

平成22年3月31日現在

研究種目：特定領域研究

研究期間：2005～2009

課題番号：17016056

研究課題名（和文）細胞増殖シグナルを標的とした阻害分子の探索と応用

研究課題名（英文）Targeting the ERK-MAP kinase pathway in cancer therapy

研究代表者

河野 通明 (KOHNO MICHIAKI)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：00027335

研究成果の概要（和文）： ERK-MAPキナーゼ経路が恒常的に活性化されたがん細胞において、MEK阻害剤でそれを遮断しても有意な細胞死誘導には至らない。一方、MEK阻害剤と併用することで、微小管重合阻害剤、及びHDAC阻害剤の細胞死誘導効果が、極めて顕著に増強されることを見出した。すなわち、単独では顕著な抗腫瘍効果を示さない微小管重合阻害剤／HDAC阻害剤が、MEK阻害剤と併用することで、極めて顕著な増殖抑制、さらに腫瘍萎縮効果を示すことを、動物個体レベルで確認した。これより、上記薬剤の組み合わせ併用が、有効ながん化学療法に繋がる可能性を提示するに至った。

研究成果の概要（英文）： Specific blockade of the ERK pathway by MEK inhibitors alone induces mostly cytostatic rather than pro-apoptotic effects, resulting in a limited therapeutic efficacy of MEK inhibitors. However, MEK inhibitors specifically enhance the induction of apoptosis by microtubule-destabilizing agents and HDAC inhibitors in various tumor cells with aberrant activation of the ERK pathway. Our results clearly indicate that administration of both a MEK inhibitor and a microtubule-destabilizing agent/HDAC inhibitor represents a promising chemotherapeutic strategy with improved safety for cancer patients.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	9,000,000	0	9,000,000
2006年度	9,000,000	0	9,000,000
2007年度	9,000,000	0	9,000,000
2008年度	9,000,000	0	9,000,000
2009年度	9,000,000	0	9,000,000
総計	45,000,000	0	45,000,000

研究分野：分子細胞生物学

科研費の分科・細目：がん治療・がん化機構を基盤とした分子創薬と分子標的治療

キーワード：細胞がん化，がん化学療法，ERK-MAPキナーゼ経路，MEK阻害剤，微小管重合阻害剤，HDAC阻害剤，併用療法

1. 研究開始当初の背景

我々はヒトがんにおけるERK-MAPキナ

一ゼ経路の機能亢進にいち早く注目して解析を進め、腎臓がん、大腸がん、肺がん、卵巣がん、膵臓がん等において特に高頻度 (~50%) にその恒常的活性化が認められる事を世界に先駆けて報告した。次いで、(1) ERK-MAP キナーゼ経路が恒常的に活性化されているがん細胞において、MEK 阻害剤等でそれを選択的に遮断した際、p27<sup>Kip1</sup> の Up-regulation を介した完全な増殖停止(G1 期停止)が誘導される事、(2) ERK-MAP キナーゼ経路は matrix metalloproteinase-9 等の発現亢進を介して細胞の運動制御にも密接に関与しており、その選択的遮断はがん細胞の浸潤・転移能の抑制につながる事等を見出し、ERK-MAP キナーゼ経路はがん治療における絶好の分子標的である事を世界に向けて発信してきた。なお、これまで解析した大部分のがん細胞株において、ERK-MAP キナーゼ経路の遮断だけでは有意な細胞死の誘導に至らない。そこで上記経路を遮断した(がん細胞の勢いを止めた)条件下、様々な抗がん剤の細胞死誘導効果が増強される可能性を多角的に検討することで、ERK-MAP キナーゼ経路遮断剤を基盤としたがん分子標的治療法を開発すべく、本研究企画を提案した。

