

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 11 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07211

研究課題名(和文) 甲状腺未分化癌に対する新規治療法および治療薬の開発

研究課題名(英文) Development of a novel treatment for anaplastic thyroid carcinoma

研究代表者

西條 憲 (Saijo, Ken)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：70636729

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：甲状腺癌はその組織型で大きく予後が異なる。分化型癌は長期生存をもたらすが、未分化癌は予後が著しく不良であり、唯一の承認薬であるレンパチニブの効果も不十分である。新たな治療法および治療薬の開発が必要である。そこで、レンパチニブの効果を増強しうる化合物を文部科学省化学療法支援班の標準阻害剤キットより探索したところIRAK1/4InhibitorIが選別された。甲状腺未分化癌細胞株を用いた検証実験から、IRAK1/4InhibitorIがG2/M期での細胞周期停止の増強を介して、レンパチニブの細胞増殖抑制効果を高めることを明らかにした。また、動物モデルにおいて抗腫瘍効果を増強させることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

進行が極めて速い甲状腺未分化癌に対しては、唯一の承認薬であるレンパチニブもその効果が不十分なものであり、新規治療の開発が求められている。本研究の結果から、IRAK1/4InhibitorIがレンパチニブの効果を増強することが示された。その作用機序をより詳細に明らかにし、抗腫瘍効果および毒性の情報を蓄積することで、レンパチニブとIRAK1/4InhibitorIの併用療法が、甲状腺未分化癌に対する有望な治療法の開発につながるものと考えている。

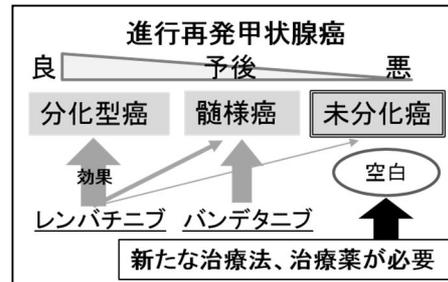
研究成果の概要(英文)：Anaplastic thyroid carcinoma (ATC) is an aggressive cancer. Although lenvatinib is the only therapeutic agent, its efficacy is insufficient. To develop the novel treatment for ATC, we used SCADS inhibitor kits to screen compounds that could potentiate the anti-proliferative effect of lenvatinib on the ATC cell. As a result, IRAK 1/4 Inhibitor I was identified. The combination effect of lenvatinib and IRAK1/4 inhibitor I was investigated in four ATC cell lines, and the synergistic anti-cell proliferation effect was observed. Cell cycle analysis showed that IRAK1/4 Inhibitor I potentiated lenvatinib-induced cell cycle arrest in G2/M phase. Knockdown of IRAK1/4 gene similarly potentiated the anti-proliferative effect of lenvatinib. The combination of lenvatinib and IRAK1/4 inhibitor I showed more potent anti-tumor effect than control and monotherapy of each drug in xenograft mouse model. IRAK1/4 inhibitor I was identified as a promising drug to potentiate the effect of lenvatinib in ATC.

研究分野：臨床腫瘍学

キーワード：甲状腺未分化癌 レンパチニブ 阻害剤ライブラリー

1. 研究開始当初の背景

甲状腺癌は、内分泌臓器において最も頻度の高い悪性腫瘍である。甲状腺癌は組織型から、分化型癌、髄様癌、未分化癌に分類され、その組織型で予後が大きく異なる。分化型癌は外科的切除や放射線ヨウ素の治療により長期生存をもたらすことがあるが、切除不能の髄様癌と未分化癌は予後が不良である。とくに未分化癌は急速に進行し、分化型癌が未分化転化することもある。最近、新規分子標的治療薬として 2014 年にソラフェニブが、2015 年にレンバチニブが市販された。レンバチニブは VEGFR、FGFR、PDGFR、KIT、RET キナーゼを抑制する多標的キナーゼ阻害剤である。しかし、その奏効率は分化型癌では 60%ほどと報告されているが、髄様癌および未分化癌に対しては著しく低い(N Eng J Med 372:621-30,2015)。また、レンバチニブは多標的阻害剤であるがゆえ、その作用機序が明らかでない点も多く、バイオマーカーも存在していない。髄様癌に対しては、バンデタニブが生存期間の延長を示し(J Clin Oncol 30; 134-42, 2012)、2015 年に承認されたが、未分化癌に対する有効な治療法および治療薬は欠落している。未分化癌に対する、新たな治療法および治療薬の開発が必要である。一つのアプローチとして、レンバチニブの効果を増強する併用療法の開発の可能性を探る。



