

## 細胞内シグナル伝達経路の遮断を基盤とした新規がん分子標的治療法の開発

尾崎 恵一

## Targeted Molecular Strategies for Cancer Therapy Based on the Blockade of Oncogenic Pathways in Human Tumor Cells

Kei-ichi OZAKI

*Laboratory of Cell Regulation, Department of Pharmaceutical Sciences, Graduate School of Biomedical Sciences, Nagasaki University, 1-14 Bunkyo-machi, Nagasaki City 852-8521, Japan*

(Received February 17, 2007)

Constitutive activation of the extracellular signal-regulated kinase (ERK) and/or phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K)/Akt signaling pathways is associated with neoplastic transformation of a variety of human tumor cells. Treatment of such tumor cells with agents that specifically inhibit the activity of mitogen-activated protein kinase/ERK kinase (MEK) or PI3K completely suppresses their proliferation. However, treatment of cells with these inhibitors leads to only a modest increase in apoptotic cell death. Efficient induction of apoptosis is essential for the development of effective cancer chemotherapy. Therefore, we have examined whether specific blockade of these two signaling pathways affects the efficacy of the induction of apoptosis by various anti-cancer agents in tumor cells. We found that MEK inhibitors markedly enhance the efficacy of histone deacetylase inhibitors to induce the generation of reactive oxygen species and apoptosis. This effect was only observed in tumor cells in which the ERK pathway was constitutively activated. Furthermore, we found that PI3K inhibitors selectively and markedly enhanced the efficacy of the induction of apoptosis by doxorubicin. This latter effect was only detected in tumor cells in which the PI3K/Akt pathway was constitutively activated and in which the p53 pathway was functional. These combination treatments provide an efficient chemotherapeutic strategy for the treatment of tumor cells in which the ERK pathway or PI3K/Akt pathway is constitutively activated. This review gives an overview of the development of new targeted molecular strategies for cancer therapy based on the suppression of the activity of oncogenic pathways involved in the proliferation or survival of tumor cells.

**Key words**—extracellular signal-regulated kinase; phosphatidylinositol-3 kinase; Akt; histone deacetylase inhibitor; molecular-targeted cancer therapy

## 1. はじめに

これまでの多くの抗癌剤は、DNA 傷害作用や細胞分裂阻害作用等を有する細胞毒性の強い薬剤であるために、正常細胞に対する副作用の発現は無視できなかった。しかし、近年、癌細胞に特徴的な遺伝子変化や異常増殖の分子メカニズムが明らかになり、癌細胞で特異的に変化している分子を標的とした副作用の少ない効果的な分子標的治療薬の開発が進められている。このような分子標的薬はすべての癌細胞に有効ではないが、標的分子を有する癌細胞に対しては極めて選択的に抗癌作用を示すことが期

待されている。その成功例としては、慢性骨髄性白血病治療薬としての BCR-ABL のチロシンキナーゼ活性の阻害薬（グリベック）などが知られているが、その一方で、一部の患者には画期的な効果をもたらすものの、重い副作用や今なお効果が証明できないなどの問題を抱える肺癌治療薬としての epidermal growth factor receptor (EGFR) キナーゼ阻害剤（イレッサ）などがあるのも現実である。

われわれは、かねてより個体の恒常性維持に極めて重要な役割を演じる主要な細胞内シグナル伝達経路である ERK-MAP キナーゼ系（細胞増殖シグナル）及び phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K)/Akt 系（生存シグナル）に注目し、その制御異常と癌との関連について解析を進めてきた。また、多くの癌細胞においてこの二大経路の機能異常亢進が報告<sup>1)</sup>されていることから、本研究ではこの二大経路の恒

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科生命薬科学専攻細胞制御学研究室（〒852-8521 長崎市文教町 1-14）  
e-mail: kozak@nagasaki-u.ac.jp

本総説は、平成 18 年度日本薬学会九州支部学術奨励賞の受賞を記念して記述したものである。

常的活性化の認められる癌細胞において、これらの経路を選択的に遮断することで、効果的な癌治療に結び付く可能性を検討した。

具体的には、Fig. 1 に示すように、ERK 経路に関しては、主として EGFR などの receptor tyrosine kinase (RTK), Ras, B-Raf の活性型遺伝子変異、PI3K 経路に関しては、RTK, Ras の活性型変異に加えて、PI3K に対する負の制御因子である PTEN (Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10) の機能喪失などの結果、様々な癌において二大経路の恒常的活性化がみられる。<sup>1)</sup>したがって、「がん」という疾患をシグナル分子の遺伝子異常による「遺伝病」と捉えることができるが、結果として、癌細胞においてシグナル伝達異常を生じることから、われわれは、癌を「シグナル伝達病」として位置付け、異常亢進シグナル経路をその治療標的として考えた。

実際、恒常的に活性化されたシグナル伝達経路を、グリベックやイレッサのような分子標的治療薬で遮断することによって、癌細胞に効果的に細胞死を誘導することが可能な例も存在するが、それらは極めて高い癌遺伝子依存性 (oncogene addiction) を示す癌細胞の場合である。<sup>2)</sup>多くの癌細胞では、

シグナル遮断薬のみでは、十分な抗癌作用が得られないことから、われわれはシグナル遮断薬と他の抗癌剤との併用療法を提唱している。

## 2. ERK 経路の選択的遮断薬とヒストン脱アセチル化酵素阻害薬との併用効果

ERK 経路の恒常的活性化が認められるヒト大腸癌細胞株 HT-29 に対して、ERK 経路の選択的遮断薬である MEK 阻害剤 PD184352 は、有意に増殖抑制効果を示したが、顕著な細胞死誘導効果は認められなかった。そこで、近年、新しい抗癌剤として注目されているヒストン脱アセチル化酵素 (histone deacetylase: HDAC) 阻害剤との併用効果を検討した。Figure 2(A) に示すように、薬剤によって誘導される細胞死をフローサイトメーターによる sub-G1 解析<sup>3)</sup>によって検討したところ、HDAC 阻害剤である HC-toxin は単独で濃度依存的に細胞死を誘導したが、PD184352 併用により、その効果はすべての濃度領域において増強された。特に、単独での細胞死がほとんどみられない 0.1  $\mu\text{M}$  の HC-toxin に対して、PD184352 併用による増強効果は最も顕著に認められ (Fig. 2(B))、以降の実験は、この条件で併用処理を行った。HT-29 細胞に対して、本条件での併用処理によって誘導される細胞死のタイム

