

博士論文

新規抗腫瘍薬の標的分子同定と
抗腫瘍活性に関わる分子機構の解析

東京大学大学院 新領域創成科学研究科
メディカル情報生命専攻 がん分子標的治療学分野
平成 25 年度進学 学生番号 47137318
青山 暁

指導教官
藤田 直也 教授

略語表

(AA) : antibiotic - antimycotic

(Kn-) : without kanamycin

[³H] : tritium labeled

2-ME : 2-mercaptoethanol

ATP : adenosine Triphosphate

BCRP: breast cancer resistance protein

BPB : bromophenol blue

BRAF : v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1

DMEM : Dulbeccos Modified Eagle Medium

DMSO : dimethyl sulfoxide

D-PBS : Dulbeccos phosphate-buffered saline

EDTA · 2Na : ethylenediaminetetraacetic acid, disodium salt

EGFR : Epidermal Growth Factor Receptor

EtBr : ethidium bromide

EtOH : ethanol

FBS : fetal bovine serum

Fucci : Fluorescent Ubiquitination-based Cell Cycle Indicator

GTP: guanosine triphosphate

HGF : hepatocyte growth factor

JFCR : Japanese Foundation for Cancer Research

KRAS : v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog

MDR1: multidrug resistance

MEM : minimum essential medium

MET : hepatocyte growth factor receptor

MeOH : methanol

MRP1: multidrug resistance protein 1

NaCl : sodium chloride

NCI : National Cancer Institute

NP-40 : Nonidet P-40

O/N : over night

OS : overall survival

qPCR : quantitative polymerase chain reaction

PFS : progression-free survival

PMSF : phenylmethanesulfonyl fluoride

rhHGF : recombinant human HGF

RPMI-1640 : Roswell Park Memorial institute-1640

SDS : sodium dodecyl sulfate

SPA: scintillation proximity assay

TKI : tyrosine-kinase inhibitor

Tris : Tris(hydroxymethyl)aminomethane

目次

序論	4
1章 細胞・生体レベルでの tivantinib による tubulin 重合阻害作用の検討	11
2章 Tivantinib の作用機序の解明	36
3章 Tivantinib を用いた新たながん治療戦略	58
総括	67
参考文献	72
謝辞	79

序論

1981 年以来日本人の死因第一位は「がん」であり、死亡率の割合が依然として増加傾向にあることから新たな治療法の開発が求められている。従来のがん化学療法は、活発に増殖する細胞を標的とすることでがん細胞に対して細胞増殖阻害作用を発揮するものが主流だったが、そのために脱毛、貧血症、消化管障害などの副作用が起こるという問題があった。そこで、近年ではがん細胞特異的な分子を標的にした分子標的治療薬が開発され、副作用を抑えつつ治療効果を高められると期待されている。

c-MET は肝細胞増殖因子(HGF)をリガンドとする受容体型チロシンキナーゼをコードするがん遺伝子であり、*c-MET* 遺伝子の増幅、活性化変異、HGF 刺激などにより引き起こされる HGF/c-MET 経路の異常な活性化は胃がんや肝がんを含む様々な腫瘍で確認されている[1]。これらの c-MET が活性化した細胞株は c-MET 阻害剤である PHA-665752、crizotinib に対して高い感受性を示す。また、上皮成長因子受容体(EGFR)チロシンキナーゼ阻害薬(TKI)への獲得耐性機構としても c-MET 活性化を介した獲得耐性が報告されており、EGFR-TKI に加えて c-MET 阻害剤を併用することで耐性が克服できる [2] [3]。これらのことから c-MET はがん治療における有望な分子標的と期待されており、阻害剤の開発が世界中で進められている(Fig0-1) [4]。

Tivantinib は選択性が高く、経口投与可能な c-MET 特異的阻害剤として 2010 年に報告された[5]。ヒトの 230 キナーゼを対象とした阻害実験において、tivantinib は組み換えヒト c-MET に対して 355 nM と高い阻害活性を示した一方で PAK3a(p21-activated kinase 3)、VEGFR-3/Flt4 (vascular endothelial growth factor receptor-3)、CAMK2 (calmodulin-dependent kinase 2)-delta、Pim-1 に対して 1.0-10.0 μ M と弱い阻害活性を示し、その他の 225 キナーゼに対しては c-MET ファミリーに属する RON 受容体型チロシンキナーゼを含めて阻害活性を示さず、c-MET に対する高い選択性があることが確認された[5]。また、c-MET キナーゼドメインと tivantinib 複合体の結晶構造解析から tivantinib は c-MET が不活性化状態の時により高い親和性を持つと考えられており、他の c-MET 阻害剤と違って ATP 非競合的に c-MET を阻害することが示されている[6]。Tivantinib は臨床試験で c-MET 高発現の肝がん患者に対して全生存期間 (OS) 及び無増悪生存期間 (PFS) を有意に改善し、現在肝がんを対象に第三相の臨床試験、大腸がんや肺がん等を対象に第二相の臨床試験が進んでいる有望な低分子化合物である[7]。しかしこれまでに行われた tivantinib の臨床試験からは tivantinib の作用機序が c-MET 阻害によらないと考えられるようなデータも出てきている。Microphthalmia transcription factor-associated tumors(小眼球症転写因子関連腫瘍)を対象とした臨床試験では

c-MET の発現量と効果が相関しなかったという結果が報告されており、肺がんで行なわれた EGFR 阻害剤 Erlotinib との併用効果を調べた第二相臨床試験のサブセット解析からは tivantinib が理論的には効果を示さないはずの *KRAS* 変異の患者さんに対して PFS を改善することが示唆された [8] [9]。また、細胞株を用いた実験でも tivantinib は他の c-MET 阻害剤 PHA-665752 及び crizotinib が効果を示さない *KRAS* 変異の細胞に対して増殖阻害活性を示すことが報告されている [5] [10] [11]。

Tivantinib による増殖阻害活性が c-MET 阻害によるものであるかを明らかにするために、修士課程の研究では c-MET を shRNA によりノックダウン (KD) することで増殖阻害が見られる c-MET 依存性の細胞及び c-MET の KD により増殖阻害が見られない c-MET 非依存性の細胞株を用いて生存細胞アッセイを行い、tivantinib の細胞増殖阻害活性が c-MET 阻害に依存しないことを明らかにした (Fig0-2) [12]。さらに、tivantinib の新たな分子標的を予測するために、がん研究会で開発された 39 種類のがん細胞に対する増殖阻害プロファイルと比較するシステム (COMPARE 解析) でスクリーニングを行い、tivantinib が vincristine などの微小管阻害剤と類似した増殖阻害プロファイルを示すことを見出した (Fig0-3)。更に、精製した tubulin を用いた *in vitro* の実験で tubulin 重合への影響を評価した結果、tivantinib が微小管阻害剤である vincristine 同様に tubulin 重合阻害活性を示すことを発見した (Fig0-4)。

しかし、修士課程の研究では tivantinib による tubulin 重合阻害は *in vitro* での解析に留まっており、細胞レベルでも tivantinib が tubulin 重合阻害を介して増殖阻害活性を示すか検討できていなかった。また、2013 年には Remising et al から tivantinib が GSK-3 に結合して GSK-3 阻害活性を示すことも報告されており、tivantinib の分子標的については未だに不明瞭な部分があった [13]。

以上の知見を踏まえ、本研究では tivantinib の増殖阻害活性に関わる作用機序を明らかにすることを目的として研究を行った。Tivantinib をはじめとする阻害剤が c-MET 依存および c-MET 非依存性の細胞に与える影響を検討し、tivantinib が他の c-MET 阻害剤と異なり G2/M phase arrest を誘導すること、tivantinib が微小管阻害剤 vincristine と同様に重合 tubulin 量を濃度依存的に減少させることを明らかにした。さらに、担がんマウスを用いた実験により tivantinib が生体レベルでも重合 tubulin 量を減少させることを見出した。Tivantinib が直接的に tubulin に結合するかを検討するために放射標識した微小管阻害剤を用いて競合阻害実験を行い、tivantinib が競合的に colchicine と tubulin の結合を阻害することを発見した (Fig0-4)。さらに、コンピュータを用いて tivantinib と tubulin の結合モデル予測を行い、tivantinib が tubulin の colchicine 部位に立体障害なしで配置される結合モデルを得た。また、微小管阻害剤に対する獲得耐性機構の一つとして報告されている ABC トランスポータ

ータンパク質 MDR1 の過剰発現により colchicine、vincristine、vinblastine に対して交差耐性を獲得した細胞株に対しても **tivantinib** が増殖阻害活性を示すことを見出した。更に、薬剤耐性に関わることが知られる ABC トランスポーター BCRP、MRP1 遺伝子を導入した細胞に対しても **tivantinib** が親株と同程度の濃度で増殖阻害活性を示すことを明らかにした。また、患者さんの同意が得られた臨床検体から細胞株の樹立を行い、大腸がんにおいて抗 EGFR 抗体への耐性機構として報告され、治療上の障害となっている *KRAS* 変異陽性の大腸がん細胞株に対して、*KRAS* 野生型の細胞株と同程度の濃度で増殖阻害活性を示すことを発見した。本研究から、**tivantinib** は ABC トランスポーターによる耐性を克服し、*KRAS* 変異の大腸がんを含めた他の固形がんにおいても良好な治療成績を示すことが考えられる。

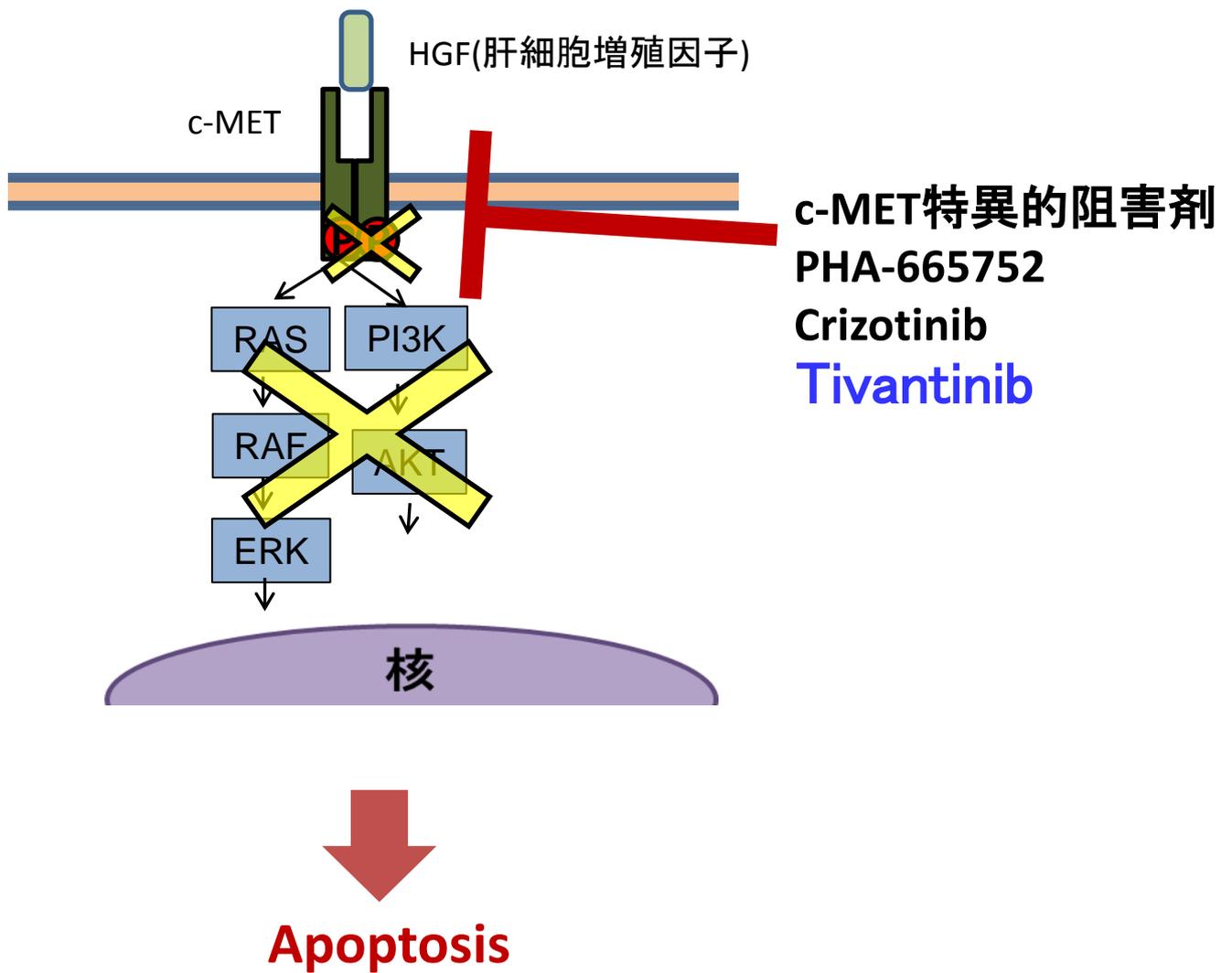
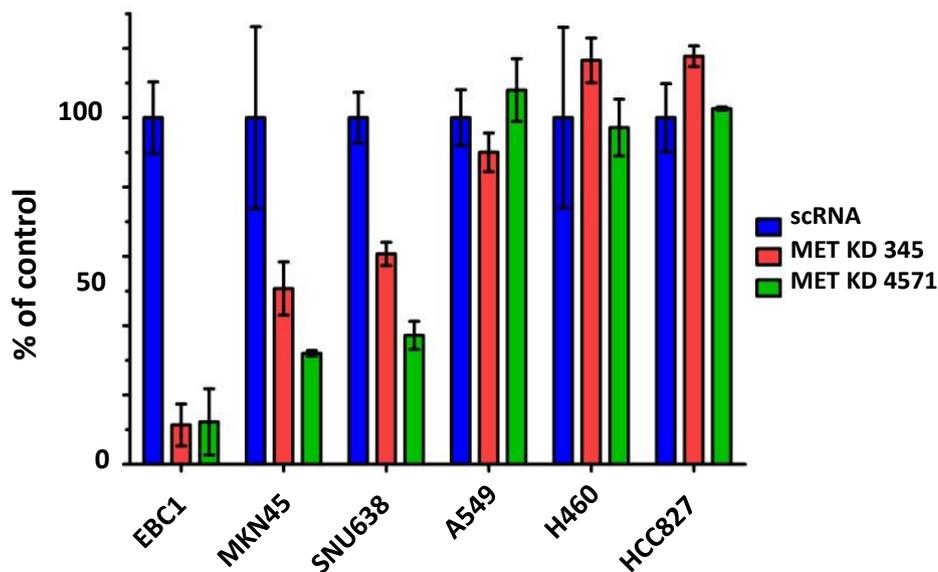


Fig.0-1 HGF/c-MET経路の阻害によるアポトーシス

HGF/c-METに誘導されるシグナル伝達経路を示した。

c-METが活性化したがん細胞では、c-MET阻害によるアポトーシス誘導が報告されている。

A



B

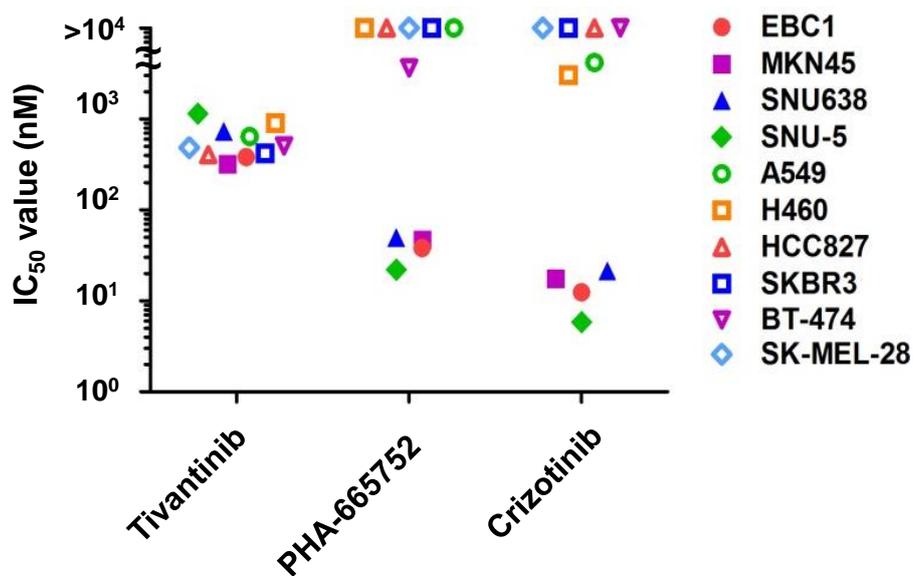
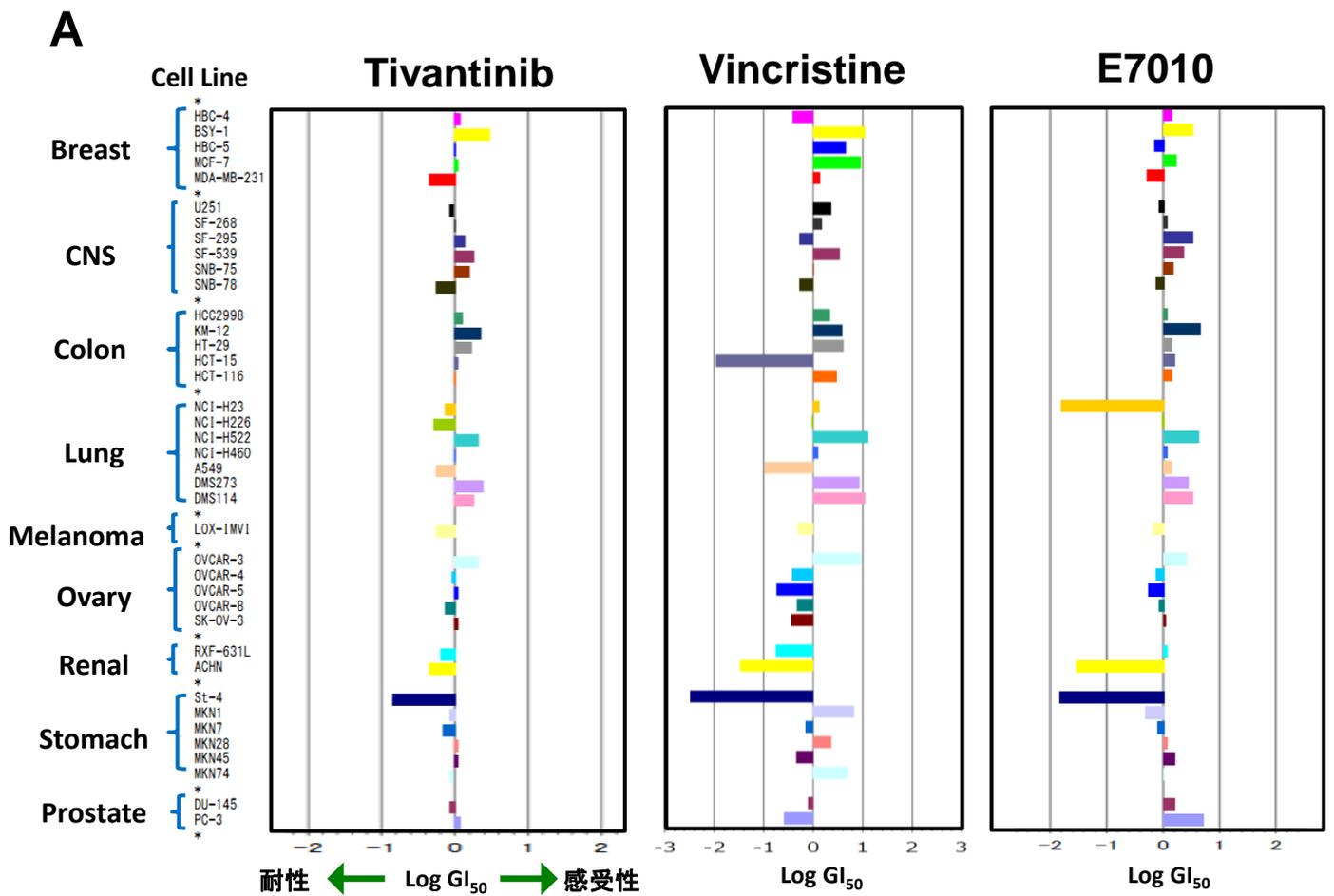


Fig.0-2 Tivantinibによる増殖阻害活性のc-MET依存性の検討

(A) Scramble shRNA (scRNA) 及び MET shRNAs (MET KD 345 and MET KD 4571) を感染させた時の細胞毒性。感染後24 hr培養してメディウムチェンジし、72 hr培養後にtriplicateで細胞増殖アッセイを行った。エラーバーはSDを示す。

(B) Tivantinib、PHA-665752、crizotinibのIC₅₀値の比較。阻害剤存在下で細胞を培養し、72 hr培養後の生存細胞数を調べた。マーカーが塗りつぶされている細胞はc-MET依存、中抜きの細胞はc-MET非依存的な細胞を示す。



B

rank	r	Chemical Name	作用機序	P-value
1/1805	0.736	E7010	Tubulin polymerization inhibitors	1.00E-05
2/1805	0.688	Vincristine sulfate	Tubulin polymerization inhibitors	1.00E-05
3/1805	0.686	paclitaxel	Microtubule-Stabilizing Agents	1.00E-05
327/1805	0.296	PHA-665752	c-Met Inhibitors	6.71E-02
818/1805	0.178	Crizotinib	c-Met/ALK dual Inhibitors	2.77E-01

Fig.0-3 がん細胞パネル(JFCR-39)による分子標的予測

(A)Tivantinib、vincristine、E7010処理時のJFCR-39細胞それぞれのGI₅₀値を元に増殖阻害プロファイルを作成した。

(B)Tivantinibと類似したパターンを持つ順番に化合物を並べた。

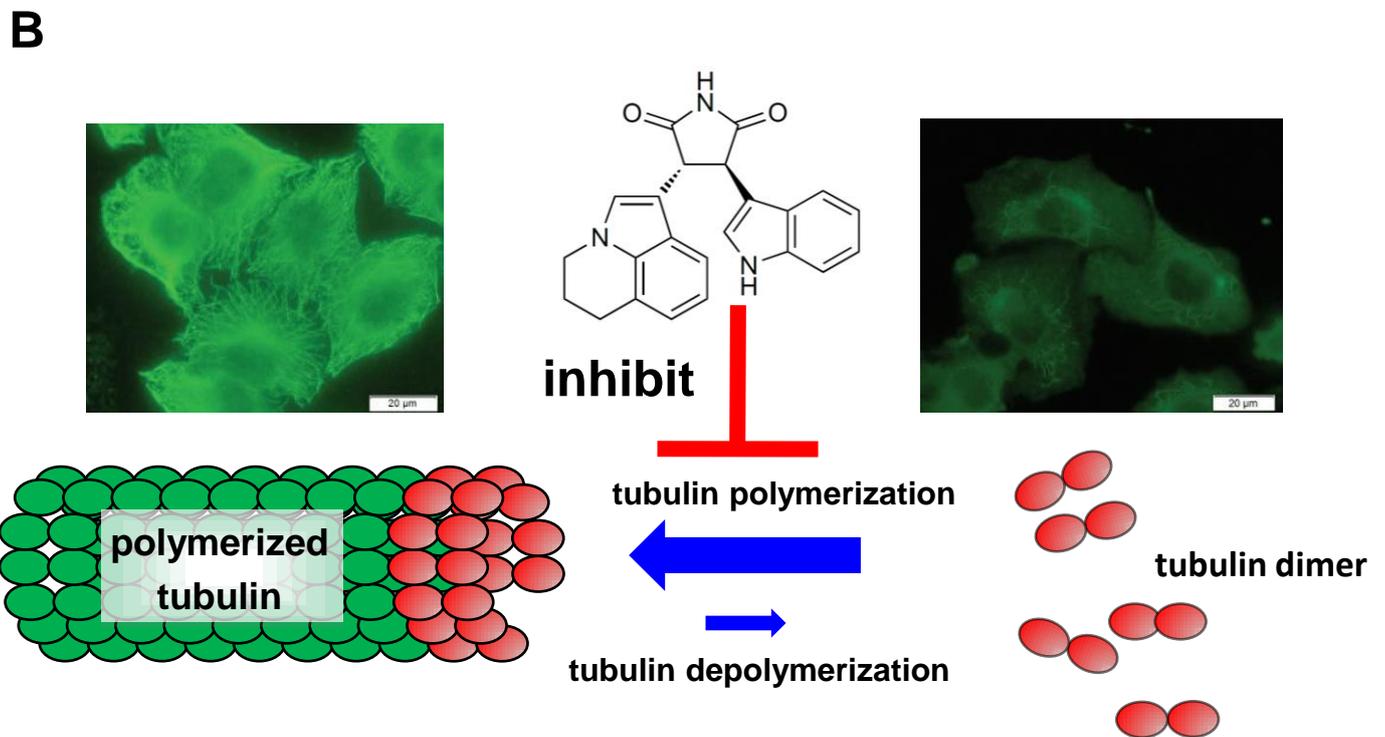
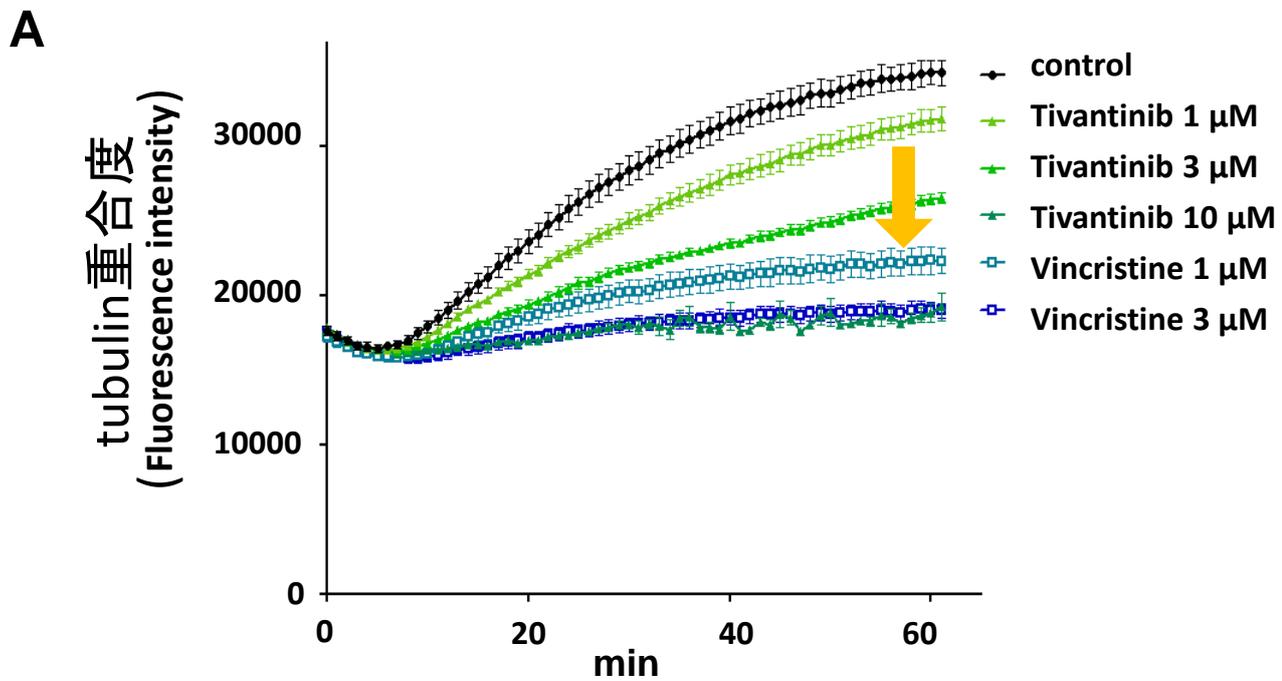


Fig.0-4 Tivantinibによるtubulin重合阻害

(A)Tivantinib及びvincristineの濃度を段階的に変化させ、tubulin重合の変化を調べた。実験はtriplicateで行い、エラーバーはSEMを示す。

(B)Tivantinib投与によりtubulinの重合が阻害され、微小管骨格が破壊される

1 章. 細胞・生体レベルでの tivantinib による tubulin 重合阻害作用の検討

<目的>

これまでの研究から、tivantinib が *in vitro* の系で tubulin 重合阻害活性を示すことを見出してきたが、詳細な作用機序については未だにわかっていない。微小管を標的とした阻害剤が微小管ダイナミクスを阻害することで細胞分裂の異常を誘導することから、tivantinib が他の微小管阻害剤と同様に G2/M phase arrest を誘導する可能性が考えられた。Tivantinib が細胞周期に与える影響をリアルタイムで観察するために、細胞周期を可視化する蛍光プローブ Fucci を発現させた細胞を用いて実験を行った[14]。

<実験方法>

細胞培養

EBC-1、SK-MEL-28、H460、DLD-1 は 10% FBS/ RPMI [10% heat-inactivated FBS (ナカライテスク)、 100 µg/ml Kanamycin sulfate (Meiji seika ファルマ) in RPMI1640 (和光純薬工業)]で、293FT は 10% FBS / DMEM(高グルコース) [10% heat-inactivated FBS、 100µg/ml Kanamycin sulfate in DMEM (和光純薬工業)]で培養する。EBC-1 は最初 10% FBS/ EMEM [10% heat-inactivated FBS、 100 µg/ml Kanamycin sulfate in EMEM (和光純薬工業)]で培養し、10% FBS/ RPMI の割合を 50%、70%、90%、100%と徐々に高めて 10% FBS/ RPMI に馴化させる。いずれの細胞も、加湿式 CO₂ インキュベーター内で 37°C、5% CO₂ の条件下で培養する。EBC-1 は Japanese Collection of Research Bioresources より購入し、SK-MEL-28 及び H460 は American Type Culture Collection より購入したものを利用する。DLD-1 は鶴尾隆教授より譲渡されたものを使用する[15]。Crizotinib、Tivantinib は ChemieTeK より、Vincristine、Colchicine、Paclitaxel は Sigma より購入したものをを用いる。

マイクロアレイ解析

RNeasy RNA purification kit (QIAGEN)を用い、薬剤処理した細胞から RNA を抽出する。抽出した RNA は Agilent RNA 6000 Nano Kit (Agilent Technologies)を用いてマイクロアレイに使用できるだけの純度があるか確認する。RNA の純度を確認後、

逆転写により RNA からハイブリダイゼーション用の cRNA を合成し、Affymetrix 社のプロトコルに従ってビオチン標識を行う。GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 arrays (Affymetrix) に対してハイブリダイズし、GeneChip Scanner 3000 (Affymetrix) を用いて蛍光強度を測定する。得られたデータは RMA (robust multichip analysis) 法を用いて正規化し、microsoft excel により解析する。具体的には control と比較して二倍以上に増加した遺伝子を up 群、半分以下に減少した遺伝子を down 群として選択する。また、正規化した結果カウントが 100 以下になった遺伝子は除外する。選択された遺伝子群について Gene Cluster を用いてクラスター解析を行い、Java Treeview を使用してヒートマップを作製する。

