

human UDP-glucuronosyltransferase 1A9 variant, D256N, found in Japanese cancer patients. *J Pharmacol Exp Ther* 306: 688-693, 2003.

25. Itoda, M., Saito, Y., Shirao, K., Minami, H., Ohtsu, A., Yoshida, T., Saijo, N., Suzuki, H., Sugiyama, Y., Ozawa, Y., Sawada, J. Eight novel single nucleotide polymorphisms in ABCG2/BCRP in Japanese cancer patients administered irinotecan. *Drug Metab Pharmacokin* 18: SNP14 (212)-SNP19 (217), 2003.
26. Sai, K., Kaniwa, N., Itoda, M., Saito, Y., Hasegawa, R., Komamura, K., Ueno, K., Kamakura, S., Kitakaze, M., Shirao, K., Minami, H., Ohtsu, A., Yoshida, T., Saijo, N., Kitamura, Y., Kamatani, N., Ozawa, S., Sawada, J. Haplotype analysis of ABCB1/MDR1 blocks in a Japanese population reveals genotype-dependent renal clearance of irinotecan. *Pharmacogenetics* 13: 741-757, 2003.
27. Kim, SR., Nakamura, T., Saito, Y., Sai, K., Nakajima, T., Saito, H., Shirao, K., Minami, H., Ohtsu, A., Yoshida, T., Saijo, N., Ozawa, S., Sawada, J. Twelve novel single nucleotide polymorphisms in the CES2 gene encoding human carboxylesterase 2 (hCE-2). *Drug Metab Pharmacokin* 18: SNP29 (327)-SNP34 (332), 2003.

H. 知的財産権の出願・登録状況  
特になし。

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

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

研究要旨：がん細胞の栄養飢餓耐性機構を支える新しい分子、ARK5 を発見し、この分子を通じて、飢餓耐性が、がんの浸潤や転移を促進する事を明らかにした。栄養飢餓耐性解除薬剤のスクリーニングで、新規物質を見だし、キガマイシンと名付けた。動物モデルでは有効であること、その作用メカニズムが飢餓耐性解除であること明らかにした。

#### 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、SW480 細胞を中心に、栄養飢餓時における様々な反応を解析し、耐性のメカニズムを、各種の分子の関与を RNAi, dominant negative form, アンチセンス RNA などや、阻害剤を用いて明らかにする中で解析する。

2) 治療法の開発に関しては、我々が発明した、簡便なスクリーニング系を用い、薬剤を探し出し、その抗腫瘍性に関しては、主に人の腫瘍をヌードマウスに移植した実験系で検討する。スクリーニングの範囲に関しては、栄養飢餓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。

#### (倫理面への配慮)

本研究では、一部ヒトの手術材料の遺伝子発現を、RNA レベルと蛋白質レベルで解析を行うため、この研究計画は、個人を特定できる情報をいっさい廃棄する形の連結不能匿名化をすることで臨死審査委員会の承認を受けた。また、動物実験に関しては、国立がんセンター実験動物倫理審査委員会の承認を受けて行った。

#### 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PKB/AktとAMPKが関与していることを見出していたが、Aktにより活性化されるARK5を発見した。ARK5をアンチセンスRNA, RNAiで抑制すると、PANC-1, SW480細胞のグルコース欠乏耐性が失われ、SW480細胞では、それだけでアポトーシスを起こした。ARK5はpro-caspase6のセリン257をリン酸化し、活性化されるのを防御し、Fas依存性のアポトーシスを抑制していると考えられた。

2) 更に、ARK5はグルコース欠乏培地でのPANC-1細胞のcaspase依存性ネクロシスをcaspase8の受容体非依存性活性化を抑制することで抑制していることが分かった。ARK5は各種のストレスで誘導が掛かり、エネルギー枯渇を来すようなストレス下での細胞生存に必須と考えられた。

3) HepG2細胞をグルコース欠乏培地で培養すると細胞周期がG1で停止する。p53, ATMが関わることを証明した。グルコース欠乏によっては、DNA損傷は認められないことから、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反応にもATMが関与することが分かった。ARK5は、このATMをリン酸化する事も見出した。

4) 腫瘍の栄養飢餓耐性を解除する薬剤を探索した。放線菌の培養ろ液から新規物質として、キガマイシンを同定した。この物質は、polycyclic xanthone の配糖体で、そのうちキガマイシンDは分子量953であった。これは、培養細胞をグルコース

953であった。これは、培養細胞をグルコース欠乏状態で殺し、グルコースが存在する場合と欠乏する場合は100倍以上の毒性の差がある。(特願 2002 302006)

動物へ移植したヒトがん細胞を用いた抗腫瘍性の検討では、PANC-1、MiaPaCa-2、KP3、CAPAN-1細胞のヌードマウスおよびSCIDマウスを用いた腫瘍系では、15 $\mu$ g/day経口投与で十分な抗腫瘍性を認めた。PANC-1、CAPAN-1腫瘍で、治療後のmicrovessel density, BUdR labeling indexを検討した。キガマイシン投与で、腫瘍の増大は抑制されるが、残存する腫瘍の血管は対照群と同程度か、やや多い。細胞分裂は明らかに盛んになっていた。spheroidの増大は抑制するが、細胞がspheroidの表面で死ぬ、spheroidそのものが崩壊するというのではなく、腫瘍中心部の血流状態あるいは酸素と栄養供給のよくない部分で細胞死を引き起こすと考えられた。

#### D. 考察

本年度の研究で、新しい治療標的になる生物反応の分子機構の解析を行いARK5を発見した。慢性的血流不足の組織に特異性がある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。しかし腫瘍を完全には消失させない。血管新生阻害薬、従来型の抗がん薬との併用を検討する必要がある。また、臨床導入するための毒性研究、薬理動態の検討を進める必要がある。

#### 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。

#### F. 健康危機情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) 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

2) 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

3) Kato S., Esumi H., Hirano A., Kato M., Asayama K. and Ohama E. Immunohistochemical expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) in human brain tumors: relationships of iNOS to superoxide dismutase (SOD) proteins (SOD1 and SOD2), Ki-67 antigen (MIB-1) and p53 protein. *Acta Neuropathol* 105: 333-340, 2003

4) Kimura H., Esumi H. Reciprocal regulation between nitric oxide and vascular endothelial growth factor in angiogenesis. *Acta Biochimica Polonica* 50: 49-59, 2003

5) Xiong HQ., Abbruzzese JL., Esumi H., Kosuge T., Kakizoe T. and Sugimura T. Report of the 16<sup>th</sup> International Symposium of the Foundation for Promotion of Cancer Research: Recent Advances in Pancreatic Cancer. *Jpn J Clin Oncol* 33(5): 246-253, 2003

6) Suzuki A., Kusakai G., Kishimoto A., Lu J., Ogura T. and Esumi H. ARK5 suppresses the cell death induced by nutrient starvation and death receptors via inhibition of caspase 8 activation, but not by chemotherapeutic agents or UV irradiation. *Oncogene* 22: 6177-6182, 2003

7) Tatemichi M., Ogura T., Sakurazawa N., Nagata H., Sugita M. and Esumi H. Inducible nitric oxide synthase activity induced by sodium chloride solution prolongs luminal pH elevation in rat and mouse stomachs. *J Gastroenterol Hepatol* 18: 1039-1046, 2003

## チロシンキナーゼ阻害剤の耐性に関わる因子の検討と血管標的薬の作用機序の検討

分担研究者 西尾和人 国立がんセンター研究所薬効試験部 室長

### 研究要旨

EGFR チロシンキナーゼ阻害剤であるゲフィチニブに対する耐性ヒト非小細胞肺癌株を用いて、ゲフィチニブ耐性に関連する遺伝子のクローニングを試み、候補遺伝子を得た。

