

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 26 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24700977

研究課題名(和文) 薬剤複合投与による癌細胞分子ネットワークのシナジー制御メカニズム解明と抗腫瘍効果

研究課題名(英文) Anti-tumor effects of combination dosage of kinase inhibitors and analysis of synergistic control molecular mechanism.

研究代表者

赤松 香奈子 (AKAMATSU, KANAKO)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・研究員

研究者番号：90553967

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、単剤では抗腫瘍活性を示さないが二種類の薬剤を混合した際に強力な活性作用を持つ薬剤を用いて、生体内での変動解析から抗腫瘍作用メカニズム解明を目指した。これまで約30000種の化合物アッセイから、混合により劇的に細胞生存率を低下させる薬剤C053とC127を発見し、構造活性相関、生体内のシグナル変動を解析したが、新たな細胞死を誘導するシグナル伝達経路の発見には至らなかった。しかしながらこの実験経過において既存の薬剤とC053の混合で細胞死が増強される組み合わせが見つかり、転移癌や抗がん剤耐性癌などに対する新たな治療薬・治療法の可能性や応用が期待された。

研究成果の概要(英文)：I analyzed an anti-tumor mechanism through a variability analysis in vivo. In this study, I focused on two-species mixture drugs treatment; combination of two-species drugs has intense anti-tumor effect, whereas both drugs are ineffective in tumor suppression when it is used as a sole regimen. Through the about 30000 spices chemical assay, I discovered two candidate drugs, C053 and C127, which showed a drastic decrease in cell survivals. Although a structure activity correlation assay, and a variability analysis of C053 did not uncover a totally new apoptotic pathway, I found some combinations of established drug and C053 strongly induced apoptosis. This finding has a possibility for new drug discovery and medical applying for drug resistance cancer cells.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍生物学

キーワード：kinase inhibitor combination dosage molecular mechanism

1. 研究開始当初の背景

分子標的治療薬は、疾患特異的な分子を標的とした副作用の少ない効果的な薬剤として期待され、開発が進められている。しかしながら、特定の標的タンパク質への選択的作用を指向しても、類縁タンパク質をはじめとした他のタンパク質との作用を完全に回避することは難しく、予期せぬ副作用が生じる問題の根本的解決には至っていない。また、これまでの癌に関する研究は、単一のパスウェイのシグナル伝達に注目したものが多く、癌細胞死や転移メカニズムの全体像は、ほとんど解明されていない。

したがって、薬物と標的タンパク質との直接的な作用が、周辺や下流の遺伝子群にどのような影響を及ぼし、最終的に制がん作用として現れるのかという視点、すなわち薬理作用を生体内の分子ネットワークの変動として捉え制御する新たな創薬アプローチの開発が必要である。

2. 研究の目的

筆者はこれまで、既存キナーゼ阻害剤の単剤(187種)ならびに2種のコンビネーション(187×187種)について、ヒト乳癌細胞株を用いた細胞増殖阻害活性のスクリーニングを行い、単剤では細胞生存率に影響を与えないが、コンビネーションでは生存率を著しく低下させる薬剤、C053とC127コンビネーションの同定に成功した。本研究では、この単一薬剤では抗腫瘍活性を示さないが二種類の薬剤を複合投与した際に強力な活性を示すキナーゼ阻害剤の混合シナジー効果について、生体内分子ネットワークの変動解析を行うことにより、その抗腫瘍作用メカニズムの解明を行った。

3. 研究の方法

1) キナーゼ阻害剤コンビネーション薬剤による細胞生存率とアポトーシス誘導能の解析

活性化カスパーゼの測定、ssDNA定量、BrdU取り込み法によるDNA合成能の測定、細胞形態観察ならびに測定を行い、コンビネーション薬剤と細胞形態の関連性を探索した。

2) コンビネーション薬剤の化学構造とシナジー活性効果の構造活性相関解析

C053およびC127の類縁化合物を用いて、そのコンビネーションによる細胞生存率のシナジー効果の詳細解析を行った。

3) 他細胞株を用いてコンビネーション薬剤による相乗効果解析

主な実験はヒト乳癌細胞株MDA-MB231を用いて行っており、その他の細胞腫で同様のコ

ンビネーション効果が得られるかを検討した。細胞株にはA549(肺癌細胞株)、PaCa2(膵臓がん)、Hep3B(肝臓がん)、PC3(前立腺癌)、MCF7(乳癌)を用いた。

4) キナーゼ阻害剤におけるシグナルパスウェイの解析ならびに癌関連分子ネットワークの構築

細胞内でのリン酸化タンパク質の変動を得るために、同様に処置した細胞からタンパク質を抽出し、リン酸化タンパク質アレイ解析を行った。これらの発現変化のパターンの違いを発現クラスター解析によって明らかにし、それらクラスター内の遺伝子の働きについてはシグナルネットワーク解析を行うことで機能の推定を行い、コンビネーション薬剤で特異的に変化する関連分子ネットワークの抽出を行った。

