

## 新生内膜形成における p53 の役割

市来 俊弘

**要 旨：** p53 はがん抑制遺伝子としても知られる転写因子であり、細胞周期などに関わる遺伝子を制御している。遺伝子導入などを用いた研究は p53 の活性化が新生内膜の形成を抑制することを示しているが、p53 を活性化する薬剤は細胞傷害性があり血管病変の治療には応用されていない。近年、p53 と結合しその分解を誘導する MDM2 を阻害することにより p53 を活性化させる nutlin-3 という小分子化合物が開発された。Nutlin-3 は新生内膜形成を抑制し、MDM2 阻害薬が新生内膜形成抑制の新たな治療戦略となる可能性が示唆された。(J Jpn Coll Angiol, 2011, 51: 409-413)

**Key words:** p53, neointimal formation, MDM2, nutlin-3

### はじめに

冠動脈形成術後の新生内膜形成による再狭窄は、ステントとくに薬剤溶出性ステントの登場によって著しく減少した。しかし完全に抑制はできず、また、静脈グラフト内の再狭窄はまだ残された問題である。新生内膜形成には様々な要因が関与すると考えられているが、血管壁細胞において傷害によって生じた様々な刺激を遺伝子発現に変換する転写因子の活性化あるいは不活化もその一つと考えられる。本稿では、転写因子であり、がん抑制遺伝子としても知られる p53 が新生内膜形成において果たす役割、および最近開発された p53 を活性化させる小分子の薬剤である nutlin-3 の作用について概説する。

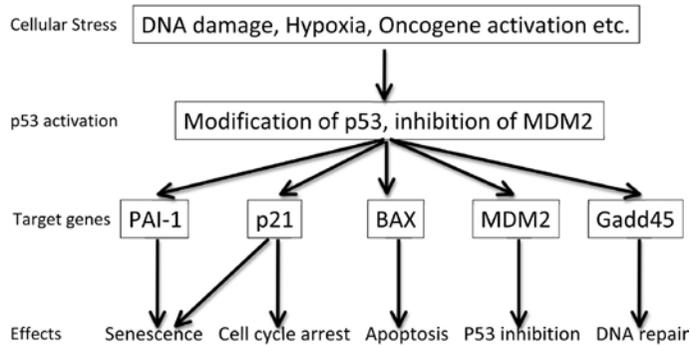
### 血管障害後の新生内膜形成のメカニズム

血管傷害後の新生内膜は主に中膜から遊走してきた平滑筋細胞の増殖によると考えられている<sup>1)</sup>。バルーンなどによる血管傷害により、内膜が脱落すると内皮下のマトリックスが露出し、血栓が形成される。この血栓には血管平滑筋の遊走や増殖を促進する様々な増殖因子が含まれている。活性化された血小板から放出される増殖因子やサイトカインが、いわゆる収縮型(分化型)の平滑筋細胞の形質転換を誘導し合成型(脱分化型)になると考えられている。収縮型の平滑筋細胞は収縮に関与する、

スミーズリン、SM- $\alpha$ -アクチン、SM ミオシン重鎖、カルボニンなどを発現している。これらの蛋白の遺伝子プロモーターの多くに CArG box と呼ばれる転写調節領域があり平滑筋細胞の分化を制御していると考えられている。CArG box には serum response factor(SRF)と呼ばれる転写因子が結合する。Myocardin と呼ばれる転写共役因子が SRF に直接結合し、これらの遺伝子の発現を促進するとされる。

内皮の脱落後 1 週間以内に、中膜の内側の平滑筋は合成型へと転換する。前述の収縮型平滑筋細胞で発現する遺伝子の発現は抑制され、合成型を特徴づける遺伝子として、SMemb や Kruppel-like factor 4 などの発現が増加してくる。収縮型で発現している遺伝子を強く抑制する因子として、血小板由来増殖因子(PDGF)が重要と考えられている。さらに PDGF はストレスファイバーの分解を促進し、アクチンの再構成を誘導することなどにより、細胞の遊走を促進する。また合成型の平滑筋細胞では、筋線維の発現は減少し、小胞体やゴルジ体が発達してくる。内膜へ遊走した平滑筋細胞は増殖し、細胞外基質を産生し、新生内膜の肥厚が生じる。

新生内膜に存在する平滑筋様の細胞は必ずしも中膜の平滑筋由来ではないことも報告されている<sup>2)</sup>。血管外膜の線維芽細胞はバルーンの拡張刺激により、筋線維芽細胞へ形質転換し、新生内膜へ遊走するとともに SM- $\alpha$ -



**Figure 1** p53 activation and regulation of downstream targets. Some of the stimuli for p53 activation, target genes of p53 and cellular effects are summarized.

