

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究 (B)
 研究期間：2006 年～2008
 課題番号：18390442
 研究課題名 (和文) 子宮体癌の新しい分子標的治療開発のための P53 変異と P63, P73 の機能解析
 研究課題名 (英文) Functional analysis of p53 mutation and p63/p73 for novel molecular targeting therapy of endometrial cancer
 研究代表者 櫻木 範明 (NORIAKI SAKURAGI)
 北海道大学・大学院医学研究科・教授
 70153963

研究成果の概要：

dominant negative (DNE)作用を有するp53変異が体癌の高悪性化を誘導する機序を明らかにするために本研究を行い、以下の結果を得た。野生型p53を有する子宮体癌細胞HHUAに導入したp53 DNE変異 (R273H) は野生型p53の標的遺伝子であるp21、Bax並びにMDM2のpromoterの転写機能を強く抑制した。更に、HHUA細胞の浸潤能および運動能が促進され、浸潤抑制作用のあるMaspin, PAI-1およびKAI1のmRNA発現が低下した。一方、p53 DNE変異 (R273H) の発現はp53 null癌細胞の浸潤能および運動能には関与しなかった。すなわちR273Hは、gain-of-function作用ではなく、野生型p53遺伝子の転写機能を阻害し、癌浸潤抑制遺伝子の発現を抑制することで浸潤能および運動能を促進すると考えられた。DNE作用の無いR213Q には浸潤能、運動能促進作用は認められなかった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	8,400,000	2,520,000	10,920,000
2007 年度	3,300,000	990,000	4,290,000
2008 年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
年度			
年度			
総計	15,400,000	4,620,000	20,020,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：婦人科腫瘍学

1. 研究開始当初の背景

子宮体癌は欧米では婦人科がんの中でも最も発生頻度の高いがんの一つである。本邦においても子宮体癌の発生頻度は年々増加傾向にあり、罹患数は1983年の約2500人であったものが2000年には約5,000人と20年足らずの間に倍増したと推定されている。子宮体癌の危険因子と考えられる肥満、糖尿病、食生活の欧米化、晩婚化、出産回数の低下、さらには高齢化などの社会的背景を考慮すると、今後さらにその罹患数の増加が予測される。全子宮癌に対する体癌の割合は最近では30-40%に達しており、近い将来その比率が逆転し体癌が最も頻度の高い婦人科癌となるであろう。体癌は子宮内膜から発生する腺癌であり、一般に放射線抵抗性であり、化学療法についても卵巣癌に比べ感受性は低く、卵巣癌のようなgold standard regimenが存在しないことから新しい早期診断法の研究開発と新しい治療戦略を構築する必要がある。

子宮体癌患者では不正性器出血を早期から認め、そのため比較的早期に診断されることが多く予後良好の疾患とみなされがちである。しかしながらFIGO（国際婦人科産科連合）Annual Reportに基づいて体癌、頸癌、卵巣癌について浸潤癌の5年生存率（%）を期別に比較してみると体癌は必ずしも予後良好の癌ではないことが判る。子宮体癌においては手術進行期が採用されており、術後の病理組織学的検索によるリスク因子の評価に基づいた個別化治療が行われつつあるが、個々の因子の詳細は術後に判明するものであり、術前に評

価可能な予後を良く反映する分子マーカーが存在すれば、それによる治療の個別化が今後進む可能性がある。また分子マーカーをターゲットとした分子標的治療に関する検討によって現在の補助療法をさらに効果的にし、進行・再発体癌の治療成績の向上、ひいては子宮体癌全体の予後改善に寄与することが期待される。p53癌抑制遺伝子の変異はもっとも高率にヒト悪性腫瘍で観察される遺伝子変異であり、子宮体癌においては進行期、組織型と共に独立した重要な予後因子である(Sakuragi N, Watari H, Ebina Y, Yamamoto R, Steiner E, Koelbl H, Yano M, Tada M, Moriuchi T. Functional analysis of p53 gene and the prognostic impact of dominant-negative p53 mutation in endometrial cancer. *Int J Cancer*. 2005 Apr 11; [Epub ahead of print])。野生型p53は細胞周期調節作用、DNA修復作用、アポトーシス誘導作用などの機能を有している。p53変異は細胞周期調節やアポトーシス機構を阻害するばかりではなく浸潤能や抗癌剤耐性などの悪性形質発現、すなわちgain-of-functionにも関与していると考えられている。このgain-of-functionの機序を解明することは、p53変異を有する予後不良体癌に対する新しい分子標的治療の臨床応用につながるものと期待される。

p53変異そのものの機能解析とともに、p53と構造的に非常に近いp63, p73の2つの相同遺伝子が発見され、その機能に大きな関心が持たれている。発生過程においてこの2つの遺伝子はp53に依存しない新たな

