がん治療ターゲットとしてのサバイビンの可能性と サバイビン発現抑制薬 YM155 の非臨床研究

喜多 彩, 中原 崇人, 竹内 雅博, 木野山 功, 山中 堅太郎,
峯松 剛, 光岡 圭介, 伏木 洋司, 三好 荘介, 笹又 理央, 宮田 桂司

要約: 正常細胞に何らかの異常が生じると、生体は異常な細胞を修復あるいは除去することによって、その恒常性を維持する。また、正常細胞において、アポトーシスによる細胞死誘導機構が破綻すると、異常な細胞は除去されることなく、がんによって代表される様々な疾患の引き金となる。アポトーシス制御に重要な因子の1つとして、IAP (Inhibitor of Apoptosis) ファミリータンパク質が知られており、これまでに8つのIAPファミリーが同定されている。IAPファミリーの中でも特にサバイビンは、発現抑制による細胞死誘導の他に、がん特異的発現、細胞の有糸分裂制御、そして既存抗がん薬の感受性を増強させるという点で注目を集め、がん治療のターゲットとして今日まで多くの研究がなされている。YM155はアステラス製薬株式会社で創製されたサバイビン発現抑制薬であり、各種ヒトがん細胞株に対して増殖阻害作用を示した。またヌードマウス担癌モデルにおいて、体重に影響を与えることなく腫瘍の退縮をとともう抗腫瘍作用を示した。siRNAやリボザイムによるサバイビンの機能抑制によって、既存抗がん薬の感受性が増強することが知られているが、YM155は既存抗がん薬との併用投与により、毒性の増悪化なく既存薬の薬効を増強させた。さらに、臨床で広く診断に用いられているpositron emission tomography (PET)を用いた評価においてはYM155の薬効が非侵襲的に検出でき、臨床におけるPET診断の有用性が確認された。以上から、YM155はサバイビン発現抑制作用により、がん細胞に対し選択的に抗腫瘍効果を発揮するユニークな新規抗がん薬となることが期待される。

はじめに

サバイビンはIAPファミリータンパク質の1つであ

り、これまでにXIAP, cIAP1, cIAP2, ML-IAP/Livin, NAIP, ILP2, apollonそしてサバイビンの8つのIAPファミリーが同定されている(1, 2)。何れのファミリーにも共通してbaculovirus IAP repeat (BIR) ドメインが認められ、N末端側に1~3個繰り返している。いくつかのIAPファミリーにおいてはこのドメインがアポトーシスの実行に必須なカスパーゼと相互作用することが知られている(3)。サバイビンはBIRドメインを1つだけ持ち、IAPファミリーの中では最も小さな142アミノ酸からなるタンパク質である(1, 2)。1997年にAltieriらによって、がん細胞におけるアポトーシス制御因子としてサバイビンの存在が初めて示されて以来(4)、①正常細胞での発現が低くがん細胞特異性がある、②がん細胞の有糸分裂およびアポトーシスシグナルを制御している、③既存抗がん薬の耐性メカニズムに関与している可能性が示され、がん治療のターゲットとして今日まで多くの研究がなされている。YM155は新規の低分子サバイビン発現抑制薬であり、非臨床研究にて抗腫瘍効果が示されている(5)。First in classの低分子サバイビン発現抑制薬として、サバイビン研究の歴史と共にアステラス製薬で蓄積されたYM155の非臨床データを紹介したい。

1. がん治療標的としてのサバイビン

サバイビンはCD34陽性の骨髄由来の幹細胞、胸腺細胞、胎盤、および結腸粘膜などを除いては正常組織での発現は認められない(1, 2)。一方、表1に示すように、多くのがん細胞で発現していることが知られており、さらにはサバイビンの発現量のがんの悪性度や予後と相関することを示す報告もされている(1)。

