

血管新生阻害活性を有する新規イミダゾ[1,2-*b*]ピリダジ
ン誘導体 TAK-593 および T-1840383 の薬効薬理研究

2015 年

栗津 紀香

本論文は、以下の論文の内容を総括したものである。なお、報文内容の転載許可は、各出版社から取得済みである。

- 1) Yoshiko Awazu, Akio Mizutani, Yoshinori Nagase, Hidehisa Iwata, Yuya Oguro, Hiroshi Miki, Shinichi Imamura, and Akira Hori : A novel pyrrolo[3, 2-d]pyrimidine derivative, as a vascular endothelial growth factor receptor and platelet-derived growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, shows potent antitumor activity by suppression of tumor angiogenesis. *Cancer Sci.*, **103**, 939-944 (2012). [第1章]
- 2) Yoshiko Awazu, Akio Mizutani, Yoshinori Nagase, Shuntarou Tsuchiya, Kazuhide Nakamura, Yuichi Kakoi, Osamu Kitahara, Toshiyuki Takeuchi, Seiji Yamasaki, Naoki Miyamoto, Hidehisa Iwata, Hiroshi Miki, Shinichi Imamura, and Akira Hori : Anti-angiogenic and anti-tumor effects of TAK-593, a potent and selective inhibitor of vascular endothelial growth factor and platelet-derived growth factor receptor tyrosine kinase. *Cancer Sci.*, **104**, 486-494 (2013). [第1章]
- 3) Yoshiko Awazu, Kazuhide Nakamura, Akio Mizutani, Yuichi Kakoi, Hidehisa Iwata, Seiji Yamasaki, Naoki Miyamoto, Shinichi Imamura, Hiroshi Miki, and Akira Hori : A novel inhibitor of c-Met and VEGF receptor tyrosine kinases with a broad spectrum of in vivo antitumor activities. *Mol. Cancer Ther.*, **12**, 913-924 (2013). [第2章]

目次

序論

第1章 新規 VEGFR/PDGFR チロシンキナーゼ阻害薬 TAK-593 の薬効薬

理研究

第1節 緒言

第2節 実験材料と方法

1. 使用薬物
2. 細胞増殖試験
3. キナーゼリン酸化試験
4. *In vitro* 管腔形成試験
5. 腫瘍異種移植モデル
6. 薬物動態・薬力学解析
7. 免疫組織化学的検査
8. ダイナミック造影磁気共鳴画像法 (DCE-MRI)

第3節 結果

1. 細胞に対する *in vitro* 作用
2. 腫瘍異種移植モデルに対する抗腫瘍活性
3. 薬物動態および薬力学的特性
4. 腫瘍血管新生阻害作用
5. 壁細胞リクルートメント阻害作用
6. 腫瘍血管透過性の低下作用

第4節 考察

第2章 新規 VEGFR/c-Met チロシンキナーゼ阻害薬 T-1840383 の薬効薬理 研究

第1節 緒言

第2節 実験材料と方法

1. 使用薬物
2. キナーゼ阻害試験
3. 細胞株
4. *In vitro* 管腔形成試験
5. 細胞散乱試験および E-カドヘリン発現解析試験
6. マトリゲル浸潤試験
7. 細胞増殖試験
8. キナーゼリン酸化試験
9. 腫瘍異種移植モデル
10. 免疫組織化学的検査

第3節 結果

1. c-Met および VEGFR チロシンキナーゼに対する阻害作用
2. 細胞に対する *in vitro* 作用
3. 腫瘍異種移植モデルに対する抗腫瘍活性
4. 腫瘍血管新生阻害作用
5. マウス胃がん腹膜播種モデルに対する抗腫瘍活性
6. 低酸素環境下における c-Met 発現亢進と活性化

第4節 考察

総括

引用文献

謝辞

序論

がん細胞が一定サイズ以上の腫瘍を形成するためには、酸素や栄養の供給を得るための血管新生が必要である。腫瘍は、血管新生により、増殖、進展し、やがて転移を引き起こす[1]。したがって、血管新生阻害による治療は、有望ながん治療戦略であると考えられ、その戦略に基づいた治療薬の開発が試みられてきた[2-7]。その治療戦略は、血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor: VEGF) のシグナル伝達阻害薬である抗 VEGF 中和抗体ベバシズマブが臨床試験において著明な効果を示したことから、臨床的にも有用性が証明されたと言っても過言ではない[3]。一方で、ベバシズマブに抵抗性を示すがん患者も一定の割合で存在し、より強力な薬剤の開発が望まれている[8-13]。VEGF を介した血管新生の過程はいくつかのステップに分けられる[14]。まず、低酸素刺激に応答して、VEGF ががん細胞などにより産生され、既存の血管内皮細胞表面の VEGF 受容体 2 (VEGFR2) に結合し、細胞を活性化する[15-18]。活性化された血管内皮細胞から産生されたタンパク質分解酵素により基底膜が分解され、血管内皮細胞の遊走、増殖、管腔形成の段階を経て、新しい血管ネットワークが形成される[19, 20]。新生血管は不安定で、壁細胞と総称されるペリサイトや平滑筋細胞に裏打ちされることで、構造的に安定、成熟化する。壁細胞のリクルートの過程では、血管内皮細胞が産生する血小板由来成長因子 (platelet derived growth factor: PDGF) が重要である。PDGF-BB あるいは PDGF 受容体 β (PDGFR β) 欠損マウスでは、新生血管周囲への壁細胞リクルートメントがほとんど起こらず、微小血管透過性の亢進および出血により胎生致死となることから、特に PDGF-BB がその受容体 PDGFR β を発現する壁細胞を活性化して壁細胞リクルートメントを誘導すると考えられている[21-23]。

がんで過剰発現している血管新生促進因子は VEGF および PDGF-BB 以外にもいくつか報告されており、肝細胞増殖因子 (hepatocyte growth factor: HGF) もまた、強力な血管新生促進活性を示す増殖因子のひとつである[24]。c-Met は HGF 特異的な受容体チロシンキナーゼであり、HGF が c-Met に結合することで、c-Met の二量体形成、細胞内の複数のチロシン残基のリン酸化、および下流のシグナル伝達が誘導される。HGF/c-Met シグナル伝達経路は血管新生だけでなく、がん細胞の増殖、浸潤、転移、薬剤耐性機構にも関与している[25, 26]。MET 遺伝子増幅や遺伝子変異、HGF あるいは c-Met の過剰発現による c-Met シグナルの活性化は様々ながん種で報告されており、予後不良因子として知られる[25, 26]。近年、遺伝子増幅による c-Met の恒常的活性化が一部の胃がん細胞株の増殖および生存のドライバーとなることや[27, 28]、非小細胞肺癌症例における EGFR チロシンキナーゼ阻害薬に対する獲得耐性機構に関与していることが明らかとなった[29, 30]。そのため c-Met もまた、抗がん治療のための魅力的な標的分子であると考えられる[26, 31-33]。

本研究において、著者は、固形腫瘍に対する新たな分子標的治療薬の開発に取り組み、血管新生を阻害することで固形腫瘍の増殖や転移に有効性を発揮する新規イミダゾ[1,2-b]ピリダジン誘導体 TAK-593 および T-1840383 を見出した。TAK-593 は VEGF および PDGF シグナルの強力な二重阻害薬であり[34, 35]、T-1840383 は c-Met および VEGF シグナルの強力な二重阻害薬である[36]。これら 2 化合物の *in vitro* および *in vivo* での薬効薬理作用について検討し、化合物の特性を明らかにした結果、多様な腫瘍に対する新たな治療薬として有用である可能性が示唆されたので

ここに報告する。

第1章

新規 VEGFR/PDGFR チロシンキナーゼ阻害薬 TAK-593 の薬効薬理研究

第1節 緒言

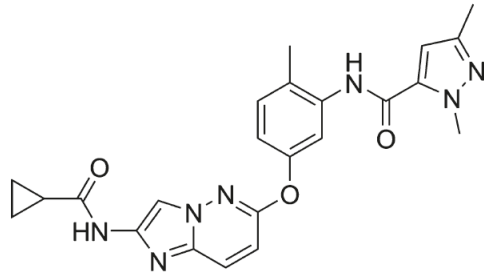
冒頭にも述べた様に、抗 VEGF 中和抗体ベバシズマブは化学療法との併用により、臨床での有用性が既に実証されている[3]。その一方で、いくつかの臨床試験結果からは、ベバシズマブ単剤では十分な血管新生阻害効果が発揮されない可能性が示唆されている[8-13]。具体的には、全てのがんがベバシズマブに感受性を示すわけではなく、治療途中から耐性を獲得し、再燃するがんも観察されている。そのメカニズムのひとつとして、PDGF シグナル伝達経路を介した血管構造の安定化が寄与していると考えられている。実際に、壁細胞に支持されたより成熟した腫瘍血管は抗 VEGF 療法に対して感受性が低く[37-39]、さらには、抗 VEGF 療法に対し耐性を獲得した腫瘍血管の周囲では PDGF-BB の発現が亢進していることが報告されており[40]、VEGFR2 および PDGFR β の機能を阻害して血管内皮細胞および壁細胞の両者を標的とする血管新生阻害療法は、抗 VEGF 薬単独療法よりも更に強い抗腫瘍効果が期待できる[37, 41-45]。

新規イミダゾ[1,2-*b*]ピリダジン誘導体 TAK-593 は、VEGFR2 および PDGFR β チロシンキナーゼ、ならびにその他の血管新生に関与する VEGFR1, VEGFR3 および PDGFR α チロシンキナーゼに対して、強力で選択的な阻害作用を示す化合物として見出された[34, 35]。本研究では、TAK-593 の *in vitro* および *in vivo* での薬効薬理作用について検討した結果、TAK-593 が VEGF および PDGF シグナル阻害作用を介して強い血管新生阻害作用および抗腫瘍作用を示すとともに、その機序として壁細胞のリクルートメント阻害が関与していることを見出したので報告する。

第2節 実験材料と方法

1. 使用薬物

TAK-593、N-[5-({2-[(cyclopropylcarbonyl)amino]imidazo[1,2-b]pyridazin-6-yl}oxy)-2-methylphenyl]-1,3-dimethyl-1H-pyrazole-5-carboxamide は武田薬品工業株式会社 医薬研究本部にて合成された[34, 35]。*In vitro* 試験に際しては、TAK-593 はジメチルスルホキシドに溶解し 10 mmol/L ストック溶液を作製した。*In vivo* 試験に際しては、TAK-593 は 0.5% メチルセルロース溶液に懸濁し 10 mL/kg の容量で投薬した。



TAK-593

2. 細胞増殖試験

ヒト臍帯静脈内皮細胞 (Human umbilical vein endothelial cell: HUVEC) およびヒト冠状動脈平滑筋細胞 (Human coronary artery smooth muscle cell: CASMC) は Cambrex 社より購入した。その他細胞株はアメリカ培養細胞系統保存機関 (American Type Culture Collection: ATCC) あるいはヨーロッパ動物細胞培養保存機関 (European Collection of Animal Cell Cultures: ECACC) より購入した。HUVEC は TAK-593 およびヒト組換え VEGF-A (R&D Systems) 存在下で 5 日間培養した。CASMC は血清飢餓状態で一晚培養後、TAK-593 およびヒト組換え PDGF-BB (Pepro Tech EC) 存在下で 6 日間培養した。ヒトがん細胞株およびヒト肺線維芽細胞株 MRC-5 は TAK-593 存在下で 3 日間培養した。培養後は Cell Counting Kit-8 (同仁化学研究所) を用いて生細胞数を測定した。50% 阻害濃度 (50% inhibitory concentration: IC₅₀) は統計解析ソフト SAS の NLIN プロシジャ (version 5.0; SAS Institute Japan) による線形最小二乗法で求めた用量反応曲線を用いて算出した。

3. キナーゼリン酸化試験

HUVEC と CASMC は血清飢餓条件下、TAK-593 で 2 時間前処理した後に、ヒト組換え VEGF-A あるいはヒト組換え PDGF-BB でそれぞれ 5 分間刺激した。細胞溶解液中のタンパク質は抗 Phospho-Tyr⁹⁵¹-VEGFR2 抗体 (Cell Signaling Technology)、抗 VEGFR2 抗体 (Cell Signaling Technology)、および抗 PDGFRβ 抗体 (Santa Cruz Biotechnology) を用いてウェスタンブロットで検出した。リン酸化 PDGFRβ は抗 PDGFRβ 抗体で免疫沈降した後に、抗 phosphotyrosine 抗体 (4G10, Upstate Systems) でウェスタンブロット検出した。検出したシグナルは LAS ルミノイメージアナライザーおよび画像解析ソフトウェア Multi gauge ver.3.3 (FUJIFILM) を用いて可視定量化した。

4. *In vitro* 管腔形成試験

HUVEC と正常ヒト皮膚線維芽細胞 (Normal human dermal fibroblast: NHDF, Cambrex) の共培養系モデルを用いた。TAK-593 およびヒト組換え VEGF-A 存在下で 7 日間共培養した後に、マウス抗ヒト CD31 抗体 (R&D systems) および Alexa Fluor 488 標識二次抗体 (Invitrogen) を用いて HUVEC が形成した管腔を染色し、Discovery-1 high content imaging system (Molecular Devices) により可視化した。管腔面積は画像解析ソフトウェア Metamorph (Molecular Devices) を用いて定量化した。

5. 腫瘍異種移植モデル

全ての実験操作は社内実験動物委員会の認可のもと、社内規定に準じて実施した。胸腺欠損ヌードマウス (BALB/cA Jcl-nu/nu) および重症複合免疫不全マウス (severe combined immunodeficient; SCID mice (C.B17/Icr-scid/scid Jcl)) は日本クレアより購入した。動物は滅菌済みの餌と水道水を自由に摂取させ、12時間の明暗周期で飼育した。マウスは実験開始前に少なくとも一週間馴化した。がん細胞はマウスの後側腹部皮下に移植した。ヒト胃がん細胞株 MKN-45 およびヒト初代腎細胞がん異種移植片 RCC-02-JCK は、理研バイオリソースセンターセルバンクおよび実験動物中央研究所よりそれぞれ入手した。RCC-02-JCKは直径約2 mmの移植片として皮下に移植した。頭蓋内異種移植モデルにおいては、ブレグマ近傍ヘマイクロシリンジを用いてヒトグリオーマ細胞株 U87MG (5×10^5 cells/5 μ L) を直接移植した。腫瘍生着確認後、TAK-593あるいは溶媒を1日2回マウスに経口投与した。治療効果は、少なくとも週2回ノギスで腫瘍の直径(L)と短径(W)を測定し、腫瘍体積 (mm^3) = $L \times W^2 \times 1/2$ の公式にて算出することで評価した。抗腫瘍活性の強さはT/C値 (TAK-593投与群 (treated) と溶媒投与群 (control) の平均腫瘍体積増加比率) を指標とした。頭蓋内異種移植モデルではマウスの生存を観察した。腫瘍サイズの測定時に体重も測定した。TAK-593投与群の統計的有意性は統計解析ソフト SAS を用いた William 検定あるいは Shirley-Williams 検定 (有意水準片側 2.5%) により評価した。

6. 薬物動態・薬力学解析

ヒト肺胞基底上皮腺がん細胞株 A549 をヌードマウスに皮下移植したモデルに対して、TAK-593 を経口投与した。TAK-593 の血漿中および肺組織内濃度は、蛍光検出器付 HPLC あるいは HPLC/MS/MS を用いて定量測定した。薬物動態パラメータ AUC_{0-24h} (投与後 24 時間までの血中濃度-時間曲線下面積 (area under the plasma concentration-time curve: AUC)) および C_{max} (最高血中濃度) はノンコンパートメント解析法により算出した。薬力学試験には、ヒト組換え VEGF-A を尾静脈内投与して 5 分後に肺組織を回収し、抗 Phospho-Tyr⁹⁵¹-VEGFR2 抗体および抗 VEGFR2 抗体を用いたウェスタンブロット解析を行った。

7. 免疫組織化学的検査

ヒト肺胞基底上皮腺がん細胞株 A549 をヌードマウスに皮下移植したモデルに対して、TAK-593 を経口投与した。摘出した腫瘍は OCT コンパウンド (Optimal Cutting Temperature compound) 包埋により凍結切片を作製した。腫瘍血管新生は、一次抗体としてラット抗マウス CD31 抗体 (BD Bioscience) を、発色基質としてジアミノベンジジン (3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride: DAB) を使用した免疫ペルオキシダーゼ法を用いて切片を染色した。腫瘍細胞の増殖能は抗 Ki-67 抗体 (DAKO) を用いて検討した。腫瘍内アポトーシス細胞は TUNEL 法に基づき ApopTag Peroxidase *In Situ* Apoptosis Detection Kit (Millipore) により検出した。全ての染色標本は Axiovert 200M 顕微鏡 (Carl Zeiss) を用いて評価した。各標本 3 視野 (各視野 8.25 mm^2) を無作為に選択し、デジタルカメラおよび画像取得ソフトウェア (AxioVision Release 4.5 digital imaging analysis software, Carl Zeiss) により画像を取り込み、解析を行った。壁細胞リクルートメントの評価には、パラホルムアルデヒドによる灌流固定を施した腫瘍組織のパラフィン包埋切片

を用いた。血管内皮細胞は抗 CD31 抗体 (Spring Bioscience) および AlexaFluor594 標識二次抗体 (Invitrogen) で、壁細胞は抗 alpha smooth muscle actin (α SMA)抗体 (DAKO) および AlexaFluor488 標識二次抗体 (Invitrogen) でそれぞれ免疫蛍光染色した。染色標本はバーチャルスライドスキャナ NanoZoomer Digital Pathology (浜松ホトニクス) でスキャンし、各標本 5 視野を無作為に選択して画像解析ソフトウェア WinROOF (三谷商事) で壁細胞の面積を測定した。

8. ダイナミック造影磁気共鳴画像法 (dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging: DCE-MRI)

イソフルラン麻酔下のヒト結腸腺がん細胞株 HT-29 担がんヌードマウスをアクリル板に固定し、4.7T 動物実験用 MRI (Varian Unity INOVA 4.7T) で撮像した。グラジエントエコーシーケンス (TE/TR=6/20 msec, flip angle=3, 5, 10, 15, 20, and 30 degrees, FOV=4 x 4 cm, slice thickness=1 mm, NEX=2) により腫瘍組織の T1 測定をした後に、RF スポイルドグラジエントエコーシーケンス (TE/TR=6/20 msec, flip angle=60 degrees, FOV=4 x 4 cm, slice thickness=1 mm, NEX=2) を用いて二次元マルチスライス DCE-MRI データを収集した。造影剤注入前に 10 フレーム撮像し、ガドリニウム造影剤 (Gd-DTPA, 0.2 mL of a 10 mM Gd-DTPA solution, Magnevist, Bayer Healthcare Pharmaceuticals) を尾静脈からボラス注入した後、10 分間にわたって断続的に 61 フレーム撮像した。DCE-MRI はまず、TAK-593 投与前に撮像した。TAK-593 は 1 日 2 回 3 日間経口投与し、4 日目の初回投与 1 時間後に DCE-MRI 画像データを取得した。解析には two-compartment bidirectional model を用いた[46]。腫瘍組織中 Gd-DTPA 濃度 (C_t) および血漿中 Gd-DTPA 濃度 (C_p) は、 $R_1 (=1/T_1)$ 値として以下の計算式 1 から算出した。計算された C_t 値および C_p 値を計算式 2 に導入し、移行定数 K_{trans} (K^{ps}) を求めた。

計算式 1:

C: concentration (mM), t1d: T1 of tissue (sec), α : flip angle, tr: repetition time (sec), r1: relaxivity (mM/sec), SI: signal intensity after treatment, SI_{pre} : signal intensity before treatment

計算式 2:

$$\frac{C_t(t)}{C_p(t)} = v_p + K^{ps} \frac{\int_0^t C_p(t') dt'}{C_p(t)}$$

Varian の FID 信号を TIFF 画像ファイルに変換し経時的変化 (71 フレーム) のシグナル強度を補正した後に、MATLAB (version 7.5, Cybernet systems) を活用して K_{trans} マップを作成した。腫瘍体積の算出には、各スライス (スライス厚=1 mm) の寸法をピクセル数で計測してミリメートルに変換した。