形質転換

TOP10F' (Thermo Fisher Scientific) を氷中で解凍する。Vector を TOP10F' に加え、ピペッティングせずにタッピングで軽く混和し、氷上に 30 min 静置する。恒温槽と BIO-SHAKER の準備を行なう。42°C 30 sec ヒートショック後、氷上に静置する。250 μ l の SOC medium (Thermo Fisher Scientific) を加え BIO-SHAKER で 37°C 225rpm 1 hr 培養。培養後、20-50 μ l の培養液を LB プレートに塗布し、37°C O/N 培養する。抗生物質入 LB 培地 3 ml をチューブに用意し、マイクロピペットのチップでコロニーをピックアップする。ピックアップ後、BIO-SHAKER を用いて 37°C O/N 振盪培養する。Plasmid Mini Kit (QIAGEN) を用いてプラスミドを精製する。

Lentivirus 作成

以下のプロトコルは 2008 年に Sakaue et al から報告された方法を基にした[14]。293FT 細胞を 2x10⁶cells/dish になるように継代し、カナマイシンフリー10% FBS DMEM(高グルコース)存在下で 24 hr 培養する。エッペンドルフチューブに mCherry-hCdt1 (理化学研究所) もしくは mVenus-hGem (理化学研究所) と pCMV- Δ 8.2 (Addgene)、pCMV-VSVG (Addgene)、OPTI-MEM (Gibco) を混合し、virus mix を調製する。FuGENE6 (Promega) を OPTI-MEM に加えて混合し、RT 5 min 反応させる。FuGENE6 と OPTI-MEM の混合液を virus mix に加え、RT 30 min 反応させる。反応後、50-80% confluent の 293FT に加え、15 hr 培養する。培養後、medium change して更に 24 hr 培養する。細胞上清を回収する。回収したウイルス液は 0.45 μ m フィルターでフィルトレーションして 293FT cell を除去し、使用するまで -80°C で保存する

Fucci 恒常発現細胞株の樹立

EBC-1 及び SK-MEL 28 細胞を 6 well プレートに継代し、24 hr 培養する。8 $\mu\text{g/ml}$ polybrene (Sigma)を混合した medium に交換し、ウイルス液 1 ml を加えて 24 hr 培養する。培養後、細胞を 10 cm ディッシュに継代する。感染した細胞をセレクションするため G418 を混合した medium に交換し、培養する。G418 (Gibco)によるセレクションの終了後、ハイグロマイシン (Invitrogen)を混合した medium に交換し、更にセレクションを行う。ハイグロマイシンによるセレクション終了後、赤色蛍光及び緑色蛍光を発するコロニーを探し、クローニングシリンダーで単離する。両方の蛍光を同程度に強く蛍光するクローンを選択し、以降の実験に用いる。

蛍光細胞の解析

Fucci 発現細胞株を 1×10^5 cells/well で 6 well プレートに継代し、24 hr 培養する。翌日、目的濃度に薬剤を希釈した medium に交換し、24 hr 培養する。細胞をトリプシン処理 (Sigma)して回収し、PBS wash を行う。洗浄後、細胞懸濁液をセルストレーナーキャップ付きポリスチレンラウンドチューブに通して細胞を分離する。Cytomics 500 flow cytometer (Beckman Coulter) を用いて緑色及び赤色蛍光を発する細胞の割合を測定する。

Time-Laps imaging

Fucci 発現細胞を 1×10^5 cells/well で CELLview™ cell culture dish (Greiner Bio One)に継代し、24 hr 培養する。目的濃度に薬剤を希釈した medium に交換し、共焦点顕微鏡 FLUOVIEW FV10i (Olympus)を用いて写真を経時的に取得する。

ウェスタンブロット

薬剤処理後の細胞を回収し、PBS wash する。洗浄後、Cell lysis buffer [0.2% NP-40 (ナカライテスク)、10% Glycerol (Sigma)、137 mM NaCl (ナカライテスク)、20 mM Tris (pH7.6) (ナカライテスク)、1 mM EDTA 4Na (pH7.6) (DojinDo)、1.5 mM MgCl_2 (ナカライテスク)、1% phosphatase inhibitor cocktail 2 (Sigma)、1% phosphatase inhibitor cocktail 3 (Sigma)、1mM PMSF (Sigma)、1mM aprotinin (Sigma)]を加えて氷上で 30 min 静置し、5 min 毎に 10 sec ボルテックスを行う。15000 rpm 15 min 遠心後、上清を回収し別のエッペンドルフチューブに移す。Bradford 法でタンパク質定量を行い、サンプル間の protein 量を揃える。5xSDS buffer [62.5 mM Tris-HCl (pH6.8)、12.5% glycerol、1% SDS (Sigma)、5% 2-Mercaptoethanol、0.05% bromophenol blue (和光純薬工業)] を混和し、100°C 5 min ボイルして RT (室温)で静置。sample を SDS-PAGE 用ゲル (ナカライテスク)に添加し、60 min 泳動。電気

泳動後、Transfer buffer [3.03 g/L Tris (Sigma)、14.4 g/L Glycin (ナカライテスク)、20% MeOH (和光純薬工業)]中で 100 V 3 hr の条件でニトロセルロースフィルターに転写する。転写後のメンブレンを blocking buffer [25 mM Tris-HCl (pH7.6)、125 mM NaCl (和光純薬工業)、0.1% Tween20 (Sigma)、4% スキムミルク (雪印)]もしくはリン酸化抗体用 Blocking buffer [25 mM Tris-HCl (pH7.6)、250 mM NaCl、0.1% Tween20、5% BSA (ナカライテスク)]で RT 1 hr ブロッキングし、以下に示す抗体で 2 hr RT 反応させる。特に記述がない抗体については Cell Signaling Technology (CST)社から購入したものを使用する。β-actin (AC-15;Sigma)、c-MET (25H2)、phospho-c-MET (Tyr1234/1235)(3D7)、phospho-c-MET (Tyr1349)、AKT (pan)(C67E7)、phospho-AKT (Ser473)(D9E)、p44/42 MAPK、Phospho-p44/42 MAPK (Thr202/Tyr204)、phospho-GSK-3α/β (Ser21/9)、phospho-P-β-Catenin (Ser33/37/Thr41)、mKO2 (3B3;MBL)、mAG1 (polyclone;MBL)、Cyclin A1 (H-432;Santa Cruz Biotechnology)、Cyclin B1 (GNS1; Santa Cruz Biotechnology)、α-tubulin (DM1A;SIGMA)、GAPDH(6C5; Millipore)、GSK-3 (4G-1E)。一次抗体反応後、Washing buffer [25 mM Tris-HCl (pH7.6)、125 mM NaCl、0.05% Tween20]でニトロセルロースフィルターを洗浄し、二次抗体 1 hr RT 反応させる。二次抗体として Anti-Mouse IgG, HRP linked whole antibody (GE Healthcare)及び Anti-Rabbit IgG, HRP linked whole antibody (GE Healthcare)を用いる。再び Washing buffer で洗浄し、ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare)を加え発光の測定を LAS3000mini (FUJIFILM)で行う。

免疫染色

CELLview™ cell culture dish に 1×10^4 cell/dish で細胞を継代し、24 hr 培養する。翌日、目的濃度に薬剤を希釈した medium に交換し、24 hr 培養する。阻害剤処理後の細胞に 4% ホルムアルデヒド (和光純薬工業)を加え、15 min RT 反応して細胞を固定する。細胞を固定後 PBS で洗浄し、0.5% Triton X-100 (Sigma) in PBS で 5 min RT 反応させ透過処理を行う。PBS で洗浄し、1% BSA in PBS-T で O/N 4°C ブロッキングする。ブロッキング後 PBS で wash し、一次抗体を添加し 2 hr RT。PBS で洗浄し、Hoechst 33342 (和光純薬工業)を加えて 5 min RT 反応させる。PBS で洗浄後、蛍光顕微鏡で観察を行う。

ウェスタンブロット法を用いた重合 tubulin 定量 (in cell 用)

以下のプロトコルは 1995 年に Blagosklonny et al から報告された方法を基にした

[16]。薬剤処理後の細胞を PBS で洗浄し、tubulin detection buffer [0.5% NP-40、20mM Tris-HCl (pH8.6)、2 mM EDTA 4Na (pH7.6)、1 mM MgCl₂、1 mM PMSF、1 mM aprotinin] を直接加える。セルスクレーパーで Cell Lysate を回収し、15000 rpm 15 min 遠心する。9 割を目安に上清を回収し、別のエッペンに移してタンパク質定量を行う。sample 間の protein 量を揃え、5xSDS sample buffer を加えて RT で保存。ペレットに tubulin detection buffer を 500 μ l 加え、再度 15000 rpm 15 min 遠心する。上清をアスピレートし、ペレットに Laemmli sample buffer [2% SDS、10% Glycerol、5% 2-メルカプトエタノール、0.002% BPB、62.5 mM Tris-HCl (pH6.8)] を添加し、95°C 10 min 反応。数分毎にボルテックスして沈殿物を溶解させる。15000 rpm 15 min 遠心し、上清を新しいエッペンドルフチューブに移す。タンパク質定量を行い、sample 間の protein 量を揃える。5xSDS buffer を加えて RT で保存。溶液の調製以降の操作は上述したウェスタンブロットのプロトコルに従う。

Mouse Xenograft 実験

6 週齢の胸腺欠損 BALB/c 雌ヌードマウス (チャールス・リバー)の皮下に 1×10^6 cell の EBC-1 もしくは H460 細胞を植え付ける。皮下移植 5 日後、tivantinib を polyethylene glycol 400 (Sigma): 20% Vitamin E tocopheryl polyethylene glycol (Sigma)= 6:4 で混合した溶媒に溶解し、200 mg/kg で 1 日 2 回経口投与する。投薬スケジュールは 5 日連続投与後に 2 日間の休薬期間を設け、マウスの体重及び腫瘍の大きさは薬剤投与後 2、4、7、9、11、14、16、18 日目に計測する。

ウェスタンブロット法を用いた重合 tubulin 定量 (Mouse xenograft 用)

薬剤投与開始後 19 日の段階でマウスから腫瘍を摘出する。腫瘍片をはさみにより細断し、PBS で洗浄して 5000 rpm 1 min で遠心する。沈殿した組織を回収し、ホモジナイザーを用いて破碎する。ホモジナイズ後、100 μ m フィルターでフィルトレーションを行い、15000 rpm 15 min 遠心する。上清画分と沈殿部に分けた後は、上述した重合 tubulin 定量のプロトコルに従う。

<結果・考察>

阻害剤処理による遺伝子発現量変化の解析

微小管は α -tubulin と β -tubulin のヘテロダイマーから構成され、伸長と短縮を繰り返す動的不安定性を持ち、細胞骨格の維持、細胞の運動能、細胞内輸送、分裂期の紡錘体形成等に関与する[17]。微小管を標的とした微小管阻害剤は作用機序により、vincristine をはじめとする微小管形成を阻害する薬剤、paclitaxel をはじめとする微小管形成を促進する薬剤の二つに大別でき、がん治療に大きな役割を果たしている。本研究で使用した主な微小管阻害剤とその構造を示す(Fig1-1)。Vincristine は catharanthus roseus より発見された天然由来の化合物で、微小管を構成する tubulin の重合を阻害することで微小管形成に影響を与え、細胞分裂を停止させる [18]。Paclitaxel は tubulin の脱重合を阻害することで微小管の安定性を促進する[19]。微小管の動的不安定性が阻害された細胞は G2/M phase arrest を起こし、アポトーシスが誘導される[20]。

Tivantinib が微小管阻害剤 vincristine と類似した増殖阻害プロファイルを示し、精製した tubulin を用いた *in vitro* の実験系でも vincristine と同様に tubulin の重合を阻害したことから、tivantinib は vincristine と同様の作用機序を持つ可能性が考えられた。Tivantinib が微小管阻害剤と共通の作用機序を持つ場合、細胞に与える影響が c-MET 阻害剤よりも微小管阻害剤に近いと考えられる。Tivantinib 処理した細胞で微小管阻害剤処理時と同様の反応が起こっているかを検討するため、c-MET 増幅の肺癌由来細胞 EBC-1 及び胃癌由来細胞 MKN45 を薬剤存在下で培養した時の遺伝子発現量の変化を cDNA マイクロアレイにより比較した。以前の研究から EBC-1 及び MKN45 細胞は c-MET の KD により増殖が阻害される c-MET 依存的な細胞であることがわかっている[12]。Control と比較して二倍以上に増加した遺伝子及び半分以下に減少した遺伝子を選択してクラスター解析を行ったところ、c-MET 阻害剤 PHA-665752 と crizotinib が類似した遺伝子発現変動のパターンを示して同じクラスターに分類された。一方で、tivantinib は c-MET 阻害剤とは全く異なる遺伝子発現変動のパターンを示したことから別のクラスターに分類され、微小管阻害剤 vincristine 処理した時と類似した遺伝子発現変動のパターンを示した。これらの結果から tivantinib が c-MET 阻害剤とは異なり、微小管阻害剤と類似した作用機序を持つことが示唆された(Fig1-2)。マイクロアレイによる発現変動を見たい場合は IC₅₀ 値に比べて 3-10 倍程度の濃度で処理したほうが変動を検出しやすいとされているため、tivantinib や crizotinib 等の処理濃度は IC₅₀ 値に比べて約 10 倍に設定している。

c-MET 依存性細胞の細胞周期に対する tivantinib の効果

Tivantinib、crizotinib 等の阻害剤が細胞周期に与える影響を詳細に検討するため、Fucci (Fluorescent Ubiquitination-based Cell Cycle Indicator) を恒常発現させた Fucci-EBC-1 細胞を樹立した。Fucci は Sakaue et al に報告された細胞周期を可視化するための蛍光プローブで、Cdt1 の欠失変異体に赤色蛍光タンパク質 mKO2 (monomeric Kusabira Orange 2) が、Geminin の N 末端部位に緑色蛍光タンパク質 mAG1 (monomeric Azami Green 1)がそれぞれ融合している(Fig1-3A)[14]。Cdt1 は G1 期のみ存在する一方で Geminin が S/G2/M 期にしか存在しないため、Fucci 発現細胞は G1 期には赤色蛍光を発し、S/G2/M 期には緑色蛍光を発する(Fig1-3B)。EBC-1 細胞は tivantinib 22 hr 処理後に緑色蛍光を発する丸くなった (round up した) 細胞が顕著に増加したことから G2/M phase arrest が誘導されていたと考えられる。一方で、c-MET/ALK 阻害剤である crizotinib 22 h 処理後はほとんどの細胞が赤色蛍光を発しており、G1 phase arrest が誘導されていると考えられた(Fig1-4A)。Time-Laps imaging で得られた結果を定量するために、薬剤処理後の細胞を回収し、フローサイトメーターを用いて緑色蛍光を発する G2/M 期の細胞と赤色蛍光を発する G0/G1 期の細胞の割合を測定した。Tivantinib 処理により G2/M 期を示す緑色蛍光を発する細胞の割合が 79.5 %に増加していた。一方で crizotinib 処理した場合は G1 期を示す赤色蛍光を発する細胞の割合が 95.2 %に増加しており、Time-Laps imaging で得られた観察結果と一致していた(Fig1-4B)。更に、Western Blot 法で検討した場合でも tivantinib 処理時に mAG1 が増加していた。細胞周期に特徴的な他の分子発現を検討したところ、tivantinib 処理した場合 S 期の進行に必要な cyclin A が減少し、M 期後期で機能する cyclin B が増加していることから、M phase arrest が示唆された (Fig1-4C) [21]。G2/M phase arrest を誘導することが知られる微小管阻害剤 vincristine 処理した場合も tivantinib 処理時と同様に mAG1、cyclin B の増加及び cyclin A の減少が確認できた。また、crizotinib で処理した場合は cyclin A、cyclin B 共に減少しており、G1 phase arrest が誘導されていることが示唆された。チロシンキナーゼ阻害剤は c-MET/ALK 阻害剤 crizotinib が c-MET 増幅した細胞に対して、EGFR 阻害剤である erlotinib もしくは gefitinib が EGFR 活性化変異の細胞に対してそれぞれ G1 phase arrest を誘導することが報告されており、今回の結果は従来の報告と一致していた[22] [23] [24]。これらの結果から、G2/M phase arrest を誘導する tivantinib は G1 phase arrest を誘導する他のチロシンキナーゼ阻害剤とは異なるメカニズムを有していると考えられる。阻害剤処理後の細胞を経時的に観察した結果、tivantinib 存在下で培養した場合は vincristine 存在下で培養した時と同様に、細胞の分裂が round up した状態で停止していることが確認できた(Fig1-4D)。Tivantinib 及

び vincristine 存在下で更に培養を続けると細胞は再び赤色蛍光を発する G1 期に進行し、アポトーシスを誘導した。微小管阻害剤で長時間処理することで細胞周期が G1 期に移行する mitotic slippage が起こることが報告されており、tivantinib でも同様の現象が発生したと考えられる [25]。

c-MET 非依存性細胞の細胞周期に対する tivantinib の効果

Tivantinib 処理による細胞周期への影響が細胞の c-MET 発現に依存するかを検討するため、Fucci を恒常発現させた Fucci-SK-MEL-28 細胞を作製して同様に実験を行った。SK-MEL-28 は *BRAF* 変異を有するメラノーマ由来細胞で、c-MET はほとんど発現しておらず、c-MET の KD でも増殖が阻害されない c-MET 非依存的な細胞である [12] [26]。3 μ M tivantinib で処理した時は vincristine 処理時と同様に緑色蛍光を発する細胞が増加しており、G2/M phase arrest の誘導が確認できた (Fig1-5A)。SK-MEL-28 細胞で見られた結果を定量するために、EBC-1 と同様にフローサイトメーターを用いて G2/M 期の細胞と G0/G1 期の細胞の割合を測定した。Tivantinib 処理により SK-MEL-28 細胞で G2/M 期を示す緑色蛍光を発する細胞が 44.7 % に増加していた。Vincristine 処理した場合は緑色蛍光を発する細胞が 44.0 % に増加しており、Time-Laps imaging による観察結果と一致していた (Fig1-5B)。阻害剤処理後の細胞を経時的に観察した結果 EBC-1 細胞と同様に細胞の分裂が round up した状態で停止していることが確認できた (Fig1-5C)。EBC-1 を含め今回の研究で用いた主要な細胞株について c-MET 及び活性化の指標である c-MET リン酸化の状態を Western Blot 法により定量した (Fig1-6)。Tivantinib に対する IC₅₀ 値と c-MET 発現に特に相関は見られなかった。以上の結果から、tivantinib は細胞の c-MET 発現に非依存的に G2/M phase arrest を誘導し、増殖阻害活性を発揮することが示唆された。

細胞骨格に対する tivantinib の影響

微小管阻害剤は微小管ダイナミクスを阻害することで細胞骨格を破壊することが知られているため、tivantinib 処理が細胞骨格に与える影響を検討した。c-MET 依存性の EBC-1 細胞を tivantinib 及び crizotinib 存在下で 16 時間培養し、免疫染色を行った。Tivantinib 処理した細胞では tubulin からなる微小管が破壊されていた一方で crizotinib 処理した細胞では微小管が維持されていた。Actin からなり、微小管と同様に細胞骨格を作るアクチンフィラメントはどちらの薬剤で処理した場合も影響が見られず、tivantinib による細胞骨格の破壊は微小管に限定的だった (Fig1-7)。これらの結果から、tivantinib が tubulin からなる微小管を破壊し、G2/M phase arrest を誘導することが示唆された。

Tivantinib による tubulin 重合阻害 (in cell)

以前の研究から、精製した tubulin を用いた *in vitro* の実験系において tivantinib が tubulin の重合阻害活性を有することを確認している [12]。そこで、tivantinib が細胞レベル、生体レベルにおいても tubulin 重合阻害活性を示すかを確認するため、以下の実験を行った。Tivantinib が細胞レベルでも tubulin 重合阻害活性を示すことを定量的に確認するため、阻害剤存在下で培養した細胞の重合 tubulin 量を Western Blot 法で検討した。この実験系では重合 tubulin の溶解性が遊離 tubulin に比べて低いことを利用している [27]。はじめに、細胞を 0.5% NP-40 を含むマイルドな lysis buffer で溶解し遠心することで、上清画分に遊離 tubulin、ペレットに重合 tubulin が分離される。次に重合 tubulin が含まれたペレットを 2% SDS を含む可溶化力の高い lysis buffer で溶解し、それぞれのライセートを Western Blot 法で定量する。

c-MET 依存性の EBC-1 細胞を tivantinib、vincristine、crizotinib 及び微小管重合促進剤として知られる paclitaxel 存在下で 6 hr 培養し、tubulin 重合に与える影響を調べた。c-MET 特異的阻害剤である crizotinib 存在下で培養した場合には insoluble α -tubulin に変化が見られず tubulin 重合に影響を与えなかった。一方で tivantinib 処理時は濃度依存的に insoluble α -tubulin が減少しており、vincristine 処理時と同様に重合 tubulin 量を減少させた (Fig1-8A)。微小管重合安定化作用を持つことが知られる paclitaxel 存在下で培養した場合は従来の報告と同様に insoluble α -tubulin が増加しており、重合 tubulin 量が増加した [28]。また、crizotinib 処理時に c-MET 及び下流の AKT・ERK パスウェイの活性が阻害されているのに対し、tivantinib 及び vincristine では c-MET、AKT、ERK のリン酸化にほとんど変化が見られず阻害されなかった (Fig1-8A)。Vincristine とは異なる tubulin 結合部位に結合することが知られている微小管重合阻害剤 colchicine 及び vincristine、tivantinib による重合 tubulin 量の減少は阻害剤存在下で 24 hr 培養した後でも確認された (Fig1-8B,C)。

Tivantinib による重合 tubulin 量の減少が c-MET 活性に依存するかを検討するため、c-MET は発現しているものの c-MET 活性化がほとんど起こっていない H460 細胞を用い、同様に tubulin 重合に与える影響を検討した。以前の研究から、H460 細胞は c-MET をノックダウンしても増殖に影響が見られない c-MET 非依存性の細胞であることを確認している [12]。結果、EBC-1 細胞と同様に H460 細胞においても tivantinib は他の微小管阻害剤 vincristine や colchicine と同様に、濃度依存的に重合 tubulin 量を減少させた (Fig1-9A)。Basilico et al の論文で、数百 nM の濃度で tivantinib 処理することでむしろ微小管骨格の形成を促進するという報告があることから、tivantinib の微小管形成促進作用を検討するために、論文で使用されていた

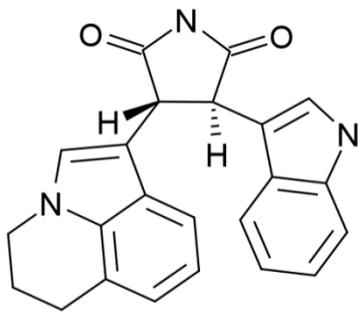
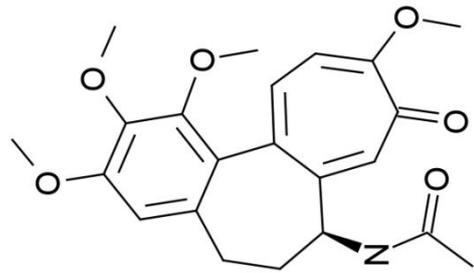
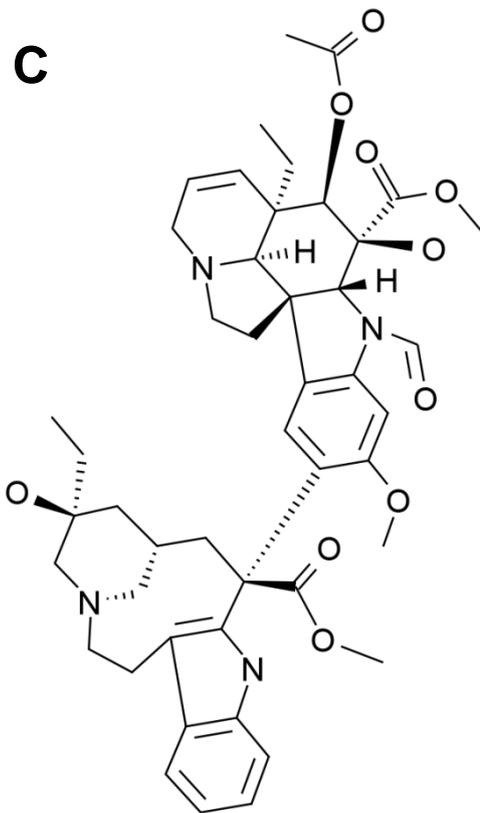
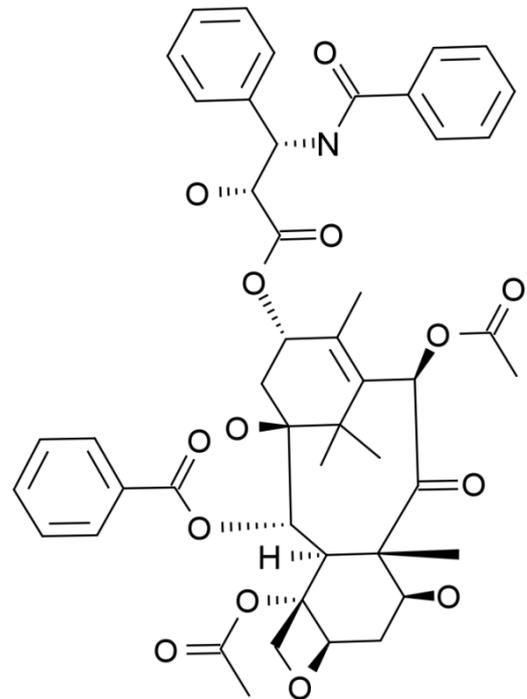
DLD-1 細胞を用いて検討を行った[29]。Basilico et al の論文と同様の手法を用い、免疫染色した tubulin に対して共焦点蛍光顕微鏡を用いて蛍光強度の観察実験を行った。しかし、選ぶ視野によって微小管形成が促進されているように見える細胞、変わっていない細胞、阻害されているように見える細胞が混在しており、明確な傾向は確認できなかった。そこでウェスタンブロットにより細胞内の重合 tubulin 量を検討したところ、DLD-1 において数百 nM の tivantinib では重合 tubulin 量の増加が見られず、1 μ M 程度の tivantinib 存在下で培養した場合には他の細胞と同様に重合 tubulin 量の減少が見られた(Fig1-9B,C)。少数の細胞を対象とするため選択する視野によって結果が変わる可能性のある蛍光強度の観察と比較して、多量の細胞を回収して重合 tubulin 量をウェスタンブロット法で検出する方法は定量性が高いと考えられる。また、tivantinib 処理により重合 tubulin の減少が見られることは、*in vitro* の系で tivantinib が tubulin 重合を阻害した結果と一致している。これらの結果から、tivantinib は細胞レベルにおいても tubulin 重合阻害を介して増殖阻害活性を示していると考えられた。

Tivantinib による tubulin 重合阻害 (*in vivo*)

第一相の臨床試験から、tivantinib の血中濃度は平均で 1-2 μ M、最大で約 5 μ M に達することが報告されている[30] [31] [32]。細胞レベルの実験で tivantinib が約 1 μ M 以下の濃度で重合 tubulin 量を減少させたことから、tivantinib が生体内でも tubulin 重合阻害を引き起こす可能性が考えられた。Tivantinib が生体レベルでも tubulin 重合阻害を示すか検討するため、c-MET 依存性の EBC-1 及び c-MET 非依存性の H460 細胞を皮下移植した担がんマウスを用いて実験を行った。Tivantinib を経口投与したところ、どちらの担がんマウスでも腫瘍縮小が見られ、tivantinib は c-MET 活性に関わらず抗腫瘍活性を示した(Fig1-10A,C)。体重減少は EBC-1 細胞の担がんマウスでは起こらなかったが、H460 細胞の担がんマウスでは見られた(Fig1-10B,D)。薬剤投与後 19 日の時点で腫瘍を摘出し、細胞レベルの実験と同じ方法を用いて Western Blot 法により重合 tubulin 量を定量した。その結果、tivantinib は細胞レベルでの実験と同様に EBC-1 及び H460 のゼノグラフトにおいても tubulin 重合を顕著に抑制した(Fig1-11A,C)。Tivantinib は c-MET 阻害剤として最初に報告されていること、近年では GSK-3 阻害に関わるという報告があることから c-MET 及び GSK-3 パスウェイについても検討を行ったが[13]、tivantinib 投与群と control 群で一貫した変化は見られなかった (Fig1-11B,D)。

重合 tubulin の減少が細胞死に伴って起こっている可能性も考えられたため、c-MET 依存性の EBC-1 細胞を皮下移植した担がんマウスに crizotinib を与え、検討

を行った。Crizotinib を経口投与したところ、担がんマウスで腫瘍縮小が見られ、抗腫瘍活性を示した(Fig1-12A)。また、体重減少は見られなかった(Fig1-12B)。有意な腫瘍縮小効果が見られた薬剤投与後 11 日の時点で腫瘍を摘出し、パスウェイ解析及び重合 tubulin 量の定量を行った。その結果、crizotinib は細胞レベルでの実験と同様に、ゼノグラフトにおいても顕著に c-MET パスウェイを抑制した(Fig1-12C)。Crizotinib による tubulin 重合阻害を検討したところ、変化は見られなかった。より正確に検討するために、insoluble GAPDH との比を定量し、タンパク量の補正を行ったところ、crizotinib 投与群では insoluble tubulin : insoluble GAPDH の比に減少は見られなかった(Fig1-12D)。また、同様の検討を、Fig1-11A の tivantinib 投与群でも行ったところ、tivantinib 投与により有意に insoluble tubulin : insoluble GAPDH の比が減少していることが確認された(Fig1-12E)。これらの結果から、生体レベルでも tivantinib が tubulin 重合を阻害することが示唆された。

A**Tivantinib****B****Colchicine****C****Vincristine****D****Paclitaxel****Fig.1-1 微小管阻害剤の構造式**

使用した微小管阻害剤(A)tivantinib (B) colchicine (C) vincristine (D) paclitaxelの構造式を上記した。molファイルをChemSpider (<http://www.chemspider.com/>)から入手し、Bkchemを用いて描画した。

