

博士論文

新規作用を有する抗がん剤の創薬研究
およびトランスレーショナルリサーチ

岩井 謙一

目次

略語一覧

第 1 章 緒言	1
第 2 章 新規 CLK 阻害剤による pre-mRNA スプライシング機構および MYC 脆弱性を標的とした抗腫瘍作用 (Anti-tumor efficacy of a novel CLK inhibitor via targeting RNA splicing and MYC-dependent vulnerability)	
2.1 背景	6
2.2 結果	6
2.3 考察	26
2.4 実験材料および手法	27
2.5 小括	33
第 3 章 新規 CDC7 選択的阻害剤 TAK-931 の分子メカニズムおよび有効な対象疾患探索 (Molecular Mechanism and Potential Target Indication of TAK-931, a Novel CDC7-Selective Inhibitor)	
3.1 背景	34
3.2 結果	34
3.3 考察	53
3.4 実験材料および手法	55
3.5 小括	58
第 4 章 総括	59
第 5 章 引用論文	58
利益相反	69
謝辞	70
原著論文目録	71

略語一覧

4OTH	4-hydroxytamoxifen
53BP1	Tumor suppressor p53-binding protein 1
A3'SS	Alternative 3'-splice-site
A5'SS	Alternative 5'-splice-site
AAALAC	Association for the Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care
AFE	Alternative First Exon
ALE	Alternative Last Exon
ALK	Anaplastic Lymphoma Kinase
AML	Acute Myeloid Leukemia (急性骨髄性白血病)
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosine Triphosphate
ATR	ataxia telangiectasia and Rad3-related protein
BCLAF1	Bcl-2-associated transcription factor 1
BF	Bayes factor
BRAF	v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1
BRCA	Breast Cancer susceptibility gene
BrdU	Bromodeoxyuridine
CCLE	Cancer Cell Line Encyclopedia
CDC	Cell division cycle
CDK	cyclin-dependent kinase
CHK1	Checkpoint kinase 1
CldU	5-chloro-2 -deoxyuridine、
CLK	Cdc2-Like Kinases
CMML	Chronic Myelomonocytic Leukemia (慢性骨髄単球性白血病)
CNV	Copy Number Variation
CREBBP	CREB (cAMP response element binding protein)-binding protein
DAPI	4,6 -diamidino-2-phenylindole
DLBCL	Diffuse Large B-Cell Lymphoma (びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫)
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DNA	Deoxyribonucleic Acid
Dox	Doxycycline
DSB	Double-Strand Break
DYRK	Dual-specificity tyrosine-(Y)-phosphorylation-regulated kinase
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor

EML4	Echinoderm Microtubule associated protein Like-4
FACS	Fluorescence-Activated Cell Sorting
FANCD2	Fanconi anemia group D2
GI ₅₀	Growth Inhibition 50%
HRAS	Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog
IC ₅₀	Half Maximal Inhibitory Concentration、
IdU	(+)-5-Iodo-2 -deoxyuridine
K _d	Dissociation Constant
KRAS	Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
MCM	Minichromosome maintenance
MDS	Myelodysplastic Syndromes (骨髓異形成症候群)
MDS without RS	MDS without Ring Sideroblasts
MEE	Mutually Exclusive Exon
MISO	Mixture of Isoforms
MMTV	Mouse Mammary Tumor Virus
MPN	Myeloproliferative Neoplasms (骨髓増殖性腫瘍)
NOP16	Nucleolar protein 16
NRAS	neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene
ORC1	Origin recognition complex subunit 1
PARP	Poly (ADP-ribose) polymerase
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PD	Pharmacodynamics
PDX	Patient Derived Xenograft
PK	Pharmacokinetics
PSI	Percentage Spliced In
PTEN	Phosphatase and Tensin Homolog Deleted from Chromosome 10
RARS	Refractory Anaemia with Ring Sideroblasts (環状鉄芽球を伴う不応性貧血)
RB1	Retinoblastoma 1
RCMD-RS	Refractory Cytopenia with Multilineage Dysplasia with ≥15% Ring Sideroblasts (多系統の異形性を伴う鉄芽球性貧血)
RFP	Red fluorescent protein
RI	Retained Intron
RNA, mRNA	Ribonucleic acid, messenger RNA
RNAi	RNA interference
RNA-Seq	RNA sequencing
ROBO2	Roundabout guidance receptor 2

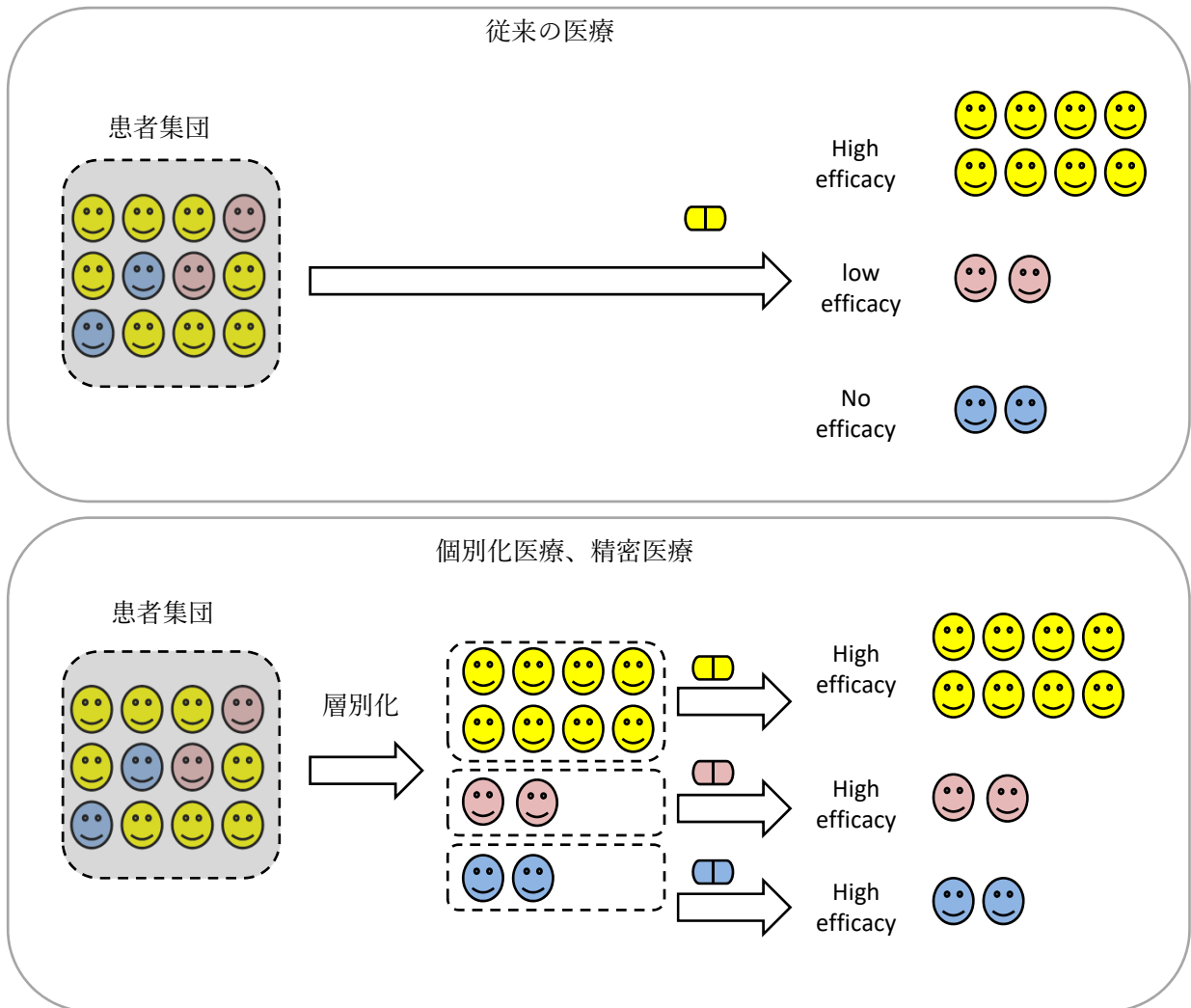
RPS6KB1(S6K)	Ribosomal protein S6 kinase beta-1
RS	Replication stress
RT-PCR	Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction
SD	Standard Deviation
SE	Skipped Exon
SEM	Standard Error of the Mean
SF3B1	Splicing Factor 3b Subunit 1
shRNA	small hairpin RNA
siRNA	small interfering RNA
SR	serine-arginine-rich
SRSF	Serine Arginine Rich Splicing Factor
SSB	Single-Strand Break
%T/C	Percentage of Treatment per Control
%TGI	Percentage of Tumor Growth Inhibition
TP53	tumor protein p53
WB	Western Blotting

第1章 緒言

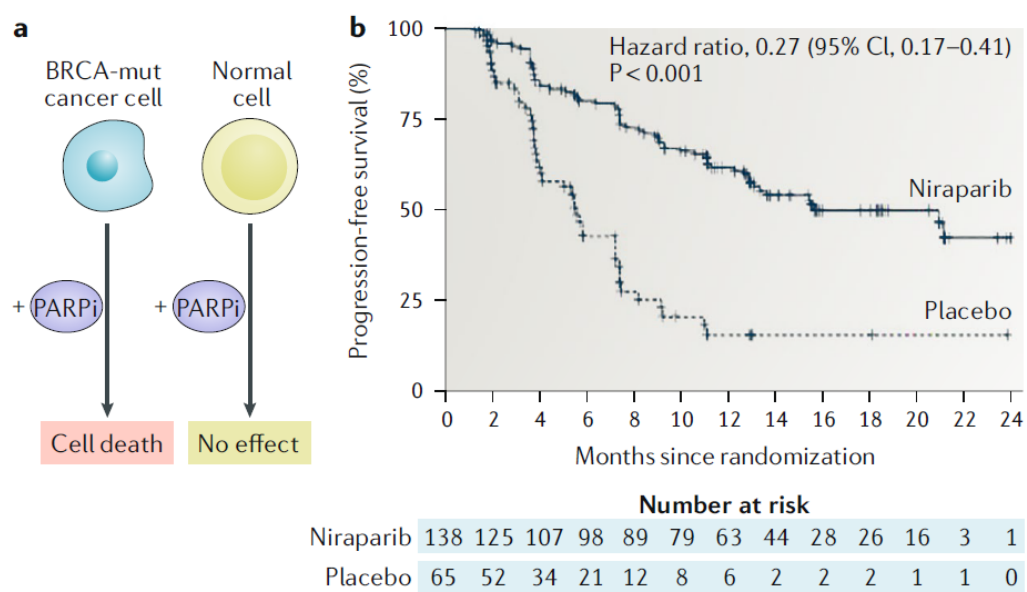
近年、個々の患者に最も適した医療を施す個別化医療（personalized medicine）や精密医療（precision medicine）の実現に高い期待が寄せられている。これはすべての患者に同じ標準治療を施すのではなく、個々の患者の遺伝子情報などを基に最良の治療法を選択し治療する医療である（図表 1-1）^{1,2}。この考え方はがん治療の領域では早期から取り入れられており、すでにいくつかのがんでは標準療法となっている。まず診断薬を用いて患者を層別化し、効果が期待される患者を絞って薬剤を処方しすることで、その薬剤は非常に高い奏効率を示すことが期待される。特に肺がん治療では、がん化の原因となったがん遺伝子の活性を抑制する薬剤が高い抗腫瘍効果を発揮している。EML4-ALK 融合遺伝子を有するがんに対する ALK 阻害剤、変異型 EGFR を有するがんに対する EGFR 阻害剤などが臨床において顕著な成績をあげている^{3,4}。

一方で、がんの原因が明らかになっても有効な治療薬が存在しないがんは多く存在する。活性を阻害する薬剤の創出が困難ながん遺伝子で誘導されたがんや、がん抑制遺伝子の機能欠損によって誘導されたがんである⁵。このようながんに対しては、細胞ががん化する際に生み出された脆弱性を標的とする薬剤の研究開発が活発に行われている⁶⁻⁸。この戦略で成功した抗がん剤として DNA 修復酵素の 1 つである PARP を阻害する薬剤があげられる^{9,10}。近年、家族性の乳がんや卵巣がんの原因遺伝子として同定された BRCA1/2 が機能不全のがんに対して、PARP 阻害剤は臨床で顕著な効果を発揮している（図表 1-2）。これは相同組換 DNA 修復機構の重要な分子である BRCA1/2 の機能欠損ががん化の要因となると同時に、PARP 阻害によって起こる DNA 損傷を修復することができなくなることを狙った戦略である。

今回、がんの脆弱性を狙った 2 つの薬剤について報告する。第 2 章では異常な pre-mRNA スプライシング機構を有するがんを標的とした薬剤を報告する。近年、ある種の血液がんでは pre-mRNA スプライシング因子に高頻度で変異が入っていることが明らかになっている（図表 1-3）¹¹。この pre-mRNA スプライシング因子の変異は排他的であり、複数の pre-mRNA スプライシング因子に変異を有するがんは非常に稀であることから pre-mRNA スプライシング因子変異間で合成致死が誘導される可能性が考えられている。また異常な pre-mRNA スプライシング機構を有するがん細胞はさらなる pre-mRNA スプライシング変化を誘導する薬剤に対して脆弱性を示すことが示唆されている¹²。続いて第 3 章では DNA 複製ストレスを標的とした薬剤の研究について報告する。DNA 複製ストレスはがんの特徴の 1 つと考えられている（図表 1-4）。これはがん細胞が多くの DNA 変異や染色体異常を有していることから正常細胞よりも大きなストレスが DNA 複製にかかっているためと考えられている¹³。また DNA 損傷修復に関連する分子の機能不全や、RAS や MYC などのがん遺伝子の活性化も DNA 複製ストレスの増大に繋がっていると考えられており、DNA 複製ストレスを誘導する薬剤はこれらのがんにより大きな効果を発揮することが期待されている。



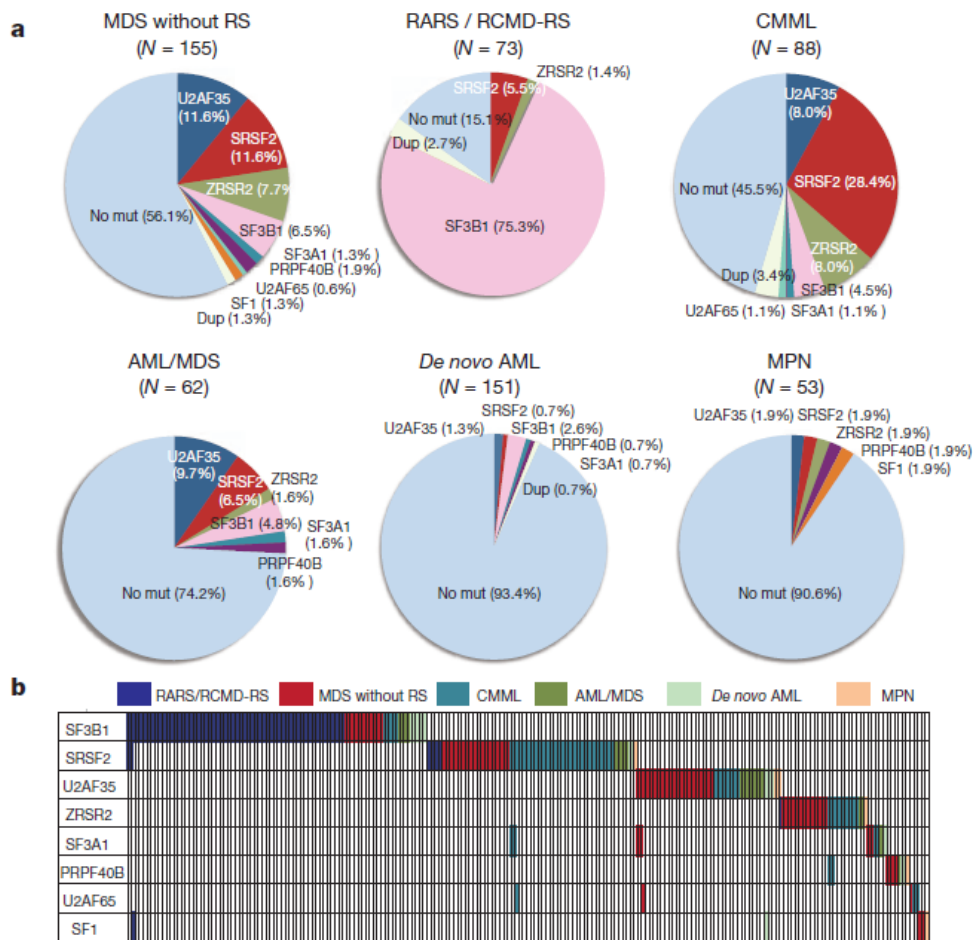
図表1-1 個別化医療 (personalized medicine) および精密医療 (precision medicine) の概念
 (上) 従来 of 患者集団に対して標準治療を施す医療。(下) 患者を層別化し、個々にもっとも適した薬剤を施す医療。



図表1-2 合成致死の概念とPARP阻害剤の臨床成績

(a) BRCA変異とPARP阻害剤による合成致死。(b) PARP阻害剤であるNiraparibの生殖細胞BRCA変異を有する卵巣がん患者での臨床第三臨床試験の成績 (N. Engl. J. Med., Mirza et al., Niraparib maintenance therapy in platinum-sensitive, recurrent ovarian cancer, 375, 2154–2164. より引用)。

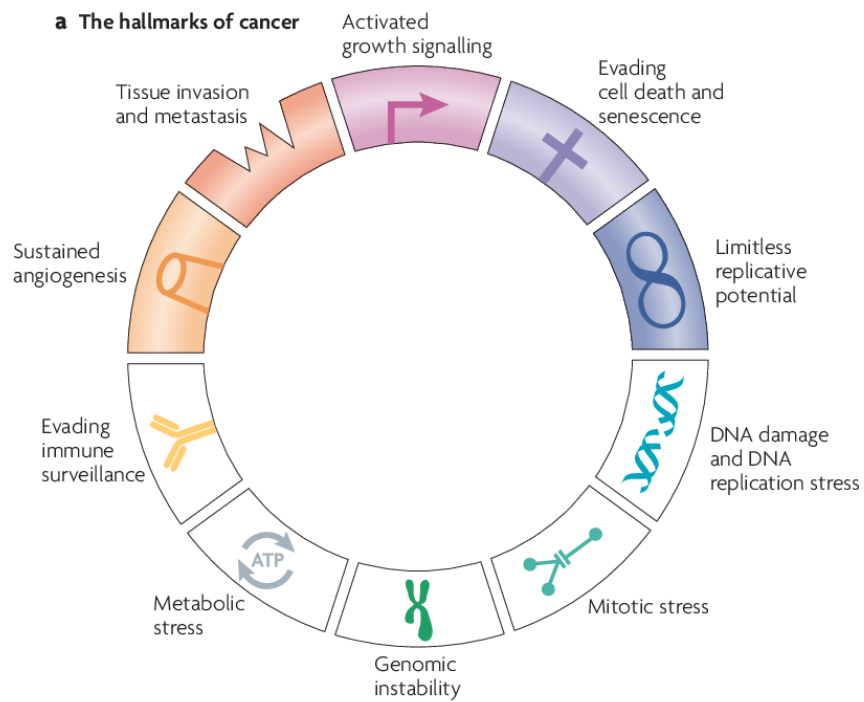
Reprinted by permission from Springer Nature, Nature Reviews Drug Discovery, Synthetic lethality as an engine for cancer drug target discovery, 2019.



図表1-3 がんにおけるpre-mRNAスプライシング因子の変異

(a) Pre-mRNAスプライシング因子変異を有する患者の割合をがん種ごとに示した。(b) それぞれの変異の分布を示した。

Reprinted by permission from Springer Nature, Nature. Frequent pathway mutations of splicing machinery in myelodysplasia, Yoshida K. et al., 2011.



図表1-4 がんの特徴とDNA複製ストレス

(a) DNA複製ストレスはがんの特徴のひとつと考えられている。

Reprinted by permission from Springer Nature, *Nat Rev Mol Cell Biol.*, Genomic instability — an evolving hallmark of cancer, Negrini S et al., 2010.

第2章 新規 CLK 阻害剤による pre-mRNA スプライシング機構および MYC 脆弱性を標的とした抗腫瘍作用 (Anti-tumor efficacy of a novel CLK inhibitor via targeting RNA splicing and MYC-dependent vulnerability)

2.1 背景

Pre-mRNA スプライシングは、発生や分化など様々な生物学的プロセスにおいて重要な役割を果たすことが知られている。また同時に pre-mRNA スプライシング機構の異常は多くの疾患との関連も示唆されている¹⁴⁻¹⁶。近年、骨髄異形成症候群(MDS)、慢性骨髄単球性白血病(CMML)、急性骨髄性白血病(AML)といった血液がんにおいて非常に高頻度に *SF3B1* や *SRSF2* などのスプライシング関連因子に変異が認められことが明らかになった¹⁷⁻¹⁹。これらスプライシング関連因子の変異は、血液がんだけでなく、肺がん、乳がん、すい臓がんなど様々な固形がんにおいても認められている¹²。この臨床における高頻度の変異発見と並行して、これら変異のがん化における役割に関する研究、さらには pre-mRNA スプライシング機構をターゲットとした抗がん剤の研究に対して高い注目が集まっている^{11,12,20-22}。

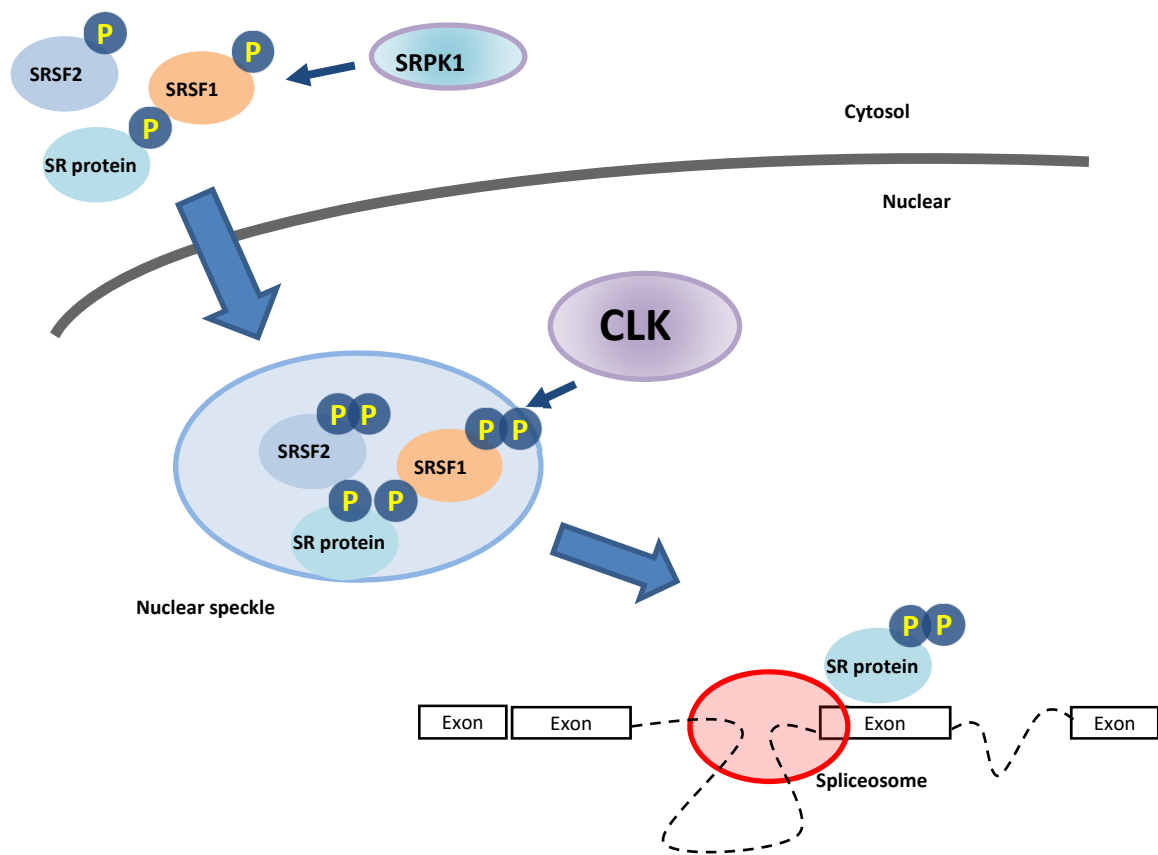
Cdc2-like kinase (CLK) は pre-mRNA スプライシングに重要な役割を果たすキナーゼである。CLK ファミリーには CLK1 から CLK4 まで 4 つのキナーゼが報告されており、CLK は RNA 結合タンパク質である SR タンパクをリン酸化することで pre-mRNA スプライシング機構を制御している。CLK によってリン酸化された SR タンパクは、Spliceosome に移行し、pre-mRNA に結合することで、pre-mRNA 機構におけるエクソン認識を促進する (図表 2)²³⁻²⁶。RNAi による CLK のノックダウンおよび低分子化合物による CLK の阻害はエクソンスキッピングを中心とした選択的スプライシング変化を誘導すること、またその結果として細胞の増殖を抑制させることが報告されている²⁷⁻³⁰。

最近、がん遺伝子である MYC が pre-mRNA スプライシングを制御していること、また Spliceosome 阻害剤は MYC が活性化したがんに対して有望な治療戦略となりえることが発表された^{31,32}。転写因子である MYC はもっとも有名ながん遺伝子の 1 つであり、種々のがんにおいて変異や遺伝子増幅、遺伝子融合によって活性化していることが知られている^{33,34}。これまで MYC が活性化したがんをターゲットとした研究は多数報告されているが、いまだに治療法が確立していない非常に重要なターゲットの 1 つである³⁵⁻³⁹。

2.2 結果

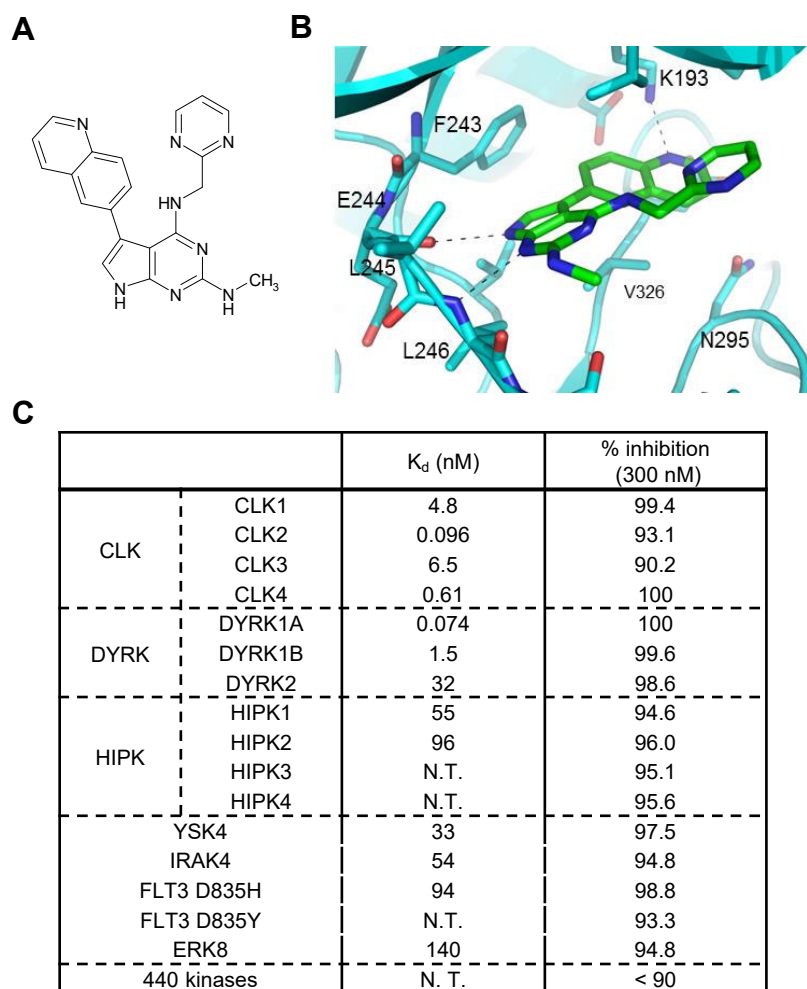
2.2.1 CLK 阻害剤 T-025 の創出およびキナーゼ阻害プロファイル

T-025 (*N*²-methyl-*N*⁴-[pyrimidin-2-ylmethyl]-5-[quinolin-6-yl]-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidine-2,4-diamine) は武田薬品において創出された新規の CLK 阻害剤である。CLK2 阻害活性の測定および CLK2 との結晶構造解析を用いた最適化研究の結果、強力な CLK2 阻害活性かつ経口投与可能な低分子阻害剤として見出された (図表 2-1A)。共結晶構造解析の結果から、T-025 は CLK2 の ATP 結合部位に挿入され、CLK2 のヒンジ部位である Glu244 および Leu246 に作用すること



図表2 CLKの分子機能

CLKはNuclear speckleに局在するSRタンパクをリン酸化することで、SRタンパクのSpliceosomeへの移行を誘導する。



図表2-1 新規CLK阻害剤T-025

(A) T-025の化学構造。(B) T-025とCLK2のX線構造。(C) T-025のCLKおよびDYRKファミリーキナーゼおよびほかの様々なキナーゼに対する K_d 値。N.T.は、not testedを表す。468キナーゼに対するT-025の300 nMの阻害率を測定した (n = 2)。