#### A. 研究目的

ゲフィチニブなどチロシンキナーゼ阻害剤の固形癌に対する有効性が示されてきているが、その感受性、耐性規定因子の同定は、効果が期待できる症例の選択、治療の継続、中止の決定、不応例の治療法の開発に重要である。本研究では、ゲフィチニブに対する感受性因子を探索することを目的とし、基礎的検討をおこなった。

#### B. 研究方法

昨年度までに、ゲフィチニブ耐性ヒト非小細胞肺癌株 PC-9/ZD の樹立とその性状解析をおこなった。本年度は以下の方法でイレッサ耐性関連遺伝子の同定を試みた。

1) サブトラクションクローニング: PC-9/ZD およびその母細胞 PC-9 細胞由来の RNA をサブトラクションし、得られた cDNA を TA ベクターにクローン化し、発現量を DIG プロブを用いたノーザンブロットで解析した。

2) 遺伝子発現解析: PC-9 および PC-9/ZD 細胞由来の RNA を用いてマイクロアレイにより遺伝子発現変動を解析し、統計的に有意な遺伝子を選択した。各種細胞株における選択遺伝子の発現量を RT-PCR で測定した。

3) 発現クローニング: PC-9/ZD 由来 cDNA ライブラリーを複製、発現ベクターにサブクローニングし、感受性である PC-9 細胞に導入した。遺伝子導入細胞を、高濃度ゲフィチニブで選択し、残った細胞をクローン化し、導入 cDNA を回収、塩基配列を決定した。同 cDNA を再度 PC-9 細胞に導入し、ゲフィチニブに対する感受性の変化を MTT アッセイで検討した。

#### C. 研究結果

1) サブトラクションクローニング: PC-9/ZD 細胞由来 RNA から PC-9 RNA をサブトラクションして、約 20 遺伝子を得た。その中で、PIRP1/2 と名づけた遺伝子は、PC-9/ZD で発現が高く、その遺伝子産物は SH3 を有するリン酸化蛋白質であった。PIRP1/2 は EGFR のアダプター蛋白質 SOS と結合し、複合体形成量は、PC-9 に比し PC-9/ZD で増加していた。PC-9/ZD における EGFR-SOS 複合体形成の著減の一因と示唆された。PIRP1/2 の発現量とゲフィチニブに対する感受性が相関する可能性があり、検討をすすめている。

2) 遺伝子発現解析: マイクロアレイにより得られた遺伝子発現プロフィールより、PC-9/ZD に発現が著増している遺伝子 PIRP3、著減している遺伝子 PIRP4 を得た。PIRP3 の mRNA 発現レベルは、ゲフィチニブ耐性細胞に高く、PIRP4 はゲフィチニブに感受性の高い細胞で発現がみとめられた。

同遺伝子の機能を解析中である。

3) 発現クローニング: 得られた非クローン化 cDNA 導入細胞は MTT アッセイで、コントロール細胞に比しゲフィチニブに対し約 100 倍の耐性を示した。細胞のクローン化後、得られた約 10 クローンもそれぞれゲフィチニブに対し同等の耐性を示した。その中から、PCR 法にて、導入 cDNA を回収し塩基配列を決定した。得られた cDNA を発現ベクターにサブクローニングし、再度遺伝子導入した。その 1 つ PIRP5 は新規遺伝子であり、現在その機能解析をすすめている。

#### D. 考察

ゲフィチニブの耐性に関わる遺伝子を PC-9/ZD 耐性細胞から得られつつあるが、その機能解析と耐性との関わりを明らかにする必要がある。また、同遺伝子、産物がゲフィチニブに対する感受性予測マーカーとなることが期待されるが、臨床検体における発現状態の測定をすすめている。

#### E. 結論

ゲフィチニブの耐性に関わる遺伝子を PC-9/ZD 耐性細胞から得られつつある。ゲフィチニブに対する感受性予測マーカーとなることが期待される。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Taguchi, F., Kusaba, H., Asai, A., Iwamoto, Y., Yano, K., Nakano, H., Mizukami, T., Saijo, N., Kato, H., Nishio, K. hnRNP L enhances sensitivity of the cells to KW-2189. *Int. J. Cancer*, 108:679-685, 2004.
2. Koizumi, F., Kanzawa, F., Ueda, Y., Koh, Y., Tsukiyama, S., Taguchi, F., Tamura, T., Saijo, N., Nishio, K. Synergistic interaction between the EGFR tyrosine kinase inhibitor gefitinib ('Iressa') and the DNA topoisomerase I inhibitor CPT-11 (Irinotecan) in human colorectal cancer cells. *Int. J. Cancer*, 108:464-472, 2004.
3. Nishiyama, N., Okazaki, S., Cabral, H., Miyamoto, M., Kato, Y., Sugiyama, Y., Nishio, K., Matsumura, Y., Kataoka, K. Novel cisplatin-incorporated polymeric micelles can eradicate solid tumors in Mice. *Cancer Res.*, 63:8977-8983, 2003.
4. Suzuki, T., Agui, M., Togawa, T., Naganuma, A., Nishio, K., Tanabe, S. MRP5b/SMRP mRNA is

