



新規モータープロテイン阻害剤のドセタキセル耐性 非小細胞肺癌細胞株における増殖抑制効果の検討

洪 泰 浩 西 尾 和 人¹ 中 川 和 彦²

静岡県立静岡がんセンター研究所 新規薬剤開発・評価研究部 ¹近畿大学医学部ゲノム生物学教室

²近畿大学医学部内科学教室 (腫瘍内科部門)

抄 録

ドセタキセルは進行非小細胞肺癌治療におけるキードラッグのひとつであり、白金製剤との併用もしくは単剤にて用いられている。しかしながら、薬剤耐性の獲得は必至であり、ドセタキセル耐性非小細胞肺癌に対する有効な薬剤の開発が必要である。我々は、細胞分裂時の紡錘体形成において重要な役割を担うモータープロテインの一つである Eg5 を標的とした、新規 S-trityl-L-cystein 誘導体 Compound3 の、ドセタキセル耐性非小細胞肺癌における有効性について基礎的検討を行った。MTT アッセイによりその細胞増殖抑制効果が、非小細胞肺癌細胞株である、PC-14 細胞およびドセタキセル耐性 PC-14/TXT 細胞において同等であることを確認した。また、その作用機序は、G2/M 期における細胞周期の停止およびアポトーシスの誘導であることが示唆された。Eg5 阻害剤処理時に観察される典型的な monoastral spindle formation の誘導についても免疫染色にて、耐性細胞において親株と同様に観察された。アポトーシスの誘導について、耐性株において親株と同等であることをウェスタンブロット及び APO-BRDU アッセイにより確認した。新規 Eg5 阻害剤である Compound3 はドセタキセル耐性非小細胞肺癌において有効であることが示唆された。

Key words : 非小細胞肺癌, ドセタキセル耐性, 微小管, モータープロテイン, Eg5

諸 言

肺癌は日本および世界におけるがん関連死の主たる原因のひとつであり¹, 非小細胞肺癌は病理組織学的分類により、肺癌全体の80%以上を占めると報告されている²。チューブリン重合促進剤であるドセタキセルは進行非小細胞肺癌に対する薬物療法におけるキードラッグの一つであり、プラチナ製剤との併用にて一次治療に、また単剤で二次治療に用いられるとともに、高齢者においては単剤で一次治療にも用いられている³。しかしほとんどの症例は最終的にはドセタキセル治療に対して耐性を獲得することが知られており、そのため、ドセタキセル耐性 NSCLC における有効な新規薬剤の開発が急務となっている。

Kinesin spindle protein としても知られている微小管関連分子である Eg5 は、細胞分裂期における双極紡錘体 (bipolar spindle) の形成および維持に重

要な役割を担うモータープロテインの一つである^{4,5}。Eg5 はタキサン系薬剤やビンカアルカロイド系薬剤が標的とするチューブリンと異なり、有糸分裂後の神経細胞には発現しておらず、分裂期にある細胞においてのみ作用することが知られている^{6,7}。よって従来の微小管阻害薬と比べて、より腫瘍特異的な増殖抑制効果を持つことが期待されている。Eg5 を標的とした薬剤のいくつかについては臨床試験においてその効果について評価が行われており^{8,9}、従来の抗腫瘍薬と異なる作用機序をもつ新規の薬剤として開発に期待が持たれている。

我々はこれまでに、S-trityl-L-cysteine をマザーコンパウンドとして合成された新規の Eg5 阻害剤の増殖抑制効果およびその効果予測バイオマーカーについて、胃がん、大腸がん、膵がん、および非小細胞肺癌から樹立された細胞株において基礎検討を行い、Eg5 阻害剤が幅広いがん種において増殖抑制効果を持つことを報告した¹⁰。本研究の目的は、非

小細胞肺がんのドセタキセル耐性獲得後の治療選択肢となり得る薬剤開発のための基礎検討であり、Eg5 阻害剤をその候補薬剤として評価を行った。ドセタキセルへの持続的暴露により樹立した、ドセタキセル耐性非小細胞肺がん細胞株である PC-14/TXT を用いて、Eg5 阻害剤のドセタキセル耐性獲得後の治療薬としての有効性およびその作用メカニズムについて検討を行った。

材料と方法

1. 細胞株

ヒト非小細胞肺がん細胞株である、A549, PC-9, PC-14 細胞とドセタキセル耐性 PC-14/TXT 細胞およびヒト小細胞肺がん細胞株である H69, H69/TXL は国立がん研究センター支援研究室の小泉博士より供与され、H441 細胞および H1975 細胞は American Type Culture Collection より購入した。すべての細胞株は10% 仔牛血清を添加した RPMI1640 培地 (Invitrogen) を用いて、37°C で5% 二酸化炭素下の条件にて培養を行った。ドセタキセル耐性 PC-14/TXT 細胞の樹立および耐性機序については過去に報告されている¹¹。

2. 化合物

古典的 Eg5 阻害剤である monastrol は Sigma-Aldrich から、S-trityl-L-cystein は Calbiochem からそれぞれ購入した。新規 Eg5 阻害剤である Compound3 は静岡ファルマバレーセンターおよび静岡県環境衛生科学研究所の小郷博士から供与された¹²。ドセタキセルはサノフィアベンティスから購入した。パクリタキセルはブリストル・マイヤーズ スクイブより供与された。

3. P-glycoprotein の発現測定

PC-14 細胞と PC-14/TXT 細胞を2% パラホルムアルデヒド (Wako) にて室温で20分間固定した後、十分に冷却した phosphate-buffered saline (PBS) (Invitrogen) にて洗浄を行った。その後細胞を90% メタノールにて再度懸濁し、測定のために使用するまで-20°C にて保存を行った。測定においては、PBS による洗浄の後に、5% BSA/PBS にて10分間反応を行い、その後に anti-P glycoprotein C219 (50 ng/mL; abcam) もしくはアイソタイプコントロール (IgG2a, 50 ng/mL; R&D Systems) を用いて室温で1時間反応を行った。その後再度 PBS にて洗浄を行い、Alexa488-labeled goat anti-mouse (1:50 dilution; Molecular Probes) にて30分間室温で反応を行った。反応後に再度 PBS にて洗浄を行い、BD Accuri C6 Flow Cytometer (BD Biosciences) にて発現の測定および解析を行った。

