

博士論文

新規サバイビン発現抑制剤（YM155）と抗がん剤
との併用療法に関する薬理学的研究

Combination of YM155, a survivin suppressant, with anti-cancer agents:

A potential cancer therapy

2014年

アステラス製薬株式会社

金子直樹

目次

略語集	4
緒言	6
第 1 章 トリプルネガティブ乳がんに対する YM155 と微小管標的薬との併用効果	9
第 1 節 はじめに	9
第 2 節 実験方法	10
2.1. 試験物質	10
2.2. 細胞株	10
2.3. 抗体	10
2.4. 生細胞数の測定	10
2.5. カスパーゼ 3/7 活性の測定	11
2.6. ウェスタンブロット法によるタンパク質発現量の解析	11
2.7. 細胞周期解析	12
2.8. MRK-nu-1 皮下移植マウスモデルに対する抗腫瘍作用	12
2.9. 併用効果の判定	13
2.10. YM155 の定量	13
2.11. 統計解析	14
第 3 節 結果	14
3.1. ヒト TNBC 細胞株に対する YM155 とドセタキセルとの <i>in vitro</i> 併用作用	14
3.2. ヒト TNBC 細胞株に対する YM155 と微小管標的薬との <i>in vitro</i> 併用作用	16
3.3. YM155 のヒト TNBC 細胞への取り込みに対するドセタキセルの影響	17
3.4. YM155 と微小管標的薬との併用作用のメカニズム解析	17
3.5. ヒト TNBC 皮下移植担がんモデルにおける YM155 とドセタキセルとの併用投与の抗腫瘍作用	19
第 5 節 小括	22
第 2 章 びまん性大細胞型 B 細胞性リンパ腫における YM155 と STAT3 経路阻害との併用作用	23
第 2 節 実験方法	24

2.1.	試験物質	24
2.2.	細胞株	24
2.3.	抗体	24
2.4.	生細胞数の測定	24
2.5.	ウエスタンブロット法によるタンパク質発現量の解析	25
2.6.	細胞周期解析	25
2.7.	統計解析	26
第3節	実験結果	26
3.1.	ヒト DLBCL 細胞に対する STAT3 経路阻害剤の作用	26
3.2.	ヒト DLBCL 細胞株に対する YM155 と STAT3 阻害剤との併用作用	28
3.3.	ヒト DLBCL 細胞株におけるリツキシマブの STAT3 経路抑制作用	30
3.4.	ヒト DLBCL 細胞株に対する YM155 とリツキシマブとの併用作用	31
第4節	考察	33
第5節	小括	34
第3章	びまん性大細胞型 B 細胞性リンパ腫における YM155、ベンダムスチン及びリツキシマブ 3 剤併用療法の有用性	35
第1節	はじめに	35
第2節	実験方法	36
2.1.	試験物質	36
2.2.	細胞株	36
2.3.	抗体	36
2.4.	生細胞数の測定	36
2.5.	ウエスタンブロット法によるタンパク質発現量の解析	37
2.6.	細胞周期解析	37
2.7.	ヒト DLBCL 皮下移植マウスモデルに対する抗腫瘍作用	38
2.8.	ヒト DLBCL 全身播種マウスモデルに対する延命作用	38
2.9.	3'-Deoxy-3'-[¹⁸ F] fluorothymidine positron emission tomography (¹⁸ F-FLT-PET)	39
2.10.	併用効果の判定	39

2.11. 統計解析	40
第3節 結果.....	40
3.1. ヒト DLBCL 細胞株に対する YM155 とベンダムスチンとの <i>in vitro</i> 併用作用.....	40
3.2. ヒト DLBCL 皮下移植担がんモデルに対する YM155 とベンダムスチンとの併用投与の抗腫瘍作用.....	42
3.3. YM155 とベンダムスチンとの併用のメカニズム解析.....	43
3.4. ヒト DLBCL 全身播種モデルにおける YM155、ベンダムスチン及びリツキシマブ 3 剤併用投与の延命作用.....	44
3.5 ヒト DLBCL 全身播種モデルにおける ¹⁸ F-FLT-PET による腫瘍シグナルの検出	45
第4節 考察.....	46
小括	48
総括.....	49
引用文献.....	53

略語集

ABC-DLBCL: Activated B-cell like diffuse large B-cell lymphoma、活性化 B 細胞型びまん性大細胞様 B 細胞性リンパ腫

Apaf-1: Apoptic protease activating factor 1

ATCC: American Type Culture Collection

ATM: Ataxia-telangiectasia mutated、血管拡張性失調症変異

BIR: Baculovirus IAP repeat、バキュロウイルス IAP 反復配列

B-NHL: B-cell Non-Hodgkin lymphoma、B 細胞性非ホジキンリンパ腫

CLL: Chronic lymphocytic leukemia、慢性リンパ性白血病

CPC: Chromosomal passenger complex 染色体パッセンジャー複合体

CR: Complete regression、(腫瘍の) 完全退縮

DMSO: Dimethyl sulfoxide

DLBCL: Diffuse large B-cell lymphoma、びまん性大細胞型 B 細胞性リンパ腫

DSMZ: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (German Resource Center for Biological Material)

EGFR; Epidermal growth factor receptor

ERK: Extracellular signal-regulated kinase

FADD: Fas-associated protein with death domain

FBS: Fetal bovine serum

¹⁸F-FLT-PET: 3'-Deoxy-3'-[¹⁸F] fluorothymidine positron emission tomography

GCB-DLBCL: Germinal center B-cell like diffuse large B-cell lymphoma、胚中心型びまん性大細胞様 B 細胞リンパ腫

GI₅₀: 50% growth inhibitory concentration

HER2: human EGFR-related 2、ヒト上皮成長因子受容体 2

HTS: High Throughput Screening

iv: Intravenously、静脈内に

IAP: Inhibitor of apoptosis protein、細胞死抵抗性タンパク質

IC₅₀: 50% inhibitory concentration

JCRB: Japanese Collection of Research Bioresources

MDR1: Multidrug resistance protein 1、

NSCLC: Non-small cell lung carcinoma、非小細胞肺癌

PARP: Poly ADP-ribose polymerase、ポリ ADP リボースポリメラーゼ

PBS: Phosphate-buffered saline、生理的リン酸緩衝液

ROI: Region of Interest

R-CHOP: Rituximab, Cyclophosphamide, Hydroxydaunorubicin, Oncovin, Prednisone

sc: Subcutaneously、皮下に

SD: Standard deviation、標準偏差

SE: Standard error、標準誤差

siRNA : Small interfering RNA

SPF: Specific pathogen-free

STAT: Signal transducer and activator of transcription

SUVmax: Maximum standard uptake value

TNBC: Triple negative breast cancer

緒言

がんは我が国における死因別死亡率第一位の疾患である。近年、慢性骨髄性白血病に対する BCR-ABL 阻害剤イマチニブ（グリーベック[®]）やヒト上皮成長因子受容体 2（HER2）陽性乳がんにおけるトラスツズマブ（ハーセプチン[®]）等の分子標的薬の登場により、特定のがん腫で劇的に治療効果が改善されるようになった。一方、臨床研究において、分子標的薬単独、あるいは既存の薬物との併用療法の試みはされているものの、満足な治療効果を得ることができないがん種が依然多く存在している。よって、新規メカニズムの薬剤の開発及びより効果的な併用療法の確立が臨床上の大きな課題である。

がんはアポトーシス制御の異常が一つの誘因である。アポトーシスシグナルは外因性経路と、内因性経路がある。外因性経路では、Fas などのデスリガンドが TNF レセプターファミリーに属するデスレセプターに結合すると、アダプター分子 Fas-associated protein with death domain（FADD）とカスパーゼ 8 がリクルートされる。カスパーゼ 8 は、下流のカスパーゼ 3、7 を活性化し、アポトーシスを誘導する。内因性経路では、抗がん剤や DNA 損傷により p53 が活性化されると、ミトコンドリアからシトクロム c が放出される。放出されたシトクロム C は、apoptic protease activating factor 1（Apaf-1）と結合し、さらにカスパーゼ 9 がリクルートされ、アポトソームと呼ばれる巨大な複合体を形成し、カスパーゼ 9 が活性化される。カスパーゼ 9 は、カスパーゼ 8 と同様にカスパーゼ 3、7 を活性化し、アポトーシスが誘導する¹⁾。

アポトーシスを制御するたんぱく質は、Bcl-2 ファミリーと Inhibitor of apoptosis protein（IAP）ファミリーに大別される。Bcl-2 ファミリーは、Bcl-2、Bcl-xL などアポトーシスを抑制する因子と Bax、Bad、Bid などアポトーシスを促進する因子に大別される。前者は、ミトコンドリア外壁に存在し、シトクロム c のミトコンドリアからの放出を抑制し²⁾、後者は細胞質に存在するが、デスシグナルに従ってミトコンドリアへ移動し、シトクロム c の放出を促進する^{3,4)}。IAP ファミリーは、共通モチーフとして Baculovirus IAP repeat（BIR）ドメインを有し、BIR ドメインを介し、カスパーゼ 3、7 及びプロカスパーゼ 9 に結合し、

その結合を阻害する。今までに Bruce/Apollon、NIAP、cIAP1、cIAP2、XIAP、ML-IAP/Livin、ILP-2/Ts-IAP、及びサバイビンが報告されている⁵⁾。

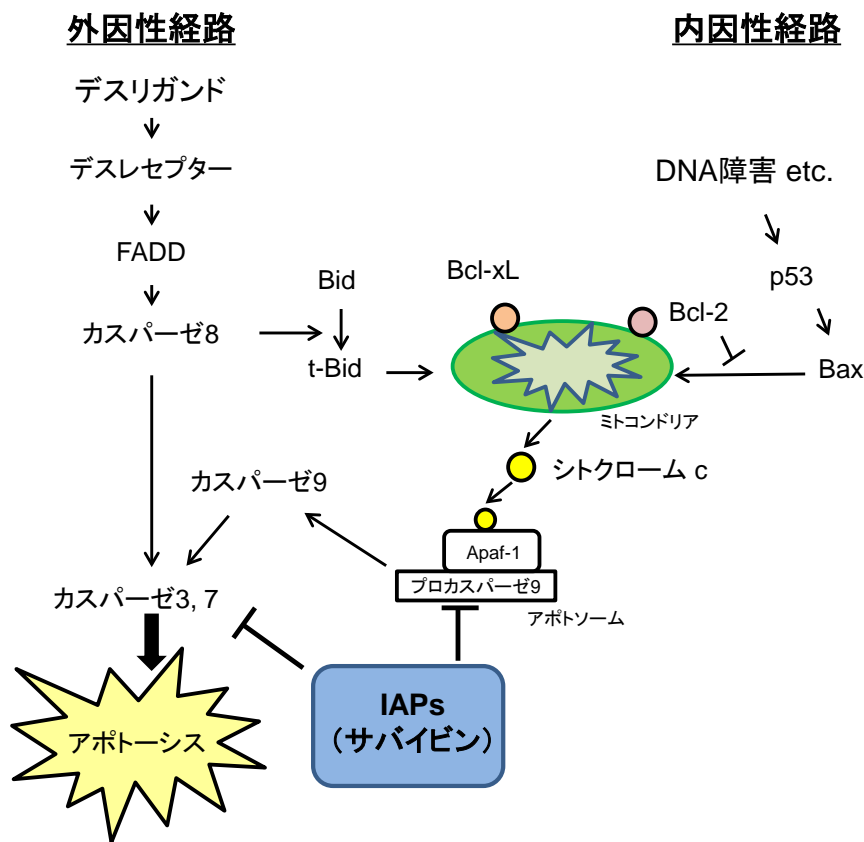


Figure 1 Two major apoptotic pathways¹⁾

サバイビンは、分化した正常ヒト組織では発現を認めず、がん細胞において過剰発現していることが知られており⁶⁾、アポトーシスの実行因子であるカスパーゼと相互作用し、活性化を阻害すること、また、細胞分裂期に紡錘糸や微小管と結合することから、アポトーシスの抑制因子及び細胞周期進行の調節因子として機能している⁷⁾。また、サバイビンは、乳がん⁸⁾、非ホジキンリンパ腫^{6,9,10)}、肝臓がん¹¹⁾など様々ながん種において高発現が認められ、サバイビンの高発現と予後不良が関連していることが報告されている。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、乳がんや非ホジキンリンパ腫などがん細胞のアポトーシス誘導が認められることから¹²⁻¹⁵⁾、サバイビンはがん細胞の生存に重要な役割を果たしており、がん治療薬の有望な標的の一つとして考えられている。

YM155 は、サバイビン遺伝子プロモーターを用いたレポーターアッセイ系の High Throughput Screening (HTS) のヒット化合物の最適化により、創製された縮環イミダゾリウム骨格を有するサバイビン発現抑制剤である (Figure 2)。YM155 は他の IAP ファミリータンパク質の発現には作用せず、サバイビン特異的に発現を抑制し、細胞増殖の抑制とアポトーシスを誘導する¹⁶⁾。また、119 個のがん細胞を用いたセルパネルスクリーニングにおいて、広い抗腫瘍スペクトラムを示し、平均 GI₅₀ 値が 15 nmol/L と非常に強い細胞増殖抑制活性を示す。その中でも、悪性リンパ腫、ホルモン抵抗性前立腺がん、非小細胞肺癌 (Non-small cell lung carcinoma: NSCLC)、乳がん特に高感受性を示し、これらががん種の複数の皮下担がんモデルにおいて、YM155 の皮下持続投与は腫瘍退縮作用を示す¹⁷⁾。さらに、臨床試験において、悪性リンパ腫、前立腺がん、NSCLC 及び悪性黒色腫において、忍容性と有効症例が確認されている¹⁸⁻²³⁾。

サバイビンは既存の抗がん剤に対する抵抗性に関しても、重要な役割を担っていることが報告されている。サバイビンの機能抑制により、シスプラチン²⁴⁾、エトポシド²⁵⁾、パクリタキセル²⁶⁾などの抗がん剤や放射線療法²⁷⁾の感受性が増強されることから、抗がん剤や放射線療法の耐性に関するサバイビンの関与が示唆されている。そこで本研究は、がん併用薬物療法の標的としてのサバイビンの機能を検証する目的で、YM155 と抗がん剤との併用作用及びそのメカニズムを明らかにし、サバイビンを標的とした、新しいがん併用療法の可能性を検討した。また、YM155 が高感受性を示し、生存におけるサバイビンの依存度が高いと想定されるがん種の内、既存抗がん剤で満足な治療効果を得ることができず、抗がん剤に対する耐性克服が臨床上大きな課題であるトリプルネガティブ乳がん (Triple negative breast cancer: TNBC) 及びびまん性大細胞型 B 細胞性リンパ腫 (Diffuse large B-cell lymphoma: DLBCL) に着目し、研究を実施した。

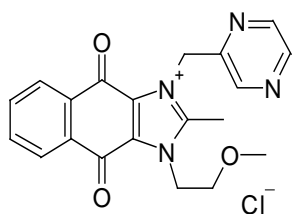


Figure 2 Structure of YM155

第1章 トリプルネガティブ乳がんに対する YM155 と微小管標的薬との併用効果

第1節 はじめに

乳がんはアメリカにおける女性第二位の死亡原因である²⁸⁾。その中で15%の患者はエストロゲン受容体、プロゲステロン受容体及びHER2の発現が認められないTNBCであり、他のサブタイプと比較して腫瘍増殖速度が速く、転移の発現頻度が高く、死亡率が高いことが報告されている²⁹⁻³¹⁾。TNBCの薬剤治療は薬剤標的の発現が認められないことから、分子標的薬の使用ができず、化学療法に頼らざるを得ない。その中でもタキサン系薬剤やビンカアルカロイド系薬剤などの微小管を標的とする薬剤はTNBCの治療に最も使用される薬剤タイプの一つである^{32,33)}。TNBCは化学療法に対する感受性が高いにも拘らず予後が悪いことが報告されている³¹⁾。特にネオアジュバント療法において腫瘍が残存する場合、特に予後が悪い³⁰⁾。以上のことからTNBCの新しい治療オプションの開発及び既存治療の薬効増強は臨床上アンメットニーズが高いと考えられる。

サバイビンは乳がんにおいて高発現が認められ^{34,35)}、リボザイムやドミナントネガティブ変異体を用いた機能阻害により、乳がん細胞において細胞増殖阻害及び細胞死が誘導されること、また、複数のがん種においてサバイビン siRNA やドミナントネガティブ体がタキサン系薬剤の薬効を増強することが報告されている¹²⁻¹⁴⁾。これまでに、YM155 が TNBC を含む乳がんに対して高感受性であり、TNBC 細胞においてサバイビンの発現抑制を伴う細胞増殖抑制作用及びアポトーシス誘導作用を示すこと、及び TNBC 自然転移モデルにおける YM155 の延命効果を報告している³⁶⁾。さらに、YM155 はヒトメラノーマモデル及び NSCLC モデルにおいてドセタキセルの薬効を増強することから^{17, 37)}、本章では TNBC においても YM155 によるサバイビン抑制が微小管標的薬の薬効を強めると仮説を立て、YM155 と微小管標的薬の併用作用とそのメカニズムについて検討した。

第2節 実験方法

2.1. 試験物質

YM155 は、アステラス製薬において合成した。パクリタキセルは LC Laboratories (Woburn, MA, USA)、ドセタキセル、ビノレルビン、及びドキシソルビシンは Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) より購入した。*In vitro* 試験においては、各被検物質を Dimethyl sulfoxide (DMSO) に溶解した。*In vivo* 実験においては、タキソテール注 (Sanofi Aventis, Bridgewater, NJ, USA) を用いた。

2.2. 細胞株

ヒト TNBC 細胞株 MRK-nu-1 (JCRB0628) は、Japanese Collection of Research Bioresources (JCRB) 細胞バンクより入手した。MDA-MB-453 (HTB-131) は American Type Culture Collection (ATCC) より入手した。培地には 10% の非働化した Fetal bovine serum (FBS) (GIBCO BRL) を添加した RPMI-1640 (GIBCO BRL) を用いた。細胞は 37°C、5% CO₂ の条件下で培養した。

2.3. 抗体

抗サバイビン抗体 (AF886) は R&D Systems (Minneapolis, MN, USA) より、抗 cleaved poly ADP-ribose polymerase (PARP) 抗体 (#9541) 及び抗リン酸化ヒストン H3 (S10) 抗体 (#9701) は Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA) より、抗アクチン抗体 (A2066) は Sigma-Aldrich より購入した。

2.4. 生細胞数の測定

各細胞を 96-well plate (AGC TECHNO GLASS, Tokyo) に 1×10^4 cells/well で播種した。翌日、ドセタキセル (3、10、30、100、300 nmol/L)、パクリタキセル (1、10、100 nmol/L)、

ビノレルビン (10、100、1000 nmol/L)、ドキソルビシン (0.1、1、10 μ mol/L) を 24 または 48 時間処理後に、YM155 (10 nmol/L) を添加し、8 時間併用処理した。CellTiter Glo[®] (Promega, Madison, WI, USA) を用い、細胞内 ATP 量を指標に生細胞を測定した。操作は添付のプロトコールに従い、マルチラベルプレートリーダー (EnVision[®]; Perkin-Elmer, Waltham, MA, USA) で測定した。1 回の試験は triplicate で行い、DMSO コントロールを 100% として細胞生存率を算出した。

2.5. カスパーゼ 3/7 活性の測定

Caspase-Glo[®] 3/7 Assay Systems (Promega) を用い、2.4.と同様の薬剤処理後の、カスパーゼ 3 及び 7 の活性を測定した。操作は添付のプロトコールに従い、Envision[®] (Perkin-Elmer) で測定した。また、同時に CellTiter Glo[®]にて生存細胞数を測定し、細胞数にて補正をした。1 回の試験は triplicate で行い、薬剤処理後の DMSO コントロールに対する相対的カスパーゼ 3 及び 7 活性を算出した。