- highly expressed in metallothionein-deficient mouse liver. *J. Health Sci.*, 49:524-526, 2003.
5. Tsunoda, T., Koh, Y., Koizumi, F., Tsukiyama, S., Ueda, H., Taguchi, F., Saijo, N., Nishio, K. Differential gene expression profiles and identification of the genes relevant to clinicopathologic factors in colorectal cancer selected by cDNA array method in combination with principal component analysis. *Int. J. Oncol.*, 23:49-59, 2003.
  6. 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.
  7. Saijo, N., Nishio, K., Tamura, T. Translational and clinical studies of target-based cancer therapy. *Int. J. Clin. Oncol.*, 8:187-192, 2003.
  8. Kanzawa, F., Akiyama, Y., Saijo, N., Nishio, K. In vitro effects of combinations of cis-amminedichloro (2-methylpyridine) platinum (II) (ZD0473) with other novel anticancer drugs on the growth of SBC-3, a human small cell lung cancer cell line. *Lung Cancer*, 40:325-332, 2003.
  9. Nishiyama, N., Koizumi, F., Okazaki, S., Matsumura, Y., Nishio, K., Kataoka, K. Differential gene expression profile between PC-14 cells treated with free cisplatin and cisplatin-incorporated polymeric micelles. *Bioconjug. Chem.*, 14:449-457, 2003.
  10. Hirama, M., Takahashi, F., Takahashi, K., Akutagawa, S., Shimizu, K., Soma, S., Shimanuki, Y., Nishio, K., Fukuchi, Y. Osteopontin overproduced by tumor cells acts as a potent angiogenic factor contributing to tumor growth. *Cancer Lett.*, 198:107-117, 2003.
  11. Natsume, T., Watanabe, J., Koh, Y., Fujio, N., Ohe, Y., Horiuchi, T., Saijo, N., Nishio, K., Kobayashi, M. Antitumor activity of TZT-1027 (Soblidotin) against VEGF-secreting human lung cancer *in vivo*. *Cancer Sci.*, 94:826-833, 2003.
  12. Saijo, N., Tamura, T., Nishio, K. Strategy for the development of novel anticancer drugs. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 52:S97-S101, 2003.
  13. Yamanaka, R., Akutagawa, S., Taguchi, F., Yajima, N., Tsuchiya, N., Uzuka, T., Morii, K., Takahashi, H., Tanaka, R., Saijo, N., Nishio, K. Selection of surrogate marker genes in primary central nervous system lymphomas for radio-chemotherapy by DNA array analysis of gene expression profiles. *Int. J. Oncol.*, 23:913-923, 2003.
2. 学会発表
1. Koizumi, F., Taguchi, F., Shimoyama, T., Saijo, N., Nishio, K. Mechanism of resistance to epidermal growth factor receptor inhibitor ZD1839: A role for inhibiting phosphorylation of EGFR at Tyr1068. *Am. Assoc. Cancer Res. 94th Ann. Meet. Washington DC USA. 7:11-15, 2003.*
  2. Jang, JH., Lee, SH., Kang JH., Nishio, K., Saijo, N., Kuh, HJ. ZD1839 potentiates the antiproliferative activity of paclitaxel and oxaliplatin against human gastric carcinoma cells in vitro. *Am. Assoc. Cancer Res. 94th Ann. Meet. Washington DC USA. 7:11-15, 2003.*
  3. Sugiyama, K., Yamashita, K., Nishio, K., Akinaga, S., Kanazawa, J. Synergistic combined effect of vinorelbine and ZD1839 (Iressa) in NSCLC cell lines which overexpress the phosphorylated EGFR and ErbB2. *Am. Assoc. Cancer Res. 94th Ann. Meet. Washington DC USA. 7:11-15, 2003.*
  4. Shimoyama, T., Koizumi, F., Saijo, N., Nishio, K. Synergistic interaction between the EGFR tyrosine kinase inhibitor ZD1839 (Iressa) and the DNA topoisomerase I inhibitor CPT-11 (Irinotecan) in human colorectal cancer cells. *Am. Assoc. Cancer Res. 94th Ann. Meet. Washington DC USA. 7:11-15, 2003.*
  5. Ohmori, T., Inoue, F., Yamaoka, T., Hirose, T., Horiuchi, N., Nishio, K., Adachi, M., Saijo, N., Arteaga, CL., Kuroki, T. EGFR-degradation activity contributed to ZD1839 (Iressa)-resistant mechanism in human non-small cell lung cancer cell lines. *Am. Assoc. Cancer Res. 94th Ann. Meet. Washington DC USA. 7:11-15, 2003.*
  6. Taguchi, F., Koh, Y., Koizumi, F., Shimoyama, T., Saijo, N., Nishio, K. Activity of ZD6474, a vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor (VEGFR (KDR)-TKI), in a model of ZD1839 (Iressa) resistance. *Am. Assoc. Cancer Res. 94th Ann. Meet. Washington DC USA. 7:11-15, 2003.*
  7. Tsunoda, T., Koh, Y., Nishio, K. Differential gene expression profiles and identification of the genes relevant to clinicopathologic factors in colorectal cancer selected by cDNA array method in combination with principal component analysis. *Am. Assoc. Cancer Res. 94th Ann. Meet. Washington DC USA. 7:11-15, 2003.*
- 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

久留米大学・先端癌治療研究センター・教授

研究要旨：

がん化学療法の個別化をすすめるために、幾つかの ABC トランスポーターや DNA 結合蛋白 YB-1 の正常とがんでの発現様式や細胞内局在に注目するとともに、イレッサの感受性、炎症性血管新生及び浸潤／転移に関与する分子標的を同定した。

A. 研究目的

がん個別化治療を進めるために、薬剤の感受性や代謝を担う分子標的を把握し、正常組織とがんでの発現様式や遺伝子多型の有無を明らかにすることが大切である。そこで本研究では、(1) 分子標的抗がん薬剤と殺細胞性抗がん薬剤を対象にして、発現と SNP を検討する。と同時に、(2) がんの浸潤／転移や血管新生と密接に関連する分子標的を検索する。

B. 研究方法

本研究を進めるために以下の研究方法を駆使した。

1. 分子標的のがん組織での発現をみるために、各標的に特異的な抗体を用いて免疫染色法で検索した。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。
2. Northern blot と定量 PCR 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。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。
3. 倫理面への配慮は、久留米大学倫理委員会の審査を経た後、開始する。尚、ヒトノゲム・遺伝子解析研究については、ヒトノゲム・遺伝子解析研究に関する倫理指針（平成 13 年 3 月 29 日 文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第 1 号）を遵守する。

C. 研究結果

1. 薬剤感受性を担う分子標的に関して

- (1) EGF レセプターを標的とするイレッサ (Gefitinib) のヒト肺がん細胞における感受性は細胞増殖や細胞死のシグナルがどれだけ緊密に EGF/EGF レセプターに依存しているかによってイレッサの感受性が左右されていることを見出した。
- (2) ヒト滑膜内腫や乳がんにおいて、YB-1 の核内発現が多剤耐性を担う MDR-1 の発現と患者の予後に有意に相関することを見出した。ヒト MDR1 遺伝子の 5'制御領域の遺伝子多型を同定した。その中で -692 と -2352 多型が発現に影響を与えることを明らかにした。
- (3) YB-1 の発現レベルの上昇ががん患者の予後因子になることを報告した。YB-1 蛋白合成が YB-1 によって mRNA の 5'非翻訳領域で制御されること、ならびに YB-1 のヘテロ欠失 ES-1 細胞においてマイトマイシン C やシスプラチンの感受性を著明に変化させた。
- (4) 肝炎ウイルス感染の肝臓における MRP2 の発現低下と関連して、IL-1 や TNF $\alpha$  による肝細胞の MRP2 の発現低下に転写因子 IRF3 が関与していた。

2. 血管新生、転移・浸潤に関与する分子標的に関して

- (1) がんで転移・浸潤とも関連する 43kD 蛋白の NDRG1/Cap43 の発現は低酵素やニッケルによって誘導され、腎がん細胞においては VHL 遺伝子によって抑制された。
- (2) TNF $\alpha$  は血管内皮の  $\alpha 4$  インテグリンの発現を著明に上昇させ可溶性 VCAM-1 と協調して in vitro と in vivo 系で有意に血管新生を誘導させた。

(3) IL-1 $\beta$ による血管新生においてシクロオキシゲナーゼ2の活性化とプロスタノイド自身が重要な役割を果たしていることをマウス角膜の血管新生モデル系で明らかにした。

#### D. 考察

イレッサの感受性に関連して、我々が提示した研究を基盤にして感受性に関するがんの個別化のための分子診断法を開発していく必要がある。他方、YB-1核内発現が予後や病気進行またP-糖蛋白質の発現のための分子診断のプロープとして役立てていきたい。肝や腸を中心にしたABCトランスポーターの発現レベルを同定していくことによって、副作用を軽減するための診断の確立に寄与できるよう努力していくことが大切である。

膀胱がん、乳がん及び肝がんなどでNDRG1/Cap43遺伝子の発現が治療と診断の有用なマーカーになるか否かを明らかにしていかなければならない。他方、炎症とがんとの問題を我々は血管新生から問いかけてがんの診断・治療に貢献したいと考えた。そのために、炎症性血管新生に関与するシクロオキシゲナーゼ2やインテグリンなどを対象に仕事を展開していきたい。

#### E. 結論

1. 薬剤感受性を制御する標的としてMDR1とMRP2に関して、その発現に関与する遺伝子多型を提示(MRP2については論文準備中)、さらにMDR1の臨床がんでの発現がYB-1の核内局在と相関した。
2. イレッサについてはその薬剤感受性が個々の肺がん細胞のEGF/EGFレセプターの増殖や細胞死シグナルへの依存度と関連した。
3. NDRG1/Cap43ががん患者の病気進行や予後と相関し、さらにシクロオキシゲナーゼ2やインテグリンの活性が炎症性血管新生と関連した。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Hisaeda, K., Inokuchi, A., Nakamura, T.,

Kohno, K., Iwamoto, Y., Kuwano, M. and Uchiumi, T. IL-1 $\beta$  represses multidrug resistance protein2 gene expression through inactivation of IRF3 in human hepatic cells. *Hepatology*, in press.

