癌細胞パネルインフォーマティクス

— 分子標的治療薬探索と感受性診断への応用 —

特集 抗がん剤の molecular targeting

矢 守 隆 夫*

Informatics based on human cancer cell line-panel—Its application to the discovery of molecular target-based drugs and the diagnosis of chemosensitivity

Studies conducted at the US National Cancer Institute (NCI) and in our laboratory show that databases including the drug sensitivities of panels of many human cancer cell lines (cancer cell line-panel) provide valuable information on the molecular pharmacology of anticancer drugs. The cancer cell line-panel is a unique system where “a wet system (biological experiments)” and “a dry system (informatics)” are efficiently combined. Its characteristic is to predict the action mechanism of a testing compound. We have been using this system for drug discovery, coupled with various target-based drug screenings. We used the system to identify a novel DNA minor-groove binder, MS-247, which has inhibitory activity against topoisomerases I and II, and potent *in vivo* antitumor activity against various human cancer xenografts. We also discovered a potent novel telomerase inhibitor, FJ 5002, by mining our database with the COMPARE algorithm, followed by experimental validation. We investigated the gene expression profiles of the cell lines by using cDNA microarrays to find profiles determining cellular chemosensitivity and new targets for anticancer drugs. Our integrated database, including the chemosensitivities and gene expression profiles of the cell-line panel, could provide a basis for drug discovery and personalized therapy.

ヒト癌細胞数十系を一括して扱い(一括された癌細胞株を癌細胞パネルとよぶ), 多数の抗がん剤に対する感受性を調べデータベース化することによって, 抗がん剤の分子薬理に関するさまざまな有用な情報が得られることが, 近年, 米国国立研究所および筆者らの研究でわかってきた。癌細胞パネル法は, ウェットな系(生物学的実験)とドライな系(情報学)が効率的に結合したユニークなシステムで, その特徴は, テスト化合物の作用メカニズムを予測できる点にある。筆者らは, このシステムを種々の分子標的スクリーニング系とカップルさせて抗がん剤探索に利用してきた。本法により, 新規マイナーグループバインダーMS-247が見いだされた。MS-247物は, トポイソメラーゼIおよびIIを阻害し, ノードマウスに移植したヒト癌ゼノグラフトに対して強力な抗癌活性を示した。また, テロメラーゼ阻害物質を探索する目的で, データベースをCOMPARE解析でマイニングし候補化合物を抽出し, 実験的にそれらの活性を検証した結果, 新規テロメラーゼ阻害物質FJ 5002を見いだされた。一方, 抗がん剤感受性を決定する遺伝子ならびに新たな創薬ターゲットを探索するため, 癌細胞パネルの各癌細胞での遺伝子発現をcDNAマイクロアレイ法により調べた。癌細胞パネルについて抗がん剤感受性データと遺伝子発現データの両者を統合した筆者らのデータベースは, 抗がん剤探索と癌の個別化治療への一つの基盤を提供するものと期待される。

Takao Yamori*

key words : cancer cell line-panel, drug discovery, chemosensitivity database, informatics, genom

癌化学療法の進歩には, より有効な新規抗がん剤の開発が必須である。最近, 抗がん剤探索は発癌・悪性度の原因であることが証明された分子(分子標的)の阻害剤に向けられている。ことに, 種々のプロテインキナーゼに対する阻害剤が開発されつつあ

り¹⁾, そのなかにはイマチニブ(グリベック), ゲフィチニブ(イレッサ)のようにすでに新薬となったものもある(図1)。既知の分子標的に加え細胞周期, アポトーシス, 浸潤, 血管新生などに関連する新たな標的についての研究が進められている。ここでは, 細胞ベースの抗がん剤スクリーニングシステムでありながら, インフォーマティクスを導入することによ

* Division of Molecular Pharmacology, Japanese Foundation for Cancer Research (財)癌研究会癌化学療法センター分子薬理部

