

【第74回生涯教育講座】

がんの分子標的療法薬の新たな展開

—がん抑制遺伝子 p53 を標的とする治療戦略—

ほん ま よし お
本 間 良 夫

はじめに

分子・細胞生物学の発展にともない、細胞のがん化のメカニズムが次第に明らかにされてきた。特に、がん遺伝子の活性化とがん抑制遺伝子の不活化が重要なステップであることが指摘され、これらの過程に特異的に作用する治療戦略を考案することが可能となってきた。大きく分けて2つの戦略が考えられる。活性化されたがん遺伝子の機能を阻止する方法と機能を喪失したがん抑制遺伝子を回復させる方法とがあるが、「出る釘を叩く」方法がより簡単であることは明白である。したがって最初の分子標的療法はがん遺伝子を標的として進んできた。チロシンキナーゼ型のがん遺伝子が深く関与している慢性骨髄性白血病の治療に、チロシンキナーゼ阻害剤が有効に働き顕著な治療効果を示すことは、その典型的な例としてあげられる。がん抑制遺伝子を標的とする治療法において標準的治療法として確立しているものは未だない。しかしその可能性を示唆する研究成果が報告されるようになってきたので、将来は現実的な治療法となってくるであろう。最近の知見を基に、その治療戦略を概説したい。

1 がん抑制遺伝子

正常細胞はがん細胞と融合させると、“がん”としての形質を失うことが明らかにされている。完全な細胞でなくとも、ある種の正常な染色体だけを導入しただけでも同じ現象が観察される。このことは、細胞の正常な制御機構が破綻した結果が“がん化”に重要なインパクトを与えることを示している(図1)。がん遺伝子が活性化された細胞でも、がん抑制遺伝子の機能が正常に保持されていれば、がん細胞としての形質は発現されない。逆の言い方をすれば、がん細胞においてはがん抑制遺伝子の機能が喪失しているということである。がん細胞において、喪失しているがん抑制遺伝子の機能を回復させることが出来れば制癌に導くことが可能となる。

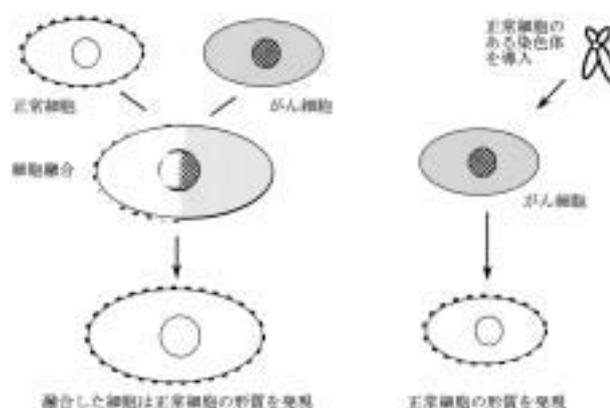


図1 がん細胞と正常細胞の融合実験

Yoshio HONMA

島根大学医学部生命科学講座

連絡先：〒693-8501 出雲市塩冶町89-1

それぞれの遺伝子は、父方からと母方からの2つ（一对）あるが、がん抑制遺伝子の場合どちらかの遺伝子が正常に機能していれば正常で健康な細胞としてふるまう。がん化に至るには、一对のがん抑制遺伝子が両方とも欠損したり破損したりしていることになる。遺伝子の不活化には、染色体の欠損・点突然変異などとともに、メチル化などによるエピジェネティックな変化による不活性化も含まれる。

現在までに、10以上のがん抑制遺伝子が明らかにされているが、細胞の増殖を負に制御する調節因子をコードするものが多い。がん遺伝子が活性化するシグナル伝達系や細胞周期調節機構の各段階に、がん抑制遺伝子も機能している。がんが頻発する家系においては、対立するがん抑制遺伝子の一方が遺伝的に欠損していることが多い。もう一方の対立遺伝子に点突然変異や欠損が起こる確率は、両方とも正常な遺伝子に変異を示す場合よりはるかに高い。その代表的な例は、網膜芽腫における家族性（配偶子変異）のRb遺伝子欠損である。

2 p53 がん抑制遺伝子

今までにヒトの腫瘍で最も高頻度に変異が見られた遺伝子は p53 がん抑制遺伝子である。ヒトのがんの約半数にこの遺伝子の変異が認められることから、もっとも重要ながんに関連する遺伝子とみなされている。また p53 遺伝子産物（p53 タンパク質）の機能からみても、その重要性はよく理解できる。細胞周期の制御、アポトーシスの調節、DNA 修復・遺伝的安定性の維持に関与し、そのチェックポイント機能を果たしている。通常、正常細胞において p53 タンパク質は非常に不安定であり、細胞内で p53 タンパク質を検出