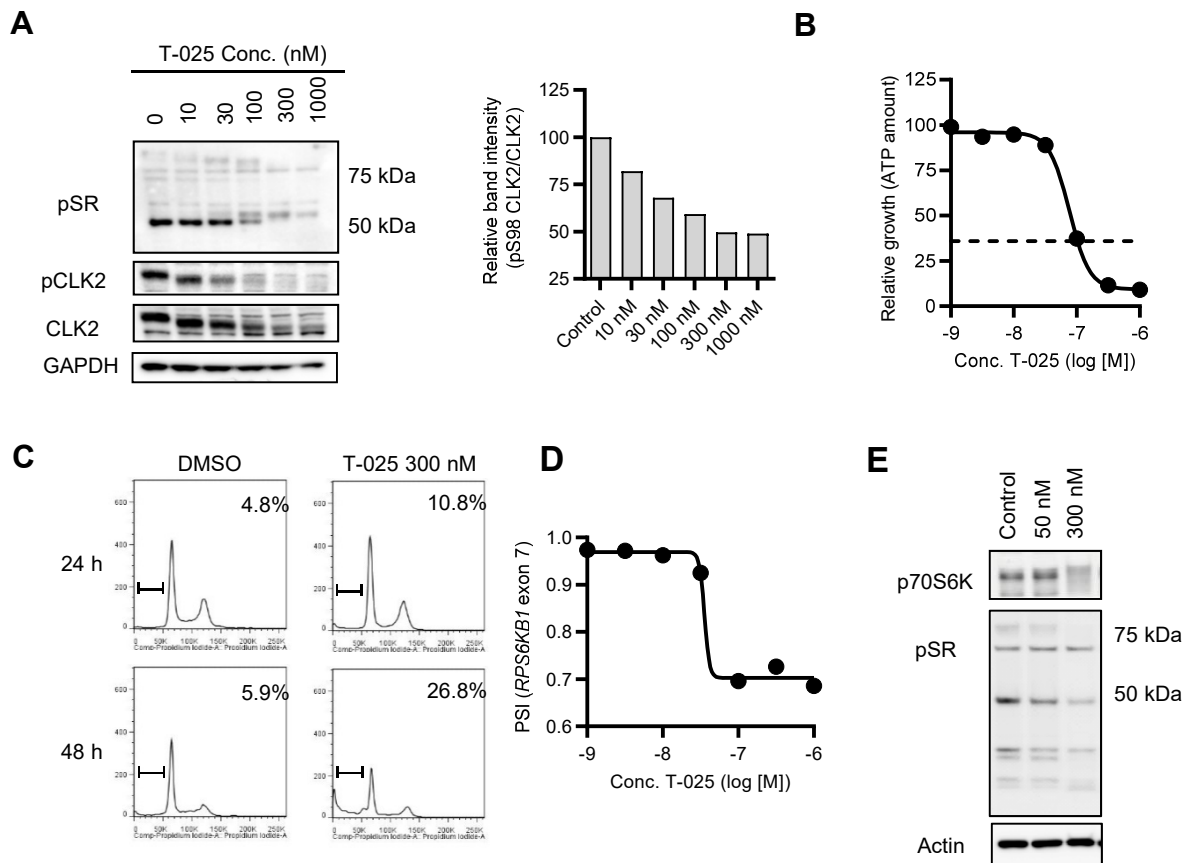
で CLK2 活性を阻害することが示唆されている (図表 2-1B)。Kinome-Scan を用いたキナーゼプロファイリングによって T-025 を評価したところ、T-025 は CLK ファミリーおよび DYRK1 ファミリーに対する強力な活性を示した (CLK1、CLK2、CLK3、CLK4、DYRK1 および DYRK1B に対する K_d 値はそれぞれ 4.8 nM、0.096 nM、6.5 nM、0.61 nM、0.074 nM および 1.5 nM) (図表 2-1C)。一方で、それ以外のキナーゼに対しては K_d 値が 30 nM 異常であり、T-025 は CLK/DYRK1 選択的なキナーゼ阻害剤であることが明らかになった。

2.2.2 In vitro 培養化の MDA-MB-468 細胞株に対する T-025 の増殖阻害効果

荒木らは、CLK 阻害剤が MDA-MB-468 乳がん細胞株に対して細胞死を伴う増殖効果作用を示すことを報告している⁴⁰。また同時に CLK 阻害剤が SR タンパクのリン酸化 (1H4 マウスモノクローナル抗体で検出) を低下させること、選択的スプライシング変化を誘導することも明らかにしている。荒木らの報告の結果と同様に、T-025 を MDA-MB-468 細胞に処理すると、SR タンパクのリン酸化低下、増殖抑制、またアポトーシス誘導 (FACS 解析での Sub-G1 期増加) が検出された (図表 2-2A-C)。さらに細胞内における CLK 阻害をより確実に検出するために CLK2 の Ser98 のリン酸化を認識する新規リン酸化 CLK2 抗体を作成した (pCLK2 抗体)。CLK2 の Ser98 は自己リン酸化サイトであることが報告されているとともに⁴¹、新たに実施した *in vitro* キナーゼアッセイでも確認された。pCLK2 抗体および CLK2 抗体を用いて、WB を行った結果、pCLK2 および CLK2 両方が T-025 処理によって減少することが明らかになった。バンドの強度を定量した結果、濃度依存的に CLK2 のリン酸化が減少することが確認された (図表 2-2A)。CLK2 のキナーゼ活性が CLK2 タンパクの安定化に寄与しているを考慮すると⁴¹、これらの結果は T-025 が MDA-MB-468 細胞内で CLK2 の活性を抑制したことによって CLK2 の分解が誘導されていると考えらる。

2.2.3 In vitro 培養化の MDA-MB-468 細胞株における T-025 によって誘導される選択的スプライシングの変化

次に CLK 阻害によって誘導される選択的スプライシングの変化について検討した。CLK 阻害によって変化が誘導されることが知られている選択的スプライシングとして *RPS6KB1* のエクソン 7 のスキッピングがある⁴⁰。T-025 を 6 時間処理した MDA-MB-468 細胞の *RPS6KB1* mRNA を RT-PCR で解析すると *RPS6KB1* のエクソン 7 のスキッピングが誘導されていた。またそれに引き続いて S6K タンパクの減少が認められた (図表 2-3A および B)。続いて T-025 によって引き起こされる選択的スプライシング変化を網羅的に解析した。増殖抑制 IC_{50} 値近辺である 30、100、300 nM の T-025 を処理した MDA-MB-468 細胞から RNA を回収し、全トランスクリプトーム RNA シークエンス (RNA-Seq) および MISO 解析ソフト⁴² を用いたバイオインフォマティクス解析によって解析した。その結果、選択的スプライシングイベント、特にエクソンスキッピングタイプの選択的スプライシングイベントが濃度依存的に大きく変化することが明らかになった (図表 2-3C)。さらに詳細に検討した結果、*BCLAF1* のエクソン 11 のエクソンスキッピ



図表2-2 T-025のin vitro MDA-MB-468細胞における効果

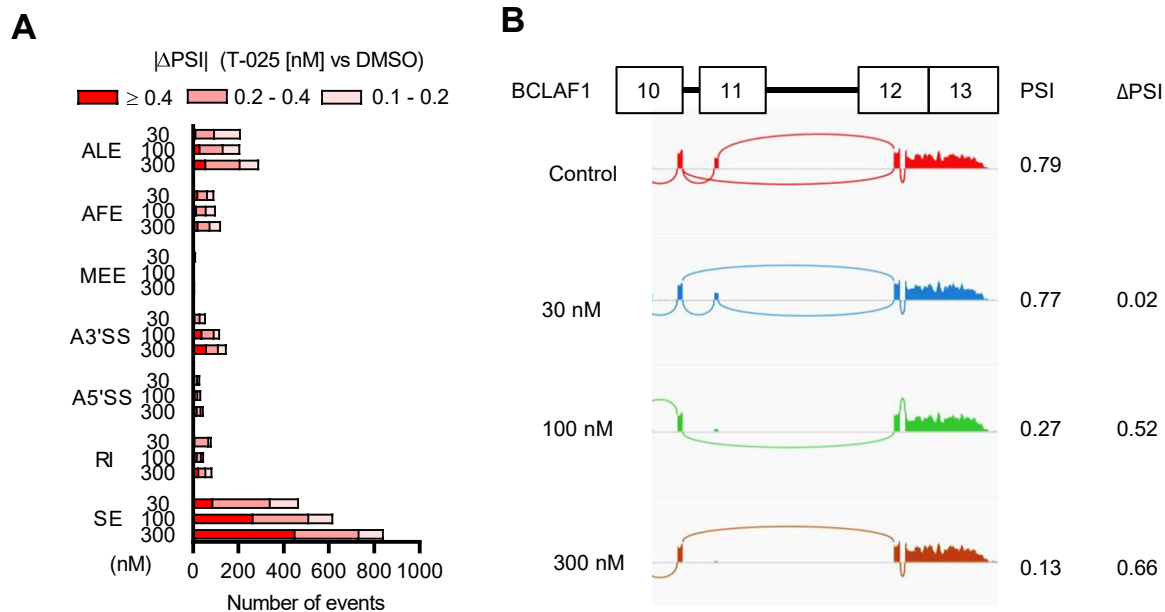
(A) T-025のCLKの基質に及ぼす影響。T-025を6時間処理したMDA-MB-468細胞から回収した細胞ライセートを用いてWBを実施した。バンド強度を定量し算出したpCLK2/CLK2の比率も示す。

(B) T-025をMDA-MB-468に72時間処理した増殖阻害曲線。細胞増殖をATP量を指標に評価した。点線はT-025処理前のATP量を表す。データは、平均±SDで表す (n=3)。

(C) T-025の細胞周期に及ぼす影響および細胞死誘導。MDA-MB-468に300 nM T-025をそれぞれの時間処理後、細胞周期解析を行った。Sub-G1細胞の割合を記載した (n=1)。

(D) T-025のRPS6KB1エクソン7スキッピングに及ぼす影響。T-025を6時間処理したMDA-MB-468細胞から回収したRNAを用いてRT-PCRを実施し、PSIを算出した (n=1)。

(E) T-025がS6Kタンパクに及ぼす影響。T-025を48時間処理したMDA-MB-468細胞から回収した細胞ライセートを用いてWBを実施した。



図表2-3 網羅的選択的スプライシング解析

(A) T-025によって変化される選択的スプライシングイベントの数およびその種類。T-025を6時間処理したMDA-MB-468細胞から抽出したRNAを用いてRNA-Seqを実施した。MISOを用いて選択的スプライシングを解析した。選択的スプライシングイベントの中で、BFが20より大きく、 $|\Delta\text{PSI}|$ が0.1より大きいイベントの数を選択的スプライシングの種類によって記載した (SE: skipped exon、RI: retained intron、A5'SS: alternative 5'-splice-site、A3'SS: alternative 3'-splice-site、MEE: mutually exclusive exon、AFE: alternative first exon、ALE: alternative last exon)。 (B) T-025によって誘導されるBCLAF1選択的スプライシング変化。

ングが最も感受性が高い（変化の程度が大きい）選択的スプライシングの 1 つとして同定された（図表 2-3D）。これら *in vitro* 培養化の MDA-MB-468 細胞を用いた結果より、T-025 は他の CLK 阻害剤や RNAi によるロックダウンで報告のある現象と類似した作用を伴う増殖阻害作用を示すことが明らかになった。

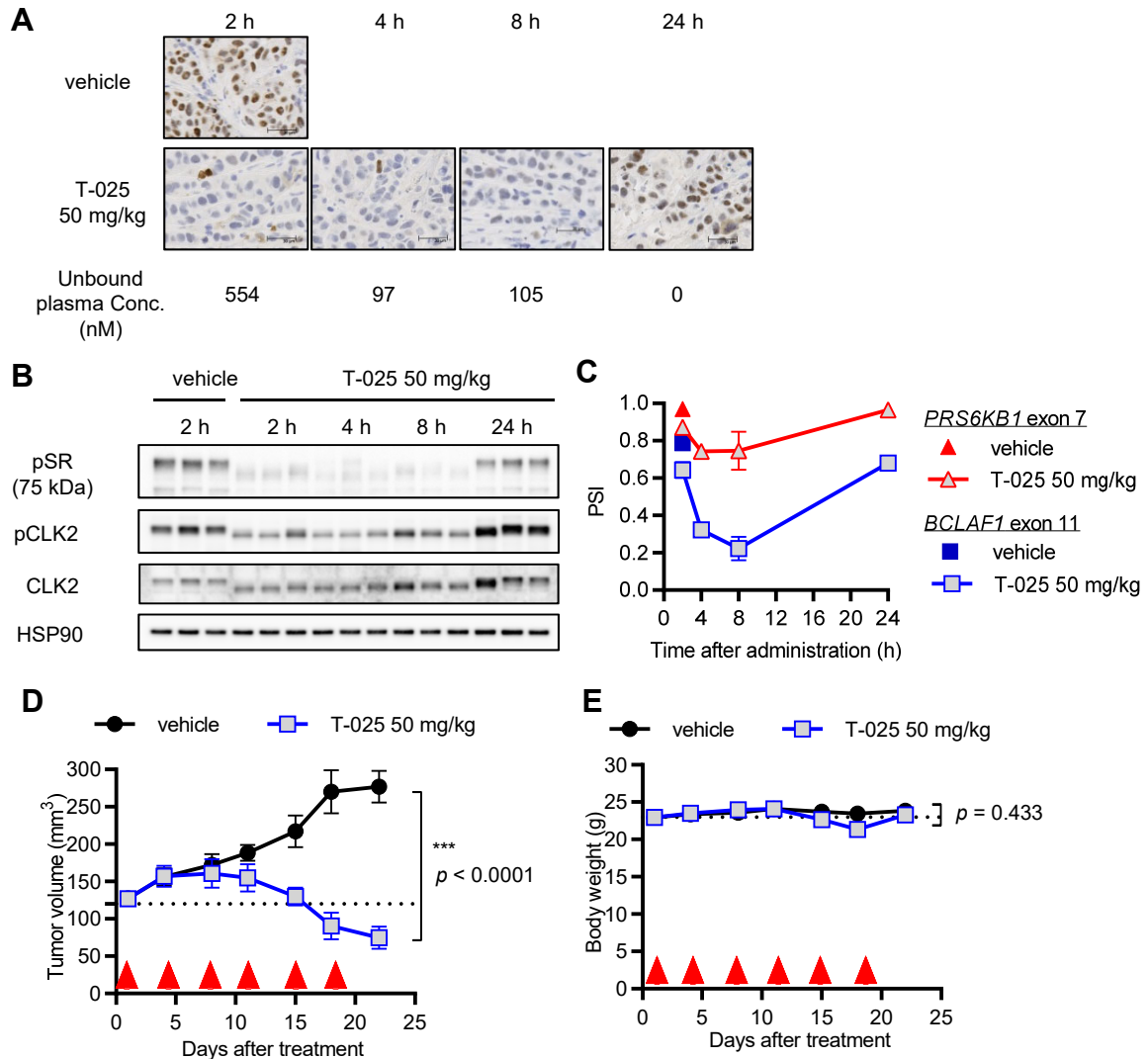
2.2.4 MDA-MB-468 ゼノグラフト腫瘍に対する T-025 の抗腫瘍効果

次に T-025 を動物モデルで評価した。50 mg/kg の T-025 をヌードマウスに経口投与し PK を評価したところ、投与後 2、4、8 時間後の T-025 のフリー血漿中濃度はそれぞれ 554 nM、97 nM、104 nM であり（図表 2-4A）、これらの濃度は T-025 が CLK 依存的なリン酸化の抑制およびエクソスキッピングを誘導するのに十分な濃度であった。そこで 50 mg/kg の用量で MDA-MB-468 ゼノグラフト腫瘍を用いた PD 試験を実施した。その結果、投与 2 から 8 時間後にかけて pCLK2 シグナルの低下が免疫染色および WB で認められ、また *RPS6KB1* エクソン 7 および *BCLAF1* エクソン 11 のスキッピングの誘導（PSI の低下）が認められた（図表 2-4A–C）。

MDA-MB-468 ゼノグラフト腫瘍に対する T-025 の抗腫瘍試験を、1 日 2 回投与を週 2 回行うレジメンで実施した。投与によって顕著な抗腫瘍効果が確認され、3 週間の投与終了後には、投与開始前と比較して腫瘍の退縮が認められた（図表 2-4D）。更に投与による体重減少は、最もひどい時点でも 10%未満であり、この投与は忍容であった（図表 2-4E）。これら MDA-MB-468 ゼノグラフト腫瘍を用いた試験の結果より、T-025 は下流マーカーの変化を誘導し、忍容性のある用量で抗腫瘍効果を示すことが明らかになった。

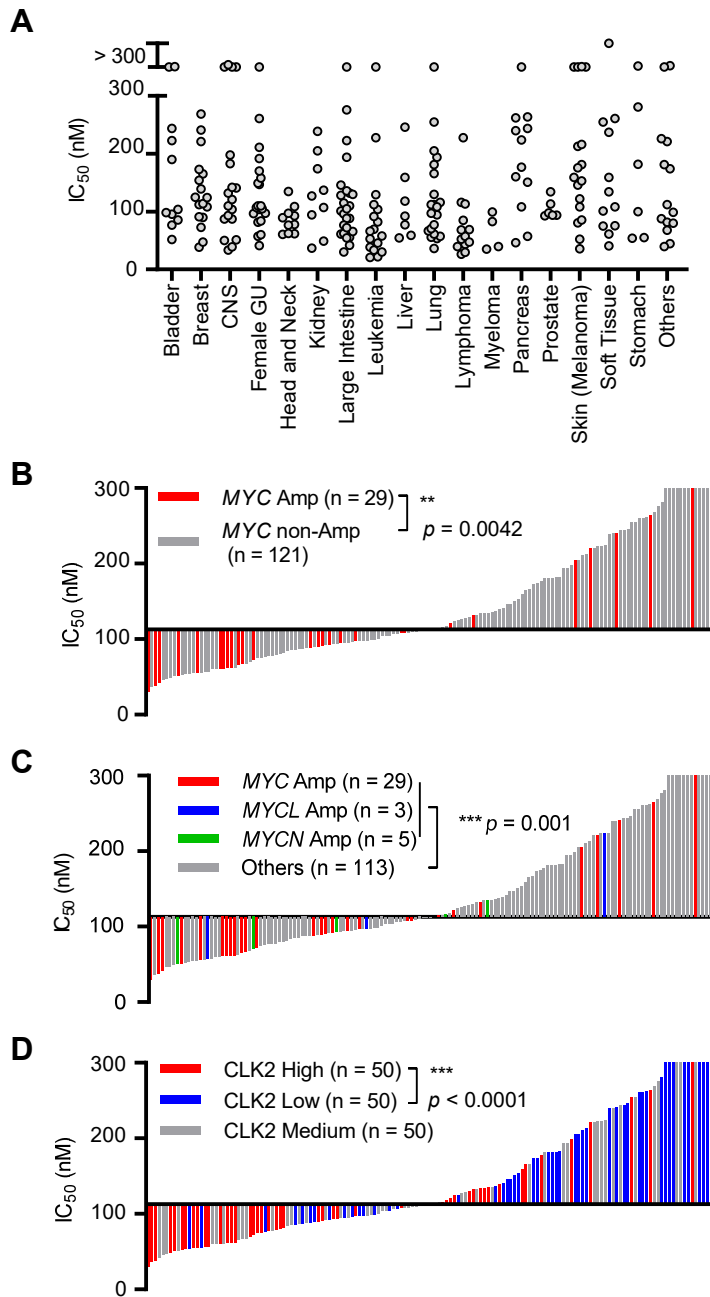
2.2.5 240 種のがん細胞を用いた増殖阻害活性プロファイリング

T-025 の抗がん剤としての特徴を明らかにするために、240 種のがん細胞株を用いた増殖阻害パネル試験（OncoPanel 240）およびそれに引き続くバイオインフォマティクス解析を実施した。結果として、T-025 は血液がん・固形がん細胞株両方の広範ながん細胞に対して IC₅₀ 値 30 から 300 nM の濃度で増殖抑制効果を発揮すること、および感受性は細胞株の由来臓器や由来疾患に依存しないことが明らかになった（図表 2-5A）。無作為のバイオインフォマティクス解析の結果、感受性と相関するいくつかのバイオマーカー候補がリストアップされた。上位 25%の高感受性株と下位 25%の低感受性株を比較した mRNA 発現量の解析では、高感受性細胞株群で統計的優位に高発現、または低発現している mRNA がリストアップされた。その中で CLK2 が高感受性株群で優位に高発現していることが明らかになった（図表 2-6A）。CLK2 の *p* 値は 1.58×10^{-9} であり、他の CLK ファミリーキナーゼや DYRK1 ファミリーキナーゼと比較して明らかに低値であった。T-025 のターゲットが CLK2 であること、CLK2 が乳がんにおいてがん遺伝子としての機能を持つという報告を考えると⁴³、CLK2 高発現のがん細胞は自身の生存を CLK2 キナーゼ活性に依存しているという仮説が考えられた。もう 1 つの無作為解析である遺伝子変異および遺伝子コピー数を用いた解析では、14 のバイオマーカー候補遺伝子に統計的に相関が認められ、その中には *MYC* 増幅および変異も含まれていた（図表 2-6B）。Spliceosome 阻害は *MYC* 活性



図表2-4 T-025によるMDA-MB-468ゼノグラフトモデルでの抗腫瘍効果

(A) (B) (C) T-025経口投与によって誘導されるリン酸化低下および選択的スプライシング変化。MDA-MB-468ゼノグラフト腫瘍担がんマウスにT-025を50 mg/kgの用量で経口投与後、回収した腫瘍から抽出したサンプルをWB、免疫染色、RT-PCRで解析した。データは、平均±SDで表す (n=3)。また血漿中のフリー体T-025の濃度も示す。(D) (E) MDA-MB-468ゼノグラフト腫瘍におけるT-025の抗腫瘍効果。T-025は50 mg/kgの用量で1日2回、週2回 (赤矢印) 経口投与した。データは、平均±SEMで表す (n=5)。統計解析は、unpaired Student's t-testを実施した。



図表2-5 T-025による増殖阻害効果

(A) T-025の240細胞株に対する増殖阻害 IC_{50} 値。灰色の円が個々の細胞を示す。細胞を由来組織および疾患によって分類した。(B) (C) 固形がん細胞株(150細胞株)におけるMYCファミリーの増幅とT-025感受性の関係。それぞれの縦棒がそれぞれの細胞株を表す。色付けされた縦棒は図表中に記載のMYCファミリーの遺伝子増幅(Amp)の有無を示す。(D) 固形がん細胞株(150細胞株)におけるCLK2の発現量とT-025感受性の関係。それぞれの縦棒がそれぞれの細胞株を表す。色付けされた縦棒は図表中に記載のCLK2の発現レベルを示す。統計解析は、Mann-Whitney testを実施した。

A

P-Value Rank	Gene	Probe	Fold Change	P-Value	Q-Value	Sensitive Mean	Sensitive StdDev	Resistant Mean	Resistant StdDev
1	WDR18	209461_x_at	-1.78	5.86E-13	2.51E-08	1149.9	387.3	646.7	262.9
2	RBMX_SNORD6								
3	1	213762_x_at	-1.42	5.95E-13	1.28E-08	8631.4	1888.6	6083.9	1435.0
4	CD63	200663_at	1.61	6.22E-13	8.89E-09	7476.3	2994.3	12065.6	3062.3
5	CAD	202715_at	-1.78	7.39E-13	7.92E-09	2144.3	767.7	1202.0	432.1
6	SFXN4	229236_s_at	-1.88	1.22E-12	1.04E-08	742.8	239.6	395.3	226.0
7	SFXN4	225143_at	-1.86	2.67E-12	1.91E-08	1485.1	483.1	799.6	453.3
8	PDCD11	212422_at	-1.69	3.53E-12	2.16E-08	1092.7	373.0	647.7	218.2
9	GTPBP3	213835_x_at	-1.33	1.11E-11	5.94E-08	1391.3	284.4	1049.4	190.0
10	ANXA5	200782_at	1.97	2.35E-11	1.12E-07	4240.1	2296.0	8333.1	3505.5
	APEX1	210027_s_at	-1.39	2.83E-11	1.21E-07	9272.5	2106.1	6649.9	1674.7
70	CLK2	203229_s_at	-1.47	1.58E-09	9.66E-07	2207.8	670.0	1501.2	461.9
	CLK1	214683_s_at	-1.21	3.69.E-02	1.35.E-01	561.8	275.9	466.2	203.5
	CLK3	238072_at	1.06	1.09.E-01	2.79.E-01	154.1	31.5	162.7	24.6
	CLK4	228751_at	1.11	2.34.E-01	4.47.E-01	117.8	43.4	130.2	66.2
	CLK4	241403_at	-1.06	2.54.E-01	4.69.E-01	63.2	19.0	59.4	16.3
	CLK3	202140_s_at	-1.05	3.38.E-01	5.53.E-01	1014.9	318.5	968.9	171.0
	CLK4	1568836_at	-1.03	6.00.E-01	7.65.E-01	40.5	10.8	39.4	11.3
	CLK4	210346_s_at	1.01	8.84.E-01	9.40.E-01	439.9	156.6	444.6	186.2
	DYRK1A	209033_s_at	-1.20	9.53.E-03	5.17.E-02	1970.1	747.7	1644.7	560.2
	DYRK1A	211079_s_at	-1.06	8.83.E-02	2.43.E-01	109.3	20.2	103.0	19.2
	DYRK1B	217270_s_at	-1.03	4.19.E-01	6.26.E-01	179.0	31.2	174.2	32.8
	DYRK1A	239308_at	1.02	4.78.E-01	6.74.E-01	137.5	19.1	140.4	24.2
	DYRK1A	211541_s_at	1.01	5.38.E-01	7.21.E-01	313.7	42.6	318.2	35.3
	DYRK1B	204954_s_at	1.01	8.57.E-01	9.27.E-01	214.6	38.6	216.2	56.6

B

Gene	Change	p-value		Q-value	Effect
		Student's t-test	Fisher's exact test		
ZFP106	Mut	1.11E-03	2.83E-03	5.93E-02	Sensitive
FBN3	Mut	1.11E-03	3.13E-03	5.92E-02	Sensitive
AUTS2	Mut	1.20E-03	8.34E-04	6.15E-02	Sensitive
PCM1	Mut	1.69E-03	8.34E-04	7.39E-02	Sensitive
CREBBP	Mut	4.99E-03	4.63E-03	1.25E-01	Sensitive
UBR4	Mut	5.24E-03	1.20E-03	1.29E-01	Sensitive
CHD7	Mut	5.61E-03	9.63E-03	1.36E-01	Sensitive
ROBO2	Mut	6.60E-03	7.69E-03	1.49E-01	Sensitive
MYC	Mut or Amp	6.66E-03	8.32E-03	2.67E-01	Sensitive
ARFGEF1	Mut	7.96E-03	9.83E-03	1.65E-01	Sensitive
ODZ2	Mut or Del	8.12E-03	4.86E-03	4.14E-01	Sensitive
LRRN3	Mut or Del	8.17E-03	1.28E-03	2.78E-01	Sensitive
ASXL1	Amp	9.39E-03	1.77E-03	3.42E-01	Resistant

図表2-6 増殖阻害パネル試験の無作為バイオインフォマティクス解析

(A) T-025の感受性と相関する遺伝子発現。高感受性株と低感受性株を比較し、感受性と相関する遺伝子をそれぞれのp値の順で示した。CLKおよびDYRK1ファミリーについても示した。(B) T-025の感受性と相関する遺伝子特徴。Student's t-testおよびFisher's exact test両方で統計的に優位であった遺伝子特徴について示した。

化によって誘導されたがんにより有効であるという報告が同時期に発表されたため^{31,32}、*MYC* 増幅および変異を有するがんが T-025 により高感受性であるという結果をさらに検討をすることとした。

2.2.6 *MYC* 遺伝子増幅または *CLK2* 高発現の固形がん細胞株は T-025 に対する感受性が高い

さらなるバイオインフォマティクス解析を、発現量、コピー数、変異情報が CCLE データベース⁴⁴に記載されている 150 種の固形がん細胞株を用いて行った。150 細胞株の *MYC* 遺伝子の変異部位を詳細に検討したところ、すべてはパッセンジャー変異と考えられる変異であり、*MYC* が活性化していると考えられる細胞株は *MYC* 遺伝子増幅がん細胞株のみであった。再解析したところ *MYC* 遺伝子増幅がある固形がんはやはり T-025 に対して感受性が高いことが確認された (図表 2-6B、*p* 値 0.0042)。他の *MYC* ファミリーがん遺伝子である N-*MYC* や L-*MYC* は、*MYC* と同じ機能をいくつかもっていることが知られている⁴⁵。N-*MYC* および L-*MYC* も含めた解析も行った結果、*MYC* ファミリー遺伝子に増幅をもつ固形がん細胞株は、増幅をもたない細胞株に比べて T-025 に対する感受性が高いことが示された (図表 2-6C、*p* 値 0.0010)。感受性が高い上位 20% の 30 細胞株のうち、半数の 15 細胞株は *MYC* ファミリー遺伝子に増幅を有していた。

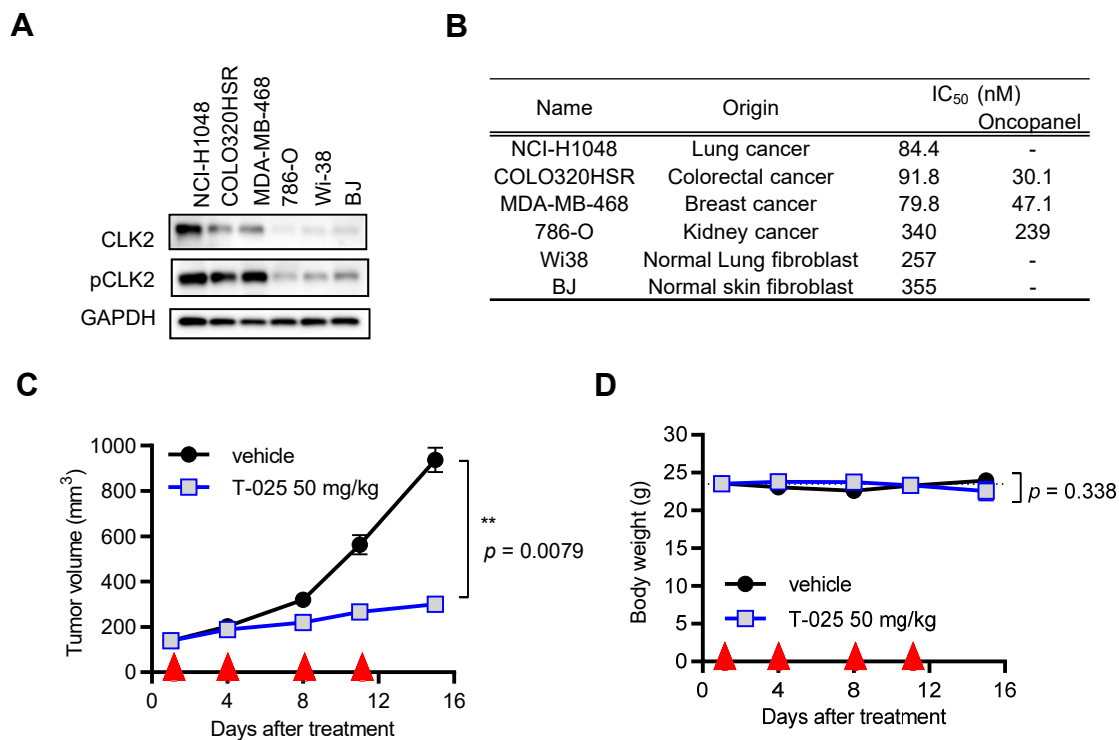
続いて *CLK2* の発現量について解析を行った。細胞株を *CLK2* 高発現量、中発現、低発現の 3 グループ (各 50 細胞株) に分けて解析したところ、*CLK2* 高発現の固形がん細胞株は低発現の固形がん細胞株に比べて統計的優位に感受性が高かった (図表 2-6D、*p* 値 0.0001 以下)。以上の解析より、*MYC* 遺伝子増幅または *CLK2* 高発現の固形がん細胞株は T-025 に対する感受性が高いことが示された。

