

Title	ATP競合型チロシンキナーゼ阻害剤の作用を増強する併用化学療法の開発
Sub Title	Developing effective combination therapy with ATP competitive tyrosine kinase inhibitors
Author	安田, 浩之(Yasuda, Hiroyuki)
Publisher	
Publication year	2017
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書(2016.)
JaLC DOI	
Abstract	近年、多くの分子標的治療薬が開発され、癌患者の予後改善に貢献している。分子標的治療薬のうち、有効性が報告されているものにATP競合型TKI(tyrosine kinase inhibitor)がある。ATP競合型TKIは、癌の増殖・生存に必須の働きをするチロシンキナーゼを標的としており、癌遺伝子由来のタンパクのATP結合ドメインにATPと競合的に結合することで、癌遺伝子由来のタンパクを不活性化し抗癌剤としての機能を発揮する。我々は腫瘍内ATP濃度を低下させる薬剤との併用でATP競合型TKIの効果を増強できることに注目し研究を進めた。その中で複数の腫瘍内ATP濃度を低下させる薬剤を同定した。 Recently, multiple molecular targeted drugs have been developed. Of these molecular targeted drugs, ATP competitive tyrosine kinase inhibitors improved the prognosis of lung cancer patients. Depending on the findings that ATP concentration of the cancer cells affect the efficacy of the ATP competitive tyrosine kinase inhibitors, we tried to develop a combination therapy with drugs which lower the ATP concentration of cancer cells and ATP-competitive tyrosine kinase inhibitors. By examining the effect of multiple drugs on the ATP concentration of cancer cells, we have identified several drugs which lower the ATP concentration of cancer cells.
Notes	研究種目：若手研究(A) 研究期間：2015～2016 課題番号：15H05666 研究分野：肺癌
Genre	Research Paper
URL	<a href="https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_15H05666seika">https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_15H05666seika</a>

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the Keio Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

平成 29 年 5 月 27 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2015～2016

課題番号：15H05666

研究課題名（和文）ATP競合型チロシンキナーゼ阻害剤の作用を増強する併用化学療法の開発

研究課題名（英文）Developing effective combination therapy with ATP competitive tyrosine kinase inhibitors

研究代表者

安田 浩之 (Yasuda, Hiroyuki)

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・講師

研究者番号：70365261

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 11,100,000 円

**研究成果の概要（和文）：**近年、多くの分子標的治療薬が開発され、癌患者の予後改善に貢献している。分子標的治療薬のうち、有効性が報告されているものにATP競合型TKI（tyrosine kinase inhibitor）がある。ATP競合型TKIは、癌の増殖・生存に必須の働きをするチロシンキナーゼを標的としており、癌遺伝子由来のタンパクのATP結合ドメインにATPと競合的に結合することで、癌遺伝子由来のタンパクを不活性化し抗癌剤としての機能を発揮する。我々は腫瘍内ATP濃度を低下させる薬剤との併用でATP競合型TKIの効果を増強できることに注目し研究を進めた。その中で複数の腫瘍内ATP濃度を低下させる薬剤を同定した。

**研究成果の概要（英文）：**Recently, multiple molecular targeted drugs have been developed. Of these molecular targeted drugs, ATP competitive tyrosine kinase inhibitors improved the prognosis of lung cancer patients. Depending on the findings that ATP concentration of the cancer cells affect the efficacy of the ATP competitive tyrosine kinase inhibitors, we tried to develop a combination therapy with drugs which lower the ATP concentration of cancer cells and ATP-competitive tyrosine kinase inhibitors. By examining the effect of multiple drugs on the ATP concentration of cancer cells, we have identified several drugs which lower the ATP concentration of cancer cells.

研究分野：肺癌

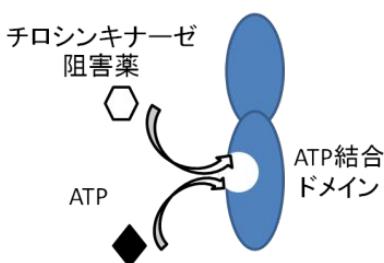
キーワード：肺癌 分子標的治療薬 ATP 濃度

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19(共通)

### 1. 研究開始当初の背景

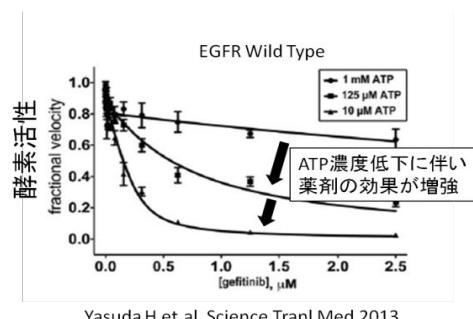
今まで多くの抗癌剤が開発されたが、現在多くの人が癌で生命を失っている。近年、多くの分子標的治療薬が開発され、癌患者の予後の改善に貢献している。分子標的治療薬のうち、盛んに開発が行われ、その有効性が多く報告されているものに ATP 競合型 TKI (tyrosine kinase inhibitor) がある。ATP 競合型 TKI は、癌の増殖・生存に必須の働きをするチロシンキナーゼを標的としている。これら ATP 競合型 TKI は、その名の通り癌遺伝子由来のタンパクの ATP 結合ドメインに ATP と競合的に結合することで、癌遺伝子由来のタンパクを不活性化し抗癌剤としての機能を発揮する。(下図)