出来ない程少量しか存在していない。これは HDM2 と結合して ubiquitination により分解されているからである。DNA 損傷などの刺激により p53 はリン酸化され HDM2 から離れ安定化される。HDM2 は p53 の標的遺伝子でもあるので、安定化し活性化した p53 を抑制するという negative feedback 機構が働くようになっている。刺激が除かれた後は、上記の機構によりまた平常状態の p53 がほとんど検出されないレベルに低下する（図2）。軽い DNA 損傷などの場合は、p53 は細胞周期を停止させ、傷んだ DNA の修復させるように指令を出す。DNA 損傷が著しい時は修復ではなく細胞死（アポトーシス）を誘導する指令を出す。このような p53 によるチェックポイント機構があるので細胞が“がん化”することから逃れられている。

もし p53 遺伝子の欠失や突然変異で機能を失った場合、細胞はがん化の階段を確実に進んだこととなる。意外に思われるが、正常細胞には通常 p53 の発現は認められないが、がん細胞においては p53 の強い発現が認められることが多い。これは変異した p53 タンパク質は HDM2 と結合しないため分解され難いためである。p53 としての機能を喪失しているか著しく低下しているた

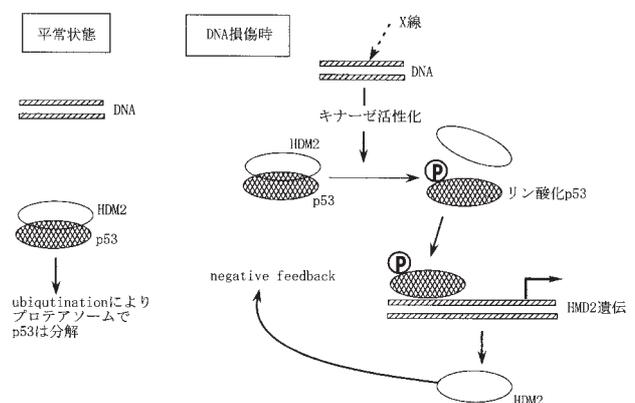


図2 p53 の調節機構

め、以前は p53 をがん遺伝子と誤認していた。

3 p53 の遺伝子治療

多くの腫瘍に p53 の変異や欠損が見いだされ、またその機能の重要性が明らかになったことから、p53 を分子標的とする治療戦略が検討されてきている。遺伝子が欠失しているなら、正常の p53 遺伝子をおがん細胞に導入して治療しようとする遺伝子治療が試みられてきた。わが国においても、難治性の固形癌に対しアデノウイルスに p53 遺伝子を組み込んだベクターで遺伝子治療が行われた。しかしその治療成績は当初の期待ほどのものではなかった。いくつかの問題点が浮かび上がってきた。(1)がん細胞に選択的に、しかも効率よくベクターを取り込ませるかを検討しなければならない。(2)ベクターが入っても p53 遺伝子が効率よく発現しなければ期待通りの結果は得られない。正常な p53 遺伝子が導入された細胞に対し、前述のように障害性の薬剤や放射線などでその発現を亢進する試みも行われている。(3)遺伝子治療により造血器腫瘍が発生するという報告がなされるに至った。この事実は深刻に受け止めなければならない。導入した DNA が核 DNA の構造と機能を損傷する可能性が指摘され、根本的な対策を迫られている。しかし p53 の遺伝子治療は非常に魅力ある治療戦略と考えられるので、今後のさらなる技術の改善が望まれる。

4 変異型 p53 を分子標的とする治療

ヒトのがんにおいて一番多く遺伝子異常が認められるのは p53 であるが、その中でも DNA 結合領域に missense point mutation を起こしているものが大部分である。これらの変異した p53 は、がん遺伝子と誤認されたように、がん化に役

割を果たしていると考えられる。変異型 p53 遺伝子をお特異的に分解するようにデザインした RNA interference (RNAi) の治療薬としての可能性が検討された。正常細胞に含まれる野生型 (正常型) p53 遺伝子に対しては作用しないので、理論的には変異型 p53 遺伝子を持つがん細胞に選択的に作用すると考えられる。実際に変異型 p53 が低下し、細胞増殖が低下することが示された¹⁾。この遺伝子治療の変法も、いかに細胞内に効率よく RNAi を運び込めるかが臨床応用への大きな課題となっている。

変異型 p53 遺伝子は、ヒトの腫瘍において高頻度に認められている。しかも、p53 の機能はがん細胞の増殖抑制・アポトーシスの誘導に重要な遺伝子群の発現を促す転写因子であるから、変異した p53 を修復し正常な p53 の機能を果たせるように転換できれば新たな治療戦略となり得る。

