

厚生科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）
分担研究報告書

腫瘍特異的微小環境適応シグナル伝達を利用した抗がん剤の開発

分担研究者 順天堂大学医学部生化学第一講座 上野 隆

研究要旨 Kigamicin は、低酸素分圧・低栄養条件下で盛んに増殖する膵がんを低栄養条件下で選択的に細胞死に至らしめる抗生物質としてスクリーニングされた。低栄養下のアミノ酸再利用機構であるオートファジーに Kigamicin がどのような効果を及ぼすかを検討した。PANC-1、PaCa-2、Capan-1 の3つのヒト膵がん細胞に対して Kigamicin を 0.02-0.2 μ g/ml の濃度で24時間処理したところ、オートファゴソーム膜マーカーである LC3 や GABARAP のリン脂質結合反応を促進することを見出した。この効果は、対照として用いた SW480 や B16 メラノーマ細胞では見られなかった。

A. 研究目的

リソソーム経由自己タンパク分解系であるオートファジーは、栄養欠乏条件下で生体の自己タンパクを分解してアミノ酸を得、これをエネルギー源として再利用したり新たなタンパク合成に振り向ける機構である。

膵がんは、血管造成を誘導することなく、栄養や酸素供給が乏しい環境下でもさかんに増殖する特徴が有る。膵がんの生存・増殖の機構に自己タンパク分解機構であるオートファジー（自食作用）がどのように関わるかを明らかにする。

B. 研究方法

ヒト膵がんのクローンである PANC-1、Capan-1、PaCa-2、およびコントロールとして大腸がん（SW480）やメラノーマ（B16）を用い、Kigamicin のオートファジーに及ぼす影響を調べる目的で以下の3点について検討した。1）これらの細胞を富栄養条件あるいは栄養欠乏条件下にインキュベートし、長寿命

タンパク分解を測定し、タンパク分解が栄養欠乏条件下で促進されるかを調べる。2）オートファジーにおいて最も主要なステップであるオートファゴソーム形成に関わる LC3、GABARAP、GATE-16 のリン脂質結合型（LC3-II、GABARAP-II、GATE-16-II）の分布を明らかにする。3）低栄養条件下でこれらの膵がんクローンに選択的に細胞死を誘導する抗生物質である Kigamicin がタンパク分解や2）で述べたオートファゴソームマーカーにどのような影響を及ぼすか調べる。

C. 研究結果

1) 膵がんにおける長寿命タンパク分解

PANC-1、Capan-1、PaCa-2 細胞の長寿命タンパクを 14 C-leucine で標識し、その分解を測定した。タンパク分解は、低栄養条件下で有意に促進され、リソソームプロテアーゼ阻害剤である E64d や pepstatin によって阻害された。しかし、オートファジーの古典的阻害剤である 3-methyladenine は、PaCa-2 のタンパ

ク分解を有意に抑えたが、他の細胞については阻害効果は非常に小さかった。

2) 膵がんクローンにおける Atg8 ホモログの発現と Kigamicin の影響

イムノプロットにより PANC-1、Capan-1、Paca-2 では、オートファゴソーム膜マーカーである Atg8 の哺乳動物ホモログ LC3、GABARAP、GATE-16 が多く発現していることが明らかになった。LC3 は、脂質化された (lipidated) II 型が多く、GABARAP や GATE-16 は可溶性の I 型が多かった。また、E64d および pepstatin 存在下に LC3-II と GABARAP-II の蓄積が促進されたことから、少なくとも LC3 と GABARAP はオートファゴソームに動員され、リソソームでターンオーバーを受けていることが判明した。

膵がんクローンでは、Kigamicin 処理によって LC3 と GABARAP のレベルが有意に増加し、Kigamicin はオートファゴソーム形成を促進する働きを持つことが示唆された。一方、対照として用いた SW480 やメラノーマ細胞では、LC3 や GABARAP の脂質化 (lipidation) 促進は見られなかった。

D. 考察

PANC-1、Capan-1、PaCa-2 の3つの膵がんクローンのオートファジーは、富栄養条件下でもある程度の高いレベルで維持されている点で肝細胞とは異なった特色を示す。

Kigamicin の作用ががんによって異なること、特に膵がんについては、オートファゴソーム膜マーカーである LC3 と GABARAP の脂質化を促進することは、Kigamicin の膵がんに対する選択毒性にオートファジーの促進が関係し

ていることを示唆している。オートファジー促進と細胞死との関係についてさらに調べたい。

E. 結論

膵がんの3つのクローン (PANC-1、Capan-1、Paca-2) では、オートファゴソーム膜マーカーとしてオートファゴソーム膜形成に必須な役割を担う Atg8 ホモログ、すなわち LC3、GABARAP、GATE-16 がよく発現し、オートファジーが盛んに起こることを示唆した。これらの細胞に対して Kigamicin は濃度依存的にこれらのマーカーの脂質化を促進する。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

1: Tanida I, Ueno T, Kominami E. Human light chain 3/MAP1LC3B is cleaved at its carboxyl-terminal Met121 to expose Gly120 for lipidation and targeting to autophagosomal membranes. *J Biol Chem.* 279: 47704-14770, 2004

2: Jager S, Bucci C, Tanida I, Ueno T, Kominami E, Saftig P, Eskelinen EL. Role for Rab7 in maturation of late autophagic vacuoles. *J Cell Sci.* 117: 4837-4848, 2004

3: Tanida I, Ueno T, Kominami E. LC3 conjugation system in mammalian autophagy. *Int J Biochem Cell Biol.* 36: 2503-2518, 2004

4: Kouno T, Mizuguchi M, Tanida I, Ueno T, Kominami E, Kawano K. ^1H , ^{13}C , and ^{15}N

resonance assignments of human microtubule-associated protein light chain-3. *J Biol Chem.* 279: 415-416, 2004

