

p53アミロイド形成に着目した卵巣癌の新しい病態機構の解明

和歌山県立医科大学医学部産科婦人科学教室 助教 岩橋 尚幸

要約

p53遺伝子変異を標的とした治療薬開発研究が世界中で長らく注目されているが、臨床応用された薬剤は今のところない。特に婦人科癌の中でも最も予後が悪いと言われている卵巣癌は、p53の遺伝子変異または欠失の頻度が高いものの、既存の分子標的薬の標的となるドライバー変異を検出する確率は低く、新しい視点からの治療戦略の開発が求められている。本研究では、p53変異卵巣癌を対象とした新規治療戦略の開発基盤として、神経変性疾患で見られるようなアミロイド凝集体が変異p53タンパク質により形成されることに着目し、全く新しい視点から見たp53変異卵巣癌の病態メカニズムの解明を目指すことを目的とした。申請者はp53変異卵巣癌におけるp53アミロイド(凝集体)形成を確認し、p53変異癌の病態メカニズムの一端として、p53凝集体のcell-to-cellのプリオン様伝播性が硫酸化糖鎖により仲介されることを発見した。さらに、p53変異を有する卵巣癌の細胞質内p53凝集体に着目し、臨床的にp53凝集体を有する症例は予後不良であること、p53凝集体形成の分子機構を解明し、治療標的となることを証明した。本研究結果により、p53変異卵巣癌におけるp53凝集体を標的とした新規個別化医療を実現することが期待できる。

緒言

p53遺伝子変異は多くの癌種で見られ、p53を標的とした治療薬開発研究が世界中で長らく注目されているが、臨床応用された薬剤は今のところ存在しない。90%以上の症例でp53遺伝子変異を伴うといわれている卵巣癌は、近年初期癌の治療成績は向上しているが、進行/再発症例の予後は不良であり、予後改善のためには新規治療戦略の確立が必要である。肺癌などの悪性腫瘍では患者個々の癌の遺伝子プロファイルに合わせたPrecision medicine研究が進められ、多種の分子標的薬が臨床導入されているのに対し、卵巣癌では臨床承認された新規分子標的薬が少なく、新たな治療戦略が求められている。しかしながら、近年の卵巣癌の腫瘍組織を用いた遺伝子解析の研究結果からも、卵巣癌は主にp53の遺伝子変異または欠失、もしくはBRCA1/2の変異が認められる以外に、代表的なoncogeneの変異はきわめて稀であることが明らかとなっており、治療標的となる遺伝子が少ないのが問題となっている。申請者はこれまで超高感度次世代シーケンサー法を用い、血中腫瘍循環DNAのLiquid Biopsyによる網羅的遺伝子変異解析に関する研究を継続してきた。卵巣癌漿液性癌の16/24例(66.7%)で、大腸癌の卵巣転

移症例の4/8例(50%)でp53のpathogenicな遺伝子変異を検出することができ、p53変異癌の診断および治療バイオマーカーとしてのLiquid biopsyの有用性を示した。しかし、p53遺伝子変異型の検出ツールとしては有用であるが、卵巣癌の新規治療戦略の基盤作成のためには、p53遺伝子変異に着目した新たな標的治療の確立が必須である。

そこで申請者は、p53アミロイド形成に着目したタンパク質凝集体病としてのp53変異癌の発症や病態メカニズムの解明を目指すことを目的に本研究を開始した。p53変異卵巣癌病理組織において、アミロイド沈着物に共通する非タンパク質性成分であるヘパラン硫酸多硫酸化ドメインとp53が共沈着している症例を多数認め、p53凝集体が形成されていることを確認した。そして、p53変異型卵巣癌由来OVCAR-3細胞株およびp53野生型の細胞株を用い、p53凝集体が硫酸化糖鎖依存的に細胞外に分泌されること、p53凝集体の細胞による取り込みは細胞表面の硫酸化糖鎖依存的であること、p53凝集体の伝播には細胞外硫酸化糖鎖依存的な細胞による取り込みが必要であることを見出し、p53凝集体のcell-to-cellのプリオン様伝播性のメカニズムの一端を解明した。これを踏まえ、本研究では卵巣癌に限らず他

のp53変異の多い癌種も含めたp53変異癌を広く対象とし、p53凝集体がどのように癌の予後に影響するのかについてのさらなる病態メカニズムの解明を試みる。

方法

1. 卵巣癌のp53免疫染色による細胞質“p53凝集体”の証明と予後や変異との関連

細胞質p53凝集体に着目し、p53 核/細胞質陽性症例(N+C)を解析した。同意が得られた卵巣高異型度漿液性癌患者の手術時に摘出した病理組織のp53免疫組織化学染色を行い、①p53 null/WT(Low)②p53 核強発現(OE)③p53 核+細胞質(N+C)の3群に分け、予後との関連を解析し、細胞質内凝集体の検出を行なった。遺伝子解析で得られたp53の変異の有無や変異の種類と、免疫染色結果や凝集体の有無との相関を検討した。

