

Consecutive Days: A Phase I Study. *Jpn J  
Clin Oncol*, 30, 377-384, 2000

厚生科学研究費補助金（がん克服新十カ年戦略研究事業）

分担研究報告書

がん細胞の栄養飢餓耐性を標的とした治療法の開発に関する研究

分担研究者：江角 浩安 国立がんセンター研究所支所長

研究要旨：新しい生理反応を見つけ、この反応ががんでは固定化されたものが存在し、がんの治療標的と成りうることを見出した。  
ヒトに適用可能な候補の薬剤を見出した。

A. 研究目的

本研究は、腫瘍組織、腫瘍細胞に特異性のある生物反応を見出し、これを解析しかつこれを標的とした新しい治療戦略を見出すことを目的とする。さしあたり特に分担研究者らが見出した、腫瘍細胞の栄養飢餓耐性反応を標的とする。

B. 研究方法

1. がん細胞の栄養飢餓耐性のメカニズム解析に関しては、すでに我々が見出している顕著な栄養飢餓耐性を示す PANC-1 細胞を中心に、栄養飢餓時における細胞の反応を解析し、耐性のメカニズムへの関与をアンチセンス RNA 発現ベクターや、阻害剤を用いて解析する。
2. 治療法の開発に関しては、簡便なスクリーニング系を作り幅広く薬剤を探し出し、これが治療に使

いうる。

C. 研究結果

1. 低酸素や一酸化窒素による栄養飢餓耐性の誘導の発見

細胞を低酸素や一酸化窒素発生試薬で処理するとグルコース欠乏に対して顕著に耐性となることを見いだした。この反応は、培地中に少なくともグルタミン、アルギニン、アスパラギン酸など数種類のアミノ酸の一つが存在することを要求し、薬理的検討と、アンチセンス RNA 発現ベクターを用いた検討から、5'-AMP activated protein kinase に依存した反応であること、PKB/Akt がその反応に一部関与することを見いだした。HIF-1 とは独自の経路の反応と考えられた。

がん細胞の一部は既にグルコース欠乏耐性である事を見いだした隣

臓がんは代表的な hypovascular tumor である。膵臓がんの細胞株を 6 種類グルコース欠乏の培地で培養すると増殖を示すものさえあった。胃がん、大腸がん、肝臓がんでも同様に検討すると、肝臓がんはすべてグルコース飢餓に感受性であったが胃がん大腸がんの未分化なものは耐性であった。

PANC-1 を例にそのメカニズムを検討すると、上に述べた AMPK, PKB/Akt のアンチセンス発現ベクターでグルコース依存性が回復した。新しい、がん治療の標的になると考えられ薬剤のスクリーニングをしている。

2. 簡便なスクリーニング系を開発した(特許出願中、特願 2000-260688)。このスクリーニング系を用い、troglitazone, LY294002 が候補薬剤であることを見出した。とくに、troglitazone は 20 $\mu$  M と経口投与でも到達可能な、またヒトでの使用経験のある濃度に近い濃度で有効であり臨床導入も可能であると考えられた。

#### D. 考察

本年度の研究で、新しい治療標的になりうると考えられる生物反応を見出した。この反応は生理的なものと考えられるが、正常な体

で安静時には作動していない可能性が高い。慎重に検討を要することはもちろんであるが、そうであれば腫瘍組織には特異性があり、この反応で使われる特別なエネルギー代謝は十分に特異性を持った標的と考えられる。また、現在はアレルギー性肝障害のため発売中止になってはいるが、多くのヒトに使用経験のある薬剤が候補に上った。臨床応用を具体的に検討中である。

#### E. 結論

新しい生理反応を見つけ、この反応ががんでは固定化されたものが存在し、がんの治療標的と成りうることを見出した。ヒトに適用可能な候補の薬剤を見出した。

#### G. 研究発表

1. Kimura, H., Weisz, A., Kurashima, Y., Hashimoto, K., Ogura, T., D'Acquisto, F., Addeo, R., Makuuchi, M., Esumi, H.

Hypoxia response element of the human vascular endothelial growth factor gene mediates transcriptional regulation by nitric oxide: control of hypoxia-inducible factor-1 activity by nitric oxide

BLOOD, 95: 189-197(2000)

2. Matsumi H, Yano T, Osuga Y, Kugu K, Tang X, Xu JP, Yano N, Kurashima Y, Ogura T, Tsutsumi O, Koji T, Esumi H, Taketani Y.  
Regulation of nitric oxide synthase to promote cytostasis in ovarian follicular development.  
Biol Reprod. ;63:141-146(2000)
3. Bermont, L., Lamielle, F., Fauconnet, S., Esumi H., Weisz, A., and Adessi, G.  
Regulation of vascular endothelial growth factor expression by Insulin-like Growth Factor-I in endometrial adenocarcinoma cells  
Int J Cancer, 85: 117-128(2000)
4. Muto, M., Hitomi, Y., Ohtsu, A., Ebihara, S., Yoshida, S., Esumi H.  
Association of aldehyde dehydrogenase 2 gene polymorphism with multiple esophageal dysplasia in head and neck cancer patients  
GUT, 47:256-261(2000)
5. Sakurazawa, N., Tanaka, N., Onda, M., Esumi H.  
Instability of X-chromosome methylation in aberrant crypt foci of the human colon  
Cancer Res, 60: 3165-3169( 2000)
6. Muto, M., Hitomi, Y., Ohtsu, A., Shimada H., Kashiwase Y., Sasaki H., Yoshida S., Esumi H. Acetaldehyde production by Non-pathogenic Neisseria in Human Oral Microflora  
Int J Cancer, 88:342-350,(2000)
7. Soisungwan Satarug, Jason R.Baker., paul E.B.Reilly., Hiroyasu Esumi., Micheal R.Moore.  
Evidence for a Synergistic Interaction between Cadmium and Endotoxin Toxicity and for Nitric Oxide and Cadmium Displacement of Metals in the Kidney  
NITRIC OXIDE 4: 431-440(2000)
8. Izuishi, K., Kato, K., Ogura, T., Kinoshita, T., Esumi H.  
Remarkable Tolerance of Tumor Cells to Nutrient Deprivation : Possible New Biochemical Target for Cancer Therapy  
Cancer Res : 60:6201-6207(2000)
9. Hideo Kimura., Alessandro Weisz., Tsutomu Ogura., Yoshiaki Hitomi., Yukiko Kurashima., Kouichi Hashimoto., Fulvio D'Acquisto.,

Masatoshi Makuuchi., Hiroyasu Esumi.  
Identification of Hypoxia-Inducible  
Factor-1 (HIF-1) Ancillary Sequence  
and Its Function in Vascular  
Endothelial Growth Factor Gene  
Induction by Hypoxia and Nitric Oxide  
J Biol Chem (in press)

10. Laurent Bermont., Fr d rique

Lamielle., Fabrice Lorchel., Sylvie  
Fauconnet., Hiroyasu Esumi.  
Alessandro Weisz., and Gerard L.  
Adessi.

Insulin upregulates VEGF and  
stabilizes its messengers in endometrial  
adenocarcinoma cells

J. Clin. Endocrinol. Metab. (in press)

H. 知的財産権の出願・登録状況

栄養飢餓耐性を標的とした薬剤スク  
リーニング系の開発

(特許出願中、特願2000-26  
0688)

分担研究報告書

新しいがん薬物療法の研究（がん化学療法の分子標的の同定と個別化）

分担研究者 桑野 信彦

九州大学大学院医学研究院分子常態医学部門生化学講座医化学分野 教授

研究要旨：

がん化学療法における分子標的として血管新生・浸潤に関連するマクロファージや肥満細胞とサイトカインとシグナル、さらに抗がん剤の排出に関連する ABC トランスポーターなどを選んで検討した。その結果、がん血管新生やがん特異的発現から見た幾つかのサイトカインや ABC トランスポーターに“個別化”の可能性について提示する。

A. 研究目的

悪性腫瘍における血管新生・浸潤ならびに抗がん剤耐性は代表的な悪性形質である。この2つの悪性形質に関与するヒト悪性腫瘍での分子標的の発現レベルを明らかにし、新しい抗腫瘍薬の作用機構からみた感受性の個別化を行い分子診断ならびに適切な治療法と新しい薬剤の開発に寄与していく。

B. 研究方法

1. 血管新生・浸潤に関与する分子標的に関して

① マクロファージの浸潤がヒト腫瘍において血管密度や悪性度と関連する否かを CD68、第8抗原などの抗体を用いた免疫染色法で検討した。さらにチミジンフォスホリラーゼ（TP）やヘムオキシゲナーゼ1（HO-1）の発現について各々の酵素の特異的抗体で免疫染色法や Northern blot 法で検討した。

② 血管新生のモデル系として *in vitro* では血管内皮細胞を用いた遊走やコラーゲンゲル内の管腔形成で、*in vivo* ではラット角膜、マウス角膜、背部皮下法やマトリゲル法などを用いた。

