

論文の内容の要旨

論文題目：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

青山 暁

【序文】

1981 年以来日本人の死因第一位は「がん」であり、死亡率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。近年、がん細胞特異的な分子を標的にした分子標的治療薬の開発が進み、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の発症に関与している。また、EGFR-TKI (EGFR チロシンキナーゼ阻害剤) 耐性の獲得機構にも c-MET が関わるということが報告されており、c-MET を介した獲得耐性については、EGFR-TKI と c-MET 阻害剤の併用により耐性が克服できることが報告されている。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。Tivantinib は選択性が高く、経口投与可能な ATP 非競合的 c-MET 阻害剤として開発され、現在肝がんと大腸がんを対象に臨床試験が進んでいる低分子化合物である。

しかし、これまでに行われた tivantinib の臨床試験では c-MET の発現量と tivantinib の抗腫瘍効果が相関しないと報告されており、細胞株の実験でも原理的には c-MET 阻害剤が効果を示さないはずの KRAS 変異の細胞に対しても増殖阻害活性を示すことが報告されている。これらの知見から tivantinib による増殖阻害活性は c-MET 阻害以外の標的分子に作用することによってもたらされていることが示唆された。

【研究目的】

Tivantinib の増殖阻害活性に c-MET 阻害以外の阻害活性が関与するか検討するために、① Tivantinib の増殖阻害活性を従来の c-MET 阻害剤と比較し、更に c-MET の活性化に対する影響を調べることで tivantinib の c-MET に対する効果を評価すること、② Tivantinib の増殖阻害活性に関わる他の分子標的を同定し、詳細な分子機構を明らかにすることを目的に研究を行った。

【研究方法及び研究結果】

(1) Tivantinib の増殖阻害活性と c-MET 阻害との相関

Tivantinib の細胞増殖阻害活性が c-MET 阻害に依存するかを確認するために、shRNA を用いた c-MET のノックダウン実験で大幅な増殖阻害が見られる c-MET 依存性の細胞とほとんど増殖が阻害されなかった c-MET 非依存性の細胞を用いて、Tivantinib 及び c-MET 特異的阻害剤として知られる PHA-665752 あるいは crizotinib 存在下での増殖阻害活性を比較した。その結果、c-MET 特異的阻害剤 PHA-665752 及び crizotinib では、c-MET 依存性の細胞のみが極めて高い感受性を示して低い IC₅₀ 値を示したのに対し、tivantinib はどちらの細胞にも同程度の薬剤濃度で増殖阻害活性を示した(図 1)。

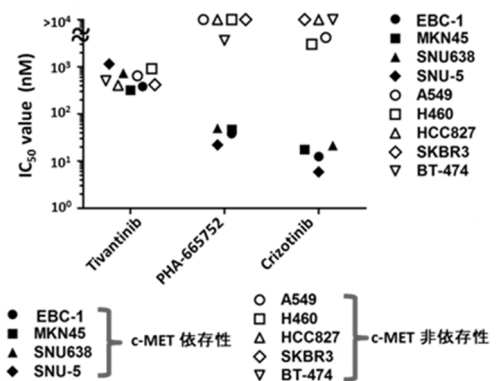


図 1. Tivantinib, PHA-665752, Crizotinib の増殖阻害効果

Tivantinib の c-MET 阻害活性を確認するため、薬剤処理 6 時間後の活性化型 c-MET を、リン酸化 c-MET (p-MET) に対する抗体を用いて Western Blot 法で検討した。通常培養条件下で p-MET が確認される MKN45 細胞及び EBC-1 細胞は、crizotinib の処理で p-MET が消失したのに対し、tivantinib 処理では p-MET レベルにほとんど変化は見られなかった(図 2)。以上の結果から tivantinib の増殖阻害活性は c-MET の阻害によらない別の作用機序で引き起こされていることが強く示唆された。

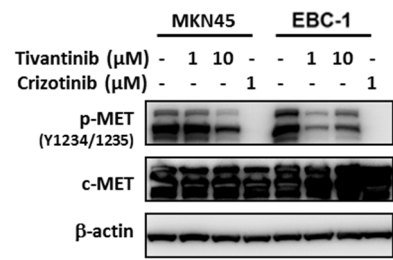


図2. c-MET阻害活性の検討

(2) Tivantinib の分子標的予測

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既知薬物の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った結果、tivantinib は 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。

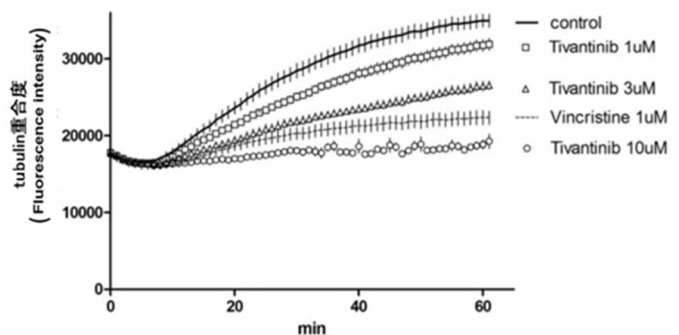


図 3. Tivantinib による tubulin の重合阻害

(3) Tivantinib による微小管阻害作用の検討 (in vitro)