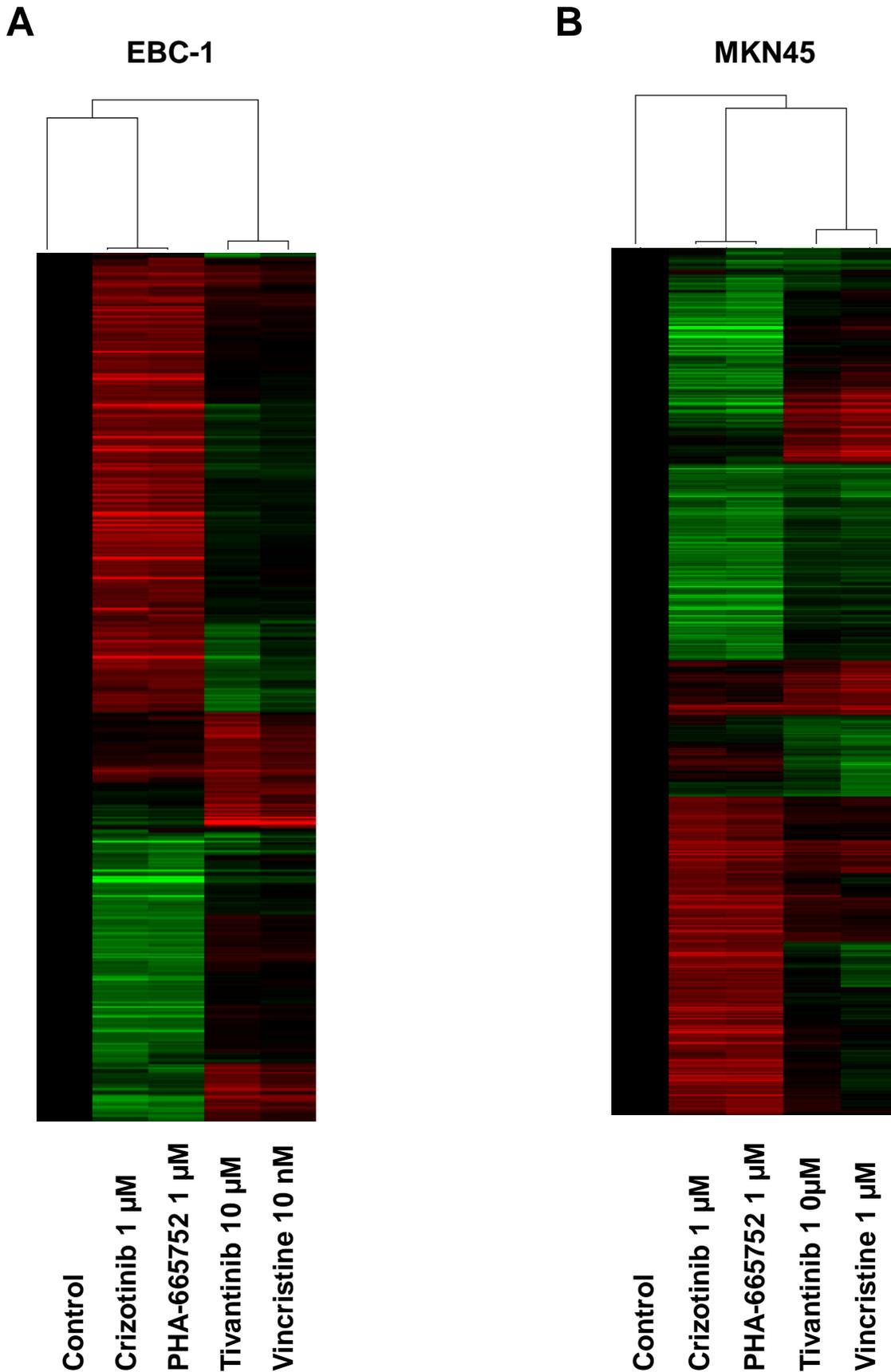
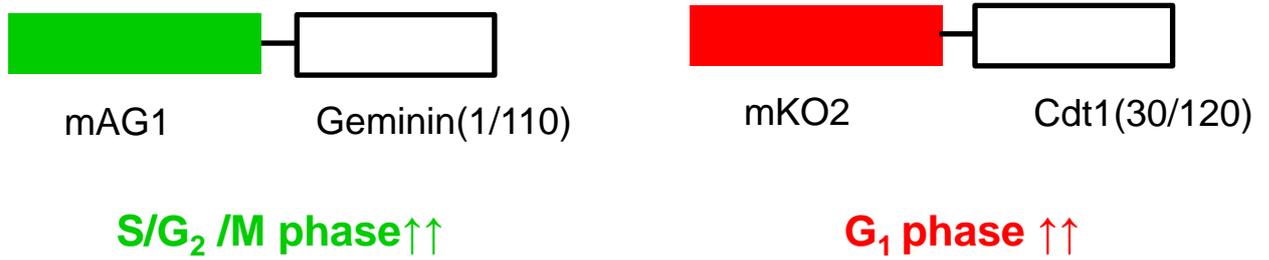


Fig.1-2 阻害剤処理による遺伝子発現量変化の解析

(A)EBC-1及び(B)MKN45細胞を図示した濃度の薬剤存在下で8 hr培養し、細胞からmRNAを抽出してマイクロアレイ解析を行った。緑はcontrolと比較して発現が減少した遺伝子、赤はcontrolと比較して発現が増加した遺伝子を示す。

A



B

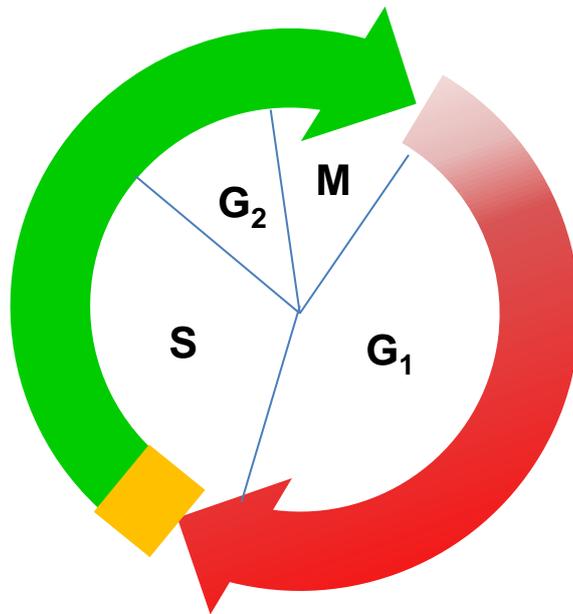
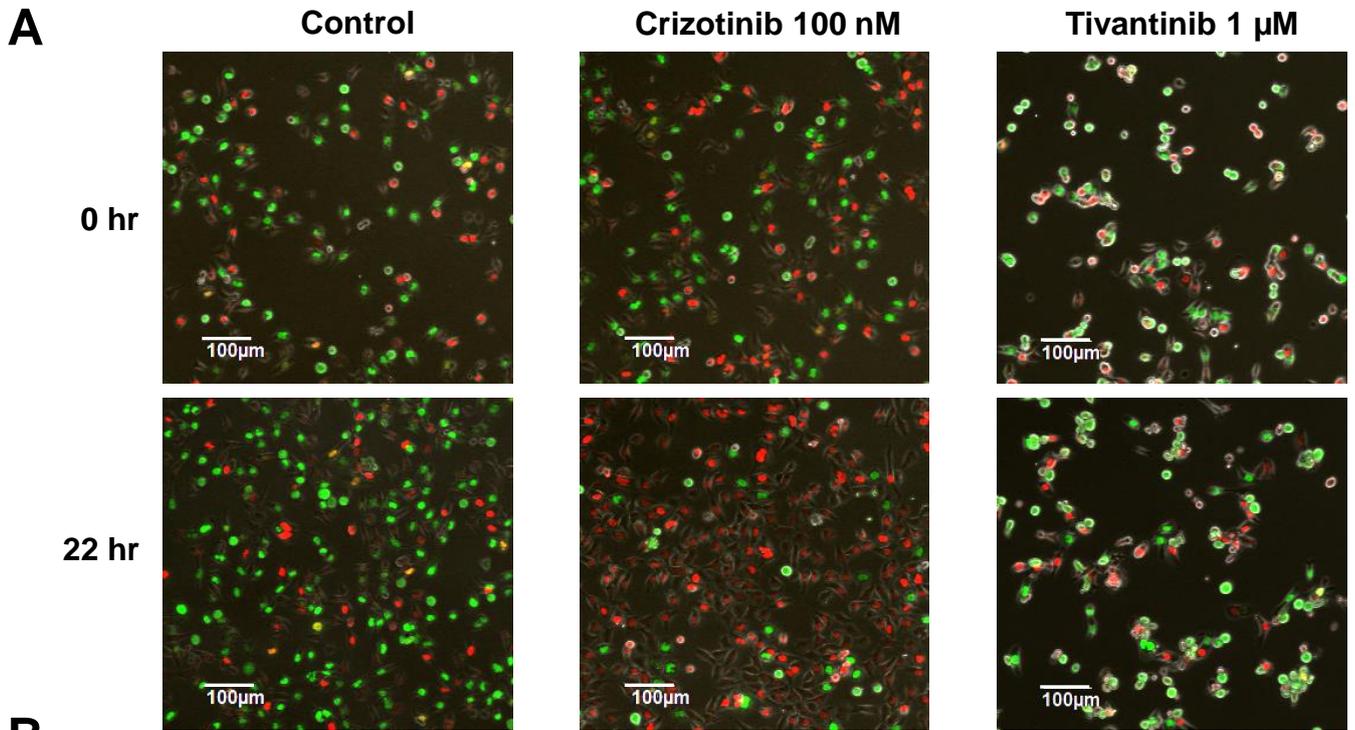


Fig.1-3 蛍光プローブFucciの概略

(A) 蛍光プローブFucciの構造。蛍光タンパク質mAG1にgemininのN末端部位(1-110アミノ酸)が結合し、蛍光タンパク質mKO2にcdt1の欠失変異体(30-120アミノ酸)が結合している。

(B) Fucci細胞が細胞周期に応じて示す蛍光。Cdt1がG₁期に最も高く発現するのでG₁期には細胞が赤色蛍光を発し、gemininはS期からM期にかけて最も高く発現するので細胞が緑色蛍光を発する。G₁期からS期の移行にかけて両方のタンパク質が存在するので黄色蛍光を発する。



B

Ratio at 22 hr	Control	Crizotinib 100 nM	Tivantinib 1 µM
Red (G ₀ /G ₁)	39.5%	95.2%	14.6%
Green (G ₂ /M)	50.2%	4.2%	79.5%

C

EBC-1 Fucci (24 hr treatment)

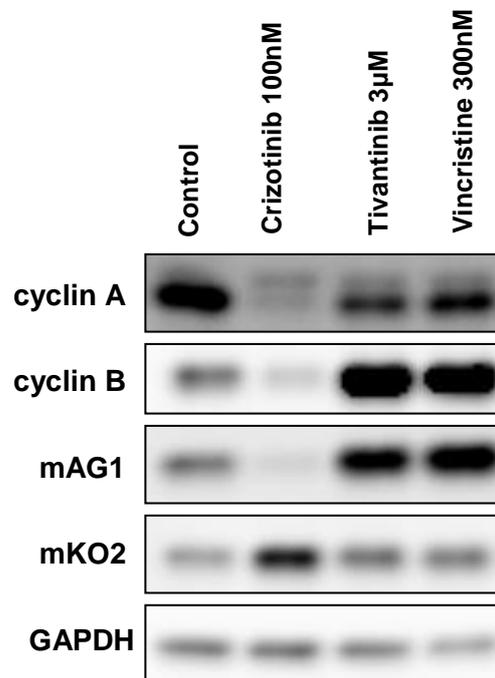


Fig.1-4 Tivantinib、crizotinib処理による細胞周期の変化

(A) Fucci-EBC-1 細胞を図示した濃度の薬剤存在下で培養し、細胞周期に与える影響を共焦点蛍光顕微鏡により経時的に観察した。白のスケールバーは100 µmを示す。

(B) 薬剤投与後22 hr の段階で細胞を回収し、緑色蛍光(G₂/M phase) 及び赤色蛍光(G₁ phase)を発する細胞の割合をフローサイトメーターを用いて計測した。

(C)図に示した濃度で6 hr薬剤処理した後に細胞を回収し、ウェスタンブロットを行った。

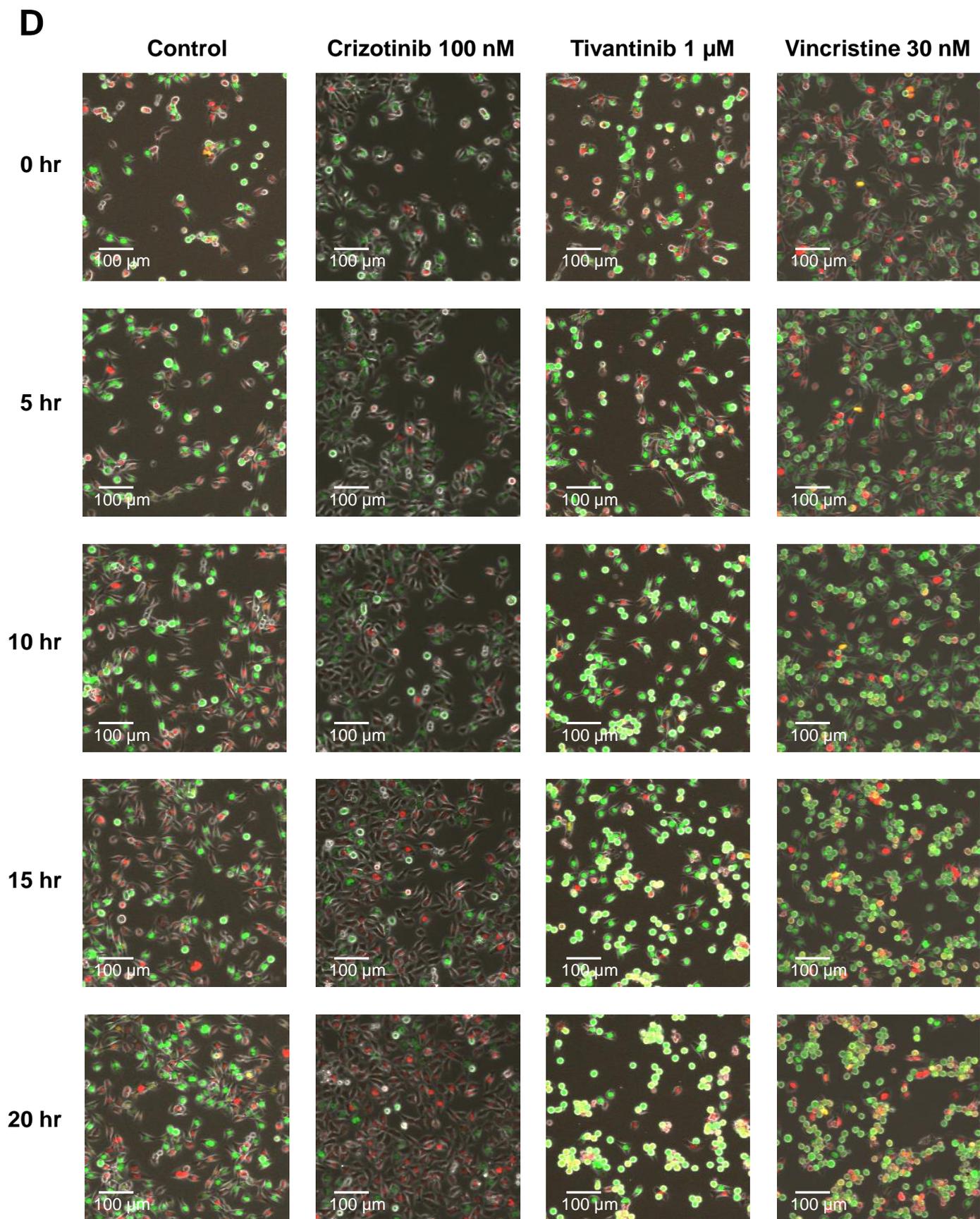
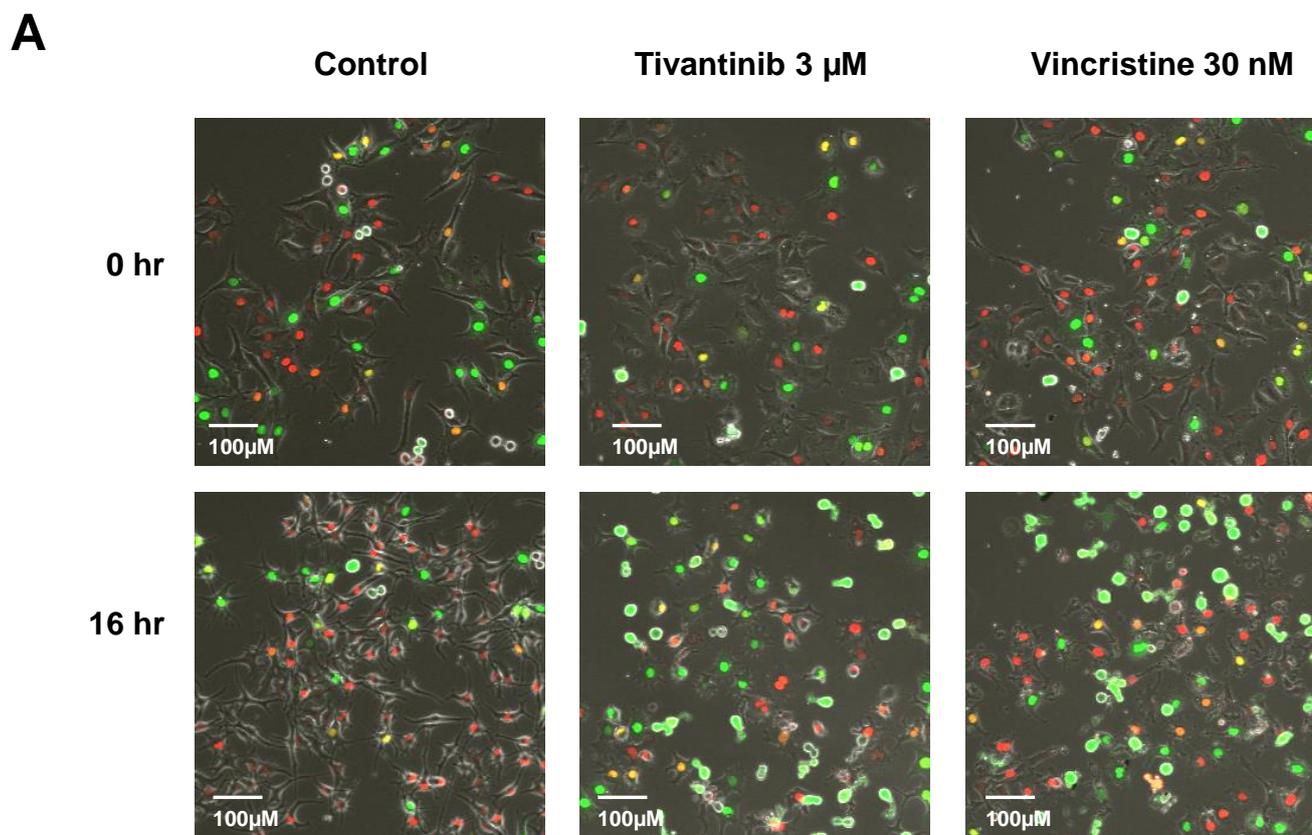


Fig.1-4 Tivantinib、vincristine、crizotinib処理による細胞周期の変化

(D) Fucci-EBC-1 細胞を図示した濃度の薬剤存在下で培養し、細胞周期に与える影響を共焦点蛍光顕微鏡により経時的に観察した。白のスケールバーは100 μ mを示す。



B

Ratio at 16 hr	Control	Tivantinib 3 μM	Vincristine 30 nM
Red (G_0/G_1)	72.1%	41.6%	42.0%
Green (G_2/M)	20.7%	44.7%	44.0%

Fig.1-5 Tivantinib処理によるG2/M phase arrestの誘導

(A) Fucci-SK-MEL-28 細胞を図示した濃度の薬剤存在下で培養し、細胞周期に与える影響を共焦点蛍光顕微鏡により経時的に観察した。白のスケールバーは100 μm を示す。

(B) 薬剤投与後16 hrの段階で細胞を回収し、緑色蛍光(G_2/M phase) 及び赤色蛍光(G_1 phase)を発する細胞の割合を FC 500 フローサイトメーターを用いて計測した。

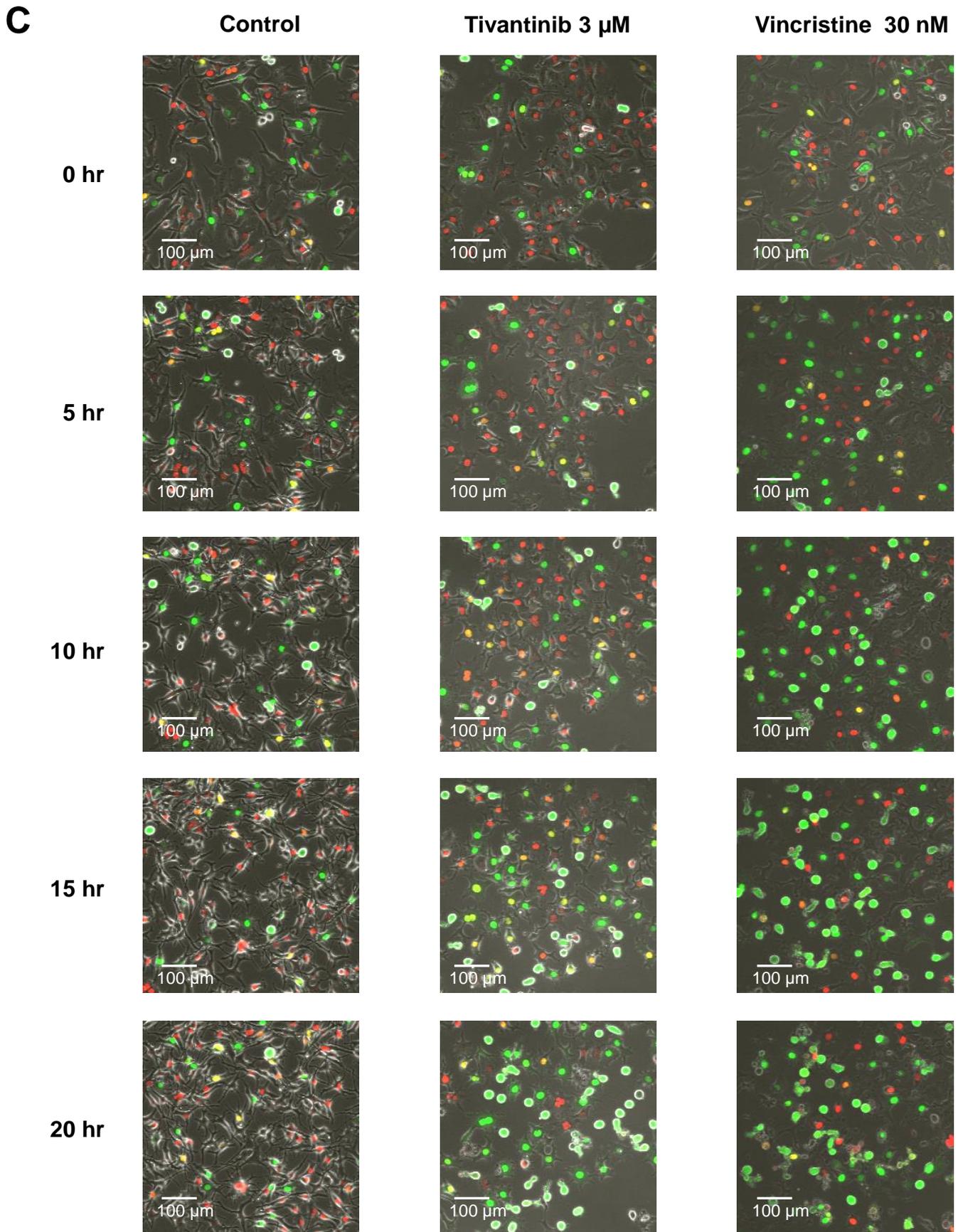


Fig.1-5 Tivantinib処理によるG2/M phase arrestの誘導

(C) Fucci-SK-MEL-28 細胞を図示した濃度の薬剤存在下で培養し、細胞周期に与える影響を共焦点蛍光顕微鏡により経時的に観察した。白のスケールバーは100 μm を示す。

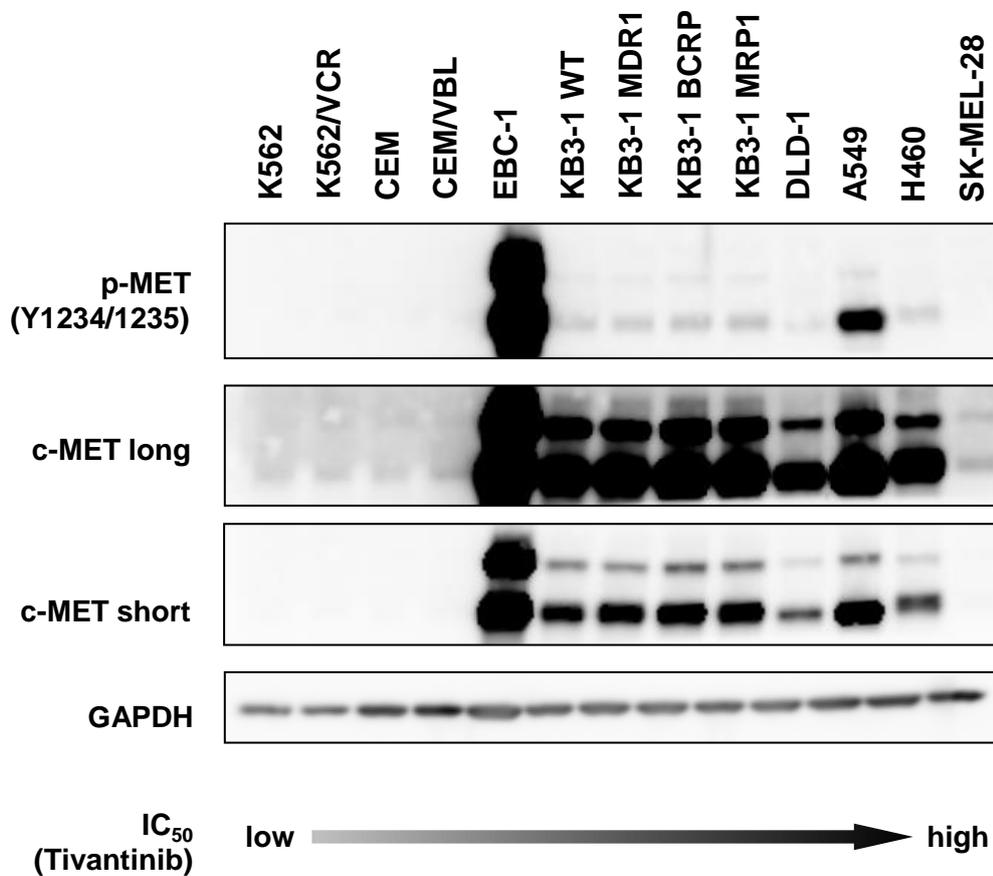


Fig.1-6 c-MET及びp-METの発現レベルの検討

今回の研究で用いる主な細胞株について、通常培養条件下で細胞を回収し、c-MET及びp-METの発現を確認した。

発現量に差があるため、c-METについては長時間露光したもの(long)と短時間露光したもの(short)を掲載した。

細胞はtivantinibに対する IC_{50} 値が低い順に左から並べている。

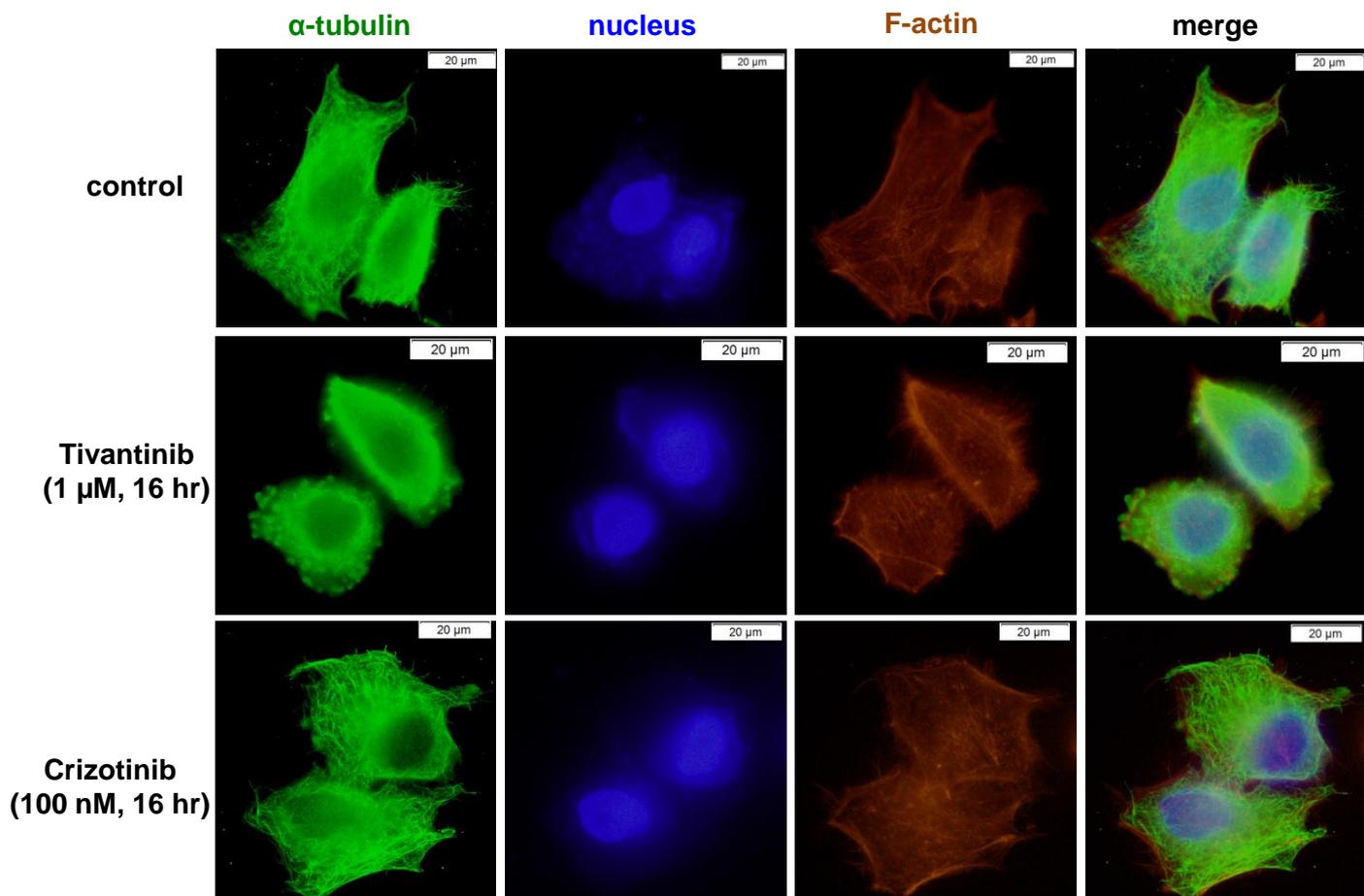


Fig.1-7 Tivantinib処理による重合tubulin量の減少

EBC-1細胞を図示した薬剤濃度の存在下で16 hr培養後、細胞を固定してhoechst33342、phalloidin及び α -tubulin抗体で免疫染色した。スケールバーは20 μ mを示す。