5: Tanida I, Sou YS, Ezaki J, Minematsu-Ikeguchi N, Ueno T, Kominami E. HsAtg4B/HsApg4B/autophagin-1 cleaves the carboxyl termini of three human Atg8 homologues and delipidates microtubule-associated protein light chain 3- and GABAA receptor-associated protein-phospholipid conjugates. *J Biol Chem.* 279: 36268-36276, 2004

6: Komatsu M, Chiba T, Tatsumi K, Iemura S, Tanida I, Okazaki N, Ueno T, Kominami E, Natsume T, Tanaka K. A novel protein-conjugating system for Ufm1, a ubiquitin-fold modifier. *EMBO J.* 23: 19771-19786, 2004

2. 学会発表

1. 谷田以誠、曾友深、江崎淳二、上野隆、木南英紀 HsAtg4B/HsApg4B/autophagin-1 はシステインプロテアーゼであると共に、LC3-PL と GABARAP-PL conjugate の脱脂質化酵素である。第77回日本生化学大会、*生化学* 76: 945, 2004

2. 上野隆、谷田以誠、小松雅明、谷田恵美子、木南英紀 オートファジーに必須な Atg12 および Atg5 の不安定性について。第77回日本生化学大会、*生化学* 76: 945, 2004

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

無し

2. 実用新案登録

無し

3. その他

無し

厚生科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）

分担研究報告書

臨床的ゲノム情報に基づいた抗がん剤の開発

分担研究者 門田守人 大阪大学大学院医学系研究科病態制御外科 教授

研究要旨

ヒト全遺伝子対応型のマイクロアレイを用いて、腫瘍周囲の微小環境の中で特に腫瘍血管を標的とした新規治療法の開発を行う。

A. 研究目的

近年、血管障害薬である抗 VEGF 抗体と抗癌剤との組み合わせが進行・再発大腸癌の生存率向上に寄与することが示され、腫瘍周囲の微小環境が癌の進展に重要と認識されてきた。本研究では大腸癌肝転移巣の腫瘍血管を標的として、新規血管新生遺伝子探索と、血管周皮細胞・内皮細胞の interaction 障害との両面から新しい治療法、並びに抗癌剤の開発を目的とする。

B. 研究方法

1. 腫瘍血管新生には低酸素状態で誘導される VEGF や Ang2 が関与する。細胞培養では低酸素の強度や暴露時間により遺伝子群は著しく変化し、生体の低酸素状態との compatibility が不明である。大腸癌の肝転移巣は非常に近似した癌細胞集団であるにもか

かわらず、腫瘍辺縁部と中心部で腫瘍血流分布のみが大きく異なった特殊な組織環境である。両者の差をヒトの 3 万遺伝子を搭載した Microarray で抽出し肝転移巣の低酸素状態で発現誘導される新規遺伝子を同定することで、実際に生体の腫瘍血管新生に関与する遺伝子候補が決定される。これを低酸素培養した細胞を用いて RT-PCR で screening する。2. 腫瘍血管は Angiopoietin 2 による血管周皮細胞の乖離と VEGF による内皮細胞の増殖により伸長する。VEGF 抗体は血管新生を障害するがすでに血管構築ができあがった大腫瘍では腫瘍抑制効果が乏しい点が問題とされている。しかし、ある種の膵内分泌腫瘍では周皮細胞抑制によって血管が壊死に陥り抗腫瘍効果があるという。そこで、周皮細胞を標的とした治療効果を動物モデルで検討する。

(倫理面への配慮)

Microarray については学内倫理委員会の承認を得ており、動物実験については動物実験委員会承認を得ている。

C. 研究結果

1. Perfusion CTでは肝転移巣の血流は外縁で豊富であるが中心に向かうにつれ減少した。低酸素誘導遺伝子マーカーとして HIF-1, VEGF, CA9(carbonic anhydrase), Glut-1 の染色を行い、血管分布(CD34 染色)との関連を検討した(肝転移巣パラフィン切片、N=14)。VEGF と CA9 が乏血管領域の癌細胞で発現が亢進していた。特に CA-9 は乏血管領域の中に血管がわずかでもあると近傍の腫瘍細胞は発現を失い、低酸素の鋭敏なマーカーと考えられた。Microarray 解析のために RNA レベルで同様の事を検討中である。

2. 培養上清中に高い VEGF 分泌を示す DLD1 を利用しヌードマウスに皮下腫瘍を作成した。抗 VEGF 抗体、周皮細胞の PDGF receptor beta の阻害剤となる Gleevec を腹腔内投与し、6 週後に評価した結果、抗 VEGF 抗体 200・g x4 回投与で僅かに腫瘍抑制がみられたが、通常量(100・g)や Gleevec では変化が無かった。腫瘍は組織学的にコントロール群でも壊死部分が大半を占め血管も僅かしか認めなかった。次に大腸癌肝高転移株で

ある KM12sm をヌードマウスに脾注し、5 週後に肝転移巣を調べると、周皮細胞を伴う血管内皮細胞が豊富に観察され本研究のよいモデルが得られた。周皮細胞阻害には、他に、Ang1, Ang2 の受容体 TIE2 の阻害ペプチド 2 種類(BBRC2004, EMBO2004) に HIV-associated delivery peptide(Science1999) を接合したものを合成中である。さらに Ang-2 中和抗体(Cancer cell2004)を amgen 社に依頼中である。

D. 考察

1. ある報告では血管から 8 μ m 離れると腫瘍細胞は低酸素状態に陥るとされるが、その実際は組織により様々である。肝転移巣の低酸素細胞を抽出には血管を目安にするが実際に腫瘍細胞が低酸素状態にあるかどうかを判断する指標として CA-9 が有用である。2. これまでに肝転移巣の血管新生に VEGF と Ang2 の両者が重要であることを報告した(Hepatology2004)。VEGF 抗体はすでに臨床化されているが、最近の Cancer cell で待望の Ang-2 中和抗体が開発され動物レベルではあるが抗腫瘍効果を示したことは画期的である。内皮細胞を標的にした場合の肝転移巣における抗腫瘍効果を引き続き検討したい。