Tivantinib が微小管阻害作用を示すか検討するため、精製した tubulin を阻害剤の存在下でインキュベートし、tubulin 重合への影響を評価した。その結果、微小管重合阻害剤として知られる vincristine が tubulin 重合を濃度依存的に阻害するのと同様に、tivantinib も tubulin 重合を濃度依存的に阻害し、微小管阻害作用を持つことが分子レベルで確認された(図 3)。

これらの結果より、tivantinib は微小管形成を阻害することにより抗腫瘍効果を発揮している可能性が示唆された(図 4)。

(4) Tivantinib による微小管阻害作用の検討 (in cell 及び in vivo)

Tivantinib が細胞レベルで tubulin 重合阻害活性を示すことを定量的に検討するため、薬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。その結果、c-MET 依存性の EBC-1 細胞(図 5)及び非依存性の H460 細胞どちらにおいても c-MET 特異的阻害剤である crizotinib が tubulin 重合に影響を与えなかったのに対し、vincristine 及び tivantinib は濃度依存的に重合 tubulin 量を減少させ、tubulin 重合促進作用が知られる paclitaxel は重合 tubulin 量を増加させた。

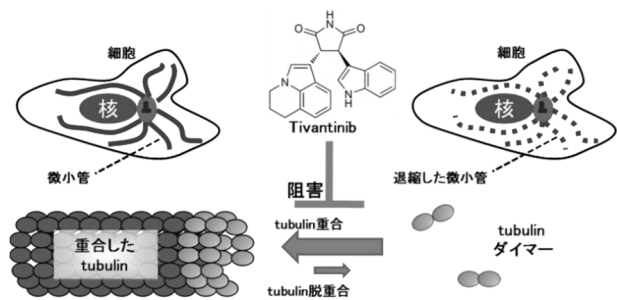


図 4. c-MET 阻害薬として開発された tivantinib の微小管重合阻害効果

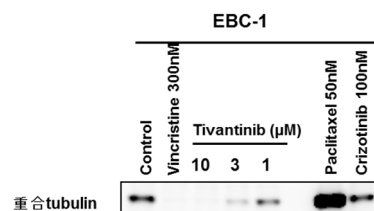


図5. 阻害剤処理細胞における重合tubulin量

更に tivantinib が生体レベルでも tubulin 重合阻害を示すか検討するため、EBC-1 及び H460 細胞を皮下移植した担がんマウスに tivantinib を経口投与し、

腫瘍縮小効果が見られた薬剤投与開始後 18 日の時点で腫瘍を摘出し、Western Blot 法で重合 tubulin 量を定量した。その結果、細胞での実験と同様に *tivantinib* は 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。これらの結果から、*in vivo* でも *tivantinib* が tubulin 重合を阻害することが示唆された。

(5) *Tivantinib* の tubulin 結合部位の探索

Vinblastine や *colchicine* といった微小管阻害剤はそれぞれ tubulin の異なる部位に直接結合することが知られている。*Tivantinib* が tubulin に直接結合するかを検討するため、放射標識した微小管阻害剤と精製 tubulin を用いて結合阻害実験を行なった。その結果、*tivantinib* は *vinblastine* の tubulin への結合を全く阻害しなかったのに対して、*colchicine* の tubulin への結合を競合的に阻害したことから、*tivantinib* は *colchicine* 結合部位に直接結合することが示唆された(図 6)。

実験結果を基に、*tivantinib* と tubulin の三次元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なった。最も確からしいと判定された結合モデルでは *tivantinib* は *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ることが判明し、tubulin と *colchicine* 結合ドメインで直接的に結合することが示唆された(図 7)。

(6) 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

従来の微小管阻害剤に対する獲得耐性機構として、ABC トランスポーターの過剰発現による薬剤の細胞外排出が知られている。*Tivantinib* が薬剤耐性を克服できるか検討するため、MDR1 遺伝子の導入により *vinblastine* に耐性となった KB3-1 細胞に対する *tivantinib* の増殖阻害活性を調べた。その結果、*tivantinib* は親株と耐性株で同程度の薬剤濃度で増殖阻害活性を示した。また、他の ABC トランスポーターをコードする MRP1、BCRP の遺伝子を導入した KB3-1 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(図 8)。

これらの結果から、*tivantinib* は *in vivo* でも *in vitro* 同様に tubulin 重合を阻害し、増殖阻害活性を c-MET 非依存的に示すこと、tubulin の *colchicine* 結合部位に直接結合すること、ABC トラン

