

乳癌の生物学的情報による治療法の選択

分担研究者 戸井 雅和 東京都立駒込病院 臨床試験科・外科部長

研究要旨

乳癌を対象にした分子標的治療薬について、治療効果予測因子の探索的研究ならびに薬力学的研究を行い、乳癌の腫瘍特性あるいは治療反応性に対応した治療法の選択、治療の最適化に関する研究を遂行した。

A. 研究目的

原発性、再発性乳癌を対象に、抗 Her-2 治療法ならびに血管新生阻害療法に関する新しい治療効果予測因子を探索し、その臨床応用を図ることを主研究目的とした。

B. 研究方法

- 1) 抗 Her-2 療法：抗 Her-2 療法の効果発現においては Her 受容体ファミリーとその下流分子群の発現動態が極めて重要と考えられている。そこで、Her-2 過剰発現を有する再発乳癌を対象に、腫瘍組織中の Her-1, Her-2, Her-3 のタンパク量、リン酸化状態、2 量体形成量を eTag 法を用いて測定し、抗 Her-2 抗体療法、trastuzumab の臨床的効果との相関性を検討した。eTag 法は複数の抗体をベースにしたプロテオミクス法で同時に数十種の蛋白の定量が可能である。
- 2) 血管阻害療法：原発性乳癌腫瘍組織中における Vascular endothelial growth factor (VEGF) とその受容体ファミリーの発現を検索し、各分子の予後因子としての意義を検討した。中でも内因性の VEGF 阻害蛋白、soluble VEGF receptor (sVEGFR)-1 の発現に着目し、研究を行った。
- 3) 化学療法、ホルモン療法併用が及ぼす標的分子発現修飾に関する研究：上記の治療法は多くの場合、既存の化学療法、ホルモン療法と併用で用いられる。そこで、化学療法あるいはホルモン療法が治療標的分子、Her 受容体ファミリーや血管新生関連分子の発現に及ぼす影響を蛋白レベルを中心に検討した。

(倫理面への配慮)

いずれの研究課題も厚生労働省の臨床研究に

関する倫理指針に則り、東京都立駒込病院倫理委員会の承認を得た上で遂行した。

C. 研究結果

- 1) 抗 Her-2 療法：パラフィン包埋標本を用いた初期的探索において、eTag 法により定量される Her 受容体ヘテロ 2 量体形成量 (index) と trastuzumab の臨床的抗腫瘍効果が強く相関することが見出された。さらに、100 例の再発乳癌を対象に多施設共同の検証試験を企画し、症例を集積、測定ならびに index の算定を終了した。現在、統計的に妥当性の検証を行っている。ADCC 活性は trastuzumab を対象に患者血液から分離した末梢血単核球をエフェクター細胞、MCF-7 細胞を標的細胞としてアッセイ系を作成した。安定した成績がえられるようになり、アッセイ系として確立した。
- 2) 血管新生阻害療法：原発性乳癌において、VEGF/sVEGFR-1 バランスが強力な予後因子になることが見出された。VEGF 高値が予後不良因子であることは以前より知られているが、今回、VEGF と sVEGFR-1 間の優位性を検証することでより正確に原発性乳癌患者の予後を予測できることが示された。
- 3) 化学療法、ホルモン療法併用が及ぼす標的分子発現修飾に関する研究：原発性乳癌を対象にした術前化学療法の研究から、化学療法がその作用のひとつとして種々の血管新生誘導因子、抗アポトーシス分子の発現を誘導することが見出された。NF- $\kappa$ B, thymidine phosphorylase (TP), Cyclooxygenase (COX)-2 などである。一方、ホルモン療法を用いた検討では、アロマターゼ阻害剤が腫瘍組織中の Her-2 蛋白ならびに Her-2 遺

伝子発現を低下させることが明らかになった。特に奏効例においてその傾向が顕著であった。

#### D. 考察

抗 Her-2 療法の適応は現在腫瘍組織中の Her-2 発現によってのみ決定されているが、治療標的関連分子の発現を詳細に測定することで、さらに精度の高い治療効果予測が可能になると思われる。内因性の VEGF 阻害蛋白 sVEGFR-1 の測定は抗 VEGF 治療を必ずしも必要としない患者群の同定に役立つ可能性がある。医療経済学的側面においてもその意義は大きいかもしれない。複数の治療法を組み合わせると、互いに相乗、相加的あるいは干渉的に作用する可能性があることはよく知られているが、今回の研究では化学療法における血管新生、抗アポトーシス分子の発現誘導、ホルモン療法による Her-2 分子の発現抑制が見出された。いずれも今後の併用療法を考慮する上で重要な知見と考えられる。

#### E. 結論

乳癌を対象に、抗 Her-2 療法、血管新生阻害療法を中心に、分子標的治療薬の新しい効果予測因子の探索、治療標的関連分子の予後因子としての意義の検討、既存の化学療法、ホルモン療法が及ぼす標的分子発現の修飾を検討した。得られた知見はいずれも、既に導入された、あるいは近い将来導入されるであろう分子標的治療薬の適応決定と治療の最適化に有用と考えられる。

#### F. 研究発表

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

1. Nakanishi C., Toi M. Nuclear factor  $k$ -B inhibitors as sensitizer of anticancer drugs. *Nature Reviews Cancer* April, 2005 (in press)
2. Toi M., Rahman M.A., Bando H., Chow W.C.L. Thymidine phosphorylase (platelet-derived endothelial-cell growth factor) in cancer biology and treatment *Lancet Oncol.* 6:158-166, 2005.
3. Saji, S., Kawakami, M., Hayashi, S-I., Yoshida, N., Hirose, M., Horiguchi, S-I., Itoh, A., Funata, N., Schreiber, S.L., Yoshida, M., Toi M. Significance of HDAC6 regulation via estrogen signaling for cell motility and prognosis in estrogen receptor positive breast cancer *Oncogene* (in press), 2005.
4. Kuwano M., Oda Y., Izumi H., Yang S.J., Uchiumi T., Iwamoto Y., Toi M., Fujii T., Yamana H., Kinoshita H., Kamura T., Tsuneyoshi M., Yasumoto K., Kohno K. The role of YB-1 as a global marker of drug resistance. *Mol. Cancer Ther.* 3: 1485-1492, 2004.
5. Toi M., Bando H., Chow W.C.L. Novel insights in clinical trials with preoperative systemic therapy for primary breast cancer. *Bio med. Pharmacother.*58: 531-535, 2004.
6. Matsumoto G., Namekawa J., Muta M., Nakamura T., Bando H., Tohyama K., Toi M., Umezawa K. Targeting of nuclear factor  $k$ appaB Pathways by dehydroxymethylepoxyquinomicin, a novel inhibitor of breast carcinomas: antitumor and antiangiogenic potential in vivo. *Clin. Cancer Res.* 11:1287-1293, 2005.
7. Bando H., Weich H.A., Brokelmann M., Horiguchi S., Funata N., Ogawa T., Toi M. Association between intratumoral free and total VEGF, soluble VEGFR-1, VEGFR-2 and prognosis in breast cancer. *Br. J. Cancer* 92:553-561, 2005.
8. Yasuno M., Mori T., Koike M., Takahashi K., Toi M., Takizawa T., Shimizu S., Yamaguchi T., Matsumoto H. Importance of thymidine phosphorylase expression in tumor stroma as a prognostic factor in patients with advanced colorectal carcinoma. *Oncol. Rep.* 13:405-412, 2005.
9. Saeki T., Takashima S., Terashima M., Sato H A., Toi M., Osaki A., Toge T., Ohno S., Nomura N., Fukuyama Y., Koizumi W., Taguchi T. A Japanese phase I study of continuous oral capecitabine in patients with malignant solid tumors. *Int. J. Clin. Oncol.* 10: 51-57, 2005.
10. Zhu L., Chow L., Loo WTY, Guan X, Toi M. Her2/neu expression predicts the response to antiaromatase neoadjuvant therapy in primary breast cancer: subgroup analysis from celecoxib antiaromatase neoadjuvant trial. *Clin. Cancer Res.* 10:4639-4644, 2004.
11. Tominaga T., Kimura M., Asaga T., Yoshida M., Awane H., Koyama H., Takatsuka Y., Mitsuyama S., Ikeda T., Ogita M., Aoyam

