

腫瘍細胞の MDM2 特異的阻害剤 Nutlin-3a に対する感受性と p53 変異

長谷川寛雄* 山田恭暉* 上平 憲*

はじめに

P53 はゲノムの守護神ともいうべき重要ながん抑制遺伝子である。その量的・質的調節は種々の細胞ストレスに応答して行われており、様々なシグナル伝達が多数のタンパクとの相互作用を介して起こる。さらに細胞側の要素や条件も加わり、最終的に細胞ストレスに対応した細胞運命が決定されていると考えられている。DNA 損傷によって p53 が活性化の方向に働くと細胞周期の停止に続いて DNA の修復やオートファジー機能によって、細胞を生存させていく方向 (pro-survival) で一種のふるい掛けが行われる。DNA 損傷が重度であった場合は細胞分化や、細胞老化 (cellular-senescence)、またはアポトーシスに至り、細胞運命としては細胞死 (pro-elimination) へと向かう (図 1)。このような p53 による細胞運命の決定において、様々な p53 下流因子のなかでどの因子が決定的な働きをするかは議論が続いているが、DNA 損傷の程度に対して pro-elimination に方向づけられる何らかの閾値のようなものが存在すると考えられている^{1,2)}。一方、p53 タンパクは通常はユビキチン-プロテアソーム系の働きによって分解されており、その発現はユビキチンリガーゼである MDM2 によって厳

密にコントロールされている (normal growth conditions)。Nutlin-3a は MDM2 特異的阻害剤として 2004 年に報告された低分子化合物であり、MDM2 と p53 の結合を阻害することによって p53 タンパクの蓄積、活性化が起こり野生型 p53 を有するがん細胞に細胞死をもたらす³⁾。ほとんどのがん種の約半数の症例において p53 は野生型であり、野生型 p53 の機能をいかに治療に応用するかはがん治療の重要なテーマのひとつである。この視点で見ると、放射線療法は細胞ストレス応答の結果として起こる p53 活性を利用しているといえる。また多くの抗がん剤は p53 経路を直接、間接的に利用して抗腫瘍効果を発揮している。さらにウイルスベクターを利用した p53 遺伝子導入治療も始まっているが、そのデリバリー技術には改善の余地がある状況である。この点で Nutlin-3a のようなメカニズムで直接的に p53 機能を発揮させる薬剤は現在のところ他になく、臨床応用が期待されている。

成人 T 細胞白血病 (ATL) は HTLV-1 感染に起因し、多くの場合 60~70 年の経過を経て、数%のキャリアーに発症する難治性の白血病である。種々の抗がん剤による多剤併用化学療法が急性型 ATL の治療法的第一選択肢となっているが、50% 生存期間は 13 カ月と極めて予後が悪い⁴⁾。一方で、ATL における p53 変異症例は変異のない症例よりもさらに予後不良である

* 長崎大学大学院 臨床検査医学

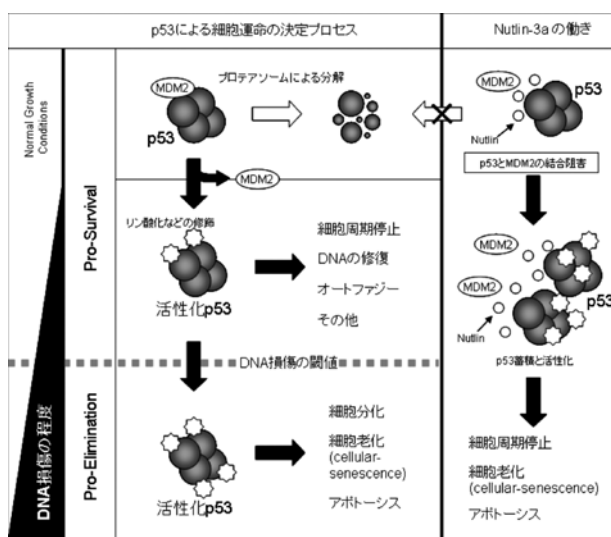


図1 p53による細胞運命の決定プロセスと Nutlin-3aの働き
(文献2より改変)