## 2. 研究の目的

本研究では、細胞がん化に密接に関連する細胞増殖シグナル伝達系として、特に ERK-MAP キナーゼ経路に焦点を当てて解析を進める。具体的には、まず ERK-MAP キナーゼ経路の恒常的活性化が認められた癌細胞において、MAP キナーゼ・キナーゼ(MEK) に対する特異的阻害剤等を利用して ERK-MAP キナーゼ系を選択的に遮断した際、その増殖性が如何に影響されるかを、培養細胞系及びヌードマウスを使った動物個体系を利用して解析する。さらに MEK 阻害剤と他の作用機構を持つ抗癌剤の組み合わせが上記癌細胞の増殖性に及ぼす相乗効果の可能性についても同様に解析し、ERK-MAP キナーゼ系の機能を特異的に阻害することが実際の「制がん」に結びつく可能性を多角的に検討する。一方、ERK-MAP キナーゼ系の特異的遮断に関しては、ユニークな基質特異性をもつ MEK、および ERKs に注目し、これらの機能を特異的に阻害する化合物を、様々な薬用植物より抽出した天然物を中心に、in vitro および in vivo アッセイ系を併用して多角的に検索する。すなわち、(1) 新規抗癌剤開発における極めて有望な標的分子としての MEK、ERK-MAP キナーゼの同定、(2) それらに対する特異的阻害物質の探索、さらに(3) ERK-MAP キナーゼ系を選択的遮断を基盤とし、それと他の作用機構を持つ薬剤との併用による新規癌化学療法の開

発に向けて基礎的知見を集積することが、本研究の最終目的である。

## 3. 研究の方法

(1) ERK-MAP キナーゼの恒常的活性化が認められた癌細胞株の増殖性が、ERK-MAP キナーゼ経路の選択的遮断によって如何に変動するかを、新規 MEK 阻害剤 (PD184352, PD0325901 等) を利用して、動物個体レベルで解析する。すなわち ERK-MAP キナーゼ系の選択的遮断が、ERK-MAP キナーゼ系が恒常的に活性化されている癌細胞に対して選択的に「制癌効果」を示す可能性を、Apoptosis 誘導及び腫瘍塊萎縮効果を主な指標として解析する。

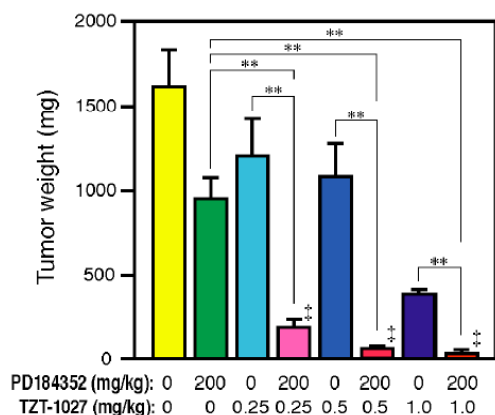
(2) MEK 阻害剤との併用で、他の作用機構をもつ抗癌剤の抗腫瘍効果が増強される可能性を、これまでの解析をもとに、特にチューブリン重合阻害剤、及び HDAC 阻害剤等を選択し、これらの薬剤と MEK 阻害剤を組み合わせた際、ERK-MAP キナーゼ系が恒常的に活性化されている癌細胞に対して Apoptosis 誘導作用が亢進する可能性、さらに癌組織塊を萎縮、消失させる可能性を、培養細胞系及び動物個体レベルで解析する。

(3) ERK-MAP キナーゼ経路に対する特異的阻害物質を、従来より抗腫瘍活性物質を含む可能性が示唆されている様々な薬用植物より抽出したフラボン類などを中心とし、標的分子としては MAP キナーゼ・キナーゼ (MEK)、および ERK-MAP キナーゼに注目して探索する。

## 4. 研究成果

(1) MEK 阻害剤と微小管重合阻害剤の併用による抗腫瘍効果増強：ERK-MAP キナーゼ経路の恒常的活性化が認められるがん細胞において、MEK 阻害剤でそれを遮断しただけでは有意な細胞死誘導に至らない。そこで、MEK 阻害剤処理でがん細胞の増殖能を抑制した条件下、他の抗がん剤 (cytotoxic) の作用が増強される可能性を検討した結果、(i)それは微小管重合阻害剤の細胞死誘導効果を極めて顕著、かつ選択的に増強すること、(ii)上記薬剤併用による細胞死誘導増強は、ERK-MAP キナーゼ経路が恒常的に活性化されている多くのがん細胞株 (受容体チロシンキナーゼ、Ras、Raf 等の機能亢進変異) で共通して認められることを明らかにした。次いで、HT-29 細胞(B-raf

