

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 11 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24591962

研究課題名(和文) p53 遺伝子変異と治療早期の Ser46 リン酸化誘導からみた食道癌個別化治療戦略

研究課題名(英文) The study of the significance of the phosphorylation of p53 Ser46 in the prediction of response to preoperative chemotherapy or chemoradiotherapy for advanced esophageal cancer.

研究代表者

安田 卓司 (YASUDA, Takushi)

近畿大学・医学部・教授

研究者番号：10324782

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000 円

研究成果の概要(和文)：本研究では、食道扁平上皮癌に対する化学療法、放射線化学療法の治療早期における p53-Ser46 のリン酸化をバイオマーカーとした治療効果予測の有用性を検討し、実際に生検組織の検討で p53-Ser46 のリン酸化の誘導を治療開始翌日の生検で初めて臨床的に確認したが、治療開始後早期の Ser46 リン酸化の有無と化学療法や化学放射線療法の治療効果との間には明らかな相関は認めなかった。CR が得られた症例の中には p53 mutant/Ser-46 リン酸化陰性例も認められており、今回の検討から化学療法や化学放射線療法に対する効果は p53 によるアポトーシス経路のみでなく、他の要因も関与することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we examined the usefulness of induction of the phosphorylation of p53-Ser46 the next day after initiation of treatment as a biomarker of the prediction of treatment response of chemotherapy/chemoradiotherapy for esophageal squamous cell carcinoma. We confirmed the fact for the first time that the phosphorylation of p53-Ser-46 was induced by chemotherapy/chemoradiotherapy in the early stage of treatment. However, there was no significant correlation between the phosphorylation of p-53-Ser-46 and treatment response. Among cases obtained complete response to preoperative therapy, the cases with p-53 mutant and no induction of Ser-46 phosphorylation were involved, therefore, these results suggested that the effect on chemotherapy and chemoradiotherapy was caused not only by apoptosis thorough p53 pathway, but also by another pathway associating with other factors.

研究分野：食道癌集学的治療

キーワード：p53-Ser-46 食道扁平上皮癌 治療効果予測 リン酸化誘導 バイオマーカー アポトーシス

1. 研究開始当初の背景

食道癌治療は、全身の微小転移制御による再発予防を目的とした術前化学療法や腫瘍縮小による切除率向上または完全奏効による非切除食道温存治療を目的とした化学放射線療法が行われ、予後や治療の質の向上が図られている。しかし、survival benefitはいずれも responder に限られており、正確な効果予測が今後の治療の質を左右する。これまでの研究によれば、化学療法の奏効は、*p53* 野生型が変異型に比べて有意に良好であり、予後も野生型で良好であった(文献1)。しかし有意差はあるものの、野生型 *p53* であっても術前化学療法不応例は存在し、それらは術前化学療法の恩恵を受けてないことになる。*P53* はリン酸化により活性化される。リン酸化部位の中でも Ser46 は抗癌剤や放射線治療などにより DNA が修復できないほど損傷されたときにリン酸化される部位である。Ser46 がリン酸化されると *p53* 標的遺伝子である API 遺伝子の転写が活性化されアポトーシスが誘導されるとされている(文献 ~ )。

2. 研究の目的

本研究の目的は、食道扁平上皮癌に対する化学療法、化学放射線療法 (CRT) において、治療開始後早期の Ser46 のリン酸化をバイオマーカーとした治療効果予測の有用性を検討することである。

3. 研究の方法

(1) 細胞株

食道扁平上皮癌 9 株 (KYSE30, KYSE50, KYSE70, KYSE150, KYSE170, KYSE180, KYSE220, KYSE270, T.T) より DNA を抽出し、*p53* 遺伝子の Exon2~11 における変異の有無を direct sequence で調べた。さらにそれら 9 株に対して Strat linker 1800 (Stratagene, La Jolla, CA, USA) を用いて紫外線 20 J/m<sup>2</sup> を 30 秒間照射して DNA を損傷させ、経時的に *p53* 蛋白の発現、*p53* のリン酸化 (Ser46 部位)、*p53* のアセチル化 (Lys382 部位) 及び apoptosis の誘導 (cleaved-PARP の出現) を Western blot で評価した。

(2) 臨床検体

当科で術前や導入化学療法もしくは化学放射線療法施行した 7 症例において、治療開始後 1 日目に上部消化管内視鏡を行い、癌部・正常部より組織検体を採取した。*p53* 遺伝子変異の有無、さらに免疫染色にて Ser46 リン酸化の有無と、治療効果との関係を検討した。

4. 研究成果

(1) 細胞株での検討

9 株中 KYSE30, KYSE70, T.T の 3 株で、それぞれ E326K, Insertion (953\_954 insA), E258X の *p53* 遺伝子変異を認めた。変異株の Western blot による Ser46 リン酸化によるアポトーシスの誘導の検討では、