E. 結論

大腸癌肝転移は再発形式の中で最も高頻度であり、患者予後の規定因子である。腫瘍周辺の微小環境中の腫瘍血管を標的とした治療の機序は不明点も多いが、1. 中期課題、2. 短期課題の両面からアプローチしてゆくことで本研究の結果が新しい治療に繋がる可能性がより高くなると考える。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Bazarragchaa D., Nagano H., Kondo M., Yamamoto H., Hiraoka N., Yamamoto T., Marubashi S., Miyamoto A., Umeshita K., Dono K., Nakamori S., (Wakasa K.), Sakon M., Monden M.: Expression of Id proteins in human hepatocellular carcinoma: Relevance to tumor dedifferentiation. *Int J Oncol* 26, 319-327, 2005.

Hayashi N., Nakamori S., Okami J., Nagano H., Dono K., Umeshita K., Sakon M., (Narimatsu H.), Monden M.: Association between expression levels of CA 19-9 and N-Acetylglucosamine- $f\Delta$ 1, 3-Galactosyltransferase 5 gene in human pancreatic cancer tissue. *Pathobiology* 71, 26-34, 2004.

Yamamoto S., Nakamori S., Tsujie M., Takahashi Y., Nagano H., Dono K., Umeshita K., Sakon M., (Tomita Y.), (Hoshida Y.), (Aozasa K.), (Kohno K.), Monden M.: Expression of uridine diphosphate

N-Acetyl- $f\Delta$ -D-Galactosamine:

Polypeptide N-Acetylgalactosaminyl transferase 3 in adenocarcinoma of the pancreas. *Pathobiology* 71, 12-18, 2004.

Xu Xundi., Sakon M., Nagano H., Hiraoka N., Yamamoto H., Hayashi N., Dono K., Nakamori S., Umeshita K., (Ito Y.), Matsuura N., Monden M.: Akt2 expression correlates with prognosis of human hepatocellular carcinoma. *Oncology Reports* 11, 25-32, 2004.

Hayashi N., Nakamori S., Hiraoka N., Tsujie M., Xundi Xu., (Takano T.), (Amino N.), Sakon M., Monden M.: Antitumor effects of peroxisome proliferator activate receptor $f\Delta$ ligands on anaplastic thyroid carcinoma. *International Journal of Oncology* 24, 89-95, 2004.

Aoki T., Miyamoto A., Marubashi S., Nagano H., Umeshita K., Fujiwara Y., Dono K., Nakamori S., Sakon M., Monden M.: Clinical value of alterations in p73 gene, related to p53 at 1p36, in human hepatocellular carcinoma. *International journal of oncology* 24,

441-446, 2004.

Takahashi Y., (Hamada J.), (Murakawa K.), (Takada M.), (Tada M.), (Nogami I.), Hayashi N., Nakamori S., Monden M., (Miyamoto M.), (Moriuchi T.): Expression profile of 39 HOX genes in normal human adult organs and anaplastic thyroid cancer cell lines by quantitative real-time RT-PCR system. *Experimental Cell Research* 293, 144-153, 2004.

Ogawa M., Yamamoto H., Nagano H., Miyake Y., Sugita Y., Hata T., (Kim B.), Ngan C., Damdinsuren B., Ikenaga M., Ikeda M., Ohue M., Nakamori S., Sekimoto M., Sakom M., Monden M.: Hepatic expression of ANG2 RNA in metastatic colorectal cancer. *Hepatology* 39(2), 529-539, 2004.

Yoshida K., Monden M., (Nakamura Y.), (Arakawa H.): Adenovirus-mediated p53AIP1 gene transfer as a new strategy for treatment of p53-resistant tumors. *Cancer Sci* 95(1), 91-97, 2004.

Yamamoto S., Tomita Y., (Hoshida Y.), Nagano H., Dono K., Umeshita K., Sakon M., (Ishikawa S.), (Ohigashi H.), Nakamori S., Monden M., (Aozasa K.): Increased expression of valosin-containing protein (p97) is associated with lymph node metastasis and prognosis of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Annals of Surgical*

Oncology 11(2), 165-172, 2004.

Mori T., Fujiwara Y., Sugita Y., Azama T., Ishii T., Taniguchi K., Yamazaki K., Takiguchi S., Yasuda T., Yano M., Monden M.: Application of molecular diagnosis for detection of peritoneal micrometastasis and evaluation of preoperative chemotherapy in advanced gastric carcinoma. *Annals of Surgical Oncology* 11(1), 14-20, 2004.

Kurokawa Y., (Matoba R.), Takemasa I., Nakamori S., Tsujie M., Nagano H., Dono K., Umeshita K., Sakon M., (Ueno N.), (Kita H.), (Oba S.), (Ishii S.), (Kato K.), Monden M.: Molecular features of non-B, non-C hepatocellular carcinoma: a PCR-array gene expression profiling study. *Journal of Hepatology* 39, 1004-1012, 2003.

Kobayashi S., (Hori M.), Dono K., Nagano H., Umeshita K., Nakamori S., Sakon M., Osuga K., (Umetani K.), (Murakami T.), (Nakamura H.), Monden M.: In vivo real-time microangiography of the liver in mice using synchrotron radiation. *Journal of Hepatology* 40, 405-408, 2004.