図 1 話題の分子標的薬

表 1 平成 15 年度 スクリーニング委員会

メンバー	所属	役割分担
矢守隆夫	癌研	総括・ヒト癌細胞パネル・データベース
上原至雅	感染研	プロテインキナーゼ阻害
安藤俊夫	創価大	トポイソメラーゼ阻害
河野通明	長崎大	チューブリン阻害
済木育夫	富山医薬大	基底膜浸潤阻害
小野真弓	九大	血管新生阻害
吉田 稔	東大	ヒストンデアセチラーゼ阻害
内藤幹彦	東大	アポトーシス誘導
早川洋一	東大	構造活性相関
鶴尾 隆	東大	総括
杉本芳一	癌研	マウス P 388 白血病
馬島哲夫	癌研	細胞バンク

り、ターゲットベースのスクリーニングとしての機能を持つ「癌細胞パネル」とそのインフォーマティクスを取り上げる。

文部科学省のがん特定領域研究組織のなかに設けられた「スクリーニング委員会」(表 1)は、分子標的スクリーニングシステムを構築し、全国の研究施設から新規物質を収集し、有望な新規抗癌物質を見いだすことを目標に抗がん剤スクリーニングを実施している²⁾。この委員会は、癌細胞パネルを柱に、プロテインキナーゼ、チューブリン、トポイソメラーゼ、ヒストンデアセチラーゼなど有力な分子標的を狙ったスクリーニング系、癌転移、血管新生を阻害する物質のスクリーニング系、さらにアポトーシス誘導物質評価系の計 8 種類のスクリーニングを行っている(図 2)。

癌細胞パネルは、以下に述べるようにテスト化合

図 2 分子標的スクリーニング

表 2 癌細胞パネルとは？

- ・多様な癌細胞株の詰め合わせ
- ・化合物の薬理評価系
- ・がん細胞の個性を評価
- ・化合物/癌細胞の個性をパターン認識
- ・WET & DRY のシステム (Cell Informatics)

物の作用メカニズムを予測することができ、このシステムの中心になっている。癌細胞パネルを他のスクリーニングと組み合わせることにより、化合物の薬理評価を多角的に行うことができる。

本稿では、癌細胞パネルを用いた抗がん剤評価の概略を紹介するとともに、癌細胞パネルがオーダーメイド診断・治療への基盤情報を提供するモデルとして、ポストゲノム研究分野でも活用できることを紹介する。

癌細胞 39 株の抗がん剤感受性データベース

癌細胞パネルとは、多数の癌細胞株を集めてひとまとめにしたものを指す(表 2, 図 3)。実験はこれらを一括し同時に行う。癌細胞パネルにおける抗がん剤感受性を調べデータベース化することによって、抗がん剤の分子薬理に関するさまざまな有用な情報が得られることが、近年、米国国立研究所および筆者らの研究でわかってきた³⁻⁷⁾。

筆者らは、39 系のヒト培養癌細胞株を集め(39 種癌細胞パネル)、その薬剤感受性を一括して調べデータベース化した(図 4)。その過程で、一つの薬剤によって細胞が 50%増殖阻害を受ける濃度(GI 50)は

図 3 ヒト癌細胞パネルデータベース

図 4 73 Cell lines panel

図 6 Correlation

図 5 COMPARE program

癌細胞株ごとに異なる、すなわち個性がみられ、GI 50 をパネル全体で眺めると、その薬剤に固有のパターン (fingerprint) を示すことが明らかとなった。薬剤 A と薬剤 B の fingerprint を比較するため、筆者らは、Paull らの方法⁸⁾に基づき COMPARE プログラムを開発した⁹⁾。Pearson 相関係数は、以下の式により計算される。

$$r = [\sum (x_i - x_m)(y_i - y_m)] / [\sum (x_i - x_m)^2 \sum (y_i - y_m)^2]^{1/2}$$

ここで、 x_i , y_i はおのこの薬剤 A と薬剤 B について個々の細胞株に対する log GI 50 を示し、 x_m と y_m はおのこの x_i と y_i の平均値を示している。COMPARE プログラムは、このデータベース情報を活用するために必須なツールである (図 5)。

