

①キナーゼ阻害薬

これらの低分子性分子標的薬 435 化合物の 66% にあたる 288 の薬剤が、キナーゼ阻害薬である。この比率は、承認薬の場合とほぼ同じであり、キナーゼを標的とする阻害薬開発は臨床試験ステージにおいても盛んに行われていることがわかる。288 のキナーゼ阻害薬を標的別に分類すると、“マルチターゲット”型阻害薬が 26 剤、チロシンキナーゼ阻害薬が 113 剤、セリン・スレオニンキナーゼ阻害薬が 149 剤となる。

113 剤の阻害薬が標的とするチロシンキナーゼを見てもみると、84 種の阻害薬が計 13 種の受容体型キナーゼ (EGFR/HER2 [21], IGF1R [6], VEGFR [12], PDGFR [3], FGFR [5], CSF1R [2], c-Kit [4], c-Met [17], FLT3 [6], Trk [1], Tie2 [1], Alk [5], Ret [1]; 以下 [] 内の数値は個々の標的に対する開発化合物の数を示す) を標的としている。また 29 種の阻害薬が計 7 種の非受容体型キナーゼ (Src [4], Lyn [2], BCR-ABL [5], Btk [3], Syk [2], FAK [4], JAK [9]) を標的としている。

一方、149 剤の阻害薬が標的とするセリン・スレオニンキナーゼを見ると、計 22 種の酵素が標的になっている。その内訳は、まず 28 剤が MAPK 経路の 3 種の酵素 (MAPK/ERK kinase (MEK) [17], Raf [8], p38MAPK [3]) を標的としている。次に 58 剤が phosphoinositide 3-kinase (PI3K) /Akt/mTOR 経路の 3 種の酵素 PI3K [28], Akt [12], mTOR [18]) を標的としている。さらに 49 剤が細胞周期関連の 6 種の酵素 (cyclin dependent kinase (CDK) [16], wee1 kinase [1], CDC7 [2], checkpoint kinase (Chk) 1/2 [9], aurora kinase [13], polo-like kinase (PLK) [8]) を標的としている。その他の 14 剤は上記の 3 カテゴリー以外の 10 種の酵素 (protein kinase C [4], casein kinase II (CK2) [1], PDK1 [1], DNA-PK [1], PIM [2], TGF β R1 kinase [1], p21 protein (Cdc42/Rac)-activated kinase4 (PAK4) [1], glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3) [1], sphingosine kinase-2 [1], choline kinase alpha [1]) を標的としている。

②キナーゼ以外の分子標的薬

低分子性分子標的薬 435 化合物の 34% にあたる 147 の薬剤は、キナーゼ以外の 48 種を標的としている。これら 48 種の標的の機能は、エピジェネティクス、

テロメア制御、遺伝子発現、蛋白質翻訳後修飾・分解・フォールディング、分子モーター、核外輸送、アポトーシス、オートファジー、Hedgehog/Notch/Wnt 経路、がん幹細胞経路など、多岐にわたっている。ちなみに 2 剤以上の化合物が臨床試験ステージにある標的を化合物数の多い順で並べると、histone deacetylases (HDAC) [23], Hsp90 [18], poly (ADP ribose) polymerase (PARP) [12], mitotic kinesin [9], farnesyltransferase (FTPase) /Ras signaling [8], Hedgehog signaling pathway [7], inhibitor of apoptosis protein (IAP) [6], p53 activation [5], proteasome [4], Bcl-2 (BH3 mimetic) [4], Notch signaling pathway [4], cyclooxygenase-2 (COX-2) [3], telomerase [2], STAT3 phosphorylation [2], CRM1/XPO1 [2], Wnt signaling pathway [2], cancer stem cell pathway [2], Nicotinamide phosphoribosyltransferase [2], CXCR4 antagonist [2], toll-like receptor (TLR) agonist [2] となる。

すでに承認薬が登場している、HDAC [23], Hedgehog signaling pathway [7], proteasome [4] 以外では、Hsp90 [18], PARP [12], mitotic kinesin [9], FTPase/Ras signaling [8], IAP [6], p53 activation [5] に対して、多くの化合物が臨床試験ステージにあることがわかる。

③ HDAC とプロテアソーム, Hedgehog signaling pathway 阻害薬

HDAC 阻害薬とプロテアソーム阻害薬、Hedgehog signaling pathway 阻害薬は、“first-in-class”と呼ばれる先行認可薬が存在するため、現在臨床開発中の薬剤が “best-in-class” となるためには、先行認可薬に対して差別化可能な知見やコンセプトを今後の臨床開発で示す必要がある。

④ PARP 阻害薬

DNA 修復酵素の poly (ADP ribose) polymerase (PARP) の阻害薬については、AZD2281/KU-0059436 が *BRC1/2* 遺伝子変異 (DNA 二重鎖切断修復変異) を有する卵巣がんを層別化した臨床試験で奏効を示したことから、大きな注目を集めた¹⁷⁾。なおこの顕著な効果は、*BRC1/2* 遺伝子変異による DNA 二重鎖切断修復不全と PARP 阻害による DNA 単鎖切断修復の阻害との合成致死効果によるものと考えられ、“が

ん細胞に対する合成致死 synthetic lethality”のコンセプトを支持するものである¹⁸⁾。なお本コンセプトは特定の遺伝子が欠損しているがん細胞が他の異なる遺伝子の機能を停止された場合に細胞死を起こす状態を指し、元来は酵母の遺伝学的概念である。

⑤ HSP 阻害薬

Heat shock protein (HSP) 90 アンタゴニストは16剤もの化合物の臨床試験が進行中である。HSP90はシャペロン活性をもち、顧客蛋白質の多くががん化に関わっていること、またがん細胞でしばしば高発現していることが、選択的な抗がん活性発現を期待する根拠となっている。なお最近、Elledgeらは、がん遺伝子以外の特定の遺伝子にがん細胞の増殖と生存が依存する“non-oncogene addiction：非がん遺伝子中毒”というコンセプトを提唱し、例としてHSP90発現の正の転写因子 HSF1 をあげている^{19,20)}。また別に、チューブリンには作用せず、新規のメカニズムによる細胞分裂の阻害薬の開発を目指して kinesin 阻害薬の臨床開発も進んでいる。

⑥ その他

ファルネシルトランスフェラーゼ (FTase) 阻害薬はRAS機能阻害への期待から大きな注目を集めてきたが、これまでの臨床試験での奏効率は低く、その原因として、ゲラニルゲラニル化修飾も受けるKRASのシグナル伝達を完全に阻害できないことが考えられる。また、チューブリンには作用せず、新規のメカニズムによる細胞分裂の阻害薬の開発を目指して Mitotic kinesin 阻害薬の臨床開発も進んでいる。その他、アポトーシス誘導を狙って、inhibitor of apoptosis protein (IAP) の阻害薬、p53の活性化薬も臨床開発も進んでいる。

なお臨床試験ステージに至っている化合物数は少ないが、cancer stem cell pathway 阻害薬などに代表される、がんの最先端研究より生まれる新規標的に対する新規薬剤が登場し始めている。今後、上述の薬剤が臨床試験において優れた治療成績を収めることにより、毎年一定数が承認され続け、がん医療で使用される分子標的薬が質・量とも着実に充実化することが期待される。

3 抗がん薬のスクリーニングプロセス

前述したように、1980年代以降のがん遺伝子研究を中心とするがんの分子生物学の爆発的進展の恩恵を受けて、抗がん薬のスクリーニングはパラダイムシフトが起こり、現在は分子標的薬一色にほぼ染まっている。しかし、がん化学療法薬における経験則に基づくスクリーニングや開発の方法論の大部分は、分子標的薬には当てはまらなくなっている。ここでは、分子標的薬の基本的な開発戦略を含め、スクリーニングや開発プロセスにおける最新の方法論、研究手法を紹介する。

● バイオマーカーと proof of concept (POC) の重要性

分子標的薬開発の第1ステップであるスクリーニングの標的分子の選択は、抗がん薬の開発上、最も重要な課題である。標的分子は、がんの臨床サンプルでの発現レベルや変異の解析からがんの悪性度と相関し、がん化の原因分子であることが必要である。標的としての妥当性を検証した後、標的を阻害するリード化合物を探索、同定することになるが、その際もリード化合物としての妥当性を検証する必要がある。標的分子と阻害薬の妥当性を検証するためには、将来的な臨床試験での評価を踏まえて、生化学・細胞・実験動物・臨床サンプルレベルの評価系を構築しなければならない。重要な点は、検証のための評価系にバイオマーカーを組み込むことである。バイオマーカーは、薬剤がその分子標的に作用した結果として現れる薬理作用を反映する pharmacodynamic (PD) biomarker と、臨床試験で感受性あるいは耐性を示す患者を層別するために用いられる predictive biomarker に分類することができる。なおFDAは2006年にファーマコゲノミクス関連の白書である Critical Path Opportunities Report を発表し、筆頭課題として“新規バイオマーカーと疾患モデルの開発”をあげ、分子標的薬の開発の際のバイオマーカーの重要性を強調している^{21,22)}。

また最近では、proof of concept (POC) という考えのもと、臨床試験の早期段階で、薬剤の標的への作用の結果をPDバイオマーカーのレベルで証明することの重要性が強く指摘されている。がんの分子標的薬にお