2. P-糖蛋白質や MRP をはじめとする ABC トランスポーターを主な対象として薬剤感受性の分子標的となるか否かに関して、

① Northern blot 法と定量 PCR 法、さらに免疫染色法で各種 ABC トランスポーター遺伝子の発現をヒト腫瘍やがん細胞株で検討した。さらに P388 白血病担がんマウスでピンクリスチン治療を行い治療感受性から抵抗性に変化する時期に白血病細胞を単離し多剤耐性遺伝子の発現をみた。

② 単離した遺伝子のプロモーターはルシフェラーゼ活性で、遺伝子再編成については Southern blot 法で各々解析した。さらに様々な ABC トランスポーターの抗がん剤特異性について cDNA 導入株やアンチセンス導入株を樹立した。

3. 倫理面への配慮

本研究計画では、血管新生の臨床材料を用い、血管新生に関与する遺伝子の発現解析を行う予定である。そのため、

① 研究対象とする個人の人権擁護のためデータ処理には個人名の使用を避け、臨床データと遺伝子発現データのリンクは桑野のみが行う。

② 同意書をもって対象者に理解を求めた上で検体を使用する。

③ 解析結果は個人の利益に資する場合にのみ本人に通知し、一方全ての結果は個人が特定できない所で人類の医学への貢献のため利用する。

尚、本実験は九州大学医学部倫理委員会の審査を経た後、開始する。

### C. 研究結果

1. 血管新生・浸潤能に関する分子標的について、がんの間質に浸潤してくる血球細胞や微小環境はがんの血管新生においても極めて重要な役割を果たすが、その分子機構については明らかでない。そこでマクロファージや肥満細胞や環境 pH に注目し、血管新生や癌の悪性度との関連性について解析した。その結果、

① マクロファージの浸潤がメラノーマの悪性度や微小血管密度と深く相関すること、ならびに活性マクロファージから生産される TNF $\alpha$ や IL1 がパラクライン的にメラノーマの血管新生を促進している可能性を示唆した<sup>1)</sup>。活性マクロファージは TP や HO-1 を活発に生産しており、血管新生マクロファージの酵素マーカーとなる可能性を示唆した<sup>2)</sup>。さらに、IFN $\gamma$ が強くマクロファージの TP の発現を転写レベルで上昇させ、プロモーター上の GAS/TP エlementが関与していることを見出した<sup>11)</sup>。

② 肥満細胞やリンパ球などから生産される IL4 や IL13 に血管新生誘導活性があることを見出した。さらにこの血管新生には sVCAM/  $\alpha$ 4 インテグリン系の活性化が関与することを見出した<sup>3, 4)</sup>。

③ 腫瘍を取り巻く微小環境の一つの重大な要素に pH がある。我々は抗血管新生作用を示す、アンジオスタチンのプラスミノゲンからの生産に酸性 pH で働くカテプシン D が関与していることを見出した<sup>5)</sup>。

2. 薬剤感受性を制御する分子標的として ABC トランスポーターの関与について、ATP 依存的に排出される抗がん剤と ABC トランスポーターとの対応ならびにヒトがんでの特異的発現をはっきりさせることが分子標的による個別化には大切である。我々は、

① MRP2 の発現がヒト大腸がんで特異的に上昇していること、MRP1、MRP2 ならび MRP3 の大腸における発現レベルに 1000 倍近い個人差があることなどを観察した<sup>7)</sup>。さらに MRP3 がエトポシドならびにシスブ

ラチンの感受性と ATP 依存性排出に関与すること、脳腫瘍の症例でがん部位に MRP1 と MRP3 の発現上昇などを見出した<sup>14)</sup>。

② ヒト MDR1 遺伝子のがん細胞における発現上昇にプロモーター領域での Alu 配列や他遺伝子の挿入などによる再配列が観察された<sup>6)</sup>。膀胱腫瘍において再発症例での MDR1 発現上昇にはプロモーター領域の CpG の脱メチル化が関与していることを明らかにした<sup>8)</sup>。さらに、マウス白血病の化学療法で上昇してくる多剤耐性遺伝子の上昇にプロモーター上にレトロウイルス LTR 配列の挿入を見出した<sup>12)</sup>。

③ 抗がん剤や放射線などによって誘導される MDR1 遺伝子の発現に関与するプロモーター上の Y-box を結合する YB-1 は p53 と結合することならびに一本鎖 RNA にも結合しエキソヌクレアーゼ活性を示すことを明らかにした<sup>10, 15)</sup>。

### D. 考察

我々のサイトカインによって誘導される新しい血管新生モデルがどれだけヒトがんに実際に関与しているかは不明である。さらに IFN $\gamma$ がマクロファージの TP 活性を上昇させることを見出したが、ヒトがんでどれだけ反映しているかもこれからの課題である。血球性間質細胞が何れのがんの血管新生や浸潤に関与し、さらにその主役を演じているサイトカインや因子を明らかにすることは“がんの個別化”に新しい貢献ができると確信している。他方、抗がん剤の解毒抱合体などを含め、細胞外への排出を担う ABC トランスポーターの発現や腫瘍特異性を明らかにすることも“がんの個別化”に重要と考える。膀胱がんや白血病での MDR1 遺伝子/P-糖蛋白質プロモーター上の CpG のメチル化の有無は重要な鍵を握っている。今後、分子診断へ寄与することが大切である。さらに MRP ファミリーについても正常部位とがん部位の発現の特異性についての分子的背景を明らかにしていくことも重要と考える。

## E. 結論

1. 血管新生・浸潤に関して我々は、マクロファージや肥満細胞がヒト腫瘍で重要な働きを担っていることを示唆した。さらに関連するサイトカインである TNF $\alpha$ /IL1 さらに IL4/IL13 が血管新生の誘導に関与していることを *in vitro* と *in vivo* の血管新生モデル系で示した。
2. ABC トランスポーターの中で代表的な MDR1/P-糖蛋白質についてはプロモーターを含む、遺伝子発現制御領域の遺伝子再配列ならびに CpG のメチル化がヒト腫瘍の発現上昇に重要であることを示した。
3. ABC トランスポーターの中で MRP3 がエトポシドやシスプラチンの細胞外排出に関与していることや、脳腫瘍において MRP1 と MRP3 が、さらに大腸がんにおいて MRP2 が各々ががん部位で上昇していることが観察された。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Torisu, H., Ono, M., Kiryu, H., Furue, M., Ohmoto, Y., Nakayama, J., Nisioka, Y., Sone, S. and Kuwano, M.  
Macrophage infiltration correlates with tumor stage and angiogenesis in human malignant melanoma: possible involvement of TNF $\alpha$  and IL-1 $\alpha$ . *Int. J. Cancer*, 85: 182-188 (2000).
2. Torisu, H-I., Furue, M., Kuwano, M. and Ono, M.  
Co-expression of thymidine phosphorylase and heme oxygenase-1 in macrophages in human malignant vertical growth melanomas. *Jpn. J. Cancer Res.*, 91: 906-910 (2000).
3. Fukushi, J., Ono, M., Morikawa, W., Iwamoto, Y. and Kuwano, M.  
The activity of soluble VCAM-1 in angiogenesis stimulated by IL-4 and IL-13. *J. Immunol.*, 165: 2818-2823 (2000).
4. Umeshita-Suyama, R., Sugimoto, R., Akiwa, M., Arima, K., Yu, B., Wada, M., Kuwano, M., Nakajima, K., Hamasaki, N. and Izuhara, K.  
Characterization of IL-4 and IL-13 signals dependent on the human IL-13 receptor  $\alpha$  chain 1: redundancy of requirement of tyrosine residue for STAT3 activation. *Int. Immunol.*, 12: 1499-1509 (2000).
5. Morikawa, W., Yamamoto, K., Ishikawa, S., Takemoto, S., Ono, M., Fukushi, J., Naito, S., Nozaki, C., Iwanaga, S. and Kuwano, M.  
Angiostatin generation by cathepsin D secreted by human prostate carcinoma cells. *J. Biol. Chem.*, 275: 38912-38920 (2000).
6. Harada, T., Nagayama, J., Kohno, K., Mickley, L., Fojo, T., Kuwano, M. and Wada, M.  
Alu-associated interstitial deletions and chromosomal rearrangement in 2 human multidrug-resistant cell lines. *Int. J. Cancer*, 86: 506-511 (2000).
7. Hinoshita, E., Uchiumi, T., Taguchi, K., Kinukawa, N., Tsuneyoshi, M., Maehara, Y., Sugimachi, K. and Kuwano, M.  
Increased expression of an ATP-binding cassette superfamily transporter, multidrug resistance protein 2, in human colorectal carcinomas. *Clinical Cancer Res.*, 6: 2401-2407 (2000).
8. Tada, Y., Wada, M., Kuroiwa, K., Harada, T., Tsuneyoshi, M., Nakagawa, M., Naito, S., Kuwano, M.  
MDR1 overexpression and altered degree of methylation at the promoter region in bladder cancer during chemotherapeutic treatment. *Clinical Cancer Res.*, 6: 4618-4627 (2000).
9. Naito, S., Koga, H., Yokomizo, A., Sakamoto, N., Kotoh, S., Nakashima, M., Kiue, A. and Kuwano, M.  
Molecular analysis of mechanisms regulating drug sensitivity and the development of new chemotherapy strategies for genitourinary carcinomas. *World J. Surg.*, 24:1183-1186 (2000).
10. Okamoto, T., Izumi, H., Imamura, T., Takano, H., Ise, T., Uchiumi, T., Kuwano, M. and Kohno, K.  
Direct interaction of p53 with the Y-box binding protein, YB-1: a mechanism for regulation of human gene expression. *Oncogene*, 19: 6194-6202 (2000).
11. Ushigome, F., Takanaga, H., Matsuo, H., Yanai, S., Tsukimori, K., Nakano, H., Uchiumi, T., Nakamura, T., Kuwano, M., Ohtani, H., and Sawada, Y.  
Human placental transport of vinblastine, vincristine, digoxin and progesterone: contribution of P-glycoprotein. *Eur. J. Pharmacol.*, 408: 1-10 (2000).
12. Goto, H., Kohno, K., Sone, S., Akiyama, S., Kuwano, M. and Ono, M.  
Gamma interferon-dependent induction of thymidine phosphorylase/platelet derived endothelial growth factor through gamma-activated sequence-like element in human macrophages. *Cancer Res.*, 61: in press (2001).
13. Nagayama, J., Iino, M., Tada, Y., Kusaba, H., Kiue, A., Ohsima, K., Kuwano, M. and Wada, M.  
Retrovirus insertion and transcriptional activation of the multidrug resistance (*mdrla*) gene in leukemias treated by a chemotherapeutic agent in vivo. *Blood*, 97: in press (2001).
14. Haga, S., Hinoshita, E., Ikezaki, K., Fukui, M., Scheffer, G. L., Uchiumi, T. and Kuwano, M.  
The involvement of the multidrug resistance protein 3 in drug sensitivity and its expression in human glioma. *Jpn. J. Cancer Res.*, in press (2001).
15. Izumi, H., Imamura, T., Nagatani, G., Ise, T., Murakami, T., Uramoto, H., Torigoe, T., Ishiguchi, H., Nomoto, M., Okamoto, T., Uchiumi, T., Kuwano, M., Funai, K. and Kohno, K.  
YB-1 binds preferentially to single-stranded nucleic acid and exhibit 3'-5' exonuclease activity. *Nucl. Acids Res.*, in press (2001).