2. Shibahara, K., Uchiumi, T., Fukuda, T., Kura, S., Tominaga, Y., Maehara, Y., Kohno, K., Nakabeppu, Y., Tsuzuki, T. and Kuwano, M. Targeted disruption of one allele of the Y-box binding-1 (YB-1) gene in mouse embryonic stem cell and increased sensitivity to cisplatin and mitomycin C. *Cancer Science*, in press.

3. Ono, M., Hirata, A., Kometani, T., Miyagawa, M., Ueda, S., Kinoshita, H., Fujii, T. and Kuwano, M. Sensitivity to gefitinib (Iressa: ZD1839) in non-small cell lung cancer cell lines correlates with dependence on the EGF receptor / ERK1/2 and EGF receptor /AKT pathway for proliferation. *Molec. Cancer Therapeutics*, in press.

4. Kuwano, T., Nakao, S., Yamamoto, H., Tsuneyoshi, M., Yamamoto, T., Kuwano, M. and Ono, M. Cyclooxygenase 2 is a key enzyme for inflammatory cytokine-induced angiogenesis. *FASEB J.*, 18: 300-310, 2004.

5. Fukuda, T., Ashizuka, M., Nakamura, T., Shibahara, K., Maeda, K., Izumi, H., Kohno, K., Kuwano, M. and Uchiumi, T. Characterization of 5'-untranslated region of YB-1 mRNA and autoregulation of translation by YB-1 protein. *Nucleic Acids Res.*, 32: 611-622, 2004.

6. Taniguchi, S., Mochida, Y., Uchiumi, T., Tahira, T., Hayashi, K., Takagi, K., Shimada, M., Maehara, Y., Kuwano, H., Kono, S., Nakao, H., Kuwano, M. and Wada, M. Genetic polymorphism at the 5' regulatory region of multidrug resistance 1 (MDR1) and its association with interindividual variation of expression level in the colon. *Molec. Cancer Therapeutics*, 2: 1351-1359, 2003.

7. Wakisaka, Y., Furuta, A., Masuda, K., Morikawa, W., Kuwano, M. and Iwaki, T. Cellular distribution of NDRG1 protein in the rat

kidney and brain during normal postnatal development. *J. Histochem. Cytochem.*, 51: 1515-1525, 2003.

8. Mochida, Y., Taguchi, K. I., Taniguchi, S., Tsuneyoshi, M., Kuwano, H., Tsuzuki, T., Kuwano, M. and Wada, M. The role of P-glycoprotein in intestinal tumorigenesis: disruption of mdrla suppresses polyp formation in *Apc<sup>Min/+</sup>* mice. *Carcinogenesis*, 24: 1219-1224, 2003.

9. Kohno, K., Izumi, H., Uchiumi, T., Ashizuka, M. and Kuwano, M. The pleiotropic functions of the Y-box-binding protein, YB-1. *Bio Essays*, 25: 691-698, 2003.

10. Saji, H., Toi, M., Saji, S., Koike, M., Kohno, K. and Kuwano, M. Nuclear expression of YB-1 protein correlates with P-glycoprotein expression in human breast carcinoma. *Cancer Lett.*, 190: 191-197, 2003.

11. Konno, T., Ebihara, T., Hisaeda, K., Uchiumi, T., Nakamura, T., Shirakusa, T., Kuwano, M. and Wada, M. Identification of domains participating in the substrate specificity and subcellular localization of the multidrug resistance proteins MRP1 and MRP2. *J. Biol. Chem.*, 278: 22908-22917, 2003.

12. 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 topoisomerase2 alpha expression, and with poor prognosis in synovial sarcoma. *J. Pathol.*, 199: 251-258, 2003.

13. Masuda, K., Ono, M., Okamoto, M., Morikawa, W., Otsubo, M., Migita, T., Tsuneyoshi, M., Okuda, H., Shuin, T., Naito, S. and Kuwano, M. Downregulation of CAP43 gene by von Hippel-Lindau tumor suppressor protein in human renal cancer cells. *Int. J. Cancer*, 105: 803-810, 2003.

14. Nakao, S., Kuwano, T., Ishibashi, T., Kuwano, M. and Ono, M. Synergistic effect of TNF- $\alpha$  in

soluble VCAM-1-induced angiogenesis through  $\alpha 4$  integrins. *J. Immunol.*, 170: 5704-5711, 2003.

15. Kuwano, M., Uchiumi, T., Hayakawa, H., Ono, M., Wada, M., Izumi, H. and Kohno, K. The basic and clinical implications of ABC transporters, Y-box-binding protein-1 (YB-1) and angiogenesis-related factors in human malignancies. *Cancer Science*, 94: 9-14, 2003.

## 2. 学会発表

1. 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)

2. 桑野信彦 日本臨床腫瘍学会への大きな期待 第 1 回日本臨床腫瘍学会 (会長講演) 2003 年 2 月 28 日-3 月 1 日 (福岡)

3. 内海健、和田守正、桑野信彦 ABC トランスポーターMRP2 遺伝子の炎症性サイトカインによる発現制御 第 7 回がん分子標的治療研究会総会 2003 年 6 月 2 日-3 日 (東京)

4. 小野眞弓、桑野隆史、中尾新太郎、桑野信彦 L-1 誘導の血管新生へ関与する 2 つの機序と COX-2 第3回トランスレーショナルリサーチワークショップ 2003 年 9 月 1 日-2 日 (兵庫)

5. 平田晃、宮川美保、上田秀一、桑野信彦、小野眞弓 EGFR ファミリー発現様式の ZD1839 (Iressa) 感受性への関与 第3回トランスレーショナルリサーチワークショップ 2003 年 9 月 1 日-2 日 (兵庫)

6. 桑野隆史、中尾新太郎、桑野信彦、小野眞弓 炎症性サイトカイン IL-1 $\beta$  による血管新生誘導の分子標的 第 62 回日本癌学会総会 (講演) 2003 年 9 月 25 日-27 日 (名古屋)

7. 平田晃、宮川美保、上田秀一、桑野信彦、小野眞弓 EGFR および HER2 強制発現による ZD1839(Iressa)感受性への影響 第 62 回日本癌学会総会 (ポスター) 2003 年 9 月 25 日-27 日 (名古屋)

8. 青木俊二、小野眞弓、中尾新太郎、桑野隆史、桑野信彦 海綿由来プロモチロシン誘導体 bastadin 類の血管新生阻害作用 第 62 回日本癌学会総会 (ポスター) 2003 年 9 月 25 日-27 日 (名古屋)



屋)

9. 桑野信彦 オーダーメイド医療を考える：基礎研究者の立場から 「オーダーメイド医療を考える」(講演 公開シンポジウム) 2003年10月10日 (福岡)

10. 桑野信彦 併用化学療法の開発研究をどう推進するか、根拠、デザイン、そして結果-5-FU系抗癌剤との併用 regimen を中心に 第2回消化器癌分子標的治療セミナー (パネルディスカッション) 2003年11月22日 (東京)

11. 桑野信彦 がんのオーダーメイド医療の進歩 日本薬学会九州支部主催「くすり作りと化学療法の最前線」(特別講演) 2004年1月18日 (福岡)

12. Nakamura, H., Takamori, S., Fujii, T., Fukunaga, M., Shirouzu, H., Yamana, H., Kuwano, M. Combination of gefitinib and trastuzumab as a novel therapeutics strategy in human non-small cell lung cancer 第6回米国癌研究会議 (AACR)・日本癌学会合同会議 2004年1月25日-29日 (Hawaii)

