

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 25 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22300340

研究課題名（和文）ERK-MAP キナーゼ経路の選択的遮断を基盤としたがん化学療法の開発

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）

京都大学・薬学研究科・研究員

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、様々なヒトがん細胞株を利用したXenograft系で確認した。これより、上記薬剤の組み合わせ併用が、真に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 and markedly sensitize various humor tumor xenografts to microtubule-destabilizing agent/HDAC inhibitor-induced cytotoxicity. 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
平成 22 年度	7,900,000	2,370,000	10,270,000
平成 23 年度	3,100,000	930,000	4,030,000
平成 24 年度	2,500,000	750,000	3,250,000
年度			
年度			
総計	13,500,000	4,050,000	17,550,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・臨床腫瘍学

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、Bcl-2 ファミリー蛋白質

1. 研究開始当初の背景

申請者は、ヒトがんにおけるERK-MAPキナー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、(I) 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^{Kip1} 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 (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した結果、それは微小管重合阻害剤、及び HDAC 阻害剤の細胞死誘導効果を極めて顕著に増強することを見出した。さらに、HT-29 大腸がん細胞等を用いた Xenograft 解析より、MEK 阻害剤と併用する事で、低濃度の微小管重合阻害剤 (単独での抗腫瘍効果は軽微) が、極めて顕著な腫瘍萎縮効果を示す事を明らかにした。また、ERK1/2 が GEF-H1 (微小管結合タンパク) のリン酸化を介して、細胞運動制御において重要な役割を果たしている RhoA を活性化する事、MEK 阻害剤と HDAC 阻害剤の併用による細胞死誘導においては細胞内に蓄積した活性酸素種 (ROS) が本質的な役割を果たしている事等、上記薬剤併用による細胞死誘導増強の分子機構解明に関しても着実に成果を上げつつある。このような状況下、上記成果を発展させて完成度を高め、MEK 阻害剤と微小管重合阻害剤/HDAC 阻害剤の併用療法が、真に有効な「がん化学療法」となり得る事を動物個体レベルで実証し、もって Translational Research での実践応用を期して、本研究を企画、提案した。

2. 研究の目的

本研究では、ERK-MAP キナーゼ経路遮断剤 (MEK 阻害剤) と微小管重合阻害剤、あるいは HDAC 阻害剤の併用による細胞死誘導増強効果を、幾つかのがん細胞株 (ゲフィチニブ耐性肺がん細胞、Triple-Negative 乳がん細胞、等) を利用した Xenograft 系で検証し、シグナル伝達遮断剤の活用が、副作用を軽減した「がん化学療法」の開発に繋がる可能性を検討する。また、各種がん細胞株を利用した培養系での解析より、上

記薬剤併用による細胞死増強の分子機構を多角的に進める。

一方、ERK-MAP キナーゼ経路の選択的遮断は、がん細胞の浸潤・転移抑制にも連動する可能性が高い。そこで、上記可能性に関する論理的基盤整備を図るべく、ERK-MAP キナーゼ経路による細胞運動制御の分子機構の解明を進める。具体的には、細胞運動制御において、ERK1/2 の下流で機能する分子として申請者が見出した新規分子、SH3P2 に着目し、その下流で機能する分子群の同定、それらの機能解明を進める。

これらの解析を通して、ERK-MAP キナーゼ経路の選択的遮断を基盤とした新規がん分子標的治療法の確立、その Translational Research への実践応用に向けて、基礎的知見を集積する。本研究の推進は、今後のがん化学療法に新たな方向性を提示する可能性が高く、その先鞭としたい。

3. 研究の方法

(1) ERK-MAP キナーゼ経路の恒常的活性化が認められる様々なヒトがん細胞株 (Gefitinib 耐性肺がん細胞、Triple-Negative 乳がん細胞等に注目) を利用した Xenograft 系で、MEK 阻害剤 (動物個体系での解析に耐える PD184352、PD0325901、AZD6244) と微小管重合阻害剤 (低神経毒性の TZT-1027、Navelbine) / ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害剤 (経口投与が可能な MS-275) の併用による抗腫瘍効果増強を検証、確認する。