変異)、HT1080 細胞(N-ras 変異)を利用した Xenograft 系で、MEK 阻害剤 (PD184352) と微小管重合阻害剤 (低神経毒性の TZT-1027、Navelbine) の併用による抗腫瘍効果増強を検討した結果、(a)低濃度の微小管重合阻害剤 (各単独での抗腫瘍効果は軽微) が PD184352 と併用することで極めて顕著な抗腫瘍効果を発現すること (HT1080 細胞では PD184352 と TZT-1027 を、1 回/週、2 サイクルの併用投与で、ほぼ完全な腫瘍塊消失を確認) (下図; 薬剤投与開始 2 週間後の腫瘍重量を示す)、(b)体重減少等の副作用は認められないことを見出した。また、上記薬剤併用による細胞死誘導増強の分子機構に関しては、(i)ERK1/2 が GEF-H1 (微小管結合タンパク) のリン酸化を介して、細胞運動において重要な役割を果たしている RhoA を活性化すること、(ii)siRNA 導入による GEF-H1 の発現抑制が、上記薬剤併用による細胞死誘導を有意に抑制すること、(iii)ERK-MAP キナーゼ経路は M 期進行の制御、特に Spindle Check Point において重要な役割を果たしており、その遮断はがん細胞の微小管重合阻害剤に対する感受性増強に繋がる可能性を見出した。



(2) MEK 阻害剤と HDAC 阻害剤の併用による抗腫瘍効果増強:MEK 阻害剤との併用で細胞死誘導効果が増強される薬剤として、ヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)阻害剤を見出し、(i)それは ERK-MAP キナーゼ経路の機能亢進が認められるがん細胞株に共通して認められること、(ii)そこでは細胞内に蓄積した活性酸素種(ROS)が細胞死誘導の mediator として機能することを明らかにした。また、上記薬剤併用は、Gefitinib、Imatinib 等に対して抵抗性を示すがん細胞株 (H1650、変異 Bcr-Abl 発現 BaF3 等) に対しても、顕著な細胞死を誘導すること、HT-29 細胞等を利用した Xenograft 系での解析において、PD184352 と MS-275 (経口投与可能な HDAC 阻害剤; 単独での抗腫瘍効果が中程度の低濃度領域で検討) の併用

が、顕著な抗腫瘍効果を発現することを見出している。また、上記薬剤併用による細胞死増強の分子機構に関しては細胞内 ROS の蓄積に焦点を当てて解析を進め、両薬剤併用処理で Glutathione peroxidase (抗酸化酵素) の発現抑制/活性低下、及び Bim (BH3 only protein: ミトコンドリアの膜透過性亢進) の発現亢進が顕著に誘導されることを見出した。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 21 件)

1. Watanabe, K., Tanimura, S., Uchiyama, A., Sakamoto, T., Kawabata, T., Ozaki, K. & Kohno, M. Blockade of the extracellular signal-regulated kinase pathway enhances the therapeutic efficacy of microtubule-destabilizing agents in human tumor xenograft models. **Clin. Cancer Res.**, 16: 1170-1178, 2010 (*Selected as a highlighted article*).
2. Ozaki, K., Kosugi, M., Baba, N., Fujio, K., Sakamoto, T., Kimura, S., Tanimura, S. & Kohno, M. Blockade of the ERK or PI3K-Akt signaling pathway enhances the cytotoxicity of histone deacetylase inhibitors in tumor cells resistant to gefitinib or imatinib. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 391: 1610-1615, 2010.
3. Tamura, S., Hattori, Y., Kaneko, M., Shimizu, N., Tanimura, S., Kohno, M. & Murakami, N. Peumusolide A, unprecedented NES non-antagonistic inhibitor for nuclear export of MEK. **Tetrahedron Lett.**, 51, 1678-1681, 2010.
4. Kakiashvili, E., Speight, P., Waheed, F., Seth, R., Lodyga, M., Tanimura, S., Kohno, M., Rotstein, O.D., Kapus, A. & Szász, K. GEF-H1 mediates tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced Rho activation and myosin phosphorylation: Role in the regulation of tubular paracellular permeability. **J. Biol. Chem.**, 284: 11454-11466, 2009.
5. Tanimura, S., Uchiyama, A., Watanabe, K., Yasunaga, M., Inada, Y., Kawabata, T., Iwashita, K., Noda, S., Ozaki, K. & Kohno, M. Blockade of constitutively activated ERK signaling enhances cytotoxicity of microtubule-destabilizing agents in tumor cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 378: 650-655, 2009.
6. Fujishiro, S., Tanimura, S., Mure, S.,