13. Fujii, T., Yamana, H., Nakamura, H., Shirouzu, K., Kuwano, M. Clinicopathologic study of vascular index in superficial esophageal carcinoma 第6回米国癌研究会議 (AACR)・日本癌学会合同会議 2004年1月25日-29日 (Hawaii)

14. Ono, M., Kuwano, T., Nakao, S., Kuwano, M. Tumor and their stromal interaction: involvement of IL-1-induced angiogenesis through dual pathways-COX2 and angiogenic factors 第6回米国癌研究会議 (AACR)・日本癌学会合同会議 2004年1月25日-29日 (Hawaii)

15. 持田泰、和田守正、田口健一、恒吉正澄、谷口秀一、前原喜彦、桑野博行、桑野信彦 大腸癌発生における P 糖蛋白質は抑制的か促進的か-上皮および癌細胞への P 糖蛋白質の作用- 第104回日本外科学会定期学術集会 2004年4月7日-9日 (大阪)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

- 1) 特願 1996-259945
- 2) 特願 2003-332584

厚生労働科学研究費補助金（がん克服新 10 ヶ年戦略研究事業）

分担・研究報告書

新規効悪性腫瘍剤の早期臨床試験に関する研究

近畿大学医学部腫瘍内科 福岡正博

#### 研究要旨

- ① 新しい代謝拮抗剤、LY231514 (pemetrexed) の Vitamin B12 および葉酸を補充した場合の臨床第 I 相試験を実施し、新たな MTD 及び DLT を決定することにより、本薬剤の新たな用法用量を検討すると同時に、各種悪性腫瘍に対する有用性を予測する。
- ② Her1 および Her2 に対する新しいチロシンカイネース阻害剤、GW572016 の臨床第 I 相試験を実施し MTD 及び DLT を決定することにより、これら薬剤の臨床プロファイルを探査し、先行導入されたゲフィチニブの臨床プロファイルと比較検討する。

#### A 研究目的

##### ① LY231514 (pemetrexed) の臨床第 I 相試験

本薬剤は thymidylate synthase 及び dihydrofolate reductase など、DNA 合成、RNA 合成に関与する複数の主要な酵素を阻害する新規抗癌剤である。Vitamins を補充をした場合の pemetrexed 投与量の増量の可能性、Vitamins の補充に伴う薬物動態の変化、Vitamins 補充により pemetrexed の増量が可能であった場合の有効性を検討する。

##### ② GW572016 臨床第 I 相試験

GW572016 は Her1 と Her2 の両者のチロシンキナーゼ活性を阻害する。先行する Her1 の可逆的シロシンキナーゼ阻害剤、ゲフィチニブと比較して、これら新しい薬剤の臨床的プロファイルを検討し、今後の可能性を評価する。

#### B 研究方法

##### ① LY231514 (pemetrexed) の臨床第 I 相試験

本臨床第 I 相試験における初回投与量は 300mg/m<sup>2</sup> であり、第 2 レベルは欧米での推奨用量 500mg/m<sup>2</sup>、その後は MTD まで 100mg/m<sup>2</sup> ず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。

##### ② GW572016 の臨床第 I 相試験

GW572016 に関して通常の臨床第 I 相試験と同様の方法論に則って実施した。初回投与量は 900mg/日とし 400mg の幅で 1600mg/日まで増量し、その後 200mg 幅での増量を計画した。投与期間は 21 日間の 1 日 1 回連続投与で。各コホート 6 例を登録、21 日間の安全性を判断して増量すること

とした。

## C 研究結果

### ① LY231514 の臨床第 I 相試験

MTD は 1200mg/m<sup>2</sup> と決定された。また、そのときの DLT は Grade 3 の感染と Grade 3 の皮疹であり比較的軽いものであった。ビタミン剤の補充により投与量を約 2 倍に増量可能であることが示されたが、高用量であっても好中球減少等も Grade 3 レベルであり、程度としては軽かった。900mg/m<sup>2</sup> までの成績では、腫瘍縮小効果は既治療非小細胞肺癌例 12 例中 4 例 (33.3%) に PR を認めている。期待された悪性胸膜中皮腫に対しては 3 例登録され治療されたが有効症例は認められなかった。非小細胞肺癌を対象とした臨床第 II 相試験への推奨用量範囲は 500mg/m<sup>2</sup> から 1000mg/m<sup>2</sup> と結論された。

### ② GW572016 の臨床第 I 相試験

900mg/日より増量、1800mg/日まで増量した。1800mg/日の投与量にて Grade 3 の下痢 2 例を認めたため、この投与量を MTD と決定した。今後の臨床試験における推奨用量は 1500mg/日と推定された。DLT は下痢であり、最も高頻度に出現する副作用はゲフィチニブと同様の脂漏性皮疹であり、ほぼ全例に出現を認めた。有効性に関しては、非小細胞肺癌 (扁平上皮癌:ゲフィチニブ非投与症例) 1 例とハーセプチン抵抗性乳癌の 1 例に PR を認めた。ゲフィチニブを前投与された 9 例の非小細胞肺癌においては全く腫瘍縮小効果を認めなかった。このことは本剤とゲフィチニブとの臨床的差別化が困難であることを意味しており、今後の非小細胞肺癌に対する臨床開

発は困難となることが予想される。

## D 考察

### ① LY231514 の臨床第 I 相試験

LY231514 はビタミン剤の補充により投与量を増量可能であり、なおかつ副作用も軽微であった。また、非小細胞肺癌に対する有用性が示唆された。このことから、気治療非小細胞肺癌を対象として投与量の異なる単剤による比較第 II 相試験を実施することにより、本剤の非小細胞肺癌に対する有効性とビタミン剤の補充による用量増加の臨床的意義について検討することの重要性が示唆された。

### ② GW572016 の臨床第 I 相試験

本剤は非小細胞肺癌というよりも乳癌患者に対する有効性が期待される。このことは Her1 と Her2 の両者を阻害する本剤の特性からの帰結であるのかどうか、臨床第 II 相試験以降の臨床試験で明らかにする必要がある。

## E 結論

### ① LY231514

LY231514 は非小細胞肺癌に有用な抗癌剤である可能性が示唆された。また、悪性胸膜中皮腫に関しては単剤での開発よりシスプラチンなど他の抗癌剤との併用で開発するべきと思われる。

### ② GW572016

GW572016 は Her1 と Her2 の両者を抑制することによりゲフィチニブと異なるプロファイルを示す可能性を認めた。

## F 健康危険情報

LY231514 に関しては皮膚発赤、肝機能障害が主な副作用であり、GW572016 に関しては下痢と脂漏性皮膚炎が主な副作用である。

G 研究発表

論文発表

1. Kurata, T., Tamura, K., Kaneda, H., Nogami, T., Uejima, H., Asai, G., Nakagawa, K., Fukuoka, M. Effect of re-treatment with gefitinib ('Iressa', ZD1839) after acquisition of resistance. *Ann Oncol*, 15(1): 173-174. 2004
2. Yamamoto, N., Fukuoka, M., Negoro, S., Nakagawa, K., Saito, H., Matsui, K., Kawahara, M., Senba, H., Takada, Y., Kudoh, S., Nakano, T., Katakami, N., Sugiura, T., Hosoi, T., Ariyoshi, Y. for the West Japan Thoracic Oncology Group. Randomized phase II study of docetaxel/ cisplatin versus docetaxel/ irinotecan in advanced non-small cell lung cancer: a West Japan Thoracic Oncology Study (WJTOG9803). *Br J Cancer*, 90(1): 87-92, 2004
3. 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* 21(12): 2237-2246. 2003
4. Hirashima, T., Yamamoto, N., Sugiura, T., Takada, Y., Negoro, S., Kasii, T., Takada, M., Nakanishi, Y., Kato, T., Fukuoka, M. A Randomized Phase II study of Carboplatin / Gemcitabine versus Vinorelbine / Gemcitabine in Patients with Advanced Non-small Cell Lung Cancer; West Japan Thoracic Oncology Group (WJTOG) 0104. *Lung Cancer* 41, Supplement S79, 2003
5. 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*, 14(6): 922-930, 2003
6. Komiya, T., Fusetani, N., Matsunaga, S., Kubo, A., Kaye, F.J., Kelly, M.J., Tamura, K., Yoshida, M., Fukuoka, M. and Nakagawa K. Ritterazine B, a new cytotoxic natural compound, induces apoptosis on cancer cell, *Cancer Chemother Pharmacol*, 51(3): 202-208, 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