アクチンを発現するようになり、新生内膜の肥厚に関与することが報告されている。

さらに、骨髄由来の単核球細胞が新生内膜の形成に関与することも報告されている<sup>3)</sup>。当初これらの細胞は平滑筋細胞や内皮細胞のマーカーは発現していないが、後にSM- $\alpha$ -アクチンを発現するようになる。また血中の単核球細胞が平滑筋細胞や内皮細胞へ分化しうることが報告されている。しかしながら、最近の研究によれば、新生内膜において骨髄由来のSM- $\alpha$ -アクチン陽性細胞は、同時に炎症性単球の表面マーカーをもち、SMミオシン重鎖を発現する成熟した平滑筋細胞には分化しないとされる<sup>4)</sup>。これらの研究から、新生内膜は様々な細胞に由来する不均一な細胞集団から構成されていることが示唆される。

新生内膜の形成の後期では、新生内膜の細胞におけるSM- $\alpha$ -アクチンの発現が増加し、コラーゲンやフィブロネクチンの産生が増加する。血管は収縮し傷害血管の内腔はさらに狭くなるいわゆるネガティブリモデリングを生じる。この過程には、TGF- $\beta$ が重要な役割を果たすと考えられている。

## p53

ヒトのがん細胞のおおよそ50%においてp53の変異が生じており、p53は重要ながん抑制遺伝子として知られている転写因子である<sup>5)</sup>。p53欠損マウスも様々な腫瘍を発症することが知られている。正常細胞ではp53はMDM2とよばれるユビキチンリガーゼと結合し、ユビキチン化を受けプロテオソームにおいて分解されるためそ

の発現は低く抑えられている。細胞が様々なストレスを受けると、この抑制は解除される。その結果p53蛋白は安定化し、様々な遺伝子の発現を活性化する。p53の標的遺伝子は細胞周期の停止、アポトーシス、細胞老化、オートファジーなどに関連する(Fig. 1)。またMDM2遺伝子自身もp53により発現が活性化され、ネガティブフィードバックが形成されている。がん細胞におけるp53の変異の80%以上はDNA結合領域に生じていると報告されていることから、p53の転写因子としての役割が重要であることがわかる。現在125以上の遺伝子がp53の直接の標的遺伝子であると報告されている。

数多くあるp53標的遺伝子のなかで異なった刺激に対して選択的に遺伝子発現が活性化される機序はp53の研究において熱心に研究されている分野である。この刺激-遺伝子応答の選択性を決定する機序には大きく3つの機構が報告されている。第一の機序はp53応答配列の多様性に起因すると考えられている。4量体を形成するp53はコンセンサスDNA配列の半分から3分の4程度が保存されていれば、DNAに結合できるとされている。しかし、酵母を用いた解析によれば、そのDNA配列によりp53とDNAとの結合親和性は1000倍も違うとされる。全体的に、細胞周期に関する遺伝子のプロモーターへのp53の結合のほうがより強固であると考えられている。また、p53はメチル化やアセチル化、リン酸化などの様々な翻訳後修飾を主にN末端とC末端に、一部DNA結合部位に受ける。これらの修飾は、細胞外からの刺激が細胞内シグナルを活性化し、最終的にp53へ収束する結果として生じる。これらの、修飾が、標的遺

伝子の選択性に関わっていると考えられているが、翻訳後修飾のどのような組み合わせが選択的に遺伝子発現を活性化させるかについてはまだ十分には解明されていない。第三の機序として、p53に結合する蛋白による制御が知られている。p53に結合する蛋白は、p53応答配列の認識を変化させ、あるいは異なった転写共役因子をリクルートすることによりp53の遺伝子プロモーターに対する選択性を制御していると考えられている。また翻訳後の修飾が結合蛋白の選択性を規定する例も報告されている。

