

綜 説

難治性小児固形腫瘍：進行例神経芽細胞腫の細胞死
における p53経路の役割

上 條 岳 彦

信州大学医学部小児医学講座

Functional Role of p53 Pathway in Cell Death of Advanced Neuroblastoma

Takehiko KAMIJO

Department of Pediatrics, Shinshu University School of Medicine

Key words : neuroblastoma, p53, apoptosis, translocation

神経芽腫, p53, アポトーシス, 細胞内移行

固形腫瘍の治療は非進行例では外科治療が主体であるが、進行例は化学療法および放射線療法の適応となる。しかし相当数の症例は抵抗性を示し予後は不良となる。免疫療法、遺伝子療法も近年検討されてはいるがいまだに確立されていない。代表的な小児固形腫瘍である神経芽細胞腫（神経芽腫）は交感神経系細胞由来の腫瘍である。神経芽腫の治療成績は徐々に改善されつつあるが、発症年齢が1歳以上の進行例（Stage IV）では5年生存率が30%と小児腫瘍としてはきわめて難治性であると欧州から報告されている¹⁾。わが国においても、厚生省（当時）の治療研究班による治療成績の評価が行われているが、85年プロトコルではIV期生存率が34%と改善はしたが依然として十分ではなく、その後の91年プロトコル、98年プロトコルでも進行例の5年生存率は30~40%程度であり著明な改善はない²⁾。このような現状であり、進行例神経芽腫における新たな治療法の確立が切望されている。

また、神経芽腫は現在マス・スクリーニングの対象疾患として生後6カ月~7カ月で尿を検体としてスクリーニングが行われている。このマス・スクリーニング発症例では腫瘍の自然退縮も認められ、無治療観察を行って外科手術、抗腫瘍剤投与などのストレスを与えずに治癒する例も見られ、その多くは再燃することなく経過することが明らかにされつつある。しかしな

がこれらの早期発見腫瘍の中にも進行腫瘍の存在が示唆され、検索例の半数近くで現在進行のリスクファクターとして知られる因子群（病理所見島田分類, N-Myc, Ha-ras/Trk A）の陽性化を検出している報告がある³⁾。

それではこれらの予後良好群と予後不良群の神経芽腫細胞ではどのような生物学的性質の差があるのだろうか。これを明らかにすることが難治性神経芽腫治療におけるブレイク・スルーにつながる可能性がある。現在判明していることは、予後良好例の発症年齢は1歳未満である例がほとんどであり、hyperdiploidまたはnear-triploidの核型を示し、特有の染色体の増幅を示さない。また、明らかな染色体の構造異常も示さない傾向にある。ニューロトロピン受容体であるTrkAが高発現しているのもこの予後良好群の特徴である。これに対して、予後不良群では発症年齢は1歳以上が多く、核型はnear-diploidかnear-tetraploidが大半である。染色体の変化は多くの例に認められ、17番染色体q腕のgain, 1番染色体p腕のdeletionが良く知られている。予後を最も左右する因子はがん遺伝子Mycのfamily geneであるN-Mycである。N-Mycの増幅が認められる例では明らかに予後不良であり、このN-Mycの増幅は1pのdeletionとTrkBの発現と相関している。予後良好群と予後不良群の間でこのような差は判明してはいるが、難治性神経芽腫の治療法の進歩には結びついていないのが現状である。