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

抗がん剤のミセル内包化により、抗がん剤の固形腫瘍への選択的腫瘍集積性を図り、逆に正常組織への分布を抑えることで毒性の軽減をもたらし、結果として治療域の増大を達成できる。

A. 研究目的

本研究の目的は現在種々のがん種にその効果が知られているタキソール(PTX)をミセルに内包させることにより、正常組織特に神経系への集積を抑えつつ、がん組織に選択的に PTX を集積させることにある。そして、タキソール内包ミセル体(NK105)が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

- 1) 血中動態 7週齢の雄 SD ラットに PTX および NK105 を PTX 換算 5mg/kg 単回尾静脈投与を行い 24 時間にわたり血中 PTX 濃度を測定した。そして両者の血漿 AUC を比較した。
- 2) 抗腫瘍効果 6 週齢の雌 Balb/c nu/nu ノードマウスの背部皮下に HT-29 ヒト大腸がん細胞株  $1 \times 10^6$  個を移植し、腫瘍径が 5-8mm サイズになったところで、PTX および NK105 を

PTX 換算 100mg/kg、50mg/kg、25mg/kg 週 1 回の計 3 回尾静脈投与した。治療開始後から 1 ヶ月間それぞれの群の腫瘍の長径と短径およびマウスの体重を適時計測した。

3) 神経毒性 9-10 週齢の雌 SD ラットに対して PTX および NK105 を PTX 換算 7.5mg/kg 週 1 回、計 6 回尾静脈投与を行った。また、コントロールとして PTX の臨床用の溶解液であるクレノフォア EL とエタノールの混合溶液を同様に静注した。投与終了後ネンブタール麻酔下にラットを屠殺し、座骨神経を摘出後 HE 染色を行い、神経変性の指標である myelin globe の出現について比較検討した。

C. 研究結果

- 1) ミセル体の NK105 は著明に血中半減期がのびて血漿中 AUC は PTX に比べ 50 倍以上高くなった。
- 2) 抗腫瘍効果においては 100mg/kg、

50mg/kg、25mg/kg それぞれにおいて NK105 の方が PTX を有意に優っていた。NK105 の 25mg/kg 投与群と PTX の 100mg/kg 投与群がほぼ同程度の抗腫瘍効果を示した。特筆すべきは、NK105 の 100mg/kg 投与群において投与された5匹すべての腫瘍が消失した。またこの実験系に使用されたマウスの体重変化において、コントロール、NK105、PTX 間で有意な差はなかった。

3) 神経病理学的検討においては、座骨神経における myelin globe の出現頻度により神経障害の程度を比較した。すなわち myelin globe の出現が全視野に観察されない：0 度、全視野で 1-2 個：1 度、1 視野内に数個限局性に散在して認められる：2 度、全視野内にび漫性に認められる：3 度、1 視野内にび漫性に認められる：4 度とスコア化したところコントロールでは 0 度が 13 例中 12 例、1 度が 13 例中 1 例であった。NK105 投与群では 0 度が 14 例中 8 例、1 度が 14 例中 2 例、2 度が 14 例中 4 例、3 度および 4 度は認められなかった。それらに対し、PTX 投与群では 0 度 10 例中 0 例、1 度 10 例中 1 例、2 度 10 例中 4 例、3 度 10 例中 5 例、4 度は 0 であった。以上より、PTX と NK105 では有意に PTX において myelin globe の出現頻度が高い結果となった。

#### D. 考察

本研究の結果から PTX のミセル内包化により、著明な血漿 AUC の増加が認められた。このことはこのミセル体 NK105 のサイズが径 90 ナノメートルと高分子化され腎からの排せつが減少したことと、ミセルの外郭がポリエチレングリコールで覆われているために肝や脾などの網内系により捕獲されない、つまりステルス効果を保有するようになったことなどにより、血中安定性が増した結果であると思われる。そして腫瘍内 AUC でも NK105 は PTX の約 25 倍増大していることも判明している。その結果抗腫瘍効果が増大したことは容易に想像しうる。また NK105 は組織分布も著明に抑制され、その結果として末梢神経系への分布も抑えられ、PTX による神経変性がミセル化により減少したと考えられる。

#### E. 結論

PTX のミセル内包化体 NK105 は有機溶媒なしで静注可能製剤である。NK105 は PTX に比べ優れた血中安定性を示し、優れた抗腫瘍効果を示した。抗腫瘍効果は容量依存性であった。また NK105 は PTX による末梢神経障害を著明に抑制しうることも判明した。以上の基礎研究の結果から早急に NK105 の臨床試験を行うべきと考え

る。

F. 健康危険情報

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 Y., Yokoyama M., Okano T., Kawaguchi

T., Moriyasu F., and Kakizoe T. *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

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

新しいがん薬物療法の研究

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。マウス大腸癌の肝転移モデルを用いて hydrodynamics 法による NK4 遺伝子治療による制癌作用を調べたところ、NK4 遺伝子治療により大腸癌細胞の肝転移ならびに転移巣の成長が抑制された。さらに、肝転移巣での大腸癌細胞における c-Met/HGF レセプターの in situ チロシンリン酸化が NK4 発現によって強く阻害され、これと一致して肝臓内での癌細胞浸潤は強く抑制された。これら NK4 の制癌作用は NK4 のもつ2機能性によって達成されたと考えられ、NK4 は大腸癌に対する新しい治療法になることが期待される。

A. 目的

癌細胞は宿主間質細胞との相互作用、癌-間質相互作用を介して浸潤・転移、腫瘍血管新生等の悪性形質を獲得することが知られている。癌-間質相互作用の分子機構を解明し、癌悪性化の生物学的な背景に基づいた浸潤・転移阻止法を立案することが、新しい制癌法の確立につながると期待される。私達は HGF (hepatocyte growth factor) が、癌-間質相互作用のメディエーターとして様々な癌の浸潤・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、本年度は大腸癌肝転移モデルを用いて NK4 遺伝子治療の制癌作用を検討した。

B. 研究方法

NK4 生体内遺伝子発現：ヒト NK4 遺伝子発現用プラスミドを構築し、プラスミドを hydrodynamics 法によってマウス尾静脈から投与した。投与後、マウス血中、各臓器中の NK4 タンパク質のレベルを ELISA 法によって定量した。

マウス大腸癌肝転移モデル：NK4 発現用プラスミドならびに NK4 cDNA を含まない empty プラスミドを hydrodynamics 法によってマウスに投与した。翌日、マウス大腸癌細胞 (MC-38 細胞、 $2 \times 10^5$ /マウス) を脾臓内に注入した。肝転移を解析するためには、細胞移植3週間後にマウスを解析した。実験動物の扱いは大阪大学医学部実験動物指針を遵守し倫理的な取り扱いに十分配慮した。