2. p53変異による細胞質“p53凝集体”形成の分子機構とこれを標的とした治療効果の検討

OVCAR-3(p53変異有卵巣癌細胞株)およびp53変異導入したPC-3(p53 null)の細胞内と細胞上清中のp53凝集体の発現を検討した。またPC-3(p53 null)およびCHO細胞にリコンビナントp53凝集体もしくはOVCAR-3の細胞上清を添加する系を用いて、cell-to-cellのp53凝集体取り込みを検討した。細胞質p53凝集体のcell-to-cellのプリオン様伝播性メカニズムについて、硫酸化阻害剤や硫酸化糖鎖欠損CHO株を用いて硫酸化糖鎖に着目した解析を行なった。さらに細胞外p53凝集体の有無や凝集阻害剤(ヘパリン)やp53凝集体解除化合物(ReACp53)による紫外線誘導性アポトーシスへの反応性を検討した。

結果

1. p53変異卵巣癌症例における細胞質“p53凝集体”は予後不良因子である

卵巣高異型度漿液性癌患者を対象としてp53免疫組織染色を行なったところ、14/96例(15%)がp53 N+Cであり、他群に比べ有意にPFSおよび全生存期間(OS)が不良であった($p < 0.001$)。p53 N+C症例でタンパク凝集体形成を認識するヘパリン硫酸多硫酸化ドメイン抗体と共染色を行い、全例で細胞質p53と共沈着することを確認し、細胞質p53凝集体の存在を確認した。腫瘍組織DNAを用いた遺伝子

変異解析から、p53 N+C症例の全例でpathogenicなTP53変異を検出した

2. p53変異による細胞質“p53凝集体”形成が治療抵抗性因子となる

OVCAR-3の細胞質と細胞上清中にp53凝集体が発現しており、p53変異導入 PC-3でも同様にp53凝集体が発現した。PC-3およびCHOにリコンビナントp53凝集体もしくはOVCAR-3の細胞上清を添加したところ、細胞内にp53凝集体が取り込まれ、その後細胞外に放出されたことから、細胞質p53凝集体のcell-to-cellのプリオン様伝播性が確認された。このp53凝集体の細胞取り込みおよび放出は、硫酸化糖鎖依存的な機能をもつことを発見した。またp53凝集体の取り込みにより紫外線誘導性アポトーシスが抑制され、ヘパリン添加によりp53凝集体の取り込みが抑えられ、抗アポトーシス作用が抑制された。シスプラチン抵抗性細胞株においても、ReACp53の併用によりシスプラチンとの相乗効果を認め、p53凝集体がシスプラチン抵抗性をもたらす可能性が示唆された。さらにp53凝集体解除化合物であるReACp53添加により、OVCAR-3でp53が細胞質から核内に移行し細胞死が誘導されたことから、p53変異癌におけるp53凝集体を標的としたヘパリンおよびReACp53による治療の可能性が示唆された。

考察

これまでタンパク質凝集体の面からp53変異癌を見た研究は少なく、p53を標的とし臨床応用された薬剤は今のところ存在せず、p53変異癌の新規治療戦略の基盤作成のためには、p53変異癌の新たな病態メカニズムの解明が必要である。変異p53凝集体による新たな癌化メカニズムの解明目的としている点において、本研究は学術的独創性に加え、さらなる臨床応用に向けた発展性があると考えられる。今後はp53凝集体の標的治療開発を目指し、各細胞株および卵巣癌患者のがん組織由来オルガノイド(patient-derived tumor organoid; PDO)細胞を対象に、p53凝集体を解除する低分子化合物ReACp53を用いた薬効評価を行い、正常なp53機能が回復し細胞死を誘導するかや、ReACp53とプラチナ製剤との併用効果について検討する予定である。これらの研究成果から、p53変異型癌のメカニズム解明

→診断治療バイオマーカー→治療標的や治療薬作成
という一連の新規治療戦略の基盤作成を行うこと
ができ、卵巣癌のみならずその他のp53変異の多い
癌種（大腸癌・乳癌・肺癌など）の診断や治療の標
的候補として新たに細胞外p53を提唱するものであ
り、臨床医学的にも基礎医学的にも意義深いもので
ある。

Abstract

p53 was recently reported to form protein aggregates in human cancer, which suggests that p53-mutant cancers may be a new class of protein aggregation diseases. The objective of this study was to investigate the functional role of cytoplasmic p53-aggregates in p53-mutated ovarian cancers. We focused on highly sulfated domains of heparan sulfate (HS S-domains), which have been highlighted as being critical for protein aggregation. 96 patients with high-grade serous carcinoma (HGSC) was included. We performed immunohistochemistry of p53/HS S-domains, and found 14 cases of HGSC expressing cytoplasmic p53, which significantly correlated with worse progression-free survival and overall survival. We detected the cytoplasmic co-localization of HS S-domains with p53 deposits in p53-mutated cases, which represent the existence of cytoplasmic p53-aggregates. In cell-based assay, we found that OVCAR-3 (p53 mut) cells released p53-aggregates into the culture medium. Furthermore, PC-3 (p53 null) and CHO (non-human control) cells uptook both recombinant and OVCAR-3-derived p53 aggregates HS-dependently. Finally, HS-dependent cellular uptake of p53-aggregates was critical in acquisition of resistance to ultraviolet-induced apoptosis in recipient CHO cells. Our study provides a previously unidentified oncogenic mechanism of cytoplasmic p53-aggregates in ovarian cancers, which could be the novel treatment target for p53-mutated ovarian cancers.