Yamamoto S., Tomita Y., (Hoshida Y.), (Morooka T.), Nagano H., Dono K., Umeshita K., Sakon M., (Ishikawa O.), (Ohigashi H.), Nakamori S., Monden M., (Aozasa K.): Prognostic significance of activated akt expression in pancreatic

- ductal adenocarcinoma. *Clinical Cancer Research* 10, 2846-2850, 2004.
- Murakami T., (Hori M.), (Kin T.), Hashimoto K., Dono K., Hayashi S., (Sugihara E.), Nagano H., (Sase S.), Sakon M., Monden M., (Nakamura H.): Xenon-inhalation computed tomography for noninvasive quantitative measurement of tissue blood flow in hepatocellular carcinoma. *Investigative Radiology* 39(4), 211-215, 2004.
- Yamamoto S., Tomita Y., (Hoshida Y.), (Iizuka N.), (Kidogami S.), Miyata H., Takiguchi S., Fujiwara Y., Yasuda T., Yano M., Nakamori S., Sakon M., Monden M., (Aozasa K.): Expression level of valosin-containing protein (p97) is associated with prognosis of esophageal carcinoma. *Clinical Cancer Research* 10, 5558-5565, 2004.
- Yamamoto S., Tomita Y., (Hoshida Y.), (Iizuka N.), Marubashi S., Miyamoto A., Nagano H., Dono K., Umeshita K., Nakamori S., Sakon M., (Aozasa K.), Monden M.: Intersitial pneumonia induced by combined intraarterial 5-fluorouracil and subcutaneous interferon- γ therapy for advanced hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol* 39, 793-797, 2004.
- Takiguchi S., Sekimoto M., Fujiwara Y., Yasuda T., Yano M., (Hori M.), Murakami T., Nakamura H., Monden M.: Laparoscopic lymph node dissection for gastric cancer with intraoperative navigation using three-dimensional angio computed tomography images reconstructed as laparoscopic view. *Surgical Endoscopy* 18, 106-110, 2004.
- Takiguchi S., Sekimoto M., Fujiwara Y., Yasuda T., Yano M., Monden M.: Laparoscopic intragastric surgery for gastric tube cancer following esophagectomy. *Surgical Endoscopy* 17(8), 1323-1324, 2003.
- Ishitobi M., Tamaki Y., Yamamura J., Miyoshi Y., Monden M., (Noguchi S.): Bilateral breast metastases of medullary thyroid cancer. *The Breast Journal* 10(2), 162-, 2004.
- Ishitobi M., Miyoshi Y., Hasegawa S., Egawa C., Tamaki Y., Monden M., (Noguchi S.): Mutational analysis of BARD1 familial breast cancer patients. *Cancer Lett* 200, 1-7, 2003.
- Ishitobi M., Miyoshi Y., Egawa C., Tamaki Y., Monden M., (Noguchi S.): Association of BRCA2 polymorphism at codon 784 (Met / Val) with breast cancer risk and prognosis. *Clinical Cancer Research* 9, 1376-1380, 2003.
- Takayama O., Yamamoto H., Ikeda K., (Ishida H.), (Kato T.), (Okuyama M.), (Kanou T.), (Fukunaga M.), (Tominaga S.), (Morita S.), Fujie Y., Fukunaga H., Ikenaga M., Ikeda M., Ohue M.,

- Sekimoto M., Kikkawa N., Monden M.: Application of TR-PCR to clinical diagnosis of micrometastasis of colorectal cancer: A translational research study. *International Journal of Oncology* 25, 597-604, 2004.
- Kurokawa Y., Matoba R., Hiroaki N., Sakon M., Takemasa I., Nakamori S., Dono K., Umeshita K., Ueno N., Ishii S., Kato K., Monden M.: Molresular Prediction of Response to 5-Fluorouracil and Interferon- γ Combination Chemotherapy on Advanced Hepatocellular Carcinoma. *Clinical Cancer Research* 10, 6029-6038, 2004.
- Kurokawa Y., Matoba R., Takemasa I., Nagano H., Dono K., Nakamori S., Umeshita K., Sakon M., Ueno N., Oba S., Ishii S., Kato K., Monden M.: Molecular-based prediction of early recurrence in hepatocellular carcinoma. *Journal of Hepatology* 41, 284-291, 2004.
- Aritake N., Tamaki Y., Masuda N., Nakano Y., Monden T., Noguchi S., Monden M.: High expression of two genes selected by iAFLP: A new prognostic factor of estrogen receptor-positive breast cancer. *Oncology Reports* 12, 381-387, 2004.
- Sugita Y., Wada H., Fujita S., Nakata T., Sato S., Noguti Y., Achim A., Jungluth., Yamaguti M., Yao-Tseng Chen., Elisabeth Stockert., Sacha Gnjatic., Barbara Williamson., Matthew J. Scanlan., Ono T., Sakita I., Yasui M., Miyoshi Y., Tamaki Y., Matuura N., Noguti S., Lloyd J. Old., Nakayama E., Monden M.: NY-ESO-1 Expression and Immunogenicity in Malignant and Benign Breast Tumors. *Cancer Res* 64, 2199-2204, 2004.
- Kurokawa Y., Matoba R., Nakamori S., Takemasa I., Nagano H., Dono K., Umeshita M., Monden K., Kato K.: PCR-array Gene Expression Profiling of Hepatocellular Carcinoma. *J. Exp. Clin. Cancer Res* 23(1), 135-141, 2004.
- Fushimi R., Hanamura R., Takashina M., Noguchi S., Nakata S., Monden M.: Überprüfung des Reinigungserfolgs bei wiederverwendbaren chirurgischen Instrumenten mit Protect. *Zentr Steril* 12(1), 171-180, 2004.
- Takahashi H., Oda T., Hasebe T., Aoyagi Y., Konoshita T., Konishi M., Nakagohri T., Inoue K., Takahashi S., Kawahira H., Monden M., Ochiai A.: Biologically Different Subgroups of Invasive Ductal Carcinoma of the Pancreas: Dpc4 Status According to the Ratio of Intraductal Carcinoma Components. *Clinical Cancer Research* 10, 3772-3779, 2004.
- Oji Y., Nakamori S., Fujiwara M., Nakatsuka S., Yokota A., Tatsumi N., Abeno S., Ikebe A., Takashima S., Tsujie M., Yamamoto H., Sakon M., Nezu R.,