- Kashimoto, Y., Watanabe, K. & Kohno, M. ERK1/2 phosphorylate GEF-H1 to enhance its guanine nucleotide exchange activity toward RhoA. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 368: 162-167, 2008.
7. Ozaki, K., Kishikawa, F., Tanaka, M., Sakamoto, T., Tanimura, S. & Kohno, M. Histone deacetylase inhibitors enhance the chemosensitivity of tumor cells with cross-resistance to a wide range of DNA-damaging drugs. **Cancer Sci.**, 99: 376-384, 2008.
  8. Tanimura, S., Hirano, A., Hashizume, J., Yasunaga, M., Kawabata, T., Ozaki, K. & Kohno, M. Anticancer drugs up-regulate HspBPI and thereby antagonize the prosurvival function of Hsp70 in tumor cells. **J. Biol. Chem.**, 282: 35430-35439, 2007.
  9. Fujiwara, Y., Hosokawa, Y., Watanabe, K., Tanimura, S., Ozaki, K. & Kohno, M. Blockade of the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt signaling pathway enhances induction of apoptosis by microtubule-destabilizing agents in tumor cells in which the pathway is constitutively activated. **Mol. Cancer Ther.**, 6: 1133-1142, 2007.
  10. Araki, H., Inoue, M., Suzuki, T., Yamori, T., Kohno, M., Watanabe, K., Abe, H. & Katoh, T. Enantioselective total synthesis of (+)-Ottelione A, (-)-Ottelione B, (+)-3-epi-Ottelione A and preliminary evaluation of antitumor activity. **Chem. Eur. J.**, 13, 9866-9881, 2007.
  11. Maekawa, M., Yamamoto, T., Kohno, M., Takeichi, M. & Nishida, E. Requirement of ERK MAP kinase in mouse preimplantation development. **Development**, 134, 2751-2759, 2007.
  12. Kohno, M. & Pouyssegur, J. Targeting the ERK signaling pathway in Cancer Therapy. **Ann. Medicine**, 38: 200-211, 2006.
  13. Ozaki, K., Minoda, A., Kishikawa, F. & Kohno, M. Blockade of the ERK pathway markedly sensitizes tumor cells to HDAC inhibitor-induced cell death. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 339: 1171-1177, 2006.
  14. Tanimura, S., Kadomoto, R., Tanaka, T., Zhang, Y., Kouno, I. & Kohno, M. Suppression of tumor cell invasiveness by hydrolysable tannins (plant polyphenols) via the inhibition of matrix metalloproteinase-2/-9 activity. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 330: 1306-1313, 2005.
  15. Ozaki, K., Miyazaki, S., Tanimura, S. & Kohno, M. Efficient Suppression of Fibroblast Growth Factor-2-induced ERK Activation by the Cooperative Interaction among Mammalian Sprouty Isoforms. **J. Cell Sci.**, 118: 5861- 5871, 2005.
- [学会発表] (計 59 件)
1. Watanabe, K., Tanimura, S., Yasunaga, M., Uchiyama, A. & Kohno, M. Blockade of the ERK pathway enhances the antitumor activity of microtubule-destabilizing agents in vitro and in vivo. **AACR Annual Meeting 2008**, San Diego (2008)
  2. Watanabe, K., Fujiwara, Y., Tanimura, S., Ozaki, K. & Kohno, M. Blockade of the PI3-kinase-Akt signaling pathway enhances induction of apoptosis by microtubule-destabilizing agents in tumor cells in which the pathway is constitutively activated. **AACR Annual Meeting 2007**, Los Angeles (2007)
  3. 河野 通明, 谷村 進, 尾崎 恵一, 渡邊 一石. Targeting the ERK signaling pathway in cancer therapy, **第 65 回日本癌学会総会**, 横浜 (2007)
- [図書] (計 9 件)
1. 尾崎 恵一, 谷村 進, 河野 通明 「細胞内シグナル伝達経路の選択的遮断を基盤としたがん治療戦略」 **ファルマシア**, 44 巻, 219-224 頁, 2008 年。
  2. 河野 通明 「シグナル伝達 - 1. MAP キナーゼ経路」 (分担執筆) **がんの分子標的治療** (鶴雄隆編, 南山堂) 107-112 頁, 2008 年。
  3. 河野 通明 「シグナル伝達系」 (分担執筆) **新臨床腫瘍学** (日本臨床腫瘍学会編, 南江堂) 13-18 頁, 2006 年
6. 研究組織
- (1)研究代表者  
河野 通明 (KOHNO MICHIAKI)  
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授  
研究者番号: 00027335
- (2)研究分担者  
尾崎 恵一 (OZAKI KEI-ICHI)  
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授  
研究者番号: 50252466
- 谷村 進 (TANIMURA SUSUMU)  
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教  
研究者番号: 90343342