

令和 5 年 6 月 30 日現在

機関番号：72602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07626

研究課題名(和文)細胞特異性の高い抗がん効果を示す新規CDK阻害剤を用いた画期的ながん治療法の開発

研究課題名(英文) Development of innovative cancer therapy using novel CDK inhibitors that exhibit highly cell-specific anticancer effects

研究代表者

大橋 愛美 (OHASHI, Yoshimi)

公益財団法人がん研究会・がん化学療法センター 分子薬理部・主任研究助手

研究者番号：50727427

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：海洋天然物ラメラリンNの新規合成誘導体から、ナノモルレベルでサイクリン依存性キナーゼ(CDK)を広く阻害する化合物(Azalam4)を見出した。本剤は、調べた39種のがん細胞株のうち4種にのみ低濃度でアポトーシスを伴う強い抗がん効果を示し、先行開発された複数の転写調節型CDK阻害剤と抗がん特異性や遺伝子発現変動が類似した。また、上記のがん細胞株に対して動物モデルでも著効した。本剤は、他のCDK阻害剤と比較して最も高い抗がん特異性を示したことから、本剤をリードとした新たな転写調節型CDK阻害剤の開発が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の結果、Azalam4や先行して開発された転写調節型CDK阻害剤が、高い細胞特異性でアポトーシスを誘導する抗がん剤候補であることが示された。現在、Azalam4を含む転写調節型CDK阻害剤の薬効予測を実現するために、アポトーシス誘導を起こす細胞特異性を規定する分子の探索を進めている。これにより、転写調節型CDK阻害剤の開発が加速化するとともに、転写調節型CDK阻害剤の治療効果が高い患者の層別化に役立つものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we identified a novel synthetic derivative of the marine natural product Lamellarin N, Azalam 4, that broadly inhibited cyclin dependent kinases (CDKs) at the nanomolar level. We demonstrated that this compound showed a strong anticancer efficacy via apoptosis only on 4 of the 39 cancer cells examined, exhibiting similar anticancer selectivity and gene expression changes to several previously developed transcriptional CDK inhibitors. Furthermore, it was also effective in animal models against cancer cell lines that induced cell death in cellular level. Since Azalam 4 showed the highest anticancer specificity among the transcriptional CDK inhibitors examined, this compound would be a promising lead compound for the novel antitumor drug candidates that target transcriptional CDKs.

研究分野：腫瘍学

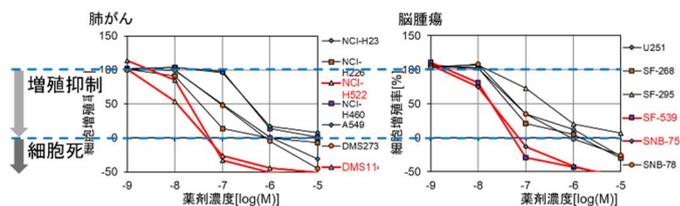
キーワード：サイクリン依存性キナーゼ RNAポリメラーゼII 転写調節 細胞死 分子標的薬

## 1. 研究開始当初の背景

がんは、がん遺伝子のドライバー変異が原因で自立性増殖能を獲得した細胞集団である。近年、そのような異常遺伝子を標的とした分子標的薬が数多く開発され、大きな成果を上げている。増殖・生存は多くの場合、1つないし少数の遺伝子のドライバー変異に依存しており（オンコジーンアディクション）、それぞれのがんで依存している遺伝子が異なることから、上市された分子標的薬の多くは標的とする遺伝子異常を持つがんにのみ著効を示し、その他のがんや正常細胞に対してはほとんど影響を与えない。一方で、有効な分子標的治療法が見出されていないがんも多く残されている。このようながんに対する治療標的分子の探索には通常ゲノム手法が用いられるなか、当部では39種類のがん細胞株からなるJFCR39パネルを用いた独自の手法を用いている。これまでに当部では、既知の抗がん剤や新規抗がん物を含むおよそ1万種類の化合物について、JFCR39各細胞株に対する抗がん効果を調べ、データベース(DB)化している。JFCR39細胞株に対する化合物の増殖抑制濃度(GI50)のパターン(フィンガープリント、FP)の類似性により、化合物の作用メカニズムを予測できる。本パネルシステムは、本DBから特定のがん細胞にのみ著効する化合物を抽出し、その化合物をプローブに特異的な抗がん分子機序を解明することにより、がんの新たな治療標的を見出そうとするものである。