チロシンキナーゼ阻害薬とATPの競合



これら TKI は、多くの癌種で頻繁に使用され癌患者の予後の改善に大きく貢献しているが、その効果は完全ではなく、最初から効果のない場合(一次耐性)もあれば、使用当初は効果が認められるが、長期的に使用するに伴い癌細胞が耐性を獲得し効果がなくなってしまう場合(二次耐性)もある。

申請者らの研究の中で得られたとくに重要な知見は、複数の ATP 競合型 EGFR-TKIs の感受性が EGFR タンパクに対する「ATP の親和性」と「薬剤の親和性」の“バランス”で規定されていることを見出したことである。より端的に表現すれば、腫瘍内の ATP 濃度を低下させることで、ATP 競合型 TKI の薬剤効果を増強できるということである。



図は ATP 競合型 TKI である gefitinib の効果が ATP 濃度の低下に伴い増強していることを示している。

### 2. 研究の目的

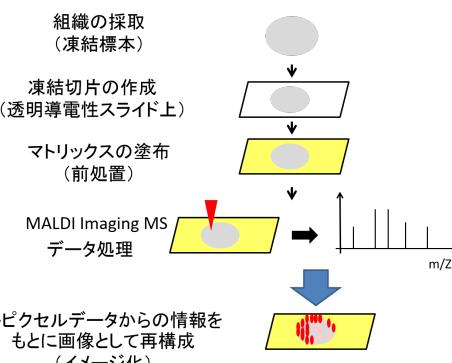
本研究の目的は、現在臨床で使用されている既存薬の中から、腫瘍内 ATP 濃度を低下させる薬剤を同定し、その薬剤と ATP 競合型 TKI を併用する、より強力な抗癌剤治療法を開発することである。

### 3. 研究の方法

「生体内」で腫瘍内 ATP 濃度を低下させる薬剤を現在臨床で使用されている既存薬の中から探索する。

具体的には、免疫不全マウス皮下に肺癌細胞株を移植し腫瘍を形成させるマウスゼノグラフトモデルを使用した。これらゼノグラフトモデルを用いてマウスに複数の薬剤を投与し、薬剤の腫瘍内 ATP 濃度にあたえる影響を評価した。マウス腫瘍内の ATP 濃度定量は Imaging mass-spectrometry (MS) をはじめとする質量分析器を使用した。

Imaging MS は、組織切片内の各局在部位(ピクセル)での標的分子を質量分析器を用いて網羅的に定量し、それを可視化することがで



きる最新の工学的 technology である(上図)。我々は、一回の解析で約 200 種類に及ぶ代謝因子を生体内に近い状態で定量化、imaging する(代謝マッピング)独自の実験基盤を確立している。

### 4. 研究成果

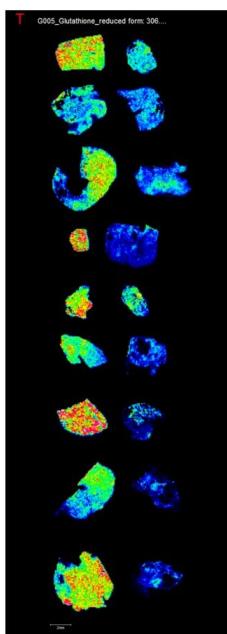
まず我々は、我々の実験系が正常に機能するかの確認のため、また腫瘍内の ATP 濃度を測定できることを確認するため、ヒト肺癌および近接する非癌部肺組織を用いた研究を行った。我々は、慶應義塾大学医学部呼吸器外科との共同研究により、肺癌および近接の非癌部肺組織を採取し保存管理するバイオバンクを構築している。

本研究では、バイオバンクに登録された 9 人の肺癌患者の癌および対になる非癌部肺組織を用いて質量分析器、および Imaging MS を用いて組織内の ATP 濃度を測定した。次の図は、その結果である。非癌部肺組織に比べて癌組織で ATP の濃度が明らかに上昇していることがうかがえる。本結果は、我々の実験系が正常に機能していること、組織内の ATP

濃度を定量することが可能であることを示している。

### 組織内ATP濃度

癌部 非癌部

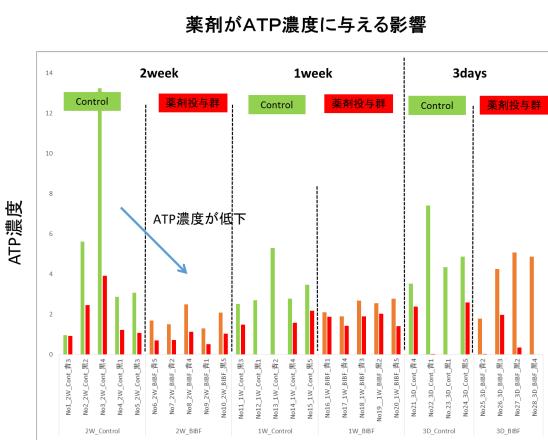


我々は、複数の薬剤が癌細胞の代謝に与える影響を評価するとともに、腫瘍内 ATP 濃度に与える影響を *in vitro* および *in vivo* で評価した。