(2) 上記薬剤併用による細胞死誘導増強の分子機構を、T24、HT1080 細胞株等を利用した培養系で、蛍光標識二次元ディフュージョン法/質量分析法を組み合わせながら、多角的に解析する。具体的には、MEK 阻害剤と微小管重合阻害剤の併用では、アポトーシス誘導において中心的な役割を果たす Bcl-2 ファミリー蛋白質、GEF-H1/RhoA 系、M 期進行制御において機能する分子群に焦点を当てる。一方、MEK 阻害剤と HDAC 阻害剤の併用では細胞内活性酸素種 (ROS) の産生、消去系で機能する分子群に焦点を当てる。

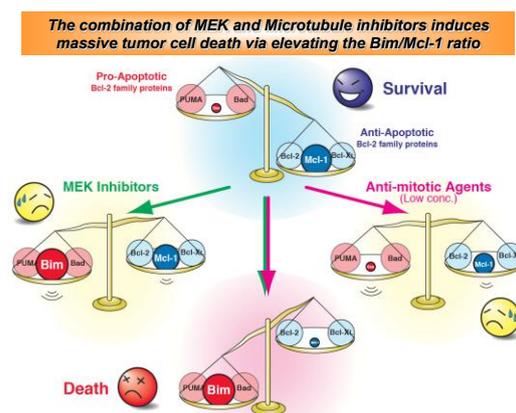
(3) ERK-MAP キナーゼ経路による細胞運動制御機構に関する分子レベルでの理解を深めるべく、ERK1/2 の下流で機能する分子として同定した新規タンパク SH3P2、それと複合体を形成する Myo1E に焦点を当て、それらの機能解明を進める。

4. 研究成果

(1) ERK-MAP キナーゼ経路遮断剤と微小管重合阻害剤の併用による抗腫瘍効果増強を、

HT-29 (Raf 変異)、HT1080 (Ras 変異)細胞株等を利用した Xenograft 系で検討した。その結果、MEK 阻害剤 (PD184352) と微小管重合阻害剤 (低濃度の TZT-1027、Navelbine) との併用で、顕著な増殖抑制増強、さらに HT1080 細胞では1週間毎、2度の薬剤処理で腫瘍塊のほぼ完全な消失を認めた。なお、上記各薬剤併用実験条件下において、体重減少等の副作用は認められなかった。すなわち、MEK 阻害剤と微小管重合阻害剤の併用は、副作用を軽減した、真に有効ながん化学療法に繋がる可能性を動物個体レベルで確認した。

(2) MEK 阻害剤と微小管作用薬の併用による細胞死増強の分子機構に関して、それは MEK 阻害剤による Bim (pro-apoptotic Bcl-2 family protein) の Up-regulation / MEK 阻害剤と微小管作用薬の相乗的な作用による Mcl-1 (anti-apoptotic Bcl-2 family protein) の Down-regulation を介して、細胞の生存 / 死シグナルのバランスを大幅に細胞死側に傾ける事が重要である事を明らかにした (下図)。



さらに、MEK 阻害剤と併用する事で顕著な細胞死を誘導できる薬剤として、微小管作用薬だけでなく、M 期進行に関与する様々な分子 (Polo-like kinase、Kinesin-5 等) に対する阻害剤 (M 期延長を誘導する) が該当する事を見出し、MEK 阻害剤を利用した新規がん化学療法の開発に向けて、分子レベルで基盤を確立した。

(3) MEK阻害剤とHDAC阻害剤の併用によるがん細胞死誘導増強に関して、それが動物個体系 (Xenograft) においても有効である可能性を、HT-29細胞 (B-Raf変異)、H1650細胞 (EGFR変異、EGFR-TK阻害剤抵抗性)、AZD6244/PD184352 (MEK阻害剤)、MS-275 (HDAC阻害剤) を組み合わせて多角的に検討した。その結果、両薬剤の併用は、①有意な副作用を示さない条件下において、極

めて顕著な抗腫瘍効果(増殖抑制、がん組織の脱落)を示す事、②そこでは酸化ストレスに起因するDNA障害が本質的な役割を果たしている事を明らかにした。

(4) MEK 阻害剤と HDAC 阻害剤の併用による細胞死誘導増強の分子機構に関しては、両薬剤処理によって ①Bim の発現上昇、ミトコンドリア膜透過性亢進、ROS の細胞質への放出、②FOXO1/3 の発現上昇、TBP-2 の発現上昇、抗酸化能の減弱、が誘導される。これらが相乗的に作用して細胞内 ROS の顕著な蓄積に繋がり、これが細胞死誘導の mediator として機能することを明らかにした。