KYSE30 では Ser46 はリン酸化されずアポトーシスも誘導されていなかった。KYSE70 では Ser46 はリン酸化され、アポトーシスが誘導されていた。T.T では Ser46 はリン酸化されないが、アポトーシスが誘導されていた。という結果であり *p53* 変異株 3 株の UVC に対する反応はそれぞれで異なっていた(図1)。

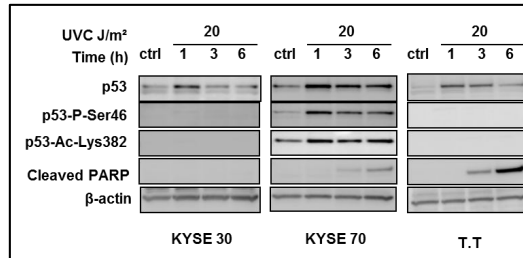


図1 *p53* 変異株における UVC に対する反応

一方で、*p53* 野生株では、6 株中 4 株では UVC による DNA 損傷により ser46 のリン酸化を認めアポトーシスが誘導されていたが、*p53* が野生型であるにもかかわらず 6 株中 2 株では Ser46 がリン酸化されず、アポトーシスが誘導されていなかった(図2)。*p53* 野生株であっても UVC による DNA 損傷で Ser46 がリン酸化されず、アポトーシスが誘導されないことがあることが示された。

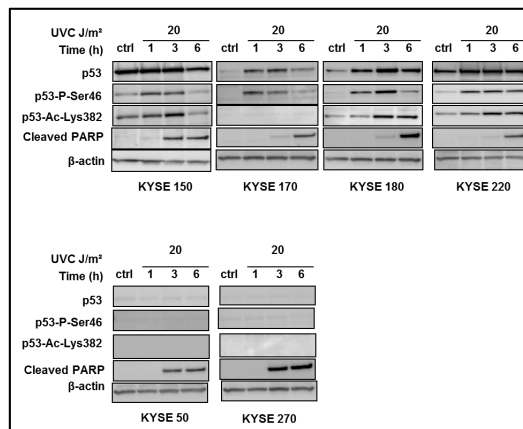


図2 *p53* 野生株における UVC に対する反応

(2) 臨床検体の背景と *p53* 変異の有無

検討した 7 症例は、男:6 例、女:1 例、年齢は平均 68 歳 (60 - 74 歳) であった。治療内容は 5 例が DTX + CDDP + 5FU (DCF) 療法による化学療法、1 例が DCF 療法の後根治 CRT60Gy を施行、1 例が根治 CRT60Gy であった(表1)。7 例中 6 例で *p53* 遺伝子変異を認め、変異部位は Exon5: 3 例、Exon7: 1 例、Exon8: 2 例であった。

症例	性別	治療
1	M	化学療法 (DCF2クール)
2	M	化学療法 (DCF2クール)
3	F	化学療法 (DCF2クール)
4	M	化学療法 (DCF2クール) + CRT 60Gy
5	M	化学療法 (DCF2クール)
6	M	化学療法 (DCF2クール)
7	M	CRT 60Gy

表1 患者背景

(3) 免疫染色による Ser46 リン酸化の検討  
 治療開始後 1 日目の内視鏡検査による生検凍結検体の免疫染色では、リン酸化 Ser46 陽性となったのは 7 例中 1 例で認めた。その Ser46 リン酸化陽性症例は p53 遺伝子変異症例であった (図 3)。

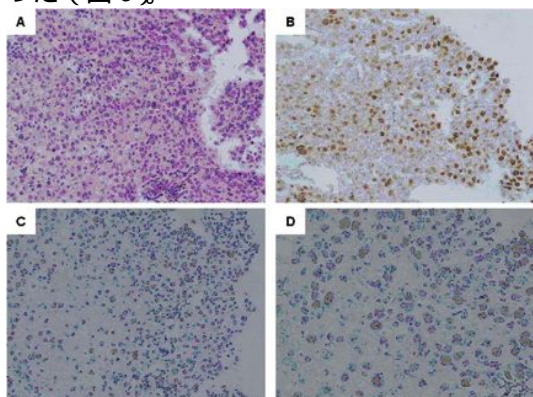


図 3 Ser46 リン酸化陽性症例。A)HE 染色。B) p53 蛋白染色。p53 変異例であり、p53 蛋白の過剰発現を認める。C、D)リン酸化 Ser46 染色。陽性細胞を認める。