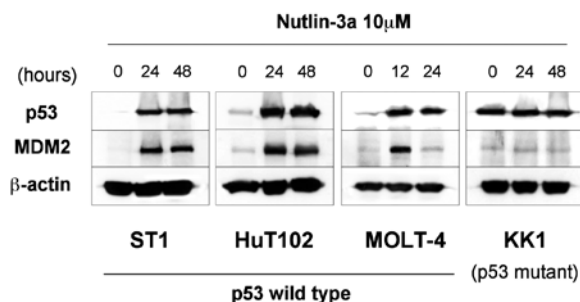


図2
ウエスタンブロット：p53野生株では Nutlin-3a によって p53 と MDM2 の蓄積が起こった。

ものの、その割合は20-30%であり必ずしも多いとはいえない⁵⁾。そこでATL細胞株を中心に種々の白血病細胞株のp53変異を解析し、さらにNutlin-3aに対する感受性を検討してみた。

1. p53変異解析と Nutlin-3aに対する感受性

まずp53のopen reading frameをターゲットとしてATLを中心に16種の白血病細胞株のシークエンスを行い、変異解析を行った⁶⁾。さらに各々の細胞に対し10 μ M Nutlin-3aで48時間培養し細胞増殖抑制能をMTSアッセイによ

り解析した(表1)。その結果、9株のATL関連細胞株中6株が野生型p53を有しており、野生型はすべてNutlin-3aに対して感受性であった。他の白血病細胞株では7株中2株のみが野生型p53を有しておりやはり感受性であった。変異型p53をもつ細胞株ではNutlin-3aに対する反応は認められなかった。p53野生型の細胞株においてはNutlin-3a処理によってp53タンパク蓄積とMDM2タンパクの蓄積が理論どおりに起こっていることがウエスタンブロットにより確認できた(図2)。変異型においては変異型p53の蓄積が常に起こっているためその発現量はNutlin-3aによって変化しない。p53プ

ロモーター活性をルシフェラーゼアッセイにより評価すると野生型の細胞株においては Nutlin-3a 処理によって濃度依存的に活性化が起こった (図 3)。さらに、p53 活性化の指標の一つであるリン酸化の状態をルミネックスアッセイ

によって定量的に評価すると Nutlin-3a によって 4 倍から 20 倍の活性化が起こっていることが確認できた (図 3)。したがって p53 が野生型であれば Nutlin-3a によって p53 蓄積と活性化が理論どおりに起こってくるといえる。

表 1 p53 遺伝子変異解析と Nutlin-3a に対する感受性

| 細胞株 | 由来 | exon | codon | WT codon | Mutant codon | effect | p53 status | Nutlin-3a 感受性 | p16 ^{INK4a} /p14 ^{ARF} | HTLV-I-Tax mRNA 定量 |
|---------|-------------------------|------|-------|----------------|--------------|----------------|------------|---------------|--|--------------------|
| ST1 | ATL | 4 | 72 | CCC | CGC | missense (SNP) | 野生型 | + | del / del | 0.4 |
| KOB | ATL | 4 | 72 | CCC | CGC | missense (SNP) | 野生型 | + | del / del | 542 |
| LM-Y1 | ATL | 4 | 36 | CCG | CCA | silent | 野生型 | + | del / del | 1741 |
| MT1 | ATL | 5 | 176 | TCG | TAC | missense | 変異型 | - | del / del | 17.5 |
| SO4 | ATL | 6 | 223 | CCT | CAT | missense | 変異型 | - | del / del | 0.2 |
| KK1 | ATL | 3 | 31 | GTT | ATT | missense | 変異型 | - | del / del | 0.03 |
| | | 5 | 152 | CCG | CTG | missense | | | | |
| OMT | HTLV-I infected T-cell | 4 | 72 | CCC | CGC | missense (SNP) | 野生型 | + | del / del | 971 |
| HuT102 | HTLV-I infected T-cell | | | | | | 野生型 | + | | 2381 |
| MT2 | HTLV-I infected T-cell | | | | | | 野生型 | + | | 9331 |
| MOLT-4 | T-cell leukemia | | | | | | 野生型 | + | del / del | N.D |
| Jurkat | T-cell leukemia | 4 | 125 | ACG | ACA | silent | 変異型 | - | del / del | 0 |
| | | 6 | 196 | CGA | TGA | nonsense | | | | |
| SUDHL-4 | B-cell lymphoma | | | | | | 野生型 | + | del / | N.D |
| Ramos | B-cell lymphoma | 7 | 254 | ATC | GAC | missense | 変異型 | - | | N.D |
| U937 | Monocytic leukemia | 4 | 105 | GGC | AGC | missense | 変異型 | - | del / del | N.D |
| | | 4 | 125 | ACG | ACA | silent | | | | |
| | | 6 | 196 | CGA | TGA | nonsense | | | | |
| K562 | Erythroblastic leukemia | 4 | 72 | CCC | CGC | missense (SNP) | 変異型 | - | del / del | N.D |
| | | 5 | 136 | | | ins 1 | | | | |
| HL60 | Myeloid leukemia | | | gross deletion | | | 変異型 | - | | N.D |

