

厚生労働科学研究費補助金（がん克服戦略研究事業）

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：がん細胞の栄養飢餓耐性機構を解析し pKB/Akt、AMPK の関与を証明した。さらにこの機構ががんの浸潤や転移と密接に結びつくことを明らかにした。栄養飢餓耐性を解除する薬剤のスクリーニングを行い、ヒトに適用可能な候補の薬剤、さらに新規の化合物を見出し、動物モデルでは有効であることを証明した。

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。さしあたり我々が見出した、腫瘍細胞の栄養飢餓耐性反応を標的とする薬剤の開発を目的とする。

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、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とともに cDNA アレイやチップを持ち手その詳細なメカニズムの解析をする。
- 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。スクリーニングの範囲に関しては、耐性のメカニズムから考え得る既知の薬剤を検討するとともに、放線菌の培養ろ液など全くの新しい物質の検討も行う。

C 研究結果

- 1.血流の乏しい膵臓がんや、未分化な胃がん大腸がん細胞では、強いグルコース欠乏耐性があることを見出しこのメカニズムには PKB/Akt と AMPK が関与していることを見出していたが（1—5）、本年度はこれら標的遺伝子産物と、それらの相互関係に関して明らかにした。まず、HepG2 細胞をグルコース欠乏培地で培養すると細胞周期が停止する。このとき p53 蛋白質が強くリン酸化されること、このリン酸化はセリン 15、続いてセリン 20 番がリン酸化された。このリ

ン酸化を担うのは ATM 蛋白質ではないかと疑い、ATM 患者の線維芽細胞 AT1OS を持ち手同様の実験を行うと p53 のリン酸化は起こらず、ATM の発現ベクターを導入するとリン酸化が回復した。このことより、ATM 蛋白質は、放射線などの DNA 損傷のみならず栄養欠乏の認識とそれに対する生体反応にも関与することが分かった。さらに、この ATM をリン酸化する AMPK の一種である新しい酵素を見出し、ARK5 と名付けた (7)。ARK5 はそのアミノ酸配列の中に AKT によるリン酸化部位を持っていたので AKT による活性化、リン酸化を検討した。直接にリン酸化による活性化を受けることが分かった。

2. グルコースが欠乏し酸素が欠乏している状態では主にアミノ酸がエネルギー源になっている事を見出しているが、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 (6)。腫瘍の血流不足による栄養飢餓が、アミノ酸の需要のために細胞間基質を分解し浸潤に結びつく可能性が示唆された。この反応にも ARK5 が関与していることも明らかになった。

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ウム塩に活性があることを見いだしたが、ヌードマウスでの抗腫瘍性を検討すると、皮下投与は勿論経口投与でも十分に抗腫瘍性を発揮することが分かった。

新規の抗腫瘍性栄養飢餓耐性解除薬を見出した。栄養飢餓耐性解除薬スクリーニング系で放線菌の培養ろ液をスクリーニングした。このスクリーニング系は我々が確立した方法で、栄養飢餓状態で選択的に毒性を探す方法である (特開 2002-065298)。その結果、本年は新規物質を見いだすことが出来た。キガマイシンとなづけた。キガマイシンは栄養飢餓条件下で PANC1 細胞に顕著な毒性を示すが通常の培養条件下ではその約 100 倍以上の濃度で初めて毒性が現れる。

PANC1 細胞のヌードマウスを用いた腫瘍系では 3 μ g/day 皮下投与および、15 μ g/day 経口投与で十分な抗腫瘍性を認めた。特許出願 (特願 2002-302318)。

D 考察

本年度の研究で、新しい治療標的にな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。慢性的血流不足の組織に特異性

があるとなれば、がん組織特異性を期待できる。実際、本年度に抗腫瘍性まで検討したピルヴィニウム塩、キガマイシンは期待通りの抗腫瘍性を発揮した。栄養飢餓耐性を標的とすることの正しさを強く示唆する。

E 結論

新しい戦略に基づく新しい抗癌薬の候補を見出し、抗腫瘍性を確認し戦略の正しさを証明するとともに、抗癌薬の候補を見出した。

G. 研究発表

1. Hashimoto K., Kato K., Imamura K., Kishimoto A., yoshikawa H., Taketani Y., and Esumi H. 5-Amino-4-imidazoecarboxamide Riboside (AICAR) Confers Strong Tolerance to Glucose Starvation in a 5'-AMP Activated Protein Kinase Dependent Fashion Biochemical and Biophysical Research Communications 290: 263-267, 2002
2. Kimura H., Ogura T., Kurashima Y., Weisz A., and

Esumi H. Effects of nitric oxide donors on vascular endothelial growth factor gene induction Biochemical and Biophysical Research Communications 296: 976-982, 2002

3. Esumi H., Izuishi K., Kato K., Hashimoto K., Kurashima Y., Kishimoto A., Ogura T., and Ozawa T. Hypoxia and Nitric Oxide Treatment Confer Tolerance to Glucose Starvation in a 5'-AMP-activated Protein Kinase-dependent Manner J Biol Chem 36:32791-32798, 2002
4. Kato K., Ogura T., Kishimoto A., Minegishi Y., Nakajima N., Miyazaki M., and Esumi H. Critical roles of AMP-activated protein kinase in constitutive tolerance of cells to nutrient deprivation and tumor formation. Oncogene 21:6082-6090, 2002

H 特許

5. Yen L, Benlimame N, Nie ZR, Xiao D, Wang T, Moustafa AE, Esumi H, Milanini J, Hynes NE, Pages G, Alaoui-Jamali MA. Differential regulation of tumor angiogenesis by distinct ErbB homo- and heterodimers. Mol Biol Cell 13:4029-44, 2002
特開 2002-065298
特願 2002-302318
6. Ishii Y., Ogura T., Tatemichi M., Fujisawa H., Otsuka F., and Esumi H. Induction of matrix metalloproteinase gene transcription by nitric oxide and mechanisms of MMP-1 gene induction in human melanoma cell lines International Journal of Cancer 103: 161-168, 2003
7. Suzuki A., Kusakai G., Kishimoto A., Lu J., Ogura T., Lavin MF., and Esumi H. Identification of A Novel Protein Kinase Mediating Akt Survival Signaling to ATM. J Biol Chem 278: 48-53, 2003

厚生労働科学研究費補助金（がん克服戦略研究事業）
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

EGFR 特異的受容体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、感受性を規定するマーカーの同定が必要である。腫瘍縮小の作用機序を明らかにする目的で ZD1839 の耐性細胞 PC-9/ZD を樹立し、その性状を解析した。PC-9/ZD においては PC-9 細胞に比し、EGFR-HER2 のヘテロダイマーの増加、EGFR から Ras ヘシグナルを伝えるアダプター分子のうち、Grb2 および SOS が EGFR との結合量において著減していること、ZD1839 接触による EGFR のリン酸化抑制のうち Tyr1068 のリン酸化抑制が重要と示唆された。また耐性細胞において PI-3 キナーゼ経路の活性化等がみとめられた。これらが ZD1839 に対する感受性を予測するマーカーとなる可能性が示唆された。

A. 研究目的

分子標的薬物の臨床応用が開始され、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、因子は何か、感受性・耐性に関わる機序が何かについての知見が重要になっている^{1-5,7,9)}。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考えられる^{8,12)}。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

昨年度本研究で樹立した ZD1839 耐性ヒト肺癌細胞の性状解析を継続した⁸⁾¹²⁾。In vitro で持続接触により樹立した PC-9/ZD 細胞の耐性機序を中心に実施した。(1)耐性細胞における、EGFR 蛋白質およびその関連分子の発現量、リン酸化、ZD1839 によるリン酸化抑制効果の検討を immunoblot, 免疫沈降、RNAase protection, 各種キナーゼアッセイなどを用いて検討した。¹²⁾(2) ZD1839 接触時の EGFR リン酸化抑制作用を各種部位特異的な抗リン酸化 EGFR 抗体を用いて検討した。(3)chemical cross link による HER ファミリーの 2 量体形成量を測定した。

