

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 8 月 24 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590497

研究課題名（和文） MDM2 を標的とした新規胃癌治療薬の開発

研究課題名（英文） Potent *in vitro* and *in vivo* antitumor effects of MDM2 inhibitor nutlin-3 in gastric cancer cells

研究代表者

兵頭 一之介（HYODO ICHINOSUKE）

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号：60416469

研究成果の概要（和文）：Murine double minute 2 (MDM2)はユビキチン化を介して p53 を分解する。MDM2 の阻害は、その過剰発現により p53 機能が抑制されている野生型 p53 腫瘍細胞に有効ではないかと考えられる。本研究では MDM2 阻害剤 nutlin-3 のヒト胃癌細胞 p53 野生株におけるアポトーシスの誘導や細胞周期の停止を確認した。p53 野生株 MKN-45 皮下移植ヌードマウスの系においても nutlin-3 単剤、5-FU との併用で腫瘍増殖を抑制した。MDM2 阻害は野生型 p53 遺伝子を有する胃癌に対する有望な治療薬になり得ると考えられた。

研究成果の概要（英文）：Murine double minute 2 (MDM2) is a negative regulator of p53. An MDM2 inhibitor, nutlin-3, stabilized p53 and induced apoptosis in the gastric cell lines with wild-type p53. An *in vivo* antitumor effect of nutlin-3 alone and its additive augmentation by 5-fluorouracil were confirmed in MKN-45 xenograft tumor model. Nutlin-3 showed potent antitumor activity against human gastric cancer cells with wild-type p53 and shows promise as a single agent and in combination with conventional anticancer drugs.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：消化器内科学

科研費の分科・細目：境界医学・応用薬理学

キーワード：胃癌，MDM2，p53

1. 研究開始当初の背景

我が国における胃癌の死者数は厚生労働省の 2003 年の調査では 49,535 人（男 32,142 人，女 17,393 人）で，男女とも癌の中で第 2 位の頻度となっている。研究代表者はこれまで胃癌に対する化学療法の新薬開発に深く関わってきたが，現在最も効果的な

レジメンにおいても奏効率 54%，生存期間中央値 13 ヶ月にとどまり，満足のいく成績ではない。我々は新たな標的分子として，MDM2 に着目した。MDM2 は PI3-Akt 経路の Akt により活性化され，癌抑制遺伝子 p53 の働きを阻害する他，癌細胞の細胞周期，分化，DNA 合成，細胞増殖に関与している。

実際、各種癌細胞では MDM2 が過剰に発現していることが報告されている。Nutlin-3 は 2004 年に米国で開発された小分子化合物で、MDM2 の選択的阻害作用を有するユニークな薬剤である。MDM2 を抑えることで、p53 の機能が回復し癌細胞増殖を停止させることができると考えられる。この薬剤は既存の抗癌剤と全く異なる作用をもった新しい抗癌剤として現在注目されており、米国では悪性黒色種に対し phase I の臨床試験が開始された。しかし、消化器系癌、中でも我が国に多く、米国では比較的頻度の少ない胃癌には全く基礎的な検討がなされていない。また、この薬剤が抗腫瘍効果を最大限に発揮するには p53 に変異がないことが望ましいが、各癌種の中でも胃癌は p53 の変異率が約 30% と少なく、Nutlin-3 の治療対象として適切であると考えられる。

2. 研究の目的

- (1) 本研究では、胃癌を対象として Nutlin-3 による新たな治療法を開発するため、*in vitro* および *in vivo* での抗腫瘍効果を検証することを目的とし、本研究計画を立案した。
- (2) 本研究では、各種ヒト胃癌細胞株の MDM2 発現及び p53 変異について解析し、それら細胞株における *in vitro* での抗腫瘍効果とその特異性を検証する。また、胃癌細胞株を用いた担癌動物モデルを作成後、Nutlin-3 を各種濃度で腹腔内投与し、*in vivo* での抗腫瘍効果を確認する。また既存の化学療法薬との併用効果も明らかにする。
- (3) これらの研究と平行して胃癌のヒト臨床検体において、野生型 p53 を有し MDM2 を高発現している胃癌の頻度と臨床的特徴について解析し、本研究の臨床応用に必要な情報収集を行なう。

