

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、これが治療に使うか否かを主に動物実験を中心に検討する。

C 研究結果

- 1.がん細胞の一部はグルコース欠乏耐性である事を見いだした。これらの細胞は一般には血管の乏しい膵臓がんや、胃がん大腸がんの未分化なものに多いことが解った。PANC-1 細胞を例にしてそのメカニズムを解析した。その結果、PKB/Akt と 5'-AMP activated proteinkinase が関与していることを各の antisense RNA 発現ベクターを用いて証明した。
- 2.グルコースが欠乏し酸素が欠乏している状態でのがん細胞のエネルギー代謝を調べた。その結果、主にアミノ酸がエネルギー源になっていると考えられた。このアミノ酸を供給するためには都合よく、多くのがん細胞では栄養飢餓にすると MMP 遺伝子の活性化が見られた。具体的には、ヒトの膵臓がん細胞である PANC-1、肝臓がん細胞である HepG2、メラノーマである

特に顕著なのは、MMP1,3,10,13 であった。腫瘍の血流不足による栄養飢餓が細胞レベルで耐性反応と、アミノ酸の需要のために基質を分解し浸潤に結びつく可能性が示唆された。

3. 腫瘍の栄養飢餓耐性を解除する薬剤を探索した。その結果、駆虫薬として知られるピルヴィニューム塩に活性があることを見いだした。この薬品は寄生虫のブドウ糖の利用を阻害するとされているが、新たにフマル酸還元酵素の阻害をすることを見いだした。また、がん細胞でのグルコース欠乏によるPKB/Aktの活性化を阻害することも見いだした。ヌードマウスにPANC-1細胞を移植し、十分に腫瘍が大きくなってから対側の皮下に5 μ g/mouse/dayで投与すると、腫瘍形成を有意に抑制することを見いだした。

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の分子機構の解析を行い PKB/Akt, AMPK の関与を確定した。この反応は阻血下での生体の生理的反応と考えられるが発がんの過程で固定化したものと考えられる。慢性的血流不足の組織に特異性があるとすれば、

がん組織特異性を期待できる。前年度で特許申請をした方法で新しい候補薬剤を見いだした。この薬剤はヒトへの使用経験はあるが経口投与であり、あまり吸収されないとされている。今後、静脈や皮下投与による毒性試験まで含めて慎重に検討する必要があるが、企業との提携による開発の方法も考える必要がある。

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. Bermont, L., Lamielle, F., Lorchel, F., Fauconnet, S., Esumi, H., Weisz, A., and Adessi, G. L.: Insulin up-regulates vascular endothelial growth factor and stabilizes its messengers in endometrial adenocarcinoma cells. *J Clin Endocrinol Metab*, 86:363-368,2001.
2. Hashimoto, K., Kato, K., Imamura, K., Kishimoto, A., Yoshikawa, H., Taketani, Y., and Esumi, H.: 5-amino-4-imidazolecarboxamide riboside confers strong tolerance to glucose starvation in a 5'-AMP-activated protein kinase-dependent

- fashion. *Biochem Biophys Res Commun*, 290: 263-267,2002.
3. Hirano, K., Yamashita, K., Yamashita, N., Nakatsumi, Y., Esumi, H., Kawashima, A., Ohta, T., Mai, M., and Minamoto, T. : Non-Hodgkin's lymphoma in a patient with probable hereditary nonpolyposis colon cancer: report of a case and review of the literature. *Dis Colon Rectum*: 45, 273-279,2002.
 4. Imamura, K., Ogura, T., Kishimoto, A., Kaminishi, M., and Esumi, H. : Cell cycle regulation via p53 phosphorylation by a 5'-AMP activated protein kinase activator, 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-D-ribofuranoside, in a human hepatocellular carcinoma cell line. *Biochem Biophys Res Commun*: 287, 562-567,2001.
 5. Kawasaki, H., Ogura, T., Yokose, T., Nagai, K., Nishiwaki, Y., and Esumi, H. : p53 gene alteration in atypical epithelial lesions and carcinoma in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Hum Pathol*: 32, 1043-1049,2001.
 6. Kimura, H., Weisz, A., Ogura, T., Hitomi, Y., Kurashima, Y., Hashimoto, K., D'Acquisto, F., Makuuchi, M., and Esumi, H.: Identification of hypoxia-inducible factor 1 ancillary sequence and its function in vascular endothelial growth factor gene induction by hypoxia and nitric oxide. *J Biol Chem*: 276, 2292-2298,2001.
 7. Nomura, S., Tatemichi, M., Kaminishi, M., and Esumi, H.: A novel method for detecting single glandular intestinal metaplasia in the mucosal surface of the fixed stomach using methylene blue. *Jpn J Cancer Res*: 92, 659-665,2001.
 8. Takamochi, K., Ogura, T., Suzuki, K., Kawasaki, H., Kurashima, Y., Yokose, T., Ochiai, A., Nagai, K., Nishiwaki, Y., and Esumi, H. : Loss of heterozygosity on chromosomes 9q and 16p in atypical adenomatous hyperplasia concomitant with adenocarcinoma of the lung. *Am J Pathol*: 159, 1941-1948,2001.

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:

がん治療において治療薬の分子標的の同定とその発現レベルを把握することは、個別化治療を進展させる上で極めて重要である。我々は抗がん剤排出と関連する ABC トランスポーターと血管新生やがん増殖の分子標的を対象にしてがん治療における“個別化”治療と診断の可能性を提示する。

A. 研究目的

悪性腫瘍において抗がん剤耐性と浸潤・転移は代表的な悪性形質である。我々は本研究で①P-糖蛋白質をはじめとした ABC トランスポーターが特異的に認識する抗がん剤の同定、ならびに ABC トランスポーターの発現、さらに②血管新生や転移、またがん増殖と関連する分子標的薬剤の作用と感受性を制御する機序などを明らかにする。その成果をがん治療の“個別化”へ役立てていく。

B. 研究方法

1. Northern blot、定量 PCR と免疫染色法を用いてがん細胞やヒトがんの材料などの各種遺伝子レベルを定量化する。
2. DNA メチレーションの有無について MSP 法、特異的制限酵素による切断、さらに塩基配列決定などで検討した。
3. 各種遺伝子のプロモーター活性について欠失変異導入プロモーターとルシフェラーゼなどを連結させて測定した。
4. 血管新生活性については、in vitro では血管内皮細胞の遊走や管腔形成能をさらに in vivo では、マウス角膜法、マウス背部皮下法、マトリゲル法などを用いた。
5. 倫理面への配慮は、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。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。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. MRP1 と MRP3 はヒト・グリオーマ細胞において発現が見られたシスプラチンやエトポシドの感受性と関連した。(Haga, et al., 2001)。さらに、ヒト膀胱

がん症例においては、膀胱内注入療法や全身化学療法後の再発腫瘍において MDR1 や MRP3 遺伝子の発現レベルの有意な上昇が見られた (Tada, et al., 2002)。

2. 胆がん白血球病マウスにおいて治療抵抗性を示す時期に P-糖蛋白質の発現上昇が見られた。その機序としてプロモーター領域にレトロウイルス LTR 配列の挿入が見出された(Nagayama, et al., 2001)。

3. MRP2 は肝において毛細血管側に局在するが、その頂側膜での局在に C 末端が重要であることを明らかにした(Harris et al., 2001)。さらに C 型の肝炎ウイルス感染症例において肝臓の MRP2 の減少が見られた。(Hinoshita et al., 2001)。

4. ヒト腸で発現する ABC トランスポーター-MRP3 は胆汁酸によって著明にヒト腸細胞で上昇する。その上昇に FTF が関与することを明らかにした(Inokuchi et al., 2001)。

5. 血管新生阻害因子アンジオスタチンがヒト前立腺がんで発現しており、PSA 発現と相関することを報告した(Migita et al., 2001)。もう一つの血管新生阻害因子トロンボスポンジン発現が EGF/TGF α や TGF β によって上昇する機構を示した(Okamoto et al., 2001)。

