

令和 3 年 5 月 22 日現在

機関番号：32665

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K24131

研究課題名(和文)p53変異細胞特異的に抗腫瘍効果を示す新規化合物9bwの作用機序の解明

研究課題名(英文)Analysis of the mechanism of anti-cancer effect of 9bw specific on the cells with mutant p53

研究代表者

築根 直哉 (TSUKUNE, Naoya)

日本大学・歯学部・専修医

研究者番号：20847785

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：これまでに、土壌微生物由来の新規化合物 Nonaethylene glycol mono (‘4-iodo-4-biphenyl) ester (9bw)は、がん抑制遺伝子p53に変異のある腫瘍細胞に対しては強い増殖抑制効果を示すが、p53野生型のがん細胞に対してはほとんど毒性を持たないことを確認している。9bwによる酸化的リン酸化の阻害はp53の変異の有無に関係なくみられることから、その後の反応過程に何等かの差がある可能性が考えられた。そこで、本研究では9bw投与後のATPの低下速度を詳細に検討したが、p53変異の有無で顕著な違いは見られなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では新規ポリエチレングリコール誘導体9bwが、変異型p53を持つ細胞に対し特に強い毒性を示す原因の解明を試みた。結果的に、現時点で明確な理由はつかめていないが、少なくとも9bwによる酸化的リン酸化の抑制とそれに伴うATP産生の低下レベルにはp53野生型と変異型の間で差が無いことが確認できた。多くの抗腫瘍薬は細胞のDNAを損傷し、それにより細胞死を誘導するが、変異型p53を持つ細胞は、こうしたタイプの抗腫瘍薬に対して強い耐性を示すことから、p53変異型の腫瘍細胞に対して特に強い障害性を示す9bwは理想的な抗腫瘍薬候補であり、その作用機序を調べる本研究の社会的意義は大きいと考える。

研究成果の概要(英文)：Previously I found that nonaethylene glycol mono (‘4-iodo-4-biphenyl) ester (9BW), a polyethylene glycol derivative synthesized by modifying a compound originally extracted from filamentous bacteria, induced strong growth inhibition in cancer cells carrying mutant type p53, but not in the cells with wild type p53. Since 9bw suppress oxidative phosphorylation of the cells regardless of p53 status, I hypothesized that there are difference between p53 wild-type cells and mutant cells in inhibition rate of ATP production or susceptibility for reduced ATP concentration. To evaluate these hypotheses, I minutely investigated the ATP reduction rate of the cells after 9bw addition, however I could not see clear difference in the reduction rate between p53 wild type and mutant cells. Further analyses are needed to find the reason why 9bw shows stronger cytotoxicity on the cells with mutant p53 than on those with wild type p53.

研究分野：腫瘍学

キーワード：ポリエチレングリコール 口腔がん

1 . 研究開始当初の背景

口腔がんは舌, 歯肉, 口腔底, 頬粘膜, 口蓋, 口唇にできる悪性腫瘍の総称であり, 頭頸部がんの中では, 喉頭がんに次いで高い罹患率・死亡率を示す。治療法は外科的な切除が主であり, 病期や部位, 組織型, 患者の健康状態等に応じて, 放射線療法や化学療法が術後の補助療法として併用される。一方, 臨床試験において術前にシスプラチン(CDDP)や5-FUの投与を行う群と手術単独群で比較した場合に, 予後に差が無いとの結果が得られており, 術前の化学療法は推奨されていない。口腔がんに対する外科療法・放射線療法は, 顔貌の変形や飲食・会話能力への障害といった弊害を生じることから, 高い QOL を維持するために新規の有効で副作用の少ない化学療法剤の開発が求められている。

土壌微生物からの抽出した新規化合物 Nonaethylene glycol mono (' 4-Iodo-4-biphenyl) ester (9bw) は, 歯肉細胞がん Ca9-22 をはじめとする各種腫瘍細胞の増殖を特異的に抑制する一方, 正常細胞に対してはほとんど作用しないことが判っている。その詳細な作用機序を解明するために, 複数の種類の腫瘍細胞株について 9bw の効果を検証した結果, 9bw はがん抑制遺伝子 p53 に変異のある細胞に対しては強い増殖抑制効果を示すが, p53 野生型のがん細胞に対してはほとんど毒性を持たないことを発見した。

50%以上のがん細胞で p53 が変異していることが判っているが, p53 は細胞が DNA 損傷等のストレスにさらされた際に細胞死を誘導する機能を持ち, p53 変異型のがん細胞では, CDDP やアドリアマイシン等の DNA 損傷を誘発する一般的な抗がん剤が効きにくい。したがって, p53 変異型細胞に特異的な毒性を示す 9bw は, 高い薬効と正常細胞への安全性を持つ抗がん剤として非常に期待できる。そこで「9bw はどのような機序で p53 変異型の腫瘍細胞特異的に障害性を示すのか」という問いを解決するために, 以下の研究を計画した。