3. 研究の方法

- (1) ヒト胃癌細胞株 7 種類(p53 野生株 4 種類 : MKN-45, NUGC-4, STKM-2, SNU-1 ; p53 変異株 3 種類 : NUGC-3, NUGC-2, STKM-1)を用い、各細胞株における p53, MDM2, MDM4 及び p14^{ARF} の発現レベルを Western blotting にて解析した。また、これら細胞株における MDM2 及び MDM4 癌遺伝子増幅について、Quantitative RT-PCR法にて解析した。
- (2) p53 野生株 4 種類 (MKN-45, NUGC-4, STKM-2, SNU-1) 及び p53 変異株 1 種類 (NUGC-3) を nutlin-3 と 72 時間共培養し、その抗腫瘍効果について WST-8 assay にて評価した。
- (3) 同様に、10 μ M nutlin-3 との共培養 0, 4, 8, 24 時間後における、p53 シグナル下流蛋白 (p21, Noxa, Cleaved PARP) の発現レベルについて、Western blotting 法にて解析した。

- (4) また、上記の p53 野生株 3 種類 (MKN-45, NUGC-4, SNU-1) 及び p53 変異株 1 種類 (NUGC-3) を 10 μ M nutlin-3 と共培養し、cell cycle arrest や apoptosis の誘導について、Flow cytometry にて解析した。
- (5) 更に、上記の p53 野生株 4 種類を nutlin-3 (1, 2, 5 μ M) と 5-FU (0.25, 1 μ M) あるいは cisplatin (1 μ M) と共培養し、併用した薬剤の相互作用について、Chou らの報告した Combination Index (CI)-isobologram 法にて評価した。
- (6) *in vivo* における nutlin-3 の抗腫瘍効果について、MKN-45 皮下移植マウスを用い評価した。p53 野生株 MKN-45 細胞浮遊液 100 μ L (5 \times 10⁶ 個) を 5~6 週齢のヌードマウス右大腿部皮下へ移植し、腫瘍体積(0.5 \times 長径 \times 短径²)の平均値が約 100 mm³に達した時点で、コントロール群と治療群とに割り付けした。腫瘍皮下移植モデルへの治療群として、nutlin-3 40mg/kg 投与群、5-FU 40mg/kg 投与群、nutlin-3 40mg/kg 及び 5-FU 40mg/kg 併用投与群を各々設け(n=6)、隔日にて 6 回腹腔内投与し、各群の腫瘍容積の評価を行った。コントロール群には同量の DMSO の投与を行った。また、無拘束・自由給水・自由摂食の状態にて、体重変動や異常行動の有無をも観察した。

4. 研究成果

- (1) p53 野生株 4 種類 (MKN-45, NUGC-4, STKM-2, SNU-1) のうち、MKN-45 では、MDM2 遺伝子増幅を伴った MDM2 蛋白の過剰発現が認められ、また、SNU-1 では MDM4 蛋白の過剰発現が認められたが、MDM4 遺伝子増幅は認められなかった。残りの細胞 2 種類 (NUGC-4, STKM-2) については、MDM2 及び MDM4 何れの遺伝子増幅も認められず、MDM2 蛋白及び MDM4 蛋白の過剰発現も認められなかった (図 1)。

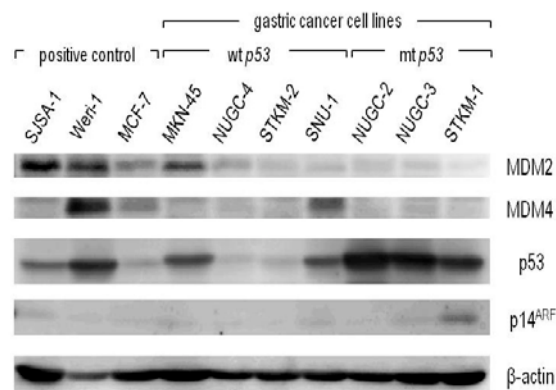


図 1

- (2) これらの各 p53 野生株に対し、nutlin-3 は MDM2/MDM4 遺伝子増幅あるいは

MDM2/MDM4 蛋白の過剰発現の有無に関わらず、WST-8 assay にて、顕著な抗腫瘍効果を示した(図 2)。また、nutlin-3 投与後の p53 シグナル下流蛋白 (p21, Noxa, Cleaved PARP) 発現レベルの変化について、経時的に Western blotting 法にて解析したところ、24 時間までに何れの下流蛋白も強発現しており、cell cycle arrest 及び apoptosis の両系統が活性化されたものと考えられた (図 3)。