5) マウスを用いた抗腫瘍試験

リンパ節や肺に高率に転移を示す乳癌細胞株BJMC3879をマウスに移植し、腫瘍サイズが100mm³になったところでミニ浸透圧ポンプにて持続的投与(A群:DMSO、B群:C053 40mg/kg/day、C群:C127 40mg/kg/day、D群:C053 + C127 20+20mg/kg/day)した。毎週腫瘍径を測定し、4週刊後に屠殺、剖検した。

6) 既存分子標的薬とのコンビネーションによる相乗効果解析

C053もしくはC127と既存分子標的薬(19種)とのコンビネーション投与において、相乗効果が得られるかどうか、細胞生存率測定により検討した。

4. 研究成果

1) キナーゼ阻害剤コンビネーション薬剤による細胞生存率とアポトーシス誘導能の解析

スクリーニングによって同定された薬剤C053とC127の単剤ならびに複合投与について、詳細な細胞生存率を検討した。その結果、単剤ではほとんど細胞死に影響を与えないが、7.5+7.5μMの複合投与から、劇的に細胞生存率を低下させていることがわかった(図1a, b)。

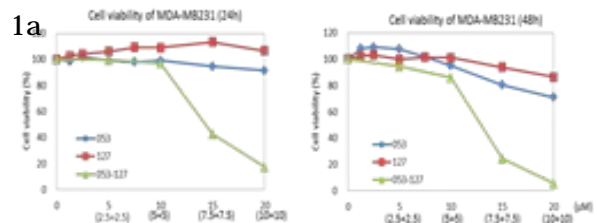


図1a C053とC127の単剤ならびにコンビネーションによる細胞生存率

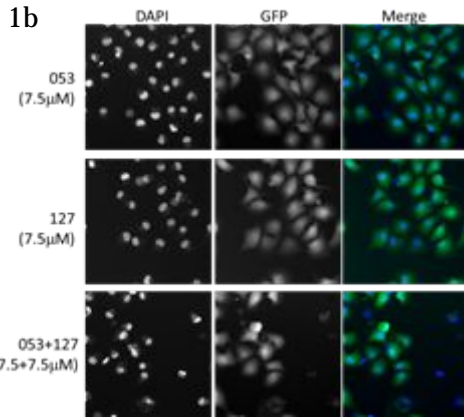


図 1b 細胞形態観察

また時間毎に生存率を測定したところ、単剤において高濃度の 48 時間で若干の細胞生存率の低下が見られたが、複合投与では時間依存的ならびに濃度依存的に細胞死が有意に低下するのがわかった(図 2)。

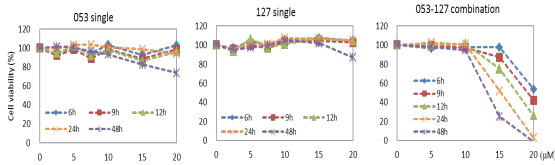


図 2 C053 と C127 の時間毎細胞生存率

この結果より、7.5+7.5µM の薬剤濃度を次のアポトーシス誘導能解析に使用した。Caspase3/7、8 および 9 活性解析においては、すべての条件で、有意な上昇を示した(図 3)。

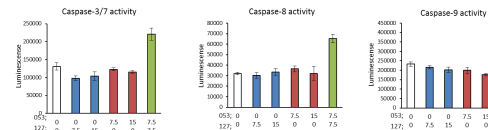


図 3 Caspase 活性阻害測定結果

ssDNA (single-stranded DNA) 定量解析、BrdU 取り込み法を用いた DNA 合成能を測定では、コンビネーション投与と C127 単剤の 15µM において、有意な細胞増殖抑制が見られた(図 4)。

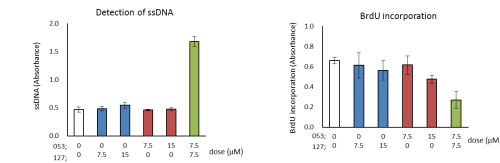


図 4 ssDNA ならびに DNA 合成能測定結果

以上の結果より、C053 と C127 のコンビネーション投与による細胞死は、細胞増殖を抑制し、アポトーシスを誘導していることがわかった。

2) コンビネーション薬剤の化学構造とシナジー活性効果の構造活性相関解析

C053 ならびに C127 の類縁体入手(C053 ; 44 種、C127 ; 44 種) コンビネーションによる生存率について検討した。その結果、C053 類縁体と C127 によるコンビネーション効果は見られなかったが、C236 が単剤で強力な細胞死を示した(図 5a、赤ライン)。また C127 類縁体では C053 と相乗効果を示す薬剤が見つかり、構造活性相関がみられた(図 5b、緑ライン)。