C. 研究結果

I. EGFR および関連蛋白質および RNA の発現：EGFR を含む各種 HER ファミリー受容体の発現量を、抗体アレイ、cDNA アレイ、immunoblot、RNAase protection assay を用いて PC-9/ZD 細胞における発現量を検討したが、EGFR 発現量の増加以外には、親株に比し大きな変化はみとめられなかつ

た。蛋白質レベルの変動はみとめられなかった。
II. EGFR, HER2, HER3 においては、耐性細胞と親株の間に、塩基配列に変化はなかった。
III. HER2 ファミリーの 2 量体形成量を chemical cross link および免疫沈降法で検討した。EGFR, HER2 の 2 量体形成量は耐性細胞と親株で同程度であったが、EGFR-HER2 のヘテロダイマー形成量が増加していた。また ZD1839 接触により、両細胞でヘテロダイマー形成量が増加した。
III. EGFR とアダプター蛋白質の interaction：EGFR と各種アダプター蛋白質の interaction を免疫沈降法で検討した。EGFR-Grb2 複合体の形成量の減少、EGFR-SOS 複合体の欠如が耐性細胞でみとめられた。
IV. ZD1839 接触による EGFR のリン酸化抑制が耐性細胞ではみとめ難いが、その現象は特に、1068 番目のチロシン残基のリン酸化で著明であり、そのリン酸化部位の下流シグナルである MAPK および AKT カスケードが増殖抑制活性に重要であると知れた。
V. 下流シグナルの変化：PC-9/ZD においては AKT カスケードの活性化がみとめられた。ZD1839 接触によるアポトーシスの誘導およびカスパーズの活性化は耐性細胞で低下していた。

D. 考察

ZD1839 耐性細胞の性状解析を昨年度の遺伝子発現プロファイルの解析^{6,10,11)}に引き続き、耐性機序に関連する現象を見出した^{13,14)}。EGFR-HER2 のヘテロダイマー形成量、EGFR-SOS の interaction、1068 番目のリン酸化等は、ZD1839 の感受性、耐性を予測するマーカーとなる可能性がある。これらの測定法は現在のところ簡便ではなく、臨床材料での解析が可能にする技術の開発を行う必要がある。またみとめられた現象が、どの程度 ZD1839 感受性に寄与するのかを検証する意味で、基礎的には、dominant negative 遺伝子導入実験を実施し、検証する必要がある。また、得られた分子を指標とした、臨床試験における correlative study を実施したい。

E. 結論

EGFR 特異的チロシンキナーゼ阻害剤 ZD1839 に対する特異的耐性細胞の性状解析をおこなった。ZD1839 に対する感受性、耐性のマーカー分子の候補が選択できた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Usuda, J., Inomata, M., Fukumoto, H., Iwamoto, Y., Suzuki, T., Kuh, H.J., Fukuoka, K., Kato, H., Saijo, N., Nishio, K. Restoration of p53 gene function in 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate-resistant human leukemia K562/TPA cells. *Int. J. Oncol.*, 22:81-86 (2003)
2. Kawamura-Akiyama, Y., Kusaba, H., Kanzawa, F., Tamura, T., Saijo, N., and Nishio, K. Non-cross resistance of ZD0473 in acquired cisplatin-resistant lung cancer cell lines. *Lung Cancer*, 38:43-50 (2002)
3. Naruse, I., Fukumoto, H., Saijo, N., and Nishio, K. Enhanced anti-tumor effect of trastuzumab in combination with cisplatin. *Jpn. J. Cancer Res.*, 93:574-581 (2002)
4. 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.*, 49:385-390 (2002)
5. 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)
6. 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)
7. 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-acetylgalactosaminyl-transferase in gastrointestinal cancers. *Exp.*

Biol. Med., 227:196-200 (2002)

8. 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*, 10;98:310-315 (2002)
9. 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)
10. Ohira, T., Akutagawa, S., Usuda, J., Nakamura, T., Hirano, T., Tsuboi, M., Nishio, K., Taguchi, F., Ikeda, N., Nakamura, H., Konaka, C., Saijo, N., and Kato, H. Up-regulated gene expression of angiogenesis factors in post-chemotherapeutic lung cancer tissues determined by cDNA macroarray. *Oncology reports*, 9:723-728 (2002)

2. 学会発表

11. Nishio, K.: Selection of target molecules for anticancer agents based on gene expression profiling and reliability of assay techniques. Drug Information Association 9th Annual Workshop in Japan for BIOSTATISTICS, 2002.8.29-30 Tokyo
12. Ohmori T, Yamaoka T, Nishio, K., Arteaga CL, Saijo, N., Adachi M, Kuroki T : ZD1839(Iressa) enhances TNF α -induced apoptotic cell death by inhibition of the Akt/NF- κ B pathway in human non-small-cell lung cancer PC-9 cells. American Association for Cancer Research 93rd Annual Meeting 2002.4.6-10 Sun Francisco
13. Yamaoka T, Ohmori T, Kadofuku T, Noda M, Tsukiyama M, Koizumi F, Nishio, K., Saijo, N., Kawaguchi T, Adachi M, Kuroki T : Characteristics and resistance mechanism(s) of human non-small-cell lung cancer cell lines with acquired resistance to an epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor. American Association for Cancer Research 93rd Annual Meeting 2002.4.6-10 Sun Francisco
14. Taguchi F, Koh Y, Koizumi F, Ueda Y, Tsukiyama S, Tamura, T., N. Saijo, K., Nishio : Activity of ZD6474, a vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor (VEGFR [KDR]-TKI), in a model of ZD1839 ('Iressa') resistance. 14th NCI-EORTC-AACR Symposium on "Molecular Targets and Cancer Therapeutics "Eur J Cancer" 2002.11.19-22 Frankfurt, Germany

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

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、新しいがん治療戦略や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と悪性形質と関連する分子標的を対象にしてがん治療における新しい治療薬の開発と“個別化”治療と診断に関する具体的な提示を行う。

A. 研究目的

がん治療薬での個別化を進めるために薬剤の感受性や代謝を担う分子標的の正常組織とがんでの発現や遺伝子背景を明らかにすることが大切である。本研究では、抗がん剤の感受性を担う ABC トランスポーターを対象にして正常組織やがんでの発現や SNPs を検討することによって、個別化療法へ貢献できる。他方、がんの悪性形質や再発また血管新生/転移と関連する分子標的を探索することによって新しい診断治療法や創薬へ寄与していく。