表 I-1-3 抗がん薬スクリーニングの最新の研究手法

I 創薬標的の探索と機能検証	
① オンコゲノミクス	次世代シーケンサーによる体細胞変異の網羅的解析・同定, アレイ CGH (comparative genomic hybridization) 法によるゲノム構造異常・コピー数異常遺伝子の網羅的解析・同定
② エピゲノム (DNA メチル化やヒストン修飾などのゲノムの後天的修飾) プロファイリング	クロマチン免疫沈降・次世代シーケンサー解析等による発現亢進・サイレンシング遺伝子の網羅的解析・同定
③ トランスクリプトームプロファイリング	マイクロアレイ・次世代シーケンサー解析によるがん特異的な発現亢進遺伝子・Non-Coding RNA の網羅的解析・同定, パスウェイ・ネットワーク解析
④ プロテオームプロファイリング	質量分析計によるがん特異的な発現亢進蛋白質・翻訳後修飾・蛋白質間相互作用の網羅的解析・同定
⑤ メタボロームプロファイリング	質量分析計によるがん特異的な発現代謝物質の網羅的解析・同定
⑥ ケミカルゲノミクス	フェノタイプ (表現型) 原因分子・合成致死標的分子と阻害薬の網羅的解析・同定, 創薬標的候補遺伝子の機能解析・妥当性検証
⑦ RNA 干渉	フェノタイプ (表現型) 原因分子・合成致死標的分子の網羅的解析・同定, 創薬標的候補遺伝子の機能解析・妥当性検証
⑧ 遺伝子改変動物 (トランスジェニック動物, ノックアウト動物)	創薬標的候補遺伝子の機能解析・妥当性検証
II 創薬リード化合物の探索・最適化から非臨床解析まで	
① 生化学アッセイ法 (酵素活性, リガンド・受容体 / 蛋白質間相互作用解析等)	enzyme-linked immuno sorbent assay (ELISA) 法, scintillation proximity assay (SPA) 法, 時間分解蛍光法 (HTRF, LANCE 等), 化学増幅型ルミネッセンス法 (alphaScreen), 表面プラズモン共鳴 (surface plasmon resonance, SPR) 法
② 細胞ベースアッセイ法 (細胞増殖, 浸潤, 細胞周期, 細胞内シグナル伝達等のバイオイメージング, 遺伝子発現解析等)	MTT 法, ATP 検出法, スフェロイド形成法, フォーカス形成法, 軟寒天コロニー形成法, Boyden チャンバー法, フローサイトメトリー法, FLIM-FRET (蛍光寿命イメージング顕微鏡 / 蛍光共鳴エネルギー移動) 法, レポータージーンアッセイ (ルシフェラーゼ化学発光法)
③ ハイスループットスクリーニング (HTS) システム	高密度プレート (384, 1536 ウェルプレート), 高機能プレートリーダー, 自動化スクリーニングロボット
④ 化合物ライブラリー	コンビナトリアルケミストリー (スプリット・ミックス法, パラレル法) による網羅的合成, 新規骨格天然由来化合物の探索, ケモインフォマティクスによる構造多様性化合物ライブラリーの構築, "Lipinski's rule of five" を考慮した物性・薬らしさ druglikeness の解析
⑤ ドラッグデザイン (メディカルケミストリー)	蛋白質構造の網羅的解析・立体構造予測, <i>in silico</i> ドッキングシミュレーション, fragment-based drug design (FBDD) による高活性化合物の合成, quantitative structure-activity relationship (QSAR)
⑥ 作用機構解析, proof of concept (POC)	アフィニティービーズテクノロジー・化合物アレイによる薬剤標的分子解析, cancer cell informatics (がん細胞株パネルへの薬剤感受性とゲノム情報のデータマイニングによる薬剤の標的予測等) 解析, connectivity map (がん細胞株への薬剤曝露後の遺伝子発現 signature 解析による薬剤作用機構予測) 解析, バイオマーカーを用いた PK/PD 試験 (薬剤の標的分子への作用確認)
⑦ 遺伝子改変マウスモデル	ヒトがん移植用高度免疫不全マウス, がん種特異的な発がんマウスモデル, 薬効・転移評価用発光・蛍光イメージングマウスモデル
⑧ 薬物代謝・動態, 安全性試験	<i>In vitro</i> ADME/Tox プロファイリング, p450・hERG channel 阻害評価, トキシコゲノミクスによる毒性・副作用予測

いてはとくに、バイオマーカーと POC への取り組みが、医薬品開発の成功確率を高めるためのキーファクターと考えられる。なお POC は臨床試験だけでなく、リード化合物としての妥当性検証のステップでも、適切な評価系を構築して実施されるべきである^{22~24)}。

● スクリーニングのプロセスと手法

創薬プロセスは、創薬標的分子の同定・機能検証を最上流ステップとし、以降、創薬リード化合物の探索・

最適化・作用機構解析、薬理評価、薬物代謝・動態、安全性試験、開発化合物の非臨床試験・臨床試験の各ステップへと続き、最終的に認可申請、認可で終了する。

表 I-1-3 に、抗がん薬スクリーニングで用いられる最新の研究手法を、「I 創薬標的の探索と機能検証」, 「II 創薬リード化合物の探索・最適化から非臨床解析まで」の 2 段階に分けて示した。

① 創薬標的分子の探索・同定

創薬の第 1 ステップであるスクリーニングの標的分子

子の探索・機能検証は、創薬プロセスのなかで最重要と言っても過言ではない。前述したように、現在認可されている分子標的薬が標的とする分子の多くは、HER2, EGFR, BCR-ABL, Kit などのがん遺伝子産物である。これらがん遺伝子産物は、臨床的にも創薬標的としての妥当性が検証(バリデーション)されており、1980年代のがんの分子生物学は、がん遺伝子というきわめて重要な創薬標的を生み出したといえる。現在ではヒトがん関連遺伝子の数は400程度と考えられているが、現在スクリーニングの標的となっていないがん遺伝子でも、実際のがん組織で活性化や発現の亢進が確認され、またRNA干渉によるノックダウンでがん細胞の増殖抑制やアポトーシス誘導、さらには正常細胞のがん化誘導活性が確認されれば、創薬標的となりうると考えてよい。

がん遺伝子に続く新規創薬標的を同定することは、きわめて重要な課題である。1980年代のがん遺伝子研究以降もがんの分子生物学は進展し、細胞周期、蛋白質分解、アポトーシス、エピジェネティクスなどの新たな研究領域が生まれ、図 I-1-1 や表 I-1-2 で示されている数多くの標的に対して、薬剤スクリーニングが行われ、低分子阻害薬やモノクローナル抗体の臨床試験が行われている。

今や、従来のがんの分子生物学的・病理学的アプローチを超えて、ゲノム科学的な研究手法による網羅的アプローチによって標的探索が進められている。すなわち、①オンコゲノミクスによるがん細胞でのDNA変異・ゲノム構造異常・コピー数異常遺伝子の同定、②エピゲノムプロファイリングによるがん細胞での発現亢進遺伝子の同定、③トランスクリプトームプロファイリングを利用したがん特異的発現亢進遺伝子やマイクロRNAの同定、④質量分析によるプロテオームプロファイリングを利用したがん特異的な発現亢進蛋白質の同定などである。これらの網羅的解析により、ゲノム・遺伝子レベル、RNAレベル、蛋白質レベルで、がんで活性化あるいは発現上昇している標的候補分子の同定が試みられている。現時点では臨床試験に至る低分子化合物を生み出すに至った新規標的の同定は少ないようだが、がんで高発現している抗原蛋白質に対して、モノクローナル抗体を創製し、臨床試験のステージにまで進んでいるケースはある程度

みられる。

これまでに各種がん由来する100以上のがん組織について、エキソーム解析が行われており²⁵⁾、たとえば膀胱がんの場合は1腫瘍あたり平均63カ所の遺伝子異常が検出された²⁶⁾。これらの遺伝子異常から、膀胱がんで亢進している12のコアとなるシグナル伝達経路を導き出し、膨大な数となる個々の異常遺伝子を標的とするのではなく、これらの経路を標的とする薬剤開発が現実的であるとのコンセプトが提唱されている²⁶⁾。

また最近、機能ゲノミクスのアプローチにより、si/shRNAライブラリーの発現による機能の喪失を指標として、がんの増殖や生存に関わる遺伝子をゲノム全体にわたって探索・同定することが可能になってきた²⁷⁾。またこのアプローチは、合成致死性と組み合わせることにより、がんで共依存的に働く経路を合理的に同定することを可能とする。実際、活性化したKRASと合成致死性を示すパートナーとして、非標準的なI κ BキナーゼTBK1が同定され、TBK1の抑制により、KRASの発現に依存して特異的にアポトーシスを誘導できることが示されている²⁸⁾。

②創薬シード化合物の一次スクリーニング

表 I-1-3 のIIに示したように、創薬シード化合物のスクリーニングのための一次アッセイ系には、生化学アッセイ法と細胞ベースアッセイ法が用いられる。前述した手法で同定・選択した標的分子を組み込んだアッセイ系を構築する必要があるが、どのようなアッセイ系とするかは、標的分子のもつ活性による。たとえば標的分子がプロテインキナーゼやプロテアーゼなどの酵素活性をもつ場合やリガンドに対する受容体である場合、化学発光や蛍光を検出する生化学アッセイ法の適用が可能である。また転写因子や細胞内シグナル伝達に関わる分子の場合、標的を組み込んだ組み換え細胞を構築し、たとえばレポーター遺伝子アッセイ(ルシフェラーゼ化学発光法)で細胞内シグナル伝達や遺伝子発現を定量化することが可能である。なおヒトがん細胞の増殖は、MTT [3-(4, 5-di-methylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, yellow tetrazole] 法による生細胞の染色で測定することが多い。

スクリーニングを実際に行うにあたっては、検体数が多い場合など、必要に応じて、高密度プレート(384、

1536 ウェルプレート), 高機能プレートリーダー, 自動化スクリーニングロボットを利用し, ハイスループト化(高効率化, 高速化)する。

スクリーニングソースの化合物ライブラリーは, 構造多様性をもち, また物性的にも質的, 量的にも優れたものを用いる必要がある。製薬企業では, 今では各企業が独自に構築した 100 万化合物レベルのライブラリーが使用されている。大学などアカデミアの研究者が抗がん薬のスクリーニングを実施する場合は, 独自にライブラリーや天然物のスクリーニングソースを有していない限り, ライブラリーを外部機関より入手する必要がある。化合物ライブラリーの提供組織としては, わが国では, 文部科学省新学術領域研究「がん研究分野の特性等を踏まえた支援活動」化学療法基盤支援活動班²⁹⁾, 理化学研究所基幹研究所ケミカルバイオロジー研究領域ケミカルバイオロジー研究基盤施設³⁰⁾, 東京大学創薬オープンイノベーションセンター³¹⁾がある。

③創薬シード化合物の二次評価, 最適化

スクリーニングの結果, 得られる一次ヒット化合物では, たとえば生化学アッセイ法で得られるヒット化合物の場合, 細胞レベルのアッセイ系で二次評価を行い, 標的分子の下流の細胞内シグナル伝達や遺伝子発現に対する作用やヒトがん細胞に対する細胞増殖抑制活性を検討することが必要である。なおこの種の評価は, 得られた一次ヒット化合物がアッセイ系の偽陽性物質でないこと, 選択的な作用により活性を示していること, 細胞膜透過性を有することなどを保証する。その後さらに, 細胞レベルの高次評価を行い, スフェロイド形成能, フォーカス形成能, 軟寒天培地中でのコロニー形成能, Boyden チャンバー法による細胞浸潤能などの評価により, がん機能に対しての抑制活性を検証する。