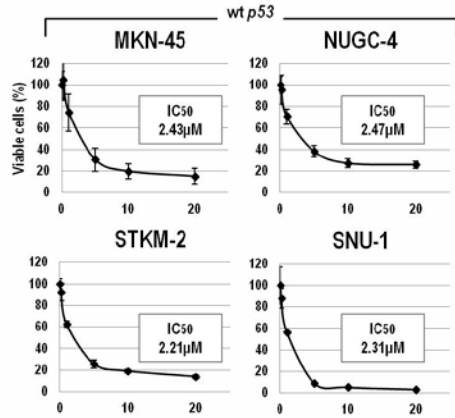


図 2

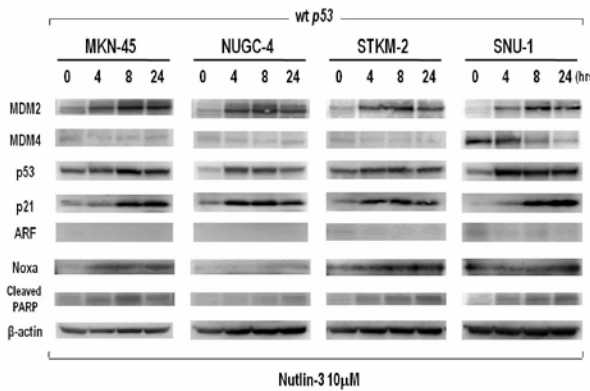


図 3

これを更に裏付ける目的にて、Flow cytometry も施行したが、コントロール群に比し、10 μ M nutlin-3 投与群では有意に cell cycle arrest 及び apoptosis の誘導が認められた (図 4, 図 5)。一方、ヒト胃癌細胞 p53 変異株 NUGC-3 においては、全く nutlin-3 の抗腫瘍効果は認められなかった。

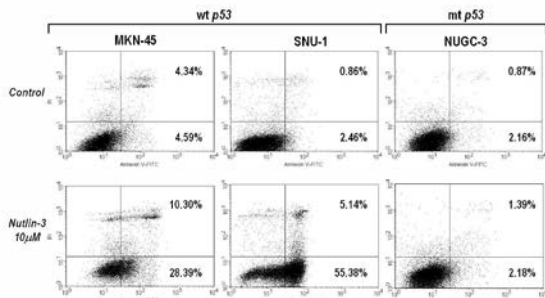


図 4

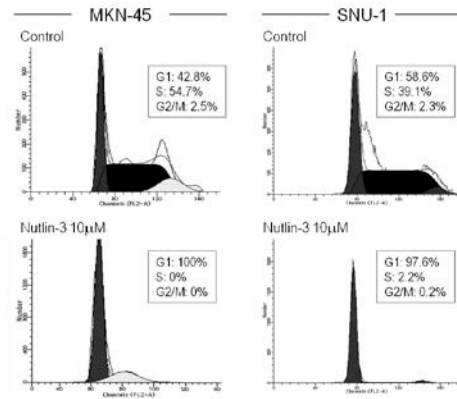


図 5

(3) 既存の化学療法薬との併用効果については、現在臨床にて進行期胃癌に対し広く用いられている 5-FU と cisplatin との相互作用に関して検討を行ったところ、5-FU との併用では主に相加効果が、cisplatin との併用では相乗効果が認められた。

(4) MKN-45 皮下移植ヌードマウスを用いた動物実験においても、*in vitro* 実験と同様に、nutlin-3 治療群では有意な抗腫瘍効果が認められた ($p < 0.001$)。また、5-FU と nutlin-3 との併用群では、5-FU 単独治療群及び nutlin-3 単独治療群との比較にても有意な抗腫瘍効果が認められた (各々 $p = 0.048$, $p < 0.001$) (図 6)。何れの群においても、体重減少や下痢などの有害事象は認められず、nutlin-3 の投与は安全に施行可能であった。