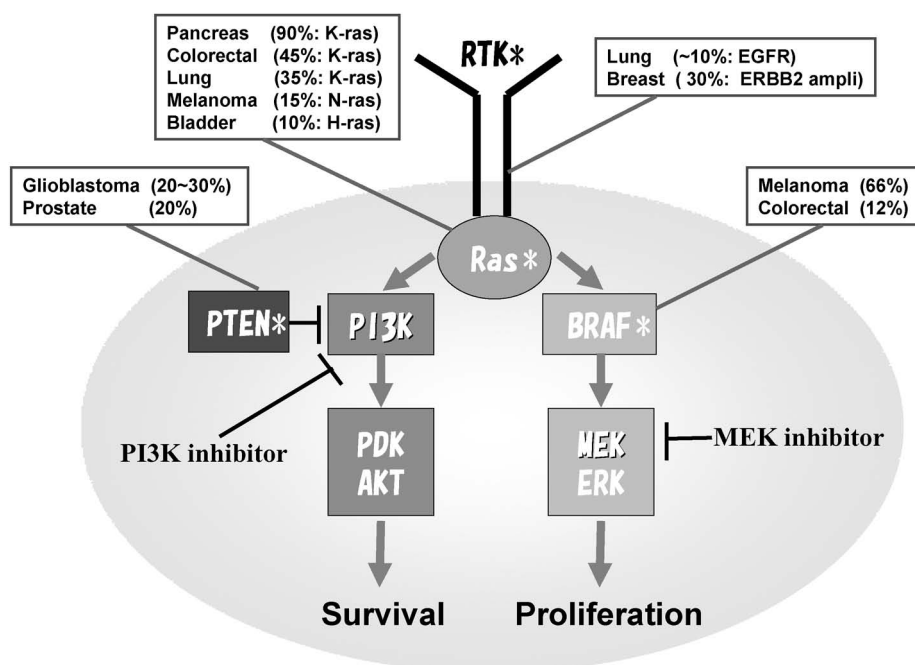


Fig. 1. Targeting Oncogenic Signaling Pathways in Cancer Therapy

Constitutive activation of ERK and/or PI3K/Akt pathways in different tumors has been reported.

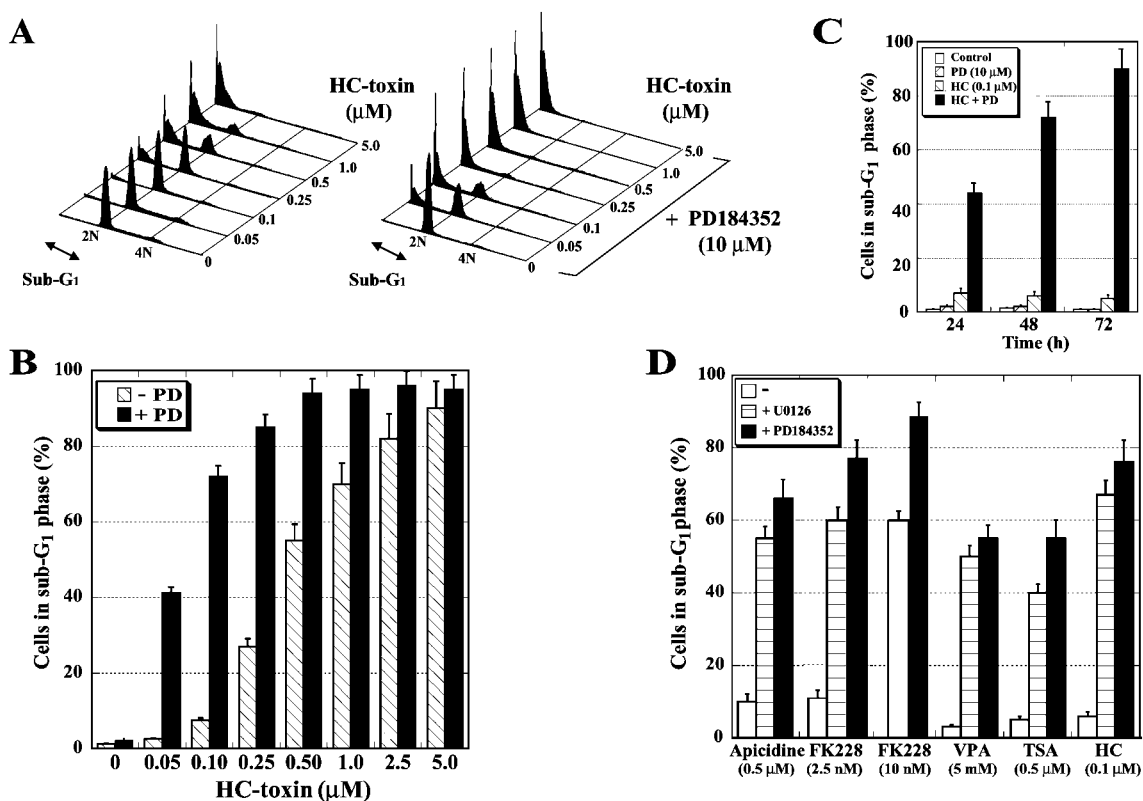


Fig. 2. MEK Inhibitor PD184352 Enhances the Efficacy of HDAC Inhibitors to Induce the Cell Death in HT-29 Cells

(A) (B) HT-29 cells were treated with the indicated concentration of HC-toxin in the absence or presence of 10  $\mu\text{M}$  PD184352 for 48 h. Cells stained with propidium iodide were analyzed by flow cytometry. Proportions of dead cells with fractional DNA content (cells in sub-G1 phase) are shown. (C) HT-29 cells were mock-treated (control) or treated with 10  $\mu\text{M}$  PD184352 (PD), 0.1  $\mu\text{M}$  HC-toxin (HC) or PD184352 and HC-toxin in combination (HC+PD) for the indicated periods of time. Proportions of dead cells with fractional DNA content (cells in sub-G1 phase) are shown. (D) HT-29 cells were treated with the indicated concentration of various HDAC inhibitors in the absence (-) or presence of 20  $\mu\text{M}$  U0126 (+U0126) or 10  $\mu\text{M}$  PD184352 (+PD184352) for 48 h. Proportions of dead cells with fractional DNA content (cells in sub-G1 phase) are shown. Data are mean  $\pm$  S.D. of three separate experiments, each performed in duplicate.

