

氏名(本籍)	ひきちゆういち 引地裕一(福島県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	博乙第2613号
学位授与年月日	平成24年7月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
審査研究科	人間総合科学研究科
学位論文題目	がん治療薬 PLK1 阻害剤の薬理学的研究
主査	筑波大学教授 薬学博士 幸田幸直
副査	筑波大学教授 医学博士 野口雅之
副査	筑波大学教授 医学博士 兵頭一之介
副査	筑波大学講師 医学博士 柳健一

論文の内容の要旨

(目的)

Polo-like kinase (PLK1) は細胞分裂に関与するキナーゼであり、大腸がんや非小細胞肺癌など多くのがん組織で高発現しており、かつ、がんの悪性化との相関が指摘されている。

本研究では、がん治療薬 (PLK1 阻害薬) の作用機序を確認すると共に、臨床試験の最適化に寄与するべく以下の研究を行った。

- ・ in vitro/in vivo 試験を実施し、患者選別バイオマーカーになり得る薬剤感受性マーカーを探索する。
- ・ 薬力学 (PD) マーカーの選別と有用性を実証する。
- ・ 薬物動態 (PK) /PD 試験を通じて、前臨床最適投与レジメンを確立する。

(対象と方法)

PLK1 の ATP 結合ポケットを指向してデザインされた新規 PLK1 選択的阻害薬 TAK-960 を用いた。K562ADR 株は K562 を親株として Doxorubicin 耐性株として樹立した。それ以外の株は全て市販の細胞株を用い、購入先に示された培地・培養条件を用いた。増殖抑制試験は CellTiter-Glo[®] を、細胞周期解析は FACSCalibur[™] を用い、細胞分裂像観察には α , γ チューブリン抗体および DAPI にて免疫細胞化学的に染色し、マニュアルに従って観測、もしくは定量した。リン酸化ヒストン H3 (pHH3) の測定は ELISA 法もしくは抗 pHH3 抗体を用いて免疫組織化学的に染色後カウント、定量化した。

in vivo 試験はヌードマウス、もしくは SCID マウスにがん細胞を皮下移植し、群分け後、薬剤を経口もしくは尾静脈注射にて投与した。PK/PD 試験は、単回投与後、血漿中および腫瘍中の化合物濃度と pHH3 を経時的に測定した。

(結果)

PLK1 は細胞分裂に関与するため、大腸がん細胞株 HT29 に作用させると濃度依存的に、G2/M 期の増加と pHH3 の増加 (EC_{50} = 9.8 nmol/L)、それに相関する増殖抑制活性 (EC_{50} = 8.4 nmol/L) を示した。また免疫細胞化学的には PLK1 阻害に特徴的な polo と呼ばれる単極紡錘体 (monopolar spindle) を確認した。

18 種の細胞株を用いて増殖抑制試験を行った。TAK-960 添加後 3 日目の EC_{50} 値は 8.4~46.9 nmol/L であり、

p53 変異や KRAS 遺伝子変異と阻害感受性との有意な相関は認められなかった。高密度培養し、増殖を抑制した正常細胞においては、生存率の低下は観察されなかった。また MDR1 (Multidrug resistance protein1) を高発現し、Doxorubicin や Paclitaxel に耐性を示す株 (K562ADR, HCT15, COLO320DM) にも増殖抑制活性を示し、TAK-960 は MDR1 の基質とならないことを確認した。

HT29 移植ヌードマウスを用いて PK/PD 試験を実施した。TAK-960 を経口 (5, 10 および 30 mg/kg) および静脈注射 (10 および 30 mg/kg) で単回投与し、化合物濃度と pHH3 の推移をみたところ、用量依存的な AUC (薬物濃度・時間曲線下面積) の増加だけでなく、pHH3 の AUE (PD レスポンス・時間下面積; area under the effect) にも相関が認められた。MDR1 高発現株 HCT15 では HT29 に比べ PD は低値を示した。同じく MDR1 高発現株 K562ADR の場合、Paclitaxel (20 mg/kg) は pHH3 を亢進させなかったが、TAK-960 は親株 K562 同様の PD レスポンスを示した。

TAK-960 経口投与による薬効試験を実施した。TAK-960 は HT29 担がんマウスモデルにおいて種々の投薬レジメンで強い薬効を示した。中でも 21 日間連続投与 (QDx21) が最も強い薬効を示し、5 匹中 3 匹で完全寛解を維持した。HCT15 移植担がんモデルにおいては T/C=51%にとどまった。8 種の担がんマウスモデルを用いて TAK-960 薬効試験を行った (10 mg/kg, QDx14) が、いずれの株にも顕著な増殖抑制活性を示し、明らかな耐性株は見いだせなかった。

(考察)

本研究ではまず、in vitro において TAK-960 の作用機序を確認した。PLK1 阻害によって誘導される G2/M 期、pHH3 の増加と増殖阻害濃度が相関し、polo 様分裂異常が観測されることから、細胞内でも PLK1 選択的に作用 (阻害) していることが確認された。pHH3 は in vivo 試験における PD マーカーとして利用することが妥当と考えられた。In vitro/in vivo 共に MDR1 高発現株を含む広いがん細胞株に強い増殖抑制作用を示し、薬剤感受性を判断するマーカーは、発見には至らなかった。

In vivo PD マーカーとして用いた pHH3 はおおよそ投与後 24 時間目にピーク (E_{max}) に達するが、 E_{max} には用量依存性は観察されなかった。それに対して、AUE には広く用量依存性が認められたことから、in vivo における PD の評価は AUE を指標とすることが好ましいことがわかった。ここで用いた HT29 に比べると HCT15 担がん腫瘍は AUE が明らかに低値をとり、実際、薬効試験においても HT29 では完全寛解を含む強力な薬効が認められるのに対し、HCT15 では顕著な薬効が認められなかった。MDR1 高発現 K562ADR 株では、Paclitaxel は pHH3 のレスポンス、薬効共に認められなかったのに対し、TAK-960 は PD レスポンスと強い薬効が観察されたことから、HCT15 において低い薬効にとどまった原因は MDR1 による薬剤排出ではないことが示唆された。以上を踏まえると pHH3 (AUE) は PD マーカーとしてだけでなく、初期薬効予測マーカーとして有用であることが示された。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究において、TAK-960 は細胞、in vivo において PLK1 選択的に阻害する薬剤であることを確認し、PK/PD 試験から前臨床における最適投与レジメンが確立された。TAK-960 は広いがん細胞に薬効を示すため、薬剤感受性マーカー (患者選別マーカー) の発見には至らなかったが、pHH3 (AUE) は PD マーカーとしてだけでなく、初期薬効予測マーカーとして有用であることが示された。薬剤とその薬剤感受性マーカーの発見は、薬効が期待される患者への効果的な薬剤投与が実現できるだけでなく、薬効が期待できない患者への無駄な薬剤投与に伴う副作用が回避されることになり、がん薬物療法に大きな進展をもたらすと考えられ、本研究は、今後の新規抗がん薬の創薬研究において重要な知見を提供したものと評価できる。

平成 24 年 5 月 8 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもと論文について説明を求め、

関連事項について質疑応答を行い、学力の確認を行った。その結果、審査委員全員が合格と判定した。
よって、著者は博士（医学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。