6. Cap43 遺伝子は腎がんの浸潤マクロファージに発現していた(Nishie et al., 2001)。さらに TP/PDECGF のヒトマクロファージでの IFN γ による発現上昇には GAS エLEMENT が関与していることを発見した(Goto et al., 2001)。

7. ZD1839 (Iressa) の抗腫瘍機序の一つとして血管新生因子の生産を阻害することが関与することを示した(Hirata et al., 2002)。さらに VEGF 受容体 KDR/Fik-1 の阻害剤 SU5416 が Fik-1 のシグナリングにも影響し、マクロファージの遊走を阻害することを明らかにした(Itokawa et al., 2002)。

D. 考察

いくつかの ABC トランスポーターに関して、親和性を示す抗がん剤が明らかになりつつある。ABC トラ

ンスポーターが発現上昇を示す腫瘍に対しては適切な抗がん剤の選択ができると確信している。さらに、肝炎ウイルス感染後に影響を受ける ABC トランスポーターを同定したり、関連する遺伝疾患の有無を明らかにすることにより、薬剤の副作用に対しても個別化して対処できるのではないかと考えている。

血管新生や細胞増殖を標的とした分子標的薬剤に関して、EGF 受容体阻害剤 ZD1839 は非常に効率よく血管新生を阻害することが観察された。その機序の一つとして、EGF によって誘導される VEGF, IL8 その他の血管新生因子の生産の阻害や血管内皮への直接効果の可能性について提示した。この作用が生体内で実際に働いているか否かはこれからの課題である。

E. 結論

1. ABC トランスポーターのうち、MRP2 や MRP3 が親和性を示す抗がん剤を明らかにした。さらにヒトグリオーマや膀胱がんにおいて MRP ファミリーが悪性度の高いがんや再発がんにおいて有意に上昇した。C 型肝炎ウイルス感染患者の肝において MRP2 が減少していた。

2. マクロファージに Cap43 遺伝子が発現していること、ならびに IFN γ による TP/PDECGF の発現上昇には GAS エlement が関与していた。

3. ZD1839 (Iressa)は EGF/TGF α の誘導の血管新生因子の生産阻害、ならびに血管内皮に直接働いて血管新生に影響を与えた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Haga, S., Hinoshita, E., Ikezaki, K., Fukui, M., Scheffer, G. L., Uchiumi, T. and Kuwano, M., Involvement of the multidrug resistance protein 3 in drug sensitivity and its expression in human glioma. **Jpn. J. Cancer Res.**, 92: 211-219, 2001
2. Nagayama, J., Iino, M., Tada, Y., Kusaba, H., Kiuie, A., Ohsima, K., Kuwano, M. and Wada, M., Retrovirus insertion and transcriptional activation of the multidrug resistance (mdr1a) gene in leukemias treated by a chemotherapeutic agent in vivo. **Blood**, 97: 759-766, 2001
3. Izumi, H., Imamura, T., Nagatani, G., Ise, T., Murakami, T., Uramoto, H., Torigoe, T., Ishiguchi, H., Nomoto, M., Okamoto, T., Uchiumi, T., Kuwano, M., Funa, K. and Kohno, K. YB-1 binds

preferentially to single-stranded nucleic acid and exhibit 3'-5' exonuclease activity. **Nucl. Acids Res.**, 29: 1200-1207, 2001

4. Hinoshita, E., Taguchi, K., Inokuchi, A., Uchiumi, T., Kinukawa, N., Shimada, M., Tsuneyoshi, M., Sugimachi, K. and Kuwano, M., Decreased expression of an ATP-binding cassette transporter, MRP2, in human livers with hepatitis C virus infection. **J. Hepatol.**, 35: 765-773, 2001
5. Harris, M. J., Kuwano, M., Webb, M. and Board, P. G., Identification of the apical membrane-targeting signal of the multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2/MOAT). **J. Biol. Chem.**, 276: 20876-20881, 2001
6. Shibahara, K., Sugio, K., Osaki, T., Uchiumi, T., Maehara, Y., Kohno, K., Yasumoto, K., Sugimachi, K. and Kuwano, M. Nuclear expression of the Y-box binding protein, YB-1, as a novel marker of disease progression in non-small-cell lung cancer. **Clin. Cancer Res.**, 7: 3151-3155, 2001
7. Inokuchi, A., Hinoshita, E., Iwamoto, Y., Kohno, K., Kuwano, M. and Uchiumi, T., Enhanced expression of human multidrug resistance protein 3 by bile salt in human enterocytes: a transcriptional control of plausible bile acid transporter. **J. Biol. Chem.**, 276: 46822-46829, 2001
8. 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: 469-473, 2001
9. Kuwano, M., Fukushi, J., Okamoto, M., Nishie, A., Goto, H., Ishibashi, T. and Ono, M., Angiogenesis factors. **Int. Med.**, 40: 565-572, 2001
10. Migita, T., Oda, Y., Naito, S., Morikawa, W., Kuwano, M. and Tsuneyoshi, M., The accumulation of angiostatin-like fragments in human prostate carcinoma. **Clin Cancer Res.**, 7: 2750-2756, 2001
11. Okamoto, M., Ono, M., Uchiumi, T., Ueno, H., Kohno, K., Sugimachi, K. and Kuwano, M. Up-regulation of thrombospondin-1 gene by epidermal growth factor and transforming growth factor β in human cancer cells-transcriptional activation and messenger RNA stabilization. **Biochim. Biophys. Acta.**, 93595: in press, 2002

12. Hirata, T., Ogawa, S., Kometani, T., Kuwano, T., Naito, S., Kuwano, M. and Ono, M., ZD1839 ('Iressa') induces antiangiogenic effects through inhibition of EGFR tyrosine kinase. **Cancer Res.**, in press, 2002
13. Itokawa, T., Nokihara, H., Nishioka, Y., Sone, S., Iwamoto, Y., Yamada, Y., Cherrington, J., McMahon, G., Shibuya, M., Kuwano, M. and Ono, M., Antiangiogenic effect by SU5416 is partly due to inhibition of Flt-1 receptor signaling. **Molec. Cancer Therapeutics**, in press, 2002
2. 学会発表
1. Masuda, K., Nishie, A., Otsubo, M., Ono, M., Izumi, H., Kohno, K., Naito, S. and Kuwano, M., The role of the hypoxia-inducible cap43 gene in malignancy and tumor growth of human renal cell carcinoma. 92th Annual Meeting of American Association for Cancer Research (Poster session) 2001/3/24-3/28 (New Orleans)
2. Tada, Y., Nagayama, J., Motida, Y., Wada, M., Naito, S. and Kuwano, M., Simultaneous hypermethylation of multiple genes including dap-kinase and MDR1 genes is associated with recurrence in bladder cancer. 92th Annual Meeting of American Association for Cancer Research (Poster session) 2001/3/24-3/28 (New Orleans)
3. Mochida, Y., Hinoshita, E., Tada, Y., Nagayama, J., Harada, T., Maehara, Y., Kuwano, M. and Wada, M., Expression of P-glycoprotein coded by MDR1 gene, a possible determinant for distinct carcinogenesis pathway, in the colorectal cancer in association with microsatellite instability. 92th Annual Meeting of American Association for Cancer Research (Poster session) 2001/3/24-3/28 (New Orleans)
4. Uchiumi, T., Hinoshita, E., Taguchi, K., Inokuchi, A., Nakamura, T., Wada, M. and Kuwano, M. The expression of human ABC superfamily MRP2 in association with differentiation in human colorectal carcinoma-experiment and clinical Approach. 92th Annual Meeting of American Association for Cancer Research (Poster session) 2001/3/24-3/28 (New Orleans)
5. Ashizuka, M., Uchiumi, T., Nakamura, T., Okamoto, T., Fukuda, T., Kohno, K. and Kuwano, M., Isolation of proteins associated with the Y-Box binding protein (YB-1) and their expression in malignant cancers 92th Annual Meeting of American Association for Cancer Research (Poster session) 2001/3/24-3/28 (New Orleans)
6. 永山淳、原寿郎、和田守正、桑野信彦 "レトロウイルス挿入と多剤耐性遺伝子 *mdr1a* の活性化" 第7回九州山口小児血液・腫瘍研究会(一般演題) 2001年5月12日(鹿児島)
7. 小野真弓、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10回日本がん転移学会総会(ワークショップ) 2001年6月14日-15日(徳島)
8. 岡本正博、小野真弓、桑野信彦 "トロンボスポンジン 1 の新しい発現調節機構" 第10回日本がん転移学会総会(ミニシンポジウム) 2001年6月14日-15日(徳島)
9. 芦塚慈美、内海健、中村崇規、岡本龍郎、福田隆男、河野公俊、桑野信彦 "転写因子 YB-1 と相互作用する蛋白の機能と悪性腫瘍における発現" 第5回がん分子標的治療研究会総会(ポスターセッション) 2001年6月21日-22日(東京)
10. 増田克明、西江昭弘、大坪路弘、小野真弓、桑野信彦 "腎癌における Cap43 遺伝子の発現と機能に関する検討" 第5回がん分子標的治療研究会総会(ポスターセッション) 2001年6月21日-22日(東京)
11. 中尾新太郎、福士純一、小野真弓、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5回がん分子標的治療研究会総会(ポスターセッション) 2001年6月21日-22日(東京)
12. 多田靖弘、和田守正、内藤誠二、桑野信彦 "ヒト膀胱腫瘍における DNA メチル化の異常と膀胱内再発" 第5回がん分子標的治療研究会総会(ポスターセッション) 2001年6月21日-22日(東京)
13. 内海健、和田守正、桑野信彦 "ヒト大腸癌の分化とABCトランスポーターMRP2 遺伝子の発現" 第5回がん分子標的治療研究会総会(ポスターセッション) 2001年6月21日-22日(東京)
14. 桑野信彦 "がんの血管新生と間質応答" 第1回神奈川頭頸部癌フォーラム(特別講演) 2001年7月6日(神奈川)
15. 多田靖弘、和田守正、持田泰、谷口秀一、内藤誠二、桑野信彦 "ヒト表在性膀胱腫瘍における異常なメチル化と膀胱内再発" 第60回日本癌学会総会(セッション) 2001年9月26-28日(横浜)
16. 芦塚慈美、内海健、中村崇規、福田隆男、岡本龍郎、芝原幸太郎、河野公俊、桑野信彦 "YB-1 (Y-box Binding protein) による翻訳制御 [I] YB-1 結合蛋白の単離とフェリチン蛋白合成の調節" 第60回日本癌学会総会(ポスター討論) 2001年9月26-28