機能を示す。p63は上皮性幹細胞の再生に、p73は海馬の神経発生、フェロモン調節などに関わっている。これらのp53相同遺伝子が腫瘍生物学にどのような役割を果たしているかは未だ十分に解明されていない。しかし、これらが古典的なKnudson型の癌抑制遺伝子ではないことが明らかにされてきている (Moll UM, Slade N. p63 and p73: roles in development and tumor formation. *Mol Cancer Res* 2004;2:371-386)。p53類似機能あるいは p53抑制的機能を持つ2つの型のp73蛋白とp63蛋白が存在すること、これらの蛋白間に緊密なクロストークが存在することは、この蛋白ファミリーに癌抑制と癌発生の両方の役割を賦与することになる。p53変異の有無とその機能状態、ならびにこれら蛋白ファミリーの発現バランスがどのように発癌と進展に関わっているのかについて、これらの因子を臨床経過ならびに予後と照らし合わせて詳細に比較検討することが子宮体癌を含めて新しい癌治療戦略に必要であると考えられる。

2. 研究の目的

従来p53変異の意義は正常p53の転写因子としての機能が喪失することによる細胞周期調節機能やアポトーシス誘導機能の面から捉えられ、野生型p53を導入することにより、失われた機能が回復し抗癌効果が得られるものと期待されていた。しかしこれまでのところ野生型p53導入による遺伝子治療は期待された効果をあげていない (Zeimet AG, Marth C. Why did p53 gene therapy fail in ovarian cancer? *Lancet Oncol* 2003;4:415-22. Review)。この戦略の失敗はp53変異のもつ dominant negative作用やgain-of-function作用を

考慮に入れていなかったためと思われる。今後p53変異をターゲットとした新しい治療戦略を構築するためにはp53変異の機能について、loss of function, transdominanceとともにgain-of-functionの解析が必須である (Fig. 1)。

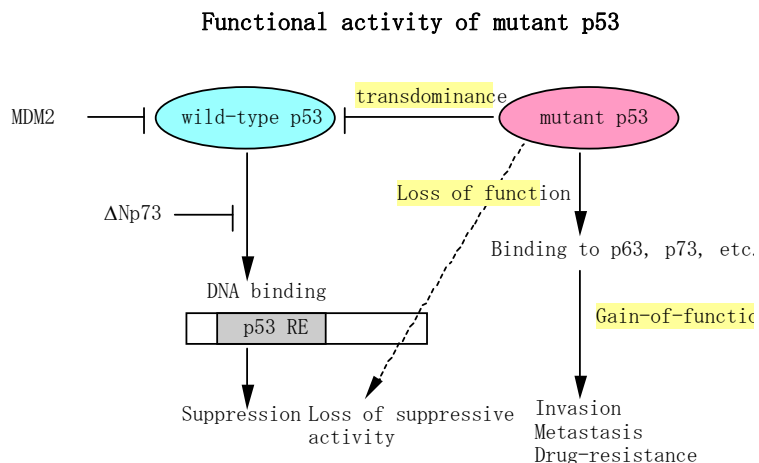


Figure 1

p53 変異はヒトがんの 50%に認められ p53 の不活化を回復させることによる新しい治療法開発の試みが続けられている。そのターゲットとしては、1) 野生型 p53 遺伝子の導入、2) MDM2, HPV E6 など p53 の ubiquitin 化と分解に関与する蛋白、3) 変異 p53 蛋白の正常転写機能の回復、4) 変異 p53 蛋白の gain-of-function の阻害などが考えられる。これまでのところ p53 の C-末端に対する抗体、p53 の C-末端に対応したペプチド、低分子化合物 (PRIMA-1、CP-31398) などについて検討が加えられている。PRIMA-1 や CP-31398 が p53 変異を有するヒト骨肉腫細胞、卵巣癌細胞、肺癌細胞株の増殖能を抑制すること、骨肉腫細胞のアポトーシスを誘導すること、これらの効果が p53 変異蛋白の転写調節能を正常に戻すことによりもたらされることが明らかにされている。