(5) ERK-MAPキナーゼによる細胞運動制御の分子機構に関して、そこで機能する分子として同定したSH3P2 (細胞運動を負に制御し、その機能はRSK(p90)によるリン酸化で抑制される) の下流で ①Myosin1E(Myosin1E)が必須の役割を果たす、②Myosin1EはそのSH3ドメインを介してカベオラ形成に関与するCaveolin1-Cavin1/3複合体と結合する、③Myosin1Eの発現を抑制すると、Caveolin1、Cavin1/3の発現量が低下し、それは各分子の安定性低下に起因する、④Caveolin1、Cavin3の発現を抑制すると細胞運動が阻害される、⑤Myosin1Eを過剰発現させた場合には、カベオラ / 脂質ラフト画分 (Triton X-100不溶性画分) におけるAktのリン酸化 (活性化) の持続時間が顕著に延長されることを見出した。これらの知見は、細胞運動制御におけるERK-MAPキナーゼ経路とPI3K/Akt経路のCross-Talkの実態解明に繋がる可能性を示唆するものである。

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 10 件 ; 全て査読有)

- (1) Sakamoto, T., Ozaki, K., Fujio, K., Kajikawa, S., Uesato, S., Watanabe, K., Tanimura, S., Koji, T. & Kohno, M. Blockade of the ERK pathway enhances the therapeutic efficacy of the histone deacetylase inhibitor MS-275 in human tumor xenograft models. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 433: 456-462, 2013.
- (2) Waheed, F., Dan, Q., Amoozadeh, Y., Zhang, Y., Tanimura, S., Speight, P., Kapus, A. & Szász, K. Central role of the exchange factor GEF-H1 in TNF- α -induced sequential activation of Rac, ADAM17/TACE, and RhoA in tubular epithelial cells. **Mol. Biol. Cell**, 24: 1068-1082, 2013.

- (3) Matsuse, M., Mitsutake, N., Tanimura, S., Ogi, T., Nishihara, E., Hirokawa, M., Fuziwara, C. S., Saenko, V. A., Suzuki, K., Miyauchi, A. & Yamashita, S. Functional characterization of the novel BRAF complex mutation, BRAF^(V600delinsYM), identified in papillary thyroid carcinoma. **Int. J. Cancer**, 132: 738-743, 2013.
- (4) Sugiyama, N., Kohno, M. & Yokoyama, T. Inhibition of the p38 MAPK pathway ameliorates renal fibrosis in an NPHP2 mouse model. **Nephrol. Dial. Transplant.**, 27: 1351-1358, 2012.
- (5) Kawabata, T. Tanimura, S., Asai, K., Kawasaki, R., Matsumaru, Y. & Kohno, M. Up-regulation of pro-apoptotic protein Bim and down-regulation of anti-apoptotic protein Mcl-1 cooperatively mediate enhanced tumor cell death induced by the combination of ERK kinase (MEK) inhibitor and microtubule inhibitor. **J. Biol. Chem.**, 287: 10289-10300, 2012. (Evaluated and included in the “Faculty of 1000” library).
- (6) Kohno, M., Tanimura, S. & Ozaki, K. Targeting the extracellular signal-regulated kinase pathway in cancer therapy. **Biol. Pharm. Bull.**, 34: 1781-1784, 2011.
- (7) Tanimura, S., Hashizume, J., Kurosaki, Y., Sei, K., Gotoh, A., Ohtake, R., Kawano, M., Watanabe, K. & Kohno, M. SH3P2 is a negative regulator of cell motility whose function is inhibited by RSK-mediated phosphorylation. **Genes Cells**, 16: 514-526, 2011.
- (8) Kawaratani Y., Harada T., Hirata Y., Nagaoka Y., Tanimura S., Shibano M., Taniguchi M., Yasuda M., Baba K. & Uesato S. New microtubule polymerization inhibitors comprising a nitrooxymethyl-phenyl group. **Bioorg. Med. Chem.**, 19: 3995-4003, 2011.
- (9) 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.
- (10) 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).