Rastinjad らは、変異型 p53 の DNA 結合ドメインを修飾し野生型 p53 に変換する薬剤として CP31398 を報告した (図 3)²⁾。変異型 p53 をもつ腫瘍に対し効果を示し、in vitro のみならず in vivo においても有効であることを明らかにした。

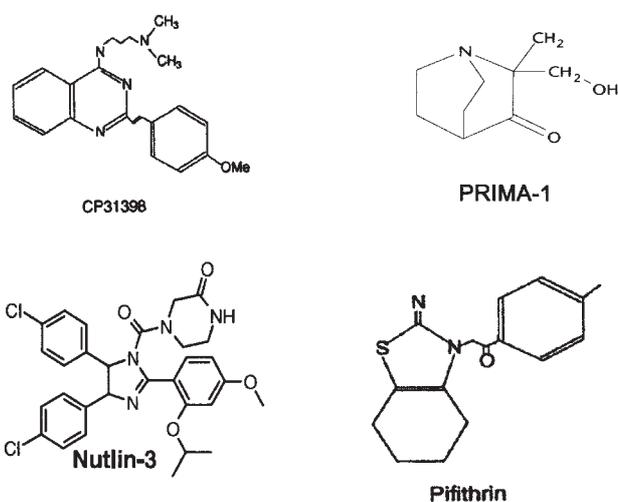


図 3 p53 を標的とする分子標的治療薬

さらに野生型 p53 の安定化にも有効であり、その機序が詳細に検討され、MDM2 (HDM2 のマウス homolog) 非依存性のタンパク質分解を抑制することで効果を示すことが判明した³⁾。PRIMA-1 (p53 reactivation and induction of massive apoptosis-1) も変異型 p53 を修飾し野生型 p53 に似た構造に変える作用があり、抗癌剤として可能性が示唆されている (図3)⁴⁾。変異型 p53 を持つ細胞に 9-hydroxyellipticine を処理すると、p53 の標的遺伝子である p21/WAF-1 や BAX を誘導し、アポトーシスに導ける。この薬剤は変異型 p53 の機能を回復させたことにより効果を示したと推察されている。その他、p53 およびその結合蛋白質との複合体に作用する特異的なペプチドが p53 の機能を修飾することが明らかにされているので、これらのペプチドも今後有望な p53 修飾薬として注目されるかもしれない。

5 不活化されている p53 の発現誘導による治療

がん患者の約半数に p53 遺伝子に何らかの変異が認められるということは、逆に言えば残りの半数の患者の p53 遺伝子は正常である。遺伝子に異常が無くとも、その発現が低く抑えられていることが多い。抗癌剤の処理で p53 遺伝子発現は増加するが、さらに発現を促進すれば治療効果は増大すると期待できる。悪性リンパ腫細胞にヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 suberoylanide hydroxamic acid (SAHA) を処理すると細胞増殖は抑制され、その時に p53 やその標的遺伝子の発現が増加する。また SAHA を投与することで、リンパ腫細胞を移植したヌードマウスにおいて腫瘍の縮小を認めた⁵⁾。p53 遺伝子の promoter 領域に Stat3 結合部位があり、Stat3 が p53 の発

現調節に役割を担っていることが明らかにされている。Stat3 の活性化 (リン酸化) を抑制すると p53 の遺伝子発現は増大するので、Stat3 のリン酸化を抑えるキナーゼ阻害剤が癌細胞において抑制されている p53 の発現を促進し、アポトーシスに導く可能性が考えられる⁶⁾。腎細胞癌においては野生型 p53 を持っているが、機能を果たしていない場合が多いと言う。腎細胞癌細胞の p53 遺伝子発現を正常に復帰させる薬剤をスクリーニングして探索した結果、抗マラリア薬 quinacrine を含む 9-aminoacridine 誘導体はその活性を見出した。この p53 遺伝子発現の誘導には genotoxic なストレスによるのではなく、NF-kB 活性を抑制したことによると判明した⁷⁾。以上の結果は、細胞の種類により野生型 p53 遺伝子の不活化機構が異なることを示唆している。

6 p53 の安定化を促進する薬剤による治療

図2に示すように、p53 は MDM2 (ヒトの homolog は HDM2) により制御されている。p53 と MDM2 との会合を阻止できれば、細胞内の p53 のレベルを上昇させることができずである。そのような考えから、MDM2 内の p53 binding pocket に p53 が会合できないようにする薬剤を探索した。その結果、図3で示す nutlin-3 に強力な活性を見出した。細胞増殖抑制・アポトーシスの誘導といった in vitro での効果だけでなく、ヒトがん細胞を移植したヌードマウスにおいて明らかな抗腫瘍効果を示した^{8,9)}。急性骨髄性白血病 (AML) においては、p53 の遺伝子変異は多くないが、p53 の発現レベルは低下している。Nutlin-3 の AML 細胞に対する感受性は、MDM2 の発現と相関していた。さらに nutlin-3 は正常の骨髄造血細胞 (CD34+) の増殖