別刷請求先：上條 岳彦 〒390-8621

松本市旭3-1-1 信州大学医学部小児医学

この神経芽腫の新たな治療戦略を考える上で特に注目すべき生物学的性質として、神経芽腫における p53 経路の状態が上げられる。ヒト p53 は 393 のアミノ酸から成る転写因子である。この構造を簡単に述べると、アミノ酸 1-101 部分の転写活性調節部を含む N 末端領域、アミノ酸 102-292 部分の DNA 結合ドメイン、アミノ酸 293-393 部分の四量体形成ドメインを含む C 末端領域となっている (図 1)。この p53 の腫瘍抑制能の基礎に存在する分子メカニズムにはどのようなものがあるだろうか。まず p53 が関与する細胞における現象を考えてみると、DNA 傷害や、様々な生体ストレス (ウイルス感染, 低酸素, 栄養障害など) によって p53 の量的および質的な調節が行われ、その結果 p53 下流遺伝子群の転写の増減、および他の蛋白との相互作用による生体内シグナルの修飾が起きる。これらによって引き起こされる細胞内の現象は a. 遺伝子転写調節, b. DNA 複製への関与, c. DNA 修復, d. 分化誘導, e. アポトーシス誘導などが知られている。これらの p53 によって引き起こされた現象が、細胞にもたらされた遺伝情報の誤りやストレスによる細胞機能への影響を回避する。悪性腫瘍における p53 変異は、DNA 結合ドメインにある動物種間で特によく保存された 4 カ所の保存領域に集中する傾向がある。この保存領域は各種遺伝子のプロモーターに存在する p53 特異的 DNA 配列 (5'-PuPuPuC (A/T) (T/A) GPyPyPy-3') に対して p53 が結合するために重要な領域である。p53 の変異の 80% 以上は 1 塩基が置換された点変異であり、特に変異が多い部位では CpG 配列が見られる。これは CG 配列のシトシンが C 5 位でメチル化されることに加えて、C 4 位のアミノ基の脱アミノ化が生じると、シトシンがチミンに置換されるのである。また相補鎖側の C が T に置換されればセンス鎖の G が A に置換され、これによって CpG 部位

での C : G → T : A 置換が生じることになる。

これまでの報告を顧みると、p53 の変異は非常に多くの非上皮系腫瘍・上皮系腫瘍で認められ、血液系の腫瘍では AML の 15% 前後、MDS の 10% 前後に p53 変異が認められ、p53 変異は治療抵抗性、予後不良例と相関している⁴⁾。しかしながら、神経芽腫ではこの p53 の点変異がほとんど認められず、野生型であるという驚くべき特徴がある⁵⁾。この野生型 p53 によって細胞周期の停止やアポトーシスの誘導が神経芽腫ではもたらされないのだろうか? p53 自体の変異・欠失以外にも p53 変異・欠失に類似した発がん起序における意義をもつ遺伝子異常として、癌抑制遺伝子 ARF の不活化や癌遺伝子 MDM2 の増幅が挙げられ、多くのヒト腫瘍で報告されている⁶⁾。ARF/MDM2 の p53 に及ぼす影響を簡略に述べてみる。ARF は 1995 年に同定されて以来、その抗腫瘍機能が精力的に解析されてきた⁷⁾。その主な機構は癌遺伝子産物 MDM2 を空間的に p53 から隔離し (MDM2 を核小体にトラップする)、MDM2 の機能 (p53 のユビキチンリガーゼ) を抑制して、p53 の分解を抑えてその活性を増加させることである⁸⁾。神経芽腫におけるこの癌抑制遺伝子 ARF の不活化については、ARF の局在する染色体 9p21 部位の LOH が 24/80 腫瘍検体で認められ、LOH+ 群では生存率が有意に低い報告がある⁹⁾。しかしながら同部位には癌抑制遺伝子 p15INK4b, p16INK4a も存在しており腫瘍発症における ARF-p53 経路の影響の把握は難しい。癌遺伝子 MDM2 の増幅は、23 細胞株を調べたところ 3 株で MDM2 の増加が認められ、26 の腫瘍検体では 1 例に MDM2 増加が報告されている¹⁰⁾。それでは野生型の p53 およびそれを制御する ARF/MDM2 は神経芽腫の発がん起序にはそれほど寄与しないのであろうか? これについて、近年神経芽腫における p53 経路の重要性を示唆する報告も成さ