コースは Fig. 2(C) に示す通りである。

さらに、HC-toxin とは構造の異なる様々な HDAC 阻害剤と PD184352 以外の MEK 阻害剤 (U0126) との組み合わせによる併用によっても、同様に顕著な細胞死誘導増強効果が認められた (Fig. 2(D)).

### 3. ERK 経路の恒常的活性化が認められる癌細胞に特異的にみられる併用効果

次に、MEK 阻害剤と HDAC 阻害剤との併用効果がみられる癌細胞特異性について検討した。ERK 経路の活性化レベルは、活性型であるリン酸化 ERK を western blot によって解析することで検出可能である。Figure 3(A) のように、ERK のリン酸化 (活性化) レベルが高い癌細胞 (HT-29, WiDr, A431, PC-9) においてのみ併用効果が認められ、リン酸化 ERK の検出されない癌細胞 (Colo320, PC3) については併用による細胞死誘導増強効果は全く検出されなかった (Fig. 3(B)). ま

た、ヒト正常 2 倍体細胞 (TIG-3) に対しても、併用効果は認められなかった。

さらに、併用効果が顕著に認められる癌細胞の ERK 経路の恒常的活性化は、上流のシグナル分子である EGFR<sup>4)</sup> や B-Raf<sup>5)</sup> についての遺伝子増幅や活性型変異に起因するものであった。特に、本併用効果の発現する癌細胞特異性の 1 つである B-Raf の活性型変異は、「B-Raf 変異と MEK 阻害剤感受性には相関性がある」との報告<sup>6)</sup> とも一致している。

### 4. アポトーシス誘導因子としての活性酸素

併用処理によって誘導される細胞死についての解析を行った。Figure 4(A) のように、HT-29 細胞に対して、PD184352 と HC-toxin との併用処理 (24 時間) を行うことによってのみ、caspase-8, caspase-9, caspase-3, 及び PARP (caspase-3 の基質) の切断が検出され、caspase 経路の活性化<sup>7)</sup> が確認された。したがって、併用処理によって誘導される細胞死はアポトーシスであることが判明した。さらに、

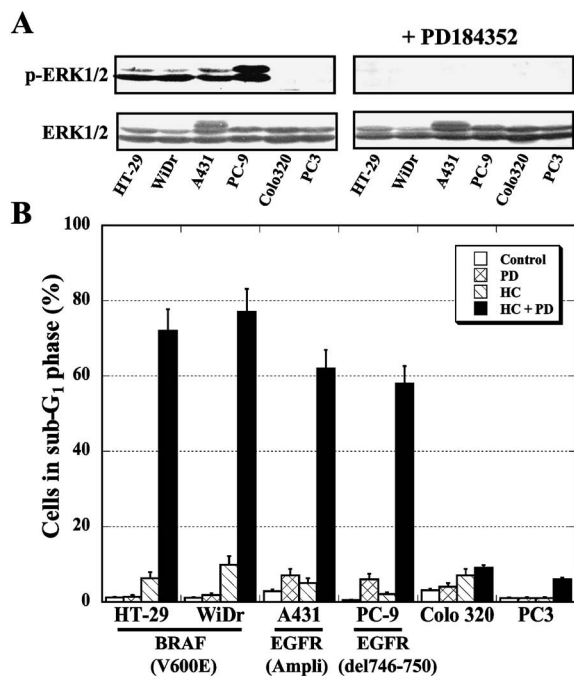


Fig. 3. Enhanced Cell Death Induced by the Combination of PD184352 and HC-toxin is Observed in a Cell Type-specific Manner

(A) Tumor cells were mock-treated or treated with 10  $\mu$ M PD184352 for 2 h. Cell lysates were resolved by SDS-PAGE, followed by immunoblot analysis using anti-phospho-ERK1/2 or anti-ERK1/2 antibody. (B) All cells used were mock-treated (Control) or treated with 10  $\mu$ M PD184352 (PD), 0.1  $\mu$ M HC-toxin (HC) or PD184352 and HC-toxin in combination (PD+HC) for 48 h. Proportions of dead cells with fractional DNA content (cells in sub-G1 phase) are shown. Data are mean  $\pm$  S.D. of three separate experiments, each performed in duplicate. HT-29, WiDr, A431 and PC-9 cells are those exhibiting constitutive activation of the ERK pathway as the consequence of activation mutation of B-Raf (V600E), overexpression of EGFR (gene amplification) or activation mutation of EGFR (E746-A750 deletion), respectively.

caspase の general inhibitor である Z-VAD 添加によって、併用薬剤処理後 24 時間の細胞死はほぼ完全に、48 時間では部分的に抑制された (Fig. 4(B)). したがって、48 時間以降の細胞死については、ネクロシスなどの影響も考えられた。

次に、アポトーシス誘導のメカニズムについて検討した。HDAC 阻害剤による細胞傷害活性は、活性酸素 (reactive oxygen species: ROS) によって媒介されるとの報告<sup>8,9)</sup>があり、本併用効果にも関与している可能性が考えられたため、ROS の産生を ROS 感受性蛍光プローブ (CMH<sub>2</sub>DCFDA) によって調べた。Figure 4(C)にみられるように、HT-29 細胞に対して、PD184352 と HC-toxin との併用処理 (24 時間) をすることによってのみ、顕著な ROS の産生が認められた。一方、ROS スカベンジャーである *N*-acetyl cysteine (NAC) を添加するこ

とによって、併用処理により検出された ROS は完全に消去された。

さらに、Fig. 4(D)に示すように、フローサイトメーターを用いて、定量的に ROS 産生をモニターした。横軸の蛍光強度に対して、コントロールよりもピークが右にシフトした部分に相当する細胞の割合を ROS-positive (%) として表すと、併用によって顕著な ROS 産生が誘導され (34.8%), これは 50 倍濃度である 5  $\mu$ M HC-toxin 単独処理によって産生される ROS 産生レベル (31.1%) に匹敵することが分かった。また、これらの薬剤処理によって誘導される ROS 及び細胞死は、NAC 添加で完全に抑制された (Figs. 4(E), (F)).

