

選択的オーロキナーゼ A 阻害剤 TAS-119 を用いた
オーロキナーゼ A 阻害剤の薬剤感受性マーカーの探索

2022 年 3 月

三浦晃敬

目次

1. 概要.....	4
2. 序論.....	6
3. 実験方法.....	9
3.1 細胞株.....	9
3.2 被験物質.....	9
3.3 リコンビナントタンパクを用いたキナーゼ阻害活性の測定.....	9
3.4 細胞を用いたキナーゼ阻害活性の測定.....	9
3.5 化合物による細胞増殖抑制効果の測定.....	9
3.6 ウェスタンブロッティング.....	10
3.7 phospho-histone H3 (pHH3)の検出.....	11
3.8 <i>In vivo</i> 薬効試験.....	11
3.9 <i>In vivo</i> 薬力学的試験.....	12
4. 結果.....	13
4.1 TAS-119 は強力かつ選択的なオーロラ A と TRK ファミリー阻害剤である.....	13
4.2 TAS-119 処理によって細胞周期の有糸分裂期 (G2/M 期) への同調が認められる.....	13
4.3 TAS-119 と他のオーロラ A 阻害剤との比較.....	16
4.4 <i>MYC</i> 増幅と <i>CTNNB1</i> 遺伝子変異は TAS-119 の感受性を規定する.....	17
4.5 TAS-119 処理は神経芽細胞腫株において N-Myc の分解を誘導する.....	21
4.6 TAS-119 処理は TRK 融合陽性細胞においても抗腫瘍作用を示す.....	23
5. 考察.....	26
6. 参考文献.....	31

図表目次

図 1 :	オーロラキナーゼファミリーについて.....	8
図 2 :	TAS-119 の標的阻害活性及び選択性.....	14
図 3 :	TAS-119 は選択的に細胞内オーロラ A 阻害を示す.....	16
図 4 :	TAS-119 は <i>MYC</i> 増幅株及び <i>CTNNB1</i> 変異株に対して増殖抑制効果を示す.....	19
図 5 :	TAS-119 は <i>MYC</i> 増幅株及び <i>CTNNB1</i> 変異株を用いた動物モデルにおいて腫瘍増殖抑制効果を示す.....	20
図 6 :	TAS-119 処理は神経芽細胞腫株において N-Myc の分解を誘導する.....	22
図 7 :	TAS-119 は <i>TRK</i> 融合細胞株において, 腫瘍増殖抑制効果を示す.....	24

1. 概要

オーロラキナーゼ A は、様々ながんで過剰発現している細胞周期に関わるキナーゼであり、有望な抗がん剤のターゲットと考えられている。本研究では、経口投与可能な新規のオーロラ A 阻害剤である TAS-119 の前臨床評価を行った。

TAS-119 は、リコンビナントオーロラ A を用いた化合物活性測定試験において強い阻害効果を示し、IC50 値は 1.04 nmol/L であった。また TAS-119 は、リコンビナントオーロラ B を用いた化合物活性測定試験では、IC50 値は 95 nmol/L を示し、オーロラキナーゼ B と比較して、オーロラ A に選択的に強い阻害活性を示した。さらに、TAS-119 はその他ヒトキナーゼに対してもオーロラ A に選択的に強い阻害活性を示した。

次に、TAS-119 の細胞内オーロラ A 阻害について、HeLa 細胞を用いて検討した。TAS-119 処理において、細胞内オーロラ A の阻害と M 期の細胞周期マーカーであるヒストン H3 のリン酸化の蓄積が観察された。TAS-119 はオーロラ A の阻害を介して、細胞周期を M 期に遅滞させることが示唆され、一般的なオーロラ A タンパク阻害による表現系と一致する結果が得られた。

TAS-119 の感受性マーカーの探索を行うために、240 株のがん細胞株を用いた細胞株感受性試験を行った。TAS-119 は、様々ながん細胞株の増殖を抑制したが、特に *MYC* ファミリーの遺伝子増幅や *CTNNB1* の遺伝子変異を有するがん細胞株の増殖を強く抑制した。また、TAS-119 は、*MYC* 増幅を有するヒト肺がん細胞株や *CTNNB1* 変異を有するヒト大腸がん細胞株の *in vivo* 異種移植モデルにおいて、忍容性の高い用量で強い抗腫瘍活性を示した。

次に、*MYCN* が増幅した神経芽細胞腫株を用いて、TAS-119 処理による *MYC* ファミリー増幅株に対する増殖抑制効果の作用機序を探索した。TAS-119 は、N-Myc 分解を促し、N-Myc の下流の転写標的である *P53* や *CDK4* などの発現誘導も阻害した。TAS-119 はこの作用機序を介して、*MYCN* 遺伝子増幅を有する細胞株の増殖抑制に寄与していることが示唆された。

また、TAS-119 はトロポミオシン受容体キナーゼ (TRK) A, TRKB, TRKC に対する阻害作用も有することから、TAS-119 の *NTRK* 融合によって、TRK 経路が亢進した株を用いた検討を行った。TAS-119 処理は、RIP-TRKA 発現 NIH3T3 細胞において、TRKA 阻害を介した ERK や

AKT のリン酸化の阻害や、PARP や Caspase3 の開裂といった細胞死マーカーの誘導を示した。また、TAS-119 処理は、RIP-TRKA 発現 NIH3T3 細胞を用いた *in vivo* 異種移植モデルにおいて、TRK 経路の阻害を介した、腫瘍の強力な増殖抑制作用を示した。

本研究は、TAS-119 の抗がん剤としての可能性を示すもので、特に、MYC ファミリー遺伝子増幅、CTNNB1 遺伝子変異、NTRK 融合を有するがんに対して、TAS-119 の抗がん剤としての可能性が示された。

2. 序論

オーロラキナーゼファミリーは、セリン/スレオニンキナーゼに属するキナーゼファミリーであり、細胞周期の制御に重要な役割を果たす事が報告されている[1]。また、オーロラキナーゼファミリーは、オーロラA、B、Cの3つのメンバーで構成される事が知られている(図1a) [2]。その中でも、オーロラAとBは、ともに有糸分裂期に働くことが知られているが、その機能は異なっている。有糸分裂の前駆期において、オーロラAは、染色体の分離と紡錘体の形成を制御することで、適切なセントロメアの形成を司っている[3]。ヒトの細胞において、オーロラAをサイレンシングすると、G2/M期の細胞の蓄積、紡錘体の形態異常、紡錘体形成チェックポイント(SAC)の活性化などが起こる(図1b) [4,5]。一方でオーロラBは、有糸分裂初期にはセントロメアに局在し、有糸分裂後期および細胞質分裂期には中央紡錘体領域(mid-zone)、赤道面、中央体(mid-body)へと移動する染色体パッセンジャータンパク質である事が知られている[3,6,7]。オーロラBをサイレンシングすると、SACが不活性化され、染色体の整列異常や細胞質分裂の失敗が引き起こされる[8]。オーロラCの機能については、非常に限られた報告しかない。

オーロラAは、様々な腫瘍細胞で過剰発現しており、腫瘍形成に重要な役割を果たしていることが示唆されている[9]。例えば、食道扁平上皮がんにおいて、オーロラAの過剰発現は、細胞の増殖を促進し、アポトーシスを抑制する事が報告されている[10]。その他、オーロラAの増幅および過剰発現は、さまざまながんの50%以上で検出されており、オーロラAは、抗がん剤の魅力的なターゲットと考えられている[1]。

現在までに複数のオーロラキナーゼ阻害剤が開発され、臨床試験で評価されている。阻害剤の大部分は、VX-680、PHA-739358、AMG-900などのオーロラキナーゼ選択性のない、汎オーロラキナーゼ阻害剤である。また、一部には、オーロラAサブタイプ選択的阻害剤(MK-5108, alisertib, LY3295668)やオーロラBサブタイプ選択的阻害剤(AZD1152)などがある[11-17]。これまで数多くの研究がなされてきたにもかかわらず、これらの阻害剤はいずれも上市されていない。近年、汎オーロラキナーゼ阻害剤投与による好中球減少が、オーロラB阻害による事が報告され、オーロラAサブタイプ選択的阻害剤が、汎オーロラキナーゼ阻害剤よりも優れていることが示唆された[16]。しかし、オーロラキナーゼファミリーのアイソフォー

ム間での活性部位は、類似性が非常に高いため、サブタイプ選択的なオーロラ阻害剤を設計することは困難であると考えられてきた。この課題を克服するために、我々は高選択的で経口投与可能なオーロラA阻害剤、TAS-119を開発した[18]。TAS-119は、大鵬薬品工業株式会社内のメディシナルケミストリー研究で発見された新規低分子阻害剤である。その化学構造を図2aに示す。本研究では、TAS-119のオーロラAに対する効力と選択性を、他の301種のキナーゼと比較して検討した。また、MYCファミリーの増幅、CTNNB1変異、NTRK融合を有する細胞株を用いて、*in vitro*および*in vivo*での抗がん作用を評価した。

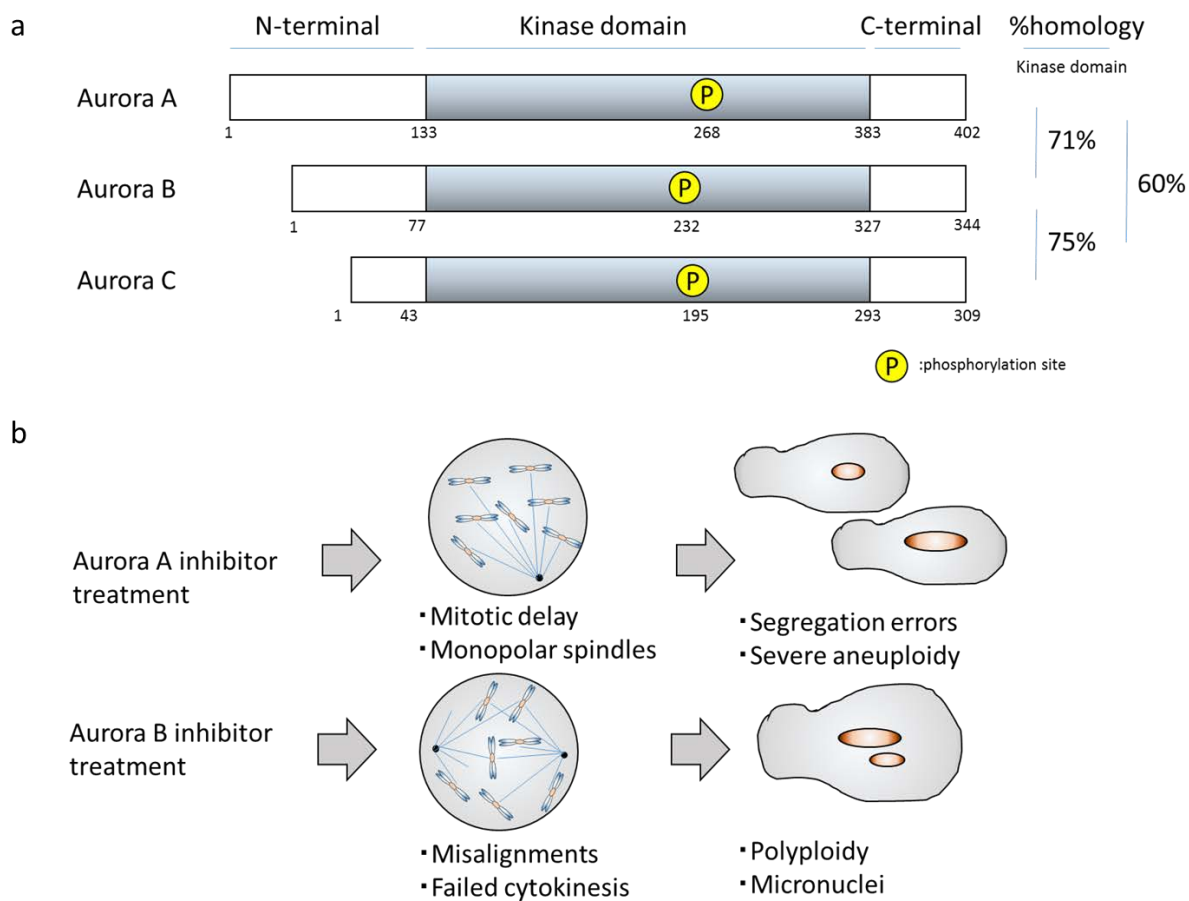


図 1： オーロラキナーゼファミリーについて

a オーロラキナーゼファミリーを構成するタンパク質とその相同性について示した. b オーロラ A とオーロラ B が阻害された際に報告された表現系について示した.

3. 実験方法

3.1 細胞株

ヒト子宮頸がん株HeLaと神経芽細胞腫株IMR-32はHealth Science Research Resources Bank (Tokyo, Japan)から購入した。ヒト子宮頸がん株HeLa-lucはCaliper Life Science (現在のPerkin Elmer, Inc, (Waltham, MA, USA) から購入した。ヒト肺癌株NCI-H446 (H446) は, American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA)から購入した。すべての細胞は, 入手元のプロトコールに従い継代維持した。

3.2 被験物質

TAS-119は, 大鵬薬品工業株式会社内で国際特許出願WO2013129443に記載されている通りに合成された。TAS-119のフリー体は, 実施例1として, 上記特許内に記載されている。MK-5108およびalisertibは, Selleck Chemicals LLC(Houston, TX, USA)から購入した。LY3295668は, MedChemExpress LLC (Monmouth Junction, NJ, USA)から購入した。

3.3 リコンビナントタンパクを用いたキナーゼ阻害活性の測定

リコンビナントタンパクを用いた化合物のキナーゼ阻害活性は, カルナバイオサイエンス株式会社において, IMAP™ Mobility Shift Assayを用いて評価された。

3.4 細胞を用いたキナーゼ阻害活性の測定

オーロラキナーゼのリン酸化に関しては, HeLa細胞を6ウェルプレートに播種し, 37°Cで一晩培養した後, 0.33 μ mol/Lノコダゾールで16時間処理し, 細胞をM期に同調させた。その後, 同調させた細胞を各濃度のTAS-119または他オーロラキナーゼ阻害剤で2時間処理し, 細胞を回収後, ウェスタンブロッティングで分析した。また, TRKAのリン酸化に関しては, 非同調培養条件下で, NIH3T3細胞を各濃度のTAS-119で1時間処理し, 細胞を回収後, ウェスタンブロッティングで分析した。示したデータは, 少なくとも2回の独立した実験の代表データである。

3.5 化合物による細胞増殖抑制効果の測定

細胞パネルアッセイは, Ricerca Biosciences, LCC (現在のFrontage Laboratories, Inc, (Exton, PA, USA) で行われた。384ウェルプレートに細胞を播種後, 化合物またはジメチルスルホキシド(DMSO) を添加し, 5%CO₂, 37°C条件下で72時間培養した。細胞の増殖については, IN

Cell Analyzer 1000 (GE Healthcare, Chicago, IL, USA) を用いた自動蛍光測定により、核内に取り込まれた色素のシグナル数を用いて定量化した。Time 0 (化合物を添加した時間) における細胞数についても検出を行い、50%成長阻害濃度 (GI50) を決定した。

また、細胞株の遺伝子異常に関するデータは、以下のデータベースから収集した。

Cancer Cell Line Encyclopedia (<http://www.broadinstitute.org/ccle/home>);

Cancer Genome Project, Sanger (<http://www.sanger.ac.uk/research/projects/cancergenome/>);

Catalogue of Somatic Mutations in Cancer

(<http://cancer.sanger.ac.uk/cancergenome/projects/cosmic/>)

3.6 ウェスタンブロッティング

タンパク質は、プロテアーゼ阻害剤及びフォスファターゼ阻害を加えたタンパク質抽出液を使用して、各細胞から抽出した。タンパク質抽出液の濃度は、Pierce® BCA Protein Assay Kit (Bio-Rad) により測定した。各タンパク質抽出液は、ウェスタンブロットによりポリアクリルアミドゲルを用いたSDS-PAGEにより分離し、PVDFメンブレン (Bio-Rad) にブロッティングした。メンブレンは5%(w/v) skim milk/トリス緩衝生理食塩水(T-TBS)でブロッキングした後1次抗体と反応させた。一次抗体の希釈には、5%ウシ血清アルブミンを含むブロッキングバッファーを用い、一次抗体は、下記を使用した。phospho-Aurora A (Thr288)/Aurora B (Thr232)/Aurora C (Thr198), phospho-tropomyosin receptor kinase(TRKA) (Tyr674/Tyr675), phospho-protein kinase B (AKT)(Ser473), phospho-extracellular signal-regulated kinase(ERK) (Thr202/Thr204), phospho-phospholipase C γ (PLC γ) (Tyr759), cleaved poly-ADP ribose polymerase(PARP), cleaved caspase-3, B cell lymphoma 2 (BCL2)(Cell Signaling Technologies, Inc., Danvers, MA, USA), IAK1 (Aurora A antibody), AIM-1 (Aurora B antibody) (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA), phospho-histone H3 (Ser28) (pHH3) (Assay Designs, Enzo Life Science, Inc., Farmingdale, NY, USA), histone H3 (Upstate, Merck Millipore, Burlington, MA, USA), and TRKA (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA).

続いて 5%(w/v)スキムミルク/TBSで希釈した適切な二次抗体とインキュベートした後、化学発光シグナルをSuperSignal® West Dura Extended Duration Substrate (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA) を用いて誘導し、Lumino Image Analyzer LAS-3000 (富士フイルム株

株式会社)で検出した。

3.7 phospho-histone H3 (pHH3)の検出

96ウェルプレートに播種したHeLa細胞を異なる濃度のTAS-119もしくは0.4 μ g/mLのノコダゾールで16時間処理した後、氷冷したメタノールで細胞を固定し、0.5% (v/v) Triton X-100/リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で細胞膜の透過処理を行った。抗ウサギpHH3 (Ser28) 抗体および抗ウサギCy-5抗体 (Chemicon, Merck Millipore, Burlington, MA, USA) を用いて細胞を染色した。また、核はDAPIを用いて染色した。免疫染色した細胞の画像を、10倍の対物レンズを備えたIN-Cell Analyzer 1000を用いて取得した。TAS-119処理群については、各サンプルについて、全核数に対するpHH3陽性細胞数の割合を算出し、0.4 μ g/mLのノコダゾール処理細胞の陽性割合を用いて補正した。

3.8 *In vivo* 薬効試験

動物の飼育及び取り扱い等動物を使用する際には、「大鵬薬品工業株式会社における動物実験等の実施に関する規程」に従い動物を適正に使用した。

5週齢のBALB/cヌードマウスを日本クレア株式会社から購入し、1週間の検疫期間の後使用した。腫瘍移植は、Matrigel (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA) と1:1の割合で混合した腫瘍細胞をマウスの脇腹に皮下移植することで行った。群分けは、腫瘍移植後、腫瘍体積 (Tumor Volume, 以下TV) を次の式: $TV (mm^3) = (\text{長径}) \times (\text{短径})^2 / 2$ より算出し、TVが100~300 mm^3 になったマウスを選別し、各群の平均TVが均等になるように、層別化割付により各群5-6匹ずつに割り付けた。群分け後、動物にTAS-119またはTAS-119の溶媒 (0.5% w/vヒドロキシプロピルメチルセルロース) を投与した。腫瘍径は、Day 15までの間に1週間2回の頻度で測定した。体重変化 (Body Weight Change, %, 以下BWC) を次の式: $BWC = [(\text{測定日の体重}) - (\text{群分け日の体重})] / (\text{群分け日の体重}) \times 100$ より算出した。

コントロール (溶媒投与) 群とTAS-119投与群との間の腫瘍体積の差を評価するためにDunnett's testを用いた。P < 0.05の結果を統計的に有意とした。

HCT116およびA427細胞を用いた動物実験は、Charles River Laboratories, Inc. (Morrisville, NC, USA)で同様の方法で行われた。

3.9 *In vivo* 薬力学的試験

pHH3の評価においては、HeLa-luc細胞を50%Matrigel/50%PBSの溶液に懸濁し、ヌードマウスの脇腹に皮下移植した。TAS-119またはTAS-119の溶媒（0.5%ヒドロキシプロピルメチルセルロース）を単回投与した4時間後に腫瘍サンプルを採取し、凍結保存した。凍結保存された腫瘍サンプルは、0.4 mol/L塩酸を含む酸抽出緩衝液で溶解後、ウエスタンブロッティングを用いて解析された。

phospho-TRKAの評価においては、NIH3T3 RIP-TRKA細胞を50%Matrigel/50%PBSの溶液に懸濁し、ヌードマウスの脇腹に皮下移植した。TAS-119またはTAS-119の溶媒（0.5%ヒドロキシプロピルメチルセルロース）を単回投与した後、特定の時間で腫瘍サンプルを採取した。凍結した異種移植モデルの腫瘍サンプルは、標準的な溶解バッファーで溶解後、ウエスタンブロッティングで解析された。

4. 結果

4.1 TAS-119 は強力かつ選択的なオーロラ A と TRK ファミリー阻害剤である

まず、TAS-119のヒトリコンビナントオーロラA、B及びCに対する阻害活性を*in vitro*で測定した。オーロラA、B及びCに対するTAS-119のIC₅₀値は、それぞれ1.04±0.09, 95±11, 36.5±6.2 nmol/Lであった(図2a)。TAS-119のオーロラAに対する阻害活性は、オーロラBやCの阻害活性に対して、91倍と35倍の乖離があることが分かった。また、TAS-119は、TRKA, TRKB, TRKCに対しても強い阻害作用を示し、IC₅₀値はそれぞれ1.46±0.16, 1.53±0.12, 1.47±0.04 nmol/Lであった(図2a)。TAS-119の細胞内オーロラA、B及びCに対する活性と選択性を、ヒト子宮頸がん株HeLaを用いて測定した。一般的に、オーロラキナーゼの活性はM期に最も高いことが報告されているため、ノコダゾール処理で細胞周期をM期に同期させた上で化合物の評価を行った[19]。TAS-119は、10-100 nmol/LでHeLa細胞内のオーロラAの自己リン酸化を用量依存的に阻害し、IC₅₀値は13.9 nmol/Lであった(図2b)。オーロラAの自己リン酸化は、100 nmol/L以上のTAS-119処理でほぼ完全に阻害されたが、オーロラBおよびCの自己リン酸化は10,000 nmol/Lの濃度まで阻害されなかった。

4.2 TAS-119 処理によって細胞周期の有糸分裂期 (G2/M 期) への同調が認められる

G2/M期の細胞の特徴としてpHH3の蓄積が認められるため、pHH3の増加は細胞周期をG2/M期に誘導するオーロラAの細胞内における優れた薬力学的マーカーとなる[20]。細胞周期非同調のHeLa細胞において、TAS-119処理は用量依存的にpHH3を誘導した(図2c)。TAS-119処理によるpHH3誘導のED₅₀値は、105.8±18.4 nmol/Lであった。また、300 nmol/Lから10,000 nmol/LのTAS-119の濃度域において、pHH3は強く誘導された。一方で、10,000 nmol/Lの濃度において、pHH3陽性細胞のわずかな減少が認められた。これは、HH3がオーロラBキナーゼの基質であることから、オーロラBの阻害に起因すると考えられる。

次に、TAS-119によるオーロラAの阻害を介したpHH3の誘導が、*in vivo*動物モデルにおいても確認できるか、HeLa-lucを用いた異種移植ヌードマウスモデルで検討した。TAS-119単回経口投与後4時間において、TAS-119投与群のpHH3シグナルは、10, 30, 100 mg/kgでコントロール群よりも亢進し、用量依存的な増加が認められた(図2d)。このことから、*in vivo*動物モデ

ルにおいてもTAS-119の投与はオーロラAを阻害し、移植腫瘍の細胞周期をG2/M期に同調することが示唆された。

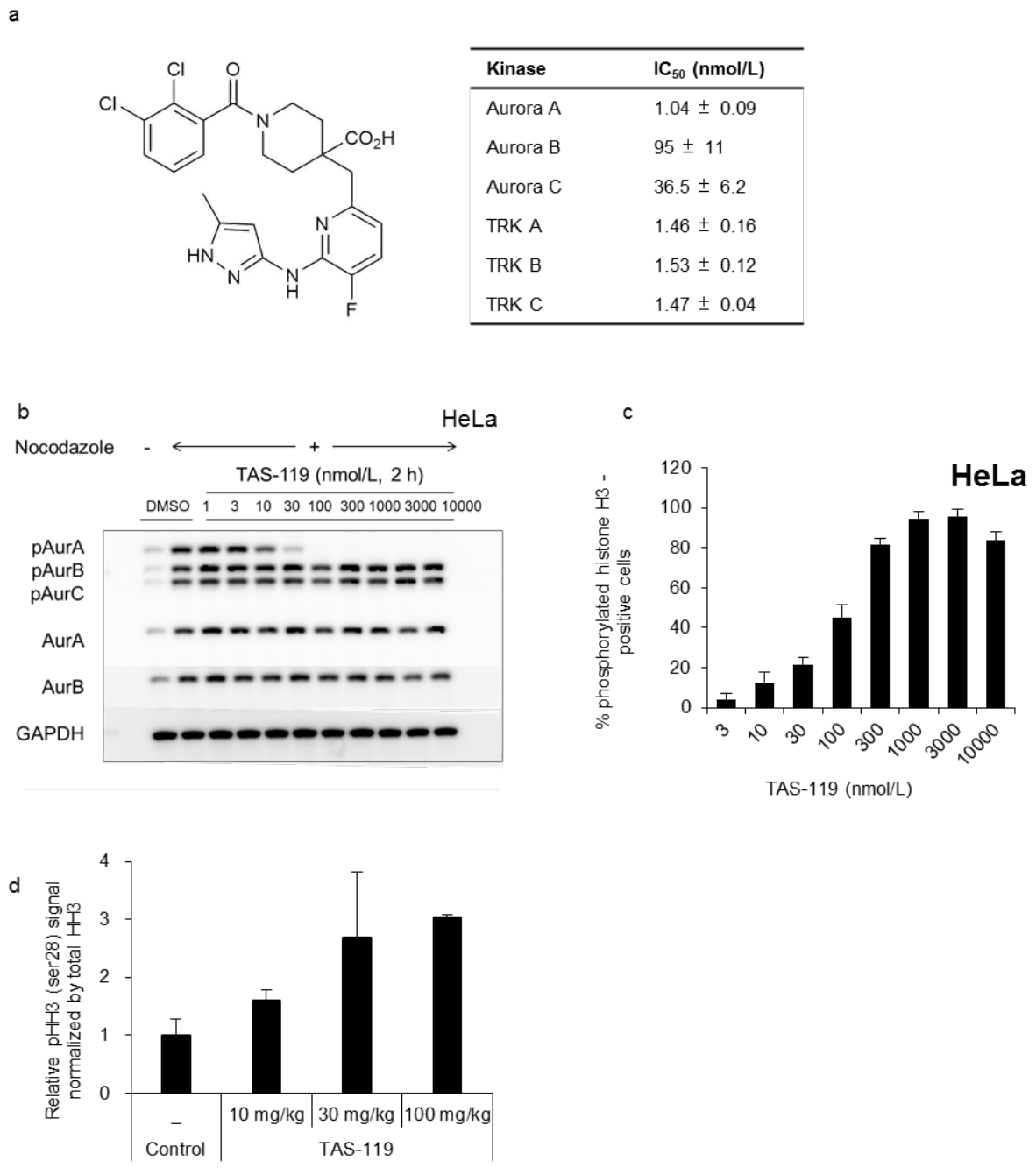


図 2 : TAS-119 の標的阻害活性及び選択性

a TAS-119 の化学構造と、生化学的アッセイにおけるオーロラキナーゼファミリーと TRK ファミリーの阻害活性作用を示した。3回の独立した実験の平均 IC₅₀ 値 (nmol/L) を平均 ±

SD で示す. b HeLa 細胞におけるオーロラキナーゼファミリーに対する TAS-119 の自己リン酸化阻害効果を示した. c HeLa 細胞における, TAS-119 処理によって誘導される pHH3 の蓄積を示した. ノコダゾールは 100%コントロールとして使用している (平均±SD, n=4). d TAS-119 を用いた *in vivo* での薬力学的解析を示した. HeLa-luc 移植マウスから切除した腫瘍を, ウェスタンブロッティングを用いて解析した (平均±SD, n=3).

4.3 TAS-119 と他のオーロラ A 阻害剤との比較

TAS-119 と、過去に報告のあるオーロラ A 選択的阻害剤 MK-5108, alisertib, LY3295668 との比較を行った。これらの化合物の細胞内オーロラ A に対する活性とオーロラ B 及び C に対する選択性を、M 期に同期した HeLa 細胞で検討した (図 3)。4 化合物はいずれも 10-100 nmol/L の濃度範囲でオーロラ A の自己リン酸化を強く阻害した。TAS-119, MK-5108, LY3295668 はオーロラ B と C に対する活性は低く、10,000 nmol/L までオーロラ B と C を阻害しなかった。しかし、alisertib は他の 3 阻害剤に比べてオーロラ B および C に対する選択性が低く、1,000 nmol/L 以上の濃度でオーロラ B と C を阻害した。

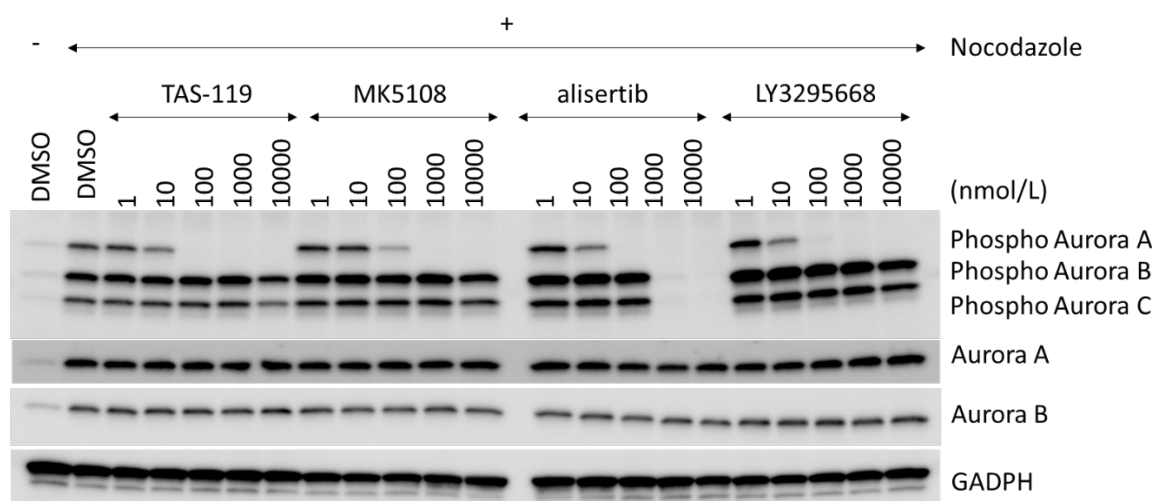


図 3： TAS-119 は選択的に細胞内オーロラ A 阻害を示す

TAS-119, MK5108, alisertib 及び LY3295668 の細胞内のオーロラキナーゼファミリーに対する影響を示した。HeLa 細胞を Nocodazole で終夜処理後、各濃度のオーロラキナーゼ阻害剤で 2 時間処理した。

4.4 MYC 増幅と CTNNB1 遺伝子変異は TAS-119 の感受性を規定する

240 種のヒトがん細胞株パネルを用いて、TAS-119 単剤での細胞増殖抑制効果を検討した。がん細胞株 240 株の TAS-119 に対する感受性は、IC₅₀ 値が 0.01 μmol/L から 10 μmol/L まで多様であった (図 4a)。最も感受性の高かった 10 細胞株のうち、4 細胞 (NCI-H69, IMR-32, CHP-212, MC-IXC) が MYC 増幅 (MYCN または MYC) を持ち、4 細胞 (SW48, AGS, HCT116, A427) が CTNNB1 変異を持っていたことより、MYC と CTNNB1 について精査した。(図 4a)。

240 細胞株のうち、26 細胞株で MYC, MYCN, または MYCL の増幅が認められた。全体として、TAS-119 は、MYC が増幅された細胞株では、増幅されていない細胞株に比べて、有意に、強力な細胞増殖抑制効果を示した (P<0.01) (図 4b)。また、神経芽細胞腫の 6 細胞株のうち、4 細胞株が MYCN または MYC の増幅を有しており、これらの細胞の IC₅₀ 値は 10-100 nmol/L であった (図 4c)。他にも、肺がん細胞株の 18 細胞株のうち、4 細胞が MYCN, MYCL, または MYC の増幅を持っていた。これらの細胞の IC₅₀ 値は 10-100 nmol/L であった (図 4f)。これらの結果から、MYC 増幅の細胞は、TAS-119 に対して比較的感受性が高いことが示された。

大腸がん細胞株の 27 細胞株のうち、3 細胞が CTNNB1 の変異を持っていた。そのうち SW48 (CTNNB1 S33Y 変異) と HCT116 (CTNNB1 S45 欠損) は TAS-119 に高い感受性を示し、IC₅₀ 値は 100 nmol/L 以下であった (図 4e)。また、胃がん細胞株の 6 細胞株のうち AGS は CTNNB1 G34E 変異を持ち、肺がん細胞株の 18 細胞株のうち A427 は CTNNB1 T41A 変異がそれぞれ認められた。これらの CTNNB1 変異株は、TAS-119 に対して高い感受性を示し、IC₅₀ 値は 100 nmol/L 以下であった (図 4d および f)。CTNNB1 の N 末変異は、タンパク質の安定化や転写の活性化に関係しているとされている[21]。

TAS-119 の *in vivo* 動物モデルでの抗腫瘍作用について、NCI-H446 (小細胞肺がん株、MYC 増幅) を用いたヌードマウスの異種移植モデルで検討した。TAS-119 は 1 日 2 回 60 mg/kg から 200 mg/kg の用量において、用量依存的な増殖抑制効果を示した (図 5a)。また、TAS-119 はいずれの投与量でもマウスの忍容性が高く、体重減少を引き起こすことはなかった (図 5b)。さらに、HCT116 と A427 の異種移植モデルでは、連続投与と間欠投与の 2 種類の投与スケジュールで抗腫瘍効果を比較した。HCT116 (大腸がん株、CTNNB1 S45 欠損) の異種移植モデルでは、TAS-119 は連続投与と間欠投与のいずれにおいても腫瘍の増殖を有意に抑制した (図 5c)。

A427（肺がん株，*CTNNT1* T41A 変異）異種移植モデルでは，TAS-119 は 120 mg/kg/day の連続投与，120 および 200 mg/kg/day の間欠投与により，腫瘍の増殖を有意に抑制した（図 5d）。

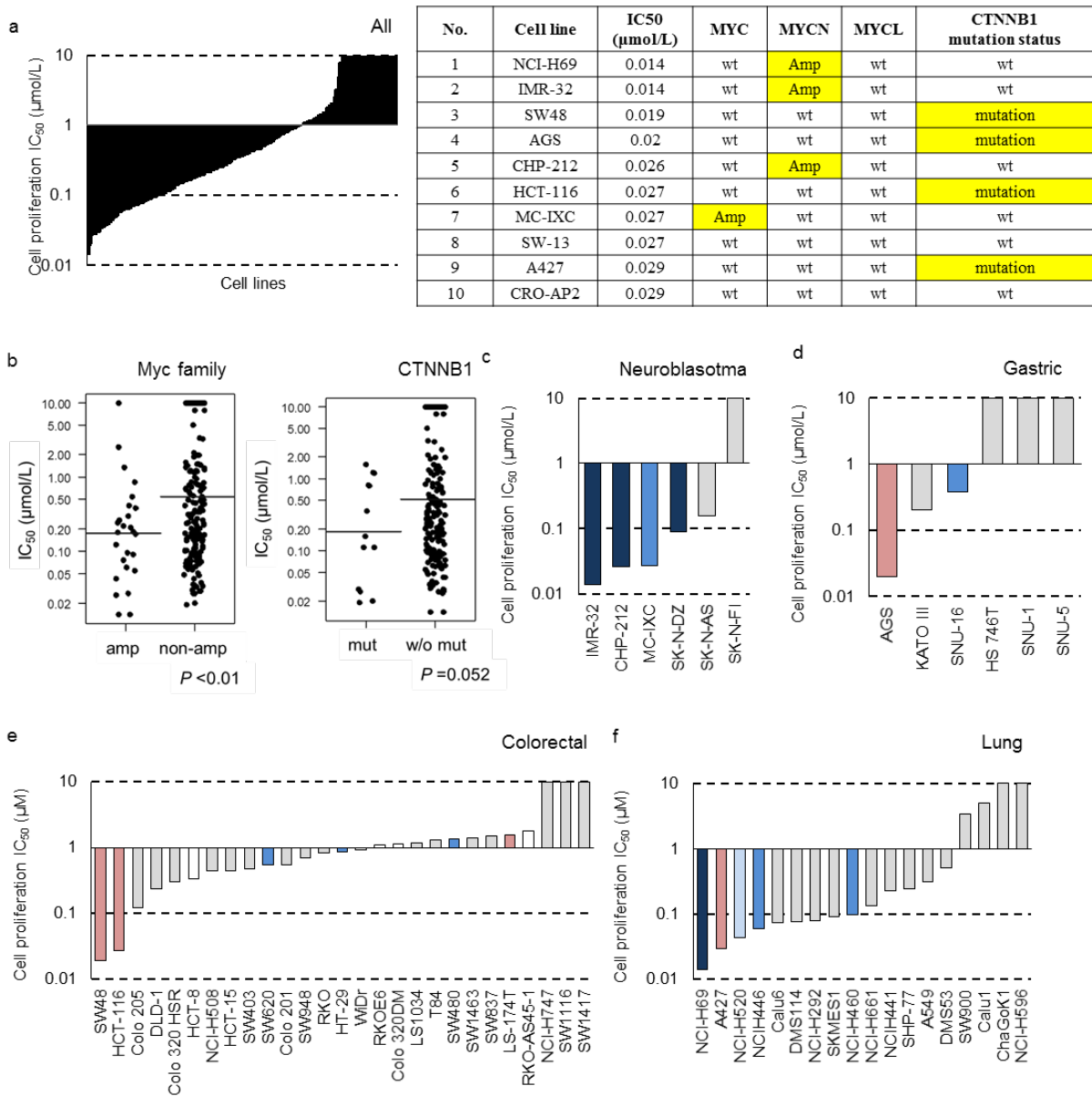


図4： TAS-119はMYC増幅株及びCTNNB1変異株に対して増殖抑制効果を示す

a がん細胞株 240 株における TAS-119 処理による IC₅₀ 値を示した。また、TAS-119 感受性上位 10 株における MYC ファミリーの遺伝子増幅及び CTNNB1 の遺伝子変異情報を示した。b MYC ファミリーの遺伝子増幅または CTNNB1 の遺伝子変異の有無における TAS-119 の IC₅₀ 値の分布を示した。2 群間は、Welch's t test で比較した。c-f 神経芽細胞腫 (c), 胃がん (d), 大腸がん (e), 肺がん (f) のがん細胞の種類によって分類した結果を示した。MYCN, MYC, MYCL の遺伝子増幅は、それぞれ濃い青, 青, 水色で示した。CTNNB1 の遺伝子変異は赤色で示した。MYC 及び CTNNB1 野生型および遺伝子情報未報告の細胞株は、それぞれ灰色および白のボックスで示した。

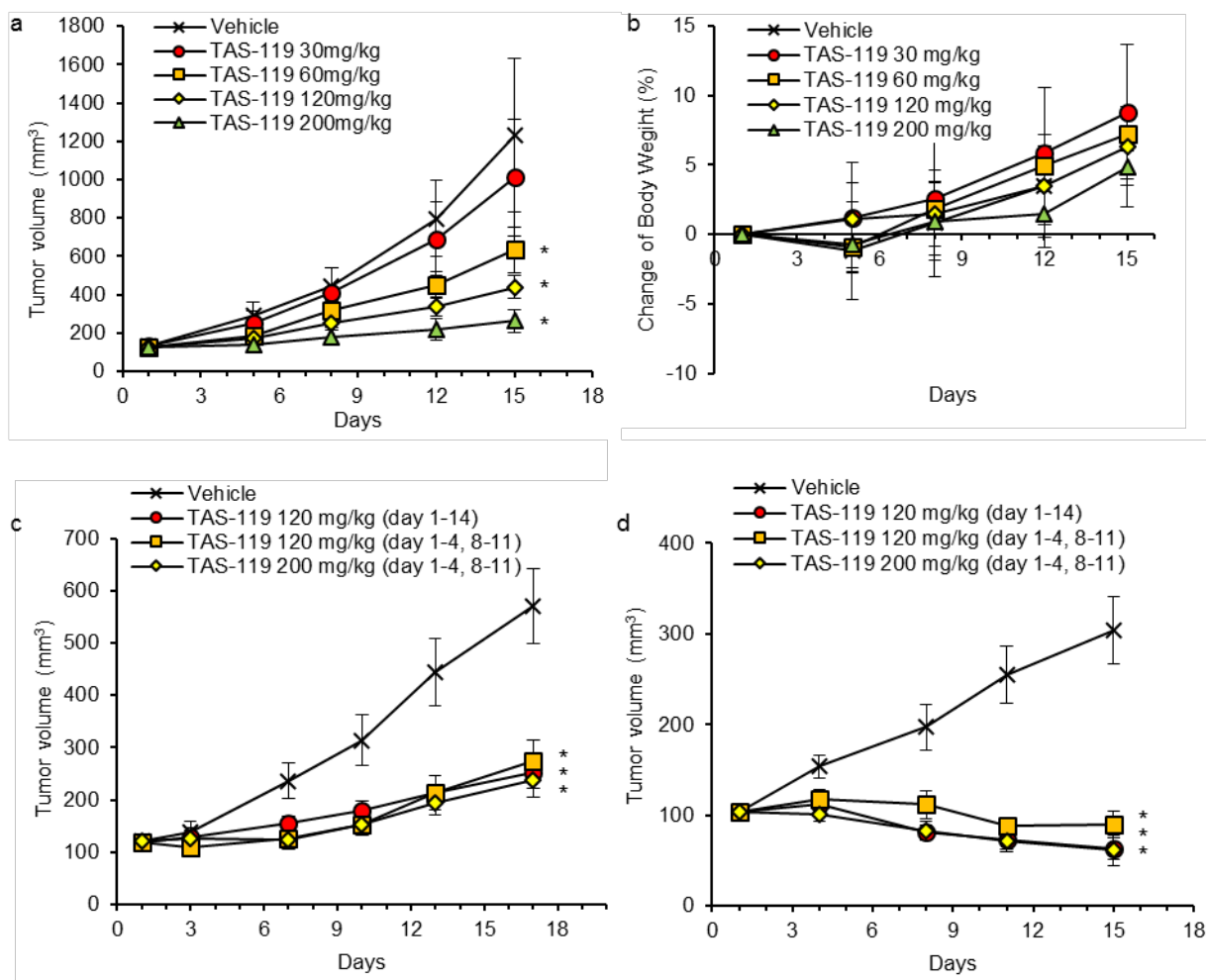


図5： TAS-119は *MYC* 増幅株及び *CTNNB1* 変異株を用いた動物モデルにおいて腫瘍増殖抑制効果を示す

a NCI-H446 移植マウスモデルに、コントロール溶媒または TAS-119 塩酸塩を 1 日 2 回、1 日目と 8 日目から 4 日間、各用量で経口投与した際の腫瘍の増殖を示した (平均±SD, n=6). *, コントロール溶媒投与マウスと比較して $P < 0.05$ (Dunnett's test). b ノードマウスの体重を初日の体重に対する変化率で示した. c, d HCT116 (c) または A427 (d) 移植マウスモデルに、コントロール溶媒または TAS-119 ナトリウム塩を 1 日 2 回、14 日間または 1 日目と 8 日目から 4 日間、各用量で経口投与した (平均±SEM, n = 10). *, コントロール溶媒投与マウスと比較して $P < 0.05$ (Dunnett's test)

4.5 TAS-119 処理は神経芽細胞腫株において N-Myc の分解を誘導する

MYCN 増幅神経芽細胞腫株 IMR-32 を用いて、N-Myc の安定性に対する TAS-119 の効果を評価した (図 6a). N-Myc の発現レベルは、IMR-32 において TAS-119 処理によって用量依存的に減少した. 細胞パネルの結果において、TAS-119 は IMR-32 細胞の増殖を用量依存的に阻害し、その IC_{50} 値は 14 nmol/L であることから、TAS-119 が細胞増殖抑制を示す濃度域と矛盾はなかった. また、IMR-32 においても 10 nmol/L 以上の濃度でオーロラ A を選択的に阻害し、1,000 nmol/L までの濃度ではオーロラ B は阻害されず、M 期のマーカーである pHH3 も 10 nmol/L 以上の濃度で誘導された. さらに細胞死マーカーである PARP の開裂も認められた (図 6a).

さらに、TAS-119 で処理した IMR-32 細胞における、N-Myc のターンオーバーを評価した. 図 6b に示すように、TAS-119 を投与しない場合の N-Myc の半減期は 66 分と推定された. TAS-119 とインキュベートした後の N-Myc の半減期は 35 分であったため、TAS-119 は N-Myc の分解を促進していることが示唆された. また、N-Myc の発現減少が、N-Myc の生理的な機能である転写活性の抑制につながることを示すために、下流遺伝子である *CDKN1A* (p21Cip1), *TP53*, およびサイクリン依存性キナーゼ 4 (*CDK4*) の発現の変動を確認した. N-Myc は、下流の標的として *TP53*, *CDK4* および *CDKN1A* の転写を正または負に制御している[22-24]. IMR-32 細胞に TAS-119 を投与したところ、p21 の発現が増加し、p53 と *CDK4* の発現が減少した (図 6c).

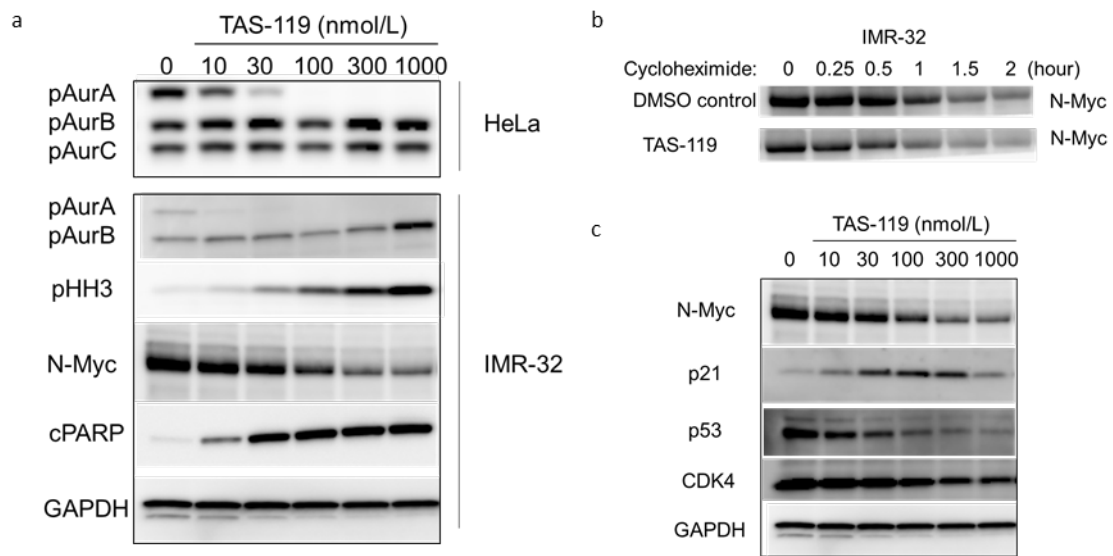


図 6 : TAS-119 処理は神経芽細胞腫株において N-Myc の分解を誘導する

a HeLa および IMR-32 細胞を各濃度の TAS-119 で 16 時間処理した後、ライセートをウエスタンブロッティングで解析した。 b IMR32 細胞に対して DMSO または 500 nmol/L の TAS-119 で 24 時間処理した後、細胞をシクロヘキシミドで処理し、各時間に回収した。各群はウエスタンブロッティングで解析された。 c IMR-32 細胞を表示濃度の TAS-119 で 24 時間処理した後、ライセートをウエスタンブロッティングで解析した。

4.6 TAS-119 処理は TRK 融合陽性細胞においても抗腫瘍作用を示す

TRK 阻害剤としての TAS-119 を評価するために、*NTRK1* 融合タンパク質，すなわち RIP-TRKA と CD74-TRKA を安定発現させた NIH3T3 を用いて，TAS-119 の有効性を評価した。TAS-119 は，NIH3T3 で過剰発現している TRKA の自己リン酸化を，100 nmol/L 以上の濃度で用量依存的に阻害した（図 7a）。下流のシグナル伝達経路である AKT，ERK1/2，PLC γ のリン酸化は，TRKA の阻害と同程度の濃度で TAS-119 によって阻害された（図 7a）。NIH3T3 RIP-TRKA と NIH3T3 CD74-TRKA の増殖は，TAS-119 によって濃度依存的に阻害され、GI₅₀ 値がそれぞれ 82 nmol/L と 96 nmol/L であった（図 7b）。さらに，TRKA を阻害すると，BCL2 の発現が低下し，cleaved-PARP と caspase-3 の誘導が引き起こされたことから，細胞死が誘導されていることが示唆された（図 7c）。一方で，TRKA を過剰発現していない NIH3T3 では，TAS-119 は限定的な増殖抑制効果しか示さなかった（GI₅₀ 値=1855 nmol/L，図 7b）。これらの結果より，NIH3T3 RIP-TRKA および CD74-TRKA の増殖は TRKA に依存しており，TAS-119 が TRKA およびその下流のシグナルを阻害することで，細胞の増殖が抑制され，アポトーシスが誘導されることが示された。

TAS-119 の *in vivo* 抗腫瘍効果について，NIH3T3 RIP-TRKA を移植したヌードマウスで評価したところ，体重の減少なしに有意な抗腫瘍効果が認められた（ $P < 0.05$, Dunnett's test, 図 7d, e）。薬力学的試験において，TAS-119 を 60 mg/kg または 100 mg/kg の濃度で単回投与することにより，腫瘍における TRKA のリン酸化の抑制された（図 7f）。TAS-119 投与後 1 時間ではほぼ完全な TRKA のリン酸化の抑制が認められたが，6 時間後にはこの阻害は部分的に回復した。このことは，TAS-119 のマウス薬効試験において行われる 1 日 2 回の投与スケジュールと矛盾しない。

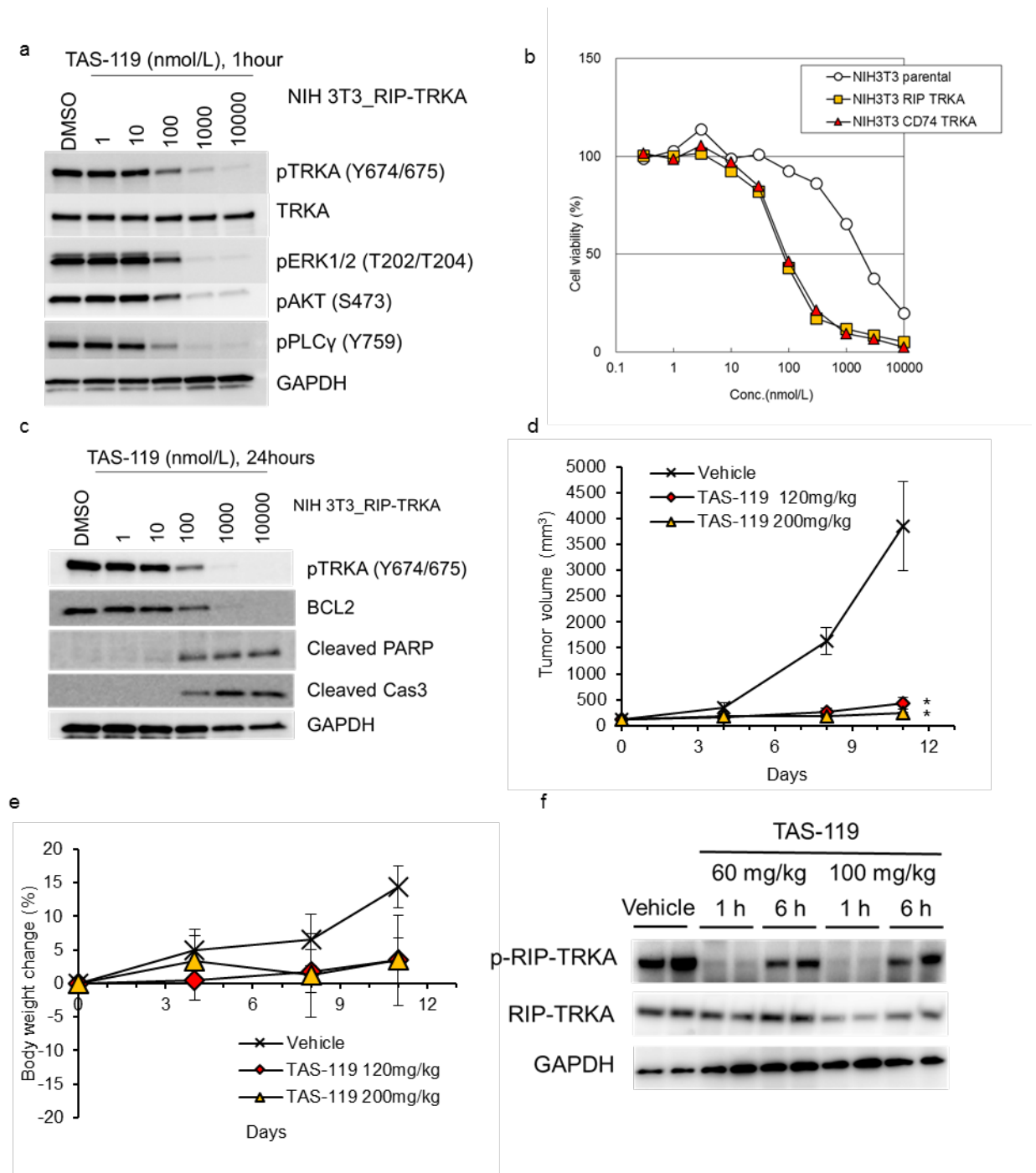


図 7： TAS-119 は TRK 融合細胞株において，腫瘍増殖抑制効果を示す

a NIH3T3 RIP-TRKA を各濃度の TAS-119 で 1 時間処理後，各群をウエスタンブロッティングで解析した． b NIH3T3 親株及び *NTRK* 融合タンパク安定発現 NIH3T3 の TAS-119 の細胞増殖抑制効果を示した． c NIH3T3 RIP-TRKA 細胞を各濃度の TAS-119 で 24 時間処理した．各群はウエスタンブロッティングで解析された． d, e NIH3T3 RIP-TRKA 異種移植マウスにコントロール溶媒または TAS-119 塩酸塩を各用量で 1 日 2 回，14 日間経口投与した（平均±SD, n =

6). *, コントロール溶媒投与マウスと比較して $P < 0.05$ (Dunnett's test). f NIH3T3 RIP-TRKA 移植マウスモデルに各用量の TAS-119 単回投与後 1 時間または 4 時間で腫瘍を回収した. 各群はウエスタンブロッティングで解析された.

5. 考察

TAS-119 は、約 1 nmol/L で強力にオーロラ A, TRKA, TRKB, TRKC を阻害する化合物である。また、TAS-119 は、オーロラ B 及びオーロラ C と比較して、オーロラ A に対して 25 倍以上選択的であった。

これまでに、MK-5108, LY3295668, alisertib とそのプロトタイプである MLN8054 の 4 種類のオーロラ A 選択的阻害剤が臨床試験で評価されている[14-16]。TAS-119, MK-5108, LY3295668 は、いずれも 2-アミノピリジン構造を含んでおり、化学構造が類似している。我々は、細胞アッセイを用いて、これら 3 つの阻害剤の直接比較を行った。その結果、TAS-119, MK-5108 及び LY3295668 は、細胞内オーロラ A に対する阻害活性が類似しており、オーロラ B 及び C よりもオーロラ A に対して選択性が高いことがわかった。Alisertib は、細胞内オーロラ A と B の両方をそれぞれ 100 nmol/L と 1000 nmol/L の濃度で阻害した。このことから、Alisertib は MK-5108, LY3295668 及び TAS-119 と比較して、オーロラ B に対するオーロラ A の細胞内選択性が相対的に低いことが示唆され、この結果は過去の報告と矛盾しない (図 3) [25]。

本研究では、240 細胞株で TAS-119 の細胞増殖抑制効果を検討し、TAS-119 の感受性を規定するバイオマーカーを探索した。まず、MYC ファミリーの増幅は TAS-119 感受性マーカーとなる可能性が考えられた。この考察は、MYC が小細胞肺がんのオーロラ A 阻害剤感受性のゲノムマーカーであるという先行研究の結果と一致している[26,27]。

N-Myc のタンパク質分解は、オーロラ A のキナーゼ非依存的な機能によって部分的に制御されているという報告がある。オーロラ A は N-Myc や Myc と直接相互作用し、神経芽細胞腫および肝細胞がんにおいて N-Myc や Myc の分解を阻害する[28,29]。オーロラ A 阻害剤はオーロラ A に直接結合し、オーロラ A のコンフォメーションを変化させ、オーロラ A-Myc 相互作用を解離させ、Myc の分解を誘導するとされている。過去の報告内では、Alisertib は N-Myc とオーロラ A の直接的な相互作用を阻害し、N-Myc の分解を誘導し、さらに、他の汎オーロラキナーゼ阻害剤である VX680 や CD532 も、N-Myc の分解を誘導した[30]。しかし、高選択的なオーロラ A 阻害剤である MK5108 は、N-Myc の分解を誘導しないことから、MK-5108 のオーロラ A への結合様式は、alisertib, VX680, CD532 とは異なることが示唆されていた[28]。興味深いことに、本研究内では TAS-119 は MK-5108 と同様の構造クラスの化合物に属するにも

かかわらず、N-Myc の分解を誘導した。今のところ、TAS-119 とオーロラ A の結合様式は解析されていない。今後の解析により、TAS-119 が Myc タンパク質の分解を誘導する機序が明らかになるかもしれない。また、IMR-32 は、MYCN が増幅された神経芽細胞腫の細胞株であり、この細胞株の増殖は、N-Myc シグナルに依存していることが報告されている[31]。IMR-32 を TAS-119 で処理すると、N-Myc の発現レベルの低下が認められた。また、この N-Myc の発現レベルの低下は、負の細胞周期制御因子である p21 の誘導と正の細胞周期制御因子である CDK4 の発現抑制に関連していた。p21 と CDK4 の転写は N-Myc によって制御されていることが知られており、TAS-119 による N-Myc の発現レベルの低下は、これらの細胞周期制御因子の発現量変化をもたらすと考えられる。全体として、この細胞株における TAS-119 による細胞増殖抑制のメカニズムは、N-Myc シグナルの阻害が最も重要であると考えられる。しかし、N-Myc の分解と細胞増殖の抑制に必要な TAS-119 の濃度には相違があった。TAS-119 を 10-30 nmol/L の濃度で処理すると、細胞増殖の抑制と PARP 切断の誘導が観察されたが、N-Myc の分解は 100 nmol/L 以上の濃度で観察された。興味深いことに、10-30 nmol/L の濃度では、TAS-119 を処理することによって、p21 の誘導、および p53 と CDK4 の減少が観察された。これは、N-Myc の発現低下に必要な濃度よりも低い濃度で、TAS-119 により N-Myc の機能が阻害されたためと考えられる。

また、TAS-119 を接触させると、IMR32 細胞の分裂期マーカーである pHH3 の蓄積が誘導された (図 5)。このことは、IMR32 細胞のある集団が G2/M 期に集積されたことを示唆している。この G2/M 期の細胞の蓄積が、どのようにして細胞増殖の抑制や細胞死に寄与しているのかは明らかではなく、今後の研究が必要である。

なお、今回の細胞パネルでは、TAS-119 に対する感受性が比較的低い MYC 増幅細胞が数細胞株認められた。これは、MYC 増幅以外の別の特性が TAS-119 の感受性を決定していることを示唆している。一つの可能性は、がん細胞株の由来組織の違いである。我々のパネルには MYC 増幅を持つ大腸がん細胞株があり、これらの細胞株の IC₅₀ 値は比較的高かった (Colo320 HSR = 298 nmol/L, SW620 = 539 nmol/L, HT-29 = 865 nmol/L, SW480 = 1340 nmol/L)。特定の遺伝子の変化が、特定の腫瘍組織タイプではがんのドライバーとして作用しても、別の腫瘍組織タイプでは作用しないことがある。例えば、BRAF V600E の変異は、メラノーマではドライバー変

異であるが、大腸がんではドライバー変異ではないことが報告されている[32,33]。これは、大腸がんはゲノム変化の不均一性が高いため、単一の発がん因子に依存しないためではないかと考えられる。

TAS-119 は、*CTNNB1* 変異を有する細胞株で増殖抑制作用を示した (図 3)。また、*CTNNB1* は、汎オーロラキナーゼ阻害剤である VX-680 の感受性マーカーとしての報告がある[34]。しかし、*CTNNB1* 変異を有する細胞株におけるオーロラ A 阻害の分子機構を明らかにした研究はわずかしかない。オーロラ A の siRNA による阻害は、AGS 細胞において、GSK3 β のリン酸化阻害を介して β -catenin の発現を抑制する事が報告されている[35]。我々の細胞パネルでは、*CTNNB1* 変異陽性細胞の IC₅₀ 値を野生型細胞の IC₅₀ 値と比較しても、TAS-119 の感受性に有意な違いは認められなかった (図 3b)。より多くの *CTNNB1* 変異陽性細胞を用いた更なる調査が必要である。

また、TAS-119 に感受性が高いが、*MYC* 増幅や *CTNNB1* 変異を持たない細胞株も認められた。例えば、我々の研究で最も感受性の高い 20 細胞株のうち、SW-13, CRO-AP2, MDA-MB-453, KPL-1, SR, Daoy, G-401, CAMA-1 は *MYC* 増幅も *CTNNB1* 変異も報告されていない。また、CEMC1, BeWo, KHOS-240S の遺伝子情報は不明である。また、240 細胞株の中に *NTRK* が融合した細胞株はなかった。

近年、別のオーロラ A 阻害剤である LY3295668 が、*RB* 変異を持つがん細胞に対して増殖抑制能を持つことが報告された[16]。LY3295668 に感受性の *RB* 変異をもつがん細胞は、TAS-119 にも感受性が認められた。具体的には、NCI-H69, NCI-H446, MDA-MB-468, HeLa 細胞などであった。しかし、我々の研究では、TAS-119 は HCT116 や A427 などの *CDKN2A* 欠損細胞にも活性を示した。これは、*CTNNB1* 変異などの他のマーカーがこれらの細胞では優勢であることによると考えられる。*MYC*, *CTNNB1*, *RB*, *NTRK* 以外の予測マーカーを特定するためには、パネルデータのさらなる解析が必要である。

オーロラ A 選択的阻害剤のうち、alisertib の臨床活性は複数の臨床試験で幅広く検証されているが、上市までには至っていない。alisertib の臨床試験では副作用として、好中球減少が認められた。これは、我々の研究や先行研究で観察されたように、オーロラ B に対する選択性が相対的に低い (我々の実験では約 10 倍 ; 図 3) ことに起因していると考えられる[25]。また、MK-

5108 の臨床試験は、主にドセタキセルとの併用で行われた。しかし、ドセタキセル/MK-5108 併用の臨床第一相試験は、予想される薬物動態上の曝露目標量以下の用量で MK-5108 の毒性が認められたため、早期に終了した[36]。現在進行中の LY3295668 と TAS-119 の臨床試験は、高選択的なオーロラ A 選択的阻害剤として、その臨床的安全性と有効性を示す可能性がある。最近、TAS-119 単剤療法の臨床第一相試験の予備的結果が報告された[37]。TAS-119 は、安全性と忍容性が良好で、薬力学的試験を通じて、標的を阻害していることが確認された。TAS-119 は、これまでに報告されているオーロラ A 阻害剤と比較して、オーロラ A 選択的阻害剤の有効性を臨床的に証明するために好ましい化合物であると考えている。

さらに、以下のような新しい知見が TAS-119 の臨床開発に貢献すると考えている。まず、私たちと他の研究者は、前臨床モデルにおいて、オーロラ A 選択的阻害剤に対する腫瘍細胞の感受性を示すいくつかのバイオマーカー (*MYC*, *CTNNB1*, *RB*) を特定した[16]。このような遺伝子異常を持つがん患者を対象とした臨床試験は、オーロラ A 阻害剤の臨床試験の成功率を高める可能性がある。次に、TAS-119 は他の阻害剤との併用が有効であると考えられる。オーロラ A はパクリタキセルなどのタキサン系薬剤のエンハンサーとして知られている[38]。最近の報告では、オーロラ A が第三世代の EGFR 阻害剤や KRAS G12C 阻害剤の耐性メカニズムに関与しているとされているため、TAS-119 はそれらの阻害剤との併用で効果を発揮する可能性がある[39,40]。最後に、TAS-119 の柔軟な投与スケジュールについてである。今回の研究では、TAS-119 は連続投与と間欠投与の両方で抗腫瘍効果を発揮した。図 5a に示すように、TAS-119 を間欠的に投与すると、200 mg/kg までの濃度で用量依存的に抗増殖効果を示した。また、TAS-119 の 200 mg/kg を間欠的に投与した場合、120 mg/kg を連続的に投与した場合とほぼ同等の効果が得られた (図 5c,d)。TAS-119 はどちらの投与スケジュールでも抗増殖効果を示したことから、臨床試験において柔軟に投与スケジュールを組むことが出来、単剤療法や併用療法で予測されない毒性に対応することも可能であると考えられる。

TRKA は、TRKB と TRKC を含む受容体チロシンキナーゼの TRK ファミリーのメンバーである[41]。TRK ファミリーは、RAS-MAPK, PI3K-AKT, PLC γ -PKC などの下流のシグナル伝達経路を活性化することができる。TPM3-NTRK1, RIP-NTRK1, CD74-NTRK1 などの NTRK 遺伝子融合体は、大腸がんや肺がんなどの様々な悪性腫瘍で観察されている[42,43]。この種の融

合タンパク質は、TRK の二量体化を促進し、そのキナーゼ機能を活性化する。TRK 阻害剤である LOXO-101 は、NTRK 融合タンパク質陽性のがん患者に対して強い阻害力を持つことが報告されている[44]。我々は、NTRK 融合タンパク質安定発現細胞株において、TAS-119 による TRKA とその下流である ERK, AKT, PLC γ の強い阻害と、*in vitro* および *in vivo* 両方での増殖の阻害を確認した。これらの結果から、TAS-119 は、NTRK 融合遺伝子の変化を有するがん患者に有用であると考えられる。

現在のところ、オーロラ A と TRK のデュアルキナーゼ阻害剤がシングルキナーゼ阻害剤よりも優れているかどうかを示す証拠はない。一方で、オーロラ A は、BCL2 阻害剤である BIM のリン酸化を介して、EGFR 阻害剤に対する抵抗性に寄与することが報告されている[39]。もしオーロラ A が他の受容体チロシンキナーゼ阻害剤に対する耐性にも関与しているのであれば、TRK とオーロラ A のデュアル阻害剤は、TRK のみに対する阻害剤よりも優れている可能性がある。NTRK 融合タンパク質を保有する患者にとって、TAS-119 が優れた治療法であるかどうかを明らかにするには、さらなる研究が必要である。

結論として、TAS-119 は、*in vitro* および *in vivo* において、オーロラ A の高活性かつ選択的な新規の阻害剤である。また、MYC 増幅と CTNNB1 変異を有する細胞の増殖を阻害した。TAS-119 は TRK 阻害剤としても有用である。今後、前臨床試験や臨床試験を重ねることで、TAS-119 のがん患者に対する臨床的有用性が示されると考えている。

6. 参考文献

1. Mountzios G, Terpos E, Dimopoulos MA (2008) Aurora kinases as targets for cancer therapy. *Cancer Treat Rev* 34 (2):175-182. doi:10.1016/j.ctrv.2007.09.005
2. Lens SM, Voest EE, Medema RH (2010) Shared and separate functions of polo-like kinases and aurora kinases in cancer. *Nat Rev Cancer* 10 (12):825-841. doi:10.1038/nrc2964
3. Vader G, Lens SM (2008) The Aurora kinase family in cell division and cancer. *Biochim Biophys Acta* 1786 (1):60-72. doi:10.1016/j.bbcan.2008.07.003
4. Du J, Hannon GJ (2004) Suppression of p160ROCK bypasses cell cycle arrest after Aurora-A/STK15 depletion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 (24):8975-8980. doi:10.1073/pnas.0308484101
5. Willems E, Dedobbeleer M, Digregorio M, Lombard A, Lumapat PN, Rogister B (2018) The functional diversity of Aurora kinases: a comprehensive review. *Cell Div* 13:7. doi:10.1186/s13008-018-0040-6
6. Ruchaud S, Carmena M, Earnshaw WC (2007) Chromosomal passengers: conducting cell division. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8 (10):798-812. doi:10.1038/nrm2257
7. Garcia-Rodriguez LJ, Kasciukovic T, Denninger V, Tanaka TU (2019) Aurora B-INCENP Localization at Centromeres/Inner Kinetochores Is Required for Chromosome Bi-orientation in Budding Yeast. *Curr Biol* 29 (9):1536-1544 e1534. doi:10.1016/j.cub.2019.03.051
8. Vader G, Maia AF, Lens SM (2008) The chromosomal passenger complex and the spindle assembly checkpoint: kinetochore-microtubule error correction and beyond. *Cell Div* 3:10. doi:10.1186/1747-1028-3-10
9. Zhang W, Xia D, Li Z, Zhou T, Chen T, Wu Z, Zhou W, Li Z, Li L, Xu J (2019) Aurora-A/ERK1/2/mTOR axis promotes tumor progression in triple-negative breast cancer and dual-targeting Aurora-A/mTOR shows synthetic lethality. *Cell Death Dis* 10 (8):606. doi:10.1038/s41419-019-1855-z
10. Wang XX, Liu R, Jin SQ, Fan FY, Zhan QM (2006) Overexpression of Aurora-A kinase promotes tumor cell proliferation and inhibits apoptosis in esophageal squamous cell carcinoma cell line. *Cell Res* 16 (4):356-366. doi:10.1038/sj.cr.7310046
11. Harrington EA, Bebbington D, Moore J, Rasmussen RK, Ajose-Adeogun AO, Nakayama T, Graham JA, Demur C, Hercend T, Diu-Hercend A, Su M, Golec JM, Miller KM (2004) VX-680, a potent and selective small-molecule inhibitor of the Aurora kinases, suppresses tumor growth in vivo. *Nat Med* 10 (3):262-267. doi:10.1038/nm1003
12. Carpinelli P, Ceruti R, Giorgini ML, Cappella P, Gianellini L, Croci V, Degrassi A, Texido G, Rocchetti M, Vianello P, Rusconi L, Storici P, Zugnoni P, Arrigoni C, Soncini C, Alli C, Patton V, Marsiglio A, Ballinari D, Pesenti E, Fancelli D, Moll J (2007) PHA-739358, a potent inhibitor of Aurora kinases with a selective target inhibition profile relevant to cancer. *Mol Cancer Ther* 6 (12 Pt 1):3158-3168. doi:10.1158/1535-7163.MCT-07-0444
13. Payton M, Bush TL, Chung G, Ziegler B, Eden P, McElroy P, Ross S, Cee VJ, Deak HL, Hodous BL, Nguyen HN, Olivieri PR, Romero K, Schenkel LB, Bak A, Stanton M, Dussault I, Patel VF, Geuns-Meyer S, Radinsky R, Kendall RL (2010) Preclinical evaluation of AMG 900, a novel potent and highly selective pan-aurora kinase inhibitor with activity in taxane-resistant tumor cell lines. *Cancer Res* 70 (23):9846-9854. doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-3001
14. Shimomura T, Hasako S, Nakatsuru Y, Mita T, Ichikawa K, Kodera T, Sakai T, Nambu T, Miyamoto M,

- Takahashi I, Miki S, Kawanishi N, Ohkubo M, Kotani H, Iwasawa Y (2010) MK-5108, a highly selective Aurora-A kinase inhibitor, shows antitumor activity alone and in combination with docetaxel. *Mol Cancer Ther* 9 (1):157-166. doi:10.1158/1535-7163.MCT-09-0609
15. Maris JM, Morton CL, Gorlick R, Kolb EA, Lock R, Carol H, Keir ST, Reynolds CP, Kang MH, Wu J, Smith MA, Houghton PJ (2010) Initial testing of the aurora kinase A inhibitor MLN8237 by the Pediatric Preclinical Testing Program (PPTP). *Pediatr Blood Cancer* 55 (1):26-34. doi:10.1002/pbc.22430
16. Gong X, Du J, Parsons SH, Merzoug FF, Webster Y, Iversen PW, Chio LC, Van Horn RD, Lin X, Blosser W, Han B, Jin S, Yao S, Bian H, Ficklin C, Fan L, Kapoor A, Antonysamy S, Mc Nulty AM, Froning K, Manglicmot D, Pustilnik A, Weichert K, Wasserman SR, Dowless M, Marugan C, Baquero C, Lallena MJ, Eastman SW, Hui YH, Dieter MZ, Doman T, Chu S, Qian HR, Ye XS, Barda DA, Plowman GD, Reinhard C, Campbell RM, Henry JR, Buchanan SG (2019) Aurora A Kinase Inhibition Is Synthetic Lethal with Loss of the RB1 Tumor Suppressor Gene. *Cancer Discov* 9 (2):248-263. doi:10.1158/2159-8290.CD-18-0469
17. Yang J, Ikezoe T, Nishioka C, Tasaka T, Taniguchi A, Kuwayama Y, Komatsu N, Bandobashi K, Togitani K, Koeffler HP, Taguchi H, Yokoyama A (2007) AZD1152, a novel and selective aurora B kinase inhibitor, induces growth arrest, apoptosis, and sensitization for tubulin depolymerizing agent or topoisomerase II inhibitor in human acute leukemia cells in vitro and in vivo. *Blood* 110 (6):2034-2040. doi:10.1182/blood-2007-02-073700
18. Sootome H, Miura A, Masuko N, Suzuki T, Uto Y, Hirai H (2020) Aurora A inhibitor TAS-119 enhances antitumor efficacy of taxanes in vitro and in vivo: preclinical studies as guidance for clinical development and trial design. *Mol Cancer Ther*. doi:10.1158/1535-7163.MCT-20-0036
19. Lee YC, Que J, Chen YC, Lin JT, Liou YC, Liao PC, Liu YP, Lee KH, Lin LC, Hsiao M, Hung LY, Huang CY, Lu PJ (2013) Pin1 acts as a negative regulator of the G2/M transition by interacting with the Aurora-A-Bora complex. *J Cell Sci* 126 (Pt 21):4862-4872. doi:10.1242/jcs.121368
20. Van Hooser A, Goodrich DW, Allis CD, Brinkley BR, Mancini MA (1998) Histone H3 phosphorylation is required for the initiation, but not maintenance, of mammalian chromosome condensation. *J Cell Sci* 111 (Pt 23):3497-3506
21. Gao C, Wang Y, Broaddus R, Sun L, Xue F, Zhang W (2018) Exon 3 mutations of CTNNB1 drive tumorigenesis: a review. *Oncotarget* 9 (4):5492-5508. doi:10.18632/oncotarget.23695
22. Herold S, Wanzel M, Beuger V, Frohme C, Beul D, Hillukkala T, Syvaoja J, Saluz HP, Haenel F, Eilers M (2002) Negative regulation of the mammalian UV response by Myc through association with Miz-1. *Mol Cell* 10 (3):509-521. doi:10.1016/s1097-2765(02)00633-0
23. Chen L, Iraci N, Gherardi S, Gamble LD, Wood KM, Perini G, Lunec J, Tweddle DA (2010) p53 is a direct transcriptional target of MYCN in neuroblastoma. *Cancer Res* 70 (4):1377-1388. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-2598
24. Hermeking H, Rago C, Schuhmacher M, Li Q, Barrett JF, Obaya AJ, O'Connell BC, Mateyak MK, Tam W, Kohlhuber F, Dang CV, Sedivy JM, Eick D, Vogelstein B, Kinzler KW (2000) Identification of CDK4 as a target of c-MYC. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 (5):2229-2234. doi:10.1073/pnas.050586197
25. Pitts TM, Bradshaw-Pierce EL, Bagby SM, Hyatt SL, Selby HM, Spreafico A, Tentler JJ, McPhillips K, Klauck PJ, Capasso A, Diamond JR, Davis SL, Tan AC, Arcaroli JJ, Purkey A, Messersmith WA, Ecsedy JA, Eckhardt SG (2016) Antitumor activity of the aurora a selective kinase inhibitor, alisertib, against preclinical models of colorectal cancer. *Oncotarget* 7 (31):50290-50301. doi:10.18632/oncotarget.10366
26. Cardnell RJ, Li L, Sen T, Bara R, Tong P, Fujimoto J, Ireland AS, Guthrie MR, Bheddah S, Banerjee U, Kalu

- NN, Fan YH, Dylla SJ, Johnson FM, Wistuba, II, Oliver TG, Heymach JV, Glisson BS, Wang J, Byers LA (2017) Protein expression of TTF1 and cMYC define distinct molecular subgroups of small cell lung cancer with unique vulnerabilities to aurora kinase inhibition, DLL3 targeting, and other targeted therapies. *Oncotarget* 8 (43):73419-73432. doi:10.18632/oncotarget.20621
27. Sos ML, Dietlein F, Peifer M, Schottle J, Balke-Want H, Muller C, Koker M, Richters A, Heynck S, Malchers F, Heuckmann JM, Seidel D, Eysers PA, Ullrich RT, Antonchick AP, Vintonyak VV, Schneider PM, Ninomiya T, Waldmann H, Buttner R, Rauh D, Heukamp LC, Thomas RK (2012) A framework for identification of actionable cancer genome dependencies in small cell lung cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109 (42):17034-17039. doi:10.1073/pnas.1207310109
28. Brockmann M, Poon E, Berry T, Carstensen A, Deubzer HE, Rycak L, Jamin Y, Thway K, Robinson SP, Roels F, Witt O, Fischer M, Chesler L, Eilers M (2013) Small molecule inhibitors of aurora-a induce proteasomal degradation of N-myc in childhood neuroblastoma. *Cancer Cell* 24 (1):75-89. doi:10.1016/j.ccr.2013.05.005
29. Dauch D, Rudalska R, Cossa G, Nault JC, Kang TW, Wuestefeld T, Hohmeyer A, Imbeaud S, Yevsa T, Hoenicke L, Pantsar T, Bozko P, Malek NP, Longerich T, Laufer S, Poso A, Zucman-Rossi J, Eilers M, Zender L (2016) A MYC-aurora kinase A protein complex represents an actionable drug target in p53-altered liver cancer. *Nat Med* 22 (7):744-753. doi:10.1038/nm.4107
30. Gustafson WC, Meyerowitz JG, Nekritz EA, Chen J, Benes C, Charron E, Simonds EF, Seeger R, Matthey KK, Hertz NT, Eilers M, Shokat KM, Weiss WA (2014) Drugging MYCN through an allosteric transition in Aurora kinase A. *Cancer Cell* 26 (3):414-427. doi:10.1016/j.ccr.2014.07.015
31. Zaatiti H, Abdallah J, Nasr Z, Khazen G, Sandler A, Abou-Antoun TJ (2018) Tumorigenic proteins upregulated in the MYCN-amplified IMR-32 human neuroblastoma cells promote proliferation and migration. *Int J Oncol* 52 (3):787-803. doi:10.3892/ijo.2018.4236
32. Chapman PB, Hauschild A, Robert C, Haanen JB, Ascierto P, Larkin J, Dummer R, Garbe C, Testori A, Maio M, Hogg D, Lorigan P, Lebbe C, Jouary T, Schadendorf D, Ribas A, O'Day SJ, Sosman JA, Kirkwood JM, Eggermont AM, Dreno B, Nolop K, Li J, Nelson B, Hou J, Lee RJ, Flaherty KT, McArthur GA, Group B-S (2011) Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *N Engl J Med* 364 (26):2507-2516. doi:10.1056/NEJMoa1103782
33. Kopetz S, Desai J, Chan E, Hecht JR, O'Dwyer PJ, Maru D, Morris V, Janku F, Dasari A, Chung W, Issa JP, Gibbs P, James B, Powis G, Nolop KB, Bhattacharya S, Saltz L (2015) Phase II Pilot Study of Vemurafenib in Patients With Metastatic BRAF-Mutated Colorectal Cancer. *J Clin Oncol* 33 (34):4032-4038. doi:10.1200/JCO.2015.63.2497
34. O'Day CL, Ovechkina Y, Marcoe K, Keyser R, Yoshino K, Nguyen P, Bernards K, Shively R, Hnilo J, Mulligan J, Lin T, Wang S (2010) Profiles of contributing genes to sensitive/resistant phenotypes of 11 different oncology therapeutic agents across 240 cell lines. Paper presented at the AACR 101st Annual Meeting 2010,
35. Dar AA, Belkhir A, El-Rifai W (2009) The aurora kinase A regulates GSK-3beta in gastric cancer cells. *Oncogene* 28 (6):866-875. doi:10.1038/onc.2008.434
36. Amin M, Minton SE, LoRusso PM, Krishnamurthi SS, Pickett CA, Lunceford J, Hille D, Mauro D, Stein MN, Wang-Gillam A, Trull L, Lockhart AC (2016) A phase I study of MK-5108, an oral aurora a kinase inhibitor, administered both as monotherapy and in combination with docetaxel, in patients with advanced or refractory solid tumors. *Invest New Drugs* 34 (1):84-95. doi:10.1007/s10637-015-0306-7
37. Robbrecht D, Eskens F, Calvo E, He X, Hirai H, Soni N, Cook N, Dowlati A, Fasolo A, Moreno V, Bono JSD

- (2019) First-in-human phase I and pharmacological study of TAS-119, a selective Aurora A (AurA) kinase inhibitor, in patients (pts) with advanced solid tumors. *J Clin Oncol* 37(no. 15_suppl):3063. doi:10.1200/JCO.2019.37.15_suppl.3063
38. Anand S, Penrhyn-Lowe S, Venkitaraman AR (2003) AURORA-A amplification overrides the mitotic spindle assembly checkpoint, inducing resistance to Taxol. *Cancer Cell* 3:51–62.
39. Shah KN, Bhatt R, Rotow J, Rohrberg J, Olivás V, Wang VE, Hemmati G, Martins MM, Maynard A, Kuhn J, Galeas J, Donnellà HJ, Kaushik S, Ku A, Dumont S, Krings G, Haringsma HJ, Robillard L, Simmons AD, Harding TC, McCormick F, Goga A, Blakely CM, Bivona TG, Bandyopadhyay S (2019) Aurora kinase A drives the evolution of resistance to third-generation EGFR inhibitors in lung cancer. *Nat Med* 25 (1):111-118. doi:10.1038/s41591-018-0264-7
40. Xue JY, Zhao Y, Aronowitz J, Mai TT, Vides A, Qeriqi B, Kim D, Li C, de Stanchina E, Mazutis L, Risso D, Lito P (2020) Rapid non-uniform adaptation to conformation-specific KRAS(G12C) inhibition. *Nature* 577 (7790):421-425. doi:10.1038/s41586-019-1884-x
41. Cocco E, Scaltriti M, Drilon A (2018) NTRK fusion-positive cancers and TRK inhibitor therapy. *Nat Rev Clin Oncol* 15 (12):731-747. doi:10.1038/s41571-018-0113-0
42. Lee SJ, Li GG, Kim ST, Hong ME, Jang J, Yoon N, Ahn SM, Murphy D, Christiansen J, Wei G, Hornby Z, Lee DW, Park JO, Park YS, Lim HY, Hong SN, Kim SH, Kang WK, Park K, Park WY, Kim KM, Lee J (2015) NTRK1 rearrangement in colorectal cancer patients: evidence for actionable target using patient-derived tumor cell line. *Oncotarget* 6 (36):39028-39035. doi:10.18632/oncotarget.5494
43. Vaishnavi A, Capelletti M, Le AT, Kako S, Butaney M, Ercan D, Mahale S, Davies KD, Aisner DL, Pilling AB, Berge EM, Kim J, Sasaki H, Park S, Kryukov G, Garraway LA, Hammerman PS, Haas J, Andrews SW, Lipson D, Stephens PJ, Miller VA, Varella-Garcia M, Janne PA, Doebele RC (2013) Oncogenic and drug-sensitive NTRK1 rearrangements in lung cancer. *Nat Med* 19 (11):1469-1472. doi:10.1038/nm.3352
44. Doebele RC, Davis LE, Vaishnavi A, Le AT, Estrada-Bernal A, Keysar S, Jimeno A, Varella-Garcia M, Aisner DL, Li Y, Stephens PJ, Morosini D, Tuch BB, Fernandes M, Nanda N, Low JA (2015) An Oncogenic NTRK Fusion in a Patient with Soft-Tissue Sarcoma with Response to the Tropomyosin-Related Kinase Inhibitor LOXO-101. *Cancer Discov* 5 (10):1049-1057. doi:10.1158/2159-8290.CD-15-0443

謝辞

終わりに臨み、本研究の機会を賜り、多大なる御支援のもと、懇切なる御指導と御鞭撻を賜りました、徳島大学大学院 先端技術科学教育部 物質生命システム工学専攻 宇都 義浩 教授に心より感謝の意を表します。主査としてご助言を戴くとともに本論文の細部にわたりご指導を賜ました、徳島大学大学院 先端技術科学教育部 物質生命システム工学専攻 松木 均 教授，並びに副査としてご助言を戴くとともに指導を賜りました，同専攻 中村 嘉利 教授 に心より感謝致します。

本研究の遂行に際し多大なる御助言と御協力を頂きました，大鵬薬品工業株式会社 平井 洋 チェアー，五月女 裕 室長，並びに，TAS-119 プロジェクトメンバーの皆様に深く感謝致します。

本研究の機会を与えて頂き，御指導と御鞭撻を賜りました，大鵬薬品工業株式会社 相良 武 研究本部長，宮寺 和孝 つくばエリア担当，伊藤 智 創薬基盤技術研究所所長，谷口 昌要 化学基盤研究室長，鈴木 賢司 管理職に，厚く御礼申し上げますとともに心から感謝致します。

最後に，これまでの人生を暖かく見守ってくれた両親，家族に心より感謝致します。

2022 年 3 月

三浦 晃敬