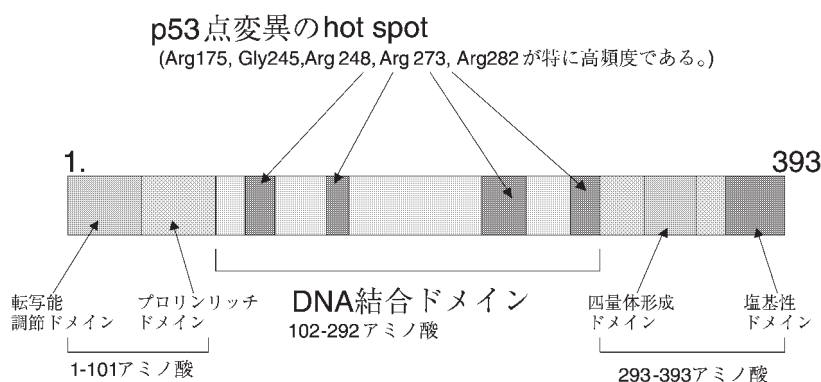


図 1 p53 の構造と点変異

れていることを紹介したい。神経芽腫の治療前には p53は野生型であったが治療後に変異型に変わっており、進行期神経芽腫が再発しやすく化学療法耐性になりやすい原因として p53経路の不活化を Tweddle ら¹¹⁾は示唆している。18の NB 細胞株で Melpharan (L-PAM) に対する薬剤感受性を調べたところ 7 株は感受性、11株は非感受性であり、感受性 7 株中 7/7 に対して非感受性株中では 4/11のみが p53が野生型であったという報告も、p53変異の神経芽腫における薬剤感受性への影響を裏付けている¹²⁾。

神経芽腫における p53機能の不活化として、p53遺伝子の変異とは異なる実に興味深いアイデアが提唱されている。Moll ら¹³⁾は、未分化の神経芽腫では Cytoplasmic p53が増加しており (30/31例、96%で核が染色されずに細胞質が染色される)、分化した ganglioneuroblastoma, ganglioneuroma ではこの p53の異常はない、と報告している。SK-N-SH, IMR-32, LAN-5, CHP134などの NB 細胞株で p53が過剰発現しており、その局在は核でなく細胞質が主であること、SK-N-SH, IMR-32, LAN-5では p53経路を介すると考えられている ionizing radiation, Actinomycin D 刺激後の G1 arrest の程度が少ないこともまた報告されている¹⁴⁾。この NB cell で Cytoplasmic に隔離されている p53は p53認識配列に結合できないことが EMSA assay を用いて示されている¹⁵⁾。また NB 細胞株 SK-N-SH に mouse p53 aa. 302-390を発現させると細胞質の p53が核に集積するが、この核に集積した内在性 p53は mouse p53 aa. 302-390と hetero-complex を形成するが p21waf1を誘導できない報告があり、NB cell で細胞質に局在している p53は転写活性が減弱～消失している可能性が示された¹⁵⁾。NBL-S, NSH, NMB の3つのオリジナル NB cell line を用いた研究で、p53は無刺激では細胞質に局在するが 4Gy の ionizing radiation で核に

集積し、この際 NBL-S, NSH では p21, MDM2 も増加し、NB cell は G0/G1 arrest した。また p53結合配列を用いた Gel-shift assay でも NBL-S, NSH では ionizing radiation 後にシフトが見られた、という報告がある¹⁶⁾。NB Cell で p53の核への移行は Mitomycin C によってもたらされ、Mitomycin C 投与後に p53は p53結合配列に結合できるようになるが、MDM2 と p21は誘導できないし、ルシフェラーゼアッセイでも活性は増加しない。よって NB cell の p53は転写装置に入り込めない構造であり、これによって転写活性が阻害され、核外に排出され、強制発現した MDM2 によって分解されにくいと考えられる、と Wolff ら¹⁷⁾は報告している。

近年神経芽腫において p53を細胞質に係留する機構として新たな分子 Parc がクローニングされた¹⁸⁾。Parc は神経芽腫細胞で過剰発現しており、神経芽腫細胞では細胞質 p53の大部分が Parc と p53と結合する。Parc と p53の結合について述べると、Parc の N 末部分と p53の C 末部分が結合することが示されているが、結合ドメインの詳細は今後の解析が待たれる。Parc は270kDa の巨大な蛋白であり、細胞質で p53や他の蛋白質とともに 1MDa に及ぶコンプレックスを形成することがゲル濾過実験で明らかにされている。図2のように C 末部分に Ring-IBR-Ring ドメイン構造を持っており、この構造は常染色体劣性遺伝性パーキンソン病の原因遺伝子である“Parkin”と類似した構造である。この Ring-IBR-Ring ドメイン構造は Parkin ではユビキチン・リガーゼ活性に関わることが知られており、Parc もユビキチン・リガーゼ活性を示すが、Parc による p53のユビキチン化・分解促進は認められていない。また Parc 中央部にある CCH (C-terminal Cullin Homology) ドメインは、Anaphase-promoting complex や Skp-Cullin-F box complex などのユビキチン・リガーゼ複合体の構成

