

(19) 日本国特許庁 (JP)

## (12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2018-520164

(P2018-520164A)

(43) 公表日 平成30年7月26日 (2018.7.26)

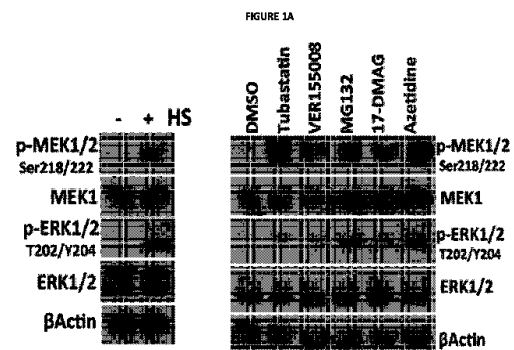
(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>A 6 1 K 45/06 (2006.01)</b>	A 6 1 K 45/06	4 C 0 8 4
<b>A 6 1 P 35/00 (2006.01)</b>	A 6 1 P 35/00	4 C 0 8 6
<b>A 6 1 P 17/00 (2006.01)</b>	A 6 1 P 17/00	
<b>A 6 1 P 43/00 (2006.01)</b>	A 6 1 P 43/00 1 2 1	
<b>A 6 1 K 31/4184 (2006.01)</b>	A 6 1 K 31/4184	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 85 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2018-500632 (P2018-500632)	(71) 出願人	398066918
(86) (22) 出願日	平成27年8月11日 (2015.8.11)		ザ ジャクソン ラボラトリー
(85) 翻訳文提出日	平成30年3月7日 (2018.3.7)		アメリカ合衆国 メイン州 バー ハーバ
(86) 国際出願番号	PCT/US2015/044662		ー メイン ストリート 600
(87) 国際公開番号	W02017/007495	(74) 代理人	100078282
(87) 国際公開日	平成29年1月12日 (2017.1.12)		弁理士 山本 秀策
(31) 優先権主張番号	62/190,563	(74) 代理人	100113413
(32) 優先日	平成27年7月9日 (2015.7.9)		弁理士 森下 夏樹
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(72) 発明者	ダイ, チェンカイ
			アメリカ合衆国 メイン 04609,
			バー ハーバー, メイン ストリート
			600
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 プロテアソームインヒビターと組み合わせてMEKインヒビターを投与することによりがんを処置する方法

## (57) 【要約】

MEKインヒビターをプロテアソームインヒビターと組み合わせて投与する工程を包含する、がんを処置するための方法が、ここで開示される。いくつかの実施形態において、上記がんは、固形腫瘍である。ある場合には、上記がんは、NF1、RAS (N-RAS、K-RAS およびH-RASを含む)、RAF (A-RAF、B-RAF、およびC-RAFを含む)、およびMEK (MEK1およびMEK2を含む) の変異から選択される少なくとも1つの変異を有する。いくつかの実施形態において、上記がんは、プロテアソームインヒビターまたはMEKインヒビターのうちの少なくとも一方での処置に抵抗性である。いくつかの実施形態において、併用療法は、相乗効果を生じる。



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

MEK インヒビターをプロテアソームインヒビターと組み合わせて投与する工程を包含する、がんを処置する方法。

## 【請求項 2】

前記がんは、固形腫瘍である、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 3】

前記固形腫瘍は、胆道（胆管癌）、膀胱がん、脳のがん、乳がん、子宮頸がん、結腸直腸癌、子宮内膜がん、類表皮がん、食道がん、胆嚢がん、胃がん、神経膠芽細胞腫、神経膠腫、頭頸部がん、肝細胞がん（肝がん）、腎臓がん、肺がん、中皮腫、非小細胞肺癌、卵巣がん、膵臓がん、小児悪性疾患、前立腺がん、腎がん、肉腫、皮膚がん（黒色腫を含む）、小腸腺がん、小細胞肺癌、精巣がん、または甲状腺がんである、請求項 2 に記載の方法。

10

## 【請求項 4】

前記固形腫瘍は、黒色腫である、請求項 2 に記載の方法。

## 【請求項 5】

前記がんは、NF 1、RAS（N-RAS、K-RAS、およびH-RASを含む）、RAF（A-RAF、B-RAF、およびC-RAFを含む）、およびMEK（MEK 1 およびMEK 2 を含む）の変異から選択される少なくとも 1 つの変異を有する、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

20

## 【請求項 6】

前記がんは、少なくともRAS変異を有する、請求項 5 に記載の方法。

## 【請求項 7】

前記RAS変異は、少なくともコドン 12、コドン 13、またはコドン 61 にある、請求項 6 に記載の方法。

## 【請求項 8】

前記がんは、少なくともRAF変異を有する、請求項 5 に記載の方法。

## 【請求項 9】

前記RAF変異は、少なくともコドン 600 にある、請求項 8 に記載の方法。

## 【請求項 10】

前記がんは、少なくともMEK 1 またはMEK 2 の変異を有する、請求項 5 に記載の方法。

30

## 【請求項 11】

前記MEK 1 変異は、少なくともP124SまたはS203Kである、請求項 8 に記載の方法。

## 【請求項 12】

前記MEK 2 変異は、少なくともQ60Pである、請求項 8 に記載の方法。

## 【請求項 13】

前記MEK インヒビターは、セルメチニブ（AZD6244）、トラメチニブ（GSK 1120212）、ビニメチニブ（MEK162）、PD-325901、コビメチニブ、PD184352（CI-1040）、U0126-EtOH、レファメチニブ（RDEA119）、PD98059、BIX 02189、ピマセルチブ（AS-703026）、SL-327、BIX 02188、AZD8330、TAK-733、ホノキオール、またはPD318088、PD0325901、WX-554、GDC-0623、E6201、RO4987655、RO5126766である、請求項 1 ~ 12 のいずれか 1 項に記載の方法。

40

## 【請求項 14】

前記MEK インヒビターは、セルメチニブである、請求項 13 に記載の方法。

## 【請求項 15】

前記プロテアソームインヒビターは、ボルテゾミブ、ラクタシスチン、ジスルフィラム

50

、エピガロカテキン - 3 - ガレート、サリノスボラミド A、カルフィルゾミブ、オプロゾミブ ( O N X 0 9 1 2 )、デランゾミブ ( C E P - 1 8 7 7 0 )、M L N 9 7 0 8、エボキシロシニン、M G 1 3 2、イキサゾミブ ( M L N 2 2 3 8 )、P I - 1 8 4 0、またはセラストロールである、請求項 1 ~ 1 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 6】

前記プロテアソームインヒビターは、ボルテゾミブである、請求項 1 5 に記載の方法。

【請求項 1 7】

前記プロテアソームインヒビターおよび前記 M E K インヒビターは、いずれかの薬剤が単独で投与される場合に治療利益を引き起こさない投与量で投与される、請求項 1 ~ 1 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

【請求項 1 8】

セルメチニブは、約 5 m g / K g で投与され、ボルテゾミブは、約 0 . 5 m g / K g で投与される、請求項 1 ~ 1 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 9】

前記がんは、プロテアソームインヒビターまたは M E K インヒビターのうちの少なくとも一方での処置に抵抗性である、請求項 1 ~ 1 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 2 0】

前記併用療法は、相乗効果を生じる、請求項 1 ~ 1 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 2 1】

前記がんは、プロテアソームインヒビターまたは M E K インヒビターのうちの少なくとも一方での処置に抵抗性である、請求項 1 ~ 2 0 のいずれか 1 項に記載の方法。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

この発明は、N a t i o n a l I n s t i t u t e s o f H e a l t h によって付与された助成金第 1 D P 2 O D 0 0 7 0 7 0 号の下、政府の支援を受けてなされた。政府は、本発明に一定の権利を有する。

【0 0 0 2】

分野

プロテアソームインヒビターと組み合わせて M E K インヒビターでがんを処置するための方法。

30

【背景技術】

【0 0 0 3】

背景

がん処置、特に、黒色腫のようながんを処置することが困難ながん処置は、その疾患の顕著な罹患率および死亡率なしに、患者が健康的な生活を取り戻す必要があるという臨床上の利益を達成するために、さらなる進展を要する。

【0 0 0 4】

さらなる研究は、がんの作用機構、および種々のクラスの薬剤の作用機構を理解するために必要とされている。これらの作用機構が一旦認識された後、新たな併用療法アプローチが、これらの作用機構に基づいてその薬剤の相互の効果を増強するために使用され得る。

40

【0 0 0 5】

環境からの攻撃に従って、細胞は、ヒートショックプロテイン ( H S P ) の生成を刺激する。この H S P 誘導は、ヒートショック、またはタンパク質毒性ストレス応答 ( P S R ) の顕著な特徴である ( L i n d q u i s t , 1 9 8 6 )。分子シャペロンとして、H S P は、他のタンパク質の折りたたみ、輸送、および分解を促進する ( M o r i m o t o , 2 0 0 8 )。誤った折りたたみおよび凝集に対してプロテオームを守るにあたって、P S R は、タンパク質恒常性を保存する ( B a l c h r a , 2 0 0 8 )。

【0 0 0 6】

50

脊椎動物において、ヒートショック転写因子（H S F）は、P S Rを左右する。それらの中には、この応答の主要調節因子であるH S F 1がある（M o r i m o t o , 2 0 0 8 ; X i a o ら , 1 9 9 9）。マルチステッププロセスとして、H S F 1 活性化は、トリマー化、核トランスロケーション、翻訳後修飾、およびD N A 結合を必要とする（M o r i m o t o , 2 0 0 8）。しかし、このプロセスの以前の理解は、不完全であった。

#### 【 0 0 0 7 】

このH S F 1 媒介性P S Rは、多くの病理的状态（高体温、重金属被毒（h e a v y - m e t a l t o x i f i c a t i o n）、虚血および再灌流、および酸化的損傷が挙げられる）に拮抗し、加齢および神経変性に影響を与える（D a i ら , 2 0 1 2 a）。H S F 1 は、驚くべきことではないものの、長寿因子として作用する（H s u ら , 2 0 0 3）。対照的に、本発明者らおよび他者の研究は、H S F 1 の腫瘍形成促進（p r o - o n c o g e n i c）の役割を明らかにした（D a i ら , 2 0 0 7 ; D a i ら , 2 0 1 2 b ; J i n ら , 2 0 1 1 ; M e n g ら , 2 0 1 0 ; M i n ら , 2 0 0 7）。非ストレス条件下でのその非必須性にもかかわらず、H S F 1 は、腫瘍細胞の増殖および生存に非常に重要である（D a i ら , 2 0 0 7）。にもかかわらず、悪性疾患におけるその活性化の根底にある機構は不明であった。

10

#### 【 0 0 0 8 】

本明細書では、本発明者らは、R A S - M E K - E R K シグナル伝達がP S Rを厳密に調節することを報告する。それは、H S F 1 をリン酸化し、活性化するM E K である。M E K 阻害は、プロテオームを不安定化し、タンパク質凝集およびアミロイド生成を誘発する。コンビナトリアルプロテアソーム遮断は、この腫瘍抑制性アミロイド生成効果を強く増大させる。

20

#### 【 0 0 0 9 】

M E K インヒビターは、プロテアソームインヒビターと同様に当該分野で公知であったが、本発明より前にそれらを組み合わせる理由も動機づけも存在せず、各処置は、効能のその制限（薬物耐性を含む）を有した。

#### 【 0 0 1 0 】

これを理解して、本発明者らは、M E K インヒビターをプロテアソームインヒビターと組み合わせて投与する工程を包含する、がんを処置するための方法を開発した。本発明者らは、H S F 1 を、M E K（これは、H S F 1 媒介性タンパク質毒性ストレス応答を抑制する）の新たな基質として同定した。本発明者らは、M E K 阻害がタンパク質恒常性を攪乱し、腫瘍抑制性アミロイド生成（t u m o r - s u p p r e s s i v e a m y l o d o g e n e s i s）を誘発することも見出した。本発明者らは、M E K インヒビターとプロテアソームインヒビターとの併用が、いずれかの処置単独にさらなる利点を提供すると考える。

30

#### 【 先行技術文献 】

#### 【 非特許文献 】

#### 【 0 0 1 1 】

【 非特許文献 1 】 H s u ら , S c i e n c e ( 2 0 0 3 ) 3 0 0 , 1 1 4 2 ~ 1 1 4 5

40

【 非特許文献 2 】 D a i ら , C e l l ( 2 0 0 7 ) 1 3 0 , 1 0 0 5 ~ 1 0 1 8

【 非特許文献 3 】 D a i ら , J . C e l l . P h y s i o l . ( 2 0 1 2 ) 2 2 7 , 2 9 8 2 ~ 2 9 8 7

#### 【 発明の概要 】

#### 【 課題を解決するための手段 】

#### 【 0 0 1 2 】

#### 要旨

記載によれば、がんを処置するための方法は、M E K インヒビターをプロテアソームインヒビターと組み合わせて投与する工程を包含する。

#### 【 0 0 1 3 】

50

いくつかの実施形態において、上記がんは、固形腫瘍（例えば、胆道（胆管癌）、膀胱がん、脳のがん（*brain cancer*）、乳がん、子宮頸がん（*cervical cancer*）、結腸直腸癌、子宮内膜がん、類表皮がん、食道がん、胆嚢がん、胃がん（*gastric (stomach) cancer*）、神経膠芽細胞腫、神経膠腫、頭頸部がん、肝細胞がん（肝がん）、腎臓がん、肺がん、中皮腫、非小細胞肺がん、卵巣がん、膵臓がん、小児悪性疾患、前立腺がん、腎がん、肉腫、皮膚がん（黒色腫を含む）、小腸腺がん、小細胞肺がん、精巣がん、または甲状腺がんが挙げられるが、これらに限定されない）である。

#### 【0014】

場合によっては、上記がんは、*NF1*、*RAS*（*N-RAS*、*K-RAS*、および *H-RAS*を含む）、*RAF*（*A-RAF*、*B-RAF*、および *C-RAF*を含む）、および *MEK*（*MEK1*および *MEK2*を含む）の変異から選択される少なくとも1つの変異を有する。例えば、*RAS*変異は、少なくともコドン12、コドン13、またはコドン61にあり得る。いくつかの実施形態において、上記 *RAF* 変異は、少なくともコドン600にある。いくつかの実施形態において、上記 *MEK1* 変異は、少なくとも *P124S* もしくは *S203K* であるか、または上記 *MEK2* 変異は、少なくとも *Q60P* である。

10

#### 【0015】

いくつかの実施形態において、上記 *MEK* インヒビターは、セルメチニブ（*AZD6244*）、トラメチニブ（*GSK1120212*）、ビニメチニブ（*binimetinib*）（*MEK162*）、*PD-325901*、コビメチニブ、*PD184352*（*CI-1040*）、*U0126-EtOH*、レファメチニブ（*RDEA119*）、*PD98059*、*BIX02189*、ピマセルチブ（*pimasertib*）（*AS-703026*）、*SL-327*、*BIX02188*、*AZD8330*、*TAK-733*、ホノキオール、または *PD318088*、*PD0325901*、*WX-554*、*GDC-0623*、*E6201*、*RO4987655*、*RO5126766* である。

20

#### 【0016】

いくつかの実施形態において、上記プロテアソームインヒビターは、ボルテゾミブ、ラクタシスチン、ジスルフィラム、エピガロカテキン-3-ガラート、サリノスポラミドA、カルフィルゾミブ、オプロゾミブ（*oprozomib*）（*ONX0912*）、デランゾミブ（*CEP-18770*）、*MLN9708*、エポキシオミシン、*MG132*、イキサゾミブ（*MLN2238*）、*PI-1840*、またはセラストロールである。

30

#### 【0017】

いくつかの実施形態において、上記プロテアソームインヒビターおよび上記 *MEK* インヒビターは、いずれかの薬剤が単独で投与される場合に治療上の利益を引き起こさない投与量で投与される。いくつかの実施形態において、セルメチニブは、約  $5\text{ mg/Kg}$  で投与され、ボルテゾミブは、約  $0.5\text{ mg/Kg}$  で投与される。

#### 【0018】

いくつかの実施形態において、上記がんは、プロテアソームインヒビターまたは *MEK* インヒビターのうちの少なくとも一方での処置に抵抗性である。いくつかの実施形態において、上記併用療法は、相乗効果を生じる。いくつかの実施形態において、上記がんは、プロテアソームインヒビターまたは *MEK* インヒビターのうちの少なくとも一方での処置に抵抗性である。

40

#### 【0019】

さらなる目的および利点は、一部は以下の詳細な説明に示され、一部は、詳細な説明から明らかであるか、または実施することによって学習され得る。その目的および利点は、添付の特許請求の範囲の中で特に指摘されるエレメントおよび組み合わせによって実現されかつ獲得される。

#### 【0020】

前述の一般的説明および以下の詳細な説明の両方が、例示でありかつ例示に過ぎず、請求項の限定ではないことは、理解されるべきである。

50

## 【 0 0 2 1 】

添付の図面（これは、本明細書の中に組み込まれ、かつ本明細書の一部を構成する）は、一（いくつかの）実施形態を例証し、詳細な説明と一緒にあって、本明細書で記載される原理を説明するのに役立つ。

## 【図面の簡単な説明】

## 【 0 0 2 2 】

【図 1 A】図 1 A ~ O は、MEK および ERK が、PSR を反対方向に調節することを示す。（A）NIH3T3 細胞を、43 において 30 分間 HS で、10  $\mu$ M ツバスタチン A で 5 時間、40  $\mu$ M VER155008 で 1 時間、500 nM MG132 で 1 時間、200 nM 17-DMAg で 1 時間、および 2.5 mM アゼチジンで 15 分間、処理した。（B）その二重 ELK1 レポーター系（血清応答エレメント（SRE）駆動性分泌型胚性アルカリホスファターゼ（SEAP）プラスミドおよび CMV 駆動性 Gaussia ンシフェラーゼ（GLuc）プラスミドを含む）を、HEK293T 細胞へとトランスフェクトした。24 時間後、細胞を（A）にあるように処理し、レポーター活性を測定する前に一晚回復させた（平均  $\pm$  SD、 $n = 6$ 、ANOVA）。（C および D）NIH3T3 細胞を、20  $\mu$ M U0126 または 20 nM AZD6244 で 3 時間処理し、続いて、HS および 4 時間の回復を行った。mRNA レベルを、qRT-PCR によって定量した（平均  $\pm$  SD、 $n = 3$ 、スチューデントの  $t$  検定）。（E）HS の直後に、（C）にあるように処理した NIH3T3 細胞の核タンパク質を抽出して、ELISA ベースのアッセイによって HSF1-DNA 結合を測定した（平均  $\pm$  SD、 $n = 3$ 、ANOVA）。（F）HEK293T 細胞を、二重 HSF1 レポータープラスミド、ヒートショックエレメント（HSE）駆動性 SEAP プラスミドおよび CMV-GLuc プラスミドでトランスフェクトした。24 時間後、細胞を、20  $\mu$ M U0126、20 nM AZD6244、1  $\mu$ M FR180204、または 100 nM Sch772984 で 3 時間処理し、続いて、HS を 30 分間および一晚の回復を行った（平均  $\pm$  SD、 $n = 6$ 、ANOVA）。（G）HEK293T 細胞を、種々のインヒビターで一晩処理した。（H）~（K）LacZ または MEK アイソフォームプラスミドを、二重 HSF1 レポータープラスミドとともに、レンチウイルス shRNA を形質導入した HEK293T 細胞へと共トランスフェクトした。24 時間後、細胞に、43 において 30 分間ヒートショックを与え、続いて、一晚回復させた（平均  $\pm$  SD、 $n = 3$ 、ANOVA）。（L）~（O）HEK293T 細胞を、siRNA で 48 時間トランスフェクトし、続いて、HS の前に二重 HSF1 レポータープラスミドで 24 時間トランスフェクトした（平均  $\pm$  SD、 $n = 6$ 、ANOVA）。図 8 も参照のこと。

【図 1 B】同上。

【図 1 C】同上。

【図 1 D】同上。

【図 1 E】同上。

【図 1 F】同上。

【図 1 G - H】同上。

【図 1 I】同上。

【図 1 J - K】同上。

【図 1 L - M】同上。

【図 1 N - O】同上。

## 【 0 0 2 3 】

【図 2 A】図 2 A ~ J は、ERK、MEK、および HSF1 がストレス誘導性タンパク質複合体を形成することを示す。（A および B）43 において 30 分間の HS の後、内因性 HSF1 タンパク質を、HEK293T 細胞から沈殿させた。WCL：全細胞溶解物；HC：重鎖。（C）内因性 MEK1-HSF1 相互作用を、PLA によって、HeLa 細胞において、ウサギ抗 MEK1 抗体およびマウス抗 HSF1 抗体を使用して検出した。スケールバー：LM に関しては 50  $\mu$ m、HM に関しては 10  $\mu$ m。（D および E）内因性

MEK - HSF 1相互作用を、IPによって、shRNAを安定して発現するHEK 293 T細胞において検出した。(F)内因性MEK - HSF 1相互作用を、siRNAでトランスフェクトしたHEK 293 T細胞で検出した。(G)内因性HSF 1 - MEK相互作用およびHSF 1 - GFP - ERK 1相互作用を、示されたプラスミドでトランスフェクトしたHEK 293 T細胞において検出した。(H)3つの考えられるシナリオの模式的描写。P:リン酸化。(I)HSの直後に、HSF 1 - ERK相互作用を、co-IPによって検出した。(J)内因性ERK - HSF 1相互作用を、shRNAを安定して発現するHEK 293 T細胞において検出した。(KおよびL)内因性ERK - MEK相互作用およびERK - HSF 1相互作用を、PLAによってHeLa細胞において検出した。スケールバー:LMに関しては50 μm、HMに関しては10 μm。図9も参照のこと。

10

【図2B】同上。

【図2C】同上。

【図2D】同上。

【図2E】同上。

【図2F】同上。

【図2G】同上。

【図2H】同上。

【図2I】同上。

【図2J】同上。

【図2K】同上。

【図2L】同上。

20

【0024】

【図3A】図3A~Oは、MEKがSer 326をリン酸化して、HSF 1を活性化することを示す。(AおよびB)HSF 1 Ser 326リン酸化を、shRNAを安定して発現するかまたはMEK 1<sup>DD</sup>プラスミドでトランスフェクトしたHEK 293 T細胞においてイムノプロットすることによって測定した。(C)GFPプラスミドまたはMEK 1<sup>DD</sup>プラスミドを、二重HSF 1レポータープラスミドとともにHEK 293 T細胞へと共トランスフェクトした(平均±SD、n=5、スチューデントのt検定)。(D)コントロールまたはERK標的化siRNA、A(s iERK 1\_\_1およびs iERK 2\_\_1)およびB(s iERK 1\_\_3およびs iERK 2\_\_2)を、shRNAを安定して発現するHEK 293 T細胞へとトランスフェクトした。(E)GFPプラスミドまたはFLAG - HSF 1プラスミドを、二重HSF 1レポータープラスミドとともに、shRNAを安定して発現するHEK 293 T細胞へと共トランスフェクトした(平均±SD、n=6、ANOVA)。(F)FLAG - HSF 1プラスミドを、HSF 1標的化shRNAを安定して発現するHEK 293 T細胞へとトランスフェクトした。HSF 1 - DNA結合を、抗FLAG抗体を使用して図1Eに記載されるようにHS後に測定した。この結果を、核FLAG - HSF 1レベルに対して正規化した(平均±SD、n=3、スチューデントのt検定)。(G)FLAG - HSF 1タンパク質を、20 μg / ml シクロヘキシミドで処理したHEK 293 T細胞において検出した。共発現したGFPタンパク質は、内部コントロールとして働いた。(H)100 ng 精製GST - MEK 1タンパク質を、U0126とともに室温において20分間インキュベートし、続いて、400 ng 精製His - HSF 1タンパク質とともに室温において30分間インキュベートした。HSF 1リン酸化を、イムノプロットングによって検出した。(I)HEK 293 T細胞から沈殿させたERK複合体を、U0126またはFR180204で処理し、続いて、400 ng His - HSF 1、400 ng GST - ERK 1、または1000 ng MBPタンパク質とともにインキュベートした。(J)不活性GST - ERK 1タンパク質を、100 ng GST - MEK 1および400 ng His - HSF 1タンパク質とともに室温において30分間インキュベートした。(K)LacZまたはGFP - ERK 1プラスミドを、MEK 1<sup>WT</sup>またはMEK 1<sup>T292A, T386A</sup>プラスミドとと

30

40

50

もに、MEK 標的化 shRNA を安定して発現する HEK293T 細胞へと共トランスフェクトした。(L) HSF1 Ser326 リン酸化を、示されたプラスミドでトランスフェクトした HEK293T 細胞において検出した。(M) HSF1 活性を、二重レポーター系によって、示されたプラスミドでトランスフェクトした HEK293T 細胞において検出した(平均±SD、n=6、ANOVA)。(N) WM115 細胞を、20 nM AZD6244 または 20 μM U0126 で一晩処理した。(O) HSF1 ChIP アッセイを、DMSO または 20 nM AZD6244 で一晩処理した WM115 細胞を使用して行った。その結果を、IgG コントロールの値に対して正規化した(平均±SD、n=3、ANOVA)。図10も参照のこと。

【図3B-C】同上。

【図3D】同上。

【図3E】同上。

【図3F】同上。

【図3G】同上。

【図3H】同上。

【図3I】同上。

【図3J】同上。

【図3K】同上。

【図3L】同上。

【図3M】同上。

【図3N】同上。

【図3O】同上。

【0025】

【図4A】図4A~Rは、MEKがタンパク質恒常性を保存することを示す。(A) GFP プラスミドおよび GFP - GR プラスミドを、HEK293T 細胞へと共トランスフェクトし、続いて、20 nM AZD6244、20 μM U0126、または 200 nM 17 - DMAG で4時間処理した。(B) GFP - GR プラスミドを、HA - Ub - K48 プラスミド(これは、タンパク質基質へとリジン48を介してのみ結合体化し得る変異体ユビキチンをコードする)とともに HEK293T 細胞へと共トランスフェクトした。20 nM AZD6244 または 200 nM 17 - DMAG で4時間処理した後に、GFP - GR タンパク質を沈殿させ、ユビキチン化を、抗HA抗体を使用して検出した。(C) 変性ホタルルシフェラーゼを、DMSO または 20 nM AZD6244 で処理した A2058 細胞の溶解物とともにインキュベートした(平均±SD、n=4、ANOVA)。(D) A2058 細胞を、20 nM AZD6244 で処理し、ユビキチン化タンパク質を、界面活性剤可溶性および界面活性剤不溶性両方の画分において、Lys48 特異的ユビキチン抗体を使用して検出した。(E) LacZ または HSF1 S326<sup>D</sup> を安定して発現する A2058 細胞を、20 nM AZD6244 で8時間処理した。(F) C57BL/6J マウスに、DMSO または AZD6244 を1週間に3回、2週間にわたって i.p. 注射した。S: 脾臓; K: 腎臓; L: 肝臓。(G) ユビキチン化ペプチドの MS ベースの定量の実験手順、1 処理あたり 2 つの技術的複製物。(H) 処理条件とコントロール条件との間のペプチド存在量における相対的变化の散布図。緑の線および赤の線は、2.5 倍カットオフを示す。(I) 68 種のタンパク質の分類を、PANTHER 遺伝子リスト分析ツール(pantherdb.org)を使用して行った。(J) 遺伝子オントロジー(GO)生物学的プロセスエンリッチメント分析を、ウェブベースの Enrichr ソフトウェアアプリケーションを使用して行った。(K) 68 種のタンパク質の相互作用ネットワーク。公知のおよび推定されるタンパク質相互作用を、STRING データベース(www.string-db.org)から導き出し、そのネットワークを、Cytoscape ソフトウェアを使用して可視化した。(L および M) V5 - TOR1AIP2 プラスミドまたは V5 - RPL3 プラスミドを、HA - Ub - K48 プラスミドとともに HEK293T 細胞へと共トランスフェクトした。8 時間の 20 nM

A Z D 6 2 4 4 処理の後に、タンパク質を、抗 V 5 抗体で沈殿させた。( N ) A Z D 6 2 4 4 処理の後、内因性 c - M Y C タンパク質を、A 2 0 5 8 細胞から沈殿させ、抗ユビキチン抗体でイムノプロットした。( O および P ) V 5 - R P L 1 5 プラスミドおよび V 5 - R P L 3 プラスミドを、H A - U b - K 4 8 プラスミドとともに、s h R N A を安定して発現する H E K 2 9 3 T 細胞へと共トランスフェクトした。細胞を、8 時間、5 0 0 n M M G 1 3 2 単独で処理したか、または 2 0 n M A Z D 6 2 4 4 とともに共処理した。( Q ) 内因性 R P L 1 5 および R P L 3 タンパク質を、2 0 n M A Z D 6 2 4 4 単独で処理したかまたは 5 0 0 n M M G 1 3 2 とともに共処理した A 2 0 5 8 細胞において検出した。( R ) 内因性 R P L 1 5 および R P L 3 タンパク質を、A Z D 6 2 4 4 処理で L a c Z または H S F 1 <sup>S 3 2 6 D</sup> を安定して発現する A 2 0 5 8 細胞において検出した。図 1 1 も参照のこと。

【図 4 B】同上。

【図 4 C】同上。

【図 4 D】同上。

【図 4 E】同上。

【図 4 F】同上。

【図 4 G】同上。

【図 4 H】同上。

【図 4 I】同上。

【図 4 J】同上。

【図 4 K】同上。

【図 4 L - N】同上。

【図 4 O】同上。

【図 4 P】同上。

【図 4 Q】同上。

【図 4 R】同上。

【0 0 2 6】

【図 5 A】図 5 A ~ Y は、M E K およびプロテアソーム阻害がタンパク質凝集およびアミロイド生成を誘発することを示す。( A ~ B ) 2 0 n M A Z D 6 2 4 4、1 0 0 n M ボルテゾミブ、または両方で、2 4 時間処理した W M 1 1 5 細胞を、L y s 4 8 特異的ユビキチン抗体で染色した。矢尻は、ユビキチン陽性凝集物をマークする。スケールバー：1 0 μ m。1 細胞あたりの凝集物の量を、I m a g e J を使用して定量した(メジアン、n = 1 0 0、A N O V A)。( C ~ F ) p o l y Q 7 9 プラスミド単独で、または p o l y Q 7 9 プラスミドおよび H S F 1 <sup>S 3 2 6 D</sup> プラスミドの両方で、1 日トランスフェクションを行った後、H E K 2 9 3 T 細胞を、( A ~ B ) に記載されるとおりのインヒビターで処理した。細胞は、凝集物サイズに関して分析したか、または 1 0 μ M T h T で染色したのいずれかであった。( G ) 処理した腫瘍細胞株を、1 0 μ M T h T で染色した。幾何平均を使用して、T h T 蛍光強度における倍数変化を計算し、その l o g <sub>2</sub> ( F C ) 値を、ヒートマップとして示した。( H ) H E K 2 9 3 T 細胞を、L a c Z または p o l y Q 7 9 プラスミドでトランスフェクトした。処理後、A O を、E L I S A によって A 1 1 抗体を使用して定量した(平均 ± S D、n = 3、A N O V A)。( I ) 内在性の A O を、ヒト腫瘍細胞株において検出した(平均 ± S D、n = 3、A N O V A)。( J および K ) L a c Z または H S F 1 <sup>S 3 2 6 D</sup> を安定して発現する A 2 0 5 8 細胞を、2 4 時間処理した。アミロイドを、E L I S A によって定量した(平均 ± S D、n = 3、スチューデントの t 検定)。( L ) 2 0 μ M 合成 A 1 - 4 2 ペプチドを、室温において穏やかに振盪しながら、インヒビターで処理した A 2 0 5 8 細胞の 2 0 μ g 溶解物とともにインキュベートした。A F 形成を、T h T 結合によってモニターした(平均 ± S D、n = 3、A N O V A)。( M ) T E M 研究(左パネルは 8 0 , 0 0 0 ×、右パネルは 2 0 0 , 0 0 0 ×)に関しては、2 0 μ M 合成 A 1 - 4 2 ペプチドを、3 7 °C において穏やかに振盪しながら 2 日間、P B S 中の A 2 0 5 8 細胞溶解物とともにインキュベートした。ス

10

20

30

40

50

ケールバー：100nm。(N)種々のshRNAを安定して発現するHEK293T細胞を、10μM ThTで染色した。(OおよびP)10μM ThTとともに6時間予備インキュベートした後、A2058細胞を、24時間処理した。アミロイドを定量した(平均±SD、n=3、スチューデントのt検定)。(QおよびR)10μM ThTとともに6時間の予備インキュベーションまたはJBS-Proteoducinを使用して16時間、100ng A11抗体とともにトランスフェクションを行った後、A2058細胞を、24時間処理した。生細胞を、Cell Titer(登録商標)ブルーによって定量した(平均±SD、n=6、スチューデントのt検定)。(SおよびT)LacZまたはHSF1<sup>S326D</sup>を安定して発現するA2058細胞を、DMSOまたは20nM AZD6244で処理した。生細胞を定量した(平均±SD、n=6、ANOVA)。処理後の生細胞における相対的变化を、各時点で、DMSO処理細胞の値に対してAZD6244処理細胞の値を正規化することによって計算した。(U)~(W)20nM AZD6244、100nM ボルテゾミブ、または両方での24時間の処理後に、初代MEFおよびヒト細胞においてAOを定量した(平均±SD、n=3、ANOVA)。(XおよびY)細胞を、50μM Q-VD-OPhで一晩処理し、AOを定量した(平均±SD、n=3、スチューデントのt検定)。図12も参照のこと。

【図5B】同上。

【図5C】同上。

【図5D】同上。

【図5E】同上。

【図5F】同上。

【図5G】同上。

【図5H】同上。

【図5I】同上。

【図5J】同上。

【図5K】同上。

【図5L】同上。

【図5M】同上。

【図5N】同上。

【図5O】同上。

【図5P】同上。

【図5Q】同上。

【図5R】同上。

【図5S】同上。

【図5T】同上。

【図5U】同上。

【図5V】同上。

【図5W】同上。

【図5X】同上。

【図5Y】同上。

【0027】

【図6A】図6A~Nは、MEKおよびプロテアソーム阻害を併用すると、強力な腫瘍抑制効果が発揮されることを示す。(A)20nM AZD6244、100nM ボルテゾミブ、または両方で24時間処理した後、生細胞を、Cell Titer(登録商標)ブルーによって定量した(平均±SD、n=6、ANOVA)。(BおよびC)1×10<sup>6</sup> A2058細胞を、NOD/SCIDマウスにs.c.注射した。7日後、マウスを、DMSO、5mg/Kg AZD6244、0.5mg/Kg ボルテゾミブ、またはその組み合わせで、1週間に3回i.p.注射を介して処理した。腫瘍容積を、毎週カリパスを使用して測定した(平均±SEM、ANOVA)。腫瘍増殖曲線を、指数関数的増殖モデルにフィットさせて、腫瘍倍加時間(DT)を導き出した。カプラン-マイアー生

10

20

30

40

50

存曲線を、各群に関してプロットした（ログ・ランク検定）。（D）タンパク質を、イムノブロッティングによって検出した（1群あたり3腫瘍）。（E）腫瘍溶解物を使用して、AOを定量した（1群あたり5腫瘍）（平均±SD、n=3、ANOVA）。（F）腫瘍溶解物を使用して、A1-42ペプチドを播種した（1群あたり5腫瘍）（平均±SD、n=3、ANOVA）。（G~H）腫瘍切片を、CRで染色した（1群あたり5腫瘍）。10個の無作為の視野を、各切片に対して取った。スケールバー：50μm。各視野における合計CR蛍光を、ImageJを使用して定量し、合計の核に対して正規化した（メジアン、n=50、ANOVA）。（I）CR染色後、腫瘍切片を、偏光顕微鏡法の下で可視化した。スケールバー：50μm。（J）AF特異的抗体（OC）での染色後に、併用処置を受けた腫瘍の切片を、CRでさらに染色した。スケールバー：50μm。（K）ホタルルシフェラーゼ導入遺伝子を安定して発現する1×10<sup>6</sup> A2058細胞を、NOD/SCIDマウスへとi.v.注射した。6週間にわたって、（B）に記載されるように1日後に処理を開始した。体重を毎週モニターした（平均±SD、n=10、ANOVA）。（L）インビボでのバイオルミネッセンス画像化による転移の検出。（M）代表的顕微鏡写真は、肺、骨格筋、骨盤脂肪組織、および卵巣における転移黒色腫を図示する。T：腫瘍；L：肺；M：筋；B：骨；A：脂肪組織；OF：卵胞。スケールバー：500μm。（N）MEKおよびプロテアソーム阻害を併用すると、黒色腫転移が防止される（Barnardの正確検定）。図13および表2も参照のこと。