以上より、MEK 阻害剤と HDAC 阻害剤との併用効果は、ERK 経路の恒常的活性化の認められる癌細胞特異的であり、ROS がアポトーシス誘導の mediator として重要な役割を果たしていることを明らかにした。<sup>10)</sup>

### 5. PI3K/Akt 経路の選択的遮断薬と Doxorubicin との併用効果

われわれの注目する、もう 1 つの重要なシグナル経路である PI3K/Akt 経路については、PI3K に対してブレーキの役割をする癌抑制遺伝子、PTEN の欠損などによって、ある種の癌細胞においてその機能亢進が生じる。特に、PI3K の下流分子である Akt は、アポトーシス関連分子のリン酸化を通してその作用を抑制し、生存へと導くことから、そのアポトーシス抑制シグナル<sup>11)</sup>を治療標的と考えた。本経路の選択的遮断には、PI3K 阻害剤である LY294002 を用いた。

まず、Fig. 5(A)に示すように、活性型であるリン酸化 Akt を western blot で解析することにより、PI3K/Akt 経路の恒常的活性化のみられる細胞群 (A172, T98G, T24, LNCaP) と、活性化レベルの低い群 (WiDr, ACHN) に分類した。そこで、LY294002 による各細胞群の増殖能に対する影響を調べたところ、PI3K/Akt 経路の恒常的活性化のみられる細胞群でのみ濃度依存的な増殖抑制が観察された (Fig. 5(B)). しかし、やはり PI3K 阻害剤単独処理では、顕著な細胞死誘導には至らず、他の薬剤との併用を試みることにした。

併用薬剤選定のために、既存の抗癌剤の中で Akt 活性を低下させる効果を示す薬剤に注目した。その

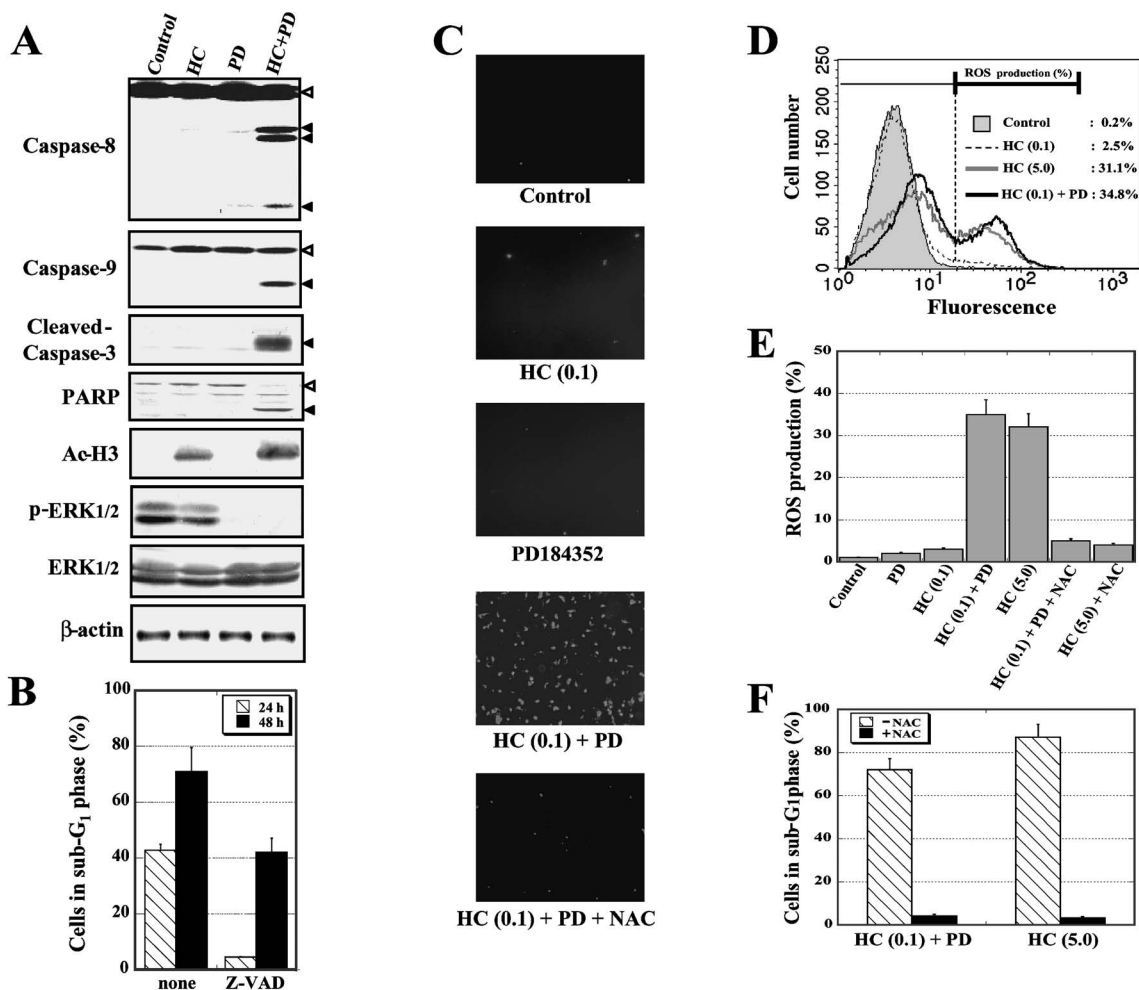


Fig. 4. Enhanced Apoptotic Cell Death Induced by the Combination of PD184352 and HC-toxin is Mediated by the ROS Generation