## 2. 学会発表

- Ohtsubo, M., Fujii, N., Maruyama, M., Nishie, A., Masuda, K., Ono, M. and Kuwano, M.  
Identification of angiogenesis-related genes in mouse matrigel implant model by cDNA expression array and suppressive subtractive hybridization (SSH). 91th Annual Meeting of American Association for Cancer Research(Poster session)2000/4/1-4/5(San Francisco)
- Nishie, A., Ohtsubo, M., Masuda, K., Naito, S., Ono, M. and Kuwano, M.  
Identification of differentially expressed genes in human renal cell carcinoma using suppression subtractive hybridization. 91th Annual Meeting of American Association for Cancer Research(Poster Discussion)2000/4/1-4/5(San Francisco)
- Uchiyumi, T., Nakamura, T., Ashizuka, M., Okamoto, T. and Kuwano, M.  
Isolation of proteins closely associated with the Y-box binding protein (YB-1) and their expression in malignant cancers. 91th Annual Meeting of American Association for Cancer Research(Poster session)2000/4/1-4/5(San Francisco)
- Harada, T., Motida, Y., Tada, Y., Wada, M., Maehara, Y. and Kuwano, M.  
Association of MDR1 expression with methylation status of 5' CPG sites at the promoter region and with mismatch repair status in colorectal tumor cell lines. 91th Annual Meeting of American Association for Cancer Research(Poster session)2000/4/1-4/5(San Francisco)
- Tada, Y., Wada, M., Nakayama, M., Harada, T., Nagayama, J., Kuroiwa, K., Tuneyoshi, M., Nagayama, M., Naito, S. and Kuwano, M.  
Methylation status of CPG sites at the promoter region and expression of MDR1 gene in patients with bladder cancer. 91th Annual Meeting of American Association for Cancer Research(Poster session)2000/4/1-4/5(San Francisco)
- Okamoto, T., Takano, H., Imamura, T., Ise, T., Ohmori, H., Izumi, H., Uchiyumi, T., Kuwano, M. and Kohno, K.  
Direct interaction of Y-Box protein, YB-1, with p53 and regulation of human multidrug resistance 1 gene expression. 91th Annual Meeting of American Association for Cancer Research(Poster session)2000/4/1-4/5(San Francisco)
- Morikawa, W., Ishikawa, S., Takemoto, S., Ono, M., Iwanaga, S. and Kuwano, M.  
Contribution of aspartyl proteinase to generation of angiostatin-like fragments from plasminogen by human carcinoma cells. 91th Annual Meeting of American Association for Cancer Research(Poster session)2000/4/1-4/5(San Francisco)
- Ono, M., Yamada, Y., Sone, S., Shibuya, M., Cherrington, J., Shawver, L K, Macmahon, G. and Kuwano, M.  
SU5416 inhibits the tyrosine kinase vascular endothelial growth factor receptor Flt-1 in vitro and angiogenesis in vivo. 91th Annual Meeting of American Association for Cancer Research(Poster session)2000/4/1-4/5(San Francisco)
- Goto, H., Ono, M., Torisu, H., Sone, S., Kohno, K. and Kuwano, M.  
Regulation mechanism of thymidine phosphorylase by interferon-gamma in activated macrophages. 91th Annual Meeting of American Association for Cancer Research(Poster session)2000/4/1-4/5(San Francisco)
- Nagayama, J., Hinoshita, E., Iino, M., Kiue, A., Oka, M., Uchiyumi, T., Wada, M. and Kuwano, M.  
Retrovirus-associated activation of multidrug resistance (MDR) gene and MDR-related protein (MRP) family genes in hematopoietic malignancies. 91th Annual Meeting of American Association for Cancer Research(Poster session)2000/4/1-4/5(San Francisco)
- Fukushi, J., Ono, M., Ohtsubo, M., Morikawa, W., Iwamoto, Y. and Kuwano, M.  
The possible role of soluble vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in angiogenesis stimulated by interleukin-4 (IL-4) and IL-13. 91th Annual Meeting of American Association for Cancer Research(Poster session)2000/4/1-4/5(San Francisco)
- Hinoshita, E., Uchiyumi, T., Taguchi, K., Kinugawa, N., Tsuneyoshi, M., Maehara, Y., Sugimati, K. and Kuwano, M.  
A multidrug resistance protein MRP2: its possible association with drug response to cisplatin in human colorectal carcinomas. 91th Annual Meeting of American Association for Cancer Research(Poster session)2000/4/1-4/5(San Francisco)
- Haga, S., Uchiyumi, T., Hinoshita, E., Wada, M., Ikezaki, K., Furui, M. and Kuwano, M.  
Expression and localization of MRP family genes in capillary-like structures of human brain endothelial cell. 91th Annual Meeting of American Association for Cancer Research(Poster session)2000/4/1-4/5(San Francisco)
- 桑野信彦  
血管内皮細胞と血管新生 第12回日本アレルギー学会(シンポジウム)2000年4月20日-22日(福岡)
- 糸川高史、小野真弓、山田雄次、桑野信彦  
VEGF受容体を標的とした血管新生の作用機構 第4回がん分子標的治療研究会総会(セッション)2000年6月15日-17日(名古屋)
- 内海健、和田守正、桑野信彦  
ABCトランスポーター遺伝子ヒトMRP3の基質特異性と腫瘍での発現 第4回がん分子標的治療研究会総会(セッション)2000年6月15日-17日(名古屋)
- 芝原幸太郎、内海健、河野公俊、桑野信彦  
肺癌における転写因子YB-1と癌抑制遺伝子p53の発現についての検討 第4回がん分子標的治療研究会総会(ポスターセッション)2000年6月15日-17日(名古屋)
- 多田靖弘、和田守正、黒岩顕太郎、永山淳、恒吉正澄、内藤誠二、中川昌之、桑野信彦  
膀胱腫瘍におけるヒト多剤耐性MDR1遺伝子の発現と5'-制御領域のDNAメチル化 第4回がん分子標的治療研究会総会(ポスターセッション)2000年6月15日-17日(名古屋)
- 桑野信彦  
ATP結合カセット(ABC)トランスポーターの構造・機能と疾病 第24回蛋白質と酵素の構造と機能に関する九州シンポジウム(特別講演)2000年7月13日-15日(鹿児島)
- Kuwano, M.  
Pathological significance of stromal blood cells in