- Kawano K., Nishida S., Ikegame K., Kawakami M., Tsuboi A., Oka Y., Yoshikawa K., Aozasa K., Monden M., Sugiyama H.: Overexpression of the Wilms'tumor gene WT1 in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Sci* 95(7), 583-587, 2004.
- Yamamoto S., Tomita Y., Nakamori S., Hoshida Y., Iizuka N., Okami J., Nagano H., Dono K., Umeshita K., Sakon M., Ishikawa O., Ohigashi H., Aozasa K., Monden M.: Valosin-Containing Protein(p97) and Ki-67 Expression Is a Useful Marker in Detecting Malignant Behavior of Pancreatic Endocrine Neoplasms. *Oncology* 66, 468-475, 2004.
- Yano M., Yasuda T., Fujiwara Y., Takiguchi S., Miyata H., Monden M.: Preoperative Intraperitoneal Chemotherapy for Patients With Serosa-Infiltrating Gastric Cancer. *J Surg Oncol* 88, 39-43, 2004.
- Fujita S., Wada H., Achim A., Jungbluth., Sato S., Nakata T., Noguchi Y., Doki Y., Yasui M., Sugita Y., Yasuda T., Yano M., Ono T., Yao-Tseng Chen., Higashiyama M., Sacha Gnjatich., Lloyd J.Old., Nakayama E., Monden M.: NY-ESO-1 Expression and Immunogenicity in Esophageal Cancer. *Clinical Cancer Research* 10, 6551-6558, 2004.
- Oji Y., Yano M., (Nakano Y.), (Abeno S.), Nakatsuka S., (Ikeba A.), Yasuda T., Fujiwara Y., Takiguchi S., Yamamoto H., Fujita S., (Kanato K.), (Ito K.), (Jomgeow T.), (Kawakami M.), (Tsuboi A.), (Shirakata T.), (Nishida S.), (Hosen N.), (Oka Y.), (Aozasa K.), Monden M., (Sugiyama H.): Overexpression of the Wilms' tumor gene WT1 in esophageal cancer. *Anticancer Research* 24, 3103-3108, 2004.
- Komori T., Takemasa I., Higuti H., Yamasaki M., Ikeda M., Yamamoto H., Ohue M., Nakamori S., Matsubara K., Monden M.: Identification of Differentially Expressed Genes Involved in Colorectal Carcinogenesis Using a cDNA Microarray. *J.Exp.Clin.Cancer Res.* 23(3), 521-527, 2004.
- Sakon M., Ajay K.Kakka., Ikeda M., Sekimoto M., Nakamori S., Yano M., Monden M.: Current Status of Pulmonary Embolism in General Surgery in Japan. *Surgery Today* 34, 805-810, 2004.
- Kanoh T., Monden T., Tamaki Y., Ohnishi Tadashi., Ikeda K., Izawa H., Sekimoto M., Tomita N., Monden M.: Extraction and Analysis of Carcinoembryonic Antigen in Lymph Nodes. A New Approach to the Diagnosis of Lymph Node Metastasis of Colorectal Cancer. *Dis Colon Rectum* 45(6), 757-763, 2004.
- Takahashi H., Yano H., Monden M., Kinoshita T.: Hand-assisted laparoscopic

- splenectomy for solitary splenic metastasis from uterine corpus carcinoma.. *Surg Endosc* 18(2), 346-2004.
- Takahashi H., Konishi M., Nakagohri., Inoue K., Takahashi S., Tanizawa Y., Monden M., Kinoshita T.: Aggressive multimodal treatment for peritoneal dissemination and needle tract implantation of hepatocellular carcinoma:a case report.. *Jpn J Clin Oncol.* 34(9), 551-555, 2004.
- Sese J., Kurokawa Y., Monden M., Kato K., Morishita S.: Constrained clusters of gene expression profiles with pathological features. *Bioinformatics* 20(17), 3137-3145, 2004.
- Takahashi H., Oda T., Hasebe T., Aoyagi T., Kinoshita T., Konishi M., Nakagohri T., Inoue K., Takahashi S., Kawahira H., Monden M., Ochiai A.: Biologically Different Subgroups of Invasive Ductal Carcinoma of the Pancreas:Dpc4 Status According to the Ratio of Intraductal Carcinoma Components. *Clinical Cancer Research* 10, 3772-3779, 2004.
- Yamamura J., Miyoshi Y., Tamaki Y., (Taguchi T.), (Iwao K.), Monden M., (Kato K.), Noguchi S.: mRNA expression level of estrogen-inducible gene, alpha 1-antichymotrypsin, is a predictor of early tumor recurrence in patients with invasive breast cancers.. *Cancer Sci.* 95(11), 887-892, 2004.
- Marubashi S., Sakon M., Nagano H., Gotoh K., Hashimoto K., Kubota M., Kobayashi S., Yamamoto S., Miyamoto A., Dono K., Nakamori S., Umeshita K., Monden M.: EFFECT OF PORTAL HEMODYNAMICS ON LIVER REGENERATION STUDIED IN A NOVEL PORTOHEPATIC SHUNT RAT MODEL. *Surgery* 136(5), 1028-1037, 2004.
- Yasuda T., Yano M., Miyata H., Higuchi I., Matsuyama J., Makari Y., Takiguchi S., Fujiwara Y., Monden M.: The new strategy in multidisciplinary treatment of advanced esophageal squamous cell carcinoma (SCC) using FDG-PET (positron emission tomography) diagnosis. *Diseases of the Esophagus* 17(Suppl 1), 138-139, 2004.
- Yamamoto T., Nagano H., Sakon M., Wada H., Egishi H., Kondo M., Damdinsuren B., Ota H., Nakamura M., Marubashi S., Miyamoto A., Dono K., Umeshita K., Makamori S., Yagita H., Monden M.: Partial Contribution of Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand(TRAIL)/TRAIL Receptor Pathway to Antitumor Effects of Interferon- γ /5-Fluorouracil against Hepatocellular Carcinoma. *Clinical Cancer Res* 10, 7884-7895, 2004.