B. 研究方法

1. ABC トランスポーターである MRP1 と MRP2 の抗がん剤感受性を制御するドメインを決定するためにキメラタンパクを PCR 増幅やサイト特異的な突然変異法で作成した。
2. ABC トランスポーターや YB-1 などの細胞膜や細胞内局在は特異的抗体を用いて共焦点顕微鏡で検討した。
3. Northern blot、定量 PCR と免疫染色法を用いて各種遺伝子レベルを定量化する。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。
4. 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。
5. 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。
6. 倫理面への配慮は、研究対象とする個人の権利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. がん化学療法後に白血病や膀胱がん患者における MDR1 遺伝子の発現上昇へ同プロモーター上の CpG サイトのメチル化の有無が関与することを観察した。他方、アポトーシスと関連する DAP-kinase のメチル化の有無が膀胱がん患者の再発と関連した²⁾。
2. 膀胱がんにおいて MDR1 と MRP2 が全身化学療法後、有意に上昇していた⁵⁾。さらに卵巣がんにおいても MRP1 や MRP3 の上昇が患者の予後と関連していた¹⁶⁾。
3. MRP4 がメトトレキサートや葉酸の細胞外放出に重要な役割を担っていた⁷⁾。他方、MRP1 と MRP2 のエトポシド耐性やメトトレキサートの親和性を決定するドメインを明らかにした^{10, 21)}。さらに新しいトランスポーターを同定した¹⁵⁾。
4. YB-1 が翻訳制御している分子機構を明らかにした^{9, 17)}。と同時に YB-1 遺伝子の発現が c-Myc と p73 と反応することによって上昇する転写制御を明らかにした¹¹⁾。さらに YB-1 は酸化グアニンを含む RNA に親和性が上昇することを見いだした¹²⁾。
5. YB-1 の核内局在が滑膜肉腫の P-糖蛋白質や DNA トポイソメラーゼ II α 発現と相関すること¹⁸⁾や卵巣がんのシスプラチン耐性相関すること¹⁴⁾を見出した。
6. イレッサ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を示した^{3, 17)}。さらに VEGF 受容体 KDR/Flk-1 の阻害剤 SU5416 が Flt-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^{4, 17)}。さらに VEGF 受容体を標的とする抗血管新生剤¹³⁾や VEGF 発

現の酸素ストレスの効果⁶⁾などを検討した。

7. 血管新生阻害因子トロンボスポンジンの発現が EGF/TGF α や TGF β によって上昇する機構を示した⁷⁾。さらにチミジンフォスホリラーゼの血管新生にリボースが関与していた⁸⁾。
8. 腎がんで発現上昇している遺伝子として単離した Cap43 は VHL によってその発現が低下する転写制御を見いだした¹⁹⁾。
9. 可溶性 VCAM-1 は TNF α と協調して血管新生を誘導するが α 4インテグリンの下流シグナルが重要であることを示した²⁰⁾。

D. 考察

1. ABC トランスポーターのうち、MFP ファミリーの幾つかについて親和性を示す抗がん剤を同定した。この研究から ABC トランスポーターの構造と機能から見た親和性を示す抗がん剤との対応を明らかにしていきたい。
2. ABC トランスポーターに関しては膀胱がん、卵巣がん、骨膜肉腫などの臨床癌症例において化学療法後の再発や予後との関連性について検討した。その結果、がん腫によって発現上昇する ABC トランスポーターを明らかにする。と同時にがん化学療法や治療後再発と密接に関連する ABC トランスポーターを同定することにより、使用する抗がん剤の選択が可能となると考える。
3. YB-1 は多機能を示すタンパクであるが、各れのがんの悪性形質や治療効果の有無と密接に関連するか否かを明らかにすることは大切である。
4. がん血管新生に関与する分子標的を対象にした有効な薬剤を開発するためには、もっとがんの血管新生への間質の役割を含め、その分子的背景の研究を進めるとともに、有力な分子標的の探索を進めていきたい。

E. 結論

1. DAP-キナーゼ遺伝子プロモーターの CpG メチル化の有無が膀胱がん患者の再発や予後と密接に関連していた。
2. ABC トランスポーターの中で MDR1、MFP2 や MFP3 の発現上昇が患者の予後と相関することが膀胱がんや卵巣がんで観察された。
3. MFP4 やメトトレキサートや葉酸の細胞外放出に重要な役割を担っていた。
4. YB-1 の核内局在や発現上昇が卵巣がんのシスプラチン耐性や滑膜肉腫の P-糖蛋白質やトポイソメラーゼ II α の発現上昇に関与していた。
5. イレッサや SU5416 の血管新生阻害の新しい分子機序について提示した。
6. ヒト腎がんにおいて野生型 VHL の発現によって

Cap43 遺伝子の発現が抑制された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 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 beta in human cancer cells - transcriptional activation and messenger RNA stabilization. *Biochim. Biophys Acta.*, 1574: 24-34, 2002
2. Tada, Y., Wada, M., Migita, T., Nagayama, J., Hinoshita, E., Mochida, Y., Maehara, Y., Tsuneyoshi, M., Kuwano, M. and Naito, S. Increased expression of multidrug resistance-associated proteins in bladder cancer during clinical course and drug resistance to doxorubicin. *Int. J. Cancer*, 98: 630-635, 2002
3. Hirata, A., Ogawa, S., Kometani, T., Kuwano, T., Naito, S., Kuwano, M. and Ono, M. ZD1839 (Iressa) induces antiangiogenic effects through inhibition of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase. *Cancer Res.*, 62: 2554-2560, 2002
4. Itokawa, T., Nokihara, H., Nishioka, Y., Sone, S., Iwamoto, Y., Yamada, Y., Cherrington, J., McMahan, G., Shibuya, M., Kuwano, M. and Ono, M. Antiangiogenic effect by SU5416 is partly attributable to inhibition of Flt-1 receptor signaling. *Mol. Cancer Ther.*, 1: 295-302, 2002
5. Tada, Y., Wada, M., Mochida, Y., Taniguchi, S., Taguchi, K., Tsuneyoshi, M., Naito, S. and Kuwano, M. The association of hypermethylation of multiple genes including DAP-kinase with recurrence in superficial bladder cancers. *Cancer Res.*, 62: 4048-4053, 2002
6. Urata, Y., Yamaguchi, M., Higashiyama, Y., Ihara, Y., Goto, S., Kuwano, M., Horiuchi, S., Sumikawa, K. and Kondo, T. Reactive oxygen species accelerate production of

