

## 針對癌細胞抗藥性機制的新穎治療策略

梁博煌研究員（生物化學研究所）

### 前言

癌症是引起人類死亡的重大疾病。根據統計102年國人十大死因第一名為惡性腫瘤，癌症死亡人數為44,791人，占所有死亡人數的29.0%，十大癌症死因依序為(1)氣管、支氣管和肺癌；(2)肝和肝內膽管癌；(3)結腸、直腸和肛門癌；(4)女性乳房癌；(5)口腔癌；(6)前列腺(攝護腺)癌；(7)胃癌；(8)胰臟癌；(9)食道癌；(10)子宮頸及部位未明示子宮癌。與上年相較，胃癌與前列腺癌對調。十大癌症死因之標準化死亡率與上年比較多呈下降，惟胰臟癌、口腔癌及食道癌略呈上升。而在美國去年一年男性有約85.5萬、女性有80.6萬人罹癌，而癌症病患的死亡人數男性有約30.7萬、女性有27.3萬人，男性的肺癌女性的肺癌及乳癌獨佔鰲頭。因此治療癌症是生醫研究的重要目標。而人類花費在治療癌症藥品目前排名第一位，預測2016年花費將高達830-880億美金。目前治療癌症以切除為主，無法切除者得以放射性治療或化療。已有諸多標靶的癌症藥物專門針對癌症特殊的標靶，例如激酶的小分子抑制劑及阻礙細胞生長激素受體的抗體等。然而，三陰性乳癌(占所有侵襲性乳癌的15-20%)因缺乏那些標靶治療的受體，仍要依靠化療。但無論化療或標靶治療，經常因抗藥性的產生，而使得治療效果不彰，因此抗藥性是目前癌症治療急需突破的障礙。

### 一、已知的癌細胞抗藥性機制

一般來說，Pharmacokinetics (PK) 因子如藥物吸收、分布、代謝、及排除 (ADME)限制藥物到達腫瘤的量，在腫瘤裡藥物對於癌細胞的效果取決於pharmacodynamics (PD)性質，一個抗癌藥物可被其欠佳的進入及過多的排出所阻礙；另外像藥物被不活化 (inactivation)或不被活化；藥物標的表現量減低；細胞存活的因應被喚醒；及細胞死亡的控制失靈等，這些都是癌症的特徵。綜合影響抗藥性的原因，例如破壞DNA的藥物cisplatin可導致細胞周期停滯，也許給癌細胞機會修補DNA而造成抗藥性。產生細胞毒性的藥物經常會喚醒細胞存活反應，如增進上皮細胞間質轉型(EMT)及自噬作用(autophagy)。另外針對酵素抑制而使癌細胞死亡的抗藥性機制包括開闢重複途徑(redundant pathway)，繞道(oncogenic bypass)等讓酵素抑制劑失效。

就細胞中促進及抑制凋亡 (apoptosis)的機制而言，當細胞受到外界的刺激，例如TNF (tumor necrosis factor), TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand)會經由其受體，透過FADD (FAS-associated protein with death domain)，導致caspase-8的活化，再活化caspase-3及caspase-7讓細胞凋亡。而XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis) 蛋白可結合這些caspases來抑制細胞凋亡，因此XIAP歸類為抗凋亡蛋白 (anti-apoptotic)。另外，caspase-8也會切割BID產生tBID，其會干擾另

一個抗凋亡蛋白Bcl和BAX或BAD結合，來使得cytochrome c從粒腺體釋出。而釋出的cytochrome c會和 APAF(apoptotic protease-activating factor)1 及 Pro-caspase-9 等結合成 apoptosome 使得 caspase-9 活化，而 XIAP 也可和 caspase-9 結合以抑制其活性，因此 XIAP 為一重要的抗凋亡蛋白，其量多時自然產生抗藥性。