(A) HT-29 cells were mock-treated (control) or treated with  $10 \mu\text{M}$  PD184352 (PD),  $0.1 \mu\text{M}$  HC-toxin (HC) or PD184352 and HC-toxin in combination (HC + PD) for 24 h. Cell lysates were subjected to immunoblot analysis using the indicated antibodies. Open arrowhead indicates the position of uncleaved form of caspase-8, caspase-9 or PARP, whereas closed arrowheads indicated the position of their cleaved fragments. (B) HT-29 cells were treated with the combination of  $10 \mu\text{M}$  PD184352 and  $0.1 \mu\text{M}$  HC-toxin in the absence or presence of Z-VAD for the indicated periods of time. Proportions of dead cells with fractional DNA content (cells in sub-G1 phase) are shown. (C) HT-29 cells were mock-treated (Control) or treated with  $0.1 \mu\text{M}$  HC-toxin [HC (0.1)],  $5 \mu\text{M}$  HC-toxin [HC (5.0)] or the combination of  $10 \mu\text{M}$  PD184352 and  $0.1 \mu\text{M}$  HC-toxin [HC (0.1) + PD] for 24 h. Cells were labeled with a ROS-sensitive dye and analyzed by flow cytometry to determine the percentage of cells displaying an increase in ROS generation as shown in (D). In some experiments, the cells were treated with the combination of  $10 \mu\text{M}$  PD184352 and  $0.1 \mu\text{M}$  HC-toxin or  $5 \mu\text{M}$  HC-toxin in the presence of  $15 \text{ mM}$  NAC. (E) Generation of ROS in the cells was monitored as described above. (F) HT-29 cells were treated with the combination of  $10 \mu\text{M}$  PD184352 and  $0.1 \mu\text{M}$  HC-toxin or  $5 \mu\text{M}$  HC-toxin in the absence (–NAC) or presence of  $15 \text{ mM}$  NAC (+NAC) for 48 h. Proportions of dead cells with fractional DNA content (cells in sub-G1 phase) are shown. Data are mean  $\pm$  S.D. of three separate experiments, each performed in duplicate.

ような薬剤として、われわれは vincristine (VCR) と doxorubicin (DXR) を見出したが、VCR と LY294002 との併用効果については既に明らかにしていた<sup>12)</sup>ことから、DXR との併用について検討した。

PI3K/Akt 経路の恒常的活性化のみられるヒト神経膠芽腫細胞株 A172 について、DXR に LY294002 を併用することによって、顕著な細胞死誘導の増強効果がみられ、それは DXR 単独では有意な細胞死を誘導しない低濃度 ( $0.2 \mu\text{M}$ ) で最も顕著であった。また、topotecan (TPT) などの他の DNA 傷害性抗

癌剤と LY294002 との組み合わせによる併用効果は認められなかった。さらに、同様の併用効果が、PI3K/Akt 経路の恒常的活性化のみられるヒト前立腺癌細胞株 LNCaP においても確認された (Figs. 5 (C), (D)).

## 6. PI3K 経路遮断薬と DXR との併用効果のみられる癌細胞特異性

DXR と LY294002 との併用処理によって誘導される細胞死についての解析を行った。まず、A172 及び LNCaP 細胞株に対して、併用処理によってアポトーシスの実行因子である caspase-3 の活性化と

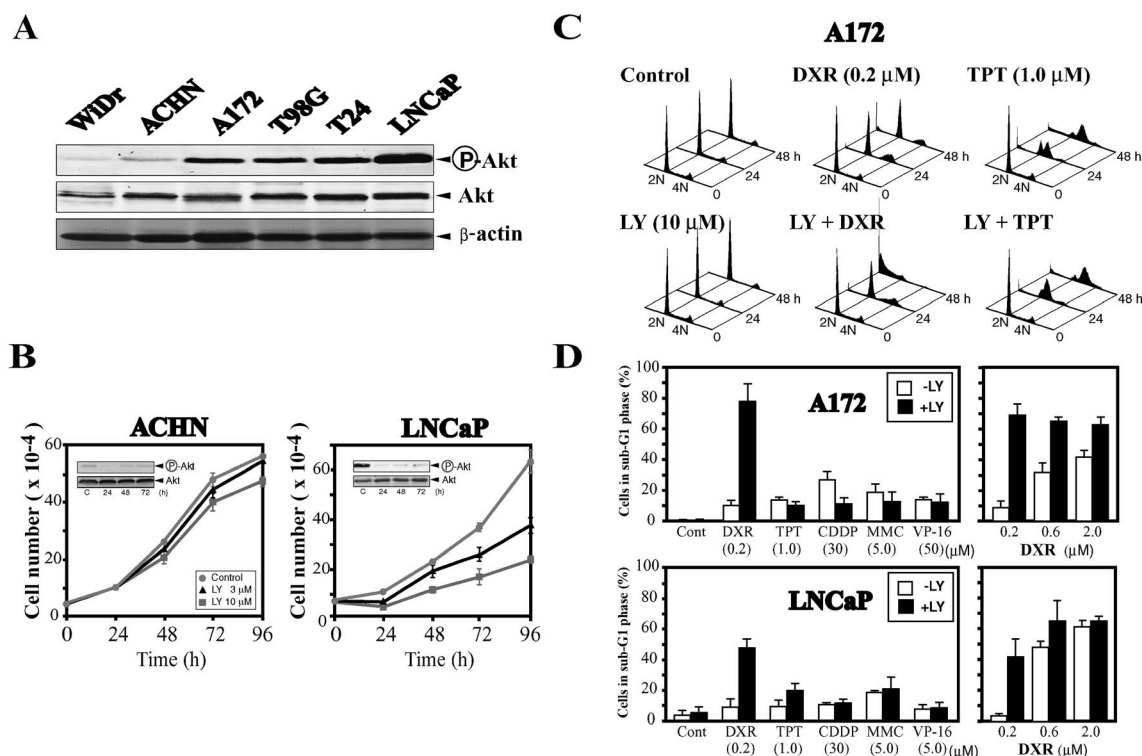


Fig. 5. Blockade of the PI3K/Akt Pathway Selectively Enhances the DXR-induced Cell Death

(A) Cell lysates were resolved by SDS-PAGE, followed by immunoblot analysis using anti-phospho-Akt, anti-Akt, or anti- $\beta$ -actin (loading control) antibody. (B) ACHN or LNCaP cells were mock-treated (Control) or treated with 3 or 10  $\mu$ M LY294002 for the indicated periods of time. Viable cells were counted using a hemocytometer. Inset; cell lysates were subjected to immunoblot analysis using anti-phospho-Akt or anti-Akt antibody. (C) A172 cells were mock-treated (Control) or treated with 10  $\mu$ M LY294002, 0.2  $\mu$ M DXR, 1  $\mu$ M TPT, LY294002 and DXR in combination, or LY294002 and TPT in combination for the indicated periods of time. Cells stained with propidium iodide were analyzed by flow cytometry. (D) A-172 or LNCaP cells were mock-treated (Cont) or treated with the indicated concentration of DXR, TPT, CDDP, MMC or VP-16 in the absence (-LY) or presence (+LY) of 10  $\mu$ M LY294002 for 48 h. Proportions of dead cells with fractional DNA content (cells in sub-G1 phase) are shown. Data are mean  $\pm$  S.D. of three separate experiments, each performed in duplicate.