- angiogenesis and possible targets for development of antiangiogenesis strategy The annual symposium of the Korean Society of Angiogenesis(plenary lecture) 2000/ 8/ 19 (Korea)
21. 小野眞弓、桑野信彦  
腫瘍血管新生におけるマクロファージなどの間質細胞の関与と制御 第 59 回日本癌学会総会 (シンポジウム) 2000 年 10 月 4 日-6 日 (横浜)
  22. 芝原幸太郎、杉尾賢治、大崎敏弘、内海健、小野眞弓、河野公俊、安元公正、杉町圭蔵、桑野信彦  
肺癌における予後因子としての転写因子 YB-1 の核内局在と癌抑制遺伝子 p53 と PTEN の発現 第 59 回日本癌学会総会 (ミニシンポジウム) 2000 年 10 月 4 日-6 日 (横浜)
  23. 持田泰、和田守正、日下英司、多田靖弘、永山淳、原田大志、高木幸一、前原喜彦、杉町圭蔵、桑野信彦  
大腸癌における MDR1 遺伝子のメチル化による発現制御とマイクロサテライト不安定性 第 59 回日本癌学会総会 (ミニシンポジウム) 2000 年 10 月 4 日-6 日 (横浜)
  24. 増田克明、福士純一、小野眞弓、桑野信彦  
Pho キナーゼ阻害剤ファスジルによる血管新生の制御 第 59 回日本癌学会総会 (ポスター発表) 2000 年 10 月 4 日-6 日 (横浜)
  25. 岡本正博、福士純一、小野眞弓、桑野信彦  
ヒトがん細胞における EGF と TGF $\beta$  によるトロンボスポンジン 1 発現誘導 第 59 回日本癌学会総会 (ポスター発表) 2000 年 10 月 4 日-6 日 (横浜)
  26. 井口明彦、日下英司、内海健、和田守正、桑野信彦  
肝細胞における ABC スーパーファミリー遺伝子の炎症性サイトカインに対する発現応答 第 59 回日本癌学会総会 (ポスター発表) 2000 年 10 月 4 日-6 日 (横浜)
  27. 内海健、中村崇規、和田守正、桑野信彦  
ABC トランスポーター遺伝子ヒト MRP7 の単離と発現 第 59 回日本癌学会総会 (ポスター発表) 2000 年 10 月 4 日-6 日 (横浜)
  28. 日下英司、内海健、田口健一、井口明彦、中村崇規、和田守正、恒吉正澄、杉町圭蔵、桑野信彦  
ヒト大腸癌の分化と ABC スーパーファミリー遺伝子の発現 第 59 回日本癌学会総会 (ポスター発表) 2000 年 10 月 4 日-6 日 (横浜)
  29. 佐治久、戸井雅和、河野公俊、桑野信彦  
ヒト乳癌組織における P-glycoprotein、YB-1 の発現とその臨床病理学的意義 第 59 回日本癌学会総会 (ポスター発表) 2000 年 10 月 4 日-6 日 (横浜)
  30. 和泉弘人、今村寿宏、永谷郡司、伊勢知子、村上忠誌、浦本秀隆、鳥越貴行、石口宏、岡本龍郎、内海健、桑野信彦、河野公俊  
YB-1 の DNA および RNA 結合能とその意義 第 59 回日本癌学会総会 (ポスター発表) 2000 年 10 月 4 日-6 日 (横浜)
  31. 芦塚慈美、内海健、中村崇規、岡本龍郎、河野公俊、桑野信彦  
転写因子 YB-1 (Y-box Binding protein) 結合蛋白の単離と悪性腫瘍における発現 第 59 回日本癌学会総会 (ポスター発表) 2000 年 10 月 4 日-6 日 (横浜)
  32. 沼崎宗夫、福士純一、貫和敏博、小野眞弓、松島綱治、桑野信彦、田原秀晃  
Interleukin-17 は T リンパ球より産生される強力な新規血管新生因子であり、腫瘍の増殖を著明に促進する 第 59 回日本癌学会総会 (ミニシンポジウム) 2000 年 10 月 4 日-6 日 (横浜)
  33. 多田靖弘、和田守正、永山淳、持田泰、内藤誠二、桑野信彦  
ヒト膀胱腫瘍における多剤耐性 MDR1 遺伝子と癌抑制遺伝子のプロモーター領域のメチル化と膀胱内再発 第 59 回日本癌学会総会 (ポスター発表) 2000 年 10 月 4 日-6 日 (横浜)
  34. 糸川高史、小野眞弓、山田雄次、桑野信彦  
VEGF 受容体を分子標的とした抗血管新生とマクロファージの関与 第 59 回日本癌学会総会 (ポスター発表) 2000 年 10 月 4 日-6 日 (横浜)
  35. 福士純一、小野眞弓、桑野信彦  
インターロイキン 4(IL-4) と IL-13 による血管新生誘導と可溶性 VCAM-1 の関与 第 59 回日本癌学会総会 (ポスター発表) 2000 年 10 月 4 日-6 日 (横浜)
  36. 右田敏郎、田宮貞史、小田義直、八尾隆史、恒吉正澄、森川亘、桑野信彦  
ヒト前立腺癌組織における Angiostatin 様物質の発現について 第 59 回日本癌学会総会 (ポスター発表) 2000 年 10 月 4 日-6 日 (横浜)
  37. 森河亘、山本健二、石川小玲、嶽本澄代、野崎周英、小野眞弓、岩永貞昭、桑野信彦  
前立腺癌細胞アンジオスタチン様蛋白産生の機序 第 59 回日本癌学会総会 (ポスター発表) 2000 年 10 月 4 日-6 日 (横浜)
  38. 桑野信彦、小野眞弓、和田守正、内海健、河野公俊  
血管新生・転移や ABC トランスポーターを標的とする治療の展開 第 59 回日本癌学会総会 (シンポジウム) 2000 年 10 月 4 日-6 日 (横浜)
  39. 桑野信彦  
作用機序からみたがん薬物療法の変遷と 21 世紀への展望 第 38 回日本癌治療学会総会 (招請講演) 2000 年 10 月 22 日-24 日 (仙台)
  40. 桑野信彦  
MDR の最近の研究 日本薬学会東海支部行事 (特別講演) 2000 年 11 月 15 日 (名古屋)
  41. 和田守正、内海健、桑野信彦  
cMOAT/MRP2 と Dubin-Johnson 症候群 第 22 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム (シンポジウム) 2000 年 11 月 16 日-17 日 (京都)
  42. 早川浩、桑野信彦、関口睦夫  
酸化 RNA 結合タンパクとその生物学的意義 第 23 回日本分子生物学会年会 (ポスター発表) 2000 年 12 月 13 日-16 日 (神戸)
  43. 日下英司、内海健、井口明彦、芳賀整、橋本健吉、久枝哲史、中村崇規、和田守正、桑野信彦  
ABC トランスポーター MRP2 遺伝子の転写制御とヒストン脱アセチル化 第 23 回日本分子生物学会年会 (ポスター発表) 2000 年 12 月 13 日-16 日 (神戸)
  44. 井口明彦、日下英司、内海健、和田守正、野本実、河野公俊、桑野信彦  
炎症性サイトカインによるヒト肝細胞 ABC トランスポーター (MRP2) 遺伝子の発現低下の制御 第 23 回日本分子生物学会年会 (ポスター発表) 2000 年 12 月 13 日-16 日 (神戸)
  45. 持田泰、和田守正、日下英司、内海健、桑野信彦  
ABC トランスポーター強制発現による DNA 損傷

の抑制 第 23 回日本分子生物学会年会 (ポスター  
発表) 2000 年 12 月 13 日-16 日 (神戸)

46. 橋本健吉、内海健、芳賀整、日下英司、井口明彦、  
中村崇規、和田守正、桑野信彦  
Dubin-Johnson 症候群における MFP2 遺伝子変異  
とプロセッシング異常 第 23 回日本分子生物  
学会年会 (ポスター発表) 2000 年 12 月 13 日-16  
日 (神戸)

H. 知的財産権の出願・登録情報

特になし

新しいがん薬物療法の研究

抗がん剤の第 I 相試験の新しい方法論の開発

分担研究者 佐々木 康綱 国立がんセンター東病院

A 研究目的

- ① 日・米・欧 3 局による抗悪性腫瘍薬開発における“Bridging Study”の現況につき国立がんセンター東病院で行われた早期臨床試験例を参考に解析した。
- ② 新規抗悪性腫瘍薬開発における“biological marker”としての PET による評価法についての研究に着手した。