10

【図6B】同上。

20

【図6C】同上。

【図6D】同上。

【図6E】同上。

【図6F】同上。

【図6G】同上。

【図6H】同上。

【図6I】同上。

【図6J】同上。

【図6K】同上。

【図6L】同上。

30

【図6M】同上。

【図6N】同上。

【0028】

【図7A】図7A~Hは、アミロイド生成が腫瘍増殖を抑制することを示す。（A）併用処置を受けた黒色腫の切片を、切断型カスパーゼ3抗体で染色し、続いて、CR染色を行った。矢尻および矢印は、それぞれ、縮合した核およびフラグメント化した核を示す。スケールバー：50μm。（B）1×10<sup>6</sup> A2058細胞を、NOD/SCIDマウスへとs.c.注射した。7日後、マウスを、併用処置の1日前に、i.p.注射を介して1mg/30g CRで処置した。腫瘍容積を毎週測定した（平均±SD、ANOVA）。（C）CR処理腫瘍の溶解物は、498nmでの吸光度を示した（1群あたり3腫瘍）（平均±SD、n=3）。CRを含む溶解緩衝液を、陽性コントロールとして供した。（D）カプラン-マイアー生存曲線を比較した（ログ・ランク検定）。（EおよびF）腫瘍溶解物の界面活性剤可溶性および界面活性剤不溶性両方の画分を使用して、アミロイドを定量した（1群あたり3腫瘍）（平均±SD、n=3、スチューデントのt検定）。（G）タンパク質を、イムノブロッティングによって検出した（1群あたり3腫瘍）。（H）MEK、ERK、およびHSF1の間の相互作用の模式的説明、ならびにプロテオーム安定性を調節することにおけるその役割。均衡のとれたタンパク質恒常性は、毒性タンパク質凝集およびアミロイド生成を抑制し、それによって、腫瘍生成を促進する。図14も参照のこと。

40

【図7B】同上。

【図7C】同上。

50

【図 7 D】同上。

【図 7 E】同上。

【図 7 F】同上。

【図 7 G】同上。

【図 7 H】同上。

【 0 0 2 9 】

【図 8 A】図 8 A ~ H は、MEK および ERK が P S R を反対に調節することを図示する。この図は、図 1 に関連する。(A) 細胞生存度は、タンパク質毒性ストレスへの一過性の曝露によって損なわれない。NIH3T3 細胞を、図 1 A に記載されるとおりの多様なストレスで処理した。細胞生存度を、Guava Easy Cytometer フローサイトメーターによって、Guava ViaCount<sup>TM</sup> 試薬を使用して測定した (平均 ± SD、n = 5、スチューデントの t 検定)。(B) MEK 遮断は、多様なタンパク質毒性ストレスによって引き起こされる H S F 1 活性化を抑制する。二重 H S F 1 レポータープラスミドでのトランスフェクション後に、HEK293T 細胞を、図 1 B に記載されるとおりの多様なストレスで処理した。処理後、ストレスを除去し、細胞を、新鮮な培地とともに 24 時間インキュベートし、その後、レポーター活性を測定した (平均 ± SD、n = 5、スチューデントの t 検定)。(C) MEK 遮断は、H S F 1 活性化を損ない、ERK 遮断は、H S F 1 活性化を増強する。GFP または H S F 1 プラスミドを二重 H S F 1 レポータープラスミドとともに共トランスフェクションした後に、HEK293T 細胞を、20 μM U0126、20 nM AZD6244、1 μM FR180204、または 100 nM SCH772984 で 24 時間処理し、その後、レポーター活性を測定した (平均 ± SD、n = 6、ANOVA)。(D) MEK および ERK 両方の遮断は、ELK1 を不活性化する。二重 ELK1 レポータープラスミドでトランスフェクトした HEK293T 細胞を、20 μM U0126、20 μM U0126、20 nM AZD6244、1 μM FR180204、または 100 nM SCH772984 で 24 時間処理し、その後レポーター活性を測定した (平均 ± SD、n = 5、ANOVA)。(E および F) ERK1 ノックダウンは、ERK2 mRNA を低減しない。ERK1 mRNA および ERK2 mRNA のレベルは、ERK1 標的化 siRNA でトランスフェクトした HEK293T 細胞において qRT-PCR によって定量した (平均 ± SD、n = 3、ANOVA)。(G および H) ERK2 ノックダウンは、ERK1 mRNA を低減しない。ERK2 mRNA および ERK1 mRNA のレベルは、ERK2 標的化 siRNA でトランスフェクトした HEK293T 細胞において qRT-PCR によって定量した (平均 ± SD、n = 3、ANOVA)。

【図 8 B】同上。

【図 8 C】同上。

【図 8 D】同上。

【図 8 E】同上。

【図 8 F】同上。

【図 8 G】同上。

【図 8 H】同上。

【 0 0 3 0 】

【図 9 A】図 9 A ~ F は、MEK が H S F 1 と物理的に相互作用することを示す。この図は、図 2 に関連する。(A および B) H S F 1 を、MEK1 および MEK2 と共沈させる。FLAG-H S F 1 プラスミドを、HA-MEK1 または MEK2-V5 プラスミドのいずれかとともに HEK293T 細胞へと共トランスフェクトした。HA-Raptor および LacZ-V5 プラスミドは、陰性コントロールとして供した。43 において 30 分間のヒートショック後に、H S F 1 タンパク質を、抗 FLAG アフィニティー樹脂を使用して免疫沈降させた。(C および D) MEK1 および H S F 1 抗体の検証。スクランブルまたは MEK1/2 標的化 shRNA を安定して発現する HeLa 細胞を、ウサギ抗 MEK1 抗体で免疫染色した。スクランブルまたは H S F 1 標的化 shRNA を安定して

発現する H e L a 細胞を、マウス抗 H S F 1 抗体で免疫染色した。スケールバー：50  $\mu$  m。(E) E R K は、H S F 1 活性化を抑制する。G F P または G F P - E R K 1 プラスミドを、二重 H S F 1 レポータープラスミドとともに H E K 2 9 3 T 細胞へと共トランスフェクトした。24 時間後、細胞に、43 において 30 分間のヒートショックを与え、続いて、一晚の回復を行った(平均  $\pm$  S D、n = 6、スチューデントの t 検定)。(F) E R K 1 / 2 抗体の検証。H e L a 細胞を、コントロールまたは E R K 1 / 2 標的化 ( s i E R K 1 \_\_ 3 および s i E R K 2 \_\_ 2 を併用した ) s i R N A でトランスフェクトした。トランスフェクションの 3 日後、細胞を、ウサギ抗 E R K 1 / 2 抗体で免疫染色した。スケールバー：50  $\mu$  m。

【図 9 B】同上。

【図 9 C】同上。

【図 9 D】同上。

【図 9 E】同上。

【図 9 F】同上。

【0031】

【図 10 A】図 10 A ~ H は、M E K が S e r 3 2 6 で H S F 1 をリン酸化することを図示する。この図は、図 3 に関連する。(A) ホスホ - H S F 1 S e r 3 2 6 抗体の検証。F L A G - H S F 1 <sup>W T</sup> または F L A G - H S F 1 <sup>S 3 2 6 A</sup> プラスミドのいずれかを、H S F 1 標的化 s h R N A を安定して発現する H E K 2 9 3 T 細胞へとトランスフェクトした。43 において 30 分間のヒートショックを与えた後、リン酸化したおよび全 H S F 1 タンパク質を、イムノブロットングによって検出した。(B) M E K 遮断は、H S F 1 S e r 3 2 6 リン酸化を損なう。N I H 3 T 3 細胞を、20  $\mu$  M U 0 1 2 6 で 3 時間処理し、続いて、43 において 30 分間のヒートショックを与えた。H S F 1 S e r 3 2 6 リン酸化を、イムノブロットングによって検出した。(C) M E K 遮断は、H S F 1 S e r 3 2 6 リン酸化を損ない、E R K 遮断は、H S F 1 S e r 3 2 6 リン酸化を増強する。20  $\mu$  M U 0 1 2 6、20 n M A Z D 6 2 4 4、1  $\mu$  M F R 1 8 0 2 0 4、または 100 n M S c h 7 7 2 9 8 4 で一晚処理した後、H S F 1 S e r 3 2 6 リン酸化を、イムノブロットングによって H E K 2 9 3 T 細胞において検出した。(D ~ E) S 3 2 6 A 変異は、H S F 1 核トランスロケーションを損なう。H E K 2 9 3 T 細胞を、F L A G - H S F 1 <sup>W T</sup> プラスミドまたは F L A G - H S F 1 <sup>S 3 2 6 A</sup> プラスミドでトランスフェクトした。43 において 30 分間のヒートショックを与えた後、細胞性 F L A G タグ付き H S F 1 タンパク質を、抗 F L A G モノクローナル抗体で免疫染色し、画像を、蛍光顕微鏡法によって取り込んだ。スケールバー：L M に関しては 50  $\mu$  m、H M に関しては 10  $\mu$  m。細胞質および核蛍光シグナルを、C e l l P r o f i l e r 細胞画像分析ソフトウェアを使用して定量し、C / N 比として計算した(メジアン、n > 150、A N O V A)。(F) 急性の M E K 枯渇は、H S F 1 タンパク質を減少させる。H E K 2 9 3 T 細胞を、スクランブルまたは M E K 1 / 2 標的化 s h R N A で 4 日間、一過性にトランスフェクトした。H S F 1 タンパク質を、イムノブロットングによって検出した。(G) E R K 媒介性 H S F 1 S e r 3 0 7 リン酸化は、M E K に依存する。スクランブルまたは M E K 1 / 2 標的化 s h R N A を安定して発現する H E K 2 9 3 T 細胞を、図 3 D に記載されるように、E R K 1 / 2 標的化 s i R N A でトランスフェクトした。ホスホ - H S F 1 S e r 3 0 7 のレベルを、イムノブロットングによって測定した。(H) H S F 1 S e r 3 2 6 リン酸化は、S e r 3 0 7 リン酸化を阻害する。H S F 1 標的化 s h R N A を安定して発現する H E K 2 9 3 T 細胞を、F L A G - H S F 1 <sup>W T</sup> プラスミドまたは F L A G - H S F 1 <sup>S 3 2 6 D</sup> プラスミドでトランスフェクトした。8 時間の 20 n M A Z D 6 2 4 4 処理後、H S F 1 S e r 3 2 6 および S e r 3 0 7 リン酸化を、イムノブロットングによって検出した。

【図 10 B】同上。

【図 10 C】同上。

【図 10 D】同上。

10

20

30

40

50

【図 10 E】同上。

【図 10 F】同上。

【図 10 G】同上。

【図 10 H】同上。

【0032】

【図 11 A】図 11 A ~ P は、MEK がプロテオーム安定性を調節することを示す。この図は、図 4 に関連する。(A) HSF 1 は、GR - GFP タンパク質を安定化する。GR - GFP プラスミドおよび HA - Ub - K48 プラスミドの両方を、LacZ プラスミドまたは FLAG - HSF 1 プラスミドとともに、スクランブルまたは HSF 1 標的化 shRNA を安定して発現する HEK293T 細胞へと共トランスフェクトした。HA - Ub - K48 プラスミドは、リジン 48 を介してのみタンパク質基質に結合体化され得る変異体ユビキチンをコードする。GFP - GR タンパク質を沈殿させ、ユビキチン化を、抗 HA イムノプロットティングによって検出した。(B) HSF 1 は、細胞のシャペロン能 (chaperoning capacity) を維持する。変性ホタルルシフェラーゼを、LacZ プラスミドまたは FLAG - HSF 1 プラスミドでトランスフェクトしたスクランブルまたは HSF 1 標的化 shRNA を安定して発現する HEK293T 細胞から抽出したタンパク質とともにインキュベートした (平均 ± SD、n = 5、ANOVA)。(C) MEK 遮断は、GR タンパク質を不安定化する。GFP プラスミドおよび GR - GFP プラスミドで共トランスフェクトした HEK293T 細胞を、200 nM 17 - DMA G、20 nM AZD6244、または 100 nM ボルテゾミブで 4 時間処理した。GFP および GR - GFP タンパク質のレベルを、イムノプロットティングによって検出した。(D および E) MEK 阻害は、プロテアソーム活性に全く影響を有しない。20 μM U0126、20 nM AZD6244、または 100 nM ボルテゾミブで 4 時間処理した後に、A2058 細胞 (D) および HEK293T 細胞 (E) におけるキモトリプシン様の、トリプシン様の、およびカスパーゼ様のプロテアソーム活性を、それぞれ、25 μM Z - LLL - AMC、Boc - LRR - AMC、および Z - LLE - AMC 基質を使用してインビトロで測定した (平均 ± SD、n = 3、ANOVA)。(F) MEK 欠損は、細胞のシャペロン能を減少させる。インビトロルシフェラーゼ再折りたたみアッセイを、スクランブルまたは MEK 1 / 2 標的化 shRNA を安定して発現する HEK293T 細胞の溶解物を使用して行った (平均 ± SD、n = 5、ANOVA)。(G) HSF 1 は、タンパク質ユビキチン化を抑制する。LacZ プラスミドまたは FLAG - HSF 1 プラスミドを、スクランブルまたは HSF 1 標的化 shRNA を安定して発現する HEK293T 細胞へとトランスフェクトした。Lys48 特異的タンパク質ユビキチン化を、イムノプロットティングによって、界面活性剤可溶性および界面活性剤不溶性両方の画分において検出した。(H) AZD6244 は、HSF 1 ユビキチン化を促進する。A2058 細胞を、20 nM AZD6244 で処理した。内因性 HSF 1 タンパク質を免疫沈降させ、抗ユビキチン抗体でプロットした。(I) MEK 欠損は、タンパク質ユビキチン化を促進する。Lys48 特異的タンパク質ユビキチン化を、イムノプロットティングによって、スクランブルまたは MEK 1 / 2 標的化 shRNA を安定して発現する HEK293T 細胞の界面活性剤可溶性および界面活性剤不溶性両方の画分において検出した。(J) S326D 変異は、HSF 1 タンパク質を、AZD6244 誘導性不安定化に対して抵抗性にする。LacZ または HSF 1<sup>S326D</sup> を安定して発現する A2058 細胞を、20 nM AZD6244 で一晩処理した。(K) 質量分析法による分析の再現性。技術的複製物の変動係数 (CV) の分布のヒストグラムをプロットした。(L) ~ (N) MEK 阻害は、リボソームタンパク質レベルを低減する。V5 タグ付きリボソームタンパク質および HA - Ub - K48 を、HEK293T 細胞において共発現させた。20 nM AZD6244 で 8 時間処理した後に、リボソームタンパク質を、抗 V5 抗体で免疫沈降させ、これらリボソームタンパク質のユビキチン化を、イムノプロットティングによって抗 HA 抗体で検出した。(O および P) MEK および HSF 1 欠損は、リボソームタンパク質を不安定化する。内因性 RPL15 および RPL3 タンパク質を、24 時間の 500 nM

M G 1 3 2 処理ありまたはなしで、スクランブル、M E K 1 / 2 標的化 s h R N A、または H S F 1 標的化 s h R N A を安定して発現する H E K 2 9 3 T 細胞において検出した。

【図 1 1 B】同上。

【図 1 1 C】同上。

【図 1 1 D】同上。

【図 1 1 E】同上。

【図 1 1 F】同上。

【図 1 1 G】同上。

【図 1 1 H】同上。

【図 1 1 I】同上。

【図 1 1 J】同上。

【図 1 1 K】同上。

【図 1 1 L】同上。

【図 1 1 M】同上。

【図 1 1 N】同上。

【図 1 1 O】同上。

【図 1 1 P】同上。

【0 0 3 3】

【図 1 2 A】図 1 2 A ~ U は、M E K およびプロテアソーム阻害がタンパク質恒常性を攪乱することを示す。この図は、図 5 に関連する。(A ~ B) A Z D 6 2 4 4 は、黒色腫細胞において H S F 1 タンパク質を枯渇させる。W M 1 1 5 および A 2 0 5 8 細胞を、2 0 n M A Z D 6 2 4 4、1 0 0 n M ボルテゾミブ、または両方で 2 4 時間処理した。(C) タンパク質凝集物サイズの定量。L a c Z プラスミドまたは p o l y Q 7 9 プラスミドでのトランスフェクションの 4 日後、H E K 2 9 3 T 細胞の界面活性剤不溶性画分を抽出して、M u l t i s i z e r <sup>T M</sup> 3 コールターカウンターを使用して粒子サイズを定量した。(D) H S F 1 は、タンパク質凝集を抑制する。スクランブルまたは H S F 1 標的化 s h R N A を安定して発現する H E K 2 9 3 T 細胞を、p o l y Q 7 9 および L a c Z または F L A G - H S F 1 プラスミドで 2 日間、共トランスフェクトした。凝集物サイズを測定した。(E および F) T h T および C R による無傷の細胞におけるアミロイドの検出。L a c Z または p o l y Q 7 9 プラスミドでトランスフェクトした H E K 2 9 3 T 細胞を、1 0 μ M T h T (E) または 5 0 n M C R (F) で染色し、フローサイトメトリーによって分析した。(G) 処理後に、W M 1 1 5 細胞における内因性アミロイドを、C R 染色によって検出した。(H および I) H S F 1 は、アミロイド生成を抑制する。スクランブルまたは H S F 1 標的化 s h R N A を安定して発現する H E K 2 9 3 T 細胞を、L a c Z または H S F 1 プラスミドのいずれかでトランスフェクトした。アミロイドオリゴマーおよび原線維のレベルを、E L I S A によって定量した(平均 ± S D、n = 3、A N O V A)。(J) H S F 1 欠損細胞は、増強したアミロイド播種能を示す。2 0 μ M 合成 A 1 - 4 2 ペプチドを、スクランブルまたは H S F 1 標的化 s h R N A を安定して発現する H E K 2 9 3 T 細胞の 2 0 μ g 溶解物とともに、室温において穏やかに振盪しながらインキュベートした。アミロイド形成を、T h T 結合によってモニターした(平均 ± S D、n = 3、A N O V A)。(K) M E K およびプロテアソームインヒビターで処理した A 2 0 5 8 細胞の溶解物は、増強した播種能を示す。合成 A 1 - 4 2 ペプチドを、D M S O、2 0 n M A Z D 6 2 4 4、1 0 0 n M ボルテゾミブ、ならびに 2 0 n M A Z D 6 2 4 4 および 1 0 0 n M ボルテゾミブの併用で処理した A 2 0 5 8 細胞の溶解物とともにインキュベートした。アミロイド原線維を、可溶性および不溶性両方の画分において E L I S A によってアミロイド原線維特異的(O C)抗体を使用して検出した(平均 ± S D、n = 3、A N O V A)。(L および M) P S M B 5 ノックダウンは、プロテアソーム機能を損ない、アミロイド播種を増強する。H E K 2 9 3 T 細胞を、2 種の独立した P S M B 5 標的化 s h R N A でトランスフェクトした。(N) ~ (R) M E K およびプロテアソームの遺伝的阻害は、タンパク質恒常性を攪乱し、アミロイド生成を誘発する

10

20

30

40

50

。H E K 2 9 3 T細胞を、M E K 1 / 2、P S M B 5、または両方を標的化するレンチウイルス s h R N Aで形質導入した。タンパク質恒常性の攪乱を、増大したタンパク質ユビキチン化によって証明した ( N )。アミロイド生成効果を、インビトロアミロイド播種アッセイ ( O、平均  $\pm$  S D、n = 3、A N O V A、および P ) ならびに内因性 A O および A F レベルの定量 ( Q および R、平均  $\pm$  S D、n = 3、A N O V A ) によって測定した。T E M 研究 ( P、左パネル 8 0 , 0 0 0  $\times$ 、右パネル 2 0 0 , 0 0 0  $\times$  ) に関しては、2 0  $\mu$  M 合成 A 1 - 4 2 ペプチドを、P B S 中の細胞溶解物とともに、3 7 において穏やかに撹拌しながら 2 6 時間インキュベートした。スケールバー : 1 0 0 n m。注意すべきは、スクランブル細胞の溶解物での播種のみが、乱れた短いプロトフィブリル ( p r o t o f i b r i l ) の形成を生じた。対照的に、M E K 欠損または P S M B 5 欠損細胞の溶解物での播種は、線維様構造または豊富な成熟原線維の密な格子を生じた。( S ) C R は、M E K およびプロテアソームインヒビターで処理した黒色腫細胞の増殖および生存を改善する。A 2 0 5 8 細胞を、1 0  $\mu$  M C R および種々のインヒビターで 2 4 時間共処理した。生細胞を、C e l l T i t e r ブルー ( 登録商標 ) 試薬によって定量した ( 平均  $\pm$  S D、n = 6、スチューデントの t 検定 )。( T ) 主要組織は、M E K 阻害によって誘導されるアミロイド生成に抵抗性である。C 5 7 B L / 6 J マウスを、種々の用量の A Z D 6 2 4 4 で処理し、種々の組織中のアミロイドオリゴマーのレベルを、E L I S A によって測定した ( 平均  $\pm$  S D、n = 2、A N O V A )。( U ) 重篤なタンパク質毒性ストレスは、M E F においてアミロイド生成を誘導し得る。N I H 3 T 3 細胞を、種々の濃度のボルテゾミブで 2 4 時間処理した。内因性アミロイドオリゴマーのレベルを、E L I S A によって定量した ( 平均  $\pm$  S D、n = 3、A N O V A )。

【図 1 2 B】同上。

【図 1 2 C】同上。

【図 1 2 D】同上。

【図 1 2 E】同上。

【図 1 2 F】同上。

【図 1 2 G】同上。

【図 1 2 H】同上。

【図 1 2 I】同上。

【図 1 2 J】同上。

【図 1 2 K】同上。

【図 1 2 L】同上。

【図 1 2 M】同上。

【図 1 2 N】同上。

【図 1 2 O】同上。

【図 1 2 P】同上。

【図 1 2 Q】同上。

【図 1 2 R】同上。

【図 1 2 S】同上。

【図 1 2 T】同上。

【図 1 2 U】同上。

【0 0 3 4】

【図 1 3 A】図 1 3 A ~ J は、M E K およびプロテアソーム阻害の併用が、タンパク質恒常性を攪乱し、インビボ腫瘍増殖を妨げることを図示する。この図は、図 6 に関連する。

( A ) A Z D 6 2 4 4 およびボルテゾミブ処置の併用は、黒色腫増殖を強力に抑制する。腫瘍を、マウスを屠殺したときに解剖し、秤量した ( 平均  $\pm$  S D、A N O V A )。( B ) A Z D 6 2 4 4 およびボルテゾミブ処置の併用は、体重減少を防止する。異種移植前および屠殺時に体重を記録した。腫瘍重量を、総体重から差し引いて、異種移植後の正味の体重を導き出した。結果を、異種移植前後の体重変化として表す ( 対応のあるスチューデントの t 検定 )。( C ~ F ) A Z D 6 2 4 4 は、ボルテゾミブ誘導性 P S R を抑制し、タン

パク質ユビキチン化を増大させる。イムノブロットティングの定量から、図 6 D を得た（平均  $\pm$  S D、 $n = 3$ 、A N O V A）。（G）アミロイドオリゴマーのレベルは、腫瘍重量と反対に相関する。（H）A Z D 6 2 4 4 およびボルテゾミブ処置の併用は、腫瘍の T h T 染色を顕著に増強する。核を、S Y T O 6 2 で染色した。スケールバー：50  $\mu$  m。（I）A Z D 6 2 4 4 およびボルテゾミブ処置の併用は、正常組織においてアミロイド生成を誘導しない。アミロイドオリゴマーを、1 群あたり 3 個のマウス脾臓において、E L I S A によってアッセイした（平均  $\pm$  S D、 $n = 3$ 、A N O V A）。（J）A Z D 6 2 4 4 およびボルテゾミブ処置の併用は、タンパク質ユビキチン化を増大させるが、マウス脾臓においてアポトーシスを誘導しない。L y s 4 8 特異的タンパク質ユビキチン化およびカスパーゼ 3 切断を、イムノブロットティングによって、1 群あたり 3 個の脾臓において測定した。

10

【図 1 3 B】同上。

【図 1 3 C】同上。

【図 1 3 D】同上。

【図 1 3 E】同上。

【図 1 3 F】同上。

【図 1 3 G】同上。

【図 1 3 H】同上。

【図 1 3 I】同上。

【図 1 3 J】同上。

20

【0 0 3 5】

【図 1 4 A】図 1 4 A ~ B は、C R 処置が腫瘍増殖を促進し、M E K およびプロテアソーム阻害の併用によって課された腫瘍抑制に拮抗することを示す。この図は、図 7 に関連する。（A）C R 処置は、インビボでの黒色腫増殖を刺激し、黒色腫を M E K およびプロテアソーム阻害の併用に対して部分的に抵抗性にする。腫瘍を屠殺時に採取し、秤量した（平均  $\pm$  S D、 $n = 10$ 、A N O V A）。（B）C R 処置は、腫瘍を有するマウスにおいて体重減少を増悪させる。異種移植前および屠殺時に、体重を記録した。黒色腫を有するマウスの正味の体重を導き出すために、腫瘍重量を、総体重から差し引いた。結果を、異種移植前後の体重変化として表す（対応のあるスチューデントの  $t$  検定）。

【図 1 4 B】同上。

30

【発明を実施するための形態】

【0 0 3 6】

配列の説明

表 1 は、本明細書で参照されるある特定の配列のリストを提供する。

【表 1】

表 1: 配列の説明		
説明	配列	配列番号
qRT-PCR のためのプライマー配列		
Ms_Hspa1a-F	ATGGACAAGGCGCAGATCC	1
Ms_Hspa1a-R	CTCCGACTTGTCCCCCAT	2
Ms_Hspb1-F	ATCCCCTGAGGGCACACTTA	3
Ms_Hspb1-R	GGAATGGTGATCTCCGCTGAC	4
Ms_Hspa4l-F	TTCTCAACTGCTACATCGCT	5
Ms_Hspa4l-R	CCTGTCGCTGTACTCGTTGG	6
Ms_Hspd1-F	CACAGTCCTTCGCCAGATGAG	7
Ms_Hspd1-R	CTACACCTTGAAGCATTAAAGGCT	8
Ms_Hspe1-F	AGTTTCTTCCGCTCTTTGACAG	9
Ms_Hspe1-R	TGCCACCTTTGGTTACAGTTTC	10
Ms_Hsph1-F	GGGCTAGACGTAGGCTCACA	11
Ms_Hsph1-R	CCACCATTTTTTCATTGGGACCA	12
Ms_Cryab-F	GTTCTTCGGAGAGCACCTGTT	13
Ms_Cryab-R	GAGAGTCCGGTGTCATCCAG	14
Ms_Actb-F	GGCTGTATTCCCCTCCATCG	15
Ms_Actb-R	CCAGTTGGTAACAATGCCATGT	16
Hs_ERK1_F	CTACACGCAGTTGCAGTACAT	17
Hs_ERK1_R	CAGCAGGATCTGGATCTCCC	18
Hs_ERK2_F	TACACCAACCTCTCGTACATCG	19
Hs_ERK2_R	CATGTCTGAAGCGCAGTAAGATT	20
Hs_ACTB_F	CATGTACGTTGCTATCCAGGC	21
Hs_ACTB_R	CTCCTTAATGTCACGCACGAT	22
ChIP のためのプライマー配列		
Hs_HSPA1A-F	GGCGAAACCCCTGGAATATTCCCGA	23
Hs_HSPA1A-R	AGCCTTGGGACAACGGGAG	24
Hs_HSPA4L-F	CTCCTTTCCCGATCCTC	25
Hs_HSPA4L-R	CAACGGCTGCCAAGAAG	26
Hs_HSPB1-F	GTCGCGCTCTCGAATTCAT	27
Hs_HSPB1-R	CCTCCCCATGCACTCCTC	28
Hs_HSPD1-F	GTGTAGACCTTTTAGCCGATGC	29
Hs_HSPD1-R	GTGCCAGTACAGTAGCAGTGG	30
Hs_GAPDH-F	TACTAGCGTTTTACGGGCG	31
Hs_GAPDH-R	TCGAACAGGAGGAGCAGAGAGCGA	32

## 【0037】

## 実施形態の説明

## I. がんを処置するための方法

がんを処置するための方法は、MEK インヒビターをプロテアソームインヒビターと組み合わせて投与する工程を包含する。本発明者らは、HSF1 を MEK（これは、HSF1 媒介性タンパク質毒性ストレス応答を活性化する）の新たな基質として同定した。本発明者らはまた、MEK 阻害がタンパク質恒常性を攪乱し、腫瘍抑制性アミロイド生成を誘発することを見出した。本発明者らは、MEK インヒビターとプロテアソームインヒビターとの併用が、さらなる利点を提供すると考える。

## 【0038】

いくつかの実施形態において、上記がんは、固形腫瘍である。いくつかの実施形態において、上記固形腫瘍は、胆道（胆管癌）、膀胱がん、脳のがん、乳がん、子宮頸がん、結腸直腸癌、子宮内膜がん、類表皮がん、食道がん、胆嚢がん、胃がん、神経膠芽細胞腫、神経膠腫、頭頸部がん、肝細胞がん（肝がん）、腎臓がん、肺がん、中皮腫、非小細胞肺癌、卵巣がん、膵臓がん、小児悪性疾患、前立腺がん、腎がん、肉腫、皮膚がん（黒色

腫を含む)、小腸腺がん、小細胞肺がん、精巣がん、または甲状腺がんである。いくつかの実施形態において、上記固形腫瘍は、黒色腫である。

#### 【0039】

上記方法は、上記がんが少なくとも1つの変異を有する場合にさらなる利点を提供し得る。例えば、上記がんは、NF1、RAS(N-RAS、K-RAS、およびH-RASを含む)、RAF(A-RAF、B-RAF、およびC-RAFを含む)、およびMEK(MEK1およびMEK2を含む)の変異から選択される少なくとも1つの変異を有し得る。

#### 【0040】

RAS変異は、少なくともコドン12、コドン13、またはコドン61にあり得る。RAF変異は、少なくともコドン600にあり得る。MEK1変異は、少なくともP124SまたはS203Kにあり得る。MEK2変異は、少なくともQ60Pにあり得る。患者サンプルにおける変異は、公知のおよび利用可能な技術を使用して決定され得る。

#### 【0041】

上記MEKインヒビターは、セルメチニブ(AZD6244)、トラメチニブ(GSK1120212)、ピメチニブ(MEK162)、PD-325901、コピメチニブ、PD184352(CI-1040)、U0126-EtOH、レファメチニブ(RDEA119)、PD98059、BIX02189、ピマセルチブ(AS-703026)、SL-327、BIX02188、AZD8330、TAK-733、ホノキオール、またはPD318088、PD0325901、WX-554、GDC-0623、E6201、RO4987655、RO5126766から選択され得るが、これらに限定されない。

#### 【0042】

上記プロテアソームインヒビターは、ボルテゾミブ、ラクタシスチン、ジスルフィラム、エピガロカテキン-3-ガラート、サリノスポラミドA、カルフィルゾミブ、オプロゾミブ(ONX0912)、デランゾミブ(CEP-18770)、MLN9708、エポキシオミシン、MG132、イキサゾミブ(MLN2238)、PI-1840、またはセラストロールから選択され得るが、これらに限定されない。

#### 【0043】

いくつかの実施形態において、上記プロテアソームインヒビターおよび上記MEKインヒビターは、いずれかの薬剤が単独で投与される場合に治療上の利益を引き起こさない投与量で投与される。いくつかの実施形態において、上記セルメチニブは、5mg/kgで投与され得、上記ボルテゾミブは、0.5mg/kgで投与され得る。

#### 【0044】

上記方法は、上記がんが、プロテアソームインヒビターまたはMEKインヒビターのうちの少なくとも一方での処置に抵抗性である場合にさらなる利点を示し得る。いくつかの実施形態において、上記併用療法は、相乗効果を生じ得る。いくつかの実施形態において、上記がんは、プロテアソームインヒビターまたはMEKインヒビターのうちの少なくとも一方(MEKインヒビターなしで投与されるプロテアソームインヒビターおよび/またはプロテアソームインヒビターなしで投与されるMEKインヒビターを意味する)での処置に対して抵抗性であるが、上記2種の薬剤の併用は、一方または両方が単独で関連し得る抵抗性を克服する。

#### II. 薬学的組成物および投与

上記MEKインヒビターおよび上記プロテアソームインヒビターは、別個の組成物において調製され得るか、またはそれらは、単一の合わされた投与形態へと製剤化され得る。例えば、上記インヒビターは、錠剤またはカプセル剤として調製され得る。両方の薬剤は、単一の錠剤もしくはカプセル剤の中に、二層錠剤もしくはカプセル剤の中の別個の区画として、または別個の錠剤またはカプセル剤の中に、共製剤化され得る。別の実施形態において、上記インヒビターは、非経口投与経路を介する投与前に、注射用水で混合されるべき乾燥粉末化形態で調製され得る。このような実施形態において、それらは、同じバイ

10

20

30

40

50

アルの中に共製剤化されてもよいし、それらは患者への投与のために別個に調製されてもよい。

上記インヒビターが別個に製剤化される場合、それらは、同時にまたは逐次的な順序で（同日にまたは異なる日に、のいずれも含む）投与され得る。

#### 【実施例】

#### 【0045】

##### 実施例1．実験手順

##### A．近傍ライゲーションアッセイ

細胞を、PBS中の4%ホルムアルデヒドで、15分間室温において固定した。0.3% Triton X-100を含むPBS中の5% ヤギ血清でブロッキングした後、細胞を、ブロッキング緩衝液中で1:200希釈した1対のウサギおよびマウス一次抗体とともに、一晚4℃においてインキュベートした。Duolink（登録商標）PLA（登録商標）抗ウサギプラスおよび抗マウスマイナスプローブ（OLINK Bioscience）とともに37℃において1時間インキュベートした後、ライゲーション、ローリングサークル増幅、および検出を、Duolink（登録商標）In Situ Detection Reagents Red（OLINK Bioscience）を使用して行った。核を、Hoechst 33342で染色した。シグナルを、Leica TCS SP5共焦点顕微鏡を使用して可視化した。

10

#### 【0046】

##### B．腫瘍切片のCRおよびThT染色

脱パラフィン化および再湿潤化（rehydration）の後に、腫瘍切片を、PBS中の0.5% CRで室温において20分間染色し、続いて、アルカリ性溶液（0.01% NaOH、50% アルコール）中で区別した。核を、Hoechst 33342またはヘマトキシリンのいずれかで染色した。Leica TCS SP5共焦点顕微鏡を使用して蛍光を可視化し、偏光フィルタを装備したLeica DM5000B正立顕微鏡を使用して複屈折を可視化した。ThT染色のために、切片を、PBS中の0.2% ThTで室温において10分間染色し、1% 酢酸中で2分間すすぎ、ddH<sub>2</sub>Oで3回洗浄した。核を、SYTO（登録商標）62（Life Technologies）で染色した。

20

#### 【0047】

##### C．黒色腫異種移植片モデル

A2058細胞を、9週齢の雌性NOD.CB17-Prkdc<sup>scid</sup>/J（NOD/SCID）マウス（The Jackson Laboratory）の左側腹部にs.c.注射した。CR処置のために、マウスに、AZD6244およびボルテゾミブ処置の併用の1日前に、PBSまたはCRをi.p.注射した。腫瘍容積を、式 $4/3 \pi R^3$ に従って計算した。実験的転移のために、操作したA2058細胞を、10週齢の雌性NOD/SCIDマウスへと、尾静脈注射を介して移植した。全てのマウス実験を、The Jackson Laboratory動物実験委員会によって承認されるプロトコルの下で行った。

30

#### 【0048】

##### D．統計方法

全ての統計分析を、Prism 6.0（GraphPadソフトウェア）を使用して行った。統計的有意性：\*  $p < 0.05$ ； \*\*  $p < 0.01$ ； \*\*\*  $p < 0.001$ 。

