アノテーションライブラリーを用いたSCD1阻害薬に対する癌細胞の耐性機構の解明

尾野 晃人*、佐野 修、風谷 謙一、村木 孝充、今村 圭佑、角 紘幸、松井 純二*、岩田 英久
（武田薬品工業株式会社　医薬研究本部、*現：Axcelead Drug Discovery Partners 株式会社　分子スクリーニング）

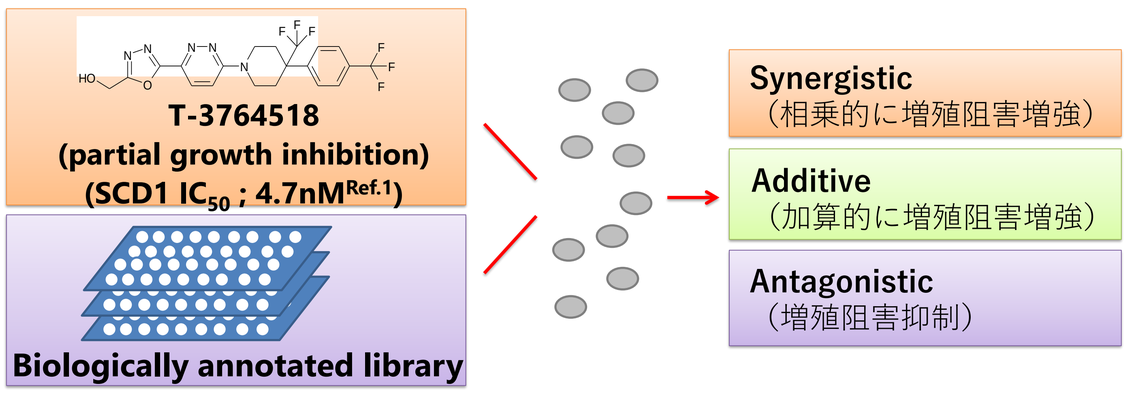
背景と目的

- 効率的な抗癌剤開発のためには、化合物の作用機序 (MoA)を明らかにし、患者の層別化マーカーと併用薬の情報を得ることが有用である。
- 化合物のMoA解析方法として、shRNA / CRISPR-Cas9 pooled libraryなどがしばしば利用されるが、オフターゲットや得られた遺伝子のdruggabilityの問題がある

⇩

- 標的分子情報を有する化合物群から成るアノテーションライブラリーを用いた併用薬スクリーニングにより、抗癌剤のMoA解析を可能とする普遍的な方法論の確立を目指す。
- SCD1阻害薬T-3764518に対する癌細胞の耐性機構を解明する。