B 研究方法

- ① 国立がんセンター東病院で施行された抗悪性腫瘍薬第 I 相試験もしくは第 I・II 相試験を同一薬剤の海外での開発状況との比較検討を行うことによりそれらの位置づけを考えるとともに、現時点における理想的な“Bridging Study”のあり方につき考察した。本解析の対象となった薬剤は、Paclitaxel 1), JM-216 2), SDZ-PSC833 3), Rituximab, Trastuzumab, Flavopyridol, NB-506, TOP-53, Interleukin-12, UCN-01, DX-8951f の各薬剤であった。また一部併用第 I・II 相試験についても検討した 4,5)。
- ② 国立がんセンター東病院に PET (positron emission tomography) が導入されたため、新規抗悪性腫瘍薬とりわけ分子標的薬剤もしくは Cytostatic Agent と称される薬剤の薬力学を評価する目的で PET の“biological marker”としての役割を検討する作業に着手した。本研究では、Flavopyridol の第 I 相試験に登録されている症例を対象として治療前後における PET

T の評価を行った。

C 研究結果

- ① 海外での開発状況を考えた場合抗悪性腫瘍薬の我が国での臨床試験は以下の三群に大別された。i) 海外の臨床試験が先行しそれらの結果を受けてもしくはそれらの臨床試験の途中において我が国での臨床試験が開始された事例： Paclitaxel, JM-216, SDZ-PSC833, Rituximab, Trastuzumab, Flavopyridol。ii) 我が国の臨床試験が先行し海外での開発が行われなかったか後に開始された事例： NB-506, TOP-53。iii) 我が国と海外との臨床試験がほぼ同時期に開始された事例： Interleukin-12, UCN-01, DX-8951f。この中でとりわけ DX-8951f については、最初から 3 極同時開発を意図して臨床開発戦略が立てられていることは注目すべき点であった。一方 Docetaxel については、海外での第 I 相試験を受けて我が国での臨床開発が開始された。本剤の第 I 相試験には国立がんセンターは参加しなかったが、その至適用量が欧米のそれと比較して低用量に設定された。この事実は、我が国と欧米での Docetaxel 第 II 相試験の投与量とその臨床成績の乖離、さらに、併用第 I・II 相試験においても Docetaxel の上限が設定されてしまうことなど深刻な問題を残すことにもなる。この場合、後付で population pharmacokinetics (PPK) 等の手法により“Bridging Study”としての解析

を行うことが可能であるもののこれらの問題は依然として解決されていない。

- ② Flavopyridol の第 I 相試験に登録された症例を対象として PET の “biological marker” としての役割を検討する作業に着手した。PET の撮影体制および患者に対する説明と同意の取得には問題はないものの最大の課題は薬剤に応じて撮影タイミングを変化させる必要があるか否かである。また、至適撮影タイミングを決定するための方法論が必ずしも前臨床研究との結果を踏まえて明らかにされていないことも問題である。また、現時点では従来の腫瘍マーカーと PET 所見には相関を認めていない。

#### D 考案

- ① 新規抗悪性腫瘍薬の早期臨床試験では、“Bridging Study” を意識した開発戦略を採用することで速やかな薬剤の臨床評価と至適投与量の国際的標準化が可能であり、海外からの大規模臨床試験の結果を我が国へ外挿する事が容易となる。
- ② 今後抗悪性腫瘍の薬力学評価の指標としての PET の検討課題として、i) 抗腫瘍効果の判定基準、ii) PET 撮影のタイミング、iii) 高度先進医療としての認可が下りた状況で臨床研究としての検査費用のあり方、などが考えられる。

#### E 結論

- ① 我が国での第 II 相試験以降の速やかな薬剤開発と、至適用量を海外にあわせることを考えた場合、同時期に海外と同様の早期臨床試験を行うことが必須である。
- ② Cytostatic Agent の薬力学評価指標としての PET の位置づけを明確にするために解決しなければならない問題が明らかになるとともに、この領域の研究がこれまで我が国で皆無であったことが問題であると認識

された。

#### F 研究発表

1. H Minami, Y Sasaki, T Watanabe and M Ogawa. Pharmacodynamic Modeling of the Entire Time Course of Leukopenia after a 3-Hour Infusion of Paclitaxel. JJCR. 2000. (in press)
2. H Minami, T Ohtsu, H Fujii, T Igarashi, K Itoh, N Uchiyama-Kokubu, T Aizawa, Y Uda, Y Tanigawara, and Y Sasaki. Phase I study of intravenous PSC-833 and Doxorubicin: Reversal of multidrug Resistance. JJCR. 2000. (in press)
3. T Kurata, T Tamura, Y Sasaki, H Fujii, S Negoro, M Fukuoka and N Saijo. Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Analysis of Bis-acetato-ammine-dichloro-cyclohexymine-platinum(IV) (JM216) Administered Once a Day for Five Consecutive Days: A Phase I Study. Jpn J Clin Oncol, 30, 377-384.
4. K Itoh, Y Sasaki, H Fujii, H Minami, T Ohtsu, H Wakita, T Igarashi, Y Watanabe, Y Onozawa, M Kashimura and Y Ohashi. Study of Dose Escalation and Sequence Switching Administration of the Combination of Docetaxel and Doxorubicin in Advanced Breast Cancer. Clin Cancer Res, 6, 4082-4090, 2000.
5. K. Itoh, T Ohtsu, H Wakita, K Ishizawa, Y Onozawa, H Fujii, H Minami and Y Sasaki. Dose-escalation study of CHOP with or without prophylactic G-CSF in a aggressive non-Hodgkin's Lymphoma. Ann Oncol, 11, 1241-1247, 2000.

新しいがん薬物療法の研究

分担研究者 杉本 芳一

財団法人癌研究会癌化学療法センター  
分子生物治療研究部 部長

研究要旨

癌および正常細胞の抗癌剤感受性、耐性を規定する因子の解析を行っている。本年度は、Mitoxantrone 耐性、CPT-11 耐性などに関与する Half-molecule 型 ABC transporter である BCRP による抗癌剤耐性の機序について解析した。BCRP の cDNA に種々の変異を導入してレトロウイルスベクターに組み込み、抗癌剤耐性の変化を調べたところ、5 番目の transmembrane region への変異の導入により、mitoxantrone に対する耐性は変化せずに SN-38 に対する耐性のみが低下した。よってこの部位に抗癌剤認識に関与する domain が存在すると示唆された。野生型 BCRP を導入して抗癌剤耐性となった細胞に、それ自身の発現では抗癌剤耐性を示さない不活性型の BCRP cDNA クローン No.15 を導入したところ、野生型 BCRP による抗癌剤耐性が失われた。この結果は、BCRP による抗癌剤耐性の克服に応用可能である。また、癌細胞の camptothecin 耐性の獲得のメカニズムとして、細胞の DNA topoisomerase I 遺伝子のゲノムの一方の allele の欠損による camptothecin 感受性な DNA topoisomerase I の量の減少が示された。

A. 研究目的

癌および正常細胞の抗癌剤感受性、耐性を規定する因子の解析を行う。本年度は、Mitoxantrone 耐性、CPT-11 耐性などに関与する Half-molecule 型 ABC transporter である BCRP による抗癌剤耐性の機序について解析する。DNA topoisomerase I の変異体の抗癌剤耐性に対する関与を調べる。MDR1 遺伝子の導入と発現が細胞機能にどのような影響を与えるかについて調べる。

B. 研究方法

ヒト BCRP の全長 cDNA の 5' 側に Myc あるいは HA epitope を付加した HA-BCRP および Myc-BCRP を作成し、これらを pHa vector に組み込んで細胞に導入して抗癌剤感受性の変化を調べた。HA-BCRP の cDNA に PCR-directed mutagenesis あるいは site-directed mutagenesis を用いて種々の変異を導入し、pHa-IRES-DHFR bicistronic retrovirus vector に組み込んだ。これを細胞に導入して methotrexate で選択することにより、multiclonal な遺伝子導入細胞を樹立して、抗癌剤耐性の変化を調べた。抗癌剤耐性を示さない HA-BCRP 変異体を Myc-BCRP 導入細胞に共導入し、不活性型 BCRP の発現が活性型 BCRP の機能に与える影響について調べた。

ヒト大腸癌細胞 HT-29 の camptothecin 耐性株 HT-29/CPT では野生型より短い DNA topoisomerase I mRNA が発現している。HT-29/CPT の DNA topoisomerase I 遺伝子の構造を調べた。また、欠損型 DNA topoisomerase I 蛋白の活性を調べた。

(倫理面への配慮)

本研究は主として培養細胞を用いた研究であり、生命倫理上の問題はない。

C. 研究結果

BCRP に関しては、以下の知見を得た。(1) Myc あり

るいは HA epitope を N 末に付加した BCRP は野生型と同じ抗癌剤耐性を示した。(2) BCRP の ATP 結合部位の活性中心と推定される Lys に変異を導入すると、抗癌剤耐性は失われた。(3) 5 番目の transmembrane region に変異をもつ BCRP cDNA クローン No.108 を導入した細胞は、mitoxantrone に対しては、野生型 HA-BCRP を導入した細胞とほぼ同程度の耐性を示したが、SN-38 に対しては野生型 HA-BCRP を導入した細胞に比べて明らかに低い耐性しか示さなかった。よってこの部位に抗癌剤認識に関与する domain が存在すると示唆された。(4) 野生型 Myc-BCRP を導入して抗癌剤耐性となった細胞に、それ自身の発現では抗癌剤耐性を示さない、5 番目の transmembrane region に変異をもつ不活性型の BCRP cDNA クローン No.15 を導入したところ、野生型 Myc-BCRP による抗癌剤耐性が失われた。