免疫組織染色：von Willebrand 因子に対する抗体を用いて組織内血管を染色した。チロシンリン酸化 c-Met を特異的に認識する抗体を用いて、c-Met レセプターの in situ での活性化を検出した。



### C. 研究結果

ヒト NK4 発現用プラスミドをマウス尾静脈から hydrodynamics 法によって投与すると、主に肝臓において NK4 の発現が認められた。肝臓ではプラスミド投与後 1 日後をピークに NK4 タンパク質の発現が認められ、その後発現量は減少するものの 3 週間後においても NK4 の発現が認められた。また、血中においても投与後 1 日後をピークとする発現上昇が認められ、2 週間後においても、NK4 レベルは 8 ng/ml 以上に維持され、hydrodynamics 法による遺伝子発現は naked プラスミドでありながら高効率の生体内遺伝子発現法であることが確認された。

上記に基づき hydrodynamics 法により NK4 発現プラスミド投与後、翌日 MC-38 マウス転移性大腸癌細胞を脾臓内に移植し、3 週間後、肝転移に対する影響を調べた。Empty プラスミドを投与したコントロールのマウスでは多数の肝転移が認められたのに対して、NK4 遺伝子治療により肝転移は 25%に阻害されるとともに癌性腹水の貯留も抑制された。肝臓内の転移巣の成長を調べた結果、NK4 遺伝子治療によって肝転移巣のサイズはコントロールの 16%に抑制された。このとき、腫瘍組織内の血管密度は NK4 遺伝子治療によって低下する一方、癌細胞のアポトーシスは 2 倍に促進された。したがって、NK4 は腫瘍血管新生を阻害することによって転移巣の成長を抑制したと考えられる。一方、コントロールのマウスにおいては転移巣辺縁部から肝組織内への活発な浸潤が観察された。腫瘍組織近傍での HGF の発現を調べたところ、大腸癌細胞自身は HGF を発現していないけれども、肝類洞に沿う肝非実質細胞において HGF の発現が認められ、HGF をメディエーターとする癌-間質相互相互作用が癌細胞の活発な浸潤に関与することが示唆された。そこで、転移巣における c-Met/HGF レセプターの in situ 活性化状態をチロシンリン酸化 c-Met に対する特異抗体によって検出した結果、とりわけ転移巣辺縁部において c-Met レセプターの in situ チロシンリン酸化 (in situ 活性化) が認められた。これに対して、NK4 遺伝子治療を施したマウスでは、転移巣における c-Met の in situ チロシン

リン酸化が強力に抑制されるとともに、これと一致して肝組織への浸潤が強く阻害された。さらに、NK4 発現プラスミドの投与量に応じて大腸癌細胞を移植したマウスに対する延命効果が認められた。

### D. 考察

NK4 遺伝子治療法はマウス大腸癌の肝転移、腫瘍血管新生に依存する転移巣の成長、転移巣の肝組織内への活発な浸潤を阻害し、これにより延命作用を発揮した。これら NK4 遺伝子治療の制癌作用は、NK4 のもつ 2 機能性、すなわち HGF アンタゴニスト作用ならびに血管新生阻害作用によって達成されたと考えられる。とりわけ、NK4 遺伝子発現による c-Met レセプターの in situ チロシンリン酸化阻害とこれと一致する癌細胞浸潤の阻害は、HGF-c-Met 系阻止戦略が癌の浸潤・転移阻止につながることを示す実験動物での proof-of-concept といえる。大腸癌はとりわけ欧米では主要な癌であるが、大腸癌で死亡する主たる要因が肝転移である。NK4 遺伝子治療あるいは NK4 タンパク質の投与は大腸癌の肝転移ならびに浸潤性成長を抑制する新しい制癌法になることが期待される。現在、NK4 遺伝子治療のトランスレーショナルリサーチにむけた準備を進めている。

### E. 結論

NK4 遺伝子治療法はマウス大腸癌の肝転移、腫瘍血管新生に依存する転移巣の成長、転移巣の肝組織内への活発な浸潤を阻害し、これにより延命作用を発揮したことから、大腸癌に対する新しい治療法になるものと考えられる。

### G. 研究発表

1. Matsumoto, K. and Nakamura, T. NK4 (HGF-antagonist and angiogenesis inhibitor) in cancer biology and therapeutics. *Cancer Sci.*, 94: 321-327, 2003.
2. Matsumoto, K., and Nakamura, T. Hepatocyte growth factor. In "Encyclopedia of Endocrinology and Endocrine Diseases" (editor-in-chief, L. Martini), Academic Press, San Diego, in press.
3. Martin, T. A., Parr, C., Watkins, G., Lane, J., Matsumoto, K., Nakamura, T., Mansel, R. E., and Jiang, W. G. Growth and angiogenesis of human

- breast cancer in a nude mouse tumor model is reduced by NK4, the HGF/SF antagonist. *Carcinogenesis*, 24: 1317-132, 2003.
4. Davies, G., Mason, M. D., Martin, T. A., Parr, L., Watkins, G., Lane, J., Matsumoto, K., Nakamura, T., and Jiang, W. G. The HGF/SF antagonist NK4 reverses fibroblast- and HGF-induced prostate tumor growth and angiogenesis in vivo. *Intern. J. Cancer*, 106: 348-354, 2003.
  5. Yoshida, S., Yamaguchi, Y., Itami, S., Yoshikawa, K., Tabata, Y., Matsumoto, K., and Nakamura, T. Neutralization of hepatocyte growth factor leads to retarded cutaneous wound healing associated with decreased neovascularization and granulation tissue formation. *J. Invest. Dermatol.*, 120: 335-343, 2003.
  6. Qian, L-W., Mizumoto, K., Maehara, N., Ohuchida, K., Inadome, N., Saimura, M., Nagai, E., Matsumoto, K., Nakamura, T., and Tanaka, M. Co-cultivation of pancreatic cancer cells with orthotopic tumor-derived fibroblasts: fibroblasts stimulate tumor cell invasion via HGF secretion whereas cancer cells exert a minor regulative effect on fibroblasts HGF production. *Cancer Lett.*, 190: 105-112, 2003.
  7. Qian, L-W., Mizumoto, K., Inadome, I., Nagai, E., Sato, N., Matsumoto, K., Nakamura, T., and Tanaka, M. Radiation stimulates HGF receptor/c-met expression that leads to amplifying cellular response to HGF stimulation via upregulated receptor tyrosine phosphorylation and map kinase activity in pancreatic cancer cells. *Intern. J. Cancer*, 104: 542-549, 2003.
  8. Manabe, T., Mizumoto, K., Nagai, E., Matsumoto, K., Nakamura, T., Nukiwa, T., Tanaka, M., and Matsuda, T. Cell-based protein delivery system for pancreatic cancer therapy: NK4 gene-transduced oral mucosal epithelial cell sheet. *Clin. Cancer Res.*, 9: 3158-3166, 2003.
  9. Bessho, K., Mizuno, S., Matsumoto, K., and Nakamura, T. Counteractive effects of HGF on PDGF-induced mesangial cell proliferation in a rat model of glomerulonephritis. *Am. J. Physiol.*, 284: F1171-1180, 2003.
  10. Kitajima, K., Matsumoto, K., Tahara, M., Takahashi, H., Nakamura, T., and Nakamura, T. A newly identified AMSH-family protein is specifically expressed in haploid stages of testicular germ cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 309: 135-142, 2003.
  11. Nakabayashi, M., Morishita, R., Nakagami, H., Kuba, K., Matsumoto, K., Nakamura, T., Tano, Y., and Kaneda, Y. HGF/NK4 inhibited VEGF-induced angiogenesis in invitro cultured endothelial cells and in vivo rabbit model. *Diabetologia*, 46: 115-123, 2003.
  12. Koike, H., Morishita, R., Iguchi, S., Aoki, M., Matsumoto, K., Nakamura, T., Yokoyama, C., Tanabe, T., Ogihara, T., and Kaneda, Y. Enhanced angiogenesis and improvement of neuropathy by cotransfection of human hepatocyte growth factor and prostacyclin synthase gene. *FASEB J.*, 17: 779-781, 2003.
  13. Tomita, N., Morishita, R., Taniyama, Y., Koike, H., Aoki, M., Shimazu, H., Matsumoto, K., Nakamura, T., Kaneda, Y. and Ogihara, T. Angiogenic property of hepatocyte growth factor is dependent on upregulation of essential transcription factor for angiogenesis, ets-1, *Circulation*, 107: 1411-1417, 2003.
  14. Matsuno, Y., Iwata, H., Umeda, Y., Takagi, H., Mori, Y., Kosugi, A., Matsumoto, K., Nakamura, T., and Hirose, H. Hepatocyte growth factor gene transfer into liver via the portal vein using electroporation attenuates the rat liver cirrhosis. *Gene Therapy*, 10: 1559-1566, 2003.
  15. Nishimura, K., Matsumiya, K., Miura, H., Tsujimura, A., Nonomura, N., Matsumoto, K., Nakamura, T., and Okuyama, A. Effects of hepatocyte growth factor on urokinase-type plasminogen activator (uPA) and uPA receptor in Du145 prostate cancer cells. *Intern. J. Androl.*, 26: 175-179, 2003.
  16. Wen, J., Matsumoto, K., Taniura, N., Tomioka, D., and Nakamura, T. Hepatic gene expression of NK4, an HGF-antagonist/angiogenesis inhibitor suppresses liver metastasis and invasive growth of colon cancer in mice. *Cancer Gene Therapy*, in press.
  17. Yoshida, S., Matsumoto, K., Tomioka, D., Bessho, K., Itami, S., Yoshikawa, K., and Nakamura, T. Recombinant hepatocyte growth factor accelerates cutaneous wound healing in diabetic mouse model. *Growth Factors*, in press.
  18. Ohuchida, K., Mizumoto, K., Murakami, M., Qian, L-W., Sato, N., Nagai, E., Matsumoto, K., Nakamura, T. and Tanaka, M. Radiation to stromal fibroblasts increases invasiveness of pancreatic cancer cells through tumor-stromal interactions. *Cancer Res.*, in press.
  19. Wen, J., Matsumoto, K., Taniura, N., and Nakamura, T. Hydrocortisone potentiates hepatocyte growth factor expression in vascular endothelial cells. *Biomed. Res.*, in press.
  20. Umeda, Y., Marui, T., Matsuno, Y., Shirahashi, K., Iwata, H., Takagi, H., Matsumoto, K., Nakamura, T., Kosugi, A., Mori, Y., and Takemura, H. Skeletal muscle targeting in vivo electroporation-mediated HGF gene therapy of bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *Lab. Invest.*, in press.