図 7 癌細胞 39 株の抗がん剤感受性

図 8 インフォーマティクスで作用機作(分子標的)を推定

表 3 癌細胞パネル法の活用

1. 新規作用機作を持つリードの探索
2. 弱い活性のリードをもとにより高い活性の物質をデータベースのなかから探索(3000化合物)
3. 分子標的薬剤を見直す.
*他の標的への作用はないのか?
4. 抗がん剤以外の化合物の分類

ヒト癌細胞パネルは、創薬シーズ探索に有用である。

Fingerprint による薬剤の分類

筆者らは、抗がん剤など 300 種類以上の標準物質の fingerprint をデータベース化し相互に比較した。ここでいう標準物質とは、分子標的あるいは作用機作がわかっている物質のことで、既存の抗がん剤や種々の阻害剤が含まれる。その結果、非常におもしろくかつ重要な点として、“薬剤の fingerprint による分類は作用機作による分類とよく一致する”ことが判明した(図 6)。この点は、GI 50 値を用いて、階層的クラスター解析をすることにより明確になる(図 7)。作用メカニズムに共通性のある薬剤同志はクラスターを形成する。たとえば、チューブリン結合薬(vincristine, vinblastine, colchicine, dolastatin 10, paclitaxel, docetaxel, E 7010, vinorelbine)とトポイソメラーゼ I 阻害薬(topotecan, SN-38, camptothecin)は別のクラスターを形成する。また、cisplatin および carboplatin と交差耐性を示さない oxaliplatin⁹⁾は、cisplatin および carboplatin のクラスターからは離れたところに位置している。

筆者らは最近、胃癌、乳癌、肝癌を含む 45 癌細胞株による新たな癌細胞パネルを樹立した。この新パネルにおいても、薬剤の fingerprint と作用メカニズムがよく相関することが認められた。したがって、抗がん剤感受性にバリエーションのある癌細胞株を数 10 種類集めれば、このような特性があらわれるものと考えられる。

抗がん剤感受性データベースの 薬剤探索能力癌細胞

この 39 細胞株の抗がん剤感受性データベースと COMPARE プログラムを使って薬剤探索を行うことができる。状況により種々の使い分けができる(表 3)。

1. 新規物質ではあるが分子標的も薬理作用も なにもわからない化合物 X の分子標的・作用 機作を推定する場合

化合物 X の fingerprint を分子標的・作用機作が既知の標準薬剤の fingerprint と比較する(図 8)。もし、X が標準薬剤 A と同一の fingerprint(相関係数 $r=1$)を示せば、X は標準薬剤 A と同一の分子標的・作用機作を持つとみてまず間違いない。また、逆に、X の fingerprint が標準薬剤のいずれともまったく似ていない($r=0$)ということになれば、X は少なくともデータベースのなかの標準薬剤とはまったく異なるユニークな分子標的・作用機作を持つと期待される。実際は、化合物 X が標準薬剤のどれとどの程度似ているか、相関係数をもとに評価し、その分子標的・作用機作を推測し、おもしろいと思われるものをピックアップする。そして、つぎの段階は再びウェットな実験により、実際の分子標的・作用機作や抗癌活性を調べることになる。実例を二つ示す。

第一は、合成新規抗癌物質 MS-247(図 9)である⁵⁾。当初分子標的情報がなかった MS-247 は、COMPARE 解析からトポイソメラーゼ I および II のデュアルインヒビターであることが予測され、実験でその通りであることが証明された⁵⁾。さらに、ヌードマウス-ヒトゼノグラフトの系で強力な in

図 9 癌細胞パネルにより発現された抗癌物質

図 10 Discovery of telomerase inhibitors by COMPARE analysis

vivo 抗癌活性が証明された⁵⁾。

第二の例は、天然物の thiazinotrienomycin B(図 9)である¹⁰⁾。この物質は、非常に低い濃度(<0.1 micro M)で癌細胞増殖阻害を起こし、COMPARE 解析結果は、既存の抗がん剤とは異なる作用メカニズムを持つと推測されたので、動物モデルでの試験に進めたところ、ヒト乳癌 BSY-1 を移植したゼノグラフトに対し明らかな抗癌活性を示した。その後の解析で thiazinotrienomycin B は、チューブリン重合を阻害することが示されたので、おそらく従来のチューブリン結合薬とは異なる作用メカニズムを持つだろうと予測される。