### 血管病変の形成における p53 の役割

p53が細胞周期を停止させる一連の遺伝子発現を活性化させることから、血管傷害後の新生内膜形成や、動脈硬化病変などにおけるp53の役割が検討されている。

平滑筋細胞にp53を過剰発現させると、PDGFによる細胞増殖が抑制され、5日後にはほとんどの細胞の細胞周期がG1期で停止し、S期の細胞が減少していた<sup>6)</sup>。しかし、p53の過剰発現のみではアポトーシスは誘導されなかった。ウサギ頸動脈のバルーン傷害後に、p53遺伝子を導入すると新生内膜の形成が抑制されたと報告されている。

上記の報告とは逆に、アデノウイルスを用いてp53を平滑筋細胞に過剰発現させると、増殖には影響を与えなかったがアポトーシスが誘導されたとの報告もある<sup>7)</sup>。この研究では、ヒトの大伏在静脈にp53を過剰発現させ、組織培養を行うと、平滑筋細胞の遊走の低下とアポトーシスの増加とともに、新生内膜の形成が抑制されたと報告されている。

Matsushitaらはp53の発現を抑制するアンチセンスオリゴヌクレオチドの効果を検討している<sup>8)</sup>。p53アンチセンスオリゴヌクレオチドを培養平滑筋細胞に導入すると細胞増殖が促進された。傷害をしていないラットの頸動脈にp53アンチセンスオリゴヌクレオチドを導入すると新生内膜形成が生じると報告されている。

マウスの頸静脈や大静脈を頸動脈に自己移植し、細動脈硬化を誘導するモデルを用いた研究が報告されている。p53欠損マウスにこのモデルを作成すると、新生内膜の形成が促進された<sup>9)</sup>。このp53欠損マウスでは新生内膜の細胞はほとんどがSM- $\alpha$ -アクチン陽性であったが、野生型マウスではMAC-1陽性のマクロファージが主体であった。またp53欠損マウスの新生内膜では

TUNEL陽性のアポトーシス細胞が著明に減少していた。p53欠損マウス由来の血管平滑筋細胞は増殖能と遊走能が亢進し、マトリックスメタプロテイナーゼの産生も増加していた。同様に豚の大伏在静脈を頸動脈に移植するモデルにおいても、アデノウイルスによるp53の過剰発現は、新生内膜形成を抑制するとともに、グラフト静脈径が拡大しポジティブリモデリングを誘導したと報告されている<sup>10)</sup>。

また、動脈硬化病変を生じるアポリポ蛋白E欠損(apoE-KO)マウスでの検討もなされている。興味深いことに、apoE-KOマウスとp53を過剰発現するトランスジェニックマウス(p53TG)を交配させても動脈硬化病変の形成そのものには影響しなかったと報告されている<sup>11)</sup>。しかし大腿動脈をガイドワイヤーにより傷害すると、apoE-KO/p53TGにおいて新生内膜の形成が野生型マウスと比べて抑制されたとされる。新生内膜が形成された時点での平滑筋細胞のアポトーシスや増殖には大きな差は認めなかったが、新生内膜がまだ形成されていない血管傷害2日後の中膜平滑筋細胞の増殖はapoE-KO/p53TGにおいて抑制されていた。

逆に、p53欠損マウスの大腿動脈にワイヤー傷害モデルを作成すると、新生内膜の形成が促進されたと報告されている<sup>12)</sup>。

### MDM2 阻害薬

p53を活性化させる薬剤が抗がん剤など細胞傷害作用をもつものしかなかったため、心血管系では前述のようにp53の遺伝子導入による過剰発現や、遺伝子欠損マウスなどにおける検討が報告されてきた。

p53の活性を制御する因子として、MDM2が重要な役割を果たすと考えられている<sup>13)</sup>。MDM2はp53によりその発現が制御されている。p53は活性化されるとMDM2遺伝子プロモーターに結合しMDM2の発現を増加させる。増加したMDM2はp53の活性を抑制するというフィードバックループを形成している。MDM2がp53を抑制する機序として少なくとも三つの機序が報告されている。MDM2はp53の転写活性化部位に結合しp53による遺伝子発現を抑制する。また、MDM2はp53の核から細胞質への排出を促進するとされる。さらにMDM2はp53に対してユビキチンリガーゼとして作用し、プロテアソームにおけるp53の分解を誘導する。MDM2欠損マウスは胎生致死であるが、p53を同時に欠損させる