- 日 (横浜)
17. 持田泰、和田守正、日下嬰兒、田口健一、恒吉正澄、赤木一成、多田靖弘、谷口秀一、桑野博行、前原喜彦、杉町圭藏、高木幸一、桑野信彦 "大腸の発がん P 糖蛋白質/MDR1 遺伝子の関与" 第 60 回日本癌学会総会 (セッション) 2001 年 9 月 26-28 日 (横浜)
 18. 福田隆男、内海健、中村崇規、芦塚慈美、芝原幸太郎、桑野信彦 "YB-1 による翻訳制御[III] YB-1 蛋白合成の自己調節" 第 60 回日本癌学会総会 (ポスター討論) 2001 年 9 月 26-28 日 (横浜)
 19. 井口明彦、内海健、日下英司、和田守正、桑野信彦 "ヒト大腸細胞における ABC トランスポーター MRP3 の胆汁酸による発現上昇と機序" 第 60 回日本癌学会総会 (ポスター討論) 2001 年 9 月 26-28 日 (横浜)
 20. 増田克明、西江昭弘、岡本正博、森河亘、大坪路弘、内藤誠二、小野真弓、桑野信彦 "腎癌における Cap43 遺伝子の発現と機能に関する検討" 第 60 回日本癌学会総会 (ポスター討論) 2001 年 9 月 26-28 日 (横浜)
 21. 中尾新太郎、福士純一、岡本正博、小川聡一郎、小野真弓、桑野信彦 "可溶性 VCAM-1 の血管新生における機能とシグナル伝達" 第 60 回日本癌学会総会 (ポスター討論) 2001 年 9 月 26-28 日 (横浜)
 22. 糸川高史、小野真弓、山田雄次、渋谷正史、桑野信彦 "SU5416 による VEGF 受容体 Flt-1 のキナーゼ阻害と血管新生阻害の機序" 第 60 回日本癌学会総会 (ポスター討論) 2001 年 9 月 26-28 日 (横浜)
 23. 岡本正博、小野真弓、河野公俊、上野光、桑野信彦 "がん細胞の TGF β と EGF によるトロンボスペンジン-1 発現上昇の機序" 第 60 回日本癌学会総会 (ポスター討論) 2001 年 9 月 26-28 日 (横浜)
 24. 谷口秀一、持田泰、蛭原卓哉、多田靖弘、桑野信彦、和田守正 "MDR1 遺伝子の遺伝子多型および DNA メチル化による発現レベルの個人差" 第 60 回日本癌学会総会 (ポスター討論) 2001 年 9 月 26-28 日 (横浜)
 25. 内海健、日下英司、田口健一、中村崇規、前原喜彦、和田守正、恒吉正澄、杉町圭藏、桑野信彦 "ヒト大腸癌の分化と ABC トランスポーター MRP2 遺伝子の発現変化と機序" 第 60 回日本癌学会総会 (ポスター討論) 2001 年 9 月 26-28 日 (横浜)
 26. 今野俊和、久枝哲史、芳賀整、橋本健吉、中村崇規、内海健、和田守正、桑野信彦 "MDR1 と MRP2 の細胞膜局在と抗癌剤を認識するドメインの同定" 第 60 回日本癌学会総会 (ポスター討論) 2001 年 9 月 26-28 日 (横浜)
 27. 久枝哲史、内海健、芳賀整、橋本健吉、和田守正、桑野信彦 "ヒト脳血管内皮細胞による管腔構築と ABC トランスポーターの局在" 第 60 回日本癌学会総会 (ポスター討論) 2001 年 9 月 26-28 日 (横浜)
 28. 平田晃、小川聡一郎、桑野隆史、米谷卓郎、桑野信彦、小野真弓 "EGF 受容体チロシンキナーゼ阻害剤 ZD1839 の血管新生阻害作用" 第 60 回日本癌学会総会 (ポスター討論) 2001 年 9 月 26-28 日 (横浜)
 29. 和田守正、桑野信彦 "大腸および膀胱腫瘍における抗がん剤感受性関連遺伝子のメチル化異常" 第 60 回日本癌学会総会 (シンポジウム) 2001 年 9 月 26-28 日 (横浜)
 30. 橋本健吉、内海健、中村崇規、開庭史雄、植田和光、天知輝夫、和田守正、桑野信彦 "Dubin-Johnson 症候群における MRP2 遺伝子変異による蛋白成熟異常と機能活性異常" 第 24 回日本分子生物学会年会 (ポスター討論) 2001 年 12 月 9-12 日 (横浜)
 31. 芦塚慈美、内海健、中村崇規、福田隆男、岡本龍郎、河野公俊、桑野信彦 "YB-1 (Y-box binding protein) による翻訳制御-YB-1 結合タンパクの単離とフェリチン蛋白合成の調節" 第 24 回日本分子生物学会年会 (ポスター討論) 2001 年 12 月 9-12 日 (横浜)
 32. 今野俊和、芳賀整、久枝啓史、中村崇規、内海健、和田守正、桑野信彦 "MRP サブファミリーの細胞内局在および基質認識ドメインの同定" 第 24 回日本分子生物学会年会 (ポスター討論) 2001 年 12 月 9-12 日 (横浜)
 33. Kuwano, M. "ATP binding cassette (ABC) transporters and Y-box protein as cancer therapeutic targets" The UICC-JSCO Joint Fukuoka Cancer Symposium on Molecular Diagnosis and Treatment in the 21st Century (symposium) 2002/3/14-16 (Fukuoka)
- G. 知的財産権の出願・登録情報
特になし