2.2.6 *CLK2* 高発現細胞株がん細胞株および低発現正常細胞株に対する T-025 の薬効

バイオインフォマティクス解析によって明らかになった仮説をさらに評価するために、まず *CLK2* のタンパク発現量と T-025 の感受性について検討した。これは *CLK2* のタンパク量はユビキチン分解機構によって分解によっても制御されていることが報告されているためである⁴⁶。*CLK2* タンパクが高いがん細胞株 3 株 (NCI-H1048、COLO320HSR、MDA-MB-468) は、T-025 に対して高い感受性を示す一方、タンパク発現が低いがん細胞株 (786-O) および正常細胞株 2 株 (Wi38、BJ) は感受性が低かった (図表 2-7A および B)。*CLK2* タンパク発現量が特に高いことが明らかになった NCI-H1048 肺がん細胞株について、ゼノグラフトモデルを作成し T-025 への感受性を評価した。その結果、T-025 は顕著な抗腫瘍効果を NCI-H1048 ゼノグラフトモデルにも発揮し、この時統計学的に優位な体重減少は認められなかった (図表 2-7C および D)。

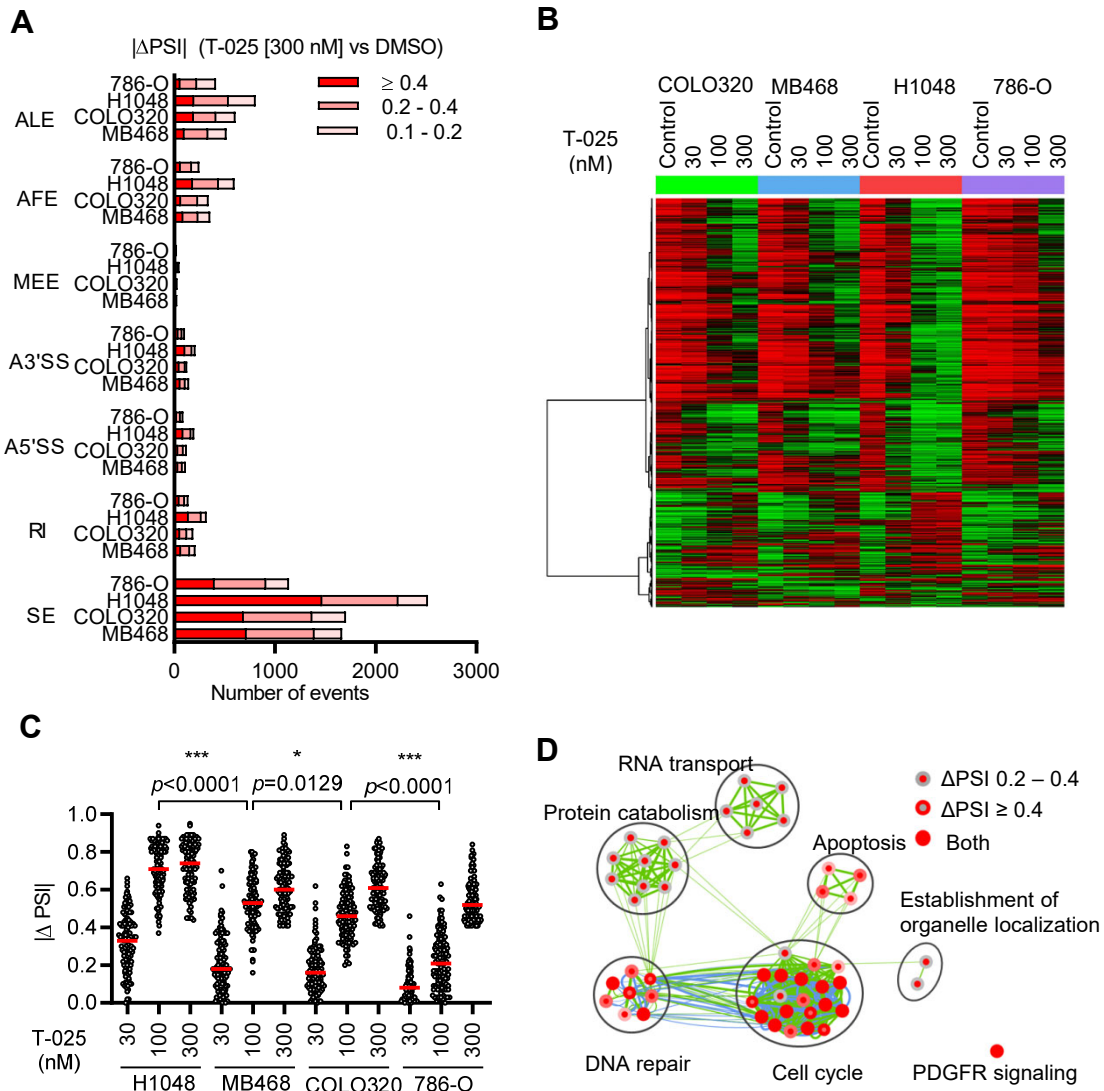
2.2.7 T-025 によって誘導される選択的スプライシング変化は細胞の *CLK2* 発現量に依存する

CLK2 高発現が T-025 に対する感受性にどのように影響を与えているのかを明らかにするために、*CLK2* の発現量および T-025 に対する感受性が異なる 3 種のがん細胞株を用いて T-025 に



図表2-7 T-025によるCLK2高発現細胞株NCI-H1048ゼノグラフトモデルでの抗腫瘍効果

(A) (B) がん細胞株および正常細胞株におけるCLK2タンパク発現量とT-025の感受性。細胞株のCLK2およびpCLK2レベルをWBで検出した。それぞれの細胞株に対するT-025の増殖阻害IC₅₀値を示した。(C) (D) NCI-H1048ゼノグラフト腫瘍におけるT-025の抗腫瘍効果。T-025は50 mg/kgの用量で1日2回、週2回(赤矢印)経口投与した。データは、平均±SEMで表す(n=5)。統計解析は、Mann-Whitney testおよび unpaired Student's t-testを実施した。



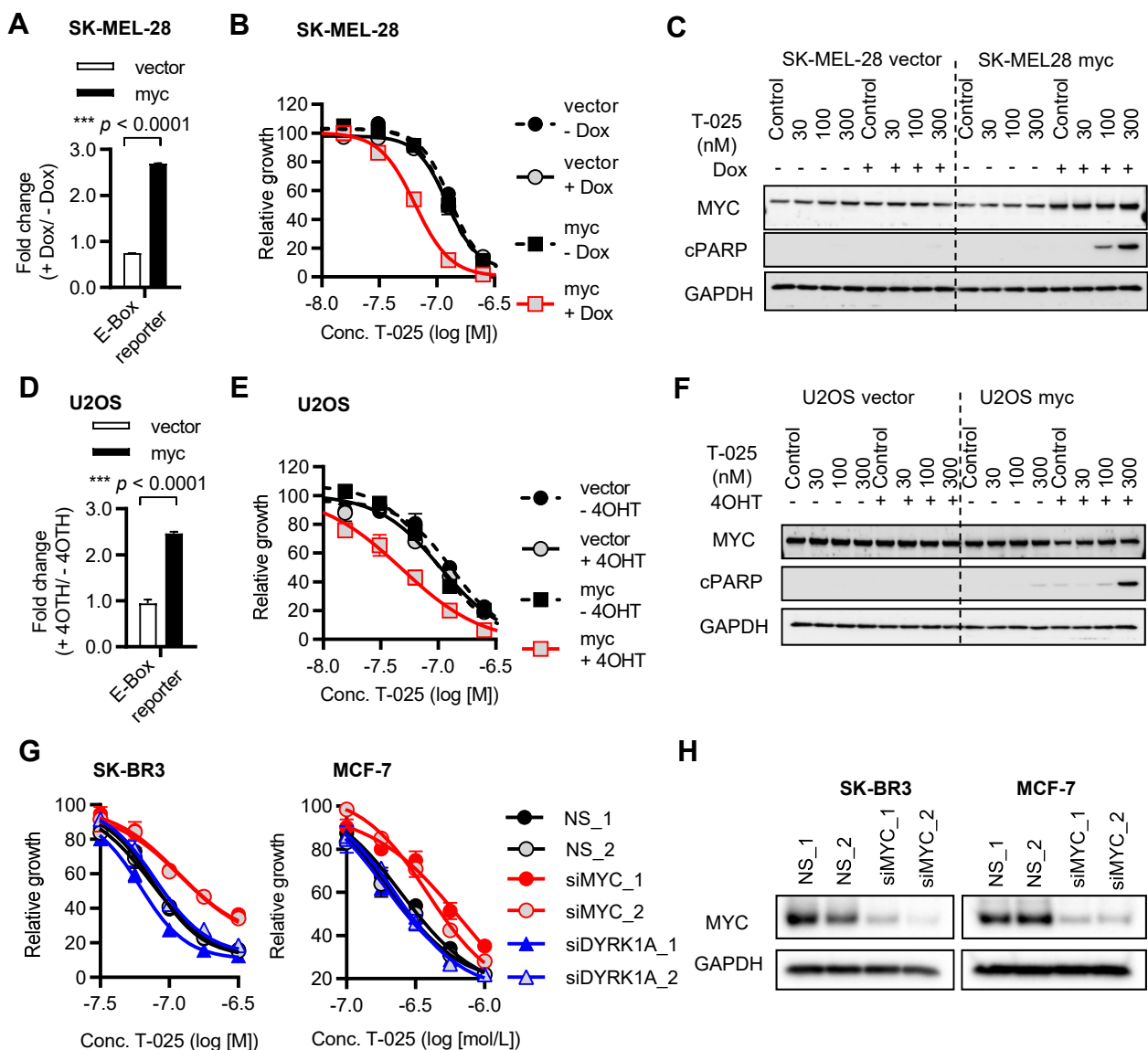
図表2-8 T-025によるCLK2発現量に依存した選択的スプライシング変化の強さ

(A) (B) T-025によって変化される選択的スプライシングイベントの数およびその種類。T-025 300 nMを6時間処理したNCI-H1048 (H1048)、COLO320HSR (COLO320)、786-O細胞から抽出したRNAについてRNA-Seqを行いMISOを用いて選択的スプライシングを解析した。選択的スプライシングイベントの中で、BFが20より大きく、 $|\Delta$ PSI|が0.1より大きいイベントの数を選択的スプライシングの種類によって記載した。MDA-MB-468 (MB-468)は図表2-3のデータ。 $|\Delta$ PSI|が0.4より大きな選択的スプライシングイベントをクラスタリングし作成したヒートマップをBに示した。(C) T-025による選択的スプライシングの変化の程度。すべての4細胞株の300 nM処理において、BFが20より大きく、 $|\Delta$ PSI|が0.4より大きいエクソンスキッピングタイプのイベント (T-025依存スキッピングエクソン、125イベント)の $|\Delta$ PSI|を示した。統計解析は、Steel-Dwass testを実施した。(D) T-025依存エクソンスキッピングイベントのパスウェイ解析。イベントが含まれる遺伝子をCytoScapeを用いてパスウェイ解析した。

よる選択的スプライシング変化を検討した。具体的には、CLK2 高発現で T-025 に対する感受性が高い NCI-H1048 肺がん細胞株（増殖阻害 IC₅₀ 値 84.4 nM）および COLO320HSR 大腸がん細胞株（増殖阻害 IC₅₀ 値 91.8 nM）、CLK2 低発現で T-025 に対する感受性が低い 786-O 脾臓がん細胞株である（増殖阻害 IC₅₀ 値 340 nM）。追加した 3 細胞株および MDA-MB-468 細胞株の RNA-Seq の結果を、MISO によって選択的スプライシング解析を行ったところ、すべての細胞株においてスキッピングエクソンタイプの選択的スプライシングイベントが誘導されていた（図表 2-8A）。さらに T-025 処理によって変化が引き起こされる選択的スプライシングはすべての細胞株で類似しており（図表 2-8B）、個々の細胞株の CLK2 発現量とは無関係に T-025 処理によって変化がある選択的スプライシングイベントが決まっていることを示唆していた。そこで次に選択的スプライシングの変化の程度と CLK2 発現量の関係を検討した。エクソンスキッピングタイプの選択的スプライシングイベントの中で、全細胞株で共通して変化した選択的スプライシングイベントを抽出し、その変化の程度を細胞株間で比較した。その結果、変化は NCI-H1048 細胞株でもっとも大きく、786-O でもっとも小さかったことから、CLK2 の発現量と、T-025 処理によって誘導される選択的スプライシングの変化の程度が相関することが示唆された（図表 2-8C）。T-025 処理によって共通に変化した選択的スプライシングイベントの遺伝子をパスウェイ解析すると、細胞周期や DNA 修復、RNA スプライシング、RNA 移送といったパスウェイがヒットした（図表 2-8D）。以上の結果より、T-025 がこれら細胞の生存に必須のパスウェイにある遺伝子の選択的スプライシングを変化させることで細胞死を誘導すること、またその変化の程度は CLK2 発現量に依存していることが明らかになった。

2.2.9 CLK 阻害と MYC 活性化は相乗的にアポトーシスを誘導する

次に、MYC の活性化が T-025 に対する感受性を亢進するのかを検討した。薬剤添加で MYC が誘導できる MYC 誘導 SK-MEL-28 悪性黒色腫細胞株を作成し、Dox の添加によって MYC の転写活性が上昇することを確認した（図表 2-9A）。Dox を SK-MEL-28 細胞に事前に処理し、その後 T-025 を処理して T-025 による増殖阻害効果を検討した結果、MYC 活性化条件化において T-025 に対する感受性が亢進することが明らかになった（図表 2-9B）。また MYC 活性化条件化で T-025 を処理するとアポトーシスの指標である切断型 PARP1 が WB で認められた（図表 2-9C）。続いてさらなる証明のために、違ったメカニズムで MYC 活性化を誘導する U2OS 細胞株を作成して評価した。この細胞では、4OHT の添加によって MYC の核内移行が誘導され MYC が活性化する（図表 2-9D）。MYC 誘導 U2OS 細胞においても MYC 活性化条件化で T-025 に対する感受性が亢進し（図表 2-9E）、また MYC 活性化条件化での T-025 処理で切断型 PARP1 が WB で検出された（図表 2-9F）。最後に MYC 遺伝子増幅を有する乳がん細胞株である SK-BR3 細胞株および MCF7 細胞株を用いて RNAi による MYC 発現低下が感受性に影響を及ぼすのかを検討した。その結果、siRNA の処理による MYC 発現低下によって T-025 に対する感受性が低下することが明らかになった（図表 2-9G および H）。これらの結果は、MYC 活性化はがん細胞株を T-025 に対して脆弱にすることを示している。



図表2-9 T-025とMYC活性化は相乗的にアポトーシスを誘導する

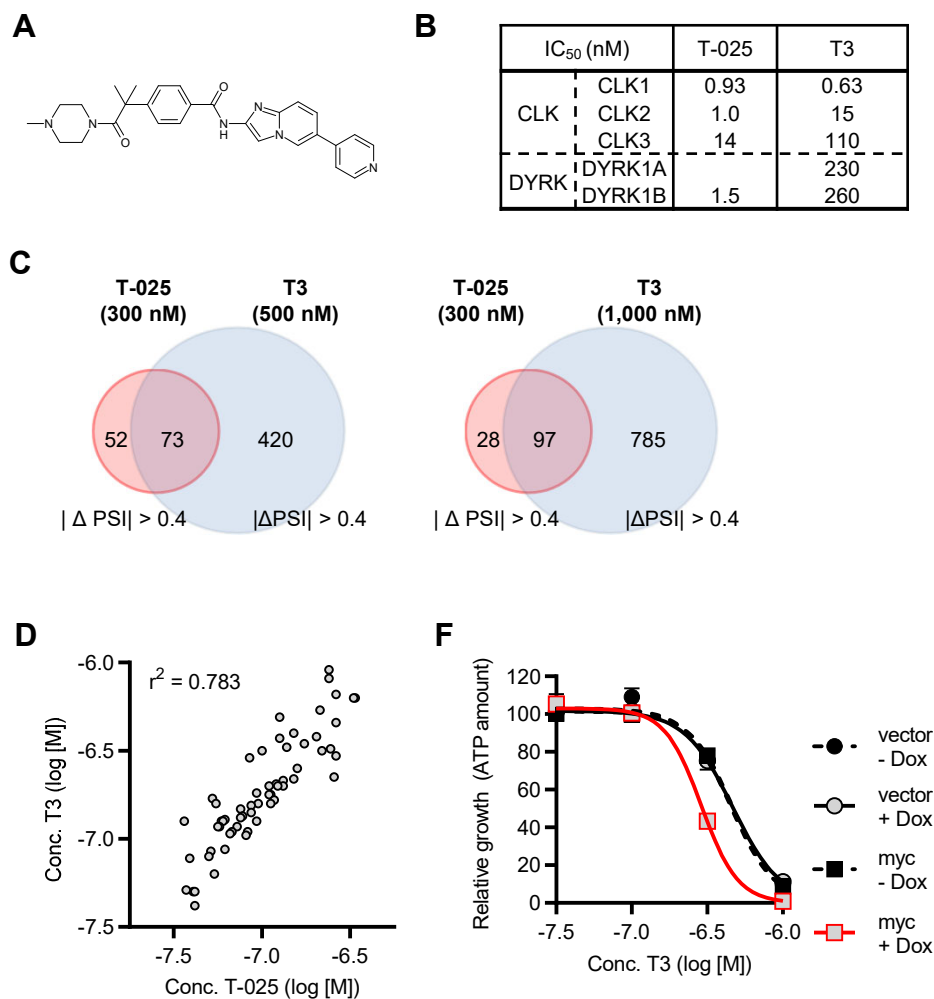
(A) (D) MYC誘導細胞における薬剤処理によるMYC活性化。MYC誘導SK-MEL-28細胞またはU2OS細胞に、0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のDoxまたは500 nMの4OHTを処理し、48時間後のE-Boxレポーター活性を測定した。(B) (E) MYC誘導細胞でのT-025の増殖阻害作用。0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のDoxまたは500 nMの4OHTを48時間処理し、その後T-025を72時間処理した。細胞増殖をATP量を指標に評価した。(C) (F) MYC誘導細胞でのT-025によるアポトーシス誘導作用。MYC誘導細胞に0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のDoxまたは500 nMの4OHTを48時間処理し、その後T-025を24時間処理した。細胞ライセートをWBで解析した。(G) MYCおよびDYRK1AノックダウンによるT-025の増殖阻害作用への影響。SK-BR3およびMCF7細胞にsiRNAを24時間処理し、その後T-025を72時間処理した細胞増殖をATP量を指標に評価した。(H) siRNAによるMYCノックダウン。siRNAを処理し、48時間後の細胞ライセートをWBで解析した。統計解析は、Unpaired Student's t-testを実施した。データは、平均 \pm SDで表す (n=3)。

2.2.10 異なった骨格をもつ CLK 阻害剤 T3 による検証

本章におけるこれまでに検討によって、T-025 が複数のがん細胞株に共通したエクソンスキッピングタイプの選択的スプライシング変化を誘導すること、および CLK2 高発現や MYC 活性化がんに対してより効果が高いことが明らかになった。そこで次にこれらの現象がほかの CLK 阻害剤でも認められるのかを検証するために、T-025 とは異なった骨格およびキナーゼ阻害プロファイルを有する CLK 阻害剤 T3 を用いた検討を行った⁴⁷ (図表 2-10A)。最初に、T-025 によって複数のがん細胞株で共通して変化が誘導されるエクソンスキッピングタイプの選択的スプライシングイベント (125 イベント) が T3 でも変化誘導されるのかを検討した。Funnel ら⁴⁷ によって報告されている HCT116 大腸がん細胞株での T3 処理による選択的スプライシング変化を用いて比較した結果、T3 の 500 nM 処理では、125 イベント中 73 イベント (58.4%)、1,000 nM では 125 イベント中 97 イベント (77.6%) について変化が認められた (図表 2-10B)。次に T3 の 60 種の固形がん細胞株に対する増殖阻害効果を調べ T-025 と比較した。その結果、T-025 の増殖阻害プロファイルと T3 の増殖阻害プロファイルには高い相関が認められた (r^2 値 0.783、図表 2-10C)。最後に、T3 を MYC 誘導 SK-MEL-2 細胞で評価したところ、T3 も MYC 活性化条件化で高い増殖阻害作用を示すことが明らかになった (図表 2-10D)。以上のように T3 が T-025 と類似の結果を示したことは、T-025 によって認めらえた効果が主に CLK 阻害によって誘導されていたことを示唆している。

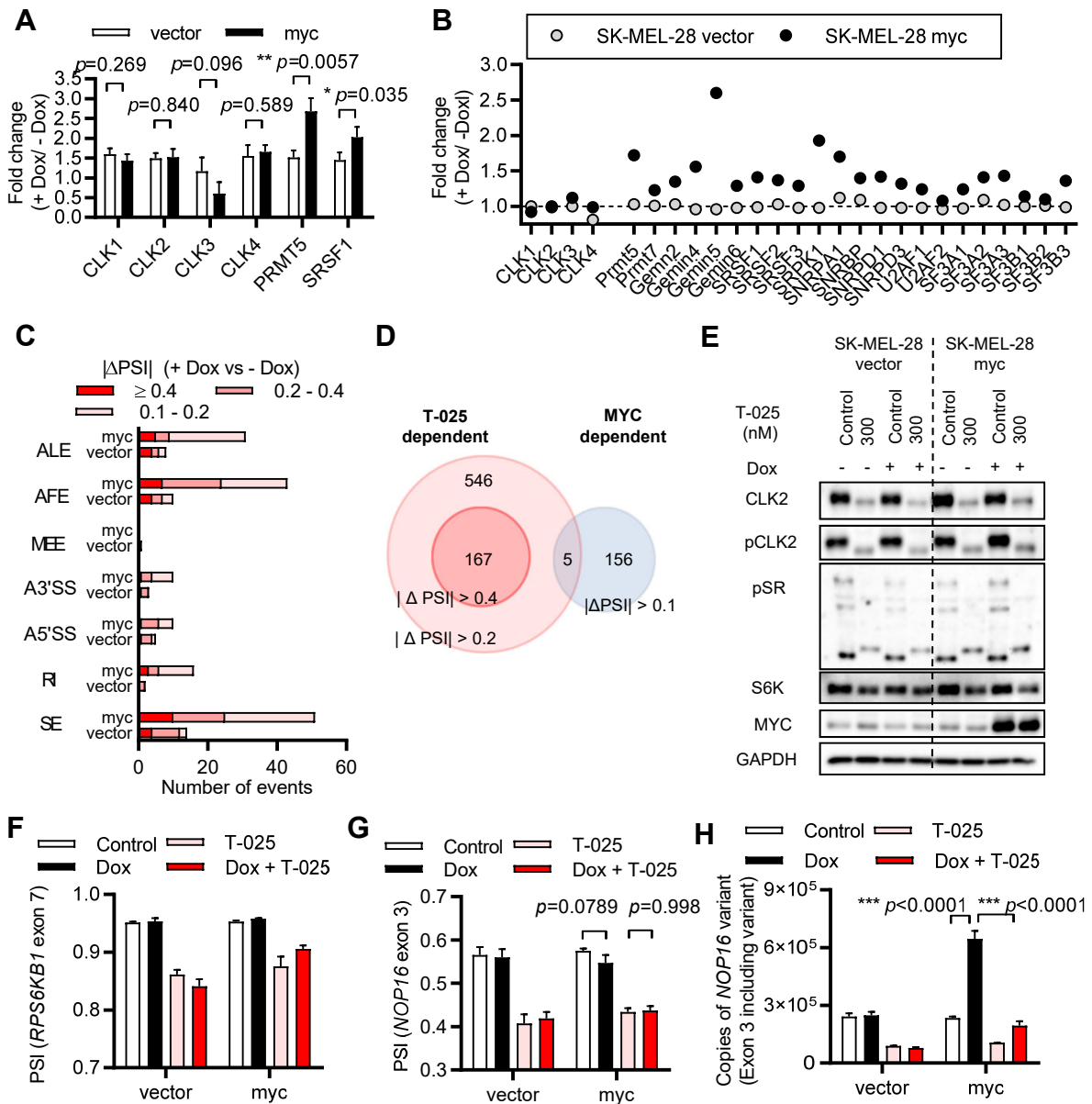
2.2.11 MYC による CLK 転写制御を介さない選択的スプライシング制御

MYC 活性化がんが CLK 阻害に対して脆弱なことが明らかになったため、次に MYC と CLK の分子的なつながりについて検討した。MYC は *SRSF1* や *PRMT5* などの Spliceosome の中心的因子を転写制御することで選択的スプライシングを制御していることがすでに報告されている^{32,48}。そこで、MYC が CLK2 やほかの CLK ファミリーキナーゼの転写も制御している可能性を検討した。MYC 誘導 SK-MEL-28 細胞に Dox を添加し MYC の転写活性を上昇させると *PRMT5* と *SRSF1* の mRNA 量の増加が認められた。しかし、CLK2 や他の CLK ファミリーキナーゼの mRNA 量の上昇は認められず、CLK ファミリーキナーゼは MYC の直接の転写ターゲットではないことが示唆された (図表 2-11A)。また MYC 誘導 SK-MEL-28 細胞を用いた RNA-Seq の結果でも、MYC 誘導はいくつかの選択的スプライシングに関連する因子の発現を上昇させたが、CLK ファミリーキナーゼの発現上昇は認められなかった (図表 2-11B)。一方で RNA-Seq の結果を用いて選択的スプライシング変化を解析した結果、今回用いた MYC 誘導 SK-MEL-28 細胞においても MYC 誘導によって選択的スプライシングに変化が起こることが確認された (図表 2-11C)。MYC が CLK ファミリーキナーゼの転写制御を伴わない選択的スプライシング変化を誘導したことから、T-025 によって変化が誘導される選択的スプライシングイベントと MYC 活性化によって変化が誘導される選択的スプライシングイベントは重複しない (排他的) という可能性を検証した。その結果、試験した 4 種のがん細胞株で共通に変化が誘導された 546 の選択的ス



図表2-10 異なる骨格をもつCLK阻害剤、T3の作用

(A) T3の化学構造。Funnellらの報告より引用。(B) T3とT-025のCLKおよびDYRKファミリーキナーゼに対する酵素阻害活性。T3の活性はFunnellらの報告より引用。(C) T3とT-025によって誘導される選択的スプライシング変化の比較。T3の選択的スプライシング変化はFunnellらの報告より引用。T-025の選択的スプライシング変化は図表2-8で抽出した125イベントを使用。(D) T3とT-025の増殖阻害プロファイルの比較。60種の固形がん細胞株に対するT3およびT-025の増殖阻害IC₅₀を比較した。灰色の円が細胞株を示す。(F) MYC誘導細胞でのT3の増殖阻害作用。MYC誘導SK-MEL-28細胞に0.5 μg/mLのDoxを48時間処理し、その後T3を72時間処理した。細胞増殖をATP量を指標に評価した。データは、平均±SDで表す (n=3)。



図表2-11 T-025とMYC活性化は相乗的にアポトーシスを誘導する

(A) MYC誘導によるCLKファミリー発現量の変化。SK-MEL-28細胞に0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のDoxを54時間し、RNAをRT-PCRで解析した。(B) (C) MYC誘導によるスプライシング関連因子の発現変化および選択的スプライシング変化。SK-MEL-28細胞に0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のDoxを54時間し、RNAをRNA-Seqで解析した。(D) T-025による選択的スプライシング変化とMYC誘導による選択的スプライシング変化の比較。(E) MYC誘導条件化でのT-025によるpCLKおよびS6Kタンパク量の変化。SK-MEL-28細胞に0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のDoxを48時間し、その後T-025を24時間処理した細胞の細胞ライセートをWBで解析した。(F) (G) MYC誘導条件化でのT-025による選択的スプライシング変化 (PSI) への影響。SK-MEL-28細胞に0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のDoxを48時間し、その後T-025を6時間処理した細胞のRNAを回収し、RT-PCRで解析した。(H) MYC誘導およびT-025によるNOP16スプライシングバリエーションmRNA量の変化。データは、平均 \pm SDで表す (n=3)。統計解析は、Unpaired Student's t-testを実施した。

プライシングイベントのうち MYC 活性化によっても変化が誘導された選択的スプライシングイベントはわずか 5 イベントであった (図表 2-11D)。以上の結果より、MYC は CLK 転写制御を介さず選択的スプライシングを制御しており、MYC によって変化が誘導される選択的スプライシングイベントと T-025 によって変化が誘導される選択的スプライシングイベントは排他的であることが示された。