また p53 野生型の 1 症例は、リン酸化 Ser46 は陰性であった。(図 4)。

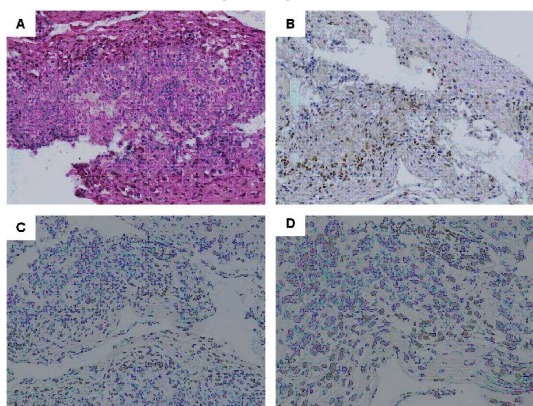


図 4 p53 野生型症例。A)HE 染色。B)p53 蛋白染色。C、D)リン酸化 Ser46 染色。陽性細胞を認めない。

(3) 治療効果と p53 変異、Ser46 リン酸化  
 治療効果 cCR は 1 例で認め、現在 CR 維持のため手術は施行していない。原発巣 PR:5 例、SD1 例であった。cCR 症例は DCF 療法+CRT を施行した症例で、p53 変異型/ Ser46 リン酸化陰性例であった。p53-Ser46 リン酸化を認めた 1 例は p53 変異型であり、治療効果は cPR であった。また p53 野生型例は Ser46 リン酸化陰性であり、治療効果は cPR であった (表 2)。

症例	p53 遺伝子	p53 蛋白 過剰発現	Ser46 リン酸化	治療効果	組織学的 効果 Grade
1	変異型	あり	なし	cPR	1a
2	変異型	あり	あり	cPR	1a
3	変異型	あり	なし	cPR	1b
4	変異型	あり	なし	cCR	-
5	変異型	あり	なし	cSD	1b
6	野生型	なし	なし	cPR	1a
7	変異型	あり	なし	cPR	1b

表 2 p53 変異、Ser46 リン酸化と治療効果

#### (4) まとめ

本研究は食道扁平上皮癌の細胞株、および臨床検体において p53 と p53-Ser46 リン酸化を検討したはじめての研究である。今回の実際の臨床検体の検討では、変異型 p53 症例が cCR となり、野生型 p53 症例より治療効果が高かった。このように p53 変異の有無のみでは治療効果予測とはならないことが示唆された。一方で相関が予想された治療開始後早期の p53-Ser46 リン酸化の有無と化学療法や化学放射線療法の治療効果との間には明らかな相関を見出せなかった。今回の検討からは食道扁平上皮癌の化学療法や化学放射線療法に対する効果は、p53 によるアポトーシス経路以外の要因も関わることが示唆された。

#### <引用文献>

- Yamasaki M, Miyata H, Fujiwara Y, et al. p53 genotype predicts response to chemotherapy in patients with squamous cell carcinoma of the esophagus. *Ann Surg Oncol*. 2010 Feb;17(2):634-42. Epub 2009 Nov 26.
- Saito S, Goodarzi AA, Higashimoto Y, et al. ATM mediates phosphorylation at multiple p53 sites, including Ser(46), in response to ionizing radiation. *J Biol Chem*. 2002 Apr 12;277(15):12491-4. Epub 2002 Mar 1.
- Komiyama S, Taniguchi S, Matsumoto Y, et al. Potentiality of DNA-dependent protein kinase to phosphorylate Ser46 of human p53. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004 Oct 22;323(3):816-22.
- Yoshida K, Liu H, Miki Y. Protein kinase C delta regulates Ser46 phosphorylation of p53 tumor suppressor in the apoptotic response to DNA damage. *J Biol Chem*. 2006 Mar 3;281(9):5734-40. Epub 2005 Dec 23.
- Taira N, Nihira K, Yamaguchi T, et al. DYRK2 is targeted to the nucleus and controls p53 via Ser46 phosphorylation in the apoptotic response to DNA damage. *Mol Cell*. 2007 Mar 9;25(5):725-38.
- Puca R, Nardinocchi L, Givol D, D'Orazi G. Regulation of p53 activity by HIPK2: molecular mechanisms and therapeutical implications in human cancer cells. *Oncogene*. 2010 Aug 5;29(31):4378-87.
- Bode Am, Dong z. Post-translational modification of p53 in tumorigenesis. *Nature Rev Cancer*. 2004:793-805.
- Oda K, et al. p53API, a potential mediator of p53-dependent

apoptosis, and its regulation by  
Ser-46-phosphorylated  
p53. *Cell*. 2000; 849-862.

5. 主な発表論文等  
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者に  
は下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安田 卓司 (YASUDA, Takushi)  
近畿大学・医学部・教授  
研究者番号：10324782

(2) 研究分担者

今本 治彦 (IMAMOTO, Haruhiko)  
近畿大学・医学部・教授  
研究者番号：80351609

今野 元博 (IMANO, Motohiro)  
近畿大学・医学部・准教授  
研究者番号：00278681

新海 政幸 (SHINKAI, Masayuki)  
近畿大学・医学部・講師  
研究者番号：80340793

安田 篤 (YASUDA, Atsushi)  
近畿大学・医学部・講師

研究者番号：60351615

白石 治 (SHIRAIISHI, Osamu)  
近畿大学・医学部・講師  
研究者番号：70388536

岩間 密 (IWAMA, Mitsuru)  
近畿大学・医学部・講師  
研究者番号：20548648

加藤 寛章 (KATO, Hiroaki)  
近畿大学・医学部・講師  
研究者番号：30460900

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：