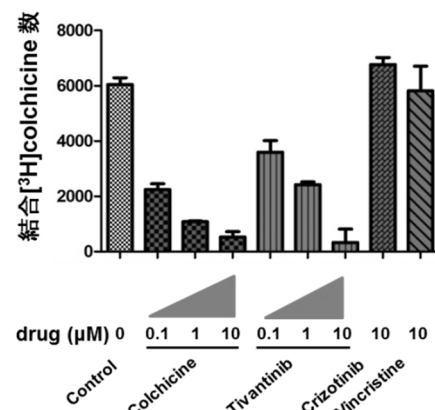


図 6. $[^3\text{H}]$ colchicine の tubulin への結合に対する競合阻害実験

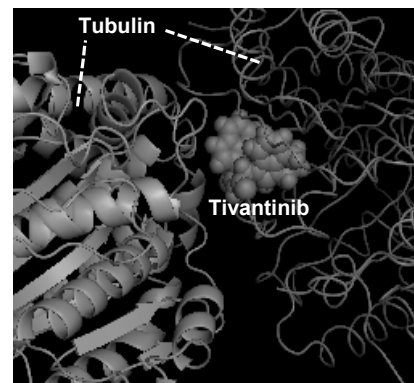


図 7.シミュレーション予測による *tivantinib* と tubulin の結合モデル

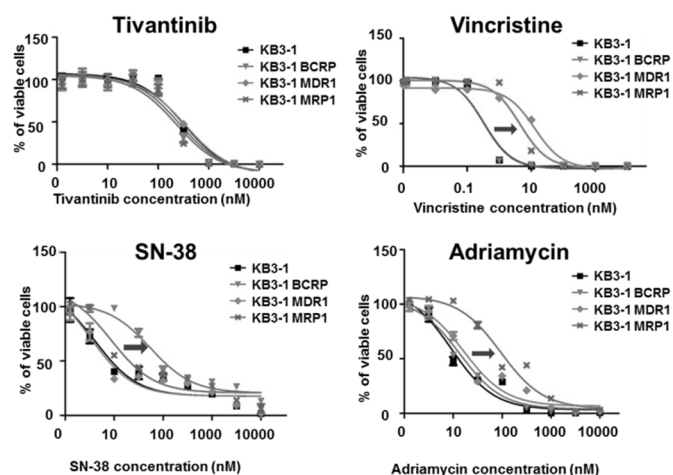


図8. ABCトランスポーター発現細胞に対する*tivantinib*の増殖阻害活性

スポンサーを介した薬剤耐性を克服できることが示唆された。

(7) Tivantinib を用いた新たながん治療戦略

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。KRAS 変異をはじめとする主要ながん遺伝子の変異については、臨床検体をシーケンス解析した。その結果、tivantinib 感受性は KRAS 変異陽性の群と KRAS 野生型の群で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(図 9)。この結果から、tivantinib が KRAS 変異陽性の大腸がんでも有用である可能性が考えられた。

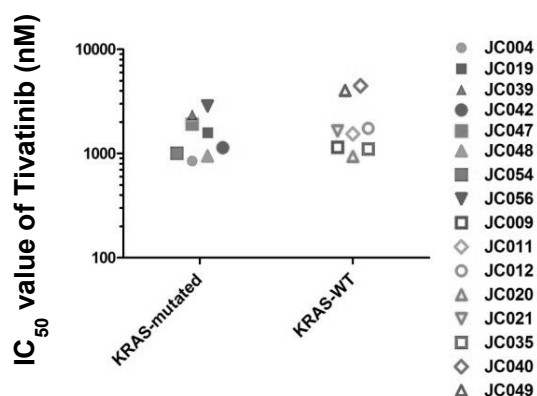


図 9.大腸がん臨床検体由来の細胞に対する tivantinib の増殖阻害活性

[まとめ]

本研究では、これまで c-MET 阻害剤として臨床試験が進んでいる tivantinib の抗腫瘍効果について、これまで発表されてきた知見にとらわれずに研究を進めることで、tivantinib の c-MET 阻害活性は限定的であり、むしろ微小管重合を阻害することで腫瘍増殖抑制を誘導していることを見出すことに成功した。更に、tivantinib が colchicine-tubulin 結合を濃度依存的に阻害することから tivantinib が colchicine 結合部位に直接結合する可能性を見出し、コンピューターシミュレーションにより tivantinib の tubulin 結合モデルを明らかにした。Tivantinib が微小管阻害作用を示すことを報告した論文がほぼ同時期に別グループから発表されているため、研究の信頼性も高いと考えられる。

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 変異陽性の大腸がん細胞に対して増殖阻害活性を示したことから、他の固形がんにおいても tivantinib が良好な臨床成績を示す可能性があることを見出した。

[発表論文]

1. 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.