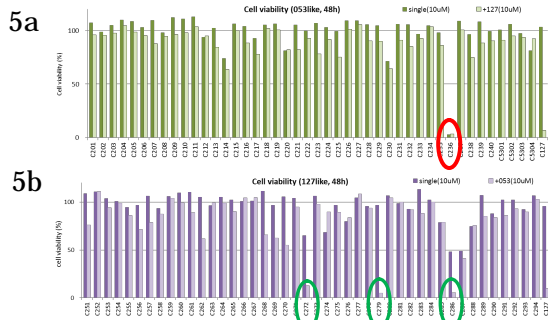


図 5a; C053 類縁体と C127 コンビネーションによる細胞生存率、5b; C053 と C127 類縁体コンビネーションによる細胞生存率

3) 他細胞株を用いてコンビネーション薬剤による相乗効果解析

他種細胞株を用いてコンビネーション効果を比較検討した。その結果、MCF7、Hep3B、PaCa2、PC3 細胞株では、C127 単剤で有意な細胞死がみられた。またコンビネーション投与による相乗効果は、すべての細胞において見られた(図 6)。

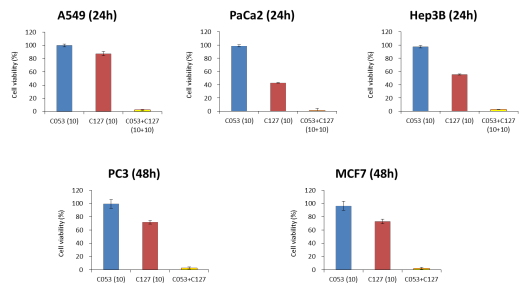


図 6 他種細胞株を用いたコンビネーション投与による細胞生存率測定

4) キナーゼ阻害剤におけるシグナルパスウェイの解析ならびに癌関連分子ネットワークの構築

リン酸化アレイを用いて、薬剤処置した細胞のリン酸化レベルについて検討した。また薬剤の阻害活性効果についても検討した。その結果、コンビネーション投与では、EGFR 経路がコントロールに比べてエンハンスされていることがわかった(図 7)。これに関して、単剤におけるシグナルパスウェイとの関連をネットワークを構築して解析を試みたが、

有力なシグナル分子の同定には至らなかった。

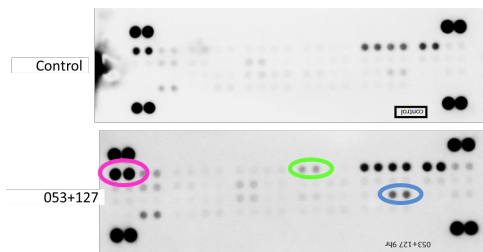


図7 リン酸化アレイ解析結果 (pink; EGFR, Green; FGFR, Blue; EphA2)

5) マウスを用いた抗腫瘍試験

単剤では細胞生存率に影響を与えないが、コンビネーションでは著しく生存率を低下させる薬剤コンビネーションについて、マウスを用いた抗腫瘍試験を行った。その結果、*in vivo* 実験では、コンビネーション投与による腫瘍の有意な抑制効果は見られなかった(図8)。コンビネーション薬剤では、薬剤の溶解性や運搬、動態の問題がより一層重要であると考えた。

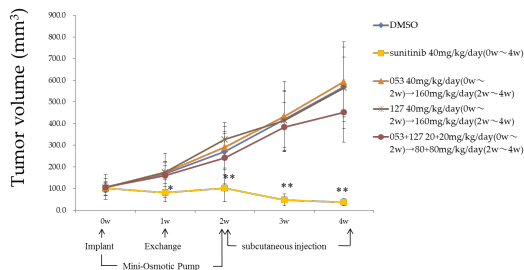


図8 マウスを用いた抗腫瘍試験

6) 既存分子標的薬とのコンビネーションによる相乗効果解析

C127 が EGFR 系のリン酸化に關与する可能性があるとのことを受けて、所有する分子標的薬と C053 のコンビネーション効果が得られるかを検討した。その結果、EGFR 阻害剤では、C053 の複合投与により、相乘的に生存率が低下した。ほかの分子標的薬では、相乗効果は見られなかった。

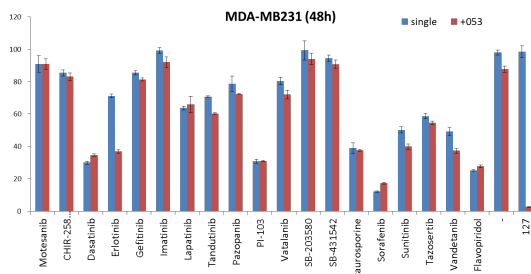


図9 既存分子標的薬とC053コンビネーションによる細胞生存率

以上の結果より、C053 と C127 のコンビネーション投与による癌細胞分子シグナルネットワークの解明には至らなかったが、既存薬剤とのコンビネーションにおいて相乗効果が得られることがわかり、今後、コンビネーション投与が癌の新たな治療法や耐性株への応用などに活用が期待できると考える。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

ALK 阻害剤耐性細胞を用いたキナーゼ阻害剤複合投与シナジー制御
第364回日本分子生物学会
2013年12月3~6日、神戸国際展示場

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

赤松 香奈子 (AKAMATSU KANAKO)

研究者番号: 90553967

(2)研究分担者

()

研究者番号:

(3)連携研究者

()

研究者番号：