一次ヒット化合物は一般的に活性が弱く, 標的以外への非選択的作用もみられる場合が多い。そこで高活性で特異性の高い誘導体合成が行われることになる。以前は経験に基づくメディシナルケミストリーのアプローチが主流であったが, 最近では, 標的蛋白質の立体構造が解明されている場合には, 阻害薬との複合体の構造解析や *in silico* ドッキングシミュレーションのほか, 特異的な相互作用分子を見出し, それらを結合さ

せることにより親和性のアップを狙う fragment-based drug design (FBDD)³²⁾などの合理的なアプローチにより, ドラッグデザインが展開される。一方, 標的蛋白質の構造が未知の場合, quantitative structure-activity relationship (QSAR) と呼ばれる手法により誘導体合成が行われることもある。なおヒット化合物からの誘導体合成展開は, 活性面のみでなく, 代謝安定性, 薬物代謝酵素への阻害作用などの薬物動態的な観点からも実施され, 最適化される。

分子標的薬の開発では, バイオマーカーの利用や POC の観点からも, 標的分子や抗がん作用のメカニズムが分子レベルで解明されていることが必要である。抗がん薬のスクリーニングでは, ヒトのがん細胞あるいはモデル生物を用いる表現型(フェノタイプ)スクリーニングが現在もよく実施されている^{33, 34)}。生化学アッセイ法で得られるヒット化合物の場合と異なり, 表現型スクリーニングで見出されるヒット化合物に関しては, 標的分子や抗がん作用のメカニズムの解明が重要課題となる。がん研究所の矢守らは, 39 種のヒトがん細胞パネル JFCR39 を用いた薬剤感受性プロファイルの解析により薬剤の標的分子を同定する手法(cancer cell informatics)を開発している。その成果として, 作用点が未知であった ZSTK474 の標的分子が phosphoinositide 3-kinase (PI3K) であると推定し, 実際の生化学アッセイの結果, 同化合物が PI3K の阻害薬であることを証明している³⁵⁾。また connectivity map と呼ばれる遺伝子発現データベースおよび解析用ソフトウェアも開発されており, がん細胞株への薬剤曝露後の遺伝子発現パターン解析により薬剤の作用メカニズムの予測に利用可能である³⁶⁾。

④創薬シード化合物の非臨床評価

ヒット化合物の細胞レベルでの効果検証後, マウスを用いて血漿中濃度等の薬物動態を検討する。薬剤への曝露が確認された後, ヒット化合物に感受性を示すがん細胞をヌードマウスに移植し, 腫瘍縮小効果の確認のほか, バイオマーカーを用いた PK/PD 試験を実施する³⁷⁾。PK/PD 試験において, 標的分子への作用が確認できれば, これは *in vivo* の POC であり, ヒット化合物はリード化合物となる。分子標的薬の開発過程において, この POC は非常に重要なマイルストーンである。この POC プロセスで用いられたバイオ

マーカーが初期臨床試験でも使用されることになる。なお通常用いられるヌードマウスへのヒトがん細胞移植系のほかに、発光・蛍光イメージングマウスモデルなどの遺伝子改変マウスモデルも PK/PD 試験に最近よく用いられている。

毒性面での評価は、初期ステージでは一般的に困難であるが、臨床的に重要な問題となる心臓毒性、QTc 延長を回避する目的で hERG チャネルに対する阻害作用を初期ステージで検討することが多くなっている。またヒトへの外挿を目的として、トキシコゲノミクスによる毒性・副作用予測の研究が進んでおり、今後の実用化が期待される。

ここまで、低分子抗がん薬のスクリーニング、開発を念頭に置いて、創薬標的分子の同定・機能検証から、創薬リード化合物の探索・最適化・作用機構解析、薬理評価、薬物代謝・動態、安全性試験について述べてきた。これらのステップを無事通過すると、リード化合物は開発化合物となる。開発化合物は、次に、薬物動態試験、薬効・薬理試験、安全性試験を good laboratory practice (GLP) レベルで実施する非臨床試験のステップに入る。その後、臨床試験のステップへと続き、最終的に認可申請、認可で創薬プロセスは終了となる。

● 抗体医薬品の開発

最後に抗体由来の分子標的薬の開発について、低分子性の分子標的薬との差異の観点から説明する。現在、抗体由来の分子標的薬は、毒素や放射性物質で標識した抗体医薬品を含めると世界で 10 種以上認可されている。一般に抗体は標的分子に対して高い特異性と親和性を有し、標的以外には作用しないことから、高い効果と少ない副作用が期待できる。選択された創薬標的分子が細胞内に存在する場合、抗体は創薬の対象とならないが、標的分子が細胞膜や細胞外に局在する場合は抗体医薬および低分子薬剤の双方の開発が可能である。たとえば、EGFR、HER2 などの受容体型チロシンキナーゼでは、リガンドと受容体の結合阻害薬は抗体医薬と低分子薬剤の双方が考えられるが、細胞内のチロシンキナーゼの触媒ドメインを標的とする場合は低分子薬剤に限定される。また、機能をもたずががん特異的に発現する膜蛋白質では、抗体医薬に限

定され、antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC：抗体依存性細胞傷害)活性あるいは complement-dependent cytotoxicity (CDC：補体依存性細胞傷害)活性による細胞傷害活性を期待することになる。現在の抗体医薬品の開発は、臨床で有効性が実証された標的分子である CD20 や EGFR、HER2、VEGF 等に開発競争が集中しているが、今後の課題として、有望な新規標的分子の発見と新世代の抗体医薬品の開発が期待される。

4 今後の展望

2003 年にヒトゲノムが完全解読され、ゲノム科学の研究手法や研究成果は、創薬システムを大きく変えつつある。ゲノム情報や生命・情報科学の先端技術は、前述したように、創薬プロセス全般に着実に浸透し、その質的向上に大きく貢献している。

またヒトゲノム解読を契機として、疾患の個性や個人の体質を治療に反映させる、いわゆる個の医療の時代に突入しているが、がん分野においてはとくに、それが現実のものになりつつある。すなわち、がんの個性を診断し、それに合わせた治療を行う事例が増えつつある。抗がん薬のなかで分子標的薬の占める割合は、今後いっそう高まるものと予想されている。

信頼できる調査報告書³⁰⁾によると、2009 年の時点で日米欧(フランス、ドイツ、イタリア、スペイン、英国)の主要 7 カ国における抗がん薬全体の売上総額は 406 億ドルであるのに対し、2019 年の予測は 572 億ドルであり、今後 10 年間は 3.5% の年成長率で伸びると予測されている。その伸びを牽引するのが分子標的薬である。上位 10 位までの抗がん薬を見ると、2009 年には分子標的薬が 5 品目存在するのに対し、2019 年にはじつに 9 品目が分子標的薬になると予測されている。2019 年には、分子標的薬が標準治療のキードラッグの骨格を構成するようになると考えられる。またさらに、ニッチながん種へも分子標的薬が浸透していると予想される。

新薬の開発には、一般に 10 年以上の研究開発期間と、数百億円ともいわれる膨大な研究開発費が必要でありながら、開発の成功確率は低く、たとえば抗がん薬の場合、臨床に入った薬剤の 5% しか認可に至らないとの統計がある。この成功確率の低さを改善するた

めに、これからの時代は、バイオマーカーの活用と POC の実践により、科学的合理性に裏づけられた開発を創薬の初期ステージから一貫して進める必要がある。今後の抗がん薬の開発は、分子標的治療を基盤とし、バイオマーカーをフルに活用することによって、細かく層別化された創薬を目指すことになると思される。

これまでに認可されている分子標的薬のかなりの部分はアカデミアとバイオベンチャーに由来する。またがんの分子生物学、ゲノム科学を牽引してきたのもアカデミアである。現在、わが国ではがんの基礎研究を橋渡しして抗がん薬の開発につなげるトランスレーショナルリサーチへの期待が非常に大きく、さまざまな研究支援体制が整いつつある。たとえば、文部科学省の新学術領域研究「がん研究分野の特性等を踏まえた支援活動」化学療法基盤支援活動では、抗がん薬開発を行う研究者に細胞レベルから *in silico* まで多彩な活性スクリーニング基盤を提供して、国内での革新的がん治療薬開発の総合的支援を行っている。抗がん薬開発に興味をもつ多くの研究者がこのような支援を受け、近い将来、わが国発の抗がん薬が多数創製されることを期待したい。