- a H., Sano M., Abe R., Nishi T., Wada T., Danno M., Toi M., Takashima S 1-hexylcarbonyl-5-fluorouracil + cyclophosphamide + tamoxifen versus CMF + tamoxifen in women with lymph node-positive breast cancer after primary surgery: a randomized controlled trial. *Oncol Rep.*12: 797-803, 2004.
12. Bando H., Brokelmann M., Toi M., Alitalo K., Sleeman J.P., Sipos B., Grone H.J., Weich H.A.. Immunodetection and quantification of vascular endothelial growth factor receptor-3 in human malignant tumor tissues. *Int. J. Cancer* 111:184-191, 2004.
13. Morita S., Toi M., Kobayashi T., Ito Y., Hozumi Y., Ohno S., Iwata H., Sakamoto J. Application of a continual reassessment method to a phase I clinical trial of capecitabine in combination with cyclophosphamide and epirubicin (CEX) for inoperable or recurrent breast cancer. *Jpn. J. Clin. Oncol.* 34:104-106, 2004.
14. Weich H.A., Bando H., Brokelmann M., Baumann P., Toi M., Barleon B., Alitalo K., Sipos B., Sleeman J. Quantification of vascular endothelial growth factor-C (VEGF-C) by a novel ELISA. *J. Immunol. Methods* 285: 145-155, 2004.
15. Nakanishi, C., Yamaguchi, T., Iijima, T., Saji, S., Toi, M., Mori, T. Miyaki, M. Germline mutation of the LKB1/STK11 gene with loss of the normal allele in an aggressive breast cancer of Peutz-Jeghers syndrome. *Oncology.* 67:476-479, 2004.
16. Takada M, Kataoka A, Toi M, Bando H, Toyama K, Horiguchi S, Ueno T, Linder S, Saji S, Hayashi Y, Funata N, Kinoshita J, Murakami S, Ohono S. A close association between alteration in growth kinetics by neoadjuvant chemotherapy and survival outcome in primary breast cancer. *Int J Oncol.*, 25:397-405, 2004.
17. Matsumoto G., Rahman M.A., Muta M., Nakamura T., Bando H., Saji S., Tsuruta K., Okamoto A., Toi M. DFU, a selective COX-2 inhibitor, suppresses MCF-7 xenograft tumor growth in mice. *Oncol Rep.*, 12:281-285, 2004.
18. Toi, M., Bando, H., Horiguchi, S., Takada, M., Kataoka, A., Ueno, T., Saji, S., Muta, M., Funata, N., Ohno, S. Modulation of thymidine phosphorylase by neoadjuvant chemotherapy in primary breast cancer. *Br J Cancer*, 90:2338-43, 2004.
19. Toi, M., Takada, M., Bando, H., Toyama, K., Yamashiro, H., Horiguchi, S-I., Saji, S. Current status of antibody therapy for breast cancer. *Breast Cancer*, 11: 10-14, 2004.
20. Saji, S., Toi, M. Novel sensitizing agents; Potential contribution of COX-2 inhibitor for endocrine therapy of breast cancer. *Breast Cancer*, 11: 129-133, 2004.
- G. 知的財産等の出願・登録状況（予定を含む。）
1. 特許取得
  2. 実用新案登録
  3. その他

「抗がん剤の分子標的評価と最適化研究」に関する研究

分担研究者 掛谷秀昭

独立行政法人理化学研究所中央研究所長田抗生物質研究室 副主任研究員

研究要旨

アポトーシス誘導剤epolactaeneをリード化合物として、より強力な活性を有する類縁化合物ETB (epolactatene tert-butyl ester)の創製に成功し、ケミカルバイオロジー(ケミカルゲノミクス)的手法によりETB/Epolactaeneの結合タンパク質の1つとして分子シャペロンHsp60 (chaperonin)を同定した。細胞周期阻害剤(G1期)phosmidosineをリード化合物として、安定誘導体phosmidosine-Etの創製に成功した。

A. 研究目的

近年のがん細胞生物学の進展により、細胞周期やアポトーシスの制御異常によってがん化が引き起こされると考えられ、これらを制御する低分子化合物は、基礎的な研究試薬(バイオプローブ)としてだけでなく、抗がん剤のリード化合物として極めて有望である。そこで、細胞周期やアポトーシスを制御する新規生理活性物質の詳細な化学的解析、化学生物学的解析(ケミカルバイオロジー)/化学遺伝学的解析(ケミカルゲノミクス)を行い、がん化学療法に適した分子標的の可能性を検討しリード化合物の最適化を試みる。

B. 研究方法

本年度は、主に我々が見出したepolactaene(アポトーシス誘導剤、G1期停止剤)、phosmidosine(G1期停止剤)の分子標的を探索・同定するための構造活性相関研究を行った。

1. Epolactaeneの各種誘導体を設計/創製し、ヒト神経芽腫細胞SH-SY5Yにおけるアポトーシス誘導活性を指標に構造活性相関研究を行った。さらに、構造活性相関研究の知見を基盤に、epolactaeneの分子標的の同定のための分子プローブの設計/創製を行い、ケミカルバイオロジー(ケミカルゲノミクス)的手法により分子標的の探索・同定を行った。

2. Phosmidosineの各種誘導体を設計/創製しv-src<sup>ts</sup>-NRK細胞におけるG1期停止作用、およびヒトcyclin D1の翻訳阻害作用を指標に構造活性相関研究を行った。さらに構造活性相関研究の知見を基盤に、phosmidosineの分子標的の同定のための分子プローブの設計/創製を試みた。

(倫理面への配慮)