4. 細胞増殖抑制試験

3, (4, 5-dimethyl-2-thiazolyl)-2, 5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) (SIGMA) を用いて、薬剤による細胞増殖抑制効果について評価を行った。具体的には、第一日目に180 μ L の細胞懸濁液 (5×10^2 – 5×10^3 細胞/ウェル) を96ウェルのマイクロタイタープレートに播種し、翌日に段階希釈によって薬剤濃度を振り分けた20 μ L の溶液を個々のウェルに添加した。さらに37°C で72時間の培養を行った後に、20 μ L の MTT 溶液 (5 mg/ml の濃度に PBS にて調整) を加えてさらに4時間、37°C で培養を行った。1500 rpm, 4°C にて5分間の遠心を行った上で上清培地を吸引にて取り除き、その後に200 μ L の dimethyl sulfoxide を添加し、マイクロプレートリーダー (Model 680, Bio-Rad) にて562 nm および630 nm における吸光度の測定を行った。マイクロプレート上において、一つの薬剤濃度に対しては6ウェルで行われ、データのばらつきを最小化するとともに、同様の実験を3回繰り返し実施した。50% 細胞増殖抑制濃度である IC₅₀ 値は生存カーブに基づき、薬剤非処理群 (コントロール) に対して50% の吸光度減少を認める濃度と定義した。生存率 (%) は以下の式に基づき計算した。[薬剤処理ウェル (n=6) の平均吸光度–バックグラウンド (n=6) の平均吸光度]/[薬剤非処理ウェル (n=6) の平均吸光度–バックグラウンド (n=6) の平均吸光度] \times 100。

5. 細胞周期解析

ドセタキセルと Eg5 阻害剤である Compound3 の細胞周期における効果についてはフローサイトメトリーにて評価を行った。6ウェルプレートに PC-14 細胞と PC-14/TXT 細胞を30,000細胞/ウェルの濃度で播種し、ドセタキセルと Compound3 にそれぞれ、8時間、16時間、24時間、48時間暴露した。薬剤暴露後に細胞を回収し、70% のエタノールにて固定を行い、細胞内 DNA を RNase (50 μ g/mL) 処理を行うとともに Propidium Iodide (10 μ g/mL) (SIGMA) にて染色を行った。データ回収は FACS-Calibur cytometer (BD Biosciences) の CellQuest ソフトウェアおよび FISHMAN-R (On-chip Biotechnologies Co., Ltd) の FISHMAN-R ソフトウェアによって行い、解析および定量は WinMDI 2.8 (The Scripps Research Institute) および FlowJo 7.6.4 (Tree Star, Inc.) にて行った。

6. 免疫細胞染色

Spindle formation の評価を免疫細胞染色にて行った。PC-14 細胞と PC-14/TXT 細胞をチャンバースライド上に培養し、それぞれドセタキセルもし

くは Compound3 にて 8 時間処理を行った後に、室温にて 20 分間、2 % パラホルムアルデヒドにて固定し、その後 0.1 % Triton X-100 in PBS にて処理を行った。引き続き 10 % 羊血清を含む PBS にてブロッキングを行い、一次抗体として α -actin (Santa Cruz) を、二次抗体として Alexa568-conjugated antibody (Promega) を用いて反応を行った。その後 DAPI (4', 6-diamidino-2-phenylindole) にて核染色を行った。最終的な観察はレーザースキャニング顕微鏡 (LSM 5; Carl Zeiss Co., Ltd) および Axio Imager Z1 (Carl Zeiss Co., Ltd) を用いて 400 倍の拡大倍率にて spindle formation の評価を行った。

7. ウェスタンブロット

薬剤処理の有無による PC-14 細胞と PC-14/TXT 細胞での、タンパクレベルにおける P-glycoprotein, Eg5, BubR1, MAD2, Caspase-3, cleaved caspase-3, PARP, cleaved-PARP および β -actin の発現変化を評価するためにウェスタンブロットを行った。具体的には、ドセタキセルおよび Compound3 処理後の細胞を、十分に冷却した PBS で 2 回洗浄した後に、lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 50 mM NaCl, 1 % Nonidet P-40, 2 mM EDTA, 10 mM NaF, 2 mM sodium orthovanadate, protease inhibitor cocktail) にて処理を行った。その溶出物を 4 °C にて 15 分間、15,000 rpm で遠心を行った後に上清を回収し、BCA protein assay (Pierce) を用いてタンパク質濃度の測定を行った。ウェスタンブロットには 20 μ g のタンパク質を用い、10 % もしくは 12 % の SDS-ポリアクリルアミドゲル上で電気泳動による分離を行い、ニトロセルロース膜 (Bio-Rad) への転写を行った。その後以下に以下の抗体を一次抗体として用いて反応を行った。Mouse monoclonal antibody against BUBR1 (BD biosciences), Eg5 (BD biosciences), β -actin (Santa Cruz Biotech, Santa Cruz), rabbit polyclonal antibody against MAD2 (Santa Cruz), PARP および cleaved PARP (Cell Signaling), Caspase-3 および cleaved caspase-3 (Cell Signaling)。その後 horseradish peroxidase-conjugated 二次抗体を用いて反応を行い、反応したバンドを Supersignal Westpico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific) を用いて発光させ、フィルムに現像をおこなった。

8. APO-BRDU アッセイ

ドセタキセルおよび Compound3 処理によるアポトーシス誘導については APO-BRDU assay kit (Phoenix Flow Systems) を用いて評価を行った。

24 時間もしくは 48 時間の薬剤処理を行った PC-14 細胞と PC-14/TXT 細胞および薬剤処理を行っていない両細胞を回収し、キットの指示に従い、固定および染色を行った。最終的なデータは FACS-calibur flow cytometer にて取得を行った。

結 果

1. ドセタキセル耐性細胞における P-glycoprotein の発現

ドセタキセル耐性 PC-14/TXT 細胞の耐性メカニズムは P-glycoprotein の誘導による細胞外への薬剤排出亢進によると報告されている¹¹。本研究において、ウェスタンブロット法と細胞表面における

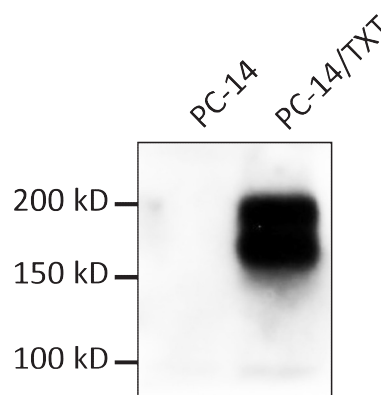


図 1 PC-14 細胞および PC-14/TXT 細胞由来タンパクにおける P-glycoprotein 発現レベル
ウェスタンブロットにより P-glycoprotein の発現を PC-14/TXT 細胞由来タンパクにおいてのみ観察した。