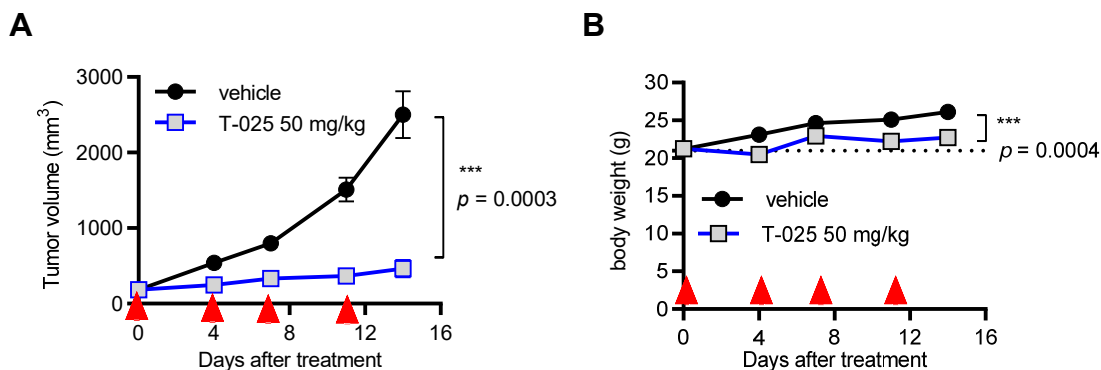
次に MYC 活性化条件化での T-025 の効果を検討した。これまでの結果から、MYC 活性化は CLK2 の発現亢進を誘導しないこと、および T-025 による選択的スプライシング変化の程度は CLK2 発現量に依存していることが明らかになっている。つまり MYC 活性化条件においても T-025 の選択的スプライシングに及ぼす影響は MYC 非活性条件と同じであることが推定される。実際に MYC 誘導 SK-MEL-28 細胞で検討した結果、T-025 による RPS6KB1 エクソン 7 スキッピングおよび S6K タンパク減少は MYC 活性条件でも MYC 非活性条件と同程度認められた (図表 2-11E および F)。そこで次に MYC の直接の転写ターゲットの選択的スプライシングを T-025 が制御している可能性を検討した。MYC の転写ターゲットであることが報告されている NOP16 (別名 HSPC111)⁴⁹ のエクソン 3 スキッピングを T-025 が制御していることが明らかになった。NOP16 エクソン 3 のスキッピングはフレームシフトタイプの転写バリエーションを誘導する。MYC 誘導 SK-MEL-28 細胞で MYC 誘導すると、NOP16 の転写が誘導された。そこに T-025 を処理すると、MYC 非活性条件化と同程度 (同レベルの PSI 値変化) でエクソン 3 スキッピングが誘導され、その結果エクソン 3 を含む NOP16 の発現量は抑制された (図表 2-11G および H)。これらの結果によって T-025 は選択的スプライシング変化によって MYC の転写ターゲットである NOP16 の発現を抑制していることが示唆された。

2.2.12 MYC によって誘導された自然発症乳がんのアログラフトモデルに対する T-025 の薬効

T-025 が MYC 活性化がんに対して有効であることをさらに証明するために、MYC 活性化によって誘導された腫瘍に対する効果を検討した。MMTV-MYC 遺伝子改変マウスに自然発症した乳がんからアログラフトモデルを作成し、そのアログラフトモデルにおける T-025 の抗腫瘍効果を評価した。その結果、T-025 は体重減少を引き起こすことなく、顕著な抗腫瘍効果を発揮した (図表 2-12A および B)。この結果は、CLK 阻害剤が MYC 活性化乳がんに対して有効である可能性を示唆している。

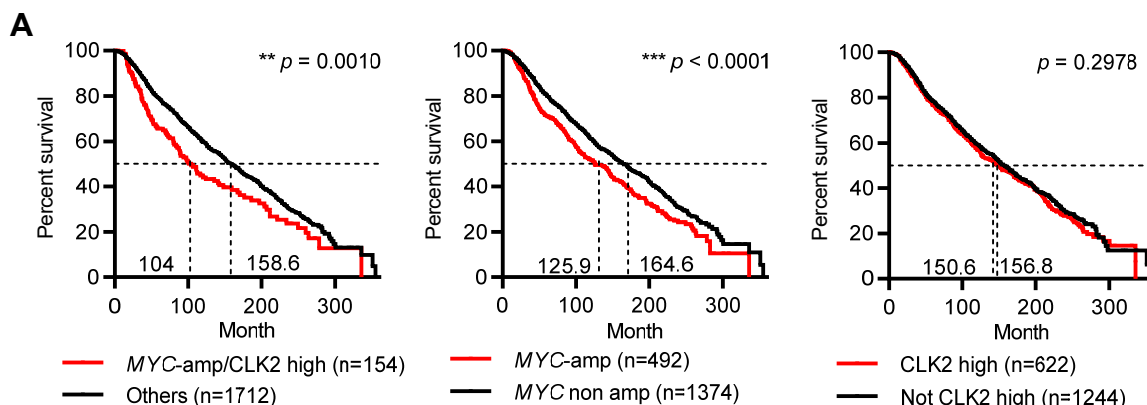
2.2.13 MYC 遺伝子増幅および CLK2 高発現の乳がんは予後不良である

CLK 阻害剤が CLK2 高発現および MYC 遺伝子増幅がんに対して有効であるという仮説が臨床での患者層別化マーカーとして有用化どうかを検討するため、公知の臨床データを用いて CLK2 高発現かつ MYC 遺伝子増幅乳がんの予後を検討した^{50,51}。まず CLK2 高発現および MYC 遺伝子増幅のそれぞれが予後に及ぼす影響を検討すると、CLK2 高発現は予後には影響を及ぼさないが、MYC 遺伝子増幅は予後不良と相関した。続いて CLK2 高発現および MYC 遺伝子増幅の両方を有する乳がんの予後を検討した結果、両マーカー陽性の乳がんの予後は、単独のマーカー



図表2-12 MYC誘導自然発症乳がんアログラフトモデルにおけるT-025の抗腫瘍効果

(A) (B) MYC誘導自然発症乳がんアログラフト腫瘍におけるT-025の抗腫瘍効果。T-025は50 mg/kgの用量で1日2回、週2回（赤矢印）経口投与した。データは、平均±SEMで表す（n=8）。統計解析は、unpaired Student's t-testおよびunpaired Student's t-test with Welch's correctionを実施した。



図表2-13 CLK2およびMYC遺伝子増幅の乳がんの予後に及ぼす影響

(A) MYC遺伝子増幅およびCLK2高発現乳がん患者のカプランマイヤー生存曲線。患者はMYC遺伝子増幅の有無およびCLK2発現量によってグループ分けし、カプランマイヤー生存曲線を描いた。生存期間中央値も表示した。統計解析は、Log rank testを実施した。

一陽性の乳がんと比較してさらに予後不良であることが明らかになった (図表 2-13A)。これらの CLK2 高発現かつ MYC 遺伝子増幅を有する乳がんが予後不良であるという臨床での観察結果は、CLK 阻害剤がこれらの予後不良の患者に対する有効な治療オプションとなりうることを示している。

2.3 考察

CLK 阻害を介した T-025 の作用

本章で明らかにした種々の *in vitro* および *in vivo* モデルにおける T-025 の抗腫瘍作用は、CLK 阻害剤が抗がん剤としてのポテンシャルを有していることを示唆している。T-025 は DYRK1A をはじめとするいくつかのほかのキナーゼを阻害するが、T-025 による抗腫瘍効果は CLK 阻害による効果であると考えられる。その根拠として、(1) 異なった骨格をもつ別の CLK 阻害剤である T3 が T-025 と類似した選択的スプライシング変化や MYC 活性化条件での強い増殖阻害効果を含む増殖阻害プロファイルを示した。また T3 による選択的スプライシング変化は CLK1/2/3/4 の siRNA 処理によって引き起こされる選択的スプライシング変化と類似している報告されており⁴⁷、T-025 による選択的スプライシング変化もまた CLKs のノックダウンによって引き起こされる選択的スプライシング変化と類似していることが示唆される。(2) T-025 による効果が細胞株の CLK2 の発現レベルに依存している。具体的には、T-025 によって誘導される選択的スプライシング変化は CLK2 が高発現の NCI-H1048 では程度が大きく、CLK2 低発現の 786-O では小さい。また 150 種の固形がん細胞株に対する T-025 の増殖阻害作用解析では細胞株の CLK2 発現量との相関が認められ、これらは T-025 による効果が CLK2 を介していることを示唆している。(3) 本研究で検討した T-025 の効果において、DYRK1A 阻害の寄与は認められていない。RNAi で DYRK1A をノックダウンした MCF7 細胞および SK-BR3 細胞でも T-025 による増殖阻害に変化がなかった。さらに CCLE に情報が記載されている細胞株の中で DYRK1A 発現が最も低い細胞株の 1 つである U2OS 細胞 ($\text{Log}_2 \text{CNV} = -1.55$ 、発現の Z-Score = -2.65) においても、T-025 の細胞増殖阻害および MYC 活性化による感受性亢進効果が認められた。DYRK1A 阻害の細胞増殖における役割には多くの議論があり、また細胞背景に依存していることが知られている⁵²。T-025 の広範な細胞に対する増殖阻害効果は CLK 阻害を介した効果であり、CLK 阻害剤が抗がん剤としてのポテンシャルを有していることが示唆される。

MYC 活性化と CLK 阻害の合成致死のメカニズム

本研究で明らかになった CLK 阻害剤が MYC 活性化したがんにより効果を発揮するという結果は、MYC で誘導されたがんは Spliceosome 阻害に対して脆弱性を示すという報告^{31,32}と一致する結果である。MYC 活性化によってがん細胞は CLK 阻害剤に対し高感受性になり、また、MYC 増幅の固形がん細胞株は T-025 に対して統計学的に高い感受性を示した。この CLK 阻害剤と MYC 活性化が合成致死を誘導するメカニズムについては 2 つの仮説が考えられる。(1) CLK 阻害による選択的スプライシング変化と MYC 活性化による選択的スプライシング変化は

別々の選択的スプライシングパスウェイであり、相乗的な選択的スプライシング変化で合成致死を誘導したという仮説。細胞株の *MYC* ステータスは *CLK* 阻害剤によって引き起こされる選択的スプライシング変化には影響がないことが示唆されている。T-025 は *MYC* 増幅の COLO320HSR 細胞を含む 4 種のがん細胞株に対して類似した選択的スプライシング変化を誘導した。さらに Funnell らは、*MYC* が増幅した大腸がん細胞株である HCT116 とがん化していない正常上皮細胞である hTERT では T3 が誘導する選択的スプライシング変化は多くが重複していた (~75%) と報告している⁴⁷。さらに本研究では *CLK* ファミリーの転写は、*MYC* 活性とは独立して制御されていること、*MYC* 誘導によって起こる選択的スプライシング変化イベントと T-025 によって誘導される選択的スプライシング変化イベントの重複がほとんどないことも明らかになった。これらの結果は、*CLK* 阻害剤と *MYC* 活性化は別々の選択的スプライシングパスウェイを制御していることが考えられる。2つのスプライシングパスウェイを変化させることによる合成致死は、臨床の血液がんでスプライシング関連因子の変異が排他的に発生していること（複数のスプライシング因子に変異がある血液がんがない）^{11,12,53}、および *SF3B1* 阻害剤が *SRSF2* または *U2AF1* 変異がんを選択的に細胞死を誘導すること^{54,55}、などによって広く提唱されている。(2) *CLK2* と *MYC* が協調的に pre-mRNA 産生と成熟を制御し、がん細胞の生存を促進しているという仮説。*CLK* キナーゼの直接の基質であり、かつ *MYC* の直接の転写ターゲットでもある *SRSF1* は⁴⁸、乳腺上皮細胞のがん化を促進することが報告されている⁵⁶。また *NOP16* の pre-mRNA は転写段階では *MYC* に、選択的スプライシング段階では *CLK* 阻害剤によって制御されることを本研究で明らかにした。*CLK2* 高発現は *MYC* 非増幅の乳がんでは予後不良因子ではないが、*MYC* 増幅の乳がんでは予後不良因子である。これらの結果から *MYC* によって誘導されたがんは *CLK* により高い依存をしている可能性が考えられる。今後、*CLK* 阻害剤によって誘導される細胞死の詳細なメカニズムが明らかになることで、*MYC* によって誘導されたがんが *CLK* 阻害剤に対して脆弱性を示すメカニズムの解明につながることを期待される。

今後の本研究の発展

本研究においては、*CLK* 阻害剤の血液がんに対する作用について十分な検討はなされていない。無作為のバイオインフォマティクス解析においては、*CREBBP* 変異や *ROBO2* 変異が感受性と相関することが示唆されている。*CREBBP* 変異は AML やびまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫 (DLBCL) で高頻度に発見されており^{57,58}、また *ROBO2* 変異は MDS 患者で見つかっている⁵⁹。さらなる研究によって、*CLK* 阻害剤はこれらの変異を有する血液がんにも有用な治療オプションとなりえることが検証されることが期待される。

2.4 実験材料および手法

細胞株

293T 細胞は理研 (日本、埼玉県) より購入した。786-O、BJ、COLO320HSR、MDA-MB-468、MCF7、NCI-H1048、SK-BR3、SK-MEL-28、U2OS、Wi38 細胞は ATCC (アメリカ、バージニ

ア)より購入した。それぞれの細胞株は推奨された培地を用いて培養し、マイコプラズマ陰性であることを確認している。

MYC誘導株を取得するためにSK-MEL-28細胞に空のpTRIPXベクター(Open Biosystems/GE Healthcare Dharmacon Inc.、アメリカ、コロラド)またはTer 依存的プロモーターの下流でMYCを発現するベクターをレトロウィスルで安定的に発現させた、geneticin を用いてセレクションした。同様にU2OS細胞に空のpBABEベクター(Cell Biolabs, Inc.、アメリカ、カリフォルニア)またはMYC-estrogen receptor transgeneを発現させ、puromycinを用いてセレクションした。

抗体および試薬

DoxはSigma-Aldrich(アメリカ、ミズーリ)より、4OHTはClontech Laboratories(アメリカ、カリフォルニア)より購入した。下記に示す抗体を使用した。anti-phospho-SR monoclonal antibody(1H4)(Invitrogen/Thermo Fisher Scientific、アメリカ、カリフォルニア、カタログ番号339400)、anti-cleaved PARP1(Cell Signaling Technology Inc. [CST]、アメリカ、マサチューセッツ、カタログ番号#9541)、anti-S6K(CST、カタログ番号#9202)、anti-CLK2(Abcam、イギリス、ケンブリッジ、カタログ番号ab86147)、anti-MYC(CST、カタログ番号#5605)、anti-GAPDH(EMD Millipore、アメリカ、マサチューセッツ、カタログ番号MB374)、anti-HSP90(CST、カタログ番号#4874)。Horseradish peroxidase-linked anti-rabbit and anti-mouse IgG F(ab)2 fragments(GE Healthcare、アメリカ、イリノイ)を二次抗体として使用した。

ラビットモノクローナルリン酸化CLK2抗体は、黒川らの手法を参考に武田薬品において作成した⁶⁰。pCLK2抗体は、WBでは1/1000または1/5000希釈で、免疫染色では1/100希釈で使用した。T-025およびT3は武田薬品において合成した。

キナーゼプロファイリング酵素試験

DiscoverX Corporation(アメリカ、カリフォルニア)が提供するKINOMEscan試験を利用し評価した。

T3とT-025のCLK1/2/3およびDYRK1A/B阻害活性試験

T3のIC₅₀値は、Funnellらによって報告された値を引用した。T-025はFunnellらによって報告された方法と同じ手法で評価した⁶¹。

細胞増殖アッセイおよびCaspase-3/7アッセイ

細胞増殖はCellTiter-Glo luminescent cell viability assay(Promega、アメリカ、ウィスコンシン)を用いて、Caspase-3/7活性はCaspase-Glo 3/7 Assay(Promega)を用いて測定した。各ウェルの発光はARVO Light(PerkinElmer Inc.、アメリカ、マサチューセッツ)を用いて測定した。IC₅₀値はGraphPad Prism 5(GraphPad Software, Inc.、アメリカ、カリフォルニア)を用いて算

出した。

WB

同一タンパク量のサンプルを 7.5%–15% Perfect NT Gel (DRC CO Ltd., 日本、大阪) を用いて電気泳道を行った。ゲルは、ニトロセルロースメンブレンに iBlot system (Invitrogen) を用いて転写し、その後 PBS containing Block-Ace (DS Pharma Biomedical Co., Ltd., 日本、大阪) に浸しブロッキングを行った。Can Get Signal Immunoreaction Enhancer solution 1 (TOYOBO, 日本、大阪) で希釈した 1 次抗体にメンブレンを 4°C で 1 晩以上軽く振とうを加えながら浸した。PBST による洗浄を 10 分間 3 回行った後に、メンブレンを Can Get Signal Immunoreaction Enhancer solution 2 (TOYOBO) で 1:10000 で希釈した 2 次抗体に室温で 30 分間軽く振とうを加えながら浸した。PBS-T による洗浄を 10 分間 3 回行った後に、ECL™ Western blotting analysis system (GE Healthcare、アメリカ、イリノイ) と用いてシグナルを検出した。画像の検出には LAS3000 Luminescent Image Analyzer (Fujifilm、日本、東京) をバンドの定量には Multi Gauge V3.1 (Fujifilm) を用いた。

免疫染色

5 μm にカットした切片は、Leica Bond Rx (Leica Biosystems、ドイツ、, ヴェツラー) を用いて染色した。スライドは、H2 バッファーで 20 分間予備処理をした後、hydrogen peroxide で 5 分、PVDF Blocking Reagent で 10 分間ブロッキングを行い、1:100 で希釈した pCLK2 抗体と 30 分間インキュベートした。Bond Polymer system および Leica IHC Refine Kit (Leica Biosystems) を用いて検出を行った。

siRNAのトランスフェクション

siRNAのトランスフェクションは、Lipofectamine™ RNAiMAX Transfection Reagent (Thermo Fisher Scientific)を用いたリバーストランスフェクション法で実施した。化合物を処理する24時間前に、10 nM siRNAを細胞にトランスフェクションした。siRNAはAmbion (Thermo Fisher Scientific)より購入した以下のsiRNAを使用した。

- siMYC_1 (s9129) 5'-AGA CCU UCA UCA AAA ACA Utt-3'
- siMYC_2 (s9130) 5'-GAG CUA AAA CGG AGC UUU Utt-3'
- siDYRK1A_1 (s4400) 5'-CCG UAA ACU UCA UAA CAU Utt-3'
- siDYRK1A_2 (s4401) 5'-GCU GAC UAC UUG AAG UUC Att-3'
- Silencer™ Select Negative Control No. 1 siRNA (4390843)
- Silencer™ Select Negative Control No. 2 siRNA (4390846)

RNA 調整、定量的 RT-PCR、PSI 値算出

トータル RNA は RNeasy Miniprep kit (QIAGEN、ドイツ、ハイデン) を用いて抽出した。

cDNAs は TaqMan Reverse Transcription Reagent kit (Applied Biosystems/Thermo Fisher Scientific) を用いて作成した。RT-PCR は、ViiA7 Real-Time PCR system (Applied Biosystems/Thermo Fisher Scientific) で行った。TaqMan Universal PCR MasterMix (Applied Biosystems/Thermo Fisher Scientific) および FAM-labeled probe and primer mix (Applied Biosystems/Thermo Fisher Scientific) を使用した。PCR 条件は、50°C 2 分間、95°C 10 分間、そして 40 サイクル、94°C 15 秒間および 60°C 1 分間を行った。各サンプルの FAM 蛍光量を測定し、ViiA7 Real-Time PCR system を用いて Ct 値を算出した。それぞれのバリエーションのコピー数は、化学合成した標準オリゴヌクレオチドの Ct 値から算出した。PSI 値は以下の計算式で算出した。

$$\text{PSI} = (\text{エクソンを含むバリエーションのコピー数}) \div (\text{エクソンを含まないバリエーションのコピー数} + \text{エクソンを含むバリエーションのコピー数})$$

BCLAF1 の選択的スプライシングの解析には下記のプライマー、プローブ、標準オリゴヌクレオチドを使用した。

- *BCLAF1* (Ex10–11)_F, 5'-CAG GAG TTA GCC GAC CAC G-3'
- *BCLAF1* (Ex10–11)_FAM, 5'-AAC CTT TTT TCG AAT TAG AGG CA-3'
- *BCLAF1* (Ex10–11)_R, 5'-GTT TGG ACC AGT ATT TGT CCC AG-3'
- *BCLAF1* (Ex10–12)_F, 5'-TGC AGG AGT TAG CCG ACC AC-3'
- *BCLAF1* (Ex10–12)_FAM, 5'-AAC CTT TCA TGA CGA CAG AG-3'
- *BCLAF1* (Ex10–12)_R, 5'-TTG GCC CAA TAA TCC ACA CC-3'
- *BCLAF1* (Ex10–11), 5'-CTT TGC AGG AGT TAG CCG ACC ACG AGG AAC CTT TTT TCG AAT TAG AGG CAG AGG AAG AGC CAG AGG AGT TTT TGC TGG GAC AAA TAC TGG TCC AAA C-3'
- *BCLAF1* (Ex10–12), 5'-AGG CTT TGC AGG AGT TAG CCG ACC ACG AGG AAC CTT TCA TGA CGA CAG AGA TGA TGG TGT GGA TTA TTG GGC CAA AAG AGG-3'.

NOP16 の選択的スプライシングの解析には下記のプライマー、プローブ、標準オリゴヌクレオチドを使用した。

- *NOP16* (Ex2–3)_F, 5'-CGC TAA ATC GGT ACG GCA GA-3'
- *NOP16* (Ex2–3)_FAM, 5'-TAA GAG AAA GGT GAA GGC C-3'
- *NOP16* (Ex2–3)_R, 5'-GCA CAT AGG GCT TCC GTA CAA G-3'
- *NOP16* (Ex2–4)_F, 5'-ACC ACG CTA AAT CGG TAC GG-3'
- *NOP16* (Ex2–4)_FAM, 5'-AAA GAC CTG GAG GCA GAA-3'
- *NOP16* (Ex2–4)_R, 5'-GTC AAT GAG GTC CCG AGA CAG-3'
- *NOP16* (Ex2–3), 5'-GAC CAC GCT AAA TCG GTA CGG CAG AAC CTG GCC GAG ATG GGG TTG GCT GTG GAC CCC AAC AGG GCG GTG CCC CTC CGT AAG AGA AAG GTG

AAG GCC ATG GAG GTG GAC ATA GAG GAG AGG CCT AAA GAG CTT GTA CGG AAG
CCC TAT GTG CTG AAT-3'.

- *NOP16* (Ex2-4), 5'-CTG GGA CCA CGC TAA ATC GGT ACG GCA GAA CCT GGC CGA GAT
GGG GTT GGC TGT GGA CCC CAA CAG GGC GGT GCC CCT CCG TAA GAG AAA GAC
CTG GAG GCA GAA GCC AGC CTT CCA GAA AAG AAA GGA AAT ACT CTG TCT CGG
GAC CTC ATT GAC TAT GT-3'

RPS6KB1 の選択的スプライシングの解析は荒木らによって報告されたプライマー、プローブ、標準オリゴヌクレオチドを使用した⁴⁰。

以下に示す FAM-labeled probe と primer mix を Thermo Fisher Scientific より購入し、使用した。

- CLK1 Hu00269734_m1
- CLK2 Hs00241874_m1
- CLK3 Hs00357427_m1
- CLK4 Hu00982806_m1
- SRSF1 Hs00199471_m1
- PRMT5 Hs01047356_ml

RNA-Seq および選択的スプライシングのバイオインフォマティクス解析

RNA-Seq は Takara Bio Inc. (日本、滋賀) または Macrogen, Inc. (韓国、ソウル) で HiSeq2000 または HiSeq4000 (Illumina Inc., アメリカ、カリフォルニア) を用いて実施した。MISO を使った選択的スプライシング解析、および Cytoscape を用いたパスウェイ解析は Funnell らによって報告された手法を同様の手法で実施した^{47,61}。優位に変化した選択的スプライシングイベントは、以下のクライテリアで算出した。(1) 比較する 2 サンプル間の PSI 値の差の絶対値 (Δ PSI) が 0.1 以上である (2) 選択的スプライシングで変化する 2 つのリード数の和が 10 より大きい。(3) 選択的スプライシングによる 2 つの産物間の確率を定量化した Bayes factor (BF) が 20 より大きい。クラスタリングには、 Δ PSI が 0.4 より大きく、BF が 20 より大きく、個々の選択的スプライシングイベントの PSI の標準偏差が 0.2 より大きな 1320 イベントを使用した。

増殖阻害パネル試験およびバイオインフォマティクス解析

増殖阻害パネル試験および付随したバイオインフォマティクス解析は Eurofins Inc. (アメリカ、ミズーリ) の Oncopanel240 または Oncopanel60 を利用して実施した。

細胞を 384 ウェルプレートに播種し、24 時間後に化合物を添加した。72 時間のインキュベーター後、細胞を固定し核染色した。それぞれのウェルの核の数をカウントし標準化した後、nonlinear regression to a sigmoidal single-site dose response モデルで IC₅₀ 値を算出した。

それぞれの遺伝子の遺伝子変化 (特徴) を次の 6 つのカテゴリーに分類した。遺伝子変異、遺

伝子増幅、遺伝子欠損、過剰発現、変異または増幅、変異または欠損である。2つの統計解析を実施してそれぞれの遺伝子の変化について解析した。(1) **Student's t-test**。上記のそれぞれの遺伝子の特徴について、その特徴を有する細胞株の IC₅₀ と有さない細胞株の IC₅₀ を比較した。等分散を仮定して、**Unpaired t-test** を実施し、*p* 値を算出した。(2) **Fisher's exact test**。感受性が上位から 25%、50%、25%の細胞株を「感受性」「中間」「抵抗性」と分類した。**Fisher's exact test** を行い、遺伝子特徴を有する細胞株が「感受性」または「抵抗性」に入る頻度が統計学的優位に高いかを検討した。*q* 値 (a false-discovery rate-adjusted *p*-value) は次の計算式で算出した。

$$q = (p/\text{rank}) \times N$$

rank は *p* 値の順番であり、N はテストを行った数である。

細胞株の遺伝子変異、コピー数、発現情報

CCLEに格納されている細胞株の遺伝子情報はcBioPortal for Cancer Genomics^{62,63}より取得した。各細胞株の各遺伝子の増幅・欠損の判定および個々の遺伝子変異の役割についてもcBioPortal for Cancer Genomicsより取得した。cBioPortalによると各遺伝子の増幅および欠損は、CCLEより取得したデータをGISTIC2によって解析し決定した。変異の種類はOncoKB databaseより取得した⁶⁴。

臨床データ解析

臨床データも同様にcBioPortal for Cancer Genomicsから取得した。各サンプルのMYC遺伝子の増幅の判定もcBioPortal for Cancer Genomicsより取得したものを使用した。CLK2高発現の定義は、細胞株の解析と同様に上位1/3を高発現サンプルとして定義した。カプランマイヤー生存曲線の作成およびその統計解析はGraphPad prism 5.0を用いて行った。

In vivo 試験

すべての動物試験は、武田オンコロジーまたは武田湘南リサーチセンターの Institutional Animal Care and Use Committees によって承認されたプロトコルに従って実施した。両施設とも AAALAC International に認定されている。

MMTV-MYC モデル⁶⁵は Mouse Models of Human Cancer Consortium より入手した。アログラフトモデルを作成するために、このモデルの雌マウスに発生した腫瘍から細胞を単離し、生存している細胞 1×10^5 細胞をマトリゲルと混合し 12 週齢の雌 Balb/c nude mice に移植した。2 回の in vivo 継代後の腫瘍を液体窒素中に凍結保存した。凍結腫瘍を in vivo に継代し、小さな腫瘍片を 7 から 8 週齢の雌 Balb/c nude mice に移植し増殖した腫瘍を抗腫瘍試験に使用した。

5×10^6 個の MDA-MB-468 細胞または NCI-H1048 細胞はマトリゲルと混合し、7 から 8 週齢の雌 Balb/c nude mice に皮下移植した。皮下移植腫瘍が十分な大きさに成長したところで、腫瘍径を測定し、以下の計算式で腫瘍体積を算出した。

腫瘍体積 = 長径 × 短径 × 短径 × (1/2)

腫瘍体積が約 200 mm³のマウスを薬効試験および PD 試験に使用した。T-025 は 0.5%メチルセルロース溶液に溶解させた。薬効試験では、無作為的に群分けを行った。T-025 は、1 日 2 回投与を週 2 回のスケジュールで投薬し、2 または 3 週間の薬効試験を実施した。腫瘍体積および体重測定は 2 から 3 日に 1 度実施した。

統計解析手法

正規分布は、Kolmogorov–Smirnov テストで検証した。正規分布が認められた場合は、パラメトリック検定(unpaired Students *t*-test または unpaired Student's *t*-test with Welch's correction、Tukey's test、Dunnnett's test) をその分散によって実施した。正規分布が認められなかった場合は、ノンパラメトリック検定 (Mann–Whitney test または Steel–Dwass test) を実施した。統計解析は、GraphPad Prism 5.0 または EXSUS version 8.0 (CAC Croit Corporation、日本、東京) を用いて解析した。図表中の n.s.、*、**、***はそれぞれ *p* 値 0.05 以上、< 0.05、< 0.001、< 0.0001 を表している。

2.5 小括

本研究で創出した T-025 は、動物モデルで抗腫瘍効果を示した最初の CLK 阻害剤である。また T-025 を用いた検討によって CLK 阻害剤と MYC 活性化による新規の合成致死を明らかにした。これらの結果は、新規のスプライシング調節剤である CLK 阻害剤が抗がん剤として、特に CLK2 高発現および MYC 活性化がんに対して、有望な治療法となりうることを示している。本研究成果が、臨床試験実施中の CLK 阻害剤などを介して、がん患者にとって有益な結果につながることを期待される。

第3章 新規 CDC7 選択的阻害剤 TAK-931 の分子メカニズムおよび有効な対象疾患探索 (Molecular Mechanism and Potential Target Indication of TAK-931, a Novel CDC7-Selective Inhibitor)

