

# 博士學位論文

内容の要旨

および

審査結果の要旨

平成 26 年 3 月

近畿大学大学院

医学研究科

大学院医学研究科博士課程修了者

## 博士学位論文審査結果の報告書

氏 名 (生年月日)	ふじ た ひで のり 藤 田 英 憲 (昭 45. 8. 13 生)
本 籍	茨 城 県
博士の専攻分野の名称	医 学
学 位 記 番 号	医 第 1149 号
学 位 授 与 の 日 付	平 成 26 年 3 月 20 日
学 位 授 与 の 要 件	学 位 規 程 第 5 条 第 1 項 該 当
学 位 論 文 題 目	The novel VEGF receptor/MET-targeted kinase inhibitor, TAS-115, has marked <i>in vivo</i> anti-tumor properties and a favorable tolerability Profile (新規 VEGF 受容体 /MET キナーゼ阻害剤 TAS-115 の創製研究)
論 文 審 査 委 員	主 査 = 西 尾 和 人 教 授 副 主 査 = 高 橋 英 夫 教 授 副 主 査 = 光 富 徹 哉 教 授

### 【背景及び目的】

血管内皮細胞増殖因子受容体 (VEGFR) のシグナルは腫瘍での血管新生において中心的な役割を担っていることが報告されている。VEGFR シグナル経路を阻害する薬剤は既に承認されており、VEGFR はがん治療の標的として検証されている。しかしながら、その適用は腎細胞がんや肝細胞がんなど一部の癌腫に限られ、低い忍容性や薬剤耐性化により未だ十分な治療効果を示しているとは言い難い。本研究ではより高い治療効果を発揮する VEGFR 阻害剤の創製を目的として、VEGFR と肝細胞増殖因子受容体 (MET) をともに阻害し、高い忍容性を有する新規のキナーゼ阻害剤 TAS-115 を同定し、プロファイル解析を行った。

### 【方法】

スクリーニングはリコンビナント VEGFR2 及び MET キナーゼを用いたモビリティシフトアッセイを、阻害選択性は市販の 192 キナーゼパネルを利用した。細胞増殖抑制効果は MET 遺伝子増幅を有するヒトがん細胞株、血管内皮細胞及び各種正常細胞を用いて検討し、*in vivo* 抗腫瘍効果は MET 遺伝子増幅の有無でそれぞれのヒトがん細胞を用いたヌードマウス移植系を用いて実施した。血管新生阻害効果は、薬剤投与後の腫瘍組織を摘出し、抗 CD31 抗体を用いた免疫染色法により組織内の陽性像を計測し算出した。

### 【結果及び考察】

TAS-115 は既存 VEGFR や MET 阻害剤と同程度に VEGFR2 と MET キナーゼ活性を阻害し、そのシグナルに依存したがん細胞や血管内皮細胞の増殖を強く阻害した ( $IC_{50}=0.01-0.03 \mu\text{mol/L}$ )。一方、TAS-115 のキナーゼ阻害選択性は、既承認 VEGFR 阻害剤のスニチニブより高く、さらに VEGFR や MET シグナル非依存性の細胞増殖に対する TAS-115 の抑制効果は顕著に弱かった ( $GI_{50} > 10 \mu\text{mol/L}$ )。加えて TAS-115 では種々正常細胞に対する障害性が他の VEGFR 阻害剤よりも低かった。従って、TAS-115 は標的細胞に選択的かつ特異性の高い効果を与える化合物であることが示された。*In vivo* 抗腫瘍効果の検討から、TAS-115 は低用量より腫瘍内の血管新生阻害、MET 阻害による腫瘍増殖阻害を示し、種々 xenograft モデルに対して顕著な腫瘍退縮や延命効果を発揮した。また、血中薬剤濃度が飽和するような高用量で、強い抗腫瘍効果を維持したまま 6 週間連日投与しても体重減少等の毒性所見を示さず、忍容性が高いことも明らかとなった。TAS-115 の各種キナーゼや標的細胞に対する選択性が高い忍容性に寄与しており、強い効力との協調が優れた治療効果に繋がっていると考えられた。


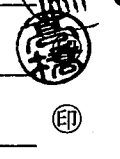
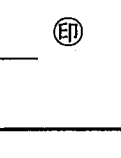
### 【結論】

本研究から見出された TAS-115 は強い抗腫瘍効果と高い忍容性を有する新規の VEGFR/MET キナーゼ阻害剤であり、臨床においてもより高い治療効果が期待できる。

博士論文の印刷公表	公 表 年 月 日	出版物の種類及び名称
	2013年 12月 6日 公 表	出版物名
	公 表 内 容	Molecular Cancer Therapeutics Vol. 12 No. 12 p.2685-2696
	全 文	2013年 12月 6日 発 行

博士学位論文審査結果の要旨

論文審査委員

主査	教授	西尾和人	
副主査	教授	光島徹哉	
副主査	教授	高橋英夫	
副査	教授		印
副査	教授		印

学位申請者

氏名 藤田 英憲  
 (医学系 分子腫瘍病態学専攻 )

