

博士論文

新規がん治療薬の創製に向けた Inhibitor of apoptosis
antagonist に関する創薬研究

角 紘幸

目次

略号一覧

第 1 章 序論

第 2 章 新規 IAP antagonist T-3256336 の薬効薬理およびバイオマーカーに関する解析

第 3 章 IAP antagonist T-3256336 の Systemic TNF alpha を介した薬効に関する薬理学的解析

第 4 章 IAP antagonist T-3256336 の Nedd8 activating enzyme inhibitor pevonedistat (MLN4924/TAK-924) との併用効果に関する薬理学的解析

第 5 章 総括

実験の部

引用文献

謝辞

報文目録

略語

IAP, Inhibitor of apoptosis

cIAP-1, cellular IAP1

cIAP-2, cellular IAP2

XIAP, X chromosome-linked IAP

ML-IAP, Melanoma IAP

Smac, Second Mitochondrial-Derived Activator of Caspases

BIR, Baculoviral IAP repeat

TNF, tumour-necrosis factor

TRAIL, TNF-related apoptosis-inducing ligand

FADD, Fas associated death domain

RING, Really Interesting New Gene

Bcl-2, B-cell lymphoma 2

ATP, adenosine 5'-triphosphate

DMSO, dimethyl sulfoxide

MOA, mode of action

NMR; nuclear magnetic resonance

Tris, tris(hydroxymethyl)aminomethane

Tween-20, polyoxyethylene(20)sorbitan monolaurate

IC₅₀, inhibitor concentration producing 50% inhibition

EGFR, epidermal growth factor receptor

HER2, human epidermal growth factor receptor 2

第一章

序論

がんは、1981年以降日本人の死因の第1位であり、現在では、年間30万人以上の国民が、がんで亡くなっている（厚生労働省「2010年人口動態統計月報年計(概算)」）。また、生涯のうちにがんに罹患する可能性は、男性の2人に1人、女性の3人に1人と推測されており、がんの治療は社会的な問題となっている。がんの3大療法は、外科的手術、放射線療法、薬物療法と言われているが、これまでの薬物療法の中心であった化学療法は正常細胞とがん細胞を区別しない殺細胞療法であり、副作用と薬効とのバランスが課題であった。一方、近年の医薬品開発において、細胞内の特定分子を標的にした分子標的治療薬が相対的に副作用の軽減された治療法として見いだされ、その有用性が明らかになるにつれ、さらなる分子標的の探索と創薬研究の発展が期待されている。

1-1. がん分子標的と細胞死

がんの標的となる分子を発見するためには、がんの特徴、つまりがんと正常組織とがどのように異なるのかを明らかにすることが重要となる。HanahanとWeinbergは2000年にCell誌に「Hallmarks of Cancer」と題して総説を発表し、持続的な増殖シグナル、増殖抑制シグナルの回避、組織への浸潤・転移能、継続的な血管新生、無制限な複製能、細胞死からの回避の6つのがんの特徴を定義付けている (Figure 1-1, Hanahan *et. al.*, 2000)。また、2011年には「Hallmarks of Cancer: The Next Generation」と題してアップデートされ、免疫逃避、腫瘍促進免疫、ゲノム不安定性・変異の4つのがんの特徴が追加された (Figure 1-2, Hanahan *et. al.* 2011)。細胞死からの回避はがんの必須な特徴の1つであり、がんの既存治療の中心である化学療法への抵抗性獲得の主要な原因となっている。実際、細胞死シグナル、アポトーシスシグナルに関わるたんぱく質の発現変動が多くのがんにおいて確認されており、抗がん剤開発の魅力的なターゲットとなっている。

アポトーシスシグナルは主にミトコンドリアを介した内因性シグナルとデスレセプターを介した外因性シグナルの2つの経路に分けられる。外因性シグナルは tumour-necrosis factor (TNF), FAS ligand, TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL), TNF ligand superfamily member 10 (TNFSF10)等のリガンド分子が、それぞれの受容体である TNF receptor 1 (TNFR1), FAS, death receptor 4 (DR4), DR5 に結合することにより、細胞死受容体と fas associated death domain (FADD)、Caspase-8 が複合体を形成し誘導される。形成された複合体内で Caspase-8 の分解、活性化を介した、エフェクターCaspase-3 および Caspase-7 が活性化し、DNA 断片化誘導、細胞内分子の分解によりアポトーシスをきたす。一方で、内因性シグナルは各種ストレスによりミトコンドリアからチトクローム c が放出さ

れることにより、細胞内で Caspase-9 を含むアポトソーム複合体を形成し、下流のエフェクター分子である Caspase-3 および Caspase-7 を分解、活性化することにより誘導される。また、直接的に細胞死に関わる分子に加え、細胞死を抑制するたんぱく質としては、チトクローム c の放出に関与する B-cell lymphoma 2 (Bcl-2)ファミリー、Caspases の抑制に関わる Inhibitor of apoptosis (IAP) protein ファミリーが重要な分子として存在しており、細胞死の誘導を指向した抗がん剤の創薬ターゲットが注目を集めている (Figure 1-3, Anderson *et. al.*, 2005, Fesik, 2005)。

1-2. Inhibitor of apoptosis (IAP) たんぱく質ファミリーとがん

アポトーシスの抑制は生理現象において重要な役割を担っており、がん細胞や神経細胞の生存やウイルスの効率的な複製に関与している。IAP たんぱく質ファミリーは最初にバキュロウイルスにおいてウイルスの複製過程においてアポトーシスを抑制する遺伝子として同定され (Birnbaum *et. al.*, 1993, Crook *et. al.*, 1992)、ヒトでは baculoviral IAP repeat (BIR) ドメインという特徴的なドメインを有する遺伝子として、これまでに neuronal apoptosis inhibitory protein (BIRC1), cellular IAP1 (cIAP1, BIRC2), cellular IAP2 (cIAP2, BIRC3), X chromosome-linked IAP (XIAP, BIRC4), survivin (BIRC5), ubiquitin-conjugating BIR domain enzyme appolon (BIRC6), melanoma IAP (ML-IAP, BIRC7), IAP-like protein 2 (ILP2, BIRC8)の 8 種類の IAP たんぱく質が同定されている (Figure 1-4, Fluda *et. al.*, 2012)。がんでは IAP たんぱく質ファミリーの遺伝子レベルもしくはたんぱく質レベルの発現亢進が多く報告されており、cIAP-1, cIAP-2 をコードする 11 番染色体 q22 領域は肺がん、食道がん、子宮頸がん、肝臓がんなど、多くのがんでの遺伝子増幅が認められており、XIAP は腎細胞がん、肝臓がん、乳がんでの発現亢進と予後不良との相関が報告されている。IAP たんぱく質ファミリーの機能としては、中心的分子である XIAP は Caspases と結合するサイトを有し、BIR3 ドメインを介して Caspase-9 と、BIR1 と BIR2 のリンカー部分を介して Caspase-3 および Caspase-7 と直接結合、活性抑制することから、直接的にアポトーシスを制御するたんぱく質ファミリーと考えられてきた (Eckelman *et. al.*, 2006)。一方で、近年の研究から C 末端の Really Interesting New Gene (RING) ドメインによる、たんぱく質のユビキチン化とデグラデーションを介して、各種シグナル伝達、特に細胞死と生存の両面で重要な機能を有する転写因子である NF κ B に関与することから、重要な分子であると考えられており、がんの創薬ターゲットとして注目を集めている。

1-3. IAP antagonist の作用メカニズム

アポトーシスの過程においてミトコンドリアから漏出し、IAP たんぱく質ファミリーの内在性リガンドとして知られている SMAC (Second mitochondria-derived activator of caspase) ペプチドの IAP たんぱく質ファミリーとの結合に重要な AVPI の 4 ペプチドを模倣する戦略のもと、複数の IAP antagonist が開発されている。IAP antagonist は当初、アポトーシスの実行因子である、Caspase-3, Caspase-7 および Caspase-9 と結合している XIAP, cIAP-1, cIAP-2, ML-IAP と直接結合し、その機能を抑制することにより、Caspase の再活性化を来し、アポトーシスを誘導すると考えられていたが、近年の研究から IAP antagonist による主要なアポトーシス誘導メカニズムは cIAP-1 を介したものであることが明らかとなってきた (Varfolomeev *et. al.*, 2007, Vince *et. al.*, 2007)。通常 cIAP-1 たんぱく質は BIR3 ドメインと RING ドメインが結合し、その E3 ligase 活性を抑制しているが、IAP antagonist が cIAP-1 の BIR3 ドメインに結合すると、たんぱく質の立体構造が変化し、E3 リガーゼが活性化される。活性化された cIAP-1 の E3 ligase は基質である RIP1 および自身である cIAP-1 をユビキチン化する。RIP1 のユビキチン化は、下流の古典的 NF κ B シグナルを活性化し、cIAP-1 の分解は NIK の蓄積を介して非古典的な NF κ B シグナルを活性化する。このように IAP antagonist を介した古典的、非古典的両者の NF κ B シグナルの活性化は下流においてサイトカインの産生と抗アポトーシスタンパク質の誘導をきたす。ここで産生された TNF はオートクラインもしくはパラクラインに外因性アポトーシスパスウェイの受容体である TNFR1 を活性化する。通常状態では TNF による TNFR1 の活性化では NF κ B の活性化が誘導されるが、IAP antagonist により cIAP-1 たんぱく質が分解されている状態では RIP1 のユビキチン化を誘導できず、TNF 刺激を受けた RIP1 は FADD や Caspase-8 と複合体を形成することにより外因性のアポトーシスシグナルを誘導することとなる。このように IAP antagonist は Prosurvival な TNF シグナルから Pro-apoptotic な TNF シグナルへとスイッチを入れ替えることにより、がん細胞に選択的なアポトーシスを誘導すると考えられている (Figure 1-5, Varfolomeev *et. al.*, 2012)。

1-4. サイトケラチン-18

サイトケラチン-18 は上皮性細胞の細胞骨格を成す、直径 8~11 nm の中間径フィラメントのサイトケラチンファミリー分子の 1 つであり、乳がんや前立腺がん、肺がん、大腸がん、卵巣がんにおいて発現が認められている。またそのメカニズムは不明であるが、がん患者さんの血液中に分泌されることから、臨床でのがんの診断や患者さんの状態をモニターするマーカーとして広く使われている (Chu *et. al.*, 2002, Lane *et. al.*, 1990)。一方で、細胞死の過程においては血液中へのサイトケラチン-18 の分泌量が増えること、アポトーシスの過程において、サイトケラチン-18 の Asp238 と Asp396 の 2 か所が Caspase により消化され、分解されたサイトケラチン-18 が血液中に増加することが報告されている。そこで、分解さ

れたサイトケラチン-18 の新しいエピトープのみを選択的に検出する M30 抗体および可溶性の全長型サイトケラチン-18 と新規エピトープの両者を検出する M65 抗体が開発されており、2 種類の抗体を組み合わせることで血液中のサイトケラチン-18 量を測定することにより、腫瘍の細胞死レベルとアポトーシスレベルを比較検討することが可能となっている (Figure 1-6, Kramer *et. al.*, 2004)。実際、近年の研究においてサイトケラチン 18 の血液中量が抗がん剤、特に細胞死を誘導する薬剤の薬効を予測するマーカーとなりうる可能性が示されている (Micha *et. al.*, 2008, Demiray *et. al.*, 2006, Ulukaya *et. al.*, 2007)。

1-5. Pevonedistat

ユビキチンプロテアソームシステムは細胞内たんぱく質の分解をつかさどり、幅広い細胞機能の調節に重要な役割を担っている。その機能は Ubiquitin activating enzyme (E1) によるユビキチンの活性化、Ubiquitin conjugating enzyme (E2) へのユビキチンの輸送、Ubiquitin ligase enzyme (E3) による基質たんぱく質のユビキチン化がたんぱく質の分解に重要なプロセスであることが知られている (Hershko *et. al.*, 2005)。一方で Nedd8 経路は Ubiquitin-like proteins (UBLs) として同定された経路であり、その活性化プロセスは Nedd8 activating enzyme (E1) による Nedd8 の活性化、E2 酵素による Nedd8 の輸送と基質となる Cullin たんぱく質群の修飾により、たんぱく質の分解を調節している (Gong *et. al.*, 1999, Pan *et. al.*, 2004)。

Pevonedistat は Nedd8 経路の最初のプロセスをつかさどる重要酵素である Nedd8 活性化酵素を阻害する薬剤として、武田薬品工業株式会社のグループ会社であるミレニウムファーマシューティカルにより創製された化合物であり (Figure 1-7, Soucy *et. al.*, 2009)、Nedd8 経路の阻害により Cullin たんぱく質群の蓄積を誘導することが知られている。Pevonedistat は増殖の盛んながん細胞において、Cullin たんぱく質群の中で DNA の再複製に重要な役割を担っている Cdt1 の顕著な蓄積を誘導し、4n 以上の DNA を含んだ細胞の増加とそれに伴う DNA のダメージを誘導し、最終的に細胞死を誘導することが知られている (Lin *et. al.*, 2010)。さらに薬効動物モデルにおいて強い抗腫瘍効果が報告されており、武田薬品工業株式会社において、急性骨髄性白血病 (AML: acute myeloid leukemia) および骨髄異型性症候群 (MDS: myelodysplastic syndrome) を対象にした臨床開発が試みられている。

1-6. 本研究の目的

抗アポトーシス分子をターゲットとした抗がん剤の開発は、がん選択的な抗腫瘍効果の獲得と、抗がん剤治療への抵抗性の克服の観点において、非常に重要であると考えられる。しかし、アポトーシスを指向した薬剤の開発は、まだ少なく、その作用メカニズムの解析や薬剤開発上の課題は不明な部分が多かった。そこで、本研究では XIAP, cIAP-1, cIAP-2 をターゲットとした創薬研究を目的に、新規 IAP antagonist である T-3256336 を用いた作用メカニズムの解析、モデル細胞、動物を用いた薬効薬理解析、および薬効や感受性を予測するバイオマーカー解析を実施した。さらに臨床での用途を指向した、併用薬の探索とそのメカニズムについて検討した。

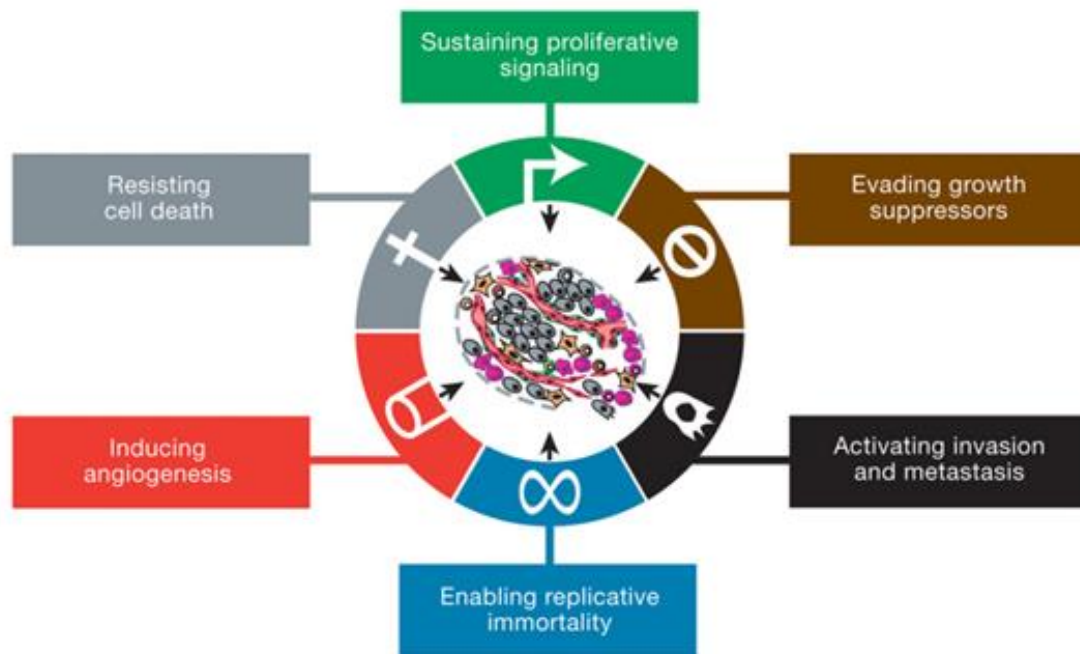


Figure 1-1 Hallmarks of Cancer

引用： *Cell*, 144, 646-74, 2011.

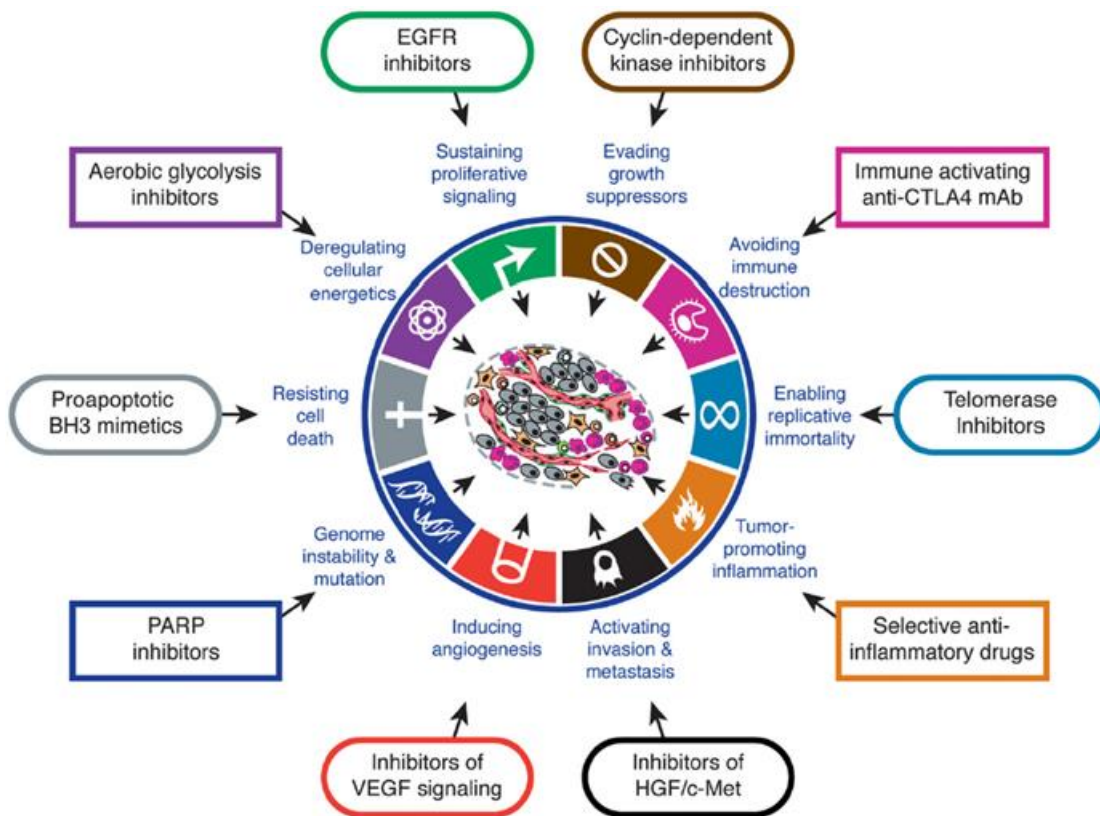


Figure 1-2 Hallmarks of Cancer: The Next Generation

引用： *Cell*, 144, 646-74, 2011.

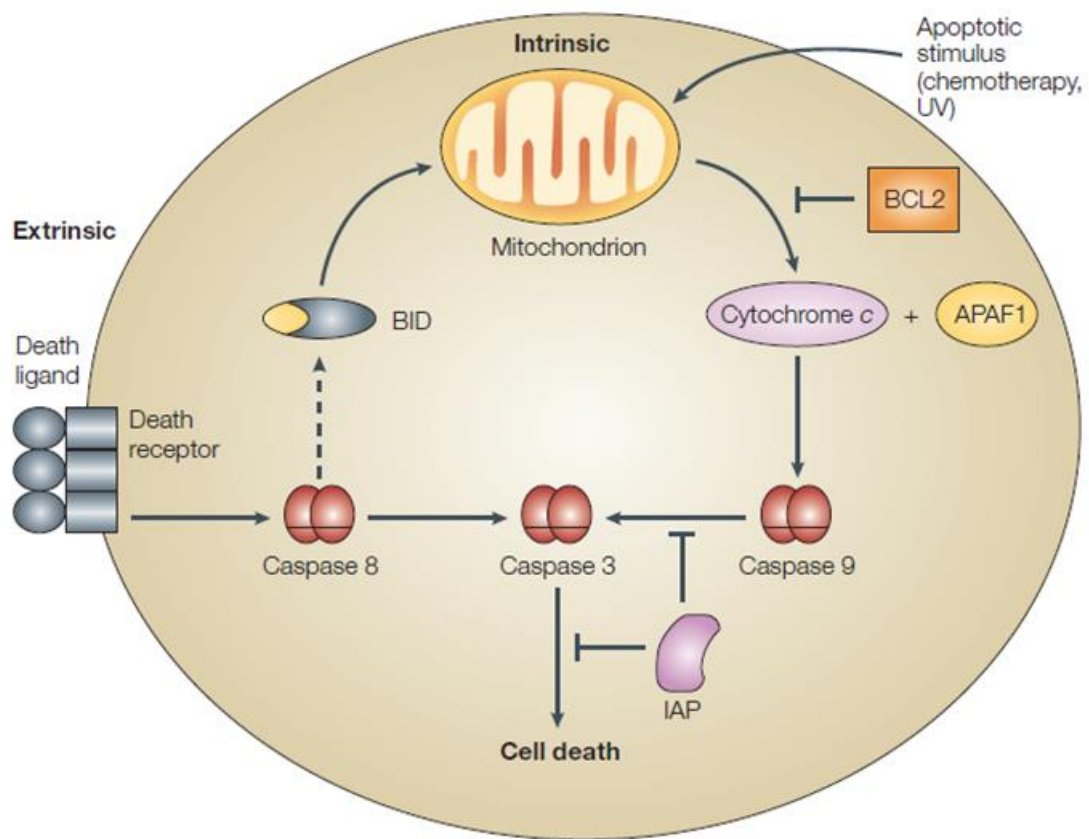


Figure1-3 細胞死シグナル

引用 : *Nat. Rev. Drug Disc.*, 5, 399-409, 2005.

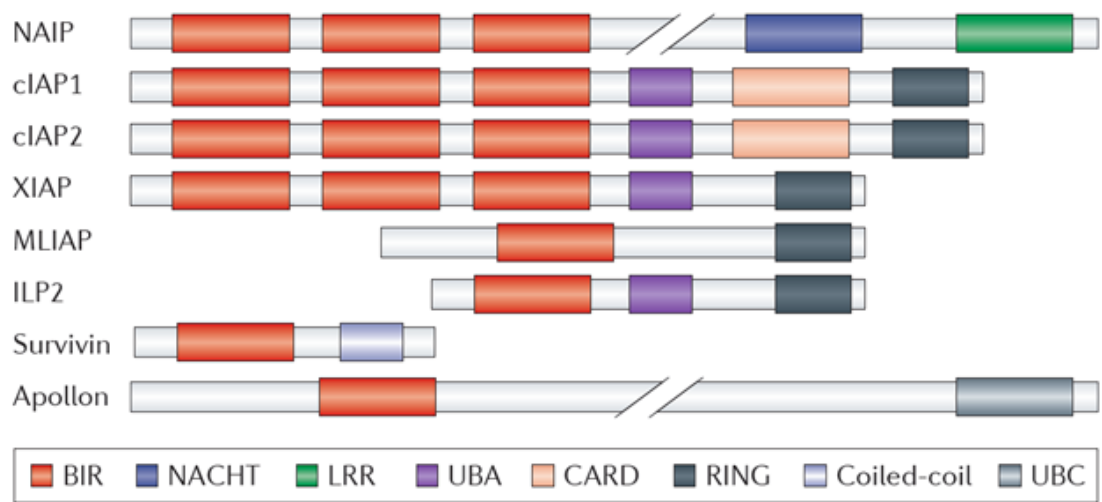


Figure 1-4 IAP たんぱく質ファミリー分子
 引用 : *Nat. Rev. Drug Disc.*, 11, 109-123, 2012.

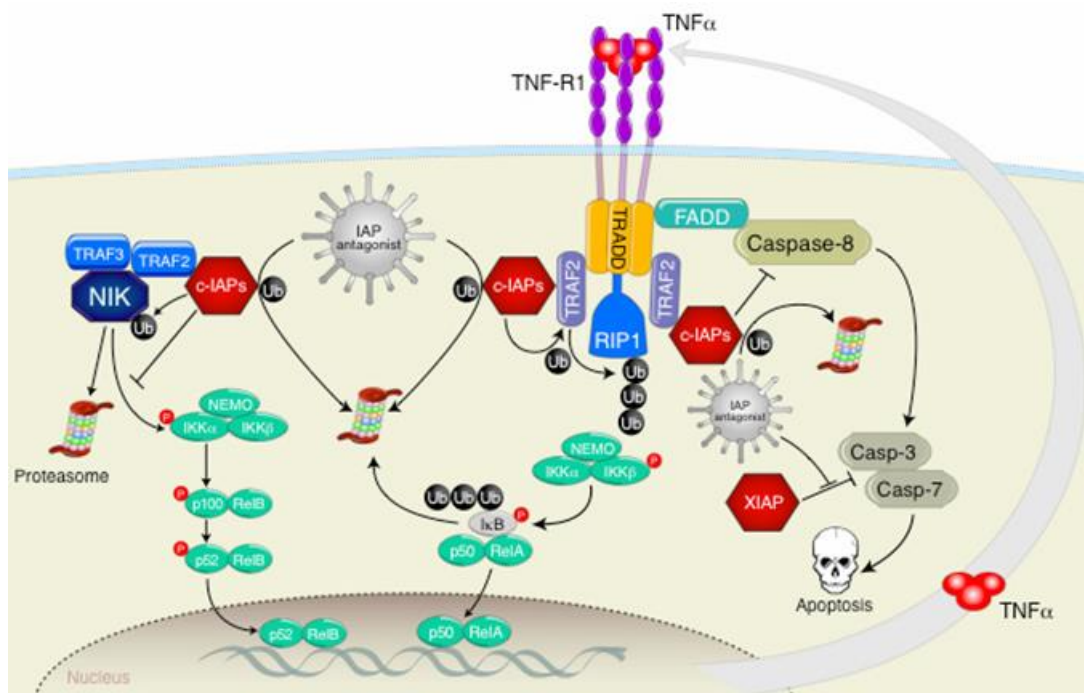


Figure 1-5 IAP antagonist の作用メカニズム
 引用 : *Cell* 131, 669-681, 2007.

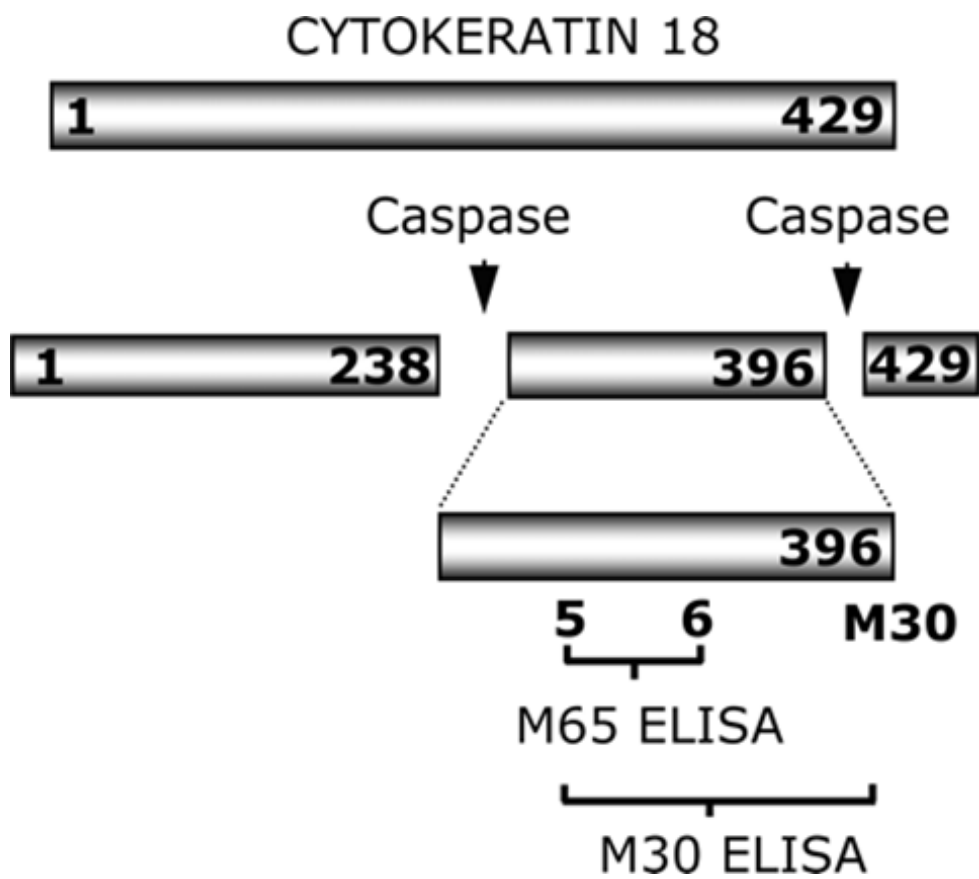


Figure 1-6 Caspase によるサイトケラチン 18 の分解と検出
 引用 : *Cancer Res*, 64, 1751-1756, 2004.