本研究に使用する各種ヒト/マウス/ラット由来細胞株は、一般に普及した細胞株であり、試料提供者の人権・利権については問題ない。

C. 研究結果

1. Epolactaeneの構造活性相関研究の結果、アポトーシス誘導活性には $\gamma$ -ラクタム構造と $\alpha$ ,  $\beta$ -不飽和カルボニル基を含んだ脂溶性側鎖が重要であることが判明し、より強力な活性を有する類縁化合物ETB (epolactatene tert-butyl ester)の創製に成功した。ETBはヒトがん細胞パネル試験においてさまざまな細胞種に対して顕著な増殖抑制効果を示した。さらに、ETB/Epolactateneの標的タンパク質を探索するために活性を保持したビオチン化ETB/Epolactatene分子プローブ(Bio-ETB)の創製に成功した。Bio-ETBを用いたプロテオミクスの手法により、ETB/Epoの結合タンパク質の1つとして分子シャペロンHsp60 (chaperonin)を同定した。

2. Phosmidosineの構造活性相関研究の結果、分子内のホスホアミダート結合部分、およびL-プロリン残基が活性発現に重要であることが判明した。さらに、phosmidosineの分子内のメトキシ基をエトキシ基に変換した化合物phosmidosine-Etが安定性および活性に優れていることを明らかにした。

D. 考察

ETB/Epolactaeneの活性発現に分子内の $\alpha$ ,  $\beta$ -不飽和カルボニル基が重要であることから、ETB/Epolactaeneは $\alpha$ ,  $\beta$ -不飽和カルボニル基を介してHsp60と結合していることが示唆された。Phosmidosine-Etがphosmidosineより安定性および

び活性に優れていることから、分子内のエトキシ基部分の重要性が示唆された。

#### E. 結論

Epolactaeneをリード化合物として、新規アポトーシス誘導剤ETBの創製に成功し、ETB/Epoの分子標的の1つとして分子シャペロンHsp60を同定した。一方、phosmidosineをリード化合物として、安定誘導体phosmidosine-Etの創製に成功した。

#### F. 研究発表

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

1. Nagumo, Y., Takeya, H., Yamaguchi, J., Uno, T., Shoji, M., Hayashi, Y., Osada, H. Structure-activity relationships of epolactaene derivatives: Structural requirements for inhibition of Hsp60 chaperone activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 14: 4425-4429, 2004.
2. Sekine, M., Okada, K., Seio, K., Obata, T., Sasaki, T., Takeya, H., Osada, H. Synthesis of a biotin-conjugate of phosmidosine O-ethyl ester as a G1 arrest antitumor drug. *Bioorg. Med. Chem.* 12: 6343-6349, 2004.
3. Sekine, M., Okada, K., Seio, K., Takeya, H., Osada, H. Structure-activity relationship of phosmidosine: importance of the 7,8-dihydro-8-oxoadenosine residue for antitumor activity. *Bioorg. Med. Chem.*, 12: 5193-5201, 2004.
4. Asami, Y., Takeya, H., Onose, R., Chang, Y.-H., Toi, M., Osada, H. RK-805, an endothelial-cell-growth inhibitor produced by *Neosartorya* sp., and a docking model with methionine aminopeptidase-2. *Tetrahedron*, 60: 7085-7091, 2004.
5. Mitsui, T., Miyake, Y., Takeya, H., Osada, H., Kataoka, T. Epoxycyclohexenone, a specific inhibitor of Fas ligand-dependent apoptosis in CTL-mediated cytotoxicity. *J. Immunology*, 172: 3428-3436, 2004.
6. Shoji, M., Imai, H., Shiina, I., Takeya, H., Osada, H., Hayashi, Y. Different reaction modes for the oxidative dimerization of epoxyquinols and epoxyquinones –Importance of the intermolecular hydrogen-bonding. *J. Org. Chem.* 69: 1548-1556, 2004.
7. Sekine, M., Okada, K., Seio, K., Takeya, H., Osada, H., Obata, T., Sasaki, T. Synthesis of chemically stabilized phosmidosine analogues

and the structure-activity relationship of phosmidosine. *J. Org. Chem.* 69: 314-326, 2004.

8. 掛谷秀昭、長田裕之. 血管内皮増殖因子(VEGF)の機能を標的とした新規血管新生阻害剤. *日本臨床*, 62: 1264-1270 (2004).
9. 長田裕之、掛谷秀昭. 癌分子標的治療のための新しい血管新生阻害剤. *日本臨床*, 62: 1257-1263 (2004).
10. 三宅靖延、掛谷秀昭、長田裕之. デスレセプター依存性アポトーシス抑制化合物 ECH の作用機序および標的分子. *日本臨床*, 62: 1283-1289 (2004)

#### G. 知的財産等の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得  
該当なし
2. 実用新案登録  
該当なし
3. その他  
該当なし

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）  
分担研究報告書

固形癌に対する分子標的治療の原理の証明のための臨床研究

分担研究者 田村 友秀 国立がんセンター中央病院総合病棟部長

研究要旨

シスプラチン（CDDP）+イリノテカン（CPT-11）療法を受けた肺癌患者において、治療前空腹時T-Bilはgrade4の好中球減少の有意な予測因子となった。T-Bil値はCPT-11の活性代謝物SN-38の不活化酵素UGT-1A1の活性を反映するためと推定された。T-Bil値と下痢との相関は認められず、他の発現メカニズムが想定される。

A. 研究目的

シスプラチン（CDDP）+イリノテカン（CPT-11）療法を受けた肺癌患者を対象に、治療前総ビリルビン（T-Bil）値と好中球減少、下痢との関連を検討する。CPT-11療法の用量規制毒性は好中球減少と下痢であり、CPT-11の活性代謝物SN-38は、UGT1A1により不活化される。UGT-1A1の基質であるビリルビンをUGT-A-の活性の簡便な指標として用いることが可能であるか、T-Bil値と毒性との関係を検討することにした。

B. 研究方法

1999年2月より2004年5月の間に国立がんセンター中央病院肺内科において、CDDP+CPT-11併用療法を受けた肺癌患者127名を解析対象とした。患者背景因子、治療開始直近の食前T-Bil値、化学療法1コースめの毒性（標的毒性はNCI-CTC version 2.0でのgrade 4の好中球減少、grade 3-4の下痢、発熱性好中球減少）を調査し、logistic regression modelを用いて関連を解析した。

（倫理面への配慮）

データの収集の際には、個人を識別可能な情報を削除して、データベース化し、厳重に管理した。

C. 研究結果

対象とした127例の背景は、男93女34、年齢中央値（範囲）61才（24-74）、PS 0/1/2 34/91/2、非小細胞肺癌64小細胞肺癌63、前化学療法なし110あり17で、治療直近空腹時T-Bilは平均0.6 mg/dL、範囲0.2-2.4であった。化学療法のスケジュールは、CDDP 60 mg/m<sup>2</sup> day1 + CPT-11 60 mg/m<sup>2</sup> day 1,8 every 3wkが32例、CDDP 60 mg/m<sup>2</sup> day1 + CPT-11 60 mg/m<sup>2</sup> day 1,8,15

every 4wkが39例、CDDP 80 mg/m<sup>2</sup> day1 + CPT-11 60 mg/m<sup>2</sup> day 1,8 every 3wk24例、CDDP 80 mg/m<sup>2</sup> day1 + CPT-11 60 mg/m<sup>2</sup> day 1,8,15 every 4wkが32例であった。これらの症例に認められた標的毒性は、grade 4の好中球減少23%（grade 2/3/4：20/50/29例）、grade 3-4の下痢10%（grade 2/3/4：30/13/0例）、発熱性好中球減少を9%（12例）であった。治療前の早朝空腹時T-Bil値は、Grade4の好中球減少を認めた症例においてより高値であった（p=0.03、Mann-Whitney U）。多変量解析では、治療前T-Bil値（≤0.7 vs. >0.7 mg/dlのみがとGrade4の好中球減少発現の有意な予測因子となった（OR：5.77；95%CI：1.76-18.98）。また、grade 3-4の下痢については、単変量解析、多変量解析において有意な予測因子はなかった。