このパネル解析の結果、我々はAzalamellarin 4 (Azalam4) に注目した。Azalam4は海洋天然物Lamellarin N (LamN)の合成誘導体であるが、リード化合物とは異なり、JFCR39がん細胞株のうち2種類のヒト肺がん細胞株と2種類のヒト脳腫瘍細胞株の4細胞株のみ、非常に低濃度で細胞死を誘導し、他の細胞株には増殖停止を誘導した(図1)。さらに複数のサイクリン依存性キナーゼ(CDK)阻害剤とFPが類似することからCDK阻害剤であることが予測され、実際ナノモルレベルの強いpan-CDK阻害活性を有することを確認した。

図1 Azalam4による細胞死の誘導



CDKはがん治療の新たな標的として注目され、近年、パルボシクリブ、リボシクリブ、アベマシクリブが上市された。これらはいずれもCDK4/6特異的な阻害剤である。一方CDK1、CDK2、CDK7、CDK9など、その他のアイソフォームを標的とした阻害剤も開発されているが、承認に至っていない。CDK阻害剤による効果予測バイオマーカーによる患者の層別化はこれまでのところ達成されていない。そこで、Azalam4がどのようなメカニズムでこれらのがん細胞株に「特異的な細胞死」を誘導するのか、その分子基盤を解明することにより、Azalam4に限らず、広くCDK阻害剤の対象疾患や効果予測バイオマーカーが同定される可能性もあり、極めて効果的で特異性の高いがん治療法の開発につながると考えられた。

## 2. 研究の目的

本研究では、Azalam4をプローブとして用い、「ある種の細胞株だけに細胞死を誘導し、他の細胞株に対しては増殖抑制を示す分子機構」を解明することを目的とし、CDK阻害を介した細胞死誘導の検証と、転写調節型CDKアイソフォームの関与を検討した。

## 3. 研究の方法

細胞レベルにおけるAzalam4のCDK活性とその下流シグナルに与える影響を検討するために、CDKの基質タンパク質のリン酸化型特異的な抗体、および下流因子の抗体を用いてウエスタンブロット法で解析した。アポトーシスの誘導は、JC-1染色によるミトコンドリア膜電位の変化をフローサイトメトリー(FCM)法にて解析した。

*in vivo*での抗腫瘍効果を示すために、ヒト肺がん細胞株NCI-H522のマウスゼノグラフト(皮下移植モデル)を用い検証した。また、腫瘍組織切片を作成し、細胞増殖マーカーKi67と

アポトーシスマーカーCaspase 3 の免疫組織染色を行った。

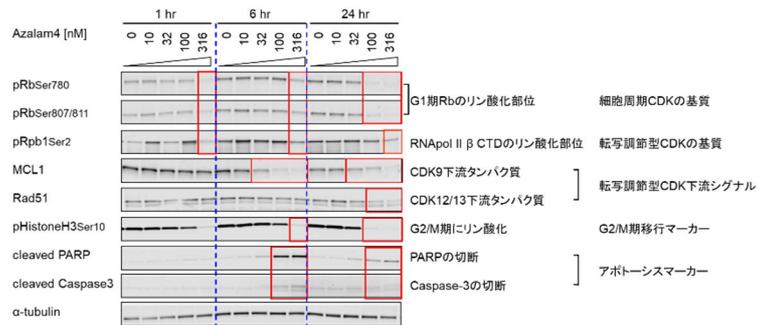
次に JFCR39 に対する細胞死誘導スペクトルに着目し、JFCR39 細胞株に対する細胞増殖率パーセントが薬剤添加時より下回る濃度領域（細胞死領域）のパターン（FP）を、JFCR39 パネルシステムのリファレンス DB 化合物について算出し、Azalam4 と類似するプロフィールを示す薬剤を探索した。また、薬剤処理前後のがん細胞における網羅的な遺伝子発現変動を RNAseq 法にて解析した。さらに発現変動遺伝子（DEG）について、Metascape を用い遺伝子オントロジー（GO）エンリッチメント解析を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) Azalam 4 による CDK 阻害と細胞死の誘導

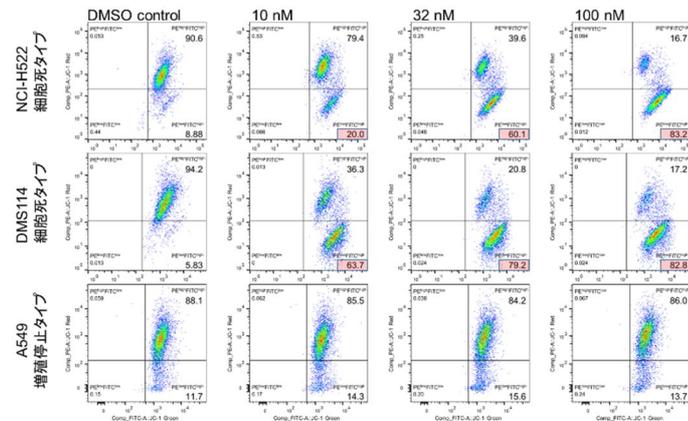
Azalam4 が細胞死を起こす細胞内で、実際に CDK とその下流シグナルを阻害するのかを確認するために、Azalam 4 が著効を示す肺がん細胞株 NCI-H522 を用いてウェスタンブロット法にて検討した（図 2）。Azalam4 添加により、確かに CDK 基質のリン酸化が抑制され、転写調節型 CDK 下流シグナル分子の発現が减弱し、アポトーシスマーカー分子の発現が上昇した。