2. おもしろい薬理活性を持つ化合物 Y が手もとにあるがもっと強い活性を持つ化合物を探したい場合

抗がん剤感受性データベースのもう一つの使い方は、いわゆる *in silico* の化合物スクリーニングである。すなわち、データベースのなかから目差す薬理活性を持つ化合物を検索するというものだ。この場

合は、化合物 Y の fingerprint を標準物質ではなく、データベースのなかの他のすべての化合物と比較する。データベースには、過去に前項の解析にかけられたテスト化合物の fingerprint 情報が蓄積されている。現状のデータベースには 3,000 化合物が登録されていることを図 8 に示す。そのなかには作用機作不明のものが多数あり、それらのなかに目差す化合物が眠っている可能性がある。COMPARE 解析で化合物 Y とよく似た fingerprint を持つ化合物を抽出できれば、そのなかに目差す高活性化合物があるかどうかをウェットな実験で試験をする。つまり、Y をリードに *in silico* のスクリーニングで候補物質の絞り込み抽出を行う。実例として筆者らは、弱いテロメラーゼ阻害活性を持つベルベリンをリードに強力なテロメラーゼ阻害活性を持つ MKT-077 と FJ-5002(図 10)を選別した¹¹⁾。この場合おもしろいのは、ベルベリンと FJ-5002 の化学構造は骨格がまったく異なる点で、置換基を変えるなどの通常の合成展開ではできないダイナミックなやり方で活性構造体が得られたことになる(図 10)。

3. ある分子標的に対し開発された化合物 Z の再評価：予期せぬ別の標的に作用しうるかどうかを簡便に知りたい場合

この場合は、前々項と同じことをすればよい。以下の実例をあげる。

VEGF レセプターキナーゼ(FLT-1)阻害スクリーニング系におけるヒット化合物 β -hydroxyisonalerylshikonin(図 9)が上記スクリーニング委員会の上原と昭和大学の中谷により見いだされた¹²⁾。この化合物は、COMPARE 解析の結果、弱いながらチューブリン阻害剤との類似が示唆され、実際ウェットな実験で同スクリーニング委員会の河野によりチューブリン阻害活性が証明された。

以上、癌細胞パネルは、薬剤探索法としてインフォーマティクスを採り入れたユニークなシステムであり、実用的有用性を備えていることを紹介した。

図 11 Molecular pharmacology of anticancer drugs

図 12 A problem in cancer chemotherapy

<u>LUNG (7)</u>	<u>STOMACH (6)</u>	<u>OVARIAN (5)</u>	<u>MELANOMA (1)</u>
NCI-H23	St-4	OVCAR-3	LOX-IMVI
NCI-H226	MKN-1	OVCAR-4	
NCI-H522	MKN-7	OVCAR-5	RENAL (2)
NCI-H460	MKN-28	OVCAR-8	RXF-631L
A549	MKN-45	SK-OV-3	ACHN
DMS273	MKN-74		
DMS114		<u>BRAIN (6)</u>	<u>PROSTATE (2)</u>
		U251	DU-145
		SF-268	PC-3
		SF-295	
<u>COLON (5)</u>	<u>BREAST (5)</u>	SF-539	
HCC-2998	HBC-4	SNB-75	
KM-12	BSY-1	SNB-78	
HT-29	HBC-5		
HCT-15	MCF-7		
HCT-116	MDA-MB-231		