もう一つのアプローチとして、申請者らは、エピジェネティック制御に関わり、がん治療の新しい標的として注目されている HDAC と、細胞生存に関わり、がん細胞において異常な活性化を高頻度で生じている PI3K を二重に阻害するシード化合物、デブペプチド類縁体を同定し(Cancer Sci 103:1994-2001, 2012)、さらに HDAC/PI3K 二重阻害活性の強いデブシペプチド類縁体 FK-A11 を同定している(Cancer Sci 106:208-15, 2015)。甲状腺未分化癌の発生および分化型癌の未分化転化に関わる分子機構として、PI3K-AKT 経路の活性化が関与していることが最近示され、PI3K-AKT 経路が有力な治療標的と考えられている(Cancer Treat Rev 41;707-13,2015)。さらに in vivo マウスモデルにおいて HDAC 阻害剤の抗腫瘍効果が報告されている (Oncotarget 6,9073-85, 2015)。これらのことから、HDAC/PI3K 二重阻害剤である FK-A11 の効果が期待される。

2. 研究の目的

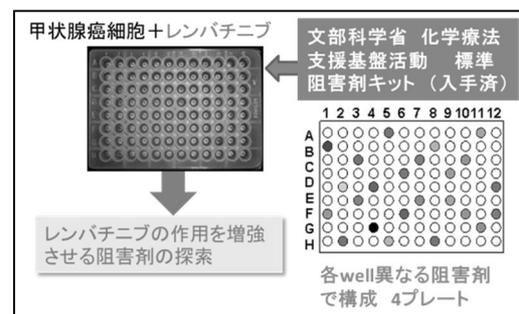
本研究は、甲状腺未分化癌に対する新規治療法および治療薬の開発することを目的とする。

3. 研究の方法

以下の 2 つのアプローチで新規治療薬の治療法のシーズを探索した。

(1) レンバチニブの作用を増強させる新たな併用薬剤の探索

不十分ながら未分化癌に対して、奏効が報告されている薬剤はレンバチニブのみであり、レンバチニブ + の併用療法の可能性を探る。レンバチニブの効果を増強しうる選択的阻害剤を同定することは、レンバチニブのバイオマーカーの探索へとつながる。併用阻害剤は、約 400 種の既知の阻害剤からなる文部科学省化学療法支援班の標準阻害剤キットより探



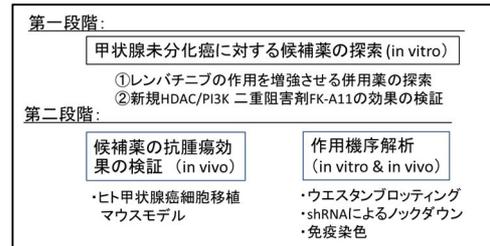
索する。

(2) 新規 HDAC/PI3K 二重阻害剤である FK-A11 の効果の検証

上述のごとく、未分化癌の発生および分化型癌の未分化転化に PI3K が関与していることに着目し、また HDAC 阻害剤の抗腫瘍効果の報告に基づき、申請者らが開発中の新規 HDAC/PI3K 二重阻害剤 FK-A11 の効果を検証する。