◆ 文 献 ◆

- 1) 矢守隆夫：抗がん薬スクリーニングの変遷。化学療法の領域, 19 : 16-21, 2003.
- 2) Gilman A, et al. : The biological actions and therapeutic applications of the b-chloroethyl amines and sulfides. *Science*, 103 : 409-415, 1946.
- 3) Gilman A : The initial clinical trial of nitrogen mustard. *Am J Surg*, 105 : 574-578, 1963.
- 4) Farber S, et al. : Temporary remissions in acute leukemia in children produced by folic acid antagonist, 4-Aminopteroyl-glutamic acid (Aminopterin). *N Engl J Med*, 238 : 787-93, 1948.
- 5) Zubrod CG, et al. : Historical background of the National Cancer Institute's drug development thrust. *Natl Cancer Inst Monogr*, 45 : 7-11, 1977.
- 6) Sausville EA, et al. : Molecules for the millennium : how will they look? *New drug discovery year 2000. Br J Cancer*, 83 : 1401-1404, 2000.
- 7) Ishidate M, et al. : Experimental studies on chemotherapy of malignant growth employing Yoshida sarcoma animals (II) : effect of N-oxide derivatives of nitrogen mustard. *Proc Jpn Acad*, 27 : 493-500, 1951.
- 8) Hata T, et al. : Mitomycin, a new antibiotic from *Streptomyces*. *J Antibiot*, 9 : 141-146, 1956.
- 9) Wakaki S, et al. : Isolation of new fractions of antitumor mitomycins. *Antibiot Chemother*, 8 : 228-240, 1958.
- 10) Umezawa H, et al. : New antibiotics, bleomycin A and B. *J Antibiot*, 19 : 200-209, 1966.
- 11) Drug Discovery at the National Cancer Institute : Fact Sheet (<http://www.cancer.gov/cancertopics/factsheet/NCI/drugdiscovery>).
- 12) 水上民夫：がんにおける新しい創薬の展開。癌と化学療法, 35 : 2293-2300, 2008.
- 13) Hanahan D, et al. : Hallmarks of Cancer : The Next Generation. *Cell*, 144 : 646-674, 2011.
- 14) Weinstein IB : Addiction to oncogenes-the Achilles heal of cancer. *Science*, 297 : 63-64, 2002.
- 15) Rodriguez-Paredes M, et al. : Cancer epigenetics reaches mainstream oncology. *Nat Med*, 17 : 330-339, 2011.
- 16) がん分子標的薬開発状況に関する情報。文部科学省新学術領域研究「がん研究分野の特性等を踏まえた支援活動」化学療法基盤支援活動 (<http://scads.jfcr.or.jp/db/table.html>) .
- 17) Ashworth A : A Synthetic Lethal Therapeutic Approach : Poly (ADP) Ribose Polymerase Inhibitors for the Treatment of Cancers Deficient in DNA Double-Strand Break Repair. *J Clin Oncol*, 26 : 3785-3790, 2008.
- 18) Kaelin WG Jr : The concept of synthetic lethality in the context of anticancer therapy. *Nat Rev Cancer*, 5 : 689-698, 2005.
- 19) Solimini NL, et al. : Non-oncogene addiction and the stress phenotype of cancer cells. *Cell*, 130 : 986-988, 2007.
- 20) Luo J, et al. : Principles of Cancer Therapy : Oncogene and Non-oncogene Addiction. *Cell*, 136 : 823-837, 2009.
- 21) 横井治彦 他：個別化医療に向けた FDA のイニシアティブ—ファーマコゲノミクス関連ガイダンスを中心に—。がん分子標的治療, 5 : 50-57, 2007.
- 22) 水上民夫 他：がんをとりまく医療環境—抗がん剤開発の環境変化を中心として—。医学のあゆみ, 222 : 965-970, 2007.
- 23) 秋永士郎：抗がん剤の最先端創薬開発プロセスの検証。Mebio, 26 : 118-125, 2009.
- 24) de Bono JS, et al. : Translating cancer research into targeted therapeutics. *Nature*, 467 : 543-549, 2010.
- 25) Stratton MR : Exploring the genomes of cancer cells : progress and promise. *Science*, 331 : 1553-1558, 2011.
- 26) Jones S, et al. : Core signaling pathways in human pancreatic cancers revealed by global genomic analyses. *Science*, 321 : 1801-1806, 2008.
- 27) Schlabach MR, et al. : Cancer proliferation gene discovery through functional genomics. *Science*, 319 : 620-624, 2008.
- 28) Barbie DA, et al. : Systematic RNA interference reveals that oncogenic KRAS-driven cancers require TBK1. *Nature*, 462 : 108-112, 2009.
- 29) 寄託化合物ライブラリーの構築とその提供。文部科学省新学術領域研究「がん研究分野の特性等を踏まえた支援活動」化学療法基盤支援活動 (<http://scads.jfcr.or.jp/kit/library.html>) .
- 30) 理化学研究所基幹研究所ケミカルバイオロジー研究領域ケミカルバイオロジー研究基盤施設 (<http://www.asi.riken.jp/jp/laboratories/departments/cbd/cl-bio/index.html>) .
- 31) 東京大学創薬オープンイノベーションセンター (<http://www.ocdd.u-tokyo.ac.jp/>) .
- 32) Hajduk PJ, et al. : A decade of fragment-based drug design : strategic advances and lessons learned. *Nat Rev Drug Disc*, 6 : 211-219, 2007.
- 33) Terstappen GC, et al. : Target deconvolution strategies in drug discovery. *Nat Rev Drug Disc*, 6 : 891-903, 2007.
- 34) 山下順範 他：酵母宿主のフォワードケミカルゲノミクスによる抗癌剤創薬の展開。化学と生物, 45, 2-4, 2007.
- 35) Yaguchi S, et al. : Antitumor activity of ZSTK474, a new phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor. *J Natl Cancer Inst*, 98 : 545-556, 2006.
- 36) Lamb J, et al. : The Connectivity Map : Using Gene-Expression Signatures to Connect Small Molecules, Genes, and Disease. *Science*, 313 : 1929-1935, 2006.
- 37) Schilsky RL, et al. : The translational research working group developmental pathway for Anticancer agents (Drugs or Biologics). *Clin Can Res*, 14 : 5685-5691, 2008.
- 38) Datamonitor 社調査報告書 : Commercial Insight Top 20 cancer therapy brands forecast. IMHC0317, 2010.
- 39) 文部科学省新学術領域研究「がん研究分野の特性等を踏まえた支援活動」化学療法基盤支援活動 (<https://scads.jfcr.or.jp/>) .

[水上民夫]

日本臨牀 72 卷 増刊号 2 (2014 年 2 月 20 日発行) 別刷

最新がん薬物療法学

—がん薬物療法の最新知見—

II がんの新規治療を目指した基礎研究

新しいがん薬物療法への革新技術

がん細胞パネルバイオインフォマティクスによる
新たな分子標的抗がん剤創薬とバイオマーカー探索

旦 慎吾

II がんの新規治療を目指した基礎研究

新しいがん薬物療法への革新技術

がん細胞パネル-バイオインフォマティクスによる 新たな分子標的抗がん剤創薬とバイオマーカー探索

Cancer cell line panels to explore molecular targeted anticancer compounds and their biomarkers via bioinformatics approach

旦 慎 吾

Key words : がん細胞株, 抗がん剤スクリーニング, NCI60, JFCR39, 効果予測バイオマーカー

はじめに

抗がん剤によるがんの薬物療法は、外科治療、放射線療法と並んでがん治療において重要な役割を占めている。しかしながら、ほんの15年前までは、抗がん剤がよく奏効し治療または長期の延命が期待できるがんは、白血病や悪性リンパ腫など血液腫瘍を除くと精巣腫瘍や子宮絨毛腫瘍など一部に限られており、固形腫瘍で奏効する抗がん剤の開発が望まれていた。そのころまで、抗がん物質のスクリーニング法として、マウス白血病モデルを用いたスクリーニングが長年行われてきたが、これから見いだされた抗がん剤は、白血病に奏効するものの、その多くは固形腫瘍には奏効しない。このような背景から、固形腫瘍で奏効する抗がん物質を選別するスクリーニング系を構築する必要性があった。

本稿では、アメリカ国立がん研究所(NCI)およびがん研究会(JFCR)で行われてきた、がん細胞パネル-バイオインフォマティクスを用いた抗がん剤スクリーニングと作用メカニズム予測について概説するとともに、その発展形として、がん細胞パネルを用いたバイオマーカー探索の取り組みについて紹介する。

1 NCIにおけるがん細胞パネルスクリーニング

1951年にヒト子宮頸がんよりHeLa細胞が世界で初めて樹立されて以来、多種多様のがんから細胞株が樹立され、がんの研究には欠かせない重要なツールとなっている。NCIでは、1980年代、従来のマウス白血病モデルによるスクリーニング系では見いだせない固形がん奏効する抗がん剤を同定するために、固形腫瘍由来の培養がん細胞株を用いたスクリーニング系の開発に着手した。まず、肺がん細胞株を集めて肺がん奏効する薬剤のスクリーニングを試みたが、肺がん奏効する薬を同定するためには肺がん以外の細胞を対照に置く必要がある。当時、培養可能な正常細胞は線維芽細胞と腎上皮細胞しか手に入らず、線維芽細胞は概して抗がん剤耐性、逆に腎上皮細胞は概して抗がん剤感受性を示し、適切なコントロールとして使えなかった。その代わり他の臓器由来のがん細胞株をコントロールとして使うこととなった。その結果、肺と併せて9種類の臓器(白血病、大腸、中枢神経系、腎、メラノーマ、卵巣、乳房、前立腺)由来の60種類のがん細胞株からなるパネ

Shingo Dan: Division of Molecular Pharmacology, Cancer Chemotherapy Center, Japanese Foundation for Cancer Research (公財)がん研究会がん化学療法センター 分子薬理部

0047-1852/14/ ¥60/頁/JCOPY

ル(NC
この
奏効す
ease-
のであ
感受性
感受性
作用メ
の特長
オマラ
ムを予
COMI
がん剤
取得し
スとす
ニズム
ータへ
まり、
であり
系とな
用した
より開
を中心
け付け
過した
フィン
ハリ
ロイン
本化合
って、
ンとの
重合を
成誘導
食品医
ProSc
発した
うち一
で増殖
は他の
な抗がん
れらに
ロテフ

ル(NCI60細胞パネル)が完成した(表1)¹⁾

このように、NCI60はそもそも臓器特異的に奏効する抗がん剤をスクリーニングする(disease-oriented screening)目的で始められたものであるが、種々の代表的な抗がん剤を用いて感受性を測定すると、各薬剤のNCI60に対する感受性スペクトル(フィンガープリント)はその作用メカニズムを反映することが示された。この特性を利用することにより、バイオインフォマティクスを用いて化合物の作用メカニズムを予測するCOMPARE解析法を開発した。COMPARE解析は、作用メカニズムが既知の抗がん剤や各種の阻害剤のフィンガープリントを取得してデータベース化し、それをレファレンスとすることにより、未知の化合物の作用メカニズムをそのフィンガープリントの特性からデータベース解析により評価するものである。つまり、細胞ベースの抗がん剤スクリーニング系でありながら、多様な分子標的スクリーニング系となりうる。NCIでは、COMPARE解析を利用したNCI60パネルスクリーニングを1989年より開始し、これまでに米国内外のアカデミアを中心に40万を超える合成・天然化合物を受け付け、3細胞株でのプレスクリーニングを通過した15万の化合物についてNCI60に対するフィンガープリントデータを取得している¹⁻³⁾。

ハリコンドリンBは、名古屋大・上村らがクロイソカイメンより単離した天然化合物である。本化合物は、NCI60パネルスクリーニングによって、チュブリン重合阻害剤であるメイタンシンとの類似性が見いだされ、実際にチュブリン重合を阻害することが示された⁴⁾。本剤の全合成誘導体であるエリブリンは、2010年に米国食品医薬品局(FDA)に承認されている。一方、ProScript社(現Millennium社)のAdamsらが開発した一連のボロン酸ジペプチドは、NCI60のうち一部のがん細胞にサブナノモラーの濃度で増殖抑制を起し、そのフィンガープリントは他の既存の抗がん剤とは全く異なるユニークな抗がん剤スペクトルを示すことがわかった。これらはプロテアソーム阻害活性をもち、20Sプロテアソーム活性が高い化合物ほど増殖抑制濃

度が低いことから、プロテアソーム阻害剤が新しいクラスの抗がん剤になることが示された⁵⁾。このうちPS-341(ボルテゾミブ)は2004年に多発性骨髄腫治療薬としてFDAに承認されている。これら以外にも、ヒストンデアセチラーゼ阻害剤ロミデプシン、サイクリン依存性キナーゼ阻害剤フラボピリドールなどがこのNCI60パネルスクリーニングによって同定されている⁶⁾。