博士の専攻分野  
 の名称 医学

学位授与の要件 学位規程第5条 第1項該当

学位論文題目

The novel VEGF receptor/MET-targeted kinase inhibitor, TAS-115,  
 has marked in vivo anti-tumor properties and a favorable tolerability  
 profile  
 (新規 VEGF 受容体/MET キナーゼ阻害剤 TAS-115 の創製研究)

## 審査結果の要旨

### 本論文の概略

申請者は VEGFR および MET を阻害する低分子化合物である TAS-115 の薬理作用を生化学的、生物学的手法を用いて解析した上で、高い認容性を備えて VEGFR と MET を阻害することが、既存の VEGFR 阻害剤（スニチニブ）や MET 阻害剤（クリゾチニブ）より強い抗腫瘍効果の発揮に繋がることを実証した。

#### 1. VEGFR/MET 阻害剤創製への着眼

申請者は、VEGFR 阻害を有する血管新生阻害剤であるスニチニブの特性と臨床状況を分析した上で、認容性を改善し、VEGFR 阻害に MET 阻害を合わせることがより抗腫瘍効果の向上に繋がる可能性を提示し、その特性を有する化合物 (TAS-115) を探索した上で性状解析を行って、マウスモデルにおいて自らの仮説を実証した。

#### 2. 生化学的手法での解析

TAS-115 の VEGFR および MET への阻害活性については、それぞれの市販の酵素触媒ドメインを利用した酵素（キナーゼ）アッセイを構築した上で評価を行っている。酵素反応速度論に基づいた解析法を取得し、データとして示すことができていると考えられる。

#### 3. 細胞生物学的手法での解析

申請者は、薬剤の細胞レベルでの阻害作用についても解析している。VEGFR の解析では VEGFR が血管新生に関与し、血管内皮細胞に発現しているため、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) を使用している。MET の解析では MET 遺伝子の増幅を有するがん細胞株 (MKN45 及び Hs746T) と MET 遺伝子が増幅していないがん細胞株 (HCT-116, MCF-7) を選択し使用している。アッセイとしては、細胞での VEGFR2 及び MET 阻害効果を western blotting で実験し、増殖阻害アッセイを BrdU uptake 法及び細胞内 ATP 定量法で行っている。上記アッセイにより、薬剤が各細胞での VEGFR 及び MET のリン酸化伝達シグナルを阻害し、血管新生及び MET 遺伝子増幅を有するがん細胞の選択的な増殖抑制効果を発揮する可能性を示すデータが得られている。また各種正常細胞への障害性も caspase 活性を測定することにより検討し、本化合物では障害性が弱いことを明らかにした。細胞の取り扱い、適切なアッセイ法の選択及び組み立てについても理解していると考えられる。

## 審査結果の要旨

---

### 4. 動物を用いた薬効及び忍容性の解析

申請者は、薬剤の効果を検証するために動物（マウス）のモデルを用いて検証している。通常の手技として、細胞の移植、動物の取り扱い、投薬、腫瘍体積の測定などを習得し、データを取得し、解析処理することができていると考えられる。

MET 遺伝子増幅の有無の違いでがん細胞株を選択し、VEGFR 阻害剤(スニチニブ)や MET 阻害剤(クリゾチニブ)の薬効を凌駕する本化合物の特徴的な効果を示すことができている。また、50%腫瘍増殖抑制用量と最大耐性量から治療係数を算出し、マウスにおいて忍容性が優れることを示した上で、高用量での継続的な投与が抗腫瘍効果の向上に寄与することを提示できている。

### 5. 組織学的解析

申請者は、腫瘍内の血管密度を測定するために、腫瘍切片の免疫染色を行っている。切片作成、抗体の選択、染色、計測法などの手法を理解していると考えられる。

本化合物の投与された腫瘍の切片で血管密度を測定し、本化合物が血管新生抑制効果を有していることを提示できている。

### 6. 論文構成

既存の VEGFR 阻害効果を有する血管新生阻害剤の現状を分析し、問題点を抽出した上で薬効の向上に繋げるための仮説を打ち立て、新規な化合物でその検証を行うという試みがなされている。その過程において、VEGFR 阻害や MET 阻害を有す低分子マルチキナーゼ阻害剤の特性、受容体型チロシンキナーゼ (VEGFR, MET) ファミリーの特徴と腫瘍増殖への関与を理解していると考えられる。

またこの分野における、近年の新しい研究成果と動向をフォローし、本研究に役立てている。検証の過程では仮説に基づき、不十分な点はあるものの、生化学、細胞生物学的手法や動物モデル等必要な実験を行っている。

Discussion では他の研究成果の報告を援用しつつ、薬剤の忍容性を高めることの意義、VEGFR と MET を阻害することの必要性と治療効果向上の可能性について議論している。

以上から、本論文は学位論文として十分な内容を有していると考えられる。

---