D. 考察

今回我々は、肺癌に対する標準的治療のひとつであるCDDP+CPT-11療法において、治療前T-Bil値が好中球減少と相関することを示した。CPT-11による化学療法における治療前T-Bil値と好中球減少との相関は、CPT-11単剤の大量療法（350 mg/m<sup>2</sup>）で報告されている。今回の解析では、CPT-11の薬物動態データはないが、UGT-1A1の活性を通じてビリルビン値とCPT-11の活性代謝物SN-38薬物動態が相関する結果と考える。下痢については、相関を認めなかったが、下痢発現のメカニズムとしては、血中SN-38濃度より胆汁に排泄されたSN-38未変化体、あるいは排泄後脱抱合を受けるSN-38-gluconideがより重要なかもしれない。測定が簡便なT-Bilの好中球減少の指標としての有用性は今後さらなる検討を要する。

## E. 結論

治療前T-Bil値はCDDP+CPT-11療法における好中球減少の予測因子であり、UGT1A1の活性の指標となりうることを示唆された。一方、もう一つの重要な毒性である下痢についてはT-Bil値との相関は認められなかった。

## F. 研究発表

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

1. Arao, T., Fukumoto, H., Takeda, M., Tamura, T., Saijo, N., Nishio, K. Small in-frame deletion in the epidermal growth factor receptor as a target for ZD6474. *Cancer Res.*, 64(24): 9101-9104, 2004.
2. Taguchi, F., Koh, Y., Koizumi, F., Tamura, T., Saijo, N., Nishio, K. Anticancer effects of ZD6474, a VEGF receptor tyrosine kinase inhibitor, in gefitinib ("Iressa")-sensitive and resistant xenograft models. *Cancer Sci.*, 95(12): 984-989, 2004.
3. Goto, K., Sekine, I., Nishiwaki, Y., Kakinuma, R., Kubota, K., Matsumoto, T., Ohmatsu, H., Niho, S., Kodama, T., Shinkai, T., Tamura, T., Ohe, Y., Kunitoh, H., Yamamoto, N., Nokihara, H., Yoshida, K., Sugiura, T., Matsui, K., Saijo, N. Multi-institutional phase II trial of irinotecan, cisplatin, and etoposide for sensitive relapsed small-cell lung cancer. *Br. J. Cancer*, 91(4): 659-665, 2004.
4. Sekine, I., Noda, K., Oshita, F., Yamada, K., Tanaka, M., Yamashita, K., Nokihara, H., Yamamoto, N., Kunitoh, H., Ohe, Y., Tamura, T., Kodama, T., Sumi, M., Saijo, N. Phase I study of cisplatin, vinorelbine, and concurrent thoracic radiotherapy for unresectable stage III non-small cell lung cancer. *Cancer Sci.*, 95(8): 691-695, 2004.
5. Takano, T., Ohe, Y., Kusumoto, M., Tateishi, U., Yamamoto, S., Nokihara, H., Yamamoto, N., Sekine, I., Kunitoh, H., Tamura, T., Kodama, T., Saijo, N. Risk factors for tumor response in patients with advanced non-small cell lung cancer treated with gefitinib. *Lung Cancer*, 45(1): 93-104, 2004.
6. Sekine, I., Yamamoto, N., Kunitoh, H., Ohe, Y., Tamura, T., Kodama, T., Saijo, N. Treatment of small cell lung cancer in the elderly based on a critical literature review of clinical trials. *Cancer Treat. Rev.*, 30(4): 359-368, 2004.
7. Fukushima-Uesaka, H., Saito, Y., Watanabe, H., Shiseki, K., Saeki, M., Nakamura, T., Kurose, K., Sai, K., Komamura, K., Ueno, K., Kamakura, S., Kitakaze, M., Hanai, S., Nakajima, T., Matsumoto, K., Saito, H., Goto, Y., Kimura, H., Katoh, M., Sugai, K., Minami, N., Shirao, K., Tamura, T., Yamamoto, N., Minami, H., Ohtsu, A., Yoshida, T., Saijo, N., Kitamura, Y., Kamatani, N., Ozawa, S., Sawada, J. Haplotypes of CYP3A4 and their close linkage with CYP3A5 haplotypes in a Japanese population. *Hum. Mutat.*, 23(1):100, 2004.
8. Sekine, I., Nokihara, H., Horiike, A., Yamamoto, N., Kunitoh, H., Ohe, Y., Tamura, T., Kodama, T., Saijo, N. Phase I study of cisplatin analogue nedaplatin (254-S) and paclitaxel in patients with unresectable squamous cell carcinoma. *Br. J. Cancer*, 90(6): 1125-1128, 2004.
9. 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(3): 464-472, 2004.
10. Hichiya, H., Tanaka-Kagawa, T., Soyama, A., Jinno, H., Koyano, S., Katori, N., Matsushima, E., Uchiyama, S., Tokunaga, H., Kimura, H., Minami, N., Katoh, M., Sugai, K., Goto, Y., Tamura, T., Yamamoto, N., Ohe, Y., Kunitoh, H., Nokihara, H., Yoshida, T., Minami, H., Saijo, N., Ando, M., Ozawa, S., Saito, Y., Sawada, JI. Functional Characterization of Five Novel CYP2C8 Variants, G171S, R186X, R186G, K247R and K383N, Found in a Japanese Population. *Drug Metab. Dispos.*, Feb 16, 2005.
11. Yamamoto, N., Tamura, T., Murakami, H., Shimoyama, T., Nokihara, H., Ueda, Y., Sekine, I., Kunitoh, H., Ohe, Y., Kodama, T., Shimizu, M., Nishio, K., Ishizuka, N., Saijo, N. Randomized pharmacokinetic and pharmacodynamic study of docetaxel: dosing based on body-surface area compared with individualized dosing based

on cytochrome P450 activity estimated using a urinary metabolite of exogenous cortisol. J. Clin. Oncol., 23(6): 1061-9, 2005.