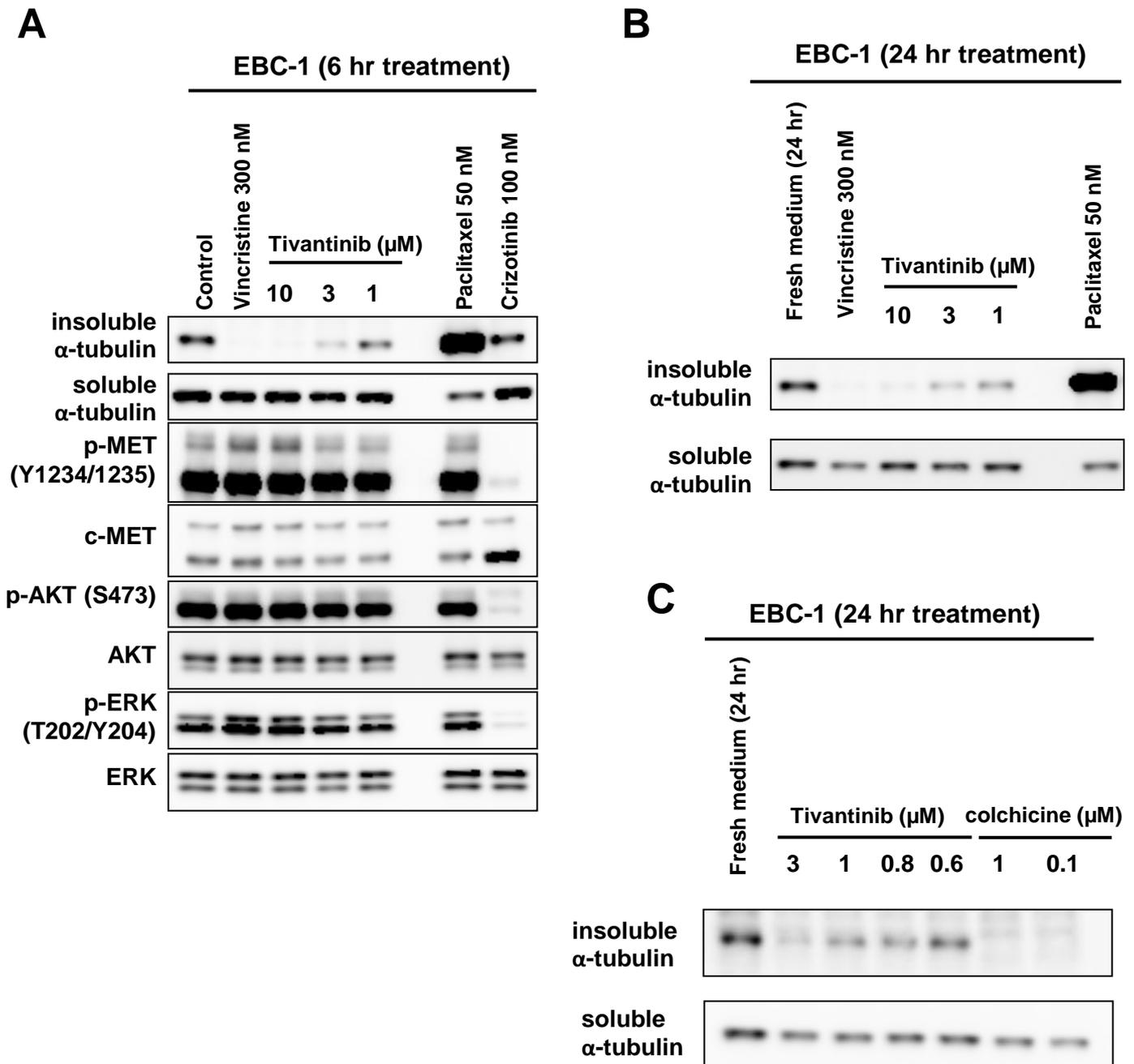


Fig.1-8 Tivantinib処理による重合tubulin量の減少

(A)EBC-1細胞を図示した薬剤濃度の存在下で(A)6 hr(B)(C)24 hr培養し、ウェスタンブロット法を用いた重合tubulin 定量を行った。

soluble α -tubulinは遊離tubulin、insoluble α -tubulinは重合tubulinをそれぞれ表す。

c-MET、AKT、ERK及びそのリン酸化の定量には遊離tubulinのライセートを使用した。

controlについては他のサンプルと同濃度になるようにDMSOを加えており、Fresh mediumにはDMSOを加えていない。

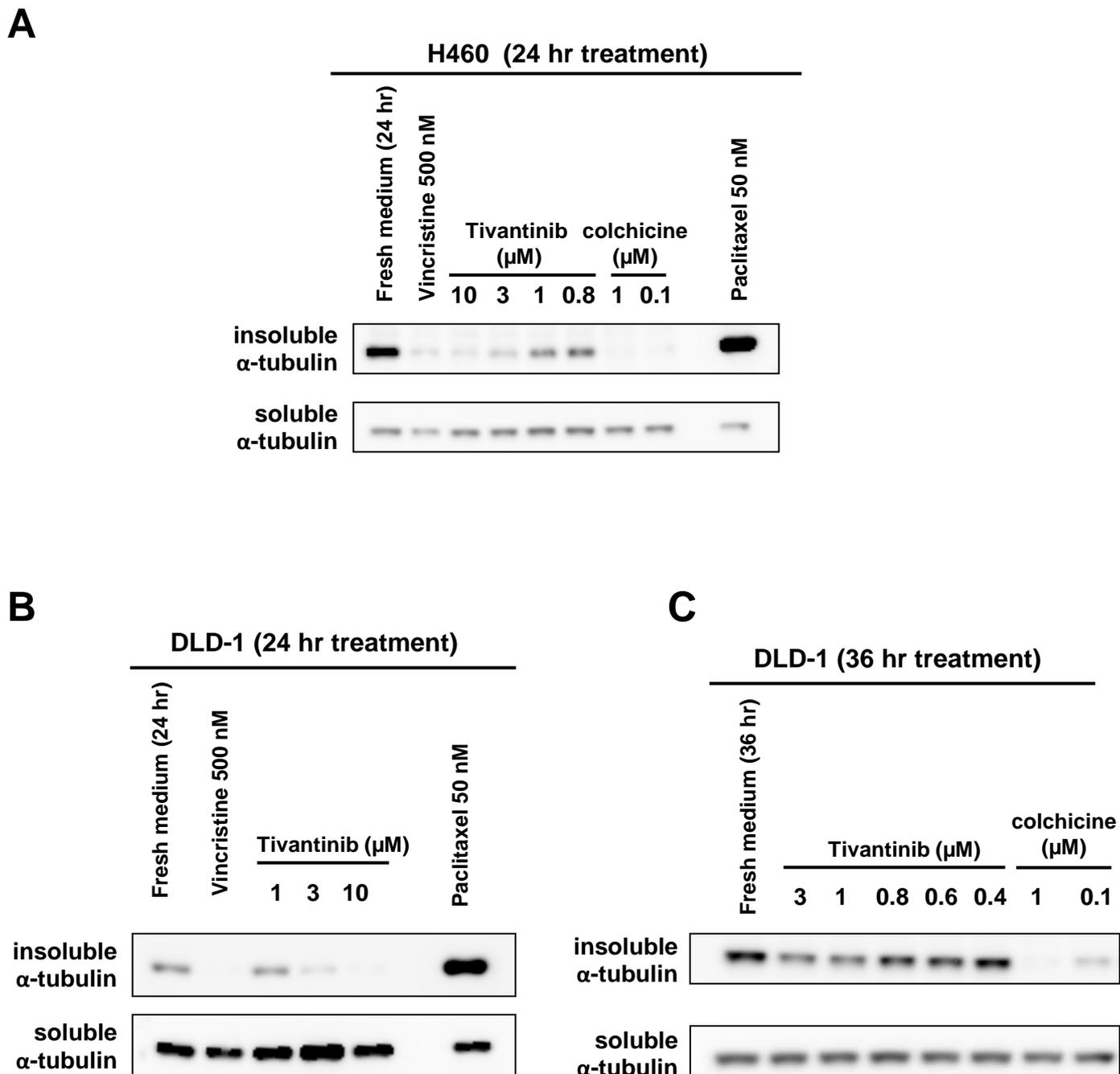


Fig.1-9 Tivantinib処理による重合tubulin量の減少

(A)H460細胞及び(B)(C)DLD-1細胞を図示した薬剤濃度の存在下で(A)(B)24 hr (C)36 hr培養し、ウェスタンブロット法を用いた重合tubulin 定量を行った。

soluble α-tubulinは遊離tubulin、insoluble α-tubulinは重合tubulinをそれぞれ表す。

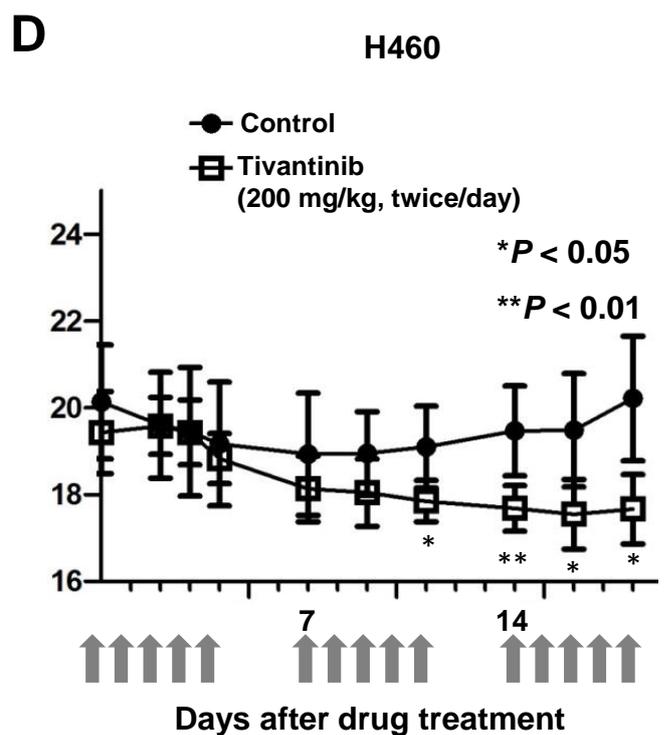
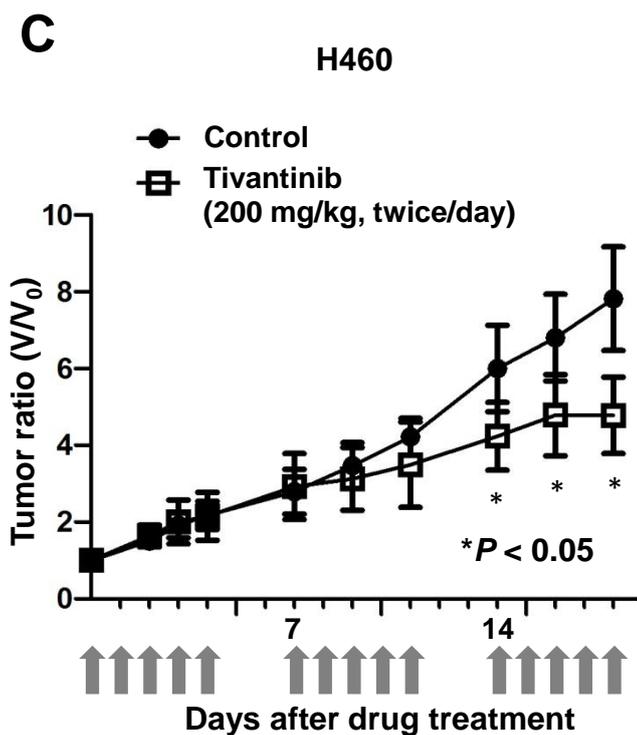
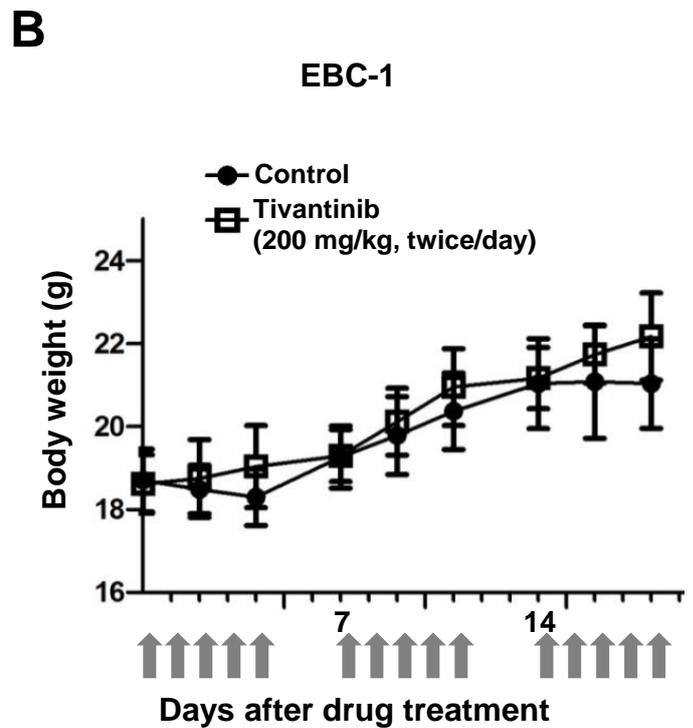
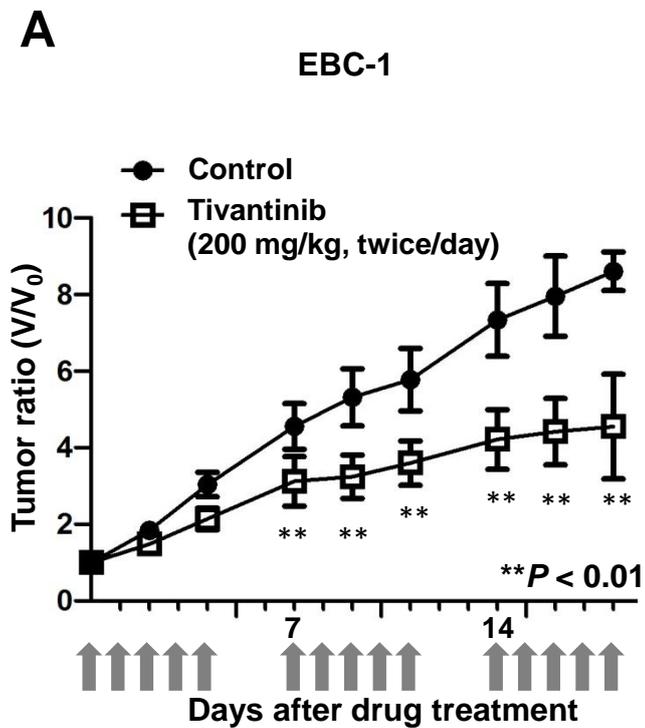


Fig.1-10 Tivantinib投与による抗腫瘍効果の検討

(A-D)EBC-1及びH460細胞を皮下移植した担がんマウスにtivantinibもしくはvehicle controlを経口投与し、腫瘍容積(A)(C)と体重(B)(D)を計測した。

グラフ下部の矢印はdrugを投与した日程を表す。

それぞれの群にはマウス6匹を使用し、エラーバーはSDを示す。

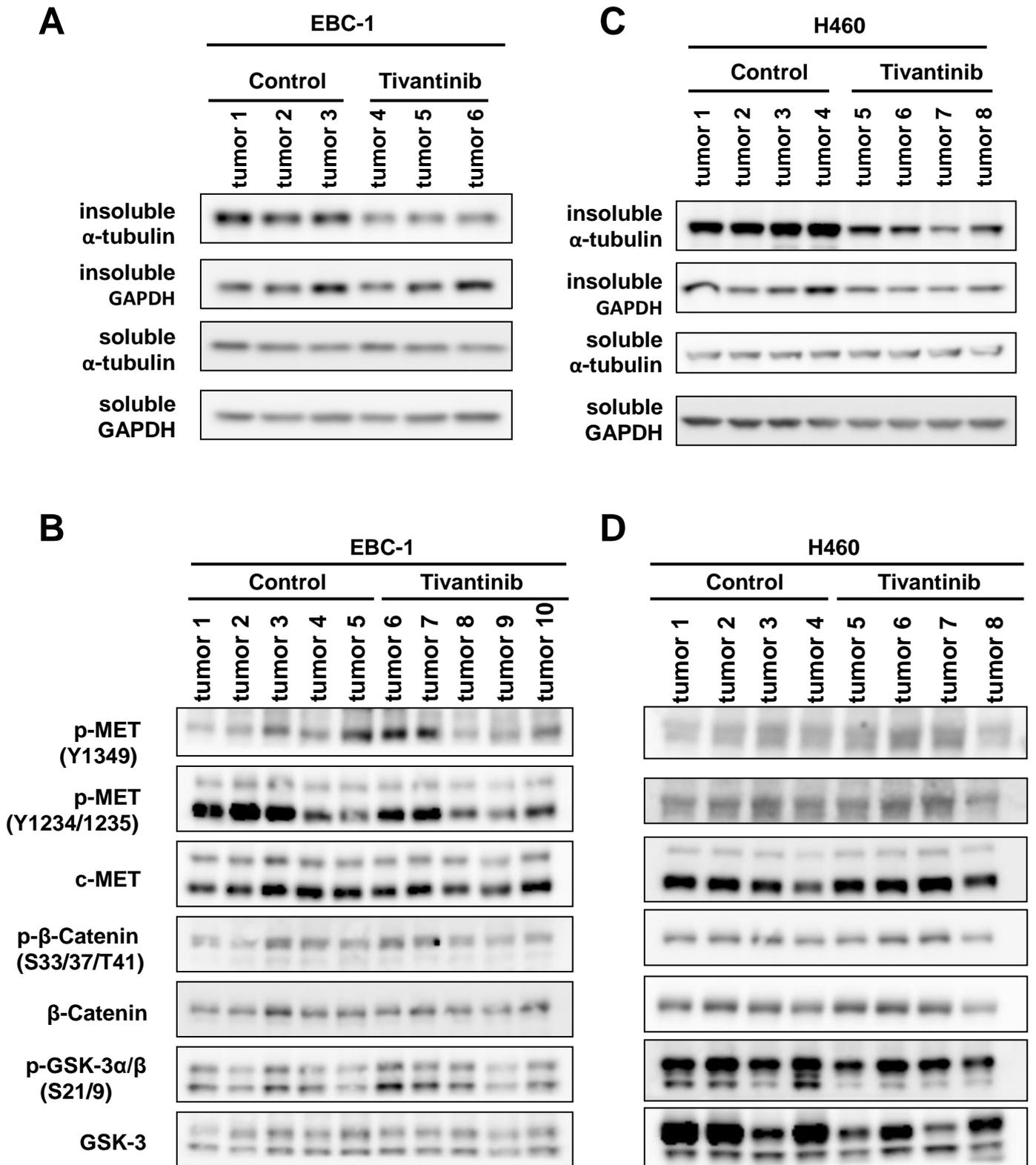


Fig.1-11 Tivantinib投与による重合tubulin量の減少

(A)(C)薬剤投与後19日目のマウスから腫瘍を摘出し、ウェスタンブロット法を用いた重合tubulin 定量を行った。

soluble α -tubulinは遊離tubulin、insoluble α -tubulinは重合tubulinをそれぞれ表す。

(B)(D) 遊離tubulinのライセートを使用し、図示した抗体を用いてウェスタンブロット法を行った。

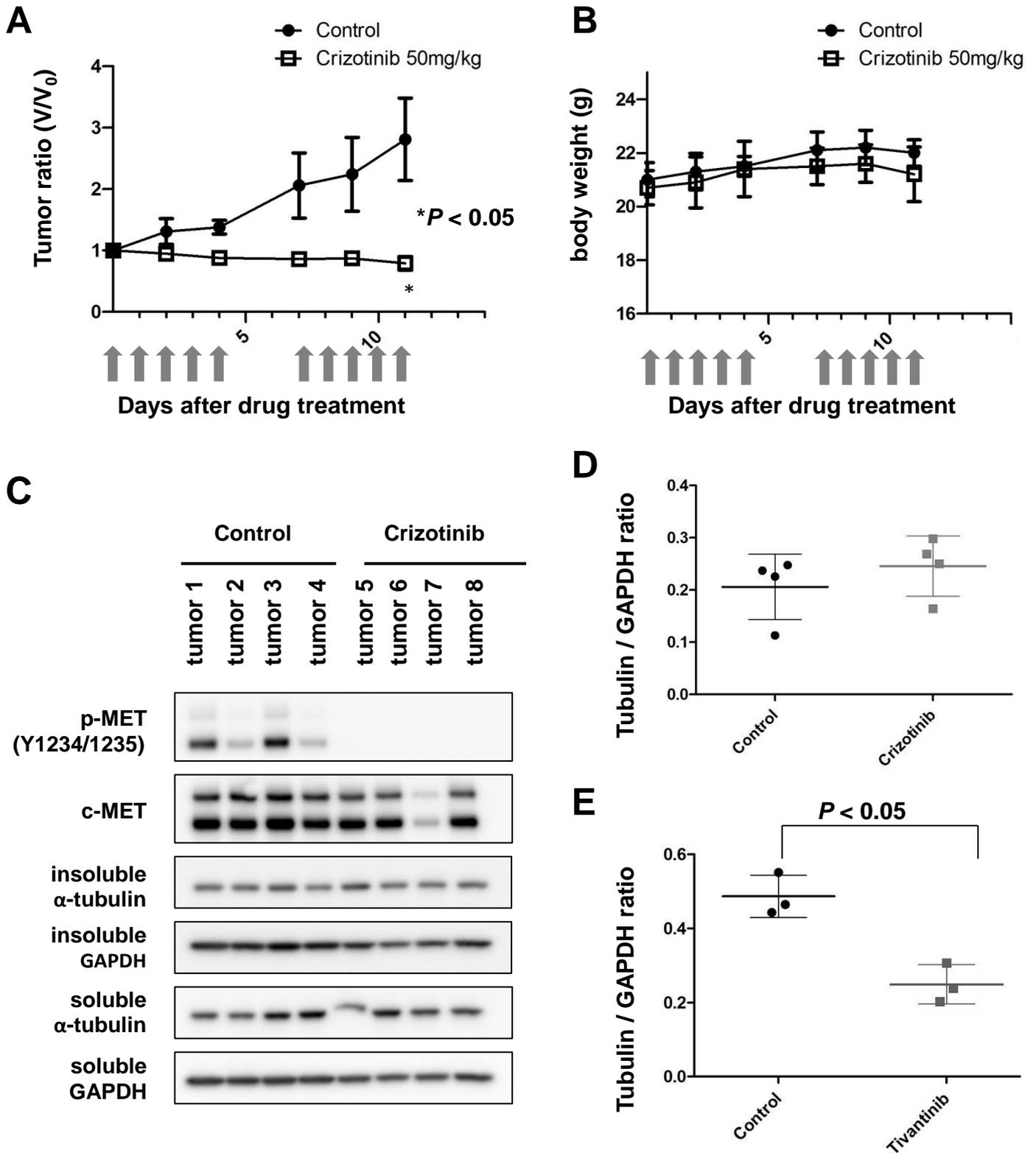


Fig.1-12 Crizotinibによるtubulin重合阻害の検討

(A)(B)EBC-1細胞を皮下移植した担がんマウスにcrizotinibもしくはvehicle controlを経口投与し、腫瘍容積(A)と体重(B)を計測した。グラフ下部の矢印はdrugを投与した日程を表す。それぞれの群にはマウス4匹を使用し、エラーバーはSDを示す。

(C)薬剤投与後12日目のマウスから腫瘍を摘出し、ウェスタンブロット法を用いた検討を行った。soluble α-tubulinは遊離tubulin、insoluble α-tubulinは重合tubulinをそれぞれ表す。

(D)(E)Fig1-12C(D)及びFig1-11A(E)のバンドの発光量をimageJを用いて定量し、insoluble tubulinとinsoluble GAPDHの比率を計算した。中央のバーは平均値とSDを示す。

2 章 Tivantinib の作用機序の解明

<目的>

前章の結果から、tivantinib が細胞及び生体レベルでも tubulin 重合阻害活性を示すことを見出した。微小管重合阻害剤である vincristine や colchicine はそれぞれ vinblastine 部位、colchicine 部位という tubulin 上の特定部位に結合することが知られている[33] [34]。Tivantinib も他の微小管重合阻害剤と同様に tubulin 上の特定部位に結合するか検討するため、以下の実験を行った。

<実験方法>

細胞培養

CEM、CEM/VBL、K562、K562/VCR、KB3-1、KB3-1/MDR1、KB3-1/MRP1、KB3-1/BCRP は 10% FBS/ RPMI (10% heat-inactivated FBS、100 µg/ml Kanamycin sulfate in RPMI1640)で培養する。いずれの細胞も、加湿式 CO₂ インキュベーター内で 37°C、5% CO₂ の条件下で培養する。耐性細胞株 CEM/VBL 及び K562/VCR は、以前基礎研究部内で樹立した細胞を使用する[35] [36]。ABC トランスポーターをコードする遺伝子を導入した KB3-1/MDR1、KB3-1/MRP1、KB3-1/BCRP 細胞株は慶応大学の杉本芳一教授から譲渡されたものを使用する[37] [38] [39]。CEM は Japanese Cancer Research Resources Bank より購入したものを使用する。K562 及び KB3-1 はそれぞれ Dr. I. Pastan、Dr. E. Ezaki より譲渡されたものを使用する[40] [41]。

ELISA 法

ポリスチレン製のマイクロタイタープレートに、PBS で 1 µg/ml に希釈した rat-IgG (BioLegend)溶液を加え、4°C O/N で反応する。プレートウォッシャーでプレートを洗浄後、5%スキムミルク in PBS をマイクロタイタープレートに加え、2 hr ブロッキングを行う。プレートウォッシャーでプレートを洗浄後、biotin 標識 anti-rat 抗体 (Thermo Fisher Scientific) を PBS で希釈し、マイクロタイタープレートに添加する。抗体反応後、プレートウォッシャーでプレートを洗浄し、PBS で希釈した

HRP-アビジン複合体 (Thermo Fisher Scientific)をプレートに加える。HRP-アビジン複合体中の tivantinib の濃度をそれぞれ 1 μM 、3 μM 、10 μM 、30 μM とする。反応後、プレートウォッシャーでプレートを洗浄し、1-step Ultra-TMB ELISA を用いて 450 nm の吸光度をプレートリーダーで計測する。

Streptavidin-coat ビーズを用いた Scintillation proximity assay

以下のプロトコルは 2000 年に Tahir et al から報告された方法を基にした[42]。エタノールに希釈した ^3H colchicine (PerkinElmer)を遠心濃縮機で 40 min 遠心し、エタノールを蒸発させる。遠心後、binding buffer [1 mM GTP (Cytoskeleton), 1 mM EGTA (和光純薬工業), 1 mM MgCl_2 , and 80 mM PIPES (pH 6.8)(和光純薬工業)]に ^3H colchicine を希釈し、96 well プレート (IWAKI)に分注する。放射線標識していない化合物をエタノールに希釈し、96 well プレートに添加する。化合物の添加後、binding buffer で 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ に希釈したビオチン標識 tubulin (Cytoskeleton)を 96 well プレートに加える。最終的な buffer の容量は 100 $\mu\text{l}/\text{well}$ 、 ^3H colchicine 濃度を 0.3 μM 、tubulin 濃度を 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ とする。96 well プレートをローテーター付きインキュベーター上で 37°C 2 hr 緩やかに回転させる。反応後、binding buffer で 4 mg/ml に希釈したストレプトアビジン標識ビーズ(PerkinElmer)を 96 well プレートに添加し、ゆるやかに混和しながら 15 min 反応させ、1 hr 静置する。静置後、TopCount microplate scintillation counter (PACKARD)を用いて蛍光を測定する。

DEAE フィルターを用いたシンチレーションアッセイ

以下のプロトコルは 2000 年に Natsume et al から報告された方法を基にした[43]。精製 tubulin (Cytoskeleton)、 ^3H vincristine (PerkinElmer) もしくは ^3H vinblastine (American Radiolabeled Chemicals)、放射線標識していない化合物をそれぞれ binding buffer [1 mM GTP, 1 mM EGTA, 1 mM MgCl_2 , and 80 mM PIPES (pH 6.8)]で希釈し、エッペンドルフチューブに添加して混合する。最終的な tubulin 濃度を 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、 ^3H vincristine 及び ^3H vinblastine 濃度をそれぞれ 0.3 μM 、1 μM とする。エッペンドルフを 37°C のウォーターバス中で 2 hr 振盪して反応させる。反応後、ポンプで吸引した状態の DEAE-cellulose filter(DE81)(Whatman)に反応液を 100 μl ずつ添加する。binding buffer で 5 回洗浄し、フィルターをドラフト内で乾燥させる。乾燥後、フィルターを取り出し MicroScint-20 (PerkinElmer)を添加後 LS 6000 SE scintillation counter (Beckman)を用いて蛍光を測定する。

Tivantinib と tubulin との結合モデル予測

結合モデルの予測には GOLD docking program version5.1 を使用し、シミュレーションの基となる構造は 2004 年に Ravelli et al から報告された tubulin と colchicine の結晶構造 (PDB code:1SA0) を RCSB Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>) からダウンロードして使用した [33]。1SA0 から colchicine を抜き取り、GOLD docking program 上で目的の化合物を再結合させる。再結合を繰り返し行い、より実際の結晶構造に近いと考えられる、GOLD score の高い結合モデルを選ぶ。結合実験後、統計ソフト R を利用して GOLD score 上位の結晶構造のクラスター分析を行う。

ウェスタンブロット

1 章で記述したプロトコルに従う。一次抗体として Cleaved PARP (Asp214)(D64E10; CST)、MDR1 (C219; Millipore)、MRP1(MRPr1; Monosan)、BCRP/ABCG2 (BXP-21; Santa Cruz Biotechnology) を用いる。記述がしていない抗体は 1 章と同じ抗体を使用する。

生存細胞アッセイ

2×10^3 cells/well で 96 well マイクロプレートに細胞を継代し、24 hr 培養する。薬剤濃度が 10 μ M、1 μ M、100 nM、10 nM、1 nM、100 pM、10 pM、1 pM、0.1 pM (tivantinib は 10 μ M、3 μ M、1 μ M、300 nM、100 nM、30 nM、10 nM、3 nM、1 nM)、no drug になるように調製した medium を加え、72 hr 培養する。培養後、CellTiter-Glo assay reagent (Promega) を用い、Centro LB 960 luminometer (Berthold Technologies) で発光シグナルを測定する。GraphPad Prism version 5.0 (GraphPad Software) を用いて no drug 条件で培養した細胞の生存細胞数を 100 とした時の、それぞれの薬剤濃度における生存細胞数の割合を求めて生存阻害活性のグラフを作成する。IC₅₀ 値は GraphPad の機能を用い、Dose-response-inhibition model で非線形回帰を行なって算出した。

MDR1 トランスポーター阻害の検討

K562 及び K562/VCR 細胞を 1×10^5 cells/well で 6 well plate に継代し、24 hr 培養する。培養後、Tivantinib、Verapamil (Sigma) 及び MS209 (Sigma) を希釈した medium に交換する。Medium 交換 15 min 後、Rhodamine 123 (Sigma) を最終濃度 5 μ M で投与し、フローサイトメーターを用いて蛍光を測定する。

アポトーシスアッセイ

細胞を 8×10^4 cells/well で 6 well plate に継代し、24 hr 培養する。薬剤を希釈した medium に交換し、72 hr 培養する。培養後、細胞を回収して PBS で洗浄する。細胞を annexin-binding buffer (Thermo Fisher Scientific)、propidium iodide (Sigma) を混合した buffer に希釈し、暗所で 15 min RT 反応させる。反応後、セルストレーナーキャップ付きポリスチレンラウンドチューブで細胞を分離し、Cytomics 500 flow cytometer (Beckman Coulter) を用いて測定する。測定後のデータは FlowJo (Treestar) を用いて解析する。