と生存することから、MDM2-p53の制御ループが重要な機能をもっていることが示唆されている。

p53の変異がないがん細胞の多くで、MDM2遺伝子が増幅しているあるいはMDM2が過剰発現しており、結果としてp53の発現、活性が抑制されていると報告されている。MDM2を過剰発現するマウスもp53欠損マウスと同様にがんの発生が増加するとされている。したがって、p53の変異がなく、MDM2の過剰発現によりp53が抑制されているがん細胞ではMDM2の発現を抑制するあるいはMDM2とp53の結合を抑制する薬剤が新規の抗がん剤となりうることが報告されている。

最近、MDM2がp53と結合するポケット部分に結合し、p53との結合を阻害する結果p53を活性化する低分子量の分子としてnutlin-3が報告された<sup>14)</sup>。Nutlin-3はp53に変異のない様々ながん細胞の増殖を抑制することが報告されている。がん細胞ではnutlin-3はp53の活性化によりcyclin-dependent kinaseを阻害するp21の発現を誘導する。その結果S期の細胞が減少し、G1/S期あるいはG2/M期で細胞周期が停止するとともにp53依存性に細胞死に陥る。ただ、アポトーシスが生じる程度はがん細胞の種類により異なり、nutlin-3に対する感受性に差があることが知られている。一方、正常細胞では細胞周期の停止は生じるが、細胞死は生じないとされる。

Nutlin-3はvascular endothelial growth factorやbasic fibroblast growth factorによる内皮細胞の増殖を抑制したが、アポトーシスは誘導しないと報告されている<sup>15)</sup>。さらに細胞周期を停止させる濃度よりもより低い濃度で内皮細胞の遊走を抑制した。マトリゲルアッセイにおいて毛細血管の形成も抑制したと報告されている。

われわれは、平滑筋細胞においてnutlin-3の効果を検討した。Nutlin-3はPDGFによる平滑筋細胞の増殖を抑制したが、やはりアポトーシスは誘導しなかった。マウスの大腿動脈のワイヤー傷害モデルで新生内膜形成を誘導し、nutlin-3を4週間投与したところ、新生内膜形成が著明に抑制された。対照群の新生内膜ではp53の発現はほとんど認められなかったが、nutlin-3投与群では、新生内膜や中膜でp53の発現が認められた。これらの結果から、nutlin-3は血管傷害後の新生内膜形成の抑制に有用な薬剤となりうると思われた。

p53の活性化は血管の老化を促進するという報告もなされており<sup>16)</sup>、nutlin-3長期投与は動脈硬化進展などの問題を生じる可能性もある。しかし、新生内膜の形成は

血管傷害後の比較的早期に生じることから短期間の投与で十分である可能性もある。また薬剤溶出性ステントによる投与も有効であるかもしれない。臨床応用という観点からは、今後、投与経路や期間などについて更なる検討が必要と考えられる。

## おわりに

血管傷害後の新生内膜ではp53の発現が抑制されており、p53の活性化は新生内膜形成の抑制に有用と考えられる。MDM2のp53との結合を抑制するnutlin-3は抗がん剤のような細胞傷害性がなくアポトーシスを誘導しないことから冠動脈疾患の患者にも応用が可能と考えられる。MDM2-p53の結合を阻害しp53を活性化する薬剤はnutlin-3以外にもMI-63、MI-219などが開発されている。これらの薬剤は正常のp53を有するがん細胞に対する抗がん剤として開発中であるが、新生内膜形成を抑制する薬剤としても期待できると考えられる。