分担研究者 佐々木 康綱

国立がんセンター東病院 病棟部

研究要旨

抗悪性腫瘍薬を評価するための“biological marker”としての Positron Emission Tomography (PET) の意義について検討するために、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の評価を行った。5症例においてCTとPETの比較が可能であった。5例全例が、CTによる画像診断的評価では、腫瘍の縮小を認めることなくすべてNCと判定された。しかしながらこの中で4例において20%以上のSUVの低下を認めた。このことは、画像診断上では効果がないと判断されたものの機能的には、細胞増殖が低下している症例が存在することが示唆された。

A. 研究目的

抗悪性腫瘍薬を評価するための“biological marker”としての Positron Emission Tomography (PET) の意義について検討した。

B. 研究方法

国立がんセンター東病院にPET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を昨年に行き続いて継続中である。本研究では、cyclin dependent kinase (CDK) の阻害薬であり cell cycle modulator として抗腫瘍活性を呈する 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の評価を行った。Flavopyridol は、24時間の持続点滴静注法によって週1回、4週連続で投与した。FDG-PETは、whole body PET scanner によってFlavopyridolの投与前と各コース終了後に撮影した。PETによる効果判定の指標としては、standard uptake value (SUV) を用いた。本研究は国立がんセンター倫理審査委員会によって承認された。またPETの評価については被験者の同意の元に実施した。

C. 研究結果

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した結果、5症例においてCTとPETの比較が可能であった。5例全例が、CTによる画像診断的評価では、腫瘍の縮小を認めることなくすべてNCと判定された。しかしながらこの中で4例において20%以上のSUVの低下を認めた。このうち1例では41%のSUVの低下を認めるとともに、腫瘍マーカーの低下も同様に認めた。さらに、SUVの低下を認めた症例の多くでは、腫瘍マーカーも低下傾向を示した。

しかしながら腫瘍増悪までの時間“time to progression”については腫瘍の多様性とsingle arm trialであるために考察が困難であった

D. 考察

抗悪性腫瘍薬の評価において画像診断とともに、薬物動態や標的分子の変化を調べる方法が注目され、これらは臨床効果を予測するための“biological marker”として認識されている1-3)。分子標的薬剤の中でもモノクローナル抗体は腫瘍縮小を臨床評価の指標として用いている4)。しかしながら分子標的治療薬の中には、必ずしも腫瘍縮小を来すことなく抗腫瘍効果を発現する薬剤が含まれていると想定されている。本年度の研究により、Flavopyridolの投与を受けた症例の中に、CT上の評価はNCであったにもかかわらずPETによるglucose-uptakeが低下している症例が観察されたことにより、画像診断上では効果がないと判断されたものの機能的には、細胞増殖が低下している症例が存在することが示唆された。このことは、PETにおけるSUVの低下がさらに腫瘍マーカーの低下と相関する症例も認められたことから、生物学的抗腫瘍効果を表現している可能性が考えられた。しかしながら現在PETの評価法として汎用されているSUVによる評価方法については、依然として解決されなければならない問題が残されている。今後は、SUVによる評価に関する基礎的研究を積み重ねるとともに、悪性リンパ腫の評価についてもPETを用いる前向き研究を予定している。

E. 結論

分子標的治療薬であるFlavopyridolを投与された症例においてPETによるglucoseの取り込みの低下を認めた症例を観察し得たことは、画像診断的には無効と判断された症例であっても機能的には細胞活性が低下していることが示唆された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Minami H, Sasaki Y, Watanabe T and Ogawa M. Pharmacodynamic Modeling of the Entire Time Course of Leucopenia after a 3-Hour Infusion of Paclitaxel. Jpn J Cancer Res 92: 220-230, 2001
- 2) Minami H Ohtsu T, Fujii H, Igarashi T, Itoh K, Uchiyama-Kokubu N, Aizawa T, Uda Y, Tanigawara Y, and Sasaki Y. Phase I study of intravenous PSC-833 and Doxorubicin: Reversal of multidrug Resistance. Jpn J Cancer Res 92: 231-238, 2001
- 3) Minami H, Fujii H, Igarashi T, Itoh K, Tamanoi K, Oguma T, and Sasaki Y Phase I and Pharmacological Study of a New Camptothecin Derivative, Exatecan Metylate (DX-891f), Infused Over 30 Minutes Every Three Weeks. Clin. Cancer Res. 7: 3056-3064, 2001
- 4) Igarashi T, Ohtsu T, Fujii H, Sasaki Y, Morishima Y, Ogura M, Kagami Y, Kinoshita T, Kasai M, Kiyama Y, Kobayashi Y, Tobinai K and Members of the IDEC-C2B8 Group. Re-treatment of relapsed indolent B-cell lymphoma with rituximab. Int J Hematol 73: 213-221, 2001

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む)

特になし

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

BCRP は Mitoxantrone、SN-38、Topotecan などの抗癌剤を細胞外に排出するポンプとして働く half molecule 型 ABC 輸送体である。本研究で、BCRP による抗癌剤耐性が Estrone、Estradiol により克服されること、Estrone、Estradiol は BCRP 発現細胞特異的に抗癌剤の細胞内取り込みを増大させることが明らかになった。BCRP は胎盤に高発現しており、これらのステロイドは BCRP の生理的基質であると考えられる。

A. 研究目的

BCRP は分子内に1つの膜貫通領域と1つの ATP 結合部位を持つ half molecule 型 ABC 輸送体であり、Mitoxantrone、SN-38、Topotecan などの抗癌剤を細胞外に排出するポンプとして働くと考えられている。本研究では、BCRP 遺伝子導入細胞の抗癌剤耐性の克服を指標として BCRP の生理的基質を検索し、BCRP の生理機能を解明する。さらに BCRP の生理的基質の類縁化合物や阻害剤を検索することにより、BCRP の耐性克服物質が得られると期待される。

B. 研究方法

ヒト胎盤由来の BCRP cDNA に Myc エピトープタグを付加後、Ha レトロウイルスベクターに組み込んでレトロウイルス HaMycBCRP を作成し、これをヒト白血病細胞 K562 に導入して BCRP 発現細胞 K562/MycBCRP を作成した。BCRP の生理的基質を検索するために、K562/MycBCRP 細胞に、それ自体ではあまり増殖阻害効果を示さない 1 ng/ml の Mitoxantrone と種々の被検物質を加えて培養し、4 日後の細胞数の計数により耐性克服作用を調べた。耐性克服作用が認

められた物質については、種々の濃度の Mitoxantrone、SN-38、Topotecan との併用により K562/MycBCRP 細胞特異的な殺細胞作用の増強効果を調べた。K562 細胞および K562/MycBCRP 細胞の Topotecan の取り込みを FACS により定量した。これに耐性克服物質を加えることにより K562/MycBCRP 細胞特異的な topotecan 取り込みの阻害を調べた。(倫理面への配慮)

本研究は培養細胞を用いた研究であり、特別な倫理面への配慮は必要としない。

C. 研究結果

ヒト胎盤由来の BCRP の cDNA を導入した K562/MycBCRP 細胞は SN-38、Mitoxantrone、Topotecan に対してそれぞれ 21 倍、11 倍、8 倍の耐性を示した。BCRP が特に胎盤で高発現していることから K562/MycBCRP の抗癌剤感受性に対する女性ホルモンの影響を調べたところ、特に Estrogen により BCRP の抗癌剤耐性が克服されることが明らかとなった。

10 μ M の Estrone 存在下、K562/MycBCRP 細胞の Mitoxantrone に対する

感受性は7.5倍低下して親株 K562 細胞に対して1.5倍の耐性しか示さなくなった。同様に、K562/BCRP 細胞の SN-38、Topotecan に対する感受性も約4倍低下した。K562 細胞の感受性は変化しなかった。また、3 μ M の Estrone あるいは3 μ M の Estradiol によって K562/MyBCRP 細胞のこれら抗癌剤に対する感受性は2倍から3倍亢進した。Estrone、Estradiol は K562/MyBCRP 細胞の Topotecan 取込みを濃度依存性に亢進させたが、K562 細胞の Topotecan 取込みには変化を与えなかった。