2.6. ウェスタンブロット法によるタンパク質発現量の解析

MRK-nu-1 細胞を 10 cm dish (AGC TECHNO GLASS) に 1×10^5 cells/mL で 10 mL 播種した。翌日、ドセタキセル (10 nmol/L)、パクリタキセル (10 nmol/L)、ビノレルビン (100 nmol/L)、ドキソルビシン (1 μ mol/L) を添加し、24 時間後に細胞を回収した。また、上記と同様の薬剤処理をした後 24 時間後に YM155 (10 nmol/L) を添加し、8 時間併用処理後に細胞を回収した。回収した細胞は、ホスファターゼ阻害剤及びプロテアーゼ阻害剤を添加した RIPA Buffer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) で溶解し、細胞抽出液を得た。細胞抽出液にトリス-グリシン SDS サンプルバッファーを加えて煮沸後、ポリアクリルアミドゲル (Wako Pure Chemical Industries, Osaka) を用いて電気泳動した。電気泳動後、ゲル上のタンパク質をイモビロン-P メンブレン (Millipore, Billerica, MA, USA) に転写した。メンブレンを Blocking-One (Nacalai Tesque, Kyoto) でブロッキングし、2.3 の

抗体を用い、ウエスタンブロット解析を行った。タンパク検出には ECL-plus (GE Healthcare, Fairfield, CT, USA) による化学発光法を用いた。

2.7. 細胞周期解析

細胞周期解析はフローサイトメトリー (Guava PCA microcytometer, Guava Technologies, Hayward, CA, USA) で行った。MRK-nu-1 細胞を 12-well plate (AGC TECHNO GLASS) に 1×10^5 cells/well/1 mL で播種した。翌日、ドセタキセル (10 nmol/L)、パクリタキセル (10 nmol/L)、ビノレルビン (100 nmol/L)、ドキソルビシン (1 μ mol/L) を添加し、24 時間後に YM155 (10 nmol/L) を添加し、8 時間併用処理した。細胞を、遠心処理によって沈殿として回収し、氷冷した 70%エタノールを添加し、4°C 一晩インキュベーションし、固定した。エタノール固定した細胞は、Guava[®] Cell Cycle Reagent (Guava technologies) を加え、30 分間室温でインキュベーションし、5000 細胞のカウントに基づく細胞周期分布を評価した。

2.8. MRK-nu-1 皮下移植マウスモデルに対する抗腫瘍作用

全ての動物実験は、アステラス製薬研究所にて定める動物倫理ガイドラインに基づき実施した。5 週齢の雌性ヌードマウス (CAnN.Cg-Foxn1nu/CrlCrlj) は、Charles River Japan より購入した。動物は試験期間を通じて Specific pathogen-free (SPF) 条件下において標準的な試料と飲水を与えて飼育した。MRK-nu-1 細胞を等量のマトリゲルと混合したがん細胞懸濁液、 3×10^6 cells/100 μ L/mouse をマウス背側部に皮下移植した。腫瘍体積の平均が 100-200 mm³ に達した後、腫瘍体積を指標に群内群間のばらつきが小さくなるように群分けした。YM155 は単体 (陽イオン部分) 重量に換算して表示し、投与直前に薬液を生理食塩液で溶解し、投与量 \times 各群の平均体重 \div 1 日あたりの放出量より算出した濃度の溶液を、浸透圧ポンプ (Alzet[®] model 1007D Micro-Osmotic Pump, DURECT) に充填し、背部皮下に埋植して 7 日間皮下持続投与した。ドセタキセルは投与直前に生理食塩液で希釈し、2.0 mg/mL の溶液を調製し、10 mL/kg で尾静脈内投与した。対照群には、生理食塩液を各

薬剤のスケジュールと同様にそれぞれ投与した。腫瘍体積 ($0.5 \times \text{長径} \times \text{短径}^2$) 及び体重を週 2 回測定した。腫瘍退縮率を以下の式で算出した。

腫瘍退縮率 (%) = $100 \times [1 - (\text{各被験物質群の最終日における平均腫瘍体積}) \div (\text{各被験物質群の投与開始時における平均腫瘍体積})]$

触診限界未満の腫瘍体積を完全退縮 (CR) とした。

2.9. 併用効果の判定

Bliss additivism 法^{38,39)} を用いて 2 つの薬剤の併用効果について判定した。薬剤 A または B 各単剤による細胞増殖阻害 (%) をそれぞれ E_A 、 E_B とした際に、薬剤 A と B の併用作用が相加効果である場合の計算値、Bliss index (E_{bliss}) を以下の式にて算出した。

$$E_{\text{bliss}} = E_A + E_B - (E_A \times E_B) \div 100$$

実際に薬剤 A と B の併用処理した際に得られた細胞増殖阻害 E_{A+B} (%) と比較し、以下の判定基準に従い、2 つの薬剤の併用効果を判定した。

$E_{A+B} > E_{\text{bliss}}$: 相乗作用、 $E_{A+B} = E_{\text{bliss}}$: 相加作用、 $E_{A+B} < E_{\text{bliss}}$: 拮抗作用

例えば、薬剤 A または、B による細胞増殖阻害 (%) がそれぞれ 30%、40% の場合、Bliss index (E_{bliss}) = $30 + 40 - (30 \times 40) \div 100 = 58\%$ となる。薬剤 A と B の併用処理による細胞増殖阻害 E_{A+B} (%) が仮に 70% である場合、 $E_{A+B} > E_{\text{bliss}}$ であるので、相乗作用と判定する。

2.10. YM155 の定量

MRK-nu-1 細胞を 6×10^5 cells/mL の播種密度で、6-well プレート (AGC TECHNO GLASS) に播種した。翌日 100 nmol/L のドセタキセルを 3 時間前処理し、その後 30 nmol/L の YM155 を添加した。4 時間後、細胞を回収し、Phosphate-buffered saline (PBS) で洗浄後 0.1% ギ酸にて YM155 を抽出し、Prominence 2000 HPLC (Shimadzu Corporation, Kyoto) と API-3000TM MS/MS system (AB SCIEX, Foster City, CA, USA) を連結した LC/MS/MS 系にて YM155 を定量した。

2.11. 統計解析

全ての統計解析は SAS ソフトウェア (SAS institute Inc.) を用いて評価した。 *In vitro* 実験においては、ドセタキセル (300 nmol/L) 単剤処理とドセタキセル (300 nmol/L) と各用量の YM155 との併用処理後の細胞数との比較 (Williams' test) を行った。危険率 2.5%未満を有意差有り と判定した。 *In vivo* 実験においては、観察最終日の腫瘍体積 ($0.5 \times \text{長径} \times \text{短径}^2$) 及び体重の実測値について、各単剤投与群と併用群との比較 (Student's t-test) を行った。併用投与群が両単剤投与群と比較して共に危険率 5%未満である時に、併用投与により作用増強効果があると判定した。

第3節 結果

3.1. ヒト TNBC 細胞株に対する YM155 とドセタキセルとの *in vitro* 併用作用

YM155 とドセタキセルの併用効果について、細胞増殖抑制及びカスパーゼ 3/7 活性を指標に評価した。ドセタキセルを処理後 24 時間または 48 時間後に YM155 と 8 時間併用処理し、細胞増殖抑制とカスパーゼ 3/7 活性を評価した。MRK-nu-1 細胞及び MDA-MB-453 細胞において、YM155 は用量依存的にドセタキセルの最大薬効を増強した (Figure 3A)。また、bliss additivism 法にて算出された Bliss index と比較して強い増殖抑制作用が複数の濃度域で認められた (Figure 3B)。さらに、YM155 とドセタキセル併用処理により、各単剤により誘導されるカスパーゼ 3/7 活性よりも強いカスパーゼ 3/7 活性誘導作用が認められた (Figure 3C)。

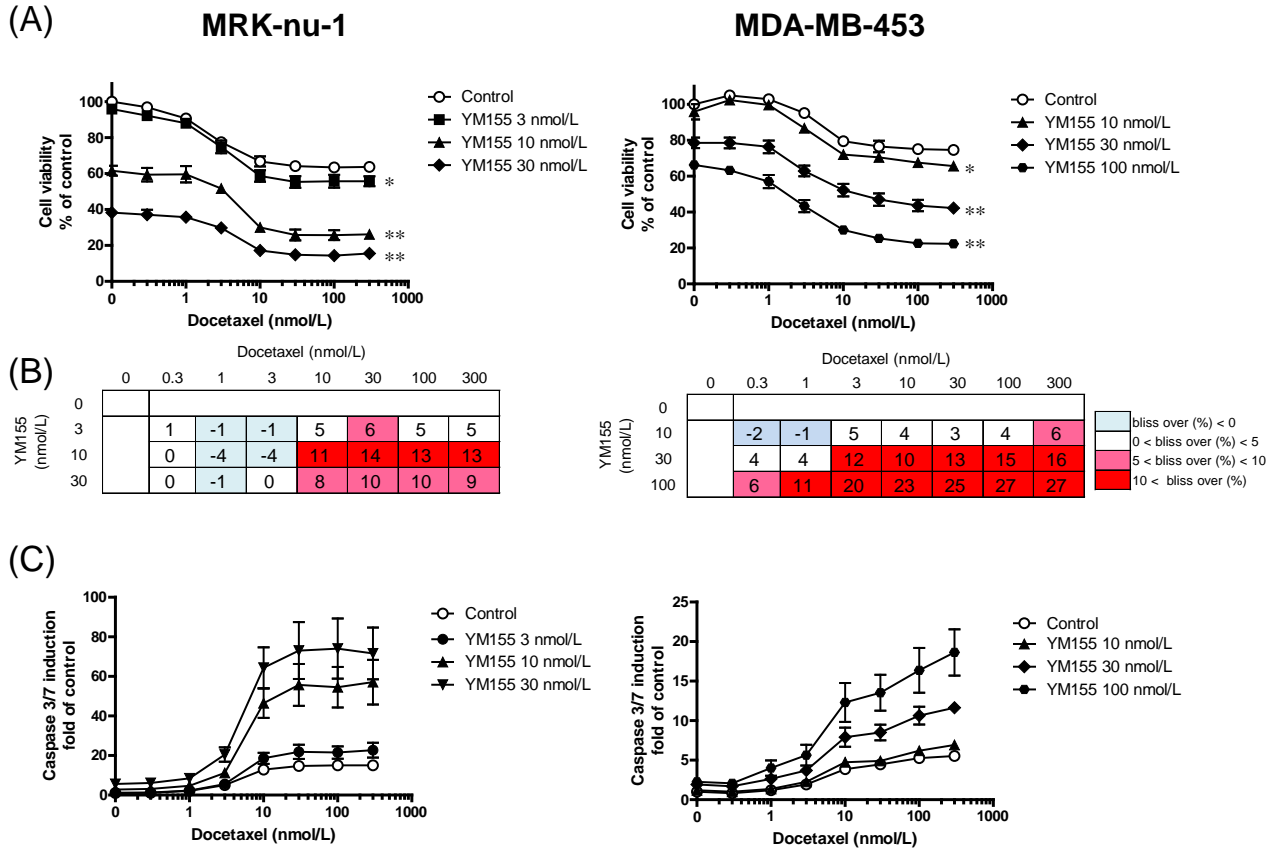


Figure 3 *In vitro* combined effect of YM155 and docetaxel in human TNBC cells

MRK-nu-1 cells and MDA-MB-453 cells were treated with docetaxel for 24 h and 48 h, respectively, followed by YM155 for 8 h. (A) Cell viability was determined using a CellTiter-Glo[®] Luminescent Cell Viability Assay. The luminescent value of treated cells was normalized to that of DMSO control and is shown as % inhibition of DMSO control. Each point represents the mean \pm SE from three independent assays. * $p < 0.025$, ** $p < 0.005$ versus docetaxel alone (Williams' multiple comparison test). (B) Average observed excess inhibition (%) relative to that predicted by the Bliss additivism model from three independent assays. (C) Caspase 3/7 activity was determined using a Caspase-Glo3/7[®] luminescent assay. The luminescent value was normalized to that of cell viability and is shown as fold of the DMSO control. Each point represents the mean \pm SE from three independent assays.

3.2. ヒト TNBC 細胞株に対する YM155 と微小管標的薬との *in vitro* 併用作用

YM155 とドセタキセル併用で認められた *in vitro* の併用作用が他の微小管標的薬でも同様の作用が認められるか確認する目的で、YM155 とパクリタキセルまたはビノレルビンとの併用作用を検討した。その結果、YM155 とドセタキセルとの併用時と同様に YM155 処理により、パクリタキセル及びビノレルビンによる増殖抑制作用及びカスパーゼ 3/7 活性化の増強作用が認められた。一方、ドキソルビシン単剤処理により細胞増殖を完全に抑制し、YM155 による増強作用は認められなかった (Figure 4)。

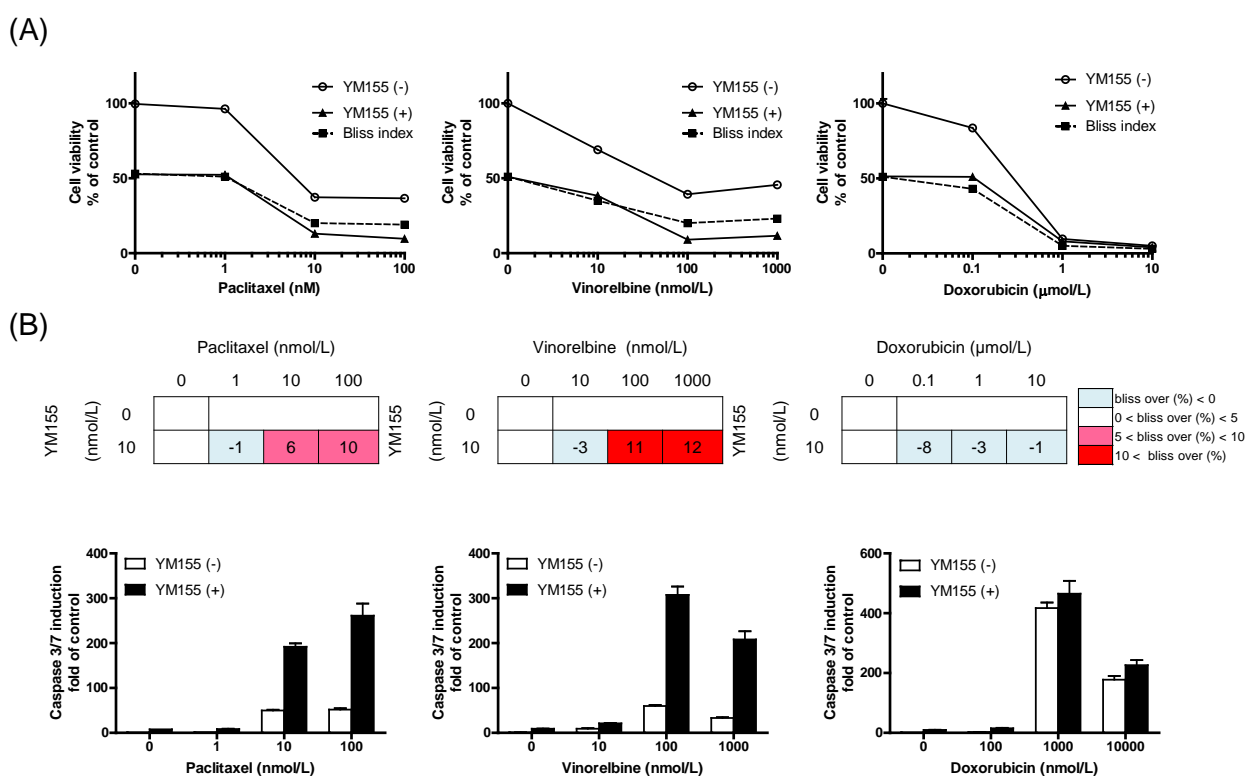


Figure 4 *In vitro* combined effect of YM155 and paclitaxel, vinorelbine or doxorubicin in MRK-nu-1 cells

MRK-nu-1 cells were treated with paclitaxel, vinorelbine or doxorubicin at the indicated concentrations for 24 h, then with YM155 (10 nmol/L) for 8 h. (A) Cell viability was determined using a CellTiter-Glo[®] Luminescent Cell Viability Assay. The luminescent value of treated cells was normalized to that of DMSO control and is shown as % inhibition of DMSO control. Each point represents the mean \pm SD of a representative assay. (B) The values are the observed excess inhibition (%) relative to that predicted by the Bliss additivism model from a representative assay. (C) Caspase 3/7 activity was determined using a Caspase-Glo3/7[®] luminescent assay. The luminescent value was normalized to that of cell viability and is shown as fold of the DMSO control. Bars represent means \pm SD of a representative assay.

3.3. YM155 のヒト TNBC 細胞への取り込みに対するドセタキセルの影響

YM155 と微小管標的薬との併用メカニズムについて、薬物—薬物相互作用の可能性を検討する目的で、ドセタキセル併用による YM155 の細胞内への取り込みによる影響を検討した。YM155 とドセタキセルとの併用処理後と YM155 単独処理後の MRK-nu-1 細胞内の YM155 濃度に差は認められなかった (Table 1)。

Table 1 Effect of docetaxel on the uptake of YM155 into MRK-nu-1 cells

Treatment	Docetaxel (-)	Docetaxel (+)	P-value
YM155 concentration (nmol/g protein)	30.1 ± 1.15	35.3 ± 1.94	0.0856

MRK-nu-1 cells were treated in triplicate wells with (+) or without (-) docetaxel at 100 nmol/L for 3 h followed by YM155 at 30 nmol/L for 4 h. Cells were harvested, and YM155 drug concentration was measured. Values were expressed as means ± SE (n=3). The *p*-value was calculated by Student's t-test.

3.4. YM155 と微小管標的薬との併用作用のメカニズム解析

前項で認められた YM155 と微小管標的薬との併用作用のメカニズムを解析する目的で、MRK-nu-1 細胞におけるサバイビンタンパク質の発現、リン酸化ヒストン H3 及び細胞周期の分布について検討した。ドセタキセル、パクリタキセル及びビノレルビン 24 時間処理により G2/M アレストが誘導され、サバイビンタンパク質及びリン酸化ヒストン H3 の発現上昇が認められた。一方、ドキソルビシンにより G2/M アレストは認められず、サバイビンタンパク質の上昇は認められなかった (Figures 5A、B)。また、微小管標的薬前処理により G2/M アレストが誘導された後に、YM155 を 8 時間併用処理することにより、各単剤処理による G2/M アレスト、サバイビンタンパク質及びリン酸化ヒストン H3 の発現上昇の抑制が認められ、各単剤よりも強い PARP の開裂及び sub-G1 分画の誘導が認められた (Figures 5C、D)。

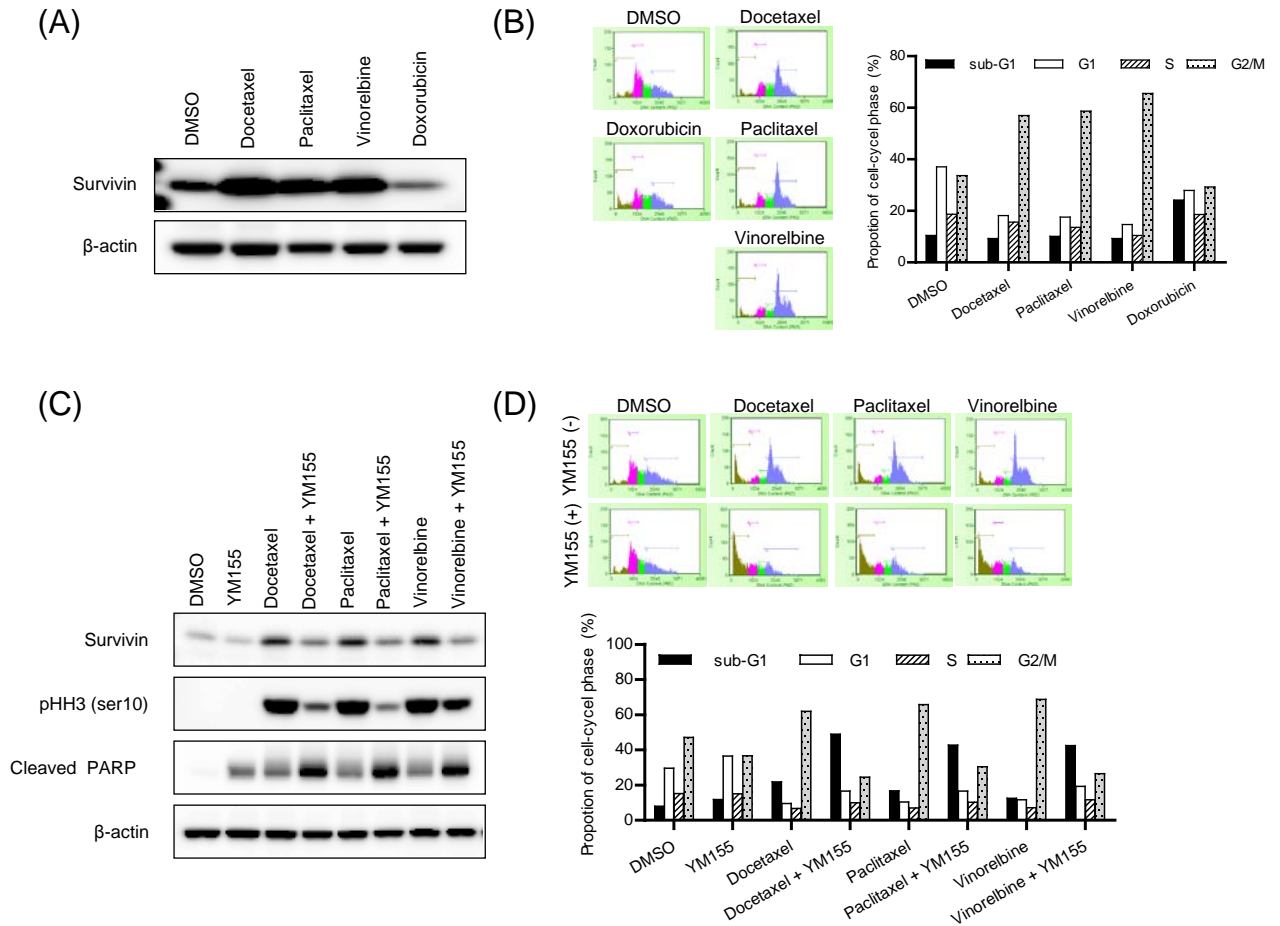


Figure 5 *In vitro* effects of YM155 and microtubule-targeting agents on the expression of survivin, phosphorylated histone H3, and cleaved PARP, and on cell cycle distribution

MRK-nu-1 cells were treated with docetaxel (10 nmol/L), paclitaxel (10 nmol/L), vinorelbine (100 nmol/L), and doxorubicin (1 μ mol/L) for 24 h. (A) Whole cell lysates were subjected to Western blotting using anti-survivin and anti- β -actin antibodies. (B) MRK-nu-1 cells were harvested and cell cycle distribution was determined by flow cytometry. MRK-nu-1 cells were treated with docetaxel (10 nmol/L), paclitaxel (10 nmol/L), and vinorelbine (100 nmol/L) for 24 h and then with or without YM155 (10 nmol/L) for 8 h. (C) Whole cell lysates were subjected to Western blotting using anti-survivin, anti-phospho histone H3 (ser 10), anti-cleaved PARP, and anti- β -actin antibodies. (D) Cells were harvested and cell cycle distribution was determined by flow cytometry.