細胞周期(sub-G1)解析

細胞を 1×10^5 cells/well で 6 well プレートに継代し、24 hr 培養する。薬剤を希釈した medium に交換し、72 hr 培養する。培養後、細胞を回収して PBS で洗浄する。最終濃度 70% のエタノールを添加して細胞を固定し、RNaseA (Sigma) 処理を行う。PBS で細胞を洗浄し、propidium iodide 溶液を加える。セルストレーナーキャップ付きポリスチレンラウンドチューブで細胞を分離し、Cytomics 500 flow cytometer を用いて測定する。測定後、FlowJo 及び Cytomics RXP により細胞周期解析を行う。

<結果・考察>

[³H]colchicine の tubulin 結合に対する競合阻害実験

Tivantinib が colchicine や vinblastine 同様に tubulin に直接結合するか確認するために、SPA ビーズを用いた Scintillation Proximity Assay を行い [³H](トリチウムラベル) colchicine と tubulin の結合に対する tivantinib の影響を検討した。この実験系では、[³H] colchicine と tubulin が結合している場合のみ SPA ビーズが蛍光することを利用して、tubulin に対する [³H] colchicine の結合数を測定している (Fig2-1A)。Colchicine 部位に結合する化合物を加えた場合、[³H]colchicine がキックアウトされて tubulin に対する [³H] colchicine の結合数は減少するため、蛍光も減少する (Fig2-1B)。

Scintillation proximity assay を行う前に、tivantinib がアビジン-ビオチンの結合に対して影響を与えていないか確認するため、コントロール rat IgG を固相化したマイクロタイタープレートを用いて検討した。この実験では、プレートに対してビオチン標識抗 rat IgG を結合させて HRP-アビジンと反応を行い、阻害剤存在下における結合への影響を見ている。実験の結果、HRP-アビジンと競合的に結合する AP-アビジンを加えた場合、濃度依存的に HRP-アビジンとビオチンの結合を示す吸光度が減少していた。しかし、tivantinib を用いて同様の実験を行ったところ、アビジンとビオチンの結合を示す吸光度は tivantinib の濃度を 30 μ M にしても変化は見られず、tivantinib がアビジン-ビオチンの結合を阻害しないことが確認できた (Fig2-2A)。Scintillation proximity assay を行ったところ、トリチウムラベルしていない colchicine を加えることで濃度依存的に蛍光強度が減少し、[³H] colchicine と tubulin の結合を阻害するのと同様に、tivantinib を加えた場合も濃度依存的に [³H] colchicine と tubulin の結合を阻害した (Fig2-2B)。一方で、colchicine 部位に結合しない vincristine、vinblastine、crizotinib を加えても [³H] colchicine と tubulin の結合は阻害されなかった。

[³H]vinca alkaloid の tubulin 結合に対する競合阻害実験

更に、DEAE セルロースフィルターを用いて [³H] vinblastine 及び [³H] vincristine と tubulin の結合に対する影響を検討した。この実験系では、tubulin に結合した化合物のみがフィルターに留まることを利用して、tubulin に対する [³H] vinblastine 及び [³H] vincristine の結合数を測定している (Fig2-3A,B)。化合物が vinblastine 部位に結合する場合、[³H] vinblastine がキックアウトされるためフィルターに留まる [³H] vinblastine は減少する (Fig2-3C)。トリチウムラベルしていない vincristine 及び

vinblastine を加えた場合に濃度依存的に蛍光強度が減少し、 $[^3\text{H}]$ vinblastine 及び $[^3\text{H}]$ vincristine の結合を阻害した一方で、tivantinib、colchicine、crizotinib を加えても $[^3\text{H}]$ vinca alkaloid と tubulin の結合に対する阻害は起こらなかった (Fig2-2C,D)。以上の結果から、tivantinib が colchicine と tubulin の結合に影響を与えることが示唆された。

$[^3\text{H}]$ colchicine の tubulin 結合に対する阻害様式の検討

Tivantinib による colchicine と tubulin の結合阻害が競合的か非競合的かを検討するために、tivantinib の濃度を変化させた条件下で、それぞれ tubulin に対する $[^3\text{H}]$ colchicine 結合数の計算上の最大数 Bmax 及び解離定数 Kd 値を非線形回帰分析により求めた。分析の結果、tivantinib の濃度が上昇する毎に Kd 値が上昇した一方で Bmax 値に顕著な変化は見られなかった (Fig2-4)。

これらの結果から、tivantinib が colchicine と競合的に tubulin に結合し、colchicine 部位を介して tubulin と直接的に相互作用することが示唆された。

Paclitaxel や vincristine といった微小管阻害剤は神経軸索や神経細胞を傷害することで末梢神経障害を引き起こすことが知られているにも関わらず、これまでに行なわれた tivantinib の臨床試験からは神経障害が報告されていない。神経障害が報告されていない理由として、tivantinib の tubulin 重合阻害活性が他の阻害剤と比べて弱いことが可能性として考えられる。Colchicine と tubulin の結合に対する tivantinib の結合阻害定数 Ki 値は $9 \mu\text{M}$ であり、この値は colchicine 部位に結合する他の阻害剤で報告されている colchicine の Ki 値 $0.53 \mu\text{M}$ 、colcemid の Ki 値 $4.56 \mu\text{M}$ と比べて高かった [42]。近年欧州で承認された微小管重合阻害剤 vinflunine は tubulin の vinblastine 部位に対する結合能が vinblastine より低いにも関わらず、vinblastine より高い抗腫瘍効果を示し神経障害の発生率も低い [44] [45]。Vinflunine が高い抗腫瘍効果を示す要因として vinblastine との作用機序の違いが考えられており、vinblastine が微小管の伸長速度と短縮速度の両方を減少させるのに対して vinflunine は短縮速度を減少させない。また、vinblastine が tubulin の休止状態を延長させるのに対し、vinflunine は tubulin の伸長状態を延長させる [46]。また、近年乳がんでの使用が承認された微小管重合阻害剤 eribulin は他の阻害剤とは異なる結合様式で tubulin と結合することで微小管阻害を起こすことが知られており、paclitaxel や vincristine と比較して神経障害の割合が少ないとされている [47]。今後より詳細な作用機序を明らかにすることで tivantinib 投与による神経障害の出現が報告されていない理由を解明できるかもしれないが、現段階では tubulin 重合阻害にどのようなメカニズムが関わっているかわかっていないため、更なる研究が必要と考

えられる。Tivantinib が微小管形成に与える影響を詳細に検討する方法として、精製した tubulin を *in vitro* で重合反応させ、顕微鏡観察により tubulin の伸長・短縮を経時的に測定する方法や GFP 融合 α -tubulin を恒常発現させた細胞を用いて微小管の伸長・短縮を観察する方法が考えられる[46] [48]。

コンピュータシミュレーションによる tivantinib と tubulin の結合モデル予測

Tivantinib が tubulin に結合することが示唆されたため、京都大学の奥野教授との共同研究により tivantinib と tubulin の結合モデルについてコンピュータを用いたシミュレーション解析を行った。シミュレーションは GOLD docking program で行い、解析に用いる colchicine と tubulin の結晶構造モデルは Ravelli et al により報告されたものを使用した(Fig2-5A) [33]。最初に GOLD プログラムを用いたシミュレーションの信頼性を確かめるために、colchicine と tubulin の結合モデル予測を行った。結晶構造中の colchicine を一度コンピュータ上で引き抜き、その後 colchicine を再び結合させた(Fig2-5B)。最も確からしいと判定された結合モデルはオリジナルの結晶構造に酷似しており、GOLD プログラムによるシミュレーションの信頼性が確認できた。次に、colchicine を一度コンピュータ上で引き抜き、その後 tivantinib を結合させることで tivantinib と tubulin の結合モデル予測を行った(Fig2-5B,C)。シミュレーションの結果確からしいと判定された上位 50 の結合モデルは 10 の集団に分類することができ、最も確からしいと判定された結合モデルでは tivantinib が colchicine とほとんど重なるような位置に、立体障害なしで配置された(Fig2-5D,2-6)。シミュレーション解析の結果、tivantinib は colchicine 結合部位を介して tubulin に対して直接的に結合することが示唆された。しかし、結合モデル予測の基にした Ravelli et al による結晶構造は解像度が低いため、予測された tivantinib と tubulin の結合モデルの精度には不確実な部分がある。2015 年に Wang et al から tivantinib と tubulin の共結晶構造が報告され、我々の行った競合阻害実験及びシミュレーション解析から導いた tivantinib が tubulin に直接結合するという予測は正しかったことが確認された[49]。報告された結晶構造はシミュレーション予測した結合モデルと類似して tivantinib の結合位置はほとんど同じだったが、tivantinib の向きが予測した結合モデルから 180° 回転した状態になっていた。前述した解像度の低さに加え、GOLD プログラムではタンパク質の運動性を考慮していないため、予測モデルと実際の結晶構造が一致しなかったと考えられる。Tivantinib が 180° 回転していないモデルを作製することも可能であるが、その場合は想定された結合部位に結合させるという意図的な操作が入ってしまうためにシミュレーションとして不適と考えた。本実験では、tivantinib が tubulin に結合するかどうかはわかっていない状態から実際の結晶構造に類似した

結合モデルの予測を行うことができたが、より正確なモデルを得るためには X 線結晶構造解析が必要となる。

微小管阻害剤耐性細胞株に対する tivantinib の増殖阻害活性

以前の研究において、tivantinib の分子標的予測をするために JFCR-39 を用いた COMPARE 解析を行った際に、HCT-15 細胞に対する感受性が tivantinib と vincristine で大きく異なる事を発見した(Fig0-3A)。HCT-15 は ABC トランスポーターである MDR1 (ABCB1)の過剰発現により耐性化することが報告されていることから、tivantinib が ABC トランスポーターを介した薬剤耐性を克服できる可能性が考えられた[50]。微小管を標的とした阻害剤は様々な腫瘍で化学療法に使用されているが、耐性を獲得した腫瘍が出現することが大きな障害である。微小管阻害剤に対する獲得耐性機構の一つとして、ABC トランスポータータンパク質 MDR1 の過剰発現が様々な腫瘍で確認されている。ABC トランスポータータンパク質は ATP を利用して基質を排出する膜輸送タンパク質であり、ヒトにおいては 50 種類近い遺伝子が同定されているタンパク質ファミリーである。ABC トランスポーターは配列の類似性やドメイン構造から更に ABCA から ABCG の 7 つのサブファミリーに分類されており、MDR1 は ABCB1、BCRP は ABCG2、MRP1 は ABCC1 としても知られている[51]。MDR1 は 12 個の膜貫通領域と 2 つの ATP 結合部位を持ち、主に中性もしくは陽イオン性の化合物を基質として ATP 依存的に細胞外に排出することで細胞内の薬剤濃度を低下させ、耐性に寄与する[52]。MDR1 は colchicine、taxol、vincristine、docetaxel、etoposide、adriamycin など、微小管阻害剤を含めた広範な薬剤を基質としている。

Tivantinib が微小管阻害剤耐性を克服できるか検討するため、微小管阻害剤存在下で長期培養することで薬剤耐性を獲得した K562/VCR 及び CEM/VBL 細胞を用いた[35] [36]。K562/VCR 細胞は K562 が vincristine に対して耐性を獲得したクローン、CEM/VBL は CEM 細胞が vinblastine に対して耐性を獲得したクローンで、耐性株は共に MDR1 を過剰発現している(Fig2-7A)。これらの細胞株の薬剤感受性を検討したところ、CEM/VBL の IC₅₀ 値は親株 CEM と比較して vincristine、vinblastine、colchicine に対してそれぞれ約 1100 倍、約 4800 倍、約 5.6 倍、K562/VCR の IC₅₀ 値は親株 K562 と比較して vincristine、vinblastine、colchicine に対してそれぞれ約 300 倍、約 4600 倍、約 3.7 倍と耐性を示した(Fig2-7B,C)。一方で tivantinib に対する IC₅₀ 値は CEM/VBL で親株の約 1.1 倍、K562/VCR で親株の 0.8 倍であり、親株と同程度の薬剤感受性を示した。

ABC トランスポーター発現細胞に対する tivantinib の増殖阻害活性

Tivantinib の感受性と ABC トランスポーターの関係を更に検討するため、薬剤耐性との関連が明らかにされている ABC トランスポーターMDR1、MRP1 (ABCC1)、BCRP (ABCG2) 遺伝子を導入した KB3-1 細胞に対する増殖阻害活性を調べた (Fig2-8A) [53]。MRP1 は MDR1 と基本的な構造が似ているが膜貫通領域を 17 個持ち、主に中性もしくは陰イオン性の化合物を基質として認識する[54]。また、BCRP は 6 個の膜貫通領域と 1 つの ATP 結合部位を持ち、二量体を形成することで機能する[55]。増殖阻害活性を検討した結果、KB3-1 細胞は MDR1 発現により vincristine 及び adriamycin に対し、BCRP 発現により SN-38 に対し、MRP1 発現により adriamycin 及び vincristine に対して耐性を獲得した (Fig2-8B,C)。しかし、いずれの ABC トランスポーター発現細胞に対しても tivantinib は親株と同程度の濃度で増殖阻害活性を示した。

Tivantinib による MDR1 トランスポーター阻害の検討

ABC トランスポーターは広範な基質を認識する一方で verapamil、quinidine、tamoxifen 等により活性が阻害されることが知られていることから、tivantinib が ABC トランスポーターの排出を阻害している可能性が考えられた。MDR1 阻害剤である MS209、verapamil 及び tivantinib 処理後に MDR1 の基質である蛍光色素 Rhodamine 123 を投与し、排出に与える影響を検討した。MS209、verapamil で処理した場合は Rhodamine 123 排出が阻害されていた一方で tivantinib では Rhodamine 123 排出に影響が見られず、tivantinib が MDR1 による基質の排出を阻害していないことが明らかになった (Fig2-9)。また、ABC トランスポーターの発現自体を阻害している可能性も考えられたが、Western Blot の結果からは tivantinib 処理後の細胞でも ABC トランスポーターの発現に減少が見られなかった (Fig2-10)。これらの結果から、tivantinib はトランスポーターの基質にならないため ABC トランスポーターを介した薬剤耐性の影響を受けないと考えられる。MDR1 は colchicine、vincristine、vinblastine、paclitaxel など多くの微小管阻害剤を基質にするが、E7010 のように基質にならない微小管阻害剤も報告されている[56]。ただし、tivantinib が ABC トランスポーターMDR1、MRP1、BCRP による排出を受けないことは間接的に示されたが、直接的には証明されていない。例えば³H]tivantinib を合成して細胞内での蓄積を見る方法、LC/MS を利用して tivantinib の定量分析をする方法等が考えられる[57] [58]。

ABC トランスポーター発現細胞に対するアポトーシス誘導の検討

Tivantinib の増殖阻害活性について更に検討するため、アポトーシスのマーカーである cleaved-PARP を Western Blot 法で検出した。生存細胞アッセイの結果と同様に KB3-1 MDR1、KB3-1 BCRP、KB3-1 MRP1 いずれの ABC トランスポーター発現細胞でも tivantinib 処理時に親株と同程度の cleaved-PARP が検出され、アポトーシスが誘導されていることが確認された(Fig2-10)。また、KB3-1 MDR1 及び KB3-1 MRP1 が vincristine 処理時に、KB3-1 BCRP が SN-38 処理時に、KB3-1 MRP1 が adriamycin 処理時にそれぞれ cleaved-PARP が減少しており、生存細胞アッセイで耐性を示した細胞ではアポトーシス誘導が抑制されていることが確認された。

アポトーシス細胞のみに Annexin V が結合できることを利用して、フローサイトメトリーでアポトーシス誘導を検討した(Fig2-11A)。Western Blot 法の結果と同様に、tivantinib はいずれの ABC トランスポーター発現細胞に対しても親株と同程度のアポトーシス誘導を示した(Fig2-11B)。一方で Vincristine 処理時には Western Blot 法の結果と異なり、KB3-1 MDR1 で 20 %程度の細胞がアポトーシス誘導を示したのに対して KB3-1 MRP1 で 50 %以上の細胞がアポトーシス誘導を起こしていた。Vincristine の濃度が 30 nM 前後の時に KB3-1 MDR1 と KB3-1 MRP1 で感受性が大きく異なることが生存細胞アッセイの結果からわかっている(Fig2-8B)。SN-38 及び adriamycin は自家蛍光を発することが原因で Annexin V を用いた実験系ではアポトーシス細胞の検出が困難なため、DNA の断片化を示す sub-G1 期にある細胞の割合を測定した。Western Blot 法の結果と一致して、SN-38 処理時は KB3-1 BCRP で、adriamycin 処理時は KB3-1 MRP1 で sub-G1 期にある細胞の割合が大きく減少しており、アポトーシス誘導が抑制されていることが確認できた(Fig2-11B)。これらの結果から、tivantinib は ABC トランスポーターを介した薬剤耐性の影響を受けず、ABC トランスポーター過剰発現による耐性を克服できることが示唆された。

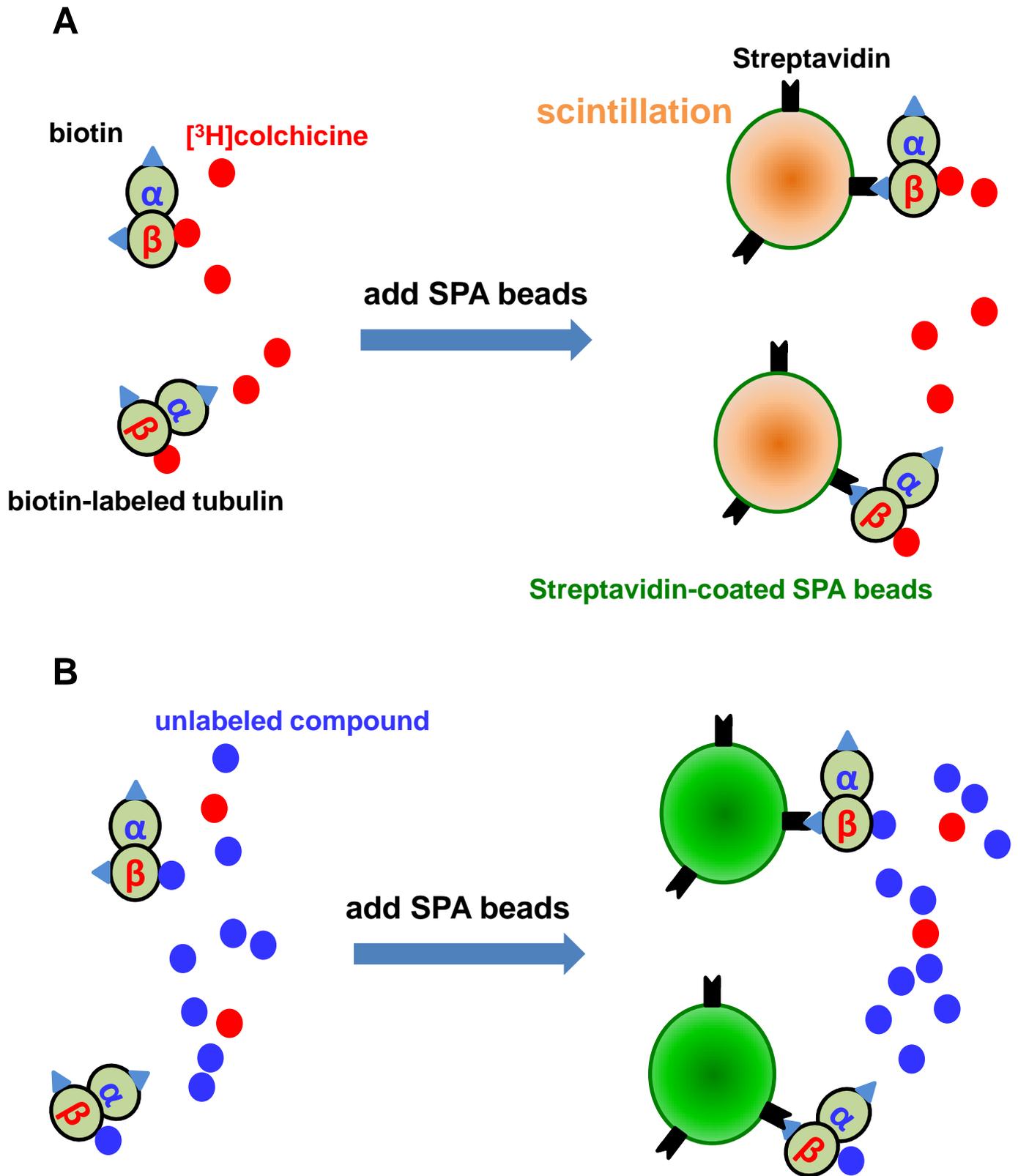


Fig.2-1 Scintillation proximity assayの概略

(A) $[^3\text{H}]$ colchicineが結合したtubulinはストレプトアビジンを通じてSPAビーズに結合する。SPAビーズが $[^3\text{H}]$ colchicineから発するβ線に反応し、蛍光を発する。

(B) unlabeled compoundがcolchicine部位に結合する場合、unlabeled compoundに妨げられて $[^3\text{H}]$ colchicineがtubulinに結合する量が減少する。tubulinに結合していない時、 $[^3\text{H}]$ colchicineから発するβ線はSPAビーズに到達しないためSPAビーズは蛍光を発しない。

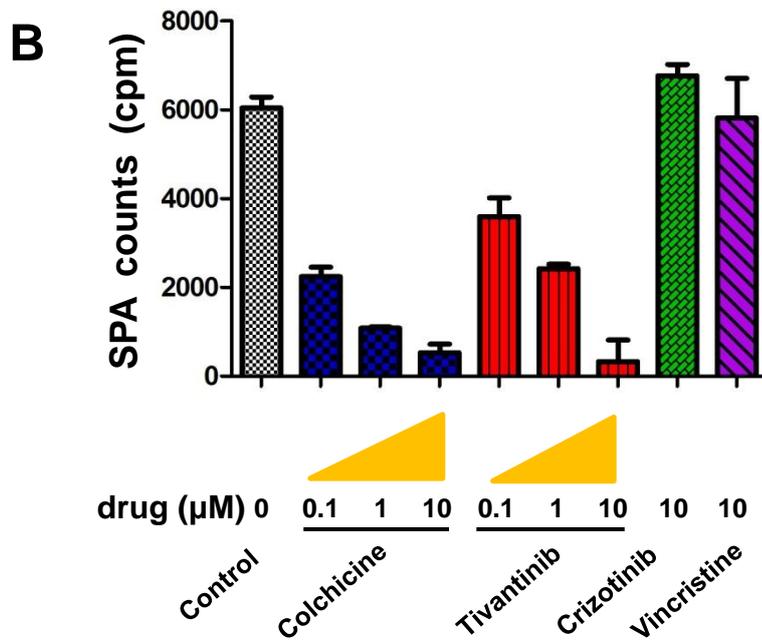
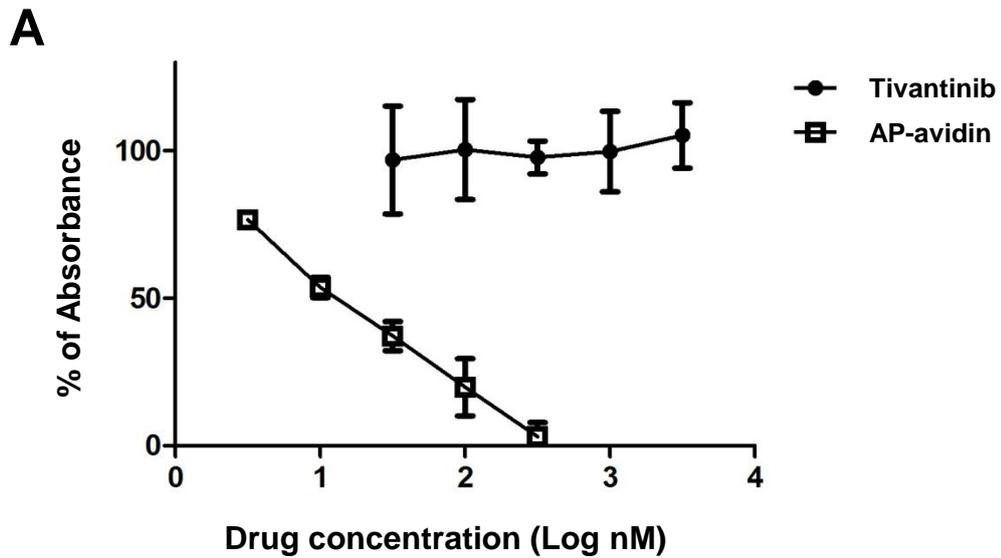


Fig.2-2 $[^3\text{H}]$ 微小管阻害剤とtubulinの結合に対する阻害実験

(A) 図示した濃度のdrug存在下でアビジン-ビオチン結合反応を行った。結合したアビジンの量をELISA法を用いて定量し、controlに対する吸光度の割合を計算した。

実験はquadruplicateで行い、エラーバーはSDを示す。

(B) ビオチン標識tubulinと0.3 μM $[^3\text{H}]$ colchicine及び図示した濃度の阻害剤をそれぞれ37°C 2 hr 反応後、ビオチン標識tubulinに結合した $[^3\text{H}]$ colchicine数をSPA法を用いて計測した。

実験はtriplicateで行い、エラーバーはSDを示す。

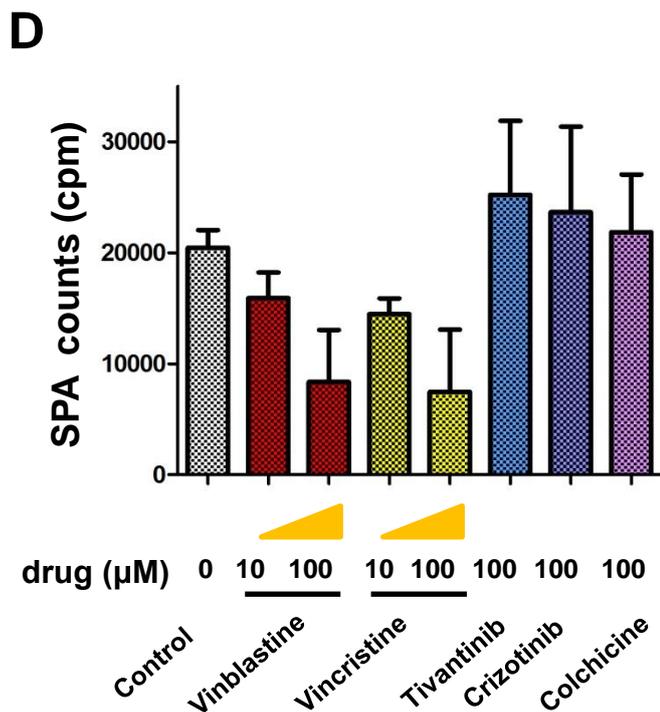
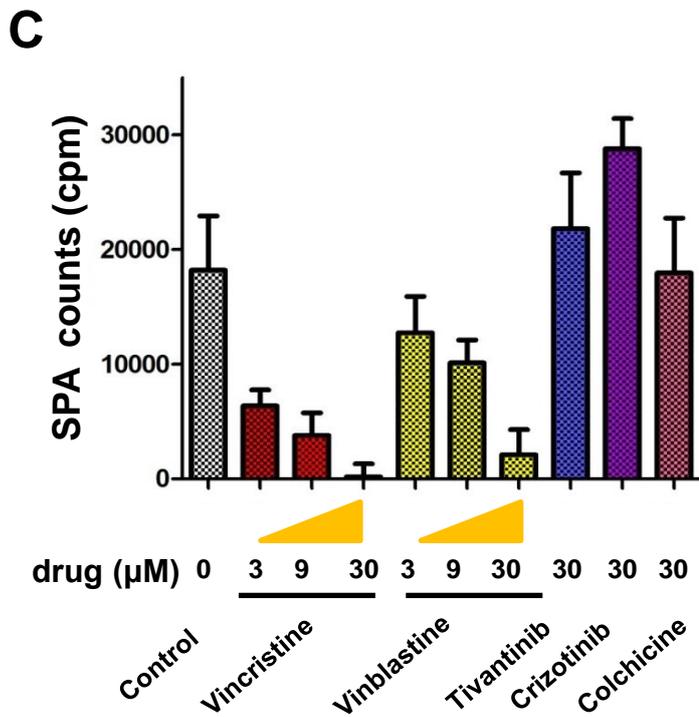


Fig.2-2 $[^3\text{H}]$ 微小管阻害剤とtubulinの結合に対する阻害実験

(C)(D) 精製tubulinと(B)0.3 μM $[^3\text{H}]$ vincristine (C) 1 μM $[^3\text{H}]$ vinblastine及び図示した濃度の阻害剤をそれぞれ37°C 2 hr 反応し、反応液をDEAEセルロースフィルターに通した。DEAEセルロースフィルターにトラップされた(B) $[^3\text{H}]$ vincristine (C) $[^3\text{H}]$ vinblastineを液体シンチレーションカウンターを用いて計測した。実験はtriplicateで行い、エラーバーはSDを示す。