他の女性ホルモンについては、Estrinol、Pregnenolone は K562/MyBCRP 細胞と K562 細胞の抗癌剤感受性を濃度依存性にわずかに亢進させた。Estrinol は K562/MyBCRP 細胞の Topotecan 取込みを濃度依存性に増加させた。Progesterone は K562/MyBCRP 細胞と K562 細胞の Mitoxantrone の感受性を亢進した。

以上より、BCRP による抗癌剤耐性が Estrone、Estradiol により克服されることが明らかになった。Estrone、Estradiol は BCRP の生理的基質であると考えられた。

D. 考察

BCRP による抗癌剤耐性が Estrone、Estradiol により克服されることが明らかになった。BCRP は正常組織では胎盤に最も高発現が見られ、母体胎盤間の物質輸送における役割が推察される。BCRP は胎盤では syncytiotrophoblast に高発現がみられるが、この細胞は実際に Estrone、Estradiol を合成して母体側へ分泌していることが知られている。したがって、Estrone、Estradiol が BCRP の生理的基質である可能性は高い。BCRP の機能を阻害する物質が明らかになったことから、今後は、ステロイドホルモン類縁体や抗ホルモン剤を中心に BCRP の阻害物質をスクリーニングし、耐性の克服による抗癌剤の治療効果に役立てたい。

E. 結論

BCRP は Mitoxantrone、SN-38、Topotecan などの抗癌剤を細胞外に排出するポンプとして働く half molecule 型 ABC 輸送体である。本研究で、BCRP による抗癌剤耐性が Estrone、Estradiol により克服されること、Estrone、Estradiol は BCRP 発現細胞特異的に抗癌剤の細胞内取り込みを増大させることが明らかになった。BCRP は胎盤に高発現しており、これらのステロイドは BCRP の生理的基質であると考えられる。

F. 健康危険情報

特にありません

G. 研究発表

論文発表

1. Kage, K., Tsukahara, S., Sugiyama, T., Asada, S., Ishikawa, E., Tsuruo, T., and Sugimoto, Y. Dominant-negative inhibition of breast cancer resistance protein as drug efflux pump through the inhibition of S-S dependent homodimerization. *Int. J. Cancer*, 97:626-630, 2002.
2. Imai, Y., Tsukahara, S., Ishikawa, E., Tsuruo, T., and Sugimoto, Y. Estrone and 17β -estradiol reverse breast cancer resistance protein-mediated multidrug resistance. *Jpn. J. Cancer Res.*, in press.
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

H. 知的財産の出願・登録状況

(予定を含む)

特にありません

「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機構に基づく新薬の適正評価の研究」

分担研究者 田村友秀 国立がんセンター中央病院 特殊病棟部 11A 病棟医長

A. 研究目的

近年のがん化学療法は、より有効な新抗がん剤の開発^{1,3,4,5,8,9,10}とより効果的な投与スケジュールの研究⁶により進歩してきた。最近、基礎での分子生物学の進歩に基づく分子標的薬剤の開発が意欲的に進められている^{2,7}。分子標的薬剤の早期臨床試験では、薬剤が本当に標的に作用していることの確認と、至適用量設定および第 III 相試験に進めるかの決定のための効果の手がかりの検出が求められる。多くは増殖阻害効果を主作用とする分子標的薬剤においても腫瘍縮小を認めれば大きな効果の根拠となりえるが、腫瘍縮小がみられない場合にどう効果のてがかりをどうつかむかについては未だ手探りの状態である。最も早期に臨床導入されたマトリックスメタロプロテナーゼの臨床試験では腫瘍マーカーの増加率の低下が効果の根拠とされた。効果のサロゲートマーカーとしての腫瘍マーカー変動の意義を画像評価との対比において検討した。

B. 研究方法

我々が実施した4つの分子標的薬剤の第 I 相試験において画像評価が NC または PD であった 61 症例を対象として、治療前後の腫瘍マーカーの変動を画像評価との関係について検討した。この 61 例のうち、1 種以上の腫瘍マーカーが高値であり、かつ治療開始前約 1 か月、治療開始時、治療開始後約 1 か月の 3 ポイントの腫瘍マーカー値が判明している 43 例について調査した。まず、治療期間中の腫瘍マーカーの変動と画像評価との関係、次いで治療開始前約 1 か月間の腫瘍マーカー上昇率と治療開始後約 1 か月間の上昇率から治療前後の腫瘍マーカー上昇率の変化を求め、解析した。腫瘍マーカーは各症例 1 項目とし、複数の腫瘍マーカーが高値の場合は基準値に比しより高値のものを選択した。

C. 研究結果

61 例の背景は、男 34 女 27、年齢 30-72 才、原疾患は非小細胞肺癌 27、大腸直腸がん 17、小細胞肺癌 3、原発不明がん 3、胸腺腫瘍 3、その他 8 であった。非小細胞肺癌と大腸直腸がんが全体の 7 割を占めた。各症例において採用した腫瘍マーカーは、CEA が 29 例と大半を占め、次いで SLX が 4 例、ProGRP 3 例、SCC 2 例、CA125 1 例、シフラ 1 例で

あった。治療開始時から治療 1 か月後（治療期間中）の腫瘍マーカーの変動では、10%以上の増加・10%以上の低下は、SD 症例で 11%・47%、PD 症例で 67%・19%で、画像評価とある程度の相関を示した。一方、治療前期間と治療期間における腫瘍マーカーの上昇率の変化の検討では、その変動範囲は SD 症例 19 例において-84%か+113%、PD 症例 21 例において-45%から+177%であった。SD 症例では、治療期間の腫瘍マーカー上昇率が治療前期間における腫瘍マーカー上昇率より 10%以上減少したものが 84%を占めた。一方、PD 症例においても 10%以上の減少は 43%に認められた。腫瘍マーカーの上昇率の変動と薬剤の投与量との関係を検討したが、明らかな用量依存性は認められなかった。

D. 考察

腫瘍マーカー値の変動は画像評価とある程度相関することが示唆された。腫瘍マーカーの増加率の低下は多くの SD/PD 症例にみられるものの、臨床的意味のある効果を示すかは現時点では不明かつ疑問である。さらには画像評価における SD 判定が臨床的効果を適切に反映しているかについても確実とはいえない。このような薬剤における画像評価 SD/PD の意義についても、腫瘍マーカーの変動と同様に不明と考えられ、PET などの新たな指標との比較検討が必要と思われる。

E. 結論

腫瘍マーカー値の変動は効果に関して有用な情報の一つであることが示唆されたが、画像評価 SD/PD 症例におけるさらなる効果の指標としての妥当性は示されていない。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tamura, T.
New State of the art in small-cell lung cancer.
Oncology,15(1):8-10,(2001).
- 2) Saijo, N., Nishio, K., Tamura, T.
New strategies of cancer therapy in 21 century.
Cancer Chemother. Pharmacol. 48:S102-S106,
(2001)
- 3) Takama, H., Tanaka, H., Sudo, T., Tamura, T.,