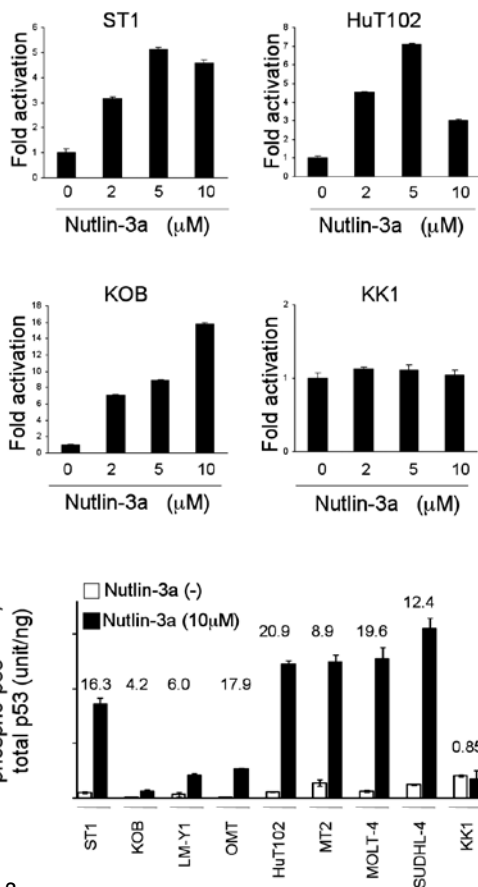


図3 (上図) ルシフェラーゼアッセイ: Nutlin-3a 処理 24 時間後の p53 プロモーター活性の変化. p53 野生株 (ST1, HuT102, KOB) では, 活性化が起こった. (下図) ルミネックスアッセイ: Nutlin-3a 処理 24 時間後の p53 リン酸化を定量的に評価した. 数値は変化の割合を示す.

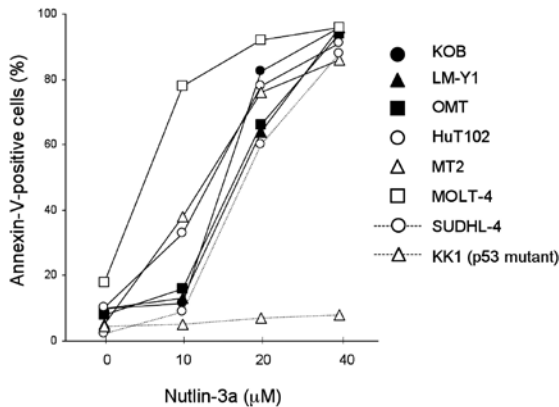


図4 アネキシン /PI 染色の結果. Nutlin-3a 処理 24 時間後のアポトーシス細胞の割合.