40

#### 【0049】

##### E．補足実験手順

##### 1．配列

qRT-PCRのためのプライマー配列を表1（配列番号1～22）に提供し、ChIPのためのプライマー配列を表1（配列番号23～32）に提供する。

#### 【0050】

50

## 2. 細胞、組織および試薬

WM115、WM278、およびA2058を除く全ての腫瘍細胞株は、以前に記載された(Daira, 2007)。WM115およびWM278細胞は、Luke Whitesell博士から親切にも贈られた。A2058細胞は、ATCCから購入した。全ての細胞培養物を、10% ウシ胎仔血清を補充したDMEM中で維持した。初代ヒト乳腺上皮細胞(PHMC)を、Lonzaから購入し、完全乳腺上皮細胞培地(Sciencell Research Laboratories)中でポリ-L-リジン被覆プレート上で培養した。初代ヒトシュワン細胞(PHSC)を、Sciencell Research Laboratoriesから購入し、完全シュワン細胞培地(Sciencell Research Laboratories)中でポリ-L-リジン被覆プレート上で培養した。

10

### 【0051】

HSP72(ADI-SPA-812)、HSP25(ADI-SPA-801)、HSP27(G3.1)、およびホスホ-MBP T98(P12)に対する抗体を、Enzo(登録商標) Life Sciencesから購入した；ラットモノクローナルHSF1(10H8)抗体、マウスモノクローナルHSF1(E-4)抗体、ウサギHSF1抗体(H-311)、ウサギp-HSF1 Ser307、ウサギMEK1抗体(C-18)、ウサギMEK2抗体(N-20)、ユビキチン抗体(P4D1)-HRP、およびウサギc-Myc抗体(N-262)を、Santa Cruz Biotechnologyから購入した；全MEK1/2(D1A5)、ホスホ-MEK1/2 S218/222(41G9)、全ERK1/2(137F5)、ホスホ-ERK1/2 T202/Y204(D13.14.4E)、ホスホ-MSK1 T581、MEK1(61B12)、切断型カスパーゼ3 Asp175(D3E9)、GFP(D5.1)、およびGSTタグ(91G1)に対する抗体は、Cell Signaling Technology製であった；ホスホ-MEK1 T292、ホスホ-MEK1 T386、およびLys48特異的ユビキチン(Apu2)に対する抗体は、Millipore製であった；そして全MSK1抗体、アクチン抗体-HRP、GAPDH抗体-HRP、HA抗体-HRP、およびFLAG抗体-HRPの結合体は、GenScript製であった。p-HSF1 Ser326(EP1713Y)、6xHisタグ(GT359)、RPL15、およびRPL3に対する抗体は、GeneTex製であった。マウスモノクローナル抗V5抗体は、Life Technologies製であった。

20

30

### 【0052】

以下の化学物質を、商業的供給源から購入した：U0126(Cell Signaling Technology)、FR180204(Tocris Bioscience)、(S)-MG132(Cayman Chemical)、VER155008(Tocris Bioscience)、17-DMAG(LC Laboratories)、ボルテゾミブ(LC Laboratories)、AZD6244(CheemieTek)、ツバスタチンA(CheemieTek)、アゼチジン(Bachem Americas)、およびQ-VD-OPH(APEXBio)。

40

### 【0053】

以下の精製組換えタンパク質を、商業的供給源から購入した：Hisタグ付きヒトHSF1タンパク質(Enzo Life Sciences)；GSTおよびGSTタグ付き活性ヒトMEK1(SignalChem)；GSTタグ付き不活性ヒトERK1タンパク質(Life Technologies)；ならびにウシミエリン塩基性タンパク質(Sigma-Aldrich)。

### 【0054】

細胞質画分および核画分を、Thermo ScientificのNE-PER核タンパク質抽出キットを使用して調製した。

### 【0055】

この研究において使用されるプラスミドは、以下を含む：pLenti6-LacZ -

50

V5およびpLenti6-MEK2-V5 (Gateway (登録商標) LR反応を介してpDONR223ベクターから生成)、Natalie AhnのpMCL-HA-MEK1 (Addgene #40808)、pMCL-HA-MEK1 T292A、T386A (HA-MEK1部位指向性変異誘発によって生成)、Rony SegerのpGFP-ERK1 (Addgene #14747)、Clontech Laboratories Inc.のpHSE-SEAPおよびpSRE-SEAP、ThermoFisher Scientific Inc.のpCMV-Gaussialルシフェラーゼ、Junying YuanのHA-Q79-GFP (Addgene #21159)、HA-Q79 (GFP配列を除去することによってHA-Q79-GFPプラスミドから生成)、David SabatiniのpRK5-HA-Raptor (Addgene #8531)、Ian MacaraのpK7-GR-GFP (Addgene #15534)、Ted DawsonのpRK5-HA-Ubiquitin-K48 (Addgene #17605)、pLX304-TOR1AIP2-V5 (DNASU #HsCD00436680)、pLX304-RPL3-V5 (DNASU #HsCD00435139)、pLX304-RPL15-V5 (DNASU #HsCD00439802)、pLX304-RPS20-V5 (DNASU #HsCD00443007)、pLX304-RPL24-V5 (DNASU #HsCD00442995)、Robert KingstonのpBabe-FLAG-HSF1 (Addgene #1948)、pBabe-FLAG-HSF1 S326AおよびS326D (部位指向性変異誘発によってFLAG-HSF1から生成)、ならびにpLenti6-FLAG-HSF1 (Gateway (登録商標) LR反応を介して生成)。

#### 【0056】

##### 3. リアルタイム定量的RT-PCR

全RNAを、RNA STAT-60試薬 (Tel-Test, Inc.) を使用して抽出し、RNAを、Verso cDNA合成キット (Thermo Fisher Scientific) を使用して逆転写のために使用した。等量のcDNAを、DynaMo SYBR Green qPCRキット (Thermo Fisher Scientific) を使用して定量的PCR反応のために使用した。シグナルを、ABI 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) によって検出した。各遺伝子に関する個々のプライマーの配列を、補足資料中に列挙する。

#### 【0057】

##### 4. トランスフェクションおよびルシフェラーゼレポーターアッセイ

プラスミドを、TurboFectトランスフェクション試薬 (Thermo Scientific) でトランスフェクトした。培養上清中のSEAPおよびルシフェラーゼ活性を、それぞれ、Ziva (登録商標) Ultra SEAP Plus Detection Kit (Jaden Bioscience) およびGaussial Luciferase Glow Assay Kit (Thermo Scientific) を使用して定量した。ルミネッセンスシグナルを、VICTOR<sup>3</sup> Multilabelプレートリーダー (PerkinElmer) によって測定した。

#### 【0058】

##### 5. ELISAベースのHSF1-DNA結合アッセイ

ビオチン化理想HSE (

#### 【化1】

5'-CTAGAAGCTTCTAGAAGCTTCTAG-3'

(太字は、HSF1によって認識されるヌクレオチド配列を示し、5'末端にビオチンが付加される) オリゴヌクレオチドは、自己アニールして、アニーリング緩衝液 (10 mM Tris (pH 7.5)、50 mM NaCl、1 mM EDTA) 中で2本鎖DNAプローブを形成した。HSF1結合のためのこれらのプローブを固定化するために、P

B S中に希釈した100 $\mu$ lの500nM ビオチン化HSEプローブを、Neutraavidin被覆96ウェルプレート(Thermo Fisher Scientific)に添加し、4 において一晚インキュベートした。PBSで1回洗浄した後、ウェルを、200 $\mu$ l SuperBlockブロッキング緩衝液(Thermo Fisher Scientific)とともに室温において1時間インキュベートした。1 $\times$  DNA結合緩衝液(10mM Tris、50mM NaCl、1mM EDTA、5% グリセロール、pH7.5)で1回洗浄した後、1 $\times$  DNA結合緩衝液中で希釈した100 $\mu$ l 核タンパク質を、各ウェルに添加し、室温において40分間インキュベートした。その捕捉したタンパク質-DNA結合を、上記ウェルを、1 $\times$  DNA結合緩衝液中で希釈した1% ホルムアルデヒドとともに室温において5分間、直ぐインキュベートすることによって安定化した。1 $\times$  DNA結合緩衝液で3回洗浄した後、各ウェルを、SuperBlockブロッキング緩衝液中に1:1000希釈した100 $\mu$ l ウサギHSF1抗体(B7109、Assay Biotechnology Company, Inc.)とともに、室温において2時間インキュベートした。TBS-Tで洗浄した後、各ウェルを、上記ブロッキング緩衝液中で希釈したHRP結合体化抗マウスIgG二次抗体とともに室温において1時間インキュベートした。徹底的にTBSで洗浄した後、比色シグナルを、1-Step Ultra TMB-ELISA基質(Thermo Fisher Scientific)を使用して発色させた。

10

#### 【0059】

##### 6. siRNAおよびshRNAノックダウン

20

陰性コントロールsiRNA(これは、ヒトおよびマウスにおける既知の遺伝子を標的としない)を、Thermo Fisher Scientific(D-001810-01)から購入した。siERK1\_\_1(SIHK1207)、siERK1\_\_2(SIHK1208)、siERK1\_\_3(SIHK1209)、siERK2\_\_1(SIHK1183)、およびsiERK2\_\_2(SIHK1184) siRNAを、Sigma-Aldrichから購入した。siRNAを、10nM最終濃度で、Mission(登録商標) siRNAトランスフェクション試薬(Sigma-Aldrich)を使用してトランスフェクトした。MEK1(TRCN0000002329)、MEK2(TRCN0000007006)、MEK1/2(TRCN0000007007)、およびPSMB5(TRC0000003918およびTRC0000003919)を標的とするレンチウイルスshRNAを、Thermo Fisher Scientificから購入した。レンチウイルススクランブルおよびHSF1標的化(hA6)shRNAは、以前に記載された(Daira, 2007)。

30

#### 【0060】

##### 7. イムノブロットングおよび免疫沈降

全細胞タンパク質抽出物を、冷細胞溶解緩衝液(100mM NaCl、30mM Tris-HCl pH7.6、1% Triton X-100、30mM NaF、1mM EDTA、1mM オルトバナジン酸ナトリウム、およびThermo ScientificのHalt<sup>TM</sup> プロテアーゼインヒビターカクテル)中で調製した。タンパク質を、SDS-PAGEゲルで分離し、ニトロセルロース膜に転写した。一次抗体を、洗浄緩衝液中で、一晚4 において添加した。ペルオキシダーゼ結合体化二次抗体を、室温において1時間添加し、シグナルを、SuperSignal West化学発光基質(Thermo Fisher Scientific)によって可視化し、続いてフィルムへ曝露した。

40

#### 【0061】

免疫沈降に関しては、細胞を、CHAPS緩衝液(40mM HEPES pH7.4、120mM NaCl、2mM EDTA、0.3% CHAPS、10mM グリセロホスフェート(glycerophosphate)、50mM NaF、およびHalt<sup>TM</sup> プロテアーゼインヒビターカクテル)中に溶解した。溶解物を、正常ウサギIgG(Santa Cruz Biotechnology)、HSF1抗体(H-311

50

、Santa Cruz Biotechnology)、ERK1/2抗体(Cell Signaling Technology)、または抗FLAG G1アフィニティー樹脂スラリー(GenScript)とともに4 において一晩インキュベートした。プロテインG樹脂(GenScript)を使用して、免疫複合体を沈降させた。溶解緩衝液で3回洗浄した後、タンパク質を、30  $\mu$ l 0.1 M グリシン(pH 2.5)でビーズから溶離し、その後、SDS-PAGEに供した。

#### 【0062】

##### 8. インビトロキナーゼアッセイ

免疫沈降させたERK複合体を、1  $\times$  インビトロキナーゼ緩衝液(25 mM MOPS pH 7.2、12.5 mM - グリセロホスフェート、25 mM MgCl<sub>2</sub>、5 mM EGTA、2 mM EDTA、0.25 mM DTT、およびThermo ScientificのHalt<sup>TM</sup> プロテアーゼインヒビターカクテル)中に再懸濁し、室温において20分間、U0126またはFR180204とともにインキュベートした。100  $\mu$ M ATPおよび精製組換えHisタグ付きHSF1、GSTタグ付きERK1、またはウシMBPタンパク質を添加した後、キナーゼ反応物を、25 において30分間、サーモミキサーで穏やかに振盪しながらインキュベートした。サンプルを、5分間煮沸して、反応を停止させた。

#### 【0063】

##### 9. ルシフェラーゼ再折りたたみアッセイ

組換えホタルルシフェラーゼタンパク質(Promega)を、変性緩衝液(25 mM HEPES (pH 7.5)、50 mM KCl、5 mM MgCl<sub>2</sub>、5 mM -メルカプトエタノール、および6 M グアニジンHCl)とともに37 において20分間インキュベートすることによって変性させた。再折りたたみアッセイを行うために、再折りたたみ緩衝液(25 mM HEPES (pH 7.5)、50 mM KCl、5 mM MgCl<sub>2</sub>、10 mM DTT、および1 mM ATP)中で希釈した200 nM 変性ルシフェラーゼを、受動溶解緩衝液(passive lysis buffer)(10 mM Tris-HCl pH 7.5、2 mM DTT、1% Triton X-100、および2 mM EDTA)中で抽出した5 mg/ml 細胞溶解物とともにインキュベートした。種々の時点で、20  $\mu$ l 再折りたたみ混合物を除去し、再折りたたみ緩衝液中で希釈したD-ルシフェリン(PerkinElmer)とともにインキュベートした。ルミネッセンスシグナルを、VICTOR<sup>3</sup> Multilabelプレートリーダー(PerkinElmer)によって測定した。

#### 【0064】

##### 10. クロマチン免疫沈降

1  $\times$  10<sup>7</sup> 細胞を、1%ホルムアルデヒドで8分間固定し、125 mM グリシンを添加して、架橋を停止させた。冷PBSで洗浄した後、細胞を集め、細胞質抽出緩衝液(20 mM Tris-HCl、85 mM KCl、0.5% Triton X-100、pH 8.0)中で10分間溶解し、続いて、5,000 rpmにおいて5分間遠心分離した。ペレットを、核抽出緩衝液(50 mM Tris-HCl、1% SDS、10 mM EDTA、pH 8.0)中で10分間さらに溶解し、超音波処理してクロマチンを平均長500 bpのフラグメントへと剪断した。16,000  $\times$  gにおいて15分間遠心分離した後、上清を集め、10%をインプット(input)としてとっておいた。その上清を事前にきれいにするために、25  $\mu$ l ChIPグレードのプロテインGアガロースビーズ(Cell Signaling Technology)を添加し、4 において3時間インキュベートした。事前にきれいにした上清を、4  $\mu$ g ウサギ抗HSF1抗体(H-311, Santa Cruz Biotechnology)または4  $\mu$ g 正常ウサギIgGとともに4 において一晩インキュベートし、続いて、25  $\mu$ l ChIPグレードのプロテインGビーズとともに4 において3時間インキュベートした。ビーズを、短時間遠心分離することによってペレットにし、低塩緩衝液、高塩緩衝液、LiCl緩衝液、およびTE緩衝液で逐次的に洗浄した。最後の洗浄の後、50  $\mu$ l

Chelex-100樹脂を各サンプルに、および上記インプットに添加し、そして上記混合物を、99 において10分間煮沸した。架橋を戻すために、40  $\mu$ g プロテイナーゼKを添加し、65 において1時間インキュベートし、次いで、99 において10分間煮沸した。16,000gにおいて2分間遠心分離した後、2  $\mu$ l 上清を、リアルタイムqPCRのために使用した。IPシグナルを、インプットシグナルに対して正規化した。

#### 【0065】

##### 11. 可溶性および不溶性のタンパク質分画

等しい数の細胞を、1% Triton X-100を含む細胞溶解緩衝液とともに氷上で20分間インキュベートした。その粗製溶解物を、500  $\times$  gにおいて2分間、4 10 においてまず遠心分離した。その上清を、20,000  $\times$  gにおいて20分間、4 においてさらに遠心分離した。その最終上清およびペレットを、それぞれ、界面活性剤可溶性画分および界面活性不溶性画分として集めた。不溶性画分を、SDS-PAGEのために、2% SDS中で、高強度においてBioruptor (登録商標) Sonication System (Diagenode Inc.) を使用してさらに超音波処理した。

#### 【0066】

##### 12. フローサイトメトリーのためのThTおよびCR染色

PBSで洗浄した後、細胞を、4%ホルムアルデヒドによって室温において30分間固定した。固定およびPBS洗浄後、細胞を、2ml 透過緩衝液(0.5% Triton X-100、3mM EDTA)中で再懸濁し、氷上で30分間インキュベートした。PBSで洗浄した後、細胞を、PBS中に溶解した10  $\mu$ M ThTまたは50 nM CRで30分間洗浄した。ThT蛍光を、FACSCalibur<sup>TM</sup> フローサイトメーター(BD Biosciences)によって測定した。 20

#### 【0067】

##### 13. ELISAによるアミロイドオリゴマーおよび原線維定量

可溶性アミロイドプレフィブリル状(prefibrillar)オリゴマーを定量するために、PBS中で希釈した20  $\mu$ g 可溶性細胞タンパク質を、96ウェルELISAプレートの各ウェルに関して、4 において一晩インキュベートし、続いて、室温において1時間ブロックした(PBS-T中5% 無脂肪乳)。各ウェルを、100  $\mu$ l アミロイドオリゴマー抗体(A11、ブロッキング緩衝液中で1:1000希釈)とともに室温において2時間インキュベートした。PBS-Tで洗浄した後、ヤギ抗ウサギAb HRP結合体(ブロッキング緩衝液中で1:5000希釈)を各ウェルに添加し、室温において1時間インキュベートした。洗浄後、100  $\mu$ l 1-Step<sup>TM</sup> Ultra TMB-ELISA基質(Thermo Fisher Scientific)を各ウェルに添加した。 30

#### 【0068】

アミロイド原線維を定量するために、界面活性剤不溶性タンパク質を抽出した。簡潔には、全細胞溶解物を、500  $\times$  gにおいて2分間、4 において遠心分離した。その上清を、20,000  $\times$  gにおいて20分間、4 においてさらに遠心分離した。その最終ペレットを、界面活性剤不溶性画分として集め、2% SDSを有するPBS中で10分間の超音波処理によって可溶化した。タンパク質定量後、PBS中に希釈した可溶化タンパク質のうちの10  $\mu$ gを、各ウェルに添加し、37 において、覆いなしで一晩インキュベートして、ウェルを乾燥させた。以下の工程は、一次Abとしてアミロイド原線維抗体(OC)を使用することを除いて、オリゴマー検出と同一であった。 40

#### 【0069】

##### 14. 透過型電子顕微鏡法

インビトロ播種の後、アミロイド原線維をペレット化し、蒸留H<sub>2</sub>O中に再懸濁した。1滴の原線維溶液を、200メッシュ炭素被覆ニッケルグリッド(Electron Microscopy Sciences)上に置いた。1分後、その残っている液体を毛 50

管作用で逃がした。直ぐに、1滴の2% 酢酸ウラニル溶液をそのグリッドの上に1分間置いた。毛管作用で逃がした後、そのグリッドを風乾し、80kVで作動するJ E O L 1230透過型電子顕微鏡(J E O L U S A I n c . )の下で検鏡した。

#### 【0070】

##### 15. バイオルミネッセンス画像化

画像化の前に、Xenolight Redirect D-ルシフェリン(150mg/kg)を、ルシフェラーゼ発現A2058細胞を予め注射したNOD/SCIDマウスへとi.p.注射した。マウスにイソフルランで麻酔をかけ、ルミネッセンスシグナルを、Xenogen IVIS(登録商標) Lumina IIシステム(Caliper Life Sciences)を使用して記録した。背側および腹側の両方の位置からの画像を、取り込んだ。各マウスの全光子フラックスを、Living Image(登録商標)ソフトウェアを使用して定量した。

10

#### 【0071】

##### 16. 凝集物サイズの測定

種々のサンプルに由来する細胞の等しい数を、冷細胞溶解緩衝液で溶解した。20,000×gにおいて15分間、4℃において遠心分離した後、界面活性剤不溶性ペレットを、RIPA緩衝液で3回さらに抽出した。その最終の不溶性ペレットを、ピペッティングすることによって10% SDS中に再懸濁し、直ぐに、20μm開口部を備えたMultisizer<sup>TM</sup> 3コールターカウンター(Beckman Coulter)を使用して、凝集物サイズ分けに供した。

20

#### 【0072】

##### 17. 免疫蛍光染色

PBS中の4%ホルムアルデヒドで室温において15分間固定した後、細胞を、0.3% Triton X-100を含むPBS中の5% ヤギ血清で室温において60分間ブロックし、Lys48特異的ユビキチンAbs(Millipore、ブロッキング緩衝液中で1:500希釈)とともに一晚4℃においてインキュベートした。腫瘍切片のために、抗原を、10mM クエン酸ナトリウム緩衝液中で回収し、続いて、ブロッキングした。切片を、切断型カスパーゼ3 Asp175 Abs(Cell Signaling Technology、ブロッキング緩衝液中で1:500希釈)またはアミロイド原線維(OC)Abs(StressMarq Biosciences、ブロッキング緩衝液中で1:200希釈)のいずれかとともに一晚4℃においてインキュベートした。PBSで洗浄した後、切片を、Alexa Fluor(登録商標) 568または488ヤギ抗ウサギIgG Abs(Life Technologies、ブロッキング緩衝液中で1:1000希釈)とともにインキュベートした。Hoechst 33342核対比染色を行った後、蛍光画像を、Leica TCS SP5共焦点顕微鏡によって取り込んだ。

30

#### 【0073】

##### 18. ユビキチン化プロテオミクス

A2058細胞を、150mm 培養ディッシュ中で増殖させ、DMSOまたは20nM AZD6244で8時間処理した。同じ処理を受けた $2 \times 10^8$  細胞をプールし、液体窒素中で急速凍結した。細胞ユビキチン化のグローバル定量分析(global quantitative analysis)を、ユビキチン分枝(K-ε-GG)モノクローナル抗体によるユビキチン化ペプチドの富化と液体クロマトグラフィータンデム質量分析法(liquid chromatograph tandem mass spectrometry)(LC-MS/MS)とを併用するUbiScan(登録商標)サービス(Cell Signaling Technology)を介して行った。2つの技術的複製物を、各処理に関して分析した。

40

#### 【0074】

##### 19. インビトロアミロイド播種

細胞を、2% PBS中で懸濁し、超音波処理して、溶解物を調製した。播種実験を、

50

96ウェル黒色マイクロプレート(100 $\mu$ l反応容積/ウェル)で行った。各反応物は、80 $\mu$ l PBS中に希釈した20 $\mu$ g 細胞タンパク質および0.01M NaOH中に溶解した10 $\mu$ lの200 $\mu$ M 合成ヒトA1-42ペプチド(GenScript)を含んだ。反応物を、室温において穏やかに振盪しながらインキュベートした。アミロイド形成を検出するために、PBS中に溶解した10 $\mu$ lの100 $\mu$ M ThT(Sigma)を反応物に添加し、蛍光を、Ex450nm/Em482nmにおいて測定した。

#### 【0075】

実施例2. MEKおよびERKは、PSRを反対に調節する

リン酸化は、HSF1活性化に顕著に影響を与える(Guettoucheら, 2005)。このことは、シグナル伝達経路の鍵となる役割を示唆する。このような経路がどのようにPSRを調節するかを解明するために、本発明者らは、RAS-MEK-ERKシグナル伝達に焦点をあてて、ストレスに対するそれらの応答を先ず試験した。タンパク質毒性ストレスを加えるために、本発明者らは、多様な作用機構を有するストレス(ヒートショック(HS)、プロテアソームインヒビターMG132、ヒストンデアセチラーゼ6インヒビターであるツバスタチン、アミノ酸アナログであるアゼチジン、およびHSPインヒビター(HSP90に関しては17-DMAGおよびHSP70に関してはVER155008)を含む)を適用した(Kawaguchiら, 2003; Masseyら, 2010; Morimoto, 2008; Neckers and Workman, 2012)。ストレスへの一過性の曝露は、細胞生存度を損なわなかった(図8A)が、この経路の2つの鍵となる成分であるMEKおよびERKのリン酸化を上昇させた(図1A)。MEK Ser218/222およびERK Thr202/Tyr204リン酸化は、それらの活性状態を表す(Dhillonら, 2007; Roux and Blenis, 2004)。一致して、全てのストレスは、ERKの下流にある転写因子であるELK1(Roux and Blenis, 2004)を活性化させた(図1B)。

#### 【0076】

MEK-ERKシグナル伝達がPSRを調節するか否かを決定するために、本発明者らは、U0126およびAZD6244(2つの特異的MEK1/2インヒビター)(Favataら, 1998; Yehら, 2007)を使用した。両方のインヒビターが、Hsp遺伝子のHS誘導性転写を妨げ、HSF1のDNA結合能および転写活性化を損なった(図1C~1Fおよび8B)。このことは、MEKがHSF1媒介性PSRを活性化することを示唆する。ERK(これはMEKによってリン酸化される(Ahnら, 1991))は、この経路の主要エフェクターとして広く認識されている(Dhillonら, 2007; Roux and Blenis, 2004)。驚くべきことに、ERKインヒビターである、FR180204およびSch772984(Ohoriら, 2005; Morrisら, 2013)は、HSF1を活性化した(図1Fおよび図8C)。MEKインヒビターおよびERKインヒビターの両方が、2つのERK媒介性事象であるMSK1リン酸化およびELK1活性化を損なった(図1Gおよび図8D; Roux and Blenis, 2004)。MEKインヒビターは、ERKリン酸化を低減した一方で、2つのERKインヒビターは、別個の効果を示した(図1G)。Sch772984は、MEK媒介性リン酸化をブロックするERKのコンホメーション変化に恐らく起因して、ERKリン酸化を抑制した(Morrisら, 2013); 逆に、FR180204は、ERKリン酸化を促進した(図1G)。このことは、フィードバックMEK活性化を示唆する。

#### 【0077】

HSF1に対するMEKインヒビターおよびERKインヒビターの影響を、MEKおよびERKの遺伝的枯渇を介して検証した(図1I~1O)。一方のERKアイソフォームの枯渇は、タンパク質レベルで他方のアイソフォームを減少させた(図1Lおよび図1N)一方で、標的化されないアイソフォームのmRNAレベルは、上昇した(図8E~8H

10

20

30

40

50

）。このことは、低減したタンパク質の根底にある転写後機構を示唆する。これらの結果は、P S Rの鍵となる調節因子としてR A S - M E K - E R Kシグナル伝達を際立たせるのみならず、H S F 1に対するM E KおよびE R Kの多様な影響をも明らかにする。

#### 【0078】

実施例3．M E Kは、H S F 1と物理的に相互作用する

M E KがH S F 1を直接的に活性化するか否かを決定するために、本発明者らは、共免疫沈降(c o - I P)によって、内因性M E K - H S F 1相互作用を調べた。M E K 1 / 2タンパク質がH SなしでH S F 1と明らかに沈降しなかった一方で、H Sは、顕著なc o - I Pを引き起こした(図2 Aおよび2 B)。このことは、ストレス誘導性のM E K - H S F 1相互作用を示す。H S F 1の移動度のシフトは、H S誘導性リン酸化をマークする(図2 A)。これらのM E K - H S F 1相互作用を、組換えタンパク質の発現を介して検証した(図9 Aおよび9 B)。M E KおよびH S F 1が直接接触しているかを決定するために、本発明者らは、近傍ライゲーションアッセイ(P L A)技術(C l a u s s o n ら, 2011)を使用した。抗体特異性を、免疫染色することによって検証した(図9 Cおよび9 D)。M E Kが機能する細胞(M E K - p r o f i c i e n t c e l l)において、P L Aシグナルは、H Sなしで僅かに見え、H Sは、これらのシグナルを強めた(図2 C)。M E K欠損細胞において、H Sの後であってもごく弱いシグナルしか検出されなかった(図2 C)。これは、P L Aの特異性を確認する。注意すべきは、P L Aシグナルは、細胞質より核においてより明白であった(図2 C)。このことは、相互作用の顕著に核の局在性を明らかにする。これらの結果は、直接的なM E K - H S F 1会合を強く示唆する。

#### 【0079】

M E K 1およびM E K 2は、インビボでホモダイマーまたはヘテロダイマーのいずれかを形成する(C a t a l a n o t t i ら, 2009)。ダイマーのどちらのタイプがH S F 1を結合するかに取り組むために、本発明者らは、M E K 2の欠損の中でM E K 1 - H S F 1相互作用を調べた。H Sの下では、より多くのM E K 1タンパク質が、M E K 2欠損細胞においてH S F 1とともに沈降した(図2 D)。同様に、M E K 1欠損は、M E K 2 - H S F 1相互作用を高めた(図2 E)。このことは、H S F 1結合に関するその2つのM E Kアイソフォームの間の競合を明らかにし、M E KホモダイマーがH S F 1と相互作用し得ることを示唆する。

#### 【0080】

実施例4．E R KはM E K - H S F 1相互作用を抑制して、H S F 1を不活性化する

E R KがどのようにしてH S F 1を不活性化するかを解明するために、本発明者らは、M E K媒介性H S F 1活性化に対するE R Kの影響をまず調べた。E R K 1枯渇はM E K - H S F 1相互作用を促進した(図2 F)のに対して、E R K 1過剰発現は、これらの相互作用を弱めてH S F 1を抑制した(図2 Gおよび9 E)。従って、本発明者らは、3つの考えられるシナリオを予想した(図2 H)：1)両方のM E K基質、E R KおよびH S F 1が、M E K相互作用に関して競合する；2)E R Kは、M E Kのように、H S F 1を結合し、それによってH S F 1相互作用に関して競合する；ならびに3)E R Kは、H S F 1に向かうM E Kキナーゼ活性を阻害する。この最初の2つのシナリオの各々は、2つのタンパク質複合体の間の競合を推測する；対照的に、第3のシナリオは、E R KがM E KおよびH S F 1と、単一のタンパク質複合体へとアセンブリすることを推定する。興味深いことに、H Sの下では、H S F 1は、M E KおよびE R Kの両方を沈降させ(図2 I)、E R Kは、M E KおよびH S F 1の両方を沈降させた(図2 J)。これらの結果は、独立したM E K - E R K複合体およびM E K - H S F 1複合体の存在を排除しないが、それらは、第1のシナリオで示されるように、その2つの複合体が安定かつ優勢であることの反証となる。第2のシナリオを試験するために、本発明者らは、E R K - H S F 1相互作用をP L Aによって検出した。なぜならこのシナリオは、H S F 1を、E R KおよびM E Kの両方の基質として推定するからである。E R K抗体の特異性を、E R K枯渇細胞において検証した(図9 F)。明らかなM E K 1 - E R K相互作用(図2 K)とは対照的に

、ERK - HSF 1相互作用を示す明らかなPLAシグナルは検出されなかった(図2 L)。このことは、これら2つのタンパク質の間の直接的接触がないことを示唆する。さらに、ERK 1過剰発現はMEK - HSF 1相互作用を弱めた一方で、ERK 1タンパク質は、HSF 1とあまり沈降しなかった(図2 G)。これは、第2のシナリオによって推定される高まったERK 1 - HSF 1相互作用とは矛盾する。従って、これらの結果は、第2のシナリオを却下するのみならず、ERKが、第3のシナリオと一致して、HSF 1とMEKを介して複合体化することをも示唆する。重要なことには、MEK枯渇は、ERK - HSF 1 co-IPを顕著に低下させた(図2 J)。これらの結果は、ERK、MEK、およびHSF 1を含むタンパク質複合体(ここでERKは、HSF 1を間接的に、MEKの阻害を介して抑制する)の存在を示唆する。

10

#### 【0081】

実施例5 . MEKは、Ser 326をリン酸化して、HSF 1を活性化する

HSの下で、HSF 1は、一連のリン酸化事象を受ける。その中でも、Ser 326リン酸化は、その活性化を刺激する(Guetto uche ら, 2005)。しかし、キナーゼの正体は、捕らえにくいままである。MEKがSer 326をリン酸化するか否かを決定するために、本発明者らは、HSF 1<sup>WT</sup>タンパク質を認識するが、HSF 1<sup>S<sup>326</sup>A</sup>タンパク質を認識しないホスト特異的抗体を使用して、この改変に対するMEK遮断の効果を調べた(図10 A)。MEKノックダウンまたはU0126処置のいずれも、Ser 326リン酸化を損なった(図3 Aおよび10 B)。逆に、構成的に活性な変異体であるMEK 1<sup>DD</sup>(S218D/S222D)(Brunet ら, 1994a)は、HSF 1のSer 326リン酸化および活性化をHSなしで誘導した(図3 Bおよび3 C)。ERK阻害は、Ser 326リン酸化を増強し;そして、MEK枯渇は、この効果を破壊した(図3 Dおよび10 C)。このことは、MEK依存性調節を示す。HSF 1<sup>S<sup>326</sup>A</sup>変異体は、損なわれた転写活性を示し(図3 E)、それらの欠陥のある核トランスロケーションおよびDNA結合能と一致する(図10 D~Eおよび図3 F)。さらに、HSF 1タンパク質は、MEK欠損細胞において低下された(図3 Aおよび10 F)。MEKがHSF 1安定性に影響を及ぼすか否かを決定するために、本発明者らは、シクロヘキシミド追跡実験(cycloheximide chase experiment)を行った。MEK枯渇は、HSF 1<sup>WT</sup>タンパク質の半減期を短縮した;重要なことには、HSF 1<sup>S<sup>326</sup>A</sup>変異体は、MEKが機能する細胞においてあまり安定ではなかった一方で、それらの安定性は、MEK欠損によって顕著には影響を受けなかった(図3 G)。このことは、MEKがHSF 1を、Ser 326リン酸化を主に介して安定化することを示唆する。これらの結果は、MEKが、その活性化および安定性にとって不可欠な改変であるインビボでのHSF 1 Ser 326リン酸化を制御することを示す。

20

30

#### 【0082】

インビトロでは、組換えMEK 1タンパク質は、Ser 326においてHSF 1を直接リン酸化した;そしてU0126は、この事象をブロックした(図3 H)。ERKは、HSF 1をSer 307においてリン酸化することが報告された(Chura, 1998)。これは、直接的なERK - HSF 1相互作用を示唆する。ERKによる直接的なSer 326リン酸化を排除するために、本発明者らは、インビトロでのHSF 1リン酸化を、MEKと会合したまたは会合していないERKを含む免疫沈降した内因性ERK複合体を使用して行った。沈降した複合体はSer 326をリン酸化したものの、この事象は、U0126によってブロックされたが、FR180204によってブロックされなかった(図3 I)。U0126は、組換えERK 1タンパク質のリン酸化を同じ沈降物によってブロックしたが、FR180204はそうではなかった(図3 I)。対照的に、FR180204は、ミエリン塩基性タンパク質(MBP)(公知のERK基質(Ahn ら, 1991))のリン酸化を同じ沈降物によってブロックしたが、U0126はそうではなかった(図3 I)。このことは、FR180204によるERK遮断を示す。これらの結果は、MEKが、ERKよりむしろ、Ser 326を直接リン酸化することを強く示唆する。さらに、組換えERK 1タンパク質は、インビボでのERKによるSer 326リン酸化

40

50

の抑制と一致して、組換えMEK1タンパク質によってインビトロでのHSF1 Ser 326リン酸化を妨げた(図3J)。対照的に、ERKは、HSF1 Ser 307リン酸化を促進する。ERK枯渇は、Ser 307リン酸化を低減した;しかし、この効果は、MEK欠損細胞において大きく破壊された(図10G)。このことは、繰り返すと、MEK依存性を示す。MEK阻害は、Ser 326リン酸化を損なったが、HSF1<sup>WT</sup>タンパク質のSer 307リン酸化を増強した(図10H)。興味深いことに、リン酸化模倣(phosphomimetic)変異体であるHSF1<sup>S326D</sup>タンパク質は、低下した基底Ser 307リン酸化を示し、MEK阻害によるこのリン酸化の誘導に抵抗した(図10H)。これらの結果は、MEKによるSer 326リン酸化が、Ser 307リン酸化を抑制し、ERKが、MEK阻害を介してHSF1 Ser 326およびSer 307リン酸化に影響を及ぼすことを裏付ける。活性化ERKは、Thr 292/386をリン酸化して、MEK1を阻害する(Brunetら, 1994b)。MEK1<sup>T292A, T386A</sup>変異体は両方とも、基底HSF1 Ser 326リン酸化を高め、内因性MEKの枯渇した細胞においてこのリン酸化のERK媒介性抑制をブロックした(図3K)。このことは、ERKが、MEKのフィードバックリン酸化を介してSer 326リン酸化を抑制することを示す。