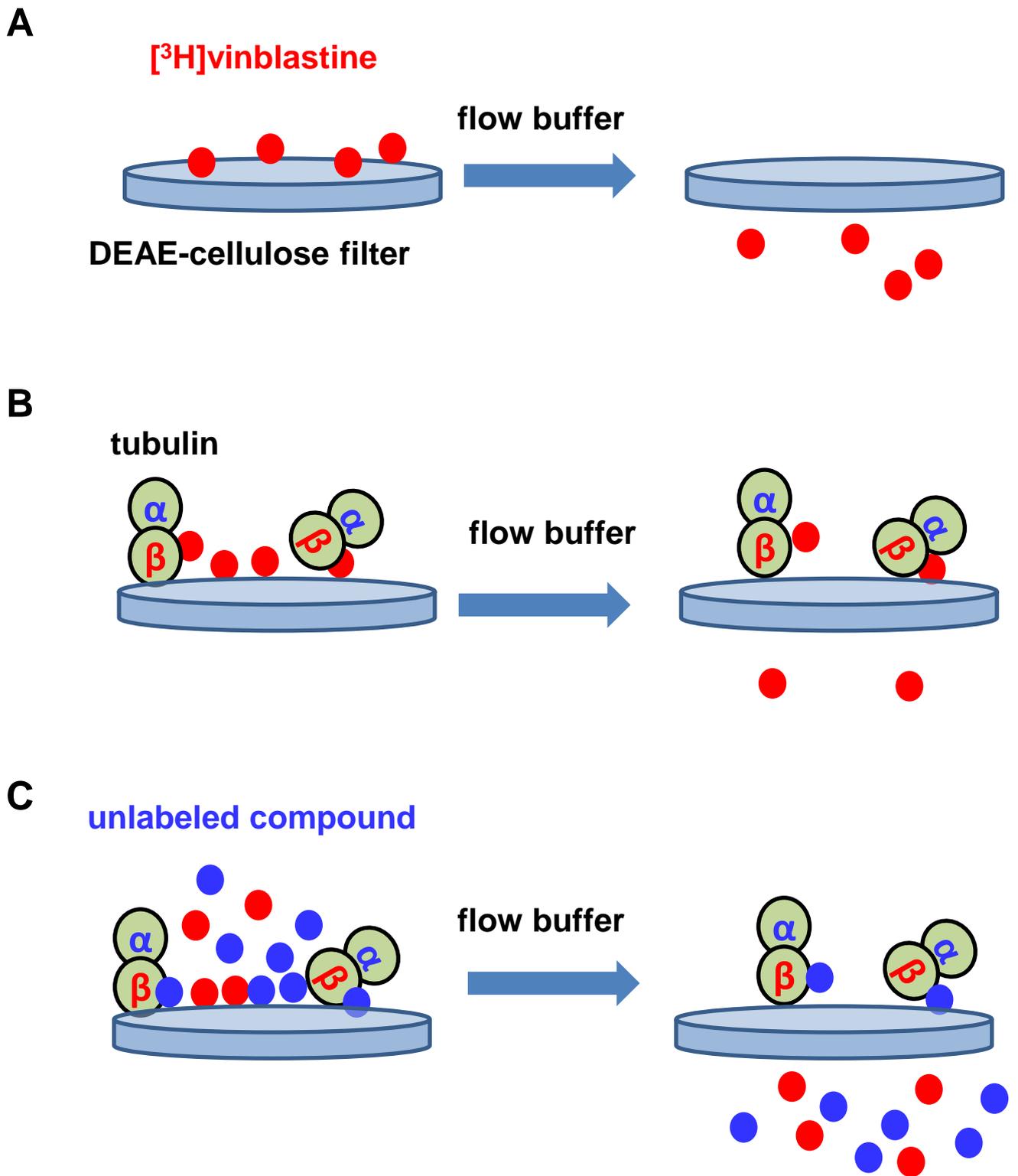
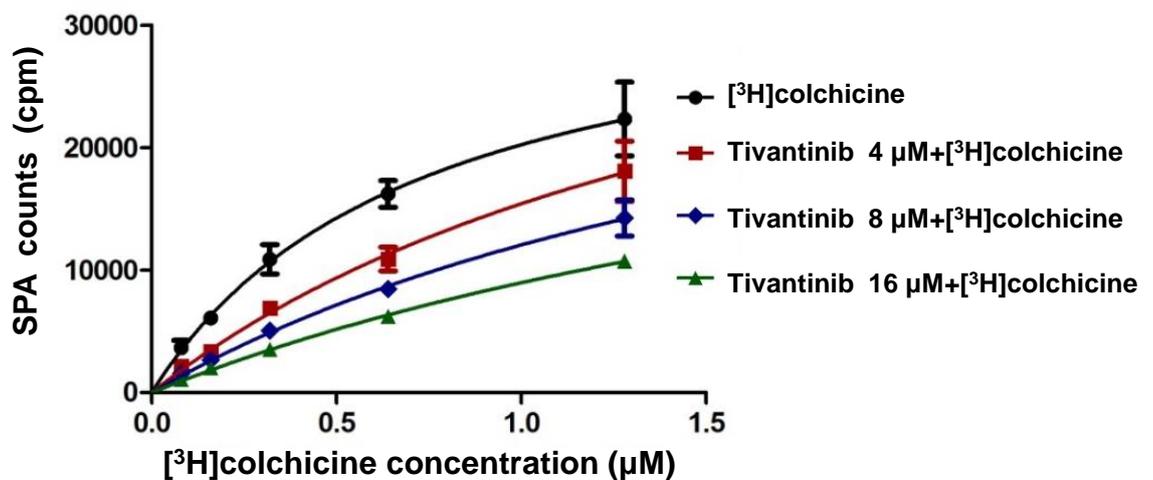


Fig.2-3 DEAEフィルターを用いたシンチレーションアッセイの概略

(A) [³H]vinblastine単独の場合、 [³H]vinblastineがDEAEセルロースフィルターを通り抜けてしまうのでDEAEセルロースフィルター上にトラップされない。

(B)tubulinはDEAEセルロースフィルターを通り抜けられないため、tubulinに結合した [³H]vinblastineはDEAEセルロースフィルター上にトラップされる。

(C)unlabeled compoundがvinblastine部位に結合する場合、 unlabeled compoundに妨げられて [³H]vinblastineがtubulinに結合する量が減少し、トラップされる量も減少する。



	[³ H]colchicine	Tivantinib 4 μM + [³ H]colchicine	Tivantinib 8 μM + [³ H]colchicine	Tivantinib 16 μM + [³ H]colchicine
Bmax	34944	43633	38469	34202
Kd	0.726	1.828	2.189	2.81

Fig.2-4 Colchicineとtubulin結合に対するtivantinibの阻害様式の検討

ビオチン標識tubulinと各種濃度の³H]colchicine(0.08, 0.16, 0.32, 0.64, and 1.28 μM) を図示した濃度のtivantinibでそれぞれ37°C 2 hr 反応後、ビオチン標識tubulinに結合した³H]colchicine数をSPA法を用いて計測した。実験はtriplicateで行い、エラーバーはSDを示す。

結果を基に非線形回帰分析によりKd値とBmax値を求めた。

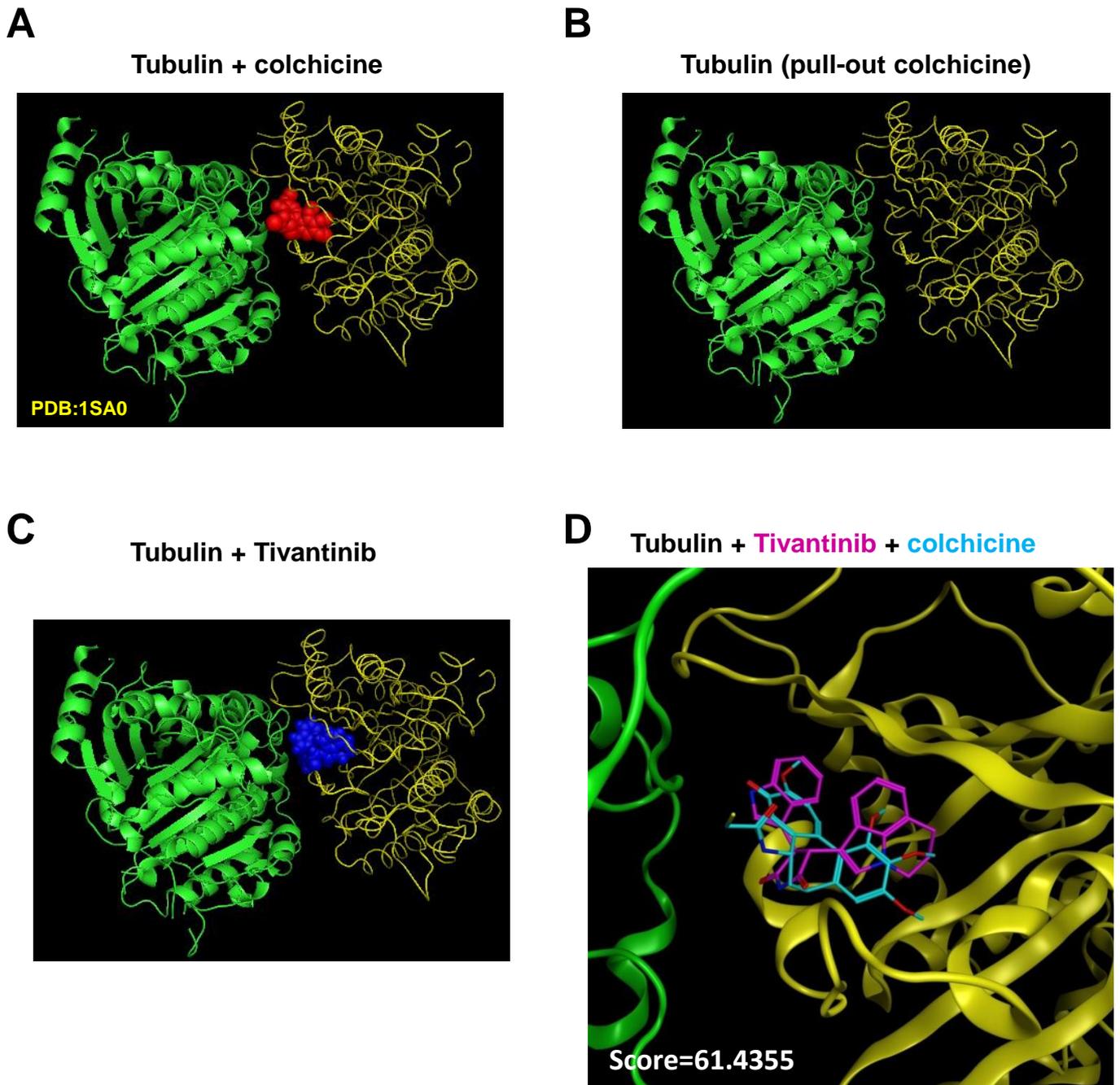


Fig.2-5 コンピュータシミュレーションによるtivantinibとtubulinの結合モデル

(A) Ravelli et alにより報告された結晶構造を基にしたtubulinとcolchicineの結晶構造モデル。
 (B) Tubulinとcolchicineの結晶構造モデルからcolchicineを引き抜いたもの。
 (C) GOLD dockingソフトウェアを用いて結晶構造モデルからcolchicineを取り除き、tivantinibを結合させたモデル。
 (D) 予測された中で最もScoreが高かったtivantinibの結晶構造モデル(赤紫)をcolchicineの結晶構造モデル(水色)と重ねあわせたもの。図中の数字はGOLD scoreを示す。全ての結晶構造モデルはPyMOLを用いて描画した。

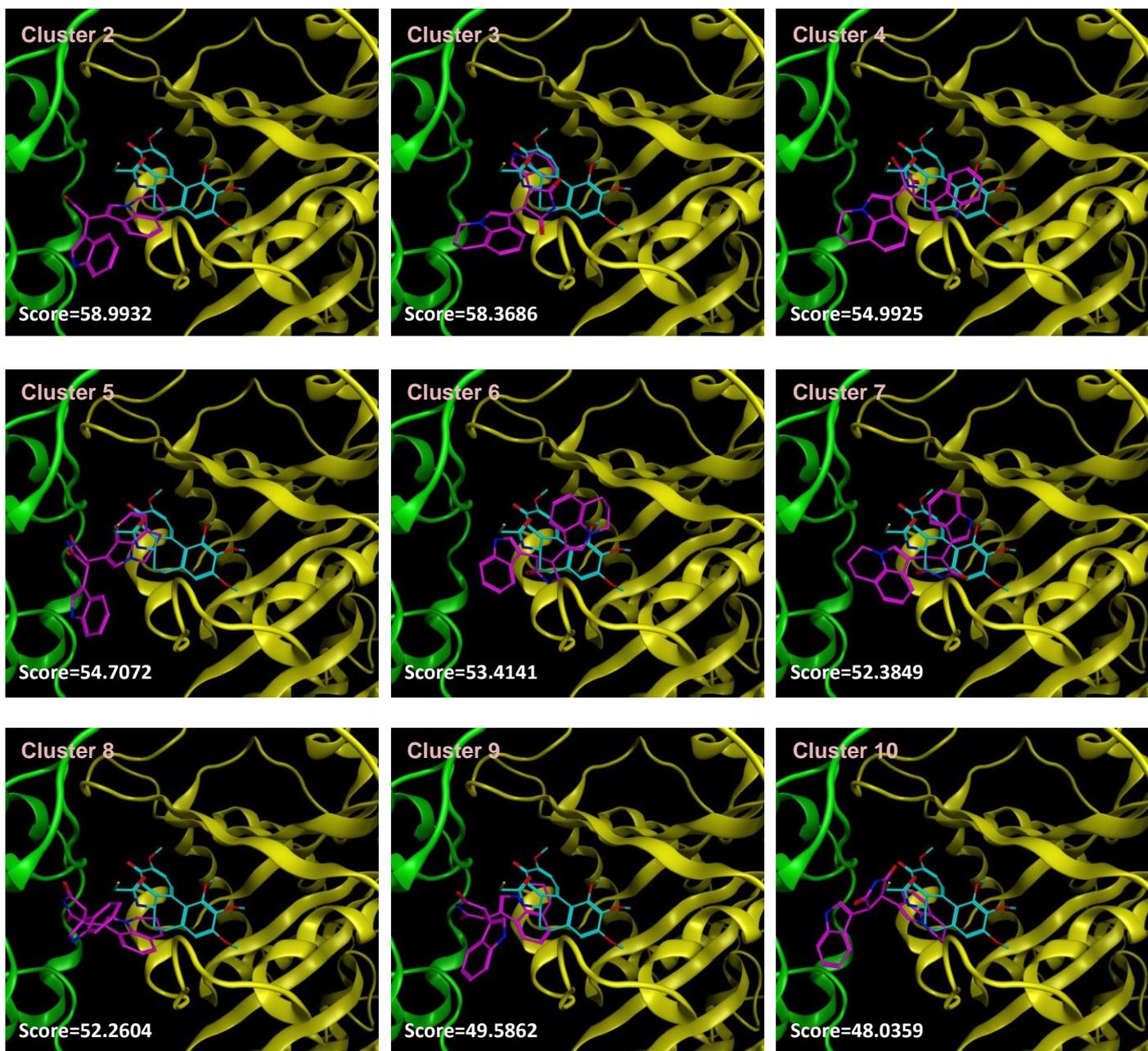
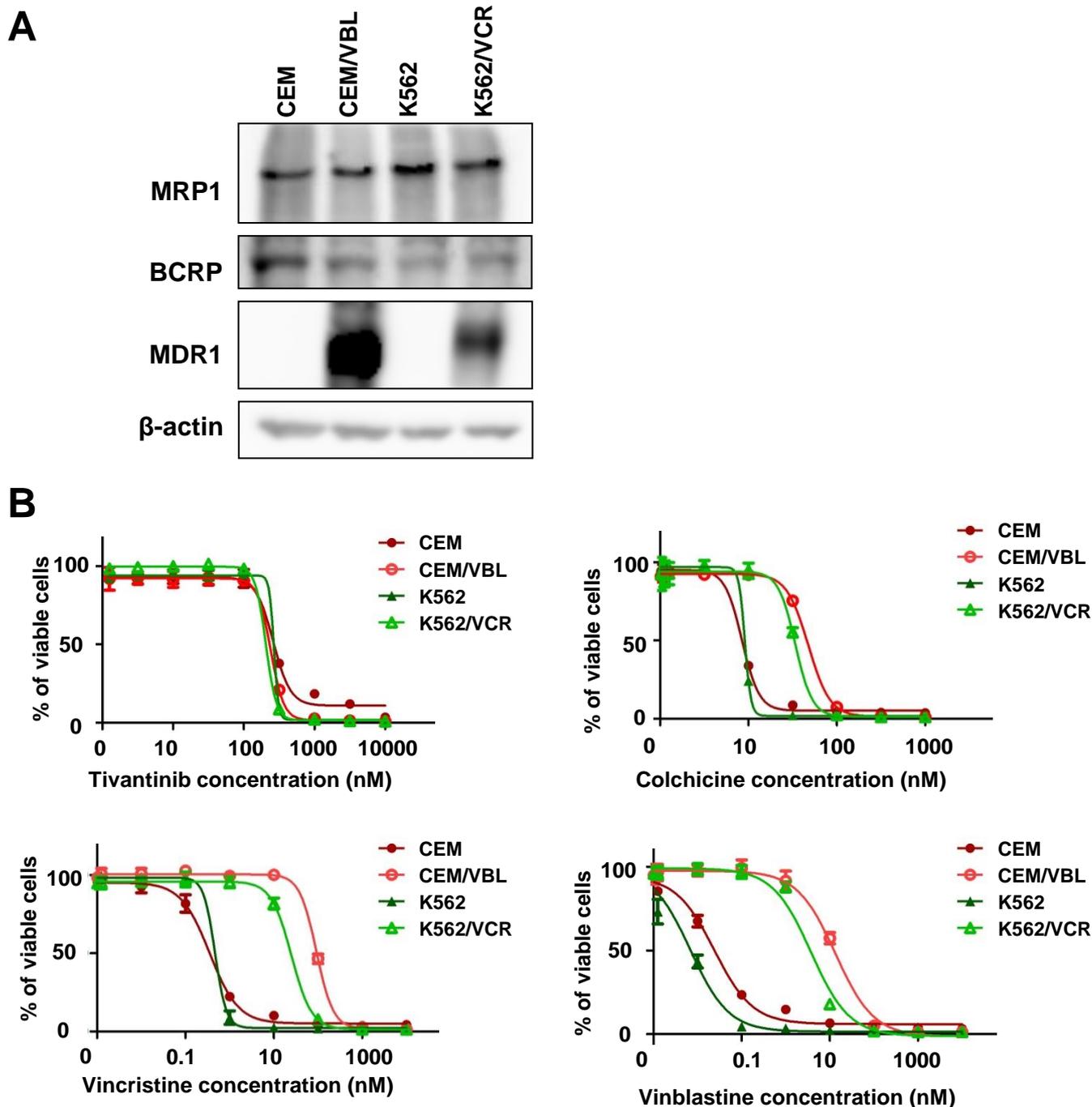


Fig2-6 コンピュータシミュレーションによるtivantinibとtubulinの結合モデル

GOLD scoreの高かった上位50の結合モデルを10のクラスタに分類し、それぞれのクラスタから代表的なtivantinibとtubulinの結合モデルを示した。最もGOLD scoreの高かったクラスタ1についてはFig3-3に使用したため、残り9のクラスタを示している。

全ての結晶構造モデルはPyMOLを用いて描画した



C

Cell Line	IC ₅₀ value (nM)		IC ₅₀ value (pM)	
	Tivantinib	Colchicine	Vincristine	Vinblastine
CEM	239.4	8.5	426.5	14.5
CEM/VBL	260.8	47.6	483668.0	69630.0
K562	268.9	9.2	248.7	4.4
K562/VCR	205.1	34.0	72204.0	20409.0

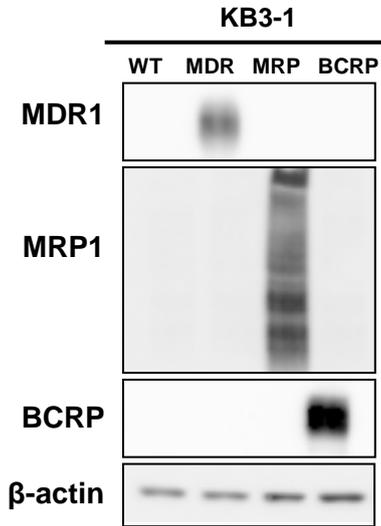
Fig.2-7 微小管阻害剤耐性株に対するtivantinibの増殖阻害活性

(A)通常培養条件下で細胞を回収し、ウェスタンブロットを行った。CEM/VBL、K562/VCRはそれぞれCEM、K562から樹立された微小管阻害剤耐性細胞株である。

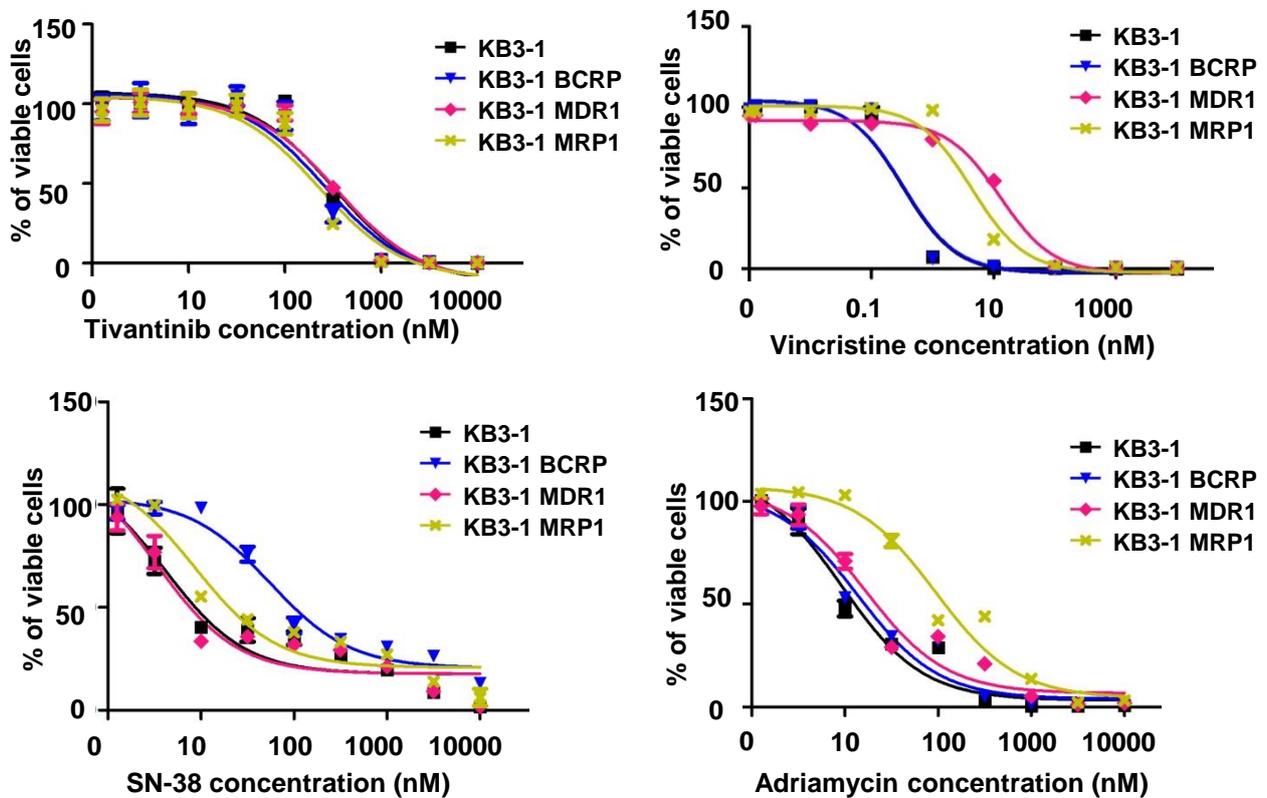
(B)図示した濃度の薬剤存在下で培養し、72 hr培養後の生存細胞数を調べた。実験はtriplicateで行い、エラーバーはSDを示す。

(C)(B)で行った実験から求めたIC₅₀値を表にまとめた。

A



B



C

Cell Line	IC ₅₀ value (nM)			
	Tivantinib	Vincristine	SN-38	Adriamycin
KB3-1	319.3	0.325	4.1	6.315
KB3-1 BCRP	263	0.333	55.23	8.57
KB3-1 MDR1	343.6	12.767	3.311	16.6
KB3-1 MRP1	304.8	4.441	8.729	94.31

Fig.2-8 ABCトランスポーター発現細胞に対するtivantinibの感受性

(A)通常培養条件下で細胞を回収し、ウェスタンブロットを行った。KB3-1/MDR1、/BCRP、/MRP1はそれぞれMDR1、BCRPP、MRP1の遺伝子をそれぞれ導入した細胞株である。
 (B)図示した濃度の薬剤存在下で培養し、72 hr培養後の生存細胞数を調べた。実験はtriplicateで行い、エラーバーはSDを示す。
 (C)(B)で行った実験から求めたIC₅₀値を表にまとめた。

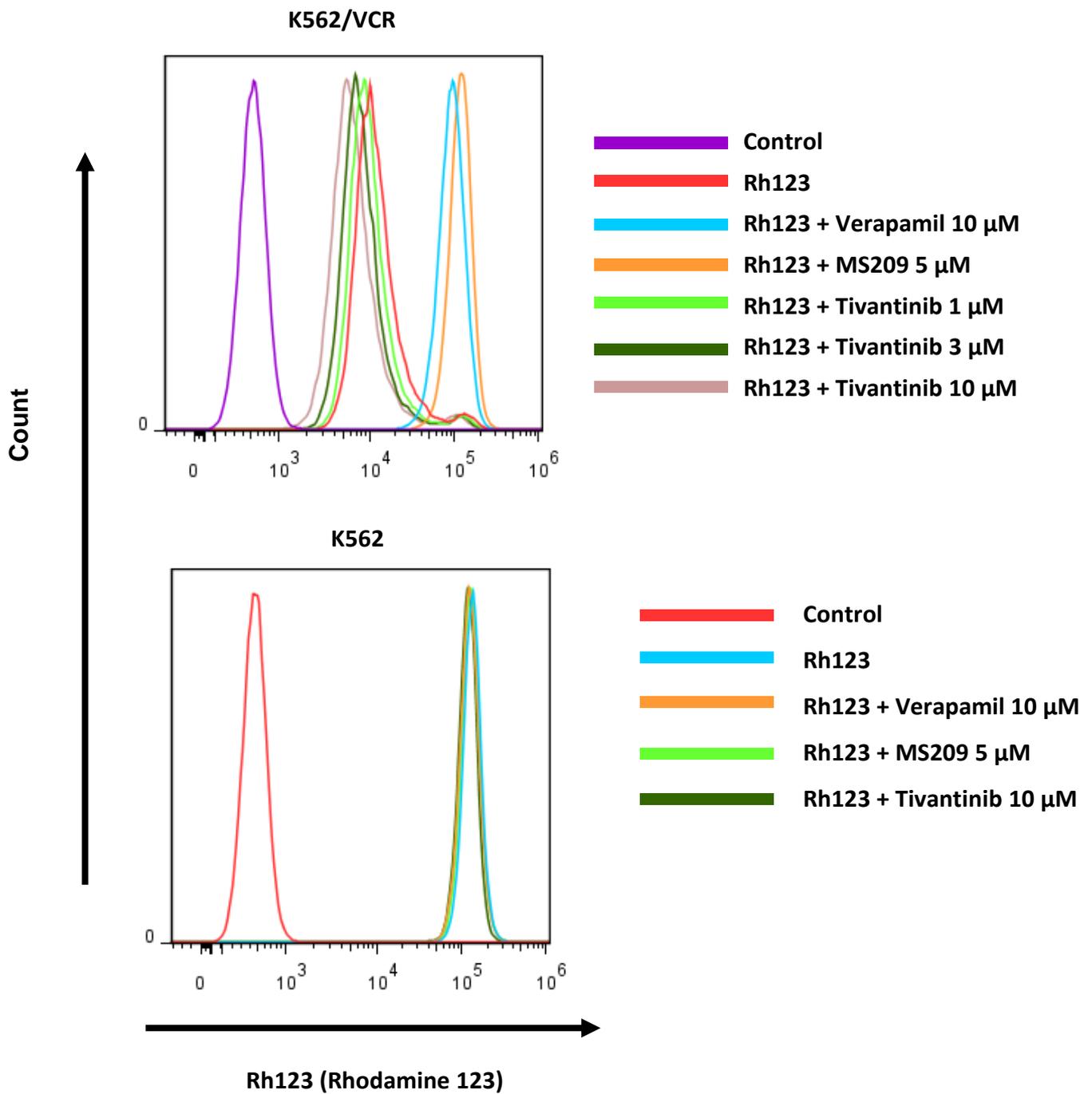


Fig.2-9 TivantinibによるMDR1トランスポーター阻害の検討

K562及びK562/VCRを図示した濃度のtivantinib、Verapamil、MS209で15 min処理後にRhodamine 123を最終濃度5 μM で投与し、フローサイトメーターを用いて蛍光を測定した。