- vascular endothelial growth factor by advanced glycation end products in RAW264.7 mouse macrophages. *Free Radic. Biol. Med.*, 32: 688-701, 2002
7. Chen, Z. S., Lee, K., Walther, S., Raftogianis, R. B., Kuwano, M., Zeng, H. and Kruh, G. D. Analysis of methotrexate and folate transport by multidrug resistance protein 4 (ABCC4): MRP4 is a component of the methotrexate efflux system. *Cancer Res.*, 62: 3144-3150, 2002
 8. Uchimiya, H., Furukawa, T., Okamoto, M., Nakajima, Y., Matsushita, S., Ikeda, R., Gotanda, T., Haraguchi, M., Sumizawa, T., Ono, M., Kuwano M., Kanzaki, T. and Akiyama, S. Suppression of thymidine phosphorylase-mediated angiogenesis and tumor growth by 2-deoxy-L-ribose. *Cancer Res.*, 62: 2834-2839, 2002
 9. Ashizuka, M., Fukuda, T., Nakamura, T., Shirasuna, K., Iwai, K., Izumi, H., Kohno, K., Kuwano, M. and Uchiumi, T. Novel translational control through Iron-responsive element by interaction of multifunctional protein YB-1 and IRP2. *Mol. Cell Biol.*, 22: 6375-6383, 2002
 10. Hashimoto, K., Uchiumi, T., Konno, T., Ebihara, T., Nakamura, T., Wada, M., Sakisaka, S., Maniwa, F., Amachi, T., Ueda, K. and Kuwano M. Trafficking and functional defects by mutations of the ATP-binding domains in MRP2 in patients with Dubin-Johnson syndrome. *Hepatology*, 36: 1236-1245, 2002
 11. Uramoto, H., Izumi, H., Ise, T., Tada, M., Uchiumi, T., Kuwano, M., Yasumoto, K., Funa, K. and Kohno, K. p73 interacts with c-Myc to regulate YB-1 expression. *J. Biol. Chem.*, 277: 31694-31702, 2002
 12. Hayakawa, H., Uchiumi, T., Fukuda, T., Asizuka, M., Kohno, K., and Kuwano, M., Sekiguchi, M. Binding capacity of human YB-1 protein for RNA containing 8-oxoguanine. *Biochemistry*, 41: 12739 - 12744, 2002
 13. Jeong, S., Itokawa, T., Shibuya, M., Kuwano, M., Ono, M., Higuchi, R and Miyamoto, T. Costunolide, a sesquiterpene lactone from *Saussurea lappa*, inhibits the VEGFR KDR/Flk-1 signaling pathway. *Cancer Lett.*, 187: 129-133, 2002
 14. Yahata, H., Kobayashi, H., Kamura, T., Amada, S., Hirakawa, T., Kohno, K., Kuwano, M. and Nakano, H. Increased nuclear localization of transcription factor YB-1 in acquired cisplatin-resistant ovarian cancer. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 128:621-626, 2002
 15. Kakehi, M., Koyabu, N., Nakamura, T., Uchiumi, T., Kuwano, M., Ohtani, H., Sawada, Y. Functional characterization of mouse cation transporter mOCT2 compared with mOCT1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 23 :644-650, 2002
 16. Ohishi, Y., Oda, Y., Uchiumi, T., Kobayashi, H., Hirakawa, T., Miyamoto, S., Kinukawa, N., Nakano, H., Kuwano, M. and Tsuneyoshi, M. ATP-binding cassette superfamily transporter gene expression in human primary ovarian carcinoma. *Clin. Cancer Res.*, 8: 3767-3775, 2002
 17. Kuwano, M., Uchiumi, T., Hayakawa, H., Ono, M., Wada, M., Izumi, H. and Kohno, K. The basic and clinical implication of ABC transporters, YB-1 and angiogenesis in human malignancies. *Cancer Science*, 94,: 9-14, 2003
 18. Oda, Y., Ohishi, Y., Saito, T., Hinoshita, E., Uchiumi, T., Kinukawa, N., Iwamoto, Y., Kohno, K., Kuwano, M., and Tsuneyoshi, M. Nuclear expression of Y-box-binding protein-1 correlates with P-glycoprotein and topoisomerase II α expression, and with poor prognosis in synovial sarcoma. *J. Pathol.*, 199:251-258, 2003
 19. Masuda, K., Ono, M., Okamoto, M., Morikawa, W., Otsubo, M., Migita, T., Tsuneyoshi, M., Okuda, H., Shuin, T., Naito, S., and Kuwano, M. Down-regulation of cap43 gene by von Hippel-Lindau tumor suppressor protein in human renal cancer cells. *Int. J. Cancer.*, in press
 20. Nakao, S., Kuwano, T., Ishibashi, T., Kuwano, M. and Ono, M. Synergistic effect of TNF- α

in soluble vascular cell adhesion molecule-1-induced angiogenesis through $\alpha 4$ integrins. *J. Immunol.*, in press

21. Konno, T., Ebihara, T., Hisaeda, K., Uchiumi, T., Nakamura, T., Shirakusa, T., Kuwano, M. and Wada, M. Identification of domain participating in the substrate specificity and subcellular localization of the multidrug resistance protein MRP1 and MRP2. *J. Biol. Chem.*, in press

2. 学会発表

1. Kuwano, M. ATP binding cassette (ABC) transporter superfamily genes as molecular targets for anticancer drug sensitivity. The 2nd Japan-China joint conference for cancer research (session) 2002年5月31日-6月1日 (徳島)
2. 桑野信彦 がん分子標的治療 第7回“癌と遺伝子・大分外科フォーラム”(特別講演) 2002年7月8日 (大分)
3. 桑野信彦 血管新生とがんの治療・診断への新しい展開. 福岡労災保険指定病院協会学術講演会 2002年7月30日 (福岡)
4. Kuwano, M. Antiangiogenesis as molecular cancer therapeutic strategy. *Vascular biology in the post-genome era 2002 (International symposium on vascular biology) 2002/8/23-24, Korea*
5. 持田泰、和田守正、田口健一、谷口秀一、蛭原拓哉、恒吉正澄、桑野博行、桑野信彦 腸管におけるDNA損傷と発がんへのP-糖蛋白質の関与 第61回日本癌学会総会(ワークショップ) 2002年10月1-3日(東京)
6. 今野俊和、蛭原卓哉、中村崇規、久枝啓史、内海健、和田守正、白日高歩、桑野信彦 ABCトランスポーターMRP1とMRP2の細胞内局在および抗がん剤を認識するドメインの同定 第61回日本癌学会総会(ワークショップ) 2002年10月1-3日(東京)
7. 中尾新太郎、桑野信彦、小野真弓 可溶性VCAM-1(sVCAM-1)による血管新生とそのシグナル伝達 第61回日本癌学会総会(ポスター討論) 2002年10月1-3日(東京)
8. 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VHLによる低酸素誘導遺伝子Cap43遺伝子の発現

制御 第61回日本癌学会総会(ポスター討論) 2002年10月1-3日(東京)

9. 谷口秀一、持田泰、蛭原卓哉、内海健、前原喜彦、田平知子、林健志、和田守正、桑野信彦 MDR1遺伝子プロモーター領域の遺伝子多型とメチル化と発現レベルの個人差 第61回日本癌学会総会(ポスター討論) 2002年10月1-3日(東京)
10. 久枝啓史、内海健、井口明彦、日下英司、和田守正、桑野信彦 炎症性サイトカインIL-1 β による肝細胞のMRP2発現制御 第61回日本癌学会総会(ポスター討論) 2002年10月1-3日(東京)
11. 蛭原卓哉、谷口秀一、持田泰、島田光生、前原喜彦、松崎彰信、原寿郎、田平知子、林健志、大谷壽一、澤田康文、和田守正、桑野信彦 ヒトMRP2/cMOAT遺伝子の遺伝的多型と発現量解析 第61回日本癌学会総会(ポスター討論) 2002年10月1-3日(東京)
12. 橋本健吉、内海健、今野俊和、蛭原卓哉、植田和光、和田守正、桑野信彦 ABCトランスポーターMRP2変異と抗癌剤耐性 第61回日本癌学会総会(ポスター討論) 2002年10月1-3日(東京)
13. 早川浩、桑野信彦、関口睦夫 ヒト細胞における酸化損傷RNAに対する品質管理機構 第25回日本分子生物学会年会(ポスター) 2002年12月11日-14日(横浜)
14. 内海健、芦塚慈美、福田隆男、中村崇規、桑野信彦 YB-1(Y-box結合タンパク)による翻訳制御 第25回日本分子生物学会年会(ワークショップ) 2002年12月11日-14日(横浜)
15. 桑野信彦 ATP結合カセット(ABC)トランスポーターの肝での発現と働き 第34回肝代謝コロキウム(特別講演) 2003年2月7日(大阪)

G. 知的財産権の出願・登録情報
特になし

厚生労働科学研究費補助金

分担研究報告書

新抗悪性腫瘍薬の早期臨床試験の研究

分担研究者 福岡 正博 近畿大学医学部内科学腫瘍内科部門教授

A. 研究目的

我々は分子標的治療薬を含めた早期臨床試験^{1,4}と新規抗がん剤を併用した化学療法レジメンの開発を目指してきた⁵⁻⁹。LY231514 (Pemetrexed) はチミジン及びプリン合成に必須の複数の酵素を阻害する代謝拮抗剤である。ビタミンの補充を行わない場合の3週1回の点滴静注法におけるMTDは700mg/m²、推奨用量は500mg/m²であった。その抗腫瘍効果はメソテリオーマ、非小細胞肺癌、乳癌、大腸がんを対象とした臨床第II相試験においてすでに証明されている。しかしながら、海外での臨床第I相、第II相試験において重篤な毒性が認められており、副作用軽減の処置として、現在、すべての臨床試験において葉酸とビタミンB12の補充が実施されている。この臨床第I相試験は、葉酸とビタミンB12補充下における最初の臨床第I相試験である。したがって、本研究の目的は、新しい代謝拮抗剤、LY231514 (Pemetrexed) の葉酸およびビタミンB12を補充した場合における安全性を確認し、最大耐用量および臨床第II相試験における推奨用量を決定すること、同時に各種固形癌に対する有効性を評価し、臨床第II相試験を実施すべき有効癌種を特定することを