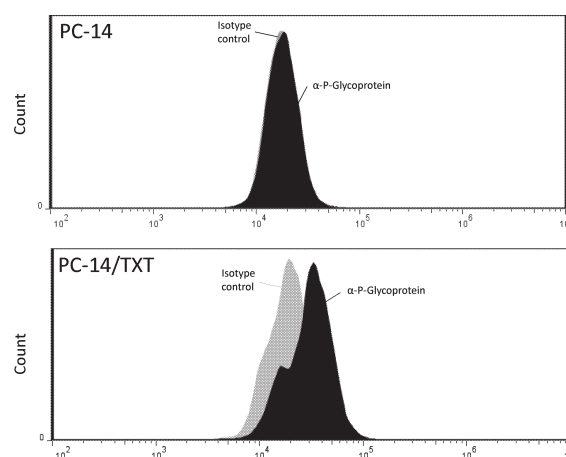


図 2 PC-14 細胞および PC-14/TXT 細胞表面における P-glycoprotein 発現レベル
PC-14 細胞および PC-14/TXT 細胞において、アイソタイプコントロールと P-glycoprotein に対する抗体を用いて、細胞表面における P-glycoprotein 発現をフローサイトメトリーにて検出を行った。

P-glycoprotein の発現をフローサイトメトリーにて評価し確認を行った(図1, 図2). 親株である PC-14 細胞と比較してドセタキセル耐性 PC-14/TXT 細胞において, 両アッセイ法にて P-glycoprotein のタンパクレベルでの発現が有意に上昇しており, 細胞表面における発現レベルも同様に高いことが確認された.

2. PC-14 細胞と PC-14/TXT 細胞のドセタキセルと Compound3 に対する感受性の検討

次に PC-14 細胞と PC-14/TXT 細胞のドセタキセルと Compound3 に対する感受性の検討を行った. Compound3 は S-trityl-L-cysteine をマザーコンパウンドとして合成されたモータープロテインの一つである Eg5 を阻害する新規の化合物であり, その Eg5 への結合能や幅広いがん種の細胞株における増殖抑制効果については既に報告されている^{10,12}. 非小細胞肺癌細胞株における検討においても, 旧来の Eg5 阻害剤と比較してもより高い活性を示した(表1). ドセタキセル耐性 PC-14/TXT 細胞は過去の報告と同様に, 親株である PC-14 細胞と比較して約20倍の IC₅₀ を示しており, 高度な耐性を獲得していることが示された(図3, 表1). 一方, Compound3 については, 両細胞における増殖抑制効果については有意な差異は認めず, 親株の PC-14

細胞のみならず PC-14/TXT 細胞においても同様な増殖抑制効果を示した(図3, 表2). これらの結果より, Eg5 阻害剤である Compound3 は P-glycoprotein の基質ではない可能性が示唆され, P-glycoprotein 高発現を耐性獲得機序とするドセタキセル耐性非小細胞肺癌における治療選択肢となる可能性が示唆された.

3. ドセタキセルと Compound3 の細胞周期における影響の検討

ドセタキセルと Compound3 はともに微小管およびその制御分子を標的とする薬剤であるため, 細胞周期に影響を及ぼすことが知られている. 特にドセタキセルはチューブリン重合を促進させ, その脱重合を抑制する. これにより細胞内においては形態的に異常な微小管束の形成が起こり, 最終的に G2/M 期にて細胞の有糸分裂を停止させることが知られている¹³. 両薬剤の細胞周期における効果を評価するために, フローサイトメトリーにて細胞周期解析を行った. 親株である PC-14 細胞においては, ドセタキセルと Compound3 処理の両方において処理8時間後より G2/M 期への集積が観察され, その後さらに集積が促進されるとともに, ドセタキセル処理においては, 24時間後より sub-G1 期への強力な誘導が認められることよりアポトーシスの誘導が示唆さ

表1 各種 Eg5 阻害剤の非小細胞肺癌細胞株における細胞増殖抑制効果

細胞株	IC ₅₀ (μmol/L, monastrol)	IC ₅₀ (μmol/L, STLC)	IC ₅₀ (μmol/L, Compound3)
A549	>10	2.261±0.137	0.724±0.159
H441	>10	>10	0.938±0.087
H1975	>10	1.004±0.039	0.234±0.031
PC-9	18.898±0.103	0.445±0.08	0.130±0.035
PC-14	>10	0.578±0.067	0.137±0.010

IC₅₀, 50%増殖阻害濃度; STLC, S-trityl-L-cysteine

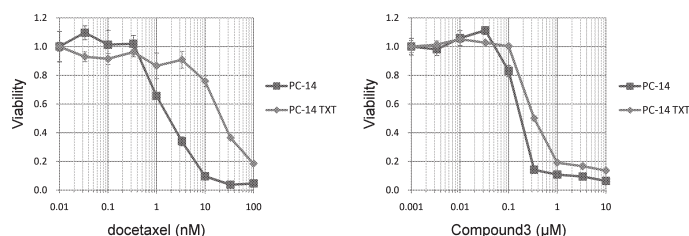


図3 細胞増殖抑制効果の検討

PC-14 細胞および PC-14/TXT 細胞において, ドセタキセルと Compound3 の細胞増殖抑制効果について検討を行った. 薬剤による処理を72時間行った後に, MTT 試薬を用いて判定を行った.