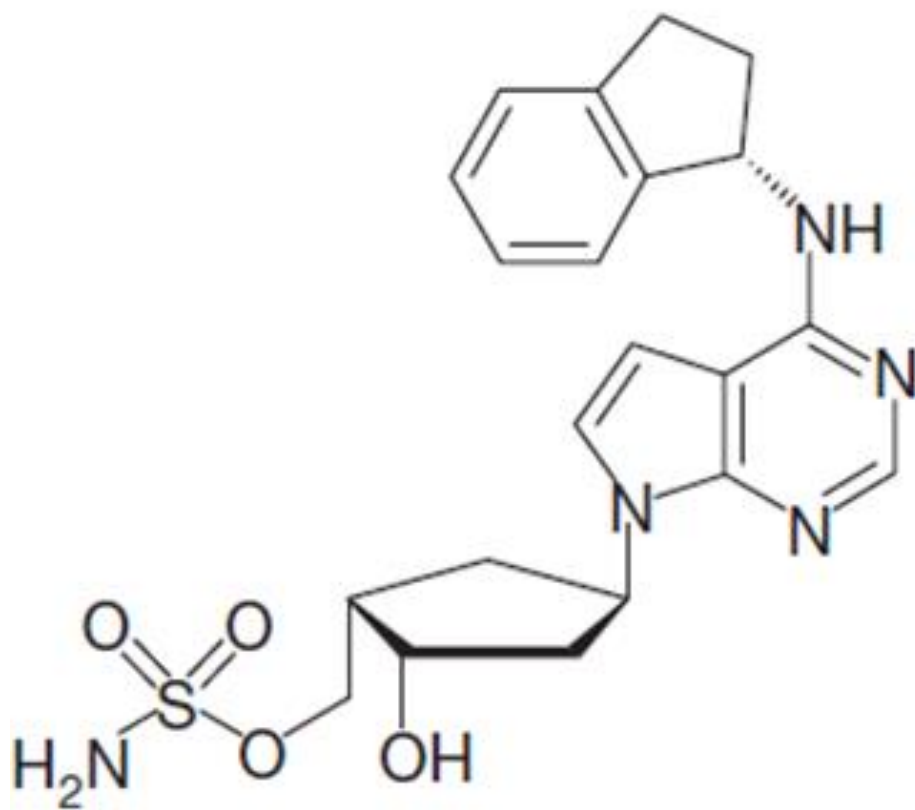


Figure 1-7 Pevonedistat の構造
引用 : *Nature*, 458, 732-736, 2009.

第二章

新規 IAP antagonist T-3256336 の薬効薬理およびバイオマーカーに関する解析

2-1. 要旨

T-3256336 は cIAP-1, cIAP-2 ならびに XIAP に結合し、その機能を抑制することによりがん細胞選択的なアポトーシスを誘導する薬剤として、がん治療薬を目指して武田薬品工業株式会社により創製されたオクタピロロピラジン骨格を有する新規経口 IAP antagonist である。T-3256336 は他社との競合状況を勘案し、同社での開発は中止されている。本章では T-3256336 の生化学的な特長と作用メカニズムを解析することを目的として、分子生物学的手法および細胞生物学的な手法を用いて検討した。さらに薬効動物モデルを用いた解析から、薬効薬理評価とバイオマーカーに関して検討した。

組換えたんぱく質を用いた結合試験および機能的 Caspase 活性回復試験の結果、T-3256336 は cIAP-1, cIAP-2 および XIAP 選択的に結合、機能を抑制する化合物であることが明らかとなった。また培養がん細胞株を用いた解析から、T-3256336 は細胞内において cIAP-1 たんぱく質に作用し、ユビキチン化を介した cIAP-1 たんぱく質の分解と NF κ B シグナルの活性化、TNF α の発現および分泌を誘導し、外因性アポトーシスシグナルに依存した強い細胞死を誘導した。T-3256336 は薬効動物モデルを用いた薬物動態解析において、高い経口吸収性と腫瘍移行性を示した。また、薬効薬理評価において、腫瘍組織における cIAP-1 たんぱく質の分解と TNF α の誘導、Caspase 活性化を誘導し、腫瘍の退縮を来たした。さらに、薬効動物モデルの血液中において TNF α 量およびアポトーシスの指標となるフラグメント化されたサイトケラチン 18 量の増加を認め、非侵襲的手法による薬理作用の検出が可能であることを示した。以上の結果により、T-3256336 は新規 IAP antagonist として有用な薬剤であることが示された。さらに今回の試験において示された各種バイオマーカーの変動率は動物モデルでの薬効との相関が示されており、臨床での薬効を予測する有用なバイオマーカーになりうる可能性が示された。

2-2. 分子生物学的な手法を用いた T-3256336 の IAP antagonist 作用の確認

武田薬品工業株式会社における化合物スクリーニングおよび化合物最適化研究の結果、オクタピロロピラジン骨格を有する新規の低分子 IAP antagonist である T-3256336 を創製した (Figure 2-1)。組換えたんぱく質を用いた Binding assay による解析の結果、T-3256336 の cIAP-1, cIAP-2 および XIAP に対する強い結合活性を有し、その阻害活性の IC₅₀ 値はそれぞれ 1.3 nM, 2.2 nM および 200 nM であった (Figure 2-2)。次に IAP antagonist の XIAP による Caspase-3 抑制作用の解除活性を確認するために、組換えたんぱく質を用いた細胞フリーの機能的 Caspase 活性測定系を設定して解析したところ、XIAP

の組換えたんぱく質は Caspase-3 の活性化を濃度依存的に抑制した(Figure 2-3A)。XIAP の組換えたんぱく質による Caspase-3 の活性抑制が強く認められる XIAP たんぱく質濃度 40 nM の条件において、T-3256336 による抑制解除の活性を測定したところ、濃度依存的な Caspase-3 活性化が認められ、その EC50 値は 1.3 μ M であった(Figure 2-3B)。Caspase-7 および Caspase-9 についても機能的 Caspase 測定系を設定し検討した結果、同様に濃度依存的な Caspase-7 および Caspase-9 の活性化が確認された(Figure 2-3C, D)。以上の結果より、T-3256336 は cIAP-1, cIAP-2 および XIAP に結合し、機能的にその作用を抑制していることが明らかとなった。

2-3. がん細胞に対する T-3256336 の IAP antagonist 作用の確認

IAP antagonist は細胞内において cIAP に結合することにより、ユビキチンプロテアソーム系を介した cIAP-1 たんぱく質の分解、NIK 安定化と RIP1 のリクルートによる NF κ B シグナルの活性化、TNF α の産生、外因性アポトーシスシグナルの強い誘導を来すことが報告されている (Varfolomeev *et. al.*, 2007, Vince *et. al.*, 2007, Petersen *et. al.*, 2007 Wang *et. al.*, 2008)。そこで、一連のシグナル分子の変動に関して、乳がん細胞株の MDA-MB-231 細胞を用いて検討した。T-3256336 は 5 nM 以下の濃度において強い cIAP-1 および cIAP-2 の分解を誘導した。XIAP や Livin のたんぱく質量に変化はなく、cIAP-1/2 に特異的な作用であることが示された(Figure 2-4A)。また、プロテアソーム阻害剤の MG-132 を共処理したところ cIAP-1 たんぱく質の分解が抑制されたことから、ユビキチンプロテアソーム系を介した作用であることが確認された(Figure 2-4B)。時間依存的な解析をしたところ cIAP-1 たんぱく質の分解は 1 時間以内から誘導され、関連する形で、時間依存的な NF κ B シグナルの活性化が認められた(Figure 2-4C)。また、NF κ B 下流にて誘導される TNF α の mRNA 量および培養液中の TNF α を測定したところ、時間依存的な mRNA 誘導と培養液中への TNF α 分泌量の増加が確認された(Figure 2-5A, B)。次に Caspase-3/-7, Caspase-8 および Caspase-9 の活性を測定キットおよびウエスタンブロットにて検討したところ、T-3256336 による強い Caspase-8 と Caspase-3/7 の活性化が時間依存的に認められた。一方で内因性アポトーシスシグナルの指標となる Caspase-9 の活性化はごくわずかの誘導であった(Figure 2-5C, Figure 2-4C)。ATP 量を指標に乳がん細胞株の MDA-MB-231 細胞および正常肺繊維芽細胞の MRC-5 細胞に対する増殖阻害作用を確認した結果、T-3256336 はがん細胞の MDA-MB-231 細胞株選択的に強い増殖阻害作用を示し、その GI₅₀ は 1.8 nM であった(Figure 2-5D)。T-3256336 による増殖阻害作用の IAP 選択性を検討するため、TNF α の中和抗体および Pan-caspase 阻害剤の z-VAD-FMK および Caspase-8 選択的阻害剤の z-IETD-FMK の共処理による増殖への影響を検証した。その結果、いずれの阻害剤においても濃度依存的な増殖抑制作用の減弱が認められ(Figure 2-6)、TNF α を介した外因性アポトーシスシグナルを介した作用であることが示唆された。以上の結果から、T-3256336 はがん細胞選択的に作用し、強い細胞死を誘導することが確認された。

2-4. T-3256336 のマウスにおける薬物動態解析

T-3256336 のマウスにおける薬物動態を検証するため、10, 30, 50, 100 mg/kg の T-3256336 を MDA-MB-231-Luc Xenograft マウスに経口にて単回投与し、経時的に血液と腫瘍を回収して薬物濃度を測定した。T-3256336 の 10, 30, 50 および 100 mg/kg 投与による薬物血液濃度-時間曲線下面積 (AUC) はそれぞれ血液中で 0.29 ± 0.07 , 1.85 ± 0.24 , 3.53 ± 0.81 および 8.03 ± 0.51 $\mu\text{g h/ml}$ 、腫瘍中で 4.02 ± 2.23 , 11.20 ± 0.94 , 23.05 ± 1.41 および 63.09 ± 0.86 $\mu\text{g h/mg}$ であった。腫瘍における AUC は血液中の AUC と比較して約 6~14 倍高かった (Table 2-1, Figure 2-7)。以上の結果から、T-3256336 は非常に優れた経口吸収性と腫瘍への移行性を示すことが明らかとなった。

2-5. T-3256336 の MDA-MB-231-Luc xenograft マウスにおける IAP antagonist 特異的なファーマコダイナミクスバイオマーカーの解析

T-3256336 の腫瘍に対する薬理作用を検討するため、10, 30, 50, 100 mg/kg の T-3256336 を MDA-MB-231-Luc Xenograft マウスに経口にて単回投与し、経時的に血液および腫瘍を回収して各種解析に供した。腫瘍内の cIAP-1 たんぱく質量の減少は単回投与後 30 分以内に速やかに確認され、その効果は 24 時間後まで持続した (Figure 2-8)。腫瘍組織から産生されるマウス血液中のヒト TNF α 量は濃度依存的に増加し、投与後 6 時間に最高濃度に達した (Figure 2-9A)。Caspase-3/7 活性化は 30 mg/kg 以上の投与量において誘導が確認され、その効果は濃度依存的に持続が確認された (Figure 2-9B)。更に、細胞死の指標となるサイトケラチン 18 (M65) の合計量および Caspase 特異的なサイトケラチン断片 (M30) の血液中濃度も Caspase-3/7 活性と同様に 30 mg/kg 以上の投与量において濃度依存的に増加した (Figure 2-9C, D)。以上の結果より、T-3256336 は薬効評価モデル動物の腫瘍組織において IAP antagonist として濃度依存的に作用することが確認された。さらに、血液中の指標として TNF α 量および M30/M65 によりモニター可能であることが示された。

2-6. T-3256336 の Xenograft モデルに対する薬効薬理作用の解析

T-3256336 の抗がん剤としての薬理作用を確認するために、MDA-MB-231-Luc xenograft マウスに対して 10, 30, 50, 100 mg/kg の T-3256336 を 1 日 1 回経口投与し、経時的に腫瘍サイズと体重、一般状態を観察した。10 mg/kg の T-3256336 を投与した群においては腫瘍の増殖はほぼ抑制され、腫瘍/コントロール群の比率 (T/C) は約 5% であった。一方、30, 50 および 100 mg/kg 投与群においては、腫瘍の退縮作用が確認され、それぞれ薬物投与開始時の腫瘍サイズと比較して 79%, 86% および 90% の腫瘍の縮小が確認された (Figure 2-10A)。重要なことに、10, 30 および 50 mg/kg の薬物投与時の有意な体重減少は確認されなかった (Figure 2-10B)。次に血液がん細胞株の HL-60 xenograft マウスに対する薬理作用を同様に確認したところ、濃度依存的な腫瘍の抑制効果が確認され (Figure 2-11A)、投与後の腫瘍を用いた病理的な解析の結果、アポトーシス細胞の増加が確認された (Figure 2-11B)。

さらに、マウス個体を用いた一般病理学的な解析の結果、毛根の萎縮、皮膚の過角化、脾臓の肥大に対して若干の異常を認めたが(data not shown)、肝臓や小腸、その他組織における異常は 100 mg/kg 投与においても確認されなかった(Figure 2-12)。以上の結果より、T-3256336 は重篤な副作用を示さずに、抗腫瘍作用を示すことが明らかとなった。

2-7. MDA-MB-231-Luc xenograft モデルにおけるファーマコダイナミクスバイオマーカーと抗腫瘍効果の相関解析

薬効マウスモデルにおけるファーマコダイナミクスバイオマーカーの変動と抗腫瘍効果の相関を解析するために、2.3 で測定した各種ファーマコダイナミクスパラメーターの Area under the effect (AUE: PD レスponse曲時間下面積)を算出した cIAP-1 たんぱく質の腫瘍内 AUE_{cIAP-1 degradation (0-24 h)}は 10 mg/kg の投与においてすでに飽和していた(Figure 2-13A)。血液中の TNF α の AUE_{TNF α (0-24 h)}, M30 の AUE_{M30 (0-48 h)}および M65 の AUE_{M65 (0-48 h)}は 10 mg/kg から 50 mg/kg の投与において用量依存的に増加し、50 mg/kg 以上の投与ではほぼ同等であった(Figure 2-13B, Figure 2-13D, Figure 2-13E)。一方で、腫瘍内の Caspase 活性化の AUE_{caspase activation (0-72 h)}は 100 mg/kg 投与まで濃度依存的な増加が確認された(Figure 2-13C)。腫瘍退縮率 (TGI: Tumor growth inhibition) との相関を検証すると、血液中の TNF α , M30 および M65 との相関が確認され(Figure 2-14)、この結果はこれらのファーマコダイナミクスパラメーターが臨床での薬効を予測しうるものであることを示唆している。

2-8. 考察

IAP たんぱく質ファミリーはがん選択的な細胞死を誘導する点でがんの創薬ターゲットとして注目を集めている。本研究において、武田薬品工業株式会社が創製したオクタピロロピラジン骨格を有する新規経口 IAP antagonist T-3256336 が cIAP-1, cIAP-2 および XIAP に選択的に結合し、細胞内での cIAP-1 たんぱく質の分解、NF κ B の活性化、TNF α の産生を誘導し、最終的に強い細胞死を起こすことを明らかにした(Figure 2-15)。またマウス薬効モデルにおける解析において、*in vitro* の強い阻害作用と相関するように腫瘍内での cIAP-1 たんぱく質の分解、TNF α および Caspase 活性化を誘導し、強い抗腫瘍効果を示した。

T-3256336 の IAP たんぱく質ファミリーに対する結合活性は XIAP と比較して cIAP1 および cIAP-1 に対して強いものであった(Figure 2-2)。この cIAP に対する選択性はたんぱく質と T-3256336 の共結晶解析の結果からも示されている(Hashimoto *et. al.*, 2013)。組換えたんぱく質を用いた細胞フリーの機能的 Caspase 活性測定系において、T-3256336 は IAP antagonist による強いアポトーシス誘導に重要な XIAP の機能を抑制し、Caspase の活性を効率的に誘導することが示された(Figure 2-3)。T-3256336 のマウスモデルを用いた薬物動態解析の結果では、用量依存的な腫瘍内濃度の増加を認めており、30 mg/kg 以上の投与

量における腫瘍内濃度は XIAP を機能的に阻害するのに十分な濃度に達していることが確認された(Table 2-1, Figure 2-7)。これらの結果は T-3256336 がマウスモデルにおいても強い抗腫瘍効果を示す可能性を示唆した。

次に、マウス薬効モデルにおける解析の結果、T-3256336 は単回投与において非常に早い cIAP-1 たんぱく質の分解(Figure 2-8)、TNF α の産生、Caspase 活性化を誘導した(Figure 2-9)。これらファーマコダイナミクスパラメーターの誘導時間は cIAP-1 が 30 分後には分解され 24 時間持続するのに対して、TNF α の血中量増加は 6 時間後、Caspase 活性化は 12 時間後にピークに達した(Figure 2-9)。この時間的なタイムラグは IAP antagonist の作用メカニズムを考えた際にリーズナブルな変化であったと考えられる。ファーマコダイナミクスパラメーターの解析で示された cIAP-1 たんぱく質の分解 AUE_{cIAP-1 degradation (0-24 h)}、血液中 TNF α の AUE_{TNF α (0-24 h)} は 10 mg/kg から 50 mg/kg まで用量依存的な傾向で増加するが、高用量ではその増加ペースは鈍くなっており(Figure 2-9)、30~50 mg/kg の用量で E_{max} に到達していると考えられる。cIAP-1 の分解および TNF α 産生は IAP antagonist による cIAP-1 阻害作用を反映したものであることから、T-3256336 の cIAP-1 に対する活性と腫瘍内濃度を総合的に解析すると、T-3256336 が MDA-MB-231-Luc の腫瘍に対して TNF α 依存的なアポトーシスシグナルを誘導する能力を有していることを示している。一方で Caspase 活性化に対する AUE_{Caspase activation (0-72 h)} は 100 mg/kg の用量まで濃度依存的な増加を示した。Caspase 活性化の最大誘導能は 50 mg/kg と 100 mg/kg のいずれの用量においても同等であったが、活性化の持続時間は 50 mg/kg の投与に比べて 100 mg/kg において長かった(Figure 2-9)。この持続的な作用は腫瘍内の T-3256336 濃度を反映した結果であると考えられ、T-3256336 による XIAP 阻害活性が寄与した結果であると推察される。T-3256336 は 100 mg/kg の週 1 回投与においても MDA-MB-231-Luc xenograft モデルに対する強い増殖阻害作用を示しており(data not shown)、Caspase の持続的な活性化が寄与したものであると考えられる。これらの結果から、強い増殖阻害作用の誘導には cIAP-1 と XIAP 両者の阻害活性が重要であり、T-3256336 は副作用を示さない用量において強い抗腫瘍効果を示すことができる有用な IAP antagonist であることが示唆された。

サイトケラチンは上皮系の細胞や腫瘍において発現しており、可溶化もしくは断片化されたサイトケラチンが上皮系がん患者の血液中において検出可能なことから、がんの診断に用いられている(Chu *et. al.*, 2002, Lane *et. al.*, 1990)。本章にて検出した M65 は全長および Caspase によって断片化されたサイトケラチン 18 を検出することから、細胞の細胞死全体を反映する指標として用いられている。一方で M30 は Caspase により断片化された新規エpiteープのみを特異的に検出することから、Caspase 依存的なアポトーシスを表す指標として用いられている(Kramer *et. al.*, 2004)。近年の研究においてサイトケラチン 18 の血液中量が抗がん剤、特に細胞死を誘導する薬剤の薬効を予測するマーカーとなりうる可能性が示されていることから、本検討においても血液中の M30 および M65 の検出を行った。T-3256336 の単回投与により用量依存的な血液中の M30 および M65 の増加が確認さ

れ、その増加のピークは投与後9時間であった(Figure 2-9)。近年の研究から IAP antagonist は Caspase 依存的なアポトーシスだけでなく、RIP1 も同時並行的に介したネクロトーシスを誘導することが報告されている。したがって、T-3256336 により Caspase 依存的な M30 だけでなく、M65 の増加が認められたことは、Caspase 依存的なアポトーシスと平行してネクロトーシスも誘導している可能性を示唆している(Feoktistova *et. al.*, 2011 Tenev *et. al.*, 2011)。また、ファーマコダイナミクスの解析において、M30 および M65 の AUE は抗腫瘍効果と相関した。これらのデータは血液を用いたサンプルの解析により抗腫瘍効果を予測できる可能性を示しており、臨床での適応に有効である可能性が示された。

2-9. まとめ

本章における解析において、武田薬品工業株式会社が創製したオクタピロロピラジン骨格を有する新規経口 IAP antagonist T-3256336 が cIAP-1, cIAP-2 および XIAP に選択的に結合し、細胞内での cIAP-1 たんぱく質の分解、NF κ B の活性化、TNF α の産生を誘導し、最終的にがん細胞選択的な強い細胞死誘導することを明らかにした(Figure 2-15)。またマウス薬効モデルにおける解析において、T-3256336 は経口吸収性、腫瘍移行性に優れ、*in vitro* の強い阻害作用と相関して、腫瘍内での cIAP-1 たんぱく質の分解、TNF α および Caspase 活性化を誘導し、強い抗腫瘍効果を示した。さらにファーマコダイナミクスの解析の結果、血液中の TNF α , M30 および M65 の増加量が薬効モデルマウスにおける抗腫瘍効果と高い相関を示し、臨床において薬効を予測しうる非侵襲的なバイオマーカーとして活用可能であることを示唆した。これらの結果は T-3256336 が IAP antagonist としてのプロファイルに優れており、臨床開発の可能性を示している。一方で IAP antagonist が抗腫瘍効果を示すがん細胞株および動物モデルは限られていることが報告されている。次章では IAP antagonist の感受性を規定する因子とそのメカニズムに関して検討を行う。

| | | Dose (mg/kg) | 10 | 30 | 50 | 100 |
|--------|---------------------------------------|--------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| plasma | C_{max} ($\mu\text{g/mL}$) | | 0.19 \pm 0.06 | 1.11 \pm 0.18 | 1.89 \pm 0.21 | 3.86 \pm 0.64 |
| | T_{max} (h) | | 1.00 \pm 0.00 | 0.75 \pm 0.43 | 0.75 \pm 0.43 | 0.50 \pm 0.43 |
| | AUC ($\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$) | | 0.29 \pm 0.07 | 1.85 \pm 0.24 | 3.53 \pm 0.81 | 8.03 \pm 0.51 |
| | MRT (h) | | 1.68 \pm 0.46 | 1.36 \pm 0.29 | 2.17 \pm 0.40 | 1.87 \pm 0.20 |
| | | Dose (mg/kg) | 10 | 30 | 50 | 100 |
| tumor | C_{max} ($\mu\text{g/mg}$) | | 0.51 \pm 0.13 | 1.67 \pm 0.21 | 3.02 \pm 0.20 | 8.29 \pm 1.43 |
| | T_{max} (h) | | 2.33 \pm 1.15 | 2.33 \pm 1.15 | 2.17 \pm 1.44 | 1.00 \pm 0.00 |
| | AUC ($\mu\text{g}\cdot\text{h/mg}$) | | 4.02 \pm 2.23 | 11.20 \pm 0.94 | 23.05 \pm 1.41 | 63.09 \pm 0.86 |
| | MRT (h) | | 10.29 \pm 2.91 | 6.86 \pm 0.35 | 8.88 \pm 0.75 | 9.92 \pm 0.25 |

Mean \pm S.D.

Table 2-1 T-3256336 のヌードマウスにおける薬物動態パラメーター
10, 30, 50, and 100 mg/kg の T-3256336 をヌードマウスに単回投与後の薬物動態パラメーターを示す、データは N =3 の平均および標準偏差を示す

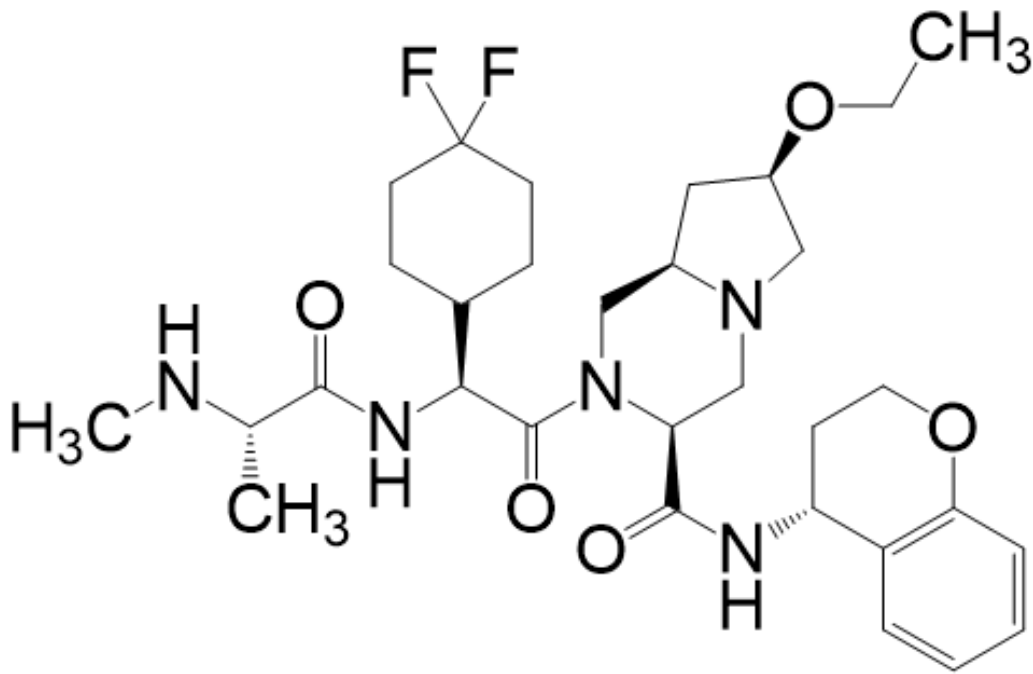


Figure 2-1 T-3256336 の構造

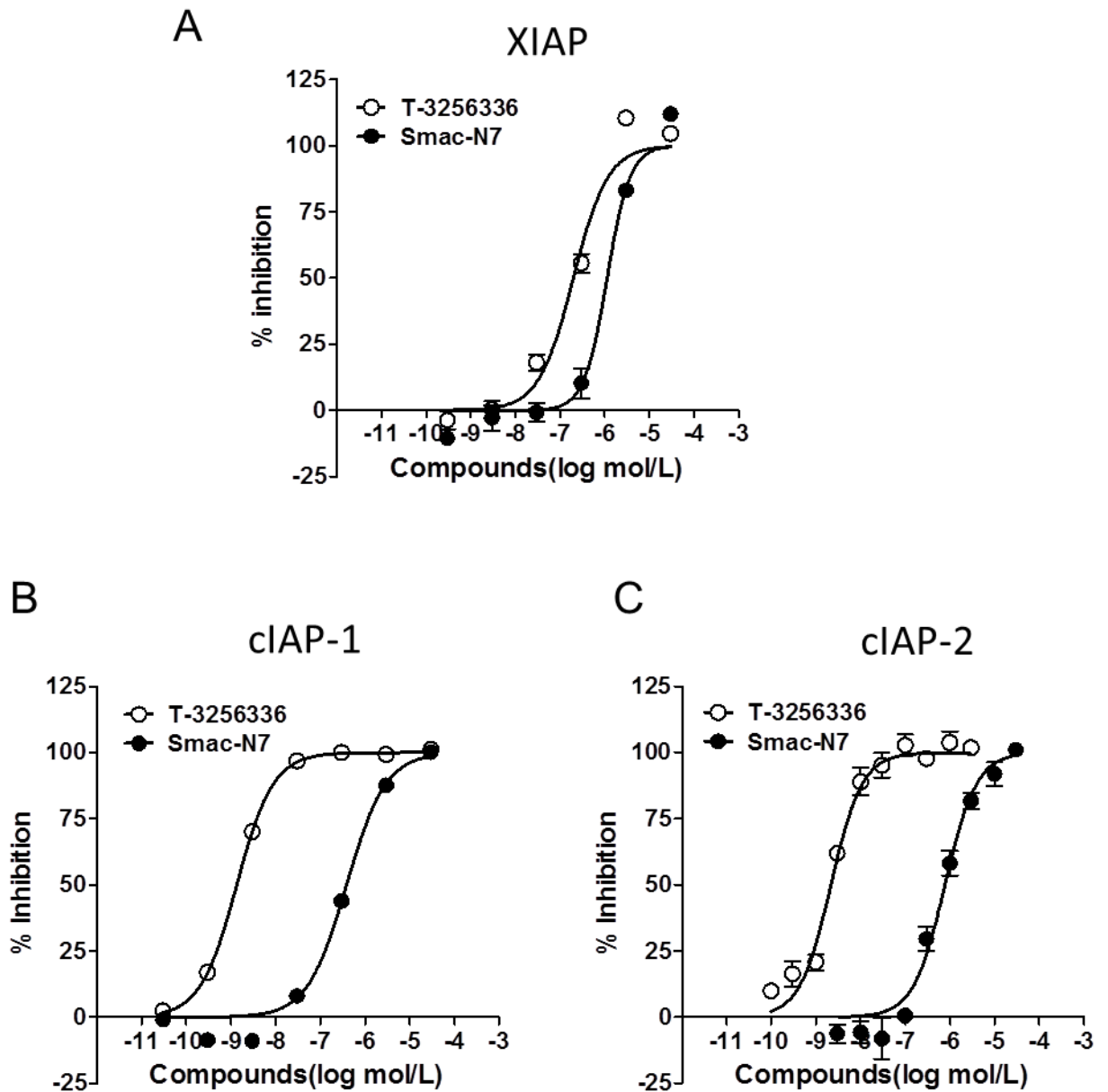


Figure 2-2 T-3256336 の IAP ファミリーたんぱく質と内在性リガンド Smac の N 末端 7 ペプチドの結合を阻害する活性, FRET 系を用いた Binding assay
 A: XIAP との結合阻害活性, B: cIAP-1 との結合阻害活性, C: cIAP-2 との結合阻害活性
 データは N =3 の平均および標準偏差を示す