2. Nutlin-3a による様々な細胞死パターン

次に Nutlin-3a によって野生型細胞株にどのような細胞死が起こるかを解析した. アネキシン /PI による染色を行いフローサイトメトリーにてアネキシン陽性細胞の割合をアポトーシスの指標として測定した. その結果, Nutlin-3a の濃度依存的にすべての野生型細胞株においてアポトーシス誘導が起こった (図4). しかし 10 μM Nutlin-3a でアポトーシスがよく誘導されているのは MOLT4 細胞のみであり, 他の細胞においては細胞死はよく起こっているにもかかわらずアポトーシス変化はほとんど観察されなかった. そこで, これらの細胞株において 10 μM Nutlin-3a 処理後に細胞周期を解析したところ, 明らかな G1 期細胞周期停止が起こっていた (図5). さらに同様の条件で細胞老化 (cellular senescence) の評価を行ってみた. セネッセンスの客観的な指標としては現在のところ Senescence-associated beta-galactosidase (SA-β gal) 染色が有効と考えられている⁷⁾. そこで野生型細胞株に対し 10 μM Nutlin-3a 処理後, この染色を行ったところ細胞周期停止を起こしている ATL 細胞はすべて SA-β gal 染色陽性であった (図6). この結果から 10 μM Nutlin-3a 処理によって, 特に ATL 細胞においては, 細胞周期停止に加えてセネッセンスが起こっており, この作用が pro-elimination に働いていると考えられた. これまでセネッセンスにはがん抑制遺伝子 p14^{ARF}, p16^{ink4a} の働きが重要と考えられてきた⁸⁾. しかし我々の解析では表1のとおり多くの ATL 細胞株が双方を欠損しているにもかかわらず, 典型的なセネッセンスを起こしていることがわかった⁹⁾. p53 野生型細胞株における Nutlin-3a による細胞死をまとめると ATL 細胞では高濃度 Nutlin-3a ではアポトーシスを起こすポテンシャルを持っているものの, 低濃度 Nutlin-3a (10 μM) では細胞周期停止およびセネッセンスによる細胞死が重要であることがわかる (図7).

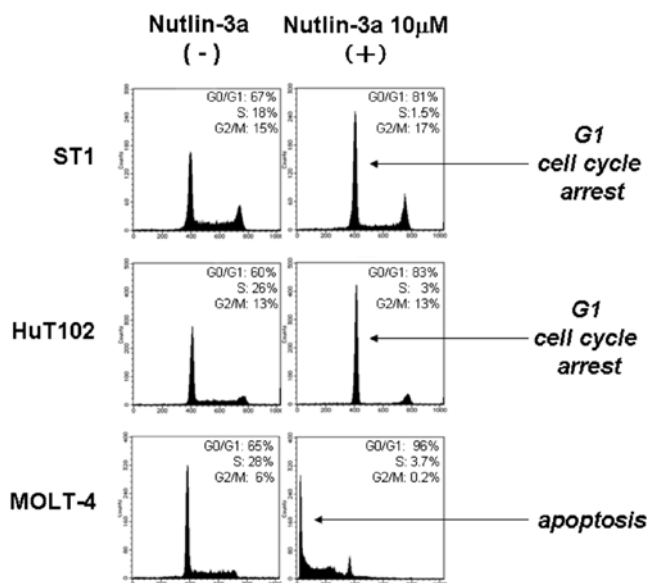


図5 Nutlin-3a 処理 24 時間後の細胞周期解析. MOLT-4 細胞ではアポトーシス変化が起きているのに対し, ST1, HuT102 細胞では, G1 期の細胞集積が起きている.

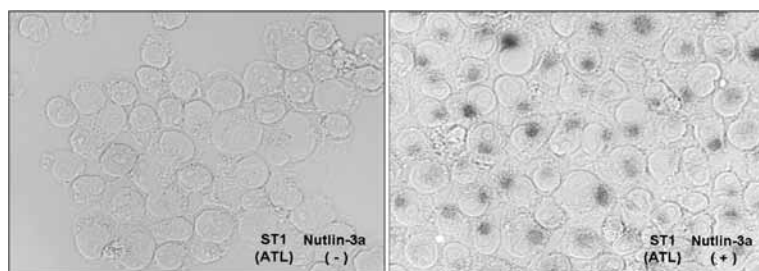


図6 10µM Nutlin-3a 処理 72 時間後の SA-βgal 染色. 細胞質部分が染まって観察される.

3. Nutlin-3a と TRAIL 併用によるアポトーシス増強

TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) はデスレセプターを介してアポトーシスを誘導する TNF スーパーファミリーのサイトカインである. TRAIL は正常細胞にはほとんど影響を及ぼさずに多くのがん細胞にアポトーシスを誘導する特徴をもっていることから新しい抗がん剤として期待されており, 海外では臨床試験が進行している¹⁰⁾. 一方, 我々のこれまでの検討では ATL 細胞は TRAIL デスレセ

プターを発現しているにもかかわらず TRAIL 抵抗性を示す. これには種々のアポトーシス抵抗因子が ATL 細胞において過剰発現していることが関与していると考えられる¹¹⁾. しかし TRAIL を Nutlin-3a と併用することで多くの ATL 細胞株は TRAIL によるアポトーシスが增強し, 図 8 のように ST1, KOB 細胞株では相乗効果が認められた. このことは低濃度の Nutlin-3a であっても, ある種の薬剤との併用によってアポトーシスを効率よく起こすことができることを示唆している.