G. 知的財産等の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
特になし



厚生労働科学研究費補助金（がん臨床研究事業）  
分担研究報告書

肺癌の生物学的情報による治療法の臨床評価

分担研究者 福岡 正博 近畿大学医学部教授

研究要旨

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。

A. 研究目的

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。

B. 研究方法

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>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。

（倫理面への配慮）

C. 研究結果

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。

D. 考察

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。

E. 結論

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。

F. 研究発表

（発表誌名巻号・頁・発行年等も記入）

1. 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: 87-92, 2004
2. 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: 173-174, 2004
- study of amrubicin and cisplatin in previously untreated patients with extensive-stage small-cell lung cancer. *Ann Oncol*. 2005 in press
3. Kurata, T., Tamura, K., Yamamoto, N., Nogami, T., Satoh, T., Kaneda, H., Nakagawa, K., Fukuoka M. Combination phase I study of nedaplatin and gemcitabine for advanced non-small-cell lung cancer. *Br J Cancer*, 90: 2092-2096, 2004
  4. Kaneda, H., Tamura, K., Kurata, T., Uejima, H., Nakagawa, K., Fukuoka M. Retrospective analysis of the predictive factors associated with the response and survival benefit of gefitinib in patients with advanced non-small-cell lung cancer. *Lung Cancer*, 46: 247-254, 2004
  5. Herbst, RS. Fukuoka, M., Baselga, J. Timeline:Gefitinib-a novel targated approach to treating cancer:*Nat Rev Cancer.*, 4: 956-965, 2004
  6. Kakiuchi, S., Daigo, Y., Ishikawa, N., Furukawa, C., Tsunoda, T., Yano, S., Nakagawa, K., Tsuruo, T., Kohno, N., Fukuoka, M., Sone, S., Nakamura, Y. Prediction of sensitivity of advanced non-small cell lung cancers to gefitinib (Iressa, ZD1839). *Hum Mol Genet* 13: 3029-3043, 2004
  7. Sekine, I., Noda, K., Oshita, F., Yamada, K., Tanaka, M., Yamashita, K., Nokihara, H., Yamamoto, N., Kunitoh, H., Ohe, Y., Tamura, T., Kodama, T., Sumi, M., Saijo, N. Phase I study of cisplatin, vinorelbine, and concurrent thoracic radiotherapy for unresectable stage III non-small cell lung cancer. *Cancer Sci*. 95: 691-695, 2005
  8. Ohe, Y., Negoro, S., Matsui, K., Nakagawa, K., Sugiura, T., Takada, Y., Nishiwaki, Y., Yokota, S., Kawahara, M., Saijo, N., Fukuoka, M., Ariyoshi, Y. Phase I-II
- G. 知的財産等の出願・登録状況 (予定を含む。)
1. 特許取得
  2. 実用新案登録
  3. その他

分子標的薬を含む薬物治療の最適化の基盤研究

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：

薬物療法の最適化をすすめるために、YB-1の核内局在とP-糖蛋白質やDNA修復、EGFレセプターファミリーの発現様式と突然変異ならびに転移や血管新生と関連するCap43/NDRG1や炎症性サイトカインやマクロファージなどが標的となるか否かを検討した。

A. 研究目的

がんの薬物療法の最適化を目指す本研究で、我々は

- 1.がん治療の効果を制御する分子標的に関して各々のがんでの治療の感受性や抵抗性を制御しているか否かを検討し、臨床的意義のある標的を提示する。
- 2.がん細胞のみならず、がんの間質や微小環境においてがんの悪性化を特徴づける標的細胞や分子標的を提示し最適化医療に貢献する。
- 3.基礎研究で同定した分子標的をがん治療の効果と対応させながら病理的な検討を行い、臨床的に有用な分子標的を提示する。

B. 研究方法

1.抗がん剤感受性や治療効果を制御する分子標的に関して：

- (1)乳癌や肺癌細胞においてYB-1のSiRNAを用いて感受性が変化する抗がん剤を明らかにする。さらに増殖に影響を与えるか否かを検討する。
- (2)インターフェロン $\alpha$ (IFN $\alpha$ )と5FUの併用については久留米大学で樹立された肝癌細胞株を用いて相乗効果のみられるグループについて、5FU関連酵素やインターフェロンシグナルのいずれが関与しているのかを示す。

(3)肺癌に対するイレッサ（ゲフィチニブ）の感受性がEGFレセプターの突然変異やEGFへの増殖シグナルの依存度だけでなくEGFレセプターの他のファミリーの関与特に、HER2やHER3の役割について明らかにしていく。

2.がん細胞やがんの間質においてがんの悪性形質の獲得に関与する分子標的に関して：

(1)Cap43/NDRG1やIGF-1とそのシグナルを対象に肝癌や膵癌由来の培養系細胞における増殖、転移ならびに血管新生との関連性を検討し、病理材料でがん特異的な発現の有無を免疫染色法などで明らかにする。

(2)炎症性サイトカインを発現している肺癌細胞の増大や血管新生がマクロファージ標的薬剤やシクロオキシゲナーゼ2阻害剤などで特異的に影響をうけるか否かをマウスの実験モデル系で検討する。その結果を臨床材料を対象とした肺癌や乳癌で対応させながら検討する。

（倫理面についての配慮）

久留米大学倫理委員会の審査を経た後、開始する。尚、ヒトゲノム・遺伝子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（平成13年3月29日文科科学省・厚生省・経済産業省告示第1号）を遵守する。

C. 研究結果

1.薬物療法の効果や感受性を担う分子標的に関

して

(1)YB-1 (Y-ボックス結合蛋白-1) の発現と薬物治療に関する感受性の臨床的意義 :

YB-1 の発現レベルや核内局在は P-糖蛋白質 /MDR1 の発現ならびに DNA 障害修傷に重要な鍵をにぎっている。我々は、乳癌や卵巣癌をはじめとした幾つかのヒトがんで YB-1 の核内局在が多剤耐性と薬剤感受性や生存率に関連することを見出した。

(2) EGF レセプター (EGFR) ファミリーとその標的薬剤の治療効果や感受性の制御 :

EGFR 標的のイレッサの効果左右する分子機序として最近、EGFR の突然変異が注目されている。しかしこれだけでは感受性の機序の全てを説明できない。我々は HER2 や HER3 また EGFR とのヘテロダイマー形成の有無がイレッサ感受性と関連することを明らかにした。

2.がんの間質応答や転移・浸潤に関与する標的細胞や分子標的に関して

(1)Cap43/NDRG1 (転移抑制また分化関連蛋白) の発現と膵癌や乳癌における臨床的意義 :

我々はヒト腎癌より単離した Cap43/NDRG1 が神経の分化に関わったり、その発現は N-myc、VHL や p53 や低酸素などで影響をうけることが知られ、前立腺癌や乳癌で予後関連因子として報告されている。我々は乳癌細胞ではタモキシフェンによっても誘導されることや、膵癌細胞においてもその浸潤や転移能とも緊密に関連していることを観察している。

(2)炎症性サイトカイン IL-1 $\alpha/\beta$  や TNF $\alpha$  によって誘導される血管新生においてシクロオキシゲナーゼ 2 (COX2) の活性化と関与するプロスタグランジンマウス角膜や *in vivo* の血管新生モデル系で同定した。

さらに、その血管新生にマクロファージの浸潤が重要な役割を担っていることをマクロファージ標的薬剤の投与や MCP-1 ノックアウトマウスで明らかにしつつある。

## D. 考察

乳癌、卵巣癌また肺癌などで YB-1 の核内局在が予後と関連することを報告してきた。その理由の一つとして P-糖蛋白質の発現上昇以外に YB-1 自身の DNA 修復活性が推察される。今後、YB-1 の下流シグナルを樹立に成功した YB-1 のノックアウトマウスで明らかにしていく。他方、EGF レセプターの突然変異以外に HER2 や HER3 の発現レベルや変異の有無がイレッサの臨床効果を左右するか否かの臨床研究を進めていきたい。