アポトーシスシグナルはFasやTNFレセプターによる刺激の一部を除き、最終的にミトコンドリアに集

キーワード：がん、アポトーシス、サバイビン、YM155、抗腫瘍作用。 原稿受領日：2010年6月25日、依頼原稿
アステラス製薬(株) 研究本部開発薬理研究所 (〒305-8585 つくば市御幸が丘21) E-mail: aya.kita@jp.astellas.com
Title: Survivin suppressant: a promising target for cancer therapy and pharmacological profiles of YM155
Author: Aya Kita, Takahito Nakahara, Masahiro Takeuchi, Isao Kinoyama, Kentaro Yamanaka, Tsuyoshi Minematsu, Keisuke Mitsuoka, Hiroshi Fushiki, Sousuke Miyoshi, Masao Sasamata, Keiji Miyata

表1 各種がん細胞におけるサバイビンの発現頻度

がんのタイプ	がん患者におけるサバイビン発現頻度 (a: mRNA, b: IHC)
悪性メラノーマ	98 ^a -100 ^b % ^{2,3}
びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫	60 % ^{4b}
乳 癌	70.7-90.2 % ^{1a}
急性リンパ性白血病	68.8 % ^{1a}
急性骨髄性白血病	54.8 % ^{1a}
膀胱癌	57.8 % ^{1a}
大腸癌	63.5 % ^{1a}
食道癌	80 % ^{1a}
胃 癌	34.5-68 % ^{1a}
肝臓癌	41-87 % ^{1a}
肺 癌	85.5 % ^{1a}
膵臓癌	76.9-88 % ^{1a}

¹Cancer Science. 2008;99:1709-14, ²Int J Cancer. 2005;117:1032-8, ³J Invest Dermatol. 1999;13:1076-81, ⁴Blood. 2000;96:1921-5.

約される。DNA 損傷によって p53 が活性化されると Bcl-2 ファミリータンパク質である Bax, Noxa, PUMA 等の転写が亢進する。Bcl-2 ファミリータンパク質は主にミトコンドリアの膜透過性を制御し、ミトコンドリアからのチトクロム c の放出を制御しているとされる。チトクロム c は Apaf-1 に結合し、カスパーゼ-9 との活性化複合体を形成し、活性型カスパーゼ-9 はエフェクターカスパーゼであるカスパーゼ-3, -7 を活性化しアポトーシスが実行される(6-8)。サバイビンのがん増殖における重要な機能の1つが、サバイビンが抗アポトーシスタンパク質として、ミトコンドリアを介するアポトーシスによって活性化するカスパーゼ-9 を阻害していることである。サバイビンはカス

パーゼ-9 に直接結合はせずに XIAP 等のコファクターと相互作用することでカスパーゼ-9 の活性を阻害しているとの説が有力となっている(1, 2) (図1)。

サバイビンに特徴的な機能として有糸分裂の制御が知られている。中心体と微小管に存在するサバイビンが細胞周期中期と後期に微小管の機能を制御していること、また細胞周期中期においては動原体に局在し、染色体パッセンジャータンパク質であるオーロラ B キナーゼ、INCENP および Borealin/Dasra と相互作用し微小管の動態や安定化に関与していることが報告されている(1, 2) (図2)。さらにタキサン系やプラチナ系を始め、多くの細胞傷害性の既存抗がん薬や放射線治療に対して抵抗性を示すがん細胞ではサバイビンの発現が上昇している(1, 2)。またサバイビンの siRNA やリボザイムを用いたサバイビンの機能的阻害によって、既存薬の感受性が増強することも示されており(1, 2)、薬剤耐性克服の観点からもサバイビンの機能や発現阻害は魅力的な治療戦略と考えられている。

2. YM155 の薬理学的特性

1) YM155 の創製

アステラス製薬ではサバイビン発現阻害作用を示す新規低分子化合物創製を目的として HeLa-S3 細胞にトランスフェクトしたサバイビン遺伝子プロモーター/ルシフェラーゼ系を用いたレポーターアッセイで high-throughput screening (HTS) を行い、ヒット化合物から一連の最適化研究により YM155 を見出すことに成功した(5)。