図 13 39 Human cancer cell lines panel

細胞パネルとポストゲノム研究 ——薬剤感受性診断への応用

抗がん剤の作用メカニズムは複雑で、抗がん剤が一つの作用点(標的)をヒットしてもそれだけで、癌細胞が死ぬ、あるいは癌細胞の増殖が止まるわけではない。

癌細胞には少なくとも1万種類以上の遺伝子産物(蛋白質)が発現し、そのなかの特定の遺伝子産物群が抗がん剤の作用に関わっていると考えられる(図11)。すなわち、抗がん剤の作用を決定する遺伝子産物の種類や発現量によって個々の癌細胞における抗がん剤の有効性が異なってくる、そのため抗がん剤の効き目が癌の種類によって、さらに患者ごとにも異なるという問題を生じていると考えられる(図12)。実際は、さらに薬物の体内動態の個人差を生じるSNPsの問題がこれに加わるので、事態はさらに複雑だが、筆者らは、癌細胞自体の持つ薬剤感受性の個性を遺伝子発現の面からみようとしている。39種癌細胞パネルについて60種類ほどの抗がん剤感受性を調べてみると、細胞株レベルでも明らかに個性があることがわかる。したがって、癌細胞パネルは、抗がん剤感受性を決定する遺伝子産物群を明らかにするモデルとして有用と考えられる。

筆者らは、ポストゲノム研究手法を用いて抗がん剤感受性決定遺伝子群の抽出・同定を開始した。39種癌細胞パネルについて、①抗がん剤感受性、ならびに、②ゲノムワイドな遺伝子発現をcDNAマイクロアレイ法やプロテインチップ法などで調べ、③インフォーマティクスにより抗がん剤感受性決定遺伝子の抽出を進めている(図13)。癌細胞株数をさらに増やし、胃癌、乳癌、肝癌については、同一臓器癌内での感受性差を規定する遺伝子の抽出も試みている。これまでに、DNAマイクロアレイ法による解析データを用い、薬剤感受性と遺伝子発現の間に相関がみられることを認めている(図14、赤のクラスターは遺伝子発現が高いと薬剤感受性も高い関係にあることを、緑のクラスターは遺伝子発現が高いと薬剤感受性が低い関係にあることを示す)⁶⁾。これらの遺伝子のなかには、さまざまなクラスの抗がん剤の感受性と相関した発現を示すものと、特定の抗がん剤の感受性と特異的に相関した発現を示すものがみられた。後者の遺伝子は、個々のクラスの抗がん剤の有効性を反映するものと思われる。また、既知の相関も確かめられた。たとえば、topoisomerase II α およびII β の発現はetoposide(topoisomerase II阻害剤)への感受性と正の相関を示し、thymidylate synthetaseの発現は5-fluorouracilへの感

図 14 Pearson 相関係数による薬剤と遺伝子の二次元クラスタリング

受性と負の相関を示した。一方、おおくの予期せぬ遺伝子も認められた。AKR1B1とDDB2の発現は種々の抗がん剤への感受性と正の相関を示し、LIMK2 and CTSHの発現は種々の抗がん剤への感受性と負の相関を示した⁶⁾。これらの関係については、別の癌細胞モデルでの検証、因果関係の有無を調べるなどが今後の課題である。

さらに、これらの解析を通じて筆者らは、相関解

析のパラメーターである Pearson 相関係数の値は決して高くならないことに気づいた。おそらくこれは、癌細胞の抗がん剤感受性が1個の遺伝子発現だけでは決まらないことの反映であり、むしろ当然と思われる。抗がん剤感受性のパスウェイ上にある一連の遺伝子をまとめて明らかにできるような新たなデータマイニング法を開発することが重要である。抗がん剤の投与により変化する遺伝子発現を捉

えることも重要である¹⁴⁾。これらの研究が、抗がん剤感受性予測法の開発ならびに抗がん剤の新規ターゲット発見につながるものと期待される。

おわりに

癌細胞パネルは、抗がん剤探索のためのモデル、および抗がん剤感受性予測法開発のためのモデルとして有用である。特に後者においては現時点で、ゲノム情報に薬剤感受性情報を加えることにより、バイオインフォマティクスの新たな方向を示すことができたと思う。データベースは、拡張するにつれ強力なポテンシャルを持つことが実感され、今後、薬剤感受性データおよび遺伝子発現データをさらに拡充してゆく予定である。癌細胞株のバリエーションは現時点で73系まで増えている。癌細胞の薬剤感受性における個性を考えるためのよりよいモデルになればと考えている。