その中で、我々はある種の血管新生阻害薬が腫瘍への血流を低下させるとともに腫瘍内 ATP 濃度を低下させることを明らかにした。

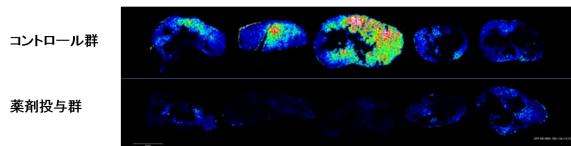
次の図は、ある薬剤を投与後にマウスから腫瘍を摘出し、そこから質量分析器を用いて TP 濃度を測定した結果である。ここでは薬剤の投与期間として、3日、1週間、2週間の 3 つのタイミングで評価を行った。

3 日、1 週間では明らかな変化は認められなかったが、2 週間の薬剤投与で腫瘍組織内の ATP 濃度が低下していることがうかがえる。



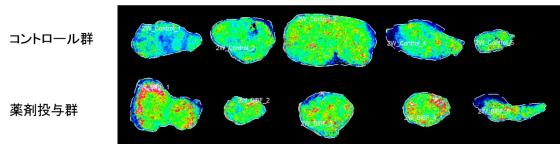
申請者らは、これら質量分析器による ATP 濃度代謝因子の定量を行うと同時に、Imaging MS を用いた、代謝産物の分布の評価もおこなっている。

図：マウスゼノグラフトモデルにおける腫瘍内ATP濃度



上図は、マウスゼノグラフトモデルを用いて腫瘍を形成させたのち、ある薬剤を 4 週間投与後の腫瘍内 ATP 濃度を Imaging MS を用いて解析した結果である。上半分のコントロール群に比べて薬剤投与群で腫瘍内 ATP 濃度が低下していることがうかがえる。

図：マウスゼノグラフトモデルにおける腫瘍内乳酸濃度



また、我々はこの際になぜ ATP 濃度が低下するかについて、薬剤投与後の癌組織における代謝産物に注目した。

上図は、薬剤投与後の乳酸の分布を Imaging MS を用いて解析した結果である。これらの結果から、同薬剤が解糖系を亢進させていることが明らかになった。

さらに、我々は複数の薬剤と ATP 競合型 TKI の併用療法についても研究を進めている。特に組織局所での ATP 濃度と薬剤（ATP 競合型 TKI）の濃度の比が重要であると考え、組織局所での薬剤濃度を Imaging MS を解析した。

今後は、これら複数の既存薬と ATP 競合型 TKI の組み合わせの中から有効であると思われるものに対して臨床応用を考えた研究を進めていく予定である。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

#### [雑誌論文](計 3 件)

- Nukaga S, Yasuda H, Tsuchihara K, Hamamoto J, Masuzawa K, Kawada I, Naoki K, Matsumoto S, Mimaki S, Ikemura S, Goto K, Betsuyaku T, Soejima K. Amplification of EGFR Wild-Type Alleles in Non-Small Cell Lung Cancer Cells Confers Acquired Resistance to Mutation-Selective EGFR Tyrosine Kinase Inhibitors. *Cancer Res.*

2017 Apr 15;77(8):2078-2089. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-16-2359. Epub 2017 Feb 15. PubMed PMID: 28202511. (査読あり)

2: Miyawaki M, Yasuda H, Tani T, Hamamoto J, Arai D, Ishioka K, Ohgino K, Nukaga S, Hirano T, Kawada I, Naoki K, Hayashi Y, Betsuyaku T, Soejima K. Overcoming EGFR Bypass Signal-Induced Acquired Resistance to ALK Tyrosine Kinase Inhibitors in ALK-Translocated Lung Cancer. Mol Cancer Res. 2017 Jan;15(1):106-114. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-16-0211. Epub 2016 Oct 5. PubMed PMID: 27707887. (査読あり)

3: Hirano T, Yasuda H, Tani T, Hamamoto J, Oashi A, Ishioka K, Arai D, Nukaga S, Miyawaki M, Kawada I, Naoki K, Costa DB, Kobayashi SS, Betsuyaku T, Soejima K. In vitro modeling to determine mutation specificity of EGFR tyrosine kinase inhibitors against clinically relevant EGFR mutants in non-small-cell lung cancer. Oncotarget. 2015 Nov 17;6(36):38789-803. doi: 10.18632/oncotarget.5887. PubMed PMID: 26515464; PubMed Central PMCID: PMC4770737. (査読あり)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

## 6 . 研究組織

(1)研究代表者

安田 浩之 (YASUDA HIROYUKI )

慶應義塾大学・医学部・専任講師

研究者番号 : 70365261

(2)研究分担者

なし ( )

研究者番号 :

(3)連携研究者

なし ( )

研究者番号 :

(4)研究協力者

なし ( )