表2 ドセタキセルと Compound3 の PC-14 細胞と PC14/TXT 細胞における細胞増殖抑制効果

細胞株	IC ₅₀ (nmol/L, ドセタキセル)	IC ₅₀ (μmol/L, Compound3)
PC-14	0.835±0.099	0.1445±0.0018
PC-14/TXT	17.705±0.715	0.2684±0.0091

IC₅₀, 50%増殖阻害濃度

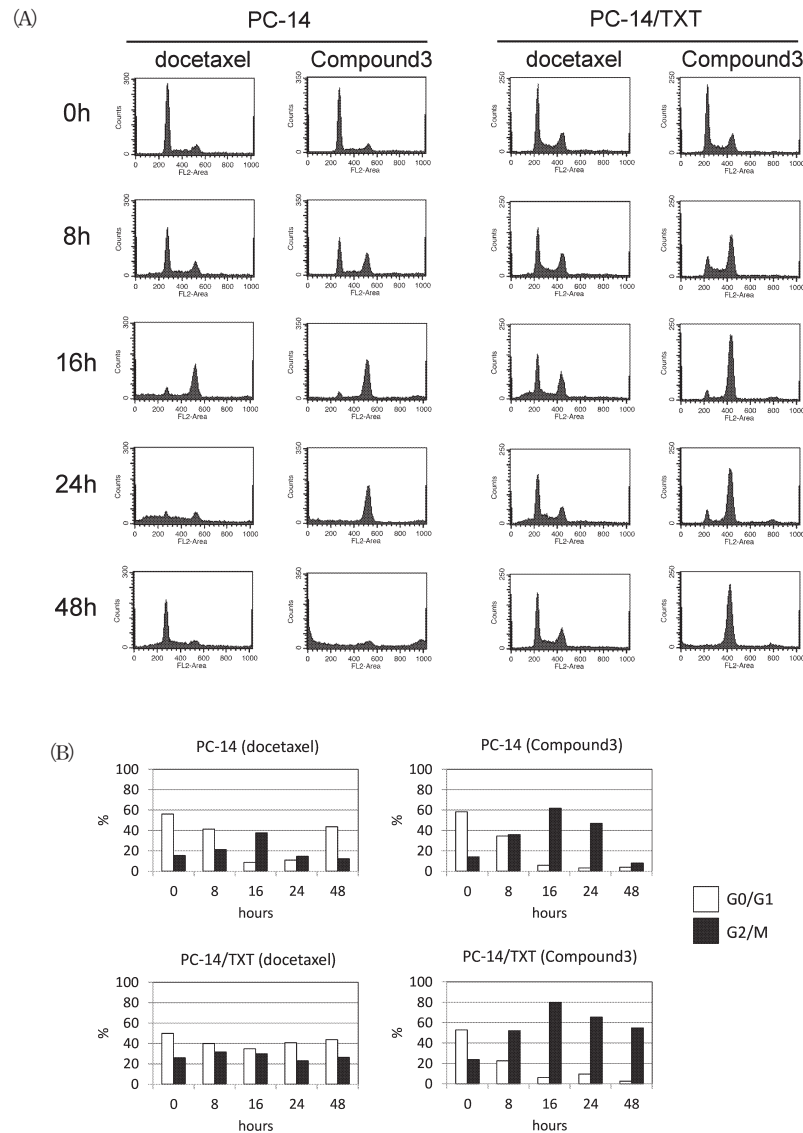


図4 ドセタキセルと Compound3 の細胞周期における作用の検討
PC-14 細胞および PC-14/TXT 細胞において、ドセタキセルと Compound3 をそれぞれ、0, 8, 16, 24, 48時間処理を行った後に propidium iodide にて染色を行い、FACScalibur にて DNA 量を測定した。(A) DNA 細胞周期ヒストグラム (B) (A) のヒストグラムにおいて G0/G1 期および G2/M 期にある細胞の割合

れた(図4 A, B). 一方、ドセタキセル耐性 PC-14/TXT 細胞においては、ドセタキセル処理の場合では、細胞周期の分布は経時的にもほとんど変化がなく、薬剤処理による影響がほとんど認められない結果であった(図4 A, B). しかし Compound3 処理においては PC-14 細胞と同様に、薬剤処理 8 時間後より G2/M 期への集積が観察された(図4 A, B). この結果は細胞増殖抑制と同様に細胞周期制御においても、Compound3 は PC-14 細胞と PC-14/TXT 細胞において同等の効果を持つことが示された。

4. ドセタキセルと Compound3 の spindles formation における影響の検討

ドセタキセルのような微小管阻害剤や Compound3 を始めとする Eg5 を含めたモータープロテイン阻害剤はそれぞれ、紡錘体における特徴的な形態変化を誘導することが知られており、我々はドセタキセルと Compound3 によるこれらへの影響を評価した。ドセタキセルにて処理を行った PC-14 細胞は 8 時間後より典型的な multipolar spindles formation を示し、ドセタキセルがチューブリンに結合することで紡錘体の形態変化を引き起こしていることが窺い知れた(図5 A). 一方 PC-14/TXT 細胞においてはドセタキセル処理後も細胞および紡錘体における形態変化は全く観察されず、ドセタキセルが

作用していないことが示唆された (図 5 B). Compound3 においては PC-14 細胞と PC-14/TXT 細胞の両細胞において, 処理 8 時間後より典型的な monoastral spindles formation と呼ばれる星状の紡錘体の形態変化が観察された (図 5 C, D). このことより Compound3 は, 紡錘体における形態変化誘導においても, PC-14 細胞と PC-14/TXT 細胞の両細胞において, 同等の効果を持つことが示された.

5. ドセタキセルと Compound3 のモータープロテイン関連分子における影響の検討

Eg5 を含むモータープロテインを阻害する薬剤の効果予測マーカーとして, spindle checkpoint kinases である MAD2 や BubR1 といった分子についての報告がなされており¹⁴, 本研究においてもドセタキセルと Compound3 処理によるこれらの分子への影響について検討を行った. PC-14 細胞と PC-14/TXT 細胞の両細胞において, ドセタキセルと Compound3 処理による Eg5, MAD2 や BubR1 のタンパクレベルでの発現量の変化をウェスタンブロットにて評価を行ったが, 経時的な観察においても有意な変化を認めなかった (図 6 A, B). これらの結果より Eg5, MAD2 や BubR1 の発現レベルは本研究において使用し, 評価を行っている Compound3 にとっては効果予測マーカーとはなり得ないことを示唆している. 同時にウェスタンブロットにて, アポトーシスのマーカーである caspase3 および PARP 発現について評価を行った. PC-14 細胞においてはドセタキセルと Compound3 の両薬剤において, アポトーシス誘導のマーカーとされる caspase3 および PARP の cleaved form の誘導を認めたが (図 6 A), 一方, PC-14/TXT 細胞では, Compound3 処理においてのみ有意な caspase3 および PARP の cleaved form の誘導を認めた (図 6 B). これらのウェスタンブロットによる結果についても, 前述した他のアッセイによる結果と一致し, Compound3 が両細胞株において同等な効果を持つことを示している.

