辺みか, 石岡千加史: 進行・再発大腸癌における KRAS、BRAF および PIK3CA 遺伝子変異解析と cetuximab の治療効果. 第 8 回日本臨床腫瘍学会学術集会 (東京・東京ビッグサイト) 2010 年 3 月 19 日. 一般口演

9. 岡田佳也, 坂本康寛, 大堀久詔, 高橋信, 角道祐一, 秋山聖子, 下平秀樹, 森隆弘, 加藤俊介, 石岡千加史: 軟部肉腫に対する AIM 療法の効果と安全性に関する後ろ向き解析. 第 8 回日本臨床腫瘍学会学術集会 (The 8th Annual Meeting of Japanese Society of Medical Oncology) (東京・東京ビッグサイト) 2010 年 3 月 18 日. 一般口演

10. 小峰啓吾, 大塚和令, 加藤俊介, 森隆弘, 下平秀樹, 角道祐一, 高橋信, 高橋雅信, 大堀久詔, 西條憲, 今井源, 井上正広, 河合貞幸, 石岡千加史: 当科における GIST 治療の検討. 第 47 回日本癌治療学会学術集会 (横浜・パシフィコ横浜) 2009 年 10 月 23 日. 示説 49 (ポスター)

11. 添田大司, 下平秀樹, 高橋雅信, 小峰啓吾, 加藤俊介, 森隆弘, 角道祐一, 大堀久詔, 高橋信, 渡辺みか, 石岡千加史: 当院における進行・再発大腸癌に対する KRAS 遺伝子解析の実際. 第 47 回日本癌治療学会学術集会 (横浜・パシフィコ横浜) 2009 年 10 月 23 日.

12. 工藤千枝子, 山越博幸, 佐藤温子, 大堀久詔, 角道祐一, 石岡千加史, 岩渕好治, 柴田浩行: The therapeutic potentials about the novel curcumin analogs; apoptosis induction abilities and anti-metastatic effects

合成新規クルクミン類縁体の抗腫瘍活性に関する評価-アポトーシス誘導能および転移浸潤抑制能について. 第 68 回日本癌学会学術総会 (横浜・パシフィコ横浜) 2009 年 10 月 3 日. ポスター

13. Yasuda, K., Kato, S., Sakamoto, Y., Watanabe, G., Mashiko, S., Sato, A., Kakudo, Y., Ishioka, C.: Cytoplasmic localized wild-type p53 and S121F super p53 still retains apoptosis inducible abilities. 2009 AACR Annual Meeting, April 19, 2009. (Denver Colorado USA. Poster)

[図書] (計 1 件)

1. 角道祐一, 石岡千加史 他
50 音順・商品名でひける治療薬辞典 総合医学社 2010 1-2, 16-17, 88-89, 119, 229-230, 865-866, 961, 1249-1251

[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

<http://www.co.idac.tohoku.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

角道 祐一 (KAKUDO YUICHI)

東北大学・加齢医学研究所・助教

研究者番号: 10396484