目的とした。

B. 研究方法

本臨床第I相試験における初回投与量は300mg/m²であり、第2レベルは欧米での推奨用量500mg/m²、その後はMTDまで100mg/m²づつ増量しそれぞれの投与レベルに3症例を登録し安全性を確認してゆく一般的な臨床第I相試験デザインを取った。もし、DLTと判断される副作用が生じた場合には更に3症例が追加され、6例中2例にてDLTが認められる投与レベルをMTDと規定した。経口総合ビタミン剤1g(500mgの葉酸を含有)が治療開始1週間前より経口連日投与され、ビタミンB12は同じく治療1週間前より経静脈的に9週毎に投与された。

C. 研究結果

現在、900mg/m²まで増量され試験続行中である。500mg/m²から700mg/m²までの3投与レベルに登録された12例における毒性をまとめると、血液毒性では、Grade3/4 neutropenia: 2/0、Grade 3/4 anemia: 0/0、Grade 3/4 thrombocytopenia: 0/0、非血液毒性では、Grade 2/3 GPT elevation: 0/1、Grade 2/3 GOT elevation: 1/0、Grade 2/3 skin rash: 3/0、Grade 2/3 mucogitis: 2/0であり、

欧米での 500mg/m²、600mg/m² を用いた臨床第 II 相試験での毒性に比べ明らかに軽減されている。薬理動態学的解析においては、欧米で実施された臨床第 I 相試験での結果とほとんど同様であり、ビタミン補充による影響、欧米人と日本人での人種差は今の所認められていない。抗腫瘍効果については、登録された 15 例中 12 例で評価可能であり、12 例中 4 例に PR を認めた。このことは、ビタミン補充による抗腫瘍効果の減弱は認められないことを意味する。また特に、既治療非小細胞肺癌 7 例中 3 例に PR を認めており、本薬剤は非小細胞肺癌に有効な薬剤と考えられた。

D. 考察

新しい代謝拮抗剤、LY231514 (Pemetrexed) は、悪性胸膜中皮種の臨床第 III 相試験においてシスプラチンに対する追加効果が証明された期待される抗がん剤である。本研究は、毒性の軽減を目的として葉酸とビタミン B12 の補充を実施した初めての臨床第 I 相試験である。その結果、主な毒性である好中球減少、血小板減少、下痢は明らかに軽減され、その結果として 900mg/m² まで安全に増量することが可能であった。一方、副作用軽減時に、その抗腫瘍効果の減弱が危惧されたが、評価可能病変を有する 12 症例中 4 例に PR を認めたことは、ビタミンの補充が毒性のみを選択的に軽減している可能性を示している。本試験は未だ最終結論に至っていないものの推奨用量が、海外での一般的用量、500mg/m² をはるかに上回ることは確実であり、今後、臨床上の推奨用量を決定するための比

較第 II 相試験が必要と思われる。

E. 結論

葉酸およびビタミン B12 の補充は LY231514 (Pemetrexed) の有効性を減じることなく明らかな毒性の軽減を期待することができ、更なる投与量の増加が可能であった。薬剤投与に伴う毒性が低いことから、非小細胞肺癌、悪性胸膜中皮種等に対して期待できる抗がん剤である。

G. 研究発表

1. 研究論文

1. Nakagawa K, Tamura T, Negoro S, Kudoh S, Yamamoto N, Yamamoto N, Takeda K, Swaisland H, Nakatani I, Hirose M, Dong R. -P, Fukuoka M., Phase I pharmacokinetic trial of the selective oral edipermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor gefitinib (ZD1839, Iressa) in Japanese patients with solid malignant tumors. *Ann Clin Oncol*, (in press).
2. Fukuoka, M., Yano, S., Giaccone, G., Tamura, T., Nakagawa, K., Douillard, J. Y., Nishiwaki, Y., Vansteenkiste, J., Kudoh, S., Rischin, D., Eek, R., Horai, T., Noda, K., Takata, I., Smit, E., Averbuch, S., Wolf, M., Macleod, A., Forsythe, B., Feyereislova, A., Dong, R. P., Baselga, J. Multi-institutional randomized phase II trial of gefitinib for previously treated patients with advanced non-small-cell lung cancer (the IDEAL 1 trial). *J Clin Oncol*, (in press).

3. Komiya T, Fusetani N, Matsunaga S, Kubo A, Kaye FJ, Kelly MJ, Tamura K, Yoshida M, Fukuoka M and Nakagawa K., Ritterazine B, a new cytotoxic natural compound, induces apoptosis on cancer cell, *Cancer Chemother Pharmacol*, (in press).
 4. Kobayashi K, Hino M, Fukuoka M, Takeuchi K, Furuse K, Yoneda S, Hasegawa K, Noda K, Kinoshita H, Kimura I, Taguchi T, Kanamaru R, Horikoshi N and Niitani H. Phase I studies of nogitecan hydrochloride for Japanese. *Int J Clin Oncol* 2002, 7: 177-186.
 5. Negoro, S., Masuda, N., Takada, Y., Sugiura, T., Kudoh, S., Katakami, N., Ariyoshi, Y., Ohashi, Y., Niitani, H., Fukuoka, M., Randomized phase III trial of irinotecan combined with cisplatin for advanced non-small cell lung cancer. *Br J Cancer*, 88:335-341, 2002.
 6. Yamada M, Kudoh S, Fukuda H, Nakagawa K, Yamamoto N, Nishimura Y, Negoro S, Takeda K, Tanaka M and Fukuoka M. Dose-escalation study of weekly irinotecan and daily carboplatin with concurrent thoracic radiotherapy for unresectable stage III non-small cell lung cancer. *Br J Cancer* 2002, 87: 258-263.
 7. Takada M, Fukuoka M, Kawahara M, Sugiura T, Yokoyama A, Yokota S, Nishiwaki Y, Watanabe K, Noda K, Tamura T, Fukuda H and Saijo N. Phase III study of concurrent versus sequential thoracic radiotherapy in combination with cisplatin and etoposide for limited-stage small-cell lung cancer: results of the Japan Clinical Oncology Group Study 9104. *J Clin Oncol* 2002, 20: 3054-3060.
 8. Inoue A, Kunitoh H, Mori K, Nukiwa T, Fukuoka M and Saijo N. Phase I trial of weekly docetaxel in elderly patients with non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2002, 38: 205-209.
 9. Noda K, Nishiwaki Y, Kawahara M, Negoro S, Sugiura T, Yokoyama A, Fukuoka M, Mori K, Watanabe K, Tamura T, Yamamoto S and Saijo N. Irinotecan plus cisplatin compared with etoposide plus cisplatin for extensive small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2002, 346: 85-91.
- H. 知的財産件の出願・登録状況
1. 特許取得 なし
 2. 実用新案登録 なし
 3. その他 なし

厚生労働科学研究費補助金（がん克服戦略研究事業）

分担研究報告書

DDS を利用したがん化学療法の選択毒性向上に関する研究

分担研究者 松村 保広 国立がんセンター研究所支所 がん治療開発部長

抗がん剤のミセル化は、薬物有害反応を抑えるとともに効果増強をもたらす DDS 製剤である。しかしながら臨床においては同じ DDS 製剤であるリポソームとの使い分けが必要となると考える。

