

令和 4 年 5 月 17 日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22833

研究課題名(和文) CDK2による過剰中心体の二極への収束を標的とした肺癌治療戦略の確立

研究課題名(英文) Targeting supernumerary centrosomes clustering by CDK2 inhibition to combat lung cancer

研究代表者

川上 正敬 (Kawakami, Masanori)

東京大学・医学部附属病院・特任講師

研究者番号：90438648

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：正常細胞では中心体数が2つに厳密に制御されるが、癌細胞では過剰な中心体の存在が知られる。細胞分裂時に過剰中心体が二極に収束することで癌細胞は正常な二極性細胞分裂が可能となるが、サイクリン依存性キナーゼ2(CDK2)の阻害で過剰中心体収束が阻害され、多極性細胞分裂からアポトーシスに至るanaphase catastropheが誘導される。本研究ではCDK2特異性が高い次世代CDK2阻害薬であるCYC065を用い、マウス及びヒト肺癌細胞株や複数の肺癌マウスモデルにおいて、CYC065の肺癌でのanaphase catastrophe誘導による抗癌活性を示した。同機序の臨床応用が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

癌細胞では過剰中心体を高頻度に認めることは臨床的にも報告されてきたが、この過剰中心体を癌治療に利用する試みの報告は多くなく、実用臨床からは遠いのが実情である。本研究で、過剰中心体収束の阻害によるanaphase catastrophe誘導を、既に臨床試験中のCDK2阻害薬で、さらには、厳しい予後である肺癌を対象として示したことは、同アプローチによる癌治療戦略の可能性を広げ、学術的にも臨床的にも意義深いものと考えている。

研究成果の概要(英文)：Cancer cells are genetically unstable and often have supernumerary centrosomes. When supernumerary centrosome clustering is inhibited at mitosis, multipolar cell division is forced, triggering apoptosis in daughter cells. This pro-apoptotic pathway is called anaphase catastrophe. Anaphase catastrophe eradicates aneuploid cancer cells while relatively sparing normal diploid cells with two centrosomes. This therapeutic window discriminates between normal and neoplastic cells and can be exploited in the cancer clinic. Cyclin dependent kinase 2 inhibitors can antagonize centrosome clustering and cause anaphase catastrophe to occur in lung and other cancers. In this study, we comprehensively studied the appearance of anaphase catastrophe in lung cancer cell lines and lung cancer mouse models using CYC065, a CDK2/9 inhibitor, and showed its pre-clinical activity against lung cancer. This study helps guide future CYC065 clinical trials.

研究分野：肺癌

キーワード：サイクリン依存性キナーゼ2 過剰中心体 多極性細胞分裂 肺癌

## 1. 研究開始当初の背景

癌細胞は正常細胞にはない特性(hallmark)を持ち(Hanahan D et al, Cell.2011)、これらは癌細胞に特異的な治療標的となる。癌細胞の hallmark の一つに染色体不安定性があり、この染色体不安定性を背景とし、正常細胞ではその数が厳密に2つに制御される中心体が、癌細胞では3つ以上の過剰中心体を高頻度に認める(Chan JY, Int J Biol Sci. 2011)。中心体は紡錘系を形成し細胞分裂時の染色体分離に重要な働きを持つが、過剰中心体により過剰な紡錘系が形成され、染色体は多極性に分裂する。その結果、娘細胞は aneuploidy となり、外的ストレスへの耐性や細胞増殖促進など癌細胞の生存に有利な形質を獲得する一方で、染色体の分離異常自体は細胞生存に有害な側面も持ち、過剰中心体の存在は癌治療に利用できる可能性がある。

過剰中心体を持つ癌細胞は細胞分裂時に中心体を二極に収束することで正常な二極性分裂が可能となるが、肺癌細胞で CDK2 阻害により過剰中心体の収束が阻害され、多極性細胞分裂を余儀なくされアポトーシスに至ることを明らかとなり、これは anaphase catastrophe と名付けられた(Galimberti F et al, Clin Cancer Res.2010; Danilov AV et al, Mol Cancer Ther.2016; Kawakami M et al, J Natl Cancer Inst.2017; Kawakami M et al, Mol Cancer Ther.2018) (図1)。