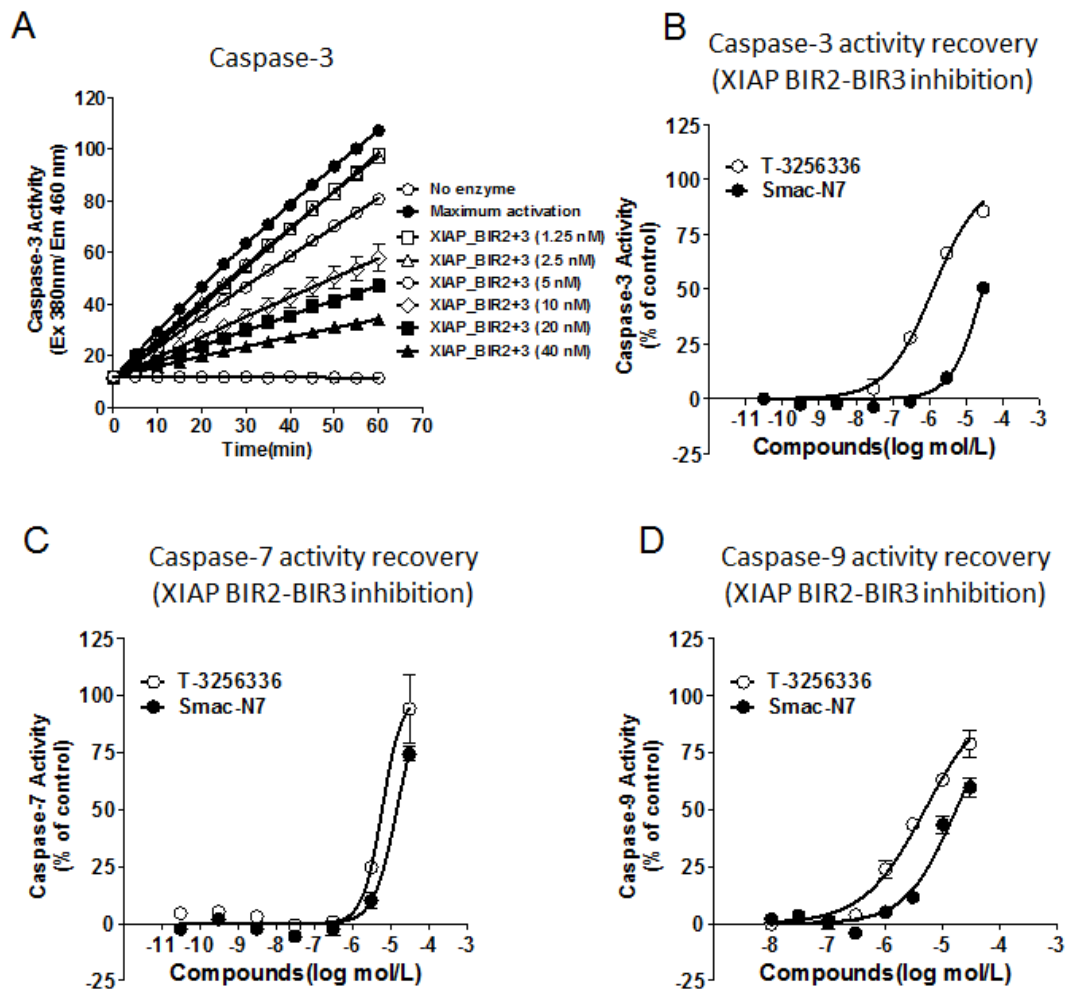


Figure 2-3 T-3256336 による Caspase 活性回復試験

A: XIAP による Caspase-3 阻害作用,

B: T-3256336 による Caspase-3 の XIAP 阻害を解除する活性,

C: T-3256336 による Caspase-7 の XIAP 阻害を解除する活性,

D: T-3256336 による Caspase-9 の XIAP 阻害を解除する活性

データは N =3 の平均および標準偏差を示す

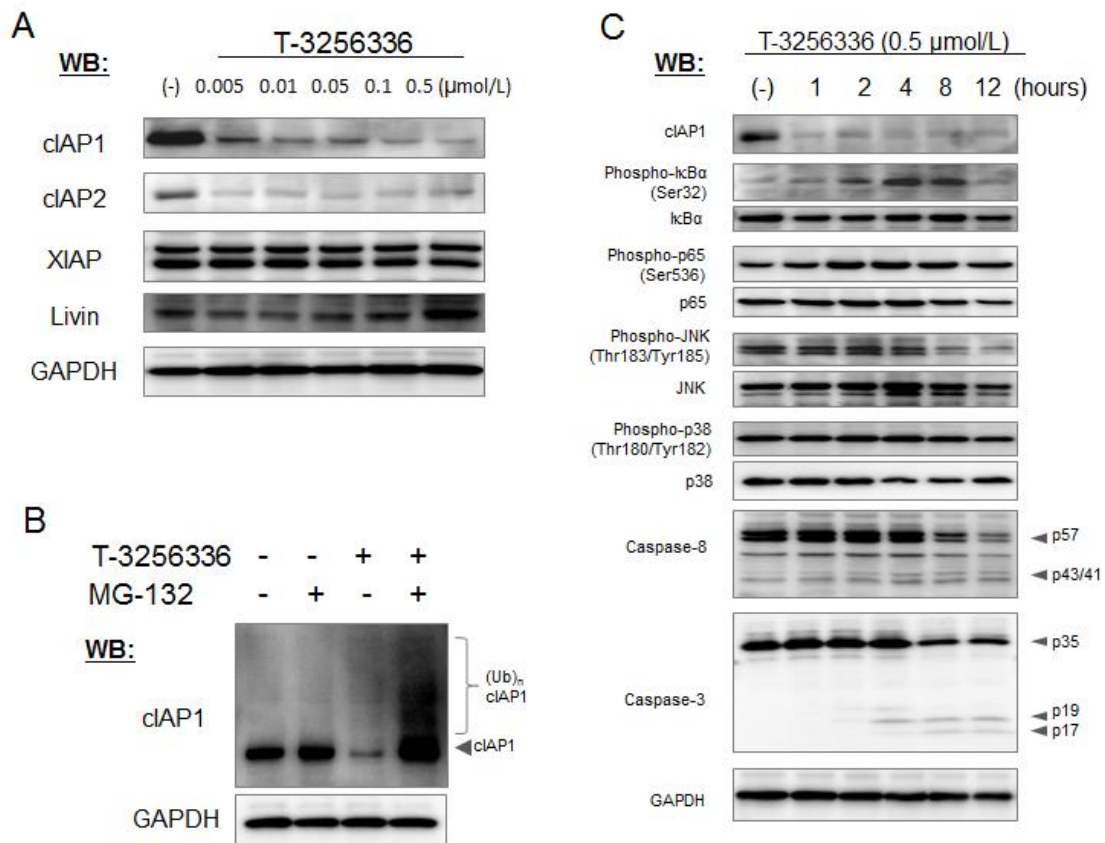


Figure 2-4 T-3256336 による MDA-MB-231 細胞内シグナルへの影響

A: IAP たんぱく質ファミリーの発現変化、化合物 8 時間後のサンプルを回収して、実験方法に記載の方法にてウェスタンブロッティングにより検出

B: cIAP-1 たんぱく質変化、化合物 8 時間後のサンプルを回収して、実験方法に記載の方法にてウェスタンブロッティングにより検出、MG-132 : プロテアソーム阻害剤

C: 細胞内シグナル変化、

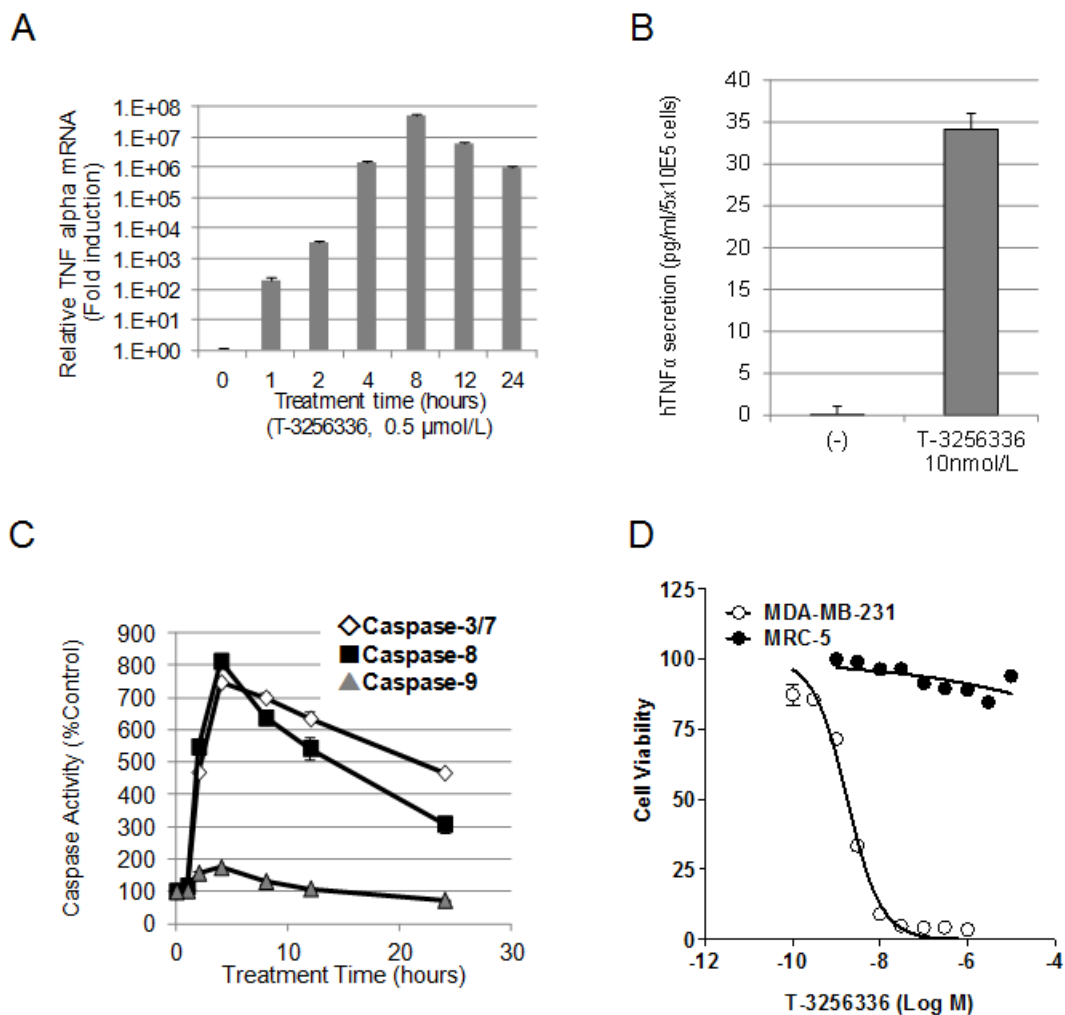


Figure 2-5 MDA-MB-231 細胞における TNF α 誘導作用、Caspase 活性と増殖抑制作用
A: TNF α mRNA レベル、化合物処理後 RNA を回収して Real-time PCR にて測定
B: 培養液中 TNF α 量、化合物処理 24 時間後の培地を回収して実験方法に記載の方法にて培地中 TNF α 量を定量
C: Caspase 活性の時間変化、500 nM の化合物処理後、実験方法に記載の方法にて Caspase 活性を測定
D: 増殖試験、化合物処理 3 日後に実験方法に記載の方法にて ATP 量を測定、いずれもデータは N =3 の平均および標準偏差を示す

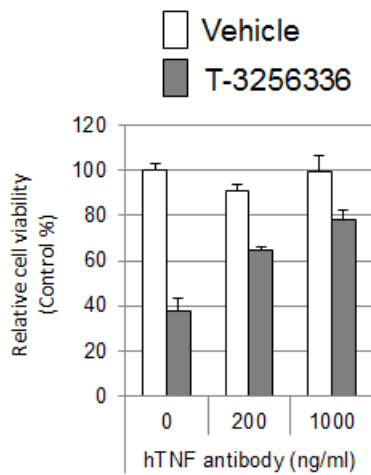
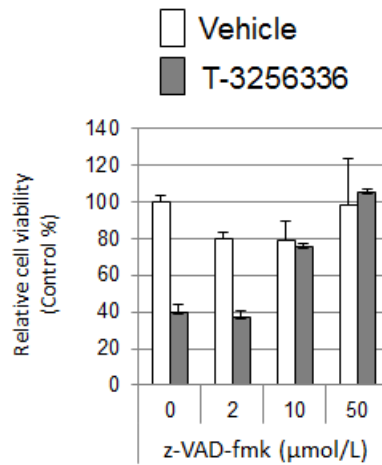
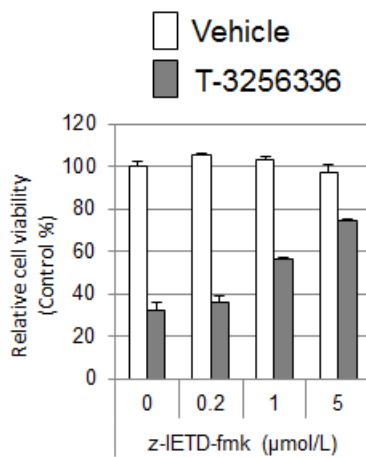
A**B****C**

Figure 2-6 T-3256336 の増殖阻害活性に対する各種阻害剤の影響

A: hTNF 抗体による作用

B: z-VAD-fmk (Pan-caspase 阻害剤)による作用,

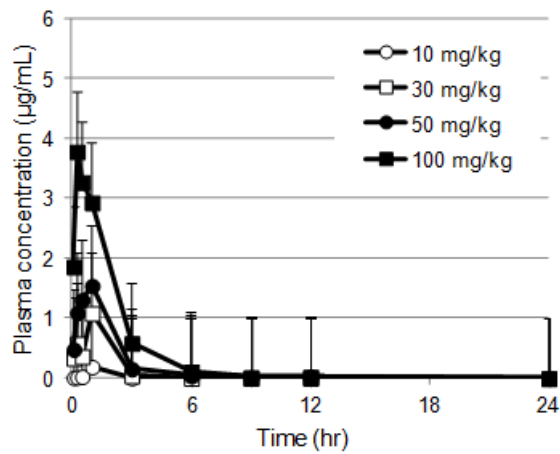
C: z-IETD-fmk (Caspase-8 選択的阻害剤)による作用

T-3256336 濃度 : 10 nM,

化合物処理 3 日後に実験方法に記載の方法にて ATP 量を測定、

データは N =3 の平均および標準偏差を示す

A



B

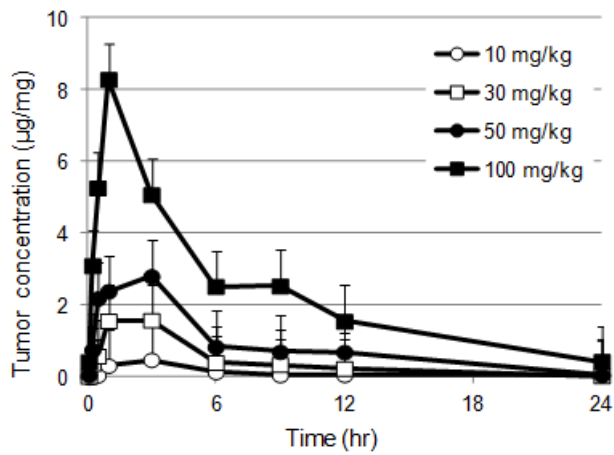


Figure 2-7 T-3256336 の血液中および腫瘍内濃度

10, 30, 50, and 100 mg/kg の T-3256336 をヌードマウスに単回投与後の血液中 (A)および腫瘍内(B)の化合物濃度を実験方法に記載の方法にて定量
データは N =3 の平均および標準偏差を示す

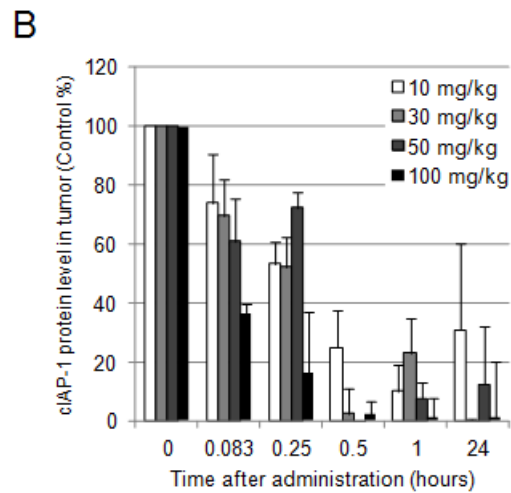
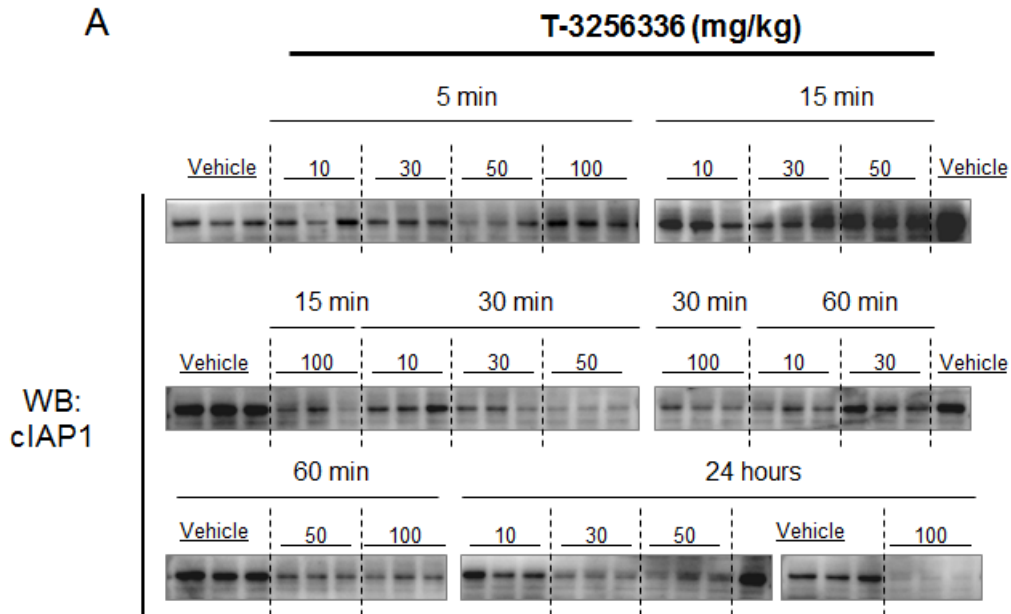


Figure 2-8 T-3256336 投与後の腫瘍内 cIAP-1 たんぱく質量変化

A: ウェスタンブロット

B: 数値化データ、データは N =3 の平均および標準偏差を示す

10, 30, 50, and 100 mg/kg の T-3256336 をヌードマウスに単回投与後の腫瘍を回収して、実験方法に記載の方法にて cIAP-1 たんぱく質量を定量

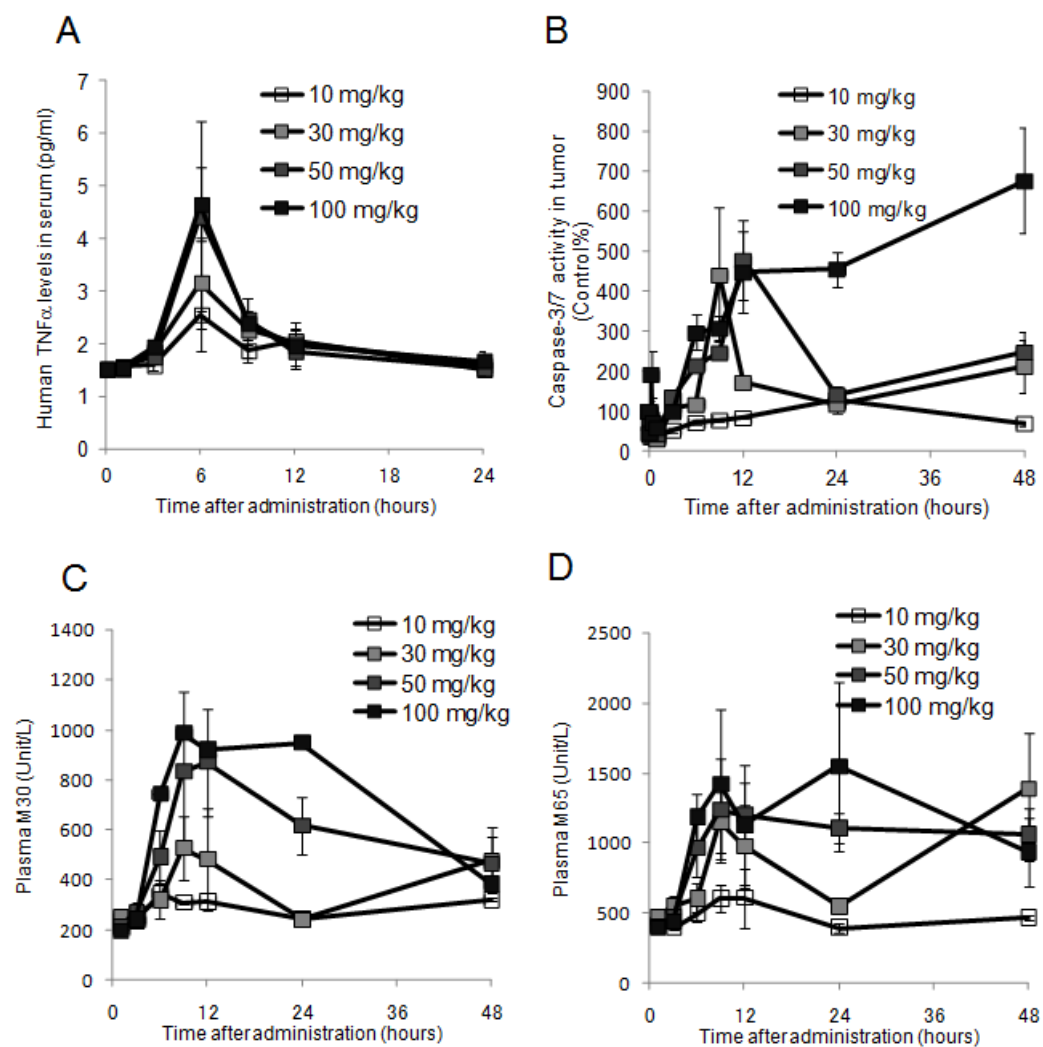
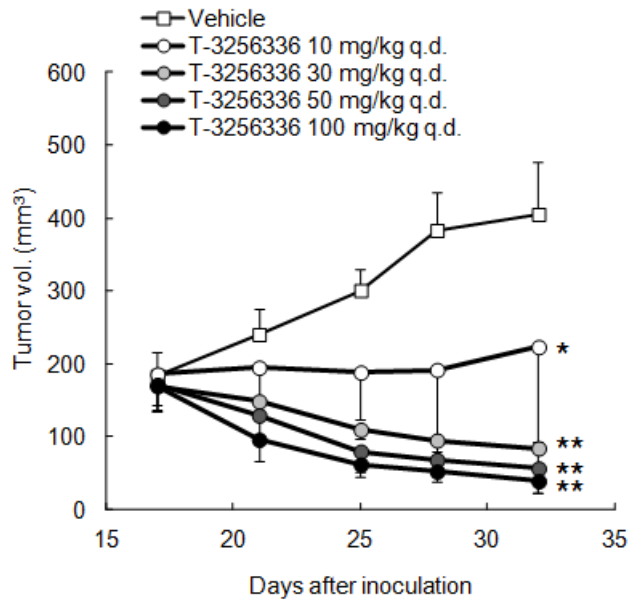


Figure 2-9 T-3256336 投与後のファーマコダイナミクスパラメーター

A: 血中のヒト TNF α 量, B: 腫瘍内 Caspase-3/7 活性, C: 血中 M30 量, D: 血中 M65 量
 データは N=3 の平均および標準偏差を示す

A



B

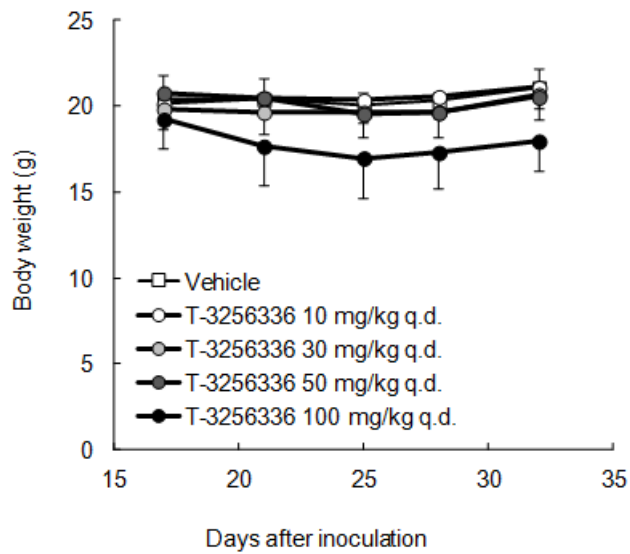


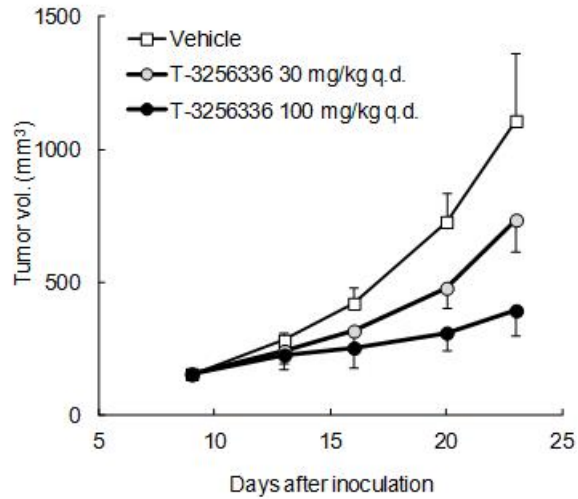
Figure 2-10 T-3256336 投与の MDA-MB-231-Luc モデルにおける薬効

A: 腫瘍サイズ, B: 体重

10, 30, 50, and 100 mg/kg の T-3256336 を 1 日 1 回経口投与して、腫瘍サイズと体重を週に 2 回計測、データは N = 5 の平均および標準偏差を示す

Shirley-Williams test, *, P < 0.05, **, P < 0.01. vs vehicle treatment.