6. アポトーシス誘導能の検討

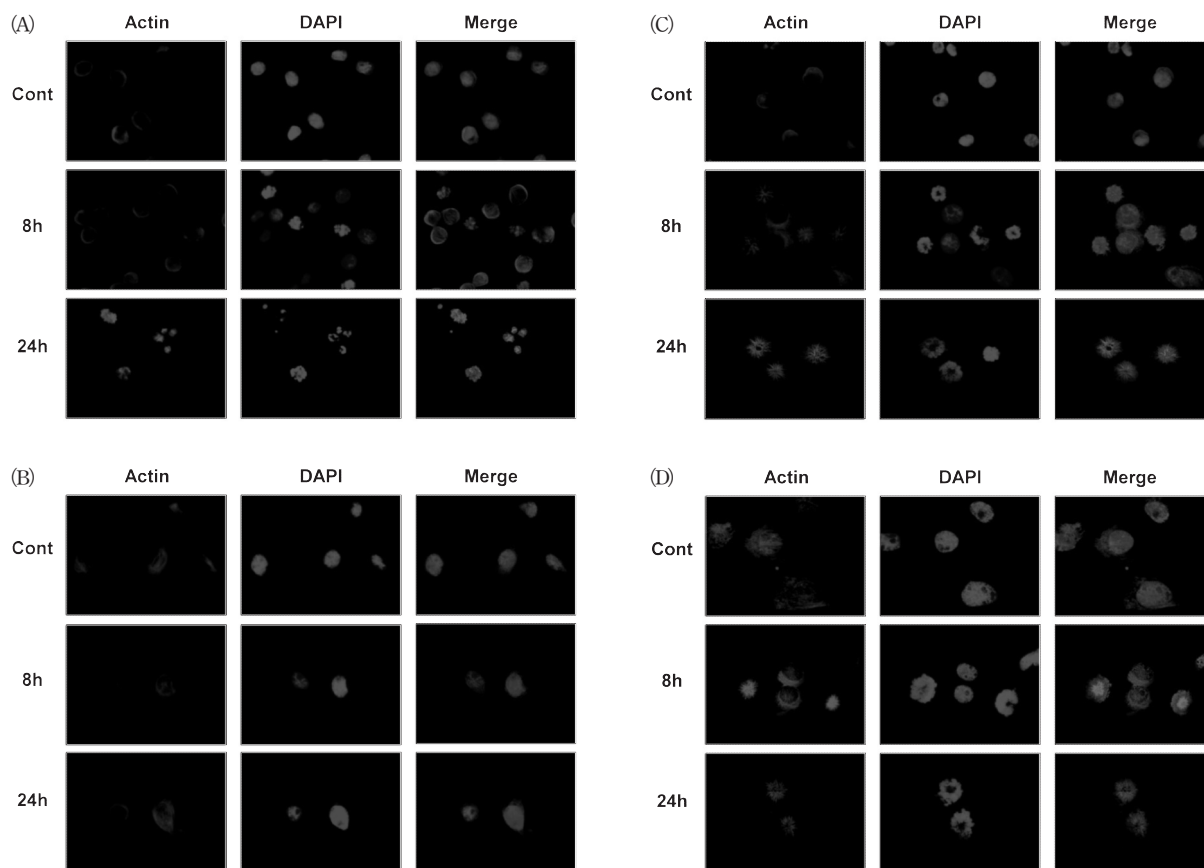


図 5 免疫細胞染色による紡錘体の形態変化の観察 (拡大率はすべて400倍)
ドセタキセルと Compound3 による紡錘体形態に対する影響の検討を行った. Actin に対しては抗 Actin 一次抗体と Alexa568 二次抗体 (赤) にて, 核染色は DAPI (青) にて行った. (A) PC-14 (10 nmol/L ドセタキセル) (B) PC-14/TXT (10 nmol/L ドセタキセル) (C) PC-14 (1 μmol/L Compound3) (D) PC-14/TXT (1 μmol/L Compound3)

ウェスタンブロットの結果より得られた, caspase3 および PARP の cleaved form 誘導が示唆するアポトーシス誘導を確認するために, APO-BRDU アッセイを実施した. 本アッセイにて, 薬剤処理等による細胞障害時の DNA 断片化を早期に検出することが可能であり, アポトーシス誘導の評価法として有用である. PC-14 細胞においてはドセタキセルと Compound3 の両薬剤において, 薬剤処理

48時間後には有意なアポトーシスの誘導を認めた (ドセタキセルにて16.9%, Compound3 にて20.8%) (図 7 A). 一方, PC-14/TXT 細胞では, 処理後48時間の時点において, ドセタキセル処理群にて1.56%, Compound3 処理群において21.0%と, アポトーシス誘導能において大きな差が認められた (図 7 B). また, 本アッセイの結果より Compound3 処理によるアポトーシスの誘導は PC-14 細胞におい

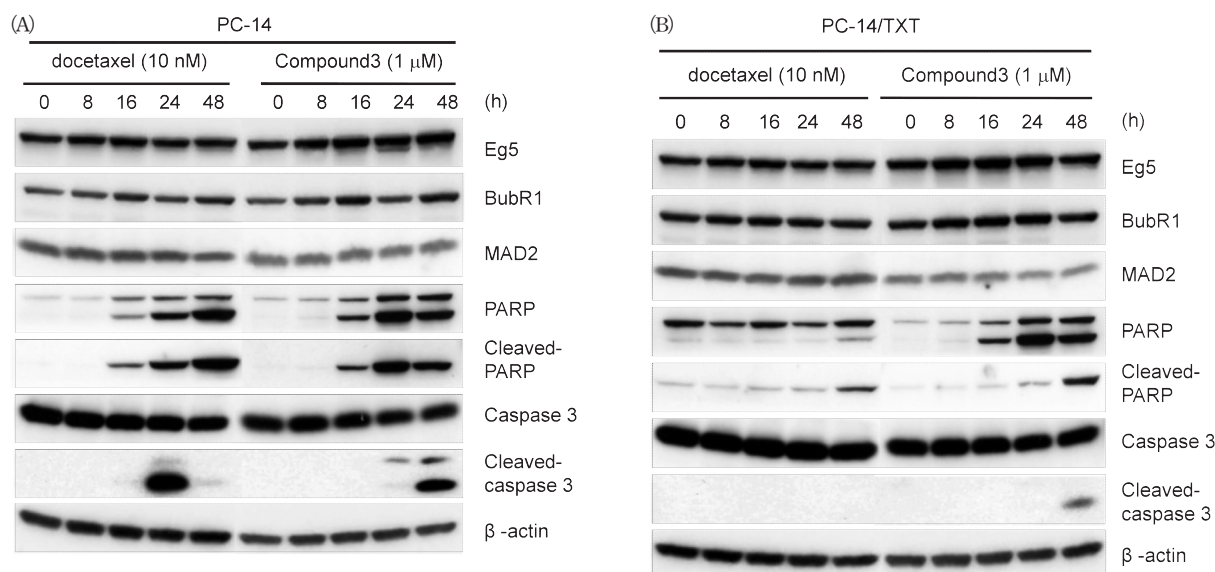


図 6 ウェスタンブロットによる Eg5 関連分子発現の検討
PC-14 細胞および PC-14/TXT 細胞において, ドセタキセルと Compound3 をそれぞれ, 0, 8, 16, 24, 48時間処理を行った後に lysate を回収し, ウェスタンブロットにて Eg5, BubR1, MAD2, Caspase-3, cleaved caspase-3, PARP, cleaved-PARP および β-actin に対する抗体を用いて発現の検討を行った. (A) PC-14 細胞 (B) PC-14/TXT 細胞