には効果が弱く、白血病細胞に対する選択性が示された¹⁰⁾。多発性骨髄腫の90%以上に、p53のシグナル伝達系が正常に保たれていることが判り、nutlin-3の効果がDNA damageによらないで効果的にアポトーシスを誘導したことから、このタイプの造血器腫瘍にも有望視される¹¹⁾。Nutlin-3以外にも、同様にp53がMDM2と会合するのを阻止する薬剤が報告されるようになってきた^{12,13)}。

おわりに

p53はヒトの腫瘍においてもっとも高頻度に異常が認められることから、今後のがん治療の分子標的としては重要視する必要がある。単にp53が標的と言っても、それぞれのがんに応じて治療戦略を変えていく必要がある。ヒトのがんにおいてp53遺伝子が欠損している場合も少なくない。

この場合は逆に、p53の特異的阻害剤を用いることが有用かもしれない。Genotoxicな薬剤で治療すると、正常細胞のp53が強く活性化されて正常細胞をアポトーシスに導く可能性がある。もしがん細胞にp53遺伝子を欠失していると、がん細胞ではアポトーシスを起こさず正常細胞のみ死ぬということになりかねない。もしその場合は、正常細胞を守る意味からp53阻害剤を用いることが有意義かもしれない。転写レベルでp53の遺伝子発現を阻止し、放射線や抗癌剤によるアポトーシスから野生型p53を持っている細胞を守る作用がある薬剤として、pifithrinが報告されている(図3)¹⁴⁾。p53に関する基礎的知見のさらなる集積により、p53を分子標的とする新しい治療戦略がつつぎと誕生するのを期待したい。

文 献

- 1) Bossi G, Lapi E, Strano S, Rinaldo C, Blandino G, Sacchi A. Mutant p53 gain of function of tumor malignancy of human cancer cell lines through abrogation of mutant p53 expression. *Oncogene* 25: 304-309, 2006
- 2) Foster BA, Coffey HA, Morin MJ, et al. Pharmacological rescue of mutant p53 conformation and function. *Science* 286: 2507-2510, 1999
- 3) Wang W, Takimoto R, Rastinejad F, et al. Stabilization of p53 by CP-31398 inhibits ubiquitination without altering phosphorylation at serine 15 or 20 or MDM2 binding. *Mol Cell Biol* 23: 2171-2181, 2003
- 4) Bykov VJ, Issaeva N, Shilov A, et al. Restraint of the tumor suppressor function to mutant p53 by a low-molecular-weight compound. *Nat Med* 8: 282-288, 2002
- 5) Sakajiri S, Kumagai T, Kawamura N, et al. Histone deacetylase inhibitors profoundly decrease proliferation of human lymphoid cancer cell lines. *Exp Hematol* 33: 53-61, 2005
- 6) Niu G, Wright KL, Ma Y, et al. Role of stat3 in regulating p53 expression and function. *Mol Cell Biol* 25: 7432-7440, 2005
- 7) Gurova KV, Hill JE, Guo C, et al. Small molecules that reactivate p53 in renal cell carcinoma reveal a NF- κ B-dependent mechanism of p53 suppression in tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 17448-17453, 2005
- 8) Vassilev LT, Vu BT, Graves B, et al. In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2. *Science* 303: 844-848, 2004
- 9) Tovar C, Rosinski J, Filipovic Z, et al. Small-molecule MDM2 antagonists reveal aberrant p53 signaling in cancer: implications for therapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 1888-1893, 2006
- 10) Kojima K, Konopieva M, Samudio IJ, et al. MDM2 antagonists induce p53-dependent apoptosis in AML: implications for leukemia therapy. *Blood* 106:

- 3150-3159, 2005
- 11) Stuhmer T, Chatterjee M, Hildebrandt M, et al. Nongenotoxic activation of the p53 pathway as a therapeutic strategy for multiple myeloma. *Blood* 106: 3609-3617, 2005
 - 12) Kobkish HK, Zhao S, Franks CF, et al. Benzodiazepinedione inhibitors of the Hdm2: p53 complex suppress human tumor cell proliferation in vitro and sensitize tumors to doxorubicin in vivo. *Mol Cancer Ther* 5: 160-169, 2006
 - 13) Brew CT, Aronchik I, Hsu JC, et al. Indole-3-carbinol activates the ATM signaling pathway independent of DNA damage to stabilize p53 and induce G1 arrest of human mammary epithelial cells. *Int J Cancer* 118: 857-868, 2006
 - 14) Komarov PG, Komarova EA, Kondratov RV, et al. A chemical inhibitor of p53 that protects mice from the side effects of cancer therapy. *Science* 285: 1733-1737, 1999.