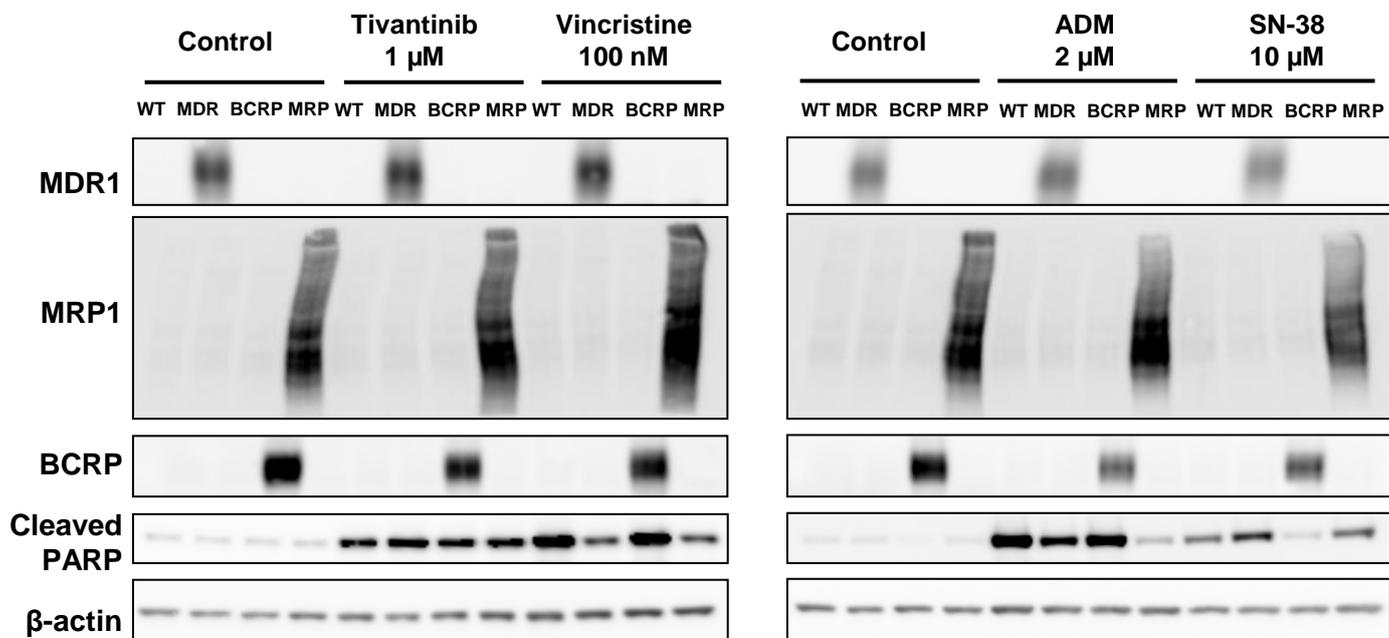


Fig.2-10 ABCトランスポーター発現細胞に対するtivantinibのアポトーシス誘導の検討

図示した濃度の薬剤存在下で細胞を培養した。72 hr後/細胞を回収し、ウェスタンブロットを行った。

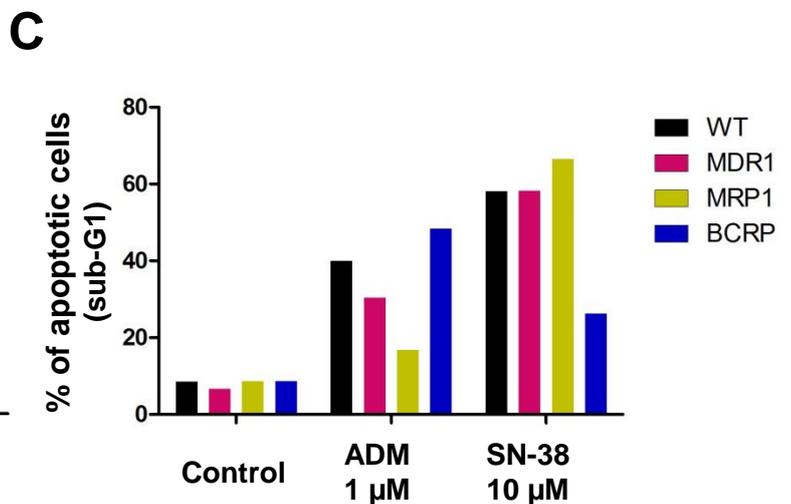
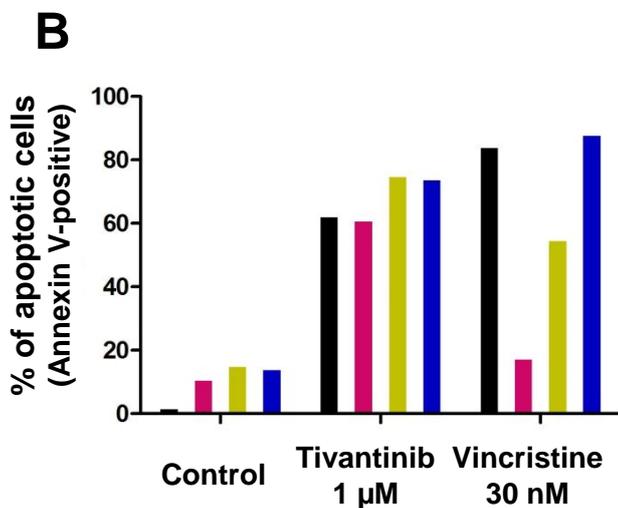
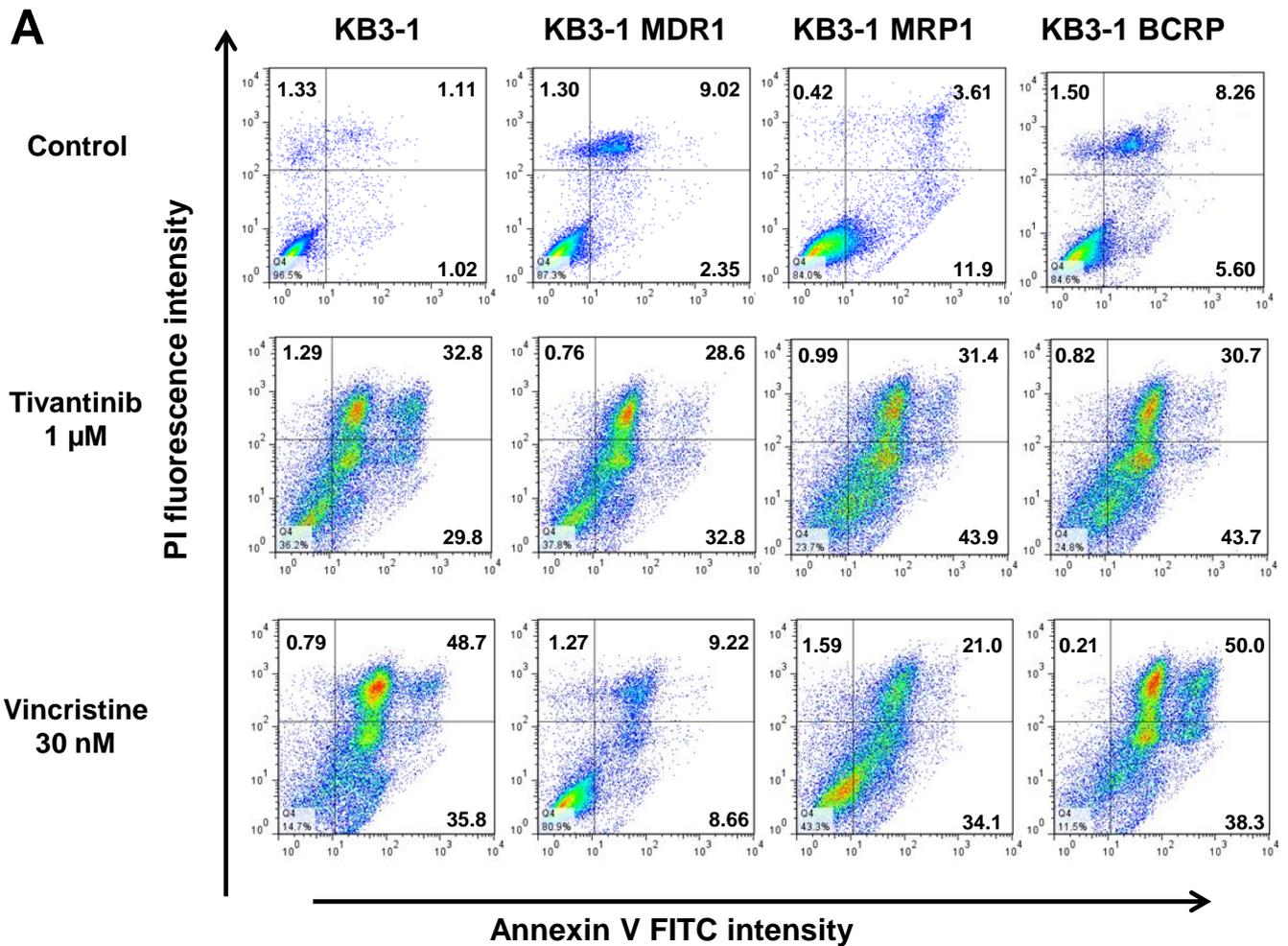


Fig.2-11 ABCトランスポーター発現細胞に対するtivantinibのアポトーシス誘導の検討

(A) 図示した濃度のtivantinib及びvincristine存在下で細胞を培養した。72 hr後細胞を回収し、FITC labeled Annexin-V と PIで染色し、フローサイトメーターを用いてアポトーシスアッセイを行った。

(B) (A)の結果からアポトーシスした細胞の割合を求め、グラフにした。

(C) 図示した濃度のADM及びSN-38存在下で細胞を培養した。72 hr後細胞を回収し、PI染色後フローサイトメーター細胞周期を測定し、sub-G1期にある細胞の割合を求めた。

3章 Tivantinib を用いた新たながん治療戦略

<目的>

Tivantinib は現在、大腸がんを対象とした臨床試験も行われている。大腸がんでは *KRAS* 変異が約 3 割存在すると知られているが、*KRAS* を標的とした有効な分子標的治療薬は未だ開発されていない。そのため、*KRAS* 変異の大腸がんに対する治療戦略は現状では限られている。Tivantinib が微小管を標的とすることから、*KRAS* 変異の大腸がんにも増殖阻害活性を示す可能性が考えられた。

そこでがん研究会有明病院の大腸がん手術検体のうち、患者さんの同意を得られたものについて、生検あるいは手術検体といった臨床検体から細胞株の樹立を行い、*KRAS* 変異の有無による感受性の比較を行なった。

<実験方法>

細胞培養

3章で用いた大腸がん臨床検体由来の細胞株は全て ESC+Y medium [1xSTEMPRO hESF SFM (Invitrogen)、1.8% BSA (Invitrogen)、8 ng/ml bFGF (BPS Biosciences)、0.1 mM 2-メルカプトエタノール、10 μM Y-27632 (LC Laboratories) in DMEM/F-12 + GlutaMAX (Invitrogen)] で培養した。いずれの細胞も、加湿式 CO₂ インキュベーター内で 37°C、5% CO₂ の条件下で培養する。

臨床検体からの細胞株樹立

本実験はがん研究会の IRB (治験倫理審査委員会) から承認を得たプロトコルに基づいて、大腸外科長山医師との共同研究により、患者さんから同意を得られた検体を用いて行った。進行度の高い腫瘍及び若年者由来の腫瘍を優先的に選択し、大腸がん外科手術後の切除検体を受け取る。受け取った切除検体は速やかに RP/F12 medium [RPMI-1640 : F-12 (ナカライテスク) = 1:1、FBS 15%] に入れ、氷中保存して運搬する。頂いた臨床検体及び腫瘍ではない正常組織をハサミで細断し、一部を後のシーケンス解析用に -80°C で保存する。腫瘍を更に細断し、Antibiotic - Antimycotic Mixed Stock Solution (ナカライテスク) を二倍量加えた PBS (AA-PBS) で洗浄する。洗浄後、

Collagenase/Dispase 及び DNase I を希釈した medium を加え、37°Cのウォーターバスで 1 hr 反応させる。反応後、AA-PBS を加えて 10 回洗浄する。洗浄後、40 µm のセルストレーナーで反応後の腫瘍を分離し、EBC lysis Buffer で溶血する。溶血反応後、細胞を AA-PBS で洗浄し、大腸がん臨床検体由来の細胞培養が報告されている ESC+Y medium を用いて培養する[59]。臨床検体は JC(Japanese foundation for cancer research Colon cancer)-臨床検体を頂いた順番、として名前を付けた。

臨床検体からの DNA 及び RNA の抽出

細胞株樹立の際に-80°C保存した臨床検体片を使用する。作業中は臨床検体を作業中ドライアイス中に静置し、使用する剃刀及びディッシュもドライアイスで冷却したものを使用する。臨床検体片を 10 cm ディッシュに取り出し、剃刀で DNA 及び RNA 抽出に必要な組織を切り出す。切断後、RNA 抽出用の腫瘍を RNeasy kit (QIAGEN)、DNA 抽出用の腫瘍を DNeasy Blood & Tissue Kits (QIAGEN)を用いて処理し、それぞれ RNA 及び DNA を抽出する。腫瘍のホモジナイズにはエッペンドルフチューブ用ホモジナイザーを使用する。

SNaPshot シークエンス

以下のプロトコルは 2010 年に Dias-santagata et al から報告された方法を基にした[60]。

(標的とする塩基配列近傍の PCR)

臨床検体由来の DNA 及び control 用の normal female DNA (Promega)を調製し、AmpliTaq PCR (Applied Biosystems)と混合して MicroAmp Optical 96 well Reaction Plate (Applied Biosystems)に分注する。Multiplex PCR primer I -IX (IDT) を MicroAmp Optical 96 well Reaction Plate に加え、PCR 反応を行う。PCR 反応後、Exonuclease I (タカラバイオ)及び Shrimp Alkaline Phosphatase (タカラバイオ)を添加して 37°C 1 hr、75°C 15 min 反応させる。

(一塩基伸長)

SNaPshot Multiplex Ready Reaction Mix を MicroAmp Optical 96 well Reaction Plate に分注し、Extension primer I -IX (IDT)をそれぞれ添加する。MicroAmp Optical 96 well Reaction Plate に(標的とする塩基配列近傍の PCR)の反応産物を添加し、Extension PCR を行う。Extension PCR 後、Shrimp Alkaline Phosphatase をそれぞれの well に添加し、37°C 1 hr、75°C 15 min 反応させる。

(シークエンス)

Hi-Di Formamide (Applied Biosystems) 及び GeneScan 120LIZ (Applied

Biosystems)を調製し、MicroAmp Optical 96 well Reaction Plate に分注する。MicroAmp Optical 96 well Reaction Plate に(一塩基伸長)の反応産物を加え、3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems)を用いてシーケンス解析する。

臨床検体の APC 変異解析

臨床検体から抽出した total RNA から Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche)を用いて cDNA を合成する。合成した cDNA から nested PCR を行い、APC の塩基配列部分を増幅する。PCR 反応液を 1%アガロースゲルで電気泳動して、目的のバンドを確認する。アガロースゲルから目的のバンドを切り出し、GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE healthcare)を用いて PCR 産物を精製する。BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems)を調製し、MicroAmp Optical 96 well Reaction Plate に分注する。PCR 産物を添加し、サイクルシーケンスを行う。3130xl Genetic Analyzer を用いてシーケンス解析する。使用したプライマーを以下に示す。

nested PCR 用プライマー 1st	
APC-PCR-F1	CCAAGGGTAGCCAAGGATGG
APC-PCR-R1	GCTGATTGTTGGTTGGAGGT
nested PCR 用プライマー 2nd	
APC-PCR-F2	AGGATGGCTGCAGCTTCATA
APC-PCR-R2	TGTTGGCATGGCAGAAATAA

APC シーケンス用プライマー	
APC-F1	ATGGCTGCAGCTTCATATGATC
APC-F2	GAGAAATCAACATGGCAACTTCTGG
APC-F3	AAATCTGAAAGTGAAGACTTAC
APC-F4	TTTTGACACCAATCGACATGATG
APC-F5	AATCAAGGAATCAAAGTACAAC
APC-F6	TCCAGCAGACTGCAGGGTTCTAG
APC-R1	CAATAGTTTTTCTGCCTC
APC-R2	CGCTCCTGAAGAAAATTCAAC
APC-R3	TGTGGTTGGAAGTTGAGGTG
APC-R4	CTTGTGTCTCTGCTTACTACG

APC-R5	GGTCATTAGTAAGCCCGTAC
APC-R6	CGATTTGCTGAATTCTGGC

生存細胞アッセイ

2章で記述したプロトコルに従う。

<結果・考察>

大腸がん臨床検体の初代培養及び遺伝子変異解析

Tivantinib は現在大腸がんにおいても臨床試験が進んでいる。化学療法として大腸がんでは長い間ほとんど 5-FU が使われてきたが、2000 年に前後して irinotecan、oxaliplatin、bevacizumab 等が相次いで承認され、近年薬物療法が発展している。Irinotecan は生体内で代謝されて SN-38 に変化することでトポイソメラーゼ阻害作用を示す[61]。Irinotecan 単独でも治療成績を示すが、5-FU 及び folinic acid (ロイコボリン)との併用による FOLFIRI 治療は臨床試験で高い治療成績を示しており、後述する FOLFOX 及び FOLFIRI が一次治療として選択されることが多い[62]。Oxaliplatin は DNA 付加物を形成することで DNA の複製及び転写を阻害する[63]。Oxaliplatin 単独では irinotecan とは異なり効果が低いが、5-FU 及び folinic acid との併用療法である FOLFOX は高い治療成績を示している[64]。Bevacizumab は血管新生に関わる VEGF-A (血管内皮細胞増殖因子)が VEGFR に結合するのを阻害する抗体で、腫瘍の内圧を調整し異常な血管新生を減少させることで薬物動態を改善し、化学療法の効果を高めると考えられる[65]。臨床試験では FOLFOX 及び FOLFIRI と併用することで有意に PFS (無増悪生存期間)を改善することが報告されている[66]。日本では 2008 年に承認された cetuximab、2010 年に承認された panitumumab は共に抗 EGFR 抗体であり臨床試験からは OS (全生存期間)及び PFS を有意に改善することが報告されている[67]。しかし、これらの抗 EGFR 抗体は大腸がんでは約 3 割存在すると知られている *KRAS* exon2 変異陽性症例に対してはほとんど治療効果を示さない[68]。また、近年では *KRAS* 及び *NRAS* の exon2、3、4 変異や *BRAF*V600E 変異も抗 EGFR 抗体の耐性に関わることを示唆する結果も報告されている[69]。更に、抗 EGFR 抗体に対する獲得耐性機構としても *KRAS* 変異の出現が確認されていることから、*KRAS* 変異に対する治療法は薬物療法の発展に重要と考えられる[70]。しかし *KRAS* を標的とした分子標的薬は未だ実用には至っておらず、*KRAS* 変異の大腸がんに対する治療戦略は現状では限られている。Tivantinib が微小管重合を阻害することで抗腫瘍効果を示すこと、ABC トランスポーターの過剰発現による化学療法剤耐性細胞にも有効であったことから、*KRAS* 変異陽性の大腸がん細胞に対しても有効である可能性が考えられた。

大腸がんは *APC*、*TP53*、*KRAS*、*BRAF*、*CTNNB1* 等の遺伝子変異が高頻度に存在することが知られている[71]。*KRAS* 変異をはじめとする主要ながん遺伝子について、臨床検体から SNaPshot シークエンスを行い解析した。SNaPshot シークエンスは Dias-santagata et al によって報告された、ホットスポットに存在する遺伝子変異

を一塩基多型の検出に使われる試薬を利用して効率的に検出する手法である [60]。SNaPshot シークエンスでは、ホットスポット変異の直前に設計したプライマーを一塩基のみ伸長反応させることで、ホットスポット変異の有無を解析する (Fig3-1A,B)。塩基数を変化させたプライマーを用意することで一つの反応系で複数のホットスポット変異を同時に読み取ることができるので、多量の変異解析が可能となる (Fig3-1C, Fig3-2A)。大腸がんの約 9 割で変異が報告されている *APC* はホットスポットが散在しているため、SNaPshot シークエンスではなく通常のサンガーシークエンス法を用いて解析した。51 症例に対するシークエンスの結果、*KRAS* 変異の割合は約 3 割で、従来報告にある *KRAS* 変異の出現率と一致していた。また、*NRAS* 変異が 3%、*BRAF* 変異が 9% と従来報告と同様の傾向が見られた (Fig3-2B) [67]。*CTNNB1* (β -Catenin)、*AKT1*、*EGFR* 等の遺伝子変異は検出できなかった。

大腸がん臨床検体由来細胞の *tivantinib* 感受性の検討

臨床検体から樹立した細胞株に対して *tivantinib* に対する感受性の検討を行った。*KRAS* 変異群と *KRAS* 野生型の群で *tivantinib* 感受性を比較したところ、 IC_{50} 値に統計的有意差は認められず、*KRAS* 変異の状態によらず同程度の薬剤濃度で増殖阻害活性を示すことが確認された (Fig3-3A,B)。この結果から、*tivantinib* が *KRAS* 変異の大腸がんでも有用である可能性が考えられた。

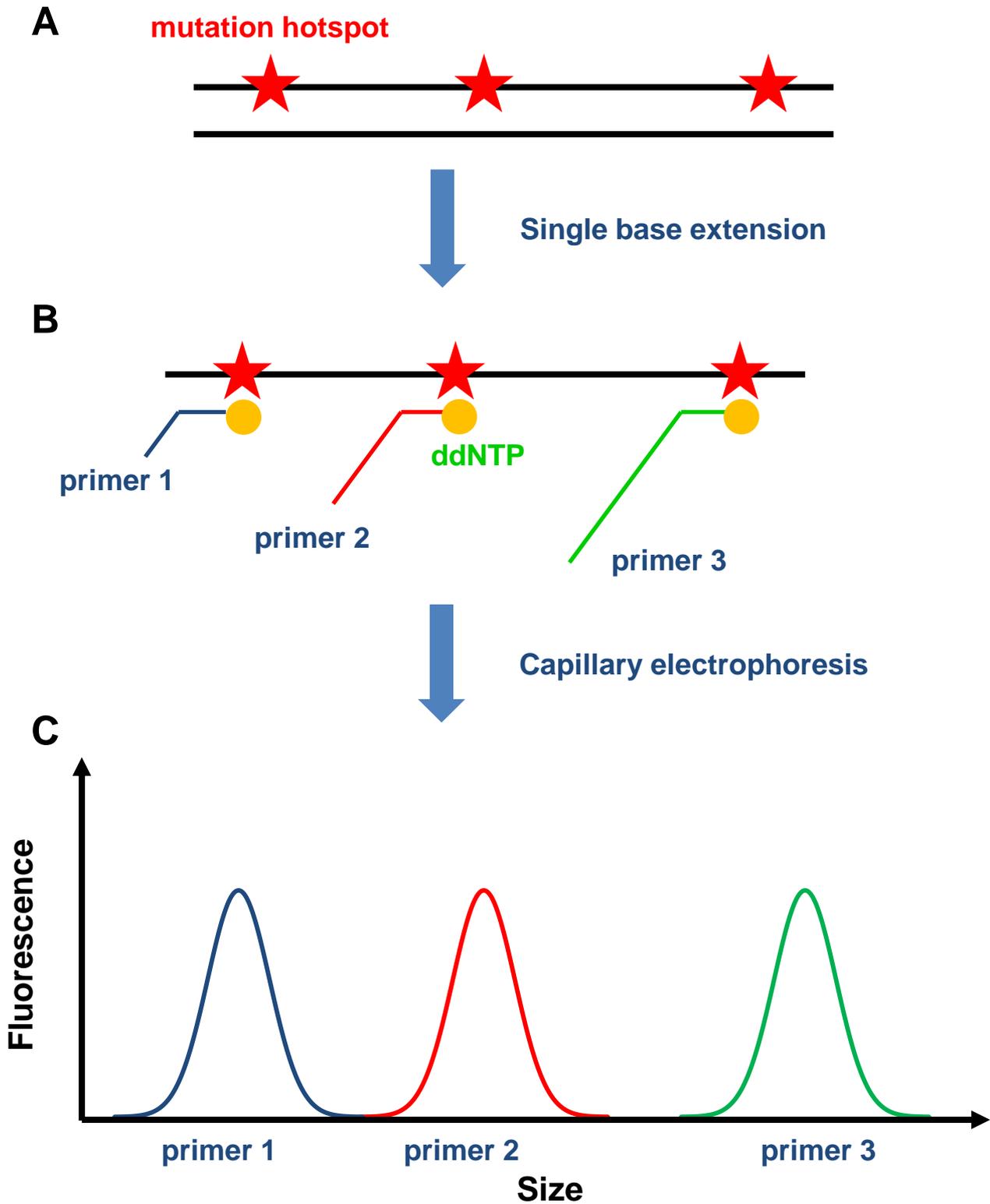


Fig.3-1 SNaPshotシーケンスの概略

- (A)星のマークで示したhotspotに対し、相補的なプライマーを作製する。Hotspot毎にプライマーの塩基数を変化させる。
- (B)作製したプライマーを用いてシーケンス反応を行う。反応液中にddNTPしか存在しないため、一塩基伸長で反応は止まる。
- (C)キャピラリー電気泳動を行うとprimer1、2、3の塩基数がそれぞれ異なるためにピークがそれぞれ別のサイズで検出される。ddNTPに応じて塩基配列を決定し、アミノ酸変異の有無を確認する。

A

遺伝子名	アミノ酸変異	遺伝子名	アミノ酸変異	遺伝子名	アミノ酸変異	遺伝子名	アミノ酸変異
APC	R1114X	IDH1	R132C	MAP2K1	Q56P	AKT1	E17K
	Q1338X		R132L		K57N		G719C
	R1450X		R132S		D67N		G719S
	T1556fs*3		R132H	L1575P	G719A		
CTNNB1	D32A	KIT	D816A	NOTCH1	L1601P	EGFR	E746_A750del
	D32G		D816G		G12A		E746_A750del
	D32H		D816V	G12C	T790M		
	D32N	G12A	G12D	L858Q			
	D32V	G12C	G12R	L858R			
	D32Y	G12D	G12S	L861Q			
	S33C	G12R	G12V	R130X			
	S33F	G12S	G13A	R130G			
	S33Y	G12V	G13C	R130R			
	G34E	G13A	G13D	R173C			
	G34V	G13C	G13R	R233X			
	S37A	G13D	G13S	R233R			
	S37C	G13R	G13V	K267fs*9			
	S37F	G13S	Q61E	K267fs*9			
	S37P	G13V	Q61H	PTEN	R175H		
	S37T	R88Q	Q61H		R175L		
	S37Y	E542K	Q61K		G245C		
	T41A	E542Q	Q61L		G245R		
	T41I	E545K	Q61P		G245S		
	T41N	E545Q	Q61Q		R248G		
	T41P	Q546E	Q61R		R248L		
	T41S	Q546K	G466V		R248P		
	T41S	Q546L	G469A		R248Q		
	S45A	Q546P	L597S		R248W		
	S45C	Q546R	L597V		R273C		
	S45F	H1047L	V600M		R273H		
	S45P	H1047R	V600A	R273L			
	S45T	H1047Y	V600E	TP53	R306X		
	S45Y	G1049R	V600G				
		G1049S					

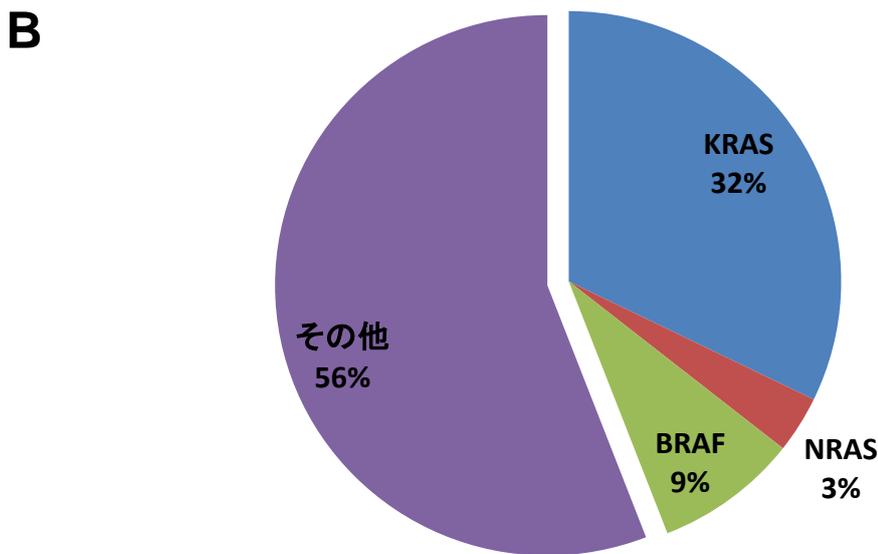


Fig.3-2 SNaPshotシーケンスによる臨床検体の遺伝子変異解析

(A) SNaPshotシーケンスによって解析可能なアミノ酸変異。

(B) 臨床検体からのSNaPshotシーケンスで得られた遺伝子変異を円グラフに纏めた(n=51)

A

JC	KRAS	BRAF	PIK3CA	P53	PTEN	APC
4	G12V					T1556fs
19	G12D		E542K		R173C	Q1178X
20	G13D					Q886X
39	G13D					
42	G13D					
47	G12V			R248W		
48	G12D					
54	G12D			R273H		
56	G12D					
9	WT	V600E				
11	WT	V600E		R175H		
12	WT		E542K	R175H		
21	WT					S943X
35	WT					
40	WT		H1047Y			
49	WT					

B

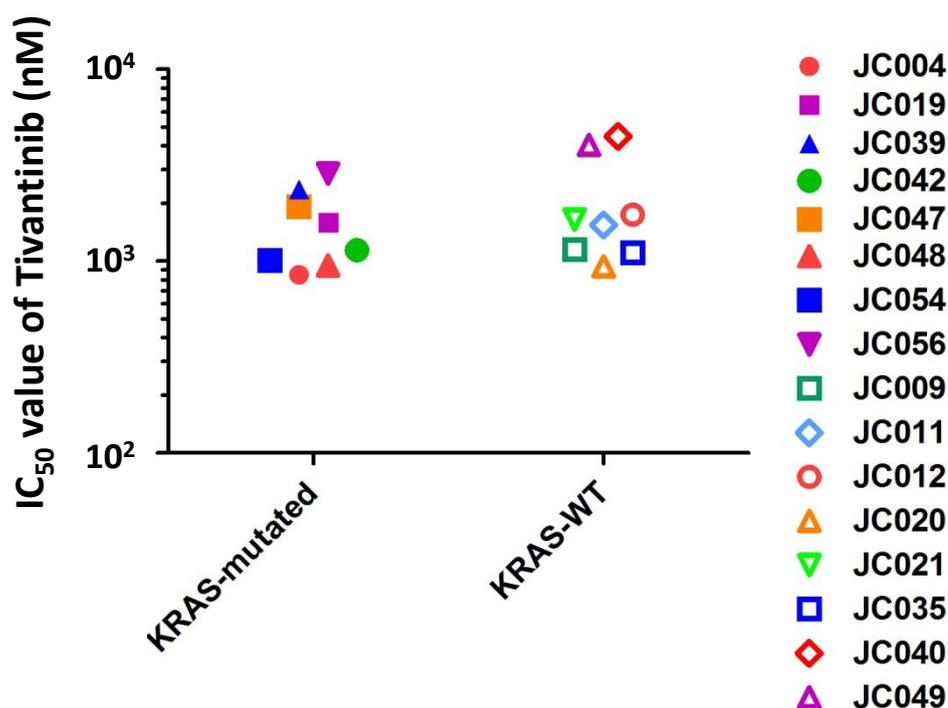


Fig.3-3 KRAS-mutated及びKRAS-WTに対するtivantinibの増殖阻害活性

(A)生存細胞アッセイに用いた大腸がん臨床検体由来細胞株の遺伝子変異情報を纏めた。空白欄はSNaPshotシーケンスで変異が検出されなかったことを示す。

(B)Tivantinib存在下で72 hr培養後に生存細胞アッセイを行い、それぞれの細胞のIC₅₀値をグラフに示した。中抜きのマーカーはKRAS野生型の細胞、色で塗りつぶされたマーカーはKRAS変異陽性の細胞を表す。

総括

Tivantinib は選択性が高く、経口投与可能な ATP 非競合的 c-MET 阻害剤として 2010 年に報告され、c-MET キナーゼドメインと tivantinib の共結晶解析から c-MET が不活性状態の時により高い親和性を持つと示されている[5] [6]。Tivantinib は臨床試験において有望な治療成績と高い忍容性を示したことから、現在肝がん、大腸がん及び肺がん等を対象に臨床試験が進められている低分子化合物である[7]。しかしこれまでに行われた tivantinib の先行研究からは tivantinib が c-MET 阻害以外の作用機序を持つと考えられるようなデータも出てきていた[8] [9] [29] [72]。このことから、修士課程では tivantinib による増殖阻害活性が c-MET 阻害によるものであるかを明らかにするために、c-MET 依存および c-MET 非依存性の細胞株を用いて検討し、tivantinib の細胞増殖阻害活性は c-MET 阻害に依存しないことを明らかにした。さらに、精製した tubulin を用いた *in vitro* の実験から tivantinib が微小管阻害剤である vincristine 同様に tubulin 重合阻害活性を示すことを発見した[12]。しかし、2013 年には Remising et al から tivantinib の分子標的として GSK-3 が報告されており、tivantinib の真の分子標的については未だに明確になっていなかった[13]。以上のことから、本研究では tivantinib の増殖阻害活性に関わる作用機序を明らかにすることを目的として研究を行った。

Tivantinib 処理した細胞の挙動を検討するため、DNA マイクロアレイを利用して阻害剤処理後の遺伝子発現量を測定した。クラスター解析の結果、Tivantinib 処理した際の遺伝子変動パターンは c-MET 阻害剤と異なり、微小管阻害剤に近いことが示された。

Tivantinib による細胞増殖阻害のメカニズムを明らかにするため、細胞周期の進行に伴い発現量が変化する蛍光プローブ Fucci を発現させた細胞を用い、細胞周期に与える影響を検討した。Tivantinib 処理した細胞では緑色蛍光を発する細胞の割合が増加しており、tivantinib 処理により G2/M phase arrest が誘導されたと考えられる。更に、細胞周期に応じて発現量が変化する cyclin について Western Blot 法で調べたところ、M 期に発現が減少する cyclinA の減少が見られ、M 期に発現が増加する cyclinB が増加していたことから、tivantinib 処理により G2/M phase arrest が誘導されたと考えられる。Tubulin の重合を阻害することで微小管のダイナミクスを阻害し、G2/M phase arrest を誘導すること知られている vincristine で処理した場合でも、cyclinA の減少及び cyclinB の増加は確認された。更に、tivantinib が細胞骨格を構成する微小管の構造を限定的に破壊することを確認した。