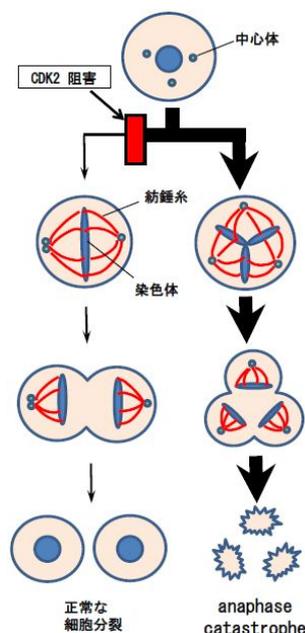


図1. CDK2 阻害で過剰中心体収束が阻害され、anaphase catastrophe が誘導される。

## 2. 研究の目的

本研究では CDK2 に特異性の高い次世代の CDK2 阻害薬である CYC065 (Cyclacel 社) を用いて anaphase catastrophe の効果と機序をより詳細に検討し、CDK2 阻害によるこの機構を新たな癌治療戦略として確立することを目指す。CYC065 は既に第二相臨床試験に入っており、本研究の成果は臨床応用への直結が期待できる。

## 3. 研究の方法

- 1) ATP 定量による細胞増殖アッセイ、アネキシン V/PI 染色によるアポトーシス、BrDU 染色による細胞周期アッセイ、細胞遊走能・浸潤能アッセイなどの *in vitro* のアッセイを用いて、CYC065 の肺癌細胞への活性を確認する。
- 2) 染色体、紡錘系 ( tubulin )、中心体 ( 中心体マーカーとして tubulin ) を蛍光染色し、CYC065 処理後の細胞での多極性細胞分裂、過剰中心体の収束の状態を観察し、CYC065 が anaphase catastrophe をもたらすかを確認する。
- 3) CYC065 処理後の細胞でのタンパク発現変化を Reverse phase protein array (RPPA) により検討し、CYC065 の作用に寄与するタンパク、パスウェイを同定する。同定されたタンパク、パスウェイについてはウェスタンブロットにて確認をする。
- 4) 上記で同定された標的タンパクの発現ベクターによる強制発現で、CYC065 によるアポトーシスや anaphase catastrophe 誘導がレスキューされるか、これらのタンパクの anaphase catastrophe 誘導をはじめとした CYC065 の作用への寄与を確認する。
- 5) 以前に確立した immunocompetent の肺癌トランスジェニックマウス (Ma Y et al, Proc Natl Acad Sci USA. 2007) や肺癌患者検体由来の patient derived xenograft (PDX) モデルを用いて、CYC065 治療による *in vivo* の抗腫瘍効果を調べる。
- 6) CYC065 による上記 *in vivo* で治療後のマウスからの腫瘍サンプルを用い、リン酸化ヒストン H3 の免疫染色で染色体像を観察し、多極性細胞分裂の有無を調べ、*in vivo* での CDK2 阻害剤による anaphase catastrophe の誘導を確認する。
- 7) 3) の RPPA で同定されたタンパク、パスウェイについて、CYC065 治療後のマウスからの腫瘍サンプルを免疫染色し、*in vivo* でもこれらのタンパクに対する CYC065 の効果を確認する。

#### 4 . 研究成果

本研究では、サイクリン依存性キナーゼ 2 (CDK2) の阻害により、過剰中心体収束が阻害され、癌細胞が多極性細胞分裂を余儀なくされアポトーシスに至る anaphase catastrophe 誘導の肺癌治療臨床への適用を目指し、CDK2 特異性が高い次世代 CDK2 阻害薬である CYC065 を用い、肺癌での抗癌活性を検討した。