3.1 背景

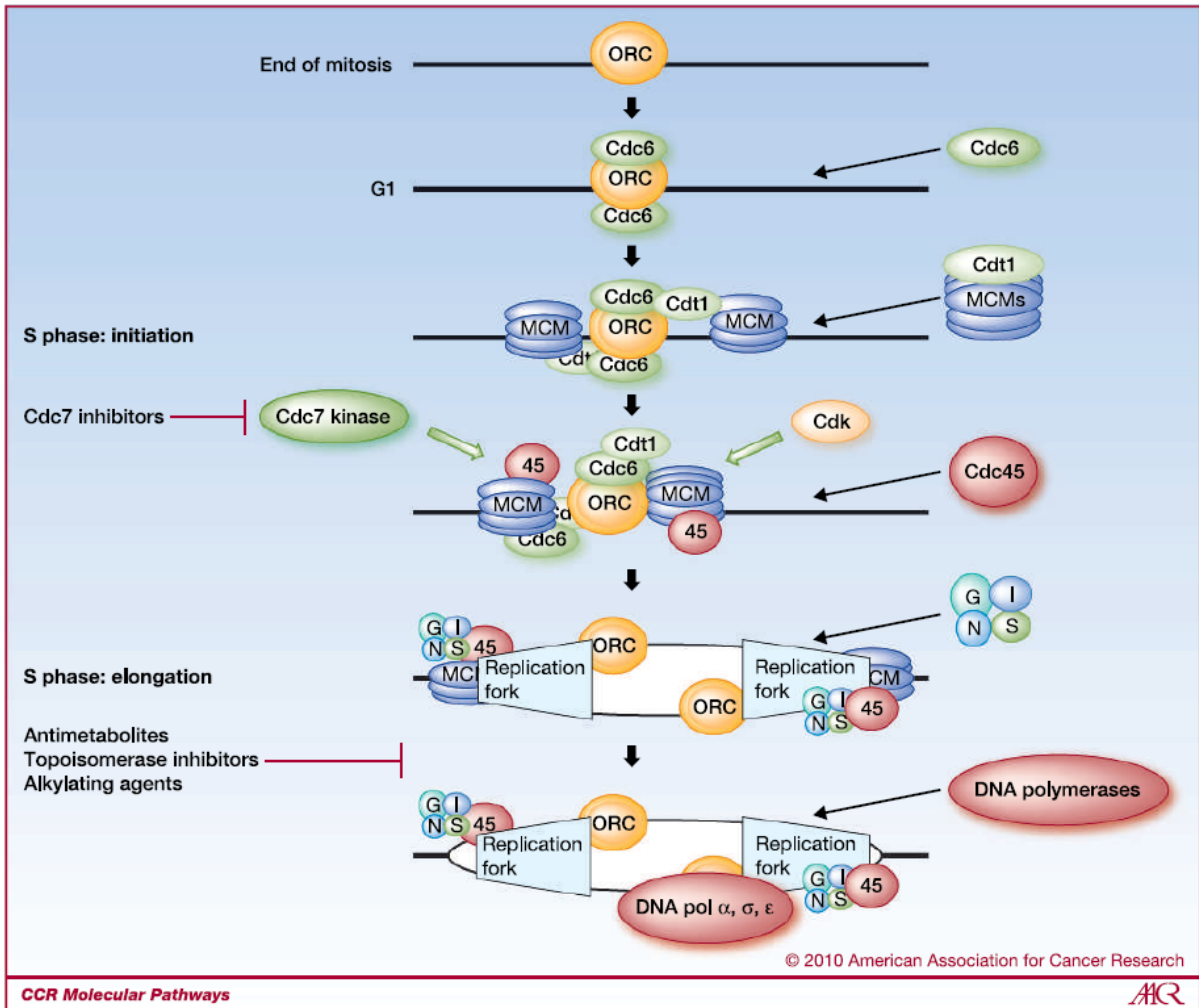
がんの特徴の 1 つとして、高頻度の遺伝子変異やゲノムの再編成といったゲノム不安定性が挙げられており、ゲノムの不安定性はがんの悪性化や治療に対する耐性化と関連することも知られている^{66,67}。このゲノム不安定性をもたらす要因の 1 つとして DNA 複製ストレス (RS)、つまり DNA 複製フォークの遅延や停滞を引き起こす不効率な DNA 複製、が挙げられている^{68,69}。DNA 複製フォークの停滞によって DNA DSBs および細胞分裂における姉妹染色体の不完全な分離を誘導され、これがゲノム不安定につながると考えられている⁷⁰。がん細胞では多くの内在的および外来的な刺激、例えば、ヌクレオチドや DNA 複製因子の不足、ヌクレオチドの誤った取り込み、DNA 巻き戻しの欠損、DNA 構造の異常などによって RS が生み出している^{71,72}。これら DNA 構造への直接的な影響に加えて、がん遺伝子活性化によっても RS が誘導されることが明らかになっている^{70,71,73-75}。具体的には、KRAS 変異、MYC 遺伝子増幅や活性化、E2F 活性化、cyclin E 過剰発現、CDC25A 過剰発現、RB1 変異、p53 変異、S 期移行関連因子の異常などが RS を誘導すると報告されている⁷¹。がんの特徴である RS を標的としたがん治療には古くから高い関心もたれており、実際に RS を誘導する化学療法剤は固形がん、血液がん両方に対し広く使用されている^{66,71}。また次世代のがん治療薬として DNA 複製に重要な働きをするタンパクを阻害する薬剤に高い注目が注がれている。

DNA 複製を制御するタンパクとして、セリン・スレオニンキナーゼである CDC7 (DBF-dependent kinase、DDK としても知られる) は有望なターゲットとして注目されている⁷⁶⁻⁸²。CDC7 は G1 期後期から S 期への移行において DBF4 を結合することで活性化され、クロマチン上にローディングされた MCM 複合体をリン酸化することで DNA 合成開始を促す (図表 3)⁸³⁻⁸⁵。さらに CDC7 は DNA 複製フォークの維持や DNA 修復応答にも重要な役割を果たしていることが知られている⁸⁶。また臨床データから DLBCL や卵巣がん、トリプルネガティブ乳がんにおいて CDC7 の発現亢進が予後不良と相関することが明らかになっている⁸⁷。

3.2 結果

3.2.1 TAK-931 は高い選択性を持つ CDC7 キナーゼ阻害剤である

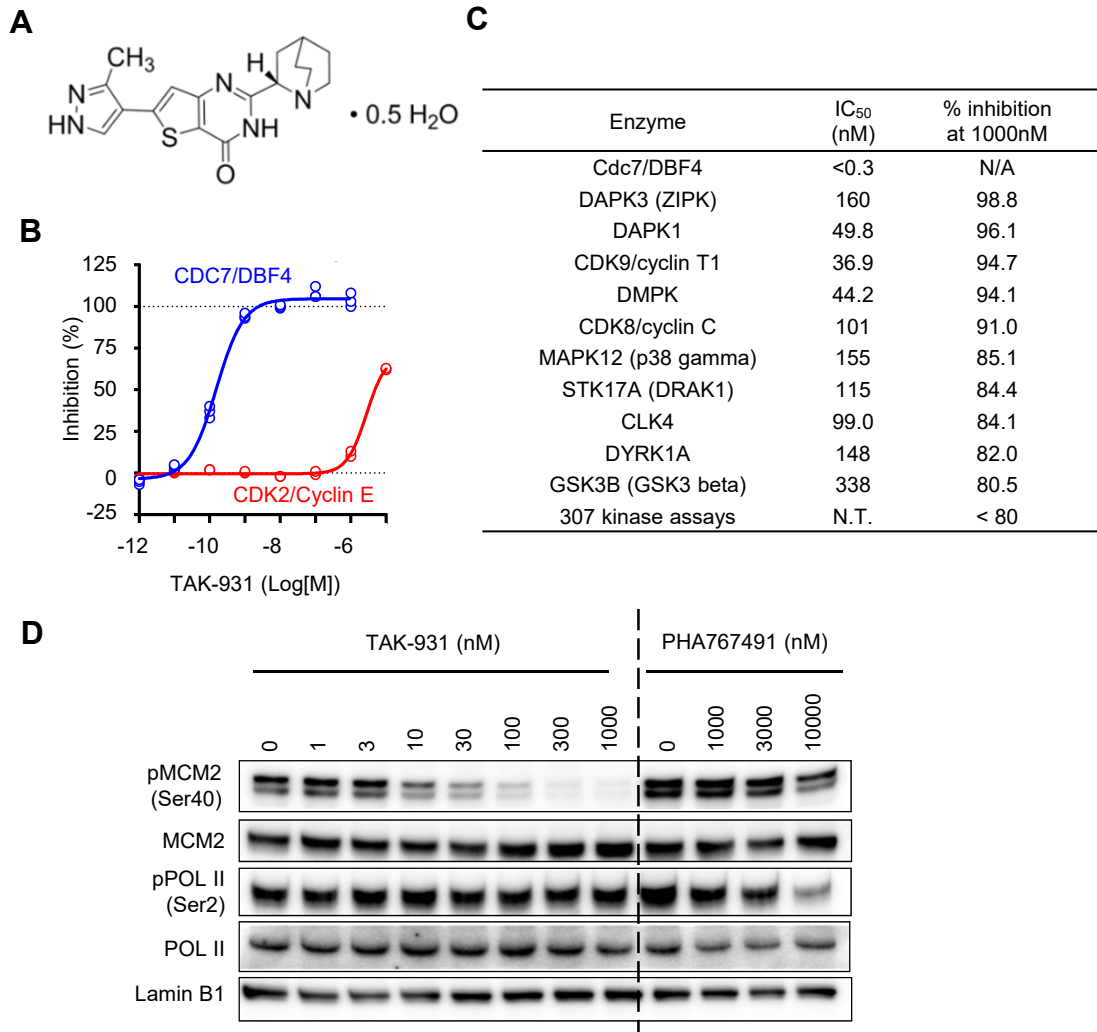
TAK-931 (CN1C=NC2=C1C(=O)N(C2)c3cc4cnc5c3cnc45) は、武田薬品において創出された低分子 CDC7 阻害剤である (図表 3-1A)。TAK-931 は CDC7 の酵素活性を 0.3 nM 以下の IC₅₀ 値で阻害する一方で、対照となる CDK2 に対する活性は非常に弱く IC₅₀ 値で 6300 nM であった (図表 3-1B)。さらにキナーゼ選択性を評価したところ、評価したほかの 317 キナーゼに対する活性は弱く、CDC7 に対する活性と比較して 120 倍以上の選択性があった (図表 3-1C)。



図表3 CDC7の分子機能

CDC7はMCMをリン酸化することでDNA複製の開始を制御する。

Reprinted from Clinical Cancer Research, 2010, 16, 4503-4508, Montagnoli et al., Targeting Cell Division Cycle 7 Kinase: A New Approach for Cancer Therapy, with permission from AACR.



図表3-1 CDC7選択的阻害剤TAK-931

(A) TAK-931の化学構造 (B) TAK-931のCDC7およびCDK2に対する酵素阻害活性。(C) TAK-931のキナーゼ選択性。317キナーゼ試験に対するTAK-931の1,000 nMにおける阻害率を示す。阻害率が高かったキナーゼは濃度依存性試験を実施し、IC₅₀値を算出した。(D) TAK-931のCDC7およびCDK9の基質に及ぼす影響。TAK-931を4時間処理したCOLO205細胞から回収した核ライセートを用いてWBを実施した。

つぎに TAK-931 の細胞での効果を COLO205 大腸がん細胞株を用いて検討した。MCM2 Ser40 のリン酸化 (pMCM2) は CDC7 キナーゼの選択的な基質であることが知られている^{84,88,89}。また、RNA polymerase II Ser2 (pPOL II)は、キナーゼ選択性試験で 2 番目に TAK-931 の活性が強かった CDK9 がリン酸化することが知られている⁹⁰。pMCM2 および pPOL II を CDC7 および CDK9 の標的阻害 PD マーカーとして使用し、また CDC7・CDK9 デュアル阻害剤である PHA767491 を対照化合物として用いた⁷⁷。WB で検討した結果、TAK-931 による濃度依存的な pMCM2 抑制が 10 から 100 nM で認められ、それ以上の濃度で完全な抑制が認められた。一方で、TAK-931 による pPOL II の抑制は 1000 nM でも認められなかった。PHA767491 は、pMCM2 の抑制が 10,000 nM で認められた一方で、濃度依存的な pPOL II 抑制が 1,000 から 10,000 nM で認められた (図表 3-1D)。この結果は、TAK-931 が細胞レベルでも高い選択性を有していることを示している。これ以降の細胞試験では、pMCM2 がほぼ完全に検出できなくなる 300 nM で TAK-931 を使用した。

3.2.2 TAK-931 は DNA 複製開始点の発射数を減少させる

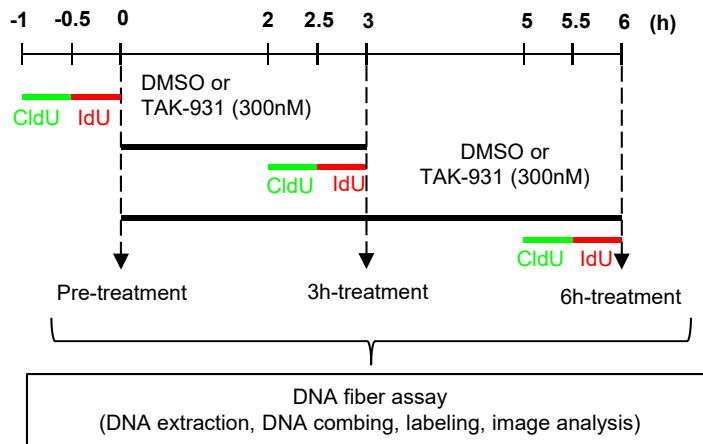
TAK-931 が DNA 複製に対してどのような影響を及ぼしているのかを検討するために HeLa 細胞を用いて DNA ファイバー試験を実施した (図表 3-2A)^{91,92}。その結果、TAK-931 を処理した細胞では、複製フォークの開始数が顕著に減少した (図表 3-2B)。一方で、複製フォークのスピードは、抑制されず、むしろ増加した (図表 3-2C)。この結果は、すでに報告されている別の CDC7 阻害剤で認められた現象と類似していた^{77,93}。この結果は CDC7 活性が DNA 複製開始点の発射に重要な働きを示していること、さらに、フォークの進行に関しては活性が逆に負に制御していることを示している^{91,92}。

3.2.3 TAK-931 は S 期延長および RS を誘導する

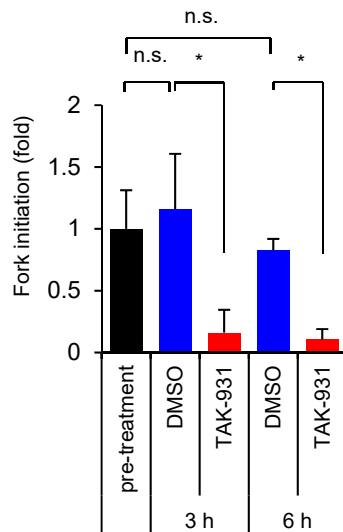
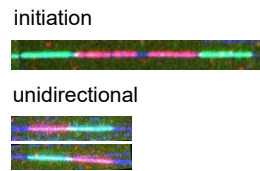
次に TAK-931 による S 期進行に対する影響を、ダブルチミジンブロックで細胞周期を同調させた HeLa 細胞を FACS で解析し検討した⁹⁴。同調からのリリース後 12 時間の時点で、(DMSO を処理した) 対照細胞はすでに次の G1 期に入っているのに対して、TAK-931 を処理した細胞では S 期後期から G2 期での細胞の蓄積が認められた (図表 3-3A)。DNA 合成を検出する BrdU 取り込み試験を実施すると TAK-931 を処理した HeLa 細胞は S 期後期から G2 期に細胞が蓄積していることが示された (図表 3-3B)。これらの結果より、TAK-931 は DNA 複製フォークの開始を完全には抑制できず、また活動している少数の DNA 複製フォークのスピードは速めるが、全体としては S 期進行を遅延させることで S 期後期から G2 期での細胞の蓄積を誘導していると考えられた。

TAK-931 処理 24 時間後では、WB によって RS のマーカーであるユビキチン化 FANCD2 および S/G2 期のマーカーである cyclin B1 の蓄積が認められた (図表 3-3C)。また免疫蛍光染色を実施したところ、TAK-931 を処理した HeLa 細胞では、DNA SSBs のマーカーである FANCD2 のフォーサイフォーメーションを有する細胞が増加したが、DSBs のマーカーである 53BP1 の

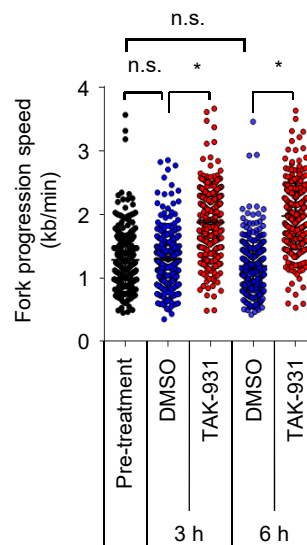
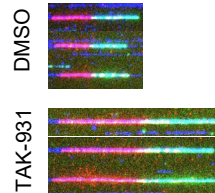
A



B



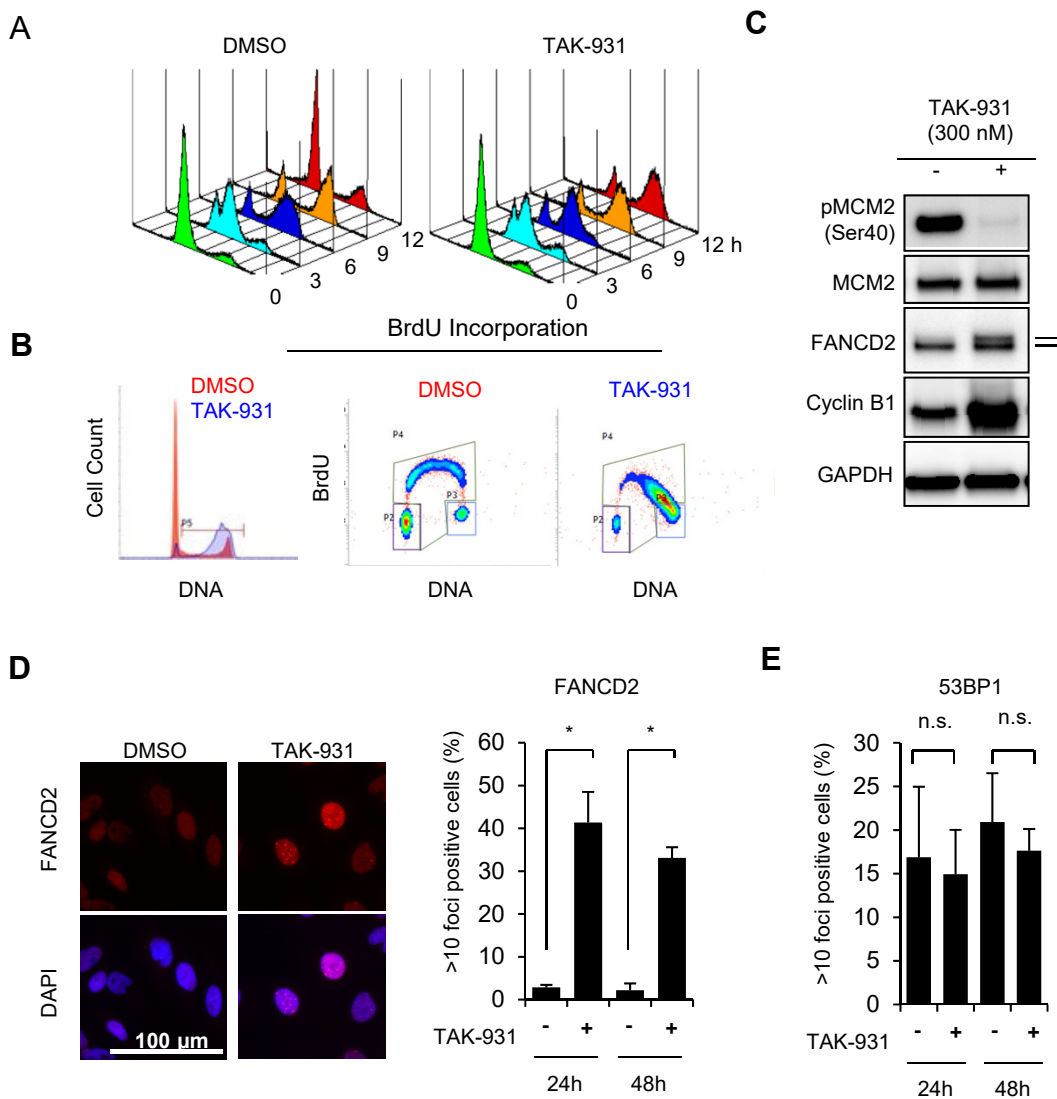
C



図表3-2 HeLa細胞においてTAK-931がDNA複製フォークに与える影響

(A) DNAファイバー試験の実験スキーム。TAK-931を処理したHeLa細胞にCldUおよびIdUにそれぞれ30分間処理して取り込ませ、細胞から回収したDNAを用いてDNAファイバー試験を実施した。

(B) TAK-931のDNA複製開始に及ぼす影響。代表的な図を示した。(C) TAK-931の複製フォーク進行に及ぼす影響。代表的な図を示した。データは、平均±SDで表す (n=3)。統計処理は、unpaired Student's t-testで実施した。



図表3-3 HeLa細胞においてTAK-931によって誘導されるRS

(A) TAK-931はS期の進行を遅らせる。ダブルチミジンブロックによって細胞周期を同調させた細胞にTAK-931を処理し、時間経過ごとの細胞周期をFACSを用いて解析した。(B) TAK-931はDNA合成を抑制する。TAK-931を24時間処理し、最後の30分間BrdUをさらに処理した細胞を回収し、FACSで解析した。(C) TAK-931はRSを誘導する。TAK-931を24時間処理したHeLa細胞の細胞ライセートをWBで解析した。(D) (E) TAK-931はSSBsを誘導する。TAK-931を24時間および48時間処理したHeLa細胞を免疫蛍光染色で解析した。代表的な図を示す。データは、平均 \pm SDで表す(n=3)。統計処理は、unpaired Student's t-testで実施した。

フォーサイフォーメーションを有する細胞は増加しなかった (図表 3-3D)。これらの結果から TAK-931 は SSBs を誘導する RS を伴う S 期の進行遅延を引き起こすことが明らかになった。

3.2.4 TAK-931 によって誘導された RS は中心体の過剰複製を引き起こす

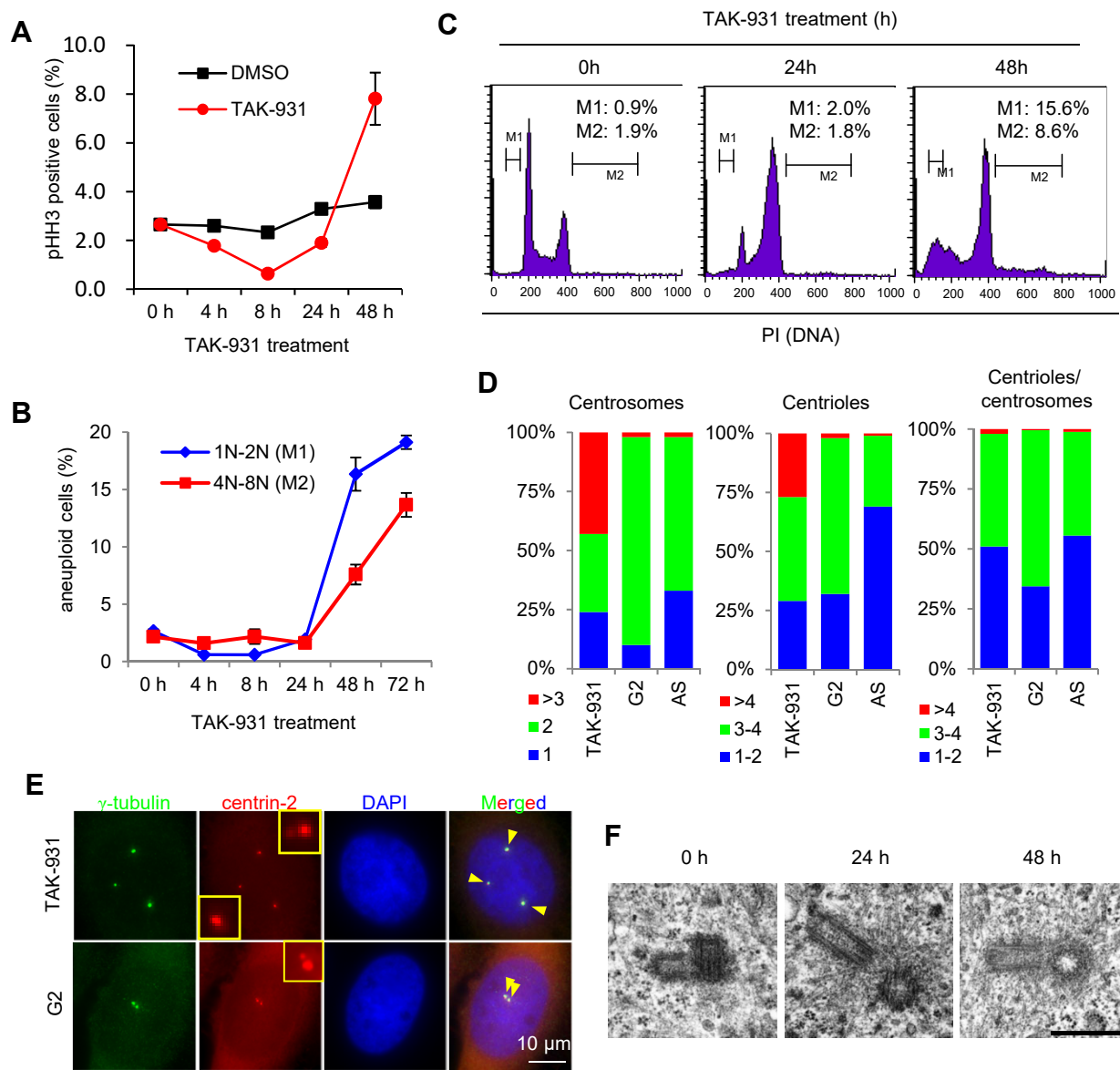
TAK-931 によって、その後どのような細胞死が誘導されるのかを検討した。M 期のマーカーである histone H3 Ser10 のリン酸化 (pHH3) を用いた時間依存的な細胞周期解析を実施した結果、TAK-931 を処理した細胞の pHH3 陽性細胞数は時間経過とともに徐々に減少し、これは S 期進行の遅延を表していると考えられた。その後、24 時間から 48 時間にかけて pHH3 陽性細胞の数は増加した (図表 3-4A)。この結果から TAK-931 による S/G2 期での停止から脱出した細胞は、次に異常な M 期が誘導され M 期延長が引き起こされている可能性が示唆された。また同時に、DNA 数が 1N から 2N (M1) または 4N から 8N (M2) の細胞が 24 時間以降で増加していることが明らかになり、染色体の分離異常によって異数体が誘導されていることが示唆された (図表 3-4B)。

染色体の分離異常は中心体の異常と密接にかかわっていることから、TAK-931 を処理した HeLa 細胞の中心体の数、局在および形態について検討した。中心小体のマーカーである centrin-2 (RFP タグ融合) を安定発現した HeLa 細胞を使用して中心体および中心小体の顕微鏡観察を実施した。対照として、細胞周期を同調していない HeLa 細胞 (AS 細胞) および G2 期で同調した HeLa 細胞 (G2 細胞) を使用した。中心体のマーカーである γ -tubulin の免疫蛍光染色を実施したところ TAK-931 を処理した細胞において中心体が 3 以上の細胞の割合が優位増加していた (図表 3-4D および E)。さらに中心小体の数も TAK-931 を処理した細胞では増加していた。4 つ以上の中心小体がある細胞は TAK-931 処理細胞では 27% だったのに対し、G2 細胞および AS 細胞ではそれぞれ 2% および 1% であった。しかし、TAK-931 処理において中心体ごとの中心小体の数の増加は、ほとんど認められず AS 細胞とほぼ同数であった。また電子顕微鏡による中心小体の形態異常についても確認できなかった (図表 3-4F)。これらの結果は TAK-931 によって中心体の過剰複製を伴った M 期の異常が誘導され、その結果がん細胞に増殖抑制効果を示していることが示唆された。