その基質である PARP の切断が検出され、効率よくアポトーシスが誘導されていることが明らかになった (Fig. 6(A)).

また、DNA 傷害性抗癌剤である DXR は、p53 依存性の抗腫瘍効果が知られており、実際、顕著な併用効果がみられた A172 及び LNCaP 細胞は p53 野生型<sup>13,14)</sup>を有していた。そこで、併用処理による影響を p53 経路に注目して解析すると、Fig. 6(B) にみられるように、少なくとも DXR 処理によって p53 の活性化とそのターゲット遺伝子である p21 と Bax の発現が誘導されていることが判明した。一方、p53 変異型であるヒト神経膠芽腫細胞株 T98G では、DXR 処理によってこのような p53 経路の活性化はみられなかった。

さらに、本併用効果のみられる癌細胞特異性を詳細に調べると、DXR と LY294002 との併用によって誘導される細胞死増強効果は、PTEN 欠損によって PI3K/Akt 経路の恒常的活性化が認められ、か

つ p53 が野生型である癌細胞 (A172, LNCaP 細胞) にもみられる現象であることが明らかになった (Fig. 6(C)).

## 7. 併用効果発現には PI3K 経路の恒常的活性化のほかに p53 経路も重要

DXR と LY294002 との併用効果発現に p53 経路の活性化が必須であるかどうかを確認するために、siRNA 法による p53 ノックダウンによる影響を検討した。

Figure 7(A) にみられるように、2 種類の p53 に対する siRNA を用いることで、いずれも DXR 処理による p53 の活性化と p21 発現誘導を特異的に抑制することができた。また、p53 をノックダウンした際、併用処理による細胞死誘導増強効果は、ほぼ完全に抑制されていることが分かった (Fig. 7(B)). さらに、併用薬剤の特異性に関しては、いくつかの DNA 傷害性抗癌剤のうち、DXR のみで p53 の活性化が顕著に認められていることが明らか

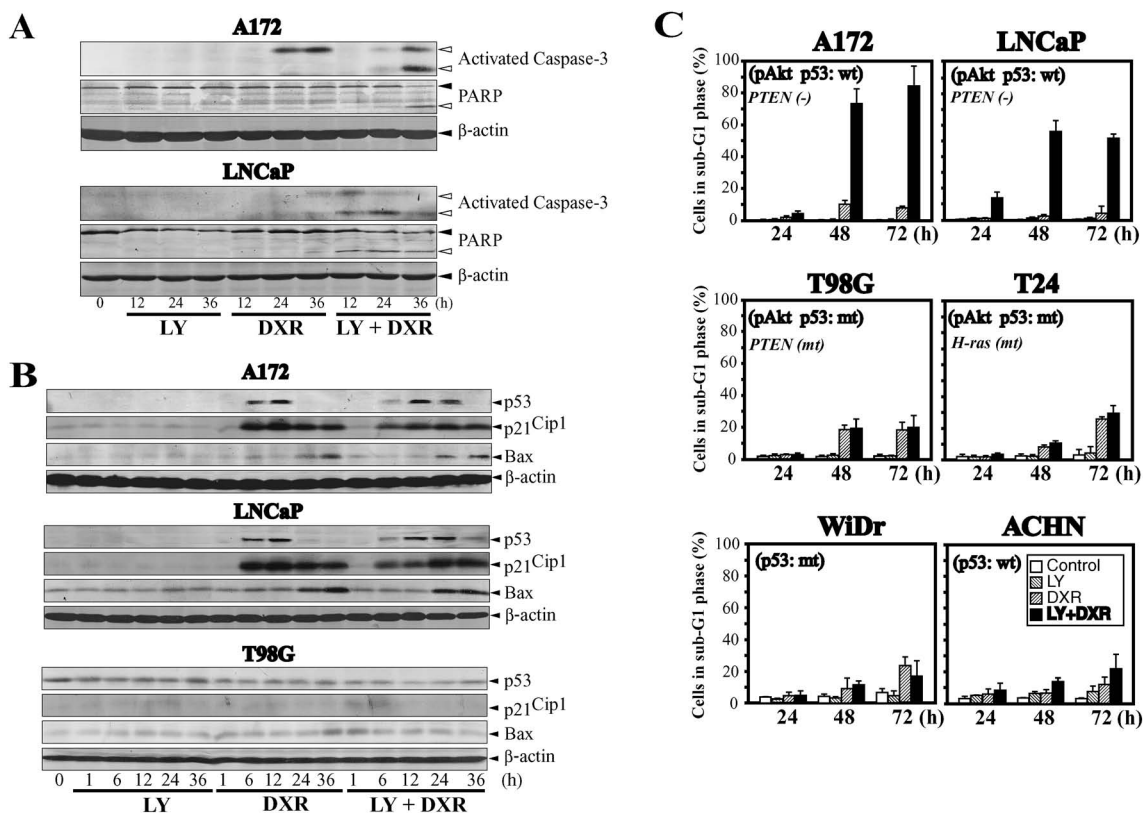


Fig. 6. Enhanced Apoptotic Cell Death Induced by the Combination of LY294002 and DXR is Observed in a Cell Type-specific Manner

(A) A172 or LNCaP cells were treated with  $10 \mu\text{M}$  LY294002,  $0.2 \mu\text{M}$  DXR or LY294002 and DXR in combination for the indicated periods of time. Cell lysates were subjected to immunoblot analysis with anti-activated-caspase-3, anti-PARP, or anti- $\beta$ -actin (loading control) antibody. Open arrowheads indicate the activated fragments of caspase-3 or cleaved species of PARP. (B) A172, LNCaP or T98G cells were treated with  $10 \mu\text{M}$  LY294002,  $0.2 \mu\text{M}$  DXR or LY294002 and DXR in combination for the indicated periods of time. Cell lysates were subjected to immunoblot analysis with anti-p53, anti-p21<sup>Cip1</sup>, anti-Bax or anti- $\beta$ -actin (loading control) antibody. (C) All cells were treated with  $10 \mu\text{M}$  LY294002,  $0.2 \mu\text{M}$  DXR or LY294002 and DXR in combination for the indicated periods of time. Proportions of dead cells with fractional DNA content (cells in sub-G1 phase) are shown. Data are mean  $\pm$  S.D. of three separate experiments, each performed in duplicate.