がんにおける間質の炎症性応答として、炎症性の血管新生に我々は注目している。特にマクロファージの浸潤と COX2 や IL-8 をはじめとする CXC ケモカインの活性化が重要であることを明らかにしたい。マクロファージの浸潤等に関与するサイトカインの働きを明らかにしながら、がんにおける炎症応答を担う分子標的や標的細胞を同定していくことが大切である。

## E. 結論

1. 薬剤治療の効果や感受性を制御する分子標的として、YB-1 の核内局在と P-糖蛋白質や予後と有意に相関するヒトがんを見出した。

2. イレッサの薬剤治療の効果に EGF レセプターの変異だけでなく、EGF/EGF レセプターが細胞生存シグナルにどれだけ依存するかさらに HER2/HER3 のヘテロダイマー形成が関与することを見出した。

3. がんの間質応答として炎症性血管新生ががんの悪性形質の獲得に重要であること、さらに COX2 や浸潤マクロファージの制御ががんの増大や転移の制御に重要であることを見出した。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. 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.
2. 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.
  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 epidermal growth factor (EGF) receptor/extracellular signal-regulated kinase 1/2 and EGF receptor/Akt pathway for proliferation. *Molec. Cancer Therapeutics*, 3: 465-472, 2004.
  4. 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 cells and increased sensitivity to cisplatin and mitomycin C. *Cancer Science*, 95: 348-353, 2004.
  5. 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*, 39: 1574-1582, 2004.
  6. Hirata, A., Uehara, H., Izumi, K., Naito, S., Kuwano, M. and Ono, M. Direct inhibition of EGF receptor activation in vascular endothelial cells by gefitinib ('Iressa', ZD1839). *Cancer Science*, 95: 614-618, 2004.
  7. Hirata, K., Masuda, K., Morikawa, W., He, J-W., Kuraoka, A., Kuwano, M., and Kawabuchi, M. N-myc downstream-regulated gene 1 expression in injured sciatic nerves. *GLIA*, 47: 325-334, 2004.
  8. Kuwano, M., Oda, Y., Izumi, H., Yang, S-J., Uchiumi, T., Iwamoto, Y., Toi, M., Fujii, T., Yamana, H., Kinoshita, H., Kamura, T., Tsuneyoshi, M., Yasumoto, K. and Kohno, K. The role of nuclear YB-1 as a global marker in drug resistance. *Molec. Cancer Therapeutics*, 3: 1458-1492, 2004.
  9. Torigoe, T., Izumi, H., Ishiguchi, H., Yoshida, Y., Tanabe, M., Yoshida, T., Igarashi, T., Niina, I., Wakasugi, T., Imaizumi, T., Momii, Y., Kuwano, M. and Kohno, K. Cisplatin resistance and transcription factors. *Curr. Med. Chem. -Anti-Cancer Agents*, 5: 15-27, 2005.
  10. Yokoyama, G., Fujii, T., Tayama, K., Yamana, H., Kuwano, M., Shirouzu, K. PKC $\delta$  and MAPK mediate G $_1$  arrest induced by PMA in SKBR-3 breast cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 327: 720-726, 2005.
  11. Hirata, A., Hosoi, F., Miyagawa, M., Ueda, S., Naito, S., Fujii, T., Kuwano, M. and Ono, M. HER2 overexpression increases sensitivity to gefitinib, an EGF receptor tyrosine kinase inhibitor through inhibition of HER2/ HER3 heterodimer formation in lung cancer cells. *Cancer Res.*, in press, 2005.
  12. Kuwano, M., Basaki, Y., Kuwano, T., Nakao, S., Oie, S., Y. N. Kimura, Fujii, T. and Ono, M. The critical role of inflammatory cell infiltration in tumor angiogenesis-a target for antitumor drug development? In "New Angiogenesis Research" by Nova Science Publishers, Inc., New York, in press.
  13. Oda, Y., Saito, T., Tateishi, N., Ohishi, Y., Tamiya, S., Yamamoto, H., Yokoyama, R., Uchiumi, T., Iwamoto, Y., Kuwano, M., and Tsuneyoshi, M. ATP-binding cassette superfamily transporter gene expression in

human soft tissue sarcomas. *Int. J. Cancer*, in press.

14. Nakamura, H., Takamori, S., Fujii, T., Ono, M., Yamana, H., Kuwano, M. and Shirouzu, K. Cooperative cell-growth inhibition by combination treatment with ZD1839 (Iressa) and trastuzumab (Herceptin) in non-small-cell lung cancer. *Cancer Lett.*, in press.

15. Sanda, T., Kuwano, T., Nakao, S., Iida, S., Ishida, T., Komatsu, H., Shudo, K., Kuwano, M., Ono, M. and Ueda, R. Anti-myeloma effects of a novel synthetic retinoid Am80 (Tamibarotene) through inhibition of angiogenesis. *Leukemia*, in press.

## 2. 学会発表

1. 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)

2. 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)

3. 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)

4. 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)

5. 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)

6. 和田守正、林健志、古野純典、桑野信彦 P糖蛋白質/MDR1の発がんへの関与と化学予防薬の開発戦略 第63回日本癌学会学術総会(シンポジウム) 2004年9月29-10月1日(福岡)

7. 内海健、和田守正、桑野信彦 薬剤排出を担うABCトランスポーターの肝、腸管での発現制御 第63回日本癌学会学術総会(シンポジウム) 2004年9月29-10月1日(福岡)

8. 中尾新太郎、桑野隆史、桑野信彦、小野真弓 腫瘍関連マクロファージとがん血管新生の進展 第63回日本癌学会学術総会(シンポジウム) 2004年9月29-10月1日(福岡)

9. 丸山祐一郎、大家真治、馬崎雄二、小野真弓、岩村威志、木下壽文、桑野信彦 Cap43遺伝子の発現は膀胱癌の悪性形質の分子標的となるか? 第63回日本癌学会学術総会(ポスター) 2004年9月29-10月1日(福岡)

10. 桑野隆史、三田貴臣、中尾新太郎、飯田真介、桑野信彦、上田龍三、小野真弓 多発性骨髄腫細胞における血管新生の誘導とレチノイン酸誘導体(Am80)による抑制 第63回日本癌学会学術総会(ワークショップ) 2004年9月29-10月1日(福岡)

11. 平田晃、上田秀一、桑野信彦、小野真弓、内藤誠二 HER2強制発現によるGefitinib(Iressa)感受性への影響 第63回日本癌学会学術総会(ワークショップ) 2004年9月29-10月1日(福岡)

12. 上田秀一、向坂彰太郎、吉江真澄、小川勝洋、桑野信彦、小野真弓 イレッサによる肝がん細胞で誘導される血管新生の阻害機序 第63回日本癌学会学術総会(ポスター) 2004年9月29-10月1日(福岡)

13. Kuwano, M. Targeting angiogenesis as a

inflammatory response in tumor growth, invasion and metastasis. The 9th International Symposium on Cancer Chemotherapy, December 2-3, 2004 (Tokyo)