◆ アノテーションライブラリーを用いた併用薬スクリーニング戦略



併用薬スクリーニング

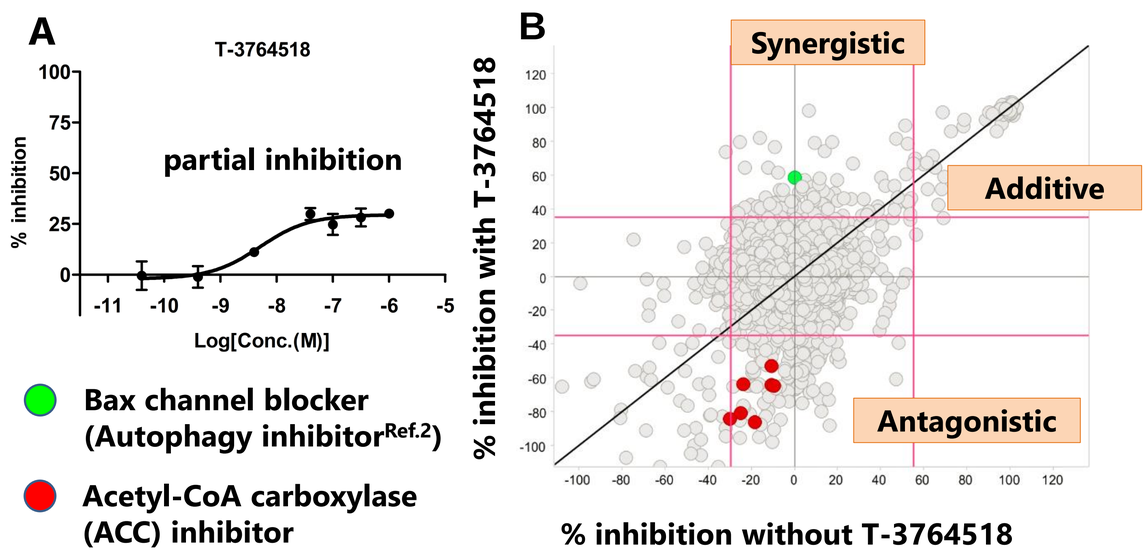


Fig 1. (A) Dose-response analysis of T-3764518 in HCT-116 cells treated with T-3764518 for 72 h. (B) Summary of combination screening. Based on the Bliss model, compounds were classified as synergistic, additive/independent, or antagonistic.

T-3764518はAMPKを活性化する

併用薬スクリーニングの結果、ACC阻害薬が拮抗的に作用した。これまでに他の癌細胞株においてSCD1阻害がAMPKを活性化することが報告されていたことから[Ref.3]、HCT116細胞においてもSCD1阻害によるAMPKの活性化、およびACCの不活性化がHCT116細胞の耐性能に寄与し、さらにACC阻害剤を併用することで耐性能が増強されたのではないかと推測した。

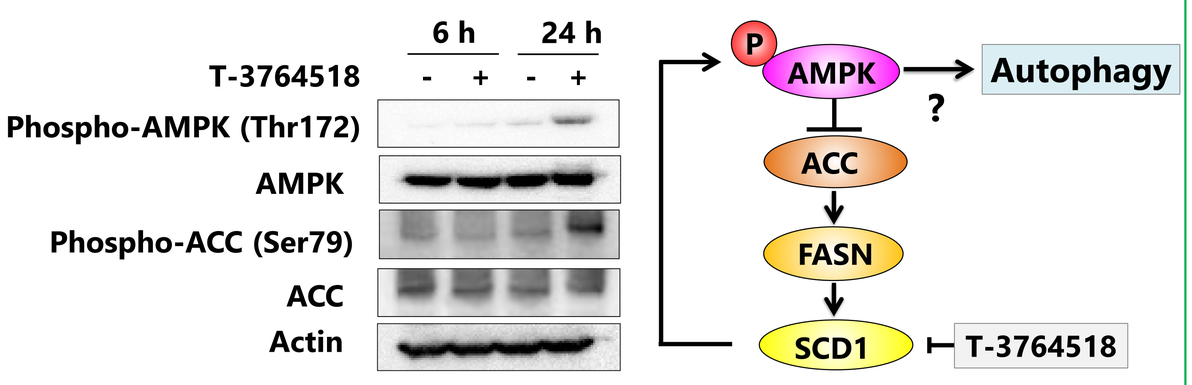


Fig 2. Western blot of HCT-116 cells treated with DMSO or T-3764518 (100 nM) for the indicated times; actin was used as a loading control.