- Tanigawara, Y.
Population Pharmacokinetic Modeling and Model Validation of Spic amyacin Derivative, KRN5500, in Phase I Study. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 47(5):404-410, (2001)
- 4) Kunitoh, H., Akiyama, Y., Kusaba, H., Yamamoto, N., Sekine, I., Ohe, Y., Kubota, K., Tamura, T., Shinkai, T., Kodama, T., Goto, K., Niho, S., Nishiwaki, Y., Saijo, N.
A phase I/II trial of cisplatin, docetaxel and ifosfamide in advanced or recurrent non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*, 33:259-265, (2001)
- 5) Kurata, T., Tamura, T., Shinkai, T., Ohe, Y., Kunitoh, H., Kodama, T., Kakinuma, R., Matsumoto, T., Kubota, K., Omatsu, H., Nishiwaki, Y., Saijo, N.
Phase I and Pharmacological Study of Paclitaxel Given Over 3 h with Cisplatin for Advanced Non-small Cell Lung Cancer. *Jpn Clin Oncol* 31(3):93-99, (2001)
- 6) Shimizu, M., Tamura, T., Yamada, Y., Akiyama, Y., Saijo, N., Nishio, K.
CPT-11 Alters the Circadian Rhythm of Dihydropyrimidine Dehydrogenase mRNA in Mouse Liver. *Jpn.J. Cancer Res*, 92:1-8, (2001)
- 7) Nishio, K., Nakamura, T., Kho, Y., Kanazawa, F., Tamura, T., Saijo, N.
Oncoprotein 18 Overexpression Increases the Sensitivity to Vinorelbine in the Human Lung Carcinoma Cells. *American Cancer Society*, 1494-1499, (2001)
- 8) Nakamura, T., Koizumi, F., Kaneko, N., Tamura, T., Chiwaki, F., Kho, Y., Akutagawa, S., Saijo, N., Nishio, K.
Reversal of Cisplatin Resistance by the 1,4-Benzothiazepine Derivative, JTV-519. *Jpn.J. Cancer Res*, 92:597-602, (2001)
- 9) Akiyama, Y., Ohe, Y., Tamura, T., Sawada, M., Inoue, A., Kusaba, H., Yamamoto, N., Sekine, I., Kunitoh, H., Kodama, T., and Saijo, N.
A Dose of Paclitaxel and Carboplatin in Untreated Japanese Patients with Advanced Non-small Cell Lung Cancer. *Jpn J Clin Oncol*, 3(10): 482-487, (2001)
- 10) Sakai, H., Yoneda, S., Tamura, T., Nishiwaki, Y., Yokoyama, A., Watanabe, K., Saijo, N.
A phase II study of paclitaxel plus cisplatin for advanced non-small cell lung cancer in Japanese patients. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 48:499-503, (2001)

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

EGFR 特異的レセプター型チロシンキナーゼ阻害剤(PTI)の腫瘍増殖抑制効果がヒト肺癌患者において認められることが明らかになりつつあるが、その作用機序は明らかでない。腫瘍縮小誘導の作用機序を明らかにする目的で ZD1839 の耐性細胞を樹立した。樹立した1つのクローン PC-9/ZD は *in vitro*, *in vivo* において PTI である ZD1839 に対する高度耐性形質を獲得していた。また既存抗がん剤や、多くのレセプター型チロシンキナーゼ阻害剤にも交差性を示さないが、EGFR 特異的阻害剤のうち、特定の薬剤のみに交差した。cDNA アレイによる遺伝子発現解析においてアポトーシス、細胞周期関連遺伝子が耐性・感受性を区別遺伝子であることが示唆された。

A. 研究目的

分子標的薬物の臨床応用が開始され³⁾、薬物が目的の標的に作用しているか、抗腫瘍効果に関わる作用¹⁾⁵⁾⁶⁾⁸⁾¹⁰⁾²⁰⁾²²⁾、因子²⁾⁷⁾¹²⁾¹⁸⁾は何か、感受性・耐性に関わる機序が何か⁴⁾⁹⁾¹⁵⁾についての知見がますます重要になっている。EGFR 特異的レセプター型チロシンキナーゼ阻害剤の腫瘍縮小効果がヒト肺癌患者においてみとめられることが明らかになりつつあるが、その作用機序は明らかでない。EGFR 発現と感受性が必ずしも相関しない事、またがんの組織型による感受性の違いから、同阻害剤に対する感受性を規定する因子が EGFR のみでは説明がつかないとされる。当研究では腫瘍縮小誘導の作用機序、腫瘍側の感受性規定因子を明らかにする目的で、各種肺癌細胞における同阻害剤接触後の下流シグナルダイナミクスの検討と耐性細胞の樹立、性状解析をおこなった。

B. 研究方法

EGFR 特異的レセプター型チロシンキナーゼ阻害剤(PTI)の作用機序の検討:各種ヒト癌細胞株に対する細胞増殖抑制効果を *in vitro* で検討し、EGFR の発現量、EGFR の自己リン酸化の程度、また PTI 接触時の EGFR のリン酸化抑制効果の程度との相関性を検討した。

耐性細胞の樹立:3つの方法で樹立を試みた。

1)長時間低濃度の PTI に持続的に接触し、接触濃度を次第に増加させ、増殖速度の速いクローンを選択する方法 2)Mutagen を短時間接触させた後、PTI に接触、生存クローンを選択する方法 3)肺癌細胞を移植した担がんマウスに、PTI を静脈内投与し、皮下腫瘍の縮小後、再増殖した細胞を株化する方法。

樹立した耐性細胞の性状解析: ①各種既存抗

がん剤、キナーゼ阻害剤による細胞増殖抑制効果の *in vitro* における検討、②マウス皮下に移植した細胞の ZD1839 投与による増殖抑制効果の検討、③耐性細胞における、EGFR 蛋白質およびそのリン酸化、PTI によるリン酸化抑制効果の検討、④cDNA アレイを用いた、耐性株において発現の変化している遺伝子群の選択をおこなった¹¹⁾。(倫理面への配慮)動物実験においては UKCCCR のガイドラインに基づいて施行した。

C. 研究結果

I. ヒト癌細胞株における ZD1839 の *in vitro* 増殖抑制効果メカニズムの解析: 約 20 種類のヒト癌細胞に対する ZD1839 の IC₅₀ は 10 μM 前後であったが、K562/TPA および PC-9 細胞、PC-9/CDDP 細胞では、0.02 と約千倍高感受性であった。各種細胞においては、EGFR の自己リン酸化が ZD1839 により抑制されたが、IC₅₀ と EGFR 発現量との相関は認められなかった。K562 および K562/TPA においては親株の約千倍程度の感受性の差異を認めたが、これは EGFR の発現の違いにより説明された¹¹⁾。すなわち EGFR の発現のない親株に対して、K562/TPA は EGFR の高発現により PTI に対する感受性は増加したと考えられた。一方、ヒト非小細胞肺癌 PC-9 および PC-14 細胞間においても約千倍の感受性の差異が認められたが、EGFR の発現量には、有意な差異を認めなかったが、PTI 投与後の EGFR のリン酸化抑制効果に差異を認めた。PTI は EGFR の ATP 結合部位に競合的に結合する小分子化合物であることから EGFR の ATP 結合領域における塩基配列を検討した。感受性細胞においては感受性である PC-9 においてむしろ遺伝子欠損が認められ、耐性機序は同部位の遺伝子変異では説明できなかった。

II. ZD1839 の耐性細胞の樹立とその性状解析

Mutagen処理にて樹立した1つの耐性クローン PC-9/ZD は ZD1839 に対し親株に比し約 300 倍の耐性を示した。各種既存抗がん剤に交差耐性をしめさず、多剤耐性とは考えられなかった。また各種チロシンキナーゼ阻害剤に対する交差性を検討したところ、他のチロシンキナーゼレセプターに対する特異的 PTI には感受性であった。EGFR 特異的阻害剤に対しては、感受性および耐性を示すものに 2 分されたが多くの PTI に対して感受性であった。すなわちほぼ PC-14/ZD は ZD1839 に対する特異的な耐性形質を獲得していると考えられた。同細胞をマウス皮下に移植し ZD1839 投与による細胞増殖抑制を検討し、同細胞は *in vivo* においても ZD1839 に耐性を示すことが示唆された。EGFR の発現および自己リン酸化は、耐性株においてむしろ増加していたが、PTI による EGFR のリン酸化抑制効果は耐性株において有意に低下していた。両細胞株の EGFR 結合領域の遺伝子配列に差はなかった。

cDNA アレイによる遺伝子発現解析において PTI 暴露により親株でアポトーシス関連遺伝子の増加、耐性株で細胞周期関連遺伝子の増加が認められ、これらが耐性・感受性を区別する遺伝子であることが示唆された。

D. 考察

臨床試験において EGFR 発現以外の因子が関連していると示唆されていること、同細胞が親株に比し明らかな EGFR の発現量の低下を認めないことから、本研究で樹立した耐性細胞は、ZD1839 の感受性規定因子の検索する研究に有用と考えられる。引き続き、同耐性機序の検討を継続するとともに、他の方法で樹立した耐性クローンの性状解析も平行しておこなうことにより、広角的に解析することが可能になると考えられる。