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

1) 特願 1996-259945

ヒト CMOAT 遺伝子とその CDNA

2) 特願 2003-332584

MDR1 遺伝子の 5'制御領域における SNP

s

トランスポーターの制御による分子標的治療の開発に関する研究

分担研究者 杉本 芳一 共立薬科大学教授

研究要旨

抗癌剤排出トランスポーターBCRPの活性および発現に影響する因子の検索を行った。genisteinなどのflavonoidはBCRP阻害作用を持ち、またそれ自身がBCRPによって輸送される基質である。EGFRのtyrosine kinase阻害剤であるgefitinibはBCRP阻害作用を持ち、またBCRPを発現する肺癌細胞などはgefitinibに耐性を示す。estrogenは生理的濃度でestrogen受容体陽性乳癌細胞のBCRP発現を抑制する。

A. 研究目的

本研究では、本研究では、抗がん剤耐性に関するABC輸送体P-糖タンパクとBCRPに焦点を当て、これらABC輸送体ががん細胞の抗がん剤感受性、抗がん剤の効果と副作用に及ぼす影響について解析する。ABC輸送体の活性阻害剤や発現抑制剤を探索・同定し、がん治療への応用に向けて開発を進める。ABC輸送体の活性阻害、発現抑制、さらに正常組織での発現を変化させる遺伝子多型により正常組織のABC輸送体の機能が低下することを示し、さらにその薬理学的効果を明らかにする。

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、ヒト乳癌細胞MCF-7、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（それぞれK562/BCRP、HCT-116/BCRPなどとよぶ）を作成した。BCRPの活性を阻害する化合物の検索には、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を細胞増殖阻害試験により検定した。また、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。BCRPによる被験物質の輸送活性の検定には、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側へ輸送された被験物質の定量を行った。また、被験物質の代謝物の定量にはTLCを用いた。

(倫理面への配慮)

特になし

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estrogenがK562/BCRPの薬剤耐性を克服することを示し、さらにBCRPはestrogenは輸送しないが硫酸抱合estrogenを輸送することを明らかにした。我々はまたphytoestrogen/flavonoidがBCRP阻害作用を持つことを見出した。genisteinはestrogenより数倍強いBCRP阻害活性を示した。また、LLC/BCRP細胞を用いたtranscellular transport assayにより、genisteinはestrogenとは異なりそれ自体でBCRPにより輸送されることを明らかにした。

gefitinibはEGFRのtyrosine kinaseの阻害剤であるが、我々はgefitinibが強いBCRP阻害作用を持つことを見出した。gefitinibに高感受性なヒト扁平上皮癌細胞A549、ヒト肺癌細胞PC-9にBCRP遺伝子を導入したA549/BCRP、PC-9/BCRPは8～10倍のgefitinib耐性を獲得した。よってBCRPはgefitinibの感受性規定因子である。

ヒト乳癌細胞MCF-7を生理的濃度のestrogen存在下で培養するとBCRPのタンパク発現が低下することを見出した。estrogenはMCF-7/BCRP細胞の外因性BCRPの発現も低下させた。このestrogenによるBCRPの発現抑制は抗estrogen剤により阻害を受ける、estrogen受容体依存性の反応であることが示された。

D. 考察

本研究により、種々の化合物がBCRP阻害作用を持つことが示された。genisteinは大豆に含まれるflavonoidであるが、数十グラム程度の大豆



の摂食によるgenisteinの血中濃度は、BCRP阻害作用を示すのに十分な濃度である。また、経口投与されたgefitinibの血中濃度もBCRP阻害作用を示すのに十分である。こうしたBCRP阻害性化合物はBCRPにより輸送される薬物・生理化合物の体内動態に影響すると考えられ、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。

#### E. 結論

genisteinなどのflavonoidはBCRP阻害作用を持ち、またそれ自身がBCRPによって輸送される基質である。EGFRのtyrosine kinase阻害剤であるgefitinibはBCRP阻害作用を持ち、またBCRPを発現する肺癌細胞などはgefitinibに耐性を示す。estrogenは生理的濃度でestrogen受容体陽性乳癌細胞のBCRP発現を抑制する。

#### F. 研究発表

（発表誌名巻号・頁・発行年等も記入）

1. Imai, Y., Tsukahara, S., Asada, S., and Sugimoto, Y. Phytoestrogens/flavonoids reverse breast cancer resistance protein/ABCG2-mediated multidrug resistance. *Cancer Res.*, 64: 4346-4352, 2004.
2. Yanase, K., Tsukahara, S., Asada, S., Ishikawa, E., Imai, Y., and Sugimoto, Y. Gefitinib reverses breast cancer resistance protein-mediated drug resistance. *Mol Cancer Ther.*, 3 :1119-1125, 2004.
3. Wang, X., Nitanda, T., Shi, M., Okamoto, M., Furukawa, T., Sugimoto, Y., Akiyama, S., and Baba, M. Induction of cellular resistance to nucleoside reverse transcriptase inhibitors by the wild-type breast cancer resistance protein. *Biochem. Pharmacol.*, 68: 1363-1370, 2004.
4. Imai, Y., Ishikawa, E., Asada, S., and Sugimoto, Y. Estrogen-mediated Post-transcriptional Down-regulation of Breast Cancer Resistance Protein/ABCG2. *Cancer Res.*, 65: 596-604, 2005.
5. Morita, H., Koyama, K., Sugimoto, Y., and Kobayashi, J. Antimitotic activity and reversal of breast cancer resistance protein-mediated drug resistance by

stilbenoids from *Bletilla striata*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 15: 1051-1054, 2005.

#### G. 知的財産等の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

分子標的の修飾に基づくがん治療最適化の研究

分担研究者 前原 喜彦 九州大学大学院 消化器・総合外科 教授

研究要旨

IGF-1R, HER2/Neu, VEGF-R, PDGF-RなどのチロシンキナーゼレセプターからのシグナルはPI3KおよびセカンドメッセンジャーであるPIP3を介してAKTに集約され、その結果、その下流の血管新生やアポトーシスの抑制などに関与するNF-kappaB, mTOR, Forkhead, Bad, GSK-3, MDM-2などのリン酸化が制御される。我々の検討では、AKTのリン酸化状態が多くの胃癌や乳癌で異常であることが明らかとなり、薬物治療におけるPTEN/AKT/PI3Kシグナル経路の重要性が次第にクローズアップされてきた。

A.研究目的

化学療法は高度進行癌における重要な治療手段であり、その感受性の正確な予測や新しい薬剤の開発は、常に重要な課題である。本研究では、消化器癌におけるAKT/PI3Kのシグナル経路の異常を系統的に解析し、PTEN/AKT/PI3Kシグナル経路を利用した消化器癌の新しい化学療法の基礎的検討を行なうことを目的とする。