A. 研究目的

本研究の目的は抗がん剤などをミセル体に封入することにより、抗がん剤の正常組織への集積を抑えつつ、がん組織に選択的に集積させることにある。また、抗がん剤のミセル内包化により、どのような臨床上の利点をもたらさるか検討することにある。

B. 研究方法

アドリアマイシン（DXR）内包ミセル体 NK911 に関してはすでに臨床第一相試験を行っているが、ポリエチレングリコール付加 DXR 内包リポソームである、doxil はすでに米国において卵巣がんやカポジ肉腫に認可されている。そこで、NK911 と doxil の薬理的違いを基礎的に検討し、それらの臨床上の意義について考察した。具体的には *in vitro* 固形腫瘍モデルであるスフェロイドに対して

NK911 と doxil および free の DXR を作用させ、スフェロイド内部での DXR の分布を蛍光顕微鏡にて観察し、HPLC あるいはコロニーフォーメーション法にて定量化した。また、水難溶解性新規抗がん剤 KRN5500 は臨床第一相試験において、静注投与するために、種々の有機溶媒に無理矢理溶解後中心静脈からの投与を余儀なくされた。我々は KRN5500 をミセル内包化し、抹消血管から投与できる剤型を作成しており、今回の研究ではブレオマイシン誘導肺線維症モデルラットにおける KRN5500 とそのミセル体（KRN/m）の影響を観察し、その臨床的意義を検討した。動物実験は、動物倫理委員会の了承を得て、動物愛護の観点から実施した。

C. 研究結果

血管外へ漏出したリポソームは自己崩壊し内部のフリーの DXR を放出

し拡散により、より深部へ薬剤を送達させることが必要であるが、リポソームは安定性に富むため、フリーの DXR を放出しにくく、結果として腫瘍血管から離れたところにあるがん細胞まで DXR が到達しにくいということになる。一方、NK911 の方は血中安定性は乏しいが、安定性に乏しい分いったん腫瘍局所で漏出した NK911 は速やかに DXR を放出し拡散で腫瘍血管から遠いところにあるがん細胞にまで DXR を到達させることができる。実際 *in vitro* 固形腫瘍モデルであるスフェロイドに対して、NK911 や doxil およびフリーの DXR を曝露させた時、doxil は内部まで DXR を到達させることはできなかったが、NK911 や DXR は時間とともに free DXR をスフェロイドの深部にまで到達させることができた。曝露後、スフェロイドをトリプシン処理し、細胞を単離し、コロニー形成法を用いてスフェロイドに対する抗腫瘍効果で検討した結果、DXR の浸透度に比例し、DXR と NK911 が高い抗腫瘍効果を示し、doxil の方は低かった。³⁾ KRN5500 と KRN/m をそれぞれ肺線維症モデルラットに投与した時、KRN5500 ではラットは急死した。解剖の結果肺での急性び慢性出血が確認された。死因は肺出血による呼吸不全とされた。一方で、KRN/m のほ

うは肺の状況はコントロールとまったく変わらないことがわかった。⁴⁾

D. 考察

doxil が認可されている卵巣がんやカポジ肉腫あるいは、有効とされている乳がんは一般的に腫瘍血管密度が高い腫瘍である。一方で、腫瘍血管に乏しい消化器系のがんにはまったく効果がでていない。本研究結果と合わせると、臨床的には腫瘍血管と腫瘍血管の距離が離れていて、薬剤が深部まで到達しにくいと考えられる胃スキルスがんや膵癌などの難治がんには doxil より NK911 の方が有効ではないかと考えた。米国における、KRN5500 の臨床試験において、投与後の急性死亡が報告されているが、急性呼吸不全の可能性も否定できない。KRN5500 のミセル内包化体はその問題を克服できるかもしれない。

E. 結論

がん種ごとに Drug Delivery System の剤型はどうあるべきか、いままで真剣に検討されてきていない。本研究では薬物キャリアとしてミセル体とリポソーム体の基礎研究および臨床試験の解析から、腫瘍血管の乏しいがん種においては、薬物キャリアががん組織に到達したあとは出来る

だけ速やかにキャリアに内包された薬物を放出したほうがよいことが示された。おそらくは臨床においてはがん種によって DDS 製剤を使い分けることが重要と考えられた。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Matsumura Y., Haruyama K., Hamaguchi T., Shirao K., Muro K., Yamada Y., Shimada Y., and Sugano K.. The effect of 3 hour-interval between methotrexate and 5-fluorouracil in the treatment of metastatic colorectal cancer. *Jpn. J. Clin. Oncol.* 32, 9-13, 2002
- 2) Namiki Y., Muro K., Shirao K., Shimada Y., Matsumura Y., Yamada Y., Goto M., Hamaguchi T., Mizuno T., and Ura T. Prognostic factors for patients with metastatic colorectal cancer receiving protracted venous infusion of 5FU. *Am. J. Clin. Oncol.* 25, 182-186, 2002
- 3) Tsukioka Y., Matsumura Y., Hamaguchi T., Koike H., Moriyasu F., and Kakizoe T. Pharmaceutical and Biomedical Differences between Micellar Doxorubicin (NK911) and Liposomal Doxorubicin (Doxil). *Jpn. J. Cancer Res.* 10, 1145-1153, 2002Y.
- 4) Mizumura, Y. Matsumura, M. Yokoyama, T. Okano, T. Kawaguchi, F. Moriyasu, and T. Kakizoe. Micells Incorporating an Anticancer Agent, KRN5500, Diminish Pulmonary Toxicity of KRN5500. *Jpn. J. Cancer Res.* 11, 1237-1243, 2002
- 5) Hosokawa A., Yamada Y., Shimada Y., Muro K., Matsumura Y., Shirao K., Fujita S., Akasu T., and Moriya Y. Weekly hepatic arterial infusion of 5-Fluorouracil and subsequent systemic chemotherapy for liver metastases from colorectal cancer. *JJCO* (in press)
- 6) Matsumura Y. An interim analysis of phase I clinical trial of MCC-465, a doxorubicin (DXR) encapsulated in PEG-immunoliposome, in patients with metastatic stomach cancer. *Polymeric Drugs in Clinical Stage* (Eds. Maeda H. et al.) Kluwer Academic/ Plenum Publishers New York. 179-193, 2003

新規癌転移血管新生阻害剤 NK4 による癌治療研究

分担研究者 松本 邦夫 大阪大学大学院医学系研究科

研究要旨

NK4 は HGF アンタゴニスト活性ならびに血管新生阻止能をもつ 2 機能性分子である。Lewis 肺癌細胞ならびに B16F10 悪性黒色腫細胞を用いて NK4 発現組換えアデノウイルス (AdCMV-NK4) 投与の効果調べたところ、AdCMV-NK4 投与により肺転移数はコントロールの 1/10 に強く抑制されるとともに、強い成長阻害作用が認められた。一方、NK4 による血管新生阻害機構を調べるため、血管内皮細胞の培養系を用いて NK4 の作用を解析したところ、NK4 は bFGF によって誘導される GSK3- β ならびに Akt の活性化を阻害するとともに、cyclin D1 の発現上昇ならびに RB リン酸化を阻害した。1) NK4 の血管内皮細胞の増殖抑制シグナルの作用点は Akt を介してもたらされる cyclin D1 ならびに RB リン酸化経路にあること、ならびに 2) NK4 遺伝子治療は転移阻害、血管新生阻害を介した癌の成長阻害をもたらす制癌法になる可能性が明らかになった。