2 日本版NCI60であるJFCR39 パネルの構築とその運用

日本では、1970年代よりがん研でP388マウス白血病モデルを用いた抗がん剤スクリーニングが行われてきた。米国でNCI60によるスクリーニングが始まると、がん研の矢守はNCIからシステムを導入し、NCI60の一部の細胞株に日本人に多い胃がん細胞株などを加えて新たに39種類のがん細胞株からなるパネル(JFCR39)を樹立した(表1)。矢守らは、JFCR39を用いたCOMPARE解析により新規トポイソメラーゼ阻害剤MS-247、新規テロメラーゼ阻害剤FJ-5002などを同定し、システムの有用性を実証した。1995年より文部省(当時)がん特定領域研究の支援活動としてJFCR39パネルスクリーニングを運用し、現在も文部科学省・がん支援活動としてアカデミアほか国内の研究者に提供している[<http://scads.jfcr.or.jp/>]¹⁰⁾。

ZSTK474は、全薬工業の矢口らが見いだした抗がん物質で*in vitro*および*in vivo*で高い抗腫瘍効果を発揮するものの、その分子メカニズムは不明であった。JFCR39パネルスクリーニングにより、本剤がPI3K阻害剤LY294002と類似したフィンガープリントをもつことがわかり、実際、PI3K阻害活性を有することが生化学的に証明された⁷⁾。本剤は現在、日米で臨床試験が行われている。一方、プラジエノライドは、エーザイの水井らが見いだした抗がん物質で、JFCR39パネルで既存の抗がん剤・阻害剤とは違うユニークな作用メカニズムをもつものと評価された。その後、本剤の標的分子はスプライ

細胞が世
のがんか
かせな
1980
スクリ
奏効す
由来の
系の開
めて肺
試みた
には肺
当時
皮細胞
がん剤
感受性
なかつ
細胞株
その
大腸
し房、前
るパネ

表 1 NCI60・JFCR39 パネルに含まれるがん細胞株の比較

origin	cell	JFCR	NCI	origin	cell	JFCR	NCI
lung cancer	NCI-H23(Ad)	○	○	ovarian cancer	OVCAR3	○	○
	NCI-H226(Sq)	○	○		OVCAR4	○	○
	NCI-H522(Ad)	○	○		OVCAR5	○	○
	NCI-H460(Lg)	○	○		OVCAR8	○	○
	A549(Ad)	○	○		SK-OV-3	○	○
	DMS273(SCLC)	○			IGROV1		○
	DMS114(SCLC)	○		glioma	U251	○	○
	EKVX		○		SF268	○	○
	NCI-H322M		○		SF295	○	○
HOP-62		○	SF539		○	○	
HOP-92		○	SNB75		○	○	
			SNB78		○	○	
colorectal cancer	HCC-2998	○	○	SNB-19		○	
	KM-12	○	○	renal cancer	RXF-631L	○	
	HT-29	○	○		ACHN	○	○
	HCT-15	○	○		UO-31		○
	HCT-116	○	○		SN12C		○
	SW-620		○		A498		○
COLO205		○	CAKI-1			○	
gastric cancer	St-4	○		RXF-393		○	
	MKN-1	○		786-0		○	
	MKN-7	○		TK-10		○	
	MKN-28	○		melanoma	LOX-IMV1	○	○
	MKN-45	○			MALME-3M		○
	MKN-74	○			SK-MEL-2		○
breast cancer	HBC-4	○			SK-MEL-5		○
	BSY-1	○			SK-MEL-28		○
	HBC-5	○			M14		○
	MCF-7	○	○	UACC-62		○	
	MDA-MB-231	○	○	UACC-257		○	
	ADR-RES		○	prostate cancer	DU145	○	○
	HS578T		○		PC-3	○	○
	MDA-MB-435		○		leukemia	CCRF-CEM	
MDA-N		○	K-562			○	
BT-549		○	MOLT-4			○	
T-47D		○	SR			○	
			HL-60			○	
			RPMI-8226		○		

シングルの合成阻害試験が異なる作用の規モデル。一方、標的薬も有用ではじmTOR阻害剤。いる。ープリンアロスタ阻害剤としたフィ害剤は、アロスタ阻害剤のもの、り異なるPI3K/A子をもバンチ臨床試験トを測性が低やビントを示ことが明

3 薬

NCI60 ガープリフィンラの作用した。Weiについてベースイ統合シグムに加

シング因子SF3bであることが示された⁹⁾。本剤の合成誘導体であるE7107は、現在米国で臨床試験が行われている。これらに加え、ユニークな作用メカニズムをもつ抗がん物質として、新規ゴルジ体阻害剤AMF-26を見いだしている⁹⁾。

一方、JFCR39パネルスクリーニングは、分子標的薬の標的的特異性やオフターゲットの評価にも有用である。著者らはLY294002やZSTK474をはじめ種々のPI3K阻害剤、Akt阻害剤、mTOR阻害剤のフィンガープリントを解析している。一連のPI3K阻害剤は類似したフィンガープリントを示し、mTOR阻害剤についても、アロステリック阻害剤ラバマイシン、ATP競合阻害剤NVP-BEZ235ともにPI3K阻害剤と類似したフィンガープリントを示した。一方Akt阻害剤は、MK-2206やAkt inhibitor VIIIなどのアロステリック阻害剤がPI3K阻害剤やmTOR阻害剤と類似したフィンガープリントを示すものの、PIアナログであるペリフォシンはかなり異なったフィンガープリントを示し、他のPI3K/Akt/mTOR経路阻害剤とは異なる標的分子をもつ可能性が示された(図1)¹⁰⁾。また、チバンチニブはMet阻害剤として開発され、現在臨床試験中であるが、本剤のフィンガープリントを測定したところ、他のMet阻害剤とは類似性が低く、チュブリン重合阻害剤であるE7010やピンクリスチンと類似したフィンガープリントを示し、実際にチュブリンの重合を阻害することが明らかにされた¹¹⁾。

3 薬剤感受性データとポストゲノムデータとの融合およびその応用

NCI60やJFCR39では、新規化合物のフィンガープリントを測定し、レファレンス化合物のフィンガープリントと照合することにより、その作用メカニズムを類推することが可能となった。Weinsteinらはこれを更に推し進め、NCI60について種々の分子標的情報を測定してデータベース化し、これを薬剤感受性データベースと統合した¹²⁾。これまでに、トランスクリプトームに加え、ゲノム情報(コピー数、変異)、マ

イクロRNA、エキソンアレイ解析、STR(short tandem repeat)分析など、様々な解析が報告されている。これにより、NCI60をモデルに、薬剤の作用メカニズムを分子レベルで予測したり、薬剤の効果を予測するバイオマーカーを探索したりすることが可能となった¹³⁾。例えば、Golubらは、マイクロアレイによるトランスクリプトームデータを利用して重みづけ多数決法を用いた薬剤感受性予測システムを構築することに成功している。また、ゲノム変異情報と薬剤感受性情報を比較することにより、BRAF変異がんでMEK阻害剤hypothemycinが効きやすいことが明らかにされている。

一方、JFCR39パネルでも各種ポストゲノム情報を取得してデータベース化を進めている。著者らは、PI3K阻害剤ZSTK474の効果予測バイオマーカーを探索する目的で、細胞内の様々なシグナル伝達分子の活性化ステータスをJFCR39各細胞株について調べてデータベース化し、これらのバイオマーカー候補としての可能性を検討した。その結果、特にPIK3CAやPTENに変異をもつがん細胞がPI3K阻害剤の効果が高いという関連は認められなかったが、KRAS/BRAF変異があるがん細胞はPI3K阻害剤が概して効きにくく、リン酸化Aktの発現量が高いがん細胞はPI3K阻害剤が効きやすいという有意な関連性を見いだした(図1)。これらの関連性は、マウス皮下に移植したヒトがんゼノグラフトでも認められたことから、PI3K阻害剤の効果予測マーカーとして利用できることが期待された¹⁰⁾。

4 より多数の細胞株パネルへ —CMT1000と Cancer Cell Line Encyclopedia—

NCI60やJFCR39は、各がん腫で数個ずつの細胞株からなっており、限られたバリエーションのがん細胞しかもたない。例えば、EGFR遺伝子の活性化の原因となるL858R変異やエキソン19の欠失や、ALK融合遺伝子陽性などのゲノム異常があるがんの特異的に奏効す

II

がんの新規治療を目指した基礎研究

る分子標的抗がん剤は、対象のがん細胞が含まれていなければ薬効評価をすることはできない。そこでマサチューセッツ総合病院分子標的治療センター(Center for Molecular Therapeutics)のSettlemanらは、NCI60ではカバーしきれない比較的低頻度(1-10%程度)のゲノム異常をカバーすることが期待できるように500種類以上(現在は1,000種類以上のがん細胞株を集め、CMT1000と呼ばれる)のがん細胞株を集めてパネル化し、ゲノム情報を取得するとともに、種々の分子標的抗がん剤に対する感受性を測定して統合データベース化し、両者の関連を解析した^{13,14)}。その結果、例えばエルロチニブへ高感受性を示すのは非小細胞肺癌由来の131細胞株のうち7つで、そのうち6つにEGFRの活性化変異が認められ、残り1つにはHER2遺伝子の増幅が認められた。これは、臨床検体で見いだされたEGFR阻害剤の感受性をよく反映している。また、肺癌以外の細胞株でも低頻度ながらエルロチニブに高感受性を示す細胞株が認められ、これらのうちの2つはやはりEGFRの活性化変異が認められた。一方、ALK阻害剤の感受性は、ALK融合遺伝子陽性の非小細胞肺癌、神経芽細胞腫、リンパ腫などで著効が認められた。このように、特定のゲノム異常で定義されるがんのサブセットは、それらの由来臓器にかかわらず、ゲノム異常によってコードされる活性化キナーゼの阻害剤に著効を示すことか

ら、今後これらの阻害剤の治療対象が臓器を超えてがんのジェノタイプで層別化されることが期待される。こういった取り組みは、CMT1000のほかにも、ブロード研究所およびノバルティス・バイオメディカル研究所の合同研究チームが、Cancer Cell Line Encyclopediaを立ち上げ、種々のオミックスデータを収集して解析を進めている¹⁵⁾。