細胞株としては、マウス及びヒト肺癌細胞株、コントロールとしてマウス肺胞上皮細胞 (C10) とヒト気道上皮細胞 (BEAS-2B) を用いた。研究方法に記載した各種 *in vitro* アッセイにて、CYC065 により肺癌細胞の細胞増殖が抑制されること、アポトーシスが誘導されること、細胞周期の進行が停止すること (G1 arrest) また、細胞の遊走能や浸潤能が抑制されることを示した。続いて、CYC065 で処理後の上記肺癌細胞株で、Hoechst 染色により DNA (染色体) を、また、紡錘系 ( $\alpha$ -tubulin) 中心体 (中心体マーカーとして  $\gamma$ -tubulin) をそれぞれ蛍光染色し、CYC065 によって過剰中心体の二極への収束が阻害され、anaphase catastrophe が誘導されることを示した。また、細胞株を用いた逆相タンパクアレイ (RPPA) により、CYC065 による細胞内シグナル変化として、CDK2 の既知の標的である RB リン酸化の他に、MCL1、FAK リン酸化、Src リン酸化の抑制が明らかになった。

さらに、これらの *in vitro* での CYC065 の肺癌細胞株に対する効果を、を複数の肺癌マウスモデル (肺癌トランスジェニックマウスや、肺癌患者由来の patient derived xenograft モデル) を用い、*in vivo* でも検証した。肺癌マウスモデルに CYC065 を経口投与すると、トランスジェニックマウスでの肺癌形成、及び、xenograft モデルで皮下に接種した肺癌細胞による腫瘍増大が有意に抑制され、*in vivo* でも CYC065 の肺癌に対する抗腫瘍作用を確認した。さらに CYC065 で治療後のこれらのマウスから摘出した腫瘍のリン酸化ヒストン H3 を免疫染色し、細胞分裂時の染色体の様子を腫瘍組織中で解析したところ、多極性細胞分裂像が観察され、*in vivo* でも CYC065 の anaphase catastrophe 誘導を確認することができた。さらに、肺癌細胞株を尾静脈から注入した tail vein モデルにおいて、CYC065 治療群のマウスで有意に肺での腫瘍形成の低下を認め、CYC065 が肺癌の転移抑制効果を有する可能性を示した。また、*in vitro* の RPPA で明らかになった CYC065 による MCL1、FAK リン酸化、Src リン酸化の抑制について、それぞれ、CYC065 で治療後のマウス肺癌組織での免疫染色により、*in vivo* でも抑制を確認した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Dmitrovsky E, Kawakami M, Liu X, Freemantle SJ, Kurie JM	4. 巻 131
2. 論文標題 TRIGGERING ANAPHASE CATASTROPHE TO COMBAT ANEUPLOID CANCERS	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Transactions of the American Clinical and Climatological Association	6. 最初と最後の頁 82-94
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Kawakami M, Mustachio LM, Chen Y, Chen Z, Liu X, Wei CH, Roszik J, Kittai AS, Danilov AV, Zhang X, Fang B, Wang J, Heymach JV, Tyutyunyk-Massey L, Freemantle SJ, Kurie JM, Liu X, Dmitrovsky E	4. 巻 20
2. 論文標題 A Novel CDK2/9 Inhibitor CYC065 Causes Anaphase Catastrophe and Represses Proliferation, Tumorigenesis, and Metastasis in Aneuploid Cancers	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular Cancer Therapeutics	6. 最初と最後の頁 477-489
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1158/1535-7163.MCT-19-0987	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Kawakami M, Mustachio LM, Chen Y, Chen Z, Roszik J, Heymach JV, Kurie JM, Liu x, Dmitrovsky E
2. 発表標題 Inducing Anaphase Catastrophe by CDK2 inhibitors to combat lung cancer
3. 学会等名 第60回日本呼吸器学会学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kawakami M
2. 発表標題 Novel targets to treat lung cancer
3. 学会等名 The 25th Congress of the Asian Pacific Society of Respirology（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2021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
---------	---------