

## 論文の内容の要旨

論文題目            新規がん治療薬の創製に向けた **Antagonist of Inhibitor of Apoptosis Proteins** に関する創薬研究

氏名                角 紘幸

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 $\kappa$ B の活性化、TNF $\alpha$  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 $\alpha$  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明らかとした。

組換え蛋白質を用いた 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 蛋白質に作用し、ユビキチン化を介した cIAP-1 たんぱく質の分解と NF $\kappa$ B シグナルの活性化、TNF $\alpha$  の発現および培養液中への分泌を誘導し、誘導された TNF $\alpha$  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 $\alpha$  の誘導、Caspase 活性化を誘導し、腫瘍の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 $\kappa$ B の活性化、TNF $\alpha$  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 $\alpha$  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。

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 $\alpha$  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 $\alpha$  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 $\alpha$  だけでなく、マウスの TNF $\alpha$  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 $\alpha$  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 $\alpha$  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 $\alpha$  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 $\alpha$  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 $\alpha$  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 $\alpha$  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 $\alpha$  発現と培養液中 TNF $\alpha$  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 $\alpha$  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 $\alpha$  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<sup>S317</sup> および CHK2<sup>T68</sup> 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 $\kappa$ B の活性化を介して TNF $\alpha$  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 $\alpha$  中和抗体により減弱され、TNF $\alpha$  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 $\alpha$ 、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 $\alpha$  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 $\alpha$  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 $\alpha$  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。