HT-29 細胞の camptothecin 耐性株 HT-29/CPT には、exon 3 から exon 9 までが欠損した DNA topoisomerase I mRNA が発現していた。これは、細胞の DNA topoisomerase I 遺伝子のゲノムの一方の allele の欠損によるものであり、その結果として camptothecin 感受性な DNA topoisomerase I の量が減少し、抗癌剤耐性を獲得したと推定された。1)。

MDR1 遺伝子の導入と発現が細胞機能にどのような影響を与えるかについて調べた。白血病細胞のレチノイン酸耐性には影響しなかった。白血病細胞の Fas による apoptosis にも影響はなかった。2,3)。

D. 考察

Mitoxantrone、SN-38 などの抗癌剤耐性に関与する BCRP は、N 末側の 1 個の ATP 結合領域と C 末側の 1 個の膜貫通領域を持つ half-molecule 型の ABC transporter である。BCRP の変異体の解析により、BCRP の 5 番目の transmembrane region の重要

性が示された。P-糖蛋白も transmembrane region の 5, 6 と 11, 12 が抗癌剤認識に関与することが示されており、両者の相同性がうかがえる。BCRP などの Half molecule 型 ABC transporter は通常は homodimer または heterodimer 型構造をとることにより輸送活性を発揮すると考えられており、不活性型の BCRP cDNA クローン No.15 の導入による野生型 Myc-BCRP の抗癌剤耐性の阻害は、BCRP とそのカウンターパートとの結合を阻害したためと考えられた。

## E. 結論

Half-molecule 型 ABC transporter である BCRP は、5 番目の transmembrane region を含む領域で抗癌剤を認識して排出する。BCRP は複合体構造をとることが予想され、不活性型 BCP 遺伝子の導入による耐性の克服が可能である。また、癌細胞の camptothecin 耐性の獲得のメカニズムとして、細胞の DNA topoisomerase I 遺伝子のゲノムの一方の allele の欠損が示された。

## F. 健康危険情報 特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Yanase, K., Sugimoto, Y., Tsukahara, S., Oh-hara, T., Andoh, T., and Tsuruo, T. Identification and characterization of a deletion mutant of DNA topoisomerase I mRNA in a camptothecin-resistant subline of human colon carcinoma. *Jpn. J. Cancer Res.*, 91: 551-559 (2000)
2. Takeshita, A., Shinjo, K., Naito, K., Ohnishi, K., Sugimoto, Y., Yamakawa, Y., Tanimoto, M., Kitamura, K., Naoe, T., and Ohno, R. Role of P-glycoprotein in all-trans retinoic acid (ATRA) resistance in acute promyelocytic leukaemia cells: analysis of intracellular concentration of ATRA. *Br. J. Haematol.*, 108: 90-92 (2000)
3. Sugimoto, Y., Tsuruo, T., Pastan, I., and Gottesman, M. M. Bicistronic retrovirus vectors encoding drug-resistant genes. *In: R. A. Aubin (ed.), Transgene Delivery and Expression in Mammalian Cells (a volume of Methods in Molecular Biology)* Humana Press, in press

### 2. 学会発表

柳瀬香恵、杉本芳一、塚原里美、大原智子、安藤俊夫、鶴尾隆。ヒト大腸癌細胞由来キャンプトテシン耐性株の耐性機構の解析。第 59 回日本癌学会総会記事、39-40 頁、2000 年

杉本芳一、塚原里美、石川悦子、杉山朋美、鶴尾隆。BCRP による抗癌剤耐性機構の解析。第 59 回日本癌学会総会記事、42 頁、2000 年

石川悦子、塚原里美、鶴尾隆、杉本芳一。retrovirus の挿入によるマウス mdr1b の活性化。第 59 回日本癌学会総会

記事、192 頁、2000 年

塚原里美、石川悦子、鶴尾隆、杉本芳一。新規 G 蛋白受容体 TASP の抗癌剤感受性への関与。第 59 回日本癌学会総会記事、193-194 頁、2000 年

高橋俊二、伊藤良則、相羽恵介、堀越昇、杉本芳一、尾形悦郎。レトロウイルスベクターによる破骨細胞への多剤耐性遺伝子(MDR1) 導入。第 59 回日本癌学会総会記事、595-596 頁、2000 年

Y. Sugimoto, S. Tsukahara, E. Ishikawa, S. Sato, T. Tsuruo. Retrovirus-Mediated Transfer of Wild-Type and Mutant Human BCRP Complementary DNAs Confer Resistance to Mitoxantrone and SN-38 with Different Cross Resistance Patterns. *Proceeding of the 6th Annual Meeting of the Japan Society of Gene Therapy*, Page: 69, (2000)

M. Nakane, D. Hashimoto, J. Mitsuhashi, S. Tsukahara, N. Horikoshi, K. Aiba, Y. Sugimoto. Preclinical Pilot Runs toward the Clinical Study of MDR1 Gene Therapy. *Proceeding of the 6th Annual Meeting of the Japan Society of Gene Therapy*, Page: 76, (2000)

S. Takahashi, T. Nagamine, N. Horikoshi, Y. Sugimoto, E. Ogata. Retroviral Gene Transfer of Multiple Drug Resistance (MDR) 1 cDNA to Osteoclasts. *Proceeding of the 6th Annual Meeting of the Japan Society of Gene Therapy*, Page: 124, (2000)

新しいがん薬物療法の研究  
分担研究課題「初期臨床試験での作用メカニズムに基づく新薬の適正評価」

分担研究者 田村友秀 国立がんセンター中央病院 医長

研究要旨：国立がんセンター中央病院では第Ⅰ相試験のための専用病床設置と実施専門チームの結成などの体制整備により、実施症例数は飛躍的に増加し、試験実施のクオリティも向上した。参加症例の生存期間は極めて良好であり、予後良好例が多いこと、また患者選択が適切であったといえる。分子標的薬剤の第Ⅰ相試験も従来の方法論のバリエーションで対応可能であり、薬剤の作用のサロゲートとなりうるマーカーの検索が重要である。

#### A.研究目的

分子標的薬剤をはじめとする新規抗悪性腫瘍薬の臨床第Ⅰ相試験の適正実施のためには、施設における実施体制の整備と科学的な評価のための実施計画の構築が必須である。国立がんセンター中央病院における第Ⅰ相試験チームの結成、計画治療病棟の開設など体制整備と第Ⅰ相試験実施状況を通して、その成果と問題点を検討する。

#### B.研究方法

1996年以來国立がんセンター中央病院第Ⅰ相試験チームにより実施された新規抗悪性腫瘍薬の第Ⅰ相試験の実施体制、試験デザイン、参加症例の背景と予後、試験結果について解析した。

#### C.研究結果

実施体制：国立がんセンター中央病院の第Ⅰ相試験チームは効率的かつ質の高い第Ⅰ相試験実施のため各臓器診療科の枠を越えて1996年に結成された。当初のスタッフ医師2名、レジデント2名の構成から現在はスタッフ医師3名、レジデント3名に加え治験管理室よりCRC1名が参画した。1999年からは早期臨床試験のために開設された計画治療病棟の8-12床を使用し、治験薬投与は病棟内の特別処置室で実施、隣接するナースステーションの1部にECGモニター、検体の処置台、冷却遠心機を設置してガラス越しに患者を観察しながら検体処理も行えるようになった。実際には病棟看護婦1名を含め、最低3名以上の実施体制をとっている。

実績：1996年より2000年9月までに分子標的薬剤4剤を含む新規抗悪性腫瘍薬10剤の第Ⅰ相試験を計108症例に実施した<sup>57)</sup>。第Ⅰ相試験参加症例数は1996年から1999年まで年間12、19、23、32例で、2000年は9か月間で31例と増加して