A. 目的

悪性癌の本態というべき浸潤・転移を高効率に阻止することが癌の治療率向上をもたらすと考えられている。私達は多くの癌組織において HGF (hepatocyte growth factor) が癌の浸潤・転移能を高める分子であることに基づき、HGF の作用をブロックする HGF アンタゴニスト (NK4) を分離した。NK4 は 4 個のクリングルドメインを有する HGF の分子内断片である。一方、その後の研究から NK4 は HGF アンタゴニスト活性とは独立に血管新生阻害作用をもつ 2 機能性分子であることを明らかにした。本研究は NK4 による新しい悪性癌治療法の確立を目的とし、本年度は 1) 組換えアデノウイルスベクターを用いた NK4 遺伝子治療の制癌効果、ならびに 2) NK4 による血管内皮細胞の増殖抑制に關与する細胞内シグナル伝達の作用点の解明を目的とした。

B. 研究方法

1. NK4 遺伝子治療の制癌作用の解析

CMV プロモーターの下流にヒト NK4 cDNA を組み込んだ発現用カセットの入ったアデノウイルスベクター (AdCMV-NK4) を構築した。マウス由来悪性黒色腫 B16 F10 細胞ならびに Lewis 肺癌細胞を用いた。マウスの皮下に 1×10^6 個の B16F10 細胞ならびに Lewis 肺癌細胞を移植し、翌日 1×10^9 pfu の NK4 アデノウイルスベクターを尾静脈から投与し、腫瘍の成長を経時的に調べた。また、転移に対する効果を調べるために、 1×10^9 pfu の NK4 アデノウイルスベクターを尾静脈から投与し、翌日 1×10^6 個の B16F10 細胞ならびに Lewis 肺癌細胞をマウスの尾静脈から注入し、肺に形成される転移巣を調べた。なお、これら動物実験においては倫理面に対して十分配慮して実験動物を取り扱った。

2. NK4 による血管内皮細胞の増殖抑制に關与する細胞内シグナル伝達

培養ヒト齶帯静脈由来血管内皮細胞の培養系に bFGF ならびに VEGF を添加し、これら増殖因子によって誘導されるレセプターのチロシンリン酸化、Erk1/2、Akt、ならびに GSK3- β の

リン酸化 (活性化)、cyclin D1 の発現、RB のリン酸化などに対するNK4 の作用をwestern blot 法などによって調べた。

C. 研究結果

1. NK4 遺伝子治療の制癌作用の解析

NK4 発現用組換えアデノウイルスをマウス尾静脈から投与し、血中ならびに組織中のNK4 の発現レベルを調べたところ、NK4 の血中濃度はアデノウイルスベクター投与後1週間をピークとして約150 ng/ml に到達し、その後血中濃度は下がるものの4週後でも約10 ng/ml の血中HGF が維持された。また肝臓・肺・腎臓においても投与後1-2週間をピークに持続的なNK4 の産生が認められた。さらに、この期間中、マウスにおいて外見的な異常はなく、大きな副作用はほとんど認められなかった。

マウスの皮下にB16F10 細胞ならびにLewis 肺癌細胞を移植した後NK4 アデノウイルスベクターを尾静脈から投与し、腫瘍の成長を経時的に調べた。その結果、NK4 組換えアデノウイルスベクター投与群においては、対照群に比べ腫瘍の成長が抑制され、両腫瘍とも3週間後の腫瘍体積は対照群の25%以下に抑制された。腫瘍組織における血管新生はNK4 遺伝子治療によって抑制されるとともに癌細胞のアポトーシスが增加していたことから、主に腫瘍血管新生阻害作用によって癌の成長阻害がもたらされたと考えられる。また、肺転移に対するNK4 遺伝子治療の作用を調べた結果、対照群NK4 組換えアデノウイルスベクター投与群では対照群の10%程度に強く抑制された。なお、これらの結果に加え、脾臓癌ならびに胃癌に対してもNK4 遺伝子治療による成長阻害作用や転移阻害作用が明らかになった(1-6)。

2. NK4 による血管内皮細胞の増殖抑制に関与する細胞内シグナル伝達

培養ヒト血管内皮細胞を用いて細胞内シグナル伝達の活性化を調べた結果、NK4 はbFGF によって誘導されるcyclin D1 の発現誘導を阻害し、それによりRB のリン酸化を抑制した。RB のリン酸化阻害がNK4 によるS 期への細胞周期進行の阻害に関与すると考えられる。次に、VEGF やbFGF によって誘導されるそれぞれのレセプターならびにErk1/2 の活性化を調べた結果、NK4 は

VEGF やbFGF によって誘導されるそれぞれのレセプターならびにErk1/2 の活性化を阻害しなかった。一方、最近血管内皮細胞においてAkt、GSK3- β の活性化がcyclin D1 の誘導に関与することが報告されている。そこで、bFGF ならびにVEGF によるAkt ならびにGSK3- β の活性化に対するNK4 の作用を調べた結果、NK4 はbFGF ならびにVEGF によって誘導されるAkt ならびにGSK3- β のリン酸化を容量依存的に阻害した。

D. 考察

今回、NK4 発現組換えアデノウイルスベクターを用いてNK4 の制癌作用を調べたところ、尾静脈からの全身投与において強力な転移阻害ならびに腫瘍血管新生阻害を介したがんの成長抑制作用が認められた。これらNK4 遺伝子治療の制癌作用は、NK4 の2機能性によって達成されたと考えられる。自殺遺伝子や癌抑制遺伝子を用いた遺伝子治療では遠隔臓器に潜伏する微小ながんの増大や浸潤・転移を防ぐことができない。これに対し、NK4 遺伝子治療はこれら遺伝子治療の難点を克服できる新しい制癌法になることが期待される。

NK4 の血管内皮増殖抑制に関与するシグナル伝達系はAkt ならびにGSK3- β を介してもたらされるcyclin D1 ならびにRB リン酸化経路にあることを明らかにした。したがって、NK4 の作用点はPI3 キナーゼに依存したAkt 活性化プロセスにあると考えられる。一方、NK4 の血管新生阻害作用は何らかのNK4 結合分子を介していると予想され、の現在NK4 結合分子の同定を行っている。