## 文 献

- 1) Zargham R: Preventing restenosis after angioplasty: a multi-stage approach. *Clin Sci (Lond)* 2008; **114**: 257-264
- 2) Sartore S, Chiavegato A, Faggin E, et al: Contribution of adventitial fibroblasts to neointima formation and vascular remodeling: from innocent bystander to active participant. *Circ Res* 2001; **89**: 1111-1121
- 3) Caplice NM, Bunch TJ, Stalboerger PG, et al: Smooth muscle cells in human coronary atherosclerosis can originate from cells administered at marrow transplantation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; **100**: 4754-4759
- 4) Iwata H, Manabe I, Fujiu K, et al: Bone marrow-derived cells contribute to vascular inflammation but do not differentiate into smooth muscle cell lineages. *Circulation* 2010; **122**: 2048-2057
- 5) Beckerman R, Prives C: Transcriptional regulation by p53. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2010; **2**: a000935
- 6) Yonemitsu Y, Kaneda Y, Tanaka S, et al: Transfer of wild-type p53 gene effectively inhibits vascular smooth muscle cell proliferation in vitro and in vivo. *Circ Res* 1998; **82**: 147-156
- 7) George SJ, Angelini GD, Capogrossi MC, et al: Wild-type p53 gene transfer inhibits neointima formation in human saphenous vein by modulation of smooth muscle cell migration and induction of apoptosis. *Gene Ther* 2001; **8**: 668-676
- 8) Matsushita H, Morishita R, Aoki M, et al: Transfection of

- antisense p53 tumor suppressor gene oligodeoxynucleotides into rat carotid artery results in abnormal growth of vascular smooth muscle cells. *Circulation* 2000; **101**: 1447–1452
- 9) Mayr U, Mayr M, Li C, et al: Loss of p53 accelerates neointimal lesions of vein bypass grafts in mice. *Circ Res* 2002; **90**: 197–204
- 10) Wan S, George SJ, Nicklin SA: Overexpression of p53 increases lumen size and blocks neointima formation in porcine interposition vein grafts. *Mol Ther* 2004; **9**: 689–698
- 11) Sanz-González SM, Barquín L, García-Cao I, et al: Increased p53 gene dosage reduces neointimal thickening induced by mechanical injury but has no effect on native atherosclerosis. *Cardiovasc Res* 2007; **75**: 803–812
- 12) Sata M, Tanaka K, Ishizaka N, et al: Absence of p53 leads to accelerated neointimal hyperplasia after vascular injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; **23**: 1548–1552
- 13) Shangary S, Wang S: Small-molecule inhibitors of the MDM2-p53 protein-protein interaction to reactivate p53 function: a novel approach for cancer therapy. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2009; **49**: 223–241
- 14) Vassilev LT, Vu BT, Graves B, et al: In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2. *Science* 2004; **303**: 844–848
- 15) Secchiero P, Corallini F, Gonelli A, et al: Antiangiogenic activity of the MDM2 antagonist nutlin-3. *Circ Res* 2007; **100**: 61–69
- 16) Kunieda T, Minamino T, Nishi J, et al: Angiotensin II induces premature senescence of vascular smooth muscle cells and accelerates the development of atherosclerosis via a p21-dependent pathway. *Circulation* 2006; **114**: 953–960

## Role of p53 in Neointimal Formation

Toshihiro Ichiki

Departments of Advanced Therapeutics for Cardiovascular Diseases and Cardiovascular Medicine, Kyushu University  
Graduate School of Medical Sciences, Fukuoka, Japan

**Key words:** p53, neointimal formation, MDM2, nutlin-3

p53 is a transcription factor that regulates many genes and is known as a tumor-suppressor. In a non-stressed state, p53 binds to MDM2 and is subject to proteosomal degradation. Upon stimulation with various stimuli that induce cellular stress such as DNA damage and hypoxia, the interaction between p53 and MDM2 is disrupted and p53 protein is stabilized and activated. The target genes of p53 regulate various aspects of cellular function including cell cycle arrest, apoptosis and senescence. Gene transfer and a series of genetic studies showed that activation of p53 inhibits proliferation of vascular smooth muscle cells and neointimal formation after injury. However, the drugs that activate p53 have not been used to reduce neointimal formation because p53 is activated by genotoxic drugs such as anti-cancer drugs. Nutlin-3, a small molecular compound that binds to MDM2 have been developed recently. Nutlin-3 binds to the p53-binding pocket of MDM2 and activates the p53 pathway. Nutlin-3 inhibited neointimal formation after vascular injury, suggesting that MDM2 inhibitor may be a novel strategy to inhibit injury-induced neointimal formation.

(*J Jpn Coll Angiol*, 2011, **51**: 409–413)