10

#### 【0083】

興味深いことに、ヒト黒色腫において同定された2つのMEK1変異体(P124SおよびE203K(Nikolaevら, 2012))は、構成的なHSF1リン酸化および活性化(図3Lおよび3M)を引き起こした。逆に、ヒト黒色腫細胞において、MEKインヒビターは、構成的HSF1リン酸化およびHSPプロモーターへの結合を損なった(図3Nおよび3O)。これらの結果は、MEKが、ストレスを受けた細胞における誘導性HSF1活性化、および悪性細胞における構成的HSF1活性化の両方を制御することを示す。

20

#### 【0084】

実施例6. MEKは、細胞タンパク質恒常性を保存する

HSF1は、HSPを介して細胞タンパク質恒常性を維持し得る。タンパク質折りたたみに対するHSF1の影響を調べるために、本発明者らは、グルココルチコイドレセプター(GR)をモデルとして使用した。適切なGR折りたたみは、HSP90に依存し、誤って折りたたまれたタンパク質は、ユビキチン-プロテアソーム系によって除去される(Taipaleら, 2010)。HSF1ノックダウンは、GR-GFPユビキチン化および枯渇を誘導した(図11A)。このことは、HSF1欠損によるタンパク質不安定化を示す。このことは、細胞のシャペロン能の低下から生じた。なぜならHSF1欠損細胞の溶解物は、変性ルシフェラーゼを再活性化するにあたってあまり効率的ではなかったからである(図11B)。HSF1欠損に類似して、MEK遮断は、GR-GFPを枯渇させた;そしてこの枯渇は、GFP不安定性または一般的な発現変化に起因しなかった。なぜなら共発現したGFPは、影響を受けなかったからである(図4A)。代わりに、MEK遮断は、GR-GFPをユビキチン化した(図4B)。これは、損なわれたプロテアソーム機能に起因しない。なぜならボルテゾミブによるプロテアソーム阻害は、GR-GFP蓄積を引き起こし、MEKインヒビターは、プロテアソーム活性に影響を及ぼさなかったからである(図11C~11E)。実際に、AZD6244およびMEKノックダウンは両方とも、シャペロン能を枯渇させた(図4Cおよび11F)。このことは、MEKによるタンパク質の折りたたみの調節および安定性を明らかにする。

30

40

#### 【0085】

細胞のプロテオームを左右するにあたってHSF1の鍵となる役割と一致して、HSF1枯渇は、界面活性剤可溶性および界面活性剤不溶性両方の画分において、プロテアソーム分解の改変マーキングタンパク質であるタンパク質Lys 48特異的ユビキチン化(Pickart and Eddins, 2004)を誘導した(図11G)。この変化は、全体のタンパク質不安定化を示唆する。HSF1不活性化と一致して、AZD6244は、Ser 326リン酸化を低減し、HSPを低下させ、全体的なユビキチン化を誘導

50

した(図4D)。一晚のAZD6244処理はまた、HSF1を不安定化した(図4Dおよび図11H)。MEKノックダウンは、全体的なユビキチン化も誘導した(図11I)。重要なことには、AZD6244は、HSF1を枯渇させず、HSF1<sup>S326D</sup>を安定して過剰発現する細胞においてユビキチン化を誘発しなかった(図4Eおよび11J)。このことは、MEK阻害に起因するタンパク質不安定性におけるHSF1不活性化の原因となる役割を示す。インビボでのMEK阻害はまた、HSPおよびHSF1を枯渇させ、そして主要組織においてユビキチン化を誘導した(図4F)。

#### 【0086】

MEK阻害に起因するユビキトーム変化(ubiquitomic change)を調査するために、本発明者らは、新規なユビキチン分枝モチーフ抗体によって富化したユビキチン化ペプチドの質量分析(MS)ベースの分析を行った(図4G; Kimら, 2011)。本発明者らは、AZD6244ありまたはなしで8時間処理したA2058細胞のユビキトームを比較した。合計で、1,715の特有のタンパク質に割り当てられた3,425の非冗長性のユビキチン化ペプチドの概略を描いた(図4Hおよび11K)。AZD6244は、ペプチドユビキチン化を増大も低減もした(図4H)。2.5倍カットオフを、有意な変化として定義した場合、76の非冗長性ペプチドの集まりを区別した。これらのペプチドは、多様な分子機能を果たし、幅広い生物学的プロセスに携わる68の特有のタンパク質を表す。(図4Iおよび4J)。興味をそそることに、最も富化された経路は、翻訳伸長であった(図4J)。これら68のタンパク質の分析から、3つの部分ネットワークを包含する機能的関連ネットワークが明らかになった(図4K)。特に重要なことは、7つのリボソームサブユニットタンパク質からなる「翻訳」部分ネットワークである。これは、リボソーム装置に対するMEKの顕著な影響を強調する。さらに、いくつかの癌遺伝子および腫瘍抑制因子(c-MYC、サイクリンD1、HIF1A、TP53、およびNF1を含む)が、そのネットワーク内に埋め込まれている(図4K)。MEKが腫瘍形成においてこれらの鍵となるプレイヤーを調節することによる機構は、おそらく多面的であるが、蓄積しつつある証拠は、HSPがそれらの安定性を調節することを意味する(Isaacsら, 2002; Muellerら, 2004)。従って、MEKは、これらタンパク質に少なくとも部分的にHSF1を介して影響を及ぼし得る。

#### 【0087】

本発明者らのMS知見を検証するために、本発明者らは、いくつかの標的タンパク質を選択した。Torsin-1A相互作用タンパク質2(TOR1AIP2)およびリボソームタンパク質L3(RPL3)は、それぞれ、ユビキチン化において61.0倍および13.7倍の増大を示した。検出を容易にするために、本発明者らは、V5タグ付きTOR1AIP2およびRPL3タンパク質を、構成的プロモーターを介して発現した。8時間のAZD6244処理は、両方のV5タグ付きタンパク質のレベルを変化させなかったが、それらのユビキチン化を増大させた(図4Lおよび4M)。本発明者らのMSの結果はまた、タンパク質(c-MYC、RPL15、RPL24、およびRPS20を含む)のユビキチン化の低減を明らかにした。本発明者らは、ユビキチン化および内因性c-MYCタンパク質の全体レベルの両方の低下を確認した(図4N)。類似の結果もまた、V5タグ付きRPL15、RPL24、およびRPS20に関して観察された(図11L~11N)。これは、短縮したタンパク質半減期を示唆する。実際に、MG132によるプロテアソーム遮断は、AZD6244によるV5-RPL15枯渇を防止し、その上昇したユビキチン化を明らかにした(図4O)。HSF1不活性化の不可欠な役割と一致して、V5タグ付きRPL15およびRPL3タンパク質の両方が、HSF1ノックダウン後に高度にユビキチン化され、AZD6244は、このユビキチン化にかすかに影響を及ぼした(図4Oおよび4P)。重要なことには、MG132は、内因性RPL15およびRPL3の枯渇を、AZD6244およびMEKノックダウンによって防止した(図4Qおよび11O)。このことは、MEK欠損によるリボソームタンパク質の不安定化を確認する。HSF1ノックダウンは、内因性RPL15およびRPL3を低減する一方で、HS

F 1<sup>S 3 2 6 D</sup>発現は、それらの基底レベルを上昇させ、そしてA Z D 6 2 4 4誘導性枯渇からそれらを保護した(図1 1 Pおよび4 R)。これらの知見はまとめると、MEK阻害がHSF 1を不活性化して、細胞のシャペロン能を枯渇させることを示す。結果として、タンパク質不安定化およびユビキトーム不均衡が後に起こる。

#### 【0088】

実施例7. MEK阻害は、悪性細胞において凝集およびアミロイド生成を誘発する

界面活性剤不溶性画分中の増大したユビキチン化は、タンパク質凝集を示唆する(図4 D)。このことを示すために、本発明者らは、ユビキチン免疫染色を行った。黒色腫細胞を、ボルテゾミブおよびA Z D 6 2 4 4で24時間処理して、明らかな凝集を誘発した。予測されるように、明るい蛍光の斑点状フォーカスが、ユビキチン含有凝集物を画定して、ボルテゾミブ処理細胞において出現した(図5 A ~ B)。A Z D 6 2 4 4はHSF 1を枯渇させ、そしてより少ない程度ではあるが、斑点状フォーカスを誘導した(図1 2 A ~ Bおよび5 A ~ B)。本発明者らは、A Z D 6 2 4 4誘導性の誤って折りたたまれたタンパク質のプロテアソーム分解の遮断が、凝集をさらに悪化させることを理論化した。実際に、ボルテゾミブ共処理は、A Z D 6 2 4 4誘導性の斑点状フォーカスを増大させた(図5 A ~ B)。本発明者らは、拡大型ポリグルタミン鎖タンパク質(expanded polyglutamine tract protein)(poly Q79)(Sanchezら, 2003)を使用して、凝集に対するMEKの影響をさらに確認した。拡大したpoly Qフラグメントを有するタンパク質は、凝集しやすく、神経変性障害に原因として関連する(Orr and Zoghbi, 2007)。Poly Q79発現細胞は、予測されるように、大きな凝集物を含んだ(図1 2 C)。HSF 1ノックダウンおよびA Z D 6 2 4 4はともに、poly Q凝集物を拡大した; 重要なことには、HSF 1<sup>S 3 2 6 D</sup>発現は、A Z D 6 2 4 4誘導性凝集物拡大に拮抗した(図1 2 Dおよび5 C ~ D)。ボルテゾミブはまた、凝集を増強し、併用処置は、最大の凝集物を生じた(図5 C ~ D)。従って、MEKおよびプロテアソームの両方が、タンパク質凝集を抑制する。

#### 【0089】

凝集しやすいタンパク質は、シート構造に関して富化されたアミロイド原線維(AF)を形成し得る(Eisenberg and Jucker, 2012)。HSF 1およびMEKがアミロイド形成に影響を及ぼすか否かを評価するために、本発明者らは、poly Q79発現細胞を、アミロイドを診断するために広く使用されている2種の蛍光色素(Chiti and Dobson, 2006)、チオフラビンT(ThT)およびコンゴレッド(CR)で染色した。Poly Q79発現は、予測されるように、ThTおよびCR染色を増強した(図1 2 Eおよび1 2 F)。A Z D 6 2 4 4、ボルテゾミブ、および併用処理は、この染色をさらに強めた; そして、HSF 1<sup>S 3 2 6 D</sup>発現は、A Z D 6 2 4 4の効果に拮抗した(図5 E ~ F)。処理はまた、ヒト腫瘍細胞株のThTおよびCR染色を増強した(図5 Gおよび1 2 G)。このことは、内因性アミロイド様構造の出現を示唆する。可溶性アミロイドオリゴマー(AO)の存在は、アミロイド生成を確認した。AOは、神経変性障害において鍵となる毒性種を構成すると考えられ、コンホメーション依存性抗体A11(Chiti and Dobson, 2006; Glabe, 2008; Kayeら, 2003)によって検出され得る。処理は、poly Q79によるAO誘導を増悪させるのみならず、ヒト腫瘍細胞株において内因性AOの生成をも誘発した(図5 Hおよび5 I)。A Z D 6 2 4 4に類似して、HSF 1枯渇は、内因性AOおよびAFを誘導した(図1 2 Hおよび1 2 I)。以前に特徴付けられた抗体であるOCを、AFを検出するために使用した(Kayeら, 2007)。繰り返すと、HSF 1<sup>S 3 2 6 D</sup>発現は、A Z D 6 2 4 4誘導性アミロイド生成を抑制した(図5 Jおよび5 K)。

#### 【0090】

アミロイドの特有の特徴は、AFを播種するそれらの能力である(Chiti and Dobson, 2006)。アミロイド播種実験において、HSF 1枯渇細胞の溶解物は、A AFの形成を加速させた(図1 2 J)。同様に、A Z D 6 2 4 4、ボルテゾ

ミブ、および併用で処理した細胞の溶解物は、全て増大した播種効能を示した（図 5 L）。これは、OC 抗体を使用して確認された（図 1 2 K）。HSF 1<sup>S326D</sup>発現は、AZD 6244 の効果を破壊した（図 5 L）。さらに、透過型電子顕微鏡法から、DMSO 処理細胞溶解物での播種は、無秩序のロッド様プロトフィブリルになる一方で、線維様構造の密な格子が AZD 6244 処理溶解物での播種後に出現することが明らかにされた；比較すると、ボルテゾミブ処理溶解物での播種は、成熟原線維を生じ、原線維の詰まったネットワークが、併用処置に由来する溶解物での播種後にアセンブリされた（図 5 M）。

#### 【0091】

AZD 6244 およびボルテゾミブのアミロイド生成効果を、遺伝的に検証した。ボルテゾミブの主要標的である 26S プロテアソームの 5 サブユニット（PSMB5）（Oerlemans ら，2008）の枯渇は、ユビキチン化タンパク質の蓄積を引き起こした（図 1 2 L）。薬理的インヒビターを模倣して、MEK、PSMB5、または両方の遺伝的枯渇は、全てアミロイド生成を誘発した（図 1 2 M ~ 1 2 R および 5 N）。

#### 【0092】

アミロイドがインヒビター誘導性の毒性に寄与するか否かを決定するために、本発明者らは、アミロイド生成を ThT（アミロイド原線維形成を、物理的結合を介して妨げる（Alavez ら，2011））でブロックした。黒色腫細胞において、ThT は、インヒビターによるアミロイド誘導を抑制し、細胞増殖および生存を 50% 改善した（図 5 O、5 P、および 5 Q）。CR 処理および A11 抗体での AO の中和は、類似の保護を発揮した（図 1 2 S および 5 R）。弱められたアミロイド生成と一致して、HSF 1<sup>S326D</sup>発現は、黒色腫細胞の増殖を刺激したのみならず、黒色腫細胞を MEK 阻害に対して不応性にした（図 5 S ~ T）。

#### 【0093】

驚くべきことに、AZD 6244 は、初代マウス胚性線維芽細胞（MEF）および組織において AO を誘導しなかった（図 5 P および 1 2 T）。これは、マウスアミロイドを検出できないことに起因しない。なぜなら重篤なストレスは、マウス細胞において AO を誘導したからである（図 1 2 U）。これらの結果は、形質転換されていない細胞が、悪性細胞よりアミロイド生成に対して不応性であり得ることを示唆する。これを評価するために、本発明者らは、AZD 6244、ボルテゾミブ、および併用で処理した、初代ヒト乳腺上皮細胞（PHMC）、固定化ヒト乳腺上皮（MCF10A）細胞、および腫瘍形成性乳腺上皮（MCF7）細胞において、AO レベルを比較した。これらの 3 種の処理の各々は、MCF7 細胞において顕著な AO 誘導、MCF10A 細胞において僅かな誘導、および PHMC において誘導なしを引き起こした（図 5 V）。類似パターンが、初代ヒトシュワン細胞（PHSC）およびそれらの悪性対応物である 90-8TL 細胞および S462 細胞において観察された（図 5 W）。不死化および形質転換された細胞は、S462 を除いて、AO の上昇した基底レベルも示した（図 5 V および 5 W）。興味をそそることに、AO レベルは、悪性状態と正に相関した（図 5 X）。このことは、プロテオミクス不均衡を悪性疾患の内在する特徴として裏付ける。本発明者らは、S462 細胞において上昇した基底 AO がないことが、アミロイド関連毒性に起因し得ると理論化した。実際に、汎カスパーゼインヒビターによる細胞死の遮断は、不死化および形質転換された細胞において AO レベルを上昇させた。このことは、アミロイド生成を強調し；対照的に、初代細胞において AO を上昇させなかったことを明らかにする（図 5 X および 5 Y）。このことは、アミロイド生成が存在しないことを裏付ける。これらの結果は、悪性細胞が特有にアミロイド生成に感受性であることを示す。

#### 【0094】

実施例 8．プロテアソームおよび MEK 阻害の併用は、腫瘍タンパク質恒常性を攪乱し、悪性疾患を抑制する

MEK およびプロテアソーム阻害は、個々に、ある特定の程度まで、腫瘍細胞においてタンパク質恒常性を攪乱した；しかし、両方の併用は、この効果を増強し、従って、ヒト腫瘍細胞株の増殖および生存を顕著に損なった（図 6 A）。注意すべきは、この併用は、

初代細胞に影響を及ぼさなかった（図 6 A）。

【 0 0 9 5 】

インビボでは、A Z D 6 2 4 4 またはボルテゾミブ単独の低用量は、異種移植された黒色腫に対して顕著な影響を示さなかったのに対して、その併用は、それらの増殖を強力に遅らせた（図 6 B および 1 3 A）。併用処置を受けた全てのマウスは、生存し続け、それらの体重は、一定のままであった；対照的に、他の群における全てのマウスは死滅し、体重の内の約 2 5 % が失われた（図 6 C および 1 3 B）。A Z D 6 2 4 4 またはボルテゾミブ単独は、腫瘍においてユビキチン化を僅かに上昇させた；しかし、その併用は、この効果を顕著に悪化させた（図 6 D および 1 3 C ~ F）。ボルテゾミブは、H S F 1 S e r 3 2 6 リン酸化および H S P 発現を誘導した一方で、A Z D 6 2 4 4 共処置は、このストレス応答を抑制し、カスパーゼ 3 切断を誘導した（図 6 D および 1 3 C ~ F）。よって、A O は、併用処置を受けた腫瘍では顕著に上昇した（図 6 E）。特に重要なのは、A O の量と腫瘍塊との間の逆相関である（図 1 3 G）。このことは、悪性増殖に対する A O の悪影響を裏付ける。アミロイド生成と一致して、併用処置を受けた腫瘍は、強力な播種能力および C R 染色の増強を示した（図 6 F および 6 G - H）。腫瘍内 A F は、C R 染色（図 6 I）、T h T 標識（図 1 3 H）、および O C 抗体での免疫染色（図 6 J）の顕著な特徴である複屈折によってさらに示された。対照的に、その併用処置は、上昇したユビキチン化にもかかわらず、同じ腫瘍を有するマウスの主要組織において A O もアポトーシスも誘導しなかった（図 1 3 I および 1 3 J）。

10

【 0 0 9 6 】

その併用処置が、実験的転移を妨げるか否かを調査するために、本発明者らは、ルシフェラーゼ導入遺伝子を発現する黒色腫を N O D / S C I D マウスへと静脈内注射した。6 週間の期間の間に、併用処置を受けたマウスのみが体重を増大させた（図 6 K）。このことは、健康の改善を示唆する。インビボ画像化から、D M S O、A Z D 6 2 4 4、またはボルテゾミブ単独で処置したマウスのうちの 4 0 % においてルミネッセンスが検出された（図 6 L）。組織学的検査から、肺、骨格筋、脂肪組織、および卵巣への黒色腫転移が確認された（図 6 M および表 2）。対照的に、併用処置を受けたマウスのうちのいずれも、認識できるルミネッセンスも転移も示さなかった（図 6 L および 6 N）。まとめると、これらの結果は、M E K およびプロテアソーム阻害の併用が、腫瘍内でタンパク質毒性ストレスおよびアミロイド生成を誘発し、堅固な抗腫瘍性効果を発揮することを示す。

20

30

【表 2 - 1】

表 2: 黒色腫転移研究のまとめ (図 6 に関連)			
マウス ID 番号	処置	ルミネッセンス	主な組織学的所見
1	DMSO	陽性	大きな侵襲性の黒色腫が筋肉に侵襲し、骨および軟骨に隣り合っている
2	DMSO	陰性	中程度のサイズの黒色腫が侵襲し、部分的に肺と置き換わっている
3	DMSO	陰性	腫瘍性細胞の証拠なし
4	DMSO	陽性	大きな黒色腫、規定された組織位置なし
5	DMSO	陽性	大きな侵襲性の黒色腫が筋肉および骨盤脂肪組織に侵襲している
6	DMSO	陽性	大きな皮下の黒色腫
7	DMSO	陰性	腫瘍性細胞の証拠なし
8	DMSO	陰性	大きな胸腺リンパ腫
9	DMSO	陰性	腫瘍性細胞の証拠なし
10	DMSO	陰性	肺に侵襲している黒色腫の小さな病巣
1	AZD6244	陰性	腫瘍性細胞の証拠なし
2	AZD6244	陰性	腫瘍性細胞の証拠なし
3	AZD6244	陰性	腫瘍性細胞の証拠なし
4	AZD6244	陽性	大きな侵襲性の黒色腫が骨格筋に侵襲し、軟骨に隣り合っている
5	AZD6244	陽性	大きな皮下の黒色腫
6	AZD6244	陰性	腫瘍性細胞の証拠なし
7	AZD6244	陰性	腫瘍性細胞の証拠なし
8	AZD6244	陽性	大きな侵襲性の黒色腫が筋肉に侵襲し、骨に隣り合っている
9	AZD6244	陽性	大きな黒色腫、規定された組織位置なし
10	AZD6244	陰性	大きな侵襲性の黒色腫が侵襲し、卵巣の大部分と置き換わっている
1	VELCADE	陽性	大きな侵襲性の黒色腫が筋肉および骨盤脂肪組織に侵襲している
2	VELCADE	陰性	1つの中程度のサイズの黒色腫が肺を侵襲している
3	VELCADE	陰性	腫瘍性細胞の証拠なし
4	VELCADE	陽性	大きな皮下の黒色腫
5	VELCADE	陽性	大きな侵襲性の黒色腫が筋肉に侵襲し、骨に隣り合っている
6	VELCADE	陰性	腫瘍性細胞の証拠なし
7	VELCADE	陽性	大きな侵襲性の黒色腫が骨格筋を侵襲している
8	VELCADE	陰性	腫瘍性細胞の証拠なし
9	VELCADE	陰性	腫瘍性細胞の証拠なし
10	VELCADE	陰性	腫瘍性細胞の証拠なし

10

20

30

40

【表 2 - 2】

1	AZD+VEL	陰性	腫瘍性細胞の証拠なし
2	AZD+VEL	陰性	腫瘍性細胞の証拠なし
3	AZD+VEL	陰性	腫瘍性細胞の証拠なし
4	AZD+VEL	陰性	腫瘍性細胞の証拠なし
5	AZD+VEL	陰性	腫瘍性細胞の証拠なし
6	AZD+VEL	陰性	腫瘍性細胞の証拠なし
7	AZD+VEL	陰性	腫瘍性細胞の証拠なし
8	AZD+VEL	陰性	腫瘍性細胞の証拠なし
9	AZD+VEL	陰性	腫瘍性細胞の証拠なし
10	AZD+VEL	陰性	腫瘍性細胞の証拠なし

10

## 【0097】

実施例 9 . アミロイド生成は、腫瘍抑制性である

強い C R 染色を示す腫瘍領域における顕著なアポトーシスは、処置誘導性毒性におけるアミロイド生成の原因となる役割を示唆する ( 図 7 A )。これを確認するために、本発明者らは、インビボ C R 投与を介して腫瘍内アミロイド誘導をブロックした。C R は、黒色腫増殖を加速させたのみならず、MEK およびプロテアソーム阻害の併用によって課された腫瘍抑制にも強力に拮抗した ( 図 7 B )。腫瘍組織への C R の浸透は、このアミロイド染色の特徴である 498 nm において腫瘍溶解物の強い光吸収 ( S l a d e w s k i ら , 2006 ) によって示される ( 図 7 C )。増強された悪性疾患と一致して、C R 処置は腫瘍塊を拡大し、身体の状態を悪化させ、そして動物の生存を短くした ( 図 14 A、14 B、および 7 D )。

20

## 【0098】

C R は、腫瘍組織においてアミロイドを低減した一方で、ユビキチン化を低減しなかった ( 図 7 E、7 F、および 7 G )。これらの結果は、MEK およびプロテアソームインヒビターでの C R の干渉はないことを示し、さらに、アミロイド生成をブロックすることにおける C R の特異的作用を裏付ける。加速した増殖に従って、C R 処置マウスは、低下したカスパーゼ 3 切断を示した ( 図 7 G )。まとめると、これらの結果は、アミロイド生成が腫瘍抑制性でありかつ MEK およびプロテアソーム阻害の併用の抗腫瘍性効果に明らかに寄与することを強く示唆する。

30

## 【0099】

実施例 10 . 考察

A . H S F 1 は、新たな MEK 基質である

予測外なことに、本発明者らの結果は、ERK が R A S - R A F - MEK シグナル伝達の効果を専ら起こさせる有力なパラダイムを疑って、MEK の生理的基質としての H S F 1 を明らかにする。本発明者らの結果はさらに、MEK が H S F 1 を活性化するが、ERK が H S F 1 を不活性化することを示す。重要なことには、本発明者らの知見は、これら 2 つの表面上は矛盾する作用を統合し、3 要素からなる ERK - MEK - H S F 1 タンパク質複合体のアセンブリを裏付ける。全体として、本発明者らの知見は、直線的な ( l i n e a r ) というよりむしろ分岐した R A S - R A F - MEK カスケードを提唱する。MEK は、中核 ( c e n t r a l n e x u s ) として、上流の刺激を伝達し、かつ 2 つの不連続であるが相互に連結した下流のエフェクター経路 ( そのうちの一方は、ERK によって媒介され、他方は、H S F 1 によって媒介される ) を左右する ( 図 7 H )。負のフィードバック様式において、ERK は、MEK の阻害性リン酸化を介して H S F 1 活性化を微細に調和させる ( 図 7 H )。本発明者らの研究は、MEK 媒介性 S e r 3 2 6 リン酸化に焦点を当てた一方で、他のキナーゼもまた、H S F 1 を調節し得る。

40

## 【0100】

B . R A S - R A F - MEK シグナル伝達によるタンパク質恒常性の保護

本発明者らの知見は、タンパク質恒常性を調節することにおける R A S - R A F - MEK シグナル伝達の新たな機能を明らかにする。多様なタンパク質毒性ストレスが、一

50

般にMEKを活性化する(図1A)。HSF1活性化を通じて、RAS-RAF-MEKシグナル伝達は、プロテオミクス完全性を保護するために細胞のシャペロン能を高める。

#### 【0101】

MEK-HSF1調節は、鍵となる生理学的関わり合いを有し得る。マイトジェンは、RAS/MAPKシグナル伝達および下流のmTORC1を刺激する(Laplante and Sabatini, 2012)。しかし、mTORC1によって駆動される、高められたタンパク質合成は、細胞のタンパク質品質制御装置を妨げる。従って、MEKを介して、HSF1制御性のシャペロン系を同時に動員して、生産的なタンパク質合成を担保し、それによって、プロテオミクス不均衡を避けることは、マイトジェンにとって必要なようである。興味深いことに、MEKはまた、HSF1を介して翻訳能を左右する(図4K)。従って、RAS-RAF-MEKシグナル伝達は、タンパク質量およびタンパク質品質の制御装置を同期化して、細胞増殖を支援する。

10

#### 【0102】

同様にRAS-RAF-MEKシグナル伝達が、タンパク質の誤った折りたたみによる疾患(protein-misfolding disease)(例えば、アミロイドーシス)に、タンパク質恒常性を守ることを介して拮抗し得ることを推測するように動機付けられる。

#### 【0103】

##### C. がんのプロテオミクス不安定性

本発明者らの知見は、悪性状態のアミロイド生成促進的性質(pro-amyloidogenic nature)を際立たせる。悪性細胞のアミロイド生成に対する感受性は、それらの弱体化したタンパク質恒常性状態からおそらく端を発し、これは、摂動に対して特に脆弱である。形質転換されていない細胞とは異なり、悪性細胞は、アミロイドの上昇した基底レベルによって証明される、プロテオミクス不均衡に絶えず耐えている。(図5Xおよび5Y)。よって、HSF1(さもないと初代細胞では潜伏性である)は、脆いプロテオミクス平衡を保持するために腫瘍細胞において構成的に動員されている(図7H)。プロテオミクスカオス(proteomic chaos)は、HSF1不活性化またはさらに軽度のタンパク質毒性の傷害のいずれかの後に結果として必然的に起こる。よって、腫瘍細胞は、それらの悪性表現型を持続させるためにHSF1に依拠する(Daira, 2007)。対照的に、内在性タンパク質毒性ストレスの欠如は、初代細胞に、強いプロテオミクスの変動を有効に緩衝し、それによって、有害な転帰-凝集およびアミロイド生成を避ける能力を与える。

20

30

#### 【0104】

刺激的なことには、初代細胞と悪性細胞との間でプロテオミクス摂動に対する異なる感受性は、悪性疾患と戦うために活用され得る。本発明者らの知見は、悪性疾患におけるMEK阻害の毒性における、タンパク質毒性ストレスおよびアミロイド生成の重要な役割を裏付ける。タンパク質不安定化を通じて、MEKインヒビターは、プロテアソームインヒビターとは機械論的に異なるタンパク質毒性ストレスとして作用する。単一の薬剤として適用される場合、MEKインヒビターまたはプロテアソームインヒビターは、腫瘍タンパク質恒常性を弱らせる能力はない。しかし、併用して適用すると、アミロイド生成を惹起して、甚大な影響を発揮する。重要なことには、本発明者らの知見は、アミロイド生成の腫瘍抑制性の性質を強く示唆する(図5O~5Rおよび7B)。これらの知見は、アミロイド生成が、相当のプロテオミクス不均衡を示して、腫瘍進行をモニターしかつ治療応答を評価するにあたって、予後における価値があり得ることを暗示する。概念的には、本発明者らの知見は、プロテオミクス不安定性が悪性状態に関連した内在的特徴であり、従って脆い腫瘍タンパク質恒常性の攪乱が実現可能な治療的ストラテジーであり得ることを示唆する。

40

#### 【0105】

##### 実施例11. 処置方法

転移性黒色腫を有する患者を、MEKインヒビターおよびプロテアソームインヒビター

50

の併用で処置する。すなわち、上記患者を、MEKインヒビターとしてのセルメチニブおよびプロテアソームインヒビターとしてのボルテゾミブで処置する。セルメチニブを、毎日の静脈内注射に関しては水で乾燥粉末を再構成した後に0.32 mg/kgで、または毎日の経口投与を通じて食品とともに0.64 mg/kgで、投与する。ボルテゾミブを、毎日の静脈内注射に関しては水で乾燥粉末を再構成した後に0.04 mg/kgで投与する。

#### 【0106】

その患者は、腫瘍増殖、腫瘍のサイズ、または他の臨床的徴候および黒色腫の症状の低減を示すと予測される。

#### 【化2】

10

#### 参考文献

- [00106] Tang, Z., Dai, S., He, Y., Doty, R., Shultz, L.D., Sampson, S.B., and Dai, C. (2015). MEK Guards Proteome Stability and Inhibits Tumor-Suppressive Amyloidogenesis via HSF1. *Cell* 160, 729-744, which is incorporated by reference herein.
- [00107] Ahn, N.G., Seger, R., Bratlien, R.L., Diltz, C.D., Tonks, N.K., and Krebs, F.G. (1991). Multiple components in an epidermal growth factor-stimulated protein kinase cascade. In vitro activation of a myelin basic protein/microtubule-associated protein 2 kinase. *J Biol. Chem.* 266, 4220-4227.
- [00108] Alavez, S., Vantipalli, M.C., Zucker, D.J., Klang, I.M., and Lithgow, G.J. (2011). Amyloid-binding compounds maintain protein homeostasis during ageing and extend lifespan. *Nature* 472, 226-229.
- [00109] Balch, W.E., Morimoto, R.I., Dillin, A., and Kelly, J.W. (2008). Adapting proteostasis for disease intervention. *Science* 319, 916-919.

20

30

## 【化 3】

[00110] Brunet, A., Pages, G., and Pouyssegur, J. (1994). Constitutively active mutants of MAP kinase kinase (MEK1) induce growth factor-relaxation and oncogenicity when expressed in fibroblasts. *Oncogene* 9, 3379-3387.

[00111] Brunet, A., Pages, G., and Pouyssegur, J. (1994). Growth factor-stimulated MAP kinase induces rapid retrophosphorylation and inhibition of MAP kinase kinase (MEK1). *FEBS Lett.* 346, 299-303.

10

[00112] Catalanotti, F., Reyes, G., Jesenberger, V., Galabova-Kovacs, G., de Matos Simoes, R., Carugo, O., and Baccarini, M. (2009). A Mek1-Mek2 heterodimer determines the strength and duration of the Erk signal. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16, 294-303.

[00113] Chiti, F., and Dobson, C.M. (2006). Protein misfolding, functional amyloid, and human disease. *Annu. Rev. Biochem.* 75, 333-366.

[00114] Chu, B., Zhong, R., Soncin, F., Stevenson, M.A., and Calderwood, S.K. (1998). Transcriptional activity of heat shock factor 1 at 37 degrees C is repressed through phosphorylation on two distinct serine residues by glycogen synthase kinase 3 and protein kinases Calpha and Czeta. *J. Biol. Chem.* 273, 18640-18646.

20

[00115] Clausson, C.M., Allalou, A., Weibrecht, I., Mahmoudi, S., Farnebo, M., Landegren, U., Wahlby, C., and Soderberg, O. (2011). Increasing the dynamic range of in situ PLA. *Nat. Methods* 8, 892-893.

[00116] Dai, C., Dai, S., and Cao, J. (2012). Proteotoxic stress of cancer: implication of the heat-shock response in oncogenesis. *J. Cell. Physiol.* 227, 2982-2987.

[00117] Dai, C., Santagata, S., Tang, Z., Shi, J., Cao, J., Kwon, H., Bronson, R.T., Whitesell, L., and Lindquist, S. (2012). Loss of tumor suppressor NF1 activates HSF1 to promote carcinogenesis. *J. Clin. Invest.* 122, 3742-3754.

30

[00118] Dai, C., Whitesell, L., Rogers, A.B., and Lindquist, S. (2007). Heat shock factor 1 is a powerful multifaceted modifier of carcinogenesis. *Cell* 130, 1005-1018.

[00119] Dhillon, A.S., Hagan, S., Rath, O., and Kolch, W. (2007). MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene* 26, 3279-3290.

[00120] Eisenberg, D., and Jucker, M. (2012). The amyloid state of proteins in human diseases. *Cell* 148, 1188-1203.

40

[00121] Favata, M.F., Horiuchi, K.Y., Manos, E.J., Daulerio, A.J., Stradley, D.A., Feeser, W.S., Van Dyk, D.E., Pitts, W.J., Earl, R.A., Hobbs, F., et al. (1998).

## 【化 4】

Identification of a novel inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase. *J. Biol. Chem.* 273, 18623-18632.

[00122] Glabe, C.G. (2008). Structural classification of toxic amyloid oligomers. *J. Biol. Chem.* 283, 29639-29643.

[00123] Guettouche, T., Boellmann, F., Lane, W.S., and Voellmy, R. (2005). Analysis of phosphorylation of human heat shock factor 1 in cells experiencing a stress. *BMC Biochem.* 6, 4. 10

[00124] Hsu, A.L., Murphy, C.T., and Kenyon, C. (2003). Regulation of aging and age-related disease by DAF-16 and heat-shock factor. *Science* 300, 1142-1145.

[00125] Isaacs, J.S., Jung, Y.J., Mimnaugh, E.G., Martinez, A., Cuttitta, F., and Neckers, L.M. (2002). Hsp90 regulates a von Hippel Lindau-independent hypoxia-inducible factor-1 alpha-degradative pathway. *J. Biol. Chem.* 277, 29936-29944.

[00126] Jin, X., Moskophidis, D., and Mivechi, N.F. (2011). Heat shock transcription factor 1 is a key determinant of HCC development by regulating hepatic steatosis and metabolic syndrome. *Cell Metab.* 14, 91-103. 20

[00127] Kawaguchi, Y., Kovacs, J.J., McLaurin, A., Vance, J.M., Ito, A., and Yao, T.P. (2003). The deacetylase HDAC6 regulates aggresome formation and cell viability in response to misfolded protein stress. *Cell* 115, 727-738.

[00128] Kaye, R., Head, E., Sarsoza, F., Saing, T., Cotman, C.W., Necula, M., Margol, L., Wu, J., Breydo, L., Thompson, J.L., et al. (2007). Fibril specific, conformation dependent antibodies recognize a generic epitope common to amyloid fibrils and fibrillar oligomers that is absent in prefibrillar oligomers. *Mol. Neurodegener.* 2, 18. 30

[00129] Kaye, R., Head, E., Thompson, J.L., McIntire, T.M., Milton, S.C., Cotman, C.W., and Glabe, C.G. (2003). Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis. *Science* 300, 486-489.