E. 結論

NK4 はAkt 活性化プロセスの阻害を介して血管内皮細胞の増殖を抑制する。何らかのNK4 結合分子を介するAkt 活性化プロセスの阻害は、血管新生阻害に関与する新しいシグナル伝達の解明につながることを予想される。一方、組換えアデノウイルスを用いるNK4 遺伝子治療は目立った副作用をとまわずに悪性黒色腫、肺癌、胃癌、脾臓癌に対して腫瘍血管新生阻害を介した癌の成長抑制や浸潤・転移阻害作用を示した。NK4 遺伝子治療は従来の抗癌剤治療の難点を克服できる新しい制癌法になることが期待される。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Maemondo, M., Narumi, K., Saijo, Y., Usui, K., Tahara, M., Tazawa, R., Hagiwara, K., Matsumoto, K., Nakamura, T., and Nukiwa, T.: Targeting angiogenesis and HGF function using an adenoviral vector expressing the HGF-antagonist NK4 for cancer therapy. *Molecular Therapy*, 5: 177-185 (2002).
2. Hirao, S., Yamada, Y., Koyama, F., Fujimoto, H., Takahama, Y., Ueno, M., Kamada, K., Mizuno, T., Maemondo, M., Nukiwa, T., Matsumoto, K., Nakamura, T., and Nakajima, Y.: Tumor suppression effect using NK4, a molecule acting as an antagonist of HGF, on human gastric carcinomas. *Cancer Gene Ther.*, 9: 700-707 (2002).
3. Maehara, N., Nagai, E., Mizumoto, K., Sato, N., Matsumoto, K., Nakamura, T., Narumi, K., Nukiwa, T., and Tanaka, M.: Gene transduction of NK4, HGF antagonist, inhibits in vitro invasion and in vivo growth of human pancreatic cancer. *Clin. Exp. Metastasis*, 19: 417-426 (2002).
4. Saimura, M., Nagai, E., Mizumoto, K., Maehara, N., Okino, H., Katano, M., Matsumoto, K., Nakamura, T., Narumi, K., Nukiwa, T., and Tanaka M.: Intraperitoneal injection of adenovirus-mediated NK4 gene suppresses peritoneal dissemination of pancreatic cancer cell line AsPC-1 in nude mice. *Cancer Gene Ther.*, 9: 799-806 (2002).
5. Saimura, M., Nagai, E., Mizumoto, K., Maehara, N., Minamishima, Y.A., Katano, M., Matsumoto, K., Nakamura, T., and Tanaka, M.: Tumor Suppression through Angiogenesis Inhibition by SUIT-2 Pancreatic Cancer Cells Genetically Engineered to Secrete NK4. *Clin. Cancer Res.*, 8: 3243-3249 (2002).
6. Kikuchi, T., Maemondo, M., Narumi, K., Matsumoto, K., Nakamura, T., and Nukiwa, T.: Tumor suppression induced by intratumor administration of adenovirus vector expressing NK4, a 4-kringle antagonist of hepatocyte growth factor, and naïve dendritic cells. *Blood*. 100: 3950-3959 (2002).
7. Matsumoto, K. and Nakamura, T.: NK4 (HGF-antagonist / angiogenesis inhibitor) in cancer biology and therapeutics. *Cancer Sci.*, in press (2003).

2. 学会発表

1. Nakamura, T. and Matsumoto, K. Inhibition of Tumor Angiogenesis, Invasion, and Metastasis by NK4, a Newly Identified HGF-antagonist and Angiogenesis Inhibitor. XIIth International Vascular Biology Meeting (2002)
2. 松本邦夫、中村敏一「NK4 による浸潤・転移阻止とその癌治療への応用」第 11 回日本がん転移学会シンポジウム「癌転移分子機構と治療への展開」2002 年
3. 松本邦夫、中村敏一「NK4 による癌の凍結・休眠治療」第 3 回 Pharma-Hematology シンポジウム特別シンポジウム「薬学からみた血管新生とその阻害」2002 年
4. 松本邦夫、中村敏一「癌浸潤・転移・血管新生阻止因子 NK4 による制癌研究」第 7 回病態と治療におけるプロテアーゼとプロテアーゼインヒビター研究会シンポジウム「血管新生とプロテアーゼ」2002 年
5. 富岡大策、久場敬司、松本邦夫、中村敏一「NK4 による血管内皮細胞増殖抑制作用のシグナル伝達機構」第 61 回日本癌学会 2002 年 (横浜)
6. 紀氏優子、久場敬司、前門戸任、貫和敏博、松本邦夫、中村敏一「NK4 systemic gene therapy による腫瘍血管新生、浸潤・転移阻害」第 61 回日本癌学会 2002 年
7. 久場敬司、松本邦夫、中村敏一「新規制癌剤としての可能性を持つリコンビナント NK4 の発現・調製とその生物活性」第 61 回日本癌学会 2002 年
8. 窪田健、藤原斉、天池寿、高嶋一博、稲田聡、阿辻清人、吉村衛、上田祐二、松本邦夫、中村敏一、山岸久一「HGF/NK4 遺伝子導入における癌遺伝子治療の基礎検討」第 61 回日本癌学会 2002 年
9. 富岡大策、久場敬司、松本邦夫、中村敏一「NK4 の血管新生阻害作用に関与する細胞内情報伝達シグナルの解析」第 75 回日本生化学会
10. 久場敬司、富岡大策、松本邦夫、中村敏一「リコンビナント NK4 の性状解析と生物活性」第 75 回日本生化学会
11. 紀氏優子、久場敬司、松本邦夫、中村敏一「NK4 遺伝子治療による癌転移ならびに血管新生の阻害」第 75 回日本生化学会

薬物療法の有効性を決定する要因の解析

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CPT-11、mitoxantrone、topotecanなどの抗癌剤の耐性に関与するABC輸送体である。我々は、estrone、estradiolがBCRPによる抗癌剤耐性を克服することを明らかにした。この知見を元にestrogen類縁体や抗estrogen剤のBCRP阻害作用について調べたところ、合成estrogen剤であるdiethylstilbestrol、新規tamoxifen誘導体であるTAG-139が強いBCRP耐性克服作用を示した。BCRP遺伝子のSNPの検索とその機能の評価を行い、BCRP蛋白の発現を消失させるC376T (Q126STOP)と発現を低下させるC421A (Q141K)の2つのSNPsを同定した。

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¹⁾。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手がかりにBCRPの耐性を克服する物質を検索する。BCRP遺伝子のSNPを検索する。

B. 研究方法

ヒト胎盤由来のBCRP cDNAを組み込んだレトロウイルスHaBCRPをヒト白血病細胞K562に導入してBCRP発現細胞K562/BCRPを作成した。K562/BCRP細胞はmitoxantroneに11倍、SN-38に21倍の耐性を示した。K562細胞およびK562/BCRP細胞を被験物質の存在下および非存在下に種々の濃度のMitoxantrone、SN-38あるいはTopotecanと培養し、被験物質がK562/BCRP細胞の抗癌剤耐性を低下させるかどうか調べた。K562細胞およびK562/BCRP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/BCRP細胞特異的なtopotecan取り込みの阻害を調べた。59種の培養ヒト癌細胞、および遺伝子解析研究のインフォームドコンセントを得た124人の健常人の末梢白血球のBCRP遺伝子およびBCRP cDNAを解析し、BCRP遺伝子のexon部分のSNPおよびsplicing variantを検索した。また、SNPの頻度解

析を行った。アミノ酸置換または欠質を伴うSNPあるいはsplicing variantのBCRP cDNAを細胞に導入して抗癌剤耐性の変化について調べた。

C. 研究結果

我々はestrone及びestradiolがBCRPによる薬剤耐性をreverseすることを示した²⁾。この結果を基に、estrogen様作用を持つ物質、およびestrogen拮抗作用を持つ物質の中で、BCRPの耐性を克服する物質を検索した。estrogen様作用を持つ物質としては、diethylstilbestrolがK562/BCRP細胞のtopotecan取り込みをほとんど親株と同程度にまで増大させた。estrogen拮抗作用を持つ物質の中では、tamoxifenおよびtoremifeneがK562/BCRP細胞のtopotecan取込みを増大させ、K562/BCRPの抗癌剤耐性を増強した。また、抗ホルモン剤の開発を目的として合成された種々のtamoxifen誘導体のBCRP阻害作用を調べた。その結果、TAG-139と名付けた化合物は、estroneの約5倍の強いBCRP耐性克服作用を示した³⁾。BCRP遺伝子のexon部分に3種類のSNPを同定した。exon 2のG34A (V12M)の頻度は20%であった。exon 4のC376T (Q126STOP)の頻度は1.2%であった。exon 5のC421A (Q141K)の頻度は27%であった。また、BCRP cDNAの解析によりAla-315とThr-316の2アミノ酸を欠失させるsplicing variantを同定した。C376TのSNPは終止コドンを生じさせるため、このSNPのalleleではBCRPタンパクはできない。次に他の3種のSNPあるいはsplicing variantのBCRP cDNAを細胞に導入したところ、Q141K BCRP cDNAを導入した細胞は野生型