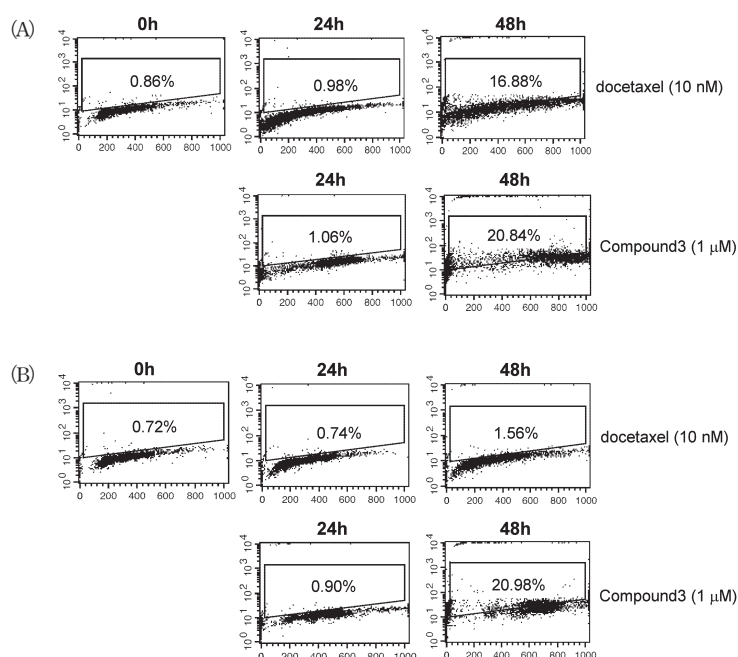


図 7 APO-BRDU アッセイによるアポトーシス誘導の検討
PC-14 細胞および PC-14/TXT 細胞に対して, ドセタキセルと Compound3 をそれぞれ, 0, 24, 48時間処理を行った後に, APO-BRDU アッセイにてアポトーシス誘導の検出を行った. (A) PC-14 細胞 (B) PC-14/TXT 細胞

て20.8%, PC-14/TXT 細胞において21.0%とほとんど同等であることが明らかになった。これらの結果より, Compound3 は Eg5 阻害による細胞周期制御, 紡錘体の形態変化, 細胞増殖抑制効果およびアポトーシス誘導において, PC-14 細胞と PC-14/TXT 細胞においてほとんど同等の効果および作用を持つことが示された。

考 察

本研究においては, ドセタキセル耐性を呈する PC-14/TXT 細胞を用いて, 非小細胞肺癌におけるドセタキセル治療増悪後の治療選択肢の可能性について基礎的検討を行った。今回検討を行った化合物である Eg5 阻害剤は, ドセタキセルをはじめとするタキサン系およびビンカアルカロイド系などの微小管作用薬と同様に細胞分裂期に主に作用することが知られている。ただしタキサン系およびビンカアルカロイド系薬剤と異なり, Eg5 阻害剤を含めたモータープロテイン阻害剤は微小管を形成するチューブリンに結合するのではなく, 紡錘体形成を制御する分子を標的としており, 従来の古典的な微小管作用薬より特異的な作用機序を持つことが知られている⁷。このことより, 従来の微小管作用薬に対して耐性を獲得した場合においても, モータープロテインを標的とした阻害剤には交叉耐性を持たず, これらの阻害剤が有効である可能性がある。

ドセタキセルやパクリタキセルなどのタキサン系およびビンカアルカロイド系などの微小管作用薬に対する耐性獲得機序については, これまでに多くの知見が報告されている¹⁵。その中で最も古典的な耐性機序とされるものは, ATP-binding cassette (ABC) トランスポーターの関与であり, 本研究で用いた PC-14/TXT 細胞も ABC トランスポーターの一つである P-glycoprotein の過剰発現が耐性獲得機序であることが明らかになっている¹¹。P-glycoprotein による耐性克服の試みについてはこれまでに様々な検討がなされてきたが, 逆に抗腫瘍薬の副作用を増強させる事例もあることが報告されており, 臨床的には有効性は確立されていない¹⁶⁻¹⁷。その他の微小管作用薬に対する耐性獲得機序として, チューブリン遺伝子変異¹⁹ やベータ・チューブリンのアイソタイプの発現レベルの変化などが報告されている²⁰⁻²¹。例えば, クラスIIIベータ・チューブリンの発現レベルが, 非小細胞肺癌におけるタキサン系薬剤に対する耐性に関与していると考えられている²¹。近年, アンスラサイクリン耐性およびタキサン耐性の乳がんにおいて, ハリコンドリンBの大環状ケトン合成アナログで, 新規のビンカアルカロイド

薬剤であるエルブリンの有効性が示され, 乳がん治療において非常に重要な治療選択肢となっている²²。タキサン系薬剤耐性の非小細胞肺癌においても既に臨床評価が行われており, 今後のさらなる開発に期待が持たれている²³。本研究の結果より, Eg5 阻害剤である Compound3 は P-glycoprotein の基質ではない可能性が示唆されており, ABC トランスポーターが耐性獲得機序として関与する耐性症例においては本阻害剤が有効である可能性がある。加えて, 従来の微小管作用薬と阻害標的が異なることもあり, ドセタキセル耐性非小細胞肺癌における臨床開発においても期待が持たれる。