3.5. ヒト TNBC 皮下移植担がんモデルにおける YM155 とドセタキセルとの併用投与の抗腫瘍作用

MRK-nu-1 皮下担がんマウスモデルに対する YM155 とドセタキセルとの併用投与の *in vivo* 抗腫瘍作用を検討した。コントロール群において、腫瘍の増大が認められるのに対し、YM155 及びドセタキセル単独投与群においては、それぞれ 9% 及び 26% の腫瘍の退縮効果が認められた。一方 YM155 とドセタキセルの併用投与群は、全例（5 例中 5 例）腫瘍の完全退縮が認められた（Figure 6、Table 2）。

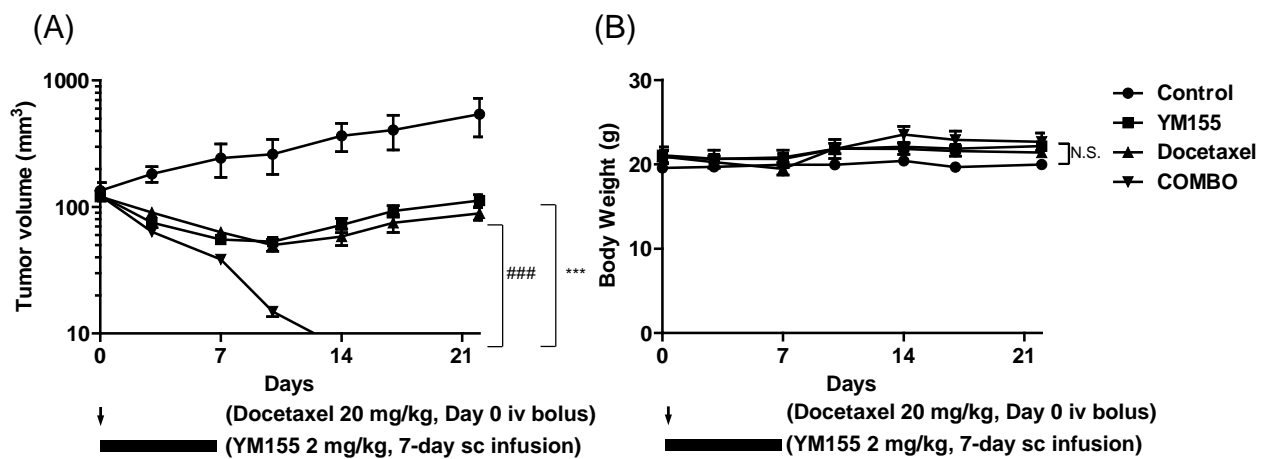


Figure 6 *In vivo* combined effect of YM155 and docetaxel against established MRK-nu-1 xenograft tumors

Values are expressed as means \pm SE (n=5). Mice received a continuous s.c. infusion of YM155 at 2 mg/kg/day for 7 days starting on day 0. Docetaxel was administered via an i.v. bolus injection at 20 mg/kg on day 0. Tumor volume and body weight on day 22 were compared between each single compound group and the combined group using Student's t-test. *** $p < 0.001$ versus YM155 group, ### $p < 0.001$ versus the docetaxel group, N.S.: not significantly different from the YM155 or docetaxel group by Student's t-test.

Table 2 Summary of antitumor activity of YM155 in combination with docetaxel in MRK-nu-1 xenograft model

Treatment Group	Antitumor Activity (% reg)	Number of CR (CR/total mice)
Vehicle Control	–	0/5
YM155	9%	0/5
Docetaxel	26%	0/5
YM155 + Docetaxel	100%	5/5

Percent tumor regression (% reg) was calculated using the following formula: $100 \times [1 - (\text{mean tumor volume of each group on day 22}) / (\text{mean tumor volume of each group on day 0})]$. The number of complete regressions (CRs) in all groups was checked during the experimental period. CRs were defined as instances in which the tumor regressed to a size below the limit of palpation.

4 節 考察

本章において、ヒト TNBC モデルにおける、YM155 と微小管標的薬との併用作用について検討を行った。その結果、YM155 はドセタキセル、パクリタキセル、ビノレルビンとの併用処理により、各単剤と比較して強い細胞増殖抑制作用とカスパーゼ 3/7 活性化作用が認められた。Bliss additivism 法で算出される Bliss index と比較して YM155 とドセタキセル併用による細胞増殖抑制が強かったこと (Figures 3B、4B)、さらに、各単剤によって誘導されるカスパーゼ 3/7 活性の和よりも併用時に誘導されるカスパーゼ 3/7 活性の方が大きいことから (Figures 3C、4C)、YM155 はヒト TNBC 細胞株において微小管標的薬の作用を相乗的に増強することが示唆された。

YM155 と微小管標的薬との併用メカニズムについて薬物—薬物相互作用と細胞内相互作用の 2 つのメカニズムが想定された。YM155 は腫瘍内に取り込まれやすく、そのレベルは血漿中と比較して約 20 倍多く¹⁶⁾、YM155 の取り込みと排泄には OCT1、OCT2 及び multidrug resistance protein 1 (MDR1) が関与していることが報告されている⁴⁰⁻⁴²⁾。MDR1 はタキサン系薬剤を排出し、その耐性化に関与することが知られていることから⁴³⁾、

YM155 の細胞内濃度がドセタキセルとの併用時に増加しているのではないかと仮説を立て検討を行ったが、YM155 単独処理と比較して、YM155 とドセタキセルとの併用処理後の、MRK-nu-1 細胞内の YM155 の濃度は変わらなかった (Table 1)。また、MDR1 高発現 MCF-7 細胞においても同様の結果が得られたことから (data not shown)、薬物—薬物相互作用の可能性は少ないと考えられた。

サバイビンの発現は細胞周期依存的に制御されており、M 期において最も発現が高い⁴⁴⁾。MRK-nu-1 細胞において、微小管標的薬は G2/M アレストを誘導し、サバイビンの発現を上昇させた (Figure 5A)。一方、ドキシソルビシンは G2/M アレストとサバイビンの発現上昇を誘導せず、YM155 との併用によって作用が増強されなかったことから (Figures 4、5A)、G2/M 期アレストによって誘導されるサバイビンが微小管標的薬に対する抵抗性に関与していることが推察された。サバイビンは細胞の生存と細胞分裂に関与している⁷⁾。サバイビンはがん化した細胞のアポトーシスを抑制し、サバイビンの機能阻害により細胞死が誘導される⁴⁵⁻⁴⁷⁾。また、サバイビンは chromosomal passenger complex (CPC) の一員としてオーロラ B キナーゼ、INCENP 及び Borealin/Dasra と相互作用し、微小管の動態や安定化に関与しており⁴⁸⁾、サバイビン siRNA により、神経芽細胞腫の細胞株で分裂期細胞死を誘導することが報告されている⁴⁹⁾。MRK-nu-1 細胞において、YM155 と微小管標的薬との併用時に微小管標的薬単剤処理と比較して G2/M 期の分画がより早く sub-G1 分画に移行していた (Figure 5D)。以上の結果から、YM155 によるサバイビンの発現抑制は、細胞分裂期のアポトーシスに対する感受性を増加させ、かつ細胞分裂をより強く阻害し、その結果、微小管標的薬の作用を強めることが示唆された。

さらに、ヒト TNBC 皮下担がんモデルにおいて、YM155 とドセタキセルとの併用投与により体重の減少を指標とした副作用を増悪化させることなく、全例が完全腫瘍退縮した (Figure 6)。ヒト非小細胞性肺癌 Calu-6 皮下担がんモデルにおいて、同用量の YM155 とドセタキセルとの併用投与による腫瘍退縮作用は、腫瘍内のサバイビンの抑制とアポトーシスの増強を伴っていたことから³⁷⁾、本試験における腫瘍内のサバイビンの抑制が腫瘍退縮に関与していることが推察される。また、YM155 単独投与により、ヒト TNBC の

自然転移モデルにおいて、転移を抑制し、延命作用を示したことから³⁶⁾、YM155は、TNBCに対して有効であること、さらに、YM155と微小管標的薬との併用投与により、さらに強い抗腫瘍効果を引き起こされることが示唆された。

第5節 小括

1. YM155は、ヒトTNBC細胞株において、微小管標的薬（ドセタキセル、パクリタキセル、ビノレルビン）による細胞増殖抑制作用及びカスパーゼ3/7活性化作用を相乗的に増強した。
2. YM155のヒトTNBC細胞株MRK-nu-1細胞への取り込みは、ドセタキセルにより影響を受けなかった。
3. YM155はMRK-nu-1細胞において、ドセタキセル、パクリタキセル、及びビノレルビン単独処理に誘導されるサバイビンの発現上昇を抑制し、より強いアポトーシス誘導作用を示した。
4. MRK-nu-1の皮下移植モデルにおいて、YM155の7日間皮下持続投与とドセタキセル併用投与は、体重減少を引き起こすことなく強い腫瘍退縮作用を示し、全例完全退縮を誘導した。

以上のことから、TNBCにおいて、サバイビンが微小管標的薬の抵抗性に関与していること、さらに、TNBCの治療における、YM155と各種微小管標的薬との併用療法の有用性が示唆された

第2章 びまん性大細胞型B細胞性リンパ腫におけるYM155とSTAT3経路阻害との併用作用

第1節 はじめに

びまん性大細胞型B細胞性リンパ腫（DLBCL）は、非ホジキンリンパ腫患者の約30-40%を占め、最も割合が多いタイプのリンパ腫である⁵⁰⁾。リツキシマブ（抗CD20モノクローナル抗体）はDLBCLを含むCD20陽性のB細胞性非ホジキンリンパ腫の標準療法として使用されており⁵¹⁾、複数の化学療法剤との併用レジメンであるRituximab, Cyclophosphamide, Hydroxydaunorubicin, Oncovin, Prednisone（R-CHOP）はCD20陽性非ホジキンリンパ腫における一次療法として用いられている⁵²⁻⁵⁴⁾。しかし、30%程度の患者は最終的に再発し、また、自家血移植後の大量化学療法を許容できない患者も多く⁵⁵⁾、リツキシマブの感受性を上げる、もしくはリツキシマブを含むレジメンに対する耐性克服は臨床上において大きな課題である。

サバイビンは、DLBCL患者で高発現が認められ、その発現は、化学療法に対する抵抗性及び予後の悪さと相関している^{6, 9, 10)}。さらに、オリゴヌクレオチドによる機能阻害により、DLBCL細胞株の増殖が抑制されることが報告されており¹⁵⁾、サバイビンがDLBCLにおける創薬標的の可能性が示唆されている。DLBCLはYM155に対して最も感受性が強いがん種であり¹⁷⁾、臨床試験において、一部のDLBCL患者で薬効が認められている^{56, 57)}。

Signal transducer and activator of transcription 3（STAT3）は、細胞増殖、分化および生存などの過程を制御するSTATファミリーの一員である^{58, 59)}。また、STAT3の恒常的な活性化は複数の固形及び血液がんで認められ、予後の悪さと相関している^{60, 61)}。DLBCLにおいて、Activated B-cell like diffuse large B-cell lymphoma（ABC-DLBCL）サブタイプで高発現が認められ、STAT3に対するshRNAやSTAT3阻害剤が*in vitro*と*in vivo*において抗腫瘍作用が認められ、STAT3がDLBCLの治療標的として有望である可能性が示唆されている^{62, 63)}。本章では、サバイビンとSTAT3経路の同時阻害がより強い薬効を示すことを仮説とし、ヒトDLBCL細胞におけるYM155とSTAT3阻害剤の併用効果について検討を行った。

第2節 実験方法

2.1. 試験物質

YM155 は、アステラス製薬において合成した。リツキシマブ注は、Chugai Pharmaceutical より、AG490、STA-21 はそれぞれ Wako Pure Chemical Industries 及び Santa Cruz Biotechnology より購入した。

2.2. 細胞株

ヒトびまん性大細胞型 B 細胞性リンパ腫由来 SU-DHL-8 細胞 (CRL-2961) は ATCC より、WSU-DLCL2 細胞と SU-DHL-4 細胞は DSMZ より入手した。培地には 5% の非働化した FBS (GIBCO BRL) を添加した RPMI-1640 (GIBCO BRL) を用いた。細胞はこれらの培地を用いて 37°C、5% CO₂ の条件下で培養した。

2.3. 抗体

抗サバイビン抗体 (AF886) は R&D Systems より、抗 cleaved PARP 抗体 (#9541)、抗リン酸化 AKT (S473) 抗体 (#4058)、抗 AKT 抗体 (#9272) 及び抗リン酸化 STAT3 (Y705) 抗体 (#9131) は Cell Signaling Technology より、抗 STAT3 抗体 (#51-9002043) は Becton Dickinson (Franklin Lakes, NJ, USA) より、抗 c-Myc 抗体 (sc-40) は Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA) より、抗アクチン抗体 (A2066) は Sigma-Aldrich より購入した。

2.4. 生細胞数の測定

各細胞は 96-well plate (AGC TECHNO GLASS) に 5×10^3 cells/well で播種した。翌日、AG490 (1、3、10、30 $\mu\text{mol/L}$)、STA-21 (2、6、20 $\mu\text{mol/L}$) を添加し、96 時間処理した。または、AG490 (3、10 $\mu\text{mol/L}$)、STA-21 (2、6 $\mu\text{mol/L}$)、または、リツキシマブ (2 $\mu\text{g/mL}$) を 16 時間処理後、YM155 (1 nmol/L) を添加し、さらに 96 時間併用処理した。CellTiter Glo[®]

(Promega) を用い、薬剤処理した培養細胞中の生細胞を測定した。操作は添付のプロトコールに従い、Envision[®] (PerkinElmer) で測定した。1 回の試験は triplicate で行い、DMSO コントロールの細胞数を 100% として算出した。

2.5. ウェスタンブロット法によるタンパク質発現量の解析

各細胞を 10 cm dish (AGC TECHNO GLASS) に 5×10^4 cells/mL で 10 または 20 mL 播種した。翌日、1) AG490 (1、3、10、30 $\mu\text{mol/L}$)、STA-21 (2、6、20 $\mu\text{mol/L}$) を添加し、48 時間処理した。2) リツキシマブ (2、20 $\mu\text{g/mL}$) を添加し、48 時間処理した。3) リツキシマブ (2 $\mu\text{g/mL}$) を 16 時間処理後、YM155 (1 nmol/L) を添加し、さらに 48 時間併用処理した。薬剤処理後回収した細胞は、ホスファターゼ阻害剤及びプロテアーゼ阻害剤を添加した RIPA Buffer (Thermo Fisher Scientific) により溶解し、細胞抽出液を得た。細胞抽出液にトリス-グリシン SDS サンプルバッファーを加えて煮沸後、ポリアクリルアミドゲル (Wako Pure Chemical Industries) を用いて電気泳動した。電気泳動後、ゲル上のタンパク質をイモビロン-P メンブレン (Millipore) に転写した。メンブレンを Blocking-One (Nacalai Tesque) でブロッキングし、2.3 の抗体を用い、ウェスタンブロット解析を行った。タンパク検出には ECL-plus (GE Healthcare) による化学発光法を用いた。

2.6. 細胞周期解析

各細胞を 6 well plate (AGC TECHNO GLASS) に播種した。翌日、AG490 (3、10 $\mu\text{mol/L}$)、STA-21 (2、6 $\mu\text{mol/L}$)、または、リツキシマブ (2 $\mu\text{g/mL}$) を 16 時間処理後、YM155 (1 nmol/L) を添加し、さらに 96 時間併用処理した。サンプル回収以降の操作は、第 1 章 2.7. と同様の方法で実施した。

2.7. 統計解析

細胞増殖アッセイにおいて、コントロール群と AG490 または STA-21 処理群との比較 (Williams' test) を、SAS ソフトウェア (SAS institute) を用いて行った。危険率 2.5%未満を有意差有りとして判定した。また、併用処理群と各単剤処理群の sub-G1 分画との比較 (Student's t-test) を、GraphPad prism 5 ソフトウェア (GraphPad software) を用いて評価した。併用処理群が両単剤処理群と比較して共に危険率 5%未満である時に、併用処理により作用増強効果があると判定した。

第 3 節 実験結果

3.1. ヒト DLBCL 細胞に対する STAT3 経路阻害剤の作用

ヒト DLBCL 細胞における STAT3 経路の細胞生存への寄与を検証する目的で、STAT3 阻害剤の、細胞増殖に対する作用を検討した。STAT3 経路阻害剤として JAK2 阻害剤である AG490 及び STAT3 の 2 量体形成阻害剤 STA-21 を使用した。SU-DHL-8、WSU-DLCL2 及び SU-DHL-4 細胞において、AG490 及び STA-21 は有意な細胞増殖抑制作用を示した (Figure 7A)。ウエスタンブロット解析の結果から、WSU-DLCL2, SU-DHL-4 細胞において、AG490 または STA-21 処理により、リン酸化 STAT3 及び c-Myc の減少を伴った PARP の開裂が認められた (Figure 7B)。