2 . 研究の目的

(1) 9bw の標的分子を同定すること, (2) 9bw が標的分子の発現または活性を阻害する機序を解明すること, (3) p53 変異の有無と, それらの機序に何らかの違いがあるか検討することにより, 9bw が p53 に変異を持つ腫瘍細胞特異的に毒性を示す理由を解明することを目的とする。

3 . 研究の方法

(1) 用いた細胞株

本研究では P53 野生型細胞として舌がん細胞株 UM-SCC-6, 乳がん細胞株 MCF7, 神経芽種細胞株 NB1, NB9, p53 変異型の細胞としては歯肉がん細胞株 Ca9-22, 舌がん細胞株 HSC3, 乳がん細胞株 MDA-MB231, 膵がん細胞株 MiaPaca-2, 神経芽種細胞株 SK-N-AS および Kelly を用いた。

(2) 関連遺伝子の発現解析

細胞周期関連分子, p53 下流遺伝子の mRNA の発現レベルは real-time PCR によって定量し, タンパク発現レベルもしくは活性化レベルは Western blotting を用いて解析した。DNA 二本鎖切断のレベルについては H2X の量を Western blotting により半定量的に確認した。

(3) ATP 濃度の解析

細胞内 ATP 濃度の定量には Intracellular ATP 測定キット (TOYO B-net) を用い、ルシフェラーゼ活性を解析することで行った。細胞を 5000 個/ml の密度で 96well プレートに播種し、24 時間後に 1 μ M の 9bw を添加した。その後 photometer を用いて ATP の濃度測定を行った。測定は継時的に、各 4well ずつおこなった。

4. 研究成果

(1) 9bw 投与後の p53 標的分子の発現、活性化レベルの解析

細胞を 1 μ M の 9bw 存在下もしくは非存在下で 24 時間培養した後、RNA 抽出およびタンパク抽出を行い、p53 の制御下にある遺伝子群の発現レベルを調べた。その結果、p53 の発現レベルや 15 番目のセリンのリン酸化状態には 9bw 投与による変化はなく、p53 野生型細胞と変異型細胞の間でも違いが見られなかった。また、p53 野生型細胞と変異型細胞どちらにおいても、CDKN1A の mRNA およびタンパクの発現レベルが大きく上昇したが、変異型細胞における上昇率が高い傾向が見られた。なお、逆に野生型より上昇率が低い細胞株もあり、9bw に対する反応性の違いを CDKN1A の誘導レベルの違いに帰するのは難しいと考えた。

(2) 9bw 投与後の DNA 二本鎖切断状態の比較

細胞を 1 μ M の 9bw 存在下もしくは非存在下で 24 時間培養した後、タンパク抽出を行い、H2X のレベルを Western blotting によって調べた。その結果、p53 野生型細胞、変異型細胞いずれにおいても、9bw 投与後の H2X の量には変化が見られず、DNA 切断レベルに違いはないという結果となった。

(3) 9bw 投与後の ATP 濃度低下速度の解析

これまでに、9bw が電子伝達系の呼吸鎖複合体 I の活性を阻害し、細胞の ATP の産生を抑制することで腫瘍細胞の増殖抑制ひきおこすことは分かっていたが、この阻害効果は p53 の変異の有無に関係なく同等に起こり、また ATP の減少量にも違いがみられなかった。しかしながら、これまでの細胞内 ATP 濃度の測定方法には技術的に問題があった可能性出てきたため、新たに方法を変えて再解析を行った。

これまでは培地に直接 ATP 測定試薬を入れる方式で測定を行っていたが、培地中の成分の影響を受けて結果がばらつく可能性が否定できないため、培地を除去し、溶解バッファー中に溶出した ATP を測定する方式を試みた。また測定時間も、これまでは 9bw 投与後 8 時間目のみの ATP 濃度を測定していたが、新しい方法では投与後 1~2 時間おきに 12 時間目までの間、継時的に濃度測定を行った。その結果、解析したほとんどの細胞において、投与後 4 時間目以降から ATP 濃度の低下が見られ始めたが、p53 変異の有無と低下のタイミングや低下量に顕著な違いは見られなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nagasaki-Maeoka E, Ikeda K, Takayama KI, Hirano T, Ishizuka Y, Koshinaga T, Tsukune N, Takayama T, Inoue S, Fujiwara K.	4. 巻 111
2. 論文標題 Polyethylene glycol derivative 9bw suppresses growth of neuroblastoma cells by inhibiting oxidative phosphorylation.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 2943-2953
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.14512	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------