E. 結論

EGFR 特異的チロシンキナーゼ阻害剤の細胞増殖抑制機序を検討し、同薬剤に対する特異的耐性細胞を樹立した。EGFR の発現量、自己リン酸化以外の感受性規定要因を検索する目的で性状解析の検討を開始した。EGFR 下流シグナル、アポトーシス関連因子が因子として選択されつつある。これらの抗腫瘍効果に関わる因子の同定は個別化治療にむけて重要であると考えられる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Yoshida, M., Feng, W., Nishio, K., Takahashi, M., Heike, Y., Saijo, N., Wakasugi, H., and Ikekawa, T. Antitumor action of the PKC activator gnidimacrin through cdk2 inhibition. *Int. J. Cancer*, 94:348-352 (2001)
2. Zhang, J., Takahashi, K., Takahashi, F., Shimizu, K., Ohshita, F., Kameda, Y., Nishio, K., and Fukuchi, Y. Differential osteopontin expression in lung cancer. *Cancer Lett.*, 171:215-222 (2001)
3. Saijo, N., Tamura, T., Yamamoto, N., and Nishio, K. New strategies for cancer therapy in the 21st century. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 48:S102-106 (2001)
4. Yoshida, M., Suzuki, T., Komiya, J., Hatashita, E., Nishio, K., Nakagawa, K., and Fukuoka, M. Induction of MRP5 and SMRP mRNA by adriamycin-exposure and its overexpression in human lung cancer cells resistant to adriamycin. *Int. J. Cancer*, 94:432-437 (2001)
5. Fukuoka, K., Arioka, H., Iwamoto, Y., Fukumoto, H., Kurokawa, H., Ishida, T., Tomonari, A., Suzuki, T., Usuda, J., Kanzawa, F., Saijo, N., and Nishio, K. Mechanism of the radiosensitization induced by vinorelbine in human non-small cell lung cancer cells. *Lung Cancer*, 34:451-460 (2001)
6. Tatsumi, Y., Arioka, H., Ikeda, S., Fukumoto, H., Miyamoto, K., Fukuoka, K., Ohe, Y., Saijo, N., and Nishio, K. Enhancement of *in vivo* antitumor activity of a novel antimetabolic 1-phenylpropanone derivative, AM-132, by tumor necrosis factor- α or interleukin-6. *Jpn. J. Cancer Res.*, 92: 768-777 (2001)
7. Usuda, J., Okunaka, T., Furukawa, K., Tsuchida, T., Kuroiwa, Y., Ohe, Y., Saijo, N., Nishio, K., Konaka, C., and Kato, H. Increased cytotoxic effects of photodynamic therapy in IL-6 gene transfected cells via enhanced apoptosis. *Int. J. Cancer*, 93:475-480 (2001)
8. Natsume, T., Nakamura, T., Koh, Y., Kobayashi, M., Saijo, N., and Nishio, K. Gene expression profiling of exposure to TZT-1027, a novel microtubule-interfering agent, in non-small cell lung cancer PC-14 cells and astrocytes *Invest. New Drugs*, 19:293-301 (2001)
9. Nakamura, T., Koizumi, F., Kaneko, N., Tamura, T., Chiwaki, F., Koh, Y., Akutagawa, S., Saijo, N., and Nishio, K. Reversal of cisplatin resistance by the 1,4-benzothiazepine derivative, JTV-519. *Jpn. J. Cancer Res.*, 92:597-602 (2001)
10. Kanzawa, F., Koizumi, F., Koh, Y., Nakamura,

- T., Tatsumi, Y., Fukumoto, H., Saijo, N., Yoshioka, T., and Nishio, K. *In vitro* synergistic interactions between the cisplatin analogue nedaplatin and the DNA topoisomerase I inhibitor irinotecan and the mechanism of this interaction. *Clin. Cancer Res.*, 7:202-209 (2001)
11. 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.*, 21:137-144 (2001)
 12. Shimizu, M., Tamura, T., Yamada, Y., Akiyama, Y., Saijo, N., and Nishio, K. CPT-11 alters the circadian rhythm of dihydropyrimidine dehydrogenase mRNA in mouse liver. *Jpn. J. Cancer Res.*, 92:554-561 (2001)
 13. Nishio, K., Nakamura, T., Koh, Y., Kanzawa, F., Tamura, T., and Saijo, N. Oncoprotein 18 overexpression increases the sensitivity to vindesine in the human lung carcinoma cells. *Cancer*, 91:1494-1499 (2001)
 14. Fukuoka, K., Usuda, J., Iwamoto, Y., Fukumoto, H., 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*, 19:219-227 (2001)
 15. Suzuki, T., Nishio, K., and Tanabe, S. The MRP family and anticancer drug metabolism current drug. *Met. Curr. Drug Met.*, 2:367-377 (2001)
 16. Takahashi, F., Akutagawa, S., Fukumoto, H., Tsukiyama, S., Ohe, Y., Takahashi, K., Fukuchi, Y., Saijo, N., and Nishio, K. Osteopontin induces angiogenesis of murine neuroblastoma cells in mice. *Int. J. Cancer*, 98:707-712 (2002)
 17. Natsume, T., Koh, Y., Kobayashi, M., Fukumoto, H., Takahashi, F., Nakamura, T., Ohe, Y., Saijo, N., and Nishio, K. Enhanced antitumor activities of TZT-1027 against TNF- α or IL-6 secreting Lewis lung carcinoma *in vivo*. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 49:35-47 (2002)
 18. Koh, Y., Tsunoda, T., Iwahashi, M., Yamaue, H., Ishimoto, K., Tanimura, H., Fukumoto, H., Nakamura, T., Tatsumi, Y., Shimizu, M., Saijo, N., and Nishio, K. Decreased expression of α 2,8 sialyltransferase and increased expression of β 1,4 N-acetylgalactosaminyltransferase in gastrointestinal cancers. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 227:196-200 (2002)
 19. Naruse, I., Ohmori, T., Ao, Y., Fukumoto, H., Kuroki, T., Mori, M., Saijo, N., and Nishio, K. Antitumor activity of the selective epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitor (EGFR-TKI) IRESSATM (ZD1839) in a EGFR-expressing multidrug resistant cell line *in vitro* and *in vivo*. *Int. J. Cancer*, 98:310-315 (2002)
 20. Koh, Y., Nishio, K., and Saijo, N. Mechanisms of action of cancer chemotherapeutic agents: topoisomerase inhibitors. In "Cancer Handbook" Reference Nature Publishing Group, Crinan Street, London, UK. Chap. 84C, 1313-1322 (2002)
 21. Naruse, I., Fukumoto, H., Saijo, N., and Nishio, K. Enhanced anti-tumor effect of trastuzumab in combination with cisplatin. *Jpn. J. Cancer Res.*, (*In press*)
 22. Fukuoka, K., Arioka, H., Iwamoto, Y., Fukumoto, H., Kurokawa, H., Ishida, T., Tomonari, A., Suzuki, T., Usuda, J., Kanzawa, F., Kimura, H., Saijo, N. and Nishio, K. Mechanism of vinorelbine-induced radiosensitization of human small cell lung cancer cells. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, (*In press*)
 23. Kanzawa, F., Akiyama, Y., Saijo, N. and Nishio, K. *In vitro* effects of combinations of cis-amminedichloro (2-methylpyridine) platinum (α) (ZD0473) with other novel anticancer drugs on the growth of SBC-3, a human small cell lung cancer cell line. *Lung Cancer*, (*In press*)
- ## 2. 学会発表
1. Akiyama, Y., Kusaba, H., Kanzawa, F., Tamura, T., Saijo, N., and Nishio, K. Overcoming of cisplatin-resistance by ZD0473 in human lung cancer cells. A8 Proc. Second Int. Lung Cancer Cong. (2001)
 2. Kanzawa, F., Akiyama, Y., Saijo, N. and