いる。2000年は常に参加希望症例が待機して、症例登録は最短のスピードで実施できた。108例の背景は、年齢中央値57才（範囲31-74）、PSはほとんどが0-1で、PS2の症例は3例のみであった。性別では、男/女が58/54でほぼ同数であり、原疾患では肺、大腸が7割以上を占め、頭頸部、胃がこれに次いだ。用量規制毒性は16例（15%）に認め、血液毒性6例、非血液毒性10例であった。抗腫瘍効果では、PR/NC/PD/NEがそれぞれ4/60/41/3で、奏効率3.7%であった。生存期間中央値は全例で7.2月、非小細胞肺癌44例で9.6月、大腸がん32例で8.5月と良好である。分子標的薬剤の第Ⅰ相試験：現在まで4剤の分子標的薬剤の第Ⅰ相試験を実施している。細胞周期作用薬UCN-01および上皮増殖因子（EGF）受容体チロシンキナーゼ阻害剤ZD1839の第Ⅰ相試験はすでに終了しており、血管内皮増殖因子（VEGF）受容体チロシンキナーゼを阻害する血管新生阻害剤2剤の試験は進行中である。いずれの試験も毒性をエンドポイントとしたデザインであり、その中で前臨床データを参考に血中濃度、生物学的指標をモニターして進められている<sup>58)</sup>。これらの試験でみられた用量規制毒性は、下痢、血圧低下、嘔吐、肝障害で、すべて非血液毒性であった。終了している2試験では、いずれも最大耐用量が決定でき、得られた血中濃度は前臨床での有効血中濃度を上回ったが、標的阻害・効果・毒性に直結するマーカーは得られなかった。投与前後の末梢単核球を用いたcDNAマクロアレイによる関連遺伝子の発現変化については現在解析中である。現在進行中の血管新生阻害剤の第Ⅰ相試験では、生物学的指標としてE-selectin、t-PA、IL-8、血漿および尿中VEGFをモニターし、またcDNAマクロアレイにて同様に検討している。



#### D. 考察

国立がんセンター中央病院では第 I 相試験のための病床設置と実施専門チームの結成などの体制整備により、実施症例数は飛躍的に増加し、試験実施のクオリティも向上した。参加症例の予後は病状を考慮すると極めて良好であり、第 I 相試験参加患者は予後良好者が多いこと、また我々の患者選択が適切であったことが示されたと考える。

分子標的薬剤の第 I 相試験の方法論については議論の多いところであるが、現状では毒性を指標として最大耐用量を決める従来のアプローチの中で血中濃度、生物学的マーカーをモニターする手法が妥当と判断される。腫瘍組織を治験薬投与前後で得ることは困難であり、生物学的マーカーは主に末梢血を用いた検討とせざるを得ないが、真の標的を確認することも含め当面は可能性のあるマーカー全てをモニターすべきと考える<sup>3)</sup>。

#### E. 結論

第 I 相試験を科学的かつ高い質で実施するためには実施専門チームの結成や専用病床設置などの体制整備が必須である。分子標的薬剤の第 I 相試験も従来の方法論のバリエーションで対応可能であり、薬剤の作用のサロゲートとなるマーカーの検索が重要である。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Harada, T., Takaba, K., Hara, T., Yamamoto, N., Tamura, T. and Saijo, N.

Inhibitory Effects of Repeated Intravenous Injections of Dexamethasone on Pulmonary Toxicity of A New Mitomycin C Analogue KW-2149 in A Novel Rat Model., *The Journal of Toxicological Sciences*, 25: 11-15(2000)

2. Yamamoto, N., Tamura, T., Kamiya, Y., Sekine, I., Kunitoh, H. and Saijo, N.

Correlation Bocetaxel and Estimated Cytochrome P450 Activity by Urinary Metabolite of Exogenous Cortisol., *Journal of Clinical Oncology*, 18: 2301-2308(2000)

3. Saijo, N., Tamura, T. and Nishio, K.

Problems in the development of target-based drugs., *Cancer Chemother Pharmacol*, 46: 43-45(2000)

4. Kubota, K., Tamura, T., Fukuoka, M., Furuse, K., Ikegami, H., Ariyoshi, Y., Kurita, Y. and Saijo, N.

Phase II study of concurrent chemotherapy and radiotherapy for unresectable stage III non-small-cell lung cancer: Long-term follow-up results. *Japan Clinical Oncology Group Protocol 8902*, *Annals of Oncology*, 11: 445-450(2000)

5. Kurata, T., Shimada, Y., Tamuta, T., Yamamoto, N., Hyoda, I., Saeki, T., Takashima, S., Fujiwara, K., Wakasugi, H. and Kashimura, M.

Phase I and Pharmacokinetic Study of a New Taxoid RPR109881A Given as a 1 Hour Intravenous Infusion in Patients With Advanced Solid Tumors., *Journal of Clinical Oncology*, 18: 3164-3171(2000)

6. Sekine, I., Matsuda, T., Saisho, T., Watanabe, H., Yamamoto, N., Kunitoh, H., Ohe, Y., Tamura, T., Kodama, T. and Saijo, N.

Bacterial Meningitis Observed in a Phase I Trial of Vinorelbine, Cisplatin and Thoracic Radiotherapy for Non-small Cell Lung Cancer: Report of a Case and Discussion on Dose-limiting Toxicity., *Jpn J Clin Oncol* 30: 401-405(2000)

7. Kurata, T., Tamura, T., Sasaki, Y., Fujii, H., Neguro, S., Fukuoka, M. and Saijo, N.

Pharmacokinetic and pharmacodynamic Analysis of Bis-acetato-ammine-dichloro-cyclohexylamine-platinum(IV)(JM216) Administered Once a Day for Five Consecutive Days A Phase I Study., *Jpn J Clin Oncol* 2000, 30: 377-384(2000)

8. Fujishiro, M., Shinkai, T., Fukuda, M., Tamura, T., Ohe, Y., Kunitoh, H., Nishiwaki, Y., Sekine, I., Fukuda, H. and Saijo, N.

Phase I Study a Weekly Infusion of Irinotecan Hydrochloride(CPT-11) and a 14-day Continuous Infusion of Etoposide in Patients with Lung Cancer JCOG Trial 9408., *Jpn J Clin Oncol* 2000, 30: 487-493(2000)

9. Usuda, J., Saijo, N., Fukuoka, K., Fukumoto, H., Kuh, HJ., Nakamura, T., Koh, Y., Suzuki, T., Koizumi, F., Tamura, T., Kato, H. and Nishio, K.

Molecular determinants of UCN-01-induced growth inhibition in human lung cancer cells., *International Journal of Cancer*, 85: 275-280(2000)

10.Tamura,T.

New State of the art in small-cell lung cancer.  
Oncology.15(1):8-10.(2001)

11.Saijo, N., Nishio, K., Tamura T.

Preclinical and clinical trials of topoisomerase  
inhibitors in Japan. Proc.NY Acad.Sci.(in press)

12.Saijo, N., Nishio, K., Tamura, T.

New strategies of cancer therapy in 21 century.Cancer  
Chemother. Pharmacol. (in press)

13.Takama, H., Tanaka, H., Sudo, T., Tamura, T.,  
Tanigawara, Y.

Population Pharmacokinetic Modeling and Model  
Validation of Spicamycin Derivative, KRN5500, in  
Phase I Study.Cancer Chemother. Pharmacol. (in press)

14.Kunitoh, H., Nakamura, Y., Aono, H., Kamiya, Y.,  
Itoh, R., Onodera, R., Nakamura, N., Sekine, I.,  
Kubota, K., Tamura, T., Shinkai, T., Kodama, T., Goto  
K., Hosomi, Y., Niho, S., Ohe, Y., Nishiwaki, Y.,  
Saijo, N.

A phase I/II trial of cisplatin, ifosfamide in advanced or  
recurrent non-small lung cancer. Lung Cancer. (in press)

厚生科学研究費補助金（がん克服新10か年戦略研究事業）  
 分担研究報告書

分子標的薬の分子機序の同定と治療の個別化に向けての基礎的検討

分担研究者 西尾 和人 国立がんセンター薬効試験部室長

研究要旨

細胞周期制御薬を中心とした分子標的薬に対する腫瘍細胞の反応性を予測するマーカー分子を非臨床研究で選択した。またcDNAアレイを用いた遺伝子発現解析の基礎的検討をおこなった。臨床検体を用いた分子標的薬のcDNAアレイを用いた評価法が可能になった。

A 研究目的

分子標的薬の抗腫瘍作用機序を明らかにし、その抗腫瘍作用に関わる分子を同定する。Translational studyとして、分子標的薬の臨床試験において、標的関連分子の発現状態の把握により効果および有害事象を予測し得るかどうかを検討する。

B 研究方法

分子標的薬接触によりがん細胞の細胞周期集積に及ぼす影響をDNAヒストグラムを用い検討した。分子標的薬を接触した際の肺がん培養細胞における標的分子の発現をNorthern, Westernブロット等で検討した。また各種キナーゼの活性におよぼす分子標的薬の影響を検討した。一方、細胞増殖に関わる標的を検討する目的で、耐性細胞を樹立し、親細胞と比較することにより、分子標的薬の作用点の同定をおこなった。一方、標的分子およびサロゲートマーカー分子のスクリーニングの目的でcDNA発現アレイを用いた遺伝子発現の評価を行った。cDNA発現アレイはマクロアレイを用い、評価対象遺伝子を薬剤感受性、耐性に関わる遺伝子約850とした。探索的統計処理は、クラスタリング解析をおこなった。薬剤接触、未接触時の肺がん細胞、ヒト末梢血リンパ球、肺癌、胃癌、大腸癌手術切除組織を対象とした。臨床材料の解析にはプロトコルを作成し、倫理委員会の承認の上おこなった。