われわれは野生型 p53 を有する体癌細胞株に dominant negative 作用をもつ変異 p53 を導入し、dominant negative p53 変異が悪性形質発現をもたらす機序を明らかにすること、p53 を欠失している体癌細胞に dominant negative p53 変異あるいは recessive p53 変異を導入し、同時に siRNA を用いて p63, p73 を knockout し、gain-of-function 効果の発現機序を解明し、ならびに CP-31398 がこれらの悪性形質発現を解消する機序を明らかにすることを計画した。

子宮体癌における変異 p53 の transdominance, gain-of-function 機能の発現機序はこれまで明らかにされていない問題であり、その解明は独創的な治療法開発に有用な知見を与えてくれると考えられる。

3. 研究の方法

実験材料

実験には体癌細胞株は類内膜腺癌由来 HHUA を用いる。HHUA は野生型 p53 遺伝子を有することを確認している (Sakuragi N, Hirai A, Tada M, Yamada H, Yamamoto R, Fujimoto S, Moriuchi T. Dominant negative mutation of p53 tumor suppressor gene in endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol* 2004;83:485-490)。

p53 変異に対する作用を示す低分子化合物として CP-31398 を Pfizer Inc. から提供を受けた。CP-31398 は DMSO に 10 mg/ml の濃度になるように溶解し、stock solution とする。本試薬を細胞培養液で希釈し、2-20 mg/ml の濃度で、細胞への暴露時間を 4-6 時間とすることで p53-independent effect を回避し p53 機能への効果を観察することができる。

変異 p53 遺伝子の導入による増殖能、遊走能、浸潤能の変化の検討

R273H, R213Q, empty vector をそれぞれ HHUA 細胞に導入し、dominant negative 変異型 p53 導入細胞 273H、recessive 変異型 p53 導入細胞 213Q および control 細胞株 E を樹立し、p53 遺伝子変異を Yeast functional assay で確認した。癌細胞の増殖、遊走、浸潤、抗癌剤耐性など gain-of-function について検討する。

1) 変異 p53 遺伝子導入体癌細胞について細胞増殖曲線を求め、変異 p53 が、その transdominance の有無により細胞増殖能にどのような効果をおよぼすかを検討する。

2) 変異 p53 導入細胞について in vitro cell migration assay を行い、フィルターを通過した細胞数をカウントし、変異 p53 の transdominance の有無と遊走能の関連を検討する。

3) 変異 p53 導入細胞について in vitro cell invasion assay を行い、マトリゲルをコートしたフィルターを通過する細胞数をカウントし、変異 p53 の transdominance の有無と浸潤能の関連を検討する。

dominant negative あるいは recessive 変異 p53 遺伝子導入による抗癌剤感受性の変化の検討

p53 変異を有する子宮体癌の予後が不良であること理由は、p53 変異が浸潤・転移など癌の進行と関連していることが想定されることとともに、手術治療後に再発高リスク症例に対して用いられる抗癌剤の感受性が低いことが考えられる。現在術後補助療法として抗癌剤が用いられることが多く、p53 変異の機能的種類と抗癌剤感受性との関連は重要な問題である。

1) 変異 p53 遺伝子導入細胞と抗悪性腫瘍薬感受性についての検討

HHUA に R273H、R213Q、empty vector を導入し樹立した細胞を用いて、各種抗悪性腫瘍薬に対する感受性の差異があるかについて、cisplatin, adriamycin, paclitaxel, docetaxel, 5-FU を種々の薬剤濃度 (IC50 の 10-500%) で添加して、細胞増殖曲線、MTT assay によって検討する。さらに、フローサイトメトリーによるアポトーシス解析も行う。

2) CP-31398 による遊走能、浸潤能、抗癌剤感受性の変化に関する検討

dominant negative p53 変異 R273H を強制発現させた細胞株を用いて R273H 蛋白に対する CP-31398 の効果を検討する。CP-31398 を 0、1、1.5、2mg/ml 濃度で添加し、培養 24 時間、36 時間、48 時間、72 時間で、細胞遊走能、浸潤能の変化を確認する。抗悪性腫瘍薬と CP-31398 との併用によって、抗悪性腫瘍薬に対する感受性が亢進するかについて検討する。そのため、まず CP-31398 添加培養 24 時間後に各種抗悪性腫瘍薬の IC50 より低濃度の抗悪性腫瘍薬の添加を開始し、24 時間、48 時間後の死細胞の割合、アポトーシス細胞の割合を FACS、Annexin V staining によるアポトーシス解析にて行う。

dominant negative 変異 p53 導入による遺伝子発現変化の検討

変異 p53 により発現調節を受ける多くの遺伝子があるが、これまでに癌細胞で報告されている p53 変異と関連して異常発現を示す遺伝子の他に、新しく体癌細胞において tissue-specific に抑制あるいはされる遺伝子群を明らかにすることは重要である。そこで HHUA および R273H 導入 HHUA 細胞から RNA を抽出し、cDNA microarray