[00130] Kim, W., Bennett, E.J., Huttlin, E.L., Guo, A., Li, J., Possemato, A., Sowa, M.E., Rad, R., Rush, J., Comb, M.J., et al. (2011). Systematic and quantitative assessment of the ubiquitin-modified proteome. *Mol. Cell* 44, 325-340. 40

[00131] Laplante, M., and Sabatini, D.M. (2012). mTOR signaling in growth control and disease. *Cell* 149, 274-293.

[00132] Lindquist, S. (1986). The heat-shock response. *Annu. Rev. Biochem.* 55, 1151-1191.

## 【化 5】

[00133] Massey, A.J., Williamson, D.S., Browne, H., Murray, J.B., Dokurno, P., Shaw, T., Macias, A.T., Daniels, Z., Geoffroy, S., Dopson, M., et al. (2010). A novel, small molecule inhibitor of Hsc70/Hsp70 potentiates Hsp90 inhibitor induced apoptosis in HCT116 colon carcinoma cells. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 66, 535-545.

[00134] Meng, L., Gabai, V.L., and Sherman, M.Y. (2010). Heat-shock transcription factor HSF1 has a critical role in human epidermal growth factor receptor-2-induced cellular transformation and tumorigenesis. *Oncogene* 29, 5204-5213. 10

[00135] Min, J.N., Huang, L., Zimonjic, D.B., Moskophidis, D., and Mivechi, N.F. (2007). Selective suppression of lymphomas by functional loss of Hsf1 in a p53-deficient mouse model for spontaneous tumors. *Oncogene* 26, 5086-5097.

[00136] Morimoto, R.I. (2008). Proteotoxic stress and inducible chaperone networks in neurodegenerative disease and aging. *Genes Dev.* 22, 1427-1438.

[00137] Morris, E.J., Jha, S., Restaino, C.R., Dayananth, P., Zhu, H., Cooper, A., Carr, D., Deng, Y., Jin, W., Black, S., et al. (2013). Discovery of a novel ERK inhibitor with activity in models of acquired resistance to BRAF and MEK inhibitors. *Cancer Discov.* 3, 742-750. 20

[00138] Muller, L., Schaupp, A., Walerych, D., Wegele, H., and Buchner, J. (2004). Hsp90 regulates the activity of wild type p53 under physiological and elevated temperatures. *J. Biol. Chem.* 279, 48846-48854.

[00139] Neckers, L., and Workman, P. (2012). Hsp90 molecular chaperone inhibitors: are we there yet? *Clin. Cancer Res.* 18, 64-76. 30

[00140] Nikolaev, S.I., Rimoldi, D., Iseli, C., Valsesia, A., Robyr, D., Gehrig, C., Harshman, K., Guipponi, M., Bukach, O., Zoete, V., et al. (2012). Exome sequencing identifies recurrent somatic MAP2K1 and MAP2K2 mutations in melanoma. *Nat. Genet.* 44, 133-139.

[00141] Oerlemans, R., Franke, N.E., Assaraf, Y.G., Cloos, J., van Zantwijk, I., Berkers, C.R., Scheffer, G.L., Debipersad, K., Vojtekova, K., Lemos, C., et al. (2008). Molecular basis of bortezomib resistance: proteasome subunit beta5 (PSMB5) gene mutation and overexpression of PSMB5 protein. *Blood* 112, 2489-2499. 40

[00142] Ohori, M., Kinoshita, T., Okubo, M., Sato, K., Yamazaki, A., Arakawa, H., Nishimura, S., Inamura, N., Nakajima, H., Neya, M., et al. (2005).

## 【化 6】

Identification of a selective ERK inhibitor and structural determination of the inhibitor-ERK2 complex. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 336, 357-363.

[00143] Orr, H.T., and Zoghbi, H.Y. (2007). Trinucleotide repeat disorders. *Annu Rev Neurosci* 30, 575-621.

[00144] Pickart, C.M., and Eddins, M.J. (2004). Ubiquitin: structures, functions, mechanisms. *Biochim. Biophys. Acta* 1695, 55-72.

[00145] Roux, P.P., and Blenis, J. (2004). ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68, 320-344.

[00146] Sanchez, I., Mahlke, C., and Yuan, J. (2003). Pivotal role of oligomerization in expanded polyglutamine neurodegenerative disorders. *Nature* 421, 373-379.

[00147] Sladewski, T.E., Shafer, A.M., and Hoag, C.M. (2006). The effect of ionic strength on the UV-vis spectrum of congo red in aqueous solution. *Spectrochim. Acta A. Mol. Biomol. Spectrosc.* 65, 985-987.

[00148] Taipale, M., Jarosz, D.F., and Lindquist, S. (2010). HSP90 at the hub of protein homeostasis: emerging mechanistic insights. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11, 515-528.

[00149] Xiao, X., Zuo, X., Davis, A.A., McMillan, D.R., Curry, B.B., Richardson, J.A., and Benjamin, I.J. (1999). HSF1 is required for extra-embryonic development, postnatal growth and protection during inflammatory responses in mice. *EMBO J.* 18, 5943-5952.

[00150] Yeh, T.C., Marsh, V., Bernat, B.A., Ballard, J., Colwell, H., Evans, R.J., Parry, J., Smith, D., Brandhuber, B.J., Gross, S., et al. (2007). Biological characterization of ARRY-142886 (AZD6244), a potent, highly selective mitogen-activated protein kinase kinase 1/2 inhibitor. *Clin. Cancer Res.* 13, 1576-1583.

## 【0 1 0 7】

均等物

前述の書面による明細書は、当業者が上記実施形態を実施するのを可能にするために十分であると考えられる。前述の説明および実施例は、ある特定の実施形態を詳述し、本発明者らによって企図されるベストモードを記載する。しかし、どれほど詳細にその前述が本文中に現れていようが、その実施形態は多くの方法で実施され得、添付の特許請求の範囲およびその任意の均等物に従って解釈されるべきであることは、認識される。

## 【0 1 0 8】

本明細書で使用される場合、用語約とは、明示的に示されていようがいまいが、例えば、整数、有理数、およびパーセンテージを含む数値に言及する。用語約は一般に、当業者がその記載される値に等しい（例えば、同じ機能または結果を有する）と考える数値の範囲（例えば、その記載される範囲の±5～10%）に言及する。少なくともおよび約のよ

10

20

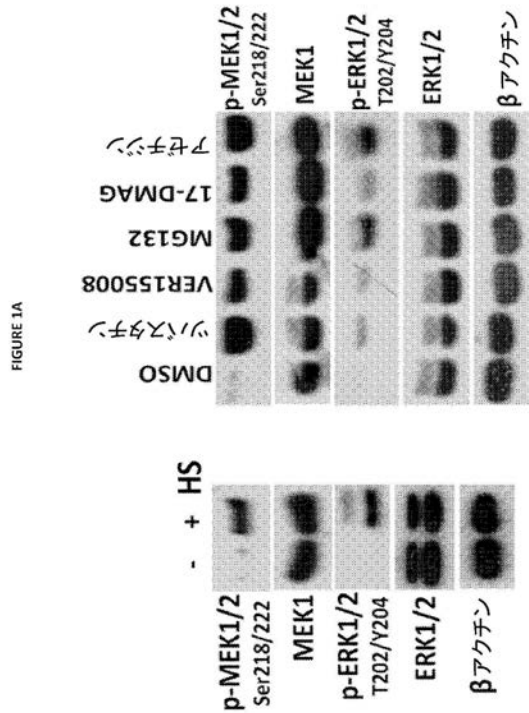
30

40

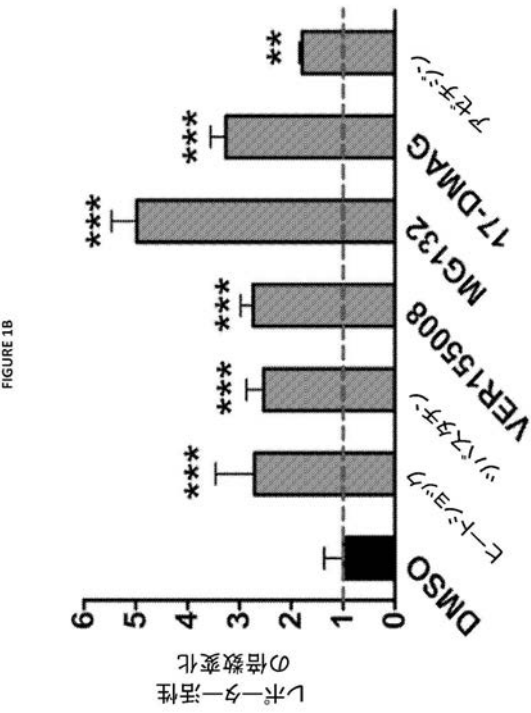
50

うな用語が、数値または範囲のリストの前にある場合、その用語は、そのリストの中に提供される値または範囲の全てを修飾する。場合によっては、用語約は、最も近い有効数字へと丸められる数値を含み得る。