3.2.5 TAK-931 による増殖および DNA 複製に対する影響には多様性がある

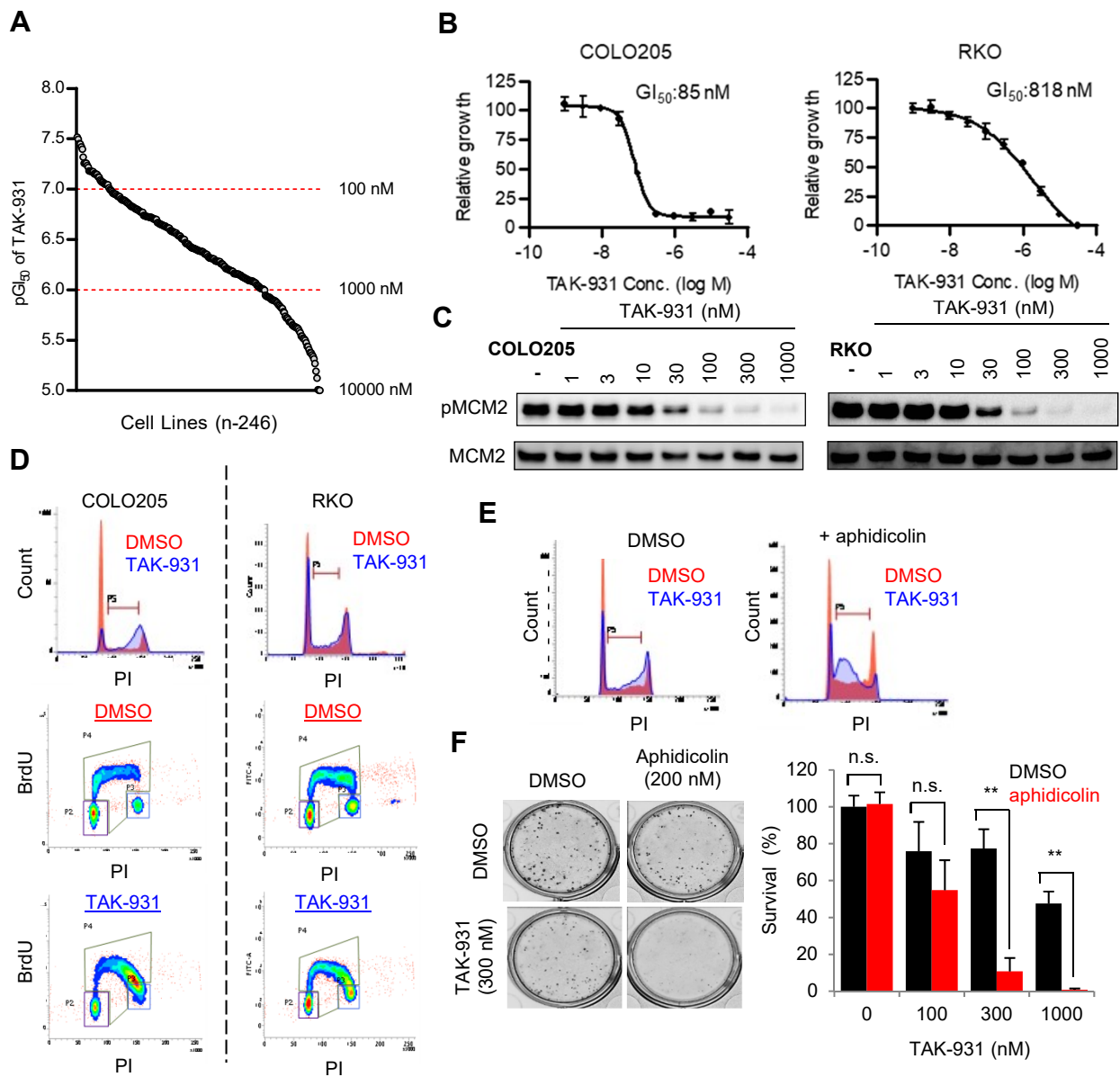
TAK-931 による増殖阻害効果の普遍性および抗がん剤としての有用性を検証するために、245 種のがん細胞株および 1 種の正常細胞株、合計 246 細胞株に対する増殖阻害パネル試験を実施した (図表 3-5A)。TAK-931 は細胞株間で幅広い増殖阻害活性を示し、GI₅₀ 値は 30.2 nM から 10 μ M 以上であった (中央値は 407.4 nM)。GI₅₀ 値が 100 nM 以下の細胞株が 33 細胞株、100 から 1000 nM が 156 細胞株、1000 nM 以上が 57 細胞株であった。

TAK-931 に対して比較的感受性が高い COLO205 大腸がん細胞株 (GI₅₀ 値 85 nM) と感受性が低い RKO 大腸がん細胞株 (GI₅₀ 値 818 nM) を用いて、TAK-931 が pMCM2 および S 期進行に及ぼす影響を検討した (図表 3-5B)。pMCM2 阻害の阻害濃度域は RKO と COLO205 で同等



図表3-4 TAK-931はHeLa細胞に中心体の過剰複製を誘導する

(A) (B) (C) TAK-931の長時間処理はM期の蓄積および異数体を誘導する。HeLa細胞にTAK-931を処理し、FACSを用いて細胞周期を解析した。M期 (pHH3陽性) 細胞数およびM1/M2の異数体細胞数の割合を解析した。データは、平均 \pm SDで表す (n=3)。 (D) (E) TAK-931は中心体数が3以上の細胞数を増やす。Centrin-2-RFPを発現させたHeLa細胞にTAK-931を24時間処理し、免疫蛍光染色で解析した。中心体 (Centrosome、 γ -tubulin) および中心小体 (Centriole、centrin-2) 数をカウントした。G2細胞はダブルチミジンブロックからリリース後、7時間経過した細胞を用いた。代表的な図を示す。 (F) TAK-931を処理したHeLa細胞の中心小体。TAK-931を処理したHeLa細胞を電子顕微鏡で解析した。



図表3-5 TAK-931は細胞株コンテキストに依存した増殖阻害作用およびDNA複製抑制作用を及ぼす
 (A) TAK-931の246細胞に対する増殖阻害活性。増殖阻害パネル試験のpGI₅₀ (-log₁₀GI₅₀) 値を感受性順に示した。(B) TAK-931のCOLO205およびRKOに対する増殖阻害作用。平均±SDで表す (n=3) (C) TAK-931のCOLO205およびRKOに対するpMCM2抑制作用。細胞株にTAK-931を4時間処理し、細胞ライセートをWBで解析した。(D) TAK-931のCOLO205およびRKOに対するS期停滞作用。TAK-931を24時間処理し、最後の30分間BrdUをさらに処理した細胞を回収し、FACSで解析した。(E) 低RSとTAK-931はRKO細胞にS期停滞を引き起こす。Aphidicolin 200 nMをTAK-931と24時間共処理したRKO細胞を回収し、FACSで細胞周期を解析した。(F) 低RSとTAK-931はRKO細胞の増殖を抑制する。RKO細胞にAphidicolin 200 nMとTAK-931を処理し、コロニーフォーメーションアッセイで増殖を評価した。データは、平均±SDで表す (n=3)。統計解析は、unpaired Student's t-testを実施した。

であったが、RKO 細胞では COLO205 細胞と比較して TAK-931 による S 期停滞が軽度であった (図表 3-5C および D)。次に DNA polymerase 阻害剤である Aphidicolin を低濃度 (200 nM) で処理し、低いレベルの RS をかけられた状態の RKO 細胞に対して、TAK-931 がどのように作用するのかを検討した。TAK-931 単独では RKO 細胞の S 期進行に軽度な影響しか及ぼさないが、TAK-931 と Aphidicolin を併用して処理すると S 期の顕著な遅延を誘導した (図表 3-5E)。さらに、低濃度の Aphidicolin 処理は RKO 細胞における TAK-931 の増殖阻害効果を顕著に増加させた (図表 3-5F)。これらの結果は、低感受性株に対しては TAK-931 単独では十分な RS を誘導できないことを示唆しており、細胞株によって TAK-931 による RS に多様性があることを示唆している。

3.2.6 正常細胞およびほかのがん細胞に対する TAK-931 の影響

続いて他のがん細胞株および正常細胞株に対する TAK-931 の効果を検討した。S 期の遅延は SW948 大腸がん細胞株、PACN1 すい臓がん細胞株でも認められたが、正常細胞株に対する TAK-931 の S 期遅延効果は比較的緩やかであり (図表 3-6A)、過去の siRNA での報告と一致していた⁹⁵。WB の結果、TAK-931 は正常細胞株である MRC5 に対して COLO205 と同様に S/G2 期マーカー (cyclin B1、リン酸化 CDC2) および S/G2 チェックポイント活性化マーカー (リン酸化 Chk1) を上昇させたが、DNA 損傷マーカーである γ H2A.X やアポトーシスマーカーである切断型 PARP1 は誘導しなかった (図表 3-6B)。また TAK-931 は正常細胞株に対しては、COLO205 や HeLa と比較して弱い増殖阻害効果を示した (図表 3-6C)。

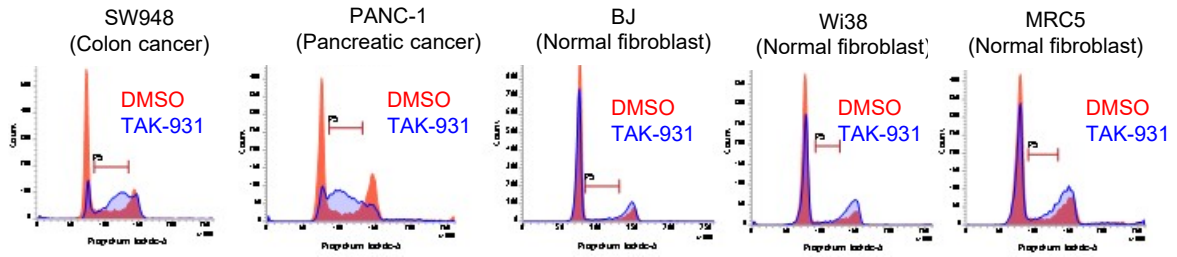
3.2.7 TAK-931 による増殖阻害効果は ATR 経路を介している

TAK-931 による増殖阻害が RS によって引き起こされているのかを検討するために ATR 阻害剤 (VE-821) によるレスキュー試験を実施した⁹⁶。ATR は DNA 複製フォークの停滞などの異常な DNA 複製をモニターする S 期チェックポイントの中心タンパクであり、ATR 阻害は TAK-931 によって誘導される RS に関連したシグナル伝達を抑制させることが期待される。VE-821 は COLO205 細胞における TAK-931 の増殖阻害効果を顕著に減弱させ (図表 3-7A)、SW948 および PANC1 細胞での TAK-931 による S 期停滞作用も減弱させた (図表 3-7B)。さらに TAK-931 による作用における ATR 経路の関与を確認するために、TAK-931 の ATR hypomorphic 変異 (A2101G/A2101G)⁹⁷ および CHK1 変異 (S317/-) DLD1 大腸がん細胞株における増殖阻害作用を親株と検討した。その結果、ATR hypomorphic 変異体および CHK1 変異体の両株とも親株と比較して TAK-931 による増殖阻害作用は低下した (図表 3-7C)。この結果は、ATR を介した RS が TAK-931 による増殖阻害作用における重要なイベントであることを示している。

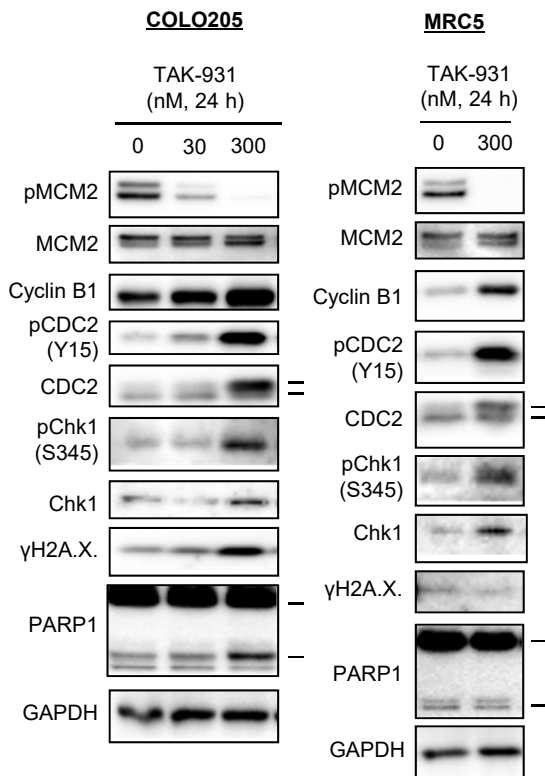
3.2.8 バイオインフォマティクス解析

続いて 3.2.5 で実施した 256 細胞株に対する増殖阻害試験の結果をバイオインフォマティクス解析した。最初に細胞株の増殖速度および病理学的な分類と GI₅₀ 値の相関を検討したが、ど

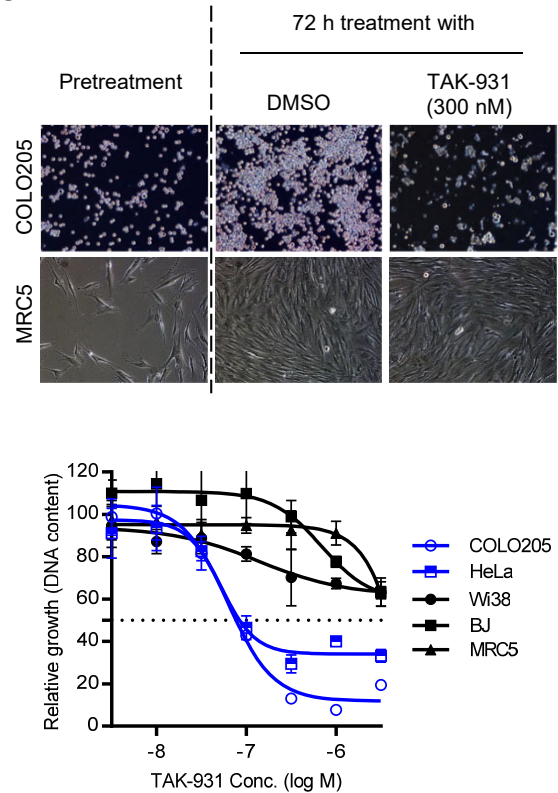
A



B

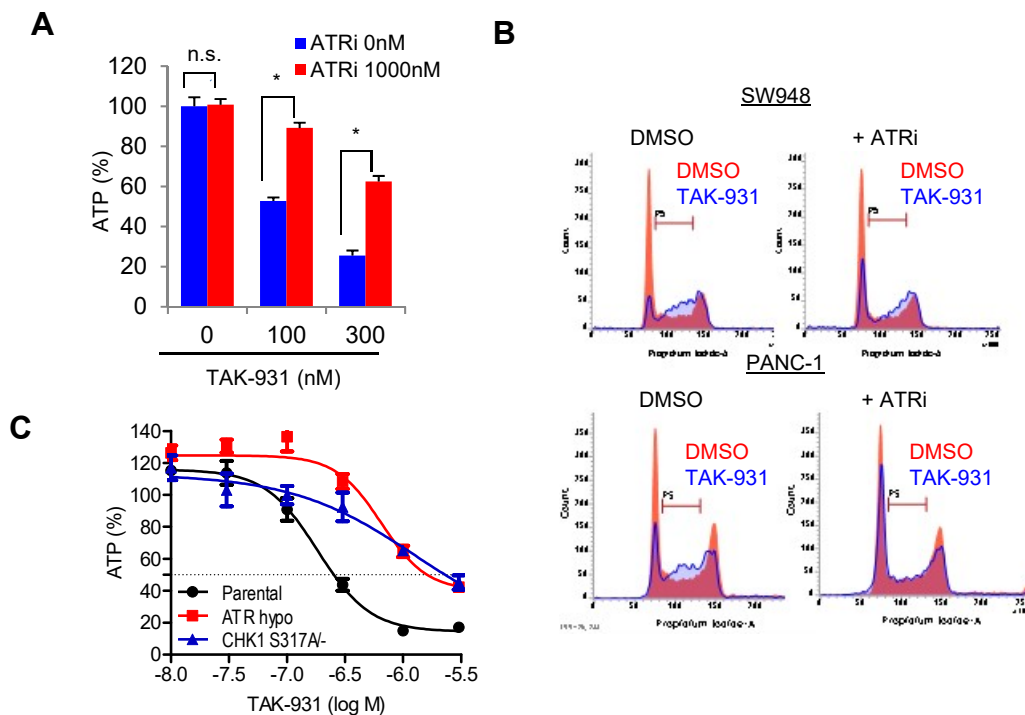


C



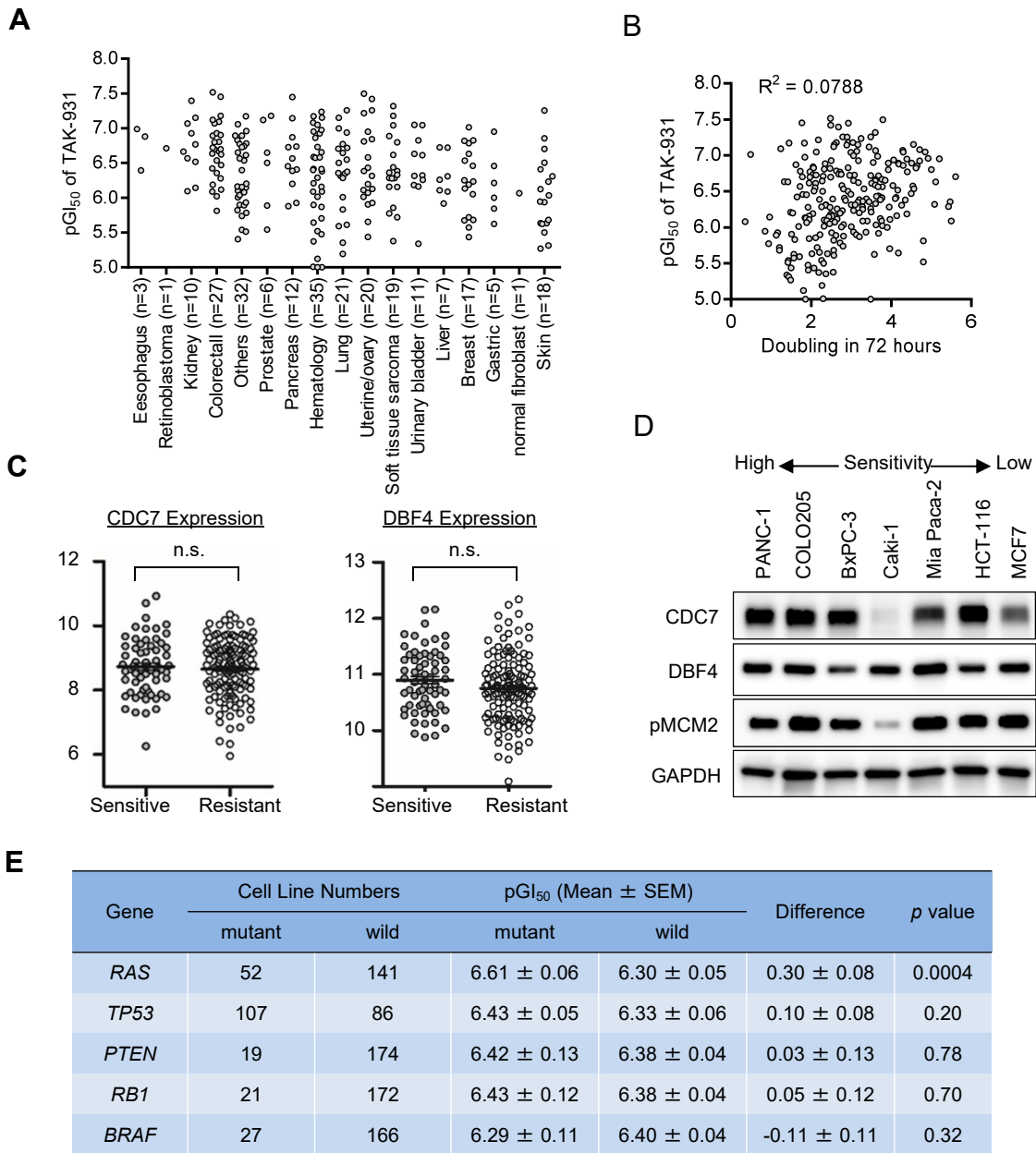
図表3-6 正常細胞に対するTAK-931の影響

(A) TAK-931は正常細胞に対し緩やかなS期停滞を引き起こす。TAK-931を24時間処理した細胞を回収し、FACSで細胞周期を解析した。(B) 正常細胞株MRC5およびCOLO205に対するTAK-931の影響。細胞株にTAK-931を24時間処理し、細胞ライセートをWBで解析した。(C) 正常細胞株に対するTAK-931の増殖阻害活性。細胞株にTAK-931を72時間処理し、細胞増殖をDNA量を指標に評価した。TAK-931処理72時間後のCOLO205およびMRC5の画像も示す。データは、平均±SDで表す (n=3)。



図表3-7 TAK-931はATRを介した増殖阻害、S期停滞誘導作用を引き起こす

(A) ATR阻害剤によるTAK-931の増殖阻害効果のキャンセル。COLO205細胞にATR阻害剤およびTAK-931を共処理し、72時間後に増殖阻害活性をATP量を指標として解析した。データは、平均±SDで表す (n=3)。統計解析は、unpaired Student's t-testを実施した。(B) ATR阻害剤によるTAK-931のS期停滞誘導作用のキャンセル。SW948細胞およびPANC1細胞に、ATR阻害剤およびTAK-931を24時間共処理し、FACSを用いて細胞周期を解析した。(C) ATR、CHK1遺伝子変異によるTAK-931の増殖阻害効果のキャンセル。DLD1 ATR変異株 (A2107G/A2107G)、DLD1 CHK1変異株 (S317A/-)、およびDLD1親株にTAK-931を72時間処理し増殖阻害活性をATP量を指標として解析した。データは、平均±SDで表す (n=3)。



図表3-8 増殖阻害パネル試験のバイオインフォマティクス解析

(A) TAK-931の246細胞株に対する増殖阻害pGI₅₀値。灰色の円が個々の細胞を示す。細胞を由来組織および疾患によって分類した。(B) 細胞の増殖速度とTAK-931の増殖阻害活性との関係。

(C) CDC7およびDBF4のmRNA量とTAK-931感受性の関係。TAK-931高感受性株(上位1/3、82細胞株)と低感受性株(残り2/3、164細胞株)のCDC7およびDBF4発現量を比較した。発現量はCCLEより入手した。統計解析は、unpaired Student's t-testを実施した。(D) CDC7およびDBF4のタンパク量とTAK-931感受性の関係。7細胞株のライセートをWBで解析した。(E) がん遺伝子の変異とTAK-931感受性の関係。がん遺伝子(KRAS、NRAS、HRAS、TP53、PTEN、RB1、BRAF)の変異はCCLEより入手した。RASはKRAS、NRAS、HRASのいずれかの変異を有する細胞株。変異を有する細胞株のpGI₅₀値と野生型の細胞株のpGI₅₀値を比較した。統計解析は、unpaired Student's t-testを実施した。

ちらも優位な相関は認められなかった (図表 3-8A および B)。また細胞株の CDC7 および DBF4 の発現と TAK-931 に対する感受性の相関を検討したが、mRNA 量およびタンパク量とも TAK-931 の感受性との明確な相関は認められなかった (図表 3-8C および D)。

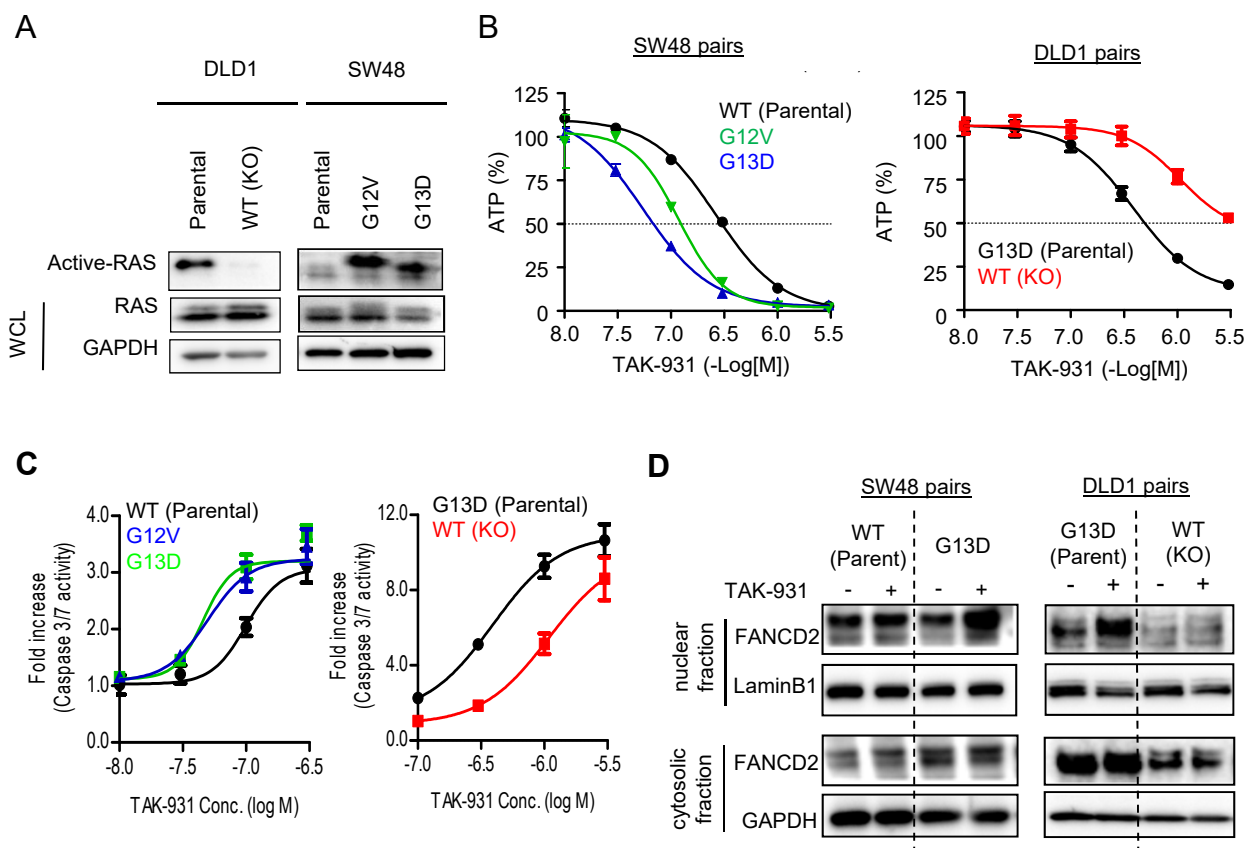
そこで次のがん遺伝子の変異が TAK-931 の増殖阻害活性に及ぼす影響を検討した。RAS 変異株細胞株群 (KRAS 変異株、HRAS 変異、NRAS 変異株) の GI₅₀ 値は RAS 野生型細胞株群の GI₅₀ 値に比べて優位に低かった (p 値 0.0004) が、BRAF (p 値 0.323)、PTEN (p 値 0.775)、RB1 (p 値=0.702)、TP53 (p 値=0.203) 変異では統計的優位な相関は認められなかった (図表 3-8E)。

3.2.9 KRAS 変異は細胞の TAK-931 に対する感受性を亢進する

RAS ファミリー変異の TAK-931 に対する感受性への影響を確認するために、2 種類の KRAS の isogenic 細胞株を用いて検討した。(1) KRAS が野生型である SW48 大腸がん細胞株に変異 KRAS (G12V または G12D) を導入した isogenic 細胞および (2) KRAS が変異型 (G13D) である DLD1 細胞の変異 KRAS allele を除去した isogenic 細胞 (WT [KO]) を用いた。細胞内の活性化状態の Ras の量を Raf-1 の Ras-binding domain を用いた免疫沈降によって検討すると、それぞれの活性化 RAS タンパク量が増加していることが確認された (図表 3-9A)。SW48 および DLD1 の両方の isogenic ペア細胞において、TAK-931 は KRAS 変異を有する細胞に対してより強い増殖阻害効果および強い Caspase3/7 活性化効果を示した (図表 3-B および C)。WB を実施したところ、両細胞株ペアにおいて TAK-931 による核内の FANCD2 タンパク量の増加は KRAS 変異株のほうが高いことが明らかになった (図表 3-9D)。これらの結果より KRAS 変異株において TAK-931 はより高い RS を誘導すること、またそれが KRAS 変異株に対して強い増殖阻害効果を示すメカニズムである可能性が考えられた。

3.2.10 TAK-931 の増殖阻害プロファイルと既存化学療法剤との比較

TAK-931 の増殖阻害プロファイルをほかの化学療法剤の増殖阻害プロファイルと比較した。比較対象として、白金製剤 (Cisplatin、Carboplatin、Oxaliplatin)、トポイソメラーゼ阻害剤 (SN-38 および Doxorubicin)、代謝拮抗薬 (Gemcitabine、Methotrexate)、チューブリン阻害剤 (Paclitaxel) を用いた。これらの in vitro での増殖阻害 IC₅₀ 値は Eurofins Panlabs, Inc. より入手した。それぞれの細胞に対する TAK-931 の増殖阻害 IC₅₀ 値とほかの化学療法剤の増殖阻害 IC₅₀ 値の相関を検討した (図表 3-10A および B)。Carboplatin と Cisplatin との間での R 値は 0.72 であり、同じクラスの化学療法剤の増殖阻害プロファイルは高い相関を示した (図表 3-9B)。TAK-931 は、Doxorubicin (R 値 0.51) または Oxaliplatin (R 値 0.47) と中程度の相関を示したが、ほかの化学療法剤との相関は比較的低かった (R 値 0.2 から 0.4)。さらに、TAK-931 とは違い、RAS 変異を有する細胞株への強い増殖阻害作用は Doxorubicin および Cisplatin では認められなかった (図表 3-10C)。これらの結果は、TAK-931 が、抗がん剤候補として既存の化学療法剤とは違ったユニークな増殖阻害プロファイルを有することを示している。



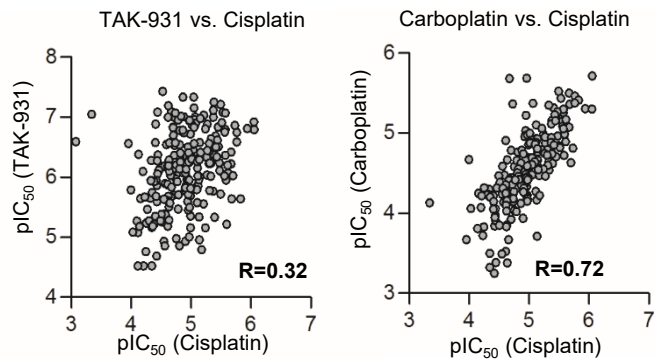
図表3-9 TAK-931はKRAS変異を有する細胞に強い増殖阻害活性を発揮する

(A) KRAS遺伝子isogenic細胞株の活性化RAS量。各isogenic細胞株の活性化RASをGSTタグが結合したRaf1 Ras-binding domainによる免疫沈降で回収し、WBで検出した。Active Ras Detection kitを用いた。(B) KRAS遺伝子isogenic細胞に対するTAK-931の増殖阻害。SW48 KRAS G12V変異株、SW48 KRAS G13D変異株とSW48親株、DLD1 WT (KO)株およびDLD1親株にTAK-931を72時間処理し増殖阻害活性をATP量を指標として解析した。データは、平均±SDで表す (n=3)。(C) KRAS遺伝子isogenic細胞に対するTAK-931のCaspase-3/7活性化効果。SW48 KRAS G12V変異株、SW48 KRAS G13D変異株とSW48親株、DLD1 WT (KO)株およびDLD1親株にTAK-931を48時間処理しCaspase-3/7活性を解析した。データは、平均±SDで表す (n=3)。(D) TAK-931によるRSにKRAS遺伝子変異が及ぼす影響。SW48 KRAS G12V変異株、SW48 KRAS G13D変異株とSW48親株、DLD1 WT (KO)株およびDLD1親株にTAK-931を24時間処理し、回収した細胞ライセートを分画して、WBで解析した。