H29 年度、ヒト甲状腺癌細胞株を用いて、in vitro で候補薬の探索、評価を行った。

H30、H31 年度は、in vivo で抗腫瘍効果を明らかにし、また、その作用機序をウエスタンブロットティングなど生化学的手法を用いて解析した。

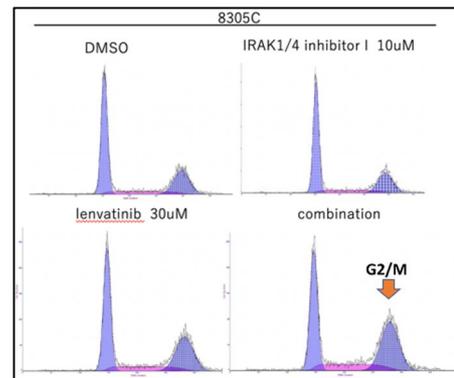


4. 研究成果

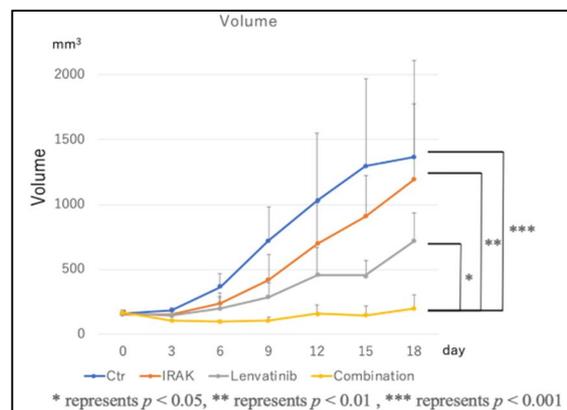
(1) レンバチニブの作用を増強させる新たな併用薬剤の探索

甲状腺未分化癌細胞株 8305C に 10 μ M 濃度のレンバチニブを作用させることで、コントロールに比して 20%ほどの細胞増殖抑制効果を得た。その状況下で、約 400 種の阻害剤からなる文部科学省化学療法支援班の標準阻害剤キットをさらに作用させた。このライブラリーは 96-well プレートの個々の well に様々な作用機序をもった既知の阻害剤が分注されている。3 回の独立したアッセイを行い、2 回以上その細胞増殖抑制効果が 50% 以上になった化合物を選別した。その結果 IRAK (IL-1 receptor-associated kinase, interleukin-1 receptor-associated kinase) 1/4 Inhibitor I がヒットした。

甲状腺未分化癌細胞株として 8305C、HTC/C3、ACT-1、8505C の 4 細胞株を用意し、Cell viability assay を用い、レンバチニブと IRAK1/4 Inhibitor I の Combination Index を算出したところ、全ての細胞において併用投与により相乗的な細胞増殖抑制効果を示した。相乗効果をもたらす濃度で細胞周期解析を施行した結果、いずれの細胞株においても、併用投与による G2M 期での細胞周期の停止 (G2/M arrest) を認めた。

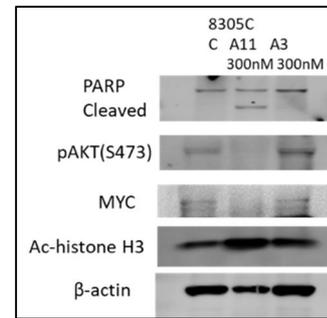


IRAK1/4 阻害によるレンバチニブの細胞増殖抑制効果への影響を確認するため、IRAK1、IRAK4 をノックダウンした HTC/C3 細胞を CRISPR Cas9 を用いて作成した。ウエスタンブロット解析により IRAK1、IRAK4 のノックダウンを確認した後、レンバチニブによる細胞増殖抑制効果を評価した結果、IRAK1、IRAK4 ノックダウン細胞では、Control 細胞に比べ、レンバチニブによる細胞増殖抑制効果が増強していた。次に、HTC/C3 細胞をヌードマウスに移植した xenograft モデルにて、レンバチニブと IRAK1/4 Inhibitor I の抗腫瘍効果を検討した。レンバチニブと IRAK1/4 Inhibitor I の併用投与群は Control 群、レンバチニブ群、IRAK 1/4 Inhibitor I 群に比べ有意に腫瘍の増大を抑制することが示された。



(2) 新規 HDAC/PI3K 二重阻害剤である FK-A11 の効果の検証

研究代表者が開発中である新規 HDAC/PI3K 二重阻害剤 FK-A11 も甲状腺未分化癌細胞株 (8305C、HTC/C3) に対して、強い細胞増殖抑制効果を示した。FK-A11 は 8305C 細胞において、HDAC 阻害、PI3K-AKT 経路の抑制の他、MYC の発現を抑制することがウエスタンブロットによる検討の結果明らかになった。しかしながら、つづいて行った FK-A11 の *in vivo* 抗腫瘍効果の条件の設定において、FK-A11 はあらゆる溶媒に難溶性であることが明らかになり、その溶解性の改善が課題となった。検討の結果 FK-A11 をナノ粒子化し、分散させるという方法に成功した。その安定性について現在検証中である。



まとめ

甲状腺未分化癌細胞に対して IRAK 1/4 Inhibitor I により、レンバチニブの細胞増殖抑制効果および抗腫瘍効果が増強されることが明らかとなった。今後、その作用機序をより詳細に明らかにし、抗腫瘍効果および毒性の情報を蓄積することで、レンバチニブと IRAK1/4 Inhibitor I の併用療法は、甲状腺未分化癌に対する有望な治療法の開発につながるものと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 川村佳史、西條憲、今井源、石岡千加史
2. 発表標題 甲状腺未分化癌細胞における lenvatinib と IRAK1/4 inhibitor I の併用効果の検討
3. 学会等名 日本がん分子標的治療学会学術集会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

2020年に国際学会での演題登録済。 論文投稿の準備中。

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----