A



B

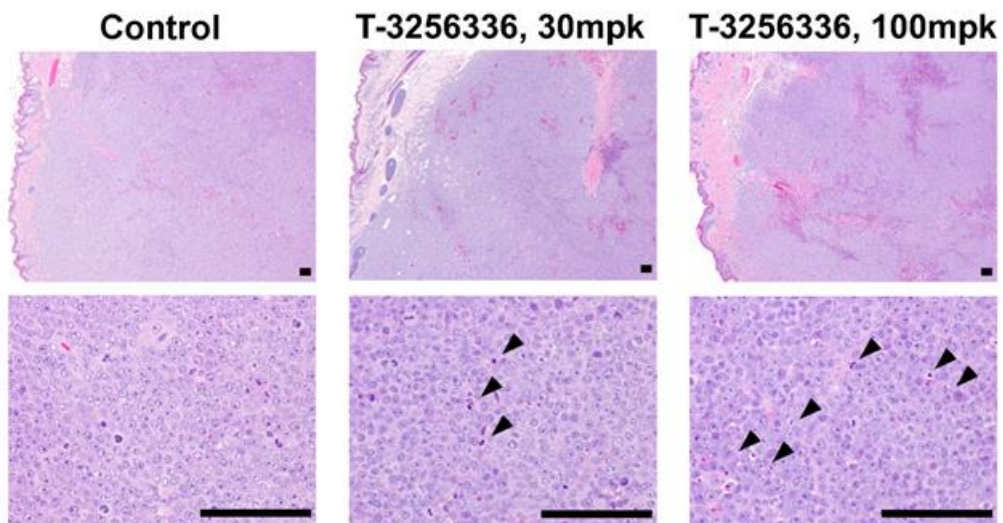


Figure 2-11 T-3256336 の HL-60 xenograft モデルにおける薬効

A: 腫瘍サイズ, データは N =5 の平均および標準偏差を示す

B: 薬効試験終了後の腫瘍 HE 染色像、黒矢印はネクロシスもしくはアポトーシス像を示す (Bar =100 μ m)

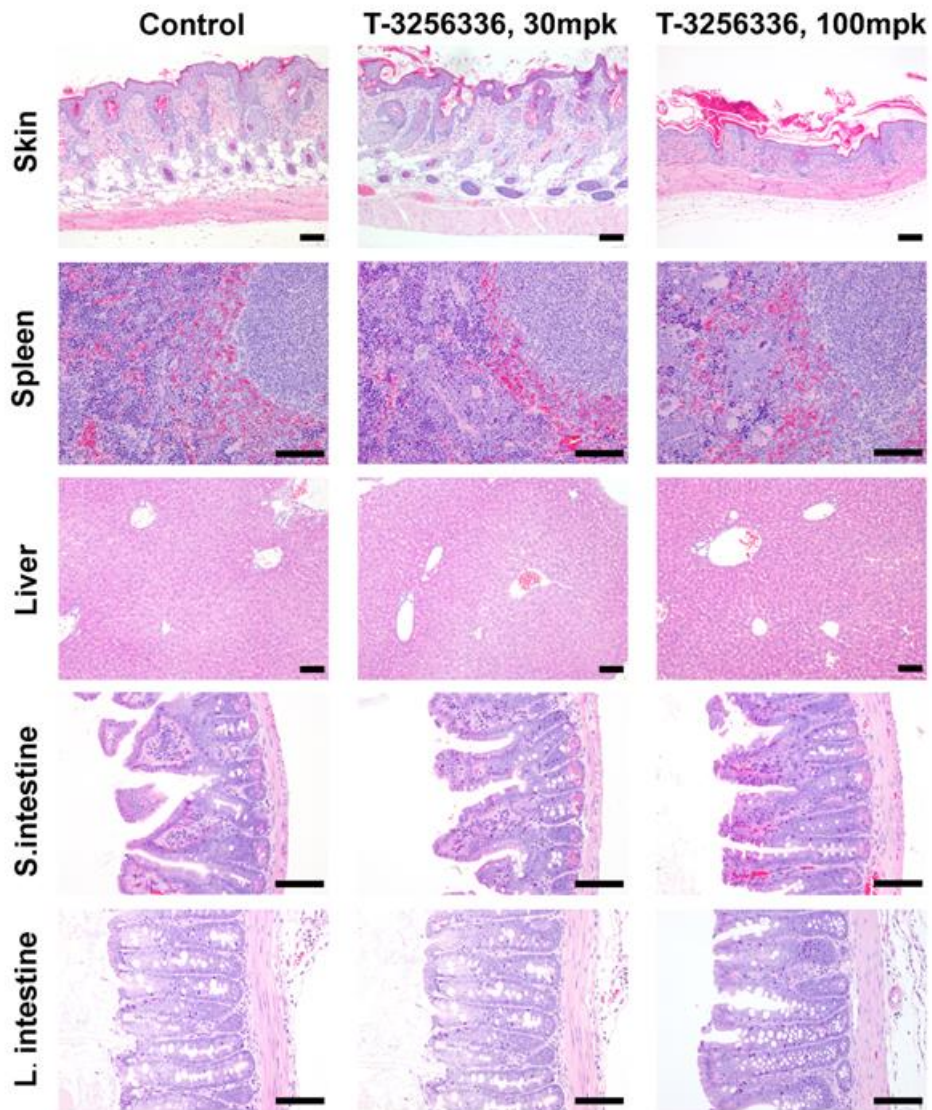


Figure 2-12 T-3256336 投与終了後の各種組織の HE 染色像(Bar =100 μ m)

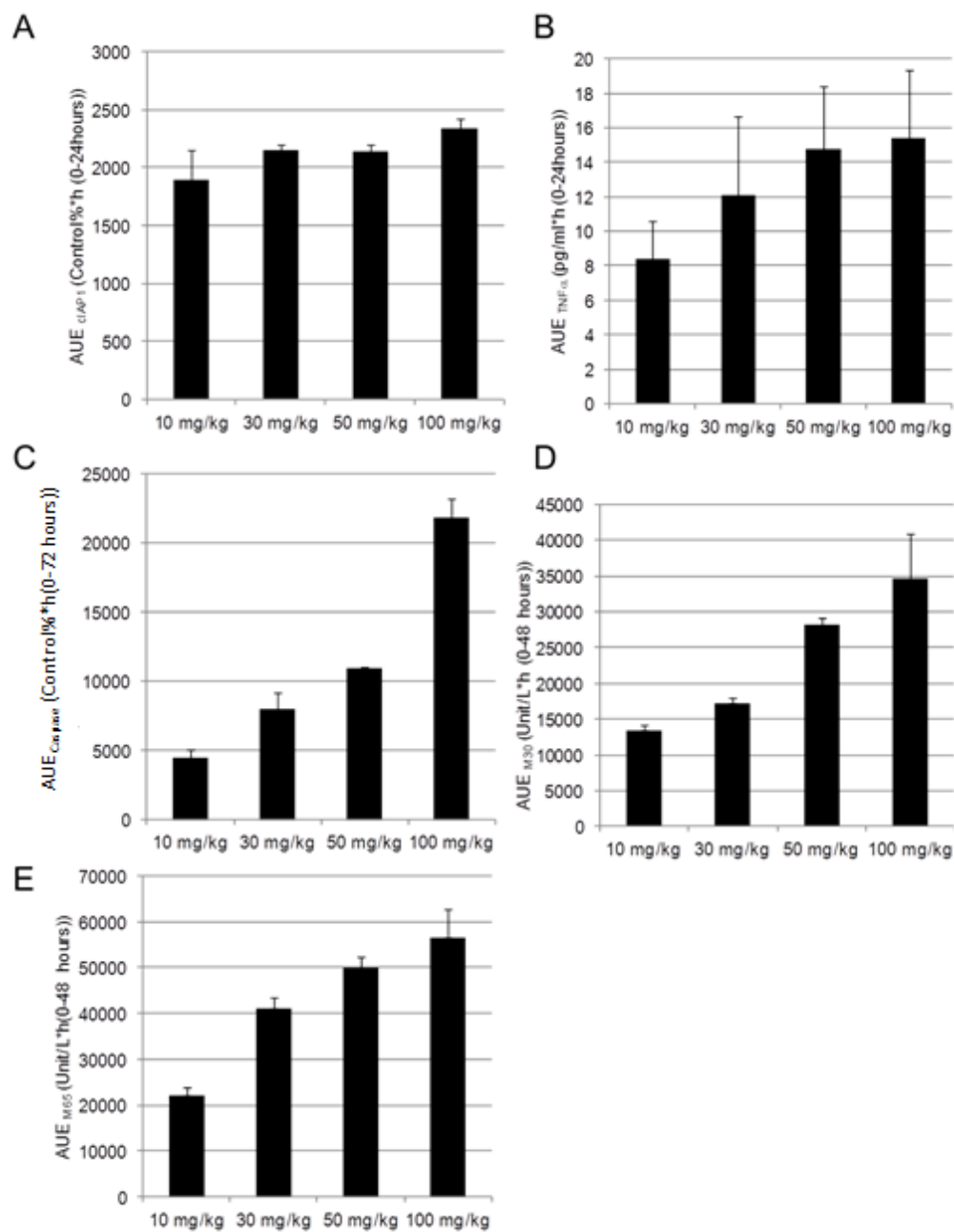


Figure 2-13 T-3256336 のファーマコダイナミクスパラメーターの AUE
 A: 腫瘍内 cIAP-1, B: 血中ヒト TNF α , C: 腫瘍内 Caspase-3/7 活性
 D: 血中 M30 量, E: 血中 M65 量
 データは N =3 の平均および標準偏差を示す

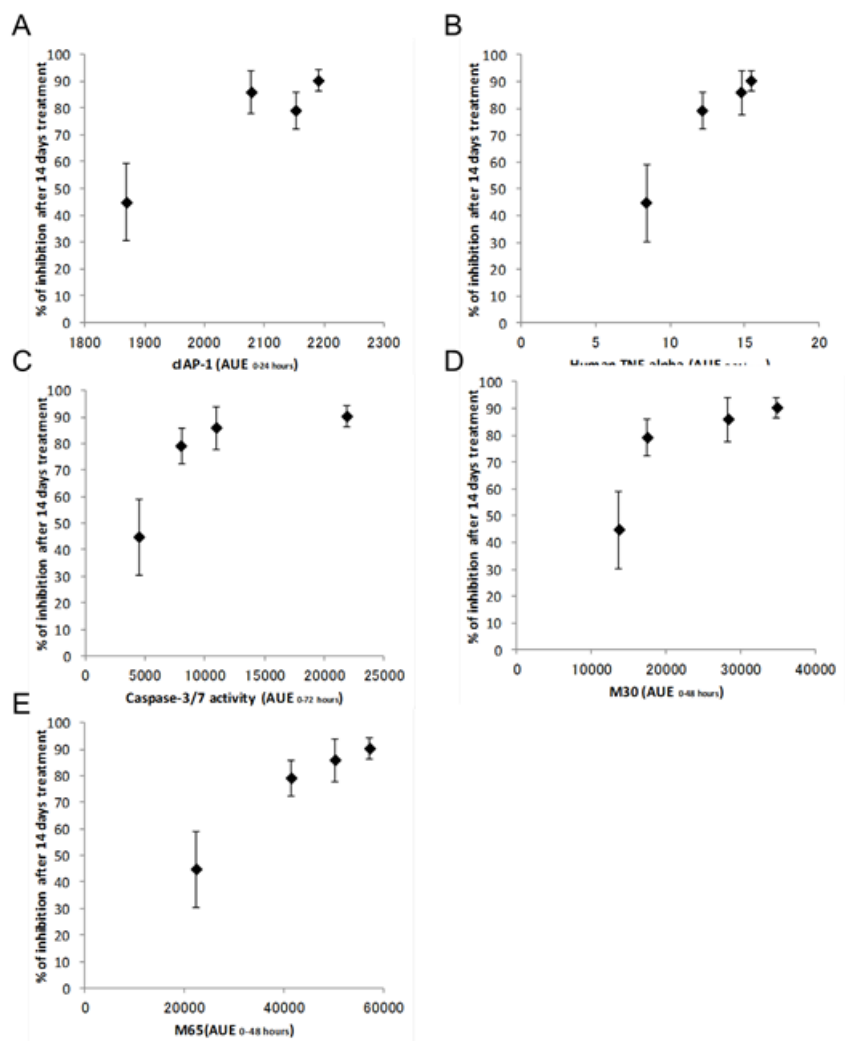


Figure 2-14 T-3256336 のファーマコダイナミクスパラメーターAUE と抗腫瘍効果
 A: 腫瘍内 cIAP-1, B: 血中ヒト TNF α , C: 腫瘍内 Caspase-3/7 活性
 D: 血中 M30 量, E: 血中 M65 量
 データは N =3 の平均および標準偏差を示す

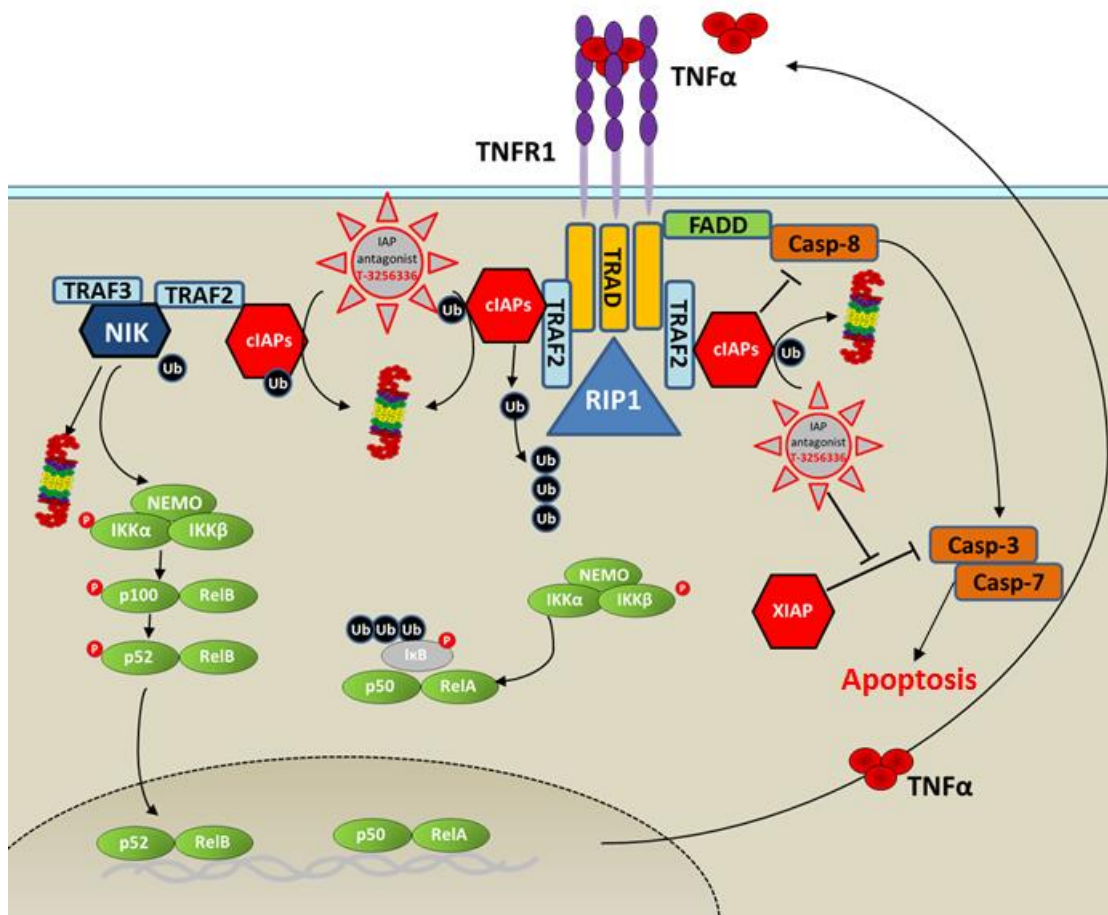


Figure 2-15 T-3256336 の作用メカニズム

第三章

IAP antagonist T-3256336 の Systemic TNF alpha を介した薬効に関する薬理的解析

3-1. 要旨

第二章では武田薬品工業株式会社が創製した T-3256336 は TNF α オートクラインに外因性アポトーシスシグナルを活性化して、がん細胞選択的な細胞死を誘導することを示した。しかし、IAP antagonist 単剤で強い抗腫瘍効果を示すがん細胞株や薬効動物モデルは限られており、IAP antagonist の感受性を規定する因子および新たな感受性群の探索が課題となっている。そこで本章では T-3256336 に対する感受性群の探索および新たな感受性メカニズムの探索を目的にがん細胞株を用いた網羅的な解析と、薬理学的手法を用いた新規の IAP antagonist 感受性メカニズムの解析を行った。

がん細胞株を用いた増殖試験結果およびアポトーシスに関連する分子の発現解析の結果、T-3256336 に対する感受性が TNF α の定常的な mRNA 発現量と相関することが示された。また T-3256336 単剤に対して非感受性の細胞株の約半数においては T-3256336 と TNF α の共処理により強い細胞死が誘導されることを明らかとした。マウス薬効動物モデルを用いた解析により、T-3256336 はこれまで報告されていたヒト腫瘍由来の TNF α だけでなく、マウスの TNF α を誘導し、血液中量が増加することを示した。血液中で増加した TNF α は T-3256336 と協調的に腫瘍に作用することにより、*in vitro*において非感受性の Panc-1 細胞に対しても、薬効動物モデルにおいて強い細胞死を誘導し、抗腫瘍効果を示した。さらにその抗腫瘍効果はマウス TNF α の中和抗体により減弱することから、マウスで産生された TNF α に依存した作用であることを示した。以上の結果から、IAP antagonist はマウスを用いた解析において全身性の TNF α の誘導し、腫瘍を IAP antagonist に対して感受性へと変化させる作用を有することが明らかとなった。

3-2. 結果

3-2-1. がん細胞株における T-3256336 と TNF α 発現レベルの相関解析

近年の研究から IAP antagonist は外因性のアポトーシスシグナルを誘導し、強い細胞死を誘導することが知られている(Vince *et. al.*, 2007, Varfolomeev *et. al.*, 2007, Petersen *et. al.*,2007)。T-3256336 を用いた、乳がん細胞株 MDA-MB-231 における大規模 RNAi スクリーニング解析において、外因性アポトーシスシグナル分子の中で、TNF α や TNFSF10 のノックダウンにより、T-3256336 による増殖阻害作用が減弱することを確認した(Data not shown)。また同様の報告は他の IAP antagonist を用いた検討でも報告されている Gaither *et. al.*, 2007)。そこで、がん細胞株における T-3256336 の感受性と TNF α および TNFSF10A の定常レベル発現の相関を明らかにするため、網羅的ながん細胞株を用いて ATP を指標とした増殖阻害試験と TaqMan PCR により TNF α および TNFSF10A の mRNA

量を定量した。T-3256336 に対して 10 μ M 以下の IC₅₀ を示す細胞株を感受性株、10 μ M 以上の IC₅₀ を示す株を非感受性株と規定して解析したところ、増殖試験に供した 47 がん細胞株中 17 細胞株は感受性株であり、T-3256336 単剤に対する感受性と TNF α の高発現と有意差を伴って相関した(Figure 3-1A, Figure 3-2A)。一方で、TNFSF10A の発現は T-3256336 の感受性とは相関しなかった(Figure 3-1B, Figure 3-2B)。なお、がん細胞株の由来癌種に基づく感受性の差異は認められなかった。以上の結果より、TNF α の定常状態での発現レベルが T-3256336 単剤に対する感受性を規定する因子になりうることが示された。

3-2-2. T-3256336 によるマウス TNF α およびサイトカインに与える影響の解析

これまでの解析からある一部の細胞株群は T-3256336 に対して高い感受性を示し、TNF α 依存的な外因的アポトーシスシグナルを強く誘導することを確認した。しかし、T-3256336 に対する感受性細胞株の割合は限られており、2 割~3 割程度であった。一方で、第二章にて解析した MDA-MB-231-Luc xenograft モデルに対して T-3256336 を投与したマウス血液のサンプルを用いた解析により、T-3256336 は腫瘍に作用してヒトがん細胞由来のヒト TNF α を誘導するだけでなく、マウス個体に対する作用を介してマウスの血液中 TNF α 量を増加させることが明らかとなった(Figure 3-3A)。そこで、100 mg/kg の T-3256336 を単回投与後の 4 および 8 時間後に血液を回収しサイトカインアレイを用いて各サイトカインレベルを測定した。その結果、T-3256336 はマウス血液中の幅広いサイトカインを誘導することが明らかとなった。10 倍以上の増加を認めたサイトカインは G-CSF, IL-5, IL-6, JE および MIG であった(Figure 3-3B, Figure 3-3C)。マウス血液中において増加の認められた TNF α の T-3256336 感受性に与える影響を推察するため、T-3256336 単剤および組換え TNF α 併用時の増殖阻害活性に関して 47 がん細胞株を用いて検証した。T-3256336 単剤に対して感受性を示す細胞株は 47 株中 14 株であったのに対して、T-3256336 と TNF α 併用に対して感受性を示す細胞株は 47 株中 23 細胞株であった(Table 3-1)。これらの試験結果より、T-3256336 がマウスに作用して血液中の TNF α 量を増加させることと合わせて、TNF α 併用時の T-3256336 感受性を示した約半数の細胞株はマウス薬効モデル動物においては T-3256336 単剤に対して薬効を示しうることが示唆された。

3-2-3. T-3256336 による全身性 TNF α 誘導を介した抗腫瘍作用の薬理的解析

T-3256336 投与による全身的な TNF α 誘導のマウス薬効モデルに対する寄与を検討するため、ヒト膵癌 Panc-1 細胞株を選択して以下の試験に供した。*in vitro* の増殖阻害試験において、Panc-1 細胞株は T-3256336 単剤に対して感受性を示さないが、TNF α との併用時に低濃度から強い増殖阻害作用を示した(Figure 3-4)。次に *in vivo* での作用を確認するため、100 mg/kg の T-3256336 を Panc-1 xenograft モデルに単回投与後、腫瘍および血液を回収して、IAP antagonist のファーマコダイナミクスパラメーターの解析を行った。その結果、T-3256336 投与により IAP antagonist の直接的作用の指標である cIAP-1 たんぱく

質の減少を認め(Figure 3-5A)、アポトーシスの指標である腫瘍内 Caspase の活性化を誘導した(Figure 3-5B)。血液中のヒト TNF α 量を ELISA 法にて測定したが、ヒト TNF α は検出されなかった (Data not shown)。次に、Panc-1 xenograft モデルにおける T-3256336 の抗腫瘍効果を確認するため、100 mg/kg の T-3256336 を 1 日 2 回投与して腫瘍サイズ、体重、一般状態を検討したところ、強い抗腫瘍活性を示し最終投与時の T/C は -41.8%であった。また T-3256336 投与により誘導されるマウス TNF α の抗腫瘍効果に与える影響を検討するため、マウス TNF α 中和抗体を同時投与して検証したところ、TNF α 中和抗体により T-3256336 の抗腫瘍作用は減弱し、最終測定時の T/C は 41.7%であった(Figure 3-6)。以上の結果から、T-3256336 投与によるマウス薬効モデルでの抗腫瘍作用はその一部がマウスにより誘導される TNF α を介したものであることが示された(Figure 3-7)。

3-3. 考察

IAP antagonist はがん細胞に対して選択的なアポトーシスを誘導する薬剤として注目を集めているが、その感受性を規定する因子に不明な部分が多く、課題となっていた。本章にて実施した網羅的細胞株を用いた解析(Table 3-1)および近年の報告(Wu *et. al.*, 2007)から、がん細胞株は IAP antagonist に対する感受性に基づき、*in vitro*, *in vivo* ともに感受性を示す第一群、*in vivo* のみにおいて感受性を示す第二群、*in vitro*, *in vivo* ともに非感受性の第三群の主に 3 つに分類されることが明らかとなってきた(Table 3-2)。第一群は第二章の解析に用いた MDA-MB-231 を含む細胞株群であり、IAP antagonist 単剤に反応して、がん細胞自身が NF κ B 活性化を介した TNF α の誘導と、オートクライン TNF α シグナルからの外因的アポトーシスの誘導を引き起こし、増殖阻害作用を示す(Vince *et. al.*, 2007, Varfolomeev *et. al.*, 2007, Petersen *et. al.*, 2007, Figure 1-5)。本章での T-3256336 を用いた解析から、単剤感受性の第一群細胞株を規定する因子として定常状態での TNF α 発現レベルが重要であることが明らかとなった(Figure 3-1A, Figure 3-2A)。類似の報告は他の IAP antagonist を用いた解析でも報告されている(Firestone *et. al.*, 2007)。また逆説的に TNF α の定常レベルの発現が低い細胞群は IAP antagonist に対して非感受性を示すことも報告されており(Szlosarek *et. al.*, 2006, Szlosarek *et. al.*, 2003)、TNF α の発現レベルによる感受性の予測が可能である可能性が示唆された。

次に *in vivo* においてのみ、単剤への感受性を示す第二群は本章での解析で明らかとなった Panc-1 細胞株を含む細胞株群である。第二群の細胞株は *in vitro* では IAP antagonist 単剤に対して感受性を示さないが、TNF α と併用した際に感受性を示す群である(Figure 3-4)。第二群の細胞株はがん細胞自身は T-3256336 に反応した TNF α の誘導を起こさないが、TNF α 併用時には第一群細胞株と同様に外因性アポトーシスシグナルを誘導し、強い細胞死を来す。47 がん細胞株を用いた感受性試験において、T-3256336 単剤に対して *in vitro* で非感受性を示す 33 株中 9 株が TNF α との併用において感受性を示すことが明らかとなった(Table 3-1)。また、本章での解析から、T-3256336 はマウス個体に作用して、マウ

ス由来の全身性 TNF α を誘導し、血液中 TNF α 量を増加させた(Figure 3-3A)。マウス血液中の TNF α レベルは約 50 pg/ml であり、この TNF α レベルは *in vitro* での T-3256336 と協調して外因性アポトーシスを誘導するのに十分なレベルであった。なお、全身の各組織における TNF α mRNA 発現レベルに関して解析を行ったが、第一群細胞株の腫瘍で確認されるような強力な遺伝子発現の誘導は確認されておらず、TNF α 誘導のメカニズムは不明である。しかし、同様の TNF α 誘導はラットやイヌでも観察されており(data not shown)、一般的な反応であると考えられる。次に第二群細胞株の *in vitro* での TNF α 併用下における T-3256336 に対する感受性とマウスモデルにおける TNF α 誘導能から、*in vivo* での薬効が期待できると仮説を立て、Panc-1 xenograft モデルにおける検証を行った結果、予想通り強い抗腫瘍効果が確認された(Figure 3-6)。またその抗腫瘍効果はマウス TNF α 中和抗体により減弱が認められ、全身性に誘導された TNF α が薬効の惹起に大切な役割を担っていることが示唆された。以上の結果から、第二群の細胞株は *in vivo* では動物から産生された TNF α と協調的に作用することにより、単剤に対して感受性へと変化することを明らかとした(Figure 3-7)。なお、サイトカインパネルの結果、T-3256336 により誘導された M-CSF, GM-CSF を初めとした各種サイトカインはマクロファージの機能や増殖、細胞傷害性 T 細胞の機能調節において重要な役割を担っていることが示唆されており、近年のがん創薬研究で注目されているがん免疫との関わりに関する研究の発展も期待される(Hamilton, 2008)。実際、競合他社の IAP antagonist である LCL-161, HGS1029 および TL32711 の臨床第一相試験においても血液中のサイトカイン類の上昇が確認されており、本章の検討にて明らかとなった血液中の TNF α を介した薬理作用は、ヒトでも同様のメカニズムで適応可能であると考えられる。

3-4. まとめ

これまで IAP antagonist の感受性を規定する因子および新たな感受性群の探索が課題であったが、本章における解析において、単剤での薬効を予測する因子として定常状態での TNF α 発現レベルが重要であることを明らかとした。また IAP antagonist はマウスに作用し血液中の TNF α を誘導すること、誘導された TNF α は IAP antagonist と協調的に作用して強い抗腫瘍効果を誘導することが明らかとなった(Figure 3-6)。これにより動物モデルにおいて IAP antagonist に対して感受性を示すと考えられる細胞株は約半数程度となり(Table 3-2)、臨床での適応可能性が広がったと考えられる。

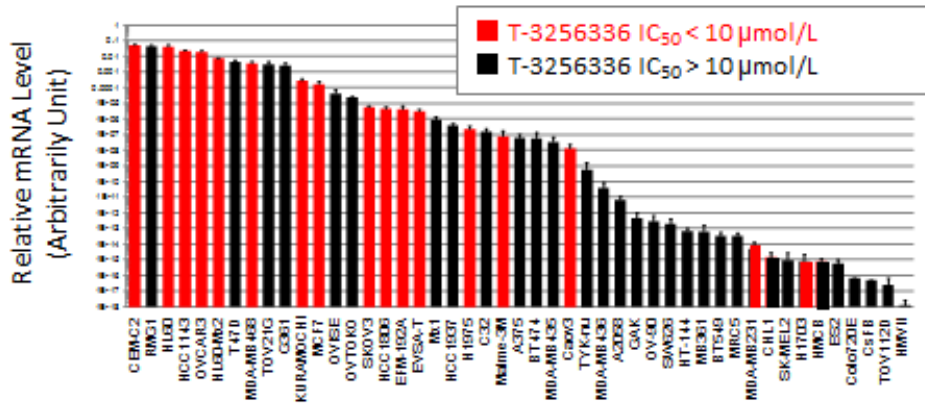
| | Cell line | T-3256336 IC ₅₀ (μmol/L) | | PF50 |
|------------|--------------|-------------------------------------|----------------|---------|
| | | TNF (-) | 0.01 ug/ml TNF | |
| Breast | MDA-MB231 | 0.001 | < 0.001 | > 1 |
| | MDA-MB436 | > 10 | > 10 | NA |
| | MDA-MB468 | 0.5 | 0.05 | 10 |
| | MDA-MB435 | > 10 | > 10 | NA |
| | BT549 | > 10 | 0.008 | > 1000 |
| | T47D | > 10 | < 0.001 | > 10000 |
| | MCF7 | 0.009 | 0.004 | 2.25 |
| | BT474 | > 10 | 0.008 | > 1000 |
| | Mx1 | > 10 | > 10 | NA |
| | MB361 | > 10 | > 10 | NA |
| | EVSA-T | 0.008 | < 0.001 | NA |
| | EFM-192A | 0.4 | 0.01 - 0.1 | 4-40 |
| | HCC1806 | > 10 | 0.01 | > 1000 |
| | HCC1143 | 0.7 | 1 - 10 | 1 |
| HCC1937 | > 10 | > 10 | NA | |
| Melanoma | CHL-1 | > 10 | > 10 | NA |
| | HMCB | > 10 | > 10 | NA |
| | SK-MEL-2 | > 10 | 0.02 | > 500 |
| | GAK | > 10 | > 10 | NA |
| | Malme-3M | 0.01 | 0.003 | 3.3 |
| | G-361 | > 10 | > 10 | NA |
| | HT-144 | > 10 | 1 | > 10 |
| | C32 | > 10 | > 10 | NA |
| | A375 | > 10 | > 10 | NA |
| | HMVII | > 10 | 0.03 | > 300 |
| A2058 | > 10 | 10 | > 1 | |
| Ovarian | SKOV3 | 0.3 | 0.01 | 30 |
| | ES-2 | > 10 | 7 | > 1 |
| | NIH: OVCAR-3 | 0.4 | > 10 | |
| | TOV-21G | > 10 | > 10 | NA |
| | RMG1 | > 10 | > 10 | NA |
| | OVISE | > 10 | > 10 | NA |
| | OVTOKO | > 10 | > 10 | NA |
| | TYK-nu | > 10 | > 10 | NA |
| | KURAMOCHI | > 10 | > 10 | NA |
| | Colo720E | > 10 | > 10 | NA |
| | Caov3 | 0.3 | 0.3 | 1 |
| | OV-90 | > 10 | > 10 | NA |
| | SW626 | > 10 | > 10 | NA |
| TOV-112D | > 10 | > 10 | NA | |
| Fibroblast | CsFb | > 10 | > 10 | NA |
| | MRC5 | > 10 | > 10 | NA |
| Lung | NCI-H1703 | 0.4 | 0.008 | 50 |
| | NCI-H1975 | 0.6 | 0.005 | 120 |
| Pancreas | PANC-1 | > 10 | 0.007 | |
| Leukemia | HL-60/Mx2 | 0.4 | 0.25 | 1.6 |
| | CEM-C2 | 0.16 | < 0.016 | > 10 |

Table 3-1 T-3256336 のがん細胞株における単剤および TNF α 併用の感受性
PF: T-3256336 単剤処理時の IC₅₀/TNF α 併用時の IC₅₀

| | Character | Model Cell Lines | Selection Marker |
|-------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Category I (TNF α autocrine active cancer) | • Produce TNF alpha in response to IAP antagonists and show sensitivity to single agent treatment. ⇒ Sensitive to IAP antagonists as single agent both in vivo and in vitro | MDA-MB231, SKOV3 ... 14 out of 47 cancer cell lines | <u>Baseline TNFα mRNA Level could predict the sensitivity to IAP antagonist.</u> |
| Category II (TNF α paracrine active cancer) | • Sensitive to IAP antagonists when co-stimulated with TNF α . <u>(IAP antagonists increases systemic TNFα through cIAP degradation and NFκB activation in host tissue and induces apoptosis in vivo) ⇒ Sensitive to IAP antagonists as single agent only in vivo</u> | Panc-1, PC14, H1703... 9 out of 47 cancer cell lines | Unknown |
| Category III (Resistant cancer) | • Not sensitive to IAP antagonist even in presence of TNF alpha. | MRC5, HCC1937, OVCAR-3... 23 out of 47 cancer cell lines | |