Epidermal growth factor receptor (EGFR) や ALK 融合遺伝子を標的とした, それぞれゲフィチニブ/エルロチニブやクリゾチニブという分子標的治療薬剤の成功もあり²⁴⁻²⁷, 非小細胞肺癌における薬物療法は近年, 非常に大きな発展を遂げている。古典的ないわゆる殺細胞性抗腫瘍薬においても, ペメトレキセドの非小細胞肺癌, 特に非扁平上皮非小細胞肺癌における有効性が確認され, 肺癌における薬物治療において重要な薬剤となっている²⁸。しかしながら, 進行非小細胞肺癌患者においては, 現状では治癒を期待することは困難であり, より良い治療成績とさらなる患者の利益の実現のためには, 新規の有効な薬剤の開発が必要不可欠である。今回, 我々は新規の S-trityl-L-cystein 誘導体である Compound3 が非小細胞肺癌細胞株において細胞増殖抑制効果を示し, ドセタキセル耐性非小細胞肺癌細胞株においてもほぼ同等の細胞増殖抑制効果を認めたことより, Eg5 が非小細胞肺癌における治療標的として有望であることが示唆されたと考える。さらには Compound3 およびそれと同様な骨格を持つ化合物が, P-glycoprotein 過剰発現を耐性獲得機序とするドセタキセル耐性非小細胞肺癌においても有効な薬剤となる可能性がある。肺癌における薬物療法を発展させるために, 本化合物を含む誘導体の開発を進め, 今後のさらなる研究および評価が望まれる。

Eg5 阻害剤の臨床開発については既に先行する薬剤における臨床試験での結果が報告されている⁸⁻⁹。しかし, これまでのところ, Eg5 阻害剤は必ずしも期待に見合う結果を示していない。その原因の一つとしては, 他の多くの薬剤と同様にすべての患者において抗腫瘍効果や延命効果を期待することが困難であることが挙げられる。そのため, 利益を受けることができる患者の選択を可能とする, 効果予測バイオマーカーの同定が必要であると考えられる。これまでに Eg5 阻害剤の効果予測バイオマーカー

一候補としては, Mad2 や BubR1 等のチェックポイントキナーゼの発現レベルについての報告がなされている¹⁴. しかし, これらが実際の患者においても予測マーカーとして有用であることは確立されていない. 我々も主に肺癌細胞株における検討より, *KRAS* 遺伝子変異が Eg5 阻害剤の効果予測バイオマーカーとなり得る可能性について報告を行うとともに, *KRAS* 変異型腫瘍細胞においては, MEK 阻害剤を Eg5 阻害剤と併用することで, アポトーシスの誘導および増殖抑制効果において相加効果が得られることを報告している¹⁰. また, Eg5 阻害剤の増殖抑制効果を規定する因子は解明されていないが, in vitro の系において, Eg5 遺伝子における R119A, D130A and L214A といった点突然変異が古典的な Eg5 阻害剤であるモノストールや S-trityl-L-cysteine に対する耐性獲得機序となり得ることが報告されている²⁹. Eg5 遺伝子に点突然変異機能的が生じることによる, 生物学および機能的な変化による耐性獲得については非常に興味深い, 臨床検体を含むさらなる in vivo での検証が必要であると考え. 今後の非小細胞肺癌における Eg5 阻害剤の開発においては, 効果予測バイオマーカーの探索および同定が必要不可欠であると考え.

Eg5 阻害剤開発における今後の課題としては以下が挙げられる. 本件研究において評価を行った Compound3 の増殖抑制活性は IC₅₀ が PC-14 細胞において約 0.14 $\mu\text{mol/L}$ であった. 本化合物は作用機序からも殺細胞性抗腫瘍薬ではないことも事実であるが, 強力な増殖抑制効果を持つとは言えない. また, 種々にわたるがん種の細胞株を用いての増殖抑制効果の検討では, 比較的感受性が高い細胞株においては IC₅₀ が 0.1–1.0 $\mu\text{mol/L}$ であり¹⁰, 現在実地臨床において用いられている抗腫瘍薬剤と比較した場合には, 決して細胞増殖抑制においてより優れているとは言えない. また, 増殖抑制が期待できる濃度域においては正常組織での薬剤濃度も同様に高くなることより, 望ましくない副作用の出現が懸念される. この点については, 基礎検討レベルでは, 担癌マウス in vivo モデルにおいて腫瘍縮小効果と体重減少等の副作用出現の観察による評価が必要であり, 今後の本化合物の開発においては最優先で検討する必

要がある. 加えて, 本化合物で得られた前臨床データを基に, さらなる高い活性を持つ誘導体の開発を進めていく必要もあると考える. より選択的に低い濃度での腫瘍増殖抑制が実現できれば, 副作用の軽減にもつながることが期待できる. また, 今回の研究においては良好な結果を得たが, 細胞株を用いての in vitro の検討に限られており, 本化合物のさらなる評価のためには, 動物モデルを用いての in vivo での検討および検証が必要であることは先に述べた通りであり, これについては効果予測バイオマーカーの探索とあわせて今後取り組む予定である. 本研究は非小細胞肺癌における検討であったが, ドセタキセルは非小細胞肺癌のみならず, 胃がん, 乳がんや卵巣がん等の他の固形腫瘍の治療においても広く用いられており, これらのがん種におけるドセタキセル耐性腫瘍における Eg5 阻害剤の今後の開発も期待される. また, 本研究において用いた PC-14/TXT 細胞は P-glycoprotein 過剰発現を耐性獲得機序としており, Compound3 がその基質でなかったことより活性を認めたと考えられる. よって, P-glycoprotein 過剰発現以外の耐性獲得機序を持つドセタキセル耐性における評価が今後必要不可欠である. 加えて, ドセタキセルと同様のタキサン系微小管作用薬であり, 類似した作用機序を持つパクリタキセルに対する耐性獲得後の有効性についても検討する必要がある. パクリタキセルは進行非小細胞肺癌におけるキードラッグの一つであり, ドセタキセルと同様に耐性獲得の克服が問題となっている. これまでにパクリタキセル耐性卵巣がん細胞株での Eg5 阻害剤の有効性の検討についての報告がなされており, Eg5 阻害剤の有効性が示唆されている³⁰. 我々は Compound3 が P-glycoprotein 過剰発現を呈さないパクリタキセル耐性肺癌細胞³¹においても有効である可能性を示唆するデータを得ており(表 3), 様々な異なる耐性獲得機序によるタキサン系微小管作用薬耐性肺癌における有効性の検討を今後さらに進める予定である.

