

平成 22 年 6 月 21 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20790087
 研究課題名 (和文) 新規 PI3K 阻害剤 ZSTK474 による細胞周期停止機構の解析
 研究課題名 (英文) Studies on cytostatic antitumor mechanism by a new PI3K inhibitor ZSTK474

研究代表者
 旦 慎吾 (DAN SHINGO)
 財団法人癌研究会・癌化学療法センター・分子薬理部・研究員
 研究者番号：70332202

研究成果の概要 (和文)：

ZSTK474 などの PI3K 阻害剤は、PIK3CA 変異株や PTEN 欠損株を含む種々のがん細胞株に *in vitro* において顕著なアポトーシスを認めず、G₀/G₁ アレストを誘導した。また *in vivo* でもアポトーシスは起こさずに抗腫瘍効果を発揮した。ZSTK474 暴露後のがん細胞の中で発現変動する遺伝子群を Genechip で解析したところ、G₀/G₁ アレストに関与しうる因子として CDK インヒビター p15 の発現誘導と、CDC25A の発現抑制を見出した。

研究成果の概要 (英文)：

We demonstrated that PI3K inhibitors including ZSTK474 did not induce apoptosis but G₀/G₁ arrest of cell cycle in cancer cell lines with PIK3CA/PTEN aberrations *in vitro*. In parallel, PI3K inhibitors exhibited their antitumor effect without inducing apoptosis *in vivo*. We examined gene expression changes after treatment of cancer cells with ZSTK474 by using GeneChip, and found induction of CDK inhibitor p15 and repression of CDC25A after ZSTK474 treatment. These changes would be involved in G₀/G₁ arrest of cell cycle.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学 (分子生物学)

キーワード：PI3K・DNA チップ・細胞周期・アポトーシス・抗がん剤

1. 研究開始当初の背景

ホスファチジルイノシトール-3 キナーゼ (PI3K) は、Akt を起点とするシグナル伝達 (PI3K パスウェイ) を活性化することにより、細胞の増殖や生存を促進する。PI3K パスウェイ

は PI3K をコードする PIK3CA 遺伝子の変異・増幅および PTEN の機能喪失によりがんを高頻度に活性化されており、がん治療のターゲット分子として有望であると考えられる。近年、当研究室が世界に先駆けて開発し

た ZSTK474 をはじめ、PI-103、BEZ-235 といった PI3K を標的とした抗がん剤の開発競争が行われており、臨床試験に向けて開発が進んでいる。前述の通り、PI3K はがん細胞の増殖・生存を促進することから、PI3K 阻害剤により PI3K 阻害するとがん細胞は増殖抑制やアポトーシスを起こすことにより抗腫瘍効果を発揮するものと考えられていたが、実際にはよく分かっていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、PI3K 阻害剤による抗腫瘍効果のメカニズムを明らかにするために、PIK3CA 遺伝子の変異や PTEN の機能喪失が認められるものを含む種々のがん細胞株を用いて、PI3K 阻害剤の抗腫瘍効果とアポトーシス誘導・細胞周期分布変化を比較した。また、PI3K 阻害剤抗腫瘍効果の分子メカニズムを解析した。

3. 研究の方法

in vitro におけるアポトーシス・細胞周期分布の解析は、PI 染色・フローサイトメトリーにより検討した。また、アポトーシスについてはカスパーゼの特異的基質 DEVD-MCA を用いた蛍光測定も併せて行った。in vivo におけるアポトーシス解析は、TUNEL アッセイにより行い、増殖マーカー Ki67 の発現は免疫組織化学染色により検討した。PI3K 阻害剤処理後の遺伝子発現変動は GeneChip により行い、タンパク質発現変化はウェスタンブロット法により検討した。

4. 研究成果

PI3K 阻害剤による抗がんメカニズムを調べるために、PI3K 触媒サブユニット PIK3CA のホットスポット変異株 (MCF7・HCT-15・SK-OV3) や PTEN 欠損株 (KM-12・PC-3) を含む 10 種類以上のがん細胞株を用いて、ZSTK474 および他の PI3K 阻害剤 GDC-0941、BEZ235 を暴露した。その結果、in vitro においてすべての細胞株で顕著なアポトーシスを認めず、G₀/G₁ アレストを誘導した。また、in vivo において、これらのがん細胞株由来のゼノグラフトに対する ZSTK474 の効果を検討したところ、すべての腫瘍で顕著な増殖抑制が認められた。ZSTK474 投与後の腫瘍塊におけるアポトーシスおよび細胞増殖を TUNEL アッセイおよび増殖マーカー Ki67 の免疫組織化学染色により検討したところ、アポトーシス細胞は出現せず、Ki67 の顕著な発現抑制が認められた。以上のことから、PI3K 阻害剤は一般に、PIK3CA/PTEN 異常がんにおいて G₀/G₁ アレストを誘導することにより抗腫瘍効果を発揮するものと結論された。