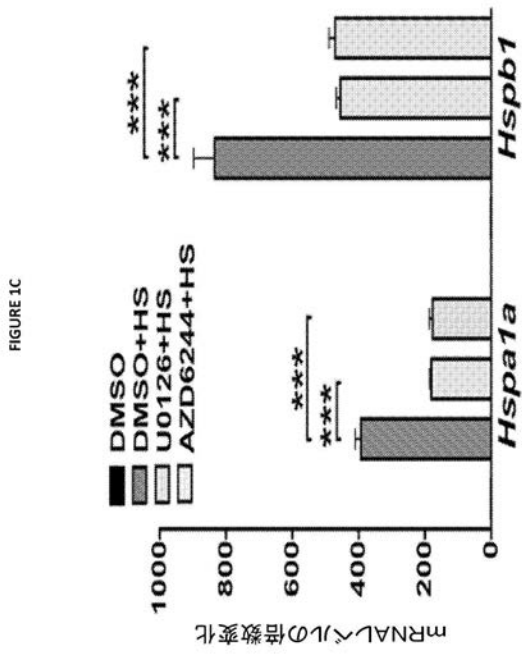
【 図 1 A 】



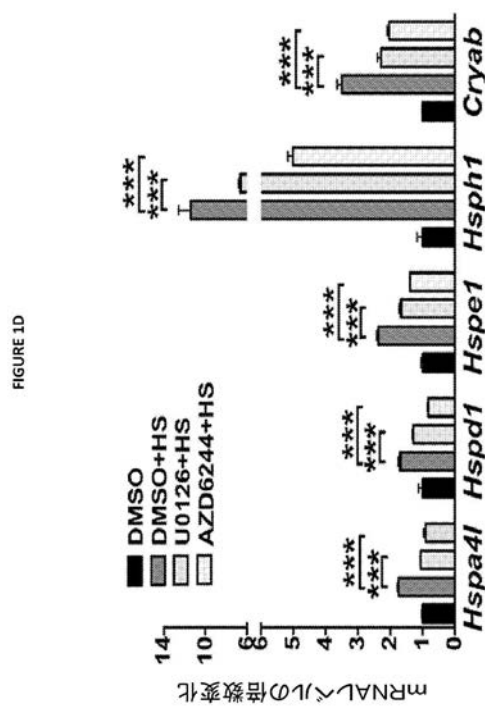
【 図 1 B 】



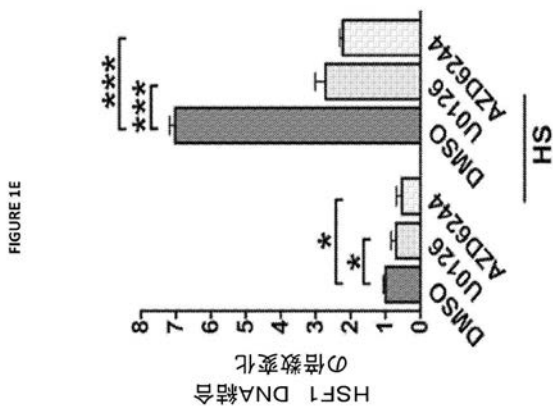
【 図 1 C 】



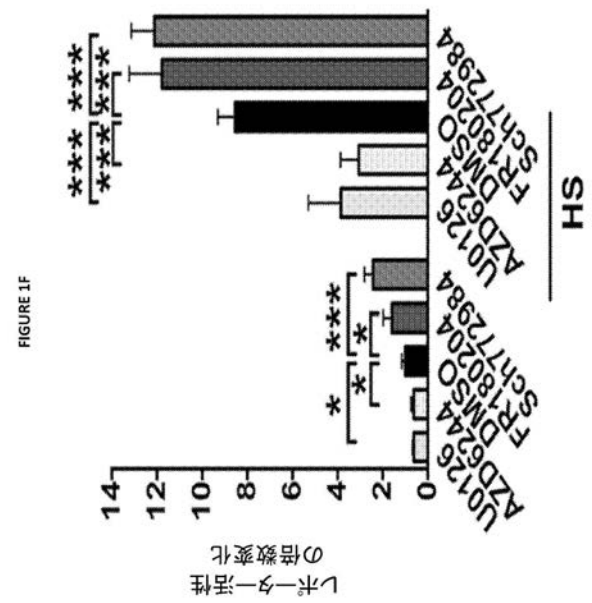
【 図 1 D 】



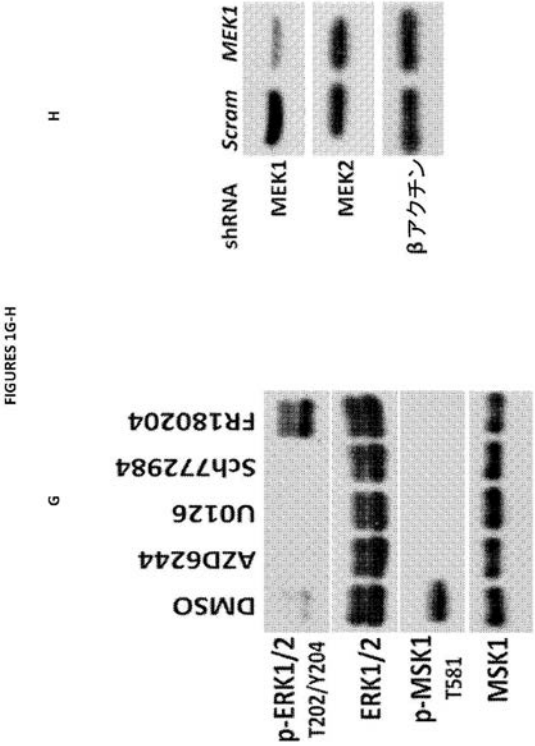
【 図 1 E 】



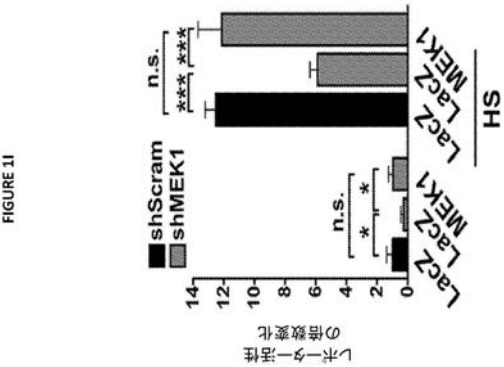
【 図 1 F 】



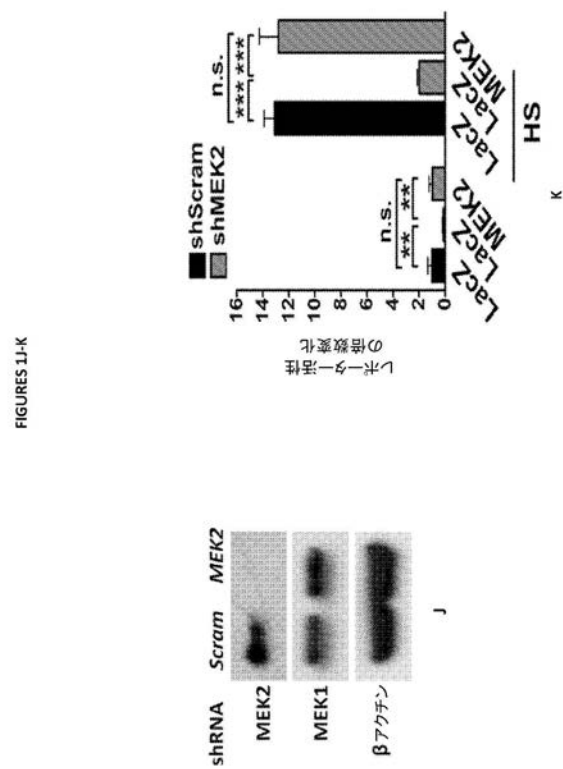
【図 1 G - H】



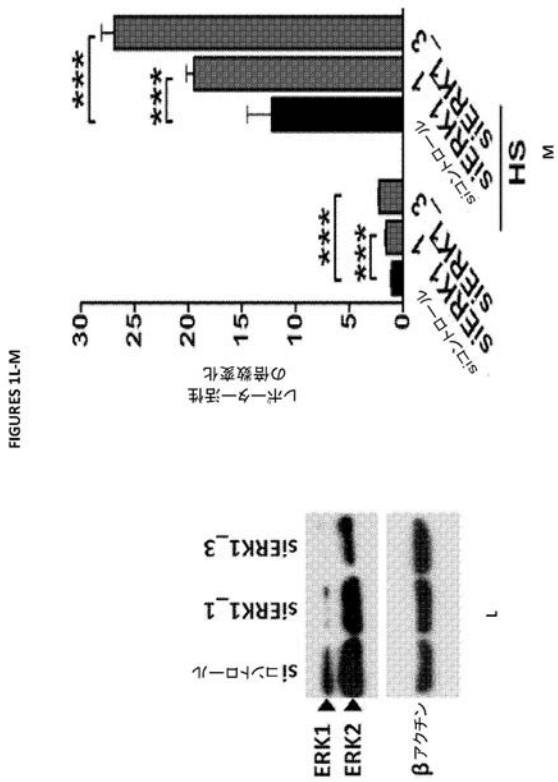
【図 1 I】



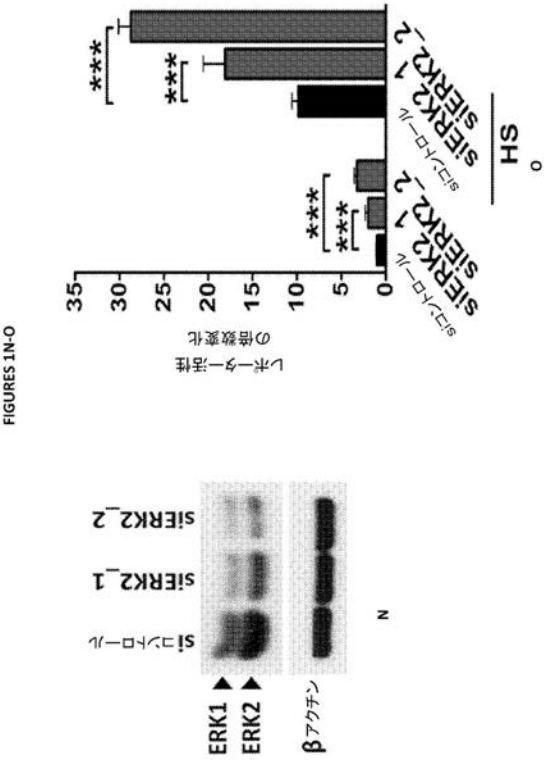
【図 1 J - K】



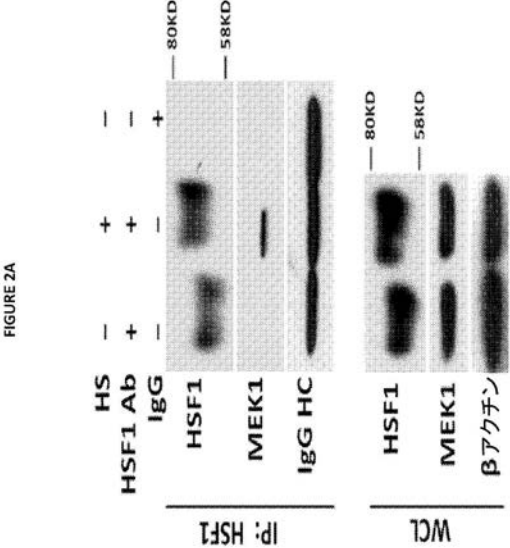
【図 1 L - M】



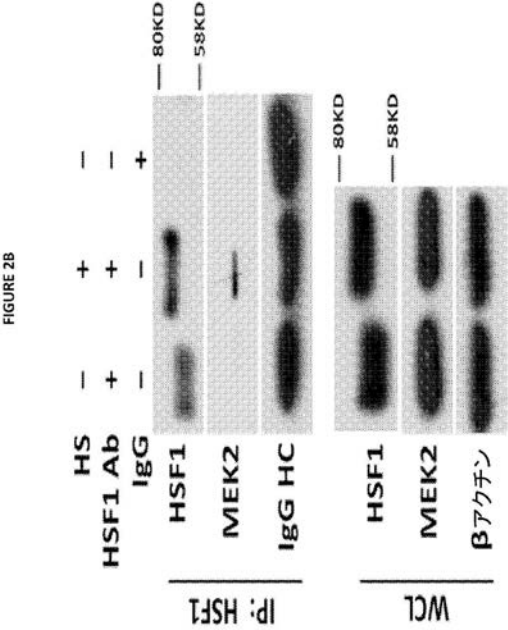
【 図 1 N - O 】



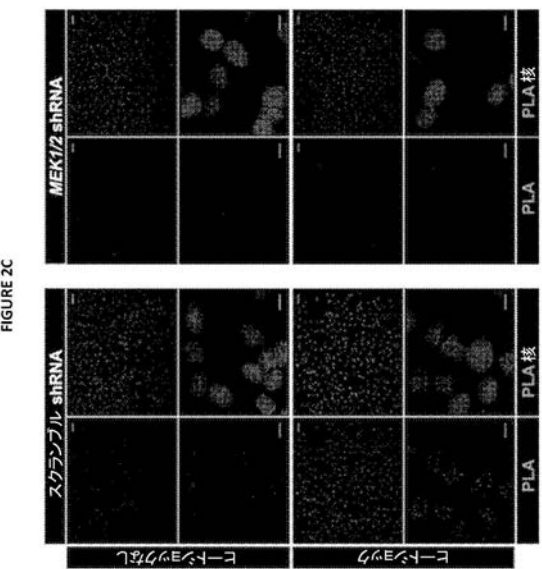
【 図 2 A 】



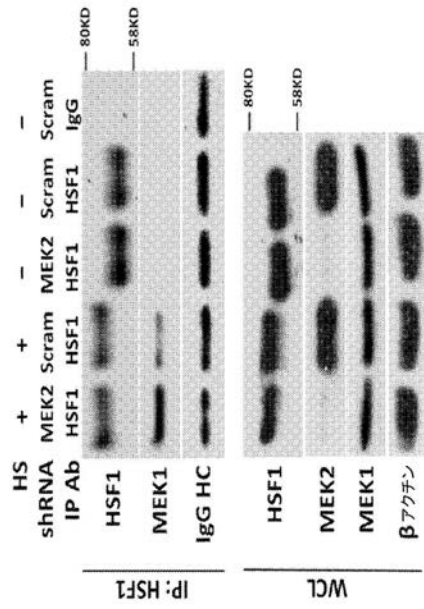
【 図 2 B 】



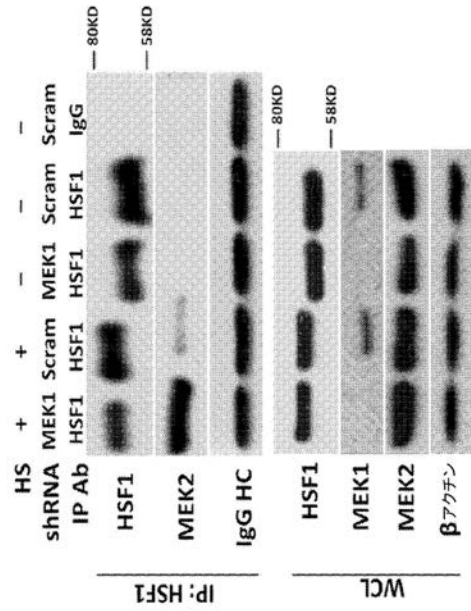
【 図 2 C 】



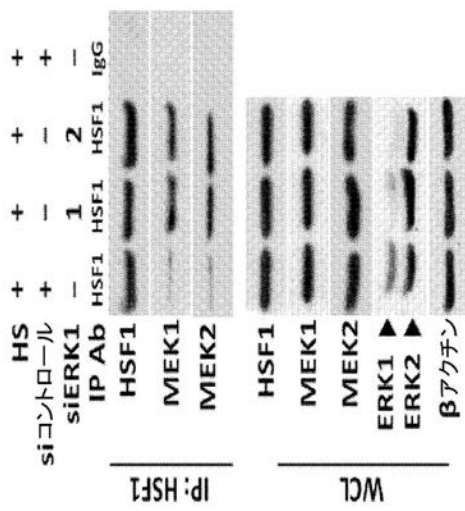
【 図 2 D 】



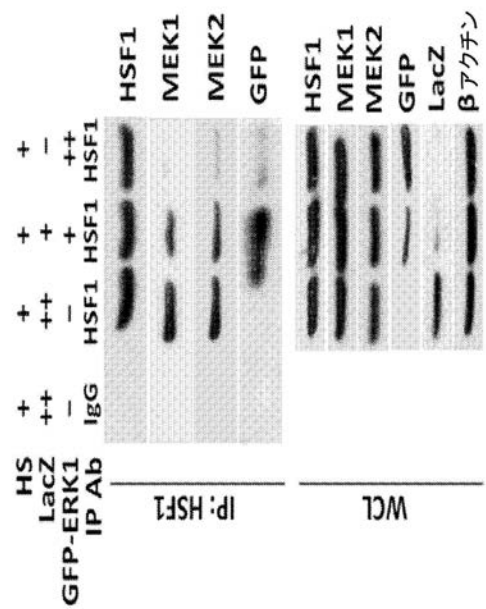
【 図 2 E 】



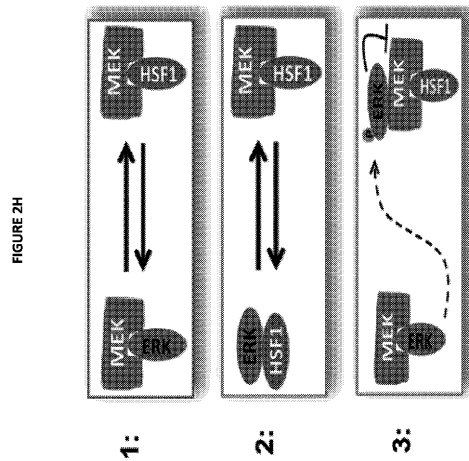
【 図 2 F 】



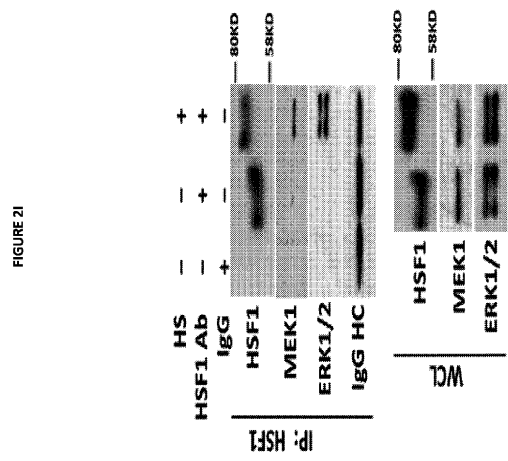
【 図 2 G 】



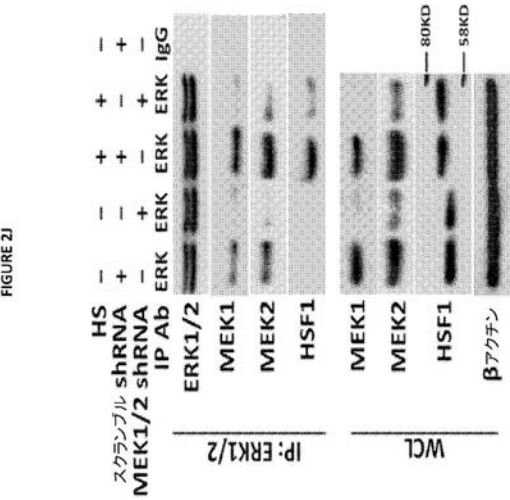
【 図 2 H 】



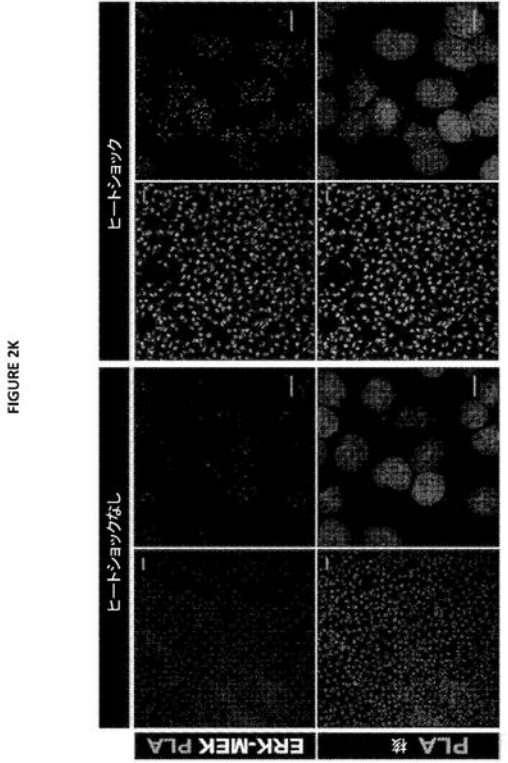
【 図 2 I 】



【 図 2 J 】

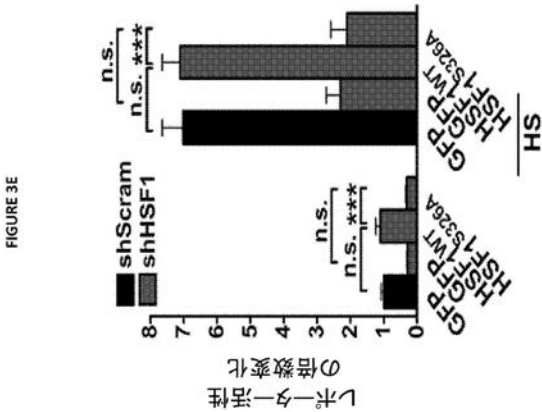


【 図 2 K 】

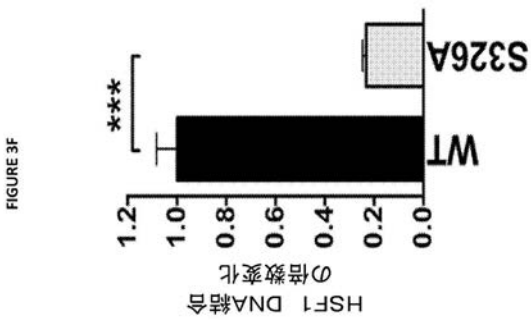




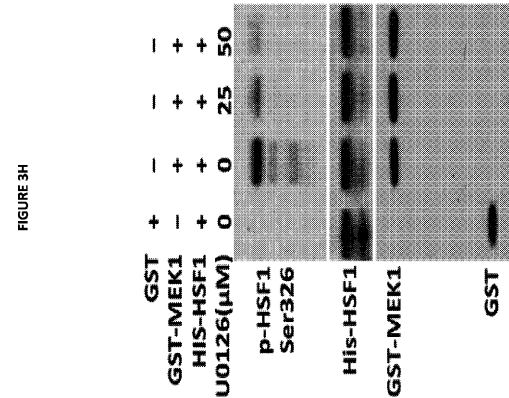
【 図 3 E 】



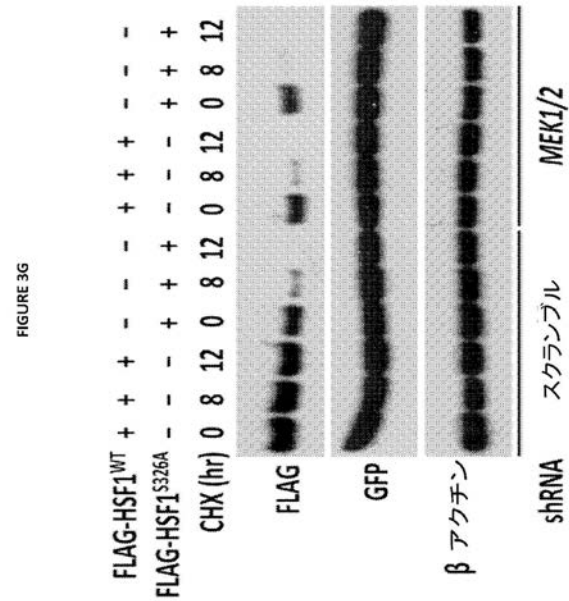
【 図 3 F 】



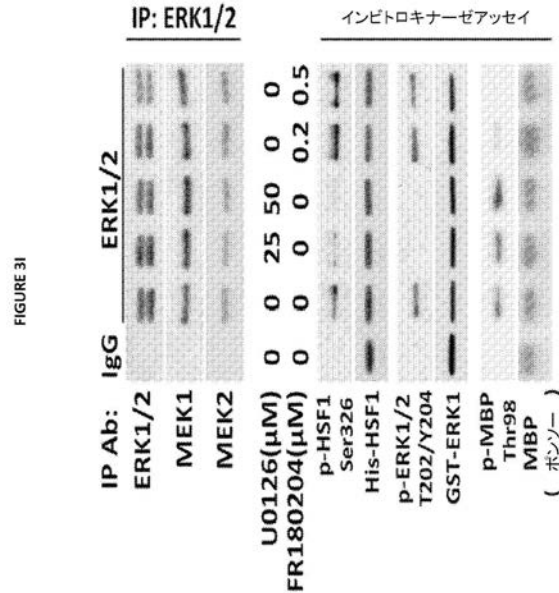
【 図 3 H 】



【 図 3 G 】

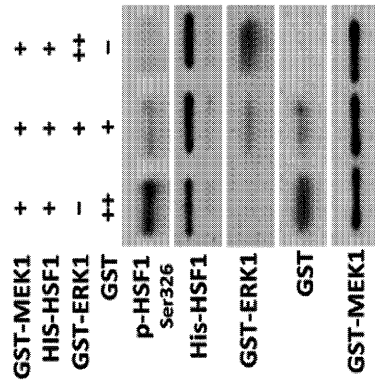


【 図 3 I 】



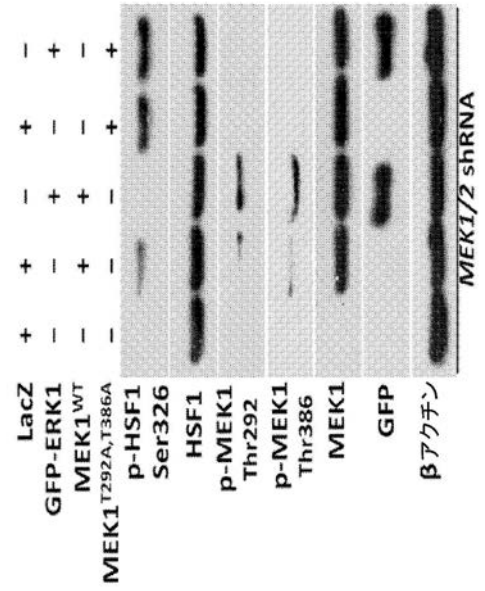
【 図 3 J 】

FIGURE 3J



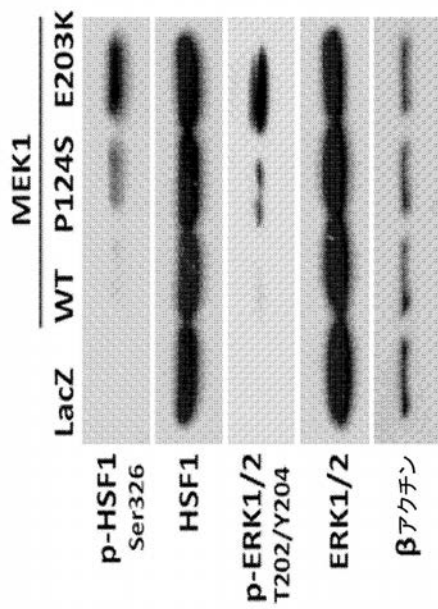
【 図 3 K 】

FIGURE 3K



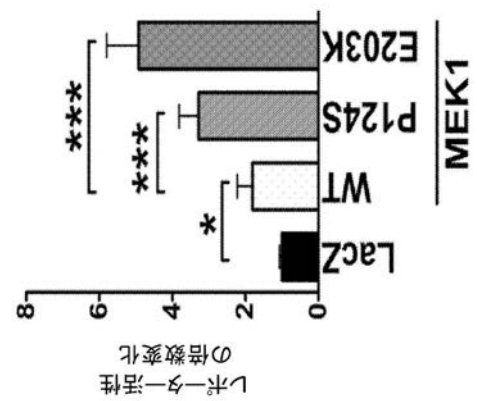
【 図 3 L 】

FIGURE 3L



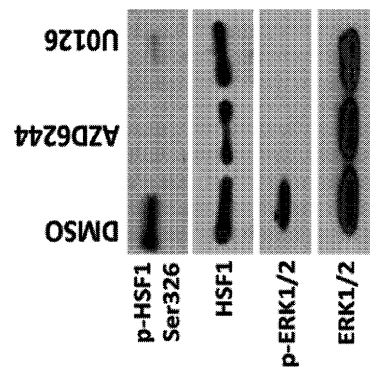
【 図 3 M 】

FIGURE 3M



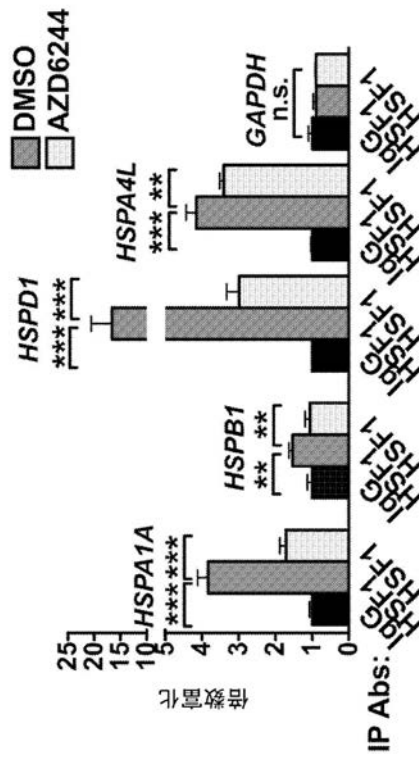
【 図 3 N 】

FIGURE 3N



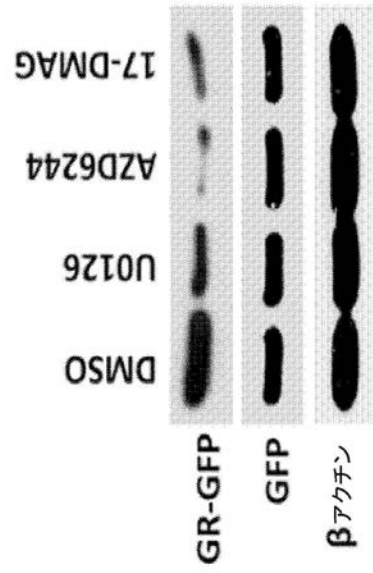
【 図 3 O 】

FIGURE 3O



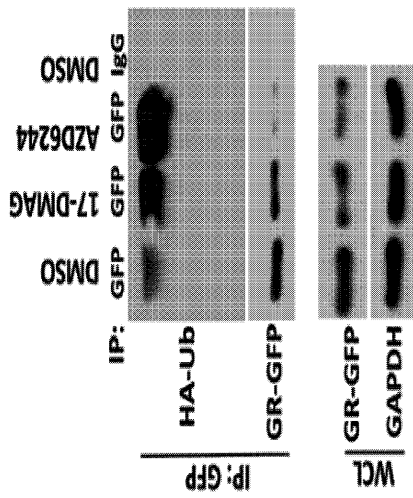
【 図 4 A 】

FIGURE 4A



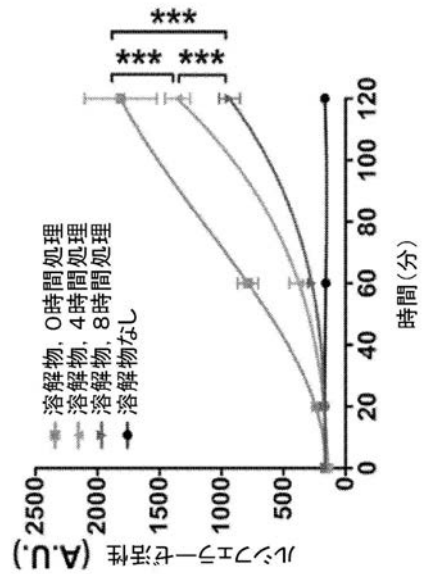
【 図 4 B 】

FIGURE 4B



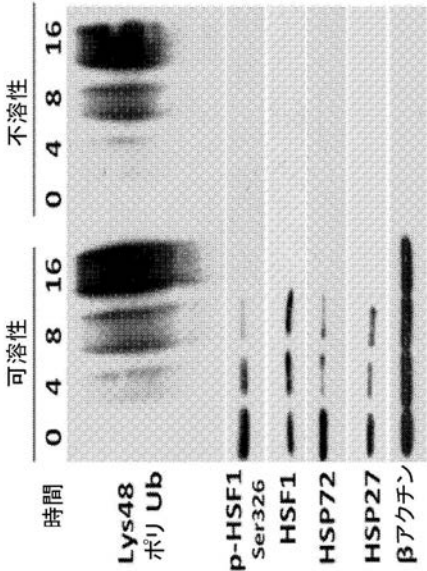
【 図 4 C 】

FIGURE 4C



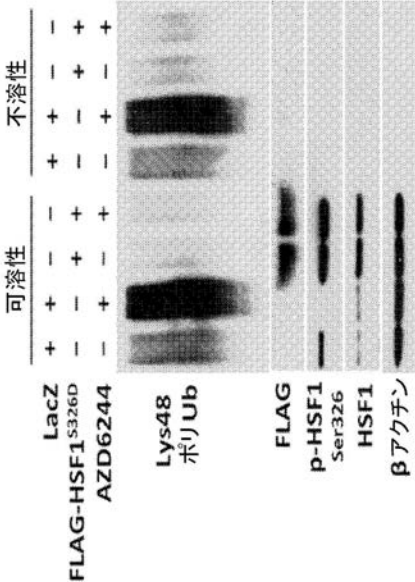
【 図 4 D 】

FIGURE 4D



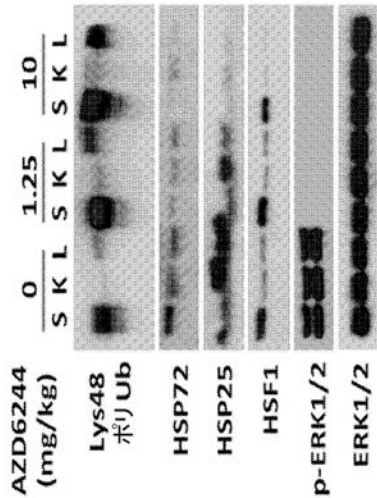
【 図 4 E 】

FIGURE 4E



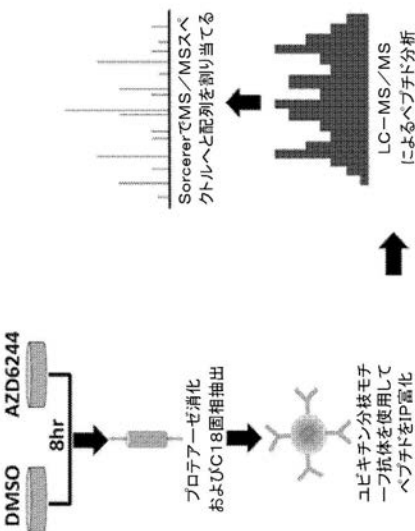
【 図 4 F 】

FIGURE 4F



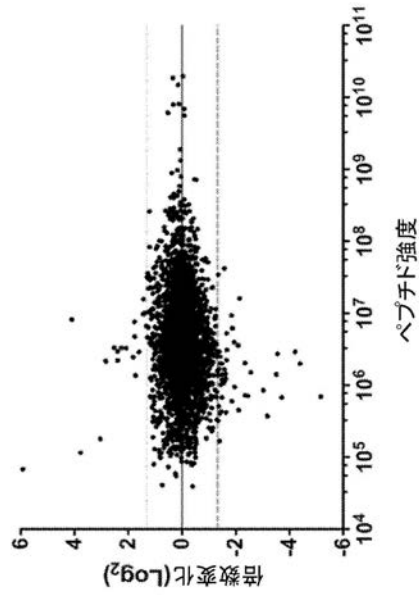
【 図 4 G 】

FIGURE 4G



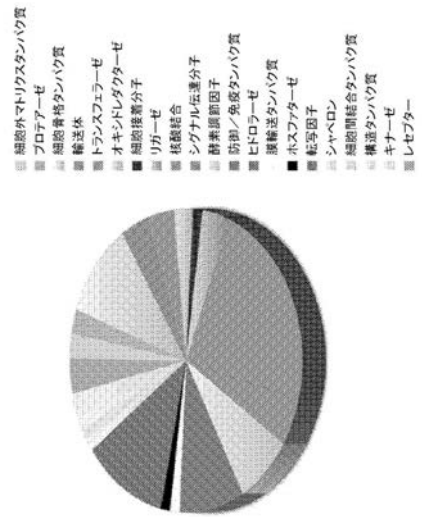
【図 4 H】

FIGURE 4H



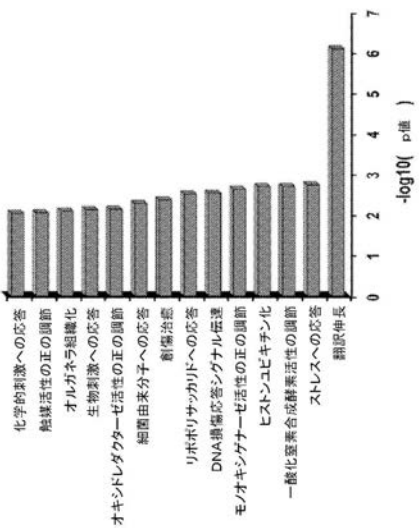
【図 4 I】

FIGURE 4I



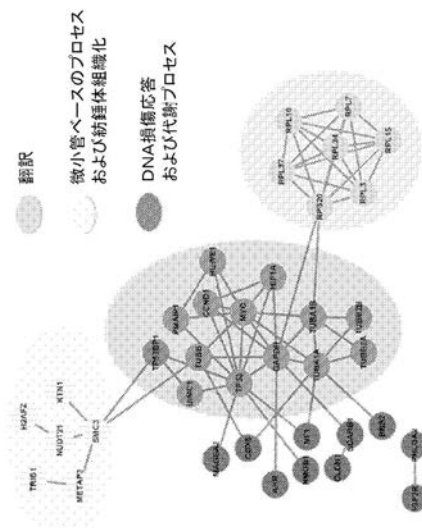
【図 4 J】

FIGURE 4J



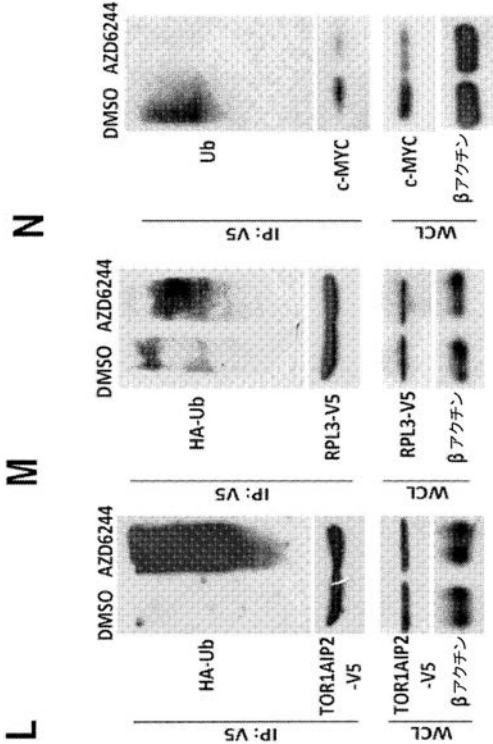
【図 4 K】

FIGURE 4K



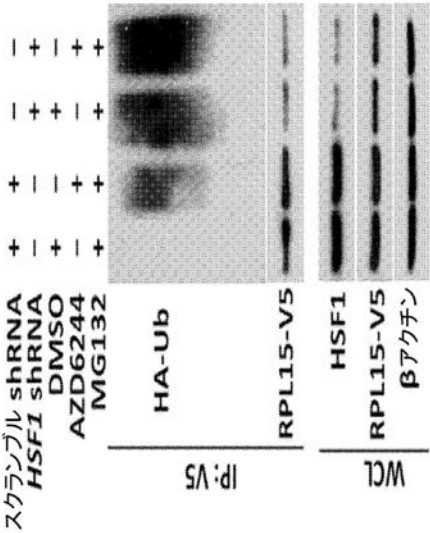
【 図 4 L - N 】

FIGURES 4L-N



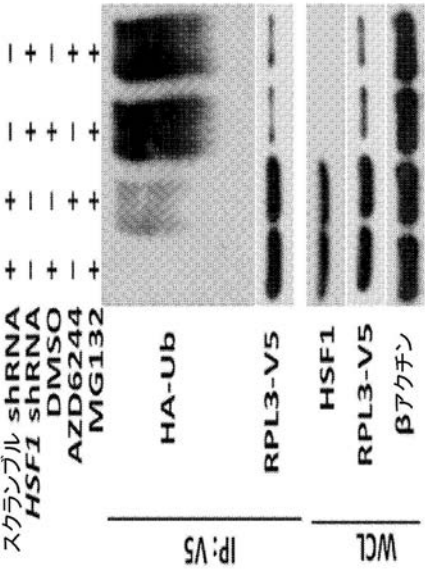
【 図 4 O 】

FIGURE 4O



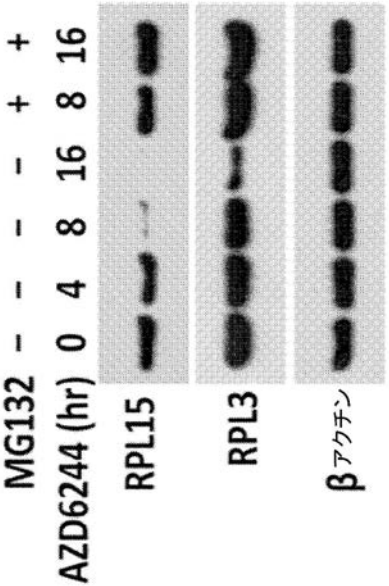
【 図 4 P 】

FIGURE 4P



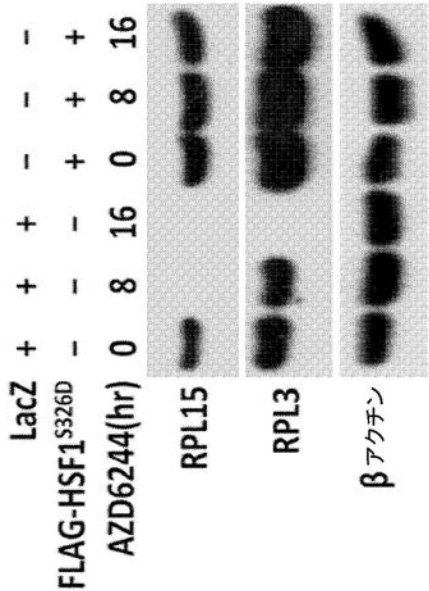
【 図 4 Q 】

FIGURE 4Q



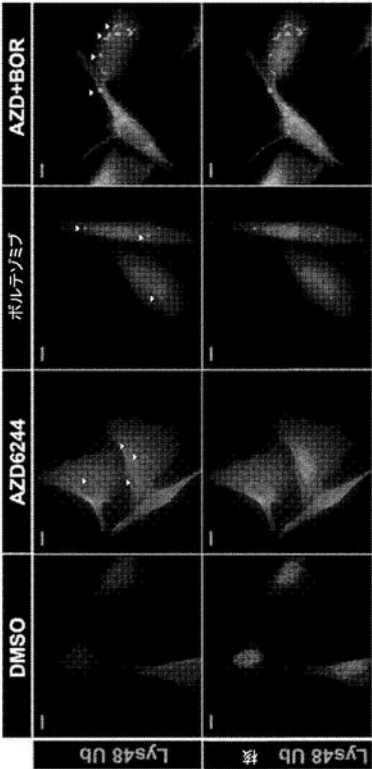
【 図 4 R 】

FIGURE 4R



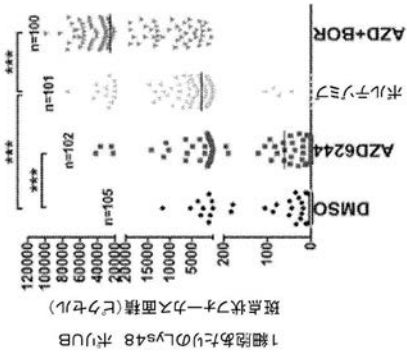
【 図 5 A 】

FIGURE 5A



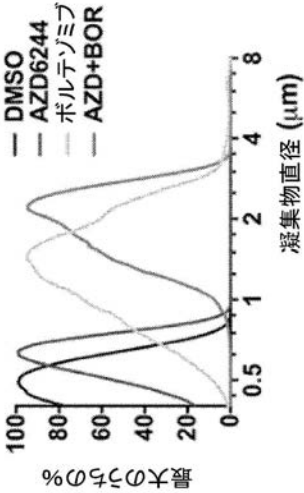
【 図 5 B 】

FIGURE 5B



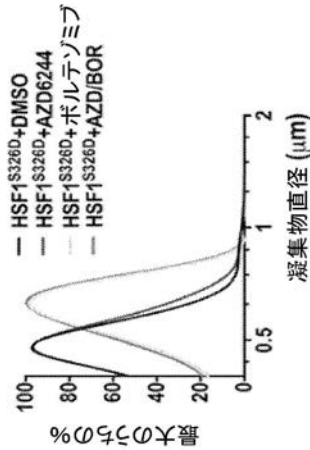
【 図 5 C 】

FIGURE 5C



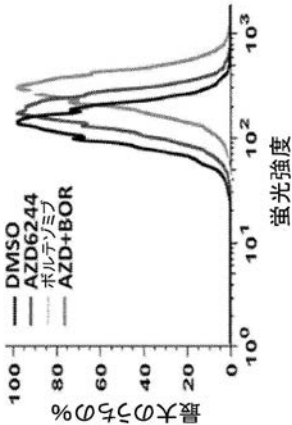
【 図 5 D 】

FIGURE 5D



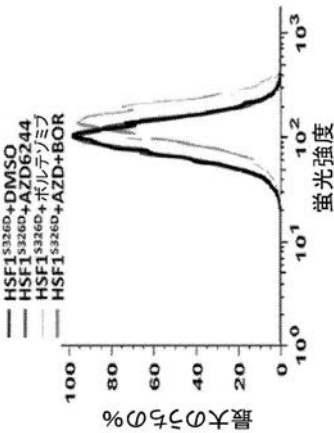
【 図 5 E 】

FIGURE 5E



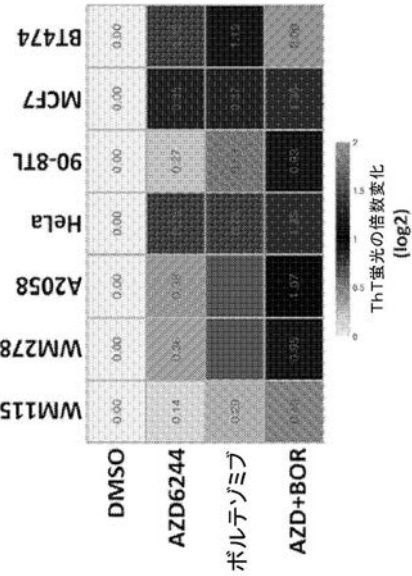
【 図 5 F 】

FIGURE 5F



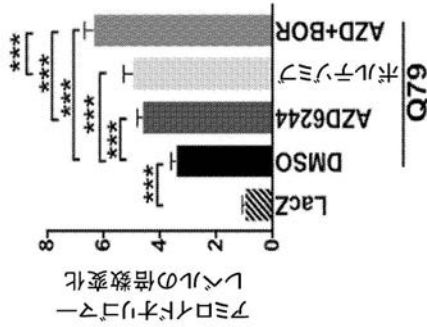
【 図 5 G 】

FIGURE 5G



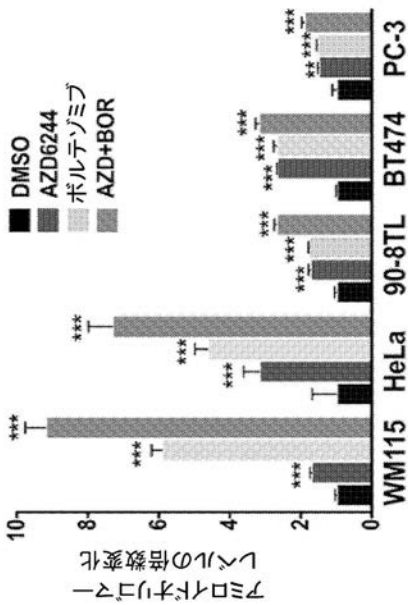
【 図 5 H 】

FIGURE 5H



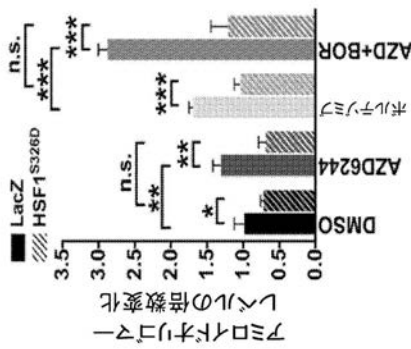
【 図 5 I 】

FIGURE 5I



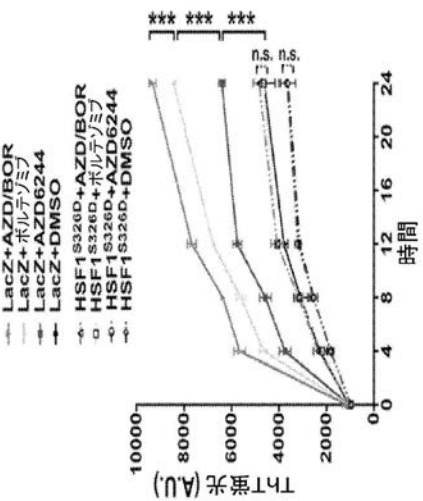
【 図 5 J 】

FIGURE 5J



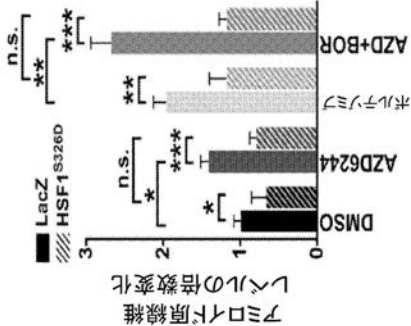
【 図 5 L 】

FIGURE 5L

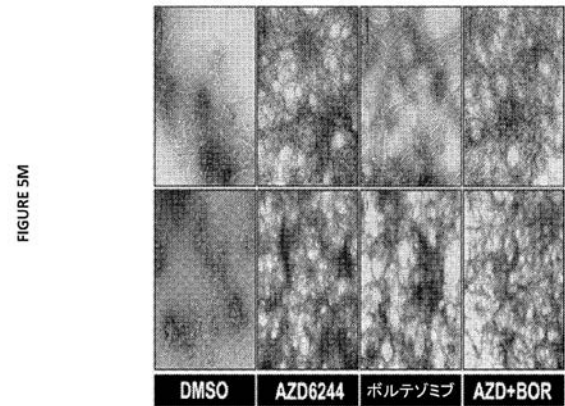


【 図 5 K 】

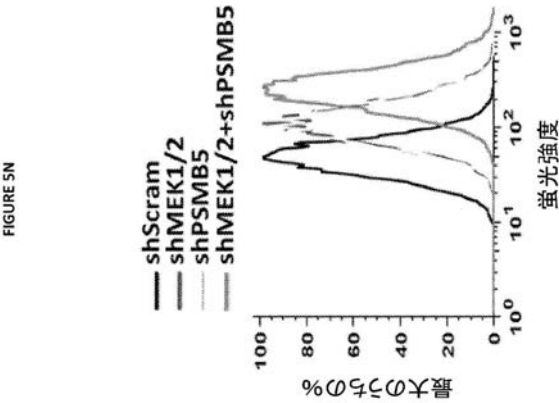
FIGURE 5K



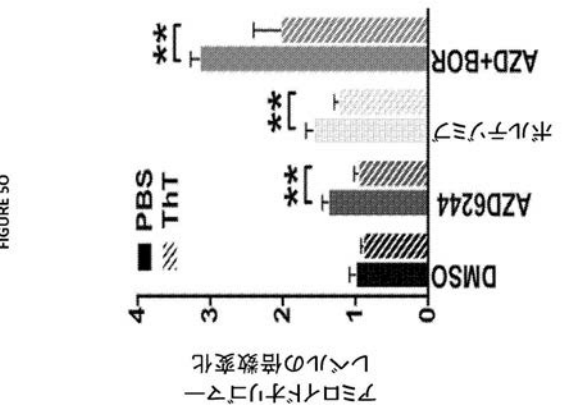
【 図 5 M 】



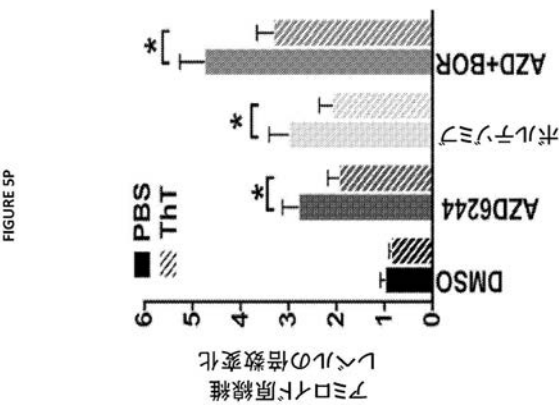
【 図 5 N 】



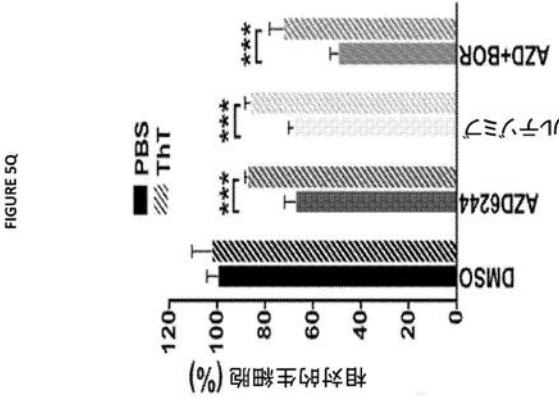
【 図 5 O 】



【 図 5 P 】

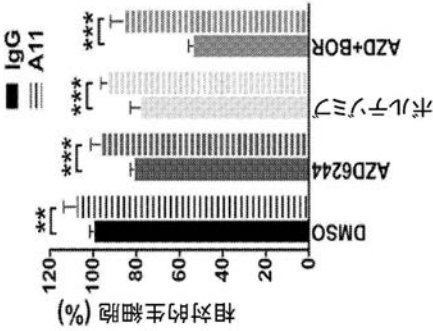


【 図 5 Q 】



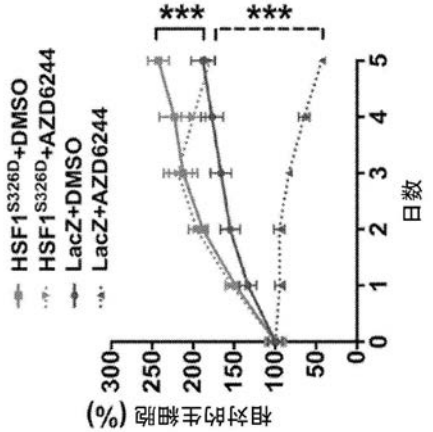
【 図 5 R 】

FIGURE 5R



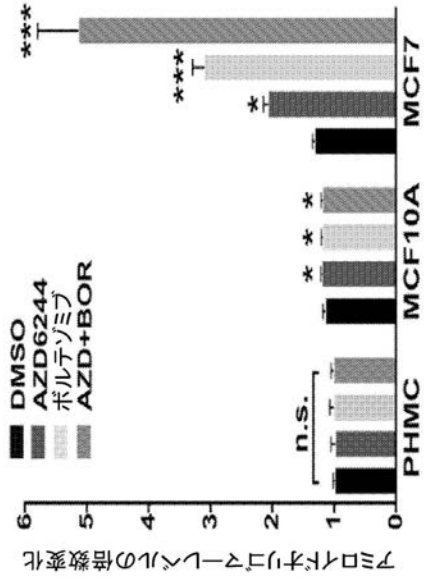
【 図 5 S 】

FIGURE 5S



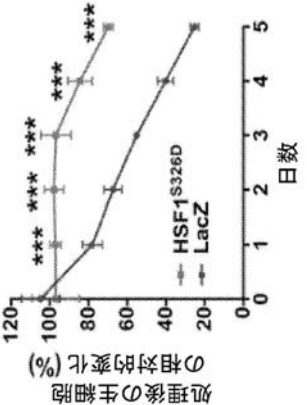
【 図 5 V 】

FIGURE 5V



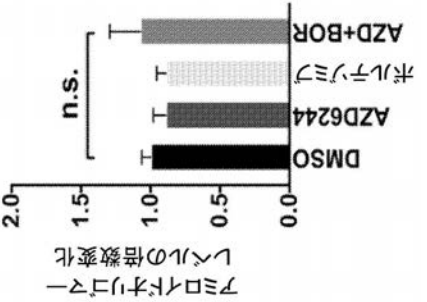