XIAP 雖可和 caspase-3、caspase-7 及 caspase-9 結合，但使用不一樣的 domain，利用 BIR(baculovirus IAP repeat)-3 和 caspase-9 結合，但利用 BIR-2 及前面的 linker 和 caspase-3 及 caspase-7 結合，細胞從粒腺體會釋出 SMAC (second mitochondria-derived activator of caspases) 和 XIAP 的 BIR-3 domain 結合而競爭掉 caspase-9，使得 caspase-9 重新獲得活性而使細胞凋亡，因此 SMAC 歸類為促進凋亡蛋白，為了治療癌症，文獻有報導類 SMAC 的小分子天然物 Embelin，藉活化 caspase-9 來促使癌細胞死亡，已經在臨床前試驗，主要適應症為前列腺癌，但發現對含 XIAP 低表達量的正常前列腺上皮細胞有影響。也無法有效活化 caspase-3 及 caspase-7。另外針對 XIAP:caspase-3 標的之 TWX024 和 TPI-1396-34，分別以大腸癌及前列腺癌為主要適應症，但缺點為同時抑制 XIAP:caspase-3 與 XIAP:caspase-7 之交互作用，較不具專一性，因此也會毒殺造血幹細胞。

## 二、本實驗室研發藥物以破壞和抗藥性相關的蛋白質交互作用

為解決上述問題，我們實驗室合成多個含可和半胱氨酸 (cysteines) 共價性鍵結的 iodo-methyl-ketone (iodoacetyl) 的化合物庫來處理癌症細胞，發現其中少數化合物能夠造成有效而專一的癌細胞凋亡。推測這些化合物可和其標靶蛋白的特定半胱氨酸形成共價鍵。利用這些具細胞毒性的化合物接以生物素 (biotin) 或螢光團來發現其標的，有趣的是有一化合物 I-Lys 可以結合到 caspase-7 的半胱氨酸 246 (非活性所需之半胱氨酸) 使其和 XIAP 分離，而活化 caspase-7，導致癌細胞凋亡<sup>1</sup>。而這類癌細胞為何有 XIAP:caspase-7 的過度堆積，乃因其 caspase-3 的彼消此長，細胞藉調低 caspase-3 表現 (負責細胞凋亡主要的蛋白水解酵素) 以逃脫藥物引起細胞凋亡，而此時癌細胞會調高和其結構功能相似的 caspase-7 的表現來維持細胞平衡。從臨床癌症病人檢體也發現 caspase-3 低表現及 XIAP:caspase-7 堆積和乳癌、肺癌、大腸癌病人的低存活率有緊密關聯。又因為在正常細胞並無 XIAP:caspase-7 複體，只解開 XIAP 和 caspase-7 的交互作用而不影響和 caspase-3 的結合，無不良副作用，這也由動物實驗證明。和上述藉結合到 XIAP 來釋出 caspases 不同，我們的策略是利用只結合到 caspase-7 的化合物來釋出 XIAP 以活化 caspase-7 來殺死亡低 caspase-3 表現的抗藥性癌細胞，因此是一個新穎的標靶治療策略。此療法也可搭配化療藥物使用，有協力合作效果 (synergistic effect)，乃因使用化療藥物引發癌細胞凋亡的同時，I-Lys 也同時抑制 XIAP 的作用，使化療藥物的效果更佳。為了驗證是因為 I-Lys 結合到 caspase-7 的 Cys246 而引起細胞凋亡，我們特地把此 Cys 突變成不會形成共價鍵的 Ser，再把突變 caspase-7 送入細胞，則細胞便不會被此化合

物殺死。但因此類化合物不適合作為藥物，藉著之前找到的熱點(hot spot)，我們篩選到具有同樣的效果的小分子可逆型XIAP:caspase-7抑制劑，亦可選擇性殺死caspase-3/低表現抗藥性癌細胞，證明此策略有效，目前正準備進行動物試驗。

我們也發現另一化合物I-Trp會和細胞中的 $\beta$ -tubulin蛋白的Cys354被化合物以共價鍵結合而破壞 $\beta$ -tubulin:CCT- $\beta$ 蛋白複體<sup>2</sup>，使得 $\beta$ -tubulin不穩定，導致內質網壓力(ER-stress)上升而引起細胞凋亡，而引起細胞凋亡<sup>3</sup>。有趣的是我們發現這種造成細胞凋亡的方法在有抗藥性的癌細胞特別有效，此乃這種癌症的CCT- $\beta$ 的表達量較高，CCT- $\beta$ 是CCT (Chaperonin-containing TCP-1為一種chaperonin)的一個次單元，而CCT負責細胞質中約10%蛋白的折疊，包括actin及tubulin等，可以想像癌細胞為維持其生長環境，要倚重CCT的幫忙，我們也發現CCT- $\beta$ 的高表現也會穩定一些抗凋亡蛋白造成抗藥性。另外將此Cys突變成不會形成共價鍵的Ser，再把突變 $\beta$ -tubulin送入細胞，則細胞便不會被I-Trp殺死，可證明是因為 $\beta$ -tubulin與I-Trp的共價性結合而破壞其與CCT- $\beta$ 之複合，才導致細胞凋亡。接著我們又篩選到可逆型具有類似效果的小分子 $\beta$ -tubulin:CCT- $\beta$ 抑制劑，並在細胞及動物實驗證明可有效抑制抗藥性乳癌(抗taxol的MCF-7)及三陰性乳癌MDA-MB231，證明此項對抗抗藥性癌細胞的新策略有效。而藥物的有效反過來說明CCT- $\beta$ 的表達量較高和癌細胞抗藥性有密切相關，其分子機制及藥物最適化(optimization)正是目前我們的研究重點。