Doki Y., Monden M.: Can metallothionein be a useful molecular marker for selecting hepatocellular carcinoma patients for platinum-based chemotherapy?. J Gastroenterol 39, 1228-1229, 2004.

Tono T., Kanoh T., Ohnishi T., Matsushita M., Nakano Y., Kimura Y., Iwazawa T., Yano H., Okamura J., Monden T.: Adjuvant Hepatic Arterial Infusion After Curative Resection of Colorectal Liver Metastases Using Removable Intra-Arterial Catheters With Shape-Memory Alloy. J Surg Oncol 88, 248-255, 2004.

Tono T., Iwazawa T., Matsui S., Yano H., Kimura Y., Kanoh T., Ohnishi T., Nakano Y., Okamura J., Monden T.: Hepatic Arterial Infusion of Paclitaxel for Liver Metastasis from Gastric Cancer. CANCER INVESTIGATION 22(4), 550-554, 2004.

Takiguchi S., Sekimoto M., Hiroshi M., Fujiwara Y., Yasuda T., Yano M., Hori M., Murakami T., Nakamura H., Monden M.: Real Time Nabigation Surgery Using 3D CT in Laparoscopic Gastric Surgery. 9th World Congress of Endoscopic Suegery , 69-76, 2004.

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・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（対がん戦略研究事業）

分担研究報告書

腫瘍脈管構築に基づくがん化学療法の開発

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

研究要旨 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シスプラチン（CDDP）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CDDPを集積させることにある。そして、CDDP内包ミセル体(CDDP/m)がどのような臨床上的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週齢の雌SDラットにCDDPおよびCDDP/mを換算5mg/kg単回尾静脈投与を行い48時間にわたり血中プラチナ濃度を測定した。そして両者のまた各種薬学的を比較した。

2) 抗腫瘍効果 6週齢の雌Balb/c nu/nuヌードマウスの背部皮下にMKN-45ヒト胃がん細胞株 1×10^6 個を

移植し、腫瘍径が5-8mmサイズになったところで、CDDPおよびCDDP/mをCDDP換算5mg/kg、2.5mg/kg、0.5mg/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CDDPおよびCDDP/mをCDDP換算2mg/kg週1回、計11回尾静脈投与を行った。投与終了後熱刺激感受性、座骨神経の感覚神経伝導速度、病理所見、ICP-MSによるプラチナ蓄積性をみた。

C. 研究結果

1) ミセル体のCDDP/mは著明に血中半減期がのびて血漿中AUCはCDDPに比べ65倍以上高くなった。

2) 抗腫瘍効果においては、2.5mg/kg投与群においてコントロールと比べ

CDDP/m は有意に優っていたのに対し CDDP はコントロールと有意差は無かった。5mg/kg 投与群においては CDDP、CDDP/m ともコントロールより有意に優っていた。ただし両投与群において CDDP と CDDP/m に統計的有意差はなかった。

3) コントロール、CDDP、CDDP/m 投与動物における sensory nerve conduction velocity (SNCV)は、それぞれ 42.86 ± 8.07 , 35.48 ± 4.91 , 43.74 ± 5.3 m/s であった。CDDP/m 投与動物では、コントロールと比較して SNCV の遅延を認めなかった。一方、CDDP 投与動物は CDDP/m 投与動物よりも有意に SNCV が遅延していた ($P < 0.05$)。加えて、電子顕微鏡観察による病理学的検討において、CDDP 投与動物の坐骨神経では、Microtubules の消失、Schwann 細胞質内の変性像、Filament の消失、Inner roop の不整といった変性像が有髄神経の約 80%に認められた。一方、CDDP/m 投与動物では殆どコントロールと同様であった。坐骨神経内のプラチナ濃度の ICP-MS 分析の結果では、CDDP、CDDP/m 投与動物における坐骨神経内のプラチナ濃度は、それぞれ 827.2 ± 291.3 , 395.5 ± 73.1 Pt ng/g tissue であり、CDDP/m が有意に低かった

D. 考察

本研究の結果から CDDP 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 CDDP/m のサイズが径 30 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。抗腫瘍効果においては CDDP/m が CDDP を上回る傾向があったが有意な差はなかった。少なくともミセル内包化により抗腫瘍効果が定価することは無かった。また CDDP/m 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、CDDP による神経障害がミセル化により減少したと考えられる。

E. 結論

CDDP/m は CDDP に比べ優れた血中安定性を示した。抗腫瘍効果は同等であった。抗腫瘍効果は容量依存性であった。また CDDP/m は CDDP 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 CDDP/m の臨床試験を行うべきと考える。