T-3764518はAutophagyを誘導する

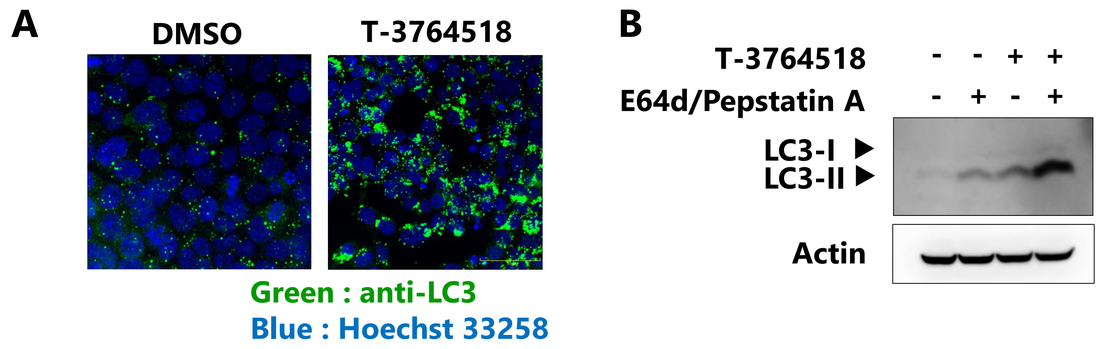


Fig 3. (A) Representative images of LC3 dot formation in HCT-116 cells treated with T-3764518 (100 nM) for 24 h. (B) Western blot of HCT-116 cells treated with E64d (10 μg/ml) and pepstatin A (10 μg/ml) with or without T-3764518 (100 nM) for 24 h.

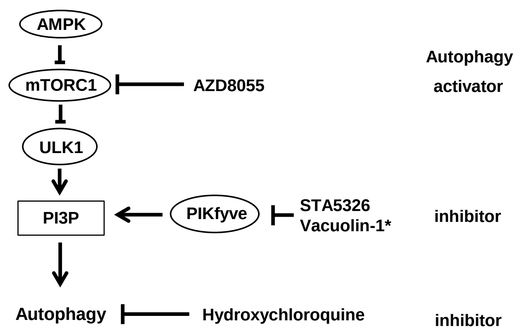
T-3764518とAutophagy阻害薬は併用効果を示す

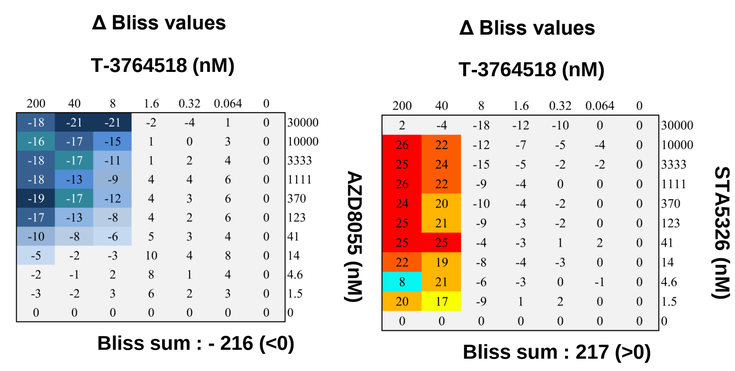
◆ Bliss independence model Ref.4

I_A = 化合物Aの阻害率
I_B = 化合物Bの阻害率
I_{AB} = 併用時の阻害率

$I_{AB} > I_A + I_B - I_A \times I_B$: 相乗作用（Δ Bliss value >0）
$I_{AB} < I_A + I_B - I_A \times I_B$: 拮抗作用（Δ Bliss value <0）

併用試験に用いたAutophagy関連化合物





Compound	ΔBliss value	Combination effect with T-3764518
AZD8055	-216	antagonistic
Bax blocker	281	synergistic
STA5326	217	synergistic
Vacuolin-1	472	synergistic
Hydroxy chloroquine	317	synergistic

Fig 4. Drug matrix heatmap illustrating ΔBliss values. HCT-116 cells were treated with autophagy modulators alone or in combination with T-3764518 at the indicated concentrations.

SCD1-KO細胞はAutophagy阻害薬に高い感受性を示す

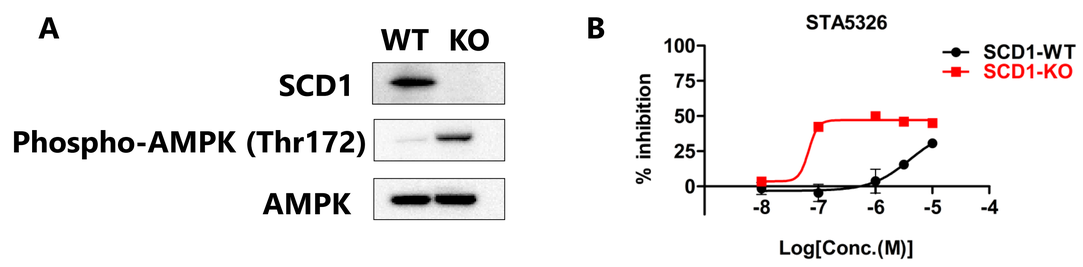


Fig 5. Validation of the results obtained by T-3764518 with SCD1-KO cells. (A) Western blot analysis of SCD1-KO cell lysates. (B) Dose-response analysis of SCD1-WT and SCD1-KO HCT-116 cells treated with STA5326 for 72 h.