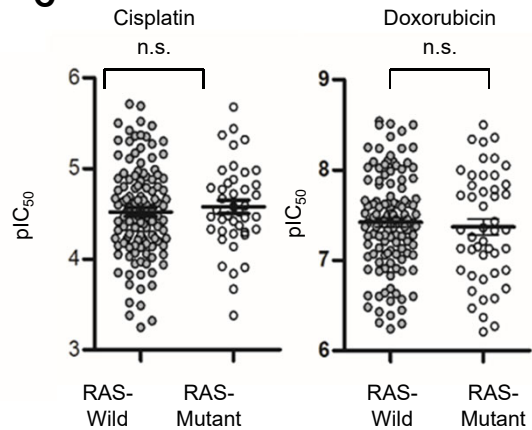
A

	TAK-931	Doxorubicin	Oxaliplatin	SN-38	Carboplatin	Paclitaxel	Cisplatin	Gemcitabine	Methotrexate
TAK-931	-	0.51	0.47	0.36	0.35	0.33	0.32	0.29	0.28
Doxorubicin	0.51	-	0.56	0.53	0.45	0.65	0.50	0.36	0.37
Oxaliplatin	0.47	0.56	-	0.45	0.46	0.33	0.46	0.22	0.41
SN-38	0.36	0.53	0.45	-	0.41	0.35	0.41	0.28	0.38
Carboplatin	0.35	0.45	0.46	0.41	-	0.21	0.72	0.34	0.30
Paclitaxel	0.33	0.65	0.33	0.35	0.21	-	0.28	0.13	0.15
Cisplatin	0.32	0.50	0.46	0.41	0.34	0.13	-	0.45	0.37
Gemcitabine	0.29	0.36	0.22	0.28	0.34	0.13	0.45	-	0.20
Methotrexate	0.28	0.37	0.41	0.38	0.30	0.15	0.37	0.20	-

B



C



図表3-10 TAK-931と化学療法剤との増殖阻害プロファイルの比較

(A) TAK-931と化学療法剤の増殖阻害プロファイルの比較。TAK-931の IC_{50} 値を化学療法剤の IC_{50} 値と比較した。相関係数を示した。(B) TAK-931とCisplatinおよびCarboplatinとCisplatinの比較。灰色の円が個々の細胞を示す。相関係数も表示した。(C) RAS変異がCisplatinおよびDoxorubicinの感受性に及ぼす影響。変異を有する細胞株の pIC_{50} 値と野生型の細胞株の pIC_{50} 値を比較した。統計解析は、unpaired Student's t-testを実施した。

3.2.11 TAK-931 の PD 試験および薬効試験

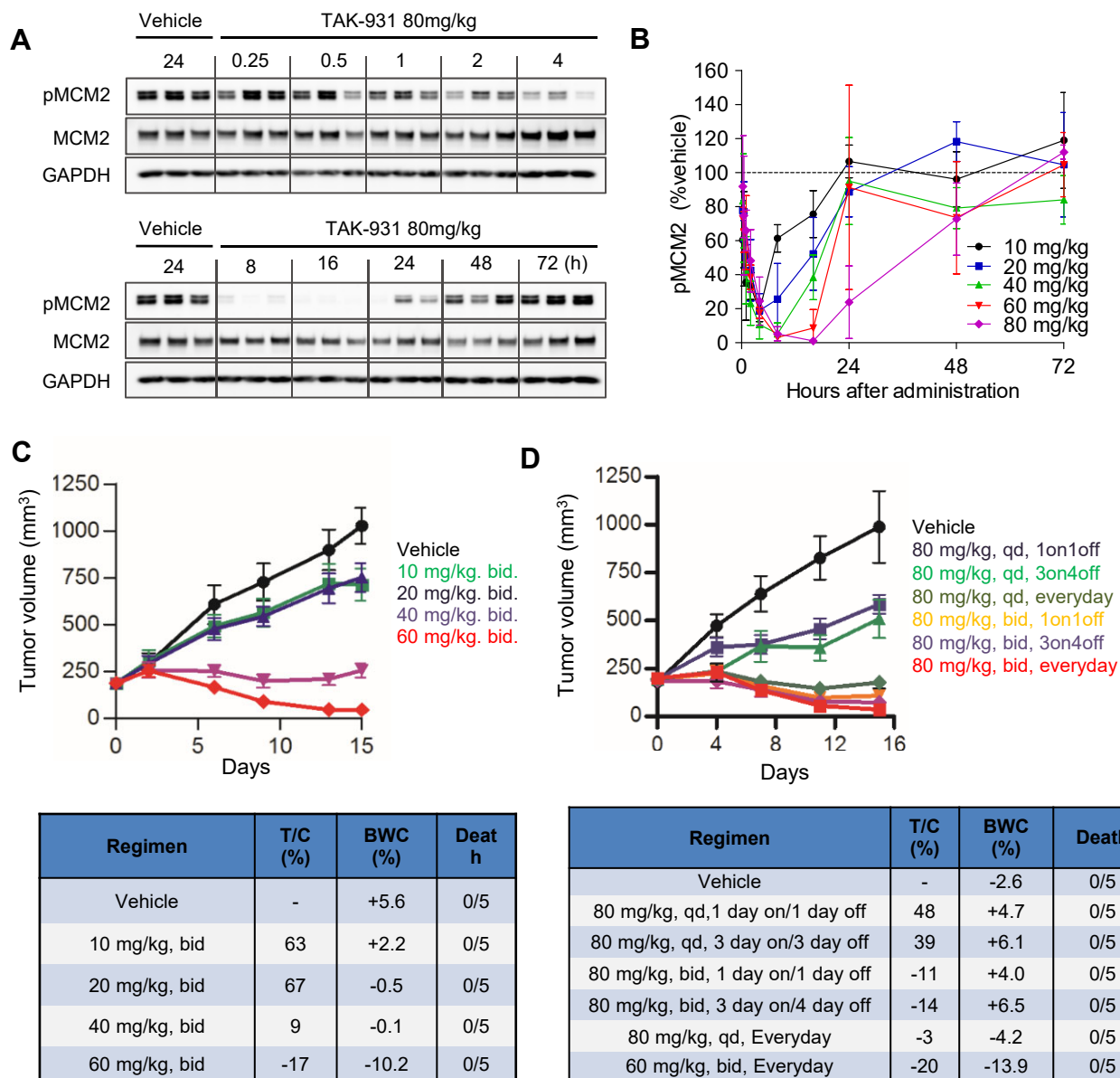
続いて TAK-931 を動物モデルで評価した。TAK-931 に対して比較的感受性が高い COLO205 細胞株のゼノグラフトモデルを用いて、TAK-931 の PD 試験および抗腫瘍試験を実施した。TAK-931 は経口投与で COLO205 ゼノグラフト腫瘍担癌マウスに投与した。80 mg/kg の TAK-931 を投与後、pMCM2 は 8 から 24 時間にかけて減少し、48 時間後には回復することが明らかになった。また用量および時間依存性を調べた結果、TAK-931 は用量および時間依存的に pMCM2 を減少させることが明らかになった (図表 3-11A および B)。

次に COLO205 ゼノグラフトモデルにおける TAK-931 の抗腫瘍試験を実施した。TAK-931 を 1 日 2 回、2 週間、担がんマウスに投与した結果、TAK-931 は深刻な体重減少を引き起こすことなく、用量依存的に抗腫瘍効果を発揮した。また休薬期間をいれた間欠投与での連投試験においても TAK-931 は顕著な抗腫瘍効果を発揮し、TAK-931 の投与レジメンに依存しない抗腫瘍効果が示された (図表 3-11C および D)。

3.2.12 PDX モデルに対する TAK-931 の抗腫瘍試験

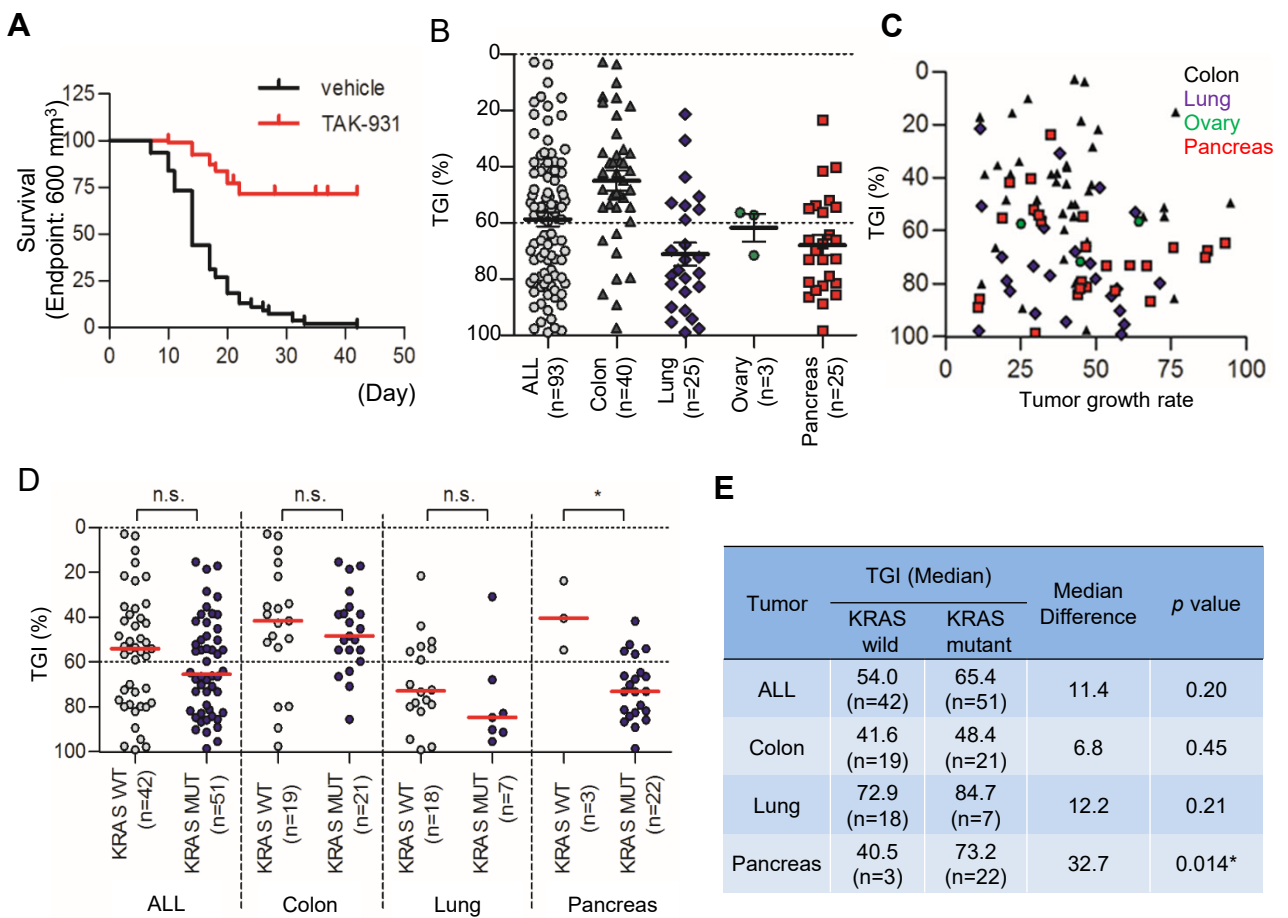
最後に前臨床第二相様試験と名付けられた 93 種の PDX モデル (大腸がん 40 モデル、肺がん 25 モデル、卵巣がん 3 モデル、すい臓がん 25 モデル) に対する TAK-931 の薬効試験を実施した。TAK-931 を 60 mg/kg で 1 日 2 回、3 日間投与 4 日間休薬を 1 サイクルとして、3 から 5 サイクルの投与を実施した。前臨床 Kaplan-Meier 生存解析は、腫瘍体積が 600 mm³ になった時点を死亡の代替エンドポイントとして実施した。生存解析の結果、TAK-931 投与は生存を統計学的優位に改善した (Hazard Ratio : 0.13、95%信頼区間 : 0.09-0.20、*p* 値 0.0001) (図表 3-12A)。また 93 モデル中 43 モデル (46.2%) において抗腫瘍効果が認められた (%TGI 60%以下)。%TGI の中央値は全モデルでは 56.5%、大腸がんでは 43.8%、肺がんでは 76.8%、卵巣がんでは 57.4%、すい臓がんでは 70.1%であった。*In vitro* での増殖阻害パネル試験の結果と同様に、PDX モデル腫瘍の増殖速度と抗腫瘍効果 (%TGI) に相関は認められなかった (*R*² 値 0.01831) (図表 3-12B および C)。

PDX モデルには 42 モデルの *KRAS* 野生型腫瘍と 51 モデルの *KRAS* 変異型腫瘍が含まれていた。*KRAS* 野生型腫瘍と *KRAS* 変異型腫瘍に対する TAK-931 の抗腫瘍活性を比較した。大腸がんおよび肺がんにおいては %TGI 値に統計的な有意差はなかったが、すい臓がんにおいては *KRAS* 変異型すい臓がん PDX に対して強い抗腫瘍活性を示した。すい臓がん PDX モデルの大部分 (25 モデル中 22 モデル) は *KRAS* 変異型であり、これはすい臓がん患者の大多数が *KRAS* 変異を有することと一致している。パラメトリック検定である Student's *t*-test およびノンパラメトリック検定である Wilcoxon-Mann-Whitney test の両方において統計学的優位に *KRAS* 変異型すい臓がん PDX モデルは *KRAS* 野生型 PDX よりも TAK-931 に対する感受性が高いこと示された (図表 3-12D および E)。 *KRAS* のステータスがすい臓がん PDX において TAK-931 感受性と相関することが示されたが、*KRAS* 変異の TAK-931 感受性への寄与に関してより強い確証を



図表3-11 TAK-931のCOLO205ゼノグラフトモデルにおける抗腫瘍効果

(A) (B) COLO205ゼノグラフト腫瘍におけるTAK-931のPD効果。担がんマウスにTAK-931の単回経口投与し、回収した腫瘍から抽出したサンプルのpMCM2をWBで解析した。データは、平均±SDで表す (n=3)。 (C) (D) COLO205ゼノグラフト腫瘍におけるTAK-931の抗腫瘍効果。T-025は図表中に示された用量およびレジメンで経口投与した。データは、平均±SEMで表す (n=5)。



図表3-12 TAK-931の前臨床臨床第二相様試験

(A) TAK-931によるPDX担がんマウスの生存改善。93種のPDXモデルに対してTAK-931の抗腫瘍効果を検討した。TAK-931は60 mg/kgの用量で1日2回、3日間投与4日間休薬のサイクルで投薬を行った。600 mm³を死亡の代替エンドポイントとした際のカプランマイヤー生存曲線を示す。

(B) TAK-931のがん種ごとの抗腫瘍効果。%TGI値をがん種ごとに分類し表示した。(C) TAK-931の抗腫瘍効果と腫瘍増殖速度。PDXモデルの腫瘍増殖速度とTAK-931による%TGIを表示した。

(D) (E) KRAS遺伝子変異がTAK-931の抗腫瘍効果に及ぼす影響。%TGI値をがん種およびKRAS変異の有無で分類し表示した。統計解析は、Wilcoxon-Mann-Whitney testを実施した。

得るにはさらなる試験が必要である。

3.3 考察

TAK-931 による増殖阻害効果の分子メカニズム

本研究において TAK-931 が他の化学療法剤とは異なった増殖阻害プロファイルを有することが明らかになった。この TAK-931 の増殖阻害プロファイルは、TAK-931 がユニークな増殖阻害メカニズムを有しているに基づくと考えられる。TAK-931 は S 期進行遅延および RS を誘導し、HeLa 細胞においては TAK-931 は中心体の過剰複製および M 期の異常を誘導し細胞増殖を阻害していた。染色体の不安定性が引き起こされるのを防ぐために、中心体複製は DNA 複製と同様に 1 回の細胞周期において 1 回の複製しか起こらないよう厳密に制御されている⁹⁸。近年の報告から DNA 複製に関わる因子、例えば ORC1、MCM5、geminin、CDC6 などが中心体の複製にも関与していることが明らかになっている⁹⁹⁻¹⁰⁴。これら複製に関わる因子に加え、CDC7 のキナーゼ活性も中心体複製と DNA 複製の両方を制御している可能性が考えらる。

TAK-931 による増殖阻害効果の分子メカニズム

薬効予測または患者層別化バイオマーカーを同定することは、分子標的薬の開発において非常に重要である。本研究にて実施した *in vitro* での大規模な増殖阻害試験の結果、TAK-931 に対する感受性は疾患分類、増殖速度、CDC7 や DBF4 発現量には依存していないものの、RAS 変異を有するがん細胞株は RAS 野生型細胞株より感受性が統計学的優位に高いということが明らかになった。TAK-931 が KRAS 野生型の細胞株に比べて KRAS 変異細胞株により高い RS を誘導することは、KRAS 活性化による下流シグナルと TAK-931 が合成致死を誘導している可能性が考えられる。7,837 遺伝子に対する RNAi の作用を 398 細胞に対して調べた大規模な RNAi スクリーニング結果が最近報告された¹⁰⁵。その中で CDC7 のノックダウンと KRAS のノックダウンは類似した増殖阻害プロファイルを示すことが明らかになった (図表 3-13)。この機能欠損試験の結果は、KRAS 経路阻害に対する脆弱性と CDC7 経路阻害に対する脆弱性が緊密に関連していることを示しており、CDC7 経路の阻害が KRAS に生存を依存したがん細胞に対してより効果を発揮するという仮説を支持している。しかしながら、KRAS 経路と CDC7 経路が機能的にどのようにつながっているのかを検討するさらなる試験が必要である。

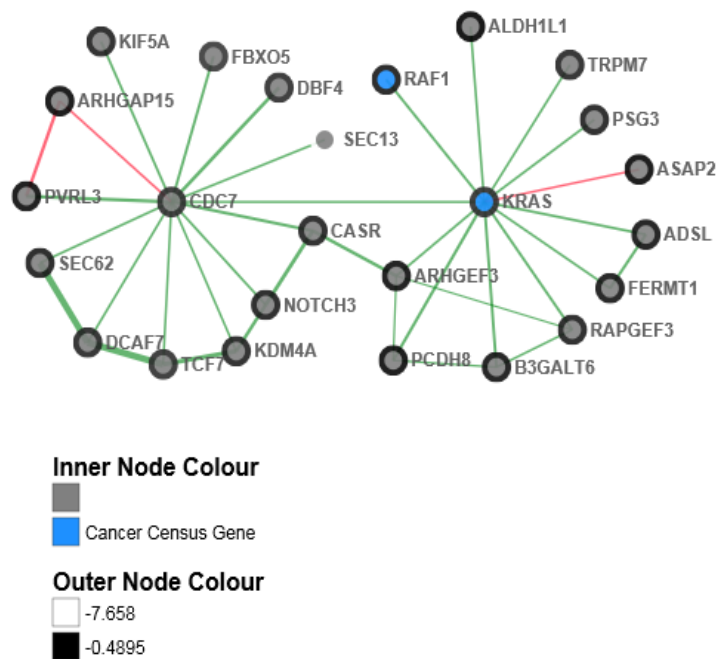
今後の研究の発展

本研究での非臨床試験において変異 RAS を有するがんが TAK-931 の標的となりうることを示されたが、いくつか明確に説明できない点が残っている。第一に RAS 変異の有無が統計学的優位に感受性と相関するが、RAS 変異が明確に感受性細胞株と非感受性細胞株を分けることができていない。第二に前臨床第二相試験の結果、KRAS 変異をもつがんに対する高い効果は、すい臓がんでは差がみられたが、肺がん、大腸がんでは差は認められなかった。これらの結果は、RAS 変異による TAK-931 への高感受性はがん細胞の背景依存していることが考えられる。今後、

A

GENESYMBOLS	Correlation
ARHGAP15	-0.30
CASR	0.35
DBF4	0.37
DCAF7	0.31
FBXO5	0.33
KDM4A	0.30
KIF5A	0.32
KRAS	0.30
NEUROD2	-0.30
NOTCH3	0.31
PVRL3	0.37
SEC13	0.30
SEC62	0.30
TCF7	0.30

B



図表3-13 CDC7ノックダウンとKRASノックダウンは類似した増殖阻害プロファイルを示す

(A) CDC7ノックダウンによる増殖阻害効果と類似する増殖阻害効果を示した遺伝子リスト。CDC7ノックダウン効果との相関が0.3以上のものを表示した。(B) CDC7ノックダウンとKRASノックダウンのパスウェイ解析の結果。正相関を緑、負相関を赤で表示した。線の太さは相関の強さを示す。Project DRIVEよりデータおよび図表を取得した。

他のがん遺伝子による RS、例えば MYC 増幅、E2F 活性化、RB1 変異、p16 欠損などによる RS⁷¹ が TAK-931 による RS 誘導にどのように関与しているのかを明らかにすることで、より明確に RAS 変異と RS、および TAK-931 感受性の関係が明らかになると考えられる。また、がん細胞がもつ内在性の RS の程度を臨床サンプルおよび PDX 腫瘍などで検出する方法を確立することで、TAK-931 がより効果を発揮する腫瘍が明確にすることが期待される。

3.4 実験材料および手法

細胞株

HeLa、COLO205、RKO、PANC1、SW948、MRC5 は ATCC より購入した。SW48 (KRAS)、DLD1 (KRAS、ATR、CHK1) の遺伝子変異株は Horizon Discovery Ltd (イギリス、ケンブリッジ) より購入した。それぞれの細胞株は推奨された培地を用いて培養した。

抗体および試薬

以下の抗体を使用した。anti-pMCM2 (EPITOMICS, Inc./Abcam、カタログ番号 3378-1)、anti-MCM2 (Santa Cruz Biotechnology、アメリカ、テキサス、カタログ番号 sc-9839)、anti-pPOLII (Millipore、カタログ番号 04-1571)、anti-POLII (Millipore、カタログ番号 05-952)、anti-Lamin B1 (Abcam、カタログ番号 ab16048)、anti-FANCD2 (Santa Cruz Biotechnology、カタログ番号 sc-20022)、pChk1 (CST、カタログ番号#2348)、anti-Chk1 (CST、カタログ番号# 2345)、anti-pCDK1 (CST、カタログ番号#9111)、anti-CDK1 (Santa Cruz Biotechnology、カタログ番号 sc-954)、anti-gH2AX (CST、カタログ番号# 2577)、anti-PARP1 (CST、カタログ番号#9542)、anti-CyclinB1 (Santa Cruz Biotechnology、カタログ番号 sc-752)、anti- γ -tubulin (Sigma-Aldrich、カタログ番号 T9026)。

TAK-931 は武田薬品において合成した。PHA767491 は KNC Laboratories Co. Ltd (日本、神戸) において合成した⁷⁷。VE-821 および Aphidicolin はそれぞれ Sigma-Aldrich および Wako Pure Chemical Corporation (日本、大阪) より購入した。

CDC7 酵素阻害試験

全長 DBF4 と共発現させた全長 CDC7 は Carna Biosciences, Inc. (神戸、日本) より購入した。CDC7/DBF4 複合体の酵素活性は Transcreener ADP Assay® (Cisbio, Inc.、アメリカ、マサチューセッツ) を用いて検出した。酵素反応は、キナーゼバッファー (20 mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid [HEPES], pH 7.5, 10 mM magnesium acetate, and 1 mM dithiothreitol) に 1.0 μ M ATP、10 μ g/mL MCM2、0.1 μ g/mL CDC7/DBF4 を添加して行った。酵素反応開始前に TAK-931 と CDC7/DBF4 を 10 分間インキュベートした。酵素反応は、ATP 添加によって開始され、90 分間室温で反応させた。IC₅₀ 値は、XLfit version 5 (ID Business Solutions Ltd、イギリス、サリー) を用いて算出した。

キナーゼ選択性試験

TAK-931 の 1000 nM における 308 キナーゼ (317 試験) に対する阻害活性は、Invitrogen の SelectScreen™ Kinase Profiling Service を利用して測定した。

WB、細胞増殖アッセイおよび Caspase-3/7 アッセイ

第 2 章に記載した手法と同様の手法で評価した。細胞増殖試験については、CyQUANT® Direct Cell Proliferation Assay kit (Thermo Fisher Scientific, Inc.) も並行して使用した。

コロニーフォーメーション試験

低密度で細胞を 12 ウェルプレートに播種し、翌日に化合物を添加した。7 日間培養後、細胞コロニーを染色した。コロニー数は GELCOUNT (Oxford Optronix Ltd., イギリス、オックスフォード) を用いて計測した。

DNA ファイバー試験

DNA ファイバー試験は、Genomic Vision (フランス、バニユー) の EasyComb サービスを利用して実施した。TAK-931 を処理した HeLa 細胞を CldU および IdU と続けてインキュベートした。その後 FiberPrep® DNA extraction kit (Genomic Vision) を用いアガロースプラグにはめ込んだ。ラベル化された DNA を含むサンプルは high-end FiberVision® scanner platform でスキャンされ、FiberStudio® を用いて画像解析した。

免疫蛍光試験

免疫蛍光染色は大橋らによって実施された方法で行った¹⁰⁶。HeLa 細胞を 4% paraformaldehyde を含む PBS で 15 分間インキュベートした後に、Triton X-100 を含むバッファーで 5 分間透過処理を行った。画像は Plan-APOCHROMAT 100× oil lens を用い Axiovert 200M microscope (Carl Zeiss、ドイツ、オーバーコッヘン) で取得した。

細胞周期の同調

細胞周期を G1/S 期で同調させるためにダブルチミジンブロックを行った。2 mM の thymidine (Sigma-Aldrich) を 16 時間細胞に処理後、thymidine を含まない培地で 8 時間培養した。その後、細胞を再び 2 mM の thymidine で 16 時間処理した。その後再び thymidine を含まない培地で培養し、それぞれの時間経過後、細胞を回収した。

FACS 解析

細胞は 70%エタノールで固定後、2% FBS、100 µg/mL RNase A (Sigma-Aldrich)、1 µg/mL Alexa Fluor® 488-conjugated pHH3 抗体 (CST、カタログ番号# 3465) を含む PBS で 30 分間インキュベートした。BrdU 取り込み試験では、固定した細胞は 1.5 N HCl、0.5 % Triton-X を含

む PBS で 30 分間インキュベートした後に FITC-conjugated BrdU 抗体 (BD BioScience、アメリカ、ニュージャージー、カタログ番号 556028)。洗浄後、細胞は 50 µg/mL propidium iodide (Sigma-Aldrich) とインキュベートした。1 万個の細胞を FACSCalibur™ flow cytometer (Becton-Dickinson、アメリカ、ニュージャージー) で解析した。

電子顕微鏡観察

電子顕微鏡観察は Tokai Electron Microscopy, Inc. (日本、愛知) で実施した。サンプルは、2% paraformaldehyde、2% glutaraldehyde を含む 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4) および 2% osmium tetroxide で固定した。固定したサンプルはエタノール (50、70、90、100%) で脱水し、その後、resin (Quetol-812; Nisshin EM CO.、日本、東京) にトランスファーして 60°C で重合させた。ブロックは ultramicrotome (ULTRACUT UCT; Leica) を用いて 70 nm に切断し、2% uranyl acetate、lead stain solution (Sigma-Aldrich) で染色した。サンプルは 80 kV で transmission electron microscope (JEM-1400Plus; JEOL Ltd.、日本、東京) を用いて観察した。電子画像は CCD camera (VRLRTA; Olympus Soft Imaging Solution GmbH、日本、東京) で撮影した。

増殖阻害パネル試験

増殖阻害パネル試験は第 2 章と同様に Eurofins Inc. (旧 Panlab) において実施した。また *RAF*、*KRAS*、*NRAS*、*HRAS*、*PTEN*、*RB1*、*TP53* の遺伝子変異データも第 2 章と同様に CCLE より取得した。GI₅₀ 値の統計解析は変異株細胞株と非変異細胞株間で Student's t-test を実施し、評価した。

COLO205 ゼノグラフト腫瘍を用いた PK、PD および薬効試験

COLO205 細胞は、3 から 5 × 10⁶ 細胞で 7 週齢の雌 BALB/c nude mice に皮下移植した。TAK-931 は、0.5% メチルセルロース溶液に溶解させ、経口投与で担がんマウスに投与した。

単回投与後、腫瘍および血漿をそれぞれの時間後に回収した。pMCM2 は WB または免疫染色を実施して検出した。抗腫瘍試験では、100 から 250 mm³ のゼノグラフト腫瘍を担がんするマウスを選択し、無作為的に群分けを実施した (各群 5 匹)。図表中に示されたレジメンで担がんマウスに TAK-931 を経口投与した。T/C (%) は以下の式で計算した。

$$T/C (\%) = \frac{(\text{TAK-931 投与群の投与最終日の腫瘍体積} - \text{TAK-931 投与群の投与前の腫瘍体積})}{(\text{vehicle 投与群の投与最終日の腫瘍体積} - \text{vehicle TAK-931 投与群の投与前の腫瘍体積})} \times 100$$

すべての動物試験は、武田湘南リサーチセンターの Institutional Animal Care and Use Committees によって承認されたプロトコルに従って実施した。

PDX モデルでの抗腫瘍試験

TAK-931 の PDX モデルに対する抗腫瘍活性は、Crown Bioscience Inc. (アメリカ、カリフォルニア) の Hutral™ Services で検討した。2~3 mm の PDX 腫瘍片を BALB/c nude mice に皮下移植した。PDX 腫瘍のサイズが 200 から 250 mm³ に達した際に、担がんマウスは無作為的に vehicle 群または TAK-931 群に群分けした (各群 3 匹)。TAK-931 は 60 mg/kg の用量で、1 日 2 回を 3 日間投与 4 日間休薬のスケジュールで 2 または 3 サイクル投与した。TGI (%) は下記の計算式で計算した。

$$\text{TGI (\%)} = [1 - (\text{TAK-931 投与群の腫瘍体積} \div \text{vehicle 投与群の腫瘍体積})] \times 100$$