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

抗癌剤排出トランスポーターBCRPは estrone sulfate などの硫酸抱合 estrogen を輸送する。estrogen などは BCRP と結合するが輸送はされず、BCRP の阻害剤として働く。また、phytoestrogen、flavonoid、kinase 阻害剤などに強い BCRP 阻害作用を持つものを見出された。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 SNP がイリノテカン投与時の副作用発現の程度と関係することを示唆する結果を得た。

A. 研究目的

本研究では、抗癌剤排出トランスポーターBCRP の遺伝子を導入した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 の発現や機能に影響する SNP を同定し、抗癌剤投与時の副作用発現との関係を調べる。

B. 研究方法

ヒト胎盤由来の野生型 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、ヒト大腸癌細胞 HCT-116、ヒト肺癌細胞 A549、マウス白血病 P388、ブタ腎尿管細胞 LLC-PK1 などに導入して BCRP 発現細胞 (K562/BCRP などとよぶ) を作成した。細胞培養により、被験物質が K562/BCRP 細胞の mitoxantrone 耐性、SN-38 耐性を低下させるかどうか調べた。K562/BCRP 細胞の topotecan の取り込みに対する被験物質の効果を FACS により定量した。LLC-PK1 細胞および LLC/BCRP 細胞をフィルター上に単層培養して basal membrane 側から apical membrane 側へ、あるいは apical membrane 側から basal membrane 側への被験物質の輸送を調べた。遺伝子解析研究のインフォームドコンセントを得た一般健常人および癌患者の末梢白血球 DNA を用いて、平成 14 年度までに得られた BCRP の発現に影響する 2 種の SNP および UGT1A1 の SNP を解析した。なお、一般健常人および癌患者を対象とする抗癌剤耐性・感受性に関与する遺伝子の SNP 解析研究については、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針を遵守して行う。この SNP 解析研究の研究計画書・同意説明文書などについては、財団法人癌研究会のヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査委員会の承認を得ている。

C. 研究結果

BCRP はイリノテカンなどの抗癌剤を排出する ABC 輸送体である。我々は estrone 及び estradiol が BCRP による薬剤耐性を reverse することを見出した。次に BCRP が estrogen およびその代謝物を輸送

するかどうか調べたところ、BCRP は estrogen そのものは輸送しないが、estrone sulfate などの硫酸抱合 steroid を ATP 依存的に輸送することを見出した。BCRP 遺伝子導入 LLC-PK1 細胞においては、basal membrane から取り込まれた estrone、estradiol が細胞内で硫酸抱合を受け、apical membrane に発現する BCRP によって apical 側に排出される、という現象が示された。BCRP の耐性を克服する物質を検索した。その結果、phytoestrogen、flavonoid、kinase 阻害剤などに強い BCRP 阻害作用を持つものを見出した。代表的な phytoestrogen である genistein、naringenin などは 1  $\mu$ M から 10  $\mu$ M の濃度で BCRP 遺伝子導入細胞の抗癌剤耐性を in vitro で阻害した。また、多くの flavonoid 化合物が 1  $\mu$ M 以下の低濃度で BCRP による抗癌剤耐性を阻害した。BCRP の遺伝子多型として、活性のある BCRP を作らない C376T (Q126stop) と、BCRP の発現が野生型の 5 分の 1 に低下する C421A (Q141K) の 2 種類を見出した。癌研病院においてイリノテカン投与患者の BCRP 遺伝子を調べた結果、BCRP 低発現型の患者に消化器毒性などの副作用が高い傾向を認めた。現在、SNP の効果を統計学的に解析するために対象患者を増やして検討中である。

D. 考察

本研究により、BCRP の生理的基質が estrone sulfate などの硫酸抱合 estrogen であることが明らかになった。estrone などの estrogen は BCRP と結合するが輸送はされない。また、本研究により種々の BCRP 阻害剤が同定された。BCRP の基質、阻害剤の同定と開発は、耐性の克服による抗癌剤の治療効果の向上という目的とともに、抗癌剤と併用される薬の抗 BCRP 作用による抗癌剤の体内動態の変化とその結果としての副作用（広い意味での薬物相互作用）の理解と防止にも役立つと考えられる。BCRP は抗癌剤耐性遺伝子であり、正常組織における BCRP 発現の低下につながる SNP は抗癌剤投与時の副作用と関係する可能性があると考えられる。

#### E. 結論

抗癌剤排出トランスポーターBCRP は estron sulfate などの硫酸抱合 estrogen を輸送する。estrogen などは BCRP と結合するが輸送はされず、BCRP の阻害剤として働く。また、phytoestrogen、flavonoid、kinase 阻害剤などに強い BCRP 阻害作用を持つものを見出された。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 SNP がイリノテカン投与時の副作用発現の程度と関係することを示唆する結果を得た。