【 図 5 T 】

FIGURE 5T



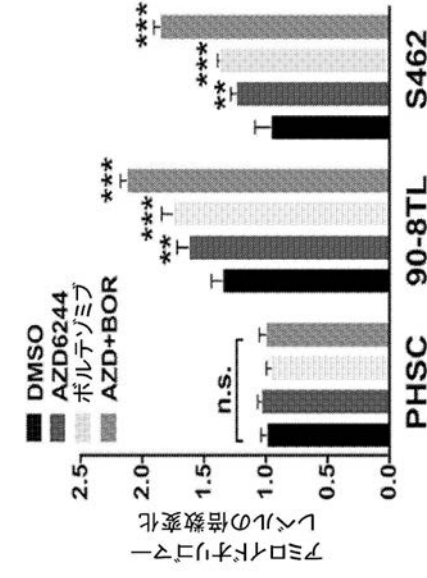
【 図 5 U 】

FIGURE 5U

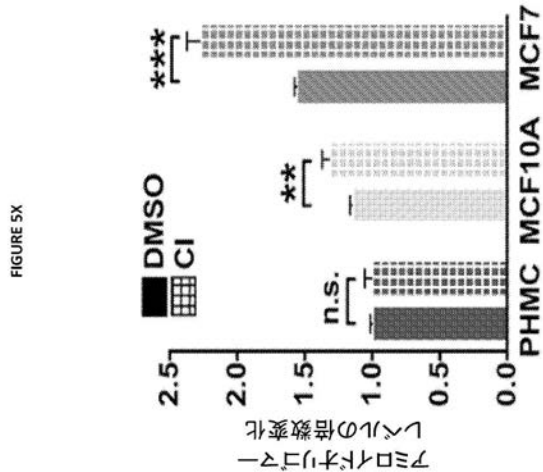


【 図 5 W 】

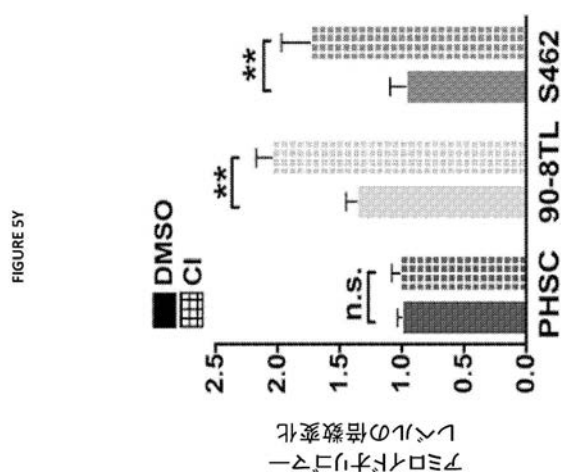
FIGURE 5W



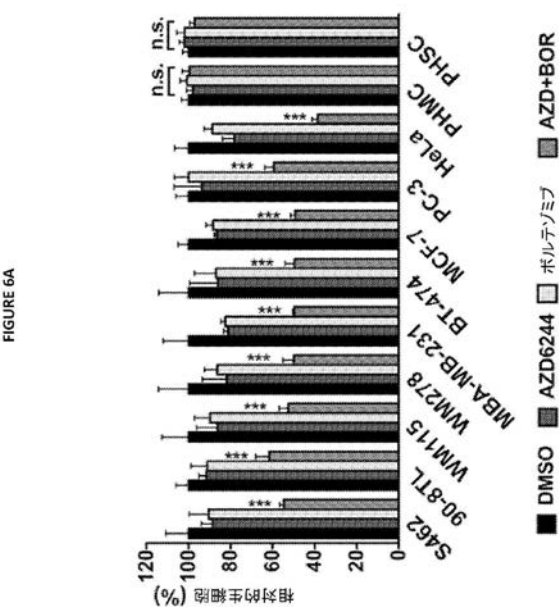
【 図 5 X 】



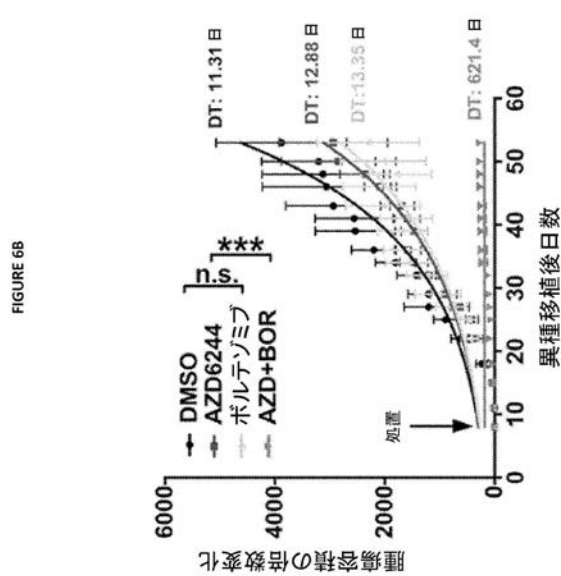
【 図 5 Y 】



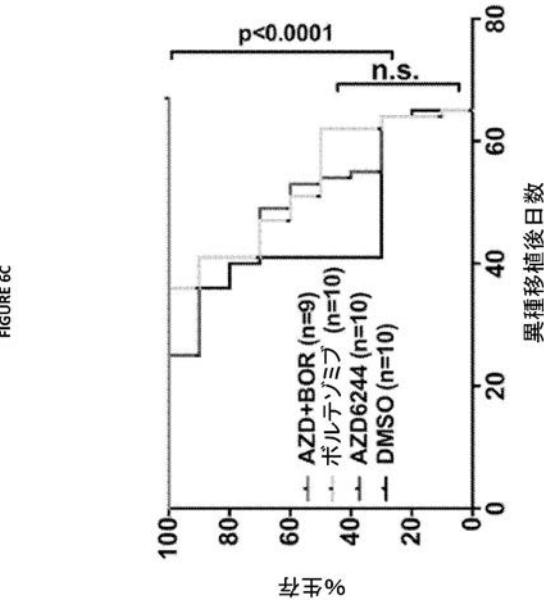
【 図 6 A 】



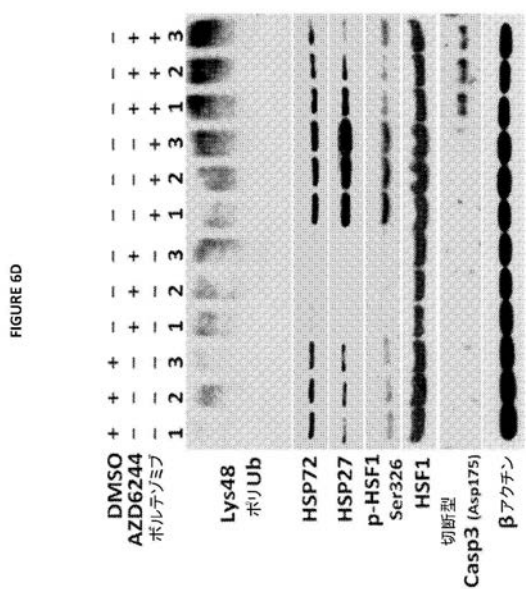
【 図 6 B 】



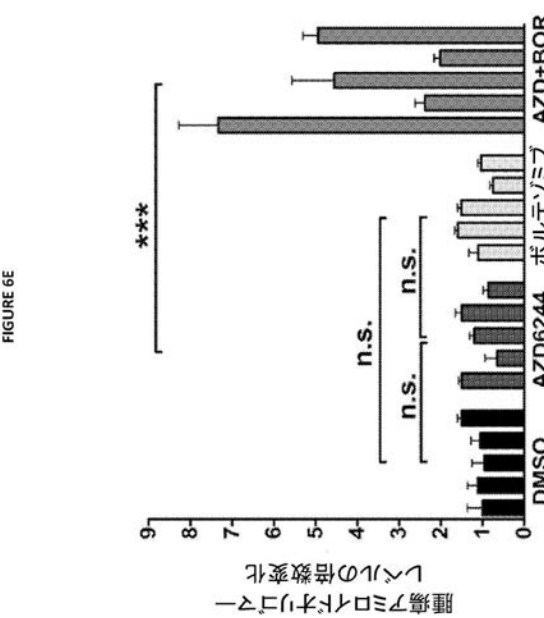
【 図 6 C 】



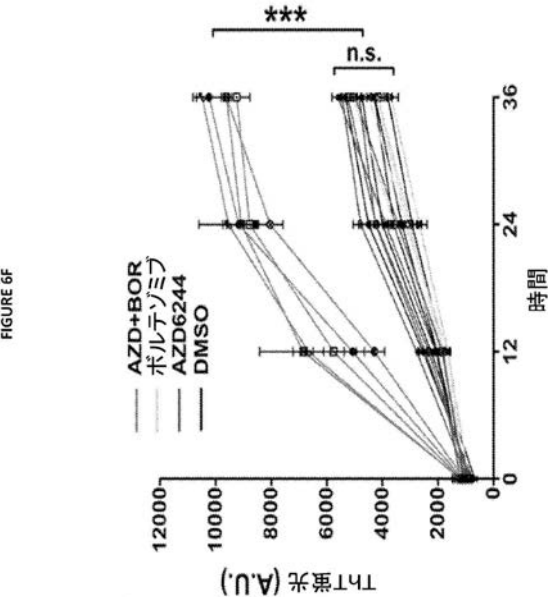
【 図 6 D 】



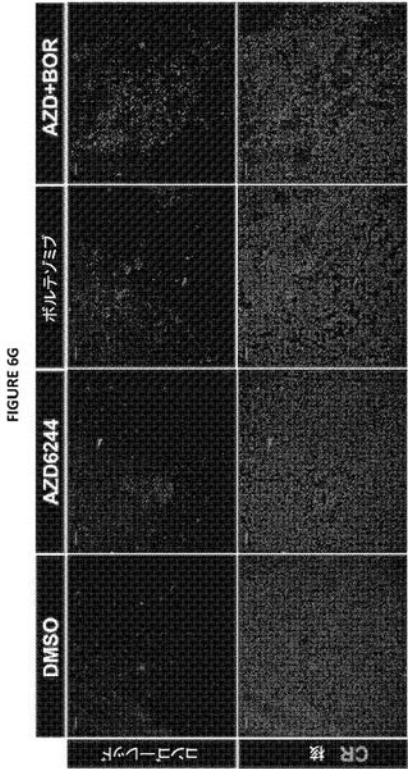
【 図 6 E 】



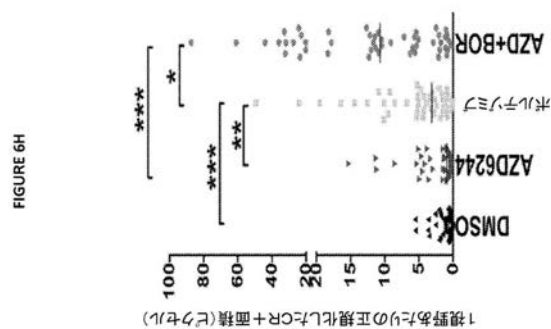
【 図 6 F 】



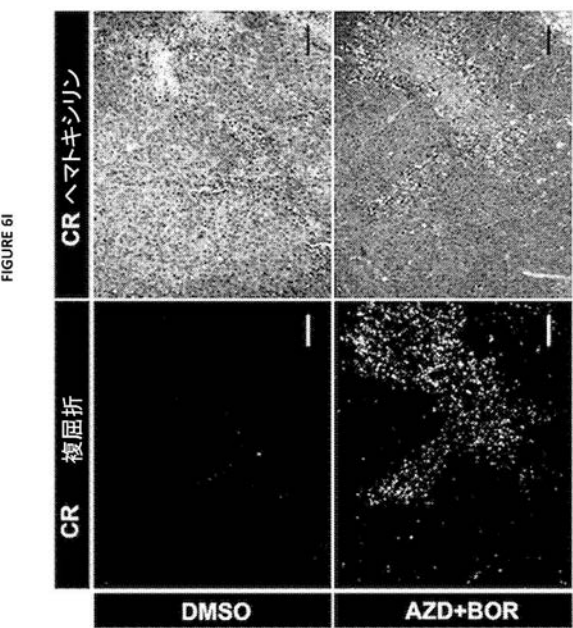
【 図 6 G 】



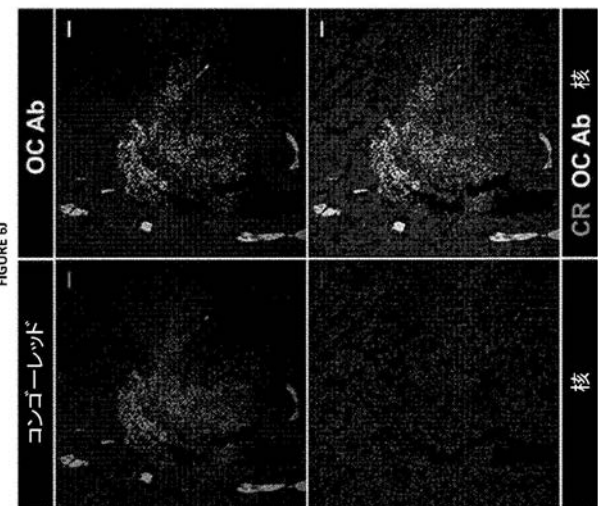
【 図 6 H 】



【 図 6 I 】

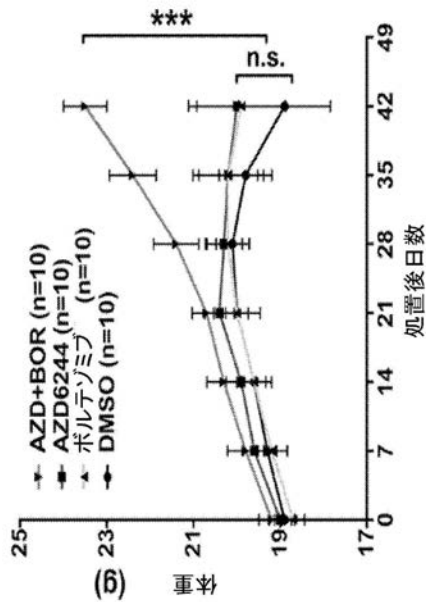


【 図 6 J 】



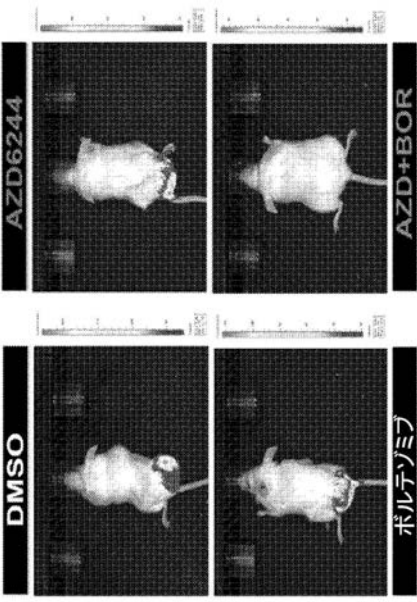
【 図 6 K 】

FIGURE 6K



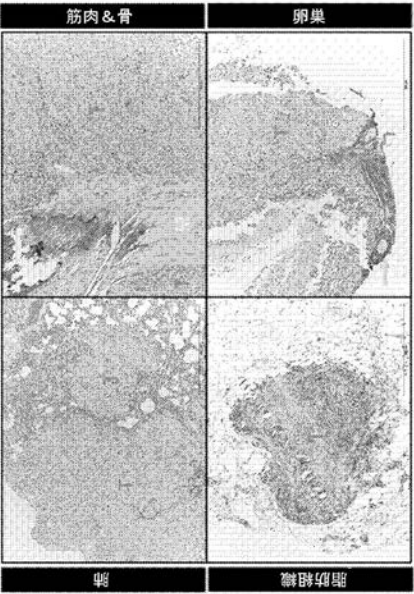
【 図 6 L 】

FIGURE 6L



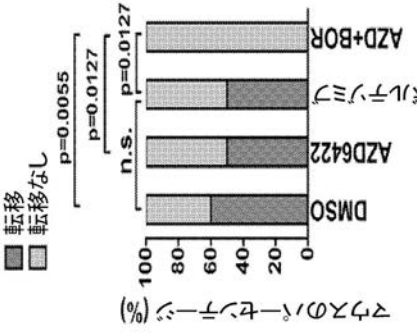
【 図 6 M 】

FIGURE 6M

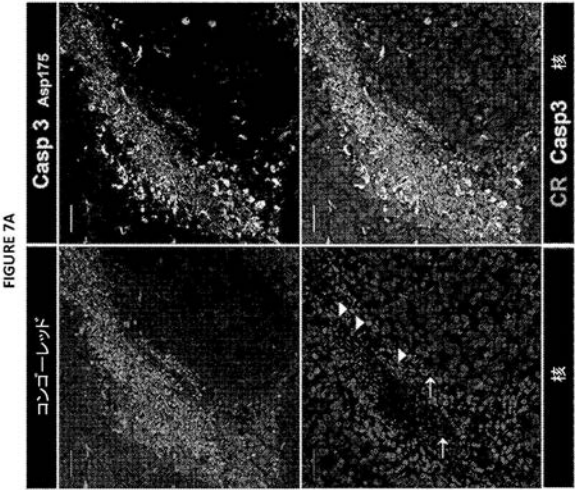


【 図 6 N 】

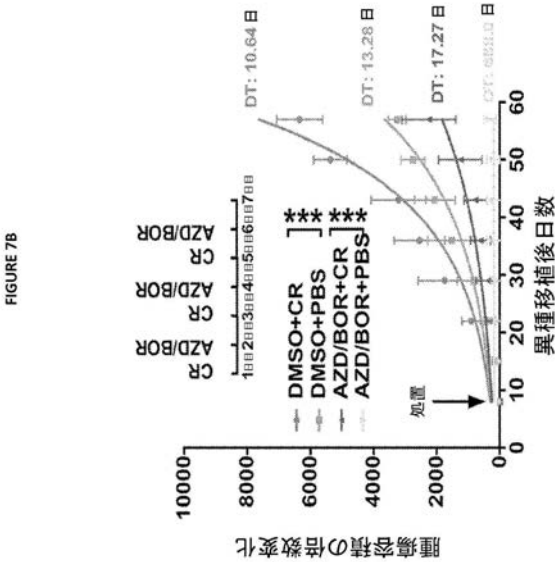
FIGURE 6N



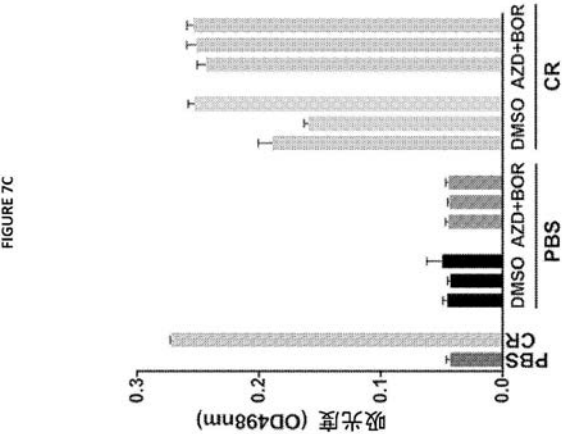
【 図 7 A 】



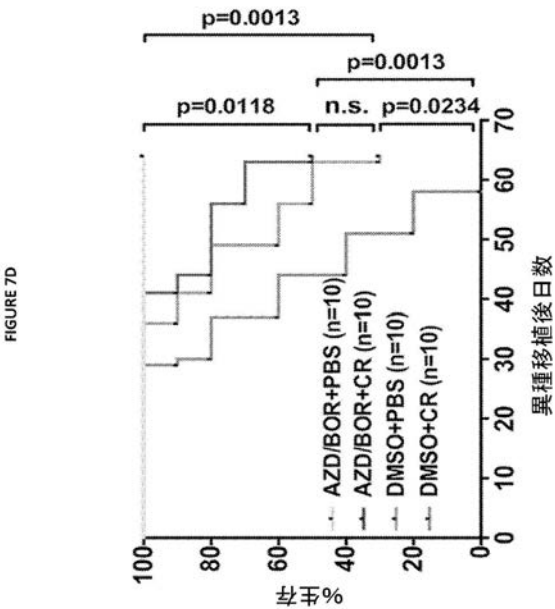
【 図 7 B 】



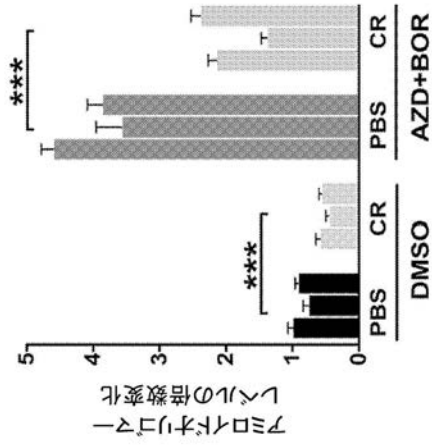
【 図 7 C 】



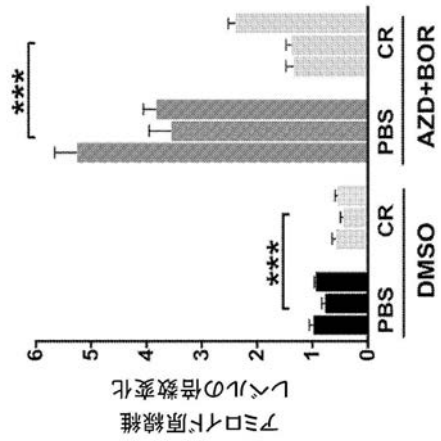
【 図 7 D 】



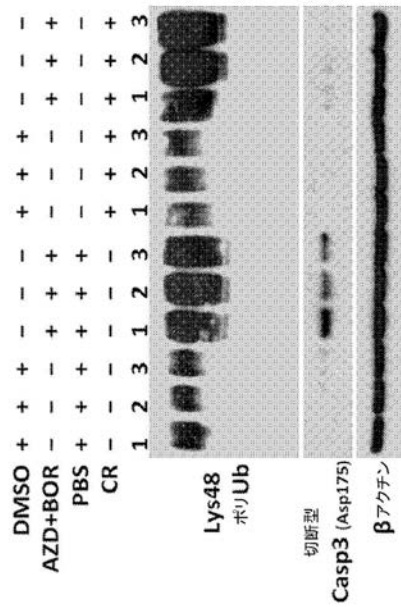
【 図 7 E 】



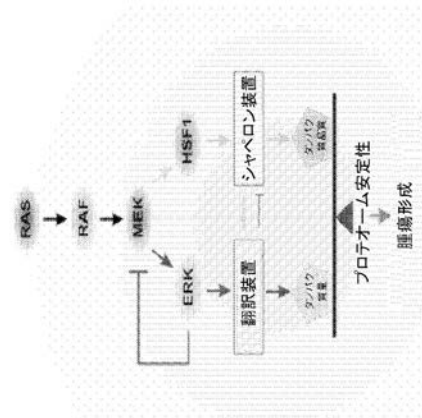
【 図 7 F 】



【 図 7 G 】

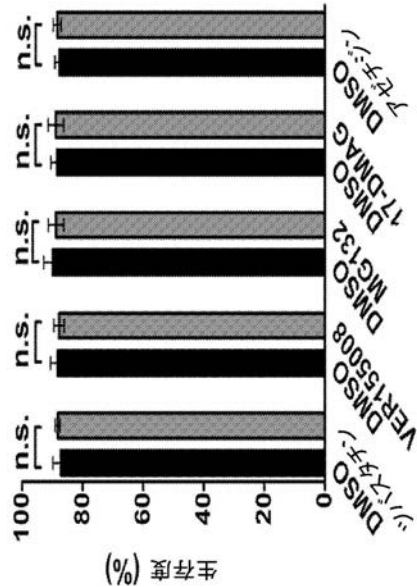


【 図 7 H 】



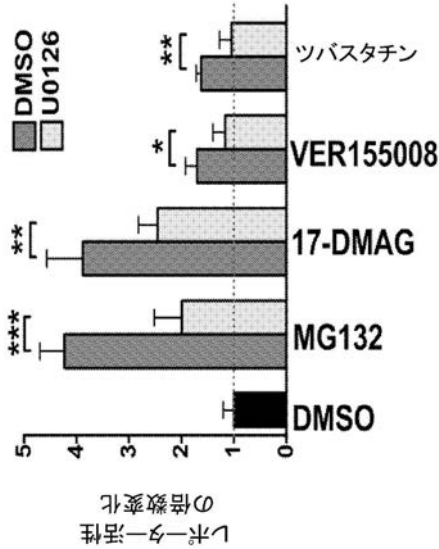
【 図 8 A 】

FIGURE 8A



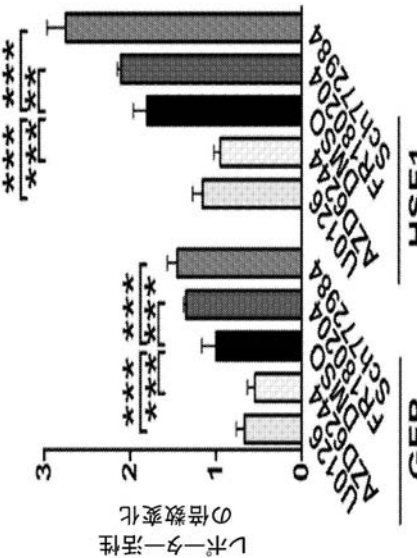
【 図 8 B 】

FIGURE 8B



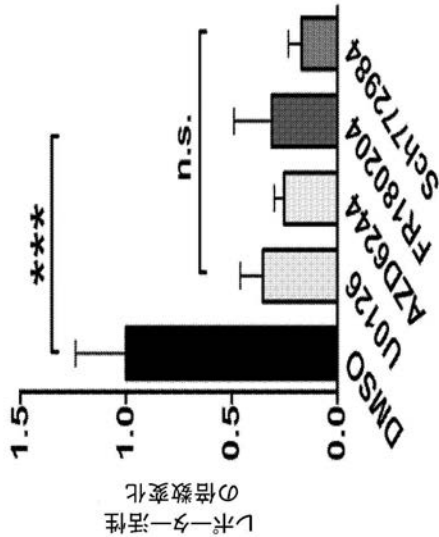
【 図 8 C 】

FIGURE 8C

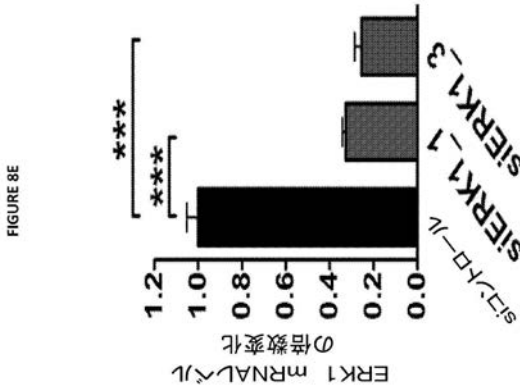


【 図 8 D 】

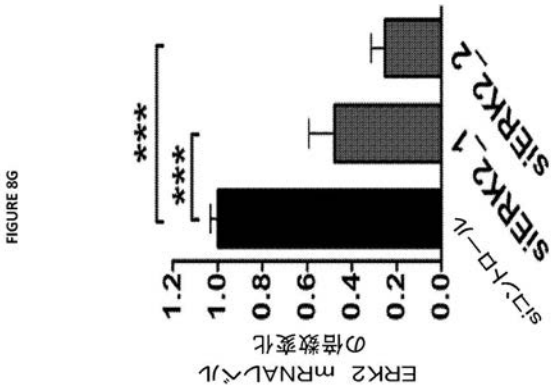
FIGURE 8D



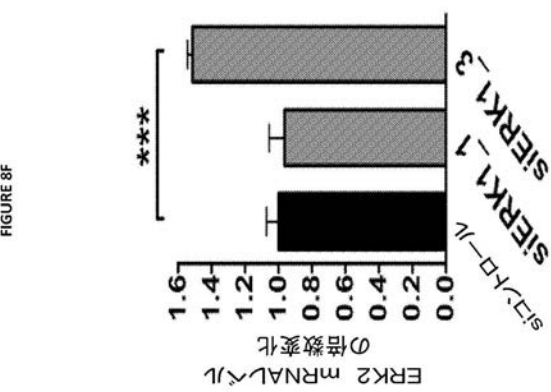
【 図 8 E 】



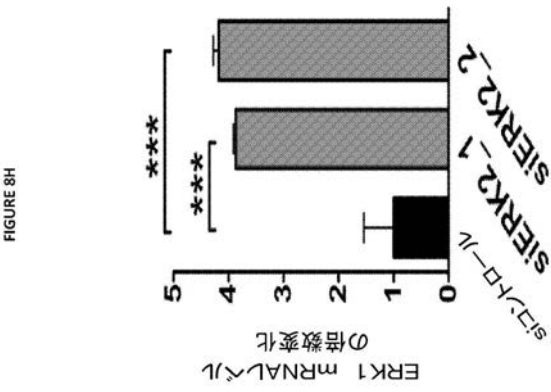
【 図 8 G 】



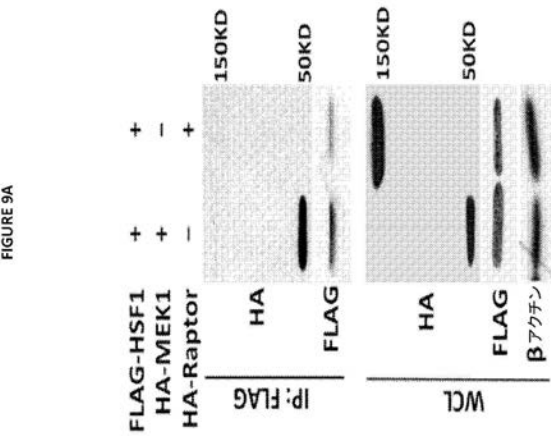
【 図 8 F 】



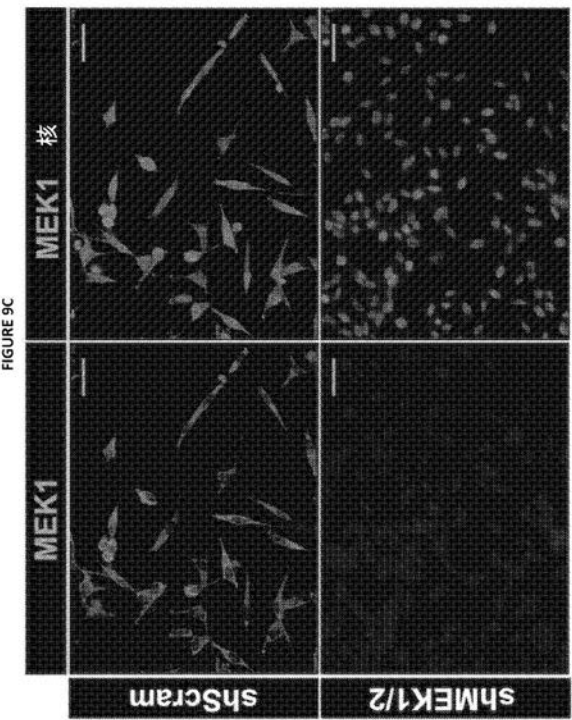
【 図 8 H 】



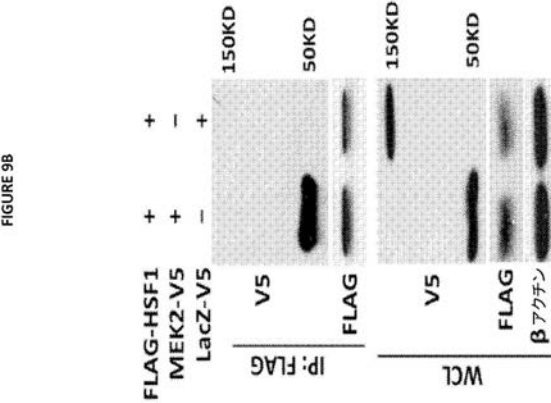
【 図 9 A 】



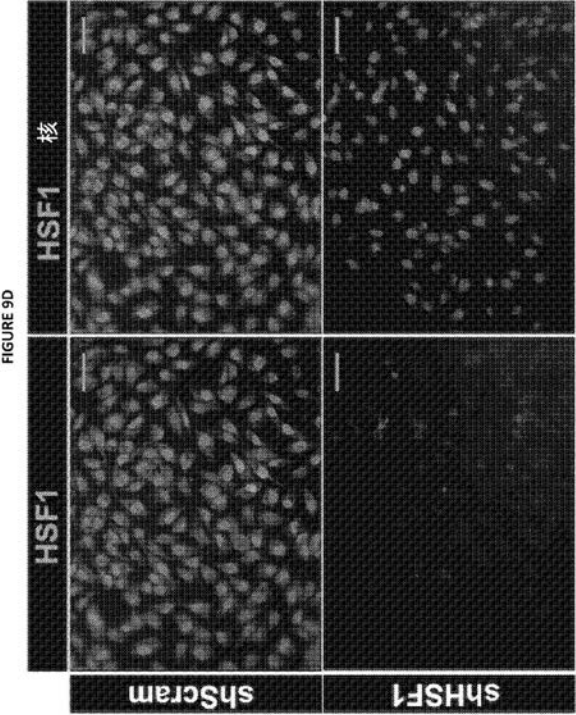
【 図 9 C 】



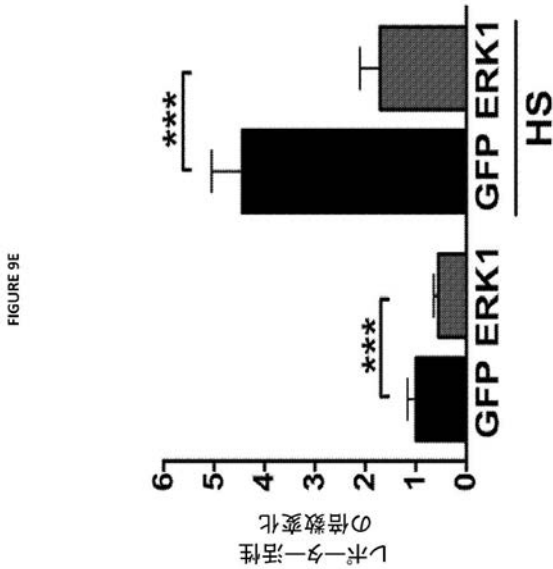
【 図 9 B 】



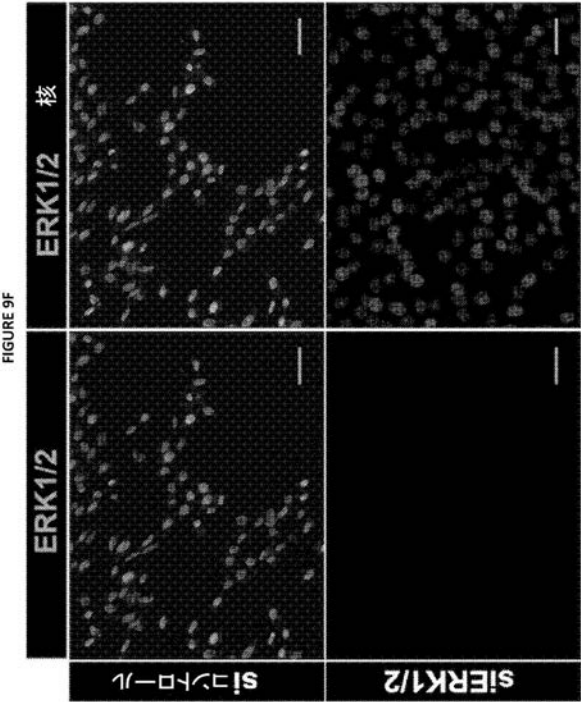
【 図 9 D 】



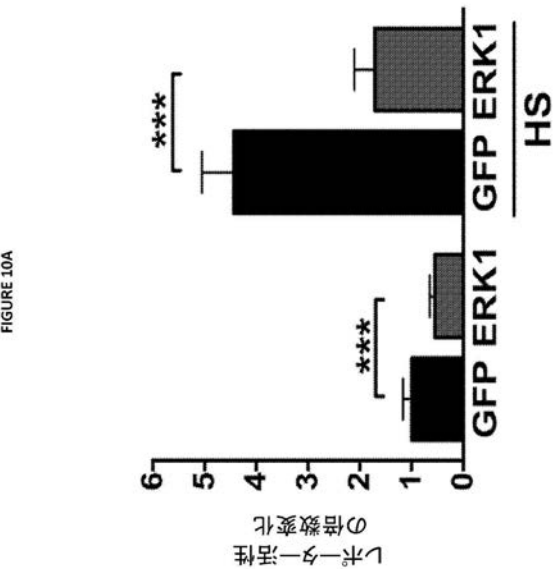
【 図 9 E 】



【 図 9 F 】

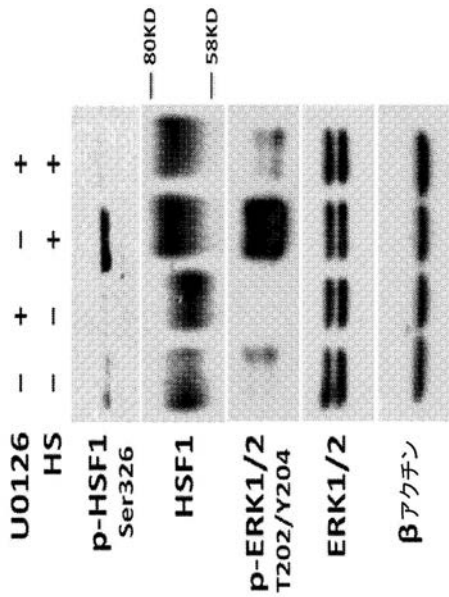


【 図 10 A 】



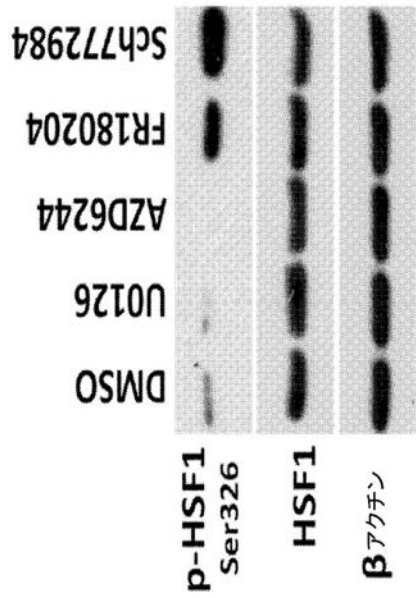
【 図 1 0 B 】

FIGURE 10B



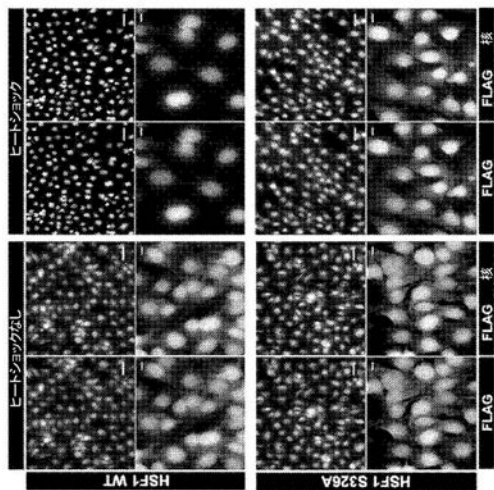
【 図 1 0 C 】

FIGURE 10C



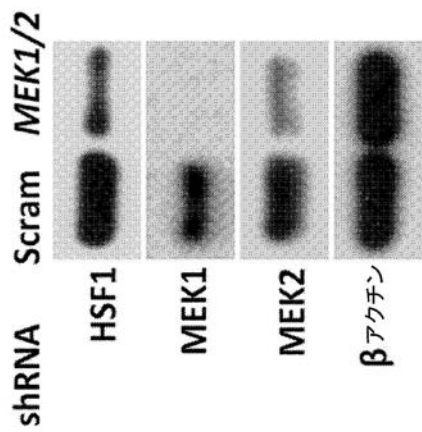
【 図 1 0 D 】

FIGURE 10D



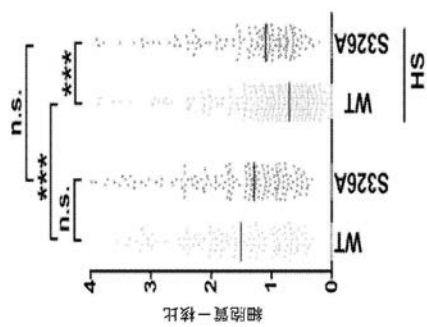
【 図 1 0 F 】

FIGURE 10F



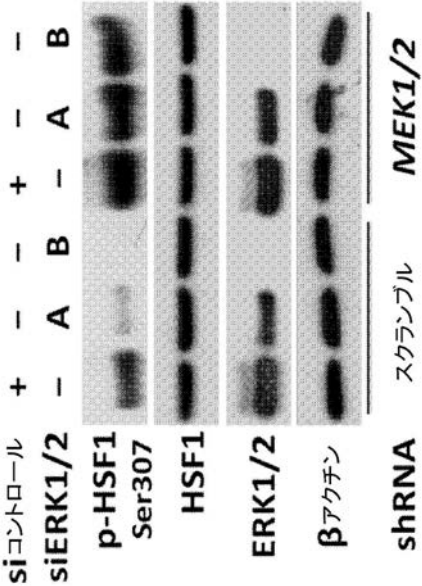
【 図 1 0 E 】

FIGURE 10E



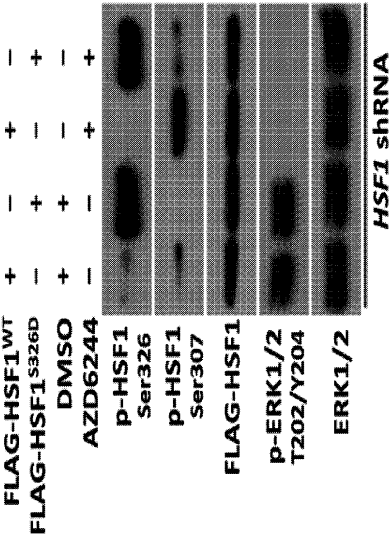
【 図 1 0 G 】

FIGURE 10G



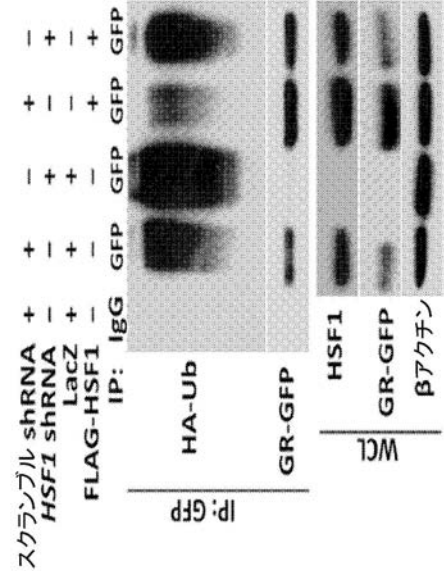
【 図 1 0 H 】

FIGURE 10H



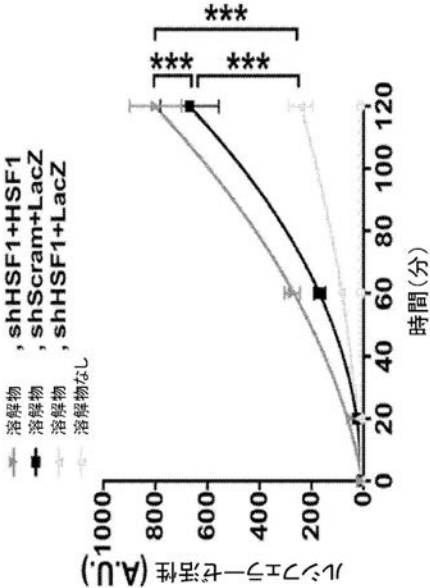
【 図 1 1 A 】

FIGURE 11A



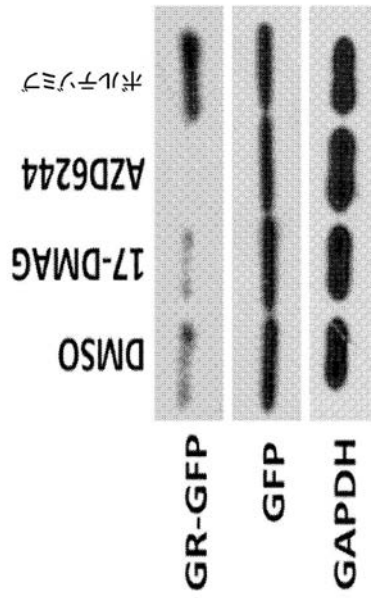
【 図 1 1 B 】

FIGURE 11B



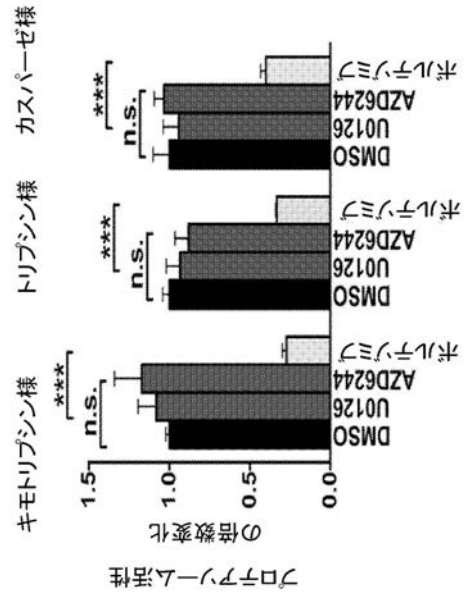
【図 1 1 C】

FIGURE 11C



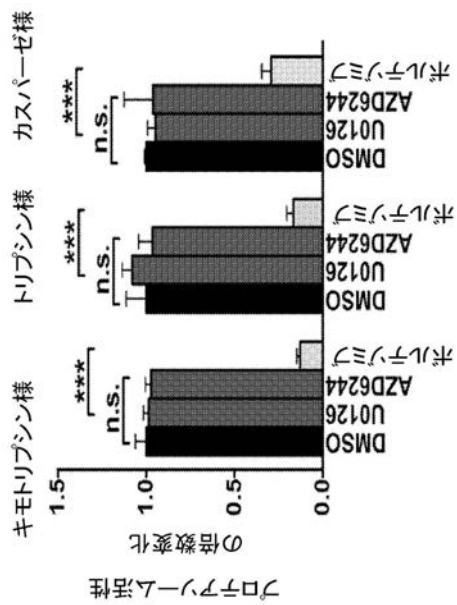
【図 1 1 D】

FIGURE 11D



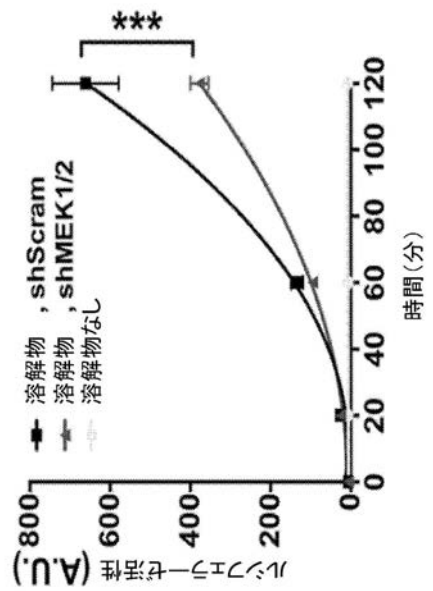
【図 1 1 E】

FIGURE 11E



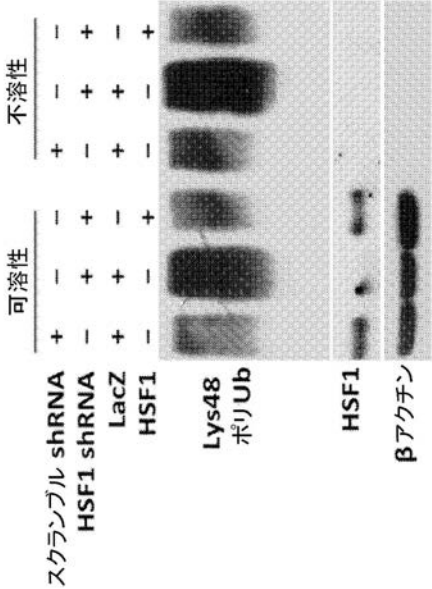
【図 1 1 F】

FIGURE 11F



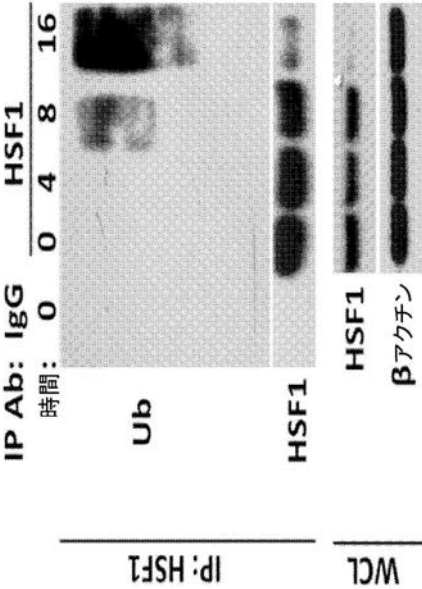
【 図 1 1 G 】

FIGURE 11G



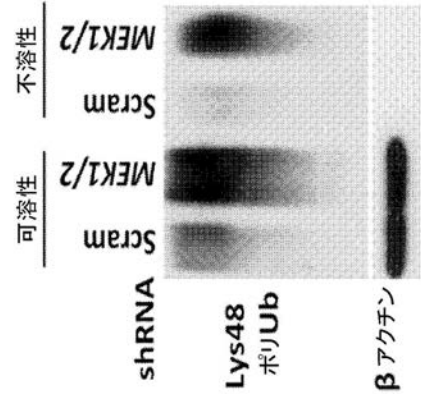
【 図 1 1 H 】

FIGURE 11H



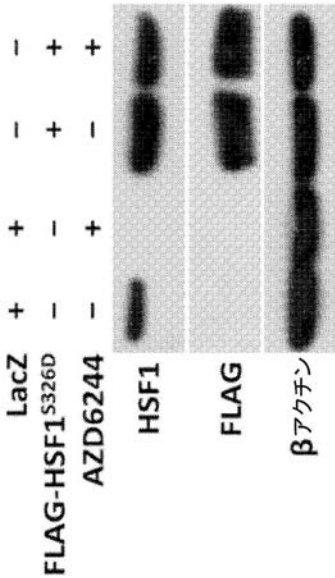
【 図 1 1 I 】

FIGURE 11I



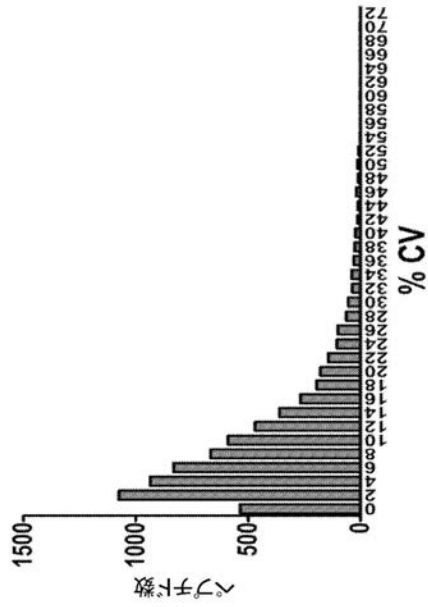
【 図 1 1 J 】

FIGURE 11J



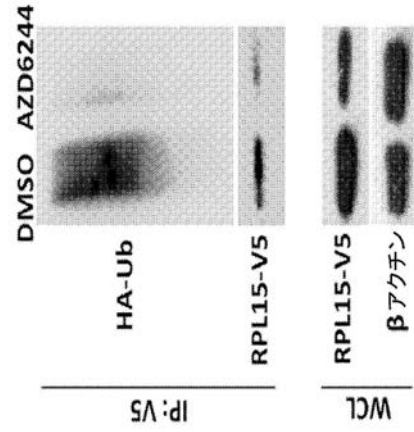
【 図 1 1 K 】

FIGURE 11K



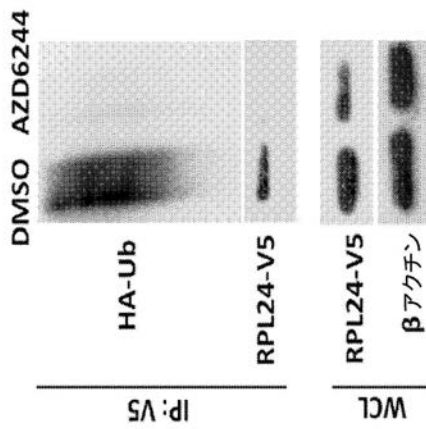
【 図 1 1 L 】

FIGURE 11L



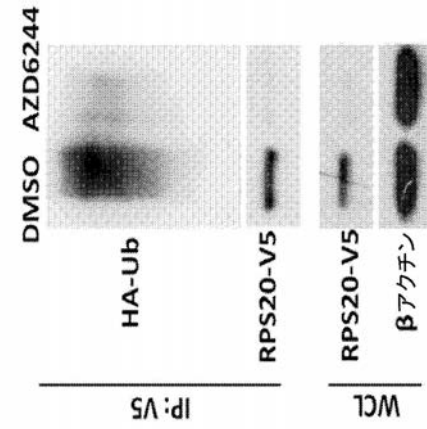
【 図 1 1 M 】

FIGURE 11M



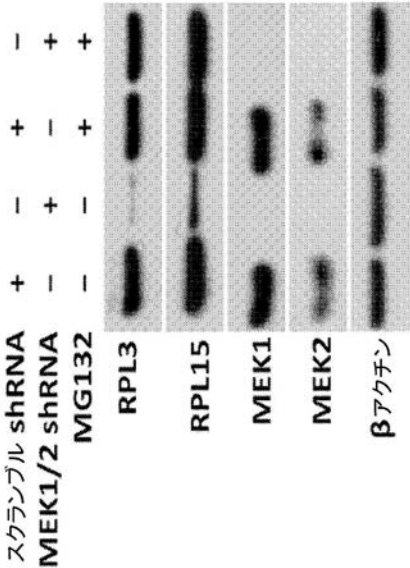
【 図 1 1 N 】

FIGURE 11N



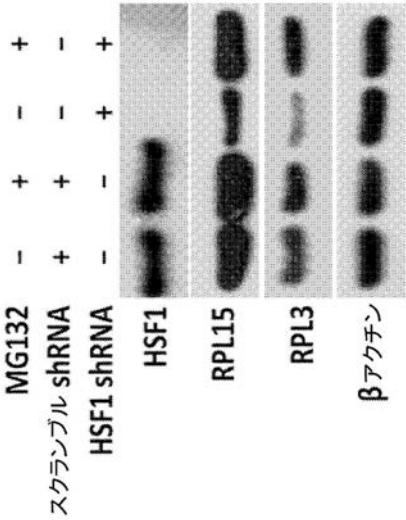
【 図 1 1 O 】

FIGURE 11O



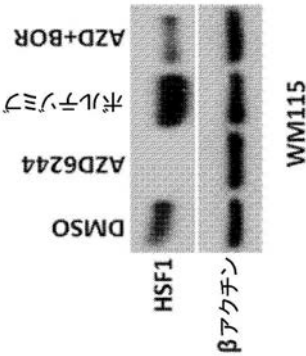
【 図 1 1 P 】

FIGURE 11P



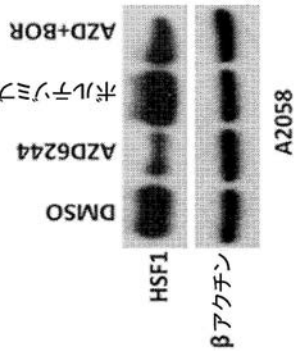
【 図 1 2 A 】

FIGURE 12A



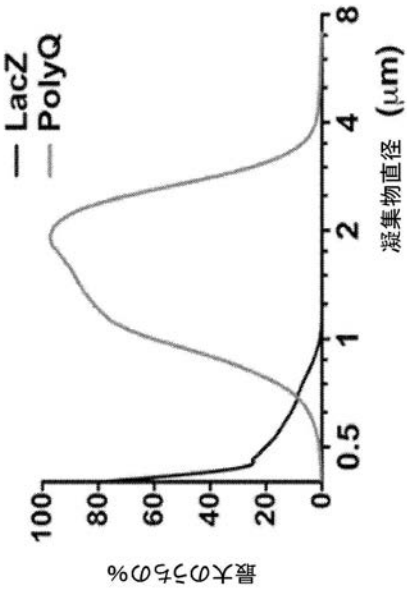
【 図 1 2 B 】

FIGURE 12B



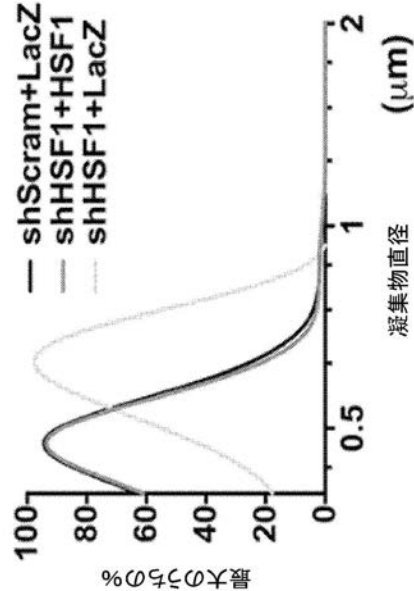
【 図 1 2 C 】

FIGURE 12C



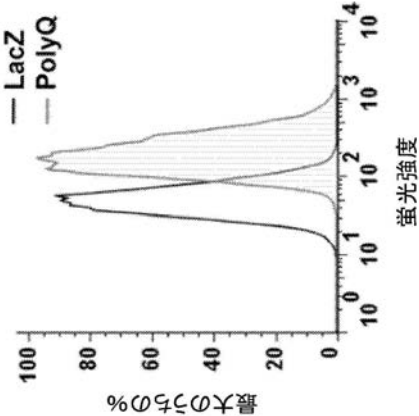