G. 研究発表
論文発表

1. Y. Matsumura, M. Gotoh, K. Muro, Y. Yamada, K. Shirao, Y. Shimada, M. Okuwa, S. Matsumoto, Y. Miyata, H. Ohkura, K. Chin, S. Baba, T. Yamao, A. Kannami, Y. Takamatsu, K. Ito, K. Takahashi. Phase I and Pharmacokinetic Study of MCC-465, a doxorubicin (DXR) encapsulated in PEG-immunoliposome, in patients with metastatic stomach cancer. *Annals Oncol* 15:517-525, 2004.
2. W. Koizumi, S. Tanabe, K. Saigenji, A. Ohtsu, F. Nagashima, K. Shirao, Y. Matsumura, M. Gotoh. Phase I/II study of S-1 combined with cisplatin in patients with advanced gastric cancer. *British Journal of Cancer*. 89, 2207-2212, 2004.
3. T. Hamaguchi, Y. Matsumura, Y. Nakanishi, K. Muro, Y. Yamada, Y. Shimada, K. Shirao, H. Niki, S. Hosokawa, T. Tagawa, T. Kakizoe. Antitumor effect of MCC-465, pegylated liposomal doxorubicin tagged with newly developed monoclonal antibody GAH, in colorectal cancer xenografts. *Cancer Science*. 95: 608-613, 2004.
4. T. Okusaka, Y. Matsumura, K. Aoki. New approaches for pancreatic cancer in Japan. *Cancer Chemother Pharmacol*. 54: 78-82, 2004.
5. Y. Matsumura, T. Hamaguchi, T. Ura, K. Muro, Y. Yamada, Y. Shimada, K. Shirao, T. Okusaka, H. Ueno, M. Ikeda, N. Watanabe. A phase I clinical trial and pharmacokinetic evaluation of NK911, a micelle-encapsulated doxorubicin. *British Journal of Cancer* 91:1775-1781, 2004.
6. Younsoo Bae, Nobuhiro Nishiyama, Shigeto Fukushima, Hiroyuki Koyama, Matsumura Yasuhiro, Kazunori Kataoka. Preparation and biological characterization of polymeric micelle drug carriers with intracellular pH-Triggered Drug Release property: tumor permeability, controlled subcellular drug distribution, and enhanced in vivo antitumor efficacy. *Bioconjugate Chem.* 2005, 16:122-130.
7. NK105, a paclitaxel-incorporating micellar nanoparticle formulation, can extend in vivo antitumor activity and reduce the neurotoxicity of paclitaxel. T. Hamaguchi¹, Y. Matsumura, M. Suzuki, K. Shimizu, R. Goda, I. Nakamura³, I. Nakatomi, M. Yokoyama, K. Kataoka and T. Kakizoe. *British Journal of Cancer*. 2005 (In press)

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
Tanaka M., et al.	Mitochondrial genome single nucleotide polymorphisms and their phenotypes in the Japanese	Lee H.-K., DiMauro, S. Tanaka M., and Wei Y.-H.	Mitochondrial Pathogenesis From Genes and Apoptosis to Aging and Disease	The New York Academy of Sciences	New York	2004	1011: 7-20
Ueno, T., et al.	Autophagy and neuromuscular diseases	Daniel J. Klionsky	Autophagy	Landes Bioscience	Austin, USA	2004	264-286

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kusakai G., <u>Esumi H.</u> , et al.	ARK5 Expression in Colorectal Cancer and Its Implications for Tumor Progression.	Am J Pathol	164(3)	987-995	2004
Suzuki A., <u>Esumi H.</u> , et al.	ARK5 is a Tumor Invasion-Associated Factor Downstream of Akt Signaling.	Mol Cell Biol	24(8)	3526-3535	2004
Nomura S., <u>Esumi H.</u> , et al.	Analysis of Promotor Region of X-Linked pgk-1 Gene Polymorphisms: Evidence for Polyclonality of Adult Mouse Gastric Glands.	Dig Dis Sci	49(2)	218-223	2004
Lu J., <u>Esumi H.</u> , et al.	Kigamicin D, a novel anticancer agent based on a new anti-austerity strategy targeting cancer cells' tolerance to nutrient starvation.	Cancer Science	95(6)	547-552	2004
Kusakai G., <u>Esumi H.</u> , et al.	Strong Association of ARK5 with Tumor Invasion and Metastasis.	J Exp Clin Cancer Res	23(2)	263-268	2004
Yoshitake J., <u>Esumi H.</u> , et al.	Nitric Oxide as an Endogenous Mutagen for Sendai Virus without Antiviral Activity.	J. Virol	78(16)	8709-8719	2004

<u>Esumi H., et al.</u>	Antitumor Activity of Pyrvinium Pamoate, 6-(Dimethylamino)-2-[2-(2,5-dimethyl-1-phenyl-1H-pyrrol-3-yl)ethenyl]-1-methyl-quinolinium Pamoate Salt, Showing Preferential Cytotoxicity during Glucose Starvation.	Cancer Sci	95(8)	685-690	2004
Suzuki A., <u>Esumi H., et al.</u>	Regulation of Caspase-6 and FLIP by The AMPK Family Member ARK5.	Oncogene	23	7067-7075	2004
Suzuki A., <u>Esumi H., et al.</u>	IGF-1 phosphorylates AMPK-alpha subunit in ATM-dependent and LKB1-independent manner.	Biochem Biophys Res Commun	324	986-992	2004
Takamochi K., <u>Esumi H., et al.</u>	Molecular analysis of the TSC1 gene in adenocarcinoma of the lung.	Lung Cancer	46	271-281	2004
Minchenko O., <u>Esumi H., et al.</u>	Hypoxia induces transcription of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase-4 gene via hypoxia-inducible factor-1alpha activation.	FEBS Lett.	576(1-2)	14-20	2004
Lu J., <u>Esumi H., et al.</u>	Chemopreventive effect of peroxisome proliferator-activated receptor gamma on gastric carcinogenesis in mice. Cancer Res.	Cancer Res.	in press		
Lu J., <u>Kunimoto S., et al.</u>	Kigamicin D, a novel anticancer agent based on a new anti-austerity strategy targeting cancer cells' tolerance to nutrient starvation	Cancer Sci.	95	547-52	2004
Someno T., <u>Kunimoto S., et al.</u>	Absolute configuration of Kigamicins A, C, and D.	J. Antibiotics	58	56-60	2005
Yamashita T., <u>Kita K., et al.</u>	Rhodoquinone reaction site of mitochondrial complex I, in parasitic helminth, <i>Ascaris suum</i> .	Biochim Biophys. Acta (Bioenergetics)	1608	97-103	2004