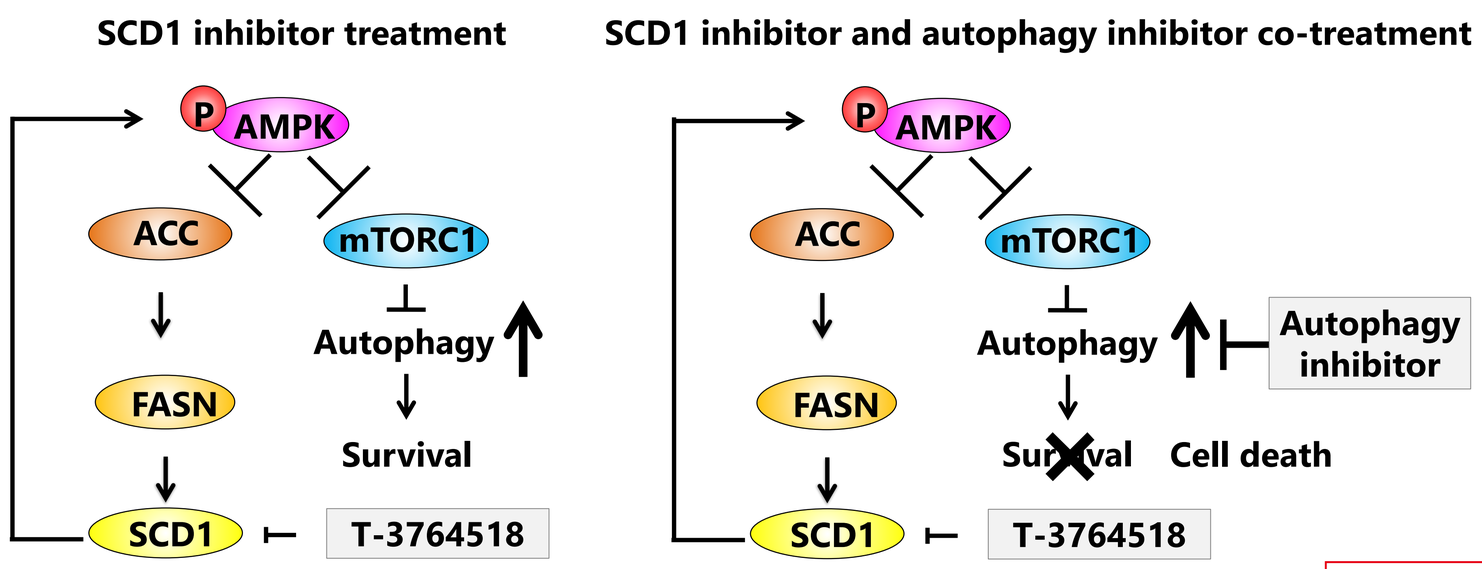
参考文献

1. Imamura *et al.*, Bioorg Med Chem. 2017; 25(14): 3768-3779.
2. Scaglia *et al.*, PLoS One. 2009; 4(8): e6812.
3. Sano *et al.*, FEBS Lett. 2016; 590(11): 1576-85.
4. Bliss C.I. Ann Appl Biol. 1939; 26: 585–615.
5. Ono *et al.*, PLoS One. 2017; 12(7): e0181243.

結論

- AMPK活性化を介したAutophagy活性の亢進が、HCT116細胞株のSCD1阻害剤に対する耐性機構として働いていることが明らかになった。
- アノテーションライブラリーを用いたunbiasedな併用スクリーニングと、KO細胞などの遺伝学的な手法を組み合わせて本アプローチ法は、抗癌剤のMoA解析に幅広く適応可能であると考えられる。

Ref5; Ono *et al.*, PLoS One. 2017; 12(7): e0181243.



無断転載禁止