本データベースを活用し、有効なデータマイニング法を開発することにより、今後多様なアウトプットが期待できる。たとえば、抗がん剤感受性を決定する遺伝子を解析するなかで、有望な新たな創薬ターゲットが見いだされる可能性があり、それを用いたスクリーニング系による新薬の探索が期待される。また、癌細胞パネルは fingerprint (バイオロジカルな作用様式) で化合物を分類できるという特徴を持つので、本系における構造活性相関解析から新しいドラッグデザインが生まれることも期待される。分子薬理部は、本系を創薬に関して、ターゲット探索と創薬シード探索の両面から多様なアプローチを生み出すプラットフォームにしたいと考えている。

文 献

1) Shawver LK, Slamon D, Ullrich A: Smart drugs:

- tyrosine kinase inhibitors in cancer therapy. *Cancer Cell* 1: 117-123, 2002.
- 2) 矢守隆夫, 安藤俊夫, 上原至雅, 小野眞弓, 河野通明・他: 制がん剤の分子標的スクリーニング成績—わが国における制がん剤候補物質のスクリーニング成績・第9報—, *癌と化学療法* 29(Suppl. 2): 225-415, 2002.
- 3) Weinstein JN, Myers TG, O'Connor PM, Friend SH, Fornace AJ et al.: An information-intensive approach to the molecular pharmacology of cancer. *Science* 275: 343-349, 1997.
- 4) Scherf U, Ross DT, Waltham M, Smith LH, Lee JK et al.: A gene expression database for the molecular pharmacology of cancer. *Nat Genet* 24: 236-244, 2000.
- 5) Yamori T, Matsunaga A, Sato S, Yamazaki K, Komi A et al.: Potent antitumor activity of MS-247, a novel DNA minor groove binder, evaluated by an *in vitro* and *in vivo* human cancer cell line panel. *Cancer Res* 59: 4042-4049, 1999.
- 6) Dan S, Tsunoda T, Kitahara O, Yanagawa R, Zembutsu H et al.: An integrated database of chemosensitivity to 55 anticancer drugs and gene expression profiles of 39 human cancer cell lines. *Cancer Res* 62: 1139-1147, 2002.
- 7) Yamori T: Panel of human cancer cell lines provides valuable database for drug discovery and bioinformatics. *Cancer Chemother. Pharmacol*, 2003, (In press).
- 8) Paull KD, Shoemaker RH, Hodes L, Monks A, Scudiero DA et al.: Display and analysis of patterns of differential activity of drugs against human tumor cell lines: development of mean graph and COMPARE algorithm. *J Natl Cancer Inst* 81: 1088-1092, 1989.
- 9) Di Francesco AM, Ruggiero A, Riccardi R: Cellular and molecular aspects of drugs of the future: oxaliplatin. *Cell Mol Life Sci* 59: 1914-1927, 2002.
- 10) Hosokawa N, Iinuma H, Takeuchi T, Sato S, Yamori T et al.: Anticancer and Some Biological Activities of Thiazinotrienomycin B. *J Antibiot* 53: 306-308, 2000.
- 11) Naasani I, Seimiya H, Yamori T, Tsuruo T: FJ 5002: a potent telomerase inhibitor identified by exploiting the disease-oriented screening program with COMPARE analysis. *Cancer Res* 59: 4004-4011, 1999.
- 12) Hashimoto S, Xu Y, Masuda Y, Aiuchi T, Nakajo S et al.: Hydroxyisovalerylshikonin Is a Novel and Potent Inhibitor of Protein Tyrosine Kinases. *Jpn J Cancer Res* 93: 944-951, 2002.
- 13) Dan S, Yamori T: Repression of Cyclin B1 Expression after Treatment with Adriamycin, but Not Cisplatin in Human Lung Cancer A 549 Cells. *Biochem Biophys Res Commun* 280: 861-867, 2001.
- 14) Zhou Y, Gwadry FG, Reinhold WC, Miller LD, Smith LH et al.: Transcriptional regulation of mitotic genes by camptothecin-induced DNA damage: microarray analysis of dose- and time-dependent effects. *Cancer Res* 62: 1688-1695, 2002.