Nishio, K. *In vitro* effect of the combination of ZD0473 and gemcitabine in human lung cancer cells. A9 Proc. Second Int. Lung Cancer Cong. (2001)

3. Kanzawa, F., Koizumi, F., Akiyama, Y., Saijo, N., and Nishio, K. *In vitro* effect of the combination of ZD0473 and gemcitabine in human lung cancer cells A721 Proc. 2001 AACR-NCI-EORTC (2001)

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

厚生科学研究費補助金

分担・研究報告書

ファルネシル・トランスフェラーゼ阻害剤 (R115777) の生体内標的分子およびシグナル経路に関する研究

分担研究者 福岡 正博 近畿大学医学部第4内科教授

研究要旨

分子標的薬剤の早期臨床試験において有効性に関わるサロゲート・マーカーを検索することは、薬剤開発において重要である。分子標的薬剤 R115777 の臨床第1相試験において、cDNA マクロアレーを用いて治療前後における末梢血リンパ球中の遺伝子発現プロファイルの変化を調べることにより、R115777 の投与量依存的に変化する遺伝子群を同定することができた。本研究では、分子標的薬剤の生体内における真の標的分子、作用メカニズムを検索する新しい方法論を提唱した。

A. 研究目的

固形がんの化学療法は新規殺細胞性抗癌剤 (CPT-11、タキソール、タキソテール、ゲミシタビン、ビノレルビンなど) の登場により徐々に進歩しつつある^{1,6,8}。しかしながら、抗癌剤耐性機構^{7,9,10}の存在などによりこれら新薬による飛躍的進歩を期待することはできない。分子標的治療剤はがんの基礎的研究成果をスクリーニングに応用することにより選択されてきた新しい治療剤であり、ZD1839、STI-571 などの登場により注目を集めている。その早期臨床試験では従来の抗癌剤の開発とは異なった新しい戦略が必要とされている。本研究では、ファルネシル・トランスフェラーゼ阻害剤、R115777 の臨床第1相試験において、本薬剤の生体内における標的分子と主なシグナル伝達経路の推定を行うことにより、薬剤開発におけるサロゲート・マーカーの検索、および併用薬剤の理論を構築する。

B. 研究方法

R115777 の臨床第1相試験において、すべての症例において同意を取った後、治療前後の末梢血リンパ球を採取後、一部はファルネシル・トランスフェラーゼ活性を測定し、一部はmRNAを抽出後、cDNA マクロアレーにより遺伝子発現プロファイルの変化を測定した。遺伝子発現プロファイルの変化に関しては、R115777 の投与量依存的変化を QQ プロット解析により投与量依存的に変化する遺伝子の存在を、また主成分解析の返報である Bi-plot 解析によりその遺伝子の特定を試みた。

倫理面での配慮としては、新薬開発における新 GCP に適合する形式においてプロトコール、同意説明文書が作成され、施設倫理委員会の承認を受けて実施された。本研究は、ヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針が発行される前の試験である。また、本指針に照らしても、RNA の遺伝子

発現を検索したものであり本倫理指針の適応外と明記されている。

C. 研究結果

(ア) 臨床第1相試験：50mg/body・Bidを初回治療量として100mg、200mg、300mg、400mgまで増量された。400mg/body Bidの投与量において3例中2例にGrade4の好中球減少を認めたため、300mg/body Bidに3例を追加して合計6例を集積、この投与量の安全性が確認されたため、300mg/body BidをMTD、推奨容量と判断した。

(イ) R115777投与により末梢リンパ球中でのファルネシル・トランスフェラーゼ活性は抑制された。また、その結果として、HDJ-2(機能は未だ不明の生体内分子)のファルネシル化が阻害されていることが示された。

(ウ) 遺伝子発現プロファイルの投与量依存的变化をQQプロット解析にて検討したところ、FTI関連遺伝子およびRas関連遺伝子群において統計学的に有意な変化を認めた。

(エ) Bi-plot解析では、第3主成分が投与量依存性を示していることが判明し、第3主成分に対する寄与度から、Rhoファミリーの特定のサブタイプが最も強く投与量依存的遺伝子発現プロファイルの変化を示していることが判明した。

D. 考察

(ア) 分子標的治療剤の早期臨床試験に

おいて、生体内において新規薬剤の標的分子を確認すること、想定されているシグナル伝達経路を確認することは最も重要な知見である。その意味でcDNAマクロアレーの精度、解析方法が提示されたことは重要である。

(イ) 末梢血リンパ球中における遺伝子発現プロファイルの変化と腫瘍細胞中における変化では、本質的に異なることも予想されるが、方法的にはこのような解析により目的とした結果を得ることができることが本研究にてしめされた。今後、腫瘍サンプルを用いた検討が可能になった。

E. 結論

(ア) 早期臨床試験におけるcDNAマクロアレーを用いたシグナル伝達経路の探索が可能であることが示された。

(イ) R115777の生体内における標的分子はファルネシル・トランスフェラーゼであり、その最も重要なシグナル伝達経路はRhoファミリーの中の特定のサブタイプであった。

F. 健康危険情報

本薬剤のDLTは好中球減少であり、その推奨容量は300mg/body Bidである。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Furuse, K., Kawahara, M., Hasegawa,

- K., Kudoh, S., Takada, M., Sugiura, T., Ichinose, Y., Fukuoka, M., Ohashi, Y., Niitani, H. Early phase II study of S-1, a new oral fluoropyrimidine, for advanced non-small-cell lung cancer. *Int J Clin Oncol*, 6(5): 236-41, 2001
2. Takeda, K., Negoro, S., Takifuji, N., Nitta, T., Yoshimura, N., Terakawa, K., Fukuoka, M. Dose escalation study of irinotecan combined with carboplatin for advanced non-small-cell lung cancer. *Cancer Chemother Pharmacol*, 48(2): 104-8, 2001
 3. Matsui, K., Masuda, N., Yana, T., Takada, Y., Kobayashi, M., Nitta, T., Hirashima, T., Fukuoka, M. Carboplatin calculated with Chatelut's formula plus etoposide for elderly patients with small-cell lung cancer. *Intern Med*, 40(7): 603-6, 2001
 4. Fukuoka, M. Role of topoisomerase I inhibitors in small-cell lung cancer. *Oncology (Huntingt)*, 15(7 Suppl 8): 9-13, 2001
 5. Fukuoka, M. State of the art of non-small-cell lung cancer in the new millennium. *Oncology (Huntingt)*, 15(3 Suppl 6): 9-11, 2001
 6. Fukuoka, M. Current status of irinotecan in lung cancer. *Oncology (Huntingt)*, 15(1 Suppl 1): 6-7, 2001
 7. Yoshida, M., Suzuki, T., Komiya, T., Hatashita, E., Nishio, K., Nakagawa, K., Fukuoka, M. Induction of MRP5 and SMRP mRNA by adriamycine exposure and its overexpression in human lung cancer cells resistant to adriamycin. *Int. J. Cancer*, 94:432-437, 2001
 8. Noda, K., Nishiwaki, Y., Kawahara, M., Negoro, S., Sugiura, T., Yokoyama, A., Fukuoka, M., Mori, K., Watanabe, K., Tamura, T., Yamamoto, S., Saijo, N. for the Members of the Japan Clinical Oncology Group. Irinotecan plus cisplatin as compared with etoposide plus cisplatin for extensive small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 346(2):85-91, 2002.
 9. Tsurutani, J., Komiya, T., Uejima H., Tada H., Negoro S., Oka M., Kohno S., Fukuoka M., Nakagawa, K. Mutation analysis of the beta-tubulin gene in lung cancer. *Lung Cancer*, (in press)
 10. Tsurutani, J., Niita T., Hirashima, T., Komiya T., Uejima H., Tada, H., Negoro, S., Tohda, Y., Fukuoka M., Nakagawa, K. Point mutations in the topoisomerase I gene in patients with non-small cell lung cancer treated with irinotecan. *Lung Cancer*, (in press)
- 2.学会発表
- H. 知的財産件の出願・登録状況
- (ア) 特許取得 なし
- (イ) 実用新案登録 なし
- (ウ) その他 なし