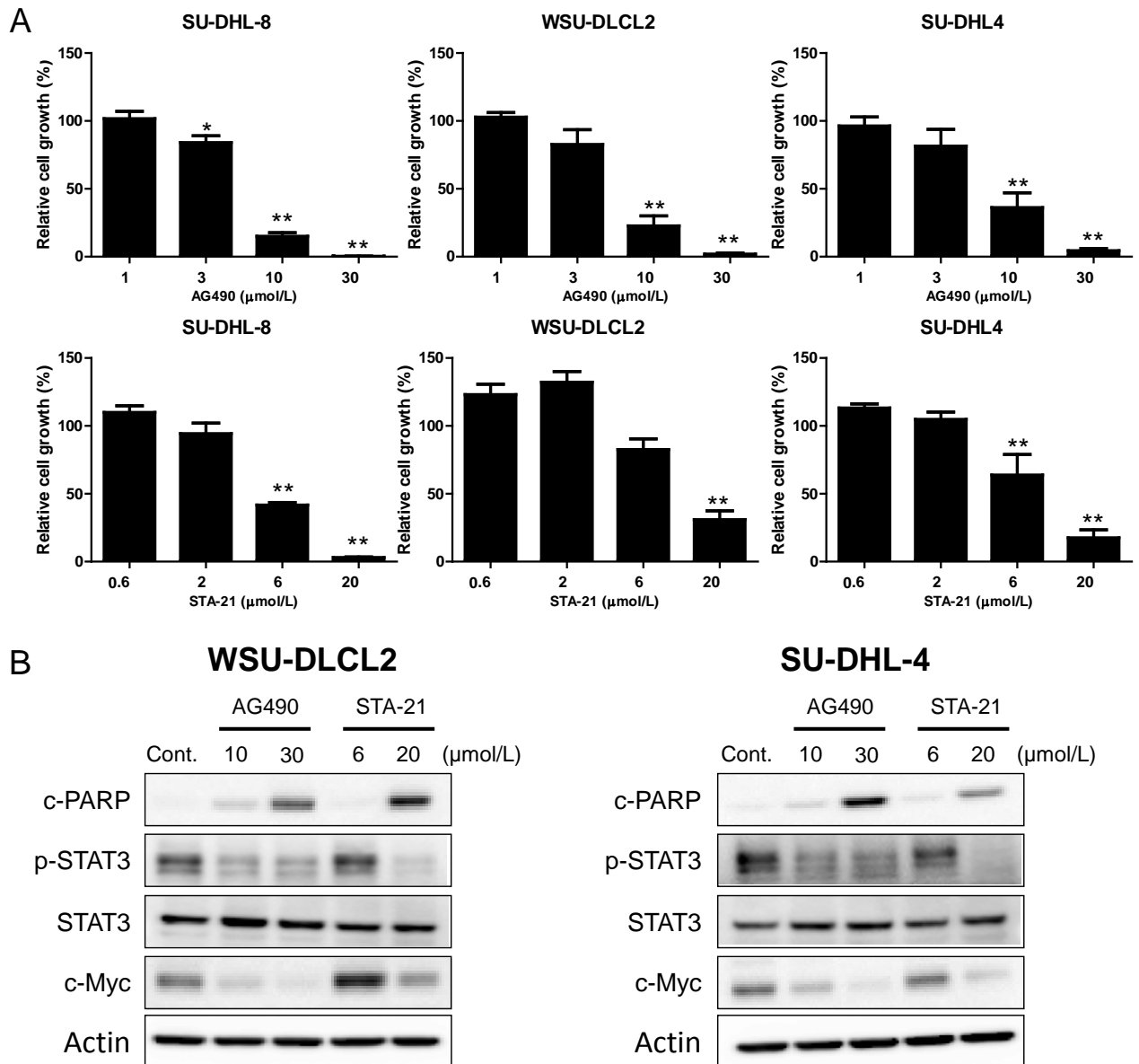


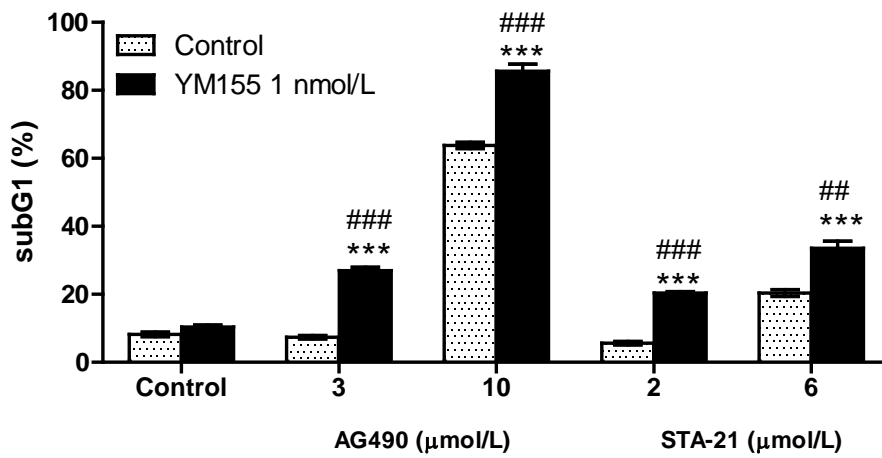
Figure 7 *In vitro* efficacy of AG490 and STA-21 against DLBCL cells.

SU-DHL-8, WSU-DLCL2 and SU-DHL-4 cells were treated with AG490 or STA-21 at indicated concentrations. (A) After treatment for 96 h, cell viability was evaluated using a CellTiter-Glo assay kit. The luminescent signals were normalized to that of control and expressed as a % of control. The data represent the mean \pm SE from three independent experiments. * $p < 0.025$, ** $p < 0.005$ versus control (Williams' test). (B) After treatment for 48 h. Whole cell lysates were subjected to western blotting using antibodies against cleaved PARP, phospho-STAT3, STAT3, c-Myc, and β -actin.

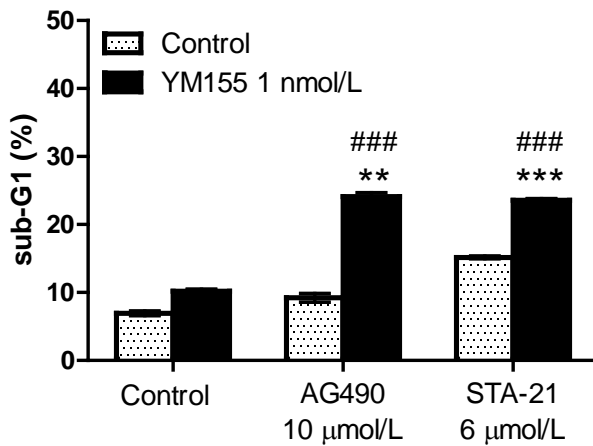
3.2. ヒト DLBCL 細胞株に対する YM155 と STAT3 阻害剤との併用作用

次に、YM155 と STAT3 阻害剤との併用処理によるアポトーシス誘導作用を検討した。SU-DHL-8、WSU-DLCL2 及び SU-DHL-4 細胞において、AG490 または STA-21 を 16 時間前処理した後、YM155 を添加し、96 時間後に sub-G1 分画を指標にアポトーシス誘導を検討した。SU-DHL-8 細胞において、DMSO control で 8.2% の sub-G1 分画が認められたのに対し、AG490 (3、10 $\mu\text{mol/L}$) 及び STA-21 (2、6 $\mu\text{mol/L}$) 単独処理によりそれぞれ 7.4、63.8、5.6、20.3% の sub-G1 分画の誘導が認められた。YM155 (1 nmol/L) 単独処理により 10.3% の sub-G1 分画の誘導が認められた。YM155 (1 nmol/L) と AG490 (3、10 $\mu\text{mol/L}$) 及び STA-21 (2、6 $\mu\text{mol/L}$) との併用処理により、それぞれ 30.0%、85.7%、20.4%、33.5% の sub-G1 分画の誘導が認められ、各薬剤単剤処理と比較して、併用処理によって、有意に強い sub-G1 分画の誘導作用が認められた。WSU-DLCL2 及び SU-DHL-4 細胞においても同様の傾向が認められた。YM155 (1 nmol/L) 単独、AG490 (10 $\mu\text{mol/L}$) 単独及び併用処理後の sub-G1 分画の割合は、WSU-DLCL2 細胞において、それぞれ 10.2%、9.2%、24.1% で、SU-DHL-4 細胞において、それぞれ 12.5%、5.8%、23.4% であった。STA-21 処理においても同様の結果が認められた。YM155 (1 nmol/L) 単独、STA-21 (2 $\mu\text{mol/L}$) 単独及び併用処理後の sub-G1 分画の割合は、WSU-DLCL2 細胞において、それぞれ 10.2%、15.2%、23.6% で、SU-DHL-4 細胞において、それぞれ 12.5%、4.1%、29.5% であった (Figure 8)。

SU-DHL-8



WSU-DLCL2



SU-DHL-4

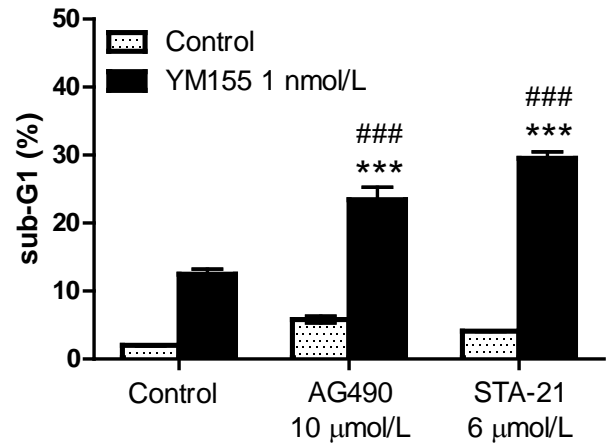


Figure 8 YM155 sensitizes DLBCL cells to AG490 and STA-21 in DLBCL cells

SU-DHL-8, WSU-DLCL2 and SU-DHL-4 cells were treated with AG490 or STA-21 at indicated concentrations for 16 h, then with YM155 (1 nmol/L) for 96 h. Cells were harvested and sub-G1 populations were determined by flow cytometry. Each bar represents the mean \pm SE of the sub-G1 population from three separate experiments. ** p <0.01, *** p <0.001 versus YM155, ## p <0.01, ### p <0.001 versus AG490 or STA-21 (Student's t- test).

3.3. ヒト DLBCL 細胞株におけるリツキシマブの STAT3 経路抑制作用

リツキシマブは STAT3, p38 MAPK 及び AKT 経路を阻害することが報告されている。次にヒト DLBCL 細胞株におけるリツキシマブ処理により制御される下流経路を検討した。ウエスタンブロット解析の結果より WSU-DLCL2 及び SU-DHL-4 両細胞において、リツキシマブ処理により、リン酸化 STAT3 の抑制が認められた。一方、リン酸化 p38 MAPK 及びリン酸化 AKT は抑制が認められず、むしろ WSU-DLCL2 細胞においてリン酸化 AKT の増加が認められた (Figure 9)。

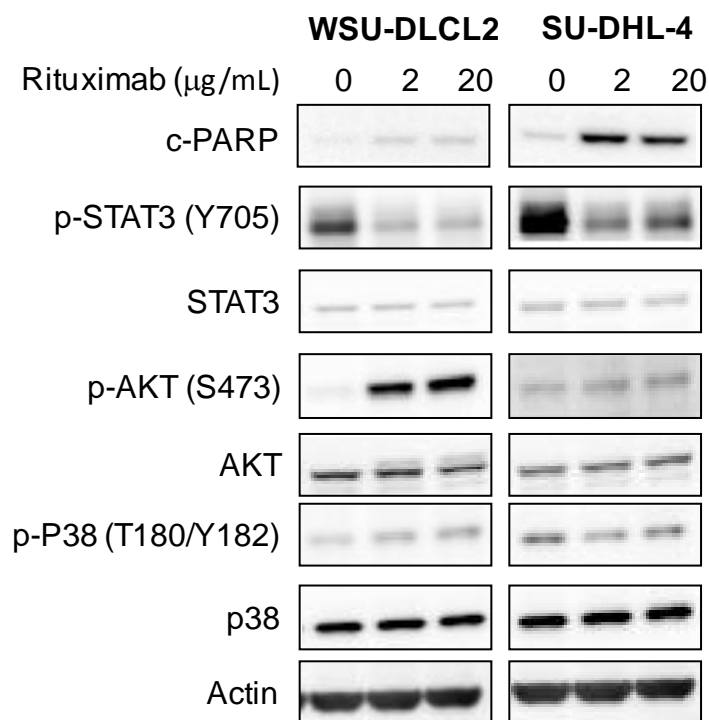


Figure 9 Rituximab inhibits phospho-STAT3 in DLBCL cells.

WSU-DLCL2 and SU-DHL-4 cells were treated with rituximab at 2 or 20 µg/mL for 48 h. Whole cell lysates were subjected to western blotting using antibodies against phospho-STAT3 (Tyr705), STAT3, phospho-AKT (Ser473), AKT, p38 MAPK, phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182), and β-actin.

3.4. ヒト DLBCL 細胞株に対する YM155 とリツキシマブとの併用作用

前項で認められた YM155 と STAT3 阻害剤との併用作用と同様に、STAT3 阻害作用を有するリツキシマブと YM155 の併用効果が認められるかを確認した。YM155 は WSU-DLCL2 細胞及び SU-DHL-4 細胞に対してそれぞれ IC₅₀ 値 2.0, 0.76 nmol/L の活性で細胞増殖抑制作用を示した。リツキシマブは WSU-DLCL2 細胞に対して増殖抑制作用を示さなかったが、SU-DHL-4 細胞に対して、コントロールと比較して 55% まで細胞増殖を抑制した。YM155 (1 nmol/L) とリツキシマブ (2 µg/mL) との併用処理により、各単剤処理よりも強い増殖抑制作用が認められた。YM155 単独、リツキシマブ単独及び併用処理により WSU-DLCL2 細胞において、それぞれコントロールの、91%、96%、37% まで、SU-DHL-4 細胞において、それぞれコントロールの、36%、45%、14% まで細胞増殖を抑制した (Figure 10A)。また、YM155 とリツキシマブとの併用処理により、各単剤と比較して強い PARP の開裂 (Figure 10B) 及び sub-G1 分画誘導作用が認められた。YM155 単独、リツキシマブ単独及び併用処理後の sub-G1 分画の割合は、WSU-DLCL2 細胞においてそれぞれ 4.5%、4.6%、30.4% で、SU-DHL-4 細胞において、それぞれ 14.6%、15.1%、38.2% であった (Figure 10C)。

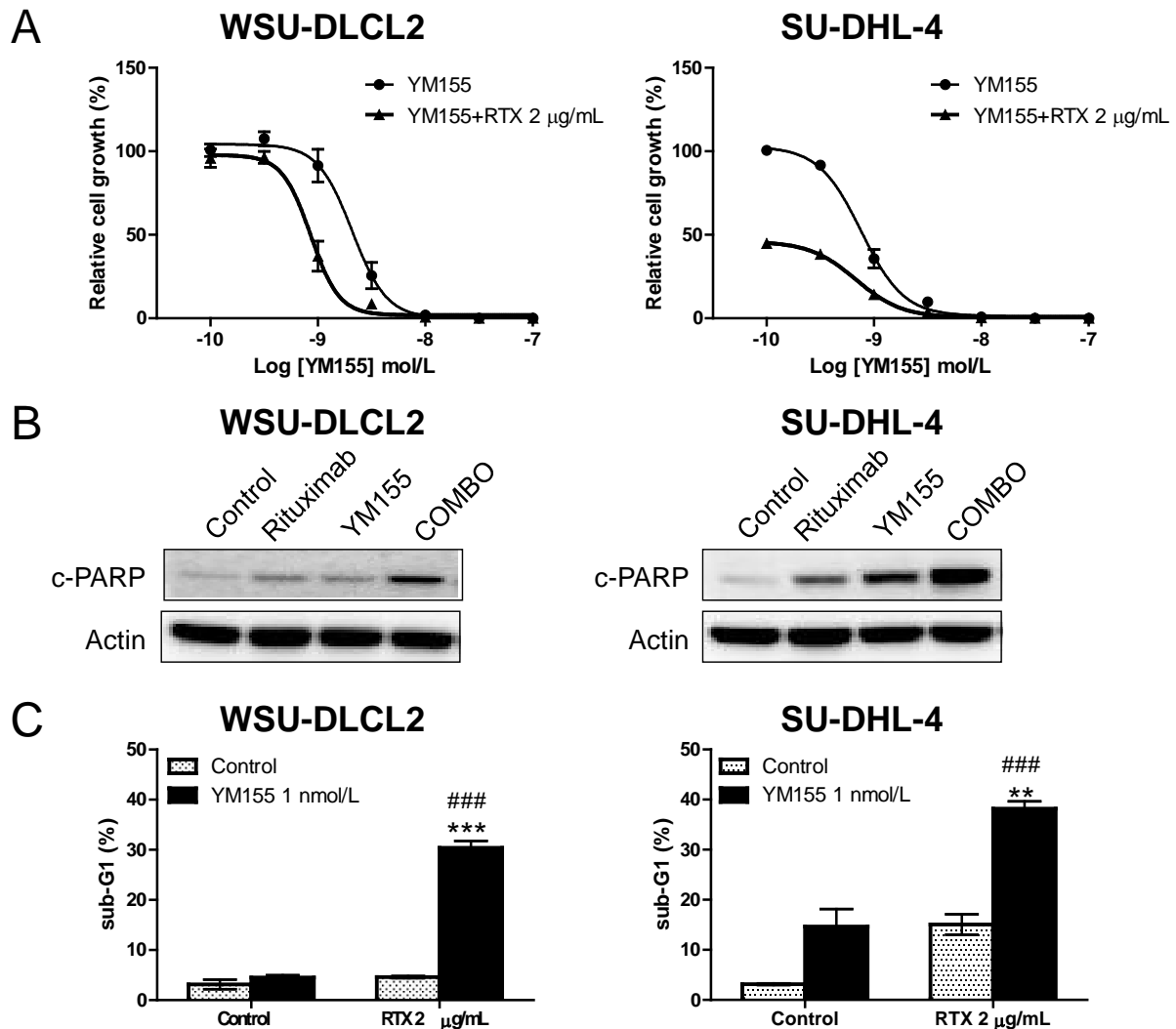


Figure 10 YM155 sensitizes DLBCL cells to rituximab.

WSU-DLCL2 and SU-DHL-4 cells were treated with rituximab (2 μ g/mL) for 16 h, then with YM155 (1 nmol/L). (A) After treatment with YM155 for 96 h, cell viability was evaluated using a CellTiter-Glo assay kit. The luminescent signals were normalized to that of control and expressed as a % of control. The data represent the mean \pm SE from three independent experiments. (B) After treatment with YM155 for 24 h, whole cell lysates were subjected to western blotting using antibodies against cleaved PARP and β -actin. (C) After treatment with YM155 for 96 h, cells were harvested and sub-G1 populations were determined by flow cytometry. Each bar represents the mean \pm SE of the sub-G1 population from three separate experiments. ** p <0.01, *** p <0.001 versus YM155 and ### p <0.001 versus rituximab (Student's t -test).

第4節 考察

STAT3 経路は DLBCL において、特に ABC-DLBCL サブタイプの生存に対して重要な役割を担っていることが報告されている^{62,63}。作用機序が異なる AG490 及び STA-21 の両薬剤を用い、ヒト DLBCL 細胞に対する STAT3 経路の寄与を検討したところ、ABC-DLBCL に分類されるヒト DLBCL 細胞株 SU-DHL-8 細胞⁶⁴) に対し、両薬剤は増殖抑制作用を示した。驚くべきことに、STAT3 経路の増殖に対する寄与度がないと報告されている Germinal center B-cell like diffuse large B-cell lymphoma (GCB-DLBCL) 細胞株である、WSU-DLCL2 細胞と SU-DHL-4 細胞^{65,66}) においても、増殖抑制作用とアポトーシス誘導作用が示された。本作用がリン酸化 STAT3 及び STAT3 の下流因子である c-Myc の発現抑制を伴っていること、また、SU-DHL-8 細胞と同程度の活性で細胞抑制作用が認められることから、STAT3 経路は ABC-DLBCL だけでなく、一部の GCB-DLBCL においても生存に重要な役割を担っていることが示唆された。

サバイビンの発現は DLBCL において高発現しており、抗がん剤に対する耐性と予後の悪さとの関連が報告されている^{9,10}。これまでに、ヒト DLBCL モデルにおいて、YM155 は細胞増殖抑制作用と *in vivo* モデルにおいて腫瘍退縮作用を示すことを報告している⁶⁷。以上の知見から、サバイビンも DLBCL の生存において重要な役割を担っており、STAT3 経路と同時に阻害することにより、さらなる抗腫瘍作用を示すことが推察された。本試験において、WSU-DLCL2 細胞、SU-DHL-4 細胞及び SU-DHL-8 細胞において、YM155 と AG490 または STA-21 との併用処理により、各単剤と比較して、より強いアポトーシス誘導作用が認められた。また、この作用は ABC-DLBCL 及び GCB-DLBCL 両サブタイプの細胞株において認められたことから、サバイビンと STAT3 経路の同時阻害が DLBCL の治療に有用なアプローチであることが示唆された。

いくつかの STAT3 阻害剤は臨床開発中であり、上市したものはない⁶⁸。STAT3 阻害作用を有することが報告されているリツキシマブと YM155 との併用作用を検討したところ、リツキシマブは DLBCL 細胞において STAT3 阻害作用を示し、STAT3 阻害剤と同様に YM155 との併用処理により抗腫瘍作用が増強された。これまでに、DLBCL を含む B cell

Non-Hodgkin lymphoma (B-NHL) モデルにおいて、YM155 とリツキシマブとの併用投与が、体重減少を示すことなく、抗腫瘍作用を増強し、腫瘍の完全退縮と生存期間の延長することを報告している⁶⁹⁾。さらに、YM155 とリツキシマブとの併用投与は、再発した DLBCL 患者を対象とした臨床試験の中間解析において 56% (9/16 例) の奏効率が認められている⁷⁰⁾。以上のことから、YM155 と STAT3 阻害作用を有するリツキシマブとの併用療法は、DLBCL の治療に有効である可能性が示唆された。

第 5 節 小括

- 1 STAT3 阻害剤は、ABC-DLBCL 細胞株 SU-DHL-8 細胞だけでなく、GCB-DLBCL 細胞株 WSU-DLCL2 及び SU-DHL-4 細胞の増殖を抑制し、アポトーシスを誘導した。
- 2 YM155 と STAT3 阻害剤との併用処理は、ABC-DLBCL 細胞株 SU-DHL-8 細胞だけでなく、GCB-DLBCL 細胞株 WSU-DLCL2 及び SU-DHL-4 細胞において、各単剤と比較して強いアポトーシス誘導作用を示した。
- 3 リツキシマブは、GCB-DLBCL 細胞株 WSU-DLCL2 及び SU-DHL-4 細胞において STAT3 阻害作用を示した。
- 4 YM155 とリツキシマブとの併用処理は、WSU-DLCL2 及び SU-DHL-4 細胞において各単剤と比較して、強い細胞増殖抑制作用とアポトーシス誘導作用を示した。

以上のことから、DLBCL の治療において、サバイビン発現抑制と STAT3 経路阻害の併用は有効なアプローチであること、さらに、YM155 とリツキシマブとの併用療法は DLBCL の治療に有効であることが示唆された。

第3章 びまん性大細胞型 B 細胞性リンパ腫における YM155、ベンダムスチン及びリツキシマブ 3 剤併用療法の有用性

第1節 はじめに

ベンダムスチンはプリンアナログ様骨格にアルキル基が結合したハイブリッドな抗がん薬であり、シクロフォスファミドやメルファランなどの既存のアルキル化剤とは異なる以下のプロファイルを有する。1) 既存のアルキル化剤の DNA 障害修復機構の影響を受けず、交叉耐性を示さない。2) 分裂期チェックポイントを抑制し、分裂期崩壊を誘導する⁷¹⁾。ドイツでは 1996 年に低悪性度 NHL (濾胞性リンパ腫, 小細胞リンパ腫)、マントル細胞リンパ腫、Chronic lymphocytic leukemia (CLL)、多発性骨髄腫、米国では 2008 年に CLL、リツキシマブ耐性低悪性度 NHL、さらに日本においても、2010 年に再発または難治性の低悪性度 B-NHL 及びマントル細胞リンパ腫に対する適応が承認されている⁷²⁾。

また、CLL において、ベンダムスチンとリツキシマブとの併用は前臨床において増強作用が認められ⁷³⁾、さらに臨床においても、低悪性度 NHL において、R-CHOP と比較して優れた薬効と忍容性を示し⁷⁴⁾、一次療法として使用されている。さらに、再発・難治性 DLBCL を対象とした臨床試験においても有効な成績が報告されている (奏効率: 62.7%、完全 37.3%、部分寛解 25.4%)⁷⁵⁾。

前章の検討から、サバイビンと STAT3 経路の同時抑制が DLBCL の治療に有効であること、さらに、YM155 がリツキシマブによる STAT3 経路抑制を介して、リツキシマブの作用を増強することを示した。また、再発 DLBCL を対象とした臨床試験の中間解析において、YM155 とリツキシマブとの併用療法は奏効率 56.3%、完全寛解 12.5%、部分寛解 43.8% と良好な作用を示し、YM155 とリツキシマブとの併用療法の臨床有用性が示唆されている⁷⁰⁾。

本章では、非小細胞肺癌モデルにおいて、YM155 が DNA 修復を遅延させ、放射線療法とプラチナ系薬剤の作用を増強すること^{76,77)}、また、YM155 は微小管標的薬 (分裂阻害剤) の薬効を増強する (第 1 章) ことから、YM155 がベンダムスチンの薬効を増強すると仮説を立て、DLBCL における YM155 とベンダムスチンとの併用療法の抗腫瘍作用につい

て検討した。さらに、YM155、ベンダムスチン及びリツキシマブ 3 剤併用療法の抗腫瘍作用について検討を行った。

第2節 実験方法

2.1. 試験物質

YM155 は、アステラス製薬において合成した。ベンダムスチン塩酸塩は Sigma-Aldrich より購入した。それぞれ *In vitro* 試験においては、YM155 及びベンダムスチンは、それぞれ DMSO 及び PBS で 10 mmol/L になるようにストック溶液を調製した。ベンダムスチン注 (Levact[®]) は Mundi pharma (Limburg, Germany) から購入し、ベンダムスチンとして使用した。

2.2. 細胞株

ヒト DLBCL 由来 DB 細胞 (CRL-2289) 及び SU-DHL-8 細胞 (CRL-2961) は ATCC より、WSU-DLCL2 細胞 (ACC575) は DSMZ より入手した。細胞は 10% の非働化した FBS を添加した RPMI-1640 培地 (Sigma-Aldrich) を用いた。細胞は 37°C、5% CO₂ の条件下で培養した。

2.3. 抗体

抗サバイビン抗体 (AF886) は R&D Systems より、抗 cleaved PARP 抗体 (#9541)、抗 γ -histone H2AX 抗体 (#2577)、抗リン酸化 Ataxia-telangiectasia mutated (ATM) (S1981) 抗体 (#5883)、抗リン酸化 p53 (S15) 抗体 (# 9286)、抗リン酸化 chk2 (T68)抗体 (# 2661) は Cell Signaling Technology より、抗アクチン抗体 (A2066) は Sigma-Aldrich より購入した。

2.4. 生細胞数の測定

各細胞は 96-well 白プレート (PerkinElmer) に 5×10^3 cells/well で播種した。翌日、YM155 及びベンダムスチンを単剤または、併用処理し、24 時間後に CellTiter Fluor[®] (Promega) を用い、生細胞数を測定した。操作は添付のプロトコールに従い、Infinite[®] 200 PRO (Tecan) で測定した。1 回の試験は triplicate で行い、生細胞数を、DMSO コントロールを 100% として算出した。

2.5. ウェスタンブロット法によるタンパク質発現量の解析

DB 細胞を 6 well プレート (AGC TECHNO GLASS) に 5×10^5 cells/mL で 3 mL 播種し、一晚培養した。YM155 (10 nmol/L) 及びベンダムスチン (250 μ mol/L) を単剤または、併用処理し、16 時間後細胞を回収した。回収した細胞は、ホスファターゼ阻害剤及びプロテアーゼ阻害剤を添加した RIPA Buffer (Thermo Fisher Scientific) により溶解し、細胞抽出液を得た。細胞抽出液にトリス-グリシン SDS サンプルバッファーを加えて煮沸後、ポリアクリルアミドゲル (Wako Pure Chemical Industries) を用いて電気泳動した。電気泳動後、ゲル上のタンパク質をイモビロン-P メンブレン (Millipore) に転写した。メンブレンを Blocking-One (Nacalai Tesque) でブロッキングし、2.3.の抗体を用いて Western blot 解析を行った。タンパク検出には ECL-prime (GE Healthcare) による化学発光法を用いた。

2.6. 細胞周期解析

DB 細胞を 6 well プレート (AGC TECHNO GLASS) に 5×10^5 cells/mL で 3 mL 播種し、一晚培養した。YM155 (10 nmol/L) 及びベンダムスチン (250 μ mol/L) を単剤または、併用処理し、48 時間後細胞を回収した。その後の操作は、第 1 章 2.7 と同様の方法で実施した。

2.7. ヒト DLBCL 皮下移植マウスモデルに対する抗腫瘍作用

全ての動物実験はアステラス製薬研究所にて定める動物倫理ガイドラインに基づき実施した。4週齢の雄性ヌードマウス (CAnN.Cg-Foxn1nu/CrlCrlj) は Charles River Japan より購入した。動物は試験期間を通じて SPF 条件下において標準的な試料と飲水を与えて飼育した。DB 細胞を等量のマトリゲルと混合し、がん細胞懸濁液とし、 3×10^6 cells/100 μ L/mouse をマウス背側部に皮下移植した。腫瘍が形成された後、腫瘍体積を指標に群内群間のばらつきが小さくなるように群分けし、YM155 あるいはベンダムスチン投与を開始した (Day 0)。YM155 は単体 (陽イオン部分) 重量に換算して表示し、投与直前に薬液を生理食塩液で溶解し、投与量 \times 各群の平均体重 \div 1 日あたりの放出量より算出した濃度の溶液を、浸透圧ポンプ (Alzet[®] model 1007D Micro-Osmotic Pump, DURECT) に充填し、背部皮下に埋植して7日間皮下持続投与した。ベンダムスチン及びリツキシマブは生理食塩液でそれぞれ3及び5 mg/mL に用時調製し、10 mL/kg で尾静脈内投与した。対照群には、生理食塩液を各薬剤のスケジュールと同様にそれぞれ投与した。腫瘍体積 ($0.5 \times$ 長径 \times 短径²) 及び体重を週2回測定した。各被験物質群の腫瘍増殖抑制率及び腫瘍退縮率を以下の式で算出した。

腫瘍増殖抑制率 (%) = $100 \times [1 - (\text{各被験物質投与群の投与開始から最終日までの腫瘍体積の増加の平均}) \div (\text{溶媒対照群の投与開始から最終日までの腫瘍体積増加の平均})]$

腫瘍退縮率 (%) = $100 \times [1 - (\text{各被験物質群の最終日における平均腫瘍体積}) \div (\text{各被験物質群の投与開始時における平均腫瘍体積})]$

触診限界未満の腫瘍体積を完全退縮とした。

2.8. ヒト DLBCL 全身播種マウスモデルに対する延命作用

5週令の雄性スキッドマウス (CB17/Icr-Prkdcscid/CrlCrlj) は、Charles River Japan より購入した。SU-DHL-8 細胞を、 1×10^6 cells/0.1 mL/mouse で、尾静脈より移植した。14日後、体重を指標に1群10匹で、5群に群分けし、以下の薬剤投与を実施した。1. 未治療群、2. YM155 (1 mg/kg/day Day 0 及び Day 19 から7日間皮下持続投与)、3. ベンダムスチン (25

mg/kg day Day 0, 1, 19 及び 20 に尾静脈内投与) とリツキシマブ (50 mg/kg/day Day 0, 2, 19 及び 22 に尾静脈内投与) との併用投与群、4. YM155 とリツキシマブとの併用投与群、5. YM155、ベンダムスチン及びリツキシマブ 3 剤併用投与群。薬剤の投与開始後、88 日まで観察し、動物死亡までの期間を評価した。また、定める瀕死基準 (20%以上の体重減少がみられた動物、回復の見込みのない衰弱状態 (活動量低下、体温低下等) の動物) に相当する場合は、安楽死させ、瀕死の状態までの期間を評価した。

2.9. 3'-Deoxy-3'-[¹⁸F] fluorothymidine positron emission tomography (¹⁸F-FLT-PET)

5 週令の雄性スキッドマウス (CB17/Icr-Prkdcscid/CrlCrlj) は Charles River Japan より購入した。SU-DHL-8 細胞を、 1×10^6 cells/0.1 mL/mouse で、尾静脈より移植した。細胞移植 14 日後に、体重を指標に、1 群 5 匹で 2 群に群分けし、以下の薬剤投与を実施した。1. 未治療群、2. YM155 (1 mg/kg/day Day 0)、ベンダムスチン (25 mg/kg day Day 0, 1 に尾静脈内投与) 及びリツキシマブ (50 mg/kg/day Day 0, 2 に尾静脈内投与) 3 剤併用投与群。¹⁸F-FLT はアステラス製薬にて既報に従って合成した⁶⁹⁾。¹⁸F-FLT トレーサー (合成終了時の Specific Activity: 45.1 MBq/nmol (1.22 Ci/ μ mol)以上) を約 9.8-11.8 MBq/body で、前日より絶食したマウスの尾静脈より投与した。2.0%-2.5%イソフルラン麻酔を施したマウスを imaging chamber (m2m Imaging Corp)に保定し¹⁸F-FLT 投与 1 時間後から、麻酔下で Inveon docked PET/CT システム (Siemens) にて 5 分間の static scan を実施し、続いて CT にて形態画像を取得した (500 μ A, 80 kV)。再構成画像の冠状断において、マウスのリンパ節内の腫瘍の境界に Region of Interest (ROI) を設定し、ROI 内の放射活性は Maximum standard uptake value (SUVmax) にて示した。

2.10. 併用効果の判定

第 1 章 2.9.と同様の方法で実施した

2.11. 統計解析

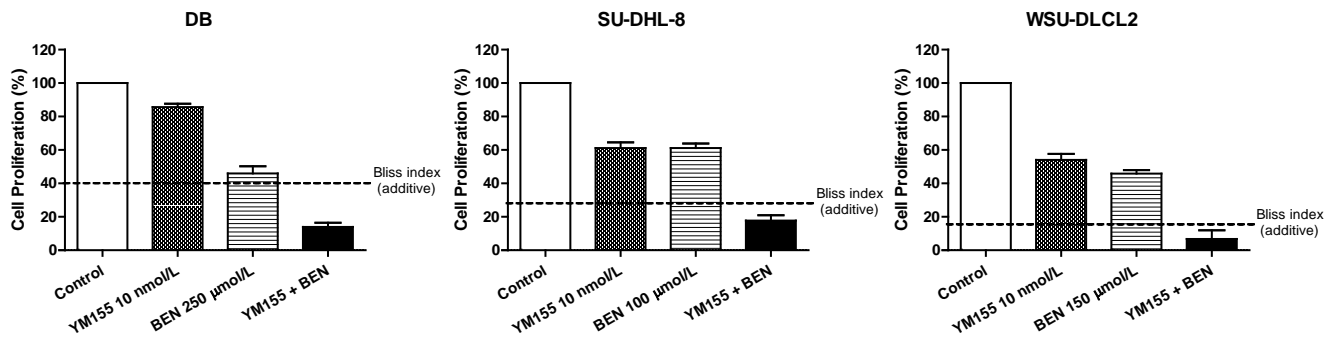
抗腫瘍試験においては、統計処理は観察最終日の腫瘍体積（長径×短径²×0.5）及び体重の実測値について、各単剤投与群と併用群の比較（Student's t-test）を、SAS ソフトウェア（SAS institute）を用いて行った。併用投与群が両単剤投与群と比較して共に危険率 5% 未満である時に、併用投与により作用増強効果があると判定した。PET 試験における ROI の比較については、無処置群と 3 剤併用群の比較（Student's t-test）を、Graphpad prism5 を用いて評価した。また生存試験については、2 群間の生存期間の差の検定（Log-rank test）を Graphpad prism5 を用いて行った。危険率 5% 未満を有意差有りとして判定した。

第 3 節 結果

3.1. ヒト DLBCL 細胞株に対する YM155 とベンダムスチンとの *in vitro* 併用作用

YM155 とベンダムスチンとの併用効果について、細胞増殖抑制及び sub-G1 分画の誘導を指標に評価した。YM155 とベンダムスチンを同時に処理し、24 または 48 時間後にそれぞれ細胞増殖及び sub-G1 分画の誘導を検討した。DB, SU-DHL-8 及び WSU-DLCL2 細胞において、YM155 とベンダムスチンとの併用処理により、各単剤と比較してより強い細胞増殖抑制作用が認められ、その程度は bliss additivism 法にて想定される相加効果よりも強かった (Figure 11A)。また、YM155 とベンダムスチン併用処理により各単剤と比較して強い sub-G1 誘導作用が認められた (Figure 11B)。

A



B

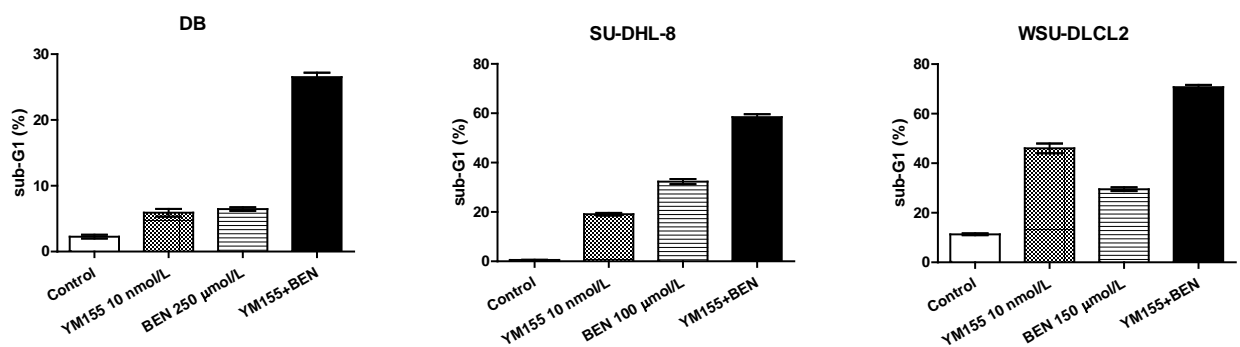


Figure 11 Effect of combined treatment with YM155 and bendamustine on cell proliferation and apoptosis induction in DLBCL cell lines.

DB, SU-DHL-8, and WSU-DLCL2 cells were treated with YM155 in combination with bendamustine (BEN) at indicated concentrations. (A) After treatment for 24 h, cell viability was determined using a CellTiter-Fluor[®] Cell Viability Assay. The fluorescent value of treated cells was normalized to that of DMSO control and is shown as % inhibition of vehicle control. Each point represents the mean \pm SEM from three independent assays. The mean of bliss index (representing the theoretical expectation if the combined effects of YM155 with bendamustine was exactly additive) from three independent assay is also shown as dashed line. (B) After treatment for 48 h, cells were harvested and sub-G1 populations were determined by flow cytometry. Each bar represents the mean \pm SEM of the sub-G1 population from three separate experiments.

3.2. ヒト DLBCL 皮下移植担がんモデルに対する YM155 とベンダムスチンとの併用投与の抗腫瘍作用

ヒト DLBCL 細胞 DB の皮下担がんマウスモデルに対する YM155 とベンダムスチンとの併用投与の *in vivo* 抗腫瘍作用を検討した。コントロール群において、腫瘍の増大が認められるのに対し、YM155 及びベンダムスチン単独投与群においては、それぞれ 97%の腫瘍増殖抑制作用及び、24%の腫瘍退縮作用が認められた。一方、YM155 とベンダムスチンとの併用投与群は、各単剤投与群と比較して有意に強い 99%の腫瘍退縮作用が認められ、8 例中 6 例で腫瘍の完全退縮が認められた (Figure 12)。

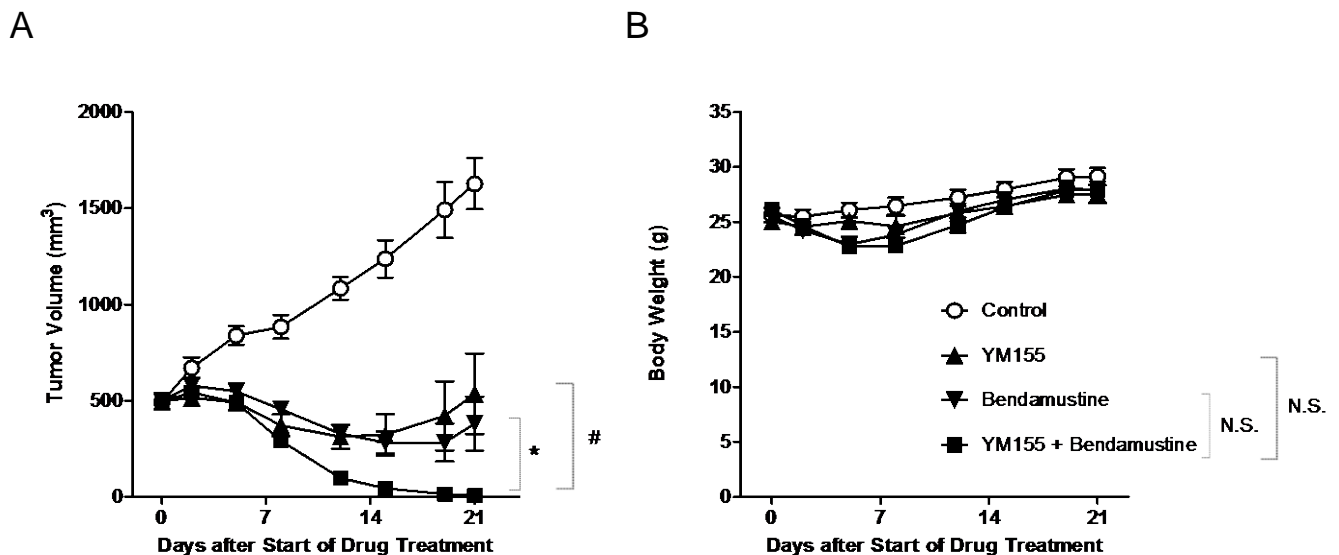


Figure 12 Antitumor activity of YM155 in combination with bendamustine against DB xenografts.

Tumor volume (A) and body weight (B) are expressed as the mean \pm SEM (n=8). Mice received a continuous s.c. infusion of YM155 at 1 mg/kg/day for 7 days starting on Day 0. Bendamustine was administered via i.v. bolus injection at 50 mg/kg on Day 0. Tumor volume and body weight on Day 21 were compared between each single compound group and the combination group using Student's t-test. * p <0.05 versus bendamustine group, # p <0.05 versus YM155 group, N.S.: not significantly different.

3.3. YM155 とベンダムスチンとの併用のメカニズム解析

多発性骨髄腫細胞において、ベンダムスチンはDNA障害作用を呈し、その結果、Ataxia-telangiectasia mutated (ATM) 経路の活性化によるG2/Mアレストが誘導されることが報告されている⁷⁸⁾。前項で認められたYM155とベンダムスチンとの併用メカニズムを解明するために、YM155とベンダムスチン併用時のATM経路の状態及び細胞周期について検討した。DB細胞において、ベンダムスチン処理により γ -H2AXの誘導が認められ、DNA障害が起こっていることが確認された。さらにATM及びその下流因子であるp53及びchk2のリン酸化の誘導が認められた。また、cdc2のリン酸化によるG2/Mアレストとサバイビンの発現の上昇が認められた。YM155を併用すると、ベンダムスチンによるサバイビンの発現上昇とATM経路の活性化が抑制され、単剤処理と比較してより強いDNA障害とsub-G1分画の誘導が認められた (Figure 13)。

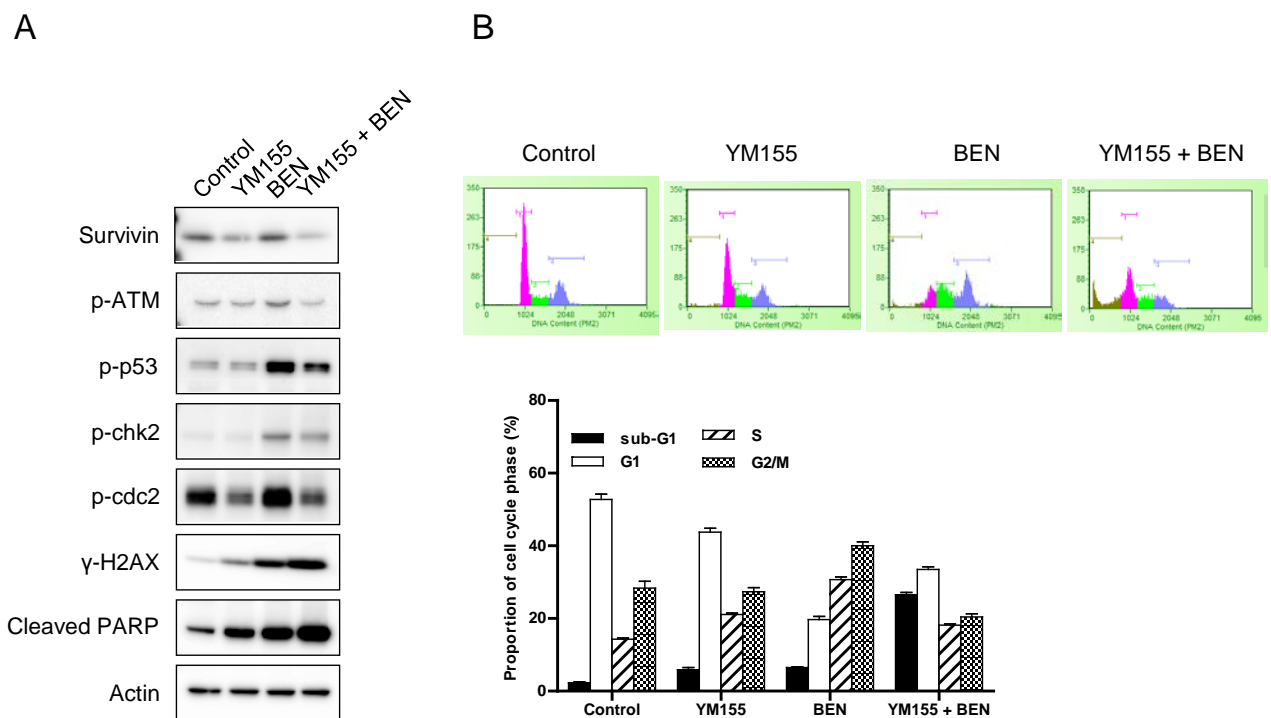


Figure 13 Mechanisms of action for combination of YM155 with bendamustine in DLBCL cell line.

DB cells were treated with YM155 at 10 nmol/L, bendamustine (BEN) at 250 μ mol/L, or both compounds (YM155 + BEN). (A) After treatment for 16 h, whole cell lysates were subjected to Western blotting using antibodies against indicated proteins. (B) After treatment for 48 h, cells were harvested, and cell cycle distribution was determined via flow cytometry.

3.4. ヒト DLBCL 全身播種モデルにおける YM155、ベンダムスチン及びリツキシマブ 3 剤併用投与の延命作用

前項の結果及び過去の報告から、DLBCL に対して、YM155 とベンダムスチン、及び YM155 とリツキシマブの各々2 剤併用の有用性が示されている。次に、YM155、ベンダムスチン及びリツキシマブ 3 剤を併用することにより、さらなる薬効の増強が認められるか検討した。YM155 単独、ベンダムスチンとリツキシマブとの併用投与及び YM155 とリツキシマブとの併用投与は、無処置と比較して有意に全生存期間を延長させた。無処置群の生存期間の中央値 45.5 日に対して、YM155 単独投与群、ベンダムスチンとリツキシマブとの併用投与群及び YM155 とリツキシマブとの併用投与群の生存期間の中央値はそれぞれ、68、57.5 及び 78 日であった。さらに、YM155、ベンダムスチン及びリツキシマブ 3 剤併用投与は、ベンダムスチンとリツキシマブとの併用投与及び YM155 とリツキシマブとの併用投与と比較して、有意に全生存期間を延長させた。3 剤併用投与群の生存期間の中央値は 86 日であった (Figure 14)。

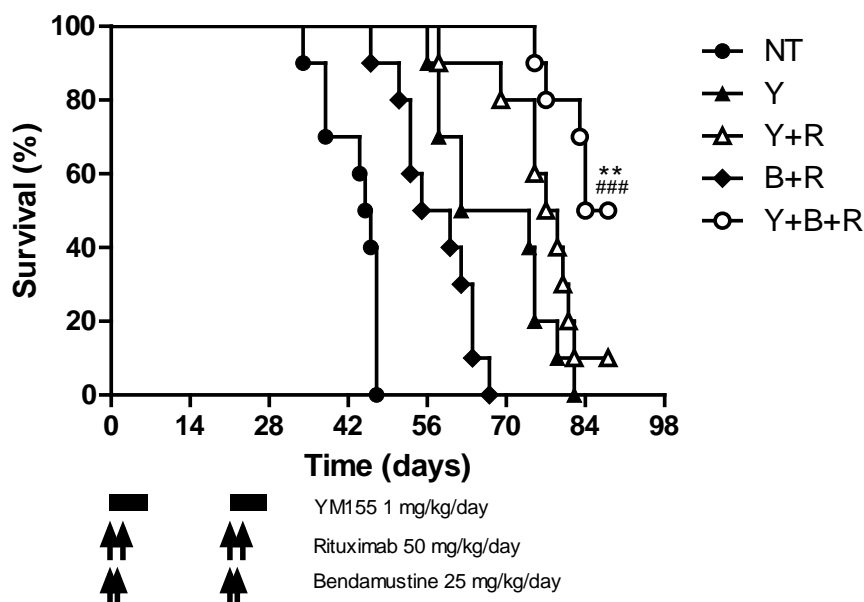


Figure 14 Life-prolonging effect of combined treatment with YM155, bendamustine, and bendamustine (Y+B+R) in a SU-DHL-8 disseminated xenograft model.

Animals (n=10/group) were monitored daily for survival. Statistical differences were determined by using the log-rank test. ** $p < 0.05$ versus YM155-rituximab (Y+R) combination group. ### $p < 0.001$ versus YM155 alone (Y) or bendamustine-rituximab (B+R) combination group. NT: no treatment.

3.5 ヒト DLBCL 全身播種モデルにおける ^{18}F -FLT-PET による腫瘍シグナルの検出

PET は非侵襲的に腫瘍のシグナルを検出するツールをして臨床現場においても利用されている。本試験では ^{18}F -FLT-PET を用い、前項で使用した SU-DHL-8 全身播種モデルにおける腫瘍シグナルの検出と YM155、ベンダムスチン及びリツキシマブの 3 剤併用による影響を検討した。SU-DHL-8 細胞の移植 30 日後に、 ^{18}F -FLT-PET 試験を実施したところ、無処置群では顎下リンパ節、腋窩リンパ節及び鼠径部リンパ節において、 ^{18}F -FLT シグナルが検出された。一方、YM155、ベンダムスチン及びリツキシマブの 3 剤併用投与群において、これらリンパ節のシグナルの減少が認められた (Figure 15)。

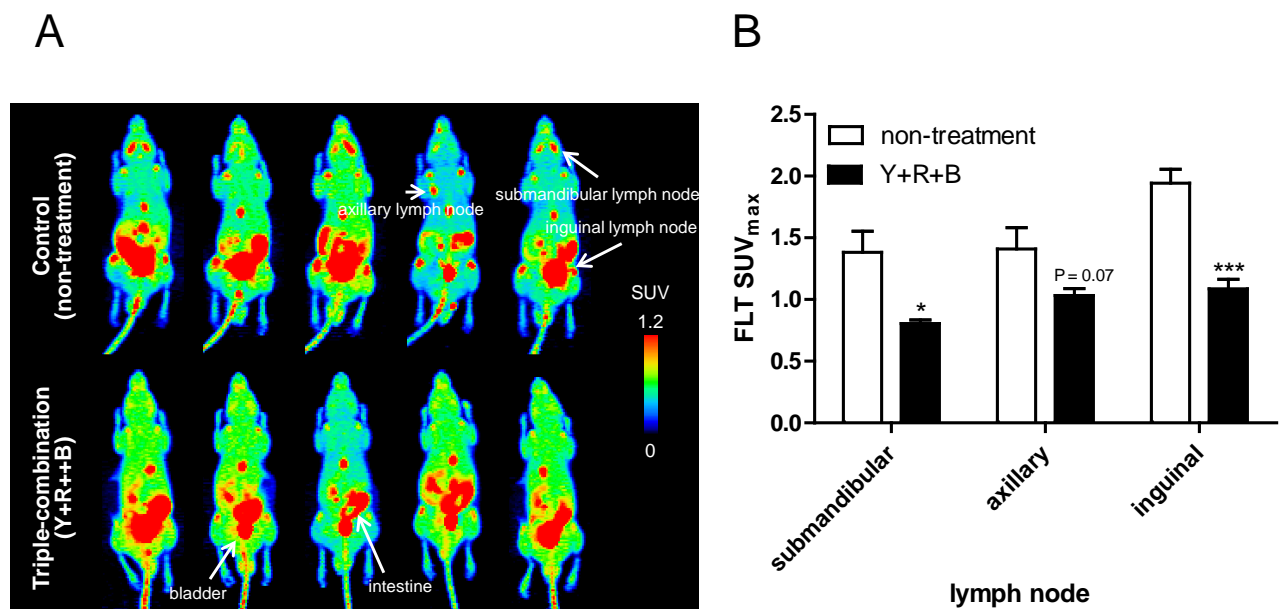


Figure 15 ^{18}F -FLT PET imaging in a SU-DHL-8 disseminated xenograft model.

(A) Coronal maximal intensity projection (MIP) ^{18}F -FLT PET images of all mice carrying SU-DHL-8 disseminated xenografts on d 16 after initiation of triple (3-)combination treatment (Y+R+B). (B) SUV_{max} values of regions of interest (ROI) were manually drawn on submandibular, axillary, and inguinal lymph nodes in control and 3-combination treatment mice. Each bar represents mean + SEM (n=5). * p <0.05, *** p <0.001 versus non-treatment group (Student's t-test).

第4節 考察

本章では、DLBCL に対する YM155 とベンダムスチンの2剤併用療法及び YM155、ベンダムスチン及びリツキシマブの3剤併用療法の抗腫瘍効果について検討した。その結果 YM155 とベンダムスチンとの併用処理により、各単剤と比較して強い細胞増殖抑制作用が認められた。Bliss additivism 法で算出される細胞増殖抑制活性と比較して、YM155 とベンダムスチンとの併用処理による細胞増殖抑制の方が強く、相乗的な作用であることが示唆された。また、YM155 とベンダムスチンとの併用処理により、各単剤処理よりも強いアポトーシス誘導が認められた。さらに、ヒト DLBCL 皮下担がんモデルにおいて、YM155 とベンダムスチンとの併用投与は、ベンダムスチン単剤による体重減少を指標とした副作用を増悪化することなく、各単剤投与と比較し、より強い腫瘍退縮作用を示し、8例中6例完全退縮を誘導した。以上の結果から、YM155 とベンダムスチンとの併用療法は、DLBCL の治療において有用であることが示唆された。

ベンダムスチンは、複数の作用機序を有することが報告されている。第一の作用機序は、DNA と架橋を形成し、DNA 障害を引き起こし、ATM 経路を活性化する^{71,78)}。ATM 経路は、DNA2 本鎖切断の修復の中心的な役割を担っており、ゲノムの安定化と細胞の生存に関与している。ATM は chk2 や p53 などをリン酸化し、細胞周期の停止、DNA 修復、アポトーシスの誘導を制御する⁷⁹⁾。第二の作用機序は、分裂期チェックポイントを阻害し、G2/M アレストを誘導する^{71,78)}。サバイビンの発現は、細胞周期依存的に制御されており、分裂期においてピークに達する⁴⁴⁾。本試験において、ベンダムスチンは DLBCL 細胞において、DNA 障害を引き起こし、ATM 経路の活性化及び cdc2 のリン酸化が誘導され、サバイビンの発現の上昇を伴い、G2/M アレストを引き起こした。さらに、YM155 によるサバイビンの抑制は、ベンダムスチンによって誘導される ATM 経路の活性化を抑制し、その結果、より強い DNA 障害とアポトーシスを誘導した。サバイビンは放射線に対する抵抗因子としても知られている⁸⁰⁾。大腸がん細胞において、放射線照射により chk2 を介してサバイビンの発現が上昇すること⁸¹⁾、さらに、サバイビンは DNA2 本鎖切断の修復複合体と結合し、DNA 障害の修復を制御していることが示唆されている⁸²⁾。さらに、siRNA

によるサバイビンの発現抑制は、放射線による DNA2 本鎖切断の修復を抑制し、その結果、より強い DNA 障害とアポトーシスを誘導する^{82,83)}。YM155 は NSCLC において、DNA 障害修復を抑制し、放射線とプラチナ製剤の薬効を増強させることが報告されている^{76,77)}。また、NSCLC^{17,37)}、メラノーマ^{17,37)}、さらに、第 1 章で明らかにしたように、TNBC において、YM155 によるサバイビン抑制が、G2/M 期におけるサバイビンによる細胞死抵抗性を抑制することにより、ドセタキセルの薬効を増強する。以上の結果から、YM155 によるサバイビン抑制は、DNA 障害修復と G2/M 期におけるサバイビンによる細胞死抵抗性を抑制することにより、ベンダムスチンの薬効を増強することが示唆された。

第 2 章において、YM155 がリツキシマブによる STAT3 阻害を介して、リツキシマブの作用を増強させることを明らかにした。よって、YM155 が各々異なるメカニズムでベンダムスチン及びリツキシマブの作用を増強することが示唆され、3 剤を併用することにより、更に薬効が増強されることが期待された。本試験において、SU-DHL-8 全身播種モデルにおける YM155、ベンダムスチン及びリツキシマブ 3 剤併用投与による延命作用を検討した。臨床の病態と同様に、リンパ節を中心に腫瘍細胞が全身に播種していることが、

¹⁸F-FLT-PET で確認されたこと、さらに、SU-DHL-8 細胞は CHOP などの化学療法に抵抗性を示す ABC-DLBCL に分類される⁶⁴⁾ことから、本モデルは、難治性 DLBCL の臨床病態を多く反映するモデルであると考えられる。本モデルにおいて、YM155、ベンダムスチン及びリツキシマブ 3 剤併用投与は、リンパ節における ¹⁸F-FLT シグナルを減少させ、ベンダムスチンとリツキシマブとの併用投与及び YM155 とリツキシマブとの併用投与と比較して、有意に全生存期間を延長させた。さらに、前臨床と臨床における PK データを基に考察すると、本試験で使用した YM155 の用量は、臨床で到達可能な用量であると想定される^{16,84)}ことから、YM155、ベンダムスチン及びリツキシマブ 3 剤併用療法は、再発・難治性 DLBCL を対象とした臨床試験において有効性が示されている 2 剤併用療法 (YM155 とリツキシマブ、またはベンダムスチンとリツキシマブ) と比較して、さらに優れた臨床効果を示すことが期待される。また、臨床においてベンダムスチンとリツキシマブとの併用は、再発・難治性 DLBCL に対して有用な併用療法の一つであるが、多くの場合、重篤な

血液毒性のためにベンダムスチンの用量を減量せざるを得ない⁷⁵⁾。一方、YM155は難治性DLBCLを対象とした臨床試験において、血液毒性がほとんど見られていない⁵⁷⁾。よって、ベンダムスチンとリツキシマブとの併用にYM155をさらに併用させることは有益であるかもしれない。今後、再発・難治性DLBCL患者に対するYM155、ベンダムスチン及びリツキシマブ3剤併用療法の忍容性と薬効が臨床試験において検証されることが期待される。

小括

1. YM155は、ヒトDLBCL細胞においてベンダムスチンによる細胞増殖抑制作用及アポトーシス誘導作用を相乗的に増強した。
2. ヒトDLBCL皮下移植モデルにおいて、YM155の7日間皮下持続投与とベンダムスチン併用投与は、体重減少を増悪化させることなく強い腫瘍退縮作用を示し、8例中6例で完全退縮を誘導した。
3. YM155によるサバイビンの抑制はベンダムスチンによるDNA障害に対する細胞応答であるATM経路の活性化及びG2/M期におけるサバイビンによる細胞死抵抗性を抑制することにより、単剤処理と比較してより強いDNA障害とアポトーシスを誘導した。YM155、ベンダムスチン及びリツキシマブ3剤併用投与は、ヒトDLBCL全身播種モデルにおいて、YM155とリツキシマブ、あるいはベンダムスチンとリツキシマブの両併用投与と比較して、全生存期間を有意に延長させた。
4. ¹⁸F-FLT-PETにより、ヒトDLBCL全身播種モデルにおけるリンパ節での腫瘍由来のシグナルが検出された。また、YM155、ベンダムスチン及びリツキシマブ3剤併用投与はこれら腫瘍由来のシグナルを有意に減少させた。

以上の結果から、YM155、ベンダムスチン及びリツキシマブ3剤併用療法が優れたDLBCLの治療法となる可能性が示唆された。

総括

本研究は、サバイビンのがん併用薬物療法の標的としての機能を検証することを目的に、YM155 に高感受性を示し、サバイビンが生存に寄与していることが示唆されている、乳がん、非ホジキンリンパ腫の内、既存抗がん剤では満足な治療効果が得られていない、TNBC と DLBCL に着目し、YM155 と既存抗がん剤との併用の薬効評価とそのメカニズム解析を実施した。その結果、サバイビンの機能に基づいた以下の3つの併用メカニズムで、YM155 が既存抗がん剤の薬効を増強することを明らかにした。

第一のメカニズムは、分裂期におけるサバイビンによる細胞死抵抗性の解除である。TNBC において、YM155 は微小管標的薬（ドセタキセル、パクリタキセル、ビノレルビン）による G2/M アレストを伴うサバイビンの発現上昇を阻害し、細胞分裂期における細胞死抵抗性を解除し、より強い抗腫瘍作用を示すことが示唆された (Figure 16)。本研究において、p53 野生型ヒト TNBC 細胞株 MRK-nu-1 細胞において⁸⁵⁾、ドキソルビシンは G2/M アレスト及びサバイビン発現上昇を示さず、YM155 との併用による作用増強は認められなかった (Figure 4)。一方、p53 が変異している MDA-MB-231 細胞株においては、ドキソルビシンが G2/M アレストを誘導することが報告されており⁸⁶⁾、予備検討の結果、MDA-MB231 細胞において、YM155 は微小管標的薬と同様に、ドキソルビシンによるカスパーゼ 3/7 の活性化を増強することが示された (data not shown)。よって、サバイビン抑制による抗がん剤の作用増強作用は、p53 変異ステータスによって、微小管標的薬以外の抗がん剤との併用にも適応できることが示唆された。また、手術不能又は再発乳がんに対する新しい治療薬として承認されたエリブリンは、ドセタキセル等と同様に微小管を標的とする薬剤であることから⁸⁷⁾、YM155 が、エリブリンの作用を増強することが期待される。

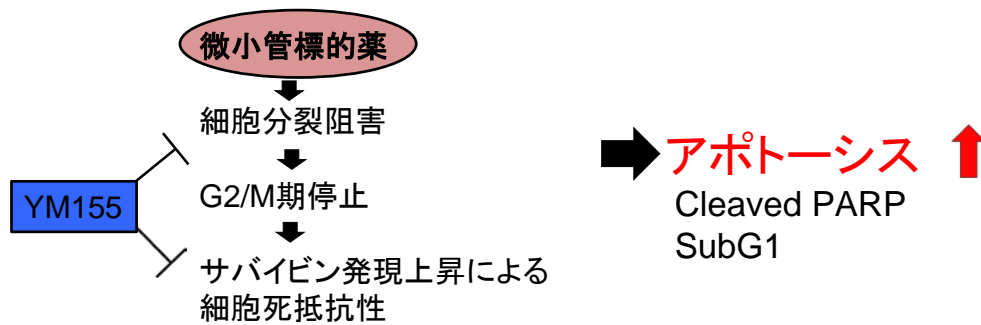


Figure 16 YM155 と微小管標的薬との併用作用のメカニズム

第二のメカニズムは、サバイビンの発現を制御する生存パスウェイとサバイビンとの同時阻害である。DLBCL 細胞において、STAT3 経路とサバイビンを同時に阻害することにより、より強い抗腫瘍作用を示すことが示唆された (Figure 17)。サバイビンと STAT3 経路との関連はいくつかの報告がある。STAT3 を NIH-3T3 細胞に高発現させると、サバイビンの発現が上昇すること⁸⁸⁾、さらに、原発性滲出液リンパ腫において、STAT3 経路を阻害することにより、サバイビンの発現が抑制されることが報告されている⁸⁹⁾。予備検討において、AG490 処理によりサバイビンの発現の抑制が認められており、DLBCL 細胞においてもサバイビンと STAT3 経路の関連が示唆されている (data not shown)。また、サバイビンの発現は STAT3 以外に、受容体チロシンキナーゼの下流で機能する PI3K/Akt 及び Extracellular signal-regulated Kinase (ERK) シグナルによって制御されており^{90,91)}、NSCLC 細胞株にサバイビンを過剰発現すると、EGFR 阻害剤ゲフェチニブの効果が顕著に低下すること⁹²⁾、さらに、NSCLC 細胞株において、EGFR 阻害剤エルロチニブの耐性に PTEN/AKT を介したサバイビンの発現上昇が関与しており、サバイビン siRNA 及び YM155 がエルロチニブの耐性を解除することが報告されている⁹³⁾。以上の知見から、受容体チロシンキナーゼ標的薬の薬効及び耐性にサバイビンが関与しており、サバイビン標的薬と受容体チロシンキナーゼ標的薬との併用が有用である事が期待される。

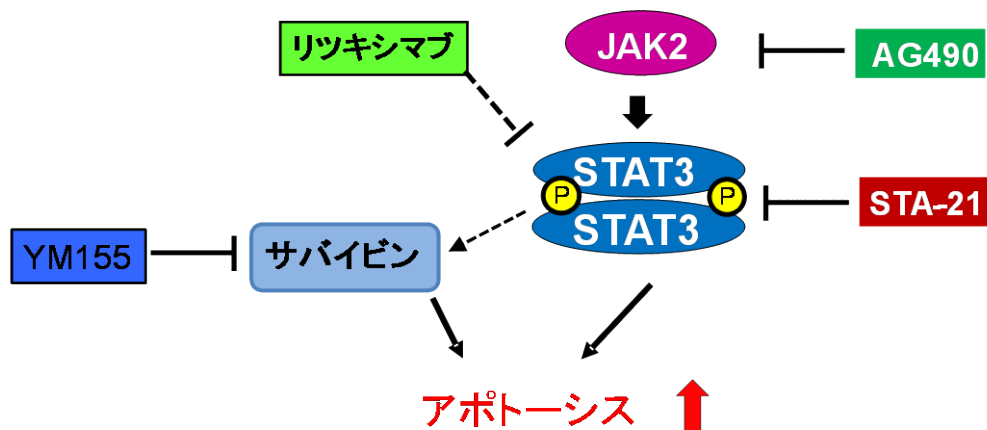


Figure 17 YM155 と STAT3 阻害剤との併用作用のメカニズム

第三のメカニズムは、サバイビンによる DNA 修復制御の阻害である。DLBCL 細胞において、YM155 によるサバイビンの抑制は、ベンダムスチンによる DNA 障害に対する細胞応答である ATM 経路の活性化及び G2/M 期におけるサバイビンによる細胞死抵抗性を抑制することにより、単剤処理と比較して、より強い DNA 障害とアポトーシスを誘導した (Figure 18)。頭頸部がんにおいて、放射線療法に対して抵抗性を示す患者において、サバイビンの発現が高いこと、さらに、サバイビンの機能抑制により、放射線療法に対する感受性が増強すること⁹⁴⁾、NSCLC 細胞株において、YM155 が放射線療法及びプラチナ製剤の薬効を増強することから^{76,77)}、サバイビンと DNA 修復との関連が示唆されてきた。近年、サバイビンが大腸がん細胞及び膠芽腫細胞において、放射線照射により、サバイビンが核内に移行し、DNA 修復タンパク質と複合体を形成することが報告され^{82, 95)}、サバイビンと DNA 修復に関する分子的機構が明らかにされつつある。本研究において、YM155 によるサバイビン発現抑制は、ATM 経路を阻害し、DNA 修復を抑制することにより、より強い DNA 障害を引き起こし、ベンダムスチンの作用を増強することを明らかにした。これらの結果は、サバイビンの DNA 修復に対する寄与を示唆するものであり、YM155 と DNA 障害作用を有する他の薬剤との併用によって作用が増強されることが期待される。

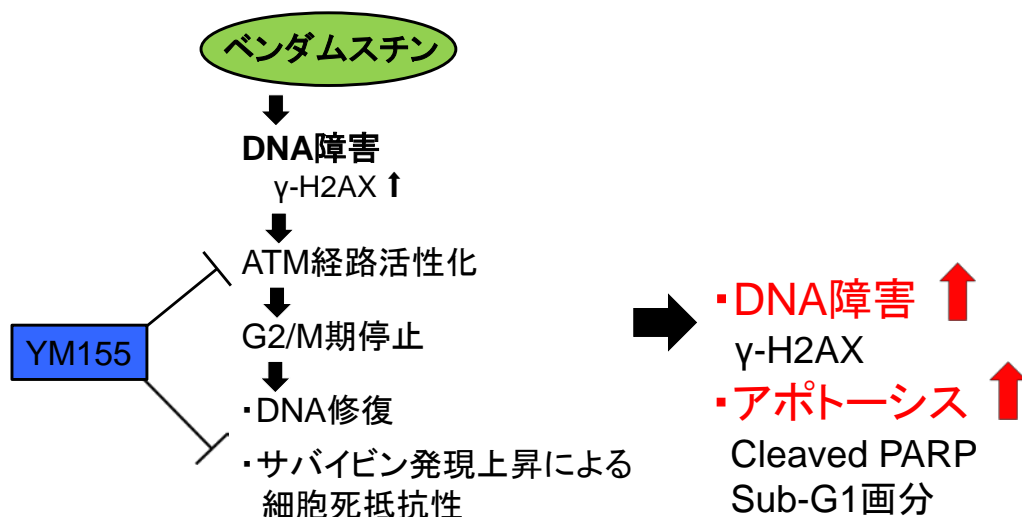


Figure 18 YM155 とベンダムスチンとの併用作用のメカニズム

以上、本研究によりサバイビンは、がん細胞の生存や既存抗がん剤の抵抗性に重要な役割を果たしており、サバイビン発現抑制は、様々なメカニズムの既存抗がん剤の効果を幅広く高めることができる有用なアプローチであることが示唆された。また、既存抗がん剤では満足な治療効果が得られていない TNBC と DLBCL において、サバイビン抑制作用を有する YM155 を含む、新しいがん薬物併用療法の可能性を示した。今後、サバイビン抑制作用を有する YM155 や新規薬剤を含むがん薬物併用療法の臨床有効性の検証が期待される。

引用文献

- 1) Hengartner MO: The biochemistry of apoptosis. *Nature*, **407**, 770-776 (2000).
- 2) Shimizu S, Narita M, Tsujimoto Y: Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature*, **399**, 483-487 (1999).
- 3) Gross A, Yin XM, Wang K, Wei MC, Jockel J, Milliman C, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Korsmeyer SJ: Caspase cleaved BID targets mitochondria and is required for cytochrome c release, while BCL-XL prevents this release but not tumor necrosis factor-R1/Fas death. *J Biol Chem*, **274**, 1156-1163 (1999).
- 4) Wolter KG, Hsu YT, Smith CL, Nechushtan A, Xi XG, Youle RJ: Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis. *J Cell Biol*, **139**, 1281-1292 (1997).
- 5) Straub CS: Targeting IAPs as An Approach to Anti-Cancer Therapy. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, **11**, 291-316 (2011).
- 6) Ambrosini G, Adida C, Altieri DC: A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat Med*, **3**, 917-921 (1997).
- 7) Mita AC, Mita MM, Nawrocki ST, Giles FJ: Survivin: key regulator of mitosis and apoptosis and novel target for cancer therapeutics. *Clin Cancer Res*, **14**, 5000-5005 (2008).
- 8) Yamashita S, Masuda Y, Kurizaki T, Haga Y, Murayama T, Ikei S, Kamei M, Takeno S, Kawahara K: Survivin expression predicts early recurrence in early-stage breast cancer. *Anticancer Res*, **27**, 2803-2808 (2007).
- 9) Adida C, Haioun C, Gaulard P, Lepage E, Morel P, Briere J, Dombret H, Reyes F, Diebold J, Gisselbrecht C, Salles G, Altieri DC, Molina TJ: Prognostic significance of survivin expression in diffuse large B-cell lymphomas. *Blood*, **96**, 1921-1925 (2000).
- 10) Markovic O, Marisavljevic D, Cemerikic V, Perunicic M, Savic S, Filipovic B, Mihaljevic B: Clinical and prognostic significance of apoptotic profile in patients with newly diagnosed nodal diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL). *Eur J Haematol*, **86**, 246-255 (2011).
- 11) Ye CP, Qiu CZ, Huang ZX, Su QC, Zhuang W, Wu RL, Li XF: Relationship between survivin expression and recurrence, and prognosis in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*, **13**, 6264-6268 (2007).
- 12) Mesri M, Wall NR, Li J, Kim RW, Altieri DC: Cancer gene therapy using a survivin mutant adenovirus. *J Clin Invest*, **108**, 981-990 (2001).
- 13) Li W, Wang X, Lei P, Ye Q, Zhu H, Zhang Y, Shao J, Yang J, Shen G: Antisense RNA of survivin gene inhibits the proliferation of leukemia cells and sensitizes leukemia cell line to taxol-induced apoptosis. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*, **28**, 1-5 (2008).
- 14) Morikawa Y, Koike H, Sekine Y, Matsui H, Shibata Y, Ito K, Suzuki K: Rapamycin enhances docetaxel-induced cytotoxicity in a androgen-independent prostate cancer xenograft model by survivin downregulation. *Biochem Biophys Res Commun*, **419**, 584-589 (2012).

- 15) Ansell SM, Arendt BK, Grote DM, Jelinek DF, Novak AJ, Wellik LE, Remstein ED, Bennett CF, Fielding A: Inhibition of survivin expression suppresses the growth of aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *Leukemia*, **18**, 616-623 (2004).
- 16) Nakahara T, Takeuchi M, Kinoyama I, Minematsu T, Shirasuna K, Matsuhisa A, Kita A, Tominaga F, Yamanaka K, Kudoh M, Sasamata M: YM155, a novel small-molecule survivin suppressant, induces regression of established human hormone-refractory prostate tumor xenografts. *Cancer Res*, **67**, 8014-8021 (2007).
- 17) Yamanaka K, Nakahara T, Yamauchi T, Kita A, Takeuchi M, Kiyonaga F, Kaneko N, Sasamata M: Antitumor activity of YM155, a selective small-molecule survivin suppressant, alone and in combination with docetaxel in human malignant melanoma models. *Clin Cancer Res*, **17**, 5423-5431 (2011).
- 18) Alexandrescu DT, Gonzales R, Lewis K, Samlowski W, Cranmer L, Catlett J, Kirkwood J, Whitman E, Lawson D, Bartels P, Drake T, Keating A: A phase II study of YM155 administered as 168 hour continuous infusion in stage IV and unresectable stage III melanoma. *Molecular Cancer Therapeutics*, **6**, 3385S-3385S (2007).
- 19) Giaccone G, Zatloukal P, Roubec J, Floor K, Musil J, Kuta M, van Klaveren RJ, Chaudhary S, Gunther A, Shamsili S: Multicenter Phase II Trial of YM155, a Small-Molecule Suppressor of Survivin, in Patients With Advanced, Refractory, Non-Small-Cell Lung Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, **27**, 4481-4486 (2009).
- 20) Gonzalez R, Samlowski W, Cranmer L, Catlett J, Whitman E, Lawson D, Lewis K, Drake T, Bartels P, Buell D, Keating A, Kirkwood J: YM155, a novel survivin suppressant, demonstrates activity in subjects with stage III or IV melanoma. *Annals of Oncology*, **18**, 40-40 (2007).
- 21) Lewis KD, Samlowski W, Ward J, Catlett J, Cranmer L, Kirkwood J, Lawson D, Whitman E, Gonzalez R: A multi-center phase II evaluation of the small molecule survivin suppressor YM155 in patients with unresectable stage III or IV melanoma. *Investigational New Drugs*, **29**, 161-166 (2011).
- 22) Satoh T, Okamoto I, Miyazaki M, Morinaga R, Tsuya A, Hasegawa Y, Terashima M, Ueda S, Fukuoka M, Ariyoshi Y, Saito T, Masuda N, Watanabe H, Taguchi T, Kakihara T, Aoyama Y, Hashimoto Y, Nakagawa K: Phase I Study of YM155, a Novel Survivin Suppressant, in Patients with Advanced Solid Tumors. *Clinical Cancer Research*, **15**, 3872-3880 (2009).
- 23) Tolcher AW, Mita A, Lewis LD, Garrett CR, Till E, Daud AI, Patnaik A, Papadopoulos K, Takimoto C, Bartels P, Keating A, Antonia S: Phase I and Pharmacokinetic Study of YM155, a Small-Molecule Inhibitor of Survivin. *Journal of Clinical Oncology*, **26**, 5198-5203 (2008).
- 24) Pennati M, Binda M, Colella G, Zoppe M, Folini M, Vignati S, Valentini A, Citti L, De Cesare M, Pratesi G, Giacca M, Daidone MG, Zaffaroni N: Ribozyme-mediated inhibition of survivin expression increases spontaneous and drug-induced apoptosis and decreases the tumorigenic potential of human prostate cancer cells. *Oncogene*, **23**, 386-394 (2004).
- 25) Olie RA, Simoes-Wust AP, Baumann B, Leech SH, Fabbro D, Stahel RA,

- Zangemeister-Wittke U: A novel antisense oligonucleotide targeting survivin expression induces apoptosis and sensitizes lung cancer cells to chemotherapy. *Cancer Res*, **60**, 2805-2809 (2000).
- 26) Zhang M, Mukherjee N, Bermudez RS, Latham DE, Delaney MA, Zietman AL, Shipley WU, Chakravarti A: Adenovirus-mediated inhibition of survivin expression sensitizes human prostate cancer cells to paclitaxel in vitro and in vivo. *Prostate*, **64**, 293-302 (2005).
- 27) Pennati M, Binda M, Colella G, Folini M, Citti L, Villa R, Daidone MG, Zaffaroni N: Radiosensitization of human melanoma cells by ribozyme-mediated inhibition of survivin expression. *J Invest Dermatol*, **120**, 648-654 (2003).
- 28) Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun MJ: Cancer statistics, 2009. *CA Cancer J Clin*, **59**, 225-249 (2009).
- 29) Conlin AK, Seidman AD: Beyond cytotoxic chemotherapy for the first-line treatment of HER2-negative, hormone-insensitive metastatic breast cancer: Current status and future opportunities. *Clinical Breast Cancer*, **8**, 215-223 (2008).
- 30) Liedtke C, Mazouni C, Hess KR, Andre F, Tordai A, Mejia JA, Symmans WF, Gonzalez-Angulo AM, Hennessy B, Green M, Cristofanilli M, Hortobagyi GN, Pusztai L: Response to neoadjuvant therapy and long-term survival in patients with triple-negative breast cancer. *J Clin Oncol*, **26**, 1275-1281 (2008).
- 31) Dent R, Trudeau M, Pritchard KI, Hanna WM, Kahn HK, Sawka CA, Lickley LA, Rawlinson E, Sun P, Narod SA: Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence. *Clin Cancer Res*, **13**, 4429-4434 (2007).
- 32) Jordan MA, Wilson L: Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nat Rev Cancer*, **4**, 253-265 (2004).
- 33) Buzdar AU, Singletary SE, Valero V, Booser DJ, Ibrahim NK, Rahman Z, Theriault RL, Walters R, Rivera E, Smith TL, Holmes FA, Hoy E, Frye DK, Manuel N, Kau SW, McNeese MD, Strom E, Thomas E, Hunt K, Ames F, Berry D, Hortobagyi GN: Evaluation of paclitaxel in adjuvant chemotherapy for patients with operable breast cancer: preliminary data of a prospective randomized trial. *Clin Cancer Res*, **8**, 1073-1079 (2002).
- 34) Sohn DM, Kim SY, Baek MJ, Lim CW, Lee MH, Cho MS, Kim TY: Expression of survivin and clinical correlation in patients with breast cancer. *Biomed Pharmacother*, **60**, 289-292 (2006).
- 35) Pennati M, Folini M, Zaffaroni N: Targeting survivin in cancer therapy. *Expert Opin Ther Targets*, **12**, 463-476 (2008).
- 36) Yamanaka K, Nakata M, Kaneko N, Fushiki H, Kita A, Nakahara T, Koutoku H, Sasamata M: YM155, a selective survivin suppressant, inhibits tumor spread and prolongs survival in a spontaneous metastatic model of human triple negative breast cancer. *Int J Oncol*, **39**, 569-575 (2011).
- 37) Nakahara T, Yamanaka K, Hatakeyama S, Kita A, Takeuchi M, Kinoyama I, Matsuhisa A, Nakano K, Shishido T, Koutoku H, Sasamata M: YM155, a novel survivin suppressant, enhances taxane-induced apoptosis and tumor regression in a human Calu 6 lung cancer

- xenograft model. *Anticancer Drugs*, **22**, 454-462 (2011).
- 38) Berenbaum MC: Criteria for analyzing interactions between biologically active agents. *Adv Cancer Res*, **35**, 269-335 (1981).
- 39) Buck E, Eyzaguirre A, Brown E, Petti F, McCormack S, Haley JD, Iwata KK, Gibson NW, Griffin G: Rapamycin synergizes with the epidermal growth factor receptor inhibitor erlotinib in non-small-cell lung, pancreatic, colon, and breast tumors. *Mol Cancer Ther*, **5**, 2676-2684 (2006).
- 40) Minematsu T, Iwai M, Sugimoto K, Shirai N, Nakahara T, Usui T, Kamimura H: Carrier-mediated uptake of 1-(2-methoxyethyl)-2-methyl-4,9-dioxo-3-(pyrazin-2-ylmethyl)-4,9-dihydro-1H-naphtho[2,3-d]imidazolium bromide (YM155 monobromide), a novel small-molecule survivin suppressant, into human solid tumor and lymphoma cells. *Drug Metab Dispos*, **37**, 619-628 (2009).
- 41) Minematsu T, Iwai M, Umehara K, Usui T, Kamimura H: Characterization of human organic cation transporter 1 (OCT1/SLC22A1)- and OCT2 (SLC22A2)-mediated transport of 1-(2-methoxyethyl)-2-methyl-4,9-dioxo-3-(pyrazin-2-ylmethyl)-4,9-dihydro-1H-naphtho[2,3-d]imidazolium bromide (YM155 monobromide), a novel small molecule survivin suppressant. *Drug Metab Dispos*, **38**, 1-4 (2010).
- 42) Iwai M, Minematsu T, Li Q, Iwatsubo T, Usui T: Utility of P-glycoprotein and organic cation transporter 1 double-transfected LLC-PK1 cells for studying the interaction of YM155 monobromide, novel small-molecule survivin suppressant, with P-glycoprotein. *Drug Metab Dispos*, **39**, 2314-2320 (2011).
- 43) Gottesman MM, Fojo T, Bates SE: Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat Rev Cancer*, **2**, 48-58 (2002).
- 44) Li F, Ambrosini G, Chu EY, Plescia J, Tognin S, Marchisio PC, Altieri DC: Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin. *Nature*, **396**, 580-584 (1998).
- 45) Altieri DC: Validating survivin as a cancer therapeutic target. *Nat Rev Cancer*, **3**, 46-54 (2003).
- 46) Zangemeister-Wittke U, Simon HU: An IAP in action: the multiple roles of survivin in differentiation, immunity and malignancy. *Cell Cycle*, **3**, 1121-1123 (2004).
- 47) Wheatley SP, McNeish IA: Survivin: a protein with dual roles in mitosis and apoptosis. *Int Rev Cytol*, **247**, 35-88 (2005).
- 48) Altieri DC: The case for survivin as a regulator of microtubule dynamics and cell-death decisions. *Curr Opin Cell Biol*, **18**, 609-615 (2006).
- 49) Lamers F, van der Ploeg I, Schild L, Ebus ME, Koster J, Hansen BR, Koch T, Versteeg R, Caron HN, Molenaar JJ: Knockdown of survivin (BIRC5) causes apoptosis in neuroblastoma via mitotic catastrophe. *Endocr Relat Cancer*, **18**, 657-668 (2011).
- 50) A clinical evaluation of the International Lymphoma Study Group classification of non-Hodgkin's lymphoma. The Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. *Blood*, **89**, 3909-3918 (1997).

- 51) Cheson BD, Leonard JP: Monoclonal antibody therapy for B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med*, **359**, 613-626 (2008).
- 52) Coiffier B, Lepage E, Briere J, Herbrecht R, Tilly H, Bouabdallah R, Morel P, Van Den Neste E, Salles G, Gaulard P, Reyes F, Lederlin P, Gisselbrecht C: CHOP chemotherapy plus rituximab compared with CHOP alone in elderly patients with diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med*, **346**, 235-242 (2002).
- 53) Hiddemann W, Kneba M, Dreyling M, Schmitz N, Lengfelder E, Schmits R, Reiser M, Metzner B, Harder H, Hegewisch-Becker S, Fischer T, Kropff M, Reis HE, Freund M, Wormann B, Fuchs R, Planker M, Schimke J, Eimermacher H, Trumper L, Aldaoud A, Parwaresch R, Unterhalt M: Frontline therapy with rituximab added to the combination of cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone (CHOP) significantly improves the outcome for patients with advanced-stage follicular lymphoma compared with therapy with CHOP alone: results of a prospective randomized study of the German Low-Grade Lymphoma Study Group. *Blood*, **106**, 3725-3732 (2005).
- 54) Pfreundschuh M, Trumper L, Osterborg A, Pettengell R, Trneny M, Imrie K, Ma D, Gill D, Walewski J, Zinzani PL, Stahel R, Kvaloy S, Shpilberg O, Jaeger U, Hansen M, Lehtinen T, Lopez-Guillermo A, Corrado C, Scheliga A, Milpied N, Mendila M, Rashford M, Kuhnt E, Loeffler M: CHOP-like chemotherapy plus rituximab versus CHOP-like chemotherapy alone in young patients with good-prognosis diffuse large-B-cell lymphoma: a randomised controlled trial by the MabThera International Trial (MInT) Group. *Lancet Oncol*, **7**, 379-391 (2006).
- 55) Friedberg JW: Relapsed/refractory diffuse large B-cell lymphoma. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, **2011**, 498-505 (2011).
- 56) Tolcher AW, Mita A, Lewis LD, Garrett CR, Till E, Daud AI, Patnaik A, Papadopoulos K, Takimoto C, Bartels P, Keating A, Antonia S: Phase I and pharmacokinetic study of YM155, a small-molecule inhibitor of survivin. *J Clin Oncol*, **26**, 5198-5203 (2008).
- 57) Cheson BD, Bartlett NL, Vose JM, Lopez-Hernandez A, Seiz AL, Keating AT, Shamsili S, Papadopoulos KP: A phase II study of the survivin suppressant YM155 in patients with refractory diffuse large B-cell lymphoma. *Cancer*, **118**, 3128-3134 (2012).
- 58) Darnell JE, Jr.: STATs and gene regulation. *Science*, **277**, 1630-1635 (1997).
- 59) Stark GR, Kerr IM, Williams BR, Silverman RH, Schreiber RD: How cells respond to interferons. *Annu Rev Biochem*, **67**, 227-264 (1998).
- 60) Yu H, Jove R: The STATs of cancer--new molecular targets come of age. *Nat Rev Cancer*, **4**, 97-105 (2004).
- 61) Yu H, Pardoll D, Jove R: STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3. *Nat Rev Cancer*, **9**, 798-809 (2009).
- 62) Scuto A, Kujawski M, Kowolik C, Krymskaya L, Wang L, Weiss LM, Digiusto D, Yu H, Forman S, Jove R: STAT3 inhibition is a therapeutic strategy for ABC-like diffuse large B-cell lymphoma. *Cancer Res*, **71**, 3182-3188 (2011).
- 63) Ding BB, Yu JJ, Yu RY, Mendez LM, Shaknovich R, Zhang Y, Cattoretti G, Ye BH:

- Constitutively activated STAT3 promotes cell proliferation and survival in the activated B-cell subtype of diffuse large B-cell lymphomas. *Blood*, **111**, 1515-1523 (2008).
- 64) Culpin RE, Proctor SJ, Angus B, Crosier S, Anderson JJ, Mainou-Fowler T: A 9 series microRNA signature differentiates between germinal centre and activated B-cell-like diffuse large B-cell lymphoma cell lines. *Int J Oncol*, **37**, 367-376 (2010).
- 65) Hailfinger S, Lenz G, Ngo V, Posvitz-Fejfar A, Rebeaud F, Guzzardi M, Penas EM, Dierlamm J, Chan WC, Staudt LM, Thome M: Essential role of MALT1 protease activity in activated B cell-like diffuse large B-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **106**, 19946-19951 (2009).
- 66) Yap DB, Chu J, Berg T, Schapira M, Cheng SW, Moradian A, Morin RD, Mungall AJ, Meissner B, Boyle M, Marquez VE, Marra MA, Gascoyne RD, Humphries RK, Arrowsmith CH, Morin GB, Aparicio SA: Somatic mutations at EZH2 Y641 act dominantly through a mechanism of selectively altered PRC2 catalytic activity, to increase H3K27 trimethylation. *Blood*, **117**, 2451-2459 (2011).
- 67) Kita A, Nakahara T, Yamanaka K, Nakano K, Nakata M, Mori M, Kaneko N, Koutoku H, Izumisawa N, Sasamata M: Antitumor effects of YM155, a novel survivin suppressant, against human aggressive non-Hodgkin lymphoma. *Leuk Res*, **35**, 787-792 (2011).
- 68) Mankan AK, Greten FR: Inhibiting signal transducer and activator of transcription 3: rationality and rationale design of inhibitors. *Expert Opin Investig Drugs*, **20**, 1263-1275 (2011).
- 69) Kita A, Mitsuoka K, Kaneko N, Nakata M, Miyoshi S, Jitsuoka M, Yamanaka K, Noda A, Mori M, Nakahara T, Sasamata M: Sepantronium Bromide (YM155) Enhances Response of Human B-cell non-Hodgkin Lymphoma to Rituximab. *J Pharmacol Exp Ther*, (2012).
- 70) Papadopoulos KP: A Phase II Study of Sepantronium Bromide (YM155) Plus Rituximab in Previously Treated Subjects with Aggressive CD20-Positive B Cell Non-Hodgkin's Lymphoma Who Are Ineligible for or Have Previously Received an Autologous Stem Cell Transplant - Stage I Results. *American Society of Hematology Annual meeting Abstract No. 2731*, (2012).
- 71) Leoni LM, Bailey B, Reifert J, Bendall HH, Zeller RW, Corbeil J, Elliott G, Niemeyer CC: Bendamustine (Treanda) displays a distinct pattern of cytotoxicity and unique mechanistic features compared with other alkylating agents. *Clin Cancer Res*, **14**, 309-317 (2008).
- 72) Garnock-Jones KP: Bendamustine: a review of its use in the management of indolent non-Hodgkin's lymphoma and mantle cell lymphoma. *Drugs*, **70**, 1703-1718 (2010).
- 73) Chow KU, Sommerlad WD, Boehrer S, Schneider B, Seipelt G, Rummel MJ, Hoelzer D, Mitrou PS, Weidmann E: Anti-CD20 antibody (IDEC-C2B8, rituximab) enhances efficacy of cytotoxic drugs on neoplastic lymphocytes in vitro: role of cytokines, complement, and caspases. *Haematologica*, **87**, 33-43 (2002).
- 74) Rummel MJ, Niederle N, Maschmeyer G, Banat GA, von Grunhagen U, Losem C, Kofahl-Krause D, Heil G, Welslau M, Balser C, Kaiser U, Weidmann E, Durk H, Ballo H, Stauch M, Roller F, Barth J, Hoelzer D, Hinke A, Brugger W: Bendamustine plus rituximab

- versus CHOP plus rituximab as first-line treatment for patients with indolent and mantle-cell lymphomas: an open-label, multicentre, randomised, phase 3 non-inferiority trial. *Lancet*, **381**, 1203-1210 (2013).
- 75) Ohmachi K, Niitsu N, Uchida T, Kim SJ, Ando K, Takahashi N, Uike N, Eom HS, Chae YS, Terauchi T, Tateishi U, Tatsumi M, Kim WS, Tobinai K, Suh C, Ogura M: Multicenter Phase II Study of Bendamustine Plus Rituximab in Patients With Relapsed or Refractory Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *J Clin Oncol*, (2013).
 - 76) Iwasa T, Okamoto I, Takezawa K, Yamanaka K, Nakahara T, Kita A, Koutoku H, Sasamata M, Hatashita E, Yamada Y, Kuwata K, Fukuoka M, Nakagawa K: Marked anti-tumour activity of the combination of YM155, a novel survivin suppressant, and platinum-based drugs. *Br J Cancer*, **103**, 36-42 (2010).
 - 77) Iwasa T, Okamoto I, Suzuki M, Nakahara T, Yamanaka K, Hatashita E, Yamada Y, Fukuoka M, Ono K, Nakagawa K: Radiosensitizing effect of YM155, a novel small-molecule survivin suppressant, in non-small cell lung cancer cell lines. *Clin Cancer Res*, **14**, 6496-6504 (2008).
 - 78) Gaul L, Mandl-Weber S, Baumann P, Emmerich B, Schmidmaier R: Bendamustine induces G2 cell cycle arrest and apoptosis in myeloma cells: the role of ATM-Chk2-Cdc25A and ATM-p53-p21-pathways. *J Cancer Res Clin Oncol*, **134**, 245-253 (2008).
 - 79) Shiloh Y: ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. *Nat Rev Cancer*, **3**, 155-168 (2003).
 - 80) Chakravarti A, Zhai GG, Zhang M, Malhotra R, Latham DE, Delaney MA, Robe P, Nestler U, Song Q, Loeffler J: Survivin enhances radiation resistance in primary human glioblastoma cells via caspase-independent mechanisms. *Oncogene*, **23**, 7494-7506 (2004).
 - 81) Ghosh JC, Dohi T, Raskett CM, Kowalik TF, Altieri DC: Activated checkpoint kinase 2 provides a survival signal for tumor cells. *Cancer Res*, **66**, 11576-11579 (2006).
 - 82) Reichert S, Rodel C, Mirsch J, Harter PN, Tomicic MT, Mittelbronn M, Kaina B, Rodel F: Survivin inhibition and DNA double-strand break repair: a molecular mechanism to overcome radioresistance in glioblastoma. *Radiother Oncol*, **101**, 51-58 (2011).
 - 83) Rodel F, Hoffmann J, Distel L, Herrmann M, Noisternig T, Papadopoulos T, Sauer R, Rodel C: Survivin as a radioresistance factor, and prognostic and therapeutic target for radiotherapy in rectal cancer. *Cancer Res*, **65**, 4881-4887 (2005).
 - 84) Aoyama Y, Nishimura T, Sawamoto T, Satoh T, Katashima M, Nakagawa K: Pharmacokinetics of sepantronium bromide (YM155), a small-molecule suppressor of survivin, in Japanese patients with advanced solid tumors: dose proportionality and influence of renal impairment. *Cancer Chemother Pharmacol*, **70**, 373-380 (2012).
 - 85) "JCRB 細胞バンク Web site." <<http://cellbank.nibio.go.jp/legacy/cellinfo/p5301.htm>>, cited 5/13, 2014.
 - 86) Bar-On O, Shapira M, Hershko DD: Differential effects of doxorubicin treatment on cell cycle arrest and Skp2 expression in breast cancer cells. *Anticancer Drugs*, **18**, 1113-1121 (2007).

- 87) Kuznetsov G, Towle MJ, Cheng H, Kawamura T, TenDyke K, Liu D, Kishi Y, Yu MJ, Littlefield BA: Induction of morphological and biochemical apoptosis following prolonged mitotic blockage by halichondrin B macrocyclic ketone analog E7389. *Cancer Res*, **64**, 5760-5766 (2004).
- 88) Shen Y, Devgan G, Darnell JE, Jr., Bromberg JF: Constitutively activated Stat3 protects fibroblasts from serum withdrawal and UV-induced apoptosis and antagonizes the proapoptotic effects of activated Stat1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 1543-1548 (2001).
- 89) Aoki Y, Feldman GM, Tosato G: Inhibition of STAT3 signaling induces apoptosis and decreases survivin expression in primary effusion lymphoma. *Blood*, **101**, 1535-1542 (2003).
- 90) Asanuma H, Torigoe T, Kamiguchi K, Hirohashi Y, Ohmura T, Hirata K, Sato M, Sato N: Survivin expression is regulated by coexpression of human epidermal growth factor receptor 2 and epidermal growth factor receptor via phosphatidylinositol 3-kinase/AKT signaling pathway in breast cancer cells. *Cancer Res*, **65**, 11018-11025 (2005).
- 91) Siddiqa A, Long LM, Li L, Marciniak RA, Kazhdan I: Expression of HER-2 in MCF-7 breast cancer cells modulates anti-apoptotic proteins Survivin and Bcl-2 via the extracellular signal-related kinase (ERK) and phosphoinositide-3 kinase (PI3K) signalling pathways. *BMC Cancer*, **8**, 129 (2008).
- 92) Okamoto K, Okamoto I, Okamoto W, Tanaka K, Takezawa K, Kuwata K, Yamaguchi H, Nishio K, Nakagawa K: Role of Survivin in EGFR Inhibitor-Induced Apoptosis in Non-Small Cell Lung Cancers Positive for EGFR Mutations. *Cancer Research*, **70**, 10402-10410 (2010).
- 93) Okamoto K, Okamoto I, Hatashita E, Kuwata K, Yamaguchi H, Kita A, Yamanaka K, Ono M, Nakagawa K: Overcoming erlotinib resistance in EGFR mutation-positive non-small cell lung cancer cells by targeting survivin. *Mol Cancer Ther*, **11**, 204-213 (2012).
- 94) Farnebo L, Tiefenbock K, Ansell A, Thunell LK, Garvin S, Roberg K: Strong expression of survivin is associated with positive response to radiotherapy and improved overall survival in head and neck squamous cell carcinoma patients. *Int J Cancer*, **133**, 1994-2003 (2013).
- 95) Capalbo G, Dittmann K, Weiss C, Reichert S, Hausmann E, Rodel C, Rodel F: Radiation-induced survivin nuclear accumulation is linked to DNA damage repair. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, **77**, 226-234 (2010).

論文目録

本論文は以下の原著論文を基に構成されている。

1. Combination of YM155, a survivin suppressant, with bendamustine and rituximab: A new combination therapy to treat relapsed/refractory diffuse large B-cell lymphoma.
Kaneko N, Mitsuoka K, Amino N, Yamanaka K, Kita A, Miyoshi S, Mori M, Kuromitsu S
Clin Cancer Res. 2014;20(7):1814-22. Highlight of This Issue
2. Synergistic Antitumor Activities of Sepantronium Bromide (YM155), a Survivin Suppressant, in Combination with Microtubule-Targeting Agents in Triple-Negative Breast Cancer Cells.
Kaneko N, Yamanaka K, Kita A, Tabata K, Akabane T, Mori M.
Biol Pharm Bull. 2013;36(12):1921-7. Highlight of This Issue
3. Combination of YM155, a survivin suppressant with a STAT3 inhibitor: a new strategy to treat diffuse large B-cell lymphoma.
Kaneko N, Kita A, Yamanaka K, Mori M.
Leuk Res. 2013;37(9):1156-61.

謝辞

本論文の発表および作成に際し、終始懇切丁寧なご指導とご鞭撻を賜りました、静岡県立大学 薬学研究院 医薬生命化学教室 奥直人教授に謹んで感謝申し上げます。また、本論文の内容を詳細にご校閲賜りました、同研究院 分子病態学教室 森本達也教授、同研究院 創薬探索センター 浅井章良教授、及び同研究院 薬理学教室 石川智久教授に深く御礼申し上げます。

本研究の遂行、発表及び学位取得に際し、ご支援及びご配慮を賜りましたアステラス製薬株式会社 研究本部 内田渡本部長、宮田桂司専任理事、バイオサイエンス研究所シード・ディスカバリー研究室 黒光貞夫室長に心より感謝申し上げます。

最後に共同研究者として、本研究の遂行にあたり、直接懇切なるご指導をいただきましたアステラス製薬株式会社 研究本部 研究推進部 森政道氏、リサーチポートフォリオ&サイエンス部 がん研究ユニット網野伸明博士、トランスレーショナルサイエンス研究所 バイオイメーキング研究室 三好荘介室長、薬物動態研究所 田端健司所長、赤羽 隆文博士、開発本部 喜多彩氏、山中堅太郎博士、製品戦略部 光岡圭介博士に深く感謝申し上げます。