Table 3-2 IAP antagonist の感受性に基づくカテゴリー

A TNF α



B TNFSF10A (TRAIL)

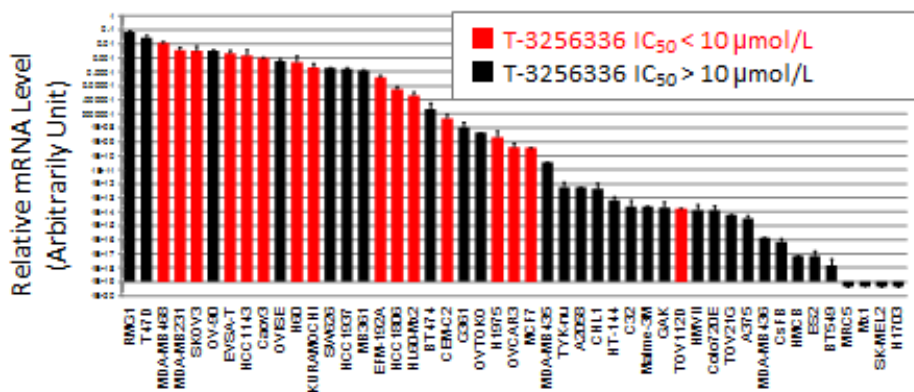


Figure 3-1 T-3256336 の増殖阻害作用と TNF および TRAIL 発現

A: TNF α , B: TNFSF10A

データは N = 3 の平均および標準偏差を示す

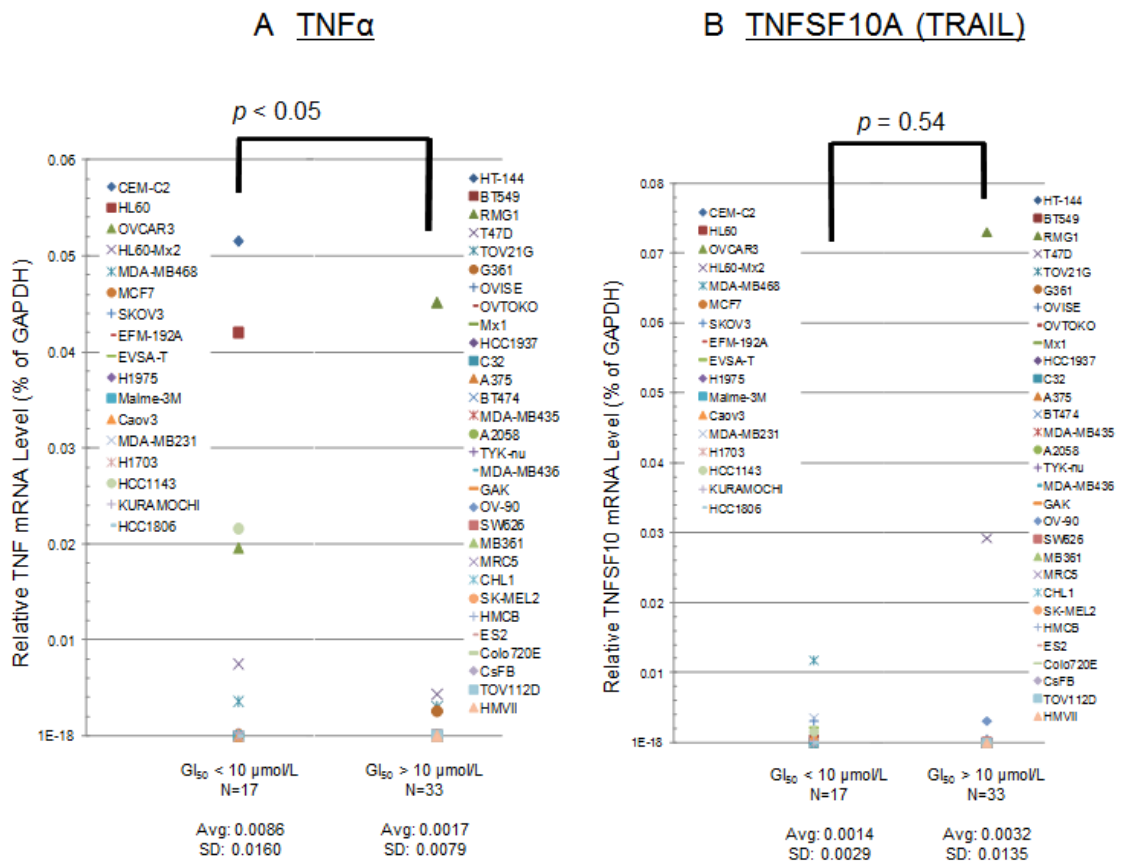


Figure 3-2 T-3256336 の増殖阻害作用と TNF および TRAIL 発現との相関解析
A: $TNF\alpha$, B: TNFSF10A

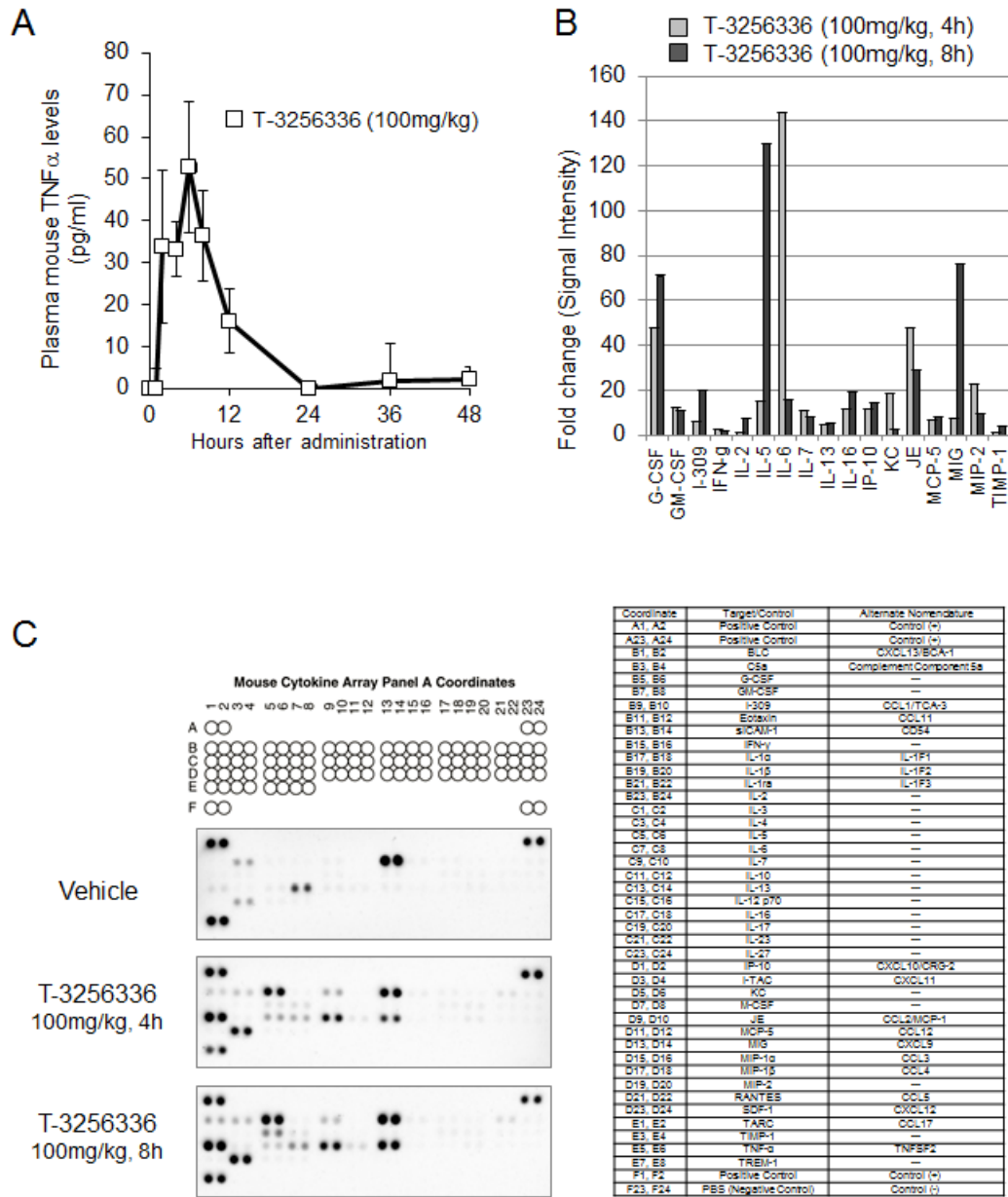


Figure 3-3 T-3256336 投与によるマウスサイトカイン分泌

A: 血中マウス TNF α 量, データは N =5 の平均および標準偏差を示す

B: 血中サイトカイン量, C: サイトカインアレイ

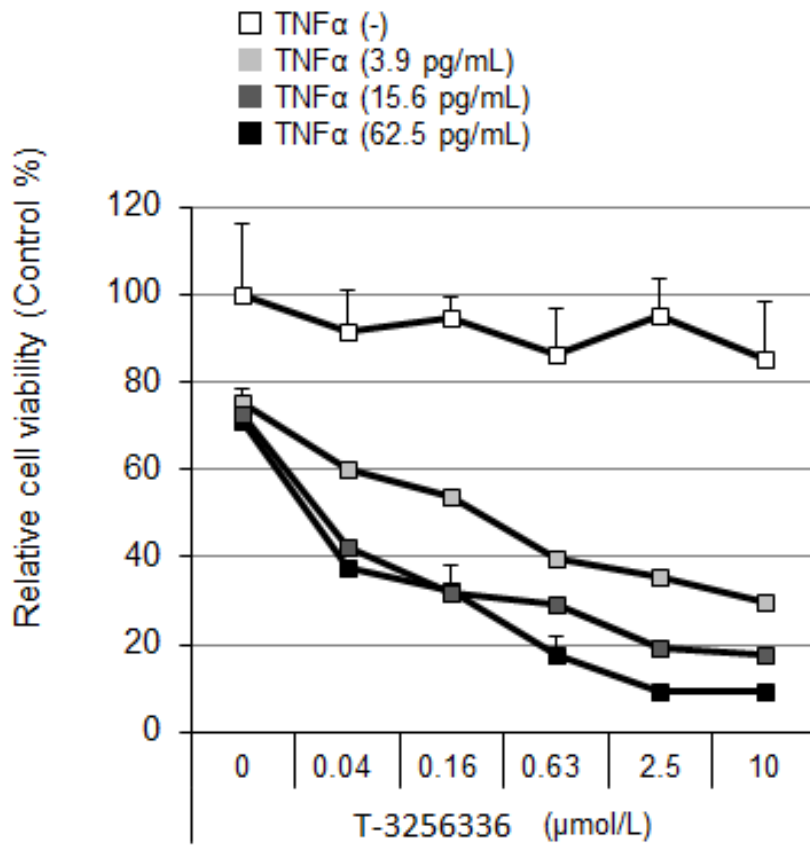


Figure 3-4 Panc-1 細胞株における T-3256336 と TNF α の併用作用
 化合物処理 3 日後に実験方法に記載の方法にて ATP 量を測定、データは N=3 の平均および標準偏差を示す

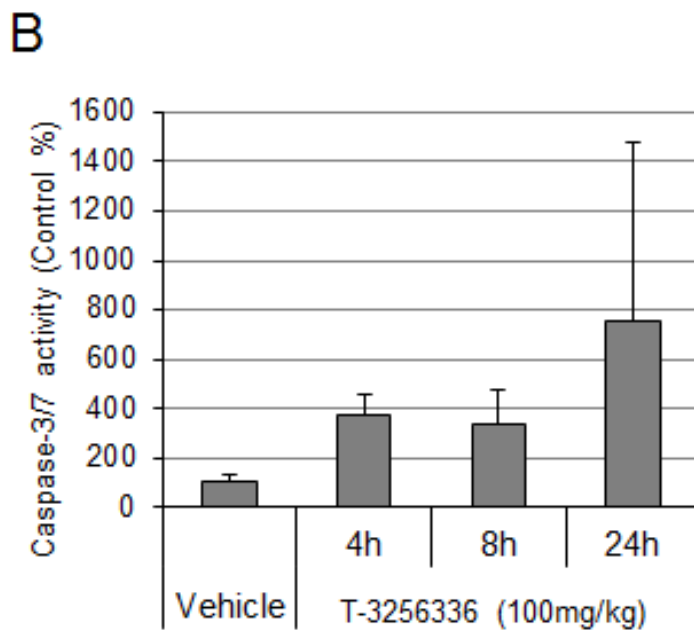
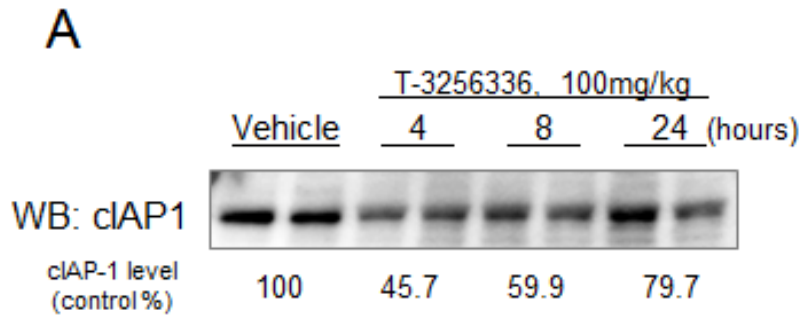
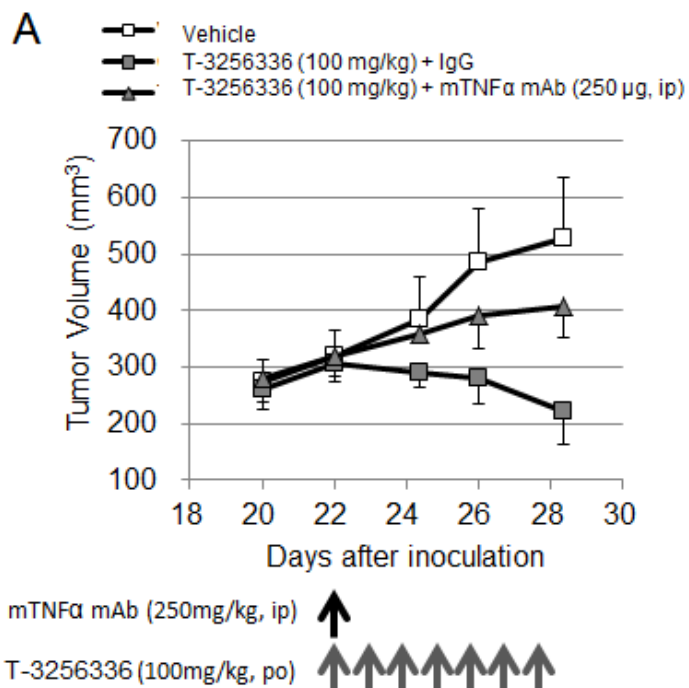


Figure 3-5 Panc-1 xenograft モデルにおける T-3256336 のファーマコダイナミクス

A: 化合物単回投与後の腫瘍内 cIAP-1 たんぱく質量の変化

B: 化合物単回投与後の腫瘍内 Caspase-3/7 活性、データは N=3 の平均および標準偏差を示す



B

| | T/C (%) | Average Tumor weight (g) | P-value |
|-----------------------|---------|--------------------------|------------------------------------|
| Saline | 100 | 0.17 | |
| T-3256336 | -41.80 | 0.08 | < 0.01 vs Saline |
| T-3256336 + TN3-19.12 | 41.73 | 0.11 | 0.09 vs Saline, 0.03 vs Compound-A |

Figure 3-6 Panc-1 xenograft モデルにおける T-3256336 の抗腫瘍作用

A: 腫瘍体積の時間推移

B: 抗腫瘍試験結果のまとめ、T/C: treated to control value、P value: Shirley-Williams test

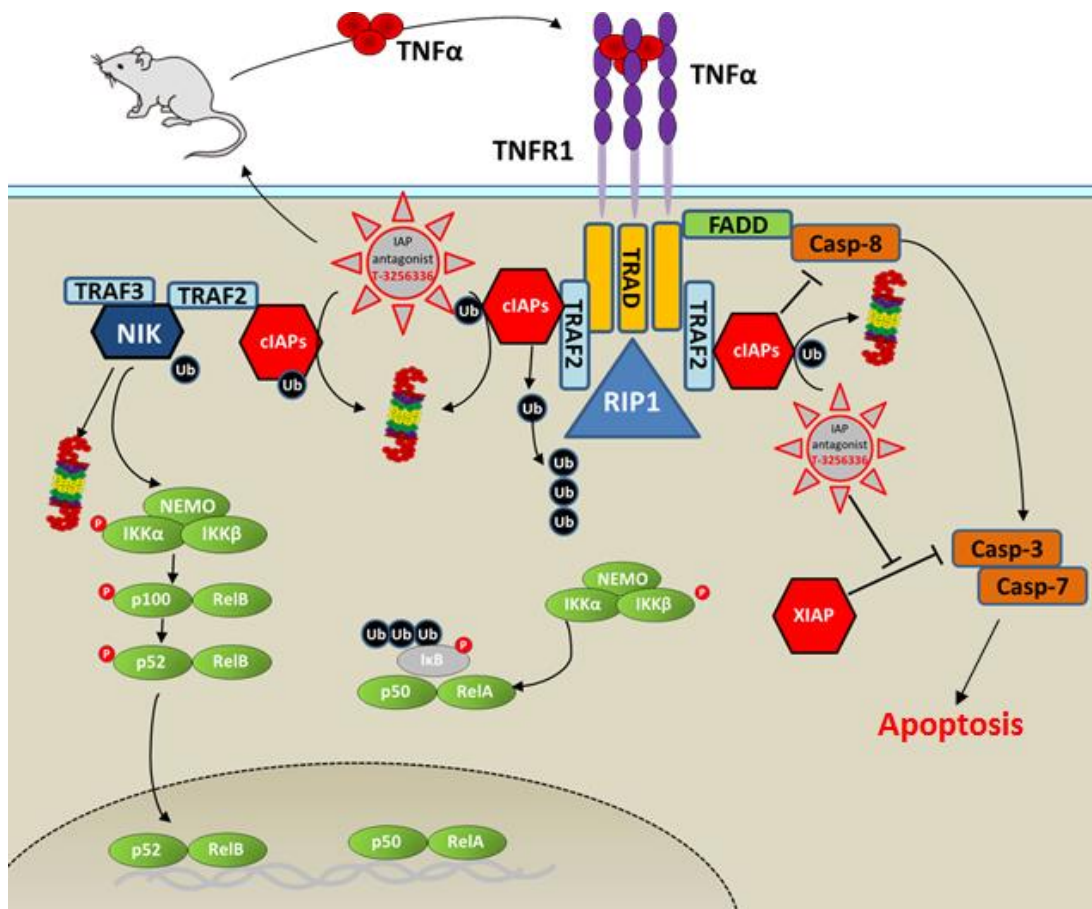


Figure 3-7 第二群細胞株における T-3256336 の作用メカニズム

第四章

IAP antagonist T-3256336 の Nedd8 activating enzyme inhibitor pevonedistat (MLN4924/TAK-924)との併用効果に関する薬理的解析

4-1. 要旨

第二章および第三章では武田薬品工業株式会社が創製した **T-3256336** 単剤の作用メカニズムおよびその感受性を規定する因子に関して検討を行ってきた。しかし、実際の抗がん剤治療の臨床現場ではその多くが化学療法剤や他の分子標的治療薬との併用で治療に用いられており、臨床試験でも他の抗がん剤と併用して試験が進められるのが一般となっている。そこで本章では化学療法剤や他の分子標的薬と **T-3256336** の併用の可能性を明らかにすることを目的に *in vitro* の併用試験スクリーニングとそのメカニズム解析を行った。特に武田薬品工業株式会社の臨床開発化合物である **Nedd8 activating enzyme inhibitor pevonedistat (MLN4924/TAK-924)**を用いた解析に注力し、新しい分子標的薬の組み合わせの可能性を検証した。**T-3256336** と **pevonedistat** の併用可能性に関して検証したところ、**HL-60** および **SK-OV-3** 細胞株において相乗的な増殖阻害作用を示した。またメカニズム解析において **pevonedistat** は細胞株に対して DNA ダメージを介した **TNF α** を誘導し、その **TNF α** が **T-3256336** と強制的に作用して外因性アポトーシスを誘導した。さらに **HL-60 xenograft** マウスにおいて、**T-3256336** と **pevonedistat** は併用の抗腫瘍効果を示した。したがって IAP antagonist と **Nedd8 activating enzyme inhibitor** は新たな併用の組み合わせとなることが示唆された。また **T-3256336** と **pevonedistat** はどちらも武田薬品工業株式会社により創製された薬剤であり、臨床開発戦略上も優れた組み合わせであると考えられた。

4-2. 結果

4-2-1. **T-3256336** と化学療法剤との併用試験およびそのメカニズム解析

T-3256336 との併用効果が期待できる薬剤の探索を目的に、**MDA-MB-231** 細胞株を用いて各種化学療法剤との併用増殖阻害試験を実施した。その結果、DNA ダメージを誘導することが知られている **gemcitabine**, **doxorubicine** および **camptothecin**、チューブリンに作用する薬剤である **paclitaxel** と相乗的な増殖阻害作用を示した。また、その作用は **TNF α** 中和抗体、**Caspase** 阻害剤、**RIPK1** 阻害剤により減弱した (**Figure 4-1**)。 **camptothecin** との併用処理時の **Caspase** 活性の活性および増殖阻害作用を検証した。その結果、**T-3256336** 処理により誘導される外因性アポトーシスの指標である **Caspase-8** および **Caspase-3/7** 活性化は **camptothecin** との併用において相乗的に増加し、これと相関する相乗的な増殖阻害作用が確認された。一方、内因性アポトーシスの指標である **Caspase-9** の活性化はいずれの単剤処理および併用処理ともに認められなかった (**Figure 4-2A**)。また **Caspase-8** および

Caspase-3/7 の相乗的な活性化に関して、4 薬剤に共通した誘導であった(Figure 4-2B)。次に、各種化学療法剤の処理 24 時間後の細胞内 TNF α mRNA 量および培養液中の TNF α 量を、それぞれ TaqMan PCR および ELISA 法にて検証した。その結果、相乗的な増殖阻害作用を示す薬剤処理により細胞内 TNF α mRNA の誘導と培地中 TNF α 量の増加を認めた(Figure 4-3)。以上の結果から、DNA ダメージを誘導する薬剤はがん細胞における TNF α を誘導し、その TNF α の誘導を介して T-3256336 と協調的に外因性アポトーシスを誘導して相乗的な増殖阻害作用を示すことが示唆された(Figure 4-12)。

4-2-2. pevonedistat の感受性およびバイオマーカー解析

pevonedistat は Nedd8 経路の最初のプロセスをつかさどる重要酵素である Nedd8 活性化酵素を阻害する薬剤として、武田薬品工業株式会社のグループ会社であるミレニウムファーマシューティカルにより創製された化合物であり(Figure 1-7, Soucy *et. al.*, 2009)、Nedd8 経路の阻害により Cullin たんぱく質群の蓄積を介して、DNA の再複製ストレスや DNA ダメージを誘導し、がん細胞の増殖を抑制することが知られている(Lin *et. al.*, 2010)。まず、がん細胞株の A2058, A375, HT29, PC3, SK-OV-3 および NCI-H460 細胞株の pevonedistat 感受性を検証したところ、A2058, A375, PC3 は pevonedistat に対して感受性を示し、GI₅₀ はそれぞれ 0.09, 0.19 および 0.27 μ M であった。一方 NCI-H460, SK-OV-3 および HT-29 細胞は相対的に非感受性であり、その GI₅₀ はそれぞれ 0.92, 1.51 μ M および 2 μ M 以上であった(Table 4-1)。次に Nedd8 活性化酵素の基質である p27 および DNA ダメージの指標である CHK1^{S317}、CHK2^{T68} のリン酸化、アポトーシスの指標である PARP を観察した。その結果、p27、CHK1^{S317} および CHK2^{T68} のリン酸化はいずれの細胞株においても濃度依存的な増加が認められたが、アポトーシスの指標である PARP の切断断片は感受性細胞株のみにおいて誘導された(Figure 4-4)。以上の結果から、pevonedistat は Nedd8 活性化酵素の阻害により DNA ダメージを誘導し、感受性と相関したアポトーシスを誘導を来すことが明らかとなった。

4-2-3. T-3256336 と pevonedistat の併用作用に関する解析

これまでの解析で明らかとなった pevonedistat による DNA ダメージとアポトーシス誘導作用および T-3256336 の DNA ダメージを誘導する薬剤との高い併用効果に着目し、pevonedistat と T-3256336 の併用作用に関して卵巣がん細胞株の SK-OV-3 および血液がん細胞株の HL-60 を用いて検証を行った。いずれの細胞株も pevonedistat 単剤による増殖阻害作用は軽微であるのに対して、T-3256336 の増殖阻害作用を相乗的に増強した(Figure 4-5)。次に T-3256336、pevonedistat 単剤および併用処理時のフローサイトメーターによる細胞周期解析を実施した。pevonedistat は Nedd8 活性化酵素の阻害により S 期での細胞の蓄積を誘導することが知られている(Lin *et. al.*, 2010)。pevonedistat 処理により SK-OV-3 細胞では G2/M 期の割合の増加が、HL-60 細胞株では S 期および 4N 以上の核を有する細

胞の割合の増加を認めた。一方で T-3256336 処理においては細胞周期の波形の大きな増加は認められず、細胞死の指標である Sub-G1 期の割合の若干の増加を認めた。2 剤を併用した際の細胞周期波形は主に pevonedistat 単剤処理時の波形と同様であったが、Sub-G1 期の細胞の割合が増加した(Figure 4-6)。以上の結果より、T-3256336 と pevonedistat の併用処理により細胞死が相乗的に誘導されていることが示唆された。

4-2-4. T-3256336 と pevonedistat 併用時のファーマコダイナミクスパラメーターに関する解析

T-3256336 と pevonedistat 併用における詳細な作用メカニズムを解析するため、それぞれの薬剤のファーマコダイナミクスパラメーターに与える影響に関して解析を行った。T-3256336、pevonedistat 単剤および併用処理 4 時間後のウエスタンブロット解析の結果、IAP antagonist の直接的な指標である cIAP-1 の分解は T-3256336 により誘導され、pevonedistat 単剤および併用による cIAP-1 たんぱく質量の変化は認められなかった。また cIAP-1 の分解はプロテアソーム阻害剤により阻害されたことから、ユビキチンプロテアソームシステムを介した作用と示唆された(Figure 4-7A)。また、pevonedistat の指標である p27 たんぱく質の蓄積および DNA ダメージの指標である CHK1^{S317}、CHK2^{T68} のリン酸化の増加は pevonedistat の単剤処理により誘導され、T-3256336 単剤および併用による変動は認められなかった。一方で、NF κ B 活性化の指標である p65^{S536} のリン酸化は pevonedistat 単剤処理により若干の増加を認め、T-3256336 との併用により増強した。アポトーシスの指標である PARP の切断断片は T-3256336 の処理により若干の増加を認め、pevonedistat の併用により増強した(Figure 4-7B)。次に IAP antagonist により誘導される Caspase-8 および Caspase-3/7 の活性化に関して検証した。T-3256336、pevonedistat 単剤および併用処理 24 時間後の活性測定の結果、いずれの細胞株においても T-3256336 および pevonedistat の 2 剤併用処理時に相乗的な活性化を認めた(Figure 4-8)。以上の結果より、T-3256336 および pevonedistat はお互いの直接的な作用メカニズムの指標である cIAP-1 および p27 たんぱく質量に影響を与えることなく、相乗的に外因性アポトーシスを誘導していることが示唆された。

4-2-5. pevonedistat の T-3256336 による TNF α 依存的アポトーシスに与える影響についての解析

これまでの解析から IAP antagonist 依存的な外因性アポトーシス誘導には TNF α が惹起因子となり重要な役割を担っていることが明らかとなっている。そこで、pevonedistat による TNF α に与える影響を検証するため、pevonedistat 処理 8 時間および 72 時間処理後の TNF α mRNA 量を TaqMan PCR により定量した。pevonedistat 処理 72 時間後の TNF α mRNA 量は DMSO 処理群と比べて、SK-OV-3 細胞では約 3.2 倍、HL-60 細胞では約 14 倍に増加していた(Figure 4-9)。次に誘導された TNF α が増殖に与える影響を検討するため、

T-3256336 および pevonedistat 併用時に対する TNF α 中和抗体の作用を確認した。その結果、いずれの細胞株においても T-3256336 と pevonedistat 併用により誘導された増殖阻害作用が TNF α 中和抗体により減弱した(Figure 4-10)。以上の結果より、T-3256336 と pevonedistat の併用により認められる相乗効果は pevonedistat により誘導される TNF α を介した外因性アポトーシスの増加による作用であることが示唆された。

4-2-6. HL-60 xenograft モデルにおける T-3256336 と pevonedistat の併用効果に関する解析

最後に、*in vivo* での T-3256336 と pevonedistat の併用効果を確認するために、HL-60 xenograft モデルにおける薬効試験を実施した。T-3256336 および pevonedistat の 2 週に 1 回投与における抗腫瘍作用はそれぞれ T/C = 45% および 81% であるのに対して、T-3256336 と pevonedistat を併用した際の T/C = 24% であった(Figure 4-11)。この結果は T-3256336 と pevonedistat の併用が動物モデルにおいても有効であることを示唆している。

4-2-3. 考察

化学療法剤や各種抗がん剤に対する薬剤抵抗性はがん治療における課題であり、アポトーシスからの回避はがんの特徴であるばかりではなく、薬剤抵抗性獲得の主要なメカニズムである。そのため IAP たんぱく質ファミリーをターゲットとした薬剤の開発は他の抗がん剤と併用した際にその抵抗性を克服する観点からも魅力的なターゲットであると考えられている。