C 研究結果 600-700

細胞周期作用薬は分子標的薬の1つであり、適切なマーカーの同定が必要である<sup>1)2)</sup>。細胞周期制御薬UCN-01の耐性細胞を樹立し、IGF-1、サイクリン等が耐性・感受性に関わる因子であると示した<sup>3)</sup>。UCN-01の細胞周期進行阻害作用による細胞増殖抑制の定量的評価を行った<sup>4)</sup>。UCN-01のリンパ球に対する

作用としてリンパ球活性化誘導型アポトーシスであり、CD95等がそのマーカーであると示した<sup>5)</sup>。海洋由来のアラグステロールA<sup>6)</sup>、スルホンアミド化合物E7070<sup>7)</sup>が細胞周期をG1期に停止させる細胞周期制御薬であり各種サイクリンがそのマーカーとなること、オンコプロテイン18がピンカアルカロイドによる細胞のM期阻害を増加し、感受性を増強すること<sup>8)</sup>、肺癌細胞において癌抑制遺伝子p16INK4によりトポI阻害剤によるS期での細胞周期進行の遅延からアポトーシスを誘導すること<sup>9)</sup>、プラチナ製剤ネダプラチンはトポI阻害剤との併用により相乗効果が期待されること<sup>10)</sup>を示した。

臨床検体による解析では、MRP5<sup>11)</sup>が肺癌患者において、プラチナ製剤の投与により発現の誘導をもたらすこと<sup>12)</sup>、p53、p27KIP1がプラチナ製剤に対する反応性と相関すること<sup>13)14)</sup>、肺、胃、大腸癌組織の遺伝子発現をcDNAアレイを用い評価し、腫瘍部の血管新生関連遺伝子群の発現亢進等を示した<sup>15)</sup>。同アレイによる分子標的薬評価を目的として遺伝子を選択し、感受性・耐性アレイを作成した。また再現性、定量性の評価、クラスタリング解析ソフトの作成、増幅方法の確立と評価、臨床検体の保存方法の画一化とマニュアル化をおこなった。

D 考察 200-300

細胞周期制御による抗腫瘍効果の予測は、増殖抑制効果として評価できた。また細胞周期に関わる分子特にサイクリン蛋白質が予測因子として考えられ、それらの発現状態を測定することにより分子標的薬を評価に用いる可能性が示唆される。しかし、同薬による腫瘍縮小効果は予測できない。臨床検体を用いたcDNAアレイを用いた遺伝子発現解析の基礎的検討においてマクロアレイによる評価が可能になった。今後分子標的薬の早期臨床試験において同手法による分子標的薬の評価を行っていく。

## E. 結論 150-200

細胞周期制御薬 (UCN-01, E7070, YTA0040 等) を中心とした分子標的薬に対する腫瘍および正常細胞の反応性を予測する特定のマーカー分子を非臨床研究で選択した。それらの発現状態を測定することにより分子標的薬を評価に用いる可能性が示唆される。また cDNA アレイを用いた遺伝子発現解析の基礎的検討をおこなった。臨床検体を用いた分子標的薬の cDNA アレイを用いた評価法が可能になった。

## F. 健康危険情報

無し

## G. 研究発表

## 1. 論文発表

- (1) Saijo, N., Tamura, T. and Nishio, K.: Problems in the development of target-based drugs. *Cancer Chemother Pharmacol*, 46:S43-S46, (2000).
- (2) Saijo, N., Tamura, T., Yamamoto, N. and Nishio, K.: New strategy for cancer therapy in 21st century. *Cancer Chemother Pharmacol*, (in press).
- (3) Usuda, J., Saijo, N., Fukuoka, K., Fukumoto, H., Kuh, H.-J., Nakamura, T., Koh, Y., Suzuki, T., Koizumi, F., Tamura, T., Kato, H. and Nishio, K.: Molecular determinants of UCN-01 induced growth inhibition in human lung cancer cells. *Int J Cancer*, 85:275-280, (2000).
- (4) Kuh, H.-J., Nakagawa, S., Usuda, J., Yamaoka, K., Saijo, N. and Nishio, K.: A computational model for quantitative analysis of cell cycle arrest and its contribution to overall growth inhibition by anticancer agents. *Jpn. J. Cancer Res.*, 91:1303-1313, (2000).
- (5) Fukumoto, H., Tamura, T., Kamiya, Y., Usuda, J., Suzuki, T., Kanzawa, F., Kuh, H.-J., Ohe, Y., Saijo, N. and Nishio, K.: Activation-induced apoptosis of peripheral lymphocytes treated with 7-hydroxystaurosporine, UCN-01. *Invest New Drugs*, 17:335-341, (2000).
- (6) Fukuoka, K., Yamagishi, T., Ichihara, T., Nakaike, S., Iguchi, K., Yamada, Y., Fukumoto, H., Yoneda, T., Samata, K., Ikeya, H., Nanaumi, K., Hirayama, N., Narita, N., Saijo, N. and Nishio, K.: Mechanism of action of aragusterol A (YTA0040), a potent antitumor marine steroid targeting the G1 phase of the cell cycle. *Int J Cancer*, 88:810-819, (2000).
- (7) Fukuoka, K., Usuda, J., Iwamoto, Y., Fukumoto, Y., Nakamura, T., Yoneda, T., Narita, N., Saijo, N. and Nishio, K.: Mechanisms of action of the novel sulfonamide anticancer agent E7070 on cell cycle progression in human non-small cell lung cancer cells. *Invest New Drugs*, (in press).
- (8) Nishio, K., Nakamura, T., Koh, Y., Kanzawa, F., Tamura, T. and Saijo, N.: Oncoprotein 18-overexpression increases the sensitivity against vindesine in the human lung cancer cells against vindesine. *Cancer*, (in press).
- (9) Fukuoka, K., Nishio, K., Fukumoto, H., Arioka, H., Kurokawa, H., Ishida, T., Iwamoto, Y., Tomonari, A., Suzuki, T., Usuda, J., Narita, N. and N., S.: Ectopic p16<sup>INK4</sup> expression enhances CPT-11-induced apoptosis through the increased delay in S phase progression in human non-small cell lung cancer cells. *Int J Cancer*, 82:759-764, (2000).
- (10) Kanzawa, F., Koizumi, F., Koh, Y., Nakamura, T., Tatsumi, Y., Fukumoto, H., Saijo, N. and Nishio, K.: In vitro synergistic interactions between the cisplatin analog nedaplatin and the DNA topoisomerase I inhibitor irinotecan and the mechanism of this interaction. *Clin Cancer Res*, 7:202-209, (2001).
- (11) Suzuki, T., Sasaki, H., Kuh, H., Agui, M., Tatsumi, Y., Tanabe, S., Terada, M., Saijo, N. and Nishio, K.: Detailed structural analysis on both human MRP5 and mouse mrp5 transcripts. *Gene*, 242:167-173, (2000).
- (12) Oguri, T., Isobe, T., Suzuki, T., Nishio, K., Fujiwara, Y., Katoh, O. and Yamakido, M.: Increased expression of the MRP5 gene is associated with exposure to platinum drugs in lung cancer. *Int J Cancer*, 86:95-100, (2000).
- (13) Oshita, F., Nishio, K., Kameda, Y., Mitsuda, A., Ikehara, M., Tanaka, G., Yamada, K., Nomura, I., Noda, K., Arai, H., Ito, H. and Nakayama, H.: Increased expression levels of p53 correlate with good response to cisplatin-based chemotherapy in non-small cell lung cancer. *Oncol Rep*, 7:1225-1228, (2000).
- (14) Oshita, F., Kameda, Y., Nishio, K., Tanaka, G., Yamada, K., Nomura, I., Nakayama, H. and Noda, K.: Increased expression levels of cyclin-dependent kinase inhibitor p27 correlate with good responses to platinum-based chemotherapy in non-small cell lung cancer. *Oncol Rep*, 7:491-495, (2000).
- (15) Tsunoda, T., Nakamura, T., Ishimoto, K., Yamaue, H., Tanimura, H., Saijo, N. and Nishio, K.: Upregulated expression of angiogenesis genes and down regulation of cell cycle genes in human colorectal cancer tissue determined by cDNA macroarray. *Anticancer Res*, (in press).

## 2. 学会発表

- (1) Saijo, N., Nakamura, T., Mizukami, T., Akutagawa, S., Fukumoto, H., Koh, Y., Tamura, T., Nishio, K. Effect of a novel pyroloacridone, KW-2170 on gene expression in various resistance cells determined by cDNA array. 91th Annual Meeting Am Assoc Cancer Res, San Francisco, CA, April 1-5 (2000)
- (2) Akutagawa, S., Nakamura, T., Usuda, J., Fukumoto, H., Koh, Y., Tamura, T., Saijo, N., Nishio, K., Differential gene expression in human UCN-01-resistant small cell lung cancer cells. 91th Annual Meeting Am Assoc Cancer Res, San Francisco, CA, April 1-5 (2000)

## H. 知的財産権の出願・登録状況

無し