おわりに

以上、NCIおよび癌研で行われてきている細胞パネルスクリーニングと、1,000種類以上の大規模な細胞株パネルを使った薬剤感受性とがんのジェノタイプの関連解析について概説した。前者は比較的小規模な細胞パネルを用いて薬剤の抗がん効果や作用メカニズムを評価することが可能で、ハイスループットな薬剤スクリーニングに適したプラットフォームである。一方、後者は、薬剤スクリーニングには不適であるが、特定の分子標的薬が奏効する比較的低頻度なゲノム異常を含むがんのバイオマーカー探索に適したプラットフォームといえる。近年、がんの分子標的治療剤の多くがセルフリーのスクリーニング系から見いだされており、その標的特異性を細胞レベルで実証する手段としてこれらのプラットフォームは有用であり、ますますの発展が期待される。

文献

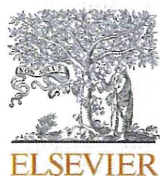
- 1) Shoemaker RH: The NCI60 human tumour cell line anticancer drug screen. *Nat Rev Cancer* 6: 813-823, 2006.
- 2) Paull KD, et al: Display and analysis of patterns of differential activity of drugs against human tumor cell lines: development of mean graph and COMPARE algorithm. *J Natl Cancer Inst* 81: 1088-1092, 1989.
- 3) Monks A, et al: Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. *J Natl Cancer Inst* 83: 757-766, 1991.
- 4) Bai R, et al: Halichondrin B and homohalichondrin B, marine natural products binding in the vinca domain of tubulin. Discovery of tubulin-based mechanism of action by analysis of differential cytotoxicity data. *J Biol Chem* 266: 15882-15889, 1991.
- 5) Adams J, et al: Proteasome inhibitors: a novel class of potent and effective antitumor agents. *Cancer Res* 59: 2615-2622, 1999.
- 6) 矢守隆夫: Cancer Cell Informaticsとケミカルバイオロジー。蛋白質 核酸 酵素 52(13): 1690-1695, 2007.

123
1236
1522
1460
273
114
298
9
15
116
-1
-7
-28
-45
-74
4
1
5
7
MB-231
AR-3
AR-1
AR-5
AR-6
V-3
8
6
9
75
63HL
IMVI
15
lung
colorectal
gastric
breast
ovarian
brain
post.med.renal

1/EGFR
2/HER2
3/HER3
ho-Akt(S473)
ho-Akt(T308)
ho-mTOR
ho-S6K1
ho-GSK-3β
ho-TSC2
ho-MEK1/2
ho-ERK1/2

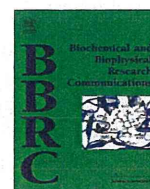
聴
ミ
関
酸

- 7) Yaguchi S, et al: Antitumor activity of ZSTK474, a new phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor. *J Natl Cancer Inst* 98: 545-556, 2006.
- 8) Kotake Y, et al: Splicing factor SF3b as a target of the antitumor natural product pladienolide. *Nat Chem Biol* 3: 570-575, 2007.
- 9) Ohashi Y, et al: AMF-26, a novel inhibitor of the Golgi system, targeting ADP-ribosylation factor 1 (Arf1) with potential for cancer therapy. *J Biol Chem* 287(6): 3885-3897, 2012.
- 10) Dan S, et al: Correlating phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor efficacy with signaling pathway status: in silico and biological evaluations. *Cancer Res* 70: 4982-4994, 2010.
- 11) Katayama R, et al: Cytotoxic activity of tivantinib (ARQ 197) is not due solely to c-MET inhibition. *Cancer Res* 73(10): 3087-3096, 2013.
- 12) Weinstein JN, et al: An information-intensive approach to the molecular pharmacology of cancer. *Science* 275: 343-349, 1997.
- 13) Sharma SV, et al: Cell line-based platforms to evaluate the therapeutic efficacy of candidate anticancer agents. *Nat Rev Cancer* 10: 241-253, 2010.
- 14) McDermott U, et al: Identification of genotype-correlated sensitivity to selective kinase inhibitors by using high-throughput tumor cell line profiling. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 19936-19941, 2007.
- 15) Barretina J, et al: The Cancer Cell Line Encyclopedia enables predictive modeling of anticancer drug sensitivity. *Nature* 483: 603-607, 2012.



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Biochemical and Biophysical Research Communications

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ybbrc

Novel tamoxifen derivative Ridaifen-B induces Bcl-2 independent autophagy without estrogen receptor involvement

Yukitoshi Nagahara^{a,*}, Midori Takeyoshi^a, Seiya Sakemoto^a, Isamu Shiina^b, Kenya Nakata^b, Keiko Fujimori^b, Yanwen Wang^b, Eri Umeda^b, Chihiro Watanabe^b, Shoko Uetake^b, Takao Yamori^c, Shingo Dan^c, Yoji Yoshimi^d, Takahisa Shinomiya^d, Masahiko Ikekita^d

^a Department of Biotechnology, College of Science and Engineering, Tokyo Denki University, Hatoyama, Hiki-gun, Saitama 350-0394, Japan

^b Department of Applied Chemistry, Faculty of Science, Tokyo University of Science, Kagurazaka, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8601, Japan

^c Division of Molecular Pharmacology, Cancer Chemotherapy Center, Japanese Foundation for Cancer Research, Ariake, Koto-ku, Tokyo 135-8550, Japan

^d Department of Applied Biological Science, Faculty of Science and Technology, Tokyo University of Science, 2641 Yamazaki, Noda, Chiba 278-8510, Japan

ARTICLE INFO

Article history:

Received 8 May 2013

Available online 18 May 2013

Keywords:

Ridaifen-B

Autophagy

LC3

Bcl-2

Beclin 1

ABSTRACT

Autophagy is a self-proteolysis process in eukaryotic cells that results in the sequestering of intracellular proteins and organelles in autophagosomes. Activation of autophagy progress continued growth of some tumors, instead extensive autophagy induces cell death. In a previous study, we synthesized a novel tamoxifen derivative, Ridaifen (RID)-B. RID-B induced mitochondria-involved apoptosis even in estrogen receptor (ER)-negative cells. Since tamoxifen induces autophagy other than apoptosis, we treated ER-negative Jurkat cells with RID-B in the present study. RID-B treatment induced apoptosis and LC3 and lysosome colocalization, which results in the formation of autolysosomes. Western blotting revealed that LC3 was converted to LC3-I to LC3-II with RID-B treatment, suggesting that RID-B induced autophagy without ER involvement. Moreover, overexpression of the anti-apoptotic protein Bcl-2 suppressed the RID-B-induced cell death, but not the induction of autophagy. These results presumed that RID-B-induced autophagy is independent of Bcl-2, making RID-B-induced autophagy different from RID-B-induced apoptosis. Since Beclin 1 level is unchanged during RID-B treatment, RID-B induced autophagy pathway is Bcl-2/Beclin1 independent noncanonical pathway.

© 2013 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Autophagy is an evolutionarily conserved self-proteolysis process in eukaryotic cells that functions to provide an alternative source of energy and thus enable cells to survive under cellular stress conditions such as nutrient-deficient environments and the accumulation of damaged proteins and organelles [1–3]. Autophagy involves the sequestration of cellular components within a membrane, the so-called ‘autophagosome’. Autophagosomes then fuse with endosomes or directly with lysosomes to form autolysosomes, resulting in the degradation of their components by hydrolytic enzymes.

The process of autophagy is controlled by a group of autophagy-related genes (Atg) [4]. First, the formation of the phagophore is related to phosphatidylinositol kinase class III Vps34 and Beclin 1 (mammalian ortholog of Atg6) [5]. Next, elongation of the phagophore membrane and formation of the autophagosome are accomplished by two ubiquitin-like conjugation systems, Atg5-Atg12 and

LC3 (mammalian ortholog of Atg8) [6]. This Beclin 1 and Vps34 dependent autophagy is so-called conventional autophagy. A serine/threonine protein kinase, mammalian target of rapamycin (mTOR) plays an important role in the control of conventional autophagy pathway upstream of Beclin 1 and Vps34 [7]. Under starvation conditions, mTOR become inactivated and precede autophagy [8]. Moreover, the anti-apoptotic protein Bcl-2 binds to Beclin 1 and inhibits this conventional autophagy process [9,10], with resulting cross-talk among cell growth, proliferation, survival and death.

Activation of the autophagy progress induces the growth of some tumors, serving to both reduce oxidative stress and sustain cell metabolism [11]. However, extensive autophagy sometimes kills cells resulting in the accumulation of autophagosomes in dying cells [12]. This dual role of autophagy – cell survival and cell death – is complex, and there are many chemicals that induce autophagy for cell survival or cell death [13,14]. For example, the breast cancer drug tamoxifen is a strong inducer of apoptosis and autophagy [15,16].

Ridaifen (RID)-B is a novel tamoxifen derivative. In a previous study, we observed that RID-B had more potent cancer cell-damag-

* Corresponding author. Fax: +81 49 296 5162.

E-mail address: yuki@mail.dendai.ac.jp (Y. Nagahara).

ing activity than tamoxifen [17]. RID-B fragmented Jurkat cells' DNA and activated caspases, suggesting that the RID-B-induced apoptosis pathway is estrogen receptor (ER)-independent. We also estimated the mitochondrial involvement during RID-B-induced apoptosis: RID-B significantly reduced the mitochondrial membrane potential, and the overexpression of Bcl-2 inhibited the RID-B-induced apoptosis phenomena. These results suggested that the induction of apoptosis by RID-B is dependent on mitochondrial perturbation without ER involvement. However, little is known about the involvement of autophagy by RID-B. In the present study, we found that RID-B induced autophagy in the ER-negative human lymphoma Jurkat cell line. The RID-B-induced autophagy was independent of Bcl-2 and Beclin 1 activity, suggesting that the RID-B-induced autophagy pathway is different from the conventional autophagy pathway.

2. Materials and methods

2.1. Cells

The human lymphoid helper T-cell line, Jurkat, stably transfected with a human Bcl-2 expression plasmid (Bcl-2) or neomycin resistance plasmid (neo), was provided by Dr. T. Miyashita of Kitasato University (Sagamihara, Japan). Human hepatoma HepG2 cells were supplied by the Cell Resource Center for Biomedical Research, Institute of Development, Aging and Cancer Tohoku University (Sendai, Japan).

2.2. Media and cell cultures

The Jurkat cells were cultured in RPMI-1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and 75 mg/L kanamycin sulfate, and maintained at 37 °C in a humidified chamber under an atmosphere of 95% air and 5% CO₂. The HepG2 cells were maintained at 37 °C with 5% CO₂ in DMEM supplemented with streptomycin and 10% (v/v) FBS.