【 図 1 2 D 】

FIGURE 12D



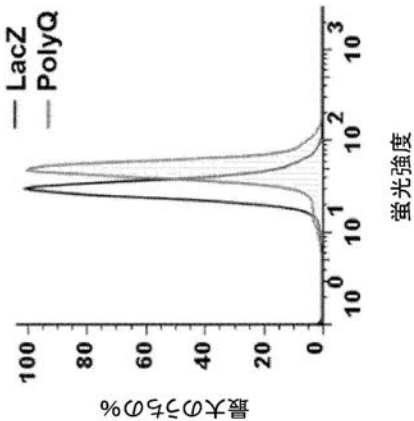
【 図 1 2 E 】

FIGURE 12E



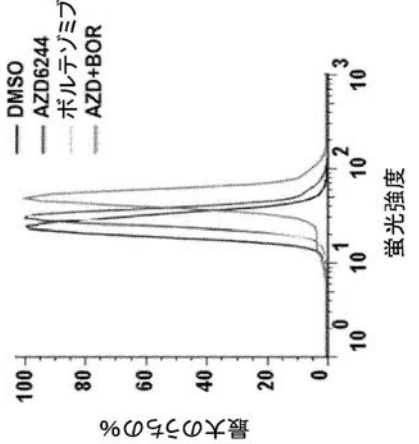
【 図 1 2 F 】

FIGURE 12F



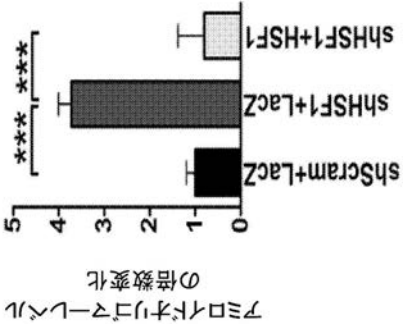
【 図 1 2 G 】

FIGURE 12G

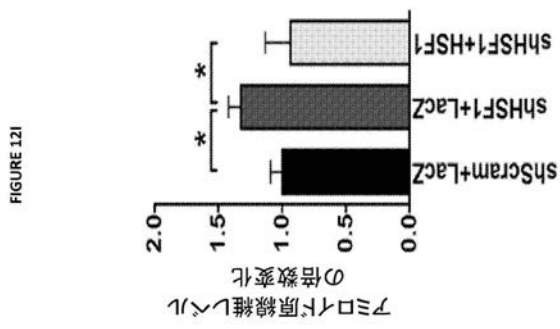


【 図 1 2 H 】

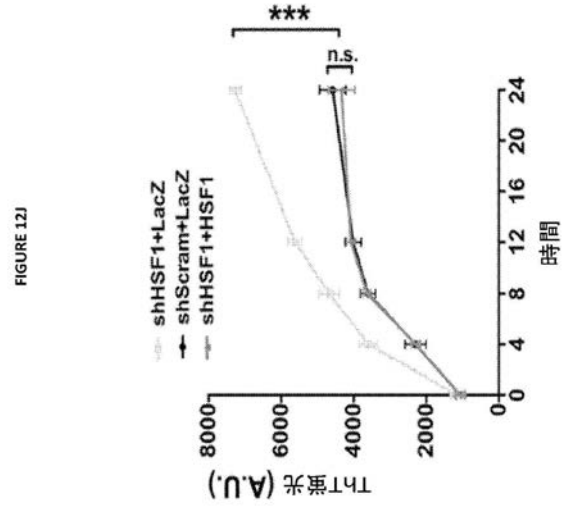
FIGURE 12H



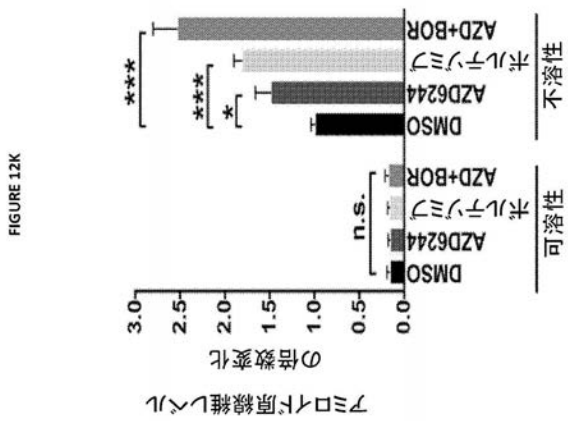
【図 1 2 I】



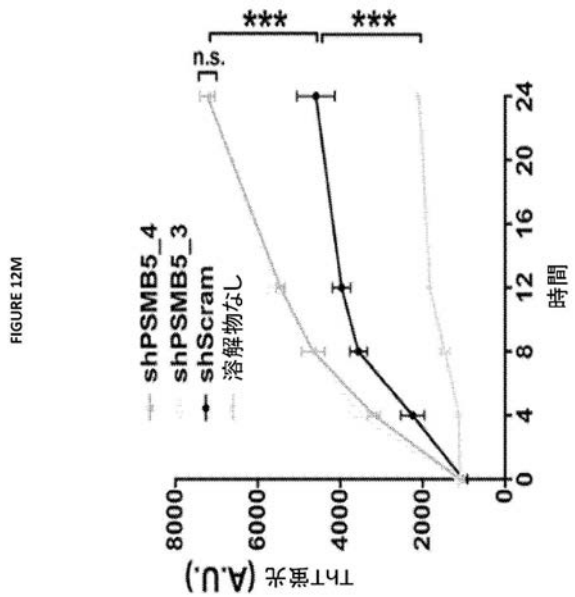
【図 1 2 J】



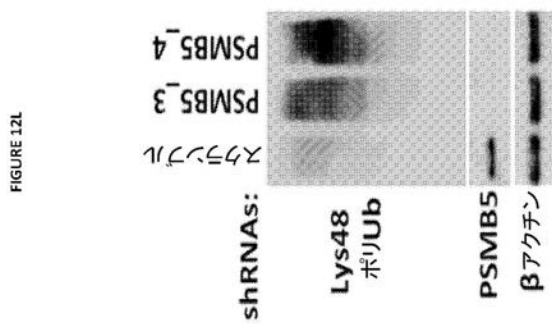
【図 1 2 K】



【図 1 2 M】

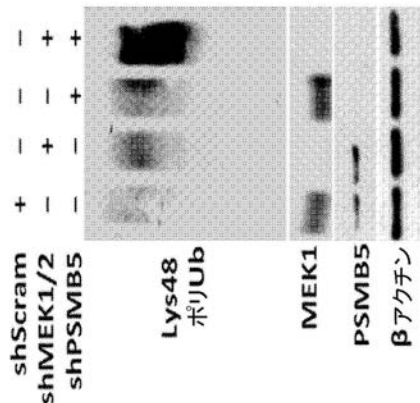


【図 1 2 L】



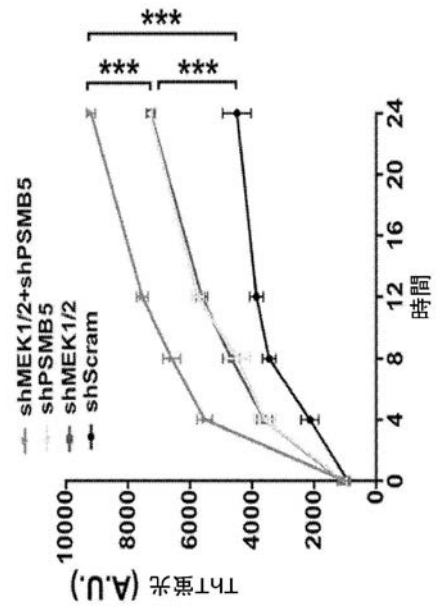
【 図 1 2 N 】

FIGURE 12N



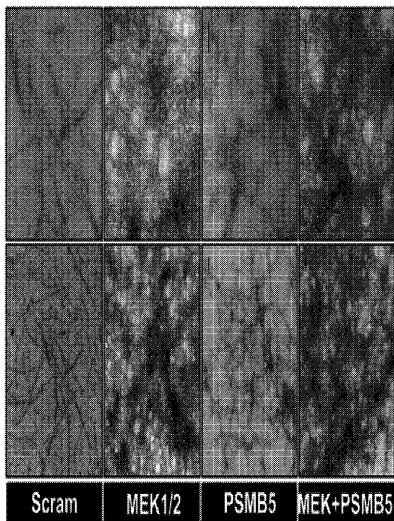
【 図 1 2 O 】

FIGURE 12O



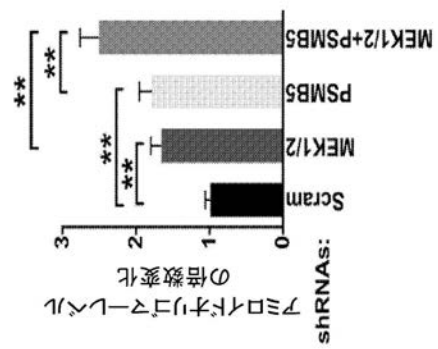
【 図 1 2 P 】

FIGURE 12P



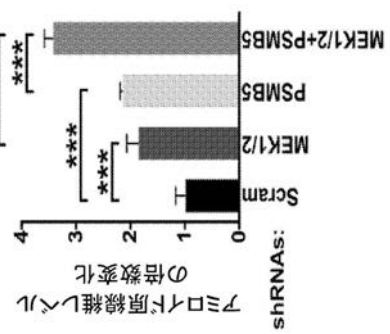
【 図 1 2 Q 】

FIGURE 12Q

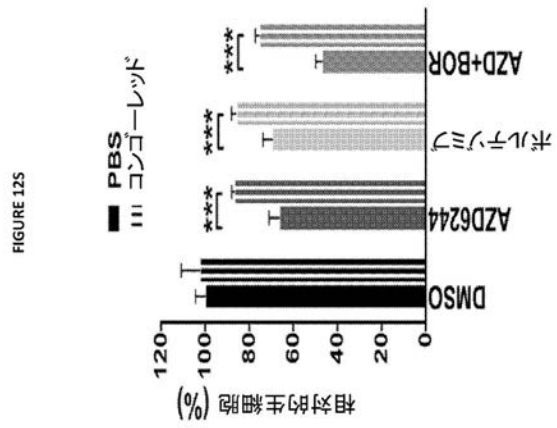


【 図 1 2 R 】

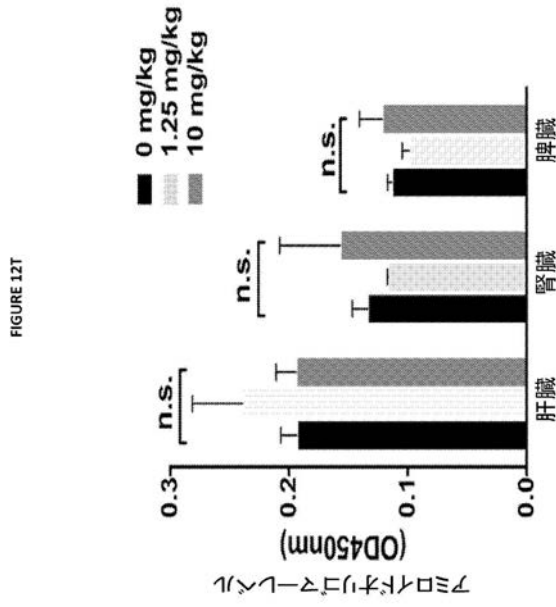
FIGURE 12R



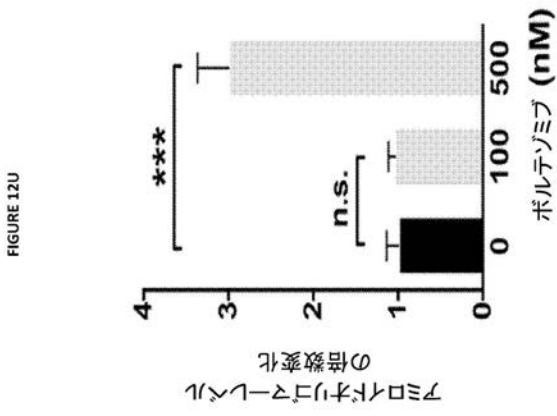
【 図 1 2 S 】



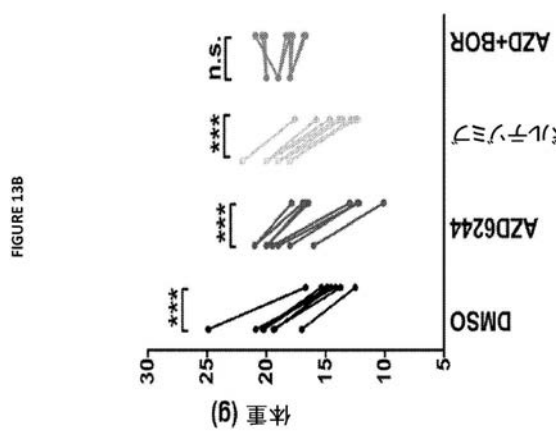
【 図 1 2 T 】



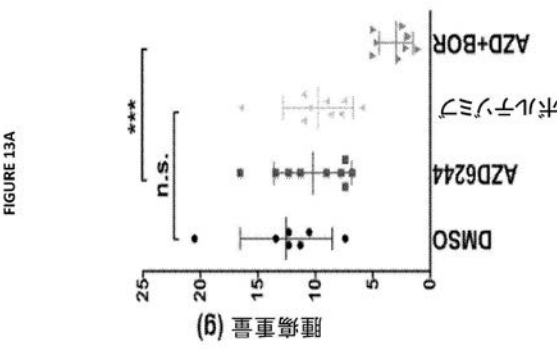
【 図 1 2 U 】



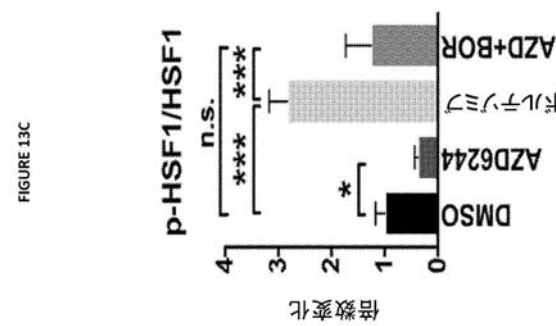
【 図 1 3 B 】



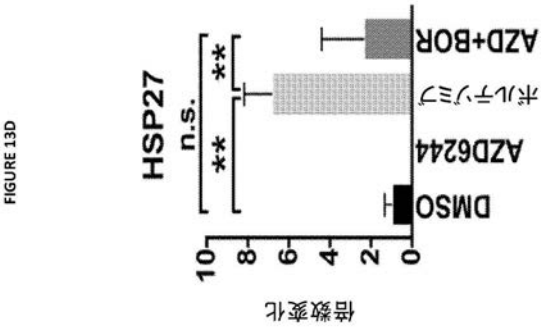
【 図 1 3 A 】



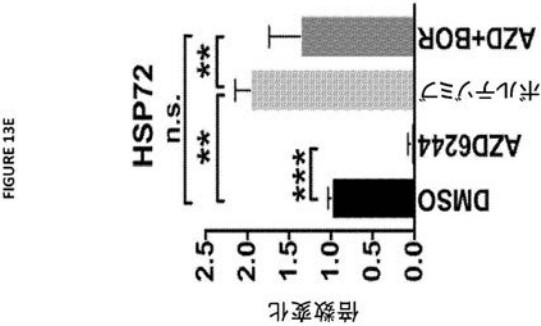
【 図 1 3 C 】



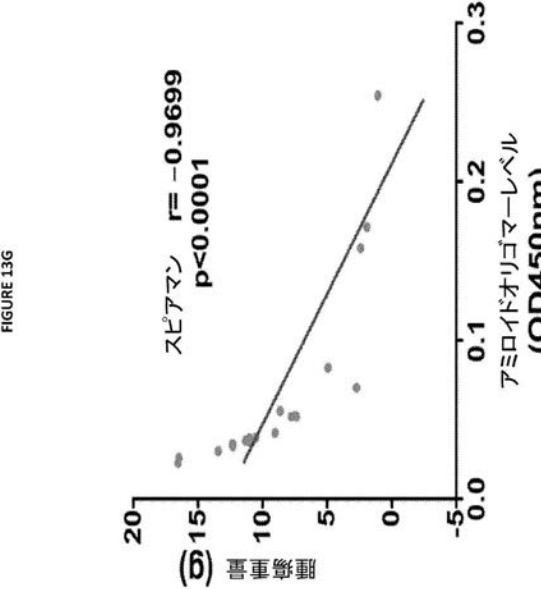
【 図 1 3 D 】



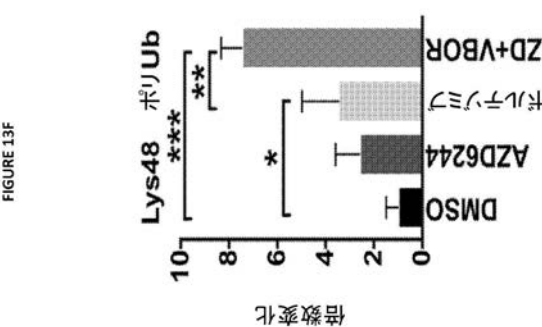
【 図 1 3 E 】



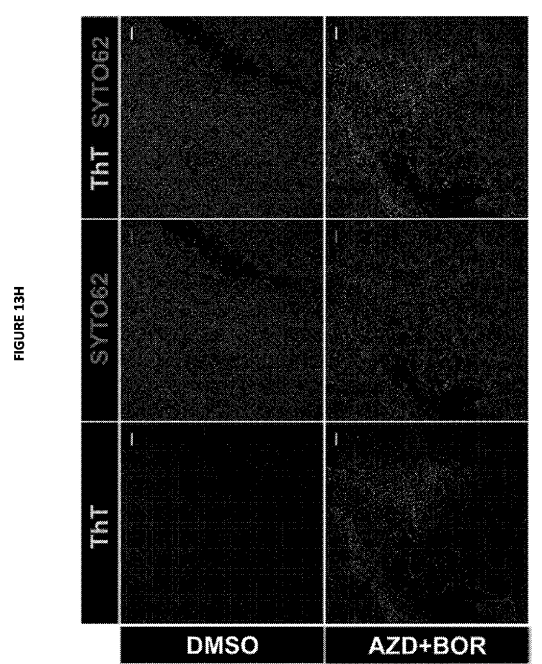
【 図 1 3 G 】



【 図 1 3 F 】



【 図 1 3 H 】





【配列表】

2018520164000001.app

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2015/044662

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(8) - A61K 31/282 (2015.01) CPC - A61K 9/0019 (2015.11) According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC(8) - A61K 31/282, 31/337, 31/404 (2015.01) CPC - A61K 9/0019, 9/08, 9/2018 (2015.11) Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched CPC - A61K 9/0019, 9/08, 9/2018 (2015.11) (keyword delimited) US Classes - 424/133.1, 142.1, 649 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PatBase, Google Patents, Google, PubMed. Search terms used: BRAF, MEK, MEK1, MEK2, RAF, melanoma, P124S, Q60P, combination, selumetinib, Bortezomib.		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2013/0004481 A1 (SOLCA et al) 03 January 2013 (03.01.2013) entire document	1-9
Y		10-12
Y	US 2012/0015973 A1 (GARRAWAY et al) 19 January 2012 (19.01.2012) entire document	10, 11
Y	VILLANUEVA et al. "Concurrent MEK2 mutation and BRAF amplification confer resistance to BRAF and MEK inhibitors in melanoma," Cell Rep. 26 September 2013 (26.09.2013), Vol. 4, No. 6, Pgs. 1090-1099. entire document	12
A	WO 2013/170066 A1 (H. LEE MOFFITT CANCER CENTER & RESEARCH INSTITUTE, INC et al) 14 November 2013 (14.11.2013) entire document	1-12
A	TANG et al. "MEK Guards Proteome Stability and Inhibits Tumor-Suppressive Amyloidogenesis via HSF1," Cell, 12 February 2015 (12.02.2015), Vol. 160, Pgs. 729-744. entire document	1-12
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 04 November 2015		Date of mailing of the international search report <b>15 DEC 2015</b>
Name and mailing address of the ISA/ Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer Blaine Copenheaver PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2015)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2015/044662

**Box No. II** Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☒ Claims Nos.: 13-21  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III** Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I		テーマコード (参考)
<b>A 6 1 K 31/69 (2006.01)</b>	A 6 1 K	31/69	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 1 1
C 1 2 N 9/99 (2006.01)	C 1 2 N	15/09	Z N A Z
	C 1 2 N	9/99	

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

特許法第30条第2項適用申請有り 2015年2月12日に公開された Cell . Volume 160 , Issue 4 , p729 - 744 “MEK Guards Proteome Stability and Inhibits Tumor - Suppressive Amyloidogenesis via HSF1”

(72) 発明者 タン , ジジャン

アメリカ合衆国 メイン 04609 , バーハーバー , メイン ストリート 600

Fターム(参考) 4C084 AA20 NA05 ZA891 ZB261 ZC201 ZC202 ZC751

4C086 AA01 AA02 BC39 DA43 MA02 MA04 NA05 ZA89 ZB26 ZC20  
ZC75