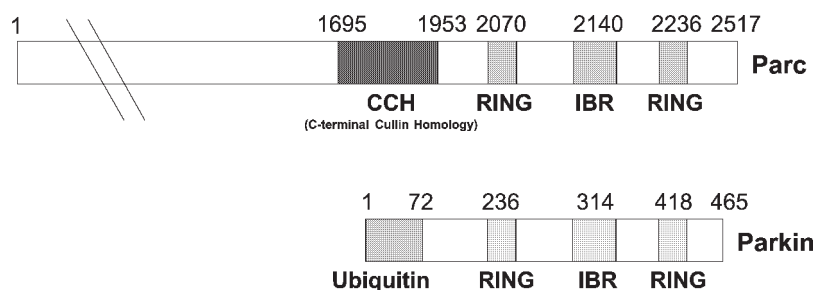


図2 Parc の構造
Parc と Parkin のドメイン構造。図中の数字は蛋白分子中のアミノ酸数を表す。

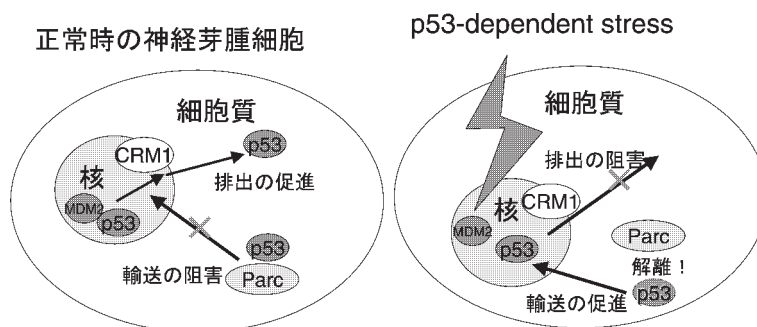


図3 神経芽腫細胞における p53局在機構

MDM2は p53にユビキチンを付加して分解を促進する。

CRM1は p53の核外輸送に働く。Parc によって p53は細胞質に係留されて蓄積する。

DNA damage によって Parc と p53が解離し、p53は核へ移行し、核内では p53排出の障害が起きることが推測される。

蛋白である Cullin とホモロジーを持つ部分である。Parc を siRNA で減少させると活性型 p53が核内に蓄積し、この Parc の減少によって DNA 障害に対する神経芽腫の感受性が顕著に亢進したことは、神経芽腫における Parc 依存性の p53の細胞質への係留が細胞がん化に寄与していることを示唆している¹⁸⁾。今後の Parc による p53の細胞質係留機構の解析の進展が、神経芽腫だけではなく乳癌、大腸癌、網膜芽細胞腫などの p53が細胞質に係留されるタイプの腫瘍の治療開発に役立つことを期待したい。

このように、神経芽腫における p53経路においては、p53の細胞質への係留によって核への移行が障害される機構、また細胞障害刺激に対する p53の活性化が障害される機構が提唱されている。細胞質係留の具体的な分子機構のひとつとして Parc の存在が近年明らか

になった。この Parc を中心とした p53の細胞質内係留機構の解明はがん治療開発にとって今後重要な課題と思われる。しかしながら、神経芽腫の治療抵抗性亢進・難治化において p53遺伝子の変異の存在も上記のように確かに存在している。これらの状況を考え合わせ、① 進行期神経芽腫の発症には、p53の細胞質内係留機構および核外への排出機構 (図3 CRM1) を中心としたメカニズムによって野生型の p53が十分な機能を発揮できないことが寄与しており、② 進行期神経芽腫の治療抵抗性亢進・難治化においては p53遺伝子の変異が重要な役割を果たしている、といった仮説が考えられるのではないだろうか (図3)。いずれにしても、進行期神経芽腫治療法開発において p53の占めている役割は大きく、今後の更なる研究の進展が治療成績向上のために期待される。