### 三、利用癌症樣本的分子與臨床資料為癌症研究趨勢

在上述的研究中我們瞭解到使用臨床病人的資料，存活率及基因表現的關係，以支持實驗結論的重要性。由於癌症起因及特徵非常複雜，是多個基因變異的結果，各國多有基因體計畫，目的在找出潛在標靶或表觀基因體變異，例如國美國家癌症研究院(National Cancer NCI)與美國國家人類基因組研究所(National Human Genome Research Institute, NHGRI)於2006年啟動的癌症基因圖譜(The Cancer Genome Atlas, TCGA)研究，以及其他諸多資料分享平台，若能參考這些癌症樣本的分子與臨床資料資訊，配合實驗數據，定能加速對癌症之治療與生物機制的系統化研究。

### 四、結語

蛋白質的交互作用是細胞中訊息傳遞的媒介，是具潛力的藥物標的，但由於介面大，很難設計小分子來影響蛋白質的交互作用，目前藉破壞蛋白質的交互作用的上市藥物有阻礙integrin結合的心血管藥物Tirofiban<sup>4</sup>及避免gp120和CCR5結合的抗HIV藥物Maraviroc<sup>5</sup>，而干擾細胞表面的receptors和ligands結合的大分子抗體藥物則相當多，但其無法作用於細胞內蛋白質的交互作用。目前有一些破壞胞內蛋白質的交互作用(Protein-Protein Interaction)的小分子藥物正在開發階段，如上述XIAP的拮抗劑<sup>6</sup>，Bcl-2抑制劑等<sup>7</sup>，可見這是一個值得研究並開發藥物的新趨勢。

## 五、參考文獻

1. Lin, Y. F., Lai, T. C., Chang, C. K., Chen, C. L., Huang, M. S., Yang, C. J., Liu, H. G., Dong, J.J., Chou, Y.A., Teng, K. H., Chen, S. H., Tian, W. T., Jan, Y. H., Hsiao, M., and Liang, P. H. (2013) Targeting the XIAP:p19/p12-caspase-7 complex selectively kills caspase-3-deficient malignancies. *J. Clinical Investigation* **123**, 3861-3875.
2. Lin, Y. F., Tsai, W. P., Liu, H. G., and Liang, P. H. (2009) Intracellular  $\beta$ -tubulin/Chaperonin containing TCP1- $\beta$  complex serves as a novel chemotherapeutic target against drug-resistant tumors. *Cancer Research* **69**, 6879-6888.
3. Lin, Y. F., Lee, Y. F., and Liang, P. H. (2012) Targeting  $\beta$ -tubulin:CCT- $\beta$  complexes incurs Hsp90 and VCP-related protein degradation and induces ER stress-associated apoptosis by triggering capacitative  $\text{Ca}^{2+}$  entry, mitochondrial perturbation and caspase overactivation. *Cell Death & Disease* **3**, e434.
4. Hartman, G. D., et al. (1992) Non-peptide fibrinogen receptor antagonists. 1. Discovery and design of exosite inhibitors. *J. Med. Chem.* **35**, 4640-4642.
5. Kuritzkes, D., Kar, S., and Kirkpatrick, P (2007) Maraviroc. *Nat. Rev. Drug Discovery* **7**, 15-16.
6. Fulda, S., and Vucic, D. (2012) Targeting IAP proteins for therapeutic intervention in cancer. *Nat. Rev. Drug Discovery* **11**, 109-123.
7. Wells, J. A., and McClendon, C. L. (2007) Reaching for high-hanging fruit in drug discovery at protein-protein interfaces. *Nature* **450**, 1001-1009.