2) YM155 によるサバイビン選択的な発現抑制作用および in vitro 細胞死誘導作用

ヒト前立腺癌由来細胞株 PC-3 細胞に対する YM155 のサバイビン発現抑制作用を定量的 RT-PCR 法およびウエスタンブロット法により検討した。YM155 は 10

図1 サバイビンのアポトーシス制御

図2 サバイビンの有糸分裂制御

nM 以上の濃度において、サバイビン mRNA の発現を用量依存的かつ有意に抑制し、その作用は薬剤処理 6 時間後から認められた (図 3)。また、YM155 は 10 nM 以上の濃度において、サバイビンタンパク質の発現を抑制し、その作用も薬剤処理 6 時間後より認められた (図 3)。次に YM155 のサバイビン特異性を検討する目的で、PC-3 細胞に YM155 を添加してから 24 時間後における細胞内のサバイビンおよび種々のタンパク質の発現量をウエスタンブロット法により比較検討した。YM155 は 10 nM および 100 nM において、PC-3 細胞のサバイビン発現を抑制したが、サバイビンを除くその他の IAP ファミリータンパク質 (c-IAP2 および XIAP) および Bcl-2 ファミリータンパク質 (Bcl-2, Bcl-XL および Bad) の発現は抑制しなかった (図 4)。また、YM155 の添加から 48 時間後において、10 nM 以上の濃度で用量依存的かつ有意な細胞生存率の減少およびカスパーゼ活性の上昇を認め、細胞死の誘導が確認された。

3) YM155 の抗腫瘍スペクトラム

YM155 の抗腫瘍スペクトラムを明らかにする目的で、各種ヒトがん細胞株 127 細胞を用いたパネルスクリーニングを実施した。その結果、YM155 が各種ヒ

トがん細胞に対して広い抗腫瘍スペクトラムを有することが示唆された。非小細胞肺癌、ホルモン抵抗性前立腺癌、メラノーマ、卵巣癌、乳癌、肉腫、悪性リンパ腫および白血病由来の細胞株が YM155 に対して特に高い感受性を示すものと推察された。また、YM155 は腫瘍抑制因子である p53 の変異株に対しても p53 野生株と同等の活性を有していることも示された。p53 は DNA 損傷、がん遺伝子の活性化、低酸素状態などの多様なストレス刺激に応答して細胞周期の停止とアポトーシスを誘発するが、半数以上の悪性腫瘍において p53 遺伝子の変異や欠失が認められ、それが化学療法や放射線治療に対する抵抗性の一因となっている。従って、YM155 の細胞増殖阻害作用が p53 変異の有無に依存しないことは、治療戦略上の利点の 1 つであると考えられている。

4) YM155 の最適投与レジメンの選択

臨床試験デザインを考える上で、安全かつ薬効を最大限発揮しうる投与レジメンを決定することは非臨床研究の重要な役割の 1 つである。In vitro の検討によって、YM155 は短時間高濃度で暴露するよりも、むしろ処理時間依存的に増殖阻害作用が向上することが示唆されたため、in vivo 試験で更なる検証を実施した。

定量的 RT-PCR 法

ウエスタンブロット解析

図 3 YM155 によるサバイビン mRNA およびタンパク質発現の抑制作用 (PC-3 細胞)

(A), (B) 定量的 RT-PCR 法によりサバイビン mRNA を定量した。サバイビン mRNA 量は G3PDH mRNA の発現量を内部標準として補正した。図中の各カラムおよび点は独立した 4 回の試験で得られた各濃度および時点についての平均値 ± 標準誤差を示す。** 対照あるいは 0 時間目に対する有意差を示す (**P < 0.01, Dunnett の多重比較検定)。(C), (D) ウエスタンブロット解析によりサバイビンおよびアクチンタンパク質を検出した。(A), (C) YM155 を各濃度において 24 時間作用させた。(B), (D) YM155 を 100 nM を作用させた。(Nakahara T, et al. Cancer Res. 2007;67:8014-21. より改変)