第3節 結果

1. 細胞に対する *in vitro* 作用

TAK-593 は HUVEC および CASMC (壁細胞の一種) において、VEGF および PDGF 誘発による受容体リン酸化を強力に阻害した。その IC₅₀ 値はそれぞれ 0.34、2.1 nmol/L であった (Fig. 1A)。VEGFR2 および PDGFRβ で検出された 2 本のバンドのうち下位のバンドは糖鎖修飾中間体と推測される。TAK-593 は VEGFR2 からのシグナル伝達系の下流に位置する ERK、Akt の活性も阻害した (Fig. 1B)。また、TAK-593 は、VEGF 依存的な HUVEC の増殖および PDGF 依存的な CASMC の増殖を濃度依存的に抑制し、そのときの IC₅₀ 値はそれぞれ 0.30、3.5 nmol/L であった。一方、正常線維芽細胞株 MRC-5 および各種がん細胞株の増殖に対する阻害作用は弱かった (Table 1)。また、*in vitro* において血管新生を模倣する、HUVEC の VEGF 誘発管腔形成を強力に阻害し、その IC₅₀ 値は 0.32 nmol/L であった (Fig. 1C)。以上の結果から、TAK-593 は VEGF および PDGF-BB による細胞内シグナルを強く阻害し、血管内皮細胞および壁細胞の増殖を強くかつ非常に選択的に阻害することが示された。

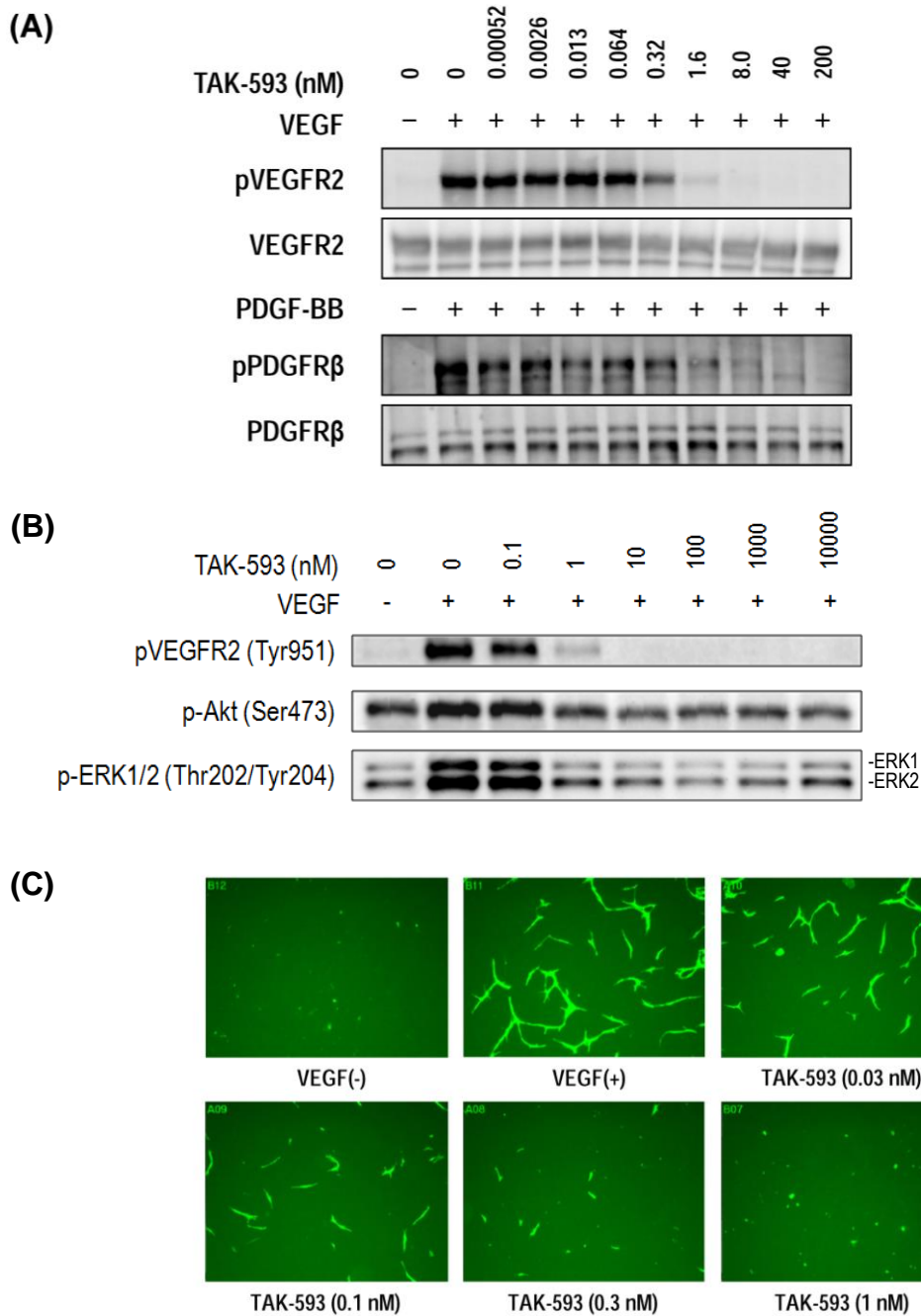


Figure 1. TAK-593 inhibits cellular VEGF/PDGF signaling and VEGF-induced tube formation. A, B HUVECs or CASCs were treated with TAK-593 and then stimulated with VEGF (100 ng/mL) or PDGF-BB (20 ng/mL), respectively. C, HUVECs co-cultured with NHDF were treated with TAK-593 in the presence of VEGF (10 ng/mL) for 7 days. Endothelial cells were visualized and quantified with anti-CD31 staining and fluorescent imaging; representative images are shown (x20). The experiments were performed in duplicate.

(出典) Awazu et al. *Cancer Sci.*, **104**, 486-494 (2013), Figure 1

Table 1. Inhibitory activity of TAK-593 against cellular proliferation.

Type	Cell line	IC ₅₀ (nM)	95% confidence interval (nM)
Endothelial cell	HUVEC*	0.30	0.28-0.32
Smooth muscle cell	CASMC**	3.5	3.0-4.0
Lung	A549	30,000	25,000-37,000
Pancreas	CFPAC-1	13,000	10,000-17,000
Prostate	DU-145	18,000	17,000-21,000
Colon	HT-29	14,000	13,000-15,000
Breast	MDA-MB-231	8,600	6,800-11,000
Lung fibroblast	MRC-5	24,000	19,000-30,000

*Proliferation of HUVECs was induced by VEGF (60 ng/mL). **Proliferation of CASMCs was induced by PDGF-BB (200 ng/mL). The experiments were performed in quadruplicate.

(出典) Awazu et al. *Cancer Sci.*, **104**, 486-494 (2013), Table 1

2. 腫瘍異種移植モデルに対する抗腫瘍活性

TAK-593は1日2回の経口投与により、肺がん、大腸がん、乳がん、前立腺がん、膵臓がん、腎臓がん、甲状腺がん、卵巣がん、および胃がん細胞株を移植したヌードマウスモデルに対して強い抗腫瘍効果を示した (Table 2)。0.25 mg/kg の用量で、8 株中 6 株の腫瘍異種移植モデル (A549, HT-29, MDA-MB-231, DU145, CFPAC-1, SK-OV-3) において、統計学的に有意に腫瘍増殖を抑制した ($p < 0.025$)。また 4 mg/kg の用量では、10 株中 6 株の腫瘍異種移植モデル (A549, HT-29, MDA-MB-231, DU145, CFPAC-1, MKN45) において、腫瘍増殖をほぼ完全に抑制し ($T/C < 10\%$)、有意な体重減少は認められなかった。ヒト肺胞基底上皮腺がん細胞株 A549 を移植したヌードマウスモデルに対して、平均腫瘍体積が 430 mm^3 (Table 2 で示した通常の腫瘍異種移植モデルの約 4 倍に相当) まで増殖してから TAK-593 の投与を開始したところ、0.125 mg/kg の用量で T/C 33%、0.25 mg/kg の用量で T/C 16% と腫瘍の増殖を強く阻害し、1.5, 3 mg/kg の用量では腫瘍が退縮した (Fig. 2A)。移植 42 日後に TAK-593 の投与を中止し再増殖してきた腫瘍に対して移植 50 日後から TAK-593 の投与を再開したところ、0.25 mg/kg の用量では腫瘍増殖が静止し、1.5, 3 mg/kg の用量では再度腫瘍が退縮した。また、TAK-593 は 5 週間という長期反復投与時にも忍容性は良好であった。ヒトグリオーマ細胞株 U87MG の頭蓋内異種移植モデルにおいては、TAK-593 は 1, 4 mg/kg の用量を 1 日 2 回経口投与することにより、生存期間の中央値を有意に延長した (Fig. 2B, $p \leq 0.025$)。

Table 2. Anti-tumor efficacy of TAK-593 in subcutaneous xenograft mouse model.

TAK-593 was orally administered at the indicated doses twice daily for 10 to 21 days. Data are shown as T/C ratios (n=5-6).

Type	Cell line	Number of mice	Injected cell number (cells)	Time to establish tumor prior to treatment (days)	Tumor size at start of treatment (mm ³)	Treatment duration (days)	T/C (%)		
							Dose (mg/kg, bid)		
							0.25	1	4
Lung	A549	5	5 x 10 ⁶	13	120	14	34*	8*	-8*
Colon	HT-29	5	5 x 10 ⁶	17	120	14	51*	26*	2*
Breast	MDA-MB-231	5	3 x 10 ⁶	32	120	14	51*	5*	-18*
Prostate	DU145	5	5 x 10 ⁶	20	200	14	43*	13*	-1*
Pancreas	CFPAC-1	5	1.25 x 10 ⁶	15	170	14	32*	-21*	-38*
Renal	RCC-02-JCK	5	tissue fragment	14	170	14	N.D.	53*	23*
Thyroid	TT	6	5 x 10 ⁶	41	120	21	78	48*	20*
Glioblastoma	U87MG	5	5 x 10 ⁶	27	190	14	88	54*	24*
Ovary	SK-OV-3	5	1 x 10 ⁶	56	170	21	53*	37*	24*
Gastric	MKN45	5	3 x 10 ⁶	11	120	10	N.D.	14*	0*

*: p≤0.025 versus the vehicle group by one-tailed Williams' or Shirley-Williams' test. N.D.: not done.

(出典) Awazu et al. *Cancer Sci.*, **104**, 486-494 (2013), Table 2

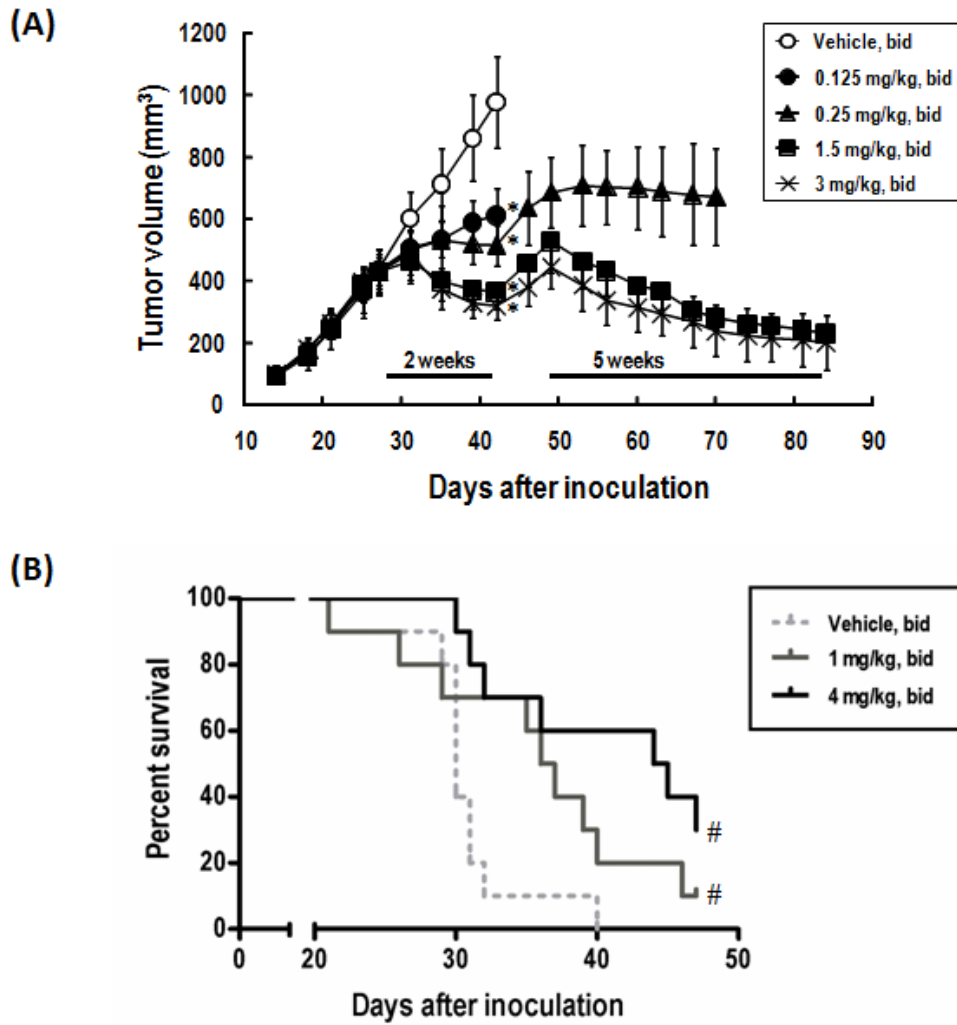


Figure 2. TAK-593 causes tumor regression and prolongs survival in a mouse xenograft model. A, Data represent the mean and SD (n=5). The T/C (%) was calculated relative to the vehicle control group on Day 42. *: $p \leq 0.025$ versus the vehicle control group by one-tailed Williams' test. B, U87 MG human glioblastoma cells were orthotopically implanted into the brains of nude mice. Twice daily oral administration of TAK-593 (1 and 4 mg/kg) or vehicle was initiated at 4 days after inoculation, and the mice were monitored for survival (n=10). #: $p \leq 0.025$ vs. vehicle control by Tarone's test.

(出典) Awazu et al. *Cancer Sci.*, **104**, 486-494 (2013), Figure 2

3. 薬物動態および薬力学的特性

TAK-593 をマウスに 0.125 mg/kg の用量で単回経口投与した時の血中濃度は、投与後 15 分で C_{max} (0.069 $\mu\text{g}/\text{mL}$) に達し、 AUC_{0-24h} は 0.078 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$ であった (Fig. 3A)。1 mg/kg の用量で単回経口投与した時の血中濃度は、投与後 1 時間で C_{max} (0.451 $\mu\text{g}/\text{mL}$) に達し、 AUC_{0-24h} は 0.883 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$ となり、 C_{max} および AUC_{0-24h} は投与量の増加にほぼ比例して増大した。この時の肺組織中濃度も投与後 1 時間で C_{max} (0.242 $\mu\text{g}/\text{mL}$) に達し、 AUC_{0-24h} は 0.556 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$ であった (Fig. 3B)。TAK-593 は吸収およびクリアランスが比較的速いという薬物動態特性を示した。TAK-593 を 1 mg/kg の用量で単回経口投与して 8 時間後には、2/3 例のマウスで血中および肺組織中濃度が検出限界以下であったが (Fig. 3B)、肺組織中の VEGFR2 リン酸化はほぼ完全に抑制されていた (Fig. 3C)。

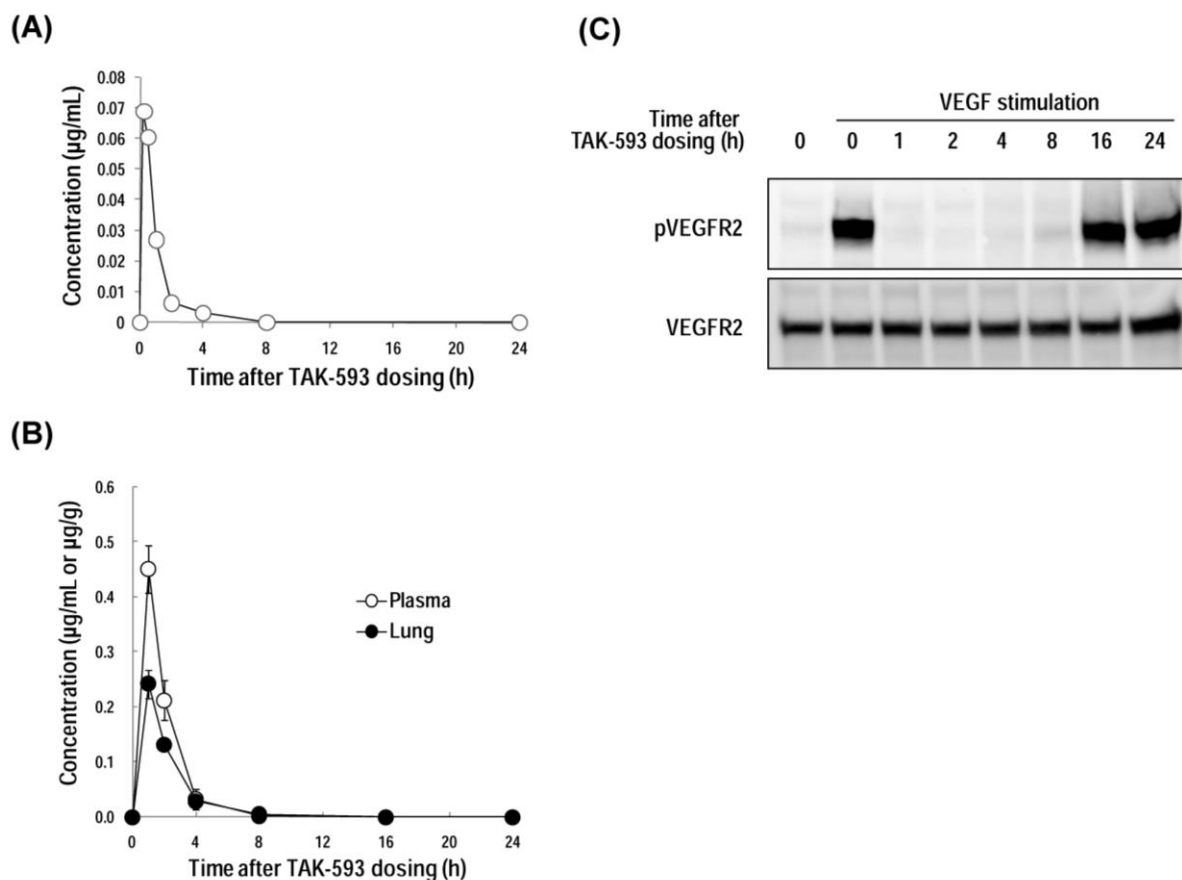


Figure 3. Pharmacodynamic and pharmacokinetic correlation of TAK-593. A, B TAK-593 was orally administered at (A) 0.125 mg/kg and (B) 1 mg/kg. Plasma and lung tissue concentration of TAK-593 were determined by HPLC/MS/MS or HPLC with a fluorescence detector at the indicated times ($n=3$). C, athymic nude mice ($n=3$) were treated with a single oral dose of TAK-593 (1 mg/kg) and the lung tissue was collected at the indicated times after VEGF injection (20 $\mu\text{g}/\text{mouse}$). Tissues were lysed and subjected to western blot analysis for phospho-VEGFR2 and VEGFR2.

(出典) Awazu et al. *Cancer Sci.*, **104**, 486-494 (2013), Figure 3

4. 腫瘍血管新生阻害作用

ヒト肺胞基底上皮腺がん細胞株 A549 を移植したヌードマウスモデルに対し、TAK-593 を 0.25, 1 mg/kg の用量で 1 日 2 回経口投与した。投与開始 3 日後および 7 日後にマウスを屠殺して腫瘍塊を摘出し、腫瘍血管新生、腫瘍細胞の増殖能および腫瘍内アポトーシス細胞について検討した。投与開始 7 日後の T/C 値は 0.25 mg/kg の用量で 49%、1 mg/kg の用量で 17% と高い腫瘍増殖抑制効果を示し (Fig. 4A)、これと一致して、CD31 陽性腫瘍血管の密度は TAK-593 投与量および投与期間依存的に有意に減少した (Fig. 4B)。特に腫瘍血管密度は TAK-593 投与前よりも低下しており、TAK-593 による血管の退縮が観察された。TAK-593 を 1 mg/kg の用量で投与開始して 3 日後には、Ki-67 陽性率 (腫瘍細胞の増殖能) の低下および TUNEL 陽性率 (腫瘍内アポトーシス細胞) の増加が認められ、TAK-593 は担がんマウスにおける A549 腫瘍に対して、細胞増殖抑制効果およびアポトーシス誘導効果を発揮することが確認された (Fig. 4C, D)。

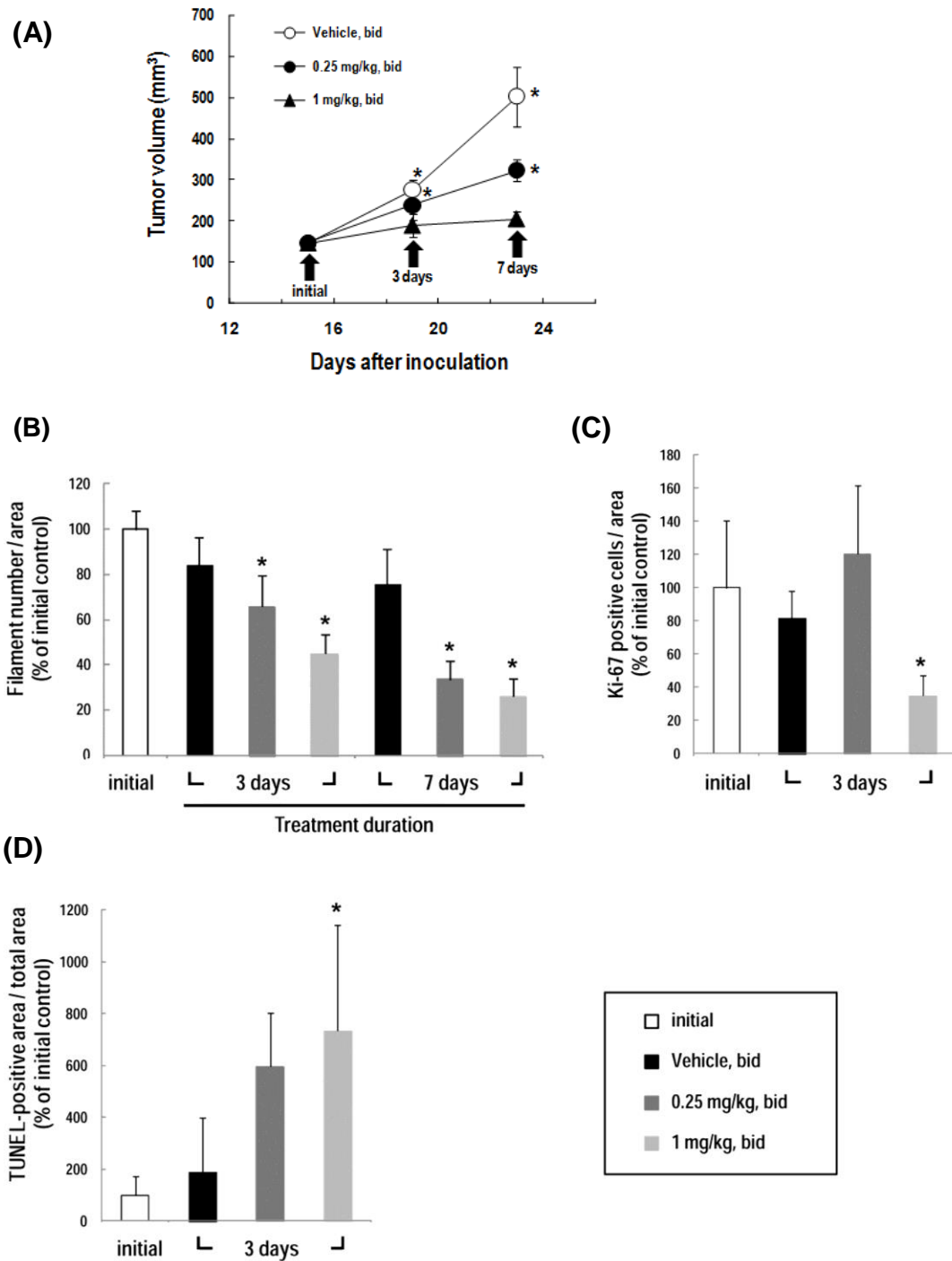


Figure 4. TAK-593 shows anti-angiogenic, anti-proliferative, and pro-apoptotic effect *in vivo*. TAK-593 was orally administered to A549 xenograft mice for up to 7 days and tumors were harvested on Days 3 and 7. A, anti-tumor effect of TAK-593. B, endothelial cells were visualized and quantified by CD31 immunostaining. C, tumor cells were immunostained with anti-Ki67 antibody and proliferative activity was quantified. D, apoptosis of tumor cells was quantified by the TUNEL method. Data represent the mean and SD (n=4). *: $p \leq 0.025$ versus the vehicle control group by the one-tailed Williams' test.

(出典) Awazu et al. *Cancer Sci.*, **104**, 486-494 (2013), Figure 4

5. 壁細胞のリクルートメント阻害作用

腫瘍血管を覆う壁細胞への作用について、免疫組織化学的手法を用いて検討した。ヒト肺胞基底上皮腺がん細胞株 A549 を移植したヌードマウスモデルに対し、TAK-593 を 0.5、1.5 mg/kg の用量で 1 日 1 回経口投与した。投与開始 7 日後の T/C 値は 0.5 mg/kg の用量で 42%、1.5 mg/kg の用量で 18% と強い腫瘍増殖抑制効果を示し、1 日 1 回投与でも効果が認められた。血管内皮細胞および壁細胞はそれぞれマーカーである CD31 および α SMA による蛍光二重免疫染色により検出した[47, 48]。CD31 陽性腫瘍血管への壁細胞のリクルートメントは TAK-593 投与量依存的に有意に減少した (Fig. 5A)。蛍光二重免疫染色の代表的な画像イメージを Fig. 5B に示したように、TAK-593 投与群では溶媒投与群と比較して、壁細胞に支持されない未熟な腫瘍血管は消失し、また、腫瘍血管の周囲を覆う壁細胞の層が比較的薄くなっており、TAK-593 は壁細胞リクルートメントを阻害することで、腫瘍血管構造をより不安定化させると考えられた。

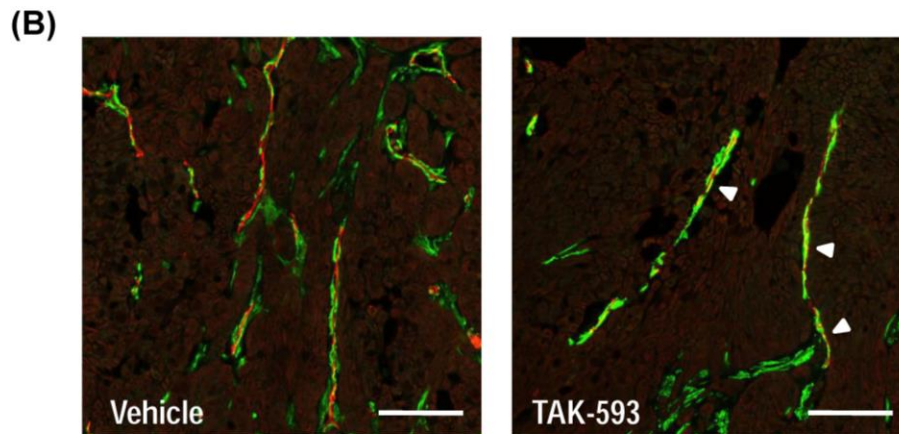
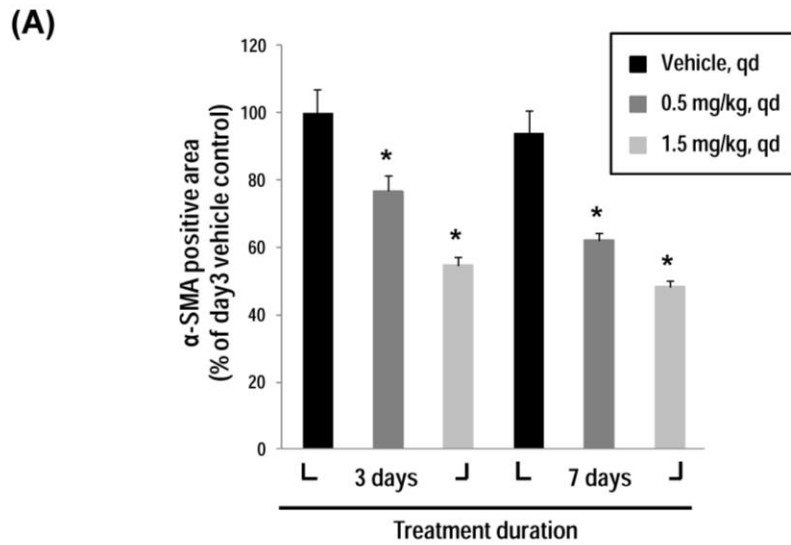


Figure 5. TAK-593 decreases pericyte coverage of vessels. TAK-593 or the vehicle was administered to A549 xenograft mice. A, tumors were resected and processed for immunohistochemical analysis at 4 hours after the last dose. Sections were simultaneously stained for CD31 and α -SMA to detect endothelial cells and pericytes, respectively. The region positive for α -SMA surrounding the CD31-positive vessels was quantified in five randomly selected fields. Data represent the mean and SD (n=3). *: $p \leq 0.025$ versus the vehicle control group by the one-tailed Williams' test. B, representative tumor sections from mice treated with the vehicle or TAK-593 (1.5 mg/kg). White arrowhead in tumors from TAK-593-treated mice indicates the pericyte layer that was substantially thinner than that seen in vehicle-treated tumors. *Bar* = 100 μ m. Red = CD31-positive endothelial cells; Green = α -SMA-positive pericytes

(出典) Awazu et al. *Cancer Sci.*, **104**, 486-494 (2013), Figure 5

6. 腫瘍血管透過性の低下作用

腫瘍血管は脆弱で透過性が亢進しており、抗 VEGF 療法は腫瘍血管を「正常化」することで血管透過性亢進を抑制することが報告されている。ダイナミック造影磁気共鳴画像法 (DCE-MRI) は、抗 VEGF 療法の間接的なバイオマーカーとして用いられる腫瘍血管透過性の変化を非侵襲的に評価することができ[49]、いくつかの抗 VEGF 療法の前臨床および臨床における腫瘍血管応答評価に用いられている[50, 51]。ヒト結腸腺がん細胞株 HT-29 を移植したヌードマウスモデルに対して、TAK-593 を 0.25, 1.5 mg/kg の用量で 1 日 2 回経口投与し、投与開始 3 日後には高用量で腫瘍増殖抑制傾向を認めた (Fig. 6A)。投与開始 4 日目の初回投与 1 時間後に DCE-MRI 画像データを取得し、腫瘍血管透過性を評価した。腫瘍血管透過性の指標である K_{trans} 値は、TAK-593 投与群で、投与前に比べて有意に低下した (Fig. 6B)。Fig. 6C の K_{trans} 値マップに示したように、TAK-593 は腫瘍内の血管透過性亢進を抑制した。

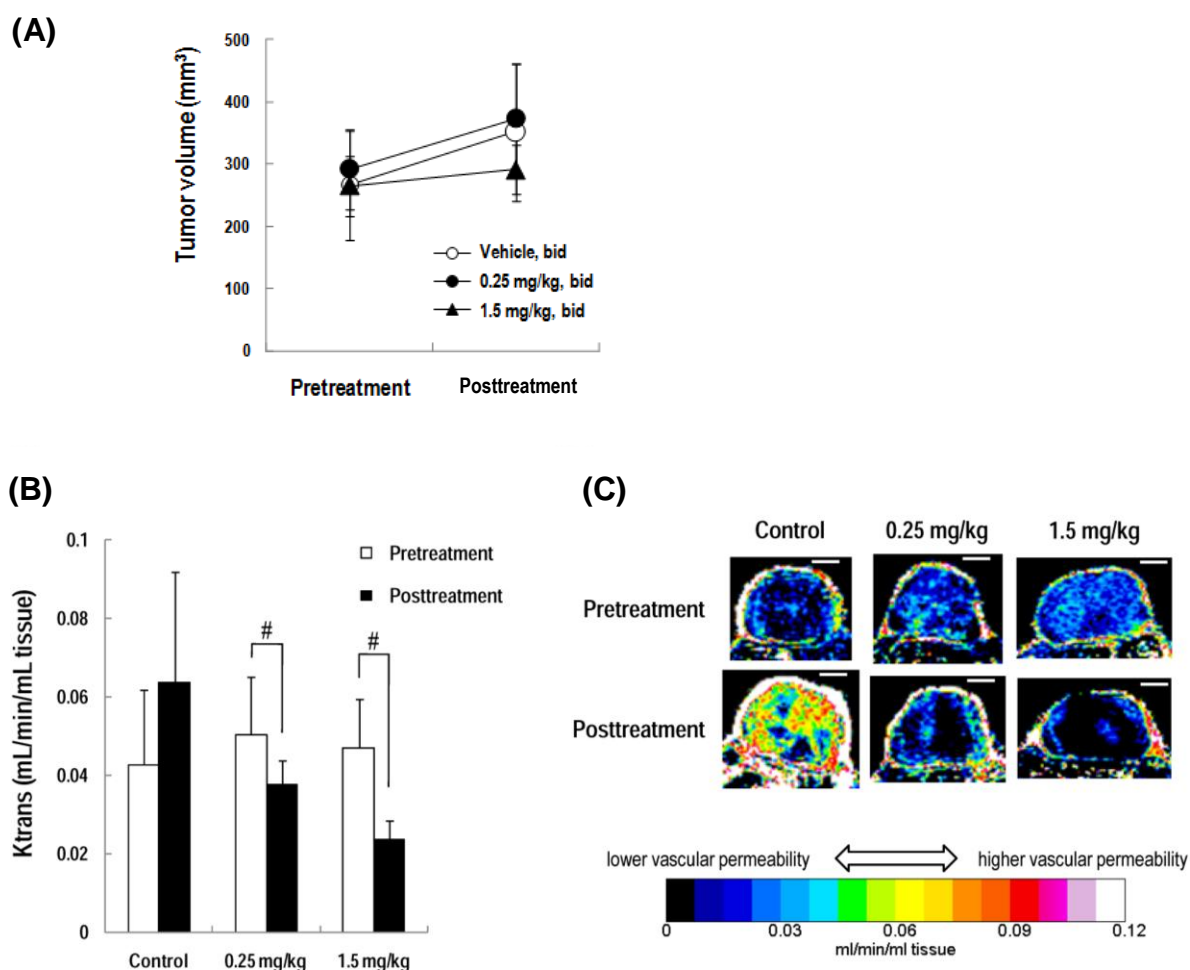


Figure 6. TAK-593 affects tumor vascular permeability on DCE-MRI. TAK-593 or the vehicle was administered for 3 days and once on Day 4 to HT-29 xenograft mice. A, anti-tumor effect of TAK-593. Before and after treatment, Gd-DTPA was injected intravenously and MRI was conducted. K_{trans} values were obtained by calculating the Gd-DTPA concentrations in tumor tissue and plasma on the basis of a two-compartment model (n=6-8 per group). B, K_{trans} values of tumors from vehicle or TAK-593-treated mice. Data represent the mean and SD. #: p ≤ 0.025 versus pretreatment by the one-tailed Shirley-Williams' test. C, representative K_{trans} maps of tumors before and after treatment with TAK-593 or the vehicle. The colored portion of the spectrum map represents higher vascular permeability. Bar = 2 mm.

(出典) Awazu et al. *Cancer Sci.*, **104**, 486-494 (2013), Figure 6

第4節 考察

VEGF-VEGFR 系および PDGF-PDGFR 系が腫瘍血管形成において中心的役割を担っている証拠は多数報告されており、VEGF シグナルを標的とした抗 VEGF 中和抗体のベバシズマブや、VEGF および PDGF シグナルを標的とした低分子阻害薬の Sorafenib や Sunitinib 等が既に承認されている[3, 4, 52, 53]。その一方で、既存薬については治療効果の限界や重篤な副作用の発症リスクも報告されている。そこで著者は、治療効果を最大化しつつ副作用を最小化することを目的とし、VEGFR2 および PDGFR β チロシンキナーゼに対して非常に高活性かつ高選択的な阻害化合物を制がん剤の候補化合物として創製した。化合物最適化の過程において、いくつかの化合物の VEGFR2 および PDGFR β チロシンキナーゼに対する結合メカニズムが two-step slow binding inhibition ("pseudo-irreversible inhibition"として知られる)であることが見出され、標的キナーゼに対する非常に長い滞留時間が強力な細胞活性に寄与すると期待された[35]。最終的に著者は、ATP 競合的に作用する、強力かつ選択的な VEGFR2 および PDGFR β チロシンキナーゼ阻害剤 TAK-593 を選択した[34]。TAK-593 の VEGFR2 および PDGFR β チロシンキナーゼに対する酵素阻害活性 (IC₅₀) はそれぞれ 0.95、13 nmol/L であり、キナーゼ選択性試験の結果、cKit、FGFR1、BRAF に対してそれぞれ IC₅₀ 値として 100、350、8400 nmol/L の酵素阻害活性を示した以外は、EGFR、IGF-1R、Tie-2、cMet、Aurora-A に対する酵素阻害活性 (IC₅₀) は 10,000 nmol/L 以上と高い酵素選択性を示した[35]。こうした TAK-593 の酵素選択性プロファイルは、他社の低分子経口 VEGFR2 阻害薬、例えば Sorafenib (BAY 43-9006)、Cediranib (AZD-2171)、Vandetanib (AZD-6474)、Regorafenib (BAY 73-4506)、XL880、KRN951 および ABT-869 とは大きく異なり、非常に良好であった[54-59]。一般的な低分子キナーゼ阻害薬はキナーゼ領域に存在する ATP 結合ポケットおよびその周辺部位を占有することで阻害作用を示す type 1 阻害薬であるが、ATP 結合ポケットはキナーゼ間での相同性が極めて高いため、キナーゼ選択性を確保することが難しい。また、ATP 濃度が非常に高い細胞内では十分な阻害活性を発揮できない懸念もある。これに対し、TAK-593 は ATP 結合ポケットに加えて、キナーゼのコンフォメーション変化に伴い形成されるバックポケットと呼ばれる奥深くのポケットも併せて占有する type 2 阻害薬である。Type 2 阻害薬はキナーゼ間での相同性が低いバックポケットも占有するためキナーゼ選択性を確保しやすく、TAK-593 の良好な酵素選択性はこうした阻害様式に基づくと考えられる。また、TAK-593 は type 2 阻害薬に特徴的な、標的キナーゼからの解離速度が遅い"pseudo-irreversible"な結合メカニズムを有していた[35]。

細胞ベースのアッセイにおいて、TAK-593 は、HUVEC における VEGF 依存的な増殖および VEGFR2 リン酸化を強力に阻害し、その IC₅₀ 値はそれぞれ 0.30、0.34 nmol/L であった。また、CASMC における PDGF 依存的な増殖および PDGFR β リン酸化も強力に阻害し、その IC₅₀ 値はそれぞれ 3.5、2.1 nmol/L であった。一方、高選択的な酵素阻害プロファイルと一致して、正常線維芽細胞株 MRC-5 および各種がん細胞株に対する増殖阻害作用は非常に弱く、HUVEC の VEGF 依存的な増殖に対する阻害活性に比べて 28,000 倍以上も弱い活性であった。こうした TAK-593 の高活性かつ高選択的な阻害作用には、VEGFR2 および PDGFR β チロシンキナーゼに対する酵素特異性の高さが寄与していると考えられる。

ヒト肺胞基底上皮腺がん細胞株 A549 を移植したヌードマウスモデルに対して、TAK-593 を 1 日 2 回経口投与したところ、0.125 mg/kg の用量で T/C 33% と腫瘍の増殖を強く阻害した。薬物動態解析の結果から、TAK-593 を 0.125 mg/kg の用量でマウスに単回経口投与した時に算出される AUC_{0-24h} 0.078 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$ より換算した 1 日あたりの AUC_{0-24h} は 0.156 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$ であった。また、TAK-593 を 1 mg/kg の用量で 1 日 2 回経口投与した際には腫瘍退縮が認められ、薬物動態解析の結果から、1 mg/kg の用量で単回経口投与した時に算出される AUC_{0-24h} 0.883 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$ より換算した 1 日あたりの AUC_{0-24h} は 1.77 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$ であった。薬物動態・薬力学解析において、TAK-593 を 1 mg/kg の用量で単回経口投与して 8 時間後には、2/3 例のマウスで血中および肺組織中濃度が検出限界以下であったが、肺組織中の VEGFR2 リン酸化はほぼ完全に抑制されており、こうした薬力学的作用の持続性が高い抗腫瘍効果に貢献している可能性がある。こうした持続的な薬力学的作用は、腫瘍増殖の阻害と強い相関を示す腫瘍内 VEGFR2 リン酸化の阻害およびサロゲート組織（肺）内 VEGFR2 リン酸化の阻害に対して十分な血中濃度維持が求められる Sunitinib のような可逆的阻害剤とは異なる[60, 61]。したがって、TAK-593 の VEGFR2 および PDGFR β チロシキナーゼに対する "pseudo-irreversible" な特徴的結合メカニズムがもたらす非常に長い滞留時間は、*in vivo* 抗腫瘍効果の強さに大きく寄与している可能性がある。

また、著者は、非侵襲的な DCE-MRI が TAK-593 の腫瘍血管に対する作用を可視化するのに有用であることを立証した。腫瘍組織の DCE-MRI において、血管に富んだ腫瘍では早期相での Gd-DTPA による増強効果が認められ、血管に乏しい腫瘍あるいは壊死領域では後期相での増強効果が認められるか、あるいは増強効果が認められない。本研究では、Gd-DTPA による増強効果を K_{trans} 値として算出し腫瘍血管透過性について評価したところ、TAK-593 は投与開始初期から Gd-DTPA による増強効果を減弱させ、腫瘍血管透過性を有意に低下させた。したがって、Gd-DTPA による増強効果は TAK-593 の非侵襲性 PD バイオマーカーとして有用である可能性が示唆された。

一般に、腫瘍組織の脈管構造は異常で血管透過性が亢進している一方、その周囲を取り巻く間質は不透過性である[62]。そのため、腫瘍血管から漏出した組織液は間質に蓄積され、腫瘍内の間質液圧は上昇している[63]。また、腫瘍間質内ではコラーゲン線維とがん関連線維芽細胞 (cancer-associated fibroblast: CAF) が密なネットワークを形成しているために、腫瘍内の間質液圧はさらに上昇している。間質液圧の上昇により腫瘍内の経毛細管輸送は妨げられ、薬物の吸収は減少する。逆に、間質液圧が低下すると血液と間質組織液との間の圧力勾配が回復し、腫瘍組織への薬物の取り込み効率が高くなる[64, 65]。ヒト結腸腺がん細胞株 HT-29 を移植したヌードマウスモデルを用いた著者の実験では、TAK-593 同様に、VEGFR2 および PDGFR β チロシキナーゼに対して高活性かつ高選択的な阻害作用を有する comp.20d [66] と塩酸イリノテカン（以下、CPT-11）とを併用投与したところ、単剤投与よりも高い腫瘍増殖抑制効果を認めた。著者はまた、comp.20d が担がん腫瘍の間質液圧を低下させ、CPT-11 の活性代謝物 SN-38 の腫瘍内への取り込みを増加させることも明らかにした[67]。VEGF あるいは VEGFR2 に対する中和抗体処理による VEGF シグナル伝達阻害は、担がんマウスの腫瘍組織で亢進した腫瘍間質液圧を低減させることが報告されている[68, 69]。また、抗 VEGF 中和抗体ベバシズマブを腎細胞がん患者に投与した際にも、腫瘍間質液圧が低減することが報告されている[68, 70]。こうした VEGF シグナル伝達阻害

薬は、腫瘍組織の異常な脈管構造を正常化させることにより血管透過性を低下させ、腫瘍間質液圧を低減させていると考えられている[71, 72]。その一方、PDGFR チロシンキナーゼ阻害薬イマチニブによる PDGF シグナル伝達阻害もまた、担がん腫瘍の間質液圧を低下させることが報告されている[73-75]。イマチニブは、併用する化学療法薬が腫瘍内へ選択的に多く取り込まれることで、より強力な抗腫瘍効果を示す[74, 75]。このことは、PDGF シグナルが、腫瘍間質内で活性化された線維芽細胞 (CAF) や過剰に産生された細胞外マトリックスに作用している可能性を示唆している。そのため、comp.20d のような VEGF および PDGF シグナルの双方を阻害する二重チロシンキナーゼ阻害薬は腫瘍内の血管を正常化させ、加えて CAF の活性化を抑制することで、腫瘍間質液圧を低減させ、併用する薬物の腫瘍内への取り込みを増加させることにより抗腫瘍効果を増強していると考えられる。同様の効果は TAK-593 にも期待できる。

結論として、TAK-593 は VEGF および PDGF シグナルの強力な阻害薬であり、腫瘍増殖や血管新生に対する強い阻害活性は著しい腫瘍退縮をもたらし、忍容性も良好であった。以上の結果に基づき、TAK-593 は固形腫瘍に対する新しい治療薬として有用である可能性が示唆された。

第2章

新規 VEGFR/c-Met チロシンキナーゼ阻害薬 T-1840383 の薬効薬理研究

第1節 緒言

前章で述べたように、VEGF/VEGFR2 シグナルはがん治療の標的分子として非常に魅力的であり、VEGF シグナル伝達阻害薬の臨床的有用性については既に立証されている[3, 4, 52,53]。また、HGF/c-Met シグナル伝達軸の調節不全は、幅広い種類のがんにおいて腫瘍発生および転移に関係していることが報告されており[25, 26]、c-Met および VEGF シグナルの二重阻害薬はより広範かつ強力な抗腫瘍効果を発揮すると期待される[76]。前章で取り上げた TAK-593 を創製する過程で合成された化合物群の中に、c-Met および VEGFR2 チロシンキナーゼに対して非常に高活性な阻害化合物が見出された。化合物の最適化の結果、最終的に著者は、c-Met および VEGFR2 に対して選択的に作用する ATP 拮抗型のマルチキナーゼ阻害薬 T-1840383 に到達した[36]。本研究では、T-1840383 の *in vitro* および *in vivo* での薬効薬理作用について検討した結果、c-Met および VEGF シグナルを同時に標的とする T-1840383 は、多様な腫瘍に対する新しい治療薬として有用である可能性が示唆されたので報告する。

第2節 実験材料と方法

1. 使用薬物

T-1840383、N-[4-({2-[(cyclopropylcarbonyl)amino]imidazo[1,2-a]pyridin-6-yl}oxy)-3-fluorophenyl]-6-methyl-2-oxo-1-phenyl-1,2-dihydropyridine-3-carboxamide hydrochloride は武田薬品工業株式会社 医薬研究本部にて合成された[36]。*In vitro* 試験に際しては、T-1840383 はジメチルスルホキシドに溶解し 10 mmol/L ストック溶液を作製した。*In vivo* 試験に際しては、T-1840383 は 0.5% メチルセルロース溶液に懸濁し 10 mL/kg の容量で投薬した。

2. キナーゼ阻害試験

c-Met, VEGFRs, Tie-2, Flt-3 に対するチロシンキナーゼ阻害活性は AlphaScreen 法 (PerkinElmer) を用いて測定した。キナーゼ選択性の評価には、KinaseProfiler (Millipore) パネルに含まれる 256 キナーゼに対する阻害率を濃度 1 μM で測定した後に、阻害活性の認められた 66 キナーゼに対する IC_{50} 値を KinaseProfiler IC_{50} Express (Millipore) により測定した。

3. 細胞株

ヒト胃がん細胞株 (GSU, Kato III, KE-97, MKN45, NUGC-4) は理研バイオリソースセンターセルバンクより入手した。ヒト胃がん細胞株 (SNU-484, SNU-620, SNU-638, SNU-668) は韓国細胞株バンク (Korean Cell Line Bank: KCLB) より購入した。ヒト肺扁平上皮がん細胞株 EBC-1 お

よびヒト膀胱がん細胞株 SUIT-2 はヒューマンサイエンス研究資源バンク (Health Science Research Resources Bank: HSRRB) より供与いただいた。ヒト食道腺がん細胞株 OE33 は ECACC より購入した。HUVEC および NHDF は Cambrex 社より入手した。その他細胞株は ATCC より購入した。

4. *In vitro* 管腔形成試験

HUVEC と NHDF の共培養系モデルを用いた。T-1840383 およびヒト組換え VEGF-A 存在下で7日間共培養した後に、マウス抗ヒト CD31 抗体 (R&D systems) および Alexa Fluor 488 標識二次抗体 (Invitrogen) を用いて HUVEC が形成した管腔を染色し、Discovery-1 high content imaging system (Molecular Devices) により可視化した。管腔長および分岐点数は画像解析ソフトウェア Metamorph (Molecular Devices) を用いて定量化した。

5. 細胞散乱試験および E-カドヘリン発現解析試験

Poly-L-lysine でコーティングしたガラスボトムディッシュにヒト肺胞基底上皮腺がん細胞株 A549 を播いて5日間培養し、細胞コロニーを形成させた。T-1840383 で1時間前処理した後に、低酸素環境下 (3% O₂) において、ヒト組換え HGF 50 ng/mL (R&D Systems) 存在下で48時間培養し、細胞散乱を刺激した。細胞は Diff-Quik 染色液 (Sysmex) を使用して染色した。E-カドヘリンの発現解析には、細胞を4%パラホルムアルデヒドで固定した後に、抗 E-カドヘリン抗体および Alexa Fluor 488 標識二次抗体を用いて蛍光免疫染色した。核酸はヨウ化プロピジウムで染色した。

6. マトリゲル浸潤試験

細胞浸潤はマトリゲル細胞浸潤チャンバー (BD Bioscience) を用いて評価した。A549 細胞あるいは SUIT-2 細胞を上部チャンバーに添加し、T-1840383 は上下チャンバーに添加した。下部チャンバーに HGF を 50 ng/mL の濃度で添加して72時間培養した。上部チャンバー内の浸潤していない細胞は綿棒で除去し、下部チャンバーに浸潤した細胞を Diff-Quik 染色液で染色した。細胞数は画像解析ソフトウェア WinROOF を用いて測定した。

7. 細胞増殖試験

HUVEC は T-1840383 およびヒト組換え VEGF (R&D Systems) 存在下で5日間培養した。ヒトがん細胞株は T-1840383 で処理し、3日間培養した。培養後は Cell Counting Kit-8 (同仁化学研究所) を用いて生細胞数を測定した。IC₅₀ 値は統計解析ソフト SAS の NLIN プロシジャ (version 5.0; SAS Institute Japan) による線形最小二乗法で求めた用量反応曲線を用いて算出した。

8. キナーゼリン酸化試験

A549 細胞と HUVEC は血清飢餓条件下、T-1840383 で1時間前処理した後に、ヒト組換え HGF (50 ng/mL) あるいはヒト組換え VEGF (100 ng/mL) でそれぞれ10分間あるいは5分間刺激し、RIPA buffer で溶解した。腫瘍組織は RIPA buffer 中でホモジナイズ、可溶化した。溶解液中のタンパク質は抗 Phospho-Tyr^{1234/1235}-c-Met 抗体 (Cell Signaling Technology)、抗 c-Met 抗体 (Cell Signaling

Technology)、抗 Phospho-Tyr⁹⁵¹-VEGFR2 抗体 (Cell Signaling Technology)、および抗 VEGFR2 抗体 (Cell Signaling Technology) を用いてウェスタンブロットで検出した。検出したシグナルは LAS ルミノイメージアナライザーおよび画像解析ソフトウェア Multi gauge ver.3.3 (FUJIFILM) を用いて可視定量化した。

9. 腫瘍異種移植モデル

全ての実験操作は社内実験動物委員会の認可のもと、社内規定に準じて実施された。胸腺欠損ヌードマウス (BALB/cA Jcl-nu/nu) は日本クレアより購入した。動物は滅菌済みの餌と水道水を自由に摂取させ、12時間の明暗周期で飼育された。マウスは実験開始前に少なくとも一週間馴化された。がん細胞はマウスの後側腹部皮下に移植した。腫瘍生着を認めたら、T-1840383 あるいは溶媒を1日1回マウスに経口投与した。治療効果は、少なくとも週に2回ノギスで腫瘍の直径 (L) と短径 (W) を測定し、腫瘍体積 (mm³) =L x W² x 1/2 の公式にて算出することで評価した。抗腫瘍活性の強さは T/C 値 (T-1840383 投与群 (treated) と溶媒投与群 (control) の平均腫瘍体積増加比率) を指標とした。腫瘍サイズの測定と同時に体重も測定した。T-1840383 投与群の統計的有意性は、統計解析ソフト SAS を用いた William 検定 (有意水準片側 2.5%) により評価した。

腹膜播種モデルマウスの作製には、ルシフェラーゼ遺伝子を安定導入した NUGC-4 細胞 (NUGC-4-luc 細胞) を 1×10^6 個調整し、マウス腹腔内に注射した。接種2週間後から、T-1840383 (5 mg/kg) あるいは溶媒を1日1回、週に5日間マウスに経口投与した。基質である D-ルシフェリン (1.5 mg/kg) を腹腔内に注射し、10分後に放出される生物発光シグナル (photons/s) を検出して腫瘍の成長をモニターした。瀕死状態のマウスには安楽死処置を施した。T-1840383 投与群の統計的有意性は統計解析ソフト GraphPad Prism を用いて生存曲線を作成し、ログランク (log-rank) 検定により評価した。

10. 免疫組織化学的検査

A549 細胞をヌードマウスに皮下移植したモデルに対し、T-1840383 を3日間経口投与した。摘出した腫瘍はパラホルムアルデヒドによる固定を施し、パラフィン包埋切片を作製した。腫瘍血管新生は一次抗体として抗 CD31 抗体 (Spring Bioscience) を、発色基質としてジアミノベンジジン (3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride: DAB) を使用した免疫ペルオキシダーゼ法を用いて切片を染色した。腫瘍細胞の増殖能は抗 Ki-67 抗体 (DAKO) を用いて検討した。腫瘍内アポトーシス細胞は TUNEL 法に基づき、ApopTag Peroxidase *In Situ* Apoptosis Detection Kit (Millipore) により検出した。全ての染色標本はバーチャルスライドスキャナ NanoZoomer Digital Pathology (浜松ホトニクス) でスキャンし、各標本 4-5 視野を無作為に選択して画像解析ソフトウェア WinROOF (三谷商事) で測定した。

第3節 結果

1. c-Met および VEGFR チロシンキナーゼに対する阻害作用

プロテインキナーゼおよび脂質キナーゼパネルを用いて、T-1840383 のキナーゼ選択性をプロファイリングした (Table 1)。T-1840383 は c-Met チロシンキナーゼを強力に阻害し、その IC₅₀ 値は 1.9 nmol/L であった。また、T-1840383 は VEGFR チロシンキナーゼ、VEGFR-1、-2 および 3 に対して、それぞれ IC₅₀ 値 7.7、2.2、5.5 nmol/L の酵素阻害活性を示した。T-1840383 の化学構造 (Fig. 1A) は、第一章で取り上げた TAK-593 を除けば、他の VEGFR あるいは c-Met チロシンキナーゼ選択的な阻害剤とはほとんど共通点がない。T-1840383 は c-Mer、Ret、Ron、Rse、Tie-2、TrkA および変異型 Abl、c-Kit、fibroblast growth factor receptors 2 (FGFR2)、platelet-derived growth factor receptors α (PDGFR α) に対して、c-Met および VEGFRs と同様の酵素阻害活性を示した。

Table 1. Inhibitory activities of T-1840383 against 72 kinases

Kinase	IC ₅₀ (nmol/L)	Kinase	IC ₅₀ (nmol/L)	Kinase	IC ₅₀ (nmol/L)
Abl (H396P)	2.8	EphB1	13	Mnk2	100
Abl (M351T)	1	EphB2	19	MuSK	51
Abl (Q252H)	4.9	EphB4	79	PDGFR α (D842V)	3
Abl	13	Fer	110	PDGFR α	270
Abl(T315I)	1.6	FGFR1	370	PDGFR α (V561D)	2
Arg	26	FGFR2	270	PDGFR β	290
Aurora-B	210	FGFR2(N549H)	5.6	PTK5	93
Axl	19	Fgr	81	Pyk2	590
Bmx	110	Flt3 ^a	19	Ret (V804L)	58
BRK	100	Fms	11	Ret	2
c-Kit(D816H)	200	Fms(Y969C)	36	Ret (V804M)	160
c-Kit	2,300	Fyn	180	Ron	3
c-Kit(V560G)	2.7	Hck	34	Rse	2
c-Kit(V654A)	1,100	IKK β	110	SIK	290
c-Mer	<1	IR	1,400	Tie2 ^a	1.2
c-RAF	100	IRAK1	870	Tie2 (R849W)	10
DDR2	120	Itk	93	Tie2 (Y897S)	14
EphA1	40	Lck	11	TrkA	4
EphA2	12	LIMK1	160	TrkB	10
EphA3	96	LOK	11	Txk	37
EphA4	76	Lyn	65	VEGFR1 ^a	7.7
EphA5	17	MELK	540	VEGFR2 ^a	2.2
EphA7	120	Met ^a	1.9	VEGFR3 ^a	5.5
EphA8	26	MLK1	43	Yes	73

^aFor these 6 kinases, the IC₅₀ values were determined by the AlphaScreen assay. For others, the IC₅₀ values were determined using KinaseProfiler IC₅₀ Express (Millipore).

(出典) Awazu et al. *Mol. Cancer Ther.*, **12**, 913-924 (2013), Table 1

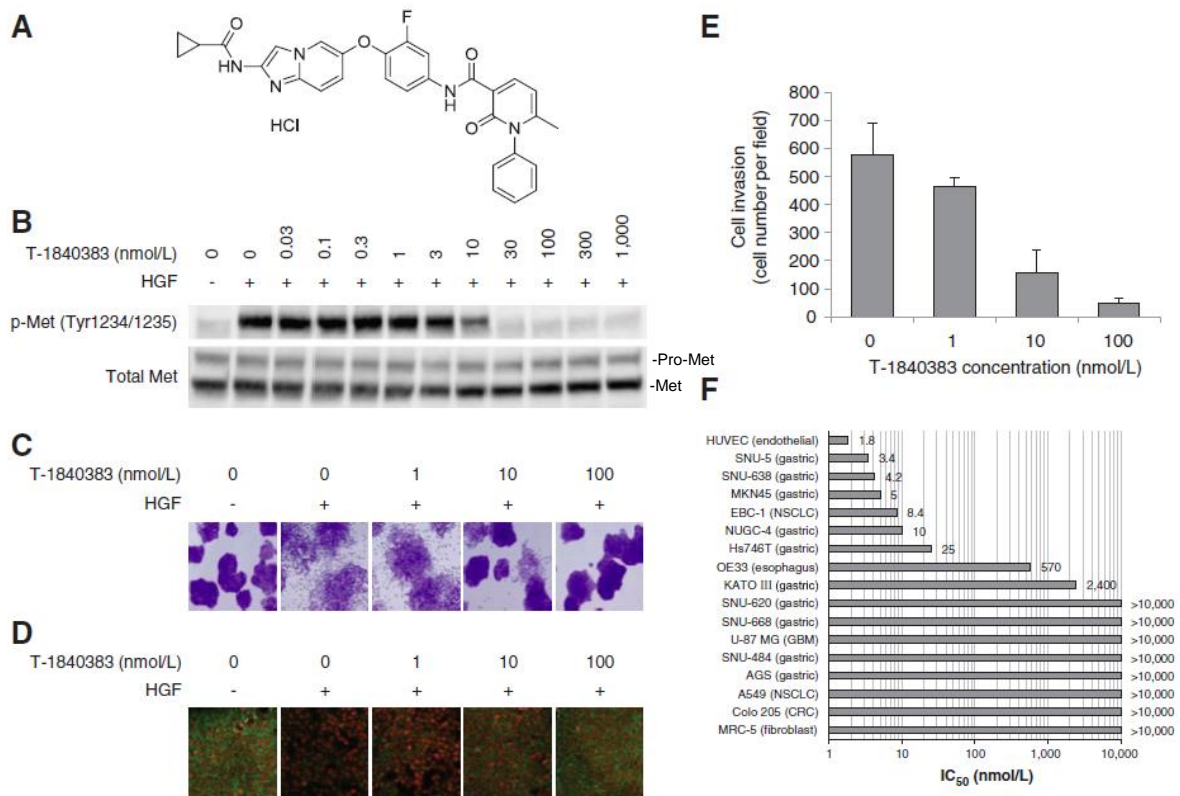


Figure 1. T-1840383 inhibits HGF-induced c-Met phosphorylation, cell scattering, and invasion. A, chemical structure of T-1840383. B, A549 cells were treated with T-1840383 for 1 hour before HGF stimulation. c-Met phosphorylation (p-Met) levels were determined by Western blotting. Total c-Met levels are shown as a loading control. Western blot analysis was done in quadruplicate with very similar results. C, T-1840383 was added to the cell culture before HGF stimulation. Scattering-stimulated cells were then stained with a Diff-Quik staining kit. Magnification, x100. D, scattering-stimulated cells were subjected to immunofluorescence stain for E-cadherin expression (green) and nuclear stain with propidium iodide (red). Magnification, x400. E, cell invasion was assessed using a Matrigel invasion chamber for 72 hours under mild hypoxia (3% O₂). The invading cells were stained with a Diff-Quik staining kit and quantified. Columns, mean (n=4); bars, SD. F, cell viabilities were determined in appropriate media containing various concentrations of T-1840383. Shown are the mean of the IC₅₀ values (n=2-6). Rows labeled as ">10,000" indicate that the IC₅₀ values are more than 10,000 nmol/L.

(出典) Awazu et al. *Mol. Cancer Ther.*, **12**, 913-924 (2013), Figure 1

2. 細胞に対する *in vitro* 作用

T-1840383 は、A549 細胞の HGF 刺激による c-Met 受容体リン酸化を IC₅₀ 値として 8.8 nmol/L で強力に阻害し (Fig. 1B)、HGF 刺激による A549 細胞分散も阻害した (Fig. 1C)。HGF/c-Met シグナルは、E-カドヘリンのエンドサイトーシスにより、細胞接着構造である接着結合を不安定化させることが報告されている[77]。T-1840383 は HGF シグナルによる E-カドヘリン発現低下の抑制を介して、A549 細胞分散に対する阻害効果を示したと考えられる (Fig. 1D)。T-1840383 はまた、マトリゲル浸潤試験における A549 細胞のマトリゲル浸潤も抑制した (Fig. 1E)。

T-1840383 の HUVEC および各種ヒトがん細胞株に対する殖阻害活性は、IC₅₀ 値として 1.8 nmol/L から >10,000 nmol/L と多様であった (Fig. 1F)。HUVEC を除くと、T-1840383 に対して感受性であった細胞株 (IC₅₀ 値 ≤ 25 nmol/L; ヒト胃がん細胞株 SNU-5、SNU-638、MKN45、NUGC-4、Hs746T、およびヒト肺扁平上皮がん細胞株 EBC-1) では c-Met が恒常的に過剰発現していた。これら細胞株では *MET* 遺伝子増幅が見つかっており [27, 28, 78, 79]、c-Met の恒常的活性化は *MET* 遺伝子増幅により引き起こされていると考えられる。MKN45 細胞においては、T-1840383 が c-Met およびその下流の ERK1/2 ならびに AKT の活性化を濃度依存的に抑制した。対照的に、ヒト食道腺がん細胞株 OE33、ヒト胃がん細胞株 Kato III および SNU-620 は c-Met が恒常的に活性化しているにも関わらず、T-1840383 に対して低感受性であった。その他、T-1840383 に対して非感受性であった細胞株 (IC₅₀ 値 > 10,000 nmol/L) においては c-Met の恒常的活性化は認められなかった。以上の結果は、c-Met の恒常的活性化が T-1840383 に対するがん細胞株の *in vitro* での感受性予測因子として必要であるが十分ではないことを示唆している。

また、T-1840383 は、HUVEC の VEGF 誘発による受容体リン酸化を IC₅₀ 値として 0.86 nmol/L で強力に阻害し (Fig. 2A)、VEGFR2 の下流に位置する ERK1/2 および AKT の活性も濃度依存的に阻害した。T-1840383 は VEGF 依存的な HUVEC の増殖を抑制し、その IC₅₀ 値は 1.8 nmol/L であった。さらに、T-1840383 は、*in vitro* で血管新生を模倣する、HUVEC の VEGF 誘発管腔形成も強力に阻害し (Fig. 2B)、管腔長および分岐点数の有意な減少が認められた (IC₅₀ 値はそれぞれ 12, 8.3 nmol/L, Fig. 2C)。

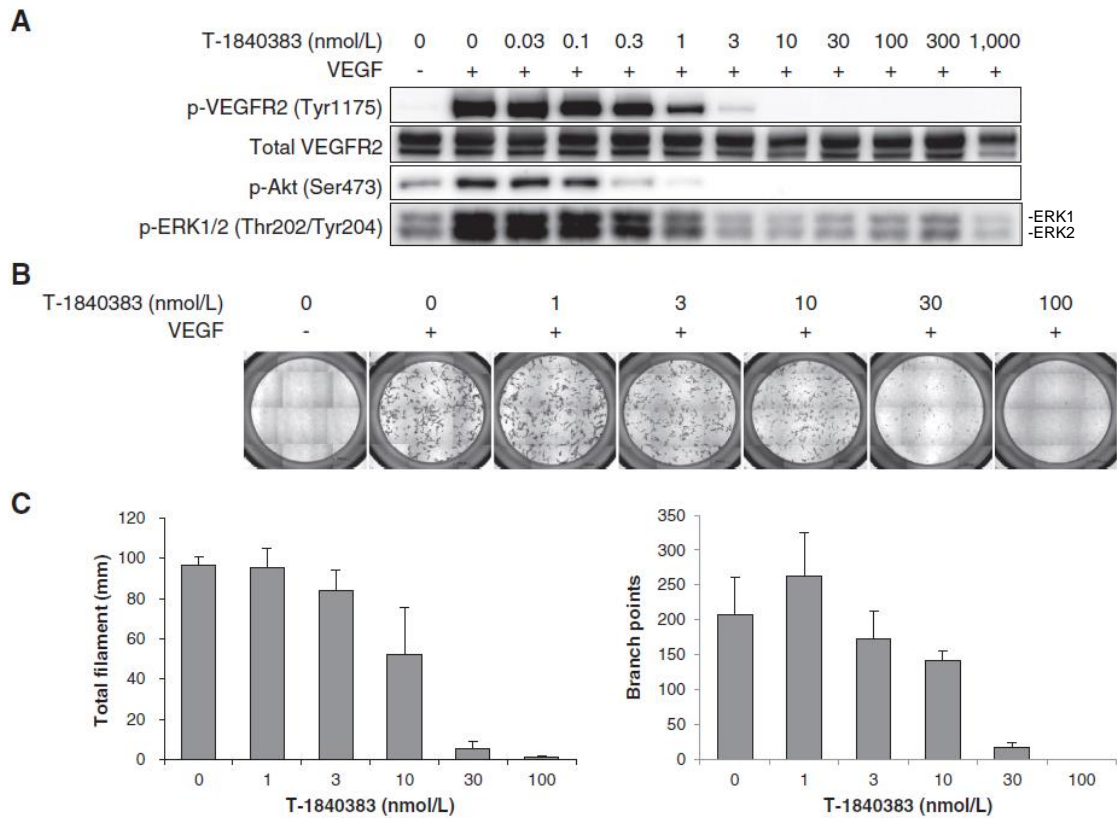


Figure 2. T-1840383 inhibits VEGFR-2 phosphorylation and VEGF signaling in HUVECs. A, HUVECs were treated with T-1840383 at the indicated concentration for 1 hour. Phosphorylation of VEGFR2 (Tyr1175), Akt (Ser473), and ERK1/2 (Thr202/Tyr204) following VEGF stimulation was analyzed by Western blotting. Western blotting was done in quadruplicate with very similar results. B, HUVECs were cocultured with fibroblasts. T-1840383 was added to the medium followed by VEGF stimulation. Shown are representative images after endothelial cell-specific staining ($n=4$). C, total filament length and number of branch points of the stained tube-like structures were measured using image analysis software in 4 to 10 different fields for each condition. Columns, mean; bars, SD.

(出典) Awazu et al. *Mol. Cancer Ther.*, **12**, 913-924 (2013), Figure 2

3. 腫瘍異種移植モデルに対する抗腫瘍活性

T-1840383 の *in vivo* での活性を評価するため、ヒト胃癌細胞株 MKN45 を移植したヌードマウスモデルに対して T-1840383 を経口単回投与し、腫瘍内の c-Met リン酸化状態を経時的に調べた。T-1840383 を 2 mg/kg の用量で投与して 2 時間後から 8 時間後まで、腫瘍内の c-Met リン酸化は十分に抑制されており、投与 24 時間後に回復した (Fig. 3A)。また、T-1840383 を投与して 4 時間後の時点では、c-Met およびその下流の ERK1/2 ならびに AKT のリン酸化が用量依存的に抑制されていた (Fig. 3B)。薬物動態解析の結果から、T-1840383 を単回経口投与した時の血中濃度は投与量の増加にほぼ比例して増大しており (1-20 mg/kg の用量範囲)、腫瘍内濃度は血中濃度に比べて低かったが、比較的持続していた。T-1840383 を単回経口投与した時の腫瘍内最高濃度到達時間 (Tmax) は 2 時間~8 時間で、腫瘍内濃度と c-Met リン酸化状態の経時変化はよく相関していた (Fig. 3A)。

MKN45 を移植したヌードマウスモデルに対し、T-1840383 を 1 日 1 回経口投与した。投与開始 2 週間後の T/C 値は 0.5 mg/kg の用量で 57%、1.5 mg/kg の用量で 30%、5 mg/kg の用量で 4% と腫瘍の増殖を用量依存的に強く阻害し、15 mg/kg の用量では腫瘍が退縮した (Fig. 3C)。また、c-Met が恒常的に活性化し、T-1840383 に対して *in vitro* で感受性を示したヒト肺扁平上皮がん細胞株 EBC-1、c-Met の恒常的活性化は認められず、T-1840383 に対して *in vitro* で耐性を示したヒト大腸がん細胞株 COLO 205 ならびに、HGF および c-Met を共に発現し、HGF/c-Met オートクライン機構が *in vitro* 細胞増殖と *in vivo* 腫瘍増殖に寄与することが報告されているヒトグリオーマ細胞株 U87MG [80] を移植した各ヌードマウスモデルに対しても、T-1840383 の抗腫瘍活性を検討した。T-1840383 は、c-Met 依存的な EBC-1 および U87MG ヌードマウス皮下移植モデルに対して、強い抗腫瘍効果を示した (Fig. 3D, E)。また、c-Met 非依存的な COLO205 ヌードマウス皮下移植モデルに対しても、c-Met 依存的なモデルに比べて活性はやや減弱するものの、T-1840383 は抗腫瘍効果を発揮した (Fig. 3F)。EBC-1 ヌードマウス皮下移植モデルにおいて、T-1840383 15 mg/kg 投与群で、わずかながら統計学的に有意な体重減少が認められた (溶媒投与群で体重が 7.9% 増加したのに対し、T-1840383 投与群では 2.3% 減少した)。しかしながら有効用量においては、T-1840383 は全ての皮下腫瘍異種移植モデルのマウスで良好な忍容性を示した。

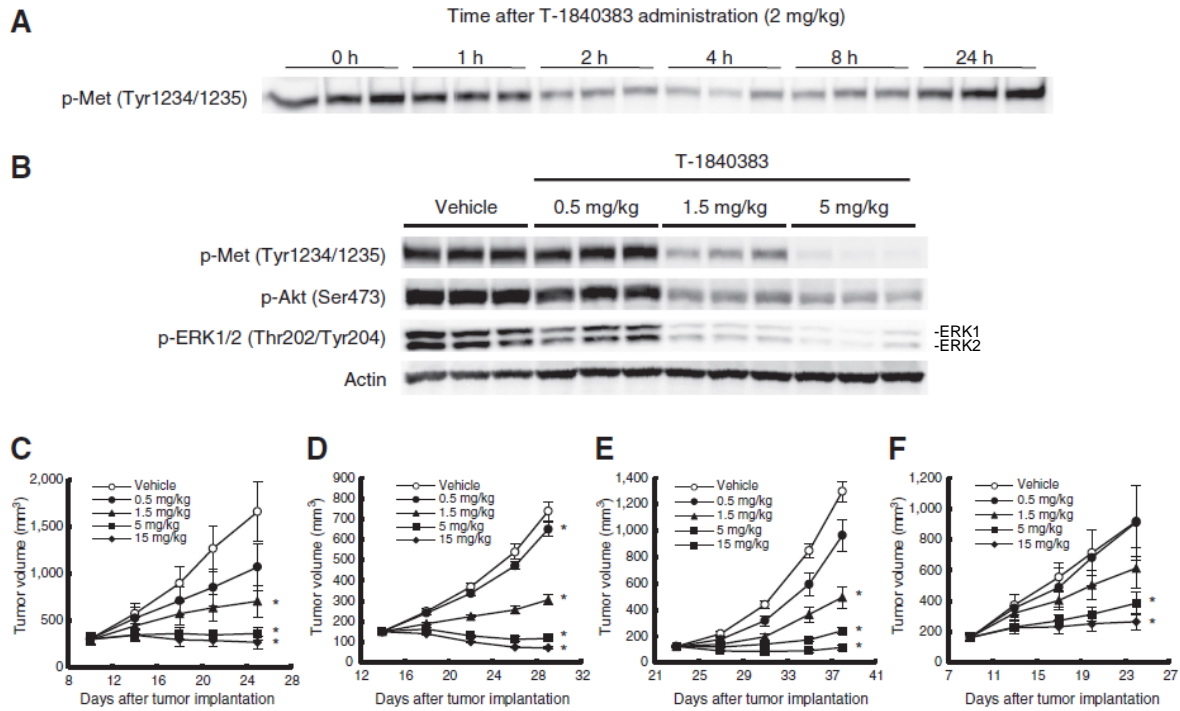


Figure 3. *In vivo* inhibition by T-1840383 of c-Met downstream signaling pathways and antitumor efficacy of T-1840383 in tumor xenograft models. A, mice bearing MKN45 tumors were administered a single oral dose of T-1840383 (2 mg/kg). At the indicated time points after administration, the tumors were collected and homogenized. c-Met phosphorylation was determined by Western blotting. B, c-Met signaling in MKN45 tumors from mice that had been received a single oral dose of T01840383 or vehicle was analyzed by Western blotting. Mice bearing MKN45 (C), EBC-1 (D), U-87MG (E), or COLO205 (F) tumors were orally administered T-1840383 once daily at the indicated dose levels or vehicle alone for 2 weeks. Data represent the mean \pm SEM for each group over the treatment period ($n=5$ or 6). *, $P \leq 0.025$ versus the vehicle control group by the one-tailed Williams test.

(出典) Awazu et al. *Mol. Cancer Ther.*, **12**, 913-924 (2013), Figure 3

4. 腫瘍血管新生阻害作用

c-Met 非依存的な腫瘍異種移植モデルにおける T-1840383 の抗腫瘍メカニズムについて明らかにするため、腫瘍血管新生に対する作用について解析した。T-1840383 に対して *in vitro* で耐性を示したヒト肺胞基底上皮腺がん細胞株 A549 を移植したヌードマウスモデルを用いて、腫瘍血管新生阻害作用について検討した。T-1840383 は 0.5, 1.5, 5 mg/kg の用量で 1 日 1 回経口投与した。投与開始 3 日後の T/C 値は 0.5 mg/kg の用量で 64%、1.5 mg/kg の用量で 51%、5 mg/kg の用量で 35% と高い腫瘍増殖抑制効果を示した (Fig. 4A)。これと一致して、CD31 陽性腫瘍血管の密度は T-1840383 投与量依存的に有意に減少した (Fig. 4B)。同様に、T-1840383 を投与開始して 3 日後には、Ki-67 陽性率 (腫瘍細胞の増殖能) の低下傾向ならびに TUNEL 陽性率 (腫瘍内アポトーシス細胞) の有意な増加が認められた (Fig. 4C, D)。以上の結果は、c-Met および VEGFR2 シグナル経路を阻害することによる腫瘍血管新生抑制が、c-Met 非依存的な *in vivo* 腫瘍増殖に対する T-1840383 の抗腫瘍メカニズムの一つであることを示唆している。

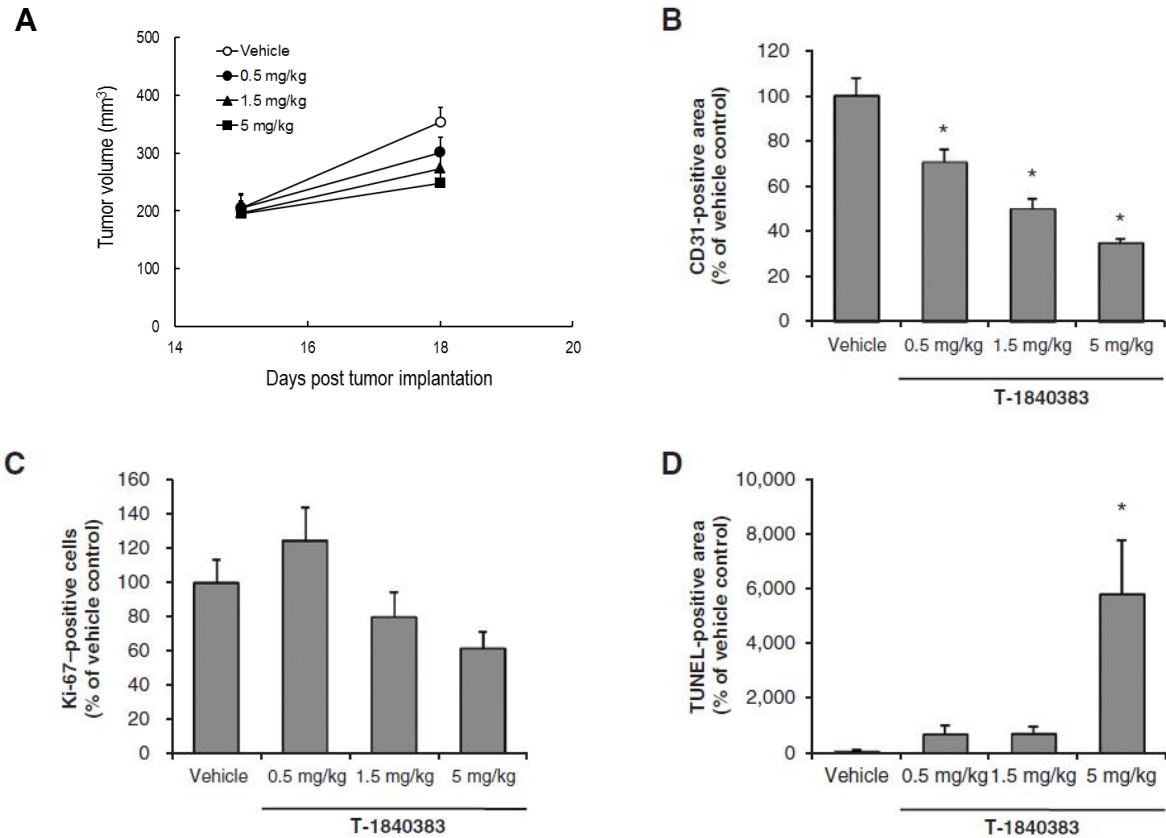


Figure 4. Effects of T-1840383 on tumor microvessel density, tumor cell proliferation, and tumor cell apoptosis in A549 tumors. mice bearing A549 tumors were treated with T-1840383 at 0.5, 1.5, and 5 mg/kg/day or vehicle for 3 days. Tumors were fixed, paraffin-embedded, sectioned, and immunostained for CD31. A, anti-tumor effect of T-1840383. B, quantitative analysis of CD31-positive endothelial cells were conducted. C, tumor specimens were immunostained with anti-Ki67 antibody, and Ki67-positive, proliferating cells were quantified. D, apoptotic tumor cells were visualized and quantified by TUNEL assay. Column, mean ($n=4$ or 5); bars, SEM. * $P \leq 0.025$ versus the vehicle control group by the one-tailed Williams test.

(出典) Awazu et al. *Mol. Cancer Ther.*, **12**, 913-924 (2013), Figure 4

5. マウス胃がん腹膜播種モデルに対する抗腫瘍活性

c-Met 依存的なヒト胃がん細胞株 NUGC-4-luc 細胞をマウス腹腔内に接種して作成した腹膜播種モデルに対する T-1840383 の抗腫瘍効果について検討した。腫瘍増殖は、NUGC-4-luc 細胞由来の生物発光シグナルにより非侵襲的にモニターした。Fig. 5A, B に示すように、溶媒投与群においては移植 14 日後から 41 日後にかけて腫瘍量は顕著に増加していた ($1.26 \times 10^7/s$ vs. $3.63 \times 10^7/s$, $p < 0.01$)。一方、T-1840383 投与群においては統計的に有意な腫瘍量の増加は認められなかった ($1.30 \times 10^7/s$ vs. $2.02 \times 10^7/s$)。また、T-1840383 投与群では生存期間が有意に延長した (Fig. 5C, 生存期間の中央値: 46.5 日 vs. 108.5 日, $p < 0.01$)。溶媒投与群において、生物発光シグナルを検出する限りは腫瘍生着が認められず、生存期間も例外的に長いマウスが 1 例認められた。

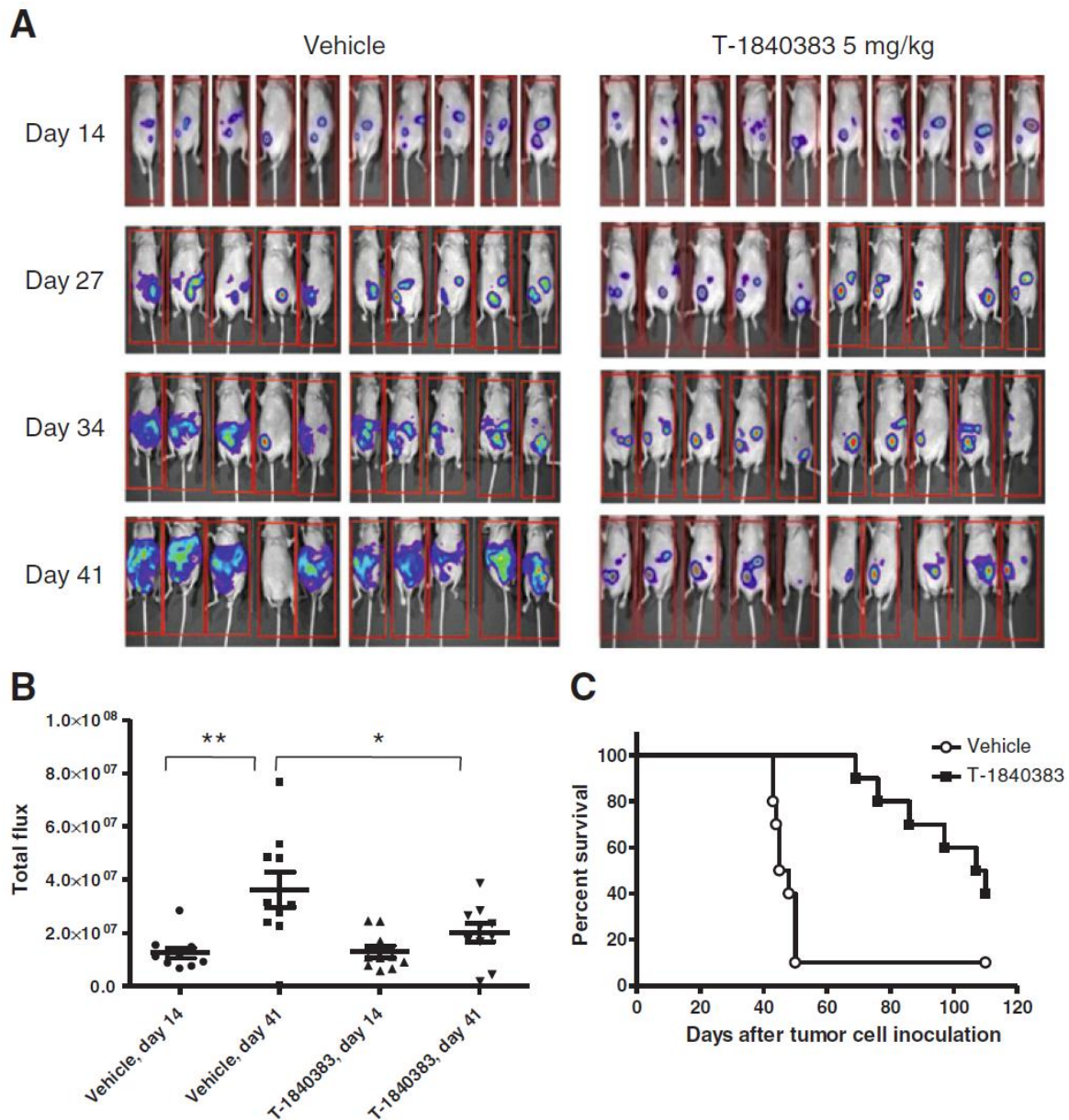


Figure 5. Antitumor efficacy of T-1840383 in a peritoneal dissemination model. A, photon emission from individual mice in which NUGC-4-luc cells had been inoculated intraperitoneally on day 0 was visualized before administration of the first dose of T-1840383 or vehicle (day 14) and over the course of treatment (days 27, 34, and 41). B, emitted bioluminescence from vehicle-treated or 5 mg/kg T-1840383-treated mice at days 14 and 41. C, survival curves of T-1840383-treated NUGC-4-bearing mice. Daily administration (5 days a week) of T-1840383 or vehicle was initiated at day 14 and lasted until the mice were euthanized (up to day 110).

(出典) Awazu et al. *Mol. Cancer Ther.*, **12**, 913-924 (2013), Figure 5

6. 低酸素環境下における c-Met 発現亢進と活性化

VEGF 産生を刺激して血管新生を誘導する低酸素環境は、*MET* 遺伝子発現を亢進して HGF 刺激に対する感受性を高めることにより、腫瘍細胞の浸潤性増殖を惹起することが報告されている[81]。この知見について検証するため、低酸素条件下での c-Met 発現と HGF 誘発細胞浸潤について検討した。先行研究と合致して、正常酸素圧状態に比べて低酸素状態は c-Met 発現を亢進させた (Fig. 6A)。今回検討した A549 細胞では、低酸素条件化において、HGF 無刺激でも c-Met リン酸化が認められた一方で、血清飢餓は c-Met 発現および活性化に影響を及ぼさなかった。ヒト腎細胞がん株 Caki-1、ヒト膵がん細胞株 SUIT-2、およびヒトグリオーマ細胞株 U87MG でも同様の結果が得られた (Fig. 6B)。さらに、正常酸素圧状態に比べて低酸素状態は HGF 誘発 SUIT-2 細胞浸潤を増加させ (Fig. 6C)、低酸素環境での腫瘍細胞の浸潤性増殖に c-Met シグナルが機能的に関与していることが示唆された。

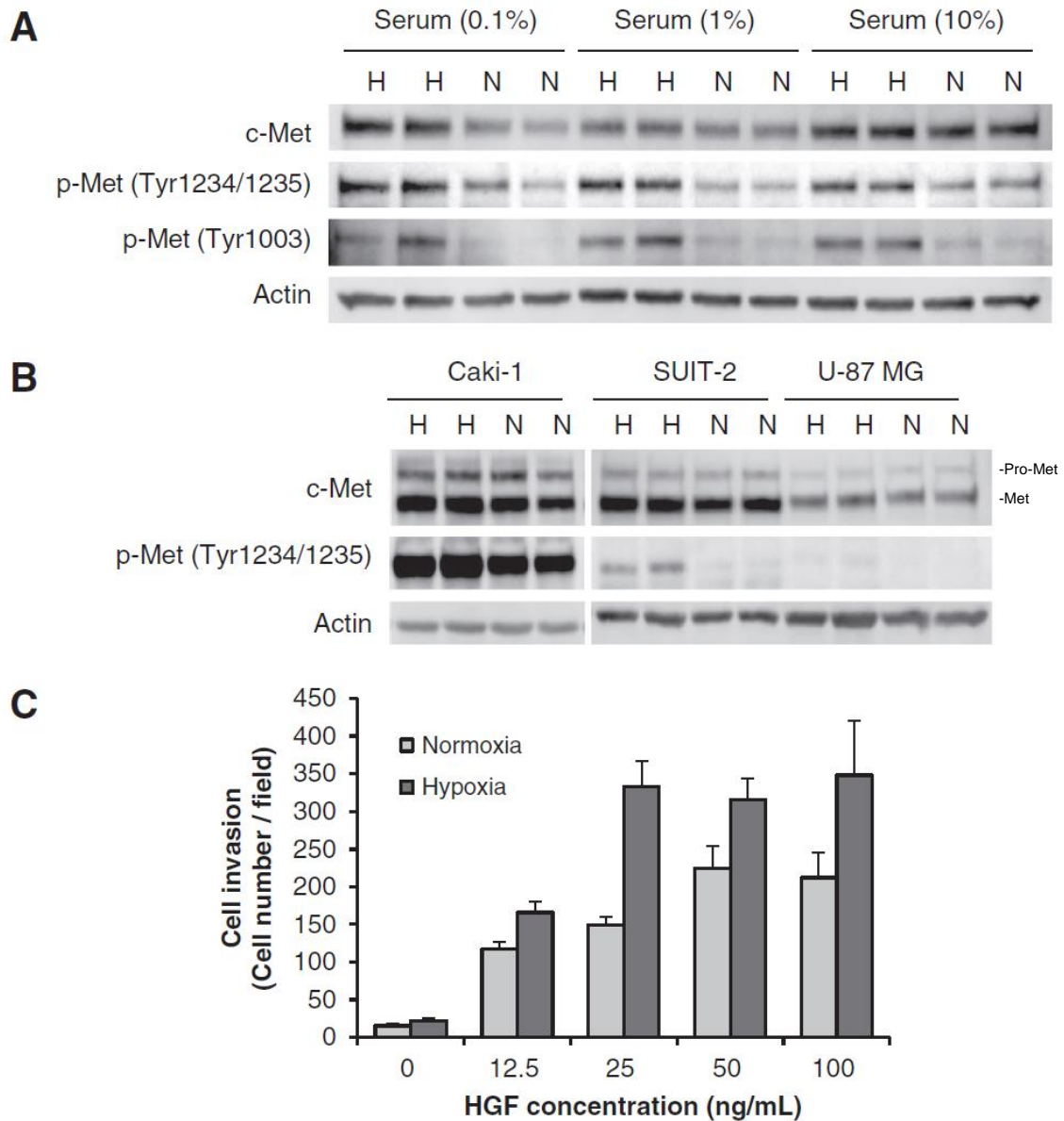


Figure 6. Hypoxia-induced c-Met expression and activation in cancer cells. A, A549 cells were cultured in media containing 0.1%, 1%, or 10% FBS in collagen-type I-coated plates under normoxia or hypoxia (2% O₂) for 24 hours. B, Caki-1, SUIT-2, and U-87MG cells were cultured in appropriate media containing 10% FBS under normoxia or hypoxia (3% O₂) for 48 hours. c-Met phosphorylation was determined by Western blotting. C, SUIT-2 cell invasion was stimulated with HGF under normoxia or hypoxia (2% O₂) for 72 hours. The invading cells were stained with a Diff-Quik staining kit and quantified. Columns, mean (n=4); bars, SD.

(出典) Awazu et al. *Mol. Cancer Ther.*, **12**, 913-924 (2013), Figure 6

第4節 考察

HGF/c-Met シグナルは様々な腫瘍において増幅され、がんの進行および転移を含む腫瘍形成に関与することが報告されており[25, 26]、HGF/c-Met シグナルおよび VEGF/VEGFR2 シグナルの二重阻害にはより広範かつ強力な抗腫瘍効果が期待できる[76]。著者は、c-Met および VEGFR2 を標的とする新規低分子阻害薬 T-1840383 を創製し[36]、多様な機能分析によりその特性を明らかにした。T-1840383 は、HGF 依存的な上皮がん細胞株の c-Met 受容体リン酸化ならびに VEGF 依存的な HUVEC の VEGFR2 受容体リン酸化を強く阻害した。さらに、がん細胞株の *MET* 遺伝子増幅に伴って恒常的に活性化される c-Met 受容体リン酸化も阻害し、細胞増殖を抑制した。加えて、T-1840383 は VEGF 依存的な HUVEC の細胞増殖および管腔形成を強力に阻害した。また、T-1840383 は経口投与により、腫瘍内の c-Met リン酸化および血管密度を低下させ、広範囲の腫瘍異種移植モデルに対して抗腫瘍効果を発揮した。従って、T-1840383 の抗腫瘍効果は、がん細胞増殖に対する直接的な阻害作用ならびに血管新生を介した間接的な阻害作用の双方によるものであると考えられた。

HGF は、細胞接着構造の不安定化や細胞の生存および運動性の亢進、血管新生などを介して腫瘍の浸潤増殖性を増強させる、上皮間葉転換 (epithelial-mesenchymal transition: EMT) を引き起こすことで知られる[82, 83]。従って、T-1840383 が *in vitro* で HGF 誘発細胞分散やマトリゲル浸潤を抑制したことは、腫瘍細胞の浸潤性増殖や転移の治療に対して T-1840383 が有用である可能性を示唆している。本研究で使用した腫瘍異種移植モデルにおいては、宿主間質由来のマウス HGF と移植腫瘍細胞のヒト c-Met との親和性が低いために、HGF/c-Met パラクライン機構がほぼ消失しており[84]、HGF/c-Met シグナル依存的な腫瘍細胞の浸潤性増殖に対する作用を正確に評価することができない。そのため、腫瘍同種移植モデルやヒト HGF トランスジェニックあるいはノックインマウスのような[85]、腫瘍細胞と間質細胞の間で HGF/c-Met パラクライン機構が機能している、より臨床を反映した再現性の高い前臨床モデルを用いて実験的に検証する必要がある。

また、著者は、転写活性化を介して腫瘍細胞の浸潤性増殖を惹起する、低酸素環境下での c-Met シグナルについても検討した[81]。先行研究と合致して、低酸素状態では c-Met 発現が亢進し、HGF 誘発の細胞浸潤が増強した。また、低酸素条件化では、HGF 無刺激においても c-Met リン酸化亢進が認められた。このことは、低酸素環境が c-Met と VEGF-A の共受容体である neuropilin-1 との相互作用を高めることにより、VEGF が c-Met シグナルを活性化するという最近の知見で一部説明される[86]。以上の結果は、腫瘍細胞の低酸素ストレス応答反応における c-Met シグナルの重要性を示唆している。血管新生阻害によりもたらされる低酸素環境において、腫瘍は悪性度を増し、高い増殖能や転移能を獲得することが知られており[10, 87]、低酸素環境下での c-Met シグナル活性化が、抗血管新生療法に対する薬剤耐性メカニズムのひとつである可能性が考えられる[88]。また、最近の研究から、血管内皮細胞における c-Met 活性化に基づく代替の血管新生経路が、抗血管新生療法に対する耐性または低応答性の機序のひとつであることが明らかとなっており[89]、c-Met シグナル阻害は、腫瘍微小環境に特徴的な低酸素環境での腫瘍悪性化を阻止し、抗血管新生療法に対する耐性を回避する有望な治療戦略であると考えられる。

結論として、T-1840383 は c-Met および VEGFR シグナルの強力な二重阻害薬であり、腫瘍上

皮細胞および腫瘍血管を標的とすることで、広範囲の抗腫瘍スペクトラムを示した。以上の結果に基づき、T-1840383 は多様な腫瘍に対する新しい治療薬として有用である可能性が示唆された。

総括

本研究において、著者は、固形腫瘍に対する新たな分子標的治療薬の開発に取り組み、血管新生を阻害することで固形腫瘍の増殖や転移に有効性を発揮する新規イミダゾ[1,2-*b*]ピリダジン誘導体 TAK-593 および T-1840383 を見出した。TAK-593 は VEGF および PDGF シグナルの強力な阻害薬であり [34, 35]、T-1840383 は c-Met および VEGF シグナルの強力な二重阻害薬である [36]。これら 2 化合物の *in vitro* および *in vivo* での薬効薬理作用について検討し、化合物の特性を明らかにした結果、多様な腫瘍に対する新たな治療薬として有用である可能性が示唆された。

TAK-593 は、*in vitro* において血管新生を模倣する、血管内皮細胞の VEGF 誘発管腔形成を強く阻害した。ヒト肺胞基底上皮腺がん細胞株 A549 担がんヌードマウスに TAK-593 を投与することで、CD31 陽性腫瘍血管の密度は有意に減少した。TAK-593 の A549 細胞に対する *in vitro* での増殖阻害作用は非常に弱い一方、担がんマウスにおける A549 腫瘍に対しては、*in vivo* での増殖阻害作用およびアポトーシス誘導作用により、強い腫瘍増殖抑制効果を発揮した。以上の結果から、TAK-593 の抗腫瘍効果は、がん細胞増殖を直接阻害するのではなく、血管新生抑制作用を介するものであると考えられた。

TAK-593 には、血管内皮細胞に対してだけでなく、壁細胞に対する作用も期待される。壁細胞は、毛細血管の血管内皮細胞と密に接触する収縮性の細胞で、活性化した壁細胞は α SMA を発現する [90]。また、血管内皮細胞が産生する PDGF-BB は、新生血管への壁細胞リクルートメントに重要な役割を果たしていることが報告されている [21-23]。TAK-593 は、CD31 陽性腫瘍血管への壁細胞リクルートメントを有意に減少させており、VEGF シグナルに加えて PDGF シグナル伝達も阻害することで、TAK-593 は、更に強い腫瘍血管新生阻害作用を示すことが示唆された。血管内皮細胞の生存および維持は、VEGF シグナルに非常に大きく依存している一方で [91]、VEGF シグナル単独阻害では、VEGF シグナル欠損から血管内皮細胞を保護するために、腫瘍血管周囲を取り囲む壁細胞の被覆は強まることが報告されている [92]。したがって、TAK-593 による VEGF および PDGF シグナル伝達の二重阻害は、血管内皮細胞と壁細胞の細胞間相互作用を障害することで、より効果的な腫瘍血管新生抑制につながると期待される。

また、近年、抗 VEGF 療法により、腫瘍内の低酸素状態ならびに c-Met 発現が増強し、浸潤・転移能が亢進することで、腫瘍の悪性度が増す可能性を指摘する研究結果も報告されている [88, 89]。著者は、TAK-593 を創製する過程で偶発的に得られた知見を基に、c-Met および VEGFR2 に対して選択的に作用する ATP 拮抗型のマルチキナーゼ阻害薬 T-1840383 を見出した [36]。

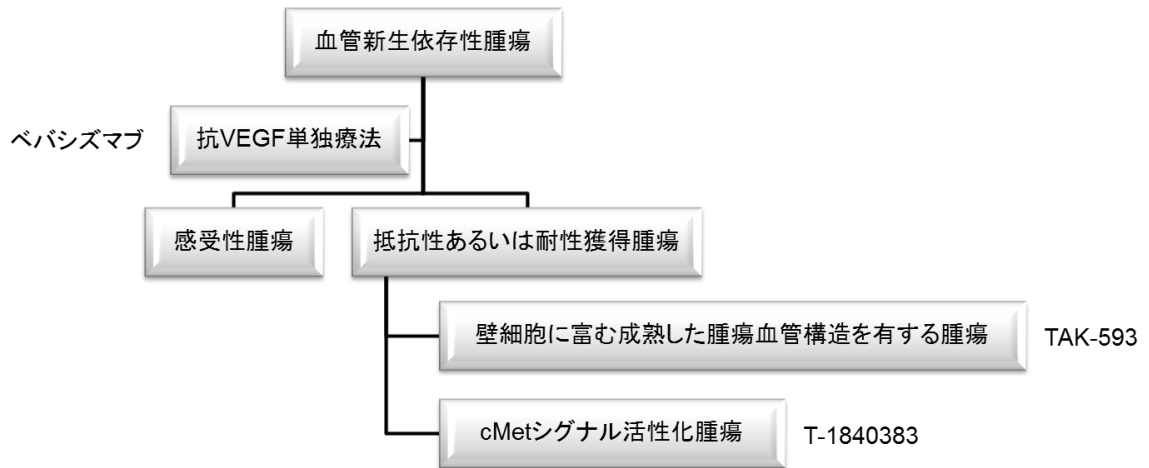
T-1840383 に対して *in vitro* で感受性を示したがん細胞株を皮下移植した腫瘍異種移植モデルに対して、T-1840383 は経口投与により c-Met、およびその下流の ERK1/2 ならびに AKT のリン酸化を抑制し、腫瘍の増殖を強く阻害した。この強力な抗腫瘍効果は、主として c-Met 依存的な腫瘍増殖を直接抑制することにより起こると考えられた。治癒的切除後であっても、高率で腹膜再発をきたすスキルス胃がん患者の予後は非常に悪く [93]、スキルス胃がんで頻繁に増幅している遺伝子のひとつとして *MET* が見出されている [94]。T-1840383 は、*MET* 遺伝子が増幅したヒト胃がん細胞株 NUGC-4-luc の腹膜播種モデルマウスに対して、強い腫瘍増殖抑制効果を発揮し、マウ

スの生存期間を有意に延長した。以上の結果は、T-1840383 がスキルス胃がん治療薬としても有用である可能性を示唆している。

さらに、著者は T-1840383 の *in vivo* 抗腫瘍効果のひとつの機序として、血管新生抑制作用も関与している可能性を示唆した。T-1840383 は、*in vitro* では VEGF 依存的な HUVEC の細胞増殖および管腔形成を強力に阻害し、*in vivo* では c-Met 非依存的な腫瘍異種移植モデルにおいても、CD31 陽性腫瘍血管の密度を有意に減少させた。HGF/c-Met シグナル伝達経路は血管内皮細胞の増殖および遊走の促進、VEGF 発現亢進、血管新生阻害因子 thrombospondin 1 の発現低下などを介して血管新生を促進することが報告されており[95]、T-1840383 の VEGF シグナル阻害活性だけでなく、c-Met シグナル阻害活性もまた血管新生抑制作用に寄与している可能性が考えられる。T-1840383 はその他の血管新生に関与する Tie-2 および PDGFR 受容体に対しても強いキナーゼ阻害作用を示すため、こうした特性もまた、強力な血管新生抑制作用に寄与することが期待される。このような血管新生抑制作用に基づいて、T-1840383 は広範囲のがん種に対して優れた抗腫瘍効果を発揮したと考えられる。

T-1840383 は *in vitro* において、*MET* 遺伝子増幅を有するがん細胞の増殖を選択的に抑制した。最近の研究で、*MET* 遺伝子増幅を認める一部の胃がんおよび非小細胞肺がんは恒常的に活性化した c-Met シグナルに『依存』しており、c-Met シグナルを標的とする低分子阻害薬はこれらがん細胞の増殖および生存を著しく阻害することが明らかとなった[27, 76]。従って、T-1840383 に対する *in vitro* での感受性プロファイルは、c-Met シグナル伝達阻害という薬理作用に基づくと推測される。しかしながら、*MET* 遺伝子増幅を有し c-Met が恒常的に活性化しているにも関わらず、T-1840383 に対して耐性を示すがん細胞株もいくつか見出されており、必ずしも c-Met の遺伝子増幅および活性化だけが T-1840383 に対する感受性を決定しているわけではなかった。こうした耐性は、付随する HER ファミリーメンバーの活性化や[96, 97]、野生型 *KRAS* 遺伝子の増幅[98]、あるいは T-1840383 の結合に影響を及ぼす c-Met 変異などに起因している可能性が考えられるが[99, 100]、詳細なメカニズムの解明には未だ至っていない。本研究により得られた知見は、T-1840383 のみならず現在臨床試験実施中の他の c-Met シグナル伝達阻害薬に対しても[26, 31-33]、患者集団の層別化や併用療法の探索、治療効果予測マーカーの同定に関する重要な手がかりを提供しうる。

本研究において、著者は腫瘍組織内での血管新生を阻害し、著しい腫瘍増殖抑制効果を発揮する、新規イミダゾ[1,2-*b*]ピリダジン誘導体 TAK-593 および T-1840383 を見出した。TAK-593 は VEGF および PDGF シグナルの強力な二重阻害薬であり[34, 35]、血管内皮細胞および壁細胞の両者を標的とする。一方、T-1840383 は c-Met および VEGF シグナルの強力な二重阻害薬であり[36]、腫瘍上皮細胞および血管内皮細胞の両者を標的とする。これら 2 化合物は共に、抗 VEGF 中和抗体ベバシズマブに代表される抗 VEGF 療法に対して抵抗性を示す腫瘍に対しても抗腫瘍効果を発揮できる可能性があり、患者ごとに効果的ながん治療薬を選択することが可能になると期待される。



引用文献

- [1] J. Folkman, What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent?, *J Natl Cancer Inst*, 82 (1990) 4-6.
- [2] J. Folkman, Tumor angiogenesis: therapeutic implications, *N Engl J Med*, 285 (1971) 1182-1186.
- [3] H. Hurwitz, L. Fehrenbacher, W. Novotny, T. Cartwright, J. Hainsworth, W. Heim, J. Berlin, A. Baron, S. Griffing, E. Holmgren, N. Ferrara, G. Fyfe, B. Rogers, R. Ross, F. Kabbinavar, Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer, *N Engl J Med*, 350 (2004) 2335-2342.
- [4] B. Escudier, T. Eisen, W.M. Stadler, C. Szczylik, S. Oudard, M. Siebels, S. Negrier, C. Chevreau, E. Solska, A.A. Desai, F. Rolland, T. Demkow, T.E. Hutson, M. Gore, S. Freeman, B. Schwartz, M. Shan, R. Simantov, R.M. Bukowski, T.S. Group, Sorafenib in advanced clear-cell renal-cell carcinoma, *N Engl J Med*, 356 (2007) 125-134.
- [5] J.M. Llovet, S. Ricci, V. Mazzaferro, P. Hilgard, E. Gane, J.F. Blanc, A.C. de Oliveira, A. Santoro, J.L. Raoul, A. Forner, M. Schwartz, C. Porta, S. Zeuzem, L. Bolondi, T.F. Greten, P.R. Galle, J.F. Seitz, I. Borbath, D. Haussinger, T. Giannaris, M. Shan, M. Moscovici, D. Voliotis, J. Bruix, S.I.S. Group, Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma, *N Engl J Med*, 359 (2008) 378-390.
- [6] R.J. Motzer, T.E. Hutson, P. Tomczak, M.D. Michaelson, R.M. Bukowski, O. Rixe, S. Oudard, S. Negrier, C. Szczylik, S.T. Kim, I. Chen, P.W. Bycott, C.M. Baum, R.A. Figlin, Sunitinib versus interferon alfa in metastatic renal-cell carcinoma, *N Engl J Med*, 356 (2007) 115-124.
- [7] G.D. Demetri, A.T. van Oosterom, C.R. Garrett, M.E. Blackstein, M.H. Shah, J. Verweij, G. McArthur, I.R. Judson, M.C. Heinrich, J.A. Morgan, J. Desai, C.D. Fletcher, S. George, C.L. Bello, X. Huang, C.M. Baum, P.G. Casali, Efficacy and safety of sunitinib in patients with advanced gastrointestinal stromal tumour after failure of imatinib: a randomised controlled trial, *Lancet*, 368 (2006) 1329-1338.
- [8] L.B. Saltz, S. Clarke, E. Diaz-Rubio, W. Scheithauer, A. Figier, R. Wong, S. Koski, M. Lichinitser, T.S. Yang, F. Rivera, F. Couture, F. Sirzen, J. Cassidy, Bevacizumab in combination with oxaliplatin-based chemotherapy as first-line therapy in metastatic colorectal cancer: a randomized phase III study, *J Clin Oncol*, 26 (2008) 2013-2019.
- [9] T.T. Batchelor, A.G. Sorensen, E. di Tomaso, W.T. Zhang, D.G. Duda, K.S. Cohen, K.R. Kozak, D.P. Cahill, P.J. Chen, M. Zhu, M. Ancukiewicz, M.M. Mrugala, S. Plotkin, J. Drappatz, D.N. Louis, P. Ivy, D.T. Scadden, T. Benner, J.S. Loeffler, P.Y. Wen, R.K. Jain, AZD2171, a pan-VEGF receptor tyrosine kinase inhibitor, normalizes tumor vasculature and alleviates edema in glioblastoma patients, *Cancer Cell*, 11 (2007) 83-95.
- [10] M. Paez-Ribes, E. Allen, J. Hudock, T. Takeda, H. Okuyama, F. Vinals, M. Inoue, G. Bergers, D. Hanahan, O. Casanovas, Antiangiogenic therapy elicits malignant progression of tumors to increased local invasion and distant metastasis, *Cancer Cell*, 15 (2009) 220-231.
- [11] G. Bergers, D. Hanahan, Modes of resistance to anti-angiogenic therapy, *Nat Rev Cancer*, 8 (2008) 592-603.
- [12] R.S. Kerbel, J. Yu, J. Tran, S. Man, A. Vioria-Petit, G. Klement, B.L. Coomber, J. Rak, Possible mechanisms of acquired resistance to anti-angiogenic drugs: implications for the use of combination therapy approaches, *Cancer Metastasis Rev*, 20 (2001) 79-86.

- [13] K.D. Miller, C.J. Sweeney, G.W. Sledge, Jr., Can tumor angiogenesis be inhibited without resistance?, *EXS*, (2005) 95-112.
- [14] M. Klagsbrun, M.A. Moses, Molecular angiogenesis, *Chem Biol*, 6 (1999) R217-224.
- [15] J.A. Forsythe, B.H. Jiang, N.V. Iyer, F. Agani, S.W. Leung, R.D. Koos, G.L. Semenza, Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1, *Mol Cell Biol*, 16 (1996) 4604-4613.
- [16] D. Shweiki, A. Itin, D. Soffer, E. Keshet, Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis, *Nature*, 359 (1992) 843-845.
- [17] P.J. Keck, S.D. Hauser, G. Krivi, K. Sanzo, T. Warren, J. Feder, D.T. Connolly, Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF, *Science*, 246 (1989) 1309-1312.
- [18] M.S. Pepper, N. Ferrara, L. Orci, R. Montesano, Potent synergism between vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in the induction of angiogenesis in vitro, *Biochem Biophys Res Commun*, 189 (1992) 824-831.
- [19] T.L. Haas, J.A. Madri, Extracellular matrix-driven matrix metalloproteinase production in endothelial cells: implications for angiogenesis, *Trends Cardiovasc Med*, 9 (1999) 70-77.
- [20] S. Zucker, H. Mirza, C.E. Conner, A.F. Lorenz, M.H. Drews, W.F. Bahou, J. Jesty, Vascular endothelial growth factor induces tissue factor and matrix metalloproteinase production in endothelial cells: conversion of prothrombin to thrombin results in progelatinase A activation and cell proliferation, *Int J Cancer*, 75 (1998) 780-786.
- [21] P. Lindahl, B.R. Johansson, P. Leveen, C. Betsholtz, Pericyte loss and microaneurysm formation in PDGF-B-deficient mice, *Science*, 277 (1997) 242-245.
- [22] M. Hellstrom, M. Kalen, P. Lindahl, A. Abramsson, C. Betsholtz, Role of PDGF-B and PDGFR-beta in recruitment of vascular smooth muscle cells and pericytes during embryonic blood vessel formation in the mouse, *Development*, 126 (1999) 3047-3055.
- [23] J.R. Crosby, R.A. Seifert, P. Soriano, D.F. Bowen-Pope, Chimaeric analysis reveals role of Pdgf receptors in all muscle lineages, *Nat Genet*, 18 (1998) 385-388.
- [24] Y. Cao, Q. Liu, Therapeutic targets of multiple angiogenic factors for the treatment of cancer and metastasis, *Adv Cancer Res*, 97 (2007) 203-224.
- [25] C. Birchmeier, W. Birchmeier, E. Gherardi, G.F. Vande Woude, Met, metastasis, motility and more, *Nat Rev Mol Cell Biol*, 4 (2003) 915-925.
- [26] J.G. Christensen, J. Burrows, R. Salgia, c-Met as a target for human cancer and characterization of inhibitors for therapeutic intervention, *Cancer Lett*, 225 (2005) 1-26.
- [27] G.A. Smolen, R. Sordella, B. Muir, G. Mohapatra, A. Barmettler, H. Archibald, W.J. Kim, R.A. Okimoto, D.W. Bell, D.C. Sgroi, J.G. Christensen, J. Settleman, D.A. Haber, Amplification of MET may identify a subset of cancers with extreme sensitivity to the selective tyrosine kinase inhibitor PHA-665752, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103 (2006) 2316-2321.
- [28] B. Lutterbach, Q. Zeng, L.J. Davis, H. Hatch, G. Hang, N.E. Kohl, J.B. Gibbs, B.S. Pan, Lung cancer cell lines harboring MET gene amplification are dependent on Met for growth and survival, *Cancer Res*, 67 (2007)

2081-2088.

- [29] J.A. Engelman, K. Zejnullahu, T. Mitsudomi, Y. Song, C. Hyland, J.O. Park, N. Lindeman, C.M. Gale, X. Zhao, J. Christensen, T. Kosaka, A.J. Holmes, A.M. Rogers, F. Cappuzzo, T. Mok, C. Lee, B.E. Johnson, L.C. Cantley, P.A. Janne, MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling, *Science*, 316 (2007) 1039-1043.
- [30] J. Bean, C. Brennan, J.Y. Shih, G. Riely, A. Viale, L. Wang, D. Chitale, N. Motoi, J. Szoke, S. Broderick, M. Balak, W.C. Chang, C.J. Yu, A. Gazdar, H. Pass, V. Rusch, W. Gerald, S.F. Huang, P.C. Yang, V. Miller, M. Ladanyi, C.H. Yang, W. Pao, MET amplification occurs with or without T790M mutations in EGFR mutant lung tumors with acquired resistance to gefitinib or erlotinib, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104 (2007) 20932-20937.
- [31] P.M. Comoglio, S. Giordano, L. Trusolino, Drug development of MET inhibitors: targeting oncogene addiction and expedience, *Nat Rev Drug Discov*, 7 (2008) 504-516.
- [32] J.P. Eder, G.F. Vande Woude, S.A. Boerner, P.M. LoRusso, Novel therapeutic inhibitors of the c-Met signaling pathway in cancer, *Clin Cancer Res*, 15 (2009) 2207-2214.
- [33] F. Cecchi, D.C. Rabe, D.P. Bottaro, Targeting the HGF/Met signaling pathway in cancer therapy, *Expert Opin Ther Targets*, 16 (2012) 553-572.
- [34] N. Miyamoto, N. Sakai, T. Hirayama, K. Miwa, Y. Oguro, H. Oki, K. Okada, T. Takagi, H. Iwata, Y. Awazu, S. Yamasaki, T. Takeuchi, H. Miki, A. Hori, S. Imamura, Discovery of N-[5-({2-[(cyclopropylcarbonyl)amino]imidazo[1,2-b]pyridazin-6-yl}oxy)-2-methylphenyl]-1,3-dimethyl-1H-pyrazole-5-carboxamide (TAK-593), a highly potent VEGFR2 kinase inhibitor, *Bioorg Med Chem*, 21 (2013) 2333-2345.
- [35] H. Iwata, S. Imamura, A. Hori, M.S. Hixon, H. Kimura, H. Miki, Biochemical characterization of TAK-593, a novel VEGFR/PDGFR inhibitor with a two-step slow binding mechanism, *Biochemistry*, 50 (2011) 738-751.
- [36] S. Matsumoto, N. Miyamoto, T. Hirayama, H. Oki, K. Okada, M. Tawada, H. Iwata, K. Nakamura, S. Yamasaki, H. Miki, A. Hori, S. Imamura, Structure-based design, synthesis, and evaluation of imidazo[1,2-b]pyridazine and imidazo[1,2-a]pyridine derivatives as novel dual c-Met and VEGFR2 kinase inhibitors, *Bioorg Med Chem*, 21 (2013) 7686-7698.
- [37] G. Bergers, S. Song, N. Meyer-Morse, E. Bergsland, D. Hanahan, Benefits of targeting both pericytes and endothelial cells in the tumor vasculature with kinase inhibitors, *J Clin Invest*, 111 (2003) 1287-1295.
- [38] M.R. Mancuso, R. Davis, S.M. Norberg, S. O'Brien, B. Sennino, T. Nakahara, V.J. Yao, T. Inai, P. Brooks, B. Freemark, D.R. Shalinsky, D.D. Hu-Lowe, D.M. McDonald, Rapid vascular regrowth in tumors after reversal of VEGF inhibition, *J Clin Invest*, 116 (2006) 2610-2621.
- [39] T. Kamba, D.M. McDonald, Mechanisms of adverse effects of anti-VEGF therapy for cancer, *Br J Cancer*, 96 (2007) 1788-1795.
- [40] J. Huang, S.Z. Soffer, E.S. Kim, K.W. McCrudden, T. New, C.A. Manley, W. Middlesworth, K. O'Toole, D.J. Yamashiro, J.J. Kandel, Vascular remodeling marks tumors that recur during chronic suppression of angiogenesis, *Mol Cancer Res*, 2 (2004) 36-42.
- [41] R.M. Shaheen, W.W. Tseng, D.W. Davis, W. Liu, N. Reinmuth, R. Vellagas, A.A. Wiczorek, Y. Ogura, D.J. McConkey, K.E. Drazan, C.D. Bucana, G. McMahon, L.M. Ellis, Tyrosine kinase inhibition of multiple

angiogenic growth factor receptors improves survival in mice bearing colon cancer liver metastases by inhibition of endothelial cell survival mechanisms, *Cancer Res*, 61 (2001) 1464-1468.

[42] R. Erber, A. Thurnher, A.D. Katsen, G. Groth, H. Kerger, H.P. Hammes, M.D. Menger, A. Ullrich, P. Vajkoczy, Combined inhibition of VEGF and PDGF signaling enforces tumor vessel regression by interfering with pericyte-mediated endothelial cell survival mechanisms, *FASEB J*, 18 (2004) 338-340.

[43] K. Pietras, D. Hanahan, A multitargeted, metronomic, and maximum-tolerated dose "chemo-switch" regimen is antiangiogenic, producing objective responses and survival benefit in a mouse model of cancer, *J Clin Oncol*, 23 (2005) 939-952.

[44] C. Lu, M.M. Shahzad, M. Moreno-Smith, Y.G. Lin, N.B. Jennings, J.K. Allen, C.N. Landen, L.S. Mangala, G.N. Armaiz-Pena, R. Schmandt, A.M. Nick, R.L. Stone, R.B. Jaffe, R.L. Coleman, A.K. Sood, Targeting pericytes with a PDGF-B aptamer in human ovarian carcinoma models, *Cancer Biol Ther*, 9 (2010) 176-182.

[45] O. Potapova, A.D. Laird, M.A. Nannini, A. Barone, G. Li, K.G. Moss, J.M. Cherrington, D.B. Mendel, Contribution of individual targets to the antitumor efficacy of the multitargeted receptor tyrosine kinase inhibitor SU11248, *Mol Cancer Ther*, 5 (2006) 1280-1289.

[46] P.L. Choyke, A.J. Dwyer, M.V. Knopp, Functional tumor imaging with dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging, *J Magn Reson Imaging*, 17 (2003) 509-520.

[47] O. Skalli, M.F. Pelte, M.C. Pecllet, G. Gabbiani, P. Gugliotta, G. Bussolati, M. Ravazzola, L. Orci, Alpha-smooth muscle actin, a differentiation marker of smooth muscle cells, is present in microfilamentous bundles of pericytes, *J Histochem Cytochem*, 37 (1989) 315-321.

[48] G. Bergers, S. Song, The role of pericytes in blood-vessel formation and maintenance, *Neuro Oncol*, 7 (2005) 452-464.

[49] M.V. Knopp, E. Weiss, H.P. Sinn, J. Mattern, H. Junkermann, J. Radeleff, A. Magener, G. Brix, S. Delorme, I. Zuna, G. van Kaick, Pathophysiologic basis of contrast enhancement in breast tumors, *J Magn Reson Imaging*, 10 (1999) 260-266.

[50] M. Rudin, P.M. McSheehy, P.R. Allegrini, M. Rausch, D. Baumann, M. Becquet, K. Brecht, J. Brueggen, S. Ferretti, F. Schaeffer, C. Schnell, J. Wood, PTK787/ZK222584, a tyrosine kinase inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor, reduces uptake of the contrast agent GdDOTA by murine orthotopic B16/BL6 melanoma tumours and inhibits their growth in vivo, *NMR Biomed*, 18 (2005) 308-321.

[51] B. Morgan, A.L. Thomas, J. Dreves, J. Hennig, M. Buchert, A. Jivan, M.A. Horsfield, K. Mross, H.A. Ball, L. Lee, W. Mietlowski, S. Fuxuis, C. Unger, K. O'Byrne, A. Henry, G.R. Cherryman, D. Laurent, M. Dugan, D. Marme, W.P. Steward, Dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging as a biomarker for the pharmacological response of PTK787/ZK 222584, an inhibitor of the vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinases, in patients with advanced colorectal cancer and liver metastases: results from two phase I studies, *J Clin Oncol*, 21 (2003) 3955-3964.

[52] R.J. Motzer, M.D. Michaelson, B.G. Redman, G.R. Hudes, G. Wilding, R.A. Figlin, M.S. Ginsberg, S.T. Kim, C.M. Baum, S.E. DePrimo, J.Z. Li, C.L. Bello, C.P. Theuer, D.J. George, B.I. Rini, Activity of SU11248, a multitargeted inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor and platelet-derived growth factor receptor, in patients with metastatic renal cell carcinoma, *J Clin Oncol*, 24 (2006) 16-24.

- [53] C.N. Sternberg, I.D. Davis, J. Mardiak, C. Szczylik, E. Lee, J. Wagstaff, C.H. Barrios, P. Salman, O.A. Gladkov, A. Kavina, J.J. Zarba, M. Chen, L. McCann, L. Pandite, D.F. Roychowdhury, R.E. Hawkins, Pazopanib in locally advanced or metastatic renal cell carcinoma: results of a randomized phase III trial, *J Clin Oncol*, 28 (2010) 1061-1068.
- [54] D.H. Albert, P. Tapang, T.J. Magoc, L.J. Pease, D.R. Reuter, R.Q. Wei, J. Li, J. Guo, P.F. Bousquet, N.S. Ghoreishi-Haack, B. Wang, G.T. Bukofzer, Y.C. Wang, J.A. Stavropoulos, K. Hartandi, A.L. Niquette, N. Soni, E.F. Johnson, J.O. McCall, J.J. Bouska, Y. Luo, C.K. Donawho, Y. Dai, P.A. Marcotte, K.B. Glaser, M.R. Michaelides, S.K. Davidsen, Preclinical activity of ABT-869, a multitargeted receptor tyrosine kinase inhibitor, *Mol Cancer Ther*, 5 (2006) 995-1006.
- [55] K. Nakamura, E. Taguchi, T. Miura, A. Yamamoto, K. Takahashi, F. Bichat, N. Guilbaud, K. Hasegawa, K. Kubo, Y. Fujiwara, R. Suzuki, M. Shibuya, T. Isae, KRN951, a highly potent inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinases, has antitumor activities and affects functional vascular properties, *Cancer Res*, 66 (2006) 9134-9142.
- [56] S.M. Wilhelm, C. Carter, L. Tang, D. Wilkie, A. McNabola, H. Rong, C. Chen, X. Zhang, P. Vincent, M. McHugh, Y. Cao, J. Shujath, S. Gawlak, D. Eveleigh, B. Rowley, L. Liu, L. Adnane, M. Lynch, D. Auclair, I. Taylor, R. Gedrich, A. Voznesensky, B. Riedl, L.E. Post, G. Bollag, P.A. Trail, BAY 43-9006 exhibits broad spectrum oral antitumor activity and targets the RAF/MEK/ERK pathway and receptor tyrosine kinases involved in tumor progression and angiogenesis, *Cancer Res*, 64 (2004) 7099-7109.
- [57] S.R. Wedge, D.J. Ogilvie, M. Dukes, J. Kendrew, R. Chester, J.A. Jackson, S.J. Boffey, P.J. Valentine, J.O. Curwen, H.L. Musgrove, G.A. Graham, G.D. Hughes, A.P. Thomas, E.S. Stokes, B. Curry, G.H. Richmond, P.F. Wadsworth, A.L. Bigley, L.F. Hennequin, ZD6474 inhibits vascular endothelial growth factor signaling, angiogenesis, and tumor growth following oral administration, *Cancer Res*, 62 (2002) 4645-4655.
- [58] F. Qian, S. Engst, K. Yamaguchi, P. Yu, K.A. Won, L. Mock, T. Lou, J. Tan, C. Li, D. Tam, J. Loughheed, F.M. Yakes, F. Bentzien, W. Xu, T. Zaks, R. Wooster, J. Greshock, A.H. Joly, Inhibition of tumor cell growth, invasion, and metastasis by EXEL-2880 (XL880, GSK1363089), a novel inhibitor of HGF and VEGF receptor tyrosine kinases, *Cancer Res*, 69 (2009) 8009-8016.
- [59] I.K. Dev, R.E. Dornsife, T.M. Hopper, J.A. Onori, C.G. Miller, L.E. Harrington, K.M. Dold, R.J. Mullin, J.H. Johnson, R.M. Crosby, A.T. Truesdale, A.H. Epperly, K.W. Hinkle, M. Cheung, J.A. Stafford, D.K. Luttrell, R. Kumar, Antitumour efficacy of VEGFR2 tyrosine kinase inhibitor correlates with expression of VEGF and its receptor VEGFR2 in tumour models, *Br J Cancer*, 91 (2004) 1391-1398.
- [60] L. Sepp-Lorenzino, E. Rands, X. Mao, B. Connolly, J. Shipman, J. Antanavage, S. Hill, L. Davis, S. Beck, K. Rickert, K. Coll, P. Ciecko, M. Fraley, W. Hoffman, G. Hartman, D. Heimbrook, J. Gibbs, N. Kohl, K. Thomas, A novel orally bioavailable inhibitor of kinase insert domain-containing receptor induces antiangiogenic effects and prevents tumor growth in vivo, *Cancer Res*, 64 (2004) 751-756.
- [61] D.B. Mendel, A.D. Laird, X. Xin, S.G. Louie, J.G. Christensen, G. Li, R.E. Schreck, T.J. Abrams, T.J. Ngai, L.B. Lee, L.J. Murray, J. Carver, E. Chan, K.G. Moss, J.O. Haznedar, J. Sukbuntherng, R.A. Blake, L. Sun, C. Tang, T. Miller, S. Shirazian, G. McMahon, J.M. Cherrington, In vivo antitumor activity of SU11248, a novel tyrosine kinase inhibitor targeting vascular endothelial growth factor and platelet-derived growth factor

receptors: determination of a pharmacokinetic/pharmacodynamic relationship, *Clin Cancer Res*, 9 (2003) 327-337.

[62] R.K. Jain, Determinants of tumor blood flow: a review, *Cancer Res*, 48 (1988) 2641-2658.

[63] C.H. Heldin, K. Rubin, K. Pietras, A. Ostman, High interstitial fluid pressure - an obstacle in cancer therapy, *Nat Rev Cancer*, 4 (2004) 806-813.

[64] R.K. Jain, R.T. Tong, L.L. Munn, Effect of vascular normalization by antiangiogenic therapy on interstitial hypertension, peritumor edema, and lymphatic metastasis: insights from a mathematical model, *Cancer Res*, 67 (2007) 2729-2735.

[65] H. Wildiers, G. Guetens, G. De Boeck, E. Verbeken, B. Landuyt, W. Landuyt, E.A. de Bruijn, A.T. van Oosterom, Effect of antivascular endothelial growth factor treatment on the intratumoral uptake of CPT-11, *Br J Cancer*, 88 (2003) 1979-1986.

[66] Y. Oguro, N. Miyamoto, K. Okada, T. Takagi, H. Iwata, Y. Awazu, H. Miki, A. Hori, K. Kamiyama, S. Imamura, Design, synthesis, and evaluation of 5-methyl-4-phenoxy-5H-pyrrolo[3,2-d]pyrimidine derivatives: novel VEGFR2 kinase inhibitors binding to inactive kinase conformation, *Bioorg Med Chem*, 18 (2010) 7260-7273.

[67] Y. Awazu, A. Mizutani, Y. Nagase, H. Iwata, Y. Oguro, H. Miki, S. Imamura, A. Hori, A novel pyrrolo[3,2-d]pyrimidine derivative, as a vascular endothelial growth factor receptor and platelet-derived growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, shows potent antitumor activity by suppression of tumor angiogenesis, *Cancer Sci*, 103 (2012) 939-944.

[68] C.G. Lee, M. Heijn, E. di Tomaso, G. Griffon-Etienne, M. Ancukiewicz, C. Koike, K.R. Park, N. Ferrara, R.K. Jain, H.D. Suit, Y. Boucher, Anti-Vascular endothelial growth factor treatment augments tumor radiation response under normoxic or hypoxic conditions, *Cancer Res*, 60 (2000) 5565-5570.

[69] R.T. Tong, Y. Boucher, S.V. Kozin, F. Winkler, D.J. Hicklin, R.K. Jain, Vascular normalization by vascular endothelial growth factor receptor 2 blockade induces a pressure gradient across the vasculature and improves drug penetration in tumors, *Cancer Res*, 64 (2004) 3731-3736.

[70] C.G. Willett, Y. Boucher, E. di Tomaso, D.G. Duda, L.L. Munn, R.T. Tong, D.C. Chung, D.V. Sahani, S.P. Kalva, S.V. Kozin, M. Mino, K.S. Cohen, D.T. Scadden, A.C. Hartford, A.J. Fischman, J.W. Clark, D.P. Ryan, A.X. Zhu, L.S. Blaszkowsky, H.X. Chen, P.C. Shellito, G.Y. Lauwers, R.K. Jain, Direct evidence that the VEGF-specific antibody bevacizumab has antivascular effects in human rectal cancer, *Nat Med*, 10 (2004) 145-147.

[71] R.K. Jain, Normalizing tumor vasculature with anti-angiogenic therapy: a new paradigm for combination therapy, *Nat Med*, 7 (2001) 987-989.

[72] R.K. Jain, Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy, *Science*, 307 (2005) 58-62.

[73] K. Pietras, A. Ostman, M. Sjoquist, E. Buchdunger, R.K. Reed, C.H. Heldin, K. Rubin, Inhibition of platelet-derived growth factor receptors reduces interstitial hypertension and increases transcapillary transport in tumors, *Cancer Res*, 61 (2001) 2929-2934.

[74] K. Pietras, K. Rubin, T. Sjoblom, E. Buchdunger, M. Sjoquist, C.H. Heldin, A. Ostman, Inhibition of PDGF

receptor signaling in tumor stroma enhances antitumor effect of chemotherapy, *Cancer Res*, 62 (2002) 5476-5484.

[75] K. Pietras, M. Stumm, M. Hubert, E. Buchdunger, K. Rubin, C.H. Heldin, P. McSheehy, M. Wartmann, A. Ostman, STI571 enhances the therapeutic index of epothilone B by a tumor-selective increase of drug uptake, *Clin Cancer Res*, 9 (2003) 3779-3787.

[76] U. McDermott, S.V. Sharma, L. Dowell, P. Greninger, C. Montagut, J. Lamb, H. Archibald, R. Raudales, A. Tam, D. Lee, S.M. Rothenberg, J.G. Supko, R. Sordella, L.E. Ulkus, A.J. Iafrate, S. Maheswaran, C.N. Njauw, H. Tsao, L. Drew, J.H. Hanke, X.J. Ma, M.G. Erlander, N.S. Gray, D.A. Haber, J. Settleman, Identification of genotype-correlated sensitivity to selective kinase inhibitors by using high-throughput tumor cell line profiling, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104 (2007) 19936-19941.

[77] H. Miura, K. Nishimura, A. Tsujimura, K. Matsumiya, K. Matsumoto, T. Nakamura, A. Okuyama, Effects of hepatocyte growth factor on E-cadherin-mediated cell-cell adhesion in DU145 prostate cancer cells, *Urology*, 58 (2001) 1064-1069.

[78] M. Park, H. Park, W.H. Kim, H. Cho, J.H. Lee, Presence of autocrine hepatocyte growth factor-Met signaling and its role in proliferation and migration of SNU-484 gastric cancer cell line, *Exp Mol Med*, 37 (2005) 213-219.

[79] Y. Asaoka, M. Tada, T. Ikenoue, M. Seto, M. Imai, K. Miyabayashi, K. Yamamoto, S. Yamamoto, Y. Kudo, D. Mohri, Y. Isomura, H. Ijichi, K. Tateishi, F. Kanai, S. Ogawa, M. Omata, K. Koike, Gastric cancer cell line Hs746T harbors a splice site mutation of c-Met causing juxtamembrane domain deletion, *Biochem Biophys Res Commun*, 394 (2010) 1042-1046.

[80] T. Burgess, A. Coxon, S. Meyer, J. Sun, K. Rex, T. Tsuruda, Q. Chen, S.Y. Ho, L. Li, S. Kaufman, K. McDorman, R.C. Cattley, J. Sun, G. Elliott, K. Zhang, X. Feng, X.C. Jia, L. Green, R. Radinsky, R. Kendall, Fully human monoclonal antibodies to hepatocyte growth factor with therapeutic potential against hepatocyte growth factor/c-Met-dependent human tumors, *Cancer Res*, 66 (2006) 1721-1729.

[81] S. Pennacchietti, P. Michieli, M. Galluzzo, M. Mazzone, S. Giordano, P.M. Comoglio, Hypoxia promotes invasive growth by transcriptional activation of the met protooncogene, *Cancer Cell*, 3 (2003) 347-361.

[82] C. Birchmeier, W. Birchmeier, B. Brand-Saberi, Epithelial-mesenchymal transitions in cancer progression, *Acta Anat (Basel)*, 156 (1996) 217-226.

[83] M.A. Desiderio, Hepatocyte growth factor in invasive growth of carcinomas, *Cell Mol Life Sci*, 64 (2007) 1341-1354.

[84] S. Rong, M. Bodescot, D. Blair, J. Dunn, T. Nakamura, K. Mizuno, M. Park, A. Chan, S. Aaronson, G.F. Vande Woude, Tumorigenicity of the met proto-oncogene and the gene for hepatocyte growth factor, *Mol Cell Biol*, 12 (1992) 5152-5158.

[85] Y.W. Zhang, B. Staal, C. Essenburg, Y. Su, L. Kang, R. West, D. Kaufman, T. Dekoning, B. Eagleson, S.G. Buchanan, G.F. Vande Woude, MET kinase inhibitor SGX523 synergizes with epidermal growth factor receptor inhibitor erlotinib in a hepatocyte growth factor-dependent fashion to suppress carcinoma growth, *Cancer Res*, 70 (2010) 6880-6890.

[86] S. Zhang, H.E. Zhau, A.O. Osunkoya, S. Iqbal, X. Yang, S. Fan, Z. Chen, R. Wang, F.F. Marshall, L.W.

- Chung, D. Wu, Vascular endothelial growth factor regulates myeloid cell leukemia-1 expression through neuropilin-1-dependent activation of c-MET signaling in human prostate cancer cells, *Mol Cancer*, 9 (2010) 9.
- [87] J.M. Ebos, C.R. Lee, W. Cruz-Munoz, G.A. Bjarnason, J.G. Christensen, R.S. Kerbel, Accelerated metastasis after short-term treatment with a potent inhibitor of tumor angiogenesis, *Cancer Cell*, 15 (2009) 232-239.
- [88] C. Boccaccio, P.M. Comoglio, Invasive growth: a MET-driven genetic programme for cancer and stem cells, *Nat Rev Cancer*, 6 (2006) 637-645.
- [89] F. Shojaei, J.H. Lee, B.H. Simmons, A. Wong, C.O. Esparza, P.A. Plumlee, J. Feng, A.E. Stewart, D.D. Hu-Lowe, J.G. Christensen, HGF/c-Met acts as an alternative angiogenic pathway in sunitinib-resistant tumors, *Cancer Res*, 70 (2010) 10090-10100.
- [90] S. Morikawa, P. Baluk, T. Kaidoh, A. Haskell, R.K. Jain, D.M. McDonald, Abnormalities in pericytes on blood vessels and endothelial sprouts in tumors, *Am J Pathol*, 160 (2002) 985-1000.
- [91] L.E. Benjamin, I. Hemo, E. Keshet, A plasticity window for blood vessel remodelling is defined by pericyte coverage of the preformed endothelial network and is regulated by PDGF-B and VEGF, *Development*, 125 (1998) 1591-1598.
- [92] L.E. Benjamin, D. Golijanin, A. Itin, D. Pode, E. Keshet, Selective ablation of immature blood vessels in established human tumors follows vascular endothelial growth factor withdrawal, *J Clin Invest*, 103 (1999) 159-165.
- [93] Y. Maehara, S. Moriguchi, H. Orita, Y. Kakeji, M. Haraguchi, D. Korenaga, K. Sugimachi, Lower survival rate for patients with carcinoma of the stomach of Borrmann type IV after gastric resection, *Surg Gynecol Obstet*, 175 (1992) 13-16.
- [94] H. Kuniyasu, W. Yasui, Y. Kitadai, H. Yokozaki, H. Ito, E. Tahara, Frequent amplification of the c-met gene in scirrhous type stomach cancer, *Biochem Biophys Res Commun*, 189 (1992) 227-232.
- [95] Y.W. Zhang, Y. Su, O.V. Volpert, G.F. Vande Woude, Hepatocyte growth factor/scatter factor mediates angiogenesis through positive VEGF and negative thrombospondin 1 regulation, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100 (2003) 12718-12723.
- [96] T. Bachleitner-Hofmann, M.Y. Sun, C.T. Chen, L. Tang, L. Song, Z. Zeng, M. Shah, J.G. Christensen, N. Rosen, D.B. Solit, M.R. Weiser, HER kinase activation confers resistance to MET tyrosine kinase inhibition in MET oncogene-addicted gastric cancer cells, *Mol Cancer Ther*, 7 (2008) 3499-3508.
- [97] U. McDermott, R.V. Pusapati, J.G. Christensen, N.S. Gray, J. Settleman, Acquired resistance of non-small cell lung cancer cells to MET kinase inhibition is mediated by a switch to epidermal growth factor receptor dependency, *Cancer Res*, 70 (2010) 1625-1634.
- [98] V. Cepero, J.R. Sierra, S. Corso, E. Ghiso, L. Casorzo, T. Perera, P.M. Comoglio, S. Giordano, MET and KRAS gene amplification mediates acquired resistance to MET tyrosine kinase inhibitors, *Cancer Res*, 70 (2010) 7580-7590.
- [99] S. Berthou, D.M. Aebersold, L.S. Schmidt, D. Stroka, C. Heigl, B. Streit, D. Stalder, G. Gruber, C. Liang, A.R. Howlett, D. Candinas, R.H. Greiner, K.E. Lipson, Y. Zimmer, The Met kinase inhibitor SU11274 exhibits a selective inhibition pattern toward different receptor mutated variants, *Oncogene*, 23 (2004) 5387-5393.
- [100] Y. Zimmer, A.V. Vaseva, M. Medova, B. Streit, W. Blank-Liss, R.H. Greiner, N. Schiering, D.M. Aebersold,

Differential inhibition sensitivities of MET mutants to the small molecule inhibitor SU11274, *Cancer Lett*, 289 (2010) 228-236.

謝辞

本論文の作成にあたり、御懇篤なるご指導とご鞭撻を賜りました、京都薬科大学 薬物治療学分野 加藤伸一 教授、生化学分野 中山祐治 教授、細胞生物学分野 藤室雅弘 教授に深甚なる感謝の意を表します。

本研究は終始、武田薬品工業株式会社 医薬研究本部 堀晃 博士の親身なご指導のもとに遂行されたものであります。また、本研究の遂行にあたり多大なるご協力とご助言を賜りました水谷明生 博士、中村一英 博士、長瀬由典 氏、土屋俊太郎 氏、梶雄一 氏、北原治 博士、竹内敏之 博士、山崎誠司 博士、岩田英久 博士、三木啓司 博士、宮本直樹 博士、今村真一 博士、月見泰博 博士をはじめとした医薬研究本部の皆様へ深く感謝の意を表します。また、DCE-MRI 試験において技術協力いただいた BioView 株式会社の余川隆 博士に厚く御礼申し上げます。本論文の作成は、家族の支えをなくしては為し得なかったものであり、ここに心から感謝致します。

末筆ながら、本研究の機会を与えて下さいました武田薬品工業株式会社 医薬研究本部 創薬第二研究所長 古矢修一 博士、長屋秀明 博士、同研究所 リサーチマネージャー 日下雅美 博士、中西理 博士に深謝致します。