Kaplan-Meier 生存曲線は、腫瘍体積が 600 mm³ に達した時点を死亡の代替エンドポイントとして作成した。統計解析には、log-rank test を実施した。

本試験のプロトコルおよび手法は試験開始前に Crown Bioscience Inc. の Institutional Animal Care and Use Committees によってレビュー、承認された。動物実験は AAALAC の基準に則って実施した。

統計解析

Shapiro-Wilk normality test および Gaussian distribution test で正規分布および等分散が認められた場合、Students t-test によるパラメトリック検定で統計解析を実施した。それ以外の場合には、Wilcoxon-Mann-Whitney test によるノンパラメトリック検定を実施した。統計解析は GraphPad Prism または R version 3.3.0 を用いて実施した。

3.5 小括

本章での研究において CDC7 選択的阻害剤である TAK-931 を創出し、また TAK-931 はいくつかの非臨床モデルで抗腫瘍効果を示すことを明らかにした。また分子生物学的解析から TAK-931 処理によって誘導される RS ががん細胞に増殖阻害を引き起こすメカニズムを明らかにすることができた。これらの知見が臨床および非臨床段階にある CDC7 阻害剤の開発の一助となることを期待される⁸⁵。

第4章 総括

本研究において、新規作用を有する抗腫瘍化合物、CLK 阻害剤である T-025 および CDC7 阻害剤である TAK-931 を創出した。これらの化合物を用いた分子メカニズム解析およびバイオインフォマティクス解析によって、ターゲットの阻害によって変化が誘導されるマーカーおよび薬剤の感受性と相関する因子を同定した。この結果は、非臨床の研究結果を臨床に橋渡しするトランスレーショナルリサーチ研究として有用であると考えられる。免疫染色や RT-PCR で検出可能な PD マーカーは、臨床試験においても PD バイオマーカーとして活用可能である。またがんの遺伝子変異・増幅の有無を明らかにする検査は、患者層別化のバイオマーカーとなりうる。本研究結果が、T-025 および TAK-931 に加えて同じ分子をターゲットとした薬剤群の今後の臨床開発につながることを期待される。

また同時に本研究結果は *KRAS* および *MYC* 活性化によって引き起こされる新たな脆弱性の発見となった。これらのがん遺伝子に対する治療法はまだ確立しておらず、数多くの研究がおこなわれている。本研究結果が、*KRAS* および *MYC* の分子機能に関する基礎研究にも貢献することが期待される。

第5章 引用文献

- 1 Dugger, S. A., Platt, A. & Goldstein, D. B. Drug development in the era of precision medicine. *Nat Rev Drug Discov* **17**, 183-196, doi:10.1038/nrd.2017.226 (2018).
- 2 Ashley, E. A. Towards precision medicine. *Nat Rev Genet* **17**, 507-522, doi:10.1038/nrg.2016.86 (2016).
- 3 Janne, P. A. *et al.* AZD9291 in EGFR inhibitor-resistant non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* **372**, 1689-1699, doi:10.1056/NEJMoa1411817 (2015).
- 4 Shaw, A. T. *et al.* Crizotinib versus chemotherapy in advanced ALK-positive lung cancer. *N Engl J Med* **368**, 2385-2394, doi:10.1056/NEJMoa1214886 (2013).
- 5 Dang, C. V., Reddy, E. P., Shokat, K. M. & Soucek, L. Drugging the 'undruggable' cancer targets. *Nat Rev Cancer* **17**, 502-508, doi:10.1038/nrc.2017.36 (2017).
- 6 Huang, A., Garraway, L. A., Ashworth, A. & Weber, B. Synthetic lethality as an engine for cancer drug target discovery. *Nat Rev Drug Discov*, doi:10.1038/s41573-019-0046-z (2019).
- 7 Nagel, R., Semenova, E. A. & Berns, A. Drugging the addict: non-oncogene addiction as a target for cancer therapy. *EMBO Rep* **17**, 1516-1531, doi:10.15252/embr.201643030 (2016).
- 8 McLornan, D. P., List, A. & Mufti, G. J. Applying synthetic lethality for the selective targeting of cancer. *N Engl J Med* **371**, 1725-1735, doi:10.1056/NEJMra1407390 (2014).
- 9 Mirza, M. R. *et al.* Niraparib Maintenance Therapy in Platinum-Sensitive, Recurrent Ovarian Cancer. *N Engl J Med* **375**, 2154-2164, doi:10.1056/NEJMoa1611310 (2016).
- 10 Bryant, H. E. *et al.* Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase. *Nature* **434**, 913-917, doi:10.1038/nature03443 (2005).
- 11 Yoshida, K. *et al.* Frequent pathway mutations of splicing machinery in myelodysplasia. *Nature* **478**, 64-69, doi:10.1038/nature10496 nature10496 [pii] (2011).
- 12 Dvinge, H., Kim, E., Abdel-Wahab, O. & Bradley, R. K. RNA splicing factors as oncoproteins and tumour suppressors. *Nat Rev Cancer* **16**, 413-430, doi:10.1038/nrc.2016.51 (2016).
- 13 Negrini, S., Gorgoulis, V. G. & Halazonetis, T. D. Genomic instability--an evolving hallmark of cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**, 220-228, doi:10.1038/nrm2858 (2010).
- 14 Chabot, B. & Shkreta, L. Defective control of pre-messenger RNA splicing in human disease. *J Cell Biol* **212**, 13-27, doi:10.1083/jcb.201510032 jcb.201510032 [pii] (2016).
- 15 Vuong, C. K., Black, D. L. & Zheng, S. The neurogenetics of alternative splicing. *Nat Rev Neurosci* **17**, 265-281, doi:10.1038/nrn.2016.27

- nrn.2016.27 [pii] (2016).
- 16 Inoue, D., Bradley, R. K. & Abdel-Wahab, O. Spliceosomal gene mutations in myelodysplasia: molecular links to clonal abnormalities of hematopoiesis. *Genes Dev* **30**, 989-1001, doi:10.1101/gad.278424.116
30/9/989 [pii] (2016).
- 17 Papaemmanuil, E. *et al.* Genomic Classification and Prognosis in Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med* **374**, 2209-2221, doi:10.1056/NEJMoa1516192 (2016).
- 18 Donaires, F. S. *et al.* Splicing factor SF3B1 mutations and ring sideroblasts in myelodysplastic syndromes: a Brazilian cohort screening study. *Rev Bras Hematol Hemoter* **38**, 320-324, doi:S1516-8484(16)30053-6 [pii]
10.1016/j.bjhh.2016.06.002 (2016).
- 19 Meggendorfer, M. *et al.* SRSF2 mutations in 275 cases with chronic myelomonocytic leukemia (CMML). *Blood* **120**, 3080-3088, doi:10.1182/blood-2012-01-404863
blood-2012-01-404863 [pii] (2012).
- 20 Salton, M. & Misteli, T. Small Molecule Modulators of Pre-mRNA Splicing in Cancer Therapy. *Trends Mol Med* **22**, 28-37, doi:10.1016/j.molmed.2015.11.005
S1471-4914(15)00213-0 [pii] (2016).
- 21 Lee, S. C. & Abdel-Wahab, O. Therapeutic targeting of splicing in cancer. *Nat Med* **22**, 976-986, doi:10.1038/nm.4165
nm.4165 [pii] (2016).
- 22 Bonnal, S., Vigevani, L. & Valcarcel, J. The spliceosome as a target of novel antitumour drugs. *Nat Rev Drug Discov* **11**, 847-859, doi:10.1038/nrd3823
nrd3823 [pii] (2012).
- 23 Corkery, D. P., Holly, A. C., Lahsae, S. & Dellaire, G. Connecting the speckles: Splicing kinases and their role in tumorigenesis and treatment response. *Nucleus* **6**, 279-288, doi:10.1080/19491034.2015.1062194 (2015).
- 24 Colwill, K. *et al.* The Clk/Sty protein kinase phosphorylates SR splicing factors and regulates their intranuclear distribution. *EMBO J* **15**, 265-275 (1996).
- 25 Ghosh, G. & Adams, J. A. Phosphorylation mechanism and structure of serine-arginine protein kinases. *FEBS J* **278**, 587-597, doi:10.1111/j.1742-4658.2010.07992.x (2011).
- 26 Singh, R. K. & Cooper, T. A. Pre-mRNA splicing in disease and therapeutics. *Trends Mol Med* **18**, 472-482, doi:10.1016/j.molmed.2012.06.006 (2012).
- 27 Dominguez, D. *et al.* An extensive program of periodic alternative splicing linked to cell cycle progression. *Elife* **5**, doi:10.7554/eLife.10288
e10288 [pii] (2016).
- 28 Fedorov, O. *et al.* Specific CLK inhibitors from a novel chemotype for regulation of

- alternative splicing. *Chem Biol* **18**, 67-76, doi:10.1016/j.chembiol.2010.11.009 S1074-5521(10)00444-8 [pii] (2011).
- 29 Sako, Y. *et al.* Development of an orally available inhibitor of CLK1 for skipping a mutated dystrophin exon in Duchenne muscular dystrophy. *Sci Rep* **7**, 46126, doi:10.1038/srep46126 srep46126 [pii] (2017).
- 30 Muraki, M. *et al.* Manipulation of alternative splicing by a newly developed inhibitor of Clks. *J Biol Chem* **279**, 24246-24254, doi:10.1074/jbc.M314298200 M314298200 [pii] (2004).
- 31 Hsu, T. Y. *et al.* The spliceosome is a therapeutic vulnerability in MYC-driven cancer. *Nature* **525**, 384-388, doi:10.1038/nature14985 nature14985 [pii] (2015).
- 32 Koh, C. M. *et al.* MYC regulates the core pre-mRNA splicing machinery as an essential step in lymphomagenesis. *Nature* **523**, 96-100, doi:10.1038/nature14351 nature14351 [pii] (2015).
- 33 Dang, C. V. MYC on the path to cancer. *Cell* **149**, 22-35, doi:10.1016/j.cell.2012.03.003 S0092-8674(12)00296-6 [pii] (2012).
- 34 Kress, T. R., Sabo, A. & Amati, B. MYC: connecting selective transcriptional control to global RNA production. *Nat Rev Cancer* **15**, 593-607, doi:10.1038/nrc3984 nrc3984 [pii] (2015).
- 35 Cermelli, S., Jang, I. S., Bernard, B. & Grandori, C. Synthetic lethal screens as a means to understand and treat MYC-driven cancers. *Cold Spring Harb Perspect Med* **4**, doi:10.1101/cshperspect.a014209 a014209 [pii] 4/3/a014209 [pii] (2014).
- 36 Delmore, J. E. *et al.* BET bromodomain inhibition as a therapeutic strategy to target c-Myc. *Cell* **146**, 904-917, doi:10.1016/j.cell.2011.08.017 S0092-8674(11)00943-3 [pii] (2011).
- 37 Horiuchi, D. *et al.* PIM1 kinase inhibition as a targeted therapy against triple-negative breast tumors with elevated MYC expression. *Nat Med* **22**, 1321-1329, doi:10.1038/nm.4213 nm.4213 [pii] (2016).
- 38 Camarda, R. *et al.* Inhibition of fatty acid oxidation as a therapy for MYC-overexpressing triple-negative breast cancer. *Nat Med* **22**, 427-432, doi:10.1038/nm.4055 nm.4055 [pii] (2016).
- 39 Kessler, J. D. *et al.* A SUMOylation-dependent transcriptional subprogram is required for

- Myc-driven tumorigenesis. *Science* **335**, 348-353, doi:10.1126/science.1212728
science.1212728 [pii] (2012).
- 40 Araki, S. *et al.* Inhibitors of CLK protein kinases suppress cell growth and induce apoptosis by modulating pre-mRNA splicing. *PLoS One* **10**, e0116929, doi:10.1371/journal.pone.0116929
PONE-D-14-35737 [pii] (2015).
- 41 Rodgers, J. T., Haas, W., Gygi, S. P. & Puigserver, P. Cdc2-like kinase 2 is an insulin-regulated suppressor of hepatic gluconeogenesis. *Cell Metab* **11**, 23-34, doi:10.1016/j.cmet.2009.11.006
S1550-4131(09)00370-2 [pii] (2010).
- 42 Katz, Y., Wang, E. T., Airoidi, E. M. & Burge, C. B. Analysis and design of RNA sequencing experiments for identifying isoform regulation. *Nat Methods* **7**, 1009-1015, doi:10.1038/nmeth.1528
nmeth.1528 [pii] (2010).
- 43 Yoshida, T. *et al.* CLK2 Is an Oncogenic Kinase and Splicing Regulator in Breast Cancer. *Cancer Res* **75**, 1516-1526, doi:10.1158/0008-5472.CAN-14-2443
0008-5472.CAN-14-2443 [pii] (2015).
- 44 Barretina, J. *et al.* The Cancer Cell Line Encyclopedia enables predictive modelling of anticancer drug sensitivity. *Nature* **483**, 603-607, doi:10.1038/nature11003
nature11003 [pii] (2012).
- 45 Malynn, B. A. *et al.* N-myc can functionally replace c-myc in murine development, cellular growth, and differentiation. *Genes Dev* **14**, 1390-1399 (2000).
- 46 Bidinosti, M. *et al.* CLK2 inhibition ameliorates autistic features associated with SHANK3 deficiency. *Science* **351**, 1199-1203, doi:10.1126/science.aad5487
science.aad5487 [pii] (2016).
- 47 Funnell, T. *et al.* CLK-dependent exon recognition and conjoined gene formation revealed with a novel small molecule inhibitor. *Nat Commun* **8**, 7, doi:10.1038/s41467-016-0008-7
10.1038/s41467-016-0008-7 [pii] (2017).
- 48 Das, S., Anczukow, O., Akerman, M. & Krainer, A. R. Oncogenic splicing factor SRSF1 is a critical transcriptional target of MYC. *Cell Rep* **1**, 110-117, doi:10.1016/j.celrep.2011.12.001 (2012).
- 49 Butt, A. J. *et al.* The estrogen and c-Myc target gene HSPC111 is over-expressed in breast cancer and associated with poor patient outcome. *Breast Cancer Res* **10**, R28, doi:10.1186/bcr1985
bcr1985 [pii] (2008).

- 50 Curtis, C. *et al.* The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups. *Nature* **486**, 346-352, doi:10.1038/nature10983 nature10983 [pii] (2012).
- 51 Pereira, B. *et al.* The somatic mutation profiles of 2,433 breast cancers refines their genomic and transcriptomic landscapes. *Nat Commun* **7**, 11479, doi:10.1038/ncomms11479 ncomms11479 [pii] (2016).
- 52 Fernandez-Martinez, P., Zahonero, C. & Sanchez-Gomez, P. DYRK1A: the double-edged kinase as a protagonist in cell growth and tumorigenesis. *Mol Cell Oncol* **2**, e970048, doi:10.4161/23723548.2014.970048 970048 [pii] (2015).
- 53 Haferlach, T. *et al.* Landscape of genetic lesions in 944 patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia* **28**, 241-247, doi:10.1038/leu.2013.336 leu2013336 [pii] (2014).
- 54 Shirai, C. L. *et al.* Mutant U2AF1-expressing cells are sensitive to pharmacological modulation of the spliceosome. *Nat Commun* **8**, 14060, doi:10.1038/ncomms14060 ncomms14060 [pii] (2017).
- 55 Lee, S. C. *et al.* Modulation of splicing catalysis for therapeutic targeting of leukemia with mutations in genes encoding spliceosomal proteins. *Nat Med* **22**, 672-678, doi:10.1038/nm.4097 nm.4097 [pii] (2016).
- 56 Anczukow, O. *et al.* The splicing factor SRSF1 regulates apoptosis and proliferation to promote mammary epithelial cell transformation. *Nat Struct Mol Biol* **19**, 220-228, doi:10.1038/nsmb.2207 nsmb.2207 [pii] (2012).
- 57 Mullighan, C. G. *et al.* CREBBP mutations in relapsed acute lymphoblastic leukaemia. *Nature* **471**, 235-239, doi:10.1038/nature09727 nature09727 [pii] (2011).
- 58 Pasqualucci, L. *et al.* Inactivating mutations of acetyltransferase genes in B-cell lymphoma. *Nature* **471**, 189-195, doi:10.1038/nature09730 nature09730 [pii] (2011).
- 59 Xu, F. *et al.* Whole-exome and targeted sequencing identify ROBO1 and ROBO2 mutations as progression-related drivers in myelodysplastic syndromes. *Nat Commun* **6**, 8806, doi:10.1038/ncomms9806 ncomms9806 [pii] (2015).
- 60 Kurosawa, N., Yoshioka, M., Fujimoto, R., Yamagishi, F. & Isobe, M. Rapid production of

- antigen-specific monoclonal antibodies from a variety of animals. *BMC Biol* **10**, 80, doi:10.1186/1741-7007-10-80
1741-7007-10-80 [pii] (2012).
- 61 Shannon, P. *et al.* Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res* **13**, 2498-2504, doi:10.1101/gr.1239303
13/11/2498 [pii] (2003).
- 62 Gao, J. *et al.* Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. *Sci Signal* **6**, pl1, doi:10.1126/scisignal.2004088
scisignal.2004088 [pii] (2013).
- 63 Cerami, E. *et al.* The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. *Cancer Discov* **2**, 401-404, doi:10.1158/2159-8290.CD-12-0095
2/5/401 [pii] (2012).
- 64 Chakravarty, D. *et al.* OncoKB: A Precision Oncology Knowledge Base. *JCO Precis Oncol* **2017**, doi:10.1200/PO.17.00011 (2017).
- 65 Muller, W. J., Sinn, E., Pattengale, P. K., Wallace, R. & Leder, P. Single-step induction of mammary adenocarcinoma in transgenic mice bearing the activated c-neu oncogene. *Cell* **54**, 105-115, doi:0092-8674(88)90184-5 [pii] (1988).
- 66 Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**, 646-674, doi:10.1016/j.cell.2011.02.013 (2011).
- 67 McGranahan, N. & Swanton, C. Clonal Heterogeneity and Tumor Evolution: Past, Present, and the Future. *Cell* **168**, 613-628, doi:10.1016/j.cell.2017.01.018 (2017).
- 68 Burrell, R. A., McGranahan, N., Bartek, J. & Swanton, C. The causes and consequences of genetic heterogeneity in cancer evolution. *Nature* **501**, 338-345, doi:10.1038/nature12625 (2013).
- 69 Jackson, S. P. & Bartek, J. The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature* **461**, 1071-1078, doi:10.1038/nature08467 (2009).
- 70 Kotsantis, P. *et al.* Increased global transcription activity as a mechanism of replication stress in cancer. *Nat Commun* **7**, 13087, doi:10.1038/ncomms13087 (2016).
- 71 Dobbstein, M. & Sorensen, C. S. Exploiting replicative stress to treat cancer. *Nat Rev Drug Discov* **14**, 405-423, doi:10.1038/nrd4553 (2015).
- 72 Zeman, M. K. & Cimprich, K. A. Causes and consequences of replication stress. *Nat Cell Biol* **16**, 2-9, doi:10.1038/ncb2897 (2014).
- 73 Gorgoulis, V. G. *et al.* Activation of the DNA damage checkpoint and genomic instability in human precancerous lesions. *Nature* **434**, 907-913, doi:10.1038/nature03485 (2005).
- 74 Halazonetis, T. D., Gorgoulis, V. G. & Bartek, J. An oncogene-induced DNA damage

- model for cancer development. *Science* **319**, 1352-1355, doi:10.1126/science.1140735 (2008).
- 75 Bartkova, J. *et al.* DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis. *Nature* **434**, 864-870, doi:10.1038/nature03482 (2005).
- 76 Koltun, E. S. *et al.* Discovery of XL413, a potent and selective CDC7 inhibitor. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **22**, 3727-3731, doi:10.1016/j.bmcl.2012.04.024 (2012).
- 77 Montagnoli, A. *et al.* A Cdc7 kinase inhibitor restricts initiation of DNA replication and has antitumor activity. *Nat Chem Biol* **4**, 357-365, doi:10.1038/nchembio.90 nchembio.90 [pii] (2008).
- 78 Harrington, P. E. *et al.* The optimization of aminooxadiazoles as orally active inhibitors of Cdc7. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **23**, 6396-6400, doi:10.1016/j.bmcl.2013.09.055 S0960-894X(13)01129-3 [pii] (2013).
- 79 Reichelt, A. *et al.* Synthesis and structure-activity relationship of trisubstituted thiazoles as Cdc7 kinase inhibitors. *Eur J Med Chem* **80**, 364-382, doi:10.1016/j.ejmech.2014.04.013 S0223-5234(14)00332-8 [pii] (2014).
- 80 Kurasawa, O. *et al.* Identification of a new class of potent Cdc7 inhibitors designed by putative pharmacophore model: Synthesis and biological evaluation of 2,3-dihydrothieno[3,2-d]pyrimidin-4(1H)-ones. *Bioorg Med Chem* **25**, 2133-2147, doi:10.1016/j.bmc.2017.02.021 (2017).
- 81 Kurasawa, O. *et al.* 2-Aminomethylthieno[3,2-d]pyrimidin-4(3H)-ones bearing 3-methylpyrazole hinge binding moiety: Highly potent, selective, and time-dependent inhibitors of Cdc7 kinase. *Bioorg Med Chem* **25**, 3658-3670, doi:10.1016/j.bmc.2017.04.044 (2017).
- 82 Irie, T. *et al.* Discovery of novel furanone derivatives as potent Cdc7 kinase inhibitors. *Eur J Med Chem* **130**, 406-418, doi:10.1016/j.ejmech.2017.02.030 (2017).
- 83 Jiang, W., McDonald, D., Hope, T. J. & Hunter, T. Mammalian Cdc7-Dbf4 protein kinase complex is essential for initiation of DNA replication. *EMBO J* **18**, 5703-5713, doi:10.1093/emboj/18.20.5703 (1999).
- 84 Cho, W. H., Lee, Y. J., Kong, S. I., Hurwitz, J. & Lee, J. K. CDC7 kinase phosphorylates serine residues adjacent to acidic amino acids in the minichromosome maintenance 2 protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 11521-11526, doi:10.1073/pnas.0604990103 (2006).
- 85 Montagnoli, A., Moll, J. & Colotta, F. Targeting cell division cycle 7 kinase: a new approach for cancer therapy. *Clin Cancer Res* **16**, 4503-4508, doi:10.1158/1078-

- 0432.CCR-10-0185 (2010).
- 86 Yamada, M., Masai, H. & Bartek, J. Regulation and roles of Cdc7 kinase under replication stress. *Cell Cycle* **13**, 1859-1866, doi:10.4161/cc.29251 (2014).
- 87 Kulkarni, A. A. *et al.* Cdc7 kinase is a predictor of survival and a novel therapeutic target in epithelial ovarian carcinoma. *Clin Cancer Res* **15**, 2417-2425, doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-1276 (2009).
- 88 Montagnoli, A. *et al.* Identification of Mcm2 phosphorylation sites by S-phase-regulating kinases. *J Biol Chem* **281**, 10281-10290, doi:10.1074/jbc.M512921200 (2006).
- 89 Tsuji, T., Ficarro, S. B. & Jiang, W. Essential role of phosphorylation of MCM2 by Cdc7/Dbf4 in the initiation of DNA replication in mammalian cells. *Mol Biol Cell* **17**, 4459-4472, doi:10.1091/mbc.E06-03-0241 (2006).
- 90 Yin, T. *et al.* A novel CDK9 inhibitor shows potent antitumor efficacy in preclinical hematologic tumor models. *Mol Cancer Ther* **13**, 1442-1456, doi:10.1158/1535-7163.MCT-13-0849 (2014).
- 91 Petermann, E., Woodcock, M. & Helleday, T. Chk1 promotes replication fork progression by controlling replication initiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 16090-16095, doi:10.1073/pnas.1005031107 (2010).
- 92 Moiseeva, T. *et al.* ATR kinase inhibition induces unscheduled origin firing through a Cdc7-dependent association between GINS and And-1. *Nat Commun* **8**, 1392, doi:10.1038/s41467-017-01401-x (2017).
- 93 Rainey, M. D., Quachthithu, H., Gaboriau, D. & Santocanale, C. DNA Replication Dynamics and Cellular Responses to ATP Competitive CDC7 Kinase Inhibitors. *ACS Chem Biol* **12**, 1893-1902, doi:10.1021/acscchembio.7b00117 (2017).
- 94 Ohashi, A. *et al.* A Novel Time-Dependent CENP-E Inhibitor with Potent Antitumor Activity. *PLoS One* **10**, e0144675, doi:10.1371/journal.pone.0144675 (2015).
- 95 Montagnoli, A. *et al.* Cdc7 inhibition reveals a p53-dependent replication checkpoint that is defective in cancer cells. *Cancer Res* **64**, 7110-7116, doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-1547 (2004).
- 96 Reaper, P. M. *et al.* Selective killing of ATM- or p53-deficient cancer cells through inhibition of ATR. *Nat Chem Biol* **7**, 428-430, doi:10.1038/nchembio.573 (2011).
- 97 O'Driscoll, M., Ruiz-Perez, V. L., Woods, C. G., Jeggo, P. A. & Goodship, J. A. A splicing mutation affecting expression of ataxia-telangiectasia and Rad3-related protein (ATR) results in Seckel syndrome. *Nat Genet* **33**, 497-501, doi:10.1038/ng1129 (2003).
- 98 Sluder, G. & Nordberg, J. J. The good, the bad and the ugly: the practical consequences of centrosome amplification. *Curr Opin Cell Biol* **16**, 49-54, doi:10.1016/j.ceb.2003.11.006 (2004).

- 99 Hemerly, A. S., Prasanth, S. G., Siddiqui, K. & Stillman, B. Orc1 controls centriole and centrosome copy number in human cells. *Science* **323**, 789-793, doi:10.1126/science.1166745 (2009).
- 100 Ferguson, R. L. & Maller, J. L. Cyclin E-dependent localization of MCM5 regulates centrosome duplication. *J Cell Sci* **121**, 3224-3232, doi:10.1242/jcs.034702 (2008).
- 101 Ferguson, R. L., Pascreau, G. & Maller, J. L. The cyclin A centrosomal localization sequence recruits MCM5 and Orc1 to regulate centrosome reduplication. *J Cell Sci* **123**, 2743-2749, doi:10.1242/jcs.073098 (2010).
- 102 Lu, F., Lan, R., Zhang, H., Jiang, Q. & Zhang, C. Geminin is partially localized to the centrosome and plays a role in proper centrosome duplication. *Biol Cell* **101**, 273-285, doi:10.1042/BC20080109 (2009).
- 103 Hossain, M. & Stillman, B. Meier-Gorlin syndrome mutations disrupt an Orc1 CDK inhibitory domain and cause centrosome reduplication. *Genes Dev* **26**, 1797-1810, doi:10.1101/gad.197178.112 (2012).
- 104 Xu, X. *et al.* DNA replication licensing factor Cdc6 and Plk4 kinase antagonistically regulate centrosome duplication via Sas-6. *Nat Commun* **8**, 15164, doi:10.1038/ncomms15164 (2017).
- 105 McDonald, E. R., 3rd *et al.* Project DRIVE: A Compendium of Cancer Dependencies and Synthetic Lethal Relationships Uncovered by Large-Scale, Deep RNAi Screening. *Cell* **170**, 577-592 e510, doi:10.1016/j.cell.2017.07.005 (2017).
- 106 Ohashi, A. *et al.* Aneuploidy generates proteotoxic stress and DNA damage concurrently with p53-mediated post-mitotic apoptosis in SAC-impaired cells. *Nat Commun* **6**, 7668, doi:10.1038/ncomms8668 (2015).

利益相反

本学位論文の原著論文は武田薬品において実施された研究を基に執筆された論文である。筆者および原著論文の共著者は武田薬品の従業員または元従業員である。

謝辞

本論文の執筆に際し、ご指導を賜りました東京大学大学院、薬学系研究科、分子生物学教室、後藤由季子教授に心より感謝いたします。

武田薬品における研究において多大なご指導いただきました吉田聖氏、野村俊之博士、木場篤司博士、三宅洋博士には心より感謝申し上げます。

CLK に関する研究に際しともに研究の中心となり実験を進めていただきました矢口正宏氏・西村和帆博士、CDC7・CLK 両研究において多くの動物実験を実施いただきました山本有紀子氏には厚く御礼を申し上げ、感謝する次第です。また多くの共同研究者の皆様には、研究を遂行するにあたり様々なご助言・ご協力をいただきました。感謝申し上げます。

最後になりますが、CDC7 に関する研究に際し、研究に関する色々な議論をさせていただくと同時に、様々なご指導をいただきました大橋紹宏博士および南部忠洋博士に厚く御礼申し上げます。

原著論文

- (1) Iwai, K., Yaguchi, M., Nishimura, K., Yamamoto, Y., Tamura, T., Nakata, D., Dairiki, R., Kawakita, Y., Mizojiri, R., Ito, Y., Asano, M., Maezaki, H., Nakayama, Y., Kaishima, M., Hayashi, K., Teratani, M., Miyakawa, S., Iwatani, M., Miyamoto, M., Klein, M, Lane, W., Snell, G., Tjhen, R., He, X., Pulukuri, S., Nomura, T.
Anti-tumor efficacy of a novel CLK inhibitor via targeting RNA splicing and MYC-dependent vulnerability.
EMBO Mol Med. 10(6), e8289, 2018

- (2) Iwai, K., Nambu, T., Dairiki, R., Ohori, M., Yu, J., Burke, K., Gotou, M., Yamamoto, Y., Ebara, S., Shibata, S., Hibino, R., Nishizawa, S., Miyazaki, T., Homma, M., Oguro, Y., Imada, T., Cho, N., Uchiyama, N., Kogame, A., Takeuchi, T., Kurasawa, O., Yamanaka, K., Niu, H., Ohashi A.
Molecular mechanism and potential target indication of TAK-931, a novel CDC7-selective inhibitor
Sci Adv. 5(5), eaav3660, 2019