ヒトホルモン非依存性前立腺癌 PC-3 皮下移植マウスモデルにおいて YM155 の抗腫瘍作用を静脈内投与および皮下持続投与において最大耐用量 (MTD) まで投与して比較したところ, YM155 を急速静脈内投与した時の MTD (2 mg/kg/day) においては 64% の有意な腫瘍増殖抑制作用を示した (図 5). 一方, YM155 を皮下持続投与した時の MTD (10 mg/kg/day) および 1/3MTD (3 mg/kg/day) においては, 腫瘍退縮作用を示した (図 5). 以上の結果から, YM155 の *in vivo* 抗腫瘍作用は薬物暴露時間の延長により増強する時間依存性であることが示唆され, YM155 の投与スケジュールとしては急速静脈内投与よりも持続投与が適切であると考えられた. また同モデルにおいて YM155 の 3 mg/kg/day の皮下持続投与における血漿中および腫瘍内未変化体濃度を比較した. その結果, YM155 は血漿中と比較して約 20 倍高い腫瘍移行性を有する薬剤であることが示され (図 6), また YM155 はある種のトランスポーターによって腫瘍内に取り込まれ薬

効を発揮することが示唆された (9).

5) YM155 のヒトがん細胞担癌マウスにおける *in vivo* 抗腫瘍効果

ヒト非小細胞肺癌 H358 皮下移植マウスモデルを用いて, YM155, シスプラチンおよびパクリタキセルの抗腫瘍作用を評価した. YM155 の皮下持続投与は投与開始時と比較して有意な腫瘍退縮作用を示した. また腫瘍退縮を示す用量においても体重減少は見られなかった. 一方既存抗がん薬であるシスプラチンは対照群と比較して有意な腫瘍増殖抑制作用を示したが, 腫瘍退縮は示さなかったと同時に顕著な体重減少を示した. パクリタキセルは投与開始時と比較して有意な腫瘍退縮作用を示したが, 同時に顕著な体重減少を示した. 以上のことから, YM155 は既存抗がん薬と比較して強い腫瘍退縮作用と広い安全域を示す薬剤であることが示唆された. また, YM155 の腫瘍退縮作用は悪性黒色腫, 乳癌, NHL 等の担癌マウスモデルにおいても同様に示された.

図 4 YM155 によるサバイビンおよび各種タンパク質発現の抑制作用 (PC-3 細胞)
(Nakahara T, et al. Cancer Res. 2007;67:8014-21. より改変)

図 5 YM155 の抗腫瘍効果に対する投与スケジュールの影響 (PC-3 細胞)

各点は平均値±標準誤差を示す (n=5). 図中の用量は 1 日あたりの投与量を示す. (Nakahara T, et al. Cancer Res. 2007;67:8014-21. より改変)

図6 腫瘍移植ヌードマウスにYM155を3 mg/kg/dayの投与速度で3日間皮下持続投与したときの血漿および腫瘍中未変化体濃度(PC-3細胞)

各点は平均値±標準誤差を示す (n=3). (Nakahara T, et al. Cancer Res. 2007;67:8014-21. より改変)

6) YM155 のヒトがん細胞担癌マウスにおける in vivo 併用試験

多くのがん治療の基本は既存薬との併用療法であり、薬効面で併用相乗効果を示すパートナーを見出す研究は、開発するがん腫選択にも大きな影響を与えるため開発戦略上非常に重要である。YM155 と併用する最適の抗悪性腫瘍薬を検討するため、我々はヒト非小細胞肺癌 Calu6 皮下移植マウスモデルを用いて各種既存薬との併用試験を行った。その結果、ドセタキセルの他、ゲムシタビン、ビノレルビン、シスプラチン、カルボプラチンおよびドキシソルビシンとの組み合わせでYM155は体重減少の有意な増悪を伴うことなく、それぞれの単独群の効果を有意に上回る併用効果を示した。サバイビンが化学療法薬の耐性に関与している報告は多数なされているが、特にドセタキセルに代表されるタキサン系薬剤においては、その投与によってp34cdc-2 (Cdk1) 活性の上昇に伴い微小管上のサバイビンが安定化し、微小管の脱重合阻害による細胞分裂阻害作用を有するタキサン系薬剤の感受性を低下させることが示唆されている(10)。またヒト NHL 細胞株 WSU-DLCL-2 皮下移植マウスモデルを用いた抗CD20抗体リツキシマブとの併用試験においては、それぞれの薬剤の単独投与が有意な抗腫瘍効果を示さない用量の併用においても完全退縮例を伴う薬効が示された。リツキシマブの作用機序としては抗体依存性細胞介在性細胞障害作用 (ADCC) や補体依存性細胞障害作用 (CDC) の他に、CD20 の下流で NF- κ B, ERK/MAPK または p38 経路を阻害することによるアポトーシス誘導作用が報告されている(11)。さらに、リツキシマブが IAP ファミリータンパク質と並ぶ抗アポトーシスタンパク質である bcl-2 ファミリータンパク質活性を阻害することを示唆する報告もなされている(12)。

以上のことから、我々はリツキシマブとYM155により、細胞内で異なるアポトーシス関連因子が同時に抑制され、併用効果が得られていると考えている。

7) イメージング技術を用いた臨床試験デザインに向けて

臨床において positron emission tomography (PET) を用いたYM155の抗腫瘍作用の早期検出を目指し、ヒト NHL 細胞株 WSU-DLBCL-2 皮下移植マウスモデルにおけるPETを用いた抗腫瘍試験を実施した。YM155の皮下持続投与3日目において、糖代謝マーカーである [18 F]-2-fluoro-2-deoxy glucose (18 F-FDG)、細胞生存マーカーである 3'-deoxy-3'-[18 F]fluorothymidine (18 F-FLT) を用いたPETスキャンを実施したところ、腫瘍内における両トレーサー集積を指標としてYM155群はコントロール群に対し有意な抑制を示した。また、免疫組織化学的評価により細胞増殖マーカーであるKi-67染色からも同様の傾向が観察され、PETによるデータが細胞生存を反映している事が示唆された。一方、この時の腫瘍体積はコントロール群に対し抑制効果が見られていたものの有意な差は認められなかった。以上のことから、臨床においてもYM155の薬効検出にはPETイメージングが有効であり、腫瘍退縮評価と比較して敏感かつ早期に検出できる事が示唆された。近年のイメージング技術の進歩は臨床におけるがん検出・診断分野のみならず、創薬戦略上においても多大な恩恵をもたらしている。特にPETは、computed tomography (CT) とならびがん診断分野では多用されているイメージング技術であるが、形態情報を提供するCTとは異なりPETは機能情報を得られることから、がん細胞内の代謝活性や細胞生存状況を推し量ることができるツールとして期待されている。イメージング技術を用いた非臨床試験からもYM155

表2 Survivin 阻害薬臨床開発状況

Drug Name	Company	Technologies	Therapy areas	Clinical Status
YM 155	Astellas	低分子	・メラノーマ（ドセタキセル併用） ・非ホジキンリンパ腫（リツキシマブ併用） ・乳癌（ドセタキセル併用）	PII
EM-1421	Erimos	低分子	白血病，固形癌	PI
LY-2181308	Lilly	アンチセンス	前立腺癌（ドセタキセル併用） 急性骨髄性白血病	PII
SPC3042	Santaris Pharma	アンチセンス	固形癌	PI
Survivac	Merck KGaA	ワクチン	固形癌	PI

の有用性が示されているが，特にPETのように臨床で使用される技術を用いて非臨床試験を実施する事は，臨床試験への橋渡しの役割を担う事が期待され，今後創薬戦略におけるイメージング技術の適応範囲はますます広がっていく事が期待される。

3. YM155 および他のサバイビン阻害薬の臨床開発状況

現在アンチセンス，低分子化合物，免疫療法，リボザイム，siRNA，ドミナントネガティブ変異体を用いたサバイビン阻害薬研究が進んでいるが，実際臨床試験に入っているものは現時点では限られている（表2）。サバイビンアンチセンスであるLY2181308は現在前立腺癌および急性骨髄性白血病で第Ⅱ相試験中である。サバイビンの転写阻害する薬剤としてはYM155とTerameprocol（EM-1421）が臨床試験に入っている。TerameprocolはDNA binderであり，転写因子であるSp-1と競合することで，Sp-1により発現制御されているサバイビンや，CDC2，VEGF，などの発現を阻害すると考えられており（13），現在第Ⅰ／Ⅱ相試験中である。YM155の研究・開発において非臨床研究チームは，①サバイビン発現の他にサバイビンの機能的阻害によって実際細胞増殖阻害・アポトーシスが認められるがん腫，つまりがん細胞の増殖に対してサバイビンががん細胞の生命維持装置のように働いていると考えられるがん腫，②YM155の感受性が高いがん腫，③タキサン系薬剤やリツキシマブのように併用効果を裏付ける科学的根拠が存在する薬剤が標準治療となっているがん腫という3つの観点で臨床開発候補がん腫を臨床開発部門に提案し，さらに臨床アンメットニーズ，市場性，臨床上の併用薬剤の位置づけも踏まえ臨床評価がん腫を決定した。現在，悪性黒色腫および乳癌患者でのドセタキセル併用，非ホジキンリンパ腫でのリツキシマブ併用で第Ⅱ相試験が進んでいる。

4. 今後の展望

がんの臨床では，同一のカテゴリーに分類される症例であっても治療への応答性が異なることが知られている。また様々な分子標的薬の開発によって治療オプションが広がるにつれ，組織病理学的，分子生物学的な分類によって症例を細分化し，治療を最適化する「個別化医療」の必要性が認識されるようになった。分子生物学的アプローチによる分子基盤の理解によって，がん治療における分子標的を正しく認識することが可能となり，がんが増殖生存する上で強く依存している要因，アキレス腱が存在するという「oncogene addiction」の概念が広く受け入れられるようになった。サバイビンにおいても既存の抗がん薬投与で誘導されるアポトーシス抵抗性に対するサバイビンの寄与に関する研究から，サバイビンががん細胞の生命維持装置のように働いている状態が存在することが示唆されている。これらの情報に加え，YM155によるサバイビン発現抑制に関与する転写因子の同定や，YM155の腫瘍内への取り込み機構の解明を目指した非臨床研究からYM155に感受性の高い状態を捉えることも重要である。今後これらの非臨床研究から，最も抗腫瘍効果が期待できる症例の絞込みが可能となることを期待したい。

文 献

- 1) Mita AC, et al. Clin Cancer Res. 2008;14:5000-5005.
- 2) Altieri DC, et al. Nat Rev Cancer. 2008;8:61-70.
- 3) Srinivasa M. Mol Cell. 2008;30:123-135.
- 4) Ambrosini G, et al. Nat Med. 1997;3:917-921.
- 5) Nakahara T, et al. Cancer Res. 2007;67:8014-8021.
- 6) Straszewski-Chavez SL, et al. Endocr Rev. 2005;26:877-897.
- 7) McBride CB, et al. Expert Opin Ther Targets. 1999;3:391-411.
- 8) Salvesen GS, et al. Nat Rev Mol Cell Biol. 2002;3:401-410.
- 9) Minematsu T, et al. Drug Metab Dispos. 2009;37:619-628.
- 10) O'Connor DS, et al. Cancer Cell. 2002;2:43-54.
- 11) Bonavida B, et al. Oncogene. 2007;26:3629-3636.
- 12) Emmanouilides C, et al. Cancer Biother Radiopharm. 2002;17:621-630.
- 13) Chang CC. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004;101:13239-13244.