| Cell lines | Nutlin-3a 10 μ M | | | Patterns of cell death |
|------------|----------------------|-----------|------------|--------------------------------------|
| | Apoptosis | G1 arrest | Senescence | |
| ST1 | △ | ○ | ○ | Cell-cycle arrest + Senescence |
| KOB | △ | ○ | ○ | |
| OMT | △ | ○ | ○ | |
| HuT102 | △ | ○ | ○ | |
| MT2 | △ | ○ | ○ | |
| LMY1 | △ | ○ | ○ | |
| SUDHL4 | △ | ○ | | Cell-cycle arrest |
| MOLT4 | ⊙ | | | Apoptosis |

図 7

10 μ M Nutlin-3a 処理による p53 野生株の細胞死のまとめ.

考察とまとめ

現在までのがん細胞に対する Nutlin-3a の効果をまとめてみると、多くの固形がん細胞は細胞周期停止とアポトーシスを起こし、白血病細胞ではアポトーシス誘導の報告が多い^{12,13}。一部の上皮系細胞株では Nutlin-3a によるセネッセンスも観察されているが、造血器腫瘍細胞では報告されていない¹⁴。ATL 細胞を用いた我々の結果では Nutlin-3a によるアポトーシスのポテンシャルも持ちながら、より低濃度では細胞周期停止とセネッセンスを起こすという特徴が明らかになった。この現象は DNA 損傷の程度に対して pro-elimination に方向づけられる何らかの閾値が存在する「閾値説」を裏付けるようにも見うけられる。一方、セネッセンスには p53 以外のがん抑制遺伝子 p14^{ARF} 及び p16^{ink4a} が重要と考えられてきたが、ATL 細胞においては両遺伝子を欠損していても典型的なセネッセンスを起こすことが明らかになった。このことは p14^{ARF} あるいは p16^{ink4a} の関与なしに p53 依存性のセネッセンスが起こっていることを意味しており、新しい発見である。セネッセンスという細胞死の形態ががん治療にとって重要であるという提言は最近のものであり、その本態はまだまだ未知の

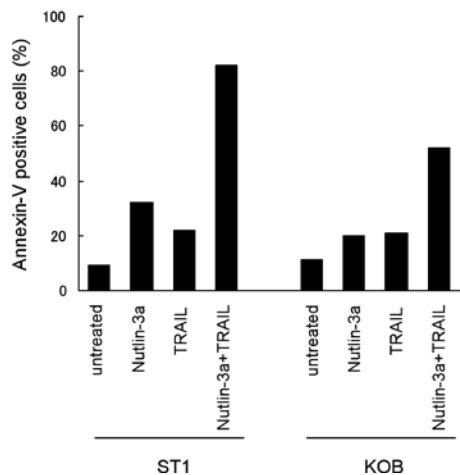


図 8

60ng/mL TRAIL と 2.5 μ M Nutlin-3a を併用、48 時間後のアネキシン/PI 染色の結果. 併用によってアポトーシス細胞の割合が増加した.

部分が多い^{15,16}。したがって ATL 細胞はセネッセンスの詳細をひも解くよいモデルとなると考えられる。

多くの固形がんでは p53 遺伝子変異により変異型 p53 が過剰発現しており、これに対する抗体ががん患者血清中に出現する。この血清 p53 抗体検査を多症例のがん患者で検討した島田らの報告では、抗体陽性症例における抗がん剤低感受性や予後不良が観察されており、この検査の有効性を示唆している¹⁷。p53 抗体測定検査は 2007 年末から保険適応となっており、早期診断や予後予測に活用が期待されている。一方、がん患者におけるこの検査の抗体陰性症例に着目した場合、そこには p53 野生型症例が多く含まれている可能性が高い。そのような症例には Nutlin-3a の使用が治療の選択肢として有効かもしれない。

我々は Nutlin-3a と TRAIL 併用によるアポトーシス増強を見出したが、このことから Nutlin-3a と他の薬剤の併用療法の重要性が示唆される。抗がん剤の多くは p53 経路を直接、間接的に利用しており、Nutlin-3a とある種の抗がん剤の併用は、その相加・相乗効果から副作用の大きい抗がん剤の減量が期待できる。特に ATL 患者の場合は高齢発症が多いことから、抗がん剤の減