Suzuki T., <u>Kita K.</u> , et al.	Direct evidence for cyanide insensitive quinol oxidase (alternative oxidase) in apicomplexan parasite <i>Cryptosporidium parvum</i> : Phylogenetic and Therapeutic Implication.	Biochem. Biophys. Res. Commun.	313	1044-1052	2004
Suzuki T., <u>Kita K.</u> , et al.	Molecular cloning and characterization of <i>Trypanosoma vivax</i> alternative oxidase (AOX) gene, a target of the trypanocidal scoulerine.	Parasitol. Int.	53	235-245	2004
Yano K., <u>Kita K.</u> , et al.	Expression of mRNAs and proteins for peroxiredoxins of the human malaria parasite <i>Plasmodium falciparum</i> in the blood stage.	Parasitol. Int.	in press		
Mi-ichi, F., <u>Kita K.</u> , et al.	Parasite mitochondria as a target of chemotherapy: The inhibitory effect of licochalcone A on the <i>Plasmodium falciparum</i> respiratory chain.	Ann. New York Acad. Sci.	in press		
Niemi A., <u>Tanaka M.</u> , et al.	A combination of three common inherited mitochondrial DNA polymorphisms promotes longevity in Finnish and Japanese subjects.	Eur J Hum Genet	13	166-170	2005
Takagi K., <u>Tanaka M.</u> , et al.	Association of a 5178C>A (Leu237Met) polymorphism in the mitochondrial DNA with a low prevalence of myocardial infarction in Japanese individuals.	Atherosclerosis	175	281-286	2004
<u>Tanaka M.</u> , et al.	Mitochondrial genome variation in eastern Asia and the peopling of Japan.	Genome Res	14	1832-1850	2004

Umetsu K., <u>Tanaka M.</u> , et al.	Multiplex amplified product-length polymorphism analysis of 36 mitochondrial single-nucleotide polymorphisms for haplogrouping of East Asian populations	Electrophoresis	26	91-98	2004
Matsui T., <u>Tanaka N.</u> , et al.	Crystallization and X-ray analysis of the N-terminal core domain of a tumour-associated human DEAD-box RNA helicase, rck/p54	Acta Crystallogr D Biol Crystallogr	60	156-159	2004
Munakata K., <u>Tanaka M.</u> , et al.	Mitochondrial DNA 3644 T->C mutation associated with bipolar disorder	Genomics	84	1041-1050	2004
Niemi A., <u>Tanaka M.</u> , et al.	A combination of three common inherited mitochondrial DNA polymorphisms promotes longevity in Finnish and Japanese subjects.	Eur J Hum Genet	13	166-170	2005
Guo L.-J., <u>Tanaka M.</u>	Mitochondrial genome polymorphisms associated with type-2 diabetes or obesity	Mitochondrion	in press		
Komatsu M., <u>Ueno T.</u> , et al.	A novel protein conjugating system for Ufm1, a ubiquitin-fold modifier	EMBO J.	23	19771-19786	2004
Tanida I., <u>Ueno T.</u> , et al.	HsAtg4B/HsApg4B/autophagin-1 cleaves the carboxyl termini of three human Atg8 homologues and delipidates microtubule-associated protein light chain 3- and GABAA receptor-associated protein-phospholipid conjugates.	J. Biol. Chem.	279	36268-36276	2004
Kouno, T., <u>Ueno T.</u> , et al.	¹ H, ¹³ C, and ¹⁵ N resonance assignments of human microtubule-associated protein light chain-3.	J. Biomol. NMR	29	415-416	2004
Tanida I., <u>Ueno T.</u> , et al.	LC3 conjugation system in mammalian autophagy.	Int. J. Biochem. Cell Biol.	36	2503-2518	2004
Jager S., <u>Ueno T.</u> , et al.	Role for Rab7 in maturation of late autophagic vacuoles.	J. Cell Sci.	117	4837-4848	2004

Tanida I, <u>Ueno T.</u> , et al.	Human light chain 3/MA P1LC3B is cleaved at its carboxyl-terminal Met121 to expose Gly120 for lipidation and targeting to autophagosomal membranes.	J. Biol. Chem.	279	47704-47710	2004
Ogawa M., <u>Monde n M.</u> , et al.	Hepatic expression of ANG2 RNA in metastatic colorectal cancer.	Hepatology	39(2)	529-539	2004
<u>Y.Matsumura</u> , et al.	Phase I and Pharmacokinetic Study of MCC-465, a doxorubicin (DXR) encapsulated in PEG-immunoliposome, in patients with metastatic stomach cancer.	Annals Oncol	15	517-525	2004
W.Koizumi, <u>Y.Matsumura</u> , et al.	Phase I/II study of S-1 combined with cisplatin in patients with advanced gastric cancer.	British Journal of Cancer	89	2207-2212,	2004
T.Hamaguchi, <u>Y. Matsumura</u> , et al.	Antitumor effect of MCC-465, pegylated liposomal doxorubicin tagged with newly developed monoclonal antibody GAH, in colorectal cancer xenografts.	Cancer Science	95	608-613	2004
T. Okusaka, <u>Y. Matsumura</u> , et al.	New approaches for pancreatic cancer in Japan.	Cancer Chemotherapy Pharmacol	54	78-82	2004
<u>Y.Matsumura</u> , et al.	Phase I clinical trial and pharmacokinetic evaluation of NK911, a micelle-encapsulated doxorubicin.	British Journal of Cancer	91	1775-1781	2004
Younsoo Bae, <u>Y. Matsumura</u> , et al.	Preparation and biological characterization of polymeric micelle drug carriers with intracellular pH-Triggered Drug Release property: tumor permeability, controlled subcellular drug distribution, and enhanced in vivo antitumor efficacy.	Bioconjugate Chem	16	122-130	2005
T Hamaguchi, <u>Y. Matsumura</u> , et al.	NK105, a paclitaxel-incorporating micellar nanoparticle formulation, can extend in vivo antitumor activity and reduce the neurotoxicity of paclitaxel.	British Journal of Cancer	in press		2005