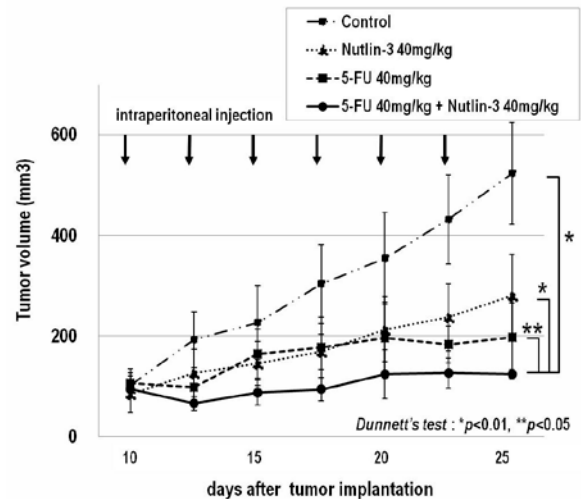


図 6

(5) ヒト胃癌切除標本 100 サンプルを用い、免疫染色法にて p53 と MDM2 蛋白の発現解析を行った。免疫染色の評価については、これら蛋白の発現強度を 0 から 3+までスコア化し、p53 については 2+/3+, MDM2 につい

では 3+を強発現とした（図 7）。結果では、それらの発現頻度は各々 15%、22%であり、p53 変異率は従来の報告同様、PS 不良例や病期進行例で有意に高かった。MDM2 の発現については、病期や予後との関連性は認められなかったが、高発現の集団が 20%以上で認められ、MDM2 阻害剤の治療対象となり得る可能性が考えられた。

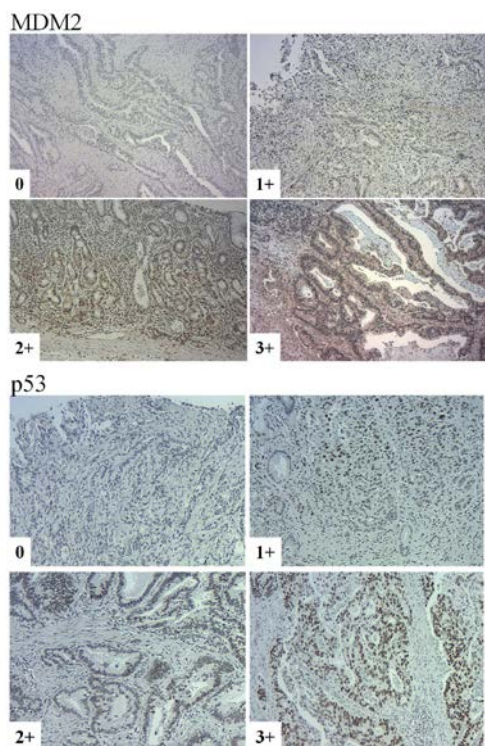


図 7

(6) 以上より、MDM2 阻害剤 nutlin-3 は、野生型 p53 遺伝子を有する胃癌細胞に対して優れた抗腫瘍効果を示し、今後、胃癌に対する有望な治療薬になり得ると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 1 件）

- (1) Endo S, Yamato K, Hirai S, Moriwaki T, Fukuda K, Suzuki H, Abei M, Nakagawa I, Hyodo I. Potent *in vitro* and *in vivo* anti-tumor effects of MDM2 inhibitor nutlin-3 in gastric cancer cells. *Cancer Sci*.102(3):605-13, 2011. 査読有.

〔学会発表〕（計 2 件）

- (1) 遠藤慎治, 鈴木英雄, 平井祥子, 兵頭一之介, 大和建嗣: ヒト胃癌細胞株における MDM2 阻害剤 nutlin-3 の抗腫瘍効果について, 第 69 回日本癌学会学術総会, 2010 年 9 月 22 日, 大阪国際会議場, 大阪市.

- (2) Endo S, Suzuki H, Hirai S, Hyodo I, Yamato K: The anti-tumor effect of MDM2 antagonist nutlin-3 in gastric cancer cell *in vitro* and *in vivo*. 第 101 回米国癌学会, 2010 年 4 月 20 日, ワシントン, 米国.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

兵頭 一之介 (HYODO ICHINOSUKE)
筑波大学・医学医療系・教授
研究者番号: 60416469

(2) 研究分担者

安部井 誠人 (ABEI MASSATO)
筑波大学・医学医療系・准教授
研究者番号: 20261802
鈴木 英雄 (SUZUKI HIDEO)
筑波大学・医学医療系・准教授
研究者番号: 00400672