量は重要な治療戦略のひとつであり、このコンセプトは多くの固形がんにも応用できると考えられる。よって Nutlin-3a の抗がん剤との併用が臨床応用可能となった場合は、抗がん剤治療のプロトコルが大きく様変わりする可能性を秘めている。

■文献

- 1) Lowe SW, Cepero E, Evan G :Intrinsic tumour suppression, *Nature*, **432**: 307-315, 2004.
- 2) Helton ES, Chen X : p53 modulation of the DNA damage response, *J Cell Biochem*, **100**: 883-896, 2007.
- 3) Vassilev LT, Vu BT, Graves B, Carvajal D, Podlaski F, Filipovic Z, et al :In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2, *Science*, **303**: 844-848, 2004.
- 4) Yamada Y, Tomonaga M: The current status of therapy for adult T-cell leukemia-lymphoma in Japan, *Leuk Lymphoma*, **44**: 611-618, 2003.
- 5) Tawara M, Hogerzeil SJ, Yamada Y, Takasaki Y, Soda H, Hasegawa H, et al :Impact of p53 aberration on the progression of Adult T-cell Leukemia/Lymphoma, *Cancer Lett*, **234**: 249-255, 2006.
- 6) Kamihira S, Terada C, Sasaki D, Yanagihara K, Tsukasaki K, Hasegawa H, et al :Aberrant p53 protein expression and function in a panel of hematopoietic cell lines with different p53 mutations. *Eur J Haematol*, **82**: 301-307, 2009.
- 7) Collado M, Blasco MA, Serrano M : Cellular senescence in cancer and aging, *Cell*, **130**: 223-233, 2007.
- 8) Satyanarayana A, Rudolph KL: p16 and ARF: activation of teenage proteins in old age, *J Clin Invest*, **114**: 1237-1240, 2004.
- 9) Hasegawa H, Yamada Y, Iha H, Tsukasaki K, Nagai K, Atogami S, et al: Activation of p53 by Nutlin-3a, an antagonist of MDM2, induces apoptosis and cellular senescence in adult T-cell leukemia cells, *Leukemia*, **23**: 2090-2101, 2009.
- 10) 長谷川寛雄, 上平 憲, 山田恭暉 : 天然由来物質 FCB による白血病細胞の TRAIL 誘導アポトーシ

ス増強, *血液・腫瘍科*, **57** : 314-321, 2008.

- 11) Hasegawa H, Yamada Y, Harasawa H, Tsuji T, Murata K, Sugahara K, et al: Sensitivity of adult T-cell leukaemia lymphoma cells to tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand, *Br J Haematol*, **128**: 253-265, 2005.
- 12) Tovar C, Rosinski J, Filipovic Z, Higgins B, Kolinsky K, Hilton H, et al: Small-molecule MDM2 antagonists reveal aberrant p53 signaling in cancer: implications for therapy, *Proc Natl Acad Sci USA*, **103**: 1888-1893, 2006.
- 13) Kojima K, Konopleva M, Samudio IJ, Shikami M, Cabreira-Hansen M, McQueen T, et al: MDM2 antagonists induce p53-dependent apoptosis in AML: implications for leukemia therapy, *Blood*, **106**: 3150-3159, 2005.
- 14) Efeyan A, Ortega-Molina A, Velasco-Miguel S, Herranz D, Vassilev LT, Serrano M: Induction of p53-dependent senescence by the MDM2 antagonist nutlin-3a in mouse cells of fibroblast origin, *Cancer Res*, **67**: 7350-7357, 2007.
- 15) Xue W, Zender L, Miething C, Dickins RA, Hernando E, Krizhanovsky V, et al: Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas, *Nature*, **445**: 656-660, 2007.
- 16) Ventura A, Kirsch DG, McLaughlin ME, Tuveson DA, Grimm J, Lintault L, et al: Restoration of p53 function leads to tumour regression in vivo, *Nature*, **445**: 661-665, 2007.
- 17) 島田英昭, 落合武徳 : 新たな腫瘍マーカー「血清 p53 抗体」の開発, *日本臨床外科学会誌*, **64** : 1551-1559, 2003.

Sensitivity of tumor cells to Nutlin-3a, an antagonist of MDM2, and the p53 mutation analysis

Hiroo Hasegawa*, Yasuaki Yamada*, Shimeru Kamihira*

**Department of Laboratory Medicine, Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences*