分類：基礎研究

論文要約・コメント作成者：清藤 佐知子

完成日：2018年　11月　30日

校閲者： 紅林 淳一

校閲終了日：2018年12月2日

出典：CDK4/6 Inhibitors: The Mechanism of Action May Not Be as Simple as Once Thought

著者：Mary E. Klein 他

出典：Cancer Cell 34: 9-20, 2018

要旨：

下線部は、臨床的にも重要と思われる内容

1. **細胞周期におけるサイクリンD-CDK4/6の重要性**

・およそ50年前からのがんとの闘いにおいて、治療薬開発における標的を同定する上でDNAの複製と分離の基礎となる過程のメカニズムを理解することが有用であると考えられてきた。その約20年後にサイクリン/CDKホロ酵素が多くの細胞周期移行のkey driverとして同定され、次の10年間で最初の非特異的CDK阻害剤（汎CDK阻害剤）が臨床で使用されるようになったが、用量制限性毒性のため、効果が限定的で、使用しづらかった。今日では、パルボシクリブやアベマシクリブのようなCDK4やCDK6を標的としたより特異的な阻害剤があり、毒性がより限定的で様々な悪性腫瘍の治療に広く用いられている。最近ではCDK4/6阻害剤は、単体でも使われるし、シグナル伝達阻害剤と併用した時の効果を検証する多くの臨床試験でも使われており、それらがどのように抗腫瘍効果を発揮するのかを理解することは重要である。

・CDK4/6活性は、多くの細胞外シグナル伝達系と細胞周期を橋渡ししている。非無限で非形質転換な細胞（以後「通常の」細胞という）と多くの形質転換腫瘍細胞は、G1期で細胞分裂に不可逆的になっている。網膜芽細胞腫がん抑制蛋白（Rb）のリン酸化と不活化では、Rbの増殖抑制作用は大きいが、転写因子E2Fへの結合や標的増殖因子での蛋白の転写抑制に関しては不完全である。Rbのリン酸化はE2Fや他の転写調節因子との相互作用を不安定にする。通常の細胞において、Rbのリン酸化は、正の調節因子であるD型サイクリンサブユニットとの複合体や、それに続くサイクリンE/CDK2複合体におけるCDK4またはCDK6酵素の一連の働きによって行われている。加えて、細胞外シグナルはサイクリンやp16Ink4a （CDK4/6酵素阻害）、p21Cip1 （CDK2酵素阻害）、p27Kip1 （CDK2酵素阻害）のようなCDK阻害因子の発現を調節している。

・実際に、全てのヒトがん細胞では、この回路は、サイクリンD1の過剰発現、p16Ink4aの欠失 、Ink4を不応状態にするCDK4の変異、またはRb自身の欠失によって調節異常がおこっている。このことは、がん細胞がどのように細胞外シグナルに応答しているかということに影響するだけではなく、Rb不活性の間CDKによって連続して起こるリン酸の需要にも影響しうる。このように、いくつかの細胞においてCDK2は重要でなく、他のCDKで代償しうるかもしれない。

・RbはCDK4/6の第一の細胞周期の標的であるが、Rbとは別の蛋白質は非細胞周期に関連した役割を持っている。CDK4/6は、細胞分化に含まれる転写活性に影響する因子、活性に影響するアポトーシス因子、ミトコンドリア活性に直接影響しうる他の因子をリン酸化することができる。

1. **CDK4/6阻害剤：明確な利点のある3剤**

・パルボシクリブは、臨床的効能を証明した最初のCDK4/6阻害剤で、すぐに他の2剤が続いた。リボシクリブは構造的にパルボシクリブによく似ており、アベマシクリブはどちらにもあまり似ていない。サイクリンD1/CDKや様々なサイクリンD/CDK6 を使った*in vitro*研究から、アベマシクリブとリボシクリブの両方が、CDK6よりCDK4に対して効力があることがわかっている。一方、パルボシクリブは、サイクリンD1/CDK4とサイクリンD2/CDK6における活性に同様の効力を持っている。そのような分析において、アベマシクリブはCDK4阻害に比べて、サイクリンT1/CDK9、サイクリンE2/CDK2、p25/CDK5、p35/CDK5に対しては弱い活性を持っている。しかし、これらRb陰性腫瘍細胞ではなくRb陽性腫瘍細胞の増殖を抑制するための薬剤の顕著な特異性として、*in vitro*での性質の相違は*in vivo*での活性にあまり役立たないかもしれないことも示唆されている。

・3つのCDK4/6阻害剤は全て経口投与可能であるが、各々は異なる薬理動態と毒性を持っており、異なる投与方法が必要である。パルボシクリブとリボシクリブは1日1回投与で、一方アベマシクリブは1日2回投与である。リボシクリブは半減期が（30時間以上と）長く、2㎍/mlを超える高血中濃度になることは注目に値する。このことは、マウスモデルで示されるように、パルボシクリブやアベマシクリブに比べ、リボシクリブでは脳脊髄液での濃度が高くなると言い換えられる。他の齧歯動物では、パルボシクリブが中枢神経系から強く排出され、アベマシクリブはそれほどではないが排出される。数人のアベマシクリブ投与後に中枢神経系での薬物濃度測定されたヒト患者では、2.2－14.7nmol／Lの範囲での蓄積濃度であった。

・阻害剤の毒性プロフィールには、理由は完全には明らかになっていないが、明らかな違いがある。Grade3-4の好中球減少が、パルボシクリブやリボシクリブを投与した患者の60%近くに認められた。アベマシクリブでは全体的に認容されているようで、有害事象のあった患者は（リボシクリブやパルボシクリブでは70－80％であったのに比較し）55%のみで、Grade3－4の好中球減少は21％のみだった。しかし、アベマシクリブの治療を受けた患者の10%にGrade3の下痢を認め、それは他の2剤では非常にまれだった。毒性を解明してそれを克服することが、これらの薬剤の理解とその生物学的有用性のより良い理解をもたらすと考えられる。

・パルボシクリブとリボシクリブは、著名な骨髄毒性のため、いずれも休薬期間を必要とし、骨髄回復のために3週投与１週休薬のスケジュールで管理される。それに対して、アベマシクリブは継続的に投与される。CDK4/6阻害剤の細胞増殖抑制性効果を考慮すると、休薬は他の細胞周期に影響する薬剤と強い相乗効果をもたらす可能性がある。例えば、DNA障害剤は、細胞周期が回転している必要がある。CDK4/6阻害剤の同時投与は、生体内で健常な細胞を化学療法の有害な副作用から「保護する」のに使われている。一方で、細胞毒性DNA損傷や細胞周期依存的治療を使うために、休薬は細胞が同時に細胞周期に入るようになり、これらの化合物に対する感受性が増加する可能性がある。そのような代替投与戦略は、乳癌、白血病、軟部肉腫を含む異なる様々な腫瘍における初期の多剤併用療法の臨床試験において調査されている。

・要約すると、３つの阻害剤の全てが、Rb陽性細胞においてはサイクリンD関連酵素の増殖能を標的として細胞周期からはずれるように誘導し、Rb陰性細胞ではほとんど無効である。このことが、Rbが唯一の重要な基質であることを示唆する一方で、これらの酵素の他の基質は、細胞が細胞周期外にある時の表現型に寄与していることが推測される。併用療法を改良する重要な点は、CDK4/6により誘導される増殖停止を認識した上で、休止状態でどのようにシグナル系が細胞の維持に寄与しているかを理解することにあるかもしれない。

1. **CDK4/6阻害剤はシグナル伝達抑制物質と併用することにより抗がん活性を補強する**

・多くのearly-phaseの臨床試験ではCDK4/6阻害剤とシグナル伝達系標的阻害剤を併用して行われている。細胞株や異種移植片では、エストロゲン、RAF、EGFR、PI3K、その他に対するシグナル伝達系阻害剤への内因性または獲得性の抵抗性は、時にp16Ink4a変異やサイクリン D1、他のD型サイクリン、CDK4、CDK6の発現亢進で増強する。これらのモデルのいくつかでは、治療にCDK4/6阻害剤が含まれることによって抵抗性は克服される。

・多くの最近の研究により、他の薬剤との併用におけるCDK4/6阻害剤の臨床的活性に対する異なる作用機序が提唱されている。それらの研究結果によると、腫瘍細胞においてCDK4/6阻害薬の効果が、可逆性の休止かより安定的な老化をもたらすかの違いに依存している。CDK4/6阻害剤は細胞代謝、抗酸化物質の枯渇、活性酸素の増加、アポトーシスの誘発にも影響している。また、CDK4/6阻害剤は免疫系センチネル細胞の成熟や制御性T細胞の増殖の両方に影響しうる。

1. **CDK4/6阻害剤による細胞休止後の細胞老化**

・最近、多くの研究グループが、細胞周期が休止に入るG1期から出る時に細胞がする決定に興味をもつようになった。細胞型と形質転換イベントによってCDK4/6阻害剤によって治療された時休止するRb陽性細胞もあれば、老化するものもある。休止細胞と違って、老化細胞は誘導シグナルが活性化されても細胞周期にもどってこず、一般的に他の増殖誘導シグナルにも抵抗性である。このことは、異なる投与スケジュールをもつアベマシクリブとパルボシクリブのいずれで治療するかどうかにおいて重要な点になるかもしれない。

・パルボシクリブと他のCDK4/6阻害剤の効果の研究の一方で、休止細胞が老化細胞に進むかどうかの決定点が明らかになった。休止から老化への移行は「完全な老化状態への移行geroconversion」とよばれ、増殖停止後の老化としても説明される。どの結果も、細胞周期からの細胞の離脱に続いて活性化される細胞型の固有プログラムによりおこってくる。とくに、MDM2の負の調整、染色質改造酵素ATRXの再分配、およびHRAS転写の抑制は、乳癌、非小細胞性肺癌、軟部肉腫、神経膠腫を含む異なる腫瘍タイプに由来する多くの間葉系と上皮性の細胞株において、休止を老化に誘導抑制するCDK4の移行にとって必要である。

・CDK4/6阻害は、多座のリン酸化消失と転写因子FOXM1の不安定化を導く。CDK4/6阻害に続くFOXM1抑制は通常のメラニン細胞ではなく、変異メラノーマにおけるROSの蓄積と休止につながる。それにもかかわらず、FOXM1のノックアウトは完全にはCDK4/6阻害剤の老化効果を再現せず、CDK4/6阻害剤がFOXM1の抑制に加えて機能を持っていることを示唆している。他の研究者による最近の研究から、メラノーマにおいてCDK4/6阻害後の老化の誘導がRb依存性であることが示された。従って、FOXM1抑制が最初に増殖阻止される細胞を必要とするかどうか、または治療的に標的とされる経路のさらなる経路特異的効果があるかどうかという疑問があがる。

・mTORは休止と老化の間で決定を切り替えることができる、ということが示唆された。これは、まだ理解されていない経路の手がかりとなる細胞型特異的かもしれない。例えば、mTORシグナル活性の経路におけるCDK阻害剤p21の過剰発現による増殖抑制は、細胞増殖の「無益な」期間をもたらすように説明されており、最終的に老化をもたらすnutlin-3の治療に続く間接的な、またはラパマイシンの治療による直接的なmTOR阻害は、細胞を休止状態に追いやる。これに対して、mTOR阻害はメラノーマのマウスモデルにおいてがん遺伝子誘発休止に到達するのに重要で、mTOR阻害剤はメラノーマ細胞株でCDK4/6阻害と協働して老化に追いやることができる。いくつかの腫瘍細胞でみられる増殖因子経路-mTORの活性化において、どのようにCDK4/6阻害剤とこれらの経路の阻害剤が協調してmTOR活動と老化に影響するのか、そしてどの経路がこの結果に影響しうるのかをさらに研究することは重要であろう。

・まとめると、これらの研究からCDK4/6阻害剤とシグナル伝達系阻害剤の併用が腫瘍細胞で連続する細胞老化の決定に影響している可能性が示唆される。細胞周期にある腫瘍細胞で効果をもつ阻害剤は、非細胞周期の細胞においてさらなる影響をもっているかもしれず、もしかしたらそれらを老化に推進しているかもしれない。現実に、脂肪肉腫腫瘍細胞を抑止した無活動のCDK4/6阻害剤は、HRASをノックダウン時に老化に追いやる。そしてHRASのmRNAリン酸化レベル近くの発現の強化は、例えそれらがまだ細胞周期を出ていても、CDK4/6阻害剤での治療に続いて細胞が老化することを防ぐことができる。休止から老化への転化を調整する蛋白を同定することは、併用療法の新しい標的や、投与スケジュールの変更を指示するかもしれない。いかに細胞が最初に細胞周期から出ていくように誘導されるのか、そしてシグナル伝達のような第二の薬剤標的に対して治療することは、必要投与量とそれらの阻害剤に関連して起こる副作用の最小化によって治療的利益をもたらすかもしれない。

・細胞を増殖停止後の細胞老化 (SAGA)に追いやることの影響は、とくに興味深い。休止状態の細胞は、免疫応答を変化させることのできるような、細胞型や遺伝子発現のシグナル特異的プログラムやサイトカイン分泌を示している。一方、細胞老化関連分泌形質 (SASP)は腫瘍の解体に影響しうる免疫細胞の増加を誘導することや、パラクリン老化を促進することができる。また一方で、SASPは前腫瘍形成性環境をつくることができる。したがって、SASPはしばしば諸刃の刃と呼ばれ、その性質のより良い理解がその臨床的操作において最も重要である、

・その上、SASPは細胞可塑性を誘導することができ、老化を回避することができる腫瘍細胞はがん幹細胞のようによりアグレッシブである。実際に、永久的な休止細胞は、転移や再発に対すると同様に、治療の有害な短期的、長期的な副作用に寄与するかもしれない。まとめると、CDK4/6阻害剤の休止促進効果を利用する最も効果的なアプローチは、最初に休止細胞を誘導し、永続的な休止細胞を排除することかもしれない。BCL2阻害剤が直接的に休止細胞を排除できたというエビデンスは、これと他のがん治療の組み合わせが有用かもしれないことを示唆している。今後、休止細胞から得られるプロテオミクスで転写学的でメタボロミクスなデータが、さらなる脆弱性を同定することが期待できる。

1. **細胞代謝におけるCDK4/6阻害剤の影響**

・細胞分化は代謝状態で調節されていると長く認識されてきた。代謝機構でCDK4/6に対するたくさんの非Rb標的が同定されてきた。例えば、CDK4によるAMPKαのリン酸化は、マウスの初期の線維芽細胞において解糖増加と脂肪酸酸化減少と関連している。それに比べて、GCN5のCDK4リン酸化は、PGC-1αのアセチル化につながり、肝細胞の糖代謝の減少と関連している。

・代謝経路の操作はCDK4/6阻害の有用な付加になるかもしれない。膵管がん細胞における3剤のいずれかでのCDK4/6阻害は、糖と酸素の代謝を変え、Rb依存的ROSの増加を導く。シグナル伝達物質のみでの治療が十分ではないのに対して、CDK4/6阻害剤とmTOR阻害剤、BCL阻害剤の併用、またはROS食細胞の減少は、これらの細胞をアポトーシスに追いやる。興味深いことに、MEK阻害剤との併用療法は独自にこれらの細胞を老化に追い立てる。

・T細胞性急性リンパ性白血病（T-ALL）において、CDK6の阻害またはサイクリンD3の遺伝子発現抑制は、アポトーシスを誘導する。これらの細胞ではサイクリンD1、サイクリンD2、CDK4のレベルが非常に低く、サイクリンD3とCDK6によって細胞増殖の指令が入る。サイクリンD3/CDK6酵素複合体は、ホスホフルクトキナーゼとピルビン酸キナーゼM2をリン酸化することができる。これには解糖中間物をペントースリン酸化とセリンの経路に押し込む効果があり、（パルボシクリブ、リボシクリブでの治療、またはCDK6のノックダウンによる）CDK6の阻害は　抗酸化剤NADPHとグルタチオンを涸渇させ、ROSとアポトーシスを増加させる。代謝におけるCDK4/6阻害後の変化は、特異的な事象になるかもしれず、独自の代謝経路と脆弱性をもたらす腫瘍原生のドライバーに依存しているかもしれない。

1. **腫瘍微小環境におけるCDK4/6**

・がん細胞と腫瘍微小環境を作る支持細胞の関係性に対する我々の理解は、最近10年間の間に著しく前進した。非常に複雑な微小環境は増殖には支持的ではないというだけでなく、slow-growingで進行の遅い腫瘍がより活動的な状態になるように働く。

・微小環境内でのCDK4の活動性の重要性は、最初に乏突起神経膠細胞腫のRCAS-PDGF/nestin-TvAマウスモデルを、CDK4欠損状態にすることで示された。CDK4は腫瘍細胞の増殖に必要とされるが、CDK4発現ベクターとCDK4欠損腫瘍細胞を再構築することは、残りの動物がCDK4欠損時に腫瘍がより活発な状態に進行するのに十分とはいえない。このことは、CDK4に腫瘍付帯的な役割があることを示唆している。このモデルにおける進行の欠如は、腫瘍関連性小膠細胞腫の成熟の欠陥と関連しており、これはCDK4欠損におけるセンチネルモデルで示されている。このことは、小膠細胞腫のセンチネルから活動性への成熟が乏突起膠腫のより進行した形への進行を支持している、という知見と一致している。これはサイクリンD/CDK4依存性現象であるという概念をさらに強化し、同様の現象はサイクリンD1欠損マウスでも起こる。そういうわけで、CDK4は、腫瘍細胞の増殖と腫瘍微小環境の成熟の両方で必要とされている。そして、両方が病気の進行に必要だ。

・最近、患者腫瘍組織移植モデルやMMTV-HER2マウスを含む様々な乳がんモデルにおいて、アベマシクリブやパルボシクリブは、腫瘍細胞の増殖停止や抗原処理や提示の増強作用を誘発することが示されている。このことは、腫瘍細胞の免疫原性を向上させる。これに一致して、腫瘍に導入されたCD3＋細胞の多くは、治療後に増加し、細胞障害性T細胞（CTLs）の活性化する。加えて、CDK4はCTL反応を抑制するCD4＋FOXP3＋制御性T細胞（T reg）が必要である。担癌と非担癌の動物において、CDK4欠損は、他のT細胞サブセットで最小効果を持つ浸潤性で循環性のCD4＋FOXP3＋T reg細胞の減少と関連している。このように、腫瘍細胞の抗原性を増大し負の調整細胞を抑制することにより、CDK4/6阻害剤を使って腫瘍増殖においてしっかりした効果を出すことができる。

・興味深いことに、微小環境におけるCDK4/6阻害剤の活動は、そのRbリン酸化を阻止し細胞周期から出るのを促進する能力を通してのみではないかもしれない。CDK4はPD-L1と相互作用するカリンE3ユビキチン合成酵素反応性蛋白であるSPOPに向かう酵素活性を持つことも示された。パルボシクリブによる治療はSPOPのリン酸化、その劣化、PD-L1プロテアソーム媒介分解の阻止を阻害する。CDK4/6阻害はまた*in vitro*でのPD-1発現T細胞を刺激し、T細胞浸潤を増加させることができる。この刺激は、少なくともNFAT4のCDK6誘導性リン酸化による部分で起こる。パルボシクリブとPD-1 遮断の併用は、大腸腺癌のマウス移植片での腫瘍消退を増大し全生存期間を改善した。

・これらの例は、CDK4/6阻害が、腫瘍微小環境の細胞における活動性によって、または増殖や成熟に影響することによって、または腫瘍や正常細胞における抗原提示や細胞の他の免疫学的事象に影響することによって、腫瘍増殖で有する深い効果を明示している。そのような結果が、CDK4/6阻害剤が免疫チェックポイント阻害薬やその他の免疫療法と併用する新しい機会を促進している。実際に、シグナル伝達系阻害剤の併用が2つ以上の異なる細胞標的を攻撃するかもしれないという機序的な可能性も示されている。

・例えば、CDK4/6阻害剤やPI3K阻害剤は、各々ではトリプルネガティブ乳がんのマウスモデルで小さな影響を持つが、CDK4/6とPI3K阻害剤の併用はHLA抗原提示を増加させ、腫瘍浸潤性細胞傷害性CD4＋およびCD8＋T細胞とナチュラルキラー細胞の増加を誘導し、CD4＋FOXP3＋Treg抑制細胞を減少させる。これらの研究者はなぜ併用の方がより良いのかについて発表していないが、彼らはさらに免疫チェックポイント阻害剤が定着した腫瘍において完全で恒久的な抑制を誘導するということを加えて示している。

・腫瘍微小環境でのCDK4の重要性は既知のことだが、CDK4/6阻害剤はRb陰性腫瘍ではあまり重要な効果を持たないことに少し驚くかもしれない。腫瘍細胞での増殖停止は組織適合性での変化を明らかにすることにおいて必要である。それに替わって、そして決して排他的ではなく、CDK4/6が微小環境に与える能力は腫瘍量を減少させるには十分ではないかもしれない。乏神経突起膠腫モデルについては先に述べたが、異所性PDGF発現はCDK4陽性細胞で発病するのに十分である。しかし、もし微小環境がCDK4欠損であったら、これらの低グレード病変は高グレードな致死的悪性に進行しないかもしれない。動物とヒトの両方でのRb陰性腫瘍におけるCDK4/6阻害剤の効果を調べた実験では、腫瘍グレードにおけるより鋭敏な変化を識別するには単にパワー不足だった。とにかく、腫瘍細胞と腫瘍微小環境において、CDK4/6阻害剤の多彩な細胞性標的はまた最善の臨床効果をもたらすために協働しうる。

**結論**

・CDK4/6阻害剤によりがんの進行を阻害することができるメカニズムは、もともと考えられていたよりもはるかに多様であることは明らかである。CDK4/6の*in vivo*での機能は、単に可逆性な細胞状態をこえて広がっているようだ。それにもかかわらず、ここで議論された代替のメカニズムが完全には分離していないかもしれないということの検証が試みられている。老化細胞は、代謝変化と免疫応答を調節するサイトカインの精巧さによって特徴付けられる。このように、CDK4/6阻害剤が腫瘍細胞を老化に追いやる能力は、免疫応答と細胞代謝における変化を誘導し、細胞反応性のメカニズムを統合するかもしれない。それゆえに、それぞれの患者群でいかに薬剤が協働して利益を生むかを学びながら、各々のメカニズムを検証されることが待たれている。