図 2 Azalam4 添加後の CDK 下流シグナルの発現変動 (NCI-H522)



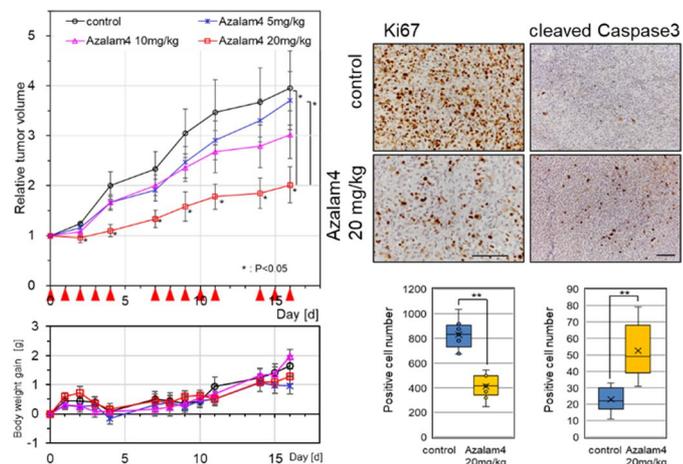
次に、Azalam4 が細胞死を起こす細胞株でアポトーシスが誘導されるかを検討するため、薬剤添加後のミトコンドリア膜電位の低下の有無を、JC-1 色素を用い細胞を染色して FCM 法にて解析した。（図 3）細胞死を起こす細胞株では、濃度依存的にミトコンドリア膜電位の低下した細胞集団が増加した。一方増殖停止タイプの細胞株では顕著な変化は認められなかった。

図 3 Azalam4 添加後のミトコンドリア膜電位の変化



Azalam4 の *in vivo* 抗腫瘍効果を、細胞死を起こすヒト肺がん株 NCI-H522 のマウスゼノグラフトモデルにて検討した結果、Azalam4 投与により有意な腫瘍増殖抑制が認められた。また、腫瘍組織切片を用いた免疫組織染色の結果、細胞増殖の指標である Ki67 陽性細胞数が抑制され、アポトーシスの指標である Caspase 3 の陽性細胞数の上昇が認められた（図 4）。

図 4 Azalam4 による *in vivo* 抗腫瘍効果

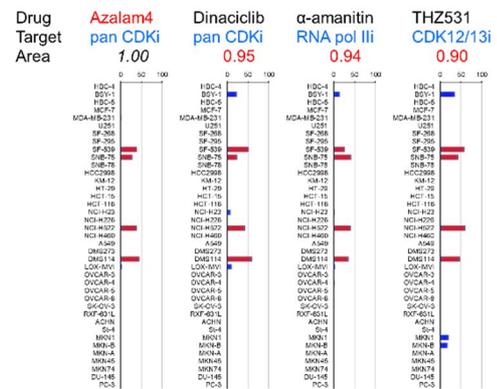


以上から、Azalam4 は細胞レベルで CDK の各アイソフォームを抑制すること、細胞特異的にアポトーシスを誘導すること、動物レベルでアポトーシスを伴う強い抗がん効果を示すことがわかった。

## (2)細胞死誘導の特異性の評価

当研究室ではこれまでに、化合物の細胞増殖抑制活性の指標となる 50%増殖阻害濃度 (Log GI50) の JFCR39 パネル細胞に対するスペクトルをレファレンス化合物と比較することにより、その作用メカニズムの推定を行ってきた。本研究では、Azalam4 の細胞死誘導スペクトルに着目し、薬物投与 48 時間後の用量反応曲線が、薬剤添加時の細胞量を下回る面積 (細胞死領域) を各 JFCR39 細胞株について求め、そのスペクトル (細胞死領域プロフィール) を 1800 種類のレファレンス化合物のそれと比較して類似のスペクトルを示す化合物を探索した。その結果、Dinaciclib などの転写調節に関わる CDK9/12/13 等の阻害剤 (転写調節型 CDK 阻害剤) や  $\alpha$ -amanitin のような RNA ポリメラーゼ II 阻害剤が高い相関を示した (図 5)。