B.研究方法

1.固形癌におけるAKT活性化の基礎的検討

a)胃癌、大腸癌などの臨床検体において、PTENの発現異常をプロモーターのメチル化、遺伝子変異などから検討する。

b)固形癌におけるAKTのリン酸化状態をリン酸化特異的な抗体を用いて検討する。

2.消化器癌細胞株におけるPTEN, AKT status とmTOR阻害剤の効果の検討

a)消化器癌細胞株20種を用いて、それぞれのPTENのLOHや遺伝子変異、プロモーターのメチル化などを検討する。

b)AKTの発現をWestern Blotting, 定量的RT-PCRなどで検討し、リン酸化の状態をリン酸化特異的抗体を用いて検討する。

c)AKT阻害剤、mTOR阻害剤の効果をそれぞれの

細胞株で検討し、a),b)の結果で得られたパネルと比較検討する。

d)AKT阻害剤と従来の抗癌剤の併用療法に関する基礎的検討:細胞株を用いて、in vitroで5-FUやCDDP, MMC, adriamycinなどをAKT阻害剤と併用し、その効果を検討する。

倫理面への配慮

平成15年以前に採取した臨床検体については、包括同意書を患者より得て検討を行なっている。また平成16年以降の臨床検体を用いる場合、また、前向き研究を行なう場合は、九州大学の倫理委員会に実験計画書を提出し、承認された上で検討を行なう予定である。

C.研究結果

PTENについて、胃癌、大腸癌、乳がんなどについて既に検討したところ、遺伝子変異はほとんど認められないにも関わらず、LOH(loss of heterozygosity)については胃癌、乳癌、大腸癌などで頻りに観察された(*J Gastrointest Hepatol*, in press)。胃癌ではPTENのLOHはp53に遺伝子変異をもつ癌で多いが、臨床病理学的な因子とは相関がないことが明らかとなった(*Cancer Lett*, in press)。また、胃癌においては、このLOHを生じている症例ではAKTのリン酸化が有為に多いことも明らかとなった(*Int J Cancer*, in press)。こ

のように消化器癌においては、PI3K/AKT 経路の活性化が癌の悪性度や薬剤感受性と関わっていることが明らかであり、このような癌では抗癌剤の感受性が低下していることが予測されている。実際、手術標本を用いたMTTアッセイの結果とAKTのリン酸化の状態を比較してみると、明らかにAKTのリン酸化が生じている群では従来消化器癌で用いられてきた5-FU, CDDP, MMCなどの抗癌剤の感受性が低下していた(*Int J Cancer*, in press)。大腸癌の場合は、胃癌のようにPTENのLOHとAKTのリン酸化が深く関わっておらず、AKTのリン酸化と抗癌剤感受性についても今のところ有意なデータは得られていない。乳癌ではHer2/neuの過剰発現があり、またPTENに異常をもつ癌では、AKTがリン酸化されており、かつホルモンレセプターの発現低下を認めるという非常に興味深い結果を得ている(投稿準備中)。

#### D. 考察

PI3K/AKT 経路によるアポトーシス抑制シグナルは、抗癌剤が誘導する細胞死に重要な役割を果たしていることが明らかにされている。AKTの持続的活性化には、PTENの機能異常が関係しているとされる。最近の研究は、AKTが下流のターゲットであるBadをリン酸化することにより細胞死を抑制すること、また、procaspase 9や転写制御因子のForkheadおよびNfκBなどの発現の誘導にも関わっていることも証明されている。我々の検討は特定の消化器癌において、このPTENの異常とAKTの活性化が従来の抗癌剤の抵抗性と関係していることを具体的に明らかにしており、AKTのリン酸化の評価による感受性予測が可能であることを示唆した。

#### E. 結論

我々の検討はPTENの異常とAKTの活性化が抗癌剤感受性と関係していることを明らかにしており、AKTのリン酸化の評価による感受性予測が可能であることを示唆した。海外においては、新しい分子標的薬剤として、AKT阻害剤とmTOR阻害剤が、血液疾

患をはじめとして既に臨床試験が進行中である。今回の結果は、これら薬剤の消化器癌における重要性に脚光を浴びせ、新しい癌治療法の開発に繋がる可能性がある。

#### G. 研究発表

論文発表

書籍

Shinya Oda

Microsatellite instability in human cancers: Its virtual and real images.

*Dynamical Genetics* 167-184, 2004.

Valerio Parisi Valeria De Fonzo Filippo Aluffi-Pentini  
Research Signpost (India)

Shinya Oda

Microsatellite instability in cancer: Assessment by high resolution fluorescent microsatellite analysis.

*Handbook of Immunohistochemistry and in situ Hybridization of Human Carcinomas* 55-63, 2004.

M. A. Hayat

Elsevier (USA)

雑誌

Shin-ichiro Maehara

Selenoprotein P, as a predictor for evaluating gemcitabine resistance in human pancreatic cancer cells.

*Int. J. Cancer* 112: 184-189, 2004.

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）  
分担研究報告書

分子標的薬物の効率的な臨床評価法に関する研究

分担研究者 南 博信（国立がんセンター東病院医長）

研究要旨

近年臨床導入される抗癌剤の多くは分子標的薬であるが、従来の薬物とは異なり分子標的薬の第I相試験では必ずしも副作用を指標にできるとは限らず、薬物の生物学的活性を評価する必要がある。Raf-1 キナーゼおよび VEGF 受容体チロシンキナーゼの阻害薬である BAY43-9006 の第I相試験において、腫瘍の代謝能を評価する PET を用いて薬物の生物学的活性を臨床評価し、従来の腫瘍縮小効果と比較検討した。その結果、腫瘍縮小を認めた症例や長期間病巣が増大しなかった症例では代謝能の低下を認め、PET による機能評価が本薬の臨床評価において有用である可能性が示唆された。

A. 研究目的

抗悪性腫瘍薬では薬物動態・薬力学の個人差が効果・副作用の個人差の原因となる。また分子標的薬剤では副作用と薬理活性が必ずしも相関せず、第I相試験において薬理活性を指標として薬物の投与量、スケジュールを設定する必要がある場合もある。分子標的薬の第I相試験において positron emission tomography (PET)により薬物の生物学的活性を評価し、分子標的薬の臨床評価における意義を検討することを目的とする。

B. 研究方法

癌細胞の糖代謝能を FDG-PET で定量的に評価するため standardized uptake value (SUV)を用いた。SUV は食事や血糖値、FDG 投与から撮像までの時間などに影響されるため、これらを一定の条件として PET を施行した。特に FDG 投与から撮像までの時間を 60 分に固定した。Raf-1 キナーゼおよび VEGF 受容体チロシンキナーゼの阻害薬である BAY43-9006 の第I相試験で治療を受けた各種がん

患者において、PET を施行し SUV を測定した。BAY43-9006 は連日 2 回経口投与し、治療開始前、開始 1, 2ヶ月後、および以後 2ヶ月毎に PET および CT を施行した。抗腫瘍効果判定は CT を用いて従来の方法により partial response (PR)、stable disease (SD)、progressive disease (PD)に分類した。PET による評価は測定した SUV の変化で行い、CT で評価した腫瘍の大きさの変化と比較した。SUV による効果判定は、EORTC から提唱されている 25%以上の SUV の低下を基準とした。

（倫理面への配慮）

BAY43-9006 の第I相試験、および分子標的治療薬の PET による評価の臨床研究の試験計画書をそれぞれ受託研究審査委員会、倫理審査委員会で審査の上承認を得た。さらに、第I相試験の性格、危険性などを患者に十分説明したのち、インフォームドコンセントの得られた患者のみを対象とした。