になった (Fig. 7(C)). 以上のことから、p53 経路の活性化が本併用効果発現に必須であることが証明された。

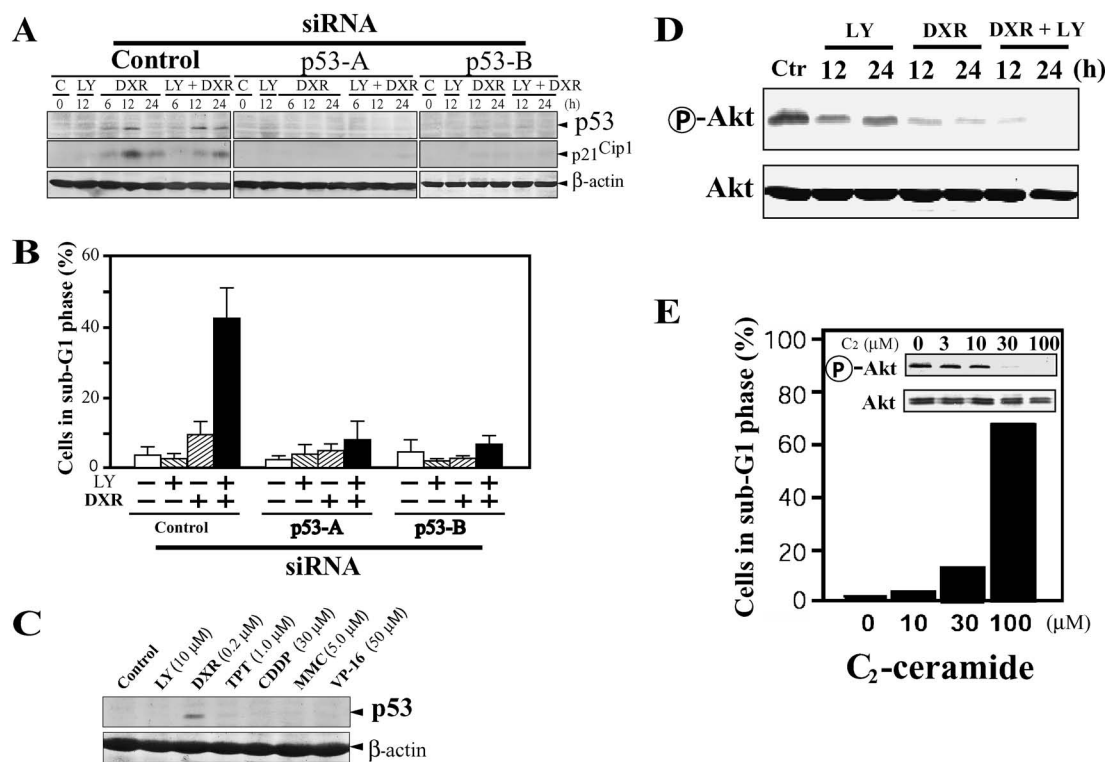
最後に、その併用処理による細胞死増強のメカニズムの一端について述べる。PI3K 経路遮断薬と併用する薬剤選定の際に、Akt の脱リン酸化に注目したが、A172 細胞に対して、DXR 単独処理でリン酸化 Akt が阻害され、それは LY294002 を併用することによって、さらに強く阻害されていた (Fig. 7(D)). ここで、DXR などの抗癌剤が細胞内セラミドを上昇させること、そしてセラミドは Akt の脱リン酸化を誘導し、アポトーシスを促進することが知られている<sup>15)</sup>ことから、これらの現象を媒介する second messenger として、細胞内セラミドに注目した。実際、細胞膜透過性の人工セラミド (C<sub>2</sub>-ceramide) を A172 細胞に添加すると、濃度依存的な Akt の脱リン酸化と細胞死が誘導された (Fig. 7

(E)). このセラミドを介した細胞死増強のメカニズムについての研究は、現在進行中である。

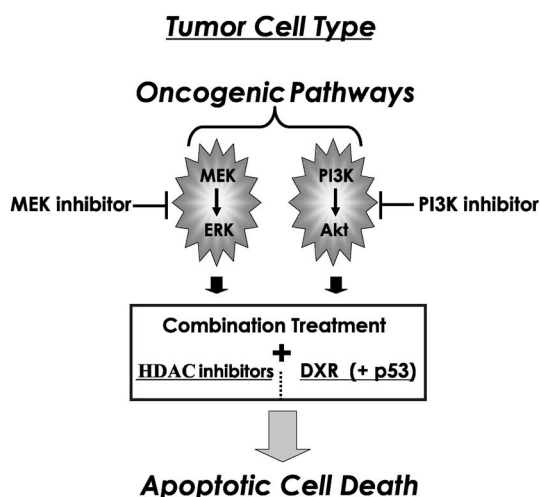
以上後半は、PI3K/Akt 経路の恒常的活性化が認められ、かつ p53 野生型を有する癌細胞に対しては、PI3K 阻害剤と DXR との併用処理が極めて有効であることを明らかにした。<sup>16)</sup>

## 8. おわりに

癌細胞における ERK 経路と PI3K/Akt 経路という二大経路の恒常的活性化とその遮断を基盤とした癌治療の可能性について述べた。また、本総説で詳細に述べた併用効果以外にも、われわれは MEK 阻害剤や PI3K 阻害剤と VCR などの微小管重合阻害剤との組み合わせるによる併用療法の有効性<sup>12,17)</sup>についても見出しており、最重要なことは恒常的活性化経路の遮断に加えて、他の作用を有する抗癌剤を併用することによって、その制癌作用を増強することであると言える (Fig. 8)。以上の成果は、今後