Tivantinib が細胞レベル・生体レベルで微小管に与える影響を明らかにするために、

tivantinib 処理後の重合 tubulin 量を定量した。c-MET 依存性の EBC-1 細胞において、tivantinib 処理により濃度依存的な重合 tubulin 量の減少が見られた一方で c-MET 及び下流の AKT・ERK パスウェイの抑制は確認できなかった。更に、c-MET 非依存性の H460 細胞でも tivantinib が濃度依存的に重合 tubulin 量を減少させた。また、低濃度の tivantinib で処理すると微小管重合が促進されることが別グループから報告されている DLD-1 細胞においても、他の細胞と同様 tivantinib の濃度依存的に重合 tubulin 量の減少が見られた[29]。これらの結果から、tivantinib は精製した tubulin を用いた *in vitro* の系だけでなく細胞レベルでも tubulin 重合を阻害し、この作用は細胞の c-MET 活性に依存しないことが示唆された。Tivantinib が生体レベルでも tubulin 重合阻害を介して抗腫瘍効果を引き起こしているかを調べるために、担がんマウスを利用して実験を行った。細胞レベルの実験と同様に、tivantinib 投与した担がんマウス由来の腫瘍は control と比較して腫瘍の縮小が確認され、さらに control と比べて顕著な重合 tubulin 量の低下が確認できた。別グループの報告から tivantinib の GSK-3 阻害作用が報告されていたため[13]、c-MET 及び GSK-3 活性に与える影響を調べたが、tivantinib 投与による違いは見られなかった。この結果は、tivantinib の抗腫瘍活性が tubulin 重合阻害により引き起こされていることを強く示唆している。

多くの微小管阻害剤は colchicine 結合部位、vinblastine 部位、taxane 部位という異なる 3 つの部位を介して β -tubulin と直接的に結合することが知られていることから、tivantinib の結合様式について検討を行った[34]。放射標識した微小管阻害剤を用いた実験で tivantinib が用量依存的に [3 H]colchicine の tubulin に対する結合を阻害する一方で、[3 H]vinblastine 及び [3 H]vincristine の tubulin に対する結合には全く影響を与えないことを確認した。更に、tivantinib の濃度を増加させることで colchicine と tubulin 結合の Kd 値が増加する一方 Bmax には変化が見られないことを確認した。これらの結果から、tivantinib が tubulin の構造を変化させることで colchicine の結合を阻害しているのではなく、colchicine 結合部位を介して tubulin に競合的に直接結合することが示唆された。

Tivantinib が tubulin に直接結合することを示唆するデータが得られたためコンピュータによる結合モデルのシミュレーションを行ったところ、競合阻害実験の結果と一致して tivantinib が tubulin の colchicine 結合部位に立体障害なしで結合するモデルが得られた。

微小管阻害剤に対する獲得耐性機構の一つとして、MDR1 をはじめとする ABC トランスポータータンパク質の過剰発現が報告されている[73]。Vincristine に対して耐性を示す MDR1 過剰発現細胞 HCT-15 に対して tivantinib が増殖阻害活性を示した

ことから、tivantinib が MDR1 を介した薬剤耐性を克服できる可能性が考えられたため、微小管阻害剤 vincristine 及び vinblastine 存在下で長期培養することで MDR1 過剰発現し、薬剤耐性を獲得した K562/VCR 及び CEM/VBL 細胞を用いて増殖阻害活性の検討を行った。Tivantinib は K562/VCR 及び CEM/VBL 細胞に対しても親株の K562 及び CEM 細胞と同程度の濃度で増殖阻害活性を示した。更に、tivantinib は SN-38 に対する獲得耐性機構として知られる BCRP、adriamycin に対する獲得耐性機構として知られる MRP1 遺伝子を導入した細胞株に対しても親株と同様に増殖阻害活性を示した[74]。Tivantinib による ABC トランスポーター活性の阻害について Rhodamine 123 を用いて検討したところ、tivantinib は Rhodamine 123 排出に影響を与えず、tivantinib が ABC トランスポーター-MDR1 による排出を阻害していないことが明らかになった。Tivantinib は肝がんに加えて大腸がんを対象とした臨床試験も進んでいる。大腸がんでは近年抗 EGFR 抗体である cetuximab、panitumumab の使用が承認されたが、約 3 割存在すると知られている KRAS 変異の患者さんに対しては抗 EGFR 抗体の併用による治療成績の改善がほとんど見られない[68]。Tivantinib が微小管を標的とすることから KRAS 変異の大腸がんにも増殖阻害活性を示す可能性を考えた。大腸がん手術検体から細胞株の樹立を行い、tivantinib に対する感受性の比較を行なったところ、KRAS 変異の有無で感受性に違いは見られなかった。

我々の研究からは tivantinib の増殖阻害活性が c-MET 阻害に依存せず、むしろ tubulin 重合阻害を介して誘導されることが示された。一方で、tivantinib はヒトの 230 キナーゼを用いた解析からは c-MET に対して阻害活性を示しており、c-MET との共結晶解析から c-MET が不活性状態のときにより高い親和性を持つことが報告されている[6]。更に、tivantinib は肝がんで行なわれた第二相の臨床試験において、サブセット解析から c-MET 高発現の患者さんに対して PFS 及び OS の改善を示した[7]。この結果からは tivantinib が生体内において c-MET を標的としているよう考えられるが、c-MET が標的ではなくバイオマーカーとして働いている可能性もある。微小管阻害剤は細胞分裂を停止させることで細胞死を誘導するため、活発に増殖する細胞に対してはより高い抗腫瘍活性を示す。c-MET が高発現したがん細胞はそのリガンドである HGF によって増殖そのものが活発になり、そのことが理由で tivantinib が c-MET 高発現の患者さんに対して高い抗腫瘍効果を示した可能性もある。また、肺がんで行なわれた第二相臨床試験のサブセット解析から tivantinib + erlotinib 併用群は erlotinib 単独群に比べて c-MET 阻害剤が本来効果を示さないと考えられる KRAS 変異陽性の肺がん患者に対して PFS の改善を示唆する結果を示した[9]。Erlotinib 単独では KRAS 変異陽性肺がんの増殖を抑制できないのに対し、tivantinib が変異 KRAS

により活性化された細胞増殖を抑制し、抗腫瘍効果を示した可能性がある。Tivantinib は、細胞レベルでは c-MET 依存性、c-MET 非依存性の細胞に対して同程度の濃度で増殖阻害活性を示しており、臨床試験でも c-MET 発現と抗腫瘍効果に相関が見られない腫瘍があることから、効果を予測するバイオマーカーについて未だ明確になっていない。肝がんで行なわれた臨床試験のサブセット解析で見られた抗腫瘍活性の作用機序解明を含めて、有望な治療成績が見込める患者さんを絞り込むためのマーカー探索が重要だと考えられる。今回の研究で tivantinib が tubulin 重合阻害を介して抗腫瘍活性を示すことが示唆されたことから、重合 tubulin 量の減少がバイオマーカーとなる可能性がある。しかし、従来から使用されている微小管阻害剤 paclitaxel、vincristine 等でバイオマーカーとして確立されていないことから、重合 tubulin 量の減少を実際に応用することは難しいと考えられる。また、どの薬剤で治療をしても最終的には耐性を獲得した腫瘍が出現するのと同様に、tivantinib に対しても何らかの機構を介して耐性を獲得すると考えられる。耐性機構について検討するために tivantinib に対する耐性細胞の樹立を試みたが、tivantinib 存在下で 1 年以上細胞を培養した場合でも tivantinib 耐性の細胞株が得られなかった。Tivantinib は耐性細胞が出現しにくい薬剤である可能性があり、tivantinib に対する耐性機構について更なる研究が必要である。

臨床試験において、現時点で tivantinib は有望な抗腫瘍効果と忍容性を示している。しかしながら、tivantinib の抗腫瘍効果は c-MET 阻害のみでは説明が付かない部分も多く、治療標的については不明な部分があった。今回の研究から、tivantinib が細胞レベル・生体レベルにおいて tubulin 重合を阻害することが確認され、colchicine 結合部位を介して tubulin と直接的に結合し、ABC トランスポーターを介した薬剤耐性を克服できることが示唆された。現在、tivantinib の臨床試験は c-MET 阻害剤であることを前提としてデザインされ、肝がんや大腸がんでは c-MET 高発現の患者を対象としている。しかし、本研究から tivantinib の新たな作用機序が発見され、ABC トランスポーターによる耐性を克服できること、KRAS 変異の大腸がん細胞に対しても増殖阻害活性を示したことから、大腸がんを含めた他の固形がんにおいても tivantinib が良好な治療成績を示す可能性があることを見出した。

本研究の成果は以下の雑誌に発表済である。

Katayama R, Aoyama A, Yamori T, Qi J, Oh-hara T, Song Y, Engelman JA, Fujita N: **Cytotoxic activity of tivantinib (ARQ 197) is not due solely to c-MET inhibition.** *Cancer Res* 2013, **73**(10):3087-3096 <http://cancerres.aacrjournals.org/content/73/10/3087.short>

Aoyama A, Katayama R, Oh-Hara T, Sato S, Okuno Y, Fujita N. **Tivantinib (ARQ 197)**

exhibits antitumor activity by directly interacting with tubulin and overcomes ABC transporter-mediated drug resistance. *Mol Cancer Ther* 2014 Dec;13(12):2978-90.
<http://mct.aacrjournals.org/content/13/12/2978.short>

参考文献

1. Gherardi E, Birchmeier W, Birchmeier C, Vande Woude G: **Targeting MET in cancer: rationale and progress.** *Nat Rev Cancer* 2012, **12**(2):89-103.
2. Engelman JA, Zejnullahu K, Mitsudomi T, Song Y, Hyland C, Park JO, Lindeman N, Gale CM, Zhao X, Christensen J *et al*: **MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling.** *Science* 2007, **316**(5827):1039-1043.
3. Yano S, Wang W, Li Q, Matsumoto K, Sakurama H, Nakamura T, Ogino H, Kakiuchi S, Hanibuchi M, Nishioka Y *et al*: **Hepatocyte growth factor induces gefitinib resistance of lung adenocarcinoma with epidermal growth factor receptor-activating mutations.** *Cancer Res* 2008, **68**(22):9479-9487.
4. Peters S, Adjei AA: **MET: a promising anticancer therapeutic target.** *Nat Rev Clin Oncol* 2012, **9**(6):314-326.
5. Munshi N, Jeay S, Li Y, Chen CR, France DS, Ashwell MA, Hill J, Moussa MM, Leggett DS, Li CJ: **ARQ 197, a novel and selective inhibitor of the human c-Met receptor tyrosine kinase with antitumor activity.** *Mol Cancer Ther* 2010, **9**(6):1544-1553.
6. Eathiraj S, Palma R, Volckova E, Hirschi M, France DS, Ashwell MA, Chan TC: **Discovery of a novel mode of protein kinase inhibition characterized by the mechanism of inhibition of human mesenchymal-epithelial transition factor (c-Met) protein autophosphorylation by ARQ 197.** *J Biol Chem* 2011, **286**(23):20666-20676.
7. Rimassa L, Porta C, Borbath I, Daniele B, Finn RS, Raoul J-L, Schwartz LH, He AR, Trojan J, Peck-Radosavljevic M: **Tivantinib in MET-high hepatocellular carcinoma patients and the ongoing phase III clinical trial.** *Hepatic Oncology* 2014, **1**(2):181-188.
8. Wagner AJ, Goldberg JM, Dubois SG, Choy E, Rosen L, Pappo A, Geller J, Judson I, Hogg D, Senzer N *et al*: **Tivantinib (ARQ 197), a selective inhibitor of MET, in patients with microphthalmia transcription factor-associated tumors: results of a multicenter phase 2 trial.** *Cancer* 2012, **118**(23):5894-5902.
9. Sequist LV, von Pawel J, Garmey EG, Akerley WL, Brugger W, Ferrari D, Chen Y, Costa DB, Gerber DE, Orlov S *et al*: **Randomized phase II study of erlotinib plus tivantinib versus erlotinib plus placebo in previously treated non-small-cell lung cancer.** *J Clin Oncol* 2011, **29**(24):3307-3315.
10. Smolen GA, Sordella R, Muir B, Mohapatra G, Barmettler A, Archibald H, Kim WJ, Okimoto RA, Bell DW, Sgroi DC *et al*: **Amplification of MET may identify a subset of cancers with extreme sensitivity to the selective tyrosine kinase inhibitor PHA-665752.**

Proc Natl Acad Sci U S A 2006, **103**(7):2316-2321.

11. Yasuda H, de Figueiredo-Pontes LL, Kobayashi S, Costa DB: **Preclinical rationale for use of the clinically available multitargeted tyrosine kinase inhibitor crizotinib in ROS1-translocated lung cancer.** *J Thorac Oncol* 2012, **7**(7):1086-1090.
12. Katayama R, Aoyama A, Yamori T, Qi J, Oh-hara T, Song Y, Engelman JA, Fujita N: **Cytotoxic activity of tivantinib (ARQ 197) is not due solely to c-MET inhibition.** *Cancer Res* 2013, **73**(10):3087-3096.
13. Remsing Rix LL, Kuenzi BM, Luo Y, Remily-Wood E, Kinose F, Wright G, Li J, Koomen JM, Haura EB, Lawrence HR *et al*: **GSK3 alpha and beta are new functionally relevant targets of tivantinib in lung cancer cells.** *ACS Chem Biol* 2013, **9**(2):353-358.
14. Sakaue-Sawano A, Kurokawa H, Morimura T, Hanyu A, Hama H, Osawa H, Kashiwagi S, Fukami K, Miyata T, Miyoshi H *et al*: **Visualizing spatiotemporal dynamics of multicellular cell-cycle progression.** *Cell* 2008, **132**(3):487-498.
15. Ishii S, Satoh Y, Tsuruo T: **Antitumor activity and cytotoxicity of a new ankinomycin derivative, 3',11-dibutyryl ankinomycin.** *Cancer Chemother Pharmacol* 1993, **32**(3):173-178.
16. Blagosklonny MV, Schulte TW, Nguyen P, Mimnaugh EG, Trepel J, Neckers L: **Taxol induction of p21WAF1 and p53 requires c-raf-1** *Cancer Res* 1995, **55**(20):4623-4626.
17. Verhey KJ, Gaertig J: **The tubulin code.** *Cell Cycle* 2007, **6**(17):2152-2160.
18. Gidding CE, Kellie SJ, Kamps WA, de Graaf SS: **Vincristine revisited.** *Crit Rev Oncol Hematol* 1999, **29**(3):267-287.
19. Schiff PB, Horwitz SB: **Taxol stabilizes microtubules in mouse fibroblast cells.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1980, **77**(3):1561-1565.
20. Schiff PB, Fant J, Horwitz SB: **Promotion of microtubule assembly in vitro by taxol.** *Nature* 1979, **277**(5698):665-667.
21. Jordan MA, Wilson L: **Microtubules as a target for anticancer drugs.** *Nat Rev Cancer* 2004, **4**(4):253-265.
22. Ling YH, Li T, Yuan Z, Haightz M, Jr., Weber TK, Perez-Soler R: **Erlotinib, an effective epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, induces p27KIP1 up-regulation and nuclear translocation in association with cell growth inhibition and G1/S phase arrest in human non-small-cell lung cancer cell lines.** *Mol Pharmacol* 2007, **72**(2):248-258.
23. Huang SM, Li J, Armstrong EA, Harari PM: **Modulation of radiation response and tumor-induced angiogenesis after epidermal growth factor receptor inhibition by ZD1839**

- (Iressa). *Cancer Res* 2002, **62**(15):4300-4306.
24. Tumati V, Kumar S, Yu L, Chen B, Choy H, Saha D: **Effect of PF-02341066 and radiation on non-small cell lung cancer cells.** *Oncol Rep* 2013, **29**(3):1094-1100.
 25. Weaver BA, Cleveland DW: **Decoding the links between mitosis, cancer, and chemotherapy: The mitotic checkpoint, adaptation, and cell death.** *Cancer Cell* 2005, **8**(1):7-12.
 26. Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, Teague J, Woffendin H, Garnett MJ, Bottomley W *et al*: **Mutations of the BRAF gene in human cancer.** *Nature* 2002, **417**(6892):949-954.
 27. Minotti AM, Barlow SB, Cabral F: **Resistance to antimitotic drugs in Chinese hamster ovary cells correlates with changes in the level of polymerized tubulin.** *J Biol Chem* 1991, **266**(6):3987-3994.
 28. Chang JY, Chang CY, Kuo CC, Chen LT, Wein YS, Kuo YH: **Salvinal, a novel microtubule inhibitor isolated from *Salvia miltiorrhizae* Bunge (Danshen), with antimitotic activity in multidrug-sensitive and -resistant human tumor cells.** *Mol Pharmacol* 2004, **65**(1):77-84.
 29. Basilico C, Pennacchietti S, Vigna E, Chiriaco C, Arena S, Bardelli A, Valdembri D, Serini G, Michieli P: **Tivantinib (ARQ197) displays cytotoxic activity that is independent of its ability to bind MET.** *Clin Cancer Res* 2013, **19**(9):2381-2392.
 30. Yap TA, Olmos D, Brunetto AT, Tunariu N, Barriuso J, Riisnaes R, Pope L, Clark J, Futreal A, Germuska M *et al*: **Phase I trial of a selective c-MET inhibitor ARQ 197 incorporating proof of mechanism pharmacodynamic studies.** *J Clin Oncol* 2011, **29**(10):1271-1279.
 31. Goldman JW, Laux I, Chai F, Savage RE, Ferrari D, Garmey EG, Just RG, Rosen LS: **Phase 1 dose-escalation trial evaluating the combination of the selective MET (mesenchymal-epithelial transition factor) inhibitor tivantinib (ARQ 197) plus erlotinib.** *Cancer* 2012, **118**(23):5903-5911.
 32. Rosen LS, Senzer N, Mekhail T, Ganapathi R, Chai F, Savage RE, Waghorne C, Abbadessa G, Schwartz B, Dreicer R: **A phase I dose-escalation study of Tivantinib (ARQ 197) in adult patients with metastatic solid tumors.** *Clin Cancer Res* 2011, **17**(24):7754-7764.
 33. Ravelli RB, Gigant B, Curmi PA, Jourdain I, Lachkar S, Sobel A, Knossow M: **Insight into tubulin regulation from a complex with colchicine and a stathmin-like domain.** *Nature* 2004, **428**(6979):198-202.
 34. Dumontet C, Jordan MA: **Microtubule-binding agents: a dynamic field of cancer therapeutics.** *Nat Rev Drug Discov* 2010, **9**(10):790-803.

35. Beck WT, Mueller TJ, Tanzer LR: **Altered surface membrane glycoproteins in Vinca alkaloid-resistant human leukemic lymphoblasts.** *Cancer Res* 1979, **39**(6 Pt 1):2070-2076.
36. Tsuruo T, Iida H, Tsukagoshi S, Sakurai Y: **Potentiation of vincristine and Adriamycin effects in human hemopoietic tumor cell lines by calcium antagonists and calmodulin inhibitors.** *Cancer Res* 1983, **43**(5):2267-2272.
37. Naito M, Matsuba Y, Sato S, Hirata H, Tsuruo T: **MS-209, a quinoline-type reversal agent, potentiates antitumor efficacy of docetaxel in multidrug-resistant solid tumor xenograft models.** *Clin Cancer Res* 2002, **8**(2):582-588.
38. Yanase K, Tsukahara S, Asada S, Ishikawa E, Imai Y, Sugimoto Y: **Gefitinib reverses breast cancer resistance protein-mediated drug resistance.** *Mol Cancer Ther* 2004, **3**(9):1119-1125.
39. Katayama K, Shibata K, Mitsuhashi J, Noguchi K, Sugimoto Y: **Pharmacological interplay between breast cancer resistance protein and gefitinib in epidermal growth factor receptor signaling.** *Anticancer Res* 2009, **29**(4):1059-1065.
40. Akiyama S, Fojo A, Hanover JA, Pastan I, Gottesman MM: **Isolation and genetic characterization of human KB cell lines resistant to multiple drugs.** *Somat Cell Mol Genet* 1985, **11**(2):117-126.
41. Ezaki K, Okabe K, Domyo M, Abe K, Kubokawa C, Ogawa M: **Effect of human fibroblast interferon on the cytotoxic activity of natural killer cells and lymphocytes against autochthonous and allogeneic tumor cells.** *Gan* 1983, **74**(5):723-729.
42. Tahir SK, Kovar P, Rosenberg SH, Ng SC: **Rapid colchicine competition-binding scintillation proximity assay using biotin-labeled tubulin.** *Biotechniques* 2000, **29**(1):156-160.
43. Natsume T, Watanabe J, Tamaoki S, Fujio N, Miyasaka K, Kobayashi M: **Characterization of the interaction of TZT-1027, a potent antitumor agent, with tubulin.** *Jpn J Cancer Res* 2000, **91**(7):737-747.
44. Etievant C, Kruczynski A, Barret JM, Tait AS, Kavallaris M, Hill BT: **Markedly diminished drug resistance-inducing properties of vinflunine (20',20'-difluoro-3',4'-dihydrovinorelbine) relative to vinorelbine, identified in murine and human tumour cells in vivo and in vitro.** *Cancer Chemother Pharmacol* 2001, **48**(1):62-70.
45. Schutz FA, Bellmunt J, Rosenberg JE, Choueiri TK: **Vinflunine: drug safety evaluation of this novel synthetic vinca alkaloid.** *Expert Opin Drug Saf* 2011, **10**(4):645-653.
46. Ngan VK, Bellman K, Panda D, Hill BT, Jordan MA, Wilson L: **Novel actions of the antitumor drugs vinflunine and vinorelbine on microtubules.** *Cancer Res* 2000,

60(18):5045-5051.

47. Dybdal-Hargreaves NF, Risinger AL, Mooberry SL: **Eribulin mesylate: mechanism of action of a unique microtubule-targeting agent.** *Clin Cancer Res* 2015, **21**(11):2445-2452.
48. Marcus AI, Zhou J, O'Brate A, Hamel E, Wong J, Nivens M, El-Naggar A, Yao TP, Khuri FR, Giannakakou P: **The synergistic combination of the farnesyl transferase inhibitor lonafarnib and paclitaxel enhances tubulin acetylation and requires a functional tubulin deacetylase.** *Cancer Res* 2005, **65**(9):3883-3893.
49. Wang Y, Zhang H, Gigant B, Yu Y, Wu Y, Chen X, Lai Q, Yang Z, Chen Q, Yang J: **Structures of a diverse set of colchicine binding site inhibitors in complex with tubulin provide a rationale for drug discovery.** *FEBS J* 2015.
50. Loganzo F, Discafani CM, Annable T, Beyer C, Musto S, Hari M, Tan X, Hardy C, Hernandez R, Baxter M *et al*: **HTI-286, a synthetic analogue of the tripeptide hemiasterlin, is a potent antimicrotubule agent that circumvents P-glycoprotein-mediated resistance in vitro and in vivo.** *Cancer Res* 2003, **63**(8):1838-1845.
51. Dean M, Rzhetsky A, Allikmets R: **The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily.** *Genome Res* 2001, **11**(7):1156-1166.
52. Ambudkar SV, Dey S, Hrycyna CA, Ramachandra M, Pastan I, Gottesman MM: **Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter.** *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1999, **39**:361-398.
53. Katayama R, Koike S, Sato S, Sugimoto Y, Tsuruo T, Fujita N: **Dofequidar fumarate sensitizes cancer stem-like side population cells to chemotherapeutic drugs by inhibiting ABCG2/BCRP-mediated drug export.** *Cancer Sci* 2009, **100**(11):2060-2068.
54. Jedlitschky G, Leier I, Buchholz U, Barnouin K, Kurz G, Keppler D: **Transport of glutathione, glucuronate, and sulfate conjugates by the MRP gene-encoded conjugate export pump.** *Cancer Res* 1996, **56**(5):988-994.
55. Miyake K, Mickley L, Litman T, Zhan Z, Robey R, Cristensen B, Brangi M, Greenberger L, Dean M, Fojo T *et al*: **Molecular cloning of cDNAs which are highly overexpressed in mitoxantrone-resistant cells: demonstration of homology to ABC transport genes.** *Cancer Res* 1999, **59**(1):8-13.
56. Yoshimatsu K, Yamaguchi A, Yoshino H, Koyanagi N, Kitoh K: **Mechanism of action of E7010, an orally active sulfonamide antitumor agent: inhibition of mitosis by binding to the colchicine site of tubulin.** *Cancer Res* 1997, **57**(15):3208-3213.
57. Qian YM, Song WC, Cui H, Cole SP, Deeley RG: **Glutathione stimulates sulfated estrogen transport by multidrug resistance protein 1.** *J Biol Chem* 2001, **276**(9):6404-6411.

58. Krumpochova P, Sapthu S, Brouwers JF, de Haas M, de Vos R, Borst P, van de Wetering K: **Transportomics: screening for substrates of ABC transporters in body fluids using vesicular transport assays.** *FASEB J* 2012, **26**(2):738-747.
59. Ohata H, Ishiguro T, Aihara Y, Sato A, Sakai H, Sekine S, Taniguchi H, Akasu T, Fujita S, Nakagama H *et al*: **Induction of the stem-like cell regulator CD44 by Rho kinase inhibition contributes to the maintenance of colon cancer-initiating cells.** *Cancer Res* 2012, **72**(19):5101-5110.
60. Dias-Santagata D, Akhavanfard S, David SS, Vernovsky K, Kuhlmann G, Boisvert SL, Stubbs H, McDermott U, Settleman J, Kwak EL *et al*: **Rapid targeted mutational analysis of human tumours: a clinical platform to guide personalized cancer medicine.** *EMBO Mol Med* 2010, **2**(5):146-158.
61. Hsiang YH, Hertzberg R, Hecht S, Liu LF: **Camptothecin induces protein-linked DNA breaks via mammalian DNA topoisomerase I.** *J Biol Chem* 1985, **260**(27):14873-14878.
62. Fuchs CS, Marshall J, Mitchell E, Wierzbicki R, Ganju V, Jeffery M, Schulz J, Richards D, Soufi-Mahjoubi R, Wang B *et al*: **Randomized, controlled trial of irinotecan plus infusional, bolus, or oral fluoropyrimidines in first-line treatment of metastatic colorectal cancer: results from the BICC-C Study.** *J Clin Oncol* 2007, **25**(30):4779-4786.
63. Woynarowski JM, Chapman WG, Napier C, Herzig MC, Juniewicz P: **Sequence- and region-specificity of oxaliplatin adducts in naked and cellular DNA.** *Mol Pharmacol* 1998, **54**(5):770-777.
64. Goldberg RM, Sargent DJ, Morton RF, Fuchs CS, Ramanathan RK, Williamson SK, Findlay BP, Pitot HC, Alberts S: **Randomized controlled trial of reduced-dose bolus fluorouracil plus leucovorin and irinotecan or infused fluorouracil plus leucovorin and oxaliplatin in patients with previously untreated metastatic colorectal cancer: a North American Intergroup Trial.** *J Clin Oncol* 2006, **24**(21):3347-3353.
65. Willett CG, Boucher Y, di Tomaso E, Duda DG, Munn LL, Tong RT, Chung DC, Sahani DV, Kalva SP, Kozin SV *et al*: **Direct evidence that the VEGF-specific antibody bevacizumab has antivasculature effects in human rectal cancer.** *Nat Med* 2004, **10**(2):145-147.
66. Giantonio BJ, Catalano PJ, Meropol NJ, O'Dwyer PJ, Mitchell EP, Alberts SR, Schwartz MA, Benson AB, 3rd, Eastern Cooperative Oncology Group Study E: **Bevacizumab in combination with oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin (FOLFOX4) for previously treated metastatic colorectal cancer: results from the Eastern Cooperative Oncology Group Study E3200.** *J Clin Oncol* 2007, **25**(12):1539-1544.
67. Bokemeyer C, Van Cutsem E, Rougier P, Ciardiello F, Heeger S, Schlichting M, Celik I,

- Kohne CH: **Addition of cetuximab to chemotherapy as first-line treatment for KRAS wild-type metastatic colorectal cancer: pooled analysis of the CRYSTAL and OPUS randomised clinical trials.** *Eur J Cancer* 2012, **48**(10):1466-1475.
68. Karapetis CS, Khambata-Ford S, Jonker DJ, O'Callaghan CJ, Tu D, Tebbutt NC, Simes RJ, Chalchal H, Shapiro JD, Robitaille S *et al*: **K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer.** *N Engl J Med* 2008, **359**(17):1757-1765.
69. De Roock W, Claes B, Bernasconi D, De Schutter J, Biesmans B, Fountzilas G, Kalogeras KT, Kotoula V, Papamichael D, Laurent-Puig P *et al*: **Effects of KRAS, BRAF, NRAS, and PIK3CA mutations on the efficacy of cetuximab plus chemotherapy in chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer: a retrospective consortium analysis.** *Lancet Oncol* 2010, **11**(8):753-762.
70. Misale S, Yaeger R, Hobor S, Scala E, Janakiraman M, Liska D, Valtorta E, Schiavo R, Buscarino M, Siravegna G *et al*: **Emergence of KRAS mutations and acquired resistance to anti-EGFR therapy in colorectal cancer.** *Nature* 2012, **486**(7404):532-536.
71. Cancer Genome Atlas N: **Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer.** *Nature* 2012, **487**(7407):330-337.
72. Michieli P, Di Nicolantonio F: **Targeted therapies: Tivantinib—a cytotoxic drug in MET inhibitor's clothes?** *Nat Rev Clin Oncol* 2013, **10**(7):372-374.
73. Gottesman MM, Fojo T, Bates SE: **Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters.** *Nat Rev Cancer* 2002, **2**(1):48-58.
74. Loe DW, Deeley RG, Cole SP: **Characterization of vincristine transport by the M(r) 190,000 multidrug resistance protein (MRP): evidence for cotransport with reduced glutathione.** *Cancer Res* 1998, **58**(22):5130-5136.

謝辞

本研究はがん研究会がん化学療法センター所長 藤田直也教授のご指導、ご鞭撻のもとに行わせていただきました。心より御礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、片山量平博士には本研究を直接指導していただき、多くの助言や議論をしてくださいました。心より感謝申し上げます。

結合モデルの解析にあたり、京都大学奥野恭史教授にご助力をいただきました、深く感謝申し上げます。

臨床検体の譲渡にあたり、がん研究会有明病院の長山聡医師にご尽力をいただきました、心より御礼申し上げます。また、検体の提供に同意して頂いた患者様及びそのご家族に心より感謝申し上げます。

COMPARE 解析にあたり、矢守隆夫博士(現 PMDA)をはじめ、がん研究会がん化学療法センター分子薬理部の皆様にご助力をいただきました、真に感謝申し上げます。

また、多くのご指導、ご助言をしていただきました竹本愛博士に深く感謝申し上げます。さらに、大原智子主任研究助手をはじめ、佐藤重男主任研究助手、高見美穂研究助手、小池清恵研究助手等多くの方々よりご指導、ご支援をしていただきました。心より感謝申し上げます。

最後に、公私にわたりご支援をいただきました家族に心より感謝致します。