2.3. Chemicals and antibodies

Tamoxifen and RID-B (Fig. 1A) were chemically synthesized in our laboratory based on the methods described by Shiina et al. [18,19]. Anti-LC3B and β -actin antibodies were purchased from Cell Signaling Technologies (Danvers, MA). Anti-Bcl-2 and Caspase-3 antibodies were purchased from Santa Cruz Biotechnologies (Santa Cruz, CA). Anti-Beclin 1 antibody was purchased from BD Bioscience (San Jose, CA).

2.4. MTT assay

The cells were incubated in 96-well plates at 37 °C with RID-B for 23 h. Then, 10 μ L of 5 mg/mL 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT; Wako, Osaka, Japan) was added to each well and the plates were incubated at 37 °C for 1 h. The media were discarded, and 100 μ L of dimethyl sulfoxide was added to dissolve MTT formazan. The absorbance of each well was measured using a microplate reader (Corona Electrics, Hitachinaka, Japan) at 570 nm.

2.5. Assessment of sub-G1 cells and cell cycle

Cells (1×10^6) were washed with phosphate buffered saline (PBS) and suspended in permeabilizing buffer (0.1% Triton-X 100 in PBS). Thereafter, the cells were washed with PBS, resuspended in PBS containing 0.5 mg/mL RNase A and 2 μ g/mL propidium iodide (PI), and analyzed by flow cytometry (FACS Calibur, Beckton

Dickinson, Mountain View, CA). Data were analyzed using Cell Quest (Beckton Dickinson).

2.6. Detection of caspase activities

The activation of caspases was determined by measuring the hydrolyzing activities of caspase-3 substrate, acetyl-DEVD-4-methyl-coumaryl-7-amide (Ac-DEVD-MCA; Alexis, San Diego, CA). Cells (1×10^7) were lysed in RIPA buffer (25 mM Tris, pH 7.4, 150 mM KCl, 5 mM EDTA, 1% Nonidet P-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS), and cell extracts were obtained by centrifugation at 13,000g for 5 min at 4 °C. The protein concentration was determined using the BCA protein assay. Cell extracts were preincubated in 250 μ L of caspase buffer (50 mM HEPES, pH 7.4, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.1% Chaps, 10% sucrose, 5 mM dithiothreitol) containing 80 μ M substrate and Ac-DEVD-MCA and incubated at 37 °C for 1 h. The mixture was centrifuged, and the release of 7-amino-4-methyl-coumarin in the supernatant was measured using the spectrofluorometer (Corona Electrics) at excitation and emission wavelengths of 365 nm and 450 nm, respectively.

2.7. Confocal microscopic analysis of colocalization of LC3 and lysosomes

Cells were labeled by incubation with LysoTracker Red (Takara Bio, Shiga, Japan), for 90 min at 37 °C. Thereafter, cells were fixed with 4% *p*-formaldehyde for 20 min and permeabilized with 1% CHAPS buffer (150 mM NaCl, 10 mM HEPES, 1.0% CHAPS) at room temperature for 10 min. Thereafter, cells were incubated with anti-LC3B monoclonal antibody overnight at 4 °C, washed with PBS, and incubated for another 60 min with Alexa Fluor 488-conjugated anti-rabbit IgG antibody. Then, cell nuclei were stained by DAPI (Wako). Samples were examined under a confocal microscope system (FV10i-DOC, Olympus, Tokyo).

2.8. Western blotting

Cells were washed with PBS and placed on ice for 20 min in lysis buffer (50 mM HEPES–NaOH, 10% glycerol, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1 mM EGTA, 1.5 mM MgCl₂, 1% proteinase inhibitor cocktail [Sigma, St. Louis, MO], pH 7.5, 0.1 mM sodium orthovanadate). Cell lysates were centrifuged at 4 °C for 15 min at 13,000g. Protein concentrations of the supernatant were determined using the BCA protein assay (Thermo Scientific, Waltham, MA). Cell lysates (30 μ g) were mixed in the same volume of sodium dodecyl sulfate (SDS) sample buffer (4% SDS, 125 mM Tris, pH 6.8, 10% glycerol, 0.02 mg/mL bromophenol blue, 10% 2-mercaptoethanol) and heated at 100 °C for 3 min. Proteins were separated by 10% polyacrylamide gel SDS-electrophoresis and electrically transferred to a PVDF membrane (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). After the membrane was blocked with the use of 3% skimmed milk, Caspase-3, LC3, Beclin 1, Bcl-2, and β -actin were immunodetected using specific antibodies. Thereafter, horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG was applied as the second antibody, and positive bands were detected by enhanced chemiluminescence (Thermo Scientific). Visualization was done with an Image Quant LAS-4000 digital imaging system (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK).

3. Results

3.1. RID-B induces apoptosis in ER-negative Jurkat cells

In our previous study, we synthesized a novel tamoxifen derivative, RID-B, and treated ER-negative human T-cell lymphoma Jur-

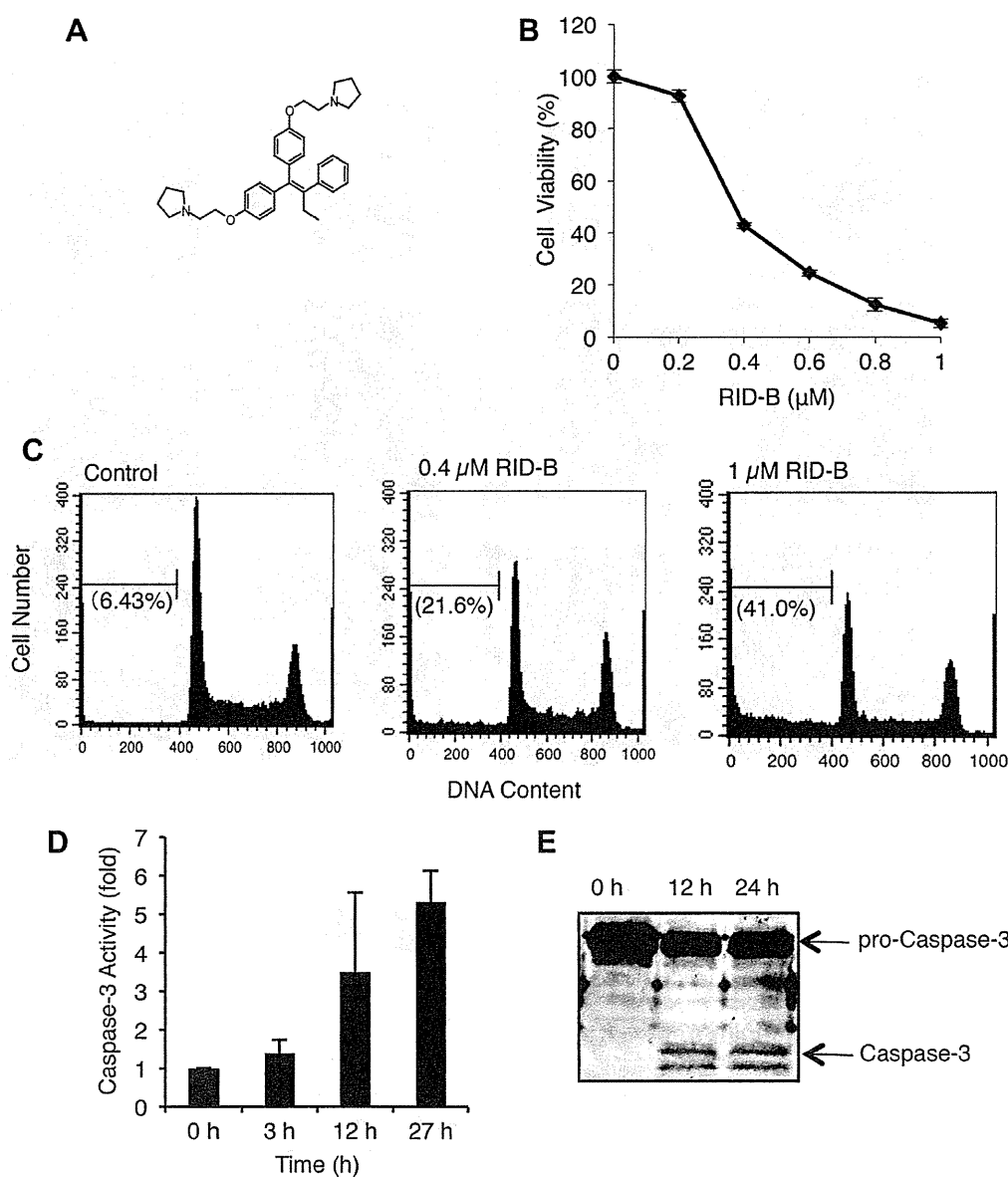


Fig. 1. RID-B induced apoptosis in ER-negative cells. (A) Chemical structure of RID-B. (B) Jurkat cells were incubated with indicated doses of RID-B for 24 h. Cell proliferation was estimated by MTT assay. The data are presented as a comparison to the nonadditive control cells. Each bar denotes the std. dev. ($n = 3$). (C) Jurkat cells were incubated with indicated doses of RID-B for 24 h and assayed flow cytometrically as described in Section 2. Data are representative of three independent experiments. Parentheses indicate the percentages of sub-G1 phase. (D) Jurkat cells were incubated with 0.4 μM RID-B for the indicated times. The cells were lysed and subjected to a caspase-3 assay as described in Section 2. The results are presented as a comparison to the 0-h treatment. Each bar = std. dev. ($n = 3$). (E) Jurkat cells were incubated with 0.4 μM RID-B for the indicated times. The cells were lysed and Caspase-3 was detected by Western blotting.

kat cells with it [17]. Four-hour treatment with RID-B damaged the Jurkat cells in a dose-dependent manner. The IC_{50} rate was 4 μM. Treatment with an antitumor drug is usually for a longer period than that used in our previous study (4-h). Thus, in the present study, first we examined the long-term effect of RID-B on Jurkat cells. As shown in Fig. 1B, 24-h treatment with RID-B injured Jurkat cells in a dose-dependent manner, similar to the previous results obtained with short-term (4-h) RID-B treatment. The IC_{50} rate was about 0.4 μM. We also evaluated RID-B-mediated cell death in the long-term treatment. The flow cytometric analysis revealed that RID-B treatment significantly increased the sub-G1 phase of DNA contents in a dose-dependent manner, indicating that DNA fragmentation is induced by RID-B (Fig. 1C). In addition, the 0.4 μM RID-B treatment activated Caspase-3 in a time-dependent

manner (Fig. 1D), as well as cleaved pro-Caspase-3 to active Caspase-3 (Fig. 1E). These results demonstrated that long-term (24-h) treatment with a low concentration (0.4 μM) of RID-B induced apoptosis in ER-negative Jurkat cells.