**Fig. 7. Induction of Enhanced Apoptotic Cell Death by the Combination of LY294002 and DXR Requires Functional p53 Pathway**  
 (A) A172 cells were transfected with p53 siRNA-A, p53 siRNA-B or the control non-targeting siRNA for 18 h and then were treated with 10  $\mu$ M LY294002, 0.2  $\mu$ M DXR or LY294002 and DXR in combination for the indicated periods of time. Cell lysates were subjected to immunoblot analysis with anti-p53, anti-p21<sup>Cip1</sup> or anti- $\beta$ -actin (loading control) antibody. Proportions of dead cells with fractional DNA content (cells in sub-G1 phase) in cells treated as described above for 48 h are shown in (B). Data are mean  $\pm$  S.D. of three separate experiments, each performed in duplicate. (C) A172 cells were treated with 10  $\mu$ M LY294002, 0.2  $\mu$ M DXR, 1  $\mu$ M TPT, 30  $\mu$ M CDDP, 5  $\mu$ M MMC or 50  $\mu$ M VP-16 for 12 h. Cell lysates were subjected to immunoblot analysis with anti-p53 or anti- $\beta$ -actin (loading control) antibody. (D) A172 cells were mock-treated (Ct) or treated with 10  $\mu$ M LY294002, 0.2  $\mu$ M DXR or LY294002 and DXR in combination for the indicated periods of time. Cell lysates were subjected to immunoblot analysis using anti-phospho-Akt or anti-Akt antibody. (E) A172 cells were treated with the indicated concentrations of C<sub>2</sub>-ceramide for 48 h. Proportions of dead cells with fractional DNA content (cells in sub-G1 phase) are shown. Inset; cell lysates were subjected to immunoblot analysis using anti-phospho-Akt or anti-Akt antibody.



**Fig. 8. Efficient Strategies for the Treatment of Tumor Cells in which the ERK and/or PI3K/Akt Signaling Pathways are Constitutively Activated**  
 In addition to specific blockade of the activated signaling pathways in tumor cells, the combination of other types of agents such as HDAC inhibitors is very important for efficient strategies to the treatment of these tumor cells.

の「がんのオーダーメイド医療」とも言うべき、「がん細胞の特性に基づく分子標的治療」に対して、極めて重要な知見になると考えている。

**謝辞** 本研究は長崎大学大学院医歯薬学総合研究科細胞制御学研究室にて行われたものであり、多大な御協力を頂きました河野通明教授に心より感謝いたします。また、研究遂行に当たり御協力頂きました谷村進博士、藤原雄介博士、蓑田亜依修士、岸川二葉修士、川田敬修士、高野大樹修士、坂元利彰学士、田中将人学士に深謝いたします。この研究の一部は日本学術振興会科学研究費補助金により実施されたことを付記いたします。

**REFERENCES**

1) Downward J., *Nat. Rev. Cancer*, 3, 11-22 (2003).



- 2) Sharma S. V., Gajowniczek P., Way I. P., Lee D. Y., Jiang J., Yuza Y., Classon M., Haber D. A., Settleman J., *Cancer Cells*, **10**, 425–435 (2006).
- 3) Darzynkiewicz Z., Juan G., Li X., Gorczyca W., Murakami T., Traganos F., *Cytometry*, **27**, 1–20 (1999).
- 4) Nagai Y., Miyazawa H., Huqun, Tanaka T., Udagawa K., Kato M., Fukuyama S., Yokote A., Kobayashi K., Kanazawa M., Hagiwara K., *Cancer Res.*, **65**, 7276–7282 (2005).
- 5) Davies H., Bignell G. R., Cox C., Stephens P., Edkins S., Clegg S., Teague J., Woffendin H., Garnett M. J., Bottomley W., Davis N., Dicks E., Ewing R., Floyd Y., Gray K., Hall S., Hawes R., Hughes J., Kosmidou V., Menzies A., Mould C., Parker A., Stevens C., Watt S., Hooper S., Wilson R., Jayatilake H., Gusterson B. A., Cooper C., Shipley J., Hargrave D., Pritchard-Jones K., Maitland N., Chenevix-Trench G., Riggins G. J., Bigner D. D., Palmieri G., Cossu A., Flanagan A., Nicholson A., Ho J. W. C., Leung S. Y., Yuen S. T., Weber B. L., Seigler H. F., Darrow T. L., Paterson H., Marais R., Marshall C. J., Wooster R., Stratton M. R., Futreal P. A., *Nature*, **417**, 949–954 (2002).
- 6) Solit D. B., Garraway L. A., Pratilas C. A., Sawai A., Getz G., Basso A., Ye Q., Lobo J. M., She Y., Osman I., Golub T. R., Sebolt-Leopold J., Sellers W. R., Rosen N., *Nature*, **439**, 358–362 (2006).
- 7) Riedl S. J., Shi Y., *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **5**, 897–907 (2004).
- 8) Ruefli A. A., Ausserlechner M. J., Bernhard D., Sutton V. R., Tainton K. M., Kofler R., Smyth M. J., Johnstone R. W., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **98**, 10833–10838 (2001).
- 9) Rosato R. R., Almenara J. A., Grant S., *Cancer Res.*, **63**, 3637–3645 (2003).
- 10) Ozaki K., Minoda A., Kishikawa F., Kohno M., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **339**, 1171–1177 (2006).
- 11) Vivanco I., Sawyers C. L., *Nat. Rev. Cancer*, **2**, 489–501 (2002).
- 12) Fujiwara Y., Hosokawa Y., Watanabe K., Tanimura S., Ozaki K., Kohno M., *Mol. Cancer Ther.*, **6**, 1133–1142 (2007).
- 13) Matsumoto H., Shimura M., Omatsu T., Okaichi K., Majima H., Ohnishi T., *Cancer Lett.*, **87**, 39–46 (1994).
- 14) Carroll A. G., Voeller H. J., Sugars L., Gelmann E. P., *Prostate*, **23**, 123–134 (1993).
- 15) Lin C. F., Chen C. L., Lin Y. S., *Curr. Med. Chem.*, **13**, 1609–1616 (2006).
- 16) Fujiwara Y., Kawada K., Tanimura S., Ozaki K., Kohno M., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **340**, 560–566 (2006).
- 17) Watanabe K., Noda S., Iwashita K., Tanimura S., Ozaki K., Kohno M., *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.*, **43**, 2891 (2002).