(Affimetrix) を用いて遺伝子発現変化を網羅的に解析する。

4. 研究成果

1) p 53 dominant negative 変異 R273H の発現により体癌細胞株 HHUA の増殖能、運動能、浸潤能が促進された。すなわち、

- a. 273H 細胞は、213Q 並びに mock 細胞株に比べて、p21、Bax 並びに MDM2 遺伝子 promoter の転写活性が有意に低下し、p53 変異の dominant negative 作用が認められた。
- b. 273H 細胞では、213Q 並びに mock 細胞株に比べて、増殖能が有意に亢進していた。これらは全て CP-31398 処理により抑制された。
- c. 273H 細胞では、213Q 並びに mock 細胞株に比べて、浸潤能および運動能が有意に亢進していた。これらは全て CP-31398 処理により抑制された。
- d. 273H 細胞では、213Q 並びに mock 細胞株よりも、Maspin、PAI-1 および KAI1 の mRNA 発現が有意に低下していた。

2) p 53 変異 R273H の発現が、p53 を欠失している癌細胞の浸潤能および運動能には関与しないことを明らかにした。すなわち、

- a. SK-OV-3-273H と SK-OV-3-mock、また Saos-2-273H と Saos-2-mock 細胞株の間に運動能と浸潤能の変化が認めなかった。
- b. SK-OV-3-273H と SK-OV-3-mock、また Saos-2-273H と Saos-2-mock 細胞株の間に Maspin、PAI-1 および KAI1 の mRNA 発現の変化を認めなかった。

【考察】

野生型 p53 を有する体癌細胞 HHUA において、p53 遺伝子変異 R273H が強いドミナントネガティブ作用を示し、野生型 p53 の標的遺伝子 p21、Bax 並びに MDM2 の promoter の転写機能解析を

有意に抑制していた。更に、HHUA細胞の浸潤能および運動能が有意に促進されることが認められた。この変化と関連して、273H細胞では、Maspin, PAI-1およびKAI1のmRNA発現が有意に低下していた。これらの変化は変異型p53の機能を回復できるCP-31398の処理により抑制された。一方、R273Hの発現はp53-null癌細胞SK-OV-3やSaos-2の浸潤能および運動能を促進することができず、この変異がドミナントネガティブ作用により体癌HHUA細胞の浸潤および運動能を促進していると考えられた。

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 3件)

Dong P, Tada M, Hamada J, Nakamura A, Moriuchi T, Sakuragi N. p53 dominant-negative mutant R273H promotes invasion and migration of human endometrial cancer HHUA cells. Clin Exp Metastasis. 2007;24: 471-483. (査読あり)

Steiner E, Plata K, Interthal C, Schmidt M, Faldum A, Hengstler JG, Sakuragi N, Watarai H, Yamamoto R, Kölbl H. Diabetes mellitus is a multivariate independent prognostic factor in endometrial carcinoma: a clinicopathologic study on 313 patients. Eur J Gynaecol Oncol. 2007;28:95-7. (査読あり)

Ahn HJ, Bae J, Lee S, Ko JE, Yoon S, Kim SJ, Sakuragi N. Differential expression of clusterin according to histological type of endometrial carcinoma. Gynecol Oncol.

2008;110: 222-229. (査読あり)

[学会発表] (計 3件)

董 培新、渡利英道、水上尚典、櫻木範明. 変異型 p53 の機能を回復する CP-31398 は p53 遺伝子ドミナントネガティブ変異依存性体癌細胞増殖および浸潤の亢進を抑制する. 第 58 回日本産科婦人科学会学術講演会. 2006.4.22-25、横浜

Dong P, Tada M, Hamada J, Nakamura A, Moriuchi T, Sakuragi N. p53 dominant-negative mutant R273H promotes invasion and migration of human endometrial cancer HHUA cells. American Association for Cancer Research, April 14-18, 2007, Los Angeles, CA, U.S.A.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

櫻木 範明

北海道大学・大学院医学研究科・教授

70153963

(2) 研究分担者

渡利 英道

北海道大学病院・婦人科・講師

10344508

(3) 連携研究者

守内 哲也

北海道大学・遺伝子病制御研究所・教授

20174394