そこで、本章においては T-3256336 併用薬の探索とそのメカニズム解析に関して、化学療法剤および pevonedistat との併用に関して検討した。T-3256336 と化学療法剤との併用増殖阻害試験の結果、T-3256336 は DNA ダメージを誘導する薬剤およびチューブリン阻害剤と高い相乗効果を示すことが明らかとなった(Figure 4-1)。またそれら薬剤により、TNF α 発現と培養液中量の増加と T-3256336 併用時において外因性アポトーシスの指標である Caspase-8 と Caspase-3/7 の誘導が認められた(Figure 4-2, Figure 4-3)。さらに、それら相乗作用は TNF α 中和抗体、Caspase 阻害剤、RIPK1 阻害剤により減弱されることが明らかとなった(Figure 4-1)。以上の結果から、DNA ダメージ誘導剤やチューブリン阻害剤との併用において認められる相乗的な増殖抑制作用は、IAP antagonist の主要な作用メカニズムである、TNF α 誘導に起因する外因性アポトーシスの惹起による作用であることが示唆された(Figure 4-12)。なお、同様のメカニズムに基づく併用効果は他の IAP antagonist を用いた報告においても報告がなされている(Probst *et. al.*, 2010)。

gemcitabine や doxorubicin は ATM/ATR を介した DNA ダメージを誘導し、IKK- γ /NEMO のユビキチン化を介して古典的 NF κ B シグナルの活性化とその下流ターゲット遺伝子の発現を誘導することが報告されている(Basu *t et. al.*, 1998 Piret *t et. al.*, 1996 Brzoska *t et. al.*, 2009)。また paclitaxel などのチューブリン阻害剤においても NF κ

Bを活性化することが報告されている(Jackman *et. al.*, 2009)。したがって、DNAダメージを誘導する薬剤やチューブリン阻害剤により TNF α の誘導を介した IAP antagonist との相乗作用が認められるのは作用メカニズムに基づいた効果であると考えられる。

pevonedistat を用いたファーマコダイナミクス解析の結果、pevonedistat は CHK1^{S317} および CHK2^{T68} にて検出される DNA ダメージを強く誘導することが明らかとなった(Figure 4-7)。また、その作用は pevonedistat による増殖阻害活性とは相関せず、いずれの細胞株においても認められる作用であった(Figure 4-4)。したがって、pevonedistat による DNA ダメージ、NF κ B 活性化を介した TNF α の誘導は T-3256336 との併用において、有用であるばかりでなく、pevonedistat に非感受性のがん細胞株に対しても併用療法が有効である可能性が考えられた。また近年の抗がん剤の開発においては、新しい作用メカニズムを有する薬剤同士を最適に組み合わせることにより、副作用のコントロールと高い薬効を両立することが期待されている。T-3256336 と pevonedistat はいずれも武田薬品工業株式会社にて創製された薬剤であり、開発戦略上も最適な組み合わせであると考えられた。実際、pevonedistat は DNA ダメージを介した NF κ B の活性化、TNF α を誘導し、T-3256336 との増殖阻害試験において相乗効果を示した(Figure 4-5, Figure 4-7, Figure 4-8, Figure 4-9)。また、T-3256336 と pevonedistat 併用による増殖阻害作用は TNF α 中和抗体により減弱され(Figure 4-10)、TNF α による惹起される外因性アポトーシスによるものであることが示唆された。さらに T-3256336 と pevonedistat の併用効果はマウス薬効モデルにおいても確認された(Figure 4-11)。IAP antagonist と pevonedistat の併用作用メカニズムのまとめを Figure 4-12 に示す。以上の結果から IAP antagonist と Nedd8 活性化酵素阻害剤の併用療法は有効である可能性が示唆された。

4-4. まとめ

最適な併用薬の探索は抗がん剤の開発の成功の可否を握るものであり、大きな課題であった。本章における IAP antagonist の併用薬探索およびそのメカニズム解析において、DNA ダメージを誘導する薬剤が TNF α の誘導を介して、IAP antagonist と高い併用効果を示すことを明らかとした。さらに新規の Nedd8 活性化酵素阻害剤である pevonedistat も同様に TNF α の誘導を介した外因性アポトーシスの惹起により、T-3256336 と高い併用効果を示した。またその併用作用はマウス動物モデルにおいても同様であった。以上の結果から、IAP antagonist と Nedd8 活性化酵素阻害剤の併用療法は新たな治療法として有効である可能性が示唆された。

| Cell Line | Pevonedistat GI ₅₀ ($\mu\text{mol/L}$) |
|-----------|--------------------------------------------------------|
| A2058 | 0.09 |
| A375 | 0.19 |
| PC3 | 0.27 |
| H460 | 0.92 |
| SK-OV-3 | 1.51 |
| HT-29 | > 2 |

Table 4-1 Pevonedistat によるがん細胞に対する増殖阻害活性
化合物処理 3 日後に実験方法に記載の方法にて ATP 量を測定して GI₅₀ を算出

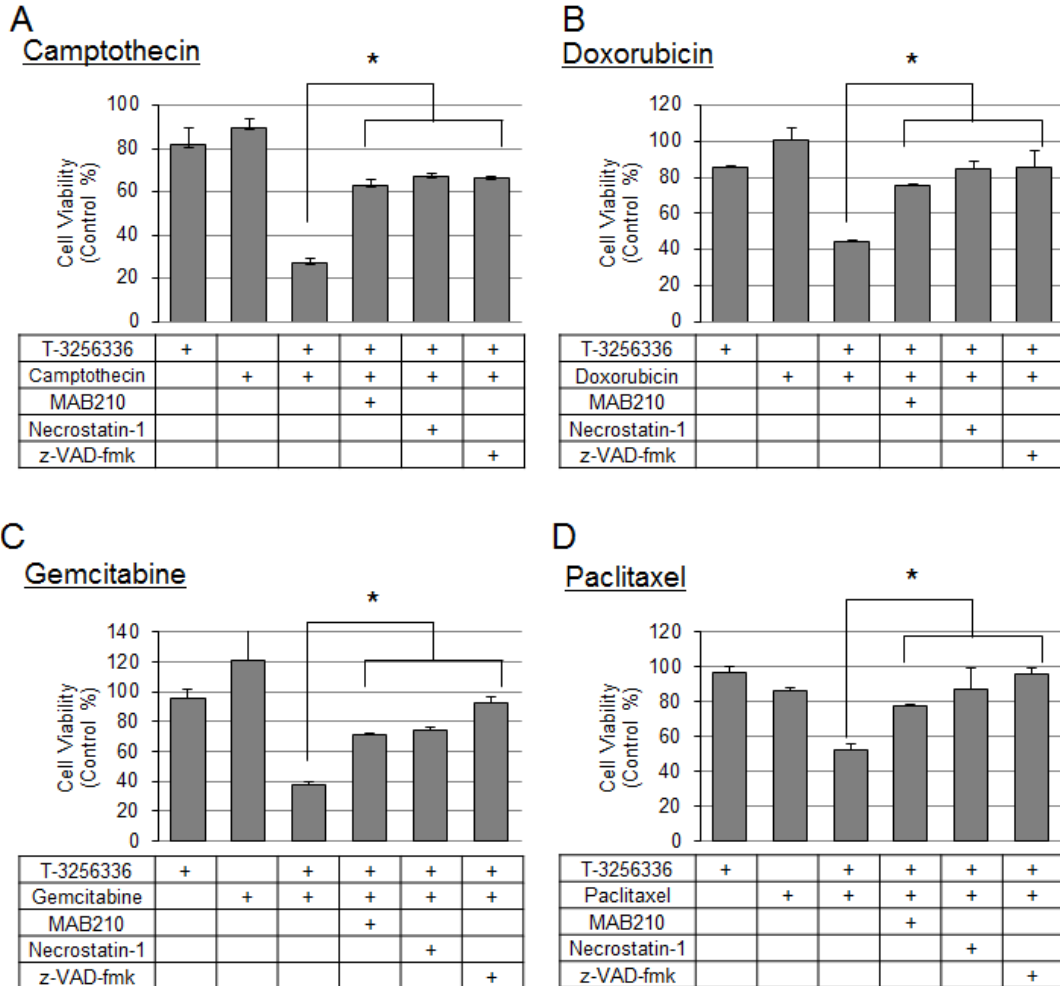


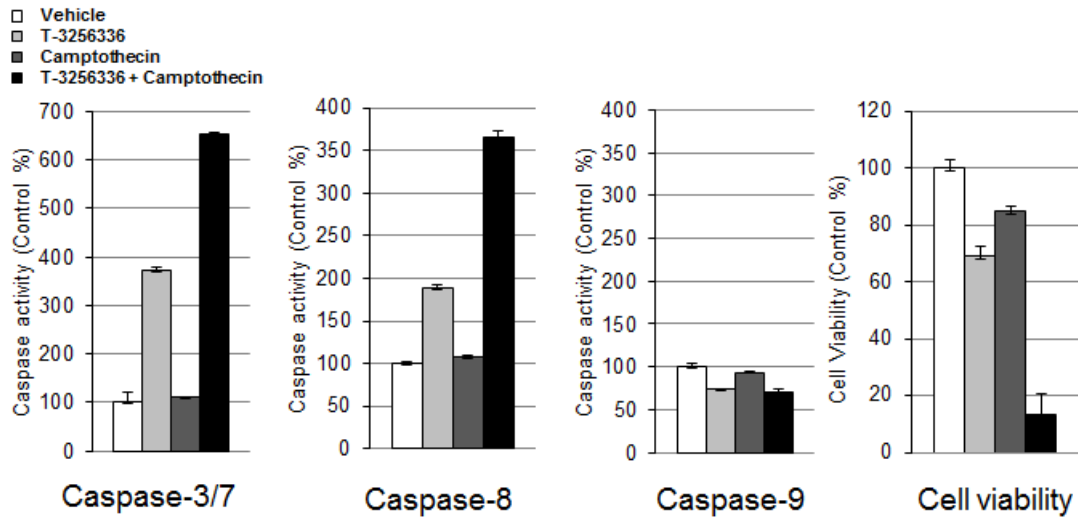
Figure 4-1 T-3256336 と化学療法剤との併用作用

A: camptothecin, B: doxorubicin, C: gemcitabine, D: paclitaxel

MAB210: TNF α 中和抗体、Necrostatin-1: RIPK1 阻害剤、z-VAD-fmk : Caspase 阻害剤
 化合物処理 3 日後に実験方法に記載の方法にて ATP 量を測定、
 データは N =3 の平均および標準偏差を示す

Student's t-test, *, P < 0.05. vs T-3256336 and chemotherapeutics treatment.

A



B

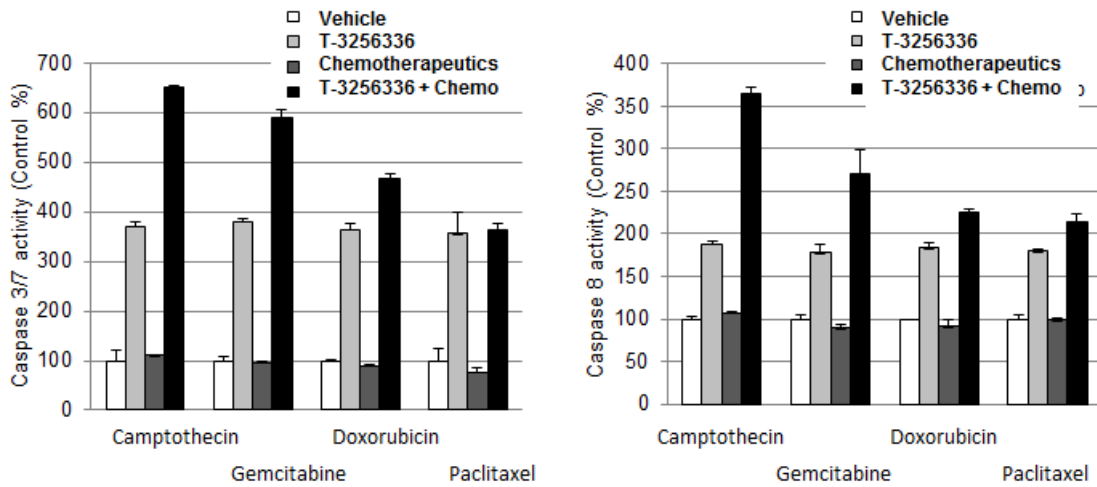


Figure 4-2 T-3256336 と化学療法剤併用時の Caspase 活性

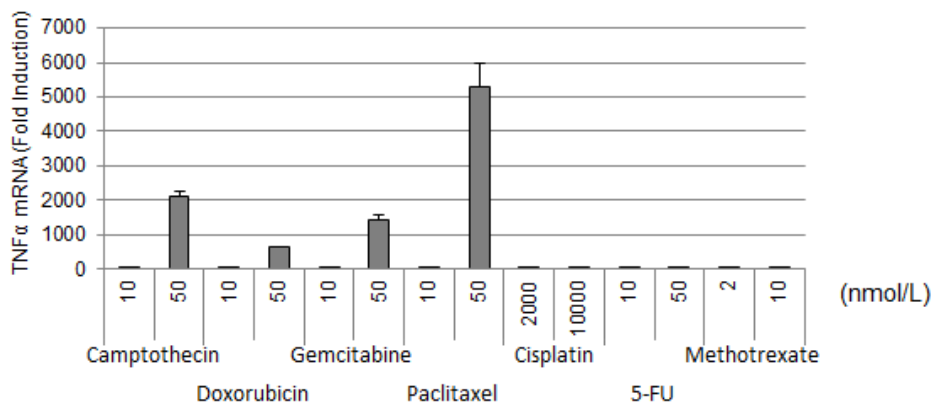
A: T-3256336 (3 nM) と camptotecin (50 nM) 併用時の Caspase 活性と増殖阻害作用

B: 化学療法剤併用時の Caspase-3/7 および Caspase-8 活性

化合物処理 24 時間後に実験方法に記載の方法にて Caspase 活性を測定

データは N = 3 の平均および標準偏差を示す

A



B

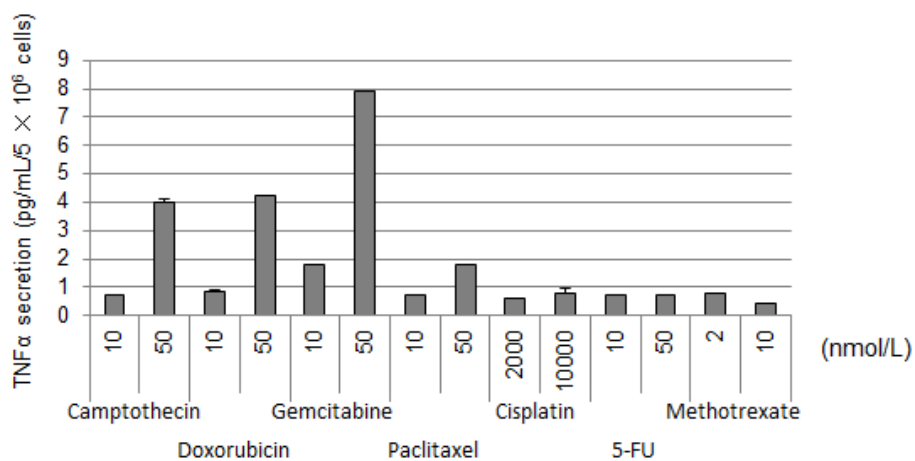


Figure 4-3 化学療法剤による TNFα 誘導作用

A: 細胞内 TNFα mRNA、B: 培養液中 TNFα 量

化合物処理 24 時間後に実験方法に記載の方法にて TNFα mRNA 量および培地中の TNFα 量を測定、データは N =3 の平均および標準偏差を示す

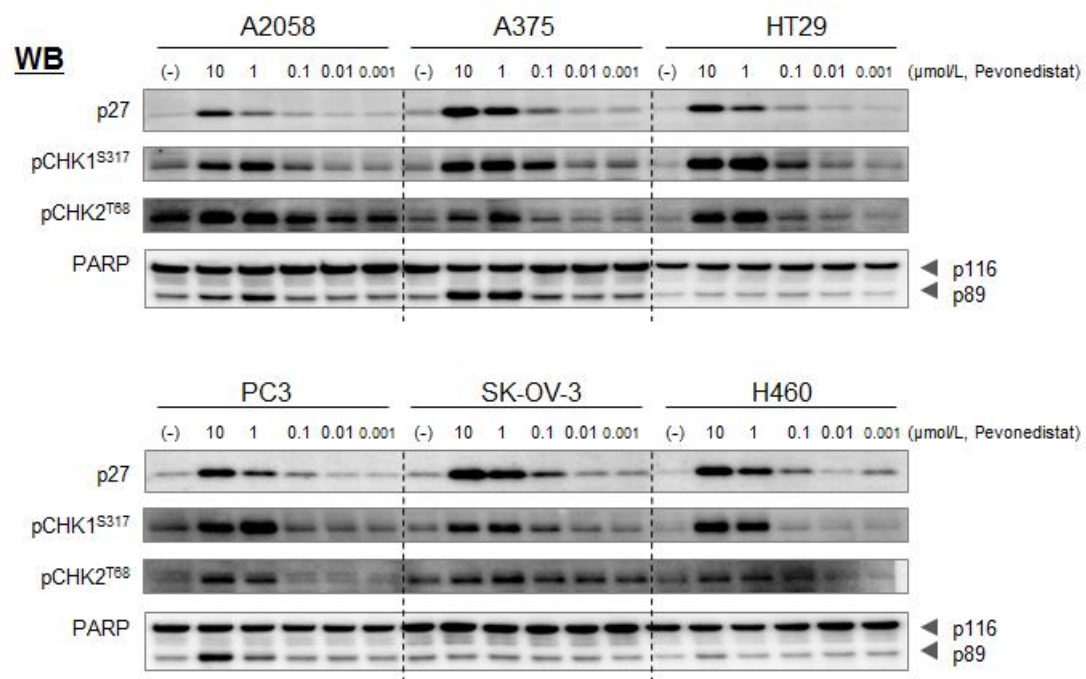


Figure 4-4 Pevonedistat による細胞内シグナルへの影響
 化合物処理 24 時間後の細胞を回収して、ウェスタンブロッティングにより検出

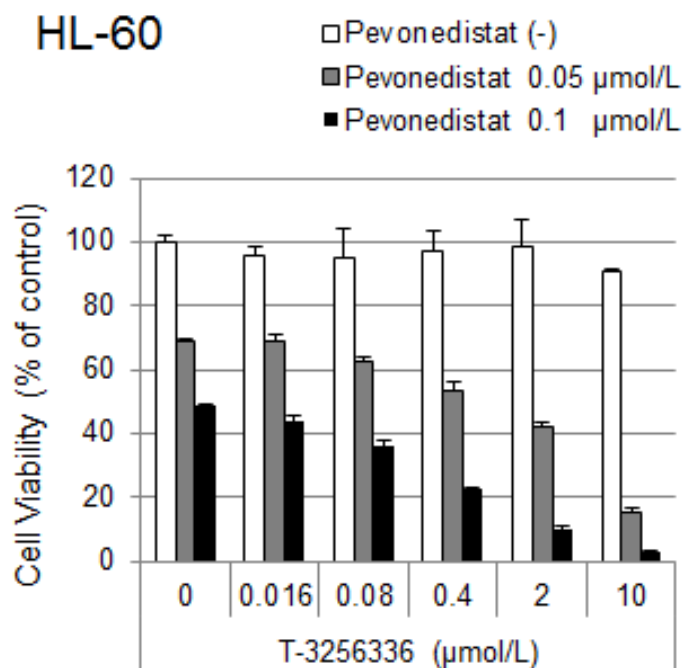
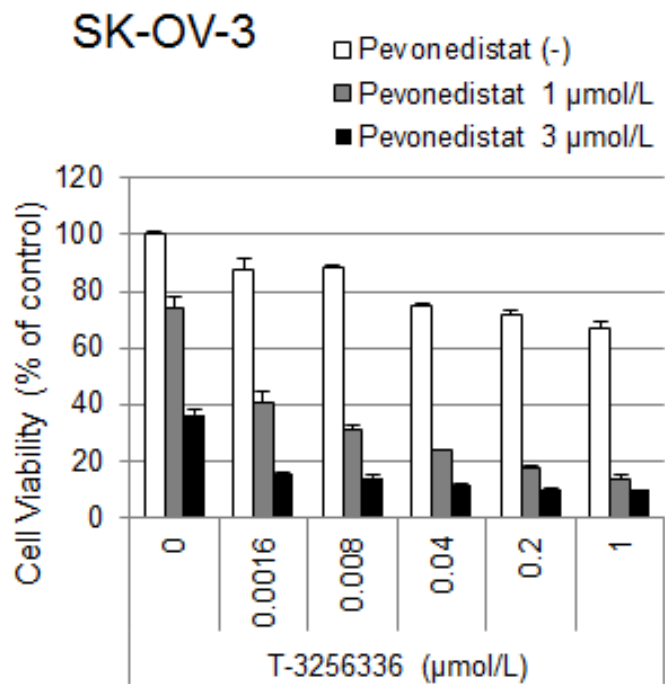


Figure 4-5 T-3256336 と Pevonedistat 併用の増殖阻害作用と細胞周期への影響
 化合物処理 5 日後に実験方法に記載の方法にて ATP 量を測定、
 データは N=3 の平均および標準偏差を示す

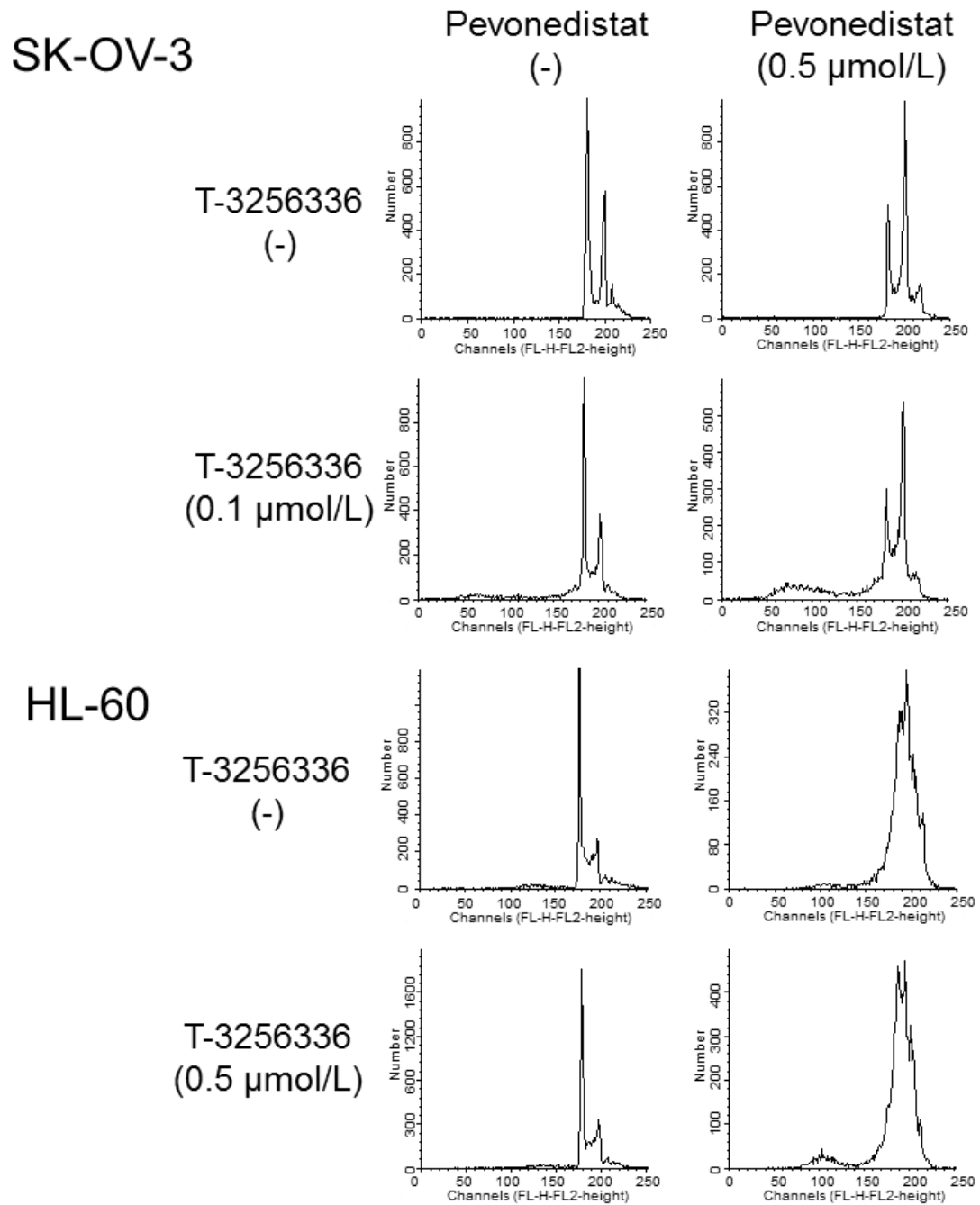


Figure 4-6 T-3256336 と Pevonedistat 併用時の細胞周期への影響
 化合物処理 3 日後に細胞を固定、propidium iodide にて染色しフローサイトメーターにより DNA プロファイルを解析

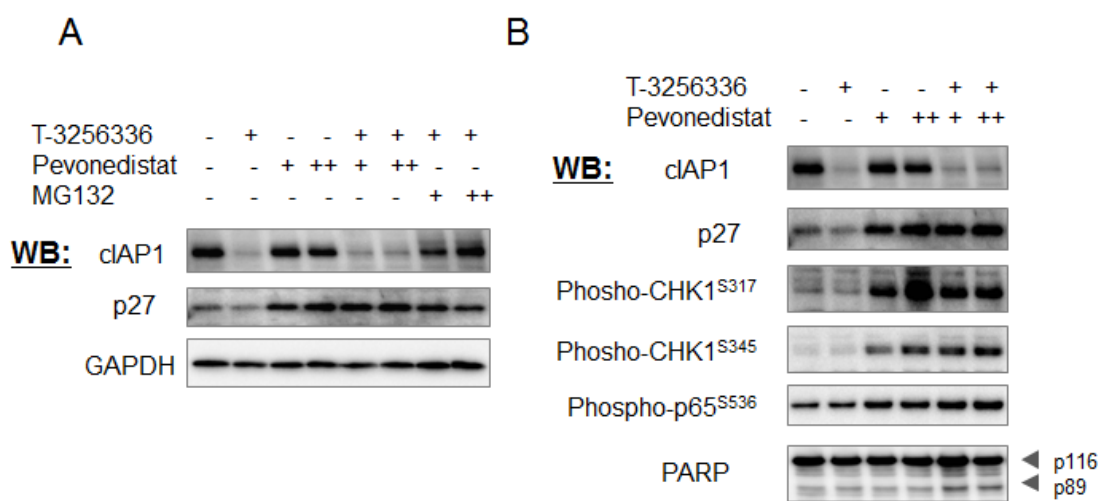


Figure4-7 T-3256336 と Pevonedistat 併用時の細胞内シグナルへの影響

A: Cullin ring ligase 関連タンパク質の変動解析、SK-OV-3 細胞に 50 nM の T-3256336 および pevonedistat 処理後 4 時間のサンプルを回収して、ウェスタンブロッティング法により解析

B: 細胞内シグナル変化の解析、SK-OV-3 細胞に 100 nM の T-3256336 および pevonedistat 処理後 24 時間のサンプルを回収して、ウェスタンブロッティング法により解析

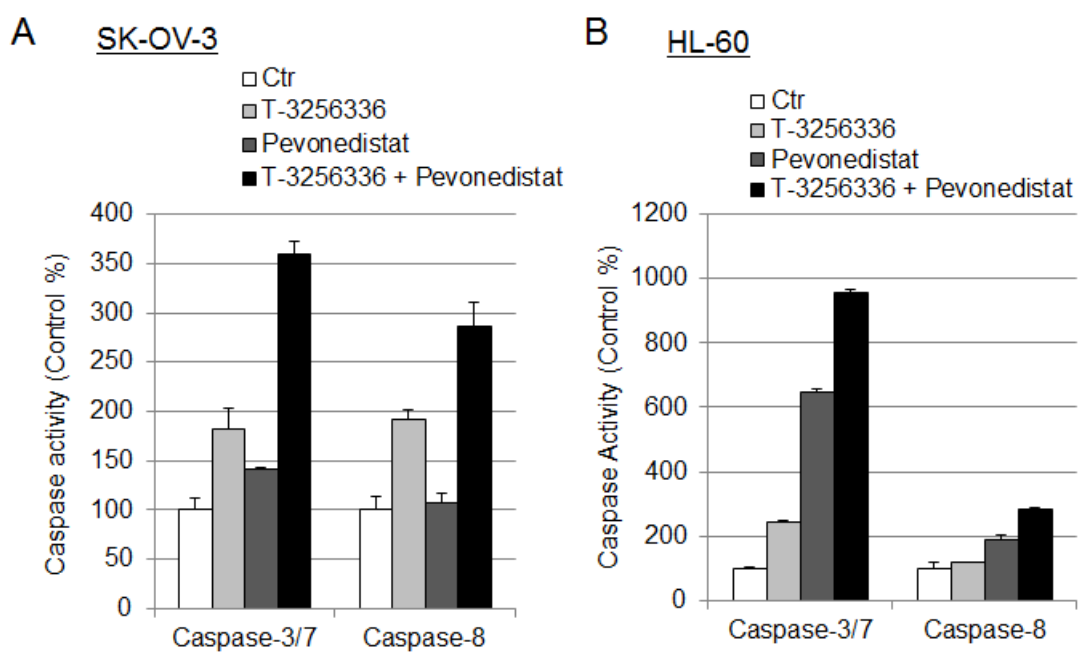


Figure4-8 T-3256336 と Pevonedistat 併用時の Caspase 活性

A: SK-OV-3 細胞, B: HL-60 細胞

SK-OV-3 細胞に 100 nM の T-3256336 および pevonedistat 処理後 24 時間に実験方法に記載の方法にて Caspase 活性を測定、データは N =3 の平均および標準偏差を示す