文 献

- 1) Spix C, Aareleid T, Stiller C, Magnani C, Kaatsch P, Michaelis J : Survival of children with neuroblastoma. time trends and regional differences in Europe, 1978-1992. Eur J Cancer 37 : 722-729, 2001
- 2) 金子道夫 : 進行神経芽腫のグループスタディ. 小児がん 39 : 360, 2002
- 3) 田中丈夫, 家原知子, 細井 創, 杉本 徹, 水田祥代, 澤田 淳, 金子道夫, 土田嘉昭 : マスクリーニング発見神経芽腫は退縮する腫瘍か? 200例での検討. 日児誌 107 : 226, 2003
- 4) Kirsch DG, Kastan MB : Tumor-suppressor p53 : implications for tumor development and prognosis. J Clin Oncol 16 : 3158-3168, 1998
- 5) Komuro H, Hayashi Y, Kawamura M, Hayashi K, Kaneko Y, Kamoshita S, Hanada R, Yamamoto K, Hongo T, Yamada M : Mutations of the p53 gene are involved in Ewing's sarcomas but not in neuroblastomas. Cancer Res 53 : 5284-5288, 1993
- 6) Lowe SW, Sherr CJ : Tumor suppression by Ink4a-Arf : progress and puzzles. Curr Opin Genet Dev 13 : 77-83, 2003
- 7) Kamijo T, Zindy F, Roussel MF, Quelle DE, Downing JR, Ashmun RA, Grosveld G, Sherr CJ : Tumor suppression at the mouse INK4a locus mediated by the alternative reading frame product p19ARF. Cell 91 : 649-659, 1997
- 8) Kamijo T, Weber JD, Zambetti G, Zindy F, Roussel MF, Sherr CJ : Functional and physical interactions of the

- ARF tumor suppressor with p53 and Mdm2. *Proc Natl Acad Sci USA* 95 : 8292-8297, 1998
- 9) Takita J, Hayashi Y, Kohno T, Yamaguchi N, Hanada R, Yamamoto K, Yokota J : Deletion map of chromosome 9 and p16 (CDKN2A) gene alterations in neuroblastoma. *Cancer Res* 57 : 907-912, 1997
 - 10) Corvi R, Savelyeva L, Breit S, Wenzel A, Handgretinger R, Barak J, Oren M, Amler L, Schwab M : Non-syntenic amplification of MDM2 and MYCN in human neuroblastoma. *Oncogene* 10 : 1081-1086, 1995
 - 11) Tweddle DA, Malcolm AJ, Bown N, Pearson AD, Lunec J : Evidence for the development of p53 mutations after cytotoxic therapy in a neuroblastoma cell line. *Cancer Res* 61 : 8-13, 2001
 - 12) Keshelava N, Zuo JJ, Chen P, Waidyaratne SN, Luna MC, Gomer CJ, Triche TJ, Reynolds CP : Loss of p53 function confers high-level multidrug resistance in neuroblastoma cell lines. *Cancer Res* 61 : 6185-6193, 2001
 - 13) Moll UM, LaQuaglia M, Benard J, Riou G : Wild-type p53 protein undergoes cytoplasmic sequestration in undifferentiated neuroblastomas but not in differentiated tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 92 : 4407-4411, 1995
 - 14) Moll UM, Ostermeyer AG, Haladay R, Winkfield B, Frazier M, Zambetti G : Cytoplasmic sequestration of wild-type p53 protein impairs the G1 checkpoint after DNA damage. *Mol Cell Biol* 16 : 1126-1137, 1996
 - 15) Ostermeyer AG, Runko E, Winkfield B, Ahn B, Moll UM : Cytoplasmically sequestered wild-type p53 protein in neuroblastoma is relocated to the nucleus by a C-terminal peptide. *Proc Natl Acad Sci USA* 93 : 15190-15194, 1996
 - 16) Goldman SC, Chen CY, Lansing TJ, Gilmer TM, Kastan MB : The p53 signal transduction pathway is intact in human neuroblastoma despite cytoplasmic localization. *Am J Pathol* 148 : 1381-1385, 1996
 - 17) Wolff A, Technau A, Ihling C, Technau-Ihling K, Erber R, Bosch FX, Brandner G : Evidence that wild-type p53 in neuroblastoma cells is in a conformation refractory to integration into the transcriptional complex. *Oncogene* 20 : 1307-1317, 2001
 - 18) Nikolaev AY, Li M, Puskas N, Qin J, Gu W : Parc : a cytoplasmic anchor for p53. *Cell* 112 : 29-40, 2003

(H 15. 12. 3 受稿)