3.2. RID-B induces autophagy

Tamoxifen induces autophagy in cancer cells [15,16]. We therefore hypothesized that the tamoxifen derivative RID-B would also induce autophagy. To evaluate the autophagy by RID-B, we observed the localization of LC3 in cells before and after RID-B treatment, by indirect immunofluorescence staining. During autophagy, the cytoplasmic form of LC3 (LC3-I) is processed and recruited to autophagosomes, where LC3-II is generated by site-specific prote-

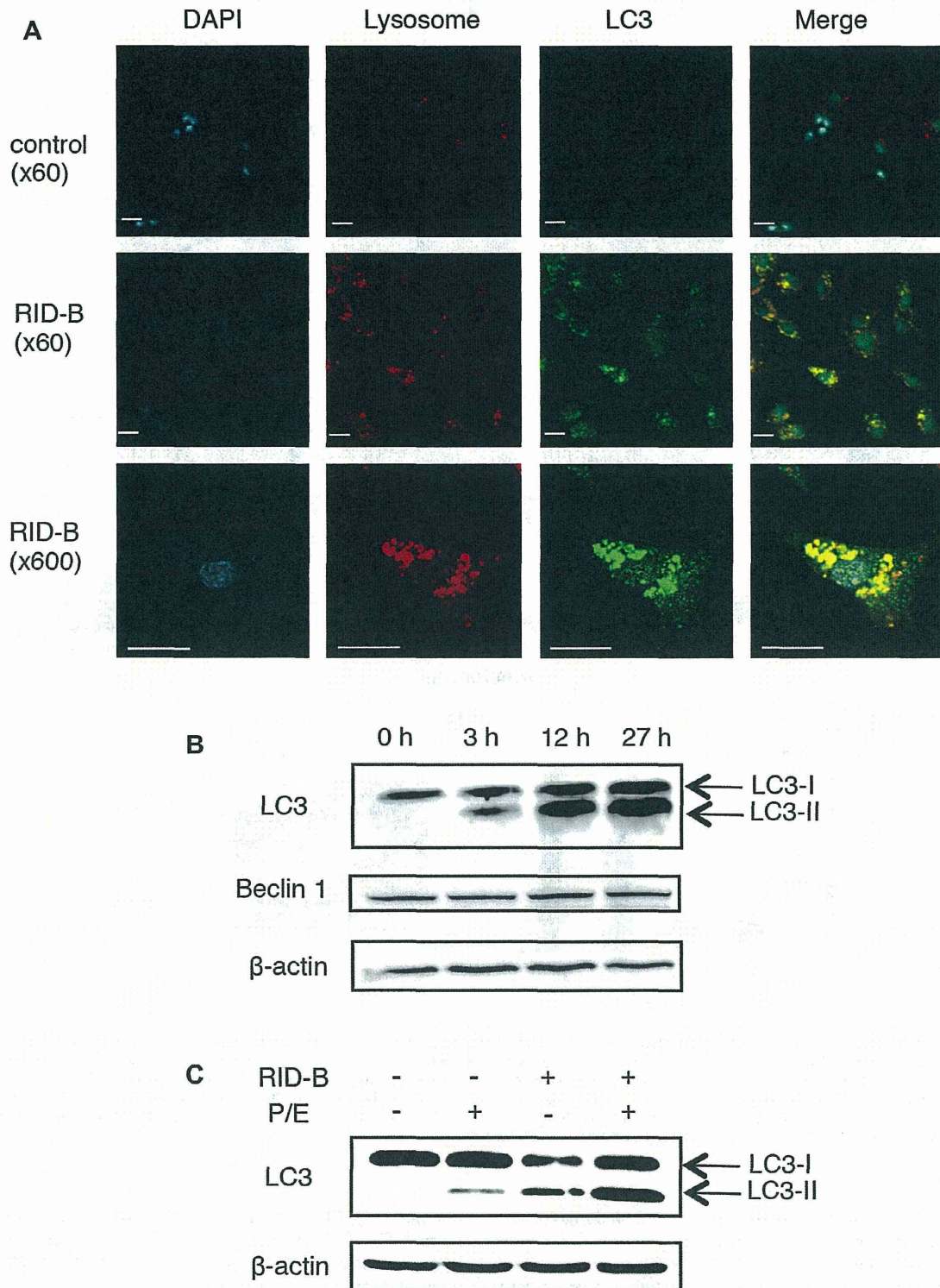


Fig. 2. RID-B induced the formation of autolysosomes and conversion of LC3. (A) HepG2 cells were incubated with 0.5 μ M RID-B for 27 h. Cells were labeled with fluorescence and imaged by confocal microscopy. Red, LysoTracker Red-labeled lysosomes; green, Alexa Fluor 488-labeled LC3; blue, DAPI-labeled nucleus. The orange-stained cells indicated LC3 colocalized with lysosomes. White bar indicates 20 μ m. (B) Jurkat cells were incubated with 0.4 μ M RID-B for the indicated times. The switch of LC3-I to LC3-II, Beclin-1 and β -actin were detected by Western blotting. β -Actin was detected as equal protein loading. (C) Jurkat cells were incubated with 0.4 μ M RID-B and/or 10 μ g/mL pepstatin A with 10 μ g/mL E-64-d (P/E) for 24 h. The switch of LC3-I to LC3-II and β -actin were detected by Western blotting. β -Actin was detected as equal protein loading. (For interpretation of color in this figure, the reader is referred to the web version of this article.)

olysis and lipidation [20,21]. Since Jurkat cells are suspension cells, they are difficult to observe, and thus we used HepG2 cells in this assay. Lysosomes were stained with a specific dye (LysoTracker

Red) to visualize the colocalization of LC3. In the nonadditive control cells, little LC3 localization was observed, and lysosomes were indistinctly stained. However, treatment with 0.5 μ M RID-B for

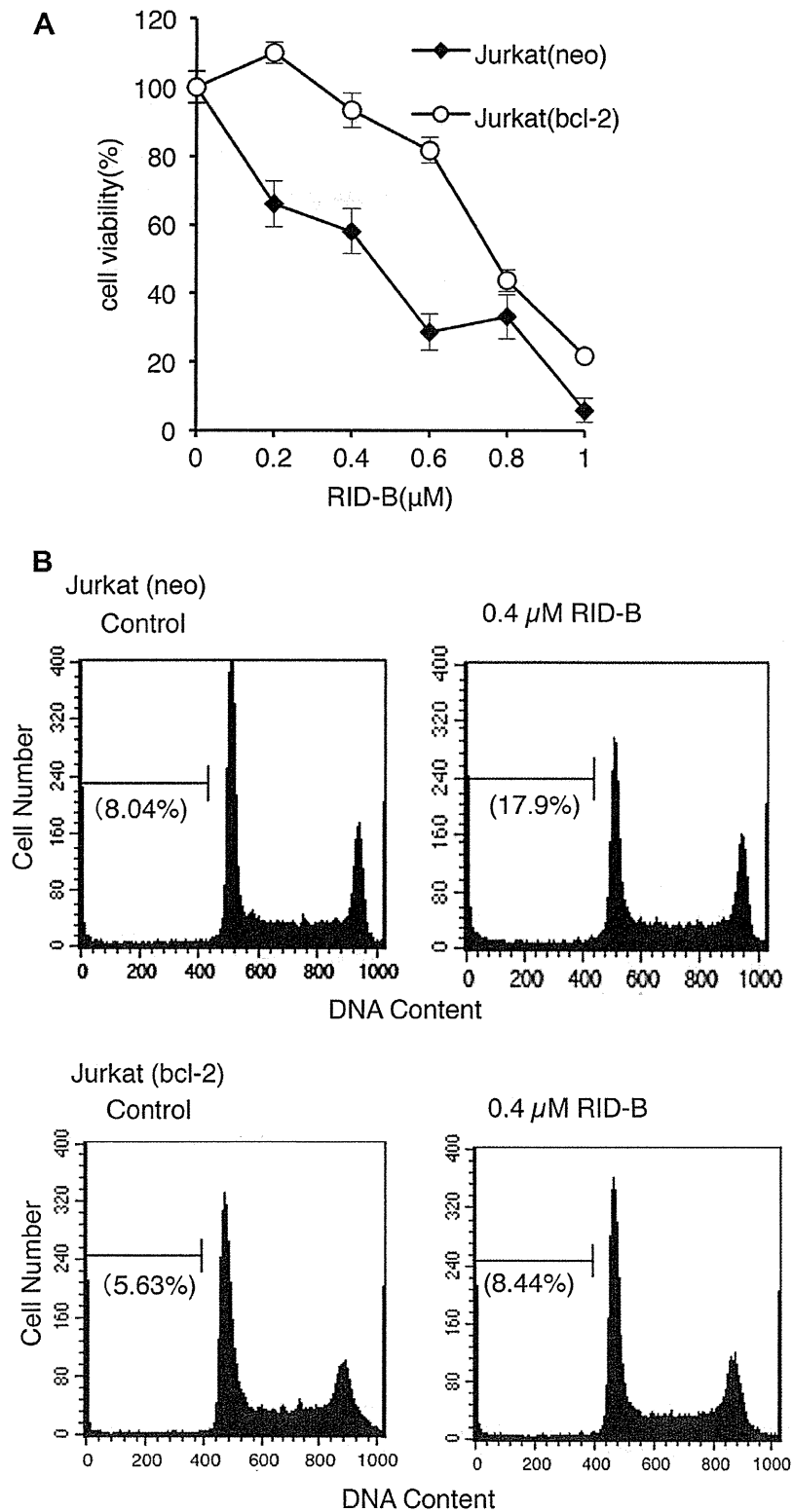


Fig. 3. Overexpression of Bcl-2 blocked RID-B-induced apoptosis. (A) Jurkat (neo) and Jurkat (Bcl-2) cells were incubated with the indicated doses of RID-B for 24 h. Cell viability was observed with an MTT assay. The results are presented as a comparison to the nonadditive control. Each bar = std. dev. ($n = 3$). (B) Jurkat (Bcl-2) cells were incubated with 0.4 μM RID-B for 24 h and assayed flow cytometrically as described in Section 2. Data are representative of three independent experiments. Parentheses indicate the percentages of sub-G1 phase.

27 h resulted in huge lysosomes, and LC3 was colocalized with lysosomes, demonstrating the formation of autolysosomes (Fig. 2A).

Moreover, the conversion of LC3-I into LC3-II during autophagy was observed. We determined the LC3 conversion of LC3-I to LC3-II in Jurkat cells by Western blotting. An attenuation of LC3-I and in-