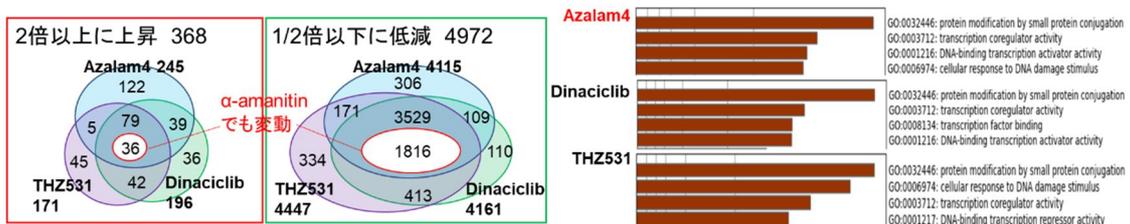
図 5 細胞死領域プロフィールの比較



## (3)Azalam4 と転写調節型 CDK 阻害剤が誘導する遺伝子発現変動の比較

次に、Azalam4 と転写調節型 CDK 阻害剤など、細胞死領域プロフィールに類似性が認められた薬剤について、薬剤暴露前後の遺伝子発現を RNAseq 法にて測定し、発現変動プロフィールを比較した。その結果、Azalam4 はこれらの薬剤と非常に高い相関を示すことがわかった。また Azalam4 処理後の遺伝子発現変動遺伝子 (DEG) を用いて遺伝子オントロジー (GO) エンリッチメント解析を行った結果、RNA ポリメラーゼ II 依存的な転写活性調節に関わる GO タームが上位に抽出された (図 6)。

図 6 Azalam4 と細胞死プロフィールが類似する薬剤により発現変動する遺伝子



以上から Azalam4 による細胞選択的な細胞死は、RNA ポリメラーゼ II 特異的な転写の調節が関与する可能性が指摘された。

## (4)まとめと今後の展望

本研究で見いだされた Azalam4 は、セルフリーの系で panCDK 阻害活性を示すが、細胞死誘導の特異性が複数の既知の転写調節型 CDK 阻害剤や RNA ポリメラーゼ II 阻害剤と非常に高い相関を示したこと、遺伝子発現変動においても同様に類似の変動を示し、さらに GO エンリッチメント解析からも Azalam4 が RNA ポリメラーゼ II 特異的な転写の調節に大きく関わっていることが示されたことから、Azalam4 の細胞特異的な細胞死の誘導には、転写調節型 CDK 阻害が重要であると考えられた。

同様の抗がんスペクトルを示す化合物のなかで、細胞特異性が既知の阻害剤を大きく上回ることから、Azalam4 は転写調節型 CDK を標的とする新規抗がん物質として有用と示唆され、本剤をリードとした新規抗がん剤の開発が期待される。

また、現在 Azalam4 を含む転写調節型 CDK 阻害剤の薬効予測を実現するために、アポトーシス誘導を起こす細胞特異性を規定する分子の探索を進めている。これにより、転写調節型 CDK 阻害剤の開発が加速するとともに、転写調節型 CDK 阻害剤の治療効果が高い患者の層別化に役立つものと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大橋愛美, 福田勉, 岡村睦美, 岩尾正倫, 旦慎吾
2. 発表標題 高い抗がん選択性を持つ新規合成ラメラリン類縁体Azalam 4の抗がん作用様式の解析.
3. 学会等名 第25回日本がん分子標的治療学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大橋愛美, 福田勉, 岡村睦美, 西谷直之, 岩尾正倫, 旦慎吾
2. 発表標題 Selective induction of apoptosis by a pan-CDK inhibitor Azalam 4, a novel synthetic derivative of lamellarin
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大橋愛美, 福田勉, 岡村睦美, 西谷直之, 岩尾正倫, 旦慎吾
2. 発表標題 強い抗がん特異性を示し CDK を阻害する新規ラメラリン類縁体 Azalam4 の同定
3. 学会等名 第24回日本がん分子標的治療学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大橋愛美, 福田勉, 岡村睦美, 西谷直之, 岩尾正倫, 旦慎吾
2. 発表標題 Antitumor mechanisms of Azalam 4, a novel synthetic lamellarin derivative, with potent antitumor selectivity
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大橋愛美, 福田勉, 岡村睦美, 西谷直之, 岩尾正倫, 旦慎吾
2. 発表標題 Analysis of antitumor mechanism by a pan-CDK inhibitor Azalam 4, a novel synthetic derivative of lamellarin: pan-CDK
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関