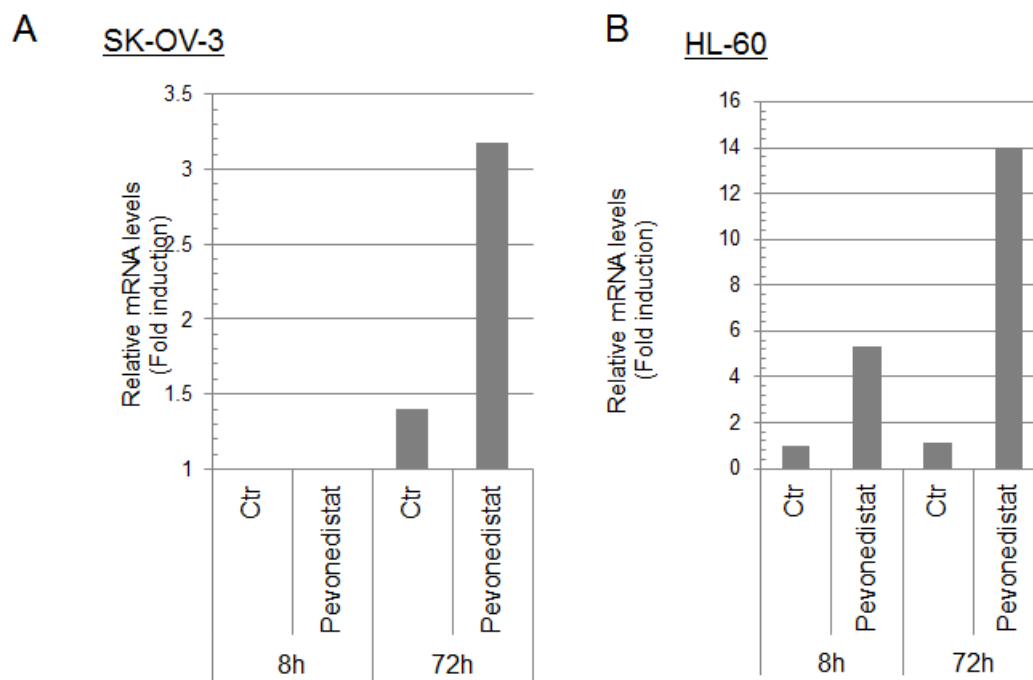


Figure 4-9 Pevonedistat による TNF α 誘導作用

A: SK-OV-3 細胞, B: HL-60 細胞

100 nM の pevonedistat 処理後に実験方法に記載の方法にて TNF α mRNA 量を Real-time PCR にて測定、データは N =3 の平均および標準偏差を示す

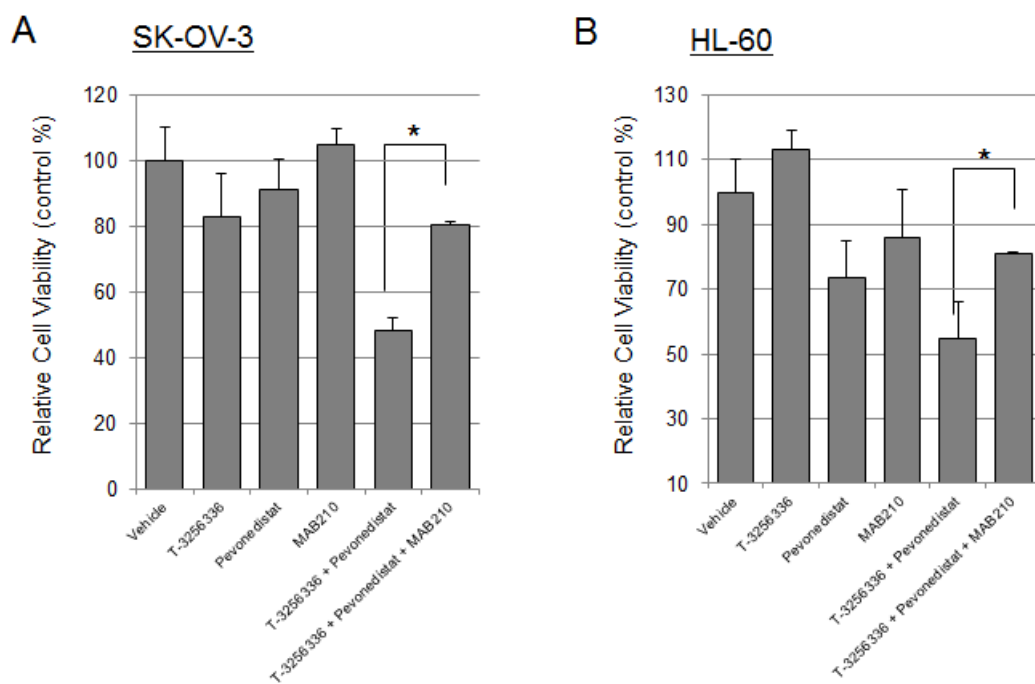
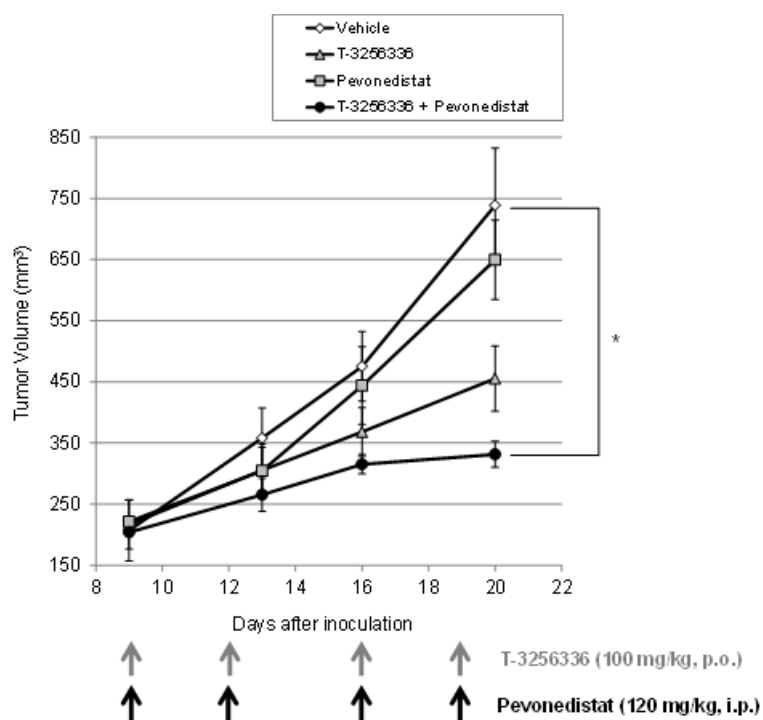


Figure 4-10 T-3256336 と Pevodestat 併用作用に対する TNF α の影響

A: SK-OV-3 細胞, B: HL-60 細胞

100 nM の T-3256336 および pevonedistat 処理後 72 時間に実験方法に記載の方法にて細胞内 ATP 量を測定、データは N =3 の平均および標準偏差を示す

Student's t-test, *, P < 0.05. vs T-3256336 and chemotherapeutics treatment.



| Treatment | T/C (%) | Tumor volume at day 20 (± SD) | P-value |
|--------------------------------|---------|-------------------------------|------------------|
| Vehicle | 100 | 475.3 (126.4) | |
| T-3256336 (100 mg/kg) | 44.9 | 368.4 (88.3) | 0.19 vs. Vehicle |
| Pevonedistat (120 mg/kg, i.p.) | 80.6 | 443.9 (141.6) | 0.96 vs. Vehicle |
| T-3256336 + Pevonedistat | 24.0 | 315.4 (35.3) | 0.02 vs. Vehicle |

Figure 4-11 HL-60 xenograft モデルにおける T-3256336 と Pevonedistat 併用の抗腫瘍作用

データは N = 5 の平均および標準偏差を示す

Student's t-test, *, P < 0.05. vs vehicle treatment.

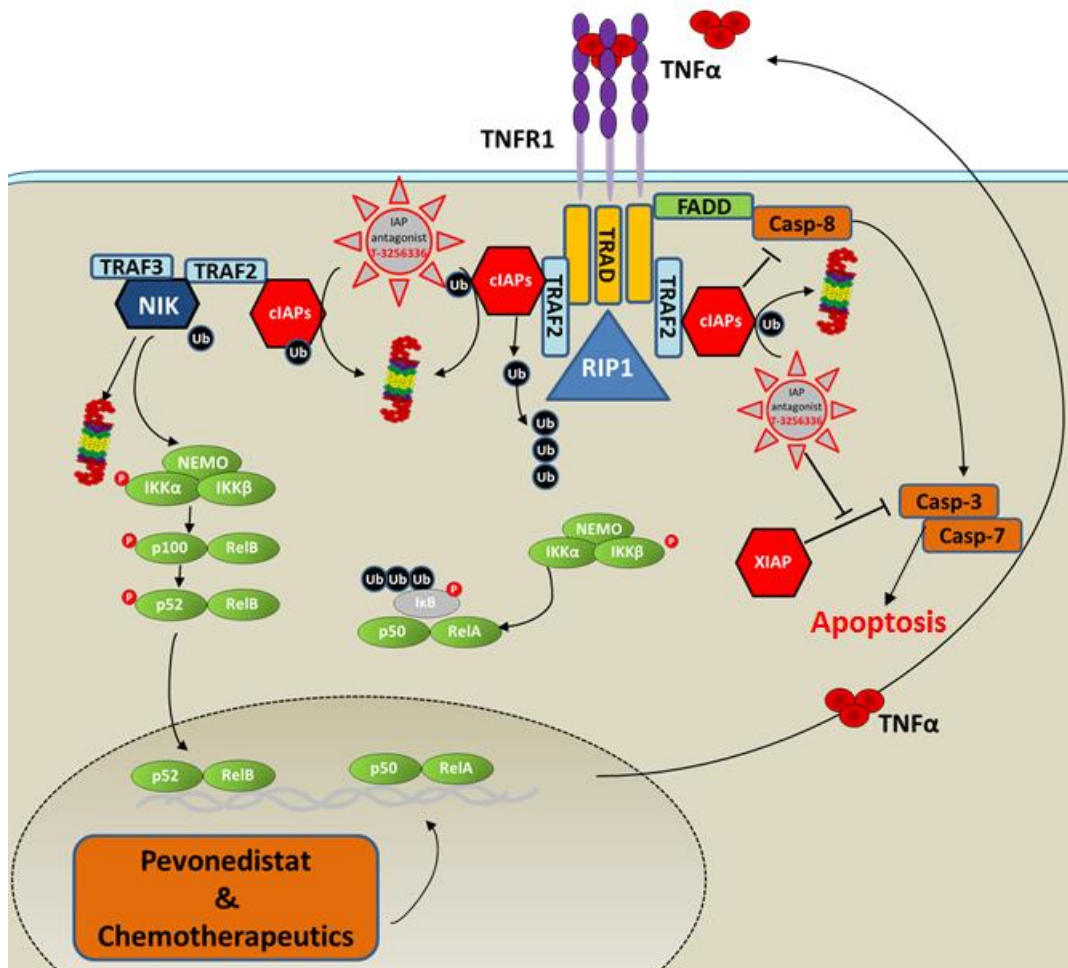


Figure 4-12 Pevonedistat と IAP antagonist の併用作用メカニズム

第五章

総括

がんは日本人の死因の第一位であり、現在では、年間 30 万人以上の国民が、がんで亡くなっている。また、生涯のうちにがんに罹患する可能性は、男性の 2 人に 1 人、女性の 3 人に 1 人と推測されており、がんの治療は社会的な問題となっている。このような背景から製薬業界における抗がん剤の開発は、そのアンメットメディカルニーズと市場性の高さから多くの製薬会社において最重要領域と位置づけられ、活発な創薬研究が推進されている。

これまでのがん創薬研究はがんの増殖に直接関与する分子やがんの増殖を助ける働きをする分子をターゲットとした薬剤、特にプロテインキナーゼ阻害剤の開発が中心であり、EGFR 阻害剤、HER2 阻害剤、VEGFR 阻害剤など、多くのキナーゼ阻害剤が市場に導入されてきた。一方で細胞死に関わる分子をターゲットとした薬剤開発は、がん選択的な殺細胞作用の達成と抗がん剤治療への抵抗性克服の観点で魅力的な領域であったが、アポトーシスに関わるターゲット分子の多くは酵素活性を有さず、創薬研究の難しさから、開発が遅延してきた。ところが、近年のたんぱく質結晶構造解析技術の進歩によりたんぱく質間の相互作用を阻害する低分子のデザインが可能になるにつれ、細胞死シグナルの薬剤の開発が進み、2016 年 4 月には慢性リンパ性白血病 (CLL) 患者の治療薬として、内因性アポトーシスシグナルを抑制する分子である Bcl-2 をターゲットとした阻害剤、venetoclax が FDA に承認された。今後 venetoclax の承認を契機に、実臨床での細胞死シグナルの理解が進み、新たな阻害剤の開発が進むと考えられる。

本研究では細胞死シグナルの主要な 2 つのパスウェイである内因性シグナルと外因性シグナルの両シグナルにおいて重要な機能を担っている XIAP, cIAP-1, cIAP-2 をターゲットとした創薬研究を目的に、新規 IAP antagonist である T-3256336 を用いた作用メカニズムの解析、モデル細胞、動物を用いた薬効薬理解析を実施した。また、がんは多種多様な組織および細胞から発生するため、1 つのがん種であってもその性質が大きく異なり、抗がん剤の効果を予測するマーカーの開発や、最適な併用薬の探索といったトランスレーショナル研究が非常に重要になってきている。そこで T-3256336 に感受性を規定する分子の探索および最適な併用薬の探索と、そのメカニズム解析を実施した。

第二章では武田薬品工業株式会社にて創製した新規 IAP antagonist である T-3256336 の生化学的な特徴と作用メカニズムを解析することを目的として、生化学および分子生物学的な手法を用いて解析した結果、T-3256336 が cIAP-1, cIAP-2 および XIAP に選択的に結合し、細胞内での cIAP-1 たんぱく質の分解、NF κ B の活性化、TNF α の産生を誘導し、最終的にがん細胞選択的な強い細胞死を誘導することを明らかにした。さらに動物モデル

を用いた解析において、臨床での応用が可能な薬効を予測するバイオマーカー探索を目的に、*in vivo*での作用メカニズムとファーマコダイナミクスパラメーターの解析と、抗腫瘍効果との相関に関して検討した結果、血液中 TNF α 量、細胞死およびアポトーシスの指標となるサイトケラチン 18 の血液中量 (M30 および M65) が臨床において薬効を予測する非侵襲的なバイオマーカーとして活用可能であることを明らかとした。

組換えたんぱく質を用いた cIAP-1, cIAP-2 および XIAP との結合試験の結果、T-3256336 は cIAP-1 および cIAP-2 に対して それぞれ 1.3 nM および 2.2 nM で結合することを明らかにした。また XIAP との結合試験および XIAP と Caspase との結合による機能的 Caspase 活性回復試験の結果、T-3256336 は XIAP に結合して Caspase 活性を回復させる作用を有する化合物であることを明らかにした。次に、培養がん細胞を用いた解析から、T-3256336 は細胞内において cIAP-1 たんぱく質に作用し、ユビキチン化を介した cIAP-1 たんぱく質の分解と NF κ B シグナルの活性化、TNF α の発現および培養液中への分泌を誘導し、誘導された TNF α がオートクライン的に外因性アポトーシスシグナルを誘導して強いアポトーシスをきたすことが示された。さらに薬効動物モデルを用いた薬物動態解析において、T-3256336 は経口吸収性と腫瘍移行性に優れた化合物であることを示し、薬理評価において、腫瘍組織における cIAP-1 たんぱく質の分解と TNF α の誘導、Caspase 活性化を誘導し、腫瘍を退縮させる作用を有することを明らかとした。以上の結果から、武田薬品工業株式会社が創製したオクタピロピラジン骨格を有する新規経口 IAP antagonist T-3256336 が cIAP-1, cIAP-2 および XIAP に選択的に結合し、細胞内での cIAP-1 たんぱく質の分解、NF κ B の活性化、TNF α の産生を誘導し、最終的にがん細胞選択的な強い細胞死を *in vitro* および *in vivo* いずれにおいても誘導することを明らかにした。

さらに、ファーマコダイナミクスパラメーターの解析において、薬効動物モデルの血液中 TNF α 量、細胞死およびアポトーシスの指標となるサイトケラチン 18 の血液中量 (M30 および M65) の増加量は薬効動物モデルにおける抗腫瘍効果と高い相関を示し、臨床において薬効を予測する非侵襲的なバイオマーカーとして活用可能であることを示唆した。これらの結果は T-3256336 が IAP antagonist としてのプロファイルに優れており、臨床開発の可能性を示している。

第三章では IAP antagonist の課題であった単剤での感受性を規定する因子と新たな感受性群の探索を目的にがん細胞株を用いた網羅的な解析と薬理学的手法を用いた新規の IAP antagonist 感受性メカニズムの解析を行った。IAP antagonist は単剤で強い抗腫瘍効果を示すが、感受性を示す細胞株は全体の約 2 割から 3 割と言われており、感受性を規定する因子は臨床開発の成功のために必須となっていた。そこで 47 のがん細胞株を用いた増殖試験結果およびアポトーシスに関連する分子の発現解析を行い、T-3256336 に対する感受性が TNF α の定常的な mRNA 発現量と相関することを明らかとした。以上の結果から、IAP antagonist 単剤に対する感受性を規定する因子として定常状態での TNF α 発現レベルが重

要であることが示唆された。

次に新たな感受性メカニズムの探索に向けた薬効動物モデルの解析において、T-3256336 はこれまで報告されていたヒト腫瘍由来の TNF α だけでなく、マウスの TNF α を誘導し、血液中量が増加することを明らかとした。47 がん細胞株を用いた TNF α と T-3256336 共処理による増殖阻害試験の結果、T-3256336 単剤に対して *in vitro* で非感受性を示す 33 株中 9 株が TNF α との併用において感受性を示すことが明らかとなった。さらにマウス薬効動物モデルを用いた解析により、T-3256336 投与により増加した血液中マウス TNF α が T-3256336 と協調的に腫瘍に作用することにより、*in vitro* では非感受性であった Panc-1 細胞に対しても、動物モデルで強い細胞死を誘導し、抗腫瘍効果を示すことを明らかとした。また、Panc-1 xenograft モデルにおいて認められた抗腫瘍効果は TNF α の中和抗体により減弱することから、マウスで産生された TNF α に依存した作用であることが示唆された。以上の結果から、IAP antagonist はマウスを用いた解析において全身性の TNF α を誘導し、腫瘍を IAP antagonist に対して感受性へと変化させる作用を有することが明らかとなった。これにより動物モデルにおいて IAP antagonist に対して感受性を示すと考えられるヒトがん細胞株は今回試験したがん細胞株全体の約半数程度となり、臨床での適応可能性が広がったと考えられる。

第四章では臨床現場で重要視されている併用療法に着目し、T-3256336 の併用薬の探索と併用メカニズムの解析を行った。実際の抗がん剤治療の臨床現場では、その多くが化学療法剤や他の分子標的治療薬との併用で治療に用いられており、臨床試験でも他の抗がん剤と併用して試験が進められるのが一般的となっている。T-3256336 と化学療法剤との併用増殖阻害試験の結果、T-3256336 は DNA ダメージを誘導する薬剤およびチューブリン阻害剤と高い相乗効果を示すことを明らかとした。またそれら薬剤により、がん細胞中の TNF α 発現と培養液中 TNF α 量の増加、T-3256336 併用時において外因性アポトーシスの指標である Caspase-8 と Caspase-3/7 の誘導が認められた。さらに、それら相乗作用は TNF α 中和抗体、Caspase 阻害剤、RIPK1 阻害剤により減弱することを明らかとした。以上の結果から DNA ダメージ誘導剤やチューブリン阻害剤との併用において認められる相乗的な増殖抑制作用は、IAP antagonist の主要な作用メカニズムである、TNF α 誘導に起因する外因性アポトーシスの惹起による作用であることが示唆された。

近年の抗がん剤の開発においては、新しい作用メカニズムを有する薬剤同士を最適に組み合わせることにより、副作用のコントロールと高い薬効を両立することが期待されている。そこで武田薬品工業株式会社が創製した Nedd8 活性化酵素阻害剤である Pevonedistat に着目したファーマコダイナミクスの解析を行ったところ、Pevonedistat はがん細胞に対する増殖阻害活性の有無に関わらず、CHK1^{S317} および CHK2^{T68} にて検出される DNA ダメージを強く誘導することが明らかとなった。Pevonedistat により誘導された DNA ダメージは NF κ B の活性化を介して TNF α を誘導し、T-3256336 との増殖阻害試験において相乗

効果を示した。また、T-3256336 と Pevonedistat 併用による増殖阻害作用は TNF α 中和抗体により減弱され、TNF α による惹起される外因性アポトーシスによるものであることが示唆された。薬効動物モデルを用いた解析において、T-3256336 と Pevonedistat の併用は *in vivo* でも高い抗腫瘍効果を示すことを明らかとした。以上の結果から、IAP antagonist と Nedd8 活性化酵素阻害剤の併用療法は有効であることが示され、2 剤とも武田薬品工業株式会社にて創製された薬剤であることから、開発戦略上も最適な組み合わせであると考えられた。

本研究において、武田薬品工業株式会社が創製した T-3256336 は cIAP-1, cIAP-2 および XIAP に対する高い阻害活性、選択性と優れた薬物動態プロファイルを有する有望な IAP antagonist であることを明らかとした。またトランスレーション研究から、血液中の TNF α 、M30 および M65 が IAP antagonist の薬効を予測する非侵襲的なバイオマーカーとなること、定常レベルの TNF α 発現レベルが、IAP antagonist に対する感受性を規定するバイオマーカーになること、IAP antagonist により誘導される全身性の TNF α を介した新たな作用メカニズムが存在すること、Pevonedistat が IAP antagonist の最適な併用薬となることを明らかとした。一連の研究において、IAP antagonist の中心的な作用は TNF α を介した外因性アポトーシスであることが示唆された。今後、これらの知見をもとに、さらに IAP antagonist および細胞死研究の発展が進むことで、新たな抗がん剤の開発に貢献することを期待したい。

実験の部

第二章の実験

Chemical synthesis

Synthesis of T-3256336

T-3256336 was prepared by following procedure. The starting material, benzyl $\{(1S)-1-(4,4\text{-difluorocyclohexyl})-2-[(3S,7R,8aR)-3-[(4R)-3,4\text{-dihydro-}2H\text{-chromen-}4\text{-yl-carbamoyl}]-7\text{-ethoxyhexahydropyrrolo}[1,2\text{-a}]\text{pyrazin-}2(1H)\text{-yl}]-2\text{-oxoethyl}\}$ carbamate, showed very weak XIAP and cIAP binding inhibitory activity (IC_{50} values $> 30 \mu M$).

$(3S,7R,8aR)-2-\{(2S)-2-(4,4\text{-Difluorocyclohexyl})-2-[(N\text{-methyl-L-alanyl)amino}]acetyl\}$ -N-[(4R)-3,4-dihydro-2H-chromen-4-yl]-7-ethoxyoctahydropyrrolo[1,2-a]pyrazine-3-carboxamide (T-3256336). To a solution of benzyl

$\{(1S)-1-(4,4\text{-difluorocyclohexyl})-2-[(3S,7R,8aR)-3-[(4R)-3,4\text{-dihydro-}2H\text{-chromen-}4\text{-yl-carbamoyl}]-7\text{-ethoxyhexahydropyrrolo}[1,2\text{-a}]\text{pyrazin-}2(1H)\text{-yl}]-2\text{-oxoethyl}\}$ carbamate (2.40 g, 3.67 mmol) in 5-10% HCl solution in methanol (48 mL) was added 10% Pd/C (0.72 g), and the reaction mixture was stirred at room temperature for 3 h under hydrogen atmosphere. The mixture was filtered through a pad of Celite®, and the filtrate was concentrated under reduced pressure to give

$(3S,7R,8aR)-2-[(2S)-2\text{-amino-}2-(4,4\text{-diluorocyclohexyl})acetyl]-N-[(4R)-3,4\text{-dihydro-}2H\text{-chromen-}4\text{-yl}]-7\text{-ethoxyoctahydropyrrolo}[1,2\text{-a}]\text{pyrazine-}3\text{-carboxamide}$ dihydrochloride as yellow oil.

To a solution of N-(tert-butoxycarbonyl)-N-methyl-L-alanine (0.82 g, 4.04 mmol), HOBT (0.59 g, 4.37 mmol) and DIPEA (3.19 mL, 18.1 mmol) in DMF (14.4 mL) was added EDC-HCl (2.11 g, 11.0 mmol) at 0 °C, and the mixture was stirred at room temperature for 15 min. To the mixture was added a solution of

$(3S,7R,8aR)-2-[(2S)-2\text{-amino-}2-(4,4\text{-difluorocyclohexyl})acetyl]-N-[(4R)-3,4\text{-dihydro-}2H\text{-chromen-}4\text{-yl}]-7\text{-ethoxyoctahydropyrrolo}[1,2\text{-a}]\text{pyrazine-}3\text{-carboxamide}$ dihydrochloride and DIPEA (0.64 mL, 0.742 mmol) in DMF (19.2 mL) at room temperature, and the reaction mixture was stirred at room temperature for 16 h. The mixture was partitioned between EtOAc (200 mL) and water (200 mL), and the organic layer was washed with sat. NaHCO₃ (100 mL) and brine (100 mL), dried over MgSO₄, and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel column chromatography (50-100% EtOAc in n-hexane) to give tert-butyl $[(1S)-2-\{(1S)-1-(4,4\text{-difluorocyclohexyl})-2-$

[(3S,7R,8aR)-3-[(4R)-3,4-dihydro-2H-chromen-4-ylcarbamoyl]-7-ethoxyhexahydropyrrolo[1,2-a]pyrazin-2(1H)-yl]-2-oxoethyl}amino)-1-methyl-2-oxoethyl]methylcarbamate (1.69 g, 65%) as white amorphous solid; ¹H NMR (DMSO-d₆, 300 MHz): δ 1.10 (3H, t, J = 7.1 Hz), 1.10–1.36 (15H, m), 1.55–2.24 (13H, m), 2.57–3.68 (8H, m), 3.86–5.17 (8H, m), 6.70–6.90 (2H, m), 7.07–7.29 (2H, m), 7.65–8.32 (2H, m).

The obtained crystals (1.68 g, 2.38 mmol) were dissolved in 4M HCl in EtOAc (33.6 mL), and the mixture was stirred at room temperature for 1 h. The mixture was concentrated under reduced pressure. The residue was partitioned between EtOAc/THF (2:1, 120 mL) and sat.NaHCO₃ (100 mL), and the organic layer was washed with brine (100 mL), dried over MgSO₄, and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel column chromatography (5-70% EtOAc in n-hexane) and subsequent crystallization from ether/heptane (1:1, 20 mL) to give T-3256336 (1.08 g, 75%) as colorless crystals; mp 171-174 °C; ¹H NMR (DMSO-d₆, 300 MHz): δ 1.01–1.15 (6H, m), 1.15–1.38 (3H, m), 1.54–2.29 (16H, m), 2.63–3.64 (7H, m), 3.88–4.48 (4H, m), 4.59–5.15 (3H, m), 6.70–6.80 (1H, m), 6.80–6.92 (1H, m), 7.07–7.30 (2H, m), 7.88–8.12 (1H, m), 8.12–8.33 (1H, m); Anal. Calcd for C₃₁H₄₅F₂N₅O₅: C, 61.47; H, 7.49 N, 11.56. Found: C, 61.54; H, 7.61; N, 11.30.

Recrystallization of T-3256336. The crystals T-3256336 (5.00 g, 8.25 mmol) was dissolved in 2-butanone (25 mL) at 77°C (inside temperature was 60°C). Heptane (40 mL) was added dropwise to the mixture at 77°C (inside temperature was above 60°C). The mixture was stirred at 77°C for 1 h (inside temperature was 65°C). Heptane (60 mL) was added dropwise at 77°C (inside temperature was above 60°C) and the suspension was cooled to 5°C slowly. The resulting crystals were collected by filtration, washed with heptane (30 mL) and dried under reduced pressure (70°C for 1 h) to give T-3256336 (4.56 g, 91%) as colorless crystals; mp 178.6°C.; ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ 1.01–1.15 (6H, m), 1.15–1.38 (3H, m), 1.54–2.29 (16H, m), 2.63–3.64 (7H, m), 3.88–4.48 (4H, m), 4.59–5.15 (3H, m), 6.70–6.80 (1H, m), 6.80–6.92 (1H, m), 7.07–7.30 (2H, m), 7.88–8.12 (1H, m), 8.12–8.33 (1H, m); Anal. Calcd for C₃₁H₄₅F₂N₅O₅: C, 61.47; H, 7.49 N, 11.56. Found: C, 61.52; H, 7.54; N, 11.45

Cell lines, Proteins, Peptides, and Reagents

MDA-MB-231, MDA-MB-468, BT-474 SK-OV-3, and T-47D, HL-60 and NCI-H1703 cancer cell line and MRC5 normal lung fibroblasts were obtained from the ATCC (Manassas, VA, USA). The culture medium that was recommended by the suppliers was used for the cultivation of each cell line. MDA-MB-231 cells stably expressing luciferase (MDA-MB-231-Luc) were established at Takeda Pharmaceutical Company, Ltd. (TPC,

Fujisawa, Kanagawa, Japan) by transfecting a firefly luciferase expression vector (Promega Corporation, Madison, WI, USA) into MDA-MB-231 cells. Commercially obtained cells were not authenticated by the authors. An antibody against cIAP-1 (AF8181), cIAP-2 (AF8171), and human TNF α (MAB210) was purchased from R&D Systems, Inc. (Minneapolis, MN, USA). Anti-XIAP (610762) was purchased from BD Biosciences (Albertslund, Denmark). Anti-Livin antibody (88C570) was from IMGENEX Corporation (San Diego, CA, USA). Anti-glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH; MAB374) antibody was from Millipore (Bedford, MA, USA). Anti-I κ B α (#4814), anti-phospho-I κ B α (Ser32) (#2859), anti-NF- κ B p65 (#3034), anti-phospho-NF- κ B p65 (Ser536) (#3033), anti-c-Jun N-terminal kinase (JNK) (#9258), anti-phospho-JNK (Thr183/Tyr185) (#9251), anti-phospho-p38 (Thr180/Tyr182) (#9211), anti-p38 (9217), anti-caspase-8 (#9746), and anti-caspase-3 (#9665) were purchased from Cell Signaling Technology, Inc. (Beverly, MA, USA). MG-132 (#474791), pan-caspase inhibitor z-BAD-fmk (#219007), caspase-8 inhibitor z-IETD-fmk (#218759) were purchased from Calbiochem (San Diego, CA, USA). The recombinant human XIAP (residues 124–357, XIAP_BIR2-BIR3) and caspase-9 were prepared at Takeda California, and the 6-His-tagged recombinant BIR3 domains of human cIAP-1 (residues 250–350, cIAP-1_BIR3) and cIAP-2 (residues 238–349, cIAP-2_BIR3) were prepared at TPC. The recombinant BIR3 domain of human XIAP (residues 252–356) fused to a N-terminal His-tag (XIAP_BIR3) was purchased from R&D Systems, Inc., and the SMAC-N7 peptide (AVPIAQK) was purchased from Merck KgaA (Darmstadt, Germany). C-terminal-biotinylated SMAC-N7 peptide [AVPIAQ-K(biotin)-NH₂] (biotinyl-SMAC) was synthesized at Peptide Institute Inc (Osaka, Japan). The cryptate-conjugated mouse monoclonal antibody anti-6-Histidine (Anti-6HIS Cryptate), high-grade XL665-conjugated streptavidin (SA-XL), and homogeneous time-resolved fluorescence resonance energy transfer (HTRF) detection buffer were purchased from Sceti Medical Labo K.K. (Tokyo, Japan). Recombinant human caspase-3 and caspase-7 were purchased from Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan).

Binding activities using HTRF technology

Five μ L of IAP proteins (40 nM of XIAP_BIR3 and 8 nM of cIAP-1/-2_BIR3) and 5 μ L of increasing concentrations of compounds were added to the wells containing assay buffer (25 mM (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid [HEPES], 100 mM NaCl, 0.1% bovine serum albumin, 0.1% Triton X-100, pH 7.5). After shaking, 5 μ L of biotinyl-SMAC (20 nM of XIAP_BIR3, 80 nM of cIAP-1_BIR3, and 120 nM of cIAP-2_BIR3 dissolved in assay buffer) was added to the well, which was followed by

adding 5 μ L of the mixture of Anti-6HIS Cryptate and SA-XL, which was diluted 100 times with HTRF detection buffer. After an overnight incubation at room temperature in the dark, HTRF measurements were conducted with a EnVision multi-label reader (PerkinElmer Inc., Waltham, MA). Fluorescence at 615 nm (F615 nm) is the total europium signal, and fluorescence at 665 nm (F665 nm) is the fluorescence resonance energy transfer signal. The ratio [(F665 nm/F615 nm) \times 10,000] was calculated, and IC50 values were determined using the ratio with nonlinear regression curve fitting with Prism (Version 5.01, GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA).

Cell-free functional assay

Various concentrations of T-3256336 or SMAC-N7, XIAP_BIR2-3 (40 nM for caspase-3, 4 μ M for caspase-7 or 300 nM for caspase-9), and 1 unit of caspase-3/caspase-7/caspase-9 were added to wells in 384-well plates (Corning Incorporated, Lowell, MA) at a final volume of 30 μ L in assay buffer (20 mM HEPES, 0.1% CHAPS, 1mM ethylenediaminetetraacetic acid [EDTA], 10% Sucrose, and 10 mM DTT, pH 7.5). After incubating at room temperature for 5 min, 10 μ L of 40 μ M or 160 μ M Ac-DEVD-AMC solution (Enzo Life Sciences, Inc., Farmingdale, NY, USA) for caspase-3 and caspase-7, 50 μ M of Ac-LEHD-AMC for caspase-9 were added to the wells, respectively. Following incubation for 30 min at room temperature with shaking, fluorescence at 380 nm excitation and 460 nm emission wavelengths was measured using a multi-mode microplate reader Spectra Max M5e (Molecular Devices, Inc., Sunnyvale, CA, USA). Activity was expressed as EC50, which was the concentration at which half-maximum recovery was achieved, with Prism.

Cell viability assay and measurement of caspase activity

Cells were seeded at 3×10^3 cells/well in 96-well plates (Sumitomo Bakelite Co., Ltd., Tokyo, Japan) and cultured overnight. On the following day, test compounds were diluted in growth medium to the desired final concentration and then added to the cells. After 24 h of incubation, caspase activities were measured with Caspase-Glo[®]-3/Caspase-Glo[®]-7, Caspase-Glo[®]-8, or Caspase-Glo[®]-9 Assays (Promega Corporation). After 3 days of incubation, cell viability was measured with a CellTiter-Glo[®] Luminescent Cell Viability Assay[®] (Promega Corporation). GI50 values were determined with the ratio by nonlinear regression curve fitting with Prism.

Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and western blotting

Cells were lysed with 100 μ L of SDS sample buffer (BioRad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA) and heated at 95°C for 5 min. Each cell lysate was subjected to SDS-PAGE and transferred onto Sequi-Blot™ PVDF Membranes (BioRad Laboratories, Inc.). The membranes were blocked with StartingBlock™ T20 (PBS) Blocking Buffer (Thermo Fisher Scientific, Inc., Rockford, IL, USA) and probed overnight with an antibody diluted 500- to 2000-fold with Can Get Signal® Immunoreaction Enhancer Solution I (Toyobo Co., Ltd., Osaka, Japan). The membrane was washed with phosphate-buffered saline containing 0.1% Tween-20 (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) and incubated with horseradish peroxidase-labeled secondary antibody (GE Healthcare, South Burlington, VT, USA) that was diluted 20,000-fold with Can Get Signal® Immunoreaction Enhancer Solution II (Toyobo Co., Ltd.) for 2 h at room temperature. The membrane was washed in the same manner as above, and proteins labeled with the antibody became chemically luminescent with SuperSignal® West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Fisher Scientific, Inc.) and were detected with the luminoimage analyzer LAS-1000 (Fujifilm Corporation, Tokyo, Japan).

Quantitative real-time-polymerase chain reaction (RT-PCR)

Cells were seeded at 5×10^5 cells/well in 6-well plates and cultured overnight. On the following day, test compounds were diluted in growth medium to the desired final concentration and then added to the cells. The isolation of total RNA was performed with a RNeasy mini kit (QIAGEN Inc., Valencia, CA, USA). About 1 ng of total RNA from each sample was reverse transcribed with the SuperScript® VILO™ cDNA synthesis kit (Life Technologies, Grand Island, NY, USA). For the quantitative analysis of the levels of mRNA expression, a real-time PCR assay was performed (TaqMan with the 7900HT Fast Real-Time PCR System; Life Technologies) using TaqMan probes.

In vivo Efficacy study

Mice were housed and maintained within the facility at Takeda Pharmaceutical Company in accordance with the Takeda Experimental Animal Care and Use Committee approved protocol. Athymic nude mice (BALB/cAJcl-*nu/nu*) of approximately 5 weeks of age were obtained from CLEA Japan, Inc. (Tokyo, Japan). For the subcutaneous implanted tumor xenograft models, nude mice were injected with 5×10^6 cells/mouse. When tumor volumes reached approximately 200 mm³, mice were randomly assigned to treatment groups. The compounds were orally administered to the mice in 0.5% methylcellulose (Shin-Etsu Chemical Co., Ltd., Tokyo, Japan). Tumor

growth and body weights were measured twice weekly, and average tumor volumes were calculated, as estimated from the formula $[(L \times W^2)/2]$ throughout the study.

In vivo pharmacokinetics/pharmacodynamics study

Nude mice were injected with 5×10^6 MDA-MB-231-Luc cells. When the tumor volumes reached approximately 200 mm³, mice were randomly assigned to control or treatment groups. Tumors and plasma were collected at multiple time points after the oral administration of T-3256336. The concentrations of T-3256336 in the plasma and tumors were determined by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. Homogenization was performed with a Phycotron (NS-310E, Chiba, Japan) with RIPA buffer containing a phosphatase inhibitor cocktail and a protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA). The protein concentration in the tumor lysate was determined by bicinchoninic acid (BCA) protein assay kit (Thermo Fisher Scientific, Inc., Rockford, IL, USA). Plasma human TNF- α levels were determined with a human TNF- α Quantikine ELISA Kit (R&D Systems, Inc.). The levels of caspase-cleaved (M30) and total (M65) cytokeratin-18 in plasma were determined with an ELISA kit (Peviva AB, Bromma, Sweden).

Measurement of caspase activity in tumors

Caspase-3/caspase-7 activities in tumors were measured with a Caspase-Glo assay kit (Promega Corporation). Cytosolic extracts from MDA-MB-231-Luc xenografts were prepared by homogenization in extraction buffer (25 mM HEPES, pH 7.5; 5 mM MgCl₂; 1 mM EDTA) and subsequently centrifuged (5 min, 10,000 rpm, 4°C). The protein concentration of the supernatant was adjusted to 1 mg/mL with extraction buffer, and an equal volume of reagents and 10 μ g/mL cytosolic protein was mixed and incubated at room temperature for 30 min. The luminescence of each sample was measured in a luminometer.

Histopathological examination of xenograft athymic nude mice

To determine the effect of T-3256336 on xenograft model, necropsy was conducted on the day after 2-week po administration of T-3256336. The animals were euthanized and were macroscopically examined the external surface of the carcass, the thoracic and abdominal cavities, organs, and tissues. Tumor tissues, liver, spleen, skin and intestines from the control, 30 and 100 mg/kg groups were fixed in 10 vol% neutral buffered formalin, embedded in paraffin, sectioned, stained with hematoxylin-eosin (H&E) and examined histopathologically.

第三章の実験

Cell Lines and Reagents

MDA-MB231, MDA-MB435S, MDA-MB436, MDA-MB468, MCF7, T-47D, BT-474, BT-549, SK-Br-3, DU-4475, MB361, HCC1806, HCC1143, HCC1937, CHL-1, HMCB, SK-MEL-2, Malme-3M, HT-144, C32, A375, A2058, SK-OV-3, ES-2, OVCAR-3, TOV-21G, TOV-112D, OV-90, Caov3, SW626, NCI-H1703, NCI-H1975, NCI-H1650, NCI-H1437, NCI-H1395, NCI-H1299, HCC827, HL-60, HL-60/Mx2, CEM/C2 and PANC-1 were purchased from the ATCC (Manassas, VA). EVSA-T, EFM-192A and EFO-21 were from the German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (Leibniz Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Germany). G-361 and HMVII were from the European Collection of Cell Cultures (Health Protection Agency Culture Collections, Salisbury, UK). GAK, KURAMOCHI, OWISE, OVTOKO, RMG1, MCAS, and TYK-nu were from the Japanese Cancer Research Resources Bank (JCRB, Tokyo, Japan). Colo720E was from the Health Protection Agency Culture Collections. PC14 was from the BioResource Center (BRC, RIKEN Tsukuba Institute, Ibaraki, Japan).

Cell viability assay

Cells were seeded at 3×10^3 cells/well in 96-well plates and cultured overnight. The following day, test compounds were diluted in growth medium to the desired final concentration and added to the cells. After 3 days of incubation, cell proliferation was measured with a CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay (Promega Corporation, Madison, WI). IC₅₀ was calculated from the dose-response curve that was generated by a least-squares linear regression analysis of the response using SAS software and the NLIN procedure (version 5.0; SAS Institute Japan, Inc, Tokyo, Japan).

Quantitative RT-PCR

The isolation of total RNA was performed with a RNeasy mini kit (QIAGEN Inc, Valencia, CA) according to the manufacturer's instructions. About 1 µg of total RNA from each sample was reverse transcribed using the SuperScript® VILO™ cDNA synthesis kit (Life Technologies, Grand Island, NY). For the quantitative analysis of the expression of each mRNA, a real-time PCR assay was performed (TaqMan, with the 7900HT Fast Real-Time PCR System; Life Technologies) using TaqMan probes.

Tumor cIAP1 levels and plasma cytokine levels

All animal experiments were performed according to the guidelines of the Institutional Animal Care and Use Committee in Takeda Pharmaceutical Company Ltd. Eight-week-old mice were inoculated subcutaneously with 5×10^6 PANC-1 cells. When the tumors had grown to approximately 250 mm³, compounds in 10% methylcellulose were orally administered to the mice (Shin-Etsu Chemical Co, Ltd, Tokyo, Japan). Mice were euthanized, and tumors were harvested 6 h after dosing. The pharmacodynamics of the compounds were assessed by measuring tumor cIAP1 protein levels, TNF α mRNA levels, and caspase activity. Plasma murine TNF α (mTNF α) levels and other cytokine levels were determined with human TNF α Quantikine ELISA Kits or Mouse Cytokine Antibody Arrays, Panel A (R&D Systems, Inc).

SDS-PAGE and western blotting

Protein extraction and Western blot analysis were performed as previously described [12]. Primary antibody against cIAP1 was purchased from R&D Systems, Inc (Minneapolis, MN). A HRP-labeled secondary antibody was purchased from GE Healthcare (South Burlington, VT)

Measurement of Caspase-3/7 activities in tumors

Caspase-3/7 activities in tumors were measured using a Caspase-Glo assay kit (Promega Corporation). Cytosolic extracts from PANC-1 xenografts were prepared by homogenization in extraction buffer (25 mmol/L HEPES, pH 7.5; 5 mmol/L MgCl₂; and 1 mmol/L EDTA) and subsequently centrifuged (5 min, 10,000 rpm, 4 °C). The supernatant protein concentrations were adjusted to 1 mg/mL with extraction buffer, and equal volumes of reagents and 10 μ g/mL cytosolic protein were mixed and incubated at room temperature for 30 min. The luminescence of each sample was measured in a luminometer.

In vivo efficacy study

Eight-week-old mice were inoculated with 5×10^6 PANC-1 cells. The mean tumor volume was calculated using the following formula: Volume = (Width² \times Length)/2. When the mean tumor volume reached approximately 250 mm³, the animals were randomized into treatment groups containing 4 animals per group. The murine TNF α -neutralizing antibody (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN) was administered once at day 22 intraperitoneally, T-3256336 was administered orally twice a day. The tumor regression rate was calculated using the following formula: Tumor regression rate (T/C, %) = (tumor volume on the day of the start of administration - tumor volume

on the day of completion of administration)/tumor volume on the day of start of administration $\times 100$.

第四章の実験

Cell lines and reagents

SK-OV-3, HL-60, A2058, A375, PC3, NCI-H460, and HT-29 cancer cell lines were purchased from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA). Chemotherapy drugs that were used in this studies were all obtained from Sigma–Aldrich Co. (St Louis, MO) and Z-VAD-FMK was purchased from EMD Millipore (Darmstadt, Germany). Pevonedistat was synthesized at Millennium Pharmaceuticals, Inc. (Cambridge, MA), (Soucy et. al., 2009).

Cell viability assays, measurements of caspase activity, and real-time PCR

Cell viability assays, measurements of caspase activity, and real-time PCR analyses were performed as described previously. Statistical analyses were performed using Microsoft Excel (Microsoft Corporation, Redmond, WA) and differences were identified using two-tailed t-tests where appropriate. Combination index (CI) values for drug sensitivity data were calculated on the basis of the Bliss independence model.

SDS-PAGE and Western blotting

Protein extraction and Western blotting analyses were performed as described previously [8]. The anti-cIAP-1 antibody (AF8181) and the anti-human TNF α antibody (MAB210) were purchased from R&D Systems, Inc. (Minneapolis, MN). Anti-p27Kip1 (sc-528) was purchased from Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA). Anti-glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (MAB374) was obtained from EMD Millipore (Billerica, MA). Anti-phospho-CHK1 (Ser317) (#2344), anti-phospho-CHK1 (Ser345) (#2341), anti-phospho-NF- κ B p65 (Ser536) (#3033), and anti-PARP (#9542) antibodies were purchased from Cell Signaling Technology, Inc. (Danvers, MA). HRP-labeled secondary antibody was purchased from GE Healthcare (South Burlington, VT).

Flow cytometry

Cells were seeded at 1×10^6 cells in 10-cm dishes and were cultured overnight. The following day, test compounds were diluted in growth medium to the desired final concentration and were then added to cells. Cells were trypsinized, washed with PBS, treated with 100 μ g/mL RNase A, and were stained with 10 μ g/mL propidium iodide for 1 h before cell cycle analyses. Flow-cytometric analyses were performed using a FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA).

In vivo study

All animal experiments were performed according to the guidelines of the Institutional Animal Care and Use Committee of Takeda Pharmaceutical Company Ltd. Eight-week-old mice were inoculated with 5×10^6 HL-60 cells and mean tumor volumes were calculated using the following formula: volume = (width² × length)/2. When mean tumor volumes reached approximately 200 mm³, animals were randomized into treatment groups of five animals. Pevonedistat was suspended in 10% 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin and was adjusted to pH 5.0–5.2 and administered intraperitoneally (i.p.) twice weekly. T-3256336 was suspended in 10% methylcellulose (Shin-Etsu Chemical Co., Ltd., Tokyo, Japan) and was orally administered twice weekly for up to 11 days. Tumor regression rates (T/C, %) were calculated using the following formula: Percent T/C = (tumor volume on the day of the start of administration – tumor volume on the day of completion of administration)/tumor volume on the day of the start of administration × 100. Statistical analyses were performed using Excel and differences were identified using two-tailed t-tests.

参考文献

Andersen MH, Becker JC, Straten Pt, Regulators of apoptosis: suitable targets for immune therapy of cancer., *Nat. Rev. Drug Disc.*, 5, 399-409, 2005.

Basu S, Rosenzweig KR, Youmell M, Price BD, The DNA-dependent protein kinase participates in the activation of NF kappa B following DNA damage., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 247, 79-83, 1998.

Birnbaum MJ, Clem RJ, Miller LK, An apoptosis-inhibiting gene from a nuclear polyhedrosis virus encoding a polypeptide with Cys/His sequence motifs. *J. Virol.* 68, 2521-2528, 1994.

Brzoska K, Szumiel I, Signaling loops and linear pathways: NF-kappaB activation in response to genotoxic stress., *Mutagenesis*, 24, 1-8, 2009.

Chu PG, Weiss LM, Keratin expression in human tissues and neoplasms., *Histopathology*, 40, 403-439, 2002.

Crook NE, Clem RJ, Miller LK, An apoptosis-inhibiting baculovirus gene with a zinc finger-like motif., *J. Virol.* 67, 2168-2174, 1993.

Demiray M, Ulukaya EE, Arslan M, Gokgoz S, Saraydaroglu O, Ercan I, Evrensel T, Manavoglu O, Response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer could be predictable by measuring a novel serum apoptosis product, caspase-cleaved cytokeratin 18: a prospective pilot study. *Cancer Invest*, 24, 669-676, 2006.

Eckelman BP, Salvesen GS, Scott FL, Human inhibitor of apoptosis proteins: why XIAP is the black sheep of the family., *EMBO Rep.*, 7, 988-994, 2006.

Feoktistova M, Geserick P, Kellert B, Dimitrova DP, Langlais C, Hupe M, Cain K, MacFarlane M, Häcker G, Leverkus M, cIAPs block Ripoptosome formation, a RIP1/caspase-8 containing intracellular cell death complex differentially regulated by cFLIP isoforms. *Mol Cell*, 43, 449-463, 2011.

Fesik SW, Promoting apoptosis as a strategy for cancer drug discovery., *Nat. Rev. Cancer*, 5, 876-885, 2005.

Firestone B, Conway C, Yang G, Gao H, Porter D, Slisz J, He D, Mosher R, Monahan J, Straub C, Morrissey M, Yao Y, Zawel L, *Mol Cancer Ther*, 8 (12 suppl.), B27, 2009

Fluda S, Vucic D, Targeting IAP proteins for therapeutic intervention in cancer., *Nat. Rev. Drug Disc.*, 11, 109-123, 2012.

Gaither A, Porter D, Yao Y, Borawski J, Yang G, Donovan J, Sage D, Slisz J, Tran M, Straub C, Ramsey T, Iourgenko V, Huang A, Chen Y, Schlegel R, Labow M, Fawell S, Sellers WR, Zawel L, A Smac mimetic rescue screen reveals roles for inhibitor of apoptosis proteins in tumor necrosis factor-alpha signaling., *Cancer Res.*, 67, 11493-11498, 2007.

Gong, L, Yeh, ET, Identification of the activating and conjugating enzymes of the NEDD8 conjugation pathway., *J Biol Chem*, 274, 12036-12042, 1999.

Kramer G, Erdal H, Mertens HJ, Nap M, Mauermann J, Steiner G, Differentiation between cell death modes using measurements of different soluble forms of extracellular cytokeratin 18., *Cancer Res*, 64, 1751-1756, 2004.

Hamilton JA, Colony-stimulating factors in inflammation and autoimmunity., *Nat Rev Immunol.* 7, 533-44, 2008.

Hanahan D, Weinberg RA, The Hallmarks of Cancer., *Cell*, 100, 57-70, 2000.

Hanahan D, Weinberg RA, The Hallmarks of Cancer: The Next Generation., *Cell*, 144, 646-74, 2011.

Hashimoto K, Saito B, Miyamoto N, Oguro Y, Tomita D, Shiokawa Z, Asano M, Kakei H, Taya N, Kawasaki M, Sumi H, Yabuki M, Iwai K, Yoshida S, Yoshimatsu M, Aoyama K, Kosugi Y, Kojima T, Morishita N, Dougan DR, Snell GP, Imamura S, Ishikawa T, Design and synthesis of potent inhibitor of apoptosis (IAP) proteins antagonists bearing an octahydropyrrolo[1,2-a]pyrazine scaffold as a novel proline mimetic., *J Med Chem*, 56, 1228-1246, 2013.

Hershko, A. The ubiquitin system for protein degradation and some of its roles in the control of the cell division cycle., *Cell Death Differ*, 12, 1191-1197, 2005.

Jackman RW1, Rhoads MG, Cornwell E, Kandarian SC, Microtubule-mediated NF-kappaB activation in the TNF-alpha signaling pathway., *Exp Cell Res*. 315, 3242-3249, 2009.

Lane EB, Alexander CM, Use of keratin antibodies in tumor diagnosis., *Semin Cancer Biol*, 1, 165-79, 1990.

Lin JJ, Milhollen MA, Smith PG, Narayanan U, Dutta A, NEDD8-targeting drug MLN4924 elicits DNA rereplication by stabilizing Cdt1 in S phase, triggering checkpoint activation, apoptosis, and senescence in cancer cells., *Cancer Res*, 70, 10310-10320, 2010.

Micha D, Cummings J, Shoemaker A, Elmore S, Foster K, Greaves M, Ward T, Rosenberg S, Dive C, Simpson K, Circulating biomarkers of cell death after treatment with the BH-3 mimetic ABT-737 in a preclinical model of small-cell lung cancer. *Clin Cancer Res*, 14, 7304-7310, 2008.

Pan ZQ, Kentsis A, Dias DC, Yamoah K, Wu K, NEDD8 on Cullin: building an expressway to protein destruction., *Oncogene*, 23, 1985-1997, 2004.

Petersen SL, Wang L, Yalcin-Chin A, Li L, Peyton M, Minna J, Harran P, Wang X, Autocrine TNFalpha signaling renders human cancer cells susceptible to Smac-mimetic-induced apoptosis., *Cancer Cell*, 12, 445-456, 2007.

Piret B, Piette J, Topoisomerase poisons activate the transcription factor NF-kappaB in ACH-2 and CEM cells., *Nucleic Acids Res*, 24,4242-4248, 1996.

Probst BL, Liu L, Ramesh V, Li L, Sun H, Minna JD, Wang L, Smac mimetics increase cancer cell response to chemotherapeutics in a TNF- α -dependent manner., *Cell Death Differ*, 10, 1645-1654, 2010.

Soucy TA, Smith PG, Milhollen MA, Berger AJ, Gavin JM, Adhikari S, Brownell JE, Burke KE, Cardin DP, Critchley S, Cullis CA, Doucette A, Garnsey JJ, Gaulin JL, Gershman RE, Lublinsky AR, McDonald A, Mizutani H, Narayanan U, Olhava EJ, Peluso S, Rezaei M, Sintchak MD, Talreja T, Thomas MP, Traore T, Vyskocil S, Weatherhead GS, Yu J, Zhang J, Dick LR, Claiborne CF, Rolfe M, Bolen JB, Langston SP, *Nature*, 458, 732-736, 2009.

Szlosarek PW¹, Balkwill FR, Tumour necrosis factor alpha: a potential target for the therapy of solid tumours., *Lancet Oncol*, 9, 565-73, 2003.

Szlosarek P, Charles KA, Balkwill FR, Tumour necrosis factor-alpha as a tumour promoter. *Eur J Cancer*, 42, 745-750, 2006.

Tenev T, Bianchi K, Darding M, Broemer M, Langlais C, Wallberg F, Zachariou A, Lopez J, MacFarlane M, Cain K, Meier P., The Ripoptosome, a signaling platform that assembles in response to genotoxic stress and loss of IAPs. *Mol Cell*, 43, 432-448, 2011.

Ulukaya E, Yilmaztepe A, Akgoz S, Linder S, Karadag M. The levels of caspase-cleaved cytokeratin 18 are elevated in serum from patients with lung cancer and helpful to predict the survival. *Lung Cancer*, 56, 399-404, 2007.

Varfolomeev E, Blankenship JW, Wayson SM, Fedorova AV, Kayagaki N, Garg P, Zobel K, Dynek JN, Elliott LO, Wallweber HJ, Flygare JA, Fairbrother WJ, Deshayes K, Dixit VM, Vucic D., IAP antagonists induce autoubiquitination of c-IAPs, NF- κ B activation, and TNF α -dependent apoptosis. *Cell* 131, 669-681, 2007.

Vince JE, Wong WW, Khan N, Feltham R, Chau D, Ahmed AU, Benetatos CA, Chunduru SK, Condon SM, McKinlay M, Brink R, Leverkus M, Tergaonkar V, Schneider P, Callus BA, Koentgen F, Vaux DL, Silke J., IAP antagonists target cIAP1 to induce TNF α -dependent apoptosis., *Cell* 131, 682-693, 2007.

Wang L, Du F, Wang X. TNF- α induces two distinct caspase-8 activation pathways., *Cell*, 133, 693-703, 2008.

Wu H, Tschopp J, Lin SC, Smac mimetics and TNF α : a dangerous liaison?, *Cell*, 131, 655-658, 2007.

謝辞

本論文を提出する機会を与えていただき、有益なご助言ならびに温かいご指導を賜りました東京大学大学院農学生命科学研究科 応用生命化学専攻 食品化学大講座 食糧化学研究室、内田浩二教授に心より感謝いたします。

本研究を遂行するにあたり、終始ご指導ならびに叱咤激励を頂きました、ナノキャリア（旧所属：武田薬品工業株式会社）吉田聖氏、国立研究開発法人日本医療研究開発機構（旧所属：武田薬品工業株式会社）中西治博士、シンバイオ製薬株式会社（旧所属：武田薬品工業株式会社）引地裕一博士に心より感謝いたします。

本研究の共同研究者であり、多大なご助言ならびにご協力を頂きました武田薬品工業株式会社 医薬研究本部 矢吹仁人博士、岩井謙一氏、稲塚雅一博士、森本恵氏、橋本健太郎博士、石川智康博士、Kura Oncology Inc.（旧所属：Millennium Pharmaceutical Inc.）杭田慶介博士に心より感謝いたします。

本研究を遂行するにあたり、スクリーニング、合成、薬物動態、薬物安全性、物性など、全般を通してご協力いただきました、各部門の代表者ならびに所属部門の皆様にご心より感謝いたします。

最後に、学生時代から応援してくれた両親と姉、いつも支えてくれた妻 実佳と明るい笑顔で励ましてくれた息子 湧希、娘 実結に心から感謝します。

2017年2月
角 紘幸

報文目録

1. Sumi, H., Yabuki, M., Iwai, K., Morimoto, M., Hibino, R., Inazuka, M., Hashimoto, K., Kosugi, Y., Aoyama, K., Yamamoto, S., Yoshimatsu, M., Yamasaki, H., Tozawa, R., Ishikawa, T., Yoshida, S.
Antitumor Activity and Pharmacodynamic Biomarkers of a Novel and Orally Available Small-Molecule Antagonist of Inhibitor of Apoptosis Proteins
Molecular Cancer Therapeutics Vol.12, No.2, pp.230-240, 2012
2. Sumi, H., Inazuka, M., Hashimoto, T., Yoshida, S., Yabuki, M.
T-3256336, a novel and orally available small molecule IAP antagonist, induced tumor cell death via induction of systemic TNF alpha production
Biochemical and Biophysical Research Communications Vol.479, pp.179-185, 2016
3. Sumi, H., Inazuka, M., Morimoto, M., Hibino, R., Hashimoto, K., Ishikawa, T., Yoshida, S., Yabuki, M.
An inhibitor of apoptosis protein antagonist T-3256336 potentiates the antitumor efficacy of the Nedd8-activating enzyme inhibitor pevonedistat (TAK-924/MLN4924)
Biochemical and Biophysical Research Communications Vol.480, pp.380-386, 2016