また、PI3K 阻害剤による G₀/G₁ アレストの分子機序を解析するために、ヒト前立腺がん細胞 PC-3・ヒト肺がん細胞株 A549 を用いて、

ZSTK474 暴露後のがん細胞の中で発現変動する遺伝子群を Genechip で明らかにした。これらのうち特に G₀/G₁ アレストとの関連が予想される因子について、RT-PCR による遺伝子発現の確認、プロモーター活性の解析、タンパク質レベルでの発現変動解析を行った。その結果、CDK インヒビター p15INK4b の発現誘導と、CDC25A の発現抑制が認められた。これらの発現変動が G₀/G₁ アレストに関わるものと考えられた。

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 5 件)

1. Dan S, Okamura M, Seki M, Yamazaki K, Sugita H, Okui M, Mukai Y, Nishimura H, Asaka R, Nomura K, Ishikawa Y, Yamori T. Correlating PI3K inhibitor efficacy with signaling pathway status: in silico and biological evaluations. *Cancer Res.* 2010; 70(12): 4982-94.
2. Kong D, Dan S, Yamazaki K, Yamori T. Inhibition profiles of phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors against PI3K superfamily and human cancer cell line panel JFCR39. *Eur. J. Cancer* 2010; 46(6): 1111-21.
3. Dan S, Yoshimi H, Okamura M, Mukai Y, Yamori T. Inhibition of PI3K by ZSTK474 suppressed tumor growth not via apoptosis but G₀/G₁ arrest. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2009; 379(1): 104-9.
4. Nakamura T, Nakatsu N, Yoshida Y, Yamazaki K, Dan S, Sadahiro S, Makuuchi H, Yamori T. Identification of Candidate Genes Determining Chemosensitivity to Anti-cancer Drugs of Gastric Cancer Cell Lines. *Biol. Pharm. Bull.* 2009; 32(11): 1936-9.
5. Sugita H, Dan S, Kong D, Tomida A, Yamori T. A new evaluation method for quantifying PI3K activity by HTRF assay. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2008; 377(3): 941-5.

[学会発表] (計 12 件)

1. Dan S, Sugita H, Yamazaki K, Yamori T. Efficacy of PI3K inhibitors to PI3K mutants in enzyme and cell levels. AACR Annual Meeting. 2009 (Denver, USA)
2. Dan S, Sugita H, Seki M, Mukai Y, Yamazaki K, Ishikawa Y, Yamori T. Efficacy of PI3K inhibitors to cancer cells with PIK3CA mutation or loss of

- PTEN expression. The 21th AACR-NCI-EORTC symposium. 2009 (Boston, USA)
3. Kong D, Dan S, Yamazaki K, Yamori T. JFCR39 COMPARE system can predict molecular targets of phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors with high resolution. The 21th AACR-NCI-EORTC symposium. 2009 (Boston, USA)
 4. Dan S, Sugita H, Seki M, Mukai Y, Yamazaki K, Ishikawa Y, Yamori T. Correlation between efficacy of PI3K inhibitors and aberration of PI3K3CA/PTEN in a panel of 39 human cancer cell lines (JFCR39). The 8th AACR/JCA joint conference. 2010 (Hawaii, USA)
 5. 旦慎吾, 山崎佳波, 矢守隆夫. PI3 キナーゼ阻害剤の変異型 PI3 キナーゼへの効果. 第13回日本がん分子標的治療学会. 2009 (徳島)
 6. 旦慎吾, 杉田裕宣, 山崎佳波, 矢守隆夫. PI3 キナーゼ阻害剤 ZSTK474 の変異型 PI3 キナーゼへの効果. 第25回日本 DDS 学会. 2009 (東京)
 7. 旦慎吾, 山崎佳波, 矢守隆夫. PI3K 阻害剤の変異型 PI3K への効果. 第68回日本癌学会. 2009 (横浜)
 8. Dan S, Mukai Y, Yaguchi S, Yamori T. ZSTK474, a novel PI3K inhibitor, down-regulates CDC25A and induces G₁ phase cell cycle arrest in human cancer cells. The 100-th Am Assoc Cancer Res (AACR) Annual Meeting. 2008 (San Diego, CA, USA)
 9. 旦慎吾, 向井由美子, 矢口信一, 矢守隆夫. 新規 PI3 キナーゼ阻害剤 ZSTK474 による G₁ アレスト誘導. 第12回がん分子標的治療研究会. 2008 (東京)
 10. 杉田裕宣, 旦慎吾, 孔徳新, 矢守隆夫. HTRF アッセイを用いた定量的な PI3 キナーゼ活性測定法の構築. 第67回日本癌学会学術総会. 2008 (名古屋)
 11. 旦慎吾, 向井由美子, 岡村睦美, 吉見直, 矢口信一, 矢守隆夫. 新規 PI3K 阻害剤 ZSTK474 による抗腫瘍メカニズムの解析. 第67回日本癌学会学術総会. 2008 (名古屋)
 12. 小林雅明, 旦慎吾, 大橋愛美, 矢守隆夫. インピーダンスによるリアルタイム細胞増殖測定法の開発. 第67回日本癌学会学術総会. 2008 (名古屋)

[図書] (計1件)

1. 旦慎吾, 矢守隆夫. Cancer Cell Informatics と分子標的薬剤. 東京: 南山堂; 2008.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

旦 慎吾 (DAN SHINGO)

財団法人癌研究会・癌化学療法センター

分子薬理部・研究員

研究者番号: 70332202

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし