

氏名(生年月日)	あお づ よし こ 粟 津 紀 香 (1979年2月14日)
学位の種類	博士(薬学)
学位記番号	論博 第202号
学位授与の日付	2016年3月19日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文題目	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
論文審査委員	(主査) 教授 加藤 伸一 (副査) 教授 藤室 雅弘 (副査) 教授 中山 祐治

論文内容の要旨

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。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。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。一方で、全てのがんがベバシズマブに対して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おり、抗 VEGF 薬単独療法よりも更に強力な薬剤の開発が望まれている。本研究において、著者は、抗 VEGF 療法に対する抵抗性および耐性獲得への関与が報告されている血小板由来成長因子 (platelet derived growth factor: PDGF) シグナルならびに cMet シグナルに着目し、VEGF および PDGF シグナルの強力な二重阻害薬である TAK-593、VEGF および cMet シグナルの強力な二重阻害薬である T-1840383 を創製した。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。

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

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。TAK-593 は、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (Human umbilical vein endothelial cell: HUVEC) における VEGF 依存的な増殖および VEGFR2 受容体リン酸化を強力に阻害し、その IC₅₀ 値はそれぞれ 0.30 および 0.34 nmol/L であった。また、壁細胞の一種であるヒト冠状動脈平滑筋細胞 (Human coronary artery smooth muscle cell: CASMC) における PDGF 依存的な増殖および PDGFR β 受容体リン酸化も強力に阻害し、その IC₅₀ 値はそれぞれ 3.5 および 2.1 nmol/L であった。さらに、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 誘発管腔形成を強力に阻害し、その IC₅₀ 値は 0.32

nmol/Lであった。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対して、TAK-593 を経口投与することで、CD31 陽性腫瘍血管の密度は有意に減少した。高選択的な酵素阻害プロファイルと一致して、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で、A549 担がん腫瘍に対しては、*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あり、血管内皮細胞が産生する PDGF 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。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たことから、VEGF シグナルに加えて PDGF シグナル伝達も阻害することで、より強力な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 シグナルに大きく依存している一方で、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。したがって、TAK-593 による VEGF および PDGF シグナルの二重阻害は、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。

2. 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

T-1840383 は、肝細胞増殖因子 (hepatocyte growth factor: 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、それらの IC₅₀ 値はそれぞれ 8.8 および 0.86 nmol/L であった。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、高率で腹膜再発を来すスキルス胃がん患者の予後は非常に悪く、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。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、著者らは T-1840383 の *in vivo* 抗腫瘍効果の機序のひとつとして、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。従って、T-1840383 は VEGF シグナル阻害薬と同様の血管新生阻害作用を有すると考えられる。また、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、T-1840383 の 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。ゆえに、T-1840383 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基づいて、広範囲のがん種に対して優れた抗腫瘍効果を発揮することが期待できる。

以上より、TAK-593はVEGFおよびPDGFシグナルの強力な二重阻害薬であり、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、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。

論文審査の結果の要旨

現在、がん化学療法において、血管新生抑制を標的としたVEGF阻害薬が臨床応用され、効果を挙げているが、VEGF阻害薬に対する抵抗性および耐性獲得などが報告されており、より効果的ながん治療薬の開発が望まれている。申請者である栗津紀香氏は、腫瘍微小環境を標的とした新たながん治療薬の創製を目指して、VEGFシグナルに加えて、PDGFシグナルの二重阻害薬であるTAK-593、ならびにHGF/c-Metシグナルの二重阻害薬であるT-1840383を見出し、薬理的検討から、これら二重阻害薬は現在臨床応用されている抗VEGF療法に対して抵抗性を示す腫瘍に対しても抗腫瘍活性を發揮することを明らかにし、これらの研究成果を二章に纏めた。

第一章では、VEGFおよびPDGFシグナルの二重阻害薬であるTAK-593が、ヒト臍帯静脈内皮細胞におけるVEGF依存的な細胞増殖およびVEGFR2受容体リン酸化を阻害するのに加えて、壁細胞の一種であるヒト冠状動脈平滑筋細胞におけるPDGF依存的な細胞増殖およびPDGFR β 受容体リン酸化も強力に阻害することを証明した。さらにTAK-593は、*in vitro*における血管内皮細胞のVEGF誘発管腔形成、*in vivo* ヒト肺胞基底上皮腺がん細胞株A549担がんマウスにおける血管新生および腫瘍増殖をいずれも顕著に抑制することを明らかにした。したがって、これら両シグナルを二重阻害することは、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繋がるものと考えられる。

第二章では、VEGFおよびHGF/c-Metシグナルに対する二重阻害薬であるT-1840383が、VEGF依存的な細胞増殖およびVEGFR2受容体リン酸化の阻害に加えて、HGF依存的な上皮がん細胞株のc-Met受容体リン酸化を強力に阻害することを証明した。また、*in vivo*腫瘍異種移植モデルにおいても、T-1840383はc-Metおよびその下流のERK1/2およびAKTのリン酸化を抑制し、直接的に腫瘍増殖を強力に阻害することを明らかにした。さらに、T-1840383はヒトスキルス胃がんに関与する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も強力な腫瘍増殖抑制効果を発揮することを見出した。一方、HGF/c-Metシグナルの阻害は、血管内皮細胞の増殖、遊走の促進、VEGF発現亢進などにも関与しており、HGF/c-Metシグナルの阻害は、VEGF阻害と共により強力な血管新生抑制に寄与している可能性も示した。ゆえに、T-1840383は強力な血管新生阻害および直接的な腫瘍増殖阻害作用などにより、スキルス胃がんなどを含む、より広範囲ながん種に対して優れた抗腫瘍効果を発揮するものと考えられる。

これらの研究成果は、国際学術雑誌3編に発表されており、従来の抗VEGF療法に加えて、PDGFやHGF/c-Metを二重阻害することで、より効果的な抗腫瘍効果を発揮するという興味深い仮説を立証したものであり、今後の応用も大いに期待されるものである。

学位論文とその基礎となる報文の内容を審査した結果、本論文は博士(薬学)の学位論文としての価値を有するものと判断する。