本研究において我々は, ドセタキセル耐性獲得後の非小細胞肺癌において, Eg5 を標的とした治療が有効な可能性を示唆する結果を得た. 今後は異なる耐性獲得機序を持つ細胞株や動物モデルを含むさ

表 3 パクリタキセルと Compound3 の H69 細胞と H69/TXL 細胞における細胞増殖抑制効果

細胞株	IC ₅₀ (nmol/L, パクリタキセル)	IC ₅₀ ($\mu\text{mol/L}$, Compound3)
H69	5.367 \pm 0.321	0.125 \pm 0.002
H69/TXL	70.43 \pm 6.86	0.196 \pm 0.045

IC₅₀, 50%増殖阻害濃度

らなる検討および効果予測バイオマーカーの検討を進め、非小細胞肺癌における新規の薬物治療開発につなげたい。

謝 辞

A549, PC-9, H69, H69/TXL, PC-14 細胞および PC-14/TXT 細胞株を供与いただきました国立がん研究センター支援研究室の小泉史明先生および静岡県立静岡がんセンター研究所の実験助手の皆様に感謝申し上げます。

文 献

- World Health Organization (2013). Cancer. <http://www.who.int/cancer/en/>
- Travis WD (2011) Pathology of lung cancer. *Clin Chest Med* 32: 669-692
- Belani CP (2005) Optimizing chemotherapy for advanced non-small cell lung cancer: focus on docetaxel. *Lung Cancer* 50: S3-8
- Sawin KE, LeGuellec K, Philippe M, Mitchison TJ (1992) Mitotic spindle organization by a plus-end-directed microtubule motor. *Nature* 359: 540-543
- Blangy A, et al. (1995) Phosphorylation by p34cdc2 regulates spindle association of human Eg5, a kinesin-related motor essential for bipolar spindle formation in vivo. *Cell* 83: 1159-1169
- Mayer TU, et al. (1999) Small molecule inhibitor of mitotic spindle bipolarity identified in a phenotype-based screen. *Science* 286: 971-974
- Zhang Y, Xu W (2008) Progress on kinesin spindle protein inhibitors as anti-cancer agents. *Anticancer Agents Med Chem* 8: 698-704
- Gerecitano JF, et al. (2012) A Phase I trial of the kinesin spindle protein (Eg5) inhibitor AZD4877 in patients with solid and lymphoid malignancies. *Invest New Drugs* 31: 355-362
- Infante JR, et al. (2012) A Phase I study to assess the safety, tolerability, and pharmacokinetics of AZD4877, an intravenous Eg5 inhibitor in patients with advanced solid tumors. *Cancer Chemother Pharmacol* 69: 165-172
- Shukuya T, et al. (2010) A novel mitotic kinesin Eg5 inhibitor exerts the growth-inhibitory effect in cancer cells in a manner independent of induction of monoastrial formation but dependent on KRAS mutation status. *Proceeding of AACR annual meeting*
- Funayama Y, et al. (1995) Establishment of a docetaxel-resistant human non-small cell lung cancer cell line. *Cellular Pharmacology* 2: 303-309
- Ogo N, et al. (2007) Synthesis and biological evaluation of L-cysteine derivatives as mitotic kinesin Eg5 inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* 17: 3921-3924
- Montero A, Fossella F, Hortobagyi G, Valero V (2005) Docetaxel for treatment of solid tumours: a systematic review of clinical data. *Lancet Oncol* 6: 229-239
- Sudo T, Nitta M, Saya H, Ueno NT (2004) Dependence of paclitaxel sensitivity on a functional spindle assembly checkpoint. *Cancer Res* 64: 2502-2508
- Fojo T, Menefee M (2007) Mechanisms of multidrug resistance: the potential role of microtubule-stabilizing agents. *Ann Oncol* 18 Suppl 5: v3-8
- Goldman B. (2003) Multidrug resistance: can new drugs help chemotherapy score against cancer? *J Natl Cancer Inst* 95: 255-257
- Thomas H, Coley HM. (2003) Overcoming multidrug resistance in cancer: an update on the clinical strategy of inhibiting p-glycoprotein. *Cancer Control* 10: 159-165
- Martello LA, et al. (2003) Elevated levels of microtubule destabilizing factors in a Taxol-resistant/dependent A549 cell line with an alpha-tubulin mutation. *Cancer Res* 63: 1207-1213
- Cabral F, Barlow SB. (1989) Mechanisms by which mammalian cells acquire resistance to drugs that affect microtubule assembly. *FASEB J* 3: 1593-1599
- Dumontet C, Sikic BI. (1999) Mechanisms of action of and resistance to antitubulin agents: microtubule dynamics, drug transport, and cell death. *J Clin Oncol* 17: 1061-1070
- Kavallaris M, et al. (2001) Multiple microtubule alterations are associated with Vinca alkaloid resistance in human leukemia cells. *Cancer Res* 61: 5803-5809
- Jain S, Vahdat LT. (2011) Eribulin mesylate. *Clin Cancer Res* 17: 6615-6622
- Gitlitz BJ, et al. (2012) A phase II study of halichondrin B analog eribulin mesylate (E7389) in patients with advanced non-small cell lung cancer previously treated with a taxane: a California cancer consortium trial. *J Thorac Oncol* 7: 574-578
- Maemondo M, et al. (2010) Gefitinib or chemotherapy for non-small-cell lung cancer with mutated EGFR. *N Engl J Med* 362: 2380-2388
- Mitsudomi T, et al. (2010) Gefitinib versus cisplatin plus docetaxel in patients with non-small-cell lung cancer harbouring mutations of the epidermal growth factor receptor (WJTOG3405): an open label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol* 11: 121-128
- Kwak EL, et al. (2010) Anaplastic lymphoma kinase inhibition in non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 363: 1693-1703
- Shaw AT, et al. (2013) Crizotinib versus chemotherapy in advanced ALK-positive lung cancer. *N Engl J Med* 368: 2385-2394
- Gridelli C, et al. (2011) Pemetrexed in advanced non-small cell lung cancer. *Expert Opin Drug Saf* 10: 311-317
- Tcherniuk S, van Lis R, Kozielski F, Skoufias DA (2010) Mutations in the human kinesin Eg5 that confer resistance to monastrol and S-trityl-L-cysteine in tumor derived cell lines. *Biochem Pharmacol* 79: 864-872
- Marcus AI, et al. (2005) Mitotic kinesin inhibitors

induce mitotic arrest and cell death in Taxol-resistant and -sensitive cancer cells. J Biol Chem 280: 11569-11577

31. Ohta S, et al. (1994) Characterization of a taxol-resistant human small-cell lung cancer cell line. Jpn J Cancer Res 85: 290-297