[学会発表] (計 12 件)

- (1) 谷村 進、平田弦也、大山 要、中原康子、松丸由美、尾崎恵一、武田弘資、河野通明 : Myosin1E の細胞運動亢進作用は UNC45-Hsp90 複合体による細胞内局在制御によって調節される、第 85 回日本生化学会大会、平成 24 年 12 月 15 日、福岡県
- (2) 平田弦也、谷村 進、木原康孝、尾崎恵一、武田弘資、河野通明 : UNC45 による Myosin1E の細胞内局在制御、第 29 回日本薬学会九州支部大会、平成 24 年 12 月 9 日、熊本県
- (3) 中原康子、谷村 進、浜松絢子、尾崎恵一、武田弘資、河野通明 : Myosin1E によるカベオラ形成制御と細胞運動、第 29 回日本薬学会九州支部大会、平成 24 年 12 月 9 日、熊本県
- (4) 谷村 進、河野通明 : MEK and microtubule inhibitors together kill tumor cells through up-regulation of Bim and down-regulation of Mcl-1. 第 71 回日本癌学会学術大会、平成 24 年 9 月 20 日、北海道
- (5) 森田和幹、平田弦也、中原康子、谷村 進、河野通明 : Myosin 1E による細胞運動制御の分子メカニズム、平成 23 年 12 月 10 日、第 28 回日本薬学会九州支部大会、福岡県
- (6) 谷村 進、橋詰淳哉、渡邊一石、河野通明 : Myosin 1E enhances cell motility via the induction of filopodia formation: essential role of phosphorylation on Ser⁷³⁶、第 70 回日本癌学会学術総会、平成 23 年 10 月 5 日、愛知県
- (7) 浅井廣平、川畑拓誠、内山 綾、谷村 進、河野通明 : MEK 阻害剤と微小管重合阻害剤の併用による細胞死誘導増強作用の分子機構、第 27 回日本薬学会九州支部大会、平成 22 年 12 月 11 日、長崎県
- (8) 大竹里佳、橋詰淳哉、中原康子、谷村 進、河野通明 : Myosin 1E による細胞運動制御の分子機構、第 27 回日本薬学会九州支部大会、平成 22 年 12 月 11 日、長崎県
- (9) 河野通宏、橋詰淳哉、森田和幹、金丸雄祐、谷村 進、河野通明 : 新規細胞運動制御因子 SH3P2 は Myosin 1E と結合する、第 27 回日本薬学会九州支部大会、平成 22 年 12 月 11 日、長崎県
- (10) 谷村 進、大竹里佳、河野通宏、橋詰淳哉、後藤愛依子、黒崎由希子、瀬井香奈子、河野通明 : 新規タンパク質 SH3P2 に

よる細胞運動制御の分子機構、第 83 回
日本生化学会大会、平成 22 年 12 月 8
日、兵庫県

(11) 谷村 進、橋詰淳哉、後藤愛依子、河
野通宏、大竹里佳、渡邊一石、河野通
明：Myosin 1E は invadopodia の形成を
介してがん細胞の浸潤を調節する、第
69 回日本癌学会学術総会、平成 22 年 9
月 23 日、大阪府

(12) 坂元利彰、藤尾康祐、梶川修平、上
里新一、渡邊一石、谷村 進、尾崎恵一、
河野通明：MEK 阻害剤と HDAC 阻害
剤の併用による抗腫瘍効果増強－
Xenograft での検討－、第 69 回日本癌学
会学術総会、平成 22 年 9 月 23 日、大
阪府

〔図書〕(計 1 件)

(1) 坂元利彰、河野通明 羊土社 **細胞死
実験プロトコール** (編集：刀禰重信・
小路武彦) 2011 年 224 ページ。(「阻
害剤リスト」(分担執筆) 210-219 ペー
ジ)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河野 通明 (KOHNO MICHIAKI)
京都大学・薬学研究科・研究員
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

(3) 連携研究者

上里 新